

# Impuls-Fourier-Transform- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie, Grundlagen und Anwendungen<sup>[\*\*]</sup>

Von Eberhard Breitmaier, Günther Jung und Wolfgang Voelter<sup>[\*]</sup>

Durch die Entwicklung der Impuls-Fourier-Transform-NMR-Spektroskopie hat sich die  $^{13}\text{C}$ -Resonanz als Methode zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit natürlichem  $^{13}\text{C}$ -Gehalt durchgesetzt. Breitband- und Off-Resonance-Protonen-Entkopplung sowie die Kenntnis longitudinaler Relaxationszeiten erleichtern die Signalzuordnung. Die im Vergleich zur konventionellen NMR-Spektroskopie infolge Vielkanalanregung empfindlichere und schnellere Impuls-Fourier-Technik gestattet es, innerhalb kurzer Zeit  $^{13}\text{C}$ -Messungen selbst an verdünnten Proben hochmolekularer Verbindungen ohne vorherige  $^{13}\text{C}$ -Anreicherung durchzuführen.

## 1. Einführung

Die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten der Protonen erlauben bei vielen organischen Verbindungen so eindeutige Aussagen zur Struktur, daß die Protonenresonanz sich zu einer der bedeutendsten instrumentalanalytischen Routinemethoden des organischen Chemikers entwickelte. Ihre Anwendbarkeit ist jedoch aus zwei Gründen beschränkt: Zum einen stehen nicht die Protonen, sondern das Kohlenstoffgerüst der Moleküle im Interessenbrennpunkt der organischen Chemie. So werden physikalische Eigenschaften und Reaktivität organischer Verbindungen durch die mit quantenmechanischen Rechnungen annäherbaren Bindungszustände der Kohlenstoffatome gedeutet. Zum anderen enthalten zahlreiche organische Moleküle zu wenige magnetisch nicht äquivalente Protonen, so daß die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie zu wenige oder keine Aussagen über das Kohlenstoffskelett solcher Verbindungen gestattet. Es liegt daher nahe zu versuchen, das magnetische Isotop  $^{13}\text{C}$  mit dem Kernspin  $\frac{1}{2}$  als Sonde für die NMR-Spektroskopie organischer Verbindungen zu verwenden.

## 2. Problematik der $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie

Das  $^{13}\text{C}$ -Isotop benötigt viel länger für die longitudinale Relaxation als das Proton, was sich durch ein langsameres Umklappen der Spinzustände bei Radiofrequenzeinstrahlung äußert.  $^{13}\text{C}$  kommt ferner nur zu 1.1% in natürlichem Kohlenstoff vor, sodaß die Beobachtung der  $^{13}\text{C}$ -Resonanz große Substanzproben erfordert. Schließlich ist die  $^{13}\text{C}$ -Resonanz bei gleicher Magnetfeldstärke aufgrund des geringen gyromagnetischen Verhältnisses von  $^{13}\text{C}$  wesentlich unempfindlicher (1.59%) im Vergleich zur  $^1\text{H}$ -Resonanz (100%).

Neben diesen grundsätzlichen Schwierigkeiten standen der Routine- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie bisher auch instrumen-

telle Hindernisse im Wege: Die herkömmlichen hochauflösenden Kernresonanzspektrometer zeichnen die NMR-Spektren unter kontinuierlicher Änderung der Frequenz oder des Magnetfeldes über den Larmor-Frequenzbereich des beobachteten Kernes auf. Dabei trägt in jedem Augenblick nur ein schmales Frequenzband zur Anregung der Resonanzen bei. Infolgedessen ist das mit dieser als Frequenz- oder Feldabtastung („Sweep“) bekannten Aufnahmetechnik erzielte Signal/Rauschen-Verhältnis (S/N), das als Empfindlichkeitsmaß dient, gering. Die Empfindlichkeit läßt sich durch Spektrenakkumulation mit Mittelwertrechnern unter Herausmittelung des Rauschens nach dem CAT-Verfahren (Computer Averaged Transitions) verbessern, da S/N mit der Anzahl der Durchläufe wächst:

$$\text{S/N} \sim \sqrt{n}$$

Aber selbst wenn man den damit verbundenen hohen Zeitaufwand in Kauf nimmt, ist doch die Langzeitstabilität herkömmlicher NMR-Geräte meist zu gering, um durch lange Aufnahmezeiten von einer gesättigten, aber infolge geringer Löslichkeit dennoch dünnen Lösung einer organischen Verbindung ein auswertbares  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zu erhalten.

Diese prinzipiell und instrumentell bedingten Schwierigkeiten führten zur Entwicklung der neuen, als Impuls- oder Puls-Fourier-Transform(PFT)-NMR-Spektroskopie bezeichneten Aufnahmetechnik<sup>[1-3]</sup>. Ihre Basis ist der „Free Induction Decay“ der Blochschen Kernresonanztheorie<sup>[4, 5]</sup>. Die PFT-NMR-Spektroskopie läßt sich für jeden magnetischen Kern als Meßsonde anwenden und ermöglicht der  $^{13}\text{C}$ -Resonanz organischer Verbindungen mit natürlichem  $^{13}\text{C}$ -Gehalt den Sprung zur Routinemethode.

## 3. Grundlagen

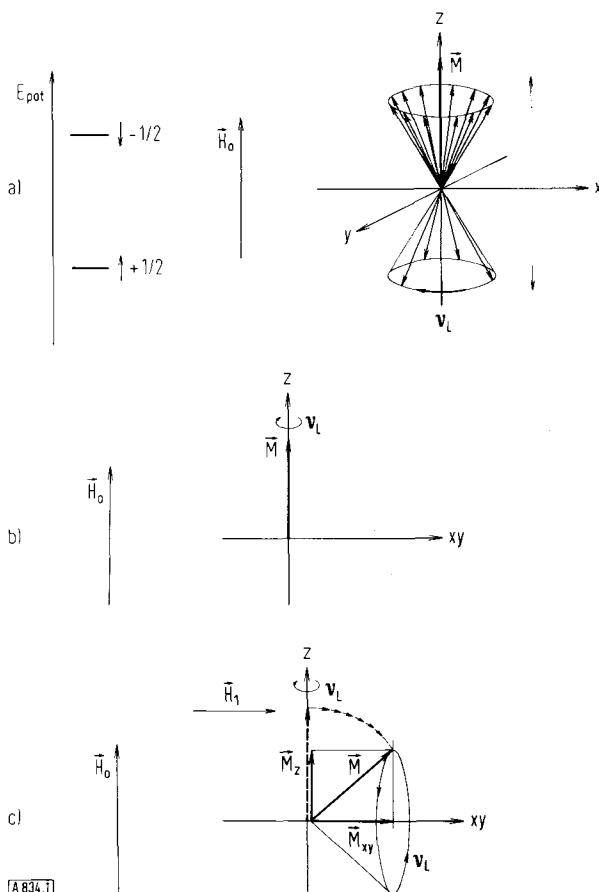
### 3.1. Blochsche Kernresonanztheorie

Zur Beobachtung der Kernresonanz bringt man eine Probe in ein statisches Magnetfeld  $\vec{H}_0$  und strahlt senkrecht zu  $\vec{H}_0$  ein Radiofrequenzfeld  $\vec{H}_1$  ein. Ist die Frequenz des  $\vec{H}_1$ -Feldes gleich der Larmor-Frequenz  $\nu_L$  des als Meßsonde verwendeten Kerns, so wird im Empfänger des

[\*] Priv.-Doz. Dr. E. Breitmaier, Priv.-Doz. Dr. G. Jung und Priv.-Doz. Dr. W. Voelter  
Chemisches Institut der Universität  
74 Tübingen, Wilhelmstraße 33

[\*\*] PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie, 7. Mitteilung. – 6. Mitteilung:  
E. Breitmaier, W. Voelter, G. Jung u. C. Tänzer, Chem. Ber. 104, 1147 (1971).

NMR-Spektrometers ein Absorptionssignal registriert. Die Blochsche Theorie<sup>[4, 5]</sup> deutet die Wirkungsweise der Felder  $\vec{H}_0$  und  $\vec{H}_1$ . Diese Theorie beschreibt nicht das Verhalten eines Kerns, sondern das der makroskopischen Magnetisierung  $\vec{M}$  einer Kernansammlung unter dem Einfluß von  $\vec{H}_0$  und  $\vec{H}_1$ .



Unter ausschließlichem Einfluß des  $\vec{H}_0$ -Feldes präzidieren die Rotationsachsen der Kerne mit einem Winkel  $\alpha$  um die Richtung des  $\vec{H}_0$ -Feldes (Abb. 1 a). Für einen Kern mit dem Spin  $I = \frac{1}{2}$  gibt es dann eine energiearme, stark besetzte Orientierung in  $\vec{H}_0$ -Feldrichtung und eine energiereiche, schwach besetzte Orientierung in  $\vec{H}_0$ -Feldgegenrichtung (Abb. 1 a; man beachte die Anzahl der Vektoren). Die hieraus resultierende makroskopische Magnetisierung  $\vec{M}$  liegt daher parallel zum  $\vec{H}_0$ -Feld (Abb. 1 a in z-Richtung) und verursacht eine geringe, meßbare Kernsuszeptibilität.

Denkt man sich das x,y,z-Koordinatensystem mit der Larmor-Frequenz  $v_L$  um die z-Achse rotierend, so vereinfacht sich Abbildung 1 a zu Abbildung 1 b, wobei  $\vec{M}$  in der z-Achse mit  $v_L$  rotiert. Das senkrecht zu  $\vec{H}_0$  eingestrahlte Radiofrequenzfeld  $\vec{H}_1$  mit der Larmor-Frequenz  $v_L$  übt eine Kraft auf den Vektor der makroskopischen Magnetisierung  $\vec{M}$  aus. Der Vektor  $\vec{M}$  weicht dieser Kraft aus, indem er um die Richtung von  $\vec{H}_1$  präzidert. Nun sind  $\vec{H}_1$  und  $\vec{M}$  in Phase, und  $\vec{M}$  hat zwei Komponenten:  $\vec{M}_z < \vec{M}$  in z-Richtung und  $\vec{M}_{xy} < \vec{M}$  in der xy-Ebene (Abb. 1 c).

Die Abnahme der Magnetisierung in z-Richtung (longitudinale Magnetisierung) ist eine Folge der Resonanz: Schwingt  $\vec{H}_1$  mit der Larmor-Frequenz  $v_L$ , so klappen einige Kerne entsprechend ihrer longitudinalen Relaxationszeit  $T_1$  ihren Spin mehr oder weniger rasch um. Dabei absorbieren sie Energie aus  $\vec{H}_1$ . Die Besetzung beider Orientierungen gleicht sich nahezu aus. Infolgedessen sinkt die Magnetisierung  $\vec{M}$  auf  $\vec{M}_z$  ab.

### 3.2. Free Induction Decay

Nach dem Resonanzdurchgang klingt die transversale Magnetisierung  $\vec{M}_{xy}$  unter Verlust der Phasenkohärenz mit dem  $\vec{H}_1$ -Feld exponentiell mit der transversalen Relaxationszeit  $T_2$  ab. Dieser Vorgang wird als „free induction decay“ (Abfall der freien Induktion, abgekürzt FID) bezeichnet. Da die transversale Magnetisierung  $\vec{M}_{xy}$  aus Komponenten resultiert, die den verschiedenen Larmor-Frequenzen eines Kerns in einem Molekül entsprechen, steckt im FID die gesamte Information eines NMR-Spektrums.

Free induction decays werden bei hoher Auflösung und schnellem Durchfahren vieler Resonanzen (z. B. des  $^1\text{H}$ -Tetramethylsilan-Signals) als Nachschwingungen („wiggles“) sichtbar, sofern keine Feldinhomogenitäten für diese Erscheinung verantwortlich sind. Unmittelbar nach Passieren der Resonanzbedingung

$$v_{\vec{H}_1} = v_{\vec{M}_{xy}} = v_L$$

sind Phase und Frequenz von  $\vec{H}_1$  und  $\vec{M}_{xy}$  noch fast gleich. Die Interferenz zwischen  $\vec{H}_1$  und  $\vec{M}_{xy}$  ist daher eine Schwebung, welche synchron zum FID exponentiell mit  $T_2$  abklingt.

Zeitlich unabhängig vom FID, nämlich exponentiell mit der longitudinalen Relaxationszeit  $T_1$ , steigt die longitudinale Magnetisierung nach dem Resonanzdurchgang durch Zurückschwenken des Vektors  $\vec{M}$  in  $\vec{H}_0$ -Richtung auf ihren ursprünglichen Wert an.

### 3.3. Impuls-Interferogramme

Die Schwebungsinterferenzsignale des FID können auch durch kurzzeitige (einige Mikrosekunden), rechtwinklig zu  $\vec{H}_0$  eingestrahlte Radiofrequenzimpulse  $\Delta\vec{H}_1$  ausgelöst werden.

Bei der Impuls-NMR-Spektroskopie trifft ein solcher Impuls auf eine Molekülprobe mit  $n$  magnetisch nicht äquivalenten Kernen, also  $n$  Larmor-Frequenzen  $v_L$ . Dann registriert der Empfänger des Spektrometers nicht eine einfache Schwebungsinterferenz, sondern die Überlagerung der Interferenzen aller angeregten Larmor-Frequenzen. Ist das Frequenzspektrum des eingestrahlten Impulses hinreichend groß, so werden alle  $n$  Larmor-Frequenzen der Molekülprobe angeregt. Das so entstandene Impuls-Interferogramm gibt die abklingende transversale Magnetisierung  $M_{xy}$  als Funktion der Zeit (Abb. 3a). Es enthält nach Abschnitt 3.2 die gesamte Information eines nach dem Feld- oder Frequenzsweep (Abschnitt 2) erhal-

tenen NMR-Spektrums. Der Zeitaufwand zur Aufnahme des Interferogramms liegt in der Größenordnung longitudinaler Relaxationszeiten  $T_1$ <sup>[2]</sup>, also im Bereich von Sekundenbruchteilen ( $^1\text{H}$ ) oder Sekunden ( $^{13}\text{C}$ ).

#### 4. PFT-NMR-Spektroskopie

##### 4.1. Prinzip und Vorteile

Ein Impuls-Interferogramm ist eine komplexe Wellenfunktion, die aus den Überlagerungen aller vom Impuls angeregten Larmor-Frequenzen resultiert. Wie jede komplexe Wellenfunktion kann ein Interferogramm daher unter bestimmten mathematischen Voraussetzungen durch Fourier-Transformation in ein Spektrum der Larmor-Frequenzen, also in das NMR-Spektrum selbst, überführt werden<sup>[6]</sup>.

Nun gleicht ein Radiofrequenzimpuls der Ausstrahlung eines Vielkanalsenders, dessen Frequenzspektrum mit voller Leistung momentan alle Larmor-Frequenzen einer Probe gleichzeitig anregt. Mit zunehmender Anzahl simultan anregender Kanäle steigt aber die Empfindlichkeit eines NMR-Spektrometers<sup>[3]</sup>. Die mit einem Spezialrechner mit fest verdrahteter Multiplikation und Division („dedicated computer“) sekundenschnell durchführbare Fourier-Transformation des Impuls-Interferogramms liefert daher ein NMR-Spektrum, dessen S/N-Verhältnis bedeutend größer ist als das eines konventionellen NMR-Spektrums derselben Probe. Innerhalb weniger Sekunden lässt sich so ein auswertbares NMR-Spektrum aufzeichnen. Abbildung 2 zeigt eindrucksvoll das aus einem einzigen Impuls zugängliche protonenentkoppelte  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum reinen Chinolins (1) mit dem natürlichen  $^{13}\text{C}$ -Gehalt von 1.1%.

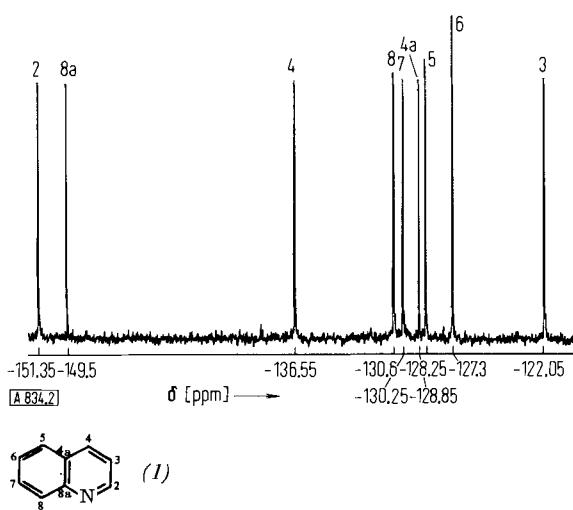


Abb. 2. 22.63-MHz-PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Chinolin (1), Transformation eines Impulses von 15  $\mu\text{s}$ , Aufnahmezeit 1.6 s (Zuordnung nach Pugmire et al. [7]). Die Zahlen an den Signalen beziehen sich auf die Nummern der C-Atome.  $\delta$ -Werte bezogen auf TMS = 0.

Hohe Zeitsparnis und die Verbesserung des S/N-Verhältnisses um mehr als eine Zehnerpotenz sind demnach die Vorteile der PFT-Methode im Vergleich zur konventionellen NMR-Spektroskopie.

Die Empfindlichkeit lässt sich noch weiter erhöhen, wenn die Impuls-Interferogramme vor der Fourier-Transformation mit Mittelwertrechnern akkumuliert werden. Erfordert die Aufnahme eines Interferogramms zum Beispiel 0.5 s, was dem Intervall zwischen zwei Impulsen entspricht, so können innerhalb der Aufnahmezeit konventioneller NMR-Spektren (500 s) 1000 Interferogramme akkumu-

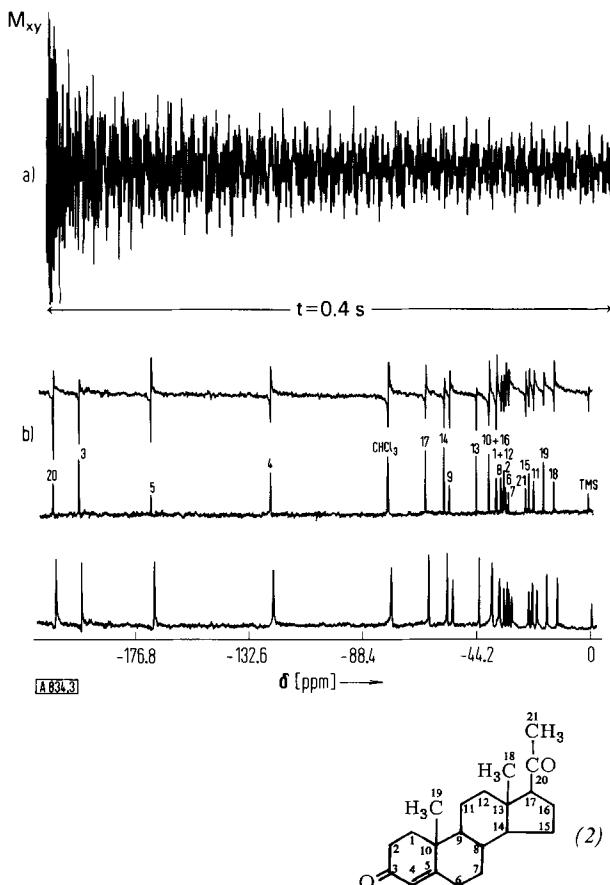


Abb. 3. a) 22.63-MHz-Impuls-Interferogramm von Progesteron (2),  $^1\text{H}$ -breitbandentkoppelt, 1.5  $\text{M}$  in Chloroform. Akkumulation von 1024 Impulsen, Impulsbreite 30  $\mu\text{s}$ , Impulsintervall 0.4 s, 4096 Datenpunkte. b) Fourier-Transformation des Impuls-Interferogramms von Progesteron; von oben nach unten: Dispersionsspektrum; Absorptionspektrum; Magnitudespektrum. Die Zahlen an den Signalen beziehen sich auf die Nummern der C-Atome.  $\delta$ -Werte bezogen auf TMS = 0. Aufnahmen Fa. Bruker Physik AG, Karlsruhe-Forchheim.

liert werden. Nach Abschnitt 1 entspricht dies einer weiteren Erhöhung des S/N-Verhältnisses um den Faktor  $10\sqrt{10}$ . Abbildung 3 zeigt als Beispiel das akkumulierte  $^{13}\text{C}$ -Interferogramm des Progesterons (2) in 1.5  $\text{M}$  Lösung mit den dazugehörigen, nach drei Programmen erhaltenen Fourier-Transformationen.

##### 4.2. Zur Technik der PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie

###### 4.2.1. Verkürzung des Impulsintervalls bei $^{13}\text{C}$

Die Fourier-Transformation eines Interferogramms wird dem NMR-Spektrum derselben Probe um so ähnlicher, je mehr Zeit für die Aufnahme des Interferogramms aufgewendet wird. Bei der Akkumulation von Interferogrammen sollte daher das Impulsintervall, der Zeitabstand zwischen zwei Impulsen, möglichst groß, keinesfalls aber wesentlich kleiner als die longitudinale Relaxationszeit  $T_1$

sein. Der Vektor  $M$  (Abb. 1) rotiert ja erst  $T_1$  Sekunden nach Impulseinstrahlung wieder in  $\vec{H}_0$ -Richtung.

Da  $T_1$  für  $^{13}\text{C}$  groß (bis zu 1 Minute) ist, würde die Akkumulation von  $^{13}\text{C}$ -Interferogrammen große Impulsintervalle und damit lange Aufnahmezeiten erfordern. Diese Schwierigkeit lässt sich durch Anwendung der Spin-Echo-Methode<sup>[8, 9]</sup> beheben. Dabei dreht ein  $90^\circ$ -Impuls den Vektor  $M$  zunächst wieder gegen die  $xy$ -Ebene (vgl. Abb. 1b und 1c). Der Empfänger registriert dann wie üblich ein Interferogramm, das im Falle von  $^{13}\text{C}$  wegen  $T_2 \ll T_1$  rascher abklingt als  $M$  in  $\vec{H}_0$ -Richtung zurückschwenkt. Die Einstrahlung zweier weiterer Impulse von  $180^\circ$  und  $90^\circ$  unmittelbar nach dem ersten  $90^\circ$ -Impuls beschleunigt das Zurückschwenken: Der  $180^\circ$ -Impuls zwingt die Vektoren der transversalen Magnetisierung  $\vec{M}_{xy}$  unter Fokussierung in die negative  $xy$ -Ebene (Spin-Echo), der darauf folgende  $90^\circ$ -Impuls kippt den fokussierten Vektor wieder in  $\vec{H}_0$ -Richtung. Die Impulsfolge  $90^\circ-180^\circ-90^\circ$  lässt sich innerhalb von Sekundenbruchteilen (z. B. 0.4 s) wiederholen, was den Zeitbedarf zur Interferogramm-Akkumulation erheblich reduziert. Diese für  $^{13}\text{C}$  anwendbare Methode ist als „Driven-Equilibrium-Fourier-Transform“ (DEFT)-NMR-Spektroskopie<sup>[8]</sup> bekannt.

#### 4.2.2. Absorptions-, Dispersions- und Magnitudespektren

Der die Fourier-Transformation durchführende Rechner zerlegt das Interferogramm je nach seiner Speicherkapazität in einige Tausend Datenpunkte. Zu deren Abtastung und Fourier-Transformation benötigt er 10 bis 20 Sekunden. Je nach Rechenverfahren ergibt die Transformation ein Absorptionsspektrum („v-mode“, Abb. 3b, oben), ein Dispersionsspektrum („u-mode“, Abb. 3b, Mitte) oder ein Magnitudespektrum („ $\sqrt{u^2 + v^2}$ -mode“, Abb. 3b, unten). Abbildung 4 illustriert, wie sich aus Absorptions- und Dispersionspektrum das Magnitudespektrum ergibt.

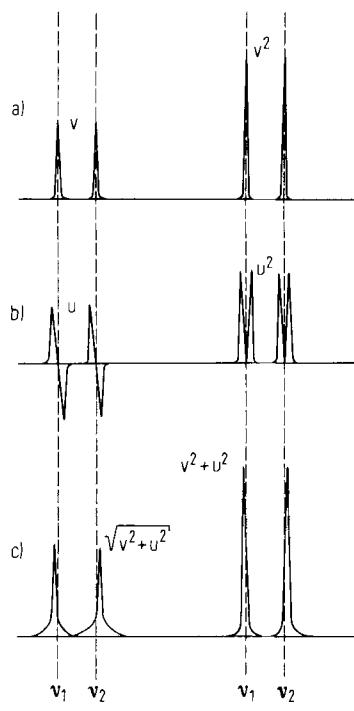


Abb. 4. a) Absorptions-, b) Dispersions- und c) Magnitudespektren.

Das Magnitudespektrum trägt den Absolutwert der transversalen Magnetisierung  $\vec{M}_{xy}$  ohne Berücksichtigung der Phase als Funktion der Frequenz auf. Im Vergleich zum Absorptionsspektrum zeigt es folgende Vorteile:

Viele Signale erscheinen intensiver, obschon unter Schwanzbildung (Abb. 3b, unten, 4c).

Dicht beieinander liegende Signale werden im Magnitudepektrum infolge des Dispersionsanteils besser getrennt (Abb. 4a und 4c).

Diese Vorteile werden, wie Abbildung 4c zeigt, durch eine Verfälschung der chemischen Verschiebungen erkauft, die bei PFT- $^1\text{H}$ -NMR-Spektren erheblich ist, bei PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren jedoch meist innerhalb der Fehlergrenze liegt. Nur im Falle schwacher Resonanzen in unmittelbarer Nähe starker Signale (z. B. des Lösungsmittels) macht sich diese Frequenzverzerrung im  $^{13}\text{C}$ -Magnitudepektrum bemerkbar<sup>[13]</sup>.

#### 4.2.3. Locksubstanz und Standard

Zur Stabilisierung des Feld/Frequenz-Verhältnisses benutzt man in der PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie ein heteronucleares Signal, meistens das  $^{19}\text{F}$ -Signal des Hexafluorbenzols oder das  $^2\text{H}$ -Signal des Deuteriumoxids. Hexafluorbenzol lässt man in einer zentrierten Kapillare extern im Probenrohr mitrotieren. Deuteriumoxid kann bei wasserlöslichen  $^{13}\text{C}$ -Proben als Lösungsmittel und interne heteronucleare Locksubstanz verwendet werden.

Der  $^{13}\text{C}$ -Resonanzbereich erstreckt sich über etwa 200 ppm. Das sind bei 22.63 MHz etwa 4.5 kHz. Als Standard können Schwefelkohlenstoff<sup>[10]</sup> oder Tetramethylsilan verwendet werden. Das TMS-Signal liegt bei sehr hohem (0 ppm), das  $\text{CS}_2$ -Signal bei sehr tiefem Feld (je nach Lösungsmittel –192 bis –193 ppm gegen TMS). Da die  $^{13}\text{C}$ -Carbonylsonanz in den Bereich des  $\text{CS}_2$ -Signals fällt, in der Nähe und oberhalb des intensiveren TMS-Signals jedoch nur sehr wenige Signale liegen, wird neuerdings TMS als Standard bevorzugt.

### 5. Zuordnungshilfen

#### 5.1. Breitbandentkopplung und Kern-Overhauser-Effekt

Dageminale  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ -Kopplungskonstanten mit 100–250 Hz sehr groß sind, erschweren häufig überlappende  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ -Multipletts eine Interpretation der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren. Zur Spektrenvereinfachung und Erhöhung der Empfindlichkeit wird bei der PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie daher oft die Technik der Protonen-Breitbandentkopplung angewendet. Dabei wird die  $^{13}\text{C}$ -Probe, zusätzlich zum (kontinuierlich oder) in Form von Impulsen eingestrahlten  $\vec{H}_1$ -Feld, kontinuierlich mit einer zweiten Radiofrequenz  $\vec{H}_2$  bestrahlt. Umschließt das Frequenzband von  $\vec{H}_2$  den gesamten Bereich der Larmor-Frequenzen der Protonen, so brechen alle  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ -Multipletts zusammen. Für jedes nicht äquivalente Kohlenstoffatom erscheint daher ein Singulett. Durch diese Breitbandentkopplung wird das S/N-Verhältnis also durch den Zusammenbruch der Multipletts, zusätzlich jedoch durch den Kern-Overhauser-Effekt<sup>[11]</sup> erhöht.

Der Kern-Overhauser-Effekt beruht darauf, daß sich durch Doppelresonanzanregung mit dem Feld  $\bar{H}_2$  die natürliche Besetzung der ( $^1H$ -)Spinniveaus (Abb. 1b) ändert. Häufig wird dabei der energiereichere Spinzustand stärker besetzt als der energieärmere. Darauffolgende Relaxationsvorgänge (Wiedereinschwenken der  $\bar{M}$ -Vektoren in  $\bar{H}_0$ -

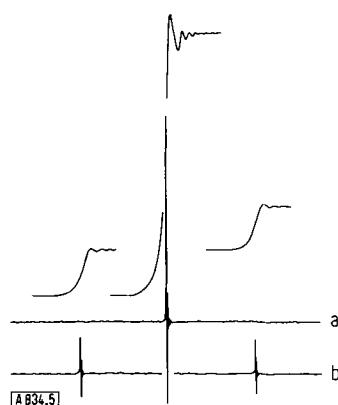


Abb. 5. Kern-Overhauser-Effekt bei der  $^1H$ -Breitbandentkopplung von  $^{13}C$ -angereicherter Ameisensäure [11]. a) entkoppelt, b) gekoppelt.

Richtung) beeinflussen infolge Dipol-Dipol(=Sender-Empfänger)-Wechselwirkung auch die Besetzung der Spinniveaus anderer Kerne. Koppeln die Spinniveaus wie z. B. bei geminalen und vicinalen Kernen, so ist der Overhauser-Effekt besonders intensiv. Er führt bei der  $^1H$ -Breitbandentkopplung von  $^{13}C$ - $^1H$ -Multipletts zu einer deutlichen Erhöhung der Signalintensitäten, wie Abbildung 5 am Beispiel der  $^{13}C$ -Resonanz  $^{13}C$ -angereicherter Ameisensäure zeigt<sup>[12]</sup>.

## 5.2. „Off-Resonance“-Entkopplung

Zwar vereinfacht die  $^1H$ -Breitbandentkopplung ein  $^{13}C$ -NMR-Spektrum unter Erhöhung der Empfindlichkeit, jedoch unterdrückt diese Technik wertvolle Hinweise zur Signalzuordnung anhand der  $^{13}C$ - $^1H$ -Multipletts.

Die „Off-Resonance“-Teilentkopplung ist in solchen Fällen ein wichtiges Hilfsmittel bei der Zuordnung von  $^{13}C$ -Resonanzen. Die dabei gegenüber der  $^1H$ -Breitbandentkopplung auftretenden Empfindlichkeitseinbußen sind gering (Abb. 6).

Bei diesem Doppelresonanzverfahren<sup>[13, 14]</sup> liegt die Zweitfrequenz  $\bar{H}_2$  nicht innerhalb, sondern einige Hundert Hz außerhalb des Larmor-Frequenzbereichs der Protonen („off resonance“). Dabei brechen Vicinal- und Fernkopplungen zusammen. Dadurch und durch den damit einhergehenden Kern-Overhauser-Effekt nimmt das S/N-Verhältnis  $^1H$ -off-resonance-entkoppelter im Vergleich zu dem  $^1H$ -breitbandentkoppelter Spektren kaum ab.

Die geminalen  $^{13}C$ - $^1H$ -Kopplungskonstanten sinken je nach Frequenzbereich des  $\bar{H}_2$ -Feldes auf 10–50 Hz, so daß ein Spektrum intensiver Multipletts erster Ordnung beobachtet wird: Quartetts für Methyl-, Triplets für Methylen-, Doublets für Methin- und Singulets für quartäre C-Atome. Abbildung 6 zeigt am Beispiel von 1,3-Butandiol (3) und 2,2'-Bipyridyl (4), wie die Signalzuordnung aus den geminalen  $^{13}C$ - $^1H$ -Multipletts der Off-Resonance- $^{13}C$ -Spektren folgt.

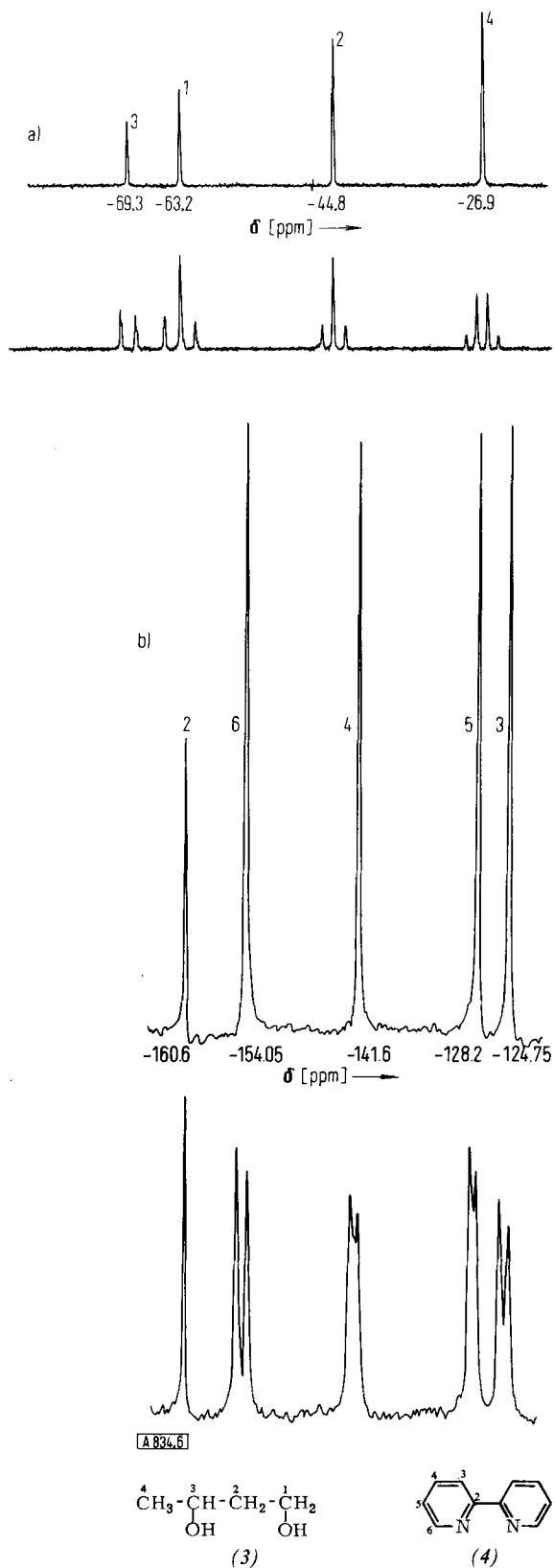


Abb. 6.  $^{13}C$ -Signalzuordnung durch Off-Resonance-Entkopplung a) bei 1,3-Butandiol (3), 22.63 MHz; b) bei 2,2'-Bipyridyl (4), 25.2 MHz. Die Zahlen an den Signalen beziehen sich auf die Nummern der C-Atome.  $\delta$ -Werte bezogen auf TMS = 0. Aufnahme Fa. Varian Ass., Palo Alto.

## 5.3. Longitudinale Relaxationszeiten

Wenn Relaxationsvorgänge durch intramolekulare C-H-Dipol-Dipol-Wechselwirkungen beherrscht werden, sollte

die longitudinale Relaxationszeit  $T_1$  von  $^{13}\text{C}$  (Spin-Gitter-Relaxationszeit) charakteristisch von der Anzahl direkt an Kohlenstoff gebundener Wasserstoffatome abhängen<sup>[15]</sup>. Die Kenntnis von  $T_1$  ist daher eine weitere Hilfe zur Zuordnung  $^1\text{H}$ -breitbandentkoppelter  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen. Infolgedessen gewinnt die Messung von  $T_1$  anhand von Spin-Echo-Fourier-Transform-(SEFT)- $^{13}\text{C}$ -Experimenten zunehmende Bedeutung<sup>[3, 16–18]</sup>.

Bei solchen SEFT-Messungen kehrt ein  $180^\circ$ -Impuls zunächst die Orientierung aller Kernspins (Abb. 1) um. Folgt sofort ein  $90^\circ$ -Impuls, so registriert der Empfänger wie üblich ein FID-Interferogramm. Die anschließende Fourier-Transformation liefert ein NMR-Spektrum, dessen Signale als Folge des  $180^\circ$ -Impulses umgekehrt sind. Ist das Intervall  $t$  zwischen  $90^\circ$ - und  $180^\circ$ -Impuls  $t = 1/2 T_1$ , so wird die Magnetisierung in der  $xy$ -Ebene null, und das Signal im Spektrum verschwindet. Nimmt  $t$  weiter zu, so kehren sich die Signale unter Intensitätszunahme um. Die longitudinalen Relaxationszeiten  $T_1$  nicht äquivalenter C-Atome lassen sich daher bestimmen, indem das Intervall  $t$  zwischen  $90^\circ$ - und  $180^\circ$ -Impuls variiert und für jedes  $t$  das PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum aufgezeichnet wird (Abb. 7).

Diese Reihenfolge bestätigt, daß am Relaxationsvorgang Protonen beteiligt sind<sup>[15]</sup>.

Größere longitudinale Relaxationszeiten  $T_1$  sowie das Fehlen von  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ -Kopplungen und damit auch des Kern-Overhauser-Effektes sind daher die Gründe, weshalb die  $^{13}\text{C}$ -Signale von quartären und Carbonyl-C-Atomen in den  $^1\text{H}$ -breitbandentkoppelten PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren die geringsten Intensitäten zeigen (siehe dazu auch Abb. 8).

## 6. PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie organischer Verbindungen

### 6.1. $^{13}\text{C}$ -Chemische Verschiebungen organischer Verbindungen

Die  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen der meisten organischen Verbindungen erstrecken sich von 0 bis  $-200$  ppm gegen Tetramethylsilan als Standard (Tabelle 1). Dies ist das zwanzigfache des  $^1\text{H}$ -Resonanzbereiches.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren zeigen daher Änderungen der chemischen Umgebung eines C-Atoms nicht nur direkter, sondern auch deutlicher

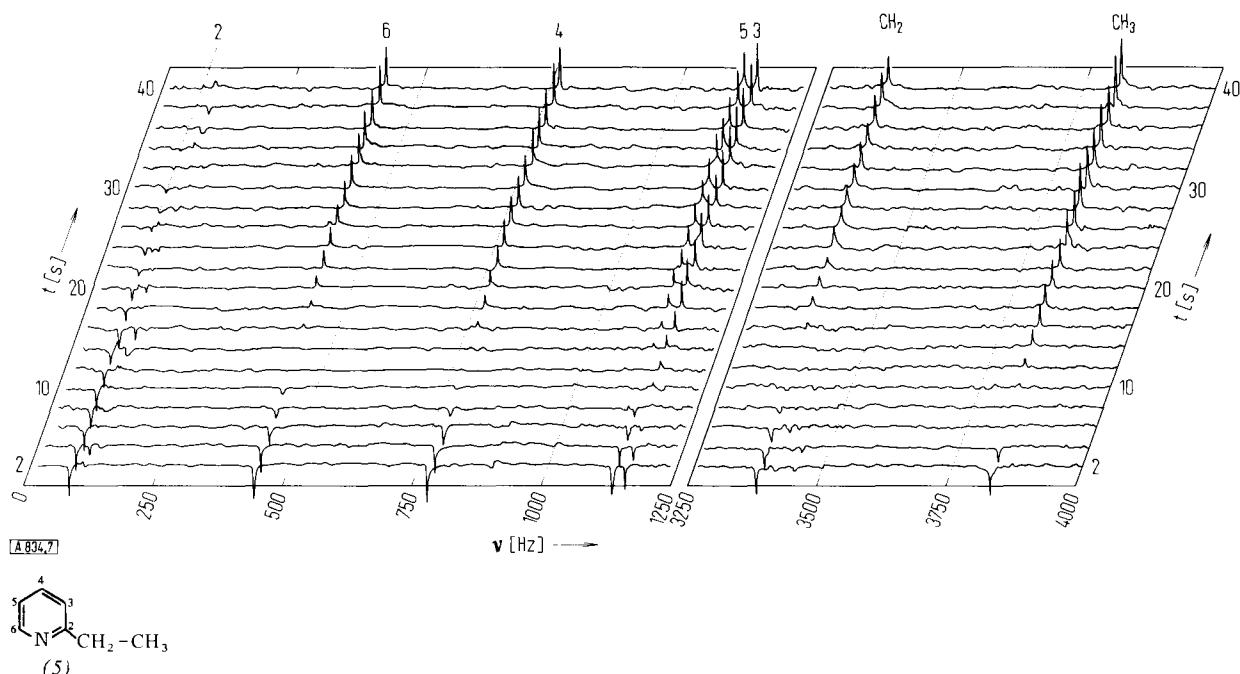
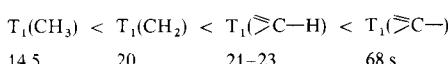


Abb. 7. SEFT-Messung longitudinaler Relaxationszeiten am 2-Äthylpyridin (5) [17]. Die Zahlen an den Signalen beziehen sich auf die Nummern der C-Atome.

Impulsfolge und Intervall, Akkumulierung der Interferogramme sowie Fourier-Transformation lassen sich durch einen Rechner so steuern, daß der angeschlossene Schreiber die Spektren beim Aufzeichnen versetzt. Dabei ergibt sich die in Abbildung 7 für 2-Äthylpyridin (5) gezeigte dreidimensionale Darstellung der Signale als Funktion von Frequenz und Intervall. Auf einen Blick sieht man, daß  $T_1$  mit abnehmender Zahl direkt gebundener H-Atome zunimmt:



an als  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren.  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen folgen häufig Gesetzmäßigkeiten, welche denen der  $^1\text{H}$ -Verschiebungen analog sind.

Die  $^{13}\text{C}$ -Verschiebungen von n-Alkanen liegen bei höchstem Feld. Sie gehorchen der Grant-Paulsenen Additivitätsbeziehung<sup>[19, 20]</sup>:

$$\delta_{\text{C}}(\mathbf{k}) = B + \sum_i A_i n_{\mathbf{k}i}$$

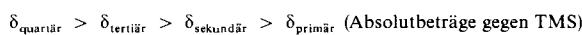
$\delta_{\text{C}}(\mathbf{k})$  = chemische Verschiebung des  $\mathbf{k}$ -ten C-Atoms

$B$  = chemische Verschiebung von Methan

$A_i$  = additiver Parameter der chemischen Verschiebung von C-Atom i

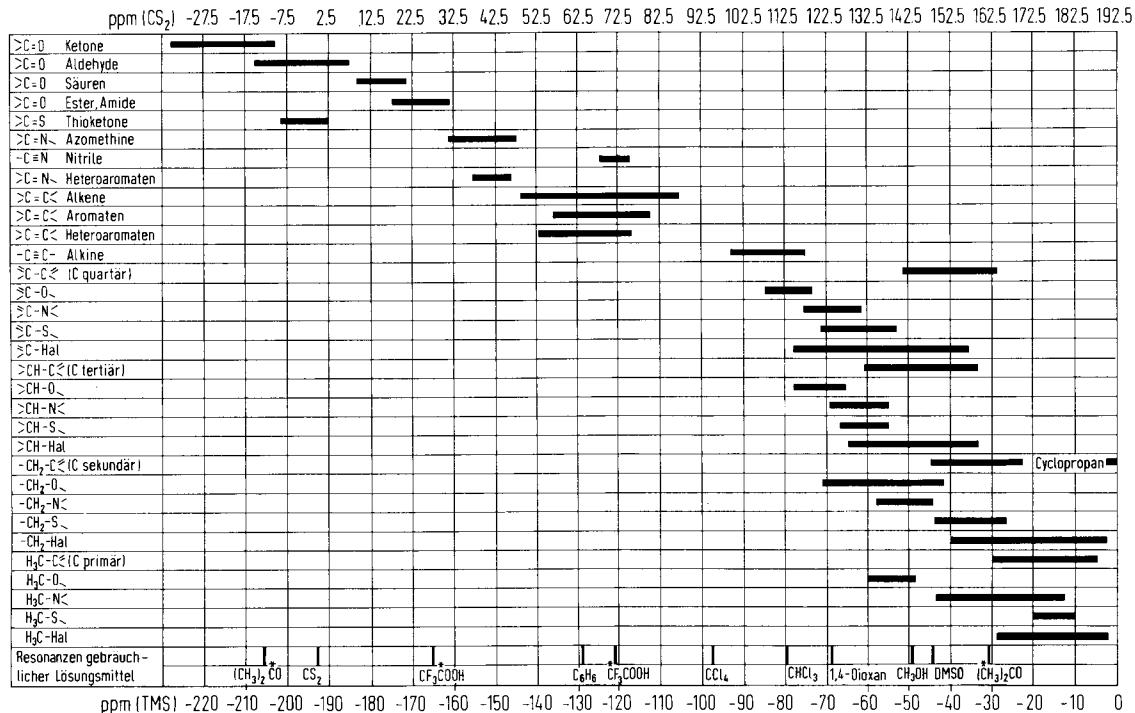
$n_{\mathbf{k}i}$  = Zahl der C-Atome in Position i, bezogen auf C-Atom k

Mit zunehmender Anzahl geminal an ein C-Atom gebundener H-Atome verschiebt sich das zugehörige  $^{13}\text{C}$ -Signal nach höherem Feld:



Elektronenanziehende Substituenten schieben die Signale benachbarter C-Atome nach tieferem Feld; entsprechendes gilt für Heteroatome in Heterocyclen.

Tabelle 1.  $^{13}\text{C}$ -Chemische Verschiebungen in organischen Verbindungen.



Bei Cycloaliphaten liegt die  $^{13}\text{C}$ -Resonanz des gespannten dreigliedrigen Ringes bei auffallend höherem Feld ( $-2.3$  ppm) als die Resonanzen mittlerer Ringe ( $-30$  bis  $-24$  ppm)<sup>[21]</sup>. In Norcaradienen liegen die  $^{13}\text{C}$ -Signale der dreigliedrigen Ringe jedoch bei tieferem Feld als in Cyclopropanen selbst<sup>[22]</sup>.

Die  $^{13}\text{C}$ -Signale von Alkinen liegen höher als die der Alkene und Aromaten, deren Verschiebungen sich im Gegensatz zu den  $^1\text{H}$ -Resonanzen überlappen. Bei cyclisch konjugierten  $\pi$ -Systemen, z. B. in nichtbenzoiden Aromaten, verschieben sich die  $^{13}\text{C}$ -Signale mit zunehmender  $\pi$ -Elektronendichte pro C-Atom linear nach höherem Feld<sup>[23]</sup>.

Die nur geringfügig überlappenden Bereiche der Carbonylresonanz gestatten eine Unterscheidung zwischen Ketonen, Aldehyden, Carbonsäuren und deren Derivaten:



## 7. PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie einiger Naturstoffe

### 7.1. Terpene und Carotinoide

Über Carotinoide, Terpene und besonders Norbornyl-derivate liegen einige  $^{13}\text{C}$ -Resonanzuntersuchungen

vor<sup>[24–26]</sup>. Als Beispiel wird die Zuordnung der Signale des PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums von Campher (6) (Abb. 8) diskutiert. Durch Off-Resonance-Entkopplung kann zwischen Methylkohlenstoff (C-8, C-9, C-10), Methylenkohlenstoff (C-3, C-5, C-6), tertiärem Kohlenstoff (C-4) und quartärem Kohlenstoff (C-1, C-7) unterschieden werden. Das Carbonyl-C-Atom (C-2) erscheint bei tiefstem Feld. Somit sind die Signale von C-2 und C-4 eindeutig zuzuordnen. Aus den  $\beta$ -Substitutionseffekten von C-2 ( $\text{C}=\text{O}$ )

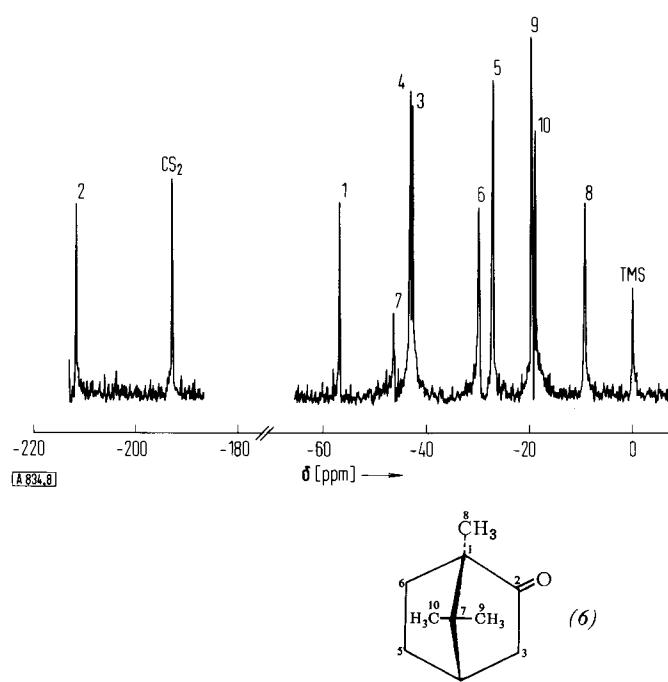


Abb. 8. 22.63-MHz-PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Campher (6) in  $\text{CS}_2$ . 256 Impulse, Impulsbreite  $40\ \mu\text{s}$ , Impulsintervall  $0.4\ \text{s}$ . Die Zahlen an den Signalen beziehen sich auf die Nummern der C-Atome.  $\delta$ -Werte bezogen auf TMS = 0.

und C-8 ( $\text{CH}_3$ ) ergibt sich die Signalsfolge der Methylen-C-Atome nach zunehmendem Feld geordnet: C-3, C-6, C-5. Die eindeutige Identifizierung der Methylsignale (C-9 und C-10) steht noch aus<sup>[26]</sup>.

## 7.2. Steroide

Durch Off-Resonance-Entkopplung, Derivatbildung wie Acetylierung oder spezifische Deuterierung und Spektrenvergleich gelang die Totalzuordnung einer größeren Anzahl von  $^{13}\text{C}$ -Steroidspektren<sup>[27]</sup>.

Bisher sind jedoch noch keine Fourier-Transform- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren dieser Naturstoffklasse beschrieben worden<sup>[28]</sup>. Abbildung 3 zeigt das mit dieser Technik aufgenommene Spektrum von Progesteron. Aus dem Off-Resonance- $^{13}\text{C}$ -Spektrum folgt die Signalzuordnung<sup>[27]</sup> der  $\text{CH}_3$ -Gruppen (C-18, C-19, C-21) und quartären C-Atome (C-10, C-13): für erstere wird ein Quartett, für letztere ein Singulett beobachtet. Die bei höchstem Feld absorbierenden Methylen-C-Atome des Steroidskeletts sind C-11 und C-15. Ein Teil der alicyclischen  $^{13}\text{C}$ -Atome wird durch elektronische Effekte nicht beeinflußt; von diesen erscheinen die Signale von C-9, C-14 und C-17 bei tiefstem Feld. Ein Vergleich der Signallagen mehrerer Progesteronderivate ergibt die Zuordnung der Resonanzen von C-1, C-6, C-7, C-8, C-12 und C-16. Das C-2-Signal kann nach Deuterierung von C-2 durch Off-Resonance-Entkopplung identifiziert werden. Die Resonanzen von C-4, C-5, C-3 und C-20 sind typisch für olefinische und Carbonyl-Kohlenstoffatome<sup>[29-34]</sup>.

## 7.3. Alkaloide

Die Aussagekraft von  $^1\text{H}$ -breitbandentkoppelten  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren zeigt sich besonders deutlich bei der Untersuchung von Alkaloiden. Allein mit der Theorie der chemischen Verschiebung<sup>[19, 35, 36]</sup> und einem Minimum an Modellsubstanzen gelang z. B. die Signalzuordnung der 20 Kohlenstoffatome des Alkaloids Gelsemin<sup>[37]</sup>. Die Anwesenheit polycyclischer, aliphatischer und aromatischer Ringe sowie von Heteroatomen führt zu einer ausgeprägten Differenzierung der  $^{13}\text{C}$ -Signale bei Alkaloiden. Infolgedessen sind die Verschiebungsdifferenzen zwischen den C-Atomen groß, was eine Zuordnung anhand off-resonance-entkoppelter Spektren und der Theorie der chemischen Verschiebung erleichtert. Wie am Beispiel der Epimeren 10-Oxo-des-N-morphinan und 10-Oxo-des-N-isomorphinan gezeigt wurde, lassen sich insbesondere auch *cis*- und *trans*-Verknüpfungen von Ringen deutlich charakterisieren<sup>[38]</sup>.

## 7.4. Kohlenhydrate

Die ersten Veröffentlichungen über die  $^{13}\text{C}$ -Resonanz von Kohlenhydraten<sup>[39-42]</sup> zeigen, daß diese Methode die Protonenresonanz hervorragend ergänzt. Erst zwei Arbeiten berichten über PFT- $^{13}\text{C}$ -Messungen an Glykosiden<sup>[43]</sup>.

Für den Cyclohexan- und Pyranose-Ring gilt, daß die  $^{13}\text{C}$ -Signale von Ring-C-Atomen mit axialen Substituenten

meistens bei höherem Feld erscheinen als entsprechende mit äquatorialen<sup>[36, 44, 45]</sup>. Das Beispiel des Anomerenpaares  $\alpha$ - und  $\beta$ -Methyl- $\text{D}$ -xylopyranosid (7) bzw. (8)

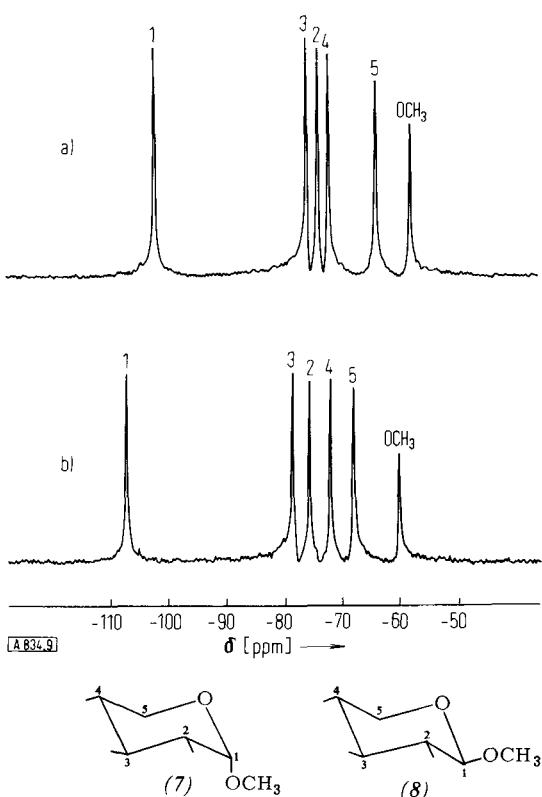


Abb. 9. 22.63-MHz-PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von a)  $\alpha$ - und b)  $\beta$ -Methyl- $\text{D}$ -xylopyranosid (7) bzw. (8), 2 M in Wasser, 256 Impulse, Impulsbreite 30  $\mu\text{s}$ , Impulsintervall 0.4 s. Die Zahlen an den Signalen beziehen sich auf die Nummern der C-Atome.  $\delta$ -Werte bezogen auf TMS = 0.

(Abb. 9) zeigen einige für alle Pyranoside geltende Gesetzmäßigkeiten<sup>[43]</sup>.

Die Signale der anomeren Kohlenstoffatome C-1 werden bei tiefstem Feld beobachtet. Im Methyl- $\alpha$ -D-xylopyranosid

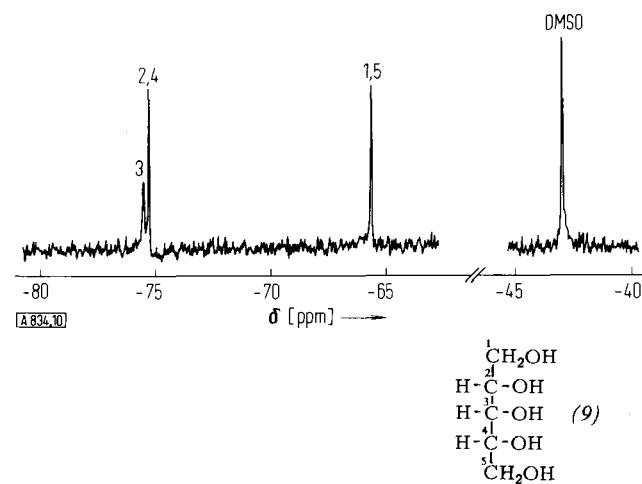


Abb. 10. 22.63-MHz-PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Ribit (9) in Dimethylsulfoxid; 256 Impulse, Impulsbreite 40  $\mu\text{s}$ , Impulsintervall 0.4 s. Die Zahlen an den Signalen beziehen sich auf die Nummern der C-Atome.  $\delta$ -Werte bezogen auf TMS = 0.

liegt das C-1-Signal infolge der axialen Methoxygruppe um 4.5 ppm bei höherem Feld als das C-1-Signal des  $\beta$ -Anomeren mit äquatorialer Methoxygruppe. Ebenso er-

scheint das bei höchstem Feld liegende Signal der axialen  $\alpha$ -Methoxygruppe um 1.9 ppm höher als das der äquatorialen  $\beta$ -Methoxygruppe. Da keine OR-Gruppe mit C-5 verknüpft ist, hat dieses Atom die höchste Abschirmung aller Pyranose-Kohlenstoffatome (Abb. 9). Bei Konfigurationswechsel der Methoxygruppe an C-1 von äquatorial nach axial verschieben sich die Signale von C-2, C-3 und C-5 nach höherem Feld. Das Signal von C-4 wird dagegen kaum beeinflusst.

Die Zuordnung der  $^{13}\text{C}$ -Signale von offenkettigen Polyalkohole gelingt mit folgenden Regeln<sup>[46]</sup>:

1. Die  $^{13}\text{C}$ -Signale der  $\text{CH}_2$ - oder  $\text{CH}_3$ -Gruppen<sup>[9]</sup> von Desoxypolyolen liegen erwartungsgemäß bei höchstem Feld.
2. Eine Hydroxygruppe übt einen großen induktiven Effekt auf das mit ihr verknüpfte C-Atom aus (Tieffeldverschiebung)<sup>[45]</sup>.
3. Bei vicinalen Polyolen liegen die  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen sekundärer alkoholischer Reste bei tieferem Feld als die primärer<sup>[46]</sup>.
4. Aus Symmetriegründen verursachen äquivalente Kohlenstoffatome identische Signale, die an ihrer stärkeren Intensität zu erkennen sind<sup>[46]</sup>.

Abbildung 10 illustriert die Regeln 3 und 4 am PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum des optisch inaktiven Ribits (9): Aus Symmetriegründen geben C-1 und C-5 zusammen ein Signal bei höchstem, C-2 und C-4 ein weiteres bei tieferem Feld. Bei tiefstem Feld erscheint mit halber Intensität das C-3-Signal. Pentite und Hexite geringerer Symmetrie wie Arabit oder Sorbit zeigen fünf bzw. sechs Resonanzsignale<sup>[46]</sup>.

## 7.5. Nucleoside und Nucleotide

Die  $^{13}\text{C}$ -Resonanzspektren von Purinnucleosiden und -nucleotiden weisen zwei Signalgruppen auf, wie das PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum des Adenosin-5'-monophosphats (Muskel-Adenylsäure) (10) zeigt. Im Bereich von –64 bis –94 ppm liegen die Resonanzen der Ribofuranose und von –95 bis –165 ppm (vgl. Abb. 11) die des Heterocyclus<sup>[47–50]</sup>. Nach Untersuchungen an Kohlenhydraten<sup>[39–42]</sup> und Nucleosiden<sup>[47–50]</sup> erscheint das  $^{13}\text{C}$ -Resonanzsignal der Hydroxymethylgruppe (C-5') bei höchstem, das des anomeren Kohlenstoffatoms (C-1') bei tiefstem Feld innerhalb der Pentose- $^{13}\text{C}$ -Resonanzen. Von allen Kohlenhydratsignalen ändert sich das von C-1' bei Variation des Heterocyclus am stärksten. Durch Phosphorkohlenstoff-Kopplung erscheint das Signal von C-4' als Dublett und ist somit leicht zu identifizieren. Ein Vergleich von Ribonucleotiden mit Desoxyribonucleotiden erlaubt die Zuordnung der C-2'- und C-3'-Signale.

Die Signale von C-2 und C-8 des Adenylrestes können durch Off-Resonance-Protonenentkopplung und Vergleich mit den Spektren anderer Purinnucleoside zugeordnet werden. Weitere Vergleiche mit den Spektren von Purin- und Pyrimidinnucleosiden gestatten die Identifizierung der restlichen drei quartären C-Atome. Vom Heterocyclus erscheint das C-5-Signal bei höchstem, das C-6-Signal bei tiefstem Feld.

Selbst unter Anwendung des CAT-Verfahrens ist es bisher nicht gelungen, die helicale Struktur bei Polynucleotiden durch  $^{13}\text{C}$ -Resonanz nachzuweisen. Ebenso schlugen bisher die Versuche fehl, Wechselwirkungen zwischen ver-

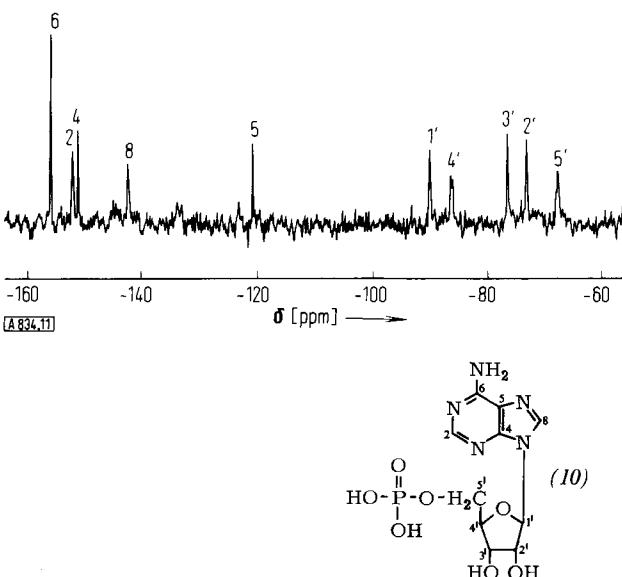


Abb. 11. 22.63-MHz-PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Adenosin-5'-monophosphat (10) in Dimethylsulfoxid; 1024 Impulse, Impulsbreite 5  $\mu\text{s}$ , Impulsintervall 0.4 s. Die Zahlen an den Signalen beziehen sich auf die Nummern der C-Atome.  $\delta$ -Werte bezogen auf TMS = 0.

schiedenen Nucleotiden durch Verschiebungen der  $^{13}\text{C}$ -Resonanz zu ermitteln<sup>[47]</sup>.

Abbildung 12 zeigt den Zusammenhang<sup>[48]</sup> zwischen  $^{13}\text{C}$ -chemischer Verschiebung und  $\pi$ -Elektronendichte<sup>[51]</sup> bei Purinnucleosiden. Nur die Resonanzen der  $^{13}\text{C}$ -H-Atome

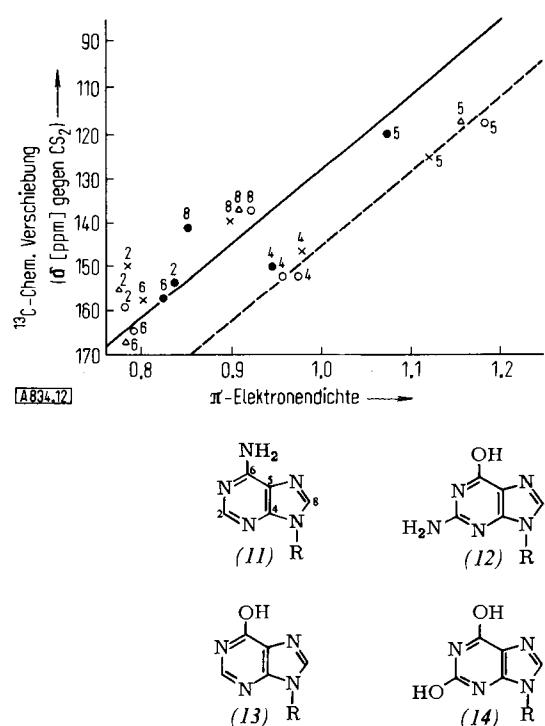


Abb. 12. Zusammenhang zwischen  $^{13}\text{C}$ -chemischer Verschiebung und  $\pi$ -Elektronendichte bei den Purinnucleosiden Adenosin (11) (●), Guanosin (12) (Δ), Inosin (13) (×) und Xanthosin (14) (○). Die Zahlen beziehen sich auf die Nummern der C-Atome. R = Ribosyl.

gehoren der Spiesecke-Schneider-Beziehung<sup>[23]</sup> (160 ppm/π-Elektron). Die quartären C-Atome gehoren einer anderen Gesetzmäßigkeit (gestrichelte Linie).

## 7.6. Aminosäuren und Oligopeptide

Die ersten <sup>13</sup>C-Resonanzen einiger Aminosäuren wurden indirekt aus INDOR-Spektren<sup>[52]</sup>, später aus den <sup>1</sup>H-breitbandenkoppelten, akkumulierten 15-MHz-<sup>13</sup>C-NMR-Spektren von <sup>13</sup>C-angereicherten (15%) Aminosäuren erhalten<sup>[53]</sup>. Die Gewinnung isotopenangereicherter Aminosäuren ist mit großem finanziellem und zeitlichem Aufwand verbunden und kommt nur für spezielle Anwendungen in Frage, z. B. zum spezifischen Einbau markierter Aminosäuren in ein Peptid oder zur Untersuchung von Enzym-Substrat-Wechselwirkungen mit <sup>13</sup>C-angereicherten Substraten. Die Vorteile der PFT-Technik wurden an den <sup>13</sup>C-Spektren freier Aminosäuren, Peptide und deren Derivate<sup>[54–56]</sup> sowie von Proteinen (siehe 7.7) mit natürlichem <sup>13</sup>C-Gehalt gezeigt.

Zur Aufnahme der Spektren gut löslicher Aminosäuren genügt meist die Akkumulation von 500 Impulsen (3.5 min)<sup>[56]</sup>. Ein einwandfreies PFT-<sup>13</sup>C-Spektrum (22.63 MHz) einer 0.2 M wäßrigen Lösung des Tripeptides Glutathion lässt sich innerhalb von weniger als 30 min durch Akkumulation von 4000 Durchgängen zu je 0.4 s unter <sup>1</sup>H-Entkopplung mit anschließender Fourier-Transformation erhalten<sup>[54]</sup>. Die Aufnahme gut interpretierbarer Spektren von Peptidantibiotika wie Gramicidin und kleineren Peptidhormonen wie Oxytocin und Vasopressin erfordert Aufnahmezeiten von ca. 3 Stunden bei 0.05–0.1 M Lösungen<sup>[57]</sup>.

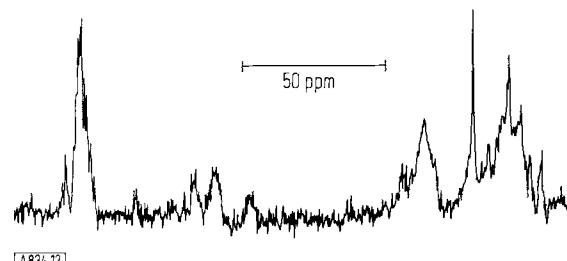


Abb. 13. 22.63-MHz-<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von Carboxymyoglobin,  $8 \cdot 10^{-3}$  M in 0.1 M Phosphatpuffer, 240 000 Impulse, Impulsbreite 60  $\mu$ s, Impulsintervall 0.4 s, 2048 Datenpunkte. Aufnahme Fa. Bruker Physik AG, Karlsruhe-Forchheim.

<sup>13</sup>C-NMR-Verschiebungen von Aminosäuren und Peptiden erstrecken sich über einen Bereich von -15 bis -180 ppm gegen TMS (siehe Abb. 13). Sie zeigen bei tiefstem Feld (-160 bis -180 ppm) die <sup>13</sup>C-Resonanzen der Carbonylgruppen (Carboxy-, Säureamid-, Hydrazid-, Ester- und Oxycarbonylgruppe geschützter Derivate sowie Peptidbindung). In den Bereich von -120 bis -145 ppm fallen die Signale aromatischer und heteroaromatischer Substituenten an C-α (Phenyl, Indolyl, Imidazolyl). Die <sup>13</sup>C-α-Signale erscheinen zwischen -50 und -65 ppm und charakterisieren jede Aminosäure. Bei höherem Feld (-15 bis -40 ppm) liegen die Resonanzen von C-β und C-γ aliphatischer Seitenketten (Übersicht siehe<sup>[56]</sup>). Die Signalzuordnung bei den einzelnen Aminosäuren gelingt am ein-

fachsten durch Spektrenvergleich homologer Reihen oder durch Vergleich mit den nach den Additivitäts-Regeln von Grant et al.<sup>[19, 58]</sup> geschätzten Werten, die gut mit den beobachteten ppm-Werten übereinstimmen<sup>[52]</sup>. In Zweifelsfällen kann die Zuordnung der Resonanzen anhand off-resonance-<sup>1</sup>H-entkoppelter Spektren oder durch Wechsel des Lösungsmittels oder Änderung des pH-Wertes eindeutig erfolgen. Die Signale der Seitenketten von Aminosäuren hängen jedoch auch bei geschützten Derivaten und Peptiden nur geringfügig vom Lösungsmittel ab (2–3 ppm); allerdings liegen bis jetzt nur wenige vergleichende Messungen in Wasser, DMSO<sup>[56]</sup> und Methanol<sup>[59]</sup> vor.

Die Messung der pH-Abhängigkeit der <sup>13</sup>C-Spektren einiger einfacher Aminosäuren und Peptide lieferte die pK-Werte der NH<sub>3</sub><sup>+</sup>- und COOH-Gruppen in ausgezeichneter Übereinstimmung mit anderen Methoden<sup>[52]</sup>. Mit zunehmendem pH-Wert (Abdissoziation der Protonen von COOH und NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) verschieben sich die <sup>13</sup>C-Resonanzen etwas nach tieferem Feld (2–4 ppm) infolge des Ladungsdichtewechsels an C-α. Die Ladungsdichtevertteilung lässt sich nach Del Re et al.<sup>[60]</sup> halbempirisch für Aminosäuren ermitteln<sup>[52]</sup>. Die anomale Tieffeldverschiebung (Hochfeldverschiebung) der <sup>13</sup>C-Signale bei der Deprotonierung (Protonierung) wird auch bei Aminen, Carbonsäuren und Phosphorsäuresystemen beobachtet. Sie steht im Gegensatz zur Verschiebung der <sup>1</sup>H-Signale nach höherem Feld bei Erhöhung des pH-Wertes. Dies kann nicht auf induktive Effekte oder auf einen Hybridisierungswchsel zurückgeführt werden, da kein Wechsel der Kopplungskonstanten beobachtet wird. Die gegenläufige Verschiebung der <sup>13</sup>C- und <sup>1</sup>H-Signale kann in erster Näherung als Folge einer Polarisation der C—H-Bindungen durch die Ammonium- oder Carboxylatgruppe gedeutet werden, wobei die Elektronendichte am Kohlenstoff ab- und am Wasserstoff zunimmt<sup>[52]</sup>.

Die Messung der pH-Abhängigkeit der <sup>13</sup>C-Spektren multifunktioneller Aminosäuren und Peptide mit der PFT-Technik gestattet eine neuartige Bestimmung dieser Verbindungen<sup>[57]</sup>. Da sich die <sup>13</sup>C-α-Signale von Cystein und Cystin um 13 ppm voneinander unterscheiden<sup>[54]</sup>, lässt sich die pH-Abhängigkeit der Redoxgleichgewichte dieser Aminosäuren und von Peptiden wie Glutathion untersuchen, was z. B. mit polarographischen und anderen Methoden außerordentlich schwierig ist<sup>[61]</sup>.

## 7.7. Polypeptide und Proteine

Die Interpretation der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von Polypeptiden und Proteinen bereitet trotz Entwicklung hochauflösender, supraleitender Magnete und des CAT-Verfahrens erhebliche Schwierigkeiten<sup>[62–68]</sup>. Mehr Information kann aus <sup>1</sup>H-NMR-Spektren durch Verwendung partiell deuterierter Enzyme<sup>[69]</sup> oder durch Anwendung selektiver Kontaktverschiebungs-Reagentien<sup>[70]</sup> erhalten werden, was allerdings oft mit einem teilweisen Verlust an Auflösung erkauft wird.

Dagegen lassen sich die Singulets aller Kohlenstoffatome in den <sup>1</sup>H-rauschenkoppelten PFT-<sup>13</sup>C-Spektren selbst bei Decapeptiden noch erfassen und zuordnen. Wegen der gegenüber <sup>1</sup>H-NMR-Signalen von Makromolekülen um

ca.  $1/_{16}$  geringeren Linienbreite der  $^{13}\text{C}$ -Signale<sup>[59]</sup> und der größeren chemischen Verschiebungen ist dabei die Wahrscheinlichkeit der Überlappung mehrerer Signale außer im Carbonylbereich äußerst gering. Vorläufige Untersuchungen zur Sequenzabhängigkeit der  $^{13}\text{C}$ -Signale zeigen, daß eine eindeutige Sequenzanalyse höchstens bis zu Tri- und Tetrapeptiden möglich ist<sup>[52, 56]</sup>.

Bereits durch einfache Akkumulation unter Breitbandentkopplung gelang die Aufnahme der  $^{13}\text{C}$ -Spektren des Decapeptid-Antibiotikums Gramicidin S-A<sup>[59]</sup> und der Kohlenhydrat-Hydrolase Lysozym (Mol.-Gew. 14 300, 129 Aminosäuren, 87 Std. Akkumulation)<sup>[71]</sup>. Durch die PFT-NMR-Technik lassen sich bedeutend aussagekräftigere  $^{13}\text{C}$ -Spektren von größeren Peptidhormonen wie Insulin<sup>[72]</sup>, von Enzymen wie Ribonuclease<sup>[73]</sup> und von Proteinen (Carboxymyoglobin, Abb. 13) innerhalb kürzerer Akkumulationszeiten (10–20 Std. bei 0.02 M Lösungen) erhalten. Längere Akkumulationszeiten sind weniger durch die Langzeitstabilität des Magneten als vielmehr durch die Kapazität des Computers begrenzt. Sie ermöglichen kaum eine wesentliche Verbesserung bei den  $^{13}\text{C}$ -Spektren komplexer Biopolymerer.

Das PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Carboxymyoglobin (153 Aminosäuren, Abb. 13) zeigt bei tiefstem Feld den typischen Absorptionsbereich der Peptid- und Seitenketten-Carbonylgruppen. Daran anschließend folgen die Resonanzen der Seitenketten aromatischer Aminosäuren, vor allem die der zwölf Histidine und sechs Phenylalanine. Bei noch höherem Feld erscheinen nacheinander die C- $\alpha$ -Signale, dann die C- $\beta$ -, C- $\gamma$ - und Methylresonanzen der Seitenketten aliphatischer Aminosäuren. Die Signalintensität im Bereich der Absorption der Guanidinium-Kohlenstoffatome (bei  $-155$  ppm) ist bei Myoglobin (4 Arginine) natürlich geringer als z. B. bei Lysozym<sup>[71]</sup> (11 Arginine). Die Interpretation solcher  $^{13}\text{C}$ -Spektren von Biopolymeren vereinfacht sich durch Vergleich mit einem computersimulierten Spektrum, wie man bereits am Lysozym zeigen konnte<sup>[71]</sup>. Wie ein Vergleich der abgeschätzten Signalintensitäten der verschiedenen Resonanzbereiche mit dem integrierten PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum der Ribonuclease zeigt, stimmen diese gut mit den experimentell ermittelten Werten überein<sup>[73]</sup>.

Die unterschiedlichen  $^1\text{H}$ -Resonanzen links- und rechtsständiger Helices werden der magnetischen Anisotropie der Carbonylgruppen zugeschrieben. Im Vergleich dazu sollten bei der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie elektrische Feldeffekte auf die  $^{13}\text{C}$ -Verschiebungen einen größeren Einfluß haben und über den magnetischen Anisotropie-Effekt der Carbonylgruppen dominieren. Somit sollten zwischen Random-coil-Konformationen von Polypeptiden und links- sowie rechtshändigen Helices größere  $^{13}\text{C}$ -Signalverschiebungen auftreten. Ebenso sollten sich direkte sterische Wechselwirkungen in Proteinen spezieller Konformationen in ausgeprägten, sterisch induzierten Verschiebungen äußern<sup>[52]</sup>.

Die wenigen vorliegenden  $^{13}\text{C}$ -NMR-Untersuchungen auf dem Peptidgebiet lassen bereits jetzt den Schluß zu, daß die PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie eine Fülle wichtiger biochemischer Fragen beantworten wird, die das Kohlenstoffskelett dieser Biopolymeren betreffen.

## 8. $^{13}\text{C}$ -NMR-Kontaktverschiebungen und Asymmetrieffekte

Neben den neuerdings aktuellen Anwendungen von Kontaktverschiebungs-Reagentien in der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie wird auch bereits die Kontaktverschiebung  $^1\text{H}$ -entkoppelter  $^{13}\text{C}$ -NMR-Signale in Gegenwart paramagnetischer Metallkomplexe untersucht<sup>[74–77]</sup>.

$^{13}\text{C}$ -Kontaktverschiebungs-Studien an  $\pi$ -Elektronensystemen<sup>[74, 76, 77]</sup> und  $\sigma$ -Elektronensystemen<sup>[75]</sup> zeigen, daß analog zu den  $^1\text{H}$ -Resonanzen auch die  $^{13}\text{C}$ -Resonanzen von der Konzentration des zugesetzten Verschiebungsreagens abhängig sind. Bei Nickelpentandionat-Piperidin- und -*N*-Alkylpiperidin-Komplexen wurden die  $^{13}\text{C}$ -Verschiebungen (bis zu 6 ppm) zur Untersuchung der Konfiguration und der Art der ElektronenspindichteVerteilung durch das  $\sigma$ -Elektronensystem herangezogen<sup>[75]</sup>. Außerdem beeinflußt die Kontaktwechselwirkung auch die  $^{13}\text{C}$ -Relaxation. Deshalb werden paramagnetische Metall-Ionen benutzt, um Intensitätsänderungen von  $^{13}\text{C}$ -Signalen aufgrund von Kern-Overhauser-Effekten während der  $^1\text{H}$ -Breitbandentkopplung zu verhindern<sup>[11]</sup>.

Molekülasymmetrieffekte auf  $^{13}\text{C}$ -NMR-Verschiebungen wurden bereits an Isopropylalkyl-alkoholen und Isopropylalkanen beobachtet<sup>[78]</sup>. Die durch die Nähe eines Asymmetriezentrums bedingte Nichtäquivalenz ( $\delta_A - \delta_B$ ) der Methylgruppen A und B der Isopropylgruppe nimmt mit Alkyl=Methyl, Äthyl, Isopropyl, tert.-Butyl von 0.1 bis 7.2 ppm zu. Dies wird durch die steigende Population einer bevorzugten Konformation mit  $\text{CH}_{3A}$  ( $\delta_A > \delta_B$  gegen  $\text{CS}_2$ ) zwischen Wasserstoff und der Hydroxygruppe an einer Hydroxymethylgruppe erklärt<sup>[78]</sup>. Diese Asymmetriever-schiebung ist für  $^{13}\text{C}$  wesentlich größer als für  $^1\text{H}$ . Die Nichtäquivalenz der Methylgruppen im Isopropylrest in der Nähe eines asymmetrischen C-Atoms läßt sich besonders deutlich in den PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von Valin und Leucin sowie deren Derivaten beobachten<sup>[56]</sup>. Die PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR- kann die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie insbesondere bei der Strukturaufklärung und Bestimmung der enantiomeren Reinheit von Diastereomeren ergänzen.

## 9. Isotopeneffekte und Aufklärung von Biosynthesewegen

Zur Aufklärung von Strukturen und Reaktionsabläufen führt man häufig Isotope, z. B.  $^2\text{H}$  oder  $^{13}\text{C}$ , an bestimmten Positionen eines Moleküls ein. Zur analytischen Verfolgung solcher Versuche bietet sich die PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie an: Zum einen ist die Isotopenverschiebung von  $^{13}\text{C}$ -Signalen sehr groß – so liegt das  $^{13}\text{C}$ -Triplet des Hexadeuteriobenzols um 13 ppm bei höherem Feld als das Benzolsingulett im  $^1\text{H}$ -entkoppelten  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum –, zum andern können in deuterierten Verbindungen die Deuteriumpositionen durch Vergleich der  $^1\text{H}$ -entkoppelten mit den simultan  $^1\text{H}$ - und  $^2\text{H}$ -entkoppelten PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren erkannt werden. Abbildung 14 illustriert dies für *cis*-3,3,4,7,8,8-Hexadeuterio-tricyclo[5.1.0.0<sup>2,4</sup>]octan (15)<sup>[79]</sup>. Ist das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum nur  $^1\text{H}$ -entkoppelt, so zeigen sich die mit  $^2\text{H}$  verknüpften C-Atome wegen des fehlenden Overhauser-Effektes als schwache Multipletts.

Die PFT-<sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie erlaubt auch die schrittweise Verfolgung jedes C-Atoms eines Naturstoffes bei seiner Biosynthese. Durch Verwendung <sup>13</sup>C-angereicherter Ausgangsstoffe (<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>, <sup>13</sup>C-Acetat) oder <sup>13</sup>C-markierter Metaboliten in den Kulturmedien lassen sich spezifisch markierte Metaboliten bzw. Endstufen gewinnen, die

forderlich sind, lassen sich die bisher üblichen aufwendigen Radioisotopenverfahren in vielen Fällen durch diese neue NMR-Technik ersetzen.

## 10. PFT-<sup>13</sup>C-NMR-Messungen in nichtflüssigen Phasen

### 10.1. Nematische Phasen

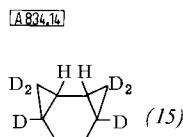
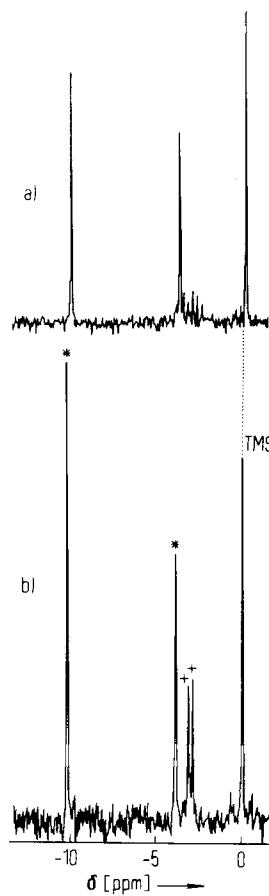


Abb. 14. 22.63-MHz-PFT-<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von *cis*-3,3,4,7,8,8-Hexadeutero-tricyclo[5.1.0.0<sup>2,4</sup>]octan (15), 20-proz. in Hexafluorbenzol/TMS, 4000 Impulse, Impulsbreite 40 µs, Impulsintervall 0.4 s. a) <sup>1</sup>H-breitbandenkoppelt, b) <sup>1</sup>H- und <sup>2</sup>H-breitbandenkoppelt, C-<sup>1</sup>H (\*) C-<sup>2</sup>H (+). δ-Werte bezogen auf TMS = 0.

mit der <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie analysiert werden können. Die <sup>13</sup>C-markierten Positionen erkennt man an der hohen Intensität der zugehörigen Signale. In einem Doppelpelexperiment wurde die Aflatoxin-Vorstufe Sterigmatocystin aus Kulturen von *Aspergillus versicolor* isoliert, die zum einen mit Natrium-[1-<sup>13</sup>C]-acetat, zum andern mit Natrium-[2-<sup>13</sup>C]-acetat als Kohlenstoffquellen gezüchtet worden waren. Die Interpretation der <sup>1</sup>H-entkoppelten akkumulierten 25.15-MHz-<sup>13</sup>C-NMR-Spektren der beiden markierten Metaboliten erlaubte eine eindeutige Bestimmung der Herkunft jedes Kohlenstoffatoms in Sterigmatocystin. Damit war eine kürzlich veröffentlichte Hypothese zur Biogenese des Sterigmatocystins bewiesen worden<sup>[80]</sup>.

Trotz der für Biosynthesestudien immer noch erheblichen Substanzmengen, die für PFT-<sup>13</sup>C-NMR-Messungen er-

In flüssiger Phase ist das NMR-Spektrum einer gelösten Verbindung isotrop: Äquivalente Kerne verursachen ein einziges Signal. Nematische Phasen (flüssige Kristalle) beschränken die Bewegung gelöster Moleküle: Im Magnetfeld orientieren sich die gelösten Moleküle in bestimmten Richtungen, welche von der Molekülgeometrie abhängen. Das NMR-Spektrum wird daher anisotrop; äquivalente Kerne verursachen Multipletts als Folge solcher Orientierungen. Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des 1,3,5-Trichlorbenzols besteht in flüssiger Phase aus einem Singulett, in nematischer Phase (4,4'-Di-n-hexyloxyazobenzol (17) bei 80°C) aus einem Triplet<sup>[81, 82]</sup>.

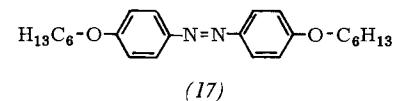
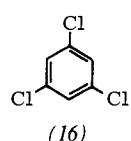
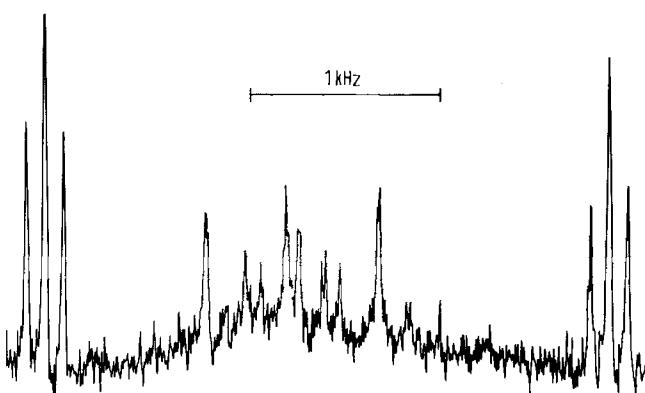


Abb. 15 PFT-<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von 1,3,5-Trichlorbenzol (16), 13-proz. in nematischer Phase 4 (Fa. Merck) bei 297°K; 85000 Impulse, Impulsbreite 40 µs, Impulsintervall 0.4 s.

Wegen der geringen Empfindlichkeit der <sup>13</sup>C-Resonanz war die Aufnahme von <sup>13</sup>C-NMR-Spektren in nematischen Phasen bisher erschwert, denn die Aggregate flüssiger Kristalle brechen schon bei mittleren Konzentrationen gelöster Verbindungen (ca. 20%) zusammen<sup>[82]</sup>. Abbildung 15 zeigt am Beispiel des 1,3,5-Trichlorbenzols, daß die PFT-Technik eine Aufnahme von <sup>13</sup>C-Spektren in nematischen Phasen ermöglicht<sup>[79]</sup>. Die beiden etwa 3 kHz voneinander entfernten Triplets entsprechen den C—H-Atomen. Dazwischen überlappen die C—Cl-Signale mit dem breiten Signal der nematischen Phase. Das Spektrum wird gegenwärtig analysiert<sup>[79]</sup>.

### 10.2. Feste Phasen

Untersuchungen an Polymeren mit der hochauflösenden Kernresonanz waren bisher aus Löslichkeitsgründen er-

schwert. Wegen der geringen Linienbreite von  $^{13}\text{C}$ -Signalen<sup>[59]</sup> sind  $^{13}\text{C}$ -Messungen selbst in hochviskosen und festen Phasen möglich. Dies konnte durch Aufnahme von PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren vieler Polymerer in festem Zustand demonstriert werden<sup>[79]</sup>. Abbildung 16 zeigt als

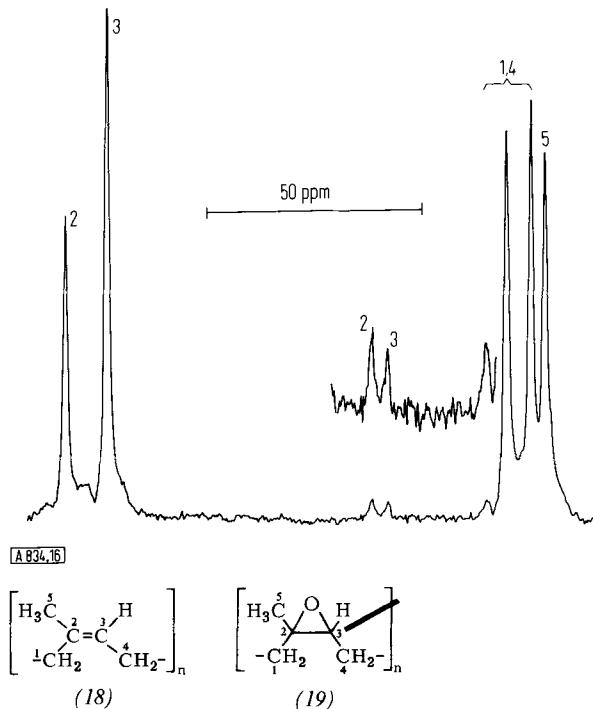


Abb. 16.  $^1\text{H}$ -breitbandentkoppeltes 22.63-MHz-PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Naturkautschuk mit 5% Isoprenoxid, 100%, fest, ext.  $\text{D}_2\text{O}$  als Locksubstanz, 8000 Impulse, Impulsbreite 40  $\mu\text{s}$ , Impulsintervall 0.2 s. Die Zuordnung der Isopren-Einheiten (18) ist in das Gesamtspektrum eingetragen, die der Isoprenoxid-Einheiten (19) in das vergrößerte Teilspektrum.

Beispiel das  $^1\text{H}$ -breitbandentkoppelte PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Naturkautschuk, der 5% Isoprenoxid enthält. Alle Arten der in diesem Makromolekül vorliegenden C-Atome können leicht erkannt werden.

Wir danken den Herren Toni Keller, Dr. Christian Tänzer, Dr. Roger Price und Dr. Victor Formacek (Fa. Bruker Physik AG, Karlsruhe-Forchheim) für viele Anregungen sowie für die Aufnahme zahlreicher PFT- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren. Herrn Dr. Roger Price danken wir herzlich für die Durchsicht des Manuskriptes.

Eingegangen am 16. März 1971 [A 834]

- [1] R. R. Ernst u. W. A. Anderson, Rev. Sci. Instruments 37, 93 (1966).
- [2] R. R. Ernst u. J. S. Wangh, Advan. Magnet. Res. 2, 108 (1966).
- [3] W. Bremser, H. D. W. Hill u. R. Freeman, Meßtechnik 78, 14 (1970).
- [4] F. Bloch, Phys. Rev. 70, 460 (1946).
- [5] E. Becker: High Resolution NMR. Academic Press, New York 1969, S. 25, 210.
- [6] I. J. Lowe u. R. E. Norberg, Phys. Rev. 107, 46 (1957).
- [7] R. J. Pugmire, D. M. Grant, M. J. Robins u. R. K. Robins, J. Amer. Chem. Soc. 91, 6381 (1969).
- [8] E. D. Becker, J. A. Ferretti u. T. C. Farrar, J. Amer. Chem. Soc. 91, 7784 (1969).
- [9] J. S. Waugh, J. Mol. Spectroscopy 35, 298 (1970).
- [10] H. Suh: Anwendungen der Kernmagnetischen Resonanz in der Organischen Chemie. Springer, Berlin 1965, S. 260.
- [11] R. A. Hoffmann u. S. Forsén, Progr. in NMR-Spectroscopy 1, 82 (1966); W. v. Philipsborn, Angew. Chem. 83, 470 (1971); Angew. Chem. internat. Edit. 10, 472 (1971).
- [12] K. F. Kuhlmann u. D. M. Grant, J. Amer. Chem. Soc. 90, 7355 (1968).
- [13] E. Wenkert, A. O. Clouse, D. W. Cochran u. D. Doddrell, J. Amer. Chem. Soc. 91, 6879 (1969).
- [14] H. J. Reich, M. Jautelat, M. T. Messe, F. J. Weigert u. J. D. Roberts, J. Amer. Chem. Soc. 91, 7445 (1969).
- [15] K. F. Kuhlmann, D. M. Grant u. P. K. Harris, J. Chem. Phys. 52, 3439 (1970).
- [16] A. Allerhand u. D. Cochran, J. Amer. Chem. Soc. 92, 4482 (1970).
- [17] R. Freeman u. H. D. W. Hill, J. Chem. Phys. 53, 4103 (1970).
- [18] H. Günther, Nachr. Chem. Techn. 18, 151 (1970).
- [19] D. M. Grant u. E. G. Paul, J. Amer. Chem. Soc. 86, 2984 (1964).
- [20] E. G. Paul u. D. M. Grant, J. Amer. Chem. Soc. 85, 1701 (1963).
- [21] J. J. Burke u. P. C. Lauterbur, J. Amer. Chem. Soc. 86, 1870 (1964).
- [22] H. Günther u. T. Keller, Chem. Ber. 103, 3231 (1970).
- [23] H. Spiesecke u. W. G. Schneider, Tetrahedron Lett. 1961, 468.
- [24] G. A. Olah u. A. M. White, J. Amer. Chem. Soc. 91, 3954 (1969).
- [25] M. Jautelat, J. B. Grutzner u. J. D. Roberts, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 65, 288 (1970).
- [26] J. B. Grutzner, M. Jautelat, J. B. Dence, R. A. Smith u. J. D. Roberts, J. Amer. Chem. Soc. 92, 7107 (1970).
- [27] H. J. Reich, M. Jautelat, M. T. Messe, F. J. Weigert u. J. D. Roberts, J. Amer. Chem. Soc. 91, 7445 (1969).
- [28] E. Breitmaier, G. Jung u. W. Voelter, noch unveröffentlicht.
- [29] J. B. Stothers, Quart. Rev. 19, 144 (1965).
- [30] R. A. Friedel u. H. L. Retcofsky, J. Amer. Chem. Soc. 85, 1300 (1963).
- [31] D. H. Marr u. J. B. Stothers, Can. J. Chem. 43, 596 (1965).
- [32] G. B. Savitsky, P. D. Ellis, K. Namikawa u. G. E. Maciel, J. Chem. Phys. 49, 2395 (1968).
- [33] J. B. Stothers u. P. C. Lauterbur, Can. J. Chem. 42, 1563 (1964).
- [34] G. B. Savitsky, K. Namikawa u. G. Zweifel, J. Phys. Chem. 69, 3105 (1965).
- [35] J. W. Emsley, J. Feeney u. L. H. Sutcliffe: High Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Pergamon, London 1966, Bd. 2.
- [36] D. K. Dalling u. D. M. Grant, J. Amer. Chem. Soc. 89, 6612 (1967).
- [37] E. Wenkert, C. J. Chang, A. O. Clouse u. D. W. Cochran, Chem. Commun. 1970, 961.
- [38] R. E. Moore, U. R. Ghatak, J. Chakravarty, R. Dasgupta u. L. F. Johnson, Chem. Commun. 1970, 1136.
- [39] A. S. Perlin u. B. Casu, Tetrahedron Lett. 1969, 2921.
- [40] L. D. Hall u. L. F. Johnson, Chem. Commun. 1969, 509.
- [41] A. S. Perlin, B. Casu u. H. J. Koch, Can. J. Chem. 48, 2596 (1970).
- [42] D. E. Dorman u. J. D. Roberts, J. Amer. Chem. Soc. 92, 1355 (1970).
- [43] E. Breitmaier, W. Voelter, G. Jung u. C. Tänzer, Chem. Ber. 104, 1147 (1971); W. Voelter, E. Breitmaier, R. Price u. G. Jung, Chimia 25, 168 (1971).
- [44] G. W. Buchanan, D. A. Ross u. J. B. Stothers, J. Amer. Chem. Soc. 88, 4301 (1966).
- [45] J. D. Roberts, F. J. Weigert, J. I. Kroschwitz u. H. J. Reich, J. Amer. Chem. Soc. 92, 1338 (1970).
- [46] W. Voelter, E. Breitmaier, G. Jung, T. Keller u. D. Häß, Angew. Chem. 82, 812 (1970); Angew. Chem. internat. Edit. 9, 803 (1970).
- [47] D. E. Dorman u. J. D. Roberts, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 65, 19 (1970).
- [48] A. J. Jones, M. E. Einkley, D. M. Grant u. R. K. Robins, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 65, 27 (1970).
- [49] A. J. Jones, D. M. Grant, M. W. Winkley u. R. K. Robins, J. Amer. Chem. Soc. 92, 4079 (1970).
- [50] G. Jung, E. Breitmaier u. W. Voelter, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., im Druck.
- [51] J. I. Fernandez-Alfonso, Advan. Chem. Phys. 7, 3 (1964).
- [52] W. Horsley u. H. Sternlicht, J. Amer. Chem. Soc. 90, 3738 (1968).
- [53] W. Horsley, H. Sternlicht u. J. S. Cohen, J. Amer. Chem. Soc. 92, 680 (1970).
- [54] G. Jung, E. Breitmaier, W. Voelter, T. Keller u. C. Tänzer, Angew. Chem. 82, 882 (1970); Angew. Chem. internat. Edit. 9, 894 (1970).
- [55] G. Jung, E. Breitmaier u. W. Voelter, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 352, 16 (1971).
- [56] W. Voelter, G. Jung, E. Breitmaier u. E. Bayer, Z. Naturforsch. 26b, 213 (1971).
- [57] G. Jung, E. Breitmaier u. W. Voelter, unveröffentlicht.

- [58] *A. J. Jones, D. M. Grant u. K. F. Kuhlmann*, J. Amer. Chem. Soc. 91, 5013 (1969).

[59] *W. A. Gibbons, J. A. Sogn, A. Stern, L. C. Craig u. L. F. Johnson*, Nature 227, 840 (1970).

[60] *G. Del Re, B. Pullman u. T. Yonezawa*, Biochim. Biophys. Acta 75, 153 (1963).

[61] *G. Jung* et al., in Bearbeitung.

[62] *G. C. K. Roberts u. O. Jarretzky*, Advan. Protein Chem. 24, 447 (1970).

[63] *E. M. Bradbury u. C. Crane-Robinson*, Nature 220, 1079 (1968).

[64] *C. C. McDonald u. W. D. Phillips*, J. Amer. Chem. Soc. 89, 6332 (1967); 91, 1513 (1969).

[65] *P. C. Lauterbur, E. J. Runde u. B. L. Blitzer*: Proceedings of Magnetic Resonances in Biological Research – An International Conference. Gordon and Breach, New York, im Druck.

[66] *R. Shulman*, Biochim. Biophys. Res. Commun. 42, 9 (1971).

[67] *J. J. Rowe, J. Hinton u. K. L. Rowe*, Chem. Rev. 70, 1 (1970).

[68] *B. Sheard u. E. M. Bradbury*, Progr. Biophys. Mol. Biol. 20, 189 (1970).

[69] *I. Putter* et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 64, 1396 (1969).

[70] *K. G. Morallee, E. Nieboer, F. J. C. Rosotti, R. J. P. Williams u. A. V. Xavier*, Chem. Commun. 1970, 1132.

[71] *P. C. Lauterbur*, Appl. Spectrosc. 24, 450 (1970).

[72] *G. Jung, E. Breitmaier u. W. Voelter*, noch unveröffentlicht.

[73] *A. Allerhand, D. W. Cochran u. D. Doddrell*, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 67, 1093 (1970).

[74] *D. Doddrell u. J. D. Roberts*, J. Amer. Chem. Soc. 92, 4484 (1970).

[75] *I. Morishima, K. Okada, T. Yonezawa u. K. Goto*, Chem. Commun. 1970, 1535.

[76] *I. Morishima, T. Yonezawa u. K. Goto*, J. Amer. Chem. Soc. 92, 6651 (1970).

[77] *J. D. Roberts*, J. Amer. Chem. Soc. 92, 6839 (1970).

[78] *J. I. Kroschwitz, M. Winokur, H. J. Reich u. J. D. Roberts*, J. Amer. Chem. Soc. 91, 5927 (1969).

[79] *R. Price*, unveröffentlicht.

[80] *M. Tanabe, T. Hamasaki, H. Seto u. L. Johnson*, Chem. Commun. 1970, 1539.

[81] *G. Englert u. A. Sause*, Z. Naturforsch. 19a, 161 (1964).

[82] *G. R. Luckhurst*, Österr. Chem.-Ztg. 68, 113 (1967).

## Systeme aus monomolekularen Schichten – Zusammenbau und physikalisch-chemisches Verhalten

Von Hans Kuhn und Dietmar Möbius<sup>[\*]</sup>

Systeme aus monomolekularen Schichten können Funktionseinheiten bilden, welche Eigenschaften entfalten, die den Einzelschichten fehlen. So findet z. B. bei UV-Bestrahlung ein Energieübergang von einer Sensibilisator-(S-)Schicht auf eine Acceptor-(A-)Schicht statt, der sich durch Fluoreszenz von A zu erkennen gibt. S und A können Cyaninfarbstoffe sein. Monomolekulare Schichten lassen sich vielfältig manipulieren und zu neuartigen Systemen zusammensetzen; nach der Energieübertragungsmethode kann geprüft werden, ob der gewünschte Aufbau tatsächlich vorliegt. Die Schichtaufbautechnik eignet sich auch zur Untersuchung der Desaktivierung angeregter Moleküle; ein interessantes Beispiel ist die spektrale Sensibilisierung des photographischen Prozesses.

## 1. Aufbau organisierter Systeme von Molekülen mit Monoschichten als Bauelementen

Durch Zusammenfügen von Molekülen in vorgeplanter Anordnung sollten sich Funktionseinheiten in molekularen Dimensionen aufbauen lassen. Solche Systeme, die besonders, durch die Anordnung bedingte Eigenschaften haben, sind als Modelle für biologische Strukturen oder als Werkzeuge mit molekulardimensionierten Bauelementen interessant. Ihre Herstellung erfordert es, für den Bereich zwischenmolekularer Bindungen Methoden zu entwickeln, wie sie dem Chemiker für das planmäßige Verknüpfen von Hauptvalenzen zur Verfügung stehen.

Man kann an mehrere Wege denken, diesem weitgesteckten Ziel zuzustreben. Eine Möglichkeit besteht darin (Abb. 1), eine monomolekulare Schicht von Molekülen A auf einen Träger zu bringen, diese Schicht mit einer monomolekularen

ren Schicht der Moleküle B zu überdecken und auf diese Schicht wiederum monomolekulare Schichten der Moleküle C, D usw. zu bringen. So müssten sich einfache, organisierte Systeme von Molekülen ergeben, die in der Richtung senkrecht zur Schicht eine geplante Ordnung im molekularen Bereich haben.

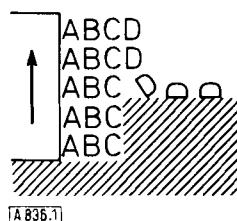


Abb. 1. Zusammenbau von monomolekularen Filmen der Moleküle A, B, C, D.

Monomolekulare Fettsäurefilme können durch Spreiten auf einer Wasseroberfläche hergestellt werden<sup>[11]</sup>. Dazu bringt man eine Lösung der Fettsäure auf die Wasseroberfläche. Das Lösungsmittel verdampft, und die auf der Wasseroberfläche zurückgebliebenen Fettsäuremoleküle

[\*] Prof. Dr. H. Kuhn und Dr. D. Möbius  
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie  
34 Göttingen-Nikolausberg