

Figur. Gaschromatographische Enantiomerentrennung von *N*-(Trifluoressigsäure)-naphthylethylamin auf der Phase CSP 6 bei 140°

grad erreicht, die maximale Bodenzahl pro Meter war aber klein. Bei der Copolymerisation von (+)-(*R*)-*N*-(1-Phenylethyl)-*N'*-[3-(diethoxymethylsilyl)propyl]harnstoff mit Diphenylsilandiol entstanden nur kurzkettinge Oligomere, welche gut immobilisiert werden konnten (CSP 2). Bei einem Ansatz mit Tetramethylammonium-hydroxid als Katalysator konnte der Polymerisationsgrad erhöht werden. Bei diesen längerkettingen Polymeren war der Immobilisierungsgrad wegen der niedrigeren Endgruppenkonzentration des Polymerisats kleiner.

Die chiralen stationären Phasen CSP 3 und 4 ergaben gleiche Trennfaktoren, aber einen kleineren Immobilisierungsgrad. Noch kleiner war der Immobilisierungsgrad bei der stationären Phase CSP 5. Die maximal erreichten Bodenzahlen sind zum Teil eher klein, da die verwendeten Phasen in der

Tab. 1. Resultate in der GC^{a)}

CSP	<i>I</i> [%]	<i>N</i> _{max}	α_{PEA}	α_{NEA}
CSP 1	90	410	1,038	1,049
CSP 2	85	1100		1,056
CSP 3	60	2100	1,051	
CSP 4	35	1900	1,052	
CSP 5	<10	1600	1,053	
CSP 6	80	800	1,072	1,083

^{a)} *I* = Immobilisierungsgrad; *N*_{max} = maximale Bodenzahl pro m; α_{PEA} = Trennfaktor für *N*-(Trifluoressigsäure)phenylethylamin bei 120°; α_{NEA} = Trennfaktor für *N*-(Trifluoressigsäure)naphthylethylamin bei 140°.

Tab. 2. Resultate in der SFC mit CSP 2^{a)}

Probe	<i>p</i> [bar]	α
<i>N</i> -TFA-Naphthylethylamin	122	1,05
<i>N</i> -DNB-Phenylethylamin	214	1,12
<i>N</i> -DNB-Naphthylethylamin	238	1,30

^{a)} TFA = Trifluoressigsäure; DNB = Dinitrobenzoyl; *p* = Druck; α = Trennfaktor bei 90°.

Kapillare häufig in feine Tröpfchen zerfielen.

In der SFC konnten Proben aufgetrennt werden, die für die GC zu schwerflüchtig sind, so zum Beispiel das Dinitrobenzoyl-Derivat von Naphthylethylamin mit einem Trennfaktor von 1,30 (Tab. 2) [8]. Bei der Chromatographie mit überkritischem CO₂ als mobiler Phase waren die Trennfaktoren etwas tiefer als in der GC (z.B. für *N*-(Trifluoressigsäure)naphthylethylamin: α_{GC} = 1,08 bei 110°; α_{SFC} = 1,05 bei 90°).

Die Harnstoff-Derivate sind thermisch nicht sehr stabil, die maximale Arbeitstemperatur beträgt ca. 140°. In der GC hatten Trenntemperaturen unter 100° breite Banden und kurze Retentionszeiten zur Folge. Dies ist auf eine verlangsamte Diffusion in der stationären Phase zurückzuführen, da diese nicht mehr vollständig als flüssiger Film vorliegt. In der SFC hingegen konnten die Phasen bereits bei Temperaturen unter 100° eingesetzt werden, da die stationäre Phase in CO₂ vermutlich in gequollener Form vorliegt und so für die Probemoleküle zugänglich ist. Wegen der Temperaturabhängigkeit des Trennfaktors ist dies von Vorteil. Da in der SFC die Retention mit sinkender Temperatur abnimmt, sind kürzere Analysenzeiten möglich.

Die Harnstoffphasen CSP 1, CSP 2 und CSP 3 weisen einen hohen Immobilisierungsgrad auf. Sie sind für den Gebrauch in der SFC geeignet.

Eingegangen am 19. November 1990

- [1] Teil der Dissertation von A. Marti, Universität Bern, 1989.
- [2] J. Bradshaw, S. Aggarwal, C. Rouse, B. Tarbet, K. Markides, M. Lee, *J. Chromatogr.* **1987**, *405*, 169.
- [3] W. Röder, F.-J. Ruffing, G. Schomburg, W.H. Pirkle, *HRC CC* **1987**, *10*, 665.
- [4] X. Lou, Y. Sheng, L. Zhou, *J. Chromatogr.* **1990**, *514*, 253.
- [5] Supelco SA, CH-1196 Gland.
- [6] K. Markides, B. Tarbet, C. Schregenerberger, J. Bradshaw, M. Lee, *HRC CC* **1985**, *8*, 741.
- [7] K. Grob, 'Making and Manipulating Capillary Columns for Gas Chromatography', Huethig, Heidelberg, 1986, S. 105–123 und 156–176.
- [8] P. Krähenbühl, Dissertation, Universität Bern, 1990.

Lösung eines stereochemischen Problems mit Hilfe moderner Methoden der hochauflösenden Kernresonanz

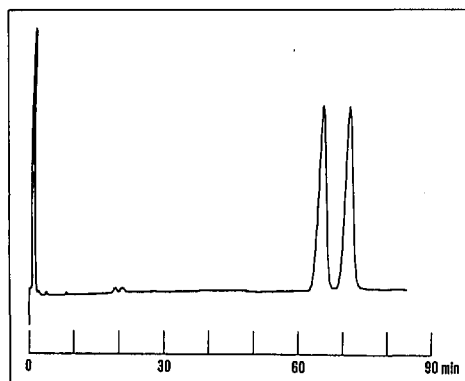
Peter Bigler*

Abstract. Two powerful methods of high-resolution NMR spectroscopy have successfully been applied for the solution of a stereochemical problem. The advantages of a modified pulse sequence for heteronuclear 2D shift correlation with inverse mode of detection and of a new variant of homonuclear 1D-NOE spectroscopy, improved with respect to sensitivity and spectral quality, are demonstrated. These two methods allow structure elucidation by low sample amounts within reasonable measuring times.

1. Einleitung

Technologische Fortschritte im Magnet- und Probenkopfbau, die Einführung zunehmend leistungsfähiger Gerätecomputer, insbesondere aber die wachsende Zahl raffinierter Messtechniken [1], haben die NMR-Spektroskopie zu einer der populärsten Methoden der instrumentellen Analytik gemacht. Trotz ihres beeindruckenden Leistungsausweises hat die hochauflösende NMR Spektroskopie aber auch Schwachstellen und Nachteile aufzuweisen. Der wohl wichtigste betrifft das Empfindlichkeitsproblem, das seinen Ursprung in der vergleichsweise sehr geringen Trennung der Energieniveaus hat, und das sich in längeren Messzeiten, beziehungsweise in einem Bedarf an grösseren Substanzmengen bemerkbar macht. So war ein Grossteil der bisheri-

Korrespondenz: PD Dr. P. Bigler
Institut für Organische Chemie
Freiestrasse 3, CH-3012 Bern



Figur. Gaschromatographische Enantiomerentrennung von *N*-(Trifluoressigsäure)-naphthylethylamin auf der Phase CSP 6 bei 140°

grad erreicht, die maximale Bodenzahl pro Meter war aber klein. Bei der Copolymerisation von (+)-(*R*)-*N*-(1-Phenylethyl)-*N'*-[3-(diethoxymethylsilyl)propyl]harnstoff mit Diphenylsilandiol entstanden nur kurzkettinge Oligomere, welche gut immobilisiert werden konnten (CSP 2). Bei einem Ansatz mit Tetramethylammonium-hydroxid als Katalysator konnte der Polymerisationsgrad erhöht werden. Bei diesen längerkettingen Polymeren war der Immobilisierungsgrad wegen der niedrigeren Endgruppenkonzentration des Polymerisats kleiner.

Die chiralen stationären Phasen CSP 3 und 4 ergaben gleiche Trennfaktoren, aber einen kleineren Immobilisierungsgrad. Noch kleiner war der Immobilisierungsgrad bei der stationären Phase CSP 5. Die maximal erreichten Bodenzahlen sind zum Teil eher klein, da die verwendeten Phasen in der

Tab. 1. Resultate in der GC^{a)}

CSP	<i>I</i> [%]	<i>N</i> _{max}	α_{PEA}	α_{NEA}
CSP 1	90	410	1,038	1,049
CSP 2	85	1100		1,056
CSP 3	60	2100	1,051	
CSP 4	35	1900	1,052	
CSP 5	<10	1600	1,053	
CSP 6	80	800	1,072	1,083

^{a)} *I* = Immobilisierungsgrad; *N*_{max} = maximale Bodenzahl pro m; α_{PEA} = Trennfaktor für *N*-(Trifluoressigsäure)phenylethylamin bei 120°; α_{NEA} = Trennfaktor für *N*-(Trifluoressigsäure)naphthylethylamin bei 140°.

Tab. 2. Resultate in der SFC mit CSP 2^{a)}

Probe	<i>p</i> [bar]	α
<i>N</i> -TFA-Naphthylethylamin	122	1,05
<i>N</i> -DNB-Phenylethylamin	214	1,12
<i>N</i> -DNB-Naphthylethylamin	238	1,30

^{a)} TFA = Trifluoressigsäure; DNB = Dinitrobenzoyl; *p* = Druck; α = Trennfaktor bei 90°.

Kapillare häufig in feine Tröpfchen zerfielen.

In der SFC konnten Proben aufgetrennt werden, die für die GC zu schwerflüchtig sind, so zum Beispiel das Dinitrobenzoyl-Derivat von Naphthylethylamin mit einem Trennfaktor von 1,30 (Tab. 2) [8]. Bei der Chromatographie mit überkritischem CO₂ als mobiler Phase waren die Trennfaktoren etwas tiefer als in der GC (z.B. für *N*-(Trifluoressigsäure)naphthylethylamin: α_{GC} = 1,08 bei 110°; α_{SFC} = 1,05 bei 90°).

Die Harnstoff-Derivate sind thermisch nicht sehr stabil, die maximale Arbeitstemperatur beträgt ca. 140°. In der GC hatten Trenntemperaturen unter 100° breite Banden und kurze Retentionszeiten zur Folge. Dies ist auf eine verlangsamte Diffusion in der stationären Phase zurückzuführen, da diese nicht mehr vollständig als flüssiger Film vorliegt. In der SFC hingegen konnten die Phasen bereits bei Temperaturen unter 100° eingesetzt werden, da die stationäre Phase in CO₂ vermutlich in gequollener Form vorliegt und so für die Probemoleküle zugänglich ist. Wegen der Temperaturabhängigkeit des Trennfaktors ist dies von Vorteil. Da in der SFC die Retention mit sinkender Temperatur abnimmt, sind kürzere Analysenzeiten möglich.

Die Harnstoffphasen CSP 1, CSP 2 und CSP 3 weisen einen hohen Immobilisierungsgrad auf. Sie sind für den Gebrauch in der SFC geeignet.

Eingegangen am 19. November 1990

- [1] Teil der Dissertation von A. Marti, Universität Bern, 1989.
- [2] J. Bradshaw, S. Aggarwal, C. Rouse, B. Tarbet, K. Markides, M. Lee, *J. Chromatogr.* **1987**, *405*, 169.
- [3] W. Röder, F.-J. Ruffing, G. Schomburg, W.H. Pirkle, *HRC CC* **1987**, *10*, 665.
- [4] X. Lou, Y. Sheng, L. Zhou, *J. Chromatogr.* **1990**, *514*, 253.
- [5] Supelco SA, CH-1196 Gland.
- [6] K. Markides, B. Tarbet, C. Schregenerberger, J. Bradshaw, M. Lee, *HRC CC* **1985**, *8*, 741.
- [7] K. Grob, 'Making and Manipulating Capillary Columns for Gas Chromatography', Huethig, Heidelberg, 1986, S. 105–123 und 156–176.
- [8] P. Krähenbühl, Dissertation, Universität Bern, 1990.

Lösung eines stereochemischen Problems mit Hilfe moderner Methoden der hochauflösenden Kernresonanz

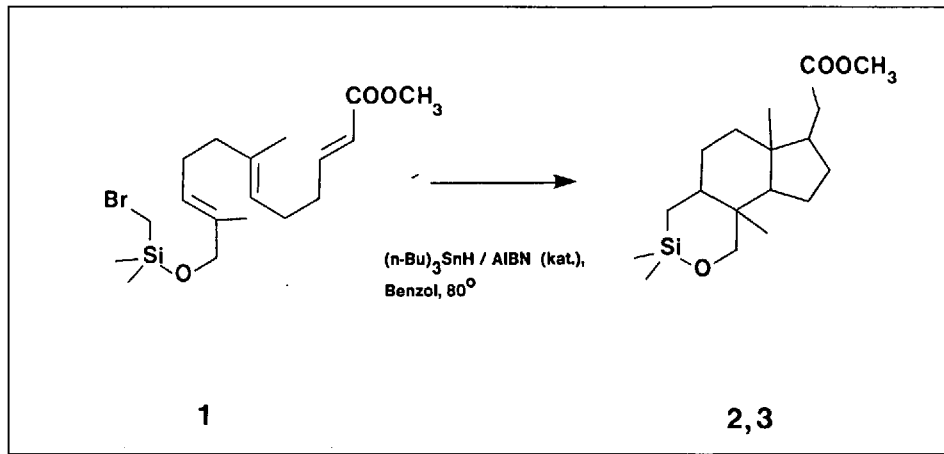
Peter Bigler*

Abstract. Two powerful methods of high-resolution NMR spectroscopy have successfully been applied for the solution of a stereochemical problem. The advantages of a modified pulse sequence for heteronuclear 2D shift correlation with inverse mode of detection and of a new variant of homonuclear 1D-NOE spectroscopy, improved with respect to sensitivity and spectral quality, are demonstrated. These two methods allow structure elucidation by low sample amounts within reasonable measuring times.

1. Einleitung

Technologische Fortschritte im Magnet- und Probenkopfbau, die Einführung zunehmend leistungsfähiger Gerätecomputer, insbesondere aber die wachsende Zahl raffinierter Messtechniken [1], haben die NMR-Spektroskopie zu einer der populärsten Methoden der instrumentellen Analytik gemacht. Trotz ihres beeindruckenden Leistungsausweises hat die hochauflösende NMR Spektroskopie aber auch Schwachstellen und Nachteile aufzuweisen. Der wohl wichtigste betrifft das Empfindlichkeitsproblem, das seinen Ursprung in der vergleichsweise sehr geringen Trennung der Energieniveaus hat, und das sich in längeren Messzeiten, beziehungsweise in einem Bedarf an grösseren Substanzmengen bemerkbar macht. So war ein Grossteil der bisheri-

Korrespondenz: PD Dr. P. Bigler
Institut für Organische Chemie
Freiestrasse 3, CH-3012 Bern



2.1. Anwendung eines modifizierten 2D-¹³C/¹H-Shift-Korrelationsexperimentes mit inverser Detektion

Das zweidimensionale (2D) ¹³C/¹H-Shift-Korrelationsexperiment verknüpft die Signale skalar gekoppelter ¹³C- und ¹H-Kerne. Je nach gewählter Experimentenvariante und den entsprechenden Messparametern können entweder Kopplungswechselwirkungen über eine (¹J(C,H)) oder mehrere (ⁿJ(C,H)) Bindungen nachgewiesen werden. Die Analyse entsprechender 2D-Spektren erlaubt somit einerseits die Verknüpfung der ¹³C- und ¹H-Signale isolierter CH_m-Fragmente und die Identifizie-

gen technologischen und messtechnischen Anstrengungen auf die Verbesserung dieser Situation ausgerichtet. Im vorliegenden Beitrag soll am Beispiel eines aktuellen Strukturproblems aus unserem Institut auf zwei solche messtechnische Entwicklungen eingegangen und ihr Leistungsvermögen demonstriert werden. In der Arbeitsgruppe Scheffold wurden bei der Umsetzung von **1** in kleinen Mengen die Verbindungen **2** und **3** isoliert [2]. Die ¹H-NMR-Spektren von **2** (Fig. 1) und **3**, sowie die entsprechenden ¹H-breitbandentkoppelten ¹³C- und ¹³C-DEPT-Spektren (135°) [3] stehen beide mit der angegebenen Struktur im Einklang. Zu deren Beweis, insbesondere aber zur Bestimmung der für **2** und **3** unterschiedlichen relativen Konfiguration wurden modifizierte moderne heteronukleare 2D-Shift-Korrelationsexperimente zur Erfassung von skalaren ¹H/¹³C-Wechselwirkungen über eine (¹J) und mehrere (ⁿJ) Bindungen eingesetzt. Andererseits gelangte ein neuartiges, in unserer Arbeitsgruppe entwickeltes, homonukleares 1D-Kern-Overhauser (NOE)-Experiment [4] zum Nachweis dipolarer ¹H/¹H-Wechselwirkungen zur Anwendung. Auf die Resultate des für die Strukturaufklärung kleiner Substanzmengen normalerweise ebenso attraktiven ¹H/¹H-2D-COSY-Experimentes soll hier nicht eingegangen werden. Der Umfang der dabei gewonnenen Strukturinformation ist im vorliegenden Fall aufgrund der hohen Signaldichte und der starken Kopplungseffekte im Bereich 1,6–1,0 ppm beschränkt.

Die Resultate sind im folgenden am Beispiel von **2** dargestellt.

2. Resultate und Diskussion

Bei der Diskussion der Resultate wird aus Platzgründen bewusst auf eine vollständige Darstellung verzichtet. Anhand ausgewählter und für die vorliegende Strukturaufklärung relevanter Messdaten soll hingegen versucht werden, einerseits die Eigenheiten der verwendeten Messverfahren hervorzuheben und andererseits das Vorgehen der Datenanalyse, also die Signalzuordnung und die Extraktion struktureller Information, zu demonstrieren.

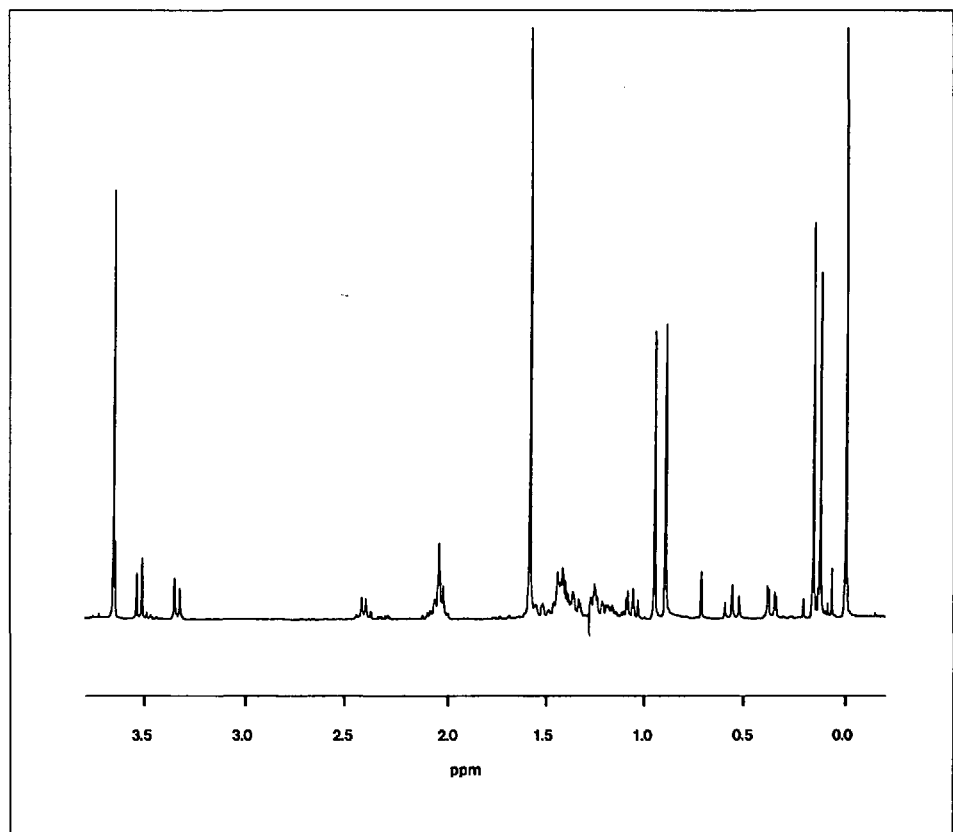


Fig. 1. 400-MHz-¹H-NMR-Spektrum der Komponente **2**

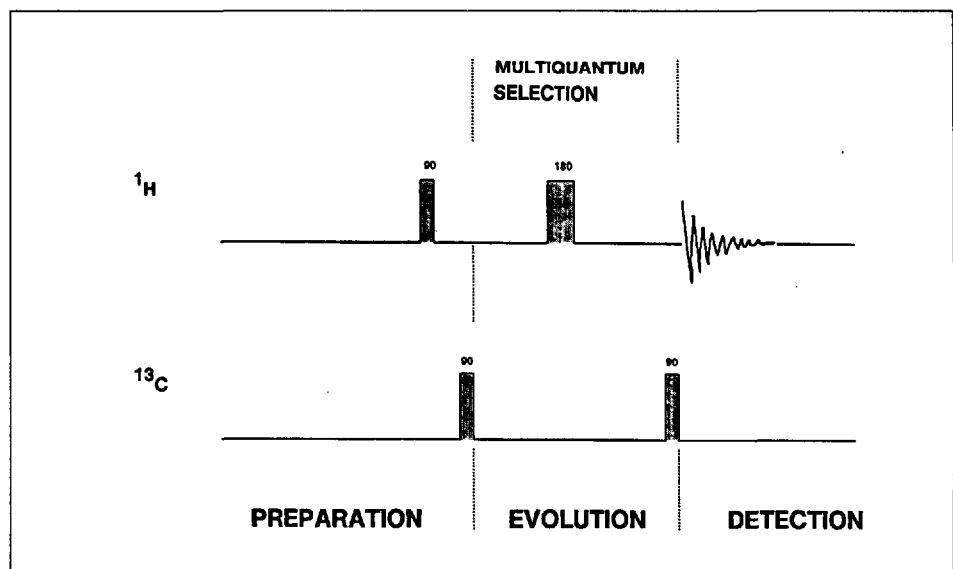


Fig. 2a. 2D-Pulsfolgen zur heteronuklearen Shift-Korrelation mit inverser (¹H) Detektion. Basissequenz.

rung der Signale nicht äquivalenter CH₂-Protonen und andererseits den Nachbarschaftsnachweis dieser isolierten CH_m-Fragmente. In günstigen Fällen reicht diese Information, allenfalls ergänzt durch Daten über homonukleare ¹H/¹H-Kopplungswechselwirkungen, zur Bestimmung molekularer Strukturen aus. Bis vor ein paar Jahren wurden diese heteronuklearen Experimente durchwegs mit der abschliessenden Detektion des unempfindlicheren ¹³C-Kernes durchgeführt. Kürzlich wurde nun eine Klasse von neuartigen heteronuklearen Shift-Korrelationsexperimenten eingeführt, bei denen sowohl die Anregung zu Beginn, als auch die Detektion am Schluss der Pulssequenz bei der höheren (Protonen-)Frequenz stattfindet [5]. Dadurch kann die höhere digitale Auflösung für den Protonenbereich genutzt und – wesentlich wichtiger – die Messempfindlichkeit gesteigert und dadurch die Messzeit für eine gegebene Substanzmenge erheblich reduziert werden. Die Verbesserung der Empfindlichkeit hängt vom Verhältnis der entsprechenden gyromagnetischen Konstanten γ_{ab} und beträgt für ein einfaches ¹H/¹³C-Zweispinsystem maximal $\gamma(^1\text{H})/\gamma(^{13}\text{C}) = 16$. Diese Technik umfasst in ihrer einfachsten Ausführung (Fig. 2a) zwei Kohärenztransferschritte. Die im ersten dieser Schritte erzeugte Doppelquantenkohärenz wird über eine variable Evolutionszeit zur Abtastung der interessierenden ¹³C-Frequenzen genutzt. Diese manifestieren sich nach dem zweiten Kohärenztransfer als Amplitudenmodulation der detektierten ¹H-Signale und können nach zweifacher Fourier-Transformation im 2D-Spektrum sichtbar gemacht werden. Diese Technik weist allerdings auch Nachteile auf. Das Hauptproblem besteht in der Unterdrückung der 200mal intensiveren ¹H-Signale des vollständig ¹²C-markierten Isotopomeren. Eine unvollständige Unterdrückung führt insbesondere bei den starken Signalen von CH₃-Gruppen zu störenden 'Rippen' in der ¹³C-Dimension von solchen 2D-Spektren und erschwert oder verunmöglicht die Detektion darunterliegender Korrelationssignale, die wegen mehrfacher homonuklearer Kopplung – sie kann bei abschliessender ¹H-Detektion nicht einfach 'gelöscht' werden – sehr geringe Intensität aufweisen können. Zur Behebung dieses Problems haben wir die von Otting und Wüthrich [6] vorgeschlagene, und durch ein vorgeschaltetes Relaxationsfilter ergänzte Experimentenvariante angewendet (Fig. 2b).

Durch mehrfachen Einsatz verschiedenartiger Filter (Relaxationsfilter, Doppelquantenfilter, sogenannte 'purge pulses' zur selektiven Zerstörung der unerwünschten Protonensignale des vollständig ¹²C-markierten Isotopomeren) konnten Unterdrückungsfaktoren >4000 erzielt werden. Fig. 3 zeigt einen Ausschnitt des mit dieser verbesserten Pulssequenz erhaltenen 2D-Spektrums im hierzu kritischen Bereich der CH₃-Protonen.

Die Messparameter wurden auf die De-

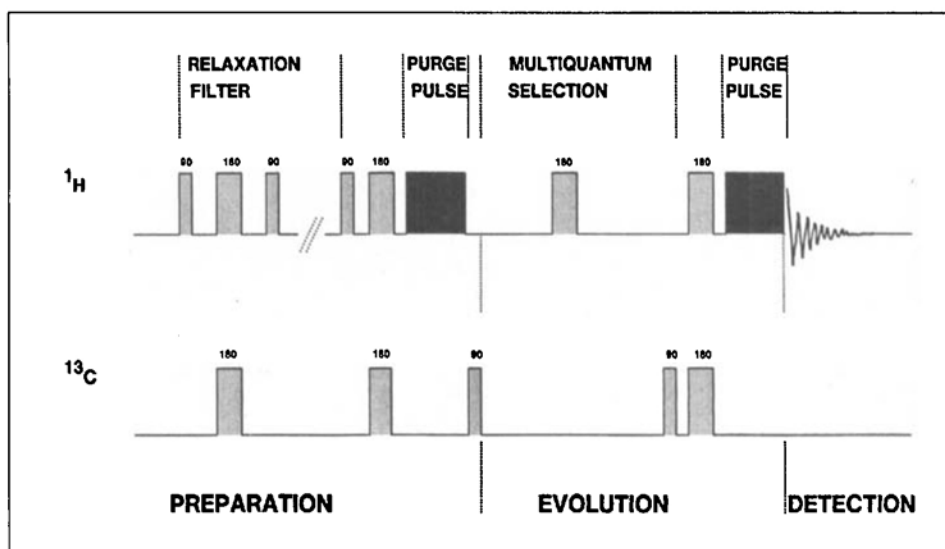


Fig. 2b. 2D-Pulsfolgen zur heteronuklearen Shift-Korrelation mit inverser (¹H) Detektion. Modifizierte Sequenz mit vorgeschaltetem Relaxationsfilter, mit 'purge' Pulsen und Doppelquantenselektion zur wirksamen Unterdrückung störender ¹H-Restsignale des ¹²C-Isotopomeren.

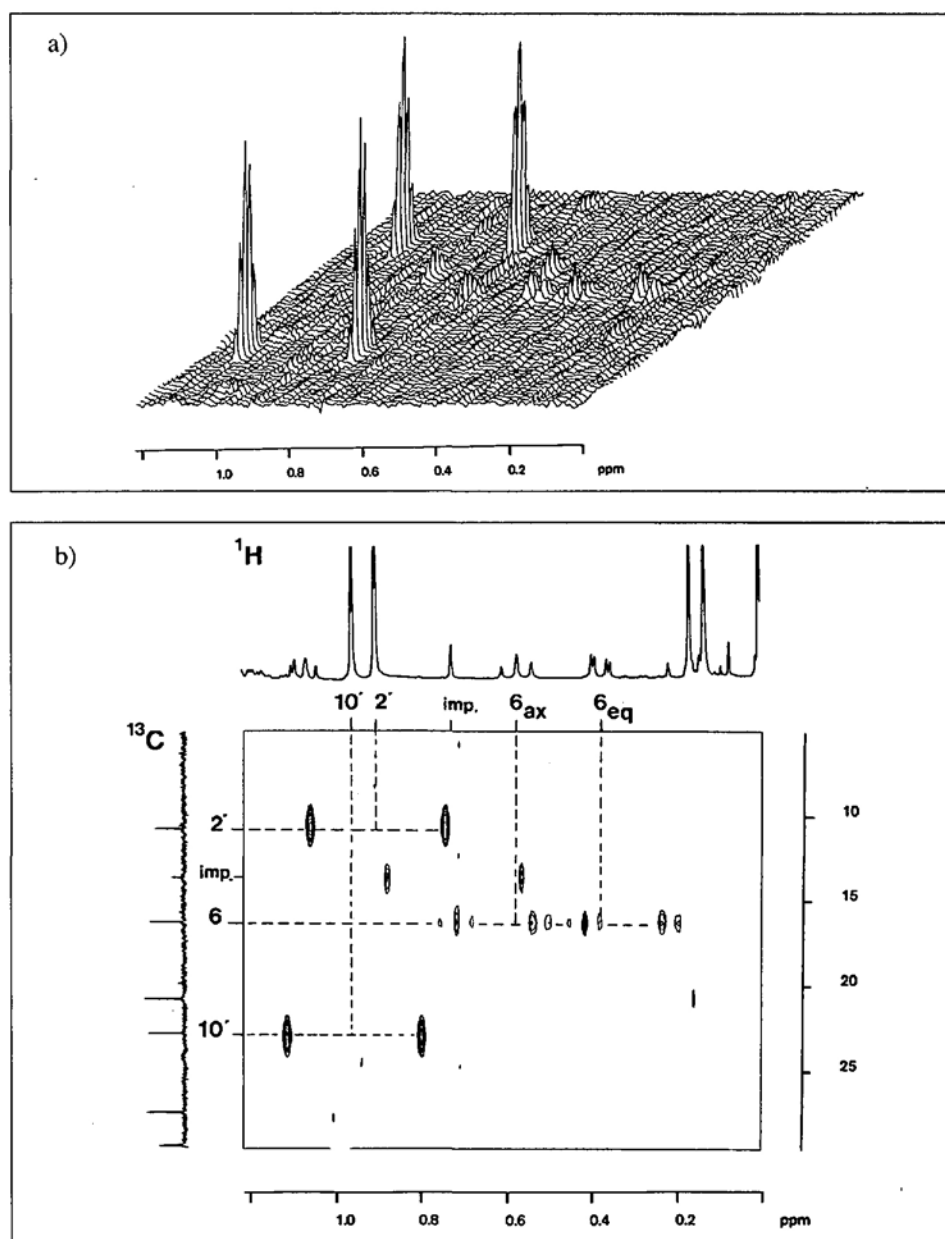


Fig. 3. Ausschnitt des 2D-¹³C/¹H-Shift-Korrelationsspektrums der Komponente 2 (2,5 mg in CDCl₃, Messzeit 12 h). Die Korrelationspeaks verknüpfen die Signale direkt (¹J(C,H)) gebundener C/H Paare. Die Signale sind in der ¹H-Domäne aufgrund der ¹J(C,H)-Kopplung in Dublette aufgespalten. a) Darstellung als 'stacked plot'. b) Darstellung als 'contour plot'.

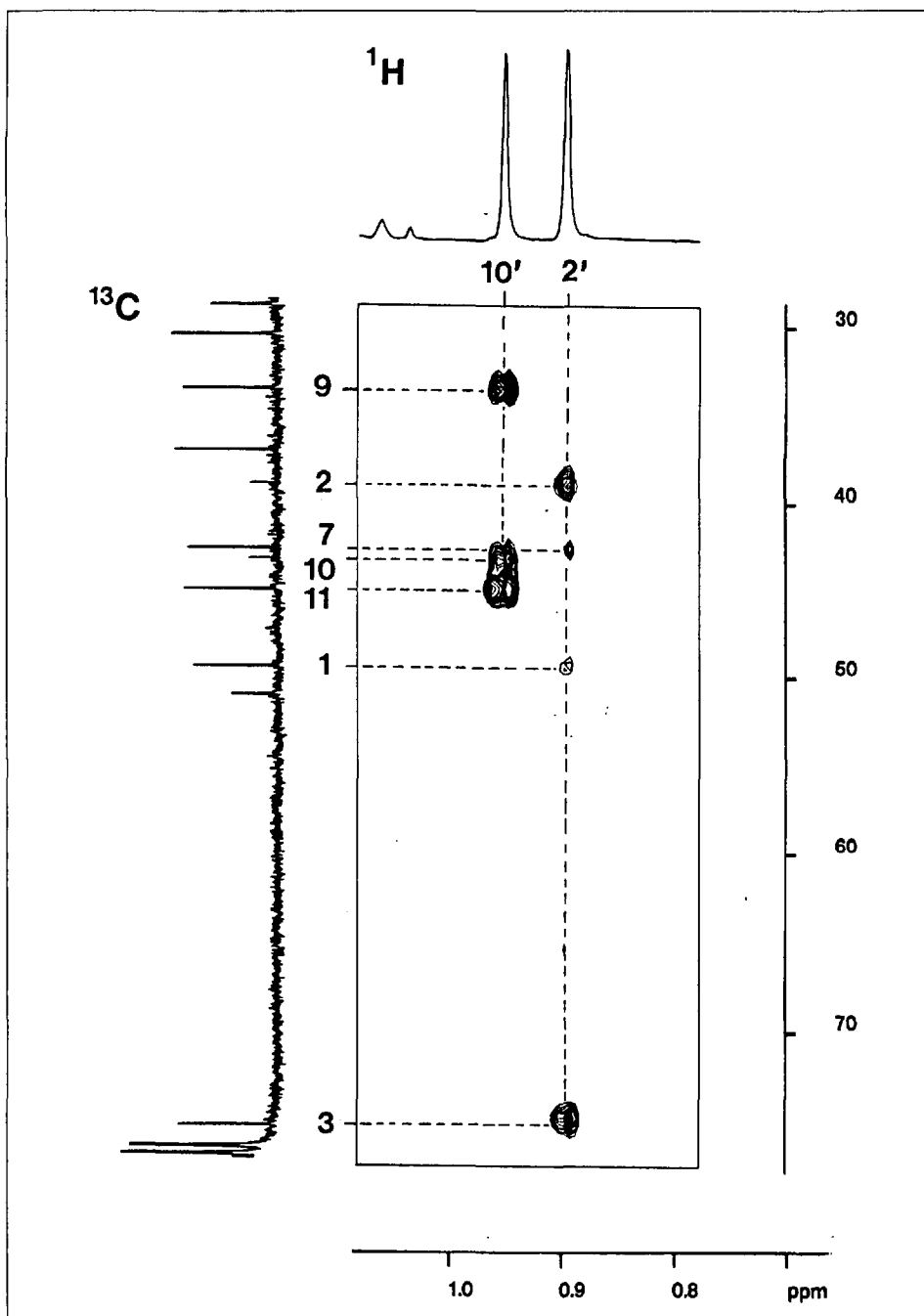


Fig. 4. Ausschnitt des 2D- $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -Shift-Korrelationsspektrums der Komponente 2 (Messzeit 12 h). Die Korrelationspeaks verknüpfen die Signale von über mehrere Bindungen ($^2J(\text{C,H})$, $^3J(\text{C,H})$) skalar gekoppelten ^{13}C - und ^1H -Kernen. Einzelne Signale sind aufgrund dieser Kopplung in *Dublette* aufgespalten.

tektion von $^1J(\text{C,H})$ -Kopplungswechselwirkungen ausgelegt. Das 2D-Spektrum ist einerseits als 'stacked plot' (Fig. 3a), welcher die Wirksamkeit der dreifachen Filterung eindrücklich demonstriert, und andererseits in der für die Analyse geeigneteren Form als 'contour plot' (Fig. 3b) dargestellt. Der Ausschnitt zeigt die starken Korrelationssignale für die beiden CH_3 -Gruppen C(2') und C(10') sowie die aufgrund von homonuklearen Kopplungen schwachen Signale der CH_2 -Gruppe C(6). Die Korrelationssignale sind durch die $^1J(\text{C,H})$ -Kopplung in der ^1H -Dimension in *Dublette* aufgespalten. Man erkennt für die beiden nicht äquivalenten CH_2 -Protonen eine *triplett*- beziehungsweise *dublett*-ähnliche Feinstruktur. Die eindeutige Zuordnung von $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(6)$ und $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(6)$ basiert einerseits auf der charakteristisch tiefen Resonanzlage

ihrer Signale (Nachbarschaft zu Si-Atom) und andererseits auf deren Feinstruktur. Die der *Triplet*-Struktur von H_{ax} zugrunde liegenden beiden grossen Kopplungskonstanten von je 13–14 Hz – eine ist der geminalen Kopplung mit $\text{H}_{\text{eq}}\text{-C}(6)$ die andere der vicinalen Kopplung mit $\text{H-C}(7)$ – zuzuschreiben ist nun für die Festlegung der Struktur besonders interessant. Sie steht angesichts der Kopplungsreferenzdaten von Cyclohexanen nur mit einer transdiaxialen Lage der beiden Protonen $\text{H}_{\text{ax}}\text{-C}(6)$ und $\text{H-C}(7)$ im Einklang. Das ^1H - und ^{13}C -Signal der CH -Gruppe C(7) wiederum kann, zusammen mit den Resonanzen anderer CH_m -Fragmente, anhand eines 2D-Spektrums (Fig. 4), welches mit einem entsprechend auf ('long range') $^nJ(\text{C,H})$ -Kopplungswechselwirkungen optimierten $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -Shiftkorrelationsexperiment erhal-

ten wurde, zweifelsfrei identifiziert werden. Ausgehend von der charakteristischen ^{13}C -Signallage der CH_2 -Gruppe C(3) können die ^1H -Signale der beiden CH_3 -Gruppen C(2') und C(10') aufgrund der $^1J(\text{H-C}(2')$, C(3))-Kopplungswechselwirkung und dem dadurch hervorgerufenen Korrelationssignal zugeordnet werden. Diese C(2')-Methylprotonen zeigen andererseits drei zusätzliche heteronukleare 'long range' Wechselwirkungen mit den zwei benachbarten Methin-, C(1) und C(7), und dem quaternären C-Atom C(2). Eine der drei in diesem Spektrum beobachteten ^{13}C -Resonanzen fehlt naturgemäss im DEPT -135° und im $^1J(\text{C,H})$ -Kopplungswechselwirkungen anzeigenden 2D-Spektrum (Bereich nicht abgebildet) und kann somit leicht dem quaternären C-Atom C(2) zugeordnet werden. Die ^{13}C - und ^1H -Resonanzlagen der übrigbleibenden CH -Gruppen C(1) und C(7) können anhand der stark unterschiedlichen Feinstrukturen ihrer ^1H -*Multiplette* zugeordnet werden. So zeigt die CH -Gruppe C(1) das erwartete einfache, *triplett*-artige Aufspaltungsbild (Kopplung zu bloss zwei benachbarten Protonen der CH_2 -Gruppe C(13)). Die CH -Gruppe C(7) weist wegen der grösseren Zahl von Kopplungspartnern dagegen ein wesentlich komplexeres Aufspaltungsbild auf. Auf diese Art und Weise konnten für beide Verbindungen 2 und 3 weitere ^1H - und ^{13}C -Signale zugeordnet und konnten einzelne zusätzliche stereochemische Aussagen gemacht werden. Zur vollständigen und überdies unabhängigen, also nicht ausschliesslich auf skalaren Kopplungswechselwirkungen abgestützten Aufklärung der Strukturen wurden in einem zweiten Schritt mit beiden Verbindungen homonukleare Kern-Overhauser (NOE)-Experimente durchgeführt.

2.2. Anwendung eines neuartigen ein-dimensionalen NMR-Experimentes zur Bestimmung homonuklearer Overhauser Effekte (NOEs)

Mit Hilfe des 1D- $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOE-Experimentes kann räumliche Nachbarschaft von Protonen – intra- und intermolekular – aufgrund von dipolaren (Kern-Kern)-Wechselwirkungen nachgewiesen und unter gewissen Voraussetzungen auch quantifiziert werden [4]. Diese Information dient einerseits zur unabhängigen Überprüfung, Bestätigung und allenfalls Vervollständigung der auf skalaren Kopplungswechselwirkungen basierenden Signal-Zuordnungen, beziehungsweise der aus Kopplungskonstanten bestimmten lokalen Molekülgeometrien. Andererseits ist die zusätzliche Kenntnis der aus homonuklearen NOEs abgeleiteten Nachbarschaftsbeziehungen von Protonen verschiedener Molekül-Fragmente, welche durch keine skalaren Kopplungswechselwirkungen miteinander verknüpft sind, besonders wertvoll. Erst dadurch wird es in vielen Fällen möglich, sowohl die relative Konfiguration als auch die Konformation des untersuchten Moleküls zweifelsfrei zu

bestimmen. Zur eindimensionalen Beobachtung homonuklearer $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOEs wird in den meisten Fällen das in Fig. 5a dargestellte Messverfahren eingesetzt.

Pro Experiment wird bloss eines der ausgewählten Protonensignale f_i selektiv bestrahlt. Zur übersichtlichen und empfindlichen Wiedergabe der dadurch auf andern Protonen ausgelösten NOEs hat sich die Berechnung und die Darstellung von Differenzspektren als vorteilhaft erwiesen. Dazu ist allerdings ein weiteres Experiment nötig, bei dem während der NOE-Aufbauperiode in einen signalfreien Spektralbereich $f_{\text{off-res.}}$ eingestrahlt wird. Das Vorgehen ist im entsprechenden Messprotokoll für den Fall von zwei ausgewählten Protonenfrequenzen f_1 und f_2 dargestellt. Dieses herkömmliche Messverfahren nutzt allerdings die zur Verfügung stehende Messzeit nicht effizient, indem pro Experiment bloss ein einziges Proton bestrahlt und damit nur die von diesem Proton induzierten NOEs beobachtet werden können. Mit zunehmender Zahl der zur selektiven Bestrahlung vorgesehenen Protonen nimmt zudem die Messzeit rasch zu. Umgekehrt, und vielleicht noch gravierender, nimmt das (Signal/Rausch)-Verhältnis bei festgelegter Gesamtmesszeit für die einzelnen Differenzspektren ab und verunmöglicht eventuell den gesicherten Nachweis der für den Strukturbeweis oftmals besonders wertvollen kleinen NOEs. Ausgehend von einer verbesserten Variante zur Messung von 1D-HOHAHA-Spektren [7] haben wir ein Messverfahren entwickelt und ausgetestet, welches gegenüber dem bisher angewendeten Verfahren die zur Verfügung stehende Messzeit besser nutzt, bei gleicher Selektivität höhere Sättigungsgrade aufweist und dadurch eine zusätzliche Empfindlichkeitsverbesserung abgibt, die Qualität der Differenzspektren erhöht und auf modernen NMR-Spektrometern einfach durchgeführt werden kann (Fig. 5b). Dabei werden die ausgewählten Protonen im Gegensatz zum normalerweise angewendeten Verfahren nach wohldefiniertem Messprotokoll teilweise simultan gesättigt. Dieses Messprotokoll ist für den einfachen Fall von wiederum zwei zur Bestrahlung ausgewählten Protonen mit den Resonanzfrequenzen f_1 und f_2 wiedergegeben. Dabei werden vier Datensätze A–D erhalten. Man erkennt, dass daraus nach einfacher Linearkombination zwei Differenzspektren erhalten werden können, die den beiden nach konventionellem Verfahren gemessenen NOE-Differenzspektren entsprechen: Subtraktion der Datensätze A und B liefert ein Spektrum mit der Summe, Subtraktion der Datensätze C und D dagegen ein Spektrum mit der Differenz der durch Bestrahlung der beiden Protonen ausgelösten NOEs. Durch Addition, beziehungsweise Subtraktion dieser berechneten Datensätze erhält man schliesslich die gewünschten beiden NOE-Differenzspektren. Anhand des Messprotokolls für zwei ausgewählte Protonenfrequenzen ist klar ersichtlich, dass innerhalb

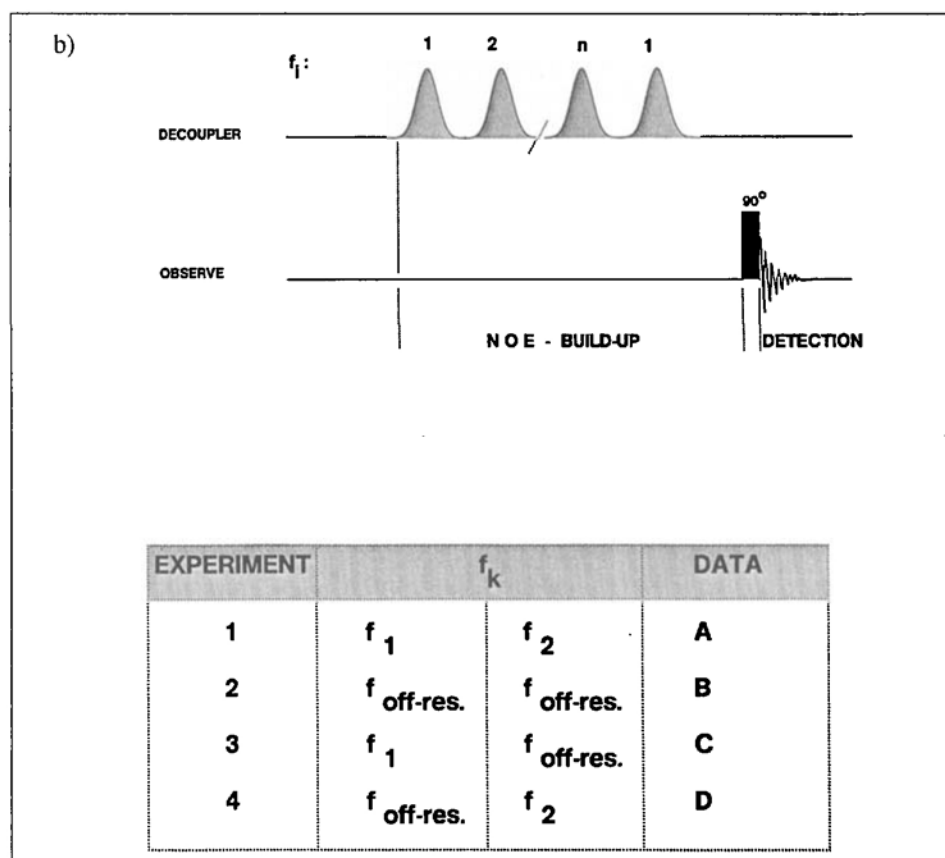
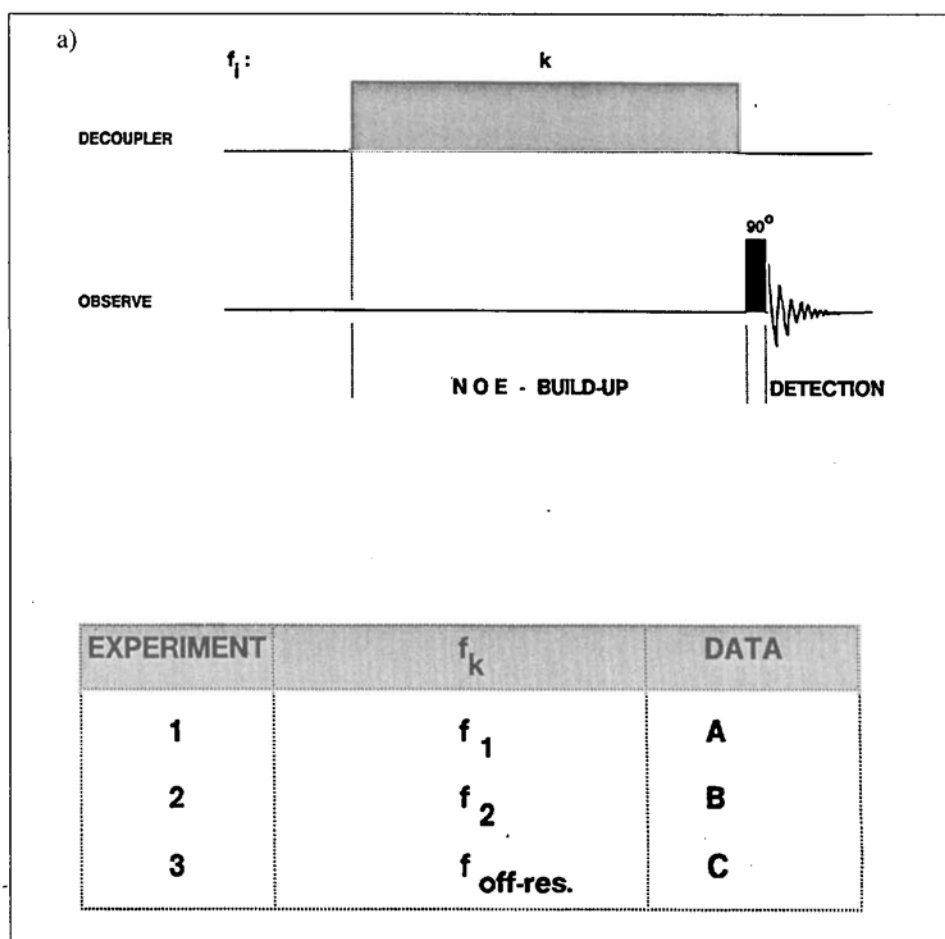


Fig. 5. 1D-Pulsfolgen und entsprechende Messprotokolle zum Nachweis von homonuklearen $^1\text{H}/^1\text{H}$ -NOEs für zwei ausgewählte Protonen mit den Resonanzfrequenzen f_1 und f_2 . a) Basissequenz zur Bestrahlung eines einzigen Protonenmultipletts bei der Frequenz f_k . Drei Experimente sind in diesem Fall nötig zur Berechnung der zwei Differenzspektren. b) Verbesserte Pulsfolge mit der Möglichkeit zur simultanen Bestrahlung mehrerer Protonenmultiplette bei den Frequenzen f_1, f_2, \dots, f_n . Die ausgewählten Protonen werden in der NOE-Aufbauperiode mehrmals frequenzselektiven 180° Pulsen (Gauss-Profil) ausgesetzt und gesättigt. Vier Experimente sind nötig zur Berechnung der zwei Differenzspektren (vgl. Text).

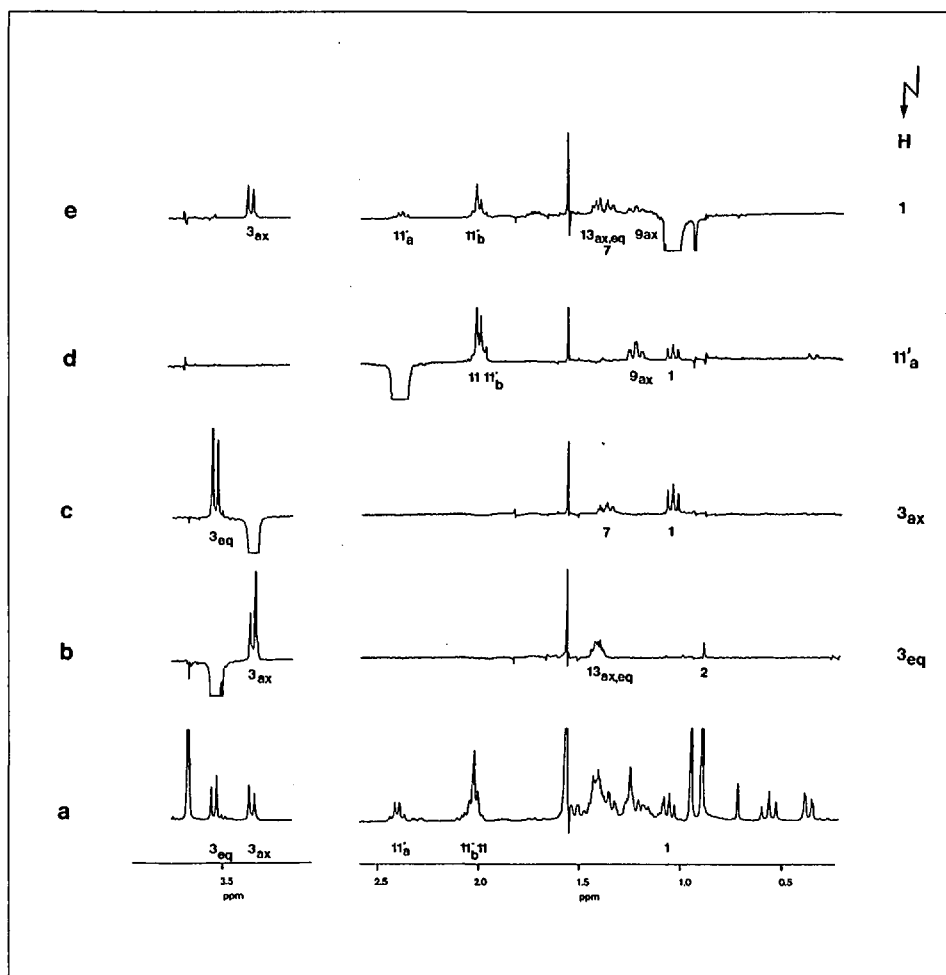
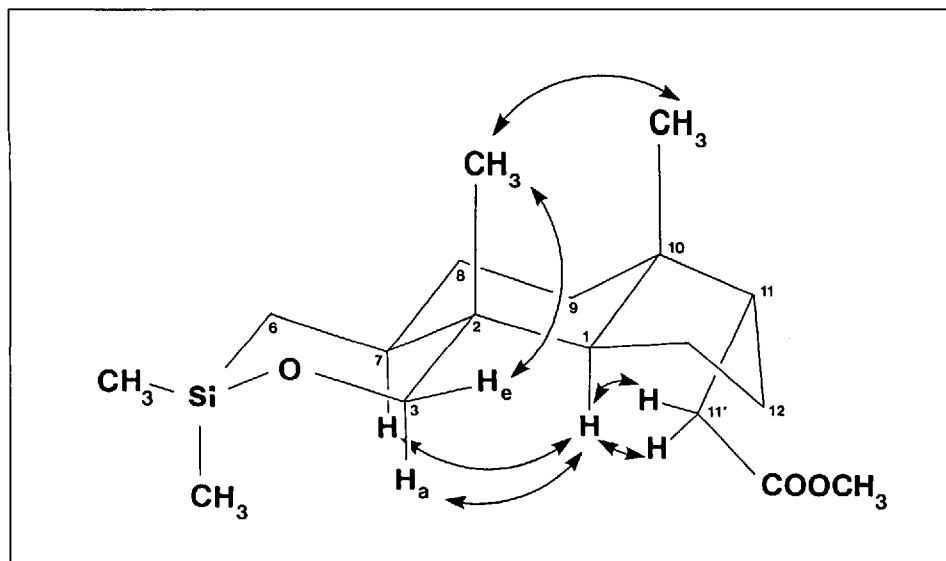


Fig. 6. Auswahl relevanter NOE-Differenzspektren der Komponente 2, die mit der verbesserten NOE-Messmethode erhalten wurden. Neben dem Ausschnitt des normalen Protonenspektrums (a) sind vier der insgesamt zwölf NOE-Differenzspektren gezeigt (b-e). Die totale Messzeit betrug insgesamt 10 h (2 Blöcke zu 5 h).



der vorgegebenen Gesamtmesszeit mit der herkömmlichen Methode bloss ein, mit der verbesserten Variante dagegen zwei NOE-Differenzspektren mit je gleicher Empfindlichkeit erhalten werden können. Das Verhältnis R der entsprechenden Messzeiten (konventionell/verbessert) nimmt mit der Zahl n der zur Bestrahlung vorgesehenen Protonen rasch zu ($R = (n+1)/2$) und damit auch der mit der neuen Methode erzielte Messzeitgewinn. Die obere Grenze wird

durch die Relaxation der beteiligten Protonen bestimmt. Zur teilweise simultanen Sättigung der einzelnen Protonen verwendeten wir selektive 180° Pulse mit Gauss-Profil. Dadurch ergibt sich im Frequenzraum einerseits ein gegenüber der herkömmlichen Methode günstigeres Anregungsfenster in der Nähe der ausgewählten Frequenz und man vermeidet andererseits störende Seitenbänder, wie sie bei entsprechender Anwendung von Puls-Serien mit Rechteck-

Gauss-Profil auftreten. Das vorgeschlagene verbesserte 1D-NOE-Experiment wurde auf beide Komponenten 2 und 3 angewendet, wobei zwei Serien mit simultaner Sättigung von je sechs ausgewählten Resonanzen durchgeführt und schliesslich für jede Komponente zwölf NOE-Differenzspektren erhalten werden konnten. Fig. 6 zeigt den Ausschnitt einer Auswahl von vier für die Konfigurationsbestimmung besonders wichtigen Differenzspektren, zusammen mit dem normalen Protonenspektrum für die Komponente 2.

Die Resultate sind zudem im folgenden Formelbild dargestellt, wobei die Pfeile vom auslösenden (bestrahlten) zum NOE zeigenden, räumlich benachbarten Proton weisen.

In den Differenzspektren 6b und 6c erkennt man die durch Bestrahlung von $H_{eq}-C(3)$ ausgelösten NOEs für $H_{ax}-C(3)$, $H_{ax}-C(13)$, $H_{eq}-C(13)$ und $H-C(2')$, beziehungsweise die durch Bestrahlung von $H_{ax}-C(3)$ induzierten NOEs für $H_{eq}-C(3)$, $H-C(7)$ und $H-C(1)$. Damit wird die von skalaren Kopplungswechselwirkungen abgeleitete axiale Position von $H-C(7)$ bestätigt und kann zusätzlich die axiale Position von $H-C(1)$ bestimmt werden. Diese wird durch die Resultate des 'Gegenexperimentes' im Differenzspektrum 6e gesichert, welches unter anderen die nach Bestrahlung von $H-C(1)$ erzeugten NOEs für $H_{ax}-C(3)$ und $H-C(7)$ erkennen lässt. Zusammen mit den wechselseitig beobachteten NOEs bei Bestrahlung der Protonen der CH_3 -Gruppen $C(2')$ und $C(10')$ (nicht gezeigt) konnte aus diesen Daten die relative Konfiguration an allen Zentren mit Ausnahme an $C(11)$ bestimmt werden. Dazu sind die nach Bestrahlung von $H-C(1)$ zusätzlich beobachteten NOEs für die beiden Protonen der CH_2 -Gruppe $C(11')$ wesentlich. Sie beweisen, zusammen mit den Daten des entsprechenden 'Gegenexperimentes' (Fig. 6d), deren räumliche Nachbarschaft und erlauben damit die Festlegung der für 2 angegebenen Struktur (Formelbild). Die Strukturen 2 und 3 unterscheiden sich in der relativen Konfiguration an $C(11)$. Bestrahlung von $H-C(1)$ führt in Komponente 3 zu einem NOE für $H-C(11)$, aber zu keinen NOEs für die Protonen der CH_2 -Gruppe $C(11')$.

Eingegangen am 5. November 1990

- [1] H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **1988**, *100*, 507.
- [2] E.R. Lee, I. Lakomy, P. Bigler, R. Scheffold, *Helv. Chim. Acta* (zur Publikation eingereicht).
- [3] D.M. Doddrell, D.T. Pegg, M.R. Bendall, *J. Magn. Reson.* **1982**, *48*, 323.
- [4] D. Neuhaus, M. Williamson, 'The Nuclear Overhauser Effect', VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1989.
- [5] M.R. Bendall, D.T. Pegg, D.M. Doddrell, *J. Magn. Reson.* **1988**, *52*, 81; A. Bax, R.H. Griffey, B.L. Hawkins, *ibid.* **1983**, *55*, 301.
- [6] G. Otting, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.* **1988**, *76*, 569.
- [7] H.R. Bircher, C. Müller, P. Bigler, *J. Magn. Reson.* **1990**, *89*, 146.