

Eine einfache und skalierbare Methode für die partielle Orientierung organischer Moleküle zur Messung dipolarer Restkopplungen (RDCs)**

Burkhard Luy, Kyril Kobzar und Horst Kessler*

Dipolare Restkopplungen („residual dipolar couplings“, RDCs) liefern wichtige Strukturinformation über den Abstand zweier Atome und den Winkel eines Atompaars gegenüber einem statischen Magnetfeld. Ihre Messung durch hochauflösende NMR-Spektroskopie erfordert die partielle Orientierung der Moleküle in der Probe.^[1–5] Für biologische Moleküle gibt es eine Reihe von Standardmethoden, wie etwa phospholipidische Bizellen,^[6] filamentöse Phagen^[7] oder andere flüssigkristalline Phasen,^[8] die sich im Magnetfeld ausrichten und durch sterische oder elektrostatische Wechselwirkungen zu einer partiellen Orientierung des Moleküls führen.

Organische Lösungsmittel wurden bisher lediglich bei flüssigkristallinem Poly- γ -Benzyl-L-Glutamat (PBLG) in CDCl_3 erfolgreich zur Orientierung von Molekülen im Magnetfeld angewendet.^[9–13] Flüssigkristalline Phasen haben jedoch den Nachteil, dass es eine minimale Konzentration und damit auch eine minimale Orientierung der Moleküle in der Probe im Flüssigkristall gibt, die die Anwendung von Standardmethoden zur Bestimmung von Kopplungskonstanten stark einschränkt.^[12] Einen Ausweg hierzu bietet die magnetfeldunabhängige und beliebig skalierbare Molekülorientierung mithilfe gestreckter oder gestauchter Polymergele (strain induced alignment in a gel, SAG). In wässrigen Lösungen wurden bisher mechanisch gestrecktes Polyacrylamid^[14–17] sowie ein Acrylamid/Acrylat-Copolymer^[18] eingesetzt. Die Pionierarbeit von DeLoche und Samulski^[19] und viele daraus resultierende Anwendungen in der NMR-Spektroskopie an Polymeren (siehe z. B. Lit. [20–23]) haben gezeigt, dass Polymergele auch in organischen Lösungsmitteln zur partiellen Ausrichtung geeignet sind. Hier stellen wir nun eine einfache und skalierbare Methode zur Orientierung organischer Moleküle und zur Messung von RDCs an quervernetztem Polystyrol in CDCl_3 vor, die prinzipiell auch auf viele andere Polymer/Lösungsmittel-Kombinationen angewendet werden kann.

[*] Dr. B. Luy, Dipl.-Chem. K. Kobzar, Prof. Dr. H. Kessler
Institut für Organische Chemie und Biochemie
Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
Fax: (+49) 89-289-13210
E-mail: horst.kessler@ch.tum.de

[**] B.L. dankt dem Fonds der Chemischen Industrie und der DFG (Emmy Noether-Stipendium LU 835/1-1) für Unterstützung. Prof. Dr.-Ing O. Nuyken, Dr. R. Jordan, Dr. M. Zweckstetter, Dr. R. Marx, O. Hiltner und W. Günther danken wir für ihre tatkräftige Hilfe.



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Vernetztes Polystyrol (PS) kann durch Polymerisation von Styrol mit Divinylbenzol (DVB) zur Kettenverzweigung und Dibenzoylperoxid (DBP) als Radikalstarter hergestellt werden.^[24] Gibt man einen zylindrischen Stab von 1 cm Länge und 3 mm Durchmesser aus diesem vernetzten PS zusammen mit CDCl_3 in ein NMR-Röhrchen, dann quillt das Polymer zum Gel und dehnt sich entlang der Glaswand des Röhrchens (Abbildung 1). Da die Reibung von PS mit der

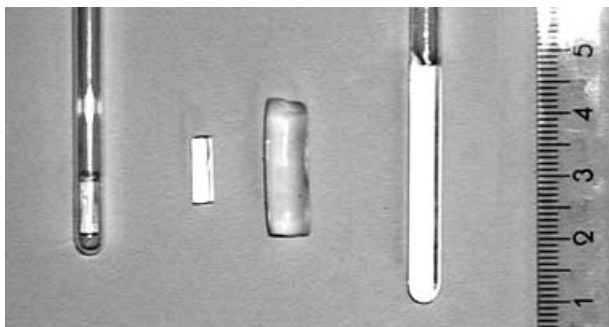


Abbildung 1. Foto eines Stabs aus vernetztem PS in verschiedenen Quellzuständen. Von links nach rechts: ungequollener Polymerstab in einem 5-mm-NMR-Röhrchen; Polymerstab direkt nach der Polymerisation; Polymerstab in vollständig gequollenem Zustand; vollständig gequollener Polymerstab im NMR-Röhrchen.

Glaswand gering ist, benötigt man keine Hilfsmittel wie etwa Teflon-Trichter.^[17] Schon nach wenigen Stunden wird im Deuterium-NMR-Spektrum eine Aufspaltung des Signals von CDCl_3 gemessen; ein Spektrum mit scharfen Linien, d. h. mit kompletter Aufspaltung, beobachtet man erst nach einigen Tagen, wenn das Gel äquilibriert ist. Wir konnten keine Korrelation zwischen dem Aussehen der Proben (alle Gele waren klar, durchsichtig und homogen) oder der Vernetzerkonzentration und der Linienbreite feststellen, allen Proben war jedoch gemeinsam, dass sich die Linienform nach etwa fünf Tagen nicht mehr änderte. Die zu vermessende Substanz kann entweder direkt mit dem Lösungsmittel oder nachträglich auf das bereits gequollene Gel gegeben werden. Bei nachträglicher Zugabe von Strychnin oder Menthol genügt die Diffusion über Nacht bei Raumtemperatur, um RDCs zu messen.

Die Stärke der Orientierung kann durch die Beschaffenheit des Polymerstabs gesteuert werden. Zunächst ist die Streckung des Gels vom Durchmesser des Stabs abhängig. Mit Stäben von 3 mm Durchmesser erzielten wir gute Ergebnisse in dem für hochauflösende NMR-Spektroskopie geeigneten Orientierungsbereich. Der Vernetzungsgrad und die Kettenlänge, und damit letztlich auch die NMR-spektroskopischen Eigenschaften, werden durch die Menge an vernetzendem DVB und Initiator DBP sowie durch die Reaktionsbedingungen wie etwa die Temperatur bei der Polymerisation bestimmt. Abbildung 2 zeigt, wie die Aufspaltung der Deuterium-NMR-Signale von CDCl_3 als Maß für die Anisotropie des Gels von der DVB- und DBP-Konzentration bei konstanter Polymerisationstemperatur (80°C) abhängt. Deutlich ist die stärkere Ausrichtung des Lösungsmittels bei höheren DVB- und niedrigeren DBP-

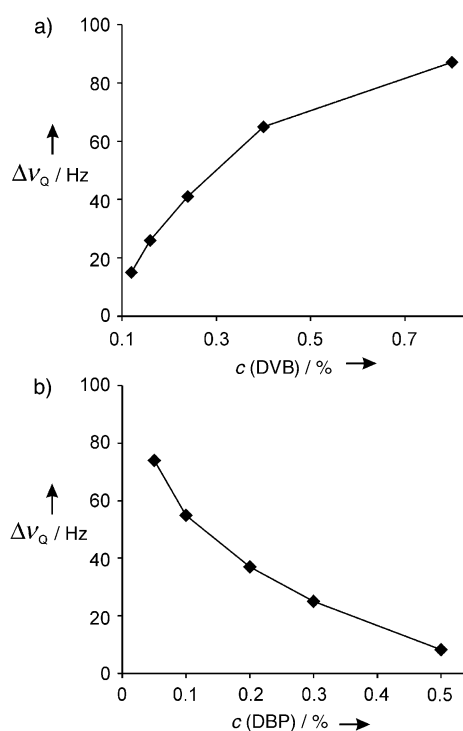


Abbildung 2. Die Quadrupolaufspaltung $\Delta\nu_Q$ des Deuterium-NMR-Signals von CDCl_3 für PS-Gele, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von DVB (a; bei 0.25 Gew.-% DBP) bzw. unterschiedlichen Konzentration von DBP (b; bei 0.16 Vol.-% DVB) erhalten wurden. Da DVB und DBP technischer Qualität verwendet wurden, sollten die Aufspaltungen lediglich als Richtwerte betrachtet werden.

Konzentrationen zu erkennen. Für die Quadrupolkopplungskonstanten analog hergestellter Proben fanden wir Abweichungen um $\pm 10\%$, die jedoch durch unterschiedliche Wandstärken der NMR-Röhrchen und Durchmesser der Polymerisationsgefäße erklärt werden können. Sicherlich trägt auch die heterogene Konsistenz des Polymers zu einer gewissen Schwankungsbreite bei. Selten wurde ein Brechen des Gels an der Oberseite beobachtet, die Ursache dafür ist jedoch noch nicht geklärt. Die Messung dieser Proben war problematischer, aber RDCs konnten nach wie vor bestimmt werden.

Die Orientierung von Strychnin, einem Standard in der NMR-Spektroskopie,^[25] wurde in einem Gel aus einem Polymerstab mit 0.16 Vol.-% DVB und 0.3 Gew.-% DBP gemessen, dessen Quadrupolaufspaltung im Deuterium-NMR-Spektrum 25 Hz betrug. Die HSQC-Spektren für die Probe mit im PS-Gel orientierten Strychnin und für eine Strychnin-Lösung in CDCl_3 als Referenz wurden ohne heteronucleare Entkopplung aufgenommen. Mit dem Programm Sparky^[26,27] wurden anschließend alle $^1J(\text{H},\text{C})$ -Kopplungen aus dem Referenzspektrum und die $^1J(\text{H},\text{C})+D(\text{H},\text{C})$ -Kopplungen aus dem Spektrum der orientierten Probe bestimmt. Die PS-Signale unterschieden sich durch ihre breiten Linien eindeutig von den Strychnin-Signalen, und die beiden Signalsätze überlagerten nur wenig (Abbildung 3). Die Differenzen der Kopplungskonstanten ergeben direkt die RDCs $D(\text{H},\text{C})$ mit Werten zwischen -11 und 13 Hz. Die Vorzeichen der beobachteten Kopplungskonstanten werden

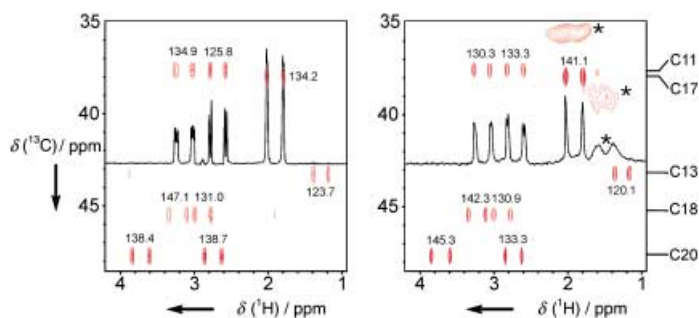


Abbildung 3. Ausschnitt aus gekoppelt gemessenen ^1H , ^{13}C -Korrelationspektren (HSQC) von Strychnin (ca. 50 mg) in CDCl_3 ohne (links) und mit gestrecktem PS-Gel (rechts), gemessen bei 300 K. Zu den einzelnen Kreuzsignalen sind jeweils die gemessenen $^1J(\text{H},\text{C})$ - bzw. $^1J(\text{H},\text{C})+D(\text{H},\text{C})$ -Kopplungen angegeben. In beiden Spektren sind Schnitte entlang $\delta(^{13}\text{C}) = 37.8$ ppm abgebildet, die zeigen, dass die Auswertung der Kopplungen keinerlei Probleme bereitet. Die breiten Signale des PS-Polymers sind mit Sternen gekennzeichnet.

also durch die deutlich größere $^1J(\text{H},\text{C})$ -Kopplung (> 120 Hz) bestimmt.

Der Vergleich von 18 gemessenen dipolaren Kopplungskonstanten mit der nicht optimierten Kristallstruktur von Strychnin mithilfe des Programms PALES^[28] ergab einen Korrelationsfaktor $R = 0.978$ (siehe Hintergrundinformationen). Aus den RDCs für orientiertes Strychnin in PBLG^[12] berechnet sich ein Orientierungstensor, dessen axiale ($D_a = -2.23 \times 10^{-3}$) und rhombische Komponente ($D_r = -8.63 \times 10^{-4}$) etwa zwölfmal größer sind als entsprechende Werte für Strychnin im PS-Gel ($D_a = -1.77 \times 10^{-4}$; $D_r = -8.82 \times 10^{-5}$). Das Verhältnis D_a/D_r unterscheidet sich in beiden Fällen leicht und die dreidimensionalen Ausrichtungen der Tensoren weichen deutlich voneinander ab. Ob eventuell sogar Aussagen bezüglich der Dynamik des Moleküls getroffen werden können (siehe hierzu z. B. Lit. ^[29–31]), muss jedoch in weiteren Untersuchungen noch geklärt werden.

Als zweite Substanz wurde Menthol vermessen, für das ebenfalls dipolare Kopplungen in PBLG ermittelt wurden.^[13] Da Menthol eine weniger gestreckte Molekülform hat als Strychnin, fiel die Wahl auf einen PS-Stab mit 0.8 % DVB und 0.25 % DBP mit einer Quadrupolaufspaltung des CDCl_3 -Signals von 87 Hz. So wurden $D(\text{H},\text{C})$ -Kopplungen zwischen -6.2 und 7.2 Hz gemessen. Der Vergleich mit den RDCs in PBLG^[13] zeigt auch hier Orientierungstensoren mit verschiedenen räumlichen Ausrichtungen; in der PBLG-Probe ist die Ausrichtung etwa viermal stärker. Das Verhältnis D_a/D_r beträgt in beiden Fällen 2.1, die Ausrichtung der rhombischen Komponente im Raum ist jedoch unterschiedlich, sodass auch hier zusätzliche strukturelle Information erhalten wird (für Kopplungen und Orientierungstensoren siehe Hintergrundinformationen).

Es können nur Vermutungen angestellt werden, warum PBLG- und PS-Gele verschiedene Orientierungstensoren induzieren. Sicherlich können die relativ kleinen organischen Moleküle direkt mit den aktiven Gruppen des orientierenden Mediums wechselwirken und kleine Ausbuchtungen können zu starken sterischen Effekten führen. Die Eigenschaften des

helicalen polaren PBLG unterscheiden sich hier deutlich von denen des Polystyrols.

Vernetzte Polymergele eignen sich auch in organischen Lösungsmitteln hervorragend zur partiellen Orientierung von Molekülen. Das Beispiel PS in CDCl_3 zeigt die einfache Handhabung und die Skalierbarkeit durch die Verwendung von Polymeren, deren Eigenschaften durch die Synthesbedingungen variiert werden können. Einziger Nachteil sind die teilweise langen Wartezeiten bei der homogenen Quellung und der Diffusion der Substanz in das Gel, die jedoch durch das Anlegen eines Vorrats an bereits im NMR-Röhrchen gequollenen und charakterisierten Gelen deutlich verkürzt werden können. Viele weitere Kombinationen aus Lösungsmitteln und Polymeren sind denkbar und werden in Zukunft charakterisiert werden, um eine möglichst breite Anwendbarkeit und Variation der Orientierungstensoren zu ermöglichen. Entsprechende Methoden sollten die Strukturbestimmung von Naturstoffen vereinfachen und viele Mehrdeutigkeiten in der NMR-Spektroskopie aufklären.

Eingegangen am 12. September 2003 [Z52860]

Stichwörter: Dipolare Restkopplungen · Gele · NMR-Spektroskopie · Partielle Orientierung · Polystyrol

- [1] C. R. Sanders, B. J. Hare, K. P. Howard, J. H. Prestegard, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1994**, 26, 421–444.
- [2] J. R. Tolman, J. M. Flanagan, M. A. Kennedy, J. H. Prestegard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 9279–9283.
- [3] N. Tjandra, A. Bax, *Science* **1997**, 278, 1111–1114.
- [4] B. Simon, M. Sattler, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 453–456; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 437–440.
- [5] A. Bax, *Protein Sci.* **2003**, 12, 1–16.
- [6] J. H. Prestegard, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 517–522.
- [7] M. R. Hansen, L. Mueller, A. Pardi, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 1065–1074.
- [8] M. Rückert, G. Otting, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 7793–7797.
- [9] A. Meddour, I. Canet, A. Loewenstein, J. M. Pechine, J. Courtieu, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 9652–9656.
- [10] P. Lesot, D. Merlet, A. Loewenstein, J. Courtieu, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9, 1871–1881.
- [11] C. Canlet, D. Merlet, P. Lesot, A. Meddour, A. Loewenstein, J. Courtieu, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, 11, 1911–1918.
- [12] C. M. Thiele, S. Berger, *Org. Lett.* **2003**, 5, 705–708.
- [13] L. Verdier, P. Sakhaei, M. Zwickstetter, C. Griesinger, *J. Magn. Reson.* **2003**, 163, 353–359.
- [14] R. Tycko, F. J. Blanco, Y. Ishii, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 9340–9341.
- [15] H. J. Sass, G. Musco, S. J. Stahl, P. T. Wingfield, S. Grzesiek, *J. Biomol. NMR* **2000**, 18, 303–309.
- [16] Y. Ishii, M. A. Markus, R. Tycko, *J. Biomol. NMR* **2001**, 21, 141–151.
- [17] J. J. Chou, S. Gaemers, B. Howder, J. M. Louis, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **2001**, 21, 377–382.
- [18] S. Meier, D. Haussinger, S. Grzesiek, *J. Biomol. NMR* **2002**, 24, 351–356.
- [19] B. Deloche, E. T. Samulski, *Macromolecules* **1981**, 14, 575–581.
- [20] P. Sentosa, F. Fujara, H. Sillescu, *Makromol. Chem.* **1992**, 193, 2421–2431.
- [21] L. C. ter Beek, F. M. Linseisen, *Macromolecules* **1998**, 31, 4986–4989.
- [22] R. J. Cormier, M. L. Kilfoil, P. T. Callaghan, *Phys. Rev. E* **2001**, 64, 051809.

- [23] P. Medick, M. Vogel, E. Rossler, *J. Magn. Reson.* **2002**, *159*, 126–136.
- [24] Siehe Standardlehrbücher der makromolekularen Chemie, z. B.: H. G. Elias, *Makromoleküle*, 6. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.
- [25] S. Braun, H.-O. Kalinowski, S. Berger, *150 and More Basic NMR Experiments*, 2nd ed., Wiley-VCH, Weinheim, **1998**.
- [26] D. G. Kneller, I. D. Kuntz, *J. Cell Biochem.* **1993**, *17C Suppl.*, 254.
- [27] T. D. Goddard, D. G. Kneller, University of California, San Francisco.
- [28] M. Zweckstetter, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3791–3792.
- [29] J. Meiler, W. Peti, C. Griesinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8072–8073.
- [30] J. Meiler, J. J. Prompers, W. Peti, C. Griesinger, R. Bruschweiler, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6098–6107.
- [31] W. Peti, J. Meiler, R. Bruschweiler, C. Griesinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 5822–5833.