

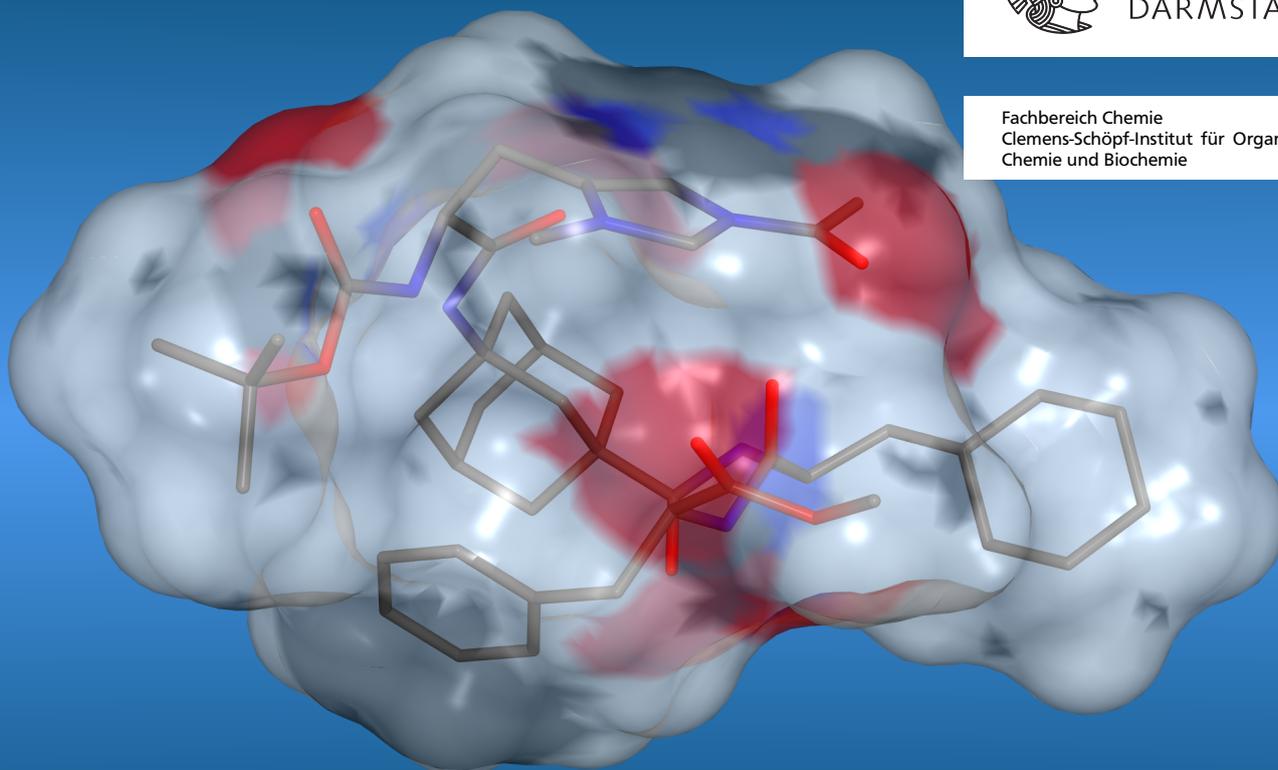
Aufklärung von Struktur-Reaktivitäts-Beziehungen komplexer organischer Moleküle mit moderner NMR-Spektroskopie

Vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)
genehmigte kumulative Dissertation, vorgelegt von Dipl.-Ing. Andreas Kolmer aus Erbach
November 2015 – Darmstadt – D 17



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Fachbereich Chemie
Clemens-Schöpf-Institut für Organische
Chemie und Biochemie



Aufklärung von Struktur-Reaktivitäts-Beziehungen komplexer organischer Moleküle mit moderner NMR-Spektroskopie

Genehmigte kumulative Dissertation von Dipl.-Ing. Andreas Kolmer aus Erbach

1. Gutachten: Prof. Dr. Christina M. Thiele
2. Gutachten: Prof. Dr. Michael Reggelin

Tag der Einreichung: 27. Mai 2015

Tag der Prüfung: 13. Juli 2015

November 2015 — Darmstadt — D 17

Für meine Familie

*It's a magical world, Hobbes, ol' buddy...
Let's go exploring!
Calvin*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Motivation und Zielsetzung	4
2.1	Untersuchung von Syntheseprodukten	4
2.2	Untersuchung von Photoreaktionen	5
2.3	Untersuchung von katalysierten Reaktionen	6
3	Stand der Forschung	8
3.1	Wechselwirkungen in der NMR-Spektroskopie	8
3.2	Bestimmung der Konstitution	11
3.3	Messung von Kopplungskonstanten	12
3.4	Diederwinkel aus der skalaren Kopplungskonstante: Die Karplus-Kurve	14
3.4.1	Grundlagen	15
3.4.2	Der Einfluss molekularer Flexibilität	16
3.5	Abstandsinformationen aus NOE-Daten	16
3.5.1	Grundlagen	17
3.5.2	Der Einfluss molekularer Flexibilität	26
3.5.3	Anwendungsbeispiele	29
3.6	Austauschspektroskopie	32
3.6.1	Grundlagen	32
3.6.2	Anwendungsbeispiele	34
3.7	Dipolare Restkopplungen	35
3.7.1	Grundlagen	35
3.7.2	Alignmentmedien	39
3.7.3	Der Einfluss molekularer Flexibilität	40
3.7.4	Anwendungsbeispiele	42
4	Ergebnisse	46
4.1	Einteilung nach molekularer Flexibilität	46
4.2	Starre Moleküle	48
4.2.1	Aufklärung des Photozersetzungsmechanismus zweier N-Heterotetracene	48
4.2.2	Aufklärung der Konnektivität des FAST-BLUE-Vorläufers	63
4.2.2.1	Produkt der oxidativen Heck-Reaktion	63
4.2.2.2	Produkt der Amid-Wittig-Reaktion	65
4.2.2.3	Fazit	67
4.2.3	Evaluation der Genauigkeit der RDC-Extraktion aus CLIP-Experimenten	67
4.3	Schneller Austausch	83
4.3.1	Evaluation der Genauigkeit von Abständen aus NOE-Daten	83
4.3.2	Untersuchung der Photocyclisierung von Dimethyldithienylcyclopenten	95
4.3.3	Bestimmung der Relativkonfiguration von acyclischen Diamiden	109
4.3.3.1	Zusammenfassung der experimentellen Daten	110
4.3.3.2	Syntheseprodukt A	112
4.3.3.3	Syntheseprodukt B	119
4.3.3.4	Syntheseprodukt C	122
4.3.3.5	Syntheseprodukt D	123

4.3.3.6	Fazit	123
4.3.4	Untersuchung der Selektivität der katalysierten enantioselektiven Acylierung	124
4.3.4.1	Zusammenfassung der experimentellen Daten	126
4.3.4.2	Die verwendeten Strukturen	128
4.3.4.3	Einzel- und Multi-Konformer-Fits	128
4.3.4.4	Schrittweiser Aufbau	130
4.3.4.5	Wechselwirkungen zwischen Tetrapeptid und Diol	134
4.3.4.6	Fazit	137
4.4	Langsamer Austausch: Dynamische NMR-Untersuchungen an Bis-NHC-Komplexen	137
5	Zusammenfassung und Ausblick	146
6	Experimenteller Teil	150
6.1	Allgemeine Messbedingungen	150
6.2	Zusätzliche Informationen zu Kapitel 4.2.2	151
6.3	Zusätzliche Informationen zu Kapitel 4.3.1	152
6.4	Zusätzliche Informationen zu Kapitel 4.3.3	156
6.5	Zusätzliche Informationen zu Kapitel 4.3.4	156
6.6	Supporting Information	171
	Literaturverzeichnis	172
	Tabellenverzeichnis	181
	Abbildungsverzeichnis	182
	Schemaverzeichnis	183

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetyl
ADEQUATE	<i>Adequate sensitivity Double-QUantum Transfer Experiment</i>
BIRD	<i>Bilinear Rotational Decoupling</i>
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bz	Benzoyl
CCR	<i>Cross-Correlated Relaxation</i>
Cha	Cyclohexylalanin
CLAP	<i>CLean AntiPhase</i>
CLIP	<i>CLean InPhase</i>
COSY	<i>CORrelation SpectroscopY</i>
Cy	Cyclohexyl
DFT	Dichtefunktionaltheorie
EASY-ROESY	<i>Efficient Adiabatic Symmetrized Rotating frame nuclear OVERHAUSER Enhancement SpectroscopY</i>
E.COSY	<i>Exclusive CORrelation SpectroscopY</i>
Et	Ethyl
EXSIDE	<i>EXcitation-Sculptured Indirect-Detection Experiment</i>
EXSY	<i>EXchange SpectroscopY</i>
FID	<i>Free Induction Decay</i>
Gly	Glycin
HECADE	<i>Heteronuclear Couplings from Assci-Domain experiments with E.cosy-type cross peaks</i>
HETLOC	<i>determination of HETeronuclear LONG range Couplings</i>
His	Histidin
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HSQMBC	<i>Heteronuclear Single Quantum Multiple Bond Correlation</i>
INADEQUATE	<i>Incredible Natural Abundance Double QUantum Transfer Experiment</i>
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
MCMT	<i>Multi Conformer Multi Tensor</i>
MCST	<i>Multi Conformer Single Tensor</i>
Me	Methyl
Met	Methionin
MMFF	<i>Merck Molecular Force Field</i>
NHC	<i>N</i> -Heterocyclisches Carben
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOE	<i>Nuclear OVERHAUSER Enhancement</i>
NOESY	<i>Nuclear OVERHAUSER Enhancement SpectroscopY</i>
PANIC	<i>Peak Amplitude Normalisation for Improved Cross-relaxation</i>
PBLG	Poly- γ -benzyl-L-glutamat
PBDG	Poly- γ -benzyl-D-glutamat
PFGE	<i>Pulsed Field Gradient Spin Echo</i>
Ph	Phenyl
Phe	Phenylalanin
RCSA	<i>Residual Chemical Shift Anisotropy</i>
RDC	<i>Residual Dipolar Coupling</i>

RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
ROE	<i>Rotating frame nuclear OVERHAUSER Enhancement</i>
SCST	<i>Single Conformer Single Tensor</i>
SVD	<i>Singular Value Decomposition</i>
SJS	<i>Selective J-Scaled</i>
tBu	<i>tert-Butyl</i>
THF	<i>Tetrahydrofuran</i>
TOCSY	<i>TOTAL Correlation SpectroscopY</i>
UV	<i>UltraViolet</i>
vis	<i>visible</i>
XLOC	<i>X nucleus for LONG range Couplings</i>
ZQS	<i>Nullquantenunterdrückung</i>

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Christina M. Thiele in der Zeit vom 1. Januar 2011 bis zum 31. März 2015 am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie des Fachbereichs Chemie der Technischen Universität Darmstadt angefertigt.

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht, oder zur Veröffentlichung eingereicht:

- [1] A. Kolmer, L. Kaltschnee, V. Schmidts, L. H. Peeck, H. Plenio, C. M. Thiele, *Magn. Reson. Chem.* **2013**, *51* (11), 695–700.
- [2] I. Timári, L. Kaltschnee, A. Kolmer, R. W. Adams, M. Nilsson, C. M. Thiele, G. A. Morris, K. E. Kövér, *J. Magn. Reson.* **2014**, *239* (1), 130–138.
- [3] L. Kaltschnee, A. Kolmer, I. Timári, V. Schmidts, R. W. Adams, M. Nilsson, K. E. Kövér, G. A. Morris, C. M. Thiele, *Chem. Commun.* **2014**, *50* (99), 15702–15705.
- [4] M. Fredersdorf, R. Göstl, A. Kolmer, V. Schmidts, P. Monecke, S. Hecht, C. M. Thiele, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21* (41), 14545–14554.
- [5] A. Kolmer, L. J. Edwards, I. Kuprov, C. M. Thiele, *J. Magn. Reson.* , im Druck, akzeptiertes Manuskript.
- [6] N. Kolmer-Anderl, A. Kolmer, C. M. Thiele, M. Rehahn, *Chem. Eur. J.* , zur Veröffentlichung eingereicht.

1 Einleitung

Der Zusammenhang zwischen Struktur und Reaktivität und dessen Verständnis ist der Kern der Wissenschaft Chemie. Besonders in der organischen Chemie kann das Verhalten kleiner, wohl definierter, organischer Moleküle durch die Entwicklung der Strukturaufklärung immer besser untersucht werden. Zudem können durch das verbesserte Verständnis der Reaktivitäten Reaktionen besser geplant sowie kontrollierter und effizienter durchgeführt werden.

Zum Verständnis einer Reaktion kann die Strukturaufklärung beitragen, indem sie die dreidimensionale Struktur der an der Reaktion beteiligten Moleküle bestimmt. Dazu müssen die Konstitution, also die Verknüpfung der Atome, die Konfiguration der Stereozentren sowie die Konformation der rotierbaren Bindungen bestimmt werden (siehe Abbildung 1.1).

Diese drei Aspekte würden idealerweise unter realen Reaktionsbedingungen über den gesamten Reaktionsverlauf untersucht werden, also modifikations- und zerstörungsfrei sowie *in situ*. Da besonders die *in situ*-Anforderung nur schwer möglich ist, werden meist Edukte, Intermediate oder Produkte der Reaktion analysiert, um anschließend auf Basis ihrer Strukturen den Reaktionsverlauf modellhaft nachzuvollziehen. Aus diesen isoliert betrachteten Teilen der Reaktion wird dann basierend auf verschiedenen Modellen der molekularen Erkennung versucht, ein Gesamtbild der Struktur-Reaktivitäts-Beziehung zu erstellen.

Das älteste und bekannteste dieser Modelle der molekularen Erkennung ist das Schlüssel-Schloss-Prinzip^[7] (siehe Abbildung 1.2a). Die Grundidee dieses Modells besagt, dass Reaktivitäten und Selektivitäten dadurch erklärt werden können, dass die dreidimensionale Struktur der Reaktionspartner zueinander passen muss. Da von starren Molekülen ausgegangen wird, können diese isoliert voneinander untersucht werden. Hier bietet sich besonders die Röntgenstrukturanalyse an^[8], mit deren Hilfe im Festkörper sogar Absolutkonfigurationen bestimmt werden können^[9,10].

Das Grundkonzept der molekularen Erkennung, also dass die Strukturen der Moleküle zueinander passen müssen, kann auf flexible Moleküle erweitert werden. Hierzu wird davon ausgegangen, dass die Reaktionspartner durch Interaktion entweder ihre Konformation verändern (*induced fit*^[11,12], siehe Abbildung 1.2b), oder dass nicht alle vorliegenden, sondern nur bestimmte Konformationen zur Reaktivität beitragen (konformationelle Selektion^[13], siehe Abbildung 1.2c). Beiden Modellen ist gemein, dass der gesamte Konformationsraum der Reaktionspartner sowohl im isolierten Zustand als auch im Verlauf der Reaktion bekannt sein muss.

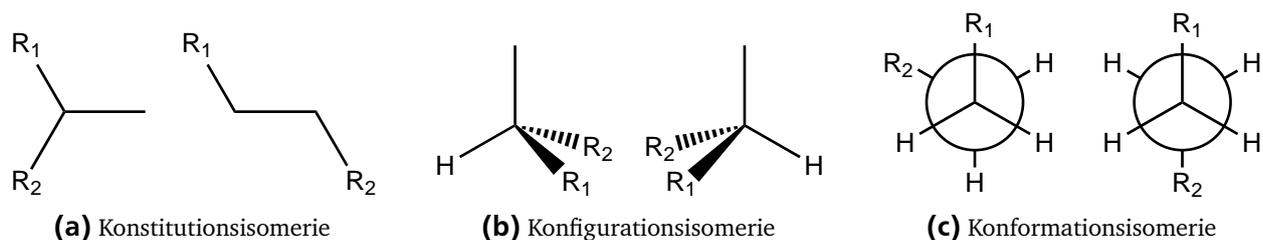


Abbildung 1.1: Die zu bestimmenden Aspekte der Strukturaufklärung kleiner organischer Moleküle.

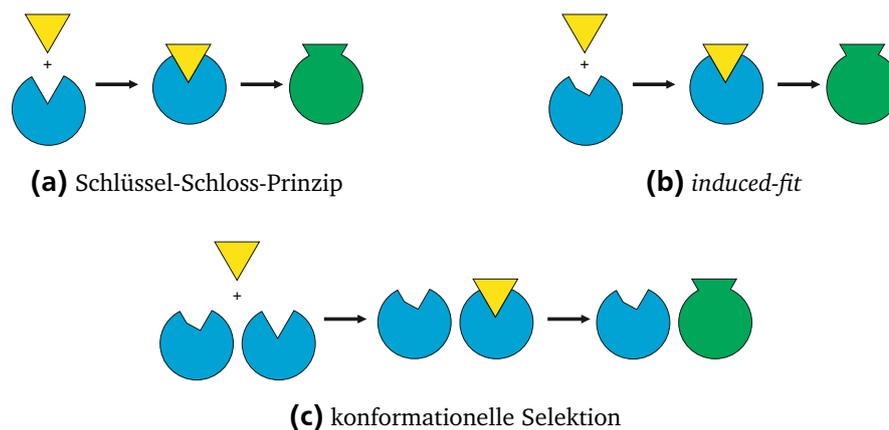


Abbildung 1.2: Verschiedene Modelle molekularer Erkennung.

Dies stellt die Strukturaufklärung vor erhebliche Herausforderungen. Die Röntgenkristallstrukturanalyse kann durch eine Fehlordnung der Röntgenkristallstrukturen Hinweise auf konformationelle Flexibilität zeigen. Da die Untersuchungen jedoch im Festkörper stattfinden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass das untersuchte Molekül in Lösung ein anderes Verhalten zeigt. Schwingungsspektroskopische Methoden, die Moleküle in Lösung untersuchen, besitzen den Nachteil, dass meist nur die Anwesenheit funktioneller Gruppen bestimmt werden kann^[14]. Zur Untersuchung der räumlichen Anordnung der funktionellen Gruppen zueinander bietet die Entwicklung von 2D-IR-Methoden besonders im Falle der Untersuchung von Carbonylgruppen neue Möglichkeiten^[15].

Damit eine spektroskopische Methode also gut zur Strukturaufklärung kleiner organischer Moleküle geeignet ist, sollte sie möglichst nicht ausschließlich funktionelle Gruppen analysieren, sondern das Kohlenstoff-Rückgrat in Lösung. Genau dies ist die Stärke der hochauflösenden *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)-Spektroskopie, die die Bestimmung der Konnektivität und der dreidimensionalen Struktur ermöglicht. Nachteilig sind jedoch die niedrige Sensitivität und die geringe Zeitauflösung der NMR-Spektroskopie, die im Falle flexibler Moleküle dazu führt, dass nur über den gesamten Konformationsraum gemittelte Parameter bestimmt werden können^[14,16–18].

Die Wahl der passenden NMR-Methode hängt von den beteiligten Reaktionspartnern und der damit verbundenen Art der Fragestellung ab. Zur Aufklärung der Konstitution von Reaktionsprodukten eignen sich neben ¹H- und ¹³C-Spektren zweidimensionale Korrelationsexperimente, besonders *CORrelation Spectroscopy* (COSY)^[19–21], *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)^[22,23] und *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC)^[24–27]. Diese Spektren werden mittlerweile routinemäßig für kleine organische Moleküle angewendet.

Zur Aufklärung von relativer Konfiguration und Konformation werden Methoden benötigt, die räumliche Informationen beinhalten. Hier können fünf Observablen zum Einsatz kommen: Die Strukturabhängigkeit der ¹³C-chemischen Verschiebung, die skalare Kopplungskonstante, die *Cross-Correlated Relaxation* (CCR)^[28,29], das *Nuclear OVERHAUSER Enhancement* (NOE)^[30,31] und die *Residual Dipolar Coupling* (RDC)^[32–36]. Diese Observablen liefern oft komplementäre Informationen. Dabei ist zur Konfigurations- und Konformationsbestimmung aber zu berücksichtigen, dass molekulare Flexibilität vorliegen kann. Unter diesem Begriff werden sämtliche reversiblen dynamischen Vorgänge innerhalb eines Moleküls

zusammengefasst. Diese umfassen Rotationen um Bindungen, Inversion der Konfiguration an Atomen ohne Bindungsbruch sowie intramolekulare Austausch- und Umlagerungsreaktionen.

Flexibilität, die nun am Beispiel der Rotationen um Bindungen diskutiert wird, führt häufig zur Umwandlung eines Konformers in ein anderes, oft energetisch unterschiedliches Konformer. Im Falle molekularer Symmetrie können Ausgangs- und Zielkonformer auch identisch sein. Zur Rotation um eine Bindung muss eine Energiebarriere überwunden werden, die Rotationsbarriere. Die Größe der Rotationsbarriere entscheidet darüber, auf welcher Zeitskala die Umwandlung der Konformere stattfindet. Aus Sicht der NMR-Spektroskopie sind hier drei Zustände zu charakterisieren: Langsamer Austausch, Koaleszenz, und schneller Austausch^[37].

Im Falle des auf der Zeitskala des NMR-Experiments langsamen Austauschs kann für jedes vorliegende Konformer je ein kompletter Signalsatz beobachtet werden. Konformerpopulationen können so direkt aus den Integralen der Signale gewonnen werden. Jedoch kommt es häufig zu Überlappungen der Signale, was die Aufklärung von Konnektivitäten erschweren kann. Gleichzeitig bietet das Regime des langsamen Austausches aber den Vorteil, Austauschraten zugänglich zu machen^[37].

Der Fall der Koaleszenz erlaubt es, direkt aus der Linienform und -breite des ¹H-NMR-Spektrums Rückschlüsse auf Rotationsbarrieren zu ziehen. Aufgrund der außergewöhnlichen Linienbreite sind dagegen aber meist keine Korrelationsexperimente möglich. Zusätzlich kann die Linienbreite eines Signals durch externe Effekte, wie z.B. inhomogene Magnetfelder, beeinflusst werden, sodass Fehlinterpretationen möglich sind.

Beim schnellen Austausch wandeln sich die Konformere so schnell ineinander um, dass im NMR-Experiment nur gemittelte Parameter zugänglich sind. Typisches Beispiel hierfür ist die Rotation einer Methylgruppe, deren drei Protonen im ¹H-Spektrum nur ein gemitteltes Signal aufweisen. Durch die vergleichsweise übersichtlichen Spektren ist der Zustand des schnellen Austausches für routinemäßige Konstitutionsbestimmungen sehr gut geeignet. Sämtliche Informationen über Konformerpopulationen gehen aber durch die Mittelung verloren und müssen durch die Beschreibung von über sinnvolle Konformerensembles gemittelten Parametern gewonnen werden. Das Verständnis dieser Mittelungsvorgänge ist somit essentiell.

Die genannten Observablen der Strukturabhängigkeit der ¹³C-chemischen Verschiebung, skalaren Kopplungskonstante, CCR, NOE und RDC weisen jeweils unterschiedliche Mittelungsverhalten auf. Zur Untersuchung molekularer Flexibilität sollten sie daher komplementär genutzt werden können. Ein Ziel der vorliegenden Dissertation ist es, die Komplementarität von NOE- und RDC-Daten an ausgewählten Beispielen zu untersuchen und zur Strukturaufklärung zu nutzen.

2 Motivation und Zielsetzung

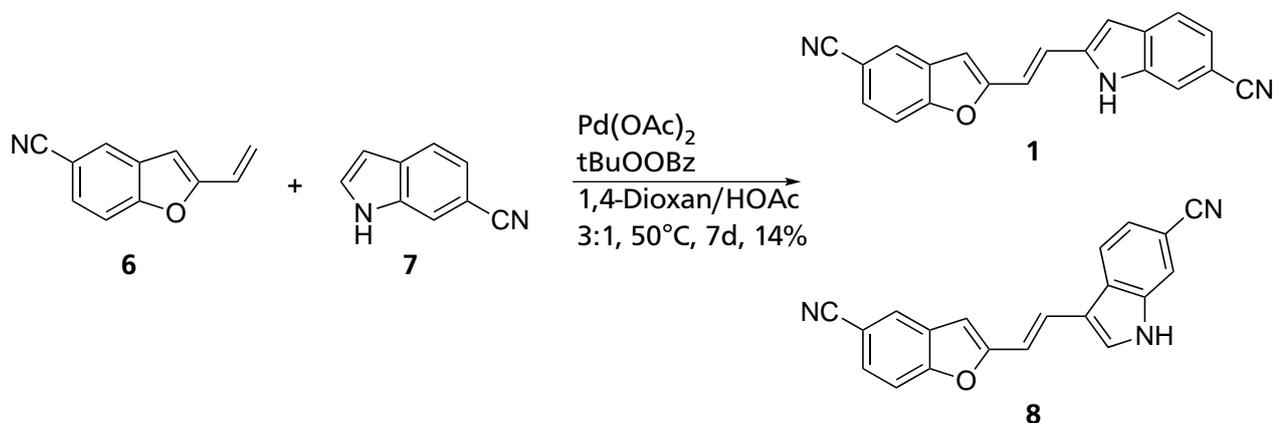
Die vorliegende kumulative Dissertation will Beiträge zum Verständnis verschiedener Reaktionen liefern. Dazu wird der Zusammenhang zwischen Struktur und Reaktivität an repräsentativen Beispielen aus vielen Bereichen der organischen Synthese mit Hilfe moderner NMR-Spektroskopie untersucht. Diese ausgewählten Beispiele umfassen die Bereiche der Untersuchung von Syntheseprodukten, der Photoreaktionen und der katalysierten Reaktionen. So wird ein möglichst breites Spektrum der in der organischen Chemie behandelten Reaktionen abgedeckt. Besonderes Augenmerk soll dabei auf die Komplementarität des Informationsgehaltes von NOE- und RDC-Daten gelegt werden. Dabei soll vor allem untersucht werden, wie diese beiden Methoden in den jeweiligen Untersuchungen zur Aufklärung des Strukturproblems beitragen.

2.1 Untersuchung von Syntheseprodukten

Ein wichtiger Bereich der organischen Chemie ist die gezielte und kontrollierte Synthese neuer Verbindungen. Dieser Bereich wird durch ein Beispiel der regioselektiven Synthese (FAST-BLUE-Vorläufer **1**) und eines der stereoselektiven Synthese (Diamide **2-5**) repräsentiert.

Ein interessantes Syntheseprodukt ist der FAST-BLUE-Vorläufer **1**, da dieser eine Schlüsselverbindung der von MÜLLER und REGGELIN entwickelten Totalsynthese von FAST-BLUE ist^[38], welches als potentieller Wirkstoff gegen Leukämie gilt^[39-41]. Ein synthetischer Ansatz zur Herstellung von **1** basiert auf der oxidativen HECK-Reaktion des Benzofurans **6** mit Indol **7** (siehe Schema 2.1.1)^[38].

Diese Reaktion basiert auf den von GRIMSTER ET AL. entwickelten Reaktionsbedingungen^[42], die die Substitution in 2-Position von Indol bevorzugen sollen. Ob die Selektivität auch für das cyanosubstituierte Indol **7** gilt, ist allerdings zunächst unklar. Im Falle der 3-Substitution würde stattdessen das Alternativprodukt **8** gebildet werden. Zur Überprüfung der Bildung des gewünschten Substitutionsproduktes soll daher die Regioselektivität der oxidativen Heck-Reaktion des Benzofurans **6** mit Indol **7** aufgeklärt werden.

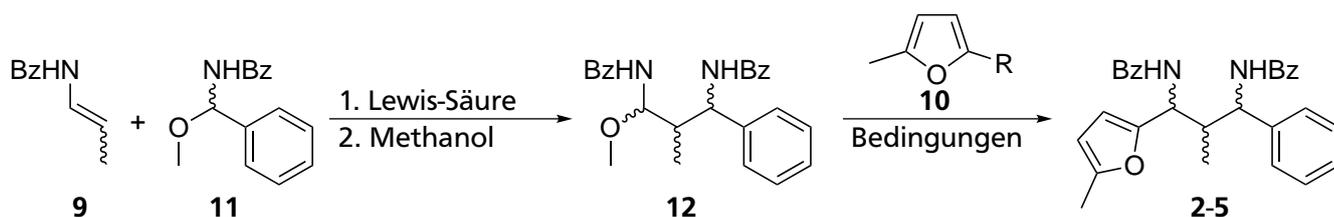


Schema 2.1.1: Oxidative Heck-Reaktion zur Herstellung des FAST-BLUE-Vorläufers **1** mit Alternativprodukt **8**^[38].

Der Bereich der stereoselektiven Synthese wird anhand der von MANOLIKAKES ET AL. entwickelten diastereoselektiven Synthese der Diamide **2-5**^[43] untersucht. Je nach Wahl der *Z*- oder *E*-Konfiguration der Ausgangssubstanz **9** sowie der Wahl des Restes von **10** kann selektiv eines der vier Diastereomere von **2-5** jeweils racemisch hergestellt und isoliert werden (siehe Schema 2.1.2).

Obwohl die Diamide **2-5** jeweils diastereoselektiv hergestellt werden können, ist die Relativkonfiguration der jeweiligen Syntheseprodukte unbekannt. Stattdessen werden die Produkte mit den Buchstaben A-D bezeichnet: A wird durch *E*-**9** und R = H erhalten, B durch *Z*-**9** und R = H, C durch *Z*-**9** und R = Met, und D durch *E*-**9** und R = Met.

Um die Stereoselektivität dieser Reaktion zu verstehen, sollen daher die Relativkonfigurationen der Syntheseprodukte A-D aufgeklärt und den Diamiden **2-5** zugeordnet werden.



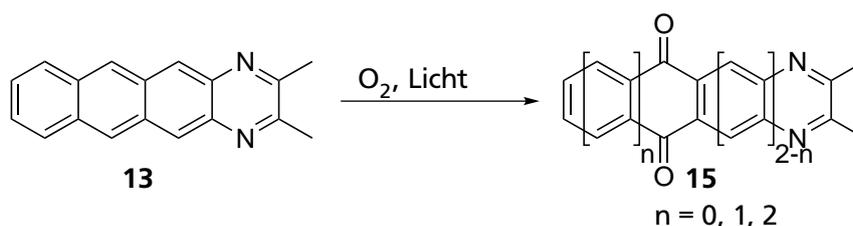
Schema 2.1.2: Allgemeines Syntheschema der vier Diastereomere der Diamide **2-5**. R = H (basische Bedingungen) oder Met (lewissaure Bedingungen).

2.2 Untersuchung von Photoreaktionen

Die zweite zu untersuchende Reaktionsklasse ist die der Photoreaktionen, die sich aufgrund der gezielten Steuerung, lokalen Adressierbarkeit und ressourcenfreundlichen Bedingungen in der organischen Chemie vermehrtem Interesse erfreut. Diese Klasse wird anhand zweier Beispiele untersucht, zum einen an der Untersuchung der photochemischen Stabilität von 2,3-Dimethylnaphtho[2,3-*g*]chinoxalin **13**, zum anderen an der Photocyclisierung von Dimethyldithienylcyclopenten **14**.

Das von KOLMER-ANDERL und REHAHN entwickelte 2,3-Dimethylnaphtho[2,3-*g*]chinoxalin **13** wird als organischer Halbleiter in organischen Feldeffekttransistoren benötigt^[44]. Es ist besonders wichtig, dass **13** stabil gegenüber Licht und Sauerstoff ist, da eine Bildung von Chinonen **15** die Funktionalität des Transistors zerstört.

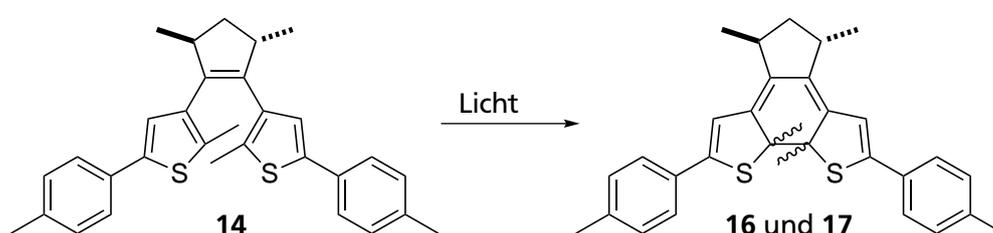
Es soll daher herausgefunden werden, ob und wie das 2,3-Dimethylnaphtho[2,3-*g*]chinoxalin **13** mit Licht und Sauerstoff reagiert (siehe Schema 2.2.1). Außerdem soll nach Möglichkeiten gesucht werden, eventuell auftretende Zersetzungsreaktionen zu unterdrücken.



Schema 2.2.1: Mögliche Photooxidation von 2,3-Dimethylnaphtho[2,3-*g*]chinoxalin **13**.

Eine weitere aus Anwendungssicht vielversprechende Photoreaktion ist die von GÖSTL und HECHT untersuchte Photocyclisierung von Dimethyldithienylcyclopenten **14** zu den geschlossenen Formen **16** und **17** (siehe Schema 2.2.2). Dabei entstehen zwei neue Stereozentren. Je nach Konfiguration dieser Stereozentren bilden sich zwei verschiedene Diastereomere, deren Stereozentren entweder als *R,R,S,S* oder *S,S,S,S* (sowie deren Enantiomere) vorliegen. Es können Diastereomerenüberschüsse von 82-84% bestimmt werden^[45], allerdings ist nicht bekannt, welches der beiden Diastereomere bevorzugt gebildet wird. Ebenso unbekannt ist der Grund für diese Bevorzugung eines Diastereomers: Als potentielle Gründe kommen eine Vororientierung von **14** in Lösung oder unterschiedliche Photocyclisierungsraten der beiden Konformere in Frage.

Deshalb soll zum einen herausgefunden werden, welches Diastereomer bevorzugt gebildet wird, und zum anderen soll der Grund für diese Selektivität verstanden werden.

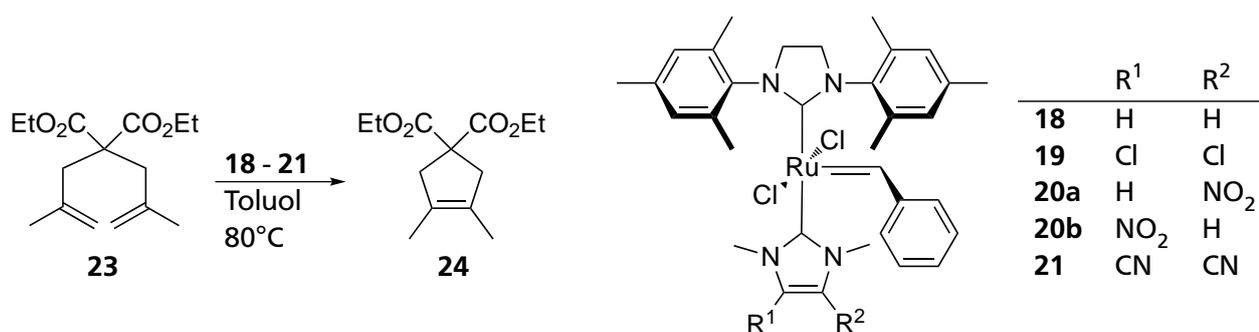


Schema 2.2.2: Photocyclisierung von Dimethyldithienylcyclopenten **14**.

2.3 Untersuchung von katalysierten Reaktionen

Die dritte wichtige Klasse von Reaktionen stellen katalysierte Reaktionen dar, da Katalysatoren Umsätze, Selektivitäten und Geschwindigkeiten von Reaktionen durch die Eröffnung neuer Reaktionspfade erhöhen können. Auch für diese Reaktionsklasse werden zwei repräsentative Beispiele analysiert: Die Übergangsmetallkatalysatoren der Bis-NHC-Komplexe **18-21** und das als Organokatalysator fungierende Tetrapeptid **22**.

Die katalytische Aktivität der Bis-NHC-Komplexe **18-21** wurde von PEECK und PLENIO an der in Schema 2.3.1 dargestellten Ringschlussmetathesereaktion von **23** untersucht^[46]. Der beobachtete Trend der katalytischen Aktivität kann bisher durch keinen spektroskopischen Parameter beschrieben werden. Es

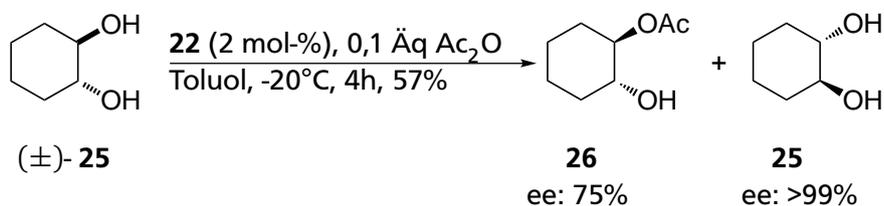


Schema 2.3.1: Die von PEECK und PLENIO untersuchte Ringschlussmetathesereaktion^[46].

soll daher herausgefunden werden, ob der Einfluss der elektronischen Modifikationen der verschiedenen NHC-Liganden auf den Katalysator quantifiziert werden und mit dem Trend der katalytischen Aktivität in Einklang gebracht werden kann.

Neben der Übergangsmetallkatalyse können auch Organokatalysatoren außergewöhnliche Selektivitäten zeigen. Die Acylierung von *trans*-Cyclohexan-1,2-diol **25** (siehe Schema 2.3.2) kann durch Verwendung des als Organokatalysator fungierenden Tetrapeptids **22** enantioselektiv durchgeführt werden^[47]. Das Tetrapeptid **22** besteht aus vier Aminosäuren: *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc)-geschütztes methylsubstituiertes (π -Me) Histidin (His), γ -Adamantylaminosäure ^AGly^[48–50], Cyclohexylalanin (Cha) und Phenylalanin (Phe)-Methylester.

Für den Verlauf der Reaktion und für die Enantioselektivität existiert ein postulierter Mechanismus (siehe Schema 4.3.2)^[47,51], auf den aber bisher keine spektroskopischen Hinweise gefunden werden konnten. Es soll daher herausgefunden werden, ob Hinweise auf diesen Mechanismus gewonnen werden können, indem eine mögliche Vororientierung des Tetrapeptids **22** in Lösung untersucht wird.



Schema 2.3.2: Die enantioselektive Acylierung von racemischem *trans*-Cyclohexan-1,2-diol **25**^[47]. Die Abkürzung ee steht für den Enantiomerenüberschuss.

3 Stand der Forschung

Zur Lösung der in Kapitel 2 vorgestellten Strukturaufklärungsprobleme ist die Wahl der geeigneten NMR-Methode von entscheidender Bedeutung. Grundlegend für deren Wahl zur Aufklärung von Struktur und Dynamik einer Moleküls mittels NMR-Spektroskopie ist die Kenntnis der Stärken und Schwächen der zur Verfügung stehenden Analysemethoden der NMR-Spektroskopie. Besonderes Augenmerk gilt der Frage, welche Methode welche Beiträge zu den aufzuklärenden Fragestellungen der Konstitution, Konfiguration und Konformation liefern kann.

Deshalb werden zunächst die physikalischen Grundlagen der Wechselwirkungen in der NMR-Spektroskopie in Kapitel 3.1 dargestellt. Anschließend werden in Kapitel 3.2 Korrelationsexperimente zur Konstitutionsaufklärung vorgestellt.

Außerdem werden Methoden zur Konfigurations- und Konformationsbestimmung analysiert. Diese umfassen die Diederwinkelbestimmung aus der KARPLUS-Kurve (Kapitel 3.4), die Abstandsbestimmung aus NOE-Daten (Kapitel 3.5) und die Interpretation von RDC-Daten (Kapitel 3.7). Da die KARPLUS-Kurve und die Bestimmung von RDC-Daten auf der Analyse von Kopplungskonstanten beruht, wird die Messung von Kopplungskonstanten zuvor in Kapitel 3.3 erläutert.

Der Einfluss von Moleküldynamik wird in den jeweiligen Kapiteln sowie in Kapitel 3.6 separat diskutiert. Anschließend folgen anhand ausgewählter Beispiele Diskussionen der Möglichkeiten und Grenzen der jeweiligen Methoden.

3.1 Wechselwirkungen in der NMR-Spektroskopie

Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie lassen sich Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Kernspins und einem externen Magnetfeld beobachten. Diese werden durch den HAMILTON-Operator \mathcal{H}^{NMR} beschrieben, der als Summe mehrerer Terme dargestellt werden kann^[18,33]:

$$\mathcal{H}^{NMR} = \mathcal{H}^Z + \mathcal{H}^J + \mathcal{H}^D + \mathcal{H}^Q \quad (3.1.1)$$

Der Term \mathcal{H}^Z beschreibt die ZEEMAN-Wechselwirkung zwischen einem Kernspin und dem externem Magnetfeld B_0 , und beinhaltet die chemische Verschiebung δ . \mathcal{H}^J symbolisiert die skalare Kopplung. Die direkte Dipol-Dipol-Wechselwirkung wird durch \mathcal{H}^D beschrieben, und \mathcal{H}^Q symbolisiert die Quadrupolwechselwirkung von Kernspins $I > \frac{1}{2}$. Diese Komponenten werden im Folgenden einzeln erläutert.

Zur Darstellung der vier Terme werden die Kernspinoperatoren \hat{I}_I und \hat{I}_S eingeführt, die zwei miteinander wechselwirkende Kerne I und S beschreiben:

$$\hat{I}_i = \begin{pmatrix} \hat{I}_{i,x} \\ \hat{I}_{i,y} \\ \hat{I}_{i,z} \end{pmatrix} \quad (3.1.2)$$

Dabei entspricht der Index i entweder I oder S . Jeder der drei Operatoren \hat{I}_x , \hat{I}_y und \hat{I}_z erzeugt bei Einwirkung auf eine Wellenfunktion den Erwartungswert des Spindrehimpulses entlang der entsprechenden Achse. Alternativ zu diesen Operatoren werden oft die Leiteroperatoren \hat{I}_+ und \hat{I}_- verwendet, die den z -Anteil des Drehimpulses um eins erhöhen oder erniedrigen:

$$\hat{I}_+ = \hat{I}_x + i\hat{I}_y \quad (3.1.3)$$

$$\hat{I}_- = \hat{I}_x - i\hat{I}_y \quad (3.1.4)$$

In modernen Flüssigkeits-NMR-Spektrometern werden Magnetfelder B_0 genutzt, die so stark sind, dass der ZEEMAN-Term die dominierende Wechselwirkung darstellt. Üblicherweise liegt die Größe dieses Beitrages im Flüssigkristall im Bereich $\approx 10^8$ Hz. Dipolare Kopplungen und Quadrupolwechselwirkungen erreichen höchstens $\approx 10^4$ Hz und skalare Kopplungen höchstens $\approx 10^2$ Hz^[33]. Aufgrund der Ausrichtung von B_0 in z -Richtung können in der Hochfeld- oder Säkularnäherung die nicht mit dem ZEEMAN-Operator kommutierenden Tensorelemente der Operatoren der skalaren, dipolaren und Quadrupolkopplung vernachlässigt werden.

Der ZEEMAN-Term kann im Rahmen dieser Hochfeldnäherung wie folgt definiert werden^[33]:

$$\mathcal{H}^Z = -\frac{B_0}{2\pi} \sum_I \gamma_I (1 - \sigma_{I,zz}) \hat{I}_{Iz} \quad (3.1.5)$$

Dabei entspricht $\sigma_{I,zz}$ der zz -Komponente des Tensors der chemischen Abschirmung und γ_I dem gyromagnetischen Verhältnis des Spins I .

Für die skalare Kopplung kann der HAMILTON-Operator folgendermaßen beschrieben werden^[33]:

$$\mathcal{H}^J = \sum_{I < S} \left[J_{IS,zz} \hat{I}_{Iz} \hat{I}_{Sz} - \frac{1}{4} (J_{IS,xx} + J_{IS,yy}) (\hat{I}_{I+} \hat{I}_{S-} + \hat{I}_{I-} \hat{I}_{S+}) \right] \quad (3.1.6)$$

Hier stehen $J_{IS,xx}$, $J_{IS,yy}$ und $J_{IS,zz}$ für die Diagonalelemente des Kopplungstensors der Kerne I und S . Werden diese beiden Operatoren nicht im laborfesten, sondern in einem molekülfesten Koordinatensystem konstruiert, so ergibt sich^[33]:

$$\mathcal{H}^Z = -\frac{B_0}{2\pi} \sum_I \gamma_I (1 - \sigma_I^{\text{iso}} - \sigma_I^{\text{aniso}}) \hat{I}_{Iz} \quad (3.1.7)$$

$$\mathcal{H}^J = \sum_{I < S} J_{IS}^{\text{iso}} \left[\hat{I}_{Iz} \hat{I}_{Sz} + \frac{1}{2} (\hat{I}_{I+} \hat{I}_{S-} + \hat{I}_{I-} \hat{I}_{S+}) \right] + \sum_{I < S} J_{IS}^{\text{aniso}} \left[\hat{I}_{Iz} \hat{I}_{Sz} - \frac{1}{4} (\hat{I}_{I+} \hat{I}_{S-} + \hat{I}_{I-} \hat{I}_{S+}) \right] \quad (3.1.8)$$

Zur Darstellung des HAMILTON-Operators der dipolaren Kopplung im molekülfesten Koordinatensystem werden implizit Polarkoordinaten verwendet, die wie folgt eingesetzt werden^[33]:

$$r_{IS,x} = r_{IS} \sin \theta_{IS} \cos \phi_{IS} \quad (3.1.9)$$

$$r_{IS,y} = r_{IS} \sin \theta_{IS} \sin \phi_{IS} \quad (3.1.10)$$

$$r_{IS,z} = r_{IS} \cos \theta_{IS} \quad (3.1.11)$$

Der HAMILTON-Operator der dipolaren Kopplung wird dann wie folgt beschrieben^[33]:

$$\mathcal{H}^D = \sum_{I < S} 2D_{IS}^{\text{aniso}} \left[\hat{I}_{Iz} \hat{I}_{Sz} - \frac{1}{4} (\hat{I}_{I+} \hat{I}_{S-} + \hat{I}_{I-} \hat{I}_{S+}) \right] \quad (3.1.12)$$

Dabei entspricht D_{IS}^{aniso} der dipolaren Kopplungskonstante. In den Abschnitten 3.5 und 3.7 wird dieser HAMILTON-Operator intensiv diskutiert, außerdem wird auch die Darstellung von \mathcal{H}^D im laborfesten Koordinatensystem eingeführt.

Der vierte Term ist die Quadrupolwechselwirkung. Sie kann wie folgt definiert werden^[33]:

$$\mathcal{H}^Q = \sum_I \frac{q_I^{\text{aniso}}}{4\hat{I}_I (2\hat{I}_I - 1)} (3\hat{I}_{Iz}^2 - \hat{I}_I^2) \quad (3.1.13)$$

Dabei entspricht q_I^{aniso} der Quadrupolkopplungskonstante. Nun können die einzelnen Terme 3.1.7, 3.1.8, 3.1.12 und 3.1.13 in Gleichung 3.1.1 eingesetzt werden, sodass sich im molekülfesten Koordinatensystem im Rahmen der Hochfeldnäherung folgender HAMILTON-Operator für die NMR-Spektroskopie ergibt:

$$\begin{aligned} \mathcal{H}^{\text{NMR}} = & -\frac{B_0}{2\pi} \sum_I \gamma_I (1 - \sigma_I^{\text{iso}} - \sigma_I^{\text{aniso}}) \hat{I}_{Iz} \\ & + \sum_{I < S} J_{IS}^{\text{iso}} \left[\hat{I}_{I,z} \hat{I}_{S,z} + \frac{1}{2} (\hat{I}_{I+} \hat{I}_{S-} + \hat{I}_{I-} \hat{I}_{S+}) \right] \\ & + \sum_{I < S} (2D_{IS}^{\text{aniso}} + J_{IS}^{\text{aniso}}) \left[\hat{I}_{Iz} \hat{I}_{Sz} - \frac{1}{4} (\hat{I}_{I+} \hat{I}_{S-} + \hat{I}_{I-} \hat{I}_{S+}) \right] \\ & + \sum_I \frac{q_I^{\text{aniso}}}{4\hat{I}_I (2\hat{I}_I - 1)} (3\hat{I}_{Iz}^2 - \hat{I}_I^2) \end{aligned} \quad (3.1.14)$$

Im Falle freier Rotation des beobachteten Moleküls in Lösung (isotrope Reorientierung) verschwinden die anisotropen Anteile durch eine Mittelung über alle Molekülorientierungen, sodass nur die isotropen Anteile beobachtet werden können. Somit sind im Falle der isotropen Reorientierung nur die isotrope chemische Abschirmung und die isotrope skalare Kopplung beobachtbar. Anstelle der chemischen Abschirmung wird konventionsgemäß die chemische Verschiebung δ verwendet, die durch Referenzierung erhalten werden kann. Die Beobachtung der beiden isotropen Parameter δ_I^{iso} und J_{IS}^{iso} wird in den Abschnitten 3.2-3.4 dargestellt.

Im Falle einer anisotropen Umgebung, zum Beispiel in einem Flüssigkristall, ist keine freie Reorientierung mehr möglich. Als Ergebnis werden die anisotropen Beiträge nicht mehr herausgemittelt, sondern müssen ebenfalls berücksichtigt werden. Der anisotrope Beitrag der chemischen Verschiebung δ_i^{aniso} wird im Rahmen dieser Arbeit nicht betrachtet. Es sei daher auf die Literatur zum Thema *Residual Chemical Shift Anisotropy* (RCSA) verwiesen^[52–54]. Der anisotrope Anteil der skalaren Kopplung J_{IS}^{aniso} gilt im Bereich der Hochfeldnäherung für leichte Atome als vernachlässigbar^[33,55] und wird in der vorliegenden Arbeit daher nicht berücksichtigt.

Der für diese Dissertation wichtigste Parameter in anisotroper Umgebung, die dipolare Kopplung D_{IS}^{aniso} , wird in Abschnitt 3.7 behandelt. Außerdem wird ihre Auswirkung auf Relaxationsphänomene in Abschnitt 3.5 diskutiert. Die Quadrupolwechselwirkung spielt für diese Dissertation eine untergeordnete Rolle, da hauptsächlich Kerne mit Spin $I = \frac{1}{2}$ beobachtet werden. Dennoch wird auf sie in Abschnitt 3.7.2 kurz eingegangen.

3.2 Bestimmung der Konstitution

Zu Beginn der Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie ist die Bestimmung der Konstitution, also der Konnektivität der Atome, nötig. Aus eindimensionalen Spektren lassen sich hierfür die Anzahl der Signale, deren Integrale und die im vorigen Abschnitt diskutierten isotropen NMR-Parameter chemische Verschiebung σ und skalare Kopplung J sowie die von der Kopplung erzeugte Multiplizität gewinnen. Basierend auf Erfahrungswerten für die chemische Verschiebung und mit Hilfe von mehrdimensionalen Korrelationsexperimenten, die auf der skalaren Kopplung nJ zwischen zwei Kernspins basieren, können dann direkte Rückschlüsse auf Konnektivitäten gezogen werden.

Die wichtigsten homo- und heteronuklearen Korrelationsexperimente zur Bestimmung der Konnektivität sind in Abbildung 3.2.1 dargestellt.

Eines der am häufigsten genutzten homonuklearen Korrelationsexperimente ist das COSY-Experiment^[19–21], welches aus Diagonal- und Kreuzsignalen besteht. Die Diagonalsignale entsprechen der Projektion des 1D-Spektrums in die Diagonale und beinhalten keine zusätzliche Information. Die Kreuzsignale werden im COSY von skalar gekoppelten Spins erzeugt. Prinzipiell kann dieses Experiment für alle NMR-aktiven Kerne durchgeführt werden. Aufgrund von Sensitivitäten und natürlichen Häufigkeiten der Kerne wird das COSY routinemäßig nur für ${}^1\text{H}$ -Spins genutzt, sowie in Ausnahmefällen auf ${}^{19}\text{F}$ oder ${}^{31}\text{P}$ angewendet^[14].

Zur Untersuchung homonuklearer Spinsysteme in Verbindung mit ähnlichen Wiederholungseinheiten kann das *Total Correlation Spectroscopy* (TOCSY)-Experiment^[56–59] genutzt werden. Zusätzlich zu den einzelnen Kopplungspfaden, die im COSY sichtbar sind, wird hier von jedem Kopplungspartner des

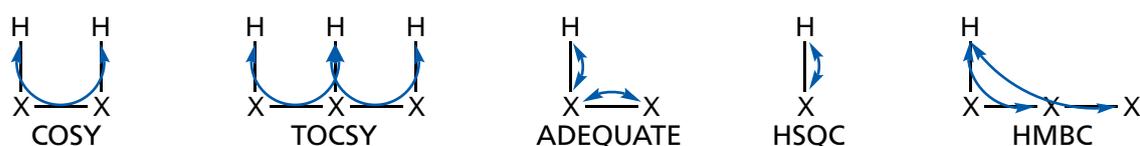


Abbildung 3.2.1: Verschiedene Korrelationsexperimente in der NMR-Spektroskopie. Die blauen Pfeile symbolisieren skalare Kopplungen, die in den entsprechenden Spektren zu Signalen führen.

Spinsystems ein Kreuzsignal erzeugt. Dies führt dazu, dass für jedes Fragment des Moleküls ein Satz an Kreuzsignalen erzeugt wird. Besonders zur Aufklärung von Protein-, Peptid- und Oligosaccharidstrukturen ist dieses Vorgehen nützlich, da so jede Aminosäure und jeder Zucker einzeln detektiert werden kann. Im Falle kleiner organischer Moleküle bietet das TOCSY durch fehlende Unterbrechungen des Kopplungspfades dagegen nur selten zusätzliche Informationen.

Zu den wichtigsten heteronuklearen Korrelationsexperimenten zählen das HSQC-Experiment^[22,23] und das HMBC-Experiment^[24-27], die beide auf Magnetisierungstransferschritten von Protonen auf Heteroatome basieren. Die Effizienz dieses Transferschrittes ist von der Übereinstimmung der eingestellten und der tatsächlichen Kopplungskonstante abhängig. So kann im Falle von ^1H - ^{13}C -Korrelationen der Größenunterschied der $^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungskonstante für $n = 1$ und $n > 1$ ausgenutzt werden. Dies führt in HSQC-Spektren zur Beobachtung direkter C-H-Konnektivitäten. In HMBC-Spektren werden C-H-Konnektivitäten über mehr als eine Bindung beobachtet. Allerdings ist keine Unterscheidung zwischen zwei, drei oder vier Bindungen möglich, da zwischen den entsprechenden Kopplungskonstanten nur geringe Unterschiede bestehen.

Direkte C-C-Verknüpfungen sind aufgrund der niedrigen natürlichen Häufigkeit des ^{13}C -Isotops nur schwer zugänglich. Bei kompletter Abwesenheit protonengebundener Kohlenstoffatome ist das *Incredible Natural Abundance Double QUAntum Transfer Experiment* (INADEQUATE)^[60-62] die Methode der Wahl. Sofern protonengebundene Kohlenstoffatome vorhanden sind, kann durch Protonenanregung und -detektion im *Adequate sensitivity Double-QUAntum Transfer Experiment* (ADEQUATE)^[63] die Sensitivität etwas erhöht werden.

Durch diese Experimente kann das Kohlenstoffrückgrat eines Moleküls aufgeklärt und die Position von funktionellen Gruppen bestimmt werden. Die Art der Heteroatome der funktionellen Gruppen kann im Falle NMR-aktiver Kerne ebenfalls aus Korrelationsexperimenten bestimmt werden, allerdings wird dieser Aufklärungsschritt üblicherweise nicht durchgeführt. Hier sind zusätzliche Informationen, z.B. aus Massenspektrometrie oder Schwingungsspektroskopie, nötig. Sind diese Informationen nicht zugänglich, bleibt einzig die chemische Verschiebung der Kerne, die der funktionellen Gruppe benachbart sind, um Informationen über die funktionellen Gruppe zu erhalten.

3.3 Messung von Kopplungskonstanten

Der Betrag und das Vorzeichen von Kopplungskonstanten beinhalten strukturelevante Informationen und müssen somit so genau wie möglich bestimmt werden.

Der Betrag der homonuklearen ^1H - ^1H -Kopplungskonstante kann aus dem eindimensionalen ^1H -Spektrum extrahiert werden. Im Falle von Signalüberlagerung oder inhomogenen Magnetfeldern stößt diese Methode aber schnell an ihre Grenzen. Abhilfe schafft eine Variante des COSY, das *Exclusive Correlation Spectroscopy* (E.COSY)^[64-66] (siehe Abbildung 3.3.1a). Ein großer Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, das relative Vorzeichen der Kopplungskonstante zu bestimmen, das Experiment ist somit vorzeichensensitiv. Für die Betrachtung reiner Dreispinsysteme ist das E.COSY gut geeignet, nachteilig ist die komplizierte Spektrenauswertung im Falle eines Spinsystems mit mehr als drei Kopplungspartnern.

Etwas einfacher zu analysierende Kreuzpeaks erzeugt das *X nucleus for LOng range Couplings* (XLOC)^[67,68] (siehe Abbildung 3.3.1b), welches eine vorzeichensensitive J_{HH} -Kopplungskonstanten-

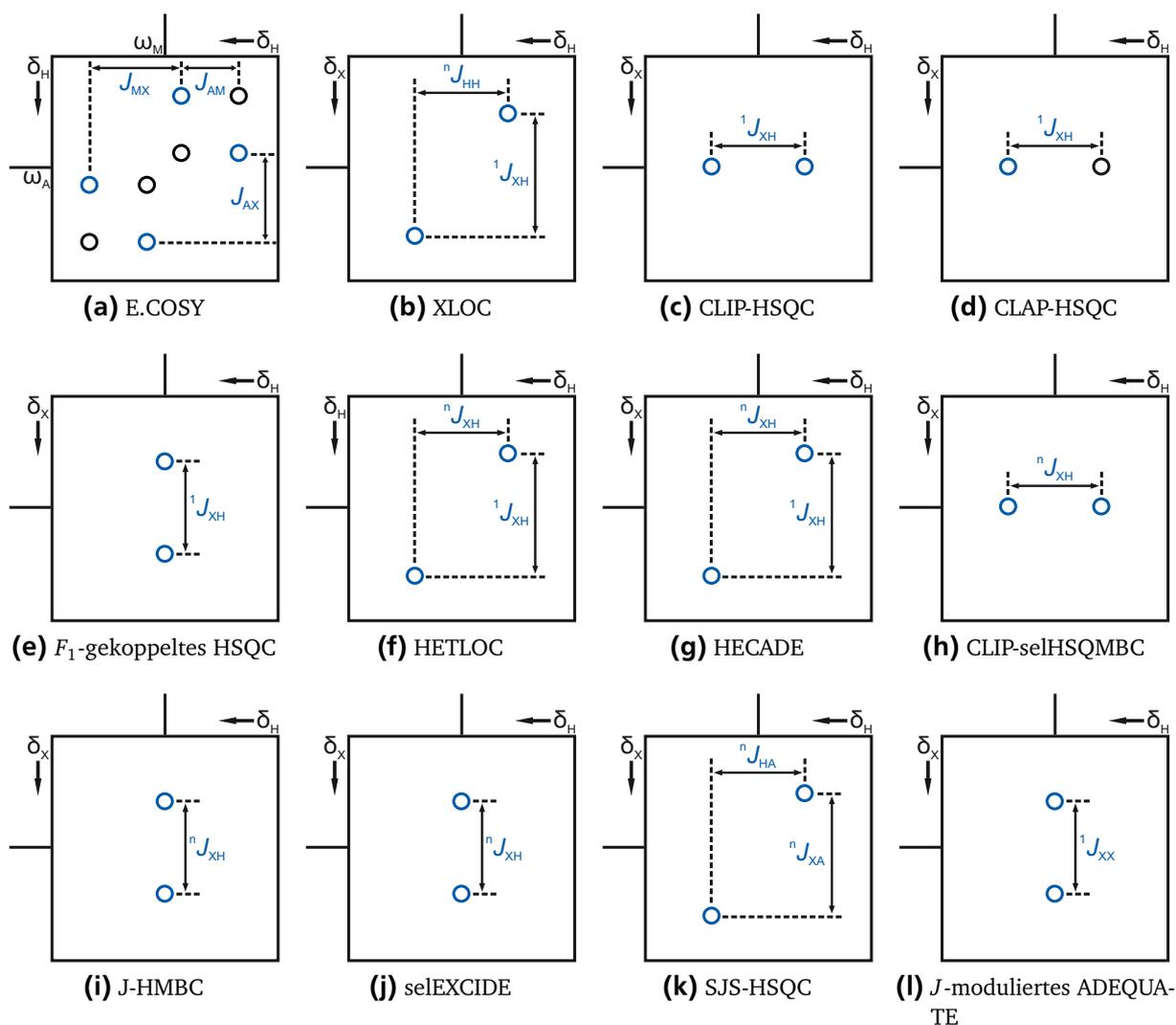


Abbildung 3.3.1: Verschiedene Experimente zur Bestimmung von Kopplungskonstanten. Die senkrechte Achse stellt die indirekte Dimension F1 dar, die waagrechte Achse die direkte Dimension F2.

extraktion ermöglicht, falls das Vorzeichen von $^1J_{XH}$ bekannt ist. Die Sensitivität dieses Experiments ist allerdings deutlich niedriger als die des E.COSY, da das XLOC auf einem Kohärenztransfer zum Heteronukleus, zum Beispiel ^{13}C , basiert.

Zur Bestimmung der $^1J_{XH}$ -Kopplungskonstante, vor allem für $^1J_{CH}$, können Varianten des HSQC verwendet werden. Bevorzugt werden F2-gekoppelte Varianten genutzt, da die Auflösung hier deutlich höher als in F1-gekoppelten Spektren ist. Die meistgenutzte Variante ist das *Clean InPhase* (CLIP)/*Clean AntiPhase* (CLAP)-HSQC^[69] (siehe Abbildungen 3.3.1c und 3.3.1d). Als nachteilig hat sich erwiesen, dass Signalüberlapp und vor allem Multipllettstrukturen durch ^1H - ^1H -Kopplungen die genaue Extraktion von Kopplungskonstanten erschweren. Das Problem der Signalüberlagerung kann zumindest teilweise durch Kombination von CLIP- und CLAP-Spuren behoben werden. Wenn dies nicht weiterhilft, kann auf F1-gekoppelte Spektren zurückgegriffen werden (siehe Abbildung 3.3.1e), die für eine hohe Auflösung aber viele Inkremente in F1 und somit sehr lange Messzeiten benötigen. Abhilfe schafft die Einführung einer Skalierung der Kopplungskonstante.

Für langreichweitige ${}^nJ_{\text{XH}}$ -Kopplungen existieren viele Experimente^[70,71]. Das in dieser Dissertation meistgenutzte Experiment ist das *determination of HETeronuclear LOng range Couplings* (HETLOC)^[72,73] (siehe Abbildung 3.3.1f). Dieses basiert auf einem heterohalbgeltem TOCSY-Transfer, und erzeugt Peaks mit E.COSY-artigem Muster. Auch hier kann das Vorzeichen gewonnen werden. Die relevante Kopplungskonstante ist in F2 ablesbar. Durch den TOCSY-Schritt ist dieses Experiment aber nicht dazu geeignet, Kopplungskonstanten zu nicht-protonen tragenden Heteroatomen zu bestimmen. Ein sehr ähnliches Experiment ist das *Heteronuclear Couplings from Associ-Domain experiments with E.cosy-type cross peaks* (HECADE)^[74], dessen F1-Dimension im Unterschied zum HETLOC dem Heterokern entspricht (siehe Abbildung 3.3.1g). Dadurch können Kopplungen zu verschiedenen Heteroatomen, zum Beispiel ${}^{13}\text{C}$ und ${}^{15}\text{N}$, in unterschiedlichen Spektren gemessen werden.

Das vom HSQC abgeleitete Experiment *Heteronuclear Single Quantum Multiple Bond Correlation* (HSQMBC)^[75-78] detektiert auch Kopplungen zu quartären Kohlenstoffen, ist aber nicht vorzeichen-sensitiv. Hiervon existiert auch eine Variante, bei der ein ausgewähltes Proton selektiv vermessen werden kann, das selHSQMBC^[79], das sowohl als CLIP (Abbildung 3.3.1h) als auch als CLAP aufgenommen werden kann. Durch Einführung eines zusätzlichen TOCSY-Schrittes entsteht das selHSQMBC-TOCSY^[80], bei dem selektiv Spinsysteme angeregt und deren ${}^nJ_{\text{XH}}$ -Kopplungskonstanten bestimmt werden können.

Soll die ${}^nJ_{\text{XH}}$ -Kopplungskonstante aus F1 extrahiert werden, ist dies mit dem vom HMBC abgeleiteten J-HMBC^[68,81] möglich (siehe Abbildung 3.3.1i). Dieses benötigt aufgrund vergleichsweise niedriger Sensitivität lange Messzeiten, besitzt aber die Möglichkeit, die Kopplungskonstante zu skalieren.

Eine weitere Möglichkeit zur Detektion von ${}^nJ_{\text{XH}}$ -Kopplungskonstante in F1 ist das *EXcitation-Scultured Indirect-Detection Experiment* (EXSIDE)^[82], das einem modifizierten selHSQMBC entspricht. Zusätzlich existiert eine ${}^{13}\text{C}$ -selektive Variante selEXSIDE^[83] (siehe Abbildung 3.3.1j), sodass selektiv ein Proton und ein Kohlenstoff ausgewählt und deren ${}^nJ_{\text{XH}}$ -Kopplungskonstante vermessen werden kann.

Die dritte Variante zur Detektion von ${}^nJ_{\text{XH}}$ -Kopplungskonstante in F1 stellt das *Selective J-Scaled* (SJS)-HSQC^[84] dar (siehe Abbildung 3.3.1k). Dabei wird ein einzelnes Proton selektiv angeregt, und anschließend alle Kopplungen dieses Protons zu Heteroatomen detektiert. Gleichzeitig können, ähnlich wie im XLOC, ebenfalls Protonen-Protonen-Kopplungen des angeregten Protons detektiert werden. Nachteilig ist hier erneut die fehlende Detektion von quartären Kohlenstoffen.

Speziell für ${}^1J_{\text{CC}}$ existiert eine Variante des ADEQUATE, das *J*-modulierte ADEQUATE^[85-87] (siehe Abbildung 3.3.1l). Aufgrund der außergewöhnlich niedrigen Sensitivität wird dieses Experiment in dieser Dissertation aber nur als letzte Möglichkeit genutzt.

3.4 Diederwinkel aus der skalaren Kopplungskonstante: Die Karplus-Kurve

Nachdem im vorigen Abschnitt Experimente zur Messung von Kopplungskonstanten beschrieben wurden, wird in diesem Abschnitt erläutert, welche Informationen aus der Größe der Kopplungskonstante gewonnen werden können. Ein besonderer Fokus wird auf die ${}^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstante gelegt.

3.4.1 Grundlagen

Die Größe der skalaren Kopplungskonstante ${}^3J_{\text{HH}}$ ist abhängig vom durch die beiden Protonen aufgespannten Diederwinkel θ (siehe Abbildung 3.4.1a). Dieser Zusammenhang wurde erstmals von KARPLUS empirisch beschrieben^[88,89]:

$${}^3J_{\text{HH}} = A \cos^2 \theta + B \cos \theta + C \quad (3.4.1)$$

Dabei sind A , B und C empirische Parameter, die von der elektronischen Umgebung des Kopplungspfad abhängen. Sind diese Parameter für ein zu untersuchendes System ausreichend genau bestimmt, kann z.B. zwischen axialen und äquatorialen Protonen in Zuckern unterschieden werden^[14].

Der Vorteil der KARPLUS-Beziehung ist die Verwendung von ${}^1\text{H}$ - ${}^1\text{H}$ -Kopplungskonstanten, da diese häufig direkt aus dem ${}^1\text{H}$ -Spektrum gewonnen werden können. Für starre, gestaffelte Konformationen ist eine Unterscheidung von syn- oder antiperiplanarer Anordnung somit häufig möglich.

Nachteilig ist, dass die empirischen Parameter A , B und C bekannt sein müssen. Abhängig von der Natur der Substituenten ist die Verfügbarkeit der Parameter aber oft nicht gegeben, sodass nur näherungsweise vorgegangen werden kann. Ein anderes Problem ist, dass der Verlauf der KARPLUS-Kurve bei gegebener Kopplungskonstante häufig dazu führt, dass bis zu vier Diederwinkel in Frage kommen. Eine genaue Bestimmung des Diederwinkels ist somit oft nur schwer möglich.

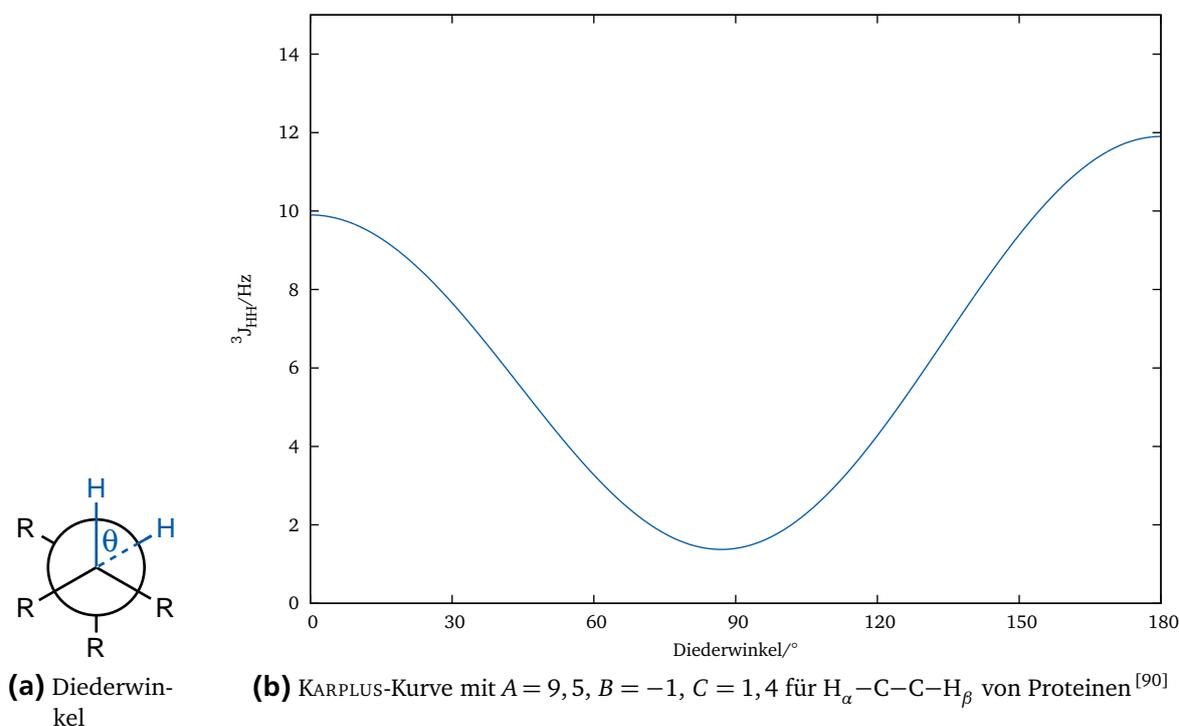


Abbildung 3.4.1: Die in Gleichung 3.4.1 beschriebene KARPLUS-Beziehung^[88,89] am Beispiel eines Proteinfragmentes^[90].

Sind Konfiguration und Konformation unbekannt, ist die Einsatzmöglichkeit der KARPLUS-Gleichung zusätzlich dadurch begrenzt, dass der H-H-Diederwinkel keine Informationen über die Stellung der restlichen Substituenten beinhaltet. Je nach Substituent können aber KARPLUS-analoge Beziehungen verwendet werden^[90–92], die dann in Kombination mit ${}^3J_{\text{HH}}$ zur Aufklärung der Relativkonfiguration führen können. Problematisch ist, dass die Verfügbarkeit einer Parametrisierung der KARPLUS-artigen Beziehungen für Heteroatome selten gegeben ist, sodass diese Variante kaum angewendet wird.

3.4.2 Der Einfluss molekularer Flexibilität

Im Falle konformationeller Flexibilität wird die Kopplungskonstante nur gemittelt beobachtet. Diese konformationelle Mittelung führt z.B. zu der für Ethylgruppen typischen Kopplungskonstante von 7,2 Hz zwischen den Protonen der CH_3 - und der CH_2 -Gruppe^[14].

Diese gemittelte Kopplungskonstante wird als Summe der Kopplungskonstanten der populierten Konformere angenommen^[92,93]:

$$J_{\text{mittel}} = \sum_{i=1}^n p_i J_i \quad (3.4.2)$$

Dabei ist p_i die Population des Konformers i , J_i die Kopplungskonstante im Konformer i und n die Anzahl der Konformere. Wird für J_i die KARPLUS-Gleichung 3.4.1 eingesetzt, ergibt sich:

$${}^3J_{\text{HH,mittel}} = \sum_{i=1}^n p_i (A \cos^2 \theta_i + B \cos \theta_i + C) \quad (3.4.3)$$

Die Rückführung der gemessenen Kopplungskonstante auf exakte Konformerenpopulationen führt zu einem unterbestimmten Gleichungssystem und ist somit nicht möglich. Umgekehrt kann aus bekannten Konformerenpopulationen eine gemittelte Kopplungskonstante bestimmt werden, die als Kontrolle verwendet werden kann. Durch die arithmetische Mittelung kann die Kopplungskonstante dann komplementär zu NOE- oder RDC-Daten verwendet werden.

Der Diederwinkel aus der skalaren Kopplungskonstante ist ein lokaler Parameter, da die skalare Kopplung über Bindungen vermittelt wird. Die Anzahl der Bindungen ist dabei üblicherweise drei, in Ausnahmefällen vier oder fünf. Durch diesen lokalen Charakter ist es nicht möglich, verschiedene Spinsysteme und damit Teile des Moleküls zueinander in Beziehung zu setzen, die weit entfernt voneinander sind, oder die durch Unterbrechungen des Kopplungspfades voneinander getrennt sind.

3.5 Abstandsinformationen aus NOE-Daten

Im Gegensatz zur skalaren Kopplung, deren Interpretation im vorigen Abschnitt beschrieben wurde, ist der NOE eine Wechselwirkung, die nicht auf chemischen Bindungen zwischen den wechselwirkenden Kernen basiert. So können auch Teile des Moleküls zueinander in Bezug gesetzt werden, die nicht miteinander skalar koppeln. Daher werden in diesem Kapitel die theoretischen Grundlagen, der Einfluss molekularer Flexibilität sowie die Interpretation des NOE beschrieben.

3.5.1 Grundlagen

Der NOE, benannt nach seinem Entdecker OVERHAUSER^[30], ist definiert als die Änderung der Intensität I eines Signals verglichen zu seiner Intensität I_0 im Gleichgewichtszustand, wenn das Signal S aus seinem Gleichgewichtszustand S_0 entfernt wird (zum Beispiel durch Sättigung oder Inversion)^[31]:

$$\eta = \frac{I - I_0}{I_0} \quad (3.5.1)$$

Im einfachsten Falle eines Zweispinsystems (siehe Abbildung 3.5.1) ist die Intensität des Signals I proportional zur longitudinalen Magnetisierung I_z des Spins I direkt vor seiner Beobachtung. In Gleichung 3.5.1 entspricht der Term $I - I_0$ also der zeitlichen Änderung des Signals I_z . Diese Änderung kann durch die SOLOMON-Gleichung^[94] beschrieben werden:

$$\frac{dI_z}{dt} = - (I_z - I_z^0) (W_{0IS} + 2W_{1I} + W_{2IS}) - (S_z - S_z^0) (W_{2IS} - W_{0IS}) \quad (3.5.2)$$

Dabei stellt W die Übergangswahrscheinlichkeit der jeweiligen Übergänge dar (vergleiche Abbildung 3.5.1). Aus dieser Gleichung kann ein Ausdruck für Gleichung 3.5.1 hergeleitet werden^[31]. Unter Annahme des *steady-state* gilt $S_z = 0$ und $\frac{dI_z}{dt} = 0$. Somit ergibt sich:

$$\frac{I_z - I_z^0}{S_z^0} = \frac{W_{2IS} - W_{0IS}}{W_{0IS} + 2W_{1I} + W_{2IS}} \quad (3.5.3)$$

Unter der Voraussetzung, dass I und S beides Protonen sind, gilt $I_z^0 = S_z^0$, und somit

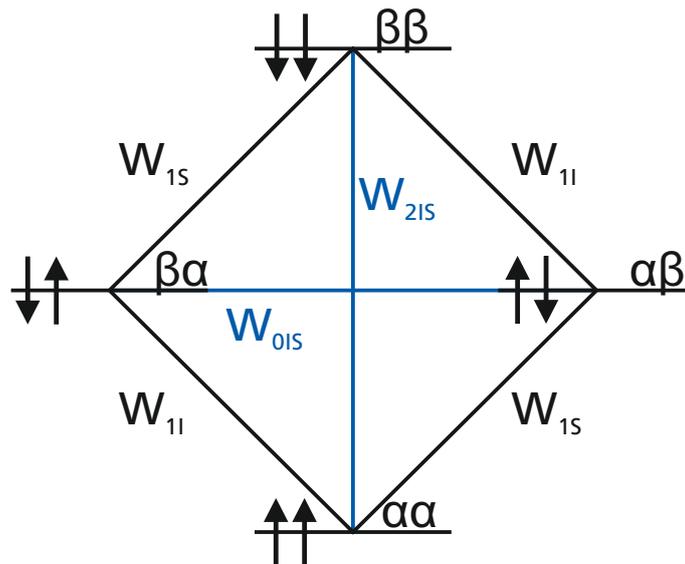


Abbildung 3.5.1: Energieniveaudiagramm für ein Zwei-Spin- $\frac{1}{2}$ -System bei Vernachlässigung chemischer Verschiebung und skalarer Kopplung. Die Symbole α und β beschreiben den Zustand der Spins I und S , mit W sind die Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen den verschiedenen Zuständen gekennzeichnet.

$$\eta = \frac{I_z - I_z^0}{I_z^0} = \frac{W_{2IS} - W_{0IS}}{W_{0IS} + 2W_{1I} + W_{2IS}} \quad (3.5.4)$$

Der Term $W_{2IS} - W_{0IS}$ wird als Kreuzrelaxationsrate σ_{IS} bezeichnet. Der Term $W_{0IS} + 2W_{1I} + W_{2IS}$ entspricht der longitudinalen Relaxationsrate ρ_{IS} ^[31].

Entscheidend für den NOE sind also die Doppel- und Nullquantenübergänge W_{2IS} und W_{0IS} . Es wird nun ein physikalischer Mechanismus benötigt, der dafür sorgt, dass die Übergangswahrscheinlichkeiten W_{2IS} und W_{0IS} von Null verschieden sind. Beides sind Prozesse, an denen beide Spins beteiligt sind. Somit liegt nahe, dass die Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen den beiden hier betrachteten Spins die entscheidende Wechselwirkung darstellt.

Die zwei beobachteten Spins I und S seien in einem frei rotierenden Molekül fest verbunden. Da beide Spins Dipole sind, besitzen beide ein Magnetfeld, das zusätzlich zum äußeren Magnetfeld B_0 wirkt. Durch die feste Geometrie ist die Stärke des Magnetfeldes von I an der Position von S immer gleich. Aufgrund der freien Rotation ändert sich aber die Richtung relativ zu B_0 , sodass das gesamte Magnetfeld B_{total} an der Position von S um B_{lokal} erweitert werden muss^[31]:

$$B_{\text{total}} = B_0 + B_{\text{lokal}} \quad (3.5.5)$$

B_{lokal} beschreibt das zeitlich veränderliche lokale Feld, das durch I entsteht. Wird eine schnelle und gleichförmige Rotation des Moleküls angenommen, ist das zeitliche Mittel $\langle B_{\text{lokal}} \rangle = 0$, was dazu führt, dass bei typischen Protonen-Protonen-Abständen keine dipolare Kopplung sichtbar ist. Trotzdem ist ein Energieaustausch von S zu I über diese Fluktuation der lokalen Felder möglich, der als dipolare Relaxation bezeichnet wird¹.

Zur Beschreibung der Übergangswahrscheinlichkeiten wird demzufolge der HAMILTON-Operator der dipolaren Kopplung \mathcal{H}^D benötigt, der wie folgt definiert werden kann^[31]:

$$\mathcal{H}^D = b_{IS} \left(\hat{I}_I \cdot \hat{I}_S - \frac{3 (\hat{I}_I \cdot \mathbf{r}_{IS}) (\hat{I}_S \cdot \mathbf{r}_{IS})}{r_{IS}^2} \right) \quad (3.5.6)$$

mit

$$b_{IS} = -\frac{\mu_0 \hbar \gamma_I \gamma_S}{4\pi r_{IS}^3} \quad (3.5.7)$$

Hierbei ist \mathbf{r}_{IS} der Verbindungsvektor der Spins \hat{I}_I und \hat{I}_S und r_{IS} dessen Länge. Dieser HAMILTON-Operator ist mit der Übergangswahrscheinlichkeit $W_{\alpha\beta}$ wie folgt verknüpft^[95,96]:

$$W_{\alpha\beta} = \int_{-\infty}^{\infty} \overline{\langle \beta | \mathcal{H}^D(t) | \alpha \rangle \langle \alpha | \mathcal{H}^D(t + \tau) | \beta \rangle} e^{-i\omega_{\alpha\beta}\tau} d\tau \quad (3.5.8)$$

¹ Es existieren auch andere Relaxationspfade, die durch fluktuierende lokale Felder vermittelt werden. Diese spielen für den NOE nur indirekt eine Rolle, indem sie die Wahrscheinlichkeit, einen NOE zu beobachten, verringern.

Dabei gilt $\omega_{\alpha\beta} = \omega_\alpha - \omega_\beta$. Zur weiteren Behandlung ist es sinnvoll, $\hat{\mathcal{H}}^D$ in einen zeitunabhängigen Spinteil $\hat{\mathbf{Z}}$ und einen zeitabhängigen Raumteil $F(t)$ zu zerlegen. Dabei enthält $\hat{\mathbf{Z}}$ alle Spinoperatorterme, und $F(t)$ beschreibt die Stärke der Interaktion, abhängig von Naturkonstanten und dem Abstand r_{IS} der beiden Spins^[31]:

$$\hat{\mathcal{H}}^D = \hat{\mathbf{Z}}F(t) \quad (3.5.9)$$

Dazu wird $\hat{\mathcal{H}}^D$ als Summe mehrerer Terme dargestellt^[31]:

$$\hat{\mathcal{H}}^D = \hat{\mathbf{A}} + \hat{\mathbf{B}} + \hat{\mathbf{C}} + \hat{\mathbf{D}} + \hat{\mathbf{E}} + \hat{\mathbf{F}} \quad (3.5.10)$$

Jeder der Terme $\hat{\mathbf{A}}$ bis $\hat{\mathbf{F}}$ wird, wie gefordert, in einen Spinteil und einen Raumteil unterteilt^[31]:

$$\hat{\mathbf{A}} = b_{IS} \hat{\mathbf{I}}_{Iz} \hat{\mathbf{I}}_{Sz} (3 \cos^2 \theta_{IS} - 1) \quad (3.5.11)$$

$$\hat{\mathbf{B}} = -\frac{1}{4} b_{IS} (\hat{\mathbf{I}}_{I+} \hat{\mathbf{I}}_{S-} + \hat{\mathbf{I}}_{I-} \hat{\mathbf{I}}_{S+}) (3 \cos^2 \theta_{IS} - 1) \quad (3.5.12)$$

$$\hat{\mathbf{C}} = \frac{3}{2} b_{IS} (\hat{\mathbf{I}}_{Iz} \hat{\mathbf{I}}_{S+} + \hat{\mathbf{I}}_{I+} \hat{\mathbf{I}}_{Sz}) \sin \theta_{IS} \cos \theta_{IS} e^{-i\phi} \quad (3.5.13)$$

$$\hat{\mathbf{D}} = \frac{3}{2} b_{IS} (\hat{\mathbf{I}}_{Iz} \hat{\mathbf{I}}_{S-} + \hat{\mathbf{I}}_{I-} \hat{\mathbf{I}}_{Sz}) \sin \theta_{IS} \cos \theta_{IS} e^{i\phi} \quad (3.5.14)$$

$$\hat{\mathbf{E}} = \frac{3}{4} b_{IS} \hat{\mathbf{I}}_{I+} \hat{\mathbf{I}}_{S+} \sin^2 \theta_{IS} e^{-2i\phi} \quad (3.5.15)$$

$$\hat{\mathbf{F}} = \frac{3}{4} b_{IS} \hat{\mathbf{I}}_{I-} \hat{\mathbf{I}}_{S-} \sin^2 \theta_{IS} e^{2i\phi} \quad (3.5.16)$$

Diese Terme haben verschiedene Bedeutungen. $\hat{\mathbf{A}}$ enthält keine Spinübergangsterme. $\hat{\mathbf{B}}$ beschreibt den Übergang $\alpha\beta \leftrightarrow \beta\alpha$. Diese beiden Terme werden in Kapitel 3.7 ausführlicher behandelt. $\hat{\mathbf{C}}$ beschreibt den Übergang eines Spins $\beta \rightarrow \alpha$, und $\hat{\mathbf{D}}$ das Gegenteil $\alpha \rightarrow \beta$. Analog dazu beschreibt $\hat{\mathbf{E}}$ den Übergang zweier Spins $\beta\beta \rightarrow \alpha\alpha$, und $\hat{\mathbf{F}}$ $\alpha\alpha \rightarrow \beta\beta$.

In den Gleichungen 3.5.11-3.5.16 sind nun die Spinterme und die Raumterme, wie in Gleichung 3.5.9 verlangt, getrennt. Somit können in Gleichung 3.5.8 die Spinoperatoren aus dem Zeitintegral herausgezogen werden:

$$W_{\alpha\beta} = \langle \beta | \hat{\mathbf{Z}} | \alpha \rangle \langle \alpha | \hat{\mathbf{Z}} | \beta \rangle \int_{-\infty}^{\infty} \overline{F(t)F(t+\tau)} e^{-i\omega_{\alpha\beta}\tau} d\tau \quad (3.5.17)$$

Da $W_{\alpha\beta}$ zeitunabhängig sein sollte^[31], ist davon auszugehen, dass das Ergebnis des Integrals ebenfalls nicht von der Zeit t , sondern nur von der Integrationsvariable τ abhängt. Demzufolge gilt:

$$\overline{F(t)F(t+\tau)} = \overline{F(0)F(\tau)} \quad (3.5.18)$$

Im nächsten Schritt wird angenommen, dass $F(\tau)$ mit Hilfe einer Korrelationsfunktion $g(\tau)$ entwickelt werden kann^[31]:

$$F(\tau) = F(0)g(\tau) \quad (3.5.19)$$

Damit ergibt sich:

$$\overline{F(t)F(t+\tau)} = \left| \overline{F(0)} \right|^2 g(\tau) \quad (3.5.20)$$

$\left| \overline{F(0)} \right|^2$ ist zeitunabhängig und kann aus dem Integral gezogen werden. Außerdem wird der Term $\langle \beta | \hat{Z} | \alpha \rangle \langle \alpha | \hat{Z} | \beta \rangle$ nun als $|Z_{\alpha\beta}|^2$ abgekürzt:

$$W_{\alpha\beta} = |Z_{\alpha\beta}|^2 |F_{\alpha\beta}(0)|^2 \int_{-\infty}^{\infty} g(\tau) e^{-i\omega_{\alpha\beta}\tau} d\tau \quad (3.5.21)$$

Das gezeigte Integral ist bekannt als die spektrale Dichtefunktion $J(\omega_{\alpha\beta})$ ^[31]:

$$W_{\alpha\beta} = |Z_{\alpha\beta}|^2 |F_{\alpha\beta}(0)|^2 J(\omega_{\alpha\beta}) \quad (3.5.22)$$

Unter der Annahme eines exponentiellen Abfalls der Korrelationsfunktion $g(\tau) = e^{-\frac{\tau}{\tau_c}}$ ergibt sich für die spektrale Dichtefunktion^[31]:

$$J(\omega_{\alpha\beta}) = \frac{2\tau_c}{1 + \omega_{\alpha\beta}^2 \tau_c^2} \quad (3.5.23)$$

τ_c wird als Korrelationszeit des Moleküls bezeichnet und ist ein Maß dafür, wie schnell das Molekül rotiert. Gleichung 3.5.22 besteht nun aus drei Teilen. Der Term $|Z_{\alpha\beta}|^2$ beschreibt, ob die Spins α und β dipolar gekoppelt sind. Der räumliche Teil $|F_{\alpha\beta}(0)|^2$ beschreibt die Stärke dieser Wechselwirkung, und ist abhängig vom Abstand der Kerne. Die spektrale Dichtefunktion $J(\omega_{\alpha\beta})$ beinhaltet die Information, ob die nötige Energie für die Übergangsfrequenz $\omega_{\alpha\beta}$ vom Gitter aufgenommen werden kann, und ist abhängig von der Rotation des Moleküls.

Unter der Voraussetzung, dass das Molekül starr ist sowie schnell und isotrop rotiert, kann die Gleichung 3.5.22 für die für den NOE wichtigen Übergänge gelöst werden. Es ergeben sich die Übergangswahrscheinlichkeiten wie folgt^[31]:

$$W_{0IS} = \frac{b_{IS}^2}{10} \frac{\tau_c}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_c^2} \quad (3.5.24)$$

$$W_{1I} = \frac{3b_{IS}^2}{20} \frac{\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} \quad (3.5.25)$$

$$W_{2IS} = \frac{3b_{IS}^2}{5} \frac{\tau_c}{1 + (\omega_I + \omega_S)^2 \tau_c^2} \quad (3.5.26)$$

Qualitativ lässt sich der Zusammenhang zwischen Übergangswahrscheinlichkeiten und der Rotationsgeschwindigkeit des Moleküls, der durch die spektrale Dichtefunktion $J(\omega_{\alpha\beta})$ beschrieben wird, anhand der Fluktuation der lokalen Felder verstehen^[31]. Für den Energietransfer, dessen Übergangswahrscheinlichkeit beschrieben werden soll, muss am Kernort eine Fluktuation des Magnetfeldes mit passender Frequenz vorhanden sein, die es ermöglicht, den im Spinsystem entstehenden Energieunterschied durch Austausch mit der Umgebung zu kompensieren. In kleinen, schnell rotierenden Molekülen ist daher der W_{2IS} -Übergang bevorzugt, da dieser höhere Frequenzen benötigt, was zu positiven NOE-Signalen führt. Große, langsam rotierende Moleküle ermöglichen dagegen W_{0IS} -Übergänge, und somit negative NOE-Signale.

Dieser Zusammenhang von Molekülgröße und NOE lässt sich auch beschreiben, indem die Gleichungen 3.5.24-3.5.26 in Gleichung 3.5.4 eingesetzt werden:

$$\eta = \frac{\frac{3b_{IS}^2}{5} \frac{\tau_c}{1 + (\omega_I + \omega_S)^2 \tau_c^2} - \frac{b_{IS}^2}{10} \frac{\tau_c}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_c^2}}{\frac{b_{IS}^2}{10} \frac{\tau_c}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_c^2} + \frac{3b_{IS}^2}{10} \frac{\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} + \frac{3b_{IS}^2}{5} \frac{\tau_c}{1 + (\omega_I + \omega_S)^2 \tau_c^2}} \quad (3.5.27)$$

Im homonuklearen Fall gilt $\omega_I \approx \omega_S \approx \omega$. Somit kann die Gleichung vereinfacht werden:

$$\eta = \frac{5 + \omega^2 \tau_c^2 - 4\omega^4 \tau_c^4}{10 + 23\omega^2 \tau_c^2 + 4\omega^4 \tau_c^4} \quad (3.5.28)$$

Wird nun η gegen $\omega \tau_c$ aufgetragen (siehe Abbildung 3.5.2), ist ersichtlich, dass das theoretische Maximum η des *steady-state*-NOE für kleine, schnell rotierende Moleküle bei $+\frac{1}{2}$ und für große, langsam rotierende Moleküle bei -1 liegt. Bei $\omega \tau_c = \frac{5}{4} \approx 1,25$ existiert ein Nulldurchgang. Bei für organische Lösemittel üblicher Viskosität und einer Frequenz von 500 MHz entspricht dieser Wert Molekülgrößen um $1000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ ^[16].

Diese Nullstelle kann umgangen werden, wenn statt des NOE das *Rotating frame nuclear Overhauser Enhancement* (ROE) betrachtet wird. Dessen Abhängigkeit von der Molekülrotation ist von der des NOE verschieden. Dies führt dazu, dass η_{ROE} immer positiv ist^[31] (siehe Abbildung 3.5.2). Die zeitliche Entwicklung des ROE ist für große Moleküle doppelt so schnell wie die des NOE^[97]. Der Verlauf der zeitlichen Entwicklung ist davon abgesehen identisch mit der des NOE, der in der Folge betrachtet wird.

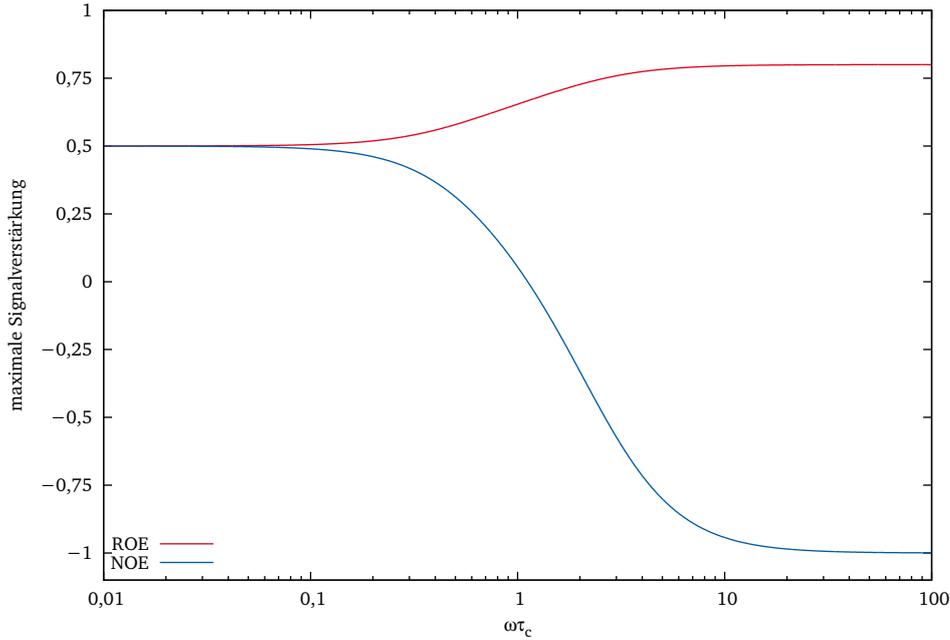


Abbildung 3.5.2: Auftragung der maximalen Signalverstärkung durch NOE oder ROE gegen τ_c .

Bisher wurden andere Relaxationsquellen als die dipolare Relaxation zwischen den beiden betrachteten Spins vernachlässigt. In Systemen mit mehr als zwei Spins muss berücksichtigt werden, dass auch andere Relaxationspfade vorliegen. Diese werden als ρ_I^* zusammengefasst, sodass Gleichung 3.5.4 modifiziert werden muss:

$$\eta = \frac{\sigma_{IS}}{\rho_{IS} + \rho_I^*} = \frac{\sigma_{IS}}{R_I} \quad (3.5.29)$$

Zur korrekten Analyse eines *steady-state*-NOEs müssen also im Prinzip alle Relaxationspfade quantifiziert werden. Dies ist bei Systemen mit mehr als zwei Spins aufwändig, und im Falle komplexer Signalüberlagerungen unmöglich. Die quantitative Auswertung des *steady-state*-NOEs zur Abstandsbestimmung ist dementsprechend nicht empfehlenswert^[31].

Stattdessen ist es sinnvoll, die zeitliche Entwicklung des NOEs zu betrachten, da sich diese zu Beginn wie in einem Zweispinsystem verhält, und die Kenntnis der anderen Relaxationspfade somit nicht nötig ist. Dazu werden häufig Experimente angewendet, die einen transienten NOE erzeugen^[98–100]. Dabei wird der Spin S nicht gesättigt, sondern selektiv invertiert. Während der Entwicklung des NOEs zum Spin I kann der Spin S frei relaxieren. Das bedeutet, dass die Intensitäten beider Spins nach der Inversion einer zeitlichen Entwicklung unterliegen:

$$\frac{dI_z}{dt} = -R_I (I_z - I_z^0) - \sigma_{IS} (S_z - S_z^0) \quad (3.5.30)$$

$$\frac{dS_z}{dt} = -R_S (S_z - S_z^0) - \sigma_{IS} (I_z - I_z^0) \quad (3.5.31)$$

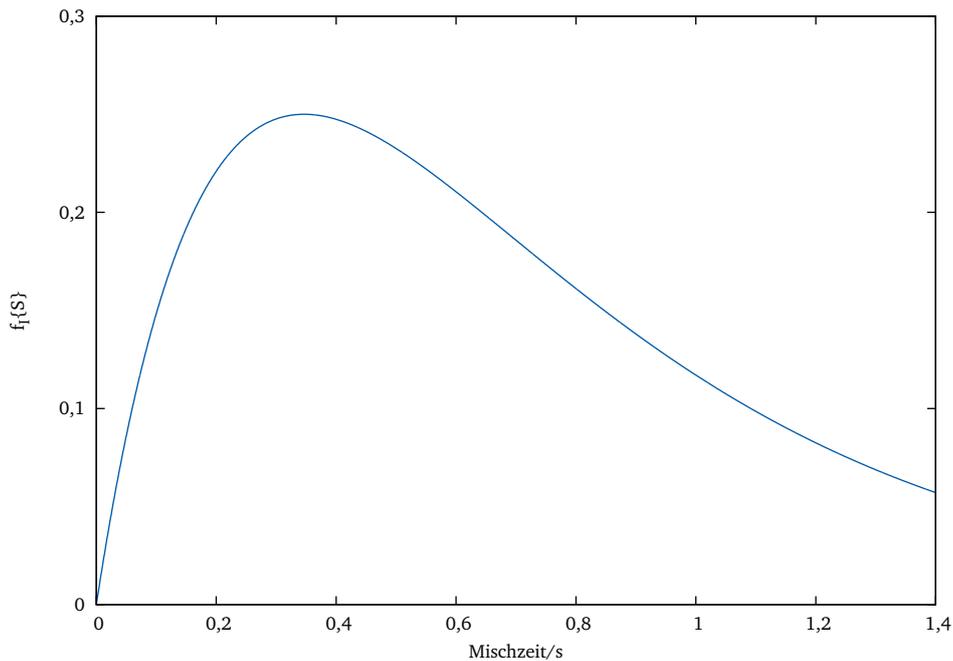


Abbildung 3.5.3: Auftragung des transienten NOE $f_I \{S\}$ gegen die Mischzeit t .

Unter der Annahme, dass die beiden Relaxationsterme gleich groß sind, gilt $R_I = R_S = R$. Dies wird in der Folge für alle Relaxationsterme R angenommen. Mit den Anfangsbedingungen der selektiven Inversion von S ($I_z = I_z^0$ und $S_z = -S_z^0$) können diese beiden Differentialgleichungen gelöst werden:

$$f_I \{S\} (t) = e^{-(R-\sigma_{IS})t} - e^{-(R+\sigma_{IS})t} \quad (3.5.32)$$

Zur Unterscheidung des transienten NOE vom *steady-state*-NOE η wird $f_I \{S\}$ als Symbol genutzt. Gleichwohl gelten die bisherigen Überlegungen zum *steady-state*-NOE analog für den transienten NOE². Der Verlauf der Gleichung 3.5.32 ist in Abbildung 3.5.3 dargestellt.

Die zeitliche Entwicklung des NOE kann für sehr kleine Zeiten t , die auch als Mischzeit bezeichnet wird, als linear angenommen werden. Dazu werden in Gleichung 3.5.30 die Anfangsbedingungen des transienten NOE-Experiments $I_z = I_z^0$ und $S_z = -S_z^0$ eingesetzt:

$$\left. \frac{dI_z}{dt} \right|_{t \rightarrow 0} = 2\sigma_{IS}S_z^0 \quad (3.5.33)$$

Ist t nicht Null, sondern sehr klein, kann diese Gleichung auch als TAYLOR-Entwicklung der Exponentialterme von Gleichung 3.5.32 dargestellt werden, bei der alle Terme zweiter und höherer Ordnung vernachlässigt werden:

² Es existieren zwei signifikante Unterschiede. Erstens beträgt der maximal erreichbare NOE nicht mehr 50%, sondern 38,5%. Zweitens werden transiente NOE-Spektren als Differenzspektren aufgenommen. Dies wird über einen doppelten Phasenzyklus gewährleistet.

$$f_I \{S\} (t) \approx 2\sigma_{IS} S_z^0 t \quad (3.5.34)$$

Diese als *initial-rate-approximation* bezeichnete Gleichung besagt, dass die Größe des NOE-Signals für sehr kurze Entwicklungszeiten nur von der Kreuzrelaxationskonstante σ_{IS} bestimmt wird. Das bedeutet zusätzlich, dass sich alle Spinpaare so verhalten, als ob sie isolierte Spinpaare seien. Die Bedeutung des NOE zur Strukturaufklärung liegt nun darin, dass aus der Kreuzrelaxationsrate σ_{IS} , die durch Auftragung von NOE-Intensitäten gegen die Zeit t erhalten werden kann, der Abstand r_{IS} der beiden interagierenden Spins bestimmt werden kann. Der Zähler von Gleichung 3.5.27 entspricht σ_{IS} , und dieser kann unter der Annahme von $\omega_I \approx \omega_S \approx \omega$ umgeformt werden zu:

$$\sigma_{IS} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\hbar^2 \gamma^4}{10} \left(\frac{6\tau_c}{1 + 4\omega^2 \tau_c^2} - \tau_c \right) r_{IS}^{-6} \quad (3.5.35)$$

In dieser Gleichung existiert neben dem Abstand r_{IS} nur τ_c als Unbekannte, sodass eine Absolutbestimmung des Abstandes aus der Kreuzrelaxationsrate σ_{IS} prinzipiell möglich ist. Dessen experimentelle Bestimmung ist aber aufwendig. Stattdessen wird ein starres Molekül angenommen, das isotrop rotiert, was bedeutet, dass τ_c für alle Spinpaare im Molekül gleich ist. Somit ist eine Kalibration durch einen bekannten Abstand r_{ref} möglich^[31]:

$$r_{IS} = r_{\text{ref}} \left(\frac{\sigma_{IS}}{\sigma_{\text{ref}}} \right)^{-\frac{1}{6}} \quad (3.5.36)$$

Diese einfache Gleichung bildet die Grundlage der Strukturbestimmung mittels des NOE auf Basis der Annahme eines starren Moleküls. Die Genauigkeit, mit der Strukturinformationen über diese Referenzierung bestimmt werden können, hängt allerdings von mehreren Faktoren ab.

Zuerst wird ein genau bekannter Abstand und dessen NOE-Aufbaukurve benötigt. Als bekannter Abstand werden üblicherweise Spinpaare starrer Geometrie gewählt, zum Beispiel diastereotope Protonen einer CH_2 -Gruppe. Zwischen diesen Protonen sollte idealerweise nur Magnetisierungstransfer durch den NOE, aber nicht durch starke Kopplung oder Austausch erfolgen, da sonst die Intensitäten verfälscht werden. Diese Voraussetzung gilt analog für alle zu bestimmenden Abstände^[31].

Bei der Auswahl des Referenzabstandes ist außerdem zu beachten, dass der gewählte Abstand repräsentativ für das zu untersuchende Molekül ist. Im Falle flexibler Moleküle ist es möglich, dass τ_c nicht für alle Spinpaare identisch ist. Besonders CH_2 -Gruppen befinden sich oft in flexiblen Alkylketten, die im Falle von Proteinen deutlich kürzere Korrelationszeiten besitzen als das restliche Molekül.

Besitzt das zu untersuchende System mehr Spins als das hier beschriebene idealisierte Zwei-Spin-System, kann das Problem der Spindiffusion auftreten^[31]. Dies bedeutet, dass die Magnetisierung durch den NOE von Spin S nach Spin I , und anschließend von I zum dritten Spin A übertragen wird. Im Ergebnis wurde also Magnetisierung von S nach A übertragen, obwohl zwischen diesen Spins kein direkter NOE-Kontakt vorliegt. Der zugehörige Abstand r_{AS} wird so verfälscht detektiert, er erscheint zu kurz. Einen Hinweis auf die Anwesenheit von Spindiffusion kann ein nicht-linearer Aufbau des NOE liefern: Im Falle von Spindiffusion erfolgt der Aufbau verzögert, sodass der Verlauf zu Beginn einer S-Kurve ähnelt,

bevor er bei längeren Mischzeiten linear verläuft. Als Grenzen zwischen dem S-Kurven-Verlauf und dem linearen Aufbau gelten 20 ms^[31]. Die Anwesenheit von Spindiffusion ist somit experimentell schwer zu detektieren, muss aber ausgeschlossen werden.

Des Weiteren muss eine Zeit t gewählt werden, die im Linearitäts- oder Gültigkeitsbereich der *initial-rate-approximation* liegt. Diese Zeiten sind üblicherweise sehr kurz, sodass Probleme mit zu geringem Signal-zu-Rausch-Verhältnissen auftreten können. Besonders für mittlere oder lange Abstände, die sehr kleine NOE-Signale erzeugen, stößt diese Methode schnell an ihre Grenzen.

Um auch Mischzeiten außerhalb des Linearitätsbereiches korrekt beschreiben zu können, ist es möglich, in Gleichung 3.5.34 weitere Terme der TAYLOR-Entwicklung einzuführen:

$$f_I \{S\} (t) \approx 2\sigma_{IS} S_z^0 t (1 - Rt) \quad (3.5.37)$$

Der zweite Grad dieses Polynoms führt dazu, dass die Gleichung nicht mehr per linearer Regression angenähert werden kann, außerdem sind nun mehr Datenpunkte nötig, um alle Unbekannten zu bestimmen. Stattdessen wird der von MACURA^[101] und HU^[102] vorgeschlagene *Peak Amplitude Normalisation for Improved Cross-relaxation* (PANIC)-Ansatz verfolgt.

Analog zu Gleichung 3.5.32, die die Entwicklung des Spins I betrachtet, kann auch die Entwicklung des Spins S aus den Gleichungen 3.5.30 und 3.5.31 beschrieben werden:

$$f_S \{S\} (t) = e^{-(R+\sigma_{IS})t} + e^{-(R-\sigma_{IS})t} \quad (3.5.38)$$

Nun kann Gleichung 3.5.32 durch Gleichung 3.5.38 geteilt werden:

$$\xi = \frac{f_I \{S\} (t)}{f_S \{S\} (t)} = \frac{e^{-(R-\sigma_{IS})t} - e^{-(R+\sigma_{IS})t}}{e^{-(R+\sigma_{IS})t} + e^{-(R-\sigma_{IS})t}} \quad (3.5.39)$$

Durch Ausklammern von e^{-Rt} wird erhalten:

$$\xi = \frac{e^{-Rt} (e^{\sigma_{IS}t} - e^{-\sigma_{IS}t})}{e^{-Rt} (e^{\sigma_{IS}t} + e^{-\sigma_{IS}t})} = \tanh (\sigma_{IS}t) \quad (3.5.40)$$

Dabei ist ξ das NOE-Signal, das durch Division der Signale I und S aus dem gleichen Spektrum normalisiert wird. Im Gegensatz zu den Gleichungen 3.5.32 und 3.5.38 befindet sich im Term $\tanh (\sigma_{IS}t)$ keine Autorelaxation R mehr. Nun wird der Term \tanh durch seine TAYLOR-Entwicklung ersetzt:

$$\xi = \sigma_{IS}t - \frac{1}{3} (\sigma_{IS}t)^3 + \frac{2}{15} (\sigma_{IS}t)^5 + \dots \quad (3.5.41)$$

Erneut werden alle Terme höherer Ordnung vernachlässigt:

$$\xi \approx \sigma_{IS}t \quad (3.5.42)$$

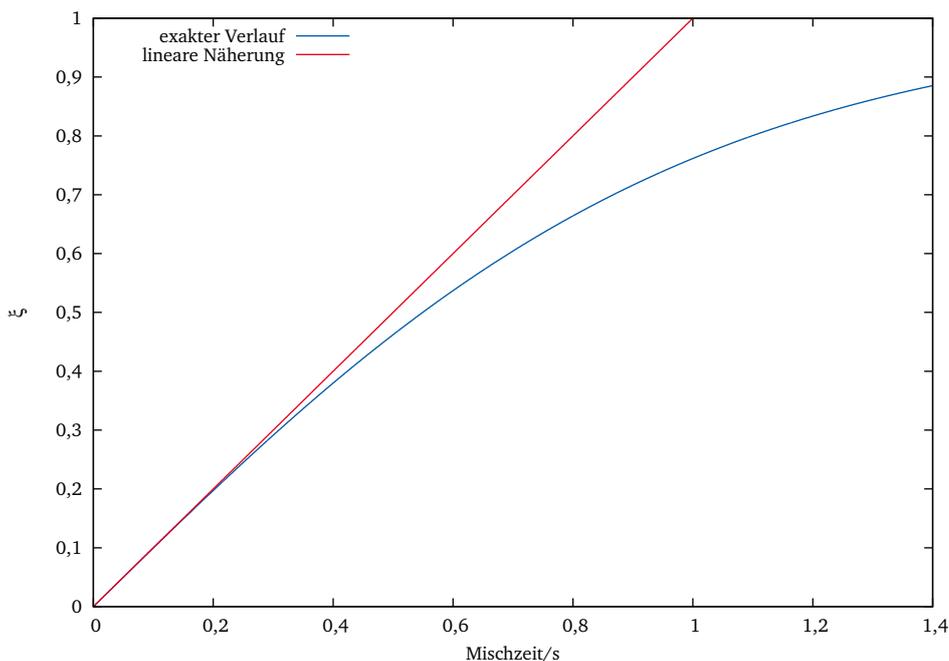


Abbildung 3.5.4: PANIC-Auftragung des normierten transienten NOE ξ gegen die Mischzeit t . Die lineare Näherung durch Gleichung 3.5.42 weicht bis 0,4 s nur wenig vom durch Gleichung 3.5.40 beschriebenen exakten Verlauf ab.

Diese TAYLOR-Entwicklung bietet gegenüber der Gleichung 3.5.34 den Vorteil der höheren Genauigkeit, da hier keine Terme zweiter Ordnung, sondern erst ab dritter Ordnung vernachlässigt werden. Das bedeutet, dass der Linearitätsbereich der NOE-Aufbaukurve deutlich verlängert werden kann, wodurch Experimente mit höheren Zeiten t und somit verbessertem Signal-zu-Rausch-Verhältnis genutzt werden können. Außerdem ist es nun nicht mehr nötig, den Term S_z^0 zu kennen, sodass σ_{IS} per linearer Regression direkt aus der Steigung der NOE-Aufbaukurve gewonnen werden kann.

Der PANIC-Ansatz kann für den ROE ebenfalls verwendet werden, zur analogen Herleitung sei auf die Literatur verwiesen^[102].

Sollte die Annahme, dass die beiden Relaxationsterme R_I und R_S gleich groß sind, nicht zutreffen, führt dies bei der Anwendung des PANIC-Ansatzes zu Abweichungen vom linearen Verhalten. Zur korrekten Bestimmung von σ_{IS} sollte dann nur der Bereich verwendet werden, der bei sehr kurzen Mischzeiten linear ist.

3.5.2 Der Einfluss molekularer Flexibilität

Liegt molekulare Flexibilität vor, so ist es möglich, dass Umwandlungsprozesse stattfinden, die zu einer zeitlichen Veränderung der Dipol-Dipol-Kreuzrelaxationsraten führen. Entscheidend für die Signalintensitäten des NOE ist dabei nicht die Art der Umwandlung, sondern nur deren Geschwindigkeit. Die auf der Zeitskala des NMR-Experiments langsame Umwandlung, bzw. der langsame Austausch, wird in Kapitel 3.6 behandelt. Der schnelle Austausch und dessen Einfluss auf NOE-Signale wird nun beschrieben. Der entscheidende Unterschied dieser beiden Regimes ist die Entartung der Übergänge und damit die Anzahl der Signalsätze: Im schnellen Austausch ist für austauschende Signale ein über alle Konformere

gemittelttes Signal sichtbar, während im langsamen Austausch für jedes Konformer ein einzelnes Signal beobachtet werden kann. Die hierfür relevanten Zeitskalen werden in Kapitel 3.6 genauer erläutert.

Im Falle des schnellen Austausches ist die in der Herleitung von Gleichung 3.5.22 verwendete Näherung, dass die spektrale Dichtefunktion $J(\omega)$ unabhängig von r_{IS} ist, nicht mehr gültig. Stattdessen muss eine veränderte spektrale Dichtefunktion $J'(\omega)$ verwendet werden, die von TROPP^[103] sowie YIP und CASE^[104] definiert wurde:

$$J'(\omega) = \frac{1}{5} \sum_{n=-2}^2 \sum_{\mu=1}^N \sum_{\nu=1}^N \frac{Y_{2n}(\phi_{IS,\nu}) Y_{2n}^*(\phi_{IS,\mu})}{r_{IS,\nu}^3 r_{IS,\mu}^3} \int_{-\infty}^{\infty} p_{\nu} e^{(A\tau)_{\mu\nu}} e^{\frac{-\tau}{\tau_c}} e^{-i\omega\tau} d\tau \quad (3.5.43)$$

Dabei sind $r_{IS,\nu}$ und $r_{IS,\mu}$ die Abstände der Spins I und S in den Konformeren μ und ν . Die Gesamtzahl der Konformere ist N , sodass über alle Kombinationen von Konformerpaaren aufsummiert wird. Die Orientierung des Verbindungsvektors zwischen I und S wird in Polarkoordinaten beschrieben. Die Terme $Y_{2n}(\phi_{ij,\nu})$ und $Y_{2n}^*(\phi_{IS,\mu})$ sind Kugelflächenfunktionen zweiter Ordnung dieser Polarkoordinaten, die über den zweiten Index n aufsummiert werden. Sie beschreiben den Winkelanteil des HAMILTON-Operators der dipolaren Kopplung, sind also eine andere Schreibweise für Gleichung 3.5.9.

Der Term p_{ν} beschreibt die Gleichgewichtspopulation des Konformers ν , und A entspricht einer Matrix von Geschwindigkeitskonstanten zur Konformerenumwandlung. Kombiniert beschreibt der Term $p_{\nu} e^{(A\tau)_{\mu\nu}}$ also die Anzahl der Moleküle, die im Zeitraum τ von der Konformation ν zur Konformation μ wechseln.

Diese Gleichung ergänzt also die Möglichkeit der dipolaren Relaxation durch Fluktuation der lokalen Felder, die durch Rotation des Moleküls hervorgerufen werden, um die Möglichkeit, dass die lokalen Felder durch Konformationsänderungen fluktuieren. Durch die Darstellung in Polarkoordinaten wird nur der zweite Beitrag beschrieben, da der erste Beitrag unverändert aus dem vorherigen Abschnitt übernommen werden kann. Die Größe dieses neuen Beitrages ist abhängig von der Geschwindigkeit, mit der die Konformere ineinander umgewandelt werden können.

Für diese Geschwindigkeit gibt es zwei Regimes, in denen sich die Gleichung deutlich vereinfachen lässt: Sie kann im Vergleich zur Korrelationszeit τ_c , und damit im Vergleich zur dipolaren Relaxation, entweder schnell oder langsam sein^[31,104]. Falls die Umwandlung der Konformere ineinander sehr langsam ist, verschwinden die Umwandlungskonstanten aus der Matrix A , die somit durch die Einheitsmatrix ersetzt werden kann. Durch die langsame Umwandlung ist eine Unterscheidung der Konformere μ und ν für die Kugelflächenfunktionen nicht mehr nötig, sodass deren Summe nach dem Additionstheorem für Kugelflächenfunktionen ihrem normalisierten Wert entspricht. Mit der gleichen Argumentation ist es nicht mehr nötig, Paare von Konformeren zu betrachten. Außerdem entspricht der Ausdruck im Integral der normalen spektralen Dichtefunktion, sodass folgende Gleichung entsteht:

$$J'(\omega) = \frac{2\tau_c}{1 + \omega^2\tau_c^2} \sum_{\mu=1}^N \frac{p_{\mu}}{r_{IS,\mu}^6} \quad (3.5.44)$$

Es ist nun sinnvoll, eine gemittelte Distanz zu definieren, um zu beschreiben, welche Distanz der NOE effektiv spürt:

$$r_{IS,mittel} = \left(\frac{J'(\omega)}{J(\omega)} \right)^{-\frac{1}{6}} \quad (3.5.45)$$

Somit ergibt sich aus den Gleichungen 3.5.44 und 3.5.23:

$$r_{IS,mittel} = \left(\sum_{\mu=1}^N \frac{p_{\mu}}{r_{IS,\mu}^6} \right)^{-\frac{1}{6}} \quad (3.5.46)$$

Diese Gleichung ist für im Vergleich zur Korrelationszeit langsamen Austausch gültig und beschreibt den effektiv beobachteten Abstand bei Vorliegen konformationeller Flexibilität. Sie ist die zentrale Gleichung für alle Protonen kleiner organischer Moleküle, abgesehen von Protonen in Methylgruppen.

Das Gegenteil zu diesem langsamen Austausch ist der schnelle Austausch, der vor allem für Protonen einer Methylgruppe von Bedeutung ist. Der Term $p_{\nu}e^{(A\tau)\mu\nu}$ der Gleichung 3.5.43 kann nun als Produkt zweier Gleichgewichtspopulationen $p_{\nu}p_{\mu}$ genähert werden. Im Falle einer Methylgruppe kann davon ausgegangen werden, dass alle Konformere gleich populiert sind, sodass $p_{\nu} = p_{\mu}$ und $p_{\nu} = \frac{1}{N}$ gilt, und der Term $p_{\nu}p_{\mu}$ letztlich durch $\frac{1}{N^2}$ dargestellt werden kann. Somit ergibt sich:

$$J'(\omega) = \frac{1}{5N^2} \sum_{n=-2}^2 \sum_{\mu=1}^N \sum_{\nu=1}^N \frac{Y_{2n}(\phi_{IS,\nu}) Y_{2n}^*(\phi_{IS,\mu})}{r_{IS,\nu}^3 r_{IS,\mu}^3} \int_{-\infty}^{\infty} e^{\frac{-\tau}{\tau_c}} e^{-i\omega\tau} d\tau \quad (3.5.47)$$

Nach dem Additionstheorem kann diese Gleichung umgeschrieben werden:

$$J'(\omega) = \frac{1}{N^2} \sum_{\mu=1}^N \sum_{\nu=1}^N \frac{P_2(\cos(\theta_{IS,\mu\nu}))}{r_{IS,\nu}^3 r_{IS,\mu}^3} \int_{-\infty}^{\infty} e^{\frac{-\tau}{\tau_c}} e^{-i\omega\tau} d\tau \quad (3.5.48)$$

Dabei ist P_2 ein LEGENDRE-Polynom, und $\theta_{ij,\mu\nu}$ entspricht dem Winkel zwischen den Kernverbindungsvektoren \mathbf{r}_{IS} in den Konformeren μ und ν . Diese Kernverbindungsvektoren können mit in die Gleichung einbezogen werden, sodass das LEGENDRE-Polynom ausformuliert werden kann:

$$J'(\omega) = \frac{1}{2N^2} \sum_{\mu=1}^N \sum_{\nu=1}^N \frac{3(\mathbf{r}_{IS,\nu} \times \mathbf{r}_{IS,\mu})^2 - r_{IS,\nu}^2 r_{IS,\mu}^2}{r_{IS,\nu}^5 r_{IS,\mu}^5} \int_{-\infty}^{\infty} e^{\frac{-\tau}{\tau_c}} e^{-i\omega\tau} d\tau \quad (3.5.49)$$

Wird erneut integriert und nach Gleichung 3.5.45 vorgegangen, ergibt sich:

$$r_{IS,mittel} = \left(\frac{1}{2N^2} \sum_{\mu=1}^N \sum_{\nu=1}^N \frac{3(\mathbf{r}_{IS,\nu} \times \mathbf{r}_{IS,\mu})^2 - r_{IS,\nu}^2 r_{IS,\mu}^2}{r_{IS,\nu}^5 r_{IS,\mu}^5} \right)^{-\frac{1}{6}} \quad (3.5.50)$$

Im Vergleich zu Gleichung 3.5.46 für langsamen Austausch ist hier durch das Vektorprodukt $\mathbf{r}_{IS,\nu} \times \mathbf{r}_{IS,\mu}$ nach wie vor eine Winkelabhängigkeit vorhanden. Das Maximum dieses Produktes entspricht:

$$\left(\mathbf{r}_{IS,\nu} \times \mathbf{r}_{IS,\mu}\right)^2 \leq r_{IS,\nu}^2 r_{IS,\mu}^2 \quad (3.5.51)$$

Somit ergibt sich für Gleichung 3.5.50 maximal:

$$r_{IS,\text{Tropp}} \geq \left(\frac{1}{N^2} \sum_{\mu=1}^N \sum_{\nu=1}^N \frac{1}{r_{IS,\nu}^3 r_{IS,\mu}^3} \right)^{-\frac{1}{6}} \quad (3.5.52)$$

Die Einführung der Bezeichnung $r_{IS,\text{Tropp}}$ soll kennzeichnen, dass es sich bei diesem Abstand um einen Maximalabstand handelt. Die Winkelabhängigkeit des Vektorprodukts $\mathbf{r}_{IS,\nu} \times \mathbf{r}_{IS,\mu}$ kann dafür sorgen, dass der Abstand in Wirklichkeit kleiner ist. Befindet sich das Proton auf der Achse der Methylgruppenrotation und zusätzlich nahe zu den Methylprotonen, ist die Verfälschung des Abstandes $r_{IS,\text{Tropp}}$ durch die Winkelabhängigkeit am größten. Umgekehrt ist die Verfälschung am kleinsten, wenn sich das Proton in der Ebene der Methylprotonen befindet.

Im Falle von Protonen einer Methylgruppe ist die Betrachtung der Konformerenpaare μ und ν nicht nötig. Stattdessen ist es ausreichend, nur einmal über alle Konformere μ zu summieren, sodass sich Gleichung 3.5.52 vereinfacht:

$$r_{IS,\text{Tropp}} \geq \left(\frac{1}{N} \sum_{\mu=1}^N \frac{1}{r_{IS,\mu}^3} \right)^{-\frac{1}{3}} \quad (3.5.53)$$

Diese Gleichung ist für im Vergleich zur Korrelationszeit schnellen Austausch gültig, wenn die Änderung der Distanzen größer ist als die Änderung der Winkel. Im Falle kleiner organischer Moleküle ist dies vor allem bei Methylgruppen der Fall^[31]. Für andere Protonenpaare ist es nicht empfehlenswert, diese Gleichung zu verwenden^[104], stattdessen sollte auf Gleichung 3.5.46 zurückgegriffen werden.

3.5.3 Anwendungsbeispiele

Die Anwendung von NOE-Daten auf kleine organische Moleküle erfolgt häufig durch qualitative Auswertung. Dazu wird nur die An- oder Abwesenheit von NOE-Kontakten beurteilt^[31]. So kann beispielsweise die Konstitution des Histidinderivats **27** als π - oder τ -substituiert bestimmt werden, indem die zwischen Sauerstoff und Stickstoff befindliche CH_2 -Gruppe angeregt und die Anzahl der NOE-Kontakte zum Heteroaromaten gezählt wird^[105]. Im Falle der τ -Substitution, die in Abbildung 3.5.5 dargestellt ist, sind zwei NOE-Kontakte zu den beiden benachbarten aromatischen Protonen sichtbar, im Falle der π -Substitution dagegen nur einer.

Genauere Strukturinformationen können erhalten werden, wenn der NOE halbqualitativ in die Bereiche stark, mittel und schwach unterteilt wird^[31]. Auf diese Art konnte durch die Zuordnung von 34 NOE-Kontakten die Relativkonfiguration von F430 **28** aufgeklärt werden^[106], obwohl einige der NOE-Kontakte aufgrund von Signalüberlapp und Intensitätsproblemen nicht eindeutig zugeordnet werden konnten.

Die Aufklärung von Konformationen flexibler Moleküle ist dagegen mit dieser Methode nur schwer möglich. Für Pulvomycin **29** konnte zwar die Konfiguration von elf der 13 Stereozentren zugeordnet

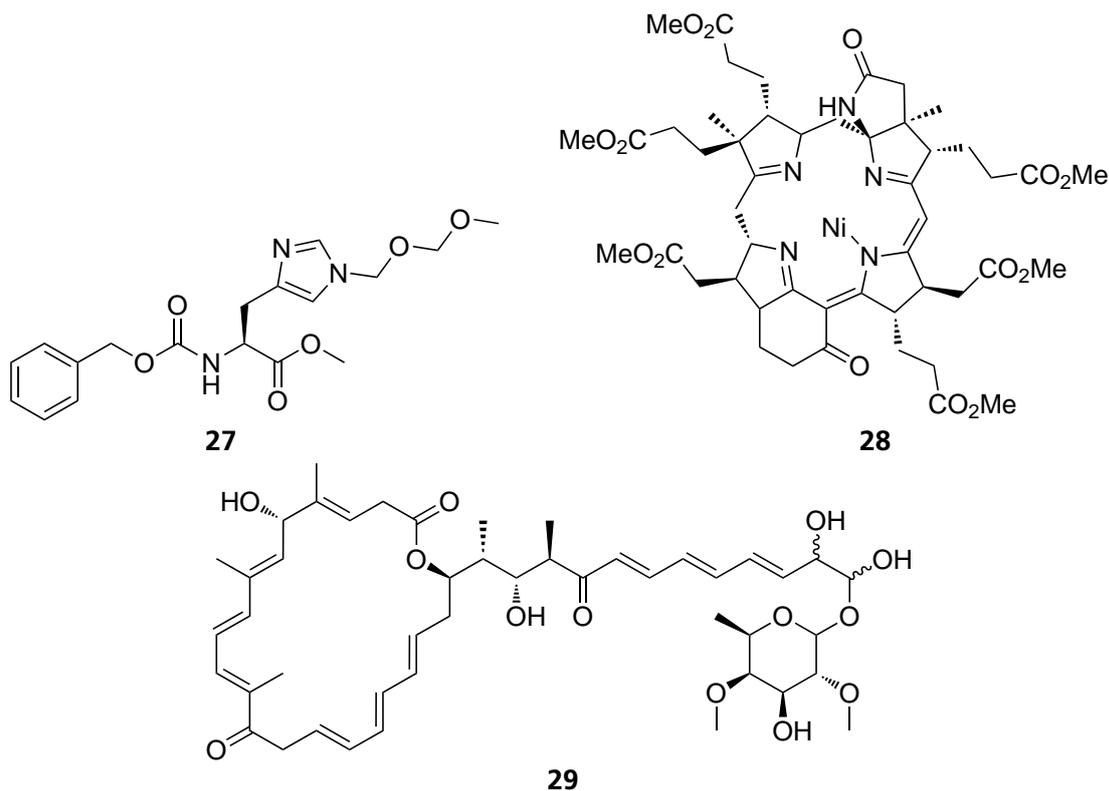


Abbildung 3.5.5: Drei mittels qualitativer und halbqualitativer NOE-Auswertung untersuchte Moleküle. So gelang die Aufklärung von Konstitution und Relativkonfiguration. Keine oder nur eingeschränkte Aussagen konnten zu Konformationen getroffen werden.

werden, allerdings konnte nur ein grobes Bild der Konformation des starren Teils des Moleküls gewonnen werden^[107].

Um auch konformationelle Flexibilität mittels NOE analysieren zu können, müssen kurze bis mittlere Distanzen quantitativ analysiert werden. So konnte für Strychnin **30** gezeigt werden, dass die quantitative Analyse einer einzigen Distanz zur Detektion eines zweiten Konformers genutzt werden kann^[108,109]. Diese Distanz wurde als deutlich kürzer bestimmt, als dies aus einer starren Struktur anzunehmen wäre. Dazu wurde eine übertragene Kalibration entwickelt, bei der bestimmte Abstände als Referenzabstand des nächsten Spinpaars genutzt werden, und somit schrittweise das ganze Molekül aufgebaut werden kann^[108]. Diese übertragene Kalibration sollte eine Kompensation für unterschiedliche τ_C -Zeiten dar-

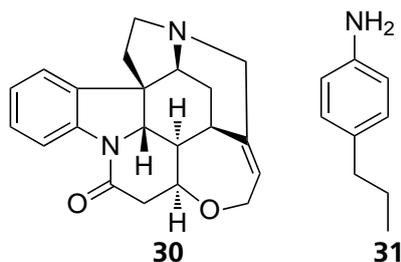


Abbildung 3.5.6: Zwei mittels quantitativer NOE-Auswertung untersuchte Moleküle. In beiden Fällen konnten Konformerenpopulationen bestimmt werden.

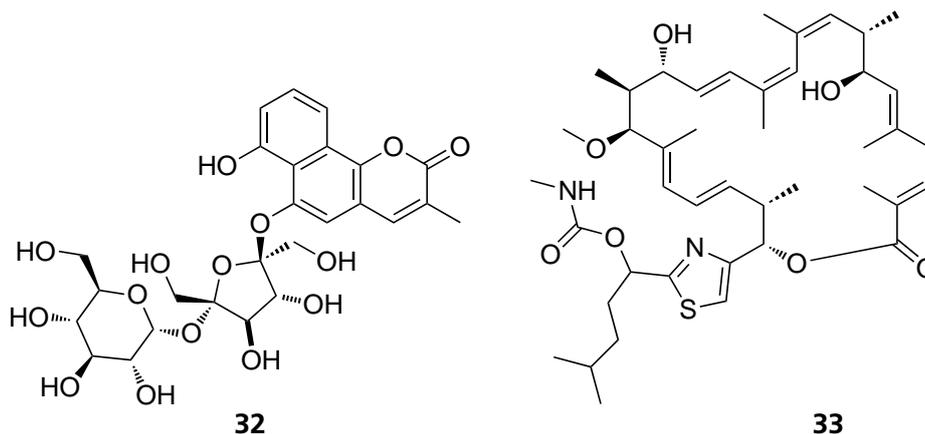


Abbildung 3.5.7: Zwei mittels quantitativer NOE-Auswertung untersuchte Moleküle. In beiden Fällen konnte das Strukturaufklärungsproblem nur durch zusätzliche Auswertung von RDC-Daten gelöst werden.

stellen. Allerdings wurde der Einfluss von Spindiffusion nicht ausgeschlossen, wodurch ebenfalls eine verkürzte Distanz erhalten werden würde.

Die verkürzte Distanz, die durch konformationelle Flexibilität erklärt wurde, konnte nur durch die quantitative Auswertung des Abstandes detektiert werden. Im Falle der halbqualitativen Einteilung wäre diese Abweichung möglicherweise nicht ins Gewicht gefallen.

Diese quantitative Methode ist auch für Moleküle erfolgreich, die zwei etwa gleich populierte Konformere besitzen, so konnten für 4-Propylanilin **31** für die flexible Alkylkette zwei Konformere mit Populationen von 55%:45% bestimmt werden^[110].

Trotz quantitativer Auswertung stößt die Konfigurations- und Konformationsbestimmung mittels NOE aber an ihre Grenzen, wenn weit voneinander entfernte Molekülteile in Relation gesetzt werden sollen. Für Sucroneolambertellin **32** konnte trotz der Bestimmung von 49 Distanzen keine Relativkonfiguration aus NOE-Daten gefunden werden, welche die experimentellen Daten besser als alle anderen möglichen Relativkonfigurationen beschreibt^[111]. Dieses Strukturaufklärungsproblem wurde dann durch Kombination mit RDC-Daten (siehe Abschnitt 3.7) gelöst^[111].

Für das Archazolid A **33** trat das gleiche Problem auf. Mit Hilfe des NOE gelang es, Relativkonfigurationen benachbarter Stereozentren aufzuklären^[112]. Allerdings ist die Distanz zwischen den drei stereogenen Bereichen so groß, dass keine eindeutige Zuordnung getroffen werden konnte. Auch hier musste zusätzlich auf RDC-Daten zurückgegriffen werden, dies wird in Abschnitt 3.7.4 diskutiert.

Im Kontext dieser Dissertation zeigen die in diesem Abschnitt diskutierten ausgewählten Beispiele, dass durch qualitative und halbqualitative Auswertung des NOE nur in Ausnahmefällen Konstitution und Konfiguration bestimmt werden können. Die quantitative Auswertung von NOE-Daten ermöglicht auch für komplexe Moleküle Konfigurations- und Konformationsbestimmungen, sofern Abstände zwischen den zu untersuchenden Molekülteilen kurzreichweitig sind. Sollen weit entfernte Molekülteile zueinander in Beziehung gesetzt werden, reicht die alleinige Analyse des NOE oft nicht aus, stattdessen sollten die in Kapitel 3.7 beschriebenen RDC-Daten zu Hilfe genommen werden.

3.6 Austauschspektroskopie

In Abschnitt 3.5.2 wurden die Auswirkungen von schnellem Austausch auf im NOE-Spektrum beobachtbaren Signale diskutiert. Dazu wurde erwähnt, dass im Regime des schnellen Austausches ein über alle Konformere gemittelt Signal sichtbar ist, während im langsamen Austausch für jedes Konformer ein einzelnes Signal beobachtet werden kann. Die Interpretation des langsamen Austausches wird in diesem Abschnitt beschrieben.

3.6.1 Grundlagen

Die Begriffe des langsamen und schnellen Austausches³ beziehen sich auf die Zeitskala der chemischen Verschiebung. Ist der Austausch langsam, gilt:

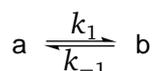
$$k < \Delta\nu_{ab} \quad (3.6.1)$$

Dabei ist k die Geschwindigkeitskonstante des Austausches, und $\Delta\nu_{ab}$ ist der Frequenzunterschied in Hz der einzelnen Signale der beiden Positionen a und b bei langsamem Austausch. Für schnellen Austausch gilt analog

$$k > \Delta\nu_{ab} \quad (3.6.2)$$

Im Falle, dass $k \approx \Delta\nu_{ab}$ entspricht, wird von Koaleszenz gesprochen, und es wird eine sehr breite Linie beobachtet. Das Auftreten der Koaleszenz ist abhängig von der Temperatur, da die Geschwindigkeitskonstante k temperaturabhängig ist, und von der Spektrometerfrequenz, da der Unterschied der chemischen Verschiebungen $\Delta\sigma_{ab}$ frequenzabhängig ist. Bei Vorliegen der Koaleszenz kann die Geschwindigkeitskonstante k aus der Linienform bestimmt werden^[37].

Der einfachste Fall des langsamen Austausches ist ein Ein-Spin- $\frac{1}{2}$ -System, das in zwei Konformeren a und b vorliegen kann. Das bedeutet, dass auf den Spin S in den beiden Konformeren jeweils unterschiedliche Magnetfeldstärken wirken, und S somit zwei unterschiedliche chemische Verschiebungen aufweist. In diesem System kann kein Magnetisierungstransfer durch NOE entstehen, sondern nur Magnetisierungstransfer durch Austausch zwischen beiden Konformationen. Die Hin- und Rückreaktion zwischen den beiden Positionen wird mit den Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung k_1 und k_{-1} beschrieben.



Schema 3.6.1: Ein Ein-Spin- $\frac{1}{2}$ -System mit zwei Konformeren und Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung.

Dabei gilt

³ Der Begriff des langsamen Austausches bezieht sich auf die Geschwindigkeitskonstante des Austausches. Es wird trotz langsamen Austausches davon ausgegangen, dass die Umwandlung der beiden Konformere ineinander sprunghaft passiert. Besser wäre es, die Begriffe „selten“ für langsamen und „häufig“ für schnellen Austausch zu verwenden^[37].

$$\frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[b]}{[a]} \quad (3.6.3)$$

Der Spin S erzeuge nun je nach Konformer entweder ein Signal A oder B . Wird auf das Signal A eingestrahlt, kann durch den Austausch Magnetisierung vom Konformer a zum Konformer b übertragen werden, sodass die Magnetisierung bei B detektiert wird. Dieses Phänomen kann analog zum NOE behandelt werden, da dort ein Zwei-Spin-System betrachtet wurde, und jetzt ein Zwei-Konformer-System^[31]. In beiden Fällen wird ein Teil des Systems angeregt, und anschließend wird Magnetisierung zum anderen Teil des Systems transferiert. Der physikalische Vorgang dieses Transfers ist allerdings völlig unterschiedlich, da der NOE auf dipolarer Relaxation, der Austausch auf konformationellen Änderungen beruht. Nichtsdestotrotz ist die mathematische Betrachtung identisch. Die Änderung der Magnetisierung B_z kann analog zur SOLOMON-Gleichung 3.5.2 formuliert werden^[31]:

$$\frac{dB_z}{dt} = - (B_z - B_z^0) k_{-1} + (A_z - A_z^0) k_1 - (B_z - B_z^0) R^B \quad (3.6.4)$$

Dabei beschreibt k_1 den positiven Einfluss der Sättigung von A , der zu Signalverstärkung führt. Die Rückreaktion k_{-1} und die Relaxation R^B wirken diesem entgegen. Erneut wird *steady-state* angenommen, also dass $\frac{dB_z}{dt} = 0$ und $A_z = 0$ gilt. Nach Umformen kann analog zu Gleichung 3.5.29 folgender Ausdruck erhalten werden^[31]:

$$f_B\{A\} = \frac{B_z - B_z^0}{B_z^0} = \frac{A_z^0}{B_z^0} \frac{-k_1}{k_{-1} + R^B} \quad (3.6.5)$$

Analog zum NOE wird hier das Symbol $f_B\{A\}$ genutzt, um die Änderung des Signals B im Vergleich zum Anfangszustand B^0 zu beschreiben⁴, wenn A aus dem Gleichgewicht entfernt wird. Der Term $\frac{A_z^0}{B_z^0}$ kann nun noch durch Annahme des chemischen Gleichgewichts ersetzt werden:

$$k_1 A^0 = k_{-1} B^0 \quad (3.6.6)$$

Damit ergibt sich^[31]:

$$f_B\{A\} = \frac{-k_{-1}}{k_{-1} + R^B} \quad (3.6.7)$$

Analog zum weiteren Vorgehen in Abschnitt 3.5.1 kann auch hier der PANIC-Ansatz verfolgt werden^[101,102]. Für kurze Entwicklungszeiten des Austauschsignals gilt also erneut:

$$\xi \approx -k_{-1} t \quad (3.6.8)$$

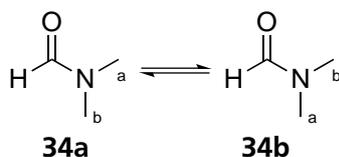
⁴ In der vorliegenden Dissertation wird das in der Literatur etablierte Symbol^[31] für den Anfangszustand B^0 genutzt, obwohl Verwechslungsgefahr mit dem ebenfalls etablierten Symbol^[16,17] des externen Magnetfeldes B_0 besteht.

Zu beachten ist besonders das negative Vorzeichen. Dies führt dazu, dass das Vorzeichen von Austauschsignalen exakt entgegengesetzt von dem des positiven NOE ist, wenn das Molekül schnell rotiert. Rotiert es dagegen langsam, ist ein negativer NOE sichtbar, der dann nicht mehr vom ebenfalls negativen Austausch unterschieden werden kann (siehe Abbildung 3.5.27). In diesem Falle muss zur Unterscheidung von NOE- und Austauschsignalen auf den ROE zurückgegriffen werden, zum Beispiel durch das *Efficient Adiabatic Symmetrized Rotating frame nuclear OVERHAUSER Enhancement Spectroscopy* (EASY-ROESY)-Experiment^[97].

Zur vollständigen Diskussion fehlt nun noch das Zwei-Spin-Zwei-Positionen-System, bei dem Magnetisierung also sowohl durch den NOE als auch durch langsamen Austausch übertragen werden kann. Da in der vorliegenden Dissertation kein solches System betrachtet wird, sei hierfür auf die Literatur verwiesen^[31].

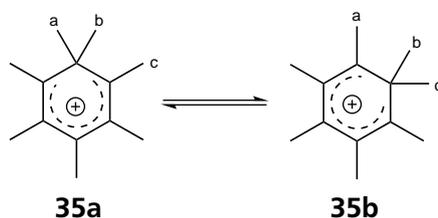
3.6.2 Anwendungsbeispiele

Die erste Untersuchung eines Systems, das Austausch zeigen kann, wurde an *N,N*-Dimethylformamid **34** durchgeführt^[113]. Dabei konnte gezeigt werden, dass die beiden Methylgruppen *a* und *b* (siehe Schema 3.6.2) zwei Signale erzeugen, also im langsamen Austausch vorliegen. Mit Hilfe der Linienformanalyse^[37] wurde die Rotationsbarriere in der Folge mehrfach untersucht^[114–122].



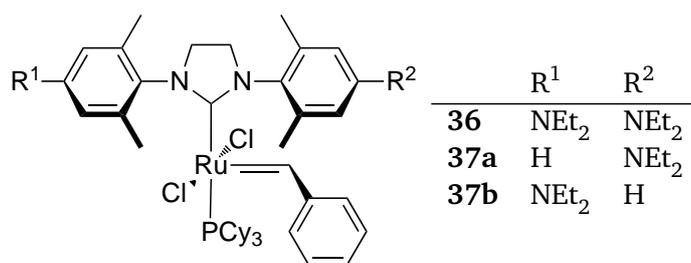
Schema 3.6.2: Austausch der Methylgruppen in *N,N*-dimethylformamid **34**.

Durch die Entwicklung zweidimensionaler Experimente können Austauschsignale leicht zugeordnet werden. Daher werden 2D-*EXchange Spectroscopy* (EXSY)-Spektren auch qualitativ genutzt^[123]. Am Heptamethylbenzeniumion **35** konnte gezeigt werden, dass die Umwandlung der verschiedenen Methylgruppen ineinander durch 1,2-Methylshifts stattfindet^[124]. Intermolekulare Prozesse konnten ausgeschlossen werden, da nur Austauschsignale zwischen benachbarten Methylgruppen gefunden wurden.



Schema 3.6.3: 1,2-Methylshift im Heptamethylbenzeniumion **35**.

Der PANIC-Ansatz lässt sich ebenfalls auf Austauschsignale übertragen (siehe Gleichung 3.6.8). Dadurch können Rotationsbarrieren genauer als durch die Linienformanalyse oder durch 2D-EXSY-Spektren quantifiziert werden. So konnten für die GRUBBS-II-artigen Komplexe **36** und **37** verschiedene Rotationsbarrieren bestimmt werden^[125].



Schema 3.6.4: Untersuchung von Bindungsstärken in GRUBBS-II-artigen Komplexen.

Damit die hier beschriebene Methode erfolgreich angewendet werden kann, müssen die beispielhaft aufgeführten Moleküle gewisse Bedingungen erfüllen. Sie müssen sich im Regime des langsamen Austausches befinden, da im schnellen Austausch nur gemittelte Signale zugänglich sind. Gleichzeitig muss der Austausch schneller als die thermische Relaxation sein, da sonst keine Austauschsignale mehr sichtbar sind. Dies bedeutet, dass die Geschwindigkeitskonstante der Umwandlung für die Beobachtung bei 500 MHz im Bereich von $10^{-4\frac{1}{s}}$ bis $1\frac{1}{s}$ befinden sollte. Durch Temperaturerhöhung oder -erniedrigung kann diese Geschwindigkeit etwas beeinflusst werden. Dies setzt aber voraus, dass das zu untersuchende Molekül in einem Medium löslich ist, mit dem entsprechende Temperaturen erreicht werden können.

Außerdem müssen die zu untersuchenden Signale von den restlichen Signalen des Moleküls basislinien-separiert sein, um eine möglichst genaue Integration der Signale zu gewährleisten. Da die chemische Verschiebung temperaturabhängig ist, widerspricht diese Bedingung möglicherweise der vorherigen Anforderung des Temperaturbereiches für langsamen Austausch. Zuletzt sei erwähnt, dass NOE- von Austauschsignalen unterschieden werden müssen. Für die GRUBBS-II-artigen Komplexe **36** und **37** wurden daher zuerst die Austauschsignale im EASY-ROESY identifiziert, und anschließend mit 1D-Spektren quantifiziert.

Für die vorliegende Dissertation zeigen diese Beispiele, dass mit Hilfe der Austauschspektroskopie Moleküldynamiken im Regime des langsamen Austausches untersucht werden können. Die Auswertung kann qualitativ oder quantitativ erfolgen. Es erscheint daher sinnvoll, zunächst qualitativ das Bewegungsregime des Moleküls zu identifizieren, und anschließend im Regime des langsamen Austausches quantitativ Austauschraten zu bestimmen.

3.7 Dipolare Restkopplungen

Die dipolare Kopplung wurde bereits in Abschnitt 3.5 als Relaxationspfad diskutiert. In diesem Abschnitt wird die direkte Beobachtung dieses anisotropen Parameters und der daraus erzielbare Informationsgewinn beschrieben.

3.7.1 Grundlagen

Die dipolare Kopplung wurde im Flüssigkristall erstmals 1963 beobachtet^[32,33]. Der HAMILTON-Operator der dipolaren Kopplung \mathcal{H}^D wurde bereits in Gleichung 3.5.6 definiert. Außerdem wurde er in Gleichung 3.5.10 als Summe einzelner Beiträge $\hat{A}-\hat{F}$ (Gleichungen 3.5.11 bis 3.5.16) dargestellt. Im Rahmen der Hochfeldnäherung sind nur Terme von Bedeutung, die mit \hat{I}_z kommutieren^[33]. Dies ist der Fall, wenn der

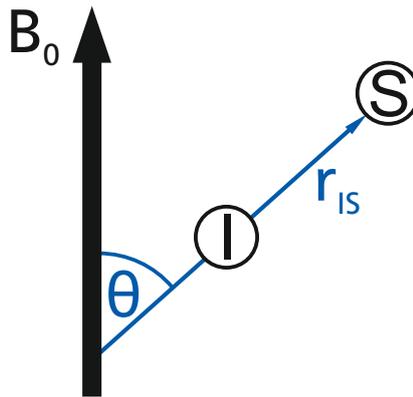


Abbildung 3.7.1: Die dipolare Kopplung.

Term $\hat{I}_z \hat{I}_{S_z}$, $\hat{I}_{I+} \hat{I}_{S-}$ oder $\hat{I}_{I-} \hat{I}_{S+}$ enthalten ist, was nur für \hat{A} und \hat{B} der Fall ist. Somit kann Gleichung 3.5.6 vereinfacht werden^[33]:

$$\hat{\mathcal{H}}^D = b_{IS} \left(3 \cos^2 \theta_{IS} - 1 \right) \left[\hat{I}_z \hat{I}_{S_z} - \frac{1}{4} \left(\hat{I}_{I+} \hat{I}_{S-} + \hat{I}_{I-} \hat{I}_{S+} \right) \right] \quad (3.7.1)$$

Daraus ergibt sich durch einen Vergleich mit Gleichung 3.1.12 und unter Anwendung von Gleichung 3.5.7 für starre Moleküle^[34-36]:

$$D_{IS} = -\frac{\mu_0 \gamma_I \gamma_S \hbar}{8\pi^2 r_{IS}^3} \left\langle \frac{3 \cos^2 \theta_{IS} - 1}{2} \right\rangle \quad (3.7.2)$$

Die für die Strukturaufklärung interessanten Parameter sind der Abstand r_{IS}^3 der beiden Kerne I und S , und der Winkel θ_{IS} zwischen dem Kernverbindungsvektor und dem externen Magnetfeld (siehe Abbildung 3.7.1). Durch diesen Winkel zu einer externen Referenz können Molekülteile miteinander in Verbindung gebracht werden, zwischen denen keine Wechselwirkungen existieren. Die dipolare Kopplung hat dadurch globalen Charakter.

Der genannte Winkel zum externen Magnetfeld wird über alle Molekülorientierungen zeitlich gemittelt. Dies ist durch die eckigen Klammern in Gleichung 3.7.2 angedeutet. Im Falle freier Rotation und Translation eines Moleküls in Lösung (*isotropic tumbling*⁵) mittelt sich die dipolare Kopplung zu $D = 0$. Existiert aber eine Vorzugsorientierung, zum Beispiel in z -Richtung des externen Magnetfeldes B_0 , ist D von Null verschieden. Die dipolare Kopplung ist also ein anisotroper NMR-Parameter, da sie nur dann zugänglich ist, wenn die Probe einer Vorzugsorientierung unterworfen wird⁶. Dies geschieht in einem Orientierungsmedium, welches auch als Alignmentmedium bezeichnet wird.

Zu Beginn der RDC-Forschung wurden Alignmentmedien benutzt, die eine starke Vorzugsausrichtung verursachten. Die resultierenden dipolaren Kopplungen in der Größenordnung von kHz dominierten die NMR-Spektren, die nur im Falle hochsymmetrischer Moleküle ausgewertet werden konnten^[126,127].

⁵ Vibrationskorrekturen werden vernachlässigt, da ihr Beitrag auf die experimentellen RDC üblicherweise kleiner als 5% ist.

⁶ Sie existiert in isotroper Lösung als Relaxationspfad, wodurch der NOE entsteht.

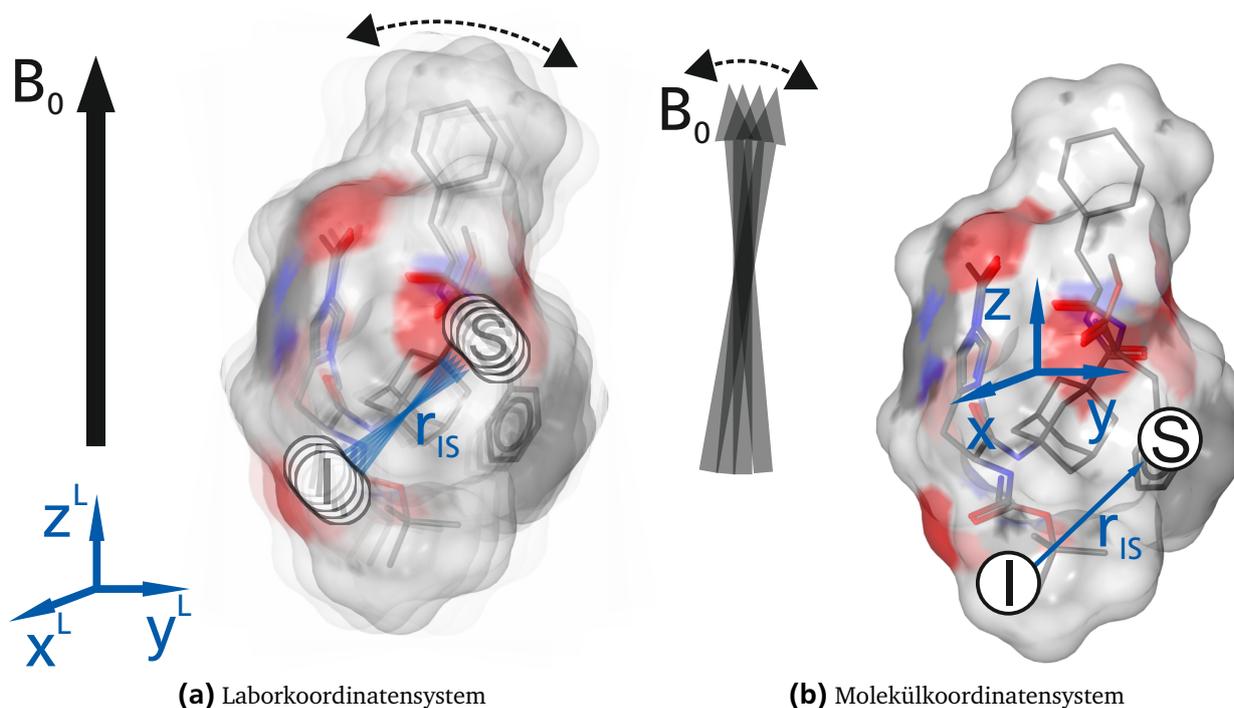


Abbildung 3.7.2: Beschreibung der Mittelung im Labor- und Molekülkoordinatensystem.

Diese Methode konnte nur durch Simulation der Molekülspektren und anschließenden Vergleich mit experimentellen Daten angewendet werden^[128].

Die Einführung des schwachen Alignments im Jahre 1997^[129], die durch die Verwendung neuer Alignmentmedien möglich wurde, resultierte in dipolaren Kopplungen, die nur noch im Hz-Bereich lagen, also in der Größenordnung skalarer Kopplungen. Die Messung der dipolaren Kopplungen konnte somit mit Methoden der hochauflösenden Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie geschehen, was der Methode auch für organische Moleküle zum Durchbruch verhalf^[130]. Die Bestimmung der dipolaren Kopplung kann nun durch Bestimmung der totalen Kopplungskonstante T aus den in Abschnitt 3.3 beschriebenen gekoppelten Korrelationspektren erfolgen, wenn die skalare Kopplungskonstante J und die jeweiligen Vorzeichen bekannt sind^[34–36]:

$$T = J + 2D \quad (3.7.3)$$

Der Begriff des schwachen Alignments beschreibt, dass der Grad der Orientierung herunterskaliert ist. Dementsprechend ist der gemittelte Term, der die Vorzugsausrichtung beschreibt, deutlich kleiner als im Falle der starken Orientierung, und die resultierende verkleinerte dipolare Kopplung wird als dipolare Restkopplung, oder residuale dipolare Kopplung bezeichnet.

Zur Auswertung des Informationsgehaltes der RDCs wird diese Mittelung und die so erzeugte Vorzugsausrichtung in der Folge genauer betrachtet. Die anschaulichste Herleitung stammt von KRAMER ET AL.^[34]. Hier wird kein laborfestes, sondern ein molekülfestes Koordinatensystem verwendet. Dies bedeutet, dass nicht mehr die Orientierung des Moleküls im Magnetfeld, sondern die Orientierung des Magnetfeldvektors \mathbf{B}_0 beschrieben werden muss (siehe Abbildung 3.7.2). Die Wahrscheinlichkeit, dass \mathbf{B}_0 in Richtung einer beliebigen Achse orientiert ist, kann nun durch den Wahrscheinlichkeitstensor \mathbf{P} dargestellt werden.

Üblicherweise wird aber nicht dieser Tensor \mathbf{P} verwendet, sondern entweder der Alignmenttensor \mathbf{A} oder der SAUPE-Tensor \mathbf{S} . Beide Tensoren sind skalierte Analoga, und errechnen sich als $\mathbf{A} = \mathbf{P} - \frac{1}{3}\mathbf{1}$ und $\mathbf{S} = \frac{3}{2}\mathbf{A}$. Die Elemente S_{ab} des SAUPE-Tensors können nun wie folgt beschrieben werden^[34,131,132]:

$$S_{ab} = \frac{3 \langle \cos \beta_a \cos \beta_b \rangle - \delta_{ab}}{2} \quad (3.7.4)$$

Dabei beschreibt $\cos \beta$ die Orientierung des \mathbf{B}_0 -Vektors zur molekülfesten Achse ($a, b \in \{x, y, z\}$), und δ_{ab} entspricht dem KRONECKER-Delta. Gleichung 3.7.2 kann nun umgeschrieben werden:

$$D_{IS} = -\frac{\mu_0 \gamma_I \gamma_S \hbar}{8\pi^2 r_{IS}^3} \sum_{a,b} S_{ab} \cos \alpha_a \cos \alpha_b \quad (3.7.5)$$

Der Winkel α beschreibt nun die Orientierung des Kernverbindungsvektors \mathbf{r}_{IS} zum molekülfesten Koordinatensystem. Sämtliche durch die Reorientierung des Moleküls verursachte Mittelungsprozesse werden nun durch den SAUPE-Tensor beschrieben.

Ist also der SAUPE-Tensor bekannt, können mit dieser Gleichung RDC-Werte berechnet werden. Der SAUPE-Tensor ist eine reelle, spurlose, symmetrische 3x3-Matrix, aus dem sich in Kombination mit einer gegebenen Struktur die dipolaren Restkopplungen errechnen lassen. Zur exakten Bestimmung des SAUPE-Tensors werden fünf Elemente benötigt, also fünf RDC. In der Regel sind mehr als fünf RDC verfügbar, wodurch ein überbestimmtes Gleichungssystem entsteht.

Aus den gemessenen RDC kann der SAUPE-Tensor per *Singular Value Decomposition* (SVD)^[133] an eine gegebene Struktur angepasst werden. Der so ermittelte SAUPE-Tensor wird dann mit der Struktur genutzt, zurückberechnete RDC zu erzeugen, die dann mit den experimentellen RDC verglichen werden können. Im Falle von fünf RDC ergibt sich immer eine eindeutige, exakt beschriebene Lösung. Der Vergleich von weiteren RDCs liefert dann einen Hinweis auf die Qualität des Strukturvorschlages, da für einen korrekten Strukturvorschlag nur Abweichungen zwischen experimentellen und zurückberechneten RDC auftreten sollten, die kleiner als der experimentelle Fehler sind. Falsche Strukturvorschläge sollten dagegen deutlich größere Abweichungen liefern^[36].

Durch Einführung eines Qualitätsfaktors kann so aus mehreren Strukturvorschlägen derjenige bestimmt werden, der die experimentellen Daten am besten beschreibt. Ein oft genutzter Qualitätsfaktor ist die Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung, die *Root Mean Square Deviation* (RMSD):

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (D_{\text{calc},i} - D_{\text{exp},i})^2} \quad (3.7.6)$$

Alternativ ist die Verwendung eines Qualitätsfaktors nach CORNILESCU ET AL.^[52] möglich:

$$Q_{\text{Cornilescu}} = \frac{\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (D_{\text{calc},i} - D_{\text{exp},i})^2}}{\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (D_{\text{exp},i})^2}} \quad (3.7.7)$$

Sollen experimentelle Fehler der RDC berücksichtigt werden, bietet sich die Verwendung des fehlergewichteten Qualitätsfaktors nach THIELE ET AL. [134] an:

$$Q_{\text{Baltzar}} = \frac{\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{D_{\text{calc},i} - D_{\text{exp},i}}{\Delta_{\text{exp},i}} \right)^2}}{\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{D_{\text{exp},i}}{\Delta_{\text{exp},i}} \right)^2}} \quad (3.7.8)$$

Allen Qualitätsfaktoren ist gemein, dass ein kleinerer Betrag für eine bessere Übereinstimmung zwischen experimentellen und zurückberechneten Daten spricht.

3.7.2 Alignmentmedien

Zur Beobachtung von RDCs ist eine anisotrope Umgebung nötig. Hierfür werden Orientierungs- oder Alignmentmedien benötigt, die nur eine schwache Orientierung auf das zu untersuchende Molekül induzieren [35]. Außerdem muss das zu untersuchende Molekül im entsprechenden Medium löslich sein. Zur Erfüllung dieser Kriterien haben sich zwei Klassen von Alignmentmedien bewährt: Lyotrop flüssigkristalline Phasen sowie gestreckte Gele [130,135].

Die Idee, Flüssigkristalle zu verwenden, wurde bereits in den ersten Beobachtungen von dipolaren Kopplungen genutzt, indem nematische Phasen von *p*-Azoxyanisol oder *p*-Butoxybenzoesäure hergestellt wurden, die aber starke Orientierung erzeugten [32,126]. Durch den Einsatz von lyotrop flüssigkristallinen Phasen konnte die Stärke der Orientierung deutlich reduziert werden. Diese Phasen basierten auf dem Lösemittel Wasser und konnten in biochemischen Fragestellungen verwendet werden. Ein bekanntes Beispiel sind die OTTING-Phasen, die aus *n*-Alkylpolyethylenglycol und *n*-Alkylalkohol bestehen [136].

Für organische Moleküle mussten aber flüssigkristalline Phasen gefunden werden, die auf organischen Lösemitteln basieren. Eines der ersten und erfolgreichen Medien ist das Homopolypeptid Poly- γ -benzyl-L-glutamat (PBLG) **38** [137–140], das durch seine Helixstruktur stäbchenförmige Mesogene bildet. Anhand von Strychnin **30** [141,142], Menthol **39** [143] und zweier Diastereomere von Dihydropyridonen [144] konnte die Anwendbarkeit dieser Phasen für organische Moleküle erstmals gezeigt werden.

Durch Verlängerung der Kettenlänge des Homopolypeptids konnte die Spektrenqualität deutlich verbessert werden [145]. Gleichzeitig konnte die kritische Konzentration, ab der eine flüssigkristalline Phase

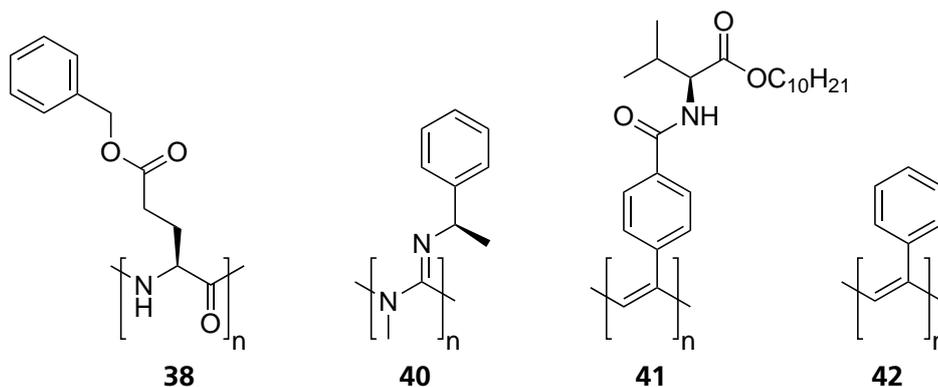


Abbildung 3.7.3: Verschiedene Alignmentmedien.

vorliegt, reduziert werden, was die Stärke der Orientierung erneut reduzierte. Dadurch konnten auch schwache enantiodifferenzierende Eigenschaften nachgewiesen werden^[146]. Ein besonderer Vorteil von PBLG ist außerdem, dass es eine Vielzahl von organischen Lösemitteln toleriert^[145,147,148].

Die Entwicklung weiterer helikal chiraler Polymere zielte vor allem auf die Verstärkung der Enantiodifferenzierung. Hier sind besonders Polyguanidine **40**^[149] und Polyacetylene **41**^[150] zu nennen. Gleichzeitig konnten so weitere Lösemittel eingesetzt werden, zum Beispiel können Polyacetylene in Toluol verwendet werden.

Als Nachteil hat sich die nicht unbegrenzte Skalierbarkeit der Orientierung erwiesen. Dies kann nur teilweise über die Konzentration des Polymers eingestellt werden. Grundsätzlich wäre möglichst schwache Orientierung zu bevorzugen, da so kleinere RDC und somit einfachere Spektren erhalten werden. Den limitierenden Faktor bildet allerdings die kritische Konzentration, sodass die minimale Orientierung nicht mehr weiter reduziert werden kann. Ist die Orientierung an der kritischen Konzentration trotzdem noch zu stark, muss das Alignmentmedium gewechselt werden. Die Senkung der kritischen Konzentration ist daher Gegenstand aktueller Forschung.

Ein weiterer Nachteil sind die in den Spektren vorhandenen Polymersignale. Auch hier wird an der Synthese längerer Polymerketten geforscht, da die Signale in Korrelationsexperimenten durch die reduzierte T_2 -Zeit verschwinden würden. Alternative Entwicklungen basieren auf der Verwendung eines komplett deuterierten Polymers, das in ^{13}C - ^1H -Experimenten unsichtbar wäre^[151,152].

Die freie Skalierung der Orientierung kann durch gestreckte Gele erreicht werden. Dazu werden Gele in einem NMR-Röhrchen so gequollen, dass der Gleichgewichtsdurchmesser des gequollenen Gels größer ist als der des Röhrchens. Während des anisotropen Quellens werden Scherkräfte erzeugt, die für anisotrope Hohlräume im Gel sorgen, welche dann die Orientierung des Analyts bewirken^[135,153].

Die Stärke des Alignments ist abhängig vom Grad der anisotropen Quellung, welcher durch den Geldurchmesser des ungequollenen Polymersticks eingestellt werden kann. Außerdem kann das anisotrop gequollene Gel nachträglich mit Hilfe eines Streckapparates weiter gestreckt oder gestaucht werden^[154–156]. Diese Methode der RDC-Messung gelang für organische Moleküle zuerst mit einem Gel aus quervernetztem Polystyrol **42**^[157]. In der Folge wurden weitere Gele entwickelt, die mit vielen organischen Lösemitteln verwendet werden können^[130,135].

Die Nachteile der Gele umfassen die langwierige Präparation, da das Quellen und das Eindiffundieren des Analyten Wochen oder gar Monate dauern kann. Die Entwicklung enantiodifferenzierender Gele ist ebenfalls schwierig und Gegenstand aktueller Forschung^[158,159].

Die Wahl des richtigen Alignmentmediums ist somit abhängig von der gewünschten Alignmentstärke, der Enantiodifferenzierung und der Kompatibilität des gewünschten Lösemittels. Durch Analyt-Alignmentmedium-Wechselwirkungen kann es zusätzlich zu Inkompatibilitäten kommen, sodass oft mehrere Versuche nötig sind, bis RDCs der gewünschten Größe erhalten werden können.

3.7.3 Der Einfluss molekularer Flexibilität

Die Betrachtungen in Abschnitt 3.7.1 gelten für starre Moleküle, für die das *isotropic tumbling* erfüllt ist, und werden als *Single Conformer Single Tensor* (SCST)-Modell bezeichnet. Im Falle von konformationeller

Flexibilität werden die RDCs, wie alle anderen NMR-Parameter, gemittelt. Es ist daher nötig, neben der Winkelinformation auch die Abstandsinformation zeitlich zu mitteln^[34–36]:

$$D_{IS} = -\frac{\mu_0 \gamma_i \gamma_S \hbar}{8\pi^2} \left\langle \frac{3\cos^2\theta_{IS} - 1}{2r_{IS}^3} \right\rangle \quad (3.7.9)$$

Dabei wird nun sowohl über die Reorientierung der Moleküle als auch über die konformationelle Flexibilität gemittelt. Zur Extraktion der strukturelevanten Parameter sind nun verschiedene Herangehensweisen möglich.

Im einfachsten Falle kann die SCST-Methode verwendet werden, die Gleichung 3.7.5 entspricht. Dies ist dann möglich, wenn trotz möglicher konformationeller Flexibilität nur ein Konformer populierte ist. Alternativ könnte die SCST-Methode auch dann eingesetzt werden, wenn nicht verschiedene Konformere, sondern nur eine gemittelte Struktur angenommen wird. Diese Näherung ist sehr grob^[36], da die so gemittelte Struktur keine physikalische Grundlage hat und somit keine Aussagen auf Strukturen und Reaktionsverläufe möglich sind, und wird dementsprechend im Rahmen dieser Dissertation nicht verwendet.

Sind verschiedene Konformere populierte, ist zur Beschreibung der Struktur die vollständige Beschreibung des gesamten Ensembles an Konformerstrukturen und deren Populationen nötig. Dazu wird jedem Konformer ein eigener SAUPE-Tensor zugeordnet, der dann mittels der Konformerpopulation gewichtet wird. Durch Aufsummierung aller Konformerpopulationen können dann die RDC-Daten erhalten werden. Dieser Ansatz wird als *Multi Conformer Multi Tensor* (MCMT)-Methode bezeichnet^[128,160–162]:

$$D_{IS} = \sum_i \sum_{a,b} p_i b_{IS} S_{ab}^i \cos \alpha_a^i \cos \alpha_b^i \quad (3.7.10)$$

Hier wird nun zusätzlich zu Gleichung 3.7.5 über alle Konformere i und deren Population p_i summiert. Außerdem sind nun p und S voneinander abhängig und somit nicht getrennt bestimmbar. Zur Lösung dieser Gleichung werden zur Beschreibung von jedem Tensor weitere Randbedingungen und jeweils fünf RDCs benötigt. Zusätzlich sind die Konformerpopulationen unbekannt. Analog zum SCST-Ansatz wird außerdem ein überbestimmtes Gleichungssystem benötigt, damit eine Aussage über die Qualität des Strukturmodells getroffen werden kann. Die vollständige Beschreibung nach der MCMT-Methode ist deshalb aufwändig.

Eine Möglichkeit zur Vereinfachung der Beschreibung ist die Annahme, dass alle Konformere durch einen gemeinsamen Tensor beschrieben werden können. Dazu müssen die Konformere zum Beispiel per ECKART-Transformation^[163] in ein gemeinsames Koordinatensystem überführt werden^[128,164]. Unter der Randbedingung, dass entweder die Umwandlung der Konformere ineinander schnell im Vergleich zur Reorientierung ist oder die Strukturen sehr ähnlich sind und somit eine identische Orientierung angenommen werden kann, kann ein gemeinsamer Alignmenttensor für alle Konformere genutzt werden (*Multi Conformer Single Tensor* (MCST)-Modell)^[161,164]:

$$D_{IS} = \sum_i \sum_{a,b} p_i b_{IS} S_{ab} \cos \alpha_a^i \cos \alpha_b^i \quad (3.7.11)$$

Ist der Austausch dagegen langsam oder gleich schnell wie die Reorientierung, ist dieser Ansatz nicht möglich, sodass auf das MCMT-Modell zurückgegriffen werden muss.

Im Falle kleiner organischer Moleküle ist die Reorientierung auf der Zeitskala der Umwandlungsgeschwindigkeit der Konformere. Die Gültigkeit des MCST-Ansatzes ist somit fraglich, es muss geprüft werden, ob der MCMT-Ansatz nötig ist^[165]. Problematisch ist hierbei aber, dass pro Tensor fünf RDCs benötigt werden, was im Falle von vielen möglichen Konformeren dazu führen kann, dass nicht genug RDCs bestimmt werden können. Besonders die oft unbekannt Konfiguration vergrößert den zu prüfenden Konformationsraum erheblich.

Ist es möglich, Teile des Moleküls als einzelne (stereogene) Domänen zu beschreiben, kann die Methode der lokalen Tensoren^[166] zielführend sein. Dazu werden für die einzelnen Domänen Tensoren bestimmt, deren Orientierung zueinander anschließend geprüft wird. Im Falle der korrekten Beschreibung der Domänen sollten die Orientierungen der lokalen Tensoren gleich sein. So können stereogene Domänen miteinander in Beziehung gesetzt werden, zwischen denen keine signifikante Wechselwirkung existiert.

3.7.4 Anwendungsbeispiele

Die einfachste Beschreibung von RDCs ist im Falle gleich langer, paralleler Bindungen in starren Molekülen möglich, da sich für diese aus Gleichung 3.7.2 exakt der gleiche Wert für D ergibt. Die Unterscheidung zwischen parallelen und nicht-parallelen Bindungen ist somit durch Vergleich von D der verschiedenen Bindungen möglich. So gelang es, für das Dihydropyridon zwischen der fast parallelen Situation (**43**) und der nicht parallelen Anordnung (**44**) zu unterscheiden^[144] (siehe Abbildung 3.7.4). Diese Unterscheidung ist durch keinen anderen Parameter möglich. Die Bindungswinkel entlang des Kopplungspfad zwischen den beiden fraglichen CH-Bindungen sind identisch, somit ist keine Analyse von J_{HH} -Kopplungskonstanten möglich. Die An- oder Abwesenheit eines NOE hätte das Problem ebenfalls nicht eindeutig gelöst. Obwohl die Struktur des Dihydropyridons sehr einfach aussieht, sorgt der Abstand der beiden aufzuklärenden Stereozentren für ein komplexes Problem. Zusätzlich wurde diese Analyse durch Vorhersage der *Single-Tensor-Elemente* bestätigt, indem alle erhaltenen RDC mit den beiden Strukturvorschlägen verglichen wurden^[144].

Die SCST-Methode ist für starre Moleküle oft erfolgreich. So konnte an zwei weiteren Testmolekülen Strychnin **30**^[141,142] und Menthol **39**^[143] die Anwendbarkeit dieser Vorgehensweise durch Zuordnung diastereotoper Protonen demonstriert werden (siehe Abbildung 3.7.4).

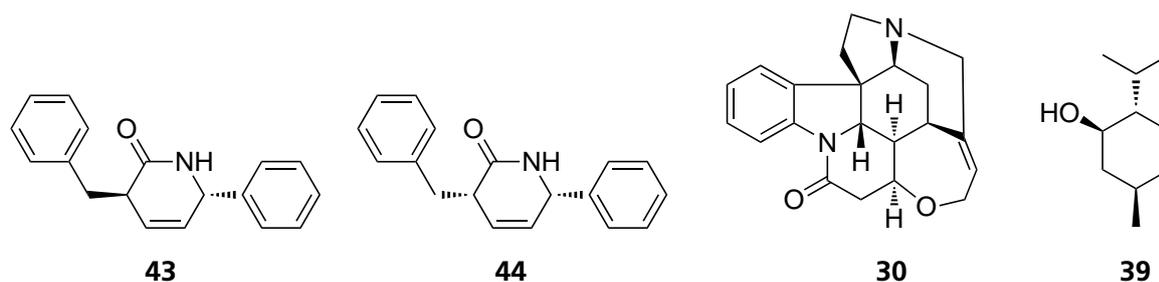


Abbildung 3.7.4: Die RDC-Analyse wurde an diesen Testmolekülen erprobt.

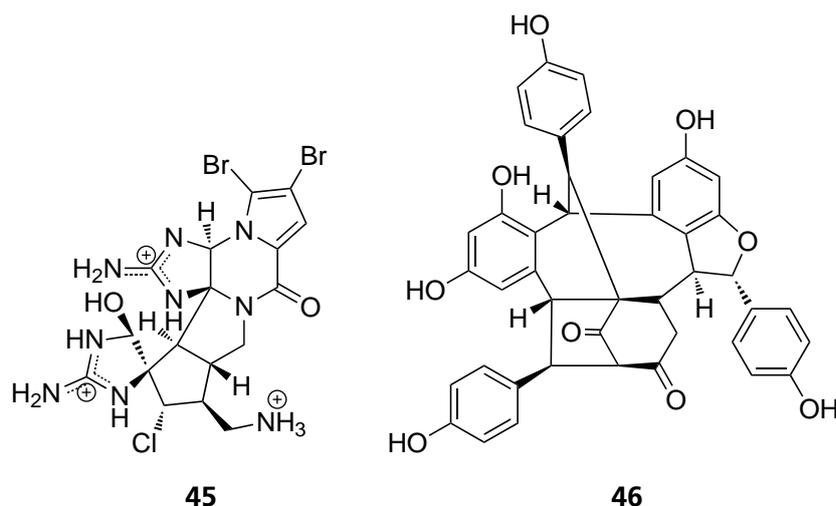


Abbildung 3.7.5: Zwei Beispiele zur Relativkonfigurationsaufklärung starrer Moleküle mit der SCST-Methode.

Die besondere Stärke der RDC-Analyse per SCST-Methode liegt darin, dass für starre Moleküle die Relativkonfiguration aller Stereozentren gleichzeitig bestimmt werden kann. Der Naturstoff Dibromopalau'amin **45**^[167] und das pharmakologisch aktive Vatiparol **46**^[168] sind zwei außergewöhnlich komplexe Beispiele für diese Stärke (siehe Abbildung 3.7.5). Die Analyse per KARPLUS-Kurve oder NOE-Daten scheiterte am geringen Protonierungsgrad der zentralen Strukturelemente und an den großen Distanzen zwischen den jeweils acht Stereozentren. Darauf aufbauend gelang in beiden Fällen eine Aufklärung der Absolutkonfiguration durch Kombination mit chiroptischen Methoden.

Weist ein Molekül Strukturelemente auf, die konformationelle Flexibilität ermöglichen, so muss diese korrekt beschrieben werden. Der einfachste Fall ist, wenn trotz möglicher Flexibilität nur ein Konformer populiert ist. Dann kann weiterhin der SCST-Ansatz verwendet werden. Dieser Ansatz war beim schon in Abschnitt 3.5.3 erwähnten Archazolid A **33** erfolgreich, sodass von einer einzigen Vorzugsausrichtung ausgegangen werden kann^[112] (siehe Abbildung 3.7.6).

Der SCST-Ansatz war auch für das 4,6-Diacetylhygrophoron A¹² **47** erfolgreich^[169] (siehe Abbildung 3.7.6). Die Strukturaufklärung dieses Moleküls erwies sich als herausfordernd, da nur wenige Kopplungen

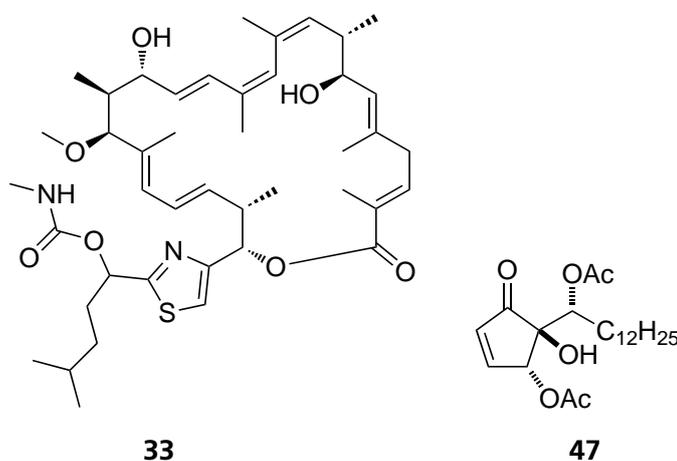


Abbildung 3.7.6: Zwei Beispiele zur Relativkonfigurationsaufklärung mit der SCST-Methode.

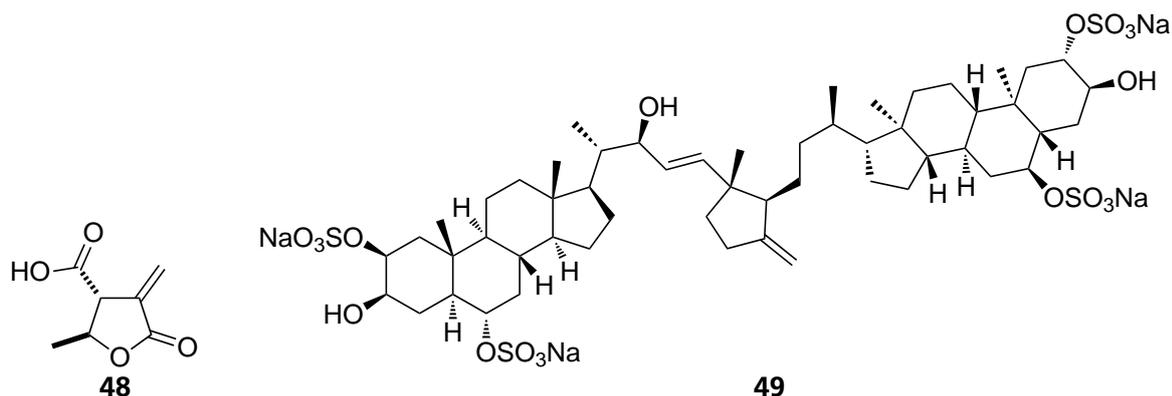


Abbildung 3.7.7: Zwei mittels der MCMT-Methode aufgeklärte Moleküle.

im Fünfring zur Verfügung standen. Dabei erwies sich die Bindung zum exocyclischen Stereozentrum aufgrund einer Wasserstoffbrücke als starr, sodass keine konformationelle Flexibilität berücksichtigt werden musste.

Liegen mehrere Konformere vor, müsste theoretisch die MCMT-Methode angewandt werden, die für jedes Konformer einen eigenen Tensor und somit jeweils mindestens fünf RDCs benötigt. Derart viele RDCs liegen selten vor, daher sind in der Literatur nur zwei Beispiele bekannt, bei denen diese Methode erfolgreich angewendet wurde: α -Methylen- γ -butyrolacton **48**^[134] und Fibrosterolsulfat A **49**^[170] (siehe Abbildung 3.7.7).

Dass die Relativkonfiguration des α -Methylen- γ -butyrolactons **48** nicht mit NOE- oder KARPLUS-Daten aufgeklärt werden konnte, erscheint ungewöhnlich, da das Strukturaufklärungsproblem zunächst nicht komplex erscheint. Allerdings liefert die Messung der $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstante keine eindeutige Aussage, und die Abstandsbestimmung per NOE scheiterte an Signalüberlapp mit Zersetzungsprodukten des α -Methylen- γ -butyrolactons **48**. Für Fibrosterolsulfat A **49** besteht die Komplexität des Moleküls dagegen darin, zwei Molekülteile über eine große Distanz in Beziehung zu setzen. Dieses Problem konnte nicht allein mit NOE-Daten gelöst werden, diese wurden aber unterstützend zur RDC-Analyse verwendet^[170].

Die meisten Analysen flexibler kleiner organischer Moleküle beschränken sich aufgrund mangelnder RDC-Anzahl erzwungenermaßen auf den MCST-Ansatz. Dieser liefert für α -Methylen- γ -butyrolacton **48** und Fibrosterolsulfat A **49** ebenfalls korrekte Ergebnisse. Es ist aber unklar, ob dies auch für andere, flexiblere Moleküle gilt. Die Anwendbarkeit und die Grenzen der MCST-Methode ist daher Gegenstand aktueller Forschung^[165].

Ein weiteres Beispiel für die erfolgreiche Anwendung der MCST-Methode ist Salsolidinhydrochlorid **50**^[171], dessen Sechsring in zwei Konformationen vorliegen kann (siehe Abbildung 3.7.8). Der Palladiumkomplex **51** wurde ebenfalls durch MCST-Analyse aufgeklärt^[172] (siehe Abbildung 3.7.8). Dabei wurden NOE-Daten unterstützend genutzt, allerdings waren nur wenige NOE-Kontakte sichtbar. Besonders herausfordernd war neben der konformationellen Flexibilität die Synthese und zersetzungsfreie Untersuchung des Komplexes. Außerdem wurde die an α -Methylen- γ -butyrolacton **48** entwickelte Methode der lokalen Tensoren^[166] als Kreuzvalidierung genutzt^[172].

Die MCST-Methode führt aber nicht immer zur Aufklärung der Konformation. Im Falle des Triazols **52** gelang es trotz umfangreicher RDC-Studien und Zuhilfenahme von NOE-Kontakten nicht, ein alle experimentellen Daten erklärendes Ensemble an Konformeren zu identifizieren^[173] (siehe Abbildung

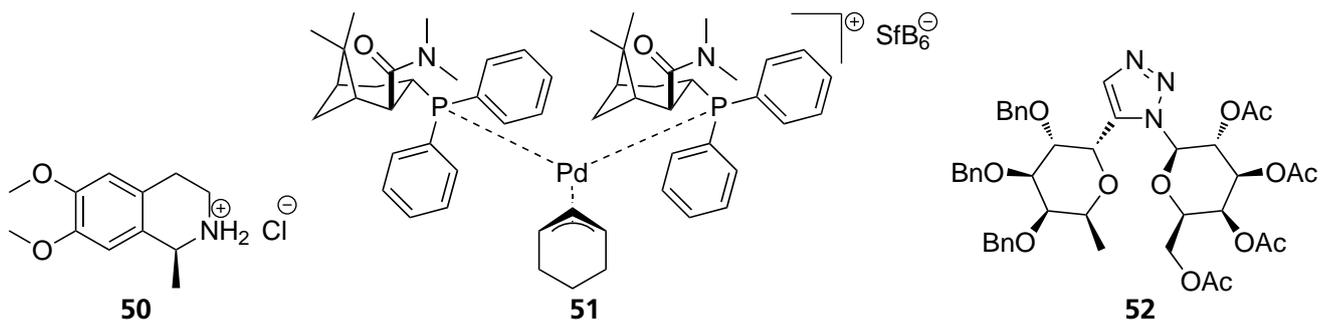


Abbildung 3.7.8: Drei mittels der MCST-Methode analysierte Moleküle.

3.7.8). Eine eindeutige Beschreibung des Systems scheiterte letztlich daran, dass zu wenig signifikante RDC-Daten erhalten werden konnten, sodass die konformationelle Flexibilität nicht umfassend beschrieben werden konnte.

Für diese Dissertation zeigen die in diesem Abschnitt gezeigten ausgewählten Beispiele, dass die RDC-Auswertung per SCST für starre Moleküle Relativkonfigurationsinformationen liefern kann. Außerdem können sowohl per MCMT als auch per MCST Relativkonfigurationen und Konformationen flexibler Moleküle aufgeklärt werden. Als großer Vorteil der RDC-Analyse erweist sich, dass auch Molekülteile zueinander in Beziehung gesetzt werden können, die weit entfernt voneinander sind. Die Grenze der Methode wird aber erreicht, wenn nur wenig experimentelle RDC zugänglich sind. Dies führt besonders im Falle umfangreicher konformationeller Flexibilität zu Problemen, die manchmal durch eine kombinierte Auswertung von RDC- und NOE-Daten gelöst werden können. Die Komplementarität dieser beiden Methoden herauszuarbeiten ist ein Ziel dieser Dissertation.

4 Ergebnisse

In Kapitel 3 wurden die Stärken und Schwächen der verschiedenen NMR-Parameter zur Bestimmung von Konstitution, Konfiguration und Konformation dargestellt. Somit ist es von entscheidender Bedeutung, die richtige Methode auszuwählen, um erfolgreich Strukturen aufzuklären und Reaktionsverläufe zu untersuchen. Die molekulare Flexibilität ist der wichtigste Parameter zur Wahl der passenden Methode. Daher müssen die zu untersuchenden Moleküle entsprechend ihrer Flexibilität klassifiziert werden. Hierzu bietet sich eine Einteilung in die Kategorien der starren Moleküle (auf der NMR-Zeitskala keine Umwandlung von Konformeren ineinander), des langsamen und des schnellen Austausches (siehe dazu Kapitel 3.6 sowie Fußnote 3).

4.1 Einteilung nach molekularer Flexibilität

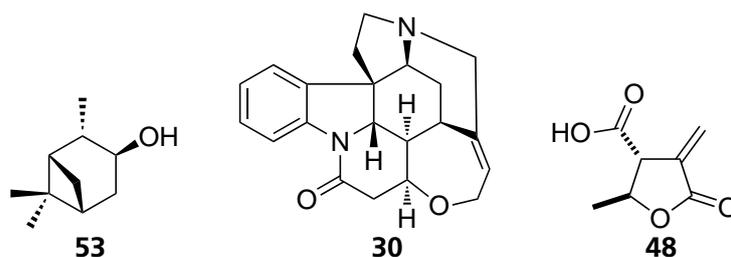
Die in der vorliegenden Dissertation zu untersuchenden Moleküle werden wie folgt unterteilt: Das 2,3-Dimethylnaphtho[2,3-g]chinoxalin **13** und dessen Zersetzungsprodukte sowie der FAST-BLUE-Vorläufer **1** werden als starr angenommen. Für Dimethyldithienylcyclopenten **14**, das Tetrapeptid **22** sowie die Diamide **2-5** ist dagegen von konformationeller Flexibilität im schnellen Austausch auszugehen. Die flexiblen Bis-NHC-Komplexe **18-21** sollen im Regime des langsamen Austausches untersucht werden. Die Richtigkeit der Unterteilung in diese Bewegungsregimes wird in den jeweiligen Kapiteln überprüft. Dabei ist zu beachten, dass ein scharfes Signal sowohl von einem einzelnen Konformer in einem starren Molekül als auch von einem Ensemble an Konformeren im schnellen Austausch erzeugt werden kann.

Im Falle des starren 2,3-Dimethylnaphtho[2,3-g]chinoxalins **13** soll der Mechanismus und die Geschwindigkeit der Zersetzung untersucht werden. Daher ist vor allem die Konstitution der Zersetzungsprodukte von Interesse, weshalb zuerst eine komplette Zuordnung aller auftretenden Signale nötig ist. Dies wird durch Aufnahme von HSQC- und HMBC-Spektren und den Vergleich mit berechneten chemischen Verschiebungen gewährleistet. Die Geschwindigkeit der Zersetzung wird anhand von zeitabhängigen ^1H -Spektren beurteilt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen finden sich in Abschnitt 4.2.1.

Für den FAST-BLUE-Vorläufer **1** soll die Konstitution des gebildeten Produktes aufgeklärt werden. Dazu werden 2D-Korrelationsexperimente aufgenommen. Außerdem wird erneut ein Vergleich der experimentellen und berechneten chemischen Verschiebungen durchgeführt. Diese Aufklärung wird in Abschnitt 4.2.2 dargestellt.

Die Fragestellungen der flexiblen Moleküle umfassen Konfiguration und Konformation, aber keine Konstitutionsaufklärung. Zu deren vollständiger Beschreibung kommen die aus der KARPLUS-Kurve, dem NOE und den RDC extrahierbaren Informationen in Betracht. Diese Methoden sollten sich komplementär verhalten, sodass jede Methode zusätzliche Informationen über das System beinhaltet und somit zum Verständnis beiträgt. Besonders wichtig ist hierbei, dass die Daten in ausreichend hoher Genauigkeit extrahiert und die durch konformationelle Flexibilität erzwungenen Mittelungsprozesse korrekt beschrieben werden.

Dazu sind Voruntersuchungen notwendig. Die Genauigkeit der Extraktion von Kopplungskonstanten und damit von RDC-Daten ist ausbaufähig. Hier werden am starren Molekül (+)-Isopinocampheol **53**



Methoden evaluiert, die durch Unterdrückung von homonuklearen Kopplungen Multiplettstrukturen vereinfachen und Linienbreiten reduzieren. Im Abschnitt 4.2.3 werden diese Methoden diskutiert.

Die Extraktion von genauen Abständen aus NOE-Daten (siehe Abschnitt 3.5.3) wird ebenfalls evaluiert. Zur Beschreibung konformationeller Flexibilität wird eine Software entwickelt, die korrekt gemittelte Abstände und experimentelle Abstände vergleicht. Beides wird an Strychnin **30** erprobt, da dieses Molekül nur sehr geringe Flexibilität aufweist. Der unterschiedliche Informationsgehalt von NOE- und RDC-Daten wird anschließend zusätzlich zu Strychnin **30** an α -Methylen- γ -butyrolacton **48** ausgewertet, da für dieses Molekül umfassende RDC-Studien vorliegen (siehe Abschnitt 3.7.4). Dabei erfolgte die korrekte Beschreibung konformationeller Flexibilität aus RDC-Daten mit der Software *RDC@hotFCHT*^[165]. Diese Untersuchungen werden in Kapitel 4.3.1 beschrieben.

Anschließend werden die so erprobten Methoden auf Dimethyldithienylcyclopenten **14**, das Tetrapeptid **22** sowie die Diamide **2-5** angewendet. Diese werden nach zunehmender Flexibilität geordnet. Ausgehend vom wenig flexiblen Strychnin **30**, das bei bekannter Konfiguration einen flexiblen Siebenring aufweist, über α -Methylen- γ -butyrolacton **48**, das bei ursprünglich unbekannter Konfiguration zusätzlich zum flexiblen Fünfring rotierbare Methylgruppen trägt, über das mit einem flexiblen Fünfring und einer⁷ frei rotierbaren Bindung ausgestattete pseudo-symmetrische Dimethyldithienylcyclopenten **14**, folgen zwei frei rotierbare Bindungen und unbekannte Konfigurationen in den Diamiden **2-5** und abschließend viele frei rotierbare Bindungen im Tetrapeptid **22**. Die zugehörigen Ergebnisse werden in den Kapiteln 4.3.2 bis 4.3.4 dargestellt.

Die entwickelte Methode der exakten Quantifizierung von Signalen in NOE-Spektren wird dann auf die Bis-NHC-Komplexe **18-21** übertragen. Dort wird zuerst der Bereich des langsamen Austausches identifiziert. Anschließend werden die Austauschsignale untersucht, um einen Rückschluss auf die Reaktivität der Katalysatoren ziehen zu können. Die Ergebnisse finden sich in Abschnitt 4.4.

⁷ Formal besitzt das pseudo-symmetrische Dimethyldithienylcyclopenten **14** zwei frei rotierbare Bindungen, die aber aufgrund der Pseudo-Symmetrie als eine Bindung klassifiziert werden.

4.2 Starre Moleküle

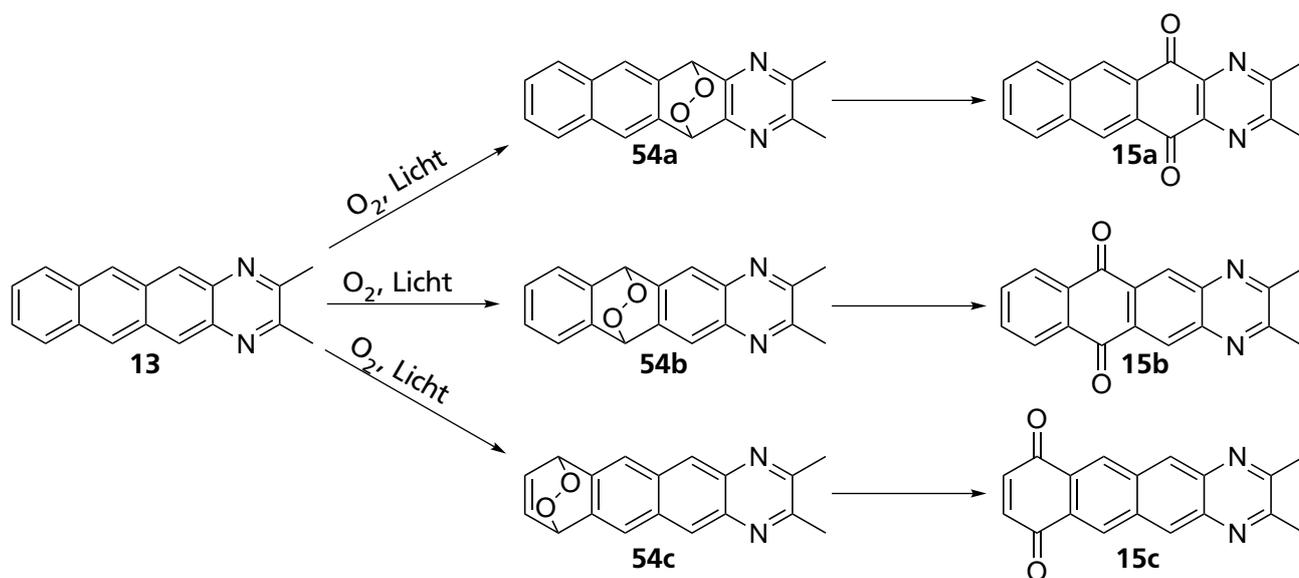
4.2.1 Aufklärung des Photozersetzungsmechanismus zweier N-Heterotetracene

Der Inhalt dieses Abschnitts ist zur Veröffentlichung eingereicht:
N. Kolmer-Anderl, A. Kolmer, C. M. Thiele, M. Rehahn, *Chem. Eur. J.*, zur Veröffentlichung eingereicht.

2,3-Dimethylnaphtho[2,3-g]chinoxalin **13** ist ein Vertreter der Klasse der Naphtho[2,3-g]chinoxaline, die von KOLMER-ANDERL und REHAHN als funktionale Binder in anorganisch-organischen Feldeffekttransistoren entwickelt wurden^[44]. Das LUMO-Energieniveau dieser Molekülklasse kann durch die variablen Substitutionen (im Falle von **13** entsprechen die Substituenten zwei Methylgruppen) variiert und somit idealerweise an die Leitungsbandkante des anorganischen Partners angepasst werden. Außerdem bietet sie dank ihrer Löslichkeit in organischen Lösemitteln die Möglichkeit, durch Druckprozesse verarbeitet zu werden.

Zur Verwendung der Verbindungen in Feldeffekttransistoren ist es wichtig, dass sie zersetzungstabil gegenüber Licht sind. Die Verarbeitung durch Druckprozesse fordert weiterhin eine Stabilität gegenüber Sauerstoff in Lösung. Es soll daher anhand des für die Molekülklasse der Naphtho[2,3-g]chinoxaline beispielhaften 2,3-Dimethylnaphtho[2,3-g]chinoxalins **13** herausgefunden werden, ob und wie eine Zersetzung unter Einfluss von Licht und Sauerstoff stattfindet.

Analog zu Tetracen^[174] kann angenommen werden, dass 2,3-Dimethylnaphtho[2,3-g]chinoxalin **13** entweder einer Oxidation über die Peroxide **54** zu den Chinonen **15** unterliegt (siehe Schema 4.2.1). Alternativ ist eine [4+4]-Cycloaddition denkbar^[175,176], deren Produkte die Dimere **55** darstellen (siehe Abbildung 4.2.1).



Schema 4.2.1: Mögliche Photooxidation von 2,3-Dimethylnaphtho[2,3-g]chinoxalin **13**.

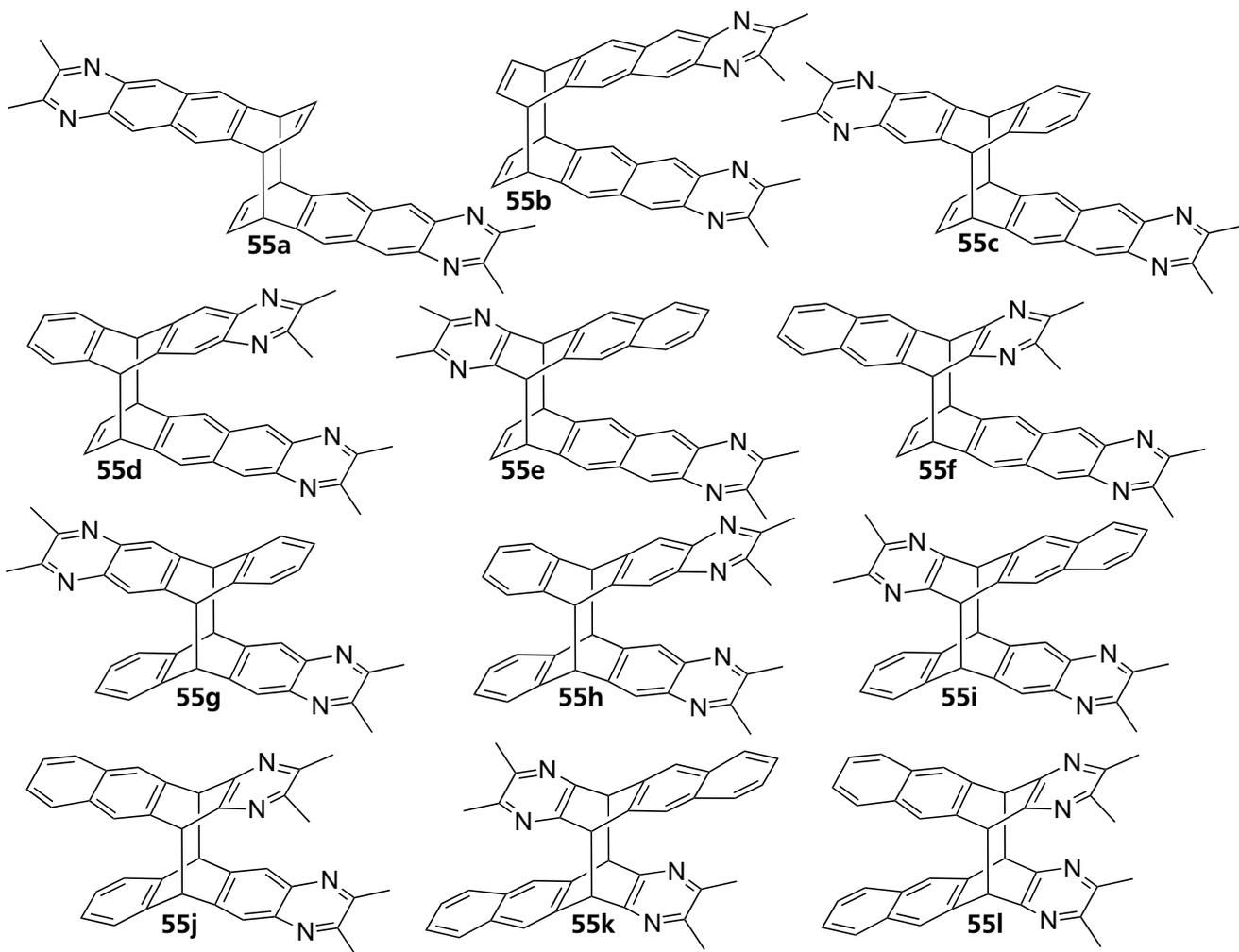


Abbildung 4.2.1: Mögliche Dimerisierungsprodukte von 2,3-Dimethylnaphtho[2,3-g]chinoxalin **13**.

Sowohl **13** als auch die Zersetzungsprodukte sind als starr anzusehen. Aufgrund der Spiegelsymmetrie sowie des geringen Protonierungsgrades der Verbindungen ist davon auszugehen, dass nur wenige strukturaufklärungsrelevante Informationen erhalten werden können. Daher wird die Frage der Konstitution der Zersetzungsprodukte durch Kombination der Aufnahme von HMBC-Spektren und der Berechnung chemischer Verschiebungen untersucht.

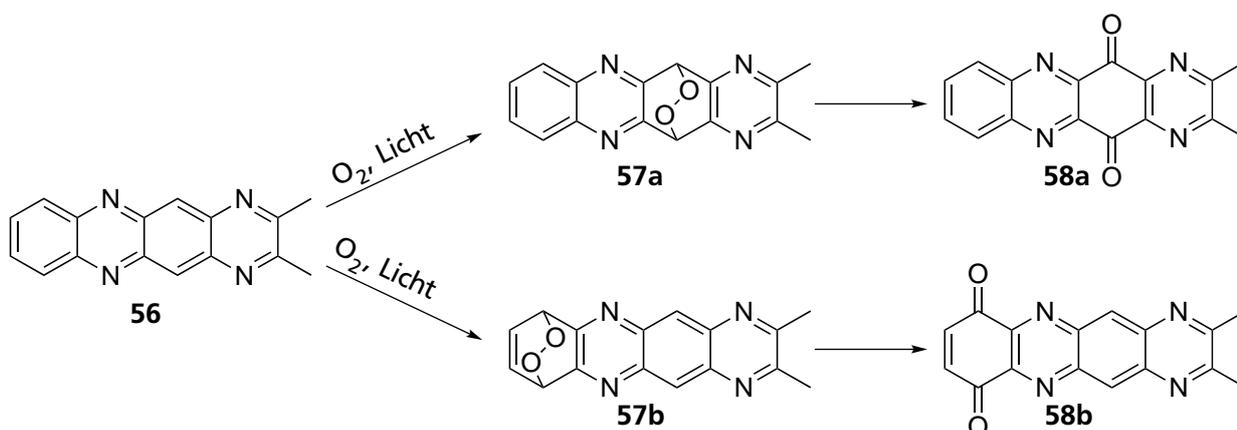
2,3-Dimethylnaphtho[2,3-g]chinoxalin **13** wurde in THF- d_8 gelöst, das NMR-Röhrchen verschlossen und die Lösung mit einer Glühbirne (100 W) bestrahlt. Nach jeweils einer Stunde Bestrahlung wurden ^1H -Spektren aufgenommen, die zeigten, dass eine Zersetzung stattfindet. Nach fünf Stunden sind keine Signale von **13** mehr sichtbar. Außerdem erscheinen neue Signale, die durch Aufnahme von HSQC- und HMBC-Spektren nach vier Stunden Bestrahlungszeit und Vergleich mit berechneten chemischen Verschiebungen den Peroxiden **54a** und **54b** zugeordnet werden konnten. Im weiteren Verlauf der Bestrahlung erscheinen auch Signale der Chinone **15a** und **15b**. Der Hauptzersetzungsprozess wird dabei durch **54b** und **15b** dargestellt.

Durch Verschließen einer Probe unter Vakuum konnte eine sauerstofffreie Lösung hergestellt werden. Erneut wurden ^1H -Spektren aufgenommen, in denen jedoch keine Oxidation mehr zu erkennen ist.

Stattdessen erschienen Signale, die durch Vergleich mit berechneten chemischen Verschiebungen den Dimeren **55g-55i** zugeordnet wurden.

Aus diesen Untersuchungen konnten zwei Rückschlüsse gezogen werden: Erstens ist eine Unterdrückung der Chinonbildung durch sauerstofffreie Verarbeitung von **13** möglich. Zweitens ist die reaktivste Position von **13** diejenige, deren Reaktion zu **54b** und **15b** führt.

Zur Blockierung dieser reaktivsten Position wurden daher von KOLMER-ANDERL weitere Stickstoffatome an Stelle der reaktivsten CH-Gruppe in das Molekülgerüst eingeführt. Dies führt zur Klasse der Pyrazino[2,3-*b*]phenazine^[177], und gleichzeitig zu einer weiteren Absenkung der LUMO-Energieebenen. Auch diese Klasse wurde auf Zersetzungsreaktionen untersucht. Dies geschah an 2,3-Dimethylpyrazino[2,3-*b*]phenazin **56**. Für **56** sind erneut sowohl Oxidationsreaktionen zu den Peroxiden **57** und den Chinonen **58** (siehe Schema 4.2.2) als auch [4+4]-Cycloadditionen zu den Dimeren **59** (siehe Abbildung 4.2.2) als Zersetzungsmechanismen denkbar.



Schema 4.2.2: Mögliche Photooxidation von 2,3-Dimethylpyrazino[2,3-*b*]phenazin **56**.

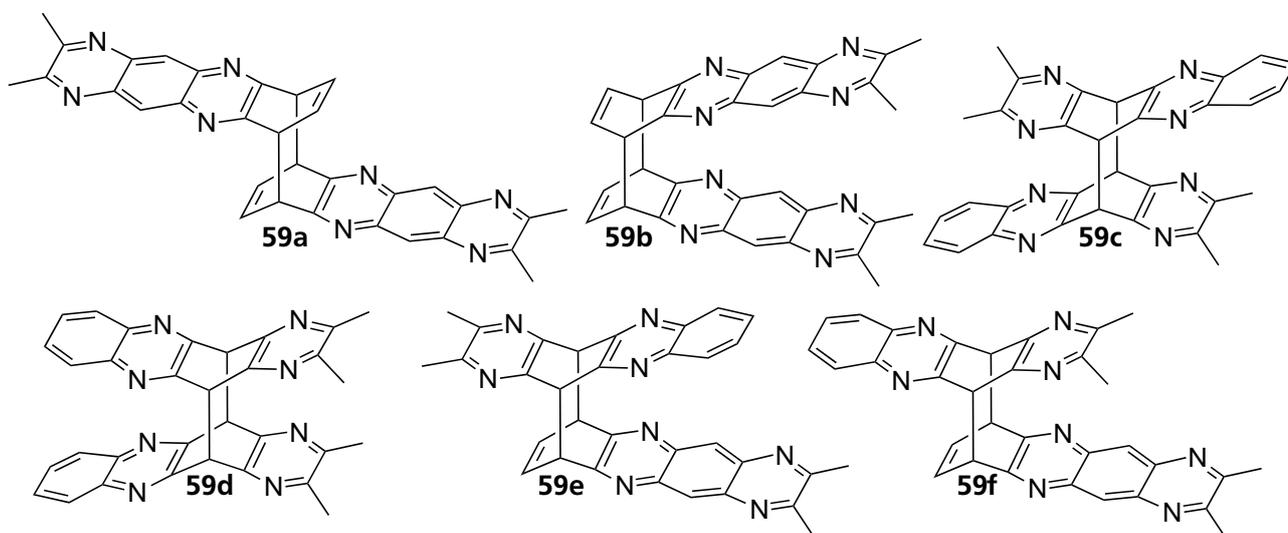


Abbildung 4.2.2: Mögliche Dimerisierungsprodukte von 2,3-Dimethylpyrazino[2,3-*b*]phenazin **56**.

Aufgrund der geringen Löslichkeit von **56** in THF- d_8 konnten die Zersetzungsprodukte der Bestrahlung nicht aufgeklärt werden. Es zeigte sich aber, dass die Zersetzung deutlich langsamer stattfindet, da nach 20 Stunden Bestrahlungszeit noch signifikante Mengen von **56** vorhanden waren.

Zur Aufklärung der Zersetzungsprodukte wurde 2,3-Dimethylpyrazino[2,3-*b*]phenazin **56** daher auch in $CDCl_3$ gelöst. Die Zersetzung findet darin noch langsamer als in THF- d_8 statt, nach 61 Stunden sind noch ca. 45% von **56** vorhanden. Außerdem können die Zersetzungsprodukte zugeordnet werden. Erneut bildet sich zuerst das Peroxid **57a**, allerdings in deutlich geringeren Mengen als im Falle des 2,3-Dimethylnaphtho[2,3-*g*]chinoxalins **13**. Die Weiterreaktion zu Chinon **58a** kann ebenfalls beobachtet werden, ist aber ebenfalls deutlich langsamer als zuvor. Gleichzeitig finden sich Signale, die durch Vergleich mit berechneten chemischen Verschiebungen den Dimeren **59c** und **59d** zugeordnet werden konnten.

Zusammenfassend konnten die Zersetzungsmechanismen von 2,3-Dimethylnaphtho[2,3-*g*]chinoxalin **13** unter Lichteinfluss bei Sauerstoffan- und -abwesenheit aufgeklärt werden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Einführung zweier zusätzlicher Stickstoffatome die Oxidationsempfindlichkeit von 2,3-Dimethylpyrazino[2,3-*b*]phenazin **56** im Vergleich zu 2,3-Dimethylnaphtho[2,3-*g*]chinoxalin **13** deutlich reduziert, sodass auch unter Sauerstoffatmosphäre verarbeitet werden kann. Gleichzeitig zur erhöhten Stabilität konnte von KOLMER-ANDERL auch gezeigt werden, dass die LUMO-Energieniveaus abgesenkt werden, was für die Verwendung der Molekülklasse in organischen Feldeffekttransistoren vorteilhaft ist.

Im Rahmen dieser Dissertation ist von Bedeutung, dass die Berechnung von ^{13}C -chemischen Verschiebung in Kombination mit HMBC-Experimenten zur erfolgreichen Aufklärung der Konstitution der starren Zersetzungsprodukte führte. Nur durch die komplementäre Nutzung dieser beiden Parameter konnte dieses Problem gelöst werden.

Im nächsten Abschnitt wird daher versucht, eine Konstitutionsaufklärung durch erneute Kombination der Berechnung von ^{13}C -chemischen Verschiebungen mit 2D-Korrelationsexperimenten durchzuführen.

Abdruckerlaubnis erteilt:

N. Kolmer-Anderl, A. Kolmer, C. M. Thiele, M. Rehahn, *Chem. Eur. J.*, zur Veröffentlichung eingereicht. Copyright © Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Exploration of photodegradation mechanism of naphtho[2,3-*g*]quinoxalines and pyrazino[2,3-*b*]phenazines

Nicole Kolmer-Anderl,^a Andreas Kolmer^b, Christina M. Thiele^{*b} and Matthias Rehahn^{*a}

Abstract: Nitrogen containing polycyclic aromatic hydrocarbons are very attractive compounds for organic electronics applications. Their low lying LUMO energies points towards a potential use as n-type semiconductors. Furthermore they are expected to be more stable under ambient conditions, which is very important for the formation of semiconducting films, where materials with high purity are needed. In this study the syntheses of naphtho[2,3-*g*]quinoxalines and pyrazino[2,3-*b*]phenazines is presented using reaction conditions, that provide the desired products in high yields, high purity and without time-consuming purification steps. HOMO and LUMO energies of the compounds are investigated by cyclic voltammetry and UV-VIS spectroscopy and their dependency on nitrogen content and the terminal substituents are examined. The photostability and degradation mechanisms of the naphtho[2,3-*g*]quinoxalines and pyrazino[2,3-*b*]phenazines are explored by NMR spectroscopy of irradiated samples affirming the large influence of nitrogen atoms in the acene core on the degradation process during the irradiation. Finally by identifying the degradations products of 2,3-dimethylnaphtho[2,3-*g*]quinoxaline it is possible to track down the most reactive position in the compound and, by blocking this position with nitrogen, to strongly increase the photostability.

Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons like tetracene and pentacene and their derivatives are of special interest due to their big potential as semiconductors in organic electronic applications like organic field effect transistors (OFETs)¹. Especially pentacene as excellent p-type semiconductor and its derivatives are well studied also in terms of reducing LUMO energies by adding electron withdrawing substituents to generate n-type semiconductors². But compared to the number of known

organic p-type semiconductors only few organic semiconductors with n-type behaviour and good transistor properties are known, although they are needed to create, for example, complementary electronic circuits³.

Unfortunately polycyclic aromatic hydrocarbons are also known for the photochemical reactions they undergo during irradiation. On the one hand endoperoxide formation is reported for pentacene and tetracene and several derivatives when irradiated in the presence of oxygen⁴. On the other hand dimerization occurs during irradiation without oxygen⁵. However this reactivity especially of soluble pentacene and tetracene derivatives is a disadvantage in terms of organic field effect transistor applications were highly purified materials are needed to achieve good performances. Hence the sensibility towards oxidation of these compounds is a disadvantage with regard to the fabrication of stable organic field effect transistors, especially since quinone compounds are known to act as electronic traps⁶. That is why new organic semiconductors with an increased durability towards photooxidation and low lying LUMO energies, that are suitable for n-type semiconductor applications, are needed. For this reason nitrogen containing acenes are one focus of current research⁷.

Theoretical studies have already shown that increasing the number of nitrogen atoms in the acene core is an efficient tool to increase electron affinity which is advantageous for stable n-type behaviour of organic semiconductors⁸. In addition these materials exhibit low LUMO energies which are necessary for n-type semiconductors, too. Furthermore there are several representatives that show good n-type properties in OFET applications⁹. UV-VIS measurements indicate that the nitrogen atoms increase the stability of acenes towards the undesirable oxidation process due to its higher electron affinity^{9,10}.

In this paper we report the synthesis of naphtho[2,3-*g*]quinoxalines and pyrazino[2,3-*b*]phenazines and investigate the influence of nitrogen content in the tetracene core on the LUMO energies and the stability towards photooxidation. For this purpose the degradation process is studied by NMR spectroscopy and chemical shifts of products and intermediates are calculated to verify the proposed decomposition mechanism.

Results and discussion

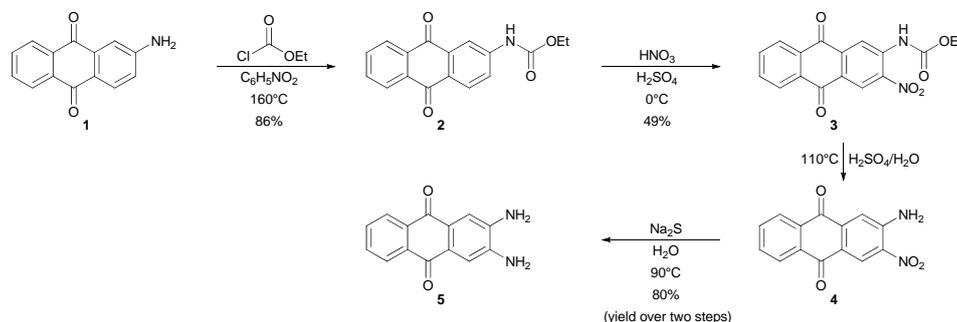
Synthesis

The synthesis of naphtho[2,3-*g*]quinoxalines **7a-f** is shown in schemes 1 and 2. Starting from 2-aminoanthraquinone **1**, 2,3-diaminoanthraquinone **5** was prepared according to the literature procedure of Schaarschmidt

[a] Dr. N. Kolmer-Anderl, Prof. Dr. M. Rehahn
Ernst-Berl-Institut für Technische und Makromolekulare Chemie,
Technische Universität Darmstadt,
Alarich-Weiss-Straße 4,
D-64287 Darmstadt, Germany
Email: M.Rehahn@MC.tu-darmstadt.de

[b] Andreas Kolmer, Prof. Dr. C. M. Thiele
Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie,
Technische Universität Darmstadt,
Alarich-Weiss-Straße 4,
D-64287 Darmstadt, Germany
Email: Cthiele@thielelab.de

Supporting information for this article is given via a link at the end of the document.



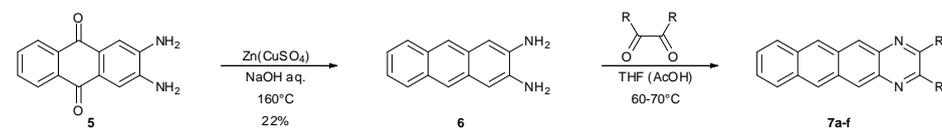
Scheme 1 Synthesis of 2,3-diaminoanthraquinone **5** according to Schaarschmidt and Leu¹¹.

and Leu¹¹ (scheme 1). The reduction of 2,3-diaminoanthraquinone **5**, first reported by Clark¹², was modified by using zinc powder, which was activated with an aqueous copper sulphate solution to ensure complete conversion of **5** (scheme 2). Finally the naphtho[2,3-*g*]quinoxalines **7a-f** were synthesized from 2,3-diaminoanthracene **6** and the corresponding 1,2-diketone (scheme 2). Except for 1,2-butandione, acetic acid was used as catalyst in the final step of this reaction. Compared to the reaction conditions described by Shitagaki et al.¹³ for the synthesis of phenyl substituted naphtho[2,3-*g*]quinoxalines, the selected conditions allow a drastic reduction of reaction time from 24 hours to 20-50 minutes. In addition the work up of the reaction mixture is much easier as purification by column chromatography can be avoided, because the raw products can easily be crystallized from toluene (**7c-f**) or precipitate directly from the reaction mixture (**7a/b**). With this method very good yields can be achieved. The results for the derivatives **7a-f** are listed in table 1.

Table 1 Reaction conditions for the synthesis of the naphtho[2,3-*g*]quinoxaline derivatives **7a-f**.

R	AcOH	Temperature [°C]	Time [min]	Yield [%]
a) CH ₃	no	65	20	69
b) CH ₂ Br	yes	70	20	90
c) C ₆ H ₅	yes	70	30	88
d) C ₆ H ₄ F	yes	70	20	36
e) C ₆ H ₄ Br	yes	60	20	96
f) C ₆ H ₄ OCH ₃	yes	76	50	77

Pyrazino[2,3-*b*]phenazines **9a-e** were synthesized in analogy to the protocol reported by Armer et al.¹⁴. 2,3-diaminophenazine **8** was reacted with the appropriate 1,2-diketone (see scheme 3) but in contrast to their



Scheme 2 Synthesis of naphtho[2,3-*g*]quinoxalines **7a-f**. The reaction conditions and yields for the last step are given in table 1.

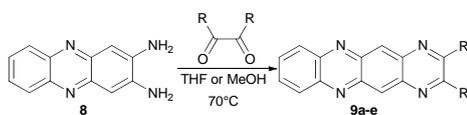
protocol, tetrahydrofuran (THF) or methanol were used as solvent instead of pure acetic acid. Only a small amount of acetic acid was added to catalyse the reaction leading to the advantage that most of the products precipitate from the reaction mixture and so can be isolated easily with already high purity. Table 2 lists the reaction conditions used and the yields obtained.

Table 2 Reaction conditions for the synthesis of the pyrazino[2,3-*b*]phenazine derivatives **9a-e**.

R	Solvent	Temperature [°C]	Time [min]	Yield [%]
a) CH ₃	THF	70	120	62
b) CH ₂ Br	methanol	70	45	18
c) C ₆ H ₅	methanol	70	360	71
d) C ₆ H ₄ F	methanol	70	47	72
e) C ₆ H ₄ CF ₃	methanol	70	30	53

Furthermore 2,3-dimethylnaphtho[2,3-*g*]quinoxaline-5,12-dione **15a** and 2,3-dimethylnaphtho[2,3-*g*]quinoxaline-6,11-dione **15b**, which are supposed to be the degradation products of **7a**, were synthesized, too (see schemes 4 and 5). Synthesis of 2,3-dimethylnaphtho[2,3-*g*]quinoxaline-5,12-dione **15a** started from 1,4-dimethoxybenzene **10** which was converted into 2,3-dimethyl-5,8-dihydroxy-quinoxaline **14** by a four-step procedure¹⁵ (see Scheme 4).

At first nitration of 1,4-dimethoxybenzene **10** was performed in acetic acid with concentrated nitric acid¹⁶. Reduction with H₂/Pd/C in ethyl acetate gave a mixture of **12a** and **12b**¹⁷. Separation of the region isomers was done in the next reaction step. Only **12a** gave the quinoxaline **13** during the reaction with 2,3-butanedione, which then could be separated easily from the by-product **12b**.



Scheme 3 Synthesis of pyrazino[2,3-*b*]phenazines **9a-e**. The reaction conditions and yields are given in table 2.

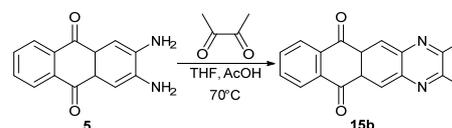
Thus the mixture of **12a** and **12b** was reacted with 2,3-butanedione in acetic acid affording **13**, which was transferred into **14** by reaction with AlCl_3 . Condensation of 2,3-dimethyl-5,8-dihydroxy-quinoxaline **14** and *o*-phthaldialdehyde gave 2,3-dimethylnaphtho[2,3-*g*]quinoxaline-5,12-dione **15a** in 70% yield. 2,3-dimethylnaphtho[2,3-*g*]quinoxaline-6,11-dione **15b** was prepared from 2,3-diaminoanthraquinone **5** and 2,3-butanedione in THF and acetic acid in 80% yield.

Orbital energies

In order to investigate the influence of substituents and nitrogen content on the HOMO and LUMO energies, cyclic voltammetry and UV-VIS measurements were performed. HOMO and LUMO levels were measured by cyclic voltammetry in dry THF with tetra-*n*-butylammonium hexafluorophosphate (0.1M) as supporting electrolyte under nitrogen atmosphere. Ferrocene was used as internal standard. If HOMO energies could not be measured by cyclic voltammetry, they were also calculated from the LUMO levels and the optical band gap measured by UV-VIS-spectroscopy (for more details see supporting information).

Compared to **7a** the LUMO levels of **7c-f** are reduced by 0.15-0.24 eV and by 0.65 eV for **7b** (figure 1).

Additionally phenyl substituents increase the solubility of the products, which is advantageous regarding solution based applications of the semiconducting film. Comparing naphtho[2,3-*g*]quinoxalines **7** and pyrazino[2,3-*b*]phenazines **9** with the same terminal



Scheme 5 Synthesis of the quinone **15b**, which is supposed to be one of the degradation products of 2,3-dimethylnaphtho[2,3-*g*]quinoxaline **7a**.

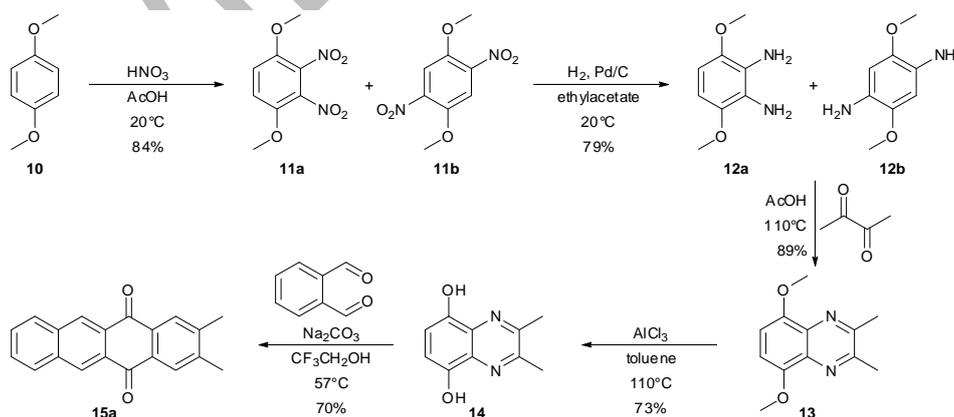
substituent LUMO energies of pyrazino[2,3-*b*]phenazines are lowered by 0.53 eV for the methyl (**7a/9a**), 0.56 eV for the phenyl (**7c/9c**) and by 0.61 eV for the fluorophenyl (**7d/9d**) derivatives (figure 2). From this it follows that the used phenyl substituents affect the energy levels to a minor extent than the number of nitrogen atoms in the acene core.

Photostability

In principle two degradation pathways for naphtho[2,3-*g*]quinoxalines and pyrazino[2,3-*b*]phenazines are expected. On the one hand, photooxidation of one of the non-nitrogen containing rings could occur, leading to the 2N-quinones **15a**, **15b**, **15c** (see scheme 6) and to the 4N-quinones **19a** and **19b** (see scheme 7).

On the other hand a [4+4] cycloaddition is also possible as a degradation pathway, as this type of reaction is also known from polycyclic aromatic hydrocarbons like tetracene¹⁸. In case of this [4+4] cycloaddition occurring, this leads to the formation of the 2N-dimers **17a-l** (see figure 3) and to the 4N-dimers **20a-f** (see figure 4).

To study the degradation mechanism of naphtho[2,3-*g*]quinoxalines **7** and pyrazino[2,3-*b*]phenazines **9** NMR measurements are performed. Therefore saturated solutions of the methyl derivatives of naphtho[2,3-*g*]quinoxaline **7a** and pyrazino[2,3-*b*]phenazine **9a** in THF-*d*₈ (euriso-top 99.5%D) are irradiated at room



Scheme 4 Synthesis of the quinone **15a**, which is supposed to be one of the degradation products of 2,3-dimethylnaphtho[2,3-*g*]quinoxaline **7a**.

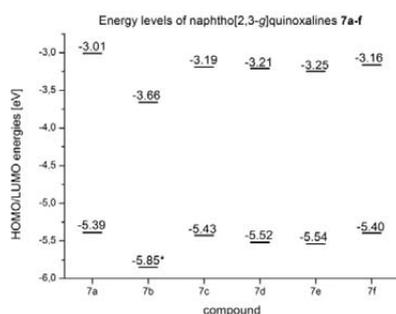


Fig. 1 HOMO and LUMO energies of naphtho[2,3-g]quinoxalines **7a-f** measured by cyclic voltammetry in 0,1M solution of tetra-*n*-butylammoniumhexafluorophosphate in dry THF. Ferrocene was used as internal standard. The value marked with an asterisk is estimated from the LUMO energy measured by cyclic voltammetry and the optical band gap predicted from UV-VIS measurements (see supporting information). This has been necessary because decomposition of the compound occurred during the cyclic voltammetry measurement.

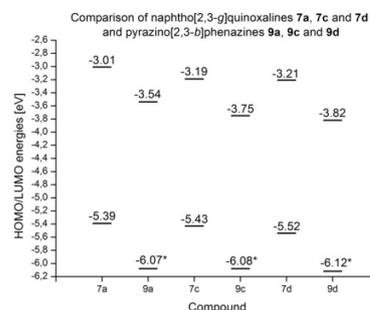


Fig. 2 Comparison of HOMO and LUMO energies of the methyl (**7a/9a**), phenyl (**7c/9c**) and fluorophenyl (**7d/9d**) derivatives. The values marked with an asterisk are estimated from the LUMO energy measured by cyclic voltammetry and the optical band gap predicted from UV-VIS measurements (see supporting information).

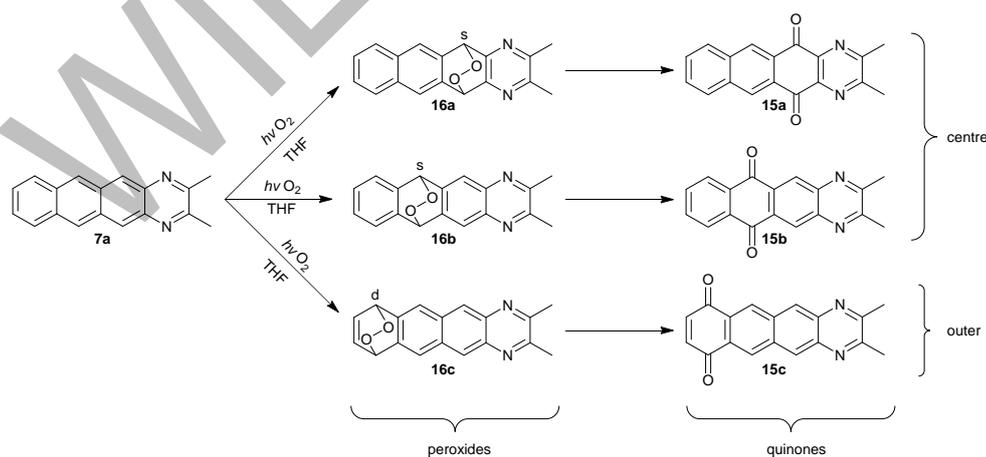
temperature and air in a NMR tube (Norell XR 55) with a 100 W light bulb. After certain time intervals 1D (^1H , ^{13}C) and 2D (HSQC, HMBC) NMR spectra are recorded on a Bruker AV-III 600MHz (see Supporting Information for details) to identify the reactive positions of the molecules **7a** and **9a** and thus gain insight on the decomposition pathways of the analysed compounds.

To differentiate between the two pathways, it is necessary to identify the decomposition intermediates and products whose signals appear in the recorded NMR spectra. There are two aspects: First, a principal distinction between the appearances of either peroxide, quinone or dimer compounds is needed. Afterwards, in each of those compounds, the reactive position has to be identified.

For the first aspect – the differentiation of the decomposition pathways – the expected multiplicity of peroxide compounds or dimers shows in each case that singlets and/or doublets might appear. In addition, the appearance of various multiplets might lead to overlap and further complicate the identification and assignment of multiplet structures. The expected multiplicity thus does not allow a distinction between peroxide compounds or dimers.

Furthermore, a simple identification of the dimers with 2D NMR spectra, namely the HMBC, is not possible due to the high symmetry of the possible products. In principle, there is a new covalent bond connecting the two tetracene backbones, which leads to a $^2J_{\text{CH}}$ correlation from a bridge-head proton to a bridge-head carbon atom that is not accessible in the peroxide compounds.

However, because of the symmetry, it is also possible to assume a $^4J_{\text{CH}}$ correlation between a bridge-head proton and a bridge-head carbon atom, which would lead



Scheme 6 Photooxidation processes of **7a** with proposed nomenclature and expected multiplicity of the bridge head protons.

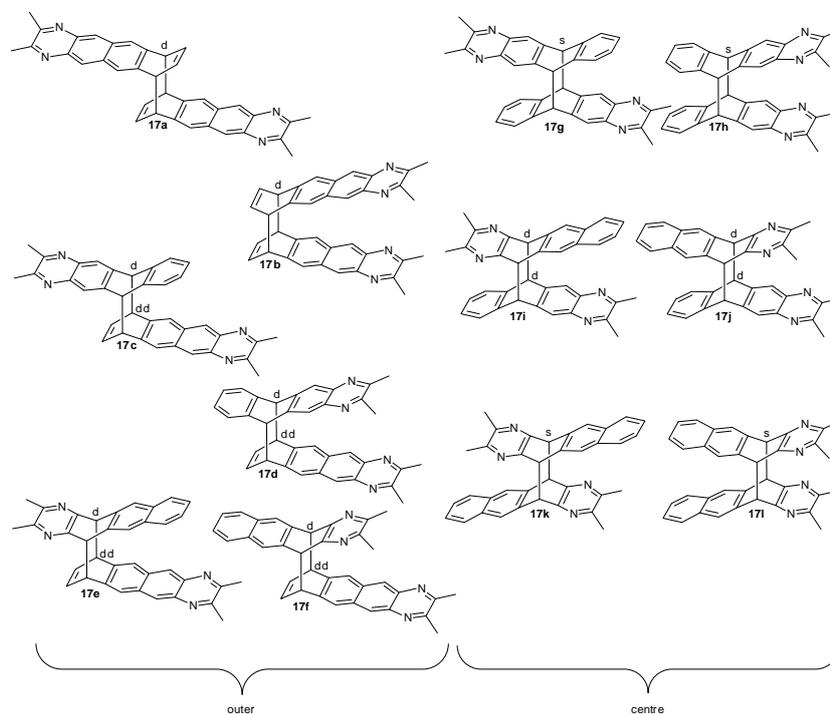


Fig. 3 Possible products of the [4+4] photo dimerization of **7a** with expected multiplicity for the bridge head protons. Each dimer that is formed when one of the outer rings is involved is called 2N-outer-dimer. The ones where only centre rings are involved in the photo dimerization are called 2N-centre-dimers.

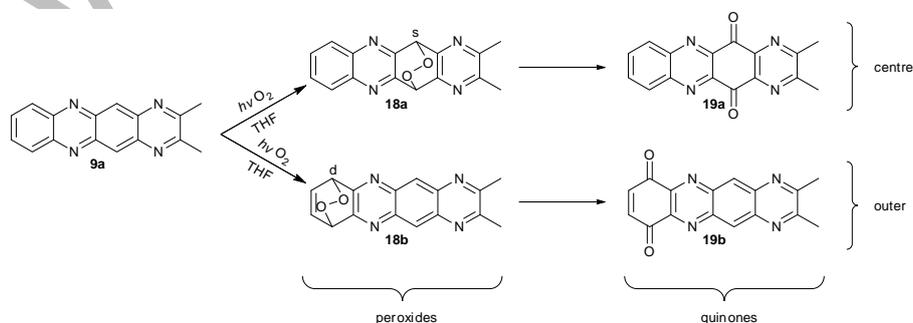
to the same signal as the ${}^2J_{\text{CH}}$ correlation. This ${}^4J_{\text{CH}}$ correlation might occur not only in the dimers, but also in the peroxide compounds. From the HMBC spectrum it is not possible to distinguish between signals from ${}^2J_{\text{CH}}$ and ${}^4J_{\text{CH}}$.

Another possibility would be the (IN)ADEQUATE¹⁹. This has been excluded due to low sensitivity. To unambiguously assign the appearing signals to one of the decomposition pathways, two-dimensional NMR spectra therefore are not sufficient.

The only accessible information is the chemical shift of both proton and carbon atoms. For the bridge head

atoms, it should vary greatly between the peroxide compounds and the dimers. To distinguish between the two decomposition pathways, we therefore rely on comparing the experimental chemical shifts to predicted chemical shifts for the bridge head atoms.

The second aspect – the identification of the reactive position – should be possible via HMBC spectra. The assignment of the appearing signals to the decomposition intermediates and products therefore needs to be done using a combination of chemical shift calculations and HMBC spectra.



Scheme 7 Photooxidation processes of **9a** with proposed nomenclature and expected multiplicity for the bridge head protons.

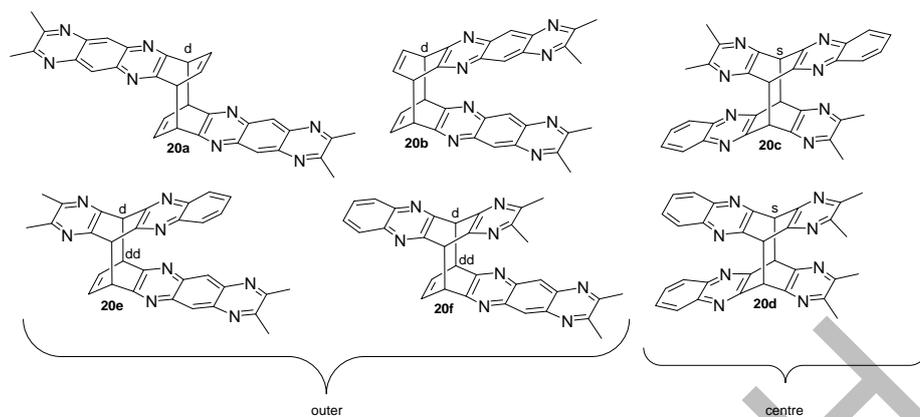


Fig. 4 Possible products of the [4+4] photo dimerization of **9a** with expected multiplicity for the bridge-head protons. Each dimer that is formed when one of the outer rings is involved is called 4N-outer-dimer. The ones where only centre rings are involved in the photo dimerization are called 4N-centre-dimers.

Prediction of chemical shifts

The chemical shifts of all proton and carbon atoms of the compounds **7a**, **9a**, the 2N-peroxides **16a-c**, the 2N-quinones **15a-c**, the 2N-dimers **17a-l**, the 4N-peroxides **18a-b**, the 4N-quinones **19a-b** and the 4N-dimers **20a-f** are calculated using the software package ORCA 2.8²⁰. First, the geometry of the structures has been optimized using DFT (B3LYP, utilizing the basis set Ahlrichs-TZV²¹ and Ahlrichs polarization function²², under the RIJCOSX assumption²³). Afterwards, the isotropic chemical shielding values are calculated using the IGLO-III basis set²⁴ and the PBE0 functional²⁵.

To convert the isotropic chemical shielding values to chemical shifts, the chemical shifts of 105 molecules from

CHESIRE CCAT²⁶ have been used as calibration set. To validate this calibration, the chemical shifts for structurally similar molecules are calculated and compared with their reported chemical shifts²⁷ (see supporting information for details).

The calculated, measured and assigned chemical shifts of the bridge head atoms are given in table 3, all calculated chemical shifts can be found in the supporting information.

As expected, the chemical shift of both proton and carbon atoms at the bridge head position of the peroxides and the dimers varies greatly. A distinction should thus be possible.

Table 3 A summary of the chemical shifts assigned from the decomposition spectra as shown in figures 5, 6 and 8 (ass.), calculated chemical shifts (calc.), and experimental chemical shifts of the quinones **15a** and **15b** as synthesized in schemes 4 and 5 (exp.) of the bridge head atoms. For the unsymmetrical dimers **17c**, **17d**, **17e**, **17f**, **17i**, **17j**, **20e** and **20f**, the first value is the one for the "upper" half of the molecule as displayed in the figures 3 and 4.

	¹ H [ppm]		¹³ C [ppm]				¹ H [ppm]		¹³ C [ppm]	
	ass.	calc.	ass.	calc.	exp.		ass.	calc.	ass.	calc.
16a	6.15	5.33	80.1	79.6	-	18a	6.36	5.08	81.5	81.5
16b	6.18	5.28	78.1	77.8	-	18b	-	4.78	-	76.8
16c	-	4.93	-	74.6	-					
15a	-	-	180.2	177.0	180.1	19a	-	-	178.6	174.9
15b	-	-	181.0	178.5	181.1	19b	-	-	-	178.7
15c	-	-	-	180.7	-					
17a	-	4.38	-	49.7	-	20a	-	4.23	-	48.7
17b	-	4.33	-	51.3	-	20b	-	4.31	-	51.0
17c	-	4.93/4.58	-	55.3/49.9	-	20c	5.35	4.88	51.8	54.0
17d	-	5.08/4.58	-	55.4/50.1	-	20d	5.36	4.88	51.8	54.1
17e	-	4.63/4.53	-	54.7/49.3	-	20e	-	4.53/4.68	-	49.8/54.0
17f	-	4.68/4.53	-	55.1/48.8	-	20f	-	4.50/4.68	-	49.3/53.7
17g	4.83-4.95	5.12	52.0-53.5	54.9	-					
17h	4.83-4.95	5.03	52.0-53.5	55.1	-					
17i	4.83-4.95	4.78/5.03	52.0-53.5	55.0/54.2	-					
17j	4.83-4.95	4.83/5.03	52.0-53.5	55.0/54.2	-					
17k	4.83-4.95	4.92	52.0-53.5	54.1	-					
17l	4.83-4.95	4.83	52.0-53.5	54.3	-					

Irradiation of 2,3-dimethylnaphtho[2,3-g]quinoxaline 7a

A saturated solution of 2,3-dimethylnaphtho[2,3-g]quinoxaline **7a** is irradiated in one hour steps in the presence of oxygen by an 100 W light bulb to generate stable conditions for the irradiation process. After every hour ^1H and ^{13}C NMR spectra are recorded. In addition HSQC and HMBC spectra are measured after four and eight hours irradiation time and an additional HMBC spectrum is recorded after ten hours. Irradiation is continued afterwards. As no decomposition without irradiation has been observed, the NMR experiment time

does not need to be taken into account.

Figure 5a shows the measured ^1H NMR spectra where several additional signals appear during the irradiation process. Based on ^1H , HSQC (figure 5b) and HMBC (figure 5c) spectra after four hours, the first appearing signals (red and purple) are assigned to the 2N-centre-peroxides **16a** and **16b**. As expected for these two compounds the ^1H -NMR shows two singlets at 6.15 and 6.18 ppm for the bridge head protons and two singlets and four doublet doublets, of which the two at 7.38 ppm do overlap, in the aromatic region of the spectra.

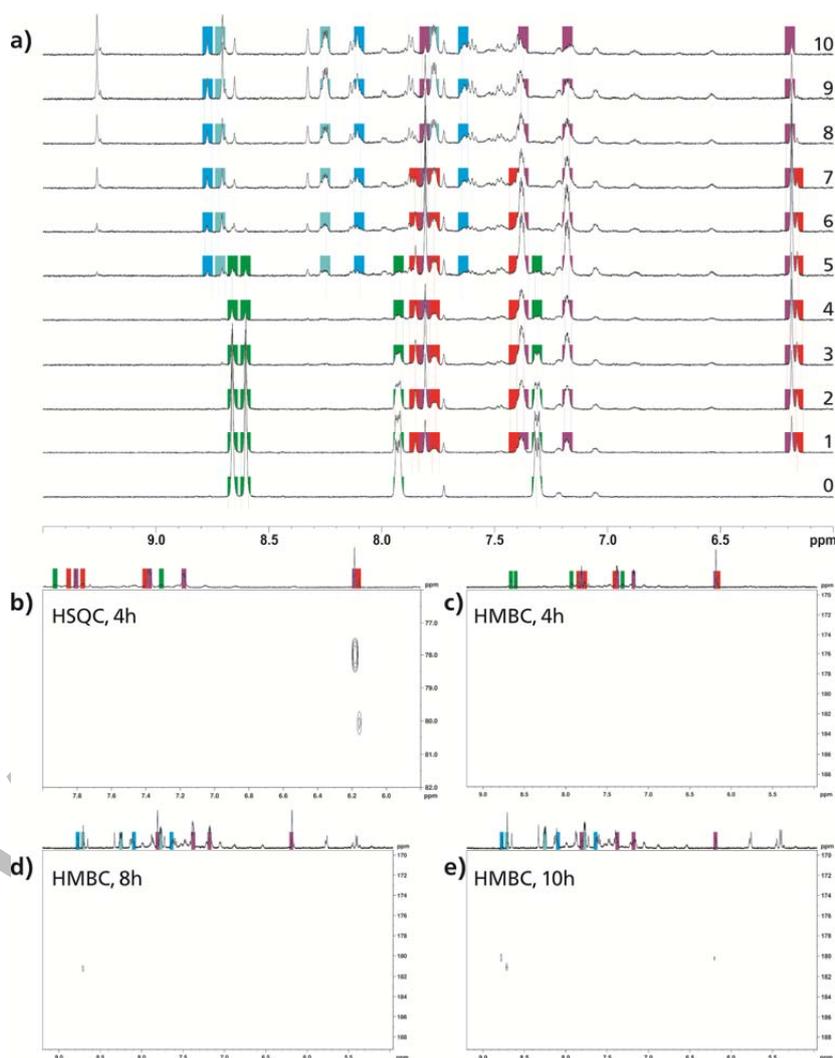


Fig. 5 a) ^1H -NMR spectra of the irradiation of **7a** with light under the presence of oxygen after 0, 1, 2, ..., 10 hours in THF-d_8 . In addition, several 2D NMR experiments were recorded, a selection is shown. The green signals correspond to **7a**, red to the 2N-centre-peroxide **16a**, purple to the 2N-centre-peroxide **16b** and blue to the 2N-centre-quinones **15a** and **15b**. b) HSQC spectrum recorded after 4h of irradiation. The peak at 78.1 ppm, assigned to the 2N-centre-peroxide **16b**, is larger than the one at 80.1 ppm, assigned to the other 2N-centre-peroxide **16a**. c) HMBC spectrum recorded after 4h of irradiation. There are no peaks in the carbonyl region yet. d) HMBC recorded after 8h of irradiation. There is one peak in the carbonyl region, which we assign to the 2N-centre-quinone **15b**. e) HMBC spectrum recorded after 10h of irradiation. A second peak appears in the carbonyl region, which we assign to the other 2N-centre-quinone **15a**.

The distinction between endoperoxides **16** and dimers **17** is done by comparison with the calculated carbon chemical shifts. The ^{13}C chemical shifts of 80.1 and 78.1 ppm (extracted from the HSQC shown in figure 5b) should correspond to the 2N-centre-peroxides **16a** and **16b**. The calculated chemical shifts for the peroxide compounds are in good agreement with these values, and in addition the calculated carbon chemical shifts for the 2N-dimers **17a-l** do not match (see table 3). Moreover the measured chemical shifts of the bridge head protons are in a very good agreement with the chemical shifts measured for the endoperoxide of tetracene (6.13 ppm) by Bjarneson and Petersen⁵.

Furthermore the HMBC spectrum allows the exact determination of the reactive position of the intermediates. The purple signals can be related to the 2N-centre-peroxide **16b** because there are two correlations from the proton signals at 7.38 (dd) and 7.81 (s) to the ^{13}C signal at 78.1 ppm, which can be assigned to the bridge head carbon atom of the 2N-centre-peroxide **16b**. The red signals, on the other hand, show correlations from the singlet at 6.15 ppm (^1H) to only one CH carbon atom, which is related to the singlet at 7.93 ppm (known from HSQC). Hence the red signals must belong to the 2N-centre-peroxide **16a**. In addition, the intensity of the signals of the 2N-centre-peroxide **16b** is larger than the one of the 2N-centre-peroxide **16a**, the corresponding position therefore should be the most reactive one. Furthermore there are no signals in the NMR spectra that can be assigned to 2N-outer-peroxide **16c**. Consequently this position should be the least reactive.

Further irradiation of the solution results in the appearance of HMBC correlations in the carbonyl region (see figures 5c-e). The chemical shifts extracted from the spectrum are in very good agreement with the measured chemical shifts of the 2N-centre-quinones **15a** and **15b** from the synthesized compounds (see table 3). From this it follows that the oxidation of **7a** leads to the 2N-centre-peroxides **16a** and **16b** as intermediates and continues to the 2N-centre-quinones **15a** and **15b**.

If oxygen is excluded during the irradiation process the only degradation pathway left is the dimerization leading to the compounds **17a-l**. In the proton spectra shown in figure 6 several new signals appear at approximately 5 ppm. Their corresponding carbon chemical shifts with 52.0-53.5 ppm are significantly different than the carbon chemical shifts of the peroxide compounds **16a-c**. Under the assumption that **17a-f** are not found due to the reduced reactivity of the outer ring, four singlets for the compounds **17g**, **17h**, **17k** and **17l** (symmetric, see figure 3) and four doublets for the dimers **17i** and **17j** (not symmetric) should appear in the region of 5 ppm. This would lead to 12 lines in this region which is in good agreement with the observed spectra.

Moreover comparison of the calculated chemical shifts of the bridge head protons and carbons for the compounds **17g-l** and the measured ones shows that they are in a very good agreement (see table 3). So it can be assumed that the compounds **17g-l** are the main degradation products of **7a**, if oxygen is excluded during the irradiation.

Analysing the degradation spectra after 8 hours of irradiation of the oxygen free sample, it was found that there is still **7a** left in the sample. In the case of oxygen being present during the irradiation, the signals of **7a** disappear already after 5 hours of irradiation, showing that oxidation of **7a** is much faster than dimerization.

Irradiation of 2,3-dimethylpyrazino[2,3-*b*]phenazine **9a**

Once the most reactive position of **7a** is known, it can be blocked by two nitrogen atoms to avoid degradation via oxidation of this position, as is the case in 2,3-dimethylpyrazino[2,3-*b*]phenazine **9a**. In order to prove that this leads to a more stable compound a saturated solution of 2,3-dimethylpyrazino[2,3-*b*]phenazine **9a** in THF- d_6 is irradiated in time steps of one hour under the same conditions as used for the 2,3-dimethylnaphtho[2,3-*g*]quinoxaline **7a** solution, up to a total irradiation time of 22 hours.

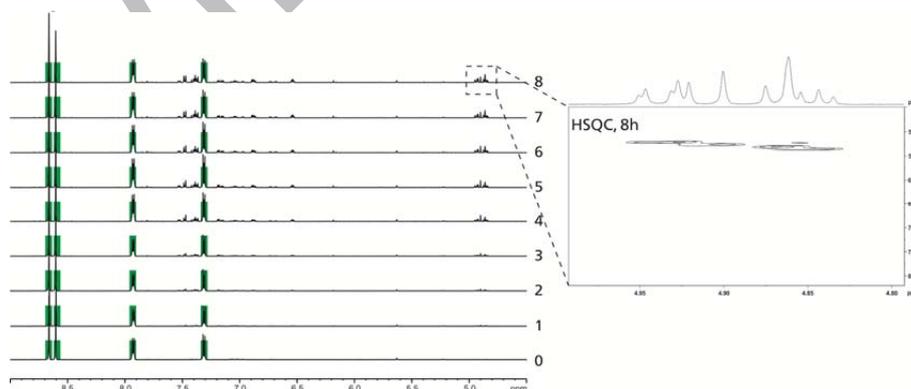


Fig. 6 ^1H -NMR spectra of the irradiation of **7a** with light with exclusion of oxygen after 0, 1, 2, ..., 8 hours in THF- d_6 . The green signals correspond to **7a**. In addition, a HSQC recorded after 8 hours of irradiation is shown, whose proton trace shows 11 lines. The corresponding carbon atoms possess chemical shifts of 52.0-53.5 ppm, which indicates that they belong to the 2N-centre-dimers **17g-l**. No signals can be found in the chemical shift regions where the 2N-peroxides appeared in Fig. 5 (^{13}C : 75-80ppm).

As can be seen from the $^1\text{H-NMR}$ spectra in figure 7 the signals assigned to 2,3-dimethylpyrazino[2,3-*b*]phenazine **9a** disappear much slower compared to 2,3-dimethylnaphtho[2,3-*g*]quinoxaline **7a** leading to the assumption that 2,3-dimethylpyrazino[2,3-*b*]phenazine **9a** is the more stable compound. The novel signals that appear in the spectrum might be assigned to the dimers **20c** and **20d** because the singlet structure and the chemical shifts of these signals are in agreement with these two structures (see figure 4). However neither ^{13}C -nor HSQC- or HMBC-spectra can be measured properly due to low signal intensity.

To gain better information about the degradation process a saturated solution of 2,3-dimethylpyrazino[2,3-*b*]phenazine **9a** in CDCl_3 is irradiated under the conditions described above. Here, chloroform is a better solvent for this compound. The recorded $^1\text{H-NMR}$ spectra are shown in figure 8. Apparently degradation in CDCl_3 is much slower than in THF-d_8 , even after a total irradiation time of 61 hours there is still 2,3-dimethylpyrazino[2,3-*b*]phenazine **9a** left in the solution. However it should be mentioned that during the irradiation process a black precipitate has appeared, which could not be analysed. It is still possible to measure ^{13}C -, HSQC- and HMBC-spectra despite the presence of the precipitate. From the HSQC, the singlets at 5.35 (pink) and 5.36 ppm (dark pink) can be correlated to the carbon signal at 51.8 ppm. Comparing the measured values with the calculated ones listed in table 3 it seems reasonable to assign these signals to the 4N-centre-dimers **20c** and **20d**. Looking at the integrals of the appearing signals it can be assumed

that the singlet at 5.35 ppm and the multiplets at 7.59 and 7.88 ppm belong to the same molecule. These values match to the predicted values for **20c**.

Likewise, the singlet at 5.36 ppm is related to the multiplets at 7.42 ppm and 7.72 ppm, which match to the predicted values for **20d**.

The singlet at 6.36 ppm (brown) can be correlated to the carbon signal at 81.5 ppm. Its existence shows that the 4N-centre-peroxide **18a** is present, because the calculated values for the bridge head proton and the bridge head carbon are in a good agreement with the measured values. There should be more ^1H signals present that belong to **18a**, but unfortunately due to very low signal intensity the expected multiplets cannot be distinguished from the noise.

At longer irradiation times, it is possible to observe signals from the 4N-centre-quinone **19a** (dark red). In addition to the measured values for the four aromatic protons (multiplets at 8.01 and 8.48 ppm) and the aromatic CH carbon atoms (133.4 and 130.4 ppm) being in very good agreement with the calculated values of this compound, a carbon signal appears at 178.6 ppm, which is assigned to the carbonyl group. From this it follows that the degradation of 2,3-dimethylpyrazino[2,3-*b*]phenazine **9a** proceeds via the 4N-centre-peroxide **18a** resulting in the formation of 4N-centre-quinone **19a** but is much slower than the oxidation of 2,3-dimethylnaphtho[2,3-*g*]quinoxaline **7a**. Because the degradation is much slower, the formation of the 4N-centre-dimers **20c** and **20d** in the presence of oxygen is also possible.

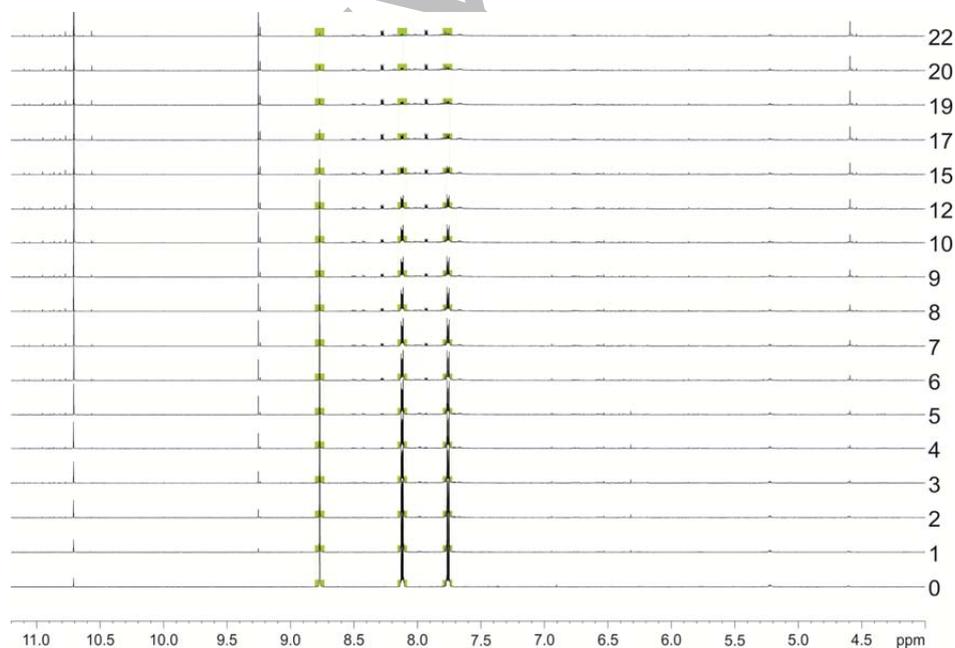


Fig. 7 $^1\text{H-NMR}$ spectra of the irradiation of **9a** with light under the presence of oxygen after 0, 1, 2, ..., 10, 12, 15, 17, 19, 20 and 22 hours in THF-d_8 . The light green signals correspond to **9a**. Several new signals appear, some of them are decomposition products of THF-d_8 . As mentioned in the text, no assignment is possible due to low signal-to-noise-ratios in 2D NMR spectra.

Conclusion

Naphtho[2,3-*g*]quinoxalines and pyrazino[2,3-*b*]phenazines have been synthesized in very good yields by condensation of 2,3-diaminoanthracene or 2,3-diaminophenazine with the appropriate diketone. The proposed synthetic protocol yields the desired products in high purity so that time-consuming work up like column chromatography and working under inert conditions can be avoided.

This work shows that inserting nitrogen atoms into polycyclic aromatic hydrocarbons is an efficient tool to tune LUMO energies and increase photo stability.

Cyclic voltammetry measurements suggest that LUMO energies are lowered by increasing nitrogen content independent from the terminal substituent. The terminal substituent does affect the HOMO and LUMO energies as well, but to a minor extent.

By NMR measurements of irradiated 2,3-dimethylnaphtho[2,3-*g*]quinoxaline **7a** and 2,3-dimethylpyrazino[2,3-*b*]phenazine **9a** samples, it has not only been possible to analyse the dependency of photostability on the nitrogen content, but also the degradation mechanism of the compounds **7a** and **9a** has been explored, showing that oxidation is the main degradation pathway.

Elucidation of the degradation products has been used to identify the most reactive position in compound **7a**. Chemical shifts of the expected intermediates and products of the degradation have been predicted showing a very good agreement with the measured data. In addition the quinones **15a** and **15b** have been

synthesized and analysed by NMR spectroscopy. The measured NMR spectra show that these two compounds are the degradation products of **7a**. If oxygen is excluded during the irradiation process of **7a**, degradation proceeds much slower. The recorded NMR spectra of the oxygen free samples of 2,3-dimethylnaphtho[2,3-*g*]quinoxaline **7a** suggest that in this case dimerization occurs leading to the compounds **17g-l**.

Subsequently the CH groups of the most reactive positions in **7a** have been substituted by nitrogen atoms leading to **9a** which shows an increased stability compared to **7a**. Furthermore the NMR studies underline that the nitrogen atoms efficiently block the position most susceptible to oxidation of 2,3-dimethylnaphtho[2,3-*g*]quinoxaline. Moreover the studies of **9a** indicate that via the decrease in sensitivity towards oxygen the dimerization process becomes more important. These results confirm that by adding nitrogen atoms to the acene core it is possible to influence orbital energies and compound stability. Moreover, the decomposition to quinone compounds can be drastically reduced by either excluding oxygen or adding nitrogen atoms to the core, thus reducing the number of potential electronic traps in the material. This opens the opportunity to tailor the properties of organic semiconductors with regard to their application.

Acknowledgements

Generous support from the European Research Council (through 2010-SG_257041), MerckLab and Merck KGaA is gratefully acknowledged.

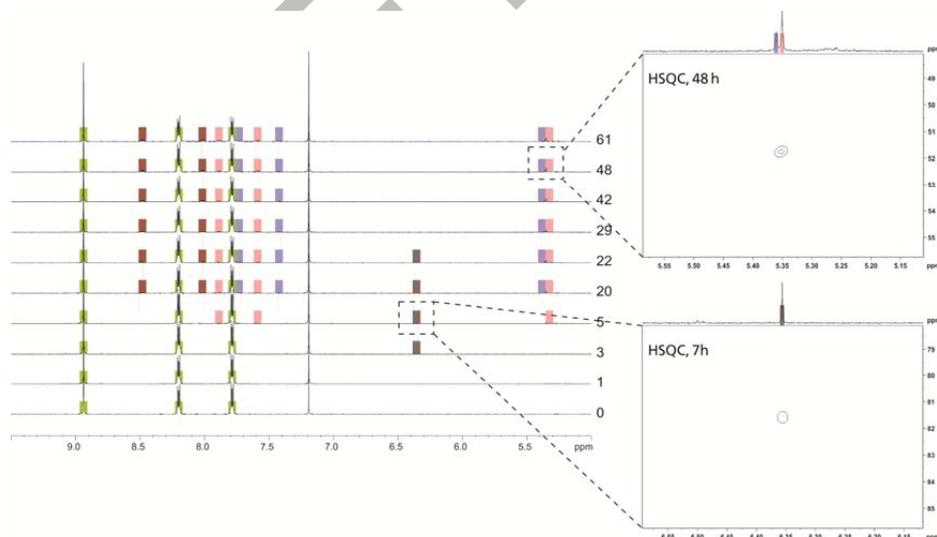


Fig. 8 ^1H -NMR spectra of the irradiation of **9a** with light under the presence of oxygen after 0, 1, 3, 5, 20, 29, 42, 48 and 61 hours in CDCl_3 . The light green signals correspond to **9a**, brown to **18a**, dark red to **19a**, pink and dark pink to **20c** and **20d**.

References

- ¹ H. Dong, X. Fu, J. Liu, Z. Wang, W. Hu, *Adv. Mater.* 2013, **25**, 6158-6183.
- ² Y. Sakamoto, T. Suzuki, M. Kobayashi, Y. Gao, Y. Fukai, Y. Inoue, F. Sato, S. Tokito, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 8138-8140.
- ³ H. Usta, A. Fachetti, T. J. Marks, *Acc. Chem. Res.*, 2011, **44**, 501-510.
- ⁴ J. Reichwagen, H. Hopf, A. Del Guerzo, J.-P. Desvergne, H. Bouas-Laurent, *Org. Lett.*, 2004, **6**, 1899-1902; A. G. L. Olive, A. Del Guerzo, J.-L. Pozzo, J.-P. Desvergne, J. Reichwagen, H. Hopf, *J. Phys. Org. Chem.*, 2007, **20**, 838-844.
- ⁵ D. W. Bjarneson, N. O. Petersen, *J. Photochem. Photobiol. A*, 1992, **63**, 327-335.
- ⁶ J. E. Anthony, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 452-483.
- ⁷ U. H. F. Bunz, J. U. Engelhardt, B. D. Lindner, M. Schaffroth, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**, 3810-3821.
- ⁸ M. Winkler and K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 1805-1815.
- ⁹ Z. Liang, Q. Tang, J. Xu, Q. Miao, *Adv. Mater.*, 2011, **23**, 1535-1539.
- ¹⁰ G. J. Richards, J. P. Hill, T. Mori and K. Ariga, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 5005-5017.
- ¹¹ A. Schaarschmidt, H. Leu, *Liebigs Ann. Chem.*, 1915, **407**, 176-194.
- ¹² M. Clark, *J. Chem. Soc. C*, 1966, 277-283.
- ¹³ S. Shitagaki, H. Yamazaki, S. Seo, 2004, US2005/0003232 A1.
- ¹⁴ A. M. Amer, A. A. El-Bahnasawi, M. R. H. Mahran, M. Lapib, *Monatsh. Chem.*, 1999, **130**, 1217-1225.
- ¹⁵ W. F. Gum, M. M. Joullie, *J. Org. Chem.*, 1967, **32**, 53-59.
- ¹⁶ F. E. King, N. G. Clark, P. M. H. Davis, *J. Chem. Soc.*, 1949, 3012-3016.
- ¹⁷ P. Hammershøj, T. K. Reenberg, M. Pittelkow, C. B. Nielsen, O. Hammerich, J. B. Christensen, *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 2786-2794.
- ¹⁸ J. E. Anthony, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 452-483.
- ¹⁹ A. Bax, R. Freeman, T. A. Frenkiel, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 2102-2104; B. Reif, M. Köck, R. Kerssebaum, H. Kang, W. Fenical, C. Griesinger, *J. Magn. Reson. A*, 1996, **118**, 282-285.
- ²⁰ F. Neese, ORCA – an ab initio, Density Functional and Semiempirical program package, Version 2.8. Max-Planck-Institut für Bioorganische Chemie, Mülheim an der Ruhr, 2011; F. Neese, *WIREs Comput. Mol. Sci.*, 2012, **2**, 73-78.
- ²¹ A. Schaefer, H. Horn, R. Ahlrichs, *J. Chem. Phys.*, 1992, **97**, 2571.
- ²² Ahlrichs and coworkers, unpublished.
- ²³ R. Izsak, F. Neese, *J. Chem. Phys.*, 2011, **135**, 144105; S. Kossmann, F. Neese, *J. Chem. Theory Comput.*, 2010, **6**, 2325-2338; S. Kossmann, F. Neese, *Chem. Phys. Lett.*, 2009, **481**, 240-243; F. Neese, F. Wennmohs, A. Hansen, U. Becker, *Chem. Phys.*, 2009, **356**, 98-109; F. Neese, *J. Comp. Chem.*, 2003, **24**, 1740-1747.
- ²⁴ W. Kutzelnigg, U. Fleischer, M. Schindler, *The IGLO-Method: Ab Initio Calculation and Interpretation of NMR Chemical Shifts and Magnetic Susceptibilities*, Springer-Verlag, Heidelberg, 1990, vol. 23
- ²⁵ C. Adamo, V. Barone, *J. Chem. Phys.*, 1999, **110**, 6158-6170.
- ²⁶ <http://cheshirenmr.info/>; M. W. Lodewyk, M. R. Siebert, D. J. Tantillo, *Chem. Rev.*, 2012, 1839-1862; M. W. Lodewyk, D. J. Tantillo, *J. Nat. Prod.*, 2011, 1339-1343; R. Jain, T. Bally, P. R. Rablen, *J. Org. Chem.*, 2011, **74**, 4017-4023; R. J. Jain, T. Bally, P. R. Rablen, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 4017-4023; P. R. Rablen, S. A. Pearlman, J. Finkbiner, *J. Phys. Chem. A*, 1999, **103**, 7357-7363.
- ²⁷ <http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 2013-08-16) Triptycene; B.-J. Pei, A. W. M. Lee, *Tetrahedron Lett.*, 2010, **51**, 4519-4522.

4.2.2 Aufklärung der Konnektivität des FAST-BLUE-Vorläufers

Bei der von MÜLLER und REGGELIN entwickelten oxidativen HECK-Reaktion des Benzofurans **6** mit dem Indol **7** (siehe Schema 2.1.1) entsteht ein Produkt unbekannter Konstitution, das entweder dem erwünschten FAST-BLUE-Vorläufer **1** oder dem Alternativprodukt **8** entspricht^[38]. In diesem Abschnitt soll die Regioselektivität dieser Reaktion aufgeklärt werden. Als Herausforderung ist der niedrige Protonierungsgrad sowie die Ähnlichkeit der Strukturen von **1** und **8** zu nennen. Für diese Dissertation bedeutet dies analog zum vorigen Abschnitt, dass die als starr angenommenen Moleküle aufgrund der geringen Observablenzahl durch Kombination der Aufnahme von 2D-Korrelationspektren und Berechnung von chemischen Verschiebungen untersucht werden.

4.2.2.1 Produkt der oxidativen Heck-Reaktion

Die Aufklärung der Konstitution des Reaktionsproduktes^[38] fordert eine Unterscheidung von **1** und **8**. Einen ersten Einblick liefert das COSY (siehe Abbildung 4.2.3a), das eine Kopplung zwischen dem NH-Proton H_{16} und dem Indolproton (H_{10} oder H_{11}) zeigt. Die Anwesenheit des Signals weist auf eine ${}^3J_{\text{HH}}$ -Kopplung und somit **8** hin, allerdings ist die Signalintensität zu gering, um eine ${}^4J_{\text{HH}}$ -Kopplung und somit **1** auszuschließen. Das COSY liefert somit einen Hinweis, aber keine eindeutige Zuordnung.

Eine andere Möglichkeit zur Unterscheidung der beiden Verbindungen wäre die Betrachtung von ${}^nJ_{\text{CH}}$ -Kopplungen mittels HMBC. Dies verlangt allerdings ebenfalls die Unterscheidung von ${}^3J_{\text{CH}}$ - zu ${}^4J_{\text{CH}}$ -Kopplungen anhand von Signalintensitäten, sodass erneut keine eindeutige Aussage getroffen werden kann.

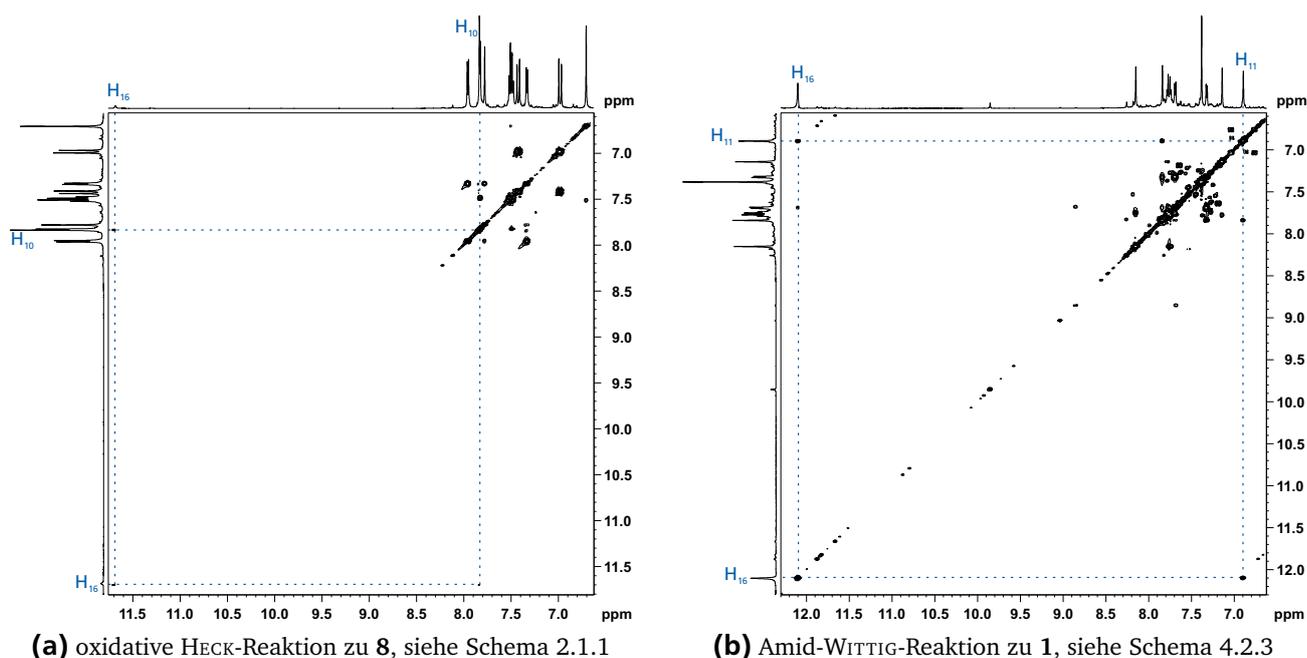


Abbildung 4.2.3: COSY der Reaktionsprodukte. In beiden Fällen ist eine Kopplung zu H_{16} sichtbar, sodass nicht zwischen H_{10} (**8**) und H_{11} (**1**) unterschieden werden kann.

Tabelle 4.2.1: Vergleich der experimentellen und berechneten ^{13}C -Verschiebungen der oxidativen HECK-Reaktion und der Amid-WITTIG-Reaktion, inklusive RMSD-Wert für die beiden möglichen Zuordnungen.

	$\delta_{\text{calc}}/\text{ppm}$		$\delta_{\text{exp}}/\text{ppm}$	
	1	8	oxidative HECK	Amid-WITTIG
C_2	154,00	156,59	158,38	156,79
C_3	99,25	97,62	102,36	106,12
C_{3a}	129,45	130,70	130,29	129,98
C_4	127,15	127,34	125,14	126,61
C_5	110,47	109,60	106,23	106,64
C_{5a}	112,58	112,77	119,45	119,70
C_6	135,30	133,10	127,59	129,19
C_7	114,40	112,58	111,74	112,81
C_{7a}	158,80	157,45	156,16	156,55
C_8	117,95	113,15	112,15	117,22
C_9	119,58	125,91	124,83	121,97
C_{10}	134,82	129,26	130,89	139,98
C_{11}	99,63	114,88	114,05	105,32
C_{11a}	131,76	124,47	128,16	131,87
C_{12}	122,93	119,10	120,58	121,84
C_{13}	130,99	126,77	122,82	122,66
C_{14}	108,93	109,03	104,10	104,08
C_{14a}	113,25	113,25	120,29	120,98
C_{15}	116,13	119,96	116,81	116,19
C_{15a}	135,59	136,55	136,15	136,72
		RMSD-1	5,30	4,39
		RMSD-8	3,47	5,55

Ein anderer experimenteller Parameter, der betrachtet werden kann, ist die chemische Verschiebung von ^{13}C . In Abschnitt 4.2.1 wurde der Vergleich von experimentellen und berechneten chemischen Verschiebungen bereits für die Aufklärung der Zersetzungsprodukte des 2,3-Dimethylnaphtho[2,3-g]chinoxalins **13** genutzt. Analog dazu können die ^{13}C -Verschiebungen der Verbindungen **1** und **8** berechnet und mit den experimentellen ^{13}C -Verschiebungen verglichen werden (siehe Tabelle 4.2.1 und Kapitel 6.2). Die berechnete Verschiebung von C_{11} unterscheidet sich stark zwischen **1** (als CH-Kohlenstoff) und **8** (als quartärer Kohlenstoff). Dabei entspricht die experimentelle Verschiebung sehr gut der berechneten von **8** (in Tabelle 4.2.1 sind diese Werte fett markiert).

Die Übereinstimmung aller experimentellen und berechneten Verschiebungen kann durch den RMSD beschrieben werden, der analog zu Gleichung 3.7.6 bestimmt wird. Die relative Betrachtung der RMSD-Werte zeigt, dass der RMSD für **8** geringer ist, was erneut dafür spricht, dass das unerwünschte Substitutionsmuster gebildet wurde (in Tabelle 4.2.1 sind diese RMSD-Werte ebenfalls fett markiert). Allerdings ist der Unterschied der beiden RMSD-Werte gering. Daher liefert die Berechnung der chemischen Verschiebung ebenfalls nur einen Hinweis auf das **8** entsprechende Substitutionsmuster.

Da die Konstitutionsaufklärung aus COSY und HMBC nicht eindeutig gelang, und auch die Berechnung der ^{13}C -Verschiebungen nur Hinweise auf die 3-Substitution liefert, wird auf das experimentell deutlich anspruchsvollere 1,1-ADEQUATE zurückgegriffen, welches durch $^1J_{\text{CC}}$ -Kopplungen erzeugte Signale zeigt.

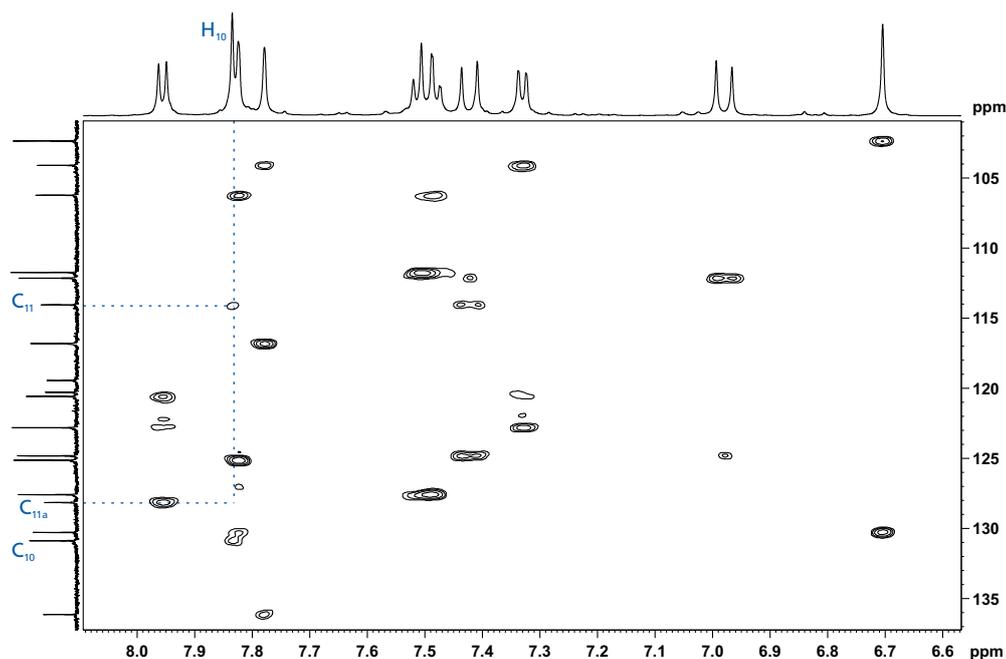


Abbildung 4.2.4: 1,1-ADEQUATE des Produktes der oxidativen HECK-Reaktion. Da nur ein Signal von H_{10} zu C_{11} , aber nicht zu C_{11a} sichtbar ist, sollte es sich um **8** handeln.

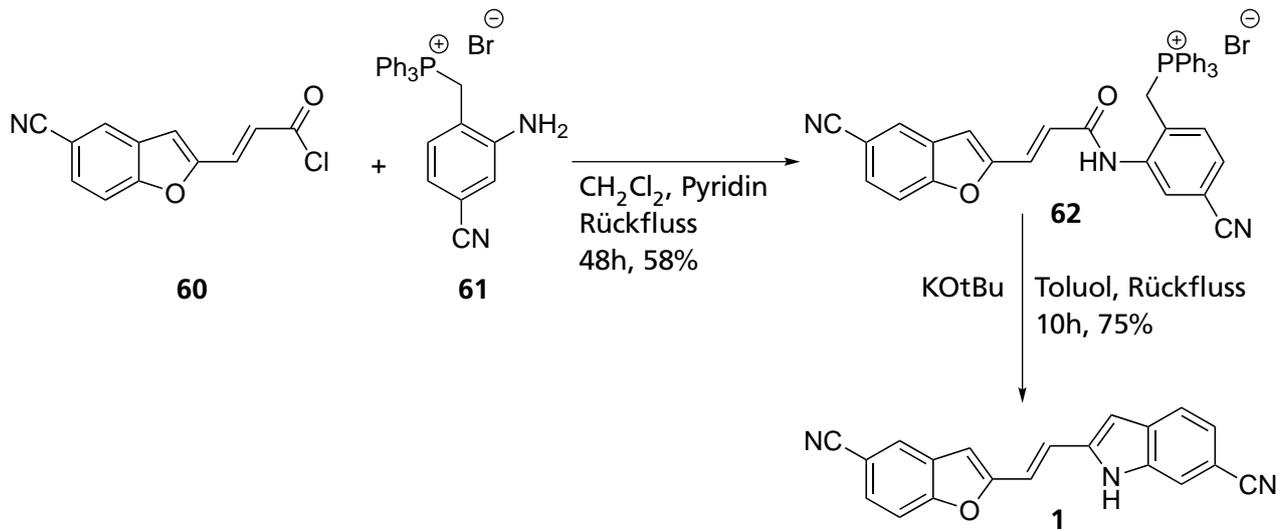
Im Falle von **1** sind für H_{11} zwei Signale zu C_{10} und C_{11a} zu erwarten. Für **8** ist dagegen nur ein Signal von H_{10} zu C_{11} zu erwarten, da das andere Nachbaratom N_{16} kein Kohlenstoffatom ist. Die Unterscheidung beruht daher darauf, dass einmal ein Signal und einmal zwei Signale zu erwarten sind.

Das 1,1-ADEQUATE ist in Abbildung 4.2.4 gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass nur ein Signal sichtbar ist. Das Reaktionsprodukt sollte somit dem unerwünschten Substitutionsmuster von **8** entsprechen. Dies ist im Einklang mit den Hinweisen aus COSY und ^{13}C -Verschiebungen, trotzdem ist eine Zuordnung aufgrund eines fehlenden Signals als vorläufig zu betrachten.

4.2.2.2 Produkt der Amid-Wittig-Reaktion

Basierend auf der vorläufigen Zuordnung des Produktes der oxidativen HECK-Reaktion als **8** muss zur Herstellung des FAST-BLUE-Vorläufers **1** eine alternative Synthesestrategie verfolgt werden. Deshalb wurde von MÜLLER und REGGELIN die Reihenfolge des Aufbaus des Indolteils und der Verknüpfung des Benzofuran- und des Indolteils vertauscht (siehe Schema 4.2.3) [38]. Dabei wird zuerst aus dem Säurechlorid **60** und dem Phosphin **61** das Amid **62** hergestellt, das anschließend in einer Amid-WITTIG-Reaktion analog zu EITEL ET AL. [178] zum FAST-BLUE-Vorläufer **1** umgesetzt wird. Obwohl eine Bildung des 3-substituierten **8** aufgrund des Mechanismus ausgeschlossen werden kann, wird erneut die Konnektivität überprüft.

Analog zum vorherigen Vorgehen wird zuerst ein COSY aufgenommen (siehe Abbildung 4.2.3b). Erneut ist eine Kopplung zwischen H_{16} und H_{11} sichtbar, was verdeutlicht, dass das COSY zur Unterscheidung von **1** und **8** nicht geeignet ist. Die Berechnung der ^{13}C -Verschiebungen, aufgeführt in Tabelle 4.2.1, liefert dagegen einen Hinweis auf das Substitutionsmuster von **1**, da die Übereinstimmung der experimentellen und berechneten chemischen Verschiebungen besser ist.



Schema 4.2.3: Amid-WITTIG-Reaktion zur Herstellung des FAST-BLUE-Vorläufers **1** [38].

Den besten Hinweis auf die korrekte Substitution liefert erneut das 1,1-ADEQUATE (Abbildung 4.2.5). Wie bereits diskutiert sind für **1** zwei Signale von H_{11} zu C_{10} und C_{11a} zu erwarten. Das Signal $H_{11}-C_{11a}$, das im Falle von **8** fehlt, ist deutlich sichtbar. Das Signal $H_{11}-C_{10}$ ist dagegen nur sehr schwach ausgeprägt. Die Intensität ist nur wenig besser als die des Rauschens, befindet sich aber in ähnlicher Größenordnung wie die Intensität des Signals H_9-C_{10} .

Sowohl das 1,1-ADEQUATE als auch der Vergleich mit berechneten chemischen Verschiebungen sprechen somit dafür, dass das Produkt der Amid-WITTIG-Reaktion dem FAST-BLUE-Vorläufer **1** entspricht. Gleichzeitig kann somit die vorläufige Zuordnung des Produktes der oxidativen HECK-Reaktion als **8** bestätigt werden.

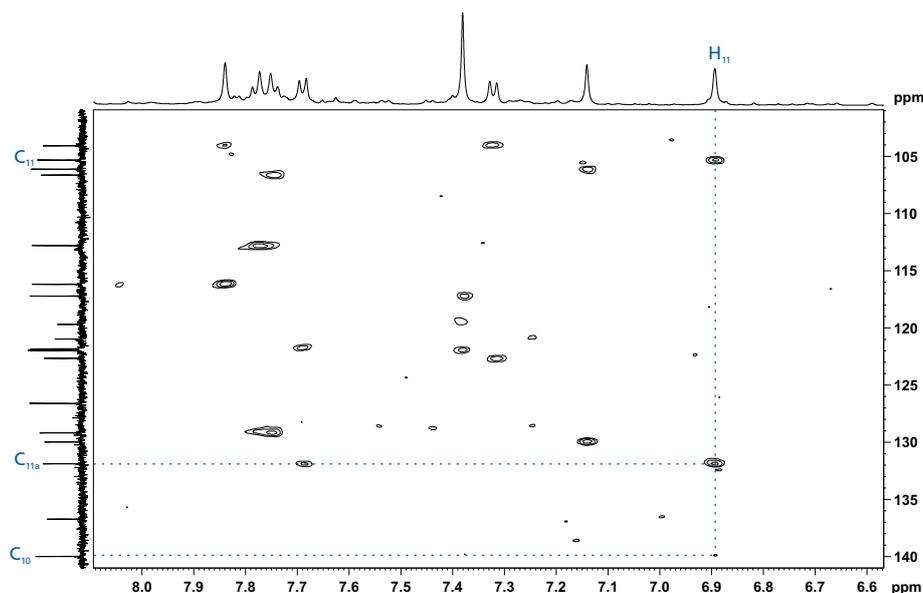


Abbildung 4.2.5: 1,1-ADEQUATE des Produktes der Amid-WITTIG-Reaktion. Da zwei Signale von H_{11} zu C_{10} und zu C_{11a} sichtbar ist, muss es sich um **1** handeln.

4.2.2.3 Fazit

Es ist durch die Aufnahme zweier 1,1-ADEQUATE-Spektren und die Berechnung von ^{13}C -Verschiebungen gelungen, die Verbindungen **1** und **8** zu unterscheiden. Für die Synthese von FAST-BLUE^[38] stellt diese Aufklärung einen Schlüsselschritt dar, da nun der Syntheserfolg des FAST-BLUE-Vorläufers **1** beurteilt werden kann.

Für die vorliegende Dissertation zeigt dieses Ergebnis, dass sowohl die bereits in Abschnitt 4.2.1 verwendete Berechnung von ^{13}C -Verschiebungen als auch die Informationen aus dem 1,1-ADEQUATE zu identischen Ergebnissen führt. Die komplementäre Anwendung beider Methoden liefert in diesem Falle das verlässlichste Ergebnis.

4.2.3 Evaluation der Genauigkeit der RDC-Extraktion aus CLIP-Experimenten

Der Inhalt dieses Abschnitts ist bereits veröffentlicht:

I. Timári, L. Kaltschnee, A. Kolmer, R. W. Adams, M. Nilsson, C. M. Thiele, G. A. Morris, K. E. Kövér, *J. Magn. Reson.* **2014**, *239* (1), 130–138.

L. Kaltschnee, A. Kolmer, I. Timári, V. Schmidts, R. W. Adams, M. Nilsson, K. E. Kövér, G. A. Morris, C. M. Thiele, *Chem. Commun.* **2014**, *50* (99), 15702–15705.

In den vorherigen Abschnitten wurde die Nutzung von 2D-Korrelationsexperimenten zur Bestimmung der Konstitution demonstriert. In diesem Abschnitt werden Methoden an starren Molekülen evaluiert, die die Auflösung eines Korrelationsexperimentes, des HSQCs, und einer Variante davon, verbessern.

Das Hauptaugenmerk liegt bei dieser Arbeit auf der Extraktion heteronuklearer Kopplungskonstanten direkt gebundener Kerne zur RDC-Bestimmung. Im Falle kleiner organischer Moleküle erfolgt die Messung von $^1J_{\text{CH}}$ - und $^1T_{\text{CH}}$ -Konstanten häufig mit Hilfe des CLIP/CLAP-HSQC-Experiments^[69] (vergleiche Abschnitt 3.3). Die Kopplungskonstante wird hierbei in der direkten Dimension abgelesen. Dies erlaubt eine hohe Auflösung bei geringem Messaufwand zu erzielen. Die Möglichkeit, sowohl inphase- als auch antiphase-Signale zu erzeugen kann zudem im Falle von Überlagerungen nützlich sein.

Ein Nachteil der Methode ist, dass eine eventuell vorhandene ^1H - ^1H -Kopplung sichtbar ist. Die Multiplizität des entstehenden Signals ist damit meist deutlich komplizierter als die des gewünschten reinen $^1J_{\text{CH}}$ -Dubletts.

Im anisotropen Medium sorgen die ^1H - ^1H -Kopplungen, die nun durch dipolare Kopplungen verstärkt sein können, dafür, dass die Linienbreite der beiden Dublettäste deutlich erhöht wird. Zur genauen Extraktion von Kopplungskonstanten kann dies hinderlich sein, je kleiner die Linienbreite, desto genauer kann die Kopplungskonstante extrahiert werden. Neben der Linienbreite kann eine Verringerung von aufgrund von Signalüberlagerungen und Effekten starker Kopplung entstehende Asymmetrien der Signale zu einer deutlichen Erhöhung in der Genauigkeit der Kopplungskonstantenmessung führen. Für die RDC-Analyse ist eine genaue Messung der Kopplungskonstanten unabdingbar. Besonders bei sehr schwachem Alignment kann der Fehler der anisotropen Messung in der Größenordnung der gewonnenen RDC liegen, sodass eine Auswertung nicht aussagekräftig ist.

Es ist somit wünschenswert, die Linienbreite deutlich zu reduzieren. Dies kann durch selektive Unterdrückung der ^1H - ^1H -Kopplung geschehen, während die ^1H - ^{13}C -Kopplung nicht unterdrückt wird, sondern

sich entwickeln kann. Die selektive Unterdrückung erfolgt im hier diskutierten Fall durch Kombination des *Bilinear Rotational Decoupling* (BIRD)-Filters^[179] mit einem ¹H-Inversionspuls. Anschließend wird nur ein sehr kurzer Teil des *Free Induction Decay* (FID) aufgenommen, während dem sich keine homonukleare Kopplung entwickeln kann. Durch das Einführen einer Pseudodimension zum Sammeln mehrerer solcher kurzer FID-Teile kann analog zum ZANGGER-STERK-Experiment^[180] ein vollständiger FID in gewünschter Länge aufgenommen werden. Das Resultat ist ein Dublett, dessen Linienbreite im Falle der Unterdrückung homonuklearer Kopplungen reduziert sein kann. Eine auf diese Weise reduzierte Linienbreite kann eine genauere Extraktion der Kopplungskonstanten ermöglichen.

Die Anwendung dieser Methode wird im isotropen und im anisotropen Medium demonstriert. Getestet wurde dies von TIMARÍ mit Tetranatrium-1-methyl-2,3,4-tri-*O*-sulfonato-6-deoxy-6-*C*-sulfonatomethyl- α -D-glucopyranosid **63**, das in D₂O und in einem Flüssigkristall nach OTTING^[136] zur RDC-Messung eingesetzt wurde.

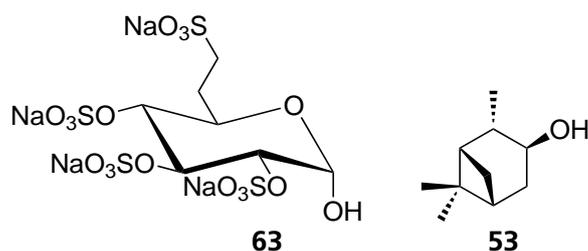
Diese in Kooperation der Arbeitskreise von THIELE, KÖVÉR und MORRIS entwickelte Modifikation des CLIP-HSQC-Experiments erlaubt es somit, ein pure-shift-HSQC-Spektrum zu erhalten, in denen die Unterdrückung der Protonen-Protonen-Kopplung scharfe Singulets erzeugt und Artefakte der starken Kopplung verringert werden. Durch leichte Modifikation des BIRD-CLIP-HSQC-Experiments kann außerdem ein heteroentkoppeltes BIRD-HSQC-Spektrum erhalten werden, dessen Intensitäten vergleichbar zu dem des RESET-HSQC^[181] ist. Besonders für automatisierte Signalerkennung und -zuordnung kann dies nützlich sein.

Gleichzeitig zu dieser Entwicklung und unabhängig von diesen Ergebnissen wurde von REINSPERGER und LUY ebenfalls an einem BIRD-entkoppelten CLIP-HSQC-Experiment gearbeitet^[182]. Die Publikation der Ergebnisse erfolgte parallel^[2,182].

Dieses Experiment stellt eine Verbesserung gegenüber dem regulären CLIP-HSQC-Experiment dar. Durch die selektive Unterdrückung der Protonen-Protonen-Kopplung sollte die Extraktion von RDC-Daten mit höherer Genauigkeit möglich sein, wodurch bessere Analysen der zu untersuchenden Moleküle möglich sein sollten. Allerdings ist dieses Experiment noch nicht perfekt, da es keine geminalen Kopplungen von CH₂-Gruppen unterdrücken kann.

Durch Kombination des *perfect-echo*-Elements mit dem BIRD-Filter konnte von KALTSCHNEE das perfectBIRD-CLIP-Experiment gestaltet werden. Dieser Filter erlaubt die zusätzliche Unterdrückung von geminalen ²J_{HH}-Kopplungen in CH₂-Gruppen, sodass reine Dubletts entstehen. Mit Ausnahme von ²J_{HH}-Kopplungen in Methylgruppen in anisotroper Umgebung können so alle Protonen-Protonen-Kopplungen unterdrückt werden.

Dies konnte im isotropen und im anisotropen Medium gezeigt werden. Dazu wurden Proben von (+)-Isopinocampheol **53** in CD₂Cl₂ und CD₂Cl₂/Poly- γ -benzyl-D-glutamat (PBDG) hergestellt. Als besonderes



Problem erwies sich, dass das gewählte Alignment zu einer totalen Kopplung von -38,4 Hz zwischen den geminalen Protonen $H_{7a} - H_{7s}$ führte. Die Unterdrückung dieser Kopplung gelang KALTSCHNEE durch Reduktion der Länge der aufgenommenen FID-Stücke.

Die Auswertung der RDC-Daten zeigte, dass die Genauigkeit der RDC-Messung durch die Verwendung des perfectBIRD-Elements gegenüber den BIRD-CLIP-HSQC und dem CLIP-HSQC verbessert werden konnte. Gleichzeitig konnte durch eine systematische Fehlerbestimmung in Zusammenarbeit mit KALTSCHNEE und SCHMIDTS gezeigt werden, dass der experimentelle Fehler der Kopplungskonstantenbestimmung verringert wird.

Besonders im Hinblick auf konformationelle Flexibilität ist diese Methode vielversprechend. Die erhöhte Genauigkeit ermöglicht es, den experimentellen Fehler der RDCs zu reduzieren. So sollten nicht populierte Konformere leichter identifiziert werden können. Außerdem sollte die Genauigkeit, mit der ein Minimum der RDC-Analyse bestimmt werden kann, ebenfalls erhöht werden. Somit werden wiederum verlässlichere Aussagen über Konformerpopulationen ermöglicht.

Ein Nachteil der Methode ist die gegenüber dem regulären CLIP-HSQC verringerte Sensitivität und somit Signalintensität sowie die längere Experimentdauer. Bei der Betrachtung von Fällen geringer molekularer Komplexität, sowie bei der Untersuchung von Proben geringer Sensitivität, ist somit abzuwägen, ob der erhöhte Messzeitaufwand durch den erhofften Gewinn an Informationen über das zu untersuchende Molekül gerechtfertigt ist.

In diesem Abschnitt konnte also demonstriert werden, dass die Genauigkeit der RDC-Extraktion gesteigert werden kann. Im Kontext dieser Dissertation ist der nächste Schritt, die Genauigkeit von NOE-Daten zu evaluieren, dies folgt im nächsten Abschnitt.

Abdruckerlaubnis erteilt:

I. Timári, L. Kaltschnee, A. Kolmer, R. W. Adams, M. Nilsson, C. M. Thiele, G. A. Morris, K. E. Kövér, *J. Magn. Reson.* **2014**, *239* (1), 130–138. Veröffentlicht von Elsevier Inc. (CC BY 3.0).

L. Kaltschnee, A. Kolmer, I. Timári, V. Schmidts, R. W. Adams, M. Nilsson, K. E. Kövér, G. A. Morris, C. M. Thiele, *Chem. Commun.* **2014**, *50* (99), 15702–15705. Veröffentlicht von The Royal Society of Chemistry (CC BY 3.0).



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Magnetic Resonance

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmr

Accurate determination of one-bond heteronuclear coupling constants with “pure shift” broadband proton-decoupled CLIP/CLAP-HSQC experiments [☆]



István Timári^a, Lukas Kaltschnee^b, Andreas Kolmer^b, Ralph W. Adams^c, Mathias Nilsson^{c,d}, Christina M. Thiele^b, Gareth A. Morris^c, Katalin E. Kövér^{a,*}

^a Department of Inorganic and Analytical Chemistry, University of Debrecen, Egyetem tér 1, H-4032 Debrecen, Hungary

^b Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität Darmstadt, Alarich-Weiss-Straße 4, D-64287 Darmstadt, Germany

^c School of Chemistry, University of Manchester, Oxford Road, Manchester M13 9PL, United Kingdom

^d Department of Food Science, University of Copenhagen, Rolighedsvej 30, DK-1958 Frederiksberg C, Denmark

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 October 2013

Available online 14 November 2013

Keywords:

Broadband proton decoupling

F_2 -coupled HSQC

Pure absorption

IPAP

RDC

ABSTRACT

We report broadband proton-decoupled CLIP/CLAP-HSQC experiments for the accurate determination of one-bond heteronuclear couplings and, by extension, for the reliable measurement of small residual dipolar coupling constants. The combination of an isotope-selective BIRD^(d) filter module with a non-selective ¹H inversion pulse is employed to refocus proton–proton coupling evolution prior to the acquisition of brief chunks of free induction decay that are subsequently assembled to reconstruct the fully-decoupled signal evolution. As a result, the cross-peaks obtained are split only by the heteronuclear one-bond coupling along the F_2 dimension, allowing coupling constants to be extracted by measuring simple frequency differences between singlet maxima. The proton decoupling scheme presented has also been utilized in standard HSQC experiments, resulting in a fully-decoupled pure shift correlation map with significantly improved resolution.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Residual dipolar couplings (RDCs) provide invaluable long-range constraints for structure determination of molecules, conveying information on the distances between dipolar-coupled nuclei and on the orientations of the corresponding internuclear bond vectors. In recent years residual dipolar couplings have therefore been widely utilized in structural studies of proteins, nucleic acids, carbohydrates, organic and organometallic compounds in the liquid state, and have been shown to improve considerably the precision of structures [1–9].

For weakly aligned samples, RDCs manifest themselves in NMR spectra as an increase or decrease in the splittings due to scalar (J) couplings between nuclei. Their magnitudes can therefore be extracted by measuring changes of splitting in isotropic compared to anisotropic sample conditions.

Here we propose a modification of F_2 -coupled CLIP/CLAP-HSQC [10] experiments in which the unwanted additional splittings caused by co-evolution of proton–proton couplings are eliminated

with the aid of an isotope-selective BIRD-based broadband proton decoupling scheme applied during signal evolution. Thus one-bond heteronuclear couplings can be determined from the resulting spectra simply by measuring the frequency differences between the peak maxima of singlets, instead of between the centers of complex multiplets.

We also demonstrate that the proposed broadband proton decoupling scheme, when built into the standard gradient enhanced HSQC experiment, leads to pure shift correlation spectra of enhanced resolution, offering significant advantages for automated spectral analysis such as automated peak-picking or automated intensity measurement in HSQC-based relaxation experiments.

2. Experimental

All experiments were performed on a Bruker Avance II 500 spectrometer (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany) equipped with a TXI z-gradient probe. All spectra were processed with TopSpin 2.1, 2.5 or 3.0 (Bruker Biospin GmbH, Karlsruhe, Germany). For testing the experiments a sample of ¹³C-labeled [C-1]-methyl- α , β -D-glucopyranoside (**1**) (30 mg) dissolved in 500 μ l D₂O was used. The measurement of RDCs was demonstrated on a

[☆] Submitted jointly with J. Magn. Reson. 239 (2014) 132–140. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmr.2013.12.004>

* Corresponding author.

E-mail address: kover@science.unideb.hu (K.E. Kövér).

sample of tetra-sodium-(1-methyl-2,3,4-tri-*O*-sulfonato-6-deoxy-6-*C*-sulfonatomethyl- α -*D*-glucopyranoside) (**2**) (20 mg), dissolved in 500 μ l D_2O for isotropic condition. The liquid crystalline phase was prepared as described by Rückert and Otting [11] from ether/alcohol (hexaethylene glycol monododecyl ether ($C_{12}E_6$)/n-hexanol, 5%, $r = 0.64$, $J_Q = 25$ Hz). The $C_{12}E_6$ and n-hexanol were purchased from Sigma-Aldrich and used without further purification. The variants of the HSQC sequence were tested on a sample of *D*-sucrose (**3**) (30 mg) dissolved in 500 μ l D_2O . For all measurements the nominal temperature was set to 298 K unless indicated otherwise. All F_2 -coupled CLIP/CLAP-HSQC spectra were acquired with a high spectral resolution of 0.3 Hz/point, for accurate measurement of small residual dipolar couplings. The ^{15}N - 1H pure shift HSQC spectrum was recorded for 1.6 mM [U - ^{15}N]-*Penicillium* antifungal protein (PAF) (95%: 5% $H_2O:D_2O$), pH 5.0, at 300 K.

Spectra were recorded with a proton 90° pulse of 15 μ s, a carbon 90° pulse of 15.7 μ s for acquisition, a carbon 90° pulse of 80.0 μ s for GARP decoupling, smoothed chirp pulses (Crp60,0.5,20.1) of 500 μ s duration for broadband ^{13}C inversion and (Crp60comp,4) of 2 ms for broadband ^{13}C refocusing. 1H - ^{15}N HSQC spectra were collected with nitrogen 90° pulses of 29 μ s for acquisition and 250 μ s for WALTZ16 decoupling.

For processing the 3D raw data sets acquired with the pulse sequences presented, a Bruker AU program (available at <http://nmr.chemistry.manchester.ac.uk>) was used to reconstruct the 2D interferograms. Prior to 2D Fourier transformation, the data were apodized by multiplying with a 90° shifted sine-squared function and then zero-filled by a factor of two in both dimensions, to yield a spectral resolution of 0.3–0.5 Hz/point in the 1H dimension.

3. Results and discussion

Due to the increasing interest in the use of RDCs in recent years, numerous methods based on measuring frequency differences between multiplet components have been developed for the measurement of one-bond heteronuclear coupling constants. The most widely used approach is based on the HSQC experiment, with het-

eronuclear couplings retained in the F_1 or F_2 dimension. To circumvent spectral crowding due to the increased number of cross-peaks in the coupled spectra, E-COSY [12], spin-state selective [13–15], IPAP [16] and TROSY [17–19] methods have been proposed. Unfortunately, all these methods suffer from additional splittings of cross-peaks due to the co-evolution during data acquisition of coupling interactions other than the desired heteronuclear one-bond coupling.

To eliminate line-splittings caused by multiple bond heteronuclear couplings in the F_1 -coupled HSQC sequence, a gradient enhanced BIRD⁽¹⁾ module has been employed during the evolution period t_1 , yielding simplified cross peaks with only splittings due to the desired one-bond couplings in the F_1 dimension [20,21]. However, heteronuclear correlation experiments coupled in the indirect F_1 dimension are limited by the necessity of acquiring large numbers of t_1 points to achieve sufficiently high digital resolution, therefore making the experiment rather time-consuming. For this reason, measurement of one-bond heteronuclear coupling constants from F_2 multiplets appears more favorable due to the high digital resolution affordable in the F_2 dimension. However, the complexity and asymmetry of multiplet structures due to proton-proton scalar/dipolar couplings may render the accurate definition of peak positions difficult or even impossible.

A breakthrough in the removal of unwanted line-splittings is offered by the use of broadband homonuclear decoupling methods that have been reported in the last few years [22–31]. Such experiments can be classified into two groups, depending on the decoupling approach employed. The first group [22,23,25,26,28,30] utilizes the Zangger–Sterk approach [22], which achieves broadband homonuclear decoupling by combining a hard 180° and a selective 180° proton pulse, the latter applied under the action of a weak gradient field pulse to give an effect that is both spatially- and frequency-selective. As a result, in a given slice of the sample the on-resonance magnetization experiences no net effect, whereas all other proton magnetizations are inverted, refocusing any homonuclear scalar couplings to the observed spin. The second group [24,27,29,31] of experiments performs broadband

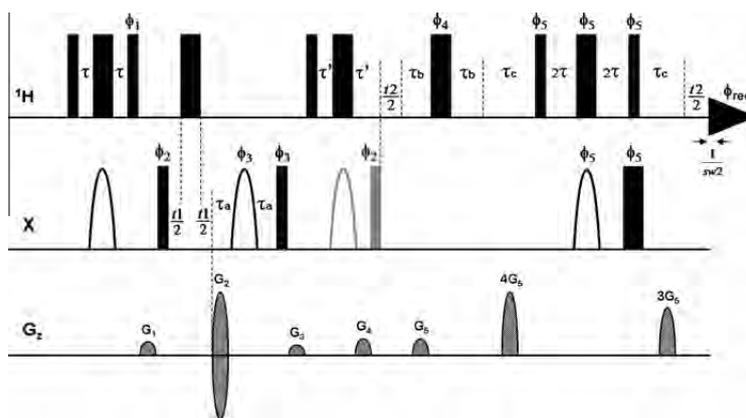
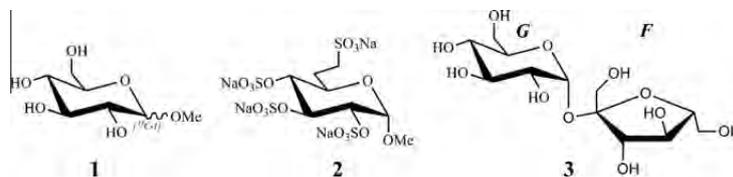


Fig. 1. Broadband proton-decoupled CLIP- and CLAP-HSQC experiments designed for the measurement of ($^1J_{CH} + ^1D_{CH}$) couplings. Narrow and wide filled bars correspond to 90° and 180° pulses, respectively, with phase x unless indicated otherwise. Smoothed chirp inversion and refocusing X pulses are shown as half-ellipses. Phases are $\phi_1 = y$; $\phi_2 = x, -x$; $\phi_3 = x, x, -x, -x$; $\phi_4 = y, y, y, y, y, y, y, y, -x, -x, -x, -x, -x, -x, -x, -x$; $\phi_5 = y, y, y, y, -x, -x, -x, -x$; and $\phi_{rec} = x, -x, -x, x, -x, x, x, -x, -x, x, x, -x, -x, x, x$. Delays are set as follows: $\tau = 1/(4 + ^1J_{XH})$, $\tau_a = p16 + d16$, $\tau_b = 1/(4 + sw2)$, $\tau_c = p16 + d16 + 350 \mu$ s, $\tau'_{(CLIP)} = \tau$; $\tau'_{(CLAP)} = p16 + d16$. Coherence order selection and echo-antiecho phase sensitive detection in the X-dimension are achieved with gradient pulses G_2 and G_4 in the ratio 80:20.1 for ^{13}C and 80:8.1 for ^{15}N , respectively. Purging gradient pulses G_1 , G_3 are set to 15%, 11% of maximum gradient strength (50 G/cm), typically of 1 ms duration ($p16$) followed by a recovery delay $d16 = 50 \mu$ s. Coherence selection gradient pulses used in the extra proton-decoupled dimension have $G_5 = 18\%$. In the CLIP-HSQC sequence an additional carbon 90° pulse (shown in gray) is employed to remove the undesired residual dispersive antiphase proton magnetization prior to detection, as proposed by Enthart et al. [10]. In contrast, in the CLAP-HSQC experiment the antiphase proton magnetization is retained and detected after $X \rightarrow ^1H$ back-transfer, so only a short spin-echo sequence ($2 * \tau'$) with a proton 180° pulse in the middle is used to accommodate the gradient pulse G_4 . The purging carbon 90° pulse and a carbon 180° pulse (shown in gray) used in the CLIP-experiment are omitted in this case.



Scheme 1. Model compounds used for testing the experiments. ^{13}C -labeled [C-1]-methyl- α,β -D-glucopyranoside (1), tetra-sodium-(1-methyl-2,3,4-tri-O-sulfonato-6-deoxy-6-C-sulfonatomethyl- α -D-glucopyranoside) (2) and D-sucrose (3).

homonuclear decoupling with a bilinear rotation decoupling (BIRD) module [32], utilizing isotope selection instead of the slice/chemical shift filtering of the Zangger–Sterk approach. Depending on the phases of BIRD pulse elements, either the direct or the remote protons attached to $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ isotopes can be independently and selectively inverted.

The BIRD approach is used in the variants of the gradient enhanced CLIP/CLAP-HSQC experiments presented here, and yields spectra with simple, pure absorptive in- or anti-phase F_2 doublets displaying only the desired $^1J_{\text{XH}}$ splitting in isotropic or ($^1J_{\text{XH}} + ^1D_{\text{XH}}$) splitting in anisotropic solution, respectively and allowing high spectral resolution along the F_2 dimension. The one exception is that because the BIRD module does not distinguish between methylene protons, geminal ^1H – ^1H couplings are not suppressed.

3.1. Broadband proton-decoupled CLIP- and CLAP-HSQC experiments

In the modified CLIP/CLAP-HSQC experiments reported here, broadband proton decoupling in the ^1H dimension is achieved by replacing the conventional data acquisition of a free induction decay (FID) $s(t_2)$ at the end of the HSQC pulse sequence with a second evolution time, t_2 , at the centre of which a hard 180° proton pulse and a BIRD pulse sequence element are applied in succession, followed by acquisition of a FID $s(t_3)$. The BIRD^(d) pulse selectively inverts all proton magnetization directly attached to the X nuclei, but leaves the magnetizations of remotely bound protons and X nuclei unperturbed. In combination with the non-selective 180° proton pulse, therefore, the net effect is for the ^1H chemical shift and the heteronuclear one-bond coupling to continue to evolve throughout t_2 . The measurement is repeated, acquiring FIDs $s(t_3)$ while incrementing t_2 in steps of $1/\text{sw}_2$, where the second indirect spectral width, sw_2 , is large compared to the widths of the proton multiplets. Once a full dataset $s(t_1, t_2, t_3)$ has been acquired, a pseudo-2D dataset is produced by stitching together chunks of $s(t_3)$ of duration $1/\text{sw}_2$ for successive increments of t_2 . The result is a pseudo-2D dataset $s(t_1, t'_2)$ in which signal evolves as normal (δ_{C} only) as a function of t_1 , and as a pure shift ^1H signal in t'_2 (δ_{H} , $^2J_{\text{HH}}$ and $^1J_{\text{CH}}$ only). Typically sw_2 is 40–100 Hz, and 16–32 FIDs $s(t_3)$ are acquired, giving a maximum t'_2 of 160–800 ms and yielding ample spectral resolution for coupling constant measurement. It is important to note that the best results require very careful timing of the BIRD^(d) and ^1H 180° pulse decoupling elements. Therefore, the correct setting of the delays in the sequences of Fig. 1, as detailed in the figure legend, is critical.

As in the original CLIP-HSQC experiment [10], a carbon 90° pulse is employed to purge the undesired residual dispersive anti-phase proton magnetization prior to detection. In the case of the CLAP-HSQC sequence, proton magnetization is detected in anti-phase, so only a short spin-echo sequence to accommodate the coherence selection gradient pulse (G_4) follows, and the purging carbon pulse is omitted here.

The broadband proton-decoupled sequences of Fig. 1 have been tested on the small model compounds depicted in Scheme 1.

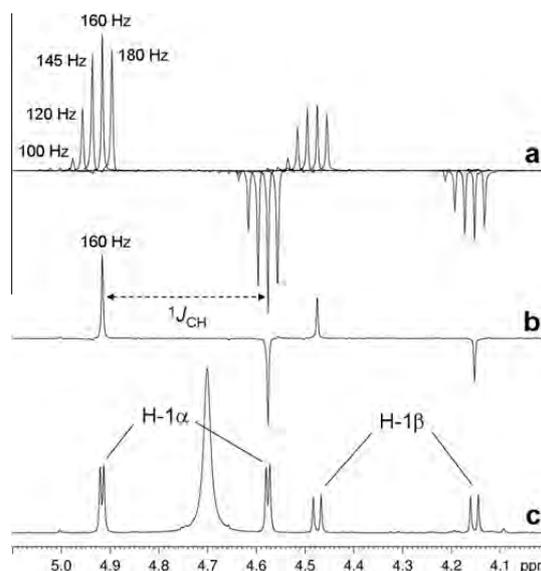


Fig. 2. Illustration of the robustness of the proposed CLAP-HSQC experiment with regard to mismatch between the INEPT and BIRD delays in the sequence and $^1J_{\text{XH}}$. Spectra of ^{13}C -labeled [C-1]-methyl- α,β -D-glucopyranoside (a,b) were recorded using the sequence of Fig. 1 with the incremented delay t_1 replaced by a constant delay of $3\ \mu\text{s}$, to give broadband proton-decoupled 1D spectra. These were recorded with different durations of INEPT and BIRD delays (corresponding to the values of $^1J_{\text{XH}}$ shown above the relevant spectra in (a,b)). Spectra in (a) were normalized to allow proper evaluation of the relative signal intensities and their dependence on the delays. Normal ^1H NMR spectrum of 1 is shown in (c). Spectra (a,b) were recorded with spectral widths in the ^1H dimension = 6.0371 ppm, relaxation delay = 1.7 s, number of scans = 4, number of t_2 increments (i.e. number of FID chunks) = 32, duration of FID chunk = 21.197 ms, number of data points of constructed FID in ^1H dimension = 4096 complex data points.

First, to investigate the robustness and tolerance of the experiments with regard to mismatch of the BIRD/INEPT delays in the sequence, a ^{13}C -labeled compound, [C-1]-methyl- α,β -D-glucopyranoside (1), was used. The results are shown in Fig. 2, which presents the C-1 doublets obtained with the broadband proton-decoupled CLAP-HSQC sequence using BIRD/INEPT delays adjusted to a range of nominal one-bond heteronuclear coupling constant spanning 100–180 Hz. It can clearly be seen that the intensities of the signals are, as expected, significantly degraded when the delays are mismatched to the coupling constant, but that the pure absorptive quality of the lineshapes remains basically unaffected, allowing accurate measurement of couplings even in anisotropic samples where net coupling constants vary widely. These results clearly demonstrate that the proposed sequences, used in combination with the pulsed field gradient coherence selection scheme illustrated in Fig. 1, efficiently remove the

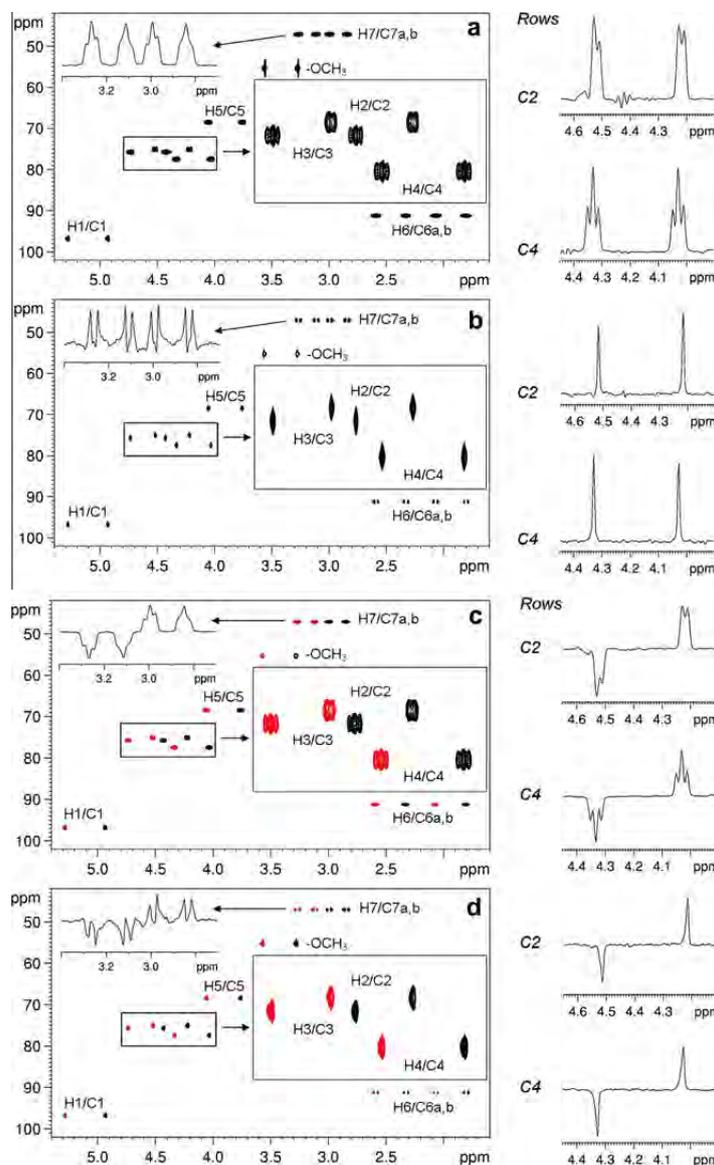


Fig. 3. Representative CLIP- and CLAP-HSQC spectra recorded with the conventional sequences [10] (a and c) and the new broadband proton-decoupled sequences of Fig. 1 (b and d) on an isotropic sample of compound **2** dissolved in D_2O . The carbon traces shown next to the corresponding spectra illustrate the characteristic differences in multiplet structure observed in the different experiments. Spectra were recorded at 300 K with spectral width in ^{13}C (1H) dimension = 65.0 (4.9887) ppm, relaxation delay = 1.7 s, number of t_1 increments = 200, number of scans = 64 using the conventional CLIP/CLAP-HSQC sequences. The broadband decoupled spectra were collected with number of scans = 4, number of t_2 increments (i.e. number of FID chunks) = 16, duration of FID chunk = 20.842 ms, number of data points of constructed FID in 1H dimension = 1664 complex data points.

undesired residual dispersive coherences arising from the mismatch between delays and J_{CH} .

Applications of the broadband proton-decoupled CLIP/CLAP-HSQC experiments of Fig. 1 under isotropic and partially orienting sample conditions are demonstrated using model compound **2** (Scheme 1). A comparison between CLIP- and CLAP-HSQC spectra acquired with the conventional sequence [10] and the broadband decoupled sequence of Fig. 1 is given in Fig. 3. The selected carbon traces presented at the right hand side of the corresponding

spectra nicely demonstrate that the decoupled experiments result in collapsed proton multiplets for XH spin systems. The pure absorptive in- or antiphase doublets, with splittings due solely to the desired one-bond couplings, allow the direct and accurate determination of the scalar coupling constants.

To investigate their potential use for RDC measurement, we have also tested the performance of the new sequences on the same model compound (**2**) but this time dissolved in a weakly-orienting liquid crystalline phase of ether/alcohol mixture,

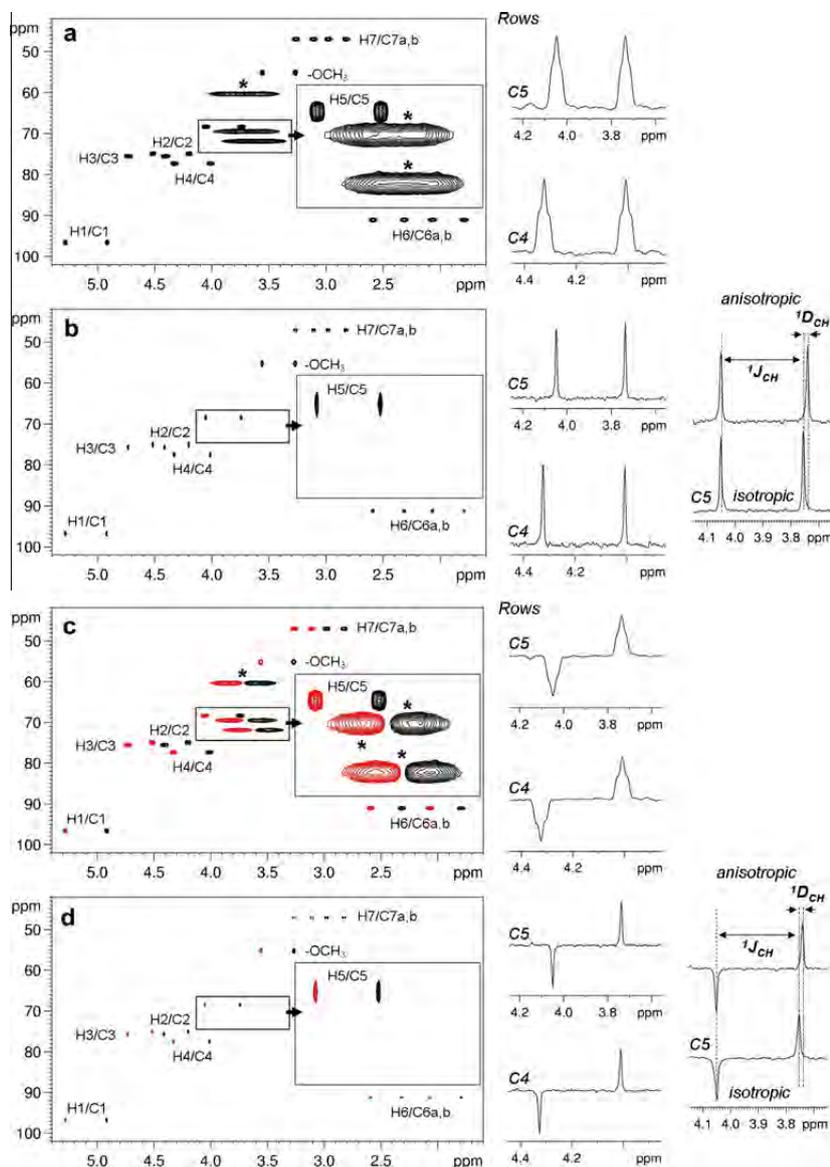


Fig. 4. Representative CLIP- and CLAP-HSQC spectra recorded with the conventional sequences [10] (a and c) and the broadband proton-decoupled sequences of Fig. 1 (b and d) on an anisotropic sample of compound **2** dissolved in the weakly-orienting phase Otting media [11]. The high quality of the spectra and of the carbon traces extracted confirm that the good performance of the experiments is maintained under anisotropic condition, ensuring the accuracy of dipolar contributions measured from the splittings, as shown for representative multiplets of C5. (Note: We use the convention of total coupling constant ($^1J_{\text{CH}} + ^1D_{\text{CH}}$) throughout the text.) Spectra were recorded at 300 K with spectral widths in ^{13}C (^1H) dimension = 65.0 (6.0371) ppm, relaxation delay = 1.7 s, number of t_1 increments = 200, number of scans = 64 using the conventional CLIP/CLAP-HSQC sequences. The broadband decoupled spectra were collected with number of scans = 8, number of t_2 increments (i.e. number of FID chunks) = 16, duration of FID chunk = 21.197 ms, number of data points of constructed FID in ^1H dimension = 2048 complex data points.

as proposed by Rückert and Otting [11]. The high quality of the spectra and the selected carbon traces, with pure absorptive in- or antiphase doublets, shown in Fig. 4 demonstrates the good performance of these experiments, and promises the reliable measurement of RDCs, as exemplified for selected multiplets of C5.

It should be mentioned here that the undesired extra signals marked by asterisks (*) in Fig. 4, which arise from the weakly orienting phase in the anisotropic sample, show considerably reduced

intensity in the broadband proton-decoupled spectra, but this is simply due to T_2 relaxation during the extended acquisition scheme of the decoupled sequences.

It is also important to note that following the IPAP-approach, as proposed earlier [16] (that is, adding and subtracting CLIP- and CLAP-HSQC spectra) allows quantitative extraction of one-bond coupling constants even in the case of complete overlap of α and β components of different doublets.

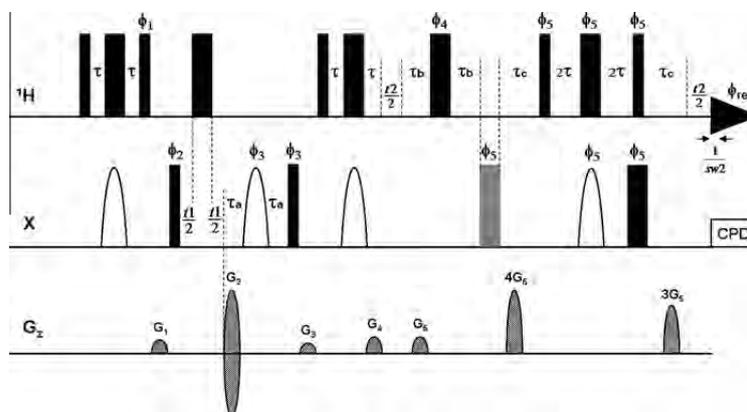


Fig. 5. Scheme of the broadband proton-decoupled (pure shift) HSQC (PS-HSQC) experiment. Narrow and wide filled bars correspond to 90° and 180° pulses, respectively, with phase x unless indicated otherwise. Smoothed chirp inversion and refocusing X pulses are shown as half-ellipses. Phases are $\phi_1 = Y$; $\phi_2 = X, -X$; $\phi_3 = X, X, -X, -X$; $\phi_4 = Y, Y, Y, Y, Y, Y, -X, -X, -X, -X, -X, -X, -X, -X, -X, -X$; $\phi_5 = Y, Y, Y, Y, -X, -X, -X, -X$; and $\phi_{rec} = X, -X, -X, X, -X, X, X, -X, -X, X, X, -X, -X, X, X, -X, -X, X, X, -X, -X, X, X$. Delays are set as follows: $\tau = 1/(4 * J_{CH})$, $\tau_a = p16 + d16$, $\tau_b = 1/(4 * sw2)$, $\tau_c = p16 + d16 + 350 \mu s$. Coherence order selection and echo-antiecho phase sensitive detection in the X-dimension are achieved with gradient pulses G_2 and G_4 in the ratio 80:20.1 for ^{13}C and 80:8.1 for ^{15}N , respectively. Purging gradient pulses G_1, G_3 are set to 15%, 11% of maximum gradient strength (50 G/cm), typically with 1 ms duration ($p16$) followed by a recovery delay $d16 = 50 \mu s$. Coherence selection gradient pulses are used in the extra proton-decoupled dimension with $G_5 = 18\%$. An additional carbon 180° pulse (shown in gray) is employed to refocus the evolution of one-bond heteronuclear coupling between FID chunks. CPD decoupling is turned on during detection.

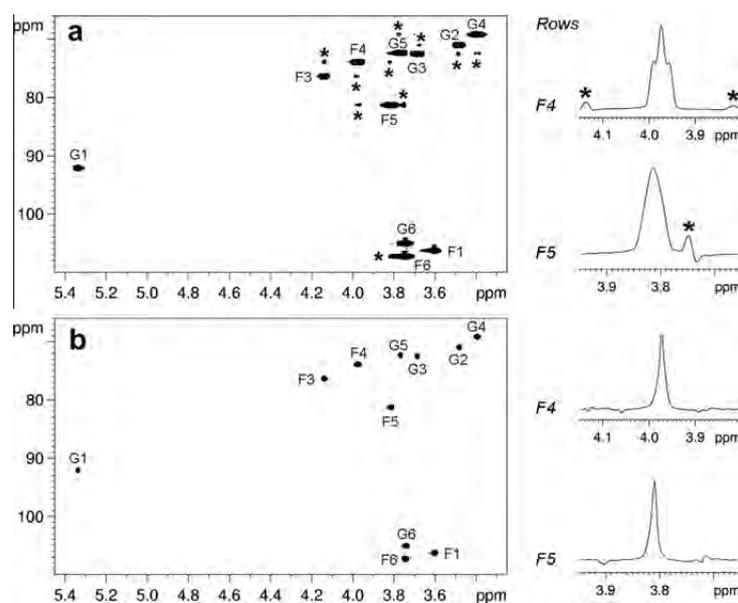


Fig. 6. Comparison of HSQC spectra recorded without (a) and with (b) broadband proton decoupling for *D*-sucrose dissolved in D_2O (30 mg/500 μl). Long-range correlation artifacts resulting from strong coupling effects observed in spectrum (a) acquired with the standard gradient enhanced HSQC sequence are labeled with asterisks (*) in both the correlation map and the selected carbon traces. In the broadband decoupled spectrum (b) these artifacts are almost entirely suppressed, resulting in a high quality pure shift correlation map with collapsed proton multiplet structure, suitable for automated spectral analysis. Spectra were recorded with spectral widths in ^{13}C (1H) dimension = 45.0 (6.0371) ppm, relaxation delay = 1.7 s, number of t_1 increments = 180. Number of scans = 32 was used with the conventional HSQC sequence. The broadband decoupled spectrum was collected with number of scans = 2, number of t_2 increments (i.e. number of FID chunks) = 16, duration of FID chunk = 21.197 ms, number of data points of constructed FID in 1H dimension = 2048 complex data points.

3.2. Broadband proton-decoupled, pure shift HSQC experiment

With a slight modification of the CLIP-HSQC sequence described above, a new method for generating broadband proton-decoupled (pure shift) HSQC (PS-HSQC) spectra is proposed. Such spectra have hitherto required a different experimental approach [24].

The PS-HSQC sequence depicted in Fig. 5 starts with the CLIP-HSQC block of the sequence in Fig. 1, but here the last purging carbon 90° pulse (which becomes superfluous when X-decoupling is used during detection) is omitted. In addition, the acquisition scheme detailed in the previous section is extended with two elements: (1) an appropriately-positioned carbon inversion 180°

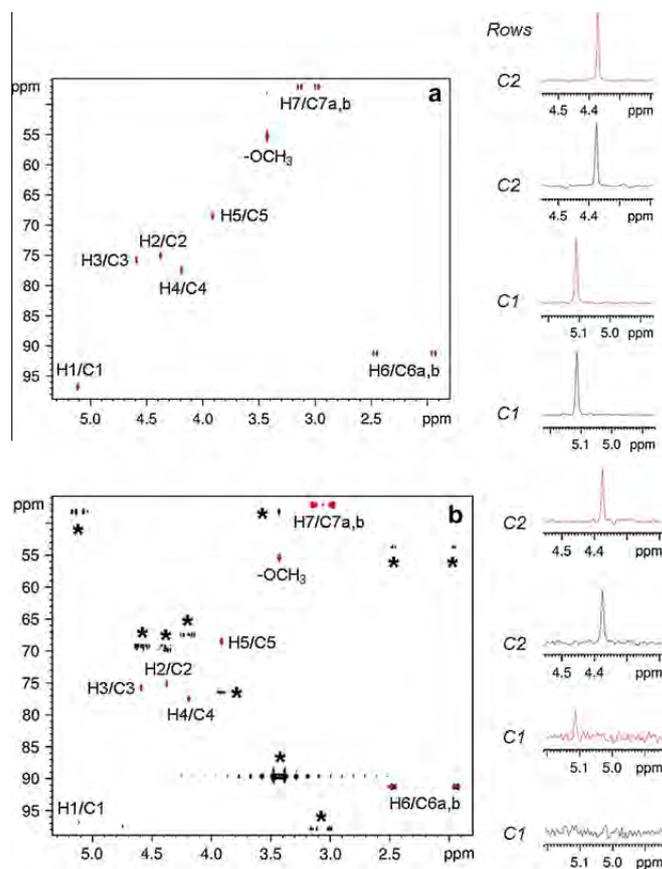


Fig. 7. Comparison of HSQC spectra recorded with the present (red lines) and earlier reported [24] (black lines) broadband proton-decoupled sequences for an isotropic sample of compound **2**. Experiments were performed with the same experimental parameters and data acquisition scheme, and the same data processing was used. To compare the sensitivity and robustness of sequences, spectra were collected with INEPT/BIRD delays adjusted to nominal $^1J_{\text{CH1}}$ values of 145 Hz (a) and 100 Hz (b) (deliberately misset), respectively. The intensities of the signals in the spectra displayed are normalized, allowing proper comparison of sensitivity and of artifact (marked by *) amplitudes. Spectra were recorded with spectral widths in ^{13}C (^1H) dimension = 65.0 (4.9887) ppm, relaxation delay = 1.7 s, number of t_1 increments = 200, number of scans = 2, number of t_2 increments (i.e. number of FID chunks) = 16, duration of FID chunk = 20.842 ms, number of data points of constructed FID in ^1H dimension = 1664 complex data points. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

pulse (shown in gray) is needed to refocus the evolution of one-bond heteronuclear coupling between the detected FID chunks; and (2) composite pulse X-decoupling is turned on during FID acquisition $s(t_3)$ to remove the undesired heteronuclear coupling interactions and so to obtain a fully decoupled, pure shift (PS) $X-^1\text{H}$ correlation spectrum.

The beneficial features of the PS-HSQC sequence presented are illustrated in Fig. 6, which compares the HSQC spectra of D-sucrose and representative F_2 traces recorded with the standard non-decoupled and decoupled experiments. It is evident from the spectra presented that the removal of proton–proton splittings from $X-^1\text{H}$ correlation spectra yields a considerable resolution improvement, making unambiguous spectral assignments and automated analyses feasible even in crowded spectra. The reduction of signal width due to proton–proton broadband decoupling, together with the pseudo-3D acquisition scheme employed, is particularly interesting for the collection of high resolution data. Specifically, in the PS-HSQC experiment presented, the resolution attainable in the direct dimension is not limited by the sample heating of X-decoupling during detection, but simply by the number of t_2 increments. Thus spectra with large

numbers of t_2 increments, offering high resolution in F_2 , can be collected even under the action of broadband heteronuclear decoupling.

An additional advantageous side-product of the BIRD^(d) filter employed in the acquisition scheme presented is the efficient suppression of undesired long-range cross peaks arising from strong coupling effects, as demonstrated in Fig. 6. The strong coupling artifacts, marked by asterisk (*) in the standard HSQC spectrum (Fig. 6a) and the corresponding carbon traces at F4, F5, are almost entirely suppressed in the PS-HSQC spectrum (Fig. 6b), yielding a high quality pure shift correlation map for further spectral analysis. Note that this beneficial purging feature of the BIRD module has been utilized earlier in the standard HSQC experiment [33,34].

To compare the sensitivity and robustness of the present pure shift HSQC experiment and the earlier method of Sakhaii et al. [24], HSQC spectra were recorded using the two pulse sequences with identical experimental parameters, but employing the same data acquisition scheme and processing, to ensure comparability. The signal intensities measured in the correlation spectra of Fig. 7 and illustrated by representative carbon traces at the right

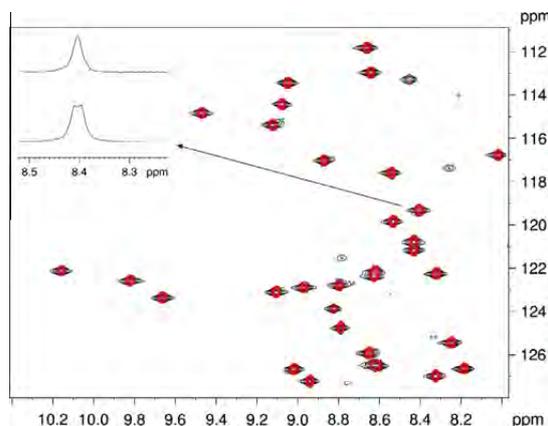


Fig. 8. Comparison of ^1H - ^{15}N HSQC peak linewidths of PAF in spectra recorded without (black lines and lower trace at the left) and with (red lines and upper trace at the left) broadband proton decoupling. The advantage of the broadband decoupled sequence of Fig. 5 for macromolecules is demonstrated by the collapsed proton doublet structures, resulting in considerable reduction of the observed linewidth, and unequivocal peak definition for automated data analysis. Spectra were recorded with spectral widths in ^{15}N (^1H) dimension = 19.0 (4.9887) ppm, relaxation delay = 1.7 s, number of t_1 increments = 128. Number of scans = 64 was used with the conventional HSQC sequence. The broadband decoupled spectrum was collected with number of scans = 4, number of t_2 increments (i.e. number of FID chunks) = 16, duration of FID chunk = 21.245 ms, number of data points of constructed FID in ^1H dimension = 1696 complex data points. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

show that the sensitivity of the two experiments is comparable. Interestingly, the HSQC spectra recorded with intentionally mismatched INEPT/BIRD delays corresponding to $^1J_{\text{XH}} = 100$ Hz show significant dissimilarity in the appearance of artifacts. The purging and coherence selection gradient scheme employed in the broadband proton-decoupled HSQC sequence of Fig. 5 seem to suppress the effects of the proportion of magnetization that does not experience perfect rotation by the BIRD^(d) module with high efficiency, yielding clean and artifact-free spectra even for a wide range of BIRD delays and hence for a wide range of one-bond coupling constants.

As noted earlier, the basic BIRD approach to broadband heteronuclear decoupling is not able to suppress the effects of geminal couplings. Thus in Figs. 3 and 4 the F_2 multiplets corresponding to CH_2 groups with non-equivalent (diastereotopic) geminal protons are doublets of doublets, with both $^1J_{\text{CH}}$ and $^2J_{\text{HH}}$ splittings. Example traces extracted at carbon C7 for compound 2 in Fig. 3 also illustrate this characteristic multiplet structure of CH_2 moieties. A method for the suppression of these undesired splittings will be the subject of a later publication.

In order to study the improvements in resolution that can be achieved for macromolecules, a ^1H - ^{15}N HSQC experiment incorporating the proposed broadband proton decoupling scheme during acquisition was carried out on a ^{15}N -labeled, 55 amino acid residue, *Penicillium* antifungal protein (PAF) [35,36]. As expected, decoupling of proton–proton interactions yields a significant decrease in F_2 linewidths (illustrated in Fig. 8), allowing direct and accurate measurements of NH chemical shifts and of cross-peak intensities from the broadband decoupled singlets using automated peak picking.

4. Conclusions and future outlook

The broadband proton-decoupled CLIP/CLAP-HSQC experiments proposed here allow direct and accurate measurement of one-bond

heteronuclear coupling constants and their dipolar contributions in XH_2 moieties, and greatly simplified measurements in XH_2 . The coupling constants can be determined directly, by measuring the splitting of pure absorptive in- or antiphase F_2 doublets, or by measuring the frequency difference between the relevant α and β multiplet components in the edited (added and subtracted) IPAP spectra. The latter approach allows the extraction of one-bond couplings even in the case of complete overlap of multiplet components. The robustness of the decoupled sequences presented with respect to variation in $^1J_{\text{XH}}$ ensures their applicability for RDC measurement, where wide distributions of ($^1J_{\text{XH}} + ^1D_{\text{XH}}$) are common.

We acknowledge work going in a similar direction by the group of Luy (T. Reinsperger, B. Luy, J. Magn. Reson. (submitted in parallel) [37]).

Modification of HSQC-based relaxation sequences, such as T_1 , T_2 , NOE, cross-correlated relaxation and relaxation dispersion experiments, to use the pure shift approach presented is in progress, with the promise of considerable benefits in the automated analysis of the resulting pure shift HSQC spectra.

Acknowledgments

The authors thank Sára Balla for her skilful technical assistance in preparation of anisotropic samples. Dr. Gyula Batta and Dr. Mihály Herczeg are acknowledged for their generous gifts of ^{15}N -labeled PAF and the monosaccharide sample, respectively. Financial support from TÁMOP-4.2.2/A-11/1/KONV-2012-0025 and OTKA K 105459 (to K.E.K.), from Richter Gedeon Talentum Alapítvány (Ph.D. scholarship to I.T.), from ERC starting Grant No. 257041 (to C.M.T.), from the Merck Society for Arts and Science Foundation (Ph.D. scholarship to L.K.), and from the Engineering and Physical Sciences Research Council (Grant Numbers EP/1007989 and EP/H024336) is gratefully acknowledged. The research of István Timári was supported by the European Union and the State of Hungary, co-financed by the European Social Fund in the framework of TÁMOP 4.2.4. A/2-11-1-2012-0001 'National Excellence Program'.

References

- [1] E. de Alba, N. Tjandra, NMR dipolar couplings for the structure determination of biopolymers in solution, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 40 (2002) 175–197.
- [2] A. Bax, Weak alignment offers new NMR opportunities to study protein structure and dynamics, *Protein Sci.* 12 (2003) 1–16.
- [3] J.H. Prestegard, C.M. Bougault, A.I. Kishore, Residual dipolar couplings in structure determination of biomolecules, *Chem. Rev.* 104 (2004) 3519–3540.
- [4] M. Blackledge, Recent progress in the study of biomolecular structure and dynamics in solution from residual dipolar couplings, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 46 (2005) 23–61.
- [5] J.R. Tolman, K. Ruan, NMR residual dipolar couplings as probes of biomolecular dynamics, *Chem. Rev.* 106 (2006) 1720–1736.
- [6] C.M. Thiele, Residual dipolar couplings (RDCs) in organic structure determination, *Eur. J. Org. Chem.* 2008 (2008) 5673–5685.
- [7] G. Kummerlöwe, B. Luy, Residual dipolar couplings for the configurational and conformational analysis of organic molecules, in: *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, Academic Press, 2009, pp. 193–232 (Chapter 4).
- [8] B. Böttcher, C.M. Thiele, Determining the Stereochemistry of Molecules from Residual Dipolar Couplings (RDCs), *eMagRes.* <http://dx.doi.org/10.1002/9780470034590.emrstm1194>.
- [9] B. Böttcher, V. Schmidts, J.A. Raskatov, C.M. Thiele, Determination of the conformation of the key intermediate in an enantioselective palladium-catalyzed allylic substitution from residual dipolar couplings, *Angew. Chem., Int. Ed.* 49 (2010) 205–209.
- [10] A. Enthart, J.C. Freudenberger, J. Furrer, H. Kessler, B. Luy, The CLIP/CLAP-HSQC: pure absorptive spectra for the measurement of one-bond couplings, *J. Magn. Reson.* 192 (2008) 314–322.
- [11] M. Rückert, G. Otting, Alignment of biological macromolecules in novel nonionic liquid crystalline media for NMR experiments, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 7793–7797.
- [12] C. Griesinger, O.W. Sørensen, R.R. Ernst, Practical aspects of the E.COSY technique. Measurement of scalar spin–spin coupling constants in peptides, *J. Magn. Reson.* 75 (1987) 474–492.

- [13] P. Andersson, A. Annala, G. Otting, An α/β -HSQC- α/β experiment for spin-state selective editing of IS cross peaks, *J. Magn. Reson.* 133 (1998) 364–367.
- [14] P. Andersson, J. Weigelt, G. Otting, Spin-state selection filters for the measurement of heteronuclear one-bond coupling constants, *J. Biomol. NMR* 12 (1998) 435–441.
- [15] F. Cordier, A.J. Dingley, S. Grzesiek, A doublet-separated sensitivity-enhanced HSQC for the determination of scalar and dipolar one-bond J-couplings, *J. Biomol. NMR* 13 (1999) 175–180.
- [16] M. Ottiger, F. Delaglio, A. Bax, Measurement of J and dipolar couplings from simplified two-dimensional NMR spectra, *J. Magn. Reson.* 131 (1998) 373–378.
- [17] K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich, Attenuated T₂ relaxation by mutual cancellation of dipole–dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 12366–12371.
- [18] M. Czisch, R. Boelens, Sensitivity enhancement in the TROSY experiment, *J. Magn. Reson.* 134 (1998) 158–160.
- [19] J. Weigelt, Single scan, sensitivity- and gradient-enhanced TROSY for multidimensional NMR experiments, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 10778–10779.
- [20] K. Fehér, S. Berger, K.E. Kövér, Accurate determination of small one-bond heteronuclear residual dipolar couplings by F1 coupled HSQC modified with a G-BIRD⁰ module, *J. Magn. Reson.* 163 (2003) 340–346.
- [21] C.M. Thiele, W. Bermel, Speeding up the measurement of one-bond scalar (¹J) and residual dipolar couplings (¹D) by using non-uniform sampling (NUS), *J. Magn. Reson.* 216 (2012) 134–143.
- [22] K. Zangger, H. Sterk, Homonuclear broadband-decoupled NMR spectra, *J. Magn. Reson.* 124 (1997) 486–489.
- [23] M. Nilsson, G.A. Morris, Pure shift proton DOSY: diffusion-ordered 1H spectra without multiplet structure, *Chem. Commun.* (2007) 933–935.
- [24] P. Sakhaii, B. Haase, W. Bermel, Experimental access to HSQC spectra decoupled in all frequency dimensions, *J. Magn. Reson.* 199 (2009) 192–198.
- [25] J.A. Aguilar, S. Faulkner, M. Nilsson, G.A. Morris, Pure shift 1H NMR: a resolution of the resolution problem?, *Angew. Chem., Int. Ed.* 49 (2010) 3901–3903.
- [26] G.A. Morris, J.A. Aguilar, R. Evans, S. Haiber, M. Nilsson, True chemical shift correlation maps: a TOCSY experiment with pure shifts in both dimensions, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 12770–12772.
- [27] J.A. Aguilar, M. Nilsson, G.A. Morris, Simple proton spectra from complex spin systems: pure shift NMR spectroscopy using BIRD, *Angew. Chem., Int. Ed.* 50 (2011) 9716–9717.
- [28] J.A. Aguilar, A.A. Colbourne, J. Cassani, M. Nilsson, G.A. Morris, Decoupling two-dimensional NMR spectroscopy in both dimensions: pure shift NOESY and COSY, *Angew. Chem., Int. Ed.* 51 (2012) 6460–6463.
- [29] A. Lupulescu, G.L. Olsen, L. Frydman, Toward single-shot pure-shift solution 1H NMR by trains of BIRD-based homonuclear decoupling, *J. Magn. Reson.* 218 (2012) 141–146.
- [30] N.H. Meyer, K. Zangger, Simplifying proton NMR spectra by instant homonuclear broadband decoupling, *Angew. Chem., Int. Ed.* 52 (2013) 7143–7146.
- [31] L. Paudel, R.W. Adams, P. Király, J.A. Aguilar, M. Foroozandeh, M.J. Cliff, M. Nilsson, P. Sándor, J.P. Waltho, G.A. Morris, Simultaneously enhancing spectral resolution and sensitivity in heteronuclear correlation NMR spectroscopy, *Angew. Chem., Int. Ed.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201305709>.
- [32] J.R. Garbow, D.P. Weitekamp, A. Pines, Bilinear rotation decoupling of homonuclear scalar interactions, *Chem. Phys. Lett.* 93 (1982) 504–509.
- [33] V. Rutar, T.C. Wong, W. Guo, Manipulated heteronuclear two-dimensional NMR bilinear pulses in the presence of strong coupling, *J. Magn. Reson.* 64 (1985) 8–19.
- [34] G.V.T. Swapna, R. Ramachandran, N. Reddy, A.C. Kunwar, Virtual coupling effects in heteronuclear chemical-shift correlation spectroscopy, *J. Magn. Reson.* 88 (1990) 135–140.
- [35] G. Batta, T. Barna, Z. Gáspári, S. Sándor, K.E. Kövér, U. Binder, B. Sarg, L. Kaiserer, A.K. Chhillar, A. Eigentler, É. Leiter, N. Hegedüs, I. Pócsi, H. Lindner, F. Marx, Functional aspects of the solution structure and dynamics of PAF – a highly-stable antifungal protein from *Penicillium chrysogenum*, *FEBS J.* 276 (2009) 2875–2890.
- [36] G. Váradi, G.K. Tóth, Z. Kele, L. Galgóczy, Á. Fizil, G. Batta, Synthesis of PAF, an antifungal protein from *P. chrysogenum*, by native chemical ligation: native disulfide pattern and fold obtained upon oxidative refolding, *Chem. – Eur. J.* 19 (2013) 12684–12692.
- [37] T. Reinsperger, B. Luy, Homonuclear BIRD-decoupled spectra for measuring one-bond couplings with highest resolution: CLIP/CLAP-RESET and constant-time-CLIP/CLAP-RESET, *J. Magn. Reson.* (2013), this issue, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmr.2013.11.015>.



Cite this: *Chem. Commun.*, 2014, 50, 15702

Received 2nd June 2014,
Accepted 16th October 2014

DOI: 10.1039/c4cc04217d

www.rsc.org/chemcomm

“Perfecting” pure shift HSQC: full homodecoupling for accurate and precise determination of heteronuclear couplings†

L. Kaltschnee,^a A. Kolmer,^a I. Timári,^b V. Schmidts,^a R. W. Adams,^c M. Nilsson,^{cd} K. E. Kövér,^b G. A. Morris^c and C. M. Thiele^{*a}

Fully homodecoupled HSQC spectra can be obtained through the use of a new pulse sequence element, “perfectBIRD”. By way of illustration, we show that perfectBIRD decoupling allows one-bond residual dipolar couplings (RDCs), which provide important NMR restraints for structure elucidation, to be measured with outstanding precision, even in methylene groups.

The ever-growing drive in modern chemistry to create increasingly complex systems creates a need for improved analytical tools for their study. While it is usually considered desirable to *increase* the amount of information provided by a given analytical technique, there are times when information overload means that it is far more useful instead to *decrease* it. High-resolution solution state NMR spectroscopy, in which narrow chemical shift ranges conspire with extensive scalar coupling to give highly overlapped spectra, is a case in point. Here “pure shift” techniques can be used to suppress the effects of homonuclear couplings,¹ collapsing multiplets to singlets, simplifying spectra and facilitating the extraction of information previously obscured.

Among the different approaches used to achieve broadband homonuclear decoupling of NMR spectra in the real-time direct dimension,^{1c,d,2} in indirect dimensions,³ or in a pseudo-direct, interferogram, dimension,⁴ the bilinear rotation decoupling (BIRD) scheme^{3b} is particularly suitable for many heteronuclear correlation experiments

involving dilute heteronuclei (e.g. natural abundance ¹³C). In such cases isotope filtration incurs no extra sensitivity penalty; indeed the signal-to-noise ratio increases in some applications when multiplet structures collapse.^{1b,d,5}

The BIRD element allows control over the effects of vicinal and long-range homonuclear couplings and both one-bond and long-range heteronuclear couplings. However it relies on the one-bond coupling to a dilute heteronucleus to distinguish between homonuclear coupling partners, and hence cannot be used to decouple geminal interactions. The latter not only cause remaining signal multiplicity due to homonuclear interactions to be present, but can also lead to significant spectral distortion. This makes BIRD pure shift methods less attractive for the study of systems containing diastereotopic methylene protons, frequently encountered in organic compounds.

To circumvent this limitation, we have incorporated BIRD decoupling into a modified perfect echo pulse sequence,⁶ to form what we refer to as a “perfectBIRD” pulse sequence element. This new sequence element provides full homonuclear broadband decoupling even in the case of diastereotopic methylene protons, at the expense of a doubling of the natural (but not instrumental) linewidth.

Here we illustrate the use of perfectBIRD decoupling in experiments to determine one-bond RDCs. RDCs have proven to be very useful for the structure determination of organic and organometallic compounds.⁷ However, RDC analysis in organic compounds is usually prone to be underdetermined, due to the small number of couplings observable. Thus it is of prime importance to obtain all possible information, including the two one-bond RDCs for diastereotopic methylene protons.

For simple AX spin systems the (original) perfect echo pulse sequence (Fig. 1a) refocuses fully both chemical shift and coupling evolution, at time 4τ , for all τ .^{6,8} Dropping the last pulse of the perfect echo (shown in grey) yields a sequence element which refocuses homonuclear coupling evolution in AX systems at time 4τ , while introducing a net chemical shift evolution over a period 2τ . Differential chemical shift evolution however prohibits the repetitive application of perfect echoes with small τ , recently used in other

^a Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität Darmstadt, Alarich-Weiss-Straße 16, D-64287 Darmstadt, Germany. E-mail: cthiele@thielelab.de; Tel: +49 (0)6151 165112

^b Department of Inorganic and Analytical Chemistry, University of Debrecen, Egyetem tér 1, H-4032 Debrecen, Hungary

^c School of Chemistry, University of Manchester, Oxford Road, Manchester M13 9PL, UK

^d Department of Food Science, University of Copenhagen, Rolighedsvej 30, DK-1958 Fredriksberg C, Denmark

† Electronic supplementary information (ESI) available: Experimental details of the spectra shown, spectra with absorptive doublet features for geminal protons, experimental analysis of ¹J_{CH} accuracy and precision, figures with characteristic spectral features for strongly coupled systems, further spectra used for RDC extraction, pulse programs, structural models for IPC and RDC analysis results. See DOI: 10.1039/c4cc04217d

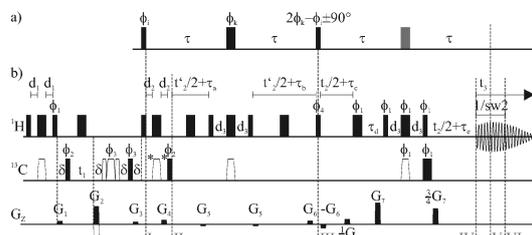


Fig. 1 (a) Perfect echo pulse sequence as proposed by Takegoshi, Ogura and Hikichi.⁶ The pulse shown in grey can be dropped to introduce a net chemical shift evolution during 2τ . (b) A generalized pulse sequence for perfectBIRD homodecoupled HSQC experiments. Hard 90° -pulses are shown as narrow filled bars and 180° -pulses as wide filled bars, broadband inversion and refocusing pulses used on ^{13}C are shown as open symbols. All experiments shown in the main text use $t'_2 = t_2$ to achieve decoupling for diastereotopic protons. In contrast, setting $t'_2 = 0$ for all t_2 allows the acquisition of clean absorptive doublets even for protons with non-negligible geminal coupling during d_2 (see the ESI†). The delays d_1 and d_3 are adjusted to match $(4 J_{\text{CH}})^{-1}$ and $(2 J_{\text{CH}})^{-1}$, respectively. In CLIP (CLEAN In-Phase) experiments $d_2 = d_1$ and the pulses marked with an asterisk are used, while in CLAP (CLEAN Anti-Phase) experiments these pulses are omitted and $d_2 = \delta^{10}$. δ equals the length of the gradients plus a recovery delay, $\tau_a = (4 \text{sw}2)^{-1} + \tau_c + \tau_e + \rho_1 - 2d_2 - \rho_3 - \rho_{14}$, $\tau_b = (4 \text{sw}2)^{-1} + \tau_c + \tau_e + \rho_1$, $\tau_c = (4 \text{sw}2)^{-1}$, $\tau_d = \tau_c + \tau_e$, $\tau_e = \delta + 350 \mu\text{s}$, where ρ_1 and ρ_3 are the lengths of the hard 90° pulse on proton and carbon respectively and ρ_{14} is the length of the broadband inversion pulse on ^{13}C . G_2 and G_4 are set according to the ratio of gyromagnetic ratios and G_2 is inverted in alternating experiments to achieve the frequency sign encoding along t_1 according to the echo/antiecho procedure. The pulse phases used are: $\phi_1 = 1$, $\phi_2 = 0$, $\phi_3 = 0$, $\phi_4 = 0$, $\phi_5 = 2$, $\phi_6 = 2$, $\phi_7 = 1$, $\phi_8 = 3$, $\phi_9 = 3$, $\phi_{10} = 1$, $\phi_{11} = 3$, $\phi_{12} = 3$, $\phi_{13} = 1$, $\phi_{14} = 3$, $\phi_{15} = 3$, $\phi_{16} = 1$, $\phi_{17} = 3$, $\phi_{18} = 3$, $\phi_{19} = 1$, $\phi_{20} = 3$, $\phi_{21} = 3$, $\phi_{22} = 1$, $\phi_{23} = 3$, $\phi_{24} = 3$, $\phi_{25} = 1$, $\phi_{26} = 3$, $\phi_{27} = 3$, $\phi_{28} = 1$, $\phi_{29} = 3$, $\phi_{30} = 3$, $\phi_{31} = 1$, $\phi_{32} = 3$, $\phi_{33} = 3$, $\phi_{34} = 1$, $\phi_{35} = 3$, $\phi_{36} = 3$, $\phi_{37} = 1$, $\phi_{38} = 3$, $\phi_{39} = 3$, $\phi_{40} = 1$, $\phi_{41} = 3$, $\phi_{42} = 3$, $\phi_{43} = 1$, $\phi_{44} = 3$, $\phi_{45} = 3$, $\phi_{46} = 1$, $\phi_{47} = 3$, $\phi_{48} = 3$, $\phi_{49} = 1$, $\phi_{50} = 3$, $\phi_{51} = 3$, $\phi_{52} = 1$, $\phi_{53} = 3$, $\phi_{54} = 3$, $\phi_{55} = 1$, $\phi_{56} = 3$, $\phi_{57} = 3$, $\phi_{58} = 1$, $\phi_{59} = 3$, $\phi_{60} = 3$, $\phi_{61} = 1$, $\phi_{62} = 3$, $\phi_{63} = 3$, $\phi_{64} = 1$, $\phi_{65} = 3$, $\phi_{66} = 3$, $\phi_{67} = 1$, $\phi_{68} = 3$, $\phi_{69} = 3$, $\phi_{70} = 1$, $\phi_{71} = 3$, $\phi_{72} = 3$, $\phi_{73} = 1$, $\phi_{74} = 3$, $\phi_{75} = 3$, $\phi_{76} = 1$, $\phi_{77} = 3$, $\phi_{78} = 3$, $\phi_{79} = 1$, $\phi_{80} = 3$, $\phi_{81} = 3$, $\phi_{82} = 1$, $\phi_{83} = 3$, $\phi_{84} = 3$, $\phi_{85} = 1$, $\phi_{86} = 3$, $\phi_{87} = 3$, $\phi_{88} = 1$, $\phi_{89} = 3$, $\phi_{90} = 3$, $\phi_{91} = 1$, $\phi_{92} = 3$, $\phi_{93} = 3$, $\phi_{94} = 1$, $\phi_{95} = 3$, $\phi_{96} = 3$, $\phi_{97} = 1$, $\phi_{98} = 3$, $\phi_{99} = 3$, $\phi_{100} = 1$.

methods,⁹ to achieve decoupling even in complex spin systems. As BIRD pulse elements are able to refocus the effects of weak coupling between protons that are bound to a ^{13}C nucleus directly through one bond ($^1\text{H}^d$) and those that are remotely attached ($^1\text{H}^r$),^{3b,5b} replacement of the first 180° pulse in the original perfect echo sequence by a BIRD^{d,x} element (inversion for $^1\text{H}^d$ and ^{13}C) leaves only geminal couplings and strong coupling contributions not refocused at the central 90° pulse in the perfect echo, enabling its use to refocus weak couplings for two geminal coupling partners $^1\text{H}^d$ even if embedded in a complex spin system. To make sure that both J_{CH} evolution and chemical shift evolution of $^1\text{H}^d$ are refocused at time (III), proton inversion pulses are used at the midpoints of periods $t'_2/2 + \tau_a$ and $t'_2/2 + \tau_b$. A combination of a broadband proton inversion and a BIRD^d element (inversion for $^1\text{H}^d$ only) is then used to replace the second 180° pulse of the perfect echo, preserving chemical shift evolution and heteronuclear couplings for $^1\text{H}^d$ while refocusing couplings between the prefocused diastereotopic protons, $^1\text{H}^d$ and $^1\text{H}^r$, as well as heteronuclear long-range couplings, at the end of the pulse sequence element.

A generalized pulse scheme for CLEAN In-/Anti-Phase¹⁰ (CLIP/CLAP) HSQC experiments, widely employed in the measurement of one-bond scalar and total couplings, that uses the perfectBIRD homonuclear decoupling element is given in Fig. 1b. The perfect echo period spans times (I) to (V), with its central mixing pulse positioned at (III). In contrast to the CLIP/CLAP HSQC experiments without homodecoupling, the direct acquisition period

normally found after (II) is replaced by the perfectBIRD element described above.

Construction of a free induction decay with negligible homonuclear coupling modulation is achieved using the interferogram-based approach, recently employed in F_2 -heterocoupled CLIP/CLAP HSQC spectra with BIRD decoupling in the proton dimension.^{5g,h} Data are collected between times (IV) and (VI), for time $1/\text{sw}2$ equal to the time increment in t_2 and centred on the point of full coupling refocusing. Keeping $1/\text{sw}2 \ll 1/(2J_{\text{HH}})$, where J_{HH} is of the order of typical proton-proton couplings, restricts data collection to times over which proton-proton coupling evolution can be neglected. A full 3D time domain signal $s(t_1, t_2, t_3)$ is collected, from which a 2D signal $s(t_1, t_2^*)$ is constructed such that $t_2^* = t_2 + t_3$. This leads to a signal sampled uniformly in t_2^* for the total time $(1/\text{sw}2) \text{TD}_{F_2}$, where TD_{F_2} is the number of points sampled in t_2 . This data treatment requires $1/\text{sw}2$ to be an integer multiple of the dwell time used for F_3 . Construction of the 2D time signal from the 3D dataset is performed conveniently using a Bruker AU program available at <http://nmr.chemistry.manchester.ac.uk/>. Afterwards $s(t_1, t_2^*)$ can be subjected to double Fourier transformation as usual.

To illustrate the potential of perfectBIRD decoupled HSQC experiments, we determined one-bond ^1H - ^{13}C -RDCs for (+)-isopinocampheol (IPC, structure shown in Fig. 2) along the pure shift dimension (F_2^*) of the experiments. This compound is frequently used for method

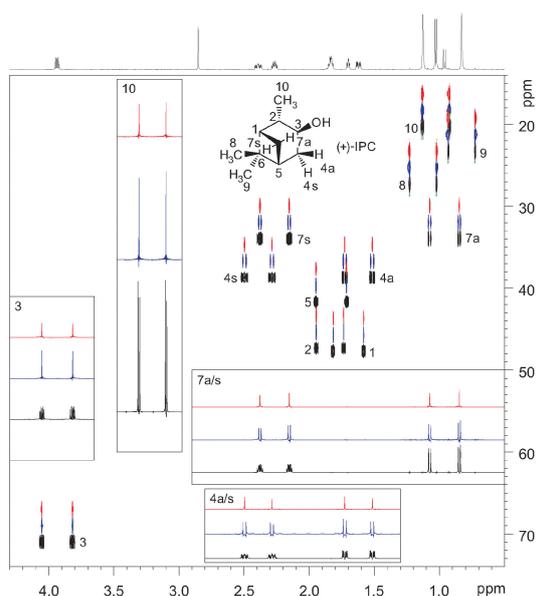


Fig. 2 F_2 -heterocoupled CLIP HSQC spectra without homonuclear decoupling (black), and with BIRD (blue) and with perfectBIRD (red) homonuclear decoupling during acquisition, collected for (+)-IPC in isotropic CD_2Cl_2 solution at 600 MHz proton frequency. Experiment durations were 10.5 min, 7.1 h and 9.4 h, respectively. The structure of the analyte is shown in the figure, with the numbering used. The corresponding proton spectrum is displayed at the top. For selected protons, traces along the proton dimension are shown. The decoupled spectra are shifted in the carbon dimension for easier comparison.

development in RDC analysis due to its rigidity, the chemically differing entities present in the molecule and its good signal dispersion.

For the measurement of scalar one-bond heteronuclear coupling constants ($^1J_{\text{CH}}$), we collected ^{13}C - ^1H F_2 -heterocoupled CLIP/CLAP HSQC spectra without ^1H - ^1H homodecoupling,¹⁰ and with BIRD^{5b} and perfectBIRD decoupling in the proton dimension, for a sample containing (+)-IPC in isotropic solution. As shown in Fig. 2, good homonuclear decoupling is achieved for protons that are bound to primary and tertiary carbons with both BIRD and perfectBIRD decoupling. In contrast, geminal couplings in methylene groups, and signal distortions stemming from geminal coupling evolution during the pulse sequences, are only suppressed when the perfectBIRD decoupling element is used. A very clean baseline is obtained in homodecoupled CLAP spectra, as cross-peaks arising from long-range ^1H - ^{13}C -couplings are also suppressed by the decoupling scheme applied (see Fig. S1, ESI†). For many applications, these very favourable spectral properties more than compensate for the additional experiment time needed to collect the pure shift NMR spectra. It should be noted that there is also a modest (at least for small, rapidly-tumbling molecules) reduction in the signal intensity, and additional line broadening, due to transverse relaxation during the decoupling element. In our current implementation we chose to include the gradient pulses labelled 6 in Fig. 1, sacrificing a further factor of two in signal, in order to minimise spectral artefacts.

While one-bond coupling constant extraction is usually a minor problem in isotropic solution, the larger proton-proton couplings, resulting in increased line widths, and the wider range of one-bond coupling constants frequently complicate coupling constant extraction for weakly aligned samples. As shown in Fig. 3, homonuclear decoupling can lead to significant simplification of the spectra observed for weakly aligned samples, facilitating spectral interpretation and coupling constant extraction. The example shown demonstrates clearly the advantage of introducing the additional decoupling of diastereotopic methylene protons, although the reduction in signal intensity between BIRD and perfectBIRD decoupled experiments is more pronounced here, as transverse relaxation is faster in the aligned sample.

A particular challenge in this system is the decoupling of protons 7a and 7s: at roughly -38.4 Hz, the geminal total coupling between these two protons is much larger than couplings typically observed in isotropic solution – a problem frequently encountered in RDC measurements. The solution is to increase the decoupling range by shortening the data chunk duration $1/\text{sw}2$, once again allowing clean singlets to be obtained, but at a reduced signal to noise ratio.

During this study an alternative approach to suppress geminal couplings, using a constant-time variant of the BIRD decoupled experiment, was proposed.^{5c} The constant-time approach necessarily limits the range of couplings accessible, while the perfectBIRD method can accommodate a wide range of $^2T_{\text{HH}}$, making perfectBIRD particularly attractive for measurements on aligned samples.

Fig. 3 also illustrates a limitation of the perfectBIRD decoupling element when applied to anisotropic samples: decoupling only works properly for groups with a maximum of two geminal coupling partners. This is a direct consequence of the fact that the perfect echo only leads to full refocusing of coupling evolution for a single

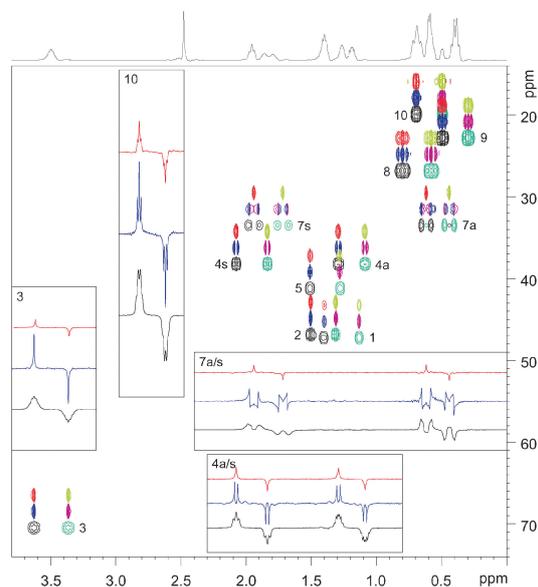


Fig. 3 F_2 -heterocoupled CLAP HSQC spectra of (+)-IPC in the PBDG/ CD_2Cl_2 lyotropic liquid crystalline phase ($\Delta\nu_{\text{O}} = 107.6$ Hz), collected without homonuclear decoupling (pos. black, neg. cyan) and with BIRD (pos. blue, neg. magenta) and with perfectBIRD (pos. red, neg. green) decoupling in the proton dimension at 600 MHz proton frequency. Experiment durations were 10.5 min, 2.8 h and 3.2 h, respectively. Traces taken along the proton dimension are shown in the insets. In the proton dimension, no chemical shift referencing has been applied.

coupling, or if τ is short compared to all $1/T_{\text{HH}}$. As both conditions are violated for methyl groups in anisotropic samples, the triplets observed using BIRD decoupling are only partially collapsed using perfectBIRD decoupling (see inset 10). In isotropic solution this problem does not arise.

In small organic molecules, strong coupling effects are quite common, though not present in the case studied. Neither the perfect echo nor the BIRD element will fully refocus the effects of strong coupling,^{3b,11} and complete decoupling of strongly coupled protons remains an unsolved challenge in pure shift NMR (as in many other methods). The precise measurement of RDCs from strongly coupled spins is an issue best addressed using specialized approaches,¹² as illustrated in the ESI†, strong coupling can be identified in homodecoupled spectra through characteristic changes in signal shapes.

The spectra shown for (+)-IPC, and additional experiments on chloroform, representing a simple AX test system, were used to test the influence of perfectBIRD homonuclear decoupling on the accuracy and precision of coupling constant measurements (see ESI†). Considering accuracy first, under the experimental conditions used, systematic errors in homodecoupled measurements of coupling constants were less than 0.05 Hz, greater than those for measurements by some conventional methods but negligible in the context of RDC measurements that typically have uncertainties of several tenths of a Hz. In contrast, the precision of $^1T_{\text{CH}}$ measurements was significantly improved by homodecoupling in

Table 1 Scalar couplings extracted from the CLIP HSQC spectra of (+)-IPC in isotropic CD₂Cl₂ solution shown in Fig. 2

	No decoupling	BIRD decoupling	PerfectBIRD decoupling
	¹ J _{CH} / Hz	¹ J _{CH} / Hz	¹ J _{CH} / Hz
FID-res:	0.76 Hz	1.02 Hz	1.02 Hz
1	140.57 ± 0.32	140.56 ± 0.11	140.59 ± 0.11
2	126.67 ± 0.17	126.65 ± 0.11	126.59 ± 0.12
3	141.67 ± 0.11	141.69 ± 0.11	141.71 ± 0.12
4s	126.35 ± 0.18	126.35 ± 0.24	126.34 ± 0.13
4a	127.04 ± 0.12	127.02 ± 0.19	127.07 ± 0.13
5	140.79 ± 0.32	140.72 ± 0.14	140.64 ± 0.23
7s	134.87 ± 0.35	134.81 ± 0.13	134.79 ± 0.17
7a	136.98 ± 0.15	136.94 ± 0.20	136.94 ± 0.12
8	124.56 ± 0.16	124.51 ± 0.12	124.51 ± 0.12
9	123.61 ± 0.11	123.66 ± 0.11	123.70 ± 0.12
10	124.75 ± 0.13	124.69 ± 0.11	124.64 ± 0.15

Table 2 Total couplings extracted from the CLIP HSQC spectra of (+)-IPC in anisotropic CD₂Cl₂/PBDG solution (Δν_Q = 107.6 Hz) shown in Fig. S2 (ESI)

	No decoupling	BIRD decoupling	PerfectBIRD decoupling
	¹ T _{CH} / Hz	¹ T _{CH} / Hz	¹ T _{CH} / Hz
FID-res:	0.76 Hz	3.05 Hz	3.05 Hz
1	160.67 ± 3.42	160.92 ± 0.84	160.19 ± 0.54
2	117.27 ± 1.60	117.00 ± 0.19	116.53 ± 0.47
3	158.31 ± 0.51	158.38 ± 0.33	158.51 ± 0.44
4s	144.03 ± 0.12	143.85 ± 0.37	143.83 ± 0.19
4a	122.54 ± 0.16	122.59 ± 0.44	122.56 ± 0.12
5	138.10 ± 0.97	137.40 ± 0.82	137.12 ± 1.00
7s	133.78 ± 1.77	134.03 ± 2.86	133.79 ± 0.32
7a	106.89 ± 1.04	106.98 ± 0.86	106.81 ± 0.77
8	131.70 ± 0.48	131.82 ± 0.59	131.66 ± 0.29
9	118.57 ± 0.19	118.71 ± 0.56	118.96 ± 0.47
10	121.28 ± 0.21	121.09 ± 0.60	120.87 ± 0.77

the practical example of (+)-IPC, because of the simplification of line shapes and the avoidance of signal overlap caused by homonuclear couplings.

The confidence intervals shown in Tables 1 and 2 have two contributions: a very conservative estimate of the possible effects of the systematic errors noted (±0.1 Hz, double the observed uncertainty range) and the results of confidence interval estimation performed according to the procedure of Kummerlöwe *et al.*¹³ In many cases these confidence intervals show a significant improvement with BIRD and perfectBIRD, particularly for methylene signals in the latter case. Couplings extracted from the CLAP HSQC spectra are given in Table S5 (ESI[†]). From the values obtained we conclude that homonuclear decoupling can indeed improve the precision of coupling constant measurements in the high-resolution proton dimension, which is particularly beneficial for RDC-based structure analysis in the case of diastereotopic methylene protons.

In this communication, we have introduced a homonuclear decoupling element, based on the BIRD and perfect echo techniques, which is able to collapse splittings due to geminal couplings between diastereotopic methylene protons. Pure shift F₂-hetero-coupled HSQC spectra of exceptional quality can be obtained, allowing highly precise measurements of one-bond couplings in the high-resolution proton dimension, even in weakly aligned media. We expect that the extended measurement times needed

for these experiments will prove to be well justified, by the higher precision of the coupling constants extracted and the improved ease of analysis, when complex structures are to be solved. Modifications of the technique that also achieve heteronuclear decoupling in the high-resolution dimension are under development, and could be used to collect HSQC spectra with full homo- and heteronuclear decouplings in both dimensions as well as very high resolution in the proton dimension.

Financial support of this work by the Merck Society for Arts and Science Foundation, the ERC (grant no. 257041), the Engineering and Physical Sciences Research Council (grant nos. EP/1007989/1 and EP/L018500/1) and by TAMOP-4.2.2/A-11/1/KONV-2012-0025, OTKA K 105459, TAMOP-4.2.4.A/2-11-1-2012-0001, Richter Gedeon Talentum Alapítvány is gratefully acknowledged.

Notes and references

- (a) M. Nilsson and G. A. Morris, *Chem. Commun.*, 2007, 933–935; (b) P. Sakhaei, B. Haase and W. Bermel, *J. Magn. Reson.*, 2009, **199**, 192–198; (c) N. H. Meyer and K. Zangger, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013, **52**, 7143–7146; (d) L. Paudel, R. W. Adams, P. Király, J. A. Aguilar, M. Forozaandeh, M. J. Cliff, M. Nilsson, P. Sándor, J. P. Waltho and G. A. Morris, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013, **52**, 11616–11619.
- A. Lupulescu, G. L. Olsen and L. Frydman, *J. Magn. Reson.*, 2012, **218**, 141–146.
- (a) A. Bax, A. F. Mehlkopf and J. Smidt, *J. Magn. Reson.*, 1979, **35**, 167–169; (b) J. R. Garbow, D. P. Weitekamp and A. Pines, *Chem. Phys. Lett.*, 1982, **93**, 504–509.
- (a) K. Zangger and H. Sterk, *J. Magn. Reson.*, 1997, **124**, 486–489; (b) A. J. Pell, R. A. E. Edden and J. Keeler, *Magn. Reson. Chem.*, 2007, **45**, 296–316.
- (a) A. Bax, *J. Magn. Reson.*, 1983, **53**, 517–520; (b) D. Uhrin, T. Liptaj and K. E. Kövér, *J. Magn. Reson., Ser. A*, 1993, **101**, 41–46; (c) T. N. Pham, T. Liptaj, K. Bromek and D. Uhrin, *J. Magn. Reson.*, 2002, **157**, 200–209; (d) K. Fehér, S. Berger and K. E. Kövér, *J. Magn. Reson.*, 2003, **163**, 340–346; (e) K. E. Kövér and G. Batta, *J. Magn. Reson.*, 2004, **170**, 184–190; (f) C. M. Thiele and W. Bermel, *J. Magn. Reson.*, 2012, **216**, 134–143; (g) T. Reinsperger and B. Luy, *J. Magn. Reson.*, 2014, **239**, 110–120; (h) I. Timári, L. Kaltschnee, A. Kolmer, R. W. Adams, M. Nilsson, C. M. Thiele, G. A. Morris and K. E. Kövér, *J. Magn. Reson.*, 2014, **239**, 130–138.
- K. Takegoshi, K. Ogura and K. Hikichi, *J. Magn. Reson.*, 1989, **84**, 611–615.
- (a) C. M. Thiele, *Concepts Magn. Reson., Part A*, 2007, **30A**, 65–80; (b) C. M. Thiele, *Eur. J. Org. Chem.*, 2008, 5673–5685; (c) G. Kummerlöwe and B. Luy, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2009, **28**, 483–493; (d) R. R. Gil, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, **50**, 7222–7224; (e) B. Böttcher and C. M. Thiele, *eMagRes*, John Wiley & Sons, Ltd, 2012, vol. 1, pp. 169–180.
- P. C. M. van Zijl, C. T. W. Moonen and M. von Kienlin, *J. Magn. Reson.*, 1990, **89**, 28–40.
- (a) J. A. Aguilar, M. Nilsson, G. Bodenhausen and G. A. Morris, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 811–813; (b) R. W. Adams, C. M. Holroyd, J. A. Aguilar, M. Nilsson and G. A. Morris, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 358–360; (c) B. Baishya, C. L. Khetrpal and K. K. Dey, *J. Magn. Reson.*, 2013, **234**, 67–74; (d) T. F. Segawa and G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson.*, 2013, **237**, 139–146; (e) J. A. Aguilar, R. W. Adams, M. Nilsson and G. A. Morris, *J. Magn. Reson.*, 2014, **238**, 16–19.
- A. Enthart, J. C. Freudenberger, J. Furrer, H. Kessler and B. Luy, *J. Magn. Reson.*, 2008, **192**, 314–322.
- R. V. Mulkern, J. L. Bowers, S. Peled, R. A. Kraft and D. S. Williamson, *Magn. Reson. Med.*, 1996, **36**, 775–780.
- (a) B. Yu, H. van Ingen, S. Vivekanandan, C. Rademacher, S. E. Norris and D. I. Freedberg, *J. Magn. Reson.*, 2012, **215**, 10–22; (b) B. Yu, H. van Ingen and D. I. Freedberg, *J. Magn. Reson.*, 2013, **228**, 159–165.
- G. Kummerlöwe, S. Schmitt and B. Luy, *Open Spectrosc. J.*, 2010, **4**, 16–27.

4.3 Schneller Austausch

4.3.1 Evaluation der Genauigkeit von Abständen aus NOE-Daten

Der Inhalt dieses Abschnitts ist bereits veröffentlicht:

A. Kolmer, L. J. Edwards, I. Kuprov, C. M. Thiele, *J. Magn. Reson.*, im Druck, akzeptiertes Manuskript.

Nachdem im vorherigen Abschnitt gezeigt wurde, wie die Genauigkeit der Kopplungskonstantenextraktion zur RDC-Bestimmung gesteigert werden konnte, wird in diesem Abschnitt die Ermittlung von Distanzen aus NOE-Daten evaluiert. Dazu wird eine Auswertungssoftware entwickelt und die Ergebnisse mit RDC-Ergebnissen verglichen, um Stärken und Schwächen beider Methoden herauszufinden.

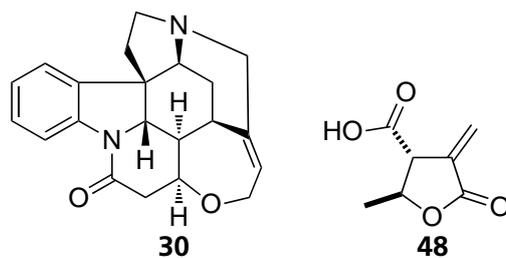
Die von BUTTS ET AL.^[109] an Strychnin **30** diskutierte Methode zur Extraktion genauer Abstände aus NOE-Daten enthält verschiedene Annahmen, die zu Über- oder Falschinterpretationen der Ergebnisse führen könnten. Es wäre daher möglich, dass die Schlussfolgerung von BUTTS ET AL., die experimentell bestimmten Abstände nur durch konformationelle Flexibilität im Siebenring erklären zu können, im Falle der Ungültigkeit dieser Annahmen eine Fehlinterpretation darstellt. Daher müssen diese Annahmen überprüft werden.

Gegen die Gültigkeit dieser Annahmen sprechen die folgenden möglichen Probleme oder Fehlerquellen. Die von BUTTS ET AL. verwendete Probe von Strychnin **30** wurde unter Sauerstoffatmosphäre abgeschmolzen. Allerdings gilt Sauerstoff als paramagnetischer Relaxationspartner, dessen Anwesenheit zu einer Veränderung der NOE-Intensitäten führen kann. Außerdem wurde ein einziger Datenpunkt bei einer Mischzeit von 500 ms aufgenommen, sodass die Gültigkeit der *initial-rate-approximation* nicht überprüft werden kann. Zusätzlich ist fraglich, ob die Wartezeit zwischen den Scans, die auf 1 s gesetzt wurde, ausreichend für komplette Relaxation ist bzw. ob trotz unterschiedlicher Relaxationszeitkonstanten ein „stationärer“ quantifizierbarer Zustand entsteht.

Neben diesen experimentellen Aspekten ist zu berücksichtigen, dass bei 600 MHz stark gekoppelte Protonen vorliegen. Trotz der Verwendung eines Moduls zur Nullquantenunterdrückung (ZQS)^[183–185] ist es möglich, dass dieses abhängig von Kopplungskonstanten nicht effektiv arbeitet^[184]. Ein weiteres mögliches Artefakt entsteht durch Spindiffusion. Obwohl Spindiffusion nichtlinear sein sollte^[31,101], ist es möglich, dass diese Nichtlinearität durch Streuung der Datenpunkte nicht entdeckt wird.

Um diese möglichen Fehlerquellen zu untersuchen und auszuschließen, wurden Mischzeitserien von 50 - 400 ms in Schritten von 25 ms des 1D *Pulsed Field Gradient Spin Echo* (PFGSE) NOE-Experiments^[98–100] mit ZQS^[183–185] aufgenommen und nach den Gleichungen 3.5.42 und 3.5.36 ausgewertet. Die Probe wurde unter Sauerstoffausschluss abgeschmolzen, und die Wartezeit zwischen den Scans wurde auf 15 s gesetzt (dies entspricht $5 * T_1$). Auf diese Art konnte ein Großteil der Abstände von BUTTS ET AL. reproduziert und verfeinert werden.

Der Einfluss der Nullquantenübergänge wurde durch Simulation von PANIC-Auftragungen mittels der Software *SPINACH*^[186–189] getestet. Dazu wurden von EDWARDS die Möglichkeit konformationeller Flexibilität von Strychnin **30** sowie ein ZQS-Modul zur Verwendung in *SPINACH* entwickelt.



Dabei stellte sich heraus, dass das ZQS-Modul nicht immer perfekt arbeitet. Trotzdem stimmten die simulierten PANIC-Auftragungen nur dann mit den experimentellen überein, wenn konformationelle Flexibilität berücksichtigt wurde. Dies führt zur Schlussfolgerung, dass selbst wenn die bestimmten Abstände Nullquantenartefakte aufweisen, trotzdem konformationelle Flexibilität nötig ist, um die experimentellen Daten zu erklären. Da außerdem durch die Wahl der Größe des Basis-Sets auch Spindiffusion korrekt beschrieben werden kann, bedeutet dies analog, dass auch Spindiffusion keinen oder einen zu vernachlässigenden Einfluss auf den bestimmten Abstand hat.

Zur korrekten Beschreibung der Mittelung durch konformationelle Flexibilität bei der Auswertung von NOE-Daten wurde die Software *WEEDHEAD* entwickelt. Diese Software basiert auf dem Ansatz, dass durch Gleichung 3.5.46 gemittelte Abstände mit experimentellen Abständen verglichen werden sollen. Dazu werden zu den Gleichungen 3.7.6 und 3.7.7 analoge Qualitätsfaktoren verwendet. Dabei wird keine Strukturoptimierung durchgeführt, stattdessen wird anhand der vorgegebenen Strukturvorschläge nach Minima der Konformerpopulationen gesucht. Als Eingabedateien werden Strukturvorschläge als .xyz-Dateien sowie eine Datei mit den gemessenen Abständen benötigt (siehe Abschnitt 6.3).

Mit Hilfe der bestimmten Abstände und der Software *WEEDHEAD* konnte ein Minimum des Qualitätsfaktors gefunden werden, welches der besten Übereinstimmung von gemittelten und experimentellen Daten entspricht. Dies liegt für Strychnin **30** bei 98% des Haupt- und 2% des Konformers mit alternativer Konformation des Siebenrings. Außerdem konnte die von BIFULCO ET AL.^[190] postulierte Flexibilität im Fünfring nicht beobachtet werden.

In der Literatur vorhandene RDC-Daten^[141,142,150,157,191] konnten mittels der MCST-Methode von *RDC@hotFCHT*^[165] ebenfalls auf ihren Informationsgehalt bezüglich konformationeller Flexibilität des Siebenrings überprüft werden. Die Unterschiede der Qualitätsfaktoren sind allerdings nicht signifikant, sodass die RDC-Daten nur Hinweise auf Flexibilität beinhalten.

Nachdem die genaue Bestimmung von Distanzen aus NOE-Daten und deren Beschreibung implementiert ist, soll nun deren Robustheit geprüft werden. Dazu wird ein Molekül ausgewählt, das flexibler ist als Strychnin **30**.

Für α -Methylen- γ -butyrolacton **48** existieren umfassende Studien zur Bestimmung konformationeller Flexibilität aus RDC-Daten^[134,166,192,193] (siehe Kapitel 3.7.4). Ursprünglich war die Konfiguration der beiden Stereozentren im flexiblen Fünfring unbekannt, diese konnte mit RDCs zu *trans* bestimmt werden^[192]. Die Population des Hauptkonformers wurde dabei per MCST zu 60%, per MCMT zu 65% und per Koppelungskonstantenanalyse zu 60% bestimmt^[134,166,193]. Nun sollte anhand des α -Methylen- γ -butyrolactons **48** getestet werden, ob mittels des NOEs ebenfalls gleichzeitig Konfiguration und Konformation bestimmt werden können.

Dazu wurden erneut quantitative NOE nach der an Strychnin **30** erprobten Methode bestimmt. Anschließend wurde die Software *WEEDHEAD* erweitert, damit Mittelungsvorgänge von Methylgruppen nach Gleichung 3.5.53 korrekt beschrieben werden. Die beste Übereinstimmung zwischen experimentellen und gemittelten Daten wurde für die *trans*-Konfiguration beim Konformerenverhältnis 67:33% gefunden.

Dieses Ergebnis ist in exzellenter Übereinstimmung mit dem Ergebnis der RDC-Analyse. Es konnte deshalb gezeigt werden, dass genaue NOE extrahiert werden können. Diese können so wie RDC-Daten zur Konfigurations- und Konformationsanalyse genutzt werden. Im Falle von Strychnin **30** ist es durch die NOE-Analyse sogar möglich, Flexibilität zu detektieren, die anhand der RDC-Daten nicht eindeutig sichtbar ist. Um die Stärken beider Methoden auszunutzen, ist es daher empfehlenswert, beide Parameter komplementär zu verwenden.

Für die vorliegende Dissertation ist dieses Ergebnis von zentraler Bedeutung. Durch quantitative Auswertung von NOE-Spektren, die Nutzung der entwickelten Auswertungssoftware *WEEDHEAD* und den Vergleich von NOE- und RDC-Daten ist es in der Folge möglich, die Konformation flexibler Moleküle mit dieser Methodenkombination zu untersuchen. In den folgenden Kapiteln wird daher die Komplexität des Strukturaufklärungsproblems stetig erhöht, um die Anwendbarkeit der komplementären NOE-RDC-Auswertung zu untersuchen und deren Grenzen auszuloten. Dazu wird im nächsten Abschnitt ein Molekül untersucht, das eine größere Flexibilität als das α -Methylen- γ -butyrolacton **48** aufweist.

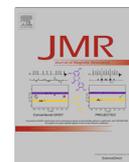
Abdruckerlaubnis erteilt:

A. Kolmer, L. J. Edwards, I. Kuprov, C. M. Thiele, *J. Magn. Reson.* , im Druck, akzeptiertes Manuskript. Veröffentlicht von Elsevier Inc. (CC BY 4.0).



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Magnetic Resonance

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmr

Conformational analysis of small organic molecules using NOE and RDC data: A discussion of strychnine and α -methylene- γ -butyrolactone

Andreas Kolmer^a, Luke J. Edwards^{b,1}, Ilya Kuprov^c, Christina M. Thiele^{a,*}^a Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität Darmstadt, Alarich-Weiss-Strasse 16, 64287 Darmstadt, Germany^b Department of Chemistry, University of Oxford, Inorganic Chemistry Laboratory, South Parks Road, Oxford OX1 3QG, United Kingdom^c School of Chemistry, Faculty of Natural and Environmental Sciences, University of Southampton, University Road, Southampton SO17 1BJ, United Kingdom

ARTICLE INFO

Article history:
Received 9 April 2015
Revised 2 October 2015
Available online xxxx

Keywords:

Nuclear Overhauser Effect
Residual Dipolar Couplings
Configuration determination
Conformational analysis
Strychnine

ABSTRACT

To understand the properties and/or reactivity of an organic molecule, an understanding of its three-dimensional structure is necessary. Simultaneous determination of configuration and conformation often poses a daunting challenge. Thus, the more information accessible for a given molecule, the better. Two sources of information, quantitative NOE and more recently also RDCs, are used for conformational analysis by NMR spectroscopy. In this paper, we compare these sources of conformational information in two molecules: the configurationally well-characterized strychnine **1**, and the only recently configurationally and conformationally characterized α -methylene- γ -butyrolactone **2**. We discuss possible sources of error in the measurement and analysis process, and how to exclude them. By this means, we are able to bolster previously proposed flexibility for these two molecules.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

For the determination of three-dimensional structures of rigid molecules in solution by NMR spectroscopy, usually dihedral angles determined from scalar coupling constants via the Karplus equation [1], distances from the Nuclear Overhauser Effect (NOE) [2–4], and recently the angular information from Residual Dipolar Coupling (RDC) data [5–9] are used.

The structure of flexible molecules is much more difficult to determine. In this case, only averaged NMR parameters are accessible. This complicates structure determination. If one succeeds though, important information about structure and dynamics of the molecule under investigation can be obtained.

Due to the different information content of NOE and RDC and their different behavior under conformational averaging, both interactions might lead to different results. It is difficult to tell in advance whether an approach based on only one kind of parameter will work for a given molecule. In consequence, depending on the molecule, a consideration of only one of the two sets of parameters might thus not be sufficient.

We herein demonstrate a combined NOE/RDC analysis for two molecules, strychnine **1** and α -methylene- γ -butyrolactone **2** (see

Fig. 1), and discuss whether a simplified approach would lead to the same results for those molecules.

2. Conformational averaging

When discussing the effects of conformational averaging on the observation of NOE and RDC, first the timescale of the molecular motion has to be identified.

There are two major regimes of conformational flexibility compared to the timescale of chemical shift evolution: slow and fast exchange [10]. In the slow exchange regime, each conformer that is present in solution gives rise to its own set of signals. The number of populated conformers can therefore be identified from the number of signal sets. In the fast exchange regime, the observed signal is an average over all conformers. Thus, a single set of signals is observed, as would be for a rigid compound. From the number of signals, a rigid compound is indistinguishable from a compound undergoing fast conformational exchange.

In the fast exchange regime, there are two different timescales for the motional averaging of NOE derived distances [3]. Compared to the overall tumbling, as characterized by the correlation time τ_c , the conformational flexibility can either be faster than τ_c (slow tumbling) or slower than τ_c (fast tumbling). To avoid confusion, it is necessary to mention that the timescale of the overall tumbling is different from the timescale of chemical shift evolution. Thus we will adopt the terms fast and slow tumbling [3,11] for

* Corresponding author.

E-mail address: cthiele@thielelab.de (C.M. Thiele).

¹ Current address: Wellcome Trust Centre for Neuroimaging, UCL, 12 Queen Square, London, WC1N 3BG, United Kingdom.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmr.2015.10.007>

1090-7807/© 2015 The Authors. Published by Elsevier Inc.

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Please cite this article in press as: A. Kolmer et al., Conformational analysis of small organic molecules using NOE and RDC data: A discussion of strychnine and α -methylene- γ -butyrolactone, J. Magn. Reson. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmr.2015.10.007>

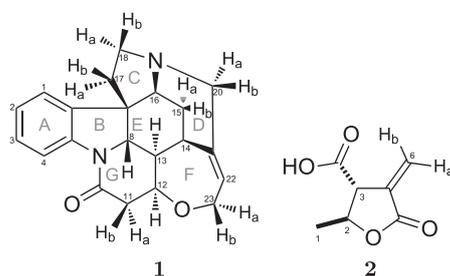


Fig. 1. Chemical structures and nomenclature of strychnine **1** and α -methylene- γ -butyrolactone **2**.

these two terms, while the terms fast and slow exchange will be applied with respect to the timescale of chemical shift evolution.

If a compound is in the fast tumbling regime [3,11], the observed distance is an average over the individual distances of all populated conformers according to the following Eq. (1) [3]:

$$r_{IS,averaged} = \left(\sum_{\mu=1}^N p_{\mu} r_{IS,\mu}^{-6} \right)^{-\frac{1}{6}} \quad (1)$$

with N being the number of conformers, p_{μ} the population of the conformer μ and $r_{IS,\mu}$ the distance of the protons I and S in the conformer μ .

If a compound or a part of a compound is in the slow tumbling regime [3,12,13], the observed distance is an average over the individual distances of all populated conformers according to Tropp [12] and is described by the following Eq. (2):

$$r_{IS,averaged,Tropp} = \frac{1}{3} \left(\sum_{\mu=1}^N r_{IS,\mu}^{-3} \right)^{-\frac{1}{3}} \quad (2)$$

For organic compounds, it is difficult to decide which of those two equations needs to be applied. To be certain which equation is the correct one for a given pair of protons, first the overall tumbling rate τ_c needs to be determined. While there are methods to do so (e.g. from ^{13}C relaxation rate constants [3]), usually one single and constant τ_c is assumed for the (organic) compound, which is a problematic assumption in itself. Secondly, the molecular motion needs to be compared to τ_c . This poses a challenge, as the authors are unaware of a way to determine the rate of conformational interconversion in the regime of fast exchange experimentally (if no line broadening due to exchange is present anymore). Thus, it is usually assumed that protons in methyl groups can be described by slow tumbling [3] and are described by Eq. (2) (r^{-3} averaging), while all other protons are assumed to be in the fast tumbling regime [3] and are described by Eq. (1) (r^{-6} averaging).

Averaging of RDC data is a different matter. In anisotropic solution, the overall tumbling might not be isotropic and thus cannot be adequately described by the isotropic tumbling rate τ_c . Instead, usually the anisotropic tumbling of a compound is described by the Saupe-tensor S [14] or its scaled analogue, the alignment tensor A [15]. For a rigid compound, one tensor is needed to compare the experimental RDC data to a structural proposal. This is called the single conformer single tensor (SCST) model [9,16–19]. For flexible compounds, ideally one tensor is used for each populated conformer, this is called the multi conformer multi tensor (MCMT) model [9,16–19]. If the conformational interconversion of the compound is fast as compared to the anisotropic tumbling, it might be possible to assume that a single tensor is sufficient to describe the

whole ensemble of conformers. This assumption is called the multi conformer single tensor (MCST) model [9,16–19].

It is challenging to judge whether a MCST approach is justified or whether a MCMT approach is necessary. It has been shown for the lactone **2** [19] and for fibrosterol sulfate **A** [20] that both methods lead to the same result, thus indicating that the assumption of the MCST approach is justified for those two molecules. Its general applicability and its limits are currently under investigation.

3. Strychnine

Strychnine **1** is composed of seven annealed rings and has been considered to be highly rigid. Its rigidity and well-known complex structure led to strychnine **1** being a challenging target molecule for total synthesis [21–23] and to it being used as test molecule for NMR method development [24]. Correspondingly, when a hidden flexibility of strychnine **1** in either ring C [25] or ring F [26,27] was proposed, these results were met with astonishment.

Butts et al. discovered that one distance ($H_{11b}-H_{23b}$) in a 1D Pulsed Field Gradient Spin Echo (PFGSE) NOE experiment can only be explained by conformational flexibility of ring F in strychnine. [26] This is also in accordance with DFT-calculations performed by the same group, in which 1–2% of the second conformer were proposed based on the free energy difference. [26] The distance $H_{11b}-H_{23b}$ shows the best agreement when adding a second conformer **1f2** with a population of 2.2%. The two conformers **1f1** and **1f2** are shown in Fig. 2.

It should be noted though that Butts et al. did not degas the sample and performed only one (series of) measurement(s) at a single mixing time of 500 ms. This does not allow one to check the validity of the initial-rate approximation [28]. In another paper [11] Butts et al. describe that the initial-rate-approximation is fulfilled for strychnine **1** for up to 600 ms. Another aspect is that at 600 MHz the protons H_{23a} and H_{23b} are strongly coupled (strong coupling parameter [3] $\theta = 0.52$). Although Butts et al. use a zero-quantum suppression (ZQS) element [29–31], full ZQS might not be possible depending on the coupling constant and effectiveness of ZQS [30] and may thus obscure the NOE intensity between H_{11b} and H_{23b} . Finally, the relaxation delay of 1 s should be mentioned, which is too short to assure complete relaxation. Butts et al. assume that the NOE obtained can be quantified in spite of all these assumptions. If this is the case, the method of Butts et al. would possess the great advantage that the measurement time can be drastically reduced by not using a mixing time series and complete relaxation. We therefore aim to exclude these potential sources of error and then compare and discuss the results.

Besides the NOE investigations by Butts et al., a RDC analysis was performed by Schmidt et al. [27]. For this, Schmidt et al. proposed two conformers [27] which show the same structures and flexibility as the ones by Butts et al. From integration of signals at low temperatures (slow exchange regime), they extrapolated a population of 2.7% **1f2** at 298 K. In addition, they compared previously published RDC data [32] to an ensemble of conformers. The best agreement was found at a population of 13% **1f2**. It is observed that the RDC fit is less sensitive to small population changes. Although newer RDC data exists [33,34], fits of these datasets were not shown. We believe the newer RDC data might also allow interesting insights, and thus aim to expand this picture. Further, we will compare the results to the results from the NOE.

In addition to the flexibility of ring F, there are first indications for a flexibility of ring C. Bifulco et al. discovered that calculated $^1J_{CC}$ values for C_7-C_{17} and C_7-C_{16} change significantly if a second conformer **1c2** with another orientation in ring C is introduced [25]. They concluded that the population of **1c2** is very small (0.11% at 298 K). Schmidt et al. considered this as not reliable

Please cite this article in press as: A. Kolmer et al., Conformational analysis of small organic molecules using NOE and RDC data: A discussion of strychnine and α -methylene- γ -butyrolactone, J. Magn. Reson. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmr.2015.10.007>

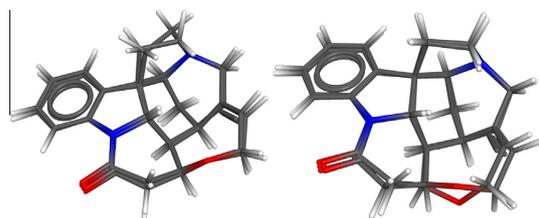


Fig. 2. Visualization of the flexibility of strychnine **1**. Left: Two conformers **1c1** and **1c2** according to Bifulco et al. [25], showing the flexibility in ring C. Right: Two conformers **1f1** and **1f2** according to Butts et al. [26] and Schmidt et al. [27], showing the flexibility in ring F.

196 [27], and thus no comparison with experimental data aside from
197 $^1J_{CC}$ values has been performed. We therefore aim to use experi-
198 mental NOE and RDC data to also investigate the proposed flexibil-
199 ity of ring C.

200 3.1. Flexibility of ring F

201 We quantified several proton–proton NOE signals of strychnine
202 via mixing time series (50–400 ms) of fully relaxed 1D PFGSE NOE
203 [35–37] spectra with ZQS [29–31]. During the period of validity of
204 the initial-rate-approximation [28], we evaluated those mixing
205 time series using the Peak Amplitude Normalization for Improved
206 Cross-relaxation (PANIC) approach [38]:
207

$$209 \quad r_{IS} = r_{\text{ref}} \left(\frac{\sigma_{IS}}{\sigma_{\text{ref}}} \right)^{-\frac{1}{6}} \quad (3)$$

210 where r_{IS} is the distance between I and S that one wishes to deter-
211 mine, and σ_{IS} is the cross-relaxation rate constant which is equal to
212 the slope of the corresponding PANIC plot [38]. r_{ref} stands for a refer-
213 ence distance with σ_{ref} being the slope of the PANIC plot for the
214 reference distance. As reference distance, we chose H_{15a} – H_{15b} as
215 rigid distance between two diastereotopic protons and set it to
216 1.760 Å. To compensate for different relaxation rates of sp^3 - and
217 sp^2 -bound protons, we used the relayed calibration as proposed
218 by Butts et al. [11], and in order to remove the confound of param-
219 agnetic atmospheric oxygen, the samples were degassed; see [Sup-](#)
220 [porting Information](#) for details.

221 The resulting distances mostly are in good agreement with the
222 ones by Butts et al. [26] (see Fig. 3). Up to 400 ms mixing time, the
223 initial-rate approximation is valid for all observed distances (see
224 [Supporting Information](#) for details).

225 After determining the distances, we performed a conforma-
226 tional analysis using the self-written software *WEEDHEAD* (see
227 [Supporting Information](#) for details). The populations were varied
228 in 1%-steps. Because only one set of signals is present at 300 K,
229 the conformational flexibility was judged to be in the regime of fast
230 exchange. In addition, no exchange signals were found in the NOE
231 spectra, thus indicating that no slow exchange is present. Averaged
232 distances were calculated using the formula (1) [3], assuming fast
233 tumbling (r^{-6} averaging). The averaged distances can then be com-
234 pared to the experimental values. For H_{11b} – H_{23b} , this comparison
235 can be found in Fig. 4.

236 We were able to determine 33 distances in total (see [Supporting](#)
237 [Information](#)). All of these distances can be compared to averaged
238 distances. At the correct population of the two conformers **1f1**
239 and **1f2**, the overall agreement between experimental and averaged
240 distances should be best. Therefore, for each population we
241 determined a quality factor q comparable to the one proposed by
242 Cornilescu et al. [39] for anisotropic NMR parameters:

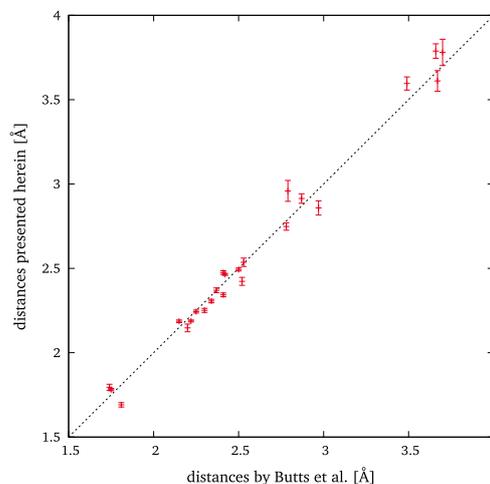


Fig. 3. A comparison of the distances determined by us (y-axis) from cross-relaxation rates (mixing time series of 50–400 ms of fully relaxed PFGSE NOE spectra with ZQS) and by Butts et al. [26] (x-axis, from PFGSE NOE spectra with ZQS, a relaxation delay of 1 s and a single mixing time of 500 ms).

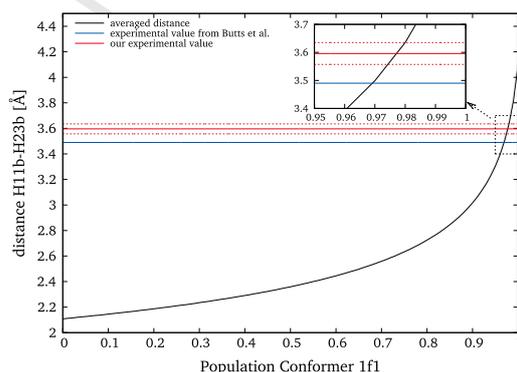


Fig. 4. A comparison of the distance H_{11b} – H_{23b} averaged from **1f1** and **1f2** by Eq. (1) (black) and the experimental values by us (red, experimental error represented as dashed lines) and by Butts et al. [26] (blue). The enlarged section shows a perfect agreement for a population of the conformer A of 98% for our value, or at 97% for Butts et al. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

$$243 \quad q = \frac{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{IS} (r_{IS, \text{averaged}} - r_{IS, \text{exp}})^2}}{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{IS} (r_{IS, \text{exp}})^2}} \quad (4) \quad 245$$

246 (with N the number of distances and $r_{IS, \text{exp}}$ the experimentally
247 determined distance between spin I and spin S) and searched for
248 the minimum (see Fig. 5).

249 Again, our results are in good agreement with the results from
250 Butts et al. [26], and our agreement of the experimental distances
251 with the conformationally averaged distances is even slightly bet-
252 ter. The minimum at 98% of **1f1** is essentially the same as deter-
253 mined by the comparison of only H_{11b} – H_{23b} (see Fig. 4). Thus, in
254 this case, the analysis of one distance would be sufficient.

255 The common school of thought is that CH - and CH_2 -groups in
256 small organic molecules are in the fast tumbling regime [3]. For
257 this analysis, r^{-6} averaging was performed according to Eq. (1).

4

A. Kolmer et al./Journal of Magnetic Resonance xxx (2015) xxx-xxx

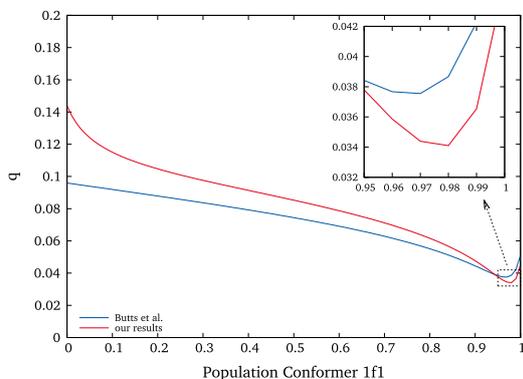


Fig. 5. Conformational analysis using our distances (red) and the ones from Butts et al. [26] (blue). The y-axis shows the quality factor q (Eq. (4)). The lower the quality factor, the better the agreement of all experimental distances to the distances averaged from conformers **1f1** and **1f2** by Eq. (1). The best agreement can be found at a population of 98% **1f1** for our values, or at 97% for Butts et al. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

258 However, we also performed an analysis using Eq. (2), which
259 would be correct for slow tumbling (r^{-3} averaging). Surprisingly,
260 the description in fast tumbling (r^{-6} averaging) leads to a descrip-
261 tion of the experimental data which is just as good as the one for
262 slow tumbling (r^{-3} averaging; see Supporting Information for
263 details on both evaluations).

264 3.2. Comparison of experimental and simulated NOE for strongly 265 coupled protons

266 Even though we were able to reproduce the experimental dis-
267 tances from Butts et al. [26], the interpretation of the experimental
268 data needs to be revisited. It might be possible that the presence of
269 a strongly coupled spin system obscures the distance $H_{11b}-H_{23b}$ in
270 a way that no second conformer **1f2** needs to be proposed. Another
271 possible source of error may be spin diffusion. Although it is gener-
272 ally believed that spin diffusion leads to a non-linear behavior of
273 the PANIC plots [3,40], we nevertheless wanted to exclude this
274 possible source of error. This non-linearity might be hidden under
275 a scattering of experimental data points, and thus might have an
276 impact on the extracted distance. The spin diffusion, the strong
277 coupling and the existence of zero-quantum coherences therefore
278 need to be evaluated.

279 For the distance $H_{11b}-H_{23b}$ itself, the PANIC plots without and
280 with ZQS are shown in Fig. 6. Without ZQS, a modulation is visible.
281 This modulation can be suppressed with the ZQS module, as would
282 be expected (see Fig. 7). Unfortunately, for $H_{23b}-H_{11b}$ the ZQS
283 module fails to suppress this modulation (see Fig. 8). This, again, is
284 in agreement with the expectation. In our 600 MHz spectrometer,
285 the chemical shift difference of the strongly coupled spins $H_{23b}-$
286 H_{23a} is roughly 50 Hz. Using a swept pulse/gradient pair of
287 20 ms, this leads to a maximum theoretical suppression of only
288 16% of the ZQS [29,30]. This leads to obscured intensities of
289 the irradiated signal H_{23b} , which leads to the PANIC plot of $H_{23b}-$
290 H_{11b} shown in Fig. 8, from which no reliable distance can be extracted.

291 This behavior can be observed when the irradiated spin is influ-
292 enced by strong coupling. It cannot be observed when the spin in
293 the strongly coupled system is the observed spin: The correspond-
294 ing PANIC plot is linear. Still, it cannot be excluded that strong cou-
295 pling and/or spin diffusion is present. We therefore decided that a
296 full relaxation matrix approach is necessary to exclude those
297 influences.

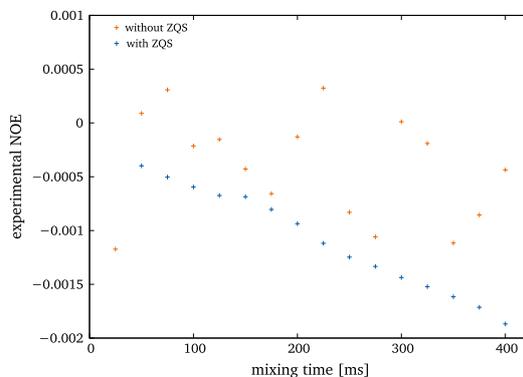


Fig. 6. A comparison of mixing time series for $H_{11b}-H_{23b}$ with and without ZQS. The modulation can be suppressed quite efficiently by using a ZQS element.

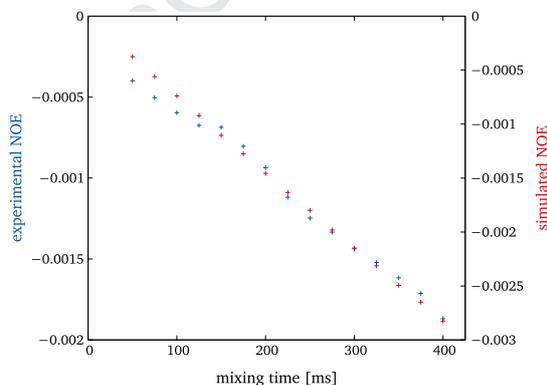


Fig. 7. A comparison of experimental and simulated mixing time series for $H_{11b}-H_{23b}$ with ZQS. Both the simulated and the experimental PANIC plot show significantly improved linear behavior, thus zero-quantum artifacts are suppressed reasonably well.

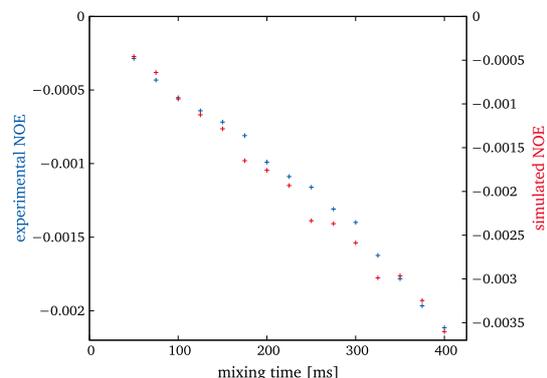


Fig. 8. A comparison of experimental and simulated mixing time series for $H_{23b}-H_{11b}$ with ZQS. Both the simulated and the experimental PANIC plot show some remaining modulation, thus indicating incomplete ZQS. No reliable distance can be extracted.

Please cite this article in press as: A. Kolmer et al., Conformational analysis of small organic molecules using NOE and RDC data: A discussion of strychnine and α -methylene- γ -butyrolactone, J. Magn. Reson. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmr.2015.10.007>

298 Using the *Spinach* library [41–44], we simulated the PANIC plots
299 for the distance $H_{11b}-H_{23b}$, including the possibility of conforma-
300 tional flexibility (*Spinach* parameters, details of the simulation
301 and the simulated PANIC plots can be found in Supporting Informa-
302 tion). The corresponding PANIC plot for a population of 98% **1f1** is
303 shown in Fig. 7, along with the experimental PANIC plot. The conformer
304 populations were varied in 1%-steps between 90% and 100%
305 **1f1**, and in 10%-steps between 0% and 90% **1f1**. Again using $H_{15a}-$
306 H_{15b} as reference distance, we compared these simulated distances
307 to distances averaged by Eq. (1) (see Fig. 9). The simulated curve
308 corresponds to the expected average distance very well.

309 This result leads to the conclusion that the main influence on
310 the distance $H_{11b}-H_{23b}$ is conformational flexibility. If strong coupling
311 and/or spin-diffusion obscures the signal intensity, its influence
312 is much weaker and can thus be neglected. It therefore is
313 necessary to add a second conformer to the analysis to be able to
314 explain the experimental distance of $H_{11b}-H_{23b}$. Thus, the approx-
315 imations from Butts et al. [26] are valid.

316 3.3. Flexibility of ring C

317 It is also possible to compare the determined experimental
318 distances to distances averaged from the structures **1c1** and **1c2**
319 determined by Bifulco et al. [25], which include flexibility at ring
320 C. Of special interest is the distance $H_{18b}-H_{20b}$, the situation of
321 which is comparable to that of $H_{11b}-H_{23b}$ for ring F: the deter-
322 mined value of (2.343 ± 0.011) Å is slightly too short for conformer
323 **1c1** (2.46 Å). Adding a second conformer **1c2** thus
324 improves the agreement of experimental and averaged distance
325 (see Fig. 10). The single value would lead to a population of
326 62% **1c1**.

327 It is again possible to compare all experimental distances to
328 averaged distances, and to determine the quality factor q (Eq.
329 (4)). The result is shown in Fig. 11. In contrast to the previously
330 described situation of ring F, the addition of **1c2** does not improve
331 the quality of the fit, even though the agreement of $H_{18b}-H_{20b}$
332 improves. On the other hand, the agreement of $H_{18a}-H_{20b}$ and
333 $H_{18a}-H_{16}$ gets worse (data not shown), thus counterbalancing the
334 improvement in $H_{18b}-H_{20b}$.

335 A three-conformer-fit including **1f1**, **1f2** and **1c2** was also per-
336 formed to check for both ring flexibilities in the same fit. Again,
337 no improvement is found when adding **1c2**. The minimum is at
338 98% **1f1**, 2% **1f2** and 0% **1c2**. The data is shown in Fig. 12.

339 For ring C, the analysis of one single distance leads to a different
340 result than the analysis of all determined distances and thus needs
341 to be viewed with caution. In this case, it is necessary to look at all
342 distances. As a result, no improvement is achieved when adding a
343 second conformer **1c2**. The main influence on the improvement of
344 the fit is the addition of **1f2**. On the basis of this data, flexibility of
345 ring C can be neglected.

346 3.4. RDC analysis

347 Next, we performed a conformational analysis using previously
348 published RDC data. We chose the Multi Conformer Single Tensor
349 (MCST)-method of the program *hotFCHT* [45] (see below), and we
350 will discuss the results based on the quality factor Q as defined
351 by Thiele et al. [19], which includes the experimental error
352 $\Delta D_{i,exp}$ of the i -th experimental RDC $D_{i,exp}$:

$$353 \quad Q = \frac{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_i \left(\frac{D_{i,calc} - D_{i,exp}}{\Delta D_{i,exp}} \right)^2}}{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_i \left(\frac{D_{i,exp}}{\Delta D_{i,exp}} \right)^2}} \quad (5)$$

354 with N being the number of RDCs.

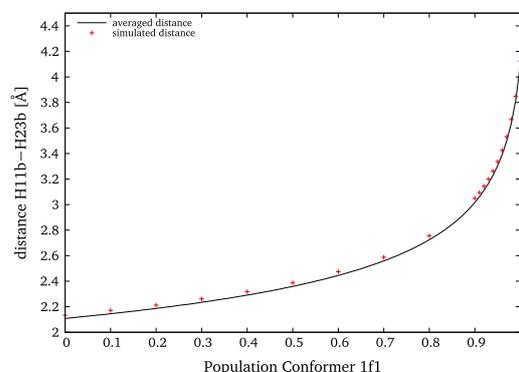


Fig. 9. A comparison of the distances simulated with *Spinach* and the distances averaged by *WEEDHEAD*. The very good agreement indicates the necessity of conformational flexibility to explain the experimentally derived distance shown in Fig. 4.

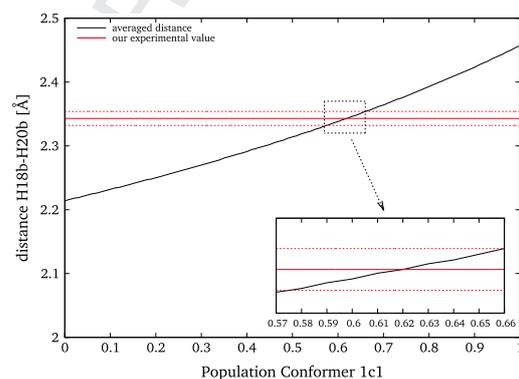


Fig. 10. A comparison of the distance $H_{18b}-H_{20b}$ averaged from conformers **1c1** and **1c2** by Eq. (1) (black) and the experimental value (red, experimental error represented as dashed lines). The enlarged section shows a perfect agreement for a population of 62% **1c1**. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

357 There are several RDC datasets for strychnine [46,32,47,33,34].
358 All of them include the RDC $C_{12}-H_{12}$, the spatial relationship of
359 which changes with respect to the rest of the molecule when adding
360 the conformer **1f2**. The spatial relationships that change the most
361 with respect to the rest of the molecule and therefore are of greatest
362 interest are $C_{23}-H_{23a}$ and $C_{23}-H_{23b}$. These RDCs are only included
363 in some of the datasets.

364 The first dataset was published by Thiele et al. [46]. Strychnine
365 was oriented in Poly- γ -benzyl-L-glutamate (PBLG)/ $CDCl_3$. The data-
366 set contains very few RDCs, each with large errors, and does not
367 include RDCs for $C_{23}-H_{23a}$ and $C_{23}-H_{23b}$. Little improvement of
368 the fit is thus expected when adding the second conformer **1f2**.
369 This small improvement is observed (see Fig. 13), which seems to
370 be too small to be of significance.

371 Next, strychnine was oriented in Poly- γ -ethyl-L-glutamate
372 (PELG)/ $CDCl_3$, again by Thiele [32]. This dataset includes RDCs for
373 $C_{23}-H_{23a}$ and $C_{23}-H_{23b}$. As discussed by Schmidt et al. [27], the
374 quality of the fit improves when adding a second conformer **1f2**.
375 The best agreement of experimental and calculated RDC data can
376 be found at a population of 87% **1f1**.

Please cite this article in press as: A. Kolmer et al., Conformational analysis of small organic molecules using NOE and RDC data: A discussion of strychnine and α -methylene- γ -butyrolactone, J. Magn. Reson. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmr.2015.10.007>

6

A. Kolmer et al. / Journal of Magnetic Resonance xxx (2015) xxx–xxx

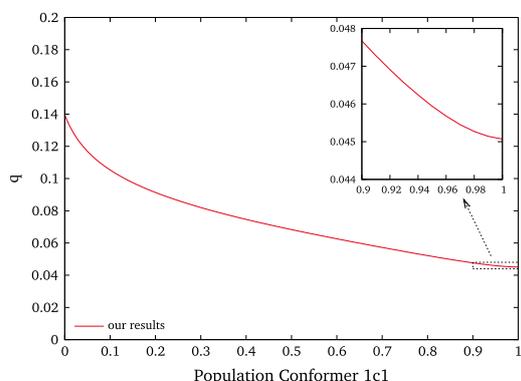


Fig. 11. Conformational analysis using our distances (red). The y-axis shows the quality factor q (Eq. (4)). The lower the quality factor, the better the agreement of all experimental distances to the distances averaged from conformers **1c1** and **1c2** by Eq. (1). No improvement can be found when adding **1c2**, the broad minimum lies at 100% **1c1**. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

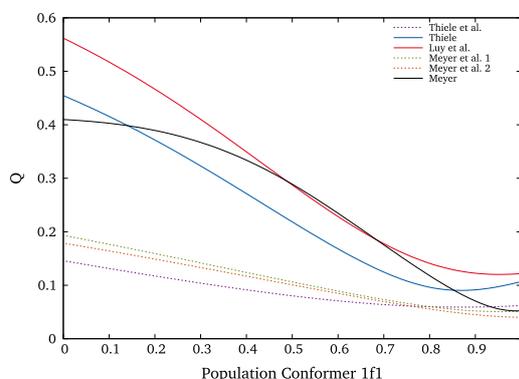


Fig. 13. MCST fits using previously published RDC data from Thiele et al. [46], Thiele [32], Luy et al. [47], Meyer et al. [33] and Meyer [34]. The solid lines indicate fits that include RDCs for $C_{23}-H_{23a}$ and $C_{23}-H_{23b}$, while fits represented by the dashed lines do not include these RDCs.

377 RDC data by Luy et al. were measured in cross-linked polystyrene
378 swollen in $CDCl_3$ [47]. This dataset also includes RDCs for $C_{23}-H_{23a}$
379 and $C_{23}-H_{23b}$. There is a small improvement of the fit, but it is too
380 small to be of significance.

381 Meyer et al. recently published two RDC datasets for strychnine
382 aligned in two enantiomers of polyacetylene/ $CDCl_3$ [33]. Both data-
383 sets do not include RDCs for $C_{23}-H_{23a}$ and $C_{23}-H_{23b}$, correspond-
384 ingly the improvement of the fits is small or nonexistent.
385 Another set of RDCs exists from Meyer which includes the RDC
386 for $C_{23}-H_{23a}$ and $C_{23}-H_{23b}$ [34]. The fit shows an improvement
387 when adding **1f2**, but the improvement again is too small to be
388 of significance.

389 Thus there are data sets (by Thiele [32] and Luy et al. [47]),
390 which show an improvement of the fit when a second conformer
391 is added, but these data sets show the worst overall agreement
392 of experimental and back-calculated RDCs and need to be viewed

with caution. The other, newer datasets show no or insignificant
improvement when adding **1f2**. In consequence, for strychnine,
the RDC analysis is not able to detect a small addition of the second
conformer **1f2**. In this particular case, the NOE analysis seems to be
superior to the RDC analysis.

Although a flexibility of ring C was not found in the NOE analysis,
we chose to investigate this matter further using the RDC
datasets. The RDC analysis reveals the same trend as the NOE analysis
(see Fig. 14). Only the RDC dataset from Luy et al. [47] shows
an improvement when adding a second conformer **1c2**. This
improvement is small, and it does not lead to a good description
of the system. In accordance with the results of the NOE analysis,
the flexibility of ring C is not necessary to describe the experimen-
tal data.

A three-conformer-analysis of the RDC data is shown in [Supporting Information](#)
and leads to the same results as the separate
analysis of the rings C and F: Only the RDC dataset from Luy et
al. [47] shows a small improvement when adding both **1f2** and
1c2. The dataset from Thiele [32] only improves when adding
1f2; adding **1c2** does not improve the quality of the fit.

While one could be tempted to view these small improvements
as indicative for a second conformer, we believe that all improve-
ments are too small to be of significance.

4. α -Methylene- γ -butyrolactone 2

The description of dipolar couplings in the presence of confor-
mational flexibility has been extensively studied [48–51,16–18,5
2–59]. RDCs especially have shown their potential in determining
conformer populations [6,5,9,60–64,20,65]. Recently, RDC data
has yielded information on both the configuration and conforma-
tion of the organic molecule α -methylene- γ -butyrolactone **2**.
The goal of the RDC analysis [66] was to determine the relative confi-
guration of the stereogenic centers C_2 and C_3 in the five-membered
ring, which was ultimately shown to be *trans*. In addition, it was
later shown [19,67] that there are two conformers for the *trans*-
configured ring. Using the MCST model, the population of confor-
mer **2trans1** was determined to be $(60 \pm 20)\%$. From the
(MCMT) model, the extracted population was $(65 \pm 7)\%$. These val-
ues are in very good agreement with those extracted from J cou-
pling constants $((60 \pm 20)\%$). The populations of **2trans1** and
2trans2 (see Fig. 15) were thus determined to be approximately
60% and 40% [19].

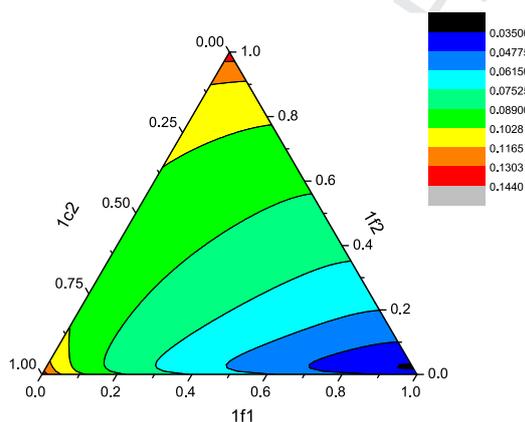


Fig. 12. Conformational analysis using our distances. The quality factor q (Eq. (4)) is color-coded. The lower the quality factor, the better the agreement of all experimental distances to the distances averaged from conformers **1f1**, **1f2** and **1c2** by Eq. (1), with the black area being the area of the best agreement. The only influence is the addition of **1f2**, no improvement can be found when adding **1c2**. The minimum is at 98% **1f1**, 2% **1f2** and 0% **1c2**.

Please cite this article in press as: A. Kolmer et al., Conformational analysis of small organic molecules using NOE and RDC data: A discussion of strychnine and α -methylene- γ -butyrolactone, J. Magn. Reson. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmr.2015.10.007>

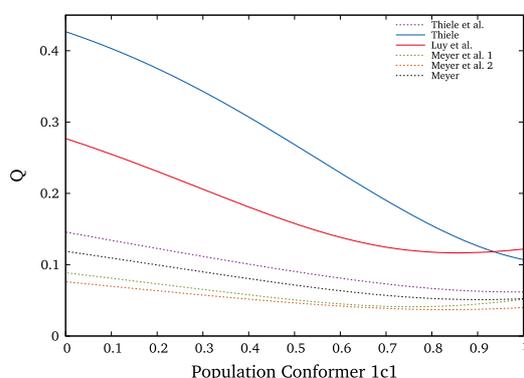


Fig. 14. MCST fits using previously published RDC data from Thiele et al. [46], Thiele [32], Luy et al. [47], Meyer et al. [33] and Meyer [34]. The solid lines indicate fits that include RDCs in the flexible ring C, while fits represented by the dashed lines do not include these RDCs.

434 Due to the lack of analyte of sufficient purity at that time, it had
435 not been possible to determine significant distances using the NOE
436 [66]. Therefore a determination of the configuration and conformer
437 populations using NOE derived distances could not be achieved.
438 Thus, it was not possible to check whether a conformational analysis
439 using NOE data would lead to the same results as the analysis
440 of the RDC data.

441 In the meantime, more analyte was synthesized [68] and purified,
442 enabling us to do a thorough NOE analysis. The distance of greatest
443 interest is the one between the protons H₂ and H₃, which may be *syn*
444 (*cis*-configuration) or *anti* (*trans*-configuration). The resulting
445 experimental distance is closer to the distance corresponding to a
446 *trans* configuration, but significantly deviates from the one expected
447 from the structures (see Fig. 16). In this case, it is not sufficient to
448 look at just one distance, so we performed a full NOE analysis using
449 mixing time series (50–400 ms) of fully relaxed 1D PFGSE NOE
450 spectra with ZQS. As calibration distance, we chose H_{6b}–H_{6a} as rigid
451 distance and set it to 1.886 Å.

452 We were able to determine four distances with good precision.
453 Two of those distances include a methyl group. The protons in these
454 groups are assumed to be in the slow tumbling regime [3,12,13].
455 Therefore, the distances from each of the three methyl protons to
456 the proton showing the NOE were averaged for every conformer
457 according to Tropp [12], using Eq. (2) (r^{-3} averaging).

458 This averaged methyl distance was then used as $r_{IS,\mu}$ in Eq. (1).
459 This two-step averaging process for methyl groups was again
460 implemented in WEEDHEAD. The result of this analysis is shown in
461 Fig. 17 and demonstrates that the original assignment of *trans* is
462 correct, and led to conformer populations of 71% **2trans1** and 29%
463 **2trans2**. This is in very good agreement with the RDC data and
464 also with conformer populations approximated from free energy
465 differences in quantum chemical calculations [66,19].

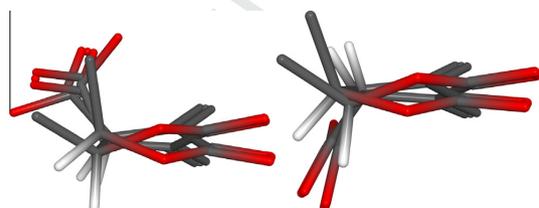


Fig. 15. The two conformers **2cis1** and **2cis2** for the *cis*-configuration (left) and **2trans1** and **2trans2** for the *trans*-configuration (right) of α -methylene- γ -butyrolactone 2 [19].

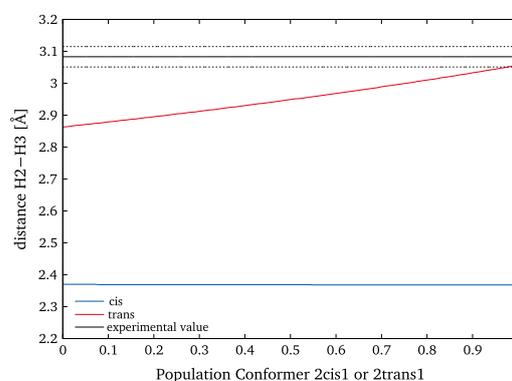


Fig. 16. A comparison of the distance H₂–H₃ averaged from the *cis*- (blue) or *trans*-configuration (red) and the experimental value (black, experimental error represented as dashed lines). The experimental distance is too large for both the *cis*- and the *trans*-configuration. It is closer to the *trans*-configuration, but this result should be met with caution. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

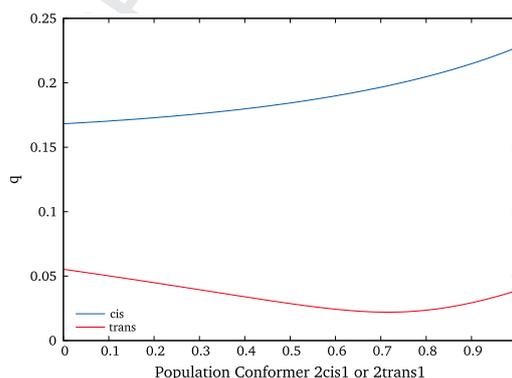


Fig. 17. Conformational analysis of the *cis*- (blue) and the *trans*-configuration (red). The quality of the fit is much better for the *trans*-configuration, with a minimum at a population of 71% of **2trans1**. This is in good agreement with the RDC data [66,19]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

466 It needs to be noted that the experimental value for the distance
467 H₂–H₃ is too large for both the *trans*- and the *cis*-configuration (see
468 Fig. 16). From this, one could assume that the *trans*-configuration
469 seems more reasonable, because the experimental distance is closer
470 to the distance from the *trans*-configuration, but no population
471 information can be extracted. The corresponding PANIC plot (see
472 Supporting Information) shows a rather large scattering of the data
473 points, thus this distance is to be viewed with caution. We believe
474 that in this case it is not sufficient to look at just one distance to
475 determine the relative configuration of the five-membered ring.
476 In this case, the combined NOE/RDC analysis seems to be superior.

477 For this analysis, the tumbling was again assumed to be fast.
478 Thus, according to Eq. (1) r^{-6} averaging was employed. Additionally,
479 we performed an analysis using r^{-3} averaging according to
480 Eq. (2), which would be correct for slow tumbling. In addition,
481 we also tried the permutations where the methyl groups were in
482 the fast tumbling regime (r^{-6}), leading to four possible combinations
483 of Eqs. (1) and (2). The best description of the experimental data
484 can be found using the two-step averaging described above (see
485 Supporting Information for details).

Please cite this article in press as: A. Kolmer et al., Conformational analysis of small organic molecules using NOE and RDC data: A discussion of strychnine and α -methylene- γ -butyrolactone, J. Magn. Reson. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmr.2015.10.007>

5. Conclusion

For strychnine **1**, we confirmed that a second conformer **1f2** has to be taken into account to understand the experimental NOE data. This result is in agreement with the results from Butts et al. [26].

By preparing the sample without oxygen, we excluded paramagnetic relaxation partners. In addition, we excluded possible influences from strong coupling or incomplete relaxation and checked the validity of the initial-rate-approximation. As a result, we were able to determine 33 distances that can only be fully explained when including conformational flexibility at ring F. For this ring, the evaluation of one distance $H_{11b}-H_{23b}$ leads to the same result as an analysis of all 33 distances. Thus for ring F one distance was enough to achieve a correct description of the populations of the conformers.

At ring C, the analysis of only one distance can be misleading. When all distances are taken into account, no improvement can be found when adding a second conformer **1c2**.

In the case of α -methylene- γ -butyrolactone **2**, the evaluation of only one distance leads to the correct assignment of relative configuration, but no populations can be described. It is necessary to evaluate all four accessible distances, leading to populations of 71% **2trans1** and 29% **2trans2**.

The RDC analysis for strychnine **1** only shows weak dependence of the quality factor on conformer populations and thus was not able to detect a second conformer. For α -methylene- γ -butyrolactone **2**, the results of the RDC analysis [66,67,19] match the result from the NOE analysis.

Thus, we believe that both methods have strengths and weaknesses. Due to the r^{-6} -averaging and its local character, the NOE changes significantly if (large) variations over short distances are present, but not if (small) variations in distant parts of the compound are present. The RDC analysis, on the other hand, benefits from its global character, so that changes at distant parts of the compound can be determined, but it will fail if only minor changes in local geometry are present.

In some cases, it can be enough to look at just one of the parameters, or even just one experimental value (as is the case for ring F of strychnine). However, there is no guarantee that this approach will work for a given compound. In our opinion, the best way therefore is to look at both NOE and RDC to benefit from the strengths of both methods.

Acknowledgments

The authors thank Lukas Kaltschnee for the helpful discussions concerning ZQS, Dr. Volker Schmidts for the support in C and Dr. Benjamin Böttcher for the supply with α -methylene- γ -butyrolactone **2**.

This work was supported by the European Research Council (ERC starting Grant No. 257041 to C.M.T.) and the EPSRC (Grant EP/H003789/1 to IK).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmr.2015.10.007>.

References

- [1] M. Karplus, Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments, *J. Chem. Phys.* 30 (1) (1959) 11–15.
- [2] I. Solomon, Relaxation processes in a system of two spins, *Phys. Rev.* 99 (2) (1955) 559–565.

- [3] D. Neuhaus, M.P. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, second ed., Wiley, Chichester, 2000.
- [4] B. Vögeli, The nuclear Overhauser effect from a quantitative perspective, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 78 (0) (2014) 1–46.
- [5] C.M. Thiele, Use of RDCs in rigid organic compounds and some practical considerations concerning alignment media, *Concepts Magn. Reson.* 30A (2) (2007) 65–80.
- [6] C.M. Thiele, Residual dipolar couplings (RDCs) in organic structure determination, *Eur. J. Org. Chem.* 2008 (34) (2008) 5673–5685.
- [7] G. Kummerlöwe, B. Luy, Residual dipolar couplings for the configurational and conformational analysis of organic molecules, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* 68 (2009) 193–232 (Chapter 4).
- [8] R.R. Gil, Constitutional, configurational, and conformational analysis of small organic molecules on the basis of NMR residual dipolar couplings, *Angew. Chem. Int. Ed.* 50 (32) (2011) 7222–7224.
- [9] B. Böttcher, C.M. Thiele, Determining the stereochemistry of molecules from residual dipolar couplings (RDCs), *eMagRes*, vol. 1, John Wiley & Sons, Ltd., 2012, pp. 169–180.
- [10] H. Kessler, Detection of hindered rotation and inversion by NMR spectroscopy, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 9 (6) (1970) 219–235.
- [11] C.P. Butts, C.R. Jones, E.C. Towers, J.L. Flynn, L. Appleby, N.J. Barron, Interproton distance determinations by NOE – surprising accuracy and precision in a rigid organic molecule, *Org. Biomol. Chem.* 9 (1) (2011) 177–184.
- [12] J. Tropp, Dipolar relaxation and nuclear Overhauser effects in nonrigid molecules: the effect of fluctuating internuclear distances, *J. Chem. Phys.* 72 (11) (1980) 6035–6043.
- [13] P.F. Yip, D.A. Case, Incorporation of internal motion in NMR refinements based on NOESY data, in: J.C. Hoch, F.M. Poulsen, C. Redfield (Eds.), *Computational Aspects of the Study of Biological Macromolecules by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Springer, US, 1991, pp. 317–330.
- [14] A. Saupe, Kernresonanzen in kristallinen flüssigkeiten und kristallinflüssigen lösungen. teil 1, *Z. Naturforsch.* 19a (2) (1964) 161–171.
- [15] F. Kramer, M. Deshmukh, H. Kessler, S. Glaser, Residual dipolar coupling constants: an elementary derivation of key equations, *Concepts Magn. Reson.* 21A (1) (2004) 10–21.
- [16] E. Burnell, C. de Lange, On the average orientation of molecules undergoing large-amplitude conformational changes in anisotropic liquids, *Chem. Phys. Lett.* 76 (2) (1980) 268–272.
- [17] E.E. Burnell, C.A. de Lange, O.G. Mouritsen, Effects of intramolecular motion on the magnetic resonance of anisotropic liquids: the equivalence of kinetic and equilibrium statistical mechanical approaches, *J. Magn. Reson.* 50 (2) (1982) 188–196.
- [18] J.W. Emsley, G.R. Luckhurst, C.P. Stockley, A theory of orientational ordering in uniaxial liquid crystals composed of molecules with alkyl chains, *Proc. Roy. Soc. Lond. A* 381 (1780) (1982) 117–138.
- [19] C.M. Thiele, V. Schmidts, B. Böttcher, L. Louzao, R. Berger, A. Maliniak, B. Stevesson, On the treatment of conformational flexibility when using residual dipolar couplings for structure determination, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (36) (2009) 6708–6712.
- [20] H. Sun, U.M. Reinscheid, E.L. Whitson, E.J. d’Auvergne, C.M. Ireland, A. Navarro-Vázquez, C. Griesinger, Challenge of large-scale motion for residual dipolar coupling based analysis of configuration: the case of fibrosterol sulfate a, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (37) (2011) 14629–14636.
- [21] R.B. Woodward, M.P. Cava, W.D. Ollis, A. Hunger, H.U. Daeniker, K. Schenker, The total synthesis of strychnine, *J. Am. Chem. Soc.* 76 (18) (1954) 4749–4751.
- [22] J. Bonjoch, D. Solé, Synthesis of strychnine, *Chem. Rev.* 100 (9) (2000) 3455–3482.
- [23] J.S. Cannon, L.E. Overman, Is there no end to the total syntheses of strychnine? Lessons learned in strategy and tactics in total synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.* 51 (18) (2012) 4288–4311.
- [24] S. Berger, D. Sicker, *Classics in Spectroscopy: Isolation and Structure Elucidation of Natural Products*, first ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2009.
- [25] G. Bifulco, R. Riccio, G.E. Martin, A.V. Buevich, R.T. Williamson, Quantum chemical calculations of $^1J_{CC}$ coupling constants for the stereochemical determination of organic compounds, *Org. Lett.* 15 (3) (2013) 654–657.
- [26] C.P. Butts, C.R. Jones, J.N. Harvey, High precision NOEs as a probe for low level conformers – a second conformation of strychnine, *Chem. Commun.* 47 (4) (2011) 1193–1195.
- [27] M. Schmidt, F. Reinscheid, H. Sun, H. Abromeit, G.K.E. Scriba, F.D. Sönnichsen, M. John, U.M. Reinscheid, Hidden flexibility of strychnine, *Eur. J. Org. Chem.* 2014 (6) (2014) 1147–1150.
- [28] A. Kumar, G. Wagner, R.R. Ernst, K. Wüthrich, Buildup rates of the nuclear Overhauser effect measured by two-dimensional proton magnetic resonance spectroscopy: implications for studies of protein conformation, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (13) (1981) 3654–3658.
- [29] M.J. Thrippleton, J. Keeler, Elimination of zero-quantum interference in two-dimensional NMR spectra, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (33) (2003) 3938–3941.
- [30] K.E. Cano, M.J. Thrippleton, J. Keeler, A. Shaka, Cascaded z -filters for efficient single-scan suppression of zero-quantum coherence, *J. Magn. Reson.* 167 (2) (2004) 291–297.
- [31] M.J. Thrippleton, R.A.E. Edden, J. Keeler, Suppression of strong coupling artefacts in J -spectra, *J. Mag. Reson.* 174 (1) (2005) 97–109.

Please cite this article in press as: A. Kolmer et al., Conformational analysis of small organic molecules using NOE and RDC data: A discussion of strychnine and α -methylene- γ -butyrolactone, *J. Magn. Reson.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmr.2015.10.007>

- 626 [32] C.M. Thiele, Simultaneous assignment of all diastereotopic protons in
627 strychnine using RDCs: PELG as alignment medium for organic molecules, *J.*
628 *Org. Chem.* 69 (22) (2004) 7403–7413.
- 629 [33] N.-C. Meyer, A. Krupp, V. Schmidts, C.M. Thiele, M. Reggelin, Polyacetylenes as
630 enantiodifferentiating alignment media, *Angew. Chem. Int. Ed.* 51 (33) (2012)
631 8334–8338.
- 632 [34] N. Meyer, Helikale chirale Polyacetylene in Katalyse und Analytik, Ph.D. Thesis,
633 TU Darmstadt, 2012.
- 634 [35] J. Stonehouse, P. Adell, J. Keeler, A.J. Shaka, Ultrahigh-quality NOE spectra, *J.*
635 *Am. Chem. Soc.* 116 (13) (1994) 6037–6038.
- 636 [36] K. Stott, J. Stonehouse, J. Keeler, T.-L. Hwang, A.J. Shaka, Excitation sculpting in
637 high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy: application to
638 selective NOE experiments, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (14) (1995) 4199–4200.
- 639 [37] K. Stott, J. Keeler, Q.N. Van, A.J. Shaka, One-dimensional NOE experiments
640 using pulsed field gradients, *J. Magn. Reson.* 125 (2) (1997) 302–324.
- 641 [38] H. Hu, K. Krishnamurthy, Revisiting the initial rate approximation in kinetic
642 NOE measurements, *J. Magn. Reson.* 182 (1) (2006) 173–177.
- 643 [39] G. Cornilescu, J.L. Marquardt, M. Ottiger, A. Bax, Validation of protein structure
644 from anisotropic carbonyl chemical shifts in a dilute liquid crystalline phase, *J.*
645 *Am. Chem. Soc.* 120 (27) (1998) 6836–6837.
- 646 [40] S. Macura, B.T. Farmer II, L.R. Brown, An improved method for the
647 determination of cross-relaxation rates from NOE data, *J. Magn. Reson.* 70
648 (3) (1986) 493–499.
- 649 [41] Spinach version 1.3.1980. <<http://spindynamics.org/Spinach.php>>.
- 650 [42] H.J. Hogben, M. Krzystyniak, G.T.P. Charnock, P. Hore, I. Kuprov, Spinach – a
651 software library for simulation of spin dynamics in large spin systems, *J. Magn.*
652 *Reson.* 208 (2) (2011) 179–194.
- 653 [43] I. Kuprov, Diagonalization-free implementation of spin relaxation theory for
654 large spin systems, *J. Magn. Reson.* 209 (1) (2011) 31–38.
- 655 [44] A. Karabanov, I. Kuprov, G.T.P. Charnock, A. van der Drift, L.J. Edwards, W.
656 Köckenberger, On the accuracy of the state space restriction approximation for
657 spin dynamics simulations, *J. Chem. Phys.* 135 (8) (2011) 084106.
- 658 [45] V. Schmidts, Entwicklung einer Auswertungssoftware zur Anwendung
659 Residualer Dipolarer Kopplungen in der organischen Strukturauflösung, Ph.
660 D. Thesis, TU Darmstadt, 2013.
- 661 [46] C.M. Thiele, S. Berger, Probing the diastereotopicity of methylene protons in
662 strychnine using residual dipolar couplings, *Org. Lett.* 5 (5) (2003) 705–708.
- 663 [47] B. Luy, K. Kobzar, H. Kessler, An easy and scalable method for the partial
664 alignment of organic molecules for measuring residual dipolar couplings,
665 *Angew. Chem. Int. Ed.* 43 (9) (2004) 1092–1094.
- 666 [48] J.W. Emsley, Liquid crystalline samples: structure of nonrigid molecules, in:
667 *Encyclopedia of Magnetic Resonance*, John Wiley & Sons, Ltd., 2007.
- 668 [49] S. Marčelja, Chain ordering in liquid crystals. I. Even-odd effect, *J. Chem. Phys.*
669 60 (9) (1974) 3599–3604.
- 670 [50] J.W. Emsley, G.R. Luckhurst, The effect of internal motion on the orientational
671 order parameters for liquid crystalline systems, *Mol. Phys.* 41 (1) (1980) 19–
672 29.
- 673 [51] E.E. Burnell, C.A. de Lange, Effects of interaction between molecular internal
674 motion and reorientation on NMR of anisotropic liquids, *J. Magn. Reson.* 39 (3)
675 (1980) 461–480.
- 676 [52] S. Sinton, D. Zax, J. Murdoch, A. Pines, Multiple-quantum NMR study of
677 molecular structure and ordering in a liquid crystal, *Mol. Phys.* 53 (2) (1984)
678 333–362.
- 679 [53] C. Zannoni, An internal order parameter formalism for non-rigid molecules,
680 *Nuclear Magnetic Resonance of Liquid Crystals*, vol. 141, Springer,
681 Netherlands, 1985, pp. 35–52.
- 682 [54] J. Emsley, N. Heaton, M. Kimmings, M. Longeri, The conformation and
683 orientational order of 1-ethoxy-4-chlorobenzene dissolved in a nematic
684 liquid crystal, *Mol. Phys.* 61 (2) (1987) 433–442.
- 685 [55] D.J. Photinos, E.T. Samulski, H. Toriumi, Alkyl chains in a nematic field. 1. A
686 treatment of conformer shape, *J. Phys. Chem.* 94 (11) (1990) 4688–4694.
- 687 [56] D. Catalano, L. Di Bari, C.A. Veracini, G.N. Shilstone, C. Zannoni, A maximum-
688 entropy analysis of the problem of the rotameric distribution for substituted
689 biphenyls studied by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy in nematic
690 liquid crystals, *J. Chem. Phys.* 94 (5) (1991) 3928–3935.
- 691 [57] A. Ferrarini, G. Moro, P. Nordio, G. Luckhurst, A shape model for molecular
692 ordering in nematics, *Mol. Phys.* 77 (1) (1992) 1–15.
- 693 [58] R. Berardi, F. Spinozzi, C. Zannoni, Maximum entropy internal order approach
694 to the study of intramolecular rotations in liquid crystals, *J. Chem. Soc.,*
695 *Faraday Trans.* 88 (1992) 1863–1873.
- 696 [59] B. Stevansson, D. Sandström, A. Maliniak, Conformational distribution functions
697 extracted from residual dipolar couplings: a hybrid model based on maximum
698 entropy and molecular field theory, *J. Chem. Phys.* 119 (5) (2003) 2738–2746.
- 699 [60] A. Schuetz, J. Junker, A. Leonov, O.F. Lange, T.F. Molinski, C. Griesinger,
700 Stereochemistry of sagittamide A from residual dipolar coupling enhanced
701 NMR, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (49) (2007) 15114–15115.
- 702 [61] C. Farès, J. Hassfeld, D. Menche, T. Carlomagno, Simultaneous determination of
703 the conformation and relative configuration of archazolide A by using nuclear
704 overhauser effects, J couplings, and residual dipolar couplings, *Angew. Chem.*
705 *Int. Ed.* 47 (20) (2008) 3722–3726.
- 706 [62] R.S. Stoll, M.V. Peters, A. Kuhn, S. Heiles, R. Goddard, M. Bühl, C.M. Thiele, S.
707 Hecht, Photoswitchable catalysts: correlating structure and conformational
708 dynamics with reactivity by a combined experimental and computational
709 approach, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (1) (2009) 357–367.
- 710 [63] B. Böttcher, V. Schmidts, J.A. Raskatov, C.M. Thiele, Determination of the
711 conformation of the key intermediate in an enantioselective palladium-
712 catalyzed allylic substitution from residual dipolar couplings, *Angew. Chem.*
713 *Int. Ed.* 49 (1) (2010) 205–209.
- 714 [64] P. Trigo-Mouriño, R. Santamaría-Fernández, V.M. Sánchez-Pedregal, A.
715 Navarro-Vázquez, Conformational analysis of an isoquinolinium
716 hydrochloride in water using residual dipolar couplings, *J. Org. Chem.* 75 (9)
717 (2010) 3101–3104.
- 718 [65] V. Schmidts, M. Fredersdorf, T. Lübken, A. Porzel, N. Arnold, L. Wessjohann, C.
719 M. Thiele, RDC-based determination of the relative configuration of the
720 fungicidal cyclopentenone 4,6-diacetylhydroporone A¹², *J. Nat. Prod.* 76 (5)
721 (2013) 839–844.
- 722 [66] C.M. Thiele, A. Marx, R. Berger, J. Fischer, M. Biel, A. Giannis, Determination of
723 the relative configuration of a five-membered lactone from residual dipolar
724 couplings, *Angew. Chem. Int. Ed.* 45 (27) (2006) 4455–4460.
- 725 [67] C.M. Thiele, A. Maliniak, B. Stevansson, Use of local alignment tensors for the
726 determination of relative configurations in organic compounds, *J. Am. Chem.*
727 *Soc.* 131 (36) (2009) 12878–12879.
- 728 [68] M. Biel, A. Kretsovali, E. Karatzali, J. Papamatheakis, A. Giannis, Design, synthesis,
729 and biological evaluation of a small-molecule inhibitor of the histone
730 acetyltransferase Gcn5, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43 (30) (2004) 3974–3976.
- 731

4.3.2 Untersuchung der Photocyclisierung von Dimethyldithienylcyclopenten

Der Inhalt dieses Abschnitts ist bereits veröffentlicht:

M. Fredersdorf, R. Göstl, A. Kolmer, V. Schmidts, P. Monecke, S. Hecht, C. M. Thiele, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21* (41), 14545–14554.

Bei der Photocyclisierung von Dimethyldithienylcyclopenten **14** zu den geschlossenen Formen **16** und **17** entstehen zwei neue Stereozentren, deren Konfiguration entweder *R,R,S,S* (**16**) oder *S,S,S,S* (**17**) sowie deren Enantiomere entspricht (siehe Schema 4.3.1). Die beiden entstehenden Moleküle sind Diastereomere, und können nicht ohne Ringöffnung ineinander umgewandelt werden.

Durch chromatographische Trennung kann das Verhältnis der beiden Diastereomere nach der Photocyclisierung bestimmt werden. Es zeigt sich, dass ein Diastereomerenüberschuss von 82-84% erreicht wird^[45]. Allerdings ist nicht bekannt, welches der beiden Diastereomere gebildet wird. Ebenso ist der Grund für die Selektivität dieser Reaktion unbekannt.

Eine mögliche Erklärung ist eine helikale Vororientierung von **14** in Lösung. Die beiden cyclisierbaren Konformere **14a** und **14b** (siehe Schema 4.3.1) können durch Rotation um die Fünfring-Aryl-Bindung ineinander überführt werden und liegen in Lösung daher im Gleichgewicht vor. Gleichzeitig kann durch diese Rotation eine nicht-helikale Orientierung **14c** erzeugt werden, die laut WOODWARD-HOFFMANN-Regeln nicht cyclisierbar sein sollte. Analog zum Modell der konformationellen Selektion sollte das relative Verhältnis der Konformere **14a:14b** das Diastereomerenverhältnis **16:17** beeinflussen.

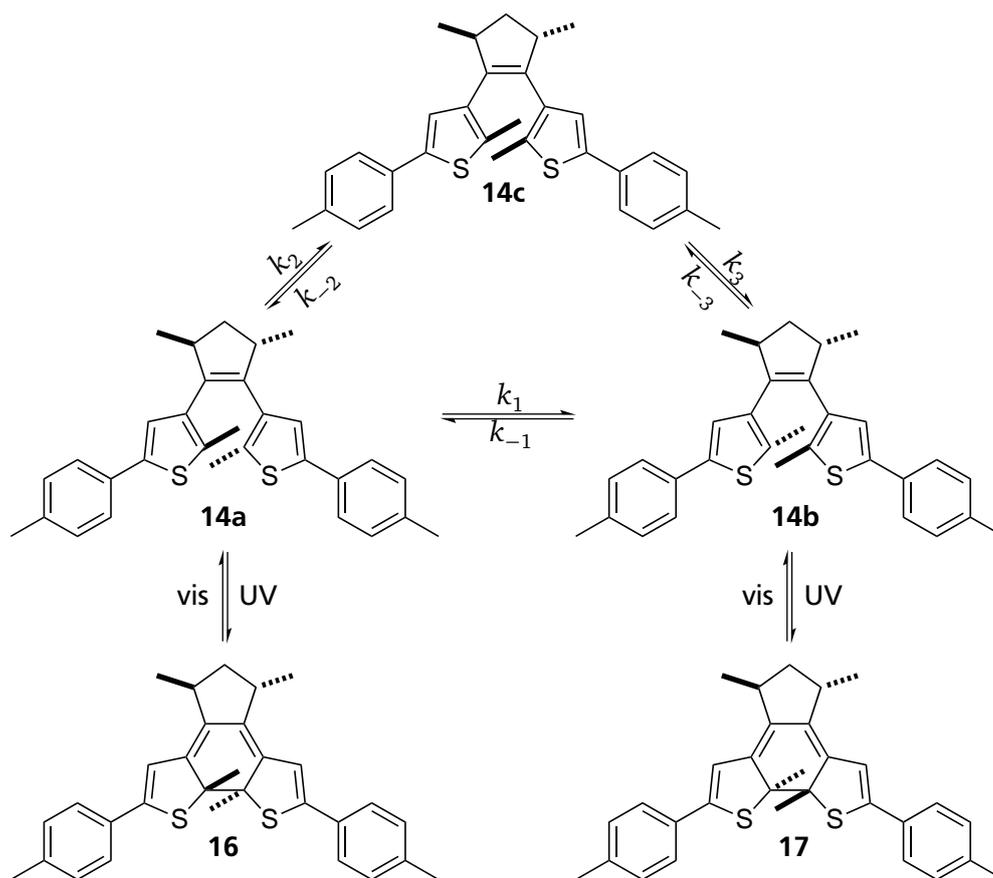
Alternativ ist es möglich, dass die Photocyclisierungseffizienz der beiden Pfade unterschiedlich ist. Dies würde ebenfalls zur bevorzugten Bildung eines der beiden Diastereomere führen. Ebenso ist denkbar, dass beide Phänomene vorliegen und die Selektivität der Reaktion nur durch Berücksichtigung beider Aspekte erklärbar ist.

Die molekulare Komplexität liegt zum einen in der konformationellen Flexibilität der rotierbaren Fünfring-Aryl-Bindung, und zum anderen in der durch die Flexibilität des Fünfrings erzeugte Pseudosymmetrie. Aufgrund der Anzahl der Signale wird von schnellem Austausch ausgegangen. Aufgrund der Symmetrie und dem niedrigen Protonierungsgrad ist davon auszugehen, dass wenig experimentelle Parameter erhalten werden können, sodass eine kombinierte NOE-RDC-Analyse in Zusammenarbeit mit FREDERSDORF angestrebt wurde.

Um also den Einfluss des Konformerengleichgewichts und der Photocyclisierung zu bestimmen, wird die Konformation von Dimethyldithienylcyclopenten **14** in Lösung untersucht. Als Lösemittel zur NOE- und isotropen Kopplungskonstantenbestimmung wurde CDCl₃ gewählt, als anisotropes Medium wurde von FREDERSDORF sowohl quervernetztes PBLG^[158] als auch Polyacetylen^[150] verwendet.

Die Fragestellung der Vororientierung bezieht sich auf die Konformation der Fünfring-Aryl-Einfachbindung. Wird der Abstand des Thienylprotons zum Fünfringproton betrachtet, so ergeben sich für **14a** und **14b** zwei unterschiedliche Situationen. Im Falle von **14a** befinden sich die Methylgruppen und die Protonen jeweils auf der gleichen Seite. Im Falle von **14b** dagegen unterscheiden sich jeweils die Seiten, sodass der Abstand deutlich größer sein sollte.

Diese unterschiedlichen Abstände werden durch Berechnungen der Konformerenstrukturen von FREDERSDORF und SCHMIDTS bestätigt. Zusätzlich zu den zwei helikalen Strukturen **14a** und **14b** existiert die Orientierung **14c** und ein weiteres Konformer **14d**, die aber aufgrund der WOODWARD-HOFFMANN-Regeln



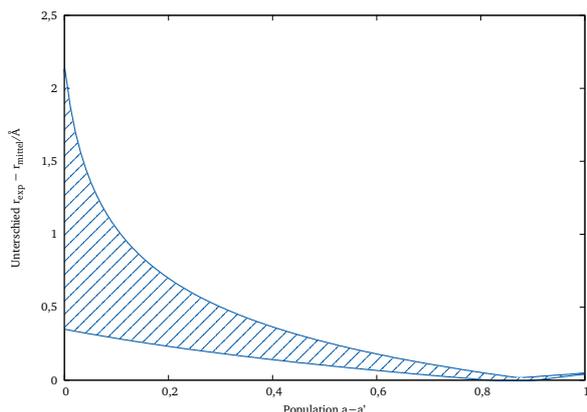
Schema 4.3.1: Cyclisierung von Dimethyldithienylcyclopenten **14**.

nicht zur Cyclisierung beitragen sollten. Eine besondere Herausforderung ist die Flexibilität des zentralen Fünfrings, die zu zwei gleich populierten Konformeren und somit zu einem pseudosymmetrischen Konformerensemble führt. Für die vier Orientierungen **14a**, **14b**, **14c** und **14d** müssen somit insgesamt acht Konformere betrachtet werden.

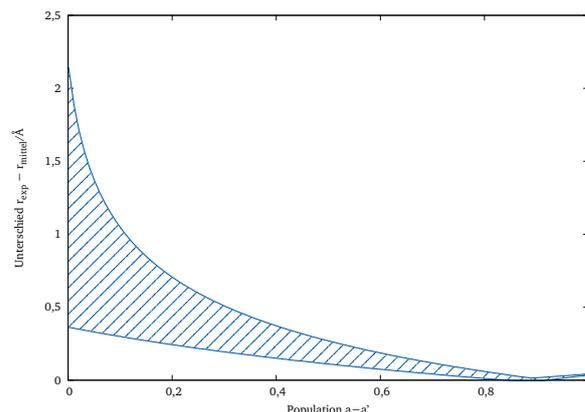
Durch die Anwendung der im vorigen Kapitel beschriebenen quantitativen NOE-Auswertung kann der Abstand des Thiophen-Protons zum Fünfringproton zu $2,62 \pm 0,1 \text{ \AA}$ bestimmt werden. Mittels der Software *WEEDHEAD* wird dieser Abstand mit aus Konformerensembles gemittelten Abständen verglichen. Dieser Vergleich ist für die beiden Molekülhälften in Abbildung 4.3.1 dargestellt. Eine perfekte Übereinstimmung kann für Konformerpopulationen von 83% bis 91% **14a** gefunden werden.

Da aufgrund der Pseudosymmetrie nur ein Abstand quantifiziert werden konnte, wird dieses Ergebnis von FREDERSDORF durch Aufnahme und Analyse von RDC-Daten verifiziert. Dazu müssen, ebenfalls aufgrund der Pseudosymmetrie, zusätzlich zu RDCs aus CLIP-HSQC und HETLOC zwei weitere RDCs aus dem *J*-modulierten 1,1-ADEQUATE bestimmt werden.

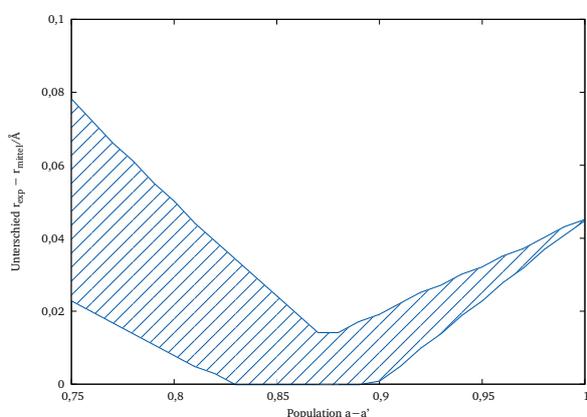
Mit der Software *RDC@hotFCHT* wurden die so gemessenen acht RDC mit den Konformeren verglichen. Es kann kein eindeutiges Minimum des Qualitätsfaktors gefunden werden. Stattdessen existiert ein Bereich an gleich guten Qualitätsfaktoren, deren Wert unter 0,1 liegt. Dieser Bereich umfasst ausschließlich Konformerensembles, bei denen die Population von **14a** größer als 50% ist. Dieses Ergebnis ist also im Einklang mit dem Resultat der NOE-Analyse.



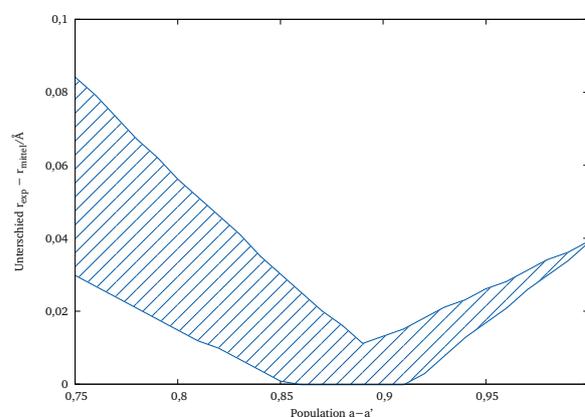
(a) „linke“ Hälfte des Dimethyldithienylcyclopentens **14**



(b) „rechte“ Hälfte des Dimethyldithienylcyclopentens **14**



(c) Detailansicht der „linken“ Hälfte des Dimethyldithienylcyclopentens **14**



(d) Detailansicht der „rechten“ Hälfte des Dimethyldithienylcyclopentens **14**

Abbildung 4.3.1: Vergleich des experimentellen und des gemittelten Abstandes. Die Konformere **14a** und **14a'** sind durch die Flexibilität des Fünfrings ineinander überführbar. Die zu 100% fehlenden Konformerpopulationen können durch **14b-14b'**, **14c-14c'** oder **14d-14d'**, oder durch eine Mischung derselbigen besetzt sein.

Da die Konformerpopulationen ungefähr dem Diastereomerenüberschuss entspricht, ist davon auszugehen, dass das Hauptprodukt der Photocyclisierung von **14** die *R,R,S,S*-Form **16** ist. Eventuell vorhandene Unterschiede der Photocyclisierungsraten scheinen keine oder nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Im Kontext der vorliegenden Dissertation bedeutet dieses Ergebnis, dass es gelungen ist, die in Abschnitt 4.3.1 weiterentwickelte kombinierte Anwendung von NOE- und RDC-Daten in Zusammenarbeit mit FREDERSDORF zur Aufklärung einer unbekannt Konformation zu nutzen. Die Fragestellung der Konformation von Dimethyldithienylcyclopentens **14** ist im Vergleich zum vorherigen Abschnitt durch die Pseudosymmetrie und die erhöhte Flexibilität als komplexer zu bewerten als Strychnin **30** und α -Methylen- γ -butyrolacton **48**. Gleichzeitig erwies sich die Komplementarität der Methoden als vorteilhaft, da nur die Kombination von NOE- und RDC-Daten zu einem verlässlichen Urteil führte. Im nächsten Schritt soll erprobt werden, ob mit Hilfe dieser Kombination von NOE- und RDC-Daten Konfiguration und Konformation eines ähnlich flexiblen Systems gelöst werden kann.

Abdruckerlaubnis erteilt:

M. Fredersdorf, R. Göstl, A. Kolmer, V. Schmidts, P. Monecke, S. Hecht, C. M. Thiele, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21* (41), 14545–14554. Copyright © 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Conformational Analysis

Exploring the Conformational Space of Bridge-Substituted Dithienylcyclopentenes

Maic Fredersdorf,^[a, b] Robert Göstl,^[c, d] Andreas Kolmer,^[a] Volker Schmidts,^[a] Peter Monecke,^[b] Stefan Hecht,^{*[c]} and Christina M. Thiele^{*[a]}

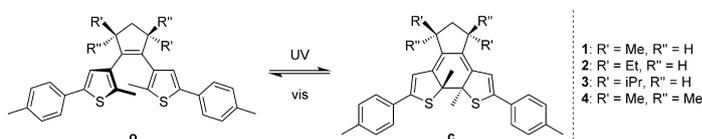
Abstract: Stimuli responsive compounds and materials are of high interest in synthetic chemistry and materials science, with light being the most intriguing stimulus due to the possibility to remote control the physicochemical properties of a molecule or a material. There is a constant quest to design photoswitches with improved switching efficiency and especially diarylethene-type switches promise photo cyclization quantum yields up to unity. However, only limited attention has been paid towards the influence of the

solution conformation on the switching efficiency. Here, we describe a detailed NMR spectroscopic investigation on the conformational distribution of bridge-substituted dithienylcyclopentenes in solution. We could discriminate between several photoactive and photoinactive as well as two diastereomorphous conformations and show that the trends observed in the switching efficiency match the conformer populations obtained from state of the art NMR parameters in solution.

Introduction

The continuous attraction to photochromic molecules underlines their great potential to control diverse functions and processes on the molecular scale by using light and hence resolved in time as well as in space.^[1–3] As highly fatigue resistant P-type photochromes, diarylethenes (DAEs) have been proven interesting candidates for a number of photocontrollable applications ranging from molecular motion over catalysis to memories.^[4–9] However, the already superior switching efficiency still needs to be improved for

non-academic applications demanding basically infinite switching cycles, that is, high fatigue resistance and large photocyclization quantum yields (Φ_{oc}).^[10–15] We recently established a synthetic protocol for the bridge-substitution of dithienylcyclopentenes and recorded a significant increase in the Φ_{oc} value for the substituted derivatives 1–4 (Scheme 1).^[16]



Scheme 1. Ring-opened (o) and ring-closed (c) forms of the bridge-substituted dithienylcyclopentenes 1–4.

[a] M. Fredersdorf,[†] A. Kolmer, Dr. V. Schmidts, Prof. Dr. C. M. Thiele
Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie
Technische Universität Darmstadt, Alarich-Weiss-Strasse 4
64287 Darmstadt (Germany)
E-mail: cthiele@thielelab.de

[b] M. Fredersdorf,[†] Dr. P. Monecke
Department of Chemistry, Sanofi Aventis Deutschland GmbH
Industriepark Höchst, 65926 Frankfurt am Main (Germany)

[c] Dr. R. Göstl,[†] Prof. Dr. S. Hecht
Department of Chemistry, Humboldt-Universität zu Berlin
Brook-Taylor-Strasse 2, 12489 Berlin (Germany)
E-mail: sh@chemie.hu-berlin.de

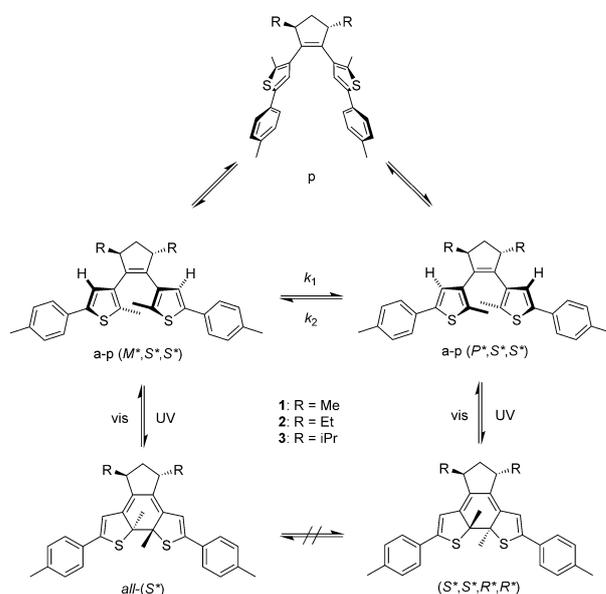
[d] Dr. R. Göstl[†]
Present address: Technische Universiteit Eindhoven
Molecular Science and Technology
group Supramolecular Polymer Chemistry
P.O. Box 513, 5600 MB Eindhoven (The Netherlands)

[†] These authors contributed equally.

Supporting information for this article is available on the WWW under
<http://dx.doi.org/10.1002/chem.201501842>.

As it is generally believed that the distribution between the anti-parallel (a-p) and parallel (p) conformations correlates to the Φ_{oc} value due to the Woodward–Hoffmann rules,^[4] it is reasonable to rationalize the underlying driving force by determination of the fraction of a-p conformers in the ring-opened form. Inexpediently and as opposed to benzothiophene-substituted DAEs, direct measurement of this fraction is analytically very demanding for dithienylcyclopentenes if simple freezing of the conformational isomers through variable-temperature ¹H NMR spectroscopy^[10, 11, 16] does not lead to unambiguous results or if there is more than one a-p conformation involved.

In fact, it can be seen in Scheme 2 that the dithienylcyclopentenes 1–3 do not only interconvert between the a-p and p conformations but that also the a-p conformation itself is in a dynamic equilibrium between two helically pre-oriented species, that is, a-p (P^*, S^*, S^*) and a-p (M^*, S^*, S^*). The latter interconversion leads to a discrimination between the ring-opened



Scheme 2. Conformational isomers of the ring-opened and diastereomers of the ring-closed bridge-substituted dithienylcyclopentenes 1–3. The other pair of enantiomers are omitted for the sake of simplicity.

a-p conformers and thus yields a distinct diastereomeric excess (*de*) after the photocyclization to the ring-closed isomers. Certain derivatives, previously described in the literature, could reach *de* values as large as 99%.^[17] Without doubt, measuring the *de* of a photocyclization process can be performed easily through conventional liquid chromatography. However and most importantly, assignment of an unambiguous structure to the major ring-closed diastereomer is by far more demanding. To the best of our knowledge, until now only in one case the thermodynamically more stable ring-opened helically pre-oriented conformation could be determined in the crystalline phase by X-ray structural analysis,^[18] which is a strong hint for the behavior of the molecule in solution but certainly requires a more thorough investigation with regard to the liquid phase. In solution, apart from the photochemically active conformations, other conformations might also be populated and required in the formal description of the cyclization mechanism. It is thus not only highly desirable to develop a method for the determination of the ratio between the a-p and p conformers to gain insight into the mechanism dictating the Φ_{oc} value but at the same time to use this method for identification of the major helically pre-oriented a-p conformer giving rise to a distinct *de* during the photocyclization process in solution.

Most configurational and conformational investigations on small organic molecules involve analysis of NMR observables such as the determination of scalar coupling constants [$^3J(\text{H,H})$],^[19] distance measurements based on the nuclear Overhauser enhancement (NOE),^[20–22] as well as more recently

residual dipolar couplings (RDCs). These become observable by orienting the molecule of interest in a suitable weak alignment medium.^[23–26]

In this work, we combine the analysis of the switching behavior in solution with NOE and RDC measurements to illuminate the overall underlying conformational equilibrium of the dithienylcyclopentenes 1–4. Thus, by obtaining a deeper insight into cyclization and cycloreversion quantum yields we disclose the peculiarity of this diastereoselective photochemical event.

Results and Discussion

Analyzing the switching performance

The photochemistry of the dithienylcyclopentenes 1–3 has been studied extensively by us in earlier work.^[16] Despite increasing the steric demand of the respective alkyl substituents in the bridge moiety (from Me over Et to *i*Pr), the cyclization quantum yields Φ_{oc} remain at values of 0.6 and the cycloreversion quantum yields Φ_{co} are unchanged with a value of 0.01.

The diastereoselective photocyclization was followed by analytical liquid chromatography and clearly shows that a major ring-closed diastereomer **c1** and a minor ring-closed diastereomer **c2** is formed during the course of the irradiation of compounds 1–3 (Figure 1). The diode array detector (DAD) trace was integrated at the isosbestic point and the *de* was calculated over the course of the irradiation (Figure 2) for compounds 2 and 3. For DAE 1 the separation of the bands of **1c1** and **1c2** was only successful at the photostationary state (PSS) and hence only one data point could be collected. Two main aspects can be extracted from Figure 2a: 1) the values obtained for the diastereomeric excess during the ring-closing process of compounds 1–3 are practically identical within the margin of error with values from 82–84%, and 2) the *de* values are constant throughout the course of the irradiation. The latter finding is in agreement with the reasonable assumption that the equilibration between the two helically pre-oriented species a-p (P^*,S^*,S^*) and a-p (M^*,S^*,S^*) is rapid at room temperature.

However and interestingly, for the cycloreversion of **3c1** to **3o** the *de* decreased during the course of the irradiation, suggesting that the abundant amount of **3c1** is depleted more rapidly than the amount of **3c2** (Figure 2b). Regarding the photokinetic rate law, this can only mean that the product of the molar absorptivity and the cycloreversion quantum yield of the major closed form **3c1**, $\epsilon_{3c1} \times \Phi_{3c1}$ is different from that of minor closed form **3c2**, that is, $\epsilon_{3c2} \times \Phi_{3c2}$. Although the preparative separation of the two diastereomers was not successful, an insight into the underlying reasons for the faster cycloreversion reaction of **3c1** could be gained by comparing the UV/Vis absorption spectra of the closed forms recorded by the diode array detector after analytical liquid chromatographic separation of the irradiated solution at the PSS (Figure 3a). It

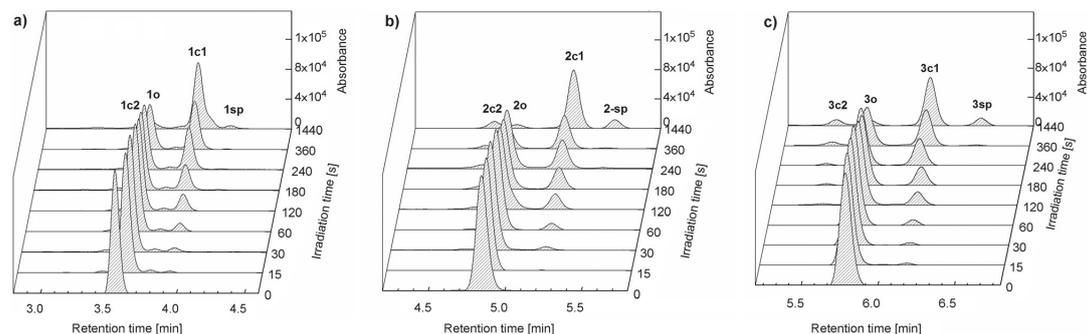


Figure 1. Evolution of the concentrations of the open form **o**, the closed forms **c1** and **c2**, and the side product **sp** during the course of irradiation of a 10^{-5} M MeCN solution of a) compound **1**, b) compound **2**, and c) compound **3** with $\lambda = 313$ nm light as observed through the diode array detector signal at the isosbestic point of ultra-high performance liquid chromatography traces.

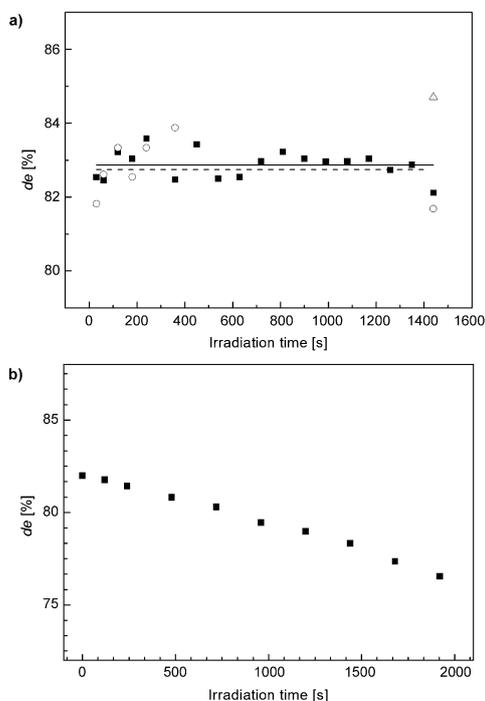


Figure 2. Evolution of the *de* values during the course of irradiation of a 10^{-5} M solution in MeCN. a) Photocyclization of diarylethenes **1o-3o** by irradiation with light of $\lambda = 313$ nm (■: *de* of **3c1** (— = linear fit), ○: *de* of **2c1** (--- = linear fit) △: *de* of **1c1**), b) cycloreversion of diarylethene **3c** by irradiation with light of $\lambda = 546$ nm (■: *de* of **3c1**).

becomes clear that the minor diastereomer **3c2** exhibits a hypsochromic shift of its absorption maximum in the visible part of the spectrum of about 30 nm as compared to the maximum of **3c1**. Hence, it is only coherent to assume that the absorptivities ϵ_{3c1} and ϵ_{3c2} are different at the wavelength employed for the cycloreversion reaction ($\lambda_{irr} = 546$ nm) and that the diastereomer absorbing less light at this wavelength ring-opens

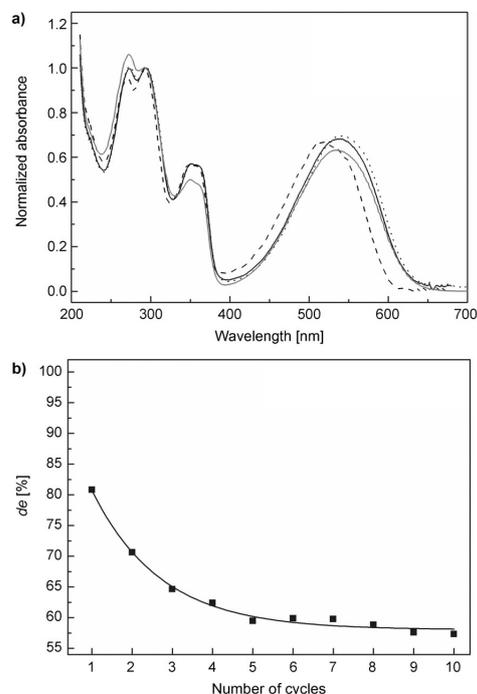


Figure 3. Comparing the absorption spectra of the different closed forms **3c1** (.....) and **3c2** (----) obtained by the diode array detector after ultra-high performance liquid chromatography in reference to the calculated (—) and actually measured (—) superposition of the diastereomers **3c**. The spectra are normalized to the absorption at $\lambda = 294$ nm. b) Evolution of the *de* of **3c1** (■, — = exponential fit of the *de*) over multiple switching cycles employing light of $\lambda = 313$ nm for the cyclization from **3o** to **3c** and $\lambda = 546$ nm for the cycloreversion from **3c** to **3o** at a concentration of 3×10^{-5} M in MeCN. The cycloreversion reactions were stopped each after approximately 50% depletion of the combined ring-closed forms **3c1** and **3c2**.

more slowly. Furthermore, a superposition of the individual absorption spectra of **3c1** and **3c2** weighted by their relative

occurrence at the PSS (83% of **3c1** and 17% **3c2**) yields a superimposed absorption spectrum strongly resembling the originally determined spectrum at the PSS.

This assumption is supported by the comparison of the computed ring-closed geometries of **1c1** and **1c2**,^[27] in particular the torsion angles within the conjugated double-bond system. Compound **1c2** exhibits a much higher ring strain than **1c1**, which could be the reason for the hypsochromic shift of the absorption maximum of compound **1c2** (see Figure 3a).

As a consequence, compound **1c1** would absorb much more light than compound **1c2**, under the postulation that the value of Φ_{∞} is equal for both species as the molar absorptivity would be different, and therefore the cycloreversion reaction from **1c1** to **1o** would be faster, resulting in a depletion of **1c1** and an enrichment of **1c2**.

Exactly this behavior of ring-closing with a constant *de* and a ring-opening with a depleting *de* can then be exploited altogether to change the overall *de* in solution over multiple switching cycles (Figure 3b). Over as many as ten switching cycles from structure **3o** to structure **3c** and vice versa, it was possible to deplete the *de* of **3c1** from 82 to 55% only by consecutively irradiating the sample with light of alternating wavelengths.

A hint to which diastereomer **1c1–3c1** is the most prevalent was gathered by synthesizing the bromo-substituted dithienylcyclopentene **5** (Figure 4a). This species was designed to bear

form. Additionally, packing effects in the solid state could result in a geometry, which is not representative of the conformational ensemble in solution.

Resolving the conformational ensemble by NMR spectroscopy

To explore the conformational (a-p vs. p) space and its relation to the diastereoselective switching in solution, we chose to further investigate the dithienylcyclopentene **1o** by using variable-temperature (VT) NMR, NOE and RDC measurements. The choice of compound **1o** instead of compound **3o** (used in the analysis of the switching performance) and compound **5o** (used in the X-ray analysis, see Figure 4) is due to both methyl groups of the cyclopentene ring of compound **1o**, which provide an additional dipolar carbon–carbon coupling in the RDC measurements, which strongly aids subsequent RDC analysis.

In analogy to the approach used in the previous study of compound **4**,^[16] we started by recording variable-temperature ¹H NMR spectra of compound **1o** (Scheme 1). Unfortunately, we were unable to quantify the conformer populations by using this method. Only the thienyl protons and the methyl groups showed a slight linear chemical shift of about 0.1 ppm upon lowering the temperature from 300 to 230 K,^[27] whereas the other chemical shifts remained unchanged within the experimental errors (<0.05 ppm). A non-linear shifting of the proton signals, which could be used to estimate the ΔG^\ddagger values of the parallel versus anti-parallel equilibrium^[30,31] could not be observed in the VT measurements of compound **1o**.

Similarly, the analysis of the scalar coupling constants did not provide further results, as a connection of the interacting nuclei over a few chemical bonds and parameterization of the dihedral angle through a Karplus-type relation are required. The high content of quaternary centers in compounds **1o–3o** interrupting the coupling pathway, as well as the a priori unknown parameterization for such systems, prevent the use of scalar couplings in the analysis of the dithienylcyclopentenes. Therefore, we extended the investigations of the conformational equilibria in the dithienylcyclopentenes to include the distance and orientational information from NOE and RDC measurements, respectively.

Computational investigation of the conformational space and considerations of molecular symmetry

As a first step, structural models of compound **1o** were generated by a conformational search by using molecular modeling (Maestro, Schrödinger suite 2012, OPLS force-field, solvent CHCl₃).^[27] A total of twenty unique, low-energy conformations could be identified, of which only eight show major differences in the torsion of the thienyl moiety with respect to the cyclopentene core. Within these conformations, the cyclopentene core is not planar, but is suggested to adopt two “envelope” conformations. Thus, we arrived at four geometries (i.e., geometries A–D in Figure 5), each with a corresponding ring-flipped envelope conformation (A'–D', indicated by an orange arrow in Figure 5). When comparing the calculated structures

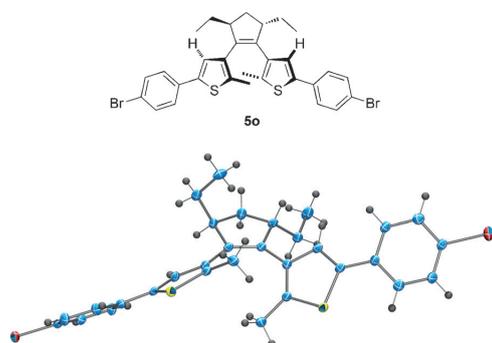


Figure 4. Ring-opened form of DAE **5**. Molecular formula (top). ORTEP plot^[28] of the molecular structure in the crystal (CCDC-1029699,^[29] ellipsoids are drawn at the 50% probability level, bottom).

heavy bromine atoms to introduce a better crystallization capability into the molecule and to facilitate the determination of the X-ray crystal structure. Indeed, compound **5o** was crystallized successfully and the molecular structure was determined (Figure 4b). It can clearly be seen that the helically pre-oriented ring-opened form of compound **5o** in the crystal corresponds to the a-p (*P*^{*},*S*^{*},*S*^{*}) form. This indicates that the relative configuration of **5c** is *S*^{*},*S*^{*},*R*^{*},*R*^{*} (see Scheme 2) but is certainly no definite proof because kinetic effects could also favor the crystallization of the thermodynamically less stable

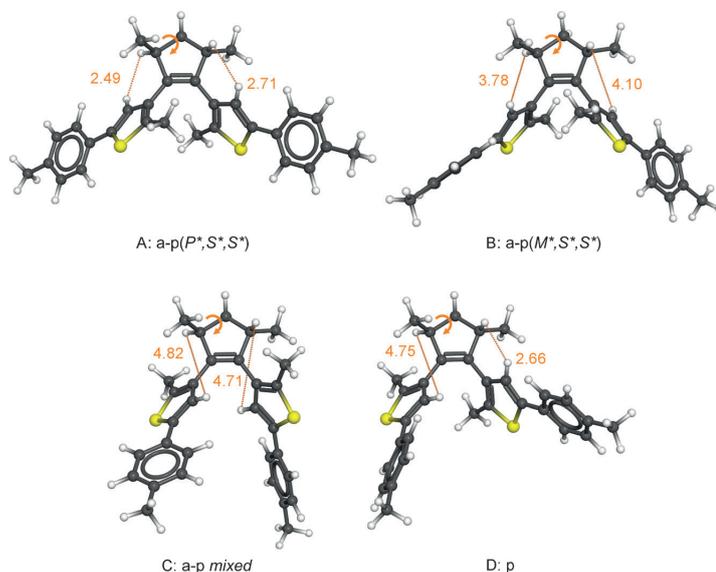


Figure 5. Geometries of the low-energy conformers of the dithienylcyclopentene derivative **1o**. The a-p-conformations [A, i.e., a-p (P^*,S^*,S^*) and B, i.e., a-p (M^*,S^*,S^*)] are shown on top, the a-p mixed and p conformation (i.e., C and D, respectively) on the bottom. The different interproton distances between the cyclopentene and thiophene moieties are highlighted in orange [Å]. The arrows indicate the flexibility in the cyclopentene core, leading to the respective conformers A', B', C', and D'.

to Scheme 2, conformer A is in accordance to the aforementioned a-p (P^*,S^*,S^*) form and conformer B to the a-p (M^*,S^*,S^*) form. Conformer C is a mixed geometry, and although inactive in terms of a Woodward–Hoffmann-allowed photocyclization, the conformer might be populated in solution and therefore should be compared to the experimental data as well. Lastly, conformer D corresponds to the p conformation shown in Scheme 2. The rotation of the phenyl rings has been ignored in the conformational selection process, because these do not contribute to the NOE- and RDC-based conformational analysis of the central moieties.

To characterize this system further, the eight geometries were subsequently re-optimized by using density functional theory calculations (B3LYP/6-311+G(d,p), IEFPCM model for CHCl_3 solvent, Gaussian 09).^[27] The nature as a local minimum for each geometry was confirmed by vibrational frequency analysis, also giving access to the relative Gibbs free energies calculated from thermochemistry. Based on these calculations, the a-p (P^*,S^*,S^*) geometry clearly has the lowest computed energy. The other a-p conformers are 6.8 [a-p (M^*,S^*,S^*)] and 5.2 kJ mol^{-1} (a-p mixed) higher in energy, whereas the p conformer (averaged over both ring-flipped conformers) is 5.3 kJ mol^{-1} higher in energy.^[32] The change in the envelope conformation of the cyclopentene core does not change the energy significantly, as the respective differences in energies are usually less than 0.5 kJ mol^{-1} .^[33] Although the computed energies are only rough estimates within the confines of the chosen method, they match well with the trends observed in other, experimental methods (see below).

Based on the observation of one signal set in the experimental spectra, we believe the ring-flip from conformer A into A' (similarly for the other conformers) to be fast on the timescale of the NMR experiment, leading to a pseudo- C_2 -symmetric ensemble of 50% conformer A and 50% conformer A' (denoted A–A', B–B', and C–C' accordingly), whereas the respective parallel D–D' ensemble is part of the C_s point group. Subsequently, the stereodiscrimination during the switching event should not be influenced by this process.

In an isotropic solution the rapid interconversion of the envelope conformations leads to a reduced set of observables in the NMR analysis, as chemical shifts and J couplings are only determined for non-equivalent sites. In the case of the NOE, only an average of the distance of interacting nuclei on both sides of the molecules is experi-

mentally accessible.^[22] In an anisotropic environment, the molecular symmetry often reduces the number of independent order parameters or imposes the restrictions on the choice of the molecular frame for some specific point groups.^[34,35] In the special case of a chiral alignment medium however (as used in this study) for both C_2 - and C_s -symmetric molecules, the effective molecular symmetry is reduced to C_1 .^[35] This allows for the same mathematical treatment of C_s and C_2 as for C_1 and thus the same software could be used in the analysis of the RDCs in these molecules. As indicated in Figure 5, the ring-flip averaged distances between the single protons of the cyclopentene moiety and thiophene rings vary greatly. A main distinctive feature is the rather small interproton distance of averaged 2.58 Å in the A–A' [a-p (P^*,S^*,S^*)] ensemble. All other computed ensembles clearly show larger averaged distances up to 4.75 Å (in the case of the a-p mixed ensemble C–C').

Determination of the conformer populations from averaged NOE distances

From quantitative measurements of the interproton distances by nuclear Overhauser enhancement (NOE) experiments,^[36–39] we should therefore be able to distinguish between the conformations of compound **1o**. We obtained distances from a mixing time series of 1D PFGSE NOE experiments^[40–42] with suppression of zero-quantum artifacts,^[43–45] by using the PANIC approach.^[46,47]

As reference distance, the distance between the protons from the methyl group located at the cyclopentene ring (H60–

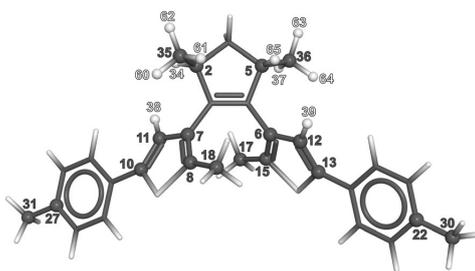


Figure 6. Atom numbering and graphical display of the extracted RDCs of DAE 1o, which were used for both pseudosymmetric sides of the molecule.

H62/H63–H65, numbering scheme see Figure 6) and the proton next to this methyl group (H34/H37) was chosen. All six distances were extracted from the calculated geometry of conformer A. An averaged distance was then determined by using Tropp averaging,^[48] leading to a calibration distance of 2.646 Å. With this method, an interproton distance between the cyclopentene (H34/H37) and thiophene rings (H38/H39) of (2.62 ± 0.1) Å was determined. This distance is in surprisingly good accordance with the distance observed for conformers A or A' in Figure 5.

To evaluate whether other conformers are present in solution, we performed a conformational analysis by using the software WEEDHEAD.^[27,49] To create the symmetry of the molecule, the populations of conformers A and A' (as well as B–B', C–C', and D–D', respectively) were always set equal. The best fitting agreement is found if the A–A' ensemble is populated between 83 and 91%. The remaining 9 to 17% could either be B–B', C–C', or D–D' as well as a mixture of all those conformers.

Cross-validation of the conformational ensemble with residual dipolar couplings

As the NOE analysis was performed with only one single distance and the evaluation of other distances failed due to signal overlap and large experimental errors, we used residual dipolar couplings to confirm and widen the results. The RDCs provide (relative) orientational information of coupled nuclear spins in remote, non-interacting fragments of the molecule, by relating individual couplings to a global property of the solute, that is, its time-averaged orientation in the alignment medium with respect to the reference frame of the external magnetic field.^[25]

The established procedure to extract orientational information from RDCs is the order matrix analysis.^[50,51] A set of structure proposals is generated with for example, computational methods, and each structure is fitted separately to the experimental RDCs, yielding an alignment tensor. This tensor can be employed to check the given model for self-consistency. The model with the best fit between the calculated and the measured RDCs can be considered as the correct one. In recent years, this method has successfully been employed in the determination of the relative configuration of stereogenic centers

in rigid compounds.^[52–57] As each conformer is treated as a rigid geometry and related to a distinct tensor, we refer to this method as the single-conformer–single-tensor fit (SCST).

When investigating flexible molecules like the dithienylcyclopentenes (see Scheme 2), the situation is different because a second motional process must be considered in the RDC analysis. In addition to the tumbling motion of the entire molecule in the medium, as it is also the case in rigid molecules, the internal conformational mobility also has to be taken into account. A common way to describe this is to use an ensemble of conformers as a model for the structure proposal in the RDC calculation.^[26,58] In the generalized approach, each structure of the conformer ensemble is described with a distinct alignment tensor (multi-conformer–multi-tensor fit, MCMT).^[59,60] Although this allows for a general treatment, the disadvantage of this method is the rather large amount of experimental RDCs required to determine each alignment tensor. This problem can be circumvented by assuming a single common alignment tensor for the whole ensemble of structures (multi-conformer–single-tensor fit, MCST). Similar to the SCST approach, only six linearly independent RDCs are needed in the MCST, however special care has to be taken in the choice of a common molecular frame.^[61,62] Analysis of the MCST fit again relies on the back-calculation of the RDCs and comparison to experimental values to find the best-fitting one. Investigations into the applicability of the approximations introduced in the MCST approach are still ongoing. However, there are a few recent examples, where the MCST fit method was successfully applied to the RDC analysis of conformationally flexible molecules.^[59,60,63]

As the investigated compound shows a reduced set of signals due to its symmetry, it is essential to obtain as many RDCs as possible. Thus we used in addition to the established (CLIP)-HSQC^[64] and HETLOC^[65,66] experiments, the *J*-modulated 1,1-ADEQUATE^[67,68] experiment for the determination of one-bond carbon–carbon couplings. Due to the low natural abundance of ¹³C and the challenging measurements in anisotropic environments, there are very few examples of RDC analyses making use of these couplings in non-isotopically labeled small molecules.^[69,70] To the best of our knowledge this is the first application of the *J*-modulated 1,1-ADEQUATE experiment in anisotropic media. Without the additional couplings, the RDC analysis would not be applicable, as only an insufficient number of experimental couplings would be available for the fitting procedure.

We aligned a racemic mixture of dithienylcyclopentene 1o in weak alignment media, being 1) a cross-linked poly- γ -benzyl-L-glutamate (PBLG) gel^[71] and 2) a valine-polyacetylene derivative (PA)^[72] in CDCl₃, to obtain the anisotropic total couplings *T*. The enantiodiscriminating properties of the homochiral phases of 1) and 2) noticeable in line broadening in the anisotropic spectra did not disturb the reliable extraction of the *T*-couplings from the spectra.

A total of five ¹D(C,H), containing the calculated ¹D(C,C) from the three methyl groups, one long-range ²D(C,H) and two ¹D(C,C) couplings including their relative signs, could be extracted from the isotropic as well as from the anisotropic spec-

Table 1. Dipolar couplings and their experimental errors as measured for DAE 1o in PBLG gel/CDCl₃.

Coupling nuclei	RDC [Hz]	Error [Hz]
C2–H34 (C5–H37) ^[a]	–8.44	0.7
C11–H38 (C12–H39) ^[a]	10.98	0.6
C35–H34 (C36–H37) ^[b]	3.18	0.7
C2–C35 (C5–C36) ^[c]	1.64	0.2
C8–C18 (C15–C17) ^[c]	–1.56	0.2
C27–C31 (C22–C30) ^[c]	–2.70	0.2
C11–C7 (C12–C6) ^[d]	–3.05	1.0
C11–C10 (C12–C13) ^[d]	–1.29	0.7

[a] Determined from CLIP-HSQC.^[64] [b] Determined from HETLOC.^[65,66]
 [c] The respective C–H RDC was determined from a CLIP-HSQC experiment and subsequently converted to the C–C RDC according to Verdier et al.^[70] [d] Determined from *J*-modulated 1,1-ADEQUATE.^[67,68]

tra. The experimental RDCs from the aligned PBLG gel sample are shown in Table 1 (numbering scheme see Figure 6). The RDCs obtained from the anisotropic polyacetylene phase are given in the Supporting Information.

For the conformer ensemble analysis we used the RDC module of the software hotFCHT.^[58,73] To reflect the molecular symmetry in the calculation of the order tensor, the RDCs of symmetry equivalent couplings were set to the same value. By using any of the calculated structure models in a SCST fit, the quality factor^[74] of all models was very poor (best fit $Q=0.490$), which is indicative of conformational flexibility.

Combining the conformers from Figure 5 with the opposite cyclopentene ring-flip yielded the four ensembles A–A', B–B', C–C', and D–D', the MCST approach led to an ensemble with a good representation of the experimental RDC data. Although the *Q* factors of the ensembles B–B' [a-p (M^*,S^*,S^*)], C–C' (a-p mixed), and D–D' (parallel) are weak ($Q>0.35$), the ensemble A–A' [a-p (P^*,S^*,S^*)] represents the experimental RDCs very well resulting in a *Q* factor of 0.100 at a conformer population of 50% of conformer A and 50% of conformer A'.^[27]

In this ensemble, only the experimental carbon–carbon coupling of C11–C10 in the thiophene rings differs in its calculated coupling of (0.08 ± 0.1) Hz from its experimental value of (-1.29 ± 0.7) Hz. All other seven couplings are within the experimental error.

The same results are achieved by using PA as alignment medium. Although the degree of order in PA is significantly weaker than in the PBLG gel resulting in smaller dipolar couplings—some are in the range of the measurement error—the ensemble A–A' [a-p (P^*,S^*,S^*)] gives the best representation of the experimental data. A more detailed view of the PA measurements can be found in the Supporting information.

Although this analysis establishes the description of flexibility in the five-membered ring, the rotation along the C–C bond connecting the thiophene moiety and the central ring has to be studied further. Hence, we pairwise combined the above-described conformers in an ensemble by using the MCST approach to determine the conformational distribution between A–A'/B–B', A–A'/C–C', and A–A'/D–D'.

However, no distinct minimum in the conformational distribution can be found, (see Figure 7). As long as the population

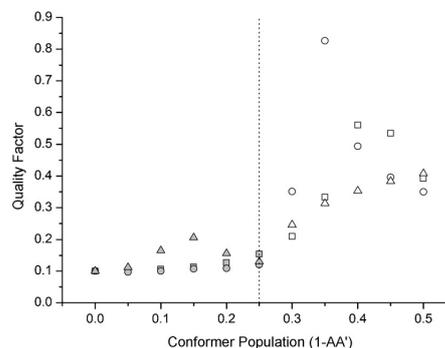


Figure 7. Dependence of the RDC quality factor of the four-conformer MCST fits as a function of the conformer population. Ensembles are generated by combining a sub-ensemble of equally populated A and A' with a corresponding sub-ensemble of B–B' (Δ), C–C' (\circ), and D–D' (\square), respectively, such that the sum of all populations is unity. As soon as the B–B', C–C', or D–D' ensembles exceeds 50% of the total population (marked by the dotted line) the *Q* factor worsens quickly (open symbols).

of the A–A' sub-ensemble is higher than 50% (25% of conformer A and 25% of conformer A'), the *Q* factor indicates a good fit (≈ 0.10). But as soon as the other conformers are populated to more than 50% (B–B' or C–C' or D–D'—each equally populated), the *Q* factor worsens quickly. Hence, we cannot exclude populations of the other conformer ensembles as the fit remains more or less equally well for up to 50%. However, when excluding the ensemble A–A' from the MCST calculations, all fits become worse ($Q>0.20$) regardless of the conformer population. The same result is obtained by combining all eight conformers. As soon as the conformers B–B', C–C', D–D' (each equally populated) are the majority ($>50\%$), the *Q* factor deteriorates.

Comparison of the conformer populations from the NOE/RDC data to the data from VT NMR spectroscopy

The results of the RDC data show that the major conformation populated in solution is the a-p (P^*,S^*,S^*) form. With a NOE-derived population of 83–91%, this conformation is the thermodynamically more stable helically pre-oriented ring-opened form of DAE 1o. Based on the difference in the Gibbs free energy, statistical weights of 72% a-p (P^*,S^*,S^*), 7% a-p (M^*,S^*,S^*), 10% a-p mixed, and 10% of the p conformer can be estimated according to a Boltzmann distribution,^[27] which matches the population obtained from the NOE experiments surprisingly well.

This result is also in good accordance with the results from the X-ray crystallographic data of compound 5o. Hence, it becomes even more reasonable to assume that the relative configuration of the major ring-closed diastereomer (1c1) corresponds to the S^*,S^*,R^*,R^* geometry.

Surprisingly, the population of the a-p conformer of compound 1o determined in this study is very similar to the population of the a-p form of the tetramethyl bridge-substituted DAE 4o, determined to be 81% by VT ¹H NMR spectroscopy,

whereas simultaneously exhibiting a photocyclization quantum yield of $\Phi_{oc} = 0.83$.^[16] The comparatively lower photocyclization quantum yield of $\Phi_{oc} = 0.6$ for compound **1**, while maintaining the same level of population of the a-p conformer around 80%, therefore might stem from additional effects beyond the scope of this work.

As we had hoped to find a more immediate relation of the a-p conformer population and the photocyclization quantum yield, we re-investigated the tetramethyl bridge-substituted DAE **4o**. When trying to reproduce the non-linear shifting of resonances previously observed in the VT ¹H NMR experiments, we were unable to find any non-linear shift. All resonances show a slight linear (but no non-linear) shift upon cooling of the sample. This is in contrast to the previously published data and may be explained by incorrect temperature calibration of the spectrometer in the previous work. However, from the changes in the signal pattern of the ¹H NMR spectra at different temperatures, we expect only the pseudo-C₂-symmetric a-p conformer form to be populated at RT. This is based on the number of signals expected for the two protons in the five-membered bridge: the a-p conformation would lead to a pseudo-C₂ symmetry and the two protons become homotopic, whereas the p conformation would be pseudo-C_s symmetric and the two protons should be diastereotopic and give distinct NMR signals. As we only observe a single, sharp resonance over the whole temperature range, we rule out a significant population of the p conformation. Unless there is incidental isochronicity of resonances, we therefore presume the a-p conformation of compound **4o** to be exclusively populated at RT. We tried to corroborate this result by NOE measurements as detailed above for compound **1o**. Although we were able to quantify the NOE of interest from the bridge methyl groups to the thienyl proton, we were unable to reliably quantify another NOE correlation as reference. Without this reference, we were unable to estimate the population based on NOEs. The indications from the number of signals observed for compound **4o** in combination with expected symmetry point towards an exclusive population of the a-p conformation in compound **4o**. Performing DFT calculations as described above, we estimate a Boltzmann population of 92% of the a-p conformer versus 8% of the p conformer of compound **4o**. Thus, the trend observed for the photocyclization quantum yields goes into the same direction as the population of the a-p conformation in compounds **1o** and **4o**.

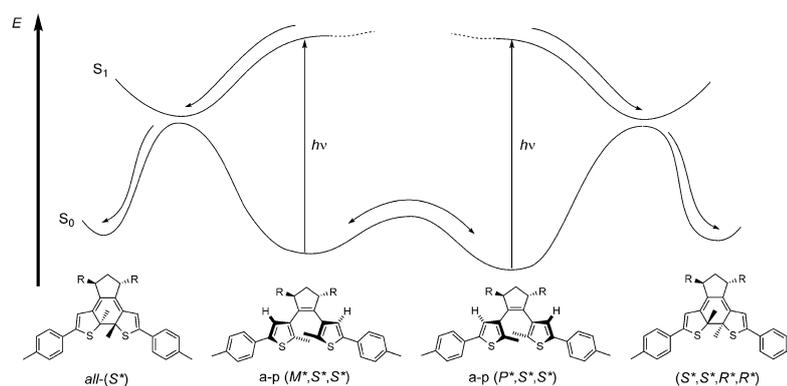
Conclusion

By combining different analytical methods, namely, UPLC-MS, X-ray crystallography, NOE, VT ¹H NMR spectroscopy, and RDC measurements, we could gain an

unprecedented insight into the stereoselective switching behavior of bridge-substituted dithienylethenes. X-ray crystallography on a distinct derivative revealed that the major helically pre-oriented form in the crystalline state is a-p (*P*^{*},*S*^{*},*S*^{*}) form suggesting (*S*^{*},*S*^{*},*R*^{*},*R*^{*}) being the most prevalent form in the ring-closed form. RDC studies of compound **1o** revealed a similar conformation for the major open form as a-p (*P*^{*},*S*^{*},*S*^{*}). This is consistent with the NOE measurements, in which the distance between the single protons of the cyclopentene and thiophene rings fits well with the predicted average distance of the computed a-p conformer ensemble. Combined with DFT calculations, these results suggest that the a-p (*P*^{*},*S*^{*},*S*^{*}) form is the thermodynamically more stable and thus major conformer in the ground state as compared to the minor a-p (*M*^{*},*S*^{*},*S*^{*}) conformer. We attribute this to the steric repulsion between the β-thienyl protons and the alkyl substituents in the cyclopentene bridge moiety. However, the thermal barrier for their respective interconversion at room temperature was found to be small and hence the ratio of both conformers remains constant throughout the cyclization process. In view of the comparable photokinetic factors (product of the quantum yield and the molar absorptivity at the irradiation wavelength) of both ring-opened conformers, the ratio of the formed ring-closed diastereomers, that is, (*S*^{*},*S*^{*},*R*^{*},*R*^{*})/*all*-(*S*^{*}), should also remain constant throughout the cyclization process. Therefore, the degree of diastereoselectivity is indeed predetermined by the conformer ratio of their ring-opened precursors as schematically depicted by a stylized potential energy diagram in Scheme 3.

However, as the ring-opening processes of the ring-closed diastereomers proceed at unequal rates due to dissimilar photokinetic factors caused by different absorption spectra, a net shift of the overall *de* in the irradiated solution could be induced over multiple switching cycles. By this means, we demonstrate for the first time that the ratio of two diastereomers can be controlled by employing subsequent irradiation cycles with UV and visible light.

Furthermore, it is quite intriguing that the conformer population in the ground state could be nicely correlated to



Scheme 3. Potential energy diagram for the interconversion of the a-p helically pre-oriented conformers of DAEs **1o–3o** and subsequent photoinduced cyclization to their respective closed-form diastereomers.

the trends seen in the observed cyclization quantum yields of DAEs 1–4 and thus reinforces the insight that only the a-p conformation can be regarded as photoactive.

Acknowledgements

We gratefully thank the chemistry department of Sanofi-Aventis Deutschland, Frankfurt (Germany), for measurement time on their NMR spectrometers. Generous support from the German Research Foundation (Research Unit FOR934 as well as SFB 658), the European Research Council (through 2010-SG_257041: "RDC@Catalysis" as well as 2012-SG_308117: "Light4-Function") is gratefully acknowledged. We thank the Center for Scientific Computing Frankfurt for providing computer time on FUCHS and PD Dr. Stefan Immel for helpful discussions.

Keywords: conformational analysis · NMR spectroscopy · NOE · photochromism · residual dipolar couplings

- [1] M. M. Russev, S. Hecht, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 3348–3360.
- [2] R. Göstl, A. Senf, S. Hecht, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1982–1996.
- [3] B. M. Neilson, C. W. Bielawski, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 1874–1885.
- [4] M. Irie, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1685–1716.
- [5] H. Tian, S. J. Yang, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 85–97.
- [6] M. Irie, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, *9*, 1535–1542.
- [7] B. L. Feringa, W. R. Browne, *Molecular Switches*, 2nd ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2011**.
- [8] M. Irie, T. Seki, Y. Yokoyama, *New Frontiers in Photochromism*, Springer, New York, **2013**.
- [9] H. Dürr, H. Bouas-Laurent, *Photochromism: Molecules and Systems*, Elsevier, Amsterdam, **2003**.
- [10] K. Uchida, E. Tsuchida, Y. Aoi, S. Nakamura, M. Irie, *Chem. Lett.* **1999**, 63–64.
- [11] S. Kobatake, K. Uchida, E. Tsuchida, M. Irie, *Chem. Lett.* **2000**, 1340–1341.
- [12] S. Kobatake, M. Irie, *Chem. Lett.* **2003**, 32, 1078–1079.
- [13] S. Fukumoto, T. Nakashima, T. Kawai, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 5047–5053.
- [14] S. Fukumoto, T. Nakashima, T. Kawai, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1565–1568; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1603–1606.
- [15] S. Z. Pu, C. H. Zheng, Q. Sun, G. Liu, C. B. Fan, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 8036–8038.
- [16] R. Göstl, B. Kobin, L. Grubert, M. Pätzl, S. Hecht, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 14282–14285.
- [17] T. Yamaguchi, K. Uchida, M. Irie, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6066–6071.
- [18] Y. Yokoyama, H. Shiraiishi, Y. Tani, Y. Yokoyama, Y. Yamaguchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7194–7195.
- [19] M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11–15.
- [20] A. W. Overhauser, *Phys. Rev.* **1953**, *92*, 411–415.
- [21] F. A. L. Anet, A. J. R. Bourne, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 5250–5251.
- [22] D. Neuhaus, M. P. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, 2nd ed., Wiley, New York, **2000**.
- [23] C. M. Thiele, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 5673–5685.
- [24] G. Kummerlöwe, B. Luy, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **2009**, *68*, 193–230.
- [25] R. R. Gil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7222–7224; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 7360–7362.
- [26] B. Böttcher, C. M. Thiele, *Determining the Stereochemistry of Molecules from Residual Dipolar Couplings in eMagRes*, Wiley, New York, **2012**.
- [27] See the Supporting Information.
- [28] L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* **2012**, *45*, 849–854.
- [29] CCDC-1029699 contains the supplementary crystallographic information for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.
- [30] S. Delbaere, J. Berthet, T. Shiozawa, Y. Yokoyama, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 1853–1859.
- [31] J. Massaad, J. C. Micheau, C. Coudret, R. Sanchez, G. Guirado, S. Delbaere, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 6568–6575.
- [32] Averaged over both ring-flipped conformers.
- [33] Deviation to the average ΔG value. Only the a-p (M^*, S^*, S^*) conformer shows a higher $\Delta\Delta G(B, B')$ value of 1.9 kJ mol^{-1} .
- [34] E. E. Burnell, C. A. De Lange, *NMR of Ordered Liquids*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **2003**.
- [35] P. Lesot, C. Aroulanda, Z. Luz, *J. Chem. Phys.* **2009**, 131.
- [36] C. P. Butts, C. R. Jones, J. N. Harvey, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1193–1195.
- [37] C. R. Jones, C. P. Butts, J. N. Harvey, *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, *7*, 145–150.
- [38] C. P. Butts, C. R. Jones, E. C. Towers, J. L. Flynn, L. Appleby, N. J. Barron, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 177–184.
- [39] M. G. Chini, C. R. Jones, A. Zampella, M. V. D'Auria, B. Renga, S. Fiorucci, C. P. Butts, G. Bifulco, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 1489–1496.
- [40] J. Stonehouse, P. Adell, J. Keeler, A. J. Shaka, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6037–6038.
- [41] K. Stott, J. Stonehouse, J. Keeler, T. L. Hwang, A. J. Shaka, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4199–4200.
- [42] K. Stott, J. Keeler, Q. N. Van, A. J. Shaka, *J. Magn. Reson.* **1997**, *125*, 302–324.
- [43] M. J. Thrippleton, J. Keeler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3938–3941; *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4068–4071.
- [44] K. E. Cano, M. J. Thrippleton, J. Keeler, A. J. Shaka, *J. Magn. Reson.* **2004**, *167*, 291–297.
- [45] M. J. Thrippleton, R. A. E. Edden, J. Keeler, *J. Magn. Reson.* **2005**, *174*, 97–109.
- [46] S. Macura, B. T. Farmer, L. R. Brown, *J. Magn. Reson.* **1986**, *70*, 493–499.
- [47] H. T. Hu, K. Krishnamurthy, *J. Magn. Reson.* **2006**, *182*, 173–177.
- [48] J. Tropp, *J. Chem. Phys.* **1980**, *72*, 6035–6043.
- [49] A. Kolmer, L. Edwards, I. Kuprov, C. M. Thiele, unpublished results.
- [50] A. Saue, G. Englert, *Phys. Rev. Lett.* **1963**, *11*, 462.
- [51] J. A. Losonczy, M. Andrec, M. W. F. Fischer, J. H. Prestegard, *J. Magn. Reson.* **1999**, *138*, 334–342.
- [52] J. L. Yan, F. Delaglio, A. Kaerner, A. D. Kline, H. P. Mo, M. J. Shapiro, T. A. Smitka, G. A. Stephenson, E. R. Zartler, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5008–5017.
- [53] C. M. Thiele, A. Marx, R. Berger, J. Fischer, M. Biel, A. Giannis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4455–4460; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4566–4571.
- [54] R. R. Gil, C. Gayathri, N. V. Tsarevsky, K. Matyjaszewski, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 840–848.
- [55] U. M. Reinscheid, M. Köck, C. Cychon, V. Schmidts, C. M. Thiele, C. Griesinger, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 6900–6903.
- [56] P. Trigo-Mouriño, A. Navarro-Vázquez, J. F. Ying, R. R. Gil, A. Bax, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7576–7580; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 7718–7722.
- [57] V. Schmidts, M. Fredersdorf, T. Lübken, A. Porzel, N. Arnold, L. Wessjohann, C. M. Thiele, *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 839–844.
- [58] V. Schmidts, PhD thesis, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt, (Germany), **2013**.
- [59] C. M. Thiele, V. Schmidts, B. Böttcher, I. Louzao, R. Berger, A. Maliniak, B. Stevensson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6708–6712; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6836–6840.
- [60] H. Sun, U. M. Reinscheid, E. L. Whitson, E. J. d'Auvergne, C. M. Ireland, A. Navarro-Vázquez, C. Griesinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14629–14636.
- [61] E. E. Burnell, C. A. De Lange, *J. Magn. Reson.* **1980**, *39*, 461–480.
- [62] E. E. Burnell, C. A. De Lange, O. G. Mouritsen, *J. Magn. Reson.* **1982**, *50*, 188–196.
- [63] A. Schuetz, J. Junker, A. Leonov, O. F. Lange, T. F. Molinski, C. Griesinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15114–15115.
- [64] A. Enthart, J. C. Freudenberger, J. Furrer, H. Kessler, B. Luy, *J. Magn. Reson.* **2008**, *192*, 314–322.
- [65] M. Kurz, P. Schmieder, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1329–1331; *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1341–1342.
- [66] D. Uhrin, G. Batta, V. J. Hruby, P. N. Barlow, K. E. Kövér, *J. Magn. Reson.* **1998**, *130*, 155–161.

- [67] B. Reif, M. Köck, R. Kerssebaum, H. Kang, W. Fenical, C. Griesinger, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1996**, *118*, 282–285.
- [68] C. M. Thiele, W. Bermel, *Magn. Reson. Chem.* **2007**, *45*, 889–894.
- [69] M. Sarfati, P. Lesot, D. Merlet, J. Courtieu, *Chem. Commun.* **2000**, 2069–2081.
- [70] L. Verdier, P. Sakhaii, M. Zweckstetter, C. Griesinger, *J. Magn. Reson.* **2003**, *163*, 353–359.
- [71] T. Montag, C. M. Thiele, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 2271–2274.
- [72] N. C. Meyer, A. Krupp, V. Schmidts, C. M. Thiele, M. Reggelin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8334–8338; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8459–8463.
- [73] R. Berger, C. Fischer, M. Klessinger, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 7157–7167.
- [74] G. Cornilescu, J. L. Marquardt, M. Ottiger, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6836–6837.

Received: May 11, 2015

Published online on August 21, 2015

4.3.3 Bestimmung der Relativkonfiguration von acyclischen Diamiden

Von MANOLIKAKES ET AL. wurden verschiedene Diastereomere des Diamids **2-5** synthetisiert und isoliert^[43]. Die Diamide **2-5** besitzen drei Stereozentren, die sich an C₆, C₇ und C₈ befinden (siehe Abbildung 4.3.2). Somit ergeben sich die vier möglichen Diastereomere **2-5**⁸. Zu Beginn der vorgestellten Arbeiten war keine Strukturaufklärung mittels Röntgenkristallanalyse möglich, sodass die Relativkonfiguration der vier Syntheseprodukte unbekannt war. Die Aufklärung dieser Strukturen wird durch die konformationelle Flexibilität und die kleine Molekülgröße erschwert. Obwohl die kleine Molekülgröße zu kurzen Abständen der in Relation zu setzenden Molekülteile führt, ist außerdem aufgrund der wenigen Protonen von wenig zu beobachtbaren Parametern auszugehen. Zur Aufklärung der Relativkonfiguration sollen daher analog zu den vorherigen Abschnitten NOE- und RDC-Daten kombiniert genutzt werden.

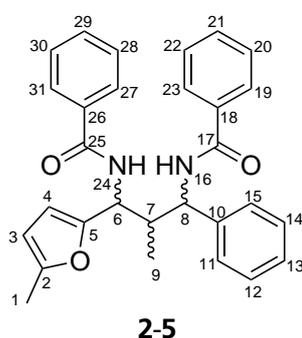


Abbildung 4.3.2: Nummerierung der Diamide **2-5**.

Für die beiden Bindungen C₆–C₇ und C₇–C₈, die die Stereozentren verknüpfen, ist unbekannt, ob von einer gehinderten Rotation oder von flexiblen Bindungen auszugehen ist. Da Konfiguration und Konformation stets gleichzeitig bestimmt werden müssen, ist zur Konfigurationsbestimmung die Beschreibung der Konformation der beiden potentiell rotierbaren Bindungen C₆–C₇ und C₇–C₈ nötig. Im Vergleich zum im Abschnitt 4.3.2 beschriebenen Dimethyldithienylcyclopenten **14** ist die potentielle konformationelle Flexibilität also erneut erhöht, da nun zwei frei rotierbare Bindungen anstelle von einer frei rotierbaren Bindung und einer Ringflexibilität vorliegen.

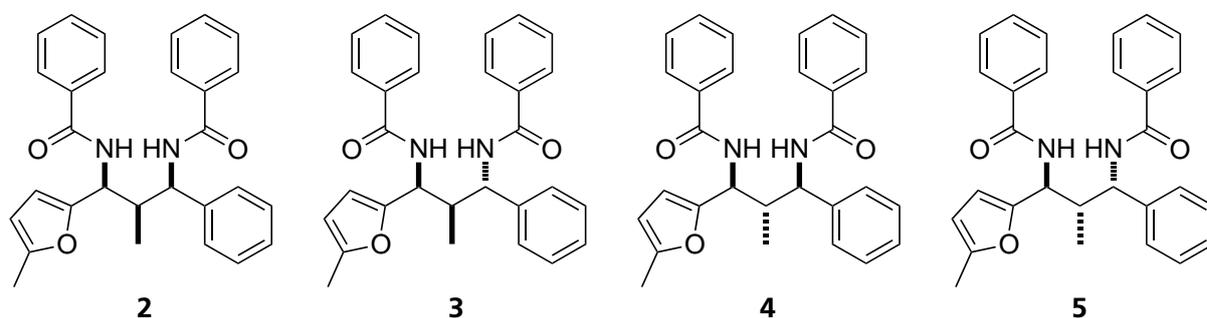


Abbildung 4.3.3: Die vier möglichen Diastereomere der Diamide **2-5**.

Ausgehend von gestaffelten Konformationen ist für beide Bindungen zu erwarten, dass jeweils drei Konformationen energetisch günstig sind. Diese drei Konformationen werden durch den Proton-Proton-Diederwinkel θ_{HH} beschrieben, die im Falle ideal gestaffelter Konformation 60°, 180° oder 300° betragen

⁸ Die Syntheseprodukte liegen racemisch vor. Das jeweils zweite Enantiomer wird im Rahmen dieser Diskussion vernachlässigt, nichtsdestotrotz erfolgt in diesem Abschnitt keine Aufklärung der Absolut-, sondern der Relativkonfiguration.

Tabelle 4.3.1: Die Diederwinkel der optimierten Strukturen, verglichen mit den Diederwinkeln der idealisierten Strukturen.

idealisiert		2		3		4		5	
$\theta_{H_6-H_7}$	$\theta_{H_7-H_8}$								
60	60	60,91	68,60	59,42	58,49	66,72	59,61	76,52	75,06
60	180	69,60	181,72	59,21	168,71	54,75	190,18	58,94	188,72
60	300	44,52	286,06	63,01	302,87	53,82	272,22	49,54	283,82
180	60	197,84	66,77	191,30	63,91	191,79	85,88	173,54	73,67
180	180	181,17	150,54	183,24	166,04	158,31	164,18	180,23	206,54
180	300	203,02	292,31	169,23	277,43	161,62	273,19	187,10	300,89
300	60	270,39	60,92	299,35	78,56	310,18	89,86	291,47	69,63
300	180	289,11	186,81	287,16	182,08	292,41	182,93	283,49	178,63
300	300	293,01	314,39	288,10	298,15	293,01	293,65	290,07	289,24

können. Für jedes Diastereomer ergeben sich somit neun mögliche Konformationen. Ausgehend von diesen idealisierten Diederwinkeln wurde eine Strukturoptimierung per DFT (B3LYP unter Verwendung des Basissets AHLRICHS-TZV^[194] und AHLRICHS Polarisationsfunktion^[195], unter der RIJCOSX-Annahme^[196–200]) mit dem Softwarepaket ORCA 3.0^[201,202] durchgeführt. Die Diederwinkel der so optimierten Strukturen finden sich in Tabelle 4.3.1.

Anhand dieser optimierten Strukturen sollen nun die Relativkonfiguration und die Konformation der vier Syntheseprodukte bestimmt werden. Die folgenden Abschnitte stellen Ergebnisse dar, die teilweise in der unter meiner Anleitung durchgeführten Bachelorarbeit von NOWAG^[203] sowie unter der Anleitung von SCHMIDTS durchgeführten Bachelorarbeit von SPARKES^[204] entstanden sind. Dazu werden die vier unbekanntesten Syntheseprodukte mit A-D bezeichnet.

In diesem Kapitel wird im Falle mehrerer populierter Konformere mit gemittelten Diederwinkeln argumentiert. Die Berechnung des gemittelten Diederwinkels erfolgt, indem der Diederwinkel des entsprechenden Strukturvorschlags erst in kartesische Koordinaten transferiert wird^[205]. Dann wird der Diederwinkel populationsgewichtet, und anschließend mittels der vorzeichensensitiven Variante der Arkustangensfunktion atan2 ^[206] zurück in Polarkoordinaten überführt, sodass ein gemittelter Diederwinkel erhalten wird^[205].

$$\theta_{\text{mittel}} = \text{atan2} \left(\sum_{i=1}^n p_i \sin(\theta_i), \sum_{i=1}^n p_i \cos(\theta_i) \right) \quad (4.3.1)$$

Dabei ist p_i die Population des Konformers i , θ_i der Diederwinkel im Konformer i und n die Anzahl der Konformere.

4.3.3.1 Zusammenfassung der experimentellen Daten

Von den vier Syntheseprodukten wurden jeweils etwa 8-14 mg unter Sauerstoffausschluss in CDCl_3 gelöst. Anschließend wurden zur Zuordnung jeweils ^1H -, ^{13}C -, COSY-, HSQC- und HMBC-Spektren bei 300 K aufgenommen. Dabei zeigte sich für Substanz C ein Überlapp der Signale H_6 und H_8 , der durch Temperaturerniedrigung auf 235 K und Wiederholung der Experimente umgangen werden konnte.

Tabelle 4.3.2: Die gemessenen $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstanten der vier Syntheseprodukte.

$^3J_{\text{HH}}/\text{Hz}$	Produkt A	Produkt B	Produkt C	Produkt D
H ₆ -H ₇	6,03 ± 0,12	4,64 ± 0,11	7,59 ± 0,20	2,45 ± 0,30
H ₇ -H ₈	7,62 ± 0,15	3,85 ± 0,23	5,08 ± 0,15	4,74 ± 0,25

Der Diederwinkel zweier Protonen ist durch die KARPLUS-Beziehung mit der $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstante verknüpft (siehe Gleichung 3.4.1). Der erste Schritt der Konformationsanalyse besteht daher aus der Bestimmung dieser Kopplungskonstanten per XLOC^[67,68], die in Tabelle 4.3.2 aufgeführt sind.

Es zeigt sich, dass die Kopplungskonstanten für die vier Syntheseprodukte unterschiedlich sind. Dies ist vermutlich auf unterschiedliche (gemittelte) Diederwinkel zurückzuführen, und somit auf unterschiedliche Konformationen. Werden diese Kopplungskonstanten nun durch die KARPLUS-Beziehung in Diederwinkel überführt, ergeben sich mehrere Probleme. Es ist nicht möglich zu bestimmen, welcher der jeweils vier möglichen Diederwinkel korrekt ist. Weiterhin ist fraglich, ob die gewählte Parametrisierung für Proteine (Abbildung 3.4.1) für das System der Diamide verlässlich sind. Außerdem sind aus der Orientierung der Protonen keine Rückschlüsse auf die Orientierung der anderen Reste an den jeweiligen Kohlenstoffatomen möglich, sodass die Relativkonfiguration unbekannt bleibt. Es ist daher nötig, auf NOE- und RDC-Daten zurückzugreifen.

Deshalb wurden für die Syntheseprodukte A, B und C in CDCl₃ mehrere Abstände per NOE bestimmt. Als Kalibrationsabstand wurde der starre Abstand H₃-H₄ gewählt und auf Basis der berechneten Strukturen auf 2,736 Å festgelegt. Analog zu den Abschnitten 4.3.1 und 4.3.2 wurden die PANIC-Auftragungen der Mischzeitserien nach Gleichung 3.5.36 ausgewertet. Die so bestimmten Abstände sind in Tabelle 4.3.3 dargestellt.

Außerdem wurden je etwa 8-14 mg der Syntheseprodukte in PBDG/CDCl₃ orientiert, um eine RDC-Extraktion zu ermöglichen. Sämtliche RDC und deren Fehler werden per CROSS-FITTING^[207] bestimmt.

Tabelle 4.3.3: Die aus NOE-Daten bestimmten Abstände der Syntheseprodukte A, B und C.

Abstand/Å	Produkt A	Produkt B	Produkt C
H ₄ -H ₂₄			3,350
H ₆ -H ₄	2,934	3,313	
H ₆ -H ₇	2,572	4,268	
H ₆ -H ₁₆		3,127	
H ₆ -H ₉	2,752	2,796	
H ₇ -H ₄	3,442	2,887	3,441
H ₇ -H ₈	2,656	3,989	
H ₇ -H ₉	2,546	2,495	2,602
H ₇ -H ₁₆		3,147	3,013
H ₇ -H ₂₄		3,287	2,896
H ₈ -H ₄	3,652	3,150	
H ₈ -H ₆		3,331	
H ₈ -H ₉	2,699	3,046	
H ₈ -H ₁₆		3,125	
H ₉ -H ₁₆		2,784	2,742
H ₉ -H ₂₄			3,063

Tabelle 4.3.4: Die gemessenen RDC-Werte der vier Syntheseprodukte.

RDC/Hz	Produkt A		Produkt B 300 K	Produkt C 235 K	Produkt D 300 K
	$\Delta Q = 264$ Hz 300 K	$\Delta Q = 259$ Hz 300 K			
C ₆ -H ₆	2,20 ± 2,04	6,65 ± 0,25	-6,29 ± 4,45	18,08 ± 5,00	39,99 ± 1,75
C ₇ -H ₇	23,79 ± 0,60	24,54 ± 0,20	-8,57 ± 2,45	19,64 ± 2,50	1,27 ± 0,90
C ₈ -H ₈	2,93 ± 1,48	10,16 ± 0,40	38,32 ± 3,40		-13,17 ± 1,75
C ₁₃ -H ₁₃	11,03 ± 3,83	2,53 ± 0,20	-3,85 ± 5,99		
C ₇ -C ₉	0,04 ± 0,34	-0,25 ± 0,10	1,71 ± 8,01	3,01 ± 1,50	2,03 ± 1,20
C ₆ -H ₇	-0,03 ± 2,74	3,80 ± 0,70	2,75 ± 12,17		
C ₇ -H ₆	1,06 ± 1,75				
C ₇ -H ₈		13,06 ± 0,50	-2,33 ± 7,33		
C ₈ -H ₇		-0,54 ± 1,00			
C ₉ -H ₇	-0,06 ± 1,30	-0,25 ± 0,50	-0,26 ± 0,49		
C ₉ -H ₆	0,28 ± 0,17		1,66 ± 3,11		
C ₉ -H ₈	-1,45 ± 0,95				
H ₆ -H ₇		1,50 ± 1,00			
H ₇ -H ₈		-3,65 ± 1,00			

Aus CLIP-HSQC^[69] und HETLOC^[72,73] konnten bei $\Delta Q = 264$ Hz verschiedene RDCs für das Syntheseprodukt A bestimmt werden, von denen zehn relevant für die Auswertung sind (im Folgenden als erster RDC-Satz bezeichnet). Um diese Anzahl zu erhöhen, wurden bei $\Delta Q = 259$ Hz RDCs aus CLIP-HSQC, HETLOC, selHSQMBC-TOCSY^[80], SJS-HSQC^[84] und XLOC bestimmt, von denen elf relevant sind (zweiter RDC-Satz). Trotz des geringen Unterschiedes der Quadrupolaufspaltung unterscheiden sich die RDC teilweise deutlich. Die beiden RDC-Sätze wurden mit einem Abstand von etwa einem halben Jahr aufgenommen, sodass die lange Lagerung möglicherweise zu einer anderen Orientierung der Moleküle in der anisotropen Phase führte. Eine Zersetzung ist auszuschließen, da die Zuordnungsspektren der beiden Sätze keine Unterschiede aufwiesen.

Für Syntheseprodukt B wurden neun relevante RDCs aus CLIP-HSQC und HETLOC extrahiert. Bei Produkt C konnten nur drei RDCs aus dem CLIP-HSQC gewonnen werden, da die Temperaturniedrigung zu einer Verstärkung der Orientierung führte, und somit die Magnetisierungstransfers aufgrund zu stark abweichender Kopplungskonstanten ineffizient wurden, sodass keine Signale in den Spektren sichtbar waren. Produkt D erwies sich als zersetzungsanfällig, sodass nur RDC aus dem CLIP-HSQC, aber keine Kopplungskonstanten aus Spektren mit langen Messzeiten (HETLOC, XLOC) extrahiert werden konnten. Alle RDC-Werte sind in Tabelle 4.3.4 zusammengefasst.

4.3.3.2 Syntheseprodukt A

Zunächst wird der erste Satz an RDCs und die optimierten Strukturen per SCST-Fit verglichen (siehe Tabelle 4.3.5). Die relativ beste Übereinstimmung von experimentellen und zurückberechneten RDC wurde für das Diastereomer **2** gefunden ($Q_{\text{Baltzar}} = 0,030$), allerdings ist der Unterschied zu den kleinsten Qualitätsfaktoren der anderen Diastereomere klein (siehe fett markierte Werte in Tabelle 4.3.5). Es kann somit nicht beurteilt werden, welche Relativkonfiguration korrekt ist. Daher wird nun untersucht, ob die Berücksichtigung der bereits postulierten Flexibilität zu einem eindeutigen Ergebnis führt.

Tabelle 4.3.5: Die per SCST-Fit bestimmten Werte von Q_{Baltzar} der optimierten Strukturen für Syntheseprodukt A.

θ_{6-7}	θ_{7-8}	2	3	4	5
60	60	0,368	0,299	0,088	0,098
60	180	0,741	0,482	0,181	0,265
60	300	0,322	0,529	0,069	0,044
180	60	0,157	0,228	0,768	0,416
180	180	0,471	0,509	0,408	0,481
180	300	0,127	0,737	0,159	0,666
300	60	0,053	0,075	0,183	0,555
300	180	0,243	0,424	0,534	0,610
300	300	0,030	0,084	0,524	0,616

Aus diesem Grund wird die Auswertung nach der MCST-Methode fortgesetzt. Dazu werden zuerst alle neun Konformere des jeweiligen Diastereomers berücksichtigt. Nicht populierte Konformere werden identifiziert und nach und nach nicht mehr berücksichtigt, sodass im Minimum von Q_{Baltzar} nur noch maximal vier Konformere populierte sind. Die beste Übereinstimmung kann für Diastereomer **3** gefunden werden (in Tabelle 4.3.6 fett markiert), allerdings ist der Unterschied zu den Minima der anderen Diastereomere klein.

Anschließend werden die so gefundenen Konformerensembles mit den NOE-Daten verglichen. Dies erfolgt mit einem analog zu Gleichung 3.7.7 verwendeten Qualitätsfaktor $Q_{\text{Cornilescu}}$. Dabei zeigt sich, dass der geringste Wert von $Q_{\text{Cornilescu}}$ für **5** gefunden wird (in Tabelle 4.3.6 fett markiert). Die Populationen der Konformere im Minimum sind für alle Ensembles unterschiedlich, und auch die Diederwinkel weichen teilweise erheblich voneinander ab. Mit dieser Methode kann somit keine gute Übereinstimmung gefunden werden, und deshalb keine Aussage über Konfiguration und Konformation getroffen werden.

Tabelle 4.3.6: Die per MCST-Fit gefundenen Minima für Syntheseprodukt A. Aufgeführt sind die Populationen der optimierten Strukturen im Minimum des Qualitätsfaktors sowie die gemittelten Diederwinkel der so gefunden Konformerensembles.

optimiert		2		3		4		5	
$\theta_{H_6-H_7}$	$\theta_{H_7-H_8}$	NOE	RDC	NOE	RDC	NOE	RDC	NOE	RDC
60	60				0,19		0,47		
60	180	0,23		0,10	0,27	0,34		0,44	0,12
60	300		0,55			0,13	0,53		0,39
180	60	0,30		0,40					
180	180								
180	300		0,13	0,06					
300	60		0,23			0,22		0,19	0,17
300	180	0,21		0,18	0,27	0,31		0,37	
300	300	0,26	0,09	0,26	0,27				0,32
$\theta_{H_6-H_7, \text{mittel}}$		263,64	4,06	236,39	343,36	352,30	59,88	337,36	353,06
$\theta_{H_7-H_8, \text{mittel}}$		157,21	306,30	71,23	186,12	178,73	334,32	170,75	284,46
$Q_{\text{Cornilescu}}$		0,098		0,112		0,090		0,057	
Q_{Baltzar}			0,017		0,014		0,041		0,016

Tabelle 4.3.7: Ergebnisse des MCST-Fit zum schrittweisen Aufbau des Syntheseprodukts A. Aufgeführt sind die Populationen der für den Fit verwendeten idealisierten Strukturen im Minimum des Qualitätsfaktors. Die Schritte sind mit folgenden RDCs durchgeführt: (1): C₇-H₇, C₈-H₈, C₇-C₉, C₆-H₇, C₉-H₇, C₉-H₈; (2): (1) + C₁₃-H₁₃.

θ_{6-7} θ_{7-8}										gemittelte θ		Q_{Baltzar}	
	60	60	60	180	180	180	300	300	300	θ_{6-7}	θ_{7-8}	(1)	(2)
2	0,95	0,02	0,03							60	59,46	0,007	0,009
				0,91	0,00	0,09				180	54,85	0,006	0,011
							0,89	0,00	0,11	300	53,49	0,006	0,040
3	0,86	0,00	0,14							60	51,27	0,008	0,157
				0,89	0,00	0,11				180	53,49	0,007	0,161
							0,95	0,01	0,04	300	58,39	0,002	0,175
4	0,58	0,34	0,08							60	91,32	0,003	0,133
				0,63	0,37	0,00				180	95,76	0,001	0,194
							0,54	0,43	0,03	300	108,17	0,001	0,175
5	0,67	0,26	0,07							60	78,05	0,001	0,111
				0,65	0,25	0,10				180	75,30	0,000	0,109
							0,61	0,37	0,02	300	96,14	0,001	0,154

Statt einer schrittweisen Reduktion des Konformerensraums wird nun alternativ versucht, die Komplexität des Problems schrittweise zu erhöhen. Zunächst wird eine stereogene Domäne am zentralen Stereozentrum C₇ aus sechs RDCs (C₇-H₇, C₈-H₈, C₇-C₉, C₆-H₇, C₉-H₇, C₉-H₈) erzeugt. Anschließend wird der gemittelte Diederwinkel $\theta_{H_7-H_8}$ für die Konformerpopulation im Minimum von Q_{Baltzar} bestimmt. Mit diesem Molekülteil wird begonnen, da für diesen mehr RDC-Daten vorhanden sind. Hierfür werden nicht die optimierten, sondern die idealisiert gestaffelten Strukturen verwendet. Dieser Schritt wird für alle drei möglichen Diederwinkel (60°, 180°, 300°) von $\theta_{H_6-H_7}$ durchgeführt. Der so erhaltene gemittelte Diederwinkel $\theta_{H_7-H_8}$ liegt für **2** und **3** bei 51-60°, für **4** bei 91-109° und für **5** bei 75-97° (siehe Schritt (1) in Tabelle 4.3.7).

Es fällt auf, dass Unterschiede zwischen den gemittelten Diederwinkeln der verschiedenen Diastereomere existieren. Diese unerwarteten Unterschiede kommen vermutlich durch verschiedenartige ECKART-Transformationen der verschiedenen Diastereomere zustande, dass also die RDC der verschiedenen Diastereomere in unterschiedlichen Koordinatensystemen zurückberechnet werden. Dies führt dann zu verschiedenen Populationen in den Minima und somit zu verschiedenen gemittelten Diederwinkeln. In der Folge werden diese Unterschiede vernachlässigt.

Um die Orientierung des Phenylrestes und somit die Konfiguration des Stereozentrums an C₈ zu bestimmen, kann der RDC C₁₃-H₁₃ verwendet werden. Als *para*-ständiger Wasserstoff muss der Vektor C₁₃-H₁₃ exakt dem von C₈-C₁₀ entsprechen. Für diesen gibt es somit in einer gestaffelten Konformation zwei mögliche Diederwinkel $\theta_{H_7-C_{10}}$ für **2** und **3**: 171-180° oder 291-300°. Die dritte Möglichkeit der gestaffelten Konformation, 51-60°, ist bereits von H₈ blockiert. Wird die Konfiguration an C₇ willkürlich auf *R* festgelegt, entspräche 291-300° der *R,R*-Anordnung und somit dem Diastereomer **2**. 171-180° dagegen entspräche der *R,S*-Anordnung von **3**. Analoge Überlegungen gelten auch für **4** (*R,S*) und **5** (*R,R*).

Wird nun der RDC C₁₃-H₁₃ mit berücksichtigt (Schritt (2) in Tabelle 4.3.7), erneut unter Einbeziehung der drei möglichen Diederwinkel (60°, 180°, 300°) von $\theta_{H_6-H_7}$, ist der kleinste Wert von Q_{Baltzar} für

Tabelle 4.3.8: Ergebnisse des MCST-Fit zum schrittweisen Aufbau des Syntheseprodukts A. Aufgeführt sind die Populationen der für den Fit verwendeten idealisierten Strukturen im Minimum des Qualitätsfaktors. Die Schritte sind mit folgenden RDCs durchgeführt: (3): wie (2); (4): (3) + $C_6-H_6, C_7-H_6, C_9-H_6$.

θ_{6-7} θ_{7-8}										gemittelte θ		Q_{Baltzar}	
	60	60	60	180	180	180	300	300	300	θ_{6-7}	θ_{7-8}	(3)	(4)
2	0,04			0,62	0,04		0,30	0,00		204,68	62,11	0,002	0,393
	0,22			0,50	0,12		0,16	0,00		173,11	67,22	0,003	0,323
5	0,30	0,16		0,16			0,32		0,06	14,92	67,37	0,002	0,234

2 zu finden (in Tabelle 4.3.7 fett markiert). Die Konformerpopulationen ergeben den gemittelten Diederwinkel $\theta_{H_7-C_{10}}$ von $299,46^\circ$ (dies entspricht $\theta_{H_7-H_8}$ von $59,46^\circ$), welcher die Relativkonfiguration R,R beschreibt.

Die Beschreibung von **5** sollte im Minimum eigentlich genauso gut sein, da hier die Relativkonfiguration identisch ist. In der Realität ist die Übereinstimmung der experimentellen und zurückberechneten RDC aber schlechter, was auf den leicht anderen Diederwinkel als mögliches Resultat der ECKART-Transformation zurückzuführen ist. Nichtsdestotrotz ist die Übereinstimmung für **5** besser als die der R,S -Relativkonfiguration von **3** und **4**. Es ist daher davon auszugehen, dass die durch **2** und **5** beschriebene Relativkonfiguration R,R in Syntheseprodukt A vorliegt.

Für die Analyse des Stereozentrums an C_6 werden daher nur noch **2** und **5** berücksichtigt. Für diese wird zuerst die optimale Beschreibung der in Schritt (2) verwendeten RDCs gesucht. Dazu werden nun alle neun idealisierten Strukturen im MCST-Fit berücksichtigt. Nicht populierte Konformere werden nach und nach entfernt, bis im Minimum des Qualitätsfaktors fünf Konformere populiert sind. So werden für **2** zwei Minima gefunden, deren Qualitätsfaktoren sehr ähnlich sind, (siehe Schritt (3) in Tabelle 4.3.8), für **5** wird dagegen nur ein Minimum gefunden. Für die so erhaltenen Konformerensemble werden erneut gemittelte Diederwinkel bestimmt. Der gemittelte Diederwinkel $\theta_{H_7-H_8}$ ist in diesen Minima leicht größer als in den Schritten (1) und (2), aber dafür ist der Unterschied zwischen **2** und **5** nicht mehr vorhanden. Für den gemittelten Diederwinkel $\theta_{H_6-H_7}$ existiert dagegen ein Unterschied zwischen **2** und **5**. Nun werden die RDC-Werte, die den Diederwinkel $\theta_{H_6-H_7}$ beschreiben, hinzugefügt (siehe Schritt (4) in Tabelle 4.3.8). Der geringste Wert von Q_{Baltzar} und somit die beste Beschreibung der RDC-Daten wird für **5** gefunden.

Nachdem der gemittelte Diederwinkel $\theta_{H_6-H_7}$ in den Minima bestimmt wurde, müsste nun das Stereozentrum C_6 durch einen weiteren RDC beschrieben werden. Dies ist aber nicht möglich, da kein experimentell zugänglicher RDC für diese Unterscheidung geeignet ist. Stattdessen wird nun versucht, diese Unterscheidung durch die Betrachtung von NOE-Daten zu ermöglichen, indem die aus den RDC bestimmten Konformerpopulationen verwendet werden.

Dazu werden die Konformerensemble aus Schritt (4) mit den Distanzen aus NOE-Daten verglichen (siehe Zeilen 1, 2 und 4 in Tabelle 4.3.9). Außerdem wird nach der besten Übereinstimmung von experimentellen und gemittelten Abständen gesucht, ohne dass die Konformerpopulationen festgelegt sind (siehe Zeilen 3 und 5 in Tabelle 4.3.9). In beiden Fällen ist der RMSD für **5** leicht kleiner (siehe Tabelle 4.3.9), allerdings weichen die Populationen der Konformere und somit auch die gemittelten Diederwinkel

Tabelle 4.3.9: Vergleich der Minima aus Schritt (4) mit NOE-Daten. Aufgeführt sind die Populationen der für den Fit verwendeten idealisierten Strukturen.

θ_{6-7} θ_{7-8}	60	60	60	180	180	180	300	300	300	gemittelte θ		$Q_{\text{Cornilescu}}$
	60	180	300	60	180	300	60	180	300	θ_{6-7}	θ_{7-8}	
2	0,04			0,62	0,04		0,30			204,68	62,11	0,170
	0,22			0,50	0,12		0,16			173,11	67,22	0,165
				0,49	0,51					180,00	358,02	0,099
5	0,30	0,16	0,16			0,32		0,06		14,92	67,37	0,146
		0,48				0,15	0,37			356,04	170,48	0,069

der RDC- und NOE-Minima voneinander ab. Trotzdem ist festzustellen, dass die experimentellen Daten von Syntheseprodukt A am besten durch 5 beschrieben werden.

Dieses Ergebnis sollte nur als vorläufige Zuordnung betrachtet werden, da es einige Aspekte gibt, die an dieser Zuordnung zweifeln lassen. Die Unterschiede der Qualitätsfaktoren sind nicht groß, sodass der Unterschied auch durch experimentelle oder statistische Fehler erklärt werden könnte. Die Beschreibung des Systems mit nur zehn RDCs könnte ebenfalls nicht ausreichend sein. Dies gilt besonders im Hinblick auf das Stereozentrum C_6 , für das nur zwei der vier Substituenten durch RDCs beschrieben werden.

Aus den Konformerpopulationen ist es mit Hilfe der KARPLUS-Beziehung (Gleichung 3.4.3) möglich, Kopplungskonstanten vorherzusagen. In Abbildung 4.3.4 sind die aus den Minima aus Tabelle 4.3.9 berechneten Kopplungskonstanten mit den experimentellen Kopplungskonstanten (siehe Tabelle 4.3.2) verglichen. Dazu wurden die in Abbildung 3.4.1 dargestellten Parameter verwendet. Wie zu erkennen

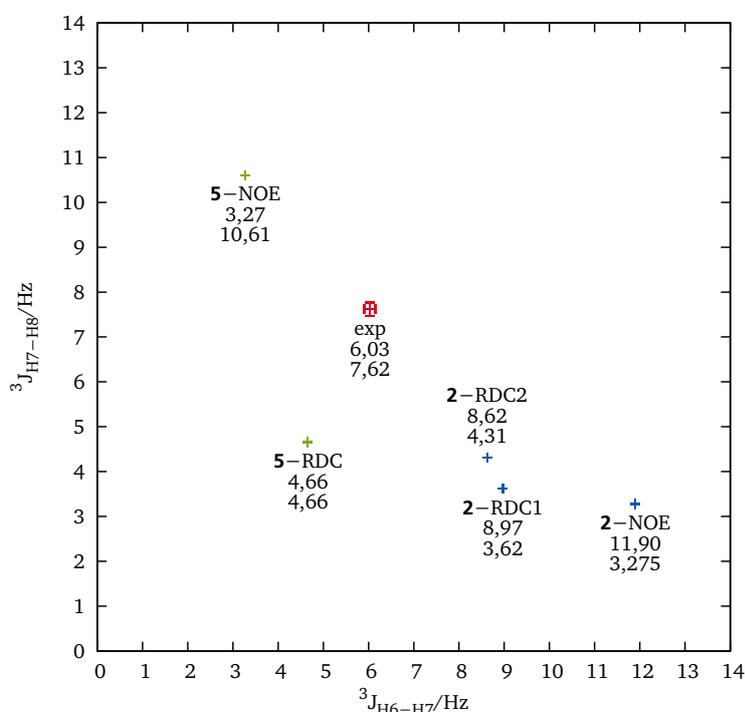


Abbildung 4.3.4: Vergleich der experimentellen Kopplungskonstanten mit aus der KARPLUS-Beziehung bestimmten Kopplungskonstanten. Für die KARPLUS-Beziehung wurden die in Abschnitt 3.4.1 genannten Parameter genutzt.

Tabelle 4.3.10: Die per SCST-Fit bestimmten Werte von Q_{Baltzar} der optimierten Strukturen für Syntheseprodukt A.

θ_{6-7}	θ_{7-8}	2	3	4	5
60	60	0,268	0,193	0,377	0,358
60	180	0,333	0,323	0,283	0,286
60	300	0,646	0,437	0,223	0,237
180	60	0,242	0,255	0,515	0,331
180	180	0,502	0,522	0,391	0,484
180	300	0,480	0,500	0,357	0,440
300	60	0,217	0,252	0,370	0,689
300	180	0,222	0,370	0,445	0,345
300	300	0,275	0,401	0,267	0,255

ist, stimmen die berechneten und die gemessenen Kopplungskonstanten nicht überein. Es ist möglich, dass dieser Unterschied durch schlechte Parametrisierung zu erklären ist, nichtsdestotrotz ist das Ergebnis kritisch zu betrachten.

Um weitere Daten zu erhalten, wurde ein zweiter Satz an RDCs aufgenommen. Dieser umfasst mit elf relevanten RDC-Werten einen mehr als der ursprüngliche Satz an RDC. Erneut werden diese per SCST-Fit an die optimierten Strukturen angepasst (siehe Tabelle 4.3.10). Die beste Übereinstimmung wird für **3** gefunden, allerdings ist der Wert von Q_{Baltzar} schlechter als im Falle des ersten RDC-Satzes. Ob dies auf eine mögliche andere Orientierung des Syntheseproduktes A oder auf eine fehlerbehaftete RDC-Bestimmung zurückzuführen ist, lässt sich nicht abschließend beurteilen und wird in der Folge vernachlässigt.

Daher wird erneut versucht, die Relativkonfiguration durch schrittweisen Aufbau zu lösen. Begonnen wird wieder mit dem Aufbau einer stereogenen Domäne um C_7 , welches als *R* festgelegt wird (Schritt (1) in Tabelle 4.3.11). Die gemittelte Diederwinkel $\theta_{H_7-H_8}$ der gefundenen Minima weisen deutlich

Tabelle 4.3.11: Ergebnisse des MCST-Fit zum schrittweisen Aufbau des Syntheseprodukts A. Aufgeführt sind die Populationen der für den Fit verwendeten idealisierten Strukturen im Minimum des Qualitätsfaktors. Die Schritte sind mit folgenden RDCs durchgeführt: (1): C_7-H_7 , C_8-H_8 , C_7-C_9 , C_6-H_7 , C_7-H_8 , C_9-H_7 , H_7-H_8 ; (2): (1) + $C_{13}-H_{13}$.

θ_{6-7} θ_{7-8}	Populationen									gemittelte θ		Q_{Baltzar}	
	60	60	60	180	180	180	300	300	300	θ_{6-7}	θ_{7-8}	(1)	(2)
2	0,47	0,27	0,26							60	62,42	0,017	0,236
				0,38	0,33	0,29				180	86,33	0,014	0,070
							0,43	0,06	0,51	300	350,41	0,009	0,513
3	0,03	0,52	0,45							60	232,41	0,027	0,037
				0,00	0,58	0,42				180	224,51	0,029	0,087
							0,40	0,60	0,00	300	139,11	0,093	0,538
4	0,46	0,00	0,54							60	352,11	0,090	0,094
				0,43	0,00	0,57				180	346,37	0,067	0,257
							0,72	0,01	0,27	300	38,78	0,094	1,013
5	0,56	0,06	0,38							60	20,82	0,015	0,504
				0,57	0,02	0,41				180	16,43	0,006	0,470
							0,40	0,09	0,51	300	345,37	0,012	0,850

Tabelle 4.3.12: Ergebnisse des MCST-Fit zum schrittweisen Aufbau des Syntheseprodukts A. Aufgeführt sind die Populationen der für den Fit verwendeten idealisierten Strukturen im Minimum des Qualitätsfaktors. Die Schritte sind mit folgenden RDCs durchgeführt: (3): wie (2); (4): (3) + C_6-H_6 , H_6-H_7 .

θ_{6-7}	60	60	60	180	180	180	300	300	300	gemittelte θ		Q_{Baltzar}	
θ_{7-8}	60	180	300	60	180	300	60	180	300	θ_{6-7}	θ_{7-8}	(3)	(4)
3	0,04	0,16	0,56				0,24			42,01	317,00	0,013	0,151
4	0,30			0,10	0,20				0,40	300,00	360,00	0,015	0,859
	0,48		0,42		0,06	0,04				65,82	2,42	0,019	0,196

größere Unterschiede auf, als dies für den ersten RDC-Satz der Fall war. Trotzdem wird als Schritt (2) der RDC für die Bindung $C_{13}-H_{13}$ hinzugefügt. Die beste Beschreibung kann für **3** gefunden werden, gefolgt von **4**. Diese stehen für die *R,S*-Relativkonfiguration, während für den ersten RDC-Satz die *R,R*-Relativkonfiguration postuliert wurde.

Im nächsten Schritt wird versucht, die Bindung C_6-C_7 zu beschreiben (siehe Schritt (3) in Tabelle 4.3.12). Besonders für **4** kann so der Qualitätsfaktor erheblich verbessert werden, allerdings entspricht der gemittelte Diederwinkel $\theta_{H_7-H_8}$ nicht mehr dem vorherigen Wert. Durch Hinzunahme von RDCs zu H_7 (Schritt (4)) zeigt sich ein kleiner Unterschied zwischen den Qualitätsfaktoren von **3** und **4**, allerdings ist fraglich, ob dieser Unterschied signifikant ist.

Abschließend wird versucht, die Relativkonfiguration an C_6 mit Hilfe des NOE aufzuklären. Bei den zuvor gefundenen Konformerensembles werden die experimentell bestimmten Abstände mit populationsgemittelten Abständen verglichen. Zusätzlich wird nach der optimalen Beschreibung der NOE-Daten gesucht. In beiden Fällen ist die Beschreibung durch **4** etwas besser, allerdings ist der Unterschied der Qualitätsfaktoren kleiner als der der RDC-Qualitätsfaktoren.

Die so getroffene Zuordnung widerspricht der des ersten RDC-Satzes, da dort **5** als vorläufige Zuordnung betrachtet wurde. Auch in diesem Falle sind die Unterschiede der Qualitätsfaktoren nicht groß, sodass auch elf RDCs zur umfassenden Beschreibung des Systems nicht auszureichen scheinen.

Erneut werden aus den Diederwinkeln mittels der KARPLUS-Beziehung (Gleichung 3.4.1) Kopplungskonstanten berechnet. In Abbildung 4.3.5 werden diese mit den experimentelle Kopplungskonstanten verglichen. Am besten beschreiben die Kopplungskonstanten für das RDC-Minimum des eigentlich ausgeschlossenen **3**.

Trotz Aufnahme zweier Sätze an RDC-Daten und mehreren Abständen aus NOE-Spektren ist es demnach nicht gelungen, ein Ensemble an Konformeren zu finden, das die experimentellen Daten korrekt und

Tabelle 4.3.13: Vergleich der Minima aus Schritt (4) mit NOE-Daten. Aufgeführt sind die Populationen der für den Fit verwendeten idealisierten Strukturen.

θ_{6-7}	60	60	60	180	180	180	300	300	300	gemittelte θ		$Q_{\text{Cornilescu}}$
θ_{7-8}	60	180	300	60	180	300	60	180	300	θ_{6-7}	θ_{7-8}	
3	0,04	0,16	0,56				0,24			42,01	317,00	0,219
		0,09		0,45				0,36	0,10	241,36	120,00	0,113
4	0,30			0,10	0,20				0,40	300,00	360,00	0,178
	0,48		0,42		0,06	0,04				65,82	2,42	0,219
		0,57					0,19	0,24		13,63	167,04	0,101

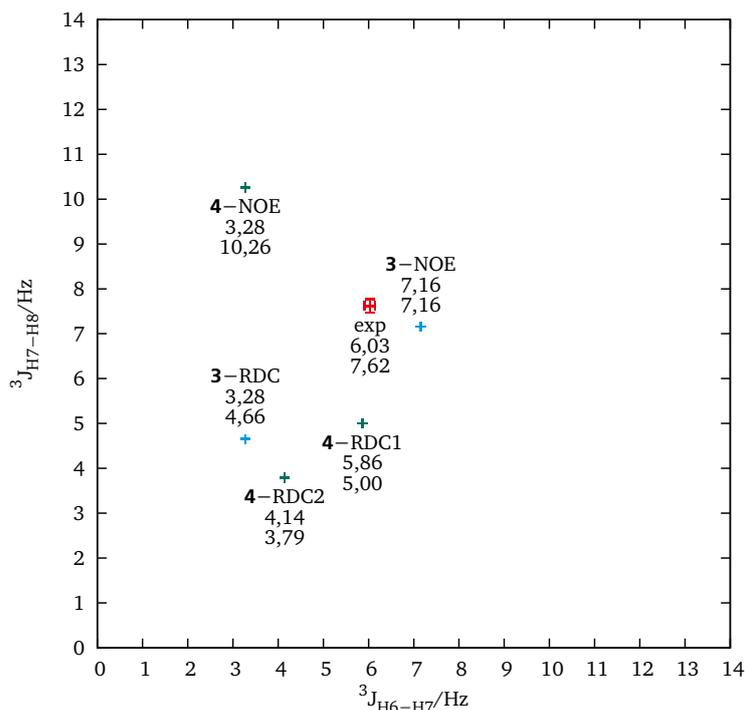


Abbildung 4.3.5: Vergleich der experimentellen Kopplungskonstanten mit aus der KARPLUS-Beziehung bestimmten Kopplungskonstanten. Für die KARPLUS-Beziehung wurden die in Abschnitt 3.4.1 genannten Parameter genutzt.

umfassend beschreibt. Auch der schrittweise Aufbau war nicht erfolgreich. Es ist nicht möglich zu beurteilen, ob die Zuordnung des ersten RDC-Satzes (5) oder die des zweiten RDC-Satzes (4) korrekt ist.

4.3.3.3 Syntheseprodukt B

Die Auswertung der NOE- und RDC-Daten des Syntheseprodukts B erfolgt analog zu der in Abschnitt 4.3.3.2 beschriebenen Auswertung von Syntheseprodukt A. Zuerst werden die optimierten Geometrien per SCST-Fit mit den experimentellen RDC verglichen (siehe Tabelle 4.3.14). Der beste Wert wird für **2** gefunden.

Tabelle 4.3.14: Die per SCST-Fit bestimmten Werte von Q_{Baltzar} der optimierten Strukturen für Syntheseprodukt B.

θ_{6-7}	θ_{7-8}	2	3	4	5
60	60	0,619	0,450	0,120	0,117
60	180	1,149	1,541	2,138	2,447
60	300	0,454	0,839	0,407	0,637
180	60	0,235	0,310	0,174	0,068
180	180	0,136	0,401	0,768	0,202
180	300	0,015	0,162	0,084	0,611
300	60	1,016	0,481	0,519	0,775
300	180	3,217	1,452	3,126	2,666
300	300	0,116	0,103	0,584	0,472

Tabelle 4.3.15: Die per MCST-Fit gefundenen Minima für Syntheseprodukt B. Aufgeführt sind die Populationen der optimierten Strukturen im Minimum des Qualitätsfaktors.

optimiert		2		3		4		5	
$\theta_{H_6-H_7}$	$\theta_{H_7-H_8}$	NOE	RDC	NOE	RDC	NOE	RDC	NOE	RDC
60	60				0,40		0,32	0,08	
60	180				0,12		0,30	0,44	0,36
60	300		0,08			0,31			0,16
180	60	0,33	0,24	0,66		0,15			0,14
180	180	0,25							0,10
180	300		0,26		0,12				
300	60		0,02		0,06		0,26		0,24
300	180	0,42		0,10	0,30	0,44		0,48	
300	300		0,40	0,24		0,10	0,12		
$\theta_{H_6-H_7, \text{mittel}}$		229,70	243,38	219,83	26,30	311,03	24,08	358,07	58,09
$\theta_{H_7-H_8, \text{mittel}}$		143,28	324,13	51,20	121,67	216,07	102,78	178,59	159,77
$Q_{\text{Cornilescu}}$		0,223		0,234		0,235		0,213	
Q_{Baltzar}		0,001		0,002		0,001		0,001	

Anschließend wird versucht, per MCST-Fit ein Ensemble an Konformeren zu generieren, das die experimentellen Daten möglichst gut beschreibt (siehe Tabelle 4.3.15). Für die RDC-Daten gelingt dies. Für jedes Diastereomer kann ein Ensemble an Konformeren gefunden werden, das die RDC-Daten sehr gut beschreibt. Allerdings ist so keine Aussage darüber möglich, welche Relativkonfiguration korrekt ist. Die NOE-Daten liefern ebenfalls keinen Hinweis, da die Qualitätsfaktoren für alle Diastereomere sehr ähnlich sind. Also wird erneut auf den schrittweisen Aufbau zurückgegriffen.

Als erstes wird versucht, den Diederwinkel $\theta_{H_7-H_8}$ zu bestimmen (Schritt (1) in Tabelle 4.3.16). Anschließend wird das Stereozentrum an C₈ durch Hinzufügen von C₁₃-H₁₃ bestimmt (Schritt (2) in

Tabelle 4.3.16: Ergebnisse des MCST-Fit zum schrittweisen Aufbau des Syntheseprodukts B. Aufgeführt sind die Populationen der für den Fit verwendeten idealisierten Strukturen im Minimum des Qualitätsfaktors. Die Schritte sind mit folgenden RDCs durchgeführt: (1): C₇-H₇, C₈-H₈, C₇-C₉, C₆-H₇, C₇-H₈, C₉-H₇; (2): (1) + C₁₃-H₁₃.

θ_{6-7}	θ_{7-8}	60	60	60	180	180	180	300	300	300	gemittelte θ		Q_{Baltzar}	
											θ_{6-7}	θ_{7-8}	(1)	(2)
2	0,74	0,26	0,00	0,77	0,23	0,00	0,62	0,37	0,01	60	80,26	0,005	0,097	
										180	76,91	0,004	0,103	
										300	95,94	0,003	0,010	
3	0,75	0,25	0,00	0,69	0,31	0,00	0,00	0,55	0,45	60	79,11	0,004	0,077	
										180	86,65	0,004	0,118	
										300	230,17	0,003	0,174	
4	0,41	0,59	0,00	0,67	0,00	0,33	0,01	0,23	0,76	60	137,32	0,002	0,067	
										180	30,49	0,001	0,206	
										300	283,42	0,004	0,024	
5	0,00	0,82	0,18	0,03	0,94	0,03	0,05	0,25	0,70	60	192,05	0,005	0,692	
										180	180,00	0,004	1,160	
										300	282,52	0,005	0,174	

Tabelle 4.3.17: Ergebnisse des MCST-Fit zum schrittweisen Aufbau des Syntheseprodukts B. Aufgeführt sind die Populationen der für den Fit verwendeten idealisierten Strukturen im Minimum des Qualitätsfaktors. Die Schritte sind mit folgenden RDCs durchgeführt: (3): wie (2); (4): (3) + C₆-H₆, C₉-H₆.

θ_{6-7} θ_{7-8}										gemittelte θ		Q _{Baltzar}	
	60	60	60	180	180	180	300	300	300	θ_{6-7}	θ_{7-8}	(3)	(4)
2	0,14	0,14	0,14		0,08	0,50				135,49	291,43	0,010	0,014
3		0,20	0,22			0,48		0,10		128,44	274,72	0,027	0,014
4	0,18	0,34			0,32		0,14	0,02		86,33	151,95	0,008	0,012
5		0,12	0,52			0,10			0,26	43,24	292,78	0,030	0,019

Tabelle 4.3.16). Für die Diastereomere **2** und **4** werden vergleichbar gute Qualitätsfaktoren gefunden. Dies ist unerwartet, da die beiden Diastereomere unterschiedliche Relativkonfigurationen an C₇ und C₈ besitzen. Im nächsten Schritt werden daher weiterhin alle Relativkonfigurationen untersucht, und nicht, wie im Falle von Syntheseprodukt A, eine der beiden Varianten ausgeschlossen.

Die Beschreibung durch den gemittelten Diederwinkel $\theta_{H_6-H_7}$ liefert das gleiche Ergebnis. Die beste Beschreibung ist durch **2** und **4** möglich (siehe Schritte (3) und (4) in Tabelle 4.3.17). Die Qualitätsfaktoren der beiden anderen Diastereomere sind jedoch in ähnlichen Größenordnungen. Auch durch Betrachtung der aus NOE-Daten bestimmten Abstände (Tabelle 4.3.18) erweist sich kein Diastereomer als besser zur Beschreibung der experimentellen Daten geeignet.

Abschließend werden aus den gefundenen Konformerensembles der verschiedenen Minima mittels der KARPLUS-Gleichung $^3J_{HH}$ -Kopplungskonstanten berechnet und mit den experimentellen $^3J_{HH}$ -Kopplungskonstanten verglichen (siehe Abbildung 4.3.6). Dieser Vergleich liefert ebenfalls keinen weiteren Hinweis auf die Struktur des Syntheseproduktes B.

Es ist somit trotz umfassender Betrachtung der RDC- und NOE-Daten nicht gelungen, eine Zuordnung zu treffen. **5** scheint etwas benachteiligt zu sein, während **2** und **4** die experimentellen Daten etwas besser beschreiben, aber die Unterschiede der Qualitätsfaktoren sind sehr klein und weisen keine deutliche Präferenz für eines der Diastereomere auf.

Tabelle 4.3.18: Vergleich der Minima aus Schritt (4) mit NOE-Daten. Aufgeführt sind die Populationen der für den Fit verwendeten idealisierten Strukturen.

θ_{6-7} θ_{7-8}										gemittelte θ		Q _{Cornilescu}
	60	60	60	180	180	180	300	300	300	θ_{6-7}	θ_{7-8}	
2	0,14	0,14	0,14		0,08	0,50				135,49	291,43	0,303
				0,39	0,20			0,41		222,68	140,86	0,231
3		0,20	0,22			0,48		0,10		128,44	274,72	0,321
				0,67				0,15	0,18	209,51	57,05	0,240
4	0,18	0,34			0,32		0,14	0,02		86,33	151,95	0,281
		0,28	0,20					0,52		356,04	193,90	0,239
5		0,12	0,52			0,10				68,35	289,49	0,287
	0,05	0,47						0,48		3,96	177,32	0,222

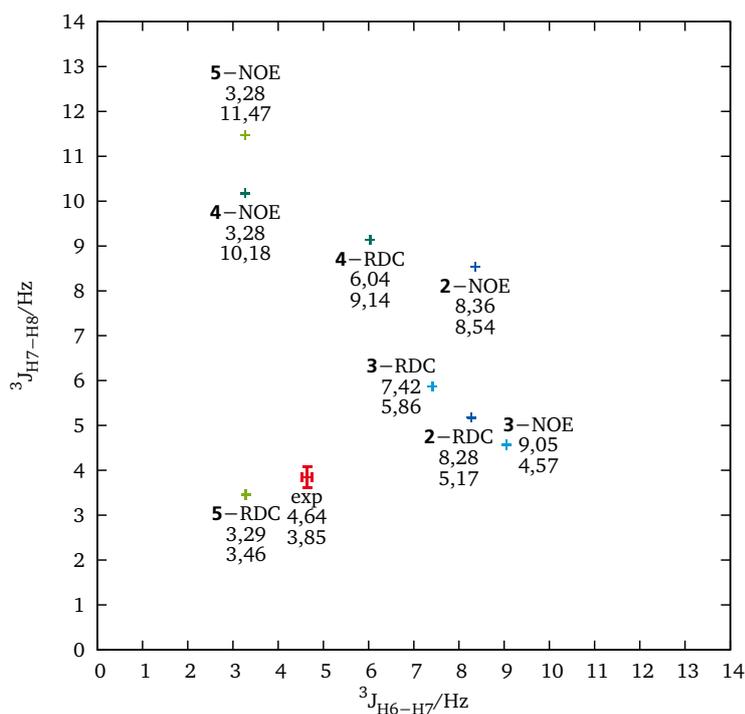


Abbildung 4.3.6: Vergleich der experimentellen Kopplungskonstanten mit aus der KARPLUS-Beziehung bestimmten Kopplungskonstanten. Für die KARPLUS-Beziehung wurden die in Abschnitt 3.4.1 genannten Parameter genutzt.

4.3.3.4 Syntheseprodukt C

Syntheseprodukt C zeigt bei Raumtemperatur einen Überlapp der ^1H -Signale von H_6 und H_8 . Dies verhindert die Extraktion von Kopplungen aus dem HETLOC und von NOE-Abständen zu diesen Protonen. Aus dem CLIP-HSQC können Kopplungen bestimmt werden, da der Signalüberlapp in der ^{13}C -Dimension nicht vorhanden ist. Bei Raumtemperatur können so vier relevante RDC extrahiert werden. Dies ist nicht ausreichend, um einen Tensor zu bestimmen. Besonders ungünstig ist die Tatsache, dass der Überlapp an zwei der drei zu bestimmenden Stereozentren vorhanden ist.

Es wurde daher versucht, den Überlapp durch Temperaturniedrigung zu beseitigen. Dies gelang bei 235K, allerdings führte dies für die anisotrope Probe zu einer Verstärkung der Orientierung. Die dadurch veränderten totalen Kopplungskonstanten führten zu ineffizienten Magnetisierungstransfers und veränderten Relaxationsverhalten. Im HETLOC waren daher keine Kopplungen sichtbar. So konnten erneut nur Kopplungen aus dem CLIP-HSQC gewonnen werden, es wurden so drei RDC gemessen. Auch dies reicht nicht aus, um einen Tensor zu bestimmen.

Aus den NOE-Spektren bei 300 K konnten sieben Abstände gewonnen werden. Diese beinhalten keine Abstände zu H_6 oder H_8 , sodass fraglich ist, ob ein Multi-Konformer-Fit zu einem sinnvollen Ergebnis führt. Dieser findet sich in Tabelle 4.3.19 und zeigt, dass die beste Beschreibung für **5** gefunden wird. Die Unterschiede der Qualitätsfaktoren sind allerdings sehr klein. Erneut kann keine Zuordnung getroffen werden.

Tabelle 4.3.19: Die per MCST-Fit gefundenen Minima für Syntheseprodukt C. Aufgeführt sind die Populationen der optimierten Strukturen im Minimum des Qualitätsfaktors.

optimiert		2	3	4	5
$\theta_{H_6-H_7}$	$\theta_{H_7-H_8}$	NOE	NOE	NOE	NOE
60	60				0,21
60	180				
60	300			0,39	0,32
180	60		0,55		
180	180	0,12			0,14
180	300	0,27		0,09	
300	60	0,61	0,45		
300	180			0,18	0,33
300	300			0,34	
$\theta_{H_6-H_7, \text{mittel}}$		243,10	237,48	338,54	33,11
$\theta_{H_7-H_8, \text{mittel}}$		49,30	70,50	268,34	206,60
$Q_{\text{Cornilescu}}$		0,186	0,174	0,179	0,170

4.3.3.5 Syntheseprodukt D

Für Syntheseprodukt D liegen, wie schon für Produkt C, zu wenig relevante RDCs vor, sodass keine Auswertung erfolgen kann. Dies liegt nicht an Signalüberlapp, sondern an der Zersetzungsanfälligkeit des Produktes D. In der Zeit, die benötigt wird, um ein HETLOC zu messen, tritt signifikante Zersetzung auf. Es konnten nur Kopplungen aus dem CLIP-HSQC gewonnen werden, da dieses Spektrum deutlich weniger Messzeit benötigt.

Für die NOE-Spektren trat das gleiche Problem auf. Die Mischzeitserien benötigen ebenfalls zu viel Zeit, sodass auch hier signifikante Zersetzung vorlag. So konnten keine Abstände aus NOE-Daten bestimmt werden. Es konnten somit keine Informationen zu Syntheseprodukt D gewonnen werden.

4.3.3.6 Fazit

In diesem Abschnitt wurden umfangreiche NOE- und RDC-Untersuchungen an den Syntheseprodukten A-D beschrieben. Dabei gestaltete sich die Zuordnung als schwierig, sodass keine eindeutige Bestimmung der Relativkonfiguration eines der Syntheseprodukte möglich ist.

Im Falle des Syntheseprodukts A ergeben sich für die beiden unterschiedlichen RDC-Sätze zwei unterschiedliche Zuordnungen (5 oder 4). Bei beiden RDC-Sätzen ist aufgrund der kleinen Unterschiede der Qualitätsfaktoren und der schlechten Übereinstimmung der NOE- und RDC-Daten nicht möglich zu beurteilen, welche der beiden Zuordnungen korrekt ist oder ob eine andere Relativkonfiguration richtig ist.

Für das Produkt B sind die Qualitätsfaktoren der RDC-Beschreibung für alle Strukturen sehr gut, sodass erneut keine Unterschiede der Qualitätsfaktoren vorhanden sind. Gleiches gilt für die NOE-Daten, hier scheinen die Diastereomere 2 und 4 leicht bevorzugt zu sein. Die Unterschiede sind aber minimal, sodass erneut keine Zuordnung getroffen werden kann.

Für Syntheseprodukt C wird die beste Beschreibung der NOE-Daten für **4** gefunden, allerdings kann aufgrund zu weniger experimenteller Daten ebenfalls keine Aussage getroffen werden. Dies gilt auch für Produkt D, das sich als zersetzungsanfällig erwies.

Als Konsequenz dieser Ergebnisse wurde von MANOLIKAKES ET AL. versucht, die Relativkonfiguration der Syntheseprodukte A-D durch Röntgenstrukturanalyse aufzuklären^[43]. Dabei wurde folgende Zuordnung getroffen: Syntheseprodukt A entspricht **4**, Produkt B stellt **2** dar, Produkt C wird durch **5** beschrieben, und Syntheseprodukt D entspricht **3**. Dies bedeutet, dass das Stereozentrum an C₇ durch die Wahl von **9** entschieden wird: Wird *E*-**9** genutzt, ist die Relativkonfiguration der Stereozentren C₇ und C₈ *R,S*. Analog führt *Z*-**9** zur Relativkonfiguration *R,R*. Das Stereozentrum an C₆ wird abhängig von der Wahl des Nukleophils **10** und den Reaktionsbedingungen aufgebaut. So ergibt sich in lewissauren Bedingungen mit R = H (siehe Schema 2.1.2) das Stereozentrum zu *R*, im basischen mit R = Met dagegen *S* (wenn C₈ = *S*).

Der Vergleich der Zuordnungen aus der Röntgenstrukturanalyse mit den NOE- und RDC-Daten zeigt, dass die korrekte Zuordnung jeweils eine der bevorzugten Möglichkeiten darstellt. Gleichzeitig stößt die Methode der kombinierten NOE- und RDC-Auswertung bei den Diamiden **2-5** an ihre Grenze, da die hohe Flexibilität und die unbekannt Relativkonfiguration durch die geringe Anzahl von NOE- und RDC-Daten nicht mehr ausreichend beschrieben werden kann.

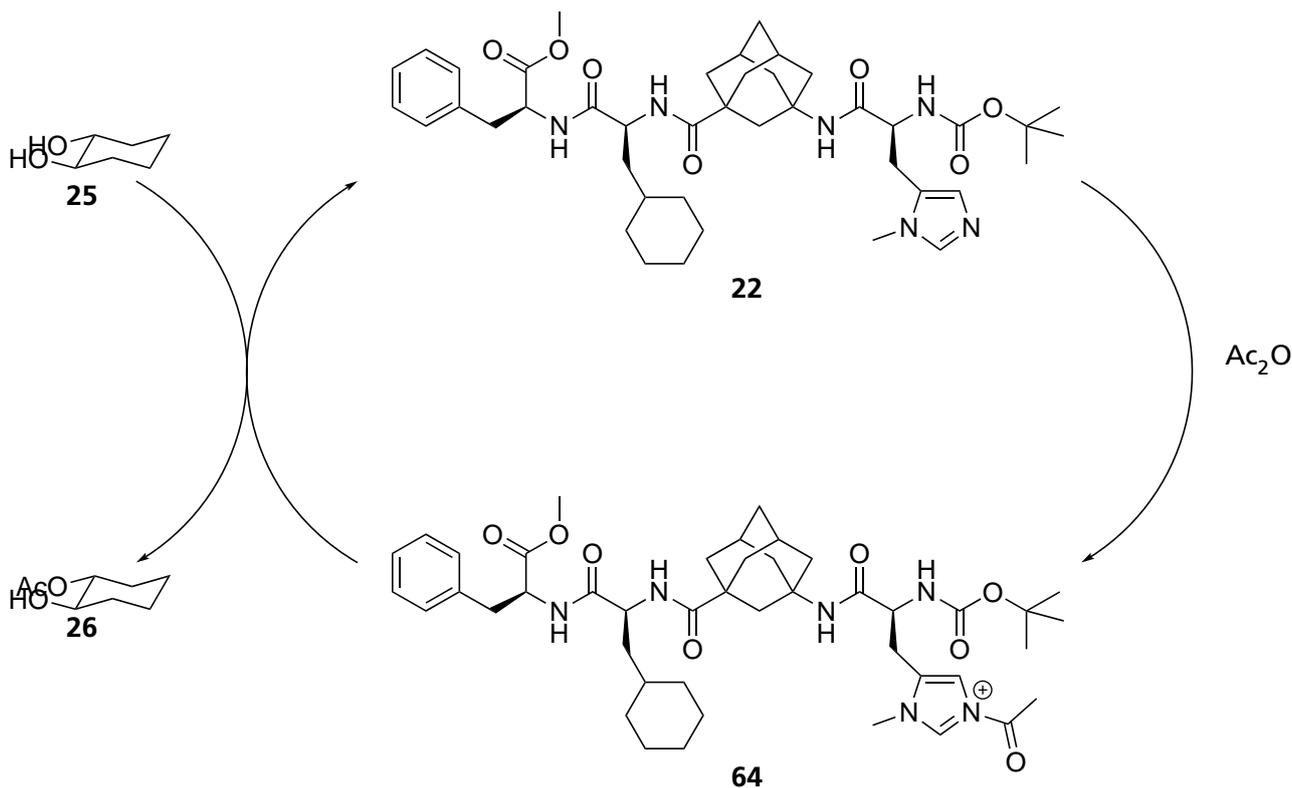
Im Rahmen dieser Dissertation ist dieses Ergebnis in zweierlei Hinsicht wichtig. Erstens zeigt dieser Abschnitt die Grenzen der Methode auf. Zu hohe Flexibilität kombiniert mit zu wenig experimentellen Daten führt hier zu keiner eindeutigen Zuordnung. Zweitens wurde trotz dieser Probleme keine falsche Zuordnung getroffen. Dies zeigt, dass die Methode robust ist, und dass sie innerhalb ihrer Grenzen korrekte Ergebnisse liefern sollte.

Im nächsten Abschnitt wird weiter versucht, die Grenzen der Methode auszuloten. Dazu wird ein Molekül untersucht, dessen Flexibilität noch höher ist als die der Diamide **2-5**, das dafür aber bekannte Relativkonfigurationen besitzt.

4.3.4 Untersuchung der Selektivität der katalysierten enantioselektiven Acylierung

Das Tetrapeptid Boc-L-(π -Me)-His-^AGly-L-Cha-L-Phe-OMe **22** kann als Organokatalysator zur enantioselektiven Acylierung von *trans*-Cyclohexan-1,2-diol **25** zu **26** genutzt werden^[47] (siehe Schema 2.3.2). Zur Erklärung der Selektivität dieser Reaktion wurde ein Mechanismus postuliert (siehe Schema 4.3.2), der auf einer Acylierung des Intermediats **64** am nichtmethylierten tertiären Stickstoff des (π -Me)-His basiert^[47,51]. Eine ebenfalls postulierte Präorganisation dieses Intermediats **64** (siehe Abbildung 4.3.7) führt dann bei Annahme eines frühen Übergangszustandes (HAMMOND-Postulat^[208]) zur beobachteten Selektivität dieser Reaktion.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit^[209] wurde versucht, spektroskopische Einblicke in den Verlauf dieser Reaktion und Hinweise auf eine Präorganisation von **22** in Lösung zu finden. Dazu wurden Abstände aus ROE-Spektren in CD₂Cl₂ sowie RDC in CD₂Cl₂/PBDG bestimmt und ausgewertet. Es konnte keine Übereinstimmung der experimentellen Daten mit den vorgeschlagenen Strukturen gefunden werden. Es ist jedoch anzumerken, dass aus Zeitgründen nicht alle möglichen Kombinationen der vorgeschlagenen Konformere ausprobiert werden konnten. Außerdem war die Qualität der experimentellen Daten,



Schema 4.3.2: Postulierter Verlauf der enantioselektiven Acylierung^[47].

besonders der Abstände aus ROE-Daten, ausbaufähig. Der wichtigste Ansatzpunkt ist ein Wechsel des Lösemittels vom verwendeten CD_2Cl_2 zu Toluol, da in der Zwischenzeit Orientierungsmedien entwickelt wurden, die mit Toluol kompatibel sind^[150,210].

Die außergewöhnlich hohe Komplexität dieses Problems entsteht durch die mehrfache Unterbrechung von Kopplungspfaden, häufigen Signalüberlapp und vor allem durch die vermutete Flexibilität des Moleküls. Aufgrund des schnellen Austausches, der weit voneinander entfernten Molekülteile und der als niedrig angenommenen Anzahl extrahierbarer Informationen wird die kombinierte NOE-RDC-Auswertung angewendet.

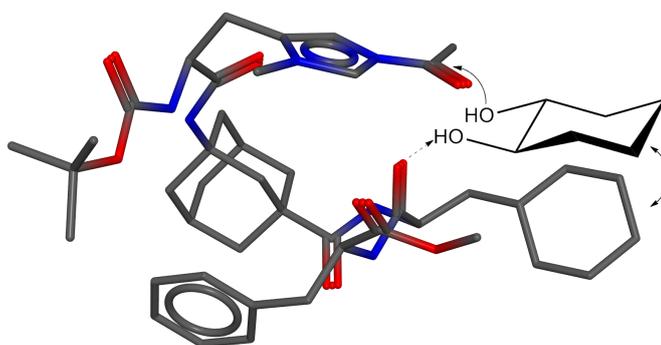


Abbildung 4.3.7: Der von SCHREINER ET AL. postulierte Übergangszustand^[47].

4.3.4.1 Zusammenfassung der experimentellen Daten

Da die beobachtete Selektivität der Reaktion im Lösemittel Toluol bei -20°C besonders hoch ist, soll die Untersuchung der Reaktion ebenfalls unter diesen Bedingungen stattfinden. Daher wurde das Tetrapeptid **22** in Toluol- d_8 gelöst und die Probe unter Vakuum verschlossen. Bei 700 MHz wurde eine Serie von ^1H -Experimenten durchgeführt, die den Temperaturbereich von 300 K bis 230 K abdeckt. Diese ist in der Abbildung 4.3.9 gezeigt.

Es ist auffallend, dass die Signale des Tetrapeptids **22** durch Temperaturniedrigung deutlich breiter werden, und ab etwa 260 K nicht mehr sichtbar sind. Besonders für den Bereich der Protonensignale von H_2 , H_8 und H_{26} , der in Abbildung 4.3.10 vergrößert dargestellt ist, ist dieses Problem deutlich sichtbar. Diese Rückgrat-Protonen sind für die Aufklärung der Konformation von höchster Wichtigkeit. Um NOE- und RDC-Daten von diesen Protonen zu erhalten, werden die Messungen bei 300 K durchgeführt.

Die Intensität der bei 700 MHz erhaltenen NOE-Signale ist allerdings extrem gering, was dafür spricht, dass sich das Tetrapeptid **22** bei 700 MHz nahe des Nulldurchgangs von Gleichung 3.5.28 befindet. Deshalb wird auf ROE-Spektren ausgewichen, da die Signalintensität in diesen deutlich größer ist. Es

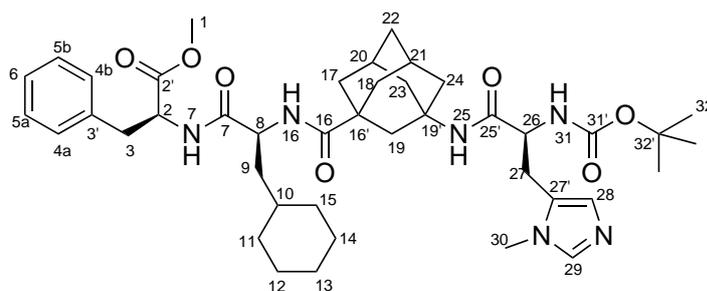


Abbildung 4.3.8: Die verwendete Nummerierung des Tetrapeptids **22**.

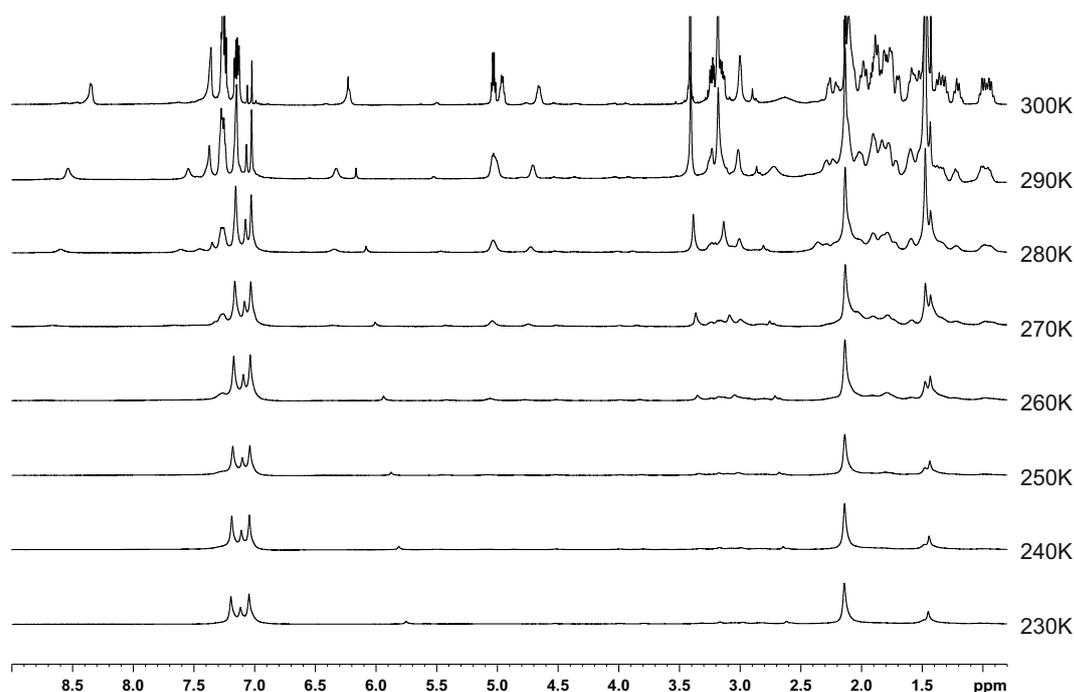


Abbildung 4.3.9: ^1H -Temperaturserie des Tetrapeptids **22** bei 700 MHz.

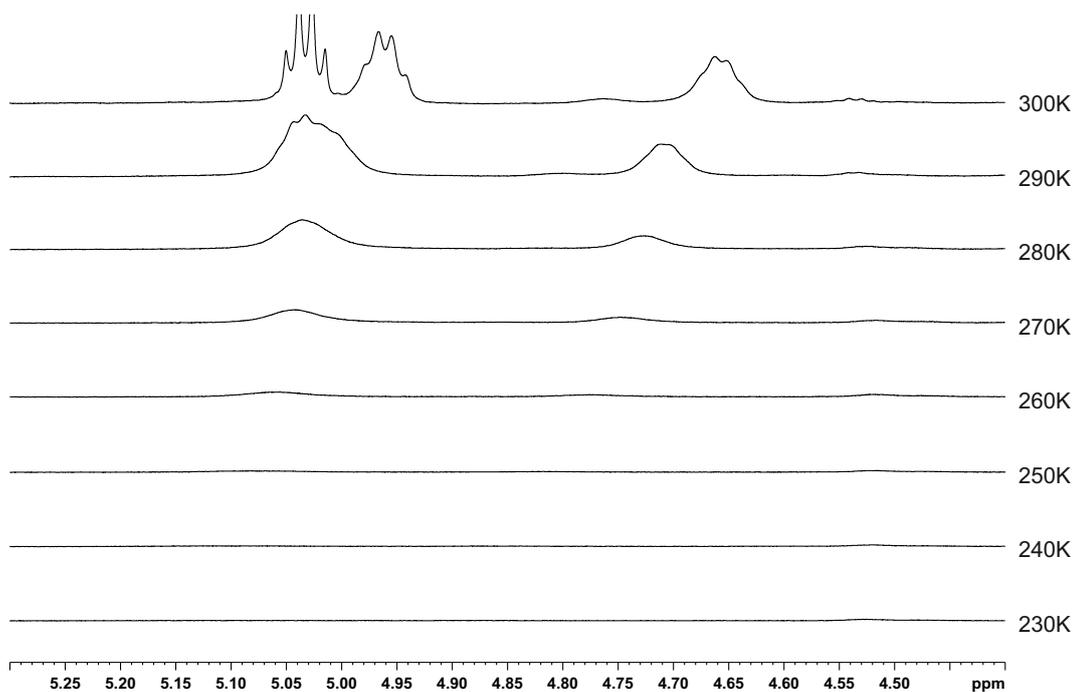


Abbildung 4.3.10: Ausschnitt der ^1H -Temperaturserie des Tetrapeptids **22** bei 700 MHz.

wurde eine Mischzeitserie von EASY-ROESY-Spektren im Bereich von 25 ms bis 400 ms in 25-ms-Schritten aufgenommen. Daraus wurden für alle Protonen Spuren in F2 extrahiert, diese wurden analog zum Vorgehen der vorherigen Abschnitte per PANIC-Methode quantifiziert. Als Kalibrationsabstand wurde $\text{H}_{3a} - \text{H}_{3b}$ ausgewählt und auf Basis der berechneten Strukturen auf $1,744 \text{ \AA}$ referenziert. Die so bestimmten Abstände sind in Tabelle 4.3.21 zusammengefasst.

Zur RDC-Bestimmung wurde ein von PÖPLER hergestelltes Gel aus quervernetztem Polystyrol^[157,210] als Orientierungsmedium gewählt. Anschließend wurden bei 700 MHz CLIP-HSQC- und HETLOC-Spektren aufgenommen. Die daraus extrahierten RDCs sowie deren per *Cross-Fitting*^[207] bestimmten Fehler sind in

Tabelle 4.3.20: Die bestimmten RDCs für das Tetrapeptid **22**.

Kopplung	RDC/Hz
$\text{C}_{29} - \text{H}_{29}$	$-19,06 \pm 1,18$
$\text{C}_{26} - \text{H}_{26}$	$20,55 \pm 2,21$
$\text{C}_2 - \text{H}_2$	$12,62 \pm 0,72$
$\text{C}_8 - \text{H}_8$	$23,95 \pm 2,27$
$\text{C}_9 - \text{H}_{9b}$	$-7,74 \pm 8,16$
$\text{C}_9 - \text{H}_{9a}$	$5,81 \pm 13,68$
$\text{C}_3 - \text{H}_{3a}$	$-7,17 \pm 4,66$
$\text{C}_3 - \text{H}_{3b}$	$4,05 \pm 3,03$
$\text{C}_{10} - \text{H}_{10}$	$-19,36 \pm 1,79$
$\text{C}_{30} - \text{N}_{29}$	$-0,07 \pm 0,29$
$\text{C}_2 - \text{H}_7$	$2,46 \pm 3,04$
$\text{C}_2 - \text{H}_{3a}$	$1,42 \pm 0,87$
$\text{C}_2 - \text{H}_{3b}$	$2,63 \pm 1,47$

Tabelle 4.3.21: Die bestimmten Abstände aus ROE-Daten für das Tetrapeptid **22**.

ROE	Distanz/ \AA	ROE	Distanz/ \AA
$\text{H}_7 - \text{H}_2$	$2,54 \pm 0,09$	$\text{H}_{31} - \text{H}_{26}$	$2,61 \pm 0,09$
$\text{H}_7 - \text{H}_8$	$2,05 \pm 0,07$	$\text{H}_2 - \text{H}_{3a}$	$2,44 \pm 0,09$
$\text{H}_7 - \text{H}_{3a}$	$2,81 \pm 0,10$	$\text{H}_2 - \text{H}_{3b}$	$2,52 \pm 0,09$
$\text{H}_7 - \text{H}_{3b}$	$2,60 \pm 0,09$	$\text{H}_8 - \text{H}_{31}$	$4,13 \pm 0,18$
$\text{H}_{29} - \text{H}_2$	$4,02 \pm 0,16$	$\text{H}_{26} - \text{H}_{30}$	$3,40 \pm 0,10$
$\text{H}_{29} - \text{H}_8$	$4,24 \pm 0,20$	$\text{H}_1 - \text{H}_2$	$4,35 \pm 0,16$
$\text{H}_{29} - \text{H}_{26}$	$3,73 \pm 0,11$	$\text{H}_{30} - \text{H}_7$	$4,19 \pm 0,15$
$\text{H}_{29} - \text{H}_{30}$	$2,81 \pm 0,08$	$\text{H}_{30} - \text{H}_{31}$	$4,70 \pm 0,15$
$\text{H}_{16} - \text{H}_8$	$2,61 \pm 0,10$	$\text{H}_{30} - \text{H}_2$	$3,53 \pm 0,10$
$\text{H}_{16} - \text{H}_{26}$	$3,42 \pm 0,14$	$\text{H}_{30} - \text{H}_8$	$4,92 \pm 0,17$
$\text{H}_{25} - \text{H}_{26}$	$2,07 \pm 0,07$	$\text{H}_{30} - \text{H}_{3a}$	$2,53 \pm 0,08$

Tabelle 4.3.20 aufgeführt. Aufgrund des Signalüberlapps sind die Fehler der RDCs C_9-H_{9a} und C_9-H_{9b} deutlich größer als die der anderen RDCs. Diese beiden RDCs werden in der folgenden Diskussion deshalb nicht verwendet.

4.3.4.2 Die verwendeten Strukturen

Die Konformationen des Tetrapeptids **22** und des Intermediats **64** wurden durch *Merck Molecular Force Field* (MMFF)-Rechnungen^[211,212] von MÜLLER und SCHREINER^[47] mit *Spartan* konstruiert. Dabei wurden jeweils 100 Startstrukturen erzeugt, optimiert und nach aufsteigender relativer Energie sortiert. Das energetisch günstigste Konformer des Intermediats **64** ist in Abbildung 4.3.7 dargestellt.

Aufbauend auf diesem Vorschlag zum Mechanismus wurden von SHINISHA ET AL. Rechnungen zu möglichen Übergangszuständen durchgeführt^[51]. Dazu wurden die beiden Enantiomere des *trans*-Diols **25** sowohl in der axial-axial- wie auch in der äquatorial-äquatorial-Konformation betrachtet. Anschließend wurde eine Geometrieoptimierung durchgeführt, dabei wurde die acylierte Methylhistidingruppe und das Diol **25** auf Dichtefunktionaltheorie (DFT)-Niveau^[213] berechnet, während das restliche Peptid auf einer niedrigeren semiempirischen PM3-Ebene^[212] behandelt wurde.

Außerdem wurden von SHINISHA ET AL. auch sechs Übergangszustände mit den Konformeren des *cis*-Diols berechnet. Der energetisch niedrigste Übergangszustand für das *cis*-Diol ist energetisch ungünstiger als der für das *trans*-Diol. Dies deckt sich mit der beobachteten Selektivität. Für jeden dieser insgesamt zwölf Übergangszustände wurde auch die Struktur des Tetrapeptids **22** im Übergangszustand berechnet.

Da sich die genannten Strukturen in der eigenen Diplomarbeit^[209] als nicht geeignet zur Erklärung der experimentellen Daten in CD_2Cl_2 erwiesen hatten, wurden weitere Strukturoptimierungen durchgeführt. Aus den energetisch günstigsten Konformeren der MMFF-Rechnungen wurden von MÜLLER und SCHREINER per DFT neue Konformere erzeugt. Dabei konnten zwei bzw. acht neue Konformere berechnet werden.

Zusätzlich wurden von FREDERSDORF mit dem Softwarepaket *Maestro* Strukturoptimierungen durchgeführt (siehe Abschnitt 6.5 für Details). Dabei wurde einmal im Lösemittel $CHCl_3$ und einmal in Vakuum simuliert. So wurden 212 (Vakuum) und 226 Konformere ($CHCl_3$) gefunden.

Die so erzeugten Sets von Konformeren werden in der Folge mit den Buchstaben A-G bezeichnet. Innerhalb jedes Sets werden die Konformere mit steigender Energie durchnummeriert.

4.3.4.3 Einzel- und Multi-Konformer-Fits

Die insgesamt 660 Konformere werden zuerst per SCST-Fit mit den experimentellen RDCs verglichen. Die zehn besten Übereinstimmungen der Konformeren-Sets A-G sind in Tabelle 4.3.22 aufgelistet. Es existieren sechs Konformere mit Qualitätsfaktoren kleiner oder gleich 0,1, davon fünf Konformere von G. Werden Konformere mit Qualitätsfaktoren kleiner als 0,15 betrachtet, werden 18 Konformere gefunden, die von allen Sätzen außer C und D stammen.

Um zu beurteilen, ob das Tetrapeptid **22** in Lösung Flexibilität aufweist, werden die RDC-Daten per MCST-Fit untersucht. Dazu werden zuerst die sechs Konformere verwendet, die im SCST die geringsten Qualitätsfaktoren aufweisen (Schritt (1) in Tabelle 4.3.23). Im Minimum des Sechs-Konformeren-Fits mit einer Schrittgröße von 5% sind nur drei Konformere populierte, sodass der daraus resultierende

Tabelle 4.3.22: Die besten Übereinstimmungen mit ROE-Daten ($Q = Q_{\text{Cornilescu}}$) und per SCST-Fit bestimmten RDC-Daten ($Q = Q_{\text{Baltzar}}$) für verschiedene Strukturvorschläge des Tetrapeptids **22**.

	MMFF 22		MMFF 64		DFT/PM3 ÜZ		DFT 64		DFT 22		Vakuum 22		CHCl ₃ 22	
	A	Q	B	Q	C	Q	D	Q	E	Q	F	Q	G	Q
RDC	72	0,100	87	0,121	3	0,154	1	0,200	1	0,112	11	0,124	7	0,056
	21	0,102	39	0,152	7	0,202	2	0,250	4	0,138	7	0,144	9	0,073
	52	0,135	38	0,153	10	0,203			7	0,163	16	0,153	6	0,080
	11	0,141	16	0,159	6	0,253			5	0,173	1	0,155	71	0,081
	59	0,153	40	0,171	8	0,277			6	0,220	3	0,162	63	0,088
	68	0,154	49	0,195	1	0,319			3	0,248	40	0,162	62	0,110
	74	0,161	52	0,207	5	0,434			8	0,260	203	0,164	4	0,122
	15	0,161	41	0,211	12	0,465			2	0,551	2	0,165	1	0,136
	90	0,162	97	0,215	2	0,481					202	0,176	11	0,139
	3	0,163	50	0,220	11	0,516					24	0,177	50	0,152
ROE	17	0,476	71	0,459	4	0,557	1	0,605	3	0,547	18	0,511	19	0,386
	90	0,488	63	0,460	9	0,576	2	0,718	1	0,553	9	0,513	12	0,515
	68	0,489	28	0,472	6	0,750			7	0,554	44	0,521	2	0,519
	52	0,497	27	0,474	11	0,761			5	0,603	125	0,523	52	0,529
	92	0,504	26	0,474	5	0,776			2	0,605	89	0,524	14	0,529
	1	0,518	47	0,475	12	0,784			6	0,614	74	0,524	17	0,530
	98	0,563	45	0,475	7	0,839			4	0,650	107	0,525	54	0,532
	3	0,565	51	0,476	10	0,859			8	1,431	22	0,525	25	0,533
	96	0,567	64	0,477	2	0,877					122	0,526	41	0,534
	48	0,575	76	0,503	8	0,903					56	0,526	42	0,537

Drei-Konformer-Fit mit kleinerer Schrittgröße (1%, Schritt (2) in Tabelle 4.3.23) in Abbildung 4.3.11 dargestellt werden kann.

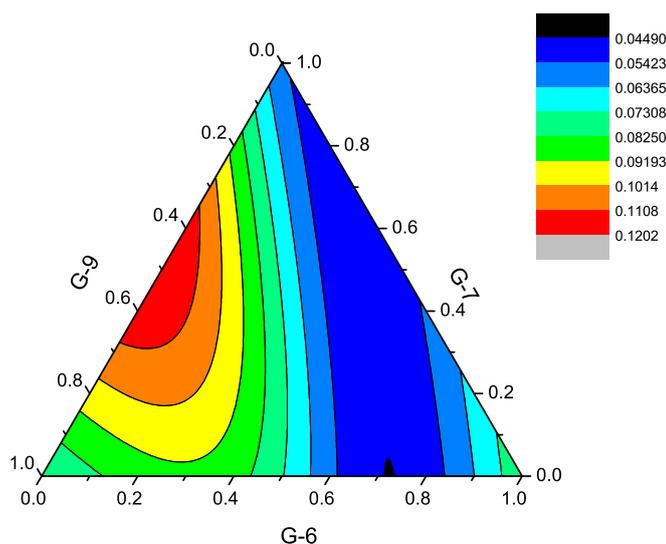


Abbildung 4.3.11: Darstellung des Drei-Konformer-Fits, der die beste per MCST-Methode gefundene Beschreibung der experimentellen Daten darstellt. Aufgetragen ist der Wert von Q_{Baltzar} in Abhängigkeit der Populationen der drei Konformere. Dabei stellt schwarz den kleinsten Qualitätsfaktor und somit die beste Übereinstimmung dar.

Tabelle 4.3.23: MCST-Fit des Tetrapeptids **22**. Aufgeführt sind jeweils die Populationen der in den Fits verwendeten Konformeren.

Schritt Schrittgröße	MCST-Fit 1				MCST-Fit 2					
	RDC		ROE		RDC				ROE	
	(1)	(2)	(7)	(9)	(3)	(4)	(5)	(6)	(8)	(10)
	0,05	0,01			0,20	0,10	0,04	0,02		
A-11					0,00					
A-21					0,00					
A-52					0,20	0,20	0,20	0,20	0,97	0,59
A-72	0,00			0,20	0,00					
B-87					0,00					0,11
E-1					0,00					
E-4					0,00					
F-7					0,00					
F-11					0,00					
G-1					0,00					0,30
G-4					0,00	0,00				
G-6	0,70	0,72	1,00	0,57	0,40	0,40	0,40	0,40	0,00	
G-7	0,05	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00			
G-9	0,25	0,28	0,00		0,20	0,30	0,28	0,28	0,00	
G-11					0,00					
G-62					0,00	0,00				
G-63	0,00				0,20	0,10	0,12	0,12	0,03	
G-71	0,00			0,23	0,00	0,00				
Q_{Baltzar}	0,045	0,045			0,043	0,042	0,042	0,042		
$Q_{\text{Cornilescu}}$			0,943	0,916					0,496	0,445

Werden alle 18 Konformere verwendet, die einen Qualitätsfaktor kleiner als 0,15 besitzen (Schritt (3)), sind in einem Fit mit 20%-Schritten acht Konformere im Minimum und in dessen Nähe populierte. Bei einer Schrittgröße von 10% können diese acht Konformere (Schritt (4)) auf fünf reduziert werden. Eine erneute Verkleinerung der Schrittgröße auf 4% (Schritt (5)) ergibt eine erneute Reduktion auf vier Konformere, deren anschließender Fit mit 2% Schrittgröße zum in Schritt (6) in Tabelle 4.3.23 aufgeführten Ensemble führt.

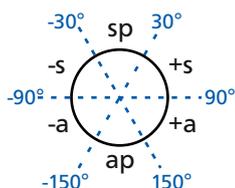
Die so gefundenen Konformerensembles werden anschließend mit den aus ROE-Daten bestimmten Abständen verglichen. Dabei stellt sich heraus, dass die Übereinstimmung in beiden Fällen schlecht ist (Schritte (7) und (8)). Eine Wiederholung der schrittweisen Reduktion der Konformerenzahl führt zu leicht besseren Qualitätsfaktoren, allerdings unterscheiden sich die Konformerpopulationen in den gefundenen Minima deutlich von denen der RDC-Minima (Schritte (9) und (10)). Zusätzlich sind die Qualitätsfaktoren weiterhin schlecht.

4.3.4.4 Schrittweiser Aufbau

Da der MCST-Fit aufgrund der vielen Konformere und Kombinationsmöglichkeiten derselben nicht praktikabel ist, wird analog zu Abschnitt 4.3.3 versucht, die Konformation des Tetrapeptids schrittweise aufzubauen. Dazu werden zuerst von den 660 Konformeren 20 Diederwinkel entlang der Hauptkette

Tabelle 4.3.24: Einteilung der Diederwinkel in Bereiche: Konformerenanzahl in den Diederwinkelbereichen.

Diederwinkel	sp	+s	+a	ap	-ap	-sp
$C_2-N_7-C_7-C_8$				660		
$N_7-C_7-C_8-N_{16}$	53	321	69	171	2	44
$C_7-C_8-N_{16}-C_{16}$		50		164	64	382
$C_8-N_{16}-C_{16}-C_{16'}$			1	659		
$N_{16}-C_{16}-C_{16'}-C_{19}$	227	79	2	27	64	261
$C_{16}-C_{16'}-C_{19}-C_{19'}$				660		
$C_{16'}-C_{19}-C_{19'}-N_{25}$				660		
$C_{19}-C_{19'}-N_{25}-C_{25'}$		566	2	36		56
$C_{19'}-N_{25}-C_{25'}-C_{26}$	1		1	635	23	
$N_{25}-C_{25'}-C_{26}-N_{31}$	128	452	26	35		19
$N_{25}-C_{25'}-C_{26}-C_{27}$		8	104	471	42	35
$C_{25'}-C_{26}-C_{27}-C_{27'}$	1	63	9	121	12	454
$C_{26}-C_{27}-C_{27'}-N_{29}$		63	123	51	332	91
$N_7-C_7-C_8-C_9$	5	44	41	339	63	168
$C_7-C_8-C_9-C_{10}$		157	7	241	20	235
$C_8-C_9-C_{10}-C_{11}$		264	138	227		31
$C_3-C_2-N_7-C_7$		36	129	424		71
$C_{3'}-C_3-C_2-N_7$	1	129		43	20	467
$C_{4b}-C_{3'}-C_3-C_2$	38	98	223	33	46	222
$C_{3'}-C_3-C_2-C_2'$		45	24	461	1	129



sowie zu den Seitengruppen bestimmt. Anschließend werden diese in sechs Bereiche unterteilt. Es zeigt sich, dass die Bindungen unterschiedlich flexibel sind: Für den Diederwinkel $C_2-N_7-C_7-C_8$ weisen alle Konformere Werte im Bereich ap auf (zur Nomenklatur siehe Tabelle 4.3.24), während zum Beispiel für den Diederwinkel $N_7-C_7-C_8-C_9$ alle sechs Bereiche möglich sind. In Tabelle 4.3.24 sind alle Diederwinkel zusammengefasst.

Es stellt sich heraus, dass manche Konformere mehrfach vorliegen, dass also alle 20 Diederwinkel in die gleichen Bereiche fallen. So reduzieren sich die 660 auf 476 Konformere. Dies verkleinert den zu untersuchenden Konformationsraum etwas. In der Folge wird daher nur jeweils ein Konformer pro Diederwinkelbereich betrachtet.

Für den schrittweisen Aufbau wird das Tetrapeptid **22** in zwei Bereiche unterteilt: Die Phe-Cha-Seite, und die His-Seite. Begonnen wird mit der Phe-Cha-Seite. Der erste Schritt umfasst vier Diederwinkel des Rückgrats (siehe Tabelle 4.3.25). Für diese vier Diederwinkel existieren 17 unterschiedliche Diederwinkelbereichskombinationen, also 17 zu untersuchende Konformere. Diese 17 Konformere werden mit *WEEDHEAD* mit sechs Distanzen der Phe-Cha-Seite verglichen. Die beste Beschreibung der experimentellen Daten, die durch den kleinsten Qualitätsfaktor ausgedrückt wird, wird bei vier populierten Konformeren gefunden (siehe Schritt (1) in Tabelle 4.3.25). Diese besitzen die folgenden Diederwinkelbereiche: B-94 ap/ap/-s/ap, G-116 ap/+a/-a/ap, G-124 ap/ap/-a/ap, G-133 ap/+a/-s/ap (die Reihenfolge der Diederwinkelbereiche entspricht der Reihenfolge der Diederwinkel in Tabelle 4.3.25).

Für Schritt (2) werden daher nur Konformere berücksichtigt, deren Diederwinkelbereiche für die Rückgratbindungen eines dieser vier populierten Konformere entsprechen. Wird ein weiterer Diederwinkel hinzugefügt, der zur β -Position des Phe zeigt, ergeben sich so zehn Möglichkeiten. Im Minimum sind

Tabelle 4.3.25: Schrittweiser Aufbau der Phe-Cha-Seite des Tetrapeptids **22**. Aufgeführt sind jeweils die Populationen der in den Fits verwendeten Konformeren. Verwendete Diederwinkel: (1) $C_2-N_7-C_7-C_8$, $N_7-C_7-C_8-N_{16}$, $C_7-C_8-N_{16}-C_{16}$, $C_8-N_{16}-C_{16}-C_{16'}$; (2): (1) + $C_3-C_2-N_7-C_7$; (3): (2) + $C_{3'}-C_3-C_2-N_7$; (4): (3) + $N_7-C_7-C_8-C_9$, $C_7-C_8-C_9-C_{10}$, $C_8-C_9-C_{10}-C_{11}$; (5): wie (4). Verwendete Distanzen: (1)-(4): H_7-H_2 , H_7-H_8 , H_7-H_{3a} , H_7-H_{3b} , H_2-H_{3a} , H_2-H_{3b} ; (5): (1) + $H_{16}-H_8$

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
A-92				0,11	0,12	0,12	0,50
B-3			0,40				
B-10				0,30	0,29	0,30	0,00
B-17				0,42	0,41	0,40	0,00
B-94	0,13	0,13	0,01				
F-171		0,33					
G-116	0,05						
G-124	0,30						
G-133	0,52	0,54	0,59	0,17	0,18	0,18	0,50
$Q_{\text{Cornilescu}}$	0,097	0,074	0,072	0,045	0,069		
Q_{Baltzar}						0,275	0,046

nun nur noch drei Konformere populiert, und die Beschreibung der ROE-Daten verbessert sich durch die Berücksichtigung dieser zusätzlichen Flexibilität. Die drei Konformere besitzen die folgenden Diederwinkelbereiche: B-94 ap/ap/-s/ap/-s, F-171 ap/+a/-a/sp/sp (die ersten vier Diederwinkel entsprechen G-116), G-133 ap/+a/-s/ap/ap.

Analog wird für Schritt (3) ein Diederwinkel hinzugefügt, der zur γ -Position des Phe zeigt. Im Minimum sind erneut nur drei Konformere populiert, und erneut wird die Beschreibung der ROE-Daten etwas besser. Für Schritt (4) werden drei Diederwinkel hinzugefügt, zu den β - γ und δ -Positionen des Phe. Nun sind vier Konformere populiert, und erneut verbessert sich die Beschreibung der ROE-Daten. Abschließend wird ein zusätzlicher Abstand hinzugefügt (Schritt (5)). Die Konformerenpopulationen im Minimum ändern sich nur geringfügig, aber die Beschreibung der ROE-Daten wird geringfügig schlechter.

Das so gefundene Konformerenensemble wird als nächstes per MCST-Fit mit RDC-Daten verglichen (Schritt (6)). Dazu werden die in Tabelle 4.3.20 aufgeführten RDC-Daten außer $C_{29}-H_{29}$, $C_{26}-H_{26}$ und $C_{30}-N_{29}$ genutzt, also insgesamt acht RDCs. Der Qualitätsfaktor der Populationen des ROE-Ensembles ist hoch, allerdings ist es möglich, durch Variation der Populationen zu einem Ensemble zu gelangen, das die RDC-Daten gut beschreibt (Schritt (7)).

Dieses Vorgehen wird für die His-Seite des Tetrapeptids **22** wiederholt. Im ersten Schritt werden zwei Diederwinkel des Rückgrats mit einem Abstand verglichen. Für die Diederwinkelbereiche gibt es insgesamt neun Kombinationsmöglichkeiten, zu denen Konformere vorhanden sind. Im Minimum ist allerdings nur eines populiert, das die Anordnung ap/+a besitzt (siehe Schritt (1) in Tabelle 4.3.26).

Anschließend werden drei weitere Diederwinkel hinzugefügt, die die Orientierung des His-Ringes beschreiben. Hierfür gibt es acht Möglichkeiten, von denen drei im Minimum populiert sind: A-26 ap/+a/-a/+s/+s, A-51 ap/+a/-a/+s/+a, G-170 ap/+a/-a/-s/-a. Der Qualitätsfaktor ist allerdings sehr schlecht, was daran liegt, dass der Abstand $H_{29}-H_{26}$ nur unzureichend beschrieben werden kann. Mit den vorhandenen Strukturen lässt sich dieser Abstand nicht erklären. Er wird daher in Schritt (3) weggelassen, was zu einem deutlich besseren Qualitätsfaktor führt. Ob dieser Abstand experimentell

Tabelle 4.3.26: Schrittweiser Aufbau der His-Seite des Tetrapeptids **22**. Aufgeführt sind jeweils die Populationen der in den Fits verwendeten Konformeren. Verwendete Diederwinkel: (1) $C_{16'}-N_{25}-C_{25'}-C_{26}$ $N_{25}-C_{25'}-C_{26}-N_{31}$; (2): (1) + $N_{25}-C_{25'}-C_{26}-C_{27}$ $C_{25'}-C_{26}-C_{27}-C_{27'}$ $C_{26}-C_{27}-C_{27'}-N_{29}$; (3): wie (2). Verwendete Distanzen: (1): $H_{25}-H_{26}$; (2): (1) + $H_{29}-H_{26}$, $H_{31}-H_{26}$, $H_{29}-H_{30}$, $H_{26}-H_{30}$, $H_{31}-H_{30}$; (3): (2) - $H_{29}-H_{26}$

	(1)	(2)	(3)
A-23	1,00		
A-26		0,20	0,39
A-51		0,75	0,56
G-170		0,05	0,05
$Q_{\text{Cornilescu}}$	0,048	0,169	0,053

schlecht bestimmt ist, oder ob die Beschreibung durch die vorhandenen Strukturen unzureichend ist, lässt sich nicht beurteilen.

Ein Vergleich mit RDC-Daten ist für den His-Teil nicht möglich, da für diesen nur drei RDCs vorliegen. Stattdessen werden im nächsten Schritt die beiden Teile des Tetrapeptids **22** zusammengefügt.

Dazu werden die vier Konformere des Phe-Cha-Teils und die drei Konformere des His-Teils mit den bisher genutzten ROE-Daten verglichen (siehe Schritt (1) in Tabelle 4.3.27). Der kleinste Qualitätsfaktor wird erreicht, wenn drei Konformere populiert sind, allerdings ist die Übereinstimmung für das gesamte Tetrapeptid **22** etwas schlechter als bei den einzelnen Teilen.

Werden in Schritt (2) weitere Distanzen hinzugefügt, die die beiden Teile des Tetrapeptids **22** verbinden, so sind erneut drei Konformere populiert, darunter zwei des ersten Schrittes. Der Qualitätsfaktor ist deutlich schlechter als zuvor, was darauf zurückzuführen ist, dass die bestimmten experimentellen Abstände zwischen den beiden Molekülteilen deutlich kleiner sind als die aus den Strukturen gemittelten Abstände. Die Strukturen stimmen also nicht mit den experimentellen Abständen, die die beiden Molekülteile verbinden, überein.

Für diesen Befund existieren zwei mögliche Ursachen. Erstens ist es möglich, dass die experimentellen Abstände fehlerbehaftet sind, da sie ausnahmslos langreichweitige ROE-Kontakte darstellen. Zweitens ist es möglich, dass das gefundene Konformerensemble nicht der Realität entspricht, da es einen Teil der experimentellen Daten nicht beschreiben kann.

Um dies zu beurteilen, werden die sieben Konformere des gefundenen Ensembles auf Konsistenz mit RDC-Daten überprüft. Dazu werden nun alle RDCs verwendet. Der niedrigste Qualitätsfaktor wird gefunden, wenn vier Konformere populiert sind, nämlich exakt die vier Konformere, die auch die beiden

Tabelle 4.3.27: Verbindung des Phe-Cha-Teils und des His-Teils des Tetrapeptids **22**.

	ROE		RDC
	(1)	(2)	
A-26	0,44	0,05	0,36
A-92	0,20	0,54	0,36
B-10		0,41	0,06
B-17	0,36		0,22
$Q_{\text{Cornilescu}}$	0,068	0,472	
Q_{Baltzar}			0,035

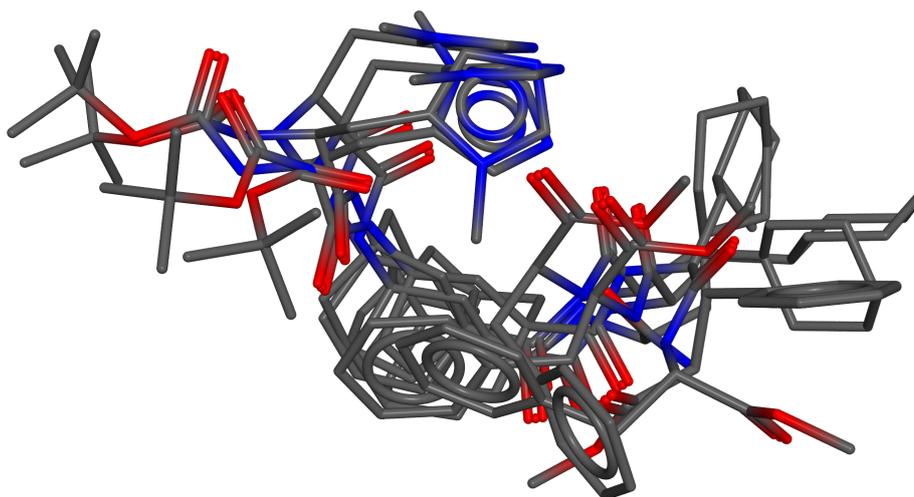


Abbildung 4.3.12: Die vier im Minimum populierte Konformere. Strukturelemente im Uhrzeigersinn: Links oben befindet sich die Boc-Gruppe, oben in der Mitte der His-Ring. Rechts daneben der Cyclohexylring, darunter die Methoxygruppe, gefolgt vom Phenylring unten in der Mitte. Im Hintergrund, teilweise verdeckt vom Phenylring, befindet sich die Adamantylgruppe.

ROE-Minima beschreiben. Der Qualitätsfaktor ist außerdem niedriger als der, der in Tabelle 4.3.23 bestimmt wurde.

Es ist also gelungen, ein Konformerensemble zu finden, das die RDC-Daten sehr gut beschreibt. Gleichzeitig wird ein Großteil der Distanzen ebenfalls sehr gut beschrieben. Die Distanzen, die nicht gut beschrieben werden können, sind ausschließlich Distanzen, die die beiden Teile des Moleküls miteinander in Verbindung setzen sollen. Solche nicht-lokale, langreichweitige Wechselwirkungen sind durch den ROE meist deutlich schlechter beschrieben als durch RDC-Daten, die globalen Charakter besitzen. Das gefundene Konformerensemble widerspricht also keinen kurzen Distanzen und keinen RDC-Daten, sondern beschreibt diese sehr gut. Daher wird davon ausgegangen, dass das gefundene Konformerensemble eine gute Beschreibung der tatsächlichen Struktur in Lösung darstellt.

Abschließend wird das so gefundene Konformerensemble in Abbildung 4.3.12 grafisch dargestellt. Es ist zu erkennen, dass diese Konformere dem in Abbildung 4.3.7 dargestellten postulierten Übergangszustand sehr ähnlich sehen. Der His-Ring befindet sich oberhalb des Cyclohexylrings, der somit die postulierten hydrophoben Wechselwirkungen mit dem Diol **25** aufbauen kann. Außerdem befinden sich zwei Carbonylgruppen in räumlicher Nähe, sodass es auch möglich ist, dass sich die postulierten Wasserstoffbrücken bilden.

4.3.4.5 Wechselwirkungen zwischen Tetrapeptid und Diol

Nachdem ein Konformerensemble gefunden wurde, das eine dem postulierten Übergangszustand ähnliche Struktur aufweist, muss nun untersucht werden, ob sich dieses Konformerensemble durch Hinzufügen des *trans*-Cyclohexan-1,2-diols **25** verändert. Dazu wurden von KÖBERLE im Rahmen eines von mir betreuten Forschungspraktikums^[214] an einer 1:1-Mischung von **22:25** Abstände aus NOE-Daten bestimmt (siehe Abschnitt 6.5 für Details). In Tabelle 6.5.1 sind die so erhaltenen Abstände aufgelistet.

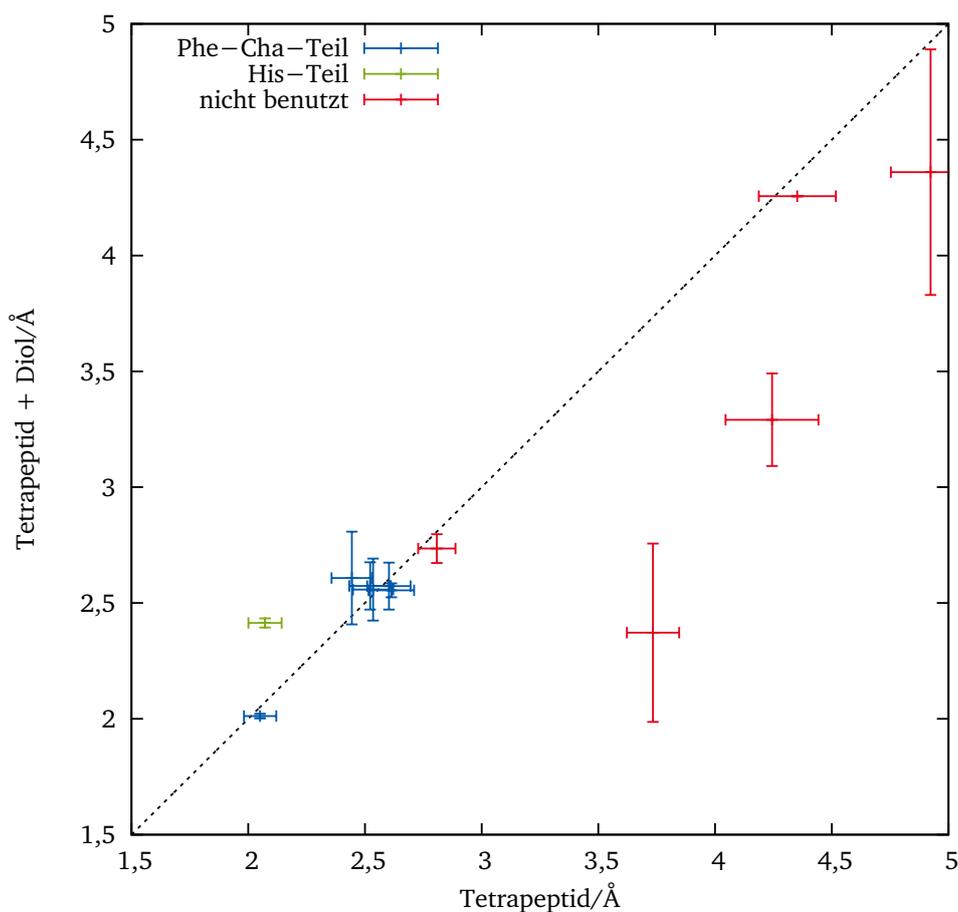


Abbildung 4.3.13: Vergleich der per NOE bestimmten Distanzen des Tetrapeptids **22** mit und ohne *trans*-Cyclohexan-1,2-diol **25**.

In Abbildung 4.3.13 sind die Abstände dargestellt, die sowohl aus den Messungen mit als auch ohne Diol **25** bestimmt werden konnten. Im Falle gleicher Struktur des Tetrapeptids **22** mit und ohne *trans*-Cyclohexan-1,2-diol **25** sollten alle Werte auf der Diagonalen liegen. Dies ist der Fall für die Werte, die für den Aufbau des Phe-Cha-Teils genutzt wurden (blau dargestellt). Von den Distanzen, die für den Aufbau des His-Teils genutzt wurden, wurde nur ein Abstand in beiden Fällen bestimmt. Dieser scheint sich etwas zu unterscheiden (grün dargestellt), allerdings war dieser etwas kürzer als der gemittelte Abstand des gefundenen Konformerensembles.

Weitere Distanzen, die in Schritt (2) der Verbindung der beiden Teile (Tabelle 4.3.27) genutzt wurden, sind rot dargestellt. Diese sind teilweise identisch, teilweise weichen sie erheblich voneinander ab. Dies spricht für eine Änderung der Struktur, allerdings konnten diese Abstände durch das gefundene Konformerensembles nicht beschrieben werden. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, ist die Verletzung solcher langreichweitigen Distanzen für das Tetrapeptid **22** zu vernachlässigen, da die RDC-Daten korrekt beschrieben werden.

Es zeigt sich also, dass sich die signifikanten Distanzen nicht oder nur geringfügig ändern. Daher ist davon auszugehen, dass sich das gefundene Konformerensembles durch Hinzufügen des *trans*-Cyclohexan-1,2-diols **25** nicht oder nur wenig ändert. Das Diol **25** sollte somit die Möglichkeit besitzen,

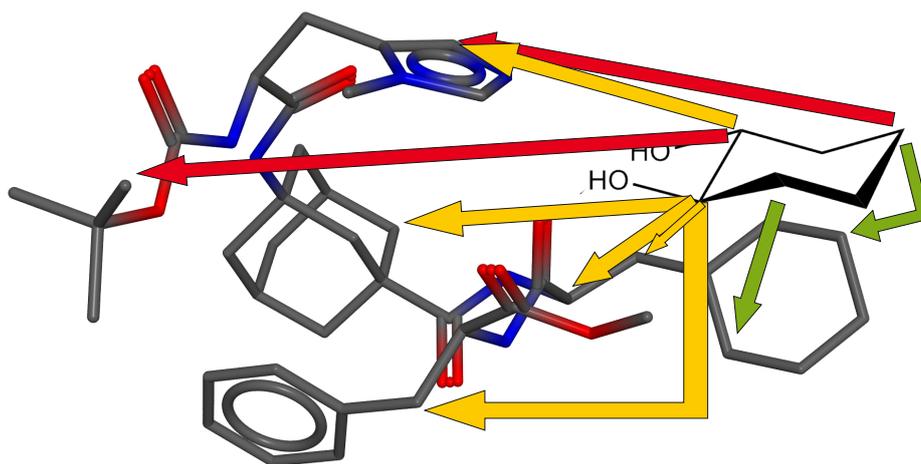


Abbildung 4.3.14: Intermolekulare NOEs zwischen Tetrapeptid **22** und Diol **25**. Grün kodiert für starke, gelb für mittlere, und rot für schwache NOE-Kontakte.

sich in die Tasche des Tetrapeptids **22** einzulagern, womit die Selektivität der Reaktion erklärt werden könnte.

Einen Hinweis auf diese Einlagerung des *trans*-Cyclohexan-1,2-diols **25** liefern intermolekulare NOE-Daten. Es konnten mehrere Abstände zwischen Diol **25** und Tetrapeptid **22** bestimmt werden. Auf eine Quantifizierung dieser Abstände wurde verzichtet, da mehrere Aspekte gegen eine Quantifizierung sprechen. Es ist nicht bekannt, zu welchen Anteilen eine Einlagerung des Diols in das Tetrapeptid stattfindet, zu welchen Anteilen also ein Komplex gebildet wird⁹. Zusätzlich tritt das Problem auf, dass unbekannt ist, ob beide Moleküle und der Komplex die gleichen Korrelationszeiten und Relaxationszeitkonstanten besitzen. Dementsprechend werden die intermolekularen NOE-Kontakte nicht quantifiziert, stattdessen werden sie halbqualitativ als stark, mittel und schwach klassifiziert. Eine Auswahl dieser halbqualitativen Abstände ist in Grafik 4.3.14 dargestellt. Grün kodiert für starke NOE-Kontakte, also kurze Abstände. Gelb symbolisiert mittlere NOE-Kontakte, also mittlere Abstände, und rot deutet schwache NOE-Kontakte und damit lange Abstände an.

Es werden kurze Abstände zwischen dem Cyclohexylring des Diols **25** und dem des Cha-Teil des Tetrapeptids **22** gefunden, die im Einklang mit den postulierten hydrophoben Wechselwirkungen sind. Zum His-Ring werden je ein mittlerer und ein langer Abstand gefunden, die für eine Orientierung der OH-Funktionen in Richtung der Tasche und damit der Carbonylfunktionen des Tetrapeptids **22** sprechen. Zusätzlich werden weitere mittlere und lange Abstände gefunden, die ebenfalls im Einklang mit dem vorgeschlagenen Modell sind (siehe Tabelle 6.5.2). Diese wurden der Übersichtlichkeit halber nicht vollständig in Abbildung 4.3.14 dargestellt. Es ist anzumerken, dass kein Abstand gefunden wurde, der diesem Modell widerspricht.

⁹ Diese Argumentation trifft auch auf die intramolekularen Abstände des Tetrapeptids **22** zu. Auch dort ist unbekannt, zu welchem Anteil ein Abstand des Tetrapeptids **22** und zu welchem Anteil von einem Tetrapeptid-Diol-Komplex erzeugt wird. Würde sich die Struktur des Tetrapeptid-Diol-Komplexes von der des Tetrapeptids **22** unterscheiden, führte dies zu Abstandsänderungen. Diese Abstandsänderungen sind auch im Falle kleiner Populationen über den NOE detektierbar. Somit werden die intramolekularen Abstände als verlässlich beurteilt.

4.3.4.6 Fazit

Vom Tetrapeptid **22** wurden ROE- und RDC-Daten in Toluol- d_8 bestimmt. Durch schrittweisen Aufbau der zwei Molekülteile ist es gelungen, ein Konformerensemble zu finden, das sowohl die ROE- als auch die RDC-Daten beschreibt.

Die Struktur des gefundenen Ensembles entspricht der Struktur des postulierten Übergangszustandes. Diese Struktur ändert sich nicht oder nur geringfügig, wenn das *trans*-Cyclohexan-1,2-diol **25** hinzugefügt wird. Dies konnte durch Aufnahme von NOE-Daten gezeigt werden. Außerdem wurden intermolekulare NOEs gefunden, die dem postulierten Übergangszustand nicht widersprechen. Dieser die Selektivität der Reaktion erklärende Mechanismus kann also alle experimentellen Daten sehr gut beschreiben.

Für die vorliegende Dissertation ist dieses Ergebnis von großer Bedeutung. In den vorherigen Abschnitten wurde die kombinierte NOE- und RDC-Auswertung erprobt und weiterentwickelt. Nur aufgrund dieser Kombination der Stärken des kurzreichweitigen ROE und der globalen RDC konnte dieses Ergebnis erlangt und bestätigt werden. Obwohl die Flexibilität des Tetrapeptids **22** höher ist als die der bisher untersuchten Moleküle, konnte der Mechanismus verstanden und bestätigt werden.

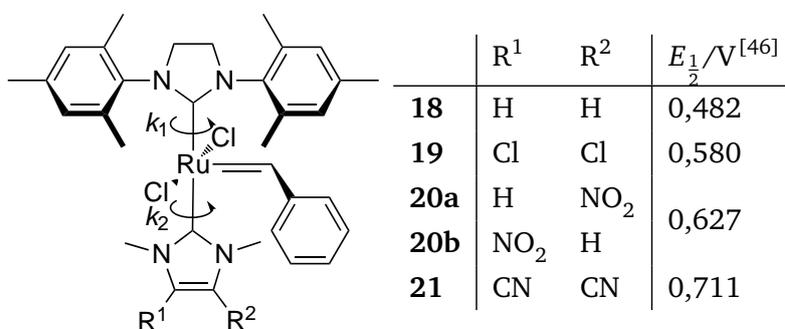
Im nächsten Abschnitt wird die quantitative Auswertung von Signalen in NOE-Spektren, die nun hinreichend erprobt ist, auf ein Problem des langsamen Austausches übertragen.

4.4 Langsamer Austausch: Dynamische NMR-Untersuchungen an Bis-NHC-Komplexen

Der Inhalt dieses Abschnitts ist bereits veröffentlicht:

A. Kolmer, L. Kaltschnee, V. Schmidts, L. H. Peeck, H. Plenio, C. M. Thiele, *Magn. Reson. Chem.* **2013**, 51 (11), 695–700.

Die Klasse der Bis-NHC-Komplexe ist eine vielversprechende Klasse an Präkatalysatoren für die Olefinmetathese sterisch anspruchsvoller Substrate. Die Komplexe **18**, **19**, **20** und **21** wurden von PEECK und PLENIO hergestellt^[46]. Die Bis-NHC-Komplexe tragen je zwei NHC-Liganden. Zum einen den SIMes-Liganden, und zum anderen einen als NHC_{ewg} bezeichneten Liganden, an dem verschiedene Reste angebracht sein können, die dann die elektronenziehenden Eigenschaften des NHC_{ewg} bestimmen.



Die gezeigten Bis-NHC-Komplexe wurden außerdem per Cyclovoltammetrie hinsichtlich des Redoxpotentials des Ru-Zentralatoms charakterisiert und die katalytische Aktivität mittels einer Ringschlussmetathese-Testreaktion untersucht^[46]. Es zeigt sich, dass der Trend der katalytischen Aktivität (siehe Abbildung

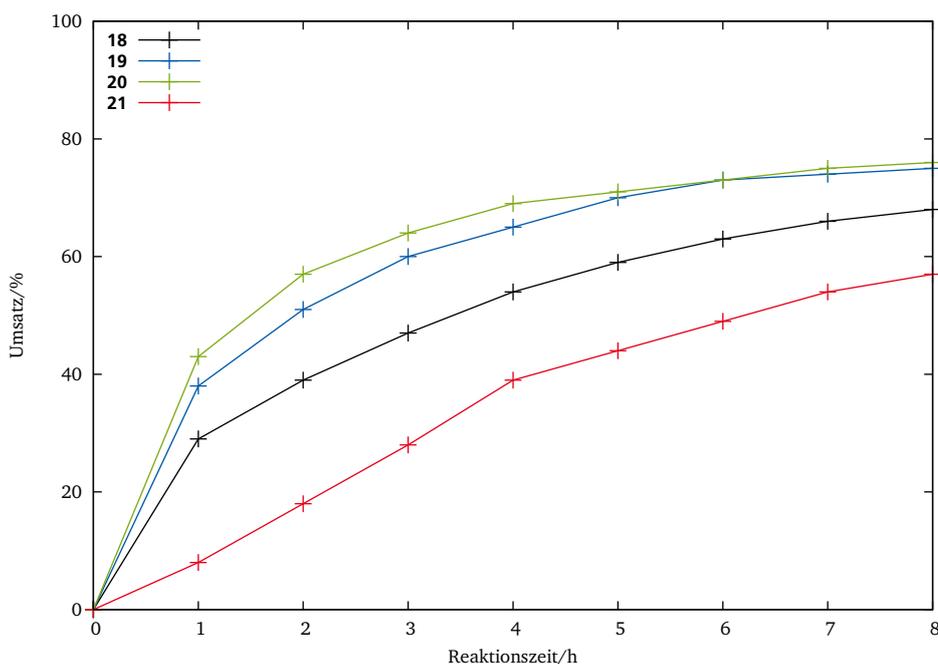


Abbildung 4.4.1: Umsatz-Zeit-Kurven der Bis-NHC-Komplexe^[46]. Es zeigt sich, dass die Initiierungsgeschwindigkeit für **18**, **19** und **20** mit zunehmendem $E_{\frac{1}{2}}$ zunimmt. Für **21**, dessen $E_{\frac{1}{2}}$ noch größer ist, ist die Initiierungsgeschwindigkeit dagegen am niedrigsten.

4.4.1) nicht dem Trend der Redoxpotentiale entspricht, sodass weitere Untersuchungen zum Verständnis der katalytischen Aktivität angestrebt wurden.

Der erste Schritt des Mechanismus der Olefinmetathese ist die Umwandlung des Präkatalysators in die katalytisch aktive Spezies^[215,216]. Dazu muss der NHC_{ewg} per Bindungsspaltung dissoziieren. Da als zweiter NHC stets SIMes genutzt wird, ist die katalytisch aktive Spezies im Falle der Komplexe **18-21** stets die gleiche. Sämtliche Unterschiede im katalytischen Verhalten müssen nach diesem Modell also aus dem Dissoziationsverhalten des NHC_{ewg} stammen. Dieses wiederum sollte von der Bindungsstärke der Ru-NHC_{ewg}-Bindung abhängig sein.

Daher wurden die Bindungsstärken der beiden Ru-NHC-Bindungen in der unter meiner Anleitung durchgeführten Bachelorarbeit von HAUS^[217] sowie im unter der Anleitung von SCHMIDTS durchgeführten Forschungspraktikum von KALTSCHNEE^[218] untersucht. Zuerst konnte durch qualitative Aufnahme von EASY-ROESY-Spektren^[97] gezeigt werden, dass sich beide Bindungen im Regime des langsamen Austausches befinden. Dementsprechend werden die Methoden des langsamen Austausches angewendet.

Für die Bindungsstärke der beiden Ru-NHC-Bindungen lässt sich aufgrund der *trans*-Anordnung der beiden NHC-Liganden eine kompetitive Situation vermuten, da beide π -Rückbindungen mit dem gleichen d-Orbital des Ru-Zentralatoms wechselwirken. Die σ -Bindung sollte dagegen keiner kompetitiven Situation unterliegen und wird deshalb als unverändert angenommen. Es ist also vor allem die Stärke der π -Rückbindung, die sich in den verschiedenen Komplexen unterscheidet.

Es wird postuliert, dass die π -Rückbindungsstärke im Falle der vorliegenden Übergangsmetallkomplexe ein mittels NMR zugänglicher Parameter ist: Eine Rotation um die beobachteten Ru-NHC-Bindungen sollte nicht von der Stärke der rotationssymmetrischen σ -Bindung abhängen. Wird angenommen, dass

sterische Einflüsse sowie intermolekulare Wechselwirkungen nur einen vernachlässigbaren Anteil der Bindungsrotationsbarriere darstellen, so stellt die experimentell beobachtete Rotationsbarriere um diese Bindungen ein gutes Maß für die π -Rückbindungsstärke dar. Die erforderlichen Rotationsbarrieren sind wiederum über die temperaturabhängige Messung der Austauschratenkonstanten k_1 und k_2 mittels Austauschspektroskopie zugänglich.

Im Falle des langsamen Austausches kann die Rotationsbarriere per quantitativer Austauschspektroskopie bestimmt werden. Dazu wurden die Komplexe unter Ausschluss von Sauerstoff in CD_2Cl_2 gelöst und anschließend qualitativ auf den Temperaturbereich des langsamen Austausches untersucht. Mit Hilfe von 1D PFGSE NOE-Spektren wurden dann die Rotationsbarrieren der beiden Ru-NHC-Bindungen untersucht, deren Auswertung analog zu der in den vorherigen Kapitel beschriebenen NOE-Auswertung erfolgte.

Dabei zeigte sich für die Ru-SIMes-Bindung ein den Ergebnissen der Cyclovoltammetrie vergleichbarer Trend. Da der SIMes-Ligand nicht variiert wird, sollte dessen σ -Donorcharakter gleich bleiben und sich einzig die π -Rückbindung ändern. Die von der σ -Bindung getrennte Betrachtung der π -Bindung ist somit mit dieser Methode möglich. Diese Methode kann außerdem komplementär zur Cyclovoltammetrie genutzt werden, was besonders bei nicht redoxstabilen Verbindungen hilfreich sein kann.

Für die Ru-NHC_{ewg}-Bindung zeigte sich ein Verhalten, das dem der katalytischen Aktivität entspricht. Es ist somit zum ersten Mal für diese Katalysatorklasse gelungen, einen spektroskopischen Parameter zu finden, der den Trend der katalytischen Aktivität abbilden kann.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation zeigt dieses Ergebnis die Vielseitigkeit der genauen Analyse von Signalen, die in NOE-Spektren auftreten. Somit können nicht nur im Regime des schnellen Austausches, sondern auch im Regime des langsamen Austausches wertvolle Beiträge zum Verständnis organischer Reaktionen geliefert werden.

Abdruckerlaubnis erteilt:

A. Kolmer, L. Kaltschnee, V. Schmidts, L. H. Peeck, H. Plenio, C. M. Thiele, *Magn. Reson. Chem.* **2013**, 51 (11), 695–700. Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd..

The influence of electronic modifications on rotational barriers of bis-NHC-complexes as observed by dynamic NMR spectroscopy

Andreas Kolmer,^a Lukas Kaltschnee,^a Volker Schmidts,^a Lars H. Peeck,^b Herbert Plenio^b and Christina M. Thiele^{a,*}



There has been much debate about the σ -donor and π -acceptor properties of *N*-heterocyclic carbenes (NHCs). While a lot of synthetic modifications have been performed with the goal of optimizing properties of the catalyst to tune reactivity in various transformations (e.g. metathesis), direct methods to characterize σ -donor and π -acceptor properties are still few. We believe that dynamic NMR spectroscopy can improve understanding of this aspect. Thus, we investigated the intramolecular dynamics of metathesis precatalysts bearing two NHCs. We chose four systems with one identical NHC ligand (*N,N'*-Bis(2,4,6-trimethylphenyl)imidazolynilidene (SIMes) in all four cases) and NHC_{ewg} ligands bearing four different electron-withdrawing groups (ewg). Both rotational barriers of the respective Ru-NHC-bonds change significantly when the electron density of one of the NHCs (NHC_{ewg}) is modified. Although it is certainly not possible to fully dissect σ -donor and π -acceptor portions of the bonding situations in the respective Ru-NHC-bond via dynamic NMR spectroscopy, our studies nevertheless show that the analysis of the rotation around the Ru-SIMes-bond can be used as a spectroscopic parameter complementary to cyclic voltammetry. Surprisingly, we observed that the rotation around the Ru-NHC_{ewg}-bond shows the same trend as the initiation rate of a ring-closing metathesis of the four investigated bis-NHC-complexes. Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

Supporting information may be found in the online version of this article.

Keywords: NMR; rotational barriers; EASY ROESY; dynamics; ruthenium complexes; *N*-heterocyclic carbenes

Introduction

The development of efficient precatalysts for various applications in olefin metathesis is one of the most active research fields of current organometallic chemistry. The first coordinated carbene metathesis catalyst, which was presented by Herrmann *et al.* in 1998,^[1] had two *N*-heterocyclic carbene (NHC) ligands. Because the dissociation of the NHC ligands is slow and the complexes thus showed only modest catalytic activity, these bis-NHC-systems had little impact in catalysis.^[2] The main focus of the research, therefore, turned to systems with a single NHC and an easily dissociable ligand, such as the Grubbs second-generation complex^[3] or Hoveyda-Grubbs systems,^[4] which possess better catalytic activity than bis-NHC-systems.^[5]

In the case of ring-closing metathesis (RCM) of sterically hindered olefins, Plenio and co-workers recently showed that unsymmetrical bis-NHC-complexes can show superior yields compared to the Grubbs second-generation system and the Hoveyda-Grubbs systems.^[6,7] The key to success is to use precatalysts that bear an electron-rich saturated NHC ligand (SIMes) and an unsaturated NHC with electron-withdrawing groups (NHC_{ewg}).

It is widely accepted that the NHC ligand is a σ -donating ligand, but its π -accepting ability has long been disputed.^[8–11] We hope that the present study, in which we propose to use rotational barriers from dynamic NMR spectroscopy as complementary parameter, may help to improve the understanding of this bonding situation in NHC complexes.

If we assume that a π -back-donation exists, the *trans* arrangement of the two NHC ligands (Fig. 1) suggests a competitive

bonding situation of the ligands, because the electron density of a *d*-orbital of ruthenium is thought to be needed for both the π -back-donation to the NHC_{ewg} and to the SIMes. By using this simple model, the electron-withdrawing ability of the NHC_{ewg} should influence the electron density available for the π -back-donation to the SIMes, and vice versa. This consideration – in full analogy to the one presented by Bielawski^[11] – is sketched in Fig. 2.

To quantify the electron-withdrawing ability of the NHC_{ewg}, cyclic voltammetry can be used to determine the redox potential of the central ruthenium atom.^[7] A stronger electron withdrawal leads to more anodic Ru(II/III) redox potentials (Table 1).

To investigate the postulated competition of π -back-bonding, additional information is needed, as the redox potential obtained from cyclic voltammetry only yields information about the electronic situation of ruthenium and does not allow the partitioning of σ - and π -donation of the Ru-NHC-bonds. There are several studies that try to deduce σ - and π -contributions in transition metal-catalyzed reactions^[12] and at least one spectroscopic study covering a competitive situation of π -back-bonds:^[11] Bielawski

* Correspondence to: Christina M. Thiele, Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität Darmstadt, Petersenstrasse 22, 64287 Darmstadt, Germany. E-mail: cthiele@thielelab.de

^a Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität Darmstadt, Petersenstrasse 22, 64287 Darmstadt, Germany

^b Organometallic Chemistry, Technische Universität Darmstadt, Petersenstrasse 18, 64287 Darmstadt, Germany

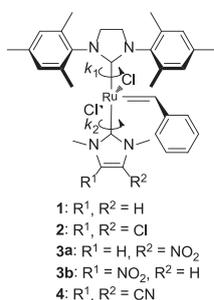


Figure 1. The structure of the four bis-*N*-heterocyclic carbene complexes and the nomenclature of the rotational barriers. The ligands SIMes and NHC_{ewg} are arranged *trans*.

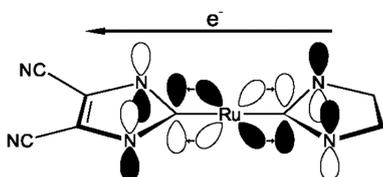


Figure 2. Basic sketch of the competitive situation of the π -back-bonds to the two NHC ligands, analogous to the model used by Bielawski *et al.*^[11]

et al. studied rhodium complexes that contained either a CO or a cyclooctadiene ligand in *trans*-position to one of the four NHC_{ewg} used in the present study (Fig. 3).^[11]

If the *trans*-related ligand is CO, as in the complexes **9–12**, then the π -back-bonding to the CO for the different electron-withdrawing NHC_{ewg} ligands should vary greatly. The strength of π -back-donation to CO can be studied easily with infrared spectroscopy based on the carbonyl stretching frequencies.^[11] The values measured by Bielawski *et al.* are listed in Table 1 and show the expected trend, so that the concept of the competitive interaction could be confirmed.^[11] Furthermore, the observed trend corresponds to the trend of the redox potential of ruthenium obtained from cyclic voltammetry.

If the *trans*-related ligand is cyclooctadiene, as in the complexes **5–8**, then the proton chemical shift of the olefinic protons

Table 1. Compilation of experimental evidence^[7,11] on the bonding situation and electron density of the respective *N*-heterocyclic carbenes.

Parameter	R = H	R = Cl	R = H, NO ₂	R = CN
	complex 1	complex 2	complex 3	complex 4
E_1 [V] ^[7]	0.482	0.580	0.627	0.711
¹ H-NMR chemical shift [ppm] ^[11]	complex 5	complex 6	complex 7	complex 8
	5.00	5.03	5.12	5.17
carbonyl stretching frequencies [cm ⁻¹] ^[11]	complex 9	complex 10	complex 11	complex 12
	2004	2010	2012	2017

can be considered as observable.^[11] The results from Bielawski *et al.* (Table 1) show a trend that is again consistent with the expectations and the previously mentioned results with the NHC_{ewg} containing CN showing the strongest, the NHC_{ewg} containing H showing the weakest electron-withdrawing ability. This trend, however, does not match the experimentally observed reactivity (see succeeding text).^[7]

So far, only the electron density at the central ruthenium atom (by cyclic voltammetry (CV))^[7] and the strength of π -back-donation to the NHC_{ewg}-opposing ligand was investigated experimentally (by ¹H chemical shifts and CO stretching frequencies).^[11] The latter has been studied in systems that indeed carried the same NHC_{ewg} as the bis-NHC-complexes **1–4** but carried only a single NHC and contained a different central atom.

Thus, there is little direct experimental evidence on σ -donor and π -acceptor portions in bis-NHC-systems.^[13]

In this investigation, we assume the σ -donating ability of the NHC ligands to remain constant (or at least its variation to be significantly less than that of π -back-bonding).^[14] If only the π -back-bonding changes significantly, leaving the σ -bond mainly unaffected, the rotational barrier should correspond to the change in π -bond strength.^[15] Therefore, in the present study, the rotational barriers of the Ru-NHC-bonds of the bis-NHC complexes **1–4** are investigated to gain direct experimental evidence on π -acceptor properties.

Methods

The analysis and quantification of rotational barriers has a long history in NMR spectroscopy.^[15,16] For many years, the only means to obtain rotational barriers was line shape analysis.^[15] A different and less error-prone way to do so is exchange spectroscopy.^[16] One has to be careful, however, if the tumbling rate of a molecule is slow, which is the case for the investigated molecules. In these cases, the sign of the nuclear Overhauser effect (NOE) changes, leading to NOE signals not being distinguishable from exchange signals. A common back door is the use of the rotating frame Overhauser effect (ROE) whose sign is different from the diagonal signal, allowing the distinction of chemical exchange and ROE for all sizes of molecules.^[17,18]

To determine a rate constant of a bond rotation from exchange spectroscopy, first the temperature range at which the exchange is slow has to be determined. Using the efficient adiabatic symmetrized ROE correlation spectroscopy (EASY ROESY) experiment,^[19] we were able to identify the temperature range of interest for each of the complexes **1–4**. For examining the exchange process, chemical sites were chosen, which do not show ROE cross peaks or measurable scalar coupling to the exchange partners.

Although quantification is possible in 2D EASY ROESY, we nevertheless chose to use the 1D pulsed field gradient spin echo (PFGSE) NOE experiment for quantification due to its shorter experimental time and the more reliable integration as compared with 2D spectra.^[20,21]

In 2D NOESY, the range of validity of the initial rate approximation^[22] can be increased by normalizing the exchange signal by division by the diagonal signal. This approach called peak amplitude normalization for improved cross-relaxation (PANIC) is of course also possible in 1D PFGSE NOE spectra and then uses the integral of the inverted spin for normalization.^[23] Recording multiple spectra with different mixing times, the rate constant

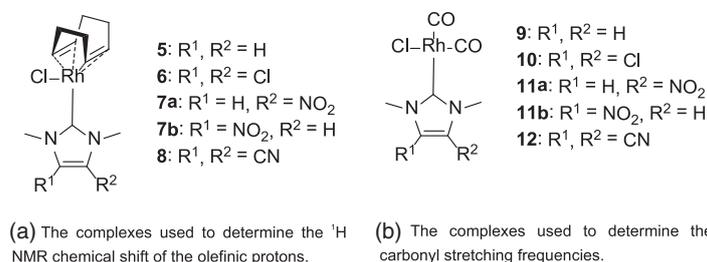


Figure 3. The structure of the complexes used by Bielawski *et al.* to study the electron-withdrawing ability of the NHC_{ewg} and the postulated competitive π -back-bond-situation.^[11] (a) The complexes used to determine the ^1H -NMR chemical shift of the olefinic protons. (b) The complexes used to determine the carbonyl stretching frequencies.

of exchange k , in this study of the rotation, is determined from the corresponding slope of a plot $\ln(\text{exchange})/\ln(\text{inverted})$ versus mixing time.

To determine the rotational barrier ΔG^\ddagger from the rate constant of rotation k_r ^[24] we use one of the results of transition state theory, the Eyring Eqn. 1. Because of the symmetry of the complexes investigated (except for complex **3**, see succeeding text), a rotation around one of the Ru-NHC-bonds leads to an interchange of the methyl groups *syn* and *anti* to the Ru=CHPh unit leading to indistinguishable rotamers. Thus, every transition state leads to the same product, which is one of the assumptions for the validity of the Eyring Eqn. 1.

$$\ln\left(\frac{k^*h}{k_B^*T}\right) = -\frac{\Delta G^\ddagger}{R^*T} \quad (1)$$

The Eyring Eqn. 1 can be rewritten to a linearized form:

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = -\frac{\Delta H^\ddagger}{R^*T} + \ln\frac{h}{k_B} + -\frac{\Delta S^\ddagger}{R} \quad (2)$$

Therefore, the plot of $\ln\frac{k}{T}$ versus $\frac{1}{T}$ should give a straight line. From the slope and the intercept of this line, we can then calculate the rotational barrier ΔG^\ddagger at 300 K using the Gibbs Eqn. 3:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T^*\Delta S^\ddagger \quad (3)$$

Results and Discussion

Figure 4 shows the corresponding PANIC-plot for k_{2a} and k_{2b} for **4** at 290 K. The slope of this plot determined by linear regression is the rate constant k_{2a} and k_{2b} , respectively. To determine k_2 , both *N*-methyl groups 2a/2b (Fig. 5) corresponding to k_{2a} and k_{2b} are inverted in separate measurements. To determine k_2 , the arithmetic means of k_{2a}/k_{2b} was formed.

For k_1 , an analogous procedure was applied. Here, we studied the *para*-methyl groups 1a/1b of the mesityl residues. The investigated temperature range for the four complexes spans from 270 to 305 K. For each temperature, the plots for k_{1a} , k_{1b} , k_{2a} , and k_{2b} are given in the supporting information, the values of the rate constants k_1 and k_2 and their experimental uncertainty are listed in Table 2.^[25]

We first obtained a linearized Eyring plot for each rate constant using Eqn. 2, as shown in Fig. 6. All linearized Eyring plots are

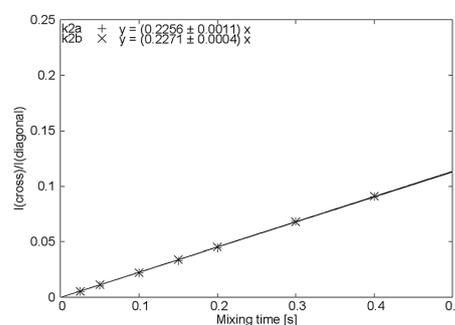


Figure 4. The peak amplitude normalization for improved cross-relaxation (PANIC) plot for k_{2a}/k_{2b} of complex **4** at 290 K. k_2 is determined by averaging, as explained in the text. Selective inversion is undertaken for both methyl groups 2a (+) and 2b (x) in separate measurements.

given in the supporting information. As can be seen, the plot shows a straight line, which is in accordance with the expectation. Therefore, from the slope and the intercept of these plots, we can calculate ΔG^\ddagger at 300 K using the Gibbs Eqn. 3, the resulting values are listed in Table 3.

For the NHC_{ewg} bearing one H and one NO_2 group, two rotamers can be seen in the NMR spectra (**3a** and **3b**, identical ratio (within experimental error) from integration (60.6/39.4 = 1.54) and from k_{2a}/k_{2b} (~1.58)). For the RCM, those two rotamers cannot be distinguished. Therefore, we determined a population averaged mean of the results from both rotamers. The averaged results are $\Delta_1 G^\ddagger = 77.09 \pm 0.10 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ and $\Delta_2 G^\ddagger = 78.88 \pm 0.06 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$, respectively. This joint value for **3** is used in the following discussion.

Previous studies of carbonyl stretching frequencies, proton chemical shift, and the redox potential^[7,10] all showed a clear trend. For the rotation around the Ru-SiMe₃-bond (activation barrier $\Delta_1 G^\ddagger$), we found a behavior similar to the chemical shift, the redox potential and the carbonyl stretching frequencies. We interpret this result as indication for π -back-bonding.^[14]

Figure 7 contains a plot of $E_{1/2}$ against the rotational barrier $\Delta_1 G^\ddagger$, which shows that the correlation is excellent. Therefore, it should be possible to use the rotational barrier as an alternative to characterize the properties of an electron-withdrawing ligand, especially if other methods are not available because of the nonexistence of carbonyl ligands or available chemical shifts or if the complex is not stable for cyclic voltammetry.

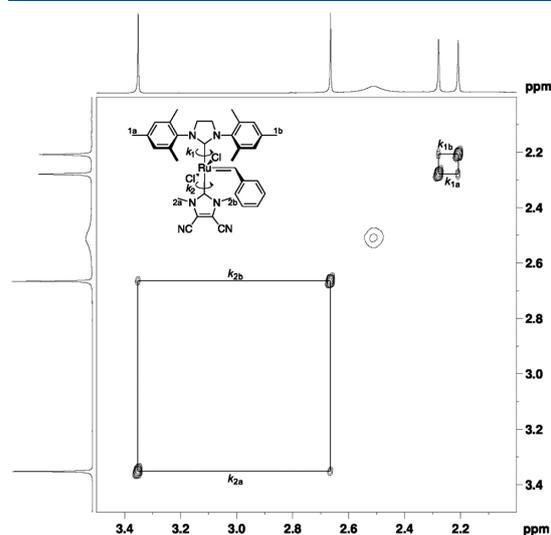


Figure 5. An efficient adiabatic symmetrized rotating frame Overhauser effect correlation spectroscopy (EASY-ROESY) of complex **4** at 290 K. The cross peaks have the same sign as the diagonal peaks; therefore, they are due to chemical exchange. Because the cross peaks are visible and baseline-separated from the diagonal signal, the temperature is in the slow exchange regime.

The linear relation cannot be observed in an analogous manner of E_2 against the rotational barrier $\Delta_2 G^\ddagger$. For the complexes **1–3**, an increase in the barrier is observed, but the rotational barrier for complex **4** is at the same level as for complex **1**. According to the model sketched in Fig. 2, from an increased E_2 , an increased rotational barrier would have been expected. These results show that the simple picture of the competing π -back-bonds must be expanded though. In this simple picture, a decrease of the Ru-NHC_{ewg}- π -bond strength should increase

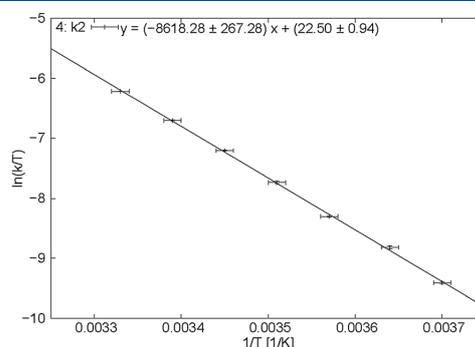


Figure 6. The linearized Eyring plot of k_2 of complex **4**.

the bond strength of the Ru-SiMes- π -bond, and vice versa. This is true for all the complexes except the cyanide complex **4**, but this exception shows that the picture is incomplete. One way to expand this picture would be to calculate the orbital coefficients and energies of the complexes. At this point, further investigations are necessary.

Much to our surprise, it turns out that the rotation barrier of the Ru-NHC_{ewg}-bond goes into the same direction as the initiation rate of the RCM of diethyldimethylallylmalonate (Fig. 8), which is the slowest for complex **4**.^[7]

If one assumes that the currently accepted mechanism of olefin metathesis^[26] is correct, then the first ligand to dissociate would be the NHC_{ewg}. Because of the previously mentioned π -back-bonding competition, it is then expected that a more electron-withdrawing NHC_{ewg} causes the system to initiate faster. The current investigation is the first one, where a trend of a spectroscopic parameter is observed, which parallels the observations from reactions for complex **4**. It needs to be mentioned here, that it is by no means clarified yet, whether the mechanistic picture is complete. Factors like aggregation, re-coordination of the ligand, or more complicated mechanistic scenarios are neglected in the current investigation.

Table 2. All determined rate constants of bond rotations. The corresponding peak amplitude normalization for improved cross-relaxation (PANIC) plots are given in the supporting information

		1	2	3a	3b	4
$k_1 \cdot 10^3 \left[\frac{1}{s} \right]$	305	149 ± 24	272 ± 9	399 ± 20	324 ± 35	
	300	86 ± 14	167 ± 11	289 ± 10	203 ± 17	507 ± 10
	295	45 ± 18	98 ± 7	173 ± 4	121 ± 12	303 ± 4
	290		62 ± 9	97 ± 15	74 ± 3	178 ± 4
	285					102 ± 3
	280					56 ± 4
	275					31 ± 7
	270					19 ± 8
$k_2 \cdot 10^3 \left[\frac{1}{s} \right]$	305	1172 ± 14	493 ± 1	241 ± 10	147 ± 6	
	300	742 ± 5	292 ± 3	148 ± 2	93 ± 2	608 ± 2
	295	478 ± 3	164 ± 1	79 ± 3	50 ± 2	374 ± 5
	290	322 ± 16	101 ± 1	43 ± 2	28 ± 1	226 ± 2
	285	112 ± 28	55 ± 1			133 ± 2
	280		29 ± 1			76 ± 1
	275					45 ± 1
	270					25 ± 1

Complex	1	2	3a	3b	4
$\Delta_1 G^\ddagger$ [kJ/mol]	79.74 ± 0.15	78.01 ± 0.03	76.79 ± 0.03	77.54 ± 0.10	75.25 ± 0.14
$\Delta_2 G^\ddagger$ [kJ/mol]	74.24 ± 0.04	76.61 ± 0.09	78.42 ± 0.06	79.59 ± 0.06	74.79 ± 0.12

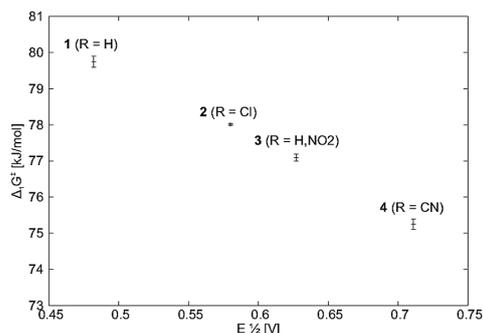


Figure 7. The plot of the rotational barrier $\Delta_1 G^\ddagger$ (Ru-SIMes) against $E_{1/2}$ of the four bis-*N*-heterocyclic carbene complexes shows a clear trend.^[7]

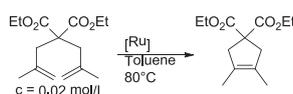


Figure 8. Ring-closing metathesis test reaction to evaluate the initiation rate of the complexes **1–4**.^[7]

Conclusion

We investigated the rotational barriers of the two Ru-NHC-bonds of four electronically differently substituted and well-characterized bis-NHC-complexes to find out whether these rotational barriers can be linked to changes in π -bond strength.

Analogous to previous studies by our group,^[18] we used exchange spectroscopy at different temperatures to quantify the rotational barriers. We first identified the temperature range of interest using the EASY ROESY experiment.^[23] With the help of the PANIC approach,^[21] we were able to extract the values of the rotational barriers from 1D PFGSE NOE spectra^[24] at various temperatures.

The rotations around the Ru-SIMes-bond follows the expected trend and gives an excellent correlation with $E_{1/2}$ from CV. Thus, the rotational barrier around the Ru-SIMes-bond can be used as an additional spectroscopic parameter, which can be helpful to characterize the properties of an electron-withdrawing ligand. We want to propose that within a system of similar ligands, this method allows a partial dissection of σ -donation and π -back-bonding.

We made the observation that the rotational barrier around the Ru-NHC_{ewg} bond of the dicyano-substituted ligand **4** does not follow the expected trend. We observed – much to our surprise – that it parallels the observed initiation rates in the RCM of diethylidimethylallylmalonate though. Whether this observation is of significance needs to be seen in the future.

Experimental

The complexes **1–4** were synthesized according to literature procedures.^[7] For each complex, approximately 10 mg were dissolved in 0.65 ml dry CD_2Cl_2 and degassed using the freeze-pump-thaw method. Afterwards, the tubes were sealed in vacuo and stored at 277 K.

All NMR experiments were recorded on a Bruker DRX 500 spectrometer at resonance frequencies of 500.15 (1H) and 125.75 MHz (^{13}C) with a Triple resonance Broadband Inverse (TBI) probe (5 mm TBI 1H/2HBB/31P Z-GRD). Temperature control was achieved with a BCU-X (above 240 K) or by evaporating liquid nitrogen (below 240 K). All spectra were recorded without sample spinning.

Assignment at low temperature was performed using 1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, and EASY ROESY^[23] spectra, which are available in the Bruker pulse sequence library. EASY ROESY spectra were recorded with 400 ms mixing time and 1 s relaxation delay for qualitative exchange/NOE mapping.

For quantitative determination of rate constants, first T_1 times were determined using the inversion-recovery method, which is also available in the Bruker pulse sequence library. The relaxation delays in the transient 1D PFGSE NOE experiment^[20] (available in the Bruker pulse sequence library as *selnopp*) were set accordingly to 15 s ($5 * T_1$ of the slowest relaxing group). For selective refocusing, a Gaussian pulse was chosen. The width of the Gaussian pulse varied between 7 and 20 Hz, depending on the width of the signal of interest and the distance to other signals. For each rate constant at each temperature, seven NOE experiments, with mixing times of 25, 50, 100, 150, 200, 300, and 400 ms respectively, were performed. The integral ratio of exchange peak to inverted peak was used (PANIC approach^[23]) for quantification. The slope of the corresponding plot led directly to the rate constant.

The precision of k_2 can be estimated from the difference of k_{2a} and k_{2b} , and from the error of the linear regression. We divided the difference of k_{2a} and k_{2b} by 2 and added the value of the larger error of the linear regression. For k_1 , an analogous procedure was applied.

The fitting with errors on both coordinates for the linearized Eyring plots was performed using Fasano-Vio fitting,^[27] assuming an error of 1 K for the temperature and using the previously determined precisions of k_1 and k_2 . From the determined slope and intercept, ΔG^\ddagger was determined via the Gibbs Eqn. 3. The precision of ΔG^\ddagger was obtained from the error of the Fasano-Vio fitting.

Acknowledgements

This work was supported by the European Research Council (ERC starting grant No. 257041) and by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) PI178/13-1.

Special thanks go to Katja Schmitz (Technische Universität Darmstadt) for the TOC graphic.

References

- [1] T. Weskamp, W. C. Schattenmann, M. Spiegler, W. A. Herrmann. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2490–2493.

- [2] a) T. M. Trnka, J. P. Morgan, M. S. Sanford, T. E. Wilhelm, M. Scholl, T.-L. Choi, S. Ding, M. W. Day, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2546–2558; b) C. Samojlowicz, M. Bieniek, K. Grela, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 3708–3742.
- [3] M. Scholl, S. Ding, C. W. Lee, R. H. Grubbs. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 953–956.
- [4] S. B. Garber, J. S. Kingsbury, B. L. Gray, A. H. Hoveyda. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8168–8179.
- [5] a) S. J. Connon, S. Blechert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1900–1923; b) G. C. Vougioukalakis, R. H. Grubbs, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1746–1787.
- [6] a) T. Vorfalt, S. Leuthäuser, H. Plenio, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5191–5194; b) L. H. Peeck, H. Plenio, *Organometallics* **2010**, *29*, 2761–2766; c) S. Wolf, H. Plenio, *J. Organomet. Chem.* **2010**, *695*, 2418–2422.
- [7] V. Sashuk, L. H. Peeck, H. Plenio. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 3983–3993.
- [8] For selected reviews on the nature of the NHC-metal bond, see: a) L. Cavallo, A. Correa, C. Costabile, H. Jacobsen, *J. Organomet. Chem.* **2005**, *690*, 5407–5413; b) S. Díez-González, S. P. Nolan, *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 874–883; c) U. Radius, F. M. Bickelhaupt, *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 678–686; d) H. Jacobsen, A. Correa, A. Poater, C. Costabile, L. Cavallo, *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 687–703.
- [9] For selected reports on NHCs as pure σ -donors, see: a) J. C. Green, R. G. Scurr, P. L. Arnold, F. G. N. Cloke, *Chem. Commun.* **1997**, *1997*, 1963–1964; b) M. Niehues, G. Erker, G. Kehr, P. Schwab, R. Fröhlich, *Organometallics* **2002**, *21*, 2905–2911; c) M.-T. Lee, C.-H. Hu, *Organometallics* **2004**, *23*, 976–983; d) S. Saravanakumar, M. K. Kindermann, J. Heinicke, M. Köckerling, *Chem. Commun.* **2006**, *2006*, 640–642.
- [10] For selected reports on non-negligible π -interactions, see: a) C. Boehme, G. Frenking, *Organometallics* **1998**, *17*, 5801–5809; b) McGuinness, N. Saendig, B. F. Yates, K. J. Cavell, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4029–4040; c) X. Hu, Y. Tang, P. Gantzel, K. Meyer, *Organometallics* **2003**, *22*, 612–614; d) R. Tonner, G. Heydenrych, G. Frenking, *Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 1555–1567; e) R. Credendino, L. Falivene, L. Cavallo, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8127–8135.
- [11] D. M. Khramov, V. M. Lynch, C. W. Bielawski. *Organometallics* **2007**, *26*, 6042–6049.
- [12] a) N. Hadei, E. A. B. Kantchev, C. J. O'Brien, M. G. Organ, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1991–1994; b) D. M. Khramov, E. L. Rosen, J. A. Er, P. D. Vu, V. M. Lynch, C. W. Bielawski, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 6853–6862; c) M. Alcarazo, T. Stork, A. Anoop, W. Thiel, A. Fürstner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2542–2546.
- [13] Note that we chose these ligands as there are no steric changes for SIMES and only insignificant steric changes for NHC_{ewg}.
- [14] We believe this assumption to be true (competing π -back bonding). It can, however, not be fully excluded that the Lewis acidity of the central atom also changes, leading to a – what believe to be a minor – change in σ -donor strength of the ligands.
- [15] H. Kessler. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1970**, *9*, 219–235.
- [16] C. L. Perrin, T. J. Dwyer. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 935–967.
- [17] D. Neuhaus, M. P. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, Wiley, Chichester, **2000**.
- [18] S. Leuthäuser, V. Schmidts, C. M. Thiele, H. Plenio. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 5465–5481.
- [19] C. M. Thiele, K. Petzold, J. Schleucher. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 585–588.
- [20] a) K. Stott, J. Keeler, Q. N. Van, A. J. Shaka, *J. Magn. Reson.* **1997**, *125*, 302–324; b) K. Stott, J. Stonehouse, J. Keeler, T.-L. Hwang, A. J. Shaka, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4199–4200.
- [21] The pulse sequence PFGSE NOE (selnopp in Bruker library) actually uses a selective refocusing of transverse magnetization of the selected spins while all others are dephased. This is then followed by a hard 90 degree pulse (on all spins). The overall effect on the selected spin is thus a net inversion. Thus we choose to use the terminology “selective inversion”.
- [22] S. Macura, R. R. Ernst. *Mol. Phys.* **1980**, *41*, 95–117.
- [23] H. Hu, K. Krishnamurthy. *J. Magn. Reson.* **2006**, *182*, 173–177.
- [24] Another way to determine ΔG^\ddagger would be to use the values of k_1 and k_2 at 300K and to use the Eyring equation 1 directly. The resulting values for ΔG^\ddagger at 300K were within the range of the error obtained by the methodology described in the text. When using the Eyring equation directly we obtained unreasonably small errors though. To provide conservative estimates for errors we chose to use the method described in the text.
- [25] In some cases, the plot shows an intercept, although, following the PANIC approach, there should be none. We assume that this could be due to imperfect selective pulses leading to a non-zero z -magnetisation at zero mixing time at the observed signal. We redid the mixing time series for k_{1b} of complex **4** at 300K on a Bruker AV-III 600 spectrometer at a proton resonance frequency of 600.40 MHz. The resulting slope of the PANIC-plot is within the error range of the value determined at 500.15 MHz, but there is no intercept. We are therefore sure that the slopes gained from the spectra recorded at 500.15 MHz are correct.
- [26] a) M. S. Sanford, J. A. Love, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6543–6554; b) J. A. Love, M. S. Sanford, M. W. Day, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10103–10109.
- [27] G. Fasano, R. Vio. *Nsl. WG Modern Astron. Meth.* **1988**, *7*, 2–7.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel der vorliegenden kumulativen Dissertation bestand darin, Beiträge zum Verständnis verschiedener Reaktionen komplexer organischer Moleküle mit moderner NMR-Spektroskopie zu leisten. Dazu wurde an verschiedenen Beispielen gezeigt, welchen Einfluss die molekulare Flexibilität auf die Wahl der passenden Methode oder Methodenkombination besitzt. Die Komplementarität von NOE- und RDC-Daten konnte dabei besonders herausgearbeitet werden. Die untersuchten Beispiele umfassten dabei drei Klassen der organischen Synthese: Photoreaktionen, katalysierte Reaktionen und Syntheseprodukte.

Für das von KOLMER-ANDERL und REHAHN entwickelte starre 2,3-Dimethylnaphtho[2,3-*g*]chinoxalin **13**^[44] konnte der Zersetzungsmechanismus unter Sauerstoff- und Lichteinfluss aufgeklärt werden. Dies gelang durch Aufnahme zeitabhängiger ¹H- und HMBC-Spektren sowie durch Vergleich der so erhaltenen chemischen Verschiebungen mit berechneten chemischen Verschiebungen. So konnte der Hauptzersetzungspfad zum Chinon **15** aufgeklärt werden. Durch Sauerstoffausschluss konnte auf die gleiche Art gezeigt werden, dass der oxidative Zersetzungsprozess unterdrückt werden kann. Stattdessen bilden sich Dimere **55**. Um auch diesen Zersetzungsprozess zu verlangsamen, wurden von KOLMER-ANDERL und REHAHN zwei weitere Stickstoffatome an den zuvor identifizierten reaktivsten Positionen eingefügt^[44]. Die Zersetzung dieses 2,3-Dimethylpyrazino[2,3-*b*]phenazins **56** wurde ebenfalls per Kombination von ¹H- und HMBC-Spektren sowie dem Vergleich chemischer Verschiebungen analysiert und stellte sich als deutlich langsamer heraus. Die erhöhte Stabilität dieser Molekülklasse ist für deren Verwendung in organischen Feldeffekttransistoren von enormer Bedeutung.

Diese Kombination von 2D-Korrelationsexperimenten und der Berechnung chemischer Verschiebungen wurde auch auf den von MÜLLER und REGGELIN synthetisierten FAST-BLUE-Vorläufer **1**^[38] angewendet. Dazu wurden zwei 1,1-ADEQUATE-Spektren von zwei verschiedenen Reaktionsprodukten aufgenommen, die durch den zusätzlichen Vergleich mit berechneten chemischen Verschiebungen als FAST-BLUE-Vorläufer **1** und das Alternativprodukt **8** aufgeklärt wurden. Für die Totalsynthese von FAST-BLUE war die Aufklärung der Produkte ein Schlüsselschritt, da nur so die Konstitution des Grundgerüsts gelöst werden konnte und so der zu FAST-BLUE führende Reaktionsweg identifiziert werden konnte.

Neben diesen Konstitutionsaufklärungen wurden am ebenfalls starren Molekül (+)-Isopinocampheol **53** in Zusammenarbeit mit KALTSCHNEE Methoden evaluiert, die die Auflösung des CLIP-HSQC-Experiments verbessern. Dazu wurden mittels BIRD-CLIP und perfectBIRD-CLIP Kopplungskonstanten und deren Fehler bestimmt. Diese Kopplungskonstanten wurden sowohl im isotropen als auch im anisotropen Medium gemessen. Die so erhaltenen RDC wurden per SCST-Methode analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass mit diesen Experimenten eine genauere Kopplungskonstanten- und RDC-Bestimmung als mit dem CLIP-HSQC möglich ist. Besonders für überlappende Signale ist diese Methode von erheblichem Vorteil, aber auch nicht-überlappende Signale profitieren vom Genauigkeitsgewinn. Ein Nachteil der Methode ist aber die niedrige Sensitivität, sodass sie trotz der höheren Genauigkeit in der Folge nicht eingesetzt wurde. Zweifellos hat diese Methode aber hohes Zukunftspotential.

Neben der Genauigkeit der RDC-Extraktion wurde auch die Genauigkeit der Extraktion von Abständen aus NOE-Daten evaluiert. Dazu wurde Strychnin **30** als Testmolekül eingesetzt. An diesem Molekül konnte durch systematischen Ausschluss der möglichen Fehlerquellen gezeigt werden, dass die von BUTTS ET AL.

postulierte Flexibilität^[109] tatsächlich vorhanden ist. Dazu wurden die experimentellen Voraussetzungen der vollständigen Relaxation und des Ausschlusses von Sauerstoff als paramagnetischem Relaxationspartner ebenso kontrolliert wie die korrekte Verwendung von ZQS und die Abwesenheit von Spindiffusion. Dies geschah durch die von EDWARDS entwickelte Simulation von Abständen unter dem Einfluss konformationeller Flexibilität mit der Software *SPINACH*, die die Interpretation unterstützten. Zusätzlich wurde die Auswertungssoftware *WEEDHEAD* entwickelt, die konformationelle Flexibilität und dessen Einfluss auf beobachtete Abstände aus NOE-Daten korrekt beschreibt. So konnten Konformerpopulationen von 98% für das Haupt- und 2% für das Nebenkonformer beschrieben werden. Gleichzeitig konnte so eine weitere postulierte Flexibilität ausgeschlossen werden. Durch Vergleich mit RDC-Daten, die per MCST bestimmt wurden, konnte außerdem gezeigt werden, dass die NOE-Analyse in diesem Fall der RDC-Analyse überlegen ist.

Im nächsten Schritt wurde die Robustheit dieser Methode an α -Methylen- γ -butyrolacton **48** getestet. Dieses Molekül besitzt neben der Ringflexibilität eine frei rotierbare Methylgruppe, deren korrekte Beschreibung ebenfalls in *WEEDHEAD* implementiert wurde. Durch die so extrahierten Distanzen konnte die per RDC-Analyse bestimmte Relativkonfiguration^[134,192] ebenso bestätigt werden wie die Konformerpopulationen. So konnte gezeigt werden, dass sowohl die NOE- als auch die RDC-Analyse das gleiche Ergebnis liefern. Eine Kombination beider Methoden wird als ideal angesehen, da so die Stärken beider Methoden genutzt werden können. Als Stärke der NOE-Analyse wird dabei die Detektion von Änderungen kurzer Distanzen angesehen, während RDC-Daten besonders bei weit voneinander entfernten Molekülteilen durch ihren globalen Charakter hilfreich sind.

Diese Kombination beider Methoden wurde für das von GÖSTL und HECHT entwickelte Dimethyldithienylcyclopenten **14**^[45] verwendet. Dieses Molekül ist flexibler als das α -Methylen- γ -butyrolacton **48**, da nun eine Ringflexibilität und eine frei rotierbare Bindung in einer pseudosymmetrischen Umgebung beschrieben werden müssen. Die Pseudosymmetrie wurde ebenfalls in *WEEDHEAD* implementiert. Durch diese in Zusammenarbeit mit FREDERSDORF durchgeführte kombinierte NOE- und RDC-Analyse der Konformerpopulationen des Dimethyldithienylcyclopentens **14** konnte die Relativkonfiguration der Cyclisierungsprodukte **16** und **17** bestimmt werden und somit eine Vororientierung von **14** in Lösung bestätigt werden.

Die konformationelle Flexibilität wird erneut gesteigert, wenn die Diamide **2-5**, deren Konfiguration und Konformation zu Beginn der Untersuchungen unbekannt waren, mit zwei frei rotierbaren Bindungen betrachtet werden. Die vier von MANOLIKAKES ET AL. hergestellten Diastereomere^[43] wurden ebenfalls per kombinierter NOE- und RDC-Analyse untersucht. Dabei erwies sich das Strukturaufklärungsproblem als zu komplex für die wenigen vorhandenen experimentellen Daten, denn für keines der Syntheseprodukte ist eine eindeutige Zuordnung der Relativkonfiguration möglich. Daher wurden die Relativkonfigurationen per Röntgenstrukturanalyse bestimmt^[43]. So zeigte sich, dass aus NOE- und RDC-Daten keine falsche Zuordnung getroffen wurde. Dies bestätigt erneut die Robustheit der Methode.

Um die Grenzen der kombinierten NOE- und RDC-Analyse zu testen, wurde das außergewöhnlich komplexe Problem des Tetrapeptids **22** untersucht, das von MÜLLER und SCHREINER zur enantioselektiven Acylierung des *trans*-Cyclohexan-1,2-diols **25** entwickelt wurde^[47]. Es gelang, die Konformation des Tetrapeptids **22** in Lösung zu bestimmen, die mit dem postulierten Mechanismus übereinstimmt. Weiterhin

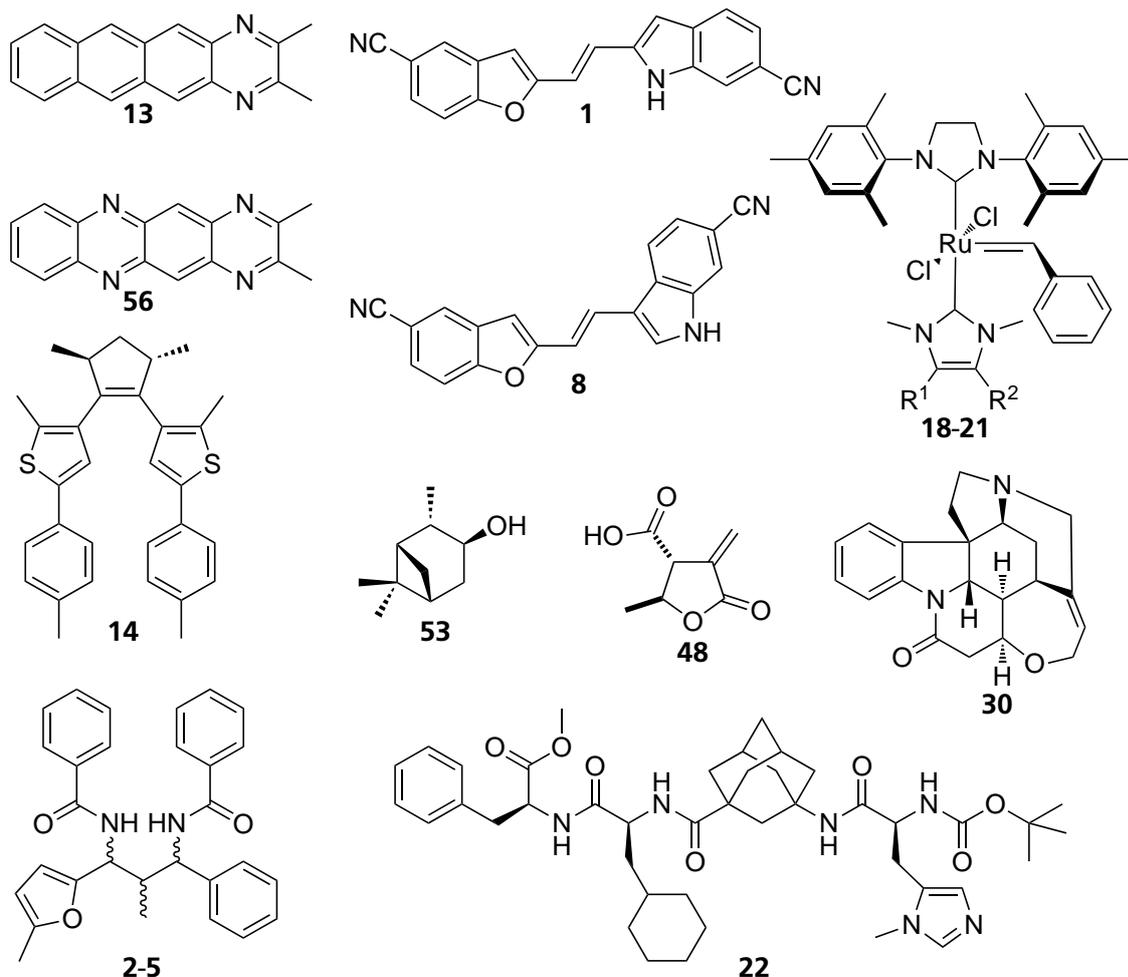


Abbildung 5.1: Die im Rahmen der vorliegenden kumulativen Dissertation untersuchten Moleküle.

wurde durch intermolekulare NOE-Kontakte gezeigt, dass sich das *trans*-Cyclohexan-1,2-diol **25** in die postulierte Tasche einzulagern scheint. Somit ist es gelungen, die Selektivität dieser Reaktion aufzuklären.

Eine weitere Reaktion, bei der Beiträge zum Verständnis der katalytischen Aktivität geliefert werden konnten, ist die Olefinmetathese der von PEECK und PLENIO synthetisierten Bis-NHC-Komplexe **18-21** [46]. Diese Komplexe wurden im Bereich des langsamen Austausches untersucht. Dabei wurde erneut die zuvor entwickelte genaue Quantifizierung von Signalen aus NOE-Spektren verwendet, um Rotationsbarrieren zu bestimmen. So gelang es erstmals, den Trend der katalytischen Aktivität durch einen spektroskopischen Parameter zu beschreiben, der außerdem komplementär zur Cyclovoltammetrie genutzt werden kann.

Durch die vorliegenden Ergebnisse konnten mehrere Erfolge erzielt werden. Erstens konnte die Genauigkeit und Anwendbarkeit der NOE- und RDC-Analyse deutlich verbessert werden. Zweitens gelang es, die Komplementarität der NOE- und RDC-Analyse an verschiedenen Beispielen zu demonstrieren. Drittens konnten dadurch verschiedene komplizierte Strukturaufklärungsprobleme aus diversen Bereichen der organischen Synthese gelöst werden (siehe Abbildung 5.1), wodurch verschiedene Struktur-Reaktivitäts-Beziehungen aufgeklärt werden konnten.

Die Strukturaufklärung organischer Moleküle profitiert nicht nur von dieser Komplementarität, sondern auch von der in dieser kumulativen Dissertation evaluierten Methode der genauen RDC-Bestimmung und der Auswertung von NOE-Daten mit der entwickelten Software *WEEDHEAD*. Besonders im Hinblick

auf die Verwendung vieler Distanzen und vieler Konformere verspricht die mit dieser Software mögliche automatisierte Analyse eine deutlich schnellere und umfangreichere Auswertung der NOE-Daten.

Die Strukturaufklärung komplexer organischer Moleküle mit NMR-Spektroskopie zum Verständnis von Struktur-Reaktivitäts-Beziehungen sollte daher dank den in dieser kumulativen Dissertation vorgestellten Entwicklungen in Zukunft effektiver und effizienter möglich sein.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeine Messbedingungen

Die Messungen wurden entweder an einem Bruker AVANCE III 600 Spektrometer mit einem 5 mm *triple-resonance broadband inverse* Probenkopf mit *z*-Gradient bei einer Protonenresonanzfrequenz von 600,4 bzw. 600,3 MHz oder einem Bruker AVANCE III-HD 700 Spektrometer mit einem inversen Vierkanalkryoprobenkopf mit *z*-Gradient bei einer Protonenresonanzfrequenz von 700,3 MHz durchgeführt. Sämtliche NMR-Spektren wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 300 K ohne Rotieren der Probe aufgenommen. Die Temperaturkontrolle erfolgte mittels einer BCU-02-Kühlung (700 MHz) oder mittels einer BCU-Xtreme-Kühleinheit (600 MHz).

Zur Messung von Kopplungskonstanten wurden die Experimente CLIP-HSQC^[69] in der von SCHMIDTS implementierten Version *hsqcetgpsp2CLIPvsz* sowie HETLOC^[72,73] aufgenommen, das in der Bruker-Pulssequenzenbibliothek als *dipsi2etgpjcsix1* hinterlegt ist.

Zur quantitativen NOE- und ROE-Bestimmung wurden zuerst mit der *inversion-recovery*-Methode T_1 -Relaxationszeitkonstanten bestimmt. Die zugehörige Pulssequenz ist als *t1ir* in der Bruker-Pulssequenzenbibliothek verfügbar. Anschließend wurde die Wartezeit zwischen den Experimenten auf $5 * T_1$ der am langsamsten relaxierenden Gruppe eingestellt, dies betrug üblicherweise 15 s. Die Messung von NOE-Daten erfolgte dann mit dem 1D PFGSE NOE-Experiment^[98–100] mit ZQS^[183–185], welches als *selnogpzs* in der Bruker-Pulssequenzenbibliothek vorhanden ist. Als selektiver Refokussionspuls wurde ein GAUSS-Puls (*Gaus1_180r.1000*) genutzt, dessen Länge abhängig von der Signalbreite auf 80 ms (9,2 Hz) oder 180 ms (4,1 Hz) eingestellt wurde. Der ZQS-Puls entspricht einem Chirp-Puls (*Crp60,20,20.10*) mit der Länge 20 ms. Mit 64 Scans führten diese Einstellungen zu einer Experimentzeit von etwa 20 Minuten pro Mischzeit, also etwa fünf Stunden pro Mischzeitserie.

Quantitative ROE-Daten wurden per EASY-ROESY^[97] bestimmt, welches in der Bruker-Pulssequenzenbibliothek als *roesyadjsphpr* zu finden ist. Dieses wurde mit 512 Inkrementen in F1 und 32 Scans je Inkrement aufgenommen, sodass eine Experimentzeit von etwa 70 Stunden pro Mischzeit nötig war.

Die Auswertung der RDC-Daten wurde mit dem von SCHMIDTS entwickelten Modul *RDC@hotFCHT*^[165] der Software *hotFCHT*^[219] vorgenommen. Die Auswertung der NOE-Daten erfolgte mit der im Rahmen dieser Dissertation entwickelten Software *WEEDHEAD*. Dabei wurde Version 0.9 verwendet (siehe Abschnitt 6.3).

Alle Chemikalien und Lösemittel wurden ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Sämtliche isotropen Proben wurden mittels der *freeze-pump-thaw*-Methode unter Vakuum verschlossen. Die anisotropen Proben wurden unter normaler Atmosphäre verschlossen. Die isotropen Proben wurden bei 277 K, die anisotropen Proben bei Raumtemperatur gelagert.

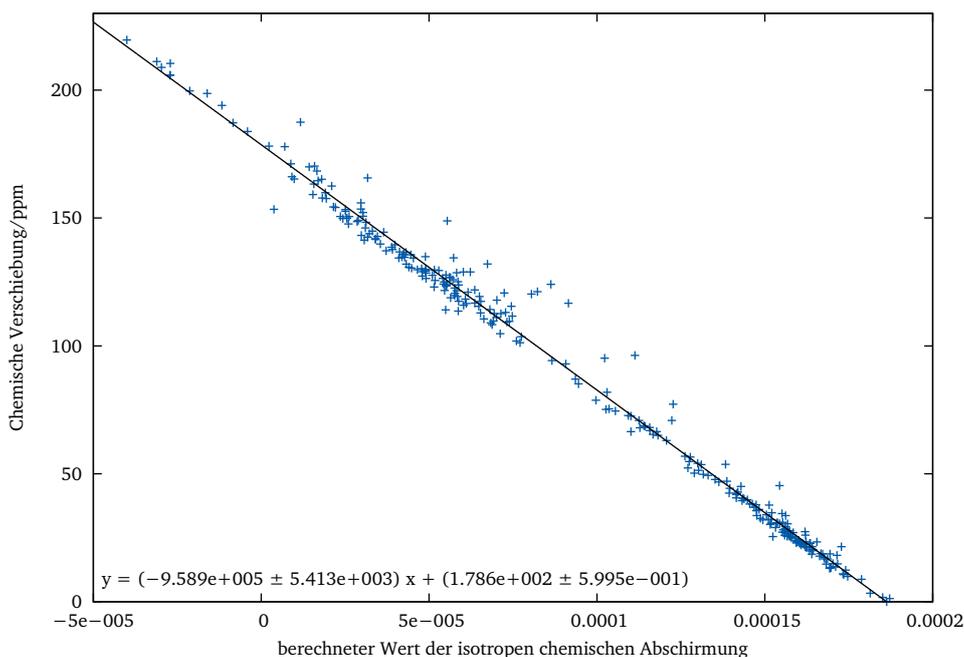


Abbildung 6.2.2: Kalibrationsgerade zur Umwandlung der isotropen chemischen Abschirmung σ_C^{iso} in ^{13}C -chemische Verschiebungen.

gen der 105 Moleküle aufgetragen (siehe Abbildung 6.2.2). Per linearer Regression kann daraus eine Kalibrationsgerade erhalten werden:

$$\delta_C = -9,589 \cdot 10^5 \sigma_C^{\text{iso}} + 1,786 \cdot 10^2 \quad (6.2.1)$$

Dabei entspricht δ_C der ^{13}C -chemischen Verschiebung. Mit Hilfe dieser Kalibrationsgleichung werden dann die σ_C^{iso} -Werte von **1** und **8** in chemische Verschiebungen umgerechnet. Die so erzeugten Werte finden sich in Tabelle 4.2.1.

6.3 Zusätzliche Informationen zu Kapitel 4.3.1

Die Auswertung der NOE-Daten erfolgte mit der im Rahmen dieser Dissertation entwickelten Software *WEEDHEAD Examines Experimental Distance Heretics from Ensemble Averaged Distances (WEEDHEAD)*. Diese ist in C geschrieben, der Quelltext ist auf http://www.chemie.tu-darmstadt.de/thiele/forschung_9/nmrspektroskopie/methoden_2/weedhead/weedhead.en.jsp sowie auf der beigelegten CD unter der Lizenz CC BY-NC-SA 4.0 verfügbar. Außerdem befinden sich auf der beiliegenden CD eine vorkompilierte Version für Linux sowie Beispiel-Eingabedateien für die in Kapitel 4.3.1 vorgestellten Untersuchungen an Strychnin **30** und α -Methylen- γ -butyrolacton **48**.

WEEDHEAD verlangt zwei Arten an Eingabedateien: Koordinatendateien und Abstandsdateien.

Die Koordinaten müssen als .xyz-Dateien vorliegen. Die Struktur der .xyz-Dateien entspricht der Konvention (siehe Schema 6.3.1). Die erste Zeile besteht aus der Anzahl der Atome (maximal werden 1024 Atome unterstützt). In der zweiten Zeile kann ein Kommentar stehen, dieser wird ignoriert. Ab der dritten Zeile folgen die Atomkoordinaten. Dazu wird in jeder Zeile ein Atomlabel definiert, gefolgt von der

x-, y- und z-Koordinate. Das Atomlabel muss aus vier Zeichen bestehen, im Zweifel müssen Leerzeichen angefügt werden. Die Reihenfolge der Atome muss in allen .xyz-Dateien identisch sein.

```

47
Strychnin major von Butts
C4      3.6711      0.8813      -0.0049
C3      4.6363     -0.0692     -0.3529
C2      4.3069     -1.4174     -0.5113
...

```

Schema 6.3.1: Ausschnitt aus einer Koordinaten-Eingabedatei von Strychnin **30**.

Als Abstandsdateien können .txt-Dateien verwendet werden (siehe Schema 6.3.2). Jede Zeile entspricht einem experimentell bestimmten Abstand (derzeit werden maximal 256 Abstände unterstützt). Dabei werden zuerst die beiden Atomlabel genannt, die denen der .xyz-Dateien entsprechen müssen. Anschließend folgt der Abstand.

```

H11b    H23b    3.596
H11b    H8      2.536
...

```

Schema 6.3.2: Ausschnitt aus einer Abstands-Eingabedatei von Strychnin **30**.

Falls Methylgruppen vorhanden sind, muss die Flag -m genutzt werden, und eine separate Abstandsdatei angelegt werden. Dessen Struktur lautet wie folgt (siehe Schema 6.3.3): Zuerst das Atom, das nicht Teil der Methylgruppe ist, und anschließend die drei Atome der Methylgruppe. Als letztes folgt erneut der experimentelle Abstand (derzeit werden maximal 256 Methylgruppenabstände unterstützt). Dabei müssen immer Dezimalpunkte genutzt werden.

```

H2      H1a    H1b    H1c    2.742
H3      H1a    H1b    H1c    2.831
...

```

Schema 6.3.3: Ausschnitt aus einer Methylgruppen-Abstands-Eingabedatei von α -Methylen- γ -butyrolacton **48**.

Dann kann *WEEDHEAD* über die Kommandozeile gestartet werden. Der Befehl lautet: `weedhead (-m) koordinaten1.xyz koordinaten2.xyz (koordinaten3.xyz ...) distanzen.txt (methyldistanzen.txt)`. Eingeklammerte Argumente sind optional, ebenso können die Dateinamen frei gewählt werden. Außerdem existiert der Befehl `weedhead -h`, um die Hilfefunktion aufzurufen.

Von *WEEDHEAD* werden dann zwei Ausgabedateien erzeugt. Alle wichtigen Informationen finden sich in der .noe-Datei (siehe Schema 6.3.4). Wenn nur Populationen und/oder Qualitätsfaktoren von Interesse sind, können diese zusätzlich in der .noe.pop-Datei gefunden werden.

Über die Kommandozeile kann bestimmt werden, wie viele Konformere bei der Berechnung berücksichtigt werden. *WEEDHEAD* unterstützt derzeit maximal 64 Konformere. Abhängig von der verwendeten Anzahl an Konformeren wird die Populationsschrittgröße automatisch angepasst. Für bis zu vier Konformere wird mit einer Schrittgröße von 1% berechnet, für fünf Konformere 2%, für sechs Konformere 4%, für sieben Konformere 5%, für acht bis zwölf Konformere 10%, für 13 bis 33 Konformere 20%, für 34 bis 57 Konformere 25%, und für mehr Konformere mit 50%-Schritten.

```

...
populations 98% 2% RMSD 0.10277 Q-Cornilescu 0.03410
Atom1 Atom2 Dist1 Dist2 DistM DistR
H11b H23b 4.101 2.108 3.635 3.596
H11b H8 2.672 2.304 2.659 2.536
...

```

Schema 6.3.4: Ausschnitt aus einer Ausgabedatei von Strychnin **30**.

Die Berechnungen erfolgen nach einem linearen Schema. Zuerst wird aus den Atomlabels der Abstandsdateien ermittelt, welche Abstände berechnet werden sollen. Anschließend werden aus den Koordinatendateien für jedes einzelne Konformer μ Abstände ermittelt:

$$r_{IS,\mu} = \sqrt{(x_{I,\mu} - x_{S,\mu})^2 + (y_{I,\mu} - y_{S,\mu})^2 + (z_{I,\mu} - z_{S,\mu})^2} \quad (6.3.1)$$

Im Falle von Methylgruppen werden so drei Abstände bestimmt. Diese werden anschließend nach Gleichung 3.5.53 gemittelt, und der so erzeugte gemittelte Abstand in der Folge verwendet.

Es folgt ein *Single-Conformer*-Vergleich. Dazu werden die experimentellen Abstände mit den aus den Koordinatendateien bestimmten Abständen verglichen und ein RMSD-Wert analog zu Gleichung 3.7.6 sowie $Q_{\text{Cornilescu}}$ analog zu Gleichung 3.7.7 bestimmt und ausgegeben.

Anschließend werden die erzeugten Abstände durch Gleichung 3.5.46 gemittelt. Die in Abhängigkeit der Schrittgröße variierenden Konformerpopulationen p_μ werden dabei durch den von SCHMIDTS und IMMEL entwickelten rekursiven Algorithmus zur Abtastung eines Populationsraumes^[165] erzeugt. Die gemittelten Abstände werden dann für jedes mögliche Konformerensemble mit den experimentellen Abständen verglichen. Erneut werden RMSD-Wert und $Q_{\text{Cornilescu}}$ bestimmt und ausgegeben.

Der jeweils niedrigste Wert von RMSD und $Q_{\text{Cornilescu}}$ wird abschließend gemeinsam mit den zugehörigen Konformerensembles ausgegeben.

Zusätzlich zu der in Abschnitt 4.3.1 beschriebenen quantitativen Auswertung von 1D-Spektren wurde an Strychnin erprobt, ob auch aus 2D-EASY-ROESY-Spektren quantitative Abstände erhalten werden können. Dazu wurde eine Mischzeitserie von EASY-ROESY-Spektren (100-400 ms in 100-ms-Schritten) aufgenommen. Danach wurden für die Protonen H_{15a} und H_{15b} aus den EASY-ROESY-Spektren Spuren in F2 extrahiert, diese wurden per PANIC ausgewertet (siehe Abbildung 6.3.1). Erneut wurde $H_{15a} - H_{15b}$ als Kalibrationsabstand eingesetzt. Die so erzeugten Werte sind in Tabelle 6.3.1 aufgeführt.

Tabelle 6.3.1: Vergleich der aus 2D-EASY-ROESY-Spektren und aus 1D PFGSE NOE-Spektren quantifizierten Abstände

Abstand/Å	EASY-ROESY	1D PFGSE NOE
$H_{15b} - H_{15a}$	$1,760 \pm 0,002$	
$H_{15a} - H_{16}$	$2,569 \pm 0,003$	$2,464 \pm 0,006$
$H_{15a} - H_1$	$4,087 \pm 0,062$	$3,734 \pm 0,065$
$H_{15a} - H_8$	$4,499 \pm 0,124$	$4,220 \pm 0,057$
$H_{15a} - H_{13}$	$2,132 \pm 0,016$	$2,188 \pm 0,006$
$H_{15b} - H_{16}$	$2,566 \pm 0,011$	$2,475 \pm 0,011$
$H_{15b} - H_{20a}$	$2,217 \pm 0,004$	$2,186 \pm 0,008$

Es zeigt sich, dass die so erhaltenen Werte bei kurzen Distanzen um etwa $0,1 \text{ \AA}$, bei längeren Distanzen bis maximal $0,35 \text{ \AA}$ voneinander abweichen. Die Genauigkeit dieser Methode wird als ausreichend beurteilt, wenn keine Quantifizierung von 1D-NOE-Spektren möglich ist. Zweifellos lässt sich die Genauigkeit durch zusätzliche Datenpunkte steigern.

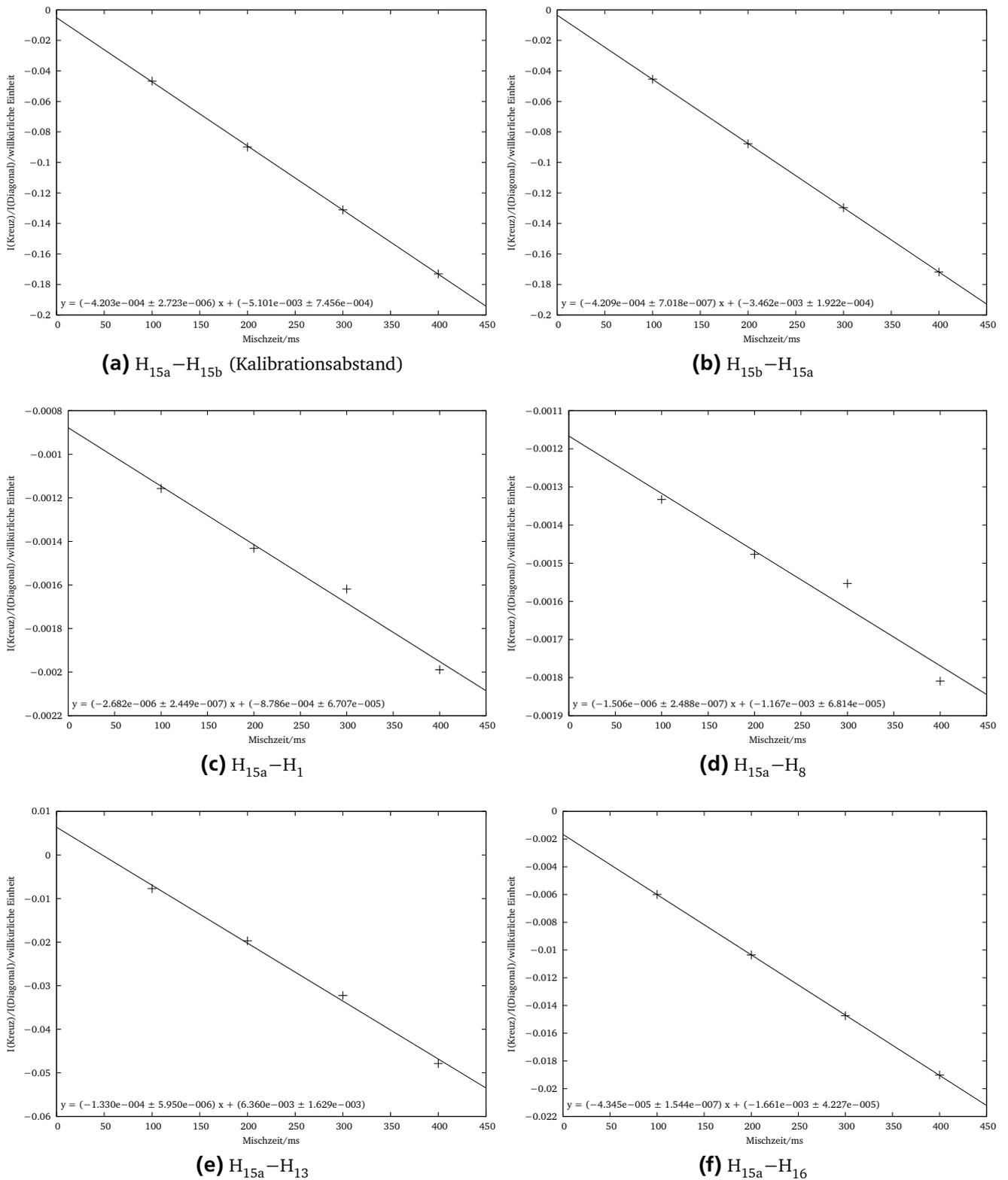
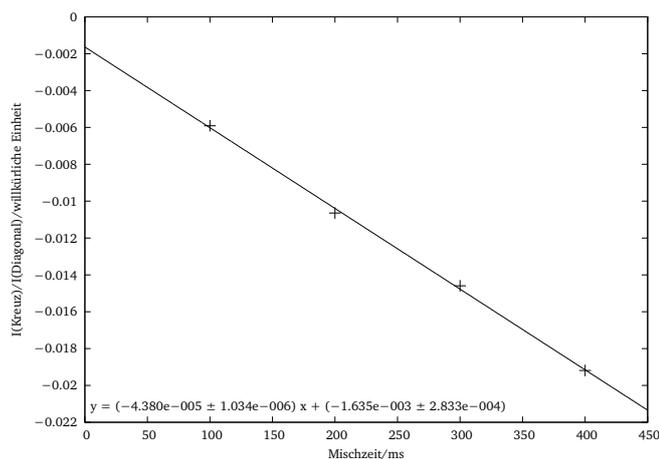
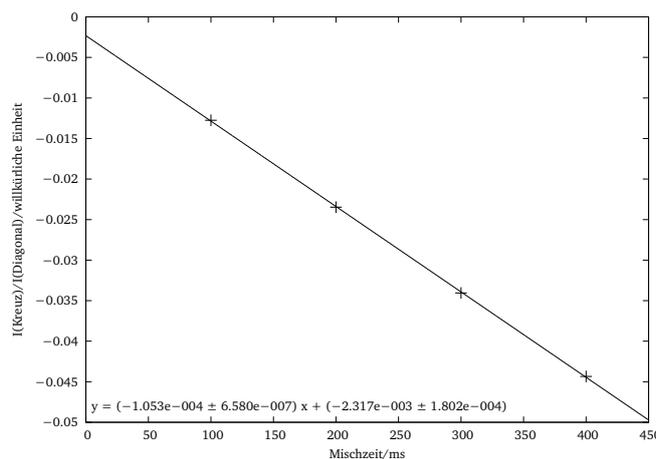


Abbildung 6.3.1: PANIC-Plots der ROE-Spektren von Strychnin 30.



(g) $H_{15b} - H_{16}$



(h) $H_{15b} - H_{20a}$

Abbildung 6.3.1: PANIC-Plots der ROE-Spektren von Strychnin 30.

6.4 Zusätzliche Informationen zu Kapitel 4.3.3

Die Koordinaten der idealisierten und optimierten Strukturen der Diastereomere 2-5 finden sich auf der beiliegenden CD. Tabellen zur Zuordnung, Kopplungskonstantenextraktion sowie zur Abstandsbestimmung per NOE sind in den Bachelorarbeiten von NOWAG^[203] und SPARKES^[204] vorhanden.

Die Einwaagen der isotropen Proben betragen für Syntheseprodukt A 14,3 mg, für B 13,2 mg, für C 8,8 mg und für D 10,2 mg, jeweils gelöst in $CDCl_3$. Die Einwaagen der anisotropen Proben betragen für Syntheseprodukt A 13,8 mg in 8,15 gew-% PBDG, für Produkt B 13,4 mg in 7,01 gew-% PBDG, für C 8,0 mg in 8,79 gew-% PBDG und für D 10,3 mg in 8,53 gew-% PBDG.

6.5 Zusätzliche Informationen zu Kapitel 4.3.4

Die Koordinaten der verwendeten Strukturen A-G finden sich auf der beiliegenden CD.

Alle Konformere der Strukturen F und G wurden von FREDERSDORF erzeugt. Dazu wurde das Modul Macromodel^[229] der Software Maestro^[230] genutzt. Als Kraftfeld wurde OPLS2.1^[231,232] verwendet, wobei einmal kein Lösemittel (Strukturen F) und einmal $CHCl_3$ als Lösemittel (Strukturen G) im Modus *Mixed Torsional/Low mode sampling* eingestellt war. So wurden 700 Rechnungsschritte durchgeführt, gefolgt von einer Energieminimierung mit POLAK-RIBIÈRE-artigem konjugierten Gradienten mit bis zu 1000 Schritten. Danach wurde nach doppelten Konformeren gesucht, die per RMSD-Cutoff von 0,5 Å identifiziert wurden. So konnten 212 (F) und 226 Konformere (G) erhalten werden.

Die Proben, an denen die NMR-Experimente durchgeführt wurden, wurden wie bereits in Abschnitt 4.3.4.1 beschrieben hergestellt. An einer isotropen Probe des Tetrapeptids 22 in Toluol- d_8 wurden EASY-ROESY-Spektren mit Mischzeiten von 25-400 ms in 25-ms-Schritten aufgenommen. Zur Bestimmung der Abstände aus den ROE-Spektren wurde analog zu der in Kapitel 6.3 beschriebenen Methode vorgegangen. Dazu wurden für alle Protonen aus den EASY-ROESY-Spektren Spuren in F2 extrahiert, diese wurden per PANIC ausgewertet. Als Kalibrationsabstand wurde $H_{3a} - H_{3b}$ ausgewählt und auf Basis der berechneten

Strukturen auf 1,744 Å referenziert. Die experimentellen Fehler wurden ebenfalls analog zum Vorgehen in Kapitel 4.3.1 nach Gleichung 6.5.1 bestimmt.

$$\Delta r_{IS} = \sqrt{\left(\frac{-r_{\text{ref}}}{6\left(\frac{\sigma_{IS}}{\sigma_{\text{ref}}}\right)^{\frac{7}{6}}\sigma_{\text{ref}}}\Delta\sigma_{IS}\right)^2 + \left(\frac{r_{\text{ref}}\sigma_{IS}}{6\left(\frac{\sigma_{IS}}{\sigma_{\text{ref}}}\right)^{\frac{7}{6}}\sigma_{\text{ref}}^2}\Delta\sigma_{\text{ref}}\right)^2 + \left(\left(\frac{\sigma_{IS}}{\sigma_{\text{ref}}}\right)^{-\frac{1}{6}}\Delta r_{\text{ref}}\right)^2} \quad (6.5.1)$$

Dabei entspricht $\Delta\sigma$ dem Fehler der Steigung des linearen Fits der PANIC-Plots (siehe Abbildung 6.5.1). Als $\Delta\sigma_{\text{ref}}$ wird der Unterschied zwischen dem Kalibrationsabstand $H_{3b}-H_{3a}$ und des Kontrollabstandes $H_{3a}-H_{3b}$, der 0,034 Å beträgt, angenommen.

Für manche PANIC-Plots sind deutliche Abweichung vom linearen Verhalten sichtbar. Diese stammen vermutlich von unterschiedlichen T_1 -Zeiten von CH- und NH-Protonen. Daher wurden für den linearen Fit nur die Werte des linearen Bereichs berücksichtigt. Sind für einen Abstand zwei Möglichkeiten vorhanden, also z.B. H_7-H_2 und H_2-H_7 , wurden die erhaltenen Werte gemittelt. Dies sollte eine Kompensation für unterschiedliche T_1 -Zeiten darstellen.

Zur RDC-Bestimmung wurde ein von PÖPLER hergestelltes Gel aus Polystyrol, welches mit 0,2 vol% Divinylbenzol quervernetzt wurde^[157,210], als Orientierungsmedium gewählt. Dieses wog vor dem Quellen 119,0 mg und wurde in 392,7 mg Toluol- d_8 mit 8,7 mg Tetrapeptid **22** gequollen. Nach 12 Tagen erwies sich die Quadrupolaufspaltung im 2H -Spektrum als konstant, worauf die Probe verschlossen wurde.

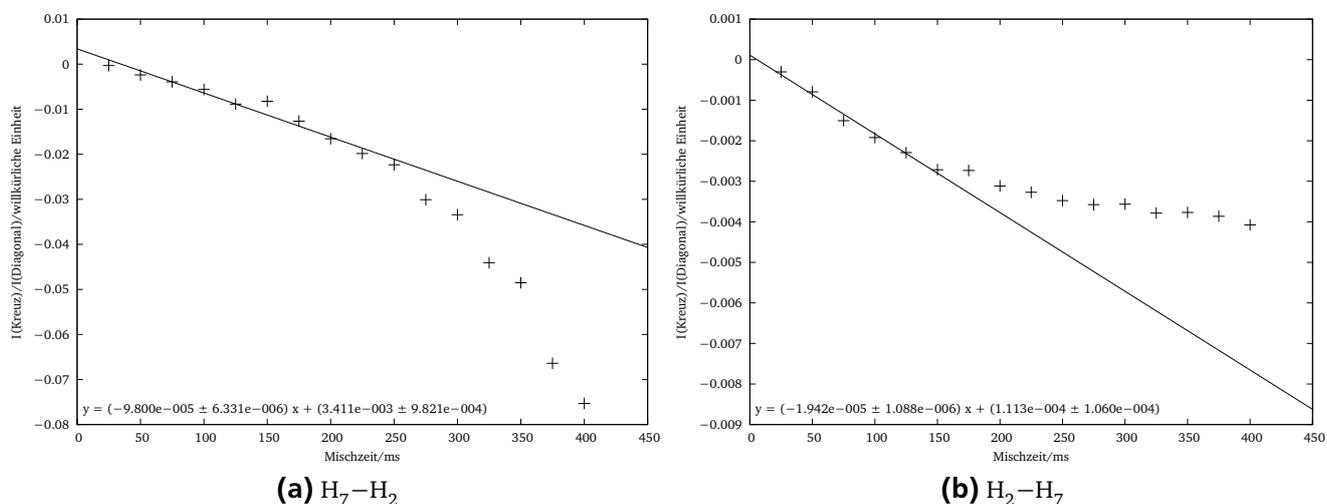
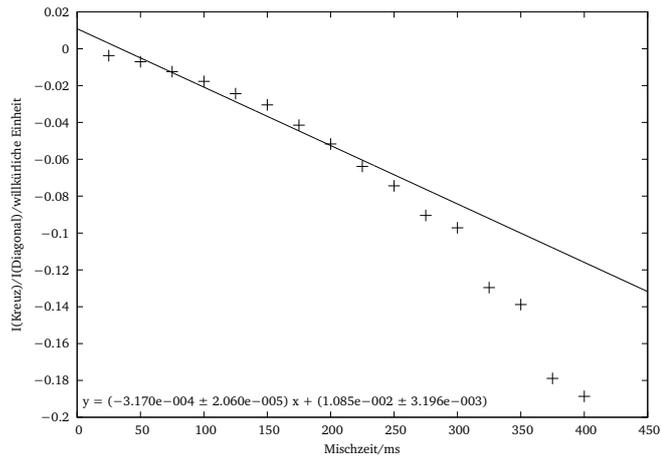
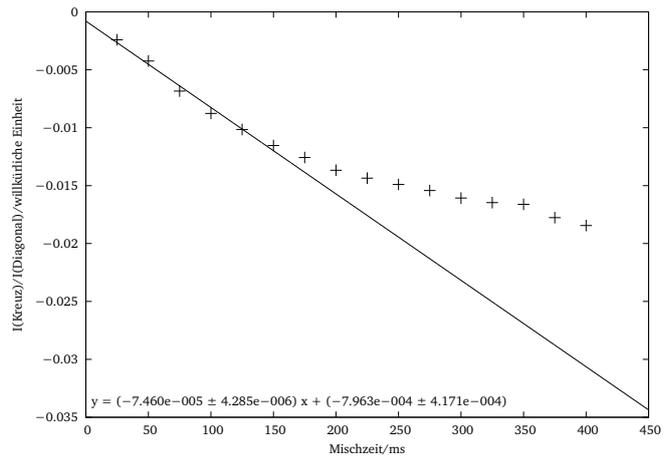


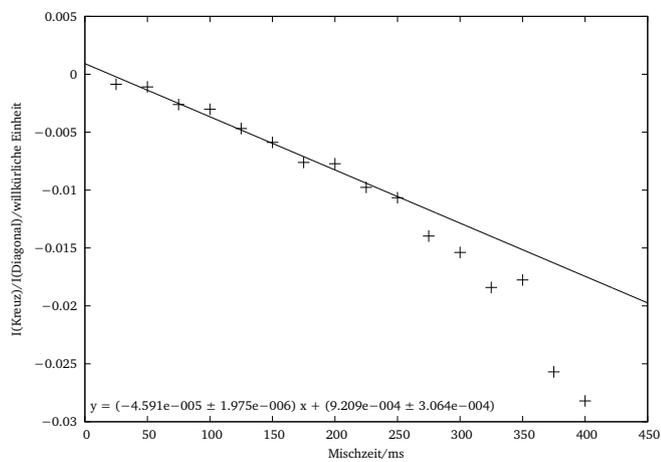
Abbildung 6.5.1: PANIC-Plots der ROE-Spektren des Tetrapeptids **22**.



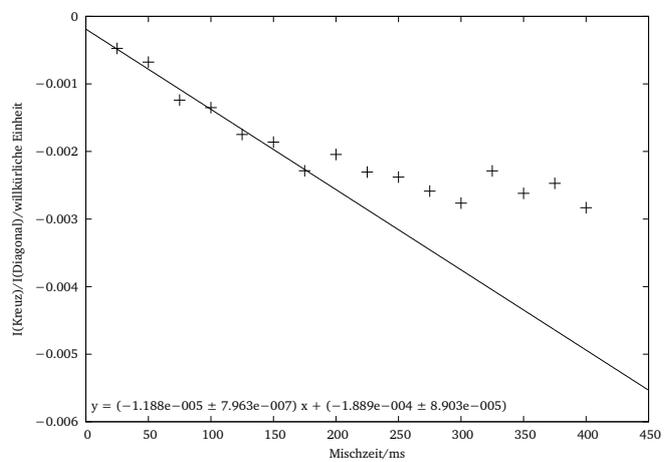
(c) H_7-H_8



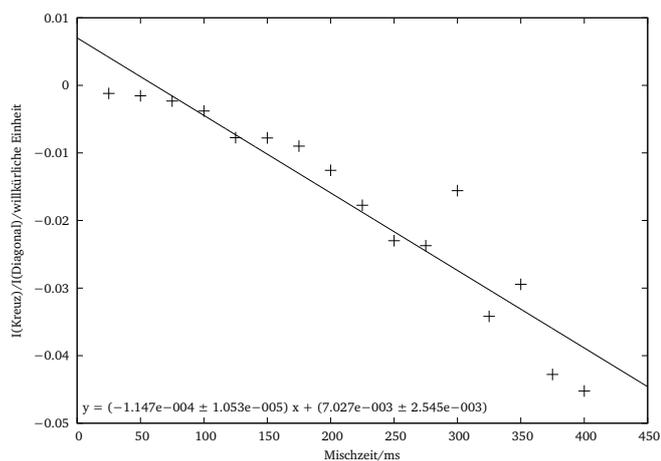
(d) H_8-H_7



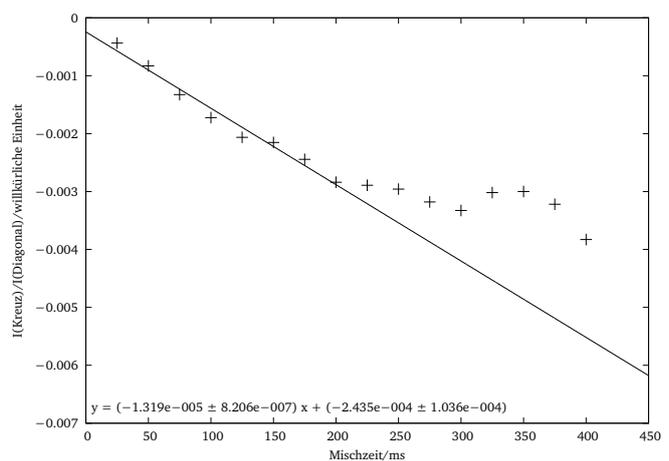
(e) H_7-H_{3a}



(f) $H_{3a}-H_7$

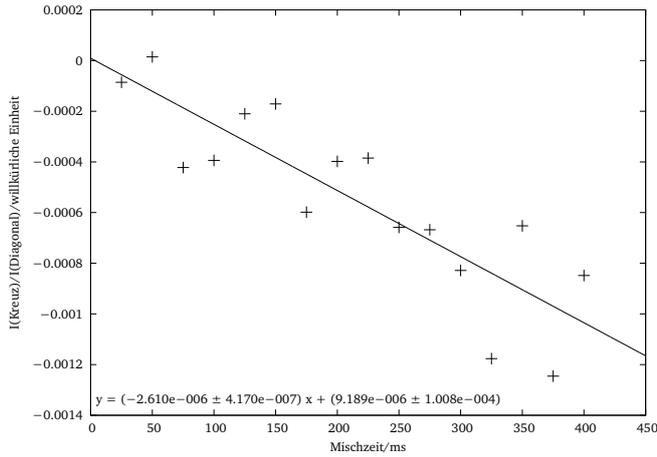


(g) H_7-H_{3b}

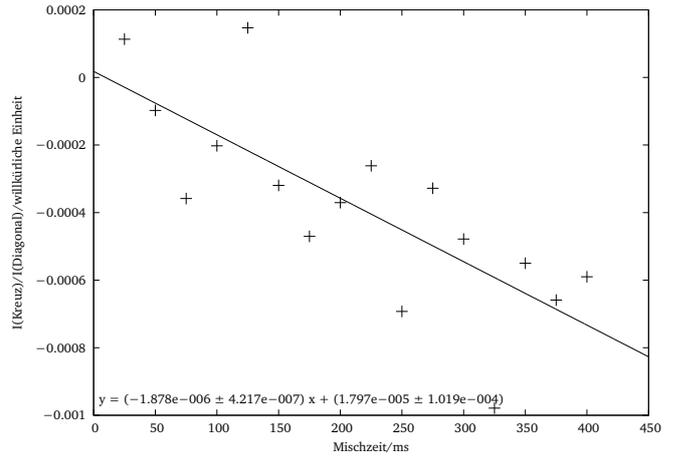


(h) $H_{3b}-H_7$

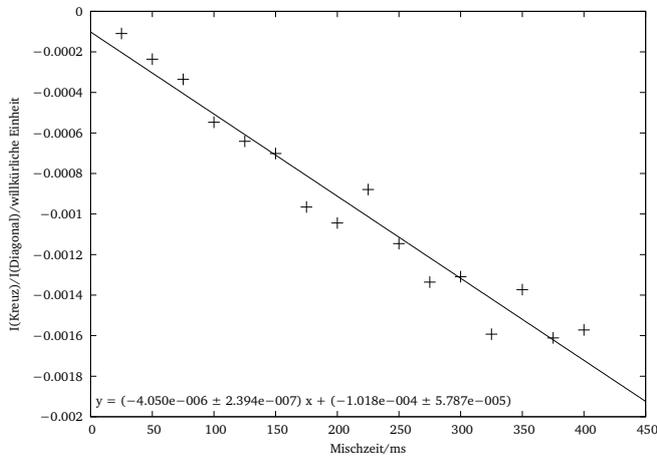
Abbildung 6.5.1: PANIC-Plots der ROE-Spektren des Tetrapeptids 22.



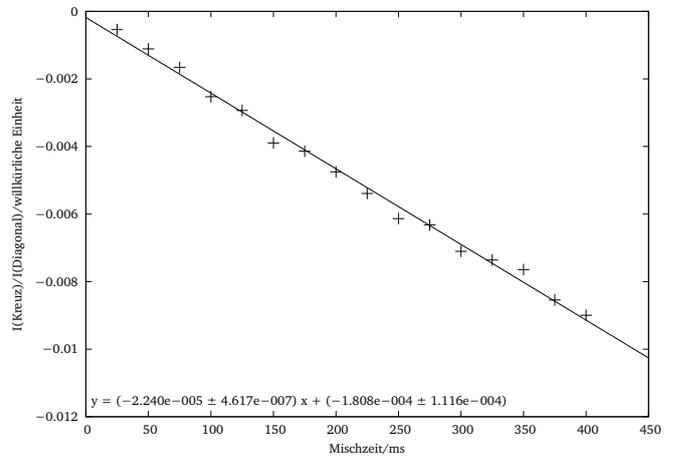
(i) $H_{29}-H_2$



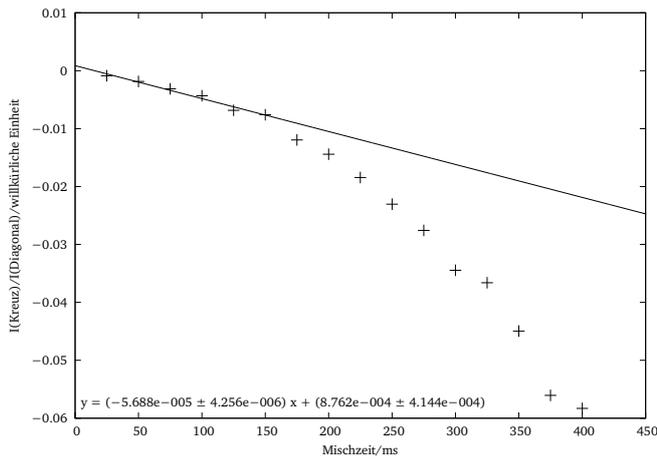
(j) $H_{29}-H_8$



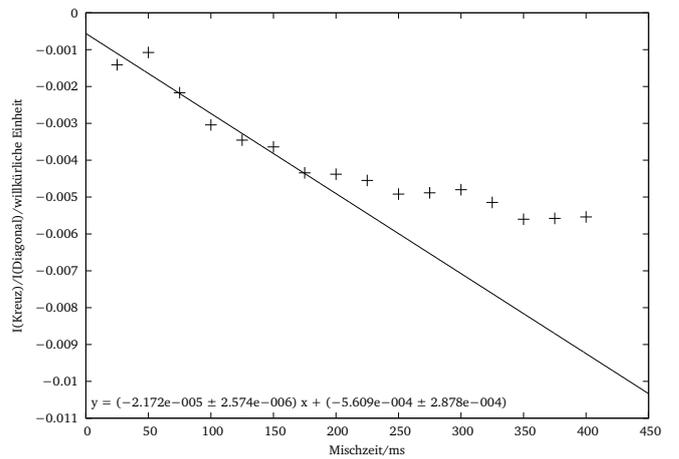
(k) $H_{29}-H_{26}$



(l) $H_{30}-H_{29}$

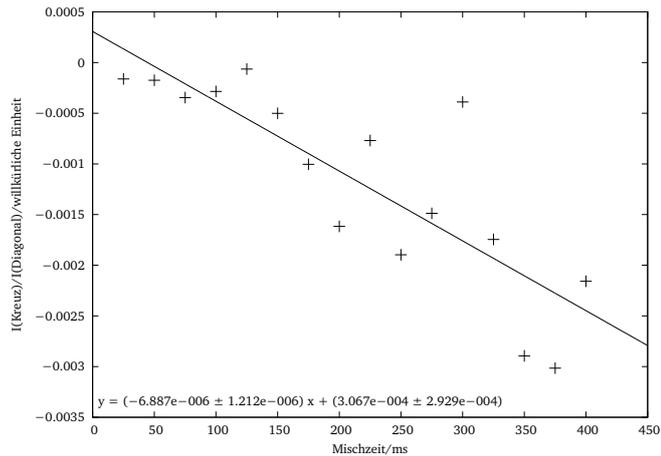


(m) $H_{16}-H_8$

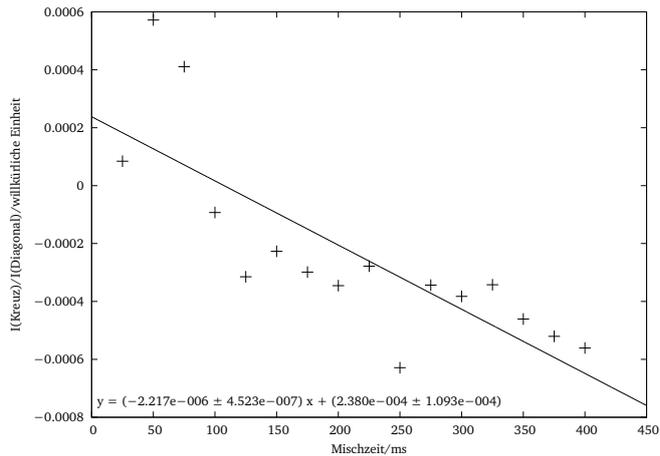


(n) H_8-H_{16}

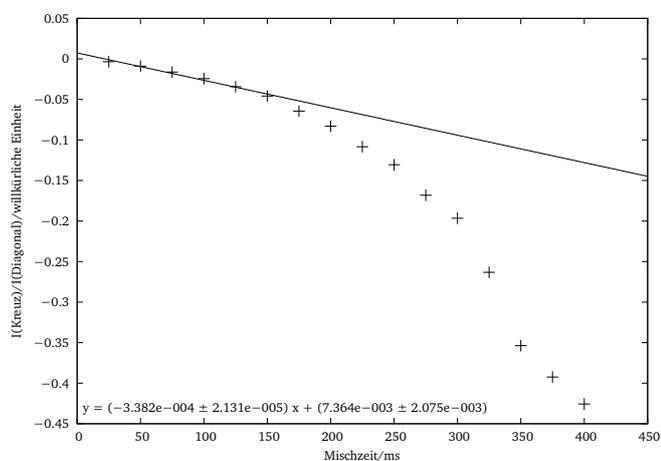
Abbildung 6.5.1: PANIC-Plots der ROE-Spektren des Tetrapeptids **22**.



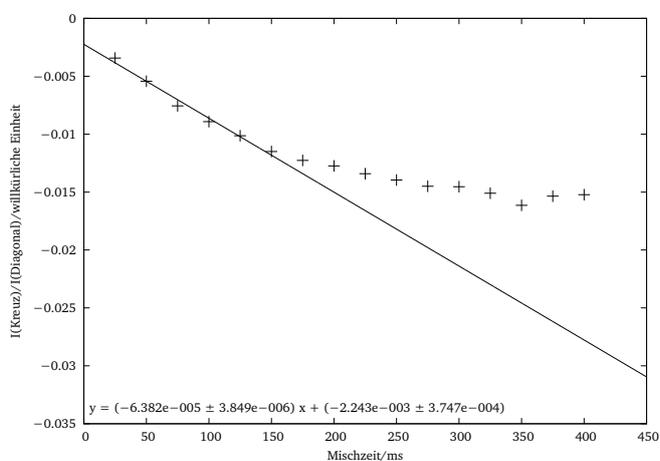
(o) $H_{16}-H_{26}$



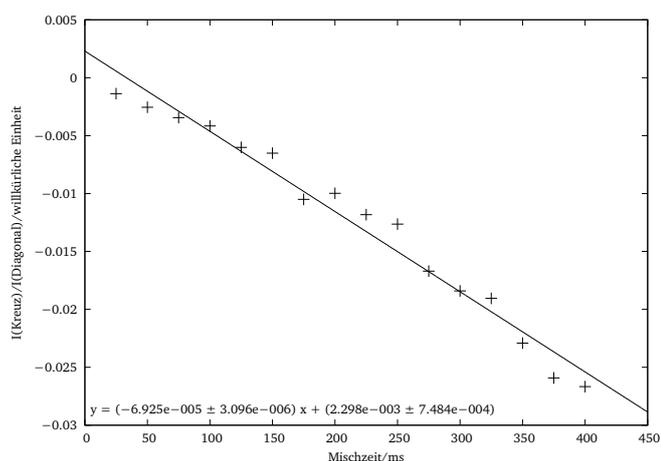
(p) H_8-H_{31}



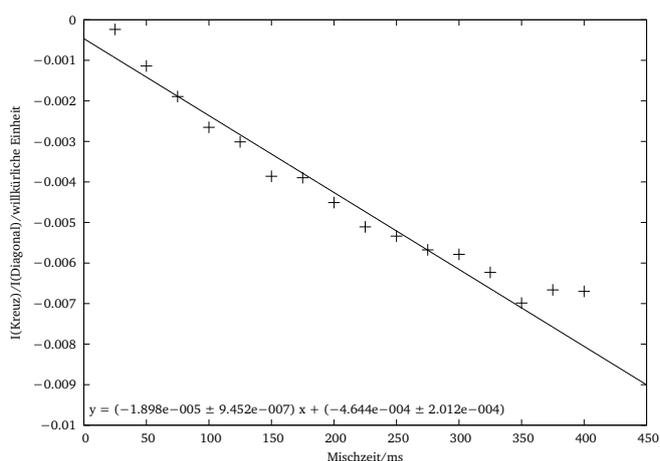
(q) $H_{25}-H_{26}$



(r) $H_{26}-H_{25}$

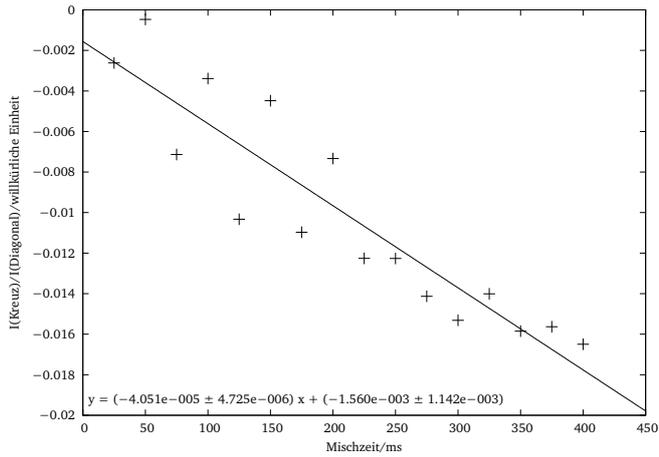


(s) $H_{31}-H_{26}$

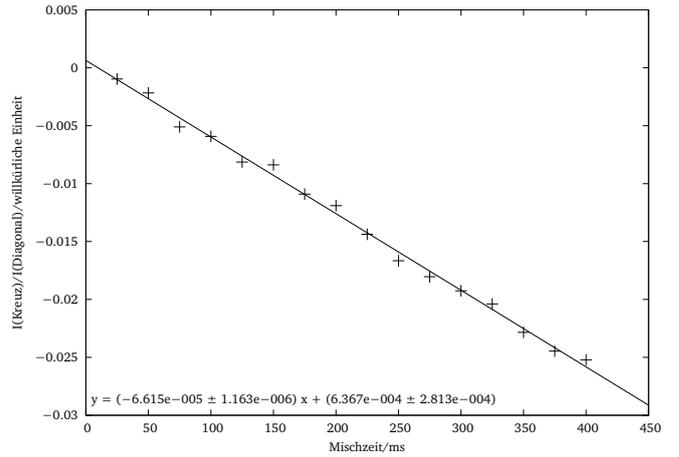


(t) $H_{26}-H_{31}$

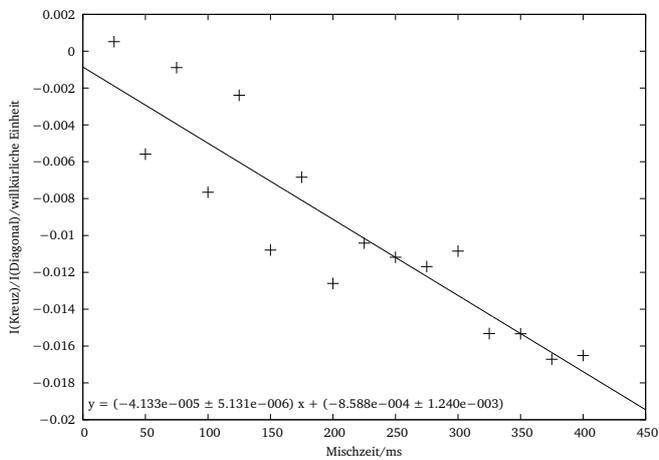
Abbildung 6.5.1: PANIC-Plots der ROE-Spektren des Tetrapeptids **22**.



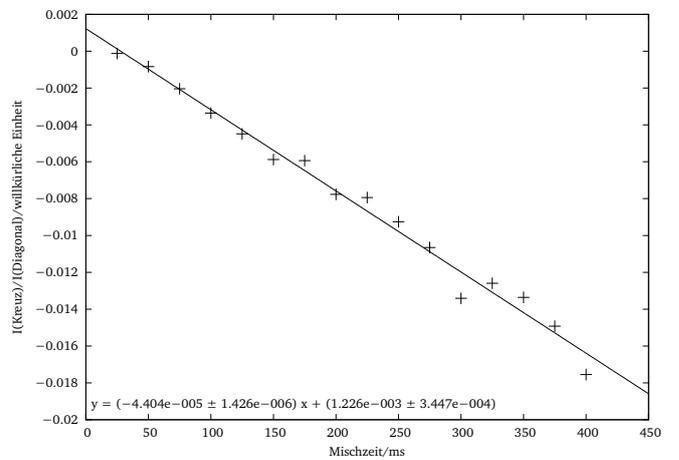
(u) H_2-H_{3a}



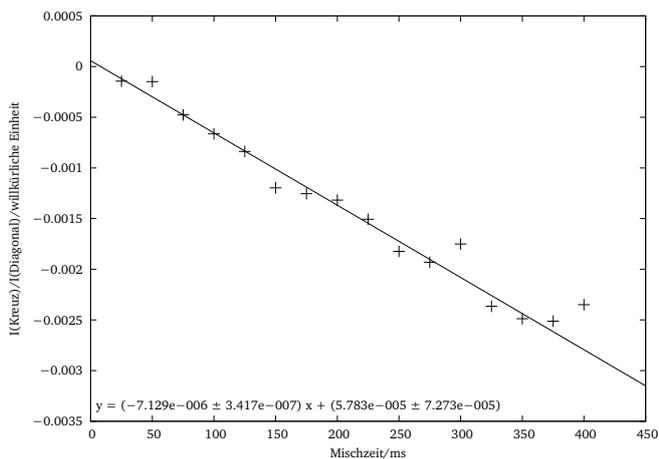
(v) $H_{3a}-H_2$



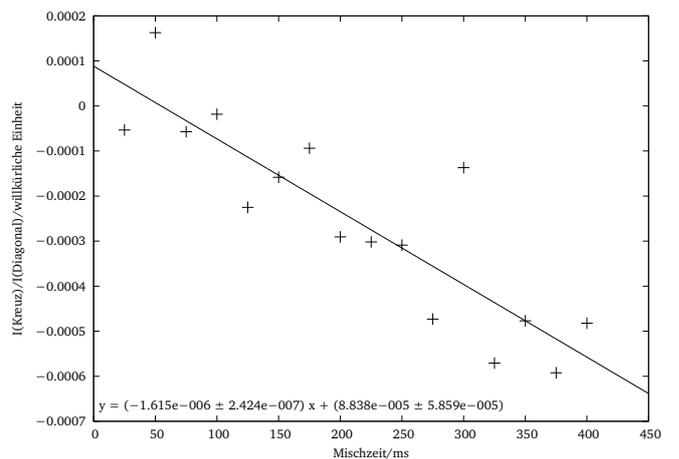
(w) H_2-H_{3b}



(x) $H_{3b}-H_2$

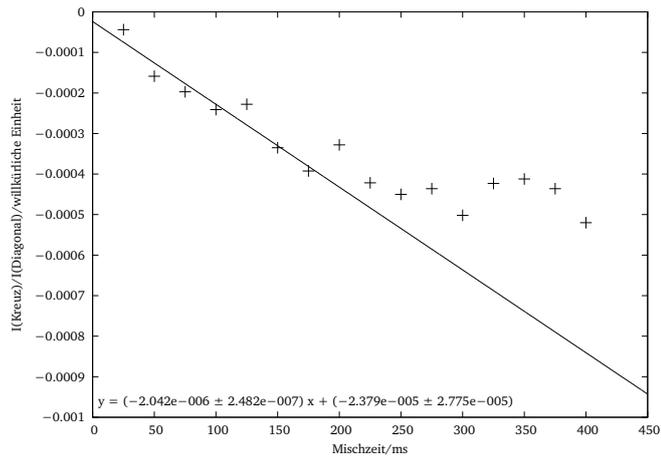


(y) $H_{30}-H_{26}$

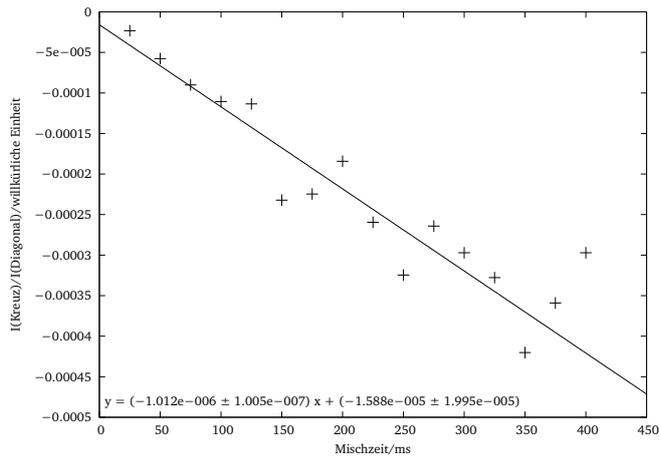


(z) H_1-H_2

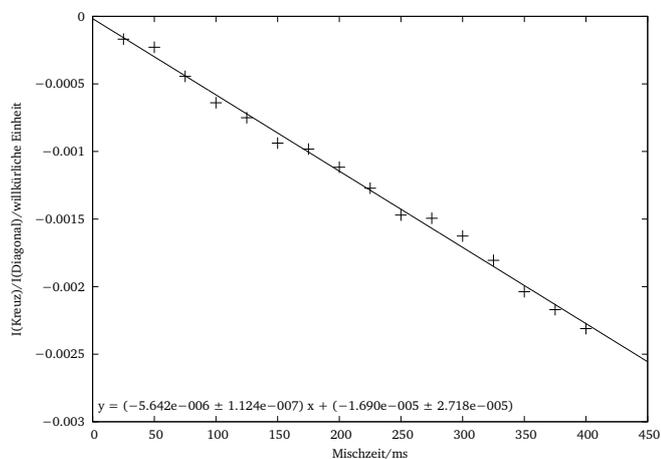
Abbildung 6.5.1: PANIC-Plots der ROE-Spektren des Tetrapeptids **22**.



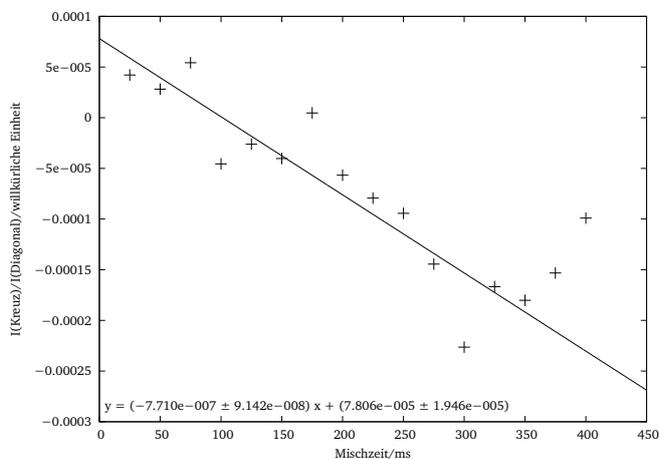
(aa) $H_{30}-H_7$



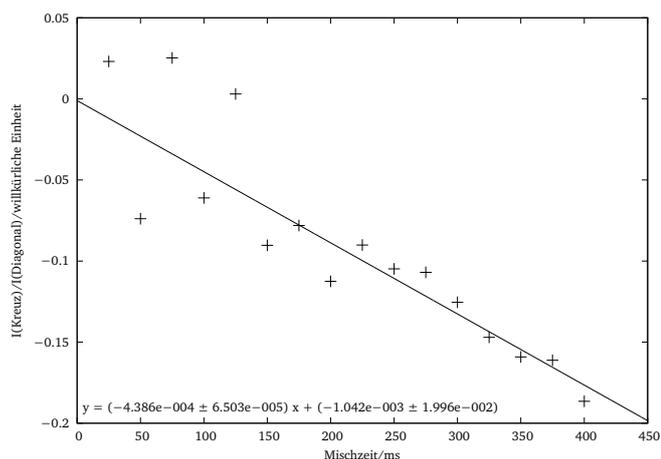
(ab) $H_{30}-H_{31}$



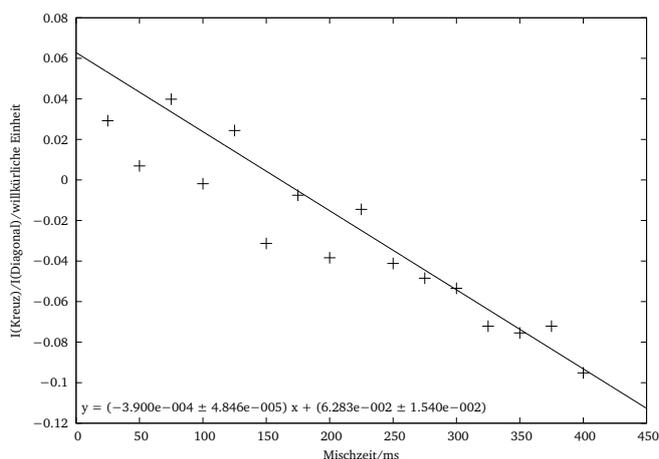
(ac) $H_{30}-H_2$



(ad) $H_{30}-H_8$



(ae) $H_{3a}-H_{3b}$



(af) $H_{3b}-H_{3a}$ (Kalibrationsabstand)

Abbildung 6.5.1: PANIC-Plots der ROE-Spektren des Tetrapeptids **22**.

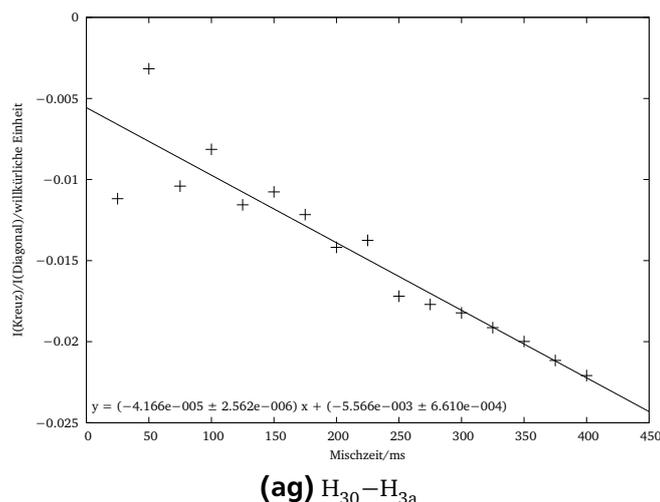


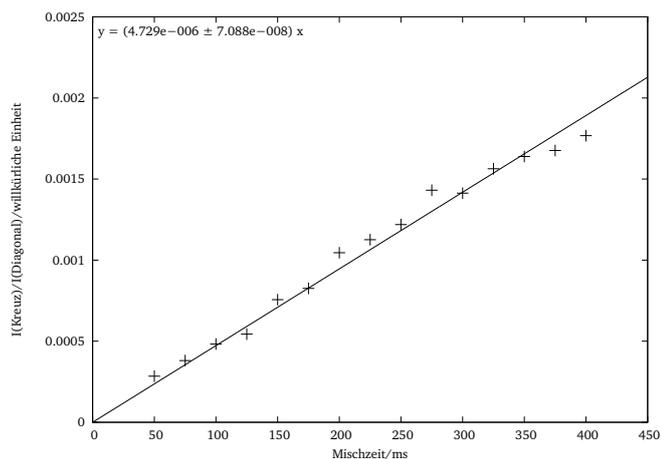
Abbildung 6.5.1: PANIC-Plots der ROE-Spektren des Tetrapeptids **22**.

Von KÖBERLE wurden im Rahmen eines von mir betreuten Forschungspraktikums^[214] an einer 1:1-Mischung von **22:25** Abstände aus NOE-Daten bestimmt. Dazu wurden 24,9 mg Tetrapeptid **22** und 3,6 mg *trans*-Cyclohexan-1,2-diol **25** in 0,8 ml Toluol-d₈ gelöst. An dieser isotropen Probe wurden NOE-Mischzeitserien mit Mischzeiten von 50-400 ms in 25-ms-Schritten analog zu der in Kapitel 4.3.1 beschriebenen Methode aufgenommen und ausgewertet. Als Referenzabstand wurde H₂₉-H₃₀ ausgewählt und auf 2,860 Å festgelegt.

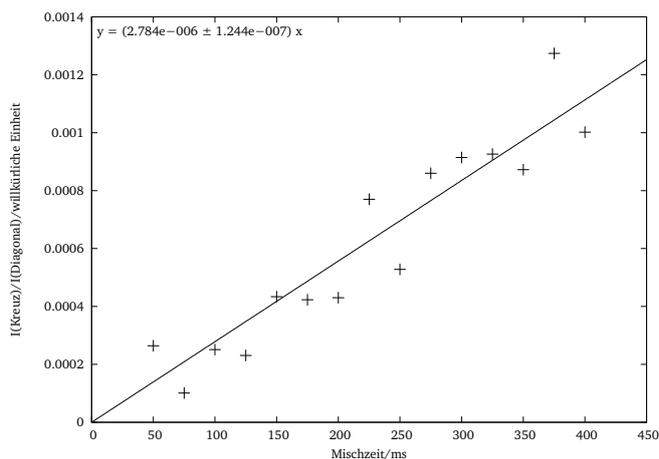
Die so erhaltenen Abstände sind in Tabelle 6.5.1 aufgeführt, die zugehörigen PANIC-Plots finden sich in Abbildung 6.5.2.

Tabelle 6.5.1: Per NOE bestimmte Abstände des Tetrapeptids **22** in Anwesenheit des Diols **25**.

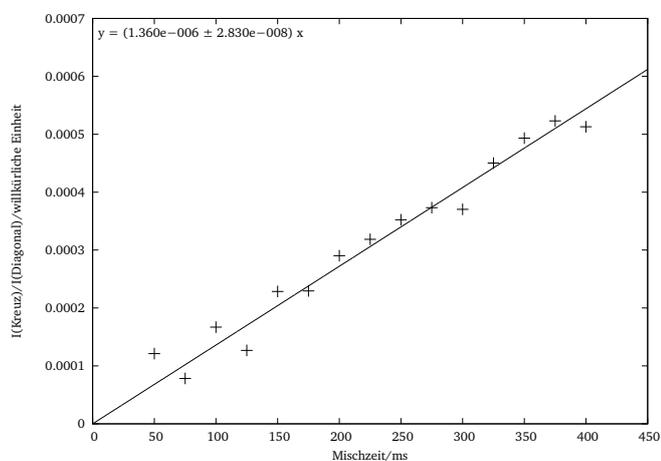
NOE	Distanz/Å	NOE	Distanz/Å
H ₁ -H ₂	4,256 ± 0,001	H ₈ -H _{3b}	3,351 ± 0,028
H ₁ -H _{3b}	4,649 ± 0,226	H ₈ -H _{3a}	3,583 ± 0,200
H ₁ -H ₂₈	5,238 ± 0,062	H ₂₅ -H ₂₆	2,414 ± 0,020
H ₂ -H ₇	2,558 ± 0,134	H ₂₅ -H ₂₈	3,067 ± 0,305
H ₂ -H ₂₈	4,648 ± 0,015	H ₂₅ -H ₂₉	3,100 ± 0,564
H ₂ -H _{3b}	2,574 ± 0,102	H ₂₆ -H ₂₈	2,745 ± 0,206
H ₂ -H _{3a}	2,608 ± 0,200	H ₂₆ -H ₂₉	2,372 ± 0,385
H ₇ -H _{3b}	2,573 ± 0,001	H ₂₈ -H ₂₉	2,968 ± 0,072
H ₇ -H ₈	2,012 ± 0,010	H ₂₉ -H _{3b}	3,204 ± 0,362
H ₈ -H ₁₀	2,748 ± 0,200	H ₃₀ -H ₈	3,300 ± 0,530
H ₈ -H ₁₆	2,555 ± 0,030	H ₃₀ -H ₂₈	4,160 ± 0,018
H ₈ -H ₂₆	3,472 ± 0,200	H ₃₂ -H ₂	5,316 ± 0,200
H ₈ -H ₂₈	3,576 ± 0,202	H ₃₂ -H _{3b}	5,144 ± 0,060
H ₈ -H ₂₉	3,291 ± 0,200	H ₃₂ -H ₂₈	4,922 ± 0,027



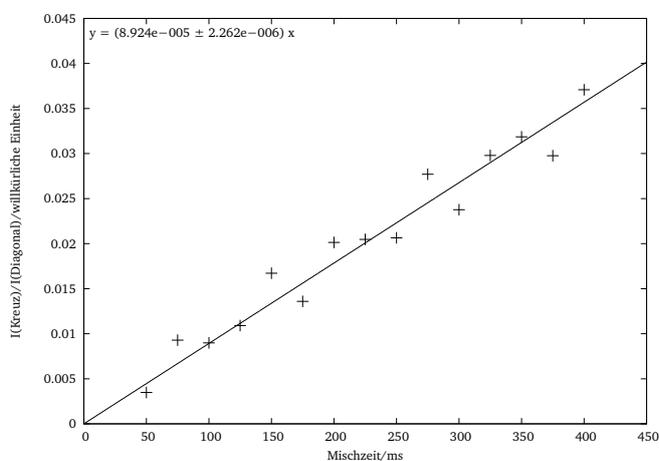
(a) H_1-H_2



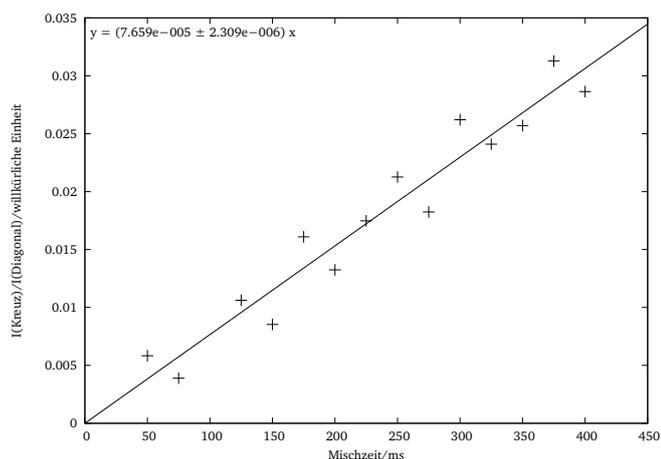
(b) H_1-H_{3b}



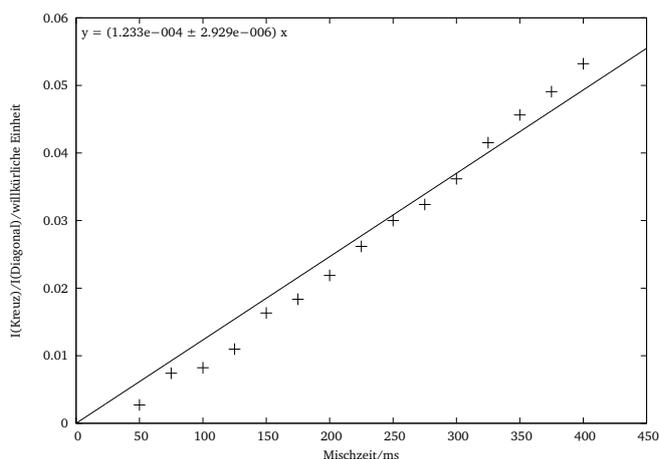
(c) H_1-H_{28}



(d) H_2-H_{3a}

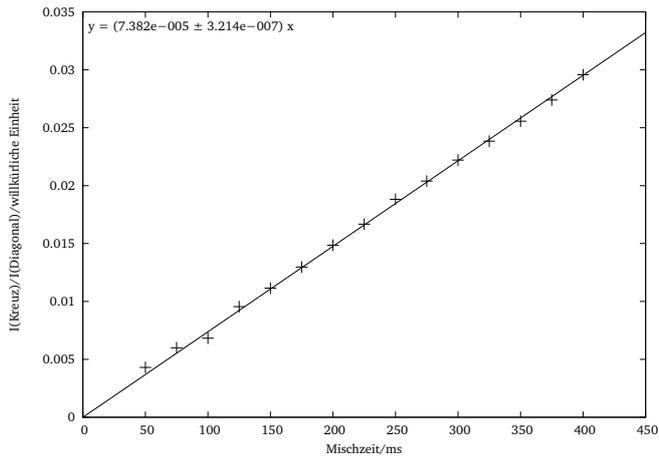


(e) H_2-H_{3b}

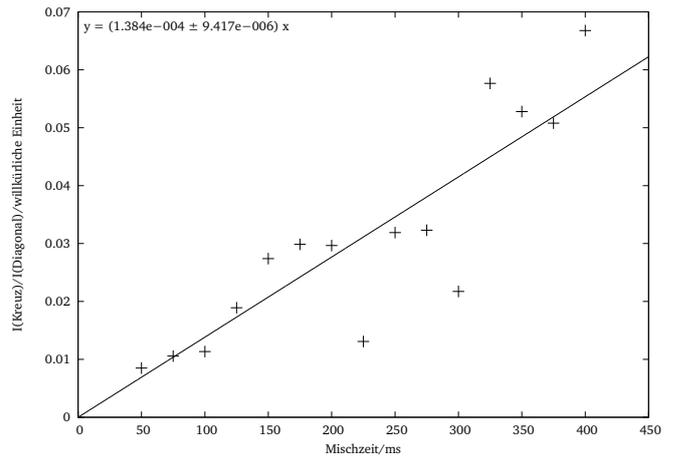


(f) $H_{3b}-H_2$

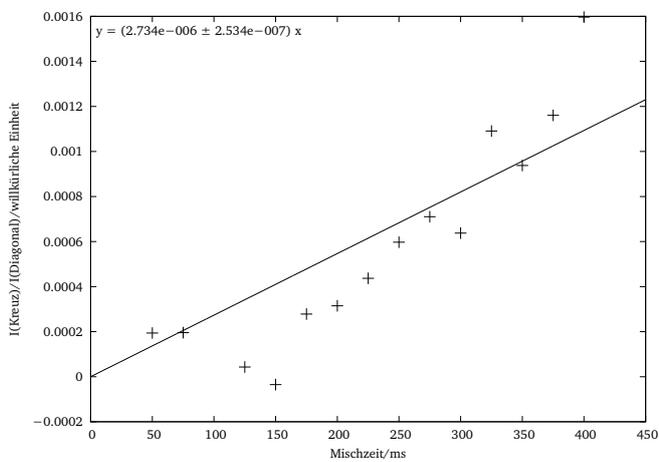
Abbildung 6.5.2: PANIC-Plots der NOE-Spektren des Tetrapeptids **22** mit dem *trans*-Cyclohexan-1,2-diol **25**.



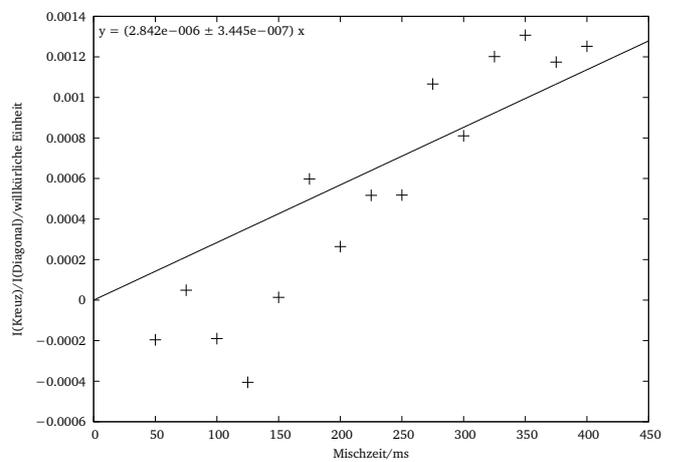
(g) H₂-H₇



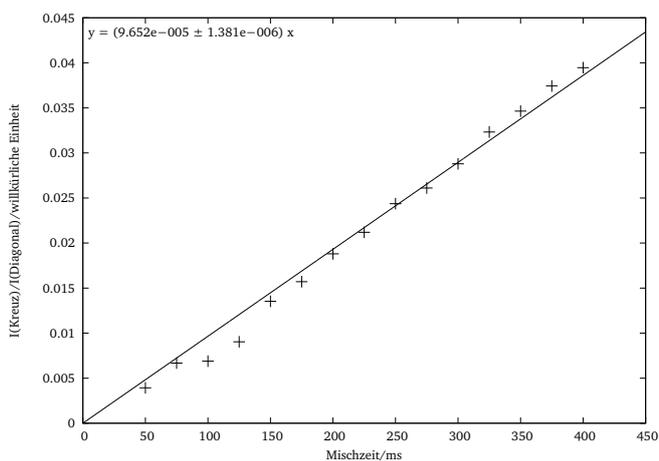
(h) H₇-H₂



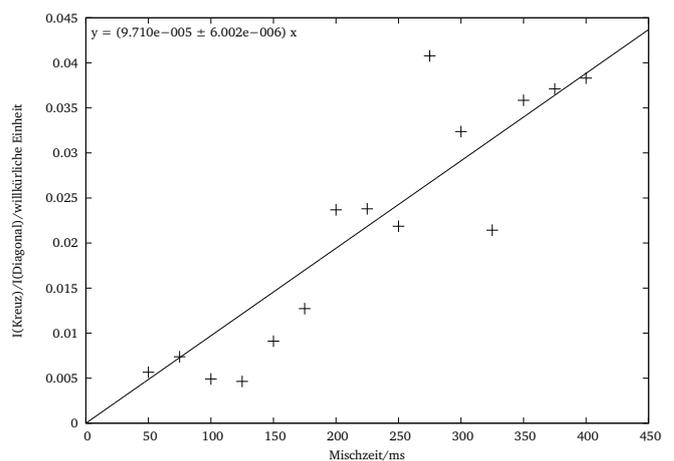
(i) H₂-H₂₈



(j) H₂₈-H₂

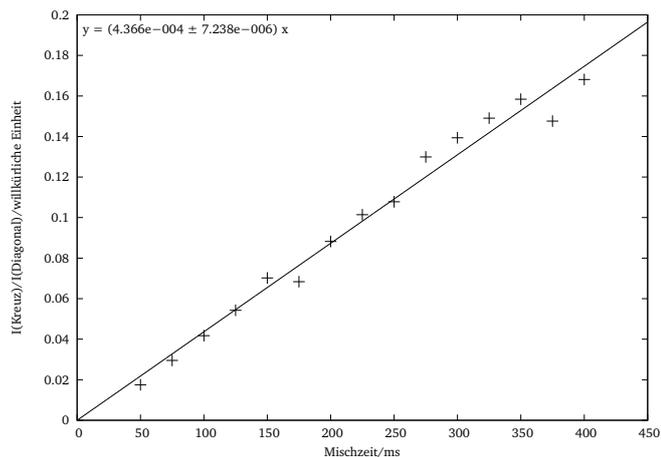


(k) H_{3b}-H₇

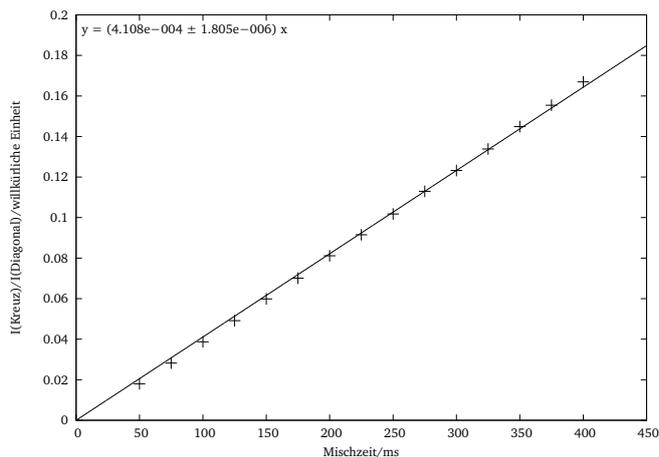


(l) H₇-H_{3b}

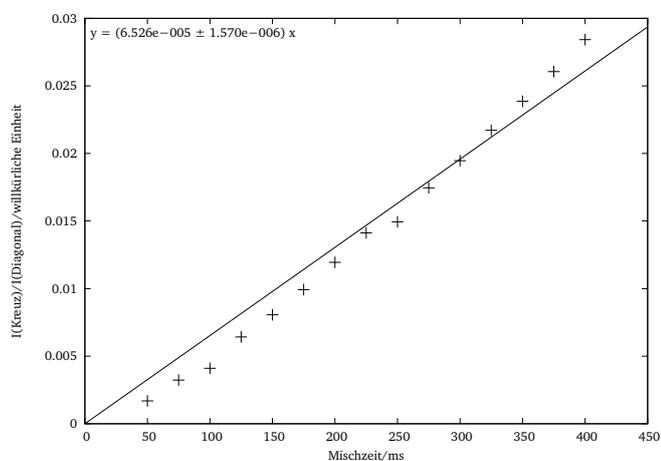
Abbildung 6.5.2: PANIC-Plots der NOE-Spektren des Tetrapeptids **22** mit dem *trans*-Cyclohexan-1,2-diol **25**.



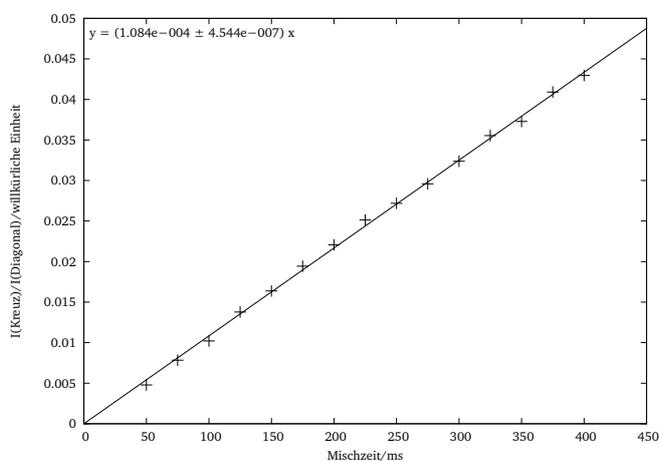
(m) H₇-H₈



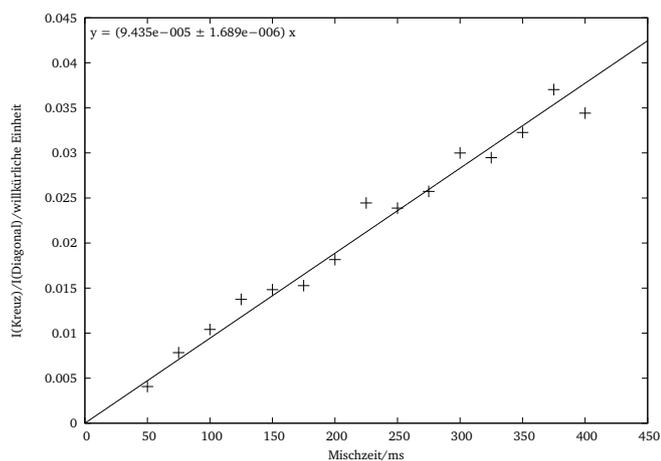
(n) H₈-H₇



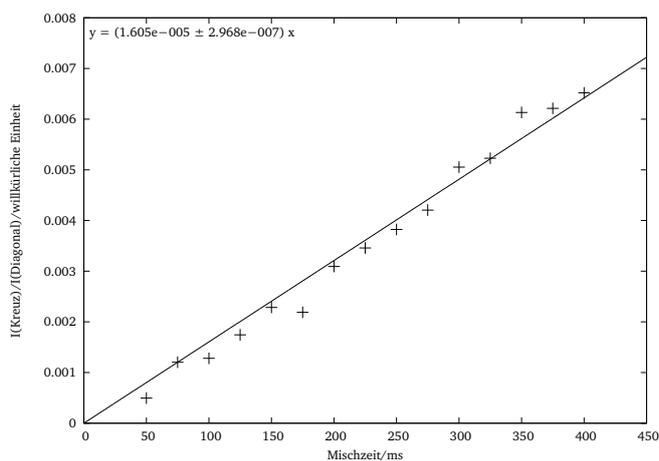
(o) H₈-H₁₀



(p) H₈-H₁₆

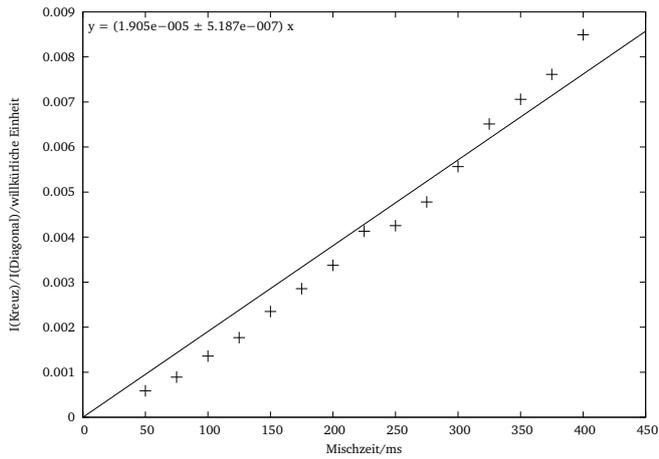


(q) H₁₆-H₈

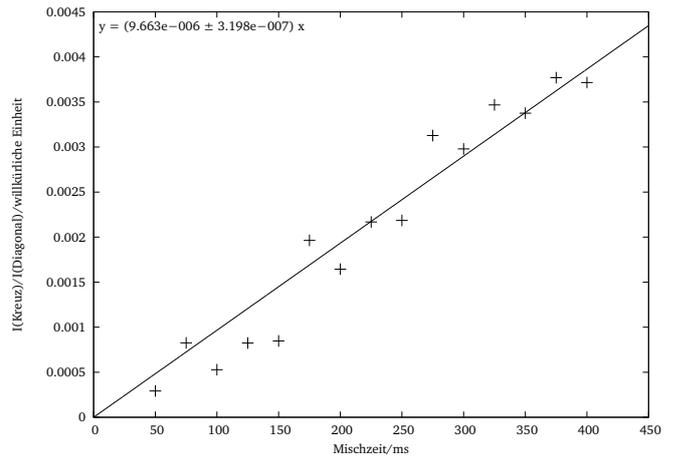


(r) H₈-H₂₆

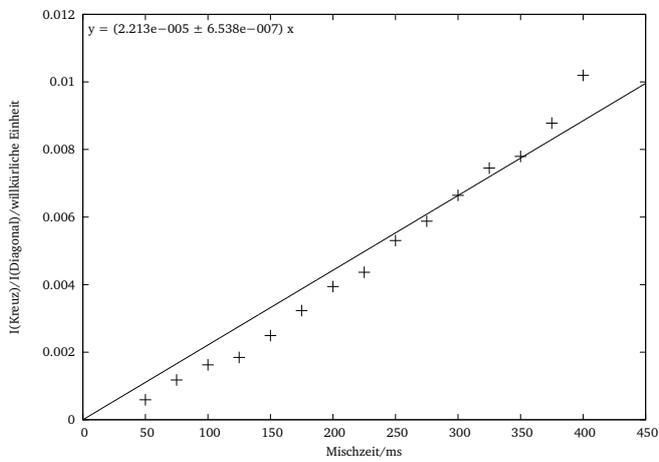
Abbildung 6.5.2: PANIC-Plots der NOE-Spektren des Tetrapeptids **22** mit dem *trans*-Cyclohexan-1,2-diol **25**.



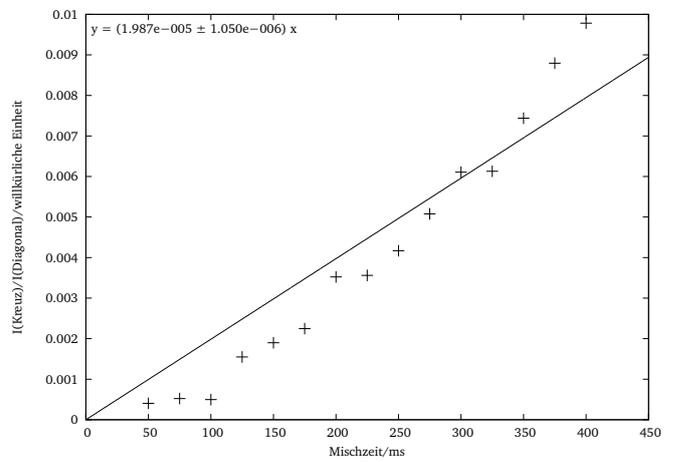
(s) H_8-H_{28}



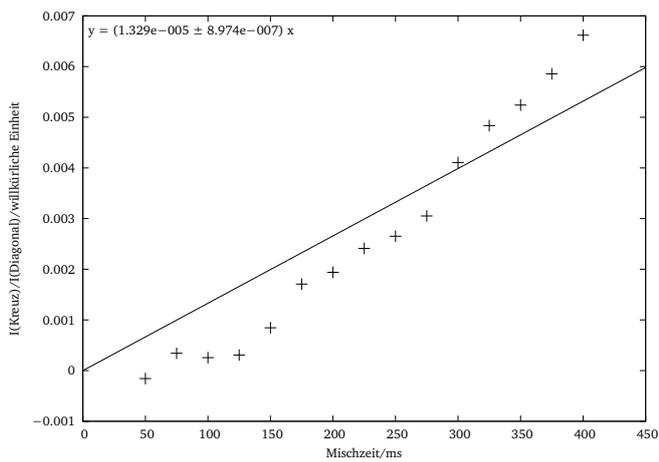
(t) $H_{28}-H_8$



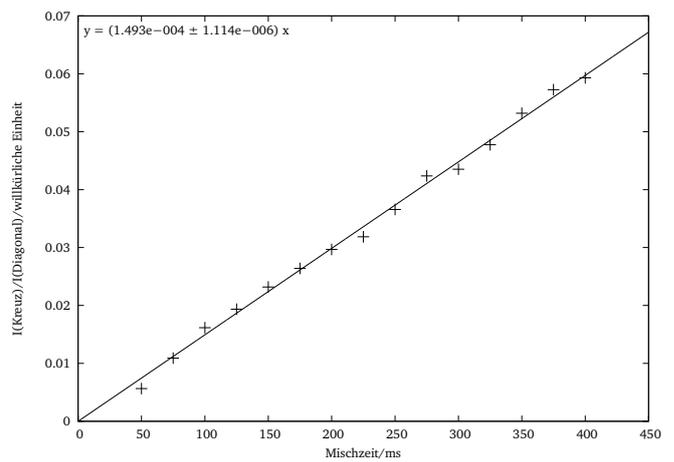
(u) H_8-H_{29}



(v) H_8-H_{3b}



(w) H_8-H_{3a}



(x) $H_{25}-H_{26}$

Abbildung 6.5.2: PANIC-Plots der NOE-Spektren des Tetrapeptids **22** mit dem *trans*-Cyclohexan-1,2-diol **25**.

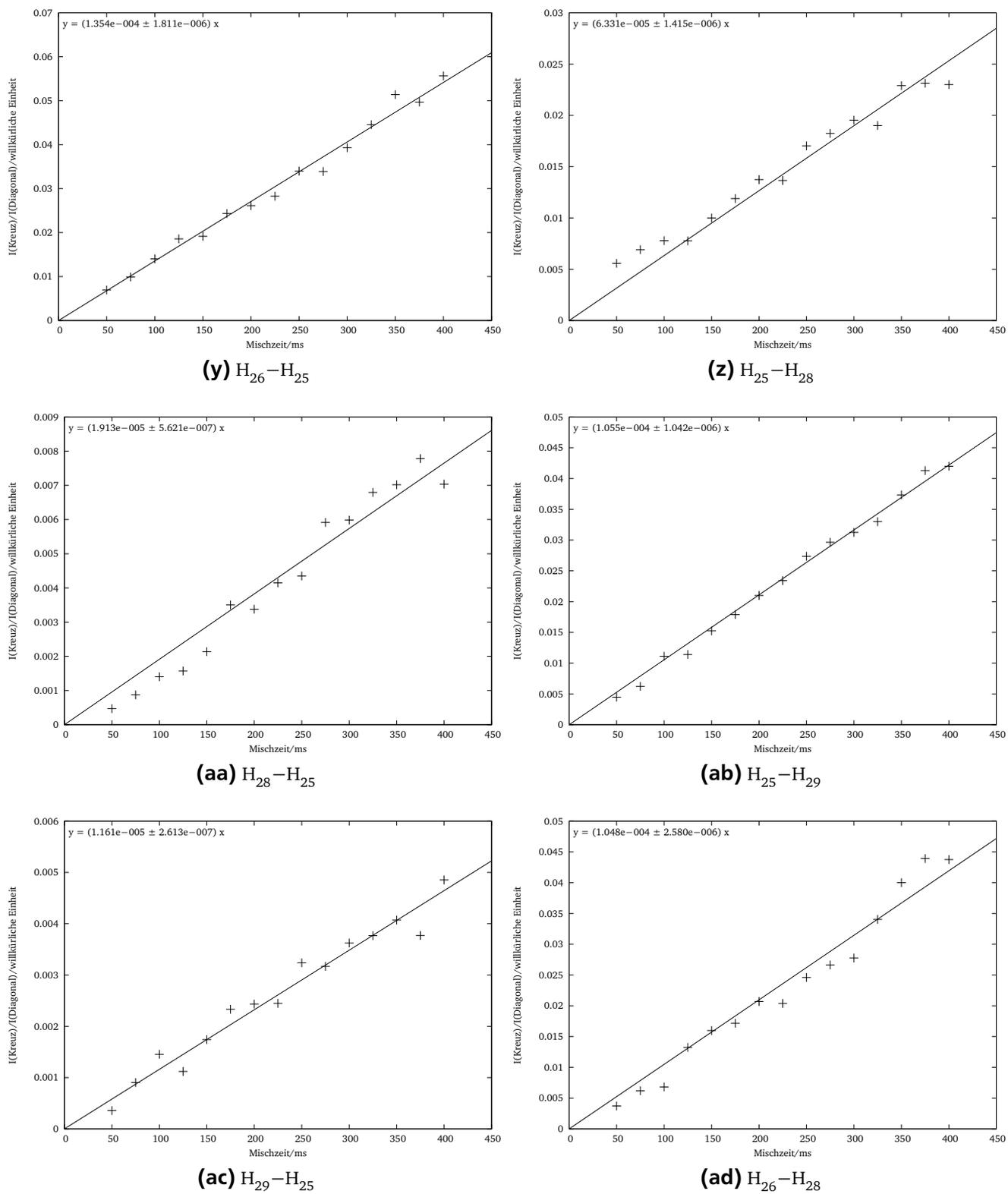
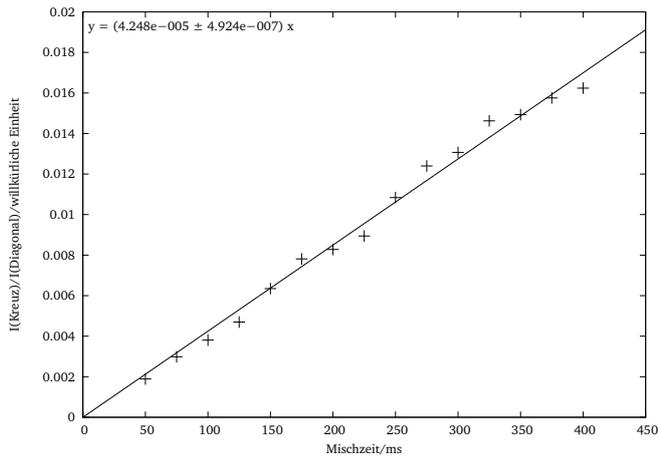
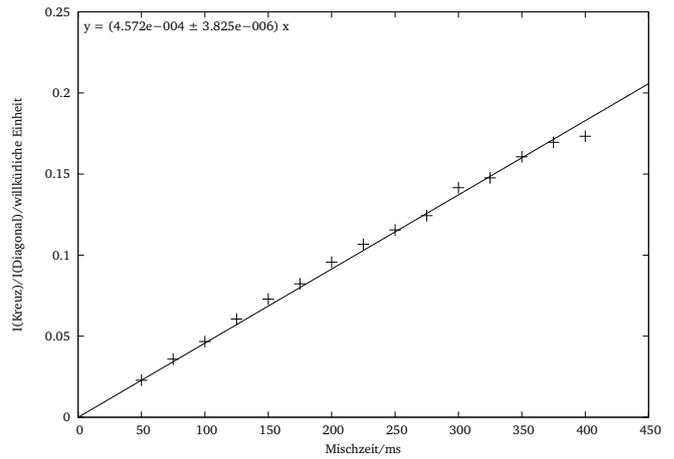


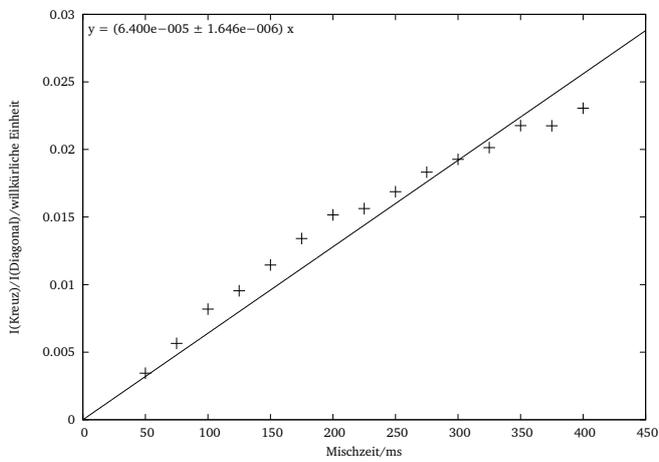
Abbildung 6.5.2: PANIC-Plots der NOE-Spektren des Tetrapeptids 22 mit dem *trans*-Cyclohexan-1,2-diol 25.



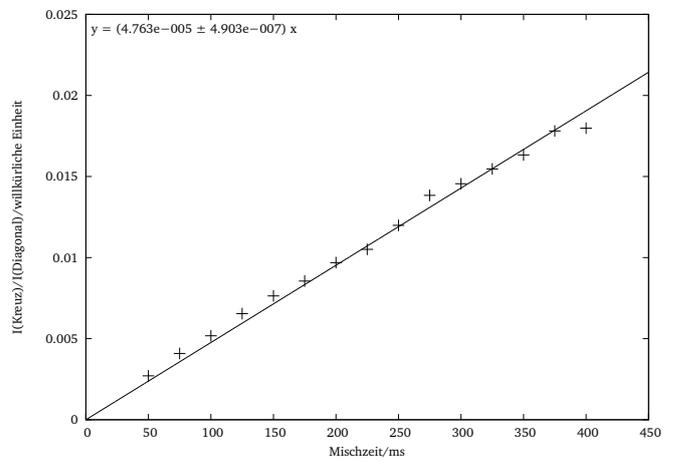
(ae) $H_{28}-H_{26}$



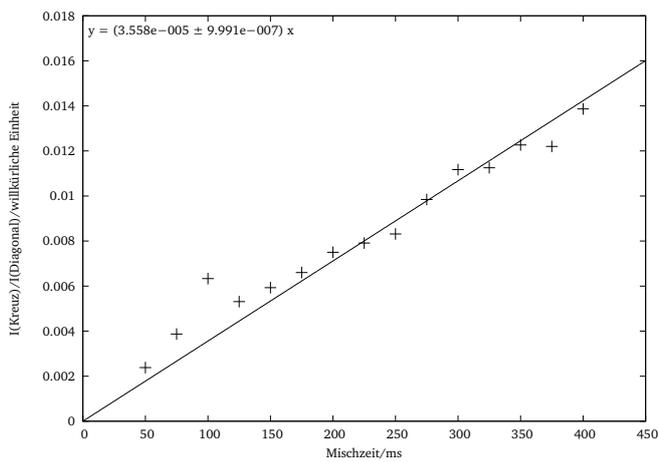
(af) $H_{26}-H_{29}$



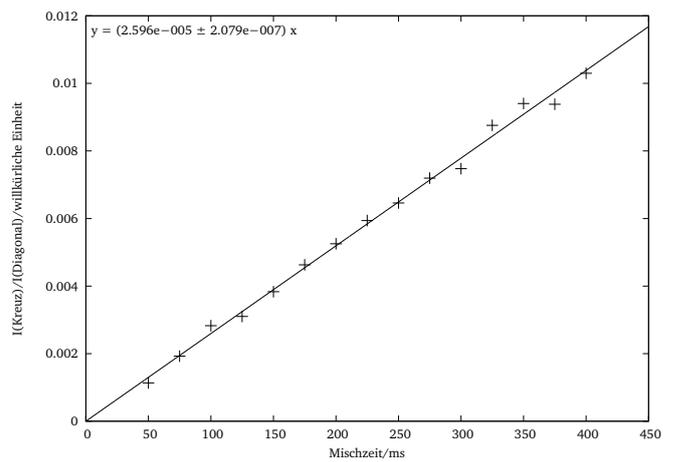
(ag) $H_{29}-H_{26}$



(ah) $H_{28}-H_{29}$



(ai) $H_{29}-H_{28}$



(aj) $H_{29}-H_{3b}$

Abbildung 6.5.2: PANIC-Plots der NOE-Spektren des Tetrapeptids **22** mit dem *trans*-Cyclohexan-1,2-diol **25**.

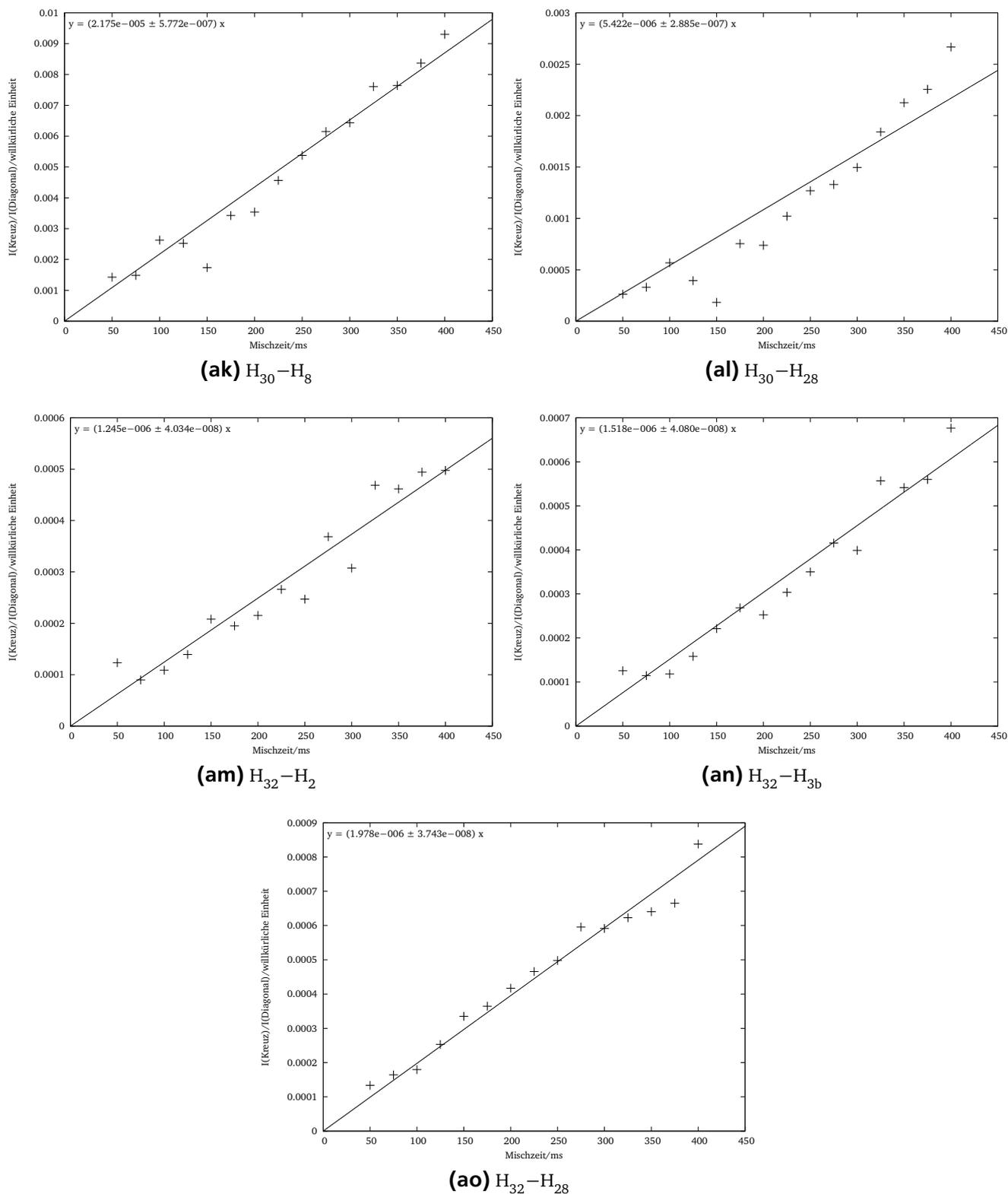
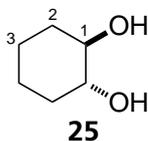


Abbildung 6.5.2: PANIC-Plots der NOE-Spektren des Tetrapeptids **22** mit dem *trans*-Cyclohexan-1,2-diol **25**.

Zusätzlich zu den intramolekularen Abständen konnten in den Mischzeitserien mit 64 Scans einzelne intermolekulare NOE-Kontakte zwischen Tetrapeptid **22** und *trans*-Cyclohexan-1,2-diol **25** detektiert werden. Deren Intensität ist bei 64 Scans sehr schwach, sodass zur Verifikation weitere 1D PFGSE NOE-

Tabelle 6.5.2: Intermolekulare NOE-Kontakte zwischen Tetrapeptid **22** und *trans*-Cyclohexan-1,2-diol **25**.

22 25 Klassifikation			22 25 Klassifikation		
H ₁	H ₁	mittel	H _{3a}	H ₁	mittel
H ₁₆	H ₁	schwach	H ₄	H ₁	schwach
H ₁₈	H ₁	mittel	H ₅	H ₁	schwach
H ₂₅	H ₁	schwach	H ₈	H ₁	mittel
H ₂₆	H ₁	schwach	H _{9a}	H ₁	mittel
H ₂₇	H ₁	mittel	H _{11a}	H ₂	stark
H ₂₈	H ₁	mittel	H ₁	H ₃	schwach
H ₂₉	H ₁	mittel	H _{12a}	H ₃	stark
H ₃₀	H ₁	mittel	H ₂₈	H ₃	schwach
H ₃₂	H ₁	schwach	H ₅	H ₃	schwach



Experimente mit 1024 Scans aufgenommen wurden. Dazu wurden zwei Experimente mit Mischzeiten von 200 ms und 400 ms für die Einstrahlpunkte von H₁ und H₃ des *trans*-Cyclohexan-1,2-diols **25** aufgenommen. Diese Experimente werden halbqualitativ ausgewertet, indem die so erhaltenen NOE-Kontakte in die Klassen stark, mittel und schwach eingeteilt. In Tabelle 6.5.2 sind alle so gefundenen NOE-Kontakte aufgelistet.

6.6 Supporting Information

Sämtliche experimentellen Parameter sowie Beschreibungen der Aufnahmebedingungen und der Auswertung der Kapitel 4.2.1, 4.2.3, 4.3.1, 4.3.2 und 4.4 finden sich in den *Supporting Information* der jeweiligen Publikationen. Diese sind auf der beigefügten CD sowie auf den folgenden Internetseiten verfügbar.

- [1] A. Kolmer, L. Kaltschnee, V. Schmidts, L. H. Peeck, H. Plenio, C. M. Thiele, *Magn. Reson. Chem.* **2013**, *51* (11), 695–700. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/mrc.4002>
- [2] I. Timári, L. Kaltschnee, A. Kolmer, R. W. Adams, M. Nilsson, C. M. Thiele, G. A. Morris, K. E. Kövér, *J. Magn. Reson.* **2014**, *239* (1), 130–138. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmr.2013.10.023>
- [3] L. Kaltschnee, A. Kolmer, I. Timári, V. Schmidts, R. W. Adams, M. Nilsson, K. E. Kövér, G. A. Morris, C. M. Thiele, *Chem. Commun.* **2014**, *50* (99), 15702–15705. URL: <http://dx.doi.org/10.1039/C4CC04217D>
- [4] M. Fredersdorf, R. Göstl, A. Kolmer, V. Schmidts, P. Monecke, S. Hecht, C. M. Thiele, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21* (41), 14545–14554. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201501842>
- [5] A. Kolmer, L. J. Edwards, I. Kuprov, C. M. Thiele, *J. Magn. Reson.* , im Druck, akzeptiertes Manuskript. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmr.2015.10.007>
- [6] N. Kolmer-Anderl, A. Kolmer, C. M. Thiele, M. Rehahn, *Chem. Eur. J.* , zur Veröffentlichung eingereicht. URL ist noch nicht bekannt.

Literaturverzeichnis

- [1] A. Kolmer, L. Kaltschnee, V. Schmidts, L. H. Peeck, H. Plenio, C. M. Thiele, *Magn. Reson. Chem.* **2013**, *51* (11), 695–700.
- [2] I. Timári, L. Kaltschnee, A. Kolmer, R. W. Adams, M. Nilsson, C. M. Thiele, G. A. Morris, K. E. Kövér, *J. Magn. Reson.* **2014**, *239* (1), 130–138.
- [3] L. Kaltschnee, A. Kolmer, I. Timári, V. Schmidts, R. W. Adams, M. Nilsson, K. E. Kövér, G. A. Morris, C. M. Thiele, *Chem. Commun.* **2014**, *50* (99), 15702–15705.
- [4] M. Fredersdorf, R. Göstl, A. Kolmer, V. Schmidts, P. Monecke, S. Hecht, C. M. Thiele, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21* (41), 14545–14554.
- [5] A. Kolmer, L. J. Edwards, I. Kuprov, C. M. Thiele, *J. Magn. Reson.* , im Druck, akzeptiertes Manuskript.
- [6] N. Kolmer-Anderl, A. Kolmer, C. M. Thiele, M. Rehahn, *Chem. Eur. J.* , zur Veröffentlichung eingereicht.
- [7] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27* (3), 2985–2993.
- [8] W. Massa, *Kristallstrukturbestimmung*, 7 Aufl., Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden, **2011**.
- [9] J. M. Bijvoet, A. F. Peerdeman, A. J. van Bommel, *Nature* **1951**, *168* (4268), 271–272.
- [10] H. D. Flack, G. Bernardinelli, *Chirality* **2008**, *20* (5), 681–690.
- [11] D. E. Koshland, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1958**, *44* (2), 98–104.
- [12] D. E. Koshland, *Angew. Chem.* **1994**, *106* (23-24), 2468–2472.
- [13] O. F. Lange, N.-A. Lakomek, C. Farès, G. F. Schröder, K. F. A. Walter, S. Becker, J. Meiler, H. Grubmüller, C. Griesinger, B. L. de Groot, *Science* **2008**, *320* (5882), 1471–1475.
- [14] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, S. Bienz, L. Bigler, T. Fox, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 8 Aufl., Thieme, Stuttgart, **2011**.
- [15] P. Hamm, J. Helbing, J. Bredenbeck, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2008**, *59* (1), 291–317.
- [16] T. D. W. Claridge, *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, 2 Aufl., Elsevier Books, Oxford, **2008**.
- [17] J. Keeler, *Understanding NMR Spectroscopy*, 2 Aufl., Wiley, Chichester, **2010**.
- [18] M. H. Levitt, *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*, 2 Aufl., Wiley, Chichester, **2008**.
- [19] W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64* (5), 2229–2246.
- [20] H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **1988**, *100* (4), 507–544.
- [21] D. M. Doddrell, in *Encyclopedia of Magnetic Resonance*, (Herausgegeben von R. K. Harris, R. E. Wasylishen), John Wiley, Chichester, **2009**.
- [22] G. Bodenhausen, D. J. Ruben, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69* (1), 185–189.

-
- [23] W. F. Reynolds, S. McLean, L.-L. Tay, M. Yu, R. G. Enriquez, D. M. Estwick, K. O. Pascoe, *Magn. Reson. Chem.* **1997**, *35* (7), 455–462.
- [24] K. Hallenga, G. V. Binst, *Bull. Magn. Reson.* **1980**, *2* (1), 343.
- [25] A. Bax, M. F. Summers, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108* (8), 2093–2094.
- [26] W. Willker, D. Leibfritz, R. Kerssebaum, W. Bermel, *Magn. Reson. Chem.* **1993**, *31* (3), 287–292.
- [27] W. F. Reynolds, in *Encyclopedia of Magnetic Resonance*, (Herausgegeben von R. K. Harris, R. E. Wasylshen), John Wiley, Chichester, **2009**.
- [28] B. Reif, M. Hennig, C. Griesinger, *Science* **1997**, *276* (5316), 1230–1233.
- [29] B. Brutscher, *Concepts Magn. Reson.* **2000**, *12* (4), 207–229.
- [30] A. W. Overhauser, *Phys. Rev.* **1953**, *92*, 411–415.
- [31] D. Neuhaus, M. P. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, 2 Aufl., Wiley, Chichester, **2000**.
- [32] A. Saupe, G. Englert, *Phys. Rev. Lett.* **1963**, *11* (10), 462–464.
- [33] E. E. Burnell, C. A. de Lange, *NMR of Ordered Liquids*, 1 Aufl., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **2003**.
- [34] F. Kramer, M. Deshmukh, H. Kessler, S. Glaser, *Concepts Magn. Reson.* **2004**, *21A* (1), 10–21.
- [35] C. M. Thiele, *Concepts Magn. Reson.* **2007**, *30A* (2), 65–80.
- [36] B. Böttcher, C. M. Thiele, in *Encyclopedia of Magnetic Resonance*, (Herausgegeben von R. K. Harris), John Wiley & Sons, Ltd., **2012**.
- [37] H. Kessler, *Angew. Chem.* **1970**, *82* (6), 237–253.
- [38] O. A. Müller, *Die Totalsynthese von Fast Blue*, Dissertation, TU Darmstadt, **2013**.
- [39] O. Dann, G. Volz, E. Demant, W. Pfeifer, G. Bergen, H. Fick, E. Walkenhorst, *Liebigs Ann. Chem.* **1973**, *1973* (7), 1112–1140.
- [40] O. Dann, H. Char, H. Griebmeier, *Liebigs Ann. Chem.* **1982**, *1982* (10), 1836–1869.
- [41] O. Dann, H. Char, P. Fleischmann, H. Fricke, *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, *1986* (3), 438–455.
- [42] N. P. Grimster, C. Gauntlett, C. R. A. Godfrey, M. J. Gaunt, *Angew. Chem.* **2005**, *117* (20), 3185–3189.
- [43] J. Halli, G. Manolikakes, unveröffentlichte Forschungsergebnisse.
- [44] N. Kolmer-Anderl, *N-Heteroacene als funktionale Halbleiter in anorganisch-organischen Feldeffekttransistoren*, Dissertation, TU Darmstadt, **2014**.
- [45] R. Göstl, B. Kobin, L. Grubert, M. Pätzelt, S. Hecht, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18* (45), 14282–14285.
- [46] V. Sashuk, L. H. Peeck, H. Plenio, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16* (13), 3983–3993.
- [47] C. E. Müller, L. Wanka, K. Jewell, P. R. Schreiner, *Angew. Chem.* **2008**, *120* (33), 6275–6278.
- [48] J. R. Geigy AG, *Verfahren zur Herstellung einer neuen 3-Amino-1-adamantancarbonsäure und ihrer Salze*, Patent, **1966**, at262967.

- [49] S. Horvat, K. Mlinaric-Majerski, L. Glavas-Obrovac, A. Jakas, J. Veljkovic, S. Marczi, G. Kragol, M. Rosic, M. Matkovic, A. Milostic-Srb, *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (11), 3136–3142.
- [50] L. Wanka, C. Cabrele, M. Vanejews, P. R. Schreiner, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, *2007* (9), 1474–1490.
- [51] C. B. Shinisha, R. B. Sunoj, *Org. Lett.* **2009**, *11* (15), 3242–3245.
- [52] G. Cornilescu, J. L. Marquardt, M. Ottiger, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (27), 6836–6837.
- [53] W.-Y. Choy, M. Tollinger, G. A. Mueller, L. E. Kay, *J. Biomol. NMR* **2001**, *21* (1), 31–40.
- [54] F. Hallwass, M. Schmidt, H. Sun, A. Mazur, G. Kummerlöwe, B. Luy, A. Navarro-Vázquez, C. Griesinger, U. M. Reinscheid, *Angew. Chem.* **2011**, *123* (40), 9659–9662.
- [55] A. Buckingham, K. McLauchlan, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1967**, *2* (1), 63–109.
- [56] L. Braunschweiler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1983**, *53* (3), 521–528.
- [57] D. G. Davis, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107* (9), 2820–2821.
- [58] A. Bax, D. G. Davis, *J. Magn. Reson.* **1985**, *65* (2), 355–360.
- [59] T. D. W. Claridge, in *Encyclopedia of Magnetic Resonance*, (Herausgegeben von R. K. Harris, R. E. Wasylishen), John Wiley, Chichester, **2009**.
- [60] A. Bax, R. Freeman, S. P. Kempell, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102* (14), 4849–4851.
- [61] A. Bax, R. Freeman, S. P. Kempell, *J. Magn. Reson.* **1980**, *41* (2), 349–353.
- [62] A. Bax, R. Freeman, T. A. Frenkiel, M. H. Levitt, *J. Magn. Reson.* **1981**, *43* (3), 478–483.
- [63] B. Reif, M. Köck, R. Kerssebaum, H. Kang, W. Fenical, C. Griesinger, *J. Magn. Reson. A* **1996**, *118* (2), 282–285.
- [64] C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107* (22), 6394–6396.
- [65] C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1986**, *85* (12), 6837–6852.
- [66] C. Griesinger, O. W. Sørensen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1987**, *75* (3), 474–492.
- [67] M. D. Sørensen, S. M. Kristensen, J. J. Led, O. W. Sørensen, *J. Magn. Reson. A* **1993**, *103* (3), 364–368.
- [68] A. Meissner, O. W. Sørensen, *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39* (1), 49–52.
- [69] A. Enthart, J. C. Freudenberger, J. Furrera, H. Kessler, B. Luy, *J. Magn. Reson.* **2008**, *192* (2), 314–322.
- [70] B. L. Marquez, W. H. Gerwick, R. Thomas Williamson, *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39* (9), 499–530.
- [71] T. Parella, J. F. Espinosa, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2013**, *73* (1), 17–55.
- [72] M. Kurz, P. Schmieder, H. Kessler, *Angew. Chem.* **1991**, *103* (10), 1341–1342.
- [73] D. Uhrín, G. Batta, V. J. Hruby, P. N. Barlow, K. E. Kövér, *J. Magn. Reson.* **1998**, *130* (2), 155–161.
- [74] W. Kozminski, D. Nanz, *J. Magn. Reson.* **1997**, *124* (2), 383–392.
- [75] D. Uhrín, A. Mele, J. Boyd, M. R. Wormald, R. A. Dwek, *J. Magn. Reson.* **1992**, *97* (2), 411–418.

-
- [76] K. E. Kövér, O. Prakash, V. J. Hruby, *Magn. Reson. Chem.* **1993**, *31* (3), 231–237.
- [77] R. Marek, L. Králík, V. Sklenár, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38* (4), 665–668.
- [78] R. T. Williamson, B. L. Márquez, W. H. Gerwick, K. E. Kövér, *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38* (4), 265–273.
- [79] J. Saurí, T. Parella, J. F. Espinosa, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 4473–4478.
- [80] J. Saurí, J. F. Espinosa, T. Parella, *Angew. Chem.* **2012**, *124* (16), 3985–3988.
- [81] C. H. Gotfredsen, A. Meissner, J. Ø. Duus, O. W. Sørensen, *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38* (8), 692–695.
- [82] V. Krishnamurthy, *J. Magn. Reson. A* **1996**, *121* (1), 33–41.
- [83] C. P. Butts, B. Heise, G. Tatolo, *Org. Lett.* **2012**, *14* (13), 3256–3259.
- [84] P. Trigo-Mouriño, A. Navarro-Vázquez, J. Ying, R. R. Gil, A. Bax, *Angew. Chem.* **2011**, *123* (33), 7718–7722.
- [85] B. Reif, M. Köck, R. Kerssebaum, J. Schleucher, C. Griesinger, *J. Magn. Reson. B* **1996**, *112* (3), 295–301.
- [86] K. E. Kövér, P. Forgó, *J. Magn. Reson.* **2004**, *166* (1), 47–52.
- [87] C. M. Thiele, W. Bermel, *Magn. Reson. Chem.* **2007**, *45* (10), 889–894.
- [88] M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **1959**, *30* (1), 11–15.
- [89] M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (18), 2870–2871.
- [90] V. F. Bystrov, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1976**, *10*, 41–82.
- [91] R. Contreras, J. Peralta, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2000**, *37* (4), 321–425.
- [92] C. Altona, in *Encyclopedia of Magnetic Resonance*, (Herausgegeben von R. K. Harris), John Wiley & Sons, Ltd., **2007**.
- [93] G. Bifulco, P. Dambrosio, L. Gomez-Paloma, R. Riccio, *Chem. Rev.* **2007**, *107* (9), 3744–3779.
- [94] I. Solomon, *Phys. Rev.* **1955**, *99* (2), 559–565.
- [95] A. Abragam, *Principles of Nuclear Magnetism*, 1 Aufl., Oxford University Press, Oxford, **1961**.
- [96] R. Harris, *Nuclear Magnetic Resonance*, 1 Aufl., Pitman, London, **1983**.
- [97] C. M. Thiele, K. Petzold, J. Schleucher, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15* (3), 585–588.
- [98] J. Stonehouse, P. Adell, J. Keeler, A. J. Shaka, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (13), 6037–6038.
- [99] K. Stott, J. Stonehouse, J. Keeler, T.-L. Hwang, A. J. Shaka, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (14), 4199–4200.
- [100] K. Stott, J. Keeler, Q. N. Van, A. J. Shaka, *J. Magn. Reson.* **1997**, *125* (2), 302–324.
- [101] S. Macura, B. T. Farmer II, L. R. Brown, *J. Magn. Reson.* **1986**, *70* (3), 493–499.
- [102] H. Hu, K. Krishnamurthy, *J. Magn. Reson.* **2006**, *182* (1), 173–177.

-
- [103] J. Tropp, *J. Chem. Phys.* **1980**, *72* (11), 6035–6043.
- [104] P. F. Yip, D. A. Case, in *Computational Aspects of the Study of Biological Macromolecules by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, (Herausgegeben von J. C. Hoch, F. M. Poulsen, C. Redfield), Springer US, **1991**, 317–330.
- [105] R. Colombo, F. Colombo, A. E. Derome, J. H. Jones, D. L. Rathbone, D. W. Thomas, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1985**, 1811–1815.
- [106] A. Pfaltz, B. Jaun, A. Fassler, A. Eschenmoser, R. Jaenchen, H. H. Gilles, G. Diekert, R. K. Thauer, *Helv. Chim. Acta* **1982**, *65* (3), 828–865.
- [107] R. J. Smith, D. H. Williams, J. C. J. Barna, I. R. McDermott, K. Haegele, F. Piriou, J. Wagner, W. Higgins, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107* (10), 2849–2857.
- [108] C. P. Butts, C. R. Jones, E. C. Towers, J. L. Flynn, L. Appleby, N. J. Barron, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (1), 177–184.
- [109] C. P. Butts, C. R. Jones, J. N. Harvey, *Chem. Commun.* **2011**, *47* (4), 1193–1195.
- [110] C. R. Jones, C. P. Butts, J. N. Harvey, *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, *7* (1), 145–150.
- [111] A. Schuetz, T. Murakami, N. Takada, J. Junker, M. Hashimoto, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **2008**, *120* (11), 2062–2064.
- [112] C. Farès, J. Hassfeld, D. Menche, T. Carlomagno, *Angew. Chem.* **2008**, *120* (20), 3782–3786.
- [113] W. D. Phillips, *J. Chem. Phys.* **1955**, *23* (7), 1363–1364.
- [114] G. Fraenkel, C. Franconi, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82* (17), 4478–4483.
- [115] J. V. Hatton, W. G. Schneider, *Can. J. Chem.* **1962**, *40* (7), 1285–1290.
- [116] R. C. Neuman, L. B. Young, *J. Phys. Chem.* **1965**, *69* (8), 2570–2576.
- [117] C. W. Fryer, F. Conti, C. Franconi, *Ric. Sci., Parte II, Sez. A* **1965**, *35* (2), 788–806.
- [118] A. G. Whittaker, S. Siegel, *J. Chem. Phys.* **1965**, *42* (9), 3320–3324.
- [119] F. Conti, W. von Philipsborn, *Helv. Chim. Acta* **1967**, *50* (2), 603–607.
- [120] M. Blanchard, A. Chevallier, G. Martin, *Tetrahedron Lett.* **1967**, *8* (50), 5057–5060.
- [121] A. Pines, M. Rabinovitz, *Tetrahedron Lett.* **1968**, *9* (31), 3529–3532.
- [122] M. Rabinovitz, A. Pines, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91* (7), 1585–1589.
- [123] C. L. Perrin, T. J. Dwyer, *Chem. Rev.* **1990**, *90* (6), 935–967.
- [124] B. H. Meier, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101* (21), 6441–6442.
- [125] S. Leuthäuser, V. Schmidts, C. M. Thiele, H. Plenio, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14* (18), 5465–5481.
- [126] A. Saupe, *Angew. Chem.* **1968**, *80* (3), 99–115.
- [127] A. C. Weber, C. A. de Lange, W. L. Meerts, E. E. Burnell, *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *496* (4-6), 257–262.
- [128] C. A. de Lange, W. L. Meerts, A. C. J. Weber, E. E. Burnell, *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114* (18), 5878–5887.

-
- [129] N. Tjandra, A. Bax, *Science* **1997**, *278* (5340), 1111–1114.
- [130] C. M. Thiele, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008* (34), 5673–5685.
- [131] A. Saupe, *Z. Naturforsch.* **1964**, *19a* (2), 161–171.
- [132] L. C. Snyder, *J. Chem. Phys.* **1965**, *43* (11), 4041–4050.
- [133] J. A. Losonczi, M. Andrec, M. W. F. Fischer, J. H. Prestegard, *J. Magn. Reson.* **1999**, *138* (2), 334–342.
- [134] C. M. Thiele, V. Schmidts, B. Böttcher, I. Louzao, R. Berger, A. Maliniak, B. Stevansson, *Angew. Chem.* **2009**, *121* (36), 6836–6840.
- [135] G. Kummerlöwe, B. Luy, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **2009**, *68*, 193–232.
- [136] M. Rückert, G. Otting, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (32), 7793–7797.
- [137] A. Elliott, E. J. Ambrose, *Discuss. Faraday Soc.* **1950**, *9*, 246–251.
- [138] C. Robinson, *Trans. Faraday Soc.* **1956**, *52*, 571–592.
- [139] E. T. Samulski, A. V. Tobolsky, *Macromolecules* **1968**, *1* (6), 555–557.
- [140] M. Panar, W. D. Phillips, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90* (14), 3880–3882.
- [141] C. M. Thiele, S. Berger, *Org. Lett.* **2003**, *5* (5), 705–708.
- [142] C. M. Thiele, *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (22), 7403–7413.
- [143] L. Verdier, P. Sakhaii, M. Zweckstetter, C. Griesinger, *J. Magn. Reson.* **2003**, *163* (2), 353–359.
- [144] C. Aroulanda, V. Boucard, F. Guibé, J. Courtieu, D. Merlet, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9* (18), 4536–4539.
- [145] A. Marx, C. M. Thiele, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15* (1), 254–260.
- [146] A. Marx, V. Schmidts, C. M. Thiele, *Magn. Reson. Chem.* **2009**, *47* (9), 734–740.
- [147] A. Marx, B. Böttcher, C. M. Thiele, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16* (5), 1656–1665.
- [148] A. Marx, *Untersuchungen zu den Orientierungseigenschaften des PBLGs und PBDGs*, Dissertation, TU Darmstadt, **2009**.
- [149] L. Arnold, A. Marx, C. M. Thiele, M. Reggelin, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16* (34), 10342–10346.
- [150] N.-C. Meyer, A. Krupp, V. Schmidts, C. M. Thiele, M. Reggelin, *Angew. Chem.* **2012**, *124* (33), 8459–8463.
- [151] G. Kummerlöwe, S. Knör, A. O. Frank, T. Paululat, H. Kessler, B. Luy, *Chem. Commun.* **2008**, 5722–5724.
- [152] G. Kummerlöwe, M. Behl, A. Lendlein, B. Luy, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8273–8275.
- [153] J. Sass, F. Cordier, A. Hoffmann, M. Rogowski, A. Cousin, J. G. Omichinski, H. Löwen, S. Grzesiek, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (10), 2047–2055.
- [154] P. W. Kuchel, B. E. Chapman, N. Müller, W. A. Bubb, D. J. Philp, A. M. Torres, *J. Magn. Reson.* **2006**, *180* (2), 256–265.
- [155] G. Kummerlöwe, F. Halbach, B. Laufer, B. Luy, *Open Spectrosc. J.* **2008**, *2* (1), 29–33.

-
- [156] G. Kummerlöwe, E. F. McCord, S. F. Cheatham, S. Niss, R. W. Schnell, B. Luy, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16* (24), 7087–7089.
- [157] B. Luy, K. Kobzar, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2004**, *116* (9), 1112–1115.
- [158] T. Montag, C. M. Thiele, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19* (7), 2271–2274.
- [159] T. Montag, *Quervernetzte und funktionalisierte Polypeptide als Orientierungsmedien in der NMR-Spektroskopie*, Dissertation, TU Darmstadt, **2013**.
- [160] J. W. Emsley, G. R. Luckhurst, *Mol. Phys.* **1980**, *41* (1), 19–29.
- [161] E. E. Burnell, C. A. de Lange, *J. Magn. Reson.* **1980**, *39* (3), 461–480.
- [162] E. E. Burnell, C. A. de Lange, O. G. Mouritsen, *J. Magn. Reson.* **1982**, *50* (2), 188–196.
- [163] C. Eckart, *Phys. Rev.* **1935**, *47* (7), 552–558.
- [164] E. Burnell, C. de Lange, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *76* (2), 268–272.
- [165] V. Schmidts, *Entwicklung einer Auswertungssoftware zur Anwendung Residualer Dipolarer Kopplungen in der organischen Strukturaufklärung*, Dissertation, TU Darmstadt, **2013**.
- [166] C. M. Thiele, A. Maliniak, B. Stevansson, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (36), 12878–12879.
- [167] U. M. Reinscheid, M. Köck, C. Cychon, V. Schmidts, C. M. Thiele, C. Griesinger, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010* (36), 6900–6903.
- [168] H. M. Ge, H. Sun, N. Jiang, Y. H. Qin, H. Dou, T. Yan, Y. Y. Hou, C. Griesinger, R. X. Tan, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18* (17), 5213–5221.
- [169] V. Schmidts, M. Fredersdorf, T. Lübken, A. Porzel, N. Arnold, L. Wessjohann, C. M. Thiele, *J. Nat. Prod.* **2013**, *76* (5), 839–844.
- [170] H. Sun, U. M. Reinscheid, E. L. Whitson, E. J. d’Auvergne, C. M. Ireland, A. Navarro-Vázquez, C. Griesinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (37), 14629–14636.
- [171] P. Trigo-Mouriño, R. Santamaría-Fernández, V. M. Sánchez-Pedregal, A. Navarro-Vázquez, *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (9), 3101–3104.
- [172] B. Böttcher, V. Schmidts, J. A. Raskatov, C. M. Thiele, *Angew. Chem.* **2010**, *122* (1), 210–214.
- [173] C. Wolff, *Strukturaufklärung und Reaktionsmonitoring katalytischer und photochromer Systeme mittels NMR*, Dissertation, TU Darmstadt, **2015**.
- [174] D. W. Bjarneson, N. O. Petersen, *J. Photochem. Photobiol. A* **1992**, *63* (3), 327–335.
- [175] J. Reichwagen, H. Hopf, A. Del Guerzo, J.-P. Desvergne, H. Bouas-Laurent, *Org. Lett.* **2004**, *6* (12), 1899–1902.
- [176] A. G. L. Olive, A. Del Guerzo, J.-L. Pozzo, J.-P. Desvergne, J. Reichwagen, H. Hopf, *J. Phys. Org. Chem.* **2007**, *20* (11), 838–844.
- [177] A. M. Amer, A. A. El-Bahnasawi, M. R. H. Mahran, M. Lapib, *Monatsh. Chem.* **1999**, *130* (10), 1217–1225.
- [178] M. Eitel, U. Pindur, *Synthesis* **1989**, *1989* (5), 364–367.
- [179] J. R. Garbow, D. P. Weitekamp, A. Pines, *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *93* (5), 504–509.

-
- [180] K. Zangger, H. Sterk, *J. Magn. Reson.* **1997**, *124* (2), 486–489.
- [181] P. Sakhaii, B. Haase, W. Bermel, *J. Magn. Reson.* **2009**, *199* (2), 192–198.
- [182] T. Reinsperger, B. Luy, *J. Magn. Reson.* **2014**, *239* (1), 110–120.
- [183] M. J. Thrippleton, J. Keeler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42* (33), 3938–3941.
- [184] K. E. Cano, M. J. Thrippleton, J. Keeler, A. Shaka, *J. Magn. Reson.* **2004**, *167* (2), 291–297.
- [185] M. J. Thrippleton, R. A. E. Edden, J. Keeler, *J. Mag. Reson.* **2005**, *174* (1), 97–109.
- [186] *Spinach version 1.3.1980*, <http://spindynamics.org/Spinach.php>.
- [187] H. J. Hogben, M. Krzystyniak, G. T. P. Charnock, P. Hore, I. Kuprov, *J. Magn. Reson.* **2011**, *208* (2), 179–194.
- [188] I. Kuprov, *J. Magn. Reson.* **2011**, *209* (1), 31–38.
- [189] A. Karabanov, I. Kuprov, G. T. P. Charnock, A. van der Drift, L. J. Edwards, W. Köckenberger, *J. Chem. Phys.* **2011**, *135* (8), 084106.
- [190] G. Bifulco, R. Riccio, G. E. Martin, A. V. Buevich, R. T. Williamson, *Org. Lett.* **2013**, *15* (3), 654–657.
- [191] N.-C. Meyer, *Helikal chirale Polyacetylene in Katalyse und Analytik*, Dissertation, TU Darmstadt, **2012**.
- [192] C. M. Thiele, A. Marx, R. Berger, J. Fischer, M. Biel, A. Giannis, *Angew. Chem.* **2006**, *118* (27), 4566–4571.
- [193] B. Böttcher, *Studien zu Konformation und Dynamik eines Palladium-Allyl-Komplexes und eines Wirkstoffes mit residualen dipolaren Kopplungen*, Dissertation, TU Darmstadt, **2011**.
- [194] A. Schäfer, H. Horn, R. Ahlrichs, *J. Chem. Phys.* **1992**, *97* (4), 2571–2577.
- [195] R. Ahlrichs, Mitarbeiter, unveröffentlichte Forschungsergebnisse.
- [196] F. Neese, *J. Comput. Chem.* **2003**, *24* (14), 1740–1747.
- [197] F. Neese, F. Wennmohs, A. Hansen, U. Becker, *Chem. Phys.* **2009**, *356* (1-3), 98–109.
- [198] S. Kossmann, F. Neese, *Chem. Phys. Lett.* **2009**, *481* (4-6), 240–243.
- [199] S. Kossmann, F. Neese, *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6* (8), 2325–2338.
- [200] R. Izsák, F. Neese, *J. Chem. Phys.* **2011**, *135* (14), 144105.
- [201] F. Neese, *ORCA – an ab initio, Density Functional and Semiempirical program package*, Version 3.0, Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie, Mülheim an der Ruhr, **2011**.
- [202] F. Neese, *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2012**, *2* (1), 73–78.
- [203] J. Nowag, *Bestimmung der Relativkonfiguration von acyclischen Diamiden*, Bachelorarbeit, TU Darmstadt, **2014**.
- [204] M. Sparkes, *Studien zur Relativkonfigurationsbestimmung diastereomerer Diamide*, Bachelorarbeit, TU Darmstadt, **2015**.
- [205] Wikipedia, The Free Encyclopedia, *Mean of circular quantities*, **2014**, Bearbeitungsstand: 5. November 2014 17:53 UTC, Versions-ID: 632582813 (Abgerufen: 23. März 2015 09:34 UTC).

-
- [206] Wikipedia, Die freie Enzyklopädie, *Arkustangens und Arkuskotangens*, **2014**, Bearbeitungsstand: 23. November 2014, 07:10 UTC, Versions-ID: 136093271 (Abgerufen: 23. März 2015, 09:37 UTC).
- [207] G. Kummerlöwe, S. Schmitt, B. Luy, *Open Spectrosc. J.* **2010**, *4* (1), 16–27.
- [208] G. S. Hammond, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77* (2), 334–338.
- [209] A. Kolmer, *NMR-Spektroskopische Analyse der Konformation eines Organokatalysators*, Diplomarbeit, TU Darmstadt, **2010**.
- [210] A.-C. Pöppler, H. Keil, D. Stalke, M. John, *Angew. Chem.* **2012**, *124* (31), 7963–7967.
- [211] T. A. Halgren, in *Encyclopedia of Computational Chemistry*, (Herausgegeben von P. von Ragué Schleyer, N. L. Allinger, T. Clark, J. Gasteiger, P. A. Kollman, H. F. Schaefer, P. R. Schreiner), John Wiley, Chichester, **1998**.
- [212] C. J. Cramer, *Essentials of Computational Chemistry - Theories and Models*, 2 Aufl., Wiley, Chichester, **2004**.
- [213] W. Koch, M. C. Holthausen, *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*, 2 Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.
- [214] M. Köberle, *NMR-spektroskopische Untersuchungen an einem Organokatalysator*, Studienarbeit, TU Darmstadt, **2012**.
- [215] P. Jean-Louis Hérisson, Y. Chauvin, *Makromol. Chem.* **1971**, *141* (1), 161–176.
- [216] S. J. Connon, S. Blechert, *Angew. Chem.* **2003**, *115* (17), 1944–1968.
- [217] M. Haus, *Rotationskinetiken in Bis(NHC)-Komplexen*, Bachelorarbeit, TU Darmstadt, **2011**.
- [218] L. Kaltschnee, *Rotationskinetiken in Bis(NHC)-Komplexen*, Studienarbeit, TU Darmstadt, **2011**.
- [219] R. Berger, C. Fischer, M. Klessinger, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102* (36), 7157–7167.
- [220] <http://cheshirenmr.info/>, abgerufen: 13. August 2014 10:42 UTC.
- [221] P. R. Rablen, S. A. Pearlman, J. Finkbiner, *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103* (36), 7357–7363.
- [222] R. Jain, T. Bally, P. R. Rablen, *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (11), 4017–4023.
- [223] T. Bally, P. R. Rablen, *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (12), 4818–4830.
- [224] M. W. Lodewyk, D. J. Tantillo, *J. Nat. Prod.* **2011**, *74* (5), 1339–1343.
- [225] M. W. Lodewyk, M. R. Siebert, D. J. Tantillo, *Chem. Rev.* **2012**, *112* (3), 1839–1862.
- [226] M. W. Lodewyk, C. Soldi, P. B. Jones, M. M. Olmstead, J. Rita, J. T. Shaw, D. J. Tantillo, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (45), 18550–18553.
- [227] W. Kutzelnigg, U. Fleischer, M. Schindler, *The IGLO-Method: Ab Initio Calculation and Interpretation of NMR Chemical Shifts and Magnetic Susceptibilities*, Bd. 23, Springer-Verlag, Heidelberg, **1990**.
- [228] C. Adamo, V. Barone, *J. Chem. Phys.* **1999**, *110* (13), 6158–6170.
- [229] *MacroModel*, Version 9.9, Schrödinger, LLC, New York, **2012**.
- [230] *Maestro*, Version 9.7, Schrödinger, LLC, New York, **2014**.
- [231] W. L. Jorgensen, J. Tirado-Rives, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110* (6), 1657–1666.
- [232] W. L. Jorgensen, D. S. Maxwell, J. Tirado-Rives, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (45), 11225–11236.

Tabellenverzeichnis

4.2.1	Vergleich der experimentellen und berechneten ^{13}C -Verschiebungen	64
4.3.1	Die Diederwinkel der optimierten Strukturen	110
4.3.2	Die gemessenen $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstanten der vier Syntheseprodukte.	111
4.3.3	Die aus NOE-Daten bestimmten Abstände der Syntheseprodukte A, B und C.	111
4.3.4	Die gemessenen RDC-Werte der vier Syntheseprodukte.	112
4.3.5	Die per SCST-Fit bestimmten Werte von Q_{Baltzar} der optimierten Strukturen für Produkt A .	113
4.3.6	Die per MCST-Fit gefundenen Minima der optimierten Strukturen für Produkt A	113
4.3.7	Ergebnisse des MCST-Fit zum schrittweisen Aufbau des Produkts A	114
4.3.8	Ergebnisse des MCST-Fit zum schrittweisen Aufbau des Produkts A	115
4.3.9	Vergleich der Minima aus Schritt (4) mit NOE-Daten	116
4.3.10	Die per SCST-Fit bestimmten Werte von Q_{Baltzar} der optimierten Strukturen für Produkt A .	117
4.3.11	Ergebnisse des MCST-Fit zum schrittweisen Aufbau des Produkts A	117
4.3.12	Ergebnisse des MCST-Fit zum schrittweisen Aufbau des Produkts A	118
4.3.13	Vergleich der Minima aus Schritt (4) mit NOE-Daten	118
4.3.14	Die per SCST-Fit bestimmten Werte von Q_{Baltzar} der optimierten Strukturen für Produkt B .	119
4.3.15	Die per MCST-Fit gefundenen Minima der optimierten Strukturen für Produkt B	120
4.3.16	Ergebnisse des MCST-Fit zum schrittweisen Aufbau des Produkts B	120
4.3.17	Ergebnisse des MCST-Fit zum schrittweisen Aufbau des Produkts B	121
4.3.18	Vergleich der Minima aus Schritt (4) mit NOE-Daten	121
4.3.19	Die per MCST-Fit gefundenen Minima der optimierten Strukturen für Produkt C	123
4.3.20	Die bestimmten RDCs für das Tetrapeptid	127
4.3.21	Die bestimmten Abstände aus ROE-Daten für das Tetrapeptid	127
4.3.22	Die besten Übereinstimmungen des SCST-Fits für verschiedene Strukturvorschläge	129
4.3.23	MCST-Fit des Tetrapeptids	130
4.3.24	Einteilung der Diederwinkel in Bereiche: Konformeranzahl in den Diederwinkelbereichen.	131
4.3.25	Schrittweiser Aufbau der Phe-Cha-Seite des Tetrapeptids	132
4.3.26	Schrittweiser Aufbau der His-Seite des Tetrapeptids	133
4.3.27	Verbindung des Phe-Cha-Teils und des His-Teils des Tetrapeptids.	133
6.3.1	Vergleich der aus 2D-EASY-ROESY-Spektren und aus 1D PFGSE NOE-Spektren quantifizierten Abstände	154
6.5.1	Per NOE bestimmte Abstände des Tetrapeptids in Anwesenheit des Diols	163
6.5.2	Intermolekulare NOE-Kontakte zwischen Tetrapeptid und Diol	171

Abbildungsverzeichnis

1.1	Die zu bestimmenden Aspekte der Strukturaufklärung kleiner organischer Moleküle	1
1.2	Verschiedene Modelle molekularer Erkennung	2
3.2.1	Verschiedene Korrelationsexperimente	11
3.3.1	Verschiedene Experimente zur Bestimmung von Kopplungskonstanten	13
3.4.1	Die KARPLUS-Beziehung am Beispiel eines Proteinfragmentes	15
3.5.1	Energieniveaudiagramm für ein Zwei-Spin- $\frac{1}{2}$ -System	17
3.5.2	Auftragung der maximalen Signalverstärkung durch NOE oder ROE gegen τ_c	22
3.5.3	Auftragung des transienten NOE $f_I \{S\}$ gegen die Mischzeit t	23
3.5.4	PANIC-Auftragung des normierten transienten NOE ξ gegen die Mischzeit t	26
3.5.5	Drei mittels qualitativer und halbqualitativer NOE-Auswertung untersuchte Moleküle . . .	30
3.5.6	Zwei mittels quantitativer NOE-Auswertung untersuchte Moleküle	30
3.5.7	Zwei mittels quantitativer NOE-Auswertung untersuchte Moleküle	31
3.7.1	Die dipolare Kopplung	36
3.7.2	Beschreibung im Labor- und Molekülkoordinatensystem	37
3.7.3	Verschiedene Alignmentmedien.	39
3.7.4	Die RDC-Analyse wurde an diesen Testmolekülen erprobt.	42
3.7.5	Zwei Beispiele zur Relativkonfigurationsaufklärung starrer Moleküle mit der SCST-Methode.	43
3.7.6	Zwei Beispiele zur Relativkonfigurationsaufklärung mit der SCST-Methode.	43
3.7.7	Zwei mittels der MCMT-Methode aufgeklärte Moleküle.	44
3.7.8	Drei mittels der MCST-Methode analysierte Moleküle.	45
4.2.1	Mögliche Dimerisierungsprodukte von Naphthochinoxalin	49
4.2.2	Mögliche Dimerisierungsprodukte von Pyrazinophenazin	50
4.2.3	COSY der Reaktionsprodukte	63
4.2.4	1,1-ADEQUATE des Produktes der oxidativen HECK-Reaktion	65
4.2.5	1,1-ADEQUATE des Produktes der Amid-WITTIG-Reaktion	66
4.3.1	Vergleich des experimentellen und des gemittelten Abstandes	97
4.3.2	Nummerierung der Diamide	109
4.3.3	Die vier möglichen Diastereomere der Diamide	109
4.3.4	Experimentelle vs. aus der KARPLUS-Beziehung bestimmte Kopplungskonstanten	116
4.3.5	Experimentelle vs. aus der KARPLUS-Beziehung bestimmte Kopplungskonstanten	119
4.3.6	Experimentelle vs. aus der KARPLUS-Beziehung bestimmte Kopplungskonstanten	122
4.3.7	Der von MÜLLER ET AL. postulierte Übergangszustand	125
4.3.8	Die verwendete Nummerierung des Tetrapeptids	126
4.3.9	^1H -Temperaturserie des Tetrapeptids bei 700 MHz	126
4.3.10	Ausschnitt der ^1H -Temperaturserie des Tetrapeptids bei 700 MHz	127
4.3.11	Darstellung des Drei-Konformer-Fits	129
4.3.12	Die vier im Minimum populierte Konformere	134
4.3.13	Vergleich der per NOE bestimmten Distanzen des Tetrapeptids	135
4.3.14	Intermolekulare NOEs zwischen Tetrapeptid und Diol	136
4.4.1	Umsatz-Zeit-Kurven der Bis-NHC-Komplexe	138
5.1	Die im Rahmen der vorliegenden kumulativen Dissertation untersuchten Moleküle.	148
6.2.1	Die 105 Moleküle des Kalibrationssets CHESHIRE CCAT	151
6.2.2	Kalibrationsgerade zur Berechnung der ^{13}C -chemischen Verschiebungen	152
6.3.1	PANIC-Plots der ROE-Spektren von Strychnin	155
6.5.1	PANIC-Plots der ROE-Spektren des Tetrapeptids	157
6.5.2	PANIC-Plots der NOE-Spektren des Tetrapeptids mit dem Diol	164

Schemaverzeichnis

2.1.1	Oxidative Heck-Reaktion zur Herstellung des FAST-BLUE-Vorläufers mit Alternativprodukt . .	4
2.1.2	Allgemeines Syntheschema der vier Diastereomere der Diamide	5
2.2.1	Mögliche Photooxidation von Tetracen	5
2.2.2	Photocyclisierung von DMDAE	6
2.3.1	Ringschlussmetathesereaktion	6
2.3.2	Die enantioselective Acylierung von racemischem <i>trans</i> -Cyclohexan-1,2-diol	7
3.6.1	Ein Ein-Spin- $\frac{1}{2}$ -System mit zwei Konformeren und Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung.	32
3.6.2	Austausch der Methylgruppen in <i>N,N</i> -dimethylformamid	34
3.6.3	1,2-Methylshift im Heptamethylbenzeniumion	34
3.6.4	Untersuchung von Bindungsstärken in GRUBBS-II-artigen Komplexen.	35
4.2.1	Mögliche Photooxidation von Naphthochinoxalin	48
4.2.2	Mögliche Photooxidation von Pyrazinophenazin	50
4.2.3	Amid-WITTIG-Reaktion zur Herstellung des FAST-BLUE-Vorläufers	66
4.3.1	Cyclisierung von DMDAE	96
4.3.2	Postulierter Verlauf der enantioselectiven Acylierung	125
6.3.1	Ausschnitt aus einer Koordinaten-Eingabedatei von Strychnin	153
6.3.2	Ausschnitt aus einer Abstands-Eingabedatei von Strychnin	153
6.3.3	Ausschnitt aus einer Methylgruppen-Abstands-Eingabedatei von Lacton	153
6.3.4	Ausschnitt aus einer Ausgabedatei von Strychnin	154

Danksagung

An erster Stelle danke ich PROF. DR. CHRISTINA THIELE für die Möglichkeit, die vorliegende Dissertation anzufertigen, sowie für die interessante Themenstellung. Zudem möchte ich mich für die engagierte und kompetente Betreuung bedanken, bei der sie stets das richtige Maß zwischen Unterstützung und Freiraum fand. Ebenfalls danke ich ihr für die von ihr geschaffene Atmosphäre in ihrem Arbeitskreis, in dem ich mich immer zuhause fühlte. Außerdem bin ich dankbar für die Möglichkeit, Teile dieser Arbeit in Publikationen und auf verschiedenen Konferenzen zu präsentieren.

Der Besuch von Konferenzen wurde mir auch durch drei Reisestipendien ermöglicht. Ich möchte mich daher bei den Organisatoren der Konferenzen SMASH 2011, Euromar 2012 und SMASH 2013 dafür bedanken, dass mir diese Stipendien zuteilwurden. Ebenfalls danke ich der Gesellschaft Deutscher Chemiker, die für die Finanzierung der Stipendien sorgte.

Die verschiedenen Projekte, aus denen meine Dissertation erwuchs, sind mit einer Reihe von Kooperationspartnern entstanden, denen ich ebenfalls danken möchte. DR. LARS PEECK danke ich für die Synthese der Bis-NHC-Komplexe und PROF. DR. HERBERT PLENIO (TU Darmstadt) für die Zusammenarbeit im Bis-NHC-Projekt. ISTVÁN TIMÁRI, PROF. DR. KATALIN KÖVÉR (beide Universität Debrecen), DR. RALPH ADAMS, DR. MATHIAS NILSSON und PROF. DR. GARETH MORRIS (alle Universität Manchester) danke ich für die Kooperation im Bereich der entkoppelten HSQC-Experimente.

Außerdem danke ich DR. LUKE EDWARDS und PROF. DR. ILYA KUPROV für die Spinach-Simulationen. DR. NICOLE KOLMER-ANDERL und PROF. DR. MATTHIAS REHAHN (TU Darmstadt) danke ich für die gute Zusammenarbeit im Tetracen-Projekt. Mein Dank geht auch an DR. CHRISTIAN MÜLLER und PROF. DR. PETER SCHREINER (Justus-Liebig-Universität Gießen), deren Tetrapeptid mich einige Mühe kostete, und das ohne das Gel von DR. ANN-CHRISTIN PÖPPLER (Universität Warwick) nur schwer aufzuklären gewesen wäre.

Weiterhin möchte ich DR. OLIVER MÜLLER und PROF. DR. MICHAEL REGGELIN (TU Darmstadt) für die Kooperation im Rahmen des FAST-BLUE-Projekts danken. Ebenfalls geht mein Dank an DR. ROBERT GÖSTL und PROF. DR. STEFAN HECHT (Humboldt-Universität zu Berlin) sowie DR. PETER MONECKE (Sanofi Aventis Deutschland GmbH), die am DMDAE-Projekt beteiligt waren. JULIETTE HALLI und DR. GEORG MANOLIKAKES möchte ich außerdem für die Zusammenarbeit am Diastereomeren-Projekt danken. Zuletzt möchte ich mich bei MARKUS HAUS und JENS NOWAG bedanken, deren unter meiner Anleitung durchgeführten Bachelorarbeiten ebenfalls zum Gelingen der Projekte beitrugen.

Dass ich trotz dieser vielen Projekte viel Freude an meiner Promotion hatte, ist vor allem dem tollen Arbeitskreis zu verdanken. Meiner Bürokollegin DR. CHRISTIANE WOLFF danke ich neben dem stets offenen Ohr für meine Probleme und dem Korrekturlesen dieser Dissertation für die Sonnenaufgänge. Meinem ehemaligen Bürokollegen DR. VOLKER SCHMIDTS möchte ich für die Beantwortung der vielen kleinen und großen Fragen rund um NMR danken, außerdem für die Zusammenarbeit in einigen Projekten und für das Korrekturlesen dieser Dissertation. Mein Dank gilt LUKAS KALTSCHNEE für die Zusammenarbeit an diversen Projekten, für das Korrekturlesen dieser Arbeit und für die Nächte in Dublin. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei DR. WITALI BLUM, mit dem ich mir ein paar Monate ein Labor und ein paar Jahre den Wald teilen durfte.

MAIC FREDERSDORF danke ich für die Zusammenarbeit an einigen der aufgeführten Kooperationen und für das Grillen. MIRA KÖBERLE danke ich für die bei mir durchgeführte Hauptvertiefung und, genauso wie MICHAELA STANDHARDT und STEFANIE HANSMANN, für das Après-Ski.

DR. ANDREAS MARX danke ich dafür, mein Interesse an NMR zu wecken. Dieses Interesse wurde dank DR. BENJAMIN BÖTTCHER zu Begeisterung. Außerdem möchte ich DR. TOBIAS LAREM für die Synthese der Alignmentmedien und für die Einführung in die Kaffeewissenschaft danken. Nicht vergessen möchte ich DR. NILS MEYER, DR. HOLGER SEELERT und DR. YULIA MOSKALENKO SERRA, von deren Erfahrung ich viel profitieren konnte.

Natürlich möchte ich auch JONAS KIND, MARTIN LEYENDECKER, SUSANN WEISSHEIT, SHARON JEZIOROWSKI, MICHAELA FRÖHLICH, MATTHIAS HINZER und FERDINAND HEIMROTH danken, mit denen ich viel zu wenig Zeit verbringen durfte. Viva la Black Empire!

Dankbar bin ich auch MATTHIAS HEMPE, TOBIAS WOMBACHER und ANDREAS RÖBIG. Auch wenn wir manchmal fachlich diskutieren, danke ich euch für die Freundschaft und dafür, mich daran zu erinnern, dass das Leben auch außerhalb der Universität lebenswert ist. Nicht zuletzt möchte ich auch meiner Familie für die Unterstützung, Geduld und Zuspruch danken.

Worte genügen nicht, um auszudrücken, wie dankbar ich meiner Frau NICOLE bin. Danke für die Unterstützung, für die Zusammenarbeit, für das Korrekturlesen, für den Rückhalt und dafür, dass ich nie alleine gehe.

Andreas Kolmer
Jahnstr. 125
64285 Darmstadt

26. Mai 2015

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

(Dipl.-Ing. Andreas Kolmer)

Andreas Kolmer
Jahnstr. 125
64285 Darmstadt

26. Mai 2015

Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

(Dipl.-Ing. Andreas Kolmer)