

NMR-Spektroskopie

Skalierung der Ausrichtung kleiner organischer Moleküle in substituierten Polyglutamaten durch Probenrotation bei unterschiedlichen Winkeln (VASS)**

Christina M. Thiele*

Die Bestimmung der relativen Konfiguration kleiner organischer Moleküle durch NMR-Spektroskopie beruht normalerweise auf der Analyse des NOE-Effektes und der Größe von 3J -Kopplungskonstanten. Kürzlich rückten die dipolaren Restkopplungen (RDCs, residual dipolar couplings) in den Blickpunkt der Strukturaufklärung, da RDCs sowohl Winkel als auch Abstandsinformationen enthalten. Damit ist es z. B. möglich, alle diastereotopen Protonen des Strychnins ohne Zuhilfenahme von NOE-Information zuzuordnen.^[1] Ebenso wurde die komplette relative Konfiguration einer fluorierten Verbindung mit fünf stereogenen Zentren bestimmt.^[2] Um aber dipolare Restkopplungen beobachten zu können, muss ein geringer Grad an Ausrichtung (alignment) des Moleküls im Magnetfeld induziert werden. Nach wie vor gibt es nur wenige Alignment-Medien für organische Moleküle, die diesen geringen Ordnungsgrad induzieren. Die flüssigkristallinen Polyglutamate^[1,3–6] und auch deuteriertes PCBP (4-*n*-Pentyl-4'-cyanbiphenyl)^[7] werden für diese Zwecke genutzt. Unlängst wurde auch über die Verwendung von vernetztem Polystyrol (PS) und vernetztem Poly(dimethylsiloxan) (PDMS) berichtet, bei denen der Ordnungsgrad vom Grad der Vernetzung abhängt.^[8–10]

Nachteil der flüssigkristallinen Medien ist das Auftreten einer unteren Konzentrationsgrenze des Flüssigkristalls im Lösungsmittel, unterhalb der die Phase isotrop wird und keine Ausrichtung mehr induziert. Der Ordnungsgrad kann also nur innerhalb bestimmter Grenzen angepasst werden. Eine Skalierbarkeit ist bei Polymerstäbchen gegeben, doch lässt sich der Ordnungsgrad nach Ende der Probenherstellung nicht mehr ändern. Dies könnte bei der Strukturbestimmung von Naturstoffen wegen der geringen Mengen vorhandener Substanz problematisch sein. Eine Alternative bietet die Methode der Probenrotation bei unterschiedlichen Winkeln (VASS, variable-angle sample spinning), bei der die flüssigkristalline Probe in einem Winkel Θ_r zum Magnetfeld gedreht wird, um anisotrope Wechselwirkungen zu reduzieren.^[11–15]

Hier wird ein unkompliziertes Verfahren vorgestellt, das durch Anwendung von VASS die dipolaren Restkopplungen in den chiralen Alignment-Medien Poly(γ -benzyl-L-glutamat)(PBLG)/CDCl₃ und Poly(γ -ethyl-L-glutamat)(PELG)/CDCl₃ skaliert.

Wenn ein Flüssigkristall mit positiver molekularer magnetischer Anisotropie ($\Delta\chi_m > 0$) in einem Winkel Θ_r , der kleiner als der magische Winkel von 54.7° ist, relativ zum Magnetfeld gedreht wird, wobei die Rotationsgeschwindigkeit wesentlich höher als seine kritische Rotationsgeschwindigkeit ω_c ist, so richtet sich der Direktor des Flüssigkristalls parallel zur Rotationsachse aus. Die anisotropen Wechselwirkungen der gelösten Substanz (und des Flüssigkristalls) stehen mit dem Winkel Θ_r über ihre Proportionalität zum zweiten Legendre-Polynom ($P_2(\cos \Theta_r) = (3 \cos^2 \Theta_r - 1)/2$) in Beziehung. So können durch Änderung des Winkels Θ_r die dipolaren Wechselwirkungen skaliert werden. Die Spin-Spin-Gesamtkopplungskonstante T (auch effektive Kopplungskonstante J_{eff} genannt) ergibt sich aus Gleichung (1).^[11]


$$T = J_{\text{eff}} = J_{\text{iso}} + \frac{3 \cos^2 \Theta_r - 1}{2} (2D + J_{\text{aniso}}) \quad (1)$$

T ist die Spin-Spin-Gesamtkopplungskonstante, Θ_r der Winkel (der Rotationsachse) zum Magnetfeld, J_{iso} die isotrope (= skalare) Kopplungskonstante, D die dipolare Restkopplung und J_{aniso} die meist vernachlässigte Anisotropie der skalaren Kopplung.

Die beiden in dieser Untersuchung verwendeten Polyglutamate PBLG und PELG sind kommerziell erhältlich, und die Proben wurden wie zuvor für Strychnin^[5,1] und andere Substanzen^[16] beschrieben hergestellt. Die Homogenität der Proben wurde in gewöhnlichen 5-mm-Hochauflösungs-Flüssigkeits-NMR-Röhrchen überprüft. Sobald die Linien des Lösungsmittels CDCl₃ im Deuteriumspektrum ein scharfes Dublett (aufgrund der Quadrupolaufspaltung) zeigten, wurde der viskose Flüssigkristall in 4-mm-Festkörper-Rotoren gefüllt und mit einer Kappe (ohne Loch, um ein Verdunsten des Lösungsmittels zu minimieren) verschlossen. Die Proben wurden bei konstanter Rotationsgeschwindigkeit bei unterschiedlichen Winkeln zum Magnetfeld gedreht. Hierzu wurde ein Bruker-DRX-600-Spektrometer mit einem handelsüblichen dualen (^1H , ^{13}C)-Bruker-HR-MAS-Probenkopf mit z -Gradienten verwendet. Die Deuteriumspektren wurden über den Lock-Kanal gemessen, um die Reduktion der beobachteten Kopplungen abschätzen zu können (Abbildung 1). Da der Probenkopf nicht mit einem Goniometer ausgerüstet ist, wurde der Winkel anhand der Quadrupolaufspaltung des Lösungsmittels im Flüssigkristall kalibriert. Um die statischen Spektren zu erhalten, wurde die Messung ohne Rotation ausgeführt. In diesem Fall richtet sich der Flüssigkristall unabhängig vom Winkel des Rotors zum Magnetfeld parallel zum Magnetfeld aus. Bei PBLG ist dies ein spontaner Prozess, bei PELG dauert es etwa zwanzig Minuten bis scharfe Linien erhalten werden. Die Rotationsgeschwindigkeit, die man überschreiten muss, um Rotationsseitenbanden zu verhindern und um die Ausrichtung des Direktors in der Rotationsachse zu gewährleisten, ist abhängig vom Quadrat der Magnetfeldstärke. Theoretisch sollte die Ausrichtung des Direktors

[*] Dr. C. M. Thiele
Institut für Analytische Chemie
Universität Leipzig
Johannisallee 29, 04103 Leipzig (Deutschland)
Fax: (+49) 341-97-36115
E-mail: thiele@chemie.uni-leipzig.de

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie finanziell unterstützt. Ich danke Prof. Dr. S. Berger, Dr. P. Lesot, Dr. M. Zweckstetter und Prof. Dr. D. Freude für ihre Hilfe. VASS = variable-angle sample spinning.

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

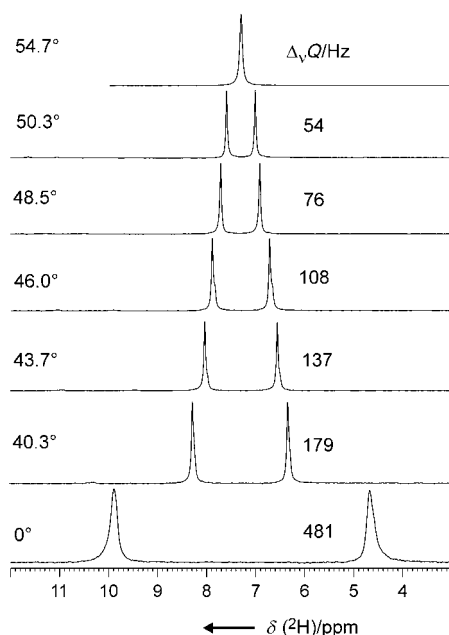


Abbildung 1. ^2H -1D-NMR-Spektren (92.09 MHz) von CDCl_3 in PBLG. Durch Variieren von θ_r (links an jeder Spur) werden $\Delta_v Q$ -Werte zwischen 0 Hz (oben, magischer Winkel) und 481 Hz (unten, statischer Fall, 0°) erhalten. Die Rotationsgeschwindigkeit war 1180 Hz, die Temperatur 298 K.

parallel zur Rotationsachse besser werden, je höher die Rotationsgeschwindigkeit ist.^[11] Wir kamen zu einem anderen Befund, der mit Ergebnissen von Lesot et al.^[17] übereinstimmt. Diese beobachteten eine zweite kritische Rotationsgeschwindigkeit, oberhalb derer sich der Direktor auf unterschiedliche Winkel zum Magnetfeld verteilt. Es wurde eine Rotationsgeschwindigkeit von 1180 Hz für PBLG und 1002 Hz für PELG gewählt, um bei einer Magnetfeldstärke von 14.1 T (entspricht 600 MHz Protonenfrequenz) innerhalb dieser beiden Grenzen zu bleiben. Bei einer Rotationsgeschwindigkeit von unter 1000 Hz kann die Rotation in unserem HR-MAS-Probenkopf nicht als stabil betrachtet werden, 1000 Hz ist also die untere Grenze. Bei Rotationsgeschwindigkeiten von mehr als 1400 Hz für PBLG und 3500 Hz für PELG gleicht das Verhalten der Linien im Deuteriumspektrum dem von Lesot et al. beschriebenen.^[17]

Es werden jeweils zwei Messungen durchgeführt, um ^1H - ^{13}C -RDCs über eine Bindung zu extrahieren. Eine Messung wird an einer isotropen Lösung von Strychnin durchgeführt (oder die anisotrope Probe wird im magischen Winkel rotiert), um die skalare Kopplungskonstante J_{iso} zu erhalten. Die zweite Messung wird an der nematischen Phase im Festkörper-Rotor bei einem Winkel durchgeführt, bei dem die Größe der Spin-Spin-Gesamtkopplungen geeignet ist. Zur Messung der RDCs für Strychnin bei Winkeln nahe des magischen Winkels (54.7 – 48.5° bei PBLG bzw. für alle verwendeten Winkel bei PELG) konnten HSQC-Spektren ohne Entkopplung während der Datenakquisition verwendet werden (Abbildung 2), da die dipolaren Wechselwirkungen erwartungsgemäß klein bleiben. Bei Winkeln, die weiter vom magischen Winkel entfernt sind, wurden zur Bestimmung der dipolaren Kopplungen „gated-decoupled“ Kohlenstoffspek-

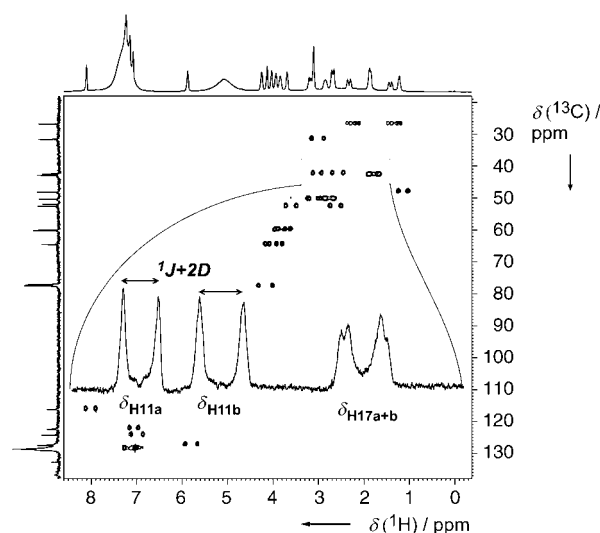


Abbildung 2. 2D-HSQC-Spektrum ohne ^{13}C -Entkopplung während der Akquisition von Strychnin in PBLG/ CDCl_3 bei $\theta_r = 50.3^\circ$ (1180 Hz, 298 K). Wie der 1D-Ausschnitt bei einer chemischen ^{13}C -Verschiebung von 42 ppm zeigt, kann die Spin-Spin-Gesamtkopplungskonstante leicht extrahiert werden. Im 2D-Spektrum werden keine Signale von PBLG beobachtet.

tren verwendet. Wie aus Abbildung 3 hervorgeht, können die ^{13}C - ^1H -RDCs nach Bedarf skaliert werden. Oben ist das isotrope Spektrum (Rotation im magischen Winkel) gezeigt, aus dem die skalaren Kopplungen gewonnen werden können. Von oben nach unten nimmt das Ausmaß anisotroper Wechselwirkungen zu. Zum Beispiel wird bei $\theta_r = 40.3^\circ$ aus einem Triplett für C15 (Methylen-Gruppe) im isotropen Fall ein Dublett von Dubletts mit beiden D -Werten kleiner als J_{iso} . Dieses entwickelt sich dann weiter in ein Dublett-artiges Signal für C15 im statischen Fall. $-2D$ ist für eines der beiden Protonen gleich groß wie J_{iso} , weshalb sich eine ^1H - ^{13}C -Spin-Spin-Gesamtkopplungskonstante T von 0 Hz ergibt. Das andere Proton zeigt einen D -Wert von -15.1 Hz, was zu einem T -Wert von 108.8 Hz führt. Die beträchtlichen Linienverbreiterungen im statischen Fall, die unter anderem auf langreichweitige C-H-Kopplungen zurückzuführen sind, führen wie schon beschrieben^[5] zu großen Fehlern in D . Dieses Beispiel der beiden Protonen an C15 belegt die Leistungsfähigkeit dieser Methode, da das Extrahieren von Kopplungen dieser Größe alleine aus statischen Spektren bisher nicht als zuverlässig galt.

Für PELG ist die Messung von fast allen RDCs bei fast allen gewählten Winkeln möglich (inklusive statischer Fall; siehe Hintergrundinformationen). Eine lineare Korrelation der dipolaren Kopplung der gelösten Substanz (D in Hz) gegen die Quadrupolaufspaltung des Lösungsmittels CDCl_3 ($\Delta_v Q$ in Hz) zeigt eine sehr gute Übereinstimmung ($R^2 > 0.94$) bei 13 von 22 Kopplungen. Wegen der geringen Datenmenge (nur drei unterschiedliche Winkel und der statische Fall wurden untersucht) kann keine genauere Aussage bezüglich der anderen neun Kopplungen getroffen werden. Eine Extrapolierung der Werte des statischen Falles aus den Werten der VASS-Experimente gibt aber einen guten Schätzwert für alle C-H-Kopplungen.

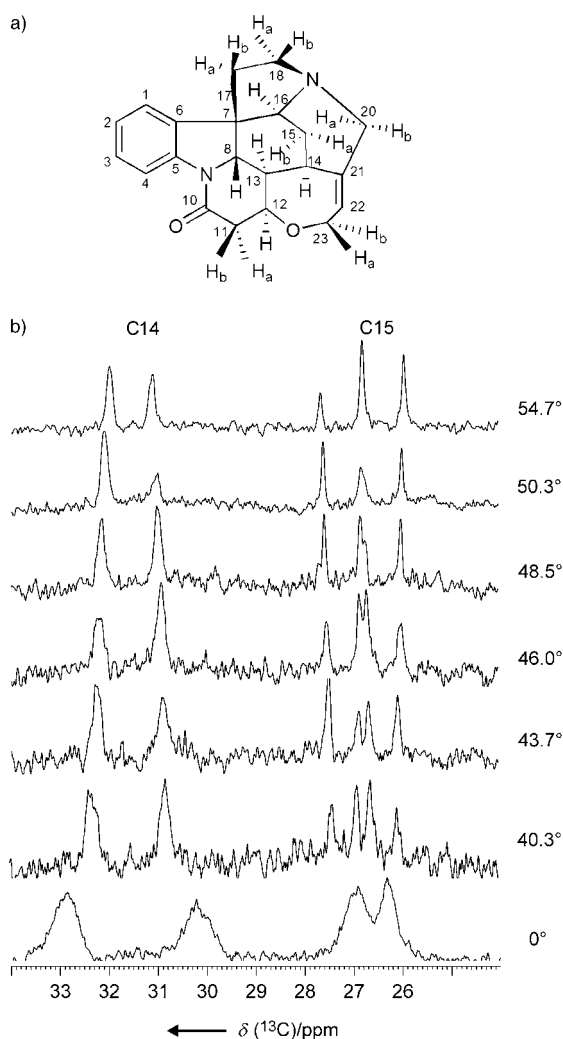


Abbildung 3. a) Strukturformel von Strychnin mit der im Text verwendeten Nummerierung. b) Teil der „gated-decoupled“ ^{13}C -1D-NMR-Spektren von Strychnin (Signale der Kohlenstoffatome C14 und C15) in PBLG/ CDCl_3 bei einer Magnetfeldstärke von 14.1 T. θ_r wird vom magischen Winkel (oben) bis zum statischen Fall bei 0° (unten) verändert.

Im statischen Fall können für PBLG, wie schon beschrieben,^[5] nur sehr wenige Kopplungen gemessen werden. Mit der VASS-Methode lassen sich hingegen fast alle Kopplungen bei den Winkeln von 40° bis 50° messen, und für die meisten Kopplungen wird ein lineares Verhalten von D gegen $\Delta_r Q$ beobachtet (siehe Abbildung 4). Mit den Steigungen dieser

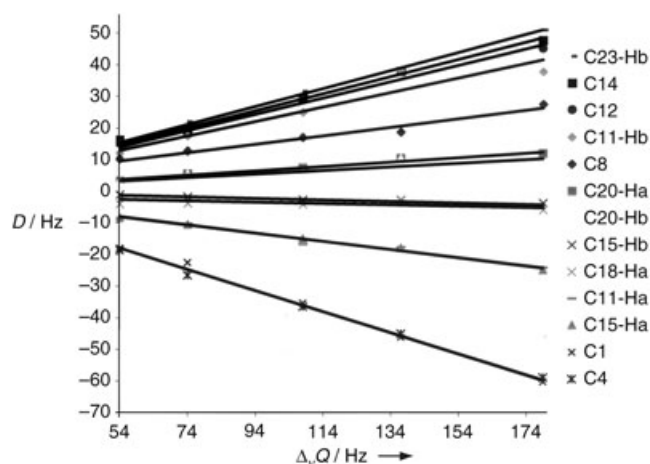


Abbildung 4. Auftragung der beobachteten dipolaren Restkopplungen D [Hz] von Strychnin in PBLG gegen die Quadrupolaufspaltung $\Delta_r Q$ [Hz] des Lösungsmittels CDCl_3 (als Maß für θ_r). Für alle RDCs kann lineares Verhalten beobachtet werden (nicht alle sind gezeigt).

Geraden können die Werte für den statischen Fall extrapoliert werden. Die so erhaltenen Werte werden bei 17 von 22 Kopplungen durch die Spektren bestätigt (± 10 Hz, was z. B. nur 3 % Fehler für C1 und C4 entspricht), wodurch auch frühere Fehlinterpretationen der Spektren aufgedeckt wurden.

Die Alignment-Tensoren für Strychnin in PBLG und PELG wurden mit dem Programm PALES (Module „bestfit“ und „addition of dipolar coupling“) berechnet.^[18,19] Es zeigen sich signifikante Änderungen in der Stärke der Ausrichtung innerhalb jeder Probenmessreihe. Diese nimmt mit steigender eingeführter Anisotropie (steigendem $\Delta_r Q$) wie erwartet zu (Tabelle 1).

Der Ordnungsgrad ist in PBLG und PELG, wie schon zuvor beschrieben,^[1] unterschiedlich stark. Aus den RDCs, die unter VASS-Bedingungen erhalten wurden, ist es nun möglich, den Alignment-Tensor für PBLG verlässlicher zu bestimmen, wodurch sich Unterschiede in den Orientierungen von Strychnin in PBLG und PELG zeigen. Die x -, y - und z -Achsen unterscheiden sich in 11° , 12° bzw. 6° (siehe Hintergrundinformationen). Ob dieser Unterschied groß genug ist, um die beiden Alignment-Medien als linear unabhängig zu betrachten, muss in zukünftigen Studien überprüft werden. Wäre dies tatsächlich der Fall, könnten beide zur Bestimmung der relativen Konfiguration an hoch substituierten Stereozentren oder zur Untersuchung von

Tabelle 1: Alignment-Eigenschaften von PBLG und PELG bei unterschiedlichen Winkeln θ_r ^[a]

	PBLG						PELG			
$\Delta_r Q$ [Hz]	54	74	108	137	179	481	37	70	122	456
θ_r [$^\circ$]	50.3	48.5	46.0	43.7	40.3	0	51.5	48.7	44.3	0
D_a [10^{-4} Hz]	2.16	2.55	4.05	4.93	6.52	19.6	0.52	0.99	1.83	6.09
D_r/D_a	0.65	0.63	0.41	0.63	0.66	0.53	0.46	0.59	0.60	0.66
$n(\text{RDC})$	22	20	22	19	20	22	22	20	22	22
R	0.99	1.00	0.97	0.99	0.99	0.99	0.96	0.99	0.99	0.99

[a] D_a ist die axiale Komponente und D_r/D_a die Rhombizität des Alignment-Tensors. $n(\text{RDC})$ ist die Zahl der in der Rechnung verwendeten RDCs, R ist der Korrelationskoeffizient (nach Pearson) von experimentellen und zurückgerechneten dipolaren Kopplungen in PALES.

dynamischen Prozessen, wie dies eindrucksvoll für Biomoleküle gezeigt wurde,^[20–22] verwendet werden.

Zusammenfassend wurde die Methode der Probenrotation bei unterschiedlichen Winkeln angewendet, um die Ausrichtung kleiner organischer Moleküle zu skalieren. Die Extraktion von Kopplungen wird komfortabel, da die RDCs innerhalb einer Probe nach Bedarf reduziert werden können. Bei den hier verwendeten flüssigkristallinen Proben ist es sogar möglich, das isotrope Spektrum an der anisotropen Probe zu messen, wenn man die Probe im magischen Winkel rotiert. Ein Nachteil könnte die technische Anforderung an den Probenkopf sein, bei unterschiedlichen Winkeln rotieren zu müssen. Wir haben einen gewöhnlichen Bruker-HR-MAS-Probenkopf verwendet, der in vielen Arbeitsgruppen vorhanden ist. Die Verwendung eines speziellen VASS-Probenkopfes ist nicht nötig.

Die hier verwendeten Ausrichtungsmedien induzieren Orientierungen des gelösten Moleküls, die zu denen der kürzlich beschriebenen Polystyrol-Stäbchen komplementär sind. Dies erweitert den Anwendungsbereich von RDCs in der Strukturbestimmung organischer Moleküle, einer Methode die sicher viele Zweideutigkeiten in der Strukturbestimmung von Naturstoffen beseitigen wird.

Eingegangen am 4. August 2004,

veränderte Fassung am 10. Januar 2005

Online veröffentlicht am 30. März 2005

Stichwörter: Dipolare Restkopplungen · NMR-Spektroskopie · Polyglutamate · Strukturaufklärung

- [15] N. Lancelot, K. Elbayed, A. Bianco, M. Piotto, *J. Biomol. NMR* **2004**, 29, 259–269.
- [16] C. Aroulanda, M. Sarfarti, J. Courtieu, P. Lesot, *Enantiomer* **2001**, 6, 281–287.
- [17] P. Lesot, J. W. Emsley, J. Courtieu, *Liq. Cryst.* **1998**, 25, 123–127.
- [18] M. Zweckstetter, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 3791–3792.
- [19] M. Zweckstetter, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **2002**, 23, 127–137.
- [20] J. Meiler, J. J. Pomper, W. Peti, C. Griesinger, R. Brüschweiler, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 6098–6107.
- [21] J. R. Tolman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 12020–12030.
- [22] T. S. Ulmer, B. E. Ramirez, F. Delaglio, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9179–9191.

-
- [1] C. M. Thiele, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 7403–7413, zit. Lit.
 - [2] J. Yan, F. Delaglio, A. Kaerner, A. D. Kline, H. Mo, M. J. Shapiro, T. A. Smitka, G. A. Stephenson, E. R. Zartler, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 5008–5017.
 - [3] C. Aroulanda, V. Boucard, F. Guibé, J. Courtieu, D. Merlet, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 4536–4539.
 - [4] L. Verdier, P. Sakhaei, M. Zweckstetter, C. Griesinger, *J. Magn. Reson.* **2003**, 163, 353–359.
 - [5] C. M. Thiele, S. Berger, *Org. Lett.* **2003**, 5, 705–708.
 - [6] C. Aroulanda, P. Lesot, D. Merlet, J. Courtieu, *J. Phys. Chem. A* **2003**, 107, 10911–10918.
 - [7] B. Bendiak, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14862–14863.
 - [8] B. Luy, K. Kobzar, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 1112–1115; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 1092–1094.
 - [9] J. C. Freudenberger, P. Spiteller, R. Bauer, H. Kessler, B. Luy, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 14690–14691.
 - [10] Zu kürzlich beschriebenen polymeren Alignment-Medien für polare Verbindungen: J. C. Freudenberger, S. Knör, K. Kobzar, D. Heckmann, T. Paululat, H. Kessler, B. Luy, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 427–430; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 423–426; P. Haberz, J. Farjon, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 431–433; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 427–429.
 - [11] J. Courtieu, J. P. Bayle, B. M. Fung, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1994**, 26, 141–169.
 - [12] R. R. Havlin, G. H. J. Park, T. Mazur, A. Pines, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 7998–8006.
 - [13] G. Zandomenighi, M. Tomaselli, P. T. F. Williamson, B. H. Meier, *J. Biomol. NMR* **2003**, 25, 113–123.
 - [14] J. Courtieu, D. W. Alderman, D. M. Grant, J. P. Bayle, *J. Chem. Phys.* **1982**, 77, 723–730.