

NMR-spektroskopische Konstitutionsaufklärung von Glycopeptiden mit der COLOC-Technik

Von Horst Kessler*, Wolfgang Bermel,
Christian Griesinger und Cenek Kolar

Bei der NMR-spektroskopischen Konstitutionsaufklärung organischer Verbindungen erkennt man meist leicht die skalar gekoppelten Protonenspinsysteme, z. B. durch H,H-COSY^[1] oder H-Relayed-H,H-COSY^[2]. Sind diese Spinsysteme durch quartäre Kohlenstoffatome oder Heteroatome, welche keine Protonen tragen, getrennt, so ist die Verknüpfung nur schwer zu bestimmen. Häufig hilft man sich dann durch Interpretation von Kern-Overhauser-Effekten (z. B. bei der Zuordnung der NMR-Signale von Biopolymeren wie Peptiden^[3] und Oligosacchariden^[4]), die jedoch, um Zirkelschlüsse zu vermeiden, möglichst nur zur Klärung der Stereochemie (Konfiguration und Konformation) herangezogen werden sollte^[5]. Zur Bestimmung von Aminosäuresequenzen eignet sich, wie wir kürzlich fanden, die zweidimensionale heteronukleare Korrelation über Fernkopplungen (COLOC)^[6]. Wir demonstrieren hier die Leistungsfähigkeit dieser Methode an dem Disaccharid-Derivat 1 (siehe Abb. 2), bei dem gleich drei Strukturprobleme durch die COLOC-Technik gelöst werden konnten:

- Die Verknüpfung der Zuckerreste 3-1' wurde mit einer $^3J_{H,C}$ -Kopplung über das Sauerstoffatom bewiesen^[7].
- Die Verknüpfung von C-1 des Zuckers mit der Aminogruppe der Aminosäure über eine Urethan-Carbonyloxygruppe wurde bestätigt.
- Die Stellung der Acetyl- und Benzoylgruppen wurde durch Kopplungen der Carbonyl-C-Atome der Acylreste zu Protonen der Zucker- und Acylreste bewiesen. Gleichzeitig ließen sich dabei die ^{13}C -Signale und die 1H -Signale der Acetylgruppen zuordnen.

Beim Versuch der Glycosylierung von Ddz-Serin-benzylester (Ddz = α,α -Dimethyl-3,5-dimethoxy-benzylloxycarbonyl) fand überraschend eine Wanderung des α,α -Dimethyl-3,5-dimethoxybenzylrestes zur β -Hydroxygruppe des Serins und die Bildung eines Glycosylurethans statt^[8]. Obwohl durch ein Signal eines Urethan-Carbonyl-C-Atoms im ^{13}C -NMR-Spektrum der Substanz nach Abspaltung der vermeintlichen Ddz-Schutzgruppe und durch die ungewöhnliche Tieffeldverschiebung des 1H -NMR-Signals von H-1 sowie durch eine massenspektroskopische Analyse des Glycosylurethans bereits ein Hinweis auf die Verknüpfung existierte^[8], war ein zweifelsfreier Strukturbeweis für 1 doch erwünscht.

Durch Analyse des 1H -NMR-Spektrums von 1 (Abb. 1a) und eines H,H-COSY-Spektrums^[1] gelang die Zuordnung der Zuckerprotonen und die Ermittlung der relativen Konfiguration in beiden Pyranoseringen. Die nichtquartären C-Atome wurden wie üblich durch ein H,C-COSY-Spektrum^[9] zugeordnet. Um die Verknüpfung der Zuckerreste zu beweisen, wurde ein COLOC-Spektrum für aliphatische C-Atome^[10] aufgenommen. Der Querschnitt an

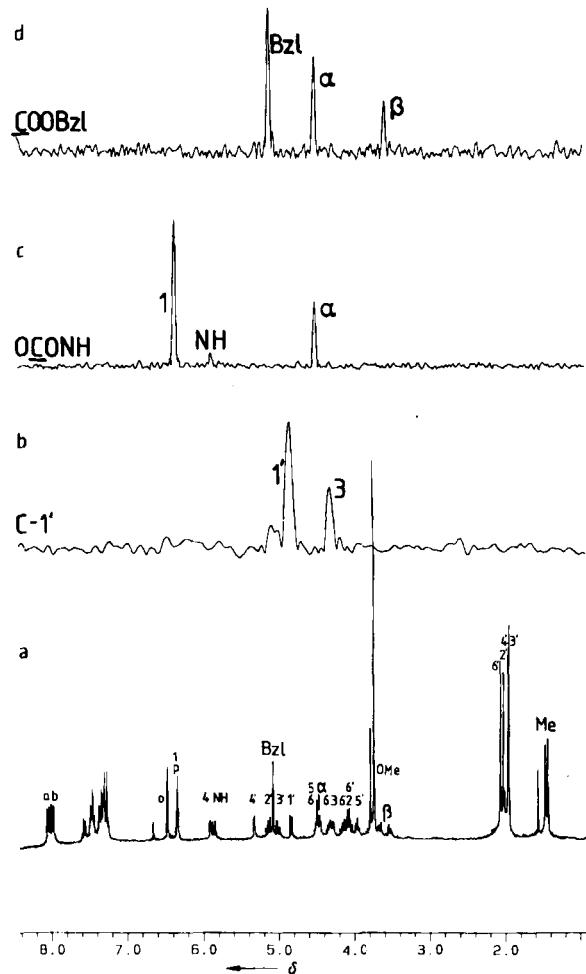


Abb. 1. 300MHz- 1H -NMR-Spektrum von 1 (a) und Querschnitte durch COLOC-Spektren (b-d). b: Querschnitt am Signal von C-1'. Das Signal zu H-3 gibt die Information über die Verknüpfung der Zuckerreste. c: Querschnitt am Signal des Urethan-C-Atoms. Neben einer schwachen $^2J_{CH}$ -Korrelation zum NH-Proton wird die Nachbarschaft von H-1 und vom α -Proton des Serins deutlich. d: Querschnitt am Signal des Carbonyl-C-Atoms des Esters. – Die COLOC-Spektren wurden mit der Pulssequenz $\pi/2(^1H)t_1/2\pi(^1H, ^{13}C)(\Delta_1-t_1/2)\pi/2(^1H, ^{13}C)\Delta_2$ Akquis. (^{13}C) 1H -Breitband-Entkoppl. erhalten. Meßbedingungen: b: 140 Experimente zu je 128 Scans mit 8 K Datenpunkten, Akquisitionszeit: 0.45 s, Relaxationsdelay: 1.5 s, $\Delta_1=\Delta_2=63$ ms, Gesamtmeßzeit: 13 h. Spektrale Breiten in F2: 9091 Hz, in F1: 2994 Hz, 1H -Meßfrequenz: 300 MHz – c, d: 330 Experimente zu je 64 Scans mit 4 K Datenpunkten, Akquisitionszeit: 0.5 s, Relaxationsdelay: 1.5 s, $\Delta_1=\Delta_2=90$ ms, Gesamtmeßzeit: 13 h. Spektrale Breiten in F2: 4032 Hz, in F1: 2439 Hz, 1H -Meßfrequenz: 270 MHz.

der chemischen Verschiebung von C-1' zeigt neben einer Korrelation von C-1' zu H-1' eine von C-1' zu H-3 ($^3J_{CH}$ -Kopplung, Abb. 1b). Am Signal von C-3 findet man dagegen nur $^2J_{CH}$ - und $^3J_{CH}$ -Kopplungen zu Protonen des gleichen Zuckerringes. Im übrigen enthält das COLOC-Spektrum eine Vielzahl von Kreuzsignalen zu jedem Kohlenstoffatom, wodurch die Zuordnung der 1H - und ^{13}C -NMR-Spektren vielfach bestätigt wird.

Das ^{13}C -NMR-Signal der Urethan-Carbonylgruppe bei $\delta=153.38$ wurde in einem zweiten COLOC-Spektrum für quartäre Kohlenstoffatome^[6, 11] durch seine Kopplung zu dem NH- und α -Proton des Serins identifiziert (Abb. 1c). Das α -Proton koppelt nur zu einem einzigen weiteren quartären C-Atom bei $\delta=169.86$, das aber durch weitere Kopplungen zu einem β -Proton des Serins und einem Methylenproton des Benzylrestes als das Signal der Ester-Carbonylgruppe charakterisiert wurde (Abb. 1d). Besonders

[*] Prof. Dr. H. Kessler, Dipl.-Chem. C. Griesinger
Institut für Organische Chemie der Universität
Niederurseler Hang, D-6000 Frankfurt am Main 50

Dr. W. Bermel
Bruker Analytische Meßtechnik GmbH
Silberstreifen, D-7512 Rheinstetten

Dr. C. Kolar
Behring Werke
Postfach 1140, D-3550 Marburg

wichtig ist schließlich noch die Kopplung des Urethan-¹³C-Atoms mit H-1 des Zuckerrestes (Abb. 1c).

Tabelle 1. Chemische Verschiebungen (δ -Werte) von 1.

| Position | Zucker | δ (H) | δ (C) | Schutzgruppe | δ (C) |
|--------------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 1 | | 6.34 | 92.13 | | |
| 2 | | 4.08 | 59.07 | | |
| 3 | | 4.28 | 75.61 | | |
| 4 | | 5.91 | 69.87 | 8.04 (ortho) | 165.26 |
| 5 | | 4.45 | 69.43 | | |
| 6 | | 4.45, 4.34 | 62.82 | 8.00 (ortho) | 165.94 |
| 1' | | 4.84 | 101.50 | | |
| 2' | | 5.15 | 68.73 | 2.01 | 169.10 |
| 3' | | 5.01 | 70.76 | 1.94 | 169.93 |
| 4' | | 5.33 | 66.64 | 1.95 | 170.04 |
| 5' | | 3.96 | 70.76 | | |
| 6' | | 4.12 [a] | 61.06 | 2.05 | 170.25 |
| Ser α | | 4.46 | 54.42 | | |
| β | | 3.53, 3.67 | 62.48 | | |
| NH | | 5.86 | | | |
| Urethan-CO | | | 153.38 | | |
| Ester-CO | | | 169.86 | | |

[a] Breit.

Alle übrigen Kohlenstoffatome lassen sich zweifelsfrei in diesem Spektrum zuordnen (Tabelle 1). Die Positionen der Acetyl- und Benzoylschutzgruppen können durch Kopplungen ihrer Carbonyl-C-Atome mit den Protonen der Zuckerreste *und* denen der Acylgruppen (CH_3 bzw. C_6H_5) bestimmt werden (Abb. 2). Mit der COLOC-Technik läßt sich also effizient die Stellung von Schutzgruppen ermitteln, was sowohl bei der Charakterisierung von Synthesezwischenprodukten als auch bei der Strukturaufklärung von Naturstoffen von Nutzen sein kann.

Wir haben demonstriert, daß mit COLOC-Spektren die ¹³C-NMR-Signale quartärer und nicht quartärer C-Atome

eindeutig zugeordnet werden können. Ferner wird auch die Zuordnung von Signalen in ¹H-NMR-Spektren erheblich zuverlässiger; selbst Protonen, die keine aufgelösten Kopplungen zu anderen Protonen aufweisen oder die durch nicht protonentragende Kohlenstoff- oder Heteroatome separiert sind, können mit dem COLOC-Experiment verknüpft werden.

Eingegangen am 4. November 1985,
veränderte Fassung am 8. Januar 1986 [Z 1518]

CAS-Registry-Nummer:
1: 100842-24-8.

- [1] W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* 64 (1976) 2229.
- [2] G. Eich, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 3731.
- [3] W. A. Gibbons, D. Crepaux, J. Delayre, J. J. Dunand, G. Hajdukovic, H. R. Wyssbrod in R. Walter (Hrsg.): *Peptides*, Ann Arbor Science Publ., Ann Arbor, MI, USA 1975, S. 127; G. Wagner, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* 155 (1982) 347.
- [4] J. Dabrowski, P. Hanfland, H. Egge, U. Dabrowski, *Arch. Biochem. Biophys.* 210 (1981) 405; H. Thøgersen, R. U. Lemieux, K. Bock, B. Meyer, *Can. J. Chem.* 60 (1982) 44.
- [5] H. Kessler, H. Oschkinat, H. R. Loosli in R. M. Carlson, W. R. Croasmun (Hrsg.): *2D NMR Spectroscopy*, VCH Publ., Deerfield Beach, FL, USA, Kap. 4, im Druck.
- [6] H. Kessler, C. Griesinger, J. Zarbock, H. R. Loosli, *J. Magn. Reson.* 57 (1984) 331.
- [7] Bereits früher wurde durch ein ¹H,¹³C-COSY-Spektrum, das auf kleine Kopplungen optimiert war (die Pulssequenz unterscheidet sich von der des COLOC-Experimentes), eine Kopplung von C-2 des Fructoseringes mit H-1 des Glucoseringes in Saccharose nachgewiesen: W. E. Hull, unveröffentlicht (siehe Prospekt der Firma Bruker „Two-Dimensional NMR“ vom Dezember 1982, Abb. 18b).
- [8] C. Kolar, U. Knödler, F. Seiler, H. Paulsen, V. Sinnwell, M. Schultz, W. Fehlhaber, unveröffentlicht.
- [9] G. Bodenhausen, R. Freeman, *J. Magn. Res.* 28 (1977) 471.
- [10] H. Kessler, W. Bermel, C. Griesinger, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 1083.
- [11] H. Kessler, C. Griesinger, J. Lautz, *Angew. Chem.* 96 (1984) 434; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 444.

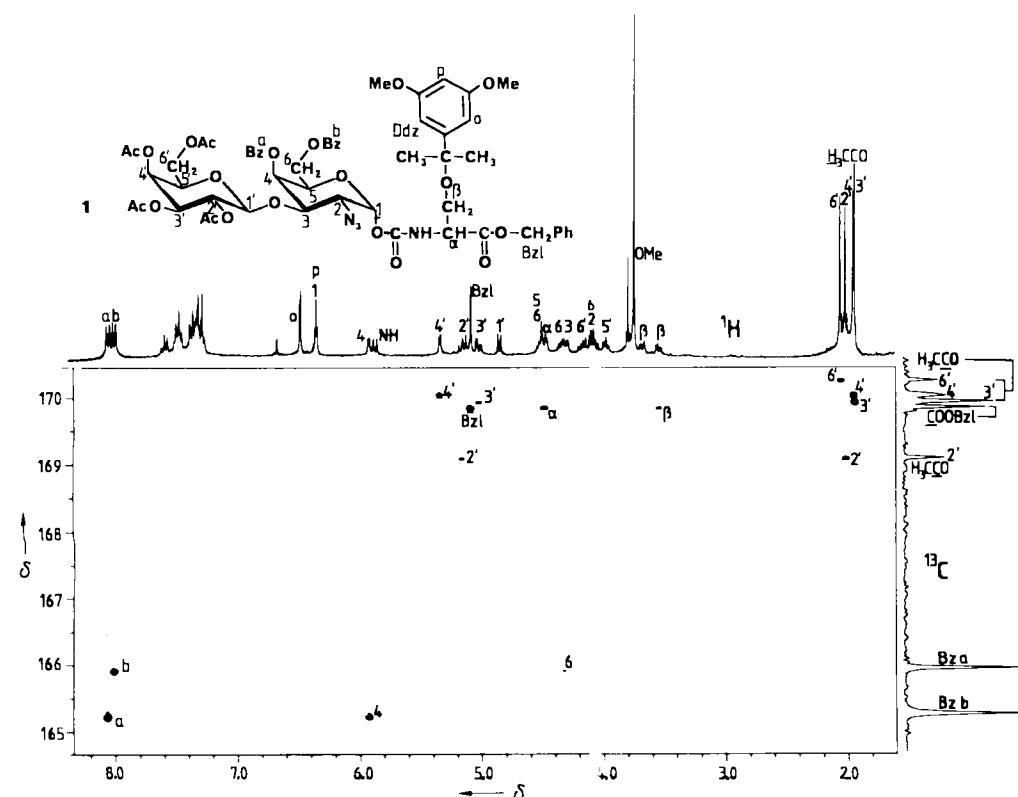


Abb. 2. Ausschnitt aus dem 300MHz-COLOC-NMR-Spektrum für die quartären Kohlenstoffatome. Die Carbonylgruppen werden durch Kreuzsignale zu den Protonen der Benzoylgruppen a und b und der Acetylgruppen identifiziert. Kreuzsignale zu den Signalen der Zuckerreste geben die Stellung der Schutzgruppen an. Meßbedingungen: siehe Abb. 1c,d.