

ANGEWANDTE CHEMIE

98. Jahrgang 1986
Heft 5
Seite 381–482

¹⁵N-NMR-Spektroskopie – neue Methoden und ihre Anwendung**

Von Wolfgang von Philipsborn* und Raffaello Müller

**Neue analytische
Methoden (28)**

Nach ¹H- und ¹³C-Kernen ist in der Organischen und Bioorganischen Chemie der Stickstoff-Kern die wichtigste NMR-Sonde bei strukturchemischen Studien. Lange Zeit jedoch verzichtete man auf die Stickstoff-NMR-spektroskopische Untersuchung größerer Moleküle – war sie doch mit einem zweifachen Handicap behaftet: Zum einen störte das elektrische Quadrupolmoment der ¹⁴N-Kerne, zum anderen war die natürliche Häufigkeit des Isotops ¹⁵N zu gering. Neue Aufnahmetechniken wie Pulssequenzen und Polarisationstransfer lösten zusammen mit der Verwendung größerer Probenköpfe und immer stärkerer Magnetfelder weitgehend das Problem der geringen NMR-Empfindlichkeit des ¹⁵N-Kerns und bewirkten eine vehemente Entwicklung der ¹⁵N-NMR-Spektroskopie. Diese gewährt inzwischen vielseitige Einblicke in die Molekülstruktur in isotroper und anisotroper Phase. Ihr Anwendungspotential reicht von der Anorganischen über die Metallorganische und Organische Chemie bis hin zur Biochemie und Molekularbiologie. Untersucht werden z. B. reaktive Zwischenprodukte, der Metabolismus von Stickstoffverbindungen sowie Biopolymere und Enzym-Inhibitor-Komplexe, wobei gerade die Kombination mit 2D-NMR-Techniken besonders detaillierte Studien ermöglicht.

1. Einleitung

Stickstoff gehört zu den wenigen Elementen im Grundgerüst organischer und biologischer Verbindungen, und Stickstoffatome steuern als Bausteine vieler funktioneller Gruppen das Geschehen bei organischen und biochemischen Reaktionen. Somit bietet sich die Stickstoff-NMR-Spektroskopie als empfindliche Untersuchungsmethode an, beispielsweise für Strukturen, Bindungsverhältnisse, Reaktionsmechanismen, Biosynthese, Stickstoff-Fixierung, Metallkoordination und aktive Zentren biochemischer Systeme.

Tatsächlich nahmen *Proctor* und *Yu*^[2] bereits in den Kindertagen der NMR-Spektroskopie die ersten ¹⁴N-NMR-Spektren auf; dabei wurde das Phänomen der chemischen Verschiebung bei NH₄NO₃ entdeckt. Wegen seiner hohen natürlichen Häufigkeit von 99.63% widmeten sich die Spektroskopiker lange Zeit nahezu ausschließlich dem ¹⁴N-Quadrupolkern. Erst die FT-NMR-Spektroskopie ließ das Interesse an dem viel selteneren Isotop ¹⁵N (0.37%) erwachen. Obwohl die Empfindlichkeit des ¹⁵N-Kerns für den NMR-spektroskopischen Nachweis um den Faktor 280 geringer ist (Tabelle 1) als die des ¹⁴N-Kerns, gibt es mindestens zwei Eigenschaften, die dieses Manko ausgleichen. Erstens fehlt bei ¹⁵N-NMR-Signalen die manchmal mehrere kHz betragende Linienverbreiterung, und zweitens beobachtet man wegen des großen Kern-Overhauser-Effekts (NOE) ($\eta_0 = -4.93$) in protonenrauschentkoppelten Spektren eine wesentliche Verbesserung der ¹⁵N-Signale.

[*] Prof. Dr. W. von Philipsborn, Dipl.-Chem. R. Müller
Organisch-chemisches Institut der Universität
Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zürich (Schweiz)

[**] ¹⁵N-NMR-Spektroskopie, 16. Mitteilung. – 15. Mitteilung: [1].

Tabelle 1. Magnetische Eigenschaften der Isotope ^{15}N , ^{14}N , ^{13}C und ^1H .

Kern	ν/MHz	Nat. Häufigkeit/%	Spin	Magnetogyrisches Verhältnis $\gamma/10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Relative Empfindlichkeit [b]	[c]
^1H	400.0	99.98	$1/2$	26.7510	62.91	5676
^{13}C	100.6	1.11	$1/2$	6.7263	1	1
^{14}N	28.9	99.63	1	1.9324	0.064	5.69
^{15}N	40.5	0.37	$1/2$	-2.7107	0.066	0.02

[a] Bei einem Feld von 9.4 Tesla. [b] Für die gleiche Anzahl von Kernen bei konstantem Feld B_0 . [c] Bei natürlicher Isotopenhäufigkeit und konstantem Feld B_0 .

gnal-Intensitäten für alle direkt mit Protonen verbundenen ^{15}N -Atome. Die störend langen Spin-Gitter-Relaxationszeiten (T_1) tertiärer N-Atome verkürzen sich unter Umständen erheblich, wenn man bei den hohen Magnetfeldstärken supraleitender Magnete misst; dieses Problem kann aber ebenso durch Polarisationstransfer von schnell relaxierenden, empfindlichen Kernen, beispielsweise ^1H und ^{19}F , gelöst werden.

Die ^{14}N -NMR-Spektroskopie wurde zur Untersuchung kleiner organischer^[3] und anorganischer Moleküle^[4,5] sowie der Molekülbewegung^[6] herangezogen; gerade für das Studium dynamischer Prozesse ist das Quadrupolmoment eine wichtige Kerneigenschaft. Bei großen Molekülen mit mehreren magnetisch und/oder chemisch nicht äquivalenten Stickstoffatomen – dazu gehören auch Biopolymere – sind aber nur die ^{15}N -NMR-Spektren von ausreichender Qualität und interpretierbar. (Drei Monographien referieren die Entwicklung der Forschung auf diesem Gebiet bis 1980^[7].) Häufig ist es auch möglich, ^1H -gekoppelte ^{15}N -NMR-Spektren aufzunehmen und so zusätzlich zur chemischen Verschiebung skalare und dipolare Spin-Spin-Kopplungskonstanten in Lösung bzw. im Festkörper zu bestimmen. Auch die Konstruktion supraleitender Hochfeld-Magnete, mit denen es zudem erleichtert wurde, größere NMR-Proben zu untersuchen, trug dazu bei, der ^{15}N -NMR-Spektroskopie ihren bisher schlechten Ruf als unempfindliche, zeitaufwendige und deshalb für die Analytik der organischen und biochemischen Forschung ungeeignete Methode zu nehmen. Es ist der Zweck dieses Beitrags, den experimentellen Fortschritt auf dem Gebiet der ^{15}N -NMR-Spektroskopie aufzuzeigen und ihr inzwischen breites und schnell wachsendes Anwendungspotential in der gesamten Chemie vorzustellen.

2. Experimentelle Techniken

2.1. Standard-Pulseexperimente

Das konventionelle FT-NMR-Experiment mit pulsmoduliertem Hochfrequenzfeld der ^{15}N -Trägerfrequenz ist nur bei ziemlich kurzen Spin-Gitter-Relaxationszeiten (T_1) erfolgreich. Dies gilt für protonenverknüpfte N-Atome wie in NH_2 - und NH-Gruppen. Dann ist die (Kern,Kern)-Dipol-Dipol-Relaxation (DD) der dominierende Relaxationsmechanismus, und gewöhnlich beobachtet man T_1 -Werte unter 20 s^[7a]. Abbildung 1 zeigt das Spektrum des Dikations **1** von 6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin, bei welchem jedes N-Atom mit mindestens einem H-Atom direkt verknüpft ist. Die Relaxationszeiten der N-Atome sind zudem alle ähnlich und führen deshalb im Spektrum zu ver-

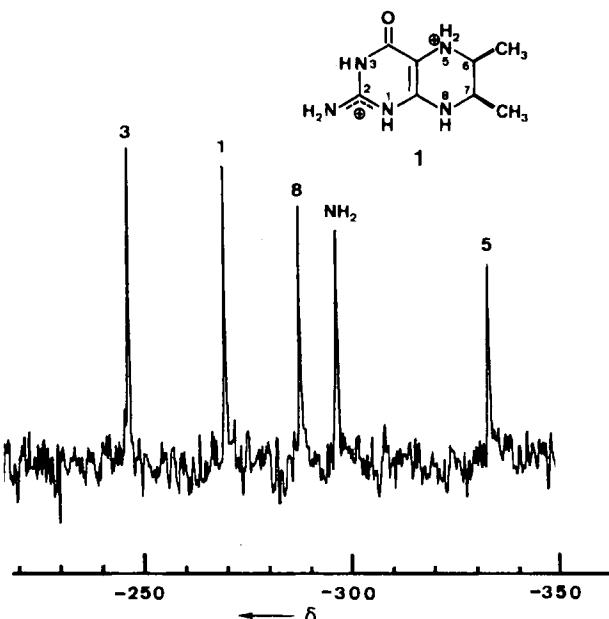


Abb. 1. Protonenrauschentkoppeltes und phasenkorrigiertes ^{15}N -NMR-Spektrum des Dikations **1** von *cis*-6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (Meßfrequenz 10.1 MHz; CF_3COOH , 0.7M) [9].

gleichbaren Signalintensitäten. Aber auch die Signale tertiärer N-Atome können mit hinreichender Intensität detektiert werden, führt man die Messungen in hohen Magnetfeldern supraleitender Magnete (9–11 Tesla) durch. Dann dominiert vermutlich der CSA-Relaxationsprozeß, der aus der großen Anisotropie der Abschirmungskonstante (Chemical Shift Anisotropy) resultiert und mit dem Quadrat der Feldstärke zunimmt (Abschnitt 3.3). Schließlich lassen sich ursprünglich lange T_1 -Zeiten über (Elektron-Kern)-Dipol-Dipol-Wechselwirkung verkürzen, wenn man paramagnetische Spezies („Relaxationsreagentien“) zugibt. Dabei greift man meist auf Chrom(III)-acetylacetonat (Cr(acac)_3)^[8] zurück, da diese Verbindung die ^{15}N -Relaxationsgeschwindigkeit erhöht, ohne den Nachteil einer deutlichen Linienverschiebung (< 1 ppm) zu haben.

Die ^1H -Breitband-Entkopplung verbessert das Signal-Rausch-Verhältnis nicht nur wegen der zusammenfallenden Multiplettlinien, sondern vor allem auch durch den großen NOE-Faktor (Nuclear Overhauser Enhancement), $\eta_0 = -4.93$ im $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -Spinsystem. Aus Gleichung (a) geht hervor, daß dieser (negative) Intensitätsgewinn sich nur dann voll auswirkt, wenn T_1 ausschließlich von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen bestimmt wird, also bei NH_2 - und NH-Gruppen, und dann zur Signal-Inversion führt (Abb. 2) ($M_z = z$ -Magnetisierung; $M_z^0 = z$ -Magnetisierung im thermischen Gleichgewicht, $T_1^{\text{DD}} =$ Zeitkonstante der Dipol-Dipol-Relaxation).

$$\frac{M_z}{M_z^0} = 1 + 0.5 \frac{\gamma_{\text{H}}}{\gamma_{\text{N}}} \frac{T_1}{T_1^{\text{DD}}} \quad (a)$$

$$\eta_0 = 0.5 \cdot (-9.86) = -4.93$$

Wie Abbildung 2a zeigt, kann mangelnde dipolare Relaxation bei tertiären N-Atomen zur Signallösung führen. Um dieses gerade bei N-Heterocyclen häufig beobachtete Phänomen auszuschließen, unterdrückt man bereits während der Messung bewußt den Aufbau des NOE-Effekts, indem man nur während der Acquisitionszeit Leistung

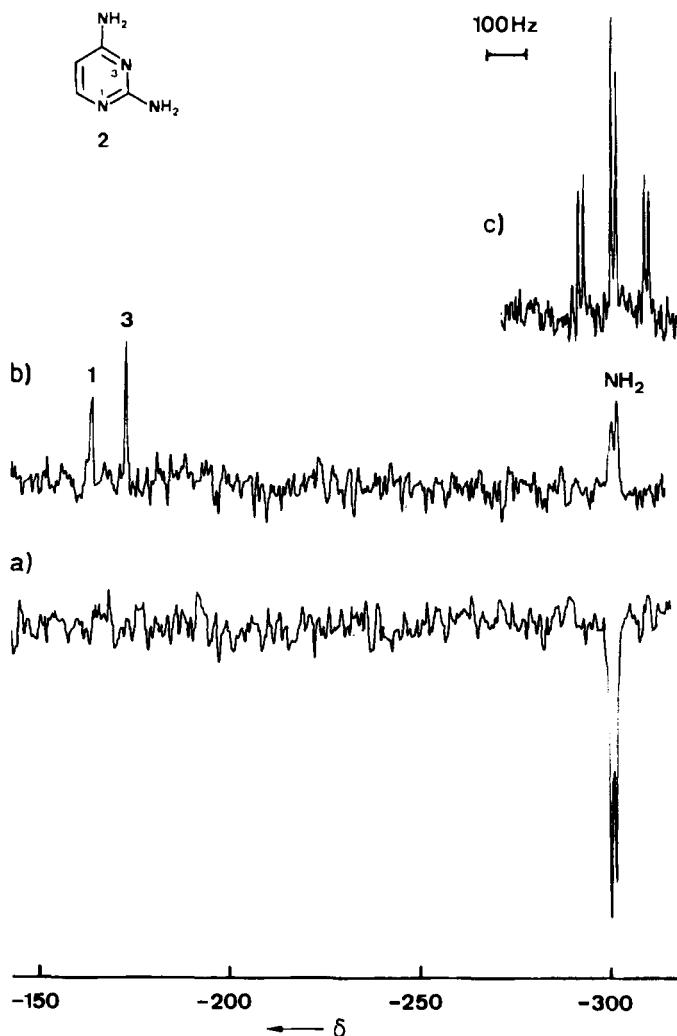


Abb. 2. ^{15}N -NMR-Spektren von 2,4-Diaminopyrimidin 2 (Meßfrequenz 10.1 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): a) protonenrauschentkoppelt; b) „inverse-gated“-entkoppelt – Entkoppler während der Acquisitionszeit eingeschaltet; c) ohne Protonenkopplung.

über den Entkopplerkanal einstrahlt („inverse gated decoupling“). Da Spin-Entkopplung sofort nach Einschalten des B_2 -Feldes stattfindet, der NOE-Effekt sich aber zeitverzögert in Abhängigkeit von T_1^{DD} langsam aufbaut, können ^1H -entkoppelte ^{15}N -NMR-Spektren mit nur minimalem NOE-Effekt aufgenommen werden (Abb. 2b). Mit diesem Experiment sind primäre, sekundäre und tertiäre N-Atome gleichzeitig zu beobachten. Dabei wird auch offensichtlich, daß die relativen Intensitäten der ^{15}N -NMR-Signale in ^1H -entkoppelten Spektren von der Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 und dem Kern-Overhauser-Faktor ($\eta \leq |\eta_0|$) abhängen. Unerwünschte, kleine NOE-Effekte wiederum lassen sich durch Relaxationsreagentien eliminieren.

Eine weitere Steigerung der Nachweisempfindlichkeit der ^{15}N -NMR-Spektroskopie bringt der Gebrauch von NMR-Röhrchen mit größerem Durchmesser (15–25 mm) und von stärkeren Magnetfeldern (B_0). Inzwischen stehen moderne, supraleitende Magnete mit großen Probenöffnungen sowie hervorragender Feldhomogenität und -stabilität zur Verfügung, mit denen es gelingt, ^{15}N -NMR-Spektren bei natürlicher Isotopenhäufigkeit mit den oben beschriebenen Techniken routinemäßig aufzunehmen. Als typisches Beispiel sei das Spektrum des [4.4.1]Propellan-Derivates 3 angeführt (Abb. 3^[10]).

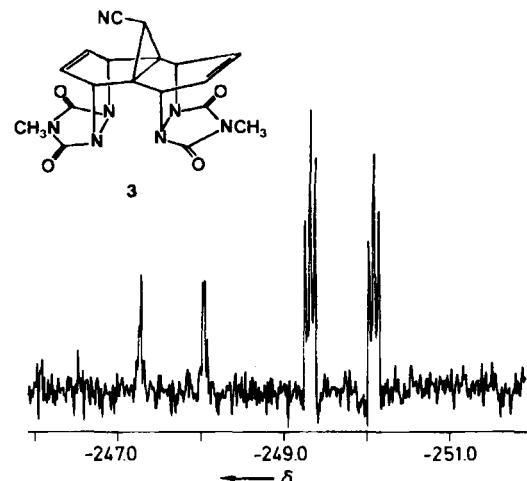
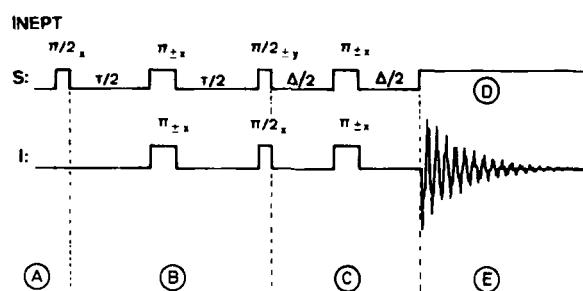


Abb. 3. Protonengekoppeltes DEPT- ^{15}N -NMR-Spektrum des 1:2-Addukts 3 von Tricyclo[4.4.1.0^{1,6}]undeca-2,4,7,9-tetraen-11-carbonitril an N -Methyl-1,2,4-triazoldion (Meßfrequenz 40.6 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$). Das Cyan-Dublett tritt bei $\delta = -113.3$ auf. Die Zuordnung der beiden schwachen sowie der beiden intensiven Signale zu den NCH_3 - bzw. NCHCH -Gruppen wurde anhand der Multiplettstrukturen und der unterschiedlichen N,H-Kopplungskonstanten getroffen.

2.2. Eindimensionale Pulsssequenz-Experimente (INEPT, DEPT)

Dank der schnellen Entwicklung von Pulstechniken und ihrer seriennäßigen Implementation in moderne Spektrometer verfügen wir über noch bessere und vielseitigere Verfahren, die die Empfindlichkeit der ^{15}N -NMR-Spektroskopie weiter erhöhen. So bewirkt eine Folge nicht selektiver, teilweise simultaner Pulse in einem skalar gekoppelten, heteronuclearen Spinsystem einen Polarisationstransfer von den empfindlichen ^1H -Kernen (große Häufigkeit, großes γ) auf die unempfindlichen ^{15}N -Kerne (geringe Häufigkeit, kleines γ), deren Signalintensitäten dadurch maximal um den Faktor $|\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{N}}| = 9.86$ zunehmen. Da zudem die Wiederholungsgeschwindigkeit der gesamten Pulssequenz von den wesentlich kürzeren Relaxationszeiten der ^1H -Kerne abhängt, verkürzt sich die Meßzeit noch mehr. Schema 1 zeigt den zeitlichen Ablauf der INEPT-



Schema 1. S: ^1H , I: ^{15}N . ④ Präparation, ⑤ Wartezeit, ⑥ Refokussierung, ⑦ ^1H -Breitband-Entkopplung, ⑧ Detektion (siehe auch [12]).

Pulsfolge (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer)^[11], einem typischen Polarisationstransfer-Experiment. Wie man sich den Mechanismus eines derartigen Polarisationstransfers vorstellen kann, haben Benn und Günther in ihrer Übersicht erläutert^[12]. Nach dem Polarisationstransfer (90°-Puls) und dem anschließenden ^{15}N -Beobachtungspuls können die in Antiphase zueinander befindlichen Signale direkt registriert oder durch anschlie-

ßende Refokussierung und Entkopplung während der Acquisitionszeit weiter „aufbereitet“ werden. So ist es möglich, rauschentkoppelte, teilentkoppelte oder gekoppelte ^{15}N -NMR-Spektren zu erhalten, die gerade die für die Strukturaufklärung wichtigen Informationen liefern.

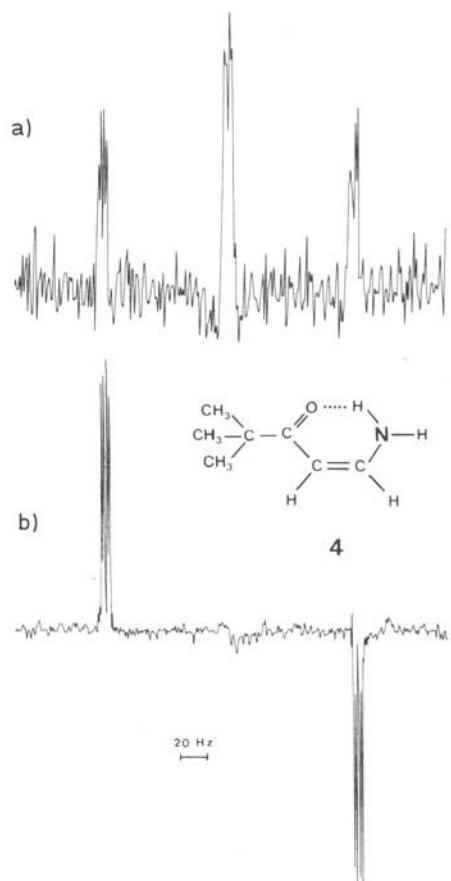
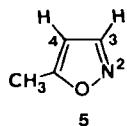


Abb. 4. ^{15}N -NMR-Spektren des abgebildeten Konformers von (Z)-1-Amino-4,4-dimethyl-1-penten-3-on 4 (Meßfrequenz 20.3 MHz; C_6D_6 , 3.7 M): a) Standard-Puls-NMR-Spektrum (Meßzeit 10 h); b) INEPT- ^{15}N -NMR-Spektrum (Meßzeit 1.9 h) [13]. $^2J(\text{N},\text{H})=92.7$, $^2J(\text{N},\text{H})=1.7$, $^3J(\text{N},\text{H})=4.0$ Hz.

Abbildung 4 zeigt – im direkten Vergleich zu Standard-Puls-NMR-Spektren – wie es um die Qualität derartiger Spektren hinsichtlich Auflösung und Signal-Rausch-Verhältnis bestellt ist. Dieses Beispiel belegt auch, daß sich INEPT-Spektren und normale Spektren sowohl in ihrer Linienmultiplizität als auch in den Signalphasen unterscheiden. Beispielsweise betragen die relativen Intensitäten des NH-Dubletts +1 und -1, die des NH₂-Triplets +1, 0 und -1^[14]. Die Phasen lassen sich durch die oben erwähnte Refokussierung berichtigten. Darüber hinaus führt selektive ^1H -Entkopplung unter Umständen zu wesentlich kleineren Linienbreiten und damit zu noch größerer Empfindlichkeit. Abbildung 5 illustriert die exakte Bestimmung der Kopplungskonstanten $^2J(\text{N},\text{H})$ und $^3J(\text{N},\text{H})$ in 5-Methylisoxazol 5 anhand von selektiv entkoppelten INEPT-Spektren. Die Kopplung von ^{15}N -Kernen mit Methylprotonen überdeckt häufig andere Spin-Spin-Kopplungen und bedingt beispielsweise bei 2-Acetylpyridin 12 (Abschnitt 3.2.2) viel längere Meßzeiten.

Der Polarisationstransfer auf einen unempfindlichen Kern setzt dessen skalare Kopplung mit einem empfindlichen Kern voraus. Neben ^1H -Kernen wurden auch ^{19}F -[17]

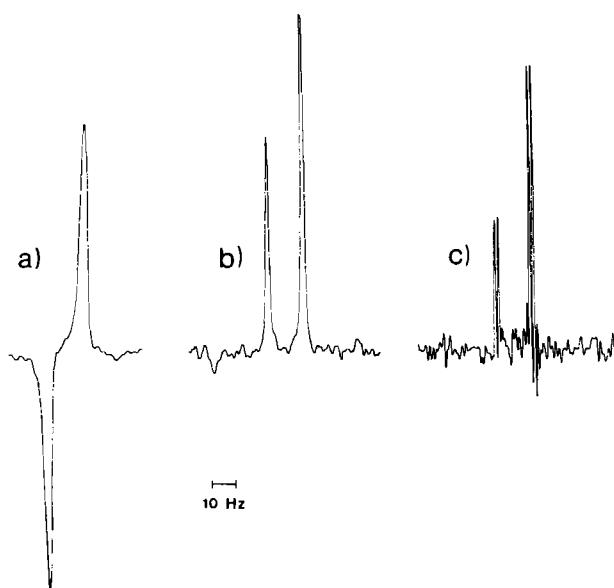


Abb. 5. INEPT- ^{15}N -NMR-Spektren von 5-Methylisoxazol 5 (Meßfrequenz 20.3 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): a) protonengekoppelt; b) Refokussierung und selektive ^1H -Entkopplung; c) analog b), doch Bestrahlung der CH_3 -Resonanz [15].

und ^{31}P -Kerne (für ^{15}N ^[16a], ^{57}Fe , ^{103}Rh und ^{183}W ^[16b]) als Polarisationsquelle benutzt. Die beträchtliche Kopplung zwischen ^{19}F - und ^{15}N -Kernen erleichtert das Polarisationstransfer-Experiment; Abbildung 6 zeigt das Ergebnis einer derartigen INEPT-Messung an Perfluorpyridin 6^[17]. Die große $^2J(\text{N},\text{F})$ -Kopplung von -51.7 Hz bestimmt die Wartezeit $\tau=1/2 J(\text{N},\text{F})$ der INEPT-Sequenz (vgl. Schema 1). Da die zentrale Linie des Triplets im INEPT-Spektrum wiederum fehlt, entspricht die Aufspaltung 2 $J(\text{N},\text{F})$.

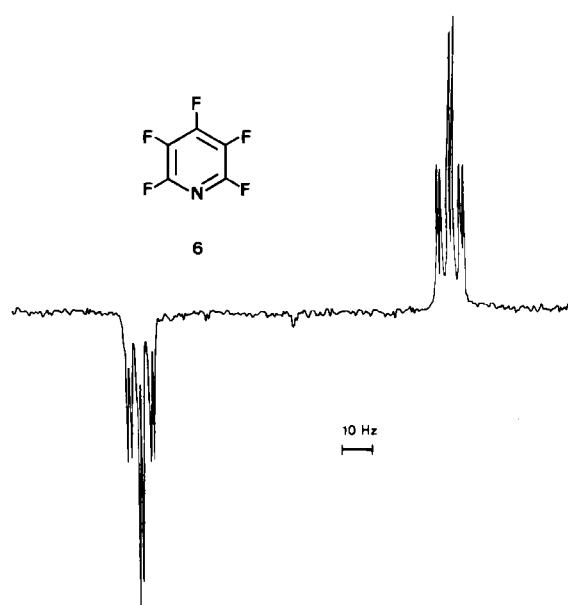


Abb. 6. INEPT- ^{15}N -NMR-Spektrum von Perfluorpyridin 6 (Meßfrequenz 20.3 MHz; $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$); Polarisationstransfer von den ^{19}F -Kernen (Meßfrequenz 188.2 MHz). Der τ -Wert der INEPT-Sequenz wurde entsprechend $|^2J(\text{N},\text{F})|=52$ Hz gewählt [17].

Schwieriger ist es, die optimale zeitliche Abfolge der INEPT-Sequenz für Verbindungen festzulegen, wenn dominante Kopplungen zu anderen Kernen fehlen. Koppelt der ^{15}N -Kern mit mehreren untereinander gekoppelten Protonen (Spinsysteme vom Typ $\text{IS}^1\text{S}^2 \dots \text{S}^a$), so gelingt die Bestimmung der günstigsten Wartezeiten (τ -Werte)^[18] anhand mathematischer Gleichungen. Abbildung 7 demonstriert

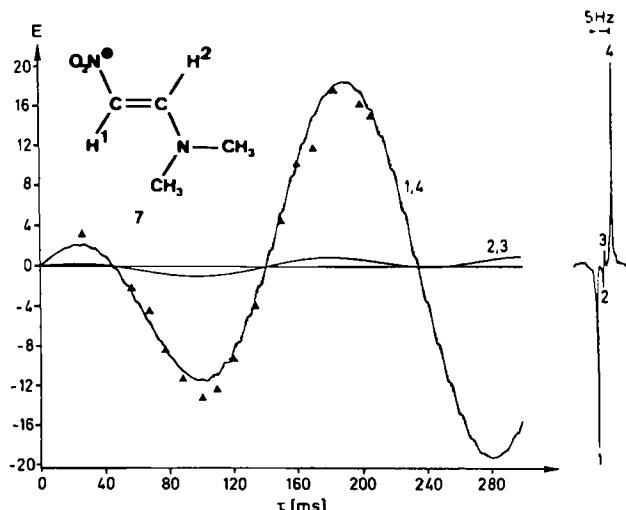
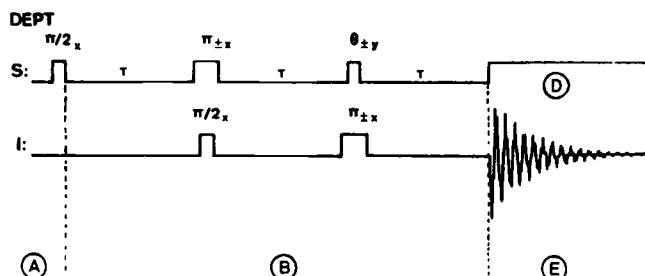


Abb. 7. Rechts: INEPT- ^{15}N -NMR-Spektrum der NO_2 -Gruppe in (E) - N,N -Dimethyl-2-nitrovinylamin 7; links: Empfindlichkeitsgewinn (E) als Funktion von τ (—) berechnet, (\blacktriangle) experimentell bestimmte Werte [18]. $J(\text{N},\text{H}-2)=2.2$, $J(\text{N},\text{H}-1)=1.8$, $J(\text{H}-1,\text{H}-2)=10.6$ Hz; $\nu(\text{H}-1)-\nu(\text{H}-2)=-290$ Hz (Meßfrequenz 20.3 MHz).

dies für das Nitroethen 7. Dabei ist zu beachten, daß τ_{opt} (190 ms) weder $1/2 J(\text{N},\text{H}^1)$ ($\tau=278$ ms) noch $1/2 J(\text{N},\text{H}^2)$ (227 ms) entspricht, da die homonukleare Kopplung $^3J(\text{H}^1,\text{H}^2)$ mit 10.6 Hz die heteronukleare Kopplung weit übertrifft. Trotzdem gelingt auch in derartigen Spinsystemen mit tertiären N-Atomen ein Polarisationstransfer. Damit reicht das Anwendungspotential der INEPT-Pulssequenz weit über die Detektion einfacher NH- und NH_2 -Gruppen^[14] hinaus (siehe auch Abschnitt 4).



Schema 2. S, I, Ⓐ, Ⓑ, Ⓒ, Ⓓ siehe Legende zu Schema 1 (siehe auch [12]).

Als INEPT-Alternative ohne deren typische Nachteile wie Phasen- und Intensitätsverzerrung wurde die DEPT-Aufnahmetechnik (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)^[19] vorgestellt. Die nach Einstrahlen der DEPT-Sequenz (Schema 2) aufgenommenen Spektren zeigen nur positive Signale und ähneln damit den Standard-Puls-NMR-Spektren. Bei diesem Verfahren bestimmen Wartezeit τ sowie Pulswinkel θ die Empfindlichkeitssteige-

rung. Jedoch lehrt die Praxis, daß man nur für einfache Spinsysteme (IS_n) phasenfehlerfreie Spektren erhält, während im Normalfall bei Spinsystemen mit hetero- und homonuklearen Kopplungen ($\text{IS}^1\text{S}^2 \dots \text{S}^a$) Phasen- und bei Spinsystemen höherer Ordnung sogar Intensitätsverzerrungen beobachtet werden^[18]. Unter Entkopplung aufgenommene DEPT-Spektren weisen ausschließlich Signale mit positiver Phase auf. Abbildung 8 illustriert DEPT- ^{15}N -NMR-Spektren von Thiazol 8. Selektive Entkopplung ergibt, daß die kleine Kopplungskonstante (2.2 Hz) von der vicinalen N,H-Wechselwirkung ($^3J(\text{N},\text{H})$) herrührt.

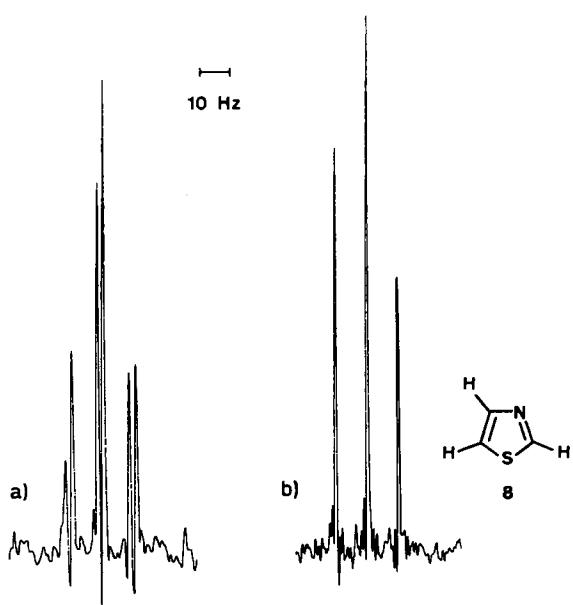


Abb. 8. DEPT- ^{15}N -NMR-Spektren von Thiazol 8 (Meßfrequenz 20.3 MHz; CDCl_3): a) protonengekoppelt; b) selektive Bestrahlung der H-5-Resonanz [15].

Hinsichtlich des Empfindlichkeitsgewinns ist die INEPT- der DEPT-Pulsfolge^[19b] überlegen, beim Fünf-Spin-System von 2-Methoxypyridin beispielsweise um den Faktor 1.8^[18]. Auch ist das einfache INEPT-Experiment (ohne Refokussierung) weniger anfällig gegen Störungen durch zusätzliche homo- und heteronukleare Kopplungen.

Der Vorteil der bisher beschriebenen Polarisationstransfer-Experimente liegt in der unselektiven Störung des Protonen-Spinsystems. So wird die Polarisation gleichzeitig auf verschiedenartige N-Atome im Molekül übertragen und die Strukturaufklärung auch von komplizierten Verbindungen möglich.

Ein anderer Weg, auf dem ebenfalls Empfindlichkeit gewonnen wird, führt über den *selektiven Populationstransfer* (Selective Population Transfer, SPT)^[20]. Diese Methode beruht auf der selektiven Bestrahlung eines Protonen-Übergangs, die eine Äquilibrierung oder Inversion (Selective Population Inversion, SPI) der Populationen bewirkt, gefolgt von einem Transfer auf verknüpfte Niveaus. Während es für die Empfindlichkeitssteigerung unerheblich ist, ob nun selektive Experimente oder unselektive DEPT- und INEPT-Experimente durchgeführt werden, gelingt die Bestimmung des relativen Vorzeichens der N,H-Kopplungen nur bei selektiver Anregung^[21]. Für nicht direkt mit Proto-

nen verbundene N-Atome existiert eine modifizierte INEPT-Pulssequenz, die ebenfalls selektiven Polarisationstransfer bewirkt. Es gelingt damit, homonucleare Mehrquantenkorrelationen zu unterdrücken; alle weitreichenden N,H-Kopplungen zu anderen als dem bestrahlten ^1H -Kern dürfen vernachlässigt werden^[22]. Mit derart „weichen“, selektiven Pulsen – die Pulsbreite eines $^1\text{H}-90^\circ$ -Anregungspulses entspricht etwa 5 ms – wurde es möglich, die ^{15}N -Resonanzlinie von Prolin in einem Hexapeptid zu beobachten. Eine drastische Empfindlichkeitssteigerung setzt allerdings eine so hochselektive Anregung voraus, wie sie experimentell vor allem bei komplizierten Molekülen, auch in starken Magnetfeldern, kaum erreichbar ist.

Die beste Technik, die Empfindlichkeit zu steigern, ist die indirekte Detektion der ^{15}N -NMR-Signale über das Protonensignal; theoretisch erreicht man damit eine Steigerung um den Faktor $(\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{N}})^3$, d. h. um 961. Durch Erzeugung von Mehrquantenkorrelationen und mit modernen 1D- und 2D-NMR-Auswertetechniken^[23,24] wurden große Peptide auf diese Weise bereits erfolgreich untersucht (vgl. Abschnitt 2.3).

Eine kritische Behandlung von Vor- und Nachteilen der zahlreichen eindimensionalen Pulssequenz-Experimente erschien vor kurzem von *Turner*^[25].

2.3. Heteronuclear korrelierte 2D-NMR-Spektroskopie

In den letzten zehn Jahren wurden sehr nützliche und raffinierte 2D-NMR-Experimente ersonnen, von denen inzwischen viele mit kommerziellen Geräten routinemäßig ausgeführt werden können. Trotzdem entwickelten sich die ^{15}N -2D-NMR-Spektroskopie nur langsam. Erst seit kurzem sind dank der allgemein besseren Geräteausstattung und der Entwicklung der Mehrquantenkorrelation-Experimente entscheidende Fortschritte zu verzeichnen. Von den klassischen 2D-NMR-Experimenten hat nur die Technik der ^{15}N - ^1H -Verschiebungskorrelation Bedeutung erlangt, da sie die Zuordnung der ^{15}N -NMR-Signale via $^1J(\text{N},\text{H})$ und weitreichende $J(\text{N},\text{H})$ ermöglicht. Der Beitrag von *Benn* und *Günther*^[12] beschreibt diese klassischen 2D-NMR-Messungen im Überblick.

Die auf Mehrquantenkorrelationen beruhende Korrelation von ^1H - und ^{15}N -Verschiebungen brachte ebenfalls eine wesentliche Empfindlichkeitsverbesserung, da die ^{15}N -Resonanz über die Beobachtung skalar gekoppelter Protonen ermittelt wird^[26]. Als dritte bedeutende ^{15}N -2D-NMR-Technik ist die Analyse von Festkörper- ^{15}N -NMR-Spektren mit dipolarer Kopplung^[27] zu nennen.

Mit ^1H , ^{15}N -verschiebungskorrelierten (COSY) 2D-NMR-Spektren gelingt – bei Kenntnis der chemischen Verschiebung der NH- und C_{α} -H-Protonen – in Oligopeptiden die Zuordnung der ^{15}N -NMR-Signale^[28,29]. Im Vergleich zu ^1H , ^1H - und ^{13}C , ^1H -2D-NMR-Experimenten sind diese Messungen, wenn an nicht angereichertem Material durchgeführt, sehr zeitaufwendig. Abbildung 9 belegt, daß für das Undecapeptid Cyclosporin A mit der COLOC-Pulsfolge^[30] auf diese Weise alle ^{15}N -NMR-Signale zugeordnet werden können; für die Identifizierung der ^1H -NMR-Signale wurden zusätzliche COSY-Experimente wie

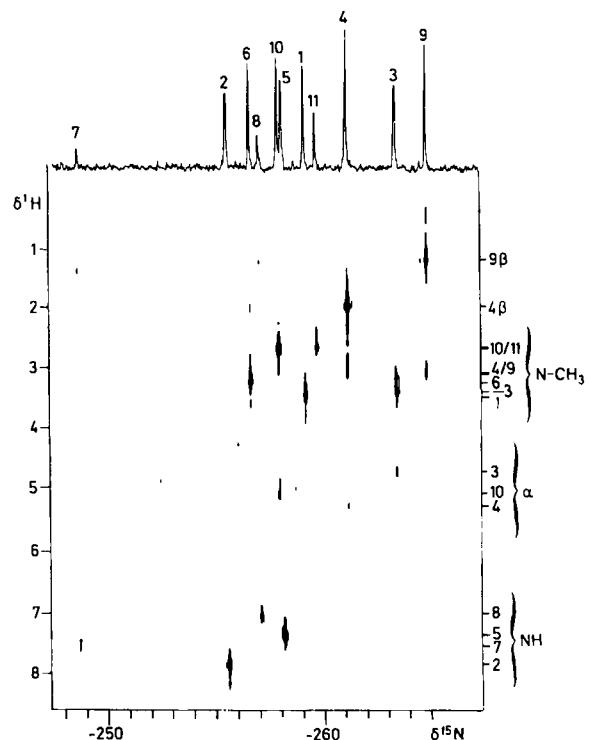


Abb. 9. COLOC- ^1H , ^{15}N -heteronuclear-verschiebungskorrikeriertes NMR-Spektrum von Cyclosporin A (Meßfrequenz 50.7 MHz; CDCl_3 , Meßzeit 36 h). Korrelationssignale beobachtet man für direkt an ^{15}N -Kerne gebundene Protonen (NH) sowie für die (geminale) Protonen der $\text{N}-\text{C}_{\alpha}-\text{H}$ - und $\text{N}(\text{CH}_3)$ -Gruppen. Sie ermöglichen die Zuordnung der elf N-Atome durch ein einziges Experiment [28c]. Cyclosporin A ist ein Undecapeptid mit folgender Aminosäure-Sequenz (MeBmt=N-Methyl-butenyl-methylthreonin):



homonucleare NH,H(α)- und heteronucleare C(α),H(α)-2D-Korrelationen durchgeführt.

Zur Beobachtung von ^{15}N -Kernen, die mit Protonen koppeln, wurde ein spezielles Experiment erdacht, das auf einer INEPT-Sequenz basiert und bewirkt, daß nach zweifachem Polarisationstransfer ^{15}N -Kerne mit der Empfindlichkeit der ^1H -Kerne gemessen werden. Die ursprünglich von *Bodenhausen* und *Ruben*^[31] eingeführte Pulsfolge wurde mehrfach durch *Redfield* (HANDOR-Pulsfolge)^[32] und *Bax* et al.^[24] verändert und vereinfacht und zählt heute zu den am häufigsten verwendeten 2D-NMR-Mehrquanten-Experimenten. Die Vorteile dieses Meßverfahrens liegen zum einen in der drastischen Empfindlichkeitssteigerung – der Faktor beträgt $(\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{N}})^3=961$ – und zum anderen in der selektiven Nachweismöglichkeit von Protonen, die über eine skalare Kopplung mit einem ^{15}N -Kern verbunden sind; gerade dies ermöglicht die Identifizierung der relevanten NH-Gruppen in großen Biomolekülen^[33a,23]. Abbildung 10 zeigt das Spektrum der ^{15}N -markierten tRNA aus *E. coli*, anhand dessen die sechs biosynthetisch aus Uridin gewonnenen Nucleotid-Einheiten identifiziert werden können und das zugleich ein Bild von der heute mit 2D-Aufnahmetechniken erreichbaren Auflösung gibt. Um die ^{15}N , ^1H -Einheiten in nicht ^{15}N -angereichertem Material nachzuweisen, benötigt man für eine 100 mM Probe des Biopolymers etwa 2–4 h Meßzeit.

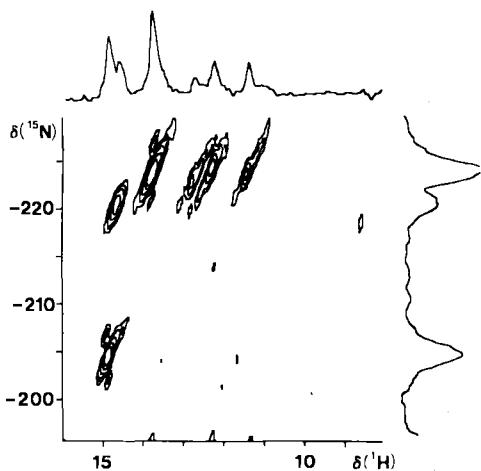


Abb. 10. Durch Erzeugung von Mehrquantenkohärenzen erhaltenes ^1H , ^{15}N -heteronuklear-verschiebungskorrigiertes NMR-Spektrum von ^{15}N -markierter tRNA $^{\text{Met}}$ aus *E. coli* (Meßfrequenz 36.5 MHz; $\nu(\text{H})=360.1$ MHz; 65% ^{15}N -Anreicherung von N-3 in Uridin und den davon abgeleiteten Basen; 5 mg Probe gelöst in 250 μL wässriger Pufferlösung; Meßzeit 6 h). Projektionen der ^1H - und ^{15}N -NMR-Spektren sind jeweils gegenüber den entsprechenden Frequenzskalen aufgetragen. Weitere experimentelle Details und Informationen zur Zuordnung siehe [33a]. Ein verbessertes Verfahren zur indirekten Beobachtung von ^{15}N -Resonanzen wurde kürzlich beschrieben [33b].

Inzwischen ist auch die hochauflösende Festkörper- ^{15}N -NMR-Spektroskopie (siehe Abschnitt 4.6) so weit entwickelt, daß man von Biopolymeren Spektren erhält, die genaue Informationen über isotrope chemische Verschiebungen und dipolare $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -Kopplungen geben. Von großem Vorteil sind dabei – da es sich meist um komplizierte Spektren handelt – die 2D-NMR-Aufnahmetechnik und die dadurch mögliche graphische Darstellung der Spektren mit

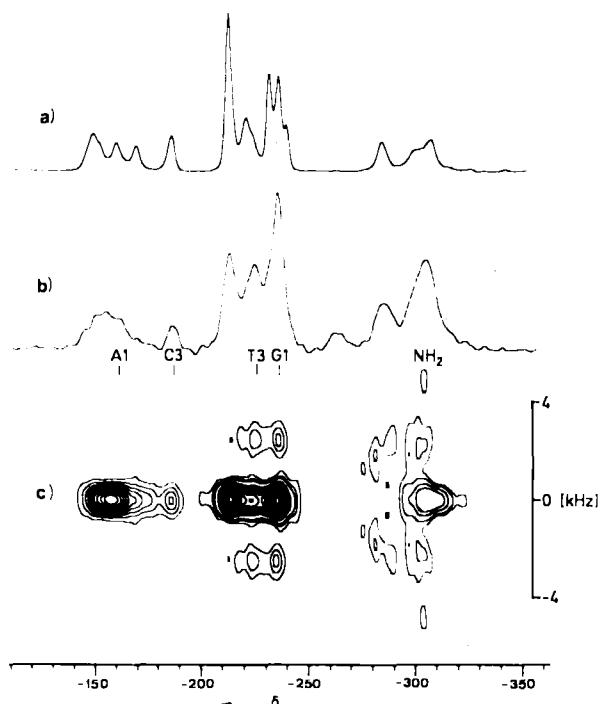


Abb. 11. ^{15}N -CPMAS („Cross Polarization and Magic Angle Spinning“)-NMR-Spektren von DNA (Meßfrequenz 15.24 MHz): a) isotrope chemische Verschiebungen für B-DNA; b) für DNA mit geringem Feuchtigkeitsgrad; c) $^{15}\text{N}/\text{D}(\text{N},\text{H})$ -2D-NMR-Spektrum von DNA mit geringem Feuchtigkeitsgrad. Zuordnung der Signale siehe [34].

$\delta(\text{N})$ als F_2 - und $\text{D}(\text{N},\text{H})$ als F_1 -Koordinate. In einer der ersten Anwendungen berechneten DiVerdi und Opella N-H-Bindungslängen in DNA anhand der gemessenen dipolaren $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -Kopplungen^[34] (Abb. 11). Ebenso wurden von Viren-Lösungen „D-aufgelöste“ $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -Spektren aufgenommen, wobei eine spontane räumliche Orientierung dieser Makromoleküle im statischen Magnetfeld B_0 stattfindet^[35] (D bedeutet hier dipolare Kopplung).

Für Strukturaufklärungen über weitreichende Kopplungen sind J -aufgelöste 2D- ^{15}N -NMR-Spektren eine zusätzliche Informationsquelle. Derartige Experimente wurden in Kombination mit Polarisationstransfer-Pulsfolgen erfolgreich durchgeführt, wobei beispielsweise die INEPT-Sequenz während der Präparationsphase einer selektiven 2D- J -Pulsfolge^[36] eingeschoben wurde. Auf diesem Weg lassen sich weitreichende $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -Kopplungen in aromatischen und aliphatischen Verbindungen bei sehr guter Empfindlichkeit mit großer Genauigkeit bestimmen. Deshalb wird diese Methode auch für exakte Messungen von $^3J(\text{N},\text{H})$ in Peptiden vorgeschlagen (siehe Abschnitt 3.2.2).

Zusammenfassend bleibt festzustellen, daß dank der modernen FT-NMR-Aufnahmetechniken sowie der heute erreichbaren hohen Magnetfeldstärken und großen Probenvolumina das Problem der geringen Empfindlichkeit des ^{15}N -Kerns weitgehend überwunden ist; ^{15}N -NMR-Untersuchungen, auch von nicht angereichertem Material, sind Routine geworden. Natürlich müssen, je nachdem welchen ^{15}N -Kern man beobachten möchte, vor jeder Messung die Aufnahmetechnik sorgfältig ausgewählt und die Parameter präzise gesetzt werden. Dies ist oft wesentlich zeitaufwendiger, als man es beispielsweise von ^1H - und ^{13}C -NMR-Messungen gewöhnt ist. Ein Haupthindernis, die langen T_1 -Relaxationszeiten und der demzufolge kleine NOE-Effekt tertärer ^{15}N -Atome, wurde durch Polarisationstransfer – meist von den empfindlichen, schnell relaxierenden Protonen – überwunden. Eine noch deutlichere Empfindlichkeitsverbesserung bringt die indirekte Messung der ^{15}N -Kerne über ^1H -Resonanzen, wobei sich die entsprechenden 1D- und 2D-Pulsfolgen, mit denen man die notwendigen Mehrquantenkohärenzen erzeugt, besonders zur Untersuchung großer Biomoleküle eignen. ^{15}N -NMR-Signale unmarkierter kleinerer Moleküle ($M_r < 500$) können heute bei Probenkonzentrationen von 0.1 bis 0.2 M innerhalb weniger Stunden aufgenommen werden. Abschnitt 4 präsentiert eine Vielzahl von Anwendungsbeispielen aus der Organischen und Anorganischen Chemie sowie der Biochemie.

3. Strukturabhängigkeit spektraler Parameter

Hochauflöste ^{15}N -NMR-Spektren informieren über Abschirmungskonstanten (chemische Verschiebung), Spin-Gitter-Relaxationszeiten (T_1), Spin-Spin-Relaxationszeiten (T_2) und skalare Kopplungen zu anderen Kerntypen (z. B. $^3J(\text{N},\text{H})$). Dies ist eine deutliche Verbesserung im Vergleich zur ^{14}N -NMR-Spektroskopie, die sich im wesentlichen auf die Bestimmung chemischer Verschiebungen beschränkt. Nur selten lassen sich aus ^{14}N -NMR-Spektren skalare Kopplungen ablesen und chemische Austauschprozesse und Molekülbewegungen quantitativ charakteri-

sieren. Dieser Abschnitt beschreibt Bedeutung und Informationspotential der ^{15}N -NMR-Parameter.

3.1. Chemische Verschiebung

Für ^{15}N -Kerne beobachtet man einen Verschiebungsbe- reich von mehr als 1000 ppm, was etwa 40 kHz bei einem Magnetfeld von 9.4 Tesla ($\nu_0=40.6$ MHz) entspricht. Geht man von einer Linienbreite von 1–2 Hz aus und bedenkt die geringe Häufigkeit der N-Atome in organischen und bioorganischen Molekülen, übertrifft die Signaldispersion sogar die Situation bei ^{13}C -NMR-Spektren. Auch wenn die Resonanzlinien der meisten ^{15}N -Kerne organischer Verbindungen innerhalb von 500 ppm liegen, mindert dies die hervorragende Verteilung der ^{15}N -NMR-Signale nicht, wie beispielsweise das ^{15}N -NMR-Spektrum eines Gemisches von 1- und 2-Methyltetrazol 9 bzw. 10 zeigt (Abb. 12).

Wert (etwa 380.2 ppm) willkürlich zu definieren^[7]. Generell liegt die Reproduzierbarkeit von ^{15}N -NMR- Verschiebungen im Bereich von ± 1 ppm. Dies ist auf Vernachlässigung der Suszeptibilitätskorrekturen^[7a], vor allem bei unterschiedlicher Probenorientierung in Elektromagneten und supraleitenden Magneten, sowie auf Lösungsmittel- und Temperatureffekte zurückzuführen. Noch größere Abweichungen können auftreten, wenn zur Bestimmung der ^{15}N -NMR-Verschiebung höhere Konzentrationen an Relaxationsreagentien (> 0.05 M) erforderlich sind.

3.1.2. Grundlegende Aspekte der ^{15}N -NMR-Verschiebungen

Abbildung 13 faßt zusammen, in welchen Bereichen die ^{15}N -NMR-Verschiebungen je nach Oxidationsstufen, Ko-

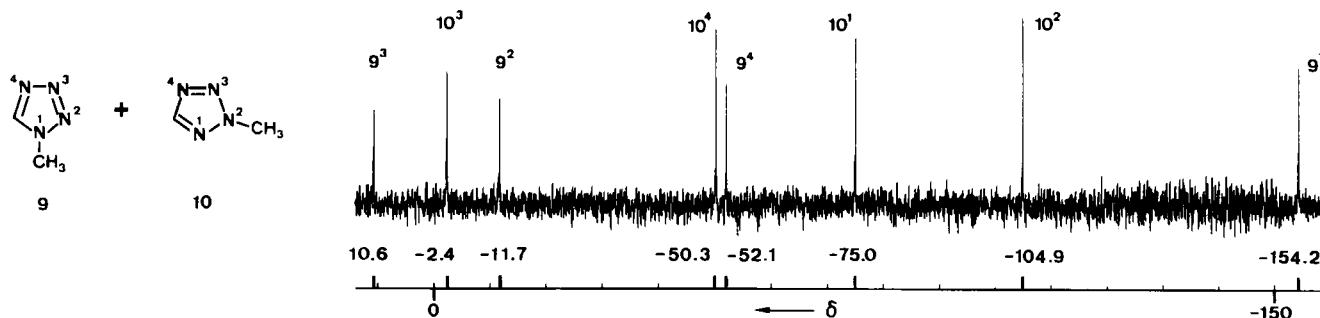


Abb. 12. ^{15}N -NMR-Spektrum eines Gemisches von 1- und 2-Methyltetrazol 9 bzw. 10 (Meßfrequenz 40.6 MHz; 200 mg in 2.5 mL CDCl_3 , 75 mg $\text{Cr}(\text{acac})_3$; Meßzeit 42 min).

Man beobachtet in einem Bereich von 170 ppm acht gut getrennte Linien, deren Zuordnung allerdings nicht ganz einfach ist (vgl. Abschnitt 3.4).

3.1.1. Standardisierung – Referenzsubstanzen

Alle in dieser Übersicht erwähnten chemischen Verschiebungen (δ -Werte) beziehen sich auf reines, in eine Kapillare eingefülltes Nitromethan ($\text{CH}_3^{15}\text{NO}_2$) als „externe“ Referenzsubstanz, wobei kleineren Frequenzen negative und höheren Frequenzen positive δ -Werte zugeordnet werden. Alle δ -Werte enthalten keine Suszeptibilitätskorrektur. Literaturwerte, die sich ursprünglich auf andere Referenzsubstanzen wie $\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$, H^{15}NO_3 und $^{15}\text{NH}_3$ bezogen, wurden umgerechnet^[7a]. Wir haben ausschließlich Nitromethan als Standard benutzt; seine Verwendung ermöglicht auch den direkten Vergleich mit den beiden größten Datensammlungen von Martin et al.^[7a] und Witkowski et al.^[7b]. Die Wahl von Nitromethan hat zur Folge, daß die meisten δ -Werte negativ sind. Obwohl dies für andere Kerne, beispielsweise Metallkerne, nichts Ungewöhnliches ist, veranlaßte es einige Autoren, andere Substanzen wie NH_3 (liq.) oder NH_2^{\oplus} als externen Standard oder als zweite, „künstliche“ Referenz vorzuschlagen. Wegen der starken Temperaturabhängigkeit der NH_3 -Signallage empfiehlt es sich jedoch, für die Umrechnung einen konstanten

ordinationszahlen und Hybridisierung typischerweise liegen. Wie aufgrund der ähnlichen Elektronenverteilung und Bindungsarten ($\text{sp}^3, \text{sp}^2, \text{sp}$) nicht anders zu erwarten, entdeckt man viele Parallelen zur ^{13}C -NMR-Verschiebungsskala. So findet man dreifach koordinierte N-Atome (Amine) am unteren Ende der Frequenzskala. Vierfach koordinierte N-Atome (Ammoniumsalze und *N*-Oxide) absorbieren im gleichen Bereich. Verknüpfung mit elektronegativen Substituenten führt zur Entschirmung; für die drei wichtigsten Hybridisierungszustände nimmt die Entschirmung in der Reihenfolge $\text{sp}^3 < \text{sp} < \text{sp}^2$ zu. Deutlich getrennt sind die Bereiche kohlenstoffsubstituierter N-Atome mit der Koordinationszahl drei ($\delta = -400$ bis -200) und zwei ($\delta = -100$ bis $+100$). Am oberen Ende der Skala organischer Stickstoffverbindungen sind die Signale der Carbonyl- und Carboxyanaloga – NO bzw. – NO_2 zu finden. Nur wenig ändern sich die typischen Signallagen funktionalisierter N-Atome, wenn sie in Metallkomplexen als Liganden fungieren, das heißt, man beobachtet nur geringe Koordinationseffekte („Koordinationsverschiebungen“)^[4] (vgl. Abschnitt 4.4). Dagegen beeinflußt das freie Elektronenpaar, ein Charakteristikum des N-Atoms, die ^{15}N -Abschirmung immer dann ausgeprägt, wenn sich durch energetisch tiefliegende $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge der $(\Delta E)^{-1}$ -Term der paramagnetischen Abschirmungskonstante verändert. So bewirkt beispielsweise Protonierung des Azin-Stickstoffs in Pyridinen und Pyrimidinen eine

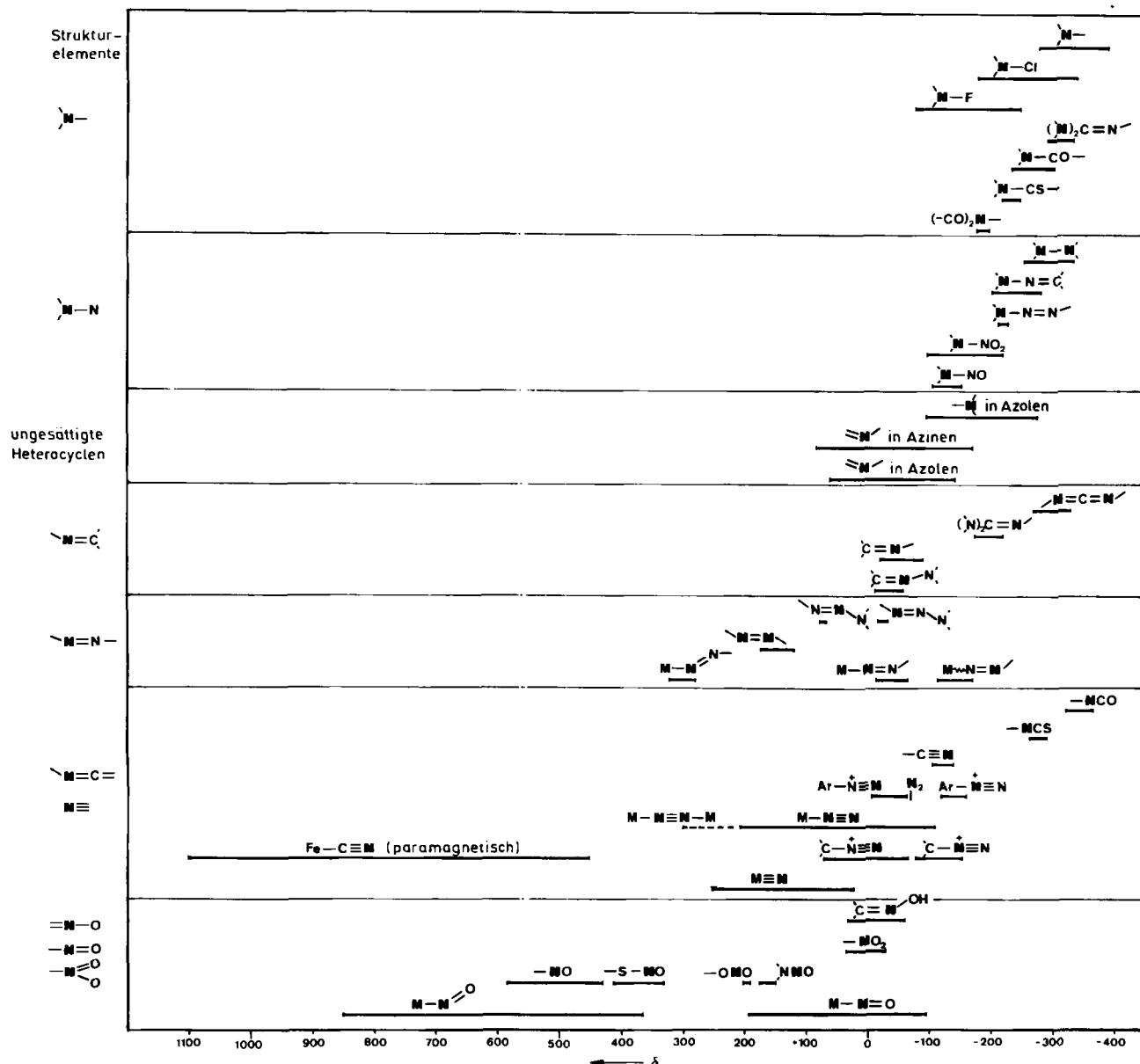


Abb. 13. ^{15}N -NMR-Verschiebungsbereiche organischer und anorganischer Verbindungen bezogen auf CH_3NO_2 ; positive δ -Werte entsprechen den zu höheren Frequenzen verschobenen ^{15}N -Resonanzen [38]. Ar=Aryl.

Abschirmung um 100–120 ppm^[39]. Derartige Effekte ermöglichen das Studium von Protonierungsreaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen in organischen und bioorganischen Molekülen (vgl. Abschnitt 4.1). Kommt es durch Wechselwirkung mit π -Systemen zur Delokalisierung des freien Elektronenpaares, wie beispielsweise in Enaminen und Enaminoketonen, resultiert eine Signalverschiebung zu hohen Frequenzen, die vom Ausmaß der Konjugation des Systems abhängt^[40]. Abbildung 14 illustriert den Übergang von Aminen zu Enaminen, Enaminoketonen (vinyligen Amiden) und Amiden, wie er durch die ^{15}N -NMR-Verschiebungen widergespiegelt wird. In Abschnitt 4.3 wird gezeigt, wie man diese Prinzipien für eine Konformationsstudie von Enaminoketonen anwenden kann.

Eine weniger phänomenologische und genauere Diskussion der chemischen Verschiebung von ^{15}N -Kernen muß auf der Basis des paramagnetischen Anteils σ^p der Abschirmungskonstante geführt werden. Dieser Anteil ist maßgeblich für die relativen Signallagen schwerer Kerne.

Auch auf der Grundlage quantenchemischer Rechnungen wurden die gemessenen ^{15}N -NMR-Verschiebungen eingehend diskutiert^[7b, 41]. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, daß die Abschirmungskonstanten von ^{14}N - und ^{15}N -Kernen sowohl miteinander als auch mit berechneten Werten ohne weiteres verglichen werden können, da Mes-

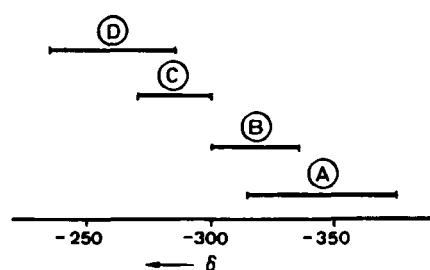


Abb. 14. ^{15}N -NMR-Verschiebungsbereiche von ④ *tert*. Aminen, ③ Enaminen, ② Enaminoketonen und ① Amiden.

sungen an einer Serie isotopomerer Moleküle einen konstanten Wert (bei einer Abweichung von $\pm 8 \cdot 10^{-8}$)^[3] für das Verhältnis der Resonanzfrequenzen erbrachte. Das derzeit verfügbare Datenmaterial deutet darauf hin, daß sich primäre Isotopeneffekte in der Größenordnung von einigen Zehntel ppm^[7b] bewegen und deshalb praktisch zu vernachlässigen sind (vgl. auch^[7b]). Dabei muß man sich jedoch bewußt sein, daß ¹⁴N-NMR-Verschiebungen wegen der extremen Linienbreiten (bis zu einigen kHz) teilweise mit großen Fehlern behaftet sind (einige ppm), während die ¹⁵N-NMR-Verschiebungen mit einer Genauigkeit von ± 0.5 ppm angegeben werden können.

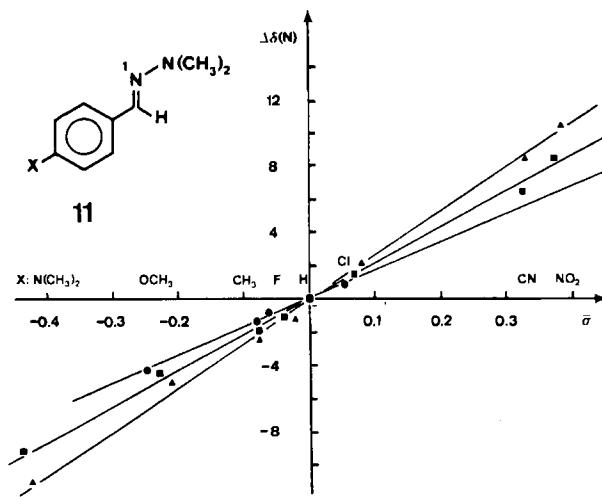


Abb. 15. Korrelationen von $\Delta\delta(N) = \delta_N - \delta_N^H$ mit $\sigma = (\rho_1\sigma_1 + \rho_K\sigma_K)/(\rho_1 + \rho_K)$ der N-1-NMR-Linie *p*-substituierter Benzaldehydhydrazone 11; (●) gemessen in C_6H_{12} , (■) in $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ und (▲) in CH_3OH [42].

Sowohl ¹⁵N- als auch ¹⁴N-NMR-Signallagen werden vom Medium beeinflußt, das heißt, sie sind lösungsmittel-, konzentrations- und temperaturabhängig. Je nach Lösungsmittel und Molekülstruktur können diese Effekte einige zehn ppm betragen, ein Beispiel findet man in Abbildung 15. Die substituenteninduzierten Verschiebungen der *p*-substituierten *N,N*-Dimethylbenzaldehydhydrazone 11 korrelieren gut mit den entsprechenden Hammett-Konstanten, wobei das Lösungsmittel die Steigung bestimmt – was auf den Ursprung der Effekte hinweist^[42]. Häufig korrelieren die vom Lösungsmittel induzierten Verschiebungen der ¹⁵N-NMR-Signallagen sehr gut mit seiner Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffbrücken; typische Beispiele sind die ¹⁵N-Resonanzlinien zweifach koordinierter N-Atome in Azinen und Azolen, wie man sie in vielen heterocyclischen Systemen antrifft^[43] (Tabelle 2). Der Grenzfall, die vollständige Protonierung des N-Atoms, verursacht eine Verschiebung um etwa 120 ppm zu kleineren Frequenzen (siehe^[39]). Einen guten Überblick über die Lösungsmittelabhängigkeit von ¹⁵N-NMR-Verschiebungen vermittelt^[7a]; einige Beispiele finden sich in Abschnitt 4.1.

Mehrere Autoren untersuchten, inwieweit bei ¹⁵N-NMR-Verschiebungen Deuterium-Isotopeneffekte zu beobachten sind – doch ist das Zahlenmaterial hierzu noch ziemlich düftig. In einer der ersten Studien fanden Litchman et al.^[44] eine Verschiebung zu kleineren Frequenzen

Tabelle 2. Lösungsmittelleffekte $\Delta\delta(N)$ für Pyridin (in ppm) [43].

Gasphase	C_6H_{12}	CCl_4	C_6H_6	ohne Solvens	DMSO [a]
0	-1.5	-4.3	-4.9	-6.3	-6.9
CH_2Cl_2	CHCl_3	CH_3OH	H_2O	TFE [b]	
-9.1	-12.5	-24.9	-28.1	-39.9	

[a] $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$. [b] $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$.

um 0.68, 1.29 und 1.96 ppm für mono-, di- bzw. trideutrierten Ammoniak; für [¹³C-2,3-¹⁵N₂-guanidino]Arginin beträgt die Verschiebung pro Deuteriumatom -0.6 ppm^[45]. Auch bei Enaminoketonen wurden Deuterium-Isotopeneffekte gemessen, doch überschreiten sie selten 0.1 ppm^[46]. Viel größere Verschiebungsdifferenzen (einige ppm) registriert man, wenn die Deuterierung rasche Tautomerengleichgewichte, beispielsweise bei 2-Hydroxy-azoverbindungen, beeinflußt^[47]. Isotopeneffekte können deshalb zum Nachweis und quantitativen Studium tautomerer Systeme herangezogen werden.

Wegen der vielfältigen Abhängigkeit der ¹⁵N-NMR-Verschiebungen (Lösungsmittel, Temperatur etc.) ist die Signalzuordnung bei Strukturaufklärungen unter Umständen schwierig. Es gibt jedoch eine Vielzahl von Zuordnungskriterien und Techniken, die zusammenfassend in Abschnitt 3.4 abgehandelt werden. Die Möglichkeiten haben sich wesentlich vergrößert, seit durch INEPT-, DEPT- und heteronuclear-korrierte 2D-NMR-Experimente auch N,H-Kopplungskonstanten zugänglich sind. Im Verlauf dieser Entwicklung wuchs das Wissen über weitreichende N,H-Kopplungen (ⁿJ(N,H), $n=2,3,4$), so daß sie heute ebenfalls zur Strukturaufklärung herangezogen werden können.

3.2. Spin-Spin-Kopplungskonstanten

Im Gegensatz zu ihren nahezu gleichen chemischen Verschiebungen sind die Kopplungskonstanten der N-Isotope zu X-Kernen von den magnetogyratischen Konstanten $\gamma(^{14}\text{N})=1.9324$ und $\gamma(^{15}\text{N})=-2.7107$ abhängig. Aus Gleichung (b) ist zu entnehmen, daß ¹⁵N,X-Kopplungskonstanten etwa um 40% größer sind als die entsprechenden ¹⁴N,X-Kopplungskonstanten; außerdem haben sie das entgegengesetzte Vorzeichen.

$$J(^{15}\text{N},X) = \gamma(^{15}\text{N})/\gamma(^{14}\text{N}) \cdot J(^{14}\text{N},X) = -1.40 \cdot J(^{14}\text{N},X) \quad (b)$$

Hier sei daran erinnert, daß eine „reduzierte Kopplungskonstante“ $K(X,X')$ eingeführt wurde, um die Kopplungsenergien verschiedener Kerne (Isotope oder Elemente) vergleichen zu können^[48] [Gleichung (c)].

$$K(X,X') = \frac{4\pi^2}{h\gamma_X\gamma_{X'}} \cdot J(X,X') [\text{N} \cdot \text{A}^{-2} \cdot \text{m}^{-3}] \quad (c)$$

Diese Definition eliminiert den Einfluß (von Größe und Vorzeichen) des magnetogyratischen Verhältnisses; K cha-

rakterisiert folglich Weg und Mechanismus der skalaren Spin-Spin-Wechselwirkung. In der Praxis werden die Kopplungsenergiebeträge immer als J - oder $|J|$ -Werte angegeben.

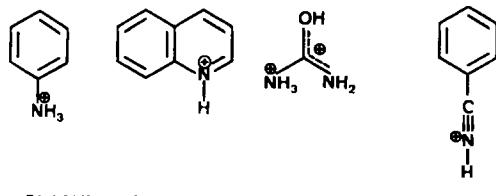
3.2.1. Unmittelbare $^{15}\text{N},\text{X}$ -Kopplungen ($^1\text{J}(\text{N},\text{X})$)

Wie in der ^{13}C -NMR-Spektroskopie für CH-beobachtet man in der ^{15}N -NMR-Spektroskopie für direkte NH-Bindungen die größten Kopplungskonstanten, und wiederum sind sie ein Maß für den s-Charakter des Hybrid-Orbitals der betreffenden N–H-Bindung (vgl. Schema 3). Es gibt mehrere empirische Gleichungen, die diese lineare Beziehung beschreiben:

$$^1\text{J}(\text{N},\text{H}) = -2.94 \cdot (\%)_{\text{s}} [\text{Hz}] \quad (\text{d})^{[51]}$$

$$^1\text{J}(\text{N},\text{H}) = -2.33 \cdot (\%)_{\text{s}} + 6 [\text{Hz}] \quad (\text{e})^{[52]}$$

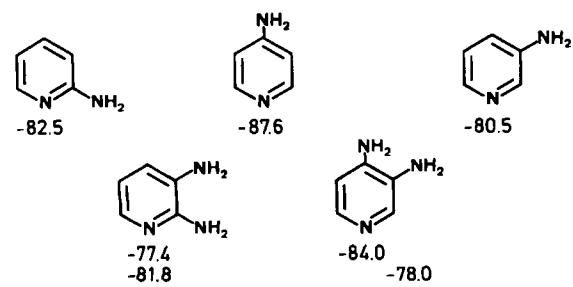
$$^1\text{J}(\text{N},\text{H}) = -1.69 \cdot (\%)_{\text{s}} - 17 [\text{Hz}] \quad (\text{f})^{[53]}$$



$^1\text{J}(\text{N},\text{H})$	gef.	-76.9 [49]	-96.0 [49]	-	-	-
[Hz]	ber.	-73.5	-98.0	-	-	-
%s		25	33	25	33	50

Schema 3.

Gleichung (d) ist bei geladenen Spezies vorzuziehen und reproduziert die $^1\text{J}(\text{N},\text{H})$ -Werte in Schema 3 innerhalb ± 3.5 Hz, nur nicht den Wert für protoniertes Benzonitril (-11 Hz). Anhand dieser Korrelationen läßt sich umgekehrt die Hybridisierung des N-Atoms – natürlich nur näherungsweise – abschätzen. Beispielsweise deutet der Vergleich der kleinen $^1\text{J}(\text{N},\text{H})$ -Werte der 1,2-disubstituierten Triaziridine 24 und 25 (51.7 bzw. 58.1 Hz, vgl. Abschnitt 4.2)^[54] mit dem für NH_3 bestimmten Wert von 62 ± 2 Hz^[7a] auf eine pyramidale Geometrie an N-3.



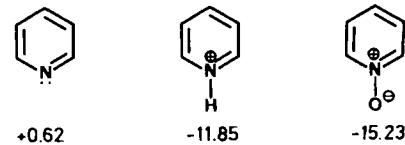
Schema 4. Unter den Formeln sind die Kopplungskonstanten $^1\text{J}(\text{N},\text{H})$ [Hz] angegeben [39].

Schema 4 macht deutlich, daß die $^1\text{J}(\text{N},\text{H})$ -Kopplung in Aminopyridin- und -pyrimidin-Derivaten vom Substitutionsort abhängt; dieser beeinflußt die Möglichkeit der Konjugation und damit die Hybridisierung des N-Atoms. Auf diese Weise können Aminogruppen in Azinen zuge-

ordnet werden – übrigens in Übereinstimmung mit den anhand der chemischen Verschiebungen getroffenen Zuordnungen^[39]. Für die 3- und 4-Aminogruppen in 3,4-Diaminopyridin werden Rotationsbarrieren (um die N–C-Bindung)^[55] von 22.1 bzw. 31.3 kJ/mol gemessen, was ebenfalls die schwächere Konjugation und höhere Pyramidialität der NH_2 -Gruppe in 3-Position belegt. Es bleibt anzufügen, daß die N,H-Kopplung in Anilin-Derivaten auch lösungsmittelabhängig ist. $^1\text{J}(\text{N},\text{H})$ nimmt zu, je größer die Tendenz des Lösungsmittels ist, Wasserstoffbrücken zu den NH_2 -Gruppen aufzubauen; $\Delta J_{\text{CDCl}_3}^{\text{DMSO}}$ beträgt beispielsweise 4–5 Hz^[56].

Ein H/D-Isotopeneffekt konnte für $^1\text{J}(\text{N},\text{H})$ -Kopplungen nicht beobachtet werden: Für NH_2D , NHD_2 sowie ND_3 ist $J(\text{N},\text{D})$ mit 9.45 ± 0.2 Hz nahezu konstant. Aus diesem Wert folgt, daß $^1\text{J}(\text{N},\text{H})$ im NH_3 -Molekül 61.4 Hz beträgt ($^1\text{J}(\text{N},\text{H}) = \gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{D}} \cdot J(\text{N},\text{D}) = 6.494 \cdot J(\text{N},\text{D})$) – in guter Übereinstimmung mit Resultaten direkter Messungen^[44].

Von den Konstanten für unmittelbare Kopplungen zu anderen Kernen wie ^{13}C , ^{15}N , ^{29}Si und ^{31}P ist zu erwarten, daß sie parallel mit dem magnetogyrischen Verhältnis des X-Kerns abnehmen, da bei leichten Elementen hauptsächlich der Fermi-Kontakt-Mechanismus die Kopplung bestimmt^[57]. Tatsächlich findet man bei den Aminophosphan-Derivaten die größten $^1\text{J}(\text{N},\text{P})$ mit 50 bis 95 Hz^[58]. Die Kopplung zwischen ^{13}C - und ^{15}N -Kernen ist dagegen viel kleiner: Ihr Betrag schwankt für Alkylamin-Derivate zwischen 2 und 5 Hz, steigt jedoch mit zunehmendem s-Charakter der N- und C-Orbitale und erreicht in Acetonitril und Diazomethan schließlich -17.5 Hz^[59] bzw. -20.2 Hz^[60]. Eine allgemeingültige Beziehung zwischen $^1\text{J}(\text{N},\text{C})$ und dem s-Charakter scheint es aber nicht zu geben, wenn auch $^1\text{J}(\text{N},\text{C}) = 0.0125 (\%)_{\text{C}} \cdot (\%)_{\text{N}}$ ^[52] vorgeschlagen wurde. Wie auch die großen Datensammlungen^[7a,b] über $^1\text{J}(\text{N},\text{C})$ belegen, beeinflussen zusätzliche Faktoren wie Elektronegativität der Substituenten an ^{15}N , π-Bindungsanteil sowie räumliche Orientierung des freien Elektronenpaares die Kopplungskonstante erheblich. Beispielsweise erbringt das freie Elektronenpaar des Pyridinstickstoffs einen positiven Beitrag zu $^1\text{J}(\text{N},\text{C})$. Dies erklärt die kleine Kopplung in der freien Base und die großen negativen Werte für das Pyridinium-Ion und das N-Oxid^[61] (Schema 5). Darüber hinaus ist es möglich, daß andere Mechanismen, die nicht auf der Fermi-Kontakt-Wechselwirkung basieren, bedeutende positive oder negative Beiträge zur Kopplung zwischen ^{15}N - und ^{13}C -Kernen liefern^[62].



Schema 5. Unter den Formeln sind die Kopplungskonstanten $^1\text{J}(\text{N},\text{C})$ [Hz] angegeben [61].

3.2.2. Weitreichende $^{15}\text{N},\text{X}$ -Kopplungen ($^n\text{J}(\text{N},\text{X})$, $n = 2,3$)

In diesem Abschnitt beschränken wir uns auf die Diskussion der $^{15}\text{N},^1\text{H}$ - und $^{15}\text{N},^{13}\text{C}$ -Kopplungskonstanten

und ihrer Bedeutung für die Strukturaufklärung. Gewöhnlich sind diese Werte kleiner als 20 Hz und damit im gleichen Bereich wie ^1H , ^1H - und ^{13}C , ^1H -Kopplungskonstanten. Während sich $J(^{15}\text{N}, ^1\text{H})$ an Material mit natürlicher Isotopenhäufigkeit bestimmen lässt, benötigt man zur Messung von ^{15}N , ^{13}C -Kopplungskonstanten entweder ^{13}C - oder ^{15}N -angereicherte Verbindungen, da die Isotope nur mit 1.1 bzw. 0.37% natürlicher Häufigkeit vorkommen. ^{15}N , ^1H -Kopplungskonstanten sind deshalb in der Analytik beispielsweise zur Signalzuordnung und Konfigurationsbestimmung sowie für Konformationsstudien, sehr nützlich, während ^{15}N , ^{13}C -Kopplungskonstanten bei der Erforschung von Reaktionsmechanismen und Biosynthesewegen eine große Hilfe sind. Mit den modernen Pulssfolgen (vgl. Abschnitt 2.2) wurde mehr und mehr über ($^{15}\text{N}, \text{X}$)-Kopplungskonstanten bekannt; so konnten die wichtigsten Merkmale ihrer Strukturabhängigkeit bestimmt werden. Schema 6 stellt typische Werte für $^2J(\text{N}, \text{H})$ und $^3J(\text{N}, \text{H})$ organischer Fragmente vor. In $\text{H}-\text{C}=\text{N}$ -Systemen beobachtet man relativ große Kopplungen von 10 bis 20 Hz, für die vor allem der Elektronentransfer nichtbindender Elektronen in das antibindende σ^* -Orbital der C–H-Bindung maßgeblich ist^[64]. Pyridinium- und Pyrimidinium-Verbindungen sind Beispiele dafür, daß Protonierung und Quaternisierung zweifach koordinierter, sp^2 -hybridisierter N-Atome eine drastische Abnahme von $^2J(\text{N}, \text{H})$ bewirken (Schema 6)^[65b].

-10.76	-3.01	+0.47	(-)14.5
	+2.7	R-CH-COO [⊖]	CH ₃ NH ₂
-4.5	-13.9	≤ 2	-1.0
-1.5	-4.0	7.4 (1,3); 6.0 (1,4); 1.0 (2,4)	4.8 (H _a) [63]; 1.0 (H _e)

Schema 6. Unter und gegebenenfalls über den Formeln sind die Kopplungskonstanten $^nJ(\text{N}, \text{H})$, $n=2,3$ [Hz] angegeben [7a,b].

Als man begann, INEPT- und DEPT-Pulssfolgen zur Messung protonengekoppelter ^{15}N -NMR-Spektren heranzuziehen, erkannte man, daß bei Azinen^[65] und Azolen^[15] der optimale τ -Wert durch $(2 \cdot ^2J(\text{N}, \text{H}))^{-1}$ gegeben ist. Folgendes Beispiel belegt den Nutzen von $^2J(\text{N}, \text{H}-6)=11.1$ Hz in 2-Acetylpyridin 12 bei der Messung eines protonengekoppelten, refokussierten INEPT-Spektrums. Das sehr komplizierte Spektrum (Abb. 16a) vereinfacht sich durch selektive ^1H -Entkopplung während der Acquisitionszeit. Mit diesen Experimenten (Abb. 16b) gelingt es, sämtliche

weitreichenden N,H-Kopplungskonstanten einschließlich ihrer Zuordnung zu bestimmen; entsprechende Messungen ermöglichen es, die Substitutionsmuster komplizierter Stickstoff-Heterocyclen aufzuklären (siehe Abschnitt 4).

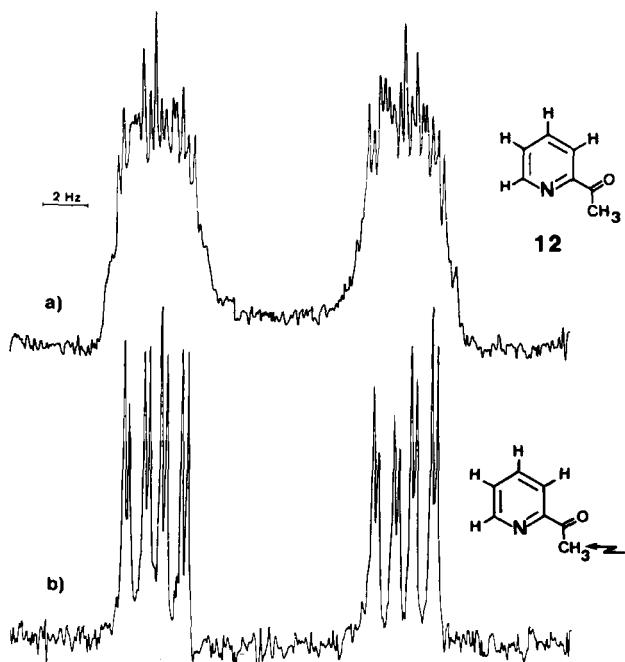


Abb. 16. INEPT- ^{15}N -NMR-Spektren von 2-Acetylpyridin 12 (Meßfrequenz 20.3 MHz; 90% v/v in $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): a) protonengekoppelt; 11000 Pulse; b) selektive Bestrahlung der CH_3 -Resonanz; 1500 Pulse [65a].

Die detaillierte Untersuchung von N,H-Kopplungskonstanten in Azolen^[66] enthüllte eine subtile Abhängigkeit von $^2J(\text{N}, \text{H})$ und $^3J(\text{N}, \text{H})$ vom Kopplungsweg, d. h. von Konnektivität, Geometrie und Bindungsordnung (Schema 7). Derartige Informationen – auch wenn sie nur halb-

$^2J(\text{N}, \text{H})$ [Hz]		1.5–1.9
		3.1–9.1
		7.2–12.0
		10.5–15.5
$^3J(\text{N}^*, \text{H})$ [Hz]		< 2
		1.0–2.2
		3.0–7.4
		6.0–10.5

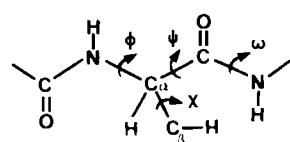
Schema 7.

quantitativ sind – können für die Strukturaufklärung sowie für die Abschätzung von Kopplungskonstanten sehr wichtig sein; anhand dieser Informationen können wiederum die Wartezeiten bei Polarisationstransfer-Experimenten und heteronuclearen 2D-Experimenten optimiert werden.

In aliphatischen Systemen sind weitreichende N,H-Kopplungen gewöhnlich klein (<4 Hz) und, da es sich meist um äußerst komplizierte Spinsysteme handelt, nicht ohne weiteres zugänglich. Beträchtliches Interesse an der $^3J(N,H)$ -Kopplung erweckte die Vermutung, daß sie zur Vorhersage der Torsionswinkel ψ und χ in Peptidsystemen herangezogen werden kann (Schema 8)^[67]. Obwohl die Diederwinkel-Abhängigkeit

$$^3J(N-CO-CH) = A \cos^2 \psi + B \cos \psi + C$$

sowohl theoretisch^[68] als auch experimentell^[69] belegt wurde, schränkt der kleine Wertebereich von $^3J(N,H)$ die Aussagekraft der Methode ein. Als zusätzlicher Unsicherheitsfaktor bei der Anwendung der Gleichung zur Lösung stereochemischer Probleme kommt hinzu, daß bei derart kleinen Werten beide Vorzeichen denkbar sind.



Schema 8.

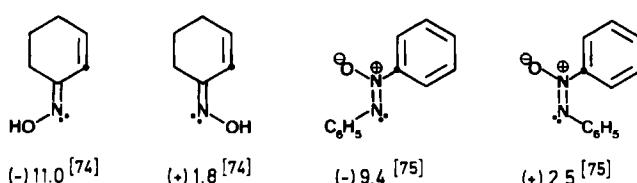
Die relativen Vorzeichen von N,H-Kopplungskonstanten erhält man entweder durch die entsprechenden Standard-Doppelresonanz-Experimente^[70] oder über Spektrenanalyse und -berechnung. Wie erwartet, sind die hauptsächlich von der Fermi-Kontakt-Wechselwirkung bestimmten Kopplungskonstanten $^1J(N,H)$ immer negativ, während für $^2J(N,H)$ und $^3J(N,H)$ beide Vorzeichen möglich sind; ganz allgemein sind N,H-Kopplungskonstanten > 10 Hz negativ^[71]. Für Pyridin und Pyrimidin wurden die relativen Vorzeichen sämtlicher N,H-Kopplungen durch SPT-Experimente^[21c] bzw. durch Berechnung der Spektren^[72] bestimmt. Tabelle 3 enthält die übereinstimmenden Werte.

Tabelle 3. Größe und relative Vorzeichen von Kopplungskonstanten $^3J(N,H)$ [Hz] in Pyridin [21c] und Pyrimidin [72].

	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
Pyridin	-10.93	-1.48	+0.27	-1.48	-10.93
Pyrimidin	-14.42	-	+0.54	-1.07	-10.76

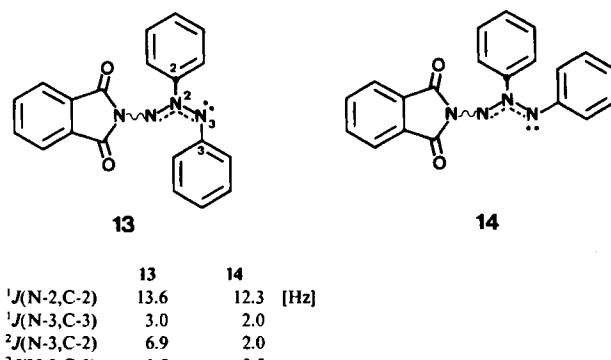
Weitreichende $^{15}N, ^{13}C$ -Kopplungen sind generell kleiner als 10 Hz. Am besten lassen sich die Werte den ^{13}C -NMR-Spektren ^{15}N -markierter Verbindungen entnehmen. Wie $^2J(N,H)$ ist auch $^2J(N,C)$ von der räumlichen Orientierung des freien Elektronenpaares am Stickstoffatom relativ

zum entsprechenden C-Atom abhängig, wobei für die syn-periplanare Anordnung deutlich größere Werte beobachtet werden als für die antiperiplanare^[73] (Schema 9). Wie die



Schema 9. Unter den Formeln sind die Kopplungskonstanten $^2J(N,C)$ [Hz] angegeben.

Spektren von (*E*)- und (*Z*)-Azoxybenzol zeigen, schwächt der Einbau anderer X-Atome die Abhängigkeit der N–C–C-Kopplung von der Molekülgeometrie nicht. So konnte anhand $^2J(N,C)$ der Strukturbeweis für die beiden stereoisomeren Azimine 13 und 14 erbracht werden, die durch Addition von Phthalimidonitren an (*E*)- bzw. (*Z*)-Azobenzol entstehen (Schema 10)^[75]. Da für N-2 und N-3 in 13 und 14 ähnliche chemische Verschiebungen gemessen wurden, basiert ihre Zuordnung auf den stark abweichenden $^1J(N,C)$ -Werten – in Analogie zu den Azoxybenzol-Derivaten und aufgrund einer theoretischen Analyse von $^1J(N,C)$ -Werten^[62]. Die (*E*)- und (*Z*)-Konfigurationen ergeben sich eindeutig aus den $^2J(N,C)$ -Werten der ^{13}C -NMR-Spektren [$2,3-N_2$]-markierter Substanzen.

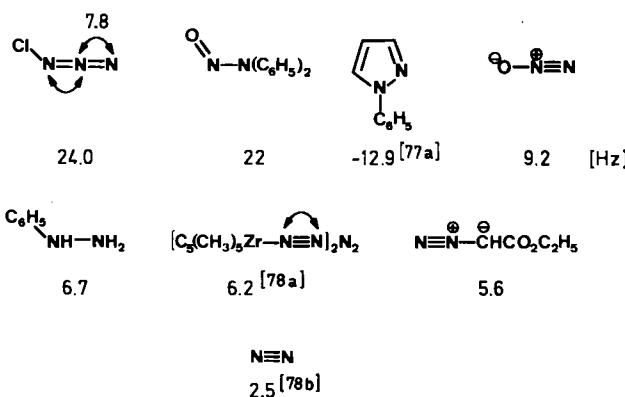


Schema 10.

Von welchem Nutzen N,C-Kopplungskonstanten für die Interpretation biosynthetischer Studien sein können, wird in den Abschnitten 4.1 und 4.5 vorgeführt.

3.2.3. $^{15}N, ^{15}N$ -Kopplungskonstanten

Wegen mangelnder Empfindlichkeit gelingt es nur in Spektren ^{15}N -markierter Substanzen, N,N-Kopplungen nachzuweisen. Trotzdem wurde beträchtliches Datenmaterial zusammengetragen und in Übersichten präsentiert^[76, 7a, b]. Die Kopplungskonstanten sind klein (<25 Hz), da die beiden miteinander koppelnden Kerne nur ein kleines magnetogyrisches Verhältnis haben. Für eine Korrelation zwischen den $^1J(N,N)$ -Werten und dem s-Charakter der bindenden Orbitale oder der Länge der N,N-Bindung gibt es keine Hinweise (Schema 11).



Schema 11. Unter und gegebenenfalls über den Formeln sind die Kopplungskonstanten $^1J(\text{N},\text{N})$ [Hz] angegeben [7a, b]. Der Wert für N_2 wurde aus dem experimentellen Wert für $^{14}\text{N}^{15}\text{N}$ [78b] nach Gleichung (b) berechnet.

Quantenchemische Rechnungen sagen voraus, daß die meisten $^1J(\text{N},\text{N})$ -Werte aufgrund des hohen Beitrags des freien Elektronenpaares an „s-hybridisierten“ Orbitalen ein negatives Vorzeichen^[79] haben und daß Größe sowie Vorzeichen vom Diederwinkel mit dem freien Elektronenpaar abhängen^[79b]. Eine genaue Interpretation der N,N-Kopplungskonstanten ist nur auf der Basis experimentell bestimmter Vorzeichen möglich^[77], doch leider fehlen diese in den meisten Fällen. Beispiele für Strukturzuordnungen unter Einbeziehung von N,N-Kopplungskonstanten finden sich in Abschnitt 4.

3.3. ^{15}N -Relaxationszeiten

T_1 und T_2 , die beiden Zeitkonstanten, die die Relaxationsprozesse charakterisieren, sind für die ^{14}N - und ^{15}N -NMR-Spektroskopie von sehr unterschiedlicher Bedeutung. Beim ^{14}N -Quadrupolkern beeinflußt die transversale Relaxationszeit T_2 die Meßbarkeit der NMR-Signale. T_2 ist für die Linienbreite $\Delta\nu_{1/2}$ maßgeblich, die von einigen Hz bei hochsymmetrischer Elektronenverteilung bis zu mehreren kHz bei unsymmetrischen großen Molekülen variiert. Man hat also wegen schnellerer, zur Linienverbreiterung führender Relaxation einen Empfindlichkeitsverlust ($T_2=1/\pi\Delta\nu \approx 65$ ms bis 65 μs für $\Delta\nu=5$ Hz bis 5 kHz).

Eine andere Situation liegt beim Isotop ^{15}N mit dem Spin 1/2 vor, dem ein derart effektiver intramolekularer Relaxationsmechanismus fehlt. Als Kern mit kleinem magnetischem Moment ist er entweder von der räumlichen Nähe eines empfindlichen Kerns abhängig – die Voraussetzung für schnelle dipolare Spin-Gitter-Relaxation ($T_1^{\text{DD}})^{-1}$ – oder von der Existenz starker Magnetfelder (B_0), da sich dann der durch die Anisotropie der Abschirmungskonstante (Chemical Shift Anisotropy, CSA) verursachte Relaxationsprozeß ($T_1^{\text{CSA}})^{-1}$ stärker auswirkt. Die Spin-Gitter-Relaxationsgeschwindigkeit (T_1) $^{-1}$ bestimmt die Wartezeit zwischen den Einzelpulsen, also die Wiederholungsgeschwindigkeit in Standard-Pulseperimenten. So wird deutlich, daß NH_2 - und NH -Gruppen wegen ihrer effizienten ^1H , ^{15}N -dipolaren Relaxation viel einfacher nachzuweisen sind als tertiäre ^{15}N -Atome, die, da nicht direkt an H-Atome gebunden, sehr lange T_1 -Zeiten haben und bei denen deshalb auch der NOE-Effekt ausbleibt (vgl. Abschnitt 2.1). Seit starken Magnetfeldern von $B_0=9.4$ und 11.7 Tesla zur Verfügung stehen, ist die Messung tertiärer

N-Atome weniger zeitaufwendig. Der CSA-Term, der für alle größeren Moleküle zu $1/T_1$ beiträgt, steigt proportional zu B_0^2 [Gleichung (g)]^[80] und bewirkt damit eine deutliche Abnahme der T_1 -Relaxationszeit (Tabelle 4).

$$(T_1^{\text{CSA}})^{-1} = \frac{2}{15} \gamma_N^2 B_0^2 (\sigma_{||} - \sigma_{\perp})^2 \cdot \tau_c \quad (\text{g})$$

Tabelle 4. Feldstärkeabhängigkeit der ^{15}N -Spin-Gitter-Relaxationszeiten T_1 /s.

	$B_0=1.4$	4.2	4.7	9.4 T
NaNO_2 [a]				17.5
KCN [b]	21.2	14.5		
2-Chlor-pyrimidin [c]			170	114

[a] 99% ^{15}N , 1.1 M in D_2O , 25 °C [b]: 95% ^{15}N , 7.9 M in D_2O , 30 °C (aus Tabelle 2.3 in [7a]). [c] 99% $^{15}\text{N}_2$, 1.6 M in $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 25 °C.

Bedenkt man, daß die Anisotropie der chemischen Verschiebung $\Delta\sigma = \sigma_{||} - \sigma_{\perp}$ bei ^{15}N -Kernen bis zu viermal größer ist als bei ^{13}C -Kernen, wird deutlich, warum der B_0^2 -abhängige CSA-Relaxationsmechanismus gerade bei ^{15}N -Hochfeld-NMR-Messungen so wirksam ist.

Bei geringeren Feldstärken läßt sich die Relaxation durch Zugabe von paramagnetischen Relaxationsreagentien wie $\text{Cr}(\text{acac})_3$, $\text{Ni}(\text{acac})_2$ oder $\text{Gd}(\text{dpm})_3$ ^[81] und $[\text{Gd}(2:2:1)]^{3+}$ -Cryptat zu wäßrigen Lösungen^[82] stark beschleunigen (dpm=Dipivalomethanato). Dadurch erhöht sich die Spin-Gitter-Relaxationsgeschwindigkeit (T_1) $^{-1}$ häufig um das 10- bis 100fache^[81] –, und die Meßzeit verkürzt sich erheblich. Die jüngste und effizienteste Methode, die durch lange T_1 -Relaxationszeiten bedingte geringe Empfindlichkeit zu erhöhen, ist der Polarisationstransfer von häufig vorkommenden, empfindlichen und schnell relaxierenden Kernen (z. B. ^1H , ^{19}F) auf ^{15}N -Kerne mit den INEPT- und DEPT-Pulsfolgen (Abschnitt 2.2). Die Wiederholung einer Pulsfolge wird dabei durch die schnelle Relaxation der Protonen und nicht durch die langsame ^{15}N -Relaxation bestimmt^[11, 12].

Recht kompliziert ist die Abhängigkeit der Spin-Gitter-Relaxation von der Molekülbewegung, genauer, den Reorientierungs- oder Korrelationszeiten τ_c . Abbildung 17 zeigt, daß im „extrem-narrowing“-Bereich, wenn $[\tau_c^2(\omega_N + \omega_H)^2 \ll 1]$ gilt, T_1 für kleine, sich schnell bewegende Moleküle linear mit zunehmender Korrelationszeit τ_c abnimmt und bei $\tau_c=10^{-9}$ bis 10^{-8} ein Minimum erreicht. Für längere Korrelationszeiten, d. h. für größere Moleküle, beobachtet man wieder eine Zunahme von T_1 , also eine Verlangsamung der Relaxation. In diesem Bereich sind die großen Biomoleküle wie Proteine und Nucleinsäuren anzusehen, wobei Abbildung 17 deutlich macht, daß sich bei stärkeren Magnetfeldern die Relaxation noch mehr verlangsamt.

Zusammenfassend bleibt zu betonen, daß für die Optimierung von ^{15}N -NMR-Experimenten eine Betrachtung der Spin-Gitter-Relaxationszeiten unerlässlich ist. Da T_1 -Werte stark von den experimentellen Gegebenheiten wie Feldstärke, Konzentration, Lösungsmittel und Temperatur sowie von der Molekülstruktur abhängen, leisten Datensammlungen nur beschränkt Hilfestellung; typische T_1 -Zeiten einiger Moleküle findet man in^[7a, c, 4].

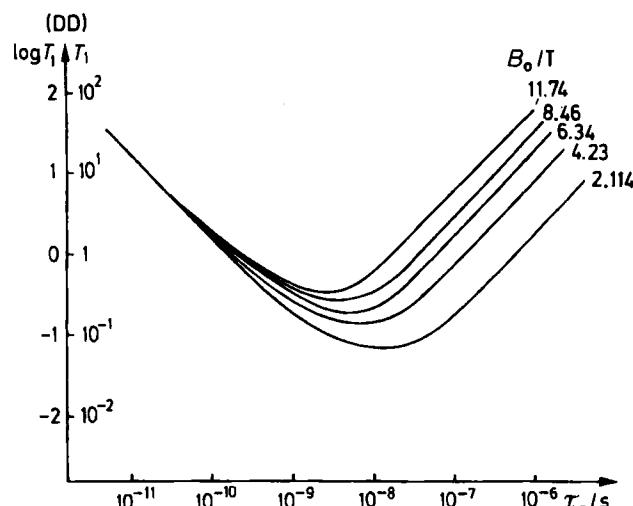


Abb. 17. Dipol-Dipol-Relaxation (T_1^{DD}) als Funktion der Korrelationszeit τ_c (isotrope Reorientierungszeit der Moleküle) für verschiedene Magnetsfeldstärken B_0 [7a].

3.4. Zuordnungstechniken

Bei Verbindungen mit mehreren N-Atomen, vor allem, wenn diese wie bei Polypeptiden und Polynukleotiden Bestandteile sich wiederholender Struktureinheiten sind, ist die Zuordnung der ^{15}N -NMR-Signale problematisch. Aber sogar bei kleinen Molekülen kann die Identifizierung der ^{15}N -NMR-Signale eine anspruchsvolle Aufgabe sein.

Die erste Schwierigkeit besteht – besonders bei Spektren mit geringem Signal-Rausch-Verhältnis – in der Unterscheidung zwischen echten und unechten, von der Elektronik hervorgerufenen NMR-Signalen. Die variablen T_1 -Zeiten und der negative NOE-Effekt bringen sehr unterschiedliche Signalintensitäten mit sich, und die Gefahr ist groß, daß schwache Signale im Rauschen untergehen. Um sicher zu sein, daß tatsächlich alle NMR-Resonanzen gemessen wurden, ist es häufig erforderlich, mehrere der in Abschnitt 2 vorgestellten Experimente durchzuführen – beispielsweise Pulsfolgen mit und ohne NOE-Entwicklung und Polarisationstransfer-Experimente mit unterschiedlichen Wartezeiten τ . Das zweite Problem betrifft die Zuordnung der NMR-Signale zu spezifischen N-Atomen. Entsprechend der Diskussion der spektralen Parameter in Abschnitt 3 bieten sich folgende Kriterien und Techniken an:

- chemische Verschiebungen, einschließlich Substituenteneffekten
- N-H-Austauschreaktionen und Protonierung
- Lanthanoiden-Verschiebungsreagentien (Lanthanoide-Induced Shifts, LIS)
- NOE-Effekt
- N,H- und N,X-Kopplungskonstanten
- N,H- und N,X-Korrelationsexperimente (1D und 2D)
- Spin-Gitter-Relaxationszeiten
- Isotopenmarkierung.

Die wichtigste Hilfe bei der Zuordnung bietet die Analyse der protonengekoppelten ^{15}N -NMR-Spektren. Dank der Entwicklung moderner 1D- und 2D-Pulssequenz-Experimente verzeichnete hier die ^{15}N -NMR-Spektroskopie ihre größten Erfolge während der letzten Jahre. Auch pa-

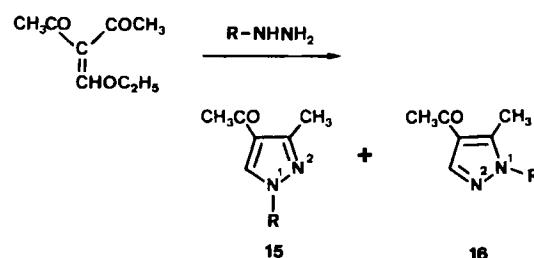
ramagnetische Verschiebungsreagentien (Lanthanoide-Komplexe) haben sich in einigen Fällen^[83, 89, 84] als sehr nützlich erwiesen. In Oligopeptiden sind die unterschiedlichen Austauschgeschwindigkeiten freier und über Wasserstoffbrücken gebundener NH-Gruppen ein gutes Kriterium für ihre Zuordnung. Zusätzlich gibt es beispielsweise für Azole^[85] und Azine^[86] Verschiebungskremente auf empirischer Basis, während für eine Vielzahl von Struktureinheiten MO-Berechnungen durchgeführt wurden, die ebenfalls zur Abschätzung und Zuordnung von ^{15}N -NMR-Verschiebungen beitragen können^[41, 7b, 87].

4. Chemische Anwendungen

Das Anwendungspotential der ^{15}N -NMR-Spektroskopie in der Strukturchemie hat sich während der letzten Jahre stark erweitert – vor allem wegen der gestiegenen Nachweisempfindlichkeit und der verbesserten Zugänglichkeit ^1H -gekoppelter ^{15}N -NMR-Spektren. Dieser Abschnitt bietet Beispiele aus der Organischen Chemie, der Biochemie, der Organometallchemie und der Komplexchemie. Sie illustrieren sowohl die in den vorangegangenen Abschnitten aufgezeigten Gesetzmäßigkeiten als auch die Breite der Anwendungsmöglichkeiten und die generelle Leistungsfähigkeit der ^{15}N -NMR-Methode als Sonde bei Strukturaufklärungen und mechanistischen Studien.

4.1. Strukturen und Bindungsverhältnisse organischer Moleküle

Die ^{15}N -NMR-Spektroskopie eignet sich besonders gut zum Studium isomerer Stickstoff-Heterocyclen, beispielsweise der isomeren Acetylpyrazole vom Typ 15 und 16, die als Vorstufen biologisch aktiver Substanzen^[88] aus monosubstituierten Hydrazinen und 3-(Ethoxymethylen)-2,4-pentandion gebildet werden. Das Produktverhältnis wird dabei durch den Substituenten R (Schema 12) be-



Schema 12.

stimmt. Da die Signale der dreifach bzw. zweifach koordinierten Atome N-1 bzw. N-2 anhand ihrer chemischen Verschiebungen leicht zu unterscheiden sind (Abb. 18), gelingt es, die Isomere über geminale und vicinale N,H-Kopplungen zu identifizieren (INEPT-Experiment)^[15]. Wie nach den bereits in Abschnitt 3.2.2 abgeleiteten Ergebnissen zu erwarten war, beobachtet man für das Pyrazol 16 große $^2J(\text{N}-2, \text{H})$ - und $^3J(\text{N}-1, \text{H})$ -Werte (z. B. für 16a, R=CO₂C₂H₅; 13.7 bzw. 9.0 Hz), dagegen betragen die entsprechenden Werte für 15a nur 3.4 bzw. 1.9 Hz; für N-Benzyl-Derivate erhält man sehr ähnliche Zahlen.

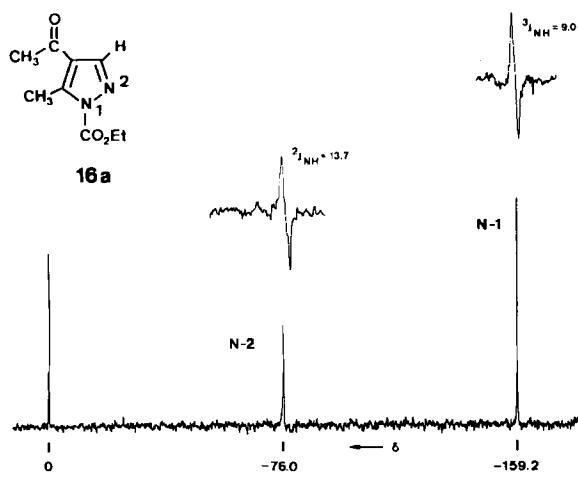


Abb. 18. Refokussiertes und protonenentkoppeltes INEPT-¹⁵N-NMR-Spektrum von Ethyl-4-acetyl-5-methyl-1-pyrazolcarboxylat **16a** (Meßfrequenz 20.3 MHz; (CD₃)₂SO); zusätzlich eingezeichnet sind die Signale, wie sie ohne Entkopplung registriert werden [15].

Einen anderen Typ von Regioisomerie trifft man bei 4- und 5-Nitroimidazolen. Ihre Unterscheidung ist von besonderer Bedeutung, da nur *N*-substituierte 5-Nitro-Isomere hochwirksame Antiprotozoica sind^[88b]. Die endgültige Zuordnung gelang auf der Basis der NO₂-¹⁵N-NMR-Verschiebungen (4-NO₂: $\delta = -18 \pm 1$; 5-NO₂: $\delta = -25 \pm 1$) sowie der ¹⁵N,¹H-Kopplungskonstanten der Atome N-1 und N-3^[15].

Verwickelte Tautomerengleichgewichte sind typisch für Heterocyclen; häufig hilft die ¹⁵N-NMR-Spektroskopie

bei ihrer Aufklärung. Zum Beispiel konnte die Lage des Tautomerengleichgewichts bei 1-Hydroxybenzotriazol **17a** und seinen Derivaten über die chemischen Verschiebungen der N-3-Atome und ihre Lösungsmittelabhängigkeit bestimmt werden^[89]. Der für N-3 gemessene Verschiebungsbereich (-58 bis -100 ppm) belegt eindeutig, daß das Gleichgewicht auf der Seite der *N*-Hydroxy-Verbindung **17a** liegt und der Anteil des *N*-Oxids **17b** zwischen 6% (DMSO) und 26% (CH₃OH) beträgt (Schema 13). Von



Schema 13.

2-Hydroxyazinen ist bekannt, daß sie normalerweise in der tautomeren Amidform vorliegen; kürzlich wurde jedoch für das Hydroxyaza[10]annulen **18** ein ungewöhnliches Iminol-Amid-Gleichgewicht nachgewiesen (Schema 14). Vergleicht man die gemittelte ¹⁵N-NMR-Verschiebung des Tautomerengemisches ($\delta = -204.3$, (CD₃)₂SO, 37 °C) mit



Schema 14.

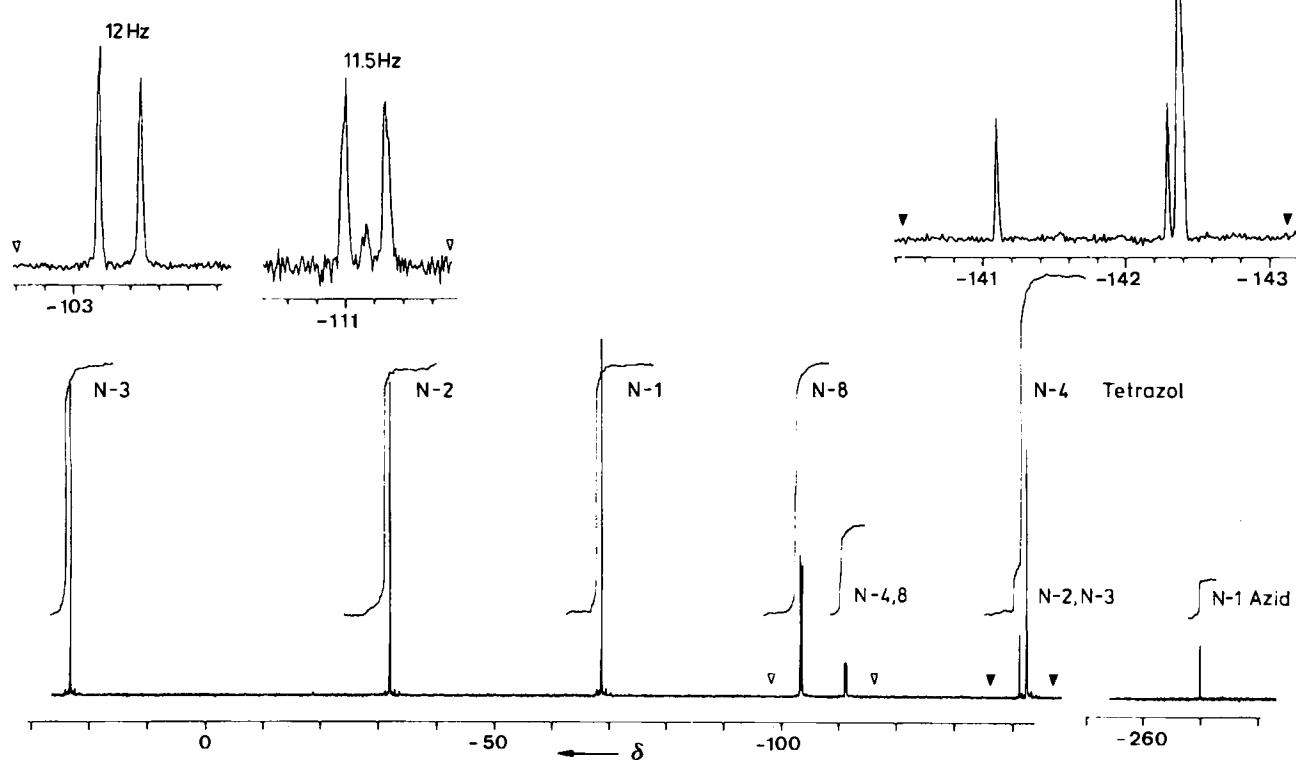


Abb. 19. ¹⁵N-NMR-Spektren des Gleichgewichtsgemisches von 6-Butyltetrazolo[1,5-a]pyrimidin **19** und 2-Azido-5-butylpyrimidin **20**, R=n-C₄H₉ (Meßfrequenz 40.6 MHz; 15 mm-Ø-Probenröhren; reine Substanz). Zur (willkürlichen) Numerierung der N-Atome siehe Schema 15 [95].

den Werten der *N*- und *O*-methylierten Derivate ($\delta = -240.6$ bzw. -115.9), so spricht dies für ein **18a/18b**-Verhältnis von 7:3^[90]. Die bemerkenswerte Stabilität der Iminolform **18b** war auch aus dem ¹³C-NMR-Spektrum ersichtlich. Ähnliche Studien wurden auch bei substituierten Azolen durchgeführt^[91, 92, 7b]. Im Vordergrund standen dabei Imidazole^[93] und Nucleotide, da sie in vielen biologischen Systemen zu finden sind, die so untersucht werden konnten^[94].



Schema 15.

Hull, Künstlinger und Breitmaier berichteten über die Valenzisomerisierung von Tetrazolo[1,5-a]pyrimidin **19**/2-Azidopyrimidin **20**^[95] (Schema 15), die sich hervorragend zur ¹⁵N-NMR-spektroskopischen Untersuchung eignet. Der Austausch – früher schon mit ¹H-NMR-spektroskopischen Methoden^[96] studiert – ist so langsam, daß man im ¹⁵N-NMR-Spektrum des reinen, flüssigen *n*-Butyl-Derivates (Abb. 19) alle neun Signale der nichtäquivalenten N-Atome zuordnen und so auf die Gleichgewichtslage (85% Tetrazol **19**) schließen kann; für die richtige Zuordnung waren jedoch auch zwei ²J(N,H)-Werte von entscheidender Bedeutung. Die Lage des Gleichgewichts ist stark lösungsmittelabhängig: Während die Tetrazoloform **19** in polaren Lösungsmitteln dominiert, stabilisiert Chloroform die Azidoform **20**.

Studiert man den Einfluß von Substituenten auf die Lage der ¹⁵N-NMR-Signale, wie dies etwa für Pyridin-^[97], Pyrimidin-^[97] und Pyridazin-Derivate^[98] getan wurde, so beobachtet man eine lineare Korrelation mit den entsprechenden ¹³C-Substituenteneffekten.

Ausführliche ¹⁵N-NMR-Studien an Pteridin-Derivaten^[99], einer biologisch wichtigen Substanzklasse, führten zur eindeutigen Strukturbestimmung des „aktivierten Formaldehyds“ (Blakley-Cofaktor), der aus (6S)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-folsäure und Formaldehyd entsteht. Diese Verbindung wirkt bei der enzymatischen Umwandlung von Glycin in Serin als Cofaktor^[99]. In der Literatur wurden dafür zwei Strukturen, die 5-Hydroxymethyl- und die cyclische 5,10-Methylenstruktur **21**, diskutiert^[99, 100]. Abbildung 20 zeigt das ¹⁵N-NMR-Spektrum der nicht ¹⁵N-an gereicherten (6RS)-Verbindung. Die Signalzuordnung der sieben N-Atome gelang anhand der ¹⁵N-NMR-Daten von Tetrahydrofolsäure-Derivaten^[91] – aber die Signale der beiden Diastereomere sind (bei 10.1 MHz) nicht aufgelöst.

Im ¹⁵N-NMR-Spektrum (20.3 MHz) des in 5- und 10-Position ¹⁵N-markierten Produkts (Abb. 21) beobachtet man dagegen deutlich separierte Signale ($\Delta\delta = 0.24$) für die diastereomeren (6R)- und (6S)-Verbindungen. Die kleine ¹⁵N-5, ¹⁵N-10-Kopplung von 2 Hz widerlegt den 5-Hydroxymethyl-Strukturvorschlag nicht; so wurde die Substanz zusätzlich in 11-Position durch Umsetzung mit [¹³C]Formaldehyd markiert. Im ¹H-entkoppelten ¹³C-NMR-Spektrum sieht man dann für den Methylenkohlenstoff ein

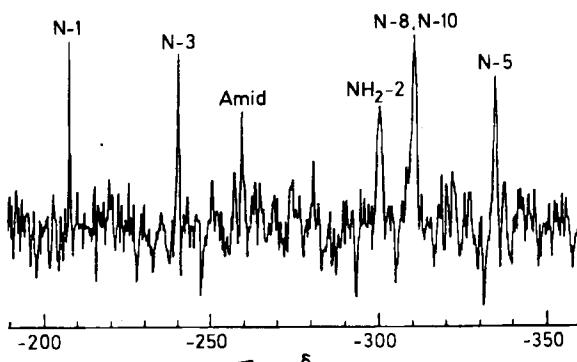
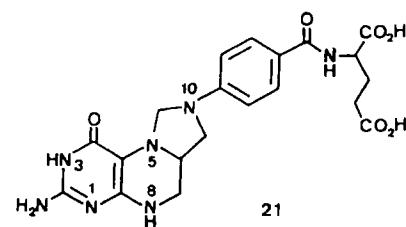


Abb. 20. ¹⁵N-NMR-Spektrum von (6RS)-5,10-Methylen-tetrahydrofolsäure **21** (Meßfrequenz 10.1 MHz; 0.8 M in H₂O/D₂O 92:8, pH=7; 20 mm-Ø-Probenröhrchen) [101a].

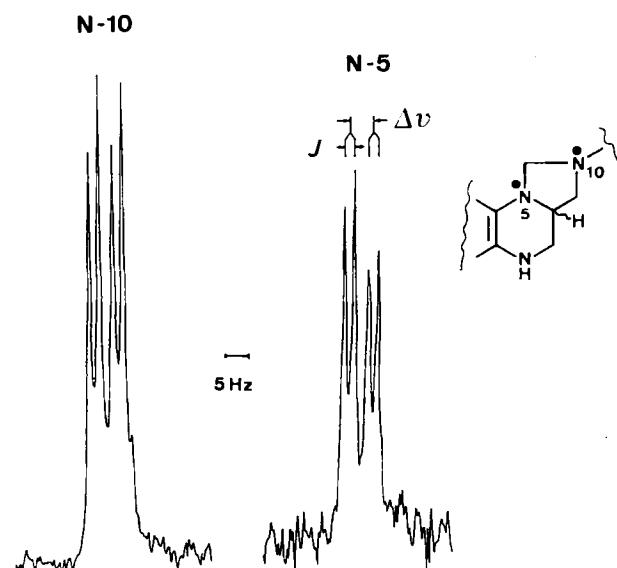
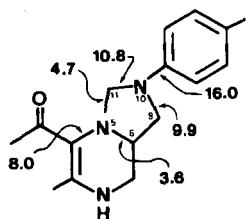


Abb. 21. ¹⁵N-NMR-Spektrum von (5,10-¹⁵N₂)-**21** (Meßfrequenz 20.3 MHz; 0.05 M in D₂O; pH=7; 10 mm-Ø-Probenröhrchen). Die Zuordnung der Multiplettstrukturen zu N-5 und N-10 ist im Text erläutert [101b].

Doppeldublett mit $J(^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}) = 10.8$ und 4.7 Hz. Dies belegt eindeutig die cyclische Methylenstruktur **21** des aktivierte Formaldehyds, da das Signal von ¹³C-11 in der nicht ¹⁵N-an gereicherten Verbindung nur als Singulett auftritt^[101] und somit das Multiplett in der dreifach markierten Verbindung nur von ¹J(N,C)-Kopplungen herrühren kann (vgl. auch die anderen in Schema 16 eingetragenen ¹³C, ¹⁵N-Kopplungskonstanten). Entsprechend der linearen Korrelation zwischen ¹J(N,C) und dem s-Charakter des Bindungssorbitals (Abschnitt 3.2.1) mißt man die größere Kopplung, wenn ein N-Atom vom „Anilin-Typ“ (N-10) beteiligt ist, während der kleinere Wert auf die pyramide Geometrie des N-5-Atoms hinweist. Zum Vergleich sei ¹J(N,C)=4.5 Hz für CH₃NH₂ angegeben^[102].

Das freie Elektronenpaar des Stickstoffatoms bedingt die Abhängigkeit der ^{15}N -NMR-Signallagen von Wasserstoffbrückenbildung und n,π -Delokalisation. Damit in direktem Zusammenhang und meistens als störend empfunden – wenn auch manchmal sehr nützlich – steht die Lösungsmittelabhängigkeit (vgl. Abschnitt 3.1.2). Im folgenden wird der Nutzen der ^{15}N -NMR-Spektroskopie beim Studium von Elektronenverteilungen und Wasserstoffbrückenbindungen aufgezeigt.

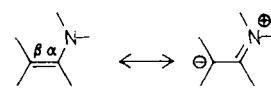


Schema 16. Zahlen siehe Text.

Eine bedeutende Rolle spielen die n,π -Wechselwirkungen bei Enaminen und verwandten Verbindungen, da sie weitgehend die besonderen physikalischen und chemischen Eigenschaften dieser wichtigen Synthesebausteine der Organischen Chemie hervorrufen^[103]. In unserem Arbeitskreis wurden umfassende Untersuchungen über ^{15}N -NMR-Verschiebungen von Aminen, Enaminen, Enamino-ketonen und analogen, durch zusätzliche Konjugation stabilisierten Verbindungen angestellt^[40, 46, 104, 13]. Die ^{15}N -NMR-Verschiebungen dieser Verbindungen liegen zwischen denen der stärker abgeschirmten tertiären Amine und denen der schwächer abgeschirmten Amide (Abb. 14). Um den Einfluß der n,π -Delokalisation von elektronischen und sterischen Substituenteneffekten unterscheiden zu können, erwies es sich als vorteilhaft, die Verschiebungsdifferenz $\Delta\delta(^{15}\text{N}) = \delta(\text{Amin}) - \delta(\text{Enamin})$ zu definieren. $\Delta\delta(\text{N})$ korreliert gut mit den für die gehinderte Rotation um die $\text{N}-\text{C}_\alpha$ -Bindung bestimmten freien Aktivierungsenthalpien ΔG^+ (aus ^{13}C -DNMR-Messungen)^[40] (Schema 17, Abb. 22). Extrapoliert man die Daten in Abbildung 22, so beträgt ΔG^+ für die Rotation um die $\text{N}-\text{C}_\alpha$ -Bindung in einem einfachen Enamin zwischen 15 und 20 kJ mol⁻¹; dies stimmt sowohl mit theoretischen Abschätzungen für Vinylamin (25.5 kJ mol⁻¹)^[105] als auch mit Meßdaten über die konjugative Wechselwirkung anderer einfacher Enamine überein^[106].

In einer ähnlichen Studie korrelierten Martin et al.^[107] bei Amiden und Thioamiden die Aktivierungsenergie E_a der Rotation mit den ^{15}N -NMR-Verschiebungen und brachten eine halbempirische Erklärung für die Existenz solcher Korrelationen. Da Enaminoketone als vinyloge Amide angesehen werden können, stützten unsere Ergebnisse diese Auffassung ebenfalls.

n,π -Wechselwirkungen wurden in gleicher Weise bei substituierten Anilinostyrolen 22 untersucht, wobei sich für viele Donor- und Acceptorgruppen eine hervorragende Korrelation zwischen $\delta(^{15}\text{N})$ -Werten und Hammettschen σ -Konstanten ergab (Abb. 23)^[40]. Nicht verwunderlich ist, daß auch die ^{13}C -NMR-Verschiebungen des C_β -Atoms mit



Schema 17.

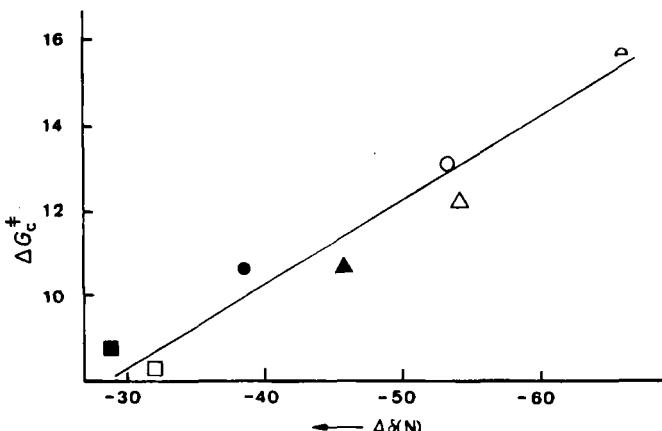
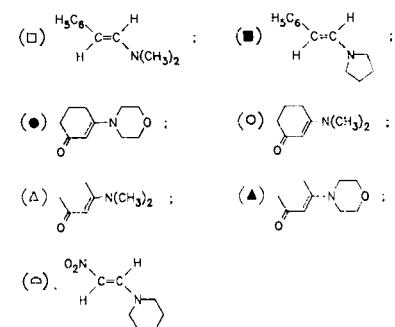


Abb. 22. Korrelation der für die Rotation um die $\text{N}-\text{C}(\alpha)$ -Bindung bestimmten freien Aktivierungsenthalpie ΔG_c^+ (in kcal mol⁻¹) mit den Verschiebungsdifferenzen $\Delta\delta(^{15}\text{N}) = \delta(\text{Amin}) - \delta(\text{Enamin})$ [40].



den $\delta(^{15}\text{N})$ -Werten korrelieren, da die Elektronenstruktur an diesem Kern analog beeinflußt wird und keine sterischen Wechselwirkungen mit den Substituenten auftreten.

Zu diesem Themenkreis (Korrelation von $\delta(^{15}\text{N})$ mit E_a , ΔG^+ - und σ -Werten) bis 1980 veröffentlichte Arbeiten sind in^[17a] sehr gut zusammengefaßt. 1981 schließlich analysierten Tasi et al.^[108] ^{15}N -NMR-Verschiebungen gelöster

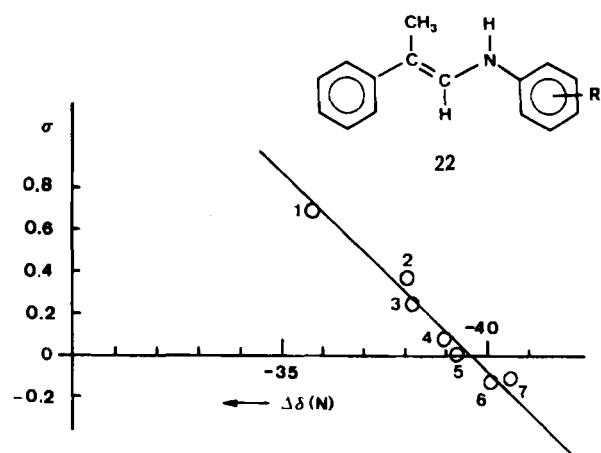


Abb. 23. Korrelation von $\Delta\delta(^{15}\text{N}) = \delta_N^S - \delta_N^H$ mit den Hammettschen σ -Konstanten für substituierte Anilinostyrole 22: (1), R = m-NO₂, (2) m-Cl, (3) p-Cl, (4) m-OCH₃, (5) H, (6) p-CH₃ und (7) p-OCH₃ [40].

Amide in Abhängigkeit von den drei Lösungsmittelparametern π^* (Polarität/Polarisierbarkeit), α (Wasserstoffbrückendonor-Acidität) und β (Wasserstoffbrückenacceptor-Basizität), wobei sie lineare Multiparameter-Beziehungen zu $\delta(^{15}\text{N})$ zugrunde legten. Weitere lineare Freie-Enthalpie-Beziehungen auf Basis der σ -Konstanten von Hammett sind bekannt, beispielsweise für die $\delta(\text{NO})$ -Werte substituierter *N*-Methyl-*N*-nitrosoaniline^[109], für die drei N-Atome *p*-substituierter 1-Phenyl-3,3-pentamethylentriazene^[110] sowie für Nitrobenzol-Derivate^[111]. Bei letzteren wurden ¹⁵N- und ¹⁷O-NMR-Verschiebungen sowohl zu σ_l und σ_R als auch zu berechneten Elektronendichten in Beziehung gesetzt.

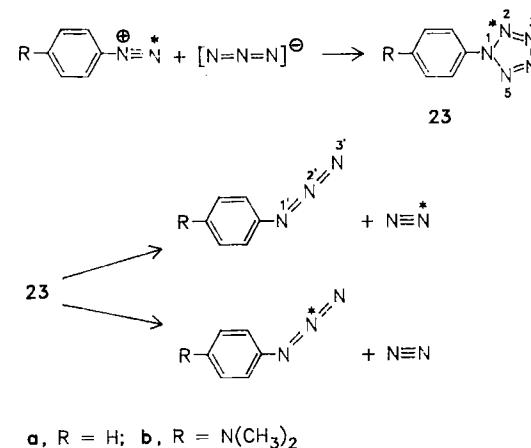
Wie nach der vorausgegangenen Diskussion der ¹⁵N-NMR-Verschiebungen zu erwarten, wurden diese erfolgreich zum Nachweis von Wasserstoffbrückenbindungen und Protonierungen genutzt. Besonders große Verschiebungen zu kleineren Frequenzen findet man in Systemen mit dem Strukturelement C=N; für Pyridin wurde das bereits in Abschnitt 3.1.2 beschrieben. Eingehende Studien von Roberts et al.^[112] an Iminen und Oximen zeigten, daß Wasserstoffbrückenbildung eine Verschiebung von maximal 28 ppm bewirkt (Übergang von CHCl₃ zu CF₃CH₂OH als Lösungsmittel), während bei vollständiger Protonierung (CF₃COOH) Verschiebungen von 110 bis 150 ppm (zu kleineren Frequenzen) resultieren. Als Modellverbindungen für Rhodopsin und Bacteriorhodopsin wurden *N*-Retinylen-butylamin und verwandte Schiff-Basen in Lösungsmitteln mit steigender Wasserstoffbrückendonor-Acidität ¹⁵N-NMR-spektroskopisch untersucht^[113]. Mit der Länge des konjugierten Polyens nehmen die gemessenen ¹⁵N-NMR-Verschiebungsdifferenzen zu; es wurde gefolgt, daß es mit der ¹⁵N-NMR-Spektroskopie sehr gut gelingt, den Protonierungsgrad von Schiff-Basen am N-Atom festzustellen. Kleine Verschiebungsdifferenzen (<25 ppm) zu hohen Frequenzen verursacht dagegen die Protonierung (und Wasserstoffbrückenbildung) aliphatischer Amine. Wenn, wie in diesen Fällen, die durch Wasserstoffbrückenbindungen induzierten Verschiebungen zu klein sind und sich einer stichhaltigen Interpretation entziehen, können statt dessen ¹⁵N-Relaxationszeiten zum Nachweis eingeschränkter Bewegungsfreiheiten herangezogen werden – darüber berichteten vor kurzem Yu und Levy für 2,4-Pentandiamin^[114].

Wasserstoffbrücken zwischen NH- und CO-Gruppen wurden in Peptiden mit dem Ergebnis studiert, daß die ¹⁵N-NMR-Verschiebung ein sehr guter Indikator für intramolekulare NH ··· O=C-Wechselwirkungen ist und damit hilft, die Sekundärstruktur von Peptiden aufzuklären. Gramicidin S, ein cyclisches Decapeptid mit zweifacher Phe-Leu-Orn-Val-Pro-Sequenz, wurde von vielen Arbeitsgruppen gut untersucht^[115]. Die vier Wasserstoffbrücken zwischen Valin und Leucin spiegeln sich in den ¹⁵N-NMR-Verschiebungen dieser beiden Aminosäurereste wider, wenn das Decapeptid in Lösungsmitteln steigender Brønsted-Acidität vermessen wird; dies bedingt die verstärkte Bildung intermolekularer Wasserstoffbrücken zwischen dem Lösungsmittel und den Carbonylgruppen der jeweiligen Peptidbindung^[116]. Die vier intramolekularen Wasserstoffbrücken lassen sich aufgrund ihrer kleineren Austauschgeschwindigkeiten und der auch in basischen Medien klar erkennbaren ¹⁵N, ¹H-Kopplung ebenfalls nach-

weisen. Zum gleichen Ergebnis führte der Vergleich von ¹⁵N-NMR-Spektren linearer Oligopeptide mit dem Spektrum von Gramicidin S^[117]. Intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen in Nucleosiden, die Hauptursache für Selbstassoziation und Basenpaarung, ist ein weiteres Gebiet, auf dem die ¹⁵N-NMR-Spektroskopie erfolgreich zur Strukturaufklärung eingesetzt wurde^[118] – auch auf die Bestimmung von N-H-Bindungslängen in der DNA anhand von Festkörper-¹⁵N-NMR-Spektren (Abb. 11, siehe auch Abschnitt 4.6) sei hier verwiesen.

4.2. Reaktionsmechanismen und reaktive Zwischenstufen

In mechanistischen Studien bewies die ¹⁵N-NMR-Spektroskopie mehrfach, daß sie bei Nachweis und Strukturaufklärung instabiler Zwischenstufen sehr gute Dienste leistet. Erst kürzlich haben wir die klassische Umsetzung von Benzoldiazoniumchlorid mit Lithiumazid, die unter Stickstoffabspaltung zu Phenylazid führt, erneut untersucht^[11]. Diese Reaktion wurde erstmals von Hantzsch beschrieben^[119]; ihr Mechanismus wurde 1956–1958 von Huisgen und Ugi et al.^[120] untersucht. Dabei entdeckten sie, daß es zwei Reaktionswege geben muß. Phenylpentazol 23a wurde als Zwischenstufe angenommen, da dies die Gleichverteilung des ursprünglich ¹⁵N-markierten terminalen Stickstoffatoms des Diazoniumsalzes in den Reaktionsprodukten Phenylazid und Stickstoff erklärt (Schema 18). In



a, R = H; b, R = N(CH₃)₂

Schema 18.

der Folge isolierte man bei tiefen Temperaturen (-30°C) eine Reihe *p*-substituierter Phenylpentazol-Derivate^[121], und obwohl inzwischen eine Röntgen-Strukturanalyse von *p*-Dimethylaminophenylpentazol 23b gelungen war^[122], stand ein direkter Nachweis des Pentazolrings in Lösung noch aus. Abbildung 24 zeigt das bei 238 K aufgenommene ¹⁵N-NMR-Spektrum (40.6 MHz) von unmarkiertem 23b. Obwohl sich das Pentazol sogar bei dieser tiefen Temperatur während der Messung teilweise zersetzt, war es möglich, seine vier Resonanzsignale zu identifizieren. Die Zuordnung gelang anhand des ¹⁵N-NMR-Spektrums von [2(5)-¹⁵N]-Pentazol 23b* (Abb. 25a). Das während der Zersetzung aufgenommene ¹⁵N-NMR-Spektrum (Abb. 25b) belegt die alleinige Bildung des in N-2-Position mar-

kierten Azids und von $^{15}\text{N} \equiv ^{14}\text{N}$. Dies bestätigt für das *p*-Dimethylaminophenyl-Derivat **23b** sowohl den Strukturvorschlag als auch die bei -20°C langsame Zersetzung des Pentazolrings^[1].

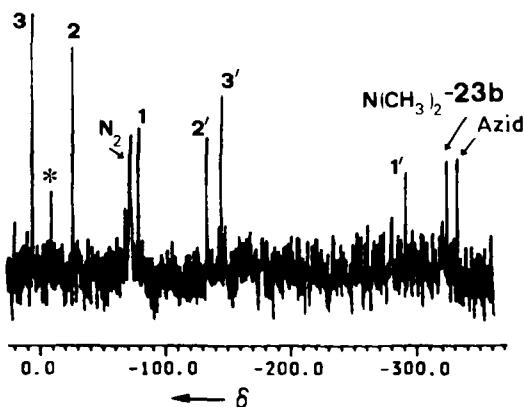


Abb. 24. ^{15}N -NMR-Spektrum von *p*-Dimethylaminophenylpentazol **23b**, (Meßfrequenz 40.6 MHz; -35°C ; 0.04 M in CDCl_3 ; 0.07 M $\text{Cr}(\text{acac})_3$). Die durch Zahlen mit Strichen gekennzeichneten Signale sind dem Azid zuzuordnen.

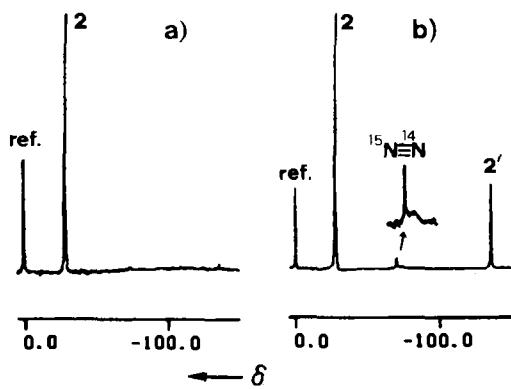
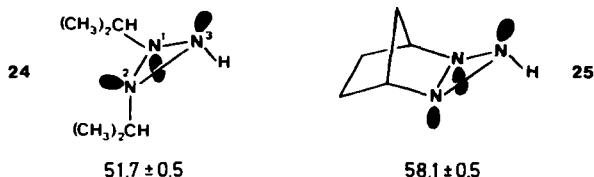


Abb. 25. ^{15}N -NMR-Spektren von [2(5)- ^{15}N]Pentazol **23b*** (Meßfrequenz 40.6 MHz; -20°C , 0.013 M in CDCl_3 , 0.06 M $\text{Cr}(\text{acac})_3$): a) direkt nach Ansetzen der Probe; b) während der Zersetzung aufgenommen: Es entstehen *N*-2'-markiertes Azid und $^{15}\text{N} \equiv ^{14}\text{N}$. ref=Standard CH_3NO_2 .

Ein wesentlich weniger reaktiver Stickstoff-Homocycclus, Triaziridin, war jahrelang das Ziel organischer Synthesen. Dreiding et al. gelang schließlich die photochemische Cyclisierung von Azimin zu substituierten Triaziridinen^[123], und in der Folgezeit stand ihre Stereochemie im Mittelpunkt experimenteller und theoretischer Studien^[124]; eine Serie von Verbindungen wurde auch ^{15}N -NMR-spektroskopisch untersucht^[54]. Die chemischen Verschiebungen 1,2-dialkylsubstituierter Triaziridine entsprechen denen substituierter Hydrazine ($\delta = -240$ bis -290) und sind damit typisch für pyramidale dreifach koordinierte N-Atome, während die N,H-Kopplungskonstanten ungewöhnlich klein ausfallen (vgl. Abschnitt 3.2.1 und Schema 19). Die



Schema 19. Unter den Formeln sind die Kopplungskonstanten $^1J(\text{N},\text{H})$ [Hz] angegeben (in CDCl_3).

zusätzliche Hyperkonjugation des freien Elektronenpaares am invertierten N-2-Atom erklärt, warum der Betrag der Kopplung im *cis*-Triaziridin **25** deutlich größer als im 1,2-*trans*-Diisopropyl-Derivat **24** ist. Damit könnte die N,H-Kopplungskonstante als Strukturbeweis für das noch unbekannte all-*cis*-Triaziridin herangezogen werden; ohne jede Möglichkeit der Hyperkonjugation erwartet man einen $^1J(\text{N},\text{H})$ -Wert von etwa 45 Hz. Ähnliches trifft für $\text{N}-\text{C}-\text{H}$ -Systeme zu, bei denen die *syn*-Orientierung des freien Elektronenpaares und der C–H-Bindung – beispielsweise in 1-Methylaziridin^[125a] und Peptiden^[125b] – eine größere Kopplungskonstante bewirkt.

Handelt es sich bei den kurzlebigen Zwischenstufen chemischer Reaktionen um Radikale, so können diese bei Bildung von Radikalpaaren durch ^{15}N -CIDNP-Experimente (Chemically Induced Dynamic Nuclear Polarization) nachgewiesen werden^[126]. Auf diese Weise ließ sich zum ersten Mal experimentell zeigen, daß bei Nitrierung von *N,N*-Dimethylanilin mit H^{15}NO_3 in H_2SO_4 (88%) ein aromatisches Radikalkation als Zwischenstufe gebildet wird^[127] (Schema 20) – wobei angenommen wird, daß es durch HNO_2 -Katalyse entsteht^[128]. Abbildung 26 zeigt nur für das *p*-Nitro-Produkt Polarisierung (zeitabhängige, negative Signale), während man für das *m*-Nitro-Produkt, das sich nicht durch diesen katalysierten Prozeß bildet, ein kontinuierlich wachsendes Signal registriert.

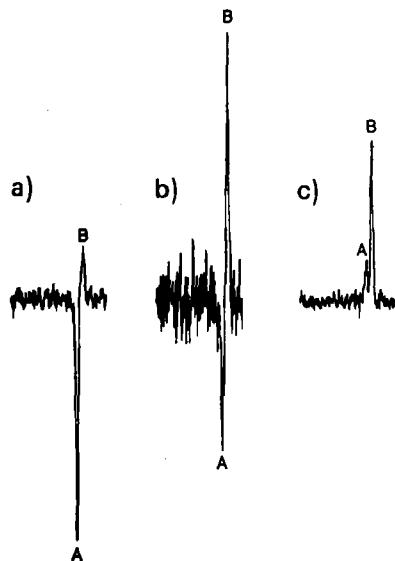
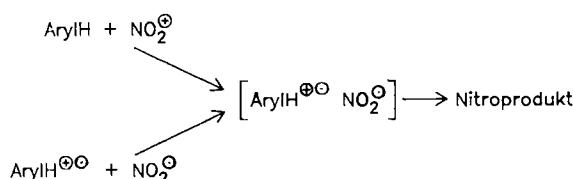


Abb. 26. Während der Nitrierung von *N,N*-Dimethylanilin (0.55 M) aufgenommene ^{15}N -NMR-Spektren (25°C ; H^{15}NO_3 (0.53 M) in H_2SO_4 (88%)): a) nach 3 min; b) nach 12 min; c) nach 55 min; A= $p\text{-O}_2^{15}\text{N-C}_6\text{H}_4\text{-N}(\text{CH}_3)_2$, B= $m\text{-O}_2^{15}\text{N-C}_6\text{H}_4\text{-N}(\text{CH}_3)_2$ [127a].

Die gleichen Autoren verfolgten die säurekatalysierte Umlagerung von *N*-Nitroanilinen zu *p*-Nitroanilinen mit ^{15}N -CIDNP-Experimenten und beobachteten die Bildung von $[\text{ArylNH}_2^{15}\text{N} \cdot \text{NO}_2^{15}\text{N}]$ -Radikalpaaren^[129]. Bei Berechnung des Bruttoeffekts mit den Kapteinschen Formeln ist zu beachten, daß wegen des negativen magnetischen Moments des ^{15}N -Kerns ein negatives Vorzeichen eingesetzt werden muß^[130].

¹⁵N-CIDNP-Spektren wurden auch während der nucleophilen Substitution von Arendiazoniumsalzen aufge-

onen in Pyrimidin- und Pyrazol-Derivate^[133] sowie die Bildung von *N*-Nitrosothioharnstoff^[134].



Schema 20.

nommen und belegen, daß diese Reaktion zumindest teilweise homolytisch abläuft^[131]. Das während der langsamen Zersetzung von ¹⁵N-markiertem 4-Chlorbenzoldiazoniumtetrafluoroborat in schwach alkalischer Lösung aufgenommene ¹⁵N-NMR-Spektrum (Abb. 27) zeigt deutlich verstärkte Absorptions- und Emissionssignale für das Diazonium-Ion **26**, das *trans*-Diazotat-Ion **27** und molekula-

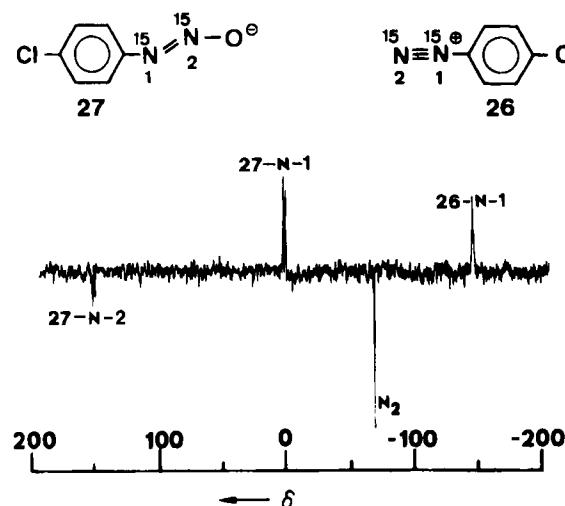


Abb. 27. ¹⁵N-NMR-Spektrum von [1,2-¹⁵N₂]-*p*-Chlorbenzoldiazoniumtetrafluoroborat (Meßfrequenz 9.1 MHz; 72 °C, H₂O, pH=9.7) [131]. Für den N-2-Kern von **26** beobachtet man kein Signal; in **26** ist ¹J(N,N)<1 Hz (nicht aufgelöst); dagegen ist in **27** ¹J(N,N)=14.7±0.5 Hz beobachtbar.

ren Stickstoff. In ihrer sehr ausführlichen Interpretation kommen die Autoren zum Schluß, daß zwei Radikalpaare

[ArylN₂⁺ON₂Aryl] und [Aryl¹⁵O¹⁵ON₂Aryl]

in einer sehr komplizierten Reaktionsfolge auftreten. Nicht auszuschließen ist jedoch die Existenz weiterer Radikalpaare, und leider gelingt es nicht, den Anteil der homolytischen Reaktion quantitativ zu bestimmen. Die Bedeutung von CIDNP-Experimenten für quantitative mechanistische Studien wird unter anderem auch dadurch eingeschränkt.

Zu den ebenfalls ¹⁵N-NMR-spektroskopisch untersuchten Reaktionen gehören beispielsweise die Fischer'sche Indolsynthese^[132], die Umwandlung von 1,3-Oxazin-2,4-di-

4.3. Stereochemie und dynamische Prozesse

Temperaturabhängige ¹H- und ¹³C-NMR-Messungen haben sich bei der Untersuchung inter- und intramolekulärer dynamischer Phänomene als sehr nützlich erwiesen. Die Bestimmung entsprechender ¹⁵N-DNMR-Parameter leidet aber immer noch unter der geringen Empfindlichkeit dieses Kernes. Es ist jedoch vorauszusehen, daß sich diese Schwierigkeit mit den neuen Techniken (vgl. Abschnitt 2) überwinden läßt. Zudem beschleunigt Temperatursenkung, zumindest bei kleinen Molekülen und mittleren Magnetfeldstärken, die Spin-Gitter-Relaxation.

Der große Einfluß der Delokalisierung des freien Elektronenpaares auf die ¹⁵N-NMR-Verschiebung macht diese zu einer wichtigen Sonde bezüglich Konfiguration und Konformation konjugierter Moleküle. So fand man unterschiedliche chemische Verschiebungen nicht nur für (*E*)- und (*Z*)-Isomere von Enaminoketonen, -estern und -amiden, sondern – im Bereich des langsamen Austausches – auch für die Konformere^[13, 104].

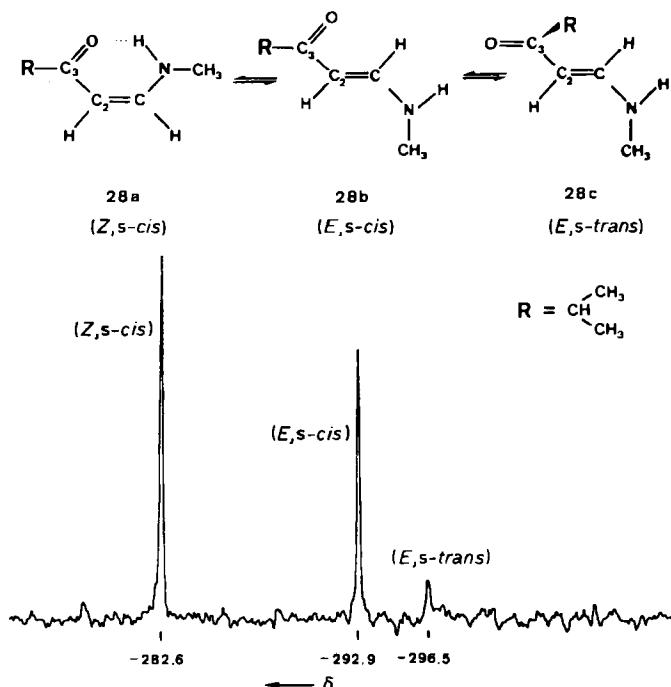


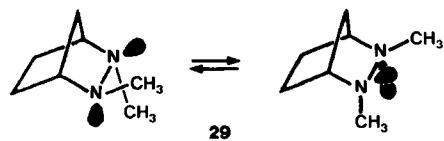
Abb. 28. INEPT-¹⁵N-NMR-Spektrum von 4-Methyl-1-(methylamino)-1-penten-3-on **28** (Meßfrequenz 20.3 MHz; -65 °C; [D₆]Dioxan) [104].

Als Beispiel sei auf das Tieftemperaturspektrum des Enaminoketons **28** (Abb. 28) verwiesen, das wegen der eingeschränkten Rotation um die C(2)-C(3)-Bindung Signale des *s-cis*- und *s-trans*-Konformers enthält^[104]. Während die Linienform des Signals bei hoher Frequenz ($\delta = -282.6$, wasserstoffbrückengebundenes (*Z,s-cis*)-Isomer **28a**) in allen zwischen +24 °C und -60 °C aufgenommenen DNMR-Spektren konstant bleibt, verändert sich die der beiden anderen Signale kontinuierlich, bis man schließlich bei -60 °C den Bereich des langsamen Aus-

tauschs für das Gleichgewicht **28b** \rightleftharpoons **28c** erreicht. Mit abnehmender Größe der C-Alkyl-Gruppe R wächst auch die Intensität des Signals bei $\delta = -296.5$; es ist deshalb dem nicht-planaren (*E,s-trans*)-Konformer **28c** zuzuordnen. Die um 2.6 bis 4.7 ppm stärkere Abschirmung des N-Kerns in **28c** im Vergleich zu der des N-Kerns im (*E,s-cis*)-Konformer **28b** erklärt sich durch den in diesem Fall unterschiedlichen Beitrag der paramagnetischen Verschiebungskonstante $\sigma^P \sim -(\Delta E)^{-1} <r^{-3}>_{2p} \sum Q$, wobei sich für das nichtplanare **28c** aufgrund der schlechteren Konjugation ein größerer ΔE -Wert ergibt (vgl. Abb. 14).

An dieser Stelle ist anzumerken, daß allgemein bei derartigen Interpretationen kleiner Verschiebungsdifferenzen wegen der starken Lösungsmittel- und Temperaturabhängigkeit der ^{15}N -NMR-Signallagen Vorsicht geboten ist.

Nomura und *Takeuchi*^[135] berichteten von einer bei tiefen Temperaturen ^{15}N -NMR-spektroskopisch beobachteten langsamem doppelten N-Inversion in bicyclischen Hydrazin-Derivaten. Die Verschiebungsdifferenz zwischen den ^{15}N -NMR-Signalen der beiden diastereotopen N-Atome in **29** (Schema 21) bei -45°C beträgt 1.08 ppm (10.9 Hz bei 10.1 MHz), und für ΔG_c^+ ($T_c = 269 \pm 1$ K) wurde ein Betrag von 58.4 kJ mol $^{-1}$ bestimmt – in guter Übereinstimmung mit den entsprechenden ^1H - und ^{13}C -DNMR-Messungen, die 55.2 kJ mol $^{-1}$ ergaben. Darüber hinaus sind Konformationsstudien von Piperidin^[136] und Tetraazadecalin-Derivaten^[137] sowie eine Untersuchung der gehinderten Rotation um die C-N-Bindung der Guanidin-Einheit in L-Arginin^[138] bekannt.



Schema 21.

Obwohl bisher die ^{15}N -DNMR-Spektroskopie bei stereochemischen Untersuchungen nur spärlich genutzt wurde, kann man aus den oben geschilderten Fällen schließen, daß die beträchtliche Empfindlichkeit des ^{15}N -Kerns bezüglich der kleinsten Veränderungen seiner räumlichen Umgebung eine Basis für erfolgreiche zukünftige Anwendungen – besonders in der Biochemie – bildet.

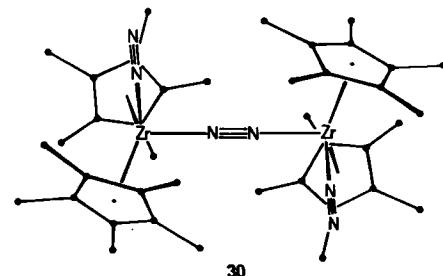
In diesem Zusammenhang sind die ^{15}N -NMR-Messungen von *Roberts* et al.^[139] an chiralen Substanzen zu erwähnen. Nach Zugabe optisch aktiver Carbonsäuren zu racemischem 8-Benzyl-5,6,7,8-tetrahydrochinolin beobachteten sie für die Diastereomeren-Komplexe (Assoziate) stark lösungsmittelabhängige ^{15}N -NMR-Verschiebungsdifferenzen zwischen 3 und 12 Hz bei 18.25 MHz. Die größeren Differenzen wurden bei tiefer Temperatur und in polaren Lösungsmitteln gemessen.

4.4. Koordinationschemie

Zwar ist die Zahl bedeutender, durch die ^{15}N -NMR-Spektroskopie erst lösbarer Probleme in der Anorganischen und Metallorganischen Chemie viel geringer als in

der Organischen Chemie, doch gibt es einige Liganden wie NO, CN und vor allem N_2 , die sehr genau und besonders im Hinblick auf die Bindung an Metallatome und -ionen untersucht worden sind. Während für die Mehrzahl der N-Liganden die durch Koordination bedingten Verschiebungsdifferenzen relativ klein sind (einige Zehn ppm)^[44], beobachtet man für NO- und N_2 -Liganden einen sehr großen Verschiebungsbereich. Grundsätzlich erweitert sich der für organische Verbindungen typische ^{15}N -Resonanzbereich in Richtung positiver Frequenzen (Abb. 13). Signale ungesättigter Liganden mit direkter N-Metall-Bindung sind bei $\delta = 0$ bis 900 zu finden; in paramagnetischen Verbindungen ist der ^{15}N -Kern zusätzlich entschirmt. Die Kopplungskonstanten für direkte N-Metall-Bindungen variieren ebenfalls stark und können zwischen einigen und mehreren Hundert Hz betragen. Das Studium dieser Parameter bringt Informationen über Koordinationsart und Geometrie der Liganden. Arbeiten bis 1980 faßt die Übersicht von *Mason*^[4a] zusammen.

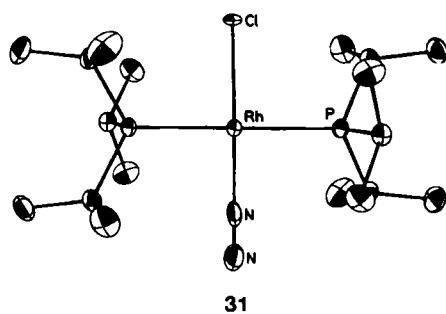
Das fundamentale biochemische Problem der Stickstoff-Fixierung und -Reduktion stimulierte das Studium vieler Distickstoff-Übergangsmetallkomplexe; die ^{15}N -NMR-Spektroskopie leistete bei deren Strukturaufklärung gute Dienste^[140]. Man kennt sowohl linear *dihapto*- als auch *monohapto*-koordinierte N_2 -Moleküle vom Typ M–N–N–M bzw. M–N–N. Schema 22 zeigt die durch Röntgen-Struk-



Schema 22. $[(\eta^5-\text{C}_5(\text{CH}_3)_5)_2\text{ZrN}_2]_2$ 30.

turanalyse belegte Struktur von **30**, einem der ersten Komplexe dieser Art, der beide Typen von N_2 -Liganden enthält^[141]. Das ^{15}N -NMR-Spektrum der vollständig markierten Verbindung weist ein Singulett bei $\delta = 179$ für 1,2- η^2 -gebundenes N_2 ($\mu\text{-N}_2$) und zwei Doublets bei $\delta = 80$ und $\delta = 11$ mit einer Kopplung von $^1J(\text{N},\text{N}) = 6.2$ Hz für η^1 -gebundenes N_2 auf; die starke Temperaturabhängigkeit dieser Signale spricht für einen dissoziativen Austausch zwischen η^1 -gebundenen und freien, in der Lösung befindlichen N_2 -Molekülen^[78a]. Die ^{15}N -NMR-Verschiebung der 1,2- η^2 - N_2 -Komplexe variiert von $\delta = 300$ bis 50, dagegen sind η^1 -gebundene N_2 -Moleküle stärker abgeschirmt ($\delta = 200$ bis -100), wobei jeweils dem N_{α} -Atom die niedrigere Frequenz zuzuordnen ist^[140a]. Die (N,M)-Kopplungskonstanten gelten als weiteres wichtiges Kriterium zur Unterscheidung zwischen den beiden Bindungsmöglichkeiten des N_2 -Moleküls, wie dies das Beispiel des *trans*-Chloro(distickstoff)-bis(triisopropylphosphoran)rhodium-Komplexes **31** mit $^1J(\text{Rh},\text{N}(1)) = 28$ Hz und $^2J(\text{Rh},\text{N}(2)) = 4$ Hz^[142] zeigt (Schema 23).

Reduktion des koordinierten Stickstoffmoleküls führt zu Diazenido-Komplexen M–N=N–R, die in einfach und



Schema 23.

doppelt gewinkelte (transoid) Konfiguration (Schema 24) existieren. Da die transoide Form durch einen stark entschirmten N_{α} -Kern ($\delta \approx 300$) charakterisiert ist, kann sie so von der einfach gewinkelten Konfiguration unterschieden werden^[143] (vgl. Abb. 13). Auch weitere Reduktionsprodukte wie etwa Hydrazido-, Nitrido- und Imido-Komplexe wurden ^{15}N -NMR-spektroskopisch nachgewiesen^[140, 143].



Schema 24. Links: einfach gewinkelt; rechts: doppelt gewinkelt.

Genauso studierte man auf diese Weise die Stereochemie von Nitroso-Komplexen^[144]. Wie im $M-\text{N}=\text{N}-M$ -System führt die Abwinkelung zu einer starken Entschirrmung des $^{15}\text{N(O)}$ -Kerns; das vorhandene Datenmaterial ermöglicht die Korrelation des $M-\text{N}-\text{O}$ -Bindungswinkels mit der ^{15}N -NMR-Verschiebung. Während für lineare Nitrosyl-Komplexe die Verschiebung innerhalb $\delta = 0 \pm 80$ variiert und man für das andere Extrem, die stark gewinkelten Komplexe (120°), Verschiebungen von $\delta = 350$ bis 800 mißt, existieren auch für den Übergangsbereich Beispiele. Mit der starken Entschirrmung geht die bathochrome Verschiebung des UV/VIS-Absorptionsmaximums einher; dieser Effekt beruht auf der Verringerung der Energie des $n \rightarrow \pi^*$ -Übergangs, wodurch der paramagne-

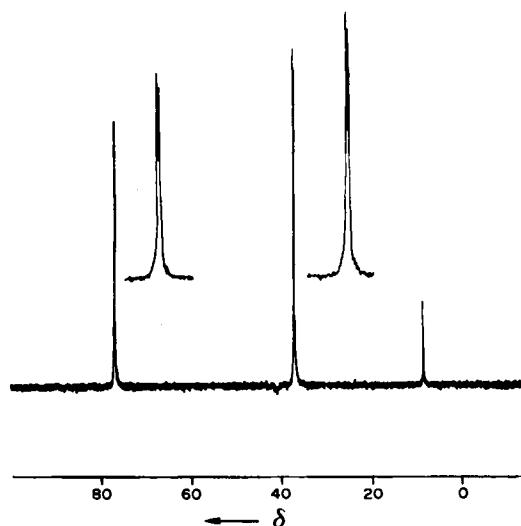
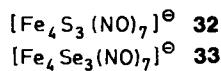
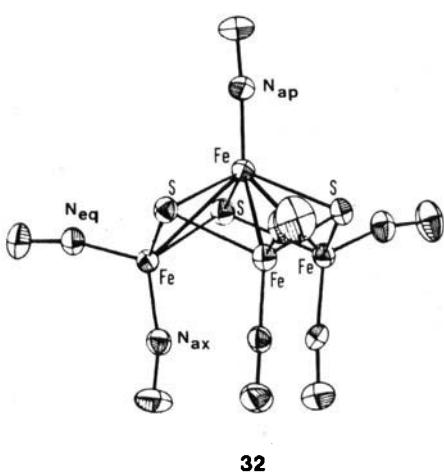


Abb. 29. ^{15}N -NMR-Spektrum der NO-Gruppen in $[(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{PNP}(\text{C}_6\text{H}_5)_3]^0 \cdot [\text{Fe}_4\text{S}_3(^{15}\text{NO})_7]^0$, einem Salz des Anions 32 (Meßfrequenz 36.5 MHz); für die äquatorial- und axial-ständigen NO-Gruppen beobachtet man eine Aufspaltung mit $^2J(\text{N},\text{N}) = 4.3$ Hz [146].



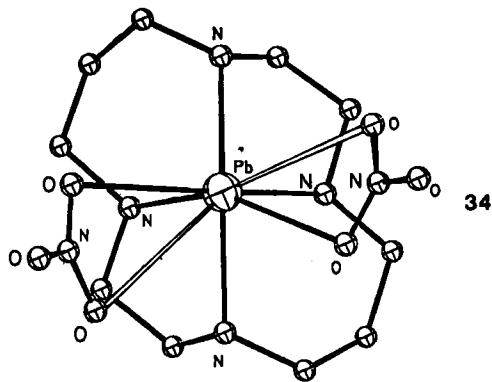
Schema 25.

tische Verschiebungsterm (siehe Abschnitt 4.3) vergrößert wird. Bei Nitrosocobalt(III)-Komplexen spiegelt sich dies auch in der Entschirrmung des ^{59}Co -Kerns wider^[145].

^{15}N -NMR-Verschiebungen der Nitroso-Liganden wurden zur Strukturbestimmung der Roussin-Cluster-Anionen 32 und 33 herangezogen^[146] (Schema 25). Die drei Resonanzlinien im Spektrum von ^{15}N -angereichertem (99%) 32 (Abb. 29) – zwei davon weisen das gleiche Kopplungsmuster auf – legen eine C_3 -Achse und die Existenz von $\text{Fe}(\text{NO})_2$ - und $\text{Fe}(\text{NO})$ -Untereinheiten nahe. Alle ^{15}N -NMR-Verschiebungen der Nitroso-Liganden in 32 und 33 sprechen für lineare $\text{Fe}-\text{N}=\text{O}$ -Gruppen ($\text{Fe}(\text{NO})_{eq}(\text{NO})_{ax}: \delta = 30$ bis 80; $\text{Fe}(\text{NO})_{up}: \delta = 7$ bis 20).

Die Kopplung zwischen ^{15}N -Kernen und komplexierten Metallkernen hängt stark vom magnetischen Moment des Metalls ab und ist sehr empfindlich gegenüber den an der Bindung beteiligten Orbitalen. Ein interessantes Beispiel dafür ist der Blei(II)-nitrat-Komplex 34 von 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecan mit verzerrt oktaedrischer Struktur (Schema 26). Sein ^{15}N -NMR-Spektrum weist für die beiden Signale am unteren Ende der ^{15}N -NMR-Verschiebungsskala ($\delta = -318.8$ und $\delta = -325.5$) verblüffend unterschiedliche $^{207}\text{Pb}, ^{15}\text{N}$ -Kopplungskonstanten von 207.5 bzw. 19.8 Hz auf. Da die Längen der äquatorialen (2.45 ± 0.02 Å) und axialen (2.50 ± 0.08 Å) Pb-N-Bindungen nicht nennenswert differieren, wird der große Unterschied durch variable Beiträge der Fermi-Kontakt-Wechselwirkung erklärt, die von der axialen Verzerrung des Oktaeders herrühren. So wurde vorgeschlagen, die 207.5 Hz den äquatorialen N-Donorliganden (normale oktaedrische Bindung) und die 19.8 Hz den axialen (verzerrte oktaedrische Bindung) zuzuordnen^[147]. Derart unterschiedliche $^1J(M, ^{15}\text{N})$ -Werte wurden auch für verwandte Cd^{II} -, Hg^{II} - und Pb^{II} -Komplexe gefunden^[148].

Unter günstigen Bedingungen, bei sehr kurzen Elektronen-Spin-Relaxationszeiten, können sogar von paramagnetischen Metallkomplexen ^{15}N -NMR-Signale aufgenommen werden; dies gelang beispielsweise für $^{15}\text{N} \equiv \text{C}^{\ominus} \text{-Li}^+$



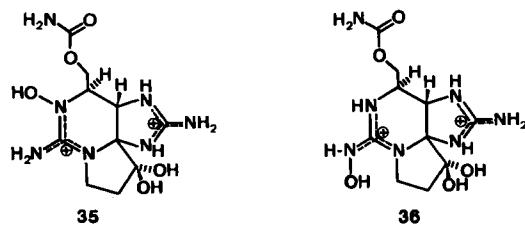
Schema 26.

ganden in low-spin-Eisen(III)-cyanid-Komplexen von Porphyrin- und Hämoprotein-Derivaten. Die ^{15}N -NMR-Verschiebungen der NC^\ominus -Liganden finden sich im Bereich von $\delta=450$ bis 1100, was den ^{15}N -NMR-Verschiebungsbe reich zu höheren Frequenzen erweitert^[149]. Bei low-spin-Eisen(III)-tetraphenylporphin-Komplexen wurden sehr kurze T_1 - und T_2 -Relaxationszeiten (0.2–3.0 ms) für die Pyrrol-N-Atome gefunden^[150].

4.5. Anwendungen in Biosynthese und Biochemie

Der Wunsch, die verheißungsvolle analytische Methode der ^{15}N -NMR-Spektroskopie möglichst schnell zum Studium biologisch relevanter Moleküle und Molekülverbände verwenden zu können, beflogelte die Entwicklung immer neuer experimenteller Techniken und bewirkte eine ständige Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit. So erlebte man während der letzten Jahre eine deutliche Zunahme biochemischer ^{15}N -NMR-Studien. Blomberg und Rüterjans veröffentlichten 1983^[151] eine Übersicht, die sich mit experimentellen Techniken, spektralen Parametern und typischen Anwendungsbeispielen aus den Hauptbereichen der Biochemie befaßt. Kanamori und Roberts^[152] berichteten zusammenfassend über Anwendungsmöglichkeiten, speziell bei Enzym-Systemen, Nucleotiden und Nucleinsäuren sowie intakten Zellen. Intermolekulare Wechselwirkungen bei Biomolekülen behandelt die Übersicht von Kyogoku^[153], und Coxon schrieb über ^{15}N -NMR-Messungen an Aminozuckern^[154]. Obwohl primär nicht biologisch ausgerichtet, ist Kricheldorf's umfassende Darstellung der ^{15}N -NMR-spektroskopischen Charakterisierung von Oligo- und Polypeptiden^[155] in diesem Zusammenhang zu erwähnen. Nur wenig untersucht wurden bis heute nicht-biologische Polymere^[156]. Wir werden uns auf wenige aktuelle Beispiele beschränken und daran Potential und Anwendungstrends der ^{15}N -NMR-Spektroskopie im weiten Feld der Biochemie illustrieren.

Biosynthese und Metabolisierung sind ein Bereich, der durch Kombination von Isotopenmarkierung und ^{15}N -NMR-Messungen detailliert erforscht werden kann; dadurch werden neue Einblicke in Reaktionsmechanismen der Biochemie gewährt. Hori und Shimizu^[157] untersuchten die Strukturen zweier verwandter Neurotoxine mit biosynthetisch angereichertem Material. Sie konnten zeigen, daß Neosaxitoxin 35 das N^1 -Hydroxy-Derivat von Saxitoxin ist (Schema 27). Das ^{15}N -NMR-Spektrum (Abb. 30) von ^{15}N -angereichertem (99%) Toxin ermöglicht die Zuord-



Schema 27.

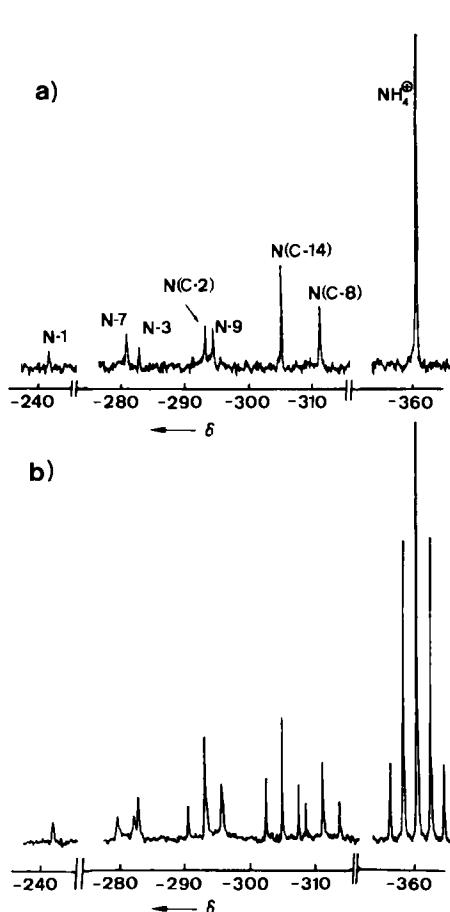


Abb. 30. ^{15}N -NMR-Spektren von 99%- ^{15}N -angereichertem Neosaxitoxin 35 (Meßfrequenz 36.5 MHz; 1.8 mm in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 95:5): a) protonenentkoppelt; b) protonengekoppelt [157].

nung aller sieben N-Atome anhand chemischer Verschiebungen sowie (N,H)-Kopplungskonstanten und schließt damit den alternativen Strukturvorschlag 36 aus. Die korrekte Linienzuordnung in ^{15}N -NMR-Spektren komplizierter Moleküle ist für biosynthetische Studien eine sehr wichtige Voraussetzung. Wie das Beispiel von Isopenicillin N – das durch Cyclisierung von δ -(α -L-Aminoacetyl)-L-[3- ^{13}C]cysteinyl-D-[^{15}N]valin entsteht – lehrt, werden durch gleichzeitige ^{15}N - und ^{13}C -Markierung (^{15}N , ^{13}C)-Kopplungskonstanten messbar, die zusätzliche, zur Aufklärung der Biosynthese wichtige Hinweise geben. So belegt die unmittelbare ^{15}N , ^{13}C -Kopplungskonstante (4.4 Hz) die biosynthetische Knüpfung der N-C(5)-Bindung in Isopenicillin^[158].

Als besonders erfolgreiche Domäne der ^{15}N -NMR-Spektroskopie haben sich in-vivo-Studien der Biosynthese von Aminosäuren in Pilz- und Bakterienzellkulturen erwie-

sen. Wir konnten schon 1975 zeigen, daß es die schnelle Bewegung *intrazellulärer* kleiner Moleküle ermöglicht, von lebenden *Ustilago-sphaerogena*-Zellen ^{15}N -NMR-Spektren mit kleiner Linienbreite aufzunehmen^[159]. Darauf aufbauend untersuchten die Arbeitsgruppen von *Roberts*^[160] und *Lapidoz*^[161] die Biosynthese der Aminosäuren in *Neurospora crassa* und *Brevibacterium lactofermentum*. An diesem Organismus verfolgte man auch die Stickstoff-Assimilation von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ sowie die Aminosäureproduktion während des Wachstumszyklus^[161]. Unter optimalen Wachstumsbedingungen, das heißt bei hoher Sauerstoff- und niedriger Biotinkonzentration, setzt das Glutaminsäure produzierende Bakterium etwa 50% des Ammoniumsalzes in L-[^{15}N]Glutaminsäure um. Abbildung 31 zeigt die von intakten Zellen und von Zellflüssigkeiten während der verschiedenen Wachstums- und Produktionsstadien aufgenommenen Spektren. Alle ^{15}N -NMR-Signale können ein-

deutig Aminosäuren und Metaboliten zugeordnet werden, doch verhindern unterschiedliche NOE-Effekte und Spin-Gitter-Relaxationszeiten die quantitative Auswertung – ein halbquantitativer Vergleich der jeweiligen Linien in den zeitabhängigen NMR-Spektren ist jedoch möglich. Der Fermentationsprozeß besteht aus zwei Phasen. Im sehr frühen Anfangsstadium (Abb. 31b) wird Glutaminsäure in den Zellen angereichert, doch gelangt fast nichts in das Nährmedium. Später werden die Zellwände durchlässig, und es werden Aminosäuren ausgeschieden (Abb. 31a). Ganz allgemein ist das intrazelluläre Alanin-Glutaminsäure-Verhältnis von der Sauerstoff- und Biotinkonzentration abhängig; schlechte Sauerstoffversorgung führt zur Produktion von Alanin statt Glutaminsäure. Damit hat sich die ^{15}N -NMR-Spektroskopie als bequeme und empfindliche Methode empfohlen, mit der es gelingt, sowohl *intrazellulär* als auch *extrazellulär* Aminosäurekonzentrationen in Fermentationsprozessen zu verfolgen. Möglicherweise entwickelt sich die ^{15}N -NMR-Spektroskopie zu einem wichtigen analytischen Verfahren in der Biotechnologie, mit dem sich zudem der intrazelluläre Aminosäuremetabolismus studieren läßt. So wurde in jüngerer Zeit mehrfach über Untersuchungen zum Metabolismus biologisch wichtiger Vorstufen berichtet^[162]. Mobilität und Umgebung von intrazellulärem Glutamin, Alanin und Arginin wurden anhand von ^{15}N -Spin-Gitter-Relaxationszeiten T_1 und NOE-Effekten studiert^[163].

Durch ^{15}N -NMR-Messungen läßt sich auch der intrazelluläre pH-Wert, ein zellbiologisch bedeutender Parameter, bestimmen. So hängen die chemischen Verschiebungen der beiden Ring-N-Atome von Histidin zwischen pH 4 und 8 deutlich vom pH-Wert ab; dies wurde bereits zur Abschätzung des intra- und extrazellulären pH-Wertes intakter *Neurospora-crassa*-Mycele herangezogen^[164]. Als weiteres Indiz benutzte man die pH-Abhängigkeit der Linienbreiten des ^{15}N -NMR-Signals der terminalen NH₂-Gruppe von Arginin sowie der α -NH₂-Gruppe von Alanin. Die Messungen an Arginin und Histidin ergaben einen pH-Wert von 6.1 ± 0.4 in den Vacuolen, hingegen betrug der durch Messungen an Prolin und Alanin ermittelte pH-Wert im Cytoplasma 7.2 – in guter Übereinstimmung mit anders erhaltenen Werten.

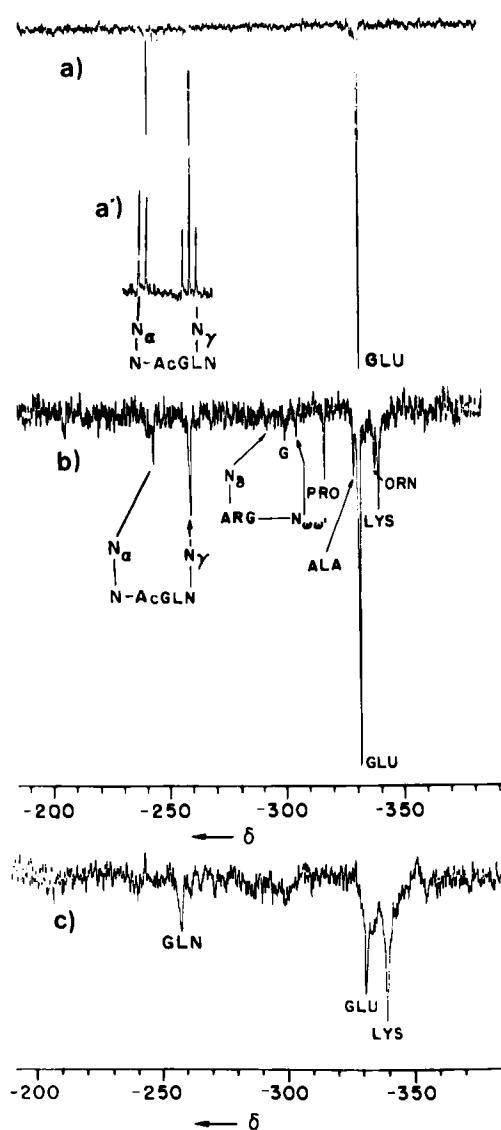


Abb. 31. Protonenentkoppelte ^{15}N -NMR-Spektren von 96.7%- ^{15}N -angereichertem *B. lactofermentum*; Zellwachstum bei hoher O₂- und normaler Biotinkonzentration (Meßfrequenz 30.4 MHz). a) Spektrum des zellfreien Nährmediums nach 31 h Fermentation; a') analog a), nur mit „gated“-Protonenentkopplung; b) Spektrum der Zellen während der Wachstumsphase nach 10 h Fermentation; c) Spektrum der Zellen in der frühen stationären Phase nach 16 h Fermentation [161].

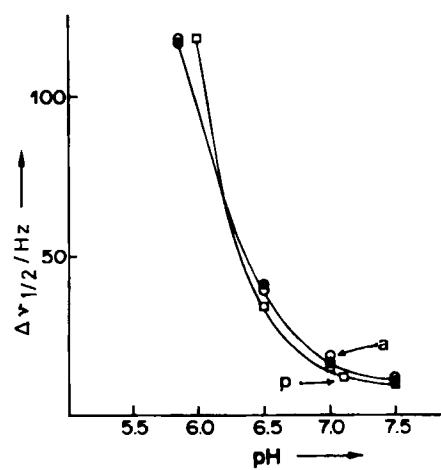


Abb. 32. Veränderung der Halbwertsbreite $\Delta v_{1/2}$ des ^{15}N -NMR-Signals für Alanin in Abhängigkeit vom pH-Wert in stickstofffreiem Medium: (●) 0.01 M, (○) 0.04 M und (□) 0.005 M Prolin [164]. a = Alanin, p = Prolin.

Die für Prolin und Alanin beobachtete pH-Abhängigkeit der ^{15}N -NMR-Linienbreiten (siehe Abb. 32) röhrt vom basiskatalysierten Protonenaustausch zwischen NH bzw. NH_2 und H_2O her. Gegenüber anderen Techniken, wie etwa der ^{31}P -NMR-Spektroskopie, bietet die ^{15}N -NMR-Spektroskopie mehr Information, da sich Aminosäuren in subzellulären Einheiten regiospezifisch verteilen und ihre strukturabhängigen NMR-Parameter im schwach sauren Gebiet eine wesentlich ausgeprägtere pH-Abhängigkeit zeigen.

zeigt. Strukturvorschläge, die dies erklären könnten, sind in Schema 28 vorgestellt. Der kleine pK_a -Wert von 4.9 lässt vermuten, daß nicht die Amidgruppe deprotoniert wird, sondern ein H_2O -Molekül in den Komplex eingebaut wird. Adenosin wird offensichtlich am besten komplexiert – man beobachtet Koordinationsverschiebungen für alle vier basischen N-Atome (N-1, N-3, N-7 und 6'-NH₂). Auf einige in diesem Zusammenhang interessierende Arbeiten über ^{15}N - ^{195}Pt -Wechselwirkungen sei verwiesen^[166] (vgl. auch

Tabelle 5. ^{15}N -NMR-Verschiebungen δ von freien und in Platinkomplexen gebundenen Nucleosiden [165] [a].

	N-1	N-3	N-7	N-9	NH ₂
Cytidin-5'-phosphat	-227.9	-179.6			-287.6
cis-[Pt(NH ₃) ₂ (Cyd) ₂] ²⁺	-228.0	-255.4			-276.8
Guanosin-5'-phosphat	-233.5	-215.7	-145.6	-211.6	-307.9
cis-[Pt(NH ₃) ₂ (Guo) ₂] ²⁺	-232.5	-215.8	-237.9	-207.1	-304.7

[a] Umgerechnet relativ zu CH_3NO_2 .

Als letzter Punkt soll die ^{15}N -NMR-spektroskopische Untersuchung der Bindung von Pharmaka und Hemmern an biologische Strukturen, insbesondere an Proteine und Nucleinsäuren, diskutiert werden. Die Antitumoraktivität einiger Platin(II)-Ammin-Komplexe gab den Anstoß, den mutmaßlichen DNA-Komplex am Modellsystem zu studieren^[165]. Bei der Bindung von ^{15}N -angereichertem cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂] an ein Nucleosid veränderten sich die chemischen Verschiebungen und die (^{15}N , ^{195}Pt)-Kopplungen im ^{15}N -NMR-Spektrum. Dank der starken, durch Koordination induzierten Verschiebung des Azin-Stickstoffatoms (–N=) nach tiefer Frequenz (Tabelle 5) gestaltet sich die Spektreninterpretation einfach. Man beobachtet die Bildung von Pt-Komplexen mit einem oder zwei Nucleosid-Liganden. Während in Cytidin erwartungsgemäß N-3 komplexiert wird, entsteht mit Guanosin, das mehrere Koordinationsstellen hat, ein Gemisch von Mono-Komplexen. Doppelter Chlorid-Austausch führt zu einem Komplex, dessen *trans* zum Sauerstoff stehender NH₃-Ligand eine starke pH-Abhängigkeit der ^{15}N -NMR-Verschiebung

Literaturverzeichnis von^[165]). Die Bindung kleiner Moleküle an große Biomoleküle bedingt nicht notwendigerweise eine starke Linienverbreiterung im ^{15}N -NMR-Spektrum, wie das die großen Korrelationszeiten τ_c dieser Makromoleküle vermuten lassen. Mit ihrer Studie am ternären Inhibitor-Komplex Leber-Alkohol-Dehydrogenase/NAD⁺/Pyrazol belegten Becker und Roberts^[167] eindrucksvoll die Tauglichkeit der ^{15}N -NMR-Spektroskopie für Enzym-Untersuchungen. Das bei 4.2 Tesla (18.25 MHz) aufgenommene ^{15}N -NMR-Spektrum (Abb. 33) zeigt

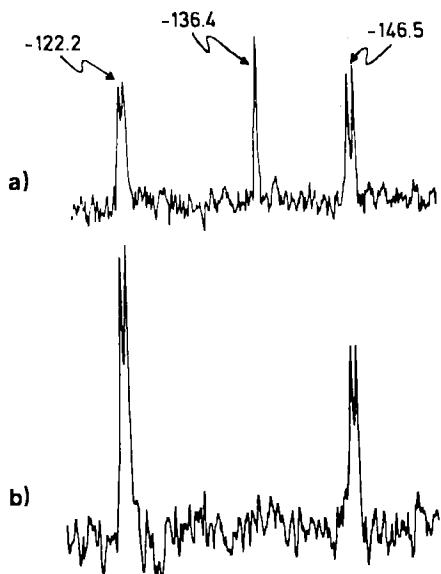
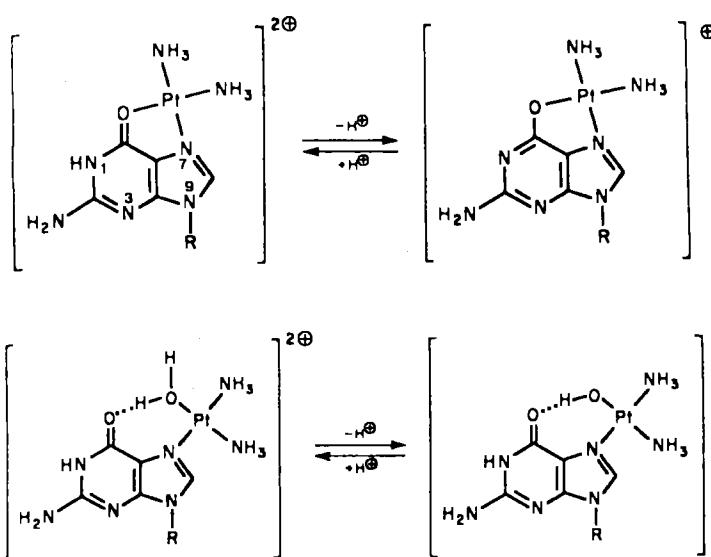


Abb. 33. ^{15}N -NMR-Spektren des Dehydrogenase/NAD⁺/Pyrazol-Komplexes (Meßfrequenz 18.25 MHz; mit 99% ^{15}N -angereichertem Pyrazol synthetisiert; 0.1 M Natriumphosphat-Puffer; pH=7). a) Vor der Dialyse; b) nach der Dialyse [167]. Die Signale bei $\delta = -122.2$, -136.4 und -146.5 werden N-2 von gebundenem Pyrazol, freiem Pyrazol bzw. N-1 von gebundenem Pyrazol zugeordnet.



Schema 28.

N-Benzylnicotinamid – so beobachtet man für N-1 jeweils ähnliche Verschiebungen ($\delta = -146.5$ bzw. -140.7). Dagegen ist das ^{15}N -NMR-Signal für N-2 im Enzym ($\delta = -122.2$) um 41.1 ppm zu kleineren Frequenzen verschoben. Das spricht für eine kovalente Bindung zwischen N-1 von Pyrazol- und C-4 der Nicotinamid-Gruppe sowie für die Koordination von N-2 am Zn-Atom im aktiven Zentrum des Enzyms. Das gleiche Modell postulierten Theorell und Yonetani, und auch Röntgen-Strukturuntersuchungen sprechen dafür (vgl. Literaturverzeichnis von^[167]).

Auch für die pharmakologische Aktivität der Dihydrofolat-Reduktase(DHFR)-Inhibitoren ist die Bildung eines Enzym-Inhibitor-Komplexes maßgeblich. Typische Inhibitoren sind Trimethoprim (2,4-Diamino-5-(3,4,5-trimethoxybenzyl)pyrimidin, TMP) und Methotrexat (MTX); letzteres ist mit Folsäure verwandt. Herauszufinden, auf welche Art TMP und MTX an DHFR gebunden sind, war das Ziel einiger interdisziplinärer Forschungsvorhaben^[168]. Detaillierte Multikern-NMR-Messungen belegen, daß in Lösung zwei Konformere des ternären Komplexes zwischen *Lactobacillus-casei*-DHFR, TMP und NADP $^+$ in etwa gleichen Anteilen vorliegen; sie wandeln sich langsam ineinander um. Abbildung 34 zeigt die ^{15}N -NMR-Spektren von dreifach ^{15}N -markiertem, protoniertem TMP sowie die des binären DHFR-TMP- und des ternären DHFR-TMP-NADP $^+$ -Komplexes. Auch ihr Vergleich lehrt, daß in wässriger Lösung zwei Spezies des ternären Komplexes vorliegen. Die chemischen Verschiebungen des Inhibitor-Komplexes stimmen sehr gut mit den für protoniertes TMP gemessenen N-1- und 2-NH $_2$ - ^{15}N -NMR-Verschiebungen überein, die bereits früher von unserer Arbeitsgruppe bestimmt wurden^[39]. Von Kanamori und Roberts^[169] stammt eine ^{15}N -NMR-spektroskopische Untersuchung über Enzym-Inhibitor-Komplexe zwischen Benzolsulfonamiden sowie Cyanat-Ionen und Carboanhydrase B. Kürzlich wurde die ^{15}N -NMR-Spektroskopie auch auf die Untersuchung von ganzen Enzymsystemen angewendet, z.B. zum Studium der Flavin-Apoenzym-Wechselwirkungen^[169a].

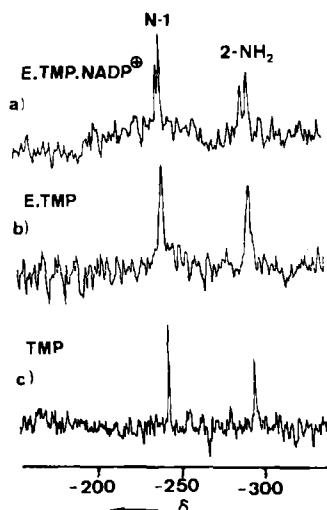


Abb. 34. ^{15}N -NMR-Spektren von (1,3,N 2 - $^{15}\text{N}_3$)Trimethoprim (TMP) (Meßfrequenz 20.2 MHz): a) TMP im ternären Komplex mit Dihydrofolsäure-Reduktase (E) und NADP $^+$ (INEPT-Sequenz und protonenentkoppelt; 90% $\text{H}_2\text{O}/10\% \text{D}_2\text{O}$), von einem N-3-NMR-Signal wird nicht berichtet [168]; b) TMP im binären Komplex mit Dihydrofolsäure-Reduktase (analoge Aufnahmeverbedingungen wie für a)); c) TMP in 0.1 M wässriger HCl.

4.6. Hochauflösende Festkörper- ^{15}N -NMR-Spektroskopie

Während sich ungezählte ^{15}N -NMR-Studien mit der Strukturaufklärung gelöster kleiner, mittlerer und sogar großer Biomoleküle beschäftigten, gibt es bis jetzt nur wenige Beispiele, in denen der ^{15}N -Kern als Sonde zur Bestimmung der Molekülstruktur von Festkörpern eingesetzt wurde – und wenn, dann meistens in Biomolekülen. Der Grund dafür liegt auf der Hand: Festkörper- ^{13}C - und - ^1H -NMR-Spektren von Biomolekülen sind gerade wegen der vielen nichtäquivalenten Protonen und ^{13}C -Atome in einem Molekül – wenn überhaupt – nur sehr schwer zu interpretieren. Anders dagegen die Festkörper- ^{15}N -NMR-Spektren, die aufgrund der viel geringeren Anzahl nichtäquivalenter N-Atome meist wenige und weit voneinander entfernte Signale aufweisen. Somit ist die Auflösung weniger wichtig. Die Empfindlichkeit läßt sich durch selektive ^{15}N -Anreicherung und die sehr effektiven Kreuzpolarisationsexperimente (Polarisationstransfer von den Protonen) in den Griff bekommen. Die großen Abstände zwischen ^{15}N -Atomen in Biomolekülen garantieren, daß selbst bei sehr starker ^{15}N -Anreicherung homonukleare Kopplungen keine Probleme bereiten. Die typischen Schwierigkeiten der Festkörper-NMR-Spektroskopie werden durch Kombination von hochfrequentem MAS (Magic Angle Spinning; eliminiert die Anisotropie der chemischen Verschiebung), Protonenbreitband-Entkopplung (hebt die dipolaren und skalaren Kopplungen auf) sowie der Technik der Kreuzpolarisation (Cross Polarization; steigert die Empfindlichkeit) überwunden. Diese Methoden^[170, 171, 27] und ihre Anwendung auf chemische Probleme^[172] wurden zusammenfassend beschrieben; zusätzlich existiert eine Übersicht zum Thema „Festkörper-NMR-Spektroskopie in biologischen Systemen“^[173]. Der vorliegende Beitrag bietet eine Bibliographie der CPMAS- ^{15}N -NMR-Experimente.

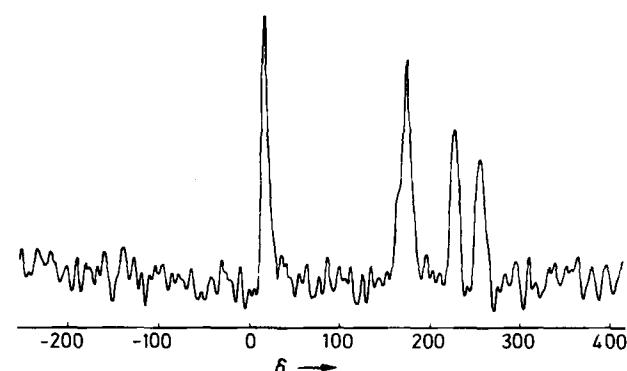


Abb. 35. ^{15}N -NMR-Spektrum eines Einkristalls aus nicht ^{15}N -markiertem L-Histidin-hydrochlorid-monohydrat. Die α -Achse der Elementarzelle stimmte etwa mit der Rotationsachse des NMR-Goniometers überein. Chemische Verschiebungen beziehen sich auf festes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als Standard. Die einzelne Linie links wird der NH_3^+ -Gruppe zugeordnet; sie deutet einen sehr kleinen Verschiebungstensor an. Die drei Linien rechts stammen von den Ring-N-Atomen (nach [174]).

Festkörper- ^{15}N -NMR-Spektren wurden von Einkristallen, kristallinen und amorphen Pulvern sowie biologischen Systemen wie Pflanzenblättern erhalten; bis auf die Messung an Einkristallen verwendete man jedoch immer ^{15}N -angereichertes Material. Abbildung 35 zeigt das Spektrum

eines Histidin-hydrochlorid-monohydrat-Einkristalls: die vier gut aufgelösten Linien sind den NH_3^+ - und den N-Atomen im Heterocyclus zuzuordnen. Durch orientierungsabhängige NMR-Messungen erhält man die Tensoren der chemischen Verschiebung^[174]. Dabei stellte sich heraus, daß die Anisotropie der chemischen Verschiebung für die beiden Ring-N-Atome $\Delta\sigma=220$ bzw. 216 ppm beträgt, während für die NH_3^+ -Gruppe <12 ppm bestimmt wurde. Da für unprotonierte Pyridin-Derivate viel größere $\Delta\sigma$ -Werte (≈ 780 ppm) erhalten wurden^[175], liefert die Bestimmung der ^{15}N -NMR-Verschiebungstensoren wertvolle Informationen über den Protonierungsgrad in festen biologischen Systemen. Munovitz et al.^[27] gelang es kürzlich zu zeigen, daß die Tensoren der chemischen Verschiebung und dipolaren Kopplung gleichzeitig mit hervorragender Auflösung gemessen werden können, wenn bei der Aufnahme die dipolare Spin-Spin-Wechselwirkung wieder eingeführt wird und die Spektren entsprechend 2D-NMR-Techniken ausgewertet werden. Damit steht eine experimentelle Methode zur Verfügung, die es ermöglicht, die dipolare Wechselwirkung zwischen verschiedenen Stickstoffpositionen in festen Biomolekülen zu studieren. Im $^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$ -markierten Glycylglycin-hydrochlorid konnten die ^{15}N - und ^{13}C -NMR-Verschiebungstensoren für die Peptidbindung bestimmt werden, wobei die Autoren darüber hinaus eine Korrelation zwischen allen bisher bekannten $\Delta\sigma(\text{N})$ -Werten und der π -Bindungsordnung der jeweiligen C-N-Bindungen diskutieren^[176]; die Anisotropie der ^{15}N -NMR-Verschiebung des N-Atoms der Peptidbindung von 155 ppm spiegelt eindeutig den partiellen Doppelbindungscharakter dieser Bindung wider.

Die Protonierung von und die Wasserstoffbrückenbildung zu Stickstoffatomen ist in vielen biochemischen Systemen von entscheidender Bedeutung. Festkörper- ^{15}N -NMR-Spektren des Schiff-Base-Segments in $\epsilon-[^{15}\text{N}]$ Lysyl-

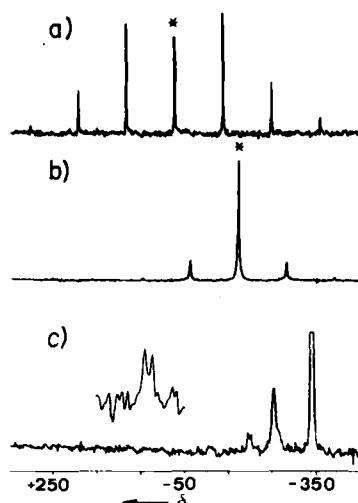


Abb. 36. Protonenentkoppelte ^{15}N -MAS-NMR-Spektren von a) Retinyldienbutyl[^{15}N]jamin (^{15}N -RB); b) ^{15}N -RH $^+$ ClO_4^- ; c) ϵ -[^{15}N]Lysylbacteriorhodopsin (Meßfrequenz 29.8 MHz). Der Übersichtlichkeit halber ist die Zentrallinie in a) und b) mit einem Sternchen gekennzeichnet. In c) ist zusätzlich das verstärkte Dublett der Schiff-Base ($\Delta\delta=5.7$) eingezeichnet, das vorläufig dem 13-cis- und dem all-trans-Stereoisomer zugewiesen wird. Die beiden übrigen Linien in c) sind den Gerüst- ^{15}N -Atomen des Peptids ($\delta=-259.3$) und den sechs NH_3^+ -Gruppen der Lysin-Einheiten zuzuordnen ($\delta=-344.5$). Die ursprünglich bezogen auf externes, wäßriges 5.6 M NH_4Cl angegebenen Verschiebungen [177] wurden auf CH_3NO_2 als Standard umgerechnet; der Umrechnungswert betrug -352.9 ppm [7a].

bacteriorhodopsin, dem einzigen Protein der Purpur-Membran, zeigten eine isotrope chemische Verschiebung von $\delta=-204.6$ und belegten damit, daß der Imin-Stickstoff in der Dunkelform protoniert ist^[177]. Die Dublett-Struktur des Signals (Abb. 36) weist auf die Existenz zweier Stereoisomere in Bacteriorhodopsin hin, vermutlich eine 13-cis- und eine all-trans-Retinal-Schiff-Base. Die ^{15}N -NMR-Verschiebung des Lysyl-bacteriorhodopsins ($\delta=-204.6$) ähnelt dem δ -Wert der Modellverbindung all-trans-Retinaliden-butyl[^{15}N]ammoniumchlorid ($\delta=-181.2$); für die Basenform dieser Modellverbindung beobachtet man dagegen eine starke Entschirmung des ^{15}N -Kerns ($\delta=-37.6$). Die gemessene chemische Verschiebung der protonierten festen Form und des gelösten Hydrochlorids ($\delta=-147$) liegen in einem ähnlichen Bereich^[113] (vgl. Abschnitt 4.1). Wie das protonenentkoppelte ^{15}N -NMR-Pulverspektrum (Abb. 37) belegt, bewirkt die Protonierung am Stickstoff eine deutliche Abnahme des Verschiebungstensors von $\Delta\sigma \approx 600$ ppm (Schiff-Base) auf 270 ppm (Hydrochlorid).

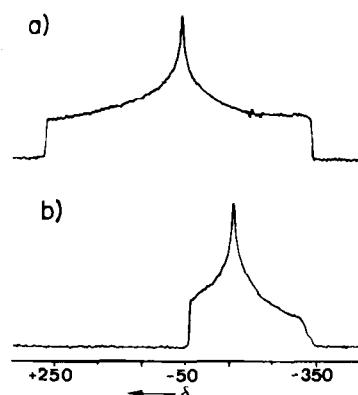


Abb. 37. Protonenentkoppelte ^{15}N -NMR-Pulverspektren von all-trans-Retinaliden-butyl[^{15}N]jamin; a) unprotoniert; b) Hydrochlorid. In a) ist das Pulverspektrum ≈ 600 ppm (18 kHz) breit mit einer isotropen Verschiebung von $\delta=-38$. Durch Protonierung verringert sich die Gesamtbreite des Spektrums auf 270 ppm, und die isotrope Verschiebung wandert um 142 ppm zu kleineren Frequenzen. Die chemischen Verschiebungen wurden auf CH_3NO_2 als Standard umgerechnet (siehe Legende zu Abb. 36) [177].

Festkörper-NMR-Studien sind besonders attraktiv, da es nun mit einer und derselben Meßtechnik möglich ist, Enzym-Strukturen sowohl in anisotroper (fester) als auch in isotroper (flüssiger) Phase zu analysieren und direkt zu vergleichen – im Gegensatz zum bisher üblichen Vergleich zwischen Röntgen-Strukturanalyse- und NMR-Daten. So wurde beispielsweise die Struktur der α -spaltenden Protease CPMAS-NMR-spektroskopisch untersucht; dabei wurde zunächst N^\ddagger , später zusätzlich N^\ddagger von His^{57} ^{15}N -markiert^[178]. Die Änderung der ^{15}N -NMR-Verschiebungen in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösungen (Abb. 38), aus denen die lyophilisierten Proben hergestellt wurden, gleicht den früher in Lösung bestimmten Werten – außer daß der Protonenaustausch an His^{57} im Festkörper wesentlich langsamer ist. Schema 29 gibt ein Bild von der lokalen Umgebung von His^{57} nahe dem aktiven Zentrum des Enzyms. Die ungewöhnliche Tautomer-Form mit einer N^\ddagger -H-Bindung wurde zunächst vorgeschlagen^[179a] und später durch ^{15}N -NMR-Messungen am gelösten Enzym^[93e] bestätigt. Stabilisiert wird das Tautomer durch die – nur in die-

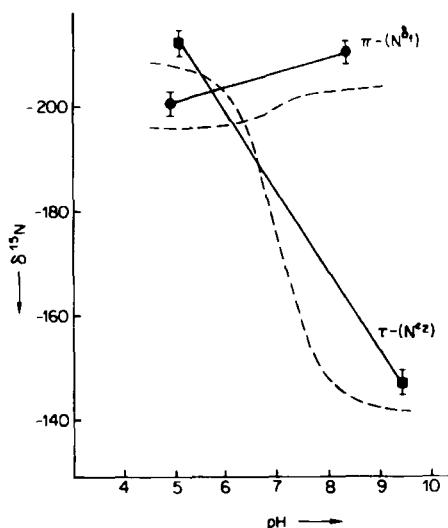
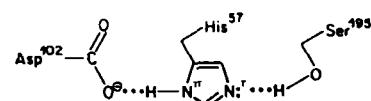


Abb. 38. pH-Abhängigkeit der ^{15}N -NMR-Verschiebungen der Imidazol-Stickstoffatome in Histidin-57 der α -spaltenden Protease; (---) in Lösung [179], (—) in lyophilisierten Pulvern [178].

ser Triadenstruktur möglichen – Wechselwirkungen von His⁵⁷ in der Mitte mit dem Aspartat¹²⁰-Ion an der π -Seite und der OH-Gruppe von Ser¹⁹⁵ an der τ -Seite. Die gute Übereinstimmung der nun vorliegenden Festkörper-NMR-Befunde mit den schon bekannten, für die flüssige Phase ermittelten Strukturparametern erbringt einen überzeugenden Strukturbeweis. Eine ähnliche Untersuchung mit Hilfe von ^{15}N -CPMAS- und Röntgen-Diffraktionsdaten ist kürzlich an einem Carboxypeptidase-A-Glycyl-Tyrosyl-Komplex ausgeführt worden^[179b].



Schema 29.

Der langsame Protonenaustausch im Festkörper ermöglicht die Identifizierung der protonierten N-Atome in Biomolekülen und das Studium des Protonentransfers durch ^{15}N -DNMR-Studien. Untersuchungen von Limbach et al.^[180a] über das Tautomerie-Gleichgewicht im ^{15}N -angereicherten *meso*-Tetra-*p*-tolylporphin 37 demonstrieren, daß heute ein derartiger Protonenaustausch zwischen zwei N-Atomen auch im Festkörper in einem Temperaturbereich von 210 bis 295 K ohne Schwierigkeiten zu verfolgen ist. Die entsprechenden CPMAS- ^{15}N -NMR-Spektren zeigen Abbildung 39, wobei die dort eingetragenen Geschwindigkeitskonstanten erster Ordnung k^{HH} durch vollständige Liniensformanalyse erhalten wurden. Während in Lösung für *p*-Tolyl- und Phenylporphine gleiche Austauschprozesse nachgewiesen wurden, weisen die Festkörperspektren auf unterschiedliche Phänomene hin. Die komplizierten Verhältnisse in den Arylporphinen wurden auch anhand der Röntgen-Strukturanalysen diskutiert^[180b].

Von Nucleinsäuren liegen ebenfalls Festkörper- ^{15}N -NMR-Studien vor; beispielsweise wurden in B-DNA die N-H-Bindungslängen untersucht^[33a] (siehe auch Abb. 11, Abschnitt 2.3) und von fd- und Pfl-Bacteriophagen wurde

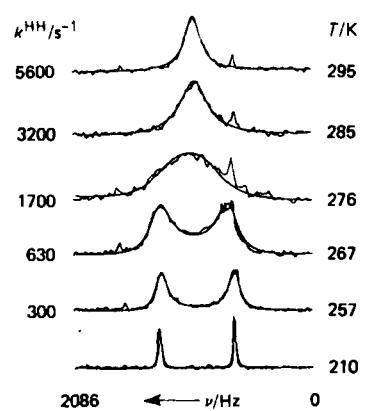


Abb. 39. ^{15}N -CPMAS-DNMR-Studie an *meso*-Tetra-*p*-tolylporphin 37 ($\text{Ar}=p\text{-Tolyl}$; Meßfrequenz 6.1 MHz; 95%- ^{15}N -angereichertes 37); experimentelle und berechnete Spektren sind übereinander gezeichnet. Das kleine Signal bei tieferer Frequenz wird durch eine Verunreinigung hervorgerufen [180a].

die Struktur des DNA-Gerüstes bestimmt^[181]. Die gleiche Arbeitsgruppe berichtete auch über Festkörper- ^{15}N -NMR-Studien an Proteinen^[181, 182a].

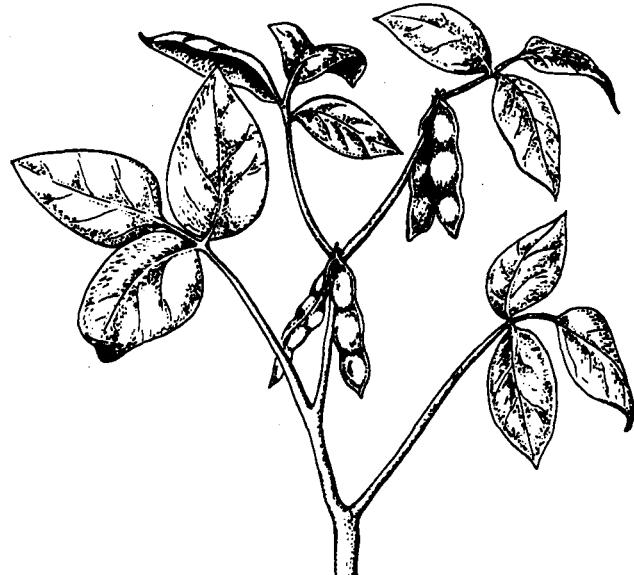


Abb. 40. Sojabohnensprößling (Glycin-Soja) [184].

Zum Abschluß dieser Übersicht sei noch ein Experiment erwähnt, das das fast unbegrenzte Potential der ^{15}N -NMR-Spektroskopie in der Biologie^[182b] vielleicht am besten beschreibt. Schaefer et al.^[183a] nahmen von Sojabohnenblättern CPMAS- ^{15}N -NMR-Spektren mit doppeltem Kreuzpolarisationstransfer auf, um die Umsatzzahlen (turn-over-Zahlen) von Enzymen zu bestimmen. Ebenfalls an dieser Pflanze wurde die Metabolisierung von Allantoin im frühen Wachstumsstadium verfolgt^[183b]. Abbildung 40 zeigt

einen Sojabohnensproßling – als Symbol für das immer weiter wachsende Anwendungspotential der NMR-Spektroskopie in Chemie, Biochemie und Biologie – und die neu wachsenden Zweige rufen nach phantasievollen Forschern!

5. Ausblick

In den letzten Jahren hat sich die Nützlichkeit der ^{15}N -NMR-Spektroskopie als Sonde sowohl für die Strukturaufklärung als auch für die Untersuchung des Reaktionsverhaltens organischer, bioorganischer und anorganischer Moleküle erwiesen. Die Mehrzahl dieser Studien wurde bereits an Molekülen mit natürlicher ^{15}N -Häufigkeit vorgenommen. Da die Empfindlichkeit der ^{15}N -NMR-Technik weiter zunimmt, wird diese Spektroskopie in Zukunft noch mehr an Bedeutung gewinnen. Moderne 1D- und 2D-NMR-Experimente werden ohne Zweifel ihren Teil dazu beitragen, daß immer größere und kompliziertere Moleküle – vor allem in der Biochemie – in fester und flüssiger Phase studiert werden können. Mit den kürzlich beschriebenen heteronuclearen „D-aufgelösten“ 2D-NMR-Experimenten (siehe Abb. 11) sollte es beispielsweise bald möglich sein, auch im Festkörper Wasserstoffbrückenbindungen quantitativ zu erforschen. Erste erfolgreiche Versuche – allerdings mit angereichertem Material – deuten darauf hin, daß die ^{15}N -NMR-Spektroskopie auch in der Pharmakologie große Bedeutung bei der Aufklärung von Wirkstoff-Bindung und -Aktivität erlangen dürfte. Fundamentale Probleme der Biochemie wie Stickstoff-Fixierung und -Metabolisierung sowie viele andere Fragen werden wohl zukünftig verstärkt mit ^{15}N -NMR-spektroskopischen Techniken erforscht werden. Jedoch wird die Realisierung dieser Ideen in vielen Fällen nur mit vielseitig ausgerüsteten Multikern-NMR-Spektrometern und den entsprechenden Rechnereinheiten gelingen. Es ist zu erwarten, daß in naher Zukunft gerade in diesem Bereich die bedeutendsten Fortschritte erzielt werden.

Der Seniorautor (W. v. P.) möchte an dieser Stelle seine große Dankbarkeit gegenüber allen Mitarbeitern aussprechen, die zum Gelingen der hier aus dem Zürcher Laboratorium beschriebenen Experimente beigetragen haben: Dr. W. Schwotzer, Dr. W. Städeli, Dr. R. Hollenstein, Dr. P. Bigler, Dr. L. Kozerski, Dr. G. Cerioni, Dr. M. Tato, B. C. Chen, C. Adams und R. Müller. Ihr wissenschaftlicher Enthusiasmus, ihr experimentelles Geschick und ihre Ausdauer hatten einen wesentlichen Einfluß auf Forschung und Arbeitsgeist in unserer Gruppe. Bei der Regierung des Kantons Zürich und dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung bedanken wir uns für die großzügige finanzielle Unterstützung.

Eingegangen am 23. Juli,
ergänzte Fassung am 23. Oktober 1985 [A 576]
Übersetzt von Dr. Eva-Elisabeth Wille, Weinheim

- [1] R. Müller, J. D. Wallis, W. von Philipsborn, *Angew. Chem.* 97 (1985) 515; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 513.
- [2] W. G. Proctor, F. C. Yu, *Phys. Rev.* 77 (1950) 717; 81 (1951) 20.
- [3] M. Witanowski, G. A. Webb (Hrsg.): *Nitrogen NMR*, Plenum Press, London 1973.
- [4] a) J. Mason, *Chem. Rev.* 81 (1981) 205; b) *Chem. Br.* 19 (1983) 654.
- [5] N. Logan in [3], Kap. 6, S. 319, "Applications of ^{14}N NMR Data in the Study of Inorganic Molecules".
- [6] J. M. Lehn, J. P. Kintzinger in [3], Kap. 3, S. 79, "Nitrogen-14 Nuclear Quadrupole Effects".

- [7] a) G. J. Martin, M. L. Martin, J.-P. Gouesnard, " ^{15}N -NMR Spectroscopy" in P. Diehl, E. Fluck, R. Kosfeld (Hrsg.): *NMR Basic Principles and Progress*, Vol. 18, Springer, Berlin 1981; b) M. Witanowski, L. Stefaniak, G. A. Webb, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* 11B (1981); c) G. C. Levy, R. L. Lichter: *Nitrogen-15 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Wiley, New York 1979.
- [8] L. F. Farnell, E. W. Randall, A. I. White, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1972, 1159; O. A. Gansow, A. R. Burke, G. N. La Mat, *ibid.* 1972, 456; A. J. DiGioia, R. L. Lichter, *J. Magn. Reson.* 27 (1977) 431.
- [9] W. Schwotzer, J. H. Bieri, M. Viscontini, W. von Philipsborn, *Helv. Chim. Acta* 61 (1978) 2108.
- [10] P. Ashkenazi, M. Kaftory, D. Arad, Y. Apeloig, D. Ginsburg, *Helv. Chim. Acta* 64 (1981) 579.
- [11] G. A. Morris, R. Freeman, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 760.
- [12] R. Benn, H. Günther, *Angew. Chem.* 95 (1983) 381; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 22 (1983) 350.
- [13] L. Kozerski, K. Kamienska-Trela, L. Kania, W. von Philipsborn, *Helv. Chim. Acta* 66 (1983) 2113.
- [14] G. A. Morris, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 428.
- [15] B. C. Chen, W. von Philipsborn, K. Nagarajan, *Helv. Chim. Acta* 66 (1983) 1537.
- [16] a) S. J. B. Price, M. J. DiMartino, D. T. Hill, R. Kuroda, M. A. Mazid, P. J. Sadler, *Inorg. Chem.* 24 (1985) 3425; b) C. Brevard, R. Schimpf, *J. Magn. Reson.* 47 (1982) 528.
- [17] A. Costa, M. Tato, R. S. Matthews, *Magn. Reson. Chem.*, im Druck.
- [18] K. V. Schenker, W. von Philipsborn, *J. Magn. Reson.* 61 (1985) 294.
- [19] a) D. M. Doddrell, D. T. Pegg, M. R. Bendall, *J. Magn. Reson.* 48 (1982) 323; b) D. T. Pegg, D. M. Doddrell, M. R. Bendall, *J. Chem. Phys.* 77 (1982) 2745; c) D. T. Pegg, M. R. Bendall, *J. Magn. Reson.* 53 (1983) 229.
- [20] K. G. R. Pachler, P. L. Wessels, *J. Magn. Reson.* 28 (1977) 53; H. J. Jakobsen, H. Bildsøe, *ibid.* 26 (1977) 183.
- [21] a) H. J. Jakobsen, W. S. Brey, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 774; b) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1979, 478; c) H. J. Jakobsen, P.-I. Yang, W. S. Brey, *Org. Magn. Reson.* 17 (1981) 290; d) O. W. Sørensen, S. Scheibye, S.-O. Lawesson, H. J. Jakobsen, *ibid.* 16 (1981) 322.
- [22] A. Bax, Ch.-H. Niu, D. Live, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 1150.
- [23] D. H. Live, D. G. Davis, W. C. Agosta, D. Cowburn, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 6104.
- [24] A. Bax, R. H. Griffey, B. L. Hawkins, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 7188.
- [25] C. J. Turner, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 16 (1984) 311.
- [26] A. Bax, R. H. Griffey, B. L. Hawkins, *J. Magn. Reson.* 55 (1983) 301.
- [27] M. G. Munovitz, H. H. Huang, C. M. Dobson, R. G. Griffin, *J. Magn. Reson.* 57 (1984) 56.
- [28] a) H. Kessler, W. Hehlein, R. Schuck, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 4534; b) H. Kessler, H. R. Loosli, H. Oschinat, *Helv. Chim. Acta* 68 (1985) 661; c) H. Kessler, H. Oschinat, H. R. Loosli, „ ^2D NMR Spectroscopy“, in R. M. Carlson, W. R. Croasmun (Hrsg.): *Methods in Stereoreactive Analysis*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1986.
- [29] G. A. Gray, *Org. Magn. Reson.* 21 (1983) 111.
- [30] H. Kessler, C. Griesinger, J. Zarbock, H. R. Loosli, *J. Magn. Reson.* 57 (1984) 331.
- [31] G. Bodenhausen, D. J. Ruben, *Chem. Phys. Lett.* 69 (1980) 185.
- [32] A. G. Redfield, *Chem. Phys. Lett.* 96 (1983) 537.
- [33] a) R. H. Griffey, C. D. Poulter, A. Bax, B. L. Hawkins, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 5895; R. H. Griffey, D. Davis, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, A. Bax, B. Hawkins, C. D. Poulter, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 9734; b) L. Müller, R. A. Schiksnis, S. J. Opella, *J. Magn. Reson.* 66 (1986) 379.
- [34] J. A. DiVerdi, S. J. Opella, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 1761.
- [35] T. A. Cross, P. Tsang, S. J. Opella, *Biochemistry* 22 (1983) 721.
- [36] D. G. Davis, W. C. Agosta, D. Cowburn, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 6189.
- [37] P. R. Srinivasan, R. L. Lichter, *J. Magn. Reson.* 28 (1977) 227.
- [38] IUPAC Recommendations for nuclei other than ^1H , vgl. *Pure Appl. Chem.* 45 (1976) 219.
- [39] W. Städeli, A. Wick, I. Kompiš, W. von Philipsborn, *Helv. Chim. Acta* 63 (1980) 504, zit. Lit.
- [40] W. Schwotzer, W. von Philipsborn, *Helv. Chim. Acta* 60 (1977) 1501.
- [41] K. A. K. Ebraheem, G. A. Webb, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 11 (1977) 149; M. Bremond, G. J. Martin, G. A. Webb, D. J. Reynolds, *Org. Magn. Reson.* 22 (1984) 640; K. A. K. Ebraheem, G. A. Webb, M. Witanowski, *ibid.* 11 (1978) 27; K. A. K. Ebraheem, G. A. Webb, *ibid.* 9 (1977) 248.
- [42] W. Städeli, *Dissertation*, Universität Zürich 1981.
- [43] Siehe [7a], S. 60.
- [44] W. M. Litchman, M. Alei, A. E. Florin, *J. Chem. Phys.* 50 (1969) 1897.
- [45] R. E. London, T. E. Walker, T. W. Whaley, N. A. Matwyoff, *Org. Magn. Reson.* 9 (1977) 598.
- [46] L. Kozerski, W. von Philipsborn, *Helv. Chim. Acta* 65 (1982) 2077.
- [47] A. Lyčka, P. E. Hansen, *Org. Magn. Reson.* 22 (1984) 569.
- [48] J. A. Pople, D. P. Santry, *Mol. Phys.* 8 (1964) 1.
- [49] Siehe [3], S. 269.

- [50] G. A. Olah, A. W. White, *J. Am. Chem. Soc.* **90** (1968) 6087.
- [51] A. J. R. Bourn, E. W. Randall, *Mol. Phys.* **8** (1964) 567.
- [52] G. Binsch, J. B. Lambert, B. W. Roberts, J. D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.* **86** (1964) 5564.
- [53] R. Wasylissen, T. Schaefer, *Can. J. Chem.* **49** (1971) 3627.
- [54] H. Hilpert, R. Hollenstein, *Helv. Chim. Acta* **69** (1986) 136.
- [55] J. Dorie, B. Mechlin, G. Martin, *Org. Magn. Reson.* **12** (1979) 229.
- [56] L. Paolillo, E. D. Becker, *J. Magn. Reson.* **2** (1970) 168.
- [57] Siehe [7b], S. 12.
- [58] Siehe [7a], S. 310f.
- [59] W. McFarlane, *Mol. Phys.* **10** (1965) 603.
- [60] W. Runge, J. Firl, *Z. Naturforsch. B* **31** (1976) 1515.
- [61] T. Bundgaard, H. J. Jakobsen, E. J. Rahkamaa, *J. Magn. Reson.* **19** (1975) 345.
- [62] J. M. Schulman, T. Venanzi, *J. Am. Chem. Soc.* **98** (1976) 4701, 6739; T. Khin, G. A. Webb, *Org. Magn. Reson.* **10** (1977) 175; J. M. Schulman, *J. Magn. Reson.* **28** (1977) 137; T. Axenrod, C. M. Watnick, M. J. Wieder, S. Duangthai, G. A. Webb, H. J. C. Yeh, S. Bulusu, M. M. King, *Org. Magn. Reson.* **20** (1982) 11.
- [63] M. J. O. Anteunis, F. A. M. Borremans, J. Gelan, A. P. Marchand, R. W. Allen, *J. Am. Chem. Soc.* **100** (1978) 4050; die $^3J(^{14}N, ^1H)$ -Werte wurden entsprechend Gleichung (b) umgerechnet.
- [64] R. Wasylissen in T. Axenrod, G. A. Webb (Hrsg.): *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Nuclei Other Than Protons*, Wiley, New York 1974, Kap. 8.
- [65] a) W. Städeli, P. Bigler, W. von Philipsborn, *Org. Magn. Reson.* **16** (1981) 170; b) M. Schumacher, H. Günther, *Chem. Ber.* **116** (1983) 2001.
- [66] R. Müller, *Diplomarbeit*, Universität Zürich 1983; R. Müller, W. von Philipsborn, noch unveröffentlicht.
- [67] V. F. Bystrov, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **10** (1976) 41.
- [68] M. Barfield, H. L. Gearhart, *Mol. Phys.* **27** (1974) 899; V. N. Solkan, V. F. Bystrov, *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.* **1974**, 102.
- [69] V. F. Bystrov, Yu. D. Gavrilov, V. N. Solkan, *J. Magn. Reson.* **19** (1975) 123; J. A. Sogn, W. A. Gibbons, E. W. Randall, *Biochemistry* **12** (1973) 2100; A. J. Fischman, H. R. Wyssbrod, W. C. Agosta, D. Cowburn, *J. Am. Chem. Soc.* **100** (1978) 54; A. J. Fischman, D. H. Live, H. R. Wyssbrod, W. C. Agosta, D. Cowburn, *ibid.* **102** (1980) 2533; A. de Marco, M. Llinas, K. Wüthrich, *Biopolymers* **17** (1978) 2727.
- [70] W. von Philipsborn, *Angew. Chem.* **83** (1971) 470; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **10** (1971) 472.
- [71] T. Axenrod in [3], Kap. 5, S. 261.
- [72] C. M. Adams, W. von Philipsborn, *Magn. Reson. Chem.* **23** (1985) 130.
- [73] S. Nagata, T. Yamabe, K. Hirao, K. Fukui, *J. Phys. Chem.* **79** (1975) 1863.
- [74] R. L. Lichter, D. E. Dorman, R. Wasylissen, *J. Am. Chem. Soc.* **96** (1974) 930.
- [75] W. Schwotzer, C. Leuenberger, L. Hoesch, A. S. Dreiding, W. von Philipsborn, *Org. Magn. Reson.* **9** (1977) 382.
- [76] H. Schultheiss, E. Fluck, *Z. Naturforsch. B* **32** (1977) 257.
- [77] a) T. Berkhoudt, H. J. Jakobsen, *J. Magn. Reson.* **50** (1984) 323; b) Y. Kuroda, Y. Fujiwara, K. Matsushita, *ibid.* **62** (1985) 218; c) M. Gruner, D. Pfeifer, H. G. O. Becker, R. Radeglia, J. Epperlein, *J. Prakt. Chem.* **327** (1985) 63.
- [78] a) J. M. Manriquez, D. R. McAlister, E. Rosenberg, A. M. Shiller, K. L. Williamson, S. I. Chan, J. E. Bercaw, *J. Am. Chem. Soc.* **100** (1978) 3078; b) J. O. Friedrich, R. E. Wasylissen, *J. Chem. Phys.* **83** (1985) 3707.
- [79] a) T. Khin, G. A. Webb, *J. Magn. Reson.* **33** (1979) 159; b) J. M. Schulman, J. Ruggio, T. J. Venanzi, *J. Am. Chem. Soc.* **99** (1977) 2045.
- [80] J. R. Lyerla, Jr., in G. C. Levy (Hrsg.): *Topics in Carbon-13 NMR Spectroscopy, Vol. 1*, Wiley, New York 1974, S. 79.
- [81] G. C. Levy, C. E. Holloway, R. C. Rosanske, J. M. Hewitt, C. H. Bradley, *Org. Magn. Reson.* **8** (1976) 643; G. C. Levy, T. Pehk, P. R. Srinivasan, *ibid.* **14** (1980) 129; siehe auch [7a], S. 7.
- [82] O. A. Gansow, K. M. Triplett, T. T. Peterson, R. E. Botto, J. D. Roberts, *Org. Magn. Reson.* **13** (1980) 77.
- [83] H. R. Kricheldorf, W. E. Hull, *Makromol. Chem.* **181** (1980) 507.
- [84] T. A. Schall, S. L. Smith, *Org. Magn. Reson.* **21** (1983) 621, 662.
- [85] Siehe [7b], S. 77.
- [86] Siehe [7b], S. 84.
- [87] L. Stefaniak, J. D. Roberts, M. Witanowski, G. A. Webb, *Org. Magn. Reson.* **22** (1984) 201, 215; L. Stefaniak, J. D. Roberts, M. Witanowski, B. T. Hamdi, G. A. Webb, *ibid.* **22** (1984) 209.
- [88] a) K. Nagarajan, V. P. Arya, *J. Sci. Ind. Res.* **41** (1982) 232; b) M. D. Nair, K. Nagarajan in E. Jucker (Hrsg.): *Progress in Drug Research, Vol. 27*, Birkhäuser Verlag, Basel 1983, S. 163.
- [89] W. Schilf, L. Stefaniak, M. Witanowski, G. A. Webb, *Magn. Reson. Chem.* **23** (1985) 181.
- [90] P. Schmitt, K. Finneiser, H. Günther, persönliche Mitteilung.
- [91] E. Bojarska-Olejnik, L. Stefaniak, M. Witanowski, B. T. Hamdi, G. A. Webb, *Magn. Reson. Chem.* **23** (1985) 166.
- [92] D. S. Wofford, D. M. Forkey, J. G. Russell, *J. Org. Chem.* **47** (1982) 5132.
- [93] a) W. W. Bachovchin, J. D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.* **100** (1978) 8041; b) I. I. Schuster, J. D. Roberts, *J. Org. Chem.* **44** (1979) 3864; c) J. D. Roberts, Chun Yu, C. Flanagan, R. T. Birdseye, *J. Am. Chem. Soc.* **104** (1982) 3945.
- [94] N. C. Gonnella, H. Nakanishi, J. B. Holtwick, D. S. Horowitz, K. Kanamori, N. J. Leonhard, J. D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.* **105** (1983) 2050; N. C. Gonnella, J. D. Roberts, *ibid.* **104** (1982) 3162.
- [95] W. E. Hull, M. Künstlinger, E. Breitmaier, *Angew. Chem.* **92** (1980) 957; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **19** (1980) 924.
- [96] Siehe Zitate in [95].
- [97] W. Städeli, W. von Philipsborn, *Org. Magn. Reson.* **15** (1981) 106.
- [98] S. Tobias, P. Schmitt, H. Günther, *Chem. Ber.* **115** (1982) 2015.
- [99] R. L. Blakley, *Biochem. J.* **58** (1954) 448.
- [100] R. L. Kisliuk, W. Sakami, *J. Am. Chem. Soc.* **76** (1954) 1456; M. J. Osborn, P. T. Talbert, F. M. Huennekens, *ibid.* **82** (1960) 4921; R. G. Kallen, W. P. Jencks, *J. Biol. Chem.* **241** (1966) 5851.
- [101] a) R. Kalbermann, W. Städeli, J. H. Bieri, M. Viscontini, *Helv. Chim. Acta* **64** (1981) 2627; b) R. Kalbermann, *Dissertation*, Universität Zürich 1981.
- [102] L. Paolillo, E. D. Becker, *J. Magn. Reson.* **3** (1970) 200.
- [103] S. K. Malhotra in A. G. Cook (Hrsg.): *Enamines*, M. Dekker, New York 1969.
- [104] L. Kozerski, W. von Philipsborn, *Org. Magn. Reson.* **17** (1981) 306.
- [105] a) R. A. Eades, D. A. Weil, M. R. Ellenberger, W. E. Farneth, D. A. Dixon, C. H. Douglass, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **103** (1981) 5372; b) W. von E. Doering, persönliche Mitteilung.
- [106] J. Dorie, B. Mechlin, G. Martin, *Org. Magn. Reson.* **12** (1979) 229.
- [107] G. J. Martin, J. P. Gouesnard, J. Dorie, C. Rabiller, M. L. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **99** (1977) 1381.
- [108] M. J. Kamlet, C. Dickinson, R. W. Taft, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1981) 353.
- [109] R. Kupper, B. D. Hilton, M. B. Kröger-Koepke, S. R. Koepke, C. J. Michejda, *J. Org. Chem.* **49** (1984) 3781.
- [110] T. B. Patrick, R. P. Willaredt, *J. Org. Chem.* **48** (1983) 4415.
- [111] D. J. Craik, G. C. Levy, R. T. C. Brownlee, *J. Org. Chem.* **48** (1983) 1601.
- [112] M. Allen, J. D. Roberts, *J. Org. Chem.* **45** (1980) 130, zit. Lit.
- [113] D. D. Muccio, W. G. Copan, W. W. Abrahamson, G. D. Mateescu, *Org. Magn. Reson.* **22** (1984) 121.
- [114] C. Yu, G. C. Levy, *Org. Magn. Reson.* **22** (1984) 131.
- [115] Literaturzitate siehe: D. H. Live, D. G. Davis, W. G. Agosta, D. Cowburn, *J. Am. Chem. Soc.* **106** (1984) 1939.
- [116] G. E. Hawkes, E. W. Randall, W. E. Hull, O. Convert, *Biopolymers* **19** (1980) 1815.
- [117] H. R. Kricheldorf, *Org. Magn. Reson.* **15** (1981) 162.
- [118] C. Dyllick-Brenzinger, G. R. Sullivan, P. P. Pang, J. D. Roberts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** (1980) 5580.
- [119] A. Hantzsch, *Chem. Ber.* **36** (1903) 2056.
- [120] R. Huisgen, I. Ugi, *Chem. Ber.* **90** (1957) 2914; I. Ugi, R. Huisgen, *ibid.* **91** (1958) 531; I. Ugi, R. Huisgen, K. Clusius, M. Vecchi, *Angew. Chem.* **68** (1956) 753.
- [121] I. Ugi, H. Perlinger, L. Behringer, *Chem. Ber.* **91** (1958) 2324.
- [122] J. D. Wallis, J. D. Dunitz, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1983) 910.
- [123] L. Hoesch, C. Leuenberger, H. Hilpert, A. S. Dreiding, *Helv. Chim. Acta* **65** (1982) 2682; C. Leuenberger, L. Hoesch, A. S. Dreiding, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1980) 1197.
- [124] M. T. Nguyen, J. Kaneti, L. Hoesch, A. S. Dreiding, *Helv. Chim. Acta* **67** (1984) 1918.
- [125] a) T. Yonezawa, I. Morishima, *J. Mol. Spectrosc.* **27** (1968) 210; b) H. Egli, W. von Philipsborn, *Helv. Chim. Acta* **64** (1981) 976.
- [126] C. Richard, P. Granger in P. Diehl, E. Fluck, R. Kosfeld (Hrsg.): *NMR Basic Principles and Progress, Vol. 8*, Springer, Berlin 1974.
- [127] a) J. H. Ridd, J. P. B. Sandall, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1981) 402; b) A. H. Clemens, P. Helsby, J. H. Ridd, F. Al-Omran, J. P. B. Sandall, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1985), 1217; c) A. H. Clemens, J. H. Ridd, J. P. B. Sandall, *ibid.* **2** (1985), 1227.
- [128] J. C. Giffney, J. H. Ridd, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1979) 618.
- [129] J. H. Ridd, J. P. B. Sandall, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1982) 261.
- [130] N. A. Porter, G. R. Dubay, J. G. Green, *J. Am. Chem. Soc.* **100** (1978) 920.
- [131] E.-L. Dreher, P. Niederer, A. Rieker, W. Schwarz, H. Zollinger, *Helv. Chim. Acta* **64** (1981) 488.
- [132] A. W. Douglas, *J. Am. Chem. Soc.* **101** (1979) 5676.
- [133] M. Yogo, K. Hirota, S. Senda, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (1982) 473.
- [134] J. W. Lown, S. M. S. Chauhan, *J. Org. Chem.* **48** (1983) 513.
- [135] Y. Nomura, Y. Takeuchi, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1979) 295.
- [136] G. T. Furst, R. L. Lichter, F. W. Vierhapper, *J. Org. Chem.* **45** (1980) 1521.
- [137] R. L. Willer, D. W. Moore, L. F. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **104** (1982) 3951.
- [138] K. Kanamori, J. D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.* **105** (1983) 4698.
- [139] R. Dyllick-Brenzinger, J. D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.* **102** (1980) 1166.

- [140] a) J. R. Dilworth, S. Donovan-Mtunzi, C. T. Kan, R. L. Richards, J. Mason, *Inorg. Chim. Acta* 53 (1981) L161; b) J. Chatt, M. E. Fakley, R. L. Richards, J. Mason, I. A. Stenhouse, *J. Chem. Res. (S)* 1979, 322; *J. Chem. Res. (M)* 1979, 3701.
- [141] R. D. Sanner, J. M. Manriquez, R. E. Marsh, J. E. Bercaw, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 8351, 3042.
- [142] D. L. Thorn, T. H. Tulip, J. A. Ibers, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1979, 2022.
- [143] J. R. Dilworth, C. T. Kan, R. L. Richards, J. Mason, I. A. Stenhouse, *J. Organomet. Chem.* 201 (1980) C24.
- [144] a) L. K. Bell, D. M. P. Mingos, D. G. Tew, L. F. Larkworthy, B. Sandell, D. C. Povey, J. Mason, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1983, 125; D. H. Evans, D. M. P. Mingos, J. Mason, A. Richards, *J. Organomet. Chem.* 249 (1983) 293; b) J. Mason, D. M. P. Mingos, J. Schäfer, D. Sherman, E. O. Stejskal, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1985, 444.
- [145] J. Bultitude, L. F. Larkworthy, J. Mason, D. C. Povey, B. Sandell, *Inorg. Chem.* 23 (1984) 3629.
- [146] A. R. Butler, C. Glidewell, A. R. Hyde, J. McGinnis, *Polyhedron* 3 (1984) 1165.
- [147] N. W. Alcock, N. Herron, P. Moore, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1979, 1486.
- [148] E. H. Curzon, N. Herron, P. Moore, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1980, 721.
- [149] I. Morishima, T. Inubushi, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 3568; *FEBS Lett.* 81 (1977) 57.
- [150] E. von Goldammer, *Z. Naturforsch. C* 34 (1979) 1106.
- [151] F. Blomberg, H. Rüterjans in L. J. Berliner, J. Reuben (Hrsg.): *Biological Magnetic Resonance*, Vol. 5, Plenum Press, New York 1983, S. 21.
- [152] K. Kanamori, J. D. Roberts, *Acc. Chem. Res.* 16 (1983) 35.
- [153] Y. Kyogoku, *Appl. Spectrosc. Rev.* 17 (1981) 279.
- [154] B. Coxon, *Pure Appl. Chem.* 49 (1977) 1151.
- [155] H. R. Kricheldorf, *Pure Appl. Chem.* 54 (1982) 467.
- [156] J. R. Ebdon, P. E. Heaton, T. N. Huckerby, W. T. S. O'Rourke, J. Parkein, *Polymer* 25 (1984) 821; R. A. McKay, J. Schaefer, E. O. Stejskal, R. Ludicky, C. N. Matthews, *Macromolecules* 17 (1984) 1124; D. E. Axelsson, S. L. Blake, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* 23 (1985) 2507; H. R. Kricheldorf, W. E. Hull, D. Müller, *Macromolecules* 18 (1985) 2135.
- [157] A. Horii, Y. Shimizu, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1983, 790.
- [158] R. L. Baxter, C. J. McGregor, G. A. Thomson, A. I. Scott, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1985, 369.
- [159] M. Liinas, K. Wüthrich, W. Schwotzer, W. von Philipsborn, *Nature (London)* 257 (1975) 817.
- [160] T. L. Legerton, K. Kanamori, R. L. Weiss, J. D. Roberts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 1495; K. Kanamori, T. L. Legerton, R. L. Weiss, J. D. Roberts, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 14168.
- [161] N. Haran, Z. E. Kahana, A. Lapidot, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 12929.
- [162] NH₃/NO₂⁻ (*Nitrosomonas*): K. K. Andersson, S. B. Philson, A. B. Hooper, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 5871; D-Lysin (*Neurospora crassa*): N. Fangmeier, E. Leistner, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 10205; Nitrat (*Neurospora crassa*): G. S. Jacob, J. Schaefer, E. O. Stejskal, R. A. McKay, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97 (1980) 1176; NH₄⁺ (*Streptomyces venezuelae*): S. Shapiro, L. C. Vining, M. Laycock, A. G. McInnes, J. A. Walter, *Can. J. Microbiol.* 31 (1985) 629; Nitropropanösäure (*Penicillium atrovenetum*): R. L. Baxter, S. L. Greenwood, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1986, 175.
- [163] K. Kanamori, T. L. Legerton, R. L. Weiss, J. D. Roberts, *Biochemistry* 21 (1982) 4916.
- [164] T. L. Legerton, K. Kanamori, R. L. Weiss, J. D. Roberts, *Biochemistry* 22 (1983) 899.
- [165] M. Nee, J. D. Roberts, *Biochemistry* 21 (1982) 4920.
- [166] M. Alei, Jr., P. J. Vergamini, W. E. Wagerman, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 5415; A. Albinati, H. Moriyama, H. Rüegger, P. S. Pregosin, A. Togni, *Inorg. Chem.* 24 (1985) 4430.
- [167] N. N. Becker, J. D. Roberts, *Biochemistry* 23 (1984) 3336.
- [168] B. Birdsall, A. W. Bevan, C. Pascual, G. C. K. Roberts, J. Feeney, A. Gronenborn, G. M. Clove, *Biochemistry* 23 (1983) 4733; A. W. Bevan, G. C. K. Roberts, J. Feeney, L. Kuyper, *Eur. Biophys. J.* 11 (1985) 211.
- [169] a) K. Kanamori, J. D. Roberts, *Biochemistry* 22 (1983) 2658; b) J. Verwoort, F. Müller, J. LeGall, A. Bacher, H. Sedlmaier, *Eur. J. Biochem.* 151 (1985) 49; W.-D. Beinert, H. Rüterjans, F. Müller, *ibid.* 152 (1985) 573.
- [170] M. Mehring: *Principles of High-Resolution NMR in Solids*, 2. Aufl., Springer, Berlin 1983.
- [171] C. S. Yannoni, *Acc. Chem. Res.* 15 (1982) 201.
- [172] J. R. Lyerla, C. S. Yannoni, C. A. Fyfe, *Acc. Chem. Res.* 15 (1982) 208.
- [173] S. J. Opella, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 33 (1982) 533.
- [174] G. Harbison, J. Herzfeld, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 4752.
- [175] D. Schweitzer, H. W. Spiess, *J. Magn. Reson.* 15 (1974) 529.
- [176] G. S. Harbison, L. W. Jelinski, R. E. Stark, D. A. Torchia, J. Herzfeld, R. G. Griffin, *J. Magn. Reson.* 60 (1984) 79; R. E. Stark, L. W. Jelinski, D. J. Ruben, D. A. Torchia, R. G. Griffin, *ibid.* 55 (1983) 266.
- [177] G. S. Harbison, J. Herzfeld, R. G. Griffin, *Biochemistry* 22 (1983) 1.
- [178] T.-H. Huang, W. W. Bachovchin, R. G. Griffin, Ch. M. Dobson, *Biochemistry* 23 (1984) 5933.
- [179] a) W. W. Bachovchin, J. D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 8041; b) N. E. Mackenzie, P. E. Fagerness, A. I. Scott, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1985, 635.
- [180] a) H. H. Limbach, J. Hennig, R. Kendrick, C. S. Yannoni, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 4059; b) R. J. Butcher, G. B. Jameson, C. B. Storm, *ibid.* 107 (1985) 2978; M. J. Hamor, T. A. Hamor, J. L. Hoard, *ibid.* 86 (1964) 1938.
- [181] T. A. Cross, J. A. DiVerdi, S. J. Opella, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 1759.
- [182] a) T. A. Cross, S. J. Opella, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 306; T. A. Cross, M. H. Frey, S. J. Opella, *ibid.* 105 (1983) 7471; T. A. Cross, S. J. Opella, *J. Mol. Biol.* 182 (1985) 367; b) F. Martin, *Physiol. Veg.* 23 (1985) 463.
- [183] a) J. Schaefer, T. A. Skokut, E. O. Stejskal, R. A. McKay, J. E. Varner, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 11574; b) G. T. Coker, III, J. Schaefer, *Plant Physiol.* 77 (1985) 129.
- [184] H. G. Baker: *Plants and Civilization*. Macmillan, London 1970.