

# ANGEWANDTE CHEMIE

104. Jahrgang 1992

Heft 7

Seite 817–952

## Kernresonanz-Fourier-Transformations-Spektroskopie (Nobel-Vortrag)\*\*

Von Richard R. Ernst\*

### Einleitung

Die Welt der Kernspins ist ein wahres Paradies für theoretisch und experimentell arbeitende Physiker. Sie liefert zum Beispiel sehr einfache Testsysteme zur Veranschaulichung der grundlegenden Begriffe der Quantenmechanik und Quantenstatistik und hat zahlreiche Lehrbuchbeispiele hervorgebracht. Kernspinsysteme sind zudem leicht zu handhaben, so daß sie ideal zur Erprobung neuer experimenteller Konzepte eingesetzt werden können. Tatsächlich wurden die für kohärente Spektroskopien allgemein anwendbaren Verfahren vor allem in der Kernspinresonanz(NMR)-Spektroskopie entwickelt, um dann in einer Reihe anderer Gebiete eine breite Anwendung zu finden.

Einige Schlüsselexperimente zur Kernspinresonanz sind bereits mit dem Physik-Nobel-Preis ausgezeichnet worden: zunächst 1944 die berühmten Molekularstrahlexperimente von Isidor I. Rabi<sup>[1–3]</sup>, anschließend 1952 die klassischen NMR-Experimente von Edward M. Purcell<sup>[4]</sup> und Felix Bloch<sup>[5, 6]</sup> und schließlich 1966 die optische Detektion magnetischer Resonanz durch Alfred Kastler<sup>[7]</sup>. Einige weitere Physik-Nobel-Preisträger waren auf die eine oder andere Art eng mit der Kernspinresonanz verbunden: John H. Van Vleck entwickelte die Theorie des Dia- und Paramagnetismus und führte die Momentenmethode in die NMR-Theorie ein; Nicolaas Bloembergen übte einen großen Einfluß auf die Anfänge der Relaxationstheorie und der Relaxationszeitmessungen aus; Karl Alex Müller trug maßgeblich zur paramagnetischen Elektronenspinresonanz bei; von Norman F.

Ramsey stammt die grundlegende Theorie der chemischen Verschiebung und der *J*-Kopplungen; Hans G. Dehmelt schließlich entwickelte die reine Kernquadrupolresonanz.

Aber nicht nur auf Physiker übt die Kernspinresonanz eine starke Faszination aus. Vielmehr entdecken auch immer mehr Chemiker, Biologen und Mediziner die NMR-Spektroskopie, allerdings nicht so sehr wegen ihrer konzeptionellen Schönheit, sondern vielmehr wegen ihres außergewöhnlichen praktischen Nutzens. Dies führte zur Entwicklung einer großen Zahl von Methoden, um die Leistungsfähigkeit der NMR-Technik im Hinblick auf eine Vielzahl von Anwendungen zu verbessern<sup>[8–15]</sup>.

Dieser Nobel-Vortrag soll einen kleinen Einblick geben in das, was hinter den Kulissen einer NMR-Methodenschmiede geschieht.

Kernspinsysteme weisen einzigartige Eigenschaften auf, die sie zum idealen Instrument für die Untersuchung von Molekülen machen:

1) Die als Sensoren dienenden Atomkerne sind mit einem Durchmesser von wenigen Femtometern außergewöhnlich gut lokalisiert und können über Gegebenheiten in ihrer unmittelbaren Umgebung berichten. Auf diese Weise ist es möglich, Moleküle und Materialien sehr genau zu untersuchen.

2) Die Energie der Wechselwirkung zwischen diesen Sensoren und ihrer Umgebung ist extrem klein; mit weniger als  $0.2 \text{ J mol}^{-1}$  ist sie kleiner als die thermische Energie bei  $30 \text{ mK}$ ; die Beobachtung der Moleküleigenschaften ist damit nahezu störungsfrei. Dennoch reagiert die Wechselwirkung höchst empfindlich auf das lokale Umfeld.

3) Es ist möglich, aus den Wechselwirkungen zwischen Kernpaaren Informationen über die Molekülstruktur zu erhalten: Magnetische Dipol-Dipol-Wechselwirkungen liefern Abstandsinformationen, während aus skalaren *J*-Kopplungen Diederwinkel bestimmt werden können.

[\*] Prof. Dr. R. R. Ernst

Laboratorium für Physikalische Chemie der Eidgenössischen Technischen Hochschule  
ETH-Zentrum, CH-8092 Zürich (Schweiz)

[\*\*] Copyright © The Nobel Foundation 1992. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.

Auf den ersten Blick mag es erstaunlich scheinen, daß sich Kernabstände mit Radiofrequenzen, d. h. Wellenlängen  $\lambda \approx 1$  m, exakt bestimmen lassen, da dies die quantenmechanische Unschärferelation  $\sigma_q \sigma_p \geq \hbar/2$  mit dem linearen Impuls  $p = 2\pi\hbar/\lambda$ , wie sie für Streuexperimente oder ein Mikroskop gilt, zu verletzen scheint. Wichtig ist, daß in der Kernspinresonanz die Strukturinformation im Spin-Hamilton-Operator  $\mathcal{H} = \mathcal{H}(q_1, \dots, q_k)$  codiert ist, wobei  $q_k$  für die Kernkoordinaten steht. Damit läuft eine exakte Strukturbestimmung auf eine exakte Energiedifferenz hinaus, die so genau wie gewünscht durchgeführt werden kann, sofern die Beobachtungsdauer  $t$  so gewählt wird, daß  $\sigma_E t \geq \hbar/2$  gilt. Eine obere Grenze für  $t$  ist in der Praxis durch die wegen Relaxationsprozessen endliche Lebensdauer der Energieeigenzustände gegeben. Die Genauigkeit von NMR-Messungen ist also nicht durch die Wellenlänge, sondern vielmehr durch die aufgrund von Relaxation begrenzte Lebensdauer von Zuständen beschränkt.

Der Informationsgehalt eines Kernspin-Hamilton-Operators und des zugeordneten Relaxations-Superoperators eines großen Moleküls, z.B. eines Proteins, ist außerordentlich groß: Man kann die Frequenzen der chemischen Verschiebung von mehreren hundert verschiedenen Spins in einem Molekül mit einer Genauigkeit bis zu 16–18 bits bestimmen; Kernabstände für mehrere tausend Protonenpaare können bis auf etwa 0.1 Å genau ermittelt werden; mehrere hundert Diederwinkel in einem Molekül können mit einem Fehler von weniger als  $10^\circ$  bestimmt werden.

Die Schwäche der Kernspinwechselwirkungen, die bislang als Vorteil dargestellt wurde, führt allerdings zu gravierenden Schwierigkeiten bei der Detektion. Eine große Zahl von Spins ist notwendig, um die schwachen Signale vom Rauschen unterscheiden zu können. Unter optimalen Bedingungen mit modernen Hochfeld-NMR-Spektrometern benötigt man  $10^{14}$ – $10^{15}$  Spins einer Art, um nach einer einstündigen Messung ein Signal zu detektieren. Das schlechte Signal-Rausch-Verhältnis ist der am stärksten limitierende Faktor in der Anwendung von Kernresonanzmethoden. Jegliche Verbesserung dieses Verhältnisses durch technische Mittel wird den NMR-Anwendungsbereich bedeutend erweitern.

Damit sind die beiden Ziele klar definiert, die in den vergangenen dreißig Jahren erreicht werden mußten, um die NMR-Spektroskopie zu einem einsatzfähigen Instrument für die Bestimmung von Molekülstrukturen zu machen: 1) Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses; 2) Entwicklung von Verfahren zur Handhabung der ungeheuren Menge an inhärenter molekularer Information.

## Eindimensionale Fourier-Transformations-Spektroskopie

Eine entscheidende Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses von NMR-Spektren brachte 1964 die Entwicklung der Fourier-Transformations(FT)-Spektroskopie. Das Grundprinzip – parallele Datenakquisition zur Nutzung des Multiplexvorteils – wurde bereits 1891 von Michelson in der optischen Spektroskopie angewendet<sup>[16]</sup> und 1951 von Fellgett explizit formuliert<sup>[17]</sup>. Der in der Optik verwendete Ansatz, die räumliche Interferometrie, ist jedoch für die NMR-Spektroskopie nicht geeignet, da hier ein Interferometer mit der notwendigen Auflösung eine Strahlenganglänge von mindestens  $3 \times 10^8$  m erfordern würde.

Weston A. Anderson bei Varian in Palo Alto experimentierte Anfang der sechziger Jahre mit einem mechanischen Multifrequenzgenerator, dem „wheel of fortune“, der ein Spinsystem gleichzeitig mit  $N$  Frequenzen anregen sollte, um die Meßzeit eines Experiments durch parallele Aufzeichnung der Antwort von  $N$  spektralen Elementen um einen Faktor  $N$  zu verkürzen<sup>[18]</sup>. Man stellte jedoch schnell fest, daß für einen kommerziellen Erfolg elegantere Lösungen nötig waren.

Es sind zahlreiche Möglichkeiten denkbar, eine breitbandige Frequenzquelle zu verwirklichen, mit der alle Spins eines Spinsystems gleichzeitig angeregt werden können. Folgende vier gehören dazu: 1) Radiofrequenzpulse, 2) stochastisches Zufallsrauschen, 3) rasches Durchfahren des Frequenzbereichs (rapid scan), 4) Computer-synthetisierte Mehrfrequenzwellenformen. Für jede Methode wird eine entsprechende Art der Datenverarbeitung benötigt, um das gewünschte NMR-Spektrum zu erhalten.

Der Vorschlag, Radiofrequenz(rf)-Pulse zur Anregung zu verwenden, stammt von Weston A. Anderson und veranlaßte den Autor zu einer detaillierten experimentellen Untersuchung in den Jahren 1964 und 1965<sup>[19–21]</sup>. Das Experiment wird in Abbildung 1 erklärt. Auf die in einem statischen Magnetfeld entlang der  $z$ -Achse polarisierte Probe wird ein rf-Puls entlang der  $y$ -Achse angewendet, der die Magnetisierungsvektoren  $M_k$  aller Spins  $I_k$  um  $\pi/2$  dreht, so daß sie dann senkrecht zum statischen Feld ausgerichtet sind. In der üblichen Pfeilschreibweise<sup>[23]</sup> mit Angabe des Operators, in diesem Fall eine  $(\pi/2)_y$ -Rotation, über dem Pfeil ergibt sich Gleichung (1).

$$M_{k_z} \xrightarrow{-(\pi/2)_y} M_{k_x} \quad (1)$$



*Richard R. Ernst, 1933 in Winterthur in der Schweiz geboren, studierte von 1952 bis zum Diplom 1956 Chemie an der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich (ETH-Z). Von 1957–1962 fertigte er unter den Professoren Hans Primas und Hans H. Günthard seine Doktorarbeit auf dem Gebiet der NMR-Spektroskopie an. 1963 ging er für fünf Jahre zu Varian nach Palo Alto, Kalifornien, von wo er als Privatdozent für Physikalische Chemie an die ETH-Z zurückkehrte. 1970 wurde er Assistentenprofessor, 1972 Außerordentlicher Professor und 1976 Ordentlicher Professor. Zu seinen vielen Ehrungen gehören die Goldmedaille der Society of Magnetic Resonance in Medicine (1983), der Ampère-Preis (1990), der Wolf-Preis für Chemie (Jerusalem, 1991) und der Nobel-Preis für Chemie 1991. Er ist Mitglied zahlreicher Akademien, darunter der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina, und Mitglied der Editorial Boards vieler wissenschaftlicher Zeitschriften. Sein Forschungsgebiet ist die Entwicklung und Anwendung NMR- und ESR-spektroskopischer Methoden.*

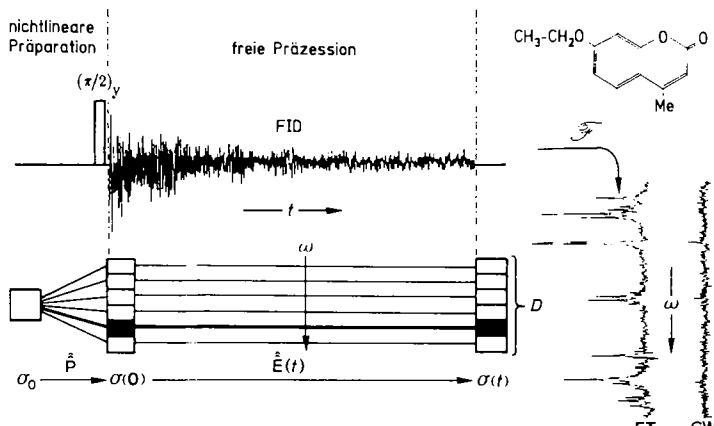


Abb. 1. Schematische Darstellung der Puls-FT-Spektroskopie am Beispiel eines 60 MHz-<sup>1</sup>H-NMR-Spektrums von 7-Ethoxy-4-methylcumarin [22]. Ein erster  $(\pi/2)$ -rf-Puls, beschrieben durch den Rotations-Superoperator  $\hat{P}$ , erzeugt transversale Magnetisierung  $\sigma(0)$  aus dem Gleichgewichtszustand  $\sigma_0$ . Synchron freie Präzession aller Kohärenzen unter dem Einfluß des Evolutions-Superoperators  $\hat{E}(t)$  führt zum Endzustand  $\sigma(t)$ . Detektion mit dem Detektionsoperator  $D$  erzeugt den gezeigten FID (die Summe aus 500 Experimenten), der nach Fourier-Transformation  $\mathcal{F}$  das Spektrum FT ergibt. Zum Vergleich ist das durch kontinuierliches Durchfahren des Resonanzbereichs (CW) erzeugte Spektrum abgebildet, wie es nach ebenfalls 500 s unter sonst identischen Bedingungen erhalten wurde.

Der darauf folgende freie Induktionsabfall (FID) besteht aus einer Überlagerung aller Eigenmoden des Systems. Der Operator einer Observablen  $D$  wird verwendet, um das Signal zu detektieren, das anschließend Fourier-transformiert wird, um die Beiträge der einzelnen spektralen Elemente zu trennen. Abbildung 1 zeigt ein frühes Beispiel der FT-NMR-Spektroskopie an 7-Ethoxy-4-methylcumarin als Probe; dabei wurden 500 FIDs aufaddiert und Fourier-transformiert, um das FT-Spektrum zu erhalten<sup>[22]</sup>. Zum Vergleich ist das durch langsames Durchfahren des Resonanzbereichs mit einer schwachen Radiofrequenzeinstrahlung (CW) in der gleichen Zeit erhalten Spektrum gezeigt.

Für den mathematisch interessierten Leser sei angemerkt, daß das Experiment auch durch die Entwicklung des Dichteoperators  $\sigma(t)$  unter Einwirkung des Präparations-Superoperators  $\hat{P} = \exp(-i\hat{F}_y\pi/2)$  und des Evolutions-Superoperators  $\hat{E}(t) = \exp(-i\mathcal{H}t - \hat{\Gamma}t)$  mit dem Hamilton-Kommator  $\hat{\mathcal{H}}A = [\mathcal{H}, A]$  und dem Relaxations-Superoperator  $\hat{\Gamma}$  beschrieben werden kann. Der Erwartungswert  $\langle D \rangle(t)$  des Operators der Observablen  $D$  ist dann gegeben durch Gleichung (2), in der  $\sigma_0$  der Dichteoperator des Spinsystems im thermischen Gleichgewicht ist.

$$\langle D \rangle(t) = \text{Tr}\{\hat{D}\hat{E}(t)\hat{P}\sigma_0\} \quad (2)$$

Die Verringerung der Meßzeit für ein Spektrum wird bestimmt durch die Zahl der spektralen Elemente  $N$ , d. h. die Zahl der signifikanten Punkte im Spektrum, die grob gegeben ist als  $N = F/\Delta f$ , wobei  $F$  der gesamte Resonanzbereich und  $\Delta f$  eine typische Signalbreite sind. Bei konstanter Meßzeit kann daher eine Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses um  $\sqrt{N}$  erreicht werden, indem eine geeignete Zahl von FID-Signalen aus sukzessiven Pulsexperimenten aufaddiert wird. Die Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses kann durch Vergleich der Spektren in Abbildung 1 beurteilt werden.

Es ist seit langem bekannt, daß die Frequenzantwortfunktion (Spektrum) eines linearen Systems die Fourier-Transformierte der Impulsantwort (FID) ist. Dies zeigte sich schon implizit in den Arbeiten von Jean Baptiste Joseph Fourier, der 1822 die Wärmeleitfähigkeit in Festkörpern untersuchte.<sup>[24]</sup> Lowe und Norberg bewiesen 1957, daß diese Beziehung auch für Spinsysteme gilt, obwohl deren Antwortverhalten stark nichtlineare Merkmale aufweist<sup>[25]</sup>.

Die Untersuchung unbekannter Systeme durch eine stochastische Störung mit weißem Zufallsrauschen wurde in den vierziger Jahren von Norbert Wiener<sup>[26]</sup> vorgeschlagen. Die spektrale Information über das untersuchte System liegt sozusagen in der Farbe des „Output“-Rauschens. Die ersten Anwendungen der Anregung durch Zufallsrauschen in der NMR-Spektroskopie wurden unabhängig voneinander von Russel H. Varian<sup>[27]</sup> für die Breitbandanregung und von Hans Primas<sup>[28, 29]</sup> für die Breitbandentkopplung vorgeschlagen. Die ersten erfolgreichen Experimente mit der Anregung durch Zufallsrauschen führten zur heteronuclearen Rauschentkopplung<sup>[30, 31]</sup>, einer Methode, die sich als wesentlich für den praktischen Erfolg der <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie in chemischen Anwendungen erwiesen hat.

1970 zeigten Reinhold Kaiser<sup>[32]</sup> und der Autor<sup>[33]</sup> unabhängig voneinander, daß stochastische Resonanz ein Mittel ist, um das Signal-Rausch-Verhältnis bei NMR-Experimenten durch Breitbandanregung zu verbessern. In diesem Fall ist die berechnete Kreuzkorrelationsfunktion (3) des

$$c_1(\tau) = \overline{n_i(t) n_j(t - \tau)} \quad (3)$$

„Input“-Rauschens  $n_i(t)$  und des Output-Rauschens  $n_o(t)$  gleich dem FID der Puls-FT-Spektroskopie. Dies wird in Abbildung 2 für die Fluorsignale von 2,4-Difluortoluol gezeigt. Zur Anregung diente eine binäre Pseudo-Zufallssequenz mit maximalem weißem Spektrum. Ihre Vorteile sind die vorhersagbaren spektralen Merkmale und die konstante rf-Feldstärke. Die niedrige Peakfeldstärke stellt

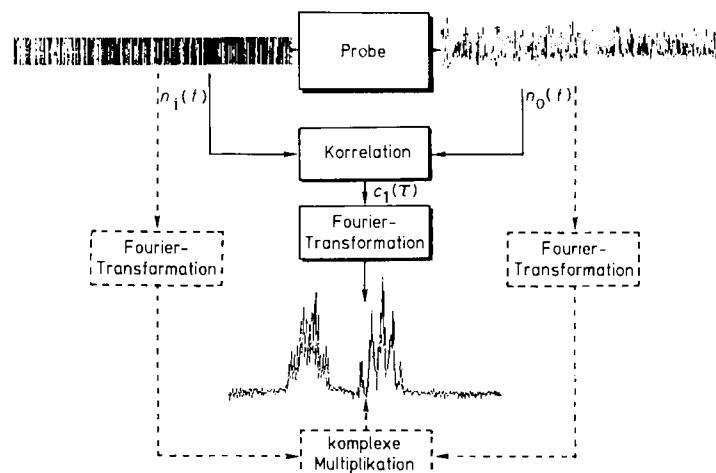


Abb. 2. Schematische Darstellung der stochastischen Resonanz am Beispiel eines 56.4 MHz-<sup>19</sup>F-NMR-Spektrums von 2,4-Difluortoluol [33]. Anregung durch eine binäre pseudostochastische Sequenz  $n_i(t)$  mit einer Länge von 1023 Punkten ruft die Antwort  $n_o(t)$  hervor. Kreuzkorrelation der beiden Signale erzeugt  $c_1(\tau)$ , das nach Fourier-Transformation das gezeigte Spektrum ergibt. In einem alternativen und in diesem Fall auch angewandten Verfahren werden die Fourier-Transformierten von  $n_i(t)$  und  $n_o(t)$  getrennt berechnet und die komplexe konjugierte Frequenzfunktion  $\mathcal{F}\{n_i(t)\}^*$  mit  $\mathcal{F}\{n_o(t)\}$  multipliziert, um das gleiche Spektrum zu erhalten.

geringere Anforderungen an die elektronische Ausrüstung. Nachteile resultieren aus der gleichzeitigen Anregung und Detektion, da dies Linienvverbreiterungen mit sich bringen kann, die in der Puls-FT-Spektroskopie nicht auftreten, weil dort Störung und Detektion zeitlich getrennt sind. Ein weiterer Nachteil bei der Verwendung realen Zufallsrauschens ist der probabilistische Charakter der Antwort, der dazu führt, daß eine extensive Mitteilung notwendig ist, um einen Mittelwert mit geringer Varianz zu erhalten. Korrelationsfunktionen höherer Ordnung wie (4) ermöglichen auch die Cha-

$$c_3(\tau_1, \tau_2, \tau_3) = \overline{n_o(t) n_i(t - \tau_1) n_i(t - \tau_2) n_i(t - \tau_3)} \quad (4)$$

rakterisierung nicht-linearer Transfereigenschaften des untersuchten Systems<sup>[26]</sup>. Diese Tatsache wurde von Blümich und Ziessow ausgiebig für NMR-Messungen genutzt<sup>[33–35]</sup>.

Ein dritter Ansatz, die Rapid-scan-Spektroskopie, die zunächst von Dadok und Sprecher<sup>[36]</sup> vorgeschlagen wurde, erzielt eine nahezu gleichzeitige Anregung aller Spins durch ein schnelles Durchfahren des Resonanzbereichs<sup>[37, 38]</sup>. Das resultierende Spektrum ist stark verzerrt, kann jedoch mathematisch korrigiert werden, da die Verzerrung voraussagbarer Art ist. Die Korrektur besteht in der Faltung (Konvolution) mit einem Ein-Spin-Signal, das unter identischen Bedingungen gemessen oder am Computer simuliert wurde. Ein Beispiel zeigt Abbildung 3. Es ist interessant festzustellen, daß ein Rapid-scan-Spektrum mit Ausnahme der sukzessiv steigenden Oszillationsfrequenzen einem FID sehr ähnlich ist.

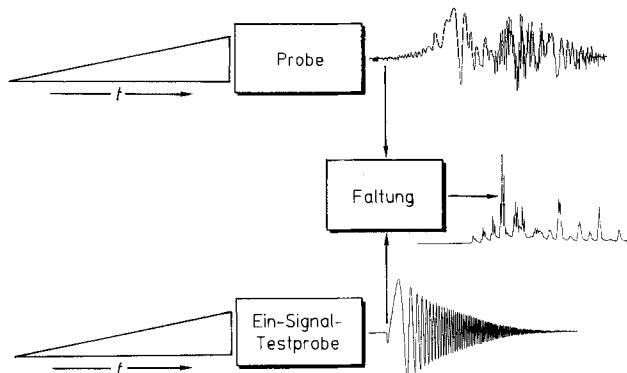


Abb. 3. Schematische Darstellung der Rapid-scan-Spektroskopie. Das stark verzerrte Spektrum, das man durch rasches Durchfahren der Frequenzen während der Zeit  $t$  erhält, kann durch Faltung mit dem auf die gleiche Art erhaltenen Spektrum einer Testsubstanz mit nur einer Resonanzlinie korrigiert werden.

Schließlich kann durch Computer-Synthese eine Anregungsfunktion mit nahezu beliebigem Anregungsprofil erstellt werden. Dies wurde zunächst von Tomlinson und Hill<sup>[39]</sup> für Entkopplungszwecke genutzt, ist aber auch die Grundlage für die Anregung mit zusammengesetzten Pulsen, die sich als sehr leistungsfähig herausgestellt hat<sup>[40, 41]</sup>.

Unter den Breitbandanregungstechniken ist die Pulsanregung die einzige, für die eine konsequente analytische Behandlung unabhängig von der Komplexität des Spinsystems möglich ist. Sie führt weder zu methodenbedingten Signalverbreiterungen wie die stochastische Resonanz, noch zu nicht korrigierbaren Signalverzerrungen wie die Rapid-scan-Spektroskopie von gekoppelten Spinsystemen<sup>[38]</sup>. Die

Puls-FT-Spektroskopie ist in konzeptioneller wie experimenteller Hinsicht einfach und kann zudem leicht erweitert und nahezu allen denkbaren experimentellen Situationen angepaßt werden. Relaxationsstudien erfordern z.B. lediglich eine modifizierte, relaxationsempfindliche Präparationssequenz, etwa ein  $\pi-\pi/2$ -Pulspaar für  $T_1$ -Messungen<sup>[42]</sup> oder ein  $\pi/2-\pi$ -Pulspaar für  $T_2$ -Messungen<sup>[43]</sup>. Auch die Ausweitung auf Untersuchungen des chemischen Austauschs mit Hilfe des Sättigungstransferexperiments von Forsén und Hoffman<sup>[44]</sup> ist problemlos möglich.

An dieser Stelle sollte erwähnt werden, daß Puls-NMR-Experimente bereits von Felix Bloch in seiner berühmten Arbeit aus dem Jahr 1946<sup>[61]</sup> vorgeschlagen wurden; die ersten Experimente zur magnetischen Resonanz in der Zeitdomäne wurden 1949 von H. C. Torrey<sup>[45]</sup> und insbesondere Erwin L. Hahn<sup>[46–48]</sup> durchgeführt, der als der wahre Vater der Pulsspektroskopie gelten kann. Er erfand das Spin-echoexperiment<sup>[46]</sup> und entwickelte außergewöhnlich bedeutende und konzeptionell schöne Festkörperexperimente<sup>[49, 50]</sup>.

Die Puls-FT-Spektroskopie hat nicht nur die hochauflösende NMR-Spektroskopie in flüssiger Phase revolutioniert, sondern auch die NMR-Methodologie auf allen Gebieten vereinheitlicht, von der Festkörperuntersuchung über Relaxationszeitmessungen bis hin zur hochauflösenden NMR-Spektroskopie mit zahlreichen Auswirkungen auf andere Gebiete wie die Ionencyclotronresonanzspektroskopie<sup>[51]</sup>, die Mikrowellenspektroskopie<sup>[52]</sup> und die paramagnetische Elektronenspin-Resonanzspektroskopie<sup>[53]</sup>. Darüber hinaus bildete sie auch den Keim für die Entwicklung der hier im Mittelpunkt stehenden mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie.

## Zweidimensionale Fourier-Transformations-Spektroskopie

Solange rein spektroskopische Messungen wie Bestimmungen der Eigenfrequenzen oder Normalschwingungen eines Systems durchgeführt werden, ist die eindimensionale (1D) Spektroskopie völlig ausreichend. Bei der NMR-Spektroskopie gilt dies für die Messung der chemischen Verschiebung, die die lokale chemische Umgebung der Kerne charakterisiert. Auf diese Art können jedoch keine Informationen über die räumlichen Beziehungen zwischen den beobachteten Kernen erhalten werden.

Es gibt zwei wichtige Paarwechselwirkungen in Kernspinsystemen: die skalare, durch die Bindung wirkende und von Elektronen vermittelte Spin-Spin-Wechselwirkung ( $J$ -Kopplung) und die durch den Raum wirkende magnetische Dipol-Dipol-Wechselwirkung (Abb. 4). Die  $J$ -Kopplung wird durch den skalaren Term  $\mathcal{H}_{kl} = 2\pi J_{kl} I_k I_l$  im Spin-Hamilton-Operator beschrieben. Sie bewirkt die Multiplettaufspaltung in hochaufgelösten Spektren von Flüssigkeiten. Unter günstigen Bedingungen kann sie zu einem oszillierenden Transfer der Spinordnung zwischen den beiden Spins  $I_k$  und  $I_l$  führen. Die magnetische Dipol-Dipol-Wechselwirkung  $D_{mn}$  wird durch einen spurlosen Tensor des zweiten Ranges beschrieben. Ihr Mittelwert ist in isotroper Lösung gleich Null; sie kann nur in anisotropen Medien zu einer Signalauflösung führen. Ihre zeitliche Modulation löst jedoch auch in isotroper Lösung Relaxationsprozesse aus, die nach

einer Störung eine multiexponentielle Rückkehr der Spins in das thermische Gleichgewicht zur Folge haben. Die Kenntnis dieser Wechselwirkungen ermöglicht es, Informationen über die Molekülstruktur in Lösung<sup>[54, 55]</sup> und die Anordnung von Atomen in Festkörpern abzuleiten. Im optimalen Fall kann die vollständige dreidimensionale Struktur eines Moleküls bestimmt werden<sup>[56]</sup>.

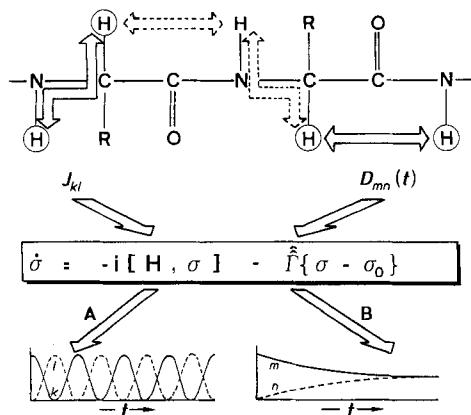


Abb. 4. Die beiden in der NMR-Spektroskopie wichtigen Paarwechselwirkungen. Die durch die Bindung vermittelte skalare  $J_{kl}$ -Kopplung ist Teil des Hamilton-Operators und führt zu einem kohärenten Transfer (A) von Spinordnung zwischen den Spins  $I_k$  und  $I_l$ . Die zeitmodulierte, durch den Raum wirkende Dipol-Dipol-Wechselwirkung  $D_{mn}(t)$  bewirkt multiexponentielle Kreuzrelaxation (B) zwischen den Spins  $I_m$  und  $I_n$ . Die beiden Wechselwirkungen ermöglichen die sequentielle Zuordnung der Resonanzsignale benachbarter Spins im gezeigten Peptidfragment und die Bestimmung von Strukturparametern: Die über drei Bindungen wirkende  $J$ -Kopplung ist ein Maß für die Diederwinkel um die zentrale Bindung, die Dipol-Dipol-Wechselwirkung ein Maß für die Kern-Kern-Abstände.

Obwohl diese Wechselwirkungen 1D-Spektren beeinflussen, sind spezielle Techniken zu ihrer Messung nötig. In der Näherung eines linearen Antwortverhaltens ist es zunächst grundsätzlich unmöglich, zwei unabhängige Signale von einem durch Spin-Spin-Wechselwirkungen erzeugten Dublett zu unterscheiden. Seit den fünfziger Jahren sind Experimente zur Untersuchung der nichtlinearen Antworteigenschaften von Kernspinsystemen bekannt. Sättigungsexperimente unter Verwendung starker rf-Felder ermöglichen das Auftreten von Mehrquantenübergängen, die wegen der gleichzeitigen Anregung mehrerer Spins ein und desselben gekoppelten Spinsystems Konnektivitätsinformationen enthalten<sup>[57]</sup>. Besonders erfolgreich waren Doppel- und Tripelresonanzexperimente, bei denen durch die gleichzeitige Anwendung von zwei bzw. drei rf-Feldern Entkopplungs- und „Spin-ticking“-Effekte erzielt werden<sup>[58–60]</sup>.

Die frühen Mehrresonanzexperimente sind in der Zwischenzeit durch mehrdimensionale Experimente ersetzt worden. Paarwechselwirkungen von Spins werden am zweckmäßigsten in Form eines Korrelationsdiagramms dargestellt (Abb. 5). Dies legt die Aufnahme eines „zweidimensionalen Spektrums“ nahe, das eine solche Korrelationskarte der entsprechenden spektralen Merkmale direkt liefert. Der einfachste Ansatz ist vielleicht ein systematisches Doppelresonanzexperiment, wobei das Spektrum  $S(\omega_1, \omega_2)$  in Abhängigkeit von den Frequenzen  $\omega_1$  und  $\omega_2$  der beiden angelegten rf-Felder dargestellt werden kann<sup>[8, 58]</sup>.

Eine neue Idee zur Messung von 2D-Spektren wurde 1971 von Jean Jeener geäußert<sup>[61]</sup>. Er schlug ein 2D-FT-Experi-

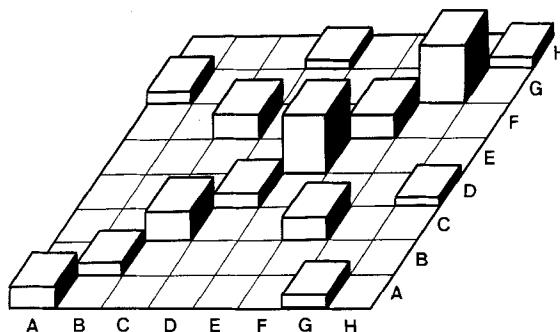


Abb. 5. Schematisches Korrelationsdiagramm zur Darstellung von Paarwechselwirkungen zwischen Kernspins.

ment vor, das aus zwei  $\pi/2$ -Pulsen mit variabler Zeit  $t_1$  zwischen den Pulsen und der Zeitvariablen  $t_2$  nach dem zweiten Puls besteht, wie es in Abbildung 6 in Erweiterung der Prinzipien von Abbildung 1 dargestellt ist (siehe auch Abb. 10a). Die Antwort  $s(t_1, t_2)$  auf die Zweipulssequenz, gemessen nach dem zweiten Puls und bezüglich beider Zeitvariablen Fourier-transformiert, ergibt ein zweidimensionales Spektrum  $S(\omega_1, \omega_2)$  der gewünschten Form<sup>[62, 63]</sup>.

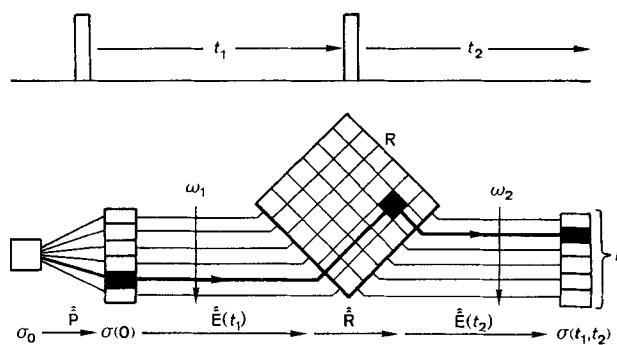


Abb. 6. Schematische Darstellung eines 2D-Experiments, hier mit einer einfachen Zweipulssequenz. Der erste Puls regt Kohärenzen an, die während  $t_1$  präzidieren und durch den zweiten Puls auf andere Übergänge übertragen werden, in denen die Kohärenzen mit neuen Präzessionsfrequenzen präzidieren. Das nach 2D-Fourier-Transformation von  $\langle D \rangle(t_1, t_2)$  erhaltenen 2D-Spektrum kann als Visualisierung der Transfermatrix  $R$  betrachtet werden.

Dieses Zweipulseperiment von Jean Jeener ist der Ursprung einer ganzen Kategorie von 2D-Experimenten<sup>[8, 63]</sup>, die auch leicht auf noch mehr Dimensionen ausgeweitet werden können. Jedes 2D-Experiment beginnt, wie den Abbildungen 6 und 7 zu entnehmen ist, mit einer Präparationspulssequenz  $\hat{P}$ , die (durch den Dichteoperator  $\sigma(O)$  repräsentierte) Kohärenzen anregt, die während der Evolutionszeit  $t_1$  unter dem Evolutions-Superoperator  $\hat{E}(t_1)$  präzidieren können. Während dieser Zeit werden die Kohärenzen sozusagen frequenzmarkiert. Die nachfolgende Mischsequenz  $\hat{R}$  führt einen kontrollierten Transfer von Kohärenzen auf andere Kernspinübergänge durch, die sich dann während der Detektionsphase in Abhängigkeit von  $t_2$  unter dem Evolutions-Superoperator  $\hat{E}(t_2)$  weiterentwickeln. Die Detektion geschieht analog zu Abbildung 1 über den Detektionsoperator  $D$ , so daß man den Ausdruck (5) erhält.

$$\langle D \rangle(t_1, t_2) = \text{tr}\{\hat{D} \hat{E}(t_2) \hat{R} \hat{E}(t_1) \hat{P} \sigma_0\} \quad (5)$$

Es genügt nicht, ein einziges Zweipulseperiment durchzuführen. Um die notwendigen Daten  $\langle D \rangle(t_1, t_2)$  zur Erstellung eines 2D-Spektrums  $S(\omega_1, \omega_2)$  zu erhalten, muß  $t_1$  in einer Reihe von Experimenten systematisch variiert und eine 2D-Datenmatrix angelegt werden, die dann bezüglich zweier Dimensionen Fourier-transformiert wird, wie schematisch in Abbildung 7 dargestellt. Das resultierende 2D-Spektrum korreliert die Präzessionsfrequenzen während der Evolutionsphase mit den Präzessionsfrequenzen während der Detektionsphase. Es ist eine anschauliche und leicht interpretierbare Darstellung des Mischprozesses. Die Diagonal- und Kreuzpeaks sind Meßgrößen für die Elemente der Transfermatrix der Mischpulssequenz in Abbildung 6.

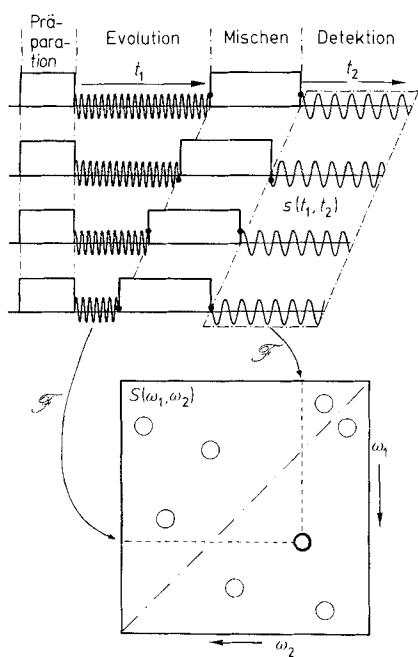


Abb. 7. Schematische Darstellung eines 2D-Experiments mit Präparations-, Evolutions-, Misch- und Detektionsphase. Die Zeit  $t_1$  der Evolutionsphase wird von Experiment zu Experiment systematisch variiert. Das resultierende Signal  $s(t_1, t_2) \sim \langle D \rangle(t_1, t_2)$  wird bezüglich zweier Dimensionen Fourier-transformiert, um das 2D-Spektrum  $S(\omega_1, \omega_2)$  zu erhalten.

Zu den zahlreichen Transferprozessen, die in dieser Art dargestellt werden können, gehören insbesondere<sup>[8]</sup>

- 1) die skalare  $J$ -Kopplung, die zur COSY abgekürzten 2D-Korrelationsspektroskopie führt,
  - 2) die Kreuzrelaxation zwischen Kernen, die in der mit NOESY abgekürzten 2D-Kern-Overhauser-Effekt-Spektroskopie gemessen wird, und
  - 3) der chemische Austausch, der zur EXSY abgekürzten 2D-Austauschspektroskopie führt.

Der COSY-Transfer, der über  $J$ -Kopplungen zustandekommt, ist ein echter quantenmechanischer Effekt, für den es keine zufriedenstellende klassische Erklärung gibt. Mit einem einzigen  $(\pi/2)_x$ -rf-Mischpuls, wie in Abbildung 6 dargestellt, ist es möglich, Antiphasenkohärenz des Spins  $k$ , im Dichteoperator durch den Operatorterm  $2I_k \cdot I_l$  beschrieben, in Antiphasenkohärenz des Spins  $l$  zu überführen, die durch  $-2I_{k_z} I_{l_y}$  beschrieben wird (6), wobei jeder Faktor des Produkt-Spinoperators um  $\pi/2$  um die  $x$ -Achse gedreht wird.

$$2I_{ky}I_{lz} \xrightarrow{(\pi/2)_x} -2I_{kz}I_{ly} \quad (6)$$

Antiphasenkohärenz des Typs  $2I_{kj}I_{lz}$  bildet sich während der Evolutionsphase nur, wenn es eine direkte Spin-Spin-Kopplung zwischen den Spins  $I_k$  und  $I_l$  gibt (7). Dies bedeutet,

$$I_{kx} \xrightarrow{2\pi J_{kl} I_{kz} I_{lz} t_1} I_{kx} \cos(\pi J_{kl} t_1) + 2I_{ky} I_{lz} \sin(\pi J_{kl} t_1) \quad (7)$$

tet, daß in einem zweidimensionalen Korrelationsspektrum Kreuzpeaks nur zwischen direkt gekoppelten Spins auftreten (solange die Näherung der schwachen Kopplung gilt). Es ist auch offensichtlich, daß es keinen Netto-Kohärenztransfer, z.B.  $I_{k_x} \rightarrow I_{l_x}$ , geben kann; das Integral über den Kreuzpeak muß notwendigerweise Null ergeben, d. h. es tritt eine gleiche Zahl von Kreuzpeak-Multiplettlinien mit positiver und mit negativer Intensität auf.

Ein COSY-Spektrum, wie es in Abbildung 8 für das cyclische Decapeptid Antamanid **1** gezeigt ist, kann dazu genutzt werden, die Spinpaare zu finden, die zum selben Kopplungsnetzwerk eines Aminosäurerestes im Molekül gehören. Alle intensiven Kreuzpeaks entstehen durch Kopplungen über

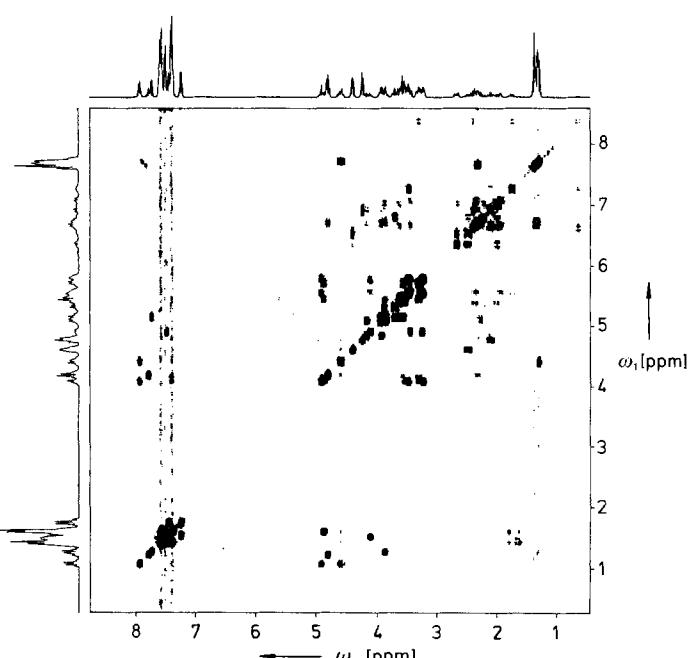
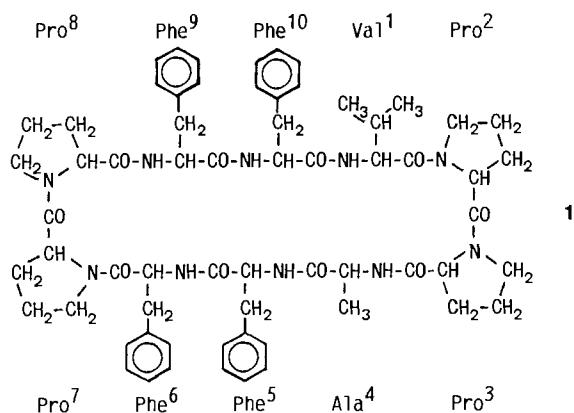


Abb. 8. Phasensensitives 400 MHz  $^1\text{H}$ -COSY-Spektrum von Antamanid **1** in Chloroform (bei 250 K) in einer Konturliniendarstellung. Positive und negative Konturlinien sind nicht unterschieden. Das Spektrum wurde von Dr. Martin Bläckle übernommen.

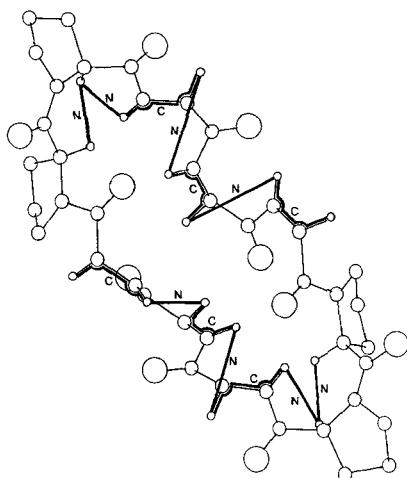


Abb. 9. Zuordnung der Rückgratprotonen in Antamanid 1 durch eine Kombination von COSY- (C) und NOESY-Kreuzpeaks (N). Die in den vier Prolinresten fehlenden NH-Protonen unterbrechen die Kette der sequentiellen C-N-Konnektivitäten.

zwei oder drei Bindungen, die vor allem die Zuordnung der Paare von NH- und  $C_2H$ -Rückgratprotonen ermöglichen. So konnten für die sechs NH enthaltenden Aminosäurereste von **1** die in Abbildung 9 mit einem C gekennzeichneten Kopplungen identifiziert werden. Es ist zudem möglich, mit einem COSY-Experiment die Seitenkettenprotonen zuzuordnen.

Die Transfers der NOESY- und EXSY-Experimente beinhalten inkohärente, dissipative Prozesse, die das System nach einer Störung exponentiell oder multiexponentiell zurück ins Gleichgewicht bringen. Sie benötigen eine genügend lange Mischzeit, damit die Zufallsprozesse ablaufen können. Beide Prozesse können mit demselben Dreipulschema (Abb. 10 b) untersucht werden<sup>[8, 64–67]</sup>. Die Mischzeit wird von zwei  $\pi/2$ -Pulsen begrenzt, die Kohärenz in statische Spinordnung und zurück in Kohärenz verwandeln. Die Aus-

tauschprozesse transferieren die Spinordnung zwischen verschiedenen Spins bzw. zwischen verschiedenen chemischen Spezies. Dieser Transfertyp kann auf der Grundlage klassischer Kinetik verstanden werden. Die Kreuzpeakintensitäten des resultierenden 2D-Spektrums sind proportional zu den Austauschgeschwindigkeitskonstanten für die Reaktionen pseudoerster Ordnung.

Die Austauschgeschwindigkeitskonstanten beim NOESY-Transfer sind durch die Kreuzrelaxationsraten gegeben, die auf magnetische Dipol-Dipol-Wechselwirkung zurückzuführen und proportional zu  $1/r_{kl}^6$  für die Kernpaare  $I_k$  und  $I_l$  sind sowie von der Korrelationszeit  $\tau_c$  der Molekülbewegungen in Lösung abhängen. Diese Abhängigkeit vom Abstand kann genutzt werden, um relative oder, wenn  $\tau_c$  bekannt ist, absolute Abstände im Molekül zu bestimmen. Die NOESY-Kreuzpeaks ermöglichen damit die Identifizierung räumlich benachbarter Protonen in einem Molekül, was z.B. für Protonen wichtig ist, die zu aufeinander folgenden Aminosäureresten in Peptiden gehören.

Abbildung 11 zeigt ein NOESY-Spektrum von Antamanid **1**. Die zu Kreuzpeaks zwischen sequentiellen Rückgrat-

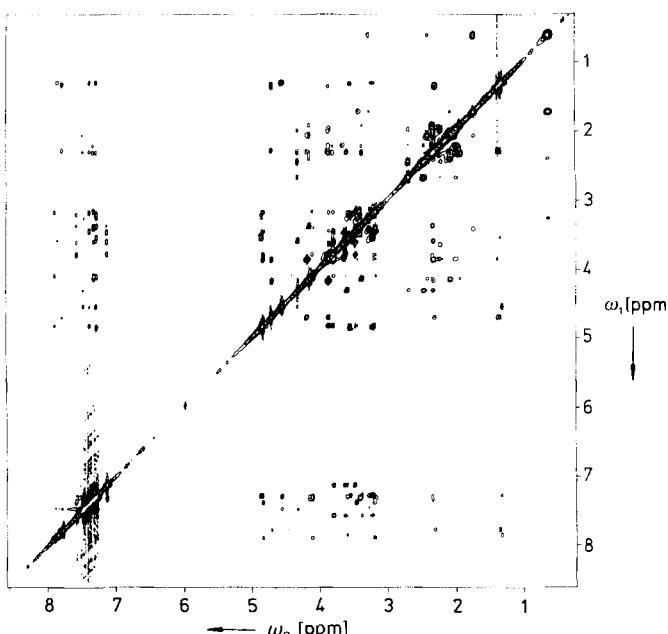


Abb. 11. 400 MHz-<sup>1</sup>H-NOESY-Spektrum von Antamanid **1** in Chloroform (bei 250 K) in einer Konturliniendarstellung. Das Spektrum wurde von Dr. Martin Blackledge aufgenommen.

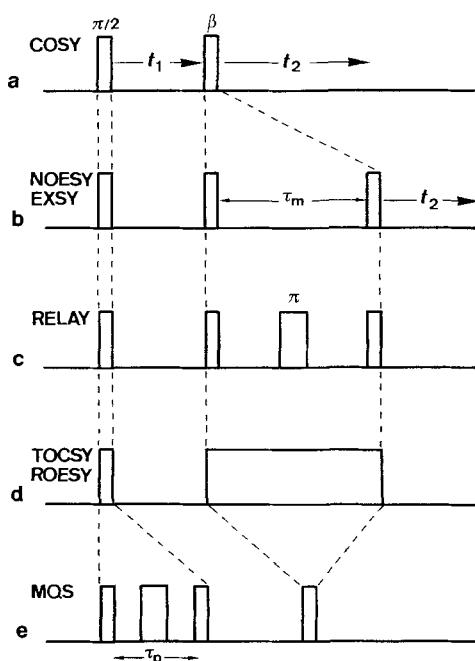


Abb. 10. Pulssequenzen für einige der nützlichsten 2D-Experimente: a) COSY, b) NOESY oder EXSY, c) Relayed COSY, d) TOCSY oder ROESY im rotierenden Koordinatensystem, e) Mehrquantenspektroskopie.

protonen benachbarter Aminosäurereste gehörenden Wechselwirkungen sind in Abbildung 9 mit einem N gekennzeichnet. Man erkennt in Abbildung 9, daß zusammen mit den *J*-Kreuzpeaks aus dem COSY-Spektrum der Abbildung 8 zwei ununterbrochene Konnektivitätsketten gefunden werden, die zur Zuordnung der Rückgratprotonensignale herangezogen werden können. Die beiden Ketten sind nicht verbunden, da die vier Prolinreste keine NH-Protonen enthalten. Das allgemeine, auf COSY- und NOESY-Spektren basierende Zuordnungsverfahren von Protonenresonanzfrequenzen wurde von Wüthrich und seiner Forschungsgruppe erarbeitet<sup>[56]</sup>.

Auf der Grundlage eines vollständigen oder teilweisen Satzes zugeordneter Resonanzsignale ist es dann möglich,

Informationen über die Molekülstruktur abzuleiten. Jede NOESY-Kreuzpeakintensität ergibt einen Abstand zwischen zwei Kernen, der in einem manuellen oder computerisierten Verfahren genutzt werden kann, um ein mit den experimentellen Daten übereinstimmendes Molekülmodell zu erstellen. Bei diesem Verfahren können zusätzlich skalare Kopplungskonstanten aus COSY-artigen Spektren herangezogen werden (insbesondere aus E. COSY-Spektren, wie später erläutert wird). Gemäß den Karplus-Beziehungen<sup>[54]</sup> ist das Verhältnis zwischen vicinalen Kopplungskonstanten und Diederwinkeln exakt definiert. Leistungsfähige Computerverfahren zur Bestimmung von Molekülstrukturen auf der Grundlage von NMR-Daten wurden zuerst von Kurt Wüthrich und seinem Arbeitskreis entwickelt und an einer großen Zahl kleiner bis mittlerer Proteine getestet<sup>[56, 68–71]</sup>. Heute werden vor allem zwei Computeralgorithmen verwendet, der „Distance-geometry“-Algorithmus<sup>[72, 73]</sup> in mehreren Versionen und der „Restrained-molecular-dynamics“-Algorithmus<sup>[74, 75]</sup>, wiederum in zahlreichen Varianten. Das Strukturproblem bei Antamanid 1 wird später noch ausführlich behandelt werden, da intramolekulare dynamische Prozesse eine Rolle spielen, was zusätzliche Probleme mit sich bringt.

Kreuzpeaks in einem NOESY-artigen Austauschspektrum können auch durch chemischen Austausch zustande kommen; das Dreipulseperiment von Abbildung 10 b ist in der Tat sehr dazu geeignet, Netzwerke chemischen Austauschs zu untersuchen<sup>[64, 65, 76]</sup>. Eine Unterscheidung der beiden Signalarten ist nicht anhand eines einzigen Spektrums möglich. Untersuchungen bei mehreren Temperaturen

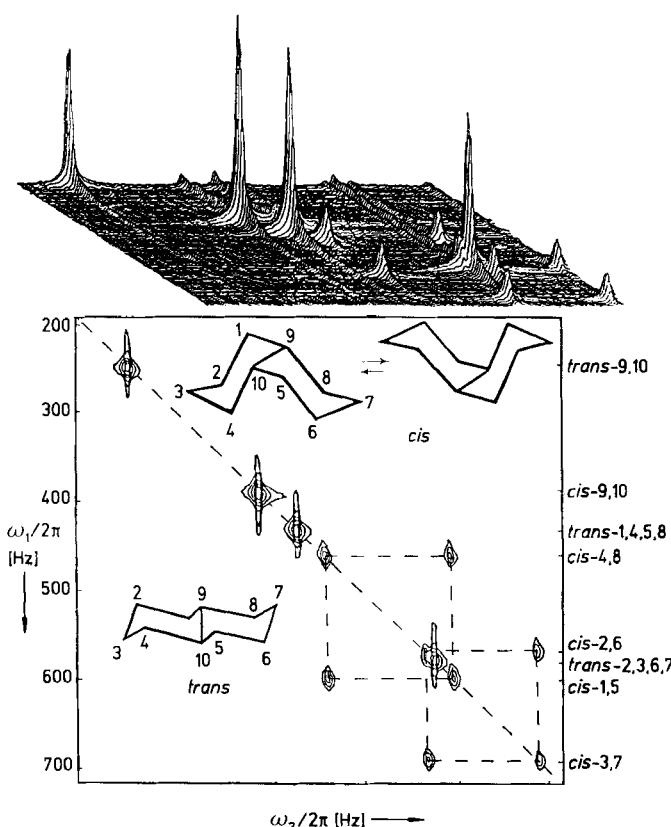


Abb. 12. 2D-<sup>13</sup>C-EXSY-Spektrum einer Mischung aus *cis*- und *trans*-Dekalin, das bei 22.5 MHz und 241 K aufgenommen wurde [76]. Oben: dreidimensionale Darstellung (stacked plot); unten: Konturliniendarstellung mit Signalzuordnung.

lassen jedoch häufig Schlussfolgerungen zu. Bei genügend tiefen Temperaturen, bei denen der chemische Austausch langsam wird, sollten nur NOESY-Kreuzpeaks übrigbleiben. Eine andere Möglichkeit zur Unterscheidung der beiden Signalarten sind Experimente im rotierenden Koordinatensystem, die im folgenden Abschnitt behandelt werden.

Das in Abbildung 12 gezeigte 2D-<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum einer Mischung aus *cis*- und *trans*-Dekalin ist typisch für ein 2D-Austauschspektrum. Es zeigt die wohlbekannte konformative Stabilität von *trans*-Dekalin, während bei *cis*-Dekalin vier Paare von Kohlenstoffspins an einem Konformationsaustauschprozeß beteiligt sind, der zwei Kreuzpeakpaare hervorruft<sup>[76]</sup>.

### Modifizierte zweidimensionale FT-NMR-Experimente

Ausgehend von den beiden Prototyp-2D-FT-NMR-Experimenten wurde eine große Zahl modifizierter, erweiterter und verbesserter Experimente vorgeschlagen. Viele davon sind zu Routinemethoden des NMR-Spektroskopikers geworden. Eine erste Experimentkategorie führt, wie in Abbildung 13 im oberen Bereich dargestellt wird, durch zwei oder mehr Transferschritte zu zusätzlichen Korrelationen: „Relayed“-Korrelationsexperimente erfassen Zweischritt-Korrelationen, die Totalkorrelationsspektroskopie (TOCSY) Mehrstufenkorrelationen. Letzteres Experiment führt zu der

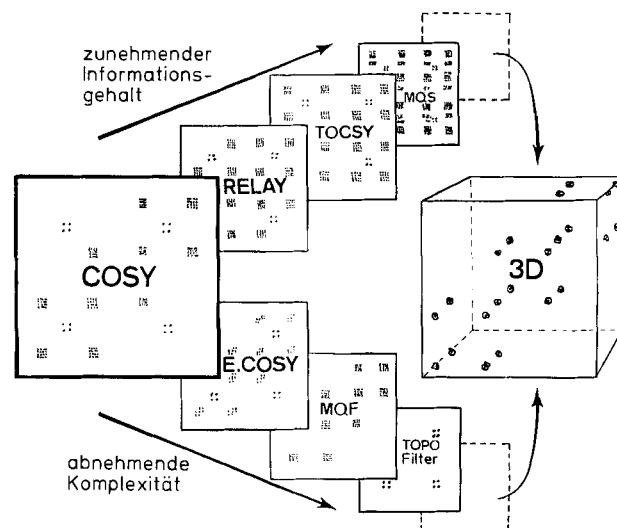


Abb. 13. Erweiterungen des Standard-COSY-Experiments. Relayed Korrelation. Totalkorrelationsspektroskopie (TOCSY) und Mehrquantenspektroskopie (MQS) erhöhen den Informationsgehalt, während exklusive Korrelation (E. COSY). Mehrquantenfilterung und Filterung gemäß Spintopologien die Komplexität reduzieren. Beide Wege können zur dreidimensionalen NMR-Spektroskopie führen.

wichtigen Kategorie der Experimente im rotierenden Koordinatensystem, darunter die Rotating-frame-Overhauser-effect-Spektroskopie (ROESY), eine Alternative zu NOESY. Schließlich ermöglicht es die Mehrquantenspektroskopie, die Konnektivität in Spinsystemen zu untersuchen. Eine zweite Experimentkategorie (Abb. 13 unterer Bereich) versucht die Spektren durch exklusive Korrelation (E. COSY), Mehrquantenfilterung und Filterung gemäß Spinkopplungstopologien (Spintopologiefilterung) zu vereinfachen.

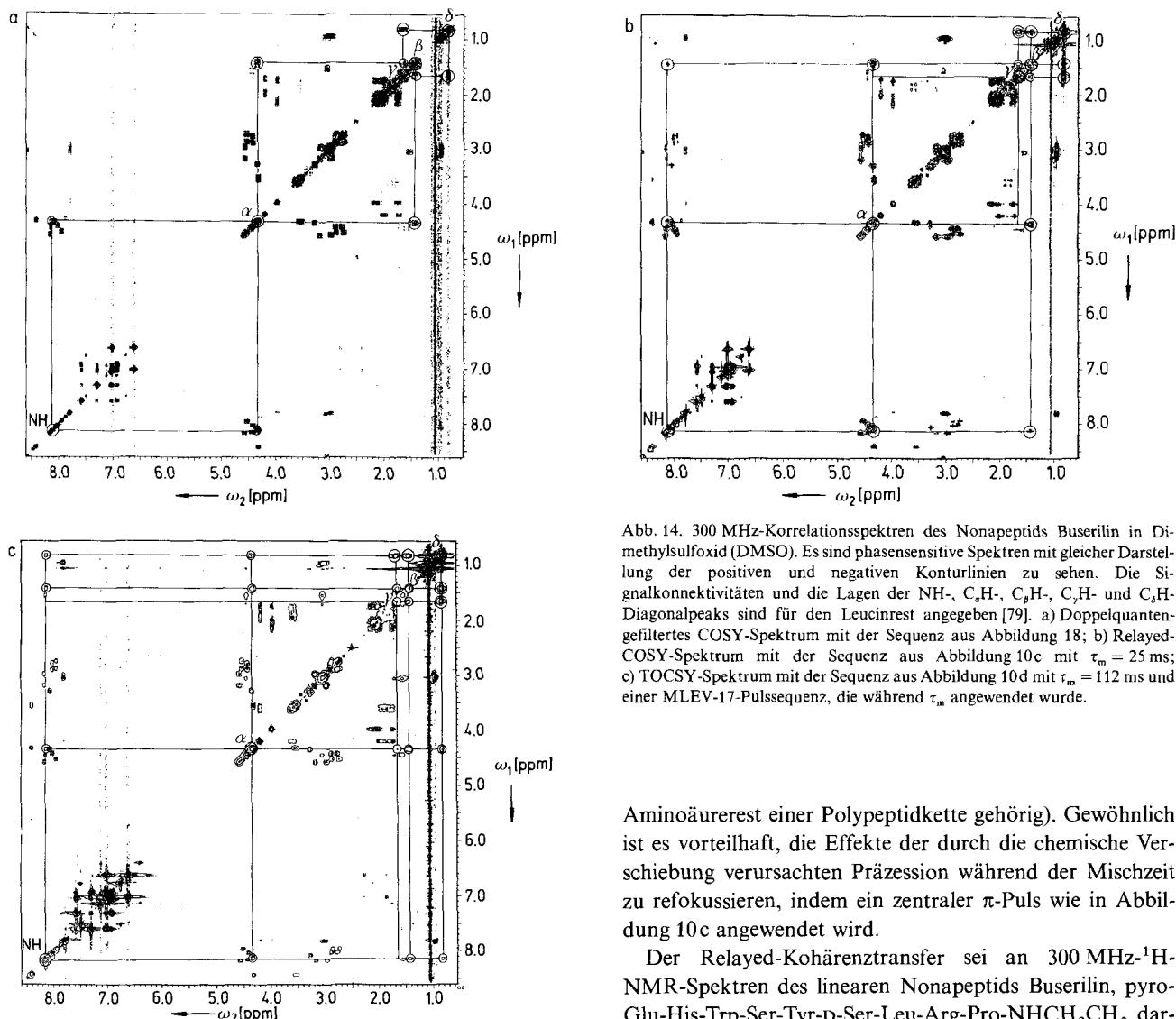


Abb. 14. 300 MHz-Korrelationsspektren des Nonapeptids Buserilin in Dimethylsulfoxid (DMSO). Es sind phasensensitive Spektren mit gleicher Darstellung der positiven und negativen Konturlinien zu sehen. Die Signalkonnektivitäten und die Lagen der NH-, C<sub>α</sub>H-, C<sub>β</sub>H-, C<sub>γ</sub>H- und C<sub>δ</sub>H-Diagonalpeaks sind für den Leucinrest angegeben [79]. a) Doppelquantengefiltertes COSY-Spektrum mit der Sequenz aus Abbildung 18; b) Relayed-COSY-Spektrum mit der Sequenz aus Abbildung 10c mit  $\tau_m = 25$  ms; c) TOCSY-Spektrum mit der Sequenz aus Abbildung 10d mit  $\tau_m = 112$  ms und einer MLEV-17-Pulsesequenz, die während  $\tau_m$  angewendet wurde.

Aminoäurerest einer Polypeptidkette gehörig). Gewöhnlich ist es vorteilhaft, die Effekte der durch die chemische Verschiebung verursachten Präzession während der Mischzeit zu refokussieren, indem ein zentraler  $\pi$ -Puls wie in Abbildung 10c angewendet wird.

Der Relayed-Kohärenztransfer sei an 300 MHz-<sup>1</sup>H-NMR-Spektren des linearen Nonapeptids Buserilin, pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser-Leu-Arg-Pro-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, dargestellt. Abbildung 14a zeigt ein doppelquantengefiltertes COSY-Spektrum und Abbildung 14b das entsprechende Relayed-COSY-Spektrum<sup>[79]</sup>. In beiden Spektren sind die Signalkonnektivitäten für den Leucinrest gekennzeichnet. Es ist offensichtlich, daß im COSY-Spektrum nur Nachbarprotonen durch Kreuzpeaks verbunden sind: NH-C<sub>α</sub>H, C<sub>α</sub>H-C<sub>β</sub>H<sup>1,2</sup>, C<sub>β</sub>H<sup>1,2</sup>-C<sub>γ</sub>H und C<sub>γ</sub>H-(C<sub>δ</sub>H<sub>3</sub>)<sup>1,2</sup>. Dagegen sind im Relayed-COSY-Spektrum auch die übernächsten Protonen-nachbarn NH-C<sub>β</sub>H<sup>1,2</sup> und C<sub>β</sub>H<sup>1,2</sup>-(C<sub>δ</sub>H<sub>3</sub>)<sup>1,2</sup> durch Kreuzpeaks verbunden. Das dritte mögliche Relayed-Kreuzpeak-paar, C<sub>α</sub>H-C<sub>γ</sub>H, ist aufgrund der hohen Multiplizität des C<sub>γ</sub>H-Signals schwach und in der Konturliniendarstellung von Abbildung 14b nicht zu erkennen. Ähnliche Relayed-Kreuzpeaks treten auch für die anderen Aminosäurereste auf.

### Relayed-Korrelationsexperimente

In einem Standard-COSY-Experiment wird Kohärenz ausschließlich zwischen direkt gekoppelten Spins durch einen einzigen Mischpuls übertragen. Durch eine Folge zweier  $\pi/2$ -Pulse wie in Abbildung 10c ist es möglich, eine Kohärenzübertragung von Spin I<sub>k</sub> zu Spin I<sub>l</sub> durch zwei sequentielle Kopplungen über den Relay-Spin I<sub>r</sub> zu bewirken<sup>[77, 78]</sup>. Für die Beziehung (8) wurde  $J_{kr}t_1 = J_{kr}\tau_m = J_{rl}\tau_m = 1/2$  angenom-

$$\begin{aligned} I_{kz} \xrightarrow{(\pi/2)I_{ky}} & I_{kx} \xrightarrow{2\pi J_{kr}I_{rz}t_1} 2I_{ky}I_{rz} \xrightarrow{(\pi/2)(I_{kx} + I_{rz})} \\ & -2I_{kz}I_{ry} \xrightarrow{2\pi J_{rl}I_{kz}\tau_m + 2\pi J_{rl}I_{rz}I_{ly}\tau_m} 2I_{ry}I_{lz} \xrightarrow{(\pi/2)(I_{rx} + I_{lx})} -2I_{rz}I_{ly} \end{aligned} \quad (8)$$

men. Während der langen Mischzeit  $\tau_m$  muß also der Antiphasencharakter der I<sub>r</sub>-Spinkohärenz bezüglich des Spins I<sub>k</sub> refokussiert und ein Antiphasencharakter bezüglich des Spins I<sub>l</sub> erzeugt werden, um einen zweiten Transfer durch den zweiten Mischpuls zu ermöglichen. Die relayed Korrelation ist immer dann hilfreich, wenn das Resonanzsignal des Relay-Spins I<sub>r</sub> nicht eindeutig identifiziert werden kann, da mit ihr die Spins I<sub>k</sub> und I<sub>l</sub> dennoch demselben Kopplungsnetzwerk zugeordnet werden können (z.B. als zum selben

### Experimente im rotierenden Koordinatensystem

Mit Hilfe einer erweiterten Mischpulssequenz ist ein Kohärenztransfer über eine beliebige Zahl von Schritten grundsätzlich möglich. Insbesondere kontinuierliche rf-Anregung führt zur Mischung aller Eigenmoden eines Spinsystems und damit zu Kohärenztransfers zwischen ihnen allen. Dies wird in der Totalkorrelationsspektroskopie (TOCSY) mit der in Abbildung 10d dargestellten Sequenz genutzt. Alle Spins,

die demselben  $J$ -Kopplungsnetz angehören, können mit TOCSY identifiziert werden<sup>[80, 81]</sup>. Die möglichst präzise Angleichung der Präzessionsfrequenzen der verschiedenen Spins in Gegenwart einer Radiofrequenz ist wesentlich, um einen effizienten Kohärenztransfer zu ermöglichen. Für diesen Zweck benötigt man entweder sehr starke Radiofrequenzfelder oder eigens entwickelte Pulssequenzen<sup>[81]</sup>. Kohärenztransfer ist möglich, wenn die effektiven mittleren Magnetfeldstärken  $B_k^{\text{eff}}$  im rotierenden Koordinatensystem innerhalb der Größe der  $J$ -Kopplungskonstanten gleich sind  $|\gamma(B_k^{\text{eff}} - B_l^{\text{eff}})| < |2\pi J_{kl}|$ , was dem Fall starker Kopplung im rotierenden Koordinatensystem entspricht.

Das TOCSY-Experiment ist hilfreich, um die Protonenresonanzen einzelner Aminosäurereste in einem Protein zuzuordnen. Ein besonderer Vorteil besteht darin, daß seine Transfergeschwindigkeit im Vergleich zu COSY- oder Relayed-Transferexperimenten im Laborkoordinatensystem um einen Faktor 2 größer ist<sup>[80]</sup>. Ein weiteres Merkmal ist, daß aufgrund des Vorhandenseins eines Spinlock-Feldes In-Phase-Kohärenz transferiert werden kann (9), so daß die Kreuzpeaks eine In-Phase-Multiplettstruktur erhalten.



Ein TOCSY-Spektrum von Buserilin ist in Abbildung 14c enthalten, um einen Vergleich mit den abgebildeten Relayed- und Standard-COSY-Spektren zu ermöglichen. Hier sind Dreischrittransfers  $C_xH-(C_yH_3)^{1,2}$  und sogar Vierschrittransfers  $NH-(C_\delta H_3)^{1,2}$  sichtbar; wiederum fehlen einige zu erwartende Kreuzpeaks für  $C_\gamma H$ , was auf die komplexe Multiplettstruktur des  $C_\gamma H$ -Signals zurückzuführen ist.

Die Eliminierung der durch die chemische Verschiebung verursachten Präzession durch die rf-Einstrahlung führt nicht nur zum kohärenten Transfer über das  $J$ -Kopplungsnetz, sondern auch zu einem inkohärenten Transfer der Spinordnung über transversale Keuzrelaxation. Die Terme der transversalen Kreuzrelaxation sind im Prinzip ständig vorhanden. Stark unterschiedliche chemische Verschiebungen von Spinaaren führen jedoch im Normalfall zu einer Unterbindung des Transfers im Sinne der Störungstheorie erster Ordnung. In Gegenwart eines starken rf-Feldes ist diese Unterbindung nicht mehr wirksam, und es kommt zu transversaler Kreuzrelaxation. Dies ist der Transfermechanismus im Rotating-frame-Overhauser-effect-spectroscopy(ROESY)-Experiment<sup>[82]</sup>.

ROESY hat ähnliche Eigenschaften wie NOESY, unterscheidet sich aber in der Abhängigkeit der Kreuzrelaxations-Geschwindigkeitskonstanten  $\Gamma_{kl}$  von der Korrelationszeit  $\tau_c$ , der molekularen Rotationsbewegung, die die für die Kreuzrelaxation ursächliche Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen Kernen moduliert [Gl. (10) und (11)]. Dabei ist  $J$  [Gl. (12)] die spektrale Leistungsdichte und  $\omega_0$  die Larmor-

$$\Gamma_{kl}^{\text{NOE}} = \frac{\gamma^4 \hbar^2}{10 r_{kl}^6} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \left[ -\frac{1}{2} J(0) + 3J(2\omega_0) \right] \quad (10)$$

$$\Gamma_{kl}^{\text{ROE}} = \frac{\gamma^4 \hbar^2}{10 r_{kl}^6} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \left[ J(0) + \frac{3}{2} J(\omega_0) \right] \quad (11)$$

$$J(\omega) = \frac{2\tau_c}{1 + (\omega\tau_c)^2} \quad (12)$$

Frequenz der beiden Kerne mit dem Abstand  $r_{kl}$  steht. Aus (10) und (12) folgt, daß  $\Gamma_{kl}^{\text{NOE}}$  das Vorzeichen bei einer mittleren Korrelationszeit  $\tau_c$  von  $(5/4)^{1/2} \omega_0^{-1}$  wechselt, d.h. die Kreuzrelaxationsrate wird nahe dieser Bedingung sehr klein. In Abhängigkeit von der Viskosität des Lösungsmittels und der Resonanzfrequenz  $\omega_0$  ist dies für kugelförmige Moleküle bei einem Molekulargewicht zwischen 500 und 2000 der Fall.  $\Gamma_{kl}^{\text{ROE}}$  dagegen ist weniger empfindlich gegenüber  $\tau_c$  und bleibt für jegliches Molekulargewicht positiv. Daher ist das ROESY-Experiment für Moleküle mittlerer Größe nützlicher als das NOESY-Experiment.

Die unterschiedliche Empfindlichkeit von NOE und ROE gegenüber  $\tau_c$  ermöglicht es zudem, Informationen über die intramolekulare Mobilität durch Vergleich der beiden Messungen abzuleiten<sup>[83]</sup>. Ein Vorteil von ROESY- gegenüber NOESY-Experimenten ist die negative Kreuzpeakamplitude, da dies zu einer leichten Unterscheidung von ebenfalls auftretenden, aber positiven Kreuzpeaks aufgrund chemischen Austauschs führt, wenn die Signale nicht überlappen.

Es sollte angemerkt werden, daß im rotierenden Koordinatensystem Kohärenztransfer durch  $J$ -Kopplung und Kreuzrelaxation gleichzeitig auftritt, wobei TOCSY-Kreuzpeaks positiv sind und ROESY-Kreuzpeaks mit negativer Amplitude erscheinen. Dadurch wird das 2D-Spektrum sehr kompliziert und erfordert Trennverfahren. Die Unterdrückung des kohärenten Transfers durch  $J$ -Kopplung (TOCSY) ist einfach, da es lediglich notwendig ist, die Bedingung  $|\gamma(B_k^{\text{eff}} - B_l^{\text{eff}})| < |2\pi J_{kl}|$  zu verletzen, z.B. durch einen leichten Frequenz-Offset in Gegenwart nicht zu starker rf-Felder.

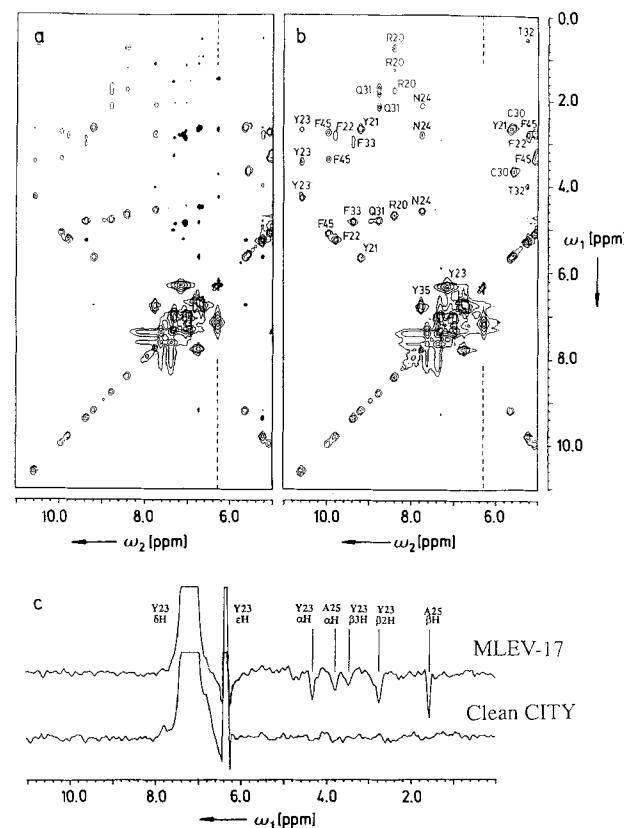


Abb. 15. Phasensensitive 300 MHz  ${}^1\text{H}$ -TOCSY-Spektren einer 15 mM Probe von BPTI in  $\text{D}_2\text{O}$  mit einer Mischzeit von 69 ms [85]. a) Mischprozeß mit der MLEV-17-Pulssequenz. Die negativen Peaks sind schwarz ausgefüllt. b) Mischprozeß mit der Clean-CITY-Pulssequenz. c) Eindimensionaler Schnitt entlang  $\omega_1$  durch den  $\text{Tyr}^{23}\text{-eH}$ -Diagonalpeak bei  $\omega_2 = 6.33$  ppm in den Spektren a) und b) (angedeutet durch gestrichelte Linien).

Die Kreuzrelaxationsraten sind weniger empfindlich gegenüber solch einer Abweichung von den Idealbedingungen, so daß man auf diese Art ein reines ROESY-Spektrum erhält.

Ein reines TOCSY-Spektrum zu bekommen ist schwieriger, da man die Relaxation nicht leicht beeinflussen kann. Eine Technik wurde von C. Griesinger vorgeschlagen<sup>[84]</sup>. Sie beruht auf einer Verknüpfung der Gleichungen (10) und (11), um eine mittlere Kreuzrelaxations-Geschwindigkeitskonstante auf Null zu bringen [Gl. (13)]. Ein geeigneter

$$\bar{\Gamma}_{kl} = p\Gamma_{kl}^{\text{NOE}} + (1-p)\Gamma_{kl}^{\text{ROE}} \stackrel{!}{=} 0 \quad (13)$$

Wichtungsfaktor  $p$  kann immer dann gefunden werden, wenn  $\Gamma_{kl}^{\text{NOE}} < 0$ , d.h. für genügend große Moleküle mit  $\tau_c > (5/4)^{1/2} \omega_0^{-1}$ . Dies erfordert, daß sich die Magnetisierung während der Mischperiode auf einer Trajektorie bewegt, die einen Bruchteil  $p$  der Zeit entlang der  $z$ -Achse und einen anderen Teil ( $1-p$ ) in der transversalen Ebene verbringt. Für  $\tau_c \rightarrow \infty$  ist die Bedingung  $p = 2/3$  und damit  $\bar{\Gamma}_{kl} = 0$ . Eine geeignete Pulssequenz, eine Variante der MLEV-17-Spinlock-Sequenz, wurde in Lit.<sup>[84]</sup> vorgeschlagen.

Eine weitere optimierte Sequenz mit dem Namen „Clean CITY“ wurde von J. Briand entwickelt<sup>[85]</sup>. Ein reines TOCSY-Spektrum des Rindertrypsin-Inhibitors, BPTI (bovine pancreatic trypsin inhibitor), erhalten mit der Clean-CITY-Sequenz, wird in Abbildung 15 mit einem konventionellen TOCSY-Spektrum verglichen, um die wirksame Unterdrückung der (negativen) ROESY-Peaks zu veranschaulichen.

## Mehrquantenspektroskopie

In der Spektroskopie sind im allgemeinen nur die Übergänge direkt beobachtbar, für die der Observablenoperator Matrixelemente ungleich Null aufweist (erlaubte Übergänge). Bei der magnetischen Resonanz im starken Magnetfeld mit schwacher CW-Störung oder beim freien Induktionsabfall in Abwesenheit von rf-Feldern hat der Observablenoperator der transversalen Magnetisierung  $\mathbf{F}_x = \sum_k \mathbf{I}_{kx}$

nur Matrixelemente zwischen den Eigenzuständen des Hamilton-Operators, die sich in der magnetischen Quantenzahl  $M$  um  $\pm 1$  unterscheiden. Damit sind Einquantenübergänge erlaubte Übergänge, während Mehrquantenübergänge mit  $|\Delta M| > 1$  verboten sind. Mehrquantenübergänge können jedoch durch starke CW-rf-Felder, die zu einem Mischen der Zustände führen<sup>[8, 57]</sup>, oder durch eine Folge von mindestens zwei rf-Pulsen (Abb. 10 e)<sup>[8, 63, 86, 87]</sup> erzeugt werden. Eine Beobachtung ist wiederum in Gegenwart eines starken rf-Feldes<sup>[8, 57]</sup> oder nach einem zusätzlichen Detektionspuls<sup>[8, 63, 86, 87]</sup> möglich.

Bei Spinsystemen mit  $I = 1/2$ -Kernen involvieren Mehrquantenübergänge notwendigerweise mehrere Spins, so daß die Mehrquantenspektren analog zu 2D-Korrelationsspektren Informationen über die Konnektivität der Spins innerhalb des  $J$ -Kopplungsnetzes enthalten. Insbesondere kann aus dem Übergang mit der höchsten Ordnung die Zahl der gekoppelten Spins abgeleitet werden. Relaxationsgeschwindigkeitskonstanten von Mehrquanten Kohärenzen hängen von der Korrelation der Zufallsstörungen ab, die die beteiligten Spins beeinflussen, und liefern Informationen über Bewegungsprozesse<sup>[88]</sup>.

An einem einfachen, anschaulichen Beispiel eines 2D-Doppelquantenspektrums (Abb. 16) sei gezeigt, wie Mehrquantenübergänge für die Zuordnung von Resonanzsignalen genutzt werden können<sup>[89]</sup>. Entlang  $\omega_1$  sind Doppelquantenübergänge und entlang  $\omega_2$  Einquantenübergänge für das Sechs-spinsystem von  $[\text{D}_3]\text{3-Aminopropanol DOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{ND}_2$  aufgetragen. Im allgemeinen gibt es drei Kategorien von Doppelquantenübergängen:

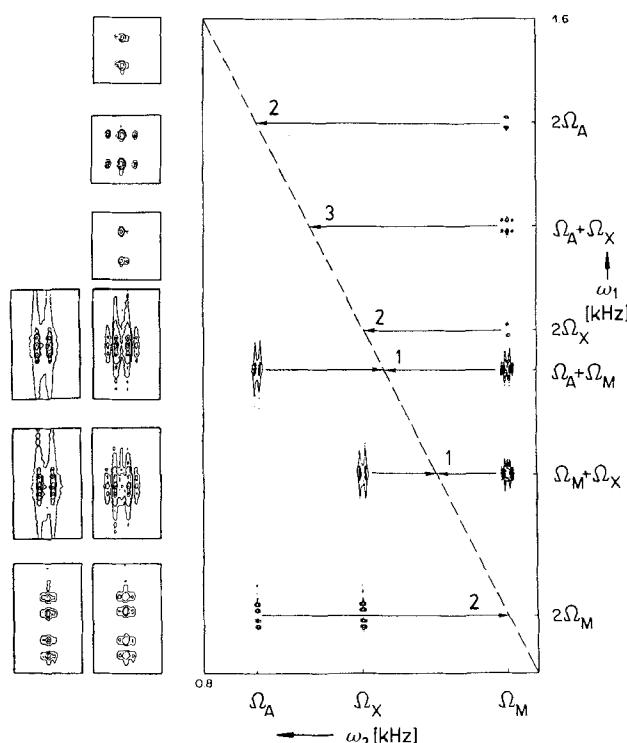


Abb. 16. 90 MHz-2D-<sup>1</sup>H-Korrelationsspektrum von  $[\text{D}_3]\text{3-Aminopropanol}$  mit den Doppelquantenübergängen entlang  $\omega_1$  und den Einquantenübergängen entlang  $\omega_2$ . Die im Text erwähnten drei Arten von Doppelquantenübergängen sind mit 1–3 bezeichnet. Vergrößerungen der Kreuzpeaks sind im linken Teil abgebildet. Das Spektrum ist in der Absolutwertdarstellung wiedergegeben (aus [89]).

1) Doppelquantenübergänge unter Beteiligung von zwei direkt gekoppelten Spins. Sie erzeugen Kreuzpeakpaare, die symmetrisch zur Doppelquantendiagonale ( $\omega_1 = 2\omega_2$ ) liegen, mit  $\omega_2$ -Koordinaten, die den Larmor-Frequenzen der beiden Spins entsprechen (z.B.  $\omega_1 = \Omega_A + \Omega_M + \Omega_x$ ).

2) Doppelquantenübergänge unter Beteiligung von zwei magnetisch äquivalenten Spins. Sie rufen einen oder mehrere Kreuzpeaks bei einer  $\omega_1$ -Frequenz hervor, die die Doppelquantendiagonale bei derjenigen  $\omega_2$ -Frequenz schneidet, die der gemeinsamen Larmor-Frequenz der beiden Spins entspricht (z.B.  $\omega_1 = 2\Omega_A, 2\Omega_M, 2\Omega_x$ ). Magnetische Äquivalenz ist im vorliegenden Beispiel nur im Rahmen der experimentellen Genauigkeit erfüllt.

3) Doppelquantenübergänge unter Beteiligung von zwei indirekt gekoppelten Spins. Sie rufen einzelne Kreuzpeaks bei einer  $\omega_1$ -Frequenz hervor, die die Doppelquantendiagonale bei  $\omega_2$  gleich dem Mittelwert der beiden Larmor-Frequenzen schneidet (z.B.  $\omega_1 = \Omega_A + \Omega_x$ ). Diese Kreuzpeaks enthalten die gleiche Information wie die in Relayed-Korrelationsspektren.

Für die praktische Anwendung ist es wesentlich, daß ein Mehrquantenspektrum keine Diagonalpeaks enthält, die üb-

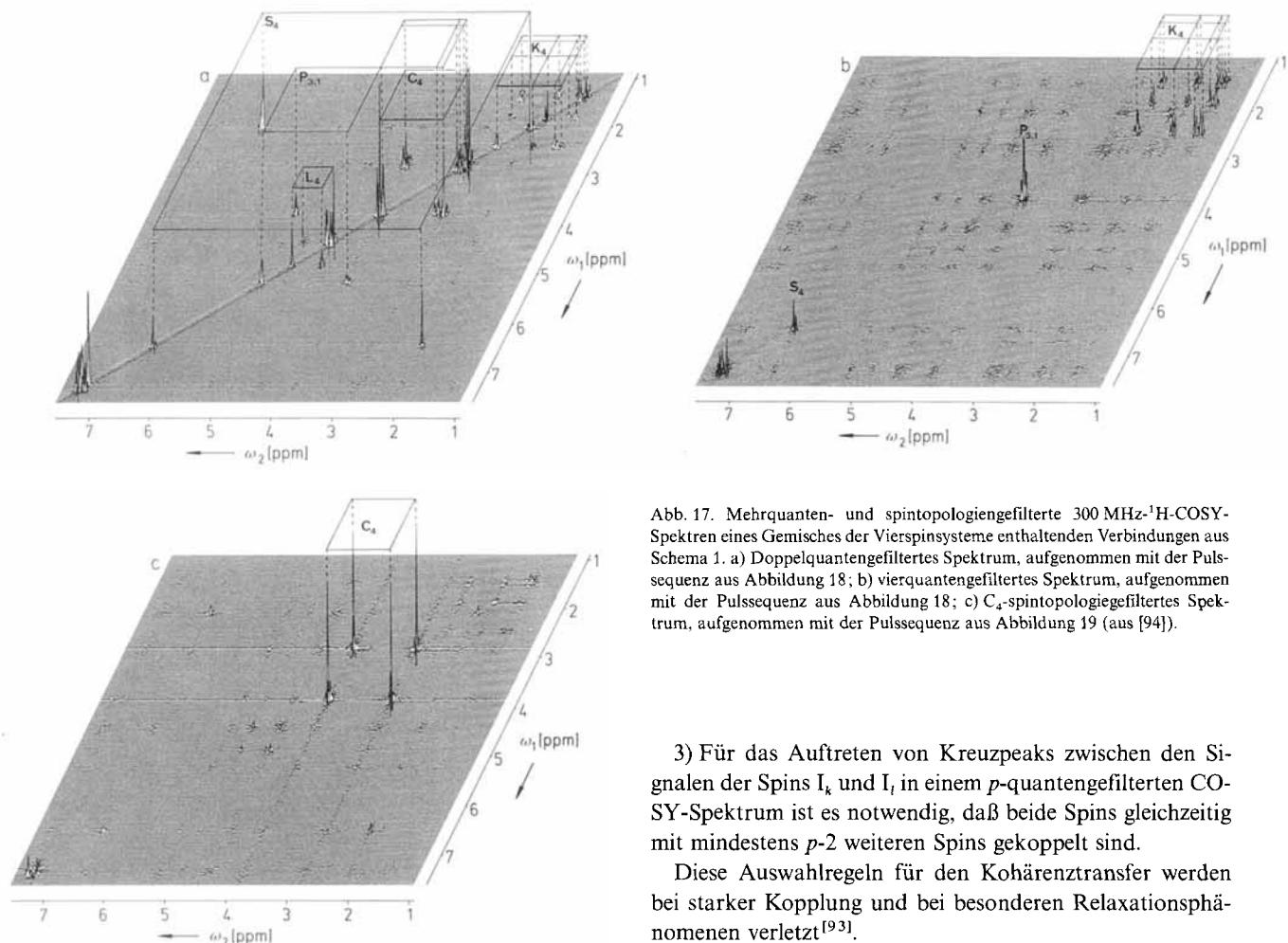
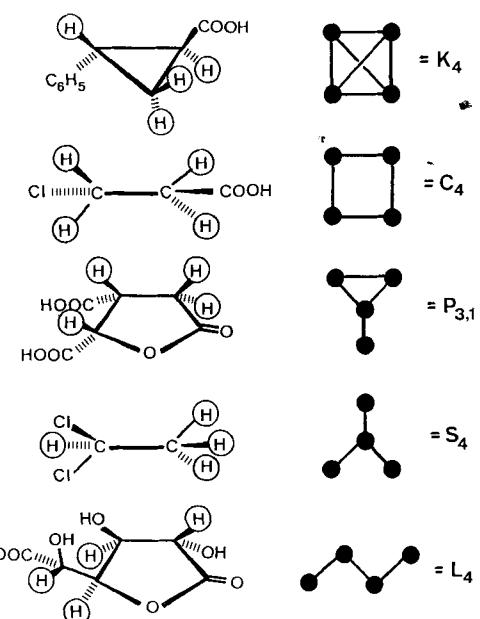


Abb. 17. Mehrquanten- und spintopologienfilterte 300 MHz-<sup>1</sup>H-COSY-Spektren eines Gemisches der Vierspinsysteme enthaltenden Verbindungen aus Schema 1. a) Doppelquantengefiltertes Spektrum, aufgenommen mit der Pulssequenz aus Abbildung 18; b) vierquantengefiltertes Spektrum, aufgenommen mit der Pulssequenz aus Abbildung 18; c) C<sub>4</sub>-spintopologiegefitered Spektrum, aufgenommen mit der Pulssequenz aus Abbildung 19 (aus [94]).

3) Für das Auftreten von Kreuzpeaks zwischen den Signalen der Spins I<sub>k</sub> und I<sub>l</sub> in einem p-quantengefilterten COSY-Spektrum ist es notwendig, daß beide Spins gleichzeitig mit mindestens p-2 weiteren Spins gekoppelt sind.

Diese Auswahlregeln für den Kohärenztransfer werden bei starker Kopplung und bei besonderen Relaxationsphänomenen verletzt<sup>[93]</sup>.

In Abbildung 17 wird der Effekt einer Vierquantenfiltrierung an mehreren Vierspinsystemen gezeigt. Die Probe besteht aus einem Gemisch der fünf Verbindungen *trans*-Phenylcyclopropancarbonsäure (K<sub>4</sub>), DL-Isocitronensäure-lacton (P<sub>3,1</sub>), 1,1-Dichlorethan (S<sub>4</sub>), 2-Chlorpropionsäure (C<sub>4</sub>) und D-Saccharinsäure-1,4-lacton (L<sub>4</sub>) mit den in Schema 1 angegebenen Kopplungstopologien<sup>[94]</sup>.



Schema 1. Für die Spektren in Abbildung 17 verwendete Verbindungen und ihre Spinkopplungstopologien.

licherweise das 2D-Spektrum dominieren. Es sollte nicht unerwähnt bleiben, daß eine schöne und nützliche Form eines Doppelquantenexperiments die 2D-INADEQUATE-Spektroskopie von Bax, Freeman und Kempf ist<sup>[90, 91]</sup>. Dort können nur Peaks des Typs 1 auftreten.

Die bislang erwähnten Methoden liefern zusätzliche Kreuzpeaks, deren Informationen nicht mit Standard-COSY- und NOESY-Experimenten zugänglich sind. Im folgenden werden Techniken behandelt, die zu vereinfachten Spektren führen, die die Interpretation erleichtern können.

### Mehrquantenfilterung

Eine selektive Filterung kann dadurch erreicht werden, daß zunächst Mehrquantenkohärenzen angeregt, dann eine bestimmte Quantenordnung p ausgewählt und die ausgewählte Ordnung in beobachtbare Magnetisierung zurückverwandelt wird. Das Verfahren wird entsprechend als p-Quantenfilterung bezeichnet. Der spinstystemselektive Effekt beruht auf Kohärenztransfers auswahlregeln, die die erlaubten Transfers für schwach gekoppelte Spins begrenzen<sup>[8, 92]</sup>:

1) Es ist nicht möglich, p-Quantenkohärenzen in Spinstystemen mit weniger als p gekoppelten I = 1/2-Spins anzuregen.

2) Das Auftreten eines Diagonalpeaks für den Spin I<sub>k</sub> in einem p-quantengefilterten COSY-Spektrum erfordert, daß dieser Spin direkt mit mindestens p-1 weiteren Spins gekoppelt ist.

In Abbildung 17 a ist ein konventionelles (doppelquanten gefiltertes) COSY-Spektrum dieses Gemisches zu sehen, während Abbildung 17 b das entsprechende vierquanten gefilterte Spektrum zeigt. Der Filtereffekt kann auf der Grundlage der gegebenen Regeln und der in Schema 1 gezeigten Kopplungstopologien ohne Schwierigkeiten erklärt werden. Dies soll dem Leser überlassen werden. Es verbleiben lediglich die Kreuzpeaks des Moleküls mit K<sub>4</sub>-Topologie und die Diagonalpeaks der Moleküle mit P<sub>3,1</sub>, S<sub>4</sub>- und K<sub>4</sub>-Topologie.

Technisch gesehen nutzt die Mehrquantenfilterung (Abb. 18) die charakteristische Abhängigkeit eines Mehrquantenkohärenztransfers von der rf-Phase der angewendeten Pulssequenz<sup>[8, 92, 95, 96]</sup>. Nehmen wir an, Kohärenz  $c_{p_1}(t)$

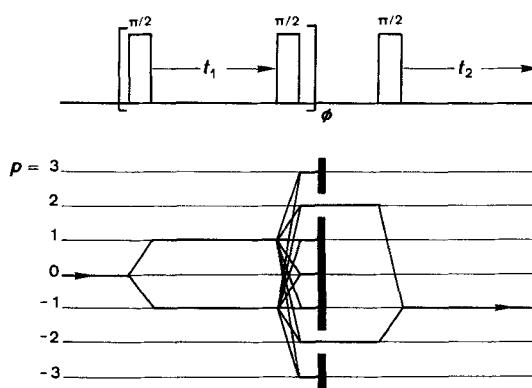


Abb. 18. Pulssequenz für ein mehrquanten gefiltertes COSY-Experiment mit dem Kohärenztransferdiagramm für Doppelquantenfilterung. Die Phase  $\phi$  wird in einer Reihe von  $N$  Experimenten systematisch inkrementiert, und die experimentellen Ergebnisse werden Gleichung (16) entsprechend kombiniert.

werde durch eine unitäre Transformation  $U(0)$ , die eine bestimmte Pulssequenz repräsentiert, in Kohärenz  $c_{p_2}(t)$  umgewandelt (14), wobei  $p_1$  und  $p_2$  Kohärenzordnungen sind. Alle

$$c_{p_1}(t) \xrightarrow{U(0)} c_{p_2}(t) \quad (14)$$

rf-Pulse in der Sequenz  $U(0)$  sollen nun um  $\phi$  phasenverschoben werden, so daß  $U(\phi)$  erhalten wird. Es kann dann gezeigt werden, daß die entstehende Kohärenz  $c_{p_2}(t)$  um den Betrag  $(p_2 - p_1)\phi$  phasenverschoben ist (15).

$$c_{p_1}(t) \xrightarrow{U(\phi)} c_{p_2}(t) e^{i(p_2 - p_1)\phi} \quad (15)$$

Die Phasenverschiebung ist also proportional zur Änderung der Kohärenzordnung ( $\Delta p = p_2 - p_1$ ). Nach Durchführung einer Reihe von Experimenten, bei denen die Phase  $\phi$  in konstanten Intervallen  $2\pi/N$  von 0 auf  $2\pi(N-1)/N$  erhöht wird, ist es durch Fourier-Analyse nach  $\Delta p$  möglich, ein bestimmtes  $\Delta p$  zu selektieren: Es sei  $s(t, \phi)$  das aufgezeichnete Signal eines Experiments mit einer Phasenverschiebung um  $\phi$ , dann erhält man das gefilterte Signal gemäß (16). Die erforderliche Zahl an Inkrementen  $N$  der Phase  $\phi$

$$s(t, \Delta p) = \sum_{k=0}^{N-1} s(t, 2\pi k/N) e^{-i2\pi k \Delta p} \quad (16)$$

hängt von der Zahl an  $\Delta p$ -Werten ab, die zu unterscheiden sind<sup>[96]</sup>.

Es ist offensichtlich, daß keine bestimmte Kohärenzordnung  $p_2$  auf diese Art herausgefiltert werden kann, solange nicht die ursprüngliche Kohärenzordnung  $p_1$  bekannt ist. Am günstigsten ist es, als ursprünglichen Zustand denjenigen im thermischen Gleichgewicht mit  $p_1 = 0$  zu wählen. Dann muß die gesamte Pulssequenz, die dem Punkt, an dem eine Kohärenzordnung ausgewählt werden soll, vorausgeht, den Phasencyclus  $\Phi$  durchlaufen. Für mehrquanten gefilterte COSY-Experimente führt dies zu der in Abbildung 18 gezeigten Pulssequenz.

Es ist offensichtlich, daß Mehrquantenfilterung und Phasencyclen die  $N$ -fache Zahl an Experimenten erfordern. Es geht jedoch keine Information verloren, da in jedem Term von Gleichung (16) gerade der Phasenfaktor kompensiert wird und identische Signale für die relevanten Pfade aufaddiert werden. Somit wird die längere Meßdauer durch ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis kompensiert.

### Spintopologiefilterung

Es kann wünschenswert sein, die in Abbildung 17 gezeigten Filtereffekte zu verstärken und einzelne Spinkopplungstopologien zu selektieren. Tatsächlich kann man umfangreiche Pulssequenzen in Verbindung mit Mehrquantenfilterung entwerfen, maßgeschneidert für bestimmte Spinkopplungstopologien<sup>[94, 97, 98]</sup>. Eine in ein 2D-COSY-Experiment eingebaute Pulssequenz, die cyclische C<sub>4</sub>-Spinkopplungstopologien selektiert, ist in Abbildung 19 zu sehen.



Abb. 19. Pulssequenz zur C<sub>4</sub>-Spintopologiefilterung. Als Delays sind  $\tau = 1/(8J)$  und  $\Delta = 1/(2J)$  eingestellt, wobei  $J$  die einheitliche J-Kopplungskonstante ist.  $\phi$  durchläuft zur Vierquantenselektion und  $\theta$  zur Unterdrückung von Axialpeaks einen Phasencyclus [94].

Auf das Gemisch von Vierspinsystemen (Schema 1) angewendet, erhält man das 2D-Spektrum der Abbildung 17 c. Es zeigt eine wirksame Unterdrückung aller anderen Spinsysteme. Es sollte jedoch angemerkt werden, daß wir es hier mit einem nahezu idealen Fall zu tun haben. Häufig ist die Wirkung der Filter nicht so gut, da für ihre Konstruktion von der Gleichheit aller von Null verschiedenen Spinkopplungen ausgegangen wurde. In Wirklichkeit gibt es starke und schwache Kopplungen, die nicht ausschließlich unter topologischen Gesichtspunkten charakterisiert werden können. Häufig nehmen auch die Signalintensitäten während der langen Pulssequenzen aufgrund von Relaxation ab. Dadurch sind dem praktischen Nutzen solcher Experimente Grenzen gesetzt.

### Exklusive Korrelationsspektroskopie

Mehrquantenfilterung unterdrückt nicht nur Diagonal- und Kreuzpeaks in 2D-Spektren, sondern ändert auch das Signalmuster in der Kreuzpeak-Multiplettstruktur. Durch

geeignete Kombination unterschiedlich mehrquantengefilterter 2D-Spektren kann man die Multiplettstruktur vereinfachen, indem die Zahl der Multiplettkomponenten verringert wird. Die exklusive Korrelationsspektroskopie (E. COSY), die von O. W. Sørensen vorgeschlagen wurde, eliminiert alle Multiplettkomponenten aus einem COSY-Spektrum außer denjenigen, die zu Transferpaaren mit einem gemeinsamen Energieniveau gehören<sup>[99–101]</sup>. In der Praxis ist es nicht notwendig, mehrquantengefilterte Spektren im eigentlichen Sinne des Wortes zu kombinieren; es ist vielmehr möglich, die experimentellen Ergebnisse eines Phasencyclus direkt mit geeigneten Gewichtungsfaktoren aufzusummen.

Abbildung 20 zeigt schematisch die Kombination der Kreuzpeakmultipletts von zwei Spins,  $I_1$  und  $I_2$ , in einem Dreispinsystem, die nach Doppelquanten- und Tripelquantenfilterung resultierten. Das verbleibende Muster besteht

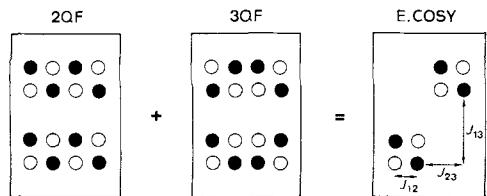


Abb. 20. E. COSY-Experiment zur Vereinfachung der Multiplettstruktur von Kreuzpeaks. Die doppel- und die tripelquantengefilterten Kreuzpeaks zwischen den Spins  $I_1$  und  $I_2$  eines Dreispinsystems werden zum E. COSY-Peakmuster kombiniert. Positive und negative Komponenten sind durch weiße und schwarze Kreise unterschieden.

aus zwei einfachen Quadranten, deren Seitenlänge der für den Kohärenztransfer ursächlichen aktiven  $J_{12}$ -Kopplungskonstante entspricht. Der Verschiebungsvektor, der die beiden Quadrate ineinander überführt, ist durch die beiden passiven Kopplungen  $J_{13}$  und  $J_{23}$  zum dritten (passiven) Spin gegeben. Es sollte erwähnt werden, daß diese Multiplettstruktur mit derjenigen übereinstimmt, die man bei einem COSY-Experiment mit extrem kleinen Flipwinkel des Mischpulses erhält<sup>[102]</sup>.

E. COSY ist immer dann von praktischem Nutzen, wenn die Kreuzpeak-Multiplettstruktur analysiert werden muß, um  $J$ -Kopplungskonstanten zu bestimmen. Dies kann gut per Hand durchgeführt werden, indem die Verschiebung der peripheren Multiplettkomponenten gemessen wird<sup>[101]</sup>, oder aber durch rechnergestützte rekursive Kontraktion<sup>[103]</sup>.

### Heteronukleare zweidimensionale Experimente

Zusätzlich zu den bislang behandelten homonuklearen 2D-Experimenten wurde eine zumindest gleich große Zahl

heteronuklearer Experimente vorgeschlagen und in die Laboratorien eingeführt. Von besonders großer praktischer Bedeutung sind heteronukleare Verschiebungskorrelationspektren, die die chemische Verschiebung direkt gebundener oder voneinander entfernter, aber wechselwirkender Heteroerkerne korrelieren<sup>[104, 105]</sup>. In diesem Zusammenhang sind die Experimente mit inverser Detektion von besonderem Interesse, bei denen Protonen-I-Spinkohärenz in  $t_2$  beobachtet wird, während sich die Spinkohärenz eines wenig empfindlichen S-Kerns geringer natürlicher Häufigkeit in  $t_1$  entwickelt<sup>[104]</sup>. Die leistungsfähigsten Pulssequenzen erzeugen heteronukleare Zweispinkohärenzen, die in  $t_1$  evolvieren und mit der Frequenz-Information der S-Spinkohärenz markiert werden<sup>[106]</sup>. Auch in heteronuklearen Experimenten sind sowohl Relayed-Kohärenztransfer-<sup>[107]</sup> als auch Experimente im rotierenden Koordinatensystem<sup>[107]</sup> wichtig. Spinfiltrierung kann dabei zur Multiplizitätselektion genutzt werden, d. h. zur Unterscheidung von S-Spins, die mit einem, zwei oder drei I-Spins gekoppelt sind<sup>[108]</sup>, oder aber als  $J$ -Filterung zur Unterscheidung von Kopplungen über eine oder mehrere Bindungen<sup>[109]</sup>. Diese Aufzählung heteronuklearer Experimente erhebt in keiner Weise Anspruch auf Vollständigkeit.

### Dreidimensionale Fourier-Transformations-Spektroskopie

Um 3D-NMR-Spektroskopie zu entwickeln, sind keine neuen Prinzipien notwendig. Sie stellt lediglich eine logische Erweiterung der 2D-NMR-Spektroskopie dar. Anstelle eines einzigen Mischprozesses, der zwei Frequenzvariable korreliert, verknüpfen zwei Mischprozesse drei Frequenzen: die Ausgangsfrequenz  $\omega_1$ , die Relay-Frequenz  $\omega_2$  und die detektierte Frequenz  $\omega_3$  (Abb. 21). In diesem Sinne kann ein 3D-Experiment als Kombination zweier 2D-Experimente aufgefaßt werden. Es ist offensichtlich, daß eine sehr große Zahl an 3D-Experimenten erdacht werden kann. Allerdings haben sich bislang nur wenige davon als unentbehrlich erwiesen<sup>[110–118]</sup>.

Zwei Anwendungen des Konzepts der 3D-Spektroskopie haben sich durchgesetzt: 1) 3D-Korrelations- und 2) 3D-Dispersionsspektroskopie (siehe auch Abb. 13). Dreidimensionale Korrelation spielt in homonuklearen Experimenten eine Rolle. Es wurde erwähnt, daß das Zuordnungsverfahren für Biomoleküle ein COSY-artiges und ein NOESY-artiges 2D-Experiment erfordert. Diese beiden 2D-Experimente könnten durch Kombination eines  $J$ -Kopplungs- und eines kreuzrelaxationsvermittelten Transfers in einem 3D-Experiment zusammengefaßt werden. Ein 3D-COSY-NOESY-Spektrum hat den Vorteil, daß das gesamte Zuordnungsverfahren mit einem einzigen homogenen Datensatz

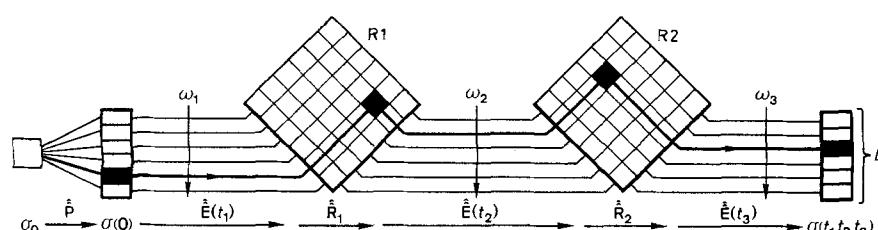


Abb. 21. Schematische Darstellung eines 3D-Experiments in Erweiterung der Abbildungen 1 und 6. Drei Evolutionsperioden mit den Zeitvariablen  $t_1$ ,  $t_2$  und  $t_3$  sind durch zwei Transfer-/Mischprozesse mit den Transfermatrizen  $R_1$  und  $R_2$  getrennt. Ein 3D-Experiment kann als Kontraktion zweier 2D-Experimente angesehen werden.

durchgeführt werden kann<sup>[115, 116]</sup>. Es enthält zudem redundante Informationen, so daß die Zuordnungen überprüft werden können. Um quantitative Informationen zu erhalten, sind 3D-Spektren allerdings weniger geeignet, da alle Peakintensitäten das Produkt zweier schwer zu trennender Transferkoeffizienten sind.

Ein 3D-ROESY-TOCSY-Spektrum des linearen Nona-peptids Buserilin ist in Abbildung 22 wiedergegeben (vgl. auch Abb. 14)<sup>[116]</sup>. Für Buserilin ist eine ROESY- statt einer NOESY-Sequenz notwendig, da es sich um ein Molekül mittlerer Größe handelt, bei dem die NOE-Intensitäten klein sind. Die TOCSY-Sequenz hat den Vorteil, daß man Ketten von Mehrschrittkreuzpeaks erhält, die auch Kerne der Seitenketten erfassen und so die Identifizierung der Aminosäurereste erleichtern.

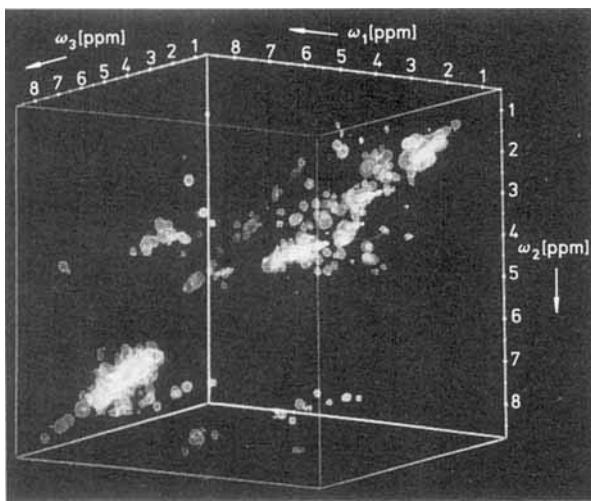


Abb. 22. 3D-Darstellung eines homonuklearen 300 MHz-3D-ROESY-TOCSY-Spektrums von Buserilin in  $[D_6]DMSO$ , abphotographiert von einem Evans-and-Sutherland-Graphikbildschirm [116].

Es sollte erwähnt werden, daß die Aufnahme eines 3D-Spektrums wesentlich mehr Zeit erfordert als die zweier 2D-Spektren, da zwei Zeitparameter,  $t_1$  und  $t_2$ , unabhängig voneinander inkrementiert werden müssen, so daß eine große Zahl von 2D-Experimenten notwendig ist. Damit stellt sich die Frage, wann es die Mühe lohnt, ein 3D-Spektrum aufzunehmen. Mit dieser Frage haben sich bereits mehrere Veröffentlichungen<sup>[116, 119, 120]</sup> beschäftigt.

Wenden wir uns nun einem bestimmten Kreuzpeak in einem 3D-Spektrum zu, der die Kohärenzen  $\{tu\}$  in der  $\omega_1$ -,  $\{rs\}$  in der  $\omega_2$ - und  $\{pq\}$  in der  $\omega_3$ -Dimension korreliert. Seine Intensität wird durch das Produkt (17) aus Matrixele-

$$Z_{\{pq\}\{rs\}\{tu\}} = D_{qp} R_{\{pq\}\{rs\}}^{(2)} R_{\{rs\}\{tu\}}^{(1)} (\hat{\bar{P}} \sigma_0)_{tu} \quad (17)$$

menten in der Eigenbasis des ungestörten Hamilton-Operators  $\mathcal{H}_0$  bestimmt<sup>[116]</sup>. Aus einer Intensität ungleich Null folgt somit eine Zweischrittkorrelation  $\{tu\}\{-rs\}\{-pq\}$ .

Das 3D-Experiment kann mit zwei 2D-Experimenten verglichen werden, die die Mischverfahren  $\hat{\bar{R}}^{(1)}$  bzw.  $\hat{\bar{R}}^{(2)}$  verwenden. Die entsprechenden Intensitäten wären durch (18)

$$Z_{\{rs\}\{tu\}}^{(1)} = D_{sr}^{(1)} R_{\{rs\}\{tu\}}^{(1)} (\hat{\bar{P}} \sigma_0)_{tu} \quad (18)$$

bzw. (19) gegeben. Wenn in den 2D-Spektren die beiden relevanten Peaks mit den Intensität  $Z_{\{rs\}\{tu\}}^{(1)}$  und  $Z_{\{pq\}\{rs\}}^{(2)}$  – möglicherweise in peakreichen Regionen – identifiziert werden können, könnte die Zweischrittkorrelation, die durch einen 3D-Peak repräsentiert wird, auch auf der Grundlage der beiden 2D-Spektren  $\{tu\}\{-rs\}$  und  $\{rs\}\{-pq\}$  festgestellt werden.

$$Z_{\{pq\}\{rs\}}^{(2)} = D_{qp} R_{\{pq\}\{rs\}}^{(2)} (\hat{\bar{P}}^{(2)} \sigma_0)_{rs} \quad (19)$$

Unter der Voraussetzung, daß  $Z_{\{pq\}\{rs\}\{tu\}} \neq 0$  gilt, sind auch die Intensitäten  $Z_{\{rs\}\{tu\}}^{(1)}$  und  $Z_{\{pq\}\{rs\}}^{(2)}$  von Null verschieden, wenn zusätzlich gilt:  $D_{sr}^{(1)} \neq 0$  und  $(\hat{\bar{P}}^{(2)} \sigma_0)_{rs} \neq 0$ . Dies bedeutet, daß der Relayed-Übergang  $\{rs\}$  im Präparationszustand  $P^{(2)}$  angeregt und durch die Observable  $D^{(1)}$  detektierbar sein muß. Für erlaubte Einspin-Einquantenkohärenzen ist diese Bedingung bei Anregung durch einen Einzelpuls und direkter Detektion erfüllt. Dagegen können verbotene Mehrspin-Einquantenkohärenzen und Mehrquantenkohärenzen weder durch einen einzelnen nichtselektiven Puls angeregt, noch können sie direkt detektiert werden. Solche Kohärenzen treten regelmäßig in der  $\omega_2$ -Dimension eines 3D-Experiments auf. Die Anregung und indirekte Detektion dieser Kohärenzen in 2D-Experimenten erfordert besondere Anregungs- und Detektionspulssequenzen.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die beiden grundlegenden 2D-Experimente die gleiche Information über das Spinsystem liefern wie das 3D-Spektrum, wenn 1) die relevanten Frequenzen in der  $\omega_2$ -Dimension des 3D-Spektrums in den 2D-Experimenten angeregt und detektiert werden können und 2) die Kreuzpeaks nicht durch Signalüberlappungen verdeckt sind, sondern in den 2D-Spektren identifiziert werden können. Die erste Bedingung ist im Normalfall leicht zu erfüllen, da die 2D-Experimente bei Bedarf für die Anregung und Detektion verbotener Übergänge modifiziert werden können. Das begrenzte Auflösungsvermögen von 2D-Spektren dagegen ist die wichtigste Rechtfertigung für 3D- und möglicherweise noch höherdimensionale spektroskopische Verfahren.

Da die Verbesserung der Auflösung die 3D-Spektroskopie rechtfertigt, kann es lohnend sein, eine dritte Frequenzachse nur für Auflösungszwecke einzuführen, statt zwei Prozesse zu kombinieren, die für das Zuordnungsverfahren relevant sind, das gleichzeitig eine hohe Auflösung in allen drei Dimensionen erfordert. Es ist dann möglich, das 3D-Auflösungsvermögen willkürlich zu wählen und die Gesamtdauer des 3D-Experiments zu optimieren. Für das Spreizen eines 2D-Spektrums in eine dritte Dimension können homonukleare oder heteronukleare Transfers genutzt werden. Heteronukleare Transfers über eine Bindung sind jedoch bei weitem wirksamer, da die starken heteronuklearen Kopplungen über eine Bindung eine Verteilung auf weitere Spins verhindern. Dies ermöglicht einen wirksamen Transfer nahezu ohne Magnetisierungsverlust. Zudem weisen Kerne wie  $^{13}C$  oder  $^{15}N$  weite Bereiche der chemischen Verschiebung auf, was ein hohes Auflösungsvermögen zur Folge hat. Das Prinzip der Spreizung ist in Abbildung 23 dargestellt.

Ein in die dritte Dimension  $^{15}N$ -gespreiztes TOCSY-Spektrum von Ribonuclease A ist in Abbildung 24 wiedergegeben. Die heteronukleare Spreizung erfordert im allgemeinen isotopenmarkierte Moleküle. In diesem Fall wurde die Ribonuclease A in einem *E. coli*-Medium mit  $^{15}N$ -markier-

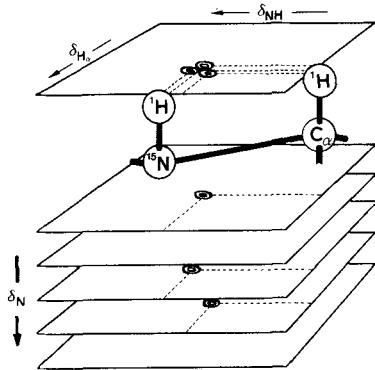


Abb. 23. 3D-Auflösung eines 2D-<sup>1</sup>H-NMR-Spektrums durch Spreizung mit den entsprechenden <sup>15</sup>N-Resonanzen. Die NH-C <sub>$\alpha$</sub> H-Kreuzpeaks werden in eine dritte Dimension gemäß den <sup>15</sup>N-chemischen Verschiebungen verschoben.

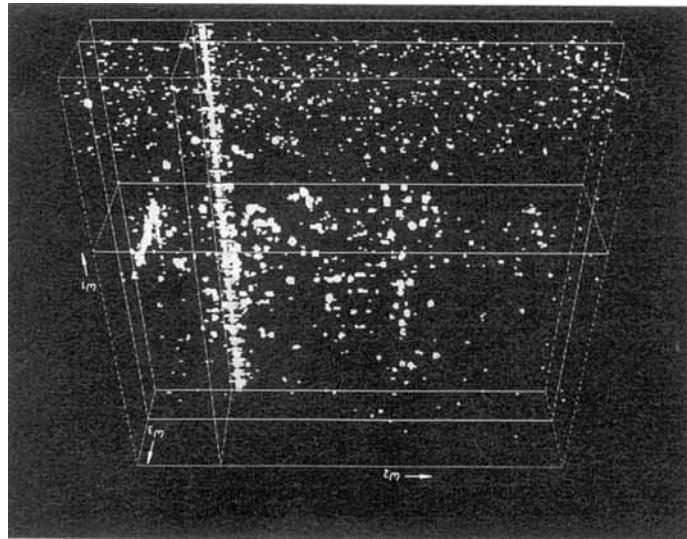


Abb. 24. In einer dritten Dimension <sup>15</sup>N-gespreiztes 600 MHz-<sup>1</sup>H-TOCSY-Spektrum von <sup>15</sup>N-markierter Ribonuclease A in Wasser. Das 3D-Spektrum zeigt die <sup>15</sup>N-Resonanzen entlang der  $\omega_2$ -Achse. Das Spektrum wurde von C. Griesinger mit der Pulssequenz von Abbildung 25 aufgenommen und von S. Boentges prozessiert. Die Probe wurde von Professor S. Benner (ETH Zürich) zur Verfügung gestellt.

ten Nährstoffen hergestellt. Das Spektrum wurde mit der in Abbildung 25 gezeigten Pulssequenz aufgenommen. Zunächst wird Protonenkohärenz angeregt, die während  $t_1$  präzidiert, wobei der in dieser Zeit angewendete  $\pi$ -Puls zur <sup>15</sup>N-

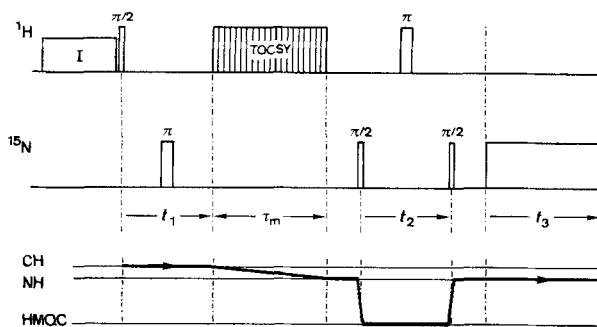
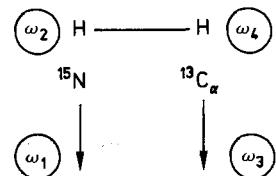


Abb. 25. Pulssequenz zur Aufnahme eines dreidimensional <sup>15</sup>N-gespreizten TOCSY-Spektrums. Nach Sättigung der Wassersresonanz (I) werden die Protonenresonanzen angeregt und präzidiert während  $t_1$ . Nach homonuklearem TOCSY-Transfer von den CH- zu den NH-Protonen wird die Kohärenz in heteronukleare Mehrquantenkohärenz (HMQC) umgewandelt, die sich während  $t_2$  entwickelt und mit den <sup>15</sup>N-chemischen Verschiebungen markiert wird. Nach Rückumwandlung in Protonenkohärenz werden die NH-Resonanzen während  $t_3$  unter <sup>15</sup>N-Entkopplung detektiert.

Refokussierung dient. Während der Mischzeit  $\tau_m$  erfolgt mit einer TOCSY-Multipulssequenz der Kohärenztransfer im rotierenden Koordinatensystem zu den NH-Protonen. Die NH-Kohärenz wird dann in <sup>15</sup>NH-heteronukleare Mehrquantenkohärenz (HMQC) überführt, die während  $t_2$  präzidiert und (unter Protonenrefokussierung) mit den <sup>15</sup>N-Resonanzinformation versehen wird. Nach Rückführung in NH-Kohärenz erfolgt Detektion während  $t_3$  unter <sup>15</sup>N-Entkopplung. Um die Protonenresonanzsignale vollständig zuordnen, ist zusätzlich ein <sup>15</sup>N-gepräzites NOESY-Spektrum notwendig.

Der Schritt hin zur 4D-Spektroskopie<sup>[121]</sup> ist ein kleiner und logischer Schritt: in 2D-Experimenten sind Spins paarweise korreliert, z.B. NH- und C <sub>$\alpha$</sub> H-Protonen. Dreidimensionale Dispersion verwendet entweder die <sup>15</sup>N- oder die <sup>13</sup>C <sub>$\alpha$</sub> -Resonanz, um die NH- bzw. C <sub>$\alpha$</sub> H-Resonanzsignale auseinanderzuziehen. In einem 4D-Experiment werden beide Spreizungen gleichzeitig angewendet (Schema 2).



Schema 2. Doppelte Spreizung in 4D-Experimenten.

Die Reihenfolge der Frequenzen im konkreten Experiment ist eine Frage der Zweckmäßigkeit. Normalerweise wird als Detektionsfrequenz  $\omega_4$  aus Gründen der Empfindlichkeit eine Protonenresonanzfrequenz gewählt. In den meisten Fällen werden die beiden Spreizungsdimensionen nur durch wenige Abtastwerte repräsentiert, um die Dauer des Experiments zu begrenzen, gerade so, daß die im 2D-Spektrum übereinander gelagerten Signale getrennt werden. Häufig sind 8 bis 32 Punkte in jeder der beiden Dimensionen ausreichend.

## NMR-Untersuchungen der Moleküldynamik

Molekülstrukturen, die durch NMR-Spektroskopie in Lösung oder durch Röntgenbeugung an Einkristallen bestimmt wurden, sind zwangsläufig über die Molekülbewegung gemittelte Strukturen, wobei der Mittelwert in starkem Maße von der Meßtechnik abhängt. Die Interpretation experimentell bestimmter Strukturen ist ohne gewisse Kenntnisse der Bewegungseigenschaften des Moleküls nicht möglich. Die Moleküldynamik ist aber auch an sich bedeutsam, insbesondere um Reaktionen und Wechselwirkungen mit anderen Molekülen zu verstehen. Beispielsweise sind in vielen Fällen aktive Bindungsstellen in Molekültaschen nur dank der Flexibilität des Moleküls selbst zugänglich.

Die Charakterisierung der Bewegungseigenschaften eines Moleküls ist um Größenordnungen schwieriger als die Beschreibung einer gemittelten Molekülstruktur. Während  $3N - 6$  Koordinaten ausreichen, um eine Struktur mit  $N$  Atomen darzustellen, erfordert die Charakterisierung der Moleküldynamik  $3N - 6$  Varianzen der intramolekularen Koordinaten,  $(3N - 6)(3N - 5)/2$  Kovarianzen und jeweils

die gleiche Anzahl von Auto- bzw. Kreuzkorrelationsfunktionen. Zusätzlich werden auch Korrelationsfunktionen höherer Ordnung für eine genauere Beschreibung der Dynamik benötigt. In der Praxis steht nie eine ausreichende Zahl an Observablen für die vollständige Beschreibung der Molekül-dynamik zur Verfügung.

Es gibt eine Reihe von Techniken, um Daten über dynamische Prozesse zu erhalten: Debye-Waller-Faktoren in der Röntgenbeugung geben Hinweise auf die Varianzen der Kernkoordinaten, jedoch ohne ein Maß für die Zeitskala zu liefern. Inelastische und quasielastische Neutronenstreuung liefern Korrelationsfunktionen, jedoch ohne Beziehung zur Struktur. Fluoreszenzdepolarisation ermöglicht die Bestimmung der Bewegungskorrelationsfunktion von fluoreszierenden Gruppen wie Tyrosinresten in Proteinen. Ultraschallabsorption liefert Informationen über die Frequenzen der dominanten Bewegungsmoden, wiederum ohne Bezug zur Struktur.

Die NMR-Spektroskopie lässt sich universeller auf Untersuchungen dynamischer Prozesse anwenden als die meisten anderen Techniken. Der Bereich der Korrelationszeiten  $\tau_c$ , die durch die verschiedenen NMR-Methoden abgedeckt werden, ist gewaltig; er reicht von Picosekunden bis zu Sekunden und mehr (Schema 3).

$1 \text{ s} < \tau_c$	Echtzeitmessung nach anfänglicher Störung
$10 \text{ ms} < \tau_c < 10 \text{ s}$	2D-Austauschspektroskopie (EXSY)
$100 \mu\text{s} < \tau_c < 1 \text{ s}$	Linienformanalyse, Austauschverbreiterung und -verschmälerung
$1 \mu\text{s} < \tau_c < 10 \text{ ms}$	$T_{1\varphi}$ -Relaxationszeitmessungen im rotierenden Koordinatensystem
$30 \text{ ps} < \tau_c < 1 \mu\text{s}$	$T_1$ -Relaxationszeitmessungen im Laborkoordinatensystem
$\tau_c < 100 \text{ ps}$	gemittelte Parameterwerte

Schema 3. NMR-Methoden zur Bestimmung unterschiedlich langer Korrelationszeiten  $\tau_c$ .

Außer bei langsam bewegten mit einer Zeitskala von Millisekunden oder mehr, bei denen Linienverbreiterungs-, Sättigungstransfer- und 2D-Austauschuntersuchungen durchgeführt werden, beruhen viele NMR-Untersuchungen der Dynamik auf Relaxationszeitmessungen. Die verschiedenen Relaxationsparameter, z.B. die longitudinale Relaxationszeit  $T_1$ , die transversale Relaxationszeit  $T_2$ , die Relaxationszeit im rotierenden Koordinatensystem  $T_{1\varphi}$  und die Kreuzrelaxations-Geschwindigkeitskonstanten  $\Gamma_{kl}$  sind von der Korrelationszeit  $\tau_c$  des zugrundeliegenden Prozesses abhängig.

Die folgende Diskussion beschränkt sich auf eine neuere Untersuchung der intramolekularen Dynamik in Antamanid 1<sup>[183, 122, 123]</sup> (siehe Abb. 8, 9, 11). Antamanid ist ein Gengengift gegen die toxischen Bestandteile des Pilzes *Amanita phalloides* und erstaunlicherweise zugleich auch ein Bestandteil dieses Pilzes. Frühe Ultraschallabsorptionsuntersuchungen<sup>[124]</sup> wiesen darauf hin, daß der Peptidring eine Konformationsänderung mit einer Frequenz von etwa 1 MHz eingeht. Des weiteren wurde im Rahmen von ausgedehnten Untersuchungen an 1 durch die Forschungsgruppe von Professor Horst Kessler festgestellt<sup>[125]</sup>, daß die aus NMR-Messungen abgeleiteten Abstandsbedingungen nicht durch eine einzige Konformation erfüllt werden können. Martin Blackledge führte in unserem Laboratorium Relaxationszeitmes-

sungen im rotierenden Koordinatensystem durch und lokalisierte einen Austausch von Wasserstoffbrückenbindungen mit einer Aktivierungsenergie von etwa  $20 \text{ kJ mol}^{-1}$  und einer Lebensdauer bei Raumtemperatur von  $25 \mu\text{s}$  (unveröffentlichte Ergebnisse, siehe auch Lit.<sup>[126]</sup>). Mit einem neuen Verfahren zur Bestimmung dynamischer Strukturen, MEDUSA genannt<sup>[123]</sup>, wurde der Konformationsraum von Antamanid 1 systematischer denn je zuvor untersucht. Es wurden 1176 mögliche Strukturen niedriger Energie gefunden. Diese wurden mit dem Ziel zu Paaren kombiniert, alle experimentellen Bedingungen zu erfüllen, nämlich NOE-Abstandsbedingungen, Diederwinkelbedingungen aus  $J$ -Kopplungskonstanten und spezifische Informationen über die Dynamik von Wasserstoffbrückenbindungen. Dabei wurde eine große Zahl möglicher Strukturpaare erhalten. Alle Paare sind innerhalb der experimentellen Genauigkeit mit den Daten zu vereinbaren. Um das dynamische System von Antamanid 1 noch genauer beschreiben zu können, sind zusätzliche und präzisere Daten erforderlich. Abbildung 26 zeigt als Beispiel das Strukturpaar, das bislang den experimentellen Daten am besten entspricht. Die beiden Strukturen unterscheiden sich hauptsächlich in den Wasserstoffbrückenbindungen Val<sup>1</sup>NH-Phe<sup>9</sup>O und Phe<sup>6</sup>NH-Ala<sup>4</sup>O, die

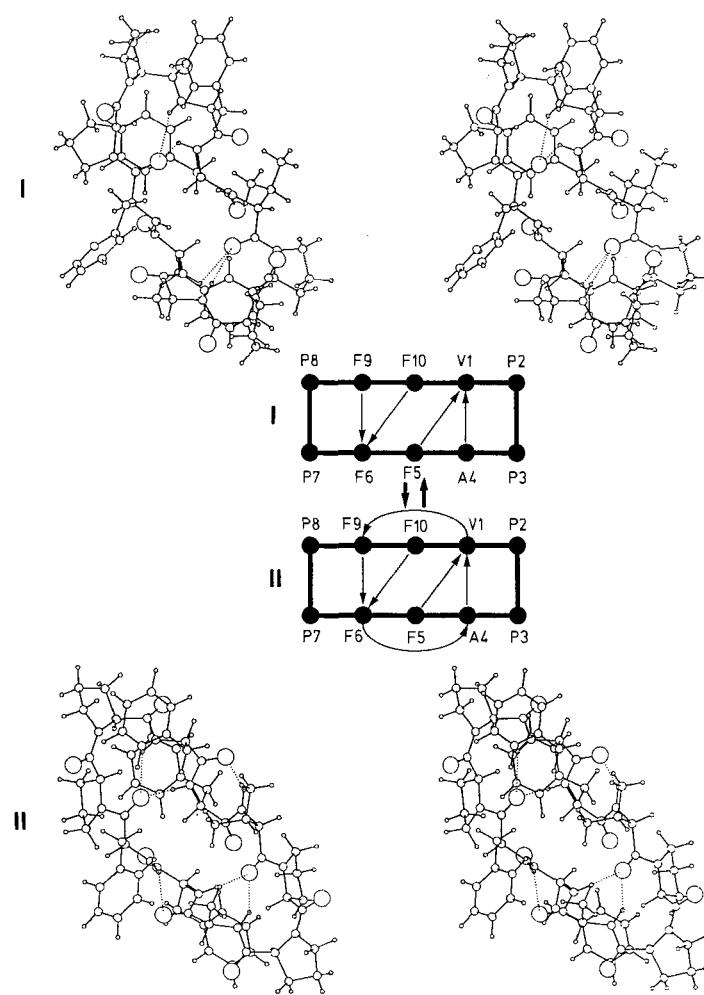


Abb. 26. Konformerenpaar von Antamanid 1, das in Einklang mit den experimentellen Ergebnissen ist. Die beiden Paare sind als Stereostrichbilder gezeigt. In der ersten Darstellung werden die Wasserstoffbrückenbindungen durch gestrichelte Linien angedeutet, in der zweiten durch Pfeile, die auf die an den Wasserstoffbrückenbeteiligten Sauerstoffatome weisen. Die Bindungen, um welche die Torsionswinkel  $\varphi_5$  (unten) und  $\varphi_{10}$  (oben) drehen, sind verdickt gezeichnet. (Aus [123].)

nur in einer der beiden Konformationen (**II**) auftreten, sowie in den Torsionswinkeln  $\phi_5$  und  $\phi_{10}$ .

Eine zweite Untersuchung konzentrierte sich auf die Ringdynamik der vier Prolinreste in Antamanid **1**<sup>[122]</sup>. Die Konformationen dieser Fünfringsysteme können aus den Diederwinkeln  $\chi_1$ ,  $\chi_2$  und  $\chi_3$  bestimmt werden, die wiederum aus den J-Kopplungskonstanten vicinaler Protonen mit Hilfe der Karplus-Beziehung<sup>[54]</sup> zugänglich sind. Die notwendigen Kopplungskonstanten (21 für jeden Aminosäurerest) wurden aus E. COSY-Spektren entnommen. Auf der Grundlage dieser Daten wurde durch Least-squares-Anpassung ein Modell für jeden Prolinrest entwickelt. Dabei konnte man für Pro<sup>3</sup> und Pro<sup>8</sup> eine gute Übereinstimmung mit einer einzigen starren Konformation erreichen, während für Pro<sup>2</sup> und Pro<sup>7</sup> zwei rasch austauschende Konformationen nötig waren, um den Anpassungsfehler auf einen akzeptablen Wert zu reduzieren. Messungen der <sup>13</sup>C-Relaxationszeiten bestätigten, daß Pro<sup>3</sup> und Pro<sup>8</sup> starr sind, während Pro<sup>2</sup> und Pro<sup>7</sup> ein dynamisches Verhalten mit Korrelationszeiten zwischen 30 und 40 ps aufweisen. Dies bedeutet, daß die Dynamik des Peptidrings und diejenige der Prolinringe nicht dynamisch korreliert sind und auf völlig unterschiedlichen Zeitskalen ablaufen. Die beiden für Pro<sup>2</sup> gefundenen austauschenden Konformationen sind in Abbildung 27 wiedergegeben. Man

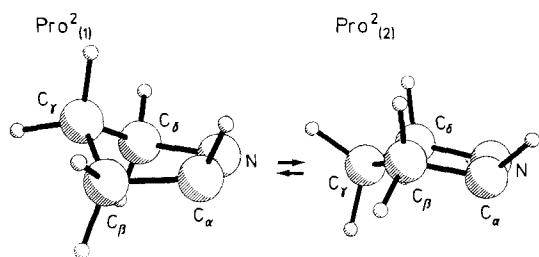


Abb. 27. Die beiden experimentell ermittelten Konformationen des Aminosäurerestes Pro<sup>2</sup> in Antamanid **1** (siehe [122]).

sieht, daß die Konformationsumwandlung einer Bewegung der „Briefumschlagklappe“ (C<sub>γ</sub>) nach oben oder unten entspricht.

### Medizinische Bildgebung auf der Grundlage der Kernresonanz-Fourier-Transformations-Spektroskopie

Das Verfahren des „magnetic resonance imaging“ (MRI) hat die medizinische Diagnostik enorm beeinflußt und sich rasch zu einer leistungsfähigen Routinemethode entwickelt. Die grundlegende Technik zur Aufnahme des zweidimensionalen Bildes eines Objekts ist auf Paul Lauterbur zurückzuführen<sup>[127]</sup>. Ein Magnetfeldgradient, der in einer Serie von Experimenten entlang unterschiedlicher Raumrichtungen angewendet wird, erzeugt Projektionen der Kernspinintensität des Objekts auf die Richtung des Gradienten. Aus einer genügend großen Zahl solcher Projektionen läßt sich ein Bild des Objekts rekonstruieren, z.B. durch gefilterte Rückwärtsprojektion in Analogie zur Röntgenographie.

Ein anderer Ansatz ist eng mit der 2D- und 3D-FT-Spektroskopie verwandt. Man erreicht dabei die Frequenzkode-

zung der drei Dimensionen des Raumes durch lineare Magnetfeldgradienten, die in einem Puls-FT-Experiment nacheinander entlang dreier orthogonaler Richtungen für die Zeiten  $t_1$ ,  $t_2$  bzw.  $t_3$  angewendet werden<sup>[128]</sup>. In vollständiger Analogie zur 3D-Spektroskopie werden die Zeitparameter  $t_1$  und  $t_2$  von Experiment zu Experiment um einen konstanten Betrag inkrementiert. Das aufgezeichnete Signal  $s(t_1, t_2, t_3)$  wird in drei Dimensionen Fourier-transformiert, und man erhält eine Funktion  $S(\omega_1, \omega_2, \omega_3)$ , die einem räumlichen dreidimensionalen Bild entspricht, wenn man die räumliche Information mit Hilfe der Bedingungen  $x = \omega_1/g_x$ ,  $y = \omega_2/g_y$ ,  $z = \omega_3/g_z$  ( $g_x$ ,  $g_y$  und  $g_z$  sind die Feldgradienten) dekodiert. Abbildung 28 veranschaulicht das Verfahren für zwei Dimensionen.

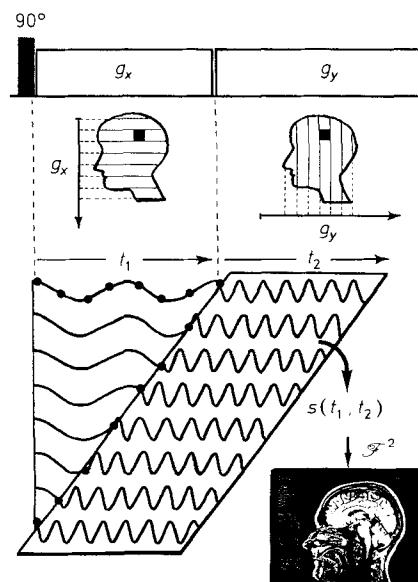


Abb. 28. Schematische Darstellung des MRI-Fourier-Verfahrens an einem zweidimensionalen Beispiel. Zwei orthogonale Gradienten ( $g_x$ ,  $g_y$ ) wirken während  $t_1$  bzw.  $t_2$  eines 2D-Experiments. Die 2D-Fourier-Transformation des Datensatzes  $s(t_1, t_2)$  erzeugt ein 2D-Bild des Untersuchungsobjekts (R.R. Ernst).

In einer weiter verfeinerten Version, die von Edelstein et al. vorgeschlagen wurde<sup>[129]</sup>, ersetzt man die Zeitvariablen  $t_1$  und  $t_2$  durch variable Feldgradienten  $g_x$  und  $g_y$ , die während einer konstanten Evolutionszeit angewendet werden. Für die akkumulierte Phase [Gl. (20)] ist es unwe-

$$\gamma = x \cdot g_x \cdot t_1 + y \cdot g_y \cdot t_2 + z \cdot g_z \cdot t_3 \quad (20)$$

lich, ob die Evolutionszeit oder die Feldgradienten variiert werden. Eine konstante Zeit  $t_k$  schaltet jedoch unerwünschte Relaxationseffekte aus.

In medizinischen Bildgebungsverfahren haben 3D-Experimente eine natürliche Rechtfertigung, obwohl es manchmal einfacher ist, mit selektiven Anregungstechniken einen 2D-Schnitt durch das zu untersuchende Objekt auszuwählen<sup>[130]</sup>. Sogar eine Ausweitung auf noch höhere Dimensionen ist recht realistisch. In einer vierten Dimension könnten z.B. Informationen über die chemische Verschiebung untergebracht werden<sup>[131]</sup>. Des Weiteren könnten auch Informationen aus der 2D-Spektroskopie mit den drei Raumrichtungen kombiniert werden, was zu einem 5D-Experiment führte. Der menschlichen Vorstellungskraft scheinen hier

keine Grenzen gesetzt zu sein. Die praktischen Grenzen werden jedoch schnell erreicht, wenn die notwendige Meßzeit berücksichtigt wird.

## Schlußbemerkungen

Ich kenne kein anderes Gebiet der Wissenschaften außerhalb der magnetischen Resonanz, das kreativen Forschern soviel Freiheit und so viele Möglichkeiten bietet, neue Experimente zu entwickeln und zu erproben, die für eine solche Vielzahl von Disziplinen nützlich sein können. Die NMR-Spektroskopie ist intellektuell attraktiv, weil die beobachteten Phänomene auf der Grundlage einer soliden Theorie erklärt werden und fast alle Einfälle mit einfachen Experimenten getestet werden können. Zugleich ist die praktische Bedeutung der NMR-Technik außergewöhnlich groß und kann viele der spielerischen Aktivitäten eines Spektroskopikers rechtfertigen.

*Mein Dank für viele Anregungen gilt vor allem meinen Lehrern Hans Primas und Hans H. Günthard, meinem Betreuer Weston A. Anderson und meinem Inspirator Jean Jeener sowie meinen Mitarbeitern (in etwa chronologischer Reihenfolge genannt): Thomas Baumann, Enrico Bartholdi, Robert Morgan, Stefan Schäuble, Anil Kumar, Dieter Welti, Luciano Müller, Alexander Wokaun, Walter P. Aue, Jiri Karhan, Peter Bachmann, Geoffrey Bodenhausen, Peter Brunner, Alfred Höhener, Andrew A. Maudsley, Kuniaki Nagayama, Max Linder, Michael Reinhold, Ronald Haberkorn, Thierry Schaffhauser, Douglas Burum, Federico Graf, Yongren Huang, Slobodan Macura, Beat H. Meier, Dieter Suter, Pablo Caravatti, Ole W. Sørensen, Lukas Braunschweiler, Malcolm H. Levitt, Rolf Meyer, Mark Rance, Arthur Schweiger, Michael H. Frey, Beat U. Meier, Marcel Müri, Christopher Councill, Herbert Kogler, Roland Kreis, Norbert Müller, Annalisa Pastore, Christian Schönenberger, Walter Studer, Christian Radloff, Albert Thomas, Rafael Brüschiweiler, Herman Cho, Claudio Gemperle, Christian Griesinger, Zoltan L. Mádi, Peter Meier, Serge Boentges, Marc McCoy, Armin Stöckli, Gabriele Aebli, Martin Blackledge, Jacques Briand, Matthias Ernst, Tilo Levante, Pierre Robyr, Thomas Schulte-Herbrüggen, Jürgen Schmidt und Scott Smith. Ebenfalls danken möchte ich meinen technischen Mitarbeitern Hansruedi Hager, Alexandra Frei, Janos A. Deli, Jean-Pierre Michot, Robert Ritz, Thomas Schneider, Markus Hintermann, Gerhard Gucher, Josef Eisenerger, Walter Lämmli und Martin Neukomm, meiner Sekretärin Irène Müller sowie einigen Forschungsgruppen, mit denen ich zusammenarbeiten durfte. Dies sind zuallererst die Gruppe um Kurt Wüthrich und die Gruppe um Horst Kessler. Die beschriebenen Arbeiten wurden in den ersten Jahren vor allem von der Firma Varian Associates und in jüngerer Zeit von der ETH-Zürich, dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung, der Kommission zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung und nicht zuletzt der Firma Spectrospin AG unterstützt, denen ich hiermit ebenfalls danke.*

Eingegangen am 30. Januar 1992 [A 868]  
Übersetzt von Dipl.-Chem. Harald Schwalbe, Steinbach

- [1] I. I. Rabi, *Phys. Rev.* **1937**, *51*, 652.
- [2] I. I. Rabi, J. R. Zacharias, S. Millman, P. Kusch, *Phys. Rev.* **1938**, *53*, 318; I. I. Rabi, S. Millman, P. Kusch, J. R. Zacharias, *ibid.* **1939**, *55*, 526.
- [3] J. M. B. Kellogg, I. I. Rabi, N. F. Ramsey, J. R. Zacharias, *Phys. Rev.* **1939**, *55*, 318; *ibid.* **1939**, *56*, 728; *ibid.* **1940**, *57*, 677.

- [4] E. M. Purcell, H. G. Torrey, R. V. Pound, *Phys. Rev.* **1946**, *69*, 37.
- [5] F. Bloch, W. Hansen, M. E. Packard, *Phys. Rev.* **1946**, *69*, 127.
- [6] F. Bloch, *Phys. Rev.* **1946**, *70*, 460.
- [7] J. Brossel, A. Kastler, C. R. Hebdo. Séances Acad. Sci. **1949**, *229*, 1213; A. Kastler, *J. Phys. Radium* **1950**, *11*, 255.
- [8] R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *Principles of NMR in One and Two Dimensions*, Clarendon Press, Oxford, 1987.
- [9] A. Bax, *Two-Dimensional NMR in Liquids*, Delft University Press, Reidel, Dordrecht, 1982.
- [10] Attur-ur-Rahman, *Nuclear Magnetic Resonance, Basic Principles*, Springer, New York, 1986.
- [11] N. Chandrasekhar, S. Subramanian, *Modern Techniques in High-Resolution FT-NMR*, Springer, New York, 1987.
- [12] H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, VCH, Weinheim, 1988; *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*, VCH, Weinheim, 1991.
- [13] G. E. Martin, A. S. Zektzer, *Two-Dimensional NMR Methods for Establishing Molecular Connectivity*, VCH, Weinheim, 1988.
- [14] J. Schraml, J. M. Bellama, *Two-Dimensional NMR Spectroscopy*, Wiley Interscience, New York, 1988.
- [15] *Pulse Methods in 1D and 2D Liquid-Phase NMR* (Hrsg.: W. S. Brey), Academic Press, New York, 1988.
- [16] A. A. Michelson, *Philos. Mag. Ser. 5* **1981**, *31*, 256; A. A. Michelson, *Light Waves and Their Uses*, University of Chicago Press, Chicago, 1902.
- [17] P. Fellgett, Dissertation, Cambridge University, 1951; P. Fellgett, *J. Phys. Radium* **1958**, *19*, 187.
- [18] *Varian Associates Magazine* **1979**, *24*, (7), 11; *IEEE Center for the History of Electrical Engineering Newsletter* **1990**, (24), 2.
- [19] R. R. Ernst, W. A. Anderson, *Rev. Sci. Instrum.* **1966**, *37*, 93.
- [20] R. R. Ernst, *Adv. Magn. Reson.* **1966**, *2*, 1.
- [21] W. A. Anderson, R. R. Ernst, US-A 3475680 (Impulse Resonance Spectrometer Including a Time Averaging Computer and a Fourier Analyzer), 1969 (eingereicht am 26. Mai 1965).
- [22] R. R. Ernst in *The Applications of Computer Techniques in Chemical Research*, The Institute of Petroleum, London, 1972, S. 61.
- [23] O. W. Sørensen, G. W. Eich, M. H. Levitt, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1983**, *16*, 163.
- [24] J. B. J. Fourier, *Theorie analytique de la chaleur*, Firmin Didot, Père et fils, Paris, 1822.
- [25] I. J. Lowe, R. E. Norberg, *Phys. Rev.* **1957**, *107*, 46.
- [26] N. Wiener, *Mass. Inst. Technol. Res. Lab. Radiation Rep.* **1942** (V) 16 S; *Nonlinear Problems in Random Theory*, Wiley, New York, 1958.
- [27] R. H. Varian, US-A 3287629 (Gyromagnetic Resonance Methods and Apparatus), 1966 (eingereicht am 29. August 1956).
- [28] H. Primas, *Helv. Phys. Acta* **1961**, *34*, 36.
- [29] R. R. Ernst, H. Primas, *Helv. Phys. Acta* **1963**, *36*, 583.
- [30] R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1966**, *45*, 3845.
- [31] R. R. Ernst, *Mol. Phys.* **1969**, *16*, 241.
- [32] R. Kaiser, *J. Magn. Reson.* **1970**, *3*, 28.
- [33] R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1970**, *3*, 10; D. Ziessow, B. Blümich, *Bunsenges. Phys. Chem.* **1974**, *78*, 1169.
- [34] B. Blümich, D. Ziessow, *J. Chem. Phys.* **1983**, *78*, 1059.
- [35] B. Blümich, *Bull. Magn. Reson.* **1985**, *7*, 5.
- [36] J. Dadok, R. F. Sprecher, *J. Magn. Reson.* **1974**, *13*, 243.
- [37] R. K. Gupta, J. A. Ferretti, E. D. Becker, *J. Magn. Reson.* **1974**, *13*, 275.
- [38] J. A. Ferretti, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1976**, *65*, 4283.
- [39] B. L. Tomlinson, H. D. W. Hill, *J. Chem. Phys.* **1973**, *59*, 1775.
- [40] M. H. Levitt, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1986**, *18*, 61.
- [41] R. L. Vold, J. S. Waugh, M. P. Klein, D. E. Phelps, *J. Chem. Phys.* **1968**, *48*, 3831.
- [42] R. Freeman, H. D. W. Hill in *Dynamic NMR Spectroscopy* (Hrsg.: L. M. Jackman, F. A. Cotton), Academic Press, New York, 1975, S. 131.
- [43] S. Forsén, R. A. Hoffman, *J. Chem. Phys.* **1963**, *39*, 2892.
- [44] H. C. Torrey, *Phys. Rev.* **1949**, *75*, 1326; *ibid.* **1949**, *76*, 1059.
- [45] E. L. Hahn, *Phys. Rev.* **1949**, *76*, 145.
- [46] E. L. Hahn, *Phys. Rev.* **1950**, *80*, 297.
- [47] E. L. Hahn, *Phys. Rev.* **1950**, *80*, 580.
- [48] M. Emshwiller, E. L. Hahn, D. Kaplan, *Phys. Rev.* **1960**, *118*, 414.
- [49] S. R. Hartmann, E. L. Hahn, *Phys. Rev.* **1962**, *128*, 2042.
- [50] M. B. Comisarow, A. G. Marshall, *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *25*, 282; *ibid.* **1974**, *26*, 489.
- [51] J. C. McGurk, H. Mäder, R. T. Hofmann, T. G. Schmalz, W. H. Flygare, *J. Chem. Phys.* **1974**, *61*, 3759.
- [52] Siehe beispielsweise M. K. Bowman in *Modern Pulsed and Continuous-Wave Electron Spin Resonance* (Hrsg.: L. Kavan, M. K. Bowman), Wiley, New York, 1990, S. 1.
- [53] M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11.
- [54] J. H. Noggle, R. E. Schirmer, *The Nuclear Overhauser Effect*, Academic Press, New York, 1971.
- [55] K. Wüthrich, *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley Interscience, New York, 1986.
- [56] S. Yatsiv, *Phys. Rev.* **1952**, *113*, 1522.
- [57] W. A. Anderson, R. Freeman, *J. Chem. Phys.* **1962**, *37*, 85.
- [58] R. Freeman, W. A. Anderson, *J. Chem. Phys.* **1962**, *37*, 2053.

- [60] R. A. Hoffman, S. Forsén, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1966**, *1*, 15.
- [61] J. Jeener, *Ampère International Summer School* (Basko Polje, Jugoslawien) **1971**, unveröffentlicht.
- [62] R. R. Ernst, *VIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems* (Kandersteg, Schweiz) **1974**, unveröffentlicht.
- [63] W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229.
- [64] J. Jeener, B. H. Meier, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1979**, *71*, 4546.
- [65] B. H. Meier, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 6641.
- [66] S. Macura, R. R. Ernst, *Mol. Phys.* **1980**, *41*, 95.
- [67] Anil Kumar, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *95*, 1.
- [68] M. P. Williamson, T. F. Havel, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1985**, *182*, 295.
- [69] A. D. Kline, W. Braun, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1986**, *189*, 377.
- [70] B. A. Messerle, A. Schäffer, M. Vasák, J. H. R. Kägi, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1990**, *214*, 765.
- [71] G. Otting, Y. Q. Qian, M. Billeter, M. Müller, M. Affolter, W. J. Gehring, K. Wüthrich, *EMBO J.* **1990**, *9*, 3085.
- [72] T. F. Haveland, K. Wüthrich, *Bull. Math. Biol.* **1984**, *46*, 673.
- [73] W. Braun, N. Göö, *J. Mol. Biol.* **1985**, *186*, 611.
- [74] R. Kaptein, E. R. P. Zuiderweg, R. M. Scheek, R. Boelens, W. F. van Gunsteren, *J. Mol. Biol.* **1985**, *182*, 179.
- [75] G. M. Clore, A. M. Gronenborn, A. T. Brünger, M. Karplus, *J. Mol. Biol.* **1985**, *186*, 435.
- [76] Y. Huang, S. Macura, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5327.
- [77] G. W. Eich, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 3731.
- [78] P. H. Bolton, G. Bodenhausen, *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *89*, 139.
- [79] Die Spektren wurden von C. Griesinger aufgenommen; siehe R. R. Ernst, *Chimia* **1987**, *41*, 323.
- [80] L. Braunschweiler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1983**, *53*, 521.
- [81] D. G. Davis, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2821.
- [82] A. A. Bothner-By, R. L. Stephens, J. Lee, C. O. Warren, R. W. Jeanloz, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 811.
- [83] R. Brüschweiler, B. Roux, M. Blackledge, C. Griesinger, M. Karplus, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2289.
- [84] C. Griesinger, G. Otting, K. Wüthrich, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7870.
- [85] J. Briand, R. R. Ernst, *Chem. Phys. Lett.* **1991**, *185*, 276.
- [86] S. Vega, T. W. Shattuck, A. Pines, *Phys. Rev. Lett.* **1976**, *37*, 43.
- [87] S. Vega, A. Pines, *J. Chem. Phys.* **1977**, *66*, 5624.
- [88] A. Wokaun, R. R. Ernst, *Mol. Phys.* **1978**, *36*, 317.
- [89] L. Braunschweiler, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *Mol. Phys.* **1983**, *48*, 535.
- [90] A. Bax, R. Freeman, S. P. Kempsell, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 4849.
- [91] A. Bax, R. Freeman, S. P. Kempsell, *J. Magn. Reson.* **1980**, *41*, 349.
- [92] U. Piantini, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6800.
- [93] N. Müller, G. Bodenhausen, K. Wüthrich, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1985**, *65*, 531.
- [94] C. Radloff, R. R. Ernst, *Mol. Phys.* **1989**, *66*, 161.
- [95] A. Wokaun, R. R. Ernst, *Chem. Phys. Lett.* **1977**, *52*, 407.
- [96] G. Bodenhausen, H. Kogler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1984**, *58*, 370.
- [97] M. H. Levitt, R. R. Ernst, *Chem. Phys. Lett.* **1983**, *100*, 119.
- [98] M. H. Levitt, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1985**, *83*, 3297.
- [99] C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 6394.
- [100] C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1986**, *85*, 6837.
- [101] C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1987**, *75*, 474.
- [102] A. Bax, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **1981**, *44*, 542.
- [103] B. U. Meier, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1988**, *79*, 540.
- [104] A. A. Maudsley, R. R. Ernst, *Chem. Phys. Lett.* **1977**, *50*, 368.
- [105] G. Bodenhausen, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **1977**, *28*, 471.
- [106] L. Müller, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4481.
- [107] M. Ernst, C. Griesinger, R. R. Ernst, W. Bermel, *Mol. Phys.* **1991**, *74*, 219.
- [108] M. H. Levitt, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *Chem. Phys. Lett.* **1983**, *94*, 540.
- [109] H. Kogler, O. W. Sørensen, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1983**, *55*, 157.
- [110] H. D. Plant, T. H. Mareci, M. D. Cockman, W. S. Brey, *27th Experimental NMR Conference* (Baltimore, MA, USA), **1986**.
- [111] G. W. Vuister, R. Boelens, *J. Magn. Reson.* **1987**, *73*, 328.
- [112] C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1987**, *73*, 574.
- [113] C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7227.
- [114] H. Oschkinat, C. Griesinger, P. Kraulis, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Nature* **1988**, *332*, 374.
- [115] G. W. Vuister, R. Boelens, R. Kaptein, *J. Magn. Reson.* **1988**, *80*, 176.
- [116] C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1989**, *84*, 14.
- [117] E. R. P. Zuiderweg, S. W. Fesik, *Biochemistry* **1989**, *28*, 2387.
- [118] D. Marion, P. C. Driscoll, L. E. Kay, P. T. Wingfield, A. Bax, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Biochemistry* **1989**, *28*, 6150.
- [119] S. Boentges, B. U. Meier, C. Griesinger, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1989**, *85*, 337.
- [120] O. W. Sørensen, *J. Magn. Reson.* **1990**, *89*, 210.
- [121] L. E. Kay, G. M. Clore, A. Bax, A. M. Gronenborn, *Science* **1990**, *249*, 411.
- [122] Z. L. Mádi, C. Griesinger, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2908.
- [123] R. Brüschweiler, M. Blackledge, R. R. Ernst, *J. Biomol. NMR* **1991**, *1*, 3.
- [124] W. Burgermeister, T. Wieland, R. Winkler, *Eur. J. Biochem.* **1974**, *44*, 311.
- [125] H. Kessler, M. Klein, A. Müller, K. Wagner, J. W. Bats, K. Ziegler, M. Frimmer, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 1030; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 997; H. Kessler, A. Müller, K. H. Pook, *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, *903*; H. Kessler, J. W. Bats, J. Lautz, A. Müller, *ibid.* **1989**, *913*; J. Lautz, H. Kessler, W. F. van Gunsteren, H. J. C. Berendsen, R. M. Scheek, R. Kaptein, J. Blaney, *Proc. 20th Eur. Pept. Symp.* **1989**, 438.
- [126] R. R. Ernst, M. Blackledge, S. Boentges, J. Briand, R. Brüschweiler, M. Ernst, C. Griesinger, Z. L. Mádi, T. Schulte-Herbrüggen, O. W. Sørensen in *Proteins, Structure, Dynamics, Design* (Hrsg.: V. Renugopalakrishnan, P. R. Carey, I. C. P. Smith, S. G. Huang, A. C. Storer), ESCOM, Leiden, **1991**.
- [127] P. C. Lauterbur, *Nature* **1973**, *242*, 190.
- [128] Anil Kumar, D. Welti, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1975**, *18*, 69.
- [129] W. A. Edelstein, J. M. S. Hutchison, G. Johnson, T. W. Redpath, *Phys. Med. Biol.* **1980**, *25*, 751.
- [130] P. Mansfield, A. A. Maudsley, T. Baines, *J. Phys. E 9*, **1976**, 271.
- [131] P. C. Lauterbur, D. M. Kramer, W. V. House, C.-N. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 6866.