

**NMR-Spektroskopie****Gestreckte Gelatine als chirales Orientierungsmedium zur Unterscheidung von Enantiomeren durch NMR-Spektroskopie\*\***

Kyryl Kobzar, Horst Kessler und Burkhard Luy\*

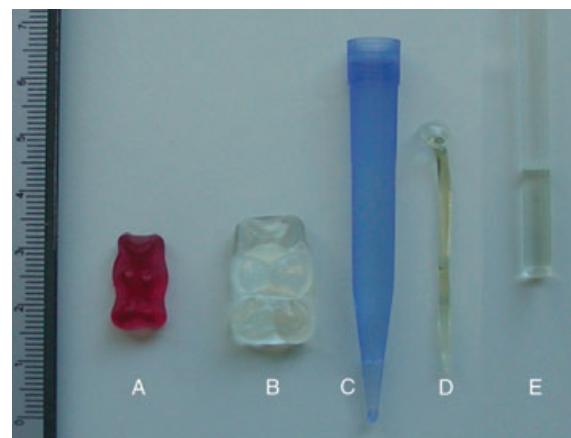
Die Bestimmung von Enantiomerenüberschüssen ist eine alltägliche Aufgabe in der modernen organischen Chemie. Daher ist die Entwicklung zweckmäßiger Messmethoden äußerst wünschenswert. Klassische NMR-Techniken zur Unterscheidung von Enantiomeren beruhen auf chiralen Zusätzen wie chiralen Derivatisierungsreagentien, Lanthanoidkomplexen als chemischen Verschiebungsreagentien oder chiralen Lösungsmitteln.<sup>[1,2]</sup> Diese Methoden führen jedoch nur bei funktionalisierten chiralen Molekülen zum Erfolg, die mit den Zusätzen detektierbare diastereomere Verbindungen oder Addukte bilden. Hingegen unterscheiden chirale Orientierungsmedien zwischen den Enantiomeren aufgrund von Ordnungseffekten in der chiralen Phase.<sup>[3,4]</sup> So können sowohl Enantiomere von Verbindungen ohne polare Gruppen, wie gesättigten Kohlenwasserstoffen,<sup>[5]</sup> als auch prochirale Strukturelemente in symmetrischen Molekülen<sup>[6,7]</sup> mithilfe von NMR-Spektroskopie differenziert werden.

Bisher wurde lediglich über Tensiddoppelschichten,<sup>[8–10]</sup> verschiedene chirale flüssigkristalline Medien<sup>[11–15]</sup> und achirale Flüssigkristalle mit chiralen Zusätzen<sup>[16]</sup> als chirale Orientierungsmedien berichtet. Diese Medien sind nicht einfach zu handhaben, operieren nur in bestimmten Temperaturbereichen, und die induzierte Orientierung hängt von der Stärke des statischen Magnetfelds ab. Mit kovalent vernetzten, gestreckten Gelen<sup>[17–19]</sup> können jedoch relativ einfach Proben angesetzt werden, die eine magnetfeldunabhängige Orientierung zeigen.

Das Ziel der hier vorgestellten Studien war die partielle Orientierung in einem gestreckten chiralen Gel. Zunächst wurde für Gelatine – in Form von Gummibärchen – nachgewiesen, dass eine Orientierung mit dieser Art Polymer prinzipiell möglich ist. In weiteren Experimenten konnten wir schließlich zeigen, dass gestreckte Gelatine als chirales Orientierungsmedium nicht nur die Messung von Strukturinformationen via dipolare Restkopplungen ermöglicht,<sup>[20,21]</sup> sondern auch die Unterscheidung von Enantiomeren und die Bestimmung des Enantiomerenüberschusses. Gelatine repräsentiert hierbei eine neue Gruppe von Orientierungs-

medien: Polymergele, deren räumliche Struktur beinahe ausschließlich durch Wasserstoffbrücken stabilisiert wird.

Gummibärchen wurden in entionisiertem Wasser auf etwa ihre doppelte Größe gequollen (Abbildung 1) und



**Abbildung 1.** Verschiedene Stadien der Präparation von gestreckten Gelatineproben: A) Gummibärchen, B) Gummibärchen, in Wasser gequollen, C) 10 Gew.-% Gelatine in  $\text{H}_2\text{O}$ , in einer Pipettenspitze gegossen, D) Gel nach der Trocknung in der Pipettenspitze, E) äquilibrierte Gelatineprobe mit einer  $\text{D}_2\text{O}$ -Deuteriumaufspaltung von 117 Hz (Abbildung 2B). Links: Zentimeterskala.

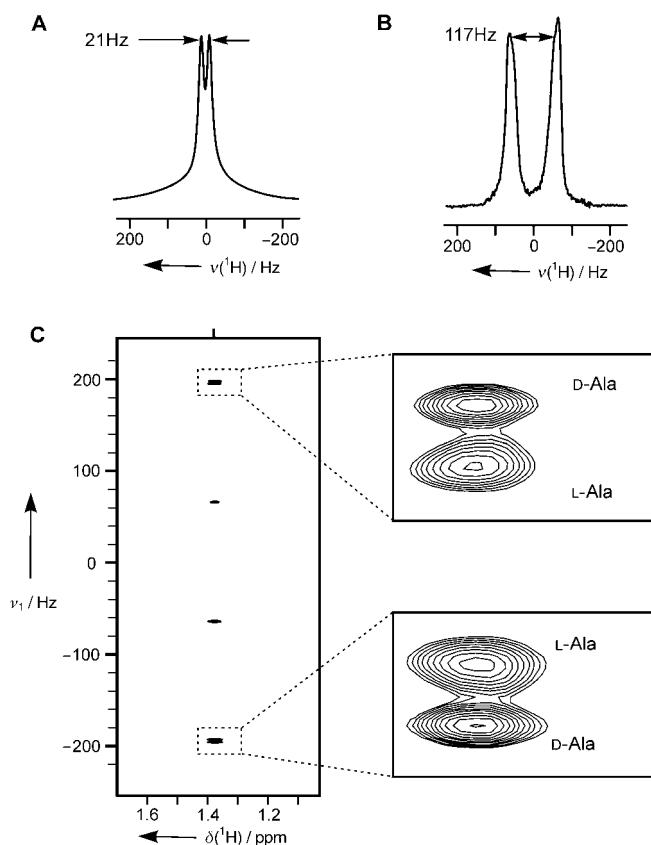
anschließend in eine grob zylindrische Form geschnitten. Die auf einer Glaskapillare aufgespießten Zylinder wurden getrocknet und zusammen mit  $\text{D}_2\text{O}$  in ein NMR-Röhrchen gegeben. Nach zwei Tagen konnten wir eine klar erkennbare quadrupolare Aufspaltung von ca. 20 Hz messen (Abbildung 2A).

Nach diesem Beweis für partielle Orientierung mit Gelatine wurden weitere Proben mit Haushaltsgelatine hergestellt. Heiße Gelatinelösung (ca. 10 Gew.-% in  $\text{H}_2\text{O}$ ) wurde in Pipettenspitzen mit abgeschmolzenem Ende gegossen und im Kühlschrank acht Wochen getrocknet (Abbildung 1). Daraus wurden Stäbchen mit ca. 1.9 mm Durchmesser erhalten, die zum Quellen direkt mit  $\text{D}_2\text{O}$  in ein NMR-Röhrchen gegeben wurden (ähnlich der Prozedur zur Streckung von Polystyrol-Gelen<sup>[19]</sup>). Nach einigen Tagen Quellen und einem Austausch des überstehenden Lösungsmittels, um Verunreinigungen zu entfernen, zeigte das Gel eine quadrupolare Aufspaltung für  $\text{D}_2\text{O}$  von 117 Hz bei 25°C (Abbildung 2B). Auf die NMR-Probe wurde schließlich eine Mischung aus 30 mg L-Alanin und 25 mg D-Alanin (9% ee) gegeben, die binnen weniger Stunden messbar in das Gel hineindiffundierte. Obwohl die räumliche Struktur von Gelatine weitgehend lediglich durch Wasserstoffbrücken stabilisiert ist, wurde trotz polarer Substanzen im Gel über zwei Monate keine Veränderung der quadrupolaren Aufspaltung für die Deuteriumkerne des Lösungsmittels beobachtet. Ein speziell entwickeltes *J*-Experiment (Abbildung 3) führte schließlich zur Unterscheidung der beiden Enantiomere.

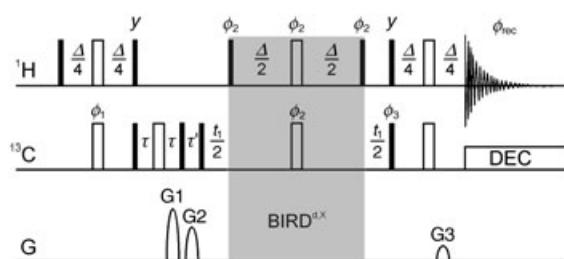
Für die Enantiomerenunterscheidung kann prinzipiell jede orientierungsabhängige NMR-Größe verwendet werden. Bisher wurde zumeist über  $1\text{D}_{-}^{[3,4,10,11,13,14,16,24–30]}$  und  $2\text{D}-^2\text{H}$ -Spektren<sup>[4,5,31–33]</sup> von nicht isotopenangereicher-

[\*] Dipl.-Chem. K. Kobzar, Prof. Dr. H. Kessler, Dr. B. Luy  
Department Chemie  
Lehrstuhl für Organische Chemie II  
Technische Universität München  
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)  
Fax: (+49) 89-289-13210  
E-mail: burkhard.luy@ch.tum.de

[\*\*] B.L. und H.K. danken dem Fonds der Chemischen Industrie und der DFG (Emmy-Noether-Stipendium LU 835/1-1; Ke 147/37-1) für finanzielle Unterstützung. Wir danken ebenfalls W. Rist und F. Rist für ihren Beitrag.



**Abbildung 2.** NMR-Spektren von Proben mit gestreckter Gelatine: A)  $^2\text{H}$ -Spektrum eines in  $\text{D}_2\text{O}$  gequollenen, gestreckten Gummibärchens. B)  $^2\text{H}$ -Spektrum einer Gelatineprobe (siehe Text für Details). C)  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -BIRD $^{d,\chi}$ -J-Spektrum einer in die Gelatineprobe diffundierten L-Ala/d-Ala-Mischung (1.2:1): Die beiden Enantiomere können deutlich unterschieden werden. Das Spektrum wurde mit der in Abbildung 3 gezeigten Pulssequenz mit 2048  $t_1$ -Inkrementen aufgenommen und in beiden Dimensionen phasenempfindlich prozessiert.



**Abbildung 3.**  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -BIRD $^{d,\chi}$ -J-Experiment für die phasenempfindliche und hochauflösende Detektion von  $(D_{\text{CH}} + ^1J_{\text{CH}})$ -Kopplungen. 90°- und 180°-Pulse sind durch schwarze bzw. weiße Rechtecke gekennzeichnet. Wenn nicht anders markiert, haben die Pulse x-Phase. Phasenzyklen:  $\phi_1 = y, y, y, -y, -y, -y; \phi_2 = x, x, -x, -x; \phi_3 = x, -x; \phi_{\text{rec}} = x, -x, x, -x, x, -x$ . Delays:  $\Delta = 1/(^1J_{\text{CH}} + D_{\text{CH}})$ ,  $\tau$  und  $\tau'$  sind Delays zur Anwendung der Gradienten (1.2 ms). Das Verhältnis der Gradientenstärken beträgt  $G1:G2:G3 = 80:30:20:1$ . Das BIRD $^{d,\chi}$ -Element (grau unterlegt) unterdrückt langreichweite  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -Kopplungen. Phasenempfindliche Aufnahme (States-TPPI) kann durch einen Zyklus auf  $\phi_1$  erreicht werden. Alternativ kann eine einfache  $t_1$ -Inkrementierung mit der in Lits. [22, 23] beschriebenen Prozessierungsmethode durchgeführt werden.

ten Proben berichtet, die Unterschiede in den quadrupolaren Restkopplungen im chiralen Orientierungsmedium nutzen. Die geringe natürliche Häufigkeit und das relativ kleine gyromagnetische Verhältnis von Deuteriumkernen erfordert jedoch lange Aufnahmezeiten oder die Verwendung von deuteriumangereicherten Proben.

In jüngster Zeit wurde die J-Spektroskopie an  $^1\text{H}$ -<sup>[31]</sup> und  $^{13}\text{C}$ -Kernen<sup>[34]</sup> als alternative Technik vorgestellt, mit der Enantiomere durch unterschiedliche dipolare Restkopplungen (residual dipolar couplings, RDCs) unterschieden werden können. Die untere Grenze der Orientierung in bekannten flüssigkristallinen Medien führt aber zu beträchtlichen RDCs, die leicht in der Größenordnung von  $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplungen liegen können (siehe z.B. Lit. [35]), womit man auf einfache NMR-Experimente mit bekannten Nachteilen beschränkt ist: So können etwa  $^1\text{H}-\text{J}$ -Spektren nicht phasenempfindlich aufgenommen werden, und Linienverbreiterungen durch  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -RDCs führen in vielen Fällen zu nicht interpretierbaren Spektren. Direkt detektierte  $^{13}\text{C}$ -J-Spektren haben den Nachteil eines niedrigen Signal-Rausch-Verhältnisses.

Gestreckte Gele mit beliebig einstellbarer schwacher Orientierung ermöglichen jedoch den Einsatz von optimierten heteronuklearen Pulssequenzbausteinen, da die Bedingung  $D_{\text{CH}} \ll ^1J_{\text{CH}}$  leicht erfüllt werden kann. Wir setzten daher eine invers angeregte und detektierte  $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ -korrelierte Pulssequenz mit zusätzlichem BIRD $^{d,\chi}$ -Element<sup>[36]</sup> ein, um langreichweite skalare  $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ -Kopplungen und dipolare Kopplungen zu unterdrücken (Abbildung 3). Das Experiment hat eine akzeptable Empfindlichkeit. Die phasenempfindliche Detektion und die reduzierte Multiplettstruktur verringern die Linienbreite in der indirekten Dimension, sodass selbst kleine Unterschiede in  $D_{\text{CH}}$ -Kopplungen gut separiert werden.

Die Anwendung der Pulssequenz auf L-Alanin/b-Alanin (1.2:1) in gestreckter Gelatine resultiert in zwei Multipletts für die  $\beta\text{-CH}_3$ -Gruppen, bei denen die jeweils äußeren Linien mit etwa 2.5 Hz Abstand gut aufgelöst sind (Abbildung 2C); ein Kontrollexperiment mit L-Alanin in einem identischen Gel zeigt lediglich ein Signal an der Position der stärkeren Komponente des Enantiomerengemisches. Dies ist ein klarer Beweis dafür, dass der Unterschied der  $D_{\text{CH}}$ -RDCs der Enantiomere in chiraler gestreckter Gelatine die beiden Multiplettstrukturen verursacht. Das Spektrum des Enantiomerengemisches ist so gut aufgelöst, dass durch Integration der einzelnen Multiplettkomponenten ein Enantiomerenüberschusses von  $7 \pm 5\%$  bestimmt werden kann. Hierbei sollte beachtet werden, dass die beobachtete Signalintensität nicht nur von der Konzentration der einzelnen Enantiomere abhängt, sondern auch von der Effizienz des Kohärenztransfers und damit von den skalaren und dipolaren Kopplungen mit der Funktion  $\sin^2(\pi[^1J_{\text{CH}} + D_{\text{CH}}]\Delta/2) \cos(\pi[^1J_{\text{CH}} + D_{\text{CH}}]\Delta)$ . Im gezeigten Fall (Abbildung 2C) beträgt dieser systematische Fehler jedoch weniger als 0.3 % ee, sodass der Fehler bei der Integration deutlich überwiegt.

Wir haben gezeigt, dass Gelatine als chirales Polymer Moleküle in wässriger Lösung partiell orientieren kann. Gelatine besteht bereits aus einem dreidimensionalen Netzwerk von Polypeptidketten aus renaturiertem Kollagen,<sup>[37]</sup> sodass keine zusätzliche Vernetzung erforderlich ist wie in

anderen Gelen.<sup>[17–19,38–40]</sup> Interessanterweise scheint diese dreidimensionale Struktur, die fast ausschließlich durch Wasserstoffbrücken zusammengehalten wird, den Kräften der Streckung standzuhalten. Die eingesetzte Gelatine ist jedoch nur bis ca. 35 °C stabil,<sup>[37]</sup> und ob gelöste Moleküle diese Stabilität beeinträchtigen, muss im Einzelfall untersucht werden. Bei neutralem pH und Raumtemperatur jedenfalls blieb die hier vorgestellte Gelatineprobe über zwei Monate unverändert.

In chiralen Orientierungsmedien unterscheiden sich Enantiomere im Allgemeinen in ihren Orientierungstensoren und sind daher NMR-spektroskopisch verschieden.<sup>[41]</sup> Unseres Wissens ist Gelatine das erste chirale Orientierungsmedium, das die Enantiomerunterscheidung mit den Vorteilen der partiellen Orientierung durch mechanische Streckung verbindet. Da mit einem solchen Medium beliebig kleine Orientierungen eingestellt werden können, ist die Anwendung von modernen Pulssequenzbausteinen mit erhöhter Empfindlichkeit oder reduzierten Linienbreiten möglich. Durch die Kombination aus chiralen Gel-Orientierungsmedien, magnetfeldunabhängiger partieller Orientierung und ebenfalls feldunabhängiger J-Spektroskopie könnten derartige Experimente sogar an NMR-Spektrometern mit niedrigem Magnettfeld gelingen, sofern die chemischen Verschiebungen nicht aufgelöst werden müssen.

Die gezeigte Methode zur Enantiomerunterscheidung ist nicht auf Gelatine als Polymer beschränkt, sondern ist wahrscheinlich auf andere chirale Polymergele oder achirale Gele mit chiralen Zusätzen übertragbar, die auch mit anderen Lösungsmitteln als Wasser kombiniert werden können.

Eingegangen am 26. November 2004,  
veränderte Fassung am 21. Januar 2005  
Online veröffentlicht am 18. April 2005

**Stichwörter:** Chiralität · Enantiomerunterscheidung · Gele · NMR-Spektroskopie · Polymere

- [1] T. J. Wenzel, J. D. Wilcox, *Chirality* **2003**, *15*, 256–270.
- [2] D. Parker, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 1441–1457.
- [3] E. Sackmann, S. Meiboom, L. C. Snyder, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 2183.
- [4] M. Sarfati, P. Lesot, D. Merlet, J. Courtieu, *Chem. Commun.* **2000**, 2069–2081.
- [5] M. Sarfati, J. Courtieu, P. Lesot, *Chem. Commun.* **2000**, 1113–1114.
- [6] D. Merlet, J. W. Emsley, P. Lesot, J. Courtieu, *J. Chem. Phys.* **1999**, *111*, 6890–6896.
- [7] C. Aroulanda, D. Merlet, J. Courtieu, P. Lesot, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12059–12066.
- [8] A. S. Tracey, P. Diehl, *FEBS Lett.* **1975**, *59*, 131–132.
- [9] A. S. Tracey, *Mol. Phys.* **1977**, *33*, 339–350.
- [10] K. Baczkó, C. Larpent, P. Lesot, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 971–982.
- [11] E. Lafontaine, J. P. Bayle, J. Courtieu, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8294–8296.
- [12] E. Lafontaine, J. M. Pechine, J. Courtieu, C. L. Mayne, *Liq. Cryst.* **1990**, *7*, 293–298.
- [13] I. Canet, J. Courtieu, A. Loewenstein, A. Meddour, J. M. Pechine, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6520–6526.

- [14] B. E. Weiss-Lopez, M. Azocar, R. Montecinos, B. K. Cassels, R. Araya-Maturana, *Langmuir* **2001**, *17*, 6910–6914.
- [15] C. Aroulanda, M. Sarfati, J. Courtieu, P. Lesot, *Enantiomer* **2001**, *6*, 281–287.
- [16] J. M. Pechine, A. Meddour, J. Courtieu, *Chem. Commun.* **2002**, 1734–1735.
- [17] R. Tycko, F. J. Blanco, Y. Ishii, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9340–9341.
- [18] H. J. Sass, G. Musco, S. J. Stahl, P. T. Wingfield, S. Grzesiek, *J. Biomol. NMR* **2000**, *18*, 303–309.
- [19] B. Luy, K. Kobzar, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1112–1115; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1092–1094.
- [20] N. Tjandra, A. Bax, *Science* **1997**, *278*, 1111–1114.
- [21] J. R. Tolman, J. M. Flanagan, M. A. Kennedy, J. H. Prestegard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 9279–9283.
- [22] B. Luy, G. Hauser, A. Kirschning, S. J. Glaser, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1338–1341; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1300–1302.
- [23] B. Luy, J. P. Marino, *J. Magn. Reson.* **2003**, *163*, 92–98.
- [24] A. Solgadi, A. Meddour, J. Courtieu, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1315–1318.
- [25] P. Lesot, D. Merlet, A. Loewenstein, J. Courtieu, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 1871–1881.
- [26] A. Meddour, P. Berdague, A. Hedli, J. Courtieu, P. Lesot, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 4502–4508.
- [27] I. Canet, A. Meddour, J. Courtieu, J. L. Canet, J. Salaun, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2155–2156.
- [28] W. Smadja, S. Auffret, P. Berdague, D. Merlet, C. Canlet, J. Courtieu, J. Y. Legros, A. Boutros, J. C. Fiaud, *Chem. Commun.* **1997**, 2031–2032.
- [29] M. Tavasli, J. Courtieu, R. J. M. Goss, A. Meddour, D. O'Hagan, *Chem. Commun.* **2002**, 844–845.
- [30] P. Lesot, D. Merlet, M. Sarfati, J. Courtieu, H. Zimmermann, Z. Luz, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10071–10082.
- [31] J. Farjon, D. Merlet, P. Lesot, J. Courtieu, *J. Magn. Reson.* **2002**, *158*, 169–172.
- [32] D. Merlet, B. Ancian, J. Courtieu, P. Lesot, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5249–5258.
- [33] P. Lesot, M. Sarfati, J. Courtieu, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 1724–1745.
- [34] J. Farjon, J.-P. Baltaze, P. Lesot, D. Merlet, J. Courtieu, *Magn. Reson. Chem.* **2004**, *42*, 594–599.
- [35] C. M. Thiele, S. Berger, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 705–708.
- [36] D. Uhrin, T. Liptaj, K. E. Kover, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1993**, *101*, 41–46.
- [37] *The Science and Technology of Gelatin* (Hrsg.: A. G. Ward, A. Courts), Academic Press, New York, **1977**.
- [38] 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.
- [39] P. Haberz, J. Farjon, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 431–433; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 427–429.
- [40] J. C. Freudenberger, P. Spiteller, R. Bauer, H. Kessler, B. Luy, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14690–14691.