

Kernresonanztechniken

Optimierte NMR-Methode zur Bestimmung der Konfiguration chemisch äquivalenter vicinaler Protonen**

Burkhard Luy, Gerd Hauser, Andreas Kirschning und Steffen J. Glaser*

Die Bestimmung der Z/E-Konfiguration an C-C-Doppelbindungen ist ein wichtiger Aspekt bei der Strukturaufklärung von Naturstoffen und synthetischen Produkten. Neben den Röntgentechniken nimmt die NMR-Spektroskopie bei der Konfigurationsanalyse eine bedeutende Rolle ein. Vor allem die $^3J(\text{H},\text{H})$ -Kopplung der vicinalen Protonen ist ein ausge-

[*] Prof. Dr. S. J. Glaser, Dr. B. Luy, Dipl.-Chem. G. Hauser
Institut für Organische Chemie und Biochemie II
Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
Fax: (+49) 89-289-13210
E-mail: glaser@ch.tum.de

Prof. Dr. A. Kirschning
Institut für Organische Chemie
Universität Hannover
Schneiderberg 1b, 30167 Hannover (Deutschland)

[**] B.L. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie und der DFG (Emmy-Noether-Stipendium LU 835/1-1) für Unterstützung. Ebenfalls der DFG danken S.J.G. und A.K. (GL 203/3-1,4-1, SFB 416). Dr. G.-W. Chen, Dr. T. Diercks und Dipl.-Chem. F. Kramer sei für ihre Hilfe gedankt.

zeichnetes Kriterium zur Bestimmung der Z/E-Konfiguration.^[1] Allerdings kann insbesondere bei symmetrisch 1,2-disubstituierten Oleinen wegen der identischen chemischen Verschiebungen der olefinischen Protonen die Kopplung im Allgemeinen nicht direkt gemessen werden.^[1] Eine Lösung bieten spezielle Methoden, die den Symmetriebruch durch das NMR-spektroskopisch aktive ¹³C-Isotop nutzen, das mit geringer natürlicher Häufigkeit vorkommt. Zwar kann im einfachsten Fall die Kopplung anhand der ¹³C-Satellitensignale in eindimensionalen ¹H-Spektren bestimmt werden, häufig allerdings verhindern Überlagerungen mit anderen Signalen und zum Teil komplizierte ¹H-¹H-Aufspaltungsmuster eine eindeutige Analyse. Die meisten der zur Lösung entwickelten mehrdimensional angelegten Experimente beruhen auf der Detektion der ¹³C-Kerne,^[2-5] was jedoch insbesondere bei invers detektierenden Probenköpfen zu einer verhältnismäßig schlechten Aufnahmeempfindlichkeit führt. Eine bessere Methode ist das protonendetektierende HMQC-Experiment^[6-8] (HMQC: heteronuclear multiple-quantum coherence) ohne ¹³C-Entkopplung. All diese Experimente haben jedoch den Nachteil, dass weitere ¹H-¹H-Kopplungen die Interpretation der Spektren erheblich erschweren. Wir stellen hier ein Experiment vor, das sich sowohl durch eine sehr gute Empfindlichkeit durch ¹H-Detektion^[9] als auch durch eine verbesserte Auflösung aufgrund der schnelleren Kopplungsevolution unter einer selektiven, isotropen Mischsequenz auszeichnet. In den resultierenden zweidimensionalen Spektren wird die doppelte ³J(H,H)-Kopplung direkt als alleinige Aufspaltung in der ω_1 -Dimension gemessen, was die Aufnahme einfacherer Spektren und eine weitere Verbesserung der Empfindlichkeit ermöglicht.

Die selektive Detektion von ¹³C-gebundenen Protonen erfordert die vollständige Unterdrückung des ca. 400fach stärkeren Signals der ¹²C-gebundenen Protonen in Proben mit ¹³C in natürlicher Häufigkeit. Eine effektive Lösung ergibt sich mit der Abwandlung einer Pulssequenz, die zur Unterdrückung von Wassersignalen entwickelt wurde.^[10] Durch einen refokussierten INEPT-Schritt^[11,12] (INEPT: insensitive nuclei enhanced by polarization transfer) wird die Magnetisierung der ¹³C-gebundenen Protonen auf den Kohlenstoff übertragen und entlang der z-Achse gespeichert. Anschließend wird durch die Kombination eines ¹H-Spinlock-Pulses und eines Gradienten die verbleibende ¹H-Magnetisierung vollständig außer Phase gebracht, bevor durch einen weiteren refokussierten INEPT-Schritt die Magnetisierung zur empfindlichen Datenerfassung wieder auf die Protonen übertragen wird (Abbildung 1). Mithilfe dieses Filterelements kann ähnlich wie mit dem in Lit. [3] vorgestellten Experiment ein protonendetektierendes zweidimensionales J-Spektrum aufgenommen werden, allerdings mit dem Nachteil, dass alle ¹H-¹H-Kopplungen während der J-Evolution aktiv sind und das J-Spektrum dadurch oft schwer interpretierbar wird. Ein einfacheres Spektrum mit verbesserter Auflösung erhält man durch isotrope J-Evolution während t_1 ^[13-16] unter Anwendung einer selektiven TOCSY-Multipulssequenz (TOCSY: total correlation spectroscopy).^[16-18]

Präpariert man in einem Zweispinsystem den Zustand $I_{1x}-I_{2x}$, dann entwickelt sich die Magnetisierung des ersten

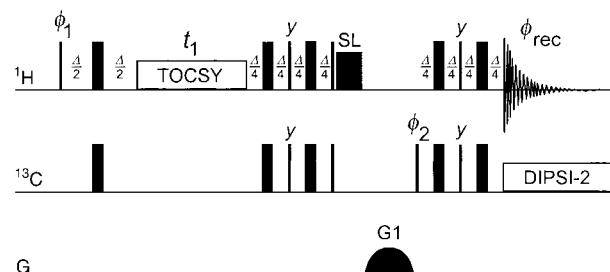
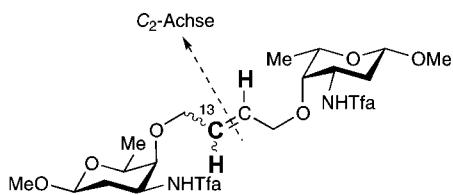


Abbildung 1. Pulssequenz zur Bestimmung der ³J(H,H)-Kopplung chemisch äquivalenter vicinaler Protonen. Zunächst wird durch ein BIRD-Filterelement^[20] die Magnetisierung ¹³C-gebundener Protonen selektiv invertiert. Die selektive t_1 -Evolution der ³J(H,H)-Kopplung unter isotropen Mischbedingungen wird danach durch die Inkrementierung einer bandselektiven TOCSY-Periode erreicht. Das anschließende ¹³C-Filterelement mit Spinlock-Gradienten-Kombination dient zur effektiven Unterdrückung des zentralen Signals der ¹²C-gebundenen Protonen. Soweit nicht anders vermerkt werden alle Pulse entlang x eingestrahlt, wobei die Emitterfrequenzen direkt auf die ¹H- oder ¹³C-Resonanzfrequenzen der vicinalen olefinischen Protonen oder der direkt gebundenen Kohlenstoffatome eingestellt werden. Die Phasenzyklen sind jeweils: $\varphi_1 = x, -x; \varphi_2 = 2(x), 2(-x); \varphi_{rec} = x, 2(-x), x; \Delta = 1/J(C,H)$. Die isotrope Misch-Evolution während t_1 wird durch einen MLEV-16-expandierten 180°-Puls mit einer Amplitude von 500 Hz erreicht. Entsprechend dem Superzyklus ergibt sich damit ein minimales t_1 -Inkrement von 16 ms und eine spektrale Breite in der indirekten Dimension von 62.5 Hz. Die Amplitude des 2-ms-Spinlock-Pulses (SL) sollte etwa 6 dB schwächer als die eines harten ¹H-Pulses gewählt werden, um die eingestrahlte Radiofrequenzleistung möglichst niedrig zu halten. Der sinusförmige 5-ms-Gradient G1 wird mit möglichst hoher Amplitude angewendet. Effiziente ¹³C-Entkopplung während der Datenerfassung wird durch Einstrahlung einer DIPSI-2-Multipulssequenz (DIPSI: decoupling in the presence of scalar interaction) mit 500 Hz Amplitude erreicht.

Spins unter isotropen Mischbedingungen^[19] mit $\langle I_{1x} \rangle^{\text{iso}} = \cos 2\pi J t_1$.^[16] Dies entspricht der doppelten Frequenz gegenüber der Oszillation bei freier Evolution des gleichen Spinsystems unter schwacher Kopplung ($\langle I_{1x} \rangle^{\text{schwach}} = \cos \pi J t_1$). Daraus folgt, dass bei gleicher relativer Auflösung der Kopplung lediglich die halbe Evolutionszeit benötigt wird – ein Vorteil, der insbesondere bei größeren Molekülen wegen der schnellen Relaxationszeiten von entscheidender Bedeutung für die Bestimmung der Kopplung ist.

Experimentell wird der Zustand $I_{1x}-I_{2x}$ mithilfe eines BIRD-Elements^[20] (BIRD: bilinear rotation decoupling) erreicht. Die alleinige Evolution der ³J(H,H)-Kopplung der vicinalen Protonen wird anschließend durch Einstrahlen einer selektiven TOCSY-Multipulssequenz erreicht, deren Transferbandbreite ausschließlich die beiden gewünschten Protonensignale umfasst und damit sowohl weitere Protonen als auch den ¹³C-Spin selektiv entkoppelt. Dies ist bei chemisch äquivalenten Protonen besonders einfach umzusetzen: Als selektive isotrope TOCSY-Sequenz eignet sich ein MLEV-16-expandierter 180°-Puls (MLEV: Malcolm-Levitt-Entkopplungssequenz).^[19,21] Bei einer Einstrahlungsamplitude von 500 Hz, entsprechend einem 180°-Puls von 1 ms Dauer, hat die Multipulssequenz eine effektive Bandbreite von ca. 360 Hz und ist damit selektiv genug, um Kohärenztransfer durch die vicinale ³J(H,H)-Kopplung zu ermöglichen und gleichzeitig alle anderen ¹H-¹H-Kopplungen und ¹³C-¹H-



Schema 1. Das verbrückte symmetrische Bis-Daunosaminid **1** (Tfa: Trifluoracetyl) liegt als Z/E-Gemisch vor, angedeutet durch geschlängelte Bindungen. Durch die ^{13}C -Filterung werden lediglich Moleküle mit einem ^{13}C -Spin in der Doppelbindung betrachtet. Ausschließlich die fett gedruckten Atome tragen zur Messung der $^3\text{J}(\text{H},\text{H})$ -Kopplung mit dem hier vorgestellten Experiment bei.

Kopplungen zu unterdrücken. Die resultierende Pulssequenz mit experimentellen Einzelheiten ist in Abbildung 1 gezeigt.

Eine praktische Anwendung ist die Analyse des Z/E-Gemisches des verbrückten homodimeren Aminoglycosids **1** (Schema 1), das durch Metathese-Olefinition erhalten wurde.^[22,23] Im Protonen-Spektrum treten zwei eng benachbarte Signale mit einer relativen Intensität von etwa 70:30 auf. Anhand von Literaturdaten^[1,24] erwartet man $^3\text{J}(\text{H},\text{H})$ -Kopplungen der Z- und E-konfigurierten Verbindungen von 6–14 Hz (meist ca. 10 Hz) bzw. 14–20 Hz (meist ca. 16 Hz), die jedoch aus den ^1H -Spektren nicht direkt zu bestimmen waren. Bei einer etwa 50 mM NMR-Probe war auch nach 1024 Messzyklen an einem Bruker-DMX600-Spektrometer mit HCN-TXI-Probenkopf nur das stärkere der beiden Signale im ^{13}C -Spektrum sichtbar, sodass eine Bestimmung der $^3\text{J}(\text{H},\text{H})$ -Kopplung mit ^{13}C -detektierenden Methoden nicht praktikabel war. Die hier vorgestellte ^1H -detektierende Pulssequenz (Abbildung 1) lieferte jedoch nach einer Messzeit von 6 h ein zweidimensionales Spektrum, aus dem direkt $^3\text{J}(\text{H},\text{H})$ -Kopplungen von 11.1 und 15.2 Hz abgelesen wurden (Abbildung 2). Aus diesen Daten folgt, dass ein Gemisch aus Z- und E-konfiguriertem **1** im Verhältnis 30:70 vorliegt.^[1]

Das hier vorgestellte Experiment ermöglicht die einfache Bestimmung der Konfiguration an der Doppelbindung symmetrischer Moleküle. Im Unterschied zu konventionellen Methoden^[2–8] wird dabei der ^{13}C -Spin nicht genutzt, um während der t_1 -Evolution ein unsymmetrisches AA'X-System zu erzeugen, sondern um die selektive Inversion und Detektion des ^{13}C -gebundenen olefinischen Protonenspins zu ermöglichen. Während der isotropen J -Evolution in t_1 sind die ^{13}C -Spins vollständig entkoppelt, und es liegt effektiv ein A₂-System vor. Das zugrunde liegende Prinzip der hier vorgestellten Methode ist nicht auf vollständig symmetrische Moleküle mit chemisch oder magnetisch äquivalenten Spins beschränkt, sondern lässt sich auch dann anwenden, wenn die olefinischen Protonen ähnliche Resonanzfrequenzen aufweisen. Damit liefert es entscheidende Informationen für die Strukturaufklärung von ungesättigten Naturstoffen und für die Synthese komplexer Verbindungen. Insbesondere ist das vorgestellte Verfahren eine wichtiges analytisches Hilfsmittel bei der Konfigurationsbestimmung von Metathese-Produkten.

Eingegangen am 27. Juni 2002,
veränderte Fassung am 17. Januar 2003 [Z19627]

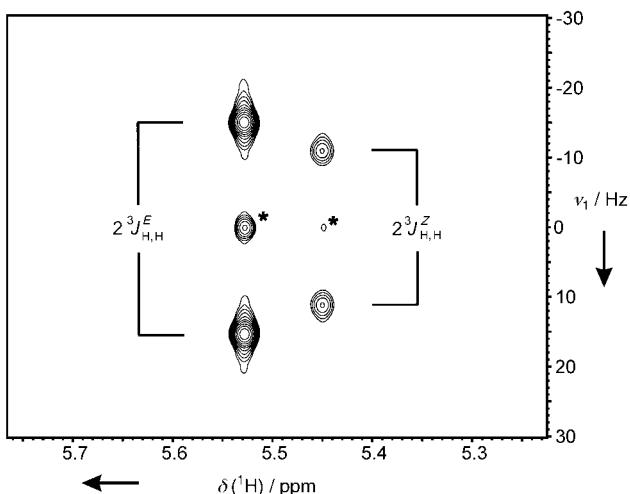


Abbildung 2. Aus dem Spektrum des Z/E-Gemisches von **1**, das mit dem anhand Abbildung 1 beschriebenen Experiment erhalten wird, können die doppelten $^3\text{J}(\text{H},\text{H})$ -Kopplungen der vicinalen olefinischen Protonen direkt abgelesen werden. Die schwachen Axialsignale (*) sind Artefakte, die auf nichtideale Pulse zurückzuführen sind. Das Spektrum wurde mit nmrPipe^[25] verarbeitet: In der direkt detektierten Dimension wurden 1024 komplexe Punkte bei einer spektralen Breite von 10 ppm aufgenommen, exponentiell apodisiert und durch Fourier-Transformation entwickelt. Die Apodisierung wurde dabei aus Gründen der Empfindlichkeit und Übersichtlichkeit so gewählt, dass die Multiplettstruktur aufgrund benachbarter Protonen (Dublett von Doublets) in der direkt detektierten Dimension nicht mehr aufgelöst ist. Die 57 aufgenommenen reellen t_1 -Inkrementen wurden mit einem aus Nullen bestehenden Imaginärteil versehen, exponentiell apodisiert und komplex durch Fourier-Transformation entwickelt. Das Spektrum wurde in beiden Dimensionen in 0. und 1. Ordnung phasenkorrigiert.

Stichwörter: Konfigurationsbestimmung · NMR-Spektroskopie · Olefine · Spin-Spin-Kopplungen · Symmetrien

- [1] H. Günther, *NMR-Spektroskopie*, 2. Aufl., Thieme, Stuttgart, 1983.
- [2] R. Radeglia, H. Poleschner, M. Heydenreich, *Magn. Reson. Chem.* **1991**, 29, 1028–1035.
- [3] R. Radeglia, *J. Prakt. Chem.* **1993**, 335, 291–293.
- [4] V. Rutar, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 4496–4497.
- [5] V. Rutar, *J. Phys. Chem.* **1983**, 87, 1669–1670.
- [6] L. Müller, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 4481–4484.
- [7] M. R. Bendall, D. T. Pegg, D. M. Doddrell, *J. Magn. Reson.* **1983**, 52, 81–117.
- [8] A. Bax, R. H. Griffey, B. L. Hawkins, *J. Magn. Reson.* **1983**, 55, 301–315.
- [9] C. Griesinger, H. Schwalbe, J. Schleucher, M. Sattler in *Two-Dimensional NMR Spectroscopy* (Hrsg.: W. R. Croasmun, R. M. K. Carlson), VCH, New York, 1994.
- [10] L. E. Kay, G. Y. Xu, A. U. Singer, D. R. Muhandiram, J. D. Forman-Kay, *J. Magn. Reson. Ser. B* **1993**, 101, 333–337.
- [11] G. A. Morris, R. Freeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 760–762.
- [12] D. P. Burum, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1980**, 39, 163–168.
- [13] N. Chandrasekaran, A. Ramamoorthy, *J. Magn. Reson.* **1992**, 99, 372–376.
- [14] M. Pfuhl, F. Fogolari, G. Esposito, P. Viglino, A. Pastore, *Q. Magn. Reson. Biol. Med.* **1994**, 1, 53–60.
- [15] M. Ravikumar, A. A. Bothner-By, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7537–7538.

- [16] S. J. Glaser, J. J. Quant, *Adv. Magn. Opt. Reson.* **1996**, *19*, 59–252.
- [17] J. Quant, T. Prasch, S. Ihringer, S. J. Glaser, *J. Magn. Reson. Ser. B* **1995**, *106*, 116–121.
- [18] T. Prasch, P. Gröschke, S. J. Glaser, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 817–821; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 802–806.
- [19] L. Braunschweiler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1983**, *53*, 521–528.
- [20] M. R. Bendall, D. T. Pegg, D. M. Doddrell, J. Field, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 934–936.
- [21] B. Luy, S. J. Glaser, *J. Magn. Reson.* **2000**, *142*, 369–371.
- [22] A. Kirschning, G.-W. Chen, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4665–4668.
- [23] G.-W. Chen, A. Kirschning, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 2717–2729.
- [24] H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, 2. Aufl., VCH, Weinheim, **1992**.
- [25] F. Delaglio, S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeiffer, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1995**, *6*, 277–293.