

UNTERSUCHUNG VON MOLEKULAREN
ERKENNUNGSPROZESSEN IN INTERPHASEN MIT MODERNEN
METHODEN DER HIGH-RESOLUTION- (HR) UND
HR-MAS-SUSPENSIONS-NMR-SPEKTROSKOPIE

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zum Erlangen des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2001

vorgelegt von
CHRISTINE HELLRIEGEL

Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.2001

Dekan: Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Albert

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Häfelinger

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Anleitung von Herr Prof. Dr. Klaus Albert im Zeitraum von Januar 1999 bis Juli 2001 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Klaus Albert danke ich sehr herzlich für die interessante Themenstellung, das stetige Interesse an meiner Arbeit, die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen und die Möglichkeit an Forschungsaufenthalten sowie nationalen und internationalen Tagungen teilnehmen zu können.

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, ohne die freundschaftliche Unterstützung meiner Kollegen und Kooperationspartner wäre die Durchführung der vorliegenden Arbeit in diesem Zeitraum nicht möglich gewesen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei:

Heidi Händel für die wertvolle fachliche Unterstützung bei vielen Fragestellungen zur NMR, für die Korrektur dieser Arbeit und die überaus herzliche Zusammenarbeit.

Andrea Haug, Manfred Krucker und Christel Wolf für das Korrekturlesen.

Stefan Bachmann, Rainer Brindle, Markus Dachtler, Sonja Dick, Arndt Ellwanger Andreas Fischer, Gerd Fischer, Holger Fischer, Elke Gesele, Tobias Glaser, Hussein Jichi, Tanja Lacker, Annette Lienau, Martin Raitza, Alexandre Schefer, Renata Rabelo Schefer, Jürgen Wegmann, Daniel Zeeb sowie den oben genannten Personen danke ich für das sehr angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima in den vergangenen drei Jahren, viele Eindrücke aus dieser Zeit sind von bleibender Erinnerung.

Allen Kollegen und Mitarbeitern der NMR-Abteilung für die gute Zusammenarbeit.

Walter Schaal (Elektronikwerkstatt) für seine unmittelbare Hilfe bei Problemen mit den NMR-Spektrometern.

Cynthia K. Larive für die Möglichkeit eines zweimonatigen Forschungsaufenthalts in ihrem Arbeitskreis. Ihr und allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, Farhana Afroz, Ben Cutak, Laurie Cardoza, Tiffany Derrick, Brittaney Lee, Laura H. Lucas, Trung Lam, William Otto sowie Katie Keel und Anna Witherow danke ich für die herzliche Aufnahme und die Freundschaften, die Dank Internet von Bestand sind.

Dem DFG-Graduiertenkolleg „Chemie in Interphasen“ und seinem Sprecher Prof. Dr. E. Lindner für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit. Allen Kolleginnen und Kollegen des Graduiertenkollegs für die freundschaftliche Zusammenarbeit, in deren Rahmen neue Projekte erfolgreich bearbeitet werden konnten.

Ulrike Holgrave für die Möglichkeit eines vierwöchigen Aufenthalts in ihrem Arbeitskreis an der Universität Würzburg. Maike Wedig und Stephanie Laug für ihre geduldige Einweisung in die Geheimnisse der CEC, sowie die vielen Diskussionen.

Ein besonders herzlicher Dank gilt meiner Familie, die mich während des gesamten Studiums und der Promotion uneingeschränkt unterstützt hat, und auf die ich mich in allen Situationen stets verlassen konnte.

1	EINLEITUNG	1
2	CHIRALE ERKENNUNG AN β-CYCLODEXTRINEN	3
2.1	Chirale Erkennung in diastereomeren Wirt-Gast-Komplexen	3
2.2	β -Cyclodextrine als chirale Selektoren	4
2.3	NMR-Spektroskopie	5
2.3.1	Kern-Overhauser-Effekt	6
2.4	Zweidimensionale Kern-Overhauser-Spektroskopie (NOESY)	9
2.5	ROESY-Spektroskopie	9
2.6	Untersuchung der chiralen Erkennung an Ephedrinenantiomeren mit <i>Heptakis(2,3-O-diacetyl-6-sulfato)</i> β -cyclodextrin (HDAS- β -CD)	11
2.6.1	Motivation	11
2.6.2	2D ROESY-NMR-Experimente	11
2.6.3	Bestimmung der Komplexstöchiometrie nach der Methode von Job	15
2.7	Untersuchung der Wechselwirkung von Dimethylcyclohexan und permethyliertem β -Cyclodextrin	19
3	PFG (PULSE FIELD GRADIENT) NMR-SPEKTROSKOPIE ZUR ANALYSE VON KOMPLEXGEMISCHEN	22
3.1	Grundlage und Geschichte der PFG NMR-Spektroskopie	22
3.1.1	Relaxation des NMR-Spinsystems	23
3.1.2	Untersuchung der Diffusion mittels NMR-Spektroskopie	23
3.2	Untersuchung der Diffusionskoeffizienten von D-/ L-N-Methylephedrin nach Komplexierung mit HDAS- β -CD sowie DIAC- β -CD	31
3.2.1	Motivation	31
3.2.2	Bestimmung der Diffusionskoeffizienten der isolierten Komponenten D-/L-N-Methylephedrin sowie HDAS- und DIAC- β -CD	32
3.2.3	Bestimmung der Diffusionskoeffizienten von D- und L-N-Methylephedrin durch Komplexierung mit HDAS- und DIAC- β -CD	33
3.2.4	Bestimmung der Diffusionskoeffizienten von HDAS- und DIAC- β -CD in Wechselwirkung mit D- und L-N-Methylephedrin	35
4	UNTERSUCHUNG DER MOLEKULAREN ERKENNUNG AN STATIONÄREN PHASEN	37
4.1	Molekulare Erkennung und Wirt-Gast-Chemie	37
4.1.1	Wirt-Gast-Chemie	37
4.1.2	Molekulare Erkennung	38
4.2	HR-MAS-NMR-Spektroskopie	39
4.3	Untersuchung der molekularen Erkennung an stationären Phasen mittels der HR-MAS-NMR-Spektroskopie	43

4.3.1	Motivation	43
4.3.2	Charakterisierung einer polymeren stationären Phase mittels ^1H -HR-MAS-NMR-Spektroskopie	43
4.3.3	Untersuchung des Quellverhaltens einer polymeren Phase	44
4.3.3.1	Untersuchung der molekularen Erkennung an einer polymeren Phase	46
4.3.4	Untersuchung und Strukturaufklärung einer Polyalkylvinyletherphase	50
4.4	Untersuchung von stationären Kieselgelphasen	52
4.4.1	Untersuchung der molekularen Erkennung an nativem Kieselgel	52
4.4.2	Wechselwirkungsuntersuchungen mit nativem und Aminopropylkieselgel und Methylphenylhydantoin sowie Methylphenylsuccinimid	56
4.4.2.1	Untersuchung der Wechselwirkung mit Methylphenylsuccinimid und APS-Kieselgel	56
4.4.2.2	Untersuchungen zur Wechselwirkung mit Methylphenylhydantoin und APS-Kieselgel	60
4.4.3	Molekulare Erkennung an stationären Kieselgelphasen	63
4.4.4	Veränderung der molekularen Erkennung durch Acetonitrilbeimischungen	66
4.4.5	Untersuchungen mit Hydantoinen	70
5	CHIRALE ERKENNUNG AN STATIONÄREN KIESELGELPHASEN	72
5.1	Motivation	72
5.2	Grundlagen der trNOESY-NMR-Spektroskopie	73
5.3	^{13}C- und ^{29}Si-CP/MAS-Festkörper-NMR-Untersuchungen von Thiokromasil und tBuCQN-Thiokromasil	76
5.3.1	Grundlagen zur Festkörper-NMR-Spektroskopie	76
5.3.1.1	Kreuzpolarisation (Cross Polarization, CP)	76
5.3.2	^{13}C -CP/MAS-NMR von Thiokromasil und tBuCQN-Thiokromasil	78
5.4	^{29}Si-CP/MAS-NMR-Spektren von Thiokromasil und tBuCQN-Thiokromasil	79
5.4.1.1	^{29}Si -CP/MAS-NMR-Spektroskopie	79
5.4.1.2	^{29}Si -CP/MAS-NMR-Spektren von Thiokromasil und tBuCQN-Thiokromasil	80
5.5	transfer NOESY-NMR-Experimente zur molekularen Erkennung an chiralen stationären Phasen	82
5.5.1	Motivation	82
5.5.2	^1H -HR-MAS-NMR-spektroskopische Charakterisierung der stationären Phasen	82
5.5.2.1	^1H -HR-MAS-NMR-Spektrum von Thiokromasil 100 – 5 μm	83
5.5.2.2	^1H -HR-MAS-NMR-Spektrum von tBuCQN-Thiokromasil	84
5.5.3	Charakterisierung des Selektors tert-Butylchinincarbamat (tBuCQN)	85
5.6	Charakterisierung von DNB-(R/S)-Leucin mittels ^1H- und NOESY-HR-MAS-NMR-Spektroskopie	87
5.6.1	Charakterisierung von DNB-(R)-Leucin mittels ^1H - und NOESY-HR-MAS-NMR-Spektroskopie	87
5.6.2	Charakterisierung von DNB-(S)-Leucin mittels ^1H - und NOESY-HR-MAS-NMR-Spektroskopie	89
5.7	trNOESY-NMR-Untersuchung von tBuCQN-Thiokromasil mit DNB-(R)/ (S)-Leucin in Methanol	90
5.7.1	trNOESY-NMR-Spektrum von DNB-(R)- und (S)-Leucin in Wechselwirkung mit tBuCQN-Thiokromasil (2 mg) in Methanol	91
5.7.2	trNOESY-NMR-Spektrum von DNB-(R)- und (S)-Leucin in Wechselwirkung mit tBuCQN-Thiokromasil (5 mg) in Methanol	92

5.8	Untersuchung der Wechselwirkung zwischen DNB-(R/S)-Leucin mit tBuCQN-Thiokromasil in Methanol mit Lösungsmittelvorsättigung	96
5.8.1	trNOESY von DNB-(R)- und DNB-(S)-Leucin (0.1 mol/l) mit jeweils 5 mg tBuCQN-Thiokromasil	96
5.8.2	trNOESY von DNB-(R)- und DNB-(S)-Leucin (0.1 mol/l) mit jeweils 15 mg tBuCQN-Thiokromasil	98
5.9	Molekulare Erkennung mit Thiokromasil und DNB-(R/S)-Leucin in Methanol	100
5.10	Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen tBuCQN-Thiokromasil und DNB-(R)/(S)-Leucin in Acetonitril/Wasser 90:10	102
5.10.1	Charakterisierung von DNB-(R)-Leucin in Acetonitril/Wasser 90:10 mittels ¹ H- und 2D NOESY-HR-MAS-NMR-Spektroskopie	102
5.10.2	Charakterisierung von DNB-(S)-Leucin in Acetonitril/Wasser 90:10 mittels ¹ H- und 2D NOESY-HR-MAS-NMR-Spektroskopie	104
5.10.3	trNOESY-NMR-Spektren von DNB-(R/S)-Leucin und tBuCQN-Thiokromasil (5 mg) in Acetonitril/Wasser 90:10	105
5.10.4	trNOESY-NMR-Spektren von DNB-(R/S)-Leucin und tBuCQN-Thiokromasil (15 mg) in Acetonitril/Wasser 90:10	106
5.11	Vergleich der Signalintensitäten von DNB-R- und -S-Leucin mit verschiedenen Rezeptorbedingungen	110
5.12	Untersuchung der Wechselwirkung zwischen DNB-(R/S)-Leucin und tBuCQN mittels 2D ROESY-NMR-Spektroskopie unter Hochauflösungsbedingungen	111
5.12.1	2D ROESY-NMR-Spektrum von DNB-(R)-Leucin und tBuCQN in Methanol	113
5.12.2	2D ROESY-NMR-Spektrum von DNB-(S)-Leucin und tBuCQN in Methanol	114
6	ZUSAMMENFASSUNG	116
7	EXPERIMENTELLER TEIL	120
7.1	Chemikalien	120
7.2	NMR-Geräte	120
7.3	NMR-Spektroskopie	121
7.3.1	2D ROESY-NMR-Spektroskopie	121
7.3.2	Job-Plots	121
7.3.3	¹ H-HR-MAS-NMR-Spektroskopie	122
7.3.4	PFG-NMR-Spektroskopie	122
8	LITERATUR	123

Abkürzungen

ϑ	Magischer Winkel 54.7°
1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
ACN	Acetonitril
B ₀	starkes Magnetfeld, entlang der z-Achse orientiert
B ₁	zusätzliches transversales Magnetfeld
CDCl ₃	Deuteriochloroform
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
D	Diffusionskoeffizient
D ₂ O	Deuteriumoxid
D-EPH	D-Ephedrin
DIAC-β-CD	<i>Heptakis(2,3-di-O-acetyl)β-cyclodextrin</i>
D-ME	D-N-Methylephedrin
DNB-(R/S)-Leu	Dinitrobenzoyl-(R/S)-Leucin
FID	<i>Free Induction Decay</i> , aufgenommenes NMR-Signal
FT	<i>Fourier-Transformation</i>
h	Stunde
HDAS-β-CD	<i>Heptakis(2,3-di-O-acetyl-6-sulfato)β-cyclodextrin</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochleistungsflüssig- chromatographie)
Hz	Hertz
I	Kernspinquantenzahl
J	Kopplungskonstante [Hz]
K	Kelvin
L-EPH	L-Ephedrin
L-ME	L-N-Methylephedrin
M	Molar
M	Gleichgewichtsmagnetisierung
M	monofunktionelle Siliziumbausteine
MAS	<i>Magic Angle Spinning</i>
MeOH	Methanol
Me-φ-Hyd	Methylphenylhydantoin
Me-φ-SI	Methylphenylsuccinimid

mg	Milligramm
ml	Milliliter
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Kernresonanz-Spektroskopie)
NOE	<i>Nuclear Overhauser Enhancement</i> Effekt
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy</i>
Q ⁿ	Silandiol (Q ² -), Silanol (Q ³) und Siloxan-(Q ⁴)-Einheiten Grundeinheiten des Kieselgels
ROE	Kreuzsignal auf NOE-Effekt im rotierenden Koordinatensystem basierend
ROESY	<i>Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
SI	Succinimid
T	Tesla
t ₁	inkrementierte Zeit, ergibt die erste Frequenzdomäne
T ₁	longitudinale Relaxationszeit
t ₂	Detektionszeit, ergibt die zweite Frequenzdomäne
T ₂	transversale Relaxationszeit
tBuCQN	tert-Butylchinincarbamat
T ⁿ	trifunktionelle Siliziumbausteine
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
trNOE	negatives Kreuzsignal auf NOE-Effekt beruhend
trNOESY	transfer NOESY-Spektroskopie
δ	chemische Verschiebung
γ	gyromagnetisches Verhältnis
μl	Mikroliter
ν _r	Rotationsfrequenz
τ	Wartezeit
τ _C	Korrelationszeit
ω ₁	erste Frequenzdomäne im 2D NMR-Spektrum, durch Fourier-Transformation über t ₁ erhalten
ω ₂	zweite Frequenzdomäne

1 Einleitung

Fragestellungen und Anforderungen an die moderne Analytik unterschiedlicher Bereiche werden durch zunehmende Ansprüche an hochwertige und reine Produkte immer komplexer. Bezüglich der Isolierung und Charakterisierung neuer Verbindungen sowie Qualität und Reinheit bereits auf dem Markt befindlicher Produkte sind in den letzten Jahren schärfere gesetzliche Bestimmungen und Kontrollen wirksam geworden. In beiden Fällen, der Entwicklung und der Qualitätskontrolle, sind demzufolge leistungsfähige Methoden zur Auftrennung komplexer Stoffgemische notwendig.

Seit ihrer Einführung vor über 30 Jahren hat sich dabei die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) zu einer der wichtigsten Trenntechniken entwickelt und ist gegenwärtig ein unverzichtbarer Bestandteil in den Analytiklaboratorien.^[1-4]

Die große Bedeutung der HPLC als fortschrittliche analytische Trennmethode beruht hauptsächlich auf ihren breitgefächerten Anwendungsmöglichkeiten, welche vor allem durch die Verbesserungen in der Säulenttechnologie ermöglicht wurden. Dennoch sind viele analytische Fragestellungen auch heute noch ungeklärt. Um weitere Fortschritte zur Beantwortung komplexer Fragestellungen zu erzielen, ist die Entwicklung neuer Trenntechniken und damit neuer Trennmaterialien, von entscheidender Bedeutung.

Chromatographische Trennsäulen werden üblicherweise mit Trägermaterialien gefüllt, die aus organischen Polymeren oder anorganischen Oxiden aufgebaut sind.^[5] Bei den organischen Polymeren erweist sich jedoch die ungleiche Quellbarkeit der Polymere in verschiedenen organischen Lösungsmitteln häufig als großer Nachteil und schränkt deren Verwendung ein. Anorganische Oxide, allen voran Kieselgel, quellen in organischen Lösungsmitteln praktisch nicht, verfügen zusätzlich über eine hohe Druckstabilität und werden dadurch den organischen Materialien vorgezogen. Freie Silanolgruppen auf der Oberfläche der Kieselgele ermöglichen darüber hinaus die Modifizierung mit funktionellen Silanen und die Immobilisierung von organischen Polymeren auf Kieselgel.

Viele Trennprobleme lassen sich durch die Anwendung der weit verbreiteten C₁₈- und C₃₀-Phasen lösen.^[6-8] Für die Auftrennung spezieller komplexer Substanzgemische aus den Bereichen der biomedizinischen, Umwelt- und pharmazeutischen Analytik werden allerdings dem Problem angepasste, sehr selektive Trennphasen benötigt. Die Synthese von maßgeschneiderten Trennphasen wird durch synergetische Kombination von Resultaten aus der Anwendung in der HPLC sowie Untersuchung des chromatographischen Trennprozesses mit

spektroskopischen Methoden, insbesondere der magnetischen Kernresonanzspektroskopie, ermöglicht.

Von großer Bedeutung ist das Verständnis des molekularen Erkennungsprozesses, dessen Untersuchung sich durch verschiedene Methoden anbietet. Chromatographische Tests mit Standardsubstanzgemischen stehen zur Verfügung, diese geben allerdings nur einen indirekten Einblick in den Wechselwirkungsmechanismus der Trennphasen.

Aussagekräftiger sind spektroskopischen Methoden allen voran die HR-MAS-(High Resolution Magic Angle Spinning) Suspensions-Kernresonanzspektroskopie.^[9] Durch Zugabe eines Lösungsmittels liegen, bei dieser Methode, die im allgemeinen unlöslichen Trennphasen im suspendierten oder gequollenen Zustand vor. Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie in Suspension wird es nun ermöglicht, die Untersuchung der Wechselwirkungen direkt an den Rezeptorstellen der chromatographischen Trennphase durchzuführen. Zudem erlaubt es diese Technik, die gleichen Voraussetzungen und Messbedingungen zu schaffen, wie sie während der Trennung in der chromatographischen Säule vorliegen. Infolgedessen ist es möglich einen direkten Vergleich mit den Verhältnissen unter chromatographischen Messbedingungen zu ziehen, wechselseitige Anpassungen der Parameter zur weiteren Untersuchung der Wechselwirkungen durchzuführen und somit den Trennprozess zu optimieren.

Das Screening stationärer Phasen ist möglich geworden durch ein NMR-Experiment, welches auf dem Kern-Overhauser-Effekt (NOE – *Nuclear Overhauser Effect*) beruht. So können auf relativ unkomplizierte und elegante Weise Wechselwirkungen zwischen Rezeptor- und Substratmolekülen sogar innerhalb einer Substanzbibliothek spezifisch detektiert werden.^[10]

Besondere Beachtung wird in den letzten Jahren, aufgrund der wachsenden Kenntnis über asymmetrische Zentren chiraler Verbindungen und der unterschiedlichen und z.T. entgegengesetzten Wirksamkeit chiraler Arzneistoffe, auf die Entwicklung von enantioselektiven Trennphasen^[11-13] gerichtet. Ein hauptsächliches Augenmerk gilt dabei der Untersuchung der chiralen Erkennung, welche wertvolle Beiträge zum Verständnis des Erkennungsmechanismus liefert. Einen direkten Einblick in die Wechselwirkungen an den chiralen stationären Phasen liefern die HR- und HR-MAS-NMR-Spektroskopie. So lassen sich durch Kombination unterschiedlicher ein- und zweidimensionaler Experimente Informationen über diastereomere Komplexe, deren Struktur und den Wechselwirkungsmechanismus zwischen den Komponenten erhalten und dadurch die maßgeschneiderte Synthese sowie chromatographischen Bedingungen entscheidend verbessern.

2 Chirale Erkennung an β -Cyclodextrinen

2.1 Chirale Erkennung in diastereomeren Wirt-Gast-Komplexen

Die chirale Erkennung racemischer Gastkomponenten in komplexen, makrocyclischen Wirtssystemen war bis vor einiger Zeit auf die freien oder polymergebundenen Cyclodextrine beschränkt. In den letzten Jahren konnte die Bildung von diastereomeren Komplexen zwischen synthetischen Wirten und nichtkationischen Gästen in wässrigen oder organischen Lösungsmitteln beobachtet werden.^[14] Anwendung finden die chiralen Selektoren auch in der Chromatographie. Die Trennung von Enantiomeren wird stark vereinfacht, wenn eine Säule mit fester chiraler stationärer Phase zur Verfügung steht. Leider gibt es keine „Universalphase“, welche alle Trennprobleme lösen kann. Die chiralen Wirtkomponenten bzw. stationären Phasen arbeiten nach verschiedenen Prinzipien. Eine Einteilung ist wie folgt möglich:^[2]

- Ligandenaustauschphasen:^[15,16]

Es handelt sich um Aminosäure-Kupfer-Komplexe, die auf Silicagel gebunden sind. Eine potentielle Gastkomponente muss zwei funktionelle Gruppen im richtigen Abstand haben. Diese Bedingung ist bei Aminosäuren und Dipeptiden erfüllt, so dass diese Stoffklassen in Enantiomere getrennt werden können.

- Helicale Polymere:^[17]

Polymere mit schraubenförmiger, helicaler Struktur können Enantiomere trennen, wenn diese zwischen den einzelnen Schichten dieser Struktur festgehalten werden. Die Polymere eignen sich vor allem zur Trennung von starren nichtplanaren Molekülen.

- Phasen mit chiralen Kavitäten:^[18]

Cyclodextrine können Enantiomere trennen, wenn der apolare Teil eines Moleküls genau in die Kavität der Ringstruktur hineinpasst. Der polarere Teil tritt dabei mit den auf der Kante des Rings im Uhrzeigersinn gerichteten Hydroxylgruppen (H(2)) in Wechselwirkung (s. auch Abbildung 1). Chirale Kronenether gehören ebenfalls zu den Verbindungen, bei denen eine Kavität die Trennung bewirkt.

2.2 β -Cyclodextrine als chirale Selektoren

Cyclodextrine entstehen beim enzymatischen Abbau von Stärke. Es sind cyclische Oligosaccharide, die aus sechs bis acht α -1-4'-verknüpften Glucoseeinheiten (α -, β - bzw. γ -Cyclodextrin) bestehen und auf diese Weise relativ starre und hydrophobe Hohlräume bilden.^[19] Die Durchmesser der Cyclodextrinmoleküle variieren von 0.50 bis 0.85 nm (Abbildung 1). Im Kristallgitter sind sie so aufeinandergeschichtet, dass sie durchgehende intermolekulare Kanäle bilden, in denen sie hydrophobe Gastmoleküle in wechselnden Schichten bis zur Sättigung einschließen können. Die Cyclodextrine werden aufgrund dieser Eigenschaften zur Fertigung von Nahrungsmitteln und Pharmazeutika sowie zur Gewinnung von Hochleistungstrennphasen für Enantiomeren- und Diastereomergemische eingesetzt.^[20,21]

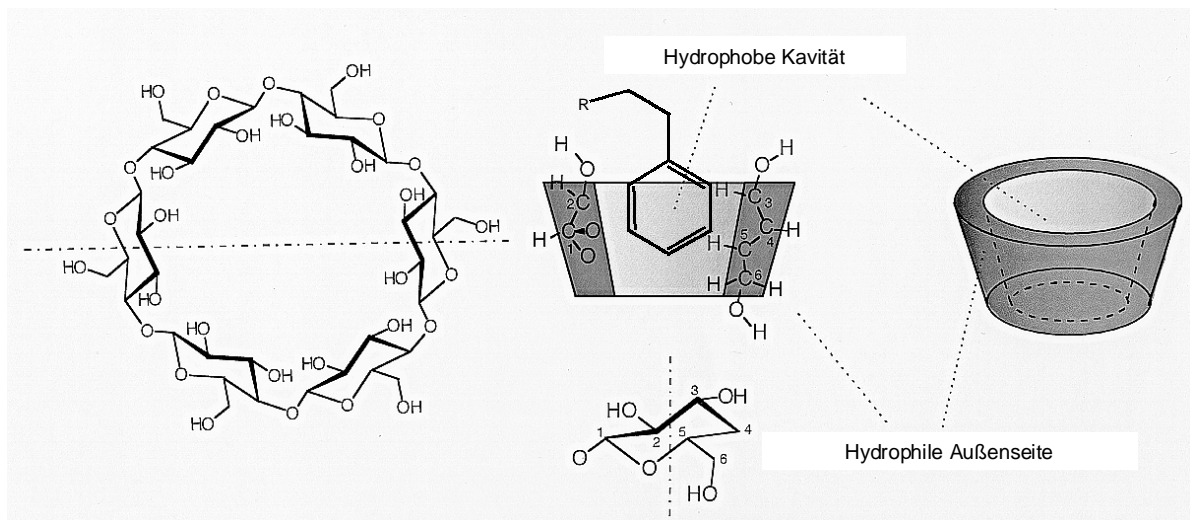


Abbildung 1: Struktur und räumliche Darstellung von Cyclodextrinen

Das wesentliche Merkmal einer Einschlussverbindung ist, dass eine Wirkkomponente in ihren Hohlraum Gastkomponenten aufnehmen kann, ohne dabei kovalente Bindungen zu knüpfen. Während sich Clathrate aufgrund des besonderen Kristallgitters der Wirkkomponente nur im festen Zustand bilden, entstehen die Cyclodextrinkomplexe schon in wässriger Lösung. Sie lassen sich daher elegant mit spektroskopischen oder kalorimetrischen Methoden untersuchen. In letzter Zeit haben vor allem Methoden der NMR-Spektroskopie sehr zum Verständnis der Gast-Cyclodextrin-Wechselwirkungen beigetragen.^[22]

Für die Bildung der Cyclodextrin-Einschlussverbindungen sind mehrere Kräfte gleichzeitig verantwortlich, die je nach Substrat verschieden stark beteiligt sind. Die Abhängigkeit der

Bindungskonstante von der Polarisierbarkeit des Substrats deutet daraufhin, dass im allgemeinen Van-der-Waals-Kräfte vorherrschen.

Auch die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Gast und OH-Gruppen des Cyclodextrins konnte nachgewiesen werden. Daneben sind hydrophobe Wechselwirkungen beteiligt, da das Gastmolekül bei Einschluss in den Cyclodextrin-Hohlraum die dort befindlichen Solvatmoleküle ausstoßen und seine eigene Solvathülle abstreifen muss. Die freigewordenen Lösungsmittelmoleküle gewinnen Freiheitsgrade und tragen durch die damit verbundene Entropiezunahme zur Stabilität der Komplexe bei.

Obwohl Experimente und theoretische Überlegungen zeigen, dass wahrscheinlich Van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen bei der Komplexbildung überwiegen, dürften sich andere Kräfte je nach Art des eingeschlossenen Gastmoleküls verschieden stark beteiligen. In jedem Fall aber ist die den Cyclodextrinen eigene, ringförmige Struktur entscheidend, da sich Einschlusskomplexe nur dann bilden, wenn Gast- und Wirtkomponenten räumlich gut übereinstimmen.^[23,24]

2.3 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie ist zu einer der wichtigsten Methoden für Aussagen über Struktur und Geometrie von organischen Verbindungen geworden. Die Technik ist von steigender Signifikanz für die meisten Anwendungen in der Cyclodextrin-Komplexchemie.^[25] Mit Hilfe von 2D NMR-Experimenten, die auf den Grundlagen des Kern-Overhauser-Effekts (NOE-Effekt) beruhen ist es möglich Einschlussverbindungen eindeutig zu charakterisieren und detaillierte Informationen über die Lage der Wechselwirkungszentren zu erhalten.

Aufgrund dessen ist die NOESY-Spektroskopie für die Konformationsanalyse heute unentbehrlich geworden. Sie hat den Weg zu dreidimensionalen Strukturanalysen in Lösung eröffnet, da nun neben den Korrelationen über das Netzwerk der chemischen Bindung direkte Informationen über räumliche Abstände gewonnen werden können.

2.3.1 Kern-Overhauser-Effekt^[26]

Beim Kern-Overhauser-Effekt handelt es sich um Intensitätsänderungen von Resonanzlinien bei Doppelresonanz-Experimenten. Die Intensität eines NMR-Signals ist proportional zum Besetzungsunterschied der beiden Energieniveaus, zwischen denen der Kernresonanzübergang erfolgt. In Abbildung 2 ist das Energieniveauschema für ein Zweispinsystem AX wiedergegeben; bei A und X kann es sich um Protonen oder verschiedene Kerne handeln. Sie sollten nicht skalar gekoppelt sein, das heißt $J_{AX} = 0$.

Die Übergänge zwischen den Niveaus 1 und 3 sowie 2 und 4 sind solche der A-Kerne, zwischen 1 und 2 sowie 3 und 4 solche der X-Kerne. Diese Übergänge sind erlaubt und messbar. Da $J_{AX} = 0$ gilt, wird im NMR-Spektrum für ein A- und ein X-Kern je ein Singulett beobachtet, dessen Intensitäten von den entsprechenden Besetzungsunterschieden im Gleichgewichtszustand bestimmt werden.

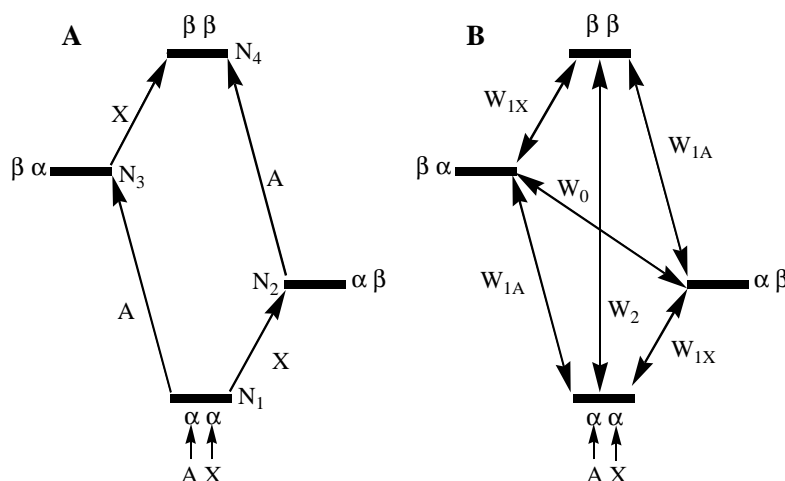


Abbildung 2: Energieniveauschemata für ein AX-Zweispinsystem

Beim NOE-Experiment, bei dem kontinuierlich die Übergänge eines Kernes gesättigt werden, werden offensichtlich Besetzungsverhältnisse geschaffen, die nicht mehr dem Gleichgewicht entsprechen, da sich sonst die Signalintensitäten für den X-Kern nicht ändern dürften. Wie bei jeder Störung strebt das System möglichst schnell danach, durch Spin-Gitter-Relaxation den Gleichgewichtszustand wieder herzustellen. Das Spinsystem relaxiert dabei bevorzugt nach einem dipolarem Mechanismus. Die Theorie besagt nun, dass der NOE und die Dipol-Dipol-(DD)-Relaxationseffekte eng zusammenhängen.

Im Unterschied zum Energieniveauschema A sind in B (Abbildung 2) zwischen den Energieniveaus nicht Übergänge eingezeichnet, sondern Übergangswahrscheinlichkeiten W für die möglichen und nach der Theorie auch erlaubten Relaxationsvorgänge. Vier

Wahrscheinlichkeiten entsprechen Einquantenübergängen. Diese gelten für die Relaxationsprozesse, die bisher im NMR-Experiment als Spin-Gitter-Relaxation (T_1) beobachtet wurden. Neu sind die beiden Übergänge $4 - 1$ (W_2) und $3 - 2$ (W_0); W_2 und W_0 geben die Wahrscheinlichkeiten an, mit denen das Zweispinsystem über Doppel- bzw. Nullquantenübergänge relaxiert. Diese Übergänge, für die die Änderung der magnetischen Quantenzahl Δm Zwei bzw. Null ist, lassen sich nicht durch elektromagnetische Wellen anregen, sie sind verboten und daher auch nicht im NMR-Spektrum beobachtbar. Bei der Relaxation sind dagegen beide erlaubt. Laut Theorie kann W_2 sogar größer sein als W_1 . Außerdem werden W_2 und W_0 nahezu ausschließlich durch die DD-Relaxation bestimmt. Sollten noch andere Mechanismen außer den dipolaren zur Relaxation beitragen, beeinflussen diese vor allem W_1 .

In Abbildung 3 ist die Balkenstärke als Maß für die Besetzung der Niveaus dargestellt. Schema A beschreibt den Ausgangszustand, die Besetzungszahlen N_1 bis N_4 entsprechen den Gleichgewichtswerten. Werden die A-Übergänge, deren Frequenzen gleich sind, gesättigt, werden die Niveaus 1 und 3 und auch 2 und 4 gleichbesetzt: $N_{1'} = N_{3'}$ und $N_{2'} = N_{4'}$. Im Schema B sind formal die Anteile durch schwarze Balken markiert, die von N_1 und N_2 auf N_3 und N_4 übertragen wurden.

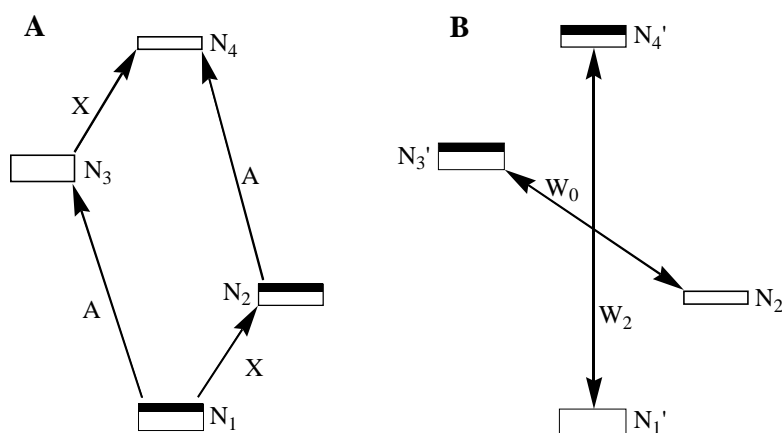


Abbildung 3: Änderung der Besetzungsverhältnisse beim NOE-Experiment. Das Energieniveauschema A gibt den Anfangszustand an, B den Zustand bei Sättigung der energiegelichen A-Übergänge

Die Änderungen der Besetzungszahlen haben keinen Einfluss auf die Gesamtintensität des Signals von X, da die Intensität nur von der Gesamtmagnetisierung M_x abhängt, und M_x beim Sättigen der A-Übergänge nicht betroffen wird. Durch die erlaubten Relaxationswege gemäß W_2 und W_0 stellt sich das Gleichgewicht mit einer neuen Besetzungsverteilung ein. Beim Vergleich der beiden Schemata A und B, lässt sich rein qualitativ verstehen, wie die beiden Relaxationsprozesse W_2 und W_0 die Signalintensitäten beeinflussen. Es fällt auf: $N_{1'} < N_1$ und

$N_{4'} > N_4$. Daraus folgt, dass das Besetzungsverhältnis $N_{1'}/N_{4'}$ kleiner als das Gleichgewichtsverhältnis N_1/N_4 ist.

Die Relaxation gemäß W_2 wird deshalb versuchen, $N_{1'}$ auf Kosten von $N_{4'}$ zu vergrößern. Dadurch werden die für die Intensität der X-Übergänge verantwortliche Besetzungsunterschiede $N_{1'} - N_{2'}$ und $N_{3'} - N_{4'}$ vergrößert. Dies ist gleichbedeutend mit einem Intensitätsgewinn, entsprechend einer Signalverstärkung. Die Relaxation gemäß W_0 versucht dagegen, $N_{2'}$ auf Kosten von $N_{3'}$ zu erhöhen. Dadurch werden die Differenzen $N_{1'} - N_{2'}$ und $N_{3'} - N_{4'}$ verkleinert, was zu kleineren Intensitäten führt.

Beide Relaxationsprozesse zusammen ergeben die positive oder negative Verstärkung durch den Kern-Overhauser-Effekt. Je nachdem, wie groß die Beiträge von W_2 und W_0 sind, kann somit die Intensität zu- oder abnehmen.

Bei kleinen Molekülen mit kurzen Korrelationszeiten τ_C dominiert W_2 , das heißt, es wird ein positiver NOE gefunden. In Molekülen mit längeren Korrelationszeiten τ_C , zum Beispiel Makromolekülen, wird dagegen W_0 effektiver. Diese Abhängigkeit der Übergangswahrscheinlichkeiten W_2 und W_0 von den Korrelationszeiten wird verständlich, wenn bedacht wird, dass die fluktuierenden magnetischen Felder für den Doppelquantenübergang Frequenzen mit der Summe der Larmor-Frequenzen von ν_A und ν_X enthalten müssen, während für den Nullquantenübergang viel kleinere Frequenzen ausreichen.

Der enge Zusammenhang zwischen DD-Relaxation und NOE erklärt auch dessen Abhängigkeit vom Abstand, da die DD-Wechselwirkungen mit der sechsten Potenz des Abstandes abnehmen (Gleichung 1).

$$\sigma = W_2 - W_0 = \frac{\gamma^4 h^2 \tau_C}{40\pi^2 r^6} \left(\frac{6}{1 + 4\omega^2 \tau_C^2} - 1 \right) \quad \text{Gleichung 1}$$

σ = dipolare Kreuzrelaxationsrate

τ_C = molekulare Korrelationszeit

ω = Resonanzfrequenz ($\sim B_0$)

r = Abstand der Kerne

2.4 Zweidimensionale Kern-Overhauser-Spektroskopie (NOESY)^[27-29]

Grundlage dieses NMR-Experiments ist die Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Die schnelle Umorientierung der Moleküle in Lösung erzeugt am Ort des Spins magnetische Wechselfelder, die den Austausch von Spinpolarisierung ermöglichen und letztlich bewirken, dass das Spinsystem wieder in den Gleichgewichtszustand relaxiert. Wegen der dipolaren Kopplung relaxieren beide Spins allerdings nicht unabhängig voneinander, sondern beeinflussen sich gegenseitig, d. h. jede Abweichung eines Spins vom Gleichgewicht überträgt sich auf den anderen Spin und führt dort ebenfalls zu Abweichungen vom Gleichgewicht. Der Magnetisierungstransfer beruht dann auf dem Kern-Overhauser-Effekt (s. Kapitel 2.3.1).

NOESY-Spektren haben das gleiche Aussehen wie COSY-Spektren: Auf der Diagonalen ist das 1D-Spektrum abgebildet, die Kreuzsignale liefern als Nichtdiagonalelemente die gewünschte Information. In denjenigen Fällen, in denen sowohl Austausch- wie NOE-Effekte zu Kreuzsignalen führen können, muss eine Unterscheidung durch phasensensitive Spektren getroffen werden. Beim „normalen“, positiven NOE-Effekt besitzen Diagonal- und Kreuzsignale entgegengesetztes Vorzeichen, während Austauschpektren gleiches Vorzeichen liefern. Allerdings ergibt der negative NOE-Effekt bei Makromolekülen ebenfalls gleiches Vorzeichen für die Diagonal- und Kreuzsignale. Zur Unterscheidung kann in solchen Fällen das ROESY-Experiment (s. Kapitel 2.5) herangezogen werden, welches immer entgegengesetztes Vorzeichen für beide Signaltypen liefert.

2.5 ROESY-Spektroskopie^[29-31]

In der Praxis wirkt sich der beim Kern-Overhauser-Effekt in Abhängigkeit von der molekularen Korrelationszeit τ_C eintretende Vorzeichenwechsel nachteilig aus. Es ist deshalb von erheblichem Interesse, dass NOE-Messungen im rotierenden Koordinatensystem von diesem Nachteil befreit sind. Die maximalen NOE-Effekte steigen von 38,5 % bei $\omega_0\tau_C \ll 1$ bis 67,5 % für $\omega_0\tau_C \gg 1$.

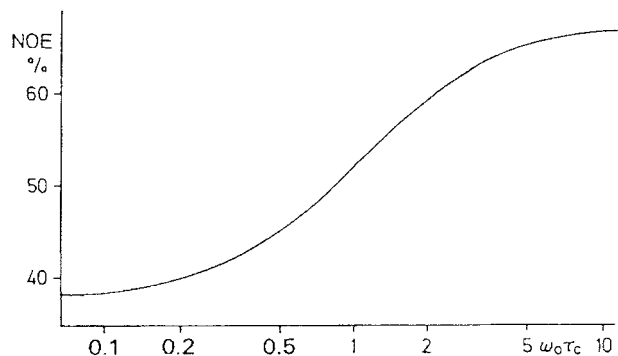


Abbildung 4: Abhängigkeit des NOE von $\omega\tau_c$ im rotierenden Koordinatensystem

Dieses Verhalten hat zwei wichtige Konsequenzen, zum einen ist der Kern-Overhauser-Effekt positiv und verschwindet nicht für einen beliebigen Wert von $\omega_0\tau_c$, zum anderen werden Multispineffekte verringert. Durch das positive Signal kann es auch nicht mehr zur Verwechslung des NOE-Effekts mit Magnetisierungstransfer durch chemischen Austausch kommen. Ein Problem bei der ROESY-Spektroskopie ist der kohärente Magnetisierungstransfer durch TOCSY (Total Correlated Spectroscopy), welcher bei dipolaren Kopplungen beobachtet werden kann, aber in keinem Zusammenhang zur Kreuzrelaxation steht. Es treten Störungen durch Signale auf, die entweder zusätzlich zu den gewünschten ROESY-Signalen registriert werden oder, da sie entgegengesetzte Phase besitzen, die ROESY-Signale auslöschen. In diesem Fall ist eine Unterscheidung durch die Aufnahme phasenempfindlicher Spektren möglich, da diese Signale die gleiche (positive) Phase wie die Diagonalsignale besitzen.

2.6 Untersuchung der chiralen Erkennung an Ephedrinenantiomeren mit *Heptakis(2,3-O-diacetyl-6-sulfato)* β -cyclodextrin (HDAS- β -CD)^[32]

2.6.1 Motivation

β -Cyclodextrine werden häufig als Selektoren zur Enantiomerentrennung chiraler Pharmazeutika, sowohl in der HPLC^[33] als auch der Kapillarelektrophorese (CE)^[34] eingesetzt. Das Verständnis der Wechselwirkungsmechanismen zwischen Selektor und Selektant ist dabei zentrales Thema für die Weiterentwicklung der chiralen Separationsmethoden. Hierzu wurde mit Hilfe der NMR-Spektroskopie, insbesondere der chemischen Verschiebungsänderung (CICS, Complexation Induced Chemical Shift) der Enantiomeren von Ephedrin und N-Methylephedrin sowie negativ geladenem *Heptakis(2,3-O-diacetyl-6-sulfato)* β -cyclodextrin^[35,36] (HDAS- β -CD) in Kombination mit NMR-Untersuchungen zu Komplexstöchiometrie nach der Methode von Job^[37] und 2D ROESY-Experimenten der Mechanismus der chiralen Erkennung eingehend charakterisiert und aufgeklärt.

2.6.2 2D ROESY-NMR-Experimente

Das 2D ROESY-NMR-Experiment ermöglicht die Untersuchung von Kernen, die sich in enger räumlicher Nachbarschaft zueinander befinden. Durch die Beobachtung von intermolekularen ROEs ist es möglich, auftretende Wechselwirkungen zwischen einem Enantiomer von Ephedrin oder N-Methylephedrin und HDAS- β -Cyclodextrin zu lokalisieren und daraus Rückschlüsse auf die Struktur der gebildeten Einschlusskomplexe zu ziehen. Der Vergleich der ROESY-Daten der Ephedrin- und N-Methylephedrinenantiomeren untereinander beschreibt die Unterschiede im chiralen Erkennungsmechanismus der Substrate.

Die nachfolgende Abbildung zeigt ROESY-NMR-Spektren von D-^[38] und L-N-Methylephedrin bei Anwesenheit des HDAS- β -CD im Molverhältnis von 1:1.

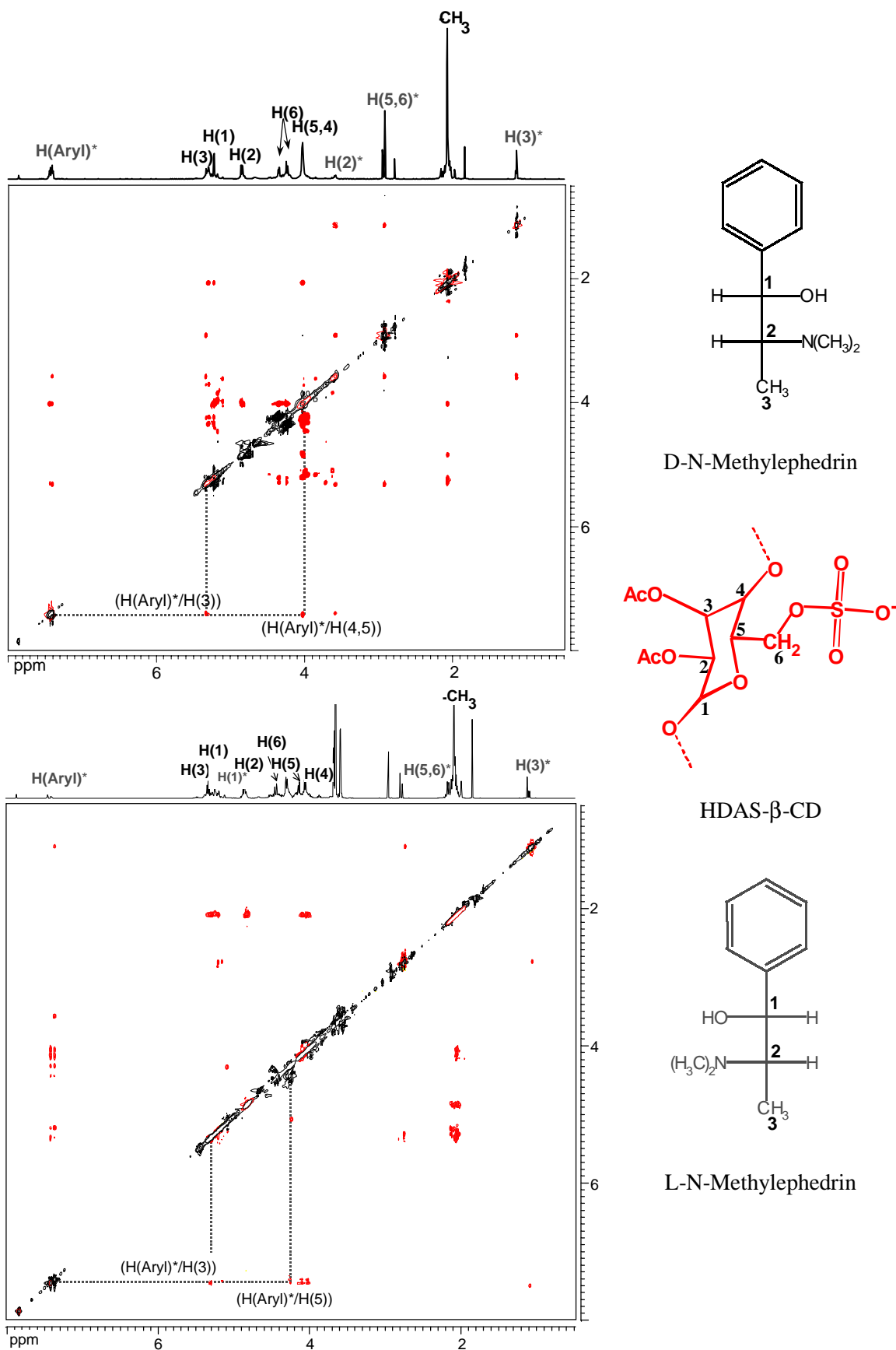


Abbildung 5: 2D ROESY-NMR-Spektren von D-N-Mephedrin* (oben) und L-N-Mephedrin* (unten) mit HDAS- β -CD

Sowohl beim Enantiomer D-N-Methylephedrin als auch beim L-N-Methylephedrin konnten in den ROESY-Spektren Kreuzsignale zwischen den aromatischen Protonen und den Protonen H(3) und H(5) des HDAS- β -CD zugeordnet werden, welche in das Innere der Kavität hineinragen. Durch die gefundenen Kreuzsignale und die Position der Protonen im Cyclodextrinmolekül kann auf die Bildung von Einschlusskomplexen bei beiden Enantiomeren geschlossen werden. Mehr Details über die Wechselwirkungen zwischen den Enantiomeren von Ephedrin sowie N-Methylephedrin und HDAS- β -CD sind in nachfolgender Tabelle 1 aufgelistet:

D-/L-EPH HDAS- β -CD	H(Aryl)	H(1)	H(2)	CH ₃ (3)	NH-CH ₃
H1	ll	-	-	d	-
H2	-	-	-	-	-
H3	l	-	d	-	-
H4	d ll	l	-	-	-
H5	d ll	dd ll	d	-	-
H6a	-	-	-	-	-
H6b	d l	-	-	-	-
CH ₃ -CO	-	dd	-	-	(d)

D-/L-ME HDAS- β -CD	H(Aryl)	H(1)	H(2)	CH ₃ (3)	N(CH ₃) ₂
H1	l	-	-	l	-
H2	-	-	-	-	-
H3	d l	-	d	d	-
H4	d l	-	-	-	-
H5	d l	-	d	-	-
H6a	l	-	-	-	-
H6b	l	-	-	-	-
CH ₃ -CO	l	-	-	-	-

Tabelle 1: Intermolekulare ROEs, welche zwischen Ephedrin (oben) und N-Methylephedrin (unten) sowie HDAS- β -CD beobachtet wurden. „d“ und „l“ repräsentieren ROEs für das jeweilige D- und L-Enantiomer. Zwei Buchstaben bezeichnen starke ROEs, ein Buchstabe dagegen steht für schwächere ROEs.

Mit HDAS- β -CD werden mehr oder weniger schwache Kreuzsignale zwischen den Cyclodextrinprotonen und Ephedrin sowie N-Methylephedrin gefunden, die zudem willkürlich verteilt erscheinen.

Beide Enantiomere von Ephedrin (Tabelle 1, oben) zeigen starke ROEs zwischen dem aromatischen Teil und H(5), welches tief im Innern des Hohlraums sitzt. Das deutet klar daraufhin, dass der Phenylring in der Kavität lokalisiert ist. Es können jedoch weitere Kreuzsignale zwischen Phenylring und Proton H(2) des Ephedrins sowie H(1), H(4), H(6) und COCH₃ des HDAS- β -CD zugeordnet werden, welche außerhalb der Kavität angeordnet sind.

Die meisten dieser ROEs wurden jedoch nur mit jeweils einem Enantiomer beobachtet, was die chirale Erkennung erklären könnte.

Die Anzahl der intermolekularen ROEs mit N-Methylephedrin (Tabelle 1, unten) ist wesentlich geringer. Erneut treten Kreuzsignale zwischen dem aromatischen Teil und den Cyclodextrinprotonen im Hohlrauminnern, H(3) und H(5), auf. Offenkundig kommt es auch bei den Enantiomeren von N-Methylephedrin zur Bildung eines Einschlusskomplexes. Zusätzlich treten stereoselektive ROEs mit den Wasserstoffatomen auf, die außerhalb der Kavität lokalisiert sind.

Weitere Details ergeben sich bei Betrachtung der chemischen Verschiebungsänderung der HDAS- β -CD Protonen in Anwesenheit der D- und L-Enantiomeren von Ephedrin sowie N-Methylephedrin (s. Abbildung 6).

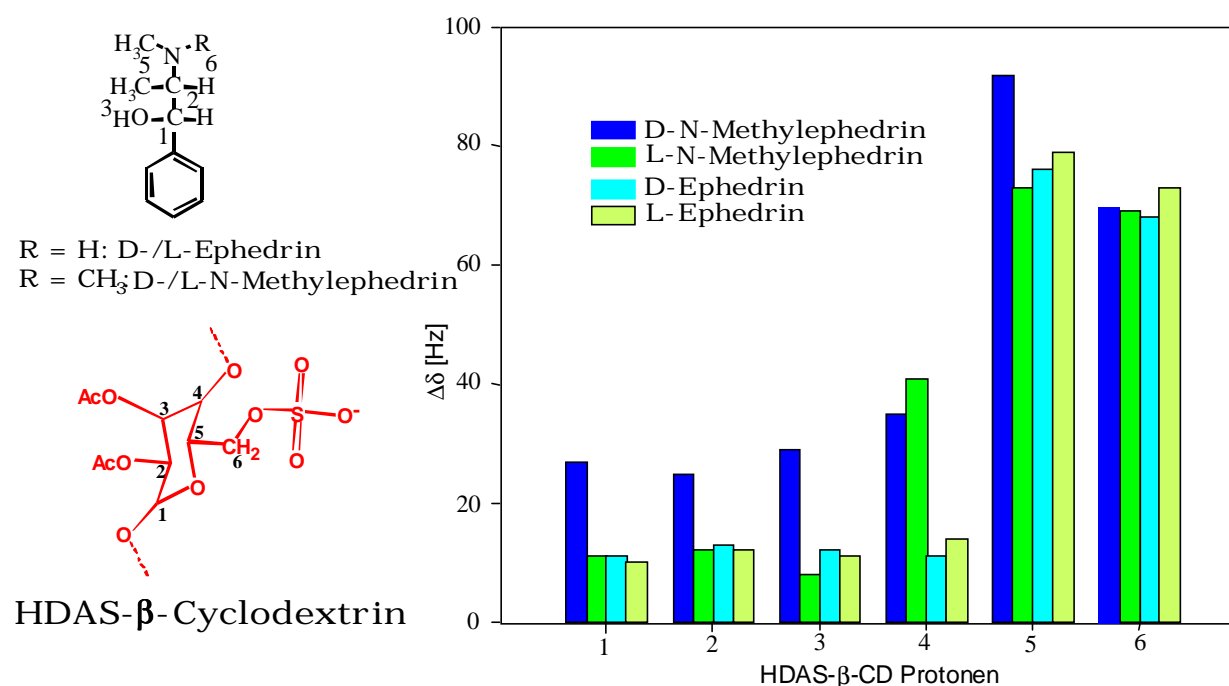


Abbildung 6: Chemische Verschiebungsänderung der HDAS- β -CD Protonen bei Anwesenheit des jeweiligen Enantiomers von Ephedrin und N-Methylephedrin

Aus der Grafik der Abbildung 6 ist zu erkennen, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Änderung der chemischen Verschiebung der HDAS- β -CD Protonen bei Anwesenheit der Enantiomeren von Ephedrin sowie N-Methylephedrin gibt. Für alle Enantiomere ist die chemische Verschiebungsänderung des Protons H(5) am größten, was erneut für die Bildung von Einschlusskomplexen spricht. Interessanterweise ist die chemische Verschiebungsänderung

ung der Protonen H(6 a +b) ebenfalls sehr groß. Diese Protonen sind am engen Rand des Cyclodextrins in direkter Nachbarschaft zur negativ geladenen Sulfatogruppe angeordnet. Die große Verschiebungsänderung ist dadurch nicht mehr durch Van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen Enantiomer und HDAS- β -Cyclodextrin hervorgerufen, sondern es kommt in diesem Fall zu elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der Sulfatogruppe und der Aminosseitenkette der Enantiomeren.

2.6.3 Bestimmung der Komplexstöchiometrie nach der Methode von Job^[37]

Die Bestimmung der Stöchiometrie erfolgt über sog. Job-Plots. Dazu werden äquimolare Lösungen von β -Cyclodextrin und jeweiligem Ephedrinderivat hergestellt. Diese Lösungen werden so in die Probengefäße gegeben, dass ihr Verhältnis zueinander ständig variiert, das gesamte Probenvolumen aber nicht mehr als 600 μ l beträgt. Beispielsweise enthält das erste NMR-Röhrchen nur ein Enantiomer, das zweite 550 μ l Enantiomer- und 50 μ l HDAS- β -CD-Lösung usw. Bei den durchgeführten Experimenten betrug die Konzentration der Lösungen immer $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l.

Für jede Probe wurde ein ^1H -NMR-Spektrum aufgenommen. Die chemische Verschiebungsänderung der Resonanzen von den Enantiomeren und HDAS- β -CD sind dazu verwendet worden, die Komplexkonzentration zu berechnen. Diese Daten werden im Diagramm gegen den Molenbruch des Substrats aufgetragen. Sollte der resultierende Job-Plot ein Maximum bei $x = 0.5$ aufweisen, so ist die Stöchiometrie des vorliegenden Komplexes 1:1.

Die folgenden Diagramme (Abbildung 7) zeigen die chemischen Verschiebungsänderungen der Ephedrin- und N-Methylephedrinantimomeren aufgrund der Wechselwirkung mit HDAS- β -CD.

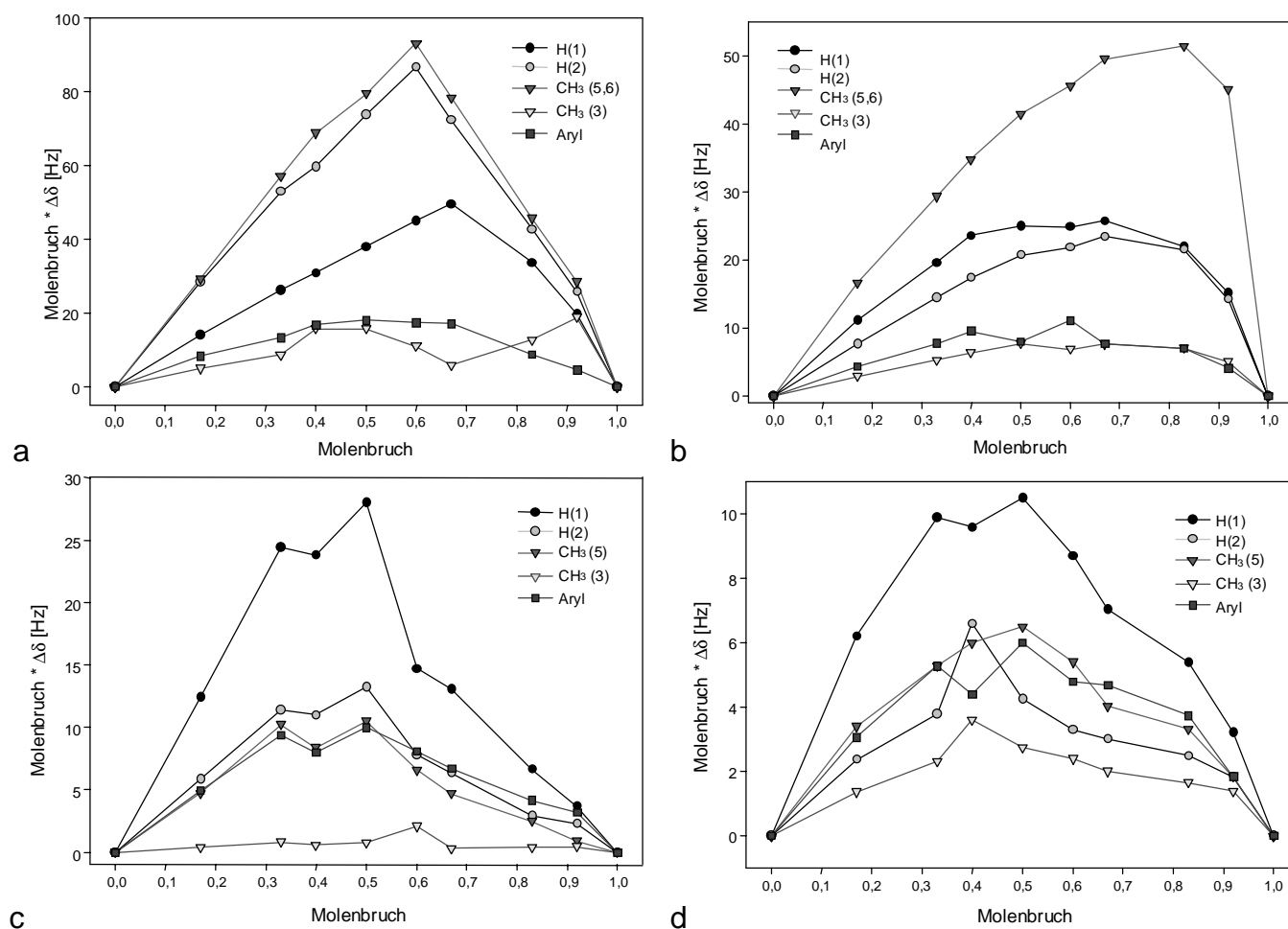


Abbildung 7: Job-Plots der Wechselwirkungen zwischen HDAS- β -CD und D-N-Methylephedrin (a), L-N-Methylephedrin (b), D-Ephedrin (c), L-Ephedrin (d); y-Achse = $\Delta\delta$ der Ephedrin Protonen, x-Achse = Molenbruch

Obwohl alle $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der HDAS- β -CD Komplexe an einem Spektrometer mit 600 MHz aufgenommen wurden ist eine Linienverbreiterung insbesondere der Protonensignale zu beobachten, die direkt an der Wechselwirkung beteiligt sind. Dieser Effekt bestätigt ebenfalls die Vermutung, dass eine Vielzahl unterschiedlicher Komplexe gebildet wird. Darüber hinaus können keine systematischen Änderungen für die meisten Wasserstoffatome der Ephedrine beobachtet werden (s. Abbildung 7). Die chemische Verschiebungsänderung der aromatischen Protonen von Ephedrin und N-Methylephedrin sind in den Job-Plots im Gesamten dargestellt, da sich die Signalaufspaltung der aromatischen Region aufgrund der Komplexbildung stark verändert.

Im Hinblick auf das HDAS- β -CD zeigen nur die Protonen H(5) und H(6a,b) eine starke Tieffeldverschiebung mit zunehmender Menge an zugegebenem HDAS- β -CD. Aufgrund dieser starken Verschiebung wandert das Signal von H(5) in das Signal des Protons H(4) bei der Komplexbildung mit D-N-Methylephedrin. Weiterhin zeigen die Job-Plots, welche

aufgrund der chemischen Verschiebungsänderung der Protonen von HDAS- β -CD erstellt wurden, keine charakteristischen Unterschiede zwischen den Komplexen, die mit den Enantiomeren von Ephedrin oder N-Methylephedrin geformt wurden.

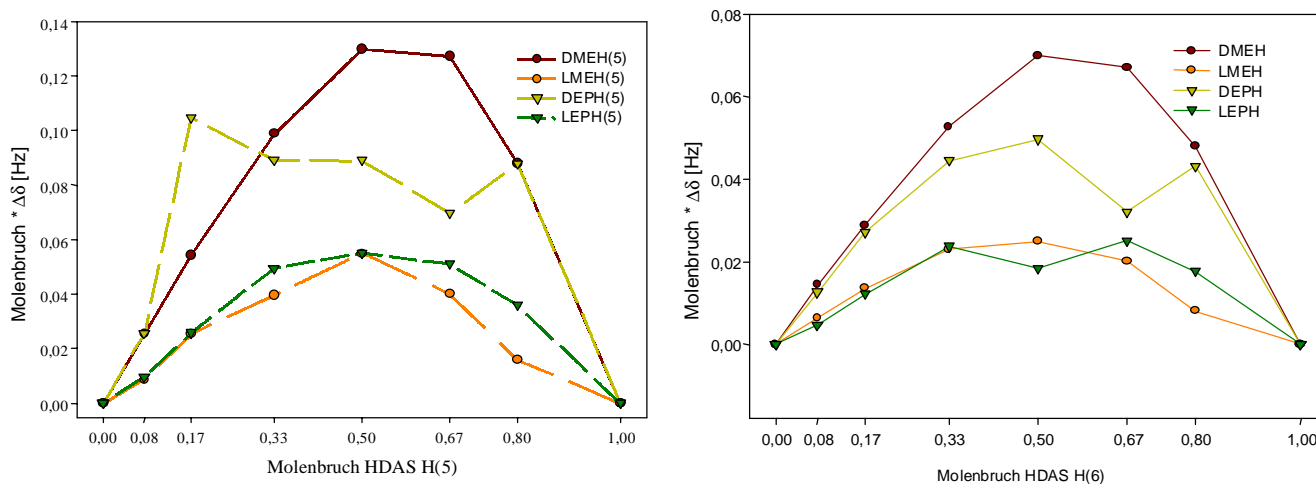


Abbildung 8: Job-Plots der Protonen H(5) (links) und H(6a+b) (rechts) von HDAS- β -CD in Gegenwart der Enantiomeren

Zusammenfassend ergibt sich aus der, bei der Komplexbildung, beobachteten chemischen Verschiebungsänderung, dass H(5) und H(6a,b) des HDAS- β -CD und außerdem die aromatischen Protonen der Ephedrin Derivate maßgeblich an den Wechselwirkungen beteiligt sind.

Ogleich das negativ geladene HDAS- β -CD vielgestaltige Komplexe bildet, kann darauf geschlossen werden, dass im Durchschnitt der Phenylring der Enantiomeren im Innern der Kavität lokalisiert ist. Die Seitenkette dagegen außerhalb am engen Rands des Cyclodextrins, was die Möglichkeit zur Ausbildung von ionischen Wechselwirkungen zwischen den Aminogruppen der Ephedrine und negativ geladenen Sulfatgruppen des HDAS- β -CD eröffnet. Jedoch werden auch Komplexe gebildet durch Anlagerung von Ephedrin oder N-Methylephedrin an das HDAS- β -CD an der Ringaußenseite, gleichsam sind auch 2:3 und 3:2 Einschlusskomplexe möglich.

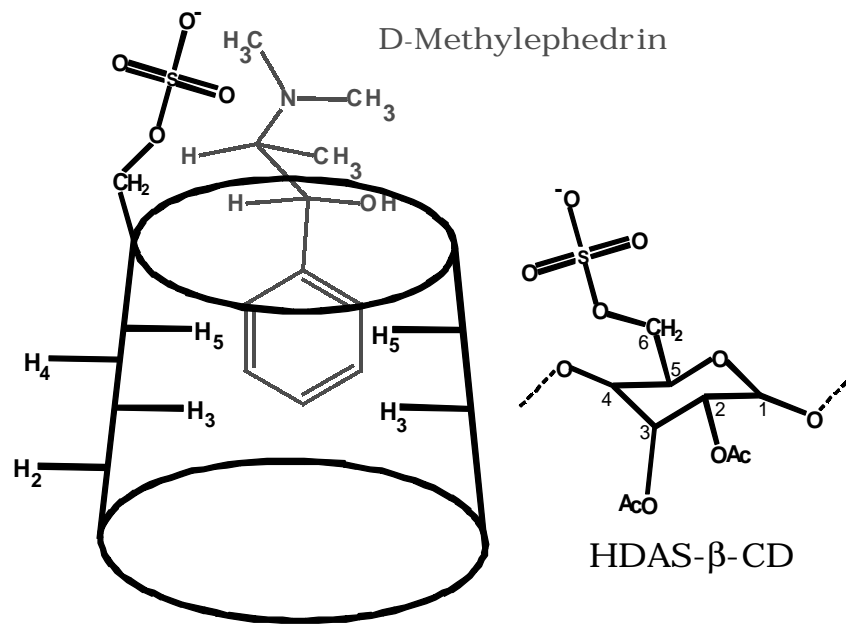


Abbildung 9: Vermutete Struktur eines Komplexes zwischen D-N-Methylephedrin und HDAS- β -CD, welche aus den ROESY-Daten und Job-Plots ermittelt wurde.

2.7 Untersuchung der Wechselwirkung von Dimethylcyclohexan und permethyliertem β -Cyclodextrin^[39,40]

Dimethylcyclohexan liegt in der Sesselform vor, die beiden Methylgruppen sind dabei cis-ständig. Im NMR-Spektrum sollten sich dadurch zwei getrennte Signale ergeben, da die Methylgruppen unterschiedliche räumliche Umgebungen haben. Temperaturbedingt kommt es jedoch zum Umklappen der Sesselkonformation in die Wannenkongformation und die beiden NMR-Signale gehen in ein breiteres Signal über, welches die zwei Konformationen repräsentiert. Die Anwesenheit des permethylierten β -CD verhindert, infolge der Interaktion, den Wechsel der Konformationen, und es resultieren wieder zwei Signale. Mit Hilfe der 2D ROESY-NMR-Spektroskopie ist es dabei möglich, Informationen über den Wechselwirkungsmechanismus zu erhalten. Die nachfolgende Abbildung zeigt das ROESY-NMR-Spektrum von Dimethylcyclohexan und permethyliertem β -Cyclodextrin im Verhältnis 1:1.

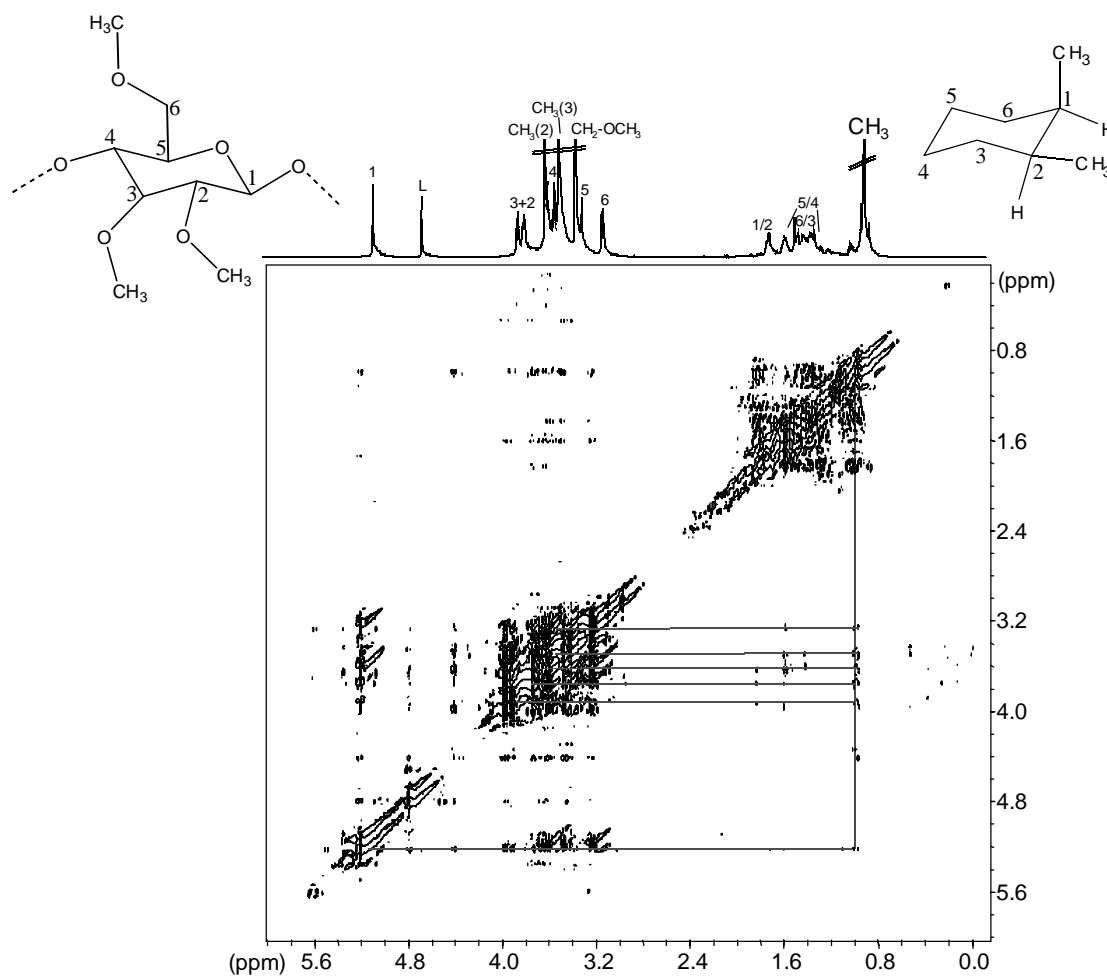


Abbildung 10: 2D ROESY-NMR-Spektrum von Dimethylcyclohexan und permethyliertem β -CD

In der Tabelle sind die intermolekularen Kreuzsignale, die infolge der Komplexbildung zwischen den beiden Verbindungen auftreten, aufgelistet.

β -CD DMCH	H(1)	H(2)	H(3)	H(4)	H(5)	H(6)	CH ₃ (2)	CH ₃ (3)	CH ₂ OCH ₃
CH ₃	+	+		+		+	+	+	
CH(1/2)				+				+	
CH ₂ (3/6)									
CH ₂ (4/5)				+			+	+	

Tabelle 2: ROEs zwischen Dimethylcyclohexan und permethyliertem β -Cyclodextrin

In dem vorliegenden Spektrum gibt es wenige ROE-Signale zwischen den Verbindungen, sie weisen jedoch eine relativ starke Intensität auf, demzufolge sind die auftretenden Wechselwirkungen nachhaltig und eindeutig gerichtet. Die Wechselwirkungen sind dabei so stark, dass dadurch der Wechsel zwischen Sessel- und Wannenkonformation reduziert wird und zwei Signale für die Methylgruppen zu beobachten sind. Bei der Wechselwirkung mit diesem β -Cyclodextrin kommt es nicht zum Auftreten von intermolekularen Wechselwirkungen im Innern des Hohlraums, es wird demzufolge kein Einschlusskomplex ausgebildet. Die Van-der-Waals-Interaktionen treten bevorzugt an den Protonen H(2) und H(4) auf, die außen am Cyclodextrinring orientiert sind, daneben mit den Methylgruppen in Position 2 und 3, diese sind am weiten Rand des β -Cyclodextrins lokalisiert. Beim Dimethylcyclohexan treten die ROE-Signale bei den Methylgruppen, den Protonen H(1/2) und H(5/4), auf. Die Protonen H(3/6) zeigen dagegen keinerlei Wechselwirkungen.

Anhand der im ROESY-Spektrum beobachteten Kreuzsignale zwischen den Komponenten zeigt sich, dass in diesem Fall die Wechselwirkungen an der Ringaußenseite des β -Cyclodextrins stattfinden, demzufolge also kein Einschlusskomplex gebildet wird. Beim Dimethylcyclohexan zeigen die endständigen Methylgruppen, benachbarte CH-Gruppen und die Methylengruppe auf der gegenüberliegenden Ringseite, Kreuzsignale zum permethylierten β -CD. Ein Modell über die mögliche Wechselwirkung zwischen den Verbindungen zeigt die Abbildung 11.

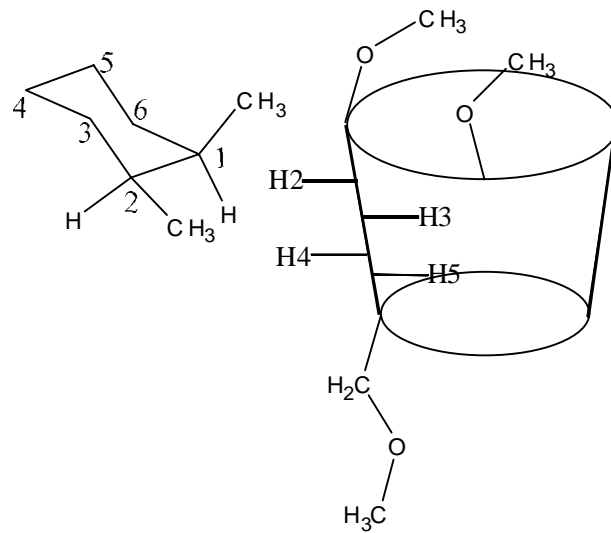


Abbildung 11: Modell der Wechselwirkung zwischen Dimethylcyclohexan und permethyliertem β -Cyclodextrin

3 PFG (Pulse Field Gradient) NMR-Spektroskopie zur Analyse von Komplexbgemischen^[41]

3.1 Grundlage und Geschichte der PFG NMR-Spektroskopie

Die chemische Analyse von Komplexbgemischen vor allem in den Bereichen der Umwelt-, Petro- und Biochemie ist in den letzten Jahren ein Forschungsgebiet von steigendem Interesse geworden.^[42-45] Vielfach ist der Analyt in einer Matrix wie Blut, Plasma oder Öl vorhanden oder die zu untersuchenden Komponenten bilden eigene Komplexe. Wenn es darum geht, Komplexbgemische zu analysieren, steht im Vordergrund der Untersuchungen häufig die Vereinfachung der Prozesse, beispielsweise kann dies erreicht werden durch Separation des Gemischs mittels chromatographischer oder elektrophoretischer Methoden. Die aufgetrennten Komponenten werden anschließend individuell charakterisiert, um daraus Informationen über das gesamte System zu erhalten. Für die Charakterisierung der komplexen Verbindungen ist es jedoch häufig notwendig oder erwünscht die Substanzen komplett ohne störende Einflüsse seitens der Trennungen zu untersuchen. Aus diesem Grund wird bei der Analyse komplexer Mischungen oft auf spektroskopische Methoden zurückgegriffen. Hierbei ist die Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) die Methode der Wahl, wenn es darum geht Komplexbgemische, ohne vorhergehende Separation, durch physikalische Methoden zu analysieren. Die NMR-Spektroskopie ist nicht invasiv, führt nicht zur Zerstörung der zu charakterisierenden Verbindungen und ist aus den genannten Gründen sehr gut geeignet für die Untersuchung diffiziler Proben.

Eine Vielzahl von Parametern wie Chemische Verschiebung, Kernrelaxationsraten, Korrelationszeiten und Diffusionskoeffizienten stehen zur Verfügung, um Informationen über die molekulare Struktur, Größe, Bindungsverhältnisse und Reaktionskinetiken zu erhalten. Insbesondere NMR-Diffusions-Experimente ermöglichen die Charakterisierung von Komponenten mit unterschiedlicher Molekülgröße sowie die Analyse der Bindungswechselwirkungen eines kleinen Moleküls an einem großen Rezeptor. Diese auf Diffusion basierende Anwendung ist sehr vorteilhaft für die Analyse von Gemischen, welche eine große Anzahl isolierter Protonen enthalten. Darüber hinaus ist diese Technik eine sinnvolle Alternative zu teilweise sehr zeitaufwendigen 2D NMR-Methoden die hauptsächlich auf Kopplungen zwischen den Protonen beruhen (z.B. COSY).

3.1.1 Relaxation des NMR-Spinsystems

Nachdem die Magnetisierung \mathbf{M} aus dem Grundzustand durch einen Impuls angeregt wurde, hat sich die Energie des Spinsystems geändert. Es gibt zwei Grundmechanismen, nach denen das Spinsystem wieder zurück in den Gleichgewichtszustand relaxiert.

Beim ersten Mechanismus übertragen die zuvor angeregten Kerne die überschüssige Energie an die Umgebung bzw. das umgebende Gitter. Dieser Vorgang steht im Verhältnis zur Zeitdauer, mit der sich die Magnetisierung \mathbf{M} entlang der z- oder longitudinalen Achse wieder aufbaut. Die Bezeichnung für diesen Mechanismus lautet daher Spin-Gitter- oder longitudinale Relaxation.

Der zweite Mechanismus beruht auf der Relaxation der Komponenten in der transversalen oder xy-Ebene im Anschluss an die Anregung und ist als Spin-Spin- oder transversale Relaxation bekannt. Er beinhaltet den schnellen Energieaustausch zwischen den individuellen Kernen und resultiert in der Dephasierung der Magnetisierung in der xy-Ebene.

In den meisten NMR-Experimenten wird die Magnetisierung durch eine Serie von sorgfältig kalibrierten Impulsen, der sog. Pulssequenz, manipuliert. Spezielle Multi-Pulssequenzen wurden dabei entwickelt um die T_1 - und T_2 -Relaxationszeiten zu messen. Die T_1 -Relaxationszeit wird durch das inversion-recovery Experiment^[46,47] bestimmt, wohingegen die T_2 -Relaxationszeiten durch die Carr-Purcell-Meibom-Gill-Pulssequenz^[48,49] (CPMG) gemessen wird.

3.1.2 Untersuchung der Diffusion mittels NMR-Spektroskopie

Das Hahn-Spin-Echo-Experiment^[50] ist Grundlage der vorhandenen NMR-Pulssequenzen zur Untersuchung der Diffusion. Es soll im folgenden kurz vorgestellt werden (Abbildung 12).

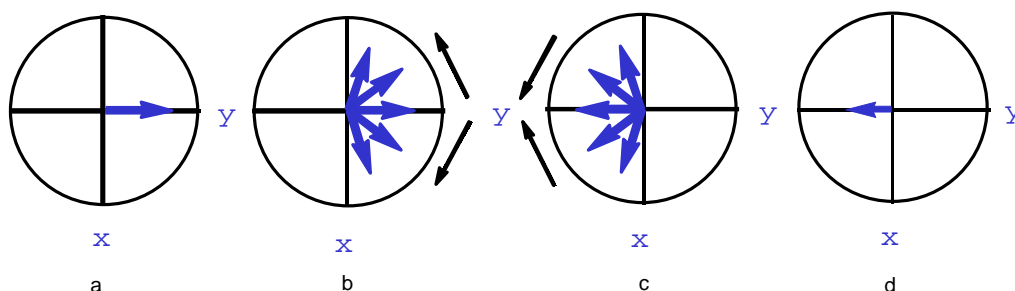


Abbildung 12: Vektorschema des Hahn-Spin-Echo-NMR-Experiments

Das Experiment beginnt mit einem 90° -Impuls, der die Magnetisierung \mathbf{M} in die y -Achse auslenkt (a). Anschließend präzessiert die Magnetisierung innerhalb einer Wartezeit τ , während dieser dephasiert die Magnetisierung aufgrund der Spin-Spin-Relaxation (b). Im Anschluss an τ wird ein 180° -Impuls verwendet, welcher die Magnetisierung an der x -Achse spiegelt (c). Die Magnetisierung refokussiert entlang der negativen y -Achse am Ende einer zweiten Wartezeit τ und wird als „Echo“ bezeichnet (d).

Das Hahn-Spin-Echo-Experiment wurde ursprünglich zur Bestimmung der T_2 -Relaxationszeit, durch Beobachtung der Abnahme der Echointensität als Funktion der Länge von τ verwendet. Mit zunehmendem τ nimmt die Intensität des Echos jedoch nicht alleine wegen der T_2 -Relaxation, sondern auch durch Spin-Spin-Kopplung und Diffusion der Moleküle in Lösung, ab. Aufgrund dieser zusätzlichen Effekte hat die CPMG-(Carr Purcell Meiboom Gill) Pulssequenz das Spin-Echo-Experiment zur Bestimmung der T_2 -Relaxationszeit abgelöst.

Nachdem der Einfluss der Diffusion auf die Abnahme der Echointensität entdeckt wurde, kam es zur Entwicklung des ersten gradienten-abhängigen Experiments zur Untersuchung von Diffusionskoeffizienten.^[51] Seit dieser Zeit hat sich die PFG (Pulse Field Gradient) NMR-Spektroskopie zu einer sehr effektiven sowie nichtinvasiven Methode zur Überwachung der molekularen Diffusion entwickelt.

Alle NMR-Experimente, die mit gepulsten Feldgradienten arbeiten verfügen über einen gemeinsamen Aufbau (s. Abbildung 13).

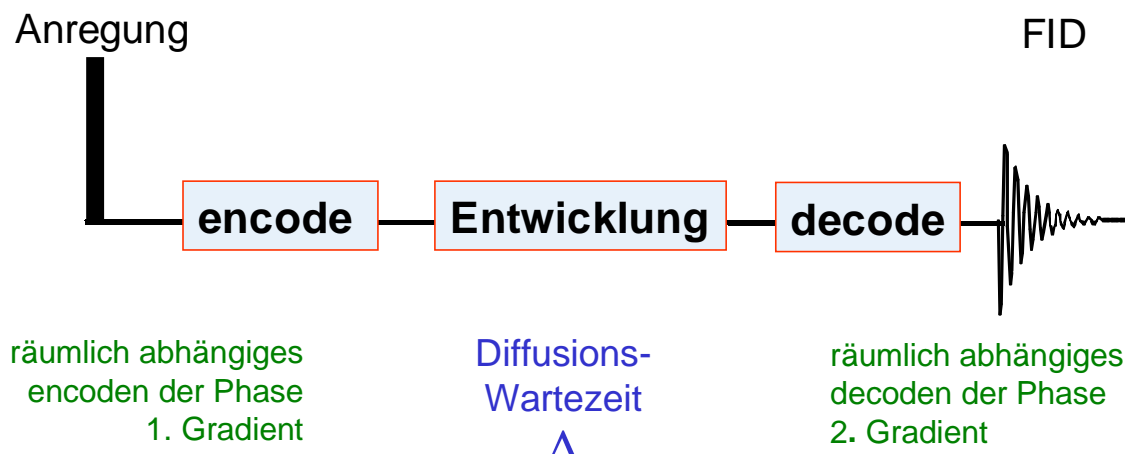


Abbildung 13: Essentielle Komponenten einer Feldgradienten-Pulssequenz

Nach einem Anregungsimpuls und einer Wartezeit wird der erste Gradientenpuls angewandt um die Kernspins innerhalb der Probe räumlich zu encoden d.h. festzuhalten. Anschließend erfolgt eine weitere Wartezeit, während dieser Zeit kommt es zur Diffusion in der Probe. Am Ende wird der zweite Gradientenpuls angewendet, wodurch die Kerne decodiert werden. Die

Diffusion an sich ist generell abhängig von der Molekülgröße, Viskosität der Lösung und der Temperatur, diese Korrelation ist durch die Stokes-Einstein-Beziehung (Gleichung 2) wiedergegeben.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H} \quad \text{Gleichung 2}$$

Bei der PFG-NMR-Spektroskopie wird ein transientes magnetisches Feld erzeugt, indem Strom durch eine speziell gewundene Spule geleitet wird, um einen regulären, variablen magnetischen Gradienten G , entlang der Länge der Probe, entstehen zu lassen. Die Amplitude γg und die Zeitdauer des linearen magnetischen Feldgradienten G , können im Experiment kontrolliert werden.

Das erste Experiment, welches gepulste Feldgradienten verwendet, wurde von Stejskal und Tanner entwickelt und als „Pulsed Gradient Spin-Echo“-Methode (PGSE) bekannt (s. Abbildung 14).^[51]

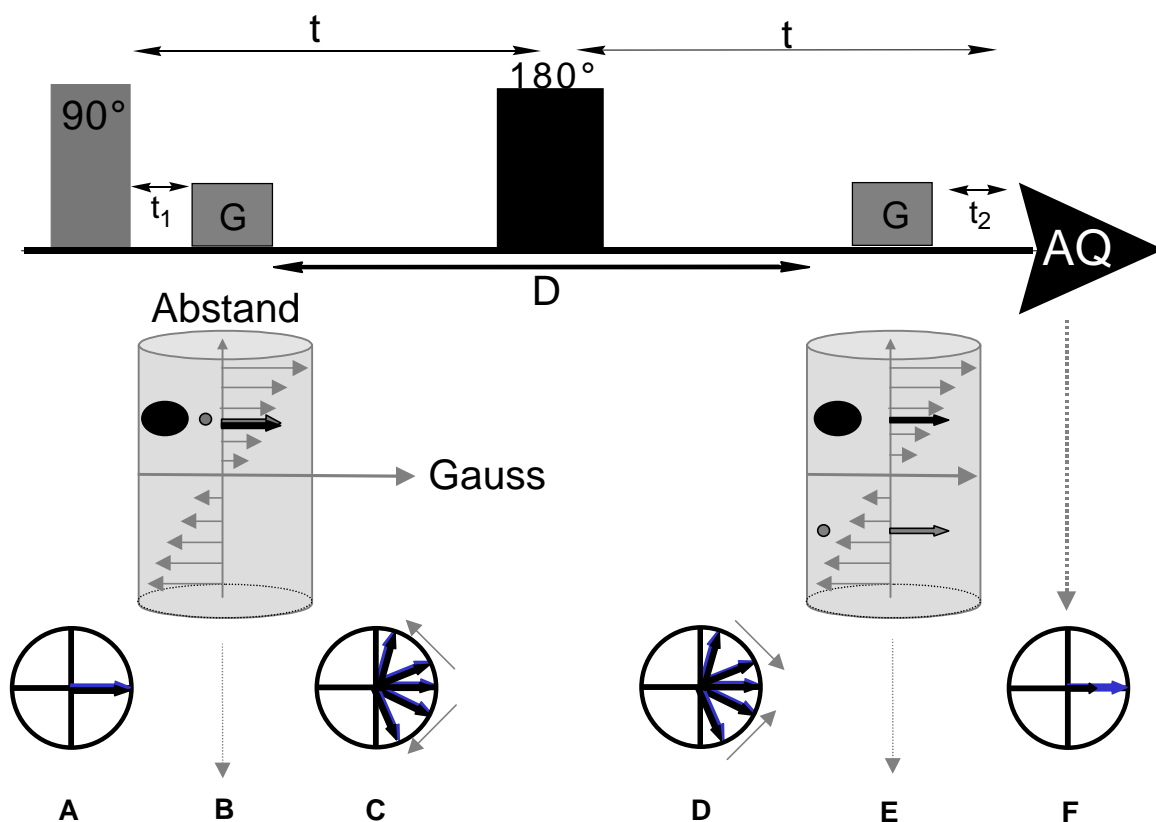


Abbildung 14: Pulsschema des PGSE-NMR-Experiments. Die Pulssequenz ist oben gezeigt und der Effekt auf die Magnetisierung unten im Bild.

In Anschluss an den ersten 90° -Impuls (A) und einer kurzen Wartezeit t_1 , wird ein Gradientenpuls angewendet um die Kernspins räumlich entlang der Länge der Probe zu encoden (B). Das räumliche Encoding oder Festhalten findet statt, da die Kerne mit unterschiedlichen Frequenzen, abhängig von ihrer Position vom angelegten Magnetfeld, präzessieren. Diese Technik entstammt dem kernmagnetischen Imaging (MRI), bei dem die Position der Kerne in zwei oder drei Dimensionen fixiert ist.^[52] Während der Wartezeit, die auf den ersten Gradientenpuls folgt, präzessiert die Magnetisierung in der xy-Ebene (C). Im Folgenden ändert ein 180° -Impuls die Richtung der Präzession (D) und ein zweiter Gradientenpuls, der in seiner Phase und Amplitude analog zum ersten ist, decodiert die Kerne räumlich in der Probe.

Die Abbildung (E) veranschaulicht den Effekt der Diffusion auf die Magnetisierung eines kleinen, schnell diffundierenden Moleküls, bevor das Decoding stattfindet. Die Diffusion eines in seiner Magnetisierung fixierten Kerns zu einer anderen Position innerhalb der Probe bewirkt, dass die Magnetisierung dieser Kerne durch den zweiten Gradientenpuls nicht grundlegend refokussiert und die Signalintensität abgeschwächt wird (F). Ebenfalls zu sehen in Abbildung (E) ist die Auswirkung dieses Experiments auf die Magnetisierung eines größeren, langsamer diffundierenden Moleküls bei dem daher nur eine geringe Abschwächung der Signalintensität resultiert. Nach einer Zeit 2π nach dem ersten 90° - π -Impuls wird das Spin-Echo ausgebildet und der FID aufgenommen.

Ein großer Nachteil des PGSE-Experiments ist die Tatsache, dass während der Wartezeit in der die Diffusion stattfindet die Magnetisierung in der xy-Ebene gehalten wird und aufgrund von Spin-Spin-Kopplung, T_2 -Relaxation sowie Diffusion dephasiert. Demzufolge kann diese Pulssequenz nur für nichtkoppelnde Kerne angewendet werden, und die Zeitdauer in der ein Molekül diffundieren kann ist durch die T_2 -Relaxationszeit limitiert, wodurch wiederum die Molekülgröße, die mit diesem Experiment analysiert werden kann, beschränkt ist.

Die „Stimulated Echo“ Sequenz (STE), welche ursprünglich von Hahn entwickelt wurde erzeugt ein Echo, dessen Abschwächung von der T_1 - und nicht T_2 -Relaxation abhängt und bei dem eine Dephasierung der Magnetisierung durch Spin-Spin-Kopplung eliminiert wird.^[50]

Das Schema des „Pulsed Field Gradient Stimulated Echo“ (PFG-STE) Experiments, welches von Tanner entwickelt wurde, ist in Abbildung 15 zu sehen.^[53] Analog zum PGSE-Experiment wird transverse Magnetisierung durch einen Gradientenpuls codiert und durch einen zweiten decodiert, welcher nach einer Wartezeit, in der die Diffusion stattfindet, erfolgt.

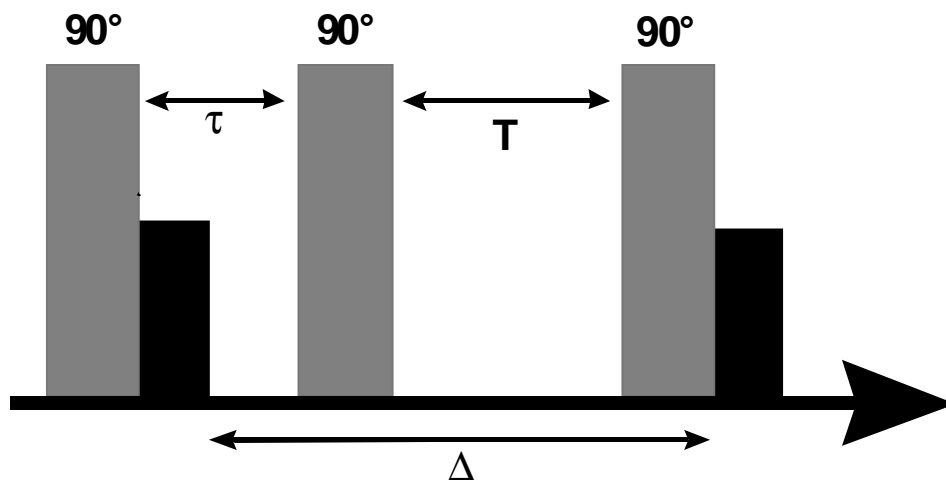


Abbildung 15: Pulsschema des PFG-STE-NMR-Experiments.

Das PFG-STE-Experiment unterscheidet sich vom PGSE-Experiment dadurch, dass hierbei die Magnetisierung während der Diffusion entlang der negativen z-Achse gehalten wird und hat damit den Vorteil, dass die Relaxation nur durch den longitudinalen Mechanismus erfolgt und die Modulation der Resonanzen durch Spin-Spin-Kopplung verhindert wird.

Die magnetischen Feldgradienten erzeugen in der metallischen Umgebung, dem aktiven Volumen des NMR-Probenkopfs, einen zusätzlichen Strom (Eddy-Current). Da dieser Eddy-Strom abgeklungen sein muss, bevor es zur Aufnahme des FIDs kommen kann, wird nach dem letzten Gradientenpuls eine zusätzliche Wartezeit eingefügt.

Eine modifizierte Version der PFG-STE-Sequenz wurde von Gibbs und Johnson unter der Bezeichnung LED-Experiment (Longitudinal Eddy-Current Delay) eingeführt.^[54]

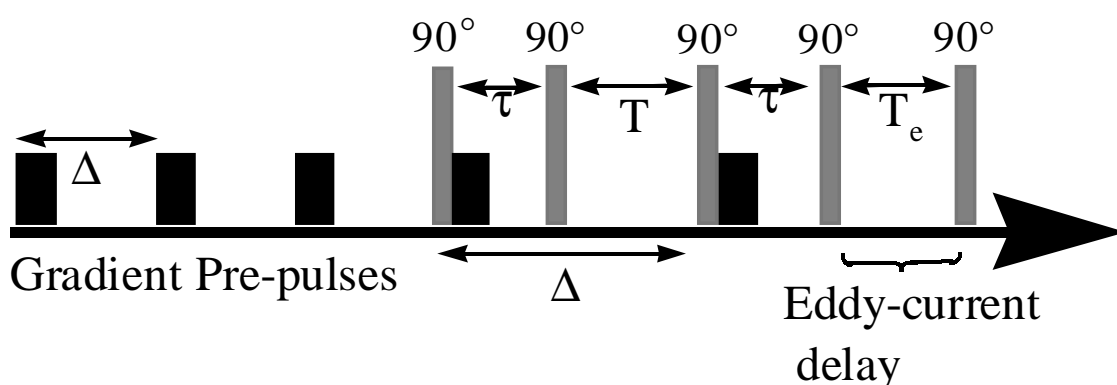


Abbildung 16: Pulsschema der LED-Pulssequenz

Abbildung 16 zeigt das Pulsschema des LED-Experiments. Im Anschluss an den zweiten Gradientenpuls wird die Magnetisierung während der Wartezeit t_e , in welcher der Eddy-Strom abklingen kann, entlang der negativen z-Achse gehalten. Hierbei relaxiert die Magnetisierung

durch T_1 -Prozesse. Durch den letzten 90° -Impuls kehrt die Magnetisierung wieder in die xy -Ebene zurück, in welcher der FID aufgenommen wird.

Bei einer anderen Weiterentwicklung des PFG-STE-Experiments wurden drei Gradienten Vorpulse (Gradient Pre-Pulses, s. Abbildung 16) eingeführt, um den Beitrag des Eddy-Stroms, sowohl für den encoding als auch für den decoding Gradienten, übereinstimmend zu gestalten.^[54]

Eine Erweiterung dieser Methode, das „Bipolare Puls LED“-Experiment (BPPLD) reduziert die Einflüsse des Eddy-Stroms durch die Verwendung von Gradientenpulspaaren, die in Antiphasse zueinander stehen (s. Abbildung 17).^[55]

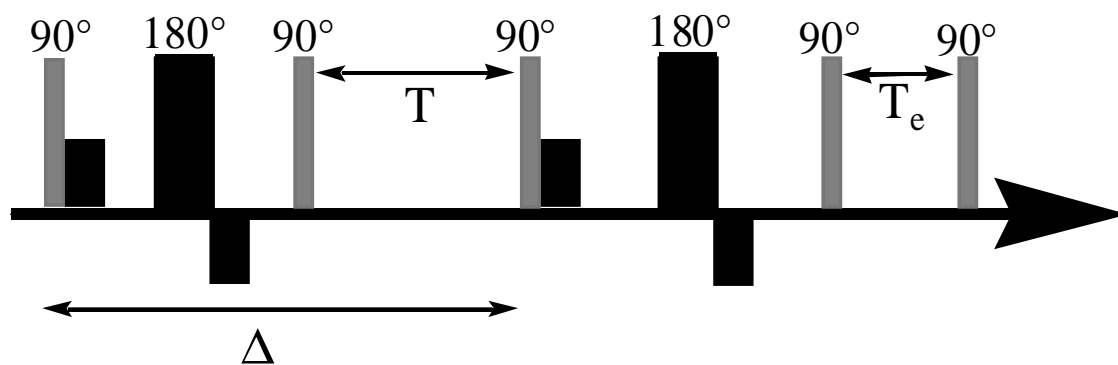


Abbildung 17: Pulsschema des BPPLD-Experiments

Mit der BPPLD-Pulssequenz ist es möglich einen 95 %igen Abfall des Eddy-Stroms zu erreichen, wenn die Zeitdauer der Gradientenpulse sehr kurz ist (1 ms) und diese zeitlich dicht aufeinanderfolgen (< 1 ms).

Ein NMR-Diffusions-Experiment beinhaltet die Anwendung von gepulsten Feldgradienten mit zunehmender Amplitude und die Aufsummierung der resultierenden eindimensionalen NMR-Spektren. Durch die Abschwächung der NMR-Resonanz mit steigender Amplitude des Gradienten wird die Diffusion eines Moleküls offenkundig. Die Intensität einer spezifischen Resonanz I und der Diffusionskoeffizient D sind durch nachfolgende Gleichung 3 miteinander verknüpft.

$$I = I_0 \exp \left[- D \left(\Delta - \frac{\delta}{3 - \tau/2} \right) G^2 \cdot \gamma^2 \cdot \delta^2 \right]$$

Gleichung 3

- I = Intensität
- I_0 = Signalintensität ohne Gradientenimpulse
- D = Diffusionskoeffizient
- Δ = Diffusionswartezeit
- δ = Dauer des Gradientenpuls
- τ = Zeit zwischen Gradientenpuls und RF-Puls
- G = Amplitude des Gradientenpuls
- γ Gyromagnetisches Verhältnis

Die Berechnung der Diffusionskoeffizienten ist von der jeweiligen Probe abhängig und durch eine Vielzahl alternativer Methoden möglich.

Der Diffusionskoeffizient kann dargestellt werden zum einen durch Anpassung der variablen Resonanzintensitäten, welche als eine Funktion der Gradientenamplitude im Quadrat gemessen wurden, entsprechend zu den Beziehungen, wie sie in Gleichung 3 dargestellt sind. Durch Berechnung mit nichtlinearem minimalen Fehlerquadrat wird der Diffusionskoeffizient D erhalten. Diese einfache numerische Analyse ist vor allem sehr effektiv, wenn gut aufgelöste Signale für jede Komponente in der Probe vorliegen, oder die Diffusionskoeffizienten von überlappenden Signalen signifikant unterschiedlich sind (s. Abbildung 18).

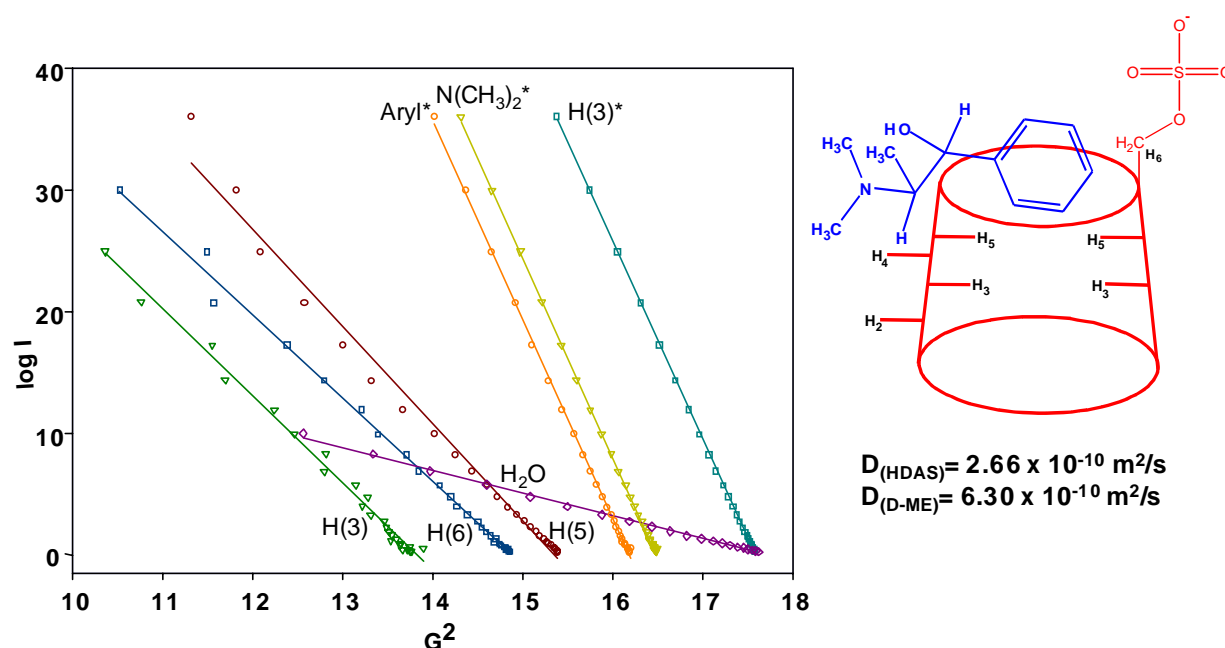


Abbildung 18: Ermittlung der Diffusionskoeffizienten von D-N-Methylephedrin* und HDAS- β -CD mittels numerischer Analyse

In Abbildung 18 ist die Bestimmung der Diffusionskoeffizienten von D-N-Methylephedrin und HDAS- β -CD durch numerische Analyse dargestellt. Bei der Berechnung ist zu beachten, dass nicht für jedes Signal einer Komponente die Bestimmung aufgrund von Signalüberlappungen durchgeführt werden kann. So sind für das HDAS- β -CD (Geraden auf der linken Seite) nur die Protonen H(2), H(6) und H(5) in die Berechnung mit eingegangen, für das D-N-Methylephedrin (Geraden auf der rechten Seite) die aromatischen Protonen sowie $N(CH_3)_2$ und H(3). In der Grafik treten die Unterschiede in den Diffusionskoeffizienten bereits deutlich durch die verschiedenen Steigungen der Geraden auf, das Lösungsmittel Wasser diffundiert sehr schnell und ist durch die Gerade mit der geringsten Steigung charakterisiert.

Bei den Geraden der HDAS- β -CD fällt auf, dass keine Linearität der Datenpunkte vorliegt, wie das für Geraden des D-N-Methylephedrin der Fall ist. Verursacht wird das vermutlich durch die Heterogenität des β -Cyclodextrins, da es bei der Synthese generell schwierig ist, Produkte mit gleichem Substitutionsgrad zu erhalten. Für Proben, die polydispers vorliegen, gibt es die Möglichkeit eine Verteilung der Diffusionskoeffizienten zu bestimmen. Hierzu werden die Spektren nach der Fourier-Transformation in Regionen unterteilt und integriert. Diese Regionen werden im Anschluss analysiert, als Resultat ergibt sich eine Verteilung der Diffusionskoeffizienten (s. folgende Abbildung 19).

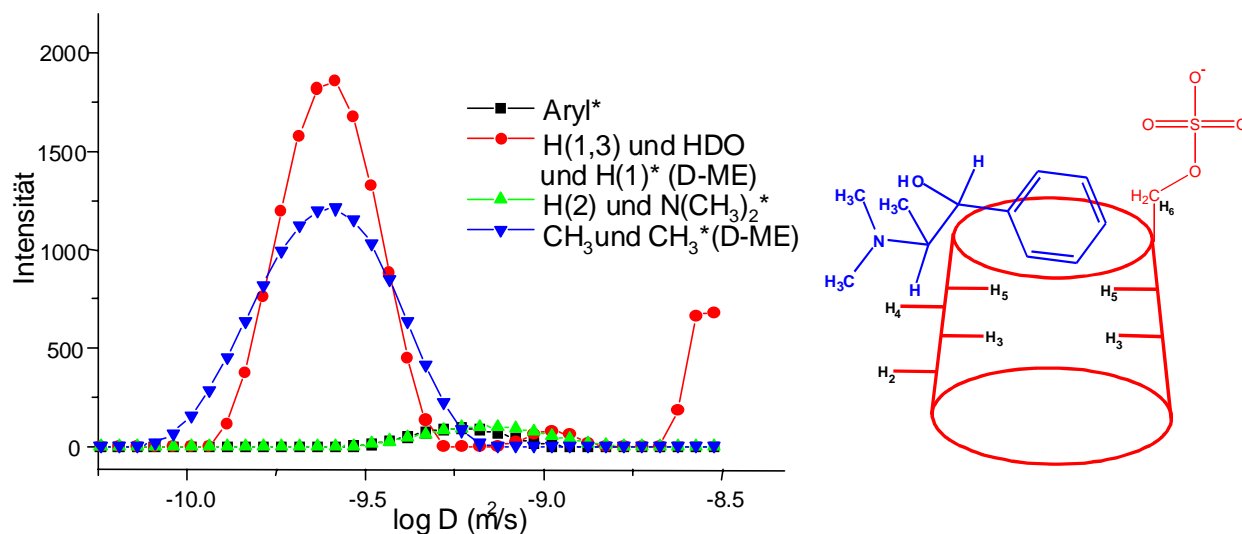


Abbildung 19: Verteilung der Diffusionskoeffizienten von D-N-Methylephedrin* und HDAS- β -CD.

Für komplexere Systeme wurden Softwareprogramme entwickelt, die eine simultane Analyse aller Resonanzen in einem Spektrum ermöglichen. So entwickelten z.B. Morris und Johnson, eine zweidimensionale Computermethode mit der die chemischen Verschiebungen eines NMR-Spektrums in einer Dimension und die korrespondierenden Diffusionskoeffizienten in der zweiten Dimension projiziert werden.^[56] Diese DOSY (Diffusion Orderd 2D NMR Spectroscopy) Technik ist ein zweckvolles Instrument zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten aller individueller Komponenten in einem Gemisch.

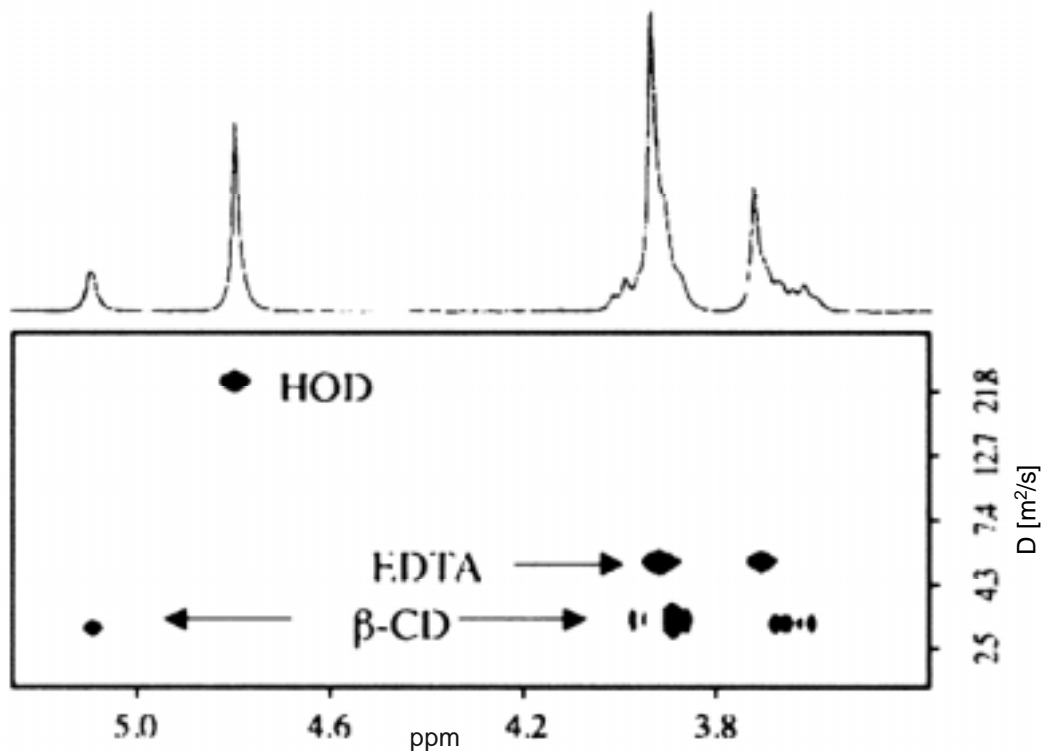


Abbildung 20: 2D DOSY-NMR-Spektrum von β -Cyclodextrin aus [41]

3.2 Untersuchung der Diffusionskoeffizienten von D-/ L-N-Methylephedrin nach Komplexierung mit HDAS- β -CD sowie DIAC- β -CD

3.2.1 Motivation

Die vorliegenden Untersuchungen wurden im Rahmen eines Forschungsaufenthalts an der University of Kansas, USA, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Cynthia K. Larive durchgeführt. Zweck des Aufenthalts war es zum einen die Methode der PFG-NMR-Spektroskopie zu erlernen und zum anderen die erworbenen Kenntnisse auf die Bestimmung der Diffusionskoeffizienten von D- und L-N-Methylephedrin in Wechselwirkung mit HDAS- sowie DIAC- β -CD anzuwenden. Aufgabe sollte dabei auch sein, Unterschiede in der chiralen Erkennung zwischen den Enantiomeren herauszufinden und Vergleiche zu den mit 2D ROESY-NMR-Experimenten (Kapitel 2) erhaltenen Daten zu ziehen.

3.2.2 Bestimmung der Diffusionskoeffizienten der isolierten Komponenten D-/L-N-Methylephedrin sowie HDAS- und DIAC- β -CD

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde eine Änderung der Diffusionsgeschwindigkeit von D- und L-N-Methylephedrin bei Wechselwirkung mit modifizierten β -Cyclodextrinen bestimmt. Folglich war es zunächst erforderlich, die Diffusionskoeffizienten aller Komponenten der jeweiligen Komplexverbindungen zu messen. Die Untersuchungen erfolgten mit dem BPPLD-Experiment (s. Abbildung 17), welches sich neben der LED-Pulssequenz als besonders geeignet für die Bestimmung von Diffusionskoeffizienten erwiesen hat.

Den Bedingungen entsprechend, unter denen die elektrophoretischen Separationen durchgeführt wurden, betragen die verwendeten Konzentrationen der Verbindungen $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l. Als Lösungsmittel wurde Wasser, gepuffert mit Ammoniumphosphat, verwendet.

Zur Bestimmung ist es notwendig, die Stärke der Gradientenamplitude in hinreichend kleinen Schritten so zu variieren, dass im Verlauf der Messungen ein 90 %iger Intensitätsabfall erzielt wird. Hierzu wurde die Stärke der Amplitude zwischen 0.5 G und 4.5 G gewählt, die in 27 Messpunkten variiert und für jede Messung dreimal wiederholt wurde um störende Einflüsse auf die Messergebnisse durch Wärmebewegung (Konvektion) zu eliminieren.

Das nachfolgende Diagramm zeigt grafisch die Diffusionskoeffizienten von D- und L-N-Methylephedrin, HDAS- sowie DIAC- β -CD

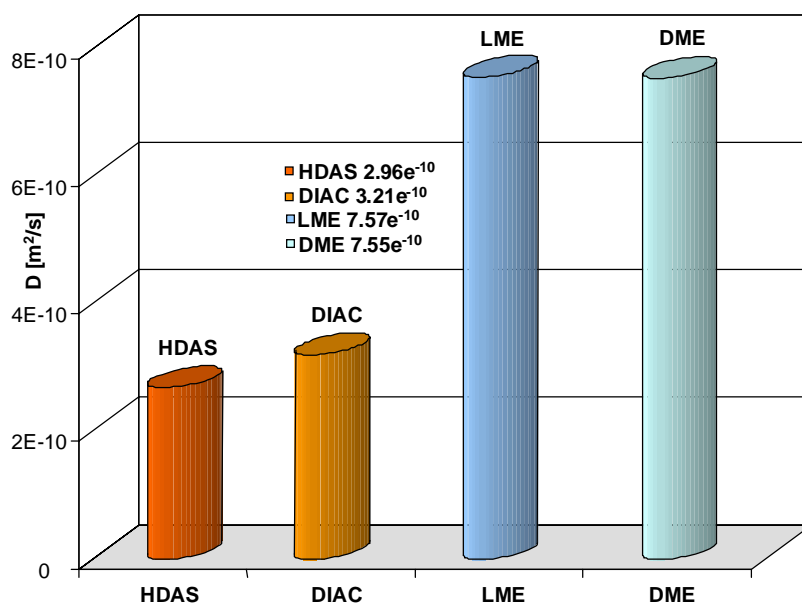


Abbildung 21: Grafische Darstellung der ermittelten Diffusionskoeffizienten D von HDAS- ($2.96 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$), DIAC ($3.21 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$), L- und D-N-Methylephedrin (7.57 bzw. $7.55 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$) (von links nach rechts)

Es ergeben sich Unterschiede in den Werten der Diffusionskoeffizienten der β -Cyclodextrine sowie den Enantiomeren. Da die Molekülmasse von D- und L-N-Methylephedrin mit 165 g/mol wesentlich kleiner ist als die der modifizierten β -Cyclodextrine (1652 g/mol DIAC- β -CD und 2058 g/mol HDAS- β -CD), ist ihre Diffusionsrate sowie der daraus resultierende Koeffizient D mit 7.55 und $7.57 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ erheblich höher. Auch zwischen den β -Cyclodextrinen an sich gibt es Differenzen in der Molekülmasse, was auch durch die Diffusionskoeffizienten widerspiegelt wird, HDAS- β -CD hat eine höhere Molekülmasse folglich ist der Koeffizient D mit $2.96 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ geringer als für DIAC- β -CD ($3.21 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$)

3.2.3 Bestimmung der Diffusionskoeffizienten von D- und L-N-Methylephedrin durch Komplexierung mit HDAS- und DIAC- β -CD

Die Untersuchungen zur Änderung der Diffusionsgeschwindigkeit der Enantiomeren von N-Methylephedrin sowie der modifizierten β -Cyclodextrine infolge der Komplexierung wurde unter der Annahme von 1:1-Verbindungen durchgeführt. Die Konzentration der Verbindungen betrug dabei wieder jeweils $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$.

Die Variation der Gradientenamplitude erfolgte im gleichen Bereich (0.5 – 4.5 G) wie auch bei der Bestimmung der Diffusionskoeffizienten der isolierten Komponenten.

Die nachfolgende Grafik stellt die Änderungen der Diffusionskoeffizienten von D- und L-N-Methylephedrin in Abhängigkeit von der Wechselwirkung mit HDAS- bzw. DIAC- β -CD dar. Um einen direkten Vergleich zu ermöglichen, wurden die Koeffizienten der isolierten Enantiomeren mit in die Darstellung aufgenommen; sie sind jeweils am linken und rechten Rand des Diagramms präsentiert. Die zugehörigen Werte sind in Tabelle 3 gezeigt.

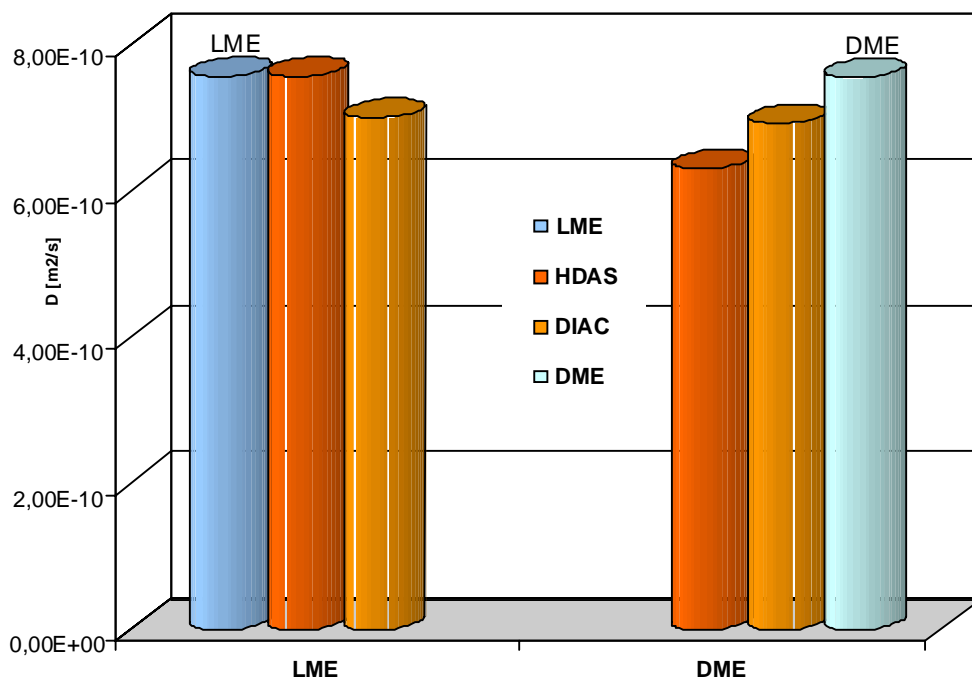


Abbildung 22: Änderung der Diffusionskoeffizienten von D- und L-N-Methylephedrin durch Wechselwirkung mit HDAS- sowie DIAC- β -CD. Die Werte von D-/L-N-Methylephedrin ohne β -CD sind am rechten bzw. linken Rand dargestellt

	L-N-Methylephedrin ($7.57 \cdot 10^{-10}$) D [m^2/s]	D-N-Methylephedrin ($7.55 \cdot 10^{-10}$) D [m^2/s]
HDAS-β-CD	$7.57 \cdot 10^{-10}$	$6.30 \cdot 10^{-10}$
DIAC-β-CD	$6.99 \cdot 10^{-10}$	$6.92 \cdot 10^{-10}$

Tabelle 3: Änderung der Diffusionskoeffizienten von D- und L-N-Methylephedrin durch Wechselwirkung mit HDAS- bzw. DIAC- β -CD

Bei D-N-Methylephedrin ergibt sich eine Verringerung des Diffusionskoeffizienten D von $7.55 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ zu $6.92 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ durch die Komplexbildung mit DIAC- β -CD und zu $6.30 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ mit HDAS- β -CD. Im Falle des L-N-Methylephedrin resultiert mit HDAS- β -CD keine Änderung von D, bei DIAC- β -CD nimmt der Diffusionskoeffizient von $7.57 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ zu $6.99 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ ab. Es zeigt sich somit, dass bei D-N-Methylephedrin angesichts der Komplexbildung mit den β -Cyclodextrinderivaten die Abnahme des Diffusionskoeffizienten in einem stärkeren Maße erfolgt als bei L-N-Methylephedrin (s. auch Abbildung 22). Diese Entwicklung legt die Vermutung nahe, dass der chirale Erkennungsmechanismus der modifizierten β -Cyclodextrine für D-N-Methylephedrin bevorzugt funktioniert. Noch mehr Aufschluss darüber ergibt die Betrachtung der Änderung der Diffusionskoeffizienten von

DIAC- und HDAS- β -CD durch die Wechselwirkung mit den Enantiomeren von N-Methylephedrin.

3.2.4 Bestimmung der Diffusionskoeffizienten von HDAS- und DIAC- β -CD in Wechselwirkung mit D- und L-N-Methylephedrin

Die Änderung der Diffusionskoeffizienten von HDAS- und DIAC- β -CD, welche sich durch die Wechselwirkung mit den Enantiomeren von N-Methylephedrin ergeben hat, ist in der folgenden Abbildung 23 dargestellt. Die dazugehörigen Werte sind in der Tabelle 4 aufgelistet.

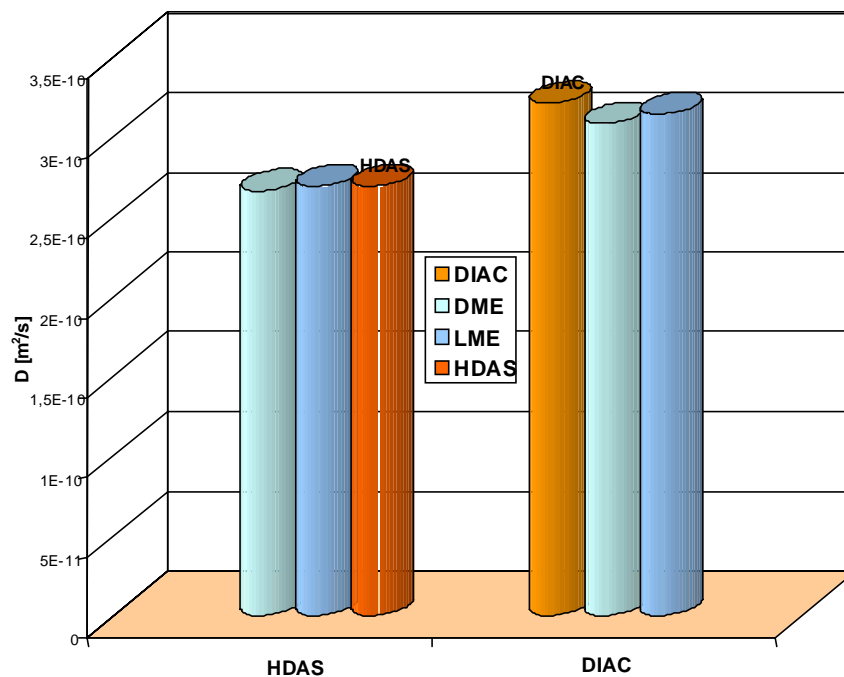


Abbildung 23: Änderung der Diffusionskoeffizienten von HDAS- und DIAC- β -CD durch Wechselwirkung mit D-/L-N-Methylephedrin. Die Werte von HDAS- und DIAC- β -CD sind rechts bzw. links dargestellt.

	DIAC- β -CD ($3.21 \cdot 10^{-10}$) D [m^2/s]	HDAS- β -CD ($2.69 \cdot 10^{-10}$) D [m^2/s]
D-N-Methylephedrin	$3.08 \cdot 10^{-10}$	$2.66 \cdot 10^{-10}$
L-N-Methylephedrin	$3.14 \cdot 10^{-10}$	$2.69 \cdot 10^{-10}$

Tabelle 4: Änderung der Diffusionskoeffizienten von HDAS- bzw. DIAC- β -CD durch Wechselwirkung mit D- und L-N-Methylephedrin

Die Ergebnisse der Bestimmung von D für HDAS- und DIAC- β -CD bestätigen die unter Kapitel 3.2.3 aufgestellten Vermutungen. Bei DIAC- β -CD ergibt sich in der Wechselwirkung mit D-N-Methylephedrin von $3.21 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ auf $3.08 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ eine stärkere Abschwächung von D als mit L-N-Methylephedrin ($3.14 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$). Die Abnahme des Diffusionskoeffizienten bei HDAS- β -CD ist infolge der Komplexbildung insgesamt geringer, von $2.69 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ auf $2.66 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ für D-N-Methylephedrin. Mit L-N-Methylephedrin ($2.69 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$) ergibt sich wiederum keine Änderung der Diffusion. Die geringe Änderung der Diffusion bei HDAS- β -CD trotz der vermuteten stärkeren Wechselwirkungen resultiert aus der größeren Molekülmasse dieses β -Cyclodextrinderivats. Dadurch hat die Anlagerung eines kleinen Moleküls weniger Einfluss auf das Diffusionsverhalten des HDAS- β -CD, wohingegen die Molekülmasse bei DIAC- β -CD kleiner ist und die Wechselwirkung mit den Enantiomeren von N-Methylephedrin daher eine größere Änderung von D bewirkt. Bei beiden β -Cyclodextrinderivaten ist die Wechselwirkung mit dem D-Enantiomer stärker als mit L-N-Methylephedrin. Diese Unterschiede in der chiralen Erkennung sind bereits durch die Bestimmung der Diffusionskoeffizienten der Enantiomeren aufgrund der Komplexbildung aufgetreten und werden hier nochmals bestätigt.

Die Vermutung, dass es mit HDAS- β -CD zur stärkeren chiralen Diskriminierung zwischen D- und L-N-Methylephedrin kommt, lässt sich aus den Änderungen der Diffusionskoeffizienten der β -Cyclodextrinderivate jedoch nicht bestätigen, da hierbei noch die unterschiedlichen Molekülmassen von HDAS- und DIAC- β -CD einen nicht unwesentlichen Einfluss haben.

Generell ist es möglich, mit der PFG NMR-Spektroskopie Untersuchungen zur chiralen Erkennung zu machen, diese Methode ist eine sinnvolle Alternative zu den 2D Experimenten wie NOESY oder ROESY. Allerdings muss die Temperaturempfindlichkeit der Diffusion beachtet werden, da durch Konvektionseinflüsse ganze Messreihen nicht mehr verwendbar werden. Auch ist mit der PFG-NMR-Spektroskopie keine detaillierte Aussage über die Lage der Wechselwirkungszentren möglich, diese Informationen können wiederum mit den zweidimensionalen Kern-Overhauser-Experimenten NOESY und ROESY erhalten werden.

4 Untersuchung der molekularen Erkennung an stationären Phasen

4.1 Molekulare Erkennung und Wirt-Gast-Chemie

Die Quantifizierung nicht-kovalenter Wechselwirkungen, z. B. die Erkennung zwischen Substrat und Rezeptor, spielt eine wichtige Rolle für das Verständnis von molekularen Prozessen. Diese Wechselwirkungen sind Grundlage der Informationsübertragung zwischen Molekülen, sowohl in der belebten Natur als auch in künstlichen Strukturen. Durch definierte Formen eröffnen synthetische Wirt-Gast-Komplexe in einer weitgehend fixierten Umgebung den Weg zur Aufklärung einzelner Wechselwirkungen.^[23]

4.1.1 Wirt-Gast-Chemie

Die Wirt-Gast-Chemie^[57] beschäftigt sich mit der Synthese und Untersuchung von hochstrukturierten organischen Molekülen. Zentrales Thema dieser molekularen Forschung ist die definierte Komplexierung von Molekülen im Grund-, Übergangs- oder angeregten Zustand. Komplexe bestehen definitionsgemäß aus zwei oder mehreren Verbindungen mit festgelegten Strukturbeziehungen. Die Komplexpartner werden dabei als Wirte und Gäste klassifiziert. Der Rezeptor (Wirt) ist ein organisches Molekül oder Ion, dessen Bindungsstellen in Komplexen konvergieren. Gäste entsprechen den Substraten und sind ebenfalls ein organisches Molekül, ein Ion, oder ein Metallion, dessen Bindungsstellen divergent angeordnet sind.

Komplexe können über Kontakte von Wirt und Gast an mehreren Bindungsstellen gebildet werden. Im Falle eines Kontakts kommt es darauf an, die Wechselwirkungszentren von Rezeptor und Substrat komplementär anzuordnen, entsprechend dem Grundsatz der gegenseitigen Ergänzung (Schlüssel-Schloss-Prinzip). Bei den Wechselwirkungsmechanismen handelt es sich um Attraktionskräfte, die zwischen permanent geladenen und induzierten Monopolen und Dipolen auftreten. Die Komplexe der Wirt-Gast-Chemie werden dabei zusammengehalten durch Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenpaarung oder Metallion/Ligand-Anziehung.

Die Bindungskräfte zwischen Solvens und Wirt bzw. Solvens und Gast sind häufig von der gleichen Art wie die zwischen Wirt und Gast. Folglich müssen bei der Komplexbildung Lösungsmittelmoleküle von den Bindungsstellen verdrängt werden, um eine Komplexbildung zu erreichen. Die freie Solvatationsenergie setzt sich zusammen aus einem Enthalpieterm, der die Solvensbindung begünstigt, und einem Entropieterm, der ihr entgegenwirkt. Tatsächlich konkurriert das Lösungsmittel sowohl mit dem Wirt als auch mit dem Gast um die Besetzung der Bindungsstellen. Dass sich trotzdem Wirt/Gast-Komplexe in Lösung bilden, beruht üblicherweise auf der komplexgerechten Anordnung der Bindungsstellen des Wirts, die im Solvens nicht vorhanden sind.^[58]

4.1.2 Molekulare Erkennung^[57]

Molekulare Wechselwirkungen sind Basis für hochselektive Erkennungs-, Reaktions-, und Transportprozesse, wie z.B. Substratbindung an Rezeptorproteine oder enzymatische Reaktionen. Die Synthese von künstlichen Rezeptoren, mit hohem Wirkungsgrad und hoher Selektivität, erfordert präzisen Umgang mit energetischen und stereochemischen Besonderheiten der nichtkovalenten Kräfte. Bindet ein Substrat selektiv an einen Rezeptor, so ergibt dies ein sogenanntes Supramolekül, das durch seine thermodynamische und kinetische Stabilität gekennzeichnet ist. Für den Bindungsprozess ist die Größe der aufzuwendenden oder freigesetzten Energie charakteristisch und bestimmt dadurch die Selektivität. Molekulare Erkennung entspricht der Speicherung und dem Auslesen von Informationen. Diese können in der Struktur des Rezeptors, in seinen Bindungsstellen (Art, Anzahl, Anordnung) und in der Schicht, die das gebundene Substrat umgibt, gespeichert sein.

Infolgedessen entspricht die molekulare Erkennung dem größtmöglichen Informationsgehalt des Rezeptors für ein bestimmtes Substrat. Diese Vorstellung enthält sowohl energetische (elektronische) wie geometrische Komponenten und gilt als Weiterentwicklung des bekannten „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ von Emil Fischer aus dem Jahre 1894.^[59]

Die Ideen der molekularen Erkennung und der Rezeptoren sind im Laufe der letzten fünfundzwanzig Jahre in viele Bereiche der Chemie mehr und mehr eingedrungen, vor allem angesichts ihrer Bedeutung für chemische Selektivität und zwischenmolekulare Kräfte.^[14,60]

4.2 HR-MAS-NMR-Spektroskopie^[61,62]

Unter den spektroskopischen Hilfsmitteln, die dem Chemiker bei der Strukturaufklärung und molekularen Erkennung zur Verfügung stehen, nimmt die magnetische Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) zweifellos die führende Stellung ein. Die Kombination verschiedener NMR-Experimente wird eingesetzt, um Informationen über die molekulare Struktur, die Molekülgröße, Bindungsverhältnisse und Reaktionskinetiken zu erhalten. Messbare Parameter beinhalten chemische Verschiebungswerte, Kernrelaxationsraten, Korrelationszeiten und Diffusionskoeffizienten. Die Befunde, welche mit den unterschiedlichen NMR-Untersuchungsmethoden und -Techniken erhalten werden, liefern darüber hinaus Aufschluss über die Art und Stärke der Wechselwirkungen während des Trennprozesses und sind somit ein unerlässliches Instrument zum Verständnis von chromatographischen Resultaten.

Proben, die in Lösungsmitteln nicht löslich sind, aber in ihnen aufquellen, können auch in gequollenem Zustand NMR-spektroskopisch untersucht werden. In diesem Zustand ist die Beweglichkeit höher als im Festkörper ohne Lösungsmittel, jedoch immer noch geringer als in Lösung. Das NMR-Spektrum einer gequollenen Probe wurde bislang unter den gleichen Bedingungen wie das einer gelösten Probe aufgenommen und besitzt infolge der geringeren Beweglichkeit des Probenmoleküls eine schlechtere Auflösung. Um hochaufgelöste NMR-Spektren von gequollenen Proben zu erhalten, wird die HR-MAS-NMR-Spektroskopie angewandt, die Elemente aus der Hochauflösungs- und der Festkörper-NMR-Spektroskopie vereint.

In Abbildung 24 ist der Vergleich zwischen der Festkörper-, Suspensions- und Hochauflösungs-NMR-Spektroskopie dargestellt.

Im Festkörper-Protonen-Spektrum ist die Auflösung am schlechtesten, zu sehen ist nur ein breites Signal im dargestellten Verschiebungsbereich. Beim Hochauflösungs-NMR-Spektrum ist die Auflösung hervorragend. Die Probenvorbereitung hat sich jedoch als sehr zeitaufwendig erwiesen, da das Polymer nur unter langer Behandlung mit Ultraschall und Temperatur in eine einigermaßen gelöste Form gebracht werden konnte. Anders mit der HR-MAS-NMR-Spektroskopie, hier genügte es, die Probe im gequollenen Zustand vorliegen zu haben. Die Auflösung des resultierenden Spektrums ist erheblich besser als mit der Festkörper-NMR-Spektroskopie bei geringerem Aufwand für die Probenvorbereitung wie bei der NMR-Spektroskopie in Lösung.

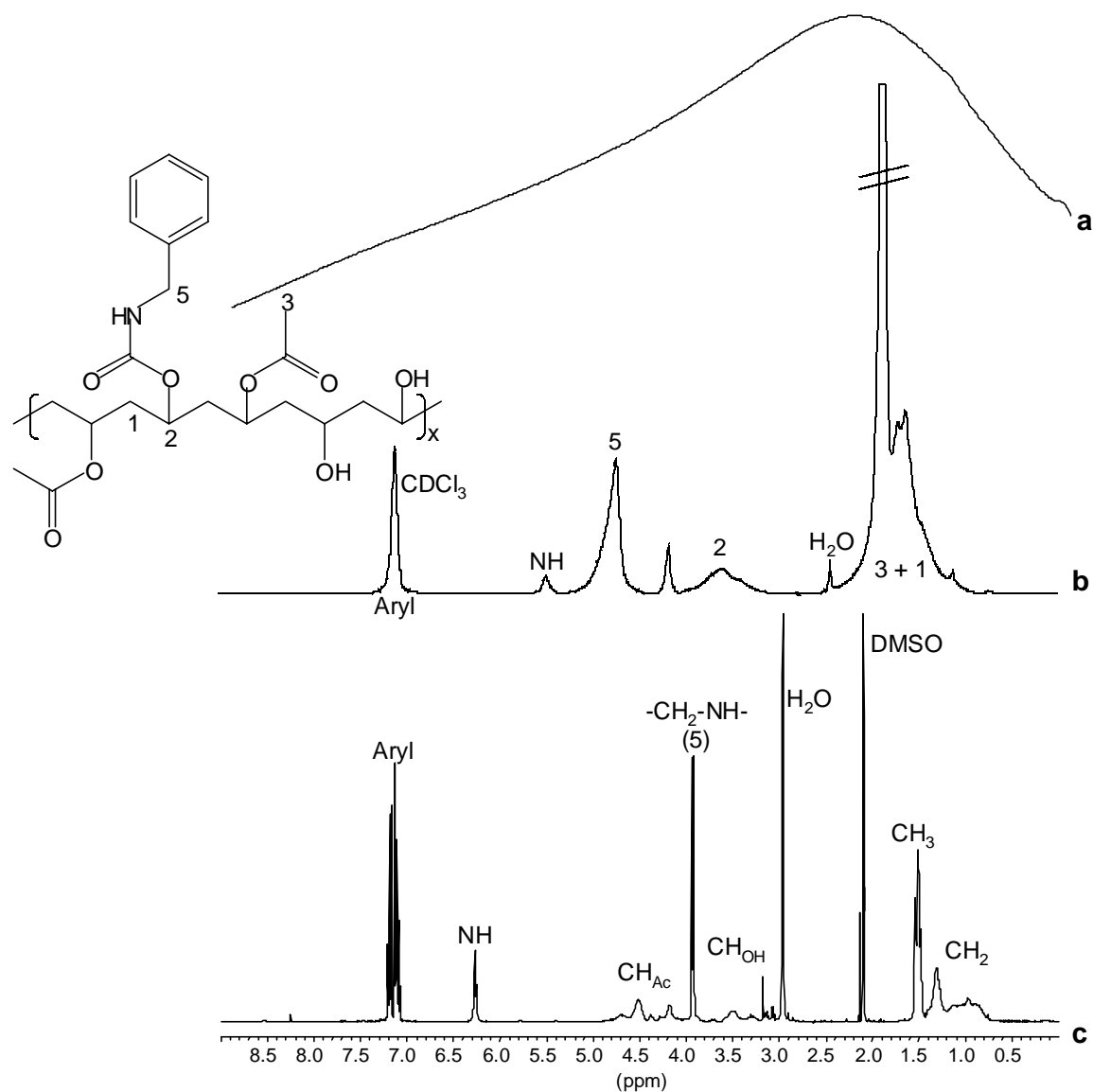


Abbildung 24: Vergleich der ^1H -Festkörper-(a), Suspensions-(b) und Hochauflösungsspektren (c) einer polymeren Phase.

Die HR-MAS-NMR-Technik (High-Resolution-Magic-Angle-Spinning) hat sich in den letzten Jahren zu einem wichtigen Instrument in der Analytik entwickelt. Die Probe wird bei dieser Methode schnell um den sogenannten magischen Winkel (Magic Angle) rotiert. Dadurch können Magnetfeldinhomogenitäten aufgrund des Zwei-Phasensystems fest-flüssig herausgemittelt werden, infolgedessen wird die Linienbreite der Signale so stark verkleinert, dass sogar Kopplungskonstanten ermittelt werden können.

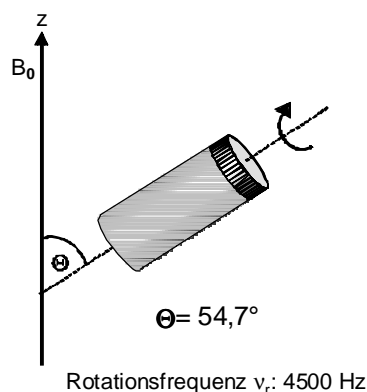


Abbildung 25: Rotation um den magischen Winkel unter HR-MAS-NMR-Bedingungen

Durch die Suspensions-NMR-Spektroskopie wird die Untersuchung der Wechselwirkungen an den Rezeptorstellen der chromatographischen Trennphase ermöglicht. Diese Methode erlaubt es, die gleichen Voraussetzungen und Messbedingungen zu schaffen, wie sie während der Trennung in der chromatographischen Säule vorliegen. Dadurch ist es möglich einen direkten Vergleich mit den Verhältnissen unter chromatographischen Messbedingungen zu ziehen, wechselseitige Anpassungen der Parameter zur weiteren Untersuchung der molekularen Erkennung durchzuführen und somit den Trennprozess zu optimieren.

Zum Einsatz kommen hierbei Phasen, die den chromatographischen Trennbedingungen am nächsten kommen und über Wasserstoffbrücken-Akzeptoren verfügen. Als Substrate werden Wasserstoffbrücken-Donor-Systeme, z.B. NH-Protonen-Substrate, verwendet. Beobachtet wird die induzierte chemische Verschiebung der NH-Protonen aufgrund der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen bei der Wechselwirkung mit den Rezeptorstellen der chromatographischen Trennphase.

Je nach Struktur respektive Anzahl der Wasserstoffbrücken-Donor-Einheiten der eingesetzten Substrate unterscheiden sich die Wechselwirkungen der Substrate mit der Trennphase in ihrer Art und Stärke. Diese Unterschiede führen zur chromatographischen Trennung und können in der HPLC anhand der verschiedenen Retentionszeiten der einzelnen Substrate beobachtet werden.

Schwierigkeiten bei der Studie der Wechselwirkungen mittels der Suspensions-NMR-Spektroskopie tauchen jedoch durch das Auftreten von breiten Signalen der Polymerphase in den NMR-Spektren auf, da die Verbindungen zum einen relativ unbeweglich sind und zum anderen ein verhältnismäßig großes Molekulargewicht besitzen.

Von großem Interesse ist hierbei die Einführung und Anwendung neuer NMR-Experimente und Techniken, mit denen es möglich ist breite Signale zu eliminieren und dadurch relevante NMR-Signale der Substrate sichtbar und quantitativ erfasst werden. Die von Meiboom und

Gill^[48] eingeführte CPMG-Pulssequenz, ursprünglich zur Bestimmung von T_2 -Relaxationszeiten entwickelt, basiert auf der Grundlage, dass breite Signale durch eine sehr kurze T_2 -Zeit charakterisiert sind ($\nu \sim 1/T_2$). Wird nun die Wartezeit zwischen dem ersten 90° -Impuls und dem folgenden 180° -Impuls entsprechend kurz gewählt, so relaxieren hauptsächlich die breiten Signale in den Grundzustand zurück, werden durch die Aufnahme des FID nicht mehr erfasst und erscheinen demzufolge nicht im Spektrum (Abbildung 26).

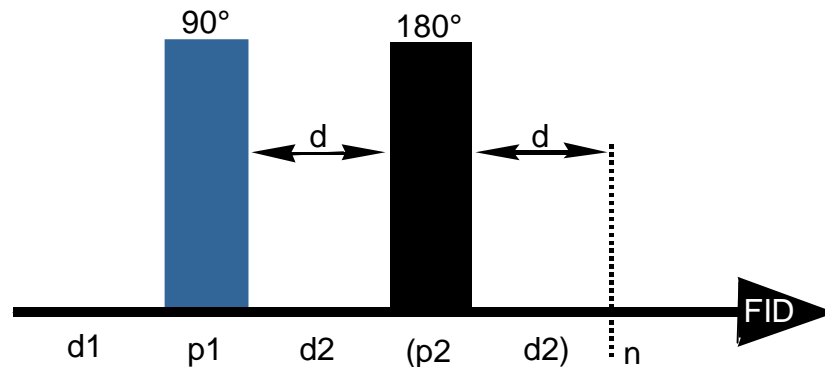


Abbildung 26: Pulsschema der CPMG-Pulssequenz zur Bestimmung von T_2 -Relaxationsraten und als T_2 -Filter

Mit diesem T_2 -Filter ist eine Unterdrückung der breiten Resonanzen so möglich, dass dadurch relevante, schmalere Signale nicht betroffen sind und insgesamt die Empfindlichkeit des NMR-Spektrums wesentlich gesteigert werden kann.^[63]

4.3 Untersuchung der molekularen Erkennung an stationären Phasen mittels der HR-MAS-NMR-Spektroskopie

4.3.1 Motivation

Die Weiterentwicklung der modernen Analysetechnik und die damit verbundene Herabsetzung der Nachweisgrenze hat zu einem gesteigerten Anspruch an die Reinheit der Analyten geführt. Leistungsfähigere Trennmethoden, die eine verbesserte Separation der Proben ermöglichen, erfordern in zunehmenden Maße Trennmaterialien, die für ein spezielles Trennproblem synthetisiert und entwickelt werden. Zu einem wichtigen Instrument für das Erfassen molekularer Wechselwirkungsmechanismen zwischen Analyten und stationärer Phase hat sich in jüngster Zeit die HR-MAS-NMR-Spektroskopie entfaltet. Vor allem die vorliegenden Untersuchungen haben dabei einen entscheidenden Beitrag für die Anwendung der Suspensions-NMR-Methode zum Verständnis der molekularen Erkennung an chromatographischen Trennphasen geliefert.

4.3.2 Charakterisierung einer polymeren stationären Phase mittels ^1H -HR-MAS-NMR-Spektroskopie

In den letzten Jahren wurde versucht Phasen mit verbesserten Eigenschaften, auf der Grundlage von rein organischen Polymeren, darzustellen. Diese verfügen über den Vorteil einer erhöhten pH-Stabilität, können zudem durch Einbindung funktioneller Gruppen auf unkomplizierte Weise modifiziert und dem aktuellen Trennproblem angepasst werden. Eine unterschiedlich starke Quellbarkeit dieser Polymere in verschiedenen organischen Lösungsmitteln, im Vergleich mit rein anorganischen Trägersystemen, macht jedoch bezüglich der Druckstabilität und damit bei der Anwendung als HPLC-Basismaterial, einige Schwierigkeiten. Infolgedessen haben sich nur wenige rein organische Trennphasen, meist für sehr spezielle Trennprobleme durchgesetzt. Zu erwähnen sind vor allem Phasen, die aus Polystyrol unterschiedlicher Quervernetzung^[64], aber auch aus Cellulose^[65], modifizierten Polyvinyl- sowie Polyallylalkoholen, bestehen.

4.3.3 Untersuchung des Quellverhaltens einer polymeren Phase

Vor dem Einsatz eines organischen Polymers als stationäre Trennphase muss dessen Quellverhalten gegenüber den zur Trennung verwendeten Lösungsmitteln auch über einen längeren Zeitraum hinweg analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde an einem ausgewählten Polymer eine Quellzeitstudie mit der ^1H -HR-MAS-NMR-Spektroskopie in Chloroform durchgeführt.

Bei dem Polymer handelt es sich um ein Polyviol45, bei dem zuerst 20 % Benzylamino-urethangruppen eingeführt wurden und anschließend weitere 15 % Acetylgruppen, von denen vorher schon 55 % vorhanden waren. Der Gesamtanteil an Acetylgruppen beträgt demzufolge 70 %, es sollten also auch 10 % freie OH-Gruppen vorhanden sein. Im folgenden wird der Name des Polymers mit PVBzIOAc abgekürzt (Struktur s. Abbildung 27).

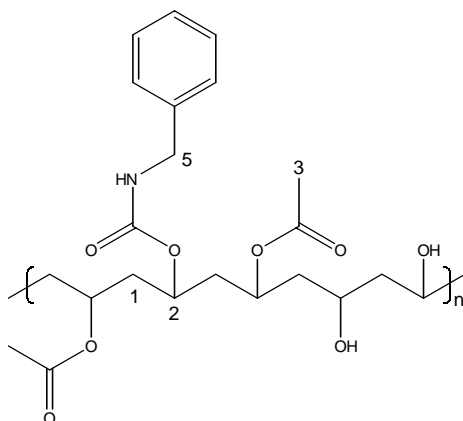


Abbildung 27: Struktur von PVBzIOAc.

Eine Übersicht zur Serie von ^1H -HR-MAS-NMR-Spektren in Abhängigkeit von der Quellzeit ist in der folgenden Abbildung 28 enthalten.

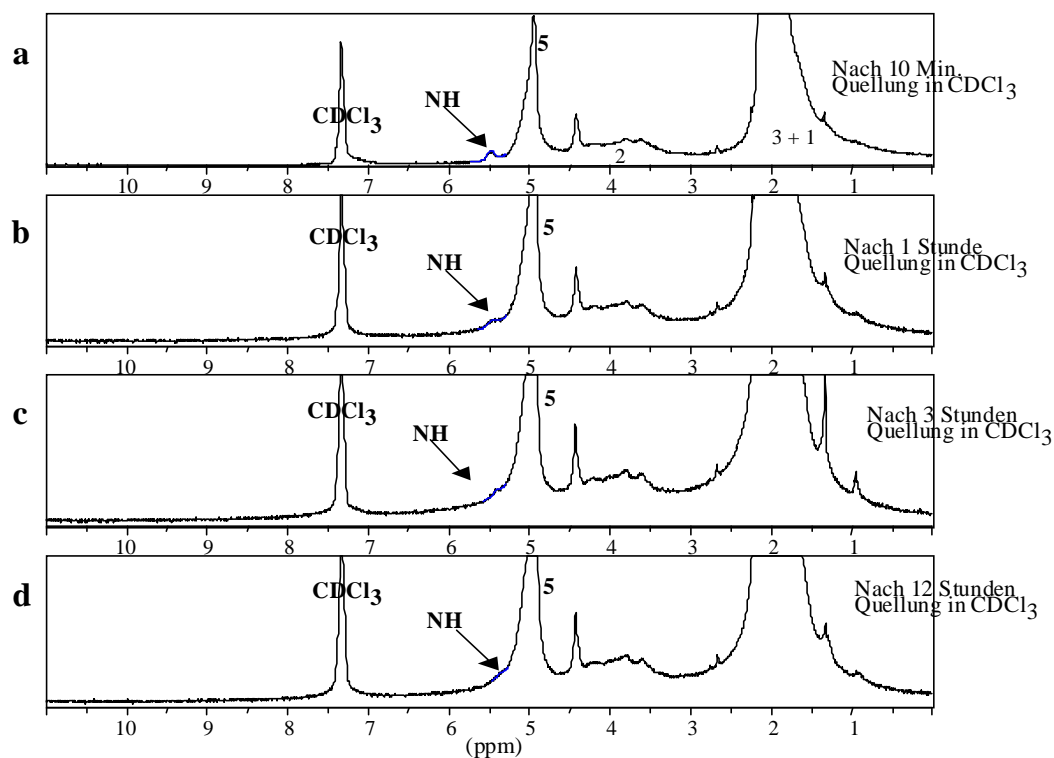


Abbildung 28: Quellzeitstudie an der polymeren Phase PVBzIOAc; ^1H -HR-MAS-NMR-Spektrum nach 10 Min Quellung in Chloroform (a), nach 1 (b), 3 (c) und 12 Stunden (d) Quellzeit.

Die Spektren in Abbildung 28 sind stark vergrößert, um möglichst alle Signale der einzelnen Molekülfragmente des Polymers sichtbar darzustellen.

Die Untersuchungen zur Quellzeitabhängigkeit des Polymers wurden unter der Voraussetzung durchgeführt, dass sich bei einer verbesserten Mobilität infolge der zeitabhängigen Einwirkung des Lösungsmittels eine Verschmälerung der Linienbreite der Signale ergeben sollte. Bei ca. 7.4 ppm haben die aromatischen Protonen ihre Resonanzen, die Signale sind jedoch durch das Lösungsmittelsignal vollständig überlagert. Das NH-Proton erscheint bei 5.5 ppm. Interessant ist, dass das Signal des NH-Protons sich nach einer Stunde Quellung zu einer Schulter verbreitert, nach 3 Stunden fast vollständig verschwindet und nach zwölf Stunden wieder als Schulter zu sehen ist. Das Verschwinden des NH-Signals ist generell durch einen Austausch zwischen dem Proton und dem Deuteron des Lösungsmittels (H/D-Austausch) zu erklären. Das Verschwinden und Auftauchen des NH-Signals infolge des H/D-Austausches findet unabhängig von der Quellzeit statt und ist auf zwei Gründe zurückzuführen. Zum einen hat die Quellung des Polymers außerhalb des Rotors stattgefunden, für jede Messung ist demzufolge eine andere Probe verwendet worden und zum anderen ist das Polymer sehr grobkörnig vorgelegen, die einzelnen Partikel waren aufgrund dessen sehr inhomogen und die

Art und Weise des Austauschs zwischen dem Proton und Deuteron erfolgte individuell und charakteristisch für die jeweilige Probenzusammensetzung.

Die Protonen der benzyllischen Gruppe haben ihr Signal bei 5.2 ppm. In diesem Bereich liegen auch die chemischen Verschiebungen der Methinprotonen des Polymergrundgerüsts. Diejenigen, mit einer Acetylgruppe in direkter Nachbarschaft erscheinen zwischen 4.5 und 5.0 ppm. Bei den, mit einer Hydroxylgruppe benachbarten CH-Gruppen zeigen sich Resonanzen von 3.2 bis 4.0 ppm. Die Signale im Hochfeldbereich bei 1.2 bis 2.5 ppm werden den CH₃- und CH₂-Gruppen der Acetylgruppen sowie des Polymergrundgerüsts zugeordnet.

Wie es sich in den Spektren der Abbildung 28 zeigt ist bereits nach zehn Minuten Quellung des Polymers in Chloroform eine sehr gute Beweglichkeit der Molekülfragmente erreicht, zu erkennen an der guten Auflösung des ¹H-HR-MAS-NMR-Spektrums (a). Auch nach 1 (b), 3 (c) und 12 Stunden (d) lässt sich keine Änderung in der Linienbreite der Signale ermitteln. Das bedeutet, dass die polymere Phase bereits nach kurzer Zeit einen Quellungsendezustand erreicht hat, der sich auch nach langer Penetration durch das Lösungsmittel nicht ändert. Diese Eigenschaft ist eine gute Voraussetzung für die Verwendung als stationäre Phase in der Chromatographie, bedeutet es doch, zum einen den schnellen Einsatz der Trennphase ohne lange vorhergehende Kalibrierung. Zum anderen ist es möglich, das Trennmateriale über einen langen Zeitraum hinweg zu verwenden, da eine Änderung der Trennungsleistung durch eine nachträglich erfolgte Quellung anhand der vorhandenen Untersuchungen ausgeschlossen werden kann.

4.3.3.1 Untersuchung der molekularen Erkennung an einer polymeren Phase

Für die Verwendung einer stationären Phase in der Chromatographie ist es von Vorteil, wenn der Wechselwirkungsmechanismus mit Analytmolekülen bekannt ist. Angaben über die molekulare Erkennung geben zudem Hintergrundinformationen über Form und Flexibilität der Rezeptorstellen, welche wiederum für eine verbesserte Anpassung der Synthese verwendet werden können.

Auch bei der Untersuchung der Wechselwirkung mit einem Analyten ist es wichtig, das Langzeitverhalten der stationären Phase zu beobachten. Daher ist in diesem Fall ebenfalls eine zeitabhängige Serie zum Quellungsverhalten der polymeren Phase PVBzlOAc in der mobilen

Phase, Lösungsmittel und Analyt Succinimid, durchgeführt worden. Eine Übersicht der erfolgten ^1H -HR-MAS-NMR-Experimente ist in der Abbildung 29 zu sehen.

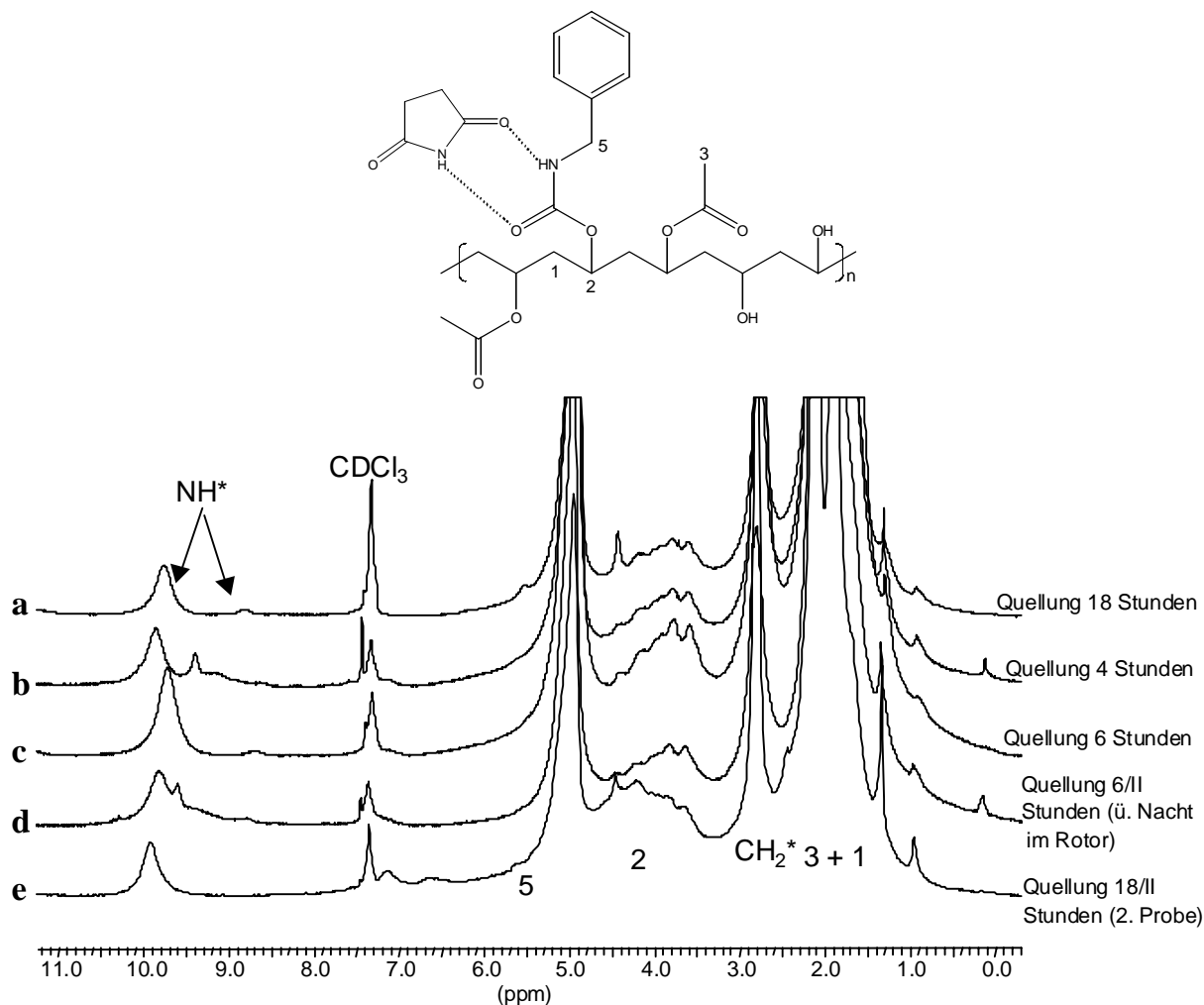


Abbildung 29: Quellzeitstudie der polymeren Phase PVBzIOAc mit Succinimid* (0.1 mol/l); ^1H -HR-MAS-NMR-Spektrum nach 18 h Quellung in der mobilen Phase (a), nach 4 (b), 6 (c), nachdem die Probe 6 h gequollen wurde und anschließend über Nacht im Rotor verblieben ist (d) und eine zweite Messung mit 18 h (e) Quellzeit.

Die ^1H -HR-MAS-NMR-Spektren der Abbildung 29 enthalten, neben den Signalen der polymeren Phase PVBzIOAc, welche in Kapitel 4.3.3 ausführlich diskutiert wurden, die Signale des Succinimids. Bei 2.0 ppm liegen die chemischen Verschiebungen der CH_2 -Gruppen. Das NH-Proton zeigt ohne Wechselwirkung mit einem Rezeptor, ein Signal bei 8.5 ppm. Durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zur Carbonylgruppe des Rezeptormoleküls (s. Abbildung 4) kommt es zur Entschirmung des Protons und infolgedessen zu einer Tieffeldverschiebung. Im Spektrum (a) der Abbildung 29 ist die Probe insgesamt 18 Stunden zusammen mit dem Substrat, welches zuvor in Chloroform gelöst wurde gequollen worden. Aufgrund der Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Substrat ergibt sich eine

Tieffeldverschiebung der NH-Resonanz zu 9.9 ppm. Daneben ist ein weiteres Signal zu sehen, welches wegen der chemischen Verschiebung dem NH-Proton des ungebundenen Succinimids zugeordnet werden kann. Zwischen Succinimid und dem Polymer PVBzIOAc kommt es demzufolge zu Wechselwirkungen über Wasserstoffbrückenbindungen. Die Einstellung des Gleichgewichts erfolgt dabei so langsam, dass innerhalb der NMR-Zeitskala ($\sim 10^{-8}$ s) zwei deutlich voneinander getrennte Signale detektiert werden können. Zur Überprüfung des diskutierten Mechanismus wurde eine zeitabhängige Serie von Quellungs-experimenten durchgeführt. Nach vier Stunden Quellzeit des Polymers zusammen mit dem Substrat, erscheint im ^1H -HR-MAS-NMR-Spektrum (b), zwischen den Signalen des NH-Protons für das gebundene (9.9 ppm) bzw. ungebundene Succinimid (8.5 ppm), ein weiteres Signal bei ca. 9.5 ppm. Die Lage des Signals könnte für eine intermediale Wechselwirkungsform zwischen der stationären Phase und dem Analyt stehen. Bei einer Quellung des Polymers von sechs Stunden sind im Spektrum (c) dagegen wieder zwei Signale für das gebundene und das freie Succinimid zu sehen. Anders verhält es sich, wenn die gleiche Probe über Nacht im Rotor verblieben ist und am nächsten Tag nochmals vermessen wurde. In diesem Fall sind wieder drei Signale im ^1H -HR-MAS-NMR-Spektrum (d) zu beobachten, die dem gebundenen, freien und einem dazwischenliegenden Zustand des Succinimids zugeordnet werden. Als letztes Experiment dieser Messreihe wurde eine weitere Probe nochmals achtzehn Stunden zusammen mit Succinimid in Chloroform gequollen, im Spektrum (e) ist diesmal nur ein Signal zu sehen, welches aufgrund seiner chemischen Verschiebung dem NH-Proton des gebundenen Succinimids zugeordnet werden kann.

Mit den Resultaten dieser Experimente lässt sich deutlich erkennen, dass im Wechselwirkungsmechanismus zwischen dem Polymer und Succinimid keine zeitliche Abhängigkeit existiert.

Das eher willkürliche Auftauchen von unterschiedlich stark gebundenen Zuständen des Succinimids zeigt, dass im hochbeweglichen Polymer keine definierten Rezeptorstellen vorhanden sind. Als Konsequenz ergibt sich, dass diese polymere Phase für eine chromatographische Anwendung aufgrund der unspezifischen Wechselwirkungen, ungeeignet ist. Die gute Quellbarkeit und die damit verbundene Mobilität hat sich für die Untersuchung mit der ^1H -HR-MAS-NMR-Spektroskopie als sehr vorteilhaft erwiesen. Die damit verbundene Beweglichkeit der Rezeptorstellen ist jedoch ungünstig für die Anwendung in der HPLC, da durch die unspezifischen Wechselwirkungen die Analyten sehr breit eluiert werden.

Entsprechende Ergebnisse wurden, bei einer Variation der Succinimidkonzentration zwischen 0.5 und 10^{-3} mol/l erhalten, bei der die Quellzeit der einzelnen Proben konstant eine Stunde betragen hat (s. Abbildung 30).

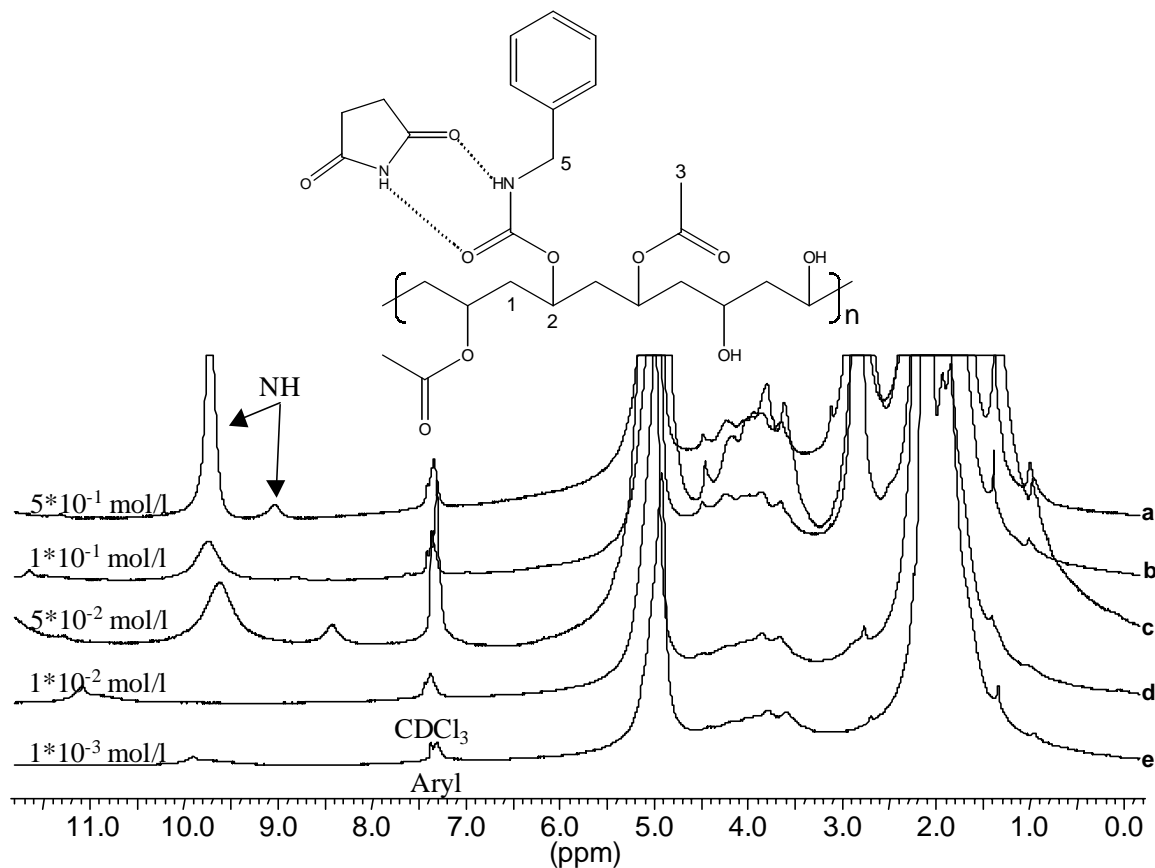


Abbildung 30: Quellzeitstudie der polymeren Phase PVBzIOAc mit unterschiedlichen Konzentrationen an Succinimid zwischen $5 \cdot 10^{-1}$ und $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l in Chloroform mit Quellzeiten von jeweils einer Stunde.

Auch bei der konzentrationsabhängigen Untersuchung der molekularen Erkennung des Polymer PVBzIOAc zeigt sich zum einen wieder, dass die Rezeptorstellen sehr beweglich sind und der molekulare Erkennungsmechanismus am Succinimid sehr vielfältig ist. Neben der konzentrationsbedingten chemischen Verschiebungsänderung der NH-Substratsignale zu tieferem Feld mit steigender Konzentration, ist das Auftreten von verschiedenen Bindungszuständen des Succinimids wieder stark von der jeweiligen Polymerprobe, damit auch von der Menge der zur Verfügung stehenden Rezeptorstellen und nicht von der gewählten Konzentration des Analyten, abhängig. Deutlich zeigt sich das bei den Spektren (c) und (d), bei der geringeren Konzentration (d) tritt nur ein Signal mit sehr großer chemischer Verschiebungsänderung (11.0 ppm) auf, was für eine sehr starke Interaktion zwischen Polymer

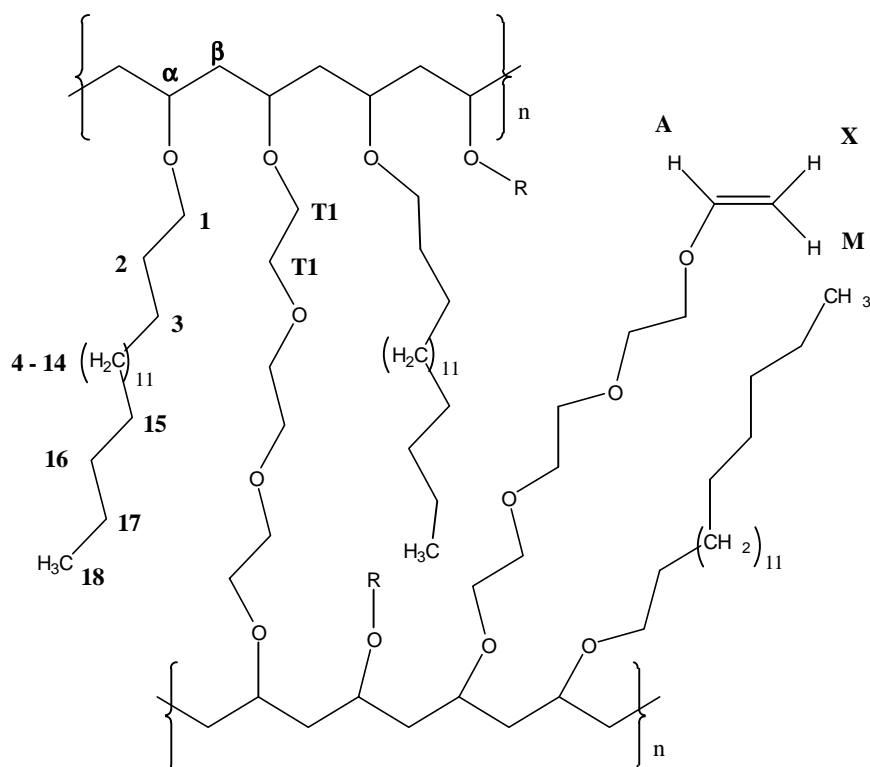
und Substrat sprechen würde. Im Spektrum mit der höheren Succinimidkonzentration dagegen sind zwei Signale mit der zur Konzentration entsprechenden chemischen Verschiebung zu beobachten, d.h. bei dieser Polymerprobe treten keine ungewöhnlichen Wechselwirkungen auf.

4.3.4 Untersuchung und Strukturaufklärung einer Polyalkylvinyletherphase^[66]

Hinsichtlich der guten Quellbarkeit polymerer Proben und die daraus resultierende hohe Auflösung der HR-MAS-NMR-Spektren kann mit dieser Technik auch eine Synthesekontrolle und im weiteren detaillierte Strukturzuordnung durchgeführt werden.

So ist es möglich an der untersuchten Polyalkylvinyletherphase^[67] die vicinalen Kopplungskonstanten des AMX-Spinsystems der Vinylgruppen mit $^3J_{\text{trans}}$ von 14.3 Hz und $^3J_{\text{cis}}$ mit 6.3 ppm zu bestimmen. Dennoch kann aus dem eindimensionalen Protonenspektrum keine vollständige Zuordnung der Signale erfolgen.

Aufgrund der guten Quellbarkeit der polymeren Phase ist es möglich gewesen, ein zweidimensionales H/H-COSY-NMR-Spektrum aufzunehmen, welches in der Abbildung 31 zu sehen ist.



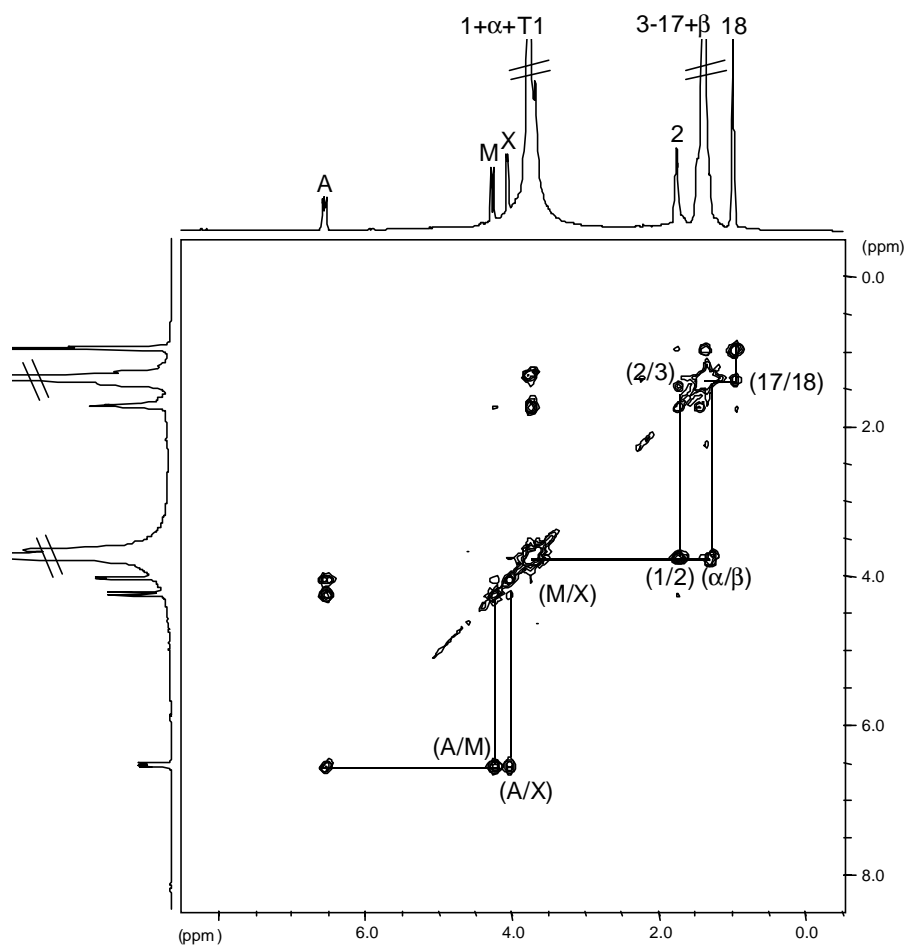


Abbildung 31: Struktur (oben) und 2D H/H-COSY-HR-MAS-NMR-Spektrum (unten) der Polyalkylvinyletherphase.

Im H/H-COSY-HR-MAS-NMR-Spektrum (Abbildung 31) sind die Kopplungen zwischen den Protonen der vinyllischen Doppelbindung (AMX-System), welche beim vorhergehenden Syntheseschritt nicht vollständig polymerisiert wurden, deutlich zu sehen. Sogar die geminale Kopplung zwischen den Protonen H(M) und H(X) ist klar zu erkennen. Zudem ist es möglich, das Resonanzsignal der Protonen H(β) eindeutig dem Signal bei 1.4 ppm zuzuordnen, da nur so die Kopplung zwischen den Signalen bei 3.7 und 1.4 ppm (Protonen 1/ α /T1) erklärt werden kann. Anhand des 2D H/H-COSY Spektrums kann somit entschieden werden, ob die Methylenprotonen H(β) des Polymergrundgerüsts eine Resonanz bei 1.4 oder 1.7 ppm besitzen.

Mit Hilfe der HR-MAS-NMR-Spektroskopie war es bei der polymeren Polyalkylvinyletherphase zum einen möglich einen qualitativen Überblick über die durchgeführte Polymerisation zu erhalten und zum anderen, Dank der sehr guten Auflösung des Spektrums, eine eindeutige Signalzuordnung und damit Strukturaufklärung durchzuführen. ^[68-71]

4.4 Untersuchung von stationären Kieselgelphasen

Stationäre Phasen bestehen prinzipiell aus organischen oder anorganischen Komponenten. Die Verwendung rein organischer Verbindungen bietet den Vorteil einer sehr guten pH-Stabilität und darüber hinaus eine große Variationsbreite der Synthese durch die Gelegenheit, einfache Modifikationen mit vielen verschiedenen funktionellen Gruppen durchzuführen.

Auf der anderen Seite überzeugen die als Trägermaterialien eingesetzten anorganischen Kieselgele aufgrund ihrer Druckstabilität und leichten Modifizierbarkeit. Ein großes Problem bleibt jedoch die geringe pH-Stabilität, welche die Anwendung der Kieselgele nur im pH-Bereich von 2-8 erlaubt. Außerdem sind oft Metallverunreinigungen vorhanden, die zusammen mit den freien Silanolgruppen auf der Kieselgeloberfläche zu unerwünschten Wechselwirkungen mit den Analyten führen können und bei chromatographischen Trennungen sehr breite Signale nach sich ziehen.

Um die genannten Nachteile zu umgehen, wird häufig versucht die Kieselgeloberfläche mit einem Polymer zu umschließen^[72-74] und so organische/anorganische Hybridphasen darzustellen, welche ausschließlich die positiven Eigenschaften beider Materialien besitzen.

4.4.1 Untersuchung der molekularen Erkennung an nativem Kieselgel

Vor der eigentlichen Untersuchung der molekularen Erkennung an modifizierten Kieselgelphasen ist es von Interesse eine Charakterisierung der Wechselwirkung von nativem Kieselgel mit den Analyten durchzuführen. Da durch Modifikation des Kieselgels nicht alle freien Silanolgruppen an der Oberfläche abreagieren, tragen diese gleichzeitig, mit nicht unwesentlichen Beiträgen, zu den Ergebnissen der chromatographischen Trennung bei.

Die nachfolgende Abbildung 32 zeigt das ¹H-HR-MAS-NMR-Spektrum von nativem Kieselgel, welches in Chloroform suspendiert wurde.

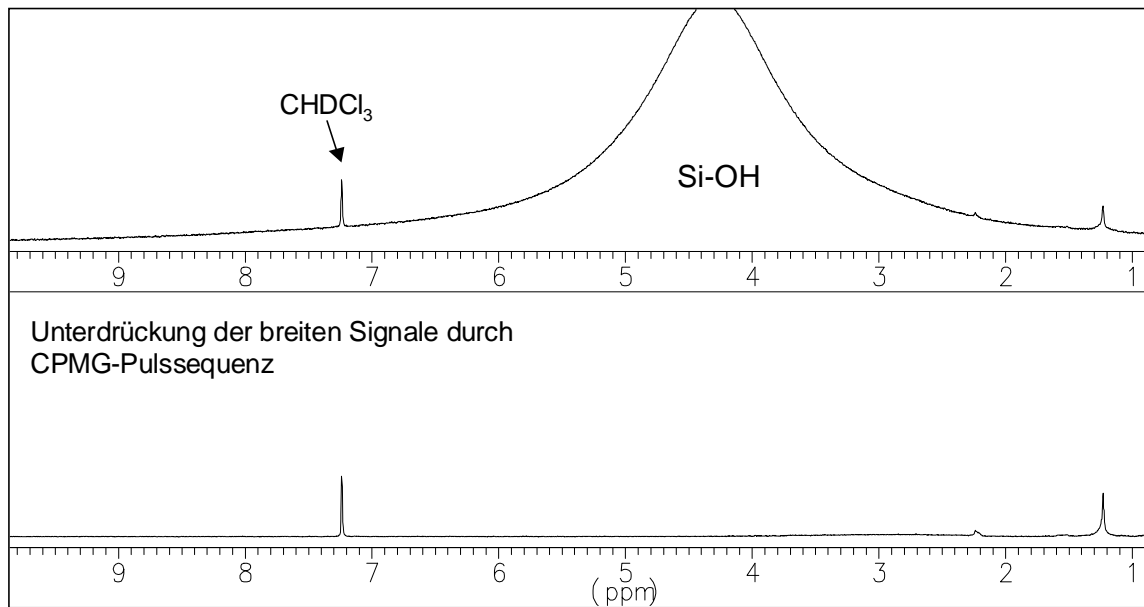


Abbildung 32: ^1H -HR-MAS-NMR-Spektrum von nativem Kieselgel, suspendiert in Chloroform (oben) und das ^1H -NMR-Spektrum, welches mit der CPMG-Pulssequenz aufgenommen wurde, zur Unterdrückung der breiten Kieselgelsignale.

Das ^1H -HR-MAS-NMR-Spektrum des nativen Kieselgels (Abbildung 32, oben) enthält, neben dem Signal des Lösungsmittels Chloroform bei 7.24 ppm, ein sehr breites Signal der Silanolgruppen bei ca. 4.5 ppm. Kieselgel quillt nicht, daher sind die freien Si-OH-Gruppen an der Oberfläche unbeweglich, und es resultieren noch relativ starke dipolare Kopplungen, die auch durch die Suspension und Rotation um den magischen Winkel nicht vollständig gemittelt werden können. Das untere Spektrum wurde durch Aufnahme mit der CPMG-Pulssequenz erhalten, es zeigt sich, dass es möglich ist, das breite Signal der Silanolgruppen vollständig zu unterdrücken, im Vergleich dazu wurde das Signal des Chloroforms davon nicht beeinflusst.

Im nächsten Schritt wurde die Wechselwirkung zwischen nativem Kieselgel und Succinimid als Analyt untersucht. Die entsprechenden ^1H -HR-MAS-NMR-Spektren sind in der Abbildung 33 gezeigt.

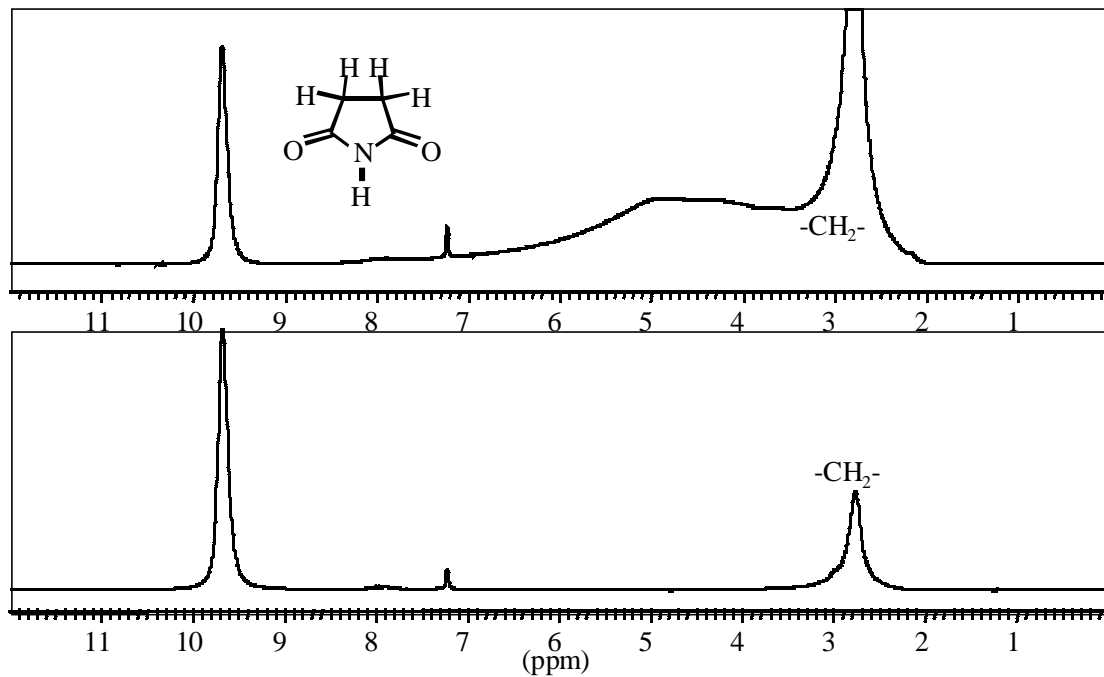


Abbildung 33: Wechselwirkung von nativem Kieselgel mit Succinimid (^1H -HR-MAS-NMR-Spektrum, oben), unten wurde das Spektrum wieder mit der CPMG-Pulssequenz aufgenommen.

Bei der Wechselwirkung von Succinimid mit dem nativem Kieselgel tauchen neben dem Signal der CH_2 -Gruppen bei 2.8 ppm wiederum zwei Signale für die NH-Protonen des Succinimids in unterschiedlichen Bindungszuständen auf. Die Resonanz bei ca. 8 ppm entspricht der chemischen Verschiebung, wenn das Succinimid keine Wechselwirkung zu einem Rezeptor zeigt, während das Signal bei 9.9 ppm durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den Silanolgruppen zustande kommt.

Auch hier ist die Einstellung des Gleichgewichts zwischen freiem und gebundenem Zustand so langsam, dass die beiden Konformationen des Succinimids innerhalb der NMR-Zeitskala durch zwei voneinander getrennte Signale aufgelöst werden können (s. auch Kapitel 4.3.3.1). Eine Vorstellung davon, wie die Wechselwirkung mit den Silanolgruppen im Gleichgewicht zum ungebundenen Succinimid sein könnte gibt die nachfolgende Abbildung 34.

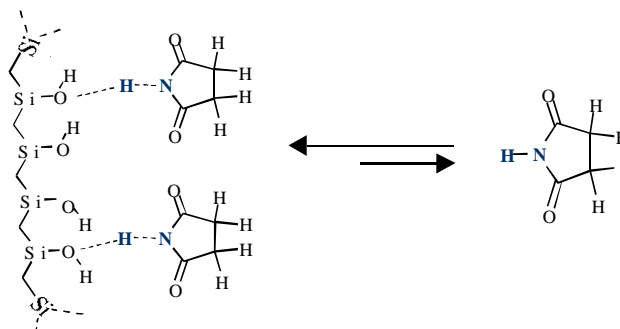


Abbildung 34: Wechselwirkungsmechanismus zwischen Succinimid und den Silanolgruppen des Kieselgels im Gleichgewicht mit freiem Substrat.

Die Wechselwirkungen zwischen den freien Hydroxylgruppen des Kieselgels und dem NH-Proton am Succinimid sind dabei sehr stark. Das spiegelt sich auch in den Intensitätsverhältnissen der beiden Signale wider, von denen die Resonanz bei 9.9 ppm eindeutig eine größere Intensität aufweist. Das Gleichgewicht liegt demzufolge auf der Seite des gebundenen Substrats.

Mit der CPMG-Pulssequenz ist es wieder möglich, das breite Signal der Silanolgruppen bei 4.5 ppm zu unterdrücken und dadurch die Empfindlichkeit des Spektrums zu verbessern.

Um auch in diesem Fall die Zeitabhängigkeit der Wechselwirkungen zu überprüfen, wurde eine Serie von ^1H -HR-MAS-NMR-Experimenten hintereinander aufgenommen. Da das Signal des ungebundenen Succinimids sehr klein ist, wurden, um ein gutes Signal zu Rausch Verhältnis zu erhalten, sehr viele Scans aufsummiert. Die Zeit zwischen zwei Spektren beträgt dadurch eine Stunde.

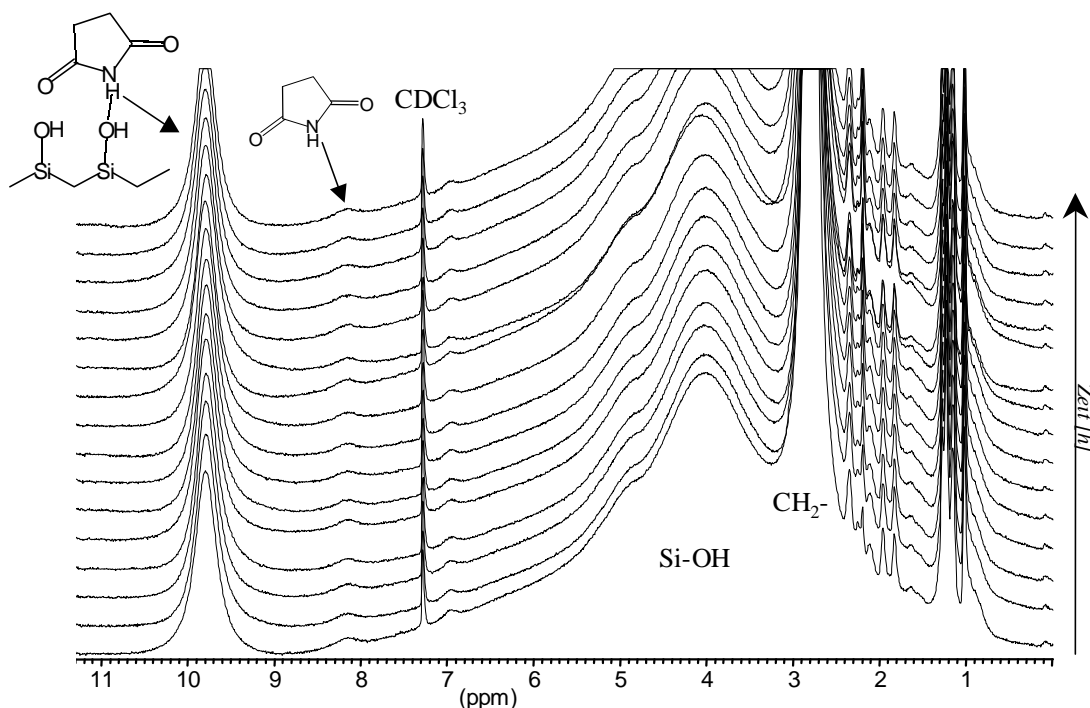


Abbildung 35: Zeitabhängigkeit der Wechselwirkungen zwischen nativem Kieselgel und Succinimid

In den ^1H -HR-MAS-NMR-Spektren der Abbildung 35 sind in Abhängigkeit von der Zeit keine Unterschiede in der molekularen Erkennung zwischen den Silanolgruppen und Succinimid zu erkennen. Da uniforme Rezeptorstellen (OH-Gruppen) zugänglich an der Oberfläche des Kieselgels positioniert sind, liegen prinzipiell wenig verschiedene Erkennungsmechanismen vor. Auch in der Gleichgewichtseinstellung zwischen gebundenem und freiem Substrat ergibt sich keine Änderung, was an der gleichbleibenden Intensitätsverteilung der beiden Signale bei 9.9 und 8.2 ppm zu erkennen ist.

Mit nativem Kieselgel ist es möglich die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu einem Analyten durch eine entsprechende Tieffeldverschiebung zu detektieren. Aufgrund der starken Wechselwirkung können zudem zwei verschiedene Konformationen des Substrats innerhalb der NMR-Zeitskala beobachtet werden.

4.4.2 Wechselwirkungsuntersuchungen mit nativem und Aminopropylkieselgel und Methylphenylhydantoin sowie Methylphenylsuccinimid

Die molekulare Erkennung wurde neben dem nativen Kieselgel auch mit Aminopropylkieselgel als Rezeptormolekül untersucht. Bei diesem Kieselgel sind die freien Silanolgruppen auf der Oberfläche durch den Aminopropylspacer teilweise bedeckt und aufgrund der Belegung schwerer zugänglich. Außerdem verfügt das Aminopropylkieselgel im Gegensatz zum Polymer oder der polymeren Kieselgelphase nur über eine definierte Spezies an Rezeptorstellen. Als Analytmoleküle wurden zwei sterisch anspruchsvollere Verbindungen, Methylphenylhydantoin und Methylphenylsuccinimid, gewählt. Die Substrate besitzen eine annähernd gleiche Struktur, so dass bei der Untersuchung auch Unterschiede in der molekularen Erkennung strukturell ähnlicher Substanzen charakterisiert werden können.

4.4.2.1 Untersuchung der Wechselwirkung mit Methylphenylsuccinimid und APS-Kieselgel

Andere Wechselwirkungsverhältnisse, im Vergleich zum nativen Kieselgel, ergeben sich, wenn die freien Silanolgruppen des Kieselgels durch Aminopropylgruppen abgeschirmt werden. Die Untersuchung der molekularen Erkennung an einem solchen Aminopropylkieselgel (APS-Kieselgel) wurde in diesem Fall mit dem Substrat Methylphenylsuccinimid durchgeführt (s. Abbildung 36).

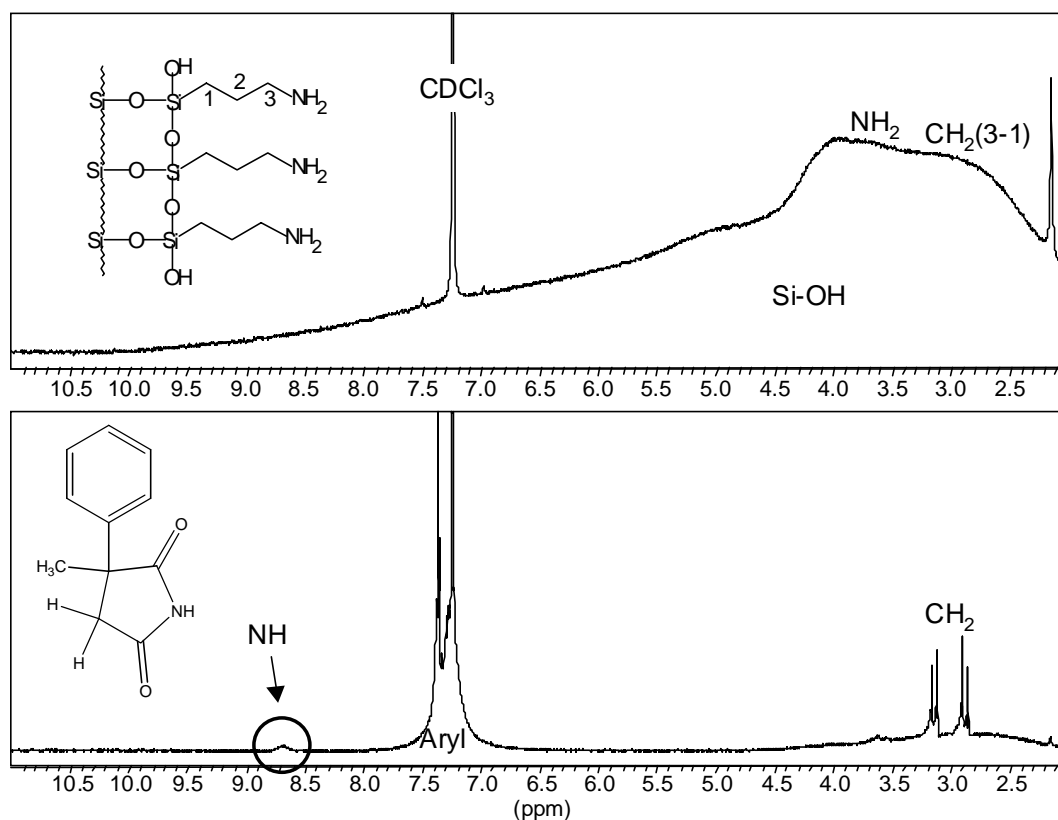


Abbildung 36: ¹H-HR-MAS-NMR-Spektrum von Aminopropylkieselgel (oben), Untersuchung der molekularen Erkennung zwischen dem APS-Kieselgel und Methylphenylsuccinimid (unten)

Das ¹H-HR-MAS-NMR-Spektrum des Aminopropylkieselgels in der Abbildung 36 oben zeigt neben dem wieder sehr breiten Signal der freien Silanolgruppen (ca. 4.5 ppm). Die Resonanzen des Aminopropylspacers liegen zwischen ca. 2.5 ppm und 4.0 ppm (CH₂(3-1)). Das Signal der NH₂-Gruppen hat eine chemische Verschiebung von ca. 3.6 ppm.

Im unteren Spektrum ist die molekulare Erkennung mit Methylphenylsuccinimid nach der Aufnahme mit der CPMG-Pulssequenz zu sehen. Die aromatischen Protonen des Substrats sind dabei durch das Lösungsmittel (7.24 ppm) überdeckt. Bei diesem sind zwei Signale zu beobachten, die von unterschiedlichen Orientierungen des Chloroforms im Kieselgel herühren, ein Phänomen, welches bei den Suspensionsaufnahmen häufiger beobachtet wird. Die CH₂-Gruppe hat eine chemische Verschiebung bei ca. 3.0 ppm. Aufgrund der geminalen Kopplung (²J = 12,4 Hz) der beiden nicht-äquivalenten Protonen der CH₂-Gruppe spaltet das Signal in zwei Dupletts auf (AB-Spektrum).

Für das NH-Proton tritt nur ein Signal bei ungefähr 8.5 ppm auf, welches sowohl den gebundenen als auch den freien Zustand des Substrats charakterisiert. Da die Silanolgruppen zum Teil durch die Aminopropylspacer abgedeckt wurden und die noch verbliebenen wegen

der Modifizierung schlecht zugänglich sind, treten nur sehr schwache Wechselwirkungen auf. Das Resonanzsignal charakterisiert beide Zustände. Da die Wechselwirkungen nicht sehr stark sind läuft die Gleichgewichtseinstellung wesentlich schneller ab, so dass eine Auflösung innerhalb der Zeitskala nicht erreicht werden kann.

Typisch bei den Aminopropylspacern ist auch das Auftreten von protonierten Stickstoffatomen^[75], die durch Wechselwirkung der Aminogruppe mit den Silanolgruppen an der Kieselgeloberfläche zustande kommen (s. Abbildung 37). Durch das Umklappen wird zum einen die Zugänglichkeit der Silanolgruppen für das Substrat erschwert und zum anderen durch die Wechselwirkung zwischen Spacer und Si-OH-Gruppen die Anzahl der zur Verfügung stehenden Rezeptorstellen weiter reduziert.

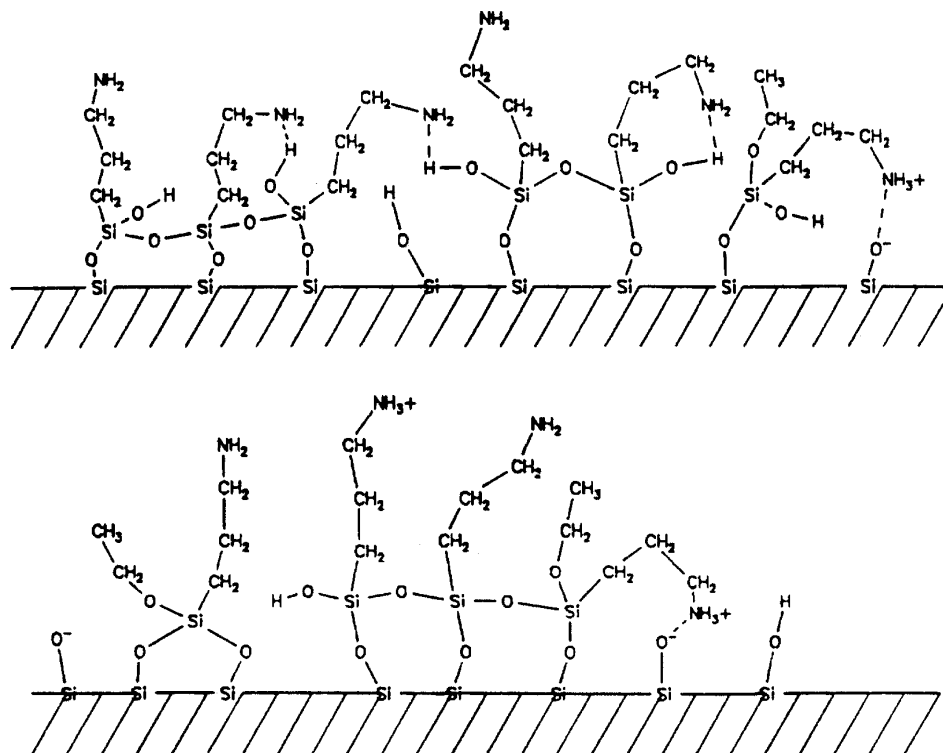


Abbildung 37: Modelle über Wechselwirkung an der Oberfläche von Aminopropylkieselgel

Die nächste Abbildung 38 zeigt die Spektren einer Messreihe, bei der kontinuierlich, ausgehend von der Methylphenylsuccinimidlösung, die Menge an Kieselgel im Rotor erhöht wurde. In der Tabelle 5 sind die chemischen Verschiebungsänderungen der NH-Signale in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge an Rezeptoren dargestellt.

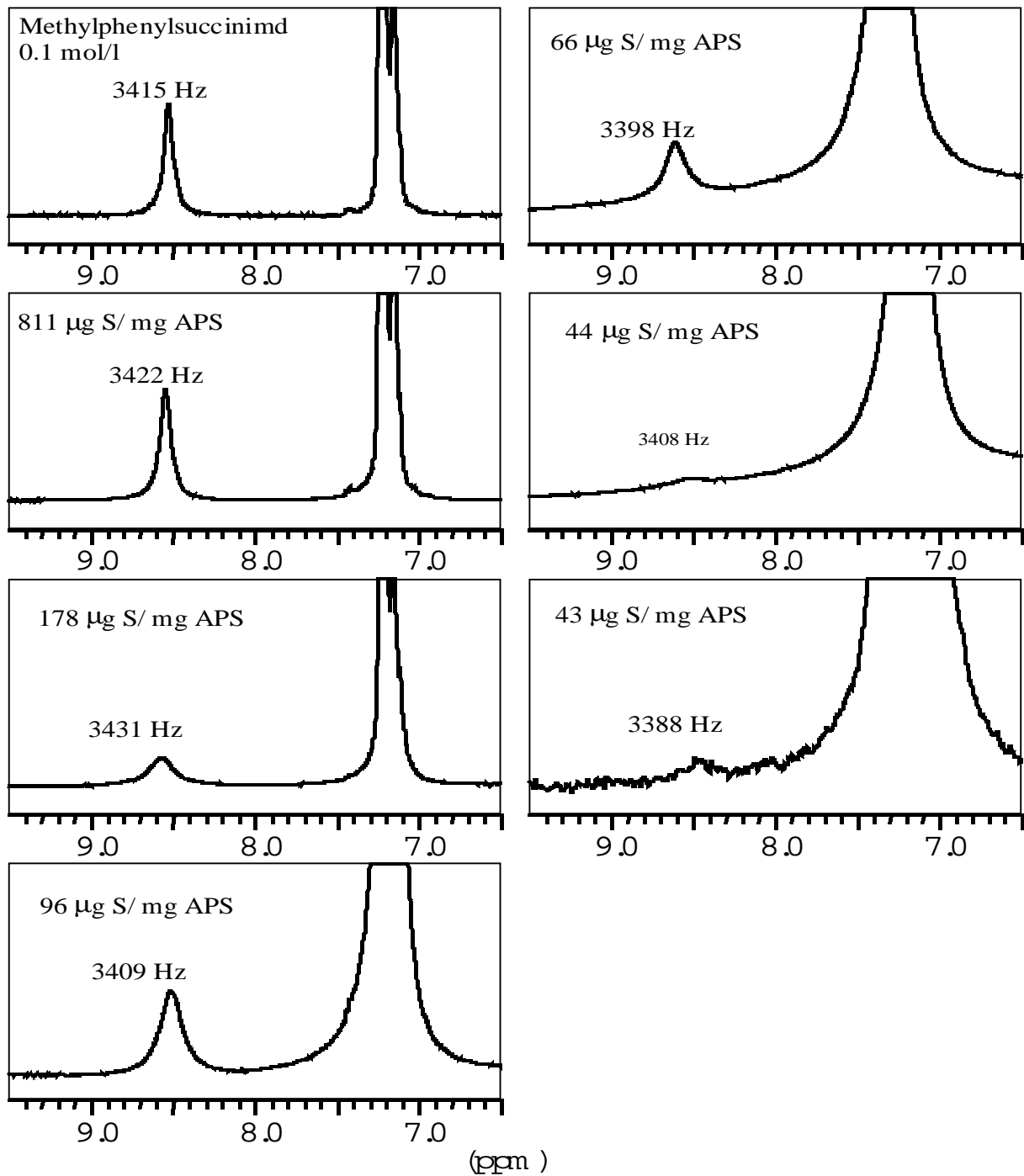


Abbildung 38: Molekulare Erkennung zwischen Methylphenylsuccinimid (0.1 mol/l) und APS-Kieselgel in Abhängigkeit von der zugegebenen Kieselgelmenge. Abnahme der Substratmenge von oben nach unten und von links nach rechts.

Proben	δ_{NH} [Hz]	Menge Kieselgel [mg]	Menge Substrat [μg]	μg Substrat (mg Kieselgel)
Me-Phi-SI	3415	-	741	-
+APS / 2	3422	0,8	649	811
+APS / 3	3431	3,9	697	178
+APS / 4	3409	9,7	931	96
+APS / 5	3398	13,7	906	66
+APS / 6	3408	20,2	869	44
+APS / 7	3388	17,7	769	43

Tabelle 5: Chemische Verschiebung des NH-Signals von Methylphenylsuccinimid in Gegenwart von unterschiedlichen Mengen an APS-Kieselgel.

Die Änderung der chemischen Verschiebung des NH-Signals von Methylphenylsuccinimid in Abhängigkeit von der zugegebenen Kieselgelmenge ist sehr gering (Abbildung 38/ Tabelle 5). Bei einer Differenz von ca. 770 mg Substrat pro mg Kieselgel ergibt sich insgesamt nur eine chemische Verschiebungsänderung von 40 Hz. Dieser Wert ist zu gering, um bei dieser Messreihe von einer definierten Wechselwirkung zwischen Methylphenylsuccinimid und dem Aminopropylkieselgel sprechen zu können. Bei der Auswertung der Spektren kommt erschwerend hinzu, dass das NH-Signal des Substrats mit zunehmender Menge an Kieselgel breiter wird, dadurch ist eine exakte Ermittlung der chemischen Verschiebung dieses Signals mit einem größeren Fehler behaftet als bei kleineren Kieselgelmengen, bei denen das NH-Signal schärfer ist.

4.4.2.2 Untersuchungen zur Wechselwirkung mit Methylphenylhydantoin und APS-Kieselgel

Eine der ersten Messreihe entsprechende ist mit Methylphenylhydantoin als Substrat und Aminopropylkieselgel durchgeführt worden. Die dazugehörigen ^1H -Suspensions-MAS-NMR-Spektren zeigt die folgende Abbildung 39, die betreffenden Parameter werden in Tabelle 6 präsentiert.

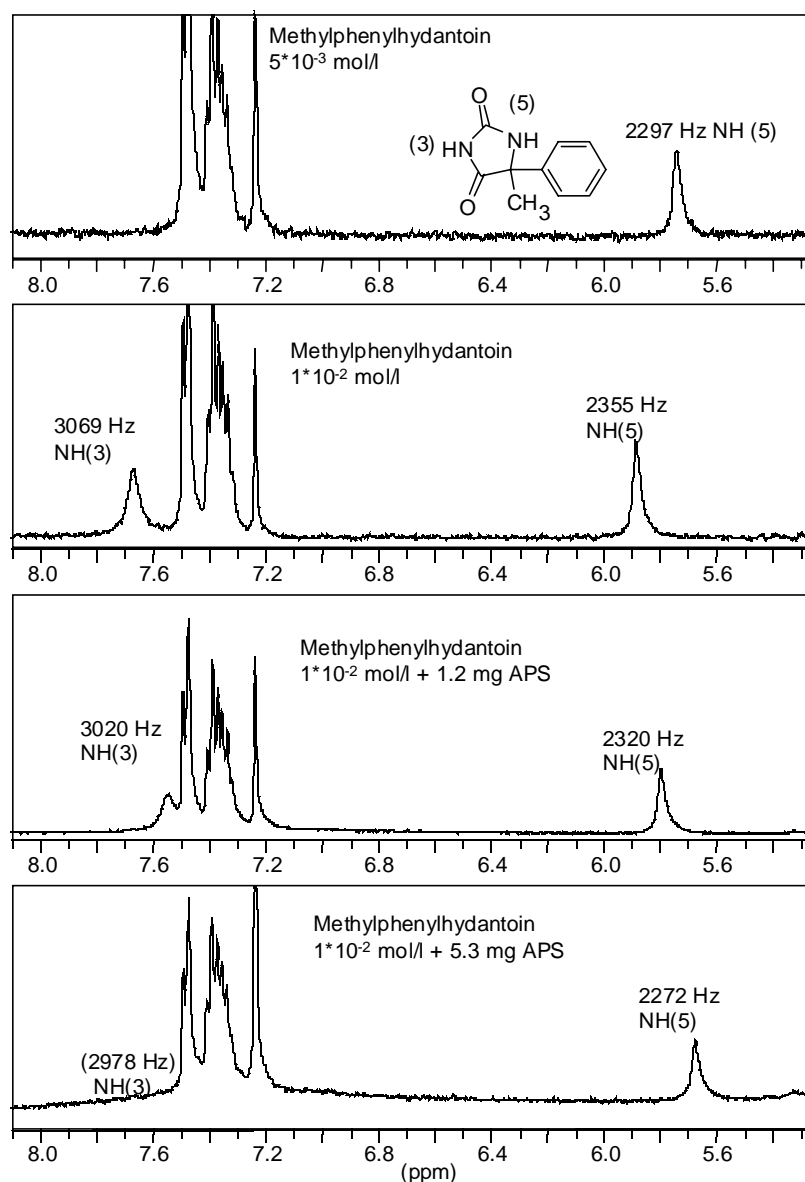


Abbildung 39: ^1H -Suspensions-MAS-NMR-Spektren von Methylphenylhydantoin reine Lösung $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l (1. Spektrum), 10^{-2} mol/l (2. Spektrum), 10^{-2} mol/l mit 1,2 mg APS (3. Spektrum), mit 5,3 mg APS (4. Spektrum)

Probe	Menge Substrat [μg]	Menge Kieselgel [mg]	μg Substrat/ mg Kieselgel	δ NH(3)	δ NH(5)
Methylphenylhydantoin $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l	37.3	-	-	-	2297
Methylphenylhydantoin 10^{-2} mol/l	97.0	-	-	3069	2355
+ APS (1.2 mg)	88.5	1.2 mg	74	3020	2320
+ APS (5.3 mg)	83.0	5.3 mg	16	(2978)	2272

Tabelle 6: Chemische Verschiebungsänderungen der NH-Signale in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge an APS-Kieselgel

Zunächst ist eine Konzentration an Methylphenylhydantoin von $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l eingewogen worden. Die NMR-spektroskopische Untersuchung mit der HR-MAS-NMR-Technik (Abbildung 39) zeigt, dass die Konzentration zu gering ist und dadurch das Signal des NH-Protons (3), welches sich zwischen zwei Carbonylgruppen befindet, von den Signalen der aromatischen Protonen verdeckt wird. Durch die Verdoppelung der Konzentration und die stärkere Selbstassoziation des Substrats tritt eine Tieffeldverschiebung auf, und die NH-Signale (3 und 5) können eindeutig zugeordnet werden (3069 Hz und 2355 Hz).

Im nächsten Schritt (3. Spektrum) wurde in den bereits mit Methylphenylhydantoinlösung gefüllten Rotor 1,2 mg Aminopropylkieselgel zugegeben und erneut untersucht. Zu beobachten ist eine Verschiebung beider NH-Signale des Substrats zu höherem Feld (3020 Hz und 2320 Hz) entsprechend einer geringeren Selbstassoziation. Dieser Effekt wird bei der Zugabe von mehr Aminopropylkieselgel (insgesamt 5.3 mg, Spektrum 4) weiter verstärkt ((2978 Hz) und 2272 Hz), und das NH-Signal (3) wird wiederum durch die Signale der aromatischen Protonen verdeckt.

Das Auftreten der Hochfeldverschiebung beider NH-Signale des Substrates lässt auf eine geringere Selbstassoziation schließen. Das kann durch zwei Effekte verursacht werden:

Zum einen kommt es zur Wechselwirkung mit dem Aminopropylkieselgel. Da jedoch nur eine geringe Anzahl von Silanolgruppen zur Verfügung steht, wechselwirkt nur maximal die Hälfte der Substratmoleküle mit dem Kieselgel, wenn die erhaltene chemische Verschiebung des NH-Signals mit der bei einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l verglichen wird. Es ist weiterhin möglich, dass die Wasserstoffbrückenbindungen wiederum so stark sind, dass kein zweites NH-Signal sichtbar ist, welches dem gebundenen Substrat zugeordnet werden kann. Andererseits kann es sein, dass die Wechselwirkungen des Substrates mit dem APS-Kieselgel zu schwach sind, um eine detektierbare chemische Verschiebungsänderung zu verursachen, die Anwesenheit des Kieselgels allerdings die Selbstassoziation des Substrats vermindert.

Von Interesse ist auch die Entwicklung des Signals für das Proton NH(5), welche zu einer Carbonylgruppe benachbart ist, in Abhängigkeit von der zugegebenen Aminopropylkieselgelmenge. Durch die Zugabe von Aminopropylkieselgel tritt eine Hochfeldverschiebung des NH-Signals auf. Das entspricht einer verminderten Selbstassoziation des Substrats infolge der Anwesenheit des Kieselgels. Es zeigen sich keine Effekte, d.h. Tieffeldverschiebung der Signale, die auf eine Wechselwirkung des Substrats mit dem Kieselgel hinweisen. Die exakte Auswertung der Spektren ist wieder durch die große Linienbreite der NH-Signale erschwert.

Im Vergleich der Wechselwirkungen von Methylphenylsuccinimid und Methylphenylhydantoin zu Aminopropylkieselgel zeigen sich Unterschiede in der molekularen Erkennung,

die bei der chromatographischen Anwendung für eine Separation der Analyten verantwortlich ist. Beim Methylphenylsuccinimid treten geringe chemische Verschiebungsänderungen zu tieferem Feld auf. Dieser Effekt bedeutet, dass Wasserstoffbrückenbindungen zu stationären Phasen ausgebildet sind, die jedoch relativ schwach sind. Anders verhält es sich bei Methylphenylhydantoin, hier ist für beide NH-Protonen (3 und 5) eine Hochfeldverschiebung zu beobachten, gleichbedeutend mit einer verminderten Selbstassoziation. Eine Wechselwirkung mit Aminopropylkieselgel kann jedoch nicht detektiert werden. Aufgrund dieser unterschiedlicher Wechselwirkungen sollte eine chromatographische Trennung der Substrate möglich sein. Die vorgestellten Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass Methylphenylhydantoin als nicht-wechselwirkender Analyt zuerst eluiert.

Anders verhält es sich jedoch, bei den chromatographischen Untersuchungen und weiteren Resultaten durch das trNOESY-Experiment.^[76] Dabei zeigt sich, dass die Wechselwirkungen mit Methylphenylhydantoin wesentlich stärker sind und bei der chromatographischen Trennung wird dieses erst nach Methylphenylsuccinimid eluiert. Diese Gesichtspunkte zeigen, dass für eine Beurteilung des Wechselwirkungsverhaltens chromatographischer Trennphase mehrere Parameter herangezogen werden müssen und detaillierte Informationen über die Erkennungsmechanismen sind erst durch eine gemeinsame Analyse von chromatographischen und spektroskopischen Resultaten zu erhalten.

4.4.3 Molekulare Erkennung an stationären Kieselgelphasen

Zunächst wurden drei Kieselgelphasen mit der ^1H -HR-MAS-NMR-Spektroskopie charakterisiert. Bei den Proben handelt es sich um natives Kieselgel, welches mit einer Lage Polyallylacetatbenzoylurethan zu sieben Prozent derivatisiert wurde (PAA-BzIO-Urethan-1), mit zwei Schichten Polymer sowie zu zwei Prozent mit Dodecandisäure vernetzt (PAA-BzIO-Urethan-2), mit drei Schichten PAA-BzIO-Urethan und gleichem Vernetzungsgrad (PAA-BzO-Urethan-3). Die entsprechenden ^1H -HR-MAS-NMR-Spektren sind in der folgenden Abbildung 40 zu sehen.

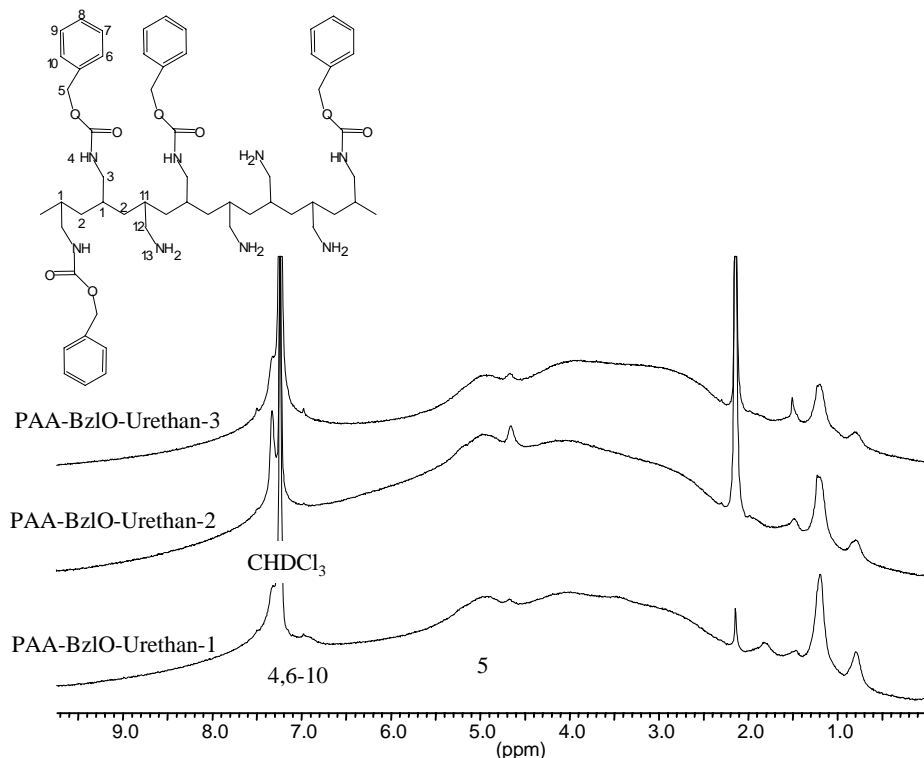


Abbildung 40: ^1H -HR-MAS-NMR-Spektren der polymeren Kieselgelphasen, PAA-BzlO-Urethan-1 (unten), PAA-BzlO-Urethan-2 (Mitte), PAA-BzlO-Urethan-3 (oben)

In den drei Spektren der Abbildung sind keine wesentlichen Unterschiede in den Linienbreiten der Signale zu erkennen, was auf eine größere Mobilität durch die höhere Beschichtung mit Polymer zurückzuführen wäre (vgl. PAA-BzlO-Urethan-1 mit -3). Einschränkend auf die Beweglichkeit wirkt sich jedoch die zusätzliche Quervernetzung der einzelnen Polymerschichten mit Dodecandisäure (Phase 2 und 3) aus, resultierend ergibt sich dadurch für alle drei Verbindungen die gleiche Beweglichkeit.

Die weiteren Untersuchungen zur Wechselwirkung mit dem Substrat Succinimid wurden mit der dreifach beschichteten Phase PAA-BzlO-Urethan-3 durchgeführt.

Zunächst wurde eine Probe anhand einer Messreihe von fünfzehn ^1H -Suspensions-MAS-NMR-Experimenten untersucht, die mit einer 0.1 mol/l Succinimidlösung präpariert wurde. Die Untersuchung der zeitlichen Abhängigkeit der Wechselwirkung wurde überprüft, um eventuelle Änderungen in der molekularen Erkennung der stationären Phase zu erkennen. Eine Verschiebungsänderung oder das Auftauchen von unterschiedlich vielen Signalen würde bedeuten, dass die Quervernetzung des Polymers nicht ausreichend ist damit stabile Rezeptortaschen gebildet werden, in denen das Substrat sehr spezifisch wechselwirkt.

Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in der nachfolgenden Abbildung 41 gezeigt.

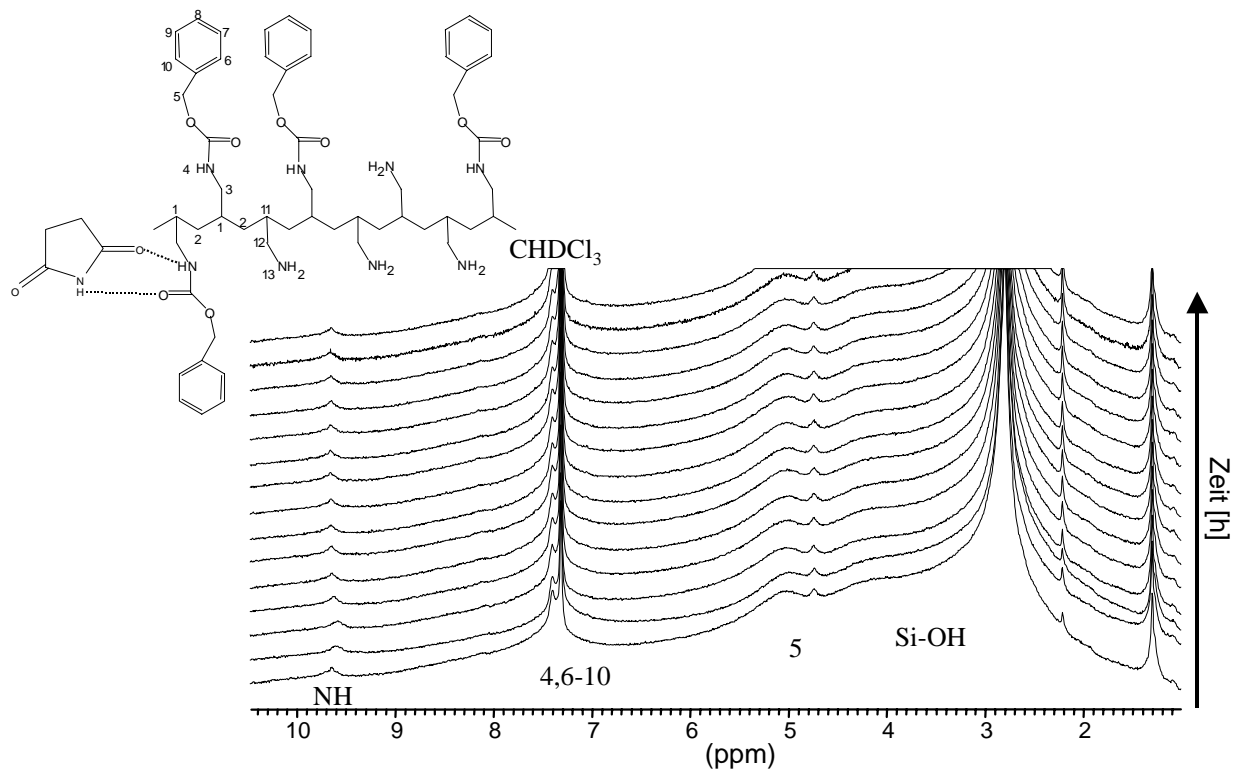


Abbildung 41: zeitabhängige Untersuchung der molekularen Erkennung zwischen der polymeren Phase PVBzIOAc und Succinimid (0.1 mol/l)

Deutlich sichtbar sind die Signale der CH₂-Protonen (5) sowie der NH-Protonen (3859 Hz / 9.6 ppm) im polymer-gebundenen Zustand, nicht sichtbar sind Signale der NH-Protonen im ungebundenen Zustand. Möglicherweise sind diese durch die Polymersignale überdeckt, eventuell liegt sogar kein ungebundenes Succinimid vor. Es zeigt sich auch, dass innerhalb der Messreihe keine Änderung in der chemischen Verschiebung des NH-Signals auftritt, daher kann also davon ausgegangen werden, dass die Ausbildung der Wechselwirkungszentren infolge der Quervernetzung der Polymerschichten mit Dodecandisäure ausreichend erfolgt ist.

Mit der Kieselgelphase PAA-BzIO-Urethan-3 ist eine weitere Messreihe durchgeführt worden, bei der die Succinimidkonzentration auf 0.001 mol/l vermindert wurde. Es ist hierbei versucht worden, die chromatographischen Bedingungen so weit wie möglich nachzuvollziehen. Es war jedoch nicht möglich in den Spektren NH-Signale des Succinimids zu detektieren, die entweder durch Polymersignale überdeckt oder aufgrund der starken Wechselwirkung zur Phase stark verbreitert und dadurch nicht mehr vom Untergrundrauschen des Spektrums zu unterscheiden sind.

4.4.4 Veränderung der molekularen Erkennung durch Acetonitrilbeimischungen

Durch Zugabe des im Vergleich zu Chloroform polaren Lösungsmittels Acetonitril wird versucht, ein Konkurrenz-molekül in das Gleichgewicht einzubringen. Infolgedessen werden die Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Substrat geschwächt und NH-Succinimid-Signale besser detektierbar, da diese weniger stark verbreitert werden aufgrund der höheren Mobilität der Substratmoleküle

Die Experimente sind mit einer Succinimidkonzentration von 0.25 und 0.1 mol/l durchgeführt worden. Acetonitril wurde zu 5, 10 und 15 % dem Lösungsmittel Chloroform beigemischt. Zunächst sind die chemischen Verschiebungsänderungen des Succinimids ohne Wechselwirkung mit der stationären Phase PAA-BzlO-Urethan-3 charakterisiert worden (s. Abbildung 42). Im Anschluss daran erfolgte die Untersuchung der Wechselwirkungen an der stationären Phase unter Zugabe von Acetonitril.

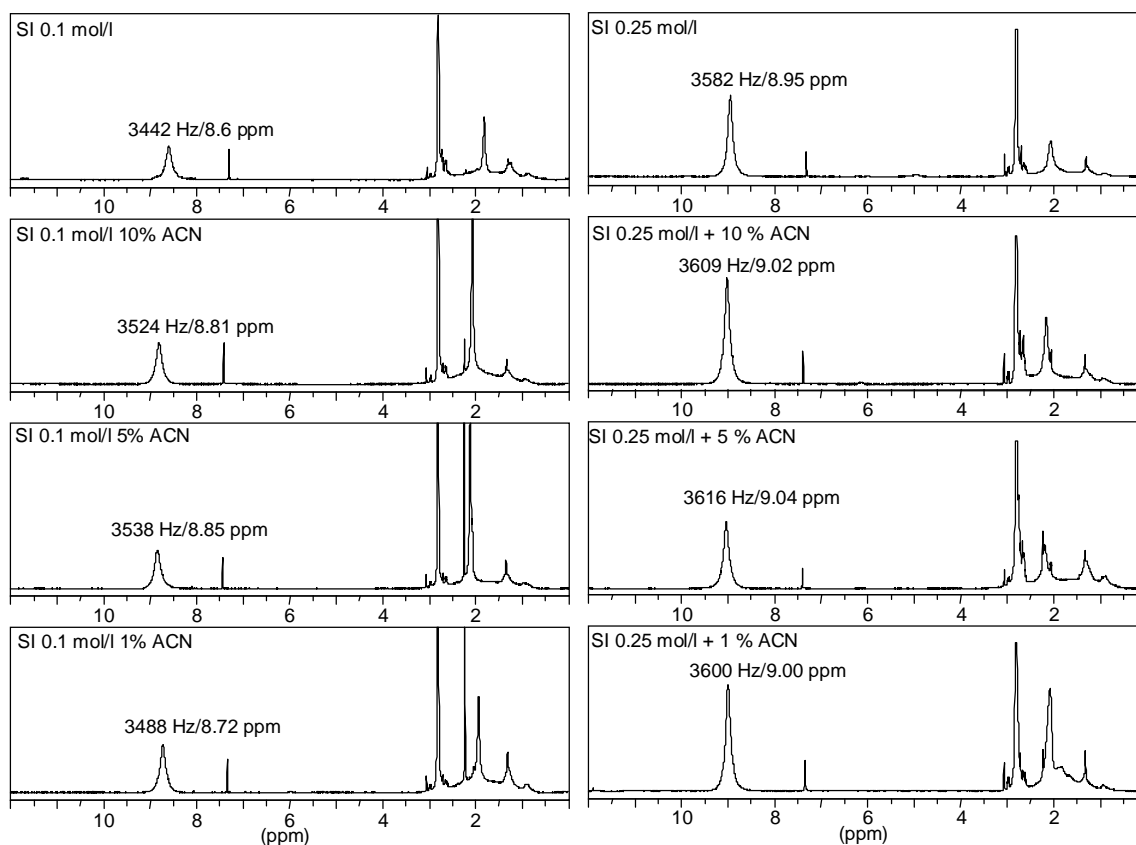


Abbildung 42: Wechselwirkungsstudien mit einer Konzentration an Succinimid von 0.1 (links) und 0.25 (rechts) mol/l und der Phase PAA-BzlO-Urethan-3, sowie unterschiedlichen Acetonitrilbeimischungen (1 % unten, 5 % Mitte, 10 % zweites Spektrum von oben)

In der nachfolgenden Tabelle 7 ist eine Übersicht der chemischen Verschiebungsänderung von NH-Succinimid-Signalen in Abhängigkeit von der Konzentration und der Acetonitrilbeimischung dargestellt.

Succinimid-konzentration [mol/l]	Menge an Acetonitril [%]	Chemische Verschiebung $\delta(\text{NH})$
0.1	-	3422 Hz/ 8.60 ppm
0.1	1	3488 Hz/ 8.72 ppm
0.1	5	3538 Hz/ 8.85 ppm
0.1	10	3524 Hz/ 8.81 ppm
0.25	-	3582 Hz/ 8.95 ppm
0.25	1	3600 Hz/ 9.00 ppm
0.25	5	3616 Hz/ 9.04 ppm
0.25	10	3609 Hz/ 9.02 ppm

Tabelle 7: Chemische Verschiebung der NH-Succinimid-Protonen in Abhängigkeit von der Konzentration und Acetonitrilbeimischung

Durch die Zugabe von Acetonitril tritt eine Tieffeldverschiebung der NH-Succinimid-Signale auf. Bei einer Konzentration von 0.1 mol/l Succinimid ist diese mit ca. 80 Hz stärker ausgeprägt, als bei 0.25 mol/l Succinimid (~ 30 Hz). Grundsätzlich liegt bei einer Konzentration von 0.25 mol/l eine stärkere Tieffeldverschiebung vor, das ist gleichbedeutend mit einer stärkeren Selbstassoziation der Moleküle. Bei der höheren Konzentration überwiegt die Wahrscheinlichkeit, dass Succinimid-Moleküle aufeinander treffen und miteinander wechselwirken. Im Gegensatz dazu liegen bei der geringeren Succinimidkonzentration weniger Moleküle vor. Wird nun ein weiterer Akzeptor angeboten, sind die dadurch auftretenden Effekte größer, als bei höherer Konzentration.

Zusätzlich treten noch Veränderungen zwischen 1% Acetonitril und 5% auf, dagegen kaum noch beim Übergang zu 10% Acetonitril. Bei 5% Acetonitril scheint eine Sättigungskonzentration vorzuliegen, bei der ein Maximum an Tieffeldverschiebung erreicht wird, welches durch eine höhere Konzentration an Acetonitril nicht mehr gesteigert werden kann. In den nachfolgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der Wechselwirkungsstudien mit den diskutierten Succinimidkonzentrationen und der Phase PAA-BzlO-Urethan-3 zu sehen.

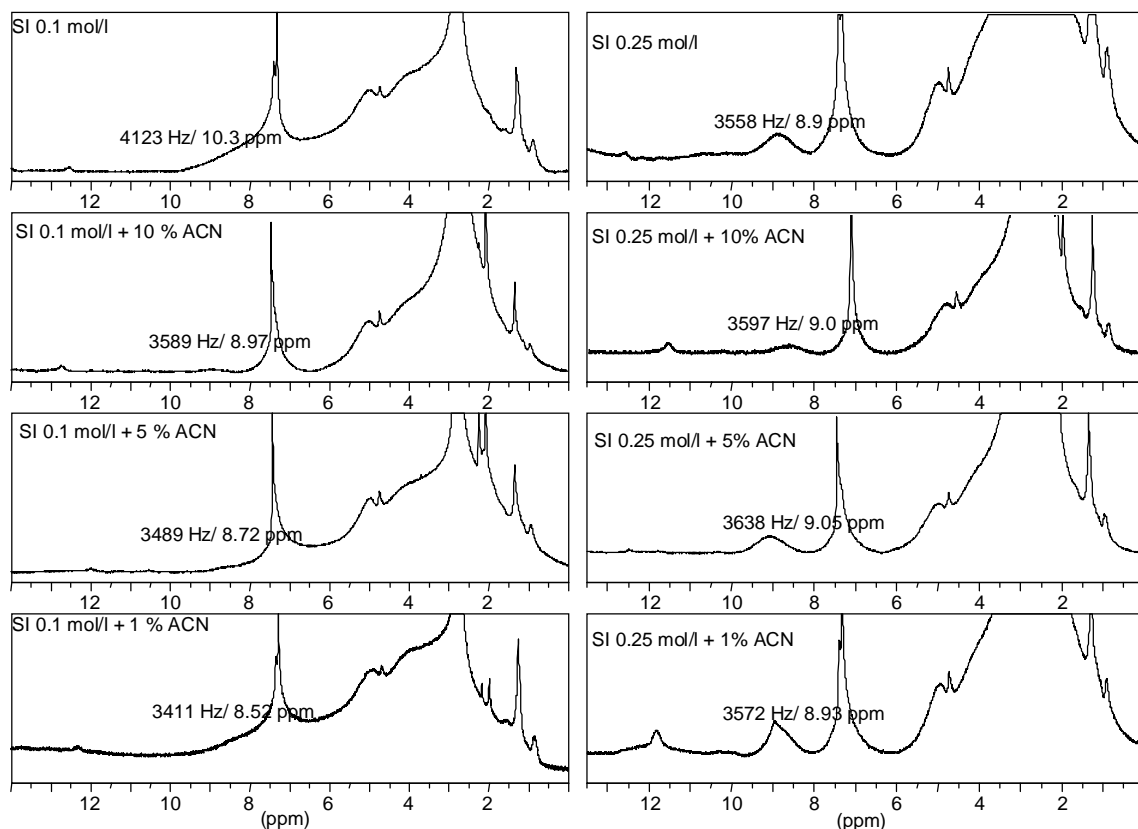


Abbildung 43: Wechselwirkungsstudien mit einer Succinimidkonzentration von 0.1 (links) sowie 0.25 mol/l (rechts) und der Phase PAA-BzlO-Urethan-3 mit unterschiedlichen Acetonitrilbeimischungen

Bei der Konzentration von 0.1 mol/l Succinimid (Abbildung 43, links) ist es aufgrund der geringen Signalintensitäten schwierig, definierte Zuordnungen zu machen. Im Spektrum der Probe ohne Acetonitrilbeimischung lässt sich nur ein Signal bei ca. 10 ppm erkennen, das allerdings durch die breiten Signale des Kieselgels stark überlagert ist und den Protonen im polymergebundenen Zustand entspricht. Ein weiteres Signal der freien Succinimid-NH-Protonen ist aufgrund des breiten Untergrunds des Kieselgels nicht zu detektieren. Mit zunehmender Konzentration an Acetonitril tritt eine Tieffeldverschiebung des NH-Signals auf, welches den freien Protonen zugeordnet werden kann. Acetonitril tritt als Konkurrenz zur Phase auf. Mit zunehmender Acetonitrilkonzentration steigt der Anteil der Wechselwirkungen zwischen Succinimid und Acetonitril und damit kommt es zur stärkeren Tieffeldverschiebung des Signals. Vermutlich handelt es sich hierbei um ein Mischsignal, welches aus der chemischen Verschiebung von freiem (selbstassoziertem) Succinimid und mit Acetonitril wechselwirkendem Succinimid entstanden ist.

Mit der Konzentration von 0.25 mol/l Succinimid (Abbildung 43, rechts) tritt nach Zugabe von Acetonitril, der bereits bei der reinen Lösung (ohne Phase) beobachtete Effekt einer Tieffeldverschiebung des NH-Signals auf. Die Verschiebungsänderung ist auch hier geringer

als bei der kleineren Konzentration, weil ebenfalls die höhere Konzentration der Succinimidmoleküle eine gewichtigere Rolle spielt, wie das schon bei den Versuchen ohne Phase diskutiert wurde. Eine definierte Zuordnung von gebundenen NH-Protonen ist wiederum wegen der überaus geringen Intensität nicht durchführbar.

Die nachfolgende Tabelle 8 zeigt nochmals eine Übersicht der chemischen Verschiebungen der NH-Succinimid-Protonen in Abhängigkeit der Succinimidkonzentration und der Acetonitrilbeimischung:

Succinimidkonzentration [mol/l]	Acetonitril [%]	Chemische Verschiebung NH-Succinimid
0.1	-	4123 Hz/ 10.3 ppm
0.1	1	3411 Hz/ 8.52 ppm
0.1	5	3489 Hz/ 8.72 ppm
0.1	10	3589 Hz/ 8.97 ppm
0.25	-	3558 Hz/ 8.90 ppm
0.25	1	3572 Hz/ 8.93 ppm
0.25	5	3638 Hz/ 9.05 ppm
0.25	10	3597 Hz/ 9.00 ppm

Tabelle 8: Chemische Verschiebung der NH-Protonen in Abhängigkeit von der Konzentration und Acetonitrilbeimischung bei Wechselwirkung mit der Phase PAA-BzIO-Urethan-3

Generell ist es möglich durch Zugabe eines polareren Lösungsmittels das Gleichgewicht der Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Substrat zu verändern.

Als Konkurrenz zu diesem Gleichgewicht treten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Succinimid und Acetonitril auf, die zu einer Tieffeldverschiebung des Signals der freien NH-Protonen führen (evtl. Mischsignal). Gründe für das Auftreten von Wechselwirkungen zwischen Substrat und Acetonitril könnten Entropie- und Enthalpieeffekte sein.

Vermutlich tritt das Acetonitril auch mit den Rezeptorstellen der Phase in Wechselwirkung und verändert so wiederum das Gleichgewicht in Richtung des „freien“, nicht-polymergebundenen Substrats.

4.4.5 Untersuchungen mit Hydantoinen

In den folgenden Untersuchungen wurde versucht, durch die Verwendung von Lösungsmittelgemischen die chromatographischen Bedingungen noch mehr anzupassen. Bei Zugabe von 5 % Acetonitril wird die Bindungsaffinität des Substrats zum Rezeptor reduziert. Für die Chromatographie ergibt sich dadurch eine schnellere Separation, und die Analyten werden vollständig von der Trennsäule eluiert. In der NMR-Spektroskopie ist zum einen eine geringere chemische Verschiebungsänderung zu erwarten und zum anderen sollte die Linienbreite der Signale reduziert werden, da die Wechselwirkungen erwartungsgemäß schwächer sind. Mit dem Substrat Diphenylhydantoin wurde zusätzlich ein sterisch anspruchsvollerer Analyt gewählt, bei dem zu erwarten ist, dass die Wechselwirkung zu stationären Phasen aufgrund der anspruchsvolleren Konformation schwächer ist.

Zunächst wurde das Substrat Diphenylhydantoin mit einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l in einem Lösungsmittelgemisch Chloroform/Acetonitril (5%) unter Suspensionsbedingungen untersucht. Das zugehörige Spektrum zeigt die folgende Abbildung 44.

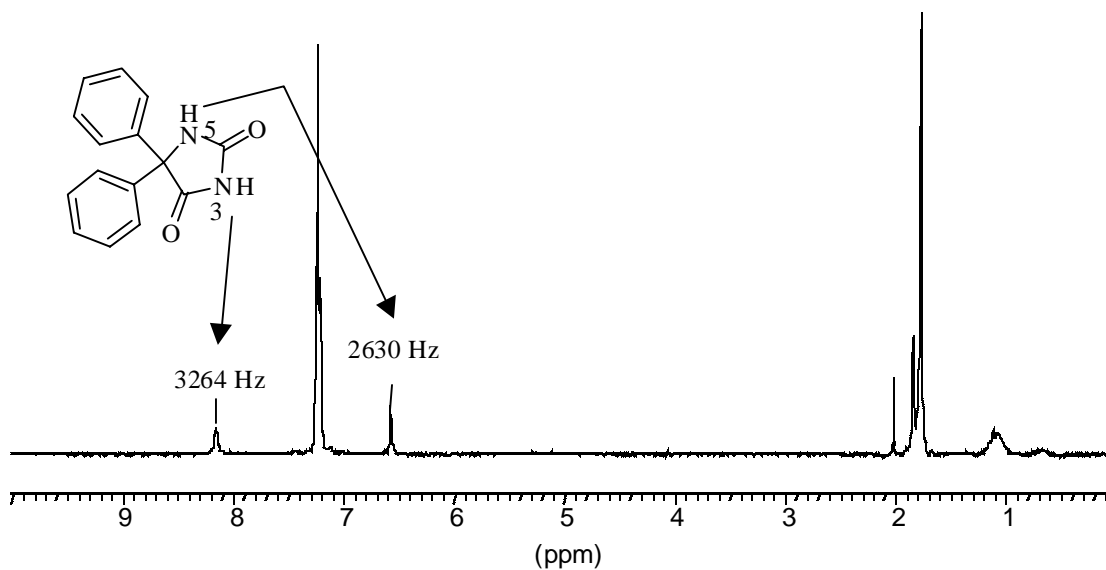


Abbildung 44: ^1H -Spektrum von Diphenylhydantoin ($5 \cdot 10^{-3}$ mol/l) im Lösungsmittelgemisch 5% Acetonitril/Chloroform unter Suspensionsbedingungen.

Bei 6.6 und 8.2 ppm sind die Resonanzen der NH-Protonen (H(3) und H(5)) des Diphenylhydantoins zu sehen. Die Signale der aromatischen Protonen liegen unter dem Lösungsmittelsignal des Chloroforms bei 7.24 ppm, die chemische Verschiebung des Acetonitrils ist bei 1.9 ppm. Die nächste Abbildung 45 zeigt das ^1H -HR-MAS-NMR-Spektrum der Phase PAA-BzIO-Urethan-3 zusammen mit einer Konzentration von $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l Diphenylhydantoin.

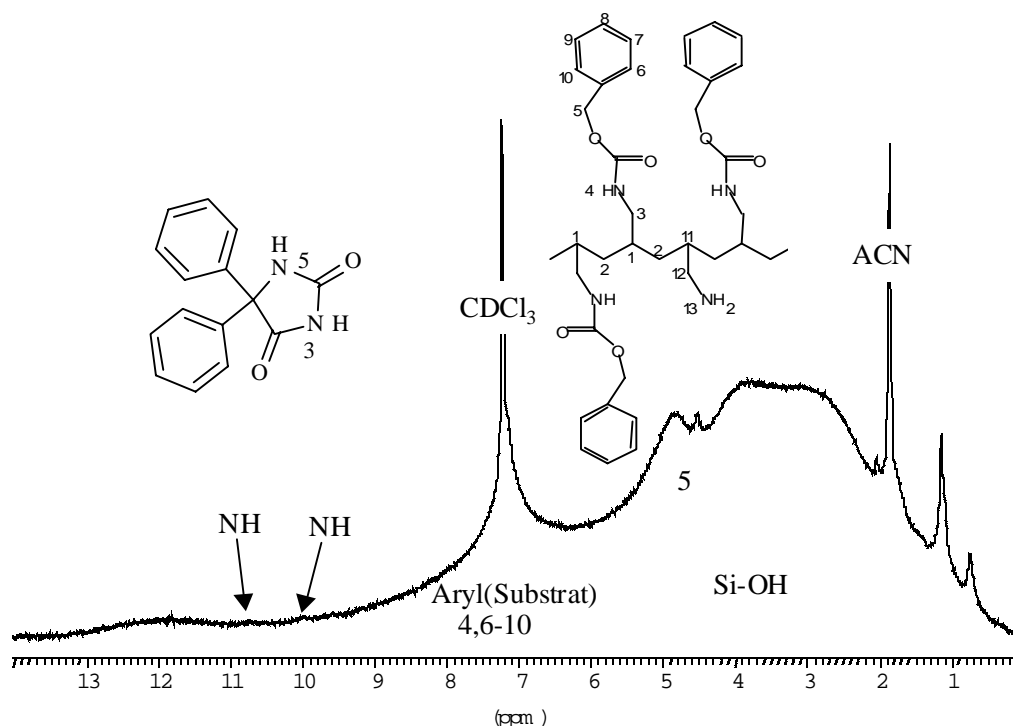


Abbildung 45: ¹H-HR-MAS-NMR-Spektrum der Phase PAA-BzIO-Urethan-3 in Wechselwirkung mit Diphenylhydantoin ($5 \cdot 10^{-3}$ mol/l); Lösungsmittelgemisch Chloroform/ Acetonitril 5%

Neben den Signalen der stationären Phase PAA-BzIO-Urethan-3 bei 7.24 ppm (4,6-10) und ca. 5 ppm (benzyliche CH₂-Gruppe) sind zusätzlich Resonanzen des Analyten zu sehen. Die aromatischen Protonen erscheinen im gleichen Bereich wie das Lösungsmittel Chloroform (7.24 ppm). Bei 10.8 und 10 ppm sind zwei äußerst kleine Signale sichtbar, die den Protonen der NH-Gruppen des Diphenylhydantoin zugeordnet werden. Es erscheint recht unwahrscheinlich, dass für das Proton NH(5) eine Tieffeldverschiebung von mehreren ppm auftritt, zumal diese NH-Gruppe, da nur zu einer Seite einer elektronenziehenden Carbonylgruppe benachbart, weniger acide ist als das Proton NH(3). Wesentlich glaubhafter erscheint, dass die beiden Signale bei 10 und 10.8 ppm Wechselwirkungskonformationen der NH-Gruppe (3) mit der stationären Phase zuzuschreiben sind. Sollte eine vergleichbare chemische Verschiebungsänderung für das Proton NH(5) auftreten, so sind die entsprechenden Signale durch das Polymergrundgerüst bzw. Lösungsmittel und Resonanzen der aromatischen Protonen überdeckt.

Mit der HR-MAS-NMR-Spektroskopie ist es generell möglich, Wechselwirkungen an stationären Phasen zu untersuchen. Obendrein können je nach Phase und Analytmolekül Unterschiede in der molekularen Erkennung detektiert werden, die zur Aufklärung der verschiedenen Wechselwirkungsmechanismen entscheidend beitragen und einen wesentlichen Anteil zur Optimierung der chromatographischen Bedingungen liefern.

5 Chirale Erkennung an stationären Kieselgelphasen

5.1 Motivation

Racemische Wirkstoffe stellen fixe 1:1 Kombinationen aus zwei Enantiomeren, die zumeist eine unterschiedliche Toxikologie aufweisen, dar.^[77] Deshalb sollte für die therapeutische Anwendung eine Verabreichung von Racematen weitgehend vermieden werden. Aus diesem Grund ist die Racemattrennung für die Herstellung enantiomerenreiner Arzneistoffe ein äußerst wichtiges Gebiet geworden. Zu einem der bedeutungsvollsten Instrumente für effiziente Enantiomerentrennungen hat sich die Kapillar-Elektrochromatographie (CEC) entwickelt. Das Hauptinteresse der Forschung ist dabei vor allem auf die Übertragung etablierter Anwendungen von der HPLC zur CEC gerichtet. Die gebräuchlichen Technologien verwenden gepackte Trennkapillaren, welche mit chiralen stationären Phasen (CSP) gefüllt sind, die meisten davon basieren auf modifiziertem Kieselgel.

Es gibt eine große Vielzahl von enantioselektivem Trennmaterial mit typischen Selektoren wie Proteine^[78,79], derivatisierte Cyclodextrine^[80-83] z.B. Chirasil-Val^[84,85], Antibiotika, wie Vancomycin und Teicoplanin^[86-88], chinin-derivatisierte chirale Ionenaustauscher^[89-91] und Pirkle's „Bürstentyp“ Selektoren^[92]. In ähnlichem Maße wurden Kieselgelpartikel, die mit polymeren chiralen Phasen ummantelt sind, auf der Grundlage von Polyacrylamid^[93], Poly(diphenyl-2-pyridylmethylmetacrylat)^[94] und Polysacchariden^[93,95-98] synthetisiert sowie erfolgreich für die Trennung von Enantiomeren eingesetzt.

Die Entwicklung monolithischer chromatographischer Phasen für die enantioselektive CEC hat zur Reduktion vieler Probleme der gepackten Kapillarsäulen, wie z.B. uneffektive Kontrolle der Stärke und Richtung des EOFs wegen der verbliebenen Silanolgruppen auf der Kieselgeloberfläche, geführt. Vor allem die Verwendung von Chinidincarbamat, welches über die erforderlichen Eigenschaften zur Bildung des EOFs und der chiralen Erkennung verfügt, ermöglicht die Enantiomerentrennung mit hoher Effektivität von bis zu 60000 theoretischen Böden/m.^[99]

Strukturell besteht Chinidin aus einem planaren Chinolin und einem rigiden Chinuclidinring, welcher über einen sekundären Methylalkohol verknüpft ist. Insgesamt ist das Molekül semi-rigide und als solches ein vielversprechendes chirales Selektormolekül.

Im Chinidincarbamat zeigt der kationische Chinuclidinring ionische Wechselwirkungen, die Carbamatgruppe enthält Wasserstoffbrückenbindungsstellen und das Chinindingrundgerüst kann über π - π -Wechselwirkungen interagieren.

Zur Charakterisierung der chiralen Erkennung geben chromatographische Methoden in Form des Trennungsfaktors (α) Auskunft, welcher das Verhältnis der individuellen Bindungskonstanten von Selektanten mit räumlich übereinstimmenden Selektoren wiedergibt und ausschließlich Informationen über die relativen Rezeptor-Enantiomer Affinitäten enthält. Die auf diesem Weg erhaltenen enantioselektiven Faktoren sind verknüpft mit den nichtselektiven Bindungseinheiten, welche durch die Supportmatrix, den Spacer und die immobilisierte Spezies verursacht werden, d.h. sie geben nur einen Überblick über alle Wechselwirkungen und sind daher weniger geeignet für eine qualitative oder quantitative Beurteilung der Enantioselektivität chiraler stationärer Phasen.

Aus diesem Grund ist die Untersuchung enantioselektiver Wechselwirkung durch andere experimentelle Techniken unerlässlich. Die NMR-Spektroskopie und hier insbesondere die HR-MAS-NMR-Spektroskopie bieten die Möglichkeit selektiv die Wechselwirkungsmechanismen an der chiralen stationären Phase zu untersuchen. Seit Einführung des transfer NOESY-Experiments (trNOESY), einer Technik, die auf der Abhängigkeit des NOE-Effekts von der Molekülkorrelationszeit beruht ist es darüber hinaus möglich geworden, das Trennverhalten von stationären Phasen mit Substanzbibliotheken im allgemeinen zu überprüfen.

5.2 Grundlagen der trNOESY-NMR-Spektroskopie^[100-102]

Zu Grunde liegt die Tatsache, dass kleine Liganden meist keine oder gering positive bzw. negative NOEs mit sehr kurzer Korrelationszeit τ_C (10^{-10} s) besitzen. Große Moleküle (Proteine) dahingegen haben lange Korrelationszeiten (10^{-8} s) und negative NOEs.

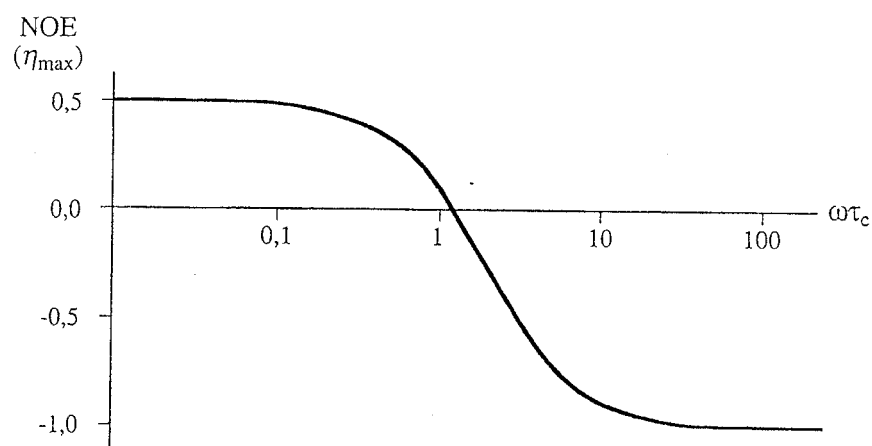


Abbildung 46: Abhängigkeit des NOE von der Larmorfrequenz ω und Korrelationszeit τ_c

Das trNOE-NMR-Experiment wird als Screening-Methode zur Untersuchung von biologischen Aktivitäten beschrieben.^[103] Wenn ein kleines Molekül (Substrat) als Ligand an einer hochmolekularen Verbindung (Rezeptor) wirkt, wird seine Relaxation bestimmt durch die lange Korrelationszeit des Rezeptors, die zu stark negativen NOEs führt, sog. trNOEs, welche die Konformation widerspiegeln. Assoziation und Dissoziation liegen im Gleichgewicht vor, der negative NOE des wechselwirkenden Substrats bleibt bis zu seiner Relaxation in den Grundzustand erhalten und kann detektiert werden.^[104,105]

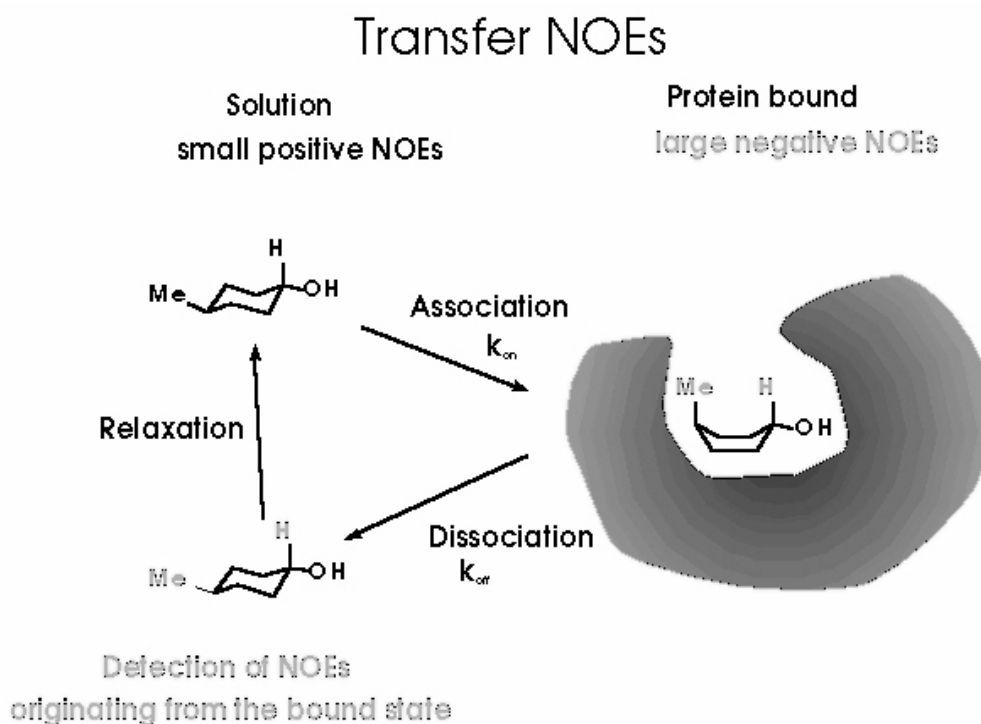


Abbildung 47: Wechselwirkungsschema bei trNOESY

Hinzu kommt die Tatsache, dass die NOEs kleiner Moleküle zum einen ja sehr schwach sind und dazu langsam aufgebaut werden. Dagegen sind die trNOEs durch das Rezeptormolekül viel stärker negativ und werden bedeutend schneller ausgebildet, so dass die Unterscheidung durch geeignete Messbedingungen erleichtert wird. Um dies zu erreichen, wird mit einer signifikant kleineren Mischzeit als bei isolierten Liganden in der Lösung gearbeitet. In Abbildung 48 sind die Unterschiede der Entwicklung von Kreuzsignalen und von Disacchariden isoliert und in Wechselwirkung mit einem Protein dargestellt

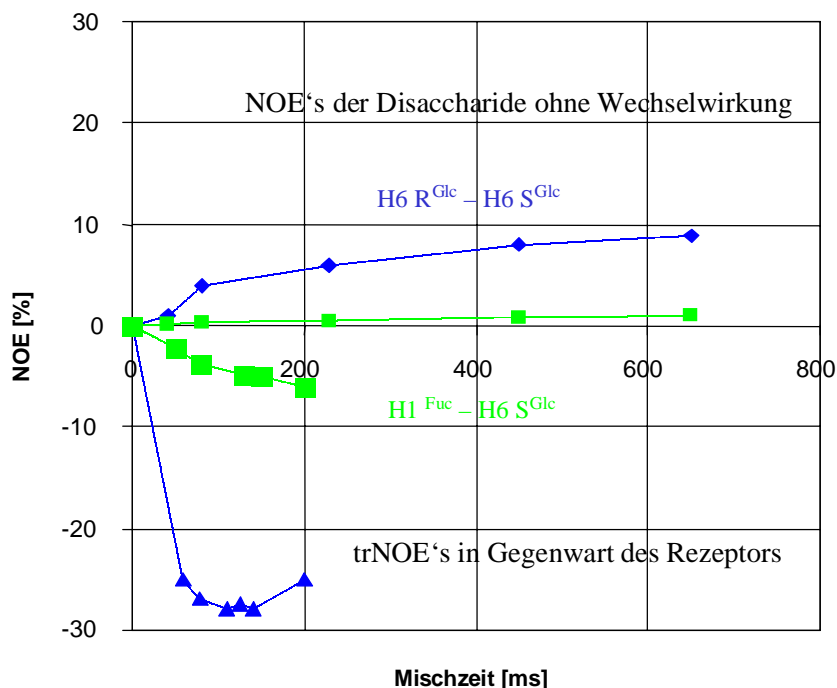


Abbildung 48: Darstellung der Entwicklung von NOE und trNOE

Kernstück eines 2D NOESY-Spektrums ist die Mischzeit (= die Zeit, die zum Aufbau der räumlichen Wechselwirkungen der betreffenden Kerne zur Verfügung steht). Durch Aufnahme der NOESY-Spektren der Substrate mit langer Mischzeit (ca. 800 ms – 1 sec) und des Rezeptor-Substrat-Gemisches mit entsprechend kurzer (ca. 100 – 200 ms) sollte eine Unterscheidung zwischen normalen NOEs und trNOEs möglich sein.

Die Konformationsanalyse der gebundenen Liganden ist direkt aus der Substanzbibliothek möglich, d.h. es ist keine Isolierung einzelner Substanzen aus einer Vielzahl von Verbindungen nötig. Dabei sind die Zusammensetzung, sowie die Konzentration der Substanzbibliothek unwichtig, und es ist im weiteren möglich mit einem großen Überschuss an Liganden zu arbeiten.^[106,107] Die Methode wird allerdings durch die Tatsache eingeschränkt, dass es zum Auftreten von trNOEs nur bei Liganden mit kleinen Dissoziationskonstanten ($10^{-3} - 10^{-7}$ s) kommt.

5.3 ^{13}C - und ^{29}Si -CP/MAS-Festkörper-NMR-Untersuchungen von Thiokromasil und tBuCQN-Thiokromasil

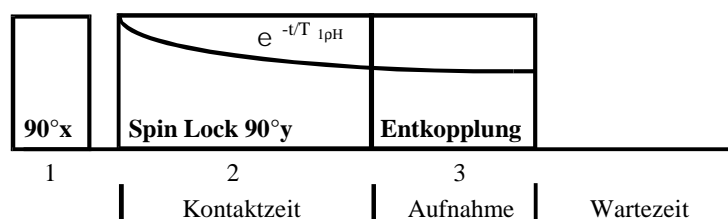
Die chirale stationäre Phase tBuCQN-Thiokromasil und das Kieselgelgrundmaterial Thiokromasil sind vor den Wechselwirkungsuntersuchungen mit den Enantiomeren anhand der ^{13}C - und ^{29}Si -Festkörper-NMR-Spektroskopie eingehend charakterisiert worden.

5.3.1 Grundlagen zur Festkörper-NMR-Spektroskopie

5.3.1.1 Kreuzpolarisation (Cross Polarization, CP)

Bei Heterokernen, die eine geringe natürliche Häufigkeit und ein kleines gyromagnetisches Verhältnis besitzen, wie z.B. ^{13}C (1.1 %) oder ^{29}Si (4.7 %), ist eine Aufsummierung zahlreicher Spektren notwendig, um ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Da die T_1 -Relaxationszeiten dieser Kerne groß sind, ist auch der Zeitaufwand für solche Aufnahmen sehr hoch. Mit Hilfe der Kreuzpolarisation ist es jedoch möglich, die starke Magnetisierung der Protonen, welche sich durch die hohe relative Häufigkeit und ein großes gyromagnetisches Moment auszeichnet, durch heteronukleare dipolare Kopplung auf die unempfindlicheren Heterokerne (X-Kerne) zu übertragen.

Protonenkanal:



X-Kanal:

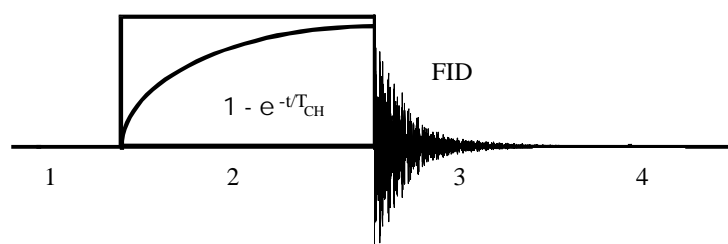


Abbildung 49: Pulssequenz für das Kreuzpolarisationsexperiment

Durch einen 90°_x -Puls im Protonenkanal wird die Magnetisierung der Protonen aus der z-Richtung in die y-Richtung ausgelenkt. Um die transversale Magnetisierung der Protonen beizubehalten, wird die Phase von $B_1(^1\text{H})$ nach Ende des Pulses um 90° verschoben (s. Abbildung). Die Protonenmagnetisierung verhält sich dann in diesem neuen „statischen“ Feld wie vorher im B_0 -Feld, d.h. sie präzessiert mit der Larmorfrequenz $\omega_{1\text{H}} = \gamma_{1\text{H}} \cdot B_1$ um die y-Achse. Diesen Vorgang bezeichnet man als Spinlock. Gleichzeitig wird ein Puls im X-Kanal eingestrahlt. Damit der Magnetisierungstransfer von den Protonen auf die X-Kerne stattfinden kann, muss die Hartmann-Hahn-Bedingung (Gleichung 4) erfüllt sein.

$$\omega_{1\text{H}} = \omega_{13\text{C}} \Rightarrow \gamma_{1\text{H}} \cdot B_1(^1\text{H}) = \gamma_{13\text{C}} \cdot B_1(^{13}\text{C}) \quad \text{Gleichung 4}$$

Wird nun auf dem X-Kanal das B_1 -Feld so justiert, dass die obige Bedingung erfüllt ist, dann oszillieren die z-Komponenten beider Magnetisierungen mit gleicher Frequenz, wodurch ein Energieaustausch möglich wird.

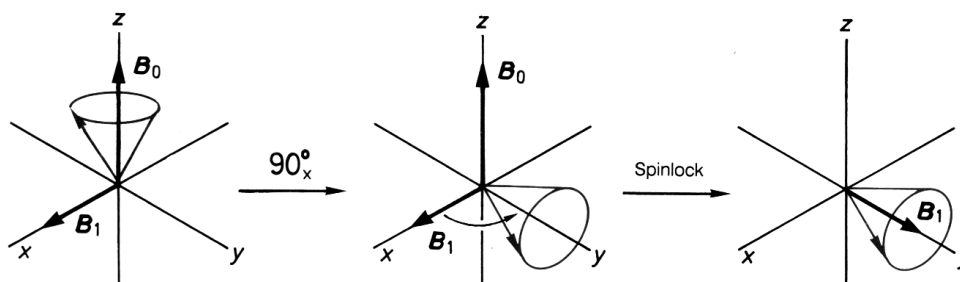


Abbildung 50: Das Prinzip des Hartmann-Hahn-Spinlock-Experiments

Damit wird die Magnetisierung der Protonen auf die Heterokerne übertragen, wobei sich die transversale Magnetisierung der X-Kerne aufbaut und die transversale Magnetisierung der Protonen abnimmt. Der Anstieg der Heterokernmagnetisierung erfolgt mit der Kreuzpolarisationskonstante T_{XH} , der Abfall der Protonenmagnetisierung über die Relaxationszeit $T_{1\rho\text{H}}$ der Protonen im rotierenden Koordinatensystem. Nach Ende der Kontaktzeit wird unter ^1H -Breitbandentkopplung die Magnetisierung der X-Kerne aufgenommen.

Durch das Kreuzpolarisationsexperiment kann die Empfindlichkeit der Messung um das Verhältnis $\gamma_{1\text{H}}/\gamma_{13\text{C}} \approx 4$ gesteigert werden. Ein zusätzlicher Empfindlichkeitsgewinn wird durch deutlich kürzere Wartezeiten zwischen den Pulsen erreicht, da diese nicht mehr von

$T_{1(X)}$, sondern vom deutlich kleineren $T_{1(H)}$ abhängig sind und sich so die Spektren besser akkumulieren lassen.

Verschiedene Strukturelemente können auch verschiedene Kreuzpolarisationskonstanten besitzen. Eine quantitative Aussage kann daher nur getroffen werden, wenn die T_1 -Relaxationszeiten der Strukturelemente im selben engen Bereich liegen.

5.3.2 ^{13}C -CP/MAS-NMR von Thiokromasil und tBuCQN-Thiokromasil

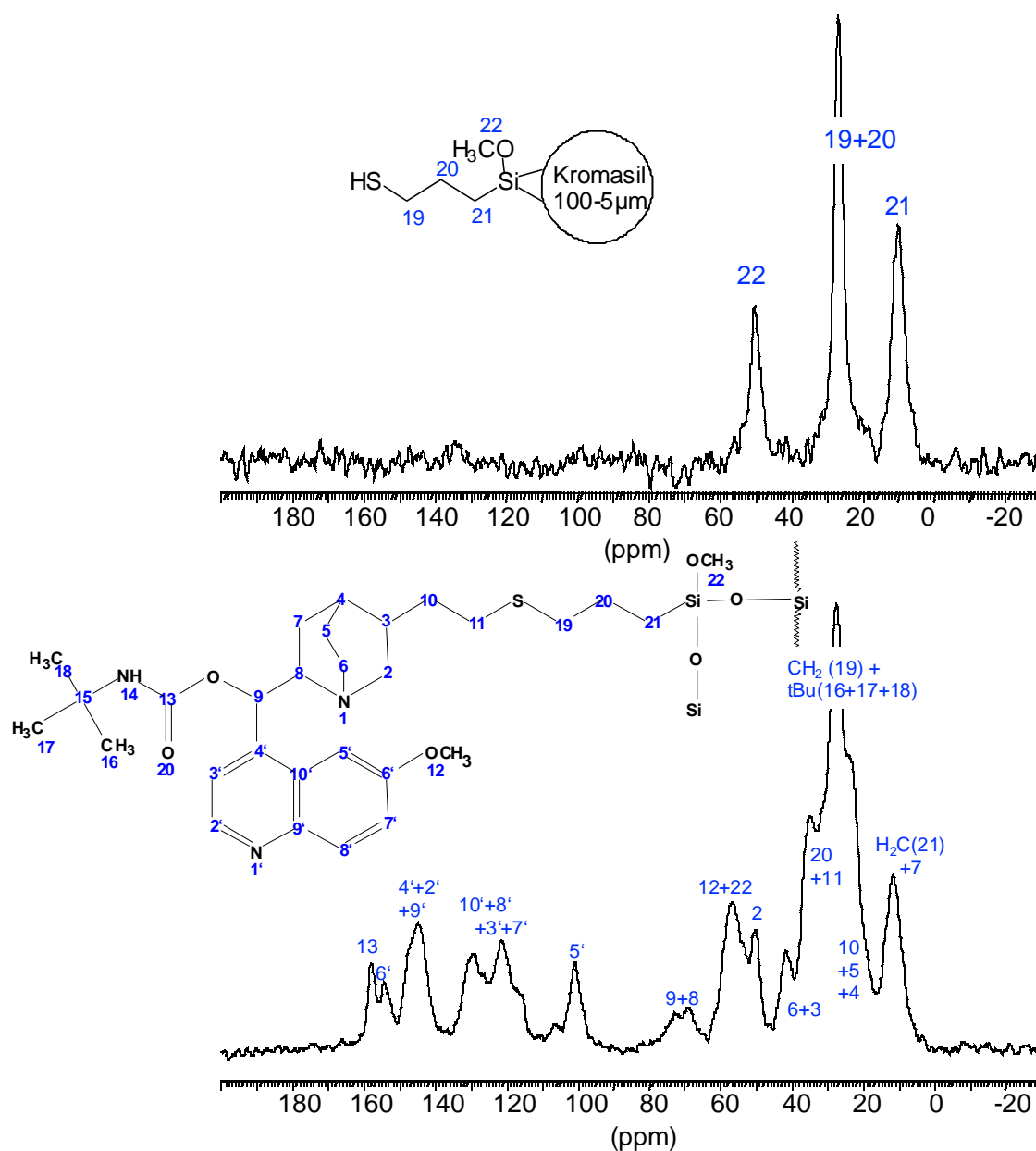


Abbildung 51: ^{13}C -CP/MAS-Festkörper-NMR-Spektrum von Thiokromasil (oben) und tBuCQN-Thiokromasil (unten)

Im ^{13}C -CP/MAS-NMR-Spektrum von Thiokromasil in Abbildung 51 oben sind die Signale des Thiopropylspacers zu sehen, bei 55 ppm liegt das Signal der Methoxygruppe (22). Die CH_2 -Gruppen (19+20) haben Resonanzen bei ca. 30 ppm. Aufgrund der direkten Nachbarschaft zum Silizium erscheint das Signal der Methylengruppe (21) hochfeldverschoben bei 10 ppm.

Im Spektrum des tBuCQN-Thiokromasil (Abbildung 51, unten) treten neben den Resonanzen des Kieselgelbasismaterials (19-21) die Signale des tert-Butylchinincarbamats auf. Im Bereich von 165 – 110 ppm können die Resonanzen der aromatischen Protonen (13, 2'-10') zugeordnet werden. Sehr intensitätsstark ist das Signal der tert-Butylgruppe bei 30 ppm, welches die benachbarten Signale überlagert und teilweise verdeckt. Die Methoxygruppen (12 und 22) erscheinen bei 60 ppm.

5.4 ^{29}Si -CP/MAS-NMR-Spektren von Thiokromasil und tBuCQN-Thiokromasil

5.4.1.1 ^{29}Si -CP/MAS-NMR-Spektroskopie

Kieselgele werden großtechnisch mit Hilfe des Sol-Gel-Prozesses aus Tetraalkoxysilanen hergestellt. Diese werden zuerst in Anwesenheit einer Säure oder Base als Katalysator einer kontrollierten Hydrolyse unterworfen, wobei sie in eine kolloidale Lösung (Sol) überführt werden. Die Kondensationsreaktion führt dann zu oligomeren bzw. polymeren Strukturen. Es entsteht ein hydratisiertes Gel, welches im Vakuum dehydratisiert wird und einen anorganischen polymeren Festkörper ergibt. Die Größe der Poren und der Teilchendurchmesser hängen von den Reaktionsbedingungen ab.

Kieselgele sind amorphe Materialien mit einer großen Bandbreite an Bindungslängen und Bindungswinkeln, in denen aber auch kristalline Bereiche vorliegen, die sich vom β -Tridymit ableiten lassen. Die SiO_2 -Einheiten sind dreidimensional aufgebaut. Die Siliziumatome werden dabei tetraedrisch von Sauerstoffatomen umgeben. Der Festkörper ist aus Siloxaneinheiten (Q^4) aufgebaut, die freien Valenzen des Siliziums an der Oberfläche sind durch Hydroxylgruppen abgesättigt, und es entstehen Silandiol- (Q^2) und Silanoleinheiten (Q^3).

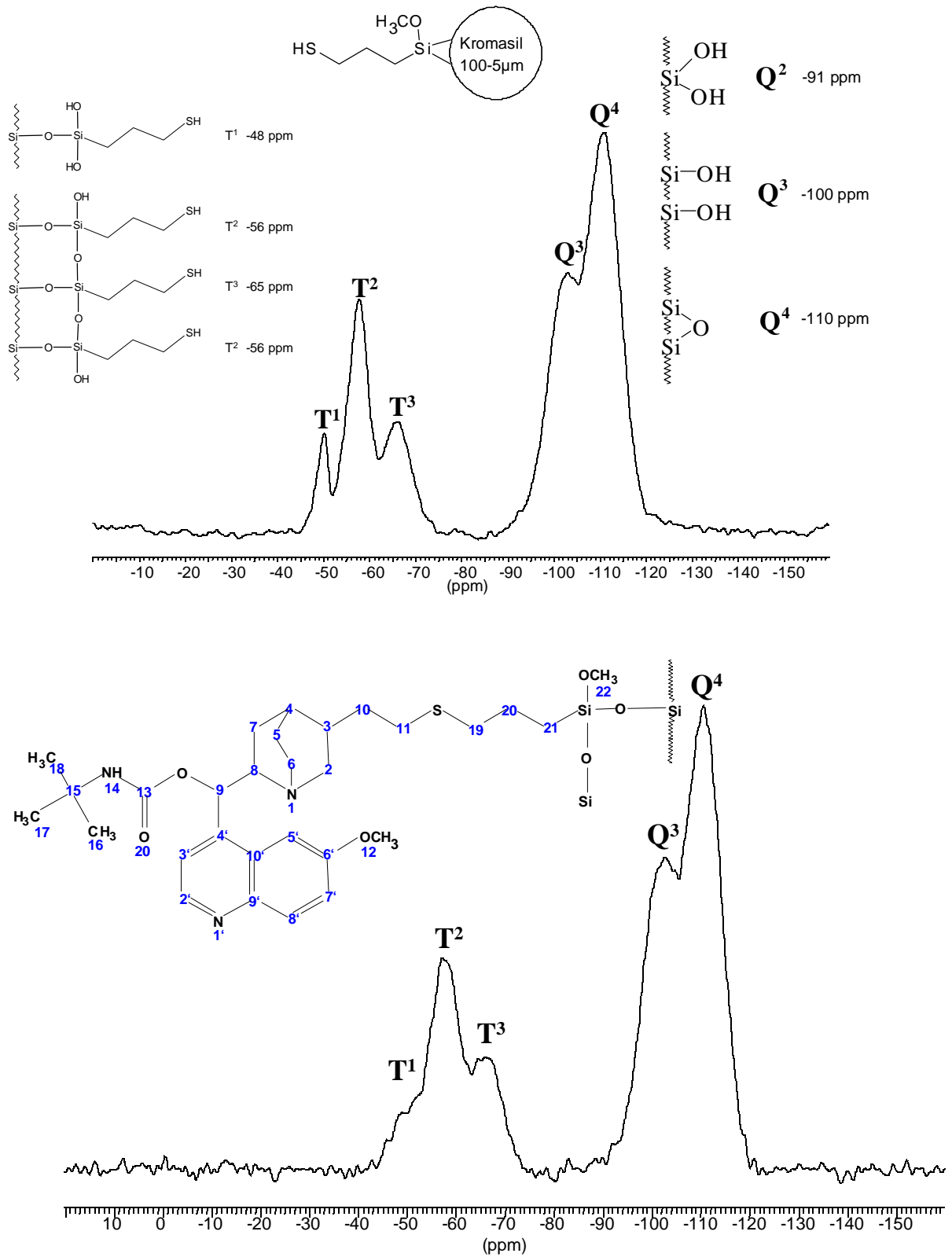
5.4.1.2 ^{29}Si -CP/MAS-NMR-Spektren von Thiokromasil und tBuCQN-Thiokromasil

Abbildung 52: ^{29}Si -CP/MAS-Festkörper-NMR-Spektren von Thiokromasil (oben) und tBuCQN-Thiokromasil (unten)

Anhand der Werte der chemischen Verschiebung unterschiedlicher Strukturelemente ist ihre Unterscheidung und damit auch der Nachweis mittels ^{29}Si -CP/MAS-NMR-Spektroskopie möglich. In Abbildung 52 sind die ^{29}Si -CP/MAS-NMR-Spektren von Thiokromasil (oben) sowie tBuCQN-Thiokromasil (unten) gezeigt. Die Q^3 - und Q^4 -Gruppen an der Oberfläche des Grundkieselgels sind gut sichtbar, daneben treten zusätzliche Signale bei -48 ppm, -56 ppm und -65 ppm auf, die eindeutig die entsprechenden T-Gruppen der Alkylsilane repräsentieren. Da die T-Gruppen ein ähnliches Kreuzpolarisationsverhalten besitzen, ist eine Intensitätsbestimmung der T-Gruppensignale aus den CP-Spektren möglich und dadurch wieder ein Vergleich des Quervernetzungsgrades Q .^[108]

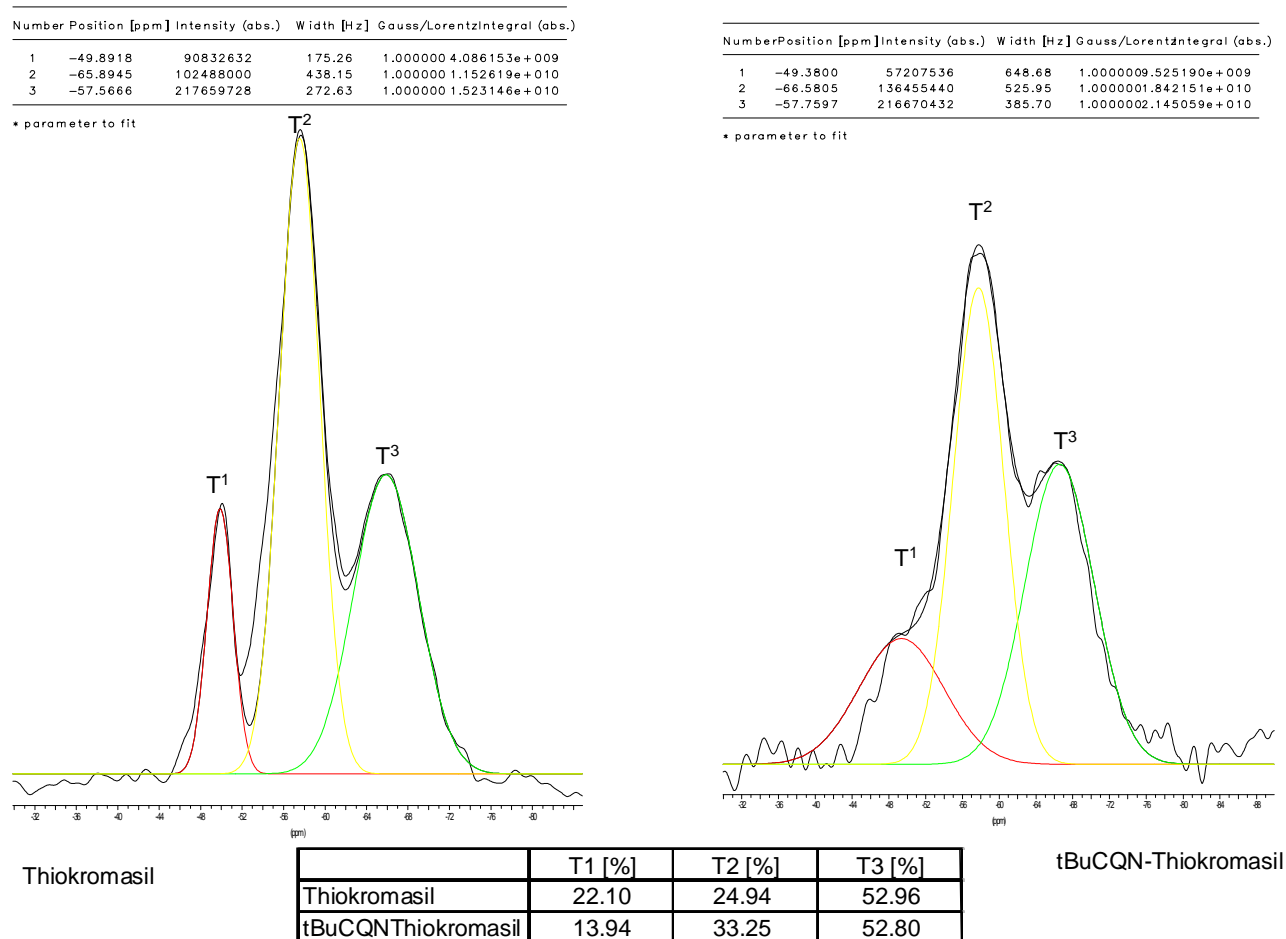


Abbildung 53: Intensitätsbestimmung der T-Gruppensignale durch Peak-Dekonvolution

Der Quervernetzungsgrad Q ergibt sich zu:

$$Q(\%) = 1/3 T1 (\%) + 2/3 T2 (\%) + T3 (\%) \quad \text{Gleichung 5}$$

Aus der Tabelle in Abbildung 53 wird deutlich, dass sich für Thiokromasil (75 %) und tBuCQN-Thiokromasil (76 %) der gleiche Vernetzungsgrad ergibt, auch wenn dies aus den Spektren direkt nicht ersichtlich ist. Denkbar wäre gleichfalls auch eine stärkere Ausbildung der Vernetzung bei der weiterführenden Modifizierung der stationären Phase gewesen.

5.5 transfer NOESY-NMR-Experimente zur molekularen Erkennung an chiralen stationären Phasen

5.5.1 Motivation

Chromatographische^[109-111] und spektroskopische Studien in Lösung liefern ein relativ gutes Bild über die chiralen Erkennungsmechanismen zwischen Chinincarbamaten und Aminosäurederivaten. HR-MAS-NMR-spektroskopische Untersuchungen an der stationären Phase sind besonders interessant, da sie das eigentliche chromatographische System betreffen, wohingegen die Experimente in flüssiger Phase nur vereinfachende Darstellungen sind.^[112-115] Anhand des mit einem chiralen Selektor modifizierten Kieselgels tert-Butyl-chinincarbamatthiokromasil wurden die Wechselwirkungen sowie Diskriminierung zwischen R- und S-(3,5-Dinitrobenzoyl)leucin mit Hilfe des trNOESY-Experiments ausführlich analysiert.

5.5.2 ¹H-HR-MAS-NMR-spektroskopische Charakterisierung der stationären Phasen

Vor den eigentlichen Untersuchungen zur chiralen Erkennung wurden alle Verbindungen mittels der HR-MAS-NMR-Spektroskopie ausführlich charakterisiert.

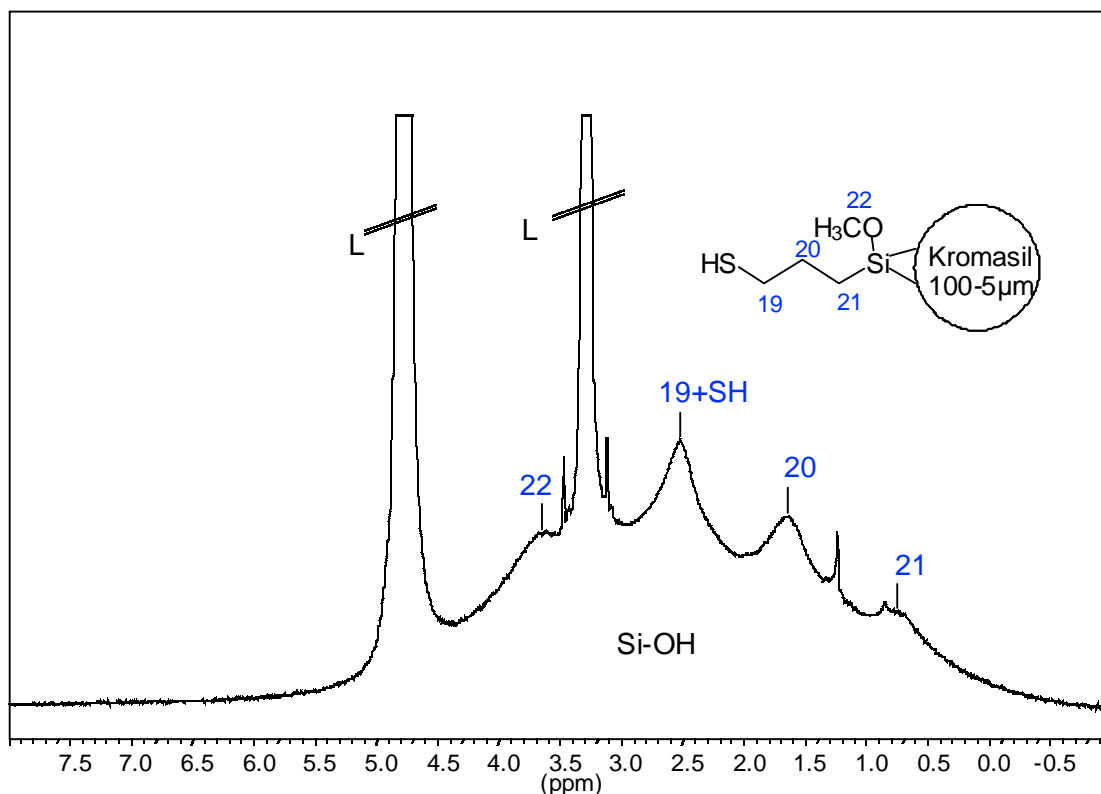
5.5.2.1 ^1H -HR-MAS-NMR-Spektrum von Thiokromasil 100 – 5 μm 

Abbildung 54: ^1H -HR-MAS-NMR-Spektrum von Thiokromasil 100 – 5 μm in Methanol- d_4 (L)

Das Protonenspektrum (Abbildung 54) zeigt neben den Lösungsmittelsignalen bei 4.8 und 3.3 ppm das Signal der OCH_3 -Gruppe (3.7 ppm (16)) und die der CH_2 -Gruppen (2.5 ppm (19), 1.6 ppm (20) und 0.8 ppm (21)) des Thiopropylspacers. Das SH-Signal fällt mit dem Signal der CH_2 -Gruppe (19) zusammen (2.5 ppm). Überlagert werden die Peaks durch das sehr breite Signal der Si-OH-Gruppen des Kieselgels. Diese Silanolgruppen sind sehr unbeweglich, aus diesem Grund werden dipolare Kopplungen der Protonen nicht ausgemittelt, und es resultiert ein stark verbreitertes Signal, welches die anderen Signale überlagert.

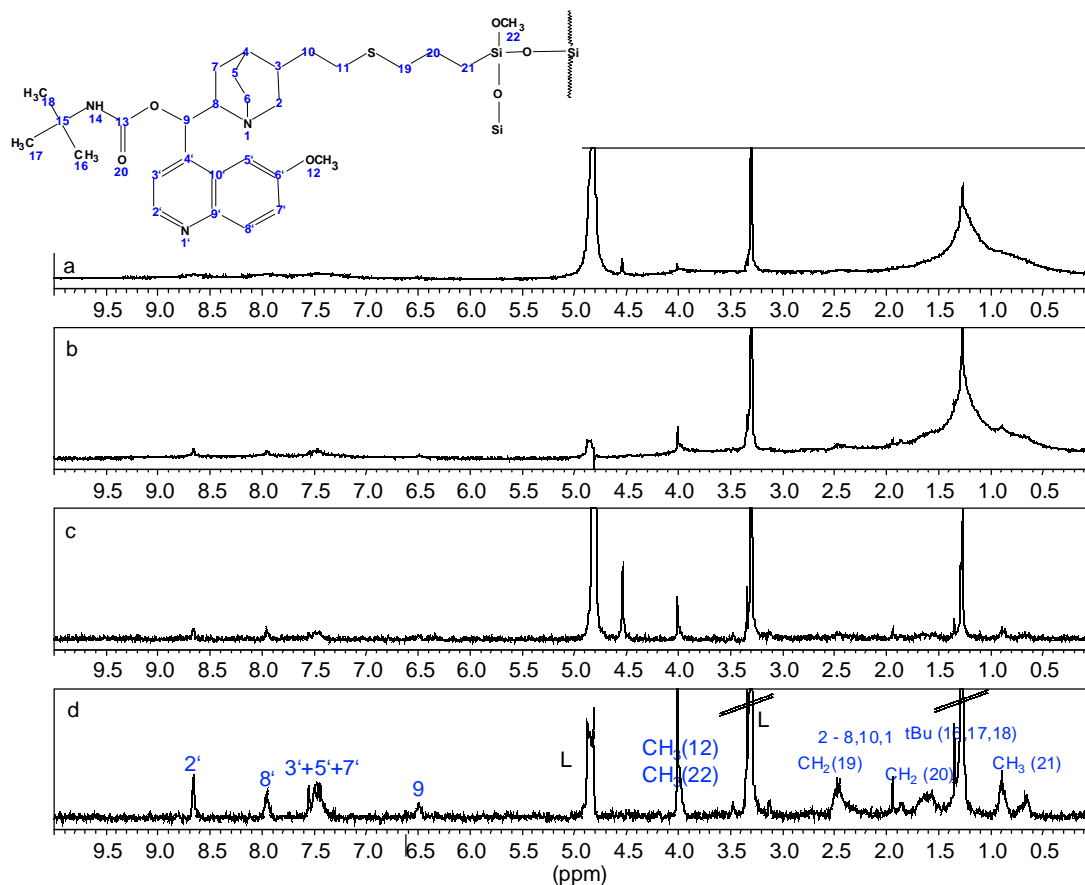
5.5.2.2 ^1H -HR-MAS-NMR-Spektrum von tBuCQN-Thiokromasil

Abbildung 55: tBuCQN-Thiokromasil in Methanol- d_4 (L), a) ^1H -HR-MAS-NMR-Spektrum, b) mit Unterdrückung des Wassersignals, c) mit T_2 -Filter, d) mit Wasserunterdrückung und T_2 -Filter

Zu sehen ist eine Serie von unterschiedlich aufgenommenen Spektren des tBuCQN-Thiokromasils (Abbildung 55). Spektrum a) zeigt das normale Protonenspektrum. In b) wurde das Wassersignal durch Vorsättigung unterdrückt, Abbildung c) zeigt das Spektrum nachdem es mit einem T_2 -Filter aufgenommen wurde. Hierbei werden breite Signale, die durch eine sehr kurze T_2 -Relaxationszeit gekennzeichnet werden unterdrückt. In Spektrum d) wurde sowohl eine Lösungsmittelvorsättigung als auch ein T_2 -Filter eingesetzt.

Neben den bereits in Abbildung 54 diskutierten Signalen des Thiopropylspacers (19-21) ist zusätzlich das Signal der tBu-Gruppe bei 1.23 ppm zu sehen, welches, aufgrund seiner starken Intensität, die Signale der Propylgruppe teilweise überlagert. Weiterhin sind im Bereich zwischen 7.0 und 9.0 ppm die Peaks der aromatischen Protonen des Chinolins zu sehen. Bei 6.5 ppm erscheint das Signal der CH-Gruppe H(9). Die Protonen der OCH_3 -Gruppen (12 und 22) zeigen Resonanzen bei 4.0 ppm. An diesem Beispiel wird die Effektivität des T_2 -Filters, wie die Reihe der ^1H -HR-MAS-NMR-Spektren in Abbildung 55 zeigt, deutlich. Im Spektrum

(d) ist die Auflösung der Signale so gut, dass alle Signale des tBuCQN im Spektrum zu beobachten sind und detailliert zugeordnet werden können. Darüberhinaus ist es mittels der HR-MAS-NMR-Spektroskopie das erste Mal möglich gewesen, einen aktiven chiralen Selektor, welcher auf Kieselgel immobilisiert wurde, eindeutig zu detektieren und charakterisieren.

5.5.3 Charakterisierung des Selektors tert-Butylchinincarbamat (tBuCQN)

Zunächst wurde der Selektor in Methanol gelöst und mittels ^1H -HR-MAS-NMR-Spektroskopie untersucht. Die Aufnahme der Spektren erfolgte trotz guter Löslichkeit des Selektors unter HR-MAS-NMR-Bedingungen um bei nachfolgenden Untersuchungen mit dem immobilisierten tBuCQN einen Vergleich sowie das Auffinden der Signale zu erleichtern.

Zunächst ist es nicht möglich gewesen, die Signale im Protonenspektrum eindeutig zuzuordnen. Im Anschluss wurden daher die zur Analyse benötigten 1D ^{13}C - und 2D H/C-korrelierten Spektren mit Hochauflösungs-NMR-Spektroskopie (600 MHz) aufgenommen (Abbildung 56 und 57).

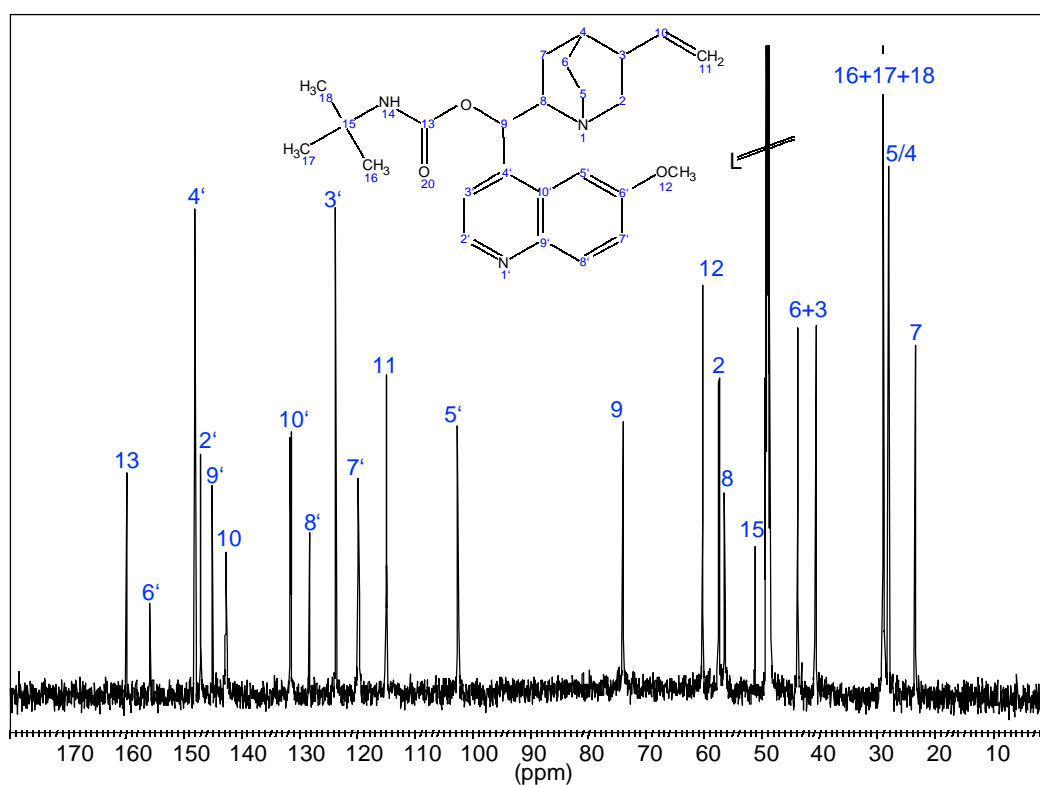


Abbildung 56: ^{13}C -HR-NMR-Spektrum von tert-Butylchinincarbamat (tBuCQN) in Methanol- d_4 (L)

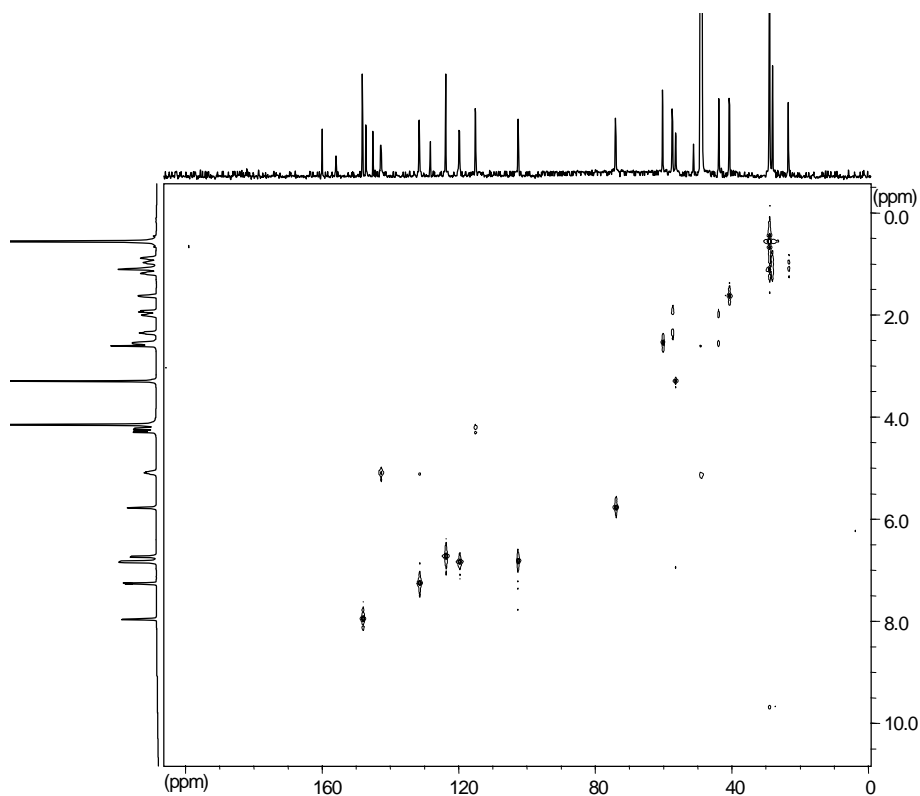


Abbildung 57: H/C -COSY-NMR-Spektrum von *t*BuCQN in Methanol (600 MHz)

Mit Hilfe des 2D H/C -korrelierten NMR-Spektrums (Abbildung 57) ist nun eine Zuordnung der Signale im 1H -HR-(MAS)-NMR-Spektrum (Abbildung 58) möglich:

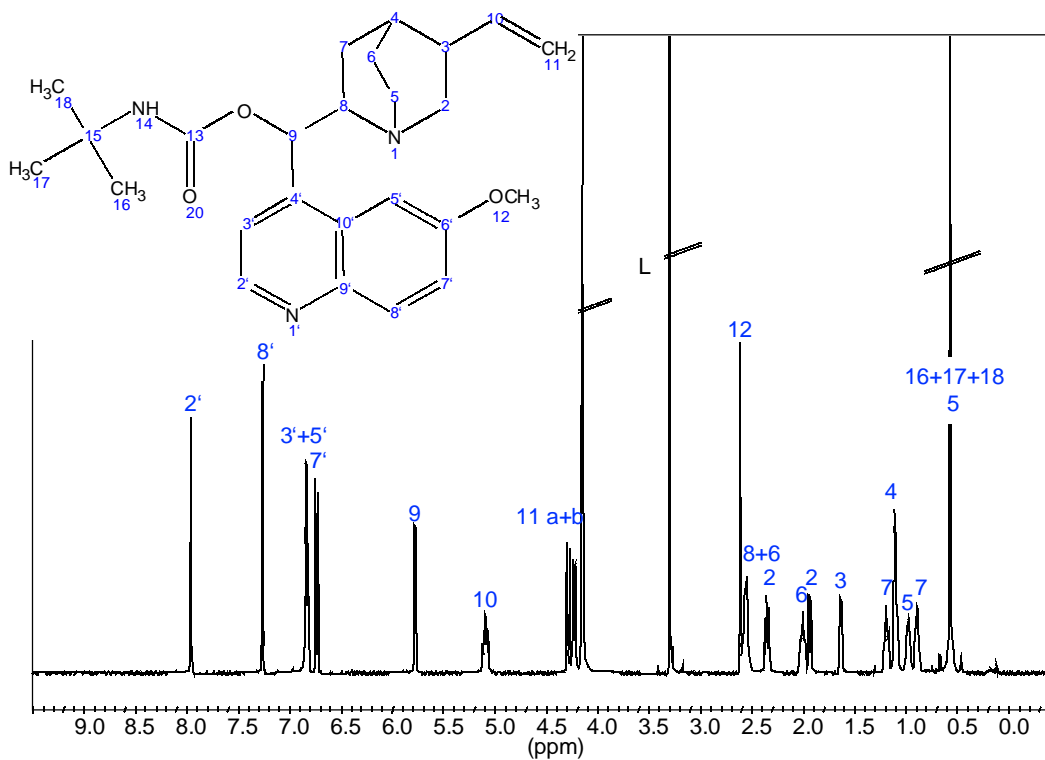


Abbildung 58: 1H -HR-NMR-Spektrum von *tert*-Butylchinincarbamat (*t*BuCQN) in Methanol- d_4 (L)

5.6 Charakterisierung von DNB-(R/S)-Leucin mittels ^1H - und NOESY-HR-MAS-NMR-Spektroskopie

Für die weiteren Untersuchungen, insbesondere der trNOESY-Experimente, wird eine Auswertung der Spektren erleichtert, wenn Daten von den isolierten Substanzen, in Lösung unter Suspensionsbedingungen aufgenommen, vorliegen. ^1H -HR-MAS-NMR-Spektren wurden aufgenommen (Abbildung 59 und 61), da hier neben der Charakterisierung der Komponenten, ein Vergleich der chemischen Verschiebung mit möglichen Änderungen bei Anwesenheit der stationären Phase zusätzliche Informationen über Wechselwirkungen und etwaige Komplexbildungen, liefern soll.

Die Aufnahme von 2D NOESY-NMR-Spektren (Abbildung 60 und 62) zeigt die NOE-Kreuzsignale (positive Signale) der Substrate und erleichtert bei der Auswertung der trNOESY-NMR-Spektren die Zuordnung der Kreuzsignale (negative Signale).

5.6.1 Charakterisierung von DNB-(R)-Leucin mittels ^1H - und NOESY-HR-MAS-NMR-Spektroskopie

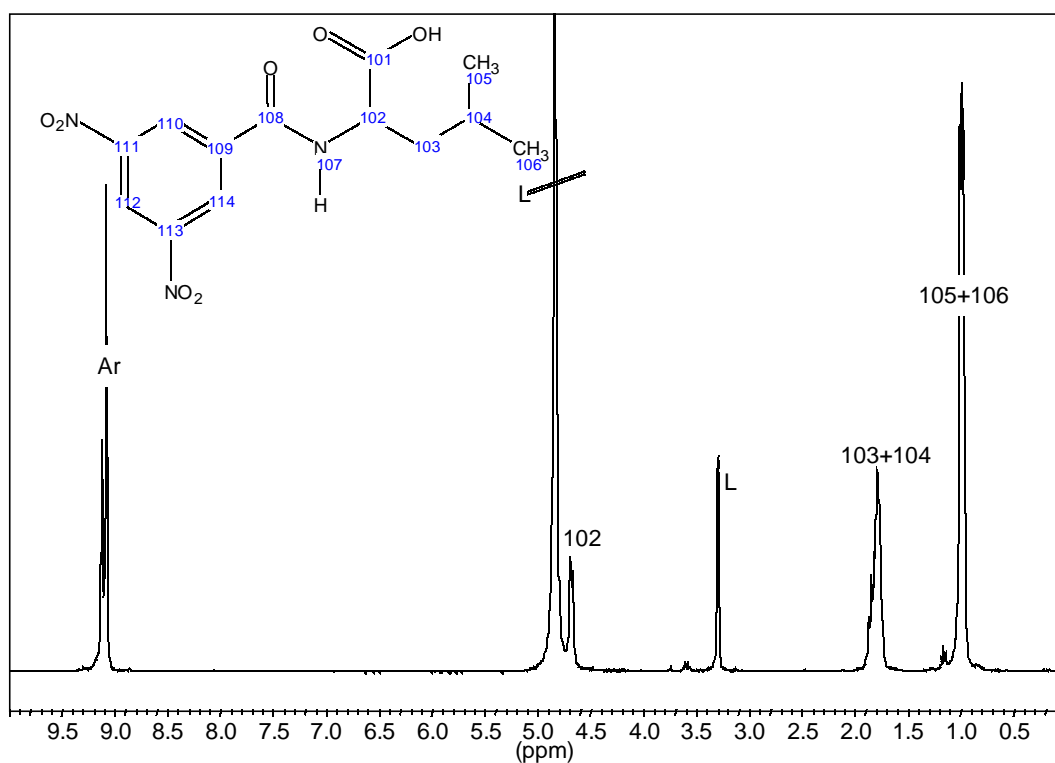


Abbildung 59: ^1H -HR-MAS-NMR-Spektrum von DNB-(R)-Leucin in $\text{Methanol-}d_4$ (L)

In Abbildung 59 ist das Protonenspektrum von DNB-(R)-Leucin, welches in Methanol gelöst und anschließend unter Suspensionsbedingungen untersucht wurde, zu sehen. Die Protonen des aromatischen Restes erscheinen bei 9.2 ppm H(112) und 9.1 ppm H(110+114), die Tieffeldverschiebung ergibt sich dabei durch den elektronenziehenden Effekt der beiden, am Aromaten substituierten, Nitrogruppen. Das Proton am Chiralitätszentrum H(102) befindet sich in direkter Nachbarschaft zum Peak des Wassers (Methanol) bei 4.6 ppm. Die angedeutete Aufspaltung stammt von Wechselwirkungen mit den benachbarten Protonen NH(107) und H(103). Bei 1.9 – 1.6 ppm erscheinen die Resonanzen der Protonen H(103) und H(104), die durch zahlreiche Kopplungen aufspalten und stark überlagern. Als weiteres erscheinen die Signale der Methylgruppen H(19 + 22) bei 1.0 ppm. Für die Protonen der NH- (107) und OH- (101) Gruppe konnten keine Signale detektiert werden, die Resonanzen sind im Bereich des Wasserpeaks des Lösungsmittels (4.8 ppm) und werden von diesem überdeckt.

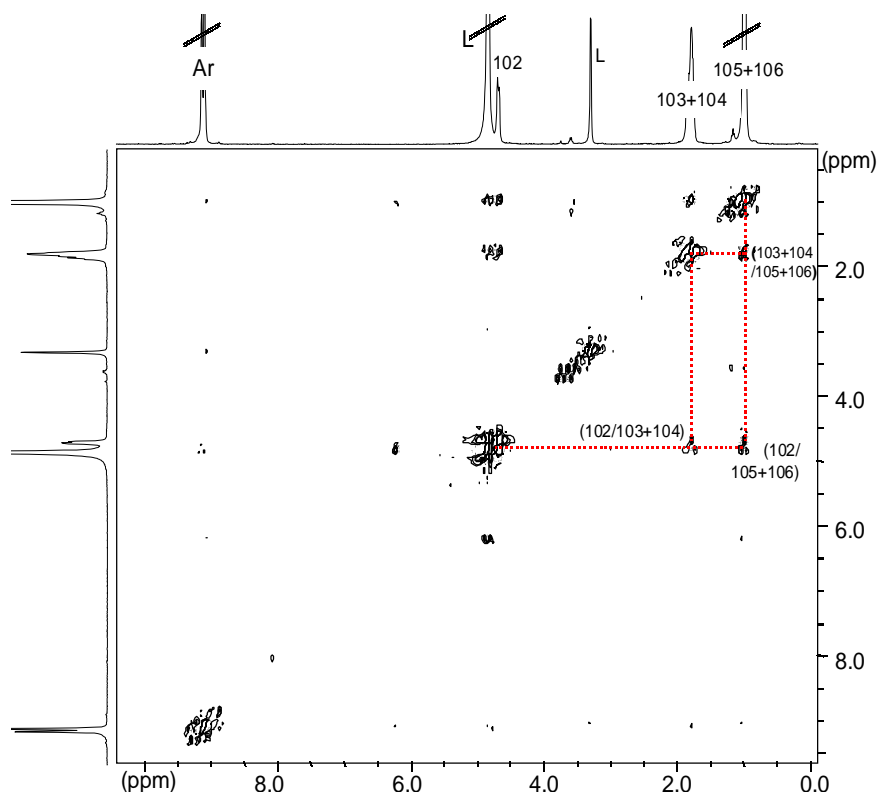


Abbildung 60: 2D NMR-Spektrum (NOESY) von DNB-(R)-Leucin in Methanol- d_4 (L) (positive Signale)

Im NOESY-NMR-Spektrum (Abbildung 60) sind Kopplungen zu sehen zwischen den Protonen H(103+104) und den Methylgruppen sowie von H(103+104) und den Methylgruppen zu H(102).

5.6.2 Charakterisierung von DNB-(S)-Leucin mittels ^1H - und NOESY-HR-MAS-NMR-Spektroskopie

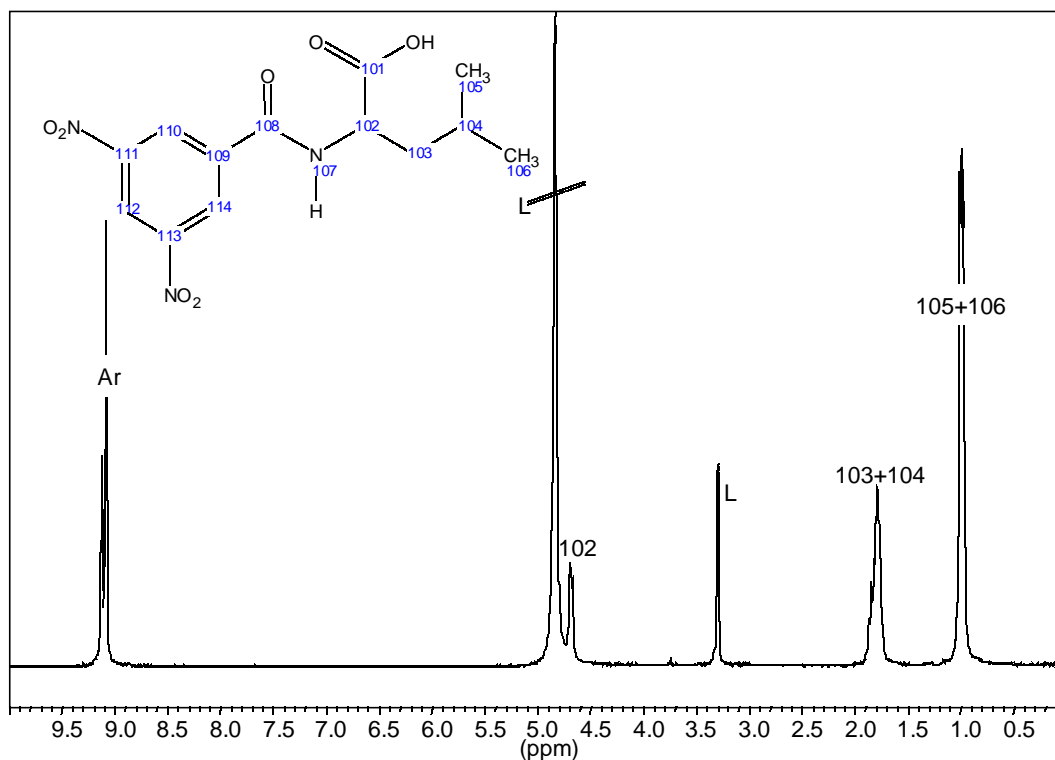


Abbildung 61: ^1H -HR-MAS-NMR-Spektrum von DNB-(S)-Leucin in Methanol- d_4 (L)

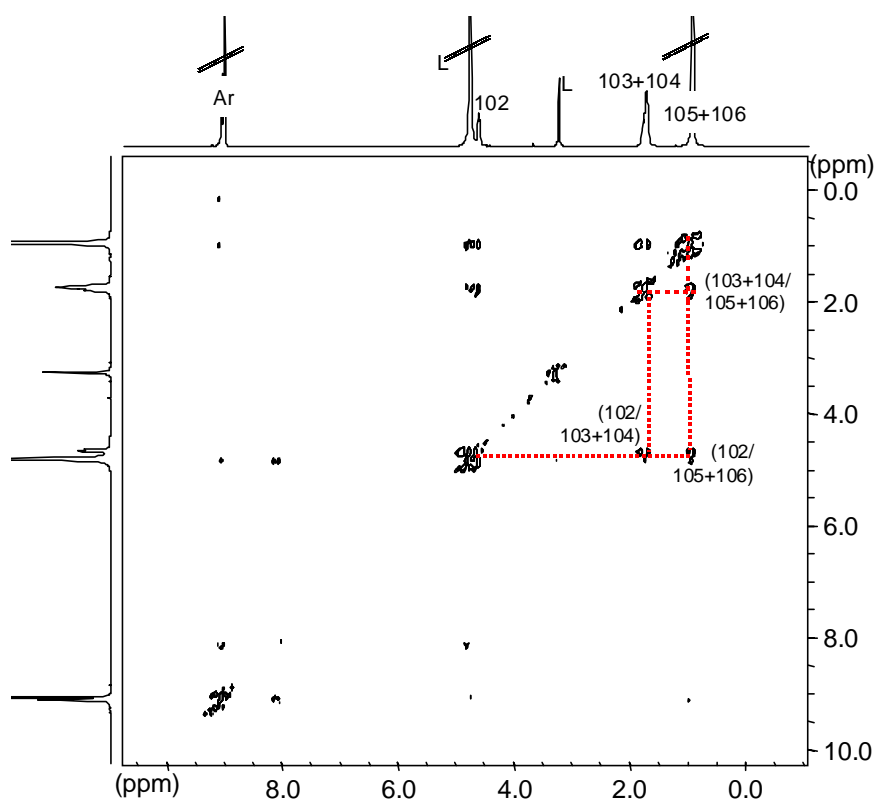


Abbildung 62: 2D NMR-Spektrum (NOESY) von DNB-(S)-Leucin in Methanol- d_4 (L)(positive Signale)

Die Zuordnung der Signale im Protonenspektrum des DNB-(S)-Leucin (Abbildung 61) erfolgt entsprechend der des DNB-(R)-Leucins (Abbildung 59).

Im NOESY-NMR-Spektrum (Abbildung 62) sind wieder die Kopplungen zwischen den Methylgruppen H(105+106) und H(103+104) zu sehen, ebenfalls deren Wechselwirkungen zu H(102).

5.7 trNOESY-NMR-Untersuchung von tBuCQN-Thiokromasil mit DNB-(R)/ (S)-Leucin in Methanol

Erste Versuche mit jeweils den Enantiomeren (0.1 mol/l) und 2 mg Kieselgel (tBuCQN-Thiokromasil) wurden durchgeführt. Da die angebotene Selektormenge mit 2 mg relativ gering ist, um eindeutige Wechselwirkungen zuordnen zu können, wurde in weiteren Messungen die Menge an tBuCQN-Thiokromasil auf 5 mg erhöht. Durch Variation der Kieselgelmenge im Rotor ist es auf verhältnismäßig unkomplizierte Weise möglich das Verhältnis zwischen Rezeptorgruppen und Substrat zu verändern. Diese Messungen sollen dazu dienen, eventuell Unterschiede in der chiralen Erkennung der Enantiomeren in Abhängigkeit von der Rezeptorkonzentration zu verdeutlichen.

5.7.1 trNOESY-NMR-Spektrum von DNB-(R)- und (S)-Leucin in Wechselwirkung mit tBuCQN-Thiokromasil (2 mg) in Methanol

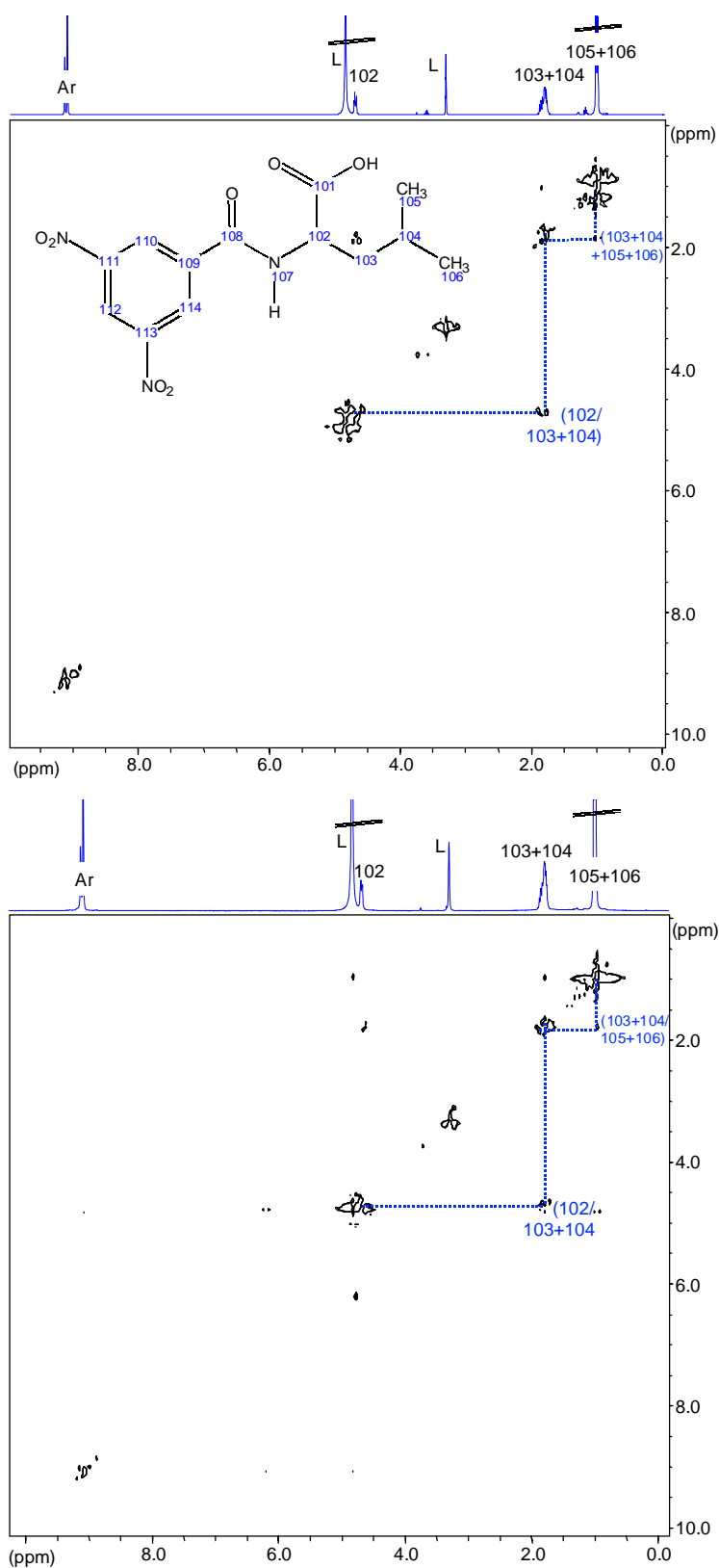


Abbildung 63: trNOESY-NMR-Spektrum von DNB-(R)-Leucin (0.1 mol/l) (oben), sowie DNB-(S)-Leucin (unten) in Wechselwirkung mit tBuCQN-Thiokromasil (2mg) suspendiert in Methanol-*d*₄ (negative Signale)

5.7.2 trNOESY-NMR-Spektrum von DNB-(R)- und (S)-Leucin in Wechselwirkung mit tBuCQN-Thiokromasil (5 mg) in Methanol

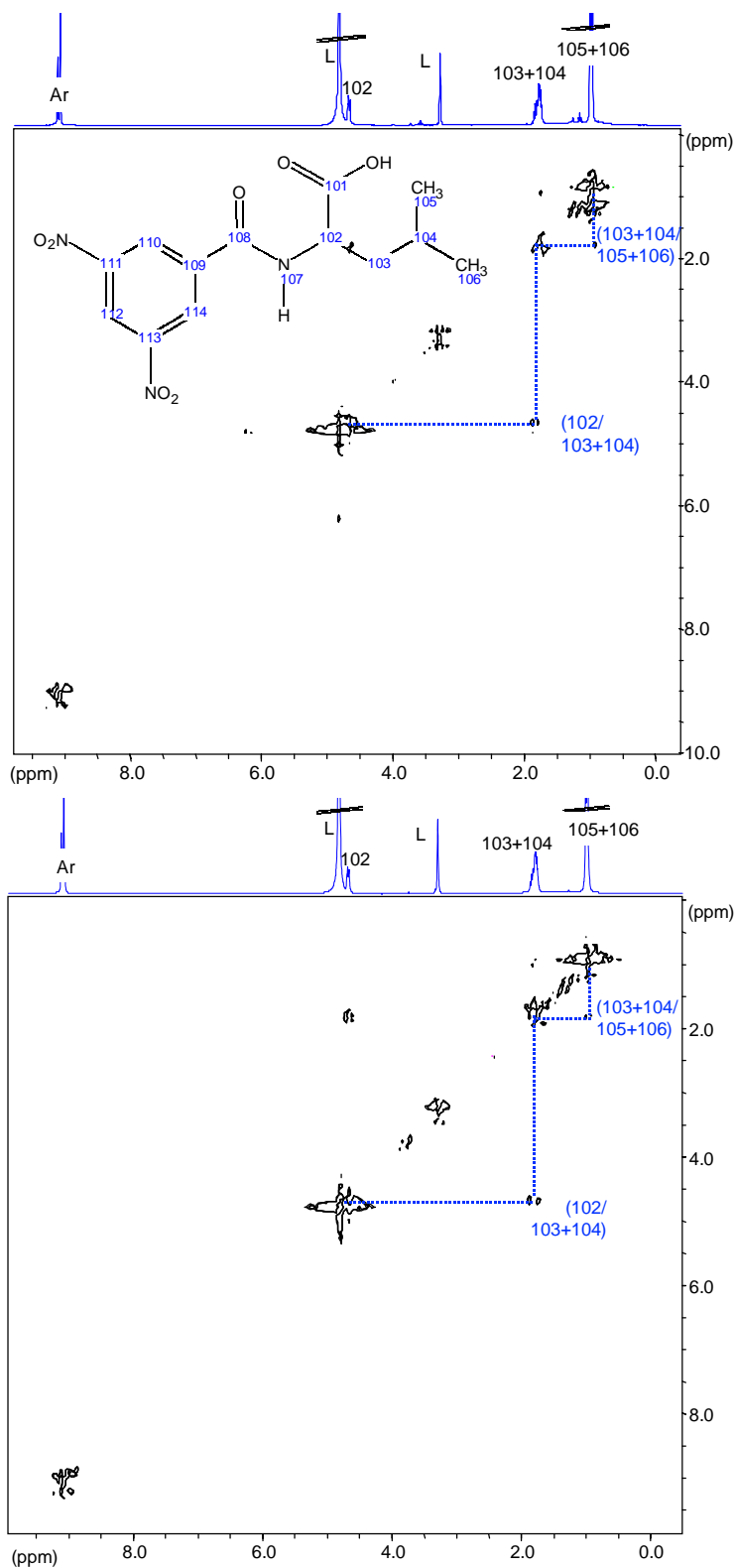


Abbildung 64: trNOESY-NMR-Spektrum von DNB-(R)-Leucin (0.1 mol/l) (oben), sowie DNB-(S)-Leucin (unten) in Wechselwirkung mit tBuCQN-Thiokromasil (5 mg) suspendiert in Methanol- d_4 (negative Signale)

Die Unterschiede in den Signalintensitäten der trNOESY-Spektren mit 2 und 5 mg stationärer Phase sind minimal. Bei beiden Spektren (2 und 5 mg) (Abbildung 63 und 65) sind nicht alle trNOEs zu sehen wie sie bei den NOESY-Spektren (Abbildung 60 und 62) der isolierten Enantiomeren detektiert werden konnten. Generell problematisch bei der Auswertung erweist sich dabei die große Signalintensität der Lösungsmittelsignale, insbesondere des Wassersignals (ca. 4.8 ppm). Dadurch auftretendes „Rauschen“ erschwert neben den Kreuzsignalen zwischen Lösungsmittel und Komponente die Auswertung. Als Lösung bietet sich hier die Aufnahme der trNOESY-Spektren mit Lösungsmittelunterdrückung an, wobei bei der Unterdrückung insbesondere auf eng benachbarte Signale geachtet werden muss, die unter Umständen auch unterdrückt werden.

Die folgende Tabelle 9 gibt eine Übersicht der chemischen Verschiebungswerte der Enantiomeren sowie deren Änderung in Anwesenheit von 2 und 5 mg stationärer Phase.

	DNB-(S)-Leu [Hz]	DNB-(S)-Leu + tBuCQN 2mg [Hz]	DNB-(S)-Leu + tBuCQN 5mg [Hz]	DNB-(R)-Leu [Hz]	DNB-(R)-Leu + tBuCQN 2mg [Hz]	DNB-(R)-Leu + tBuCQN 5mg[Hz]
Ar	3653.05	3652.56	3652.56		3653.05	3653.05
Ar	3651.09	3650.59	3650.59	3650.59	3650.59	3651.09
Ar	3649.12	3648.62	3648.62	3649.61	3648.62	3648.62
Ar	3635.83	3635.33	3635.33	3634.84	3635.33	3635.33
Ar	3633.86	3633.37	3633.37	3633.86	3633.37	3633.37
H(102)	1881.56	1882.05	1882.05	1881.07	1881.56	1881.56
H(102)	1878.11	1877.62	1877.62	1877.13	1877.13	1877.13
H(102)	1870.73	1872.21	1872.7	1870.73	1872.21	1872.21
H(102)	1868.76	1867.78	1867.78	1867.78	1867.28	1867.28
H(103+104)	748.47	747.98	748.47	747.98	747.98	747.98
H(103+104)	740.1	740.1	740.1	738.63	740.1	740.1
H(103+104)	730.75	738.13	738.13	729.77	737.64	738.13
H(103+104)	716.48	730.75	730.75	715.98	730.26	730.26
H(103+104)	707.62	715.98	715.98	707.12	725.34	719.92
H(103+104)	702.69	713.03	713.03	702.2	719.92	715.98
H(103+104)		707.12	707.12		715.98	713.03
H(103+104)		702.69	702.69		713.03	710.57
H(103+104)					710.57	707.12
H(103+104)					707.12	702.69
CH3	406.38	406.38	406.38	405.39	406.38	406.38
CH3	400.47	400.47	400.47	400.47	399.98	399.98
CH3	396.53	396.04	396.04	395.55	396.04	396.04
CH3	390.63	390.13	390.13	390.13	390.13	390.13

Tabelle 9: Chemische Verschiebung der Enantiomeren ohne und in Gegenwart von 2 und 5 mg stationäre Phase

Zusammenfassend werden bei den trNOESY Spektren, sowohl für DNB-(R)- als auch für DNB-(S)-Leucin, negative Kreuzsignale detektiert. Es kann also davon ausgegangen werden, dass beide Enantiomere mit der stationären Phase wechselwirken. Durch Integration ausgewählter Signale zeigt sich jedoch, dass im Falle des DNB-(S)-Leucin die Intensität der Signale und damit auch die Wechselwirkung, bei gleicher Verstärkung der Spektren, stärker ist (mit je 2 und 5 mg zugegebenem tBuCQN-ThioKromasil, s. auch Tabelle 12).

Weder bei DNB-(R)-Leucin noch bei DNB-(S)-Leucin weisen in den 1D Spektren, chemische Verschiebungsänderungen auf Wechselwirkungen mit der stationären Phase tBuCQN-ThioKromasil hin.

Bei der Auswertung der Spektren zeigte sich jedoch ein anderer Effekt, der zur Verdeutlichung in nachfolgender Abbildung, am Beispiel des DNB-(R)-Leucins, gezeigt ist.

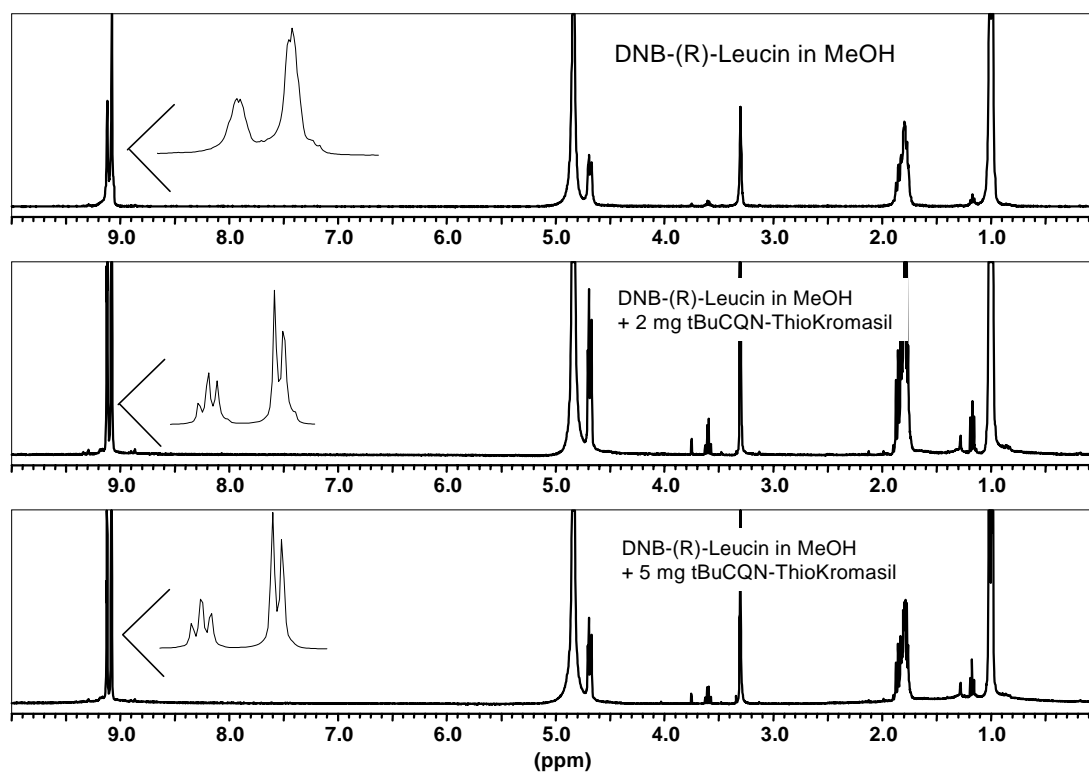


Abbildung 65: Vergleich der Linienbreiten von DNB-(R)-Leucin ohne und mit tBuCQN-ThioKromasil in Methanol

So ist zunächst, wenn die Enantiomere isoliert in Methanol gelöst untersucht werden, die Auflösung der Spektren unerwartet schwach. Durch Zugabe der stationären Phase verbessert sich die Auflösung erheblich, das wird besonders an der Signalaufspaltung der aromatischen Protonen deutlich. Ist hier die Aufspaltung der Signale, beim isolierten Enantiomers nur durch Schultern angedeutet, werden nach Zugabe von tBuCQN-ThioKromasil, die Aufspaltungen

der aromatischen Protonen offensichtlich. Dieser Effekt widerspricht den Erwartungen, wonach sich aufgrund von intramolekularen Wechselwirkungen und der daraus resultierenden, eingeschränkten Beweglichkeit eine größere Linienbreite und geringere Auflösung der Spektren ergeben sollte.

Es besteht zum einen die Möglichkeit, dass die Wechselwirkung (self-association) der Enantiomeren untereinander sehr stark ist und als Folge kommt es in den Protonenspektren zur Linienverbreiterung. Die Zugabe von Kieselgel stört die Wechselwirkungen, es resultiert eine verbesserte Auflösung der Spektren.

Eine andere Erklärung wäre die starke Interaktion durch Wasserstoffbrückenbindungen des Enantiomers mit dem Lösungsmittel Methanol. Die Variationsbreite der H-Brücken führt zu einer Vielzahl an Spezies mit geringfügig unterschiedlichen chemischen Verschiebungen. Das und auch die dadurch eingeschränkte Beweglichkeit führen zu einer Linienverbreiterung. Die zugegebene stationäre Phase tritt dann als Konkurrenz auf und hemmt diese Wechselwirkungen, was in einer besseren Auflösung der Spektren resultiert (s. Abbildung 66).

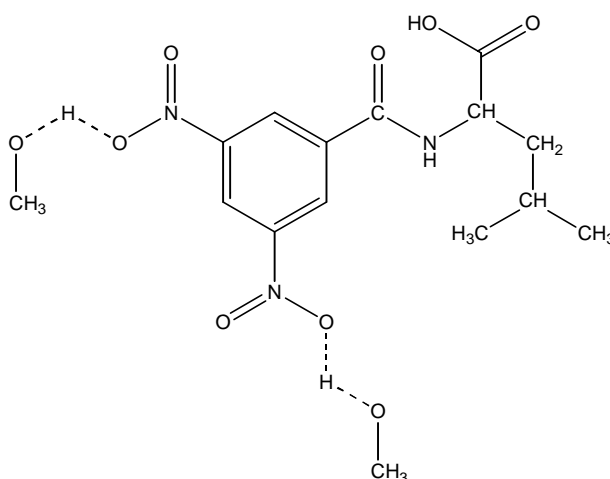
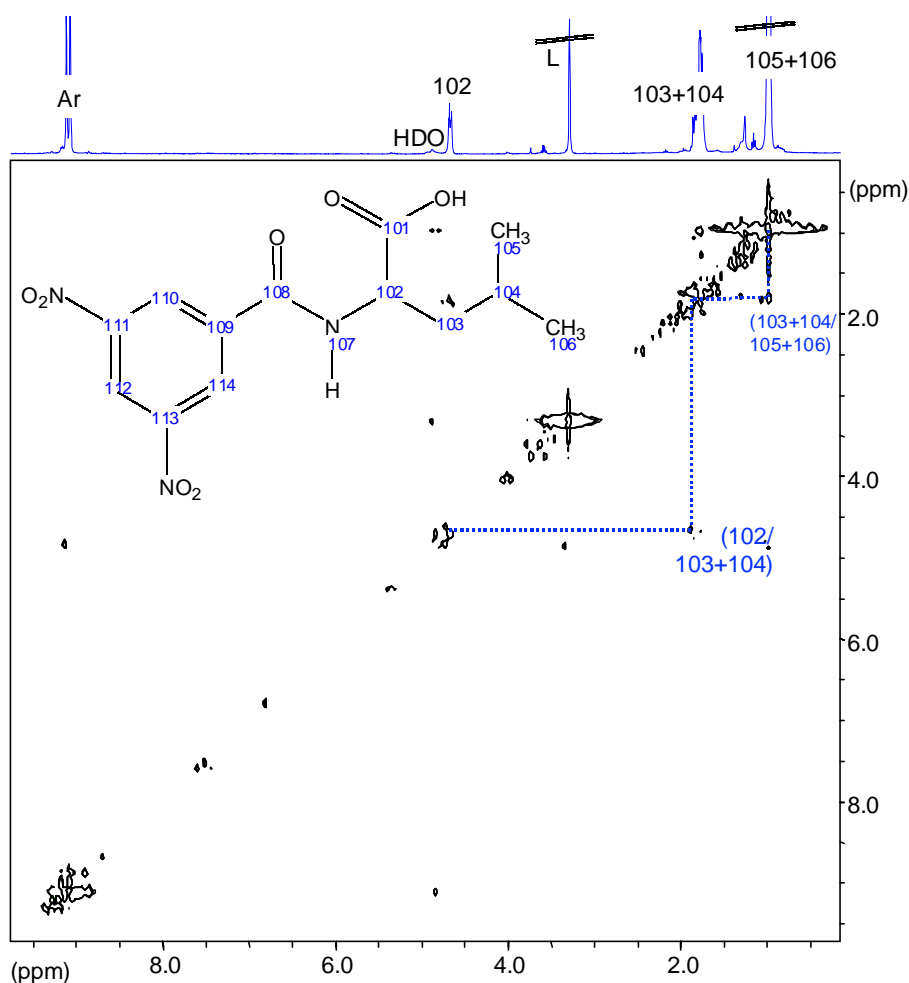


Abbildung 66: Modell für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Enantiomeren und dem Lösungsmittel Methanol

5.8 Untersuchung der Wechselwirkung zwischen DNB-(R/S)-Leucin mit tBuCQN-Thiokromasil in Methanol mit Lösungsmittelvorsättigung

Da zum Teil Unklarheiten über eindeutige Signalzuordnungen in der Nachbarschaft zu den Lösungsmittelsignalen (Methanol und darin enthaltenes Wasser) aufgetreten sind, wurde in weiteren Experimenten versucht, eine Empfindlichkeitssteigerung durch Lösungsmittelunterdrückung (Vorsättigung des Wassersignals) zu erzielen. Die trNOESY-Spektren von DNB-(R)- und DNB-(S)-Leucin wurden in Gegenwart von 5 und 15 mg tBuCQN-Thiokromasil aufgenommen (Abbildung 67 und 68).

5.8.1 trNOESY von DNB-(R)- und DNB-(S)-Leucin (0.1 mol/l) mit jeweils 5 mg tBuCQN-Thiokromasil



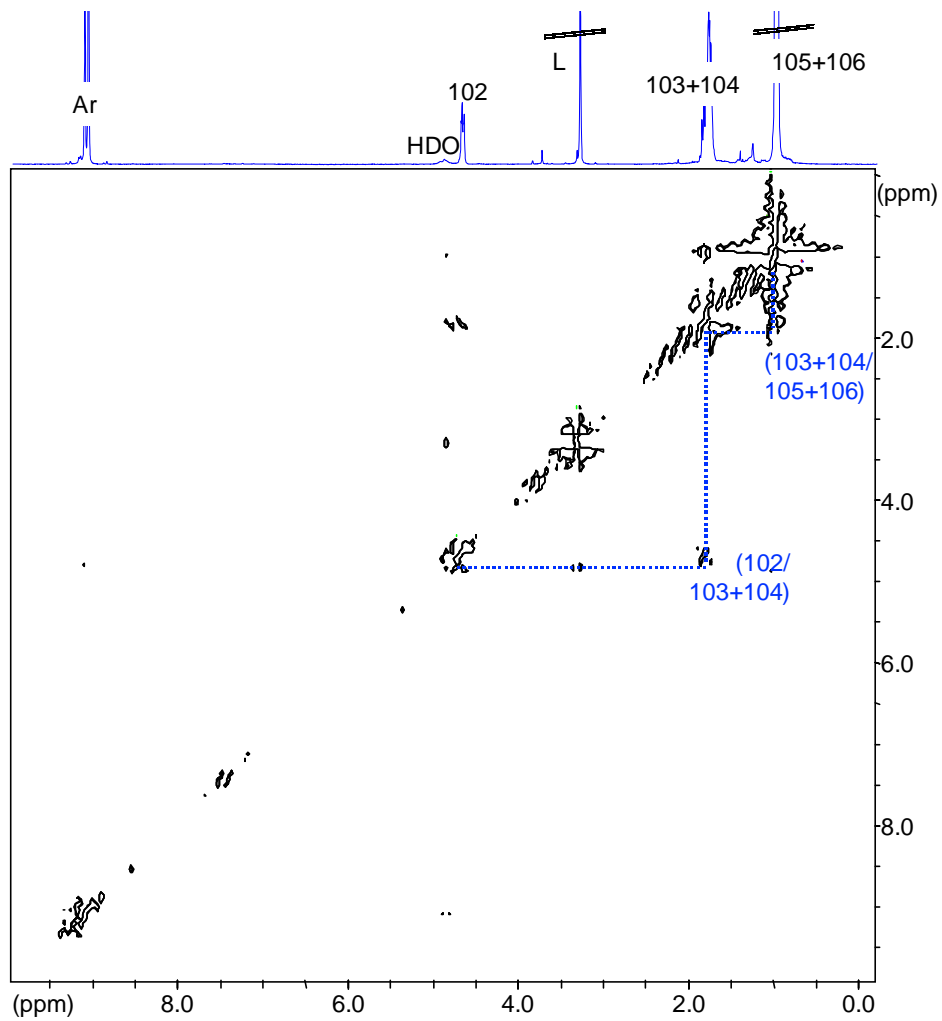


Abbildung 67: *trNOESY* Untersuchung (mit Lösungsmittelvorsättigung) der Wechselwirkung zwischen DNB-(*R*)-Leucin (oben) und DNB-(*S*)-Leucin (unten) mit 5 mg *t*BuCQN-Thiokromasil

5.8.2 trNOESY von DNB-(R)-und DNB-(S)-Leucin (0.1 mol/l) mit jeweils 15 mg tBuCQN-Thiokromasil

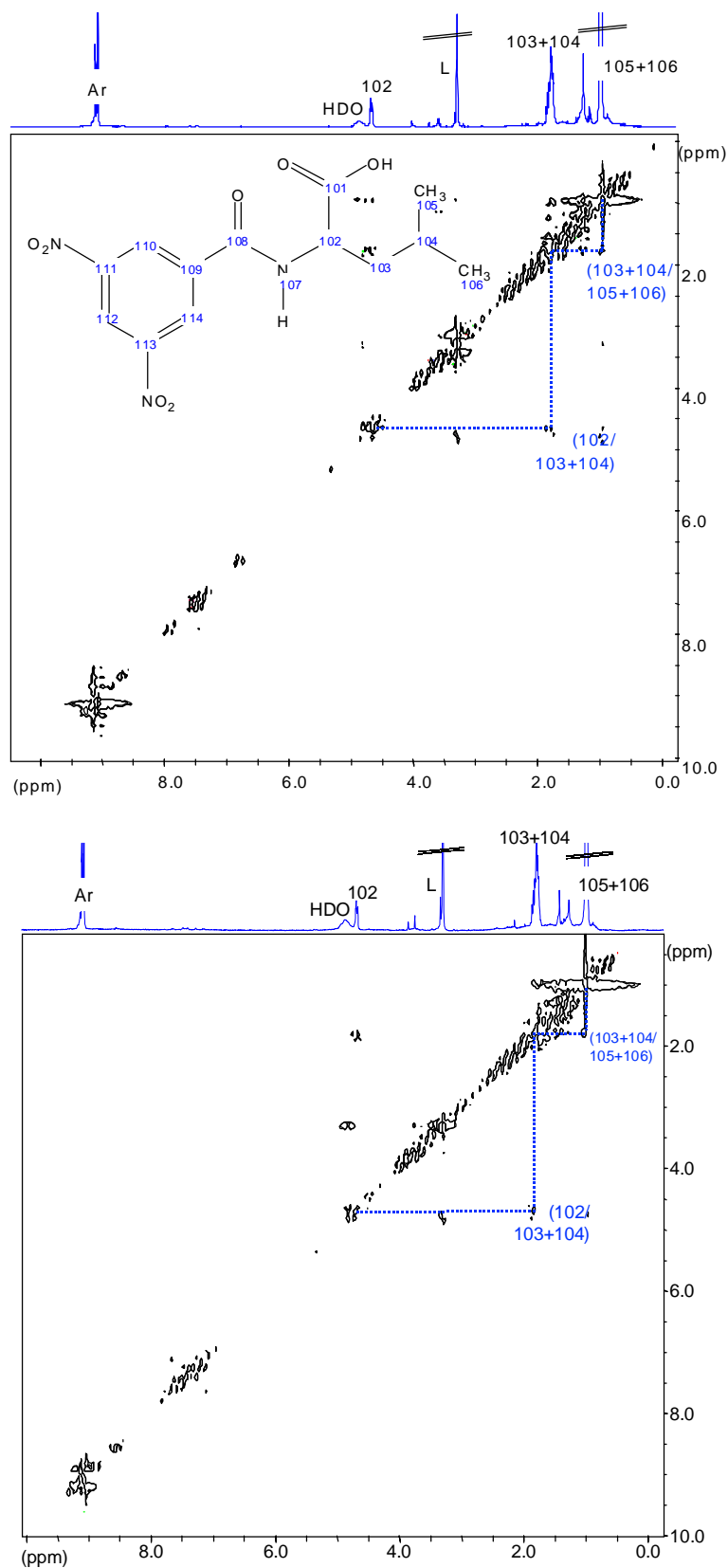


Abbildung 68: trNOESY Untersuchung (mit Lösungsmittelvorsättigung) der Wechselwirkung zwischen DNB-(R)-Leucin (oben) und DNB-(S)-Leucin (unten) mit 15 mg tBuCQN-Thiokromasil.

Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht der chemischen Verschiebungen von DNB-(R)- und DNB-(S)-Leucin sowie die Änderung in Abhängigkeit von 5 und 15 mg tBuCQN-Thiokromasil:

	DNB-(S)-Leu [Hz]	DNB-(S)-Leu + tBuCQN 5mg [Hz]	DNB-(S)-Leu + tBuCQN 15mg [Hz]	DNB-(R)-Leu [Hz]	DNB-(R)-Leu + tBuCQN 5mg [Hz]	DNB-(R)-Leu + tBuCQN 15mg[Hz]
Ar	3653.05	3651.58	3644.19		3652.56	3653.07
Ar	3651.09	3649.61	3642.23	3650.59	3650.59	3650.10
Ar	3649.12	3647.64	3640.26	3649.61	3648.62	3648.13
Ar	3635.83	3633.86	3629.92	3634.84	3635.35	3634.84
Ar	3633.86	3631.89	3627.95	3633.86	3632.87	3632.87
H(102)	1881.56	1880.08	1880.57	1881.07	1879.59	1878.11
H(102)	1878.11	1876.14	1877.13	1877.13	1875.65	1874.18
H(102)	1870.73	1870.73	1871.71	1870.73	1870.24	1868.76
H(102)	1868.76	1866.30	1867.28	1867.78	1865.81	1864.33
H(103+104)	748.47	747.98	746.99	747.98	747.40	746.01
H(103+104)	740.1	739.61	739.12	738.63	739.49	738.13
H(103+104)	730.75	737.64	737.15	729.77	737.12	736.17
H(103+104)	716.48	729.77	729.77	715.98	729.64	728.78
H(103+104)	707.62	724.35	724.35	707.12	717.35	717.46
H(103+104)	702.69	717.95	717.95	702.2	712.49	715.49
H(103+104)		715.49	711.53		706.63	711.06
H(103+104)		712.05	704.66		702.20	705.65
H(103+104)		706.63				702.69
H(103+104)		702.69				
CH3	406.38	405.89	404.90	405.39	405.39	404.91
CH3	400.47	399.98	398.99	400.47	399.49	398.50
CH3	396.53	395.55	395.55	395.55	395.55	395.05
CH3	390.63	389.64	390.13	390.13	389.64	389.64

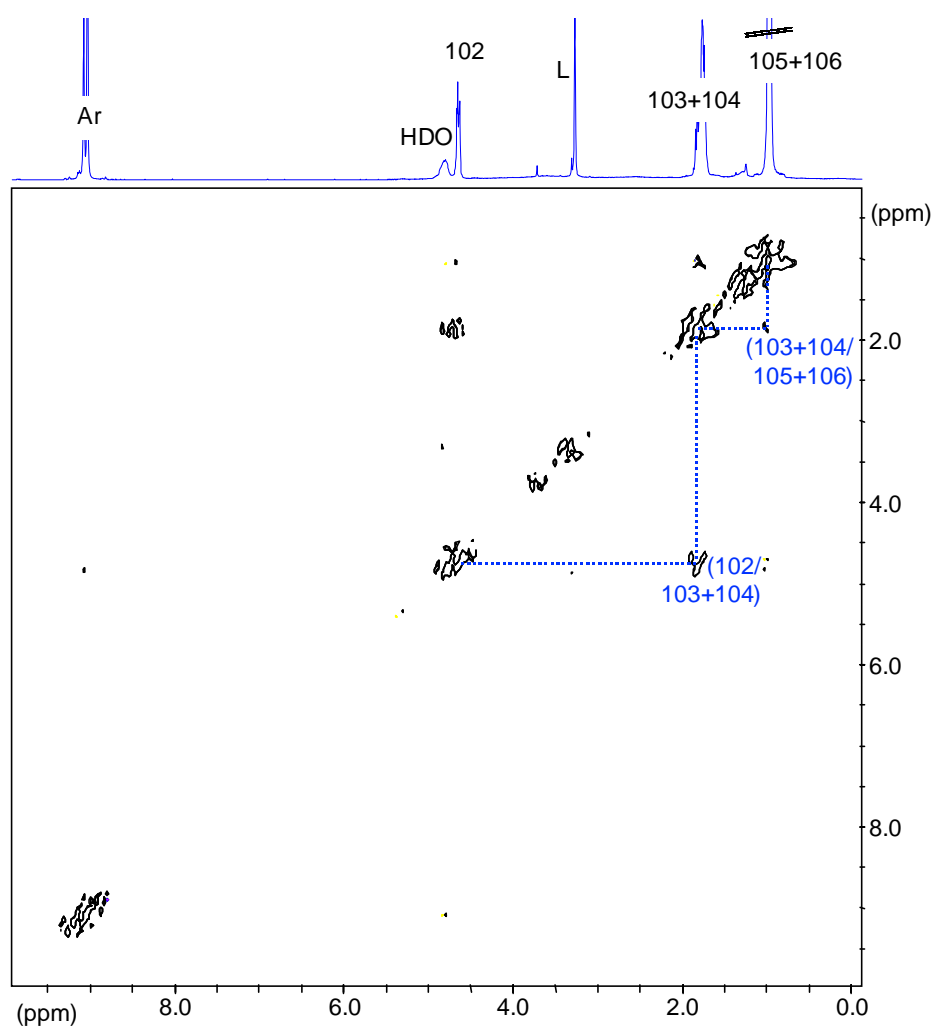
Tabelle 10: Chemische Verschiebung der Enantiomeren ohne und in Gegenwart von 5 und 15 mg stationäre Phase

Mit der verwendeten Lösungsmittelunterdrückung ist eine deutliche Verbesserung der spektralen Auflösung erzielt worden. Bei 5 mg tBuCQN ist im Falle des S-Enantiomers die Signalintensität wiederum stärker. Bei 15 mg erscheinen die Signale der chiralen Phase deutlicher im Spektrum. Parallel zu den intensiveren Signalen des tBuCQN-Thiokromasils kommt es zur Verbreiterung der Diagonalen in den trNOESY-Spektren. Das erschwert leider wiederum eine eindeutige Kreuzsignalzuordnung in den Randzonen der Diagonalen.

5.9 Molekulare Erkennung mit Thiokromasil und DNB-(R/S)-Leucin in Methanol

Um sicher zu gehen, dass die auftretende Wechselwirkungen und die zu beobachtende Unterschiede in der chiralen Erkennung auf den tBuCQN-Selektor zurückzuführen sind und nicht allein auf Wechselwirkungen mit dem Kieselgelbasismaterial, wurde in weiteren Messungen als stationäre Phase das Thiokromasil verwendet.

Die nachfolgende Abbildung zeigt die trNOESY-Spektren von DNB-R- und DNB-(S)-Leucin in Wechselwirkung mit jeweils 5 mg Thiokromasil im Lösungsmittel Methanol.



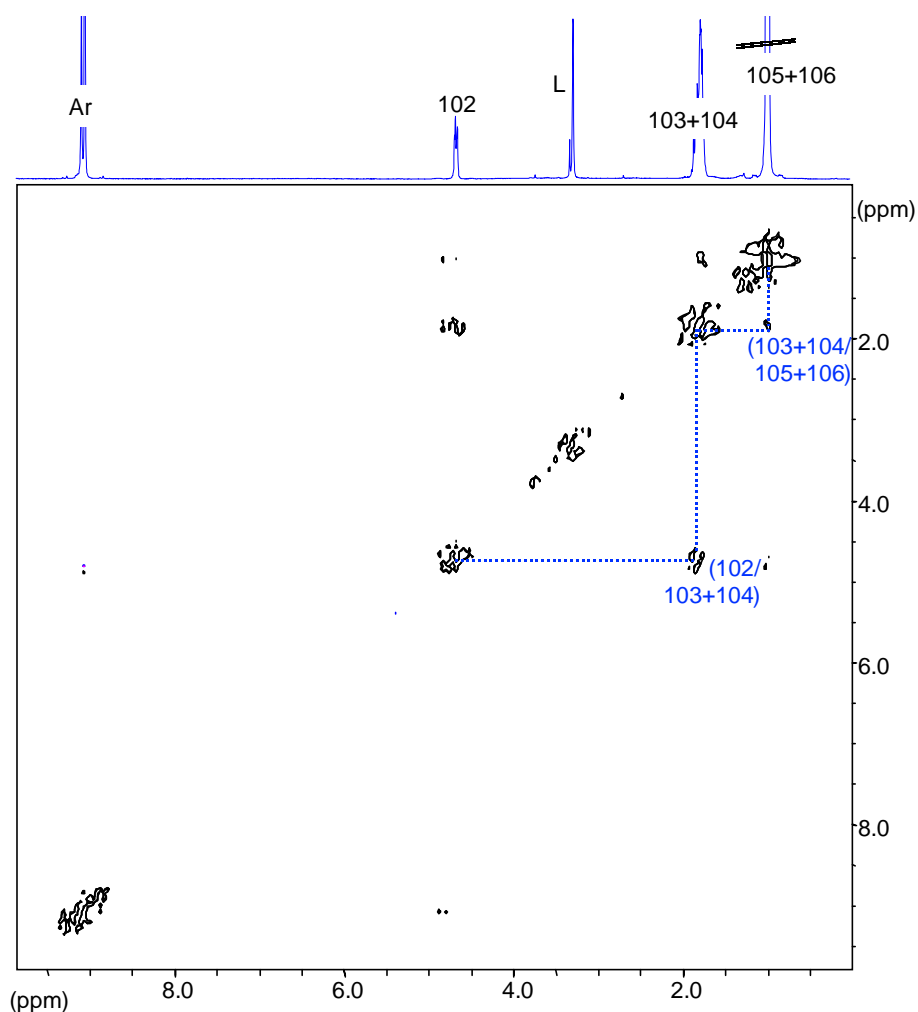


Abbildung 69: *trNOESY* Untersuchung (mit Lösungsmittelvorsättigung) der Wechselwirkung zwischen DNB-(R)-Leucin (oben) und DNB-(S)-Leucin (unten) mit 5 mg Thiokromasil in MeOH

Auffällig bei beiden *trNOESY*-Spektren der Abbildung ist nicht so sehr die geringere Signalintensität, als dass bei beiden Enantiomeren die Stärke der Kreuzsignale annähernd gleich ist. Das wird auch bestätigt durch die integrale Analyse (s. Tabelle 12) der Spektren, da ergeben sich die gleichen Werte der Intensitäten für das R- und S-Enantiomer. Mit der stationären Phase ohne chiralen Selektor treten demzufolge ebenfalls Wechselwirkungen auf. In diesem Fall zeigen sich allerdings keine Unterschiede in der chiralen Erkennung. Diese Differenzen treten eindeutig erst bei Anwesenheit des Selektors auf.

5.10 Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen tBuCQN-Thiochromasil und DNB-(R)-/(S)-Leucin in Acetonitril/Wasser 90:10

Die trNOESY-NMR-Untersuchungen wurden zusätzlich in einem Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril/Wasser durchgeführt, um eventuell die Unterschiede in der chiralen Erkennung zwischen den Enantiomeren deutlicher hervorzuheben. Ursprünglich war eine Messreihe mit variablen Verhältnissen zwischen Acetonitril und Wasser geplant. Nach den ersten Ergebnissen, bei denen erkennbar schlechtere Wechselwirkungen detektiert wurden, sind diese Untersuchungen nicht fortgesetzt worden. Begonnen wurde mit einem Mischungsverhältnis Acetonitril/Wasser von 90:10, diese Resultate werden im folgenden vorgestellt und diskutiert. Der Einsatz von Lösungsmittelgemischen ist in der Chromatographie ein gebräuchliches Verfahren um die Separation der Analyten zu verbessern.

5.10.1 Charakterisierung von DNB-(R)-Leucin in Acetonitril/Wasser 90:10 mittels ^1H - und 2D NOESY-HR-MAS-NMR-Spektroskopie

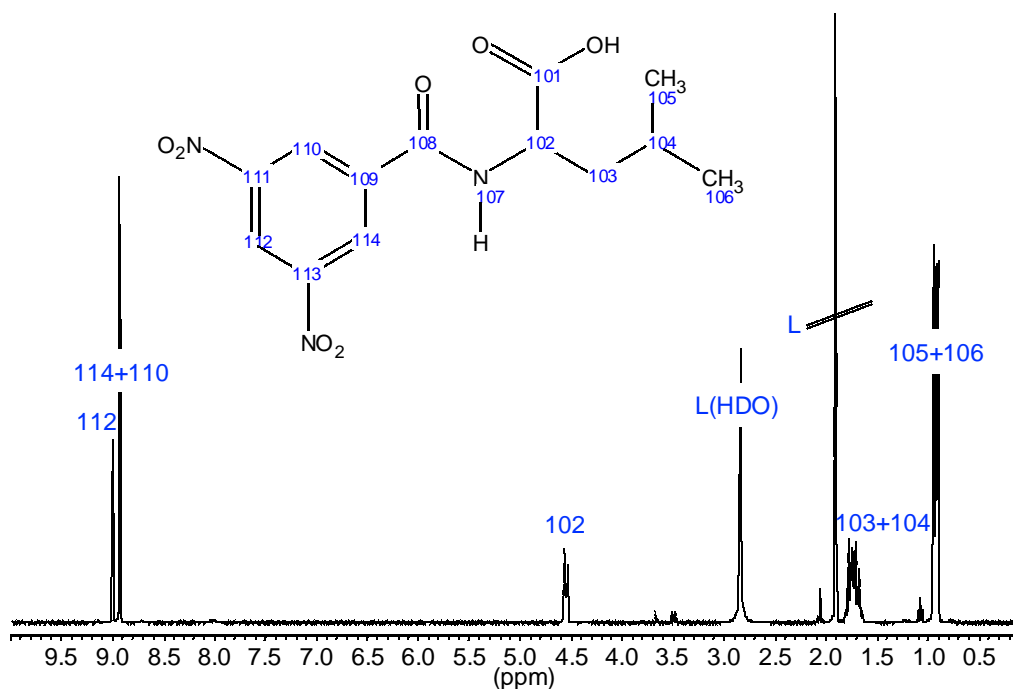


Abbildung 70: ^1H -HR-MAS-NMR-Spektrum von DNB-(R)-Leucin in Acetonitril/Wasser 90:10

Abbildung 70 und 72 zeigen die ^1H -HR-MAS-NMR-Spektren von DNB-(R)- und DNB-(S)-Leucin in Acetonitril/Wasser. Die aromatischen Protonen zeigen Resonanzen bei 9.1 ppm

H(112) und 9.0 ppm H(110+114). Auch hier tritt wieder eine Tieffeldverschiebung aufgrund des elektronenziehenden Effekts der beiden NO₂-Substituenten auf. Das Signal des Protons H(102) am Chiralitätszentrum erscheint bei 4.6 ppm. Die Protonen H(103+104) zeigen Signale bei 1.75 ppm, in direkter Nachbarschaft zum Lösungsmittelsignal. Auch im Lösungsmittelgemisch Acetonitril/Wasser ist die Aufspaltung sowie Überlagerung der Signale sehr stark. Weiterhin besitzen die Protonen der Methylgruppen Resonanzen bei 1.0 ppm.

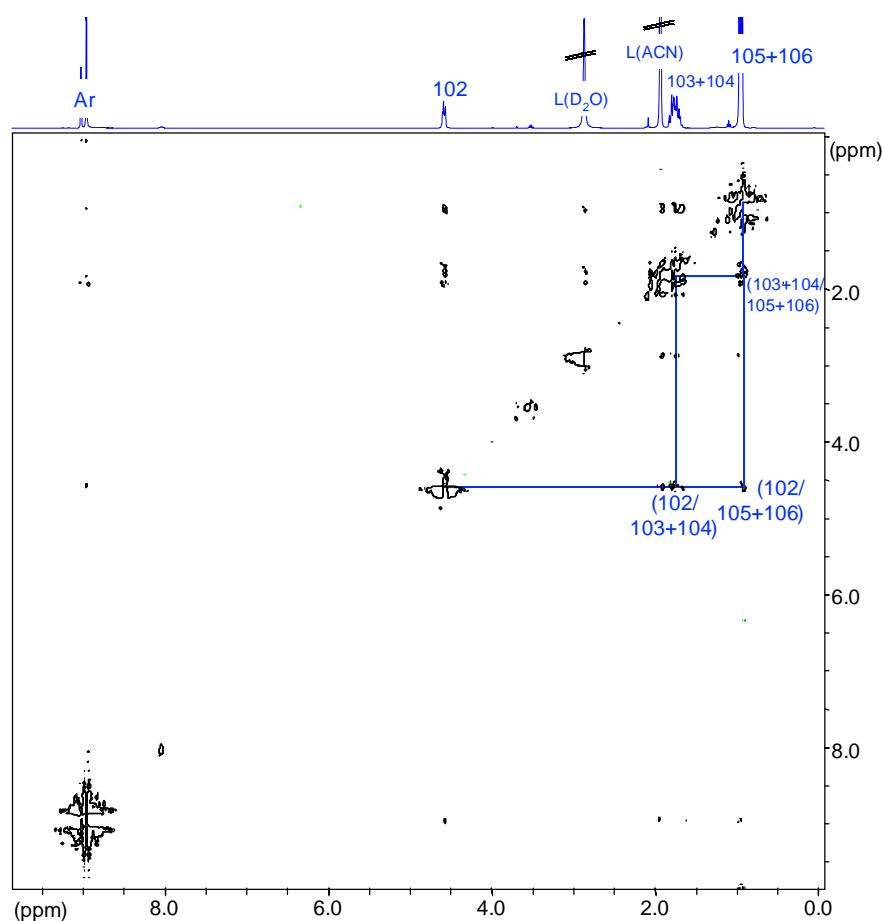


Abbildung 71: 2D NOESY-HR-MAS-NMR-Spektrum von DNB-(R)-Leucin in Acetonitril/Wasser 90:10

Beide NOESY-Spektren (Abbildung 71 und 73) der Enantiomeren zeigen die gleichen Kreuzsignale zwischen H(103+104) und H(105+106), sowie zwischen diesen Protonen und H(102).

5.10.2 Charakterisierung von DNB-(S)-Leucin in Acetonitril/Wasser 90:10 mittels ^1H - und 2D NOESY-HR-MAS-NMR-Spektroskopie

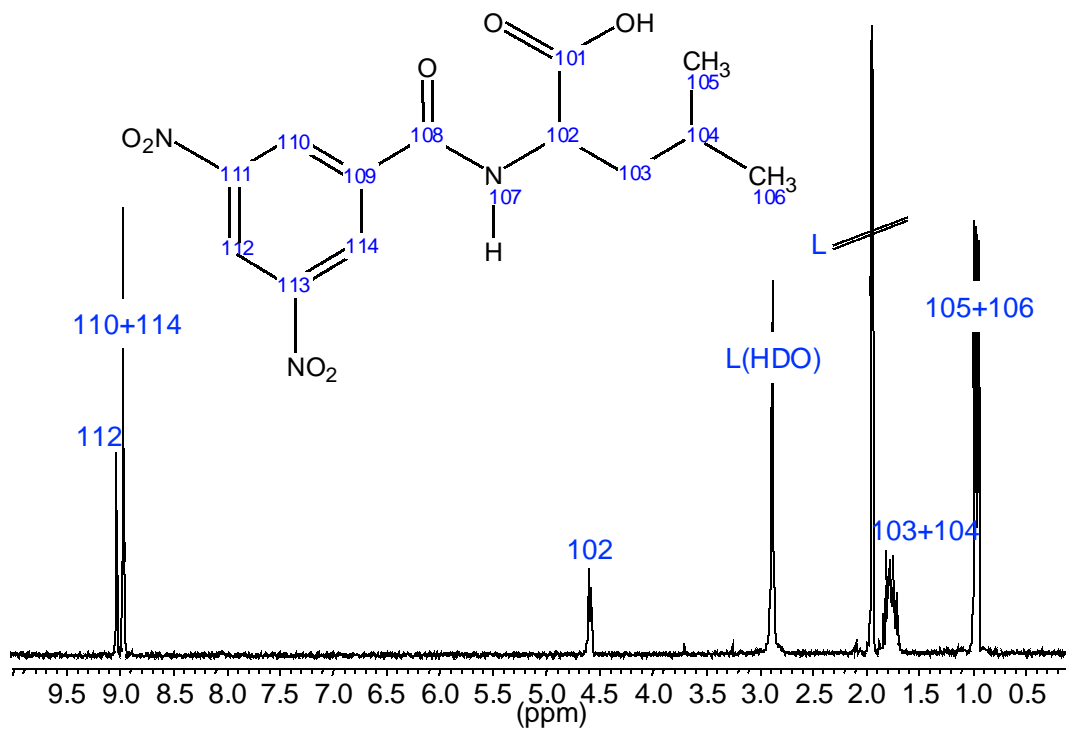


Abbildung 72: ^1H -HR-MAS-NMR-Spektrum von DNB-(S)-Leucin in Acetonitril/Wasser 90:10

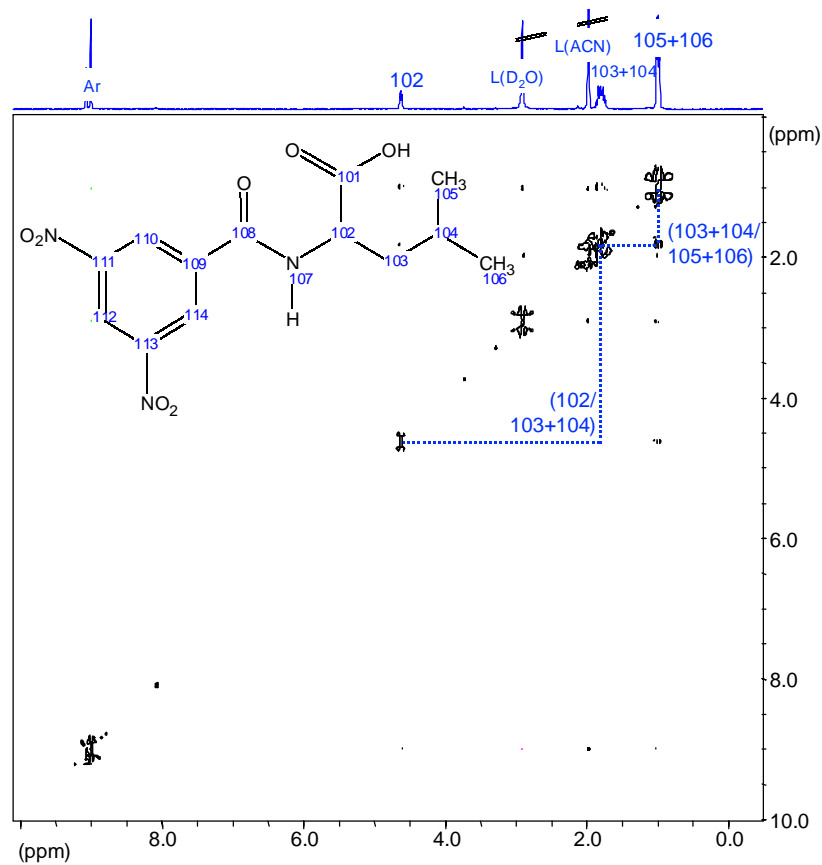


Abbildung 73: 2D NOESY-HR-MAS-NMR-Spektrum von DNB-(S)-Leucin in Acetonitril/Wasser 90:10

5.10.3 trNOESY-NMR-Spektren von DNB-(R/S)-Leucin und tBuCQN-Thiokromasil (5 mg) in Acetonitril/Wasser 90:10

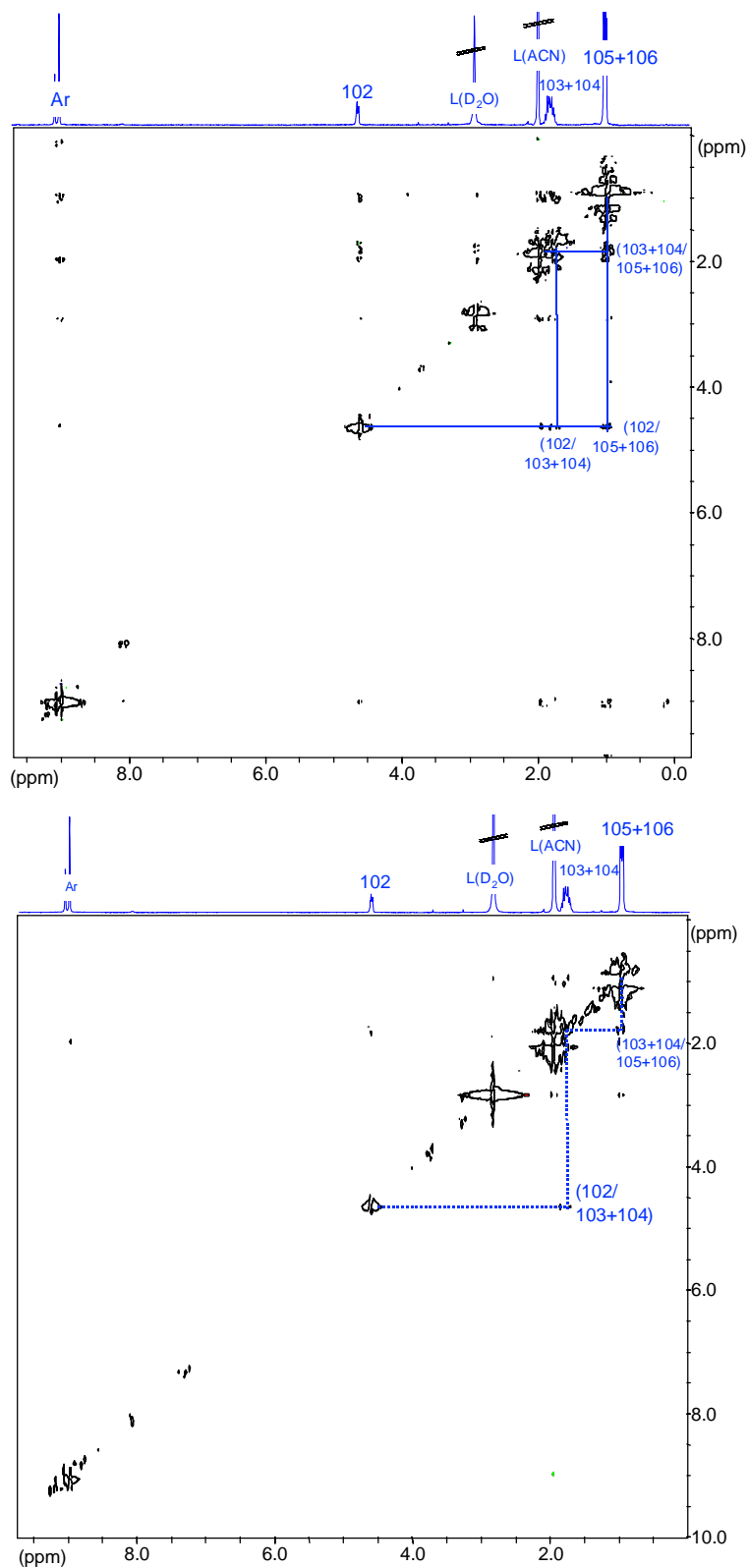


Abbildung 74: trNOESY-NMR-Spektrum von DNB-(R)-Leucin (0.1 mol/l) (oben), sowie DNB-(S)-Leucin (unten) in Wechselwirkung mit tBuCQN-Thiokromasil (5 mg) suspendiert in Acetonitril/ Wasser 90:10.

5.10.4 trNOESY-NMR-Spektren von DNB-(R/S)-Leucin und tBuCQN-Thiokromasil (15 mg) in Acetonitril/Wasser 90:10

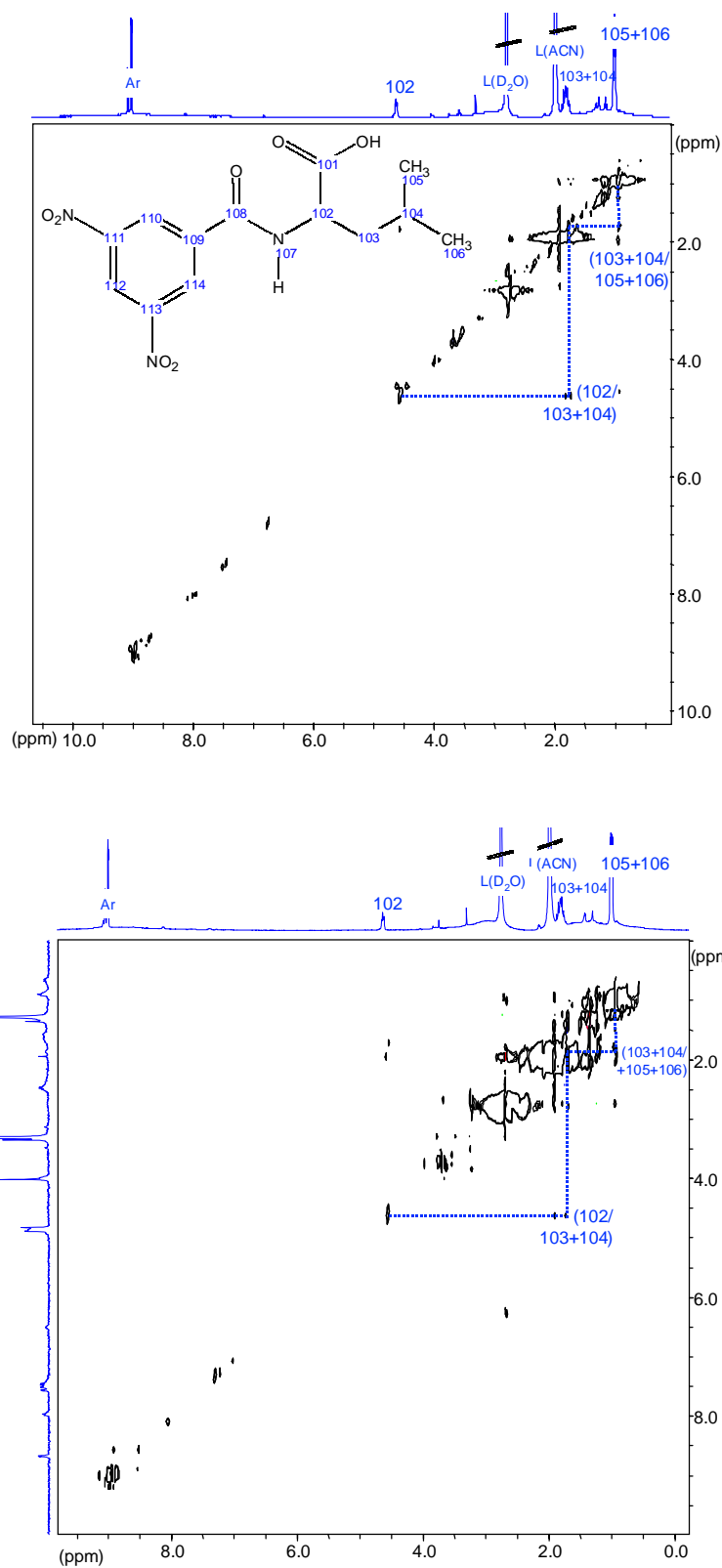


Abbildung 75: trNOESY-NMR-Spektrum von DNB-(R)-Leucin (0.1 mol/l) (oben), sowie DNB-(S)-Leucin (unten) in Wechselwirkung mit tBuCQN-Thiokromasil (15 mg) suspendiert in Acetonitril/ Wasser 90:10.

Im Vergleich zu den in Methanol durchgeführten Untersuchungen fällt hier zunächst die geringere Intensität der Signale, sowohl bei den NOESY-Spektren, als auch bei den trNOESY-Spektren der Enantiomeren und der chiralen Phase, auf. Die gefundenen trNOEs der Experimente mit einer zugegebenen Kieselgelmenge von 5 mg und die unterschiedlichen Intensitäten der Kreuzsignale von DNB-(R)- und DNB-(S)-Leucin bestätigen die stärkere Wechselwirkung des S-Enantiomers. Hier kommt es gleichfalls, bei den trNOESY-Spektren mit 15 mg stationärer Phase, zu einer Verbreiterung der Linienform der Diagonalen, dadurch ist es schwer gewesen, eindeutige Kreuzsignale der Enantiomeren zuzuordnen.

Auch bei dieser Messreihe sind erneut Unterschiede zwischen DNB-(R)- und DNB-(S)-Leucin zu erkennen. Das S-Enantiomer zeigt abermals deutlichere Kreuzsignale, bei gleicher Verstärkung der Spektren ergibt die Integration ausgewählter Signale (H16) eine wesentlich größere Signalintensität für das S-Enantiomer, was nochmals für die stärkeren Wechselwirkungen dieses Enantiomers spricht (s. Tabelle 12).

Die nachfolgende Tabelle 11 führt die chemische Verschiebung der Enantiomerensignale in Abhängigkeit von der zugegebenen Kieselgelmenge auf:

	DNB-(R)-Leu [Hz]	DNB-(R)-Leu + tBuCQN 5 mg [Hz]	DNB-(R)-Leu + tBuCQN 15 mg [Hz]	DNB-(S)-Leu [Hz]	DNB-(S)-Leu + tBuCQN 5 mg [Hz]	DNB-(S)-Leu + tBuCQN 15 mg [Hz]
Ar	3611.37	3611.37	3609.4	3611.37	3607.92	3615.8
Ar	3608.91	3608.91	3607.43	3609.4	3606.94	3600.05
Ar	3606.94	3606.94	3605.46	3607.43	3605.96	3598.08
Ar	3583.81	3584.3	3585.78	3583.81	3583.81	3596.11
Ar	3581.84	3582.33	3583.81	3581.84	3581.84	3579.87
Ar						3577.9
H(102)	1838.89	1860.06	1834.46	1838.89	1837.91	1838.4
H(102)	1834.46	1838.4	1829.54	1834.46	1833.48	1833.48
H(102)	1829.05	1833.97	1824.12	1829.05	1828.06	1828.06
H(102)	1824.62	1828.55	1819.69	1824.62	1824.12	1823.63
H(103+104)	731.89	731.4	724.51	731.4	727.46	725.98
H(103+104)	727.95	727.46	714.17	727.95	716.14	715.65
H(103+104)	717.12	717.12	708.75	717.12	710.23	709.74
H(103+104)	710.72	710.72	703.83	710.72	705.8	705.31
H(103+104)	706.29	705.8	701.86	706.29	703.83	702.85
H(103+104)	703.83	703.83	697.93	704.32	698.42	701.37
H(103+104)	699.9	699.4	691.04	699.89	691.53	698.91
H(103+104)	697.43	697.43	685.13	697.43	685.13	693.5
H(103+104)	691.04	691.04	681.19	691.53	680.7	683.65
H(103+104)	685.13	685.13	676.27	685.13	676.76	678.73
H(103+104)	681.19	681.19		681.19	666.42	
H(103+104)	676.27	676.27		676.27		
H(103+104)	673.32	673.81		665.93		
H(103+104)	669.87	665.93				
H(103+104)	665.93					
CH3	387.83	387.83	386.35	387.83	386.84	387.34
CH3	381.43	381.43	380.44	381.92	381.43	381.43
CH3	376.51	376.51	376.01	376.51	376.01	377
CH3	370.6	370.6	370.11	370.6	370.6	370.6

Tabelle 11: Chemische Verschiebung der Enantiomeren ohne und in Gegenwart von 5 und 15 mg stationäre Phase

Es sind nur geringfügige Änderungen in den chemischen Verschiebungswerten der Signale zu erkennen, dennoch lässt sich kein einheitlicher Gang feststellen. Die größten Verschiebungsänderungen treten bei den Proben mit 15 mg stationärer Phase auf.

Es zeigt sich auch, dass das trNOESY-Experiment eine sehr empfindliche Methode ist, die auch bei kleinen Rezeptorkonzentrationen Unterschiede in Wechselwirkungen qualitativ aufzeigen kann.

Weitere Informationen ergeben sich, bei der Betrachtung der Linienbreite der Protonensignale in Abhängigkeit von der zugegebenen Menge an stationärer Phase (s. auch Abbildung 76).

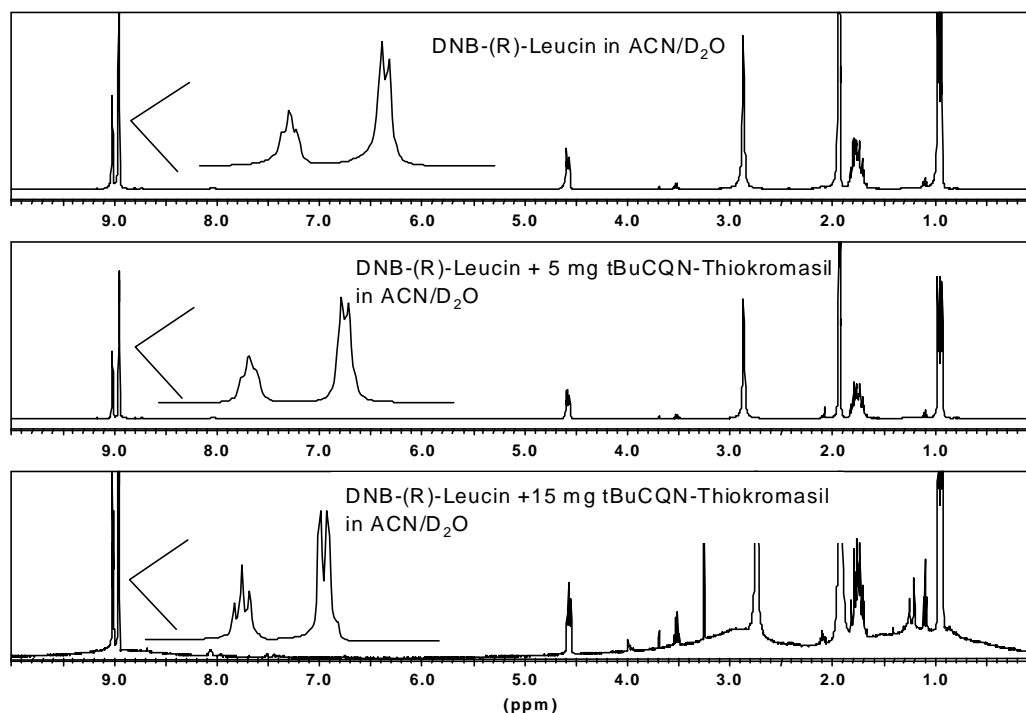


Abbildung 76: Vergleich der Linienbreiten von DNB-(R)-Leucin ohne und mit tBuCQN-Thiokromasil in Acetonitril/Wasser.

Im Falle des Lösungsmittelgemisches Acetonitril/Wasser kommt es bereits im isolierten Enantiomer zur Aufspaltung der aromatischen Signale. Hier sind entweder die Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel schwächer oder aber sie sind gerichtet, so dass nur wenige Spezies mit unterschiedlichen chemischen Verschiebungen vorliegen. Durch die Zugaben von 5 mg Kieselgel ergibt sich keine Änderung in der Linienbreite der Signale, was für die H-Brücken zum Lösungsmittel und zudem für schwache Wechselwirkungen zur stationären Phase spricht, wie es sich bereits aus den trNOESY Untersuchungen ergeben hat. Anders jedoch bei 15 mg tBuCQN-Thiokromasil, hier tritt eine wesentlich stärkere Aufspaltung der Signale auf, und es ergibt sich daraus, dass die Wasserstoffbrückenbindungen zum Lösungsmittel stärker sind als bei Methanol und erst durch ein größeres Angebot an Rezeptorstellen beeinflusst werden. Das deckt sich auch mit den Resultaten der trNOESY-Experimente, bei denen mit 5 mg stationärer Phase schwächere Wechselwirkungen der Enantiomeren detektiert werden als in Methanol.

5.11 Vergleich der Signalintensitäten von DNB-R- und -S-Leucin mit verschiedenen Rezeptorbedingungen

Die nachfolgende Tabelle 12 gibt eine Übersicht der Intensitäten der Kreuzsignale H(17/18)/H(105+106) von DNB-R- und DNB-(S)-Leucin. Berücksichtigt wurden dabei die unterschiedlichen Bedingungen, unter denen die Wechselwirkungen an der stationären Phase stattgefunden haben. Die Werte wurden durch Integration der entsprechenden 2D trNOESY-Spektren ermittelt.

	Thiokromasil [5 mg] in MeOH	tBuCQN- Thiokromasil [5 mg] in MeOH	tBuCQN- Thiokromasil [15 mg] in MeOH	tBuCQN- Thiokromasil [5 mg] in ACN/D ₂ O	tBuCQN- Thiokromasil [15 mg] in ACN/D ₂ O
DNB-(R)-Leucin (0.1 mol/l)	0.04	0.07	0.09	0.01	0.001
DNB-(S)-Leucin (0.1 mol/l)	0.05	0.20	0.09	0.02	0.164

Tabelle 12: Signalintensitäten von DNB-R/S-Leucin unter verschiedenen Rezeptorbedingungen

Mit dem Thiokromasil ohne chiralen Selektor zeigen sich zwischen beiden Enantiomeren keine Unterschiede in den Signalintensitäten, die molekulare Erkennung ist gleich stark. Bei 5 mg tBuCQN-Thiokromasil in Methanol ist die chirale Wechselwirkung zum DNB-(S)-Leucin rund dreimal größer als beim R-Enantiomer, wohingegen sich bei 15 mg stationärer Phase Unterschiede zeigen. Bei diesen Spektren sind die Diagonalsignale durch die relativ große Menge an stationärer Phase verbreitert, was eine detaillierte Integration erschwert, da die Diagonalsignale zur Kalibrierung verwendet werden.

Die Entwicklung zur stärkeren molekularen Erkennung beim DNB-(S)-Leucin setzt sich auch im Lösungsmittelgemisch Acetonitril/Wasser fort und wird sogar bei 15 mg noch deutlicher. Es lassen sich demzufolge zwei Trends feststellen, die chirale Diskriminierung der Enantiomeren findet eindeutig durch den chiralen Selektor statt. Außerdem ergibt sich sowohl in Methanol als auch in Acetonitril/Wasser eine stärkere chirale Erkennung für das DNB-(S)-Leucin.

5.12 Untersuchung der Wechselwirkung zwischen DNB-(R/S)-Leucin und tBuCQN mittels 2D ROESY-NMR-Spektroskopie unter Hochauflösungsbedingungen

Die Idee zu diesen Experimenten ist aus der Tatsache entstanden, dass der chirale Selektor tBuCQN löslich ist, wenn er im ungebundenen Zustand, nicht auf Kieselgel immobilisiert, vorliegt. Die Untersuchungen beschäftigen sich auch mit der Frage, ob im gelösten Zustand Unterschiede in der chiralen Diskriminierung der Enantiomeren festzustellen sind und wenn ja, ob sich Parallelen oder Abweichungen zu den Resultaten mit den Kieselgelphasen ergeben. Die Untersuchungen wurden am 600 MHz Spektrometer durchgeführt. Die hohe Frequenz führt dabei zu einer Intensitätssteigerung der erwarteten Kreuzsignale, da bei der ROESY (Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy)-NMR-Spektroskopie, der Aufnahme von Wechselwirkungen über den Raum hinweg im rotierenden Koordinatensystem, die ROE-Signalintensität mit zunehmender Frequenz bis zu einem Grenzwert zunimmt.

Um die chemischen Verschiebungswerte der Einzelsubstanzen und Komplexe miteinander vergleichen zu können, wurden zunächst die Substanzen einzeln untersucht und anschließend die Mischung des jeweiligen Enantiomers mit dem tBuCQN im Verhältnis 1:1 (0.1 mol/l).

Die nachfolgende Tabelle 13, sowie das Diagramm 1 zeigen die chemischen Verschiebungen der Protonen der Enantiomeren ohne und in Anwesenheit des chiralen Selektors auf:

Probe	H(112) $\Delta\delta$ [Hz]	H(110+114) $\Delta\delta$ [Hz]	H(102) $\Delta\delta$ [Hz]	H(103+104) $\Delta\delta$ [Hz]	H(105+106) $\Delta\delta$ [Hz]
DNB-(R)-Leucin	5483	5457 5455	2819	1128-1048	608
	5481		2815		602
	5479		2809		592
			2805		586
DNB-(S)-Leucin	5483	5457 5455	2819	1128-1048	608
	5481		2815		602
	5479		2809		592
			2805		586
DNB-(R)-Leu + tBuCQN	5011	5019 5017	2363	682-613	179
	5009		2356		177
	5007		2355		172
			2348		171
DNB-(S)-Leu + tBuCQN	4759	4793 4788	2550	793-703	256
	4757		2545		251
	4755		2540		249
			2535		245

Tabelle 13: Chemische Verschiebungswerte der Leucin-Signale ohne und in Anwesenheit des chiralen Selektors tBuCQN

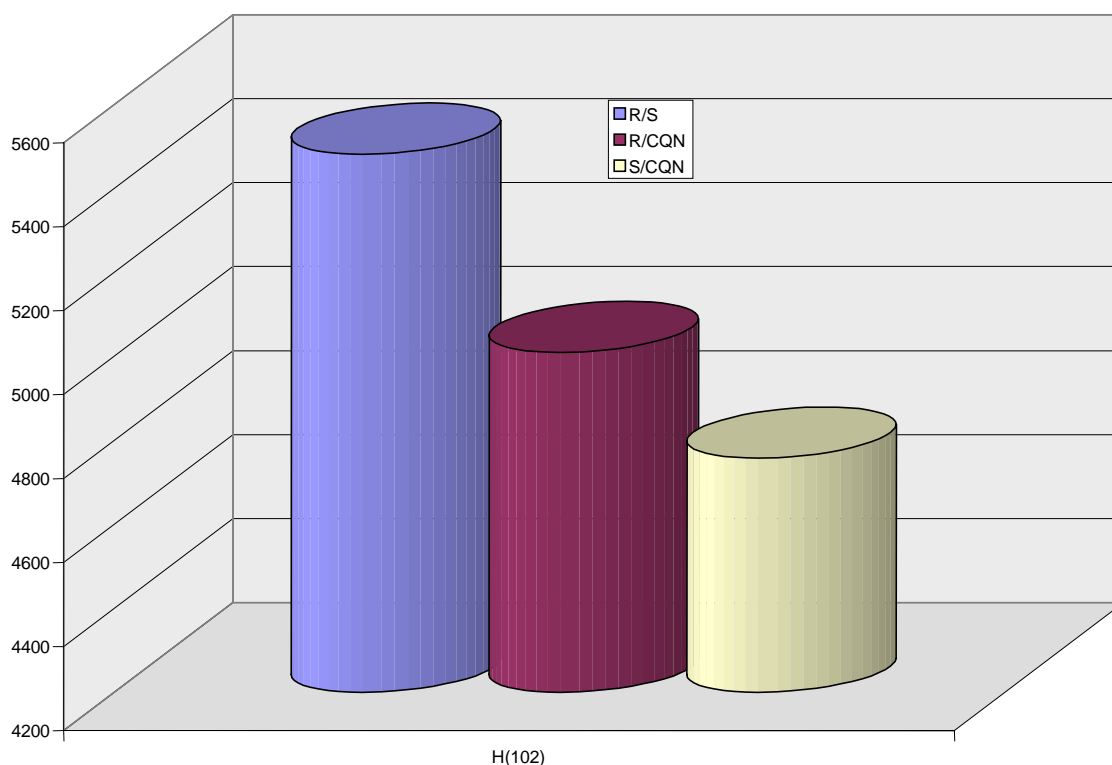


Diagramm 1: Chemische Verschiebungswerte der Leucin-Signale ohne und in Anwesenheit des chiralen Selektors tBuCQN exemplarisch für das Proton H(112)

Die chemische Verschiebungsänderung der aromatischen Protonen des DNB-(S)-Leucins in Anwesenheit des chiralen Selektors tBuCQN ist mit 724 Hz H(112) bzw. 665 Hz H(110+114) wesentlich stärker als bei DNB-(R)-Leucin (472 Hz H(112), 438 Hz H(110+114)). Die chemische Verschiebungsänderung der Protonen H(102) (456 Hz), H(103+104) (440 Hz) und H(105+106) (418 Hz) ist dagegen bei DNB-(R)-Leucin stärker als bei DNB-(S)-Leucin (H(102), 269 Hz; H(103+104), 340 Hz; H(105+106), 347 Hz). Dieses Phänomen legt den Schluss nahe, dass bei den Enantiomeren der Wechselwirkungsmechanismus mit dem Rezeptor unterschiedlich ist. Aussagen über die chirale Diskriminierung sind mit den vorliegenden Ergebnissen nur in Kombination zu den Resultaten der ROESY-NMR-Experimente möglich.

5.12.1 2D ROESY-NMR-Spektrum von DNB-(R)-Leucin und tBuCQN in Methanol

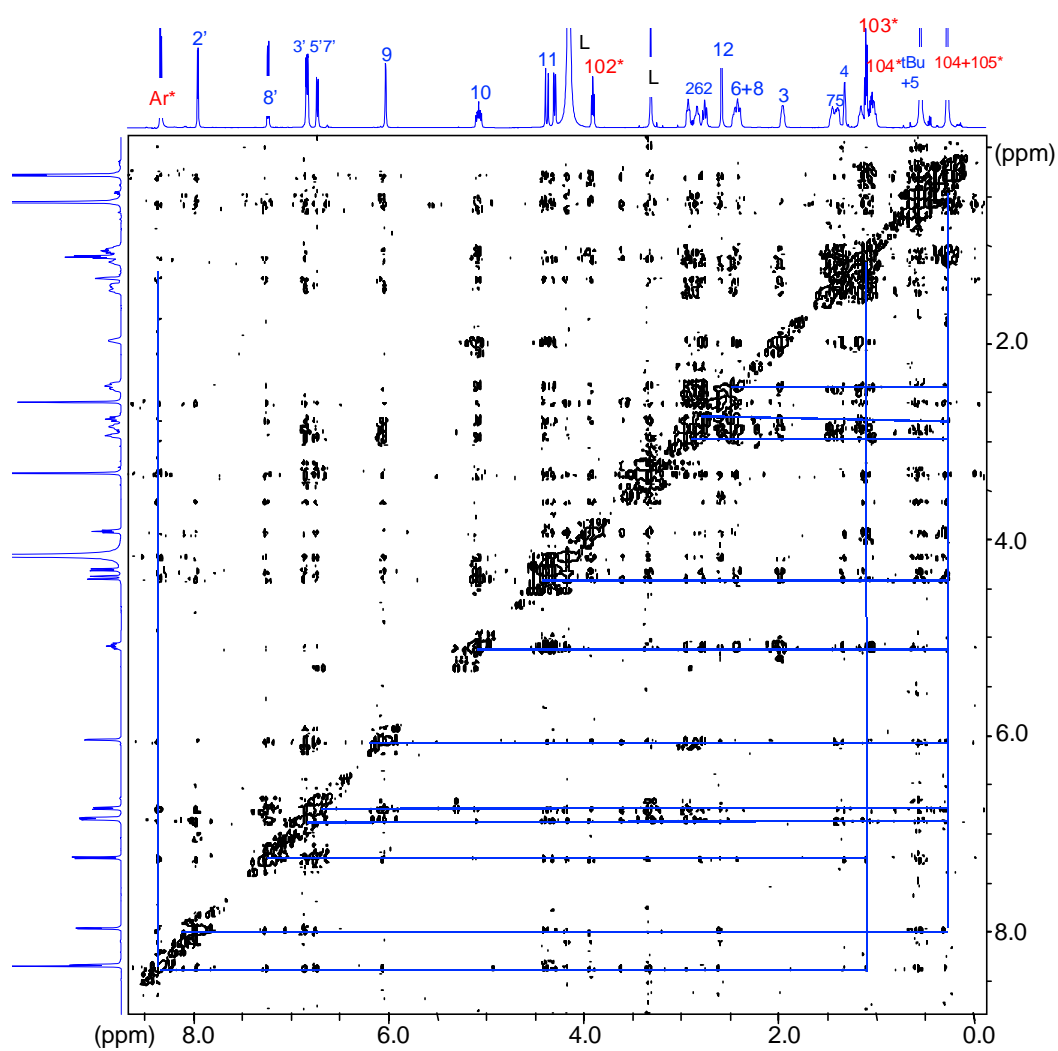
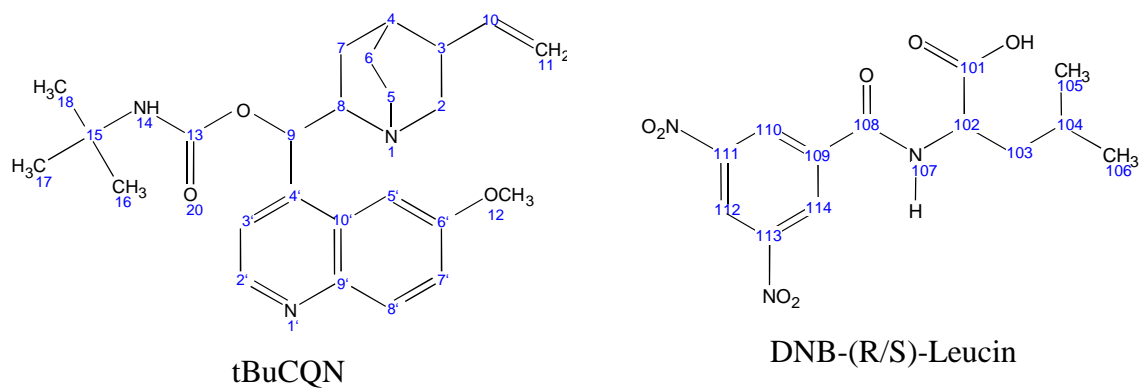


Abbildung 77: ROESY-NMR-Spektrum von DNB-(R)-Leucin(*) (0.1 mol/l) in Wechselwirkung mit tBuCQN in Methanol- d_4

5.12.2 2D ROESY-NMR-Spektrum von DNB-(S)-Leucin und tBuCQN in Methanol

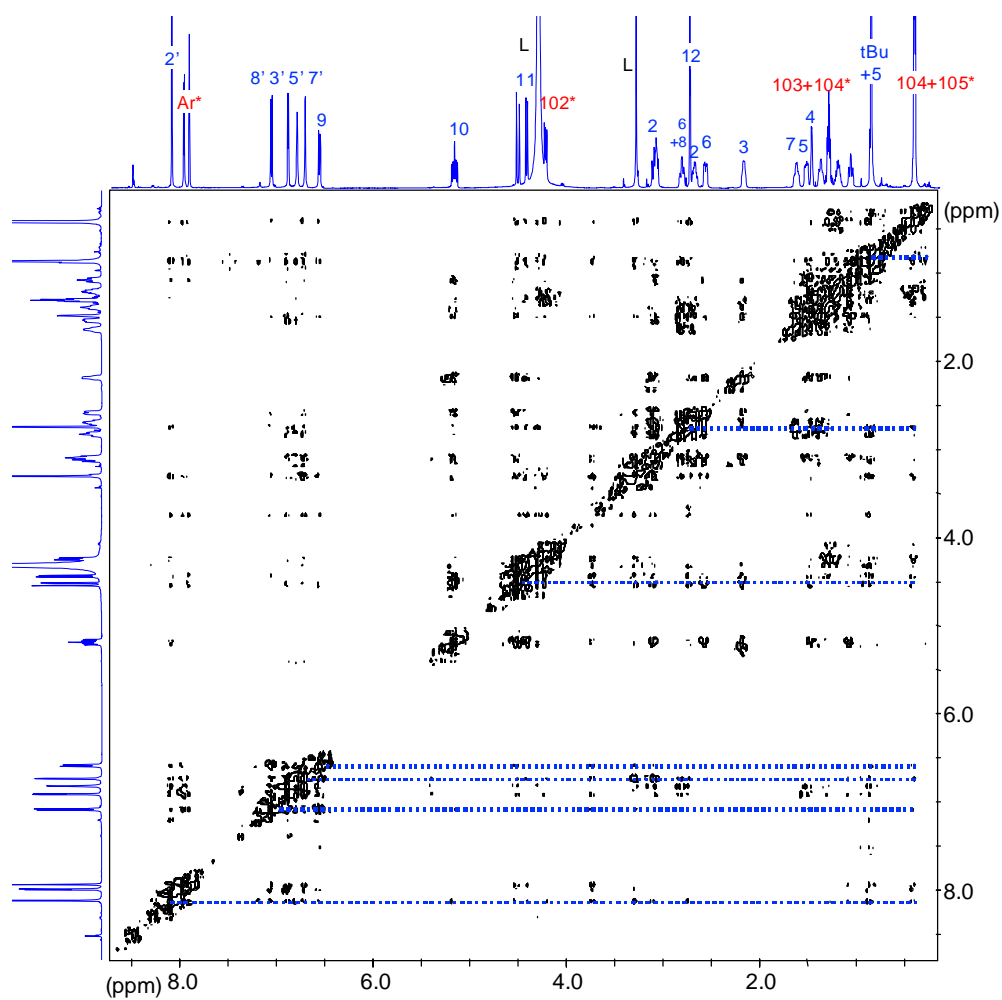
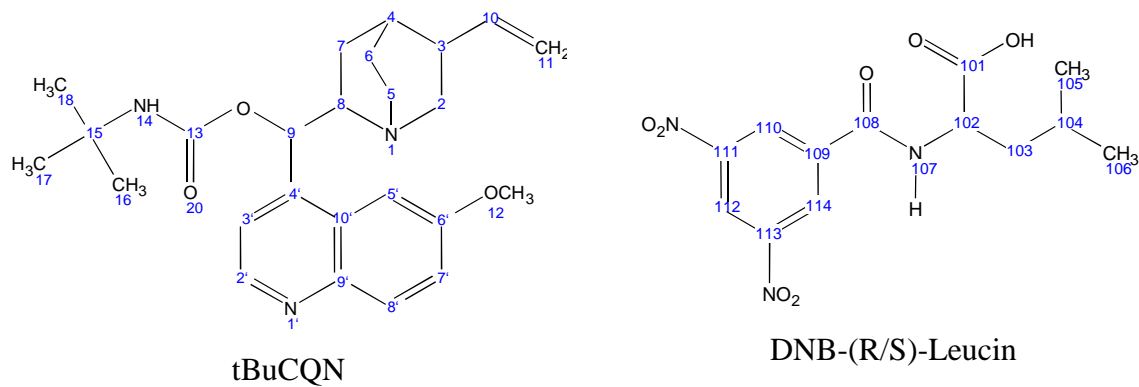


Abbildung 78: ROESY-NMR-Spektrum von DNB-(S)-Leucin(*) (0.1 mol/l) in Wechselwirkung mit tBuCQN in Methanol- d_4

Die nachfolgende Tabelle 14 gibt eine Übersicht der gefundenen ROEs zwischen dem jeweiligen Enantiomer und tBuCQN aufgrund der vorhandenen Wechselwirkungen.

Leu \ tBuCQN	2'	8'	3'	5'	7'	9	10	11	2	12	6+8	3	7	4	tBu
105+106	S/R	S	R	S/R	R	S/R	R	S/R		S/R		R	S		S/R
103+104			R	R						S/R		S/R			
102	S		S					R							
Aryl	S/R	SR	S/R	S/R	R	S/R		R		S/R					S/R

Tabelle 14: ROEs zwischen DNB-(R/S)-Leucin und dem Selektor tBuCQN

Der qualitative Vergleich der o.g. ROESY-Spektren (Abbildung 77 und 78) ergibt, bei gleicher Verstärkung der Spektren, eine größere Signalintensität der ROEs bei DNB-(S)-Leucin. Das DNB-(R)-Leucin weist vielfältigere Wechselwirkungen auf, die Signale sind jedoch deutlich schwächer. Eine vergleichende Integration beider Spektren an ausgewählten Cross-Peaks hat, bei gleicher Verstärkung der Spektren, eine um die Hälfte reduzierte Signalintensität bei DNB-(R)-Leucin ergeben. Zusammenfassend lässt sich aus den vorgestellten Resultaten schließen, dass bei der Wechselwirkung DNB-(S)-Leucin und tBuCQN stärkere ROEs auftreten, die Wechselwirkungen sind gerichtet. Beim Enantiomer DNB-(R)-Leucin dagegen sind die Wechselwirkungen insgesamt schwächer und die Orientierung des Substratmoleküls ist weniger definiert als beim S-Enantiomer.

6 Zusammenfassung

Zentraler Punkt der Wechselwirkungen im chromatographischen Trennprozess ist die molekulare Erkennung zwischen Selektor und Analyt. Für die Untersuchungen besonders geeignet ist dabei die Kernresonanzspektroskopie, bei verschiedene Methoden und Techniken für eine detaillierte Analyse der Wechselwirkungsmechanismen an der flüssigen oder festen stationären Phase zur Verfügung stehen.

β -Cyclodextrin und seine Derivate z.B. HDAS- β -CD finden aufgrund der guten Löslichkeit vielfach Anwendung als Hintergrundanalyten in der Kapillarelektrophorese.

Mittels 2D ROESY-NMR-Experimenten in Lösung, welche es generell erlauben Wechselwirkungen über den Raum hinweg zu detektieren, ist es gelungen, die chirale Erkennung von HDAS- β -CD an den Enantiomeren von Ephedrin und N-Methylephedrin sowie die Struktur der gebildeten Komplexe zu charakterisieren.

Es hat sich gezeigt, dass mit dem negativ geladenen β -Cyclodextrin die molekulare Erkennung am D-N-Methylephedrin am stärksten ist. Besonders auffällig ist auch die große Vielfalt an stereoselektiven Komplexen, dabei werden hauptsächlich Einschlussverbindungen gebildet, wobei das Eindringen der Enantiomeren in die chirale Kavität ausgehend vom engen Rand des HDAS- β -CD stattfindet. Aufgrund der negativ geladenen Seitenkette, die am engen Rand lokalisiert ist, führen ionische Wechselwirkungen zu den Aminogruppen der Enantiomeren vor der eigentlichen Penetration zu einer Vororientierung.

Es werden jedoch auch Wechselwirkungen an der Außenseite des Cyclodextrins beobachtet, die für jedes Enantiomer unterschiedlich sind und größtenteils für die chirale Diskriminierung verantwortlich sind.

Auch die Bestimmung der Komplexstöchiometrie bestätigt das Auftreten der unterschiedlichen Komplexe, da neben den 1:1 auch 2:3 und 3:2 Stöchiometrien vorliegen.

Ein weiteres Beispiel für das Auftreten von Wechselwirkungen an der Außenseite des permethylierten β -Cyclodextrins ist die Unterbindung des Konformationswechsels zwischen Sessel- und Wannenform bei Dimethylcyclohexan infolge der Ausbildung von Van-der-Waals Wechselwirkungen. Das 2D ROESY-NMR-Experiment brachte in diesem Fall Aufklärung über die Lage der Wechselwirkungszentren.

Eine Alternative zu den teilweise sehr zeitaufwendigen korrelierten 2D NMR-Experimenten stellt die PFG-NMR-Spektroskopie zur Komponentenanalyse von Komplexbgemischen dar. Die auf unterschiedliche Diffusionsgeschwindigkeiten von Molekülen verschiedener Masse beruhende Methode ermöglicht Proben mit vielen Komponenten zu analysieren ohne dass zuvor aufwendige Reinigungsschritte notwendig werden.

Die Bestimmung der Diffusionskoeffizienten von D- und L-N-Methylephedrin sowie HDAS- und DIAC- β -Cyclodextrin und die Beobachtung der Änderung infolge der Komplexierung geben Aufschluss über die Unterschiede in den Wechselwirkungen.

Die größte Änderung hat sich bei D-N-Methylephedrin durch die Komplexierung mit HDAS- β -CD ergeben. Auch mit DIAC- β -CD wechselwirkt das D-Enantiomer bevorzugt. Beim Vergleich der Änderung der Diffusionsgeschwindigkeit der modifizierten β -Cyclodextrine erweist sich die unterschiedliche Molekülmasse als einflussreicher Faktor, der eindeutige Aussagen verhindert.

Generell werden mit der PFG-NMR-Spektroskopie die gleichen Ergebnisse erzielt, wie mit den 2D ROESY-Experimenten und diese hat sich somit als effektive Methode zur Untersuchung von Wechselwirkungen erwiesen. Detaillierte Aussagen über die Wechselwirkungszentren sind jedoch nur mit den 2D Experimenten möglich.

Lösliche stationäre Phasen wie die β -Cyclodextrine stellen eher die Ausnahme, bei den zur Verfügung stehenden chromatographischen Trennmaterialien, dar. Die meisten basieren auf Kieselgel und sind daher grundsätzlich unlöslich, die Untersuchung der molekularen Erkennung an solchen Materialien ist durch die Technik der HR-MAS-NMR-Spektroskopie möglich geworden.

Bei diesen Experimenten werden die Proben im Lösungsmittel gequollen oder suspendiert und schnell um den magischen Winkel rotiert, infolgedessen können dipolare Kopplungen sowie Unterschiede in der Suszeptibilität reduziert bzw. vollständig eliminiert werden, und die Auflösung der resultierenden ^1H -NMR-Spektren wird erheblich gesteigert.

Neben den Kieselgelphasen, die zwar über eine hohe Druckstabilität verfügen, deren pH-Stabilität jedoch nur einen Einsatz im pH-Bereich von 2 bis 8 zulässt, wird versucht, Polymere als stationäre Phasen zu synthetisieren und chromatographisch zu verwenden. Dabei hat sich jedoch herausgestellt, dass eine gute Quellbarkeit zwar sehr gut geeignet ist für die Untersuchung mit der NMR-Spektroskopie aber auf der anderen Seite zeigen zeitabhängige Wechselwirkungsstudien, dass gerade die hohe Mobilität keine spezifische molekulare

Erkennung ermöglicht, was bei einer chromatographischen Anwendung sehr breite Signale erzeugt.

Mit nativem Kieselgel ergeben sich starke Wasserstoffbrückenbindungen und es können sogar innerhalb der NMR-Zeitskala (10^{-8} s) verschiedene Substratbindungszustände detektiert werden. Jedoch liegt nur ein Typ von Rezeptorstellen, die Silanolgruppen an der Kieselgeloberfläche, vor, die zudem starke Wasserstoffbrücken ausbilden. Daher resultieren bei verschiedenen Analyten oft geringe Unterschiede in der molekularen Erkennung, was sich wiederum für die Trennung mit chromatographischen Methoden negativ auswirkt.

Als Alternative bieten sich mit Aminopropylgruppen modifizierte Kieselgele an, da bei diesen die Silanolgruppen zum größten Teil abgedeckt sind und durch die Spacer schwer zugänglich. Die Untersuchung der Wechselwirkungen zeigt, dass bei Methylphenylsuccinimid schwache Wechselwirkungen auftreten, bei Methylphenylhydantoin dagegen keine detektierbaren. und Diese Differenzen sind für die chromatographische Separation verantwortlich.

Durch die Bedeckung von Kieselgel mit Polymeren wird versucht, die Vorteile beider Materialien wie Druck- und pH-Stabilität zu vereinigen. Eine entsprechende Quervernetzung der polymeren Schicht bildet fixierte Rezeptortaschen aus, die eine stabile und detaillierte molekulare Erkennung ermöglichen, wie es sich durch die vorliegenden Langzeitexperimente mit der HR-MAS-NMR-Spektroskopie an der Phase PAA-BzIO-Urethan-3 und Succinimid herausgestellt hat.

Daneben ist es möglich, simultane Bedingungen zu schaffen, wie sie in chromatographischen Trennsäulen vorliegen, und so weitere Einzelheiten im Erkennungsprozess durch die Zugabe von Konkurrenzverbindungen, in diesem Fall Acetonitril, zu untersuchen.

Für die präparative Racemattrennung hat sich die Kapillar-Elektrochromatographie als äußerst geeignet herausgestellt. Von besonderer Beachtung ist dabei die Synthese chiraler stationärer Phasen. Die Untersuchung der chiralen Erkennung mittels der HR-MAS-NMR-Spektroskopie ermöglicht den direkten Einblick in den Wechselwirkungsmechanismus und trägt wesentlich zu dessen Verständnis sowie der gezielten Syntheseoptimierung bei.

Das trNOESY-NMR-Experiment ermöglicht dabei, Erkennungsprozesse stationärer Phasen auf unkomplizierte und elegante Weise zu überprüfen.

Die Resultate zeigen, dass die Enantiomere DNB-(R)- und DNB-(S)-Leucin beide mit der chiralen Phase tBuCQN-Thiokromasil wechselwirken. Die Integration der 2D trNOESY-Spektren zeigt jedoch Unterschiede in der chiralen Diskriminierung in Methanol und auch Acetonitril/Wasser, wobei beim S-Enantiomer eindeutig stärkere Wechselwirkungen

vorliegen. Der Vergleich mit dem Thiokromasil-Grundmaterial zeigt auch, da hier das R- und S-Enantiomer gleich starke Wechselwirkungen aufweisen, dass die chirale Erkennung klar durch den tBuCQN-Selektor zustande kommt.

ROESY-Experimente in Lösung setzten die Tendenz der stärkeren Wechselwirkung des S-Enantiomers durch wenige, jedoch eindeutige Kreuzsignale, welche zudem die annähernd doppelte Intensität aufweisen, fort.

Die vorliegenden Untersuchungen haben einen wesentlichen Beitrag für die Verwendung der NMR-Spektroskopie zur Beobachtung der molekularen Erkennung geliefert. Vor allem die HR-MAS-NMR-Spektroskopie ist zu einem unverzichtbaren Medium geworden, wenn es darum geht, Wechselwirkung an stationären Phasen unter chromatographischen Bedingungen durchzuführen.

7 Experimenteller Teil

7.1 Chemikalien

Succinimid (Firma Fluka, Neu-Ulm)

Methylphenylsuccinimid (Firma Aldrich, Steinheim)

Methylphenylhydantoin (Firma Aldrich, Steinheim)

Diphenylhydantoin (Firma Aldrich, Steinheim)

KH_2PO_4 (Firma Merck, Darmstadt)

CDCl_3 , D_2O , CD_3OD ACN-d_3 (Firma Merck, Darmstadt)

Die Substanzen N-Methylephedrin, Ephedrin, DIAC, HDAS wurden im Rahmen einer Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. U. Holzgrabe, Institut für Pharmazeutische und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt

Die Verbindungen DNB-(R/S)-Leucin, tBuCQN, Thiokromasil, tBuCQN-Thiokromasil wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Lindner, Institut für Analytische Chemie der Universität Wien, für die Untersuchung der chiralen Erkennung zur Verfügung gestellt

Die Polymere PVBzlOAc und PAA-BzlO-Urethan wurden im Zuge einer Kooperation mit der Firma Gottschall Instruction GmbH, Ludiwigshafen, zur Verfügung gestellt.

7.2 NMR-Geräte

Alle HR-NMR-Experimente wurden an einem Bruker AMX600 Spektrometer (Magnetfeldstärke 13.1 Tesla) bei Sendefrequenzen von 600.13 MHz (^1H) und 150.9 MHz (^{13}C) aufgenommen.

Die ^1H -HR-MAS-NMR-Spektroskopie wurde an einem Bruker ARX400 Spektrometer (Magnetfeldstärke 9.4 Tesla) bei Sendefrequenzen von 400.13 MHz (^1H) und 100.6 MHz (^{13}C) durchgeführt.

Die ^{29}Si -CP/MAS- und ^{13}C -CP/MAS-NMR-Spektren wurden an einem Bruker ASX300 Spektrometer (Magnetfeldstärke 7.05 Tesla) bei Sendefrequenzen von 59.9 MHz (^{29}Si), 74.43 MHz (^{13}C) und 300.13 MHz (^1H) aufgenommen.

Die Geräte wurden über eine O2-Workstation (Silicon Graphics) mit XWINNMR-Software (Bruker Daltonik, Bremen) gesteuert. Die Datenauswertung wurden sowohl an einer INDY-Workstation (Silicon Graphics) mit XWINNMR-Software als auch am PC mit 1D und 2D WINNMR-Software (Bruker Daltonik, Bremen) durchgeführt.

Alle PFG-NMR-Spektren sind an einem Bruker AM360 Spektrometer (Magnetfeldstärke 8.5 Tesla) bei Sendefrequenzen von 360.13 MHz (^1H) und 90.5 MHz (^{13}C) aufgenommen worden.

Die ^1H FIDs wurden an einer INDY-Workstation mit FELIX 97.0 (Biosym) Software prozessiert.

7.3 NMR-Spektroskopie

7.3.1 2D ROESY-NMR-Spektroskopie

Die 2D ROESY-Spektren wurden alle am Bruker AMX600 Spektrometer bei einer Temperatur von 298 K aufgenommen

Bei HDAS- β -CD wurde das Lösungsmittelsignal (Wasser) durch Vorsättigung unterdrückt. Für die Experimente wurde die roesyprtp Pulssequenz verwendet mit einer Mischzeit von 225 ms.

Die Untersuchungen mit permethyliertem β -CD und tBuCQN wurde mit der roesytp-Pulssequenz und einer Mischzeit von 300 ms durchgeführt.

7.3.2 Job-Plots

Lösungen mit molaren Verhältnissen von 5.5:0.5, 5:1, 4:2, 3.6:2.4, 3:3, 2.4:3.6, 2:4 und 1:5 (Enantiomer:Cyclodextrin) wurden in deuteriertem 100 mM Phosphatpuffer (KH_2PO_4 in D_2O , pH 4.5) hergestellt. Die induzierten chemischen Verschiebungsänderungen von HDAS- β -CD-

und den Ephedrin-Signalen wurden mit 1D-NMR-Spektren (AMX600) ermittelt und aus den Daten Job-Plots erstellt.

7.3.3 ^1H -HR-MAS-NMR-Spektroskopie

Alle ^1H -HR-MAS-NMR-Spektren wurden am Bruker ARX400 Spektrometer bei einer Temperatur von 300 K mit einer Rotationsfrequenz von 4500 Hz aufgenommen.

Die 2D NOESY-Spektren wurden mit der noesytp oder noesyprtp Pulssequenz aufgenommen, mit einer Mischzeit von 900 ms.

Die trNOESY-Spektren sind mit der trnoesytp oder trnoesyprtp Pulsesequenz aufgenommen worden mit einer Mischzeit von 100 ms.

7.3.4 PFG-NMR-Spektroskopie

Die Gradientenspulenkonstante (gradient coil constant) wurde durch Kalibrierung mit einer 10 mM β -Cyclodextrin-Lösung gemessen und zu $0.0534 \text{ T m}^{-1} \text{ A}^{-1}$ bestimmt. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 298 K aufgenommen.

Zur Aufnahme wurde die BPPLIED-Pulssequenz verwendet mit einer Relaxationswartezeit von 1.2 s und einer Diffusionswartezeit von 0.2 s, die Dauer der Gradientenpulse beträgt 1.2 ms und die Wartezeit zwischen den Gradientenpulsen 1.1 ms, Wartezeit für den Eddy-Strom (eddy current delay) 15 ms.

8 Literatur

- 1 K.K. Unger, *Handbuch der HPLC*, GIT-Verlag, Darmstadt, (1989).
 - 2 V. R. Meyer, „*Praxis der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie*“, Diesterweg, Sauerländer, Frankfurt, Aarau, 7. Aufl., (1992)
 - 3 C. Horvath, W. Melander, I. Molnar, *J. Chromatogr.* **125**, 129 (1976).
 - 4 J.G. Dorsey, K.A. Dill, *Chem. Rev.* **89**, 331 (1989).
 - 5 K.K. Unger, „*Packings and Stationary Phases in Chromatographic Techniques*“, Dekker, New York, (1990)
 - 6 G. Acer, H.J. Möckel, „*Liquidchromatographie*“, VCH, Weinheim, (1991).
 - 7 L.C. Sander, S.A. Wise, „*Retention and Selectivity in Liquid Chromatography*“, Elsevier, Amsterdam, (1995).
 - 8 L.C. Sander, K.E. Sharpless, N.E. Craft, S.A. Wise, *Anal. Chem.* **67**, 2004 (1994).
 - 9 C. Doremieux-Morin, L. Heeribout, C. Dumousseaux, J. Fraissard, H. Hommel, A.P. Legrand, *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 13040 (1996)
 - 10 B. Meyer, T. Weimar, T. Peters, *Eur. J. Biochem.* **246**, 705 (1997)
 - 11 V. Schurig, S. Mayer, M. Jung, M. Fluck, S. Negura, H. Jakubetz, *J. Chrom., A* **694**, 119 (1995)
 - 12 V. Schurig, H.P. Nowotny, *Angew. Chem.* **102**, 969 (1990)
 - 13 W. A. Koenig, *The practice of enantiomer separation by capillary gas chromatography*, Heidelberg; Huethig; (1987)
 - 14 F. Diederich, *Angew. Chem.* **100**, 372 (1988)
 - 15 G. Gübitz, *J. Liquid Chromatogr.* **9**, 519 (1986)
 - 16 C. Petterson, *Eur. Chromatogr. News* 2, **4**, 16 (1988)
 - 17 M. Zief, L. Crane (Editors), „*Chromatographic Chiral Separations*“, Dekker, New York (1988)
 - 18 R.A. Menges, D.W. Armstrong, in: „*Chiral Separations by Liquid Chromatography*“, ACS Symposium Series 471, Washington 1991.
 - 19 K. Freudenberg, M. Meyer-Delius, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **558**, 1 (1947)
 - 20 H.-J. Buschmann, D. Knittel, K. Beeremann, E. Schollmeyer, *Nachrichten aus der Chemie*, **49**, 620 (2001)
 - 21 M. Eggersdorfer, S. Warwel, G. Wulff (Editors), „*Nachwachsende Rohstoffe – Perspektiven für die Chemie*“, VCH, Weinheim, (1993)
 - 22 W. Saenger, *Angew. Chem.* **92**, 343 (1980)
 - 23 D.J. Cram, *Angew. Chem.* **98**, 1041 (1986)
 - 24 G. Wenz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **33**, 803 (1994)
 - 25 H.-J. Schneider, F. Hacket, V. Rüdiger, *Chem. Rev.* **98**, 1755 (1998)
 - 26 H. Fribohn, *Ein- und Zweidimensionale NMR Spektroskopie*, VCH, Weinheim (1992)
 - 27 J. Jeener, B.H. Meier, P. Bachmann, R.R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **71**, 4546 (1979)
-

- 28 G. Bodenhausen, H. Kogler, R.R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **48**, 286 (1982)
- 29 D. Neuhaus, M. Williamson, „*The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*“ VCH, Weinheim, (1989)
- 30 A.A. Bothner-By, R.L. Stephens, J.-M. Lee, C.D. Warren, R.W. Jeanloz, *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 811 (1984)
- 31 A. Bax, D.G. Davis, *J. Magn. Reson.* **63**, 207 (1985)
- 32 C. Hellriegel, H. Händel, M. Wedig, S. Steinhauer, F. Sörgel, K. Albert, U. Holzgrabe, *J. Chromatogr., A* **914**, 315 (2001)
- 33 G. Subramanian, „*A Practical Approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*“, VCH, Weinheim, (1994)
- 34 B. Chankvetadze, „*Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*“, Wiley, Chichester, (1997)
- 35 M. Wedig, U. Holzgrabe, *Electrophoresis* **20**, 2698 (1999)
- 36 U. Holzgrabe, H. Mallwitz, S.K. Branch, T. M. Jeffries, M. Wiese, *Chirality* **9**, 211 (1997)
- 37 B. Job, *Ann. Chim.* **9**, 113 (1928)
- 38 C. Hellriegel, *Diplomarbeit*, Universität Tübingen (1999)
- 39 O. Trapp, V. Schurig, *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 1323 (2000)
- 40 G. Schoetz, O. Trapp, V. Schurig, *J. High. Resol. Chromatogr.* **23**, 290 (2000)
- 41 A.M. Dixon, C. K. Larive, *Appl. Spectrosc.* **53**, 426A (1999)
- 42 K.F. Morris, B.J. Cutak, A.M. Dixon, C.K. Larive, *Anal. Chem.* **71**, 5315 (1999)
- 43 T.S. Derrick, C.K. Larive, *Appl. Spectrosc.* **53**, 1595 (1999)
- 44 D.A. Jayawickrama, C.K. Larive, E.F. McCord, D.C. Roe, *Magn. Reson. Chem.* **36**, 755 (1998)
- 45 M. Lin, C.K. Larive, *Anal. Biochem.* **229**, 214 (1995)
- 46 R.L. Vold, J.S. Waugh, M.P. Klein, D.E. Phelps, *J. Chem. Phys.* **48**, 2831 (1986)
- 47 J. Kowalewski, G.C. Levy, L.F. Johnson, L. Palmer, *J. Magn. Reson.* **26**, 533 (1977)
- 48 S. Meiboom, D. Gill, *Rev. Sci. Instrum.* **29**, 688 (1958)
- 49 S. W. Homans, „*A Dictionary of Concepts in NMR*“, Revised Edition, Clarendon Press, Oxford, (1993)
- 50 E.L. Hahn, *Phys. Rev.* **80**, 580 (1950)
- 51 E.O. Stejskal, J.E. Tanner, *J. Chem. Phys.* **42**, 288 (1965)
- 52 S.L. Smith, *Anal. Chem.* **57**, 595A (1985)
- 53 J.E. Tanner, *J. Chem. Phys.* **53**, 2523 (1970)
- 54 S.J. Gibbs, C.S. Johnson, Jr., *J. Magn. Reson.* **93**, 395 (1991)
- 55 D. Wu, A. Chen, C.S. Johnson, Jr., *J. Magn. Reson.* **115**, 260 (1995)
- 56 K.F. Morris, C.S. Johnson, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 3139 (1992)
- 57 J.-M. Lehn, *Angew. Chem.* **100**, 91 (1988)
- 58 J.-M. Lehn, J. Simon, J. Wagner, *Angew. Chem.* **85**, 578 (1973)
- 59 E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **27**, 2985 (1894)
- 60 B. Sellergren, M. Lepistö, K. Mosbach, *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 5853 (1988)
-

- 61 D. Moka, R. Vorreuther, H. Schicha, M. Spraul, E. Humpfer, M. Lipinski, P.J.D. Foxall, J.K. Nicholson, J.C. Lindon, *Anal. Commun.* **24**, 107 (1997)
- 62 A.M. Tomlins, R.J.D. Foxall, J.C. Lindon, M.J. Lynch, M. Spraul, J.R. Everett, J.K. Nicholson, *Anal. Commun.* **35**, 113 (1998)
- 63 A. Sacco, I.N. Bolsi, R. Massini, M. Spraul, E. Humpfer, S. Ghelli, *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4242 (1998)
- 64 C. Hirayama, H. Ihara, S. Nagaoka, H. Markise, *Chromatographia* **33**, 19 (1992)
- 65 J.M. Egly, J. Portath, *J. Chromatogr.* **168**, 35 (1979)
- 66 S. Bachmann, C. Hellriegel, J. Wegmann, H. Händel, K. Albert, *Solid Nucl. Magn. Reson.* **17**, 39 (2000)
- 67 S. Bachmann, *Dissertation*, Universität Tübingen (2001)
- 68 W.L. Fitch, G. Detre, C.P. Holmes, *J. Org. Chem.* **59**, 7955 (1994)
- 69 P.A. Keifer, *J. Org. Chem.* **61**, 1558 (1996)
- 70 S.K. Sakar, R.S. Garigipati, J.L. Adams, P.A. Keifer, *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 2305 (1996)
- 71 M. Pursch, G. Schlotterbeck, L.-H. Tseng, K. Albert, W. Rapp, *Angew. Chem.* **108**, 3034 (1996); *Angew. Chem. Int. Ed.* **35**, 2869 (1996)
- 72 F. Corcos, E. Bourgeat-Lami, C. Nocat, J. Lang, *Colloid Polym. Sci.* **277**, 1142 (1999)
- 73 E. Bourgeat-Lami, J. Lang, *J. Colloid Interface Sci.* **197**, 293 (1998)
- 74 E. Bourgeat-Lami, J. Lang, *J. Colloid Interface Sci.* **210**, 281 (1999)
- 75 K. Albert, R. Brindle, J. Schmid, B. Buszewski, E. Bayer, *Chromatographia* **38**, 283 (1994)
- 76 Private Mitteilungen Dr. S. Kammermeier, Fa. Gottschall Instruction, Ludwigshafen und Dr. H. Händel.
- 77 U. Holzgrabe, G. Bejeuhr, *Dtsch. Apoth. Ztg.* **134**, 27 (1994)
- 78 S. Li, D.K. Loyd, *Anal. Chem.* **65**, 3684 (1993)
- 79 D.K. Loyd, S. Li, P. Ryan, *J. Chromatogr., A* **694**, 285 (1995)
- 80 S. Li, D.K. Loyd, *J. Chromatogr., A* **666**, 321 (1994)
- 81 F. Lelièvre, C. Yan, R.N. Zare, P. Gareil, *J. Chromatogr., A* **723**, 145 (1996)
- 82 D. Wistuba, H. Czesla, M. Roeder, V. Schurig, *J. Chromatogr., A* **815**, 193 (1998)
- 83 D. Wistuba, V. Schurig, *Electrophoresis* **20**, 2779 (1999)
- 84 H. Frank, G.-J. Nicholson, E. Bayer, *J. Chromatogr.* **146**, 197 (1978)
- 85 V. Schurig, M. Juza, M. Preschel, G.-J. Nicholson, E. Bayer, *Enantiomer* **4**, 297 (1999)
- 86 A. Dermaux, F. Lynen, P. Sandra, *J. High Resolut. Chromatogr.* **21**, 575 (1998)
- 87 A.S. Carter-Finch, N.W. Smith, *J. Chromatogr., A* **848**, 375 (1999)
- 88 H. Wilkström, L.-A. Svensson, A. Torstensson, P.K. Owens, *J. Chromatogr., A* **869**, 395 (2000)
- 89 M. Lämmerhofer, W. Lindner, *J. Chromatogr., A* **829**, 115 (1998)
- 90 M. Lämmerhofer, E. Tobler, W. Lindner, *J. Chromatogr., A* **877**, 421 (2000)
- 91 E. Tobler, M. Lämmerhofer, W. Lindner, *J. Chromatogr., A* **874**, 341 (2000)
-

-
- 92 C. Wolf, P.L. Spence, W.H. Pirkle, E.M. Derrioco, D.N. Cavender, G.P. Rozing, *J. Chromatogr., A* **782**, 175 (1997)
- 93 K. Krause, M. Girod, B. Chankvetadze, G. Blaschke, *J. Chromatograph., A* **837**, 51 (1999)
- 94 K. Krause, B. Chankvetadze, Y. Okamoto, G. Blaschke, *Electrophoresis* **20**, 2272 (1999)
- 95 S. Mayer, X. Brian, E. Francotte, *J. Chromatograph., A* **875**, 331 (2000)
- 96 S. Mayer, V. Schurig, *J. High Resolut. Chromatogr.* **15**, 129 (1992)
- 97 D.W. Armstrong, Y. Tang, T. Ward, M. Nichols, *Anal. Chem.* **65**, 1114 (1993)
- 98 V. Schurig, D. Wistuba, *Electrophoresis* **20**, 2313 (1999)
- 99 E.C. Peters, K. Lewandowski, M. Petro, F. Svec, J.M. Fréchet, *J. Anal. Commun.* **35**, 83 (1998)
- 100 B. Meyer, T. Weimar, T. Peters, *J. Eur. Biochem.* **246**, 705 (1997)
- 101 M. Vogtherr, T. Peters, *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 6093 (2000)
- 102 H. Maaheimo, P. Kosma, L. Brade, H. Brade, T. Peters, *Biochem.* **39**, 12779 (2000)
- 103 D. Heinrichsen, B. Ernst, J.L. Magnani, W.T. Wang, B. Meyer, T. Peters., *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 98 (1999)
- 104 G.M. Clore, A. M. Gronenborn, *J. Magn. Reson.*, **48**, 402 (1982)
- 105 G.M. Clore, A. M. Gronenborn, *J. Magn. Reson.*, **53**, 423 (1983)
- 106 J. Feeney, B. Birdsall, G.C.K. Roberts, A.S.V. Burgen, *Biochemistry* **22** 628 (1983)
- 107 C.P.J. Glaudemans, L. Kerner, G.D. Daves, P. Kova, R. Venable, A. Bax, *Biochemistry* **29** 10906 (1990)
- 108 B. Pfliederer, K. Albert, E. Bayer, *J. Chromatogr.* **506**, 343 (1990)
- 109 M. Lämmerhofer, W. Lindner, *J. Chromatogr., A* **741**, 33 (1996)
- 110 A. Mandl, L. Nicoletti, M. Lämmerhofer, W. Lindner, *J. Chromatogr., A* **858**, 1 (1999)
- 111 N.M. Maier, L. Nicoletti, M. Lämmerhofer, W. Lindner, *Chirality*, **11**, 522 (1999)
- 112 M. Lämmerhofer, W. Lindner, *J. Chromatogr., A*, **33**, 741 (1996)
- 113 A. Mandl, L. Nicoletti, M. Lämmerhofer, W. Lindner, *J. Chromatogr., A* **1**, 858 (1999)
- 114 N.M. Maier, L. Nicoletti, M. Lämmerhofer, W. Lindner, *Chirality* **11**, 522 (1999)
- 115 J. Lah, N.M. Maier, W. Lindner, G. Vesnaver, *J. Phys. Chem. B* **105**, 1670 (2001)
-

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Albert, E. Bayer, H. Bertagnolli, H. Eckstein, G. Gauglitz, W. Göpel, G. Häfelinger, H. Hagenmaier, M. Hanack, D. Hoffmann, V. Hoffmann, W. Jäger, G. Jung, W. Koch, B. Koppenhöfer, D. Krug, N. Kuhn, E. Lindner, M. E. Maier, H. Mayer, H.-J. Meier, U. Nagel, W. Nakel, H. Obermaier, D. Oelkrug, G. Pausewang, E. Plies, H. Pommer, B. Rieger, V. Schurig, E. Schweda, F. F. Seelig, B. Speiser, H. Stegmann, J. Strähle, W. Voelter, K.-P. Zeller, C. Ziegler

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Christine Hellriegel
Geburtsdatum/-Ort: 31.05.1972, Böblingen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1978-1982: Friedrich Kammerer Grund- und Hauptschule, Ehningen
1982-1988: Friedrich-Schiller-Realschule Böblingen
1988-1991: Ernährungswissenschaftliches Gymnasium der Mildred-Scheel-Schule
Böblingen
26.06.91: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

04/92 – 09/92: Studium der Pharmazie an der Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz
10/92 – 01/98: Studium der Chemie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen.
27.10.1994: Vordiplom
07/98 – 01/99: Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie, der Universität
Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr. Klaus Albert mit dem
Thema "Untersuchungen zur molekularen Erkennung von
Rezeptormolekülen durch NMR-Titrationsanalysen und zwei-
dimensionaler Kernresonanzspektroskopie
04.01.1999 Chemie-Diplom
01/99 – 07/01: Doktorarbeit am Institut für Organische Chemie, der Universität
Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Klaus Albert mit dem Thema:
„Untersuchungen von Erkennungsprozessen in Interphasen mit
modernen Methoden der HR-(High Resolution) und HR-MAS-(High
Resolution-Magic-Angle-Spinning)-Suspensions-NMR-Spektroskopie“
01/99 – 07/01 Kollegiatin und Stipendiatin im Graduierten Kolleg „Chemie in
Interphasen“
12.05. –20. 07.2000 Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. C.K. Larive,
Department of Analytical and Environmental Chemistry, University of
Kansas, USA
