

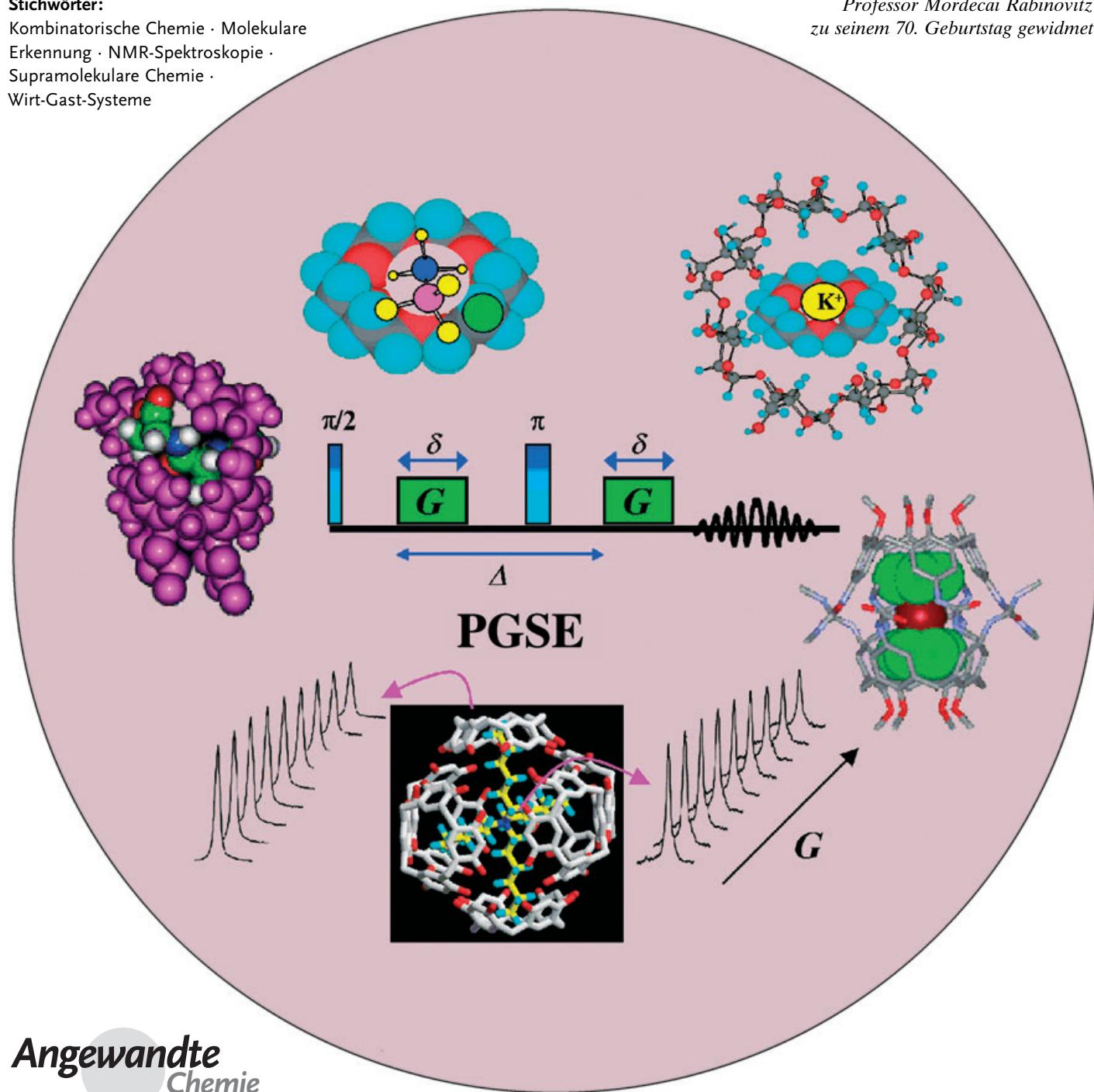
# Diffusions-NMR-Spektroskopie in der Supramolekularen und Kombinatorischen Chemie: ein alter Parameter – neue Erkenntnisse

Yoram Cohen,\* Liat Avram und Limor Frish

**Stichwörter:**

Kombinatorische Chemie · Molekulare Erkennung · NMR-Spektroskopie · Supramolekulare Chemie · Wirt-Gast-Systeme

Professor Mordechai Rabinovitz  
zu seinem 70. Geburtstag gewidmet



**Intermolekulare Wechselwirkungen in Lösung spielen eine wichtige Rolle bei der molekularen Erkennung und sind somit von besonderer Bedeutung in der Supramolekularen und Kombinatorischen Chemie. Die Untersuchung der molekularen Diffusion liefert Aufschlüsse über solche Wechselwirkungen, wobei sich die hochauflöste Diffusions-NMR-Spektroskopie als Methode der Wahl für die gleichzeitige Bestimmung von Diffusionskoeffizienten in einem Mehrkomponentensystem erwiesen hat. Der Diffusionskoeffizient ist dabei ein Maß für die effektive Größe und Form eines Moleküls. Zu den Anwendungen dieser Technik gehören die Abschätzung von Assoziationskonstanten, die Kartierung intermolekularer Wechselwirkungen in Mehrkomponentensystemen sowie Untersuchungen zum Aggregationsverhalten, zur Ionenpaarbildung, zur Bildung von Einschlusverbindungen und zur Bestimmung der Größe und Struktur von labilen Systemen. Mit Hilfe der Diffusions-NMR-Spektroskopie kann man aber auch Gemische virtuell auftrennen und gezielt nach Liganden für Rezeptoren suchen. Diese Methode kann so bei der Identifizierung von Leitverbindungen von Nutzen sein.**

## 1. Einleitung

### 1.1. Die NMR-spektroskopische Untersuchung von Diffusionsvorgängen

In den vergangenen zehn Jahren haben sich gepulste Feldgradienten-NMR-Experimente (pulsed field gradient, PFG) als Methode der Wahl zur Messung der Diffusion chemischer und biologischer Systeme in Lösung erwiesen. Der Diffusionskoeffizient eines Moleküls hängt unter gegebenen Bedingungen (z.B. Lösungsmittel, Druck) von seinem effektiven Molekulargewicht sowie seiner effektiven Größe und Form ab. Es liegt damit auf der Hand, dass durch die Untersuchung der Diffusion Kenntnisse über intermolekulare Wechselwirkungen in Lösung erhalten werden können. Derartige Wechselwirkungen spielen in chemischen und biologischen Systemen eine wichtige Rolle und sind die Grundlage der molekularen Erkennung, eines auch für die Supramolekulare und die Kombinatorische Chemie bedeutenden Prinzips.<sup>[1-3]</sup> Die Diffusions-NMR-Spektroskopie wird jedoch erst seit kurzer Zeit in diesen Bereichen eingesetzt.

Bereits zu einem frühen Zeitpunkt in der Entwicklung der NMR-Spektroskopie wurde erkannt, dass sich die molekulare Diffusion mit den Methoden der NMR-Spektroskopie bestimmen lässt.<sup>[4]</sup> Die am besten geeignete Pulssequenz zur NMR-spektroskopischen Bestimmung der Diffusion wurde bereits 1965 von Stejskal und Tanner eingeführt,<sup>[5a]</sup> lange bevor die heute gebräuchliche 2D-NMR-Spektroskopie<sup>[6-8]</sup> ihren Einzug hielt. Seit dieser Zeit sind Diffusions-NMR-Messungen zunehmend eingesetzt worden; für den Zeitraum bis 1987 sind die meisten dieser Anwendungen in Lösung in Übersichtsartikeln von Stilbs, Kärger et al. zusammengefasst worden.<sup>[9,10a]</sup>

In den letzten zehn Jahren war eine exponentielle Zunahme im Gebrauch von Gradienten auf allen Gebieten der

## Aus dem Inhalt

<b>1. Einleitung</b>	525
<b>2. Konzepte der molekularen Diffusion</b>	526
<b>3. NMR-Methoden zur Messung der Diffusion</b>	528
<b>4. Anwendungen von Diffusions-NMR-Messungen in der Supramolekularen Chemie</b>	532
<b>5. Anwendungen von Diffusions-NMR-Messungen in der Kombinatorischen Chemie</b>	550
<b>6. Zusammenfassung und Ausblick</b>	555

NMR-Spektroskopie, von der Kohärenzselektion in der hochauflösten NMR-Spektroskopie<sup>[11]</sup> bis zu bildgebenden Magnetresonanzverfahren (magnetic resonance imaging, MRI),<sup>[12]</sup> zu verzeichnen. Tatsächlich hat besonders das Diffusions-MRI des Zentralnervensystems (ZNS) in dieser Zeit enorm an Bedeutung gewonnen.<sup>[13]</sup> Dies liegt zum Teil an der überraschend effizienten Frühdiagnose von Schlaganfällen mithilfe diffusionsgewichteter MRI-Verfahren<sup>[14]</sup> sowie an den Vorteilen der Diffusions-Tensor-Bildgebung (diffusion tensor imaging, DTI) beim Kartieren der Nervenbahnen des ZNS.<sup>[15]</sup>

Vor diesem Hintergrund ist es überraschend, dass in der Supramolekularen und Kombinatorischen Chemie die Diffusions-NMR-Spektroskopie als Werkzeug zum Studium molekularer Wechselwirkungen erst in letzter Zeit ihren Eingang gefunden hat. Ein Grund dafür ist vermutlich, dass die benötigten Gradienten für ein gepulstes Gradienten-Spin-Echo-NMR-Experiment (pulsed gradient spin echo, PGSE), mit dem sich die Diffusion NMR-spektroskopisch bestimmen lässt, bis vor kurzem kommerziell nicht zur Verfügung standen. Im Zuge des Aufkommens der hochauflösten gradientenverstärkten Spektroskopie (gradient enhanced spectroscopy)<sup>[11]</sup> und dank technischen Verbesserungen der Gradienteneigenschaften, die wiederum auf die Entwicklung des MRI zurückzuführen sind, wurden implementierte Gradienten kommerziell erhältlich und gehören heute zur Standardausstattung moderner Hochfeld-NMR-Spektrometer. Mit entsprechenden Probenköpfen lassen sich für einen

[\*] Prof. Y. Cohen, L. Avram, Dr. L. Frish  
School of Chemistry  
Tel Aviv University  
Ramat Aviv, Tel Aviv 69978 (Israel)  
Fax: (+972) 3-6409-293  
E-mail: ycohen@post.tau.ac.il

vollständigen Signalsatz in einem hochaufgelösten Spektrum die Diffusionskoeffizienten simultan mit hoher Empfindlichkeit und großer Genauigkeit ermitteln. Es ist anzumerken, dass mithilfe der Diffusions-NMR-Spektroskopie, wie im Folgenden gezeigt werden wird, die Diffusion auch in Systemen bestimmt werden kann, in denen keine Konzentrationsgradienten vorliegen. Zudem sind neue Pulssequenzen und Methoden entwickelt worden, mit denen man an modernen NMR-Spektrometern auch komplexe Diffusions-NMR-Experimente routinemäßig durchführen kann. Einige davon werden in diesem Aufsatz vorgestellt.

## 1.2. Anwendungen der Diffusions-NMR-Spektroskopie

Diffusions-NMR-Messungen werden in einer Vielzahl von Disziplinen eingesetzt, von der Medizin<sup>[12–15]</sup> bis hin zu den Materialwissenschaften.<sup>[16–18]</sup> Vor kurzem sind im Zusammenhang mit der Entwicklung der hochaufgelösten gradientenverstärkten Spektroskopie mehrere allgemeine Übersichtsartikel erschienen, die sich mit den theoretischen und praktischen Aspekten der Gradienten-NMR-Spektroskopie beschäftigen.<sup>[11,17]</sup> Auch sind mehrere Aufsätze erschienen, die sich mit spezielleren Themen wie der Diffusion in Polymeren,<sup>[16b]</sup> in Zeolithen und porösen Systemen<sup>[16a,18]</sup> sowie mit oberflächenaktiven Substanzen<sup>[19]</sup> in Flüssigkristallen und Membranen<sup>[20]</sup> befassen. Die Diffusions-NMR-Spektroskopie ist ein vollkommen nichtinvasives Verfahren, was sie für Untersuchungen der Moleküldynamik sowie der translatorischen Diffusion und damit für die Aufklärung von Strukturdetails in biologischen und physiologischen Systemen besonders geeignet macht. So sind die Anwendungen der Diffusions-NMR-Spektroskopie bei der Untersuchung des Membrantransports kürzlich in einem Übersichtsartikel zusammengefasst worden,<sup>[21]</sup> und mehrere Veröffentlichungen von Callaghan und Price befassen sich mit der Diffusion in Systemen mit begrenzter räumlicher Ausdehnung.<sup>[17]</sup> Die q-Space-Diffusions-NMR-Spektroskopie<sup>[22]</sup> bildete die Grundlage für entsprechende Experimente zum Erhalt von Informationen über die Struktur und Größe des untersuchten Kompartiments. Da diese Technik nichtinvasiv ist und die Untersuchung von Kompartimenten von nur wenigen Mikrometern Durchmesser ermöglicht, wurde die q-Space-Diffusions-NMR-Spektroskopie auch zur Untersuchung biologi-

scher Systeme eingesetzt.<sup>[23–25]</sup> Wir haben diese Methode zum q-Space-MRI des Zentralnervensystems ausgebaut.<sup>[26–27]</sup> Callaghan und andere haben Diffusions-NMR-Spektroskopie und MRI zur Untersuchung komplexer Fluide eingesetzt.<sup>[28]</sup> Van As und Mitarbeiter nutzten diese Technik, um den Fluss durch in der Chromatographie eingesetzte, poröse Materialien zu untersuchen.<sup>[29]</sup>

In diesem Aufsatz soll die Anwendung der hochaufgelösten Diffusions-NMR-Spektroskopie in Lösung diskutiert werden, mit besonderem Augenmerk auf Anwendungen in den Bereichen der Supramolekularen und der Kombinatorischen Chemie. Dabei wird der Schwerpunkt dieses Aufsatzes auf den Anwendungen und nicht auf einer tiefgehenden Diskussion der Theorie von Diffusions-NMR-Experimenten liegen, da auf diese bereits in vielen der unlängst erschienenen Übersichtsartikel eingegangen wurde.<sup>[9–11,16–21,28]</sup> Im Folgenden erläutern wir kurz den Begriff der Diffusion im Kontext von NMR-Messungen (Abschnitt 2) und geben eine grundlegende Einführung in die NMR-Verfahren, mit denen sich die Diffusion messen lässt. Dabei liegt die Betonung auf den einfachsten und gebräuchlichsten Verfahren zur Diffusionsmessung in isotropen Lösungen (Abschnitt 3). Im sich anschließenden Hauptteil dieses Übersichtsartikels (Abschnitte 4–5) diskutieren wir die Anwendungen der Diffusions-NMR-Spektroskopie und wollen so anhand ausgewählter Arbeiten das Potenzial einfacher Diffusions-NMR-Messungen für die Supramolekulare und die Kombinatorische Chemie herausstellen. Im letzten Abschnitt geben wir einen Ausblick auf zukünftige Entwicklungen der Diffusions-NMR-Spektroskopie (Abschnitt 6).

## 2. Konzepte der molekularen Diffusion

### 2.1. Translatorische Diffusion in isotropen Systemen – „freie Diffusion“

Die translatorische Diffusion ist der vielleicht wichtigste Modus des molekularen Transports.<sup>[30]</sup> Unter der Eigendiffusion versteht man die willkürliche (ziellose) translatorische Bewegung von Partikeln, die in der thermischen Energie der Teilchen ihren Ursprung hat. Im Falle der Eigendiffusion wirken de facto keinerlei Kräfte auf die Molekülparkel, sodass im statistischen Mittel keine Fortbewegung beobachtet



Yoram Cohen wurde 1956 in Israel geboren und erhielt seinen B.Sc. (1981) und seinen Ph.D. (1987) von der Hebrew University of Jerusalem unter Anleitung der Professoren M. Rabinovitz und J. Klein. Er verbrachte drei Jahre bei Professor Tom James an der University of California in San Francisco (UCSF) als Fulbright-Stipendiat. Er wechselte 1992 zur School of Chemistry an der Universität Tel Aviv zunächst als Lecturer, ab 1996 als Senior Lecturer. Seit dem Jahr 2000 ist er Associate Professor. Seine Forschungsinteressen umfassen die NMR-Spektroskopie supramolekularer Systeme sowie MRS/MRI des ZNS mit dem Schwerpunkt auf Diffusions-MR.

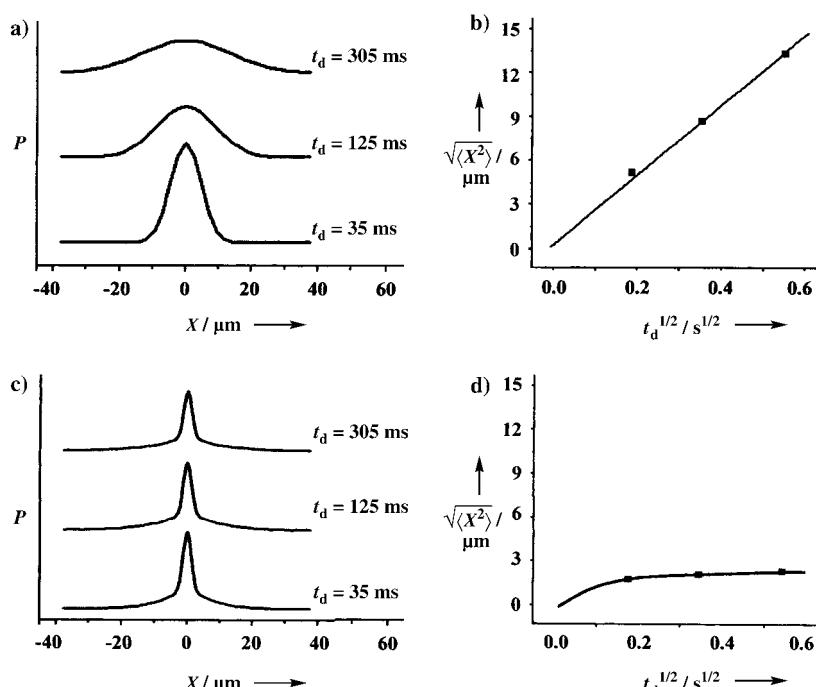


Limor Frish wurde 1973 in Ramat Gan, Israel geboren und erhielt 1997 ihren B.Sc. in Chemie von der School of Chemistry der Tel Aviv University. Sie hat gerade ihre Promotion unter der Anleitung von Prof. Yoram Cohen beendet. Ihre Forschungsinteressen konzentrieren sich auf Anwendungen der Diffusions-NMR-Spektroskopie in der Supramolekularen Chemie.

wird. In einem isotropen homogenen System ist die durch Randbedingungen eingeschränkte Wahrscheinlichkeit  $P(r_0, r, t_d)$ , dass sich ein Molekül, welches sich ursprünglich an Position  $r_0$  befand, nach der Zeit  $t_d$  an der Position  $r$  befindet, durch Gleichung (1) gegeben, wobei  $D$  der Eigen-

$$P(r_0, r, t_d) = (4\pi D t_d)^{-3/2} \exp\left(-\frac{(r-r_0)^2}{4D t_d}\right) \quad (1)$$

diffusionskoeffizient ist. Dies bedeutet, dass das von einem Molekül an einer Position  $r_0$  relativ zu einer willkürlich gewählten Referenzposition eingenommene Volumen in einem nicht eingeschränkten System durch eine Gauß-Verteilung beschrieben wird, die mit wachsender Diffusionszeit  $t_d$



**Abbildung 1.** (a), (b) Freie Diffusion in einer *tert*-Butanol-Lösung; (c), (d) eingeschränkte Diffusion (Wasser im Sehnerv). a), c) Profile der Verteilung der Positionsänderung  $X$ ; b), d) mittlere Quadratwurzel von  $X$ , berechnet aus der Signalhalbwertsbreite der Positionsänderungsverteilung aus (a) bzw. (c) und der Quadratwurzel der Diffusionszeiten. Die Steigung der Geraden in (b) liefert den Eigendiffusionskoeffizienten von *tert*-Butanol ( $2.7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$ ).<sup>[26c]</sup>



Liat Avram wurde 1977 in Tel Aviv, Israel geboren. Sie erhielt 1999 ihren B.Sc. und 2001 ihren M.Sc. an der School of Chemistry der Universität Tel Aviv. Seit Oktober 2001 arbeitet sie als Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Prof. Yoram Cohen. Liat Avram ist ein Charles Clore Ph.D. Scholar.

zunehmend breiter wird (Abbildung 1). Daher ist die Positionsänderung eines sich willkürlich bewegenden Partikels gemittelt über alle drei Raumrichtungen unter diesen Bedingungen null. In derartigen Systemen ist jedoch die Wurzel des Quadrats der gemittelten Positionsänderung,  $\sqrt{\langle X^2 \rangle}$ , durch die Einstein-Gleichung gegeben [Gl. 2],<sup>[31]</sup> wobei  $n$  bei ein-, ( $\langle X^2 \rangle$ )<sup>1/2</sup> =  $(n D t_d)^{1/2}$  (2)

zwei- und dreidimensionaler Diffusion die Werte 2, 4 bzw. 6 annimmt. Aus dieser Gleichung geht hervor, dass die mittlere Positionsänderung linear mit der Quadratwurzel der Diffusionszeit zunimmt.

Der wohlbekannte Zusammenhang zwischen der Diffusion und der molekularen Größe wird durch die Einstein-Smoluchowski-Gleichung [Gl. (3)] ausge-

$$D = \frac{k_b T}{f} = \frac{R T}{N f} \quad (3)$$

drückt.<sup>[21,30]</sup> Hierbei ist  $k_b$  die Boltzmann-Konstante,  $T$  die absolute Temperatur,  $f$  der so genannte hydrodynamische Frikionskoeffizient,  $N$  die Avogadro-Zahl und  $R$  die ideale Gaskonstante. Für eine Kugel in einem kontinuierlichen Medium der Viskosität  $\eta$  wird  $f$  durch die Stokes-Gleichung [Gl. 4] gegeben.<sup>[30]</sup> In dieser

$$f = 6\pi\eta r_s \quad (4)$$

Gleichung ist  $r_s$  der hydrodynamische Radius, häufig auch Stokes-Radius genannt. Die Kombination von Gleichung (3) mit Gleichung (4) liefert die bekannte Stokes-Einstein-Beziehung [Gl. (5)]. Es ist zu beachten, dass für

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta r_s} \quad (5)$$

Moleküle anderer Struktur auch eine andere Gleichung für die Beschreibung von  $f$  verwendet werden muss.<sup>[30]</sup>

Aus der Gleichung geht hervor, dass unter kontrollierten Bedingungen über die Messung des Eigendiffusionskoeffizienten eines Moleküls auch Informationen über dessen Eigenschaften erhalten werden können: sein Gewicht, seine Größe und Form, aber auch seine Bindungsverhältnisse, seine Aggregation und seine molekularen Wechselwirkungen. Zudem sind die Diffusionskoeffizienten direkt mit der Translationsbewegung des Moleküls im Laborkoordinatensystem korreliert, sofern die Diffusion in einem homogenen Medium stattfindet, das eine freie und isotrope Diffusion erlaubt. In nicht homogenen Proben hingegen, in denen andere Diffusionsmodi vorherrschen, ist die Bestimmung von Diffusionskoeffizienten aus Diffusions-NMR-Experimenten ein sehr viel schwierigeres Unterfangen.

## 2.2. Andere Arten der Diffusion: eingeschränkte und anisotrope Diffusion

Wie wir in Abschnitt 3 anhand der unterschiedlichen, zur Untersuchung der Diffusion herangezogenen NMR-Methoden sehen werden, werden die Spins durch die Pulsverfahren zu mindestens zwei Zeitpunkten angesprochen.<sup>[5,9–10,13–29]</sup> Der Signalabfall in einem Diffusions-NMR-Experiment hängt daher von der mittleren Positionsänderung der Teilchen ab, die diese innerhalb einer gewissen Zeit, der Diffusionszeit, erfahren. In Abbildung 1 sind zum einen die Positionsänderungsprofile für unterschiedliche Diffusionszeiten bei freier und bei eingeschränkter Diffusion (Abbildung 1a und c), zum anderen die mittlere Positionsänderung als Funktion der Quadratwurzel der Diffusionszeit bei freier und bei eingeschränkter Diffusion (Abbildung 1b und d) aufgetragen. Man erkennt, dass, wie aufgrund von Gleichung (2) zu erwarten, im Fall freier Diffusion die mittlere Positionsänderung eines diffundierenden Moleküls linear mit der Quadratwurzel der Diffusionszeit zunimmt. Durch die Auftragung der mittleren Positionsänderung als Funktion der Quadratwurzel der Diffusionszeit erhält man eine Gerade, aus deren Steigung sich der Diffusionskoeffizient ermitteln lässt (Abbildung 1b). Man kann sich vorstellen, dass bei einem System mit eingeschränkter Diffusion eine Verlängerung der Diffusionszeit nicht mehr zu einer Vergrößerung der mittleren Positionsänderung des diffundierenden Teilchens führt. Wie man anhand von Abbildung 1d erkennt, besteht in einer solchen Situation kein linearer Zusammenhang mehr zwischen der mittleren Positionsänderung und der Quadratwurzel der Diffusionszeit. Unter diesen Bedingungen kann lediglich ein scheinbarer Diffusionskoeffizient bestimmt werden.<sup>[14,15]</sup> Es ist klar, dass eine solche Einschränkung dann auftreten wird, wenn die Diffusionszeit  $t_d > l^2/2D$  ist ( $l$ : Länge des Kompartiments,  $D$ : Diffusionskoeffizient). Das bedeutet, dass die in solchen Systemen ermittelten, scheinbaren Diffusionskoeffizienten durch die Diffusionszeiten  $t_d$  im Diffusions-NMR-Experiment beeinflusst werden. Wenn Barrieren, die eine räumliche Einschränkung bewirken, nicht gleichmäßig angeordnet sind, kann die so genannte anisotrope Diffusion auftreten.<sup>[15]</sup> Sowohl die eingeschränkte als auch die anisotrope Diffusion sind wichtige Phänomene in heterogenen Systemen, z.B. porösen Materialien und biologischen Systemen, und liefern unter geeigneten experimentellen Bedingungen Informationen zur Struktur des untersuchten Systems.<sup>[22–29]</sup> Da diese Diffusionsarten in homogenen Lösungen jedoch nur eine untergeordnete Rolle spielen, werden wir diese Thematik hier nicht weiter vertiefen.

## 3. NMR-Methoden zur Messung der Diffusion

In jüngster Zeit haben NMR-Methoden das herkömmliche Verfahren zur Bestimmung von Eigendiffusionskoeffizienten mit radioaktiven Markern weitgehend verdrängt, da NMR-Messungen leichter durchführbar und nichtinvasiv sind, und darüber hinaus die simultane Bestimmung mehrerer Diffusionskoeffizienten in Mehrkomponentensystemen er-

möglichen. Im Folgenden wollen wir die Auswirkungen von magnetischen Feldgradienten auf das zu messende NMR-Signal betrachten.<sup>[5a,9–11,16–18]</sup> Im Anschluss daran werden wir einige der nützlichsten NMR-Verfahren diskutieren, mit denen sich Diffusionskoeffizienten in Lösung bestimmen lassen.

## 3.1. Modifizierte Spin-Echo-Experimente: das gepulste Gradienten-Spin-Echo-NMR-Experiment

Die Grundlage für Diffusionsbestimmungen mit der NMR-Spektroskopie ist die Tatsache, dass magnetische Feldgradienten indirekt dazu genutzt werden können, die Position NMR-aktiver Kerne über ihre Larmorfrequenz zu markieren. Dies geschieht durch das Anlegen eines externen Gradienten des Magnetfelds, was durch Gleichung (6) beschrieben wird.

$$G = \frac{\partial B_z}{\partial x} \hat{i} + \frac{\partial B_z}{\partial y} \hat{j} + \frac{\partial B_z}{\partial z} \hat{k} \quad (6)$$

Dabei sind  $\hat{i}$ ,  $\hat{j}$  und  $\hat{k}$  die Einheitsvektoren in die Richtungen  $x$ ,  $y$  und  $z$ . Das vollständige externe Magnetfeld an der Position  $r$  ist dann gemäß Gleichung (7) definiert. Die Spins präze-

$$B(r) = B_0 + Gr \quad (7)$$

dieren mit einer Winkelfrequenz gemäß Gleichung (8). Der so eingestellte Phasenwinkel hängt linear sowohl von  $B(r)$  als

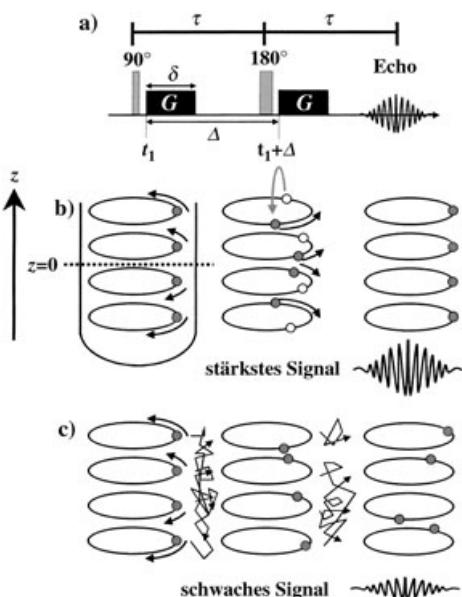
$$\omega(r) = -\gamma B(r) \quad (8)$$

auch von der Dauer des angelegten Gradienten  $\delta$  ab. Im Folgenden wollen wir annehmen, dass nur ein  $z$ -Gradient wirksam ist. Ein solcher Gradient führt zum positionsabhängigen Phasenwinkel  $\Phi(z)$  [Gl. (9)]. Daraus wird deutlich, dass

$$\Phi(z) = -\gamma B(z) \delta \quad (9)$$

der magnetische Feldgradient dazu genutzt werden kann, die  $z$ -Position von Spins zu markieren.

Die am häufigsten verwendete Methode zur Untersuchung von Diffusionsvorgängen ist das gepulste Gradienten-Spin-Echo-NMR-Experiment (pulsed gradient spin echo, PGSE),<sup>[5a]</sup> eine Variante des Hahn-Spin-Echo-Experiments.<sup>[4]</sup> Bei der PGSE-Sequenz werden zwei identische Pulsgradienten angelegt, jeweils einer pro Periode  $\tau$  der Spin-Echo-Sequenz (Abbildung 2).<sup>[5a,17a]</sup> Die PGSE-Sequenz und eine schematische Darstellung ihrer Auswirkung auf die Magnetisierung eines Ensembles von Spins sind in Abbildung 2 zu sehen. Zu Beginn des Experiments ist die Nettomagnetisierung entlang der  $z$ -Achse orientiert, sodass sich das Ensemble der Spins im thermischen Gleichgewicht befindet. Wird dann ein  $90^\circ$ -Rf-Puls eingestrahlt, rotiert die Magnetisierung von der  $z$ -Achse zur  $x$ - $y$ -Ebene. Zu einem Zeitpunkt  $t_1$  wird ein Pulsgradient der Dauer  $\delta$  und der Stärke  $G$  angelegt. Als Folge davon hat jeder Spin am Ende der ersten Periode  $\tau$  und unmittelbar vor Einstrahlung des  $180^\circ$ -Rf-Pulses eine Pha-



**Abbildung 2.** a) Die PGSE-Pulssequenz.<sup>[5a]</sup>  $G$  ist die Amplitude des Pulsgradienten,  $\delta$  seine Dauer und  $\Delta$  die Zeit vom Anfang eines Pulsgradienten bis zum Anfang des nächsten. Gezeigt ist außerdem die Auswirkung der Diffusion (c) auf die Phasenverschiebung und die Signalintensität in einem PGSE-Experiment; (b): ohne Diffusion. Bei der in (a) gezeigten Sequenz gibt der Term  $(\Delta - \delta/3)$  die Diffusionszeit wieder. Mit Genehmigung aus Lit [17a].

senverschiebung erfahren, die sich gemäß Gleichung (10)

$$\Phi_i(\tau) = \gamma B_0 \tau + \gamma G \int_{t_1}^{t_1+\delta} z_i(t) dt \quad (10)$$

beschreiben lässt. Hier entspricht der linke Term der Phasenverschiebung, die auf das statische Magnetfeld zurückzuführen ist, während der rechte Term die Phasenverschiebung beschreibt, die durch den angelegten magnetischen Pulsgradienten hervorgerufen wird.

Im nächsten Schritt wird ein  $180^\circ$ -Rf-Puls eingestrahlt, wodurch, wie in Abbildung 2 gezeigt, (Wechsel von leeren zu vollen Kreisen), das Vorzeichen der Präzession und das Vorzeichen des Phasenwinkels umgekehrt werden. Zum Zeitpunkt  $t_1 + \Delta$  wird ein zweiter Gradient, der in Dauer und Stärke mit dem ersten identisch ist, eingestrahlt. Ab diesem Moment sind zwei Szenarien denkbar: Im ersten Fall (Abbildung 2b) bewegen sich die Spins nicht entlang der  $z$ -Achse, d.h., während dieses Zeitintervalls findet keine Diffusion statt. In diesem Fall ist die Phasenverschiebung jedes Spins nach der ersten Periode  $\tau$  im Betrag identisch mit der Phasenverschiebung der Spins nach der zweiten Periode  $\tau$ . Die Wirkungen der beiden Pulsgradienten heben sich also gegenseitig auf, und alle Spins werden refokussiert. In diesem Fall wird daher das maximale Echosignal erhalten. Finden jedoch Diffusionsvorgänge statt (das zweite Szenario, Abbildung 2c), hat die Phasenverschiebung jedes Spins nach der ersten  $\tau$ -Periode einen anderen Wert als die nach der zweiten. Dieses Phänomen tritt auf, weil sich jedes diffundierende Teilchen zum Zeitpunkt  $t_1 + \Delta$  an einer anderen Position

entlang der  $z$ -Achse befindet als zum Zeitpunkt  $t_1$  und daher jedes Teilchen auch einem anderen Magnetfeld ausgesetzt ist [Gl. (7)]. In den unterschiedlichen Zeitperioden präzidieren die Spins also mit unterschiedlichen Winkelfrequenzen [Gl. (8)]. Daher wird die Verteilung der Phasenwinkel einzelner Spins zumindest teilweise aufgefächert, wodurch das Echosignal schwächer wird. Man kann daher intuitiv davon ausgehen, dass sich eine verstärkte Diffusion in einer geringeren Refokussierung der Spins und somit in einem schwächeren Echosignal widerspiegelt.

Aus den Gleichungen wird zudem deutlich, dass mit stärkeren und längeren Pulsgradienten die Refokussierung der Spinphasen und somit die Signalstärke des Echosignals der diffundierenden Spins abnimmt. Es leuchtet auch ein, dass bei Zunahme der Zeit  $\delta$  (der Dauer zwischen den Pulsgradienten) die Echosignalintensität abnimmt. So wird auch ohne eine Herleitung der vollständigen mathematischen Zusammenhänge verständlich, dass die Signalintensität durch Gleichung (11) beschrieben werden kann, wobei  $I_{(0,0)}$  und

$$I_{(2\tau,G)} = I_{(0,0)} \exp\left(-\frac{2\tau}{T_2}\right) f(\delta, G, \Delta, D) = I_{(2\tau,0)} f(\delta, G, \Delta, D) \quad (11)$$

$I_{(2\tau,0)}$  die Signal- und die Echointensität unmittelbar nach dem ersten  $90^\circ$ -Rf-Puls bzw. bei  $2\tau$  sind und  $f(\delta, G, \Delta, D)$  eine Funktion ist, die die Signalabschwächung durch Diffusionsvorgänge beschreibt.

Wird das PGSE-Experiment so durchgeführt, dass  $\tau$  konstant bleibt, ist eine Unterscheidung der  $T_2$ -Relaxationsanteile und der Diffusionsanteile möglich. Wird daher die auf  $T_2$ -Relaxation zurückzuführende Signalabschwächung durch Normalisierung herausgefiltert, verbleibt lediglich eine von der Diffusion abhängige Signalabschwächung [Gl. (12)]. Stej-

$$\frac{I_{(2\tau,G)}}{I_{(2\tau,0)}} = f(\delta, G, \Delta, D) \quad (12)$$

skal und Tanner haben gezeigt, dass für ein einzelnes, frei diffundierendes Teilchen die Signalintensität im Falle rechteckiger Pulsgradienten gemäß Gleichung (13) gegeben ist, die sich zu Gleichung (14) umformen lässt ( $\gamma$ : gyromagnetisches

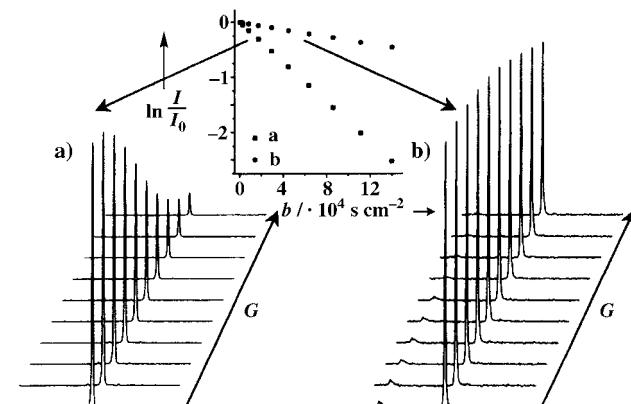
$$\begin{aligned} I_{(2\tau,G)} &= I_{(0,0)} \exp\left(-\frac{2\tau}{T_2}\right) \exp(-\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) D) \\ &= I_{(2\tau,0)} \exp(-\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) D) \end{aligned} \quad (13)$$

$$\ln\left(\frac{I_{(2\tau,G)}}{I_{(2\tau,0)}}\right) = -\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) D = -b D \quad (14)$$

Verhältnis,  $G$ : Stärke des Pulsgradienten,  $\Delta$ : Zeitspannen zwischen den Pulsgradienten,  $\delta$ : Pulsdauer,  $D$ : Diffusionskoeffizient).<sup>[5]</sup> Dabei ist  $\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3)$  der so genannte  $b$ -Wert. Im Fall einer isotropen Lösung sollte daher eine Auftragung von  $\ln(I_{(2\tau,G)}/I_{(2\tau,0)})$  gegen die  $b$ -Werte eine Gerade mit der Steigung  $-D$  ergeben. Im Prinzip kann jeder der Parameter  $\delta$ ,  $\Delta$  und  $G$  während eines Experiments verändert werden, um eine deutlichere Signalabschwächung zu erhalten. Technische Faktoren und Relaxationseigenschaften der Probe können die Variationsmöglichkeiten jedoch einschränken. Der Term

$(\Delta - \delta/3)$  wird im Allgemeinen als Diffusionszeit bezeichnet.<sup>[5b]</sup>

In Abbildung 3 sind die Ergebnisse eines PGSE-Experiments dargestellt, in dem die Stärke des Pulsgradienten unter



**Abbildung 3.** Signalabschwächung in Abhängigkeit von  $G$  bei folgenden Diffusionskoeffizienten: a)  $D = 1.81 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  und b)  $D = 0.33 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , zusammen mit den entsprechenden graphischen Auswertungen;  $\ln(I/I_0) \equiv \ln(I_{(2\tau,G)}/I_{(2\tau,0)})$ .

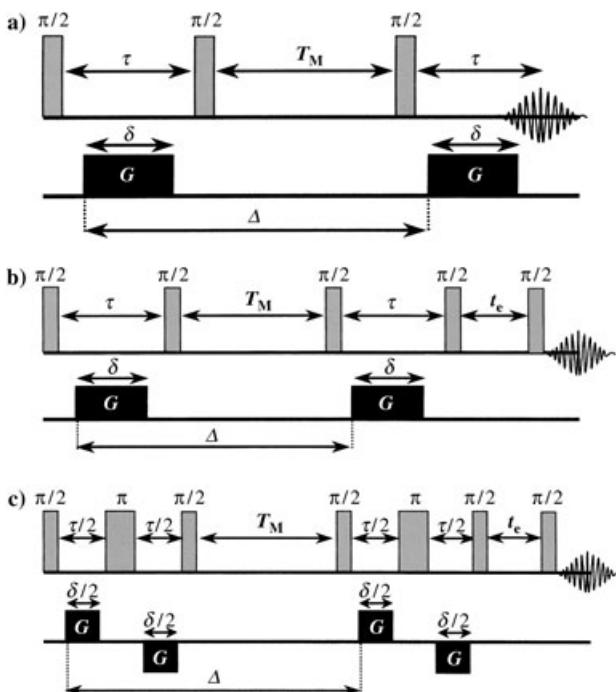
Konstanthaltung von  $\delta$  und  $\Delta$  in zehn Schritten von 0 auf ca.  $30 \text{ G cm}^{-1}$  erhöht wurde. In Abbildung 3a ist die Signalabschwächung eines kleinen Moleküls mit dem Diffusionskoeffizienten  $1.81 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  wiedergegeben, in Abbildung 3b die eines anderen Moleküls mit dem Diffusionskoeffizienten  $0.33 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . Aus diesen Abbildungen geht hervor, dass schneller diffundierende Spezies eine deutlichere Signalabschwächung zeigen. Dies resultiert in einer größeren Steigung der Geraden, die man aus der Auftragung  $\ln(I_{(2\tau,G)}/I_{(2\tau,0)})$  gegen die entsprechenden  $b$ -Werte erhält.  $\ln(I_{(2\tau,G)}/I_{(2\tau,0)})$  wird im Allgemeinen als  $\ln(I/I_0)$  abgekürzt.

### 3.2. Die Diffusionssequenz mit stimuliertem Echo

Das herkömmliche Diffusionsexperiment mit stimuliertem Echo (stimulated echo, STE) ist in Abbildung 4a gezeigt.<sup>[32]</sup> Diese Sequenz besteht aus drei  $90^\circ$ -Pulsen. Das Echo nach dem dritten Rf-Puls wurde von Hahn<sup>[4]</sup> das „stimulierte Echo“ genannt. Die Signalintensität des STE-Diffusionsexperiments ist im Falle rechteckiger Pulsgradienten durch Gleichung (15) gegeben.<sup>[32]</sup> Aus ihr geht hervor, dass sich auch

$$I_{(T_M+2\tau,G)} = (I_{(0,0)}/2) \exp\left[\left(\frac{-2\tau}{T_2}\right) - \left(\frac{T_M}{T_1}\right)\right] \exp(-\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) D) = I_{(T_M+2\tau,0)} \exp(-\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) D) \quad (15)$$

hier die auf Relaxation beruhenden Abschwächungseffekte von den durch Diffusion verursachten trennen lassen. Durch das Ausführen des STE-Diffusionsexperiments mit konstanten Zeitintervallen konnte gezeigt werden, dass die norma-



**Abbildung 4.** a) Die STE-Diffusions-Pulssequenz,<sup>[32]</sup> b) die LED-Pulssequenz<sup>[33]</sup> und c) die bipolare LED-Pulssequenz.<sup>[35a]</sup>

lierte Signalabschwächung dieselbe Abhängigkeit zeigt wie die des PGSE-Experiments.<sup>[5a,32]</sup> Beim Vergleich von Gleichung (15) mit dem Ausdruck für die Signalintensität im PGSE-Experiment [Gl. (13)] werden zwei Unterschiede zwischen den Gleichungen deutlich: Die Amplitude ist in Gleichung (15) nur halb so groß, und – im Zusammenhang mit der Diffusion der wichtigere Punkt – die relaxationsbedingte Abschwächung des stimulierten Echoes ist während des Großteils des Diffusionsintervalls (im Zeitintervall zwischen dem zweiten und dem dritten  $90^\circ$ -Puls) abhängig von  $T_1$ . Somit liegt auf der Hand, dass sich die STE-Sequenz zur Aufnahme von Diffusionsspektren von Systemen eignet, für die kurze  $T_2$ -Zeiten charakteristisch sind. Dies ist ein eindeutiger Vorteil, denn in vielen Systemen ist  $T_1$  deutlich länger als  $T_2$ . Die STE-Diffusionssequenz ermöglicht es, die Gewichtung der Diffusion auf Kosten der  $T_1$ - und nicht der  $T_2$ -Relaxationszeit zu erhöhen. Längere Diffusionszeiten zur Erhöhung der  $b$ -Werte sind nötig bei der Bestimmung niedriger Diffusionskoeffizienten oder bei einer Abhängigkeit der Diffusionskoeffizienten von der Diffusionszeit (d.h. in Fällen, in denen chemischer Austausch oder eingeschränkte Diffusion auftreten). Die STE-Diffusionssequenz ist auch besser zur Bestimmung der Diffusion in Systemen mit Spin-Spin-Kopplung geeignet.

Die PGSE- und STE-Diffusionssequenzen wurden bereits lange vor der Entwicklung der 2D-NMR-Spektroskopie eingeführt. Eine bedeutende Weiterentwicklung zu Beginn der neunziger Jahre war daher die diffusionsgewichtete Spektroskopie (diffusion ordered spectroscopy, DOSY) von Johnson, Jr. und Mitarbeitern.<sup>[33–35]</sup>

### 3.3. Das DOSY-Verfahren

DOSY bietet die Möglichkeit der „virtuellen Auf trennung“ von Verbindungen. Dazu wird in einer zweidimensionalen Darstellung auf einer Achse die chemische Verschiebung, auf der anderen der Diffusionskoeffizient aufgetragen.<sup>[34-35]</sup> Das Verfahren beruht auf longitudinaler Verzögerung von Wirbelströmen (longitudinal eddy current delay, LED) und bipolaren LED-Sequenzen. Vor kurzem wurde auch über 3D-DOSY-Experimente berichtet. Da wir hier nur eine kurze Einführung in das DOSY-Verfahren geben, seien interessierte Leser auf einen kürzlich erschienenen, ausführlichen Übersichtsartikel verwiesen.<sup>[34]</sup>

#### 3.3.1. Die grundlegenden LED und BPLED-Experimente

Eine wichtige Voraussetzung für das DOSY-Verfahren ist die Fähigkeit, einzelne Diffusionskoeffizienten zu unterscheiden, selbst wenn die Signale ähnlich großer Moleküle sich gegenseitig überlagern. Zum Erreichen dieses Ziels müssen spektrale Verzerrungen, die von elektrischen Wirbelströmen herrühren, minimiert werden. Diese Wirbelströme werden durch den Pulsgradienten hervorgerufen. Der beste Weg, die Auswirkungen der Wirbelströme zu vermeiden, ist, sie erst gar nicht auftreten zu lassen. Dies gelingt jedoch nicht immer, besonders, wenn starke Pulsgradienten in Kombination mit kurzen Verzögerungszeiten verwendet werden. Aus diesem Grund wurde die in Abbildung 4b gezeigte LED-Sequenz entwickelt,<sup>[33]</sup> die eine Modifikation der STE-Sequenz aus Abbildung 4a ist.

Wie in Abbildung 4 dargestellt, besteht der Unterschied zur reinen STE-Sequenz in zwei zusätzlichen 90°-Pulsen und einer Verzögerung  $t_e$  am Ende der Sequenz. Als Folge des vierten 90°-Pulses wird die Magnetisierung in der longitudinalen Richtung gespeichert, während die Wirbelströme abklingen. Nach der Abklingzeit  $t_e$  wird die Magnetisierung durch einen weiteren 90°-Puls abgefragt und registriert (Abbildung 4b).

Die bipolare LED-Sequenz (BPLED),<sup>[35a]</sup> eine Modifizierung des LED-Verfahrens, ist in Abbildung 4c gezeigt. Bei dieser Sequenz wird jeder Pulsgradient der ursprünglichen LED-Sequenz durch zwei Pulse unterschiedlicher Polarität ersetzt, die durch einen 180°-Puls voneinander getrennt sind. Das BPLED-Experiment hat gegenüber dem LED-Experiment zwei Vorteile: Zum einen werden dabei die Wirbelströme auf ein Minimum reduziert, zum anderen wird die effektive Stärke des Gradienten verdoppelt.<sup>[35b]</sup> Diese Sequenz ist daher in solchen Fällen nützlich, in denen zur Bestimmung relativ kleiner Diffusionskoeffizienten relativ große Gradienten benötigt werden. Aus diesen Gründen ist die BPLED-Sequenz derzeit die Sequenz der Wahl für viele DOSY-Experimente. DOSY wurde aber auch mit anderen Verfahren wie INEPT und DEPT kombiniert.<sup>[36]</sup>

#### 3.3.2. Das 2D-DOSY-Verfahren

Die Ergebnisse der oben diskutierten Diffusionsexperimente können in Form einer zweidimensionalen Matrix dargestellt werden, in der auf einer Achse die chemischen

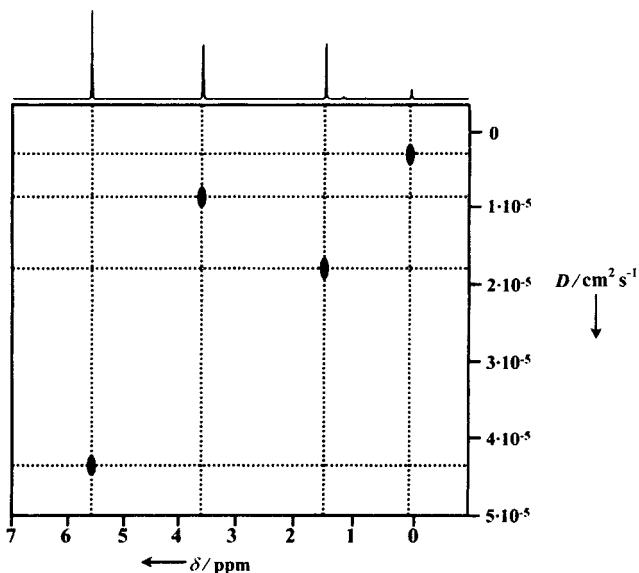


Abbildung 5. 2D-DOSY-Spektrum für vier Spezies mit unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten.

Verschiebungen, auf der anderen die Diffusionskoeffizienten aufgetragen werden (Abbildung 5). Während die Information über die chemische Verschiebung aus der Fourier-Transformation (FT) der Daten aus der Zeitdomäne erhalten wird, erhält man die Information über die Diffusion aus der inversen Laplace-Transformation (ILT) der Daten der Signalabschwächung (Abbildung 6). Das Ziel des DOSY-Verfahrens besteht darin, einzelne Spezies in einem Gemisch von Verbindungen spektroskopisch (nicht physisch) aufzutrennen. In diesem Sinne erinnert DOSY an die physische Auf trennung von Substanzgemischen mit chromatographischen Methoden. Daher wird DOSY auch als NMR-Chromatographie bezeichnet.<sup>[37]</sup> Abbildung 5 illustriert dieses Konzept. Jede horizontale Linie repräsentiert einen bestimmten Diffusionskoeffizienten; daher korrelieren alle Signale auf dieser Horizontalen mit Signalen aus der Dimension der chemischen Verschiebung und können so bestimmten Molekülen zugeordnet werden.

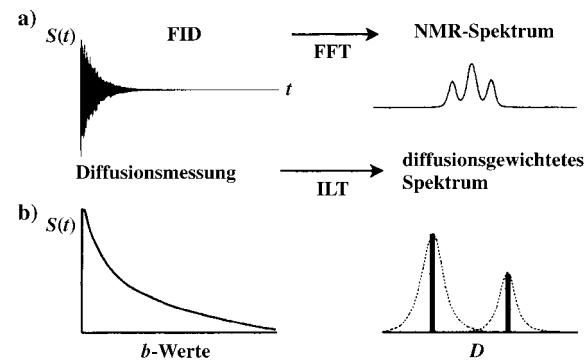


Abbildung 6. Vergleich der FFT- und ILT-Transformationen. Anders als bei der FT-Transformation gibt es bei der inversen Laplace-Transformation (ILT) nicht nur eine Lösung (in Anlehnung an [34], mit Genehmigung).

Wird bei einer bestimmten Frequenz ein Kontinuum von Diffusionskoeffizienten betrachtet, lassen sich die Datensätze  $I(s)$ , die die Abschwächung des Signals beschreiben, gemäß Gleichung (16) ausdrücken ( $\lambda = D(\Delta - \delta/3)$  und  $s = \gamma^2 \delta^2 G^2$ ).

$$I(s) = \int_0^\infty a(\lambda) \exp(-\lambda s) d\lambda \quad (16)$$

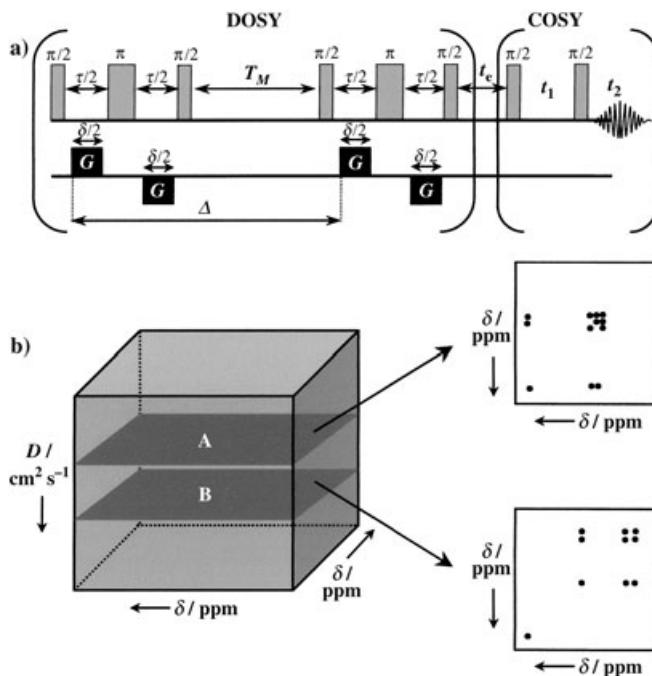
Man erkennt an dieser Gleichung, dass  $I(s)$  die Laplace-Transformation von  $a(\lambda)$  und  $a(\lambda)$  das Laplace-Spektrum der Diffusionskoeffizienten ist. Das gewünschte Spektrum  $a(\lambda)$  ist daher die inverse Laplace-Transformation der Signalabschwächungsfunktion  $I(s)$ .

Eine perfekte Transformation liefert eine Laplace-Transformation von Deltafunktionen, und daher sollte auch die inverse Transformation existieren. Die Voraussetzung dafür ist, dass es eine eindeutige Transformation gibt, wie es bei der in Abbildung 6a gezeigten FT der Fall ist. In der Realität gibt es jedoch keine perfekten Transformationen. Die gepunkteten Linien in Abbildung 6b sind die experimentellen Befunde, die diese Aussage verdeutlichen. Ein DOSY-Experiment gelingt also umso besser, je deutlicher sich die Diffusionskoeffizienten voneinander unterscheiden und je kleiner der Fehler bei der Bestimmung der Diffusionskoeffizienten ist.

### 3.3.3. Das 3D-DOSY-Verfahren

Bei 3D-DOSY-Experimenten wird eine Diffusionskoordinate zur konventionellen 2D-Auftragung hinzugefügt. Wie bei der zweidimensionalen Auftragung verringert dieses Experiment die Wahrscheinlichkeit einer Signalüberlappung, da die NMR-Signale einer Spezies nun nicht nur auf einer Achse liegen, sondern über eine Fläche verteilt sind,<sup>[6-8]</sup> und die verschiedenen Spezies entlang der dritten Achse nach ihren jeweiligen Diffusionskoeffizienten aufgetragen werden. So konnten im ersten veröffentlichten 3D-DOSY-Experiment,<sup>[38]</sup> einer DOSY-NOESY-Sequenz, die überlappenden Signale eines DNA-Duplex und eines Dinucleotids aufgelöst werden.

In Abbildung 7a ist die Pulssequenz eines DOSY-COSY-Experiments gezeigt.<sup>[39a]</sup> Diese Pulssequenz entsteht durch die Verknüpfung der BPLED- und der COSY-Sequenz mit einer Verzögerungszeit  $t_e$  zwischen den beiden Einzelsequenzen. Nach dem gleichen Muster sind andere 3D-DOSY-Sequenzen, z.B. DOSY-TOCSY<sup>[39b]</sup> und DOSY-HMQC,<sup>[39c]</sup> entwickelt worden. Abbildung 7b zeigt die schematische Darstellung der Ergebnisse einer 3D-DOSY-Sequenz, aus der deutlich wird, dass damit die „virtuelle Auf trennung“ unterschiedlicher Verbindungen gelingt. Zunächst werden die einzelnen Verbindungen spektroskopisch nach den jeweiligen Diffusionskoeffizienten aufgetrennt. Jede von der Diffusionsachse ausgehende Ebene durch den aufgespannten Würfel repräsentiert das 2D-Spektrum einer bestimmten Spezies. So zeigt Abbildung 7b zwei schematische COSY-Spektren der Verbindungen A und B mit unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten. Allerdings ist das 3D-DOSY-Verfahren wie alle dreidimensionalen Verfahren sehr zeitaufwändig. In der Tat ist dies sein gravierendster Nachteil.



**Abbildung 7.** a) Die DOSY-COSY-Pulssequenz,<sup>[38]</sup> b) eine schematische Darstellung der 3D-DOSY-Daten, die mit der Pulssequenz aus (a) erhalten wurden. Das DOSY-COSY-Experiment liefert nach der 3D-Transformation 2D-COSY-Spektren in jeder Ebene des Würfels. Jede Ebene korreliert mit einem anderen Diffusionskoeffizienten. In Anlehnung an Lit. [34], mit Genehmigung.

## 4. Anwendungen von Diffusions-NMR-Messungen in der Supramolekularen Chemie

### 4.1. Molekulare Wechselwirkungen

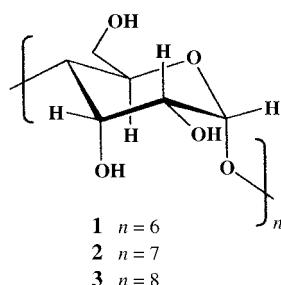
Molekulare Wechselwirkungen, die in der Supramolekularen und der Kombinatorischen Chemie so wichtig sind, wurden bereits mit vielerlei spektroskopischen Methoden untersucht.<sup>[40]</sup> NMR-spektroskopische Methoden spielen eine bedeutende Rolle in diesen Gebieten, die Diffusions-NMR-Spektroskopie wird aber bei weitem noch nicht voll genutzt, obwohl sie, wie wir glauben, ein großes Potenzial zur Charakterisierung derartiger Systeme hat. Dieses Potenzial wurde in den vergangenen Jahren durch eine wachsende Zahl von Anwendungen verdeutlicht. Einige dieser Anwendungen werden wir im Folgenden unter Betonung der chemischen Informationen, die sich aus ihnen erhalten lassen, erörtern.

#### 4.1.1 Bindungs- und Assoziationskonstanten

Die Assoziationskonstante  $K_a$  ist eine wertvolle Größe zur Quantifizierung molekularer Wechselwirkungen. In den vergangenen Jahrzehnten wurden Zehntausende dieser Konstanten durch viele unterschiedliche Methoden bestimmt und dokumentiert.<sup>[40-41]</sup> Die NMR-Spektroskopie hat sich in den vergangenen zwanzig Jahren als wichtige Methode zur Bestimmung von Assoziationskonstanten erwiesen – Diffusions-NMR-Verfahren zur Untersuchung von Wirt-Gast-Wechselwirkungen werden jedoch in den meisten entsprechenden

Übersichtsartikeln der jüngeren Zeit noch nicht einmal erwähnt.<sup>[40a,42]</sup> Nur einige wenige kürzlich erschienene Artikel berücksichtigen jeweils in kurzen Abschnitten die Anwendung der Diffusions-NMR-Spektroskopie zur Bestimmung von Assoziationskonstanten.<sup>[43]</sup>

Die Nutzung der Diffusion zur Ermittlung von Assoziationskonstanten wurde bereits vor vielen Jahren vorgeschlagen.<sup>[44]</sup> Das erste Beispiel für eine solche Anwendung wurde von Stilbs und Mitarbeitern, die mit selbst angefertigten Gradienten die Diffusions-NMR-Spektroskopie chemischer Systeme einführten, anhand eines organischen Wirt-Gast-Systems beschrieben.<sup>[45]</sup> Im Jahr 1983 bestimmten sie die  $K_a$ -Werte von Alkoholen mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -Cyclodextrinen ( $\alpha$ -CD (**1**) und  $\beta$ -CD (**2**)) in  $D_2O$ .<sup>[46]</sup> Die experimentellen Fehler der so



bestimmten Assoziationskonstanten waren in einigen Fällen relativ hoch.<sup>[46]</sup> Heute sind jedoch dank den beschriebenen Fortschritten in der Gradiententechnik solche Messungen sehr viel verlässlicher durchführbar.

Tatsächlich können Diffusions-NMR-Koeffizienten als direkte NMR-Observablen in ganz ähnlicher Weise wie die chemische Verschiebung zur Bestimmung der Stöchiometrie und der Assoziationskonstanten von Komplexen herangezogen werden.<sup>[43,44,46,47]</sup> Für den einfachen Fall eines Wirt-Gast(WG)-Komplexes der Stöchiometrie 1:1 von Wirt und Gast ist  $K_a$  durch Gleichung (17) definiert, wobei  $[W]$ ,  $[G]$

$$K_a = \frac{[HG]}{[H][G]} \quad (17)$$

und  $[WG]$  die Gleichgewichtskonzentrationen von Wirt, Gast und Wirt-Gast-Komplex sind. Ist der Austausch auf der NMR-Zeitskala langsam, lässt sich die Assoziationskonstante durch eine einfache Integration der Signale einer Lösung bekannter Konzentrationen bestimmen. In diesen Fällen können Diffusionsmessungen nur dazu verwendet werden, um die Assoziation der unterschiedlichen Spezies zu testen, numerische Werte für  $K_a$  können aber nicht erhalten werden. Ist der Austausch hingegen schnell, lässt sich auch der Wert der Assoziationskonstanten bestimmen.

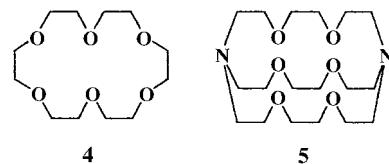
Der Grund für die Bestimmung des Anteils an assoziierten Spezies durch Diffusions-NMR-Messungen ist einfach:<sup>[43,44,46,47]</sup> Wirt und Gast haben im ungebundenen Zustand ihre charakteristischen Diffusionskoeffizienten, abhängig von ihrem Molekulargewicht und ihrer Form. Wird ein Komplex gebildet, in dem Wirt und Gast fest aneinander gebunden sind, sollte daraus ein einziger Diffusionskoeffizient resultieren.<sup>[44,46,47]</sup> Ist die Assoziation schwach oder ver-

nachlässigbar klein, bleiben die jeweiligen Diffusionskoeffizienten von Wirt und Gast unverändert. Unter der Voraussetzung eines schnellen Austauschs auf der NMR-Zeitskala ist der gemessene Diffusionskoeffizient  $D_{\text{exp.}}$  in allen anderen Fällen das gewichtete Mittel aus den Diffusionskoeffizienten der freien und der gebundenen Spezies ( $D_{\text{frei}}$  bzw.  $D_{\text{geb.}}$ ). Aus diesem Wert lässt sich daher gemäß Gleichung (18) der Anteil

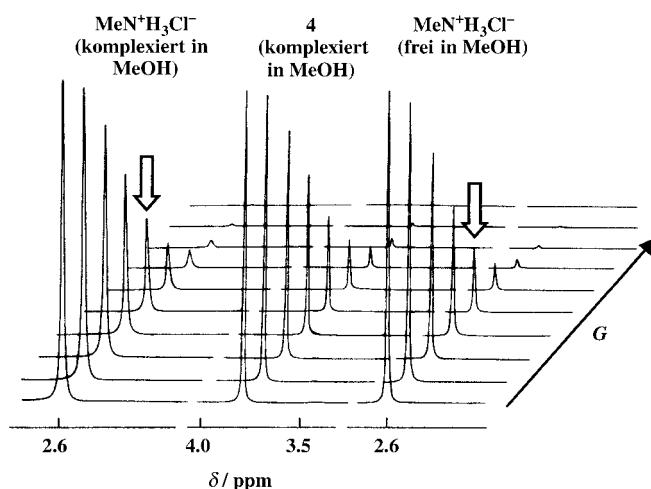
$$D_{\text{exp.}} = X D_{\text{geb.}} + (1-X) D_{\text{frei}} \quad (18)$$

an gebundener Spezies  $X$  errechnen. Die Berechnung erfolgt dabei analog der Anteilsbestimmung über chemische Verschiebungen. Im Prinzip können daher die gleichen graphischen Kurvengleichungsverfahren wie bei Titrationsexperimenten<sup>[43]</sup> zur Bestimmung der  $K_a$ -Werte aus den Differenzen der chemischen Verschiebungen verwendet werden. Der wesentliche Unterschied besteht darin, dass in vielen Fällen eine vollständige Titration zur Bestimmung der  $D_{\text{geb.}}$ -Werte des Gastes nicht nötig ist, nämlich dann, wenn sich die jeweiligen Molekulargewichte von Wirt und Gast stark unterscheiden (typischerweise hat der Gast ein sehr viel kleineres Molekulargewicht als der Wirt). In diesem Fall kann man a priori voraussagen, dass der Wert  $D_{\text{geb.}}$  des Gastes dem Wert  $D_{\text{frei}}$  des sehr viel größeren Wirts sehr ähnlich sein wird.<sup>[47]</sup>

Eines der ersten Beispiele in der Supramolekularen Chemie für den Einsatz der Diffusions-NMR-Spektroskopie bei der Bestimmung von Assoziationskonstanten an einem konventionellen hochauflösenden NMR-Spektrometer war die Bestimmung der Assoziationskonstanten von Methylammoniumchlorid mit [18]Krone-6-Ether (**4**) und dem

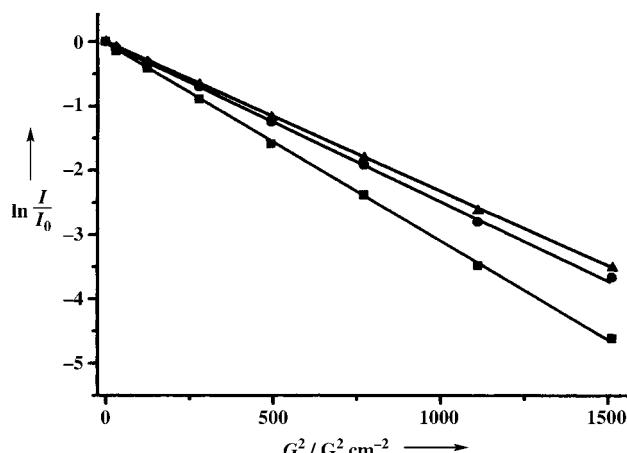


[2.2.2]Cryptanden **5** in Wasser und Methanol.<sup>[47]</sup> Abbildung 8 zeigt die Signalabschwächung von **4** und von Methylammoniumchlorid in Gegenwart und in Abwesenheit von **4** in Methanol in Abhängigkeit von der Gradientenstärke  $G$ . Daraus wird ersichtlich, dass die Signalabschwächung von Methylammoniumchlorid in Gegenwart von **4** wegen der Komplexbildung sehr viel geringer ist. Die Diffusionskoeffizienten wurden hier mithilfe der Stejskal-Tanner-Gleichung [Gl. (14)] ermittelt. In Abbildung 9 sind die normalisierten Signalverläufe von **4**, Methylammoniumchlorid und ihrem 1:1-Gemisch in  $CD_3OD$  in Abhängigkeit von  $G^2$  dargestellt. Die Diffusionskoeffizienten der Einzelverbindungen und ihres 1:1-Gemisches sowie die entsprechenden Assoziationskonstanten, die sich aus den Änderungen der Diffusionskoeffizienten ergeben, sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Im Fall der Komplexierung von Methylammoniumchlorid mit **4** erwiesen sich die Veränderungen der chemischen Verschiebungen als sehr klein – hier stellte sich die Diffusions-NMR-Spektroskopie zur Bestimmung der Assoziationskonstanten als attraktive Alternative heraus.<sup>[47]</sup>



**Abbildung 8.** Die Signalabschwächung in Stejskal-Tanner-Diffusionsexperimenten mit einer 50 mM Lösung von **4** und  $\text{MeNH}_3^+\text{Cl}^-$  (1:1) in  $\text{CD}_3\text{OD}$  (Mitte und links) und mit einer 50 mM  $\text{CD}_3\text{OD}$ -Lösung von freiem  $\text{MeNH}_3^+\text{Cl}^-$  (rechts). Die Pfeile markieren die veränderten Intensitäten des Tetramethylammoniumsignals in Gegenwart und in Abwesenheit von **4**. Mit Genehmigung aus Lit. [47].

Prinzipiell zeigt die Bestimmung von Assoziationskonstanten mithilfe von Diffusions-NMR-Messungen die Vorteile und Nachteile, die bei jedem NMR-spektroskopischen Verfahren festgestellt werden.<sup>[43]</sup> Einerseits wird dieses Verfahren daher gegenüber UV- oder Fluoreszenzmethoden weniger durch Verunreinigungen beeinträchtigt,<sup>[48]</sup> andererseits lassen sich mit der Diffusions-NMR-Spektroskopie auf direkte Weise nur Assoziationskonstanten mit Werten im Bereich von  $10\text{--}10^5 \text{ M}^{-1}$  bestimmen. Einer der Hauptvorteile der Diffusions-NMR-Spektroskopie liegt darin, dass Veränderungen der chemischen Verschiebung aufgrund von Säure-Base-Reaktionen nicht als Bindungsprozess fehlinterpretiert werden können.<sup>[47]</sup> Damit ist eine der Hauptfehlerquellen bei



**Abbildung 9.** Normalisierte Signalabschwächung in Abhängigkeit von  $G^2$  einer Probe aus Methylammoniumchlorid in  $\text{CD}_3\text{OD}$  sowie einer Mischung aus Methylammoniumchlorid und **4** (1:1) in 50 mM  $\text{CD}_3\text{OD}$ -Lösung. ■:  $\text{MeNH}_3^+\text{Cl}^-$  (frei), ●:  $\text{MeNH}_3^+\text{Cl}^-$  (komplexiert), ▲: **4**.

NMR-Titrationen von vornherein ausgeschlossen, denn Protonentransfers haben einen deutlich geringeren Einfluss auf die Diffusionskoeffizienten als auf die chemischen Verschiebungen.<sup>[47]</sup> So gelang die Bestimmung der Assoziationskonstanten von Methylammoniumchlorid mit **5**, wo **5** wie erwartet partiell protoniert vorliegt.

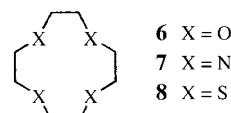
Da die Diffusion eines Moleküls von der effektiven Molekülgröße abhängt, die sich wiederum mit jeder Änderung der intermolekularen Wechselwirkungen verändern sollte, ist klar, dass zwischen Diffusionskoeffizient, Aggregation und intermolekularer Wechselwirkung ein unmittelbarer Zusammenhang besteht. Das bedeutet, dass nur bei Diffusionsmessungen die beobachtbaren Parameter des gebundenen Gastes a priori vorhergesagt werden können, ohne dass eine vollständige Titration erfolgen muss. Die Verwendung des Diffusionskoeffizienten als Parameter zur Bestimmung der Assoziationskonstanten ist hauptsächlich dann limitiert, wenn die wechselwirkenden Spezies im gebundenen und freien Zustand ähnliche Diffusionskoeffizienten aufweisen. In diesen Fällen ist die Methode nicht empfindlich oder sogar unpraktikabel.

Besonders interessante Wirt-Gast-Systeme sind solche, in denen der Gast wiederum als Wirt für einen noch kleineren Gast dienen kann. Ein frühes Beispiel dafür sind die von Vögtle und Müller bereits 1979 beschriebenen makrocyclischen Komplexe von  $\gamma$ -CD (**3**).<sup>[49]</sup> Diese Systeme, deren Festkörperstrukturen durch Röntgenstrukturanalyse untersucht worden sind,<sup>[50,51]</sup> konnten vor einigen Jahren auch in Lösung mithilfe von Diffusions-NMR-Messungen analysiert werden.<sup>[52]</sup> Dabei wurde die Komplexierung von [12]Krone-4 (**6**), Cyclen (**7**) und 1,4,7,10-Tetra-thiacyclododecan (**8**)

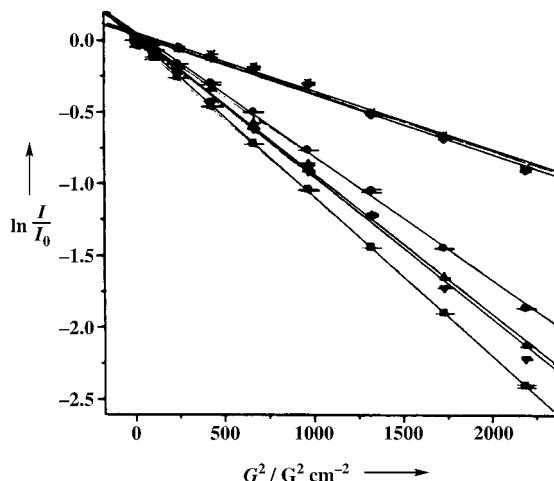
**Tabelle 1:** Diffusionskoeffizienten  $D$  und Logarithmen der Assoziationskonstanten  $K_a$  des Methylammoniumkomplexes von [18]Krone-6 (**4**) und dem [2.2.2] Cryptanden **5**.<sup>[a][47]</sup>

Substanz	Lm.	T/K	$D_m [\text{10}^{-5} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}]$	$D_{\text{MeNH}_3^+} [\text{10}^{-5} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}]$	$\lg K_a [\text{M}^{-1}]$
4 + $\text{MeNH}_3^+$	$\text{D}_2\text{O}$	298	$0.55 \pm 0.01$	$1.23 \pm 0.02$	0.67
4	$\text{D}_2\text{O}$	298	$0.56 \pm 0.01$	—	
$\text{MeNH}_3^+$	$\text{D}_2\text{O}$	298	—	$1.36 \pm 0.01$	
4 + $\text{MeNH}_3^+$	$\text{CD}_3\text{OD}$	298	$1.34 \pm 0.01$	$1.37 \pm 0.02$	3.69
4	$\text{CD}_3\text{OD}$	298	$1.35 \pm 0.02$	—	
$\text{MeNH}_3^+$	$\text{CD}_3\text{OD}$	298	—	$1.70 \pm 0.01$	
5 + $\text{MeNH}_3^+$	$\text{D}_2\text{O}$	298	$0.46 \pm 0.02$	$0.95 \pm 0.04$	1.53
5	$\text{D}_2\text{O}$	298	$0.45 \pm 0.04$	—	
$\text{MeNH}_3^+$	$\text{D}_2\text{O}$	298	—	$1.38 \pm 0.01$	
5 + $\text{MeNH}_3^+$	$\text{D}_2\text{O}$	277	$0.21 \pm 0.01$	$0.59 \pm 0.01$	1.67
5	$\text{D}_2\text{O}$	277	$0.20 \pm 0.01$	—	
$\text{MeNH}_3^+$	$\text{D}_2\text{O}$	277	—	$0.72 \pm 0.01$	
5 + $\text{MeNH}_3^+$	$\text{CD}_3\text{OD}$	298	$1.14 \pm 0.03$	$1.14 \pm 0.03$	> 4
$\text{MeNH}_3^+$	$\text{CD}_3\text{OD}$	298	—	$1.64 \pm 0.01$	
5 + $\text{MeNH}_3^+$	$\text{CD}_3\text{OD}$	213	$0.28 \pm 0.01$	$0.29 \pm 0.01$	> 4
$\text{MeNH}_3^+$	$\text{CD}_3\text{OD}$	213	—	$0.42 \pm 0.06$	

[a] Die aufgeführten Werte sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei Messungen. Lm: Lösungsmittel, m: Makrocyclus.



mit  $\gamma$ -CD in Gegenwart und in Abwesenheit von Salzen in unterschiedlichen Lösungsmitteln sowie in  $D_2O$  bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht.<sup>[52]</sup> In diesen Systemen mit sehr kleinen Veränderungen der  $^1H$ -chemischen Verschiebungen ermöglichte der Unterschied in den Molekular-



**Abbildung 10.** Normalisierte Signalabschwächung in Abhängigkeit vom Quadrat der Gradientenstärke ( $G^2$ ) in  $D_2O$ ; ■: 6, ●: 6 (+ 3), ▲: 6 (+ LiOAc + 3), ▽: 6 (+ LiOAc), ◆: 3 (+ LiOAc + 6), \*: 3 (+ 6). Alle Messungen wurden bei 298 K und  $pD = 7.6$  durchgeführt. In Anlehnung an Lit. [52], mit Genehmigung.

gewichten von  $\gamma$ -CD (**3**) und den Makrocyclen eine genaue Bestimmung der kleinen Assoziationskonstanten der relativ schwachen Assoziation.<sup>[52]</sup> In Abbildung 10 ist als Beispiel die normalisierte Signalabschwächung von **6** vor und nach der Zugabe von  $\gamma$ -CD (**3**) sowie mit und ohne Zusatz von Lithiumacetat (LiOAc) dargestellt. Die Diffusionskoeffizienten dieser Systeme und die daraus ermittelten Assoziationskonstanten sind in Tabelle 2 gegenübergestellt. Interessanterweise nahmen in Gegenwart von Alkalosalzen die Assoziationskonstanten der Komplexe aus den Makrocyclen und  $\gamma$ -CD ab, während der pH-Wert so gut wie keine Auswirkung auf die Assoziationskonstanten hatte. Dies deutet darauf hin, dass Wasserstoffbrücken kein dominierender Faktor bei der Komplexbildung zwischen Wirt und Gast sind.<sup>[52]</sup> Auch hydrophobe Wechselwirkungen, die bei vielen Cyclodextrinkomplexen mit organischen Gästen in Wasser die Haupttriebkraft für die Komplexbildung sind, spielen in diesem speziellen Fall keine Rolle.<sup>[52,53]</sup> In den hier untersuchten Systemen sind die Änderungen der chemischen Verschiebungen recht klein. Zudem beeinflussen sowohl die Kationen als auch  $\gamma$ -CD in gewissem Maße die chemischen Verschiebungen der Makrocyclen, was die Bestimmung der Assoziationskonstanten auf der Basis dieses Parameters sehr schwierig macht. Dies ist also ein gutes Beispiel für eine vorteilhafte Verwendung von Diffusionskoeffizienten zur simultanen Abschätzung von Wechselwirkungen zwischen mehreren Spezies.

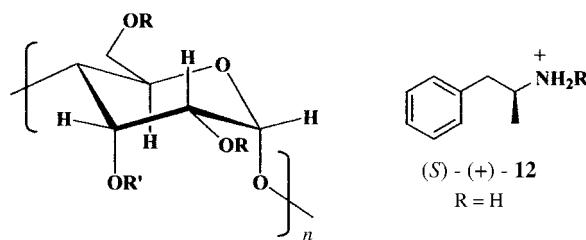
Gafni et al. haben zum ersten Mal gezeigt, dass mithilfe von Diffusions-NMR-Messungen zwischen den Enantiomeren lipphiler Cyclodextine unterschieden werden kann.<sup>[54]</sup>

**Tabelle 2:** Diffusionskoeffizienten  $D$  und berechnete Assoziationskonstanten  $K_a$  der  $\gamma$ -CD:Makrocyclus-, der Makrocyclus:Salz- und der Dreikomponenten-Systeme bei 298 K. [a],[b][52]

System	$D_3$ [ $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$ ]	$D_m$ [ $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$ ]	$D_{\text{OAc}}$ [ $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$ ]	$K_a$ [ $\text{M}^{-1}$ ]
<b>6+3+LiOAc</b>	$0.27 \pm 0.01$	$0.56 \pm 0.01$	$0.86 \pm 0.02$	11
<b>6+3</b>	$0.27 \pm 0.01$	$0.48 \pm 0.01$	—	187
<b>6</b>	—	$0.68 \pm 0.02$	—	
<b>3</b>	$0.32 \pm 0.02$	—	—	
LiOAc	—	—	$1.02 \pm 0.01$	
<b>6+LiOAc</b>	—	$0.60 \pm 0.01$	$0.90 \pm 0.01$	40
<b>7+3+LiOAc</b>	$0.30 \pm 0.01$	$0.53 \pm 0.01$	$0.96 \pm 0.01$	19
<b>7+3</b>	$0.29 \pm 0.01$	$0.42 \pm 0.01$	—	165
<b>7</b>	—	$0.60 \pm 0.01$	—	
<b>3</b>	$0.32 \pm 0.02$	—	—	
LiOAc	—	—	$1.09 \pm 0.01$	
<b>7+LiOAc</b>	—	$0.58 \pm 0.01$	$0.96 \pm 0.01$	29
<b>8+3+LiOAc</b>	$0.19 \pm 0.02$	$0.36 \pm 0.02$	$0.82 \pm 0.01$	21
<b>8+3</b>	$0.19 \pm 0.01$	$0.34 \pm 0.02$	—	69
<b>8</b>	—	$0.41 \pm 0.02$	—	
<b>3</b>	$0.24 \pm 0.02$	—	—	
LiOAc	—	—	$0.87 \pm 0.02$	
<b>8+LiOAc</b>	—	$0.39 \pm 0.01$	$0.84 \pm 0.01$	10

[a] Die aufgeführten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus drei Messungen. [b] Die **6** und **7** wurden in  $D_2O$ -Lösung bei  $pD = 7.6$  vermessen. **8** wurde in [D6]DMSO bestimmt. m: Makrocyclus.

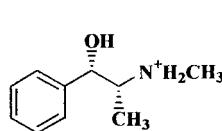
Sie konnten zeigen, dass das  $\alpha$ -Cyclodextrinderivat **9** und sein  $\beta$ -Analogon (**10**) enantioselektiv Amphetamine (**12**), Ephedrin (**13**) und Propranolol (**14**) binden. Der höchste  $K_{(+)} / K_{(-)}$ -Wert wurde bei der Bindung von Propranolol (**14**) mit **10** beobachtet. Wurde die 3-Position von **9** oder **10** wie in **11** gezeigt blockiert, wurde bei der Komplexbildung interessanterweise keine Enantioselektivität mehr beobachtet.<sup>[54]</sup> In diesen Systemen wurden die Veränderungen sowohl der chemischen Verschiebungen als auch der  $T_1$ -Relaxationszeiten bestimmt. Die Veränderungen dieser Parameter zeigten im Verlauf der Komplexbildung unterschiedliche Tendenzen, daher erwiesen sich auch hier die Diffusionskoeffizienten als verlässlichster Parameter zur Bestimmung der Assoziationskonstanten dieser Systeme.



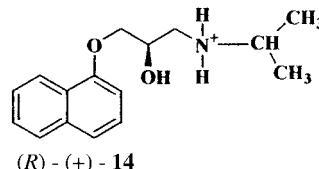
**9:**  $R = C_{12}H_{25}$   $R' = H$   $n = 6$

**10:**  $R = C_{12}H_{25}$   $R' = H$   $n = 7$

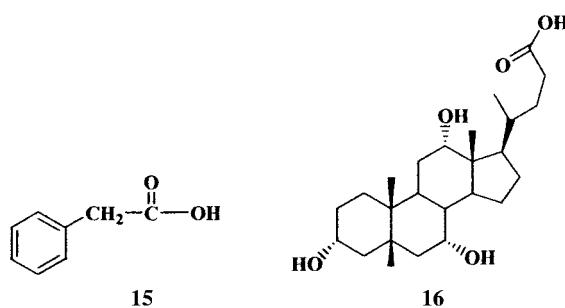
**11:**  $R = C_{12}H_{25}$   $R' = CH_3$  oder  $C_8H_{17}$   $n = 7$



(1S,2R)-(+)-**13**



In den meisten Wirt-Gast-Systemen ist der Wirt sehr viel größer als der Gast, was wie bereits erwähnt dazu führt, dass  $D_{\text{geb.}}$  nicht stark von  $D_{\text{frei}}$  abweicht. Daher kann in einigen (nicht jedoch in allen) Fällen auf eine vollständige Titration von Wirt mit Gast verzichtet werden. Diese Näherung sollte umso zutreffender sein, je stärker sich die Größen der beteiligten Moleküle unterscheiden. Vor kurzem prüften Cameron und Fielding diese Annahme sowohl auf theoretischer als auch auf experimenteller Basis.<sup>[55]</sup> Sie konnten zeigen, dass bei der Komplexbildung von  $\beta$ -CD (Molekulargewicht  $M_w = 1135 \text{ g mol}^{-1}$ ) mit Phenylsuccinsäure (**15**,  $M_w = 136 \text{ g mol}^{-1}$ ) mit  $K_a = 1800 \pm 100$  der Diffusionskoeffizient von



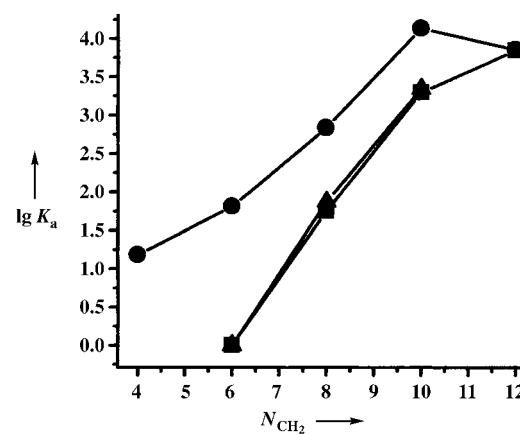
$\beta$ -CD durch Zugabe von **15** zwar geringfügig kleiner wurde, die Änderung aber noch im Bereich der Fehlertgrenzen der Diffusionsmessung lag. Wurden die Versuche hingegen mit Cholsäure (**16**,  $M_w = 420 \text{ g mol}^{-1}$ ) durchgeführt, wurden nach Zugabe von **16** sehr viel deutlichere Veränderungen von  $D_{\text{Wirt}}$  beobachtet.  $D_{\text{Komplex}}$  ist also in diesem Fall von  $D_{\text{Wirt}}$  verschieden, und somit wird eine vollständige Titration oder zumindest eine punktuelle Messung bei mehreren Mischungsverhältnissen zur Bestimmung der Bindungskurve dieses Komplexes notwendig. Diese Ergebnisse legen nahe, dass bei einem geringen Größenunterschied der beiden Bindungspartner eines Wirt-Gast-Systems das Ergebnis eines einzelnen Diffusions-NMR-Experiments mit Vorsicht zu interpretieren ist.<sup>[43,51,55]</sup>

Kürzlich wurden Diffusionsmessungen zur Untersuchung der Wechselwirkungen von  $\alpha$ -CD-basierten Pseudorotaxanen mit Diaminoalkanen (**17**) herangezogen.<sup>[56a]</sup> Die Motivation dieser Studie war unter anderem die Frage, ob sich die Pseudorotaxane durch Protonierung in Rotaxane umwandeln



- |                     |                                     |
|---------------------|-------------------------------------|
| <b>17a:</b> $n = 1$ | <b>17f:</b> $17a \cdot 2\text{HCl}$ |
| <b>17b:</b> $n = 2$ | <b>17g:</b> $17b \cdot 2\text{HCl}$ |
| <b>17c:</b> $n = 3$ | <b>17h:</b> $17c \cdot 2\text{HCl}$ |
| <b>17d:</b> $n = 4$ | <b>17i:</b> $17d \cdot 2\text{HCl}$ |
| <b>17e:</b> $n = 5$ | <b>17j:</b> $17e \cdot 2\text{HCl}$ |

lassen.<sup>[57]</sup> Die Assoziationskonstanten der Diaminoalkane mussten dazu vor und nach der Protonierung ermittelt werden.<sup>[56a]</sup> Die Änderung der chemischen Verschiebung bei der Bildung der Pseudorotaxane war gering, und zudem sollte verhindert werden, dass die veränderte chemische Verschiebung aufgrund der Protonierung der Amine fälschlicherweise als Bindungsphänomen interpretiert wurde – daher wurden die Bestimmungen mithilfe von Diffusionsmessungen und nicht von NMR-Titrationen durchgeführt. Einige repräsentative Koeffizienten dieser Systeme und die ermittelten  $\lg K_a$ -Werte sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Nur im Fall des letzten Eintrags, der Bildung eines Pseudorotaxans aus  $\alpha$ -CD mit **17e**, wurde eine geringe Auswirkung auf den Diffusionskoeffizienten von **1** beobachtet. Wie in Abbildung 11 darge-



**Abbildung 11.** Aus Diffusionsdaten erhaltene  $\lg K_a$ -Werte in Abhängigkeit von der Zahl  $N_{\text{CH}_2}$  der  $\text{CH}_2$ -Gruppen in den  $\alpha$ -CD-Pseudorotaxanen aus  $\alpha, \omega$ -Diaminoalkanen (**17a–e**) (●) sowie ihren entsprechenden Disalzen vor (▲) und nach Zugabe von  $\text{Cl}^-$  (■). Die Experimente wurden an ca. 3 mM Proben mit einer Messzeit von 20 Minuten durchgeführt. Mit Genehmigung aus Lit. [56a].

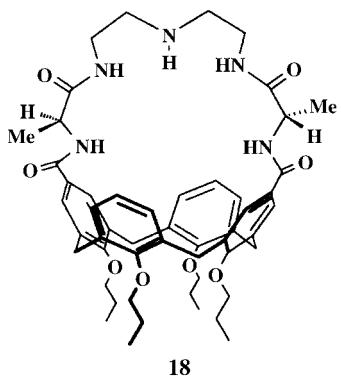
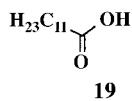
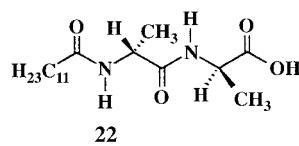
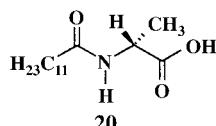
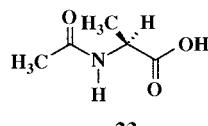
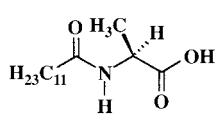
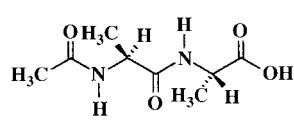
**Tabelle 3:** Diffusionskoeffizienten  $D$  und die berechneten  $\lg K_a$ -Werte des Wirtes  $\alpha$ -CD sowie der Gäste **17a–e** in  $\text{D}_2\text{O}$  bei 298 K.<sup>[56a]</sup>

System	$D_{\text{Amin}} [\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}]$	$D_{\text{CD}} [\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}]$	$D_{\text{Wasser}} [\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}]$	$X^{[a]}$	$\lg K_a [\text{M}^{-1}]$
$\alpha$ -CD [2.8 mM]		$0.30 \pm 0.01$	$1.96 \pm 0.01$	/	/
<b>17a</b>	$0.76 \pm 0.01$	/	$1.97 \pm 0.01$	/	/
<b>17a:</b> $\alpha$ -CD (1:2.9)	$0.71 \pm 0.01$	$0.29 \pm 0.01$	$1.97 \pm 0.01$	$0.11 \pm 0.03$	$1.18 \pm 0.14$
<b>17b</b>	$0.65 \pm 0.01$	/	$1.96 \pm 0.01$	/	/
<b>17b:</b> $\alpha$ -CD (1:5.1)	$0.49 \pm 0.02$	$0.30 \pm 0.01$	$1.96 \pm 0.01$	$0.46 \pm 0.04$	$1.81 \pm 0.07$
<b>17c</b>	$0.60 \pm 0.01$	/	$1.96 \pm 0.01$	/	/
<b>17c:</b> $\alpha$ -CD (1:0.8)	$0.47 \pm 0.01$	$0.29 \pm 0.01$	$1.95 \pm 0.01$	$0.42 \pm 0.05$	$2.83 \pm 0.21$
<b>17d</b>	$0.55 \pm 0.01$	/	$1.96 \pm 0.01$	/	/
<b>17d:</b> $\alpha$ -CD (1:0.7)	$0.38 \pm 0.01$	$0.29 \pm 0.01$	$1.96 \pm 0.01$	$0.65 \pm 0.06$	$4.13 \pm 0.30$
<b>17e</b>	$0.50 \pm 0.01$	/	$1.94 \pm 0.01$	/	/
<b>17e:</b> $\alpha$ -CD (1:0.9)	$0.32 \pm 0.01$	$0.26 \pm 0.01$	$1.94 \pm 0.01$	$0.75 \pm 0.10$	$3.85 \pm 0.27$

[a]  $X$ : gebundene Molfraktion.

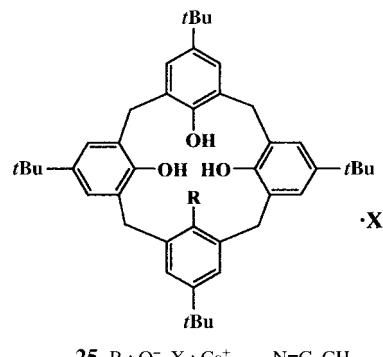
stellte, ergab sich eine Korrelation zwischen der Länge der Diaminoalkane und den Assoziationskonstanten ihrer Komplexe mit **1**.<sup>[56a]</sup> Es zeigte sich, dass eine Protonierung die Stabilität der Pseudorotaxane mit kürzeren Diaminoalkanen deutlich verringert. Nur für das längste hier untersuchte Diaminoalkan, das Diaminododekan **17e**, wurden identische Assoziationskonstanten für die Komplexe mit dem Diaminoalkan selbst und mit seiner Doppelsalzform gefunden.

Das einfache PGSE-Verfahren wurde auch bei der Untersuchung der Bindungsaffinität des Peptidocalixarens **18**,<sup>[58]</sup>

**18****19****22****20****23****21****24**

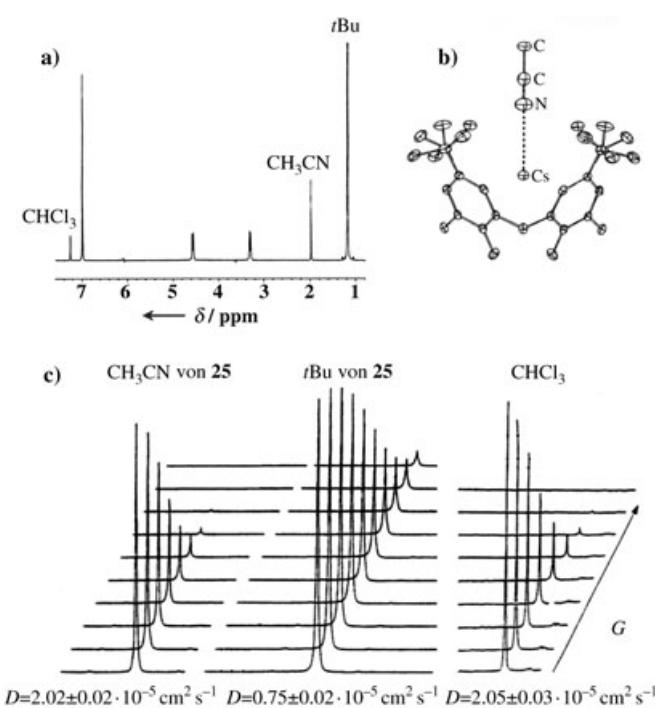
rig durchzuführen oder lieferten inkonsistente, mit relativ großen Fehlern behaftete Ergebnisse. Daher wurde auch in diesem Fall die Diffusions-NMR-Spektroskopie eingesetzt. Aus den Veränderungen der Diffusionskoeffizienten der Gastmoleküle nach Zugabe von **18** in unterschiedlichen Lösungsmitteln ergab sich, dass **18** in  $\text{CDCl}_3$  mit Laurinsäure (**19**) mäßig starke Komplexe bildet ( $\lg K_a = 2.7 \pm 0.2$ ).<sup>[58]</sup> Mit Gästen hingegen, die einen Alaninrest tragen, wurden in  $\text{CDCl}_3$  stärkere Komplexe gebildet ( $\lg K_a \sim 4.0$ ). In mit Wasser kompetitiven Lösungsmitteln ergaben sich niedrigere  $K_a$ -Werte, die bei Komplexen mit den alaninhaltigen Gästen **20**, **23** und **24** wiederum kleiner als beim Komplex aus **18** und **19** waren. Die so erhaltenen  $K_a$ -Werte sind in Einklang mit der bedeutenden Rolle von Wasserstoffbrücken bei der Komplexbildung in Chloroform. Mit diesen Studien gelang erstmals die quantitative Bestimmung der Bindungskonstanten von **18** mit mehreren Dipeptiden, deren Bestimmung zuvor durch klassische Methoden der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie nicht möglich gewesen war. Dies belegt, dass Diffusions-NMR-Messungen den Standard-NMR-Verfahren überlegen sein können, wenn die Komplexbildung mit Protonenaustausch einhergeht.

Anhand des Calix[4]aren-Cs-CH<sub>3</sub>CN-Komplexes **25** in  $\text{CDCl}_3$  wurde eindrucksvoll unter Beweis gestellt, dass es

**25** R : O<sup>-</sup> X : Cs<sup>+</sup> .... N≡C-CH<sub>3</sub>

einem von Ungaro und Mitarbeitern entwickelten Vancomycin-Mimetikum, eingesetzt.<sup>[59]</sup> Vancomycin ist ein wichtiges Antibiotikum, das durch Anbindung an die terminale D-Alanyl-D-Alanin-Sequenz der Mucopeptidvorstufen der bakteriellen Zellwand wirkt.<sup>[60]</sup> Vor einiger Zeit wurde jedoch über das Auftreten von Resistenzen gegen dieses Antibiotikum berichtet, die zu einem Bedarf an synthetischen Vancomycin-Analoga führten.<sup>[61]</sup> Da **18**, ebenso wie Vancomycin selbst, mehrere unterschiedliche funktionelle Gruppen trägt, kann seine Wechselwirkung mit der D-Alanyl-D-Alanin-Seitenkette durch eine Überlagerung elektrostatischer und/oder hydrophober Wechselwirkungen zustande kommen, wobei möglicherweise auch  $\pi$ -Wasserstoff- und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrücken eine Rolle spielen. Die Assoziationskonstanten mussten daher in unterschiedlichen Lösungsmitteln sowie mit Gästen mit und ohne D-Alanyl-D-Alanin-Seitenkette (**19–24**) ermittelt werden. NMR-Titrationen waren an diesem System entweder schwie-

möglich ist, über die schnelle, qualitative Bestimmung der Diffusionskoeffizienten die Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen Molekülen zu untersuchen.<sup>[62]</sup> Bei diesem Komplex, dessen Festkörperstruktur ein an das Caesium koordiniertes CH<sub>3</sub>CN-Molekül zeigt, ging man aufgrund seines Cs-NMR-Spektrums in Lösung davon aus, dass die Festkörperstruktur auch in Lösung erhalten bleibt.<sup>[63]</sup> Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der isolierten Kristalle von **25** sowie eine Seitenansicht seiner Struktur im Kristall sind in Abbildung 12a bzw. b aufgeführt. Abbildung 12c zeigt die Abschwächung der *tert*-Butylsignale von **25**, der CH<sub>3</sub>CN-Moleküle aus den gelösten Kristallen sowie des Lösungsmittels CHCl<sub>3</sub>. Aus dieser Abbildung geht eindeutig hervor, dass die CH<sub>3</sub>CN-Moleküle einen deutlich größeren Diffusionskoeffizienten haben als der Komplex – einen solchen Befund würde man erwarten, wenn zwischen dem kleinen CH<sub>3</sub>CN-Molekül und dem viel größeren Komplex keine Wechselwirkungen auftreten. Der Vergleich des Diffusionskoeffizienten von CH<sub>3</sub>CN aus dem gelösten Kristall von **25** mit dem von reinem



**Abbildung 12.** a) Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (500 MHz) von **25** (kristallisiert aus  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) in einer  $\text{CDCl}_3$ -Lösung; b) Seitenansicht der Struktur von **25** im Kristall;<sup>[63]</sup> c) Signalabschwächungen der *tert*-Butylgruppe von **25**, von  $\text{CH}_3\text{CN}$  aus dem Komplex **25** sowie von  $\text{CHCl}_3$  im Verlauf eines PGSE-Experiments in Abhängigkeit von der Gradientenstärke (*G*), Diffusionskoeffizienten *D* für jedes Signal.<sup>[62]</sup>

$\text{CH}_3\text{CN}$  in  $\text{CDCl}_3$  ( $2.01 \pm 0.02 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$ ) führt zu der Schlussfolgerung, dass wie erwartet zwischen  $\text{CH}_3\text{CN}$  und dem Komplex in  $\text{CHCl}_3$  keine nennenswerte Wechselwirkung stattfindet.<sup>[62]</sup> Tatsächlich liefert Abbildung 12c bereits beim bloßen Anschauen eine eindeutige Visualisierung für die nicht vorhandene Wechselwirkung. Es muss betont werden, dass das gesamte in Abbildung 12c dargestellte Diffusionsexperiment, das einen eindeutigen Beweis für die nicht vorhandene Wechselwirkung zwischen  $\text{CH}_3\text{CN}$  und dem anderen Teil von Komplex **25** liefert, in einer Messzeit von nur 10 Minuten aufgenommen wurde. Allein die Aufnahme eines  $^{133}\text{Cs}$ -NMR-Spektrums, mit der man sicherstellen wollte, dass der erwartete Komplex **25** tatsächlich gebildet worden war, dauerte dagegen mehrere Stunden.

Die Bestimmung von Assoziationskonstanten mittels Diffusions-NMR-Spektroskopie basiert auf dem schnellen Austausch zwischen der freien und der gebundenen Form des Gastes. Es gibt jedoch auch Fälle, bei denen die Diffusions-NMR-Spektroskopie bei einem langsamen Austausch zum Einsatz kommt – z. B. bei Untersuchungen von molekularen Kapseln und von Einschlussphänomenen, die im folgenden Abschnitt erläutert werden.

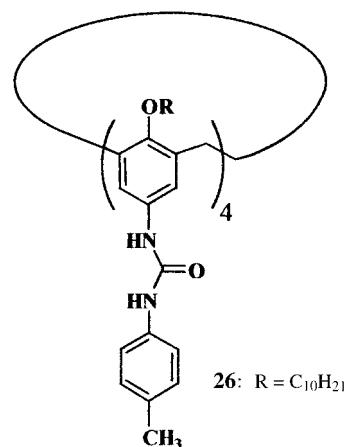
#### 4.1.2. Verkapselung und Molekulare Kapseln

Molekulare Kapseln im Allgemeinen,<sup>[64,65]</sup> besonders aber solche, die durch Selbstorganisationsprozesse erhalten wurden, sind ein faszinierendes Forschungsgebiet.<sup>[64–66]</sup> Molekulare Kapseln sind Moleküle mit Hohlräumen, in denen

kleinere Moleküle aufgenommen und somit von der unmittelbaren Umgebung abgekapselt werden können. Molekulare Kapseln können als Mikroreaktoren betrachtet werden,<sup>[67]</sup> und in der Tat sind in den vergangenen Jahren solche Systeme bereits zur Stabilisierung reaktiver Zwischenstufen<sup>[67a]</sup> und zur Beschleunigung von Reaktionsgeschwindigkeiten eingesetzt worden.<sup>[67b,c]</sup>

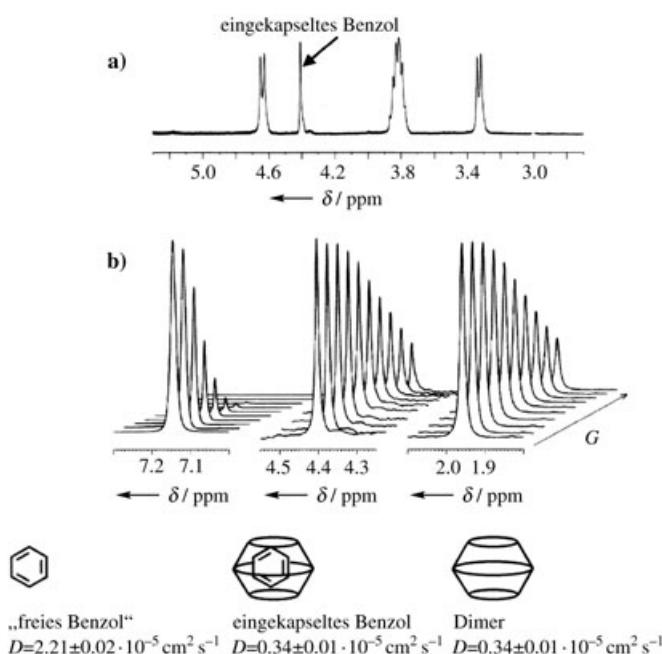
Der Diffusionskoeffizient sollte ein nützlicher Parameter für die Untersuchung von Verkapselungsphänomenen sein,<sup>[68]</sup> da der eingeschlossene Gast in aller Regel ein viel kleineres Molekül als die Kapsel ist und so die freien Gastmoleküle einen sehr viel größeren Diffusionskoeffizienten haben sollten als die eingeschlossenen Moleküle, die lediglich in langsamem Austausch mit der Umgebung stehen. Diese sollten denselben Diffusionskoeffizienten wie die Kapsel haben, da Kapsel und eingeschlossenes Molekül wie eine Einheit diffundieren.<sup>[68]</sup>

Kürzlich wurde der Einschluss von Benzol in das dimere Tetraharnstoffcalix[4]aren **26-26** untersucht.<sup>[68]</sup> In Abbil-



dung 13a ist ein Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Dimers **26-26** in einem 80:20-Gemisch aus  $\text{C}_6\text{H}_6$  und  $\text{C}_6\text{D}_6$  gezeigt. Man erkennt ein Signal bei 4.4 ppm, das dem eingeschlossenen Benzol zugeordnet wurde. Abbildung 13b zeigt die Abschwächung dieses Signals, die des Signals von „freiem“ Benzol (bei  $\delta = 7.15$  ppm) sowie die eines charakteristischen Signals des Dimers (bei  $\delta = 1.95$  ppm) gegen den Gradienten *G*. Aus dieser Abbildung wird deutlich, dass dem Signal bei  $\delta = 4.4$  ppm ein sehr viel niedrigerer Diffusionskoeffizient zuzuordnen ist als dem von freiem Benzol. Tatsächlich ist der aus diesem Signal berechnete Diffusionskoeffizient ( $0.34 \pm 0.01 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$ ) genauso groß wie der des Dimers.<sup>[68]</sup> Was belegt, dass das eingeschlossene Benzol und das Dimer wie erwartet als molekulare Einheit diffundieren. Aus Titrationsexperimenten, in denen DMSO zu einer Benzollösung von **26-26** zugesetzt und die Änderung des Diffusionskoeffizienten des Dimers mittels Diffusions-NMR-Spektroskopie beobachtet wurde, geht hervor, dass zum Aufbrechen des Dimers etwa vier DMSO-Moleküle pro **26** benötigt werden.<sup>[68]</sup>

Frish et al. nutzten daraufhin Diffusionsmessungen in ganz ähnlicher Weise, um den Einschluss von Tropylium-

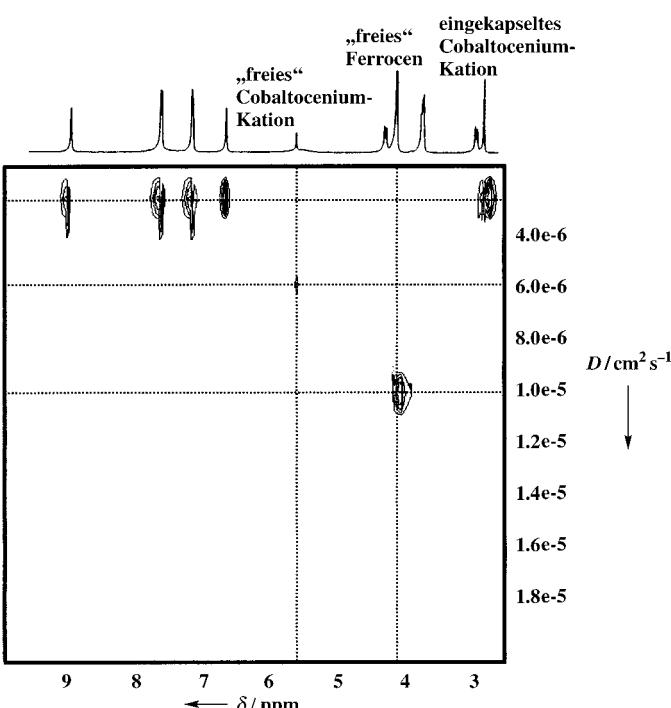


**Abbildung 13.** a) Ausschnitt aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (500 MHz) von **26** in einer 80:20-Lösung ( $v/v$ ) von Benzol und  $\text{C}_6\text{D}_6$ . b)  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren (500 MHz) derselben Probe (aufgenommen mit dem Stejskal-Tanner-Diffusionsexperiment). Die Abbildung zeigt die abnehmende Signalintensität gegen  $G$ . Zur besseren Übersichtlichkeit sind nur das Signal von **26** bei  $\delta = 1.95$  ppm sowie die Signale bei  $\delta = 7.15$  und 4.4 ppm, die dem „freien“ und dem eingeschlossenen Benzol zugeordnet werden, abgebildet.<sup>[68]</sup>

Kationen in **26–26** zu untersuchen. Dabei sollte die Bedeutung elektronischer Effekte, und zwar besonders die Rolle der  $\pi$ -Kationen-Wechselwirkung<sup>[69]</sup> bei der Affinität des Gastes gegen den Hohlraum des Dimers aufgeklärt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die  $\pi$ -Kationen-Wechselwirkungen tatsächlich einen großen Einfluss ausüben, denn die Affinität von Tropylium-Kationen ist ungefähr viermal höher als die von Benzol, das in etwa die gleiche Größe hat.<sup>[70a]</sup> Durch analoge Untersuchungen gelang der Nachweis, dass die Affinität von Cobaltocenium um mindestens fünf Größenordnungen höher als die von Ferrocen ist.<sup>[70b]</sup> Das DOSY-Spektrum in Abbildung 14 zeigt, wie leicht die Analyse und die Zuordnung von Wechselwirkungen gelingt, die in Lösung zwischen den unterschiedlichen Spezies, wie hier zwischen Ferrocen, gebundenem und freiem Cobaltocenium und dem Dimer **26–26**, vorliegen.

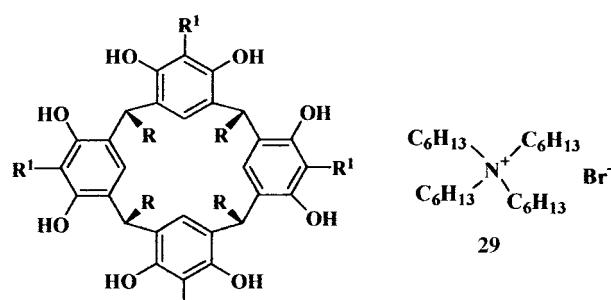
Die hier beschriebenen kleinen Kapseln sind relativ einfache Systeme, die in den meisten Fällen aus nur drei molekularen Einheiten aufgebaut sind. Wie wir noch sehen werden, liegt der Vorteil der Diffusions-NMR-Spektroskopie darin, die Zuordnung von viel komplexeren Wechselwirkungen auch bei einer höheren Zahl von Komponenten zu ermöglichen.

Vor kurzem wurde das Potenzial einfacher Diffusions-NMR-Messungen zur Kartierung molekularer Wechselwirkungen am Beispiel der spektakulären, hexameren Resorcinaren-Kapsel,<sup>[71]</sup> die zuerst von Atwood und Mitarbeitern charakterisiert wurde,<sup>[72]</sup> demonstriert. Die Gruppe von



**Abbildung 14.** Das DOSY-Spektrum (400 MHz, 298 K) einer  $\text{C}_2\text{D}_4\text{Cl}_2$ -Lösung von **26**, Ferrocen und Cobaltocenium. Das Signal bei  $\delta = 2.72$  ppm, vermutlich vom eingeschlossenen Cobaltoceniumkation herrührend, hat denselben Diffusionskoeffizienten wie alle anderen Signale von **26–26**. Mit den Signalen von freiem Ferrocen und dem freien Cobaltocenium bei  $\delta = 4.06$  bzw. 5.61 ppm sind wie erwartet wesentlich größere Diffusionskoeffizienten assoziiert.

Atwood konnte zeigen, dass **27a** im Festkörper ein Hexamer des Typs  $[(27\mathbf{a})_6(\text{H}_2\text{O})_8]$  bildet.<sup>[72]</sup> Kurze Zeit später berichteten Rebek und Shivanuk, dass auch **27b** in mit Wasser gesättigtem  $\text{CDCl}_3$  in Gegenwart geeigneter Gastmoleküle derartige Hexamere bildet.<sup>[73]</sup> Man beobachtete, dass ein Tetrahexylammonium-Kation ( $\text{THA}^+$ , **29**) im Innern des großen Hohlraums des Hexamers eingeschlossen wurde.<sup>[73]</sup> Die Zugabe von  $\text{THA}^+\text{Br}^-$  zu **27b** führte zu einer Veränderung dessen chemischer Verschiebung und zu neuen Hochfeldersignalen bei  $\delta \sim -1.00$  ppm. Anhand dieser Daten war daher die Vermutung logisch, dass der Gast **29** die Bildung der hexa-



**27a:**  $\text{R} = \text{CH}_3$ ,  $\text{R}^1 = \text{H}$

**27b:**  $\text{R} = \text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ,  $\text{R}^1 = \text{H}$

**28:**  $\text{R} = \text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ,  $\text{R}^1 = \text{OH}$

meren Kapsel herbeiführt. Durch einfache Diffusionsexperimente konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Vermutung nicht korrekt war: Diffusionsmessungen an **27b** vor und nach der Zugabe von **29** lieferten innerhalb der Fehlergrenzen identische Diffusionskoeffizienten (d.h.  $0.28 \pm 0.01 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$  einer 3 mM Lösung bei 298 K) für beide Systeme. Dieses Ergebnis ist der klare Gegenbeweis für die Annahme, dass **27b** monomer vorliegt und sich die Monomere erst in Gegenwart von **29** in  $\text{CDCl}_3$  zu einem Hexamer zusammenlagern. Es wurde daher vorgeschlagen, dass **27b** in mit Wasser gesättigtem  $\text{CDCl}_3$  spontan zu einer hexameren Kapsel selbstassoziiert.<sup>[71]</sup> Tatsächlich konnte man beim Lösen von **27b** in mit Wasser gesättigtem  $\text{CHCl}_3$  neu auftretende Hochfeldsignale bei 4.8–5.1 ppm beobachten. Vorläufig wurden diese Singulettsignale eingeschlossenen  $\text{CHCl}_3$ -Molekülen zugeordnet; dies wird auch dadurch gestützt, dass die Signale mit denselben Diffusionskoeffizienten korreliert werden können wie die Resorcinaren-Einheit. Die Zugabe von **29** zu dieser Chloroformlösung führte zum sofortigen Verschwinden der Signale – dies ist wiederum ein Indiz dafür, dass **27b** tatsächlich in mit Wasser gesättigtem Chloroform zu einer hexameren Kapsel selbstassoziiert. Vor kurzem kamen Shvanyuk und Rebek mithilfe anderer Untersuchungsmethoden zum selben Schluss.<sup>[74]</sup>

Die Ergebnisse von Titrationsexperimenten, bei denen der Diffusionskoeffizient der Resorcinaren-Einheit in  $\text{CDCl}_3$  abhängig von der Menge an zugegebenem DMSO ermittelt wurde, sind in Abbildung 15 gezeigt.<sup>[71]</sup> Aus ihr geht hervor, dass der Diffusionskoeffizient von **27b** bei Zugabe von DMSO steigt. Ähnliche Titrationskurven wurden im Falle des Hexamers sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von **29** erhalten.<sup>[71]</sup> Die durch DMSO-Zugabe hervorgerufenen, geringfügigen Veränderungen der chemischen Verschiebung gehen mit einer Erhöhung des Diffusionskoeffizienten von **27b** einher (nach DMSO-Zugabe würde man eher eine Erhöhung der Viskosität erwarten) – dies ist ein starker Hinweis darauf, dass durch die DMSO-Zugabe das Hexamer in seine Monomere aufbricht.

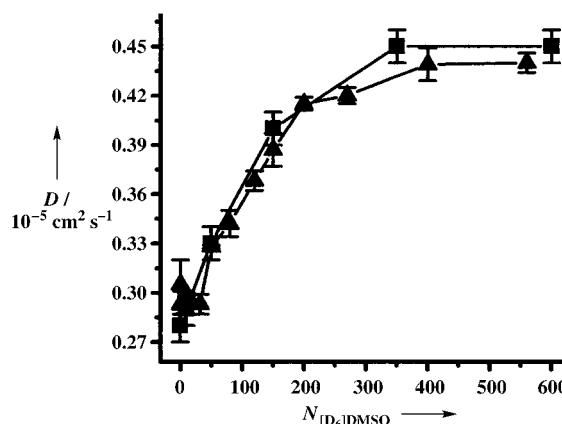


Abbildung 15. Änderung der Diffusionskoeffizienten  $D$  von **27b** (■) und **27b** in Lösungen mit  $\text{H}_2\text{O}$ -gesättigtem  $\text{CDCl}_3$  in Gegenwart von **29** (▲) bei Zugabe von  $[D_6]\text{DMSO}$  ( $N_{\text{D}_6}\text{DMSO}$ : Äquivalente an zugegebenem  $[D_6]\text{DMSO}$ ). In Anlehnung an Lit. [71], mit Genehmigung.

Die Funktion von Wasser bei der Bildung der hexameren Kapseln von **27b** und **28** in mit Wasser gesättigtem Chloroform wurde durch Messungen der Diffusionskoeffizienten der Signale von Wasser und der Hexamere in Lösungen mit unterschiedlichen **27b**, **28**/ $\text{H}_2\text{O}$ -Verhältnissen untersucht. In den Proben wurde nur ein einziges Wassersignal beobachtet – die Wasserreservoirs des Systems befinden sich also wahrscheinlich auf der NMR-Zeitskala in einem schnellen Austausch.<sup>[75a,c]</sup> Da sich jedoch herausstellte, dass die chemische Verschiebung und die Signalbreite auch stark von anderen Parametern und von den Messbedingungen abhängen (Abbildung 16 a), wurde der Diffusionskoeffizient zur Ermittlung der Rolle von Wasser gewählt. Abbildung 16 b zeigt den Effekt, den die Änderung des **27b**/ $\text{H}_2\text{O}$ -Verhältnisses auf die Diffusionskoeffizienten von Wasser und **27b** in Gegenwart und in Abwesenheit von THABr hat.<sup>[75a]</sup> Man beobachtet eine Abnahme des Diffusionskoeffizienten von Wasser mit abnehmendem relativem Wassergehalt. Interessanterweise ist, selbst bei einem **27b**/ $\text{H}_2\text{O}$ -Verhältnis von 6:8.4, der Diffusionskoeffizient von Wasser nahezu doppelt so groß wie der des Hexamers. Beträgt das Verhältnis jedoch weniger als 6:8 (z. B. 6:7.2), ist der Diffusionskoeffizient identisch mit dem des Hexamers. Bei den **29@27b**<sub>6</sub>-Systemen beträgt der Diffusionskoeffizient immer noch ein Mehrfaches des Diffusionskoeffizienten des Hexamers, selbst wenn das Verhältnis **27b**/ $\text{H}_2\text{O}$  den Wert 6:8 unterschreitet (Abbildung 16 b).<sup>[75b]</sup> Die Ergebnisse der Diffusions-NMR-Messungen deuten somit darauf hin, dass die Wassermoleküle bei der Bildung der beiden Kapseln unterschiedliche Rollen spielen. In  $\text{CDCl}_3$ -Lösung in Abwesenheit von THABr sind die Wassermoleküle anscheinend Teil der supramolekularen Kapselstruktur. Man fand tatsächlich pro sechs Moleküle **27b** etwa acht Wassermoleküle, die den gleichen Diffusionskoeffizienten wie **27b** im Hexamer haben. Man sollte jedoch beachten, dass man mit Diffusionsmessungen nicht zwischen eingeschlossenen Wassermolekülen und Wassermolekülen als Teil der Hexamerstruktur unterscheiden kann, da in beiden Fällen bei langsamem Austausch der Diffusionskoeffizient von Wasser mit dem des Hexameren übereinstimmen sollte. Wegen des raschen Austauschs der gebundenen Wassermoleküle mit dem Wasser aus der Umgebung und da auch im Festkörper Kapseln vom Typ  $[(27b)_6(\text{H}_2\text{O})_8]$  beobachtet wurden,<sup>[72]</sup> spricht jedoch mehr dafür, dass die acht Wassermoleküle in Lösung Teil der supramolekularen Struktur sind. Die Befunde in Gegenwart von THABr deuten hingegen darauf hin, dass keine Wassermoleküle zum Aufbau der supramolekularen Kapsel nötig sind.<sup>[75b]</sup> Unter Verwendung derselben Methoden (Abbildung 16 c) findet man, dass bei der Bildung der Kapsel von **28** in  $\text{CDCl}_3$ -Lösung Wasser keine Rolle spielt.<sup>[75c]</sup> Dieses Ergebnis ist in Einklang mit dem Resultat der Röntgenstrukturanalyse dieses Systems.<sup>[75d,e]</sup> Kombiniert man die Ergebnisse der chemischen Verschiebungen und der Diffusionsmessungen, kann man schlussfolgern, dass die Kapsel von **27b** Trialkylamine und Tetraalkylammoniumsalze einschließt – die Kapsel von **28** hingegen schließt lediglich Trialkylamine ein, die jedoch nach der Zugabe von DCl und In-situ-Bildung von Ammoniumsalzen wieder aus dem Hohlräum des Hexamers ausgeschleust werden.<sup>[75f]</sup> Die hier aufgeführten Beispiele verdeutlichen, dass die Diffusions-NMR-

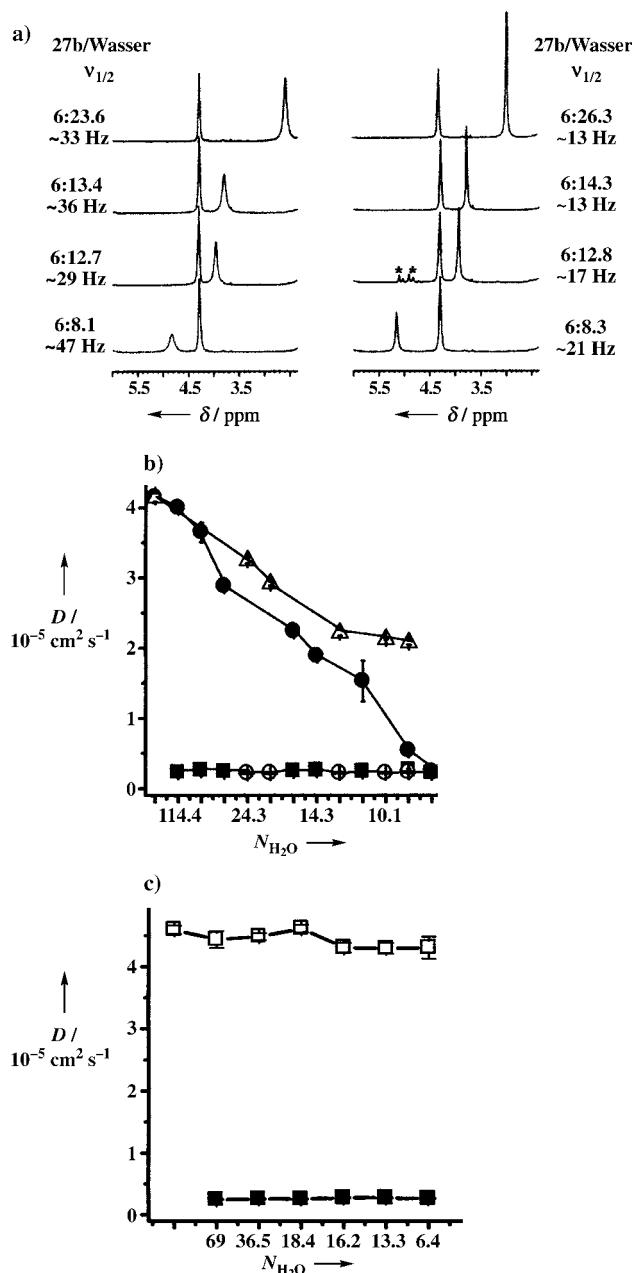


Abbildung 16. a) Ausschnitt aus  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren unterschiedlicher Herkunft von **27b** in  $\text{CDCl}_3$  in Abhängigkeit vom **27b**/ $\text{H}_2\text{O}$ -Verhältnis. Sowohl die Signalform als auch die chemische Verschiebung können selbst bei ähnlichen **27b**/ $\text{H}_2\text{O}$ -Verhältnissen sehr unterschiedlich sein. b) Diffusionskoeffizienten von **27b** und das Wassersignal in Gegenwart (○ bzw.  $\Delta$ ) und in Abwesenheit von **29** (■ bzw. ●) in Abhängigkeit von den Wasseräquivalenten  $N_{\text{H}_2\text{O}}$  pro sechs Äquivalente **27b**.<sup>[75b]</sup> c) Diffusionskoeffizienten von **28** und das Wassersignal (■ bzw. □) in Abhängigkeit von den Wasseräquivalenten  $N_{\text{H}_2\text{O}}$  pro sechs Äquivalente **28**. Nachdruck der Abbildungen 16b und c in Anlehnung an Lit. [75b,c], mit Genehmigung.

Spektroskopie mit relativ einfachen Mitteln die Charakterisierung molekularer Wechselwirkungen in Multikomponentensystemen ermöglicht. Eine Auswahl molekularer Wechselwirkungen in solchen Systemen ist in Abbildung 17 zusammengefasst.<sup>[71,75a-c]</sup>

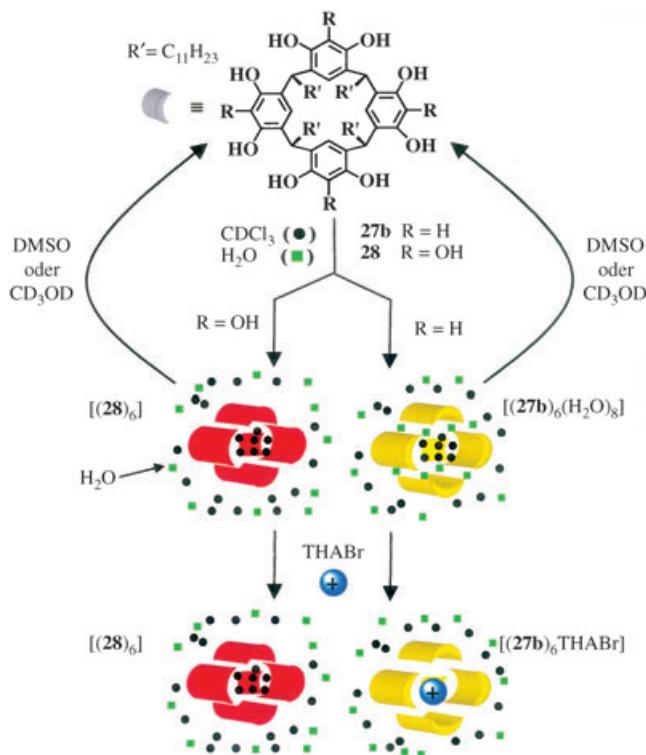


Abbildung 17. Schematische Darstellung molekularer Wechselwirkungen und Aggregationszustände großer molekularer Kapseln, die mithilfe der Diffusions-NMR-Spektroskopie nachgewiesen wurden.<sup>[71,75a-c]</sup>

Aus den in diesem Abschnitt vorgestellten Untersuchungen lässt sich schließen, dass die Wechselwirkungen zwischen Wasser und organischen Systemen in nichtwässrigen Lösungsmitteln generell mithilfe der Diffusions-NMR-Spektroskopie bestimmt werden können – darauf wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

#### 4.1.3. Wasserstoffbrücken und Hydratation in organischen Lösungsmitteln

Wegen der großen Bedeutung von Wasser-Biomolekül-Wechselwirkungen wurde zu ihrer Untersuchung eine Vielzahl von NMR-Methoden entwickelt.<sup>[76]</sup> Die zur Untersuchung der Hydratation von Biomolekülen hauptsächlich verwendeten NMR-Verfahren beruhen auf dem Nuclear-Overhauser-Effekt (NOE) und auf der kernmagnetischen Relaxationsdispersion (magnetic relaxation dispersion, MRD).<sup>[77,78]</sup> Die Wechselwirkung zwischen Wasser und einem Biomolekül sollte sich wegen des ausgeprägten Größenunterschieds der beiden Spezies problemlos mithilfe der Diffusions-NMR-Spektroskopie bestimmen lassen. Eine Diskussion der Studien, die die Wechselwirkung von Wasser mit Biomolekülen in wässrigem Medium zum Gegenstand haben, würde allerdings den Umfang dieses Artikels sprengen.<sup>[76-78]</sup> Daher wollen wir uns im Folgenden auf einige ausgewählte Beispiele für die Wechselwirkung zwischen Wasser und organischen Verbindungen in nichtwässrigen Lösungsmitteln beschränken.

Bereits vor den in Abschnitt 4.1.2 beschriebenen Studien zur Rolle von Wassermolekülen in durch Wasserstoffbrücken

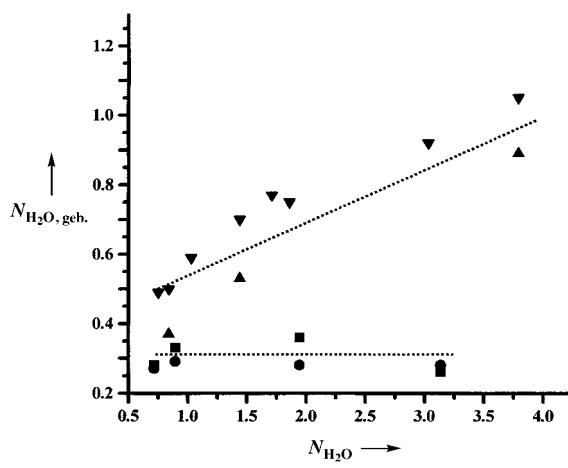
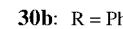
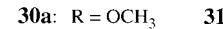
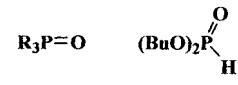
zusammengehaltenen Kapseln<sup>[75a-c]</sup> wurde über die Hydratation, genauer gesagt die Wechselwirkung von [18]Krone-6 (**4**) und seinem KI-Komplex (**4<sub>KI</sub>**) mit Wassermolekülen in mit Wasser gesättigten  $\text{CDCl}_3$ -Lösungen berichtet.<sup>[79]</sup> Man beobachtete die Veränderungen der chemischen Verschiebung und des Diffusionskoeffizienten von Wasser bei Variation des  $\text{H}_2\text{O}/\mathbf{4}$ - und des  $\text{H}_2\text{O}/\mathbf{4}_{\text{KI}}$ -Verhältnisses und fand heraus, dass der durchschnittliche Anteil an gebundenem Wasser bei **4<sub>KI</sub>** unabhängig vom Verhältnis  $\text{H}_2\text{O}/\mathbf{4}_{\text{KI}}$  ist, bei **4** jedoch bei einer Erhöhung von  $\text{H}_2\text{O}/\mathbf{4}$  beträchtlich wächst. Die Schlussfolgerungen aus Titrationsexperimenten unter Verfolgung der chemischen Verschiebung und aus Diffusions-NMR-Messungen stimmten dabei überein.<sup>[79]</sup> Den Ergebnissen zufolge ist der Anteil an gebundenem Wasser beim nicht komplexierten Kronenether höher (Abbildung 18). Beim **4<sub>KI</sub>**-System wurden

organischen Lösungsmitteln ist dieses Problem hingegen viel weniger gravierend. Man muss zudem beachten, dass Diffusionsmessungen nur ein gemitteltes Bild wiedergeben: Ein Anteil von 0.3 an gebundenen Wassermolekülen kann heißen, dass ein Molekül ca. ein Drittel seiner Zeit in gebundenem Zustand verharrt, aber auch, dass insgesamt zwei Moleküle nur 15 % ihrer Zeit in diesem Zustand vorliegen.<sup>[79]</sup>

Wasserstoffbrücken manifestieren sich in der NMR-Spektroskopie<sup>[81]</sup> in Form von Tieffeldverschiebungen,<sup>[82a]</sup> intermolekularen NOEs<sup>[82b]</sup> und Spin-Spin-Kopplungen, die gelegentlich aufgrund von Wasserstoffbrücken auftreten.<sup>[82c]</sup> Berger et al. konnten zeigen, wie man mithilfe von DOSY die Stärke von Wasserstoffbrücken zwischen unterschiedlichen Spezies in Lösung qualitativ bestimmt.<sup>[83]</sup> Das diesen Messungen zugrunde liegende Prinzip ist klar: Die Bildung einer Wasserstoffbrücke führt zu einem kleineren Diffusionskoeffizienten des Moleküls als wegen seines Molekulargewichts und seiner Größe im gegebenen Medium bei gegebener Temperatur erwartet. DOSY wurde zur Untersuchung dieses Phänomens eingesetzt, da sich bei dieser Methode der Effekt selbst in komplexen Gemischen sehr klar visualisieren lässt.<sup>[83a]</sup>

Es konnte gezeigt werden, dass bei Zugabe von DMSO (einem Wasserstoffbrückenacceptor) zu Phenol der Diffusionskoeffizient stärker abnimmt als bei DMSO-Zugabe zu Cyclohexanol. Dies wurde mit der höheren Tendenz des acideren Phenols zur Bildung von Wasserstoffbrücken mit den zugegebenen DMSO-Molekülen erklärt.<sup>[83a]</sup> Ähnliches wurde für phosphorhaltige Verbindungen beobachtet: Trimethylphosphat (**30a**), Triphenylphosphinoxid (**30b**), Triethylphosphinoxid (**32**) und Dibutylphosphit (**31**) wurden mithilfe von  $^{31}\text{P}$ -DOSY untersucht. Die Spektren vor und nach Zugabe von Triethanolamin sind in Abbildung 19a bzw. b gezeigt. Man erkennt, dass sich der Diffusionskoeffizient bei **32**, von dem man die Bildung der stärksten Wasserstoffbrücken erwartet, am deutlichsten verändert. Bei genauerer Betrachtung sieht man allerdings, dass die Zugabe von Triethanolamin bei allen Proben zu einer Abnahme der Diffusionskoeffizienten führt, was darauf hindeutet, dass die Viskosität der Lösungen durch Zugabe des Wasserstoffbrückenacceptors beeinflusst wird.

Kürzlich hat dieselbe Arbeitsgruppe vorgeschlagen, Tetramethylsilan (TMS) als Referenz zur quantitativen Untersuchung dieses Effekts zu verwenden, indem man vor und nach der Zugabe des Wasserstoffbrückenacceptors das Verhältnis der Diffusionskoeffizienten der untersuchten Verbindungen zum Diffusionskoeffizienten von TMS bestimmt. Man kann davon ausgehen, dass TMS durch Wasserstoffbrücken nicht beeinflusst wird; somit sollten sich über die Änderung seines Diffusionskoeffizienten Aussagen über Veränderungen der Viskosität der Lösung machen lassen.<sup>[83b]</sup>



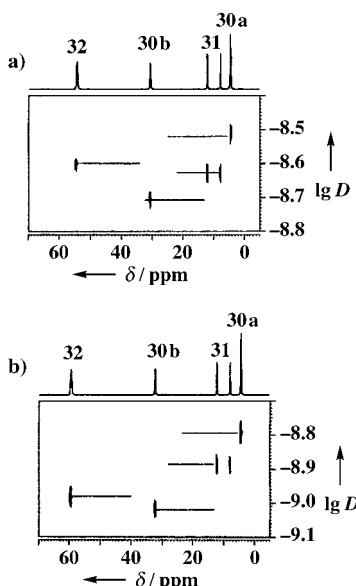
**Abbildung 18.** Mittlere Zahl der Wassermoleküle, die mit **4** und **4<sub>KI</sub>** in  $\text{CDCl}_3$ -Lösung wechselwirken ( $N_{\text{H}_2\text{O}, \text{geb.}}$ ). Berechnet wurden die Zahlen aus der Änderung der chemischen Verschiebung ( $\delta$ ) sowie aus dem Diffusionskoeffizienten von Wasser in Abhängigkeit von den Wasseraquivalenten  $N_{\text{H}_2\text{O}}$  in der  $\text{CDCl}_3$ -Lösung. ■: **4<sub>KI</sub>** (aus D), ●: **4<sub>KI</sub>** (aus  $\delta$ ), ▲: **4** (aus D), ▼: **4** (aus  $\delta$ ).<sup>[79]</sup>

im Mittel 0.3 Wassermoleküle pro Komplex gefunden. Das stimmt mit den Ergebnissen von Iwachido et al. überein, die zeigen konnten, dass eine Nitromethanphase, die den Kaliumkomplex von **4** enthält, durchschnittlich 0.3 Wassermoleküle pro Komplex aufnehmen kann, während im Fall von **4** bis zu 1.6 Wassermoleküle pro Molekül aufgenommen werden.<sup>[80]</sup> Diese Resultate deuten darauf hin, dass **4** für das Kaliumion eine effiziente Hülle gegen Hydratation bildet. Im Fall von **4** beobachtet man, dass die gebundene Menge Wasser vom  $\text{H}_2\text{O}/\mathbf{4}$ -Verhältnis abhängt. Man kann daher nicht ausschließen, dass Wassermoleküle in den Hohlraum von **4** eingeschlossen werden.

Die Hydratation von Makromolekülen ist ein komplizierter Vorgang, und mehrere Arten von Hydratsphären wurden definiert, die sich in der mittleren Lebensdauer des gebundenen Zustands der Wassermoleküle unterscheiden.<sup>[76-78]</sup> Eines der Hauptprobleme in wässrigem Medium ist das Unterdrücken des starken Signals von ungebundenen Wassermolekülen, die sich im Allgemeinen in schnellem Austausch mit den gebundenen Wassermolekülen befinden – in

#### 4.2. Molekulare Größe und Gestalt

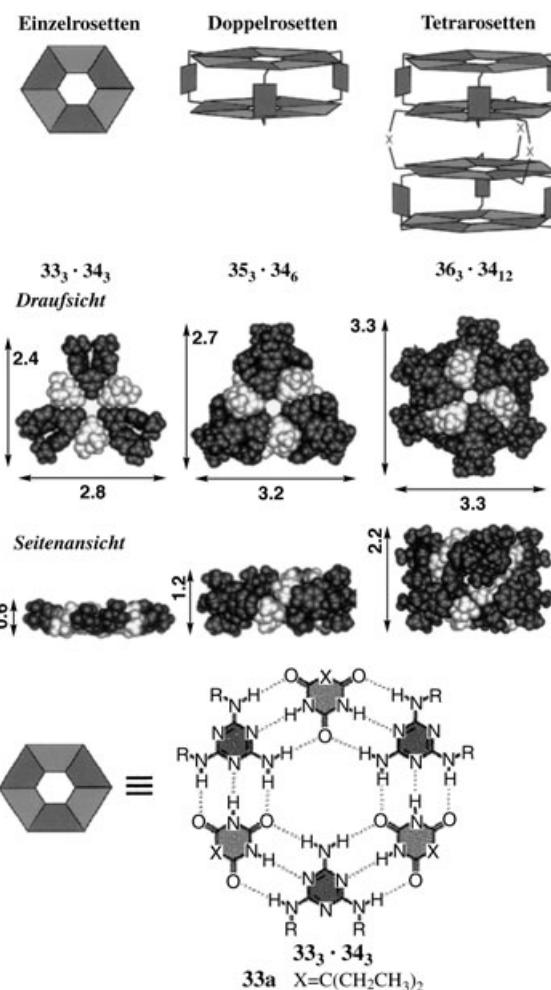
Diffusionskoeffizienten, die durch die Stokes-Einstein-Gleichung [siehe Gl. (5)] mit dem hydrodynamischen Radius



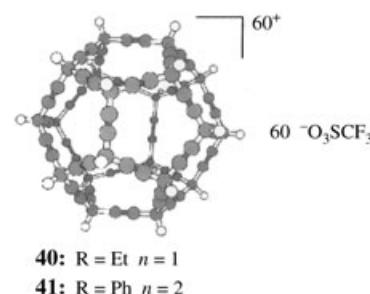
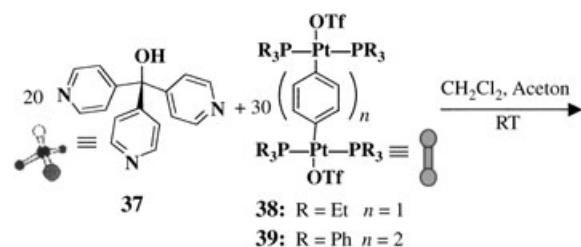
**Abbildung 19.** a) Das  $^{31}\text{P}$ -DOSY-Spektrum eines Gemisches aus Trimethylphosphat (**30a**), Triphenylphosphinoxid (**30b**), Triethylphosphinoxid (**32**) und Dibutylphosphit (**31**); b) das  $^{31}\text{P}$ -DOSY-Spektrum derselben Mischung mit Triethanolamin als zusätzlicher Komponente. Das Spektrum wurde mit der BPLED-Sequenz erhalten, wobei die Feldstärke innerhalb von 2 ms in 32 Schritten erhöht wurde. Mit Genehmigung aus Lit. [83a].

von Molekülen verbunden sind, wurden auch zur Bestimmung von Größe und Gestalt supramolekularer Gebilde, der so genannten Rosetten, verwendet.<sup>[84,85]</sup> So wurde PGSE verwendet, um mehrere Rosetten, die in der Gruppe von Reinhoudt hergestellt worden waren, zu studieren.<sup>[86]</sup> Bei dieser Untersuchung wurden Einzel-, Doppel- und Tetrarosetten wie in Schema 1 gezeigt mithilfe ihrer Diffusionskoeffizienten charakterisiert.<sup>[86]</sup> Man beobachtete eine relativ gute Übereinstimmung zwischen den aus Diffusions-NMR-Messungen bestimmten hydrodynamischen Durchmessern und den Durchmessern, die man aus für die Gasphase optimierten Strukturen berechnet hatte.<sup>[86]</sup> Des Weiteren ergab sich aus dem Diffusionskoeffizienten der Einzelrosette **33a**, **34<sub>3</sub>** nach Zugabe von **33a**, dass **33a**, **34<sub>3</sub>** kinetisch labil ist und sich auf der NMR-Zeitskala unter diesen Versuchsbedingungen (2 mm Probe in  $\text{CDCl}_3$ , 298 K, 500 MHz) in schnellem Austausch mit seinen Monomeren befindet. Mithilfe dieses Verfahrens konnte auch die kinetische Stabilität von Doppelrosetten bestimmt werden – diese Informationen waren mit herkömmlichen NMR-Methoden nur schwer zu erhalten.

In einer weiteren Anwendung aus jüngerer Zeit nutzten Stang und Mitarbeiter<sup>[87a]</sup> PGSE, um die Bildung eines spektakulären Dodekaeders aus 50 molekularen Bausteinen zu bestätigen (Schema 2). Die Diffusionskoeffizienten der beiden Dodekaeder **40** und **41** mit einem Molekulargewicht von 41 656 bzw. 61 955 Da betragen  $0.18 \pm 0.005 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$  bzw.  $0.13 \pm 0.006 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$  in einer Lösung aus Aceton und Dichlormethan.<sup>[87a]</sup> Diese Diffusionskoeffizienten wurden bei der Simulation der Molekülbewegung durch das Medium (unter Berücksichtigung seiner Viskosität) verwendet und so Molekuldurchmesser von 5.2 bzw. 7.5 nm be-

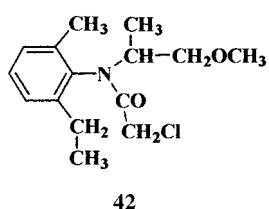


**Schema 1.** Einzel- (**33<sub>3</sub>**, **34<sub>3</sub>**), Doppel- (**35<sub>3</sub>**, **34<sub>6</sub>**) und Tetrarosetten (**36<sub>3</sub>**, **34<sub>12</sub>**), die mithilfe ihrer Diffusionskoeffizienten charakterisiert werden konnten.



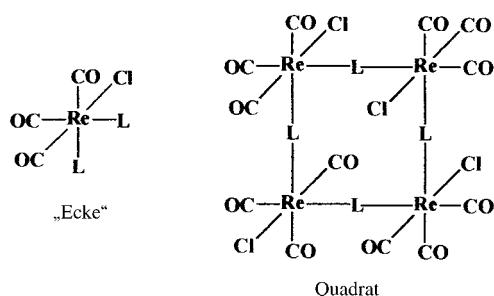
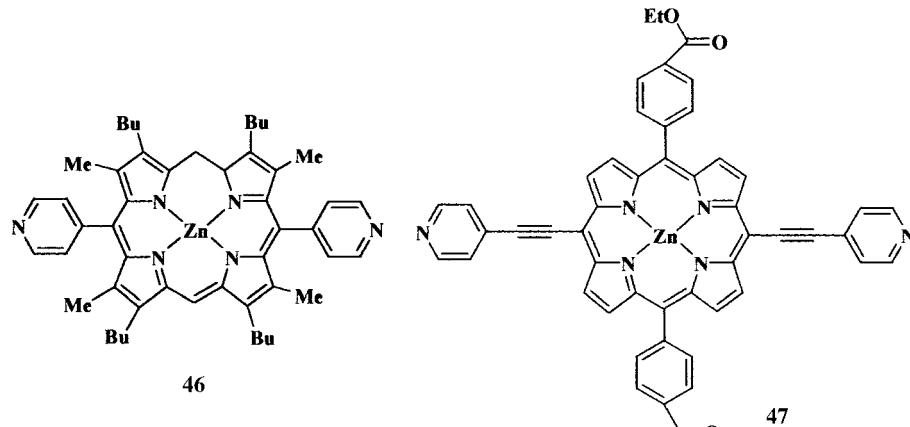
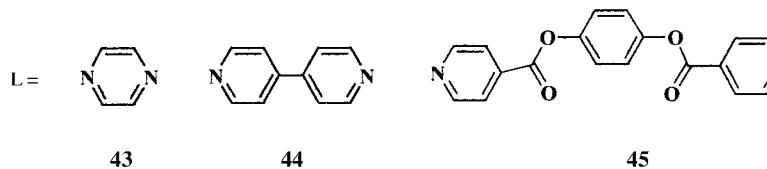
**Schema 2.** Synthese der Dodekaeder **40** ( $\text{R} = \text{Et}, n = 1$ ,  $M_w = 41\,656 \text{ Da}$ ) und **41** ( $\text{R} = \text{Ph}, n = 2$ ,  $M_w = 61\,955 \text{ Da}$ ), die aus 20 Monomeren **37** sowie 30 Monomeren **38** ( $\text{R} = \text{Et}, n = 1$ ) bzw. **39** ( $\text{R} = \text{Ph}, n = 2$ ) bestehen.<sup>[87a]</sup>

stimmt, in guter Übereinstimmung mit den berechneten Durchmessern von 5.5 und 7.5 nm. Kürzlich verwendeten Viel et al. DOSY für den Nachweis von  $\pi$ - $\pi$ -Stapelwechselwirkungen in der hydrophoben Verbindung Metolachlor, **42**,

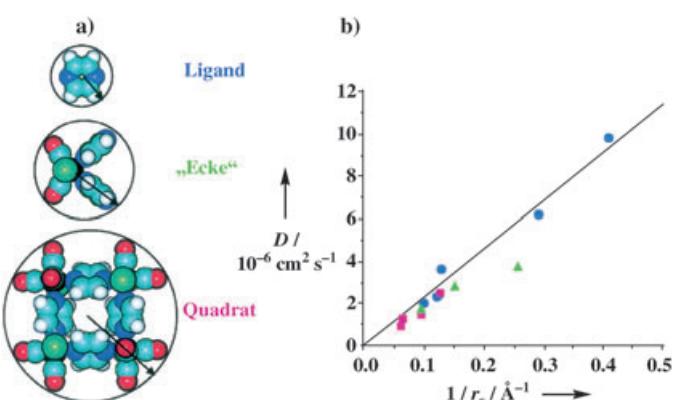


in konzentrierter wässriger Lösung.<sup>[87b]</sup> Bei hohen Konzentrationen traten zusätzliche Signale mit sehr niedrigen Diffusionskoeffizienten auf, woraus die Autoren auf die Bildung eines durch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zusammengehaltenen Polymers schlossen.<sup>[87b]</sup> Dass das gebildete Aggregat in der Tat kein Dimer oder Trimer, sondern ein Polymer ist, ergab sich aus dem Vergleich der überraschenden DOSY-Daten mit den Daten aus anderen NMR-Verfahren (z.B. 2D-NOESY).<sup>[87b]</sup>

Die Diffusions-NMR-Spektroskopie wurde in mehreren Fällen zum Nachweis der Bildung doppelsträngiger Helicate in Lösung eingesetzt.<sup>[88a,b]</sup> Larive und Mitarbeiter charakterisierten vor kurzem mithilfe von Diffusions-NMR-Messungen eine Reihe von Liganden (**43–47**) und ihren Rheniumkomplexen.



plexen, die sich zu molekularen Quadranten zusammenfügen lassen. Eine massenspektrometrische Charakterisierung gelang in diesen Fällen jedoch nicht.<sup>[88c]</sup> Wie in Abbildung 20



**Abbildung 20.** a) Angenäherte Molekülradien der Liganden **43–47** sowie der entsprechenden monomeren („Ecken“) und quadratischen Komplexe; b) die Korrelation zwischen den Diffusionskoeffizienten und dem Kehrwert der geschätzten Stokes-Radien ( $1/r_s$ ) der Liganden (●), Ecken (▲) und Quadrate (■). Mit Genehmigung aus Lit. [88c].

gezeigt, ergab sich aber eine gute Korrelation zwischen den Diffusionskoeffizienten und dem Kehrwert der geschätzten Stokes-Radien ( $1/r_s$ ) der Liganden und Komplexe. Auf der Grundlage dieser Diffusions-NMR-Messungen schlussfolgerten die Autoren, dass die beobachtete Komplexität einiger Spektren eher auf die Bildung dieser supramolekularen Systeme zurückzuführen sei als auf niedermolekulare Verunreinigungen.<sup>[88c]</sup> Die Daten dieser Messungen zeigt Tabelle 4.

Ein Gebiet, in dem die Größenbestimmung durch Diffusions-NMR-Spektroskopie bei der Charakterisierung des Systems in Lösung hilfreich sein kann, ist die Dendrimerchemie. Dendrimergenerationen lassen sich leicht mit der Diffusions-NMR-Spektroskopie untersuchen, wie im Folgenden kurz erläutert werden soll.

### 4.3. Dendrimere und Dendrone: Größe, Gestalt und Funktion

Diffusions-NMR-Messungen können auch die Charakterisierung von Dendrimeren<sup>[89]</sup> erleichtern, dennoch wurde diese Methode bis vor kurzem nur relativ selten eingesetzt.<sup>[90–94]</sup> Eine der ersten Anwendungen der Diffusions-NMR-Spektroskopie auf diesem Gebiet war die Untersuchung der ersten, zweiten, dritten und vierten Generationen der dendritischen aliphatischen Polyester aus 2,2-Bis(hydroxymethyl)propionsäure und 1,1,1-Tris(hydroxy-

**Tabelle 4:** Diffusionskoeffizienten  $D$  der Liganden **43–47** und ihrer Rheniumkomplexe.<sup>[88c]</sup>

Molekül	$D_{43}$ [ $\times 10^{-6}$ cm $^2$ s $^{-1}$ ]	$D_{44}$ [ $\times 10^{-6}$ cm $^2$ s $^{-1}$ ]	$D_{45}$ [ $\times 10^{-6}$ cm $^2$ s $^{-1}$ ]	$D_{46}$ [ $\times 10^{-6}$ cm $^2$ s $^{-1}$ ]	$D_{47}$ [ $\times 10^{-6}$ cm $^2$ s $^{-1}$ ]
Ligand	9.68 $\pm$ 0.09	6.03 $\pm$ 0.04	3.53 $\pm$ 0.04	2.24 $\pm$ 0.02	1.94 $\pm$ 0.06
„Ecke“	3.62 $\pm$ 0.08	2.69 $\pm$ 0.02		1.61 $\pm$ 0.03	
Quadrat	2.37 $\pm$ 0.11	1.42 $\pm$ 0.05	0.87 $\pm$ 0.02	1.20 $\pm$ 0.04	1.04 $\pm$ 0.03

phenyl)ethan.<sup>[91]</sup> Die bei diesen Dendrimeren beobachtete Signalabschwächung wurde mithilfe der modifizierten Stejskal-Tanner-Gleichung (19) ausgeglichen. Dabei ist  $D_{app}$  der

$$I_{(2\tau, G)} = I_{(2\tau, 0)} \exp(-\gamma^2 G^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) D_{app}) \quad (19)$$

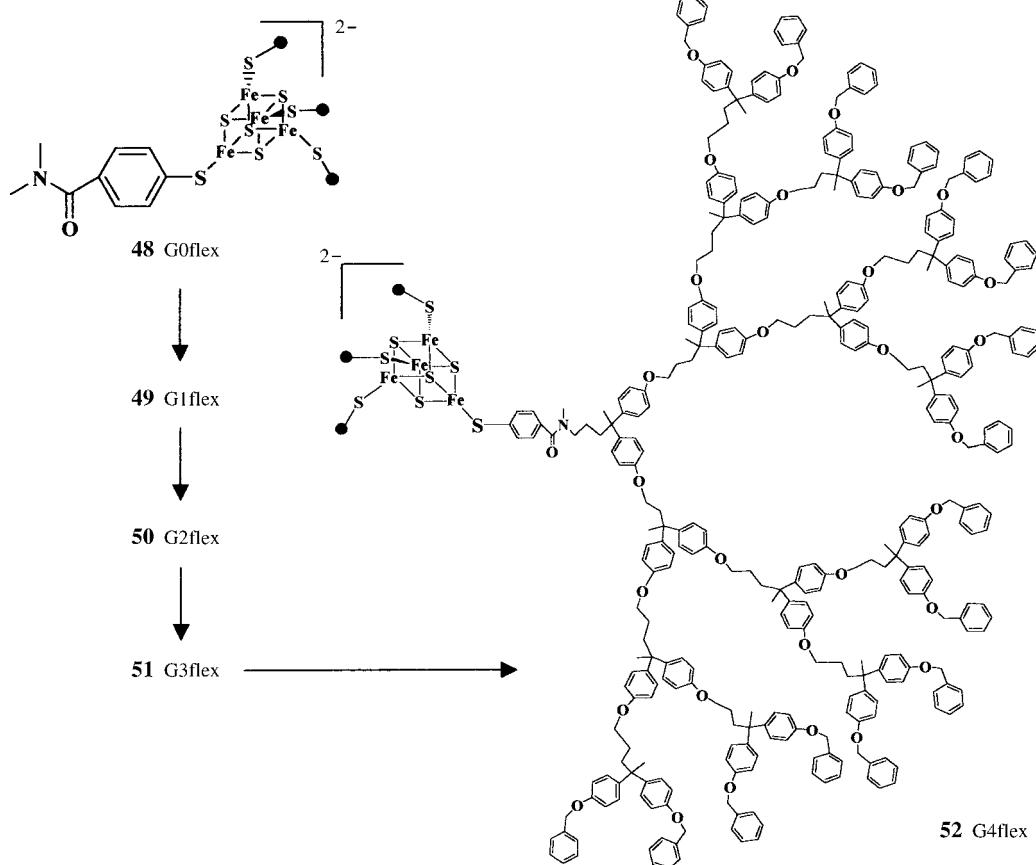
beobachtete scheinbare Diffusionskoeffizient, und  $\beta$  ist ein Maß für die Verteilungsbreite ( $0 < \beta < 1$ ). Beim Ausgleichen der Daten stellte sich heraus, dass  $\beta = 1$  war, d. h., die Dendrimeren waren annähernd monodispers. Eine sphärische Gestalt vorausgesetzt, berechneten die Autoren die hydrodynamischen Radien  $r_s$  der Dendrimeren mithilfe der Stokes-Einstein-Gleichung. Die so bestimmten Werte betrugen 7.8, 10.3, 12.6 und 17.1 Å für die erste, zweite, dritte bzw. vierte Dendrimergeneration und entsprachen damit den aus Molekülsimulationen erhaltenen Werten.<sup>[91]</sup>

In einer der ersten DOSY-Anwendungen konnte demonstriert werden, dass sich die durch äußere Stimulation herbeigeführten Strukturänderungen der Dendrimeren mithilfe

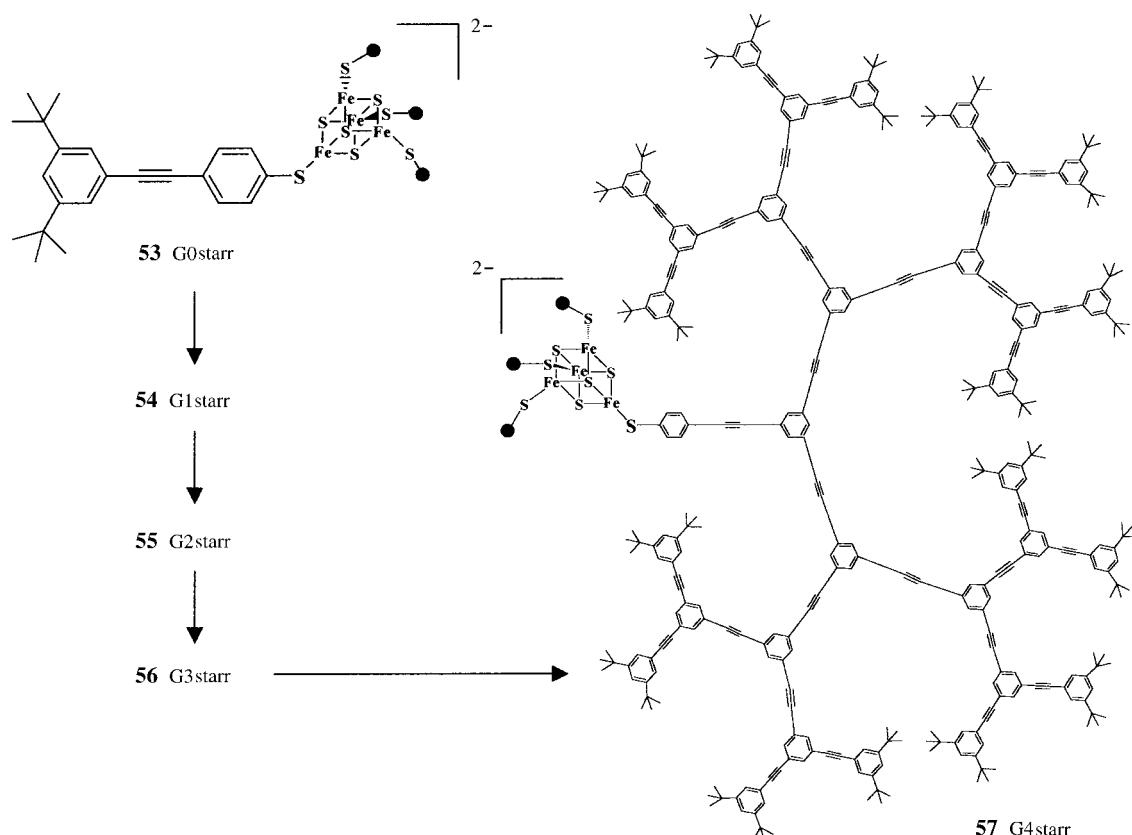
von Diffusions-NMR-Messungen nachweisen lassen.<sup>[90b]</sup> So konnte gezeigt werden, dass die Diffusionskoeffizienten – und somit die hydrodynamischen Radien – Auskunft über Strukturänderungen dieser Materialien bei der Veränderung des pH-Wertes geben:

Dendrime mit -CO<sub>2</sub>H-Endgruppen schwellen bei neutralem pH-Wert an und schrumpfen bei niedrigem pH-Wert zusammen; Dendrime mit -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>-Endgruppen schrumpfen dagegen bei hohem pH-Wert zusammen und solche mit -CH<sub>2</sub>OH-Endgruppen bleiben bei pH-Wertänderungen praktisch unverändert.<sup>[90b]</sup> Interessanterweise ändern sich die chemischen Verschiebungen aller untersuchten Systeme bei pH-Wertänderungen nur sehr geringfügig. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Diffusions-NMR-Spektroskopie die Methode der Wahl ist, um Strukturänderungen und Packungsformen von Dendrimeren mit ihrer Funktionalität zu verknüpfen.

Gorman et al. kombinierten Diffusions-NMR-Messungen mit der Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten des Elektronentransfers und Molecular Modeling, um einen Einblick in die Zusammenhänge zwischen Molekülstruktur und Elektronentransfer in dendritischen Systemen zu erlangen.<sup>[92]</sup> Interessanterweise zeigten die Diffusions-NMR-Untersuchungen der in Schema 3 und 4 gezeigten flexiblen und



**Schema 3.** Bei den flexiblen elektroaktiven Dendrimeren **48–52** wurde ein starker Einfluss des Lösungsmittels auf den hydrodynamischen Radius festgestellt (kompakte Struktur in DMF, leicht vergrößerte Struktur in THF).

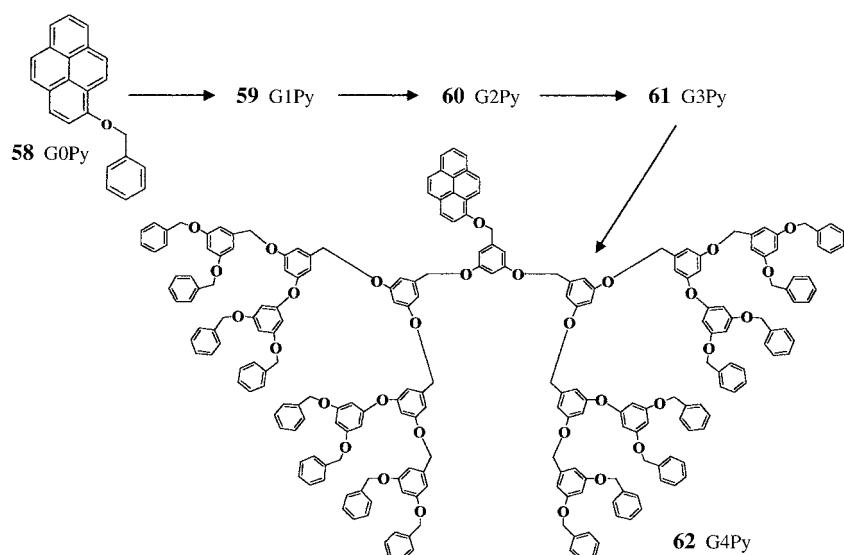


**Schema 4.** Die starren elektroaktiven Dendrimere **53–57** haben wahrscheinlich eine nicht-sphärische und eher aufgelockerte Struktur.

starren elektroaktiven Dendrimere **48–52** bzw. **53–57** im Falle der flexiblen Dendrimere einen überraschend großen Effekt des Lösungsmittels (DMF, THF) auf die hydrodynamischen Radien. In DMF ergab sich bei den Dendrimeren **48–52** eine bessere Korrelation zwischen den hydrodynamischen Radien und den aus Moleküldynamik-Rechnungen erhaltenen Radien der Kreisbewegung. In diesem Lösungsmittel liegen die Dendrimere in kompakten Strukturen (ähnlich wie harte Bälle) vor, während in THF ein gewisses Schwellen der Dendrimere beobachtet wird.<sup>[92]</sup> Bei den starren Dendrimeren war die Korrelation zwischen diesen beiden Parametern weniger ausgeprägt. Dies deutet darauf hin, dass die elektroaktiven starren Dendrimere **53–57** eine nicht-sphärische und weniger kompakte Gestalt haben. Der Vergleich der Struktureigenschaften dieser beiden Dendrimerklassen in den unterschiedlichen Lösungsmitteln mit den Elektronentransfergeschwindigkeiten in diesen Systemen ermöglichte den Autoren die Formulierung einer Struktur-Eigenschafts-Beziehung für die Distanz-abhängigkeit des Elektronentransfers.<sup>[92]</sup>

Riley et al. verglichen die Diffusions-eigenschaften und das photophysikalische Verhalten von Pyren-markierten

Polyarylether-Monodendronen (Schema 5).<sup>[93]</sup> Interessanterweise nehmen die Stokes-Radien in THF mit wachsender Dendrongeneration sehr viel stärker zu als in  $\text{CH}_3\text{CN}$  (Tabelle 5). Der Vergleich zwischen experimentellen und theoretischen Daten zeigt jedoch, dass selbst in THF die Dendrone nicht vollständig expandiert vorliegen ( $r_s < r_{\text{Theorie}}$ ) und dass die kleineren Dendrone offener vorliegen und flexibler



**Schema 5.** Pyren-markierte Polyarylether-Monodendrone **58–62**.

**Tabelle 5:** Diffusionskoeffizienten  $D$ , Radien  $r$ , Volumina  $V$  und Dichten  $\rho$  aus Pulsgradienten-NMR-Experimenten.<sup>[93]</sup>

Verb.	$M_w$	$D_{py}$ [cm $^2$ s $^{-1}$ ] <sup>[a]</sup>	$r_s$ [Å] <sup>[b]</sup>	$V_{Stokes}$ [Å $^3$ ] <sup>[c]</sup>	$\rho_{Stokes}$ [Da Å $^{-3}$ ] <sup>[d]</sup>	$r_{Theorie}$ [Å] <sup>[e]</sup>	$V_{Theorie}$ [Å $^3$ ] <sup>[f]</sup>
Tetrahydrofuran							
Pyren	82	$1.7 \times 10^{-5}$	2.8	92	2.19	(3.5)	180
<b>58</b>	308	$1.3 \times 10^{-5}$	3.7	210	1.47	7.2	1560
<b>59</b>	521	$0.97 \times 10^{-5}$	4.9	490	1.06	10.1	4320
<b>60</b>	932	$0.78 \times 10^{-5}$	6.1	950	0.99	13.0	9200
<b>61</b>	1822	$0.48 \times 10^{-5}$	10	4200	0.43	15.9	16800
<b>62</b>	3495	$0.34 \times 10^{-5}$	14	11500	0.30	18.8	27800
Acetonitril							
Pyren	82	$2.3 \times 10^{-5}$	2.6	74	2.72	(3.5)	180
<b>58</b>	308	$1.8 \times 10^{-5}$	3.3	150	2.06	7.2	1560
<b>59</b>	521	$1.4 \times 10^{-5}$	4.1	289	1.80	10.1	4320
<b>60</b>	932	$1.2 \times 10^{-5}$	4.9	490	1.92	13.0	9200
<b>61</b>	1822	$1.1 \times 10^{-5}$	5.4	660	2.72	15.9	16800
Cyclohexan							
Pyren	82	$9.4 \times 10^{-6}$	2.6	74	2.73	(3.5)	180
<b>58</b>	308	$8.7 \times 10^{-6}$	2.8	92	2.52	7.2	1560

[a] Aus Diffusions-NMR-Daten berechnet. [b] Berechnet aus Gleichung 4 mit  $\eta = 4.56 \times 10^{-4}$  Pas für THF. [c] Berechnet aus  $R_{Stokes}$  wie oben angegeben,  $V_{Stokes} = \frac{4}{3}\pi(R_{Stokes})^3$ . [d] Berechnet aus  $V_{Stokes}$  wie oben angegeben und  $M_w \rho_{Stokes} = M_w/V_{Stokes}$ . [e] Radien voll ausgestreckter Strukturen, ermittelt aus Modellrechnungen. [f] Volumina voll ausgestreckter Strukturen, errechnet aus den oben angegebenen Radien,  $V_{Theorie} = \frac{4}{3}\pi(r_{Theorie})^3$ . Messungen wurden bei 298 K durchgeführt.

sind als die größeren. In CH<sub>3</sub>CN sind die Strukturen sehr viel komprimierter, und man beobachtet eine deutliche Strukturveränderung beim Übergang von G2 (**60**) nach G3 (**61**), wobei G3 offensichtlich kompakter ist. Ein Vergleich der Strukturdaten aus Diffusions-NMR-Messungen mit Fluoreszenzlösungsexperimenten zeigt, dass G0–G3 (**58–61**) in THF und G0–G2 in Acetonitril den Durchgang des als Fluoreszenzlöscher dienenden molekularen Sauerstoffs nur minimal behindern. Dagegen sind die größeren Dendrone G4 (**62**) in THF und G3–G4 in CH<sub>3</sub>CN dichter und weniger durchlässig. In Cyclohexan ist die Struktur sogar noch dichter.<sup>[93]</sup> In THF ändert sich das Diffusionsverhalten von G2 nach G3, wohingegen bei der Fluoreszenzlösung die Änderung von G3 nach G4 auftritt. Die Eigenschaftssprünge zwischen unterschiedlichen Dendrongenerationen sind den Autoren zufolge auf die Verwendung unterschiedlicher Sonden (THF oder molekularer Sauerstoff) zurückzuführen.<sup>[93]</sup>

Die Diffusions-NMR-Spektroskopie ermöglicht also einen besseren Einblick in die Struktur dendritischer Materialien in Lösung, die wiederum direkt die Eigenschaften dieser Materialien beeinflusst, und hat daher ein hohes Potenzial bei der Etablierung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen solcher komplexen Systeme.<sup>[93]</sup>

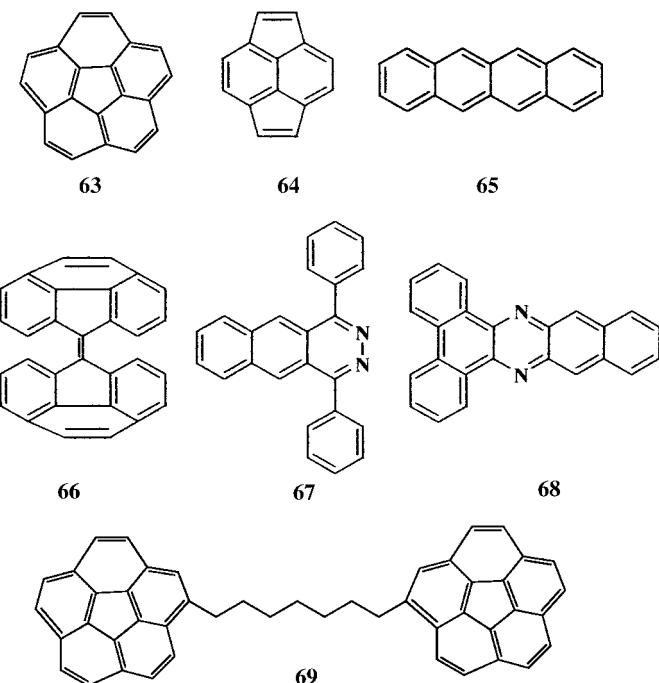
#### 4.4. Reaktive Zwischenstufen, Ionenpaarbildung und metallorganische Systeme

Die Wechselwirkungen von Ionen mit unterschiedlichen Systemen und Polyelektrolyten, ihre Bindung an Micellen und ihre Rolle bei der Bildung von Mikroemulsionen wurden intensiv mithilfe der Diffusions-NMR-Spektroskopie untersucht, liegen aber außerhalb des Rahmens dieses Aufsatzes.<sup>[9, 10, 19, 20, 95]</sup> Einige ausgewählte Beispiele für Anwendungen

der Diffusions-NMR-Spektroskopie bei organischen reaktiven Zwischenstufen, Ionenpaaren und metallorganischen Systemen, die in einem Zusammenhang mit der Supramolekularen Chemie stehen, sollen jedoch in diesem Abschnitt angesprochen werden. In der Tat sollte die Diffusions-NMR-Spektroskopie eine leistungsfähige Methode in der Chemie der reaktiven Zwischenstufen sein, da die meisten dieser Spezies instabil sind und sich somit der Untersuchung durch klassische Methoden zur Diffusionsmessung wie die Raleigh-Interferometrie<sup>[96]</sup> oder die Messung mit radioaktiven Markern<sup>[97]</sup> entziehen. Mit der störungsfreien Diffusions-NMR-Spektroskopie sollten sich dagegen auch die Diffusionseigenschaften instabiler Spezies bestimmen lassen. Zudem neigen viele Ionen und metallorganische

Verbindungen zur Dimerisierung oder Selbstaggregation, was die Diffusion zu einem wichtigen Parameter solcher Systeme macht. Daher wurde in den letzten fünf Jahren die Diffusions-NMR-Spektroskopie auch auf diesem Gebiet häufiger verwendet.

Eine der ersten Anwendungen der hochaufgelösten Diffusions-NMR-Spektroskopie bei der Untersuchung reaktiver Zwischenstufen war die Bestimmung der Diffusionskoeffizienten einer Reihe von polycyclischen Verbindungen wie **63–69** sowie ihren doppelt und vierfach geladenen ionischen Derivaten.<sup>[98]</sup> Bei dieser Untersuchung wurden sowohl exter-



ne als auch interne Standards verwendet, da man davon ausging, dass die Reduktion der Polycyclen zu ihren Anionen Einfluss auf die Viskosität der Lösung und damit auf die Diffusionskoeffizienten haben würde – in diesem Fall wäre der Diffusionskoeffizient als charakteristischer Parameter des Systems nur von eingeschränktem Nutzen. Wie in Tabelle 6

**Tabelle 6:** Diffusionskoeffizienten  $D$  von Polycyclen und ihren Anionen in  $[D_8]THF$  bei 298 K.<sup>[98]</sup>

Verb.	$D$ ( $CH_2Cl_2$ ; ext. Standard) [ $\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$ ]	$D$ (Benzol; int. Standard) [ $\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$ ]	$D$ (Polycyclus) [ $\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$ ]
<b>63</b>	$3.73 \pm 0.002$	$2.87 \pm 0.017$	$1.57 \pm 0.017$
<b>63<sup>4-</sup></b> / $4 Li^+$	$3.73 \pm 0.002$	$2.90 \pm 0.041$	$0.84 \pm 0.017$
<b>65</b>	$3.83 \pm 0.031$	$2.96 \pm 0.027$	$1.83 \pm 0.032$
<b>65<sup>2-</sup></b> / $2 Li^+$ (2 mg)	$3.79 \pm 0.006$	$2.86 \pm 0.039$	$0.96 \pm 0.038$
<b>65<sup>2-</sup></b> / $2 Li^+$ (20 mg)	$3.78 \pm 0.000$	$2.39 \pm 0.043$	$0.71 \pm 0.020$
		$2.86 \pm 0.039$	$0.86 \pm 0.017^{[a]}$
<b>65<sup>2-</sup></b> / $2 Na^+$	$3.80 \pm 0.003$	$2.74 \pm 0.014$	$0.94 \pm 0.015$
<b>65<sup>2-</sup></b> / $2 K^+$	$3.79 \pm 0.004$	[b]	$0.94 \pm 0.014$
<b>64</b>	$3.82 \pm 0.017$	$2.86 \pm 0.025$	$1.90 \pm 0.011$
<b>64<sup>2-</sup></b> / $2 Li^+$	$3.78 \pm 0.015$	$2.82 \pm 0.048$	$1.06 \pm 0.057$
<b>66</b>	$3.80 \pm 0.002$	$2.97 \pm 0.014$	$1.38 \pm 0.021$
<b>66<sup>2-</sup></b> / $2 Na^+$	$3.82 \pm 0.002$	$2.99 \pm 0.003$	$1.05 \pm 0.014$
<b>67</b>	$3.79 \pm 0.000$	$2.85 \pm 0.041$	$1.17 \pm 0.008$
<b>67<sup>2-</sup></b> / $2 Na^+$	$3.72 \pm 0.030$	$2.84 \pm 0.003$	$0.93 \pm 0.030$
<b>68</b>	$3.79 \pm 0.002$	$2.90 \pm 0.015$	$1.38 \pm 0.010$
<b>68<sup>2-</sup></b> / $2 Na^+$	$3.80 \pm 0.002$	$2.97 \pm 0.032$	$1.10 \pm 0.026$

[a] Nach Berücksichtigung der Viskositätsänderung. [b] Sehr breites Signal von Benzol, mit Spin-Echo nicht detektierbar.

gezeigt, beobachtet man nach der Reduktion tatsächlich eine starke Abnahme der Diffusionskoeffizienten der Polycyclen, jedoch nur eine geringe Viskositätsänderung. Da eine Zweielektronenreduktion keine Auswirkungen auf das Molekulargewicht der Verbindungen hat, ist klar, dass die Abnahme des Diffusionskoeffizienten von einer stärkeren Solvatation und vermutlich auch einer partiellen Selbstaggregation der geladenen Moleküle herröhrt.<sup>[98]</sup> Bei den Dilithium-, Dinalium- und Dikaliumsalzen des Tetracendantianions (**65<sup>2-</sup>**) beobachtete man sehr ähnliche Diffusionskoeffizienten, was darauf hindeutet, dass die Ionenpaarbildung unter den Untersuchungsbedingungen nur eine sehr geringe Rolle spielt.<sup>[98]</sup> Ein interessantes Ergebnis lieferte der Vergleich der Diffusionskoeffizienten von geladenen und neutralen Polycyclen: Verbindungen, die besser zur Selbstaggregation geeignet waren, zeigten eine stärkere Abnahme der Diffusionskoeffizienten. Bei diesen Verbindungen wurde eine Abnahme des Diffusionskoeffizienten um 50% beobachtet – dies wurde mit

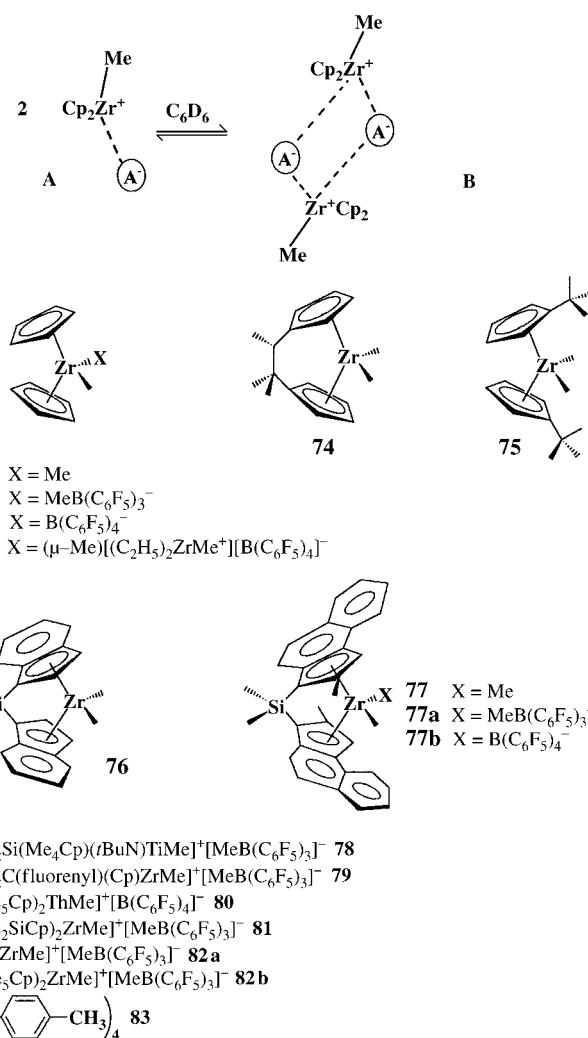
partieller Selbstaggregation begründet.<sup>[98]</sup> Vom Corannulen-tetraanion, **63<sup>4-</sup>**, bei dem eine deutliche Abnahme des Diffusionskoeffizienten beobachtet wurde, war die Bildung von Dimeren bereits zuvor bekannt.<sup>[99]</sup> Als Ergebnis dieser Studie stand somit fest, dass Selbstaggregation und Dimerisierung bei solchen Verbindungen sehr viel wichtiger sein können als bisher angenommen.<sup>[98]</sup>

Rabinovitz und Mitarbeiter konnten anschließend mithilfe der Diffusions-NMR-Spektroskopie zeigen, dass eine zufriedenstellende bis gute Korrelation zwischen  $1/D$  und den Van-der-Waals-Radien der neutralen Polycyclen besteht.<sup>[100a]</sup> Etwas geringer ist die Korrelation zwischen den aus den Diffusionskoeffizienten bestimmten Stokes-Einstein-Radien und den Van-der-Waals-Radien der neutralen Polycyclen. Die Autoren schlagen zumindest als Teilerklärung vor, dass die Stokes-Einstein-Gleichung nicht richtig erfüllt ist, wenn die diffundierenden Teilchen kleiner sind als das Fünffache des Radius der Lösungsmittelmoleküle. Bei den geladenen Verbindungen fand man praktisch keine Korrelation zwischen  $1/D$  und den ermittelten Stokes-Einstein-Radien.<sup>[100a]</sup> Dies kann mit der unterschiedlichen Solvatation der Anionen zusammenhängen, die darüber hinaus in der Zahl der Ladungen variierten. In einer anderen Untersuchung<sup>[100b]</sup> setzte dieselbe Arbeitsgruppe die Diffusions-NMR-Spektroskopie ein, um zu bestimmen, ob das Oktaanion von **69** dimerisiert. Sie fanden für **69<sup>8-</sup>** in  $[D_8]THF$  einen Diffusionskoeffizienten von  $0.55 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$ , während der des Dimers von **63<sup>4-</sup>**  $0.76 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{s}^{-1}$  beträgt. Sie folgerten daraus, dass **69<sup>8-</sup>** ein intermolekulares Sandwich bildet.<sup>[100b]</sup>

Pochapsky, der die Ionenpaarbildung sehr intensiv mithilfe der NMR-Spektroskopie untersucht hat,<sup>[101]</sup> setzte vor kurzem in einer Untersuchung zur Aggregation von Tetrabutylammoniumchlorid (**70**) die Diffusions-NMR-Spektroskopie ein.<sup>[102a]</sup> In dieser Studie wurde das Verhältnis der Diffusionskoeffizienten von **70** und Tetrabutylsilan (**71**), einer nicht aggregierenden Vergleichssubstanz mit ähnlichem Molekulargewicht und ähnlicher Gestalt, in Abhängigkeit von der Konzentration ermittelt. Die Gruppe von Pochapsky fand heraus, dass dieses Verhältnis mit abnehmender Konzentration kleiner wird und zu einem Wert von etwa 1.0 in sehr verdünnten Lösungen ( $\sim 10^{-4} \text{ M}$ ) konvergiert. Bei einer Konzentration von ca. 30 mM wurde als Aggregationszahl von **70** in  $CDCl_3$ -Lösung der Wert 3 geschätzt.<sup>[102a]</sup> Auf dieser Grundlage untersuchte die Arbeitsgruppe von Pochapsky die Ionenpaare von Tetrabutylammoniumtetrahydroborat (**72**) durch gleichzeitiges Beobachten der Diffusionskoeffizienten von Anion und Kation<sup>[102b]</sup> und konnte zeigen, dass sich die Diffusionskoeffizienten von Kation und Anion in  $CDCl_3$  nicht sehr unterscheiden, jedoch deutlich kleiner sind als die von **71**. Dies wurde durch das Vorliegen eines stark wechselwirkenden Ionenpaares im Fall des Ammoniumsalzes erklärt. Die Konzentrationsabhängigkeit des Verhältnisses der Diffusionskoeffizienten weist eindeutig auf eine Aggregatbildung in  $CDCl_3$  hin, was wegen der geringen Solvationskraft des Lösungsmittels nicht ganz unerwartet ist.<sup>[102b]</sup> Vor einiger Zeit konnten Keresztes und Williard zeigen, dass man mithilfe von Diffusions-NMR-Experimenten das Dimer und das Tetramer von *n*-Butyllithium in  $[D_8]THF$  identifizieren kann.<sup>[103]</sup> Dies gelang durch einen Vergleich der Diffusionskoeffizienten, die

man zum einen experimentell aus Diffusions-NMR-Untersuchungen erhielt und zum anderen aus den bekannten Röntgenstrukturparametern dieser Verbindung errechnete. Die Daten wurden auch in DOSY-Form dargestellt.<sup>[103]</sup>

Auch in der Metallorganischen Chemie, in der die Ligandeninsertion und/oder -dissoziation sowie die Aggregation eine bedeutende Rolle spielen, kann die Diffusions-NMR-Spektroskopie andere NMR-Verfahren bei der Charakterisierung von Teilchen in Lösung komplementieren. Da hierüber kürzlich von Pregosin und seinen Kollegen berichtet wurde,<sup>[104]</sup> wollen wir im Folgenden nur einige Beispiele erläutern. Beck et al. vertreten auf der Grundlage von Diffusions-NMR-Experimenten die Ansicht, dass die in Schema 6 gezeigte Bildung von Ionendoppelpaaren (B) aus einfachen Ionenpaaren (A) in Zirconocen-Katalysatorsystemen sehr viel wichtiger ist als bisher angenommen.<sup>[105]</sup> Zu diesem Schluss kamen die Forscher nach der Bestimmung der Diffusionskoeffizienten der Zirconocene **73–77** (Schema 6) und nach einem Vergleich der erhaltenen Werte mit denen einer Reihe von Ionenpaaren wie zum Beispiel **73a/b**, **77a/b** sowie mit dem Wert von **73c**, für das im Festkörper eine zweikernige Struktur belegt ist.<sup>[106a]</sup> Da der Diffusionskoeffizient von **73b** von denen der Verbindungen **73–74** abweicht, jedoch dem des zweikernigen Komplexes **73c** ähnelt, schloss man, dass **73b** als Ionendoppelpaar vorliegt (B in Schema 6). Die Messungen wurden in Benzol im Konzentrationsbereich zwischen 1.6–4.7 mM durchgeführt. In einer vor kurzem erschienenen Untersuchung ganz ähnlicher Komplexe (**78–82**) und von (*p*-Tolyl)<sub>4</sub>Si (**83**) als Referenz (Schema 6) konnte jedoch gezeigt werden, dass zwischen den aus PGSE-Diffusionsdaten ermittelten hydrodynamischen Volumina der Komplexe und den für 1:1-Ionenpaare aus Röntgenstrukturdaten errechneten Van-der-Waals-Volumina eine gute Korrelation besteht (Abbildung 21).<sup>[106b]</sup> Die Konzentrationen der dabei untersuchten Metallocene lagen deutlich außerhalb des üblicherweise bei Polymerisationen verwendeten Bereichs zwischen 10<sup>-4</sup>–10<sup>-5</sup> M. Man kam daher zu dem Schluss, dass die Aggregation der Metalloceniumkatalysatoren beim



Schema 6. Mögliche Bildung von Ionendoppelpaaren (B) aus einfachen Ionenpaaren (A).

Kettenwachstum in Olefinpolymerisationen nur eine untergeordnete Rolle spielt.<sup>[106b]</sup>

Zuccaccia et al. bestimmten die Diffusionskoeffizienten des kationischen Komplexes **84** und seines neutralen Analogons **85** in unterschiedlichen Lösungsmitteln und Konzentrationen.<sup>[107]</sup> In dieser Untersuchung wurde die einfache STE-Pulsgradientensequenz für die Diffusionsmessungen eingesetzt. Die Ergebnisse lassen eindeutig darauf schließen, dass **84** in CDCl<sub>3</sub> in Form eines festgebundenen Ionenpaares vorliegt; in CD<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> hingegen scheint das Gleichgewicht zu einem eher locker zusammengehaltenen Ionenpaar verschoben zu sein, denn der Diffusionskoeffizient von BPh<sub>4</sub><sup>-</sup> ist hier größer als der des Kations. In diesem Lösungsmittel beträgt der Unterschied zwischen den Diffusionskoeffizienten von **84** und **85** lediglich 10%.<sup>[107]</sup> In CDCl<sub>3</sub>- und CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Lösungen hingegen ist der Unterschied sehr viel ausgeprägter und zudem konzentrationsabhängig.<sup>[107]</sup> Auf der Grundlage dieser Ergebnisse schlagen die Autoren für diese Lösungen das Vorliegen höherer Aggregate vor. Es sollte jedoch darauf hingewiesen werden, dass die Vergleichssubstanz **85** ein niedrigeres Molekulargewicht als **84** hat, für dessen Molek-

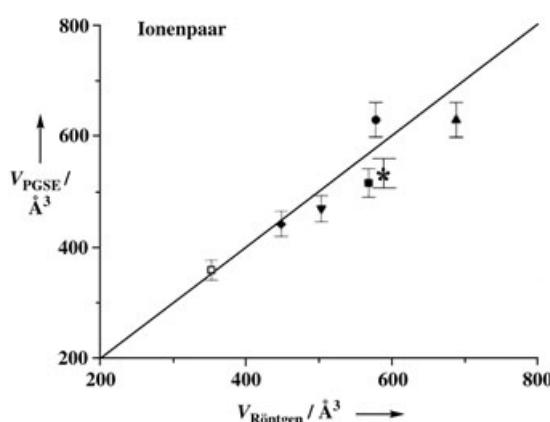
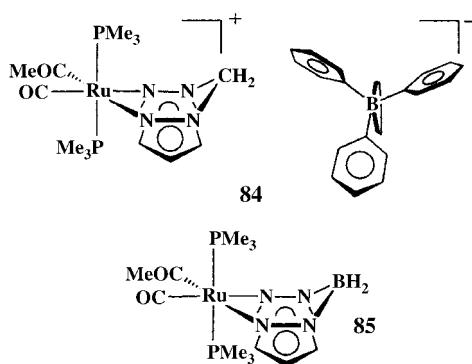
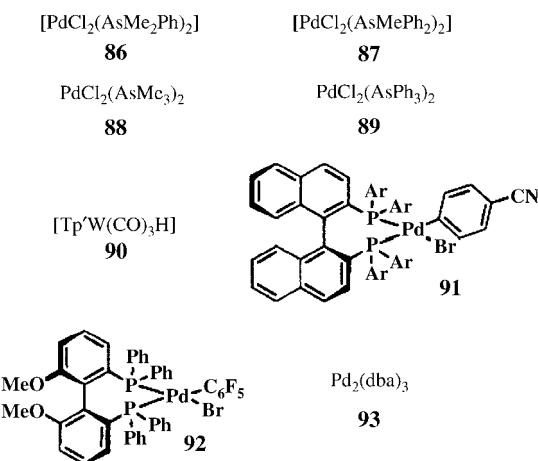


Abbildung 21. Auftragung der durch PGSE ermittelten hydrodynamischen Räden  $V_{\text{PGSE}}$  der Metallocenium-Ionenpaare gegen die Van-der-Waals-Volumina  $V_{\text{Röntgen}}$ , die aus den kristallographischen Daten der 1:1-Ionenpaare errechnet wurden. Die Gerade ergibt sich aus  $V_{\text{PGSE}} = V_{\text{Röntgen}}$ . ■: 78, ●: 79, ▲: 80, ▽: 81, ◆: 82a, ★: 82b, □: (*p*-Tolyl)<sub>4</sub>Si (83). Nachdruck in Anlehnung an Lit. [106b], mit Genehmigung.



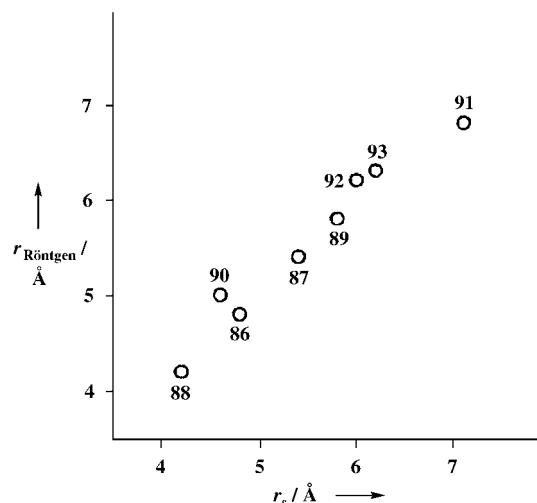
largewicht Kation und Anion zu berücksichtigen sind. Außerdem ist **85** vermutlich weniger solvatisiert als **84**, da es sich bei **85** um ein Neutralmolekül mit einem dementsprechend höheren Diffusionskoeffizienten handelt. Die kleineren Änderungen der Diffusionskoeffizienten in Lösungsmitteln mit größerem Solvationsvermögen und die Konzentrationsabhängigkeit der Diffusionskoeffizienten sprechen bei **84** für das Vorliegen höherer Aggregate in chlorierten Lösungsmitteln unter den beschriebenen Versuchsbedingungen.<sup>[107]</sup>

In einer vor wenigen Jahren erschienenen Veröffentlichung berichteten Pregosin und Mitarbeiter über die Diffusionskoeffizienten einer Reihe von  $\text{Pd}^{II}$ -Arsinkomplexen des Typs  $\text{PdCl}_2\text{L}_2$  (86–89;  $\text{L} = \text{AsMe}_x\text{Ph}_{3-x}$  ( $x = 3-0$ )) und anderen metallorganischen Komplexen unterschiedlicher Größe (90–93;  $\text{Tp}' = \text{Hydrotris}(3,5\text{-dimethylpyrazolyl})\text{borat}$ ,  $\text{Ar} = p\text{-Tolyl}$ ,  $\text{dba} = trans,trans\text{-Dibenzylidenaceton}$ ). Aus diesen Daten wurde unter Zuhilfenahme der Stokes-Einstein-Be-



ziehung [siehe Gl. (5)]  $r_s$  berechnet.<sup>[108a]</sup> Dabei wurde eine gute Korrelation zwischen den  $r_s$ -Werten und den berechneten Radien, die aus Röntgenstrukturanalysen dieser Komplexe ermittelt wurden, beobachtet (Abbildung 22).<sup>[108a]</sup> Diese Untersuchung wurde anschließend auch für Ruthenium(II)-Komplexe unter Einsatz von  $^{19}\text{F}$ - und  $^1\text{H}$ -PGSE-Messungen durchgeführt.<sup>[108b]</sup>

Die Diffusions-NMR-Spektroskopie eignet sich auch zur Charakterisierung metallorganischer reaktiver Zwischenstufen.

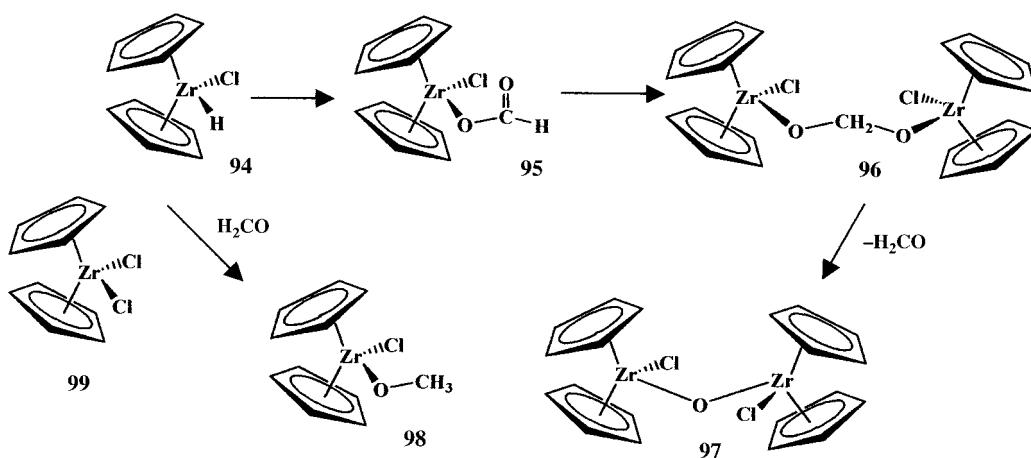


**Abbildung 22.** Auftragung von  $r_s$  gegen die aus kristallographischen Daten berechneten Radien  $r_{\text{Röntgen}}$  von 86–93. Die Radien von 86–89 im Festkörper wurden unter Verwendung der publizierten Strukturen der analogen Phosphine anstelle jener der Arsine abgeschätzt. In Anlehnung an Lit. [108a], mit Genehmigung.

fen in Lösung: Berger und Mitarbeiter erhielten einen Schnappschuss der Reaktion von  $^{13}\text{CO}_2$  mit  $[\text{Cp}_2\text{Zr}(\text{Cl})\text{H}]$  (**94**) mithilfe der  $^{13}\text{C}$ -Diffusions-NMR-Spektroskopie (Schema 7).<sup>[109]</sup>  $^{13}\text{CO}_2$  wurde zur Erhöhung der Empfindlichkeit verwendet. Des Weiteren kombinierten die Autoren die DOSY- mit einer INEPT-Sequenz (INEPT = insensitive nuclei enhanced by polarization transfer), um die Signale der wasserstoffsubstituierten Kohlenstoffatome während der Umsetzung zu verstärken.<sup>[110]</sup> Durch den Vergleich der Diffusionskoeffizienten (und damit von  $r_s$ ) der gebildeten Intermediate **96** mit denen von bekannten Zirconocenderivaten wie **97–99** konnte die Struktur der dimeren Zwischenstufe **96** aufgeklärt werden (siehe Tabelle 7). Diese Untersuchung ist ein Beispiel für den enormen Nutzen der Diffusions-NMR-Spektroskopie bei der Untersuchung der Struktur metallorganischer Komplexe, bei denen Aggregationen, Dimerisierungen und Ligandeninsertionen auftreten können.

## 5. Anwendungen von Diffusions-NMR-Messungen in der Kombinatorischen Chemie

In den vergangenen Jahren hat sich die Kombinatorische Chemie zu einem wichtigen Werkzeug in der organischen und pharmazeutischen Forschung entwickelt.<sup>[3, 110, 111]</sup> Die Kombinatorische Chemie liefert Gemische einer großen Zahl von Verbindungen in kleinsten Konzentrationen, wodurch NMR-Methoden mit hohem Probendurchsatz benötigt werden. Es müssen daher Methoden entwickelt werden, die – vorzugsweise ohne Isolierung – eine Signalzuordnung von Verbindungen in Gemischen ermöglichen. Da eines der Hauptziele der Kombinatorischen Chemie darin liegt, Leitverbindungen und spezifische Liganden für unterschiedliche Rezeptoren zu identifizieren, werden auch effiziente Durchmusterungsmethoden zum Nachweis der Wechselwirkung zwischen potenziellen Liganden und den jeweiligen Rezeptoren benötigt.



**Schema 7.** Mithilfe einer kombinierten DOSY- und INEPT-Sequenz konnte bei der Reaktion von  $\text{CO}_2$  mit  $[\text{Cp}_2\text{Zr}(\text{Cl})\text{H}]$  die Struktur der dimeren Zwischenstufe 96 aufgeklärt werden.

**Tabelle 7:** Experimentelle und berechnete Diffusionskoeffizienten  $D$  und hydrodynamische Radien  $r_s$  einiger Zirconiumkomplexe.<sup>[109]</sup>

	Experimentell	Berechnet		
	$r_s$ [Å] <sup>[a]</sup>	$D$ [ $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ]	$r_s$ [Å]	$D$ [ $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ] <sup>[a]</sup>
99	3.0	$1.61 \times 10^{-5}$	3.1 <sup>[b]</sup>	$1.55 \times 10^{-5}$
97	3.7	$1.31 \times 10^{-5}$	3.9 <sup>[b]</sup>	$1.30 \times 10^{-5}$
98	4.2	$1.55 \times 10^{-6}$	3.6 <sup>[c]</sup>	$1.81 \times 10^{-6}$
96	6.3	$1.05 \times 10^{-6}$	6.1 <sup>[c]</sup>	$1.07 \times 10^{-6}$

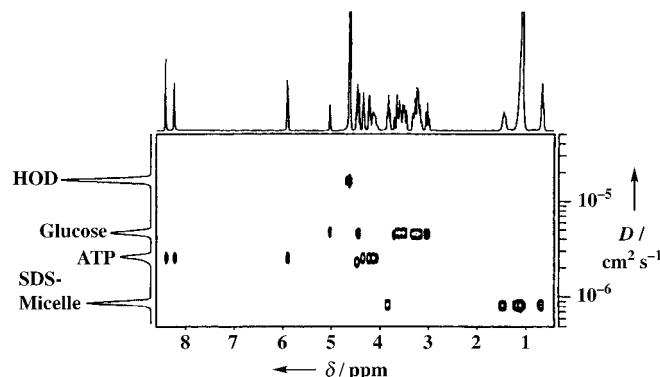
[a] Berechnet mithilfe der Stokes-Einstein-Gleichung. [b] Berechnet aus Röntgenstrukturdaten unter Annahme einer sphärischen Form. [c] Berechnet aus der energieminierten Gasphasenstruktur (PM3).

Zudem kann die Kinetik von Festphasenreaktionen von der Schwellfähigkeit der festen Hilfsphase sowie von der Fähigkeit der Reagentien abhängen, die Oberfläche des Festkörpers zu erreichen. Es erscheint daher logisch, im Zusammenhang mit der Kombinatorischen Chemie, wo Charakterisierung und Screening potenzieller neuer Liganden zentrale Themen sind, die Diffusions-NMR-Spektroskopie einzusetzen. Wir werden im Folgenden einige entsprechende Anwendungen skizzieren, wobei der Schwerpunkt bei DOSY-Anwendungen liegen wird, die ursprünglich in der Gruppe von Johnson, Jr.<sup>[33–36]</sup> entwickelt und von Shapiro und Mitarbeitern<sup>[37,112]</sup> sowie einigen anderen Arbeitsgruppen<sup>[113]</sup> angewendet wurden. Dieser Abschnitt soll das Potenzial, aber auch die Grenzen von Diffusions-NMR-Verfahren in der Kombinatorischen Chemie aufzeigen, wobei wir uns auf die beiden Aspekte der Charakterisierung von Gemischen und des Ligandenscreenings konzentrieren wollen.

### 5.1. DOSY zur Bestimmung von Gemischen

DOSY ist ein effizientes Verfahren zur „virtuellen Auf trennung“ von Gemischen.<sup>[34,35,37,113]</sup> Wie bereits in Abschnitt 3.3 erläutert, liefert DOSY 2D-Spektren, in denen auf einer Achse die chemische Verschiebung, auf der anderen die Diffusionskoeffizienten aufgetragen sind. Tatsächlich

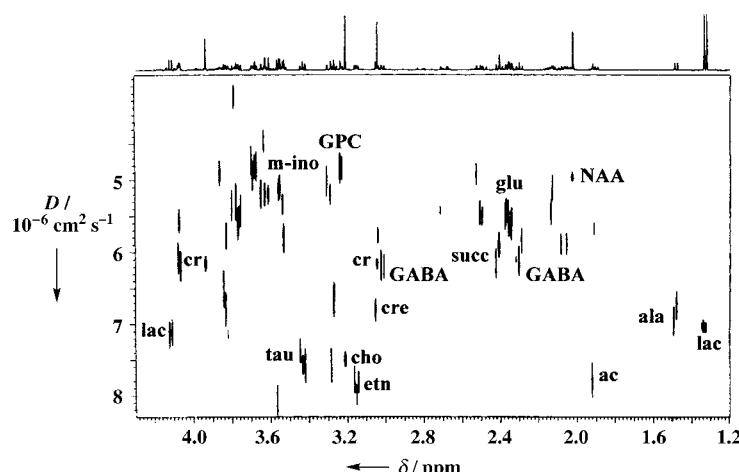
wurde die Eignung des DOSY-Verfahrens zunächst anhand von Gemischen belegt.<sup>[34,37,112–115]</sup> Abbildung 23 zeigt eine der ersten DOSY-Anwendungen, mit welcher der Nachweis gelang, dass Gemische tatsächlich auf der Grundlage des



**Abbildung 23.** 2D-DOSY-Spektrum eines Gemisches aus HOD, Glucose, ATP und SDS-Micellen. Mit Genehmigung aus Lit. [36a].

Molekulargewichte der einzelnen Verbindungen „virtuell aufgetrennt“ werden können. Bei dieser Untersuchung wurden Verbindungen deutlich unterschiedlicher Größe wie HOD, Glucose, ATP und Natriumdodecylsulfat(SDS)-Micellen nachgewiesen.<sup>[36a]</sup> Im Zuge der Fortschritte bei der Gradiententechnik sowie bei Erhalt und Auswertung von DOSY-Spektren konnten wie in Abbildung 24 gezeigt mit hochauflöstem DOSY (HR-DOSY) auch anspruchsvollere Gemische charakterisiert werden.<sup>[115–117]</sup> In dieser Abbildung erkennt man, dass eine Reihe von Metaboliten, deren Molekulargewichte sich zum Teil nur unwesentlich unterscheiden, aufgelöst werden können.<sup>[115]</sup>

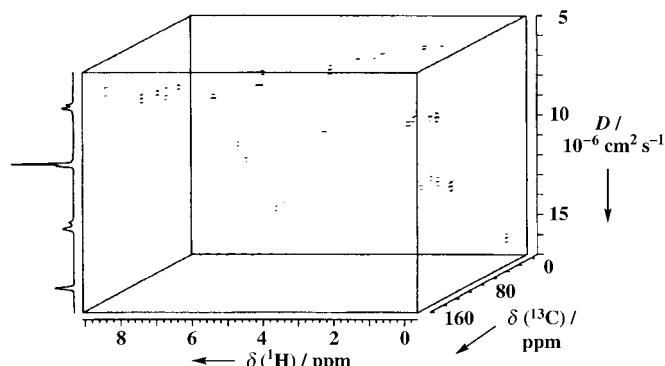
Mit den heute zur Verfügung stehenden konventionellen Methoden zur Untersuchung nicht überlappender Signale (in derselben Probe) lassen sich Diffusionskoeffizienten unterscheiden, die nur um wenige Prozent differieren. Bei über-



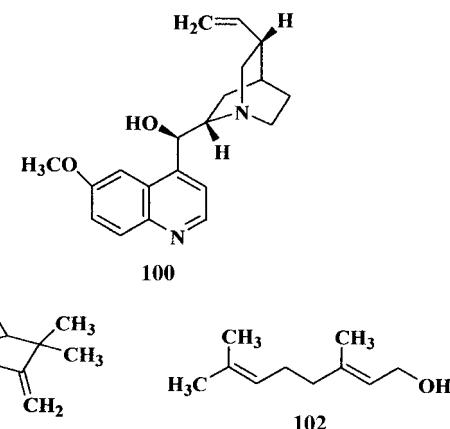
**Abbildung 24.** 2D-DOSY-Spektrum (500 MHz) des Perchlorsäureextrakts des Hirns einer Wüstenspringmaus in  $\text{D}_2\text{O}$ . Die Zuordnungen sind wie folgt: ac = Acetat, ala = Alanin, cho = Cholin, cr = Creatinin, etn = Ethanolamin, GABA =  $\gamma$ -Aminobutansäure, glu = Glutamin, GPC = Glycerophosphocholin, lac = Lactat, m-ino = myo-Inositol, NAA = N-Acetylaspartat, succ = Succinat und tau = Taurin. Mit Genehmigung aus Lit. [115].

lappenden Signale müssen sich die Diffusionskoeffizienten mindestens um den Faktor 2–3 unterscheiden, um sie in einem konventionellen DOSY-Spektrum auflösen zu können.<sup>[34,112]</sup> Beim DOSY-Verfahren müssen eine Reihe von 1D-Spektren mit gutem Signal-Rausch-Verhältnis (signal-to-noise ratio, SNR) aufgenommen werden, daher wird dieses Verfahren am leichtesten  $^1\text{H}$ -NMR-spektroskopisch durchgeführt. Überlappende Signale können zu einem Problem werden, wenn in einem Vielkomponentengemisch oder in einzelnen, komplexen Verbindungen viele Protonen mit unterschiedlichen chemischen Verschiebungen vorliegen. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu minimieren, ist die Kopplung von DOSY mit einer 2D-Sequenz, für die überlappende Signale ein geringeres Problem sind; dies führt zu einer dreidimensionalen Sequenz, dem 3D-DOSY. Da sich die Diffusionskomponente relativ einfach in 2D-Sequenzen integrieren lässt, sind viele 3D-DOSY-Verfahren leicht zugänglich.<sup>[34,38,39,112]</sup>

Neben den Experimenten, die dem prinzipiellen Eignungsnachweis für das Verfahren dienen, sind nur wenige Anwendungen in der Kombinatorischen Chemie bekannt. Die Hauptgründe mögen sein, dass die 3D-DOSY-Sequenz besonders zeitintensiv ist und viel Speicherplatz für die gesammelten Daten benötigt – der erste Punkt ist dabei sicher der wichtigere. Abbildung 25 zeigt zum Beispiel ein 3D-DOSY-HMQC-Spektrum (HMQC = heteronuclear multiple quantum coherence) eines Gemisches aus Chinin (100), Camphen (101) und Geraniol (102) in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .<sup>[39c]</sup> Das 3D-DOSY-Spektrum zeigt keine Signalüberlappung, sodass es sehr viel einfacher ist, aus diesem Spektrum Strukturinformationen zu erhalten und die Signale den Verbindungen des Gemisches zuzuordnen. Die Methode eignet sich allerdings nur für relativ konzentrierte Proben; eine bessere Lösung sind Hybridsequenzen, die eine Diffusionsgewichtung in das 2D-NMR-Spektrum einbringen, ohne die Akquisitionszeit zu

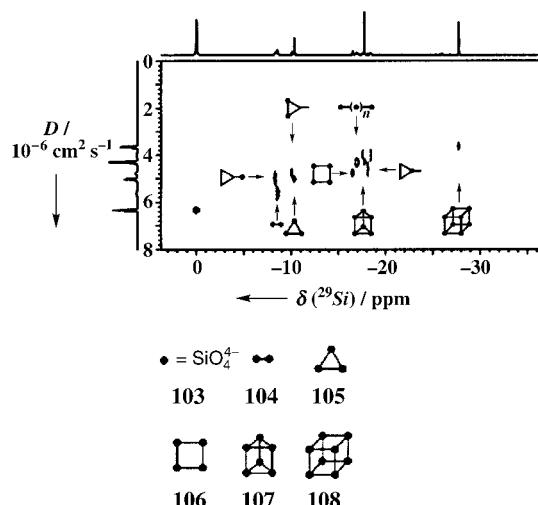


**Abbildung 25.** 3D-DOSY-HMQC Spektrum von Chinin (100), Camphen (101) und Geraniol (102) in  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Links: Projektion der Integrale auf die Diffusionsachse. Mit Genehmigung aus Lit. [39c].



verlängern.<sup>[116b]</sup> Eine andere Möglichkeit besteht darin, auf NMR-aktive Kerne auszuweichen, deren chemische Verschiebungen sich über einen größeren Bereich erstrecken. Die Gruppe von Morris hat dafür vor kurzem ein Beispiel geliefert: Ein Gemisch aus Siliciumverbindungen konnte durch ein  $^{29}\text{Si}$ -DOSY-Experiment charakterisiert werden.<sup>[117]</sup> Man erkennt eine klare Auflösung der Signale der vier Hauptkomponenten dieses Gemisches, nämlich des monomeren Silicats (103), des cyclischen Trimers (105), des prismatischen Hexamers (107) und des kubischen Oktamers (108; Abbildung 26). Darüber hinaus scheinen auch die Signale des Dimers (104) und des cyclischen Tetramers (106) aufgelöst zu sein. In diesem Experiment konnten die einzelnen Verbindungen gut aufgelöst werden, allerdings sollte darauf hingewiesen werden, dass hierbei eine konzentrierte Probe von mit  $^{29}\text{Si}$ -angereicherten Silicaten verwendet wurde (99.35 %  $^{29}\text{SiO}_2$ ) und dass zur Aufnahme des Spektrums mehrere Stunden Messzeit nötig waren.

Diese aktuellen Ergebnisse, die unter Verwendung konventioneller Instrumente erzielt worden sind, belegen, dass die derzeit verfügbare Technik bereits dazu ausreicht, subtile Unterschiede in den Molekulargewichten nachzuweisen und zur virtuellen spektroskopischen Auftrennung von Verbindungen zu nutzen.

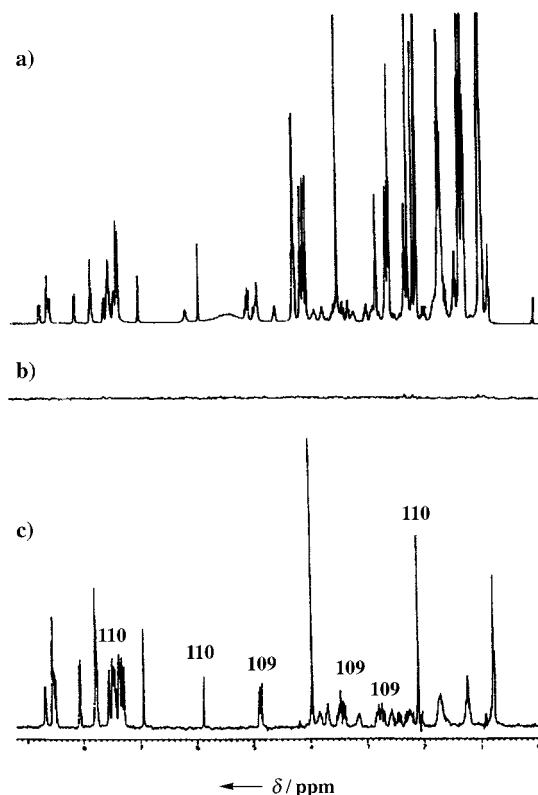


**Abbildung 26.**  $^{29}\text{Si}$ -DOSY-Spektrum (99.34 MHz) von Silikaten (0.5 M, angereichert mit 99.35 %  $^{29}\text{Si}$ ); oben:  $^{29}\text{Si}$ -Spektrum, seitlich: Projektion der Integrale auf die Diffusionsachse. Die Messzeit der zehn bipolaren STE-Spektren, die mit je 320 Scans erhalten wurden, betrug insgesamt 7 h. Mit Genehmigung aus Lit. [117].

## 5.2. Liganden-Screening mit Diffusions- und Affinitäts-NMR-Spektroskopie

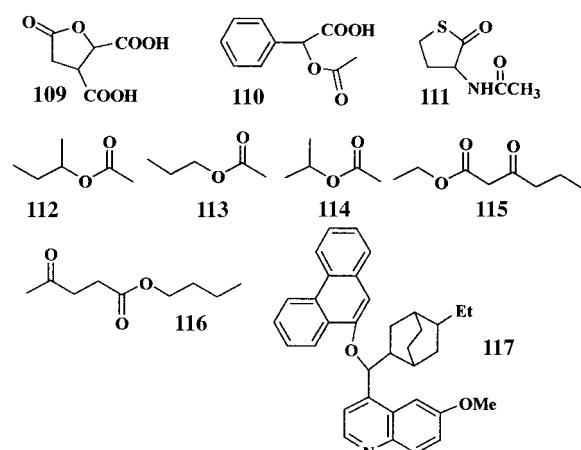
Für NMR-Screenings ist die Nutzung einer Reihe von Parametern, die sich im Verlauf einer Komplexbildung verändern, zum Beispiel der chemischen Verschiebung, des Nuclear-Overhauser-Effekts (NOE), der Relaxation oder der Diffusion, vorgeschlagen worden.<sup>[118]</sup> Die am häufigsten verwendete NMR-Screeningmethode ist die von Fesik und Mitarbeitern entwickelte SAR-by-NMR-Methode (SAR = Struktur-Aktivitäts-Beziehungen).<sup>[119]</sup> Der Diffusionskoeffizient lässt sich prinzipiell dazu nutzen, beim Screening die Wechselwirkungen zwischen kleinen Molekülen und spezifischen Rezeptoren nachzuweisen und die Spektren unterschiedlicher Moleküle voneinander zu trennen, ohne die Komponenten eines Gemisches physikalisch aufzutrennen. Wie wir in Abschnitt 4.1.1. gezeigt haben, lässt sich aus der Änderung des Diffusionskoeffizienten unter der Voraussetzung eines schnellen Austauschs eine Assoziationskonstante ermitteln. Dazu ist eine quantitative Bestimmung der Diffusionskoeffizienten nötig, was wiederum eine vollständige Charakterisierung der Signalabschwächung als Funktion der Diffusionsgewichtung voraussetzt. Beim Screening dagegen, wo lediglich Hinweise auf Komplexbildungen oder Aussagen über die relative Bindungsstärke gefragt sind, müssen nur wenige Datenpunkte erfasst werden, um nach erfolgreichen Anbindungen von Liganden an einen Rezeptor zu suchen.<sup>[120a,b]</sup>

Ein Verfahren, bei dem nur ein Datenpunkt erfasst wird, wurde von Shapiro und Mitarbeitern entwickelt und ist in Abbildung 27 dargestellt.<sup>[120b]</sup> Dabei wurde zunächst das 1D- $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum eines Gemisches aus acht potenziellen Liganden (**109–116**) und dem Hydrochinin-9-phenanthrylether **117** als Rezeptor aufgenommen (Abbildung 27a). Anschließend wurden die experimentellen Bedingungen des PFG-Experiments bestimmt (Stärke des Gradienten und



**Abbildung 27.** Screening mit NMR-Methoden: a) 1D- $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (400 MHz) einer Mischung aus den neun Komponenten **109–117** in  $\text{CDCl}_3$  in 10 mM Konzentrationen. b) Mit der LED-Sequenz aufgenommenes 1D-Pulsgradienten- $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der gleichen Mischung, jedoch ohne **117**. c) 1D-Pulsgradienten- $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Achtkomponentenmischung nach Zugabe von **117** unter denselben Messbedingungen wie in (b). Signale von **109** und **110** sind markiert. Alle anderen Signale sind der Verbindung **117** zuzuordnen. Mit Genehmigung aus Lit. [120b].

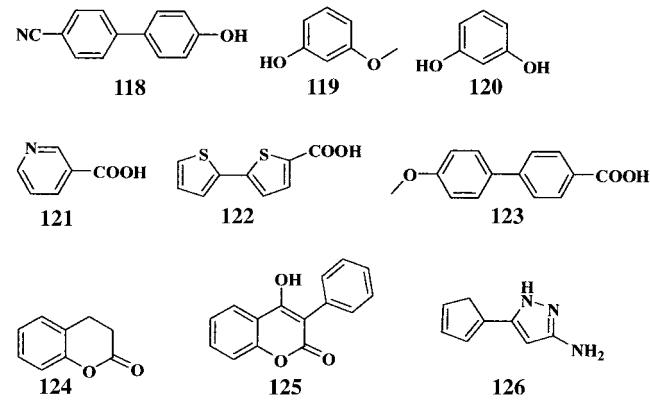
Dauer), mit denen sich das Spektrum des Gemisches in Abwesenheit von **117** eliminieren lässt (Abbildung 27b). Erneut wurde dann, jedoch nach Zugabe von **117**, unter diesen Bedingungen ein PFG-1D- $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum aufgenommen. Nur Verbindungen, die mit dem Rezeptor wechselwirken, sollten einen verminderten Diffusionskoeffizien-



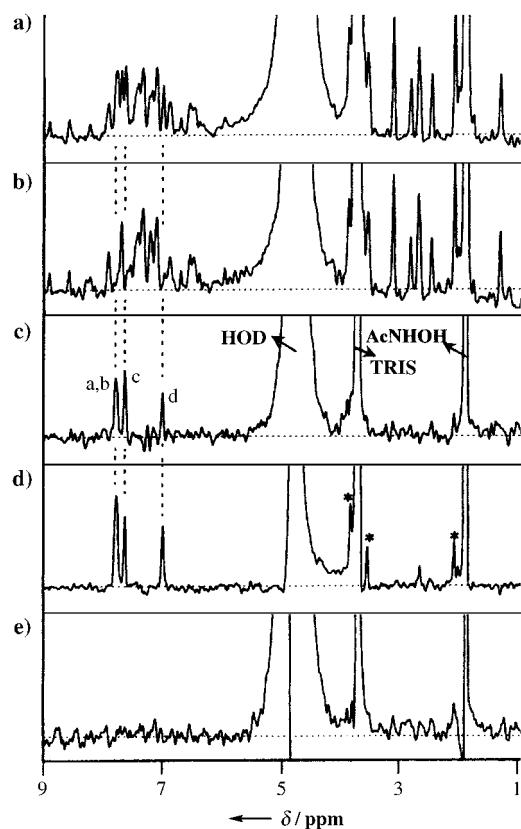
ten aufweisen, und die Signale dieser Verbindungen sollten daher unter den zuvor optimierten spektroskopischen PFG-Aufnahmebedingungen wieder auftreten – tatsächlich konnten in diesem Spektrum außer den Signalen von **117** auch die Signale von **109** und **110** beobachtet werden, die mit dem Rezeptormolekül **117** wechselwirken (Abbildung 27c).

Diese einfache Methode zum Screening potenzieller Liganden und Rezeptoren hat einige Vorteile: Der gemessene Parameter, d.h. der Diffusionskoeffizient, ist direkt mit dem beobachteten Phänomen verbunden, da man bei Liganden, die mit dem Rezeptor wechselwirken, eine Abnahme des Diffusionskoeffizienten erwartet und tatsächlich auch beobachtet. Dies ist ein Unterschied zu anderen (Nicht-NMR-)Parametern sowie zur chemischen Verschiebung und zur Relaxationszeit, die sowohl zu- als auch abnehmen können. Darüber hinaus lässt sich ein quantifizierbares Ergebnis aus einem Gemisch mehrerer Liganden schon innerhalb weniger Minuten erhalten. Ein weiterer wichtiger Vorteil beim Screening mithilfe der Diffusions-NMR-Spektroskopie ist die Tatsache, dass diese Methode prinzipiell auf alle Rezeptoren anwendbar ist – sogar auf Systeme mit zuvor unbekannten Liganden und Rezeptoren. Dies ist ein deutlicher Unterschied zur SAR-NMR-Spektroskopie, dem Hauptkonkurrent auf dem Gebiet des NMR-Screenings.<sup>[118–119]</sup> Diese Methode beruht auf dem Nachweis von Änderungen der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -heteronuklearen Einquantenohärenz (single quantum coherence, HSQC) eines einheitlich  $^{15}\text{N}$ -markierten Rezeptors nach der Zugabe potenzieller Liganden. Diese Methode lässt sich daher nur auf bekannte Rezeptoren anwenden, von denen eine ausreichende Menge (ca. 200 mg) markierter Substanz verfügbar sein muss. Der Rezeptor sollte eine möglichst hohe Löslichkeit und ein Molekulargewicht haben, das 30000 Da nicht übersteigt.<sup>[121]</sup> Die Diffusions-NMR-Spektroskopie ist dagegen eine unspezifische Methode und kann daher auch zum Screening möglicher Liganden mit möglichen Rezeptoren genutzt werden, und dies praktisch ohne Begrenzung bei der Rezeptorgröße. Sie kann im Prinzip auch in Kombination mit anderen NMR-Sequenzen unter Nutzung aller NMR-aktiven Kerne verwendet werden. Wie alle NMR-Verfahren ist auch das Screening mithilfe der Diffusions-NMR-Spektroskopie weniger anfällig für Komplikationen, die durch Verunreinigungen verursacht sind. Zudem ist diese Methode umso empfindlicher, je deutlicher sich Ligand und Rezeptor in ihrer Größe unterscheiden. Es kann sogar von Vorteil sein, Ligandenanlagerungen an große Rezeptoren zu verfolgen, die selbst keine NMR-Signale ergeben, denn der größte Nachteil des einfachen Liganden-Screenings mithilfe der Diffusions-NMR-Spektroskopie liegt, wie aus Abbildung 27 deutlich wird, darin, dass sowohl die Signale der mit dem Rezeptor wechselwirkenden Liganden als auch die des Rezeptors selbst im Spektrum zu sehen sind.<sup>[120a]</sup> Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit von Signalüberlappungen, und die Identifizierung der wechselwirkenden Liganden wird erschwert. Relativ große Rezeptoren, die wegen kurzer  $T_2$ -Relaxationszeiten unter den gewählten Aufnahmebedingungen kein NMR-Signal geben, erleichtern daher die Charakterisierung bindender Liganden.<sup>[121]</sup> In solchen Systemen erscheinen nur die Signale der wechselwirkenden Liganden im Spektrum.

Es wurden mehrere Methoden vorgeschlagen, mit denen sich die Zuordnung von Signalen beim Screening mit der Diffusions-NMR-Spektroskopie verbessern lässt: Fesik und Mitarbeiter schlugen vor, die erhaltenen Spektren zu editieren und auf diese Weise zu vereinfachen; dazu sollten die Signale des Rezeptors durch Subtraktion eliminiert werden, sodass nach wenigen Subtraktionschritten lediglich die Signale der bindenden Liganden im Spektrum verbleiben.<sup>[122]</sup> Die Autoren bestätigten die Eignung dieses Verfahrens anhand von Liganden für das FK506-Bindungsprotein und für die katalytisch aktive Domäne von Stromelysin. Im Falle von Stromelysin wurden der Ligand **118** sowie die acht



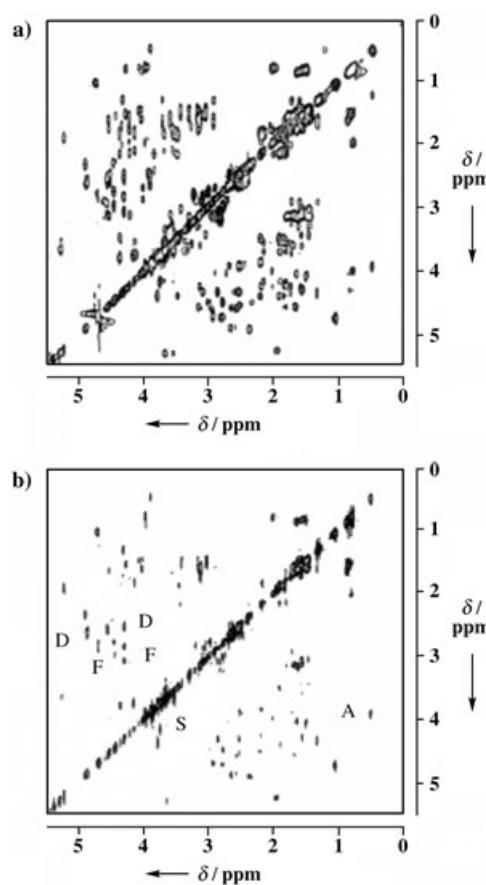
kleineren Moleküle **119–126**, von denen man keine Wechselwirkungen mit Stromelysin erwartet, untersucht (Abbildung 28). Zunächst wurden bei geringer Gradientenstärke die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von **118–126** in Gegenwart und in Abwesenheit (Abbildung 28a) von Stromelysin aufgenommen. Die Signale des Proteins wurden dann durch Subtraktion eines bei höheren Gradientenstärken aufgenommenen Spektrums (Daten nicht gezeigt) des Ligandengemisches mit Stromelysin eliminiert (Abbildung 28b). Durch Bildung der Differenz der Spektren aus Abbildung 28a und Abbildung 28b gelang so die Identifizierung der Signale des bindenden Liganden, **118** (Figure 28c). Diese Vorgehensweise ist sicher nur in solchen Fällen praktikabel, wo sich die chemischen Verschiebungen der beteiligten Komponenten im Verlauf der Komplexierung nicht stark ändern und sich Ligand und Rezeptor deutlich in ihrer Größe unterscheiden. So beobachteten Shapiro und Mitarbeiter, dass das Verfahren von Fesik beim Durchmustern von zehn Tetrapeptiden (zwei Liganden und acht nicht bindende Tetrapeptide) in Bezug auf ihr Bindungsverhalten an Vancomycin nicht funktionierte.<sup>[123a]</sup> Sie schlugen daher ein alternatives Verfahren zur Identifizierung der bindenden Liganden vor, nämlich die Kombination der Diffusionsgewichtung mit einer 2D-TOCSY-Sequenz (TOCSY = total correlation spectroscopy).<sup>[123b]</sup> Dieses Verfahren nannten sie DECODES (diffusion encoded spectroscopy). Die Autoren konnten durch einen Vergleich der DECODES- mit den TOCSY-Spektren der Serie von Tetrapeptiden in Gegenwart von Vancomycin zeigen, dass lediglich die Signale der Aminosäuren D, F, S und A im Spektrum verbleiben. Das deutet darauf hin, dass nur



**Abbildung 28.** Analyse der Ligandenbindung an das katalytische Zentrum von Stromelysin durch Editieren eines Diffusions-NMR-Spektrums.<sup>[122]</sup> a) PFG-STE-Spektrum eines Gemisches von **118–126** in Abwesenheit von Stromelysin unter Verwendung von Pulsgradienten niedriger Intensität. b) Das gleiche Spektrum wie in (a) nach Eliminierung der Proteinsignale durch Subtraktion eines mit intensitätsstarken Pulsgradienten aufgenommenen Spektrums derselben Probe. c) Differenzspektrum (a)–(b). Die Signale von **118** bei  $\delta = 7.84, 7.70$  und  $7.06$  ppm sind durch vertikale gestrichelte Linien markiert. Die Signale von TRIS (2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol;  $\delta = 3.74$  ppm) und AcNHOH (Acetohydroxamsäure;  $\delta = 1.94$  ppm) sind deutlich abgeschwächt, jedoch nicht vollständig eliminiert. d) Referenzspektrum von **118** in Reinsubstanz. Sterne (\*) markieren Verunreinigungen des Puffers. e) Differenzspektrum wie in (c), jedoch vom Gemisch der acht Substanzen (**119–126**), die nicht an Stromelysin binden. Mit Genehmigung aus Lit. [122].

die beiden Peptide DDFA und DDFS an Vancomycin binden (siehe Abbildung 29). Diese einfache Methode ermöglichte also das Screening eines Systems, in dem nur relativ schwache Bindungskräfte vorherrschen, in dem die Liganden alle eine ähnliche Größe haben und sich darüber hinaus nur wenig von der Größe des kleinen Rezeptormoleküls Vancomycin unterscheiden.<sup>[123b]</sup> Dieses Verfahren wurde auch für Bindungsstudien an einem DNA-Dodekamer genutzt.<sup>[123c]</sup>

Einige DOSY-Spektren können im Prinzip zum Screening potenzieller Liganden auf ihre Bindungsaffinität an bekannte oder unbekannte Rezeptoren verwendet werden.<sup>[34]</sup> Dazu müssen lediglich die DOSY-Spektren eines Gemisches potenzieller Liganden in Gegenwart und in Abwesenheit des zu untersuchenden Rezeptors aufgenommen werden – es muss allerdings sichergestellt werden, dass der Rezeptor keinen Einfluss auf die Viskosität der Probe hat. Durch den Ver-



**Abbildung 29.** a) TOCSY-NMR-Spektrum des Gemisches aus den Tetrapeptiden DDFA, YPFV, GLGG, GPRP, RGDS, GRGD, RGFF, KDEL, DASV und DDFS in Gegenwart von Vancomycin. b) Das entsprechende DECODES-Spektrum mit den verbleibenden Signalen der Aminosäuren D, F, S und A. In Anlehnung an Lit. [123b], mit Genehmigung.

gleich der Änderungen in den DOSY-Spektren sollten sich bindende Liganden identifizieren lassen. Bei diesem Verfahren sollte die Signalauflösung deutlich besser sein, da die Information nun über zwei Dimensionen verteilt ist und man die beiden zweidimensionalen Spektren des DOSY-Experiments miteinander vergleicht. Sollten dennoch Signale überlappen, kann man auf eine 3D-DOSY-Sequenz ausweichen, wobei man jedoch Signalüberlappungen nur auf Kosten einer längeren Akquisitionszeit vermeiden kann.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

Die hochauflöste Diffusions-NMR-Spektroskopie ist eine sehr einfache, flexible und akkurate Methode zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten. Mit diesem NMR-spektroskopischen Standardverfahren ist es möglich, ganze Ensembles von Signalen simultan zu untersuchen, indem mit dem Diffusionskoeffizienten ein weiterer Parameter zur Charakterisierung von Systemen in Lösung eingeführt wird. In diesem Aufsatz wollten wir die Vielfalt chemischer Problemstellungen aufzeigen, die mithilfe der Diffusions-NMR-Spektroskopie angegangen werden können, darunter

die Bestimmung von Assoziationskonstanten, die Untersuchung der Aggregation, der Einschlussverbindungen, der Solvatation und Hydratation und der Ionenpaarbildung, die Abschätzung von Wechselwirkungen in Mehrkomponentensystemen sowie die Bestimmung der effektiven Größe und Struktur reaktiver Zwischenstufen und metallorganischer und supramolekularer Systeme wie der Rotaxane, Catenane und molekularen Kapseln. In vielen Mehrkomponentensystemen bietet die Kombination von Diffusions-NMR-Spektroskopie mit anderen NMR-Verfahren bessere Möglichkeiten zur Kartierung der Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten. Mithilfe des Diffusionskoeffizienten lässt sich auch die kinetische Stabilität von Supramolekularen Systemen aus mehreren Komponenten auf einfache Weise untersuchen, indem die Auswirkung eines kleinen Überschusses einer der Komponenten auf den Diffusionskoeffizienten des supramolekularen Systems analysiert wird. Darüber hinaus können mit der Diffusions-NMR-Spektroskopie Gemische oder nicht zu große Verbindungsbibliotheken „virtuell aufgetrennt“ werden. Die Methode bietet daher eine effiziente und generelle Möglichkeit, ohne Einschränkungen für das untersuchte System ein Screening nach Leitverbindungen und potenziellen Liganden selbst für unbekannte Rezeptoren durchzuführen. Ein wichtiges Charakteristikum der Diffusions-NMR-Spektroskopie ist die Tatsache, dass der Diffusionskoeffizient sehr viel direkter mit den beobachteten Phänomenen zusammenhängt als dies bei den herkömmlichen und häufiger genutzten NMR-Parametern, der chemischen Verschiebung und der Relaxationszeit, der Fall ist. Die Diffusion ist ein Filter, der relativ einfach zu erhalten ist und sich leicht mit beinahe jeder bekannten NMR-Sequenz kombinieren lässt.

In diesem Aufsatz sind wir nicht ausführlich auf technische Details und auf theoretische Aspekte der Diffusion eingegangen, die aber in anderen hier zum Teil zitierten Abhandlungen umfassend dokumentiert sind. Der Schwerpunkt dieses Aufsatzes lag vielmehr auf der Präsentation von Anwendungen mit Bezug zur Supramolekularen und Kombinatorischen Chemie. Obwohl wir auf die Schilderung technischer Details verzichtet haben, sollte durch die hier vorgestellten Anwendungsbeispiele deutlich geworden sein, dass bei geeigneten Systemen mit der derzeit verfügbaren Technik (mit konventionellen Instrumenten und Programmen) eine leichte und akkurate Bestimmung von Diffusionskoeffizienten in hoher Auflösung möglich ist. Die Untersuchung der hier vorgestellten Systeme mit ihren relativ langen  $T_2$ -Relaxationszeiten und ihren großen Diffusionskoeffizienten ist beim derzeitigen Stand der Technik bereits einfach. Zudem ist absehbar, dass die Gradiententechnik ständig weiterentwickelt wird, da sie eine wichtige Rolle für andere MR-Anwendungen spielt. Bereits mit der derzeit verfügbaren Gradiententechnik liefern die PGSE- und STE-Diffusionssequenzen bei weniger anspruchsvollen Systemen mit nicht zu kurzen  $T_2$ -Relaxationszeiten sehr gute Ergebnisse. Es besteht daher sehr viel weniger Bedarf für die LED- und die BPLED-Sequenzen, die wegen der in den Laboratorien seinerzeit verfügbaren, weit weniger ausgereiften Gradiententechnik in der Anfangszeit des DOSY-Verfahrens so wichtig waren. Heutzutage haben kommerzielle Geräte DOSY-Verfahren

und Sequenzen mit eingearbeiteten Diffusionsgewichtungen bereits vorinstalliert. Wir gehen daher davon aus, dass die Diffusions-NMR-Spektroskopie in der nächsten Zukunft wesentlich stärker in der Supramolekularen und Kombinatorischen Chemie eingesetzt werden wird.

Das Hauptproblem der Diffusions-NMR-Spektroskopie wie das von NMR-spektroskopischen Verfahren im Allgemeinen ist ihre relative niedrige Empfindlichkeit, die konzentrierte Proben und lange Akquisitionszeiten nötig macht. Es kommt hinzu, dass die Diffusionsgewichtung ein weiteres Herausfiltern des Signals bedeutet. In einer konventionellen DOSY-Sequenz werden 1D- und 2D-NMR-Sequenzen in 2D- bzw. 3D-NMR-Experimente umgewandelt. Daraus folgt, dass relativ lange Akquisitionszeiten benötigt werden. Dieses Problem wird in der Zukunft jedoch zumindest teilweise gelöst werden, wenn an Hochfeldmagneten (über 600 MHz) Gradientensysteme in Kombination mit Kryoprobenköpfen zur Verfügung stehen. Die hier geschilderten Limitierungen sind jedoch nicht sonderlich gravierend, da bereits mit der heute verfügbaren Technik PGSE- oder STE-Diffusionsexperimente an Wirt-Gast- oder supramolekularen Systemen durchgeführt werden können, deren Molekulargewicht einige wenige kDa beträgt und deren Signalbreite akzeptabel (d.h.  $\Delta\nu_{1/2} = 10$  Hz) ist. Bei einer Konzentration von ca. 5 mM beträgt die Messzeit an einem konventionellen 400- oder 500-MHz-Spektrometer etwa eine Stunde.

Zwei weitere Anwendungsgebiete für die Diffusions-NMR-Spektroskopie, die in diesem Aufsatz nicht berücksichtigt werden konnten, sollen an dieser Stelle kurz erwähnt werden: die Biochemie und die Proteinforschung<sup>[124]</sup> sowie der sich gerade erst entwickelnde Bereich der Halbfestkörper, wo die Diffusions-NMR-Spektroskopie mit Rotationen um den magischen Winkel (magic angle spinning, MAS) kombiniert wird.<sup>[125]</sup> In der Biochemie und der Proteinforschung wurden Diffusionsmessungen dazu verwendet, Selbstaggregation, Anlagerungen von Liganden an DNA sowie Proteininfaltungen zu untersuchen.<sup>[124, 126]</sup> Die derzeit aufsehenerregendste Entwicklung ist der Einsatz der Diffusions-NMR-Spektroskopie bei der Beobachtung von Proteininfaltungen in Echtzeit.<sup>[127]</sup> Buevich und Baum konnten mit der anspruchsvollen  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ -LED-HSQC-Diffusionssequenz den Faltungsprozess des spezifisch  $^{15}\text{N}$ -markierten Proteins T1-892 beobachten. Dazu verfolgten sie mithilfe der Diffusions-NMR-Spektroskopie das allmähliche Verschwinden des Monomers bei gleichzeitigem Auftreten des Trimmers und anderer kinetischer Intermediate. Dieser Durchbruch gelang zwar bei einem relativ langsamem Faltungsvorgang, doch lässt sich vorstellen, dass mit der Entwicklung hochempfindlicher Kryoprobenköpfe in Kombination mit Hochfeldmagneten und schnellen 2D-Pulssequenzen in Zukunft auch Untersuchungen schnellerer Prozesse möglich werden.

Durch die Methode der Diffusionsmessung an halbfesten Proben mithilfe der MAS-Technik,<sup>[125]</sup> die erst seit kurzem zur Verfügung steht, konnte zwischen eingeschlossenen und kovalent gebundenen kleinen Molekülen in geschwollenen Wang-Harzkügelchen unterschieden werden. Mit einer Kombination aus bipolaren LED- und CPMG-Sequenzen (CPMG = Carr-Purcell-Meiboom-Gill) kann die Wechselwirkung von Molekülen mit Harzen untersucht werden.

Dieses Gebiet ist auch für die Kombinatorische Chemie von herausragender Bedeutung.<sup>[125a,b]</sup>

Vor dem Hintergrund der bereits publizierten Anwendungen und im Hinblick auf die raschen Fortschritte bei der Entwicklung von Instrumenten und Programmen ist vorherzusehen, dass die Diffusions-NMR-Spektroskopie immer populärer werden wird. Sie wird dann ihren Höhepunkt erleben, wenn sie so transparent wie andere NMR-Methoden geworden ist. Mit diesem Aufsatz wollten wir dazu beitragen, dass Chemiker auf den Gebieten der Organischen, Anorganischen, Metallorganischen und Supramolekularen Chemie die hochauflöste Diffusions-NMR-Spektroskopie vermehrt in das Repertoire ihrer analytischen Methoden zur Untersuchung molekularer Wechselwirkungen in Lösung aufnehmen.

*Wir bedanken uns bei der Israel Science Foundation administered by the Israel Academy of Science and Humanities, Jerusalem, Israel, für die Unterstützung unserer Forschungen. Auch danken wir den Professoren S. E. Biali, V. Böhmer, R. Ungaro und D. N. Reinhoudt für die gute Zusammenarbeit sowie Professor S. E. Biali für das Lesen und die Kommentare zu diesem Manuskript.*

Eingegangen am 23. Oktober 2003  
Übersetzt von Prof. Dr. Rüdiger Faust, Kassel

- [1] a) J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry Concepts and Perspectives*, VCH, Weinheim, **1995**; b) J. W. Steed, J. L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*, Wiley, New York, **2000**.
- [2] a) *Comprehensive Supramolecular Chemistry, Vol. 1–10* (Hrsg.: J. L. Atwood, J. E. D. Davis, D. D. MacNicol, F. Vögtle, J.-M. Lehn), Pergamon, Oxford, **1996**; b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 4755–5750, (Spezialausgabe zum Thema Supramolekulare Chemie und Selbstassoziation (Hrsg. J. Halpern)).
- [3] *Combinatorial Chemistry: a Practical Approach* (Hrsg.: W. Bannwarth, E. Felder), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [4] E. L. Hahn, *Phys. Rev.* **1950**, 80, 580–594.
- [5] a) O. E. Stejskal, J. E. Tanner, *J. Chem. Phys.* **1965**, 42, 288–292; b) es ist anzumerken, dass die Diffusionszeit von der Form der Pulsgradienten abhängig ist, wie man aus Gleichung (9) auch erwarten kann. So beträgt zum Beispiel in der PGSE- und der STE-Diffusionssequenz mit sinusförmigen Pulsgradienten die effektive Diffusionszeit  $\Delta - \delta/4$ . Ist  $\Delta \gg \delta$ , so entspricht die Diffusionszeit ungefähr gleich  $\Delta$ .
- [6] a) J. Jeener, Ampère International Summer School, Basko Polje, Jugoslawien, **1971**; b) W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1976**, 64, 2229–2246.
- [7] A. Bax, *Two-Dimensional Magnetic Resonance in Liquids*, Delft University Press, D. Reidel Publishing Company, **1982**.
- [8] R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, Oxford University Press, Oxford, **1987**; b) T. D. W. Claridge, *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Pergamon, Amsterdam, **1999**.
- [9] P. Stilbs, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1987**, 17, 1–45, zit. Lit.
- [10] a) J. Kärger, H. Pfeifer, W. Heink, *Adv. Magn. Reson.* **1988**, 12, 1–88; b) ein kürzlich erschienener Band ist der Diffusions-NMR-Spektroskopie in chemischen Systemen gewidmet: *Magn. Reson. Chem.* **2002**, 40, S15–S152; c) ein kürzlich erschienener Band ist der Diffusions-NMR-Spektroskopie in chemischen und biologischen Systemen gewidmet: *Diffusion NMR and MRI: Basic Concepts and Applications* (Hrsg.: Y. Cohen, M. Neeman), *Israel. J. Chem.* **2003**, 43, 1–163.
- [11] W. S. Price in *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, (Hrsg.: G. A. Webb) Academic, London, **1996**, S. 51–142; b) T. Parella, *Magn. Reson. Chem.* **1996**, 34, 329–347; c) T. Parella, *Magn. Reson. Chem.* **1998**, 36, 467–495.
- [12] a) P. C. Lauterbur, *Nature* **1973**, 242, 190–191; b) D. D. Stark, W. G. Bardley, *Magnetic Resonance Imaging*, 2. Aufl., Mosby Company, St. Louis, **1992**; c) *Methods of Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy* (Hrsg.: I. R. Young), Wiley, Chichester, **2000**.
- [13] *Perfusion and Diffusion Magnetic Resonance Imaging: Applications to functional MRI* (Hrsg.: D. Le Bihan), Raven Press, New York, **1995**.
- [14] M. E. Moseley, Y. Cohen, J. Mintorovitch, L. Chileuitt, H. Shimizu, J. Kucharczyk, M. F. Wendland, P. R. Weinstein, *Magn. Reson. Med.* **1990**, 16, 330–346.
- [15] P. J. Basser, *NMR Biomed.* **1995**, 8, 333–344; P. J. Basser, J. Mattiello, D. Le Bihan, *Biophys. J.* **1994**, 66, 259–267; kürzlich ist ein Sonderheft über DTI erschienen: *NMR Biomed.* **2002**, 15, 431–593.
- [16] a) J. Kärger, D. M. Ruthven, *Diffusion in Zeolites and Other Microporous Solids*, Wiley, New York, **1992**; b) T. Nose, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **1993**, 27, 218–253.
- [17] a) W. S. Price, *Concepts Magn. Reson.* **1997**, 9, 299–336; b) P. T. Callaghan, S. L. Codd, J. D. Seymour, *Concepts Magn. Reson.* **1999**, 11, 181–202; c) W. S. Price, *Concepts Magn. Reson.* **1998**, 10, 197–237.
- [18] a) J. Kärger, H. Pfeifer, *NMR and Catalysis*, (Hrsg.: A. Pines, A. Bell), Dekker, New York, **1994**; b) P. T. Callaghan, A. Coy in *NMR Probes and Molecular Dynamics* (Hrsg.: R. Tycko), Kluwer, Dordrecht, **1993**, S. 490–523.
- [19] O. Söderman, P. Stilbs, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1994**, 26, 445–482.
- [20] G. Lindblom, G. Oradd, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1994**, 26, 483–515.
- [21] A. R. Waldeck, P. W. Kuchel, A. J. Lennon, B. E. Chapman, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1997**, 30, 39–68.
- [22] a) D. G. Corry, D. N. Garroway, *Magn. Reson. Med.* **1990**, 14, 435–444; b) P. T. Callaghan, D. MacGowan, K. J. Packer, F. O. Zelaya, *J. Magn. Reson.* **1990**, 90, 177–182; c) P. T. Callaghan, A. Coy, D. MacGowan, K. J. Packer, F. O. Zelaya, *Nature* **1991**, 351, 467–469.
- [23] P. W. Kuchel, A. Coy, P. Stilbs, *Magn. Reson. Med.* **1997**, 37, 637–643.
- [24] A. M. Torres, A. T. Taurins, D. G. Regan, B. E. Chapman, P. W. Kuchel, *J. Magn. Reson.* **1999**, 138, 135–143.
- [25] P. W. Kuchel, C. J. Durrant, *J. Magn. Reson.* **1999**, 139, 258–272.
- [26] a) Y. Assaf, A. Mayk, Y. Cohen, *Magn. Reson. Med.* **2000**, 44, 713–722; b) Y. Assaf, D. Ben-Bashat, J. Chapman, S. Peled, I. E. Biton, M. Kafri, Y. Segev, T. Hendl, A. D. Korczyn, M. Graif, Y. Cohen, *Magn. Reson. Med.* **2002**, 47, 115–126; c) Y. Assaf, Dissertation, Universität Tel Aviv, **2001**.
- [27] Y. Cohen, Y. Assaf, *NMR Biomed.* **2002**, 15, 516–542.
- [28] P. T. Callaghan, *Rep. Prog. Phys.* **1999**, 62, 599–670, zit. Lit.
- [29] a) U. Tallarek, D. van Dusschoten, H. Van As, E. Bayer, G. Guiuchon, *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 3486–3497; b) U. Tallarek, F. J. Vergeldt, H. Van As, *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 7654–7664; c) U. Tallarek, E. Rapp, A. Seidel-Morgenstern, H. Van As, E. Bayer, G. Guiuchon, *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 12709–12721.
- [30] Die Theorie der molekularen Diffusion und des molekularen Transports ist gut verstanden. Details dazu lassen sich im folgenden Buch finden: a) J. Crank, *The Mathematics of Diffusion*, 2. Aufl., Clarendon Press, Oxford, **1975**; b) E. L.

- Cussler, *Diffusion: Mass Transfer in Fluid Systems*, Cambridge University Press, Cambridge, **1984**.
- [31] A. Einstein, *Ann. Phys.* **1906**, *19*, 289–306.
- [32] J. E. Tanner, *J. Chem. Phys.* **1970**, *52*, 2523–2526.
- [33] S. J. Gibbs, C. S. Johnson, Jr., *J. Magn. Reson.* **1991**, *93*, 395–402.
- [34] C. S. Johnson, Jr., *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, *34*, 203–256, zit. Lit.
- [35] a) D. Wu, A. Chen, C. S. Johnson, Jr., *J. Magn. Reson. Ser. A* **1995**, *115*, 123–126; b) um die Wirbelströme weiter zu reduzieren, kann man sinusförmige anstelle der herkömmlichen rechtwinkligen Pulsgradienten verwenden.
- [36] a) D. Wu, A. Chen, C. S. Johnson, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4291–4299; b) D. Wu, A. Chen, C. S. Johnson, Jr., *J. Magn. Reson. Ser. A* **1996**, *123*, 215–218.
- [37] J. S. Gounarides, A. Chen, M. J. Shapiro, *J. Chromatogr. B* **1999**, *725*, 79–90, zit. Lit.
- [38] E. Gozansky, D. G. Gorenstein, *J. Magn. Reson. Ser. B* **1996**, *111*, 94–96.
- [39] a) D. Wu, A. Chen, C. S. Johnson, Jr., *J. Magn. Reson. Ser. A* **1996**, *121*, 88–91. Die Autoren haben die dritte Dimension nicht invertiert, um die Diffusionskoeffizienten zu erhalten. b) A. Jerschow, N. Müller, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1996**, *123*, 222–225; c) H. Barjat, G. A. Morris, A. G. Swanson, *J. Magn. Reson.* **1998**, *131*, 131–138.
- [40] a) K. A. Connors, *Binding Constants*, Wiley, New York, **1987**; b) H. Tsukube, H. Furuta, A. Odani, Y. Takeda, Y. Kudo, Y. Inoue, Y. Liu, H. Sakamoto, K. Kimura in *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol. 3 (Hrsg.: J. L. Atwood, J. E. D. Davis, D. D. MacNicol, F. Vögtle), Pergamon, Oxford, **1996**, Kap. 10; c) H.-J. Schneider, A. Yatsimirsky, *Principles and Methods in Supramolecular Chemistry*, Wiley, New York, **2000**, S. 137–226.
- [41] Für einige ausgewählte Beispiele und eine Zusammenstellung von Assoziationskonstanten siehe: a) J. J. Christensen, D. J. Eatough, R. M. Izatt, *Chem. Rev.* **1974**, *74*, 351–384; b) R. M. Izatt, J. S. Bradshaw, S. A. Nielsen, J. D. Lamb, J. J. Christensen, *Chem. Rev.* **1985**, *85*, 271–339; c) K. E. Krakowiak, J. S. Bradshaw, D. J. Zamecka-Krakowiak, *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 929–972; d) R. M. Izatt, K. Pawlak, J. S. Bradshaw, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 1721–2085; e) H. An, J. S. Bradshaw, R. M. Izatt, *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 543–572.
- [42] a) T. Wang, J. S. Bradshaw, R. M. Izatt, *J. Heterocycl. Chem.* **1994**, *31*, 1097–1114; b) Y. Inoue, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **1993**, *31*, 59–101; c) K. A. Connors, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1325–1357; d) C. S. Wilcox in *Frontiers of Supramolecular Chemistry and Photochemistry* (Hrsg.: H.-J. Schneider, H. Durr) Weinheim, **1991**, S. 123–143.
- [43] a) L. Fielding, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6151–6170; b) L. Fielding, *Curr. Top. Med. Chem.* **2003**, *3*, 39–53.
- [44] B. Lévy, *J. Chem. Phys.* **1973**, *77*, 2118–2121.
- [45] Für einige in der Gruppe von Stilbs durchgeführte frühe Diffusionsmessungen siehe: P. Stilbs, M. E. Moseley, *Chem. Scr.* **1979**, *13*, 26–30; P. Stilbs, M. E. Moseley, *Chem. Scr.* **1980**, *15*, 215–217; P. Stilbs, B. Lindman, *J. Phys. Chem.* **1981**, *85*, 2587–2589; W. Brown, R. M. Johnsen, P. Stilbs, B. Lindman, *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 4548–4553; M. Jansson, P. Stilbs, *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 4868–4873.
- [46] R. Rydén, J. Carlfors, P. Stilbs, *J. Inclusion Phenom.* **1983**, *1*, 159–167.
- [47] O. Mayzel, Y. Cohen, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 1901–1902.
- [48] So wurden zum Beispiel die Assoziationskonstanten von 5,10,15,20-Tetrakis(4-carboxyphenyl)porphyrin an  $\beta$ -CD über die Fluoreszenz bestimmt. Nicht nur die so erhaltenen Werte weisen Unstimmigkeiten auf, sondern auch die Vorzeichen der Fluoreszenzänderung nach erfolgter Komplexierung: In einem Bericht, S. S. Zhao, J. H. T. Luong, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2307–2308, wurde von einer Zunahme der Fluoreszenz berichtet, während in einer anderen, F. Venema, A. E. Rowan, R. Nolte, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 257–258, von einer Abnahme die Rede ist.
- [49] F. Vögtle, W. M. Müller, *Angew. Chem.* **1979**, *91*, 676–677; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1979**, *18*, 623–624.
- [50] S. Kamitori, K. Hirotsu, T. Higuchi, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, 690–691.
- [51] a) S. Kamitori, K. Hirotsu, T. Higuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2409–2414; b) S. Kamitori, K. Hirotsu, T. Higuchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, *61*, 3825–3830.
- [52] A. Gafni, Y. Cohen, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 120–125.
- [53] Die hydrophobe Wechselwirkung ist die Haupttriebkraft bei den meisten Komplexen von organischen Molekülen mit Cyclodextrinen in wässriger Lösung. Es sind nur einige wenige Fälle bekannt, in denen die Zugabe von Alkohol zu einer Erhöhung der Assoziationskonstanten des CD-Komplexes in Wasser führt; aber selbst dort wurde bei hohen Alkoholkonzentrationen eine Abnahme des  $K_a$ -Wertes beobachtet. Siehe z.B.: G. Nelson, G. Patonay, I. M. Warner, *J. Inclusion Phenom.* **1988**, *6*, 277–289; K. A. Connors, M. J. Mulski, A. Paulson, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1794–1798.
- [54] A. Gafni, Y. Cohen, R. Kataky, S. Palmer, D. Parker, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, 19–23.
- [55] K. S. Cameron, L. Fielding, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6891–6895.
- [56] a) L. Avram, Y. Cohen, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2639–2644; b) in einer weiteren Veröffentlichung wird über die Anwendung der Diffusions-NMR-Spektroskopie zur Untersuchung der Bildung eines Rotaxans berichtet: P. J. Skinner, S. Blair, R. Kataky, D. Parker, *New J. Chem.* **2000**, *24*, 265–268.
- [57] Es wurde der Vorschlag gemacht, dass die Protonierung der Stickstoffatome in stickstoffhaltigen Pseudorotaxanen diese zu Rotaxanen umwandelt: Y. Kawaguchi, A. Harada, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3797–3798.
- [58] L. Frish, F. Sansone, A. Casnati, R. Ungaro, Y. Cohen, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5026–5030.
- [59] a) A. Casnati, M. Fabbi, N. Pelizzi, A. Pochini, F. Sansone, R. Ungaro, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2699–2704; b) A. Casnati, F. Sansone, R. Ungaro, *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 246–254.
- [60] a) B. K. Hubbard, C. T. Walsh, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 752–789; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 730–765; b) D. H. Williams, B. Bardsley, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1264–1286; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1172–1193, zit. Lit.
- [61] C. T. Walsh, S. L. Fisher, I. S. Park, M. Prahaland, Z. Wu, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 21–28.
- [62] O. Mayzel, O. Aleksiuk, F. Grynszpan, S. E. Biali, Y. Cohen, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 1183–1184.
- [63] J. M. Harrowfield, M. I. Odgen, W. R. Richmond, A. H. White, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 1159–1160.
- [64] a) D. J. Cram, *Nature* **1992**, *356*, 29–36; b) R. G. Chapman, J. C. Sherman, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 15911–15945; c) A. Jasat, J. C. Sherman, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 931–967.
- [65] a) M. M. Conn, J. Rebek, Jr., *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1647–1668; b) M. Fujita, K. Umemoto, M. Yoshizawa, N. Fujita, T. Kusukawa, K. Biradha, *Chem. Commun.* **2001**, 509–518; c) F. Hof, S. L. Craig, C. Nuckolls, J. Rebek, Jr., *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1556–1578; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1488–1508.
- [66] a) K. D. Shimizu, J. Rebek, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 12403–12407; b) V. Böhmer, O. Mogck, M. Pons, E. F. Paulus in *NMR in Supramolecular Chemistry* (Hrsg.: M. Pons), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **1999**, S. 45–60; c) J. Rebek, Jr., *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 278–286; d) J. Rebek, Jr., *Chem. Commun.* **2000**, 637–643; e) V. Böhmer, M. O. Vysotsky, *Aust. J. Chem.* **2001**, *54*, 671–677.

- [67] a) R. Warmuth, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2000**, *37*, 1–38; b) J. Chen, S. Körner, S. L. Craig, D. M. Rudkevich, J. Rebek, Jr., *Nature* **2002**, *414*, 385–386; c) J. Chen, S. Körner, S. L. Craig, S. Lin, D. M. Rudkevich, J. Rebek, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 2593–2596.
- [68] L. Frish, S. E. Matthews, V. Böhmer, Y. Cohen, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1999**, 669–671.
- [69] a) D. A. Dougherty, D. A. Stauffer, *Science* **1990**, *250*, 1558–1560; b) J. C. Ma, D. A. Dougherty, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1303–1324.
- [70] a) L. Frish, M. O. Vysotsky, S. E. Matthews, V. Böhmer, Y. Cohen, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2002**, *88*–93; b) L. Frish, M. O. Vysotsky, V. Böhmer, Y. Cohen, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2011–2014.
- [71] L. Avram, Y. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 15148–15149.
- [72] L. R. MacGillivray, J. L. Atwood, *Nature* **1997**, *389*, 469–472.
- [73] a) A. Shivanyuk, J. Rebek, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 7662–7665; b) A. Shivanyuk, J. Rebek, Jr., *Chem. Commun.* **2001**, 2424–2425.
- [74] A. Shivanyuk, J. Rebek, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3432–3433.
- [75] a) L. Avram, Y. Cohen, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 4365–4368; b) L. Avram, Y. Cohen, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1099–1102; c) L. Avram, Y. Cohen, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3329–3332; d) T. Gerkensmeier, W. Iwanek, C. Agena, R. Fröhlich, S. Kotila, C. Näther, J. Mattay, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2257–2262; e) J. L. Atwood, L. J. Barbour, A. Jerga, *Chem. Commun.* **2001**, 2376–2377; f) L. Avram, Y. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 16180–16181.
- [76] I. P. Gerothanassis, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1994**, *26*, 171–237, zit. Lit.
- [77] G. Otting, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1997**, *31*, 259–285, zit. Lit.
- [78] B. Halle, V. P. Denisov, *Methods Enzymol.* **2001**, *338*, 178–201.
- [79] O. Mayzel, A. Gafni, Y. Cohen, *Chem. Commun.* **1996**, 911–912.
- [80] T. Iwachido, M. Minami, M. Kimura, A. Sadakane, M. Kawasaki, K. Toei, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1980**, *53*, 703–708.
- [81] Ein kürzlich erschienener Band behandelt die NMR-Spektroskopie von Wasserstoffbrückensystemen: *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, S5–S213.
- [82] a) R. Konrat, M. Tollinger, G. Kontaxis, B. Kräutler, *Monatsh. Chem.* **1990**, *130*, 961–967; b) H. B. Seba, B. Ancian, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 996–997; c) F. Cordier, S. Grzesiek, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1601–1602.
- [83] a) G. S. Kapur, E. J. Cabrita, S. Berger, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7181–7185; b) E. J. Cabrita, S. Berger, *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, S142–S148.
- [84] G. M. Whitesides, E. E. Simanek, J. P. Mathias, C. T. Seto, D. N. Chin, M. Mammen, D. M. Gorden, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 37–44.
- [85] a) R. H. Vreekamp, J. P. M. van Duynhoven, M. Hubert, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1306–1309; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1215–1218; b) P. Timmerman, R. H. Vreekamp, R. Hulst, W. Verboom, D. N. Reinhoudt, K. Rissanen, K. A. Udashin, J. Ripmeester, *Chem. Eur. J.* **1997**, *3*, 1823–1832; c) K. A. Jolliffe, P. Timmerman, D. N. Reinhoudt, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 983–986; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 933–937.
- [86] P. Timmerman, J. L. Weidmann, K. A. Jolliffe, L. J. Prins, D. N. Reinhoudt, S. Shinkai, L. Frish, Y. Cohen, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2000**, 2077–2089.
- [87] a) B. Olenyuk, M. D. Levin, J. A. Whiteford, J. E. Shield, P. J. Stang, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10434–10435; b) S. Viel, L. Mannina, A. Segre, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2515–2519.
- [88] a) M. Greenwald, D. Wessely, I. Goldberg, Y. Cohen, *New J. Chem.* **1999**, *23*, 337–344; b) M. Shaul, Y. Cohen, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9358–9364; c) W. H. Otto, M. H. Keefe, K. E. Splan, J. T. Hupp, C. K. Larive, *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 6172–6174.
- [89] G. R. Newkome, C. N. Morefield, F. Vogtle, *Dendritic Macromolecules*, 2. Aufl., VCH, New York, **2001**.
- [90] a) G. R. Newkome, J. K. Young, G. R. Baker, R. L. Potter, L. Audoly, D. Cooper, C. D. Weis, K. Morris, C. S. Johnson, Jr., *Macromolecules* **1993**, *26*, 2394–2396; b) J. K. Young, G. R. Baker, G. R. Newkome, K. F. Morris, C. S. Johnson, Jr., *Macromolecules* **1994**, *27*, 3464–3471.
- [91] H. Ihre, A. Hult, E. Söderlind, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6388–6395.
- [92] C. B. Gorman, J. C. Smith, M. W. Hager, B. L. Parkhurst, H. Sierzputowska-Gracz, C. A. Haney, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9958–9966.
- [93] J. M. Riley, S. Alkan, A. Chen, M. Shapiro, W. A. Khan, W. R. Murphy, Jr., J. E. Hanson, *Macromolecules* **2001**, *34*, 1797–1809.
- [94] a) S. Hecht, N. Vladimirov, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 18–25; b) A. I. Sagidullin, A. M. Muzaferov, M. A. Krykin, A. N. Ozerin, V. D. Skirda, G. M. Ignat'eva, *Macromolecules* **2002**, *35*, 9472–9479; c) S. W. Jeong, D. F. O'Brien, G. Örädd, G. Lindblom, *Langmuir* **2002**, *18*, 1073–1076.
- [95] a) D. Bratko, P. Stilbs, M. Bester, *Macromol. Rapid Commun.* **1985**, *6*, 163–168; b) R. Rymden, P. Stilbs, *J. Phys. Chem.* **1985**, *89*, 3502–3505.
- [96] a) L. G. Longsworth, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 4155–4159; b) L. G. Longsworth, *J. Phys. Chem.* **1960**, *64*, 1914–1917.
- [97] H. J. Tyrell, K. R. Harris, *Diffusion in Liquids*, Butterworth, London, **1984**.
- [98] Y. Cohen, A. Ayalon, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 888–890; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 816–818.
- [99] A. Ayalon, A. Sygula, P.-C. Cheng, M. Rabinovitz, P. W. Rabideau, L. T. Scott, *Science* **1994**, *265*, 1065–1067.
- [100] a) R. E. Hoffman, E. Shabtai, M. Rabinovitz, V. S. Iyer, K. Müllen, A. K. Rai, E. Bayrd, L. T. Scott, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, 1659–1664; b) E. Shabtai, R. E. Hoffman, P. Cheng, E. Bayrd, D. V. Preda, L. T. Scott, M. Rabinovitz, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2000**, 129–133.
- [101] a) T. C. Pochapsky, P. M. Stone, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6714–6715; b) T. C. Pochapsky, A. P. Wang, P. M. Stone, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11084–11091.
- [102] a) S. S. Pochapsky, H. Mo, T. C. Pochapsky, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 2513–2514; b) H. Mo, T. C. Pochapsky, *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 4485–4486.
- [103] I. Keresztes, P. G. Williard, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10228–10229.
- [104] M. Valentini, H. Rüegger, P. S. Pregosin, *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 2833–2853.
- [105] S. Beck, A. Geyer, H.-H. Brintzinger, *Chem. Commun.* **1999**, 2477–2478.
- [106] a) S. Beck, M. H. Prosenc, H. H. Brintzinger, R. Goretzki, N. Herfert, G. Fink, *J. Mol. Catal.* **1996**, *11*, 67–79; b) N. G. Stahl, C. Zuccaccia, T. R. Jensen, T. J. Marks, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5256–5257.
- [107] C. Zuccaccia, G. Bellachoma, G. Cardaci, A. Macchioni, *Organometallics* **2000**, *19*, 4663–4665.
- [108] a) M. Valentini, P. S. Pregosin, H. Rüegger, *Organometallics* **2000**, *19*, 2551–2555; b) M. Valentini, P. S. Pregosin, H. Rüegger, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2000**, 4507–4510.
- [109] N. E. Schöler, E. J. Cabrita, S. Berger, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 114–116; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 107–109.
- [110] R. A. Fecik, K. E. Frank, E. J. Gentry, S. R. Menon, L. A. Mitscher, H. Telikepalli, *Res. Lab.* **1998**, *18*, 149–185.
- [111] *Combinatorial Chemistry: Synthesis, Analysis, Screening* (Hrsg.: G. Jung), Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.

- [112] M. J. Shapiro, J. S. Gounaris, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, *35*, 153–200, zit. Lit.
- [113] H. Barjat, G. A. Morris, S. C. Smart, A. G. Swanson, S. C. R. Williams, *J. Magn. Reson. Ser. B* **1995**, *108*, 170–172; b) M. D. Palta, H. Barjat, G. A. Morris, A. L. Davis, S. J. Hammond, *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 706–714; c) A. M. Dixon, C. K. Larive, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2122–2128.
- [114] Ein frühes Beispiel für DOSY-Untersuchungen an Gemischen ist erschienen in: K. F. Morris, P. Stilbs, C. S. Johnson, Jr., *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 211–215.
- [115] Für Anwendungen der hochauflösten DOSY-Spektroskopie siehe: G. A. Morris, H. Barjat in *Methods for Structure Elucidation by High-Resolution NMR* (Hrsg.: Gy. Batta, K. E. Kövér, Cs. Szántay, Jr.), Elsevier, Amsterdam, **1997**, S. 209–226.
- [116] a) H. Barjat, G. A. Morris, A. G. Swanson, *J. Magn. Reson.* **1998**, *131*, 131–138; b) für Hybridsequenzen siehe: N. Birlirakis, E. Guittet, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13083–13084.
- [117] R. K. Harris, K. A. Kinnear, G. A. Morris, M. J. Stchedroff, A. Samadi-Maybodi, N. Azizi, *Chem. Commun.* **2001**, 2422–2423.
- [118] a) P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Q. Rev. Biophys.* **1999**, *32*, 211–240; b) M. van Dongen, J. Weight, J. Uppenberg, J. Schultz, M. Wikström, *Drug Discovery Today* **2002**, *7*, 471–478; c) B. Meyer, T. Peters, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 890–918; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 864–890.
- [119] a) S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **1996**, *274*, 1531–1534; b) P. J. Hajduk, R. P. Meadows, S. W. Fesik, *Science* **1997**, *278*, 497–499.
- [120] a) M. Lin, M. J. Shapiro, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7617–7619; b) M. Lin, M. J. Shapiro, J. R. Wareing, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5249–5250; c) A. Chen, M. J. Shapiro, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 669A–675A; d) die Gruppen von Lindon und Nicholson schlugen parallel dazu ein ähnliches Verfahren zur Untersuchung komplexer Biofluide vor; siehe: M. Liu, J. K. Nicholson, J. A. Parkinson, J. C. Lindon, *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1504–1509; eine Zusammenfassung dieser Autoren über Anwendungen der Diffusions-NMR-Spektroskopie in biochemischen und pharmakologischen Bereichen ist kürzlich erschienen: J. C. Lindon, M. Liu, J. K. Nicholson, *Rev. Anal. Chem.* **1999**, *18*, 23–66.
- [121] Mit dem SAR-NMR-Verfahren lassen sich derzeit Proteine mit einem Molekulargewicht von 20–30 kDa beobachten, mit der Transversal-Relaxations-optimierten Spektroskopie (TROSY) kann man den zur NMR-Untersuchung geeigneten Molekulargewichtsbereich allerdings auf über 100 kDa ausdehnen. Siehe: K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12336–12371. Im Unterschied dazu gibt es bei NMR-Screeningverfahren, die auf der Diffusions-NMR-Spektroskopie beruhen, keine derartige Größenbeschränkung (siehe Text).
- [122] P. J. Hajduk, E. T. Olejniczak, S. W. Fesik, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12257–12261.
- [123] a) M. Lin, M. J. Shapiro, J. R. Wareing, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8930–8931; b) K. Bleicher, M. Lin, M. J. Shapiro, J. R. Wareing, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8486–8490; c) R. C. Anderson, M. Lin, M. J. Shapiro, *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 69–72.
- [124] a) J. A. Jones, D. K. Wilkins, L. J. Smith, C. M. Dobson, *J. Biomol. NMR* **1997**, *10*, 199–203; b) S. L. Mansfield, D. A. Jayawickrama, J. S. Timmons, C. K. Larive, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1382*, 257–265; c) X. Gao, T. C. Wong, *Biophys. J.* **1998**, *74*, 1817–1888; d) W. Zhang, T. E. Smithgall, W. H. Gmeiner, *Biochemistry* **1998**, *37*, 7119–7126; e) M. L. Tillett, M. A. Horsfield, L.-Y. Lian, T. J. Norwood, *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 223–232; f) W. S. Price, F. Tsuchiya, Y. Arata, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11503–11511; g) W. S. Price, F. Tsuchiya, C. Suzuki, Y. Arata, *J. Biomol. NMR* **1999**, *13*, 113–117; h) X. Gao, T. C. Wong, *Biopolymers* **1999**, *50*, 555–568; i) S. Yao, G. J. Howlett, R. S. Norton, *J. Biomol. NMR* **2000**, *16*, 109–119; j) X. Chang, D. Keller, S. I. O'Donoghue, J. J. Led, *FEBS. Lett.* **2002**, *515*, 165–170; k) T. S. Derrick, E. F. McCord, C. K. Larive, *J. Magn. Reson.* **2002**, *155*, 217–225; l) A. M. Weljie, A. P. Yamniuk, H. Yoshino, Y. Izumi, H. J. Vogel, *Protein Sci.* **2003**, *12*, 228–236.
- [125] a) M. J. Shapiro, J. Chin, A. Chen, J. R. Wareing, Q. Tang, R. A. Tommasi, H. R. Marepalli, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 6141–6143; b) J. A. Chin, A. Chen, M. J. Shapiro, *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 293–296; c) J. Chin, A. Chen, M. J. Shapiro, *Magn. Reson. Chem.* **2000**, *38*, 782–784.
- [126] a) J. Lapham, J. P. Rife, P. B. Moore, D. M. Crothers, *J. Biomol. NMR* **1997**, *10*, 255–262; b) W. H. Gmeiner, C. J. Hudalla, A. M. Soto, L. Marky, *FEBS. Lett.* **2000**, *465*, 148–152; c) X. Yang, Y. S. Sanghvi, X. Gao, *J. Biomol. NMR* **1997**, *10*, 383–388.
- [127] a) J. Balbach, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5887–5888; b) A. V. Buevich, J. Baum, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7156–7162.