

Konfigurationsbestimmung

Residuale chemische Verschiebungsanisotropie (RCSAs) – ein Parameter zur Konfigurationsanalyse kleiner Moleküle**

Fernando Hallwass, Manuel Schmidt, Han Sun, Adam Mazur, Grit Kummerlöwe, Burkhard Luy, Armando Navarro-Vázquez, Christian Griesinger* und Uwe M. Reinscheid*

Während des letzten Jahrzehnts gewannen anisotrope NMR-spektroskopische Parameter, gemessen in schwach orientierten Proben, immer mehr an Bedeutung für die Strukturaufklärung sowohl von großen Biomolekülen^[1] als auch von kleinen bis mittelgroßen organischen Molekülen.^[2] Bislang wurden zur Konformations-,^[3] Konfigurations-^[4] und auch Konstitutionsaufklärung^[5] fast ausschließlich dipolare Restkopplungen (RDCs) genutzt, während bei Proteinen und Nucleinsäuren auch schon die residuale chemische Verschiebungsanisotropie (RCSA) als zusätzlicher Parameter zum Einsatz kam.^[6] Die Entwicklung in dem Feld wurde hauptsächlich durch die Verfügbarkeit von geeigneten, sehr schwach orientierenden Medien bestimmt. Eine der wichtigsten Klassen von Orientierungsmedien sind gestreckte oder gestauchte Polymergele (auch bezeichnet als: strain induced alignment in a gel (SAG)), die sowohl für Wasser^[7] als auch für organische Lösungsmittel^[4b,8] geeignet sind. Besonders in Verbindung mit der von Kuchel et al.^[9] entwickelten und von Kummerlöwe et al.^[10a,b] weiterentwickelten Streckapparatur, oder durch die von Gil et al. beschriebene Me-

thode,^[10c] lassen sich mit Polymergele reversibel gewünschte Orientierungsstärken für die Routine-Hochauflösungs-NMR-Spektroskopie einstellen.

Während RDCs Informationen über die Orientierung des internuclearen Vektors liefern, geben RCSAs Aufschluss über die Orientierung des Tensors der chemischen Verschiebung jedes individuellen Atoms in einem Molekül. Dass RCSAs im Unterschied zu RDCs noch nicht zur Konfigurationsbestimmung von kleinen Molekülen herangezogen wurden, liegt daran, dass sie nicht einfach nur, wie RDCs, aus der Differenz der totalen gemessenen Kopplungskonstanten, $T = J + D$, unter orientierenden und nichtorientierenden Bedingungen zugänglich sind. Die Differenz der chemischen Verschiebung einer orientierenden und nichtorientierenden Probe enthält nämlich zusätzlich zur RCSA auch noch die Änderung der isotropen chemischen Verschiebung aufgrund der Änderung der Probe von isotropen (ohne Orientierungsmedium) zu anisotropen Bedingungen (mit Orientierungsmedium).^[11] Diese durch Orientierungsmedien induzierte unkontrollierbare Variation der isotropen chemischen Verschiebung, die bislang die exakte Bestimmung der RCSA verhinderte, konnte durch zwei Einstellungen der Probenachse gelöst werden. Dies ist prinzipiell durch zwei Verfahren möglich: Einstellung eines variablen Winkels mit dem statischen Magnetfeld B_0 und gleichzeitiger Rotation^[12] um die Probenachse oder Einstellung des variablen Winkels ohne Rotation.^[13] Beide Verfahren benötigen jedoch eine spezielle NMR-spektroskopische Ausstattung (Probenkopf mit variabler Einstellung der Probenachse), die in vielen Laboratorien nicht vorhanden ist. Daher stellen wir hier eine alternative Technik vor.

Sie ermöglicht die zuverlässige Messung von RCSA-Differenzen zwischen dem Messkern (k) und einem Referenzkern (ref) im gleichen Orientierungsmedium, aber unter zwei verschiedenen Orientierungsstärken, 1 und 2. Wir nennen diese doppelten Differenzen von residualen chemischen Verschiebungsanisotropien folglich $\Delta\Delta\text{RCSA}$. Um die zwei unterschiedlichen Orientierungsstärken zu erhalten, ohne dabei das Orientierungsmedium wechseln zu müssen, nutzen wir die Siliconschlauch-basierte Streckapparatur und vergleichen die gemessenen $\Delta\Delta\text{RCSAs}$ mit aus CSA-Tensoren für jedes gemessene Atom zurückgerechneten. Der CSA-Tensor wurde mithilfe der Dichtefunktionaltheorie (DFT) in Kombination mit der eichunabhängigen Atomorbitalmethode (GIAO) für die Kerne k und ref berechnet.^[14] Zusätzlich beziehen wir in die Analyse auch ΔRDCs ein, die ebenfalls als Differenz zwischen den beiden Orientierungsstärken erhalten wurden.

[*] Dr. F. Hallwass, M. Schmidt, H. Sun, Dr. A. Mazur, Prof. Dr. C. Griesinger, Dr. U. M. Reinscheid
Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie
Abteilung für NMR-basierte Strukturbiochemie
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Deutschland)
E-Mail: cigr@nmr.mpibpc.mpg.de
urei@nmr.mpibpc.mpg.de

Dr. F. Hallwass
Departamento de Química Fundamental, CCEN
Universidade Federal de Pernambuco (Brasilien)

Dr. A. Navarro-Vázquez
Departamento de Química Orgánica, Facultade de Ciencias
Universidade de Vigo (Spanien)

Dr. G. Kummerlöwe, Prof. Dr. B. Luy
Institut für Organische Chemie
Karlsruher Institut für Technologie (Deutschland)

Prof. Dr. B. Luy
Institut für Biologische Grenzflächen
Karlsruher Institut für Technologie (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs GK 782 (C.G.), einer Heisenberg-Professur (B.L.) sowie der Forschergruppe FOR 934 (C.G. und B.L.) unterstützt. F.H. dankt der Alexander von Humboldt-Stiftung für ein Humboldt-Forschungsstipendium für Postdoktoranden. A.N.V. dankt der Xunta de Galicia/FEDER für finanzielle Unterstützung (Consellería de Educación 2009/071) und dem Ministerio de Ciencia e Innovación für einen „Ramón y Cajal“-Vertrag und ebenfalls finanzielle Unterstützung (CTQ2007-65310).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201101784> zu finden.

Als Orientierungsmedium haben wir das DMSO-kompatible (*S*)-2-Acrylamido-1-propansulfonsäure (APS)-Gel verwendet.^[15] Die beiden unterschiedlichen Orientierungsstärken, repräsentiert durch die Orientierungstensenoren $A_{ij}^{(1)}$ und $A_{ij}^{(2)}$, wurden durch zwei verschiedene Streckstärken des Gels in der Streckapparatur erreicht. Dadurch wird garantiert, dass sich die Probenzusammensetzung nur minimal ändert. Die beobachtbaren Änderungen der chemischen Verschiebung sind daher hauptsächlich durch RCSAs oder durch Änderungen der gesamten magnetischen Suszeptibilität der Probe begründet, wobei letztere alle Resonanzen in gleicher Weise beeinflusst. So können die RCSAs durch die im Folgenden beschriebene Referenzierungsmethode herausgemittelt werden (für eine allgemeine Diskussion verschiedener anderer Referenzierungsmethoden siehe Lit. [13]). $\Delta\Delta\text{RCSA}$ (ΔRDCs von CH-Gruppen) werden durch Subtraktion der chemischen Verschiebungen von Messkern und Referenzkern erhalten: $\delta^{(1,k)} - \delta^{(1,\text{ref})}$ und $\delta^{(2,k)} - \delta^{(2,\text{ref})}$ (im Fall der RDCs: CH-Dublettaufspaltungen $T_{kl}^{(1)}$ und $T_{kl}^{(2)}$), gemessen unter beiden Orientierungsstärken. k und l sind die betreffenden Kernspins, und γ_k ($r^{(k)}$) und γ_l ($r^{(l)}$) sind ihre zugehörigen gyromagnetischen Verhältnisse (Koordinatenvektoren). Die resultierenden anisotropen Parameter sind gemäß Gleichung (1) und (2) definiert.

$$\Delta\Delta\text{RCSA}_k(\text{ppm}) = (\delta^{(1,k)} - \delta^{(1,\text{ref})}) - (\delta^{(2,k)} - \delta^{(2,\text{ref})})$$

$$= \sum_{i=x,y,z} \sum_{j=x,y,z} (A_{ji}^{(1)} - A_{ji}^{(2)}) (\delta_{ji}^{\text{CSA}_k} - \delta_{ji}^{\text{CSA}_{\text{ref}}}) \quad (1)$$

$$\Delta\text{RDC}_{kl} = T_{kl}^{(1)} - T_{kl}^{(2)}$$

$$= -\frac{3\hbar\mu_0\gamma_k\gamma_l}{8\pi^2(r^{(k)} - r^{(l)})^5} \sum_{i=x,y,z} \sum_{j=x,y,z} (A_{ij}^{(1)} - A_{ij}^{(2)}) (r_j^{(k)} - r_j^{(l)}) (r_i^{(k)} - r_i^{(l)}) \quad (2)$$

Um den Nutzen unserer Methode zu demonstrieren, haben wir die Konfiguration eines Moleküls bestimmt, für das die richtige Antwort bereits bekannt ist: Natürliches Estron und sein Epimer 13-*epi*-Estron (Abbildung 1). Da sich nur die Verknüpfung der Ringe C und D unterscheidet (*trans* in Estron, *cis* in *epi*-Estron), werden sich auch nur wenige ΔRDCs und $\Delta\Delta\text{RCSAs}$ signifikant ändern. Die experimentellen ΔRDCs und $\Delta\Delta\text{RCSAs}$ wurden für Estron gemessen und anschließend mit den rückgerechneten Werten für beide Strukturen verglichen. So konnten wir basierend auf dem Vergleich der Q -Faktoren zeigen, dass die Kombination aus $\Delta\Delta\text{RCSAs}$ und ΔRDCs in der Lage ist, Estron von seinem C13-Epimer zuverlässig zu unterscheiden. Überraschenderweise konnten beide Parameter unabhängig voneinander die Epimere nicht differenzieren.

Die Protonen-entkoppelten ^{13}C -NMR-Spektren von Estron wurden in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ einmal mit und einmal ohne APS-Gel-Orientierung aufgenommen (siehe Hintergrundinformationen (SI) und Abbildung S1). Abbildung 2 zeigt ausgewählte Signale aus dem Spektrum vor und nach dem Zug durch die Streckapparatur. C8 wurde als Referenzkern für Gleichung (1) verwendet. Prinzipiell kann jeder Kern als Referenzkern gewählt werden, jedoch ist es sinnvoll, den Kern mit dem kleinsten CSA-Tensor zu wählen, da für diesen

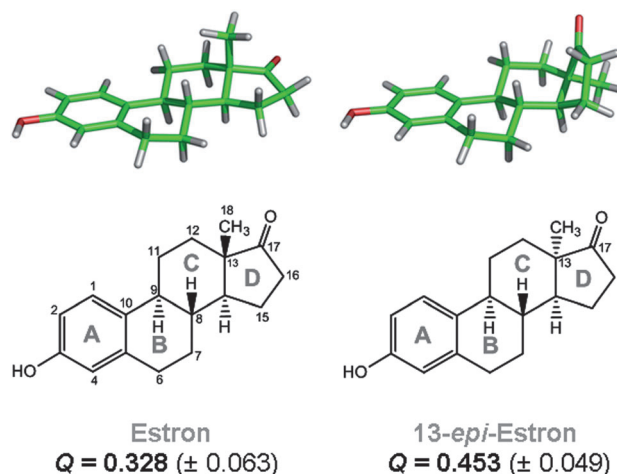


Abbildung 1. Struktur von Estron (links) und 13-*epi*-Estron (rechts) und ihre zugehörigen Q -Werte basierend auf $\Delta\Delta\text{RCSAs}$ und ΔRDCs . Der Q -Wert ist signifikant kleiner für das richtige Epimer, Estron, als für das falsche, 13-*epi*-Estron. Die Standardabweichung (in Klammern) wird im Text erklärt.

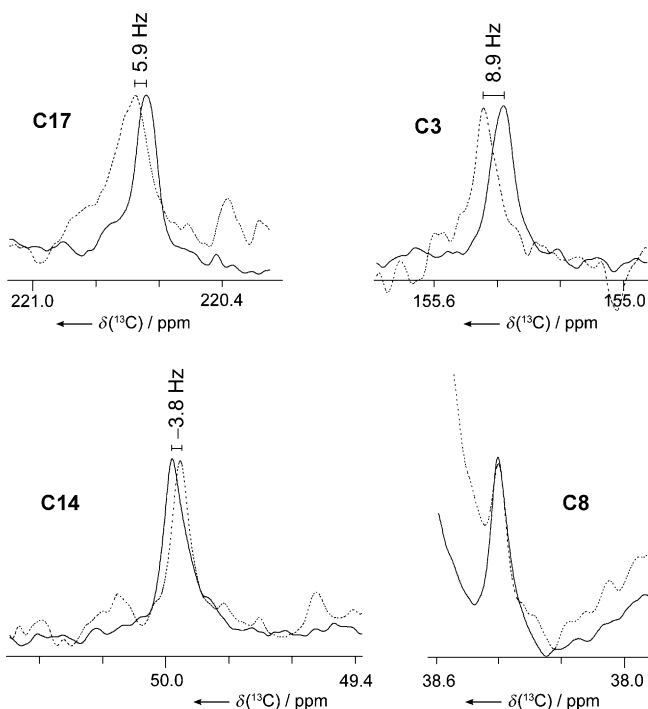


Abbildung 2. Ausschnitte aus den NMR-Spektren (^{13}C - $\{^1\text{H}\}$, 150 MHz) von Estron vor (—) und nach Streckung (•••••). Angegeben sind Wert und Vorzeichen der $\Delta\Delta\text{RCSAs}$. C8 wurde als Referenz verwendet.

auch einer der kleinsten $\Delta\Delta\text{RCSAs}$ zu erwarten ist. In Übereinstimmung mit der Theorie wurden die größten $\Delta\Delta\text{RCSA}$ -Werte für aromatische und Carbonylkohlenstoffatome gemessen. So lieferte z.B. das Carbonylkohlenstoffatom C17 einen $\Delta\Delta\text{RCSA}$ -Wert von +5.9 Hz und das aromatische Kohlenstoffatom C3 einen von +8.9 Hz, gemessen bei einer ^{13}C -NMR-Spektrometerfrequenz von 150 MHz. Insgesamt konnten 13 $\Delta\Delta\text{RCSAs}$ extrahiert werden. Wegen

starker Kopplungseffekte konnten aber nur 6 Δ RDCs zuverlässig extrahiert werden (siehe SI).

Die chemischen Verschiebungstensoren, die für Gleichung (1) benötigt werden, wurden durch DFT-Rechnungen mit B3LYP als Funktional und 6-311 + G* als Basissatz berechnet. Die Geometrien wurden zuvor auf dem gleichen Theorieniveau optimiert (SI).^[16] Die Orientierungstensor Differenz ($A_{ij}^{(1)} - A_{ij}^{(2)}$) wurde durch Einzelwertzerlegung^[17] unter Verwendung der experimentellen 13 $\Delta\Delta$ RCSAs und 6 Δ RDCs sowie der berechneten chemischen Verschiebungstensoren entsprechend den Gleichungen (1) und (2) erhalten (für Details siehe SI). Die Qualität des Tensors wurde durch Rückrechnung der experimentellen Δ RDCs und $\Delta\Delta$ RCSAs und Berechnung der Q -Faktoren überprüft.^[6a] Für die Rückrechnung wurde eine erweiterte Version des Programms MSpin^[18] verwendet, bei der RDCs von Methylgruppen nach der unter Lit. [19] beschriebenen Variante gemittelt werden. Die experimentellen Fehler wurden durch Monte-Carlo-Bootstrapping in die Rechnung mit einbezogen (siehe SI für Details).

Abbildung S3 (siehe SI) zeigt die Korrelation zwischen den experimentellen und den rückgerechneten $\Delta\Delta$ RCSAs und Δ RDCs für die beiden Konfigurationen. Die beiden Epimere können zuverlässig anhand der Q -Faktoren unterschieden werden. Der Q -Faktor ist deutlich kleiner für das richtige ($Q = 0.328 \pm 0.063$ für Estron) als für das falsche Epimer ($Q = 0.453 \pm 0.049$ für 13-*epi*-Estron; Abbildung 1). Außerdem ist der Q -Faktor-Unterschied signifikant gegenüber der Q -Faktor-Standardabweichung, ermittelt aus den statistischen Fehlern von $\Delta\Delta$ RCSAs und Δ RDCs (siehe SI). In Anbetracht dessen, dass es nur kleine Strukturunterschiede zwischen den beiden Epimeren gibt – genauer gesagt, nur an der C/D-Ringverknüpfung und im D-Ring (Abbildung 1) –, wird der bereits deutliche Q -Faktor-Unterschied sogar noch aussagekräftiger. Schon in früheren Arbeiten wurde ein Unterschied zwischen zwei Q -Faktoren von mehr als 0.1 für die erfolgreiche Unterscheidung von Diastereomeren genutzt, wie am Beispiel von Sagittamid gezeigt.^[4b]

Von den sechs experimentell erhaltenen Δ RDCs waren nur vier linear unabhängig, wodurch die Unterscheidung zwischen Estron und 13-*epi*-Estron nur mithilfe von Δ RDCs nicht möglich war. Auch durch die alleinige Verwendung von $\Delta\Delta$ RCSAs wurden sehr ähnliche Q -Faktoren erhalten (0.352 ± 0.056 für Estron und 0.339 ± 0.057 für 13-*epi*-Estron), wodurch auch hier keine $\Delta\Delta$ RCSA-basierte Unterscheidung der Diastereomere gelang. Die Tatsache, dass sich die Diastereomere nicht anhand der $\Delta\Delta$ RCSAs unterscheiden lassen, ist der linearen Abhängigkeit der chemischen Verschiebungstensoren zuzuschreiben, erkennbar an der großen Konditionszahl (ca. 20), die bei der Einzelwertzerlegung erhalten wird, wenn nur $\Delta\Delta$ RCSAs verwendet werden. Dagegen sinkt die Konditionszahl auf 6, falls auch die Δ RDCs mit einbezogen werden. Das zeigt eindeutig, dass durch die gemeinsame Nutzung von $\Delta\Delta$ RCSAs und Δ RDCs die Zuverlässigkeit der Konfigurationsbestimmung nichtlinear verbessert wird. Die Konditionszahl gibt die lineare Unabhängigkeit der anisotropen Wechselwirkungen an und ist idealerweise 1.

Zusammenfassend liefern RCSAs Orientierungsinformationen über internucleare Vektoren, die für die Konfigurationsbestimmung von Molekülen genutzt werden können. Δ RDCs und $\Delta\Delta$ RCSAs zusammen, jedoch nicht individuell, ermöglichten eine eindeutige Unterscheidung zwischen Estron und 13-*epi*-Estron. Wir haben eine zuverlässige Methode zur Messung von $\Delta\Delta$ RCSAs eingeführt. Sie fußt auf der Einstellung zweier unterschiedlicher Orientierungsstärken im NMR-Röhrchen mithilfe der Streckapparatur und Referenzierung auf ein C-Atom im Molekül. Die erhaltenen experimentellen Differenzwerte werden mithilfe ab initio berechneter CSA-Tensoren kreuzvalidiert, und die Qualität der Anpassung dient der Konfigurationsunterscheidung. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass sich die Orientierung direkt in derselben Probe ändern lässt, vorausgesetzt die Probenzusammensetzung wird dadurch nicht verändert.^[13] Die gemeinsame Nutzung von $\Delta\Delta$ RCSAs und Δ RDCs ist von großer Bedeutung, da die Zahl an experimentellen Parametern erhöht werden kann, während die minimal nötige Zahl an Parametern zur Charakterisierung des Orientierungstensors konstant bei fünf bleibt. Wir erwarten für die Zukunft, dass RCSAs zusätzlich zu RDCs gemessen werden, um die Bestimmung der Konformation und Konfiguration kleiner Moleküle zu verbessern.

Eingegangen am 12. März 2011

Online veröffentlicht am 13. September 2011

Stichwörter: Dichtefunktionalrechnungen · Konfigurationsbestimmung · NMR-Spektroskopie · Residuale chemische Verschiebungsanisotropie · Dipolare Restkopplungen

- [1] a) J. R. Tolman, J. M. Flanagan, M. A. Kennedy, J. H. Prestegard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 9279–9283; b) N. Tjandra, A. Bax, *Science* **1997**, 278, 1111–1114; c) C. Griesinger, J. Meiler, W. Peti, *Biol. Magn. Reson.* **2003**, 20, 163–229; d) J. H. Prestegard, C. M. Bougault, A. I. Kishore, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 3519–3540; e) M. Blackledge, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2005**, 46, 23–61; f) J. R. Tolman, K. Ruan, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 1720–1736.
- [2] a) G. Kummerlöwe, B. Luy, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2009**, 28, 483–493; b) C. M. Thiele, *Concepts Magn. Reson.* **2007**, 30 A, 65–80; c) C. M. Thiele, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 5673–5685; d) G. Kummerlöwe, B. Luy, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **2009**, 68, 193–232.
- [3] a) J. Klages, C. Neubauer, M. Coles, H. Kessler, B. Luy, *Chem-BioChem* **2005**, 6, 1672–1678; b) A. Schuetz, J. Junker, A. Leonov, O. F. Lange, T. F. Molinski, C. Griesinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 15114–15115; c) M. B. Schmid, M. Fleischmann, V. D'Elia, O. Reiser, W. Gronwald, R. M. Gschwind, *Chem-BioChem* **2009**, 10, 440–444.
- [4] a) A. Schuetz, T. Murakami, N. Takada, J. Junker, M. Hashimoto, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 2062–2064; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 2032–2034; b) R. R. Gil, C. Gayathri, N. V. Tsarevsky, K. Matyjaszewski, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 840–848; c) M. E. García, S. Pagola, A. Navarro-Vázquez, D. D. Phillips, C. Gayathri, H. Krakauer, P. W. Stephens, V. E. Nicotra, R. R. Gil, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 5780–5784; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 5670–5674.

- [5] G. Kummerlöwe, B. Crone, M. Kretschmer, S. F. Kirsch, B. Luy, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 2693–2696; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2643–2645.
- [6] a) G. Cornilescu, J. L. Marquardt, M. Ottiger, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6836–6837; b) W.-Y. Choy, M. Tollinger, G. A. Mueller, L. E. Kay, *J. Biomol. NMR* **2001**, *21*, 31–40.
- [7] a) R. Tycko, F. J. Blanco, Y. Ishii, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9340–9341; b) H.-J. Sass, G. Musco, S. J. Stahl, P. T. Wingfield, S. Grzesiek, *J. Biomol. NMR* **2000**, *18*, 303–309.
- [8] a) B. Deloche, E. T. Samulski, *Macromolecules* **1981**, *14*, 575–581; b) J. C. Freudenberger, P. Spiteller, R. Bauer, H. Kessler, B. Luy, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14690–14691; c) J. C. Freudenberger, S. Knör, K. Kobzar, D. Heckmann, T. Paululat, H. Kessler, B. Luy, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 427–430; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 423–426; d) P. Haberz, J. Farjon, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 431–433; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 427–429; e) G. Kummerlöwe, J. Auernheimer, A. Lendlein, B. Luy, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6080–6081.
- [9] P. W. Kuchel, B. E. Champman, N. Müller, W. A. Bubba, D. J. Philp, A. M. Torres, *J. Magn. Reson.* **2006**, *180*, 256–265.
- [10] a) G. Kummerlöwe, F. Halbach, B. Laufer, B. Luy, *Open Spectrosc. J.* **2008**, *2*, 29–33; b) G. Kummerlöwe, E. F. McCord, S. F. Cheatham, S. Niss, R. W. Schnell, B. Luy, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7087–7089; c) C. Gayathri, N. V. Tsarevsky, R. R. Gil, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 3622–3626.
- [11] B. Luy, K. Kobzar, S. Knör, D. Heckmann, J. Furrer, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6459–6465.
- [12] a) J. Courtieu, J. P. Bayle, B. M. Fung, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1994**, *26*, 141–169; b) A. Grishaev, L. Yao, J. Ying, A. Pardi, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9490–9491.
- [13] G. Kummerlöwe, S. Grage, C. M. Thiele, I. Kuprov, A. S. Ulrich, B. Luy, *J. Magn. Reson.* **2011**, *209*, 19–30.
- [14] a) G. Bifulco, P. Dambruoso, L. Gomez-Paloma, R. Riccio, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3744–3779; b) A. Bagno, G. Saielli, *Theor. Chem. Acc.* **2007**, *117*, 603–619.
- [15] M. Schmidt, P. Haberz, A. Leonov, C. Griesinger in *Future Directions in NMR (INSA)* (Hrsg.: C. L. Khetrapal, A. Kumar, K. V. Ramanathan), Springer, Heidelberg, **2009**, S. 93–100.
- [16] Gaussian 03 (Revision C.02), M. J. Frisch, et al., Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**. Siehe Hintergrundinformationen.
- [17] J. A. Losonczi, M. Andrec, M. W. F. Fischer, J. H. Prestegard, *J. Magn. Reson.* **1999**, *138*, 334–342.
- [18] MSpin. MESTRELAB RESEARCH SL, Santiago de Compostela, SPAIN. <http://www.mestrelab.com>.
- [19] a) M. Ottiger, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4690–4695; b) V. M. Sánchez-Pedregal, R. Santamaría-Fernández, A. Navarro-Vázquez, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1471–1474.