

Note

¹H-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, ringsförmige Oligosaccharide aus sechs, sieben oder acht α -D-Glucopyranose-Einheiten (α -, β -, γ -Cyclodextrin), bilden in wäßrigem Medium Einschluß-Komplexe mit zahlreichen Gastmolekülen^{1–3}. Einige unmittelbare Beweise dafür sind anhand ¹H-N.m.r.-spektroskopischer Daten erbracht worden^{4–10}, 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^{11–17}. 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 α - oder β -Cyclodextrin wurde zu verdünnten D₂O-Lösungen der stabilen Nitroxidradikale, z.B. 1, 2 oder 3, in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt.

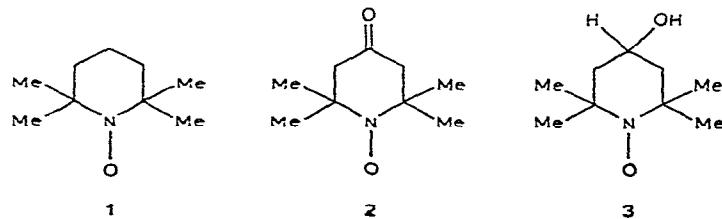


Abbildung 1 zeigt beispielsweise den Einfluß der zunehmenden Konzentration der Nitroxidradikale auf die ¹H-N.m.r.-Spektren des β -Cyclodextrins. Die Zuordnungen der Protonensignale^{4–6} sind in Abb. 1 angegeben. Unter den Meßbedingungen erschien keine Protonensignale der Nitroxidradikale.

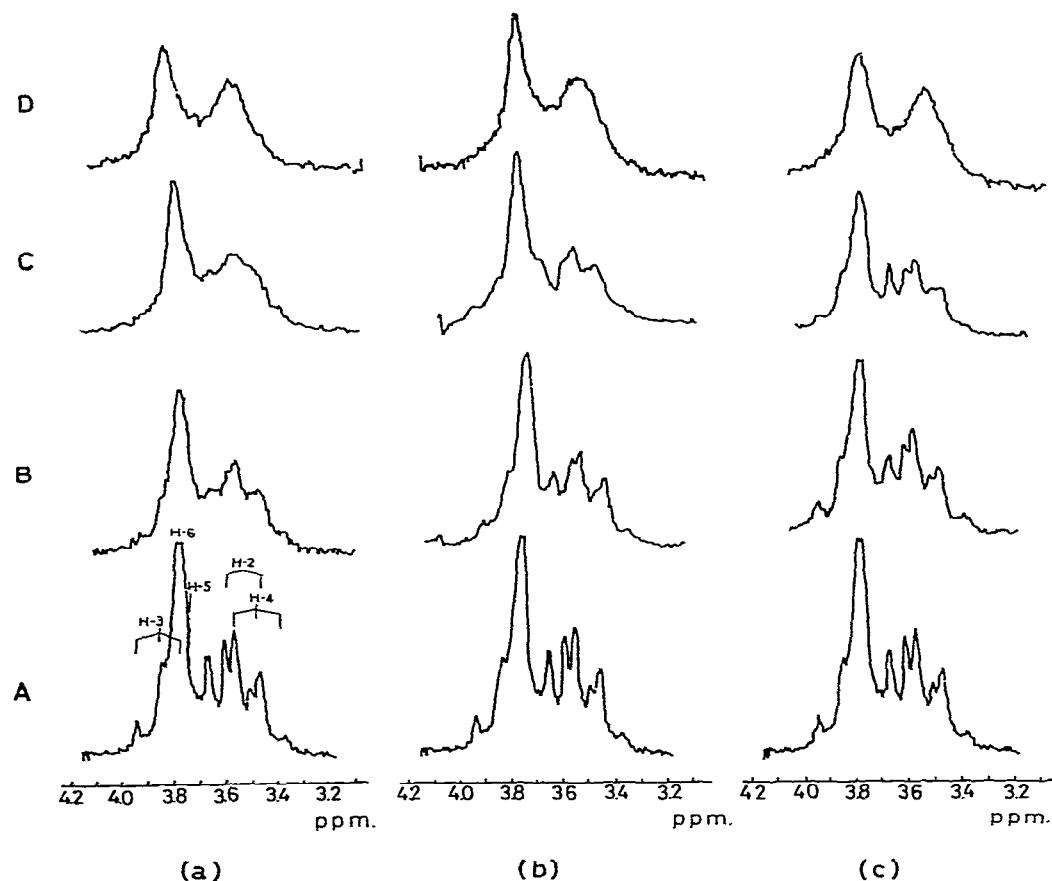


Abb. 1. ^1H -N.m.r.-Spektren (100 MHz) von β -Cyclodextrin (4,41 mM in D_2O) bei verschiedenen Konzentrationen der Nitroxidradikale: (a) 1, (b) 2 und (c) 3. Molverhältnis von jedem Radikal zu β -Cyclodextrin: (A) 0.00, (B) 0.0018, (C) 0.0092, (D) 0.055 (Linienlagen in p.p.m., bezogen auf den inneren Standard Natrium-2,2-dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat).

Wie aus Abb. I 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 δ 4,95 nach 4,98.

Ähnliche Übergänge der ^1H -N.m.r.-Spektren wurden auch in allen anderen Cyclodextrin-Proben (α - und γ -Cyclodextrin) beobachtet.

Die Wirkung der Nitroxidradikale liegt in der Linienverbreiterung derjenigen Protonen, die sich in der Nähe des Einzelelektrons befinden. Im Falle der Cyclodextrine sind dies die auf der Innenseite¹ 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.-Nachweis¹⁷ von Cyclodextrin-Nitroxidradikal-Komplexen.

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

EXPERIMENTELLER TEIL

Materialien. — Vorbereitung, Identifizierung und physikalische Daten der verwendeten Cyclodextine und Nitroxidradikale (1, 2 und 3) wurden in der vorangehenden Mitteilung¹⁷ beschrieben. Vor der N.m.r.-Untersuchung wurden die OH-Protonen der Proben durch wiederholte Lyophilization mit D₂O (Deuterierungsgrad: 99,75%) deuteriert.

Allgemeine Vorschrift für die ¹H-N.m.r.-Messungen. — Eine Mischung von β -Cyclodextrin (5 mg, 4,41 μ mol) und verschiedenen Mengen (1 nmol–30 μ mol) eines Radikals in D₂O (1 mL) wurde zu Natrium-2,2-dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat (1,5 mg, 6,88 μ mol) hingefügt. Jede Probe wurde in ein konventionelles N.m.r.-Meßröhrchen (Durchmesser: ~5 mm) eingeführt und auf einem JNM-PFT-100 Gerät bei 100 MHz vermessen. Die Probentemperatur wurde bei 23 ± 1° gehalten. Die Meßgenauigkeit der chemischen Verschiebungen war ± 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. KATÔNÔ 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. JARDETZKY, *Science*, 165 (1969) 504–506.
- 12 R. W. WIEN, I. D. MORRISSETT UND H. M. MC CONNELL, *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.