

## Note

### $^1\text{H}$ -N.m.r.-Nachweis von Cyclodextrin-Nitroxidradikal-Komplexen

MASAAKI OHARA UND JUNKO FUKUDA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Sakado, Saitama (Japan)

(Eingegangen am 10. November 1981; angenommen am 22. Dezember 1981)

Cyclodextrine, ringförmige Oligosaccharide aus sechs, sieben oder acht  $\alpha$ -D-Glucopyranose-Einheiten ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Cyclodextrin), bilden in wäßrigem Medium Einschluß-Komplexe mit zahlreichen Gastmolekülen<sup>1–3</sup>. Einige unmittelbare Beweise dafür sind anhand  $^1\text{H}$ -N.m.r.-spektroskopischer Daten erbracht worden<sup>4–10</sup>, wobei beim Zusatz verschiedener diamagnetischer, aromatischer Gastmoleküle starke Änderungen in bestimmten Protonensignalen der Cyclodextrine hinsichtlich ihrer chemischen Verschiebung und der Kernrelaxation festgestellt wurden.

In der vorliegenden Arbeit berichten wir erstmals über N.m.r.-Untersuchungen von Cyclodextrin-Einschlußkomplexen unter Benutzung stabiler Nitroxidradikale als paramagnetische Sonden (N.m.r.-spin labeling method), ein Verfahren, für das es in biologischen Systemen bereits verschiedene Anwendungsbeispiele gibt<sup>11–17</sup>. Versetzt man eine Lösung der Biomoleküle mit paramagnetischen Molekülen oder Ionen, so können sich die ursprünglich vorhandenen Signale als Folge der Verkürzung der Relaxationszeiten  $T_1$  und  $T_2$  verbreitern sowie die Resonanzfrequenzen verschieben.

Eine bestimmte Menge von  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Cyclodextrin wurde zu verdünnten  $\text{D}_2\text{O}$ -Lösungen der stabilen Nitroxidradikale, z.B. 1, 2 oder 3, in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt.

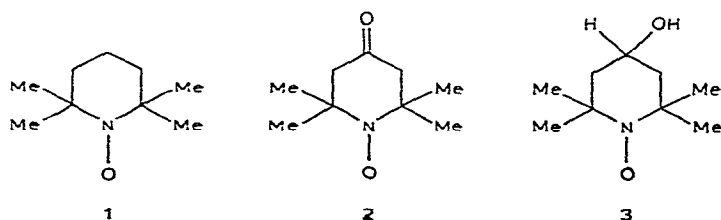


Abbildung 1 zeigt beispielsweise den Einfluß der zunehmenden Konzentration der Nitroxidradikale auf die  $^1\text{H}$ -N.m.r.-Spektren des  $\beta$ -Cyclodextrins. Die Zuordnungen der Protonensignale<sup>4–6</sup> sind in Abb. 1 angegeben. Unter den Meßbedingungen erschienen keine Protonensignale der Nitroxidradikale.

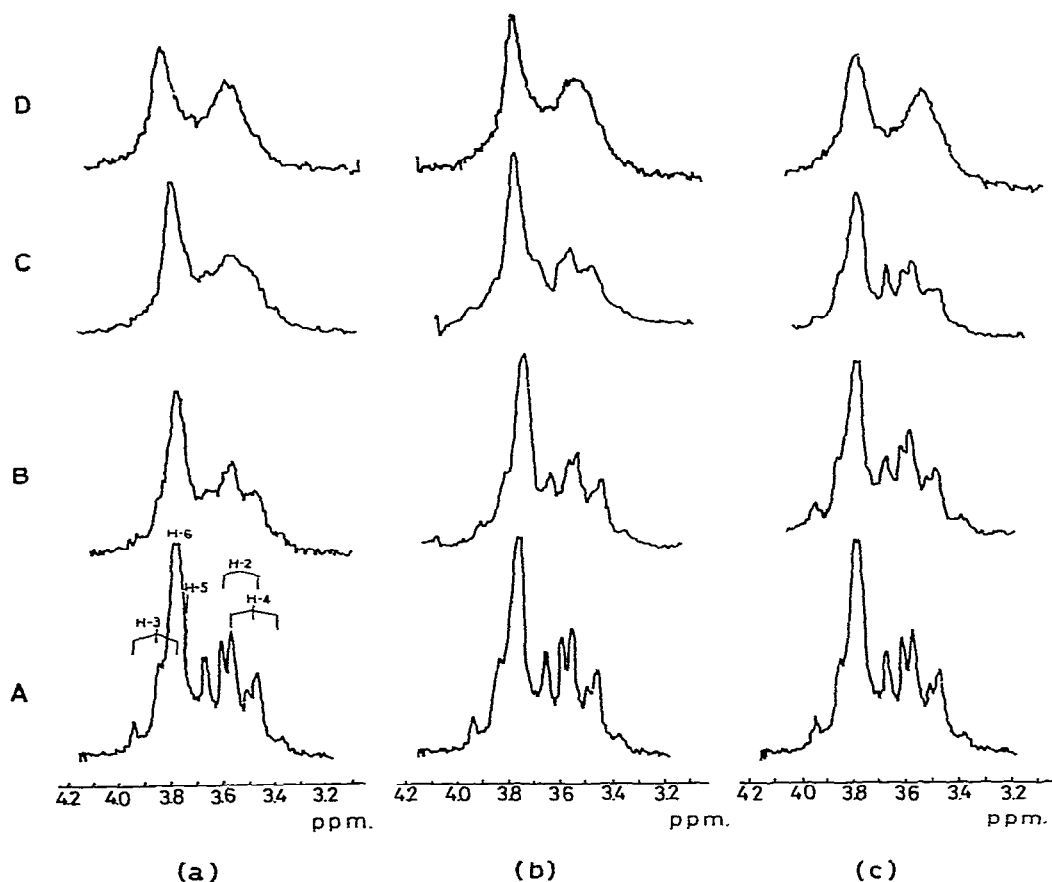


Abb. 1.  $^1\text{H}$ -N.m.r.-Spektren (100 MHz) von  $\beta$ -Cyclodextrin (4,41mM in  $\text{D}_2\text{O}$ ) bei verschiedenen Konzentrationen der Nitroxidradikale: (a) 1, (b) 2 und (c) 3. Molverhältnis von jedem Radikal zu  $\beta$ -Cyclodextrin: (A) 0,00, (B) 0,0018, (C) 0,0092, (D) 0,055 (Linienlagen in p.p.m., bezogen auf den inneren Standard Natrium-2,2-dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat).

Wie as Abb. 1 ersichtlich ist, verschwinden einige Protonensignale, die den Wasserstoffkernen, H-3 und -5 entsprechen, bereits bei geringer Radikal-Konzentration ( $7,94\mu\text{M}$ ). Die übrigen Signale, H-2, -4 und -6 entsprechend, verbreitern sich mit allmählicher Zunahme der Radikal-Konzentration. Dagegen gab es im Falle der anomeren Protonen praktisch keine Linienverbreiterung, sondern nur eine geringfügige Signalverschiebung von  $\delta$  4,95 nach 4,98.

Ähnliche Übergänge der  $^1\text{H}$ -N.m.r.-Spektren wurden auch in allen anderen Cyclodextrin-Proben ( $\alpha$ - und  $\gamma$ -Cyclodextrin) beobachtet.

Die Wirkung der Nitroxidradikale liegt in der Linienverbreiterung derjenigen Protonen, die sich in der Nähe des Einzelektrons befinden. Im Falle der Cyclodextrine sind dies die auf der Innenseite<sup>1</sup> des Molekülhohlraumes gelegenen Protonen H-3 und -5, und aus dem beobachteten Effekt läßt sich die Bildung von Einschluß-

komplexen folgern. Diese Befunde stimmen weitgehend überein mit dem E.s.r.-Nachweis<sup>17</sup> von Cyclodextrin-Nitroxidradikal-Komplexen.

Die in Abb. 1 gezeigten <sup>1</sup>H-N.m.r.-Spektren bestehen durch Superposition der Signale der komplexbildenden und freien Cyclodextrine. Auf Grund der gemessenen Dissoziationskonstante  $K_d$  (3,9 mM bei 30°) für den  $\beta$ -Cyclodextrin-1-Komplex wurde das Dissoziationsgleichgewicht berechnet. Bei Zusatz selbst einer verhältnismäßig großen Menge (1,2 mM) an 1 beträgt der Anteil des komplexbildenden  $\beta$ -Cyclodextrins nur 13%.

#### EXPERIMENTELLER TEIL

**Materialien.** — Vorbereitung, Identifizierung und physikalische Daten der verwendeten Cyclodextrine und Nitroxidradikale (1, 2 und 3) wurden in der vorangehenden Mitteilung<sup>17</sup> beschrieben. Vor der N.m.r.-Untersuchung wurden die OH-Protonen der Proben durch wiederholte Lyophilization mit D<sub>2</sub>O (Deuterierungsgrad: 99,75%) deuteriert.

**Allgemeine Vorschrift für die <sup>1</sup>H-N.m.r.-Messungen.** — Eine Mischung von  $\beta$ -Cyclodextrin (5 mg, 4,41  $\mu$ mol) und verschiedenen Mengen (1 nmol–30  $\mu$ mol) eines Radikals in D<sub>2</sub>O (1 mL) wurde zu Natrium-2,2-dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat (1.5 mg, 6,88  $\mu$ mol) hingefügt. Jede Probe wurde in ein konventionelles N.m.r.-Meßröhrchen (Durchmesser:  $\sim$ 5 mm) eingeführt und auf einem JNM-PFT-100 Gerät bei 100 MHz vermessen. Die Probentemperatur wurde bei  $23 \pm 1^\circ$  gehalten. Die Meßgenauigkeit der chemischen Verschiebungen war  $\pm 0.02$  p.p.m.

#### DANK

Die Autoren danken Herrn S. Yamaguchi für technische Unterstützung bei der Aufnahme der Spektren.

#### LITERATUR

- 1 M. L. BENDER UND M. KOMIYAMA, *Cyclodextrin Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin, 1978.
- 2 F. CRAMER, *Einschlußverbindungen*, Springer-Verlag, Heidelberg, 1954.
- 3 F. CRAMER UND H. HETTLER, *Naturwissenschaften*, 54 (1967) 625–632.
- 4 P. V. DEMARCO UND A. L. THAKKAR, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1970) 2–4.
- 5 R. BERGERON UND R. ROWAN, 3rd, *Bioorg. Chem.*, 5 (1976) 425–436.
- 6 D. J. WOOD, F. E. HRUSKA UND W. SAENGER, *J. Am. Chem. Soc.*, 99 (1977) 1735–1740.
- 7 J. P. BEHR UND J. M. LEHN, *J. Am. Chem. Soc.*, 98 (1976) 1743–1747.
- 8 M. SUZUKI UND Y. SASAKI, *Chem. Pharm. Bull.*, 27 (1979) 1343–1351.
- 9 K. UEKAMA, F. HIRAYAMA UND H. KOINUMA, *Chem. Lett.*, (1977) 1393–1396.
- 10 Y. INOUE, Y. KATONÔ UND R. CHÛJÔ, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 52 (1979) 1692–1697.
- 11 A. S. MILDVAN UND H. WEINER, *Biochemistry*, 8 (1969) 552–562; G. C. K. ROBERTS, J. HANNAH UND O. JARDETSKY, *Science*, 165 (1969) 504–506.
- 12 R. W. WIEN, I. D. MORRISSETT UND H. M. MCCONNELL, *Biochemistry*, 11 (1972) 3707–3716.

- 13 I. MORISHIMA, K. ISHIHARA, K. TOMISHIMA, T. INUBUSHI UND T. YONEZAWA, *J. Am. Chem. Soc.*, 97 (1975) 2749–2756.
- 14 T. R. KRUGH, in L. J. BERLINER (Redakt.), *Spin Labeling*, Band I, Academic Press, New York, 1976, SS. 339–372.
- 15 S. T. LORD UND E. BRESLOW, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80 (1978) 63–70.
- 16 R. E. LENKINSKI, J. L. DALLAS UND J. D. GLICKSON, *J. Am. Chem. Soc.*, 101 (1979) 3071–3077.
- 17 M. OHARA, H. HETTLER, D. GAUSS UND F. CRAMER, *Bioorg. Chem.*, 8 (1979) 211–217.