

3.37 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.33 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.12 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.98 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, =CH<sub>2</sub>-), 1.37 (quint, *J* = 8.0 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 293.0 (t, *J* = 8.8 Hz), 200.7, 196.2 (t, *J* = 10.2 Hz), 178.2, 172.9 (t, *J* = 7.7 Hz), 171.9, 166.0 (t, *J* = 9.2 Hz), 164.2, 150.4, 147.7, 134.5(br), 130.0 (t, *J* = 50.2 Hz), 129.7 (br), 127.4 (br), 123.0 (br), 85.4, 59.9, 57.2, 51.3, 50.5, 50.0, 21.3. IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): ν = 1700(br, s), 1580(m), 1540(w) cm<sup>-1</sup>. MS(FAB), *m/z* 1095.2520 (ber. für C<sub>54</sub>H<sub>49</sub>O<sub>9</sub>P<sub>2</sub>Ir + H): 1095.2536.

[9] 3 · 2C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> (*T* = 298 K): C<sub>66</sub>H<sub>51</sub>O<sub>9</sub>P<sub>2</sub>Ir, orthorhombisch, *Pna*2<sub>1</sub>, *a* = 19.226(4), *b* = 17.120(3), *c* = 17.240(2) Å, *V* = 5675(2) Å<sup>3</sup>, *Z* = 4, ρ<sub>ber.</sub> = 1.466 g cm<sup>-3</sup>, μ = 54.7 cm<sup>-1</sup>. An einem schwachgelben Kristall (0.13 × 0.14 × 0.15 mm<sup>3</sup>) wurden 3985 Reflexe gemessen (Nicolet R3m/V, Cu<sub>Kα</sub>, 3 ≤ 2θ < 110°), davon 3700 unabhängige (*R*<sub>int</sub> = 0.00), 3059 beobachtete (*F*<sub>o</sub> > 6σ(*F*<sub>0</sub>)) Reflexe. Absorptionskorrektur (*T*<sub>max</sub>/*t*<sub>min</sub> = 1.37). *R* = 0.0463, *R*<sub>w</sub> = 0.0723. Weitere Angaben siehe [6].

## Schnelle Heterokern-3D-NMR-Spektroskopie\*\*

Von Peter Schmieder, Horst Kessler und Hartmut Oschkinat\*

Die dreidimensionale NMR-Spektroskopie spielt eine wichtige Rolle bei der Strukturbestimmung komplexer Verbindungen<sup>[1, 2]</sup>. Da isotopenmarkierte Proteine gentechnisch heute gut zugänglich sind, können die chemischen Verschiebungen von Heterokernen benutzt werden, um komplizierte zweidimensionale Protonen-NMR-Spektren in einer dritten Dimension aufzulösen. Die Anwendung von 3D-Techniken auf kleinere Moleküle wie Peptide, die weniger als 20 Aminosäuren enthalten, erscheint als „zuviel des Guten“, weil die Acquisitionszeit, die benötigt wird, um ein hinreichend gut aufgelöstes Spektrum zu erhalten, übermäßig lang wird. Andererseits kann es notwendig sein, 3D-NMR-Spektren aufzunehmen, wenn viele Aminosäuren mit langen aliphatischen Seitenketten wie Arginin, Lysin oder Prolin auftreten. Wir möchten in dieser Arbeit zeigen, daß die Zeit, die benötigt wird, um ein 3D-NMR-Spektrum für die Zuordnung der Seitenkettenprotonen dieser Aminosäuren aufzunehmen, tatsächlich sehr kurz sein kann: Die Netto-Aufnahmezeit des 3D-NMR-Spektrums eines cyclischen Hexapeptides ohne Isotopenmarkierung betrug 8.2 h. Die Auflösung ent-

spricht in etwa der eines normalen 2D-NMR-Spektrums. Es gibt etliche Beispiele für die Anwendung der Heterokern-3D-NMR-Spektroskopie<sup>[3, 4]</sup>. Meist wird <sup>15</sup>N als Heterokern verwendet, da dessen Signale in einem begrenzten Bereich auftreten, so daß eine gute Auflösung in vertretbarer Meßzeit erreicht werden kann. Schwieriger ist es, 3D-NMR-Spektren mit <sup>13</sup>C als Heterokern aufzunehmen, weil der spektrale Bereich der Kohlenstoffsignale und der Signale der direkt gebundenen Protonen viel größer ist.

Die Meßzeit zur Aufnahme eines 3D-NMR-Spektrums mit ausreichender Auflösung kann reduziert werden, wenn man den spektralen Bereich in einer oder in beiden virtuellen Dimensionen durch selektive Anregung<sup>[5–8]</sup> einschränkt. Man erreicht dadurch aber nicht in jedem Fall die Selektion der gewünschten Signale, außerdem können experimentelle Nachteile auftreten.

Ein anderer Weg, den spektralen Bereich der Kohlenstoffsignale zu reduzieren, besteht darin, nur bestimmte Kohlenstoffatome durch eine DEPT-artige Pulssequenz<sup>[9]</sup> anzuregen. Dieses Verfahren sollte besonders geeignet sein, die Seitenketten-Protonen von Aminosäuren zuzuordnen.

Die Selektion der verschiedenen Multiplizitäten durch eine inverse DEPT-Sequenz hängt in anderer Weise vom Flipwinkel des Editingpulses ab<sup>[10]</sup> als bei der herkömmlichen Sequenz. Wenn man beispielsweise einen 90°-Puls wählt, werden nur CH<sub>2</sub>-Gruppen angeregt. Der besondere Vorteil dieser Art selektiver Anregung ist das praktisch rechteckige Anregungsprofil: Jede CH<sub>2</sub>-Gruppe wird mit ihrer vollen Intensität angeregt, andere Gruppen jedoch nicht. Das ist mit „soft-Pulsen“ kaum zu erreichen. Der spektrale Bereich kann damit drastisch reduziert werden, wenn die Unterdrückung gut genug ist, um Störungen durch Restsignale, die in das Spektrum zurückgefaltet werden, zu vermeiden.

Wir haben diese Verfahren in Kombination mit einem BIRD-Puls<sup>[11]</sup> zur Sättigung der an <sup>12</sup>C gebundenen Protonen angewendet, um ein kohlenstoffaufgelöstes TOCSY-Spektrum von 25 mg des cyclischen Hexapeptides cyclo(-D-Ala-Phe-Trp-Lys(Z)-Val-Phe-) in 0.5 mL DMSO zu erhalten (Abb. 1). Die Anwendung des BIRD-Pulses zur In-

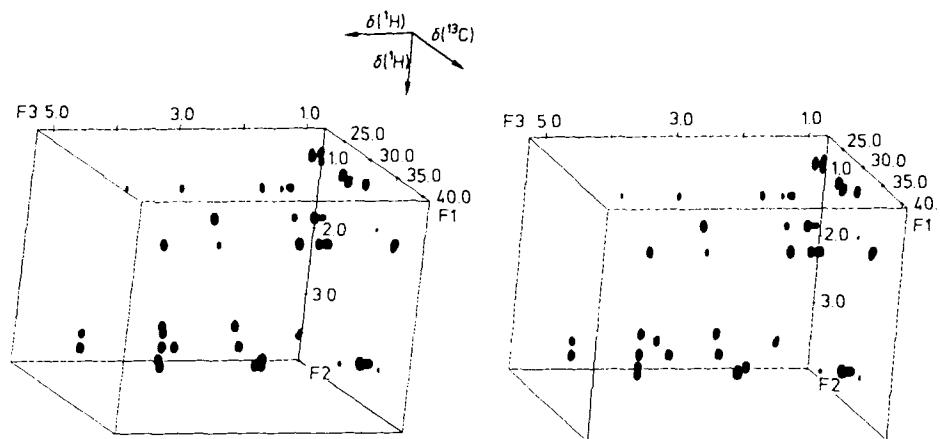


Abb. 1. Stereobild des 3D-DEPT-TOCSY-Spektrums von cyclo(-D-Ala-Phe-Trp-Lys(Z)-Val-Phe-). 64 Experimente wurden in *t*<sub>1</sub> aufgezeichnet, 96 in *t*<sub>2</sub>. Der Delay Δ betrug 3.57 ms, die Mischzeit 35 ms. Das Spektrum wurde auf einem Bruker-AM-500-Gerät aufgenommen und auf einer CONVEX mit eigener Software [8] prozessiert. Restsignale bei der Frequenz ω<sub>1</sub> = 0 (<sup>13</sup>C-Axialsignale) wurden zur besseren Darstellung mit einer Programmroutine entfernt.

[\*] Dr. H. Oschkinat  
Max-Planck-Institut für Biochemie  
Am Klopferspitz, D-8033 Martinsried  
Dipl.-Chem. P. Schmieder, Prof. Dr. H. Kessler  
Organisch-chemisches Institut der Technischen Universität München  
Lichtenbergstraße 4, D-8046 Garching

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Wir danken Herrn Dipl.-Chem. M. Kurz für das cyclische Hexapeptid. P. S. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie für ein Stipendium.

version des zentralen Signals der Protonen vor Durchlaufen der Sequenz ist nicht immer zu empfehlen, da in Molekülen mit einem starken negativen Kern-Overhauser-Effekt eine beträchtliche Signalabschwächung eintreten kann. Im Falle von kleinen oder mittleren Peptiden mit positivem oder schwach negativem NOE ist die Anwendung von BIRD eine sehr wertvolle Methode, um die Meßzeit zu verkürzen. In dieser Arbeit wurde der BIRD-Puls so in den Relaxationsdelay gesetzt, daß der Delay in zwei Teile von 193 und 255 ms

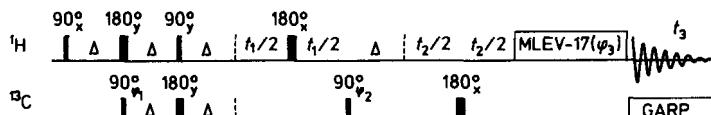


Abb. 2. Pulssequenz des 3D-DEPT-TOCSY, einer Kombination des 2D-DEPT-HMQC-Experiments [10] mit einem TOCSY-Experiment. Die Delays sind zu  $(2^{-1}J_{\text{CH}})^{-1}$  gesetzt, auf die heteronukleare Entkopplung während der Acquisition durch die GARP-Sequenz [14] kann verzichtet werden. Die MLEV-17-Sequenz [15] wurde zur Erzeugung des Spinlock-Feldes verwendet. Phasencyclus:  $\varphi_1 = x, -x, x, -x$ ;  $\varphi_2 = x, x, -x, -x$ ;  $\varphi_3 = x, x, x, -x, -x, -x, -x$ ; rec =  $x, -x, x, -x$ . Quadraturdetektion wurde in  $t_1$  durch Anwendung von TPPI (time proportional phase increment) auf Phase  $\varphi_1$  und die Phase des darauf folgenden Kohlenstoff- $\pi$ -Pulses, in  $t_2$  durch Anwendung von TPPI (time proportional phase increment) auf die Phase der ersten sieben Pulse der Sequenz erreicht.

aufgeteilt ist. Das liefert zusammen mit einer Acquisitionszeit von 92 ms eine gute und gleichzeitige Unterdrückung nahezu aller Signale von  $^1\text{H}$ , die an  $^{12}\text{C}$  gebunden sind<sup>[12]</sup>. Da  $T_1$  bei einem kleinen Peptid gewöhnlich recht kurz ist, kann man das Spektrum mit zwei Durchläufen pro Sekunde aufnehmen.

Die Pulssequenz des 3D-DEPT-TOCSY ist in Abbildung 2 ohne die BIRD-Sequenz gezeigt, die leicht in jeder beliebigen Heterokern-Technik eingesetzt werden kann. Abbildung 1 zeigt, daß nur  $\text{CH}_2$ -Gruppen genügend stark angeregt werden, um TOCSY-Kreuzsignale zu geben. Signale, die durch Anregung von  $\text{C}_\alpha$ -Kohlenstoffatomen entstehen, sind nicht zu sehen. Die Zuordnung der Signale und der chemischen Verschiebung kann man dem 2D- $\text{CH}_2$ -selektiven inversen DEPT-HMQC-Spektrum in Abbildung 3 entnehmen. Um die Qualität der Unterdrückung zu überprüfen, wurde ein 3D-NMR-Spektrum mit einer größeren spektralen Breite aufgenommen, wobei sich zeigte, daß die Unterdrückung > 90 % ist. Prinzipiell kann dieser Editingeffekt auch durch Anwendung eines Heterokern-Tripelquanten-Filters erzielt werden<sup>[13]</sup>, da  $\text{CH}$ -Gruppen keine Heterokern-Tripelquanten-Kohärenz bewirken können.  $\text{CH}_3$ -Gruppen werden auch unterdrückt, da sie fast vollständig Heterokern-Quadrupelquanten liefern, die den Filter nicht passieren können.

Die Netto-Aufnahmezeit des Spektrums mit 64 Experimenten in  $t_1$  und 96 Experimenten in  $t_2$  betrug mit je acht

Durchläufen 8.2 h. Auf unserem Bruker-AM-500-Spektrometer waren zwei Blindversuche nötig, da keine gepufferte Acquisition möglich war. Trotzdem resultierte eine Gesamtmeßzeit von nur 10.2 h. Die Mischzeit entsprach 35 ms, der Delay  $\Delta$  war auf die Kopplung  $^1\text{J}_{\text{CH}} = 140$  Hz optimiert (3.57 ms). Die spektrale Breite betrug 2500 Hz in  $F_1$  und in  $F_2$ , woraus eine Auflösung von 0.38 ppm (46.9 Hz) in  $F_1$  und 0.063 ppm (31.3 Hz) in  $F_2$  resultierte. Im Vergleich dazu betrug die Auflösung im 2D-NMR-Spektrum in Abbildung 3 in  $F_1$  0.3 ppm (36.6 Hz), was für eine Verbindung mittlerer Größe ausreicht.

Wir haben hier gezeigt, daß die Anwendung DEPT-artiger Pulssequenzen zur Begrenzung der spektralen Breite in einem 3D-NMR-Spektrum zu einem gut aufgelösten Spektrum in akzeptabler Meßzeit führen kann. Im Falle kleiner Peptide führt die Anwendung eines BIRD-Pulses dazu, daß eine einzige Nachtmeßzeit zur Aufnahme des 3D-NMR-Spektrums ausreicht.

Eingegangen am 15. Dezember 1989 [Z 3690]

- [1] C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **109** (1987) 7227–7228.
- [2] H. Oschkinat, C. Griesinger, P. J. Kraulis, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Nature (London)* **332** (1988) 374–376.
- [3] S. W. Fesik, E. R. Zuiderveld, *J. Magn. Reson.* **78** (1988) 588–593.
- [4] D. Marion, L. E. Kay, S. W. Sparks, D. A. Torchia, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **111** (1989) 1515–1517.
- [5] C. Bauer, R. Freeman, T. Frenkel, J. Keeler, A. K. Shaka, *J. Magn. Reson.* **58** (1984) 442–457.
- [6] J. Cavanagh, J. P. Walther, J. Keeler, *J. Magn. Reson.* **74** (1987) 386–393.
- [7] H. Kessler, U. Anders, G. Gemmecker, S. Steuernagel, *J. Magn. Reson.* **85** (1989) 1–14.
- [8] H. Oschkinat, C. Cieslar, T. A. Holak, G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *J. Magn. Reson.* **83** (1989) 450–472.
- [9] D. M. Doddrell, D. T. Pegg, M. R. Bendall, *J. Magn. Reson.* **48** (1982) 323–327.
- [10] H. Kessler, P. Schmieder, M. Kurz, *J. Magn. Reson.* **85** (1989) 400–405.
- [11] J. R. Garbow, D. P. Weitekamp, A. Pines, *Chem. Phys. Lett.* **93** (1982) 504; vgl. auch H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **100** (1988) 507–534; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **27** (1988) 490–536.
- [12] A. Bax, S. Subramanian, *J. Magn. Reson.* **67** (1986) 565–569.
- [13] J. M. Schmidt, H. Rüterjans, *J. Am. Chem. Soc.* **112** (1990) 1279–1280.
- [14] A. J. Shaka, P. B. Barker, R. Freeman, *J. Magn. Reson.* **64** (1985) 547–552.
- [15] A. Bax, D. G. Davis, *J. Magn. Reson.* **65** (1985) 355–360.

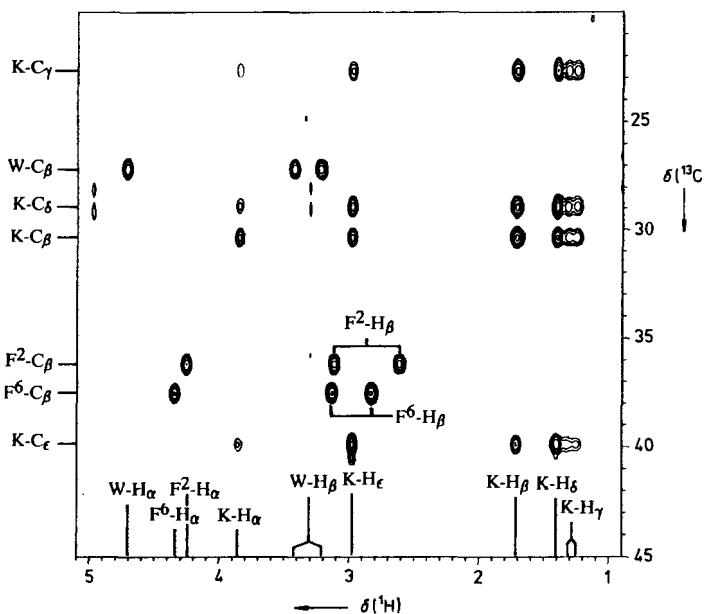


Abb. 3. Ausschnitt des 2D-DEPT-HMQC-Spektrums mit TOCSY-Transfer von *cyclo*-(D-Ala-Phe-Trp-Lys(Z)-Val-Phe)-. Die Signale aus Abbildung 1 wurden zugeordnet. Das Spektrum entspricht einer Projektion aller Signale des Spektrums aus Abbildung 1 auf die Oberseite des Quaders ( $F_1/F_3$ ).

## Auf dem Weg zu Oligocyclopentadienyl-Liganden: Synthese und erste Reaktionen der beiden isomeren Tercyclopentadienyle und ihrer Übergangsmetallkomplexe \*\*

Von Roland Boese, Randy L. Myrabo, David A. Newman  
und K. Peter C. Vollhardt\*

Synthese und Chemie von homo- und heterodinuclearen Organometallverbindungen sind gut untersucht<sup>[1–3]</sup>. Häufig sind in derartigen Verbindungen die Metallatome durch Liganden verbrückt<sup>[1, 2]</sup> und auf diese Weise eng benach-

[\*] Prof. Dr. K. P. C. Vollhardt, R. L. Myrabo, Dr. D. A. Newman  
Department of Chemistry, University of California, Berkeley,  
and the Materials and Chemical Sciences Division  
Lawrence Berkeley Laboratory  
Berkeley CA 94720 (USA)

Dr. R. Boese  
Institut für Anorganische Chemie der Universität-Gesamthochschule  
Universitätsstraße 5–7, Postfach 103764, D-4300 Essen 1

[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Direktor des Office of Energy Research, Office of Basic Energy Sciences, Materials Sciences Division of the U.S. Department of Energy (Contract No. DE-AC03-76SF00098) gefördert. Wir danken Dr. F. J. Hollander für die Röntgenstrukturanalyse von 8a.