

Messung und Anwendung von anisotropen
NMR Parametern in gestreckten Polymergelen
und flüssigkristallinen Phasen und
metabolische Studien an chinesischen
Heilpflanzen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)-Universitätsbereich
genehmigte

DISSERTATION

von
Dipl. Chem. Christian Merle
aus
Karlsruhe

Dekan:	Prof. Peter Roesky
Referent:	Prof. Burkhard Luy
Korreferent:	Prof. Michael Meier
Tag der mündlichen Prüfung:	25.10.2013

Ich versichere wahrheitsgemäß, die Arbeit selbstständig angefertigt, alle benutzten Hilfsmittel vollständig und genau angegeben und alles kenntlich gemacht zu haben, was aus Arbeiten anderer unverändert oder mit Abänderungen entnommen wurde.

Karlsruhe, 25.10.2013

.....

(Christian Merle)

Liste der Publikationen

S. S. D. Büchler, C. Merle, B. Luy, Gellan Gum Biopolymer Gels for Measurement of Anisotropic NMR Parameters of Large Proteins and for the Distinction of Enantiomers by Partially Oriented NMR Spectroscopy, in preparation.

J. Maisch, K. Kreppenhofer, S. S. D. Büchler, C. Merle, S. Sobich, B. Luy, R. Ahrens, P. Nick, A. Guber, A BioMEMS copy of plant tissues for complex metabolic engineering using NMR spectroscopy, in preparation.

C. Merle, T. Horn, S. S. D. Büchler, S. Pfannkuchen, P. Nick, B. Luy, NMR can authenticate plant products used in Traditional Chinese Medicine: the *Rheum* case, in preparation.

C. Merle, G. Kummerlöwe, C. Freudenberger, F. Halbach, W. Stöwer, C. Liese v. Gostomski, J. Höpfner, T. Beskers, M. Wilhelm, B. Luy, Crosslinked Poly(ethylene oxide) as a Versatile Alignment Medium for the Measurement of Residual Anisotropic NMR Parameters in *Angew. Chem. Int. Ed.*, online publiziert, DOI: 10.1002/anie.201301929.

D. Jakubczyk, C. Merle, G. Brenner-Weiss, B. Luy, S. Bräse, Deuterium and tritium labelling of N-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) via catalytic reduction of the double bond in the layer-by-layer method in *Eur. J. Org. Chem.*, **2013**, *2013* (24), 5323–5330.

P. Trigo-Mouriño, C. Merle, M. R. M. Koos, B. Luy, R. R. Gil, Probing Spatial Distribution of Alignment by Deuterium NMR Imaging in *Chem. Eur. J.* **2013**, *19* (22), 7013–7019.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
2. Theorie	7
2.1. Partielle Orientierung	7
2.1.1. Beschreibung der gemittelten Orientierung	8
2.1.2. Darstellung der Orientierungstensoren	9
2.2. Anisotrope Parameter	12
2.2.1. Dipolare Kopplungen	13
2.2.2. Chemische Verschiebungsanisotropie	14
2.2.3. Quadrupolare Kopplungen	15
2.3. Methoden zur Skalierung von anisotropen Parametern	18
2.3.1. Variable angle und variable angle spinning	18
2.3.2. Skalierung mittels Streckapparaturen	19
2.4. Eliminierung von Störfaktoren bei Messungen von anisotropen Parametern	22
2.4.1. Messung von anisotropen Parameter	22
2.4.2. Unterdrückung von NMR Signalen	24
2.5. Orientierungsmedien	26
2.6. Diskriminierung von chiralen Molekülen	28
2.6.1. Paramagnetische Shift Reagenzien	28
2.6.2. Flüssigkristalline Phasen	28
2.6.3. Polymergele	28
2.6.4. Homogenität von Orientierungsmedien	30
2.7. Strukturvalidierung mithilfe von anisotropen Parametern	31
2.7.1. Berechnung der Molekülstruktur	32
2.7.2. Qualitätsfaktoren	32

3. Synthese und Entwicklung von Orientierungsmedien	37
3.1. Polyethylenglycol/-oxid basierte Polymergele	37
3.1.1. Motivation	37
3.1.2. Vernetzung von Polyethylenglycolen/-oxiden	38
3.1.3. Synthese von Polyethylenoxid/methylmethacrylat	39
3.1.4. Synthese von PEOMMA mit geringem Molekulargewicht	41
3.2. Deuterierung von PEOMMA	43
3.2.1. Deuterierung von Methacryloylchlorid	43
3.2.2. Deuterierung von Polyethylenoxid	44
3.3. Charakterisierung von PEO basierten Polymergelen	45
3.3.1. Spektrenqualität	45
3.3.2. Unterdrückung von NMR Signalen	46
3.3.2.1. Unterdrückung von PEO Signale	46
3.4. Eigenschaften von PEO basierten Polymergelen	50
3.4.1. Quellverhalten	50
3.4.2. Untersuchungen von Lösungsmittelgemischen	51
3.4.3. Untersuchung der Molekülkompatibilität	53
3.4.4. Untersuchung von Ubiquitin	55
3.4.5. Orientierungseigenschaften	56
3.4.6. Fazit	57
3.5. Gellan Gum	60
3.5.1. Motivation	60
3.5.2. Eigenschaften von Gellan Gum	60
3.5.3. Messungen kleiner Moleküle	61
3.5.4. Temperatur- und pH-Stabilität von Gellan Gum Gelen	62
3.5.5. Synthese von Gellan Gum Polymergelen	62
3.5.6. Fazit	63
4. NMR spektroskopische Experimente	65
4.1. Analyse der Konfiguration von Strepturidin	65
4.1.1. Motivation	65
4.1.2. Synthese von deuteriertem Poly(acrylnitril)	66
4.1.3. Mögliche Konfigurationen von Strepturidin	66
4.1.4. Messungen an Strepturidin	67

4.1.5. Ergebnis	68
4.1.6. Fazit	69
4.2. NMR spektroskopische Untersuchungen an <i>N</i> -acyl-L-homoserinlactonen	70
4.2.1. Motivation	70
4.2.2. Untersuchung von deuteriertem AHL1	71
4.2.3. Fazit	73
4.3. Untersuchung der räumlichen Verteilung der Orientierung über ² H- Bildgebung	75
4.3.1. Motivation	75
4.3.2. Visualisierung von Inhomogenitäten	75
4.3.3. Einsatzgebiete von bildgebenden Experimenten	79
4.3.4. Fazit	81
5. Zusammenfassung Teil I	83
6. Metabolomics	87
6.1. Identifizierung von chinesischen Heilpflanzen	87
6.1.1. Einführung und Motivation	87
6.1.2. Chinesische Medizin	88
6.1.3. Behandlung von chinesischen Heilpflanzen	90
6.1.4. Standardarbeitsanweisungen	91
6.2. Auswertung von metabolischen Daten	95
6.2.1. Visualisierung der Daten	95
6.2.2. Abgleich von Datensätzen	95
6.2.3. Hauptkomponentenanalyse	98
6.2.4. Abgleich von Peaklisten	100
6.3. Untersuchung der Gattung Rheum	104
6.3.1. Motivation	104
6.3.2. Unterscheidung der einzelnen Arten	105
6.3.3. Fazit	109
7. Zusammenfassung Teil II	111
Anhang	113
A. Abkürzungen	113

B.	Messungen von PEO basierten Polymergelen	117
B.1.	Synthese von PEOMMA	117
B.2.	Synthese von vernetztem PEO	117
C.	Messdaten für Kapitel 3	118
C.1.	Norcampher	118
C.2.	Menthol	119
C.3.	Natriumcholat	120
C.4.	<i>cyclo</i> (Arg-Nal-Ala-Gly-D-Tyr-Arg)	120
C.5.	Messdaten von Ubiquitin	123
C.6.	Messdaten der Unterdrückungssequenzen	125
C.7.	Messdaten für die Berechnung der Orientierungstensoren	127
D.	Messdaten für Kapitel 4	128
D.1.	Experimente für <i>N</i> -acyl-L-homoserinlactone	128
E.	Messdaten für Kapitel 4.3	131
E.1.	Spektrometerdaten und Probenpräparation	131
E.2.	Phasenkodierte Experimente	131
E.3.	Daten für Kapitel 6	134
E.3.1.	Probenpräparation	135
E.3.2.	Durchführung	136
E.3.3.	Material	136
	Literaturverzeichnis	143
F.	Lebenslauf	161
G.	Danksagung	162

1. Einleitung

Die strukturelle Untersuchung von Molekülen und deren Interaktionen mit ihrer Umgebung nimmt bei der Synthese und Gewinnung neuer oder modifizierter Wirkstoffe einen entscheidenden Platz ein. Neben der Massenspektrometrie und der Röntgendiffraktometrie sind hier im Bereich der Molekülanalytik vor allem die Kernspinresonanzspektroskopie in Flüssigkeit und im Festkörper (*nuclear magnetic resonance*, NMR-Spektroskopie) aufgrund der chemischen Charakterisierung auf atomarer Ebene von besonderer Bedeutung.

Während die Röntgendiffraktometrie auf der Beugung der eingestrahnten Röntgenstrahlen an der Elektronenhülle eines Moleküls basiert, werden bei der Massenspektrometrie Moleküle nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis voneinander getrennt. Die NMR-Spektroskopie hingegen beruht auf der Detektion zeitlich evolvierender Kernspins nach elektromagnetischer Anregung durch einen Radiofrequenzpuls.

Mithilfe sogenannter klassischer NMR Parameter wie chemischer Verschiebung, skalarer Kopplung und Nuclear Overhauser Effekt (NOE) kann in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie in vielen Fällen die Struktur von Molekülen aufgeklärt werden. Der Nachteil dieser Parameter ist, dass diese nur Informationen über ihre direkte Umgebung liefern. Die Messung von skalaren Kopplungen ist z. B. auf drei kovalent gebundene Nachbarkerne begrenzt bzw. der Nuclear Overhauser Effekt nur für Kerne detektierbar, welche in einem Radius von weniger als 5 Å zueinander liegen.

Anisotrope Parameter, welche als hauptsächliche Wechselwirkungen in der Festkörper-NMR-Spektroskopie von Bedeutung sind, stellen auch in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie in speziellen Medien ergänzende Strukturinformationen zur Ver-

fügung. Dabei werden Orientierungen relativ zum äußeren, statischen Magnetfeld, welches gleichzeitig als externe Referenz dient, generiert. Über diese Zwischenstation können internukleare Vektoren, selbst wenn diese nicht direkt miteinander verbunden sind oder in unmittelbarer, räumlicher Nähe stehen, relativ zueinander bestimmt werden.

Für die Messung von anisotropen NMR Parametern werden sogenannte Orientierungsmedien verwendet. Neben paramagnetischen Shift Reagenzien und flüssigkristallinen Phasen können auch Polymere eine bevorzugte Ausrichtung der Moleküle im Magnetfeld generieren.

Diese Arbeit setzt sich mit zwei Themen im Bereich der NMR-Spektroskopie auseinander: Während sich der erste Teil mit der Einführung und Analyse von anisotropen NMR Parametern befasst, behandelt das zweite Thema die Untersuchung von Metaboliten chinesischer Heilpflanzen.

Zum ersten Thema wird in Kapitel 2 ein Überblick über das Konzept des Orientierungstensors gegeben, der die Ausrichtung von rigiden, gelösten Molekülen in Orientierungsmedien beschreibt. Im Weiteren wird gezeigt, wie anisotrope Parameter gemessen, skaliert, ausgewertet bzw. letztendlich dazu eingesetzt werden, Strukturmodelle zu bestätigen oder zu falsifizieren. Anschließend werden verschiedene Varianten für die Unterdrückung von störenden NMR Signalen behandelt, wobei sowohl synthetische, als auch NMR spektroskopische Methode diskutiert werden.

Nachdem die bestehenden Orientierungsmedien vorgestellt wurden, wird in Kapitel 3 auf die Synthese und Entwicklung neuer Orientierungsmedien mit besonderen Eigenschaften eingegangen. Dazu werden unter anderem die Orientierungseigenschaften, die Molekül- und Lösungsmittelkompatibilität bzw. die Unterdrückung von NMR Signalen des Polymers durch ausgewählte Pulssequenzen beschrieben.

In Kapitel 4 werden verschiedene NMR spektroskopische Themen wie die Bestimmung von Deuterierungsgraden, die Aufklärung von Molekülstrukturen bzw. die räumliche Verteilung der Orientierung in Polymergelen und flüssigkristallinen Phasen über bildgebende Experimente behandelt.

Ab Kapitel 6 wird das zweite Thema dieser Arbeit vorgestellt. Hierbei wird auf die Extraktion der pflanzlichen Inhaltsstoffe, die NMR Messungen nach einer vordefinierten Standardarbeitsanweisung (standard operating procedure, SOP) und auf die anschließende Analyse der erhaltenen Daten eingegangen.

2. Theorie

2.1. Partielle Orientierung

Neben den klassischen NMR Parametern wie chemischer Verschiebung oder skalarer Kopplung werden durch die Orientierung von Molekülen mithilfe von Orientierungsmedien auch anisotrope Wechselwirkungen in der hochauflösenden NMR-Spektroskopie detektierbar. Die Moleküle werden hierbei partiell orientiert und behalten weitestgehend ihre Fähigkeit zur Rotation. Im Gegensatz zur NMR-Spektroskopie im Festkörper, dessen Signalbreiten durch anisotrope Parameter bis zu einigen Kilohertz umfassen können, wird die Orientierungsstärke gelöster Moleküle durch ihre Brown'sche Molekularbewegung reduziert und die Linienbreiten auf wenige Hertz verkleinert.¹

Wie stark oder in welchem Winkel sich das Molekül ausrichtet, wird hauptsächlich von drei Faktoren beeinflusst:^{2,3} von Dispersionskräften, d. h. von Wechselwirkungen des Moleküls mit dem Orientierungsmedium, von permanenten, elektrischen Dipolmomenten und von der Molekülstruktur selbst. Wenn das Orientierungsverhalten des Moleküls abgeleitet werden kann, dann können anisotrope Parameter wertvolle Strukturinformationen liefern, um die Konfiguration, Konformation, Konstitution oder auch Dynamiken eines Moleküls zu berechnen.⁴⁻⁶

Im folgenden wird der theoretische Hintergrund zur Beschreibung partieller Molekülorientierung erklärt, wobei Begriffe wie Ordnungsgrad, Saupe Matrix und Wahrscheinlichkeitstensor definiert werden.

2.1.1. Beschreibung der gemittelten Orientierung

Der Ordnungsgrad G , welcher die zeitlich gemittelte Orientierung eines Vektors eines gelösten Moleküls zum externen Magnetfeld wiedergibt, wird über die Tensor-elemente $S_{j,k}$ mit $j, k = x, y, z$ der Saupe Matrix \mathbf{S} beschrieben (s. Gleichungen 2.1 und 2.2). Je nach Ausrichtung des Moleküls zum äußeren Magnetfeld kann der Ordnungsgrad G positiv (parallel) oder negativ (senkrecht) sein.¹ Die Saupe Matrix ist in einem molekülfesten Koordinatensystem definiert und die Ausrichtung bzw. Orientierungsstärke eines Moleküls wird über die Tensorelemente festgelegt.

$$G = \sum_{jk} \cos \alpha_j \cos \alpha_k S_{jk} \quad (2.1)$$

$$S_{jk} = 0.5 \langle 3 \cos \theta_j \cos \theta_k - \delta_{jk} \rangle \quad \text{mit} \quad \delta_{j,k} = \begin{cases} 0 & \text{für } j \neq k \\ 1 & \text{für } j = k \end{cases} \quad (2.2)$$

Die Matrix \mathbf{S} ist definitionsgemäß symmetrisch, wobei die Summe ihrer diagonalen Elemente, welche als S -Werte bezeichnet werden, null ergibt. Für die vollständige Beschreibung des Orientierungsverhaltens verbleiben daher fünf unabhängige Tensorelemente, welche z. B. aus fünf dipolaren Kopplungen eines Moleküls und einer MD simulierten Struktur berechnet werden können.^{7,8} Alle weiteren, dipolaren Kopplungen werden dann zur Überprüfung des angenommenen Strukturmodells verwendet.

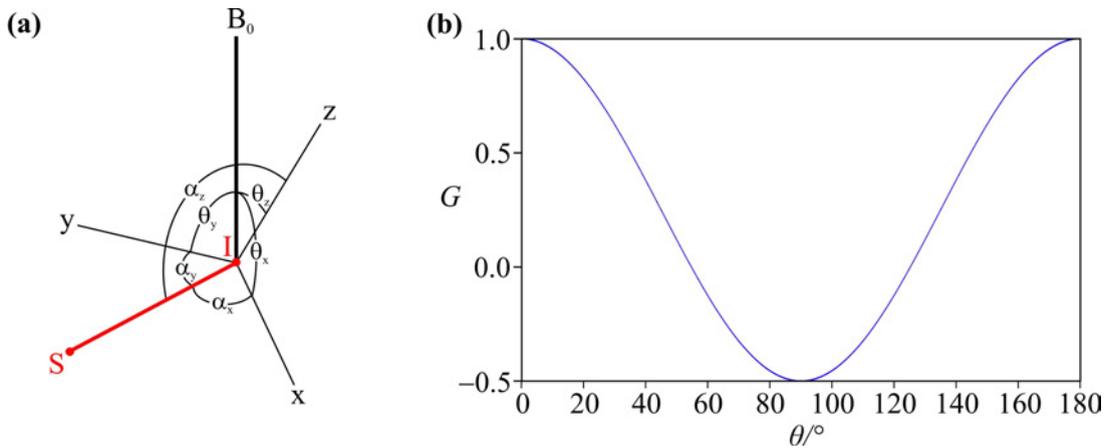


Abbildung 2.1.: (a) Das molekülfeste Koordinatensystem aufgespannt durch die Achsen x , y und z wird durch die Winkel $\theta_{j,k}$ relativ zum Magnetfeld B_0 positioniert. Die Winkel $\alpha_{j,k}$ hingegen beschreiben die räumliche Orientierung des Vektors I-S relativ zum molekülfixierten Koordinatensystem; (b) dipolare Kopplungen von Molekülen können über die Winkelfunktion $0.5(3 \cos^2(\theta) - 1)$ relativ zum Magnetfeld definiert werden.

Die Winkel $\theta_{j,k}$ und $\alpha_{j,k}$ beschreiben dabei die Orientierungen zwischen molekülfiziertem Koordinatensystem, Magnetfeld und Vektor (s. Abbildung 2.1). Damit spiegelt die Ordnungsmatrix \mathbf{S} zwar die durchschnittliche Molekülorientierung wider, ein detailliertes Abbild der dynamischen Prozesse innerhalb eines Moleküls wird jedoch erst durch Messungen in verschiedenen Orientierungsmedien und einer damit verbundenen größeren Anzahl an Parametern möglich.^{9,10}

Nachdem die Saupe Matrix \mathbf{S} berechnet wurde, werden die theoretischen, dipolaren Kopplungen nach Gleichung 2.3 ermittelt. Die dipolare Kopplung D_{IS} setzt sich aus dem Plank'schen Wirkungsquantum h , den gyromagnetischen Verhältnissen γ_I , γ_S und dem Ordnungsgrad G im Verhältnis zum Abstand r des Vektors I-S zusammen.

$$D_{IS} = \frac{-h\gamma_I\gamma_S\mu_0G}{4\pi^2r_{IS}^3} \quad (2.3)$$

Nach dem Abgleich der experimentellen und zurückberechneten Kopplungen werden diese mit Qualitätsfaktoren bewertet und entsprechende Strukturmodelle bestätigt oder falsifiziert (s. Kapitel 2.7.2). Je mehr unabhängige, dipolare Kopplungen in das entsprechende Strukturmodell eingesetzt werden, desto zuverlässiger ist dessen Aussagekraft.

2.1.2. Darstellung der Orientierungstensoren

Für eine anschauliche Darstellung des molekülfesten Koordinatensystems wird meist, anstelle der Saupe Matrix \mathbf{S} , der Probability Tensor \mathbf{P} verwendet, welcher als Rotationsellipsoid beschrieben werden kann (s. Abbildung 2.2). Hierbei kann der Wahrscheinlichkeitstensor \mathbf{P} vom Laborkoordinatensystem (*laboratory frame*, LF) durch eine Hauptachsentransformation in ein Hauptachsensystem (*principle axes system*, PAS) transformiert und anschließend diagonalisiert werden.

$$\mathbf{P} = \begin{pmatrix} b_{xx} & b_{xy} & b_{xz} \\ b_{yx} & b_{yy} & b_{yz} \\ b_{zx} & b_{zy} & b_{zz} \end{pmatrix}^{LF} \quad \Longrightarrow \quad \mathbf{P}^{diag} = \begin{pmatrix} P_{\tilde{x}} & 0 & 0 \\ 0 & P_{\tilde{y}} & 0 \\ 0 & 0 & P_{\tilde{z}} \end{pmatrix}^{PAS}$$

Schema 2.1: Transformation des \mathbf{P} -Tensors vom LF zum Wahrscheinlichkeitstensor \mathbf{P}^{diag} im PAS. b_{jk} = Stärke des jeweiligen lokalen Magnetfeldes; $P_{\tilde{x}}$, $P_{\tilde{y}}$, $P_{\tilde{z}}$ sind die Eigenwerte des PAS, welche die Wahrscheinlichkeiten widerspiegeln, das Magnetfeld entlang dieser Achsen zu finden.

Genau wie bei der Saupe Matrix \mathbf{S} können Vektoren zweier, beliebiger Spins auch über den \mathbf{P} -Tensor in Relation gesetzt werden. Die Eigenwerte und Eigenvektoren spannen dabei das molekülfeste Koordinatensystem mit den Achsen \tilde{x} , \tilde{y} und \tilde{z} auf, welches die mittlere Orientierung des Moleküls beschreibt.¹¹ Während die drei Eigenwerte die Wahrscheinlichkeiten angeben, das Magnetfeld entlang dieser Achsen zu finden, stellen die Winkel θ und φ einen Bezug zwischen dem Vektor I-S und dem Hauptachsensystem her. Daher ist die Spur des Wahrscheinlichkeitstensors \mathbf{P} im Gegensatz zur Saupe Matrix \mathbf{S} nicht null, sondern eins.

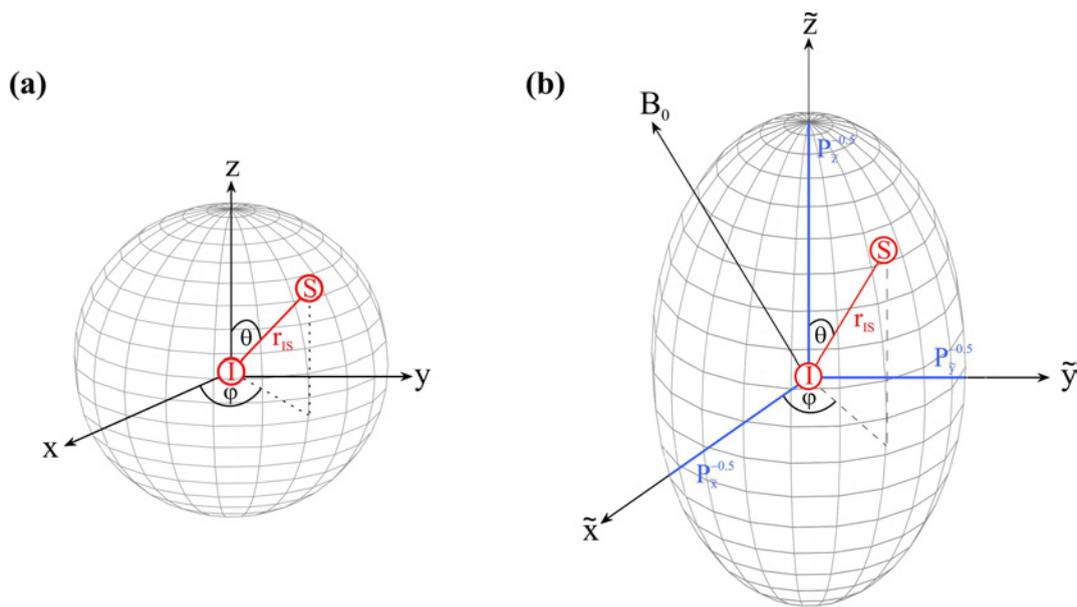


Abbildung 2.2.: Im isotropen Fall ist die Suszeptibilität in alle Raumrichtungen gleich **(a)**, wodurch keine bevorzugte Orientierung im isotropen Medium vorliegt. Dies führt zu keinen messbaren, anisotropen Parametern. Im anisotropen Fall hingegen **(b)**, hier gezeigt durch eine Streckung entlang der z-Achse, wird eine anisotrope Umgebung generiert, wodurch die zuvor freie Rotation der Moleküle eingeschränkt wird und eine bevorzugte Ausrichtung im Raum stattfindet. Die Winkel θ und φ stellen hierbei einen Bezug zwischen dem Vektor I-S und dem Hauptachsensystem her, welcher durch die Komponenten \tilde{x} , \tilde{y} und \tilde{z} aufgespannt wird. Die Eigenwerte $P_{\tilde{x}}^{-0.5}$, $P_{\tilde{y}}^{-0.5}$ und $P_{\tilde{z}}^{-0.5}$ spiegeln die Maße des Rotationsellipsoids wider.

Als dritte Möglichkeit den Tensor des molekülfesten Koordinatensystems zu beschreiben, ist der Orientierungstensor \mathbf{A} (alignment tensor) gebräuchlich. Wie der Orientierungstensor \mathbf{A} mit dem Wahrscheinlichkeitstensor \mathbf{P} , der Einheitsmatrix $\mathbf{1}$

und der Saupe Matrix \mathbf{S} korreliert, ist in Gleichung 2.4 wiedergeben.

$$\mathbf{A} = \frac{2}{3} \mathbf{S} \quad , \quad \mathbf{A} = \mathbf{P} - \frac{1}{3} \mathbf{1} \quad (2.4)$$

Häufig werden auch die entsprechenden, axialen und rhombischen Komponenten angegeben (s. Gleichung 2.5). Die axiale Komponente D_a setzt sich aus dem \tilde{z} -Anteil bzw. die rhombische Komponente D_r aus dem \tilde{x} - bzw. \tilde{y} -Anteil des entsprechenden Ordnungstensors, hier am Orientierungstensor \mathbf{A} gezeigt, zusammen.

$$D_a = \frac{3}{2} A_{\tilde{z}} \quad , \quad D_r = A_{\tilde{x}} - A_{\tilde{y}} \quad (2.5)$$

Das Konzept der Tensoren \mathbf{A} , \mathbf{P} und \mathbf{S} des molekülfesten Koordinatensystems ist nur für rigide Moleküle gültig und kann nicht für die Berechnung der Dynamik innerhalb eines Moleküls eingesetzt werden. Bei Makromolekülen wie Proteinen jedoch kann dieses Konzept aufgrund der langen Korrelationszeiten auch als Grundlage zur näherungsweise Beschreibung zeitlich gemittelter Molekülkonformationen genutzt werden.⁸

2.2. Anisotrope Parameter

Seit den Forschungsergebnissen von Saupe und Englert 1963 wurde insbesondere in den letzten zwei Jahrzehnten die Entwicklung von weiteren Orientierungsmedien forciert (s. Übersichtstabelle 2.1).¹²⁻¹⁴ Neben flüssigkristallinen Phasen und paramagnetischen Shift Reagenzien bieten vor allem gestreckte Polymergele (*strain induced alignment in a gel*, SAG) die Möglichkeit, anisotrope Parameter zu messen.

Im Gegensatz zu Flüssigkristallen, deren partielle Orientierung auf der Symmetriebrechung bzw. des Phasenübergangs bei definierter, kritischer Temperatur T_C basiert, bilden Polymergele ein vernetztes, molekulares Gitter aus. (s. Abbildung 2.3). Durch Streckung bzw. Stauchung des Polymergels, im allgemeinen entlang des äußeren Magnetfeldes, wird eine anisotrope Matrix generiert. Über kurze Kontaktzeiten (10^{-3} s) werden die gelösten Moleküle im Orientierungsmedium ausgerichtet, wobei der Ordnungsgrad einen von null verschiedenen Wert (-0.5 bis 1) annimmt. Obwohl sich die gelösten Moleküle durch die partielle Orientierung weitestgehend frei bewegen können, erhalten diese kurzzeitig eine Vorzugsrichtung, durch welche anisotrope Wechselwirkungen nicht vollständig ausgemittelt werden.

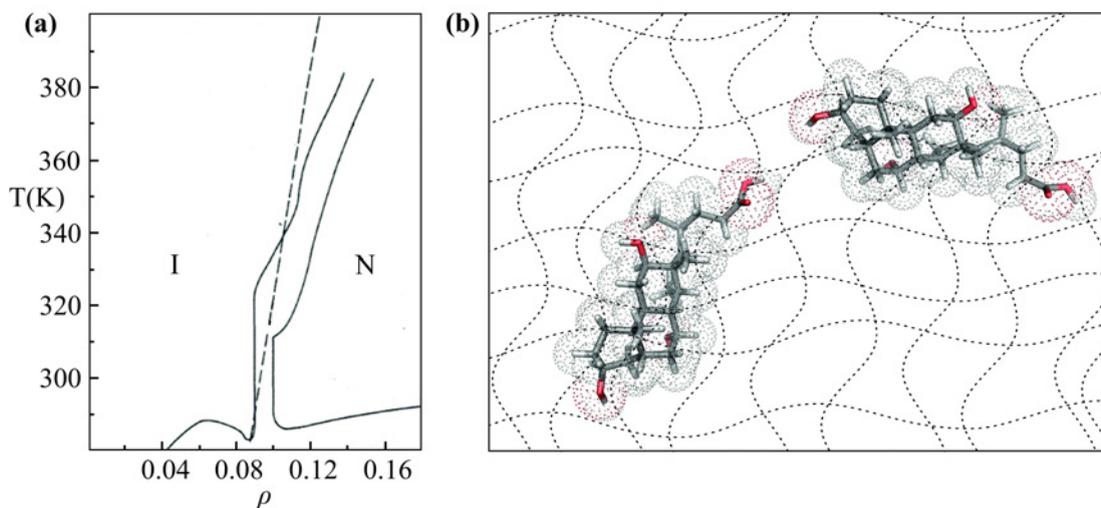


Abbildung 2.3.: (a) Phasendiagramm mit Phasenübergang von isotroper Phase (I) zu nematischer Phase (N);¹⁵ zwischen den beiden Phasen I und N existiert eine sogenannte Mischphase, welche sich aus diesen anteilig zusammensetzt; während die kontinuierlichen Linien aus experimentellen Daten gewonnen wurden,¹⁶ wurde die gestrichelte Linie aus der Molekülfeldtheorie berechnet, welche Fluktuationen der sonst im Magnetfeld miteinander wechselwirkenden Teilchen vernachlässigt;¹⁷ (b) Darstellung der Orientierung eines Polymergels als molekulares Gitter. Die Moleküle können weitestgehend ungehindert rotieren und interagieren im Millisekundenbereich mit dem molekularen Gitter, wodurch sie eine bevorzugte Orientierung erhalten.

Der primäre Gegenspieler bei der Orientierung von Molekülen ist die Brown'sche Molekularbewegung. Je weiter die Temperatur steigt, desto mehr dominieren thermische Fluktuationen, welche der makroskopischen Ausrichtung, dem Direktor, des gelösten Moleküls entgegenwirken.^{18,19}

Der Direktor kann sich nicht nur parallel, sondern auch in definierten Winkeln zum Magnetfeld, welche von dem jeweiligen Orientierungsmedium abhängen, ausrichten. Dadurch kann, wie bereits in der NMR-Spektroskopie im Festkörper auch, für die eingesetzten Polymere die Methode des *variable angle* (VA) bzw. im Falle von flüssigkristallinen Phasen die Methode des *variable angle sample spinning* (VASS) zur Skalierung von anisotropen Parametern verwendet werden (s. Kapitel 2.3).²⁰⁻²⁵ Heutzutage deckt die Vielfalt der Orientierungsmedien die komplette Bandbreite sowohl für die in der NMR-Spektroskopie verwendeten Lösungsmittel, als auch für verschiedene Molekülklassen ab. Dadurch stellen anisotrope Parameter als Strukturinformation eine gut zugängliche Ergänzung zu den klassischen Parametern dar, mithilfe derer die Konformation, Konstitution und Konfiguration von kleinen Molekülen bis hin zu Makromolekülen aufgeklärt werden kann.^{5,26} Für eine vollständige Analyse wurden anisotrope Parameter mit bereits vorhandenen NOE Daten bzw. Kristallstrukturen aus der Röntgenstrukturanalyse verglichen, um ein detailliertes Abbild von z. B. Strukturkonformationen zu erhalten.²⁷⁻²⁹

2.2.1. Dipolare Kopplungen

Bei der hochauflösenden NMR-Spektroskopie in einer orientierten Phase entspricht die dipolare Kopplung gelöster Moleküle idealerweise 0.05% derjenigen, welche im Festkörper gemessen wird. Daher werden diese als dipolare Restkopplungen (*residual dipolar couplings*, RDCs) bezeichnet. Einer der Vorteile von RDCs gegenüber klassischen NMR Parametern ist, dass die Positionen internuklearer Vektoren relativ zum äußeren Magnetfeld als externe Referenz in Korrelation gesetzt werden können und damit deren Ordnungstensor berechnet werden kann (s. Kapitel 2.1).

Weiterhin sind RDCs im Vergleich zum Nuclear Overhauser Effekt weitreichender, d.h. dass Kernspins durch die r^{-3} Abhängigkeit der dipolaren Kopplung bis zu 8 Å anstelle von 5 Å miteinander wechselwirken können.

$$D_{IS} = \frac{-h\gamma_I\gamma_S\mu_0}{4\pi^2r^3} \left(\frac{3\langle \cos^2 \theta \rangle - 1}{r^3} \right) \quad (2.6)$$

Über Gleichung 2.6 lässt sich die maximale, dipolare Kopplung für homo- und heteronukleare Interaktionen berechnen, wobei je nach Kernkombination Werte von bis zu mehreren kHz erreicht werden können. Die Größe der dipolaren Restkopplung ist von den bereits beschriebenen Parametern abhängig (s. Theorie 2.1) bzw. können, wie in Kapitel 2.3 beschrieben, skaliert werden.

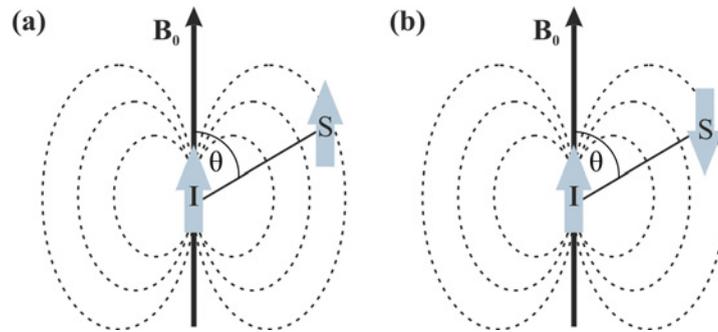


Abbildung 2.4.: Darstellung der dipolaren Interaktion zweier Kernspins I und S, welche sich zueinander entweder parallel (a) oder antiparallel (b) orientieren. Neben dem äußeren Magnetfeld B_0 wirkt zusätzlich das lokale Magnetfeld von Spin I auf das lokale Magnetfeld von Spin S. Dies führt zu einer Veränderung der Resonanzfrequenz ν_S , welche sowohl in der chemischen Verschiebungsanisotropie, als auch im Anteil der dipolaren Kopplung detektierbar ist.

Die Summe aus der skalaren Kopplung und der dipolaren Kopplung wird über die effektive Kopplungskonstante T definiert (s. Gleichung 2.7).

$$T_{eff} = J + 2D \quad (2.7)$$

Oft wird die dipolare Kopplung als D anstelle von $2D$ angegeben, dies stellt jedoch keinen Fehler, sondern lediglich eine andere Notation dar, in der die experimentelle Signalaufspaltung als Grundlage für die Berechnungen herangezogen wird.

2.2.2. Chemische Verschiebungsanisotropie

Die chemischen Verschiebungen einzelner Kerne sind primär von der jeweiligen, chemischen Umgebung abhängig. Bei orientierten Molekülen stellt das Orientierungsmedium ein Kosolvent dar und übt Einfluss auf die Abschirmungstensoren der Kernspins aus. Dadurch können sogenannte restliche, chemische Verschiebungsanisotropien (*residual chemical shift anisotropies*, RCSAs) als zusätzliche Strukturparameter genutzt werden.

Selbst tetraedrische Moleküle^{30,31} wie Trimethylsilan (TMS)³² weisen anisotrope Anteile in der chemischen Verschiebung auf. Um den experimentellen Fehler daher möglichst gering zu halten, sollten die RCSAs aus der isotropen und anisotropen, chemischen Verschiebung desselben Mediums bestimmt werden. Diese Messung kann z. B. mit verschiedenen Skalierungsmethoden durchgeführt werden (s. Kapitel 2.3). Als Referenzsignal wird meist derjenige Kern gewählt, welcher den kleinsten CSA Tensor besitzt, um die ermittelten RCSAs zu maximieren. Dabei werden zwei chemische Verschiebungswerte $\delta^{(1)}$ und $\delta^{(2)}$ desselben Kerns voneinander subtrahiert (s. Gleichung 2.8).²⁶

$$\begin{aligned} \Delta\Delta RCSA &= (\delta^{(1)} - \delta^{(1,ref)}) - (\delta^{(2)} - \delta^{(2,ref)}) \\ &= \sum_{j=\tilde{x},\tilde{y},\tilde{z}} \sum_{k=\tilde{x},\tilde{y},\tilde{z}} (A_{kj}^{(1)} - A_{kj}^{(2)}) (\delta_{kj}^{CSA} - \delta_{kj}^{CSA(ref)}) \end{aligned} \quad (2.8)$$

Um möglichst wenig Überlagerungen der NMR Signale vor allem bei ähnlichen Molekülgruppen zu gewährleisten, werden für die Messungen von RCSAs Kerne mit großen, chemischen Verschiebungsbereichen wie z. B. ^{13}C , ^{15}N oder ^{31}P herangezogen.

2.2.3. Quadrupolare Kopplungen

Ähnlich wie bei der dipolaren Kopplung werden auch die quadrupolaren Kopplungen aufgrund der kurzen Interaktion zwischen gelöstem Molekül und Orientierungsmedium durch Mittelung skaliert. Diese sogenannten quadrupolaren Restkopplungen (*residual quadrupolar couplings*, RQCs) entwickeln sich bei Kernen mit einem Kernspin $> \frac{1}{2}$. Diese Kerne besitzen ein intrinsisches Quadrupolmoment Q , welches bei Anlegen eines externen Feldes einen elektrischen Feldgradienten V_{jk} , abhängig von der chemischen Umgebung, aufbaut.³³ Die asymmetrische Ladungsverteilung wird in isotropen Proben zwar durch Rotationsbewegungen der Moleküle kompensiert, das elektrische Potential U im Kern führt jedoch zu einer beschleunigten Relaxation und resultiert letztendlich in einer Verbreiterung der Signallinien. Dies wird z. B. bei ^{14}N Kernen beobachtet.

In einer orientierten Probe hingegen sind die Quadrupolmomente zum Bezugfeld bzw. zueinander winkel- und abstandsabhängig, da die Wechselwirkung zwischen Molekül und molekularem Gitter die freie Beweglichkeit des Moleküls einschränkt

(s. Gleichung 2.9).

Der quadrupolare Hamiltonoperator ist als Quotient aus dem elektrischen Quadrupolmoment eQ , dem Feldgradienten V_{jk} bzw. den Spinoperatoren I_j und I_k mit $j, k = u, v, w$ zum Kernspin I definiert.

$$H_Q = \frac{eQ}{6I(2I-1)\hbar} \sum_{j,k=u,v,w} V_{jk} \left[\frac{3}{2}(I_j I_k - I_k I_j) - \delta_{jk} I(I+1) \right] \quad (2.9)$$

mit $V_{jk} = \left. \frac{\partial^2 U}{\partial j \partial k} \right|_{r=0}$

Nach Diagonalisierung bzw. Transformation des elektrischen Feldgradienten in sein Hauptachsensystem $\tilde{u}, \tilde{v}, \tilde{w}$ kann dessen Verteilung durch Gleichung 2.10 beschrieben werden. Mithilfe des Hamiltonoperators kann dadurch die zeitliche Entwicklung bzw. die Energie von Quadrupolmomenten analysiert werden. Die quadrupolare Kopplungskonstante κ setzt sich dabei aus dem elektrischen Quadrupolmoment eQ in Bezug zum Planck'schen Wirkungsquantum \hbar zusammen. Der asymmetrische Parameter η beschreibt die bevorzugte Orientierung des elektrischen Feldgradienten im Raum. Hierbei gilt folgende Konvention $\overline{V_{\tilde{w}}} \geq \overline{V_{\tilde{v}}} \geq \overline{V_{\tilde{u}}}$.³⁴

$$H_Q = \frac{\kappa}{4I(2I-1)} 3I_{\tilde{w}}^2 - I(I+1) + \eta(I_{\tilde{u}}^2 - I_{\tilde{v}}^2) \quad (2.10)$$

$$\kappa = \frac{e^2 q Q}{\hbar} \quad ; \quad \eta = \frac{V_{\tilde{u}} - V_{\tilde{v}}}{V_{\tilde{w}}}$$

Die Messung der RQCs wird unter anderem dazu benutzt, den Orientierungsgrad über die ^2H Aufspaltung in Korrelation zum Extensionfaktor zu setzen. Dadurch kann indirekt ein Bezug zur Orientierungsstärke des gelösten Moleküls hergestellt werden. Warum dies nicht in allen Fällen zutreffend ist wird in Kapitel 3.4.2 diskutiert.

Desweiteren kann die Messung von RQCs dazu verwendet werden, Enantiomere voneinander zu unterscheiden (s. Abbildung 2.5). Dabei wird ein Enantiomerengemisch in ein chirales Orientierungsmedium gebracht und mit z. B. *natural abundance deuterium* NMR Experimenten (NAD) bzw. anderen Experimenten wie *quadrupolare correlation spectroscopy* (QCOSY) oder *quadrupole ordered spectroscopy* (QUOSY) untersucht.^{33,35-38} Voraussetzung für die Diskriminierung von Enantiomeren ist, ein hoher Unterschied in den RQCs der Enantiomere bzw. ein hoher *differential ordering*

effect (DOE), welcher die Wechselwirkungen zwischen den Enantiomeren und dem Orientierungsmedium beschreibt.³⁹

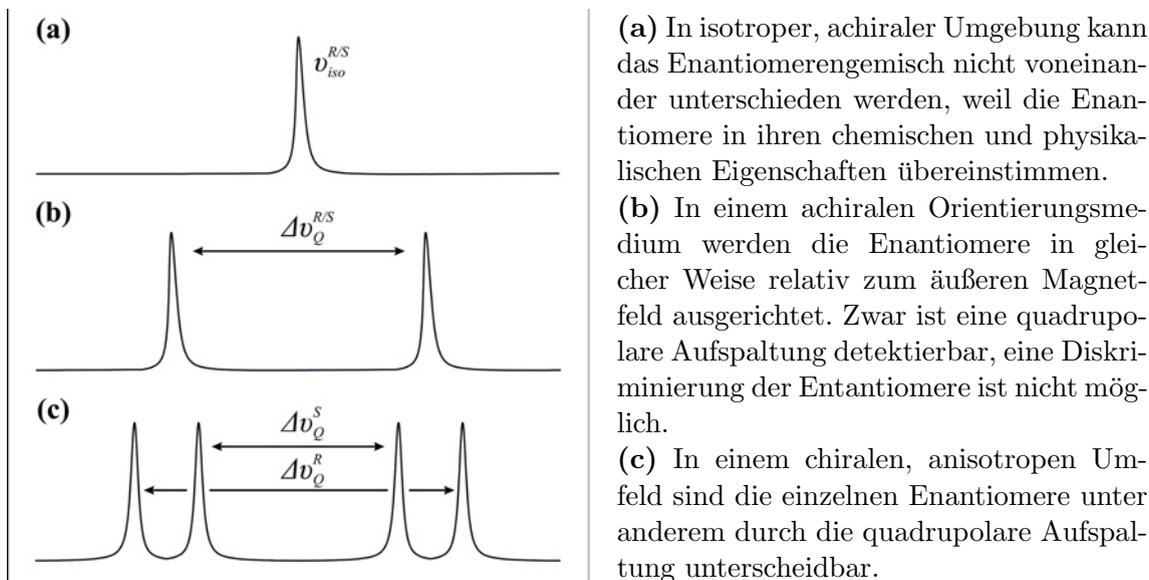


Abbildung 2.5.: Isotroper Fall (a) und anisotroper Fall in einem achiralen (b) und chiralen (c) Orientierungsmedium. Mithilfe der quadrupolaren Aufspaltung mit $\Delta\nu_Q^R \neq \Delta\nu_Q^S$, hervorgerufen durch den DOE der einzelnen Enantiomere mit dem chiralen Orientierungsmedium, können diese voneinander unterschieden werden.

2.3. Methoden zur Skalierung von anisotropen Parametern

Die Skalierung von anisotropen Parametern wie RDCs oder RCSAs spielt bei der Aufklärung der Molekülstruktur bzw. bei der Diskriminierung von Enantiomeren eine zentrale Rolle.^{40–42} Diese kann entweder chemisch wie z. B. durch Änderung der Konzentration des eingesetzten Monomerbausteins bei der Synthese des Orientierungsmediums oder physikalisch durch Justierung der Probe in definierten Winkeln zum Bezugsfeld geschehen. Desweiteren kann eine Skalierung durch Streckung oder Stauchung eines Polymergels realisiert werden. Dazu stehen die Methode des *variable angle* (VA),²¹ des *variable angle sample spinning* (VASS)²⁰ bzw. die Streckapparaturen von Ishii⁴³ und Kuchel⁴⁴ zur Verfügung.

2.3.1. Variable angle und variable angle spinning

Mithilfe der VA Methode können NMR Proben in einem vom äußeren Magnetfeld verschiedenen Winkel justiert werden. Durch Variation des Winkels werden gleichzeitig die Orientierungstensoren verändert, falls der Direktor entlang des eingestellten Winkels ausgerichtet wird.²⁰ Die anisotropen Parameter können so an derselben Probe skaliert werden.

Die Ausrichtung des Direktors findet für Polymergele bzw. flüssigkristalline Phasen unter verschiedenen Bedingungen statt.^{21,22} Für Polymergele wird der Direktor über deren Streckung bzw. Stauchung des molekularen Netzwerks definiert. Dadurch kann ein Winkel ε mit $0^\circ \leq \varepsilon \leq 90^\circ$ zwischen Probe und Bezugsfeld eingestellt werden (s. Abbildung 2.6).

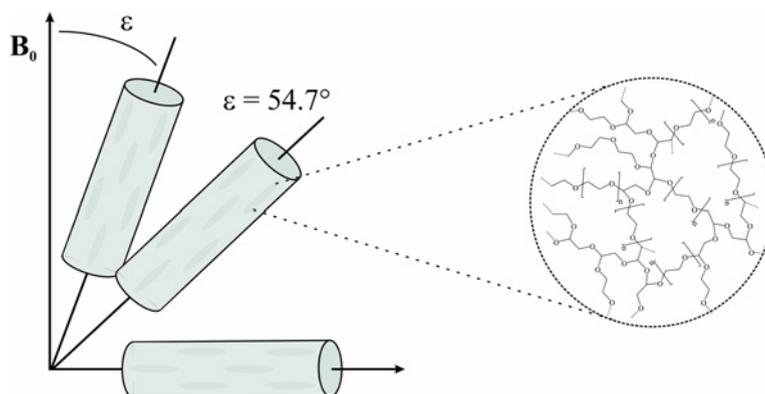


Abbildung 2.6.: Schematische Darstellung der verschiedenen Ausrichtungen der Polymerprobe relativ zu einem statischen Magnetfeld B_0 . Über den Winkel ε können die Orientierungsstärken beliebig variiert werden. Neben der Streck- bzw. Komprimierungsapparatur steht daher eine zusätzliche Methode zur Skalierung anisotroper Parameter zur Verfügung.

Flüssigkristalline Phasen hingegen richten sich gemäß dem äußeren Magnetfeld aus. Eine kontrollierte, makroskopische Ausrichtung parallel zu einem Winkel ε findet erst bei einer Rotationsgeschwindigkeit ω_R statt, welche wesentlich höher als die kritische Rotationsgeschwindigkeit ist. ω_R ist vom externen Magnetfeld bzw. von der Viskosität der flüssigkristallinen Phase abhängig.^{20,25}

Bei flüssigkristallinen Phasen ist zusätzlich die magnetische, anisotrope Suszeptibilität κ für die Einstellung des Winkels ε und damit für die Orientierung ausschlaggebend. Für negative, magnetisch anisotrope Suszeptibilitäten kann der Winkel ε mit $54.7^\circ < \varepsilon \leq 90^\circ$ bzw. für positive, magnetisch anisotrope Suszeptibilitäten mit $0^\circ \leq \varepsilon < 54.7^\circ$ eingestellt werden.^{24,25} Durch die Justierung der Probe bei beliebigen Winkeln werden die anisotropen Parameter entweder verstärkt oder abgeschwächt (s. Gleichung 2.11).²²

$$T_{eff} = J + D(3 \cos^2(\varepsilon) - 1) \quad (2.11)$$

Wird der Winkel ε abweichend von diesen Werten justiert, besitzt der Direktor keine definierte Ausrichtung, sondern verteilt sich in einer Ebene senkrecht zur Rotationsachse. Für den Sonderfall am magischen Winkel besitzt der Direktor keine Vorzugsrichtung, wodurch bei der VA bzw. VASS Methode eine isotrope Umgebung generiert wird. Ein wesentlicher Vorteil bei dieser Skalierung ist, dass sowohl isotrope, als auch anisotrope Parameter an derselben Probe gemessen werden können.

2.3.2. Skalierung mittels Streckapparaturen

Die Skalierung von anisotropen Parametern ist bei der Strukturaufklärung von Molekülen bzw. bei der Erstellung von Modellen für Moleküldynamiken essentiell. Die Fehlertoleranz der aufgenommenen Daten wird durch Messungen an derselben Probe, welche per VA und VASS Methoden bzw. über Streckungen oder Stauchungen realisiert werden, reduziert. Einflüsse wie die unterschiedliche Ausbildung des molekularen Polymergitters und die damit verbundenen, verschiedenen Quelleigenschaften von Gelen (s. Kapitel 4.3) können vernachlässigt werden. Zusätzlich können Signalüberlagerungen durch Skalierung der anisotropen Anteile von Kopplung bzw. chemischer Verschiebung aufgelöst werden.

Während flüssigkristalline Phasen durch Variation der Konzentration bzw. über VASS Methoden skalierbar sind, können anisotrope Parameter bei Polymergelen

mithilfe von Streckapparaturen eingestellt werden. Im Jahre 2001 bzw. 2004 entdeckten Ishii⁴³ und Cierpicki,⁴⁵ dass durch Einsatz eines Shigemi Plunger Polymergele komprimiert bzw. entspannt werden können. Dabei wird Druck über den Shigemi Plunger auf das Polymergel während der Quellung ausgeübt. Durch Entspannung können die verschiedenen Orientierungsstufen eingestellt werden.

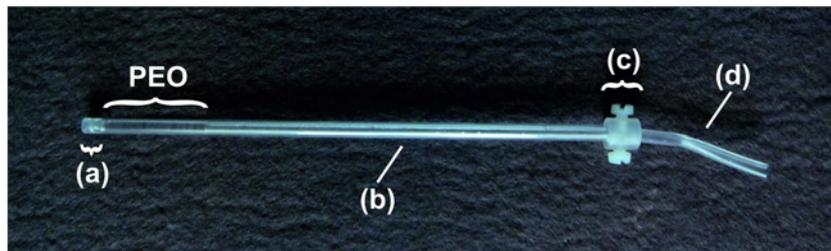


Abbildung 2.7.: Darstellung und Beschreibung der Streckapparatur für 5 mm NMR Röhren. Die Streckapparatur besteht aus einem Schraubgewinde (a), einem 5 mm NMR Röhren (b), einer Fixiervorrichtung (c) und einem Kalrez[®] Schlauch (d). Das Polymerstäbchen, hier PEO, wird im Kalrez[®] Schlauch am unteren Ende des NMR Röhrens positioniert und quellen gelassen.

Eine flexiblere Form der Streckapparatur wurde von Kuchel erfunden bzw. von Kummerlöwe weiterentwickelt.^{44,46} Mithilfe von Polymerschläuchen können Polymergele gestreckt sowie gestaucht und anisotrope Parameter mittels Fixierung beliebig skaliert werden. Der wesentliche Vorteil bei dieser Methode ist, dass die Streckung reversibel verlaufen kann, ohne das Orientierungsmedium zu zerstören.⁴⁷

Interessant ist, dass Komprimierung und Streckung im Vergleich gegensätzliche Vorzeichen bei anisotropen, residualen Parametern liefern. Während bei Streckungen die lokalen Magnetfelder primär entlang der \tilde{z} -Achse orientiert sind, ist deren Wahrscheinlichkeit bei Stauchungen entlang der \tilde{x} - bzw. \tilde{y} -Achse am höchsten (s. Abbildung 2.8).⁴⁸

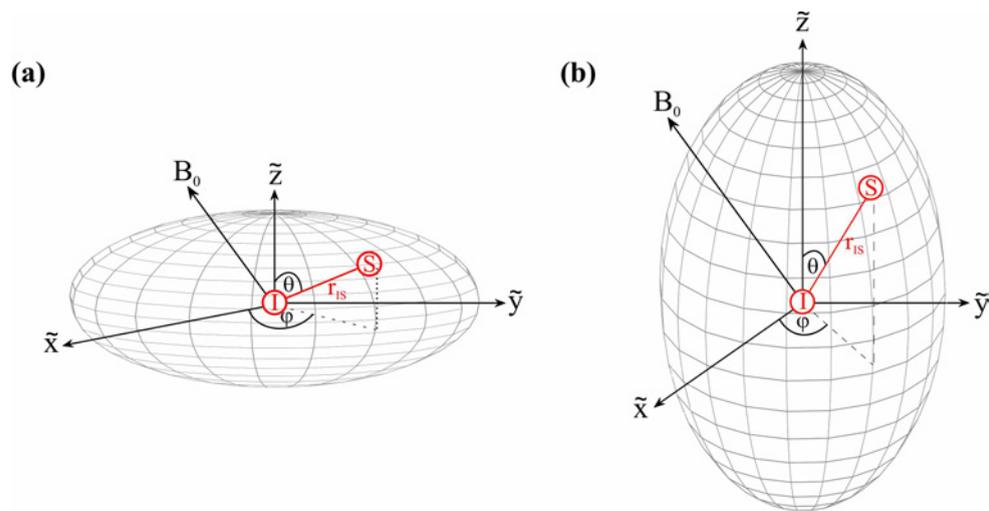


Abbildung 2.8.: Verschiedene Generierungen von Wahrscheinlichkeitstensoren ausgehend vom isotropen Fall. Nach der Stauchung entlang der \tilde{z} -Achse wird die isotrope Wahrscheinlichkeitsmatrix \mathbf{P} eines Moleküls zu einem oblaten **(a)**, nach einer Streckung zu einem prolates Rotationsellipsoid **(b)** verformt. Beim Übergang vom gestreckten zum komprimierten Fall wird der Betrag von \tilde{z} verringert, während der von \tilde{x} bzw. \tilde{y} zunimmt. Dadurch wird das Vorzeichen des jeweiligen, gemessenen RDC vertauscht.⁴⁸

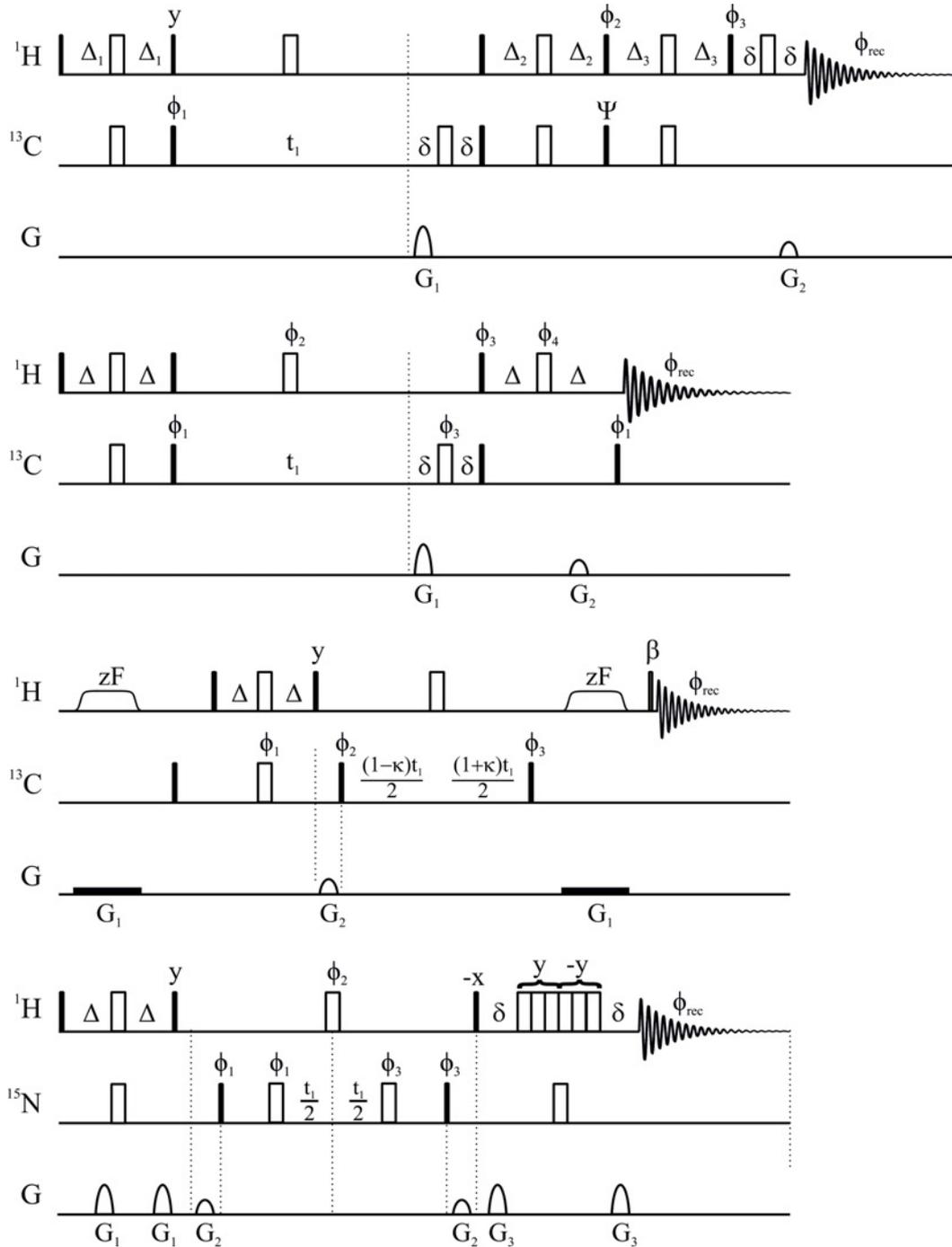
2.4. Eliminierung von Störfaktoren bei Messungen von anisotropen Parametern

Bei der Messung von residualen, anisotropen Parametern treten oft Artefakte auf, die ein exaktes Ablesen erschweren oder gar unmöglich machen. Diese Artefakte können durch geschickte Selektion der Kohärenzwege, unterstützt über Phasenzyklen bzw. Feldgradienten (*pulsed field gradients*, PFG), eliminiert werden. Nicht nur homo- bzw. heteronukleare Weitbereichskopplungen stellen einen Störfaktor dar, sondern auch die NMR Signale des Orientierungsmediums selbst können durch breite Linien interessante Signale überlagern. Im folgenden Abschnitt werden Techniken bzw. Synthesen vorgestellt, welche die Eliminierung solcher Störfaktoren bewirken.

2.4.1. Messung von anisotropen Parameter

Für die Messung von anisotropen Parametern kann eine Vielzahl an Experimenten verwendet werden. Meist werden *heteronuclear single quantum correlation* (HSQC) basierende Experimente wie *clean-inphase/antiphase* (CLIP/CLAP), *primitive exclusive* (P.E.), *inphase/antiphase* (IP/AP) oder FAST HSQC-Pulssequenzen herangezogen (s. Schema 2.2), um $^1J_{CH}$ - und $^2J_{HH}$ - bzw. $^1T_{CH}$ - und $^2T_{HH}$ -Kopplungskonstanten zu messen. Aus deren Differenzen werden die dipolaren Restkopplungen $^1D_{CH}$ und $^2D_{HH}$ für die Strukturvalidierung mit z. B. den Programmen PALES (*prediction of alignment from structure*) oder MSPIN erhalten (s. Kapitel 2.7).^{53,54} Für die Messungen von residualen, chemischen Verschiebungsanisotropien werden entsprechende 1D ^{13}C , ^{15}N oder ^{31}P Spektren verwendet. Quadrupolare Restkopplungen hingegen können mithilfe von *natural abundance deuterium-* (NAD) bzw. mit *quadrupolar correlation spectroscopy-* (QCOSY) basierenden Pulssequenzen aufgenommen werden.

Meist sind die Signale in orientierten Proben durch den Einfluss dipolarer Kopplung, heteronuklearer Weitbereichskopplungen oder passiver homonuklearer Kopplungen verbreitert. Gegen homonukleare bzw. heteronukleare Kopplungen werden z. B. *bilinear rotation decoupling* (BIRD),^{55,56} bzw. *spin-state-selective coherence transfer* (S^3CT)^{57,58} Elemente in bereits etablierte Pulssequenzen eingefügt. In dieser Arbeit wurde überwiegend das CLIP- bzw. CLAP-HSQC Experiment verwendet. Durch Separation der In- bzw. Antiphase Terme werden rein absorptive In- bzw. Antiphase Signale erhalten, welche eine genaue Analyse der Kopplungskonstanten gewährleisten.



Schema 2.2: Pulssequenzen für die Detektion von anisotropen Parametern. (a) HSQC-IP/AP um sowohl ${}^1T_{CH}$, als auch ${}^2T_{HH}$ Kopplungskonstanten zu detektieren. Hierfür werden die aufgenommenen Spektren entsprechend addiert bzw. subtrahiert;⁴⁹ (b) CLIP-HSQC um rein absorptive, Inphase Signale von ${}^1T_{CH}$ Kopplungskonstanten zu erhalten;⁵⁰ (c) P.E.HSQC mit z-Filter zF für die simultane Messung von ${}^1T_{CH}$ und ${}^2T_{HH}$ Kopplungskonstanten;⁵¹ (d) FAST-HSQC für die Messung von ${}^1\text{H}$ - ${}^{15}\text{N}$ Kopplungskonstanten mit einem 3-9-19 Kompositpuls zur Wasserunterdrückung mittels WATERGATE. Die entsprechenden Phasenzyklen, Refokussierungszeiten oder Gradientenstärken sind in der jeweiligen Literatur zu entnehmen.⁴⁹⁻⁵²

2.4.2. Unterdrückung von NMR Signalen

Um Moleküle geringer Konzentration in einem Orientierungsmedium möglichst empfindlich detektieren zu können, wird entweder das entsprechende Isotop angereichert oder der dynamische Bereich durch Unterdrückung der intensiven NMR Signale des Orientierungsmediums angepasst. Bei der zweiten Methode werden Sequenzbausteine abhängig von den R_1 - und R_2 -Relaxationsraten des Orientierungsmediums in etablierte Pulsprogramme eingesetzt (s. Kapitel 3.3.2). Hierfür können z. B. CPMG- oder Relaxationsfilter bei Orientierungsmedien mit langen T_2 -Relaxationszeiten verwendet werden, während bei kurzen T_2 -Relaxationszeiten Diffusionsfilter bzw. Vorrättigungssequenzen zum Einsatz kommen.

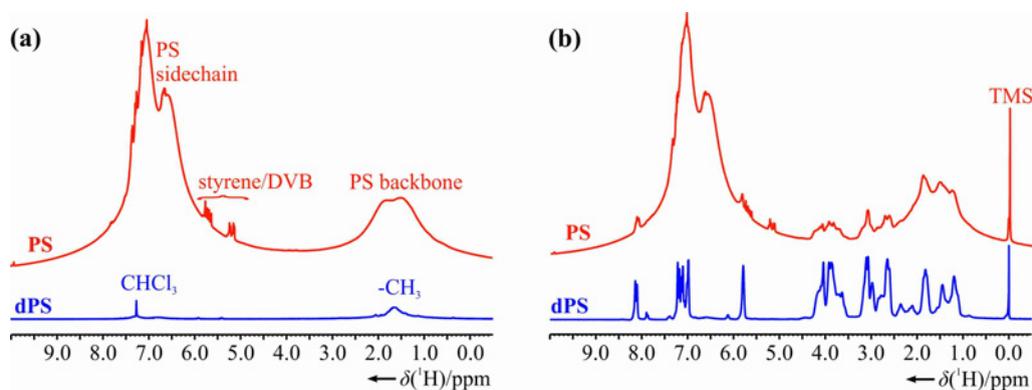


Abbildung 2.9.: 1D ^1H Spektren von nicht-deuteriertem (rot) und deuteriertem (blau) vernetztem Polystyrol. Die NMR Signale des Polymers sind nach der Deuterierung im aromatischen Bereich deutlich reduziert, lediglich die Signale des nicht-deuterierten Vernetzers Divinylbenzen sind sichtbar (a). Durch Herabsetzung des dynamischen Bereichs können selbst Substanzen mit geringer Konzentration, hier am Beispiel einer 25 mM Strychnin Probe gezeigt, detektiert werden (b).⁵⁹

Eine weitere Möglichkeit ist, die detektierbaren Kerne der flüssigkristallinen Phase bzw. des Polymergels durch weniger empfindliche bzw. nicht detektierbare Kerne zu ersetzen. Weil bei organischen Molekülen primär Protonen die störenden Faktoren darstellen, werden z. B. Perdeuterierungs- oder Fluorierungsreaktionen durchgeführt (s. Abbildung 2.9).^{59–62}

Bei der Unterscheidung von fluorierten, chiralen Molekülen hingegen, welche in der pharmazeutischen Industrie Verwendung finden, wird der Störfaktor breiter Signale, hervorgerufen durch das Orientierungsmedium, einfach übergangen, indem bei der ^{19}F -Frequenz angeregt wird.

Im nächsten Kapitel wird ein Überblick zu bereits existierenden Orientierungsmedien gegeben. Weiterhin erfolgt eine Beschreibung über die Diskriminierung von Enantiomeren anhand verschiedener Beispiele.

2.5. Orientierungsmedien

Um Orientierungsmedien für eine Vielzahl von unterschiedlichen Anforderungen in Bezug auf Molekül- bzw. Lösungsmittelkompatibilität verwenden zu können, wurden in den letzten Jahren mehrere Polymergele und flüssigkristalline Phasen entwickelt.^{14,63–66} Für die Strukturaufklärung unbekannter Biomoleküle wie Proteine werden z. B. Polyacrylamidgele, Pfl-Phagen oder die nach ihrem Entdecker benannten Otting Phasen verwendet.^{64,67–69} Bei Messungen in DMSO-haltiger Umgebung werden meist auf Poly(dimethylacrylamid)- oder Poly(acrylnitril)-basierende Polymergele eingesetzt.^{70,71}

Tabelle 2.1.: Flüssigkristalline Phasen für die Messung anisotroper Parameter

Flüssigkristalline Phase	Kompatibilität	Beschreibung	Ref.
DNA Nanoröhren	D ₂ O	chiral	65
Pfl Phagen	D ₂ O	geladen	69
PBLG/PBDG	CDCl ₃ , CD ₂ Cl ₂ , THF, DMF, Dioxan	chiral	66, 72
Vernetztes PBLG	CDCl ₃ , CD ₂ Cl ₂ , THF, Dioxan, Benzol	chiral	73
C _m E _n /n-Alkylalkohol	D ₂ O		64
Polyacetylen	CDCl ₃	chiral	74, 75

Seit Deloche und Samulski das erste Polymergel auf Isopren-Basis im Jahre 1981 synthetisierten, wurden weitere Polymergele für die Messung von anisotropen Parametern in apolarer Umgebung entwickelt. Vertreter sind die vernetzten Polymere Polystyrol (PS), Polymethylmethacrylat (PMMA), Polyurethan (PU) oder Polydimethylsiloxan (PDMS).^{14,76–78} Während die Polymergele PU und PDMS entweder mit beschleunigten Elektronen oder mit γ -Strahlung vernetzt wurden, können PS bzw. PMMA auch im Labor synthetisiert werden.^{48,79}

Die Vielzahl an Orientierungsmedien bzw. deren Weiterentwicklung stellt eine Notwendigkeit dar, um z. B. die Berechnung der Dynamik innerhalb eines Moleküls zu verfeinern. Gerade im Hinblick auf die Lösungsmittelkompatibilität chiraler Orientierungsmedien besteht ein Mangel an reproduzierbaren und kostengünstigen Alternativen zu e⁻-Gelatine bzw. Kollagen.^{40,80} Für gängige Lösungsmittel wie Methanol oder DMSO existieren nur wenige bzw. keine flüssigkristallinen Phasen.

Ein weiteres Kriterium für die Etablierung neuer Orientierungsmedien ist die Mo-

lekülkompatibilität. Neben dem bereits genannten PVAc, welches zwar in DMSO quillt, aber für Peptide unzugänglich ist, ist PS ein weiteres Beispiel hierfür, dessen π -stacking mit delokalisierten π -Elektronen eines gelösten Moleküls zu Linienverbreiterungen führt.

Tabelle 2.2.: Vernetzte Polymergele für die Messung anisotroper Parameter

Polymergele	Kompatibilität	Beschreibung	Ref.
Poly(acrylamid)	D ₂ O		43,81
e ⁻ -Gelatine	D ₂ O, DMSO	chiral	46
Gellan Gum	D ₂ O, DMSO	chiral	19
Poly(vinylacetat)	CDCl ₃ , CD ₂ Cl ₂ , CD ₃ OD, CD ₃ CN, DMSO, Dioxan, C ₆ D ₆ , THF, TFE, EtOAc, DMF, Aceton		77
*Poly(ethylenoxid)	CDCl ₃ , CD ₂ Cl ₂ , CD ₃ OD, CD ₃ CN, Dioxan, DMSO, C ₆ D ₆ , DMF, EtOAc, THF, TFE, D ₂ O, Aceton	ein ¹ H/ ¹³ C NMR Signal	82
Poly(dimethylsiloxan)	CDCl ₃ , CD ₂ Cl ₂ , Alkane, C ₆ D ₆	ein ¹ H/ ¹³ C NMR Signal	14
Poly(acrylnitril)	DMSO, DMF		71
Isopren	CDCl ₃ , Benzol, Heptan		13

* Lösungsmittelkompatibilität gilt auch für die entsprechenden Derivate von Poly(ethylenoxid)

Ein Hauptaugenmerk in dieser Dissertation wurde daher auf die Entwicklung und Synthese von neuen Orientierungsmedien gelegt (s. Kapitel 3). Polyethylenoxid (PEO) konnte als neues Orientierungsmedium etabliert werden, welches neben PVAc ebenfalls eine Bandbreite von apolaren, polaren bis hin zu wässrigen Lösungsmitteln abdeckt. Außerdem konnte Gellan Gum als Biopolymergel zur Diskriminierung von Enantiomeren im wässrigen bzw. DMSO-haltigen Milieu eingeführt werden.

2.6. Diskriminierung von chiralen Molekülen

2.6.1. Paramagnetische Shift Reagenzien

Die NMR-Spektroskopie stellt eine analytische Methode zur Unterscheidung von Enantiomeren dar. Additive wie paramagnetische Shiftreagenzien, die meist auf Europium-Komplexen basieren, werden zur Ausrichtung von Molekülen eingesetzt.⁸³ Nachdem das Ion im Magnetfeld polarisiert wurde, wird die Polarisation auf das gelöste Molekül übertragen, wodurch dieses selbst orientiert wird.

Trotz der Ausrichtung, bei welcher jegliche anisotrope Parameter gewonnen werden, können kleine, chirale Moleküle meist nur durch Pseudo-Kontakt-Shifts unterschieden werden. Wegen der geringen Auflösung, hervorgerufen durch Linienverbreiterungen aufgrund der paramagnetischen Eigenschaften des Ions, werden nur selten anisotrope Restkopplungen beobachtet.

2.6.2. Flüssigkristalline Phasen

Eines der ersten chiralen Orientierungsmedien ist die flüssigkristalline Phase Poly- γ -benzyl-L-glutamat (PBLG) bzw. das entsprechende R-Enantiomer Poly- γ -benzyl-D-glutamat (PBDG).⁸⁴ Durch Verlängerung des Rückgrats von PBLG findet der Phasenübergang erster Ordnung bei geringerer Konzentration statt, wodurch die Orientierungsstärke herabgesetzt wird.⁶⁶ Dipolare Wechselwirkungen bzw. Signalbreiten werden reduziert und Kopplungskonstanten für kleine bis mittelgroße Moleküle können genauer bestimmt werden.

Der Nachteil an flüssigkristallinen Phasen wie PBLG, PELG oder PCBLL ist die bislang geringe Bandbreite an einsetzbaren Lösungsmitteln, welche sich meist auf wenige, apolare Medien wie Chloroform oder Dichlormethan beschränken (s. Tabelle 2.1).⁸⁴⁻⁸⁶

2.6.3. Polymergele

In den letzten Jahren ist es gelungen, mithilfe von chiralen Polymergele Enantiomere zu unterscheiden. Zwei Herangehensweisen sind hierbei möglich: Zum einen wird auf Biopolymere zurückgegriffen, mit deren helikalen Sekundärstrukturen Enantiomere in verschiedener Weise wechselwirken und dadurch unterschiedliche, chemische Verschiebungen bzw. Kopplungskonstanten aufweisen (s. Abbildung 2.10). Vertreter dieser Polymerklasse sind unter anderem die Polypeptide Kollagen und Gelatine bzw. die Polysaccharide Carrageen und Gellan Gum.^{19, 40, 41, 80}

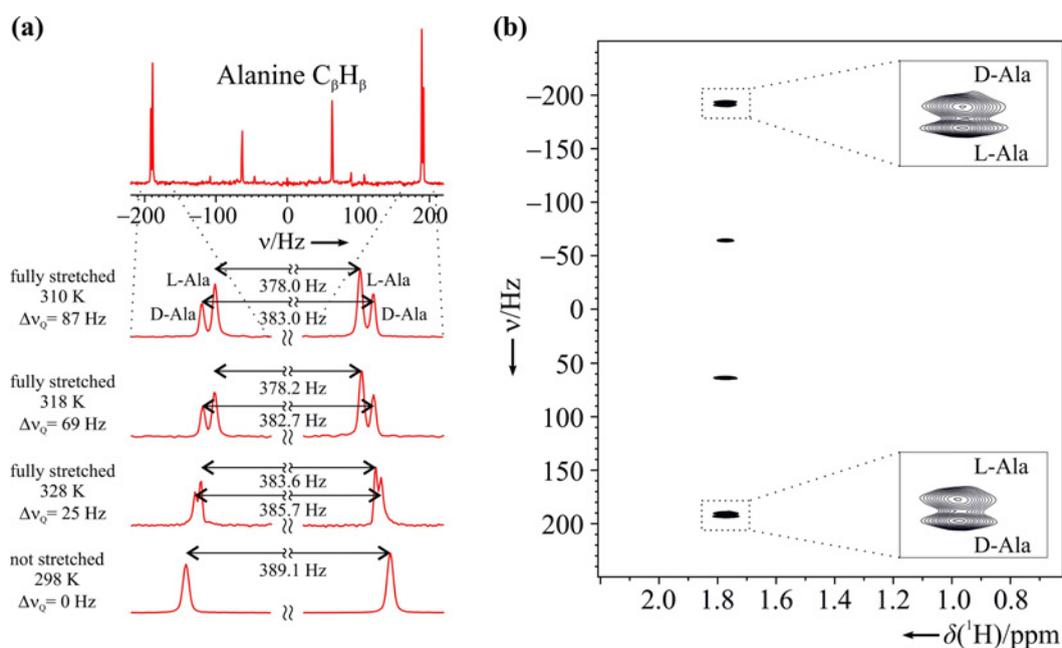


Abbildung 2.10.: NMR Messungen einer Probe aus D- und L-Alanin. 1D ^1H Spektrenausschnitte einer e^- -Gelatine/ D_2O Probe bei verschiedenen Temperaturen mit maximaler Gelstreckung (a) bzw. 2D BIRD d,X HSQC Spektrum von konventionell vernetzter Gelatine in D_2O (b).^{18,40,87}

Zum anderen können bereits etablierte Polymergele mit chiralen Gruppen derivatisiert werden. Mit dem auf Polyacrylamid basierten APhES konnte auf diese Weise gezeigt werden, dass die selektive Orientierung einzelner Enantiomere durchführbar ist.^{88,89} Jedoch ist auch im Bereich der chiralen Polymergele die Lösungsmittelkompatibilität ein wesentlicher Schwachpunkt, weil allein für die Lösungsmittel Wasser, DMSO oder MeOH geeignete Orientierungsmedien verfügbar sind.

Der Vorteil von synthetisierten im Vergleich zu biologisch chiralen Orientierungsmedien ist, dass sie vor Abbauprozessen wie enzymatischen Spaltungen geschützt sind. Sie haben daher keine Einschränkungen gegenüber Enzymen wie z. B. Lysozym oder Maltase, welche Peptid- bzw. Zuckerbindungen spalten können. Weiterhin ist die entsprechende R- bzw. S-Konfiguration des Polymers synthetisch leichter zugänglich.

Wie bereits erwähnt, ist die Diskriminierung von Enantiomeren vor allem im pharmazeutischen Bereich von wesentlichem Wert. Pharmaka werden meist über fluoridierte Restgruppen gegen den biologischen Abbau im menschlichen Körper geschützt. Mit chiralen Orientierungsmedien können über den stark elektronegativen Einfluss ($-I$ -Effekt) der Fluoratome die NMR Signale von Enantiomeren häufig deutlich voneinander getrennt bzw. aufgelöst werden.³⁹ Aufgrund dessen könnte die Unterscheidung

von chiralen Molekülen mittels NMR-Spektroskopie bald eine alternative Methode darstellen. Über die bereits beschriebenen Experimente werden auch die anisotropen Parameter für die Aufklärung von Enantiomeren gewonnen.

Einer der wesentlichen Nachteile der Diskriminierung von Enantiomeren mittels NMR-Spektroskopie ist, dass zwar R- bzw. S-Konfigurationen getrennt werden können, jedoch nicht welches der isolierten Signalgruppen dem jeweiligen Enantiomer angehören. Erst durch Verwendung von Reinsubstanzen, welche zuvor z. B. über deren Drehwert bestimmt wurden, kann eine definierte Zuordnung stattfinden.

2.6.4. Homogenität von Orientierungsmedien

Neben den Eigenschaften zur Ausrichtung von Molekülen ist die Homogenität von Orientierungsmedien für die Messung von anisotropen NMR Parametern entscheidend. Ein Maß für die Orientierungsstärke ist die Größe der ^2H residualen Quadrupolaufspaltung des eingesetzten Lösungsmittels. Dieses 1D ^2H Spektrum stellt eine zuverlässige Methode dar, um auch auf den Grad der Orientierung des gelösten Moleküls zu schließen. Dabei sollte jedoch immer auf das verwendete Molekül, Lösungsmittel und Orientierungsmedium geachtet werden (s. Kapitel 3).

Im Idealfall sollten bei der Quadrupolaufspaltung von Deuterium beide NMR Signale entsprechend einer Lorentzform verlaufen. Einheitliche Signalverläufe, d. h. beide NMR Signale besitzen sowohl dieselbe Breite, als auch Höhe, weisen auf eine gleichmäßige Orientierung des Lösungsmittelmoleküls im Orientierungsmedium hin. Falls die Signale des Lösungsmittelmoleküls jedoch nicht der Idealform entsprechen, ist es meistens mithilfe eines 1D Spektrums unmöglich eine Aussage darüber zu treffen, ob die Ursache eine nicht äquilibrierte Probe ist oder durch eine magnetisch inhomogene Umgebung hervorgerufen wird. Abweichungen von der Idealform führen zu breiten NMR Signalen und damit zu ungenauen bzw. nicht ablesbaren Kopplungskonstanten. Zusätzlich werden die $^1T_{CH}$ - und $^2T_{HH}$ -Kopplungskonstanten mit einem weitaus größeren Fehler behaftet als nötig.

In dieser Arbeit wurde daher das Verhalten sowohl von flüssigkristallinen Phasen, als auch von verschiedenen (Bio-)polymergelen während der Quellzeit bzw. bei verschiedenen Streckungen über ^2H bildgebende Experimente beobachtet (s. Kapitel 4.3).

2.7. Strukturvalidierung mithilfe von anisotropen Parametern

Bei der Überprüfung von Strukturmodellen ist die Qualität der anisotropen NMR Parameter ausschlaggebend. Mischterme aus In- und Antiphase Magnetisierungen, Phasenverzerrungen und Linienverbreiterungen bei stark orientierten Molekülen erschweren die Bestimmung von RDCs und RCSAs. Weil die Molekülstruktur nicht direkt aus den experimentellen Werten konstruiert wird, führt ein ungenaues Ablezen der anisotropen Parameter bzw. deren Fehlertoleranzen zu Fehlinterpretationen der simulierten Modelle.

Für die Geometrieoptimierung der angenommenen Molekülstrukturen können computergestützte MD-Simulationsprogramme wie SYBYL⁹⁰ oder COSMOS⁹¹ verwendet werden. Die anschließende Berechnung des Saupe Tensors \mathbf{S} wiederum erfolgt entweder mit PALES,^{92,93} XPLOR-NIH,^{94,95} AMBER⁹⁶ oder MSPIN.⁵³

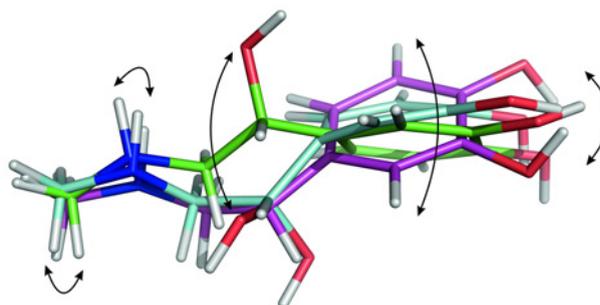


Table of Energy Contributions (in kJ/mol)

Cycle	Reset	ForceF-Total	Bond	Angle	Dihedral	Bending	Electrostatic	VdWaals	Pseudo
10	X	338.307	8.56241	20.3404	220.481	3.81722	48.772	36.334	0
20	X	335.268	4.82425	19.6295	220.926	3.08164	49.4309	37.3752	0
30	X	332.362	5.32641	21.5971	220.166	3.06423	48.3259	33.8822	0
40		329.314	2.62268	20.7254	219.945	3.25886	48.6369	34.1252	0
50	X	329.117	2.5625	20.6203	220.163	2.92672	48.6928	34.1513	0
60	X	328.813	2.49813	20.3325	220.284	2.74423	48.7369	34.2166	0
70		328.7	2.49983	20.262	220.138	2.8952	48.7257	34.1798	0
80		328.312	2.49689	20.1287	220.326	2.65501	48.6729	34.0318	0
90		328.25	2.52279	20.0577	220.191	2.79686	48.6588	34.0231	0
100		327.587	2.60758	19.7244	220.493	2.62997	48.4396	33.6919	0

Maximum of cycles

Abbildung 2.11.: Schematische Darstellung des Optimierungsprozesses am Beispiel von Adrenalin. Dabei wird die Verteilung der Gesamtenergie des Moleküls pro Zyklus solange durch Veränderung der geometrischen Struktur berechnet, bis diese ein Minimum erreicht. Zusätzlich werden die Energieverteilungen des Kraftfeldes, der Bindungen, der elektrostatischen und van-der-Waals Wechselwirkungen in einer Tabelle zusammengefasst.

Im Gegensatz zu PALES, welches eine fixierte, geometrisch optimierte Molekülstruktur benötigt, werden in anderen Programmen wie XPLOR-NIH oder AMBER die

dipolaren Restkopplungen als räumliche Randbedingungen eines simulierten Kraftfeldes verwendet. Diese zusätzlichen Abstands- und Winkelparameter ergänzen dabei bereits vorhandene potentielle Energiefunktionen, welche aus klassischen Parametern wie NOEs oder 3J -Kopplungen sowie der Temperatur berechnet werden. Anisotrope Parameter können daher zur Verfeinerung von Molekülstrukturen herangezogen werden, indem diese über einen iterativen Prozess solange zur Berechnung des Orientierungstensors verwendet werden, bis die energetische Gesamtpotentialfunktion des Moleküls ein Minimum durchläuft.

Eine weitere Option, eine Molekülstruktur zu bestimmen, ist, auf ein experimentell ermitteltes Strukturmodell zurückzugreifen. Dieses Modell wird aus den anisotropen Parametern strukturell ähnlicher Moleküle erstellt, bei welchen die absoluten Konfigurationen bekannt sind. Mithilfe einer solchen Vorlage können Moleküle unbekannter Konfiguration dem entsprechenden stereotypen Modell zugeordnet werden.^{97,98}

Im nächsten Kapitel wird das allgemeine Prinzip für die Aufklärung von Molekülstrukturen erläutert bzw. welche Programme für die Strukturvalidierung in dieser Arbeit verwendet wurden.

2.7.1. Berechnung der Molekülstruktur

Die Berechnung des Saupe Tensors \mathbf{S} erfolgte in PALES nach der mathematischen Methode der *singular value decomposition* (SVD), bei welcher ein entsprechendes, geometrisch optimiertes Strukturmodell als Vorlage dient. Hierbei sind fünf voneinander unabhängige Vektoren von RDCs notwendig, welche weder parallel verlaufen, noch mehr als drei von diesen in einer Ebene liegen dürfen.

Für die Geometrieoptimierung der Molekülstruktur wurde das Programm COSMOS verwendet. Mithilfe des berechneten Tensors wurden die RDCs zurückberechnet (s. Kapitel 2.1.1), welche mit den extrahierten RDCs verglichen und anschließend mit Qualitätsfaktoren bewertet wurden (s. Kapitel 2.7.2).

Wie bereits erwähnt, ist die Verwendung von PALES nur für rigide Bereiche bzw. unflexible Moleküle zuverlässig. Bei kleinen Molekülen mit deren Rotations- und Schwingungsbewegungen ist PALES nur bedingt einsetzbar.

2.7.2. Qualitätsfaktoren

Nach der Berechnung des Saupe Tensors \mathbf{S} mit fünf unabhängigen RDCs werden in PALES die zusätzlichen, anisotropen Parameter an diesen über die `-bestFit` Funk-

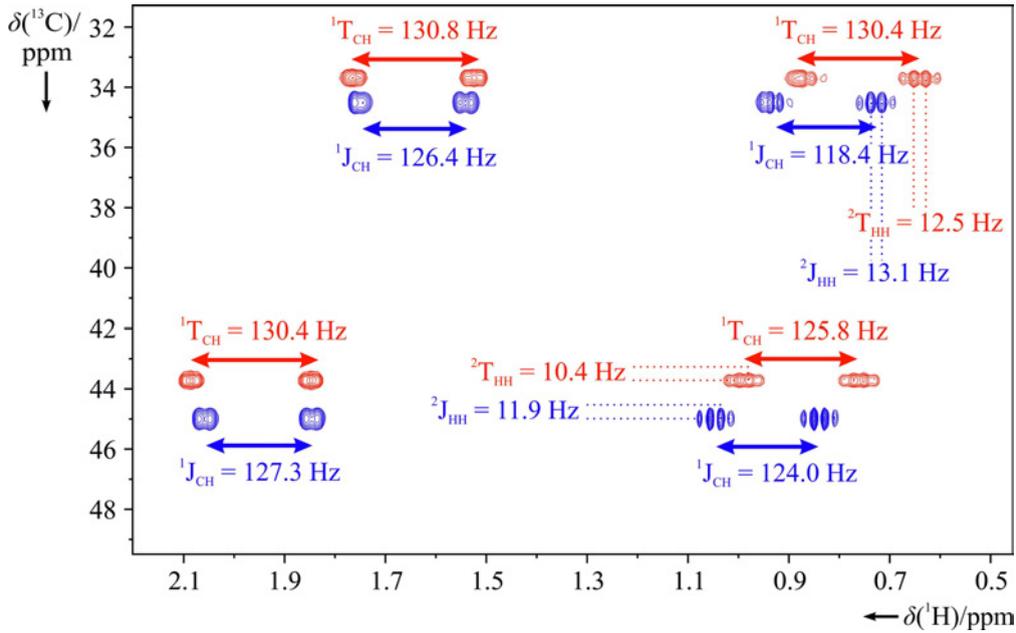


Abbildung 2.12.: 2D ^1H ^{13}C CLIP-HSQC Spektren einer isotropen (blau) bzw. anisotropen (rot) 0.3 M Menthol Probe für die Extraktion von $^1J_{\text{CH}}$ und $^2J_{\text{HH}}$ bzw. $^1T_{\text{CH}}$ und $^2T_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstanten für die Bestimmung von RDCs.

tion angeglichen, wobei auch die vorgegebenen Fehlertoleranzen einbezogen werden. Anschließend evaluiert PALES die experimentell ermittelten Daten mit den zurückberechneten und gibt über Qualitätsfaktoren wie die Pearson-Korrelation R bzw. deren Quadrat R^2 Auskunft über die Güte des Abgleichs. R beschreibt die Linearität zwischen den gemessenen und den zurückberechneten Werten. Weitere Qualitätsfaktoren sind der Quotient Q , welcher die mittlere, quadratische Abweichung in Bezug zur quadratischen Mittelung setzt,⁹⁹ und der Wert χ^2 , welcher die Differenz zwischen gemessener und zurückberechneter dipolarer Kopplung im Verhältnis zum experimentellen Fehler angibt.

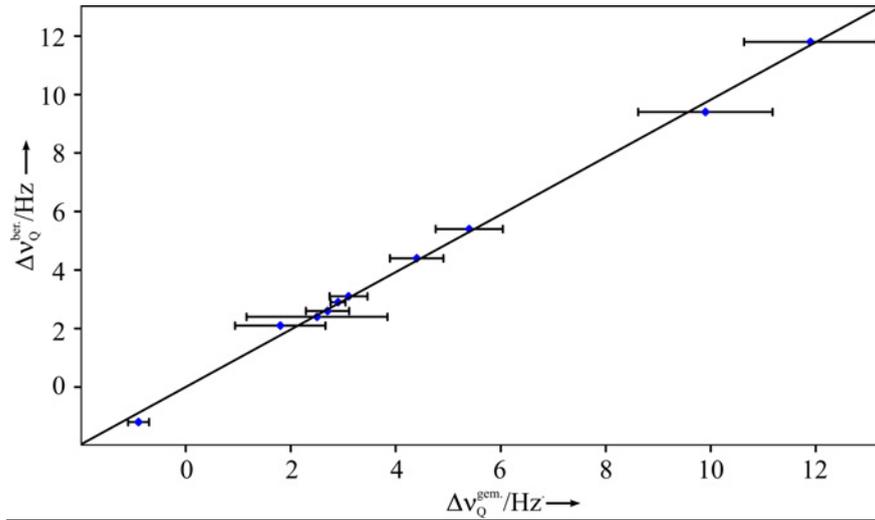
$$Q = \frac{RMSD}{RMS} = \frac{\sqrt{\frac{1}{N} \sum^N (x_{gem.} - x_{ber.})^2}}{\sqrt{\frac{1}{N} \sum^N (x_{gem.})^2}} \quad (2.12)$$

$$\Xi = \frac{N}{\chi^2} \quad \text{mit} \quad \chi^2 = \sum^N \left(\frac{x_{gem.} - x_{ber.}}{\Delta x_{gem.}} \right)^2 \quad (2.13)$$

Der Wert χ^2 steigt mit zunehmender Anzahl N an verwendeten RDCs an, daher wird dieser auf N normalisiert. In der Regel werden die englischen Bezeichnungen für die quadratische Mittelung mit RMS (*root mean square*) und die mittlere, quadratische Abweichung mit RMSD (*root mean square deviation*) wiedergeben. In PALES jedoch

entspricht der RMSD Wert dem des RMS Wertes.

Um den linearen Zusammenhang zwischen den experimentell ermittelten und den zurückberechneten Kopplungen zu verdeutlichen, werden diese gegeneinander aufgetragen und R^2 bestimmt (s. Abbildung 2.13). Falls die Datenpunkte nicht exakt auf einer Gerade verlaufen, sollten dennoch die angegebenen Fehlerbalken diese Gerade schneiden. Ist dies nicht der Fall, könnte dies je nach Anzahl ein Hinweis darauf sein, dass der zuvor berechnete Orientierungstensor bzw. die angenommene Molekülstruktur nicht bestätigt werden kann. Daher ist nicht nur die Linearität, sondern auch die Qualitätsfaktoren Q und $\frac{N}{\chi^2}$ entscheidend, die solche Abweichungen wiedergeben, wobei Q möglichst nahe 0 und $\frac{N}{\chi^2} \gg 1$ sein sollten.



DATA N	10
DATA RMS	0.216
DATA Chi2	2.245
DATA CORR R	0.999
DATA Q SAUPE	0.003
DATA REGRESSION OFFSET	0.008+/-0.101 [Hz]
DATA REGRESSION SLOPE	0.979+/-0.018[Hz]
DATA REGRESSION BAX SLOPE	0.980+/-0.012 [Hz]

Abbildung 2.13.: Auswertungsdaten von PALES nach der Berechnung der anisotropen Parameter. Mithilfe einer Regressionsgeraden lassen sich die experimentell ermittelten und die zurückberechneten RDCs miteinander vergleichen. Die Querbalken geben hierbei die Toleranzbereiche der jeweiligen Kopplung an. Wenn möglich sollte der Fehlerbalken von jeder Kopplung die Regressionsgerade schneiden, um dessen Bezug zum Strukturmodell zu bestätigen. Neben der Anzahl der verwendeten RDCs N und dem RMS Wert werden die Qualitätsfaktoren χ^2 , R , Q und verschiedene Regressionsdaten ausgegeben.

3. Synthese und Entwicklung von Orientierungsmedien

3.1. Polyethylenglycol/-oxid basierte Polymergele

3.1.1. Motivation

Obwohl bereits etablierte Orientierungsmedien, insgesamt gesehen, alle NMR relevanten Lösungsmittel wie Wasser, Chloroform oder DMSO abdecken,^{71,74,81,100–102} existieren quasi keine, welche für wässrige, polare und apolare Lösungsmittel gleichzeitig kompatibel sind.^{14,103} Allein PVAc ist für eine Bandbreite von Lösungsmitteln bzw. deren Kombinationen einsetzbar.⁷⁷ Hierbei fehlt jedoch Wasser als eines der primären Lösungsmittel für die Untersuchungen von Proteinen oder Zuckern.^{104,105} Bei vielen Substanzklassen wären auch Lösungsmittelgemische von Vorteil, um z. B. Interaktionen wie Faltungsprozesse von α -helikalen Segmenten oder deren amphiphilen Charakter über NMR-Spektroskopie zu verfolgen.^{106–111}

Im Vergleich zu anderen Orientierungsmedien wie PBLG ist der Monomerbaustein PEO wegen seiner breiten Anwendung in der pharmazeutischen Forschung sowie in der Verpackungsindustrie relativ kostengünstig und in fast jeglicher molekularen Größe bzw. Modifikation erhältlich.^{112–116} Dadurch steht für die Synthese von PEO als Orientierungsmedium eine Vielzahl an Monomerbausteinen zur Verfügung, um alternative Methoden neben der Bestrahlung von beschleunigten Elektronen bzw. γ -Strahlen für dessen Vernetzung zu finden. Hierbei sind vor allem Methacrylate als Linker von Interesse, weil diese durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht polymerisieren und den Einsatz von Radikalstartern oder Metallhalogeniden über-

flüssig machen.^{117–119} Mit dieser Methode wären vernetzte PEO Polymere auch im chemischen Labor herstellbar.

3.1.2. Vernetzung von Polyethylenglycolen/-oxiden

Die Vernetzung von Polyethylenglycolen bzw. -oxiden kann unter verschiedenen Reaktionsbedingungen durchgeführt werden. Eine klassische Methode ist der Einsatz von Startern wie Azo-bis-isobutyronitril (AIBN) oder Dibenzoylperoxid (DBPO), um eine radikalische Polymerisation des gelösten Polymers zu initiieren.^{120–122} Aufgrund der kleinen zylindrischen Form ($\varnothing \leq 5$ mm) jedoch, in welcher das Polymer vernetzt werden soll, ist ein homogenes Durchmischen der Polymerlösung kaum realisierbar.

Um dennoch eine gleichmäßige Vernetzung des Polymers zu erreichen, wurden die Polymerlösungen, wie bereits in verschiedenen Arbeiten gezeigt, mit beschleunigten Elektronen, mit γ - bzw. UV-Strahlen bestrahlt.^{61,76,123} Durch die Art und Dauer der Bestrahlung kann sowohl der Grad der Vernetzung, als auch deren Verteilung kontrolliert werden. Außerdem treten keine zusätzlichen NMR Signale des verwendeten Starters im Spektrum auf, sondern nur diejenigen des Polymers bzw. des eingesetzten Vernetzers.

Der Nachteil der Bestrahlung von reinem Polyethylenoxid mit beschleunigten Elektronen oder γ -Strahlen ist, dass bei dessen Vernetzung für jede entstandene Bindung primär jeweils zwei Wasserstoffatome abgespalten werden. Diese können zwar zu Beginn aus der flüssigen bzw. leicht viskosen Polymerlösung entweichen, gegen Ende jedoch wird diese zähflüssig, so dass der gasförmige Wasserstoff im Polymergel eingeschlossen wird. Die Folge ist eine inhomogene Gelstruktur, welche die Messungen von anisotropen Parametern ausschließt.

Zwar existieren Methoden, um die Blasenbildung zu reduzieren, dennoch sind diese zeitintensiv und für die Herstellung größerer Mengen nicht rentabel.⁸⁷ Daher wurde in dieser Arbeit die Synthese von Polyethylenglycol/-oxid basierenden Polymergelen unter verschiedenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Das Hauptaugenmerk lag auf der Lösungsmittelkompatibilität des Polymergels, welche erhalten bleiben sollte. Es folgten weitere Tests im Hinblick auf die Molekülkompatibilität für das bestrahlte Polyethylenoxid bzw. für die neu synthetisierten Polymergele, um weitgehend alle gängigen Substanzklassen wie Zucker, Peptide, Steroide bzw. Proteine abzudecken.

Im folgenden wird zwischen den Bezeichnungen Polyethylenglycol ($M \leq 16$ kg/mol)

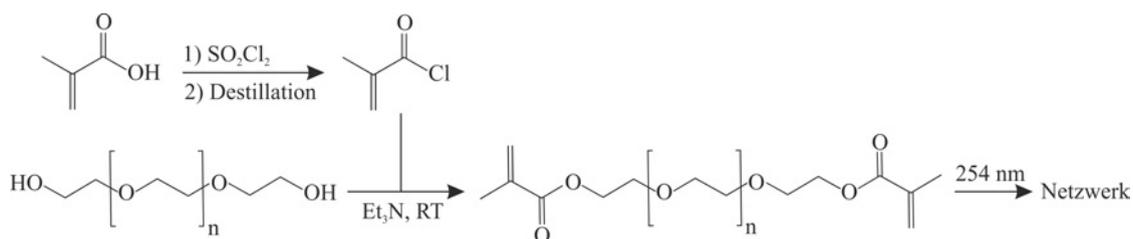
und Polyethylenoxid ($M > 16$ kg/mol) nicht mehr unterschieden, sondern nur noch der Begriff Polyethylenoxid (PEO) verwendet.

3.1.3. Synthese von Polyethylenoxid/methylmethacrylat

Polyethylenoxid/methylmethacrylat (PEOMMA) wurde mit verschiedenen Mengen bzw. Kettenlängen von Polyethylenoxid und Methacryloylchlorid (MACl) nach bereits bekannten Verfahren synthetisiert.¹²⁴⁻¹²⁸ Bei der Nomenklatur von PEOMMA handelt es sich um ein Akronym, welches das Polymer mit seinen beiden Hauptbestandteilen charakterisiert. Um die Eigenschaften des Polymers hinsichtlich Elastizität, Orientierungsstärke und Lösungsmittelkompatibilität zu prüfen, wurde dieses zunächst mit dem Radikalstarter AIBN und erst anschließend durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht vernetzt.

Die Lösungsmittel- bzw. Molekülkompatibilität von Polymethylmethacrylaten (PMMA) als Orientierungsmedium wurde in vorangehenden Arbeiten untersucht.^{48,78} Im Vergleich zu Polyethylenoxid jedoch ist bei PMMA der Einsatz von Lösungsmitteln auf wenige beschränkt (s. Tabelle 3.4), weshalb das Verhältnis des Polymergemisches zu Gunsten des Polyethylenoxids gehalten wurde.

MACl wurde aus Methacrylsäure und Thionylchlorid über eine Addition-Eliminierungsreaktion gewonnen (s. Schema 3.1).^{129,130} Anschließend wurde Polyethylenoxid mit den Molekulargewichten $M = 4$ kg/mol (PEO-4k) und $M = 8$ kg/mol (PEO-8k) in einem Verhältnis von 1:1 oder 1:2 (w:w) zusammen mit Triethylamin in wasserfreiem Acetonitril bei Raumtemperatur gelöst. Frisch destilliertes MACl wurde langsam über einen Zeitraum von 15 min hinzugegeben, so dass sich eine rosa gefärbte Lösung bildete und das entsprechende Triethylammoniumsalz als kristalliner Niederschlag ausfiel. Der Einsatz einer bestimmten Mindestmenge an MACl bzw. Triethylamin war erforderlich, um alle Hydroxygruppen von Polyethylenoxid zu verestern. Je mehr MACl bei der Synthese verwendet wurde, desto härter und unelastischer wurden die Gele, die Orientierungsstärke jedoch erhöht sukzessiv. Nach drei Stunden bei Raumtemperatur wurde eine entsprechende Menge an deuteriertem Methanol zugegeben, um das restliche MACl zu verestern. Die Polymerlösung wurde über einen Spritzenfilter vom Triethylammoniumchlorid getrennt und in ein silyliertes 5 mm NMR Röhrchen gefüllt, dessen offenes Ende anschließend abgeschmolzen wurde. Die Polymerisation wurde entweder mit AIBN oder später durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht ($\lambda = 254$ nm) eingeleitet. Während die radikalische



Schema 3.1: Synthese von PEOMMA Polymergelen. Zunächst wird PEO mit MACl verestert und anschließend mit ultraviolettem Licht bei 254 nm polymerisiert.

Reaktion unter Verwendung von AIBN in ein bis zwei Tagen verlief, wurde die Polymerlösung mit ultraviolettem Licht je nach Vernetzungsgrad bis zu vier Wochen bestrahlt. Dabei gilt: je länger die Bestrahlung, desto höher der Vernetzungsgrad und desto größer die Orientierungsstärke.

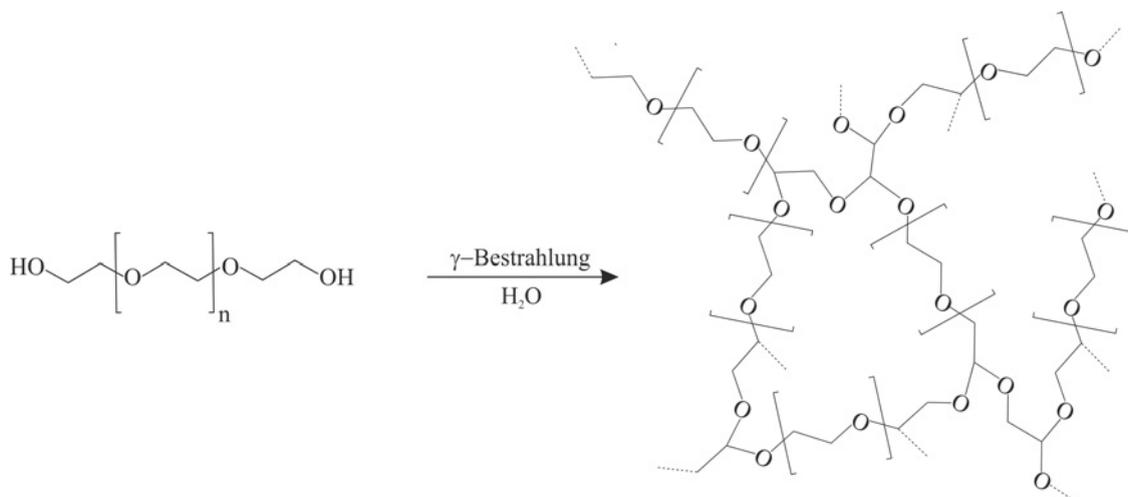
Die Qualität hinsichtlich der Homogenität war bei den mit UV-Licht bestrahlten Polymergelen höher. Für die gleichmäßige Dosierung während der Bestrahlung wurde das NMR Röhrrchen ständig um seine Längsachse rotiert. Nach der Polymerisation wurde das NMR Röhrrchen vorsichtig zerbrochen, ohne die Oberfläche des Gels durch Glassplitter zu beschädigen. Das orangegelbe Polymergel wurde in einem mit deionisiertem Wasser gefüllten Gefäß solange dialysiert bis es farblos und durchsichtig war. Danach wurde das Polymergel an der Luft bei Raumtemperatur zu einem weißen, zylindrischen Stäbchen getrocknet.

Bei nicht homogener Bestrahlung verbogen sich die Polymerstäbchen während der Trocknung entsprechend zur intensiver bestrahlten Seite hin. Für die NMR Messungen jedoch ergaben sich daraus keinerlei Nachteile. Mit dieser Versuchsvorschrift wurden Polymergele von 350 g/L bis 560 g/L hergestellt.

Bei der Synthese von PEOMMA Stäbchen spielt das Mischungsverhältnis zwischen PEO-4k bzw. PEO-8k für die Elastizität eine entscheidende Rolle. Je größer der Anteil von PEO-4k ist, desto rigider und spröder, je größer der Anteil an PEO-8k, desto elastischer und weicher wurden die Gele. Eine Polymerisation mit reinem PEO-4k konnte zwar durchgeführt werden, jedoch waren die synthetisierten Gele unter Druckeinwirkung brüchig und nicht als Orientierungsmedium geeignet. Bei reinem PEO-8k konnte keine Gelbildung beobachtet werden, es bildete sich lediglich eine viskose Polymerflüssigkeit.

Weiterhin wurde die radikalische Polymerisation von PEOMMA direkt im Kalrez[®] Schlauch durchgeführt, wobei die bereits beschriebenen Darstellungsverfahren anstelle von Acetonitril mit deuteriertem Chloroform umgesetzt wurden. Für die Ver-

netzung mit UV-Licht wurde die Polymerlösung nicht in ein silyliertes NMR Röhrchen, sondern in einen Kalrez Schlauch überführt, welcher an beiden Enden mit Teflonstopfen verschlossen wurde. Nach drei bis vier Wochen Bestrahlung konnte durch Streckung eine quadrupolare Aufspaltung von CDCl_3 von 10 Hz beobachtet werden.



Schema 3.2: Synthese von γ -PEO Polymergelen. Mithilfe von γ -Strahlen werden die Monomereinheiten abhängig von der Bestrahlungsstärke bzw. -dauer miteinander vernetzt.

Die Synthese von vernetztem PEO-20k konnte über den Linker Methylmethacrylat weder mit AIBN, noch über Bestrahlung mit ultraviolettem Licht realisiert werden. Daher wurden die PEO-20k Polymere nach bereits bekannten Vorschriften synthetisiert.⁸⁷

3.1.4. Synthese von PEOMMA mit geringem Molekulargewicht

Ein weiteres Ziel bei der Synthese von PEOMMA Gelen war deren Perdeuterierung, um jegliche ^1H NMR aktiven Signale zu ersetzen. Im Gegensatz zu vorangehenden Arbeiten sind bei längerkettigem PEOMMA die Monomereinheiten nicht kommerziell erhältlich.^{61,77,103} Daher wurde versucht, PEO-basierte Polymergele mit geringem Molekulargewicht zu synthetisieren, unter anderem auch da dessen Deuterierung in vorangehenden Arbeiten gezeigt wurde.¹³¹ Wichtige Kriterien hierbei waren, die Elastizität bzw. die Lösungsmittelkompatibilität der Polymergele weitestgehend zu erhalten.

Hierfür wurden verschiedene Ethylenglycoldimethacrylate mit einem Molekulargewicht von $M = 0.55$ kg/mol (PEOMA-0.55k) und $M = 0.75$ kg/mol (PEOMA-0.75k) kommerziell erworben, vernetzt und auf ihre Eigenschaften hin untersucht.

Verschieden konzentrierte Polymerlösungen (100 $\mu\text{L}/2\text{ mL}$ bis 200 $\mu\text{L}/2\text{ mL}$) wurden in CHCl_3 gelöst, mittels AIBN vernetzt und an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet. Die Polymerstäbchen quollen danach lediglich in Chloroform. Daher wurde die radikalische Polymerisation direkt in verschiedenen Lösungsmitteln wie MeCN, MeOH, CH_2Cl_2 , DMSO, CHCl_3 und Trifluorethanol durchgeführt, um Oberflächeneffekte während des Quellvorgangs auszuschließen.

Zusammenfassend war die Vernetzung bei PEOMA-0.75k in den Lösungsmitteln MeCN, MeOD, CHCl_3 und CH_2Cl_2 erfolgreich, während die Reaktion bei Triethylenglycoldimethacrylat und Polyethylenglycoldimethacrylat nur in CHCl_3 bzw. in CH_2Cl_2 stattfand. Jedoch waren die Polymergele bei PEOMA-0.75k unter Druckeinwirkung brüchig und für den Einsatz als Orientierungsmedium nicht geeignet. Aufgrund dieser Eigenschaften wurden die PEOMMA Gele mit geringem Molekulargewicht nicht weiter untersucht, sondern die Perdeuterierung der Einzelkomponenten forciert.

3.2. Deuterierung von PEOMMA

3.2.1. Deuterierung von Methacryloylchlorid

Für die Deuterierung von MACl wurden zwei Ansätze verfolgt: zum einen wurde Methacrylsäure mit schwerem Wasser (99.8% D₂O, 0.2% H₂O) unter der in Abbildung 3.1 gezeigten Apparatur durch ein mit Palladium auf Aktivkohle (Pd/C) gefülltes Glasrohr geleitet;¹³² zum anderen wurde mit Aceton-d₆, Kaliumcyanid, Essigsäure bzw. wässriger Aufarbeitung zunächst deuterierte Methacrylsäure synthetisiert und anschließend mit Thionylchlorid zu deuteriertem MACl umgesetzt.^{133, 134} Für Methode 1 wurde Methacrylsäure in schwerem Wasser vorgelegt und bei 170 – 190 °C zum Sieden gebracht. Dabei wurden Methacrylsäure und Deuteriumoxid gasförmig über ein 25 cm langes Glasrohr mit einem Innendurchmesser von 1 cm geleitet. In dem Glasrohr befand sich eine ca. 0.4 cm hohe Schicht eines Pd/C Katalysators. Mithilfe des Katalysators wurden die Wasserstoffatome von Methacrylsäure sukzessiv durch Deuteriumatome über heterogene Katalyse ersetzt. Das Glasrohr befand sich in einem Sandbad, welches auf 250 – 270 °C aufgeheizt wurde. Die so gewonnene Methacrylsäure-d₆ wurde über Flüssig-Flüssig-Extraktion bzw. Destillation vom Wasser getrennt und der Deuterierungsgrad über 1D ¹H- bzw. 1D ²H-NMR Spektren bestimmt. Selbst nach mehreren Durchläufen konnte ein Deuterierungsgrad von 95% nicht erreicht werden.

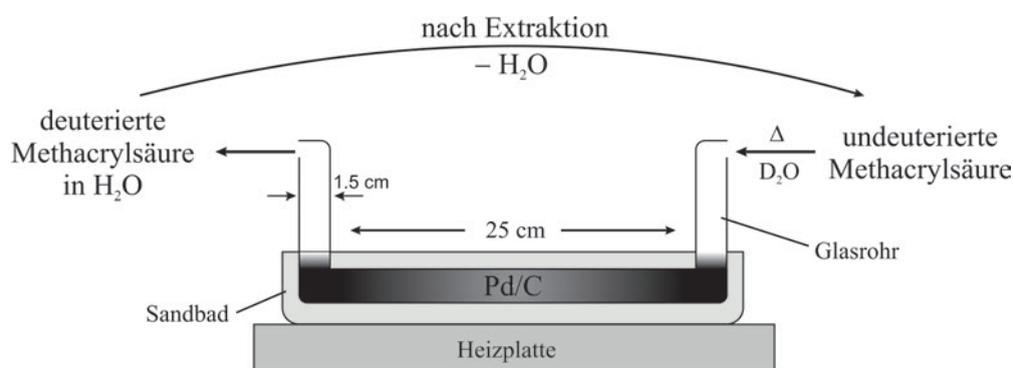
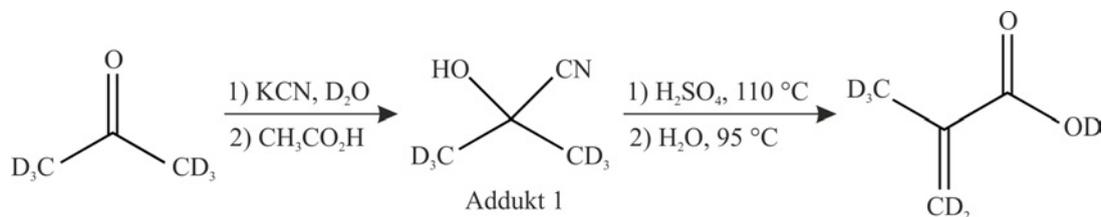


Abbildung 3.1.: Mithilfe der dargestellten Apparatur wurde Methacrylsäure zusammen mit Deuteriumoxid zum Sieden gebracht und gasförmig über einen Pd/C Katalysator geleitet. Bei einer Temperatur von > 250 °C und nach mehreren Zyklen konnte die Methacrylsäure zu 40 – 65% deuteriert werden.

Wegen des hohen Zeitaufwandes, großer Mengen an eingesetztem Deuteriumoxid und des geringen Wasserstoff-Deuterium-Austauschs bei Methode 1 wurde Methode 2 für die Darstellung von deuterierter Methacrylsäure verwendet (s. Schema 3.3). Hierfür

wurde Kaliumcyanid in Aceton-d₆ und D₂O unter Rühren gelöst und Essigsäure bei 0 °C langsam zugetropft. Nach der Extraktion von Addukt 1 mit Diethylether und der Trocknung über Magnesiumsulfat wurde dieses bei 85 °C zu konzentrierter Schwefelsäure zugetropft. Die Schwefelsäure wurde zuvor über Phosphorpentoxid getrocknet und mit Hydrochinon als Radikalinhibitor versetzt. Nach Zugabe von Addukt 1 wurde die Reaktionslösung zunächst auf 120 °C für 45 min erhitzt, anschließend mit deionisiertem Wasser hydratisiert und auf 95 °C abgekühlt. Nach drei Stunden Rühren, wurde das Gemisch auf Raumtemperatur gebracht und säulenchromatographisch oder über Kugelrohrdestillation aufgereinigt. Die deuterierte Methacrylsäure konnte nach Schema 3.1 zu teilweise deuteriertem PEOMMA umgesetzt werden, um die entsprechenden Signale in NMR Experimenten zu verhindern (s. Kapitel 3.3.1).



Schema 3.3: Darstellung von deuterierter Methacrylsäure. Aus Aceton-d₆ wurde zunächst in Gegenwart von Kaliumcyanid und Essigsäure 2-Cyano-2-hydroxypropan-d₆ gewonnen. Durch Dehydrolyse mit Schwefelsäure und anschließender wässriger Aufarbeitung wurde deuterierte Methacrylsäure erhalten.

3.2.2. Deuterierung von Polyethylenoxid

Für die direkte Deuterierung von PEO-4k und PEO-8k konnte in der Literatur keine Synthesevorschrift gefunden werden. Daher wurden verschiedene metallkatalytische Wasserstoff-Deuterium-Austauschreaktionen von PEO mit Rhodium,^{135, 136} Ruthenium,¹³⁷ Palladium¹³⁸ und D₂O unter variierenden Temperatur- und Druckbedingungen durchgeführt, um PEO vollständig zu deuterieren.¹³⁹ Bei keinem der Reaktionsansätze konnte jedoch ein genügend hoher H-D-Austausch in den 1D ²H Spektren beobachtet werden. Weil die Unterdrückung nicht chemisch durchgeführt werden konnte, wurden verschiedene NMR Pulssequenzen untersucht, um das Hauptsignal von PEOMMA bzw. PEO bei 3.7 ppm im ¹H bzw. bei 70 ppm im ¹³C Spektrum zu unterdrücken (s. Kapitel 3.3.2).

3.3. Charakterisierung von PEO basierten Polymergelen

3.3.1. Spektrenqualität

Die NMR Signale von Orientierungsmedien sind meist ein limitierender Faktor bei der Messung von gering konzentrierten Proben. Um die Signale des PEO zu reduzieren, wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einen wurde dies chemisch durch dessen partielle Deuterierung realisiert (s. Kapitel 3.2), zum anderen physikalisch durch den Einsatz bestimmter Pulssequenzen (s. Kapitel 3.3.2).

Im folgenden ist jeweils ein 1D ^1H und ein 2D ^1H ^{13}C CLIP-HSQC Spektrum von γ -PEO bzw. PEOMMA abgebildet. Während bei γ -PEO lediglich Signale bei 3.7 ppm im ^1H und bei 70 ppm im ^{13}C Spektrum zu sehen sind, erscheinen bei der PEOMMA Probe zusätzliche NMR Signale zwischen 1.1 bis 4.2 ppm im ^1H - und von 8 bis 70 ppm im ^{13}C Spektrum, bedingt durch den Vernetzer Methylmethacrylat (s. Abbildung 3.2).

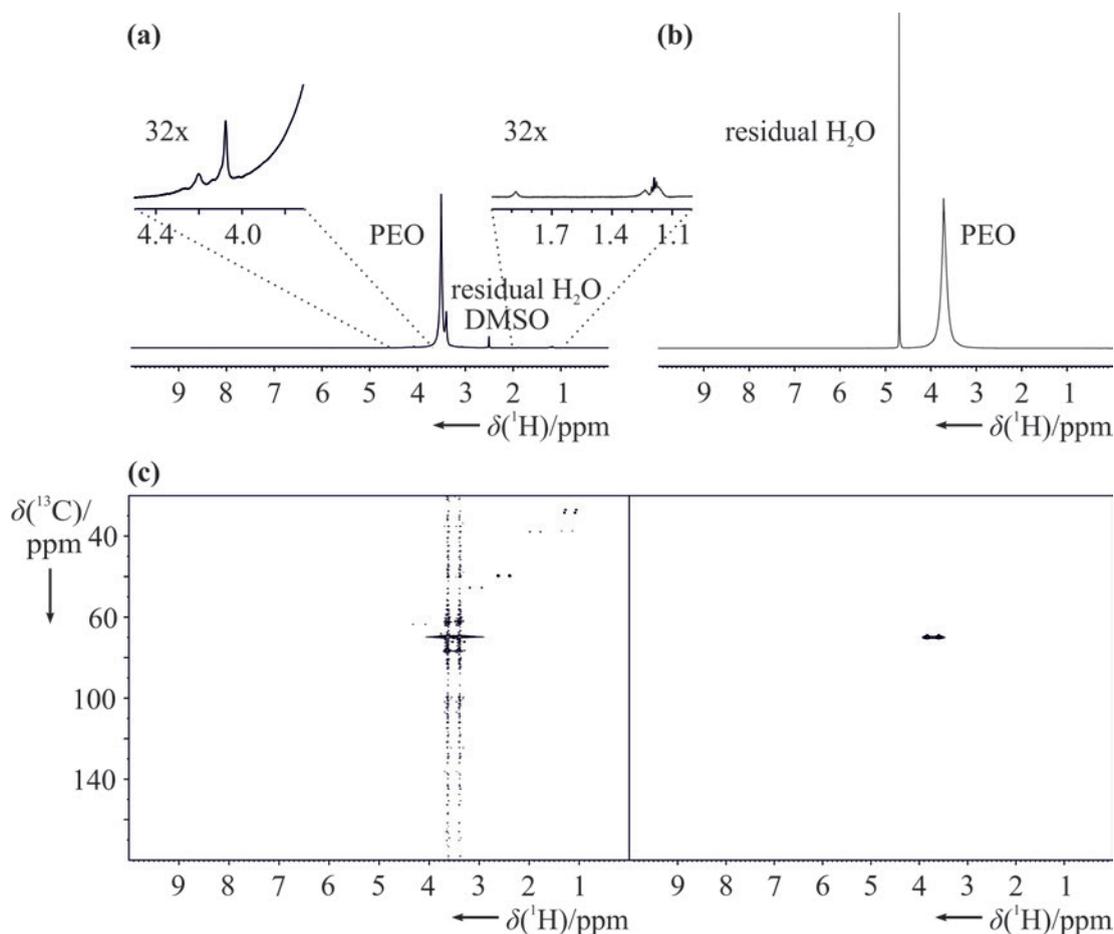


Abbildung 3.2.: 1D und 2D Spektren von PEOMMA (a) und γ -PEO (b). Während bei PEOMMA zusätzlich reduzierte Signale des Methylmethacrylats zu erkennen sind, wird bei γ -PEO lediglich das Hauptsignal detektiert (c).

Verunreinigungen von nicht polymerisiertem MMA und Triethylammoniumchlorid können durch unzureichende Dialyse im Spektrum von PEOMMA Gelen auftreten. Charakteristisch erscheinen die beiden Singulets der Doppelbindungsgruppen von MMA bei 5.8 und 6.3 ppm bzw. ein Singulett (8.2 ppm) und zwei Multiplett (1.2 und 3.7 ppm) des Triethylammoniumsalzes im ^1H Spektrum. Diese Signale können durch Deuterierung von MMA bzw. durch Einsatz von deuteriertem Triethylamin vermieden werden. Da die Synthese von deuteriertem MMA zeitaufwendig ist, wurde im folgenden versucht, die Störsignale des Polymergels mit bestimmten Pulssequenzen zu unterdrücken.

3.3.2. Unterdrückung von NMR Signalen

Wie in vorangegangenen Abschnitt gezeigt, können Polymersignale durch Deuterierung reduziert werden. Eine weitere Methode ist, entsprechende Relaxations- oder Diffusionsfilter bzw. durch einfache oder multiple Vorsättigung die intensiven Signale des Orientierungsmediums zu reduzieren. Auch selektive Pulsbausteine wie WATERGATE oder water-flipback Sequenzen werden hierfür eingesetzt.

3.3.2.1. Unterdrückung von PEO Signale

In diesem Kapitel wird die Reduzierung der Polymersignale sowohl von γ -PEO, als auch von PEOMMA vorgestellt. Während bei undeuteriertem PEOMMA eine Reihe von NMR Signalen unterdrückt werden müssen, ist bei deuteriertem PEOMMA bzw. γ -PEO lediglich das Hauptsignal der Ethylenoxidgruppen vorhanden. Dieses Signal ist sowohl bei PEOMMA (20 Hz), als auch bei γ -PEO (15 Hz) nur wenige Hertz breit und überdeckt nur eine kleine Region im Spektrum (s. Kapitel 3.3.1). Hinsichtlich der T_2 -Relaxationszeit des störenden Signals kann das Gelingen von Unterdrückungssequenzen (s. Kapitel 3.3.2) abgeschätzt werden. Dennoch wurden verschiedene Elemente in bereits etablierte Pulssequenzen eingebaut und auf deren Effektivität hin getestet. Für die Vernetzung von PEOMMA werden nur geringe Konzentrationen an MMA benötigt. Störend sind die NMR Signale von MMA daher erst, wenn nur wenig Material der zu untersuchenden Substanz vorhanden ist. Trotzdem wurden mit multipler Vorsättigung und Diffusionsfiltern zwei Methoden für die Unterdrückung aller Signale von PEOMMA realisiert (s. Abbildung 3.3 und 3.4).

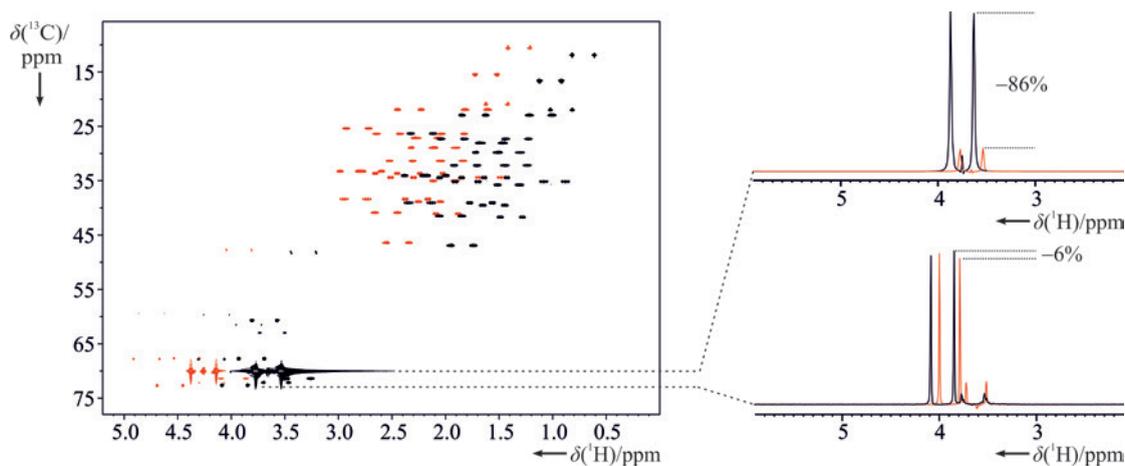


Abbildung 3.3.: Überlagerung zweier 2D ^1H ^{13}C CLIP-HSQC Spektren einer 75 mM Natriumcholat Probe in PEOMMA/ $\text{CDCl}_3/\text{D}_2\text{O}/\text{MeOD}$. Mithilfe der Vorsättigung bei 3.62 ppm konnte das Hauptsignal von PEOMMA um 86% (rot) im Vergleich zum herkömmlich aufgenommenen Spektrum (schwarz) reduziert werden. Zusätzlich wurden die Nebensignale des Polymers, welche im Bereich von 0 bis 3 ppm detektiert werden, verringert (s. Abbildung 3.2). Die NMR Signale des gelösten Moleküls werden durch die Vorsättigung nur gering reduziert ($\approx 6\%$).

Durch einfache bzw. multiple Vorsättigung konnten die NMR Signale des Polymergels selektiv über mehrere Bereiche im Spektrum hinweg unterdrückt werden. Je nach Breite und Intensität der Signale wurde ein selektives Anregungsmuster mit dem shape tool in Topspin 3.2 kreiert und in eine CLIP-HSQC Sequenz eingebaut. Dabei konnte das primäre Signal von PEO bei 3.62 ppm bis zu 86% reduziert werden. Gleichzeitig wurden auch die Molekülsignale in dessen Nähe gesättigt ($\leq 6\%$). Die Nebensignale von PEOMMA wurden ohne Einfluß auf die umgebenen Nachbarsignale des Testmoleküls soweit unterdrückt, dass diese nicht mehr im Spektrum auftraten (s. Abbildung 3.3).

Bei den diffusionsgetriebenen Spektren hingegen wurden zwei aufeinander folgende Experimente durchgeführt, das erste mit einer Gradientenstärke von 2%, das zweite mit einer von 98%. Bei einer Gradientenstärke von 2% wurde das gesamte Spektrum einschließlich gelöster Substanz und Polymersignal detektiert. Aufgrund des Größenunterschieds auf molekularer Ebene jedoch wurden bei einer Gradientenstärke von 98% beide Frequenzmuster separiert, da die gelöste Substanz schneller als das Polymer diffundierte.

Für PEOMMA wurde dabei eine Diffusionskonstante von $D_1 = 2.32 \times 10^{(-11)}$ und für Natriumcholat eine von $D_2 \approx 2.43 \times 10^{(-10)}$ erhalten. Anschließend wurden die beiden Spektren voneinander subtrahiert. Mit dieser Methode ist jedoch eine Identi-

fizierung und Reduzierung der Polymersignale erst möglich, nachdem beide Spektren detektiert und prozessiert wurden. Eine Herabsetzung des dynamischen Bereichs von PEO basierten Polymergelen ist durch einen Diffusionsfilter nicht realisierbar.

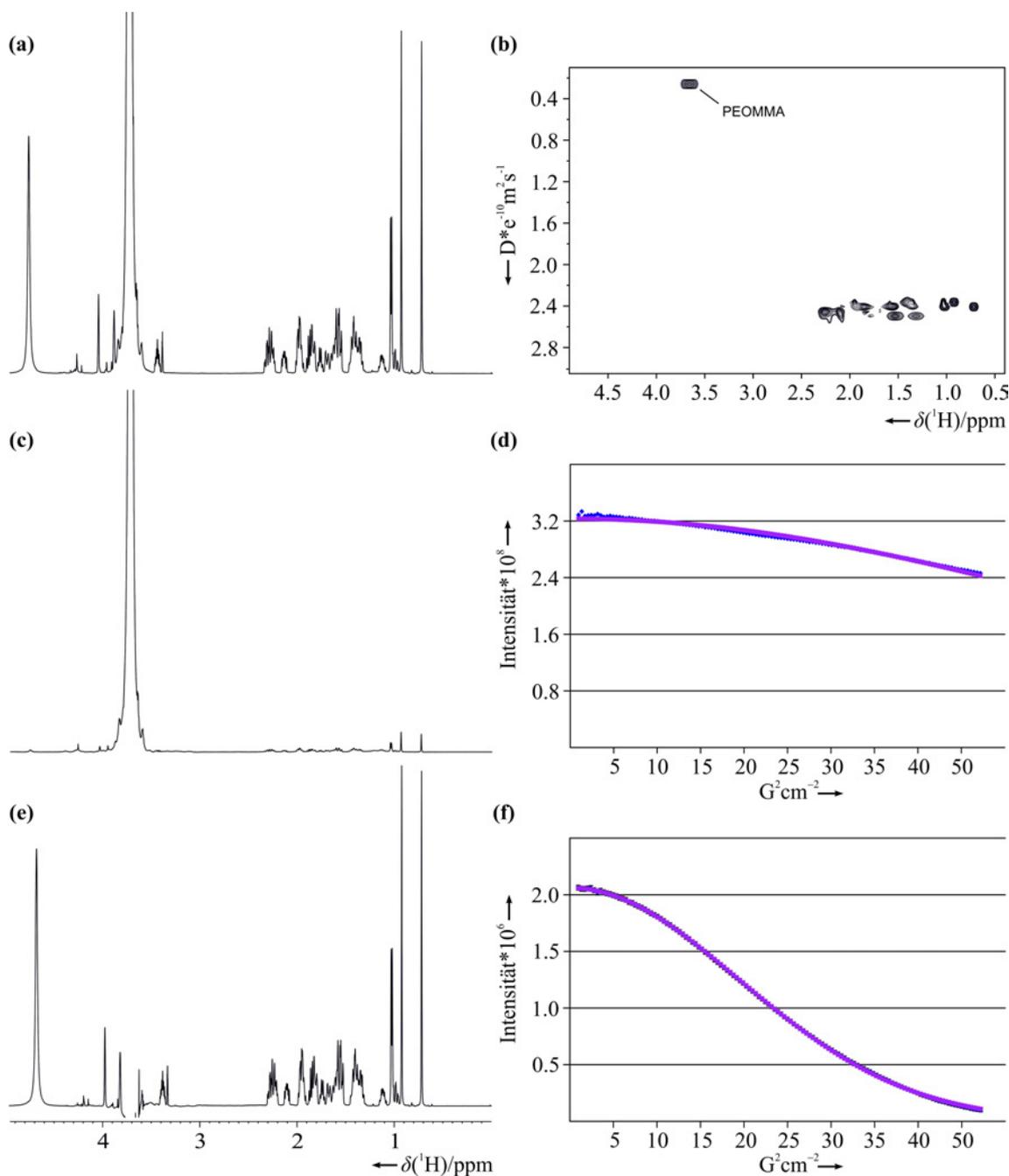


Abbildung 3.4.: Diffusionsexperimente von Natriumchololat in PEOMMA/D₂O/MeOD. Für die Reduzierung der PEOMMA Signale wurde jeweils ein diffusionsgetriebenes Experiment mit einer Gradientenstärke von 2% (a) bzw. mit 98% (c) aufgenommen und anschließend voneinander subtrahiert, wobei das PEO Hauptsignal erheblich reduziert wurde (e). Die Auftragung der verschiedenen Diffusionskonstanten des Polymergels und der gelösten Substanz verdeutlicht wie effektiv die Signale voneinander getrennt werden können (b). In (d) und (f) sind die Intensitätsverläufe in Bezug zur Gradientenstärke von PEOMMA bzw. von Natriumchololat dargestellt.

Wie bereits für andere Polymergele wie z. B. PAN wurde auch für PEO ein Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) Filter als Unterdrückungselement in eine CLIP-HSQC Sequenz eingebaut.^{71,87} Wegen den ähnlichen T_2 -Relaxationzeiten zwischen PEO und dem gelösten Testmolekül Natriumcholat jedoch konnten die beiden Signalmuster trotz variierender CPMG Perioden nicht voneinander separiert werden.

Eine effektive Unterdrückung des Hauptsignals konnte nur noch mit einem 3-9-19 Kompositpuls mittels WATERGATE-Sequenz um den letzten Refokussierungspuls eines HSQC Experiments realisiert werden. Im Gegensatz zur Vorsättigung wurden hier jedoch die Signale des Testmoleküls nahe der Einstrahlfrequenz stark reduziert. Außerdem traten Anteile von Antiphase Termen im Spektrum auf, welche nicht durch einen 90° ^{13}C Puls am Ende der Pulssequenz zu Multiquanten evolviert werden konnten.

3.4. Eigenschaften von PEO basierten Polymergelen

3.4.1. Quellverhalten

Die Löslichkeit von hochmolekularem Polyethylenoxid reicht von Wasser, über polare, organische wie Methanol oder DMSO bis hin zu apolaren Lösungsmitteln wie Benzol. Diese Lösungsmittelkompatibilität bleibt auch im vernetzten Zustand erhalten, unabhängig davon ob dieser durch beschleunigte Elektronen, γ -Strahlen, durch Linker mit Radikalstarter oder ultraviolettem Licht erzeugt wurde.

Neben PU ist PEO das einzige Polymergel, welches mit Trifluorethanol kompatibel ist. Mischungen wie TFE/H₂O (Mix 1), MeOH/H₂O (Mix 2) oder CHCl₃/MeOH/H₂O (Mix 3) stehen mithilfe von PEO ebenfalls für spezifische NMR Experimente zur Verfügung (s. Abbildungen 3.5 und 3.6). Das einzige bisher bekannte Lösungsmittel, in welchem PEO basierte Polymergele nicht quellen sind Alkane wie z. B. n-Hexan.

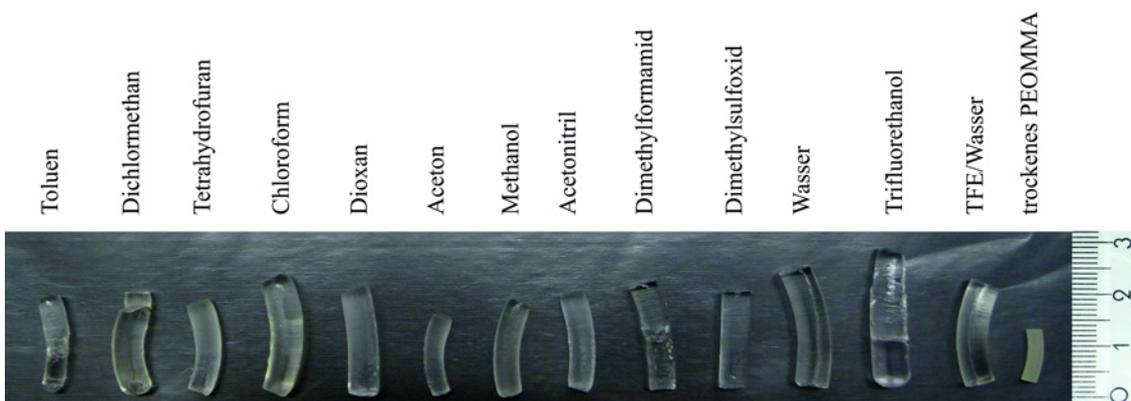


Abbildung 3.5.: Lösungskompatibilität von PEOMMA. Das Quellverhalten wurde zwei Tage lang bei Raumtemperatur dokumentiert; rechts ein trockenes PEOMMA Stäbchen bzw. links daneben die in den entsprechenden Lösungsmitteln gequollenen Polymergele. PEOMMA quillt in fast allen gängigen NMR Lösungsmitteln, außer Alkanen. Mix 2 und Mix 3 sind nicht gezeigt.

Der Quellfaktor reicht je nach Lösungsmittel von 1.4 (Aceton) bis 2.7 (Trifluorethanol). Jedes Lösungsmittel wird dabei verschieden schnell von PEO aufgenommen. Während Polymerstäbchen in CDCl₃, CD₂Cl₂ oder TFE in wenigen Stunden quellen, diffundieren Lösungsmittel wie DMSO oder Aceton erst nach ein bis zwei Tagen zur Mitte des Polymergels.

Die Verwendung von Lösungsmittelgemischen bei der Untersuchung von intermolekularen Wechselwirkungen erlangen im biologischen Bereich zunehmend an Bedeutung. Zusammensetzungen aus Trifluorethanol und Wasser stellen z. B. eine wichtige

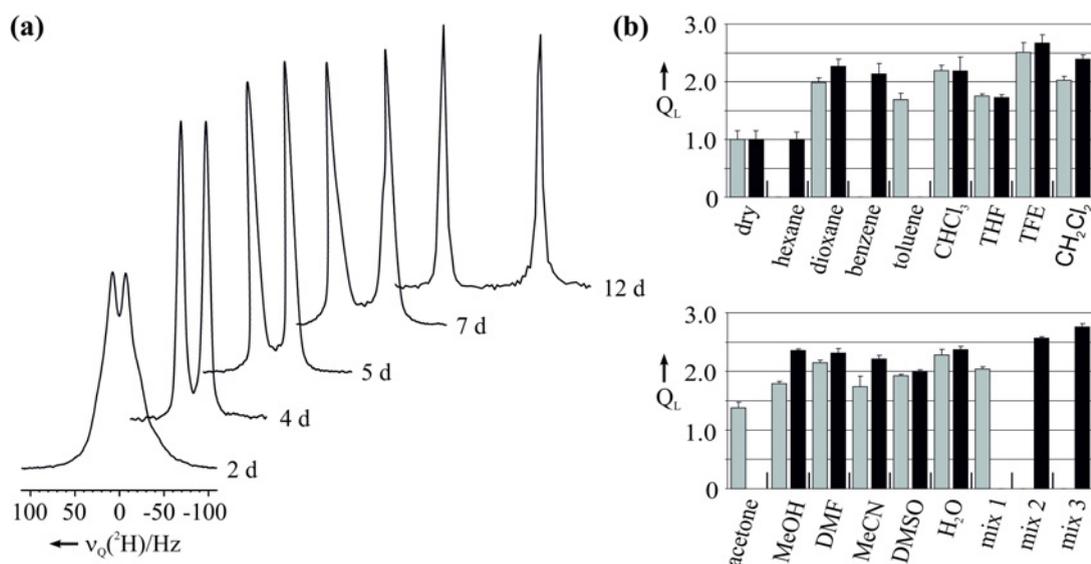


Abbildung 3.6.: Aufzeichnung der quadrupolaren Aufspaltung von CDCl_3 beobachtet über einen Zeitraum von 12 Tagen (a) und die Ausdehnungsfaktoren von PEOMMA (grau) bzw. γ -PEO (schwarz) in verschiedenen Lösungsmitteln relativ zu einem getrockneten Stäbchen (b). Abgesehen von Aceton wird ein Ausdehnungsfaktor sowohl in horizontaler, als auch in vertikaler Richtung von über 2.0 erreicht.

Matrix dar, um zuverlässige Aussagen bei der Erforschung von Faltungsprozessen von Peptiden oder Proteinen zu treffen.^{107–111} Aber auch für die Untersuchung von membranständigen Proteinen, welche z. B. in Chloroform/Methanol Gemischen charakterisiert werden, kann PEO wegen seiner breiten Lösungsmittelkompatibilität als Orientierungsmedium verwendet werden. Im folgenden wurde das Verhalten von verschiedenen Lösungsmittelgemischen zum ersten Mal für Polymergele untersucht.

3.4.2. Untersuchungen von Lösungsmittelgemischen

Anhand von Lösungsmittelgemischen wie MeOD/ D_2O und MeOD/ CD_2Cl_2 konnte gezeigt werden, dass zu Beginn der Quellung das Lösungsmittel mit der größeren Diffusionskonstante im Polymergel vorlag. Bei MeOD/ D_2O stellte sich das angesetzte Mischungsverhältnis bereits nach wenigen Tagen ein, während dieses bei Mix 2 erst nach drei bis vier Wochen erreicht wurde.

Die Geschwindigkeit, in welcher sich das Verhältnis einer Komponente A und B im Polymergel einstellt, ist von den Diffusionskonstanten der eingesetzten Lösungsmittel, der Temperatur und von der Konsistenz des Polymergels selbst abhängig. Für die Reproduzierbarkeit der Messdaten sollte daher bei orientierten Molekülen, welche in Lösungsmittelgemischen aufgenommen werden, vor der eigentlichen Messung das Mischungsverhältnis im Polymergel kontrolliert werden. Im vorliegenden Fall

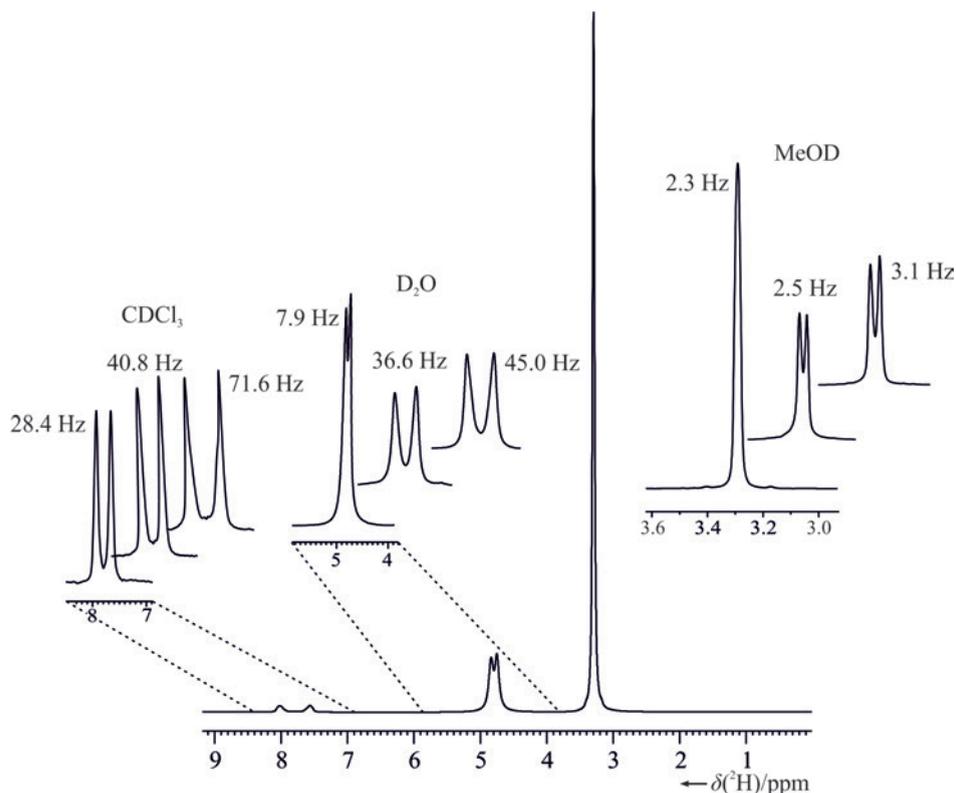


Abbildung 3.7.: Verhalten der quadrupolaren Aufspaltungsmuster von verschiedenen Lösungsmitteln. Bei verschiedenen Streckungsgraden wurde jeweils die quadrupolare Aufspaltung von CDCl_3 , D_2O und MeOD verfolgt. Da die Lösungsmittel als Gemisch zusammen in einer einzigen PEOMMA Probe angesetzt wurden, konnten die jeweiligen, quadrupolaren Aufspaltungen direkt miteinander verglichen werden. Unterschiede in der Synthese des Polymergels, im Vernetzungsgrad oder in Abweichungen des Streckungsgrads können aus genannten Gründen vernachlässigt werden. Während bei CDCl_3 bereits eine quadrupolare Aufspaltung von 71.6 Hz detektiert wurde, konnte bei der gleichen Streckung eine Aufspaltung bei D_2O von 45 Hz bzw. bei MeOD lediglich eine von 3.1 Hz beobachtet werden. Anhand solcher Messreihen wurde die Orientierungsstärke einzelner Lösungsmittel in PEO basierten Polymergelen abgeschätzt.

wurde der Diffusionsfortschritt anhand von 1D ^2H Spektren verfolgt.

Im weiteren wurden die unterschiedlichen Quadrupolaufspaltungen von MeOD/ D_2O / CDCl_3 in verschiedenen Stadien der Quellung untersucht. Dazu wurde die quadrupolare Aufspaltung einer 35%igen PEOMMA Probe über mehrere Wochen hinweg mit 1D ^2H Spektren detektiert. Wie in Abbildung 3.7 zu erkennen ist, wird deuteriertes Chloroform in dem Gemisch am frühesten bzw. über die Zeit am stärksten orientiert, gefolgt von Deuteriumoxid und deuteriertem Methanol. Für PEO basierte Orientierungsmedien kann daher die quadrupolare Aufspaltung des Deuteriumsignals nur bedingt bzw. nur in Abhängigkeit des verwendeten Lösungsmittels als Grad der Orientierung verwendet werden. Bei Beobachtung der Quadrupolauf-

spaltung verschiedener Lösungsmittel konnte eine Reihe hinsichtlich derer Orientierungsstärke abgeschätzt werden: CDCl_3 , $\text{CD}_2\text{Cl}_2 > \text{D}_2\text{O} > \text{TFE} > \text{MeOD}$, DMSO. Zu sehen ist, dass Lösungsmittel mit elektronenziehenden Gruppen als direkte Nachbarn stärker orientiert werden als kugelsymmetrische wie z. B. Methylgruppen. Dies konnte auch bereits in vorangehenden Arbeiten für flüssigkristalline Phasen zwar nicht in ^2H -Spektren, aber in ^1H -Spektren von aromatischen, halogenierten Verbindungen beobachtet werden.³ Anhand der Linienbreiten von maximal 13 Hz bei den gezeigten Lösungsmitteln wird die Homogenität über die PEOMMA Probe hinweg bzw. das homogene Quellverhalten deutlich.

In der genannten 35%igen PEOMMA Probe wurde Natriumcholat als Testmolekül gelöst und die dipolaren Restkopplungen aus einem CLIP-HSQC Spektrum abgelesen. Die erhaltenen RDCs wurden bei einer Quadrupolaufspaltung von CDCl_3 mit 76.3 Hz, D_2O mit 45.5 Hz und von MeOD mit 3.3 Hz detektiert (s. Anhang).

3.4.3. Untersuchung der Molekülkompatibilität

In der Literatur wird meist auf die Orientierungsstärke bzw. auf die Untersuchung einzelner, ausgewählter Systeme zurückgegriffen. Bei diesen Testmolekülen handelt es sich meist um dieselbe Substanzklasse oder gar um identische Moleküle.^{40,44,74,140} Um jedoch eine Aussage darüber treffen zu können, wie einsatzfähig ein Orientierungsmedium für die Herausforderung bei der Aufklärung unbekannter Molekülstrukturen ist, reichen ausgewählte Modellbeispiele nicht aus. Leider existieren nur wenige Arbeiten, in denen gezeigt wurde, welche Moleküle oder Substanzklassen für bestimmte Orientierungsmedien verwendbar sind.¹⁴

In dieser Arbeit wurde daher die Molekülkompatibilität von mehreren Substanzklassen überprüft. Zucker, Peptide, Steroide, Alkaloide und Terpene, von kleinen cyclischen Molekülen bis hin zu Proteinen wurden in verschiedenen Lösungsmitteln sowohl mit γ -PEO, als auch mit PEOMMA Gelen untersucht.

In Abbildung 3.8 werden unter anderem CLIP- bzw. FAST HSQC Spektren von Menthol in CDCl_3 , Norcampher in TFE-d_2 , *cyclo*(Arg-Nal-Ala-Gly-D-Tyr-Arg) in DMSO-d_6 und ^{15}N -markiertem Ubiquitin in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ gezeigt. In vorangehenden Arbeiten wurden bereits Paracyclophan in MeCN-d_3 , Sucrose in D_2O und Cilengitide in DMSO gemessen,⁸⁷ so dass ein großer Anteil an Molekülklassen, welche in der organischen Chemie alltäglich Verwendung finden, durch PEO basierte Polymergel abgedeckt wurden.

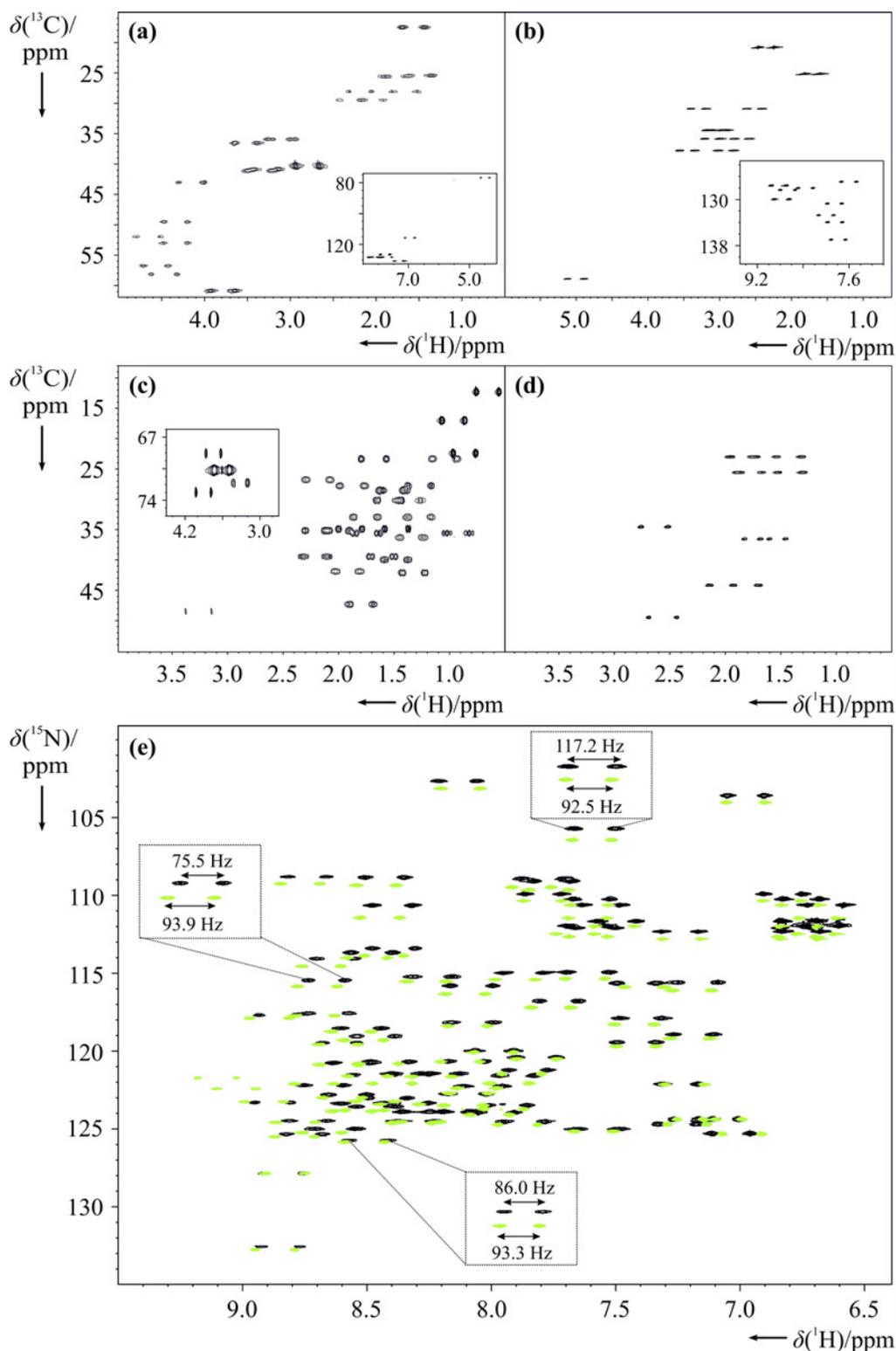


Abbildung 3.8.: ^1H ^{13}C CLIP-HSQC Spektren (a)–(d) bzw. ein ^1H ^{15}N FAST HSQC Spektrum (e) von *cyclo*(Arg-Nal-Ala-Gly-D-Tyr-Arg) in γ -PEO/DMSO (a), Paracyclophan in γ -PEO/MeCN (b), Natriumcholot in PEOMMA/MeOD/D₂O/CDCl₃ (c), Norcampher in PEOMMA/TFE (d) und ^{15}N -markiertem Ubiquitin in γ -PEO/90% H₂O/10% D₂O (e). In (e) wird ein Spektrum in isotroper (grün) und anisotroper (schwarz) Umgebung gezeigt.

3.4.4. Untersuchung von Ubiquitin

Anhand von ^{15}N markiertem Ubiquitin in PEO konnte gezeigt werden, dass alle anisotropen NMR Parameter zur Charakterisierung der Struktur bzw. Dynamik zugänglich sind. Desweiteren konnte die Skalierung der Orientierung in derselben Probe mittels Streckapparatur realisiert werden, indem sowohl die ${}^1T_{CH} = {}^1J_{CH} + {}^1D_{CH}$ Kopplungen, als auch die RCSAs für ^{15}N -markiertes Ubiquitin in PEO gemessen wurden (s. Abbildung 3.9).

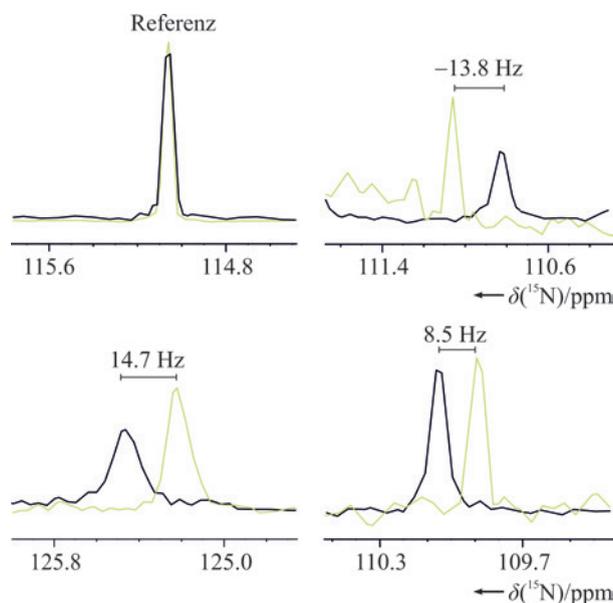


Abbildung 3.9.: Spektrenausschnitte der RCSAs von ^{15}N -markiertem Ubiquitin in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90:10) (grün) und einer in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (90:10) gequollenen γ -PEO Probe (schwarz). Die RCSAs wurden bei einer Resonanzfrequenz von 60.774 MHz gemessen. Als Referenz diente das willkürlich gewählte Gly76 NMR Signal, um die $\Delta\Delta$ RCSA Berechnungen durchzuführen.²⁶ Die Zuordnung des ^{15}N -markierten Ubiquitins erfolgte aus der BMRB, Eintrag 1D3Z.

Zur Überprüfung der Qualität der erhaltenen Daten wurden die experimentell ermittelten RDCs gegen ein mit COSMOS geometrisch optimiertes Strukturmodell von Ubiquitin verglichen. Dies wurde, wie in Kapitel 2.7 beschrieben, mit dem Programm PALES durchgeführt. Die Vorlage für das Strukturmodell von Ubiquitin wurde aus der *biological magnetic resonance data bank* (BMRB) verwendet. Wie in Abbildung 3.10 zu erkennen ist, konnte der Korrelationsparameter R von 0.98 und einem Cornilescu Wert Q von 0.093 erhalten werden.

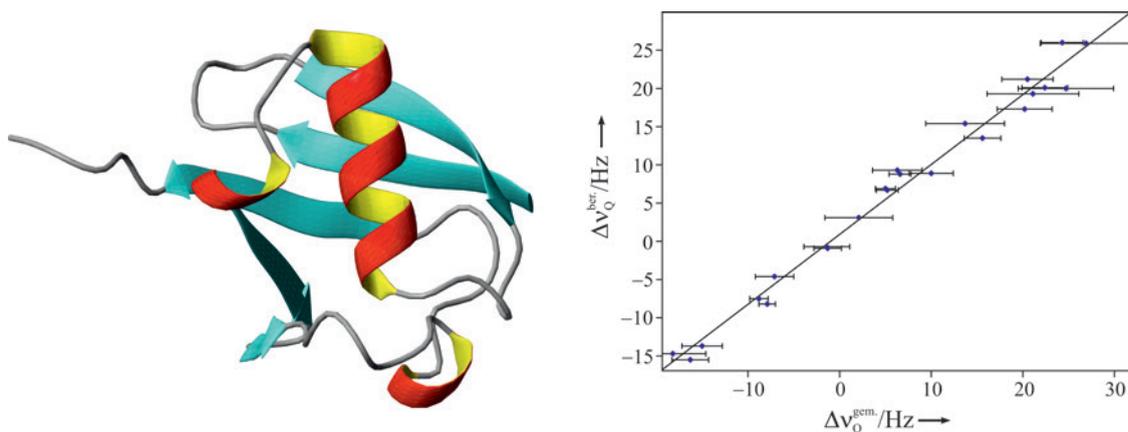


Abbildung 3.10.: Anfitzen der experimentellen Messdaten an ein Strukturmodell von Ubiquitin aus der BMRB, Eintrag 1D3Z. Nach Auftragung der gemessenen und zurückberechneten RDCs wurde eine Regressionsgerade erstellt. Es wurde ein Korrelationsfaktor R von 0.98 und ein Cornilescu Faktor Q von 0.093 erhalten.

3.4.5. Orientierungseigenschaften

Um MD-Simulationen von Molekülen zu verfeinern, werden meist mehrere Datensätze an anisotropen Parametern benötigt.^{9,10,141} Im Bereich der hochauflösenden NMR-Spektroskopie werden hierfür die zu untersuchenden Moleküle zunächst in unterschiedliche Orientierungsmedien eingebracht und die entsprechenden Parameter in den aufgenommenen Spektren abgelesen. Je mehr linear voneinander unabhängige Parameter eines Moleküls dadurch generiert werden, desto genauer kann dessen Dynamik erforscht werden.

Daher wurden die Orientierungstensoren von PEO und literaturbekannten Polymergele gegenübergestellt. Als Testmolekül diente Norcampher, dessen Orientierungstensoren für γ -PEO bzw. PEOMMA erstellt und mit bestehenden Datensätzen von PS bzw. PVAc verglichen wurden.^{63,77} Während sich die relativen Winkel der Orientierungstensoren im 5-dimensionalen Raum der PEO basierten Polymergele gering zwischen 14° und 17° unterschieden, variierten die relativen Winkel zwischen PEO und PS von 47° bis 72° bzw. von PEO zu PVAc zwischen 117° und 128° (s. Abbildung 3.11). Die genauen Werte sind aus den Tabellen im Anhang zu entnehmen.

Der Vergleich der relativen Winkel der genannten Polymergele lässt vermuten, dass die Tendenz zur Ausrichtung von Molekülen primär von dem jeweiligen Material des Polymers abhängig ist. Lösungsmittelleffekte wie Solvatation führen hingegen nur zu einer geringen Abweichung der Molekülorientierung.

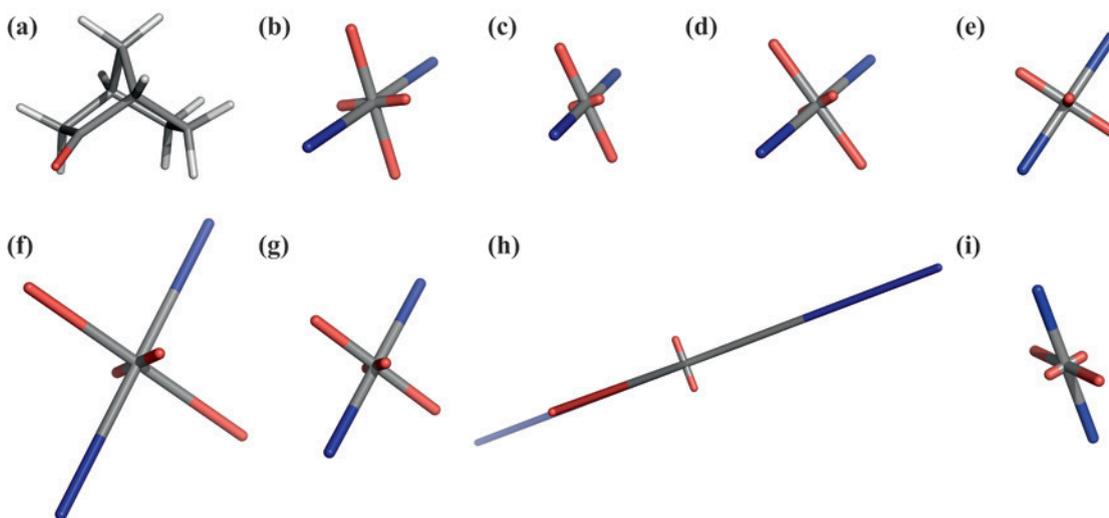


Abbildung 3.11.: Darstellung und Vergleich der Orientierungstensoren von Norcampher, welches in verschiedenen Lösungsmitteln und verschiedenen Polymergelelen gemessen wurde. (a) Orientierung von Norcampher als Referenzsystem der Orientierungstensoren von verschiedenen Polymergelelen (b)–(i). Die Länge der Orientierungstensoren sind proportional zur Größe der Eigenwerte (A_{xx} , A_{yy} und A_{zz}) bzw. deren Orientierung ist äquivalent zur Größe der entsprechenden Eigenvektoren ($EV A_{xx}$, $EV A_{yy}$ und $EV A_{zz}$). Die Orientierungstensoren wurden mit dem Programm PALES für Norcampher in γ -PEO/MeCN- d_3 (b), γ -PEO/MeOD (c), PEOMMA/TFE- d_2 (d), PS/Benzol- d_6 (e), PS/CDCl $_3$ (f), PS/Dioxand $_8$ (g), PVAc/MeOD (h) und PVAc/MeCN- d_3 (i) berechnet. Die negativen Tensorkomponenten der Orientierungstensoren sind blau markiert, die positiven Komponenten rot.

3.4.6. Fazit

Zusammenfassend konnten PEO basierte Gelorientierungsmedien für Messungen aller anisotropen Parameter etabliert werden. Dazu wurde PEO an einer Vielzahl von verschiedenen Lösungsmitteln bzw. unterschiedlichen Substanzklassen getestet. PEO zeigte bei den gemessenen Molekülen keinerlei Einschränkungen hinsichtlich deren Diffusion bzw. Ausrichtung im Orientierungsmedium. Durch geschicktes Kombinieren der verschiedenen PEO Kettenlängen bzw. des Additivs MMA von PEOMMA können Gele auf das zu untersuchende Molekül hinsichtlich Größe und Lösungsmittelkompatibilität teilweise abgestimmt werden. Für kleine Moleküle wie z. B. Norcampher, welches durch seine kugelsymmetrische Geometrie nur eine geringe Vorzugsrichtung in Orientierungsmedien einnimmt, sollte ein höherer MMA-Gehalt gewählt werden als z. B. bei einem 2 kDa großem Peptid.

Die Bandbreite an Lösungsmitteln, welche für PEO basierte Polymergele kompatibel sind, reicht von apolaren wie Benzol über polare wie DMSO oder Methanol bis

hin zu wässrigen Medien. PEO ist neben PU auch eines der ersten dokumentierten Orientierungsmedien, welches für Trifluorethanol als Lösungsmittel verwendet werden kann. Außer für alkanische Lösungsmittel wie z. B. Pentan oder Hexan lässt sich somit für spezielle Anwendungen jegliches Mischungsverhältnis realisieren.

Ein Nachteil ist, dass PEO für Messungen bei einer Temperatur ≥ 50 °C nicht geeignet ist, weil das Gel zu schmelzen beginnt und damit seine Fähigkeit, Moleküle zu orientieren, verliert. Desweiteren werden die Bindungen von PEO im sauren, wässrigen Bereich gespalten, so dass eine Orientierung nur im pH-Bereich von 5 – 8 beobachtet werden konnte.

Bei Proben mit geringer Konzentration ist der dynamische Bereich entscheidend, welcher primär durch die NMR Signale des Polymers bestimmt wird. Deswegen wurde die Unterdrückung der NMR Polymersignale durch teilweise Deuterierung bzw. mit Pulssequenzbausteinen realisiert. Hierbei wurden verschiedene Pulssequenzen getestet und Vor- bzw. Nachteile für das Ablesen von anisotropen Parametern abgeschätzt. HSQC Experimente mit WATERGATE Sequenzen bzw. mit einer einfachen oder multiplen Vorsättigung stellten die Methoden der Wahl dar. Bei diesen Experimenten konnte auch gezeigt werden, dass die selektive Vorsättigung des PEO Hauptsignals nur einen geringen Effekt auf die in unmittelbarer Nähe liegenden NMR Signale hatte. Während eine Reduzierung des Polymersignal um 86% erreicht wurde, wurden die Nachbarsignale des gelösten Natriumcholat nur um 6% verringert. Eine Übertragung von Magnetisierung zwischen Polymergel und gelöstem Molekül fand daher im vorliegenden Experiment, wenn überhaupt, nur in geringem Ausmaß statt. Zwar wurde PEO nicht für die Diskriminierung von Enantiomeren synthetisiert, jedoch sind bereits verschiedene Ansätze dokumentiert, um PEO dafür zugänglich zu machen. Eine Methode ist, chirale Additive neben chiralen Molekülen ins Gel diffundieren zu lassen. Durch Strecken bzw. Komprimieren des Polymers interagieren die Enantiomere verschieden stark mit dem Additiv und können durch bereits beschriebene Experimente unterschieden werden.¹⁴² Weiterhin lässt sich der Methylrest von MMA durch beliebige chirale Gruppe synthetisch ersetzen. Dadurch erhält das PEO_xMA (x=chiraler Rest) chiralen Informationsgehalt und könnte auch in der Lage sein, Enantiomere zu diskriminieren, wie dies bereits bei anderen Orientierungsmedien gezeigt wurde.⁸⁸

Hinsichtlich der breiten Molekül- bzw. Lösungsmittelkompatibilität stellt PEO einen idealen Baustein für die Entwicklung weiterer Orientierungsmedien dar. Mit dieser

Arbeit ist daher erst der Grundstein für die Synthese von PEO basierten Polymergelen gelegt.

Diese Arbeit wurde in Kooperation mit Dr. Grit Kummerlöwe erstellt, welche die Synthese der γ -PEO Polymergele und die Messung von Paracyclophan in γ -PEO/MeCN durchführte.

Die Ergebnisse von diesem Kapitel wurden veröffentlicht:

Christian Merle, Grit Kummerlöwe, J. Christoph Freudenberger, Felix Halbach, Wolfgang Stöwer, Christoph Lierse v. Gostomski, Johannes Höpfner, Timo Beskers, Manfred Wilhelm and Burkhard Luy, *Crosslinked Poly(ethylene oxide) as a Versatile Alignment Medium for the Measurement of Residual Anisotropic NMR Parameters* in *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, DOI: 10.1002/anie.201301929, online publiziert.

3.5. Gellan Gum

3.5.1. Motivation

Die Diskriminierung von Enantiomeren spielt in der pharmazeutischen Industrie eine zentrale Rolle, um deren Wirksamkeit auf den Metabolismus bzw. auf das Immunsystem des menschlichen Körpers zu untersuchen.^{89,143–146} Daher schritt die Entwicklung und Synthese von neuen Orientierungsmedien für die Unterscheidung der Molekülchiralität in den letzten Jahren immer weiter voran.^{18,66,73,75,88,102} Die meisten der flüssigkristallinen Phasen jedoch sind nur in Wasser, Chloroform bzw. in Mischungen mit einem Hauptanteil an Chloroform löslich.^{40,41,72,74} Neben kollagenbasierten Biopolymeren bzw. Gelatine,^{40,41,47,80} welche nur im Medium Wasser verwendbar sind, ist lediglich e⁻-Gelatine für die Unterscheidung von (pro-)chiralen Zentren in DMSO einsetzbar.¹⁸ Aber auch hier zeigten sich Schwächen. Zum einen ist die Bestrahlung von Gelatine mit beschleunigten Elektronen aufwendig und zum anderen können residuale, anisotrope Parameter nur in begrenzten Bereichen hinsichtlich pH- bzw. Temperaturstabilität effektiv gemessen werden.^{18,87}

In dieser Arbeit wurde daher Gellan Gum als ein weiteres Biopolymer für die Identifizierung von Enantiomergemischen erforscht. Ausgangspunkte hierbei waren, die Gelierung im Labormaßstab einfach und effektiv umzusetzen und Gellan Gum auf Molekül- und Lösungsmittelkompatibilität hin zu überprüfen. Außerdem wurde die Stabilität des Systems, Enantiomere über einen breiten pH- bzw. Temperaturbereich zu unterscheiden, getestet.

3.5.2. Eigenschaften von Gellan Gum

Das Hydrokolloid high acyl Gellan Gum (HAGG) wird über Fermentation aus *Sphingomonas Elodea* gewonnen.¹⁴⁷ HAGG ist ein acyliertes Polysaccharid, welches aus Rhamnose-, Glucuronsäure- und Glucoseeinheiten aufgebaut ist.^{148–150} Nach Deacylierung durch Alkalimetalle können die Acylgruppen von HAGG vollkommen abgespalten werden. Das so synthetisierte low acyl Gellan Gum (LAGG) weist entgegengesetzte Eigenschaften zu HAGG auf. Während HAGG weiche und elastische Polymergele bildet, sind LAGG Gele brüchig und fest.^{151,152} Die Eigenschaften von Gellan Gum Gelen hinsichtlich Stabilität und Elastizität sind daher von der Zusammensetzung aus HAGG und LAGG abhängig. Zusätzlich ist die Temperatur, die

Konzentration und Art der verwendeten Kationen für die Gelierung ausschlaggebend.¹⁵¹

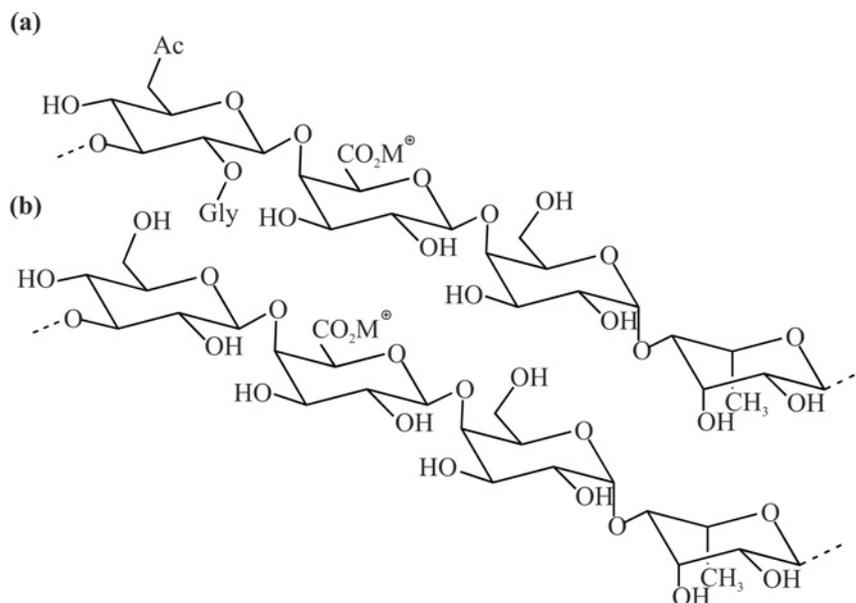


Abbildung 3.12.: Struktur von high acylated (a) und low acylated (b) Gellan Gum. Bei HAGG sind die freien Hydroxygruppen der Glucoseeinheiten entsprechend acyliert bzw. glycyliert.

Im Gegensatz zu den in der Nahrungsmittelindustrie eingesetzten, geringen Konzentrationen an Gellan Gum, wurden für die Synthese von Gellan Gum als Orientierungsmedium 0.8% bis 40%ige Lösungen verwendet. Nach der Gelierung und Trocknung der synthetisierten Biopolymergele konnte festgestellt werden, dass Gellan Gum nicht nur wie bisher angenommen in Wasser, sondern auch in DMSO quillt. Gellan Gum ist daher eines der wenigen Orientierungsmedien, welches für die Untersuchung von Enantiomeren sowohl in Wasser, als auch in DMSO einsetzbar ist.

3.5.3. Messungen kleiner Moleküle

Die Kompatibilität von Gellan Gum/DMSO Gelen für kleine, organische Moleküle wurde am Beispiel von Norcampher realisiert. Das bicyclische Norcampher wird oft aufgrund seiner kugelsymmetrischen und starren Geometrie als Testmolekül für die Strukturberechnung verwendet. Dazu wurde 15%iges Gellan Gum in einer 0.5 M Norcampher/DMSO Lösung angesetzt.

Nach der Messung der RDCs wurden diese über das Programm PALES mit einer geometrisch optimierten Modellstruktur verglichen und anschließend zurückberechnet (nicht gezeigt). Aus den Daten wurde R^2 mit 0.96 und Q mit 0.121 erhalten.

3.5.4. Temperatur- und pH-Stabilität von Gellan Gum Gelen

Um die pH- bzw. Temperaturstabilität zu untersuchen, wurde eine Testprobe mit dem Enantiomergemisch aus 0.5 M L-/D-Prolin (1:2; w:w), welches zuvor in einer NaOH/D₂O Lösung mit pH 11 gelöst wurde, in einem 10%igen Gellan Gum Gel angesetzt. Das Polymergel wurde mittels Silikonschlauch bis zu einer quadrupolaren Aufspaltung von $\Delta\nu_Q = 76$ Hz gestreckt. Anschließend wurden nacheinander mehrere 2D BIRD^{d,X} HSQC Experimente mit kontinuierlichem Anstieg der Temperatur von 20 °C bis 60 °C detektiert. Selbst unter diesen Bedingungen zeigten Gellan Gum Gele eine ausreichende Stabilität, um L- und D-Prolin zu unterscheiden.

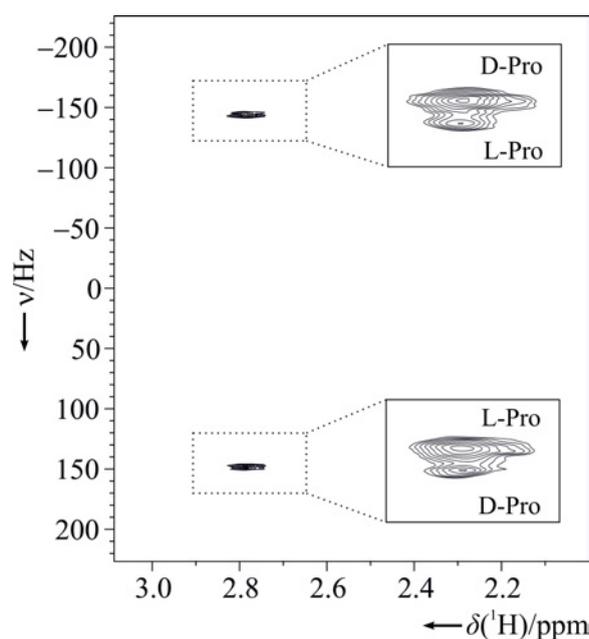


Abbildung 3.13.: 2D ¹H ¹³C BIRD^{d,X} HSQC Spektrum von L- und D-Prolin in 15% Gellan Gum. Durch unterschiedliche Orientierungen im Biopolymergel konnten die beiden Enantiomere bei Raumtemperatur und pH 11 voneinander getrennt detektiert werden.

3.5.5. Synthese von Gellan Gum Polymergelen

Für die hier vorgestellten Ergebnisse wurde das Gellan Gum Pulver (LAGG:HAGG; 1:16; w:w) zusammen mit entionisiertem Wasser zu einer 10% bis 15%igen, breiartigen Lösungen vermischt und anschließend in 3.2 mm dicke Silikonschläuche gepresst. Nachdem die Silikonschläuche auf 85 °C erhitzt wurden, wurde eine 100 mM Magnesiumchloridlösung auf die viskose Lösung aufgetragen. Nach der Vernetzung wurden die Gellan Gum Gele getrocknet, um diese länger lagern zu können.

3.5.6. Fazit

Mit Gellan Gum steht nun ein weiteres Orientierungsmedium für die Unterscheidung von Enantiomeren sowohl in wässrigem Medium, als auch in DMSO zur Verfügung. Die Eigenschaften von Gellan Gum Gelen hinsichtlich der Temperatur- bzw. pH Stabilität wurden für spezielle Anwendungen untersucht. Dabei wurde der Einsatz von Gellan Gum für einen weiten pH- (4 – 11) bzw. Temperaturbereich (20 – 60 °C) getestet, indem die dipolare Aufspaltung von L- und D-Prolin verfolgt wurde. Außerdem zeigte Gellan Gum eine hohe Proteinkompatibilität, so dass die Diffusion sowohl von kleinen Proteinen wie Ubiquitin (8.5 kDa), als auch von großen Proteinen wie Hyaluronidase (64 kDa) beobachtet werden konnte.

Das Projekt wurde zusammen mit Silke Büchler durchgeführt, welche die verschiedenen Syntheserouten von Gellan Gum Polymergelen untersuchte bzw. dessen Molekül- und Lösungsmittelkompatibilität an einer Bandbreite von Mischungen an verschiedenen Enantiomeren bzw. Norcampher testete. Außerdem trug Silke Büchler bei der Untersuchung von verschiedenen Proteinen wie Ubiquitin, Cytochrom c bzw. Hyaluronidase den Hauptanteil bei. Daher wurden deren Experimente bzw. Ergebnisse hier nur erwähnt.

Diese Arbeit wurde noch nicht veröffentlicht.

4. NMR spektroskopische Experimente

4.1. Analyse der Konfiguration von Strepturidin

4.1.1. Motivation

Mithilfe von partiellen Orientierungen konnte in den letzten zwei Jahrzehnten die Konstitution, Konfiguration bzw. Konformation einer Vielzahl von Molekülen aufgeklärt werden.^{5,6,33,153,154} Neben Polyacrylamid für biologische Makromoleküle wie Proteine^{104,105} bzw. PBLG für kleine chloroformlösliche Moleküle wie Isopinocampheol (IPC)⁷⁴ oder Strychnin⁸⁵ wurde vor allem Polyacrylnitril in verschiedenen Arbeiten erfolgreich für die Falsifizierung von Peptidstrukturen eingesetzt.^{27,42,155,156} Das hier untersuchte Antibiotikum Strepturidin ist ein Stoffwechselprodukt eines gram-positiven Bakteriums der Gattung *Streptomyces*. Seit 1960 wurden einige Bakterienstämme dieser Gattung erforscht, da sie viele Arten mit medizinisch interessanten Sekundärmetaboliten enthalten. Beispiele, neben dem oben genannten sind unter anderem weitere Antibiotika wie Mytomycin aus *Streptomyces Lavendulae*,¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ und Clavulansäure aus *Streptomyces Clavuligerus*,^{160,161} sowie ein Antituberkulotikum, das Capreomycin aus *Streptomyces Capreolus*.¹⁶²

Zunächst wurde Strepturidin mit klassischen NMR Parametern wie NOE oder ³J-Kopplungen bzw. mithilfe von massenspektrometrischen Messungen untersucht, woraus jedoch keine eindeutige Konfiguration abgeleitet werden konnte.

Ziel dieser Arbeit war unter anderem die molekulare Struktur des Antibiotikums Strepturidin zu bestimmen. Hierzu wurde Strepturidin aus *Streptomyces Albus* (DSM

40763) als Pulver extrahiert, in einem deuterierten PAN/DMSO Polymergel gelöst und NMR spektroskopisch untersucht.

4.1.2. Synthese von deuteriertem Poly(acrylnitril)

Für die jeweiligen NMR spektroskopischen Untersuchungen wurden in DMSO gequollene Polymergele aus deuteriertem Poly(acrylnitril) verwendet. Diese wurden nach der bereits etablierten Methode synthetisiert.⁶¹

4.1.3. Mögliche Konfigurationen von Strepturidin

Die unbekannte Struktur von Strepturidin wurde zunächst mit den klassischen NMR Parametern wie NOEs und 3J -Kopplungen untersucht. Mit diesen Methoden allein konnte jedoch die relative Konfiguration nicht ermittelt werden. Daher wurden verschiedene Strukturmodelle mit dem Programm COSMOS geometrisch optimiert und mit PALES angefitet.

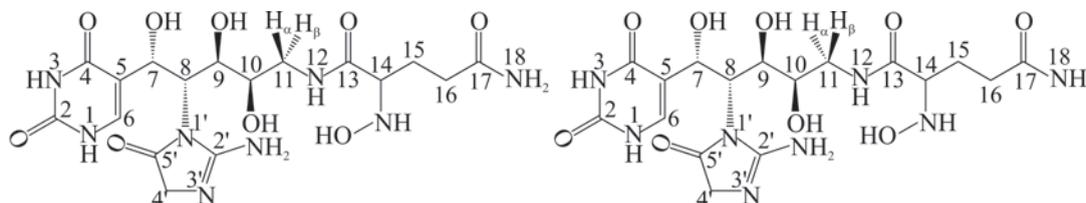


Abbildung 4.1.: Strukturmodelle der zwei Permutationen von Strepturidin am Beispiel der Konfiguration SRRR. An Position C-11 sollte bei dem Anfiten der zurückberechneten RDCs auch die entsprechende Permutation einfließen.

Das Naturprodukt Strepturidin besteht aus einem Sechsering (Thymin) bzw. Fünfring (Imidazol), welche über eine bewegliche Kohlenstoffkette miteinander verbunden sind. Das Molekül besitzt an den C-7, C-8, C-9, C-10 und C-14 Positionen jeweils ein stereogenes Zentrum. Prinzipiell können daher $2^5 = 32$ mögliche Stereoisomere gebildet werden, wobei bei den eingesetzten Methoden bzw. dem verwendeten Orientierungsmedium nicht die absolute Konfiguration von Strepturidin bestimmt werden konnte.

Daher verbleiben lediglich 16 Diastereomere, welche NMR spektroskopisch detektierbar sind. Über GC/EI-MS Untersuchungen (gas chromatography electron impact mass spectrometry) des *N*-trifluoroacetyl-2-propanol derivatisierten C-14 Atoms konnte an dieser Position die absolute S-Konfiguration ermittelt werden. Dadurch wurde

die Problemstellung auf 2^4 bzw. im vorliegenden Fall auf acht Diastereomere reduziert (s. Abbildung 4.2).

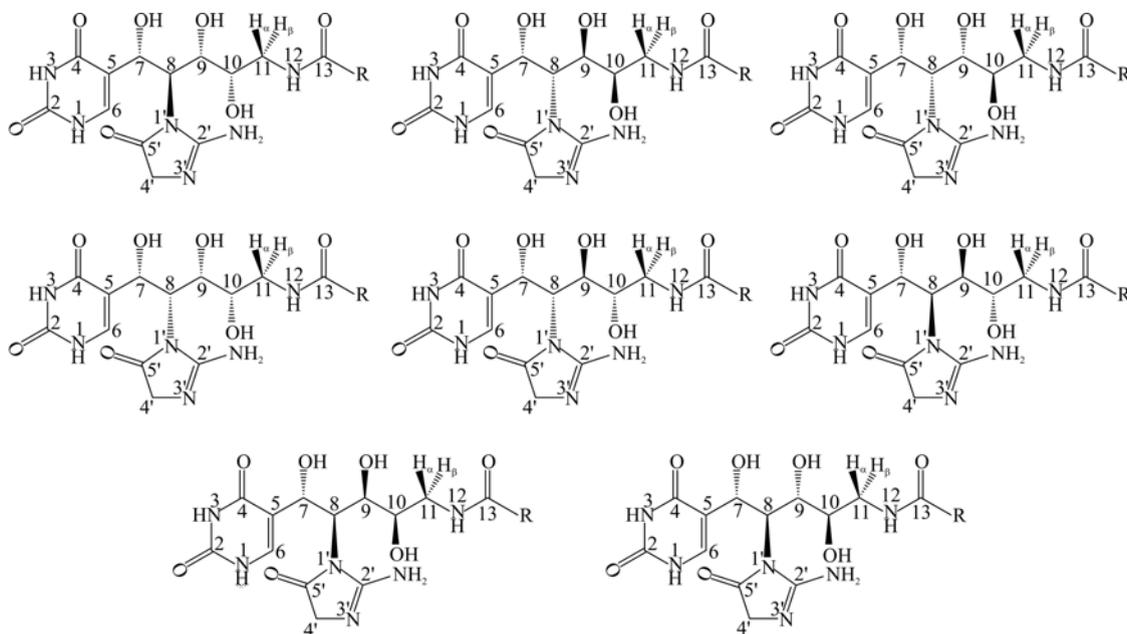


Abbildung 4.2.: Nach der Bestimmung der absoluten Konfiguration an Position C-14 verbleiben acht Diastereomere, welche jeweils durch Permutation an Position C-11 zu 16 möglichen Strukturmodellen erweitert werden. Hier sind die Konfigurationen einer Permutation von Strepturidin exemplarisch dargestellt.

An Position C-11 liegt ein prochirales Zentrum mit H_α und H_β vor, welches durch entsprechende Permutation in die Strukturanalyse einfließen sollte. Letztendlich folgen aus acht detektierbaren Diastereomeren und zwei prochiralen Ausrichtungen 16 mögliche Strukturmodelle für Strepturidin.

4.1.4. Messungen an Strepturidin

Um anisotrope Parameter an Strepturidin zu messen, wurde eine 15 mmol Probe in DMSO- d_6 in deuteriertem PAN im Kalrez Schlauch angesetzt. CLIP-HSQC Spektren wurden bei zwei unterschiedlichen Streckungen (Extensionsfaktor $\Xi = 0.5$ bzw. 0.8) aufgenommen und die residualen Kopplungskonstanten nach Gleichung 4.1 ermittelt.

$${}^1T_{CH} = {}^1D_{CH,2} - {}^1D_{CH,1} \quad (4.1)$$

In der Tabelle 4.1 sind die 1H ${}^{13}C$ skalaren bzw. residualen, dipolaren Kopplungen aufgelistet, welche für die Strukturaufklärung mithilfe von PALES verwendet wurden.

Tabelle 4.1.: RDCs des acyclischen Peptids Strepturidin in dPAN/DMSO bei zwei unterschiedlichen Extensionfaktoren.

	$\delta(^1\text{H})/[\text{ppm}]$	$\delta(^{13}\text{C})/[\text{ppm}]$	$^1J_{CH}/[\text{Hz}]$	$^1T_{CH}/[\text{Hz}]$	$^1D_{CH}/[\text{Hz}]$
C ⁶ -H ⁶	7.45	140.5	178.7±0.1	164.0±0.1	-14.74 ± 0.1
C ⁷ -H ⁷	4.40	79.7	148.2±0.1	153.4±1.0	5.2±1.0
C ⁸ -H ⁸	3.71	71.9	144.4±0.1	147.2±0.2	2.8±0.2
C ⁹ -H ⁹	3.90	73.4	148.2±0.2	141.8±1.7	-6.6 ± 1.7
C ¹⁰ -H ¹⁰	3.75	80.6	146.2±0.1	148.8±0.2	2.5±0.2
C ¹¹ -H ¹¹	3.28	41.1	134.7±0.2	146.1±0.6	11.4±0.6
C ¹⁶ -H ¹⁶	2.18	30.7	126.5±0.1	139.7±0.5	13.2±0.5
C ¹⁷ -H ¹⁷	8.42	167.2	183.5±0.1	197.0±0.2	13.5±0.2

4.1.5. Ergebnis

Die 16 möglichen Strukturmodelle von Strepturidin wurden mithilfe der `-bestFit` Funktion des Programms PALES an die berechneten RDCs angepasst. Der lineare Vergleich zwischen experimentell ermittelten und zurückberechneten RDCs ergab aufgrund der bereits zuvor angenommenen, hohen Flexibilität bzw. der freien Rotation um die markierten Achsen kein eindeutiges Ergebnis (s. Abbildung 4.3). Die relative Konfiguration für das Testmolekül Strepturidin konnte daher ohne zusätzliche Substanz und weiteren NMR Messungen bis zum Abschluss dieser Arbeit nicht ermittelt werden.

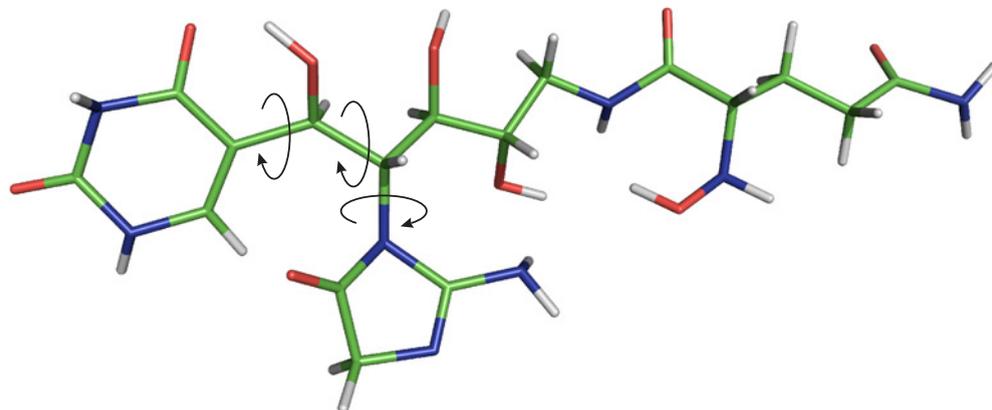


Abbildung 4.3.: Durch die freie Rotation um die markierten Achsen bzw. durch die lineare, flexible Kette von Strepturidin wurde kein eindeutiges Ergebnis der Struktur mit PALES berechnet.

4.1.6. Fazit

Das Antibiotikum Strepturidin konnte erfolgreich in deuteriertes PAN eingebracht und orientiert werden. Durch zwei unterschiedliche Streckungen wurden die dipolaren Restkopplungen des Moleküls erhalten. Nach der Erstellung der verschiedenen Strukturmodelle wurden die experimentell ermittelten RDCs jeweils mit dem Programm PALES zurückberechnet. Da PALES jedoch nur für unflexible Moleküle, rigide Regionen von Molekülen bzw. für Makromoleküle wie Proteine geeignet ist, konnte keines der angenommenen Strukturmodelle verifiziert werden. Grund hierfür ist die freie Rotierbarkeit um die eingezeichneten Achsen (s. Abbildung 4.3), welche eine Zuordnung der entsprechenden Konfigurationen verhindern. Bis zum Abschluss dieser Arbeit konnten keine weiteren NMR spektroskopischen Untersuchungen zur Aufklärung der Struktur von Strepturidin durchgeführt werden.

Dieses Projekt wurde in Kooperation mit Alexander Pesic bearbeitet, der die Synthese bzw. die massenspektrometrischen Untersuchungen von Strepturidin durchführte.

Der Inhalt dieser Arbeit wurde noch nicht veröffentlicht.

4.2. NMR spektroskopische Untersuchungen an *N*-acyl-*L*-homoserinlactonen

4.2.1. Motivation

Die Isotopenmarkierung von Signalmolekülen stellt eine effektive Methode zur Aufklärung von biologischen bzw. chemischen Wirkmechanismen dar. Die zelluläre Verteilung eines Wirkstoffs bzw. dessen Transport über Zellmembranen kann auf diese Weise analytisch verfolgt werden. Meist werden die Protonen solcher Moleküle durch deren stabile Isotope, Deuterium bzw. Tritium, ersetzt.^{163–167} *N*-acyl-*L*-homoserinlactone (AHLs) konnten z. B. bei der interbakteriellen Kommunikation via quorum sensing bzw. bei deren Kommunikation mit eukaryotischen Wirtszellen über inter-kingdom signalling als Signalmoleküle identifiziert werden.^{168–174}

Im folgenden wurden die deuterierten Homoserinlacton-Derivate *N*-pentanoyl-*L*-homoserinlacton (AHL1) und *N*-(3-oxododecanoyl)-*L*-homoserinlacton (AHL2) (s. Abbildung 4.4) als Testmoleküle für analytische Studien verwendet. Nachdem die Position bzw. der Grad der Deuterierung massenspektrometrisch nicht ermittelt werden konnte, wurden NMR spektroskopische Untersuchungen durchgeführt. Im Gegensatz zur Massenspektrometrie, welche nur die Gesamtmasse der deuterierten Moleküle wiedergibt, kann NMR spektroskopisch der Deuterierungsgrad jeder einzelnen Molekülgruppe identifiziert werden.

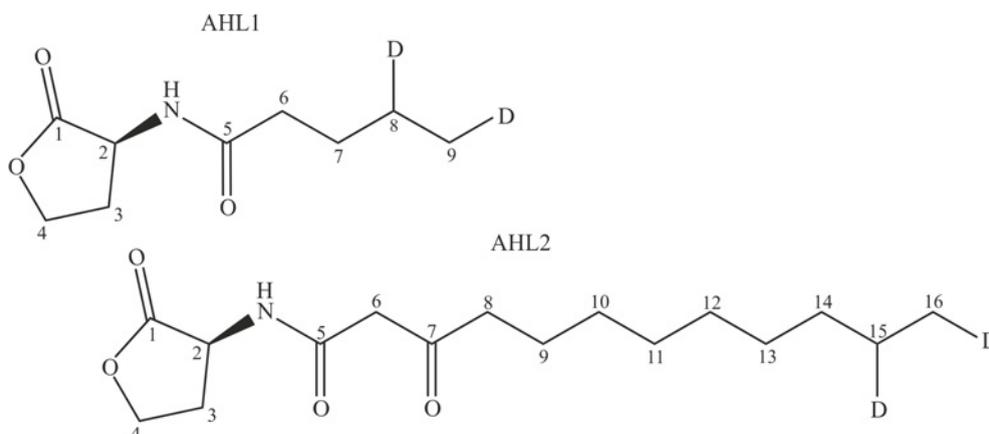


Abbildung 4.4.: Strukturmodelle von *N*-pentanoyl-*L*-homoserinlacton (AHL1) und *N*-(3-oxododecanoyl)-*L*-homoserinlacton (AHL2). Exemplarisch sind jeweils die Einfachdeuterierungen gezeigt.

In der veröffentlichten Arbeit stand primär die Suche nach einer effektiven und milden Methode im Vordergrund, um AHL Moleküle zu deuterieren und letztendlich

zu tritieren. Aus massenspektrometrischen Messungen konnte eine Verteilung der Deuterierungsgrade von AHL1 mit $d_1 = 12\%$, $d_2 = 54\%$, $d_3 = 21\%$ und $d_4 = 13\%$ und AHL2 mit $d_0 = 7\%$, $d_1 = 28\%$, $d_2 = 52\%$ und $d_3 = 13\%$ bestimmt werden. Hierbei wird der entsprechende Deuterierungsgrad durch den Index angegeben.

4.2.2. Untersuchung von deuteriertem AHL1

Die spektroskopische Untersuchung von deuterierten Molekülen wird im folgendem am Beispiel von AHL1 gezeigt. Um die Frage zu klären, an welcher Position C-7, C-8, C-9 oder gar C-6 die Deuterierung des Moleküls stattgefunden hat, wurden 1D $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ und 1D $^{13}\text{C}\{^1\text{H}, ^2\text{H}\}$ Spektren bzw. 2D $^1\text{H}\ ^{13}\text{C}$ editierte HSQC Spektren der Substanz AHL1 aufgenommen.

Mithilfe des ^1H , ^2H entkoppelten ^{13}C Spektrums wurde zunächst jedes ^{13}C Atom einzeln identifiziert und letztendlich die Anzahl an unterschiedlichen AHL1-Molekülen festgestellt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass nur die Positionen C-8 und C-9 in deuterierter Form vorlagen. Durch Überlagerung der beiden 1D Spektren konnten nun die Multipletts der ^2H - ^{13}C Kopplungen den jeweiligen Kohlenstoffatomen anhand typischer Kopplungskonstanten ($^1J_{CD} \approx 19.2$ Hz) zugeordnet werden (s. Abbildung 4.5).

Tabelle 4.2.: Ergebnisse der Untersuchung für die Markierung mit Deuterium von AHL1 über NMR Spektroskopie. Die Ausbeuten wurden über manuelle Integration erhalten.

Produkt	Methylen $\delta(^{13}\text{C})/[\text{ppm}]$	Methyl $\delta(^{13}\text{C})/[\text{ppm}]$	Ausbeute (%)
-CH ₂ -CH ₃	22.28	13.57	2.5±0.8
-CH ₂ -CDH ₂	22.20	13.28	10.0±0.6
-CH ₂ -CD ₂ H	22.11	12.99	6.7±1.3
-CH ₂ -CD ₃	22.03	12.68	3.6±0.6
-CDH-CH ₃	21.90	13.46	10.0±0.9
-CDH-CDH ₂	21.80	13.17	49.5±0.5
-CDH-CD ₂ H	21.71	12.86	11.2±0.6
-CDH-CD ₃	21.63	12.56	6.5±2.6

Das Ziel nach der Deuterierung der Doppelbindung von AHL1 sollte ein selektiver Einbau jeweils eines Deuterons an Position 8 und 9 sein. Im Gegensatz zu Protonen besitzt Deuterium anstelle eines Kernspins I von $I = \frac{1}{2}$, einen von $I = 1$. Die Einfachdeuterierung wurde demnach durch jeweils ein Triplett bei 13.17 ppm für Position 9

bzw. bei 21.8 ppm für Position 8 identifiziert. Wie aus dem schwarzen Spektrum zu entnehmen ist, fand zwar eine regioselektive Deuterierung an den beiden Positionen statt, jedoch wurde ein Gemisch aus verschiedenen Deuterierungsgraden erhalten. An beiden Positionen sind für AHL1 acht Signale im ^2H entkoppelten Spektrum zu erkennen (s. Abbildung 4.5). Aber nicht nur die direkt gebundenen Kohlenstoffatome erfahren eine Isotopenverschiebung, sondern auch Nachbaratome wie bei Position 7 zeigen bei ca. 27.3 ppm acht ^{13}C Signale. Dabei gilt allgemein: Je höher der Deuterierungsgrad am jeweiligen Kohlenstoffatom ist, desto effektiver wird dieses abgeschirmt bzw. desto weiter wird dieses in Richtung Hochfeld verschoben.

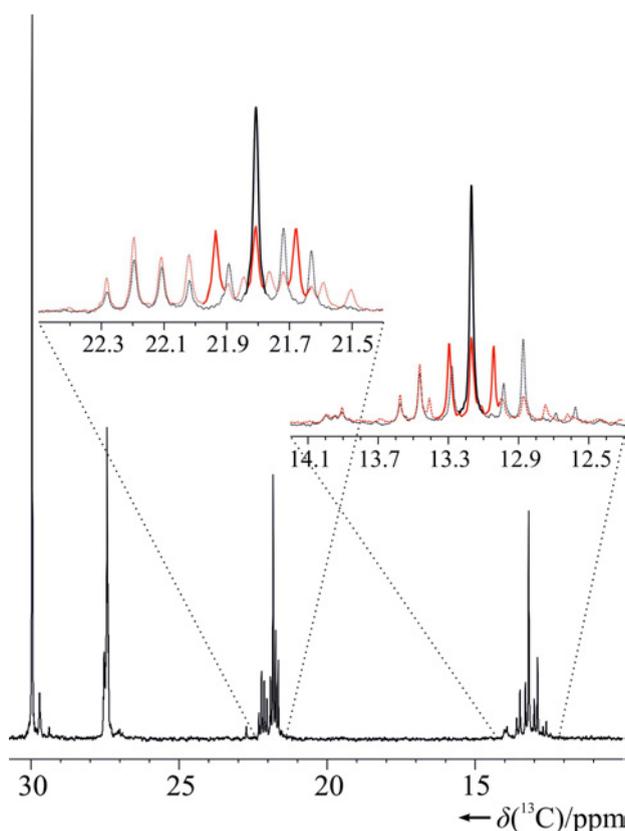


Abbildung 4.5.: ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ (schwarz) und ^{13}C $\{^1\text{H}, ^2\text{H}\}$ (rot) Spektren von AHL1. Die Bereiche zwischen 12.3 – 14.2 ppm und 21.4 – 22.5 ppm wurden vergrößert, um die Aufspaltung der entsprechenden Multipletts herauszustellen.

Zur Überprüfung der Hybridisierung der Kohlenstoffatome C-8 und C-9 wurde jeweils ein editiertes HSQC Experiment aufgenommen (s. Abbildung 4.6). An Position 13.17 ppm ist deutlich das negativ absorptive Signal eines Triplets der Methylen-Gruppe (grün) bzw. an Position 21.80 ppm das positiv absorptive NMR Signal eines Triplets der Methingruppe (blau) zu erkennen. Durch die Identifizierung der Hybridisierung und durch die unterschiedliche Abschirmung, hervorgerufen durch den

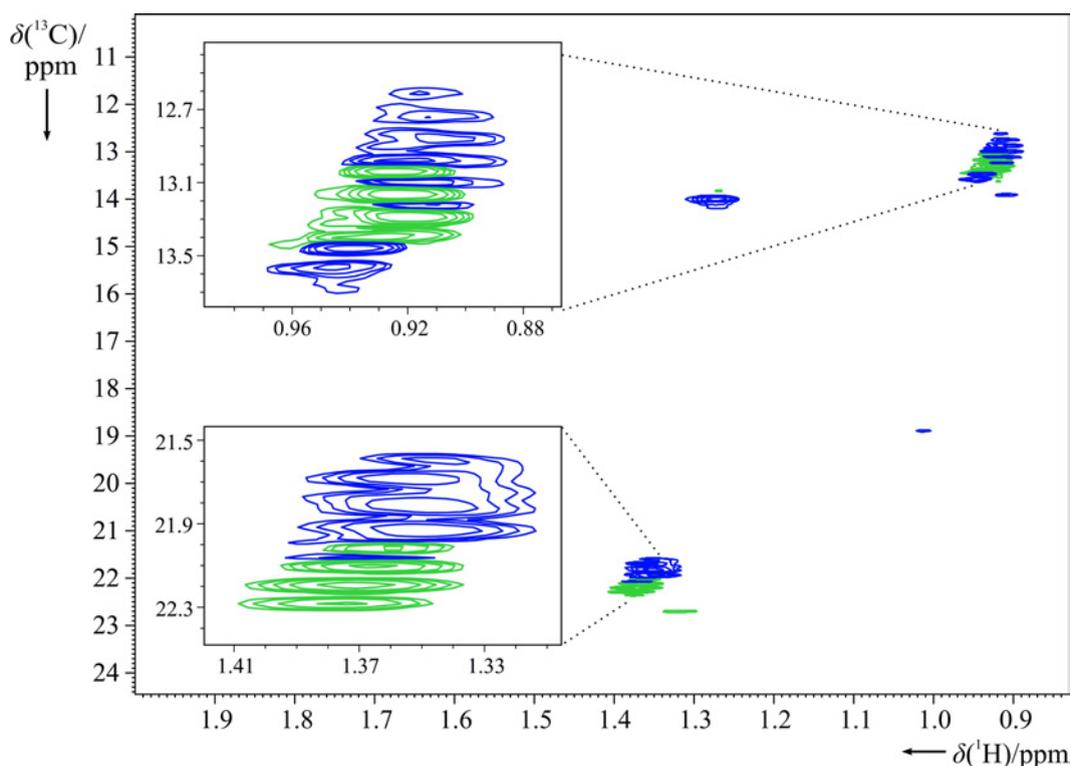


Abbildung 4.6.: 2D ^1H ^{13}C editiertes HSQC Spektrum des aliphatischen Bereichs von AHL1. Die beiden herausgestellten Bereiche zeigen die Hybridisierungen der verschiedenen deuterierten AHL Moleküle, wobei die positiven, absorptiven NMR Signale (blau) CH- und CH_3 - bzw. die negativen, absorptiven Signale (grün) CH_2 -Gruppen darstellen.

jeweiligen Deuterierungsgrad des Kohlenstoffatoms, konnte eine Qualifizierung bzw. Quantifizierung des Gemisches vorgenommen werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Die Ausbeute der verschiedenen Deuterierungsgrade von AHL1 wurde über Integration der $^{13}\text{C}\{^1\text{H}, ^2\text{H}\}$ NMR Signale durchgeführt (s. Anhang D.1). Dabei wurde das Erholzeit auf acht Sekunden gesetzt, um die unterschiedlichen Relaxationszeiten der CH-, CH_2 - und CH_3 -Gruppen auszugleichen. Nach verschiedenen Syntheseansätzen wurde die Selektivität der Einfachdeuterierung an den jeweiligen Kohlenstoffatomen der Doppelbindung mit einer Ausbeute von höchstens 52% bestimmt.

4.2.3. Fazit

Im Gegensatz zu massenspektrometrische Untersuchungen, bei welchen nur die Gesamtmasse der jeweiligen deuterierten Verbindungen detektiert werden konnten, wurde über die NMR-Spektroskopie der Deuterierungsgrad und die Deuterierungspositionen, hier am Beispiel von AHL1 gezeigt, eindeutig bestimmt.

Mithilfe von 1D $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, 1D $^{13}\text{C}\{^1\text{H}, ^2\text{H}\}$ bzw. von 2D ^1H ^{13}C editierten HSQC

Spektren konnte AHL1 als Hauptprodukt und AHL2 als Nebenprodukt identifiziert werden. Über die Integration der ^{13}C Atome der ^1H , ^2H entkoppelten Spektren konnten Ausbeuten von 49.5% bzw. 15% berechnet werden. Dabei wurden die unterschiedlichen T_1 -Relaxationszeiten der Methyl-, Methylen- und Methingruppen durch lange Erholzeiten zwischen den einzelnen Scans kompensiert.

Ziel der Deuterierungen von AHL Molekülen war es, zum einen die Einfachdeuterierung an den Positionen C-8 und C-9 bei AHL1 bzw. an den Positionen C-15 und C-16 bei AHL2 zu realisieren. Zum anderen sollten mithilfe der Deuterierungsreaktionen vorab Syntheserouten für die Tritonierung der genannten Kohlenstoffatome gefunden werden. Meist können die erhaltenen Methoden direkt auf Tritiumreaktionen übertragen werden, sind aber als Testsysteme sicherheits- bzw. arbeitstechnisch durch die Verwendung von Deuterium wesentlich einfacher zu realisieren.

Nach NMR spektroskopischen Untersuchungen der Reaktionsansätze konnten nur Gemische verschiedener Deuterierungsgrade bei AHL1 und AHL2 festgestellt werden. Zwar ist die vorgestellte Synthese somit für die selektive Einfachdeuterierung an Doppelbindungen nicht geeignet,¹⁷⁵ jedoch spielt dies letztendlich bei der Markierung von AHL ähnlichen Molekülen mit radioaktivem Tritium nur eine untergeordnete Rolle. Bei der Untersuchung von AHL Molekülen im Zusammenhang mit dem Transport über Zellmembranen ist die tatsächliche Position bzw. der Grad der Tritonierung nicht von Bedeutung, sondern lediglich dass eine detektierbare Menge an Tritium in das Molekül eingebaut wurde.

Dieses Projekt wurde in Kooperation mit Dr. Dorota Jakubczyk bearbeitet, welche die Synthesen der AHL Moleküle bzw. deren massenspektrometrischen Untersuchungen durchgeführt hat.

Diese Arbeit wurde veröffentlicht:

Dorota Jakubczyk, Christian Merle, Gerald Brenner-Weiss, Burkhard Luy und Stefan Bräse, Deuterium and tritium labelling of *N*-acyl-L-homoserine lactones (AHLs) via catalytic reduction, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 2013(24), 5323–5330.

4.3. Untersuchung der räumlichen Verteilung der Orientierung über ^2H -Bildgebung

4.3.1. Motivation

Bei der Aufklärung der Konfiguration bzw. Konformation von kleinen Molekülen bis hin zu Makromolekülen sind anisotrope Parameter mittlerweile von zentraler Bedeutung.^{5, 26, 42, 89, 176, 177} Für ein genaues Ablesen der erzeugten RDCs bzw. RCSAs sind neben dem Abgleich zwischen Probe und Magnetspule vor allem die Eigenschaften des Orientierungsmediums selbst entscheidend.

Während in einer isotropen Probe eine quasi, magnetisch homogene Umgebung für die darin gelösten Moleküle eingestellt und deren Qualität mit definierten Linienbreiten bzw. -formen entsprechender Lösungsmittel abgeschätzt werden kann, ist dies bei orientierten Proben nur bedingt umsetzbar. Über ein 1D ^2H Spektrum lässt sich bei orientierten Proben die Ursache starker Linienverbreiterung bzw. ungleichmäßiger Aufspaltung des Deuteriumsignals weder der Inhomogenität des Magnetfeldes noch derjenigen des Orientierungsmediums zuverlässig zuordnen.

Um zukünftig effektivere Aussagen über die Qualität eines Orientierungsmediums treffen zu können, wurde in dieser Arbeit die räumliche Verteilung der Orientierung an Polymergelen wie PAN und Gelatine bzw. an flüssigkristallinen Phasen wie PBLG untersucht. Dazu wurden jeweils schichtweise die quadrupolare Aufspaltungen des Deuteriumsignals mittels gepulsten Feldgradienten (PFGs) visualisiert. Mithilfe der gewonnenen Daten wurde versucht, sowohl die Diffusion von Molekülen, als auch deren dipolare und quadrupolare Aufspaltungen zeitlich und räumlich zu verfolgen.

4.3.2. Visualisierung von Inhomogenitäten

Im Gegensatz zu makroskopischen Mängeln wie eingeschlossenen Luftblasen, groben Rissen oder Trübungen entlang von Polymergelen bzw. flüssigkristallinen Phasen, sind kleinere Bruchstellen und Konzentrationsgradienten optisch meist nicht zu erkennen. Bislang stützte man sich lediglich auf die Aussagekraft der quadrupolaren Aufspaltungen eines 1D ^2H Spektrums des NMR Lösungsmittelsignals, um sowohl den Grad der Orientierung, als auch die Homogenität des Orientierungsmediums festzustellen.

Zwar sind Experimente zur Bildgebung seit den 1970er Jahren bekannt und wurden bereits für die Erstellung von Konzentrationsprofilen von Lösungsmittel-Polymer

Systemen eingesetzt,^{178–180} jedoch wurden noch keine Untersuchungen zur Qualitätskontrolle von Orientierungsmedien durchgeführt.

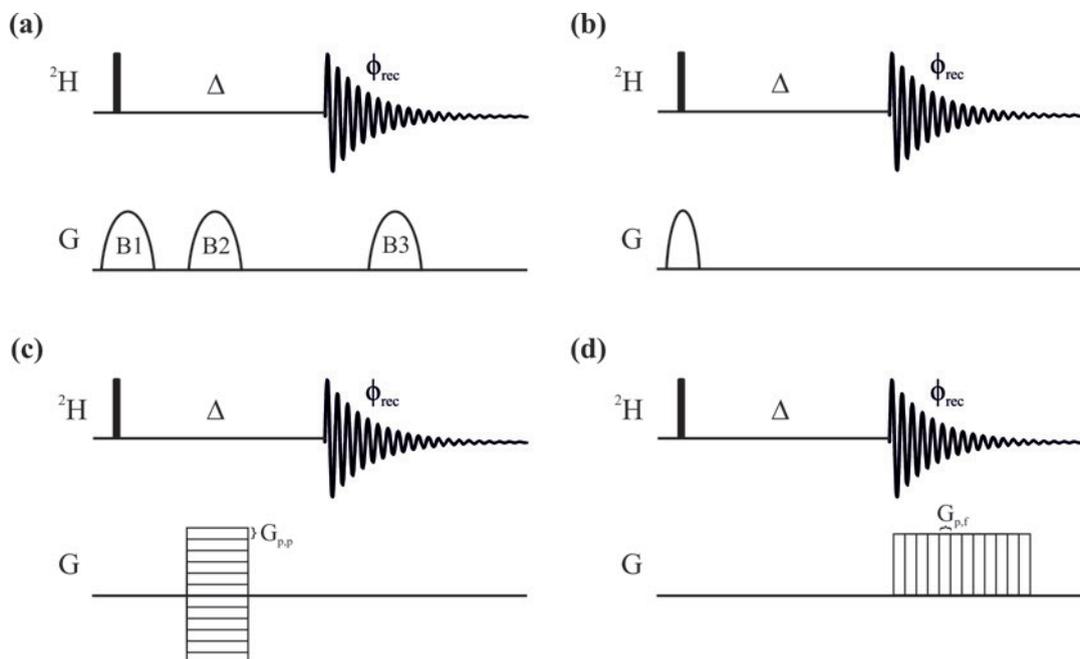


Abbildung 4.7.: Die Selektion erfolgt je nach graphischer Darstellung (1D, 2D oder 3D) mit einem, zwei oder drei PFGs an den Positionen B1, B2 und/oder B3 in der Pulssequenz (a). Bei der hier durchgeführten Bildgebung wird zwischen Schichtselektion, Frequenz- und Phasenkodierung unterschieden. Durch selektive Anregung können einzelne, horizontale Schichten im Orientierungsmedium mithilfe eines z-Gradienten selektiert werden. Dabei ist die Anregungsfrequenz proportional zum statischen Magnetfeld, welches sich linear in Richtung des Gradienten ändert. Der selektive Anregungspuls regt eine definierte Schicht proportional zu seiner Frequenzbreite an (b). Durch Anlegen eines Gradienten vor der Akquisition wird eine ortsabhängige Phase der Kernspins generiert. Bei konstanter Länge, aber kontinuierlicher Änderung der Gradientenstärke werden bei N Akquisitionszyklen $N \cdot k$ Ortsdomänen detektiert (c). Durch Anlegen eines Gradienten während der Akquisition wird ein zusätzliches Magnetfeld induziert, welches die Frequenzen der Kernspins an unterschiedlichen Positionen entlang des Gradienten ändert. Mit diesen sogenannten räumlichen Frequenzen und der Ortsdomäne k kann eine ortsabhängige Intensitätsverteilung visualisiert werden (d).

Die Visualisierung wird entweder über einen selektiven Anregungspuls in Gegenwart eines Feldgradienten entlang eines Magnetfelds oder über frequenz- bzw. phasen-kodierte Experimente realisiert (s. Abbildung 4.7).^{181–183} Bei jedem dieser Ansätze korreliert durch den Einsatz eines Feldgradienten die jeweilige Larmorfrequenz mit der räumlichen z-Komponente der Probe. Die jeweilige Phase an den verschiedenen Positionen variiert daher um den z-Anteil, welcher von der Stärke bzw. Dauer des

Gradienten abhängig ist (s. Gleichung 4.2).

Bei den durchgeführten Experimenten wurde ein Gradient mit linearer Abhängigkeit verwendet, wobei in der Mitte der Probe die Spins allein das äußere Magnetfeld ($\omega_z = \omega_0$) erfahren und zunehmend zu den Enden der Spule den Einfluss des Gradienten wahrnehmen ($\omega_z = \omega_0 - \gamma Gz$). Die Spins jeder horizontalen Schicht der Probe erfahren daher je nach Position eine andere räumliche Dephasierung (*spatially dependent phase*).¹⁸⁴

$$\phi = -\gamma Gzt \quad (4.2)$$

Im vorliegenden Fall wurden die quadrupolaren Aufspaltungen an Deuteronen gemessen. Die bildgebenden Experimente wurden mit den Pulssequenzen B bzw. C aufgenommen (die Pulsprogramme sind dem Anhang E zu entnehmen). Die Abbildung 4.8 stellt mögliche Ursachen der Inhomogenität dar, welche letztendlich zu verzerrten Linienformen bzw. -verbreiterungen führen.

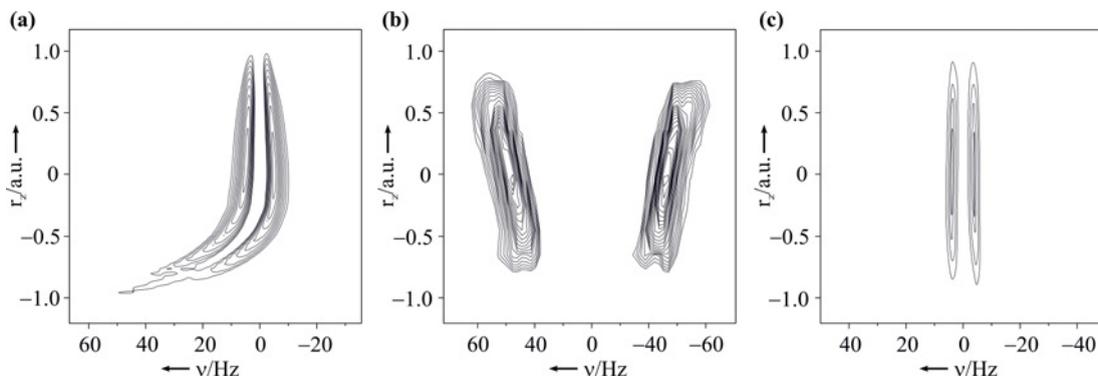


Abbildung 4.8.: Verschiedene Profile von unterschiedlich gequollenen PAN bzw. PEOMMA Polymergelen. Verantwortlich für die inhomogene Verteilung innerhalb einer Gelprobe kann entweder die Einstellung der Shims **(a)** und/oder eine ungleichmäßige Quellung **(b)** sein. Bei einer geschimten und homogen gequollenen Gelprobe werden bei einer quadrupolaren ^2H Aufspaltung zwei zu einander parallel ausgerichtete Linien gemessen **(c)**. Der Parameter r_z gibt die relative Position innerhalb der orientierten Probe an. Hierbei entspricht $1 \text{ a.u.} \approx 1 \text{ cm}$.

Während in Abbildung 4.8 **(a)** ein inhomogenes Magnetfeld Ursache für die Linienverbreiterungen ist, zeigt Abbildung 4.8 **(b)** eine ungleichmäßige Orientierung, welche entweder durch ein nicht äquilibriertes Polymergel oder durch einen Konzentrationsgradienten hervorgerufen wird. Die Abbildung 4.8 **(c)** hingegen spiegelt eine äquilibrierte, magnetisch homogene Gelprobe wider.

Aber nicht nur in Polymergelen, sondern auch in flüssigkristallinen Phasen können durch ungleichmäßige Konzentrationsverteilungen innerhalb der Probe breite Linien hervorgerufen werden. Da definierte Untergrenzen für die spontane Ausrichtung bei flüssigkristallinen Phasen existieren, werden sogar nicht orientierte Regionen in der ^2H Bildgebung detektiert. In Abbildung 4.9 ist eine für Standardmessungen von anisotropen Parametern nicht geeignete bzw. eine äquilibrierte Probe gezeigt.

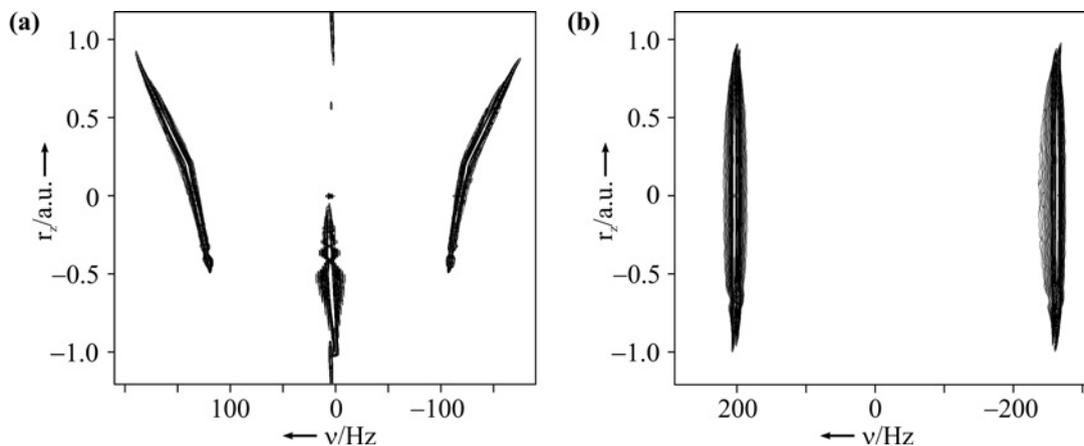


Abbildung 4.9.: ^2H bildgebende Spektren von PBLG/ CDCl_3 (a) und PBLG/ CD_2Cl_2 / CDCl_3 (b). Eine inhomogene Verteilung innerhalb eines Flüssigkristalls kann entweder durch eine magnetisch inhomogene Umgebung oder durch einen Konzentrationsgradienten (a) entstehen. Bei einer äquilibrierten, magnetisch homogenen, flüssigkristallinen Probe werden bei einer quadrupolaren ^2H Aufspaltung zwei zu einander parallel ausgerichtete Linien erhalten (b). Der Parameter r_z gibt die relative Position innerhalb der orientierten Probe an, wobei $1 \text{ a.u.} \approx 1 \text{ cm}$ entsprechen.

Eine übliche Methode, um Orientierungsgrade in einer Probe zu variieren, ist mithilfe einer Streckapparatur verschiedene Extensionsfaktoren einzustellen (s. Kapitel 2.3). Aus diesem Grund wurde die räumliche Verteilung der Orientierung in einer Gelatine Probe bei zwei unterschiedlichen Streckungen bzw. Positionen aufgenommen. Während in Abbildung 4.10 (a) die Probe nicht gestreckt wird und daher keine Orientierung zeigt, wurde in (b) bei einer 200 Hz großen, quadrupolaren Aufspaltung gemessen. Abgesehen von der inhomogenen Shimeinstellung, welche auch in der nicht orientierten Probe zu erkennen ist, werden zwei, fast senkrecht verlaufende NMR Signale erhalten. In Abbildung 4.10 (c) wurde die Probe soweit in das aktive Volumen der Spule gesetzt, dass der Teflonstopfen bzw. der konische Verlauf des Silikonschlauchs am unteren Ende detektiert werden konnte. Wie zu erwarten, zeigte die uneinheitliche Form der Probe hier eine Verzerrung der NMR Signale.

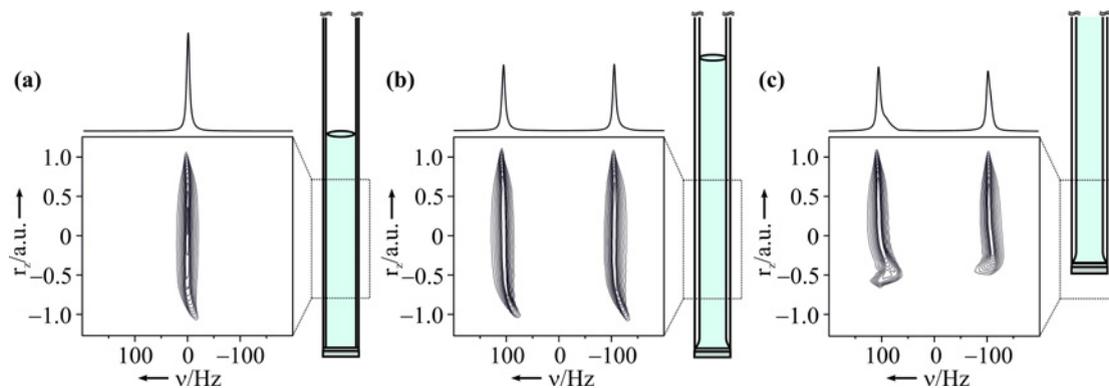


Abbildung 4.10.: Verschiedene Profile von unterschiedlich gestreckten, gelatinehaltigen Proben. Im ungestreckten Fall wird keine quadrupolare Aufspaltung detektiert **(a)**. Nach Streckung bzw. unterschiedlicher Positionierung der Probe in der Magnetspule konnte der Einfluss der räumlichen Verteilung der quadrupolaren Aufspaltung dargestellt werden **(b, c)**. Das aktive Volumen der Magnetspule ist jeweils durch einen gestrichelten Kasten angezeigt. Der Parameter r_z gibt die relative Position innerhalb der orientierten Probe an. Dabei entsprechen 1 a.u. \approx 1 cm.

4.3.3. Einsatzgebiete von bildgebenden Experimenten

Bei der Validierung von Strukturmodellen spielen die abgelesenen, anisotropen Parameter eine entscheidende Rolle. Wird die Breite eines NMR Signals betrachtet, spiegelt diese die Verteilung der Gesamtmagnetisierung der Probe wider. Neben Relaxationsprozessen führen Konzentrationsgradienten oder inhomogene Quellungen bei Orientierungsmedien zusätzlich zu Verbreiterungen der NMR Linien. Durch bildgebende Experimente können nun gezielt einzelne Schichten in einem Orientierungsmedium angeregt werden. Zwar nimmt das Signal-zu-Rausch Verhältnis ab, der Gewinn an Auflösung ist jedoch erheblich. Bei einer PEOMMA/ CDCl_3 Probe konnte durch selektive Anregung, wie in Abbildung 4.11 gezeigt, eine Verjüngung der Linienbreite bei halber Höhe und Breite **(a)** von bis zu 15% bzw. im unteren Bereich **(b)** von bis zu 23% für das Signal bei 7.75 ppm erreicht werden. Für das NMR Signal bei 6.63 ppm wurde eine Reduzierung bei **(a)** von 32% bzw. bei **(b)** von 36% erreicht. Der Verlust an Signal zu Rauschen entsprach 87%. Eine vorgeschaltete selektive Anregung einer Schicht in 2D Experimenten könnte daher das Ablesen der anisotropen Parameter mit geringeren Fehlertoleranzen gewährleisten.^{185,186}

Außerdem könnten unterschiedlich stark orientierte Bereiche des Orientierungsmediums nacheinander angeregt werden. Eine Skalierung innerhalb einer einzigen Probe wäre somit durch Einsatz von zuvor durchgeführten, bildgebenden Experimenten möglich. Dabei müsste jedoch neben der Empfindlichkeit der Magnetspule, welche

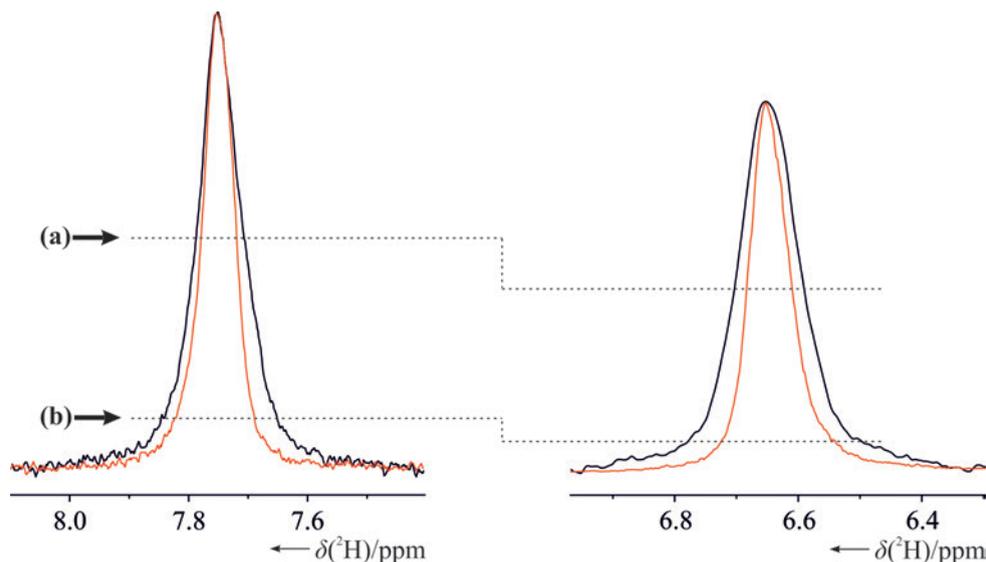


Abbildung 4.11.: Ausschnitte aus 2D ^2H Spektren von PEOMMA/ CDCl_3 . Nach der Überlagerung eines herkömmlichen (schwarz) und eines schichtselektiv angeregten (rot) 1D ^2H Spektrums wird die Verjüngung der Signalbreite deutlich. Die Intensität der Signale nahm dabei bis auf 13% ab. Daher wurde nur zu Darstellungszwecken das rote auf das schwarze Signal skaliert. An definierten Positionen des Signals (a) und (b) wurden die jeweiligen Breiten ermittelt. Das entsprechende ^2H -Profil ist in Abbildung 4.12 gezeigt. Während das schwarze Spektrum einem 1D ^2H Spektrum entspricht, wurde für das rote Spektrum die Schicht mit einer Quadrupolaufspaltung von 99.7 Hz verwendet, wobei eine ca. 1.1 mm dicke Schicht angeregt wurde.

in der Mitte am höchsten und zu den Enden hin tendenziell schwächer wird, auch das Quellverhalten der orientierten Probe betrachtet werden. Wie in Abbildung 4.12 zu erkennen ist, ist die Orientierungsstärke des Polymergels oben am stärksten und nach unten hin abfallend. Dies ist bei den meisten Polymergelen der Fall, da das Lösungsmittel zu Beginn der Quellung von allen Seiten in das trockene Polymerstäbchen diffundieren kann. Sobald jedoch das Polymergel die Wandung des NMR Röhrcchen erreicht, bedeckt das Lösungsmittel nur noch von oben das Polymergel. Daher ist die Quellung bei einer nicht äquilibrierten Probe oben tendenziell um einige Hertz größer als im unteren Bereich.

In der orientierten Probe in Abbildung 4.12 stellt dies ein Unterschied von ca. 50 Hz der quadrupolaren Aufspaltung von CDCl_3 dar. Aber nicht nur die Empfindlichkeit, sondern auch Stabilität der Polymergele nimmt jeweils an den beiden Enden ab, da hier die Gele aufgrund des Streckvorgangs während der Quellung am stärksten belastet werden.

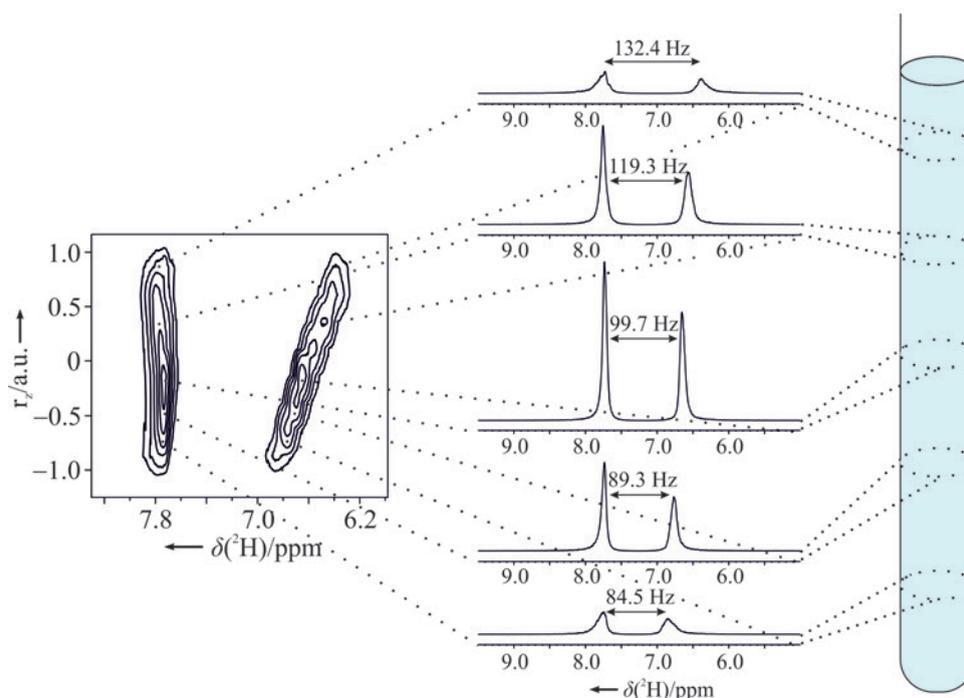


Abbildung 4.12.: Schematische Darstellung der einzelnen Schichten von PEOMMA in CDCl_3 . Wie zu erkennen ist, beträgt die Differenz der quadrupolaren Aufspaltung an den beiden Probenenden ca. 50 Hz.

4.3.4. Fazit

Über bildgebende Experimente konnte gezeigt werden, dass die räumliche Verteilung der Orientierung in Polymergelen bzw. flüssigkristallinen Phasen je nach Äquilibriumstand oder Shimeinstellung ungleichmäßig verlaufen kann. Durch selektive Anregung oder Phasenkodierung wurden einzelne Schichten entlang der z -Achse angeregt und nacheinander aufgezeichnet. Der Grund für die inhomogenen Linienformen konnte mithilfe der aufgenommenen Spektren eindeutig entweder der Inhomogenität des Orientierungsmediums oder der Einstellung des Magnetfeldes zugeordnet werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Streckapparatur auf die Homogenität keinen detektierbaren Effekt hatte. Die korrekte Positionierung von orientierten Proben in Streckapparaturen innerhalb der Spule ist, wie anhand der Gelatineprobe gezeigt wurde, für das exakte Ablesen von anisotropen Parametern dennoch entscheidend. Zusätzlich wurde der Linienverlauf in einem PEOMMA/ CDCl_3 Polymergel über bildgebende Experimente verfolgt. Durch das Herausgreifen einer Schicht des Polymergels wurde die Breite des CDCl_3 Signals und damit auch der Fehler des entsprechenden RQCs verringert. Zwar nahm die Intensität des NMR Signals ab, jedoch kann durch die Unterstützung von modernen Cryoprobeköpfen deren Verlust kompensiert werden.

Diese Arbeit wurde zusammen mit Martin Koos durchgeführt, welcher die NMR Messungen der flüssigkristallinen Phasen durchführte bzw. bei der Programmierung der Pulsprogramme mitwirkte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Pablo Trigo-Mouriño, Christian Merle, Martin R. M. Koos, Burkhard Luy, Roberto R. Gil, Probing Spatial Distribution of Alignment by Deuterium NMR Imaging, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19(22)*, 7013–7019.

5. Zusammenfassung Teil I

Für die Aufklärung unbekannter Strukturen stellt die NMR-Spektroskopie eine der am häufigsten verwendeten, analytischen Methoden dar. Zwar erlauben klassische Parameter z. B. die Konfigurationsbestimmung von Molekülen, bei komplexen Verbindungen jedoch ist deren struktureller Informationsgehalt meist nicht ausreichend, um zuverlässige Aussagen treffen zu können. Anisotrope Parameter können hierbei mit wertvollen, komplementären Daten oft weiterhelfen.

Ziel der bisher beschriebenen Arbeit war die Entwicklung neuer Orientierungsmedien für die Messung von anisotropen Parameter bzw. für die Falsifizierung von Strukturmodellen. In dieser Arbeit wurden daher die folgenden Aspekte im Bereich der partiellen Orientierung von Molekülen umgesetzt:

1. Entwicklung und Etablierung von Orientierungsmedien für kleine und mittelgroße Moleküle
2. Verbesserung der Spektrenqualität und der Analyse von anisotropen NMR Parametern

Die Kompatibilität der synthetisierten Orientierungsmedien wurde anhand verschiedener Experimente gezeigt. Die ermittelten, anisotropen Parameter wurden dazu verwendet, Strukturmodelle kleiner bzw. mittelgroßer Moleküle zu falsifizieren.

Die Molekül- bzw. Lösungsmittelkompatibilität sowohl bei Polymergelen, als auch bei flüssigkristallinen Phasen ist trotz intensiver Forschung noch immer ein aktuelles Thema. Nur wenige Orientierungsmedien zeigen breite Anwendungsmöglichkeiten, wenn es darum geht, die Struktur von Molekülen bzw. deren Wechselwirkungen zu

untersuchen. Auch die Erforschung von chemischen und biochemischen Vorgängen oder Reaktionen, bei welchen meist mehrere Lösungsmittel gleichzeitig eingesetzt werden, kann mit den bisherigen Orientierungsmedien nicht immer umgesetzt werden. In dieser Arbeit wurden zwei Orientierungsmedien für die Messung von anisotropen Parametern entwickelt, um diese Lücken zu schließen.

Zum einen wurde die Kompatibilität von auf Polyethylenoxid basierenden Polymergelen anhand einer Vielzahl von Molekülklassen und verschiedener NMR Lösungsmittel getestet. Dabei wurden sowohl verschiedene Kettenlängen der Monomereinheit verwendet, als auch verschiedene Varianten der Vernetzung erprobt. Jedes der Polyethylenoxid-basierten Polymergele zeigte eine hohe Kompatibilität zu allen Lösungsmitteln außer Alkanen. In Kapitel 3 wurden Zucker, Peptide, Steroide, Paracyclophane, und andere kleine und mittelgroße, organische Moleküle in PEO gemessen. Damit wurde die Bandbreite an Anwendungsmöglichkeiten des Orientierungsmedium PEO abgesteckt und die Kompatibilität zu verschiedenen Molekülklassen bewiesen. Weiterhin wurde das Quellverhalten von unterschiedlichen Lösungsmittelgemischen untersucht und anhand von 1D ^2H Experimenten deren quadrupolare Aufspaltung während des Quellvorgangs verfolgt. Dadurch konnten die Orientierungsstärken einzelner Lösungsmittel innerhalb des Polymergels miteinander verglichen werden. Bei PEO basierten Polymergelen kann eine Überlagerung allein mit dem Hauptsignal bei 3.7 ppm und 70 ppm im ^1H bzw. im ^{13}C Spektrum mit den gelösten Molekülen stattfinden. Aufgrund der schmalen Linienbreite (≈ 15 Hz) wurde durch selektive Vorsättigung das Hauptsignal von PEO effektiv unterdrückt, so dass nur eine kleine Region des Spektrums für die Auswertung nicht herangezogen werden konnte. Andere NMR Signale z. B. des Vernetzers waren entweder aufgrund der geringen Konzentration vernachlässigbar oder der Vernetzer wurde zuvor deuteriert.

Zum anderen wurde das Biopolymer Gellan Gum für die Diskriminierung von Enantiomeren etabliert. Anhand von Testmolekülen wurden anisotrope Parameter erhalten und für die Validierung von Strukturmodellen verwendet. Aufgrund der geringen Konzentration, welche für die Gelierung benötigt wird, stellt Gellan Gum eine ideale, anisotrope Matrix dar, um sowohl kleine und mittelgroße, als auch einige kDa schwere Makromoleküle zu messen. Bei einer Gelierungskonzentration zwischen 0.8–40% wurden die NMR Signale von Gellan Gum bei Standardmessungen erst bei höheren Konzentrationen detektiert. Unterdrückungssequenzen bzw. komplexe H-D-Austauschreaktionen sind daher nicht notwendig, um gelöste Moleküle von geringer

Konzentration zu detektieren. Die Fähigkeit Enantiomere trotz Temperaturen von bis zu 60 °C bzw. pH Werten von 4 – 11 zu unterscheiden, wurde an verschiedenen chiralen Verbindungen bewiesen. Neben Wasser kann bei Gellan Gum auch DMSO als eines der wichtigsten Lösungsmittel in der pharmazeutischen Analyse verwendet werden.

Bei der Analyse von anisotropen Parametern in Orientierungsmedien spielt die Homogenität eine zentrale Rolle. Im Gegensatz zu flüssigen NMR Proben ist die inhomogene Linienverbreiterung bei orientierten Molekülen jedoch letztendlich nicht allein von der magnetischen Umgebung, sondern auch vom Quellverhalten oder der Konzentrationsverteilung des Orientierungsmediums abhängig. Ob das Polymergel noch nicht äquilibriert bzw. die flüssigkristalline Phase mit einem Konzentrationsgradienten behaftet ist, kann in einem 1D Experiment nicht von einer magnetisch inhomogenen Umgebung differenziert werden. Bisherige Kontrollen, bei denen mithilfe von 1D ^2H Experimenten die quadrupolare Aufspaltung aufgenommen wurde, können keine Aussagen darüber treffen, ob die Probe entweder mehr Zeit zur Äquilibrierung oder die Magnetfelder nachjustiert werden müssen.

Mit den in dieser Arbeit etablierten 2D ^2H bildgebenden Experimenten wird jedoch der Verlauf der quadrupolaren Aufspaltung innerhalb der Probe detektiert. Zum einen wurde die räumliche Selektion durch eine selektive Anregung eines definierten Bereichs entlang der z-Achse, zum anderen durch Phasenkodierung erreicht. Die räumliche Verteilung der quadrupolaren Aufspaltung wurde sowohl für verschiedene Polymergele, als auch für flüssigkristalline Phasen untersucht. Bei beiden Orientierungsmedien konnten etwaige Inhomogenitäten im Linienverlauf den entsprechenden Ursachen zugeordnet werden. Zusätzlich wurden 2D ^2H Imaging Experimente einer Gelatine Probe mittels Streckapparatur bei verschiedenen Extensionsfaktoren durchgeführt. Die Qualität der Spektren wurde trotz einer Streckung mit einer quadrupolaren Aufspaltung des Lösungsmittelsignals von $\Delta\nu_Q = 200$ Hz nicht beeinflusst. Lediglich der konische Verlauf beim Übergang zwischen Teflonstopfen und Silikon-schlauch führte zu einer Verbreiterung der entsprechenden 1D Projektion aufgrund von geometrischen Suszeptibilitätseffekten.

6. Metabolomics

6.1. Identifizierung von chinesischen Heilpflanzen

6.1.1. Einführung und Motivation

Die metabolischen Untersuchungen von komplexen Mischungen zellulärer, tierischer oder pflanzlicher Extrakte wurden in den letzten zwei Jahrzehnten forciert.^{187,188} Dabei handelt es sich nicht immer um einen simplen Abgleich von Inhaltsstoffen, sondern vielmehr darum, wie der Metabolismus auf innere und äußere Einflüsse wie Krankheiten, Stress oder Hunger reagiert.¹⁸⁹ Ein Ziel hierbei ist, mithilfe der NMR-Spektroskopie z. B. über Blut- und Urinanalysen eine etwaige Krankheitsentstehung und deren Verlauf beim Menschen zu beobachten. Schon heute können beispielsweise Aussagen über den pre- bzw. post-operativen Status bei Niereninsuffizienz gemacht werden.^{190–192}

Bei zellulären Studien hingegen können die einzelnen Entwicklungsstadien der Kultur bzw. Inhaltsstoffe verfolgt und für die Grundlagenforschung verwendet werden.¹⁹³ Desweiteren ist der Ansatz des metabolischen Monitoring die Grundlage, um in Zukunft z. B. Pflanzenzellkulturen auf die Produktion pharmazeutisch relevanter Stoffe hin zu untersuchen. In diesem Zusammenhang könnte die Produktion von Arzneimitteln in Zellkulturen über NMR Messungen kontrolliert und anschließend aufgereinigt werden.

Neben der Qualitätskontrolle hinsichtlich Frische und Verarbeitungsgrad ist mithilfe der Analyse von Pflanzenextrakten eine Phänotypisierung der entsprechenden Pflanzen denkbar. Desweiteren könnten die aktiven Wirkstoffe oder komplexe Wirkungsklassen identifiziert bzw. bestimmte Arzneistoffe in definierten Entwicklungszyklen

abgefangen werden.¹⁹⁴

Die Herausforderung bei all diesen Studien ist, die Durchführung bzw. Rahmenbedingungen einheitlich zu gestalten. Neben der Blut- bzw. Urinanalyse gelten vor allem die Untersuchung von pflanzlichen Produkten als besonders schwierig, da die Extrakte meist aus Freilandkulturen stammen, diese also immer hinsichtlich ihrer Nährstoffaufnahme, ihren Umweltbedingungen und Gesundheitszuständen analysiert und charakterisiert werden müssen. Zusätzlich werden diese, wie es auch bei chinesischen Heilpflanzen der Fall ist, auf verschiedene Weise vorbehandelt und variieren in ihren Inhaltsstoffen. Die Reproduzierbarkeit bzw. das Gelingen einer Klassifizierung über die aufgenommenen NMR Spektren ist daher ungewiss.

Ziel dieser Arbeit war es, zu überprüfen, ob charakteristische Signalmuster für chinesische Heilpflanzen existieren. Die Identifikation bzw. Gruppierung von Rohdrogen derselben Gattung sollte mithilfe NMR spektroskopischer und statistischer Untersuchungen gezeigt werden.

6.1.2. Chinesische Medizin

Bei der Verarbeitung von traditionell chinesischen Arzneimitteln (TCA) wird auf ein mehr als 2000 Jahre altes Wissen und meist auf die Erfahrungen mehrerer Generationen zurückgegriffen. Unter den Begriffen TCA bzw. traditionelle chinesische Medizin (TCM) verbergen sich eine Vielzahl an Anwendungen und Produkten, welche von der Akupunktur, über den Einsatz von tierischen Organen bis hin zur Pflanzenheilkunde führen. Im Gegensatz zur westlichen Medizin beruht die TCM auf Therapiepunkte, den so genannte Meridianen. Der astronomische Begriff Meridian spiegelt in diesem Zusammenhang die Leitbahnen des Qi, der Lebensenergie, wider, welche im menschlichen Körper die einzelnen Organe miteinander verbinden. Eine Störung bzw. Beeinträchtigung des Flusses dieser Lebensenergie, so die Vorstellung, resultiert in einer Erkrankung des Körpers.¹⁹⁵

Dabei wird je nach Diagnose entsprechend der chinesischen Krankheitslehre eine der folgenden Behandlungsmethode verordnet:

1. Akupunktur: durch Nadeln werden an definierten Akupunkturpunkten Reize gesetzt, welche je nach Position eine Wirkung in dem zugehörigen Organ auslösen.¹⁹⁶
2. Arzneimitteltherapie: tierische oder pflanzliche Produkte werden nach der

chinesischen Krankheitslehre behandelt und dem Patienten entsprechend verabreicht.

3. Bewegungsübungen: zu diesen gehören Atem- und Konzentrations-, aber auch Meditationsübungen, welche unter anderem die Essenz (Qi), das Blut (Xue) und die Körpersäfte (Jinye) beeinflussen sollen.
4. Diätetik: gezielte Ernährung zur Vorbeugung bzw. zur Begleitung von Krankheiten.
5. Massage: Lockerung der Muskulatur und des Bindegewebes

Bei der Akupunktur z. B. werden einzelne Reizpunkte bestimmten Organen zugewiesen, so dass das Setzen der Nadeln nicht willkürlich, sondern gezielt, nach definierten Vorgaben stattfindet.¹⁹⁵ In gleicher Weise existieren Rezepturen aus tierischen bzw. pflanzlichen Produkten, welche individuell je nach Beschwerden des Patienten zusammengestellt werden. Dies ist einer der wesentlichen Unterschiede zur herkömmlichen Medizin, da sich im Gegensatz hierzu, die Wirkung bzw. der Zielort von TCM Präparaten je nach Vorbehandlung beeinflussen lassen (s. Kapitel 6.1.3).

Die individuelle Anpassung des Medikaments bzw. die maßgeschneiderten Therapieansätze für den Patienten reflektiert die jüngste Entwicklung der medizinischen Forschung: die personalisierte Medizin. Diese Art der Diagnostik setzt auf die Analyse der genetischen, zellulären und molekularen Merkmale eines Patienten, um letztendlich den Krankheitsverlauf festzustellen und daraus individuelle Therapiemöglichkeiten festzulegen.

In der chinesischen Medizin ist der Anbau und die Produktion von Heilpflanzen hingegen festgelegt und erst die Kombination von verschiedenen tierischen bzw. pflanzlichen Produkten entfaltet die patientengebundene Wirkung. Dabei ist die Wirksamkeit bestimmter Behandlungsmethoden der TCM nicht nur präventiv, sondern auch während und nach einer Erkrankung durch Studien belegt. Bei Patienten mit Morbus Crohn konnte z. B. eine Verbesserung des klinischen Aktivitätsindexes CDAI (Crohn's Disease Activity Index) nach akupunkturer Behandlung festgestellt werden.^{196, 197}

Wie bei vielen Medikamenten und Behandlungsmethoden wurden auch Studien über Placebo-Effekte von TCA Behandlungen an Patienten veröffentlicht.¹⁹⁸ Jedoch konnten beispielsweise Untersuchungen zu sekundären Pflanzenstoffen wie Artemisinin in der Therapie gegen Tumor- bzw. Krebszellen durchgeführt und die Wirksamkeit be-

stätigt werden.^{199,200} Im allgemeinen ist die Akzeptanz pflanzliche Pharmazeutika einzunehmen höher, da gleichzeitig von einer geringeren Wirksamkeit und meist keinen Nebenwirkungen ausgegangen wird. Diese Annahmen haben jedoch teilweise fatale Folgen. Spätestens seit der so genannten Chinesischen Heilkräuter-Nephropathie in Belgien, welche durch eine Verwechslung in der Namensgebung der entsprechenden Pflanzen hervorgerufen wurde, ist auch die Kehrseite der Verwendung von TCM Produkten oder allgemeiner gesagt von pflanzlichen Pharmazeutika bekannt.^{201–203} Ursache hierfür war die in China üblichen, unterschiedlichen Bezeichnungen für dieselbe Pflanze bzw. ein und dieselbe Benennung für verschiedene Pflanzen. Aber nicht nur die uneinheitliche Namensgebung, sondern auch die Trocknung, Vorbehandlung und Zerkleinerung der chinesischen Heilpflanzen, macht deren phylogenetische Identifikation schwierig bis unmöglich (s. Kapitel 6.1.3).

Zwar existieren Referenzproben, welche für die schnelle, aber nicht zuverlässige Identifizierung von Inhaltsstoffen der Rohdrogen in Apotheken via TLC zur Verfügung stehen, Praktiken zu einer effektiven Zuordnung gibt es bislang jedoch kaum.

6.1.3. Behandlung von chinesischen Heilpflanzen

Viele chinesische Heilpflanzen enthalten von Natur aus giftige Substanzen und können zu erheblichen Organschäden führen. Über die Jahrhunderte hinweg, in denen solche Pflanzen zu therapeutischen Zwecken eingesetzt wurden, wurden detaillierte Vorbehandlungen für die entsprechenden Drogen in Lehrbüchern festgehalten. Diese so genannte Reinigung schließt sowohl den Abbau der giftigen Substanz, als auch den Tropismus der Arzneistoffe mit ein. Die verschiedenen Eigenschaften der Heilkräuter wie Geschmack, Temperatur, Wirkung oder Funktionskreis werden somit durch die Art der Präparation beeinflusst. Meist werden diese Behandlungsmethoden mit bestimmten Zusätzen wie Wasser, Honig, Salz, Reis, Reiswein, Weizenkleie, Ingwersaft, Tieröl oder -fett oder Kräutern versehen, um wiederum bestimmte Regionen des Körpers anzusteuern.

Bei den Untersuchungen von *A. Carmichaeli* z. B. wurde die Reduzierung der toxischen Inhaltsstoffe nach unterschiedlichen Prozessierungen verfolgt.²⁰⁴ Über den Zyklus zwischen Fingerprints von Biomarkern, massenspektrometrischen oder NMR spektroskopischen Signalmustern und biologischer Reaktion kann die Qualität und Sicherheit von chinesischen Heilpflanzen sukzessiv erhöht werden (s. Abbildung 6.1).^{205,206}

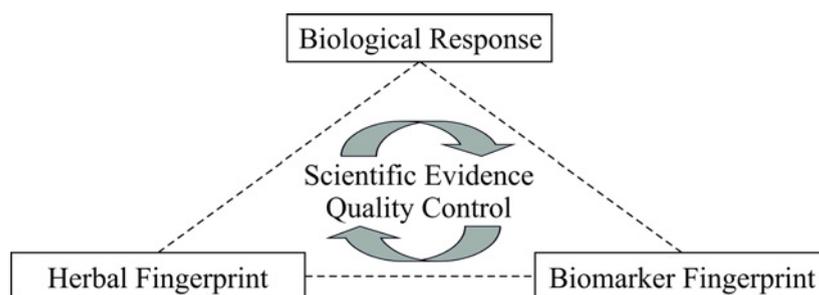


Abbildung 6.1.: Konzept zur Verlinkung von biologischer Aktivität mit biostatistischen Auswertungsmethoden.²⁰⁵

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Droge *Glycyrrhizae (radix)* und *Rhei (radix et rhizoma)* selbst nach Behandlung mit verschiedenen Zusätzen noch dem entsprechenden NMR Referenzmuster zugeordnet werden kann. Bei *Glycyrrhizae (radix)* wurde zum einen die reine und zum anderen die mit Honig behandelte und damit tonisierende Form NMR spektroskopisch untersucht. Ein weiteres Beispiel ist die Rohdroge *Rhei (radix et rhizoma)*, welche unbehandelt purgativ wirkt, jedoch nach dem Rösten mit Reiswein nach der *Shi Hui San* Rezeptur Blut stillend und bei Erkrankungen des Verdauungssystems mit einhergehenden Blutungen wie *Colitis* oder *Morbus Crohn* eingesetzt wird. Hierbei wurden verschiedene Arten der Gattung *Rheum* untersucht, um sowohl Gemeinsamkeiten für die Klassifizierung, als auch Unterschiede für die Identifikation der jeweiligen Art im Signalmuster von *NOESY* bzw. *JRES* Spektren zu erkennen.

6.1.4. Standardarbeitsanweisungen

Bei der Identifizierung von chinesischen Heilpflanzen bzw. bei der Charakterisierung der Inhaltsstoffe werden unterschiedliche Experimente eingesetzt. Hierbei gibt es verschiedene Anforderungen, um die Qualität bzw. eine Quantifizierung zu gewährleisten. Das Hauptaugenmerk neben der Probenpräparation liegt auf der effektiven Unterdrückung unerwünschter Lösungsmittelsignale wie Wasser oder Methanol. Die Probenpräparation sollte nach so genannten SOPs (standard operating procedures) durchgeführt werden, um Unterschiede in der Verarbeitung bzw. Behandlung der Pflanzen und nicht in der individuellen Arbeitsweise zu beobachten. Bei nicht Einhalten festgelegter SOPs ist jegliche Messung bzw. Auswertung der detektierten Daten nichtig, weil diese unweigerlich zu Fehlinterpretationen und falschen Schlussfolgerungen bezüglich des untersuchten Systems führen. Etwaige Unterschiede könnten z. B. nicht mehr eindeutig einer anderen Behandlungsmethode zugeordnet werden, da sie

ursächlich in der Probenpräparation liegen könnten. Die SOPs, welche für die Präparation der Proben verwendet wurden, sind in Abbildung 6.2 bzw. in Kapitel E.3.1 zusammengefasst.

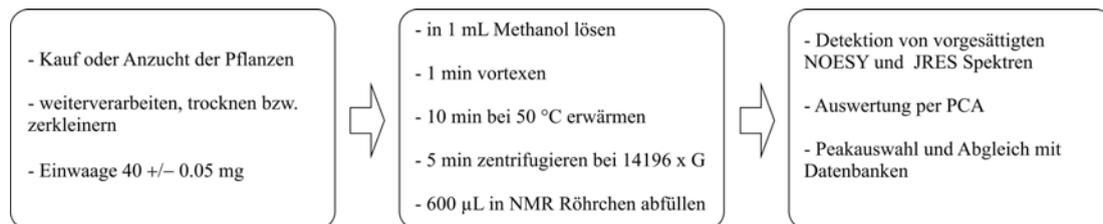


Abbildung 6.2.: SOP für die Vorbereitung von Rohdrogen für die metabolischen Untersuchungen mittels NMR Spektroskopie. Nach Anzucht und Trocknung der Pflanzenstücke werden 40 ± 0.05 mg eingewogen und nach der dargestellten SOP behandelt. Danach werden die entsprechenden Daten aufgenommen, prozessiert und ausgewertet.

Um eine einheitliche Prozessierung für den Probendurchsatz einer Metabolomics Studie von typischerweise mehreren tausend Proben zu gewährleisten, werden zu Beginn die experimentellen Parameter optimiert. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, dürfen diese Parameter über die gesamte Studie hinweg nicht verändert werden. Hierzu zählen neben den Frequenzen der Lösungsmittel, welche durch Vorsättigen unterdrückt werden, auch die Empfängerstärke, die Anzahl der Scans, die Menge an aufgenommenen Datenpunkten und die spektrale Breite. Hingegen das Matchen und Tunen des Schwingkreises zwischen Spule (mit Probe) und Kondensator wird für jede Probe individuell durchgeführt. Weiterhin wird der Shim bzw. die Pulslänge automatisch gemessen und eingestellt. Als Referenzsignal, welches auch zur Quantifizierung der Inhaltsstoffe dienen kann, wird deuteriertes Natriumtrisilylpropionate (TSP) bzw. deuterierte 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure (DSS) verwendet.

Als Nachweisexperimente werden häufig TOCSY, *J*-aufgelöste bzw. modifizierte NOESY Experimente aufgenommen. Jedes dieser Experimente beinhaltet einen Sequenzbaustein, welcher die entsprechenden Lösungsmittelsignale entweder durch einfache oder multiple Vorsättigung unterdrückt.

Wie hoch die Reproduzierbarkeit bzw. inwieweit sich die Spektren der einzelnen Rohdrogen unterscheiden, ist in Abbildung 6.3 dargestellt. Mithilfe der Farbgebung werden die Spektren der jeweiligen Rohdroge zugeordnet. Es sind drei Ansätze pro Rohdroge gezeigt, welche jeweils zu unterschiedlichen Zeitpunkten präpariert wur-

den, um subjektive Abweichungen der Präparatoren bei der Mörserung, Extraktion bzw. Messung zu berücksichtigen. Auf den ersten Blick ist zu erkennen, dass sowohl die Häufigkeit, als auch die Intensitäten der NMR Signale in definierten Regionen variieren. Nicht nur der aliphatische bzw. aromatische Bereich, sondern auch zwischen 3–5 ppm, in welchem vermehrt die NMR Signale von Zuckern detektiert werden, können zur Auswertung von chinesischen Heilpflanzen verwendet werden (s. Kapitel 6.2). An dieser Stelle wird auch deutlich, dass Methanol für die Extraktion der Inhaltsstoffe der Rohdrogen nicht immer das Lösungsmittel der Wahl ist. Vor allem in den letzten drei Spektren von *Arisaematis (rhizoma)* (braun) zeigt die geringe Anzahl der NMR Signale bzw. deren Intensitäten, dass durch die Extraktion mit Methanol nur wenig Inhaltsstoffe überführt wurden. Solche Spektren stellen für die anschließende Hauptkomponentenanalyse ein Problem dar, weil diese zu wenige Informationen beinhalten, um mehrere Spektren dieser Art den entsprechenden Rohdrogen zuzuordnen (s. Kapitel 6.2.3).

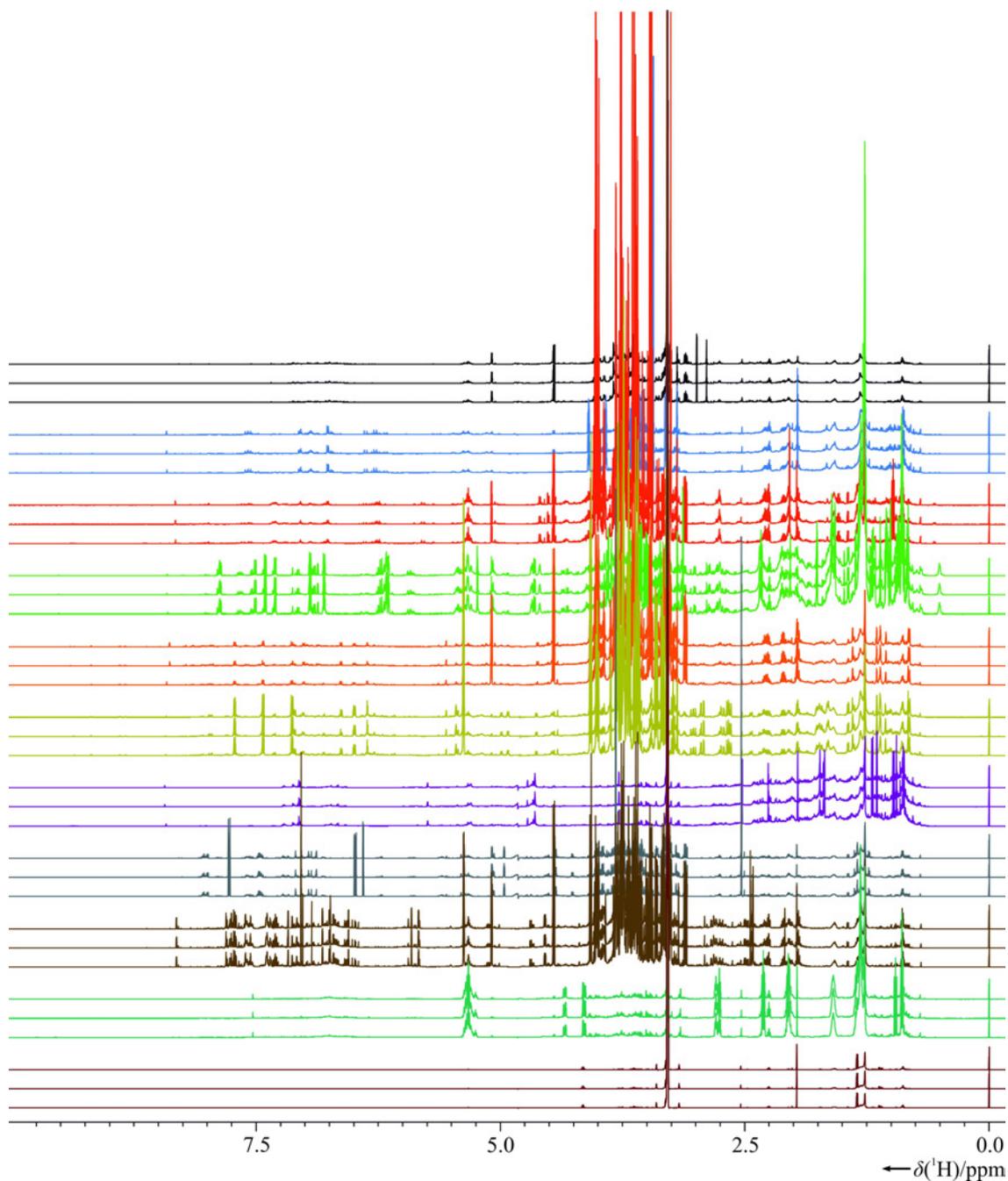


Abbildung 6.3.: Vorgesättigte 1D ^1H NOESY Spektren von elf chinesischen Heilpflanzen. Die einzelnen Rohdrogen werden nach Farben unterschieden: *Clematidis armandii* (caulis) (schwarz), *Artemisiae argyi* (folium) (blau), *Asteris* (radix) (rot), *Aurantii immaturus* (fructus) (grün), *Glycyrrhizae preparata* (radix) (orange), *Glycyrrhizae* (radix) (gelb), *Alpiniae oxyphyllae* (fructus) (lila), *Moutan* (cortex) (grau), *Rhei* (radix et rhizoma) (dunkelbraun), *Rubi* (fructus) (türkis) und *Arisaematis* (rhizoma) (braun).

6.2. Auswertung von metabolischen Daten

6.2.1. Visualisierung der Daten

Allgemein können die Spektren nach drei Aspekten analysiert werden: zum einen werden die Varianzen bzw. Kovarianzen zwischen den Inhaltsstoffen dargestellt, zum anderen charakteristische Signalmuster des untersuchten Organs oder Organismus identifiziert. Hierbei kann nicht nur die Art, sondern auch die Region bzw. Herkunft des Produkts bestimmt werden.^{207,208} Für die Auswertung der Daten werden die Hauptkomponentenanalyse (principle component analysis, PCA), partial least square (PLS) oder independent component analysis (ICA) als statistische Methoden verwendet, um Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede in den NMR Spektren aufzuzeigen.²⁰⁹

In dieser Arbeit wurden die chinesischen Heilpflanzen und deren Granulate sowohl über ihre Varianzen, als auch mit definierten Signalmustern charakterisiert bzw. identifiziert.

6.2.2. Abgleich von Datensätzen

Das Definieren von charakteristischen Signalmustern dient dazu, jede einzelne Rohdroge bzw. dessen Granulat eindeutig zuzuordnen. Die Abbildungen 6.4 und 6.5 zeigen Ausschnitte bestimmter Regionen der gemessenen NOESY Spektren der Rohdrogen bzw. Granulate von Abbildung 6.3. Wie zu erkennen ist, gleichen sich die Spektren einer Gattung. Lediglich die Signalintensitäten variieren teilweise. Dies ist auf die biologische Varianz, d.h. z. B. auf den entsprechenden Entwicklungsstand, auf unterschiedliche Umweltbedingungen während der Anzucht oder auf verschiedene Teilstücke der Rohdroge, zurückzuführen.

Für jede Pflanze konnte ein Pattern erstellt werden, welches sowohl in der Rohdroge, als auch im Granulat zu finden ist. Die Erstellung des Signalmusters erfolgte entweder durch Markierung des Signals selbst oder durch dessen Integralfläche. Diese Integralflächen wurden mit AMIX entweder automatisch oder individuell durch manuelle oder grafische Eingabe der entsprechenden Eckpunkte des Integrals berechnet. Ziel dabei war es, über die gesamte Bandbreite der Spektren, sprich im aromatischen bzw. aliphatischen, aber auch im substanzspezifischen Bereich wie in denen von Zuckern, vergleichbare Signale zu verwenden.

Mit diesen Integral- bzw. Peaklisten wurde eine entsprechende Datenbank für chinesische Pflanzen erstellt, mithilfe derer eine zweite Charge an gemessenen Rohdrogen bzw. Granulaten identifiziert wurde. Damit wurde einerseits die Reproduzierbarkeit der Präparationsmethode kontrolliert und andererseits die erstellten Signalmuster für die Erkennung des entsprechenden TCM Produkts bestätigt. Im folgenden werden die Methoden für die Identifizierung und Charakterisierung der gemessenen Rohdrogen beschrieben.

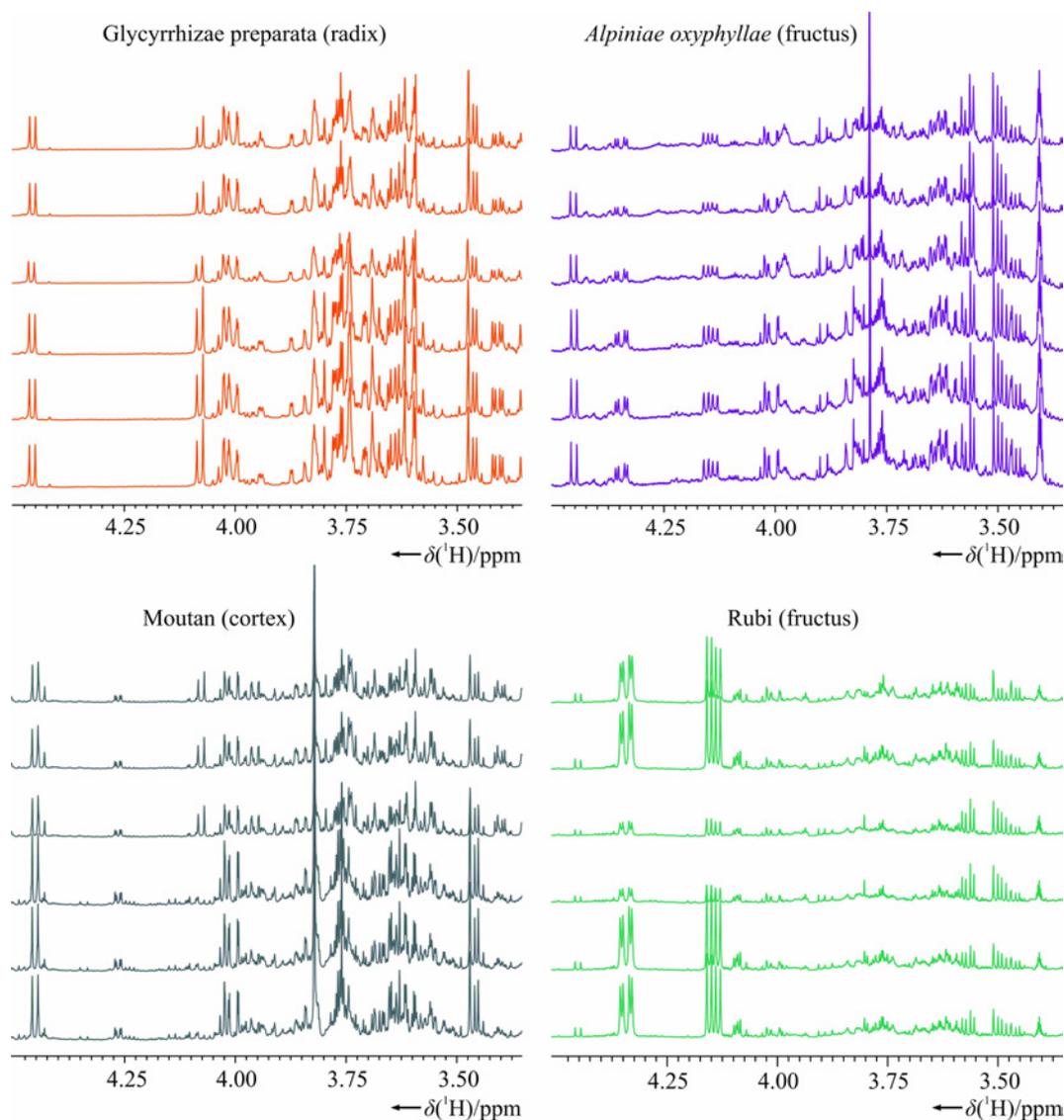


Abbildung 6.4.: Vorgesättigte 1D ¹H NOESY der Rohdrogen Glycyrrhizae preparata (radix), *Alpiniae oxyphyllae* (fructus), Moutan (cortex) und Rubi (fructus). Der Spektrenbereich von 3.35 bis 4.50 wurde vergrößert, um die Reproduzierbarkeit der Metabolomics Studie zu zeigen.

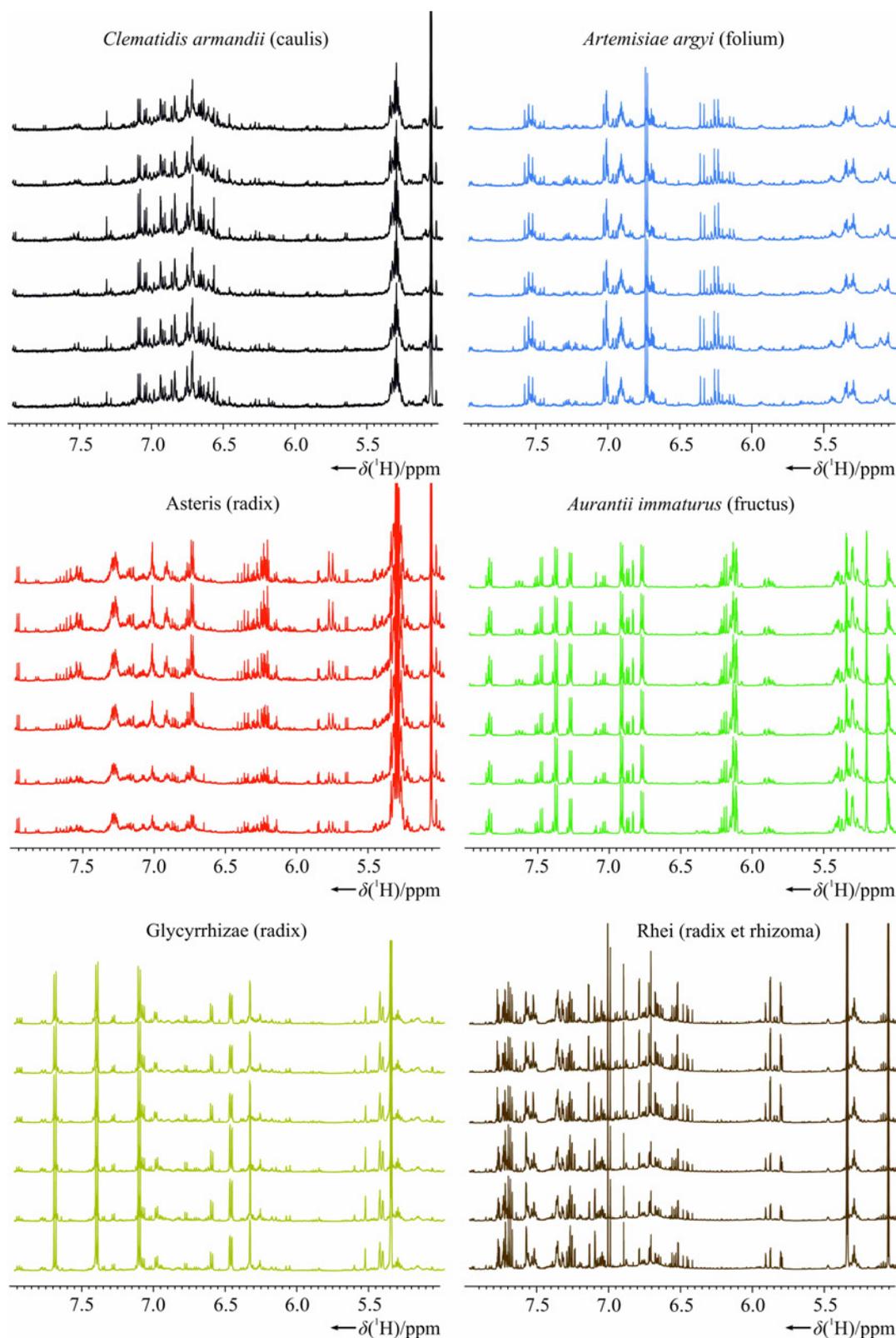


Abbildung 6.5.: Vorgesättigte 1D ^1H NOESY der Rohdrogen *Clematidis arandii* (caulis), *Artemisiae argyi* (folium), *Asteris* (radix), *Aurantii immaturus* (fructus), *Glycyrrhizae* (radix) und *Rhei* (radix et rhizoma). Exemplarisch wird der Bereich zwischen 5 und 8 ppm von sechs Spektren jeder Rohdroge gezeigt. Wie zu erkennen ist, gleichen sich die jeweiligen Spektren in Häufigkeit und Position der NMR Signale. Lediglich die Intensitäten variieren, was auf die biologische Varianz der Rohdrogen zurückzuführen ist.

6.2.3. Hauptkomponentenanalyse

Die Extraktion der Rohdrogen wurde mit Methanol durchgeführt und ohne weitere Aufreinigung für die NMR spektroskopischen Messungen verwendet. Die Spektren enthielten daher meist eine große Menge an Informationen über deren Inhaltsstoffe. Um die einzelnen Rohdrogen zu unterscheiden, wurde die Komplexität des jeweiligen Datensatzes auf definierte Spektrenabschnitte (Buckets) aufgeteilt. In diesen Ausschnitten wertet die PCA die Varianzen aus, mithilfe derer sie eine neue Basis für die Visualisierung normalverteilter Daten kreiert. Mit der Transformation der komplexen Daten in ein neues Koordinationsystem, in welchem die Hauptkomponenten als Achsen dienen, können nun Unterschiede effektiver erkannt werden. Die Grundidee dabei ist, das Gesamtsystem mit möglichst wenig voneinander unabhängigen Linearkombinationen eindeutig und ohne Informationsverlust zu beschreiben. Nach der Berechnung werden verschiedene Datenfelder erhalten, welche sowohl Informationen für die Rohdrogen untereinander wiedergeben, als auch einen Bezug zwischen statistischer Auswertung und gemessenen Spektren herstellen. Neben dem prozentualen Anteil der kumulativen Varianzen in Bezug auf die Gesamtvarianz, Hotelling und Influence Plot werden die einzelnen Hauptkomponenten gegeneinander aufgetragen. Im Influence Plot wird die Distanz der einzelnen Spektren zum Modell gegen die Distanz zum Modellzentrum dargestellt. Die Position der Konfidenzlinie ist dabei von der PC- und Spektrenanzahl und dem eingetragenen Konfidenzlimit abhängig. Der Influence Plot hilft bei der Interpretation der PCA Ergebnisse, da er anzeigt, welche Spektren von der Konfidenzlinie entfernt liegen und damit als Außenseiter angesehen werden können. Beim Hotelling Plot hingegen wird entlang der vertikalen Achse die Distanz der einzelnen Spektren zum Zentrum des Modells und auf der horizontalen Achse die entsprechenden Spektrennummern wiedergegeben.²⁰⁹

In Abbildung 6.6 sind die vorgesättigten NOESY Spektren der elf Rohdrogen *Clematidis armandii* (caulis), *Alpiniae oxyphyllae* (fructus), *Arisaematis* (rhizoma), *Artemisiae argyi* (folium), *Asteris* (radix), *Aurantii immaturus* (fructus), *Glycyrrhizae preparata* (radix), *Glycyrrhizae* (radix), *Moutan* (cortex) und *Rhei* (radix et rhizoma) gegenübergestellt. Für die Untersuchung wurden die jeweiligen Rohdrogen zunächst zerkleinert, in entsprechender Menge eingewogen und die Inhaltsstoffe mit Methanol extrahiert (s. Anhang E.3.1). Mit der Auftragung von PC1 gegen PC2 werden die Datensätze der verwendeten Rohdrogen voneinander separiert bzw. identifi-

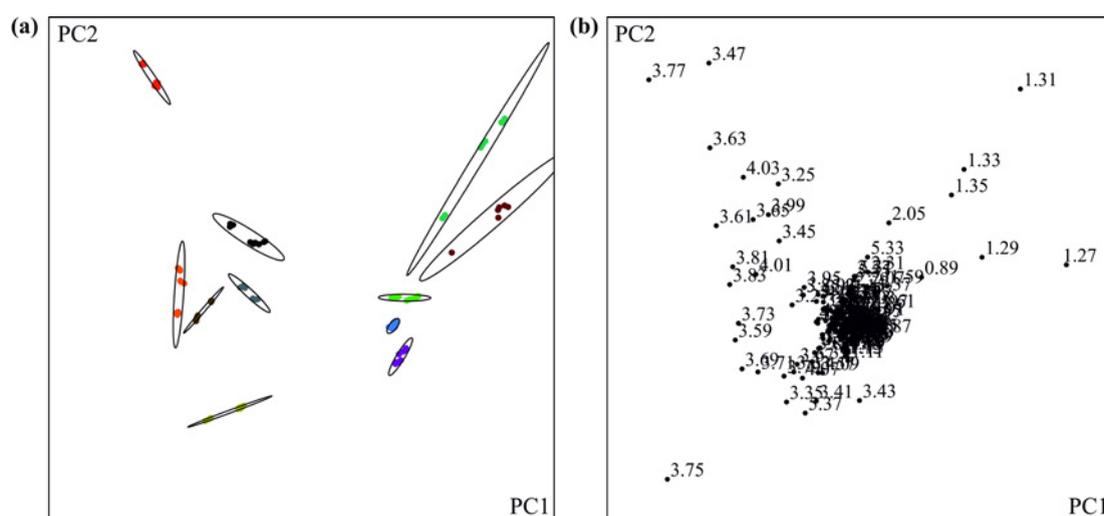


Abbildung 6.6.: Gegenüberstellung von PC1 und PC2 der 1D ¹H NOESY Spektren elf verschiedener Rohdrogen (a) und den verwendeten Loadings plots (b): *Clematidis armandii* (caulis) (schwarz), *Alpiniae oxyphyllae* (fructus) (lila), *Arisaematis* (rhizoma) (hellbraun), *Artemisiae argyi* (folium) (blau), *Asteris* (radix) (rot), *Aurantii immaturus* (fructus) (grün), *Glycyrrhizae preparata* (radix) (orange), *Glycyrrhizae* (radix) (gelb), *Moutan* (cortex) (grau), *Rhei* (radix et rhizoma) (braun) und *Rubi* (fructus) (dunkelgrün). Die jeweiligen Rohdrogen wurden über ein T2-Hotelling mit einem confidence level von 0.9 gruppiert. Die Prozessierungsdaten sind dem Anhang zu entnehmen.

ziert. Es wurden dadurch 69.69% der Gesamtvarianz abgedeckt (PC1: 57.23%, PC2: 12.46%). Die Kombination aus sechs PCs hingegen erreicht 95.18% der Gesamtvarianz.

Zusätzlich wurden die Granulate der Rohdrogen *Clematidis armandii* (caulis), *Glycyrrhizae* (radix), *Glycyrrhizae preparata* (radix), *Rhei* (radix et rhizoma) und *Rubi* (fructus) analysiert (s. Abbildung 6.7). Ziel dabei war es, die Granulate trotz verschiedener Vorbehandlungen den ursprünglichen Rohdrogen zuordnen zu können. Die NMR spektroskopischen Untersuchungen sollten hierbei die biologische Identifizierung der Granulate, welche mit genetischen Markern stattfindet, unterstützen. Die Clusterung der Rohdrogen mit den entsprechenden Granulaten ist in der 3-dimensionalen Darstellung von PC1, PC2 und PC3 aus unterschiedlichen Blickwinkeln dargestellt. Die bisher aufgenommenen Spektren lassen sich also über ihre ersten drei Hauptkomponenten der jeweiligen Gattung zuordnen. Alle Rohdrogen außer *Rubi* (fructus) und deren Granulate gruppieren sich in unmittelbarer Nähe zueinander. Die Datenpunkte von *Rubi* (fructus) hingegen streuen und lassen sich nur in einem weiten T2-Hotelling Bereich clustern.

Hinsichtlich der Vielzahl an chinesischen Heilpflanzen bzw. deren Vorbehandlungen

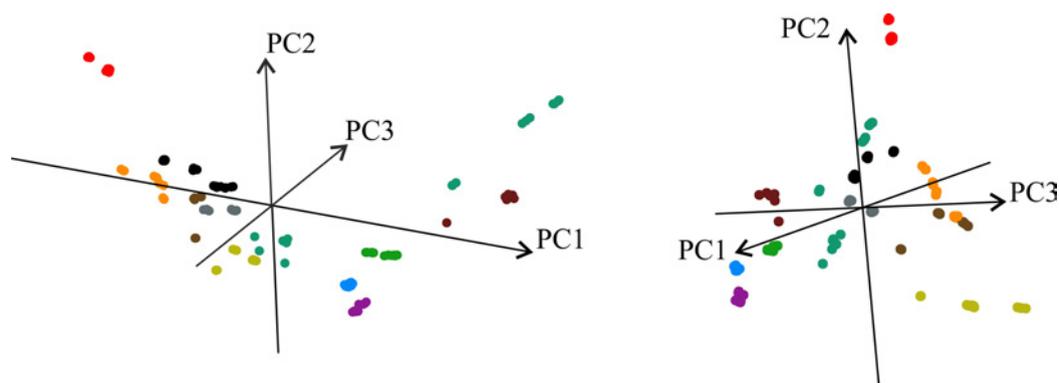


Abbildung 6.7.: Gegenüberstellung von PC1, PC2 und PC3 von elf Rohdrogen und sechs Granulaten: *Clematidis armandii* (caulis) (schwarz), *Alpiniae oxyphyllae* (fructus) (lila), *Arisaematis* (rhizoma) (hellbraun), *Artemisiae argyi* (folium) (blau), *Asteris* (radix) (rot), *Aurantii immaturus* (fructus) (grün), *Glycyrrhizae preparata* (radix) (orange), *Glycyrrhizae* (radix) (gelb), *Moutan* (cortex) (grau), *Rhei* (radix et rhizoma) (braun) und *Rubi* (fructus) (dunkelgrün) bzw. deren Granulate. Durch die 3-dimensionale Darstellung können die Rohdrogen voneinander unterschieden werden.

ist schnell ersichtlich, dass deren Diskriminierung aufgrund der großen Datenmenge mit einer PCA nicht zu realisieren ist. Beispielsweise werden Granulate meist mit Zusätzen wie Maisstärke oder Honig versetzt, welche den jeweiligen Bucket derart verändern, dass eine Clusterung nicht mehr möglich ist. Hier muss die PCA, welche sich allein auf die statistische Berechnung der vorgegebenen Daten beruft, anderen Methoden wie der PLS weichen,^{209,210} bei welcher der Benutzer Rahmenbedingungen definiert, um die Daten dem entsprechenden Modell zuzuordnen. Die Auswertung solcher Methoden ist weitaus komplexer, weil das Ergebnis nicht nur die statistische Berechnung, sondern auch subjektive Einträge des jeweiligen Statistikers enthält. Eine einfache, aber in diesem Fall effektivere Methode ist es, für jede behandelte Pflanze ein spezifisches Signalmuster zu erstellen und die Datensätze mit diesen abzugleichen.

6.2.4. Abgleich von Peaklisten

Bereits bei der Charakterisierung von elf Rohdrogen und sechs Granulaten wurde deutlich, dass trotz steigender Anzahl der Rohdrogen die PCA bzw. PLS eine schnelle und zuverlässige Zuordnung garantieren. Dennoch wurden für die Identifizierung der TCM Produkte entsprechende Peaklisten angefertigt und Referenzmuster erstellt. Die Rohdrogen-Granulat-Liste von *Glycyrrhizae* (radix) wurde so definiert, dass sowohl die mit Honig aufgearbeitete Form *Glycyrrhizae preparata* (radix), als auch deren Granulate zugewiesen werden konnten. In Tabelle 6.1 ist der entsprechen-

de Abgleich der prozentualen Übereinstimmung aufgelistet. Für den Vergleich der Peaklisten wurde ein Toleranzbereich von 0.01 ppm (6 Hz) gewählt, um kleine Variationen in den chemischen Verschiebungen zu kompensieren. Sobald ein Peak des Referenzmusters nicht im Vergleichsspektrum enthalten ist, wird die prozentuale Übereinstimmung auf null gesetzt (wird in den Tabellen nicht aufgeführt).

Tabelle 6.1.: Auflistung der prozentualen Übereinstimmung von Glycyrrhizae (radix), Glycyrrhizae preparata (radix) und deren Granulate. Notation: Rohdroge/Mörserung 1, 2, 3 oder Granulat (g)/Einwaage in μg /Übereinstimmung.

Probe	W*100%	Probe	W*100%
118/1/39998	0.961	119/1/39997	0.968
118/1/40012	0.964	119/1/40007	0.972
118/2/39970	0.973	119/2/39970	0.971
118/2/40002	0.969	119/2/39978	0.971
118/2/40047	0.971	119/2/40005	0.971
118/g/40001	0.966	119/2/40008	0.969
118/g/40030	0.969	119/g/39960	0.968
118/g/40040	0.967	119/g/39989	0.964
119/1/39983	0.971	119/g/40013	0.966
119/1/39996	0.971		

Tabelle 6.2.: Auflistung der prozentualen Übereinstimmung von Rhei (radix et rhizoma). Notation: Rohdroge/Mörserung 1, 2, 3 oder Granulat (g)/Einwaage in μg /Übereinstimmung.

Probe	W*100%	Probe	W*100%
212/1/39960	0.977	212/2/40018	0.972
212/1/39994	0.978	212/2/40020	0.971
212/1/40000	0.978	212/2/40026	0.970
212/1/40001	0.977	212/2/40040	0.970
212/1/40011	0.982	212/g/39977	0.969
212/2/39994	0.973	212/g/40002	0.969
212/2/39998	0.974	212/g/40017	0.975

Die Tabellen 6.2 und 6.3 zeigen die Prozentzahlen für den Abgleich der Peaklisten von Rhei (radix et rhizoma) und *Clematidis armandii* (caulis). Die Wahrscheinlichkeiten erreichen für *Clematidis armandii* (caulis) 89% bzw. für Rhei (radix et rhizoma) ca. 97%, während die artfremden Heilpflanzen jeweils bei 0% liegen.

Die jeweiligen Peaklisten umfassen 158 selektive NMR Signale für *Clematidis armandii* (caulis), 48 für Glycyrrhizae (radix), Glycyrrhizae preparata (radix) und deren

Tabelle 6.3.: Auflistung der prozentualen Übereinstimmung von *Clematidis armandii* (caulis). Notation: Rohdroge/Mörserung 1, 2, 3 oder Granulat (g)/Einwaage in µg/Übereinstimmung.

Probe	W*100%	Probe	W*100%
009/1/39992	0.889	009/3/40016	0.887
009/1/39999	0.882	009/3/39989	0.889
009/1/40003	0.888	009/3/40023	0.890
009/1/40020	0.886	009/3/40037	0.887
009/2/39954	0.877	009/g/39956	0.886
009/2/40034	0.886	009/g/39998	0.893
009/2/40039	0.882	009/g/40014	0.889
009/2/40047	0.888	009/g/40032	0.888

Granulate bzw. 105 NMR Signale für Rhei (radix et rhizoma).

In Abbildung 6.8 sind exemplarisch Spektrenausschnitte gezeigt, welche die gemeinsamen NMR Signale der Rohdrogen Glycyrrhizae (radix), Glycyrrhizae preparata (radix) bzw. *Clematidis armandii* (caulis) und deren Granulate kennzeichnen.

Die untersuchten, chinesischen Heilpflanzen dienten zunächst der Überprüfung, ob eine Diskriminierung selbst von ähnlichen bzw. gleichen, jedoch unterschiedlich behandelten Pflanzen gelingt. Im nächsten Kapitel werden Rohdrogen der Gattung Rheum genauer untersucht.

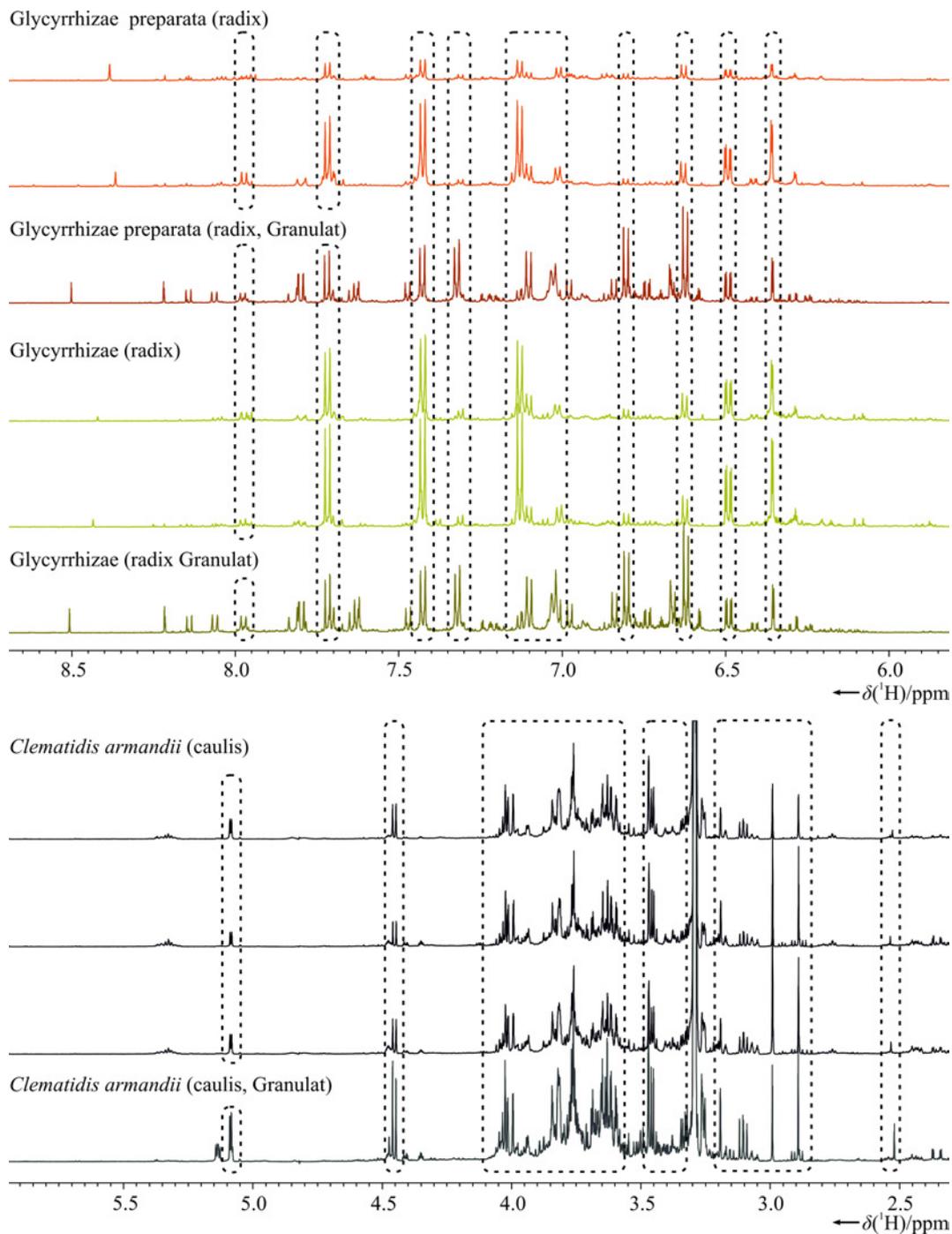


Abbildung 6.8.: Vorgesättigte 1D ^1H NOESY Spektren von Glycyrrhizae (radix), Glycyrrhizae preparata (radix) und *Clematidis armandii* (caulis) und deren Granulaten. Weite Bereiche zeigen trotz Überführung der Rohdroge zum Granulat dasselbe Signalmuster. Die gemeinsamen NMR Signale sind jeweils umrandet.

6.3. Untersuchung der Gattung Rheum

6.3.1. Motivation

Die Wirksamkeit von chinesischen Heilpflanzen der Gattung Rheum variiert nicht nur je nach Anzucht, Erntezeitpunkt oder Verarbeitung, sondern auch welche Art für die medizinische Behandlung eingesetzt wird. Hinsichtlich der etwa 30 verschiedenen Arten der Gattung Rheum bzw. durch deren Bastardisierung ist eine zuverlässige Klassifizierung der jeweiligen Art morphologisch nur schwer möglich. So können sich Inhaltsstoffe in der Pflanze befinden, welche die heilende Wirkung beeinträchtigen bzw. welche sogar für den Patienten schädigend sein können.²¹¹

Die in dieser Arbeit untersuchten Arten sind *Rheum officinale*, *Rheum palmatum*, *Rheum tanguticum*, *Rheum australe* und *Rheum rhabarbarum*, wobei den ersten drei eine höhere Wirksamkeit zugesprochen werden. Diese enthalten größere Mengen an Anthrachinonen, Tanninen und Sennosiden, den aktiven Komponenten für die Behandlung in der TCM.²¹¹

Ziel dieser Arbeit war die verschiedenen Arten miteinander zu vergleichen und diese jeweils voneinander zu unterscheiden.

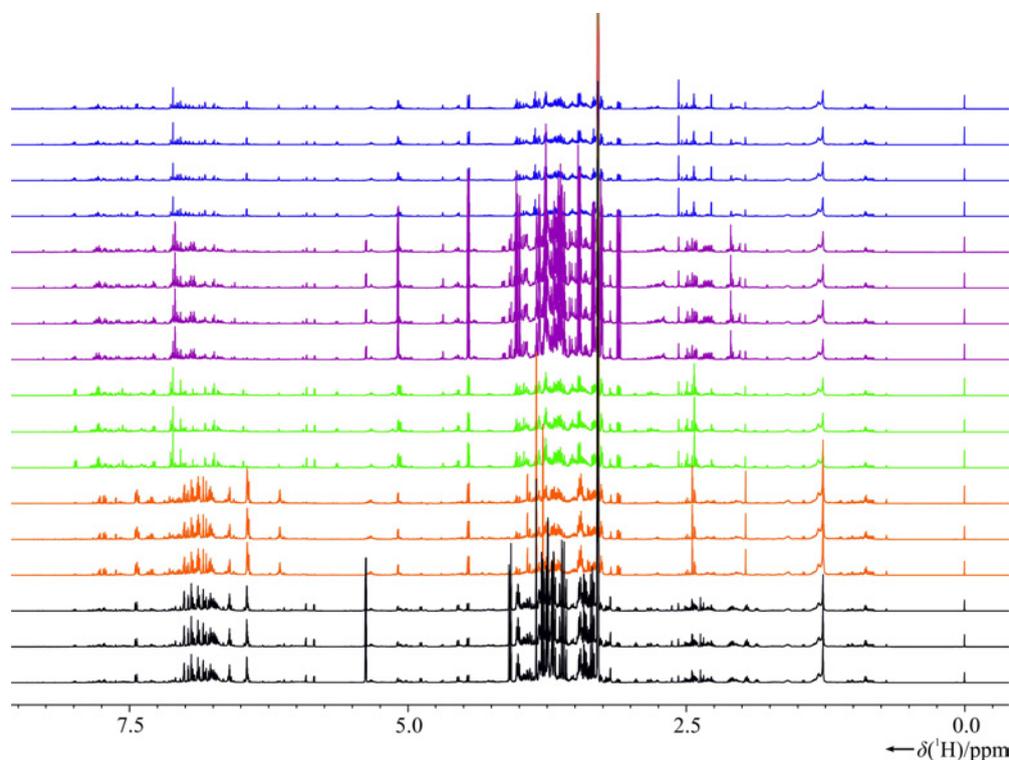


Abbildung 6.9.: 1D ¹H NOESY Spektren der Rohdrogen *Rheum officinale* (blau), *Rheum palmatum* (lila), *Rheum tanguticum* (grün), *Rheum rhabarbarum* (orange) und *Rheum australe* (schwarz).

6.3.2. Unterscheidung der einzelnen Arten

Um die Arten der Gattung *Rheum* zu charakterisieren, wurden die Rohdrogen nach der SOP für chinesische Heilpflanzen vorbereitet. Nachdem 1D ^1H NOESY bzw. JRES Spektren aufgenommen wurden, wurde die Hauptkomponentenanalyse durchgeführt bzw. Peaklisten erstellt. Von den etwa 30 Arten der Gattung *Rheum* wurden sechs NMR spektroskopisch untersucht. Davon stammten die fünf Rohdrogen *Rheum officinale*, *Rheum palmatum*, *Rheum tanguticum*, *Rheum australe* und *Rheum rhabarbarum* aus dem botanischen Garten in Karlsruhe, während Rhei (radix et rhizoma) von der Firma Phytocomm[®] erworben wurde. Da die Firma weder detaillierte Angaben über die Zusammensetzung der Rohdroge noch über deren Vorbehandlung gibt, wurden zuerst die Rohdrogen aus Karlsruhe untersucht. Abbildung 6.9 und die entsprechenden Vergrößerungen in Abbildung 6.11 zeigen die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Untereinander lassen sich die Spektren der Rohdrogen bis auf kleinere Abweichungen, eventuell begründet durch die biologische Varianz der einzelnen Rohdrogen, reproduzieren und können für die Auswertung mithilfe der PCA verwendet werden (s. Abbildung 6.10). Der Ausschnitt zwischen 0.5 und 1.1 ppm bzw. auch Regionen von 2.66 bis 3.28 ppm weisen bei allen fünf Arten ein identisches Peakmuster auf. Charakteristische Signalmuster zwischen *Rheum officinale*, *Rheum palmatum* und *Rheum tanguticum* bzw. zwischen *Rheum rhabarbarum* und *Rheum australe* zeigen sich in den Bereichen 5.3 bis 5.7 und 6.5 bis 7.28 ppm. Von 3.5 bis 3.8 ppm hingegen lassen sich Gemeinsamkeiten zwischen *Rheum officinale*, *Rheum tanguticum* und *Rheum rhabarbarum* erkennen.

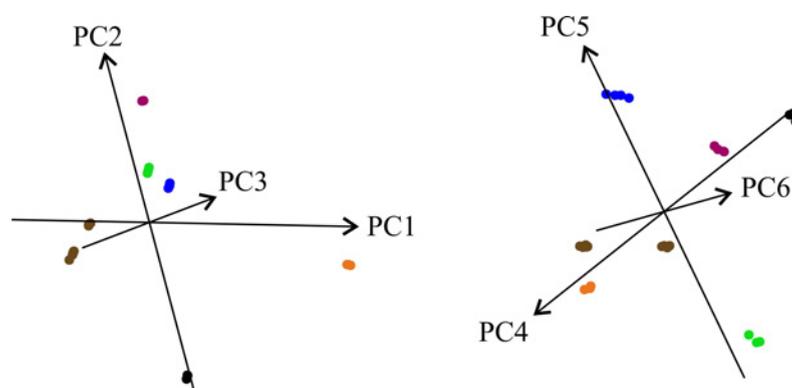


Abbildung 6.10.: Gegenüberstellung von PC1, PC2 und PC3 bzw. PC4, PC5 und PC6 der Rohdrogen *Rheum palmatum* (lila), *Rheum officinale* (blau), *Rheum australe* (schwarz), *Rheum tanguticum* (grün), *Rheum rhabarbarum* (orange) und Rhei (radix et rhizoma) (braun).

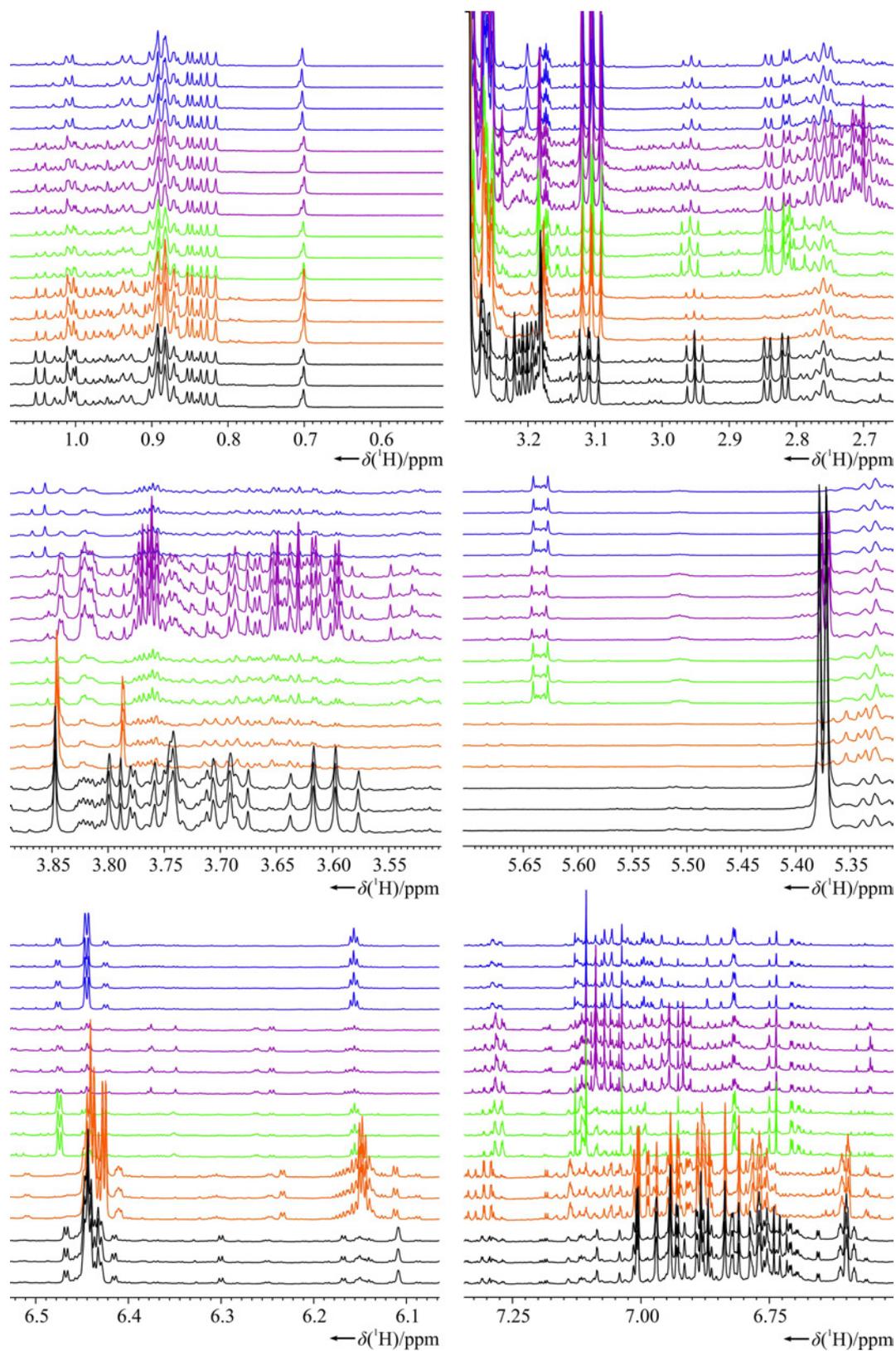


Abbildung 6.11.: Vergrößerung bestimmter Ausschnitte der 1D ^1H NOESY Spektren der Rohdrogen *Rheum officinale* (blau), *Rheum palmatum* (lila), *Rheum tanguticum* (grün), *Rheum rhabarbarum* (orange) und *Rheum australe* (schwarz).

Aufgrund dieser Unterschiede im metabolischen Signalmuster lassen sich bereits Ähnlichkeiten und Unterschiede unter den einzelnen Arten erkennen. Wie bereits bei den Rohdrogen zuvor, konnten auch hier individuelle Peaklisten erstellt und eine PCA durchgeführt werden. Die PCA wurde von allen fünf Arten der Gattung *Rheum* und einer unbekanntem Art der Firma Phytocomm[®] berechnet (s. Abbildung 6.10). Hierfür wurden PC1, PC2 und PC3 bzw. PC4, PC5 und PC6 gegenübergestellt und Abweichungen in den Spektren aufgezeigt, so dass die Arten voneinander unterschieden werden konnten. Bereits mit den ersten drei PCs konnte eine Gesamtvarianz von 94.44% abgedeckt werden.

Zusätzlich wurden spezifische Peakmuster für die Gattung *Rheum* der hier gemessenen Arten erstellt, wobei 168 charakteristische NMR Signale identifiziert wurden. Weiterhin kann für jede gemessene Art eine eigene Signatur an NMR Signalen kreiert werden. Die Tabellen 6.4 und 6.5 zeigen die Ergebnisse der 108 Peaks für *Rheum officinale* bzw. die 241 Peaks für *Rheum tanguticum*, welche für deren Identifizierung herangezogen wurden.

Tabelle 6.4.: Auflistung der prozentualen Übereinstimmung von *Rheum officinale*. Notation: Gattung/Art/Einwaage in µg/Übereinstimmung.

Probe	W*100%
rheum/officinale/40004	0.909
rheum/officinale/40026	0.897
rheum/officinale/40049	0.907
rheum/officinale/40050	0.907
rheum/palmatum/39968	0.000
rheum/palmatum/40018	0.000
rheum/palmatum/40021	0.000
rheum/palmatum/40043	0.000
rheum/rhabarbarum/39950	0.000
rheum/rhabarbarum/39960	0.000
rheum/rhabarbarum/40023	0.000
rheum/australe/39966	0.000
rheum/australe/40005	0.000
rheum/australe/40018	0.000
rheum/tanguticum/39979	0.000
rheum/tanguticum/39988	0.000
rheum/tanguticum/40008	0.000

Tabelle 6.5.: Auflistung der prozentualen Übereinstimmung von *Rheum tanguticum*. Notation: Gattung/Art/Einwaage in µg/Übereinstimmung.

Probe	W*100%
rheum/officinale/40004	0.000
rheum/officinale/40026	0.000
rheum/officinale/40049	0.000
rheum/officinale/40050	0.000
rheum/palmatum/39968	0.000
rheum/palmatum/40018	0.000
rheum/palmatum/40021	0.000
rheum/palmatum/40043	0.000
rheum/rhabarbarum/39950	0.000
rheum/rhabarbarum/39960	0.000
rheum/rhabarbarum/40023	0.000
rheum/australe/39966	0.000
rheum/australe/40005	0.000
rheum/australe/40018	0.000
rheum/tanguticum/39979	0.881
rheum/tanguticum/39988	0.901
rheum/tanguticum/40008	0.879

Allein *Rheum officinale* wird von dem Signalmuster mit ungefähr 90% identifiziert, wohingegen die anderen eine Wahrscheinlichkeit von 0% erhielten. Damit lässt sich *Rheum officinale* eindeutig von den Arten *Rheum tanguticum*, *Rheum rhabarbarum*, *Rheum australe* und *Rheum palmatum* unterscheiden. Ab einem definierten Rauschlevel konnten auch spezifische Peaks in den Spektren von *Rheum tanguticum* gefunden werden. Bei dessen Identifizierung lag die prozentuale Übereinstimmung der Peakliste zwischen 88 und 90%. Dieses Prinzip lässt sich mit weiteren Proben bzw. Spektren durchführen, so dass eine Abgrenzung zwischen den jeweiligen Arten erhalten wird.

6.3.3. Fazit

Die Unterscheidung von chinesischen Heilpflanzen konnte mithilfe NMR spektroskopischer Untersuchungen und mittels PCA durchgeführt werden. Hierbei konnten charakteristische Regionen für die einzelnen Rohdrogen und deren Granulate in den NMR Spektren gefunden werden. Hierbei steht nicht nur die Unterscheidung, sondern auch der Probanddurchsatz der Rohdrogen im Fokus. Während bei biologischen Untersuchungen spezifische Schnittstellen in der DNA individuell für die entsprechenden Marker gefunden werden müssen, verläuft die Probenpräparation bzw. Messung der chinesischen Heilpflanzen, einmal etabliert, in der NMR-Spektroskopie immer gleich. Variationen bzw. Abweichungen von festgelegten SOPs führen in der NMR-Spektroskopie zu Fehlinterpretationen und uneindeutigen Ergebnissen.

Natürlich müssten für die Erstellung eines artspezifischen Musters mehrere hundert NMR Proben vermessen und dementsprechend die Peaklisten immer wieder angeglichen werden. Durch Automatismen und kurze Messzeiten (<10 min pro Probe) könnte dies jedoch zeitnah erfolgen.

Weiterhin lassen sich Variationen über die NMR Spektroskopie leichter verfolgen: Wie verändern sich die Inhaltsstoffe zwischen Behandlungsmethode 1 und 2? Wie muss Pflanze A behandelt werden, damit der Wirkstoff B in einer bestimmten Konzentration vorliegt?

Die Aussagen, welche über NMR spektroskopische Analysen getroffen werden können, sind vielfältig und vor allem lassen sich diese meist ohne weitere Messungen beantworten. STOCYSs z. B. vergleichen die Kovarianzen bzw. Korrelationen von mehreren Spektren und können nicht nur mit spektroskopischen oder spektrometrischen Daten, sondern auch z. B. mit den Retentionszeiten eines HPLC Versuchs in Beziehung gesetzt werden.

Die Zuverlässigkeit der Analyse kann nach belieben verfeinert und verbessert werden, indem entweder neben NOESY und JRES Spektren weitere Experimenttypen wie z. B. TOCSY aufgenommen werden. Für die Rohdroge *Arisaematis* (rhizoma) z. B. konnten nach der Extraktion mit Methanol nur relativ wenige Komponenten für deren Charakterisierung herangezogen werden. Parallele Extraktionen mit Wasser oder anderen Lösungsmitteln würden daher nicht nur gewährleisten, dass immer genügend Substanzen extrahiert werden, sondern auch zusätzliche Signalmuster für die Klassifizierung der Heilpflanzen liefern.

Selbst die Zuordnung der Granulate, welche mit biologischen Markern meist fehl-

schlägt, konnte über NMR spektroskopische Analysen realisiert werden. So konnten 93 selektive NMR Signale für *Clematidis armandii* (caulis), 48 für Glycyrrhizae (radix), Glycyrrhizae preparata (radix) und deren Granulate bzw. 106 NMR Signale für Rhei (radix et rhizoma) identifiziert werden. Mit zunehmenden Behandlungen der Rohdrogen bzw. Granulate nehmen selbstverständlich die verfügbaren Peaks ab, da sich die Signalmuster immer mehr voneinander unterscheiden. Daher scheint die Anzahl von 48 Signalen zunächst gering zu sein, der ppm Toleranzbereich von 0.01 ppm (entsprechen hier etwa 6 Hz) bietet jedoch nur wenig Spielraum für Abweichungen. Außerdem stellt dies nur die Kombination aus den genannten Rohdrogen dar. Einzeln betrachtet, können immer noch für jede Pflanze bzw. Granulat ein separates Peakmuster mit mehreren 100 NMR Signalen erstellt werden.

Dieses Projekt wurde in Kooperation mit Silke Büchler und Thomas Horn durchgeführt. Während Silke Büchler die Reproduzierbarkeit der einzelnen Rohdrogen und deren Granulaten bestätigte, stellte Thomas Horn vom Botanischen Institut II die Rohdrogen zur Verfügung.

Diese Arbeit wurde noch nicht veröffentlicht.

7. Zusammenfassung Teil II

Die Kontrolle der Qualität von pharmazeutischen und lebensmitteltechnischen Produkten ist für wirtschaftliche Interessen von zentraler Bedeutung. Vor allem teure oder schwer zugänglich Produkte werden meist kopiert und als Original verkauft. Neben den ökonomischen Schäden können die gesundheitlichen Folgen bei einer Fälschung oder Falschetikettierung eines medizinischen Produkts verheerend sein, wie es z. B. in Belgien bei der Verwechslung zweier chinesischer Heilpflanzen der Fall war. Da in den letzten Jahren die Suche nach alternativen Behandlungsmethoden von Krankheiten in der westlichen Welt stetig zugenommen hat, wird auch das Verlangen nach einer zuverlässigen Methode zur Kontrolle der aus dem Ausland eingeführten Produkte laut. Häufig gibt es in diesen Ländern keine Standards, um die entsprechenden Produkte ordnungsgemäß zu deklarieren. Daher wurden in dieser Arbeit folgende Aspekte für chinesische Heilpflanzen untersucht:

1. Unterscheidung der Gattung und Art von chinesischen Heilpflanzen
2. Zuordnung der Granulate bzw. der verschieden behandelten Heilpflanzen zur entsprechenden Gattung bzw. Art

Für die Untersuchung wurden zunächst die elf Rohdrogen *Clematidis armandii* (caulis), *Alpiniae oxyphyllae* (fructus), *Arisaematis* (rhizoma), *Artemisiae argyi* (folium), *Asteris* (radix), *Aurantii immaturus* (fructus), *Glycyrrhizae* (radix), *Glycyrrhizae preparata* (radix), *Moutan* (cortex), *Rhei* (radix et rhizoma) und *Rubi* (fructus) entsprechend präpariert. Die chinesischen Heilpflanzen wurden entweder bei der Firma Phytocomm[®] gekauft oder aus dem botanischen Garten des Karlsruher Instituts für

Technologie erhalten. Mit einem definierten SOP, welches sowohl die Probenpräparation, als auch die NMR spektroskopischen Messungen umfasst, konnten die chinesischen Heilpflanzen mithilfe einer PCA voneinander separiert bzw. untereinander gruppiert werden. Die Reproduzierbarkeit der einzelnen Messungen wurde anhand von vorgesättigten NOESY und JRES Spektren für verschiedene Rohdrogen bewiesen. Zusätzlich wurde am Beispiel von *Glycyrrhizae preparata (radix)* gezeigt, dass diese trotz ihrer Vorbehandlung mit Honig der Rohdroge *Glycyrrhizae (radix)* zugeordnet werden konnte.

Hinsichtlich der Anzahl und Vielfalt an unterschiedlichen Behandlungsmethoden wurde dargestellt, dass eine PCA für die Qualitätskontrolle unübersichtlich bzw. nur begrenzt umsetzbar ist. Neben der Integrationsmethode haben sich Peaklisten als zuverlässiges Instrument für den Abgleich von Signalmustern bewährt. Die Peaklisten lassen sich objektiv erstellen, da lediglich das Rauschlevel vom Benutzer definiert wird, welches einmal festgelegt, bis zum Ende der Studie konstant gehalten wird. Dadurch ist eine subjektive Beurteilung zur Identifikation des entsprechenden Produkts nahezu ausgeschlossen. Mithilfe von Peaklisten konnte letztendlich jegliche Rohdroge der entsprechenden Gattung bzw. Art zugeordnet werden, egal ob diese zuvor behandelt wurde oder nicht.

Die Wirksamkeit und die Aufnahme im menschlichen Körper von chinesischen Heilpflanzen unterscheidet sich meist stark. Neben Vorbehandlungen spielt auch die Menge des aktiven Inhaltsstoffs eine entscheidende Rolle. Bei der Gattung *Rheum* wurde festgestellt, dass *Rheum officinale*, *Rheum palmatum* und *Rheum tanguticum* eine höhere Wirksamkeit aufweisen, als ihre Verwandten *Rheum rhabarbarum* und *Rheum australe*. In den Versuchen in dieser Arbeit konnten die einzelnen Arten durch charakteristische Peakmuster sowohl voneinander getrennt, als auch abgrenzend zu den bisher untersuchten Rohdrogen, gruppiert werden.

Anhang

A. Abkürzungen

1D, 2D, 3D	ein-/zwei-/dreidimensional
A	Alignment Tensor
Å	Ångström, 10^{-10}m
AIBN	Azodiisobutyronitril
AHL	<i>N</i> -acyl-L-homoserinlacton
a.u.	arbitrary units
B_0	Stärke des statischen Magnetfelds
ber.	berechnet
BIRD	bilinear rotation decoupling
BMRB	biological magnetic resonance database
C	Kohlenstoff
CHCl_3	Chloroform
CH_2Cl_2	Dichlormethan
CLIP/CLAP	clean inphase/antiphase
cpmg	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
d	Tag
D	dipolare Kopplung
Da	Dalton
DBPO	Dibenzylperoxid
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure
dPAN	deuteriertes PAN

dPS	deuteriertes PS
DS	dummy scans
e ⁻	Elektron
F	Filter
GC/EI-MS	gas chromatography electron impact mass spectrometry
gem.	gemessen
H	Wasserstoffatom
H ₂ O	Wasser
HPLC	high pressure liquid chromatography
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
Hz	Hertz
ICA	independent component analysis
ip/ap	inphase/antiphase
IPC	Isopinocampheol
<i>J</i>	skalare Kopplung
<i>J</i> RES	<i>J</i> -aufgelöste Spektroskopie
kGy	kilogray
m	Meter
M	molar
MA	Methacrylsäure
MACl	Methacryloylchlorid
MD	Moleküldynamik
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
mL	Milliliter
mM	millimolar
MMA	Methylmethacrylat
mmol	millimol
N	Stickstoff
n/χ^2	Qualitätsfaktor
NAD	natural abundance deuterium

NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	nuclear Overhauser effect
NOESY	nuclear Overhauser enhancement spectroscopy
NS	number of scans
O	Sauerstoff
<i>P</i>	probability tensor
PAA	Polyacrylamid
PAN	Polyacrylnitril
PBLG	Poly- γ -benzyl-L-glutamat
PCA	principle component analysis
PCBLL	Poly- ϵ -carbobenzyloxy-L-lysin
PDB	Proteindatenbank
PDMS	Polydimethylsiloxan
P.E. HSQC	primitive exclusive HSQC
PELG	Poly- γ -ethyl-L-glutamat
PEO	Polyethylenoxid
PFG	pulsed field gradient
PLS	partial least square
PMMA	Polymethylmethacrylat
ppm	parts per million
PS	Polystyren
PU	Polyurethan
PVAc	Polyvinylacetat
<i>Q</i>	Cornilescu Faktor
QCOSY	quadrupolare correlation spectroscopy
QUOSY	quadrupole ordered spectroscopy
<i>R</i>	Pearson Korrelationskoeffizient
R1/R2	reziproker Wert der longitudinalen/transversalen Relaxationszeit
RCSA	residual chemical shift anisotropy
RDC	residual dipolar coupling
RF	Radiofrequenz
RG	receiver gain

RMS	root means square
RMSD	root mean square deviation
RQC	residual quadrupolar coupling
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S	Saupe Matrix
S^3CT	spin-state-selective coherence transfer
SAG	strain induced alignment in a gel
SOP	Standard Operationsprotokoll
SVD	single value decomposition
T1/T2	longitudinale/transversale Relaxationszeit
TANGO	testing for adjacent nuclei with a gyration operator
TCA	traditionelle, chinesische Arznei
TCM	traditionelle, chinesische Medizin
TD	time domain
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilan
TSP	Trimethylsilylpropionat
TOCSY	total correlation spectroscopy
UV	ultraviolett
z.B.	zum Beispiel
$^{\circ}C$	Grad Celsius
δ	chemische Verschiebung
$\Delta\nu_Q$	quadrupolare Aufspaltung
μL	Mikroliter
μM	mikromolar
ν	Frequenz

B. Messungen von PEO basierten Polymergelelen

B.1. Synthese von PEOMMA

Die Vernetzung von 30 – 40%igen PEOMMA Polymerstäbchen konnte sowohl mit dem Radikalstarter AIBN, als auch unter Verwendung einer UV-Lampe der Firma Roth (Modell 3, output = 2×8 W, spezifiziert auf $950 \mu\text{Wcm}^{-2}$ bei einer Distanz von 15 cm) realisiert werden. Dazu wurden typischerweise 0.77 g PEO-4 K und 1.53 g PEO-8 K oder jeweils 1.15 g PEO-4K und PEO-8K in 5 mL wasserfreiem Acetonitril und 531.4 μL Et_3N bei Raumtemperatur gelöst. Unter ständigem Rühren wurden 375 μL Methacryloylchlorid über einen Zeitraum von 15 min hinzugetropft. Nach zwei Stunden wurden 145 μL Methanol- d_4 hinzugegeben, um das restliche Methacryloylchlorid zu Methylmethacrylat zu verestern. Nach weiteren drei Stunden rühren, wurde das ausgefallene Ammoniumsalz über einen Spritzenfilter von der Polymerlösung abgetrennt und diese auf zwei bis drei 5 mm NMR Röhren verteilt. Die verwendeten NMR Röhren wurden zuvor mit einer 1:1 Mischung aus $\text{ClSi}(\text{CH}_3)_3$ und $\text{Cl}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ bei Raumtemperatur binnen 24 Stunden silyliert, mit Dichlormethan viermal gewaschen und anschließend bei 50°C getrocknet.

Für die Bestrahlung mit ultraviolettem Licht wurden die NMR Röhren an den Enden jeweils abgeschmolzen und in einem 5 cm Abstand zur UV-Quelle positioniert. Nach drei bis vier Wochen bei $\lambda = 254$ nm oder $\lambda = 366$ nm wurden die NMR Röhren vorsichtig zerbrochen, ohne die Oberfläche der polymerisierten Gele zu beschädigen. Die Polymergele wurden über Dialyse in deionisiertem Wasser von nicht polymerisierten Monomereinheiten bzw. von Acetonitril befreit und bei 30°C getrocknet.

Nach dieser Vorschrift wurden die PEOMMA Gele für die Messungen der anisotropen Parameter und der zeitlichen Verläufe der quadrupolaren Aufspaltungen synthetisiert. Die jeweilige Bestrahlungsdosis bzw. -dauer und das Mischungsverhältnis von PEO-4K und PEO-8K wird bei den entsprechenden Datensätzen angegeben.

B.2. Synthese von vernetztem PEO

Um 30%ige Lösungen herzustellen, wurde die entsprechende Menge an PEO-35k in Wasser bei Raumtemperatur gelöst und in Glasröhren gefüllt, deren Enden zugeschmolzen wurden. Die Proben wurden mit einer ^{60}Co Quelle ca. fünf Tage lang bestrahlt, so dass nach 100 h bei einer Bestrahlung von 1 kGyh^{-1} eine Gesamtbestrahlungsdosis von 100 kGy erfolgte. Anschließend wurden die vernetzten Polymergele bei Raumtemperatur getrocknet und zusätzlich mit 10 MeV Elektronen eines industriellen Elektronenbeschleunigers (Beta-Gamma-Systems in Saal an der Donau, Deutschland) bestrahlt, wobei die Gesamtbestrahlungsdosis bei 160 kGy lag.⁸²

C. Messdaten für Kapitel 3

C.1. Norcampher

Für die Messung der RDCs von Norcampher wurde ein PEOMMA Stäbchen in einer 0.5 M Norcampher/TFE- d_2 Lösung fünf Tage lang gequollen. Das verwendete PEOMMA Polymerstäbchen wurde aus einer Mischung aus PEO-4K und PEO-8K (1:1, w:w) und einer Bestrahlungsdauer von vier Wochen bei 254 nm synthetisiert. Aus den aufgenommenen CLIP-HSQC Spektren konnte mithilfe der RDCs die relativen Winkel zu anderen Orientierungsmedien im 5-dimensionalen Raum bestimmt werden (s. Tabelle C.7). Die Berechnung erfolgte mit dem Programm PALES. Die verwendeten Daten sind unter C.7 aufgelistet.

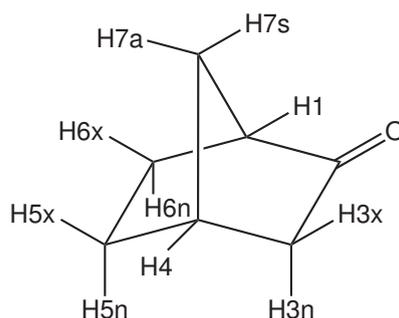


Tabelle C.2.: RDCs von 0.5 M Norcampher in PEOMMA/TFE- d_2 bei einer quadrupolaren Aufspaltung von $\Delta\nu_Q = 7.6$ Hz.

	$\delta(^1\text{H})$ /[ppm]	$\delta(^{13}\text{C})$ /[ppm]	$^1J_{CH}$ /[Hz]	$^1T_{CH}$ /[Hz]	$^1D_{CH}$ /[Hz]
$\text{C}^1\text{-H}^1$	2.08	49.4	150.4 ± 0.2	151.8 ± 0.5	1.4 ± 0.5
$\text{C}^3\text{-H}^{3,exo}$	1.57	44.0	127.5 ± 0.4	133.5 ± 0.7	6.0 ± 0.8
$\text{C}^3\text{-H}^{3,endo}$	1.33		134.1 ± 0.4	139.1 ± 0.7	5.0 ± 0.8
$\text{C}^4\text{-H}^4$	2.16	34.5	146.4 ± 0.2	143.5 ± 0.3	-2.9 ± 0.4
$\text{C}^5\text{-H}^{5,exo}$	1.31	25.6	135.3 ± 0.2	124.8 ± 0.5	-10.5 ± 0.5
$\text{C}^5\text{-H}^{5,endo}$	0.94		133.6 ± 0.2	138.9 ± 0.5	5.3 ± 0.5
$\text{C}^6\text{-H}^{6,exo}$	1.38	22.9	137.8 ± 0.3	135.9 ± 0.5	-1.9 ± 0.6
$\text{C}^6\text{-H}^{6,endo}$	0.95		134.5 ± 0.1	136.0 ± 0.2	1.5 ± 0.2
$\text{C}^7\text{-H}^{7,syn}$	1.27	36.5	134.0 ± 0.1	139.8 ± 0.2	5.8 ± 0.2
$\text{C}^7\text{-H}^{7,anti}$	1.05		138.1 ± 0.1	131.0 ± 0.2	-7.1 ± 0.2

C.2. Menthol

Die RDCs von Menthol wurden für eine 0.3 M Menthol/ CDCl_3 Lösung in einem gequollenen PEOMMA Stäbchen über ein entsprechendes CLIP-HSQC Spektrum aufgenommen. Das PEOMMA Polymer wurde aus einer Mischung aus PEO-4K und PEO-8K (1:2, w:w) und einer Bestrahlungsdauer von drei Wochen bei 366 nm synthetisiert.

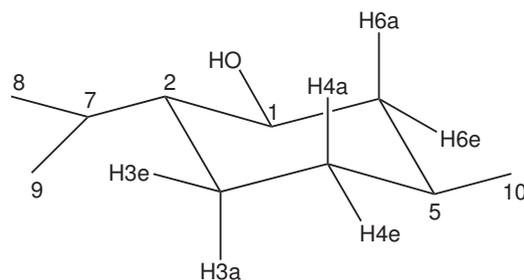


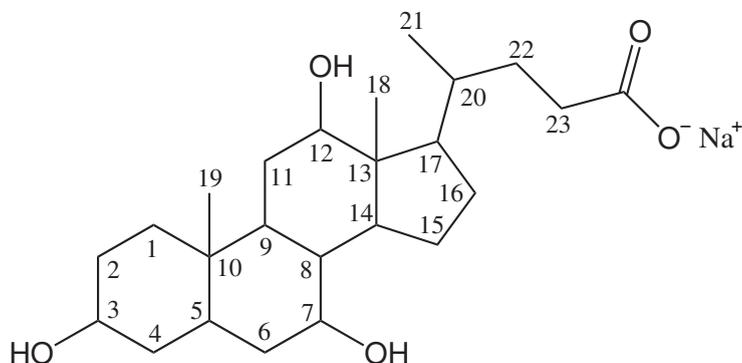
Tabelle C.3.: RDCs von 0.3 M Menthol in PEOMMA/ CDCl_3 bei einer quadrupolaren Aufspaltung von $\Delta\nu_Q = 55$ Hz.

	$\delta(^1\text{H})/[\text{ppm}]$	$\delta(^{13}\text{C})/[\text{ppm}]$	$^1J_{CH}/[\text{Hz}]$	$^1T_{CH}/[\text{Hz}]$	$^1D_{CH}/[\text{Hz}]$
$\text{C}^1\text{-H}^1$	3.39	71.4	138.9 ± 0.1	141.8 ± 0.1	2.9 ± 0.1
$\text{C}^2\text{-H}^2$	1.10	50.0	122.0 ± 0.4	127.4 ± 0.5	5.4 ± 0.6
$\text{C}^3\text{-H}^{3,e}$	1.60	23.0	127.5 ± 1.2	130.0 ± 0.6	2.5 ± 1.3
$\text{C}^3\text{-H}^{3,a}$	0.96		121.0 ± 0.8	130.9 ± 1.0	9.9 ± 1.3
$\text{C}^4\text{-H}^{4,e}$	1.65	34.5	126.4 ± 0.5	130.8 ± 0.1	4.4 ± 0.5
$\text{C}^4\text{-H}^{4,a}$	0.84		118.4 ± 1.2	130.3 ± 0.4	11.9 ± 1.3
$\text{C}^5\text{-H}^5$	1.41	31.6	124.8 ± 0.1	127.5 ± 0.4	2.7 ± 0.4
$\text{C}^6\text{-H}^{6,e}$	1.95	44.9	127.3 ± 0.2	130.4 ± 0.3	3.1 ± 0.4
$\text{C}^6\text{-H}^{6,a}$	0.95		124.0 ± 0.5	125.8 ± 0.7	1.8 ± 0.9
$\text{C}^7\text{-H}^7$	2.17	25.7	126.4 ± 0.2	131.1 ± 0.2	4.7 ± 0.3
$\text{C}^8\text{-H}^8$	0.79	16.0	124.3 ± 0.1	123.5 ± 0.1	-0.8 ± 0.1
$\text{C}^9\text{-H}^9$	0.91	21.0	124.5 ± 0.1	124.1 ± 0.1	-0.4 ± 0.1
$\text{C}^{10}\text{-H}^{10}$	0.89	22.2	124.4 ± 0.1	127.5 ± 0.2	3.1 ± 0.2

*für die RDC Analyse mit PALES wurden die D_{CH} -Kopplungskonstanten der Methylgruppen nach Verdier *et al.*²¹² zu den entsprechenden D_{CC} -Kopplungskonstanten konvertiert.

C.3. Natriumcholat

Für die Messungen der RDCs von Natriumcholat, wurde ein PEOMMA Stäbchen in einer 0.3 M Natriumcholat/ CDCl_3 /MeOD/ D_2O Lösung gequollen und ein entsprechendes CLIP-HSQC Spektrum aufgenommen. Das PEOMMA Polymer wurde aus einer Mischung aus PEO-4K und PEO-8K (1:1, w:w) und einer Bestrahlungsdauer von drei Wochen bei 254 nm synthetisiert.



C.4. *cyclo*(Arg-Nal-Ala-Gly-D-Tyr-Arg)

Für die Messungen der RDCs des Peptids *cyclo*(Arg-Nal-Ala-Gly-D-Tyr-Arg), wurde ein γ -PEO Stäbchen in einer 12.5 mM *cyclo*(Arg-Nal-Ala-Gly-D-Tyr-Arg)/DMSO- d_6 Lösung gequollen und ein entsprechendes CLIP-HSQC Spektrum aufgenommen. Das PEO Polymer wurde nach der Vorschrift B.2 synthetisiert.

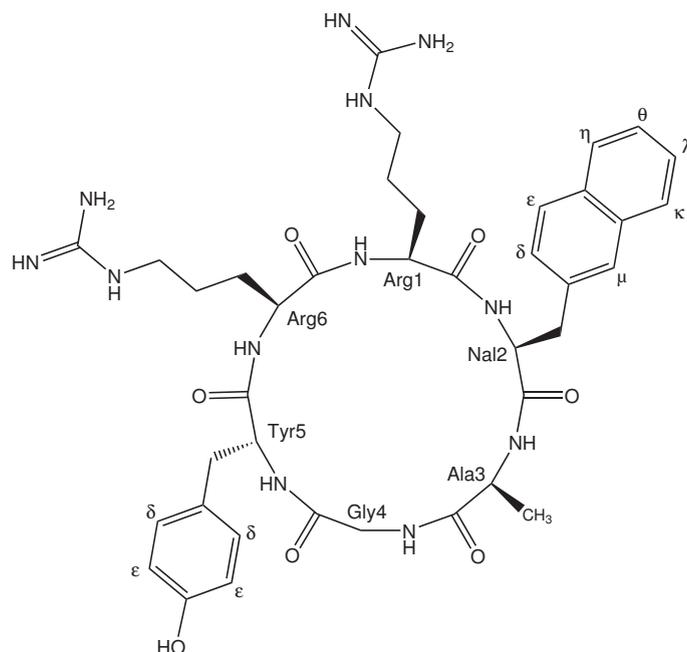


Tabelle C.4.: RDCs von 0.3 M Natriumcholat in PEOMMA/CDCl₃/MeOD/D₂O bei einer quadrupolaren Aufspaltung von $\Delta\nu_Q = 76.3$ Hz (CDCl₃), $\Delta\nu_Q = 45.5$ Hz (D₂O), $\Delta\nu_Q = 3.3$ Hz (MeOD).

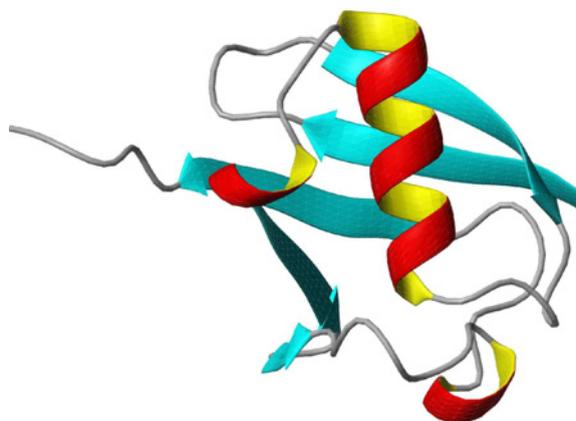
	$\delta(^1\text{H})/[\text{ppm}]$	$\delta(^{13}\text{C})/[\text{ppm}]$	$^1J_{CH}/[\text{Hz}]$	$^1T_{CH}/[\text{Hz}]$	$^1D_{CH}/[\text{Hz}]$
C ¹ _α -H ¹ _α	0.77	37.2	122.8±0.2	116.5±1.0	-6.3±1.0
C ¹ _β -H ¹ _β	1.59		127.7±0.8	128.0±0.2	0.3±0.8
C ² _α -H ² _α	1.20	31.8	125.3±0.4	123.9±2.0	-1.4±2.0
C ² _β -H ² _β	1.41		128.2±0.7	132.1±0.7	3.9±1.0
C ³ -H ³	3.47	73.5	139.5±0.1	131.9±0.1	-7.6±0.1
C ⁴ _α -H ⁴ _α	1.45	41.0	126.9±0.3	125.2±0.4	-1.7±0.5
C ⁴ _β -H ⁴ _β	2.06		128.0±0.3	122.6±0.5	-5.4±0.6
C ⁵ -H ⁵	1.77	43.6	124.8±0.5	133.3±0.5	8.5±0.7
C ⁶ _α -H ⁶ _α	1.84	36.9	125.3±1.2
C ⁶ _β -H ⁶ _β	2.05		124.5±0.6
C ⁷ -H ⁷	3.90	69.7	142.3±0.1	146.3±0.3	4.0±0.3
C ⁸ -H ⁸	1.32	41.6	120.8±0.8	129.7±0.2	8.9±0.8
C ⁹ -H ⁹	2.03	28.5	123.9±1.0	131.8±0.6	7.9±1.2
C ¹¹ _α -H ¹¹ _α	1.36	30.2	121.9±0.5	130.7±0.9	8.8±1.0
C ¹¹ _β -H ¹¹ _β	1.36		128.0±0.5	130.7±0.5	2.7±0.7
C ¹² -H ¹²	4.01	74.7	143.1±0.1	145.1±0.1	2.0±0.1
C ¹⁴ -H ¹⁴	1.17	43.8	124.5±0.1	117.2±0.2	-7.3±0.2
C ¹⁵ _α -H ¹⁵ _α	0.88	24.9	124.8±0.8	134.6±0.2	9.8±0.8
C ¹⁵ _β -H ¹⁵ _β	1.52		130.4±0.8	140.4±0.2	10.0±0.8
C ¹⁶ _α -H ¹⁶ _α	1.11	29.4	127.4±1.8	120.8±2.0	-6.6±2.7
C ¹⁶ _β -H ¹⁶ _β	1.72		131.1±1.2	138.9±2.5	7.8±2.8
C ¹⁷ -H ¹⁷	1.64	48.9	127.5±0.3	134.6±2.0	7.1±2.0
C ¹⁸ -H ¹⁸	0.50	13.8	124.3±0.1	122.4±0.1	-1.9±0.1
C ¹⁹ -H ¹⁹	0.70	23.8	124.0±0.1	121.7±0.2	-2.2±0.2
C ²⁰ -H ²⁰	1.20	38.0	125.4±0.3	131.5±0.5	6.1±0.6
C ²¹ -H ¹²	0.81	18.5	124.0±0.1	121.4±0.1	-2.6±0.1
C ²² _α -H ²² _α	1.12	34.7	127.4±0.9	133.6±0.5	6.2±1.0
C ²² _β -H ²² _β	1.6		127.4±0.9	132.6±0.5	5.2±1.0
C ²³ _α -H ²³ _α	1.32	36.5	127.3±0.4	128.2±0.8	0.9±0.9
C ²³ _β -H ²³ _β	1.74		121.2±0.3	130.8±1.0	9.6±1.0

Tabelle C.5.: RDCs von 12.5 mM *cyclo*(Arg-Nal-Ala-Gly-D-Tyr-Arg) in γ -PEO/DMSO- d_6 . Eine quadrupolare Aufspaltung von DMSO- $_6$ konnte nicht detektiert werden.

	$\delta(^1\text{H})/[\text{ppm}]$	$\delta(^{13}\text{C})/[\text{ppm}]$	$^1J_{CH}/[\text{Hz}]$	$^1T_{CH}/[\text{Hz}]$	$^1D_{CH}/[\text{Hz}]$
Ala ³ -C _{α} H _{α}	4.33	49.6	140.8±0.1	134.0±2.6	-6.8±2.6
Ala ³ -C _{β} H _{β}	1.56	17.5	129.1±0.2	127.5±0.1	-1.6±0.2
Gly ⁴ -C _{α} H _{α}	4.17	43.1	136.5±0.4	150.0±0.8	13.5±0.9
Tyr ⁵ -C _{α} H _{α}	4.57	56.8	142.9±0.2	145.8±1.3	2.9±1.3
Tyr ⁵ -C _{β} H _{β}	3.09	35.9	131.1±0.2	129.6±0.5	-1.4±0.5
Tyr ⁵ -C _{δ} H _{δ}	7.32	130.7	156.5±0.3	154.3±1.0	-2.2±1.0
Tyr ⁵ -C _{ϵ} H _{ϵ}	6.96	115.7	157.7±0.1	155.6±0.1	-2.1±0.1
Arg ⁶ -C _{α} H _{α}	4.30	53.1	138.6±0.1	142.0±0.5	3.4±0.5
Arg ⁶ -C _{δ} H _{δ}	3.28	40.9	134.7±0.7	138.5±0.1	3.8±0.7
Arg ¹ -C _{α} H _{α}	4.65	52.0	139.7±0.1	146.0±1.0	6.3±1.0
Arg ¹ -C _{δ} H _{δ}	3.34	41.2	140.3±2.0	138.9±0.1	-1.4±2.0
Nal ² -C _{α} H _{α}	4.46	58.2	145.5±0.5	149.0±2.2	3.5±2.3
Nal ² -C _{β} H _{β}	3.51	36.6	129.5±0.1	128.8±0.5	-0.7±0.5
Nal ² -C _{δ} H _{δ}	8.12	128.4	159.8±0.3	157.3±0.7	-2.5±0.8
Nal ² -C _{η} H _{η}	8.13	128.2	153.5±0.3	157.4±0.8	3.9±0.9
Nal ² -C _{θ} H _{θ}	7.77	126.2	159.6±0.2	151.7±1.5	-7.9±1.5
Nal ² -C _{λ} H _{λ}	7.79	126.7	159.1±0.6	154.7±0.2	-4.4±0.6
Nal ² -C _{κ} H _{κ}	8.04	128.1	157.4±0.3	157.1±0.2	-0.3±0.4

C.5. Messdaten von Ubiquitin

Für die Messungen der RDCs und RCSAs von ^{15}N markiertem Ubiquitin, wurde ein γ -PEO Stäbchen in einer $250\ \mu\text{M}$ ^{15}N -markierten Ubiquitin $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (90:10) Lösung gequollen und ein entsprechendes ^1H - ^{15}N FAST HSQC Spektrum aufgenommen. Das PEO Polymer wurde nach Vorschrift B.2 synthetisiert.



DATA N	23
DATA RMS	2.052
DATA Chi2	19.085
DATA CORR R	0.992
DATA Q SAUPE	0.093
DATA REGRESSION OFFSET	0.895+/-0.395[Hz]
DATA REGRESSION SLOPE	0.915+/-0.026[Hz]
DATA REGRESSION BAX SLOPE	0.922+/-0.017[Hz]

Abbildung C.1.: Auswertungsdaten nach der Berechnung der anisotropen Parameter von PALES. Neben der Anzahl der verwendeten RDCs N und dem RMS Wert werden die Qualitätsfaktoren χ^2 , R , Q und verschiedene Regressionsdaten ausgegeben.

Das Strukturmodell wurde aus der BMRB unter der Kennung 1D3Z heruntergeladen und die Molekülgruppen mit NMRPipe aus den aufgenommenen Spektren identifiziert.²¹³ Nach der geometrischen Optimierung mit dem MD-Simulationsprogramm COSMOS wurde das Strukturmodell zum Anfitzen der experimentell ermittelten RDCs verwendet. Da die Seitenketten von Ubiquitin nicht dokumentiert waren, wurden nur die RDCs des Rückgrats für die Zurückberechnung mit PALES verwendet. Die experimentellen und zurückberechneten RDCs wurden in einem $D_{CH}^{gem.}$ - $D_{CH}^{ber.}$ -Diagramm gegeneinander aufgetragen. Die Regressionsgerade wurde mit Excel erstellt.

Die RCSAs wurden nach Gleichung 2.8 aus den entsprechenden isotropen und ani-

sotropen Daten erhalten. Als Referenz wurde dabei willkürlich das NMR Signal der Aminosäure Gly76 verwendet.

Tabelle C.6.: RDCs von 250 μM ^{15}N -markiertem Ubiquitin in $\gamma\text{-PEO}/\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ (90:10) bei einer quadrupolaren Aufspaltung von $\Delta\nu_Q = 1.1$ Hz

	$\delta(^1\text{H})/[\text{ppm}]$	$\delta(^{15}\text{N})/[\text{ppm}]$	$^1J_{\text{NH}}/[\text{Hz}]$	$^1T_{\text{NH}}/[\text{Hz}]$	$^1D_{\text{NH}}/[\text{Hz}]$
Ile ³	8.21	115.2	92.6±0.2	105.9±4.3	13.7±4.3
Phe ⁴	8.51	118.5	93.2±0.2	114.2±2.0	15.6±2.0
Thr ⁷	8.65	115.5	93.9±0.2	75.5±3.6	-18.2±3.6
Thr ⁹	7.56	105.9	92.5±0.1	117.2±2.8	20.5±2.8
Gly ¹⁰	7.73	109.2	93.2±0.2	91.4±1.5	-1.3±1.5
Thr ¹²	8.56	120.7	92.4±0.2	81.6±0.2	-8.8±1.0
Glu ¹⁶	8.05	122.5	92.2±0.4	96.6±1.0	5.0±1.1
Val ¹⁷	8.84	117.6	93.6±0.2	86.5±2.1	-7.1±2.1
Ser ²⁰	6.95	103.5	92.1±0.2	75.4±2.0	-16.3±2.0
Asp ²¹	7.96	123.9	93.8±0.2	79.8±2.2	-15.0±2.2
Lys ³³	7.35	115.6	92.6±0.2	102.7±2.4	10.0±2.4
Glu ³⁴	8.64	114.2	90.4±0.1	93.7±3.7	2.1±3.7
Gly ³⁵	8.41	108.9	94.0±0.2	88.6±2.5	-1.4±2.5
Asp ³⁹	8.38	113.5	93.7±0.1	132.2±2.5	22.4±2.5
Gly ⁴⁷	8.08	102.6	93.3±0.1	90.7±1.5	6.3±2.7
Gln ⁴⁹	8.55	122.8	92.8±0.3	84.9±0.8	-7.9±0.9
Arg ⁵⁴	7.38	119.5	92.6±0.3	97.8±1.2	5.2±1.2
Ser ⁵⁷	8.45	113.7	93.3±0.1	120.2±7.0	26.9±5.0
Asn ⁶⁰	7.17	124.6	93.6±0.2	90.8±0.2	20.2±3.0
Thr ⁶⁶	8.66	117.4	91.9±0.2	120.5±7.2	24.7±5.2
Leu ⁷¹	8.07	123.3	93.0±0.2	91.0±0.5	21.1±5.0
Leu ⁷³	8.24	124.4	92.6±0.2	111.4±2.3	24.3±2.3
Arg ⁷⁴	8.35	121.9	92.9±0.2	99.5±0.8	6.6±1.2

C.6. Messdaten der Unterdrückungssequenzen

Diffusion Analysis
D:\mc\dosy\11\pdata\12rr



Fitted function:	$f(x) = A * \exp(-D * x^2 * \gamma^2 * \text{littleDelta}^2 * (\text{bigDelta} - \text{littleDelta}/3)^* 10^4$
used gamma:	26752 rad/(s*Gauss)
used little delta:	0.0028000 s
used big delta:	0.099900 s
used gradient strength:	variable
Random error estimation of data:	RMS per spectrum (or trace/plane)
Systematic error estimation of data:	worst case per peak scenario
Fit parameter Error estimation method:	from fit using arbitray y uncertainties
Confidence level:	95%
Used peaks:	peaks from D:\mc\dosy\10\pdata\1\peaklist.xml
Used integrals:	peak intensities
Used Gradient strength:	all values (including replicates) used

Peak name	F2 [ppm]	I0	error	D [m2/s]	error
1	3.657	3.23e+08	7.535e+05	2.32e-11	4.641e-13
2	2.278	1.41e+06	4129	2.49e-10	1.671e-12
3	2.273	1.53e+06	4252	2.48e-10	1.578e-12
4	2.260	1.26e+06	4104	2.49e-10	1.852e-12
5	2.252	2.15e+06	3614	2.46e-10	9.466e-13
6	2.229	1.98e+06	3232	2.45e-10	9.199e-13
7	2.218	1.11e+06	3601	2.53e-10	1.873e-12
8	2.208	1.18e+06	3652	2.53e-10	1.794e-12
9	2.125	6.78e+05	3868	2.47e-10	3.231e-12
10	2.114	8.51e+05	3467	2.46e-10	2.296e-12
11	2.105	1.04e+06	3331	2.47e-10	1.823e-12
12	2.097	9.61e+05	3437	2.46e-10	2.014e-12
13	2.094	1.03e+06	3369	2.49e-10	1.867e-12
14	2.087	8.16e+05	3673	2.52e-10	2.595e-12
15	2.077	7.50e+05	3856	2.55e-10	2.992e-12
16	1.961	2.06e+06	1827	2.38e-10	4.849e-13
17	1.949	2.63e+06	2754	2.39e-10	5.759e-13
18	1.942	2.57e+06	2504	2.41e-10	5.390e-13
19	1.928	1.33e+06	2354	2.47e-10	1.002e-12
20	1.873	6.98e+05	2329	2.51e-10	1.920e-12
21	1.857	1.74e+06	2333	2.42e-10	7.472e-13
22	1.841	2.05e+06	2170	2.41e-10	5.849e-13
23	1.822	2.27e+06	2265	2.43e-10	5.561e-13
24	1.795	1.49e+06	2497	2.50e-10	9.593e-13
25	1.745	1.20e+06	2747	2.47e-10	1.297e-12
26	1.731	1.16e+06	2620	2.49e-10	1.284e-12
27	1.686	9.69e+05	1916	2.45e-10	1.111e-12
28	1.683	1.05e+06	2089	2.47e-10	1.128e-12

Diffusion Analysis
D:\mcl\dosy\11\pdata\112rr



Peak name	F2 [ppm]	I0	error	D [m2/s]	error
29	1.675	6.00e+05	1926	2.50e-10	1.839e-12
30	1.659	9.21e+05	1615	2.41e-10	9.713e-13
31	1.627	9.19e+05	1760	2.43e-10	1.066e-12
32	1.603	1.31e+06	1611	2.39e-10	6.731e-13
33	1.587	1.64e+06	1762	2.39e-10	5.913e-13
34	1.577	3.03e+06	2442	2.40e-10	4.450e-13
35	1.556	2.77e+06	2837	2.41e-10	5.665e-13
36	1.548	3.05e+06	3352	2.44e-10	6.140e-13
37	1.536	1.13e+06	2544	2.51e-10	1.289e-12
38	1.525	1.97e+06	3985	2.49e-10	1.154e-12
39	1.447	4.39e+05	2212	2.41e-10	2.784e-12
40	1.441	4.93e+05	2120	2.39e-10	2.360e-12
41	1.423	1.70e+06	2112	2.36e-10	6.753e-13
42	1.418	1.52e+06	1802	2.36e-10	6.458e-13
43	1.405	2.38e+06	2422	2.35e-10	5.493e-13
44	1.400	2.68e+06	3190	2.36e-10	6.474e-13
45	1.377	1.97e+06	3752	2.41e-10	1.054e-12
46	1.369	1.30e+06	2171	2.40e-10	9.212e-13
47	1.359	1.21e+06	1921	2.39e-10	8.704e-13
48	1.347	1.67e+06	2354	2.39e-10	7.718e-13
49	1.343	1.70e+06	2694	2.41e-10	8.795e-13
50	1.330	1.49e+06	2588	2.40e-10	9.546e-13
51	1.313	5.84e+05	2285	2.49e-10	2.227e-12
52	1.030	7.16e+06	8529	2.38e-10	6.525e-13
53	1.019	7.39e+06	9431	2.41e-10	7.065e-13
54	0.922	1.60e+07	1.956e+04	2.39e-10	6.708e-13
55	0.717	1.55e+07	1.920e+04	2.42e-10	6.890e-13

Die diffusionsgetriebenen Experimente wurden verwendet, um die NMR Signale von PEOMMA und Natriumcholat zu trennen. Nach den Experimenten, welche mit einer Gradientenstärke von 2% und 98% aufgenommen wurden, wurden die Diffusionskonstanten von PEOMMA mit $D_1 = 2.32 \times 10^{-11}$ und von Natriumcholat mit $D_2 \approx 2.43 \times 10^{-10}$ erhalten. Für die Auswertung wurden alle NMR Signale von Natriumcholat bzw. von PEOMMA verwendet, welche manuell ausgewählt wurden. Weiterhin sind die ermittelten Intensitäten I_0 und die entsprechenden Fehler aufgelistet.

C.7. Messdaten für die Berechnung der Orientierungstensoren

Tabelle C.7.: Anisotrope Parameter für die Darstellung der entsprechenden Orientierungstensoren von Norcampher in PS/Benzol, PS/CDCl₃ und PS/Dioxan bzw. in PVAc/MeOD und PVAc/MeCN.

	Benzol	CDCl ₃	Dioxan	MeOD	MeCN
A_{xx}	$6.45 \cdot 10^{-5}$	$1.13 \cdot 10^{-4}$	$7.96 \cdot 10^{-5}$	$9.83 \cdot 10^{-5}$	$4.92 \cdot 10^{-5}$
A_{yy}	$1.39 \cdot 10^{-4}$	$3.41 \cdot 10^{-4}$	$1.94 \cdot 10^{-4}$	$9.41 \cdot 10^{-4}$	$1.68 \cdot 10^{-4}$
A_{zz}	$-2.04 \cdot 10^{-4}$	$-4.54 \cdot 10^{-4}$	$-2.74 \cdot 10^{-4}$	$-1.04 \cdot 10^{-3}$	$-2.17 \cdot 10^{-4}$
EV A_{xx}	-0.39, 0.68, 0.60	0.73, -0.50, -0.45	-0.54, 0.71, 0.43	0.14, -0.47, 0.86	0.78, 0.61, 0.06
EV A_{yy}	0.66, -0.23, 0.70	0.52, 0.01, 0.84	0.59, -0.35, 0.80	0.19, 0.87, 0.44	-0.61, 0.78, 0.08
EV A_{zz}	0.62, 0.68, -0.36	0.41, 0.86, -0.27	0.59, 0.69, -0.40	0.97, -0.10, -0.21	-0.003, -0.10, 0.99

Tabelle C.8.: Anisotrope Parameter für die Darstellung der entsprechenden Orientierungstensoren von Norcampher in PEO und PEOMMA in verschiedenen Lösungsmitteln.

	MeOD	MeCN	TFE
A_{xx}	$3.84 \cdot 10^{-5}$	$1.00 \cdot 10^{-4}$	$6.25 \cdot 10^{-5}$
A_{yy}	$1.57 \cdot 10^{-4}$	$2.02 \cdot 10^{-4}$	$1.91 \cdot 10^{-4}$
A_{zz}	$-1.95 \cdot 10^{-4}$	$-3.02 \cdot 10^{-4}$	$-2.54 \cdot 10^{-4}$
EV A_{xx}	0.95, -0.20, -0.21	0.92, -0.37, -0.49	0.83, -0.33, -0.43
EV A_{yy}	0.14, -0.29, 0.94	-0.53, -0.26, 0.96	0.33, -0.33, 0.88
EV A_{zz}	0.25, 0.93, 0.25	0.37, 0.89, 0.26	0.43, 0.88, 0.16

Tabelle C.9.: Die relativen Winkel (in °) im 5-dimensionalen Raum der Orientierungstensoren von Norcampher der verschiedenen Polymergele bzw. Lösungsmittel. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm PALES.

		γ -PEO MeCN	MeOD	PEOMMA TFE
γ -PEO	MeCN	—	14.30	15.95
	MeOD	14.30	—	17.37
PS	CDCl ₃	58.77	56.40	47.55
	Dioxan	72.56	71.01	58.39
	Benzol	68.96	68.59	54.48
PVAc	MeOD	128.52	122.82	118.75
	MeCN	118.07	127.27	117.80

D. Messdaten für Kapitel 4

D.1. Experimente für *N*-acyl-*L*-homoserinlactone

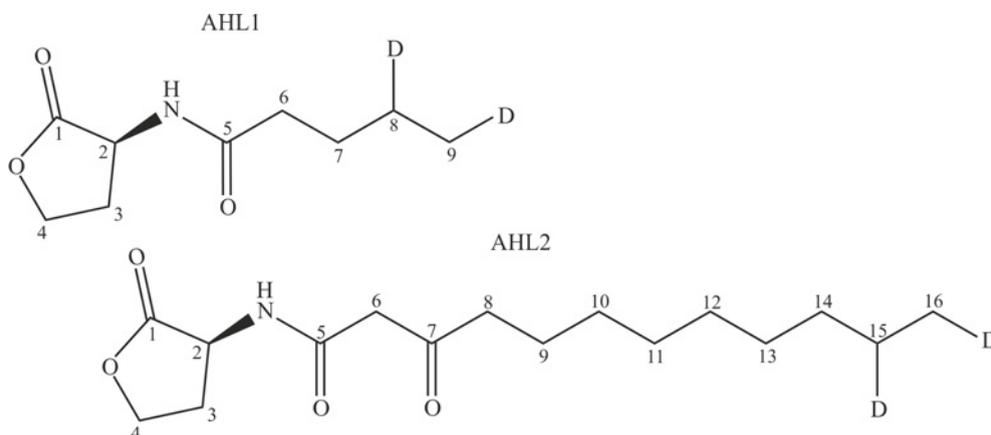


Abbildung D.2.: Strukturen von *N*-(pentanoyl- d_2)-*L*-homoserinlacton (AHL1) und *N*-(3-oxododecanoyl)-*L*-homoserinlacton (AHL2)

Die Zuordnung von AHL1 und AHL2 erfolgte über die jeweiligen HSQC, HMQC bzw. COSY Spektren. Um den Grad der Deuterierung des *N*-(pentanoyl- d_2)-*L*-homoserinlactons zu bestimmen, wurde nach jeder Reaktion eine 90 μ M Probe in CD_2Cl_2 angesetzt und über 1D $^{13}C\{^1H\}$ und 1D $^{13}C\{^1H, ^2H\}$ Spektren bzw. mit 2D $^1H\ ^{13}C$ editierten HSQC Spektren analysiert. Hierbei sollte durch Variation der Randbedingungen eine effektive Synthese gefunden werden, um AHL1 selektiv zu deuterieren. (Synthesebedingungen sind der Veröffentlichung zu entnehmen).¹⁷⁵

Im folgenden werden die NMR Daten der optimierten Synthese aufgelistet. Es wur-

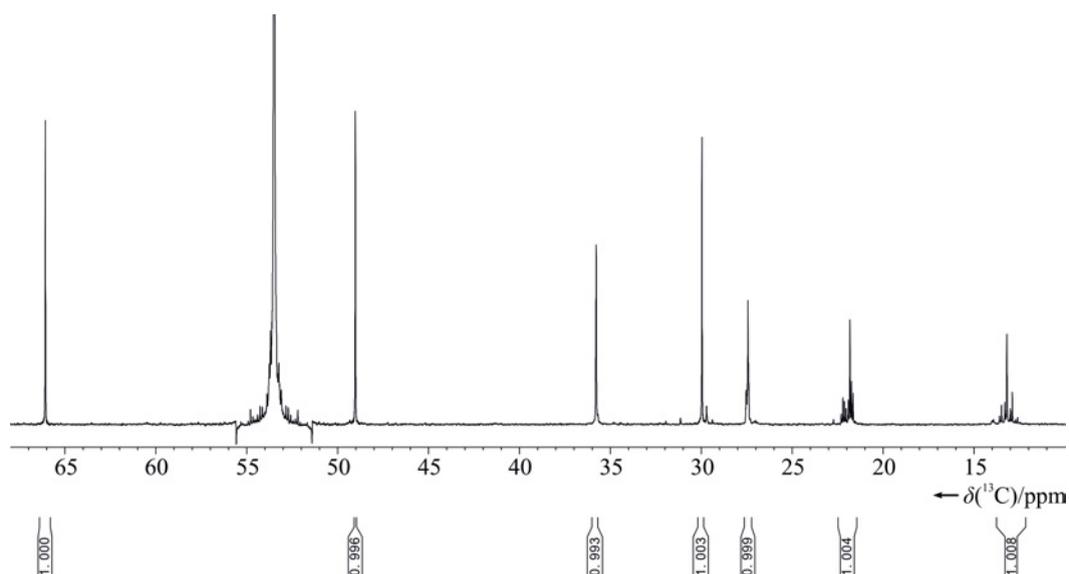


Abbildung D.3.: 1D $^{13}C\{^1H, ^2H\}$ Spektrum von AHL1. Durch lange Verzögerungszeiten zwischen den einzelnen Scans konnten die unterschiedlichen T_1 -Relaxationszeiten der Methyl-, Methylen- und Methingruppen kompensiert werden.

den 8192 Datenpunkte mit einer Akquisitionszeit von 390 ms aufgezeichnet. Die 1D Spektren wurden mit 3072 Scans, 4 Dummy Scans und einer ^1H -WALTZ65 Entkopplungssequenz mit einer RF-Amplitude entsprechend einem 90° Puls von $140\ \mu\text{s}$ während der Akquisition aufgenommen. Für die 1D $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ Spektren wurde zusätzlich eine ^2H -GARP Entkopplungssequenz mit einer RF-Amplitude entsprechend einem 90° Puls von $400\ \mu\text{s}$ angewendet. Um die Integrierbarkeit der unterschiedlich relaxierenden Kohlenstoffatome zu gewährleisten, wurde zwischen den einzelnen Scans eine Refokussierungszeit von 8 s eingestellt. Abbildung D.3 zeigt das 1D ^{13}C Spektrum mit ^1H , ^2H Entkopplung. Beim Vergleich der Integrale ist zu erkennen, dass eine zuverlässige Aussage über den Deuterierungsgrad der einzelnen *N*-(pentanoyl- d_2)-L-homoserinlactone getroffen werden kann. Die basisliniengetrennten NMR Signale wurden manuell integriert. Alle Spektren wurden mit zero filling auf 16384 Punkte prozessiert und mit einer Exponentialfunktion entsprechend einer Linienbreite von 1 Hz apodisiert.

Die 2D editierten HSQC Experimente wurden mit 2048 mal 2048 Datenpunkten, entsprechend einer Akquisitionszeit von 285 ms mal 170 ms, aufgezeichnet. Die Spektren wurden mit 4 Scans, 16 Dummy Scans und einer Relaxationszeit von 2 s detektiert. Eine ^1H -GARP Entkopplungssequenz wurde mit einer RF-Amplitude entsprechend einem 90° Puls von $70\ \mu\text{s}$ während der Akquisition angewendet. Die Spektren wurden mit zero filling von 4096 mal 4096 Punkten prozessiert und mit einer 90° -phasenverschobenen quadratischen Sinusfunktion in der indirekten und mit einer Exponentialfunktion mit zusätzlicher Linienbreite von 1 Hz in der direkten Dimension apodisiert.

Tabelle D.10.: Chemische Verschiebung und ^2H - ^{13}C -Kopplungskonstanten von AHL1.

Gruppe	Umgebung	$\delta(^{13}\text{C})/[\text{ppm}]$	$J_{CD}/[\text{Hz}]$
C^1O		175.52	—
C^2H		48.94	—
C^3H_2		29.84	—
C^4H_2		66.04	—
C^5O		173.48	—
C^6H_2		35.74	—
C^7H_2	$-\text{C}^8\text{H}_2-\text{C}^9\text{H}_3$	27.54	—
	$-\text{C}^8\text{H}_2-\text{C}^9\text{DH}_2$	27.52	—
	$-\text{C}^8\text{H}_2-\text{C}^9\text{D}_2\text{H}$	27.48	—
	$-\text{C}^8\text{H}_2-\text{C}^9\text{D}_3$	27.45	—
	$-\text{C}^8\text{DH}-\text{C}^9\text{H}_3$	27.44	—
	$-\text{C}^8\text{DH}-\text{C}^9\text{DH}_2$	27.41	—
	$-\text{C}^8\text{DH}-\text{C}^9\text{D}_2\text{H}$	27.38	—
	$-\text{C}^8\text{DH}-\text{C}^9\text{D}_3$	27.36	—
C^8H_2	$-\text{C}^9\text{H}_3$	22.27	—
	$-\text{C}^9\text{DH}_2$	22.19	—
	$-\text{C}^9\text{D}_2\text{H}$	22.10	—
	$-\text{C}^9\text{D}_3$	22.01	—
C^8DH	$-\text{C}^9\text{H}_3$	21.88	19.1
	$-\text{C}^9\text{DH}_2$	21.80	19.1
	$-\text{C}^9\text{D}_2\text{H}$	21.71	19.2
	$-\text{C}^9\text{D}_3$	21.62	—
C^9H_3	$-\text{C}^8\text{H}_2$	13.55	—
	$-\text{C}^8\text{DH}$	13.44	—
C^9DH_2	$-\text{C}^8\text{H}_2$	13.26	—
	$-\text{C}^8\text{DH}$	13.15	19.1
$\text{C}^9\text{D}_2\text{H}$	$-\text{C}^8\text{H}_2$	12.96	—
	$-\text{C}^8\text{DH}$	12.85	19.2
C^9D_3	$-\text{C}^8\text{H}_2$	12.67	—
	$-\text{C}^8\text{DH}$	12.55	—

E. Messdaten für Kapitel 4.3

E.1. Spektrometerdaten und Probenpräparation

Die Imaging Experimente wurden an einem Bruker Avance III 600 MHz Spektrometer mit einer ^2H Frequenz von 92.06 MHz durchgeführt. Die Stärke des z-Gradienten betrug 5 Gauss cm^{-1} .

Neben PBLG als Beispiel für flüssigkristalline Phasen wurden die Polymergele PAN, PEOMMA und Gelatine für die Imaging Experimente eingesetzt. Während bei Abbildung 4.9 die Experimente mit PBLG/ CDCl_3 (**a**) und PBLG/ $\text{CD}_2\text{Cl}_2/\text{CDCl}_3$ (**b**) durchgeführt wurden, wurden bei Abbildung 4.8 PAN (250 gL^{-1} bei 360 kGy) bzw. PEOMMA (35%, drei Wochen bei 254 nm) Gele verwendet. Die Polymerstäbchen (Länge $l \approx 10 \text{ mm}$ und Breite $b \approx 3 - 4 \text{ mm}$) wurden entweder mehrere Wochen in DMSO-d_6 (PAN) oder fünf Tage in CDCl_3 (PEOMMA) gequollen. Bei Abbildung 4.10 wurde eine 30%ige Gelatine/ D_2O Probe in einem Silikonschlauch angebracht und bei verschiedenen Orientierungsstärken gemessen.

E.2. Phasenkodierte Experimente

Für die breitbandige Anregung der Abbildungen 4.8, 4.9 und 4.10 wurden $50 - 65 \mu\text{s}$ lange Pulse verwendet. Die maximale Gradientenstärke betrug hierbei $G = 48.17 \text{ G cm}^{-1}$. Das Delay Δ wurde für jedes Experiment über $\Delta = \frac{n_1\pi}{r_z\gamma G}$ berechnet, wobei n_1 die Anzahl der Inkremente und r_z die detektierte, räumliche Breite darstellt.

Die 2D phasenkodierten Experimente wurden wie folgt aufgezeichnet:

Abbildung 4.9 (**a**) wurde mit 1024 mal 256 Datenpunkten entsprechend einer Akquisitionszeit von 0.7 s detektiert. Eine räumliche Breite r_z von 3 cm wurde mit 2 Scans, 8 Dummy Scans und einer Relaxationszeit von 0.1 s aufgezeichnet. Für die Anregung wurde ein $50 \mu\text{s}$ langer Rechteckpuls entsprechend eines 70° Pulses mit einem phasenkodierenden Gradienten von $1454 \mu\text{s}$ verwendet. Das Spektrum wurde mit 4096 mal 256 Punkten per zero filling prozessiert und mit einer Exponentialfunktion mit zusätzlicher Linienbreite von 0.3 Hz in der direkten und einer Sinus Funktion in der indirekten Dimension apodisiert.

Abbildung 4.9 (**b**) wurde mit 3072 mal 128 Datenpunkten entsprechend einer Akquisitionszeit von 0.7 s, einem Scan, 4 Dummy Scans und einer Relaxationszeit von 0.1 s aufgezeichnet. Als räumliche Breite r_z wurden 3 cm eingestellt. Für die Anregung wurde ein $50 \mu\text{s}$ langer Rechteckpuls entsprechend eines 70° Pulses mit einem phasenkodierenden Gradienten von $1454 \mu\text{s}$ verwendet. Das Spektrum wurde mit zero filling von 2048 mal 128 Punkten prozessiert und mit einer Sinus Funktion in der indirekten Dimension bzw. einer Exponentialfunktion mit zusätzlicher Linienbreite von 1 Hz in der direkten apodisiert.

Abbildungen 4.8 und 4.10 wurden mit 4096 Datenpunkten in der direkten und 128 in der indirekten Dimension entsprechend einer Akquisitionszeit von 1.1 s, einem Scan, 4 Dummy Scans und einer Relaxationszeit von 64 ms detektiert. Als räumliche Breite r_z wurden 3 cm eingestellt. Für die Anregung wurde ein 65 μ s langer Rechteckpuls entsprechend eines 90° Pulses mit einem phasenkodierten Gradienten von 500 μ s verwendet. Das Spektrum wurde mit zero filling von 8192 mal 128 Punkten prozessiert und mit einer Exponentialfunktion mit zusätzlicher Linienbreite von 0.3 Hz in der direkten und einer Sinus Funktion in der indirekten Dimension apodisiert. Für die ^2H Imaging Experimente wurden entweder ein Pulsprogramm mit selektiver Anregung oder mit einer Phasenkodierung verwendet.

Pulsprogramm mit selektiver Anregung:

```

;zg mit selektivem Puls
;avance-version (02/05/31)
;mc, bulu
;1D sequence

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>

1 ze
2 30m
d1
5u pl0:f1
50u UNBLKGRAD
5u
20u gron0
p10:sp10:f1 ph1
20u groff
4u BLKGRAD

go=2 ph31
30m mc #0 to 2 F0(zd)
exit

ph1=0 2 2 0 1 3 3 1
ph2=1 3 3 1 2 0 0 2
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1

```

```
;p1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p1 : f1 channel - high power pulse
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;NS: 1 * n, total number of scans: NS * TD0
;$Id: zg,v 1.7 2002/06/12 09:05:19 ber Exp $
```

Phasenkodiertes Pulsprogramm:

```
;2D sequence for z-imaging preserving chemical shift

;using a phase encoding gradient
; mc, mk
; 2H-Version
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"cnst1=50.71736*0.95*0.8914027" ; gradient*integralfactor Gs/cm
"cnst2=41.07" ; gamma2H MTs
"p30=(td1/cnst0) * (1/cnst1) * (1/cnst2) *(2*3.14159265/100)* 0.5 s"
"l1=td1-1"
lgrad r1d = l1

"acqt0= -d21-p30-p1 * 2/3.1416"

1 ze 30m LOCKDEC_ON
30m H2_PULSE
30m H2_LOCK
2 30m H2_LOCK
3 d1 50u H2_PULSE UNBLKGRAD
p1 ph1
p30:gp6*r1d*0.95
5u
d21 BLKGRAD
go=2 ph31
```

```

30m H2_LOCK
d1 wr #0 if #0 zd igrad r1d
lo to 3 times l1
goto 5
4 30m H2_LOCK
d1
5 50u H2_PULSE UNBLKGRAD
p1 ph1
p30:gp6*r1d*0.95
5u
d21 BLKGRAD
go=4 ph31

30m H2_LOCK
d1 wr #0 if #0 zd
30m LOCKDEC_OFF
exit

ph1= 0 2 1 3
ph31=0 2 1 3

;cnst0 : z-Range in cm
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;gpz6: 100% phase encoding gradient
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d21: eddy current delay (Te) [5 ms]
;NS: 1 * n
;DS: 1 * m
;td1: number of experiments
;FnMODE: QF
;use gradient files:
;gpnam6: SMSQ10.32
;$Id: ledbpgp2s,v 1.7 2009/07/02 16:40:45 ber Exp $

```

E.3. Daten für Kapitel 6

Die Daten der Metabolomics Messreihe wurden mit 1D ^1H vorgesättigten NOESY bzw. 2D ^1H J -aufgelösten Spektren erstellt. Für die Visualisierung der Messdaten wurde die Hauptkomponentenanalyse (PCA) verwendet, wobei neben der Gegenüberstellung der verschiedenen PCs auch der Bezug zwischen statistischer Auswer-

tung und gemessenen Spektren hergestellt wurde. Hierbei wurde der prozentuale Anteil der kumulativen Varianzen in Bezug zur Gesamtvarianz, Hotelling und Influence Plot berechnet. Das Konfidenzlevel wurde für die Berechnung der PCA auf 0.90 bzw. auf 0.95 gesetzt. Der zu betrachtende Spektrenbereich wurde von 0 bis 10 ppm begrenzt. Die Bereiche von -0.05 bis 0.05 ppm, 3.27 bis 3.32 ppm und 4.7 bis 4.9 ppm wurden für die Berechnung nicht verwendet. Dabei hatten die Buckets eine Breite von 0.02 ppm, wobei jeweils 500 Buckets erhalten wurden. Die Spalten der Bucket Tabellen wurden nicht bzw. deren Zeilen auf die jeweilige Gesamtintensität skaliert.

Die jeweiligen kumulativen Varianzen werden bis zu einer Gesamtvarianz von 95% für jede PCA einzeln angegeben:

Abbildung 6.6: Für die PCA wurden 125 Spektren vorgegeben und verwendet. Von den 500 erstellten Buckets wurden 155 für die PCA eingesetzt. PC1 57.23; PC2 12.46; PC3 9.08; PC4 7.89; PC5 5.42; PC6 3.11.

Abbildung 6.7: Von den eingegeben 139 Spektren wurden alle verwendet. Aus den 500 Buckets wurden 156 für die PCA selektiert. PC1 58.31; PC2 12.72; PC3 8.35; PC4 5.49; PC5 4.61; PC6 2.95; PC7 2.18; PC8 1.63.

Abbildung 6.10: Alle der 28 Spektren wurden verwendet und 120 der 500 Buckets wurden bei der PCA berücksichtigt. PC1 61.80; PC2 24.15; PC3 8.49; PC4 3.44.

E.3.1. Probenpräparation

Die Rohdrogen bzw. deren Granulate wurden entweder von der Firma Phytocomm[®] oder aus dem botanischen Garten des Karlsruher Instituts für Technologie bereitgestellt. Von der Firma Phytocomm[®] waren die chinesischen Heilpflanzen bzw. deren Granulate bereits getrocknet. Zu den Trocknungsmethoden der Rohdrogen wird von Seiten der Firma keinerlei Angaben gemacht. Die Wurzeln der Gattung Rheum aus dem botanischen Garten hingegen wurden bei 50 °C je nach Menge bis zu zwei Tage in einem Ofen getrocknet.

In dieser Arbeit wurden je nach Vorkommen mindestens zwei verschiedene Stücke einer Rohdroge separat gemörsert und mit Methanol extrahiert. Die Extrakte wurden mindestens zu jeweils drei NMR Proben angesetzt. Dazu wurden 40 ± 0.05 mg des TCM Produkts in einem 1 mL Eppendorf Tube abgewogen und 1 mL Methanol- d_3 zugefügt. Das Tube wurde 1 min lang gevortext, 10 min bei 50 °C erhitzt und 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden 600 μ L in ein 5 mm Standard Duran NMR Röhrchen abgefüllt und gemessen.

E.3.2. Durchführung

Bei der Durchführung der metabolomischen Studie von chinesischen Heilpflanzen wurde ein Bruker Avance III 600 MHz Spektrometer mit einem Cryo-Probenkopf verwendet. Jede Probe wurde nach den gleichen Voraussetzungen via 1D ^1H vorge-sättigtem NOESY bzw. 2D ^1H J -aufgelöstem Experiment gemessen. Das Tunen und Matchen, ebenso wie die Bestimmung des 90° Pulses erfolgte automatisch. Das 1D ^1H vorgesättigte NOESY Experiment wurde jeweils mit 32 Scans, 4 Dummy Scans, 65536 Datenpunkten, einer receiver gain von 90.5, einem Relaxationsdelay von 4 s, einer Mischzeit von 10 ms und einer Vorsättigungssequenz mit einer RF-Amplitude entsprechend einem 90° Puls von 40 ms detektiert. Die beiden SMSQ10.100 Gradienten wurden mit einer Stärke von $G_1 = 50\%$ und $G_2 = -10\%$ verwendet. Die Daten wurden mit 131072 Datenpunkten ohne Apodisierung prozessiert.

Die pseudo 2D ^1H J -aufgelösten Experimente wurden mit einem Scan, 16 Dummy Scans, 8192 Datenpunkten, einer receiver gain von 90.5, einem Relaxationsdelay von 4 s und einer Vorsättigungssequenz mit einer RF-Amplitude entsprechend einem 90° Puls von 40 ms durchgeführt. Die beiden SMSQ10.100 Gradienten wurden mit einer Stärke von jeweils 10% verwendet.

Die einheitliche, automatische Prozessierung wurde durch eine Voreinstellung der Pulsprogramme nach den internen Bruker Richtlinien gewährleistet.²¹⁰

E.3.3. Material

Pipetten	Research [®] Pipette Eppendorf, Discovery autoclavable HTL
Reinstwasseranlage	Millipore
Waagen	Sartorius M2P, Sartorius CP64
Zentrifugen	centrifuge 5418, eppendorf
Heizblock	AccuBlock TM , D1100 und D1200
Vortexer	Genie K-550-GE, Bender und Hobein AG
Mixer	Waring blender
Pipettenspitzen	Finnpipette, Rainin, Sarstedt
Safe-seal Reagiergefäße	1.5 mL, 2 mL, Sarstedt
Standard-NMR-Röhrchen (5 mm)	Economic, Duran [®]
Falcon	Falcon Tubes, 50 mL, 15 mL
Mörser und Pistill	Roth
Duranglasflaschen	100 mL, Roth
Clematidis arandii (caulis)	Phytocomm [®]

Alpiniae oxyphyllae (fructus)	Phytocomm [®]
Arisaematis (rhizoma)	Phytocomm [®]
Artemisiae argyi (folium)	Phytocomm [®]
Asteris (radix)	Phytocomm [®]
Aurantii immaturus (fructus)	Phytocomm [®]
Glycyrrhizae (radix)	Phytocomm [®]
Glycyrrhizae preparata (radix)	Phytocomm [®]
Moutan (cortex)	Phytocomm [®]
Rhei (radix et rhizoma)	Phytocomm [®]
Rubi (fructus)	Phytocomm [®]
Rheum officinale	botanischer Garten Karlsruhe
Rheum palmatum	botanischer Garten Karlsruhe
Rheum tanguticum	botanischer Garten Karlsruhe
Rheum australe	botanischer Garten Karlsruhe
Rheum rhabarbarum	botanischer Garten Karlsruhe
deuteriertes Methanol	eurisotop
TSP	Trimethylsilylpropionat, eurisotop

Tabelle E.12.: Peakliste aus den vorgesättigten 1D ^1H NOESY Spektren von *Clematidis armandii* (caulis) und dessen Granulate.

δ /[ppm]	δ /[ppm]	δ /[ppm]	δ /[ppm]
0.892	3.441	4.017	6.604
1.272	3.452	4.025	6.636
1.437	3.460	4.035	6.669
1.449	3.471	4.048	6.684
1.484	3.491	4.060	6.689
1.496	3.528	4.343	6.693
1.960	3.548	4.349	6.702
2.045	3.592	4.352	6.706
2.054	3.595	4.358	6.747
2.097	3.598	4.402	6.753
2.108	3.602	4.406	6.784
2.127	3.611	4.417	6.871
2.135	3.615	4.447	6.892
2.150	3.619	4.460	6.894
2.152	3.631	4.477	6.940
2.340	3.649	4.481	6.955
2.344	3.665	4.516	6.968
2.370	3.669	4.548	6.971
2.374	3.675	4.572	7.068
2.428	3.687	4.977	7.081
2.453	3.693	4.980	7.112
2.749	3.707	4.982	7.126
2.761	3.712	5.049	7.153
2.773	3.761	5.051	7.157
2.816	3.764	5.083	7.169
2.846	3.770	5.089	7.170
2.876	3.815	5.295	7.173
2.892	3.821	5.299	7.176
2.906	3.831	5.302	7.222
2.918	3.834	5.305	7.236
2.992	3.844	5.316	7.315
3.090	3.878	5.327	7.344
3.103	3.939	5.339	7.541
3.106	3.943	5.351	7.980
3.119	3.976	5.356	7.993
3.193	3.981	5.370	8.069
3.253	3.985	5.672	8.167
3.261	3.994	5.686	8.289
3.265	3.997	6.492	
3.346	4.014	6.598	

Tabelle E.13.: Peakliste aus den vorgesättigten 1D ^1H NOESY Spektren von Glycyrrhizae (radix), Glycyrrhizae preparata (radix) und deren Granulate.

δ /[ppm]	δ /[ppm]	δ /[ppm]	δ /[ppm]
3.398	5.093	6.814	7.670
3.404	5.373	7.022	7.697
3.414	5.379	7.096	7.701
3.421	5.432	7.110	7.785
3.872	5.437	7.123	7.811
4.073	5.454	7.127	7.966
4.087	5.457	7.138	7.981
4.417	6.358	7.419	8.043
4.932	6.362	7.434	8.055
4.983	6.623	7.451	8.070
4.995	6.637	7.464	8.135
5.087	6.800	7.478	8.149

Tabelle E.14.: Peakliste aus den vorgesättigten 1D ^1H NOESY Spektren von Rhei (radix et rhizoma) und deren Granulate.

δ /[ppm]	δ /[ppm]	δ /[ppm]	δ /[ppm]
1.000	2.957	3.996	6.752
1.040	2.964	4.073	6.818
1.044	2.985	4.086	6.822
1.939	2.993	4.450	6.909
1.952	3.093	4.463	6.912
1.964	3.106	4.539	6.928
2.091	3.109	4.552	6.951
2.094	3.122	5.085	6.999
2.255	3.135	5.091	7.038
2.274	3.150	5.371	7.059
2.286	3.255	5.377	7.069
2.298	3.258	5.834	7.129
2.313	3.265	5.838	7.270
2.425	3.310	5.907	7.275
2.466	3.357	5.911	7.287
2.479	3.395	5.940	7.289
2.492	3.402	5.942	7.327
2.506	3.412	6.347	7.716
2.567	3.418	6.450	7.751
2.673	3.443	6.477	7.761
2.747	3.453	6.669	7.765
2.758	3.463	6.685	7.803
2.810	3.471	6.692	7.806
2.819	3.556	6.695	7.992
2.837	3.596	6.705	
2.846	3.763	6.709	
2.954	3.994	6.738	

Tabelle E.15.: Peakliste aus den vorgesättigten 1D ^1H NOESY Spektren von *Rheum officinale*.

δ /[ppm]	δ /[ppm]	δ /[ppm]	δ /[ppm]
1.271	2.846	3.506	7.806
1.437	2.944	3.509	7.832
1.449	2.957	3.519	7.835
1.968	2.969	3.522	7.983
2.078	3.089	3.581	7.985
2.095	3.102	3.591	7.994
2.099	3.105	3.593	7.996
2.274	3.118	3.597	8.005
2.411	3.130	3.601	8.008
2.417	3.167	3.614	8.011
2.431	3.170	3.617	8.013
2.451	3.173	3.629	8.023
2.465	3.176	3.637	8.025
2.474	3.182	3.664	8.061
2.479	3.263	3.668	8.065
2.495	3.265	3.674	8.067
2.505	3.320	4.445	8.077
2.513	3.322	4.458	8.165
2.540	3.329	4.538	8.279
2.568	3.331	4.550	8.281
2.749	3.338	4.685	0.703
2.759	3.344	7.773	0.706
2.774	3.449	7.776	0.816
2.811	3.451	7.780	0.827
2.815	3.459	7.789	0.836
2.820	3.470	7.792	0.847
2.837	3.491	7.801	0.853

Tabelle E.16.: Peakliste aus den vorgesättigten 1D ^1H NOESY Spektren von *Rheum tan-
guticum*.

| δ /[ppm] |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 1.002 | 2.333 | 3.419 | 3.734 | 7.115 | 7.758 |
| 1.010 | 2.346 | 3.435 | 3.740 | 7.127 | 7.760 |
| 1.018 | 2.381 | 3.451 | 3.745 | 7.136 | 7.769 |
| 1.027 | 2.393 | 3.462 | 3.751 | 7.138 | 7.771 |
| 1.040 | 2.406 | 3.470 | 3.756 | 7.184 | 7.775 |
| 1.051 | 2.411 | 3.486 | 3.761 | 7.188 | 7.783 |
| 1.271 | 2.427 | 3.491 | 3.764 | 7.269 | 7.787 |
| 1.314 | 2.447 | 3.501 | 3.768 | 7.271 | 7.796 |
| 1.339 | 2.464 | 3.506 | 3.772 | 7.284 | 7.801 |
| 1.353 | 2.468 | 3.508 | 3.776 | 7.290 | 7.822 |
| 1.364 | 2.477 | 3.513 | 3.785 | 7.293 | 7.826 |
| 1.438 | 2.490 | 3.520 | 6.441 | 7.305 | 7.839 |
| 1.450 | 2.505 | 3.523 | 6.445 | 7.306 | 7.853 |
| 1.771 | 2.542 | 3.527 | 6.449 | 7.354 | 7.977 |
| 1.774 | 2.567 | 3.535 | 6.473 | 7.358 | 7.986 |
| 1.858 | 2.749 | 3.539 | 6.476 | 7.374 | 7.997 |
| 1.870 | 2.761 | 3.547 | 6.513 | 7.377 | 0.701 |
| 1.882 | 2.774 | 3.554 | 6.521 | 7.384 | 0.816 |
| 1.894 | 2.787 | 3.557 | 6.549 | 7.391 | 0.827 |
| 1.906 | 2.804 | 3.592 | 6.552 | 7.397 | 0.836 |
| 1.969 | 2.810 | 3.594 | 6.556 | 7.481 | 0.841 |
| 2.016 | 2.813 | 3.597 | 6.563 | 7.486 | 0.846 |
| 2.027 | 2.819 | 3.601 | 6.576 | 7.534 | 0.853 |
| 2.042 | 2.837 | 3.611 | 6.590 | 7.558 | 0.871 |
| 2.054 | 2.846 | 3.615 | 6.637 | 7.560 | 0.882 |
| 2.065 | 2.947 | 3.617 | 6.669 | 7.594 | 0.892 |
| 2.106 | 2.959 | 3.630 | 6.683 | 7.619 | 0.902 |
| 2.119 | 2.971 | 3.637 | 6.691 | 7.651 | 0.926 |
| 2.133 | 3.090 | 3.642 | 6.694 | 7.664 | 0.931 |
| 2.158 | 3.103 | 3.649 | 6.704 | 7.675 | 0.938 |
| 2.179 | 3.106 | 3.653 | 6.708 | 7.678 | 0.944 |
| 2.190 | 3.118 | 3.657 | 6.736 | 7.688 | 0.953 |
| 2.232 | 3.142 | 3.664 | 6.750 | 7.702 | 0.958 |
| 2.257 | 3.154 | 3.668 | 6.816 | 7.705 | 0.967 |
| 2.273 | 3.157 | 3.675 | 6.820 | 7.707 | 0.976 |
| 2.292 | 3.171 | 3.685 | 6.927 | 7.711 | 0.988 |
| 2.299 | 3.172 | 3.692 | 6.992 | 7.719 | |
| 2.303 | 3.176 | 3.704 | 7.007 | 7.724 | |
| 2.311 | 3.184 | 3.712 | 7.020 | 7.734 | |
| 2.323 | 3.397 | 3.714 | 7.037 | 7.743 | |
| 2.329 | 3.406 | 3.724 | 7.107 | 7.754 | |

Literaturverzeichnis

- [1] G. Englert, A. Saupe, Proton Magnetic Resonance Spectra of Oriented Molecules: Acetylenic Compounds, Acetonitrile and Methanol, *Mol. Cryst.* **1966**, *1*(4), 503–514.
- [2] J. Nehring, A. Saupe, Orientation Studies on Fluorobenzenes in Nematic Liquid Crystals by NMR, *Mol. Cryst.* **1969**, *8*(1), 403–415.
- [3] A. Saupe, The Average Orientation of Solute Molecules in Nematic Liquid Crystals by Proton Magnetic Resonance Measurements and Orientation Dependent Intermolecular Forces, *Mol. Cryst.* **1966**, *1*(4), 527–540.
- [4] J. R. Tolman, H. M. Al-Hashimi, L. E. Kay, J. H. Prestegard, Structural and Dynamic Analysis of Residual Dipolar Coupling Data for Proteins, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*(7), 1416–1424.
- [5] G. Kummerlöwe, B. Crone, M. Kretschmer, S. F. Kirsch, B. Luy, Residual Dipolar Couplings as a Powerful Tool for Constitutional Analysis: The Unexpected Formation of Tricyclic Compounds, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*(11), 2648–2648.
- [6] C. M. Thiele, Residual Dipolar Couplings (RDCs) in Organic Structure Determination, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2008*(34), 5673–5685.
- [7] A. Saupe, Neuere Ergebnisse auf dem Gebiet der flüssigen Kristalle, *Angew. Chem.* **1968**, *80*(3), 99–115.
- [8] F. Kramer, M. Deshmukh, H. Kessler, S. Glaser, Residual dipolar coupling constants: An elementary derivation of key equations, *Concepts Magnetic Res.* **2004**, *21A*(1), 10–21.
- [9] J. Meiler, W. Peti, C. Griesinger, Dipolar Couplings in Multiple Alignments Suggest α -Helical Motion in Ubiquitin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*(27), 8072–8073.
- [10] J.-C. Hus, W. Peti, C. Griesinger, R. Brüschweiler, Self-Consistency Analysis of Dipolar Couplings in Multiple Alignments of Ubiquitin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*(19), 5596–5597.

- [11] E. Englert, A. Saupe, Kernresonanz in kristallinen Flüssigkeiten und in kristallinflüssigen Lösungen, Teil 1, *Z. Naturforsch. A* **1964**, *19a*, 161.
- [12] A. Saupe, G. Englert, High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Orientated Molecules, *Phys. Rev. Lett.* **1963**, *11*, 462–464.
- [13] B. Deloche, E. T. Samulski, Short-range nematic-like orientational order in strained elastomers: a deuterium magnetic resonance study, *Macromolecules* **1981**, *14*(3), 575–581.
- [14] J. C. Freudenberger, P. Spitteller, R. Bauer, H. Kessler, B. Luy, Stretched Poly(dimethylsiloxane) Gels as NMR Alignment Media for Apolar and Weakly Polar Organic Solvents: An Ideal Tool for Measuring RDCs at Low Molecular Concentrations, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*(45), 14690–14691.
- [15] V. T. Rajan, C.-W. Woo, Liquid-crystalline properties and reentrance phenomena in PBLG solutions, *Phys. Rev. A* **1980**, *21*, 990–997.
- [16] W. G. Miller, E. L. Wee, Liquid crystals-isotropic phase equilibria in the system poly(γ -benzyl - α -L-glutamate)-methylformamide, *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*(10), 1446–1452.
- [17] D. J. Amit, *Field Theory: The Renormalization Group and Critical Phenomena*, World Scientific, **1978**.
- [18] G. Kummerlöwe, M. Kiran, B. Luy, Covalently Cross-linked Gelatin Allows Chiral Distinction at Elevated Temperatures and in DMSO, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*(45), 12192–12195.
- [19] S. S. D. Büchler, C. Merle, B. Luy, Gellan Gum Biopolymer Gels for Measurement of Anisotropic NMR Parameters of Large Proteins and for the Distinction of Enantiomers by Partially Oriented NMR Spectroscopy, *in preparation*.
- [20] J. Courtieu, J. Bayle, B. Fung, *Variable Angle Sample Spinning NMR in Liquid Crystals*, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., Pergamon Press Bd. 26, Teil 2, **1994**.
- [21] G. Kummerlöwe, S. L. Grage, C. M. Thiele, I. Kuprov, A. S. Ulrich, B. Luy, Variable angle NMR spectroscopy and its application to the measurement of residual chemical shift anisotropy, *J. Magn. Reson.* **2011**, *209*(1), 19–30.
- [22] C. M. Thiele, Skalierung der Ausrichtung kleiner organischer Moleküle in substituierten Polyglutamaten durch Probenrotation bei unterschiedlichen Winkeln (VASS), *Angew. Chem.* **2005**, *117*(18), 2847–2850.
- [23] R. H. Havlin, G. H. J. Park, T. Mazur, A. Pines, Using Switched Angle Spinning to Simplify NMR Spectra of Strongly Oriented Samples, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*(26), 7998–8006.

- [24] P. Lesot, J. W. Emsley, J. Courtieu, Preliminary communication The magneto-hydrodynamics of a chiral nematic liquid crystal: the existence of two critical speeds revealed by deuterium NMR, *Liq. Cryst.* **1998**, *25*, 123–127.
- [25] J. Courtieu, D. W. Alderman, D. M. Grant, J. P. Bayles, Director dynamics and NMR applications of nematic liquid crystals spinning at various angles from the magnetic field, *J. Chem. Phys.* **1982**, *77*(2), 723–730.
- [26] F. Hallwass, M. Schmidt, H. Sun, A. Mazur, G. Kummerlöwe, B. Luy, A. Navarro-Vázquez, C. Griesinger, U. M. Reinscheid, Residual Chemical Shift Anisotropy (RCSA): A Tool for the Analysis of the Configuration of Small Molecules, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*(40), 9487–9490.
- [27] N. Cramer, S. Helbig, A. Baro, S. Laschat, R. Diestel, F. Sasse, D. Mathieu, C. Richter, G. Kummerlöwe, B. Luy, H. Schwalbe, Synthesis and Biological Properties of Cylindramide Derivatives: Evidence for Calcium-Dependent Cytotoxicity of Tetramic Acid Lactams, *ChemBioChem* **2008**, *9*(15), 2474–2486.
- [28] A. Grishaev, J. Ying, M. Canny, A. Pardi, A. Bax, Solution structure of tRNA-Val from refinement of homology model against residual dipolar coupling and SAXS data, *J. Biomol. NMR* **2008**, *42*, 99–109.
- [29] J. Klages, C. Neubauer, M. Coles, H. Kessler, B. Luy, Structure Refinement of Cyclosporin A in Chloroform by Using RDCs Measured in a Stretched PDMS-Gel, *ChemBioChem* **2005**, *6*(9), 1672–1678.
- [30] J. G. Snijders, C. A. de Lange, E. E. Burnell, Vibration-rotation coupling in anisotropic environments: NMR of methanes in liquid crystals., *J. Chem. Phys.* **1982**, *77*(11), 5386–5395.
- [31] E. Burnell, C. de Lange, Effects of interaction between molecular internal motion and reorientation on NMR of anisotropic liquids, *J. Magn. Reson.* **1980**, *39*(3), 461–480.
- [32] L. C. Snyder, S. Meiboom, NMR of Tetrahedral Molecules in a Nematic Solvent, *J. Chem. Phys.* **1966**, *44*(10), 4057–4058.
- [33] M. Sarfati, P. Lesot, D. Merlet, J. Courtieu, Theoretical and experimental aspects of enantiomeric differentiation using natural abundance multinuclear nmr spectroscopy in chiral polypeptide liquid crystals., *Chem. Commun.* **2000**, 2069–2081.
- [34] P. P. Man, *Quadrupolar Interactions*, John Wiley & Sons, Ltd, **2007**.
- [35] D. Merlet, B. Ancian, J. Courtieu, P. Lesot, Two-Dimensional Deuterium NMR Spectroscopy of Chiral Molecules Oriented in a Polypeptide Liquid Crystal:

- Applications for the Enantiomeric Analysis through Natural Abundance Deuterium NMR, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*(22), 5249–5258.
- [36] P. Lesot, D. Merlet, A. Loewenstein, J. Courtieu, Enantiomeric visualization using proton-decoupled natural abundance deuterium NMR in poly(γ -benzyl-L-glutamate) liquid crystalline solutions, *Tetrahedron-Asymmetr.* **1998**, *9*(11), 1871–1881.
- [37] D. Merlet, W. Smadja, J. Courtieu, P. Lesot, B. Ancian, Analysis of natural abundance deuterium NMR spectra of enantiomers in chiral liquid crystals via 2D auto-correlation experiments, *Chem. Commun.* **1998**, 2301–2302.
- [38] C. Auger, A. Lesage, S. Caldarelli, P. Hodgkinson, L. Emsley, Deuterium-Carbon NMR Correlation Spectroscopy in Oriented Materials, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*(49), 12000–12001.
- [39] M. Jakubcova, A. Meddour, J.-M. Péchiné, A. Baklouti, J. Courtieu, Measurement of the optical purity of fluorinated compounds using proton decoupled ^{19}F NMR spectroscopy in a chiral liquid crystal solvent, *J. Fluorine Chem.* **1997**, *86*(72), 149–153.
- [40] K. Kobzar, H. Kessler, B. Luy, Stretched Gelatin Gels as Chiral Alignment Media for the Discrimination of Enantiomers by NMR Spectroscopy, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*(20), 3145–3147.
- [41] U. Eliav, G. Navon, Collagen Fibers as a Chiral Agent: A Demonstration of Stereochemistry Effects, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*(50), 15956–15957.
- [42] D. Intelmann, G. Kummerlöwe, G. Haseleu, N. Desmer, K. Schulze, R. Fröhlich, O. Frank, B. Luy, T. Hofmann, Structures of Storage-Induced Transformation Products of the Beer's Bitter Principles, Revealed by Sophisticated NMR Spectroscopic and LC-MS Techniques, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*(47), 13047–13058.
- [43] Y. Ishii, M. Markus, R. Tycko, Controlling residual dipolar couplings in high-resolution NMR of proteins by strain induced alignment in a gel, *J. Biomol. NMR* **2001**, *21*, 141–151.
- [44] P. W. Kuchel, B. E. Chapman, N. Müller, W. A. Bubb, D. J. Philp, A. M. Torres, Apparatus for rapid adjustment of the degree of alignment of NMR samples in aqueous media: Verification with residual quadrupolar splittings in ^{23}Na and ^{133}Cs spectra, *J. Magn. Reson.* **2006**, *180*(2), 256–265.
- [45] T. Cierpicki, J. H. Bushweller, Charged Gels as Orienting Media for Measurement of Residual Dipolar Couplings in Soluble and Integral Membrane Proteins, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*(49), 16259–16266.

- [46] G. Kummerlöwe, E. F. McCord, S. F. Cheatham, S. Niss, R. W. Schnell, B. Luy, Tunable Alignment for all Polymer Gel/Solvent Combinations for the Measurement of Anisotropic NMR Parameters Using a Perfluorinated Elastomer Tube, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7087–7089.
- [47] C. Naumann, W. A. Bubb, B. E. Chapman, P. W. Kuchel, Tunable-Alignment Chiral System Based on Gelatin for NMR Spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*(17), 5340–5341.
- [48] C. Gayathri, N. Tsarevsky, R. Gil, Residual Dipolar Couplings (RDCs) Analysis of Small Molecules Made Easy: Fast and Tuneable Alignment by Reversible Compression/Relaxation of Reusable PMMA Gels, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*(12), 3622–3626.
- [49] P. Nolis, J. F. Espinosa, T. Parella, Optimum spin-state selection for all multiplicities in the acquisition dimension of the HSQC experiment, *J. Magn. Reson.* **2006**, *180*(1), 39–50.
- [50] A. Enthart, J. C. Freudenberger, J. Furrer, H. Kessler, B. Luy, The CLIP/CLAP-HSQC: Pure absorptive spectra for the measurement of one-bond couplings, *J. Magn. Reson.* **2008**, *192*(2), 314–322.
- [51] P. Tzvetkova, S. Simova, B. Luy, P.E.HSQC: A simple experiment for simultaneous and sign-sensitive measurement of ($^1J_{CH} + D_{CH}$) and ($^2J_{HH} + D_{HH}$) couplings, *J. Magn. Reson.* **2007**, *186*(2), 193–200.
- [52] S. Mori, C. Abeygunawardana, M. Johnson, P. Vanzijl, Improved Sensitivity of HSQC Spectra of Exchanging Protons at Short Interscan Delays Using a New Fast HSQC (FHSQC) Detection Scheme That Avoids Water Saturation, *J. Magn. Reson.* **1995**, *108*(1), 94–98.
- [53] *Mestrelab*[®] program, von Mestrelab Research S.L., www.mestrec.com.
- [54] M. Zweckstetter, A. Bax, Prediction of Sterically Induced Alignment in a Dilute Liquid Crystalline Phase: Aid to Protein Structure Determination by NMR, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*(15), 3791–3792.
- [55] D. Uhrin, T. Liptaj, K. Kover, Modified BIRD Pulses and Design of Heteronuclear Pulse Sequences, *J. Magn. Reson. A* **1993**, *101*(1), 41–46.
- [56] J. Garbow, D. Weitekamp, A. Pines, Bilinear rotation decoupling of homonuclear scalar interactions, *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *93*(5), 504–509.
- [57] M. D. Sørensen, A. Meissner, O. W. Sørensen, ^{13}C Natural Abundance S³E and S³CT Experiments for Measurement of J -Coupling Constants between $^{13}\text{C}_\alpha$ or $^1\text{H}_\alpha$ and Other Protons in a Protein, *J. Magn. Reson.* **1999**, *137*(1), 237–242.

- [58] M. H. Lerche, A. Meissner, F. M. Poulsen, O. W. Sørensen, Pulse Sequences for Measurement of One-Bond ^{15}N - ^1H Coupling Constants in the Protein Backbone, *J. Magn. Reson.* **1999**, *140*(1), 259–263.
- [59] G. Kummerlöwe, S. Knör, A. O. Frank, T. Paululat, H. Kessler, B. Luy, Deuterated Polymer Gels for Measuring Anisotropic NMR Parameters with Strongly Reduced Artifacts, *Chem. Commun.* **2008**, 5722–5724.
- [60] B. Bendiak, Sensitive Through-Space Dipolar Correlations between Nuclei of Small Organic Molecules by Partial Alignment in a Deuterated Liquid Solvent, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*(50), 14862–14863.
- [61] G. Kummerlöwe, M. Behl, A. Lendlein, B. Luy, Artefact-Free Measurement of Residual Dipolar Couplings in DMSO by the Use of Cross-Linked Perdeuterated Poly(acrylonitrile) as Alignment Medium, *Chem. Commun.* **2010**, 8273–8275.
- [62] M. Kato, T. Uno, M. Kobayashi, N. Osuga, Verfahren zur Herstellung von deuterierter Acryl- oder Methacrylsäure, Aktenzeichen DE3689206T2, **1994**.
- [63] B. Luy, K. Kobzar, S. Knör, J. Furrer, D. Heckmann, H. Kessler, Orientational Properties of Stretched Polystyrene Gels in Organic Solvents and the Suppression of Their Residual ^1H NMR Signals, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*(17), 6459–6465.
- [64] M. Rückert, G. Otting, Alignment of Biological Macromolecules in Novel Nonionic Liquid Crystalline Media for NMR Experiments, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*(32), 7793–7797.
- [65] S. M. Douglas, J. J. Chou, W. M. Shih, DNA-nanotube-induced alignment of membrane proteins for NMR structure determination, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*(16), 6644–6648.
- [66] A. Marx, C. Thiele, Orientational Properties of Poly- γ -benzyl-L-glutamate: Influence of Molecular Weight and Solvent on Order Parameters of the Solute, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*(1), 254–260.
- [67] N. Tjandra, A. Bax, Direct Measurement of Distances and Angles in Biomolecules by NMR in a Dilute Liquid Crystalline Medium, *Science* **1997**, *278*, 1111–1114.
- [68] G. M. Clore, M. R. Starich, A. M. Gronenborn, Measurement of Residual Dipolar Couplings of Macromolecules Aligned in the Nematic Phase of a Colloidal Suspension of Rod-Shaped Viruses, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*(40), 10571–10572.

- [69] M. R. Hansen, L. Mueller, A. Pardi, Tunable alignment of macromolecules by filamentous phage yields dipolar coupling interactions., *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*(12), 1065.
- [70] P. Haberz, J. Farjon, C. Griesinger, A DMSO-Compatible Orienting Medium: Towards the Investigation of the Stereochemistry of Natural Products, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*(41), 7730–7730.
- [71] G. Kummerlöwe, J. Auernheimer, A. Lendlein, B. Luy, Stretched Poly(acrylonitrile) as a Scalable Alignment Medium for DMSO, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*(19), 6080–6081.
- [72] A. Marx, B. Böttcher, C. Thiele, Enhancing the Orienting Properties of Poly(γ -benzyl-L-glutamate) by means of Additives, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*(5), 1656–1663.
- [73] T. Montag, C. M. Thiele, Cross-Linked Helically Chiral Poly-(γ -benzyl-L-glutamate) as Enantiodiscriminating Alignment Medium, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*(7), 2271–2274.
- [74] N.-C. Meyer, A. Krupp, V. Schmidts, C. M. Thiele, M. Reggelin, Polyacetylenes as Enantiodifferentiating Alignment Media, *Angew. Chem.* **2012**, *124*(33), 8459–8463.
- [75] M. Dama, S. Berger, Polyacetylenes as a new alignment medium to measure residual dipolar couplings for chiral organic molecules, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*(47), 6439–6442.
- [76] P. Kaden, J. C. Freudenberger, B. Luy, Noncovalently and covalently cross-linked polyurethane gels as alignment media and the suppression of residual polymer signals using diffusion-filtered spectroscopy, *Magn. Reson. Chem.* **2012**, *50*, S22–S28.
- [77] J. C. Freudenberger, S. Knör, K. Kobzar, D. Heckmann, T. Paululat, H. Kessler, B. Luy, Stretched Poly(vinyl acetate) Gels as NMR Alignment Media for the Measurement of Residual Dipolar Couplings in Polar Organic Solvents, *Angew. Chem.* **2005**, *117*(3), 427–430.
- [78] R. R. Gil, C. Gayathri, N. V. Tsarevsky, K. Matyjaszewski, Stretched Poly(methyl methacrylate) Gel Aligns Small Organic Molecules in Chloroform. Stereochemical Analysis and Diastereotopic Proton NMR Assignment in Ludartin Using Residual Dipolar Couplings and 3J Coupling Constant Analysis, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*(3), 840–848.
- [79] A.-C. Pöppler, H. Keil, D. Stalke, M. John, ^7Li Residual Quadrupolar Coup-

- lings as a Powerful Tool To Identify the Degree of Organolithium Aggregation, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*(31), 7843–7846.
- [80] J. Ma, G. I. Goldberg, N. Tjandra, Weak Alignment of Biomacromolecules in Collagen Gels: An Alternative Way to Yield Residual Dipolar Couplings for NMR Measurements, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*(48), 16148–16149.
- [81] H.-J. Sass, G. Musco, S. Stahl, P. Wingfield, S. Grzesiek, Solution NMR of proteins within polyacrylamide gels: Diffusional properties and residual alignment by mechanical stress or embedding of oriented purple membranes, *J. Biomol. NMR* **2000**, *18*(4), 303–309.
- [82] C. Merle, G. Kummerlöwe, J. C. Freudenberger, F. Halbach, S. Wolfgang, C. Lierse v. Gostomski, J. Höpfner, T. Beskers, M. Wilhelm, B. Luy, Cross-linked Poly(ethylene oxide) as a Versatile Alignment Medium for the Measurement of Residual Anisotropic NMR Parameters, *Angew. Chem.* **2013**, DOI DOI:10.1002/anie.201301929.
- [83] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 7. überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, **2005**.
- [84] P. Doty, A. M. Holtzer, J. H. Bradbury, E. R. Blout, Polypeptides. II. The Configuration of Polymers of γ -Benzyl-L-Glutamate in Solution, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*(17), 4493–4494.
- [85] C. M. Thiele, Simultaneous Assignment of All Diastereotopic Protons in Strychnine Using RDCs: PELG as Alignment Medium for Organic Molecules, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*(22), 7403–7413.
- [86] J. P. Bayle, J. Courtieu, E. Gabetty, A. Loewenstein, J. M. Pechine, Enantiomeric Analysis in a Polypeptide Lyotropic Liquid-Crystal through Proton Decoupled Deuterium NMR, *New J. Chem.* **1992**, 837–838.
- [87] G. Kummerlöwe, *Measurement and Application of Anisotropic NMR Parameters in Stretched Polymer Gels: Structure Determination of Small Molecules*, Dissertation: Technische Universität München (Munich), **2010**.
- [88] M. Schmidt, H. Sun, A. Leonov, C. Griesinger, U. M. Reinscheid, Chiral discrimination of amines by anisotropic NMR parameters using chiral polyacrylamide-based gels, *Magn. Reson. Chem.* **2012**, *50*, S38–S44.
- [89] M. Schmidt, H. Sun, P. Rogne, G. K. E. Scriba, C. Griesinger, L. T. Kuhn, U. M. Reinscheid, Determining the Absolute Configuration of (+)-Mefloquine HCl, the Side-Effect-Reducing Enantiomer of the Antimalaria Drug Lariam, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*(6), 3080–3083.

- [90] *Sybyl*[®] Programm , Vers.: 7.2 (St. Louis, Missouri) von Tripos L.P., <http://tripos.com/>.
- [91] U. Sternberg, F.-T. Koch, P. Losso, *COSMOS: Computer-Simulation of Molecular Structures* .
- [92] M. Zweckstetter, A. Bax, Prediction of Sterically Induced Alignment in a Dilute Liquid Crystalline Phase: Aid to Protein Structure Determination by NMR, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*(15), 3791–3792.
- [93] M. Zweckstetter, G. Hummer, A. Bax, Prediction of Charge-Induced Molecular Alignment of Biomolecules Dissolved in Dilute Liquid-Crystalline Phases, *Biophys. J.* **2004**, *86*(6), 3444–3460.
- [94] C. D. Schwieters, J. J. Kuszewski, N. Tjandra, G. M. Clore, The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package, *J. Magn. Reson.* **2003**, *160*(1), 65–73.
- [95] C. D. Schwieters, J. J. Kuszewski, G. M. Clore, Using Xplor-NIH for NMR molecular structure determination, *Program NMR Spectrosc.* **2006**, *48*, 47–62.
- [96] D. A. Pearlman, D. A. Case, J. W. Caldwell, W. S. Ross, T. E. C. III, S. DeBolt, D. Ferguson, G. Seibel, P. Kollman, AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules, *Comput. Phys. Commun.* **1995**, *91*(1-3), 1–41.
- [97] L. Ziani, P. Lesot, A. Meddour, J. Courtieu, Empirical determination of the absolute configuration of small chiral molecules using natural abundance ²H NMR in chiral liquid crystals., *Chem. Commun.* **2007**, 4737–4739.
- [98] G. Kummerlöwe, S. Schmitt, B. Luy, Cross-Fitting of Residual Dipolar Couplings, *Open Spectrosc. J.* **2010**, *4*, 16–27.
- [99] G. Cornilescu, J. L. Marquardt, M. Ottiger, A. Bax, Validation of Protein Structure from Anisotropic Carbonyl Chemical Shifts in a Dilute Liquid Crystalline Phase, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*(27), 6836–6837.
- [100] P. Lesot, J. Courtieu, Natural abundance deuterium NMR spectroscopy: Developments and analytical applications in liquids, liquid crystals. and solid phases, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2009**, *55*(2), 128–159.
- [101] K. Fleming, D. Gray, S. Prasanna, S. Matthews, Cellulose Crystallites: A New and Robust Liquid Crystalline Medium for the Measurement of Residual Dipolar Couplings, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*(21), 5224–5225.

- [102] L. Arnold, A. Marx, C. Thiele, M. Reggelin, Polyguanidines as Chiral Orienting Media for Organic Compounds, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*(34), 10342–10346.
- [103] B. Luy, K. Kobzar, H. Kessler, An Easy and Scalable Method for the Partial Alignment of Organic Molecules for Measuring Residual Dipolar Couplings, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*(9), 1092–1094.
- [104] A. Bax, Weak alignment offers new NMR opportunities to study protein structure and dynamics, *Protein Sci.* **2003**, *12*(1), 1–16.
- [105] J. H. Prestegard, C. M. Bougault, A. I. Kishore, Residual Dipolar Couplings in Structure Determination of Biomolecules, *Chem. Rev.* **2004**, *104*(8), 3519–3540.
- [106] R. Rajan, P. Balaram, A model for the interaction of trifluoroethanol with peptides and proteins, *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1996**, *48*(4), 328–336.
- [107] P. Khandelwal, S. Seth, R. V. Hosur, CD and NMR investigations on trifluoroethanol-induced step-wise folding of helical segment from scorpion neurotoxin, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *264*(2), 468–478.
- [108] M. D. Díaz, S. Berger, Preferential solvation of a tetrapeptide by trifluoroethanol as studied by intermolecular NOE, *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*(7), 369–373.
- [109] M. Fioroni, M. D. Díaz, K. Burger, S. Berger, Solvation Phenomena of a Tetrapeptide in Water/Trifluoroethanol and Water/Ethanol Mixtures: A Diffusion NMR, Intermolecular NOE, and Molecular Dynamics Study, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*(26), 7737–7744.
- [110] F. D. Sonnichsen, J. E. Van Eyk, R. S. Hodges, B. D. Sykes, Effect of trifluoroethanol on protein secondary structure: an NMR and CD study using a synthetic actin peptide, *Biochemistry* **1992**, *31*(37), 8790–8798.
- [111] M. Buck, Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. Recent studies with peptides and proteins, *Q. Rev. Biophys.* **1998**, *31*, 297–355.
- [112] M. Ogris, G. Walker, T. Blessing, R. Kircheis, M. Wolschek, E. Wagner, Tumor-targeted gene therapy: strategies for the preparation of ligand-polyethylene glycol-polyethylenimine/complexes, *J. Control. Release* **2003**, *91*(1–2), 173–181.
- [113] F. M. Veronese, E. Boccu, O. Schiavon, G. P. Velo, A. Conforti, L. Franco, R. Milanino, Anti-inflammatory and pharmacokinetic properties of superoxide dismutase derivatized with polyethylene glycol via active esters, *J. Pharm. Pharmacol.* **1983**, *35*(11), 757–758.

- [114] A. Lukyanov, Z. Gao, L. Mazzola, V. Torchilin, Polyethylene Glycol-Diacyllipid Micelles Demonstrate Increased Accumulation in Subcutaneous Tumors in Mice, *Pharmaceut. Res.* **2002**, *19*(10), 1424–1429.
- [115] S. Yowell, S. Blackwell, Novel effects with polyethylene glycol modified pharmaceuticals, *Cancer Treat. Rev.* **2002**, *28*, 3–6.
- [116] R. Mehvar, Modulation of the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Proteins by Polyethylene Glycol Conjugation, *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2000**, *3*, 125–136.
- [117] T. Scherzer, Photopolymerization of acrylates without photoinitiators with short-wavelength UV radiation: A study with real-time fourier transform infrared spectroscopy, *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **2004**, *42*(4), 894–901.
- [118] M. Imoto, T. Otsu, S. Shimizu, Vinyl polymerization. LXVI.. The effect of zinc chloride on the radical polymerization of vinyl monomers, *Macromol. Chem. Physic.* **1963**, *65*(1), 174–179.
- [119] P. C. Deb, S. Ray, Non-ideality in vinyl polymerization-IV. Kinetics of polymerization of vinyl acetate in benzene initiated by azo-bis isobutyronitrile (AIBN), *Eur. Polym. J.* **1978**, *14*(8), 607–609.
- [120] B. Baysal, A. V. Tobolsky, Rates of initiation in vinyl polymerization, *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **1952**, *8*(5), 529–541.
- [121] N.-J. Huang, D. C. Sundberg, Fundamental studies of grafting reactions in free radical copolymerization. IV. Grafting of styrene, acrylate, and methacrylate monomers onto vinyl-polybutadiene using benzoyl peroxide and AIBN initiators in solution polymerization., *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **1995**, *33*(15), 2587–2603.
- [122] J. W. L. Fordham, P. H. Burleigh, C. L. Sturm, Stereoregulated polymerization in the free propagating species. III. Effect of temperature on the polymerization of vinyl chloride, *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **1959**, *41*(138), 73–82.
- [123] A. Charlesby, Crosslinking and degradation of polymers, *Radiat. Phys. Chem.* **1981**, *18*(1–2), 59–66.
- [124] P. Hubbard, W. J. Brittain, Mechanism of Amine-Catalyzed Ester Formation from an Acid Chloride and Alcohol, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*(3), 677–683.
- [125] Y. Wang, J. Huang, Controlled Radical Copolymerization of Styrene and the Macromonomer of PEO with a Methacryloyl End Group, *Macromolecules* **1998**, *31*(13), 4057–4060.

- [126] A. Sosnik, D. Cohn, J. S. Román, G. A. Abraham, Crosslinkable PEO-PPO-PEO-based reverse thermo-responsive gels as potentially injectable materials, *J. Biomat. Sci.-Polym. E* **2003**, *14*(3), 227–239.
- [127] K. Ito, S. Yokoyama, F. Arakawa, Y. Yukawa, T. Iwashita, Y. Yamasaki, Poly(ethylene oxide) macromonomers, *Polym. Bull.* **1986**, *16*, 337–344.
- [128] K. Ito, K. Hashimura, S. Itsuno, E. Yamada, Poly(ethylene oxide) macromonomers. 8. Preparation and polymerization of ι -hydroxypoly(ethylene oxide) macromonomers, *Macromolecules* **1991**, *24*(14), 3977–3981.
- [129] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen - Organische Reaktionen. Stereochemie. Moderne Synthesemethoden*, 3. Auflage, Springer Spektrum, **2004**.
- [130] M. S. Simon, J. B. Rogers, W. Saenger, J. Z. Gougoutas, A New Reaction of Thionyl Chloride with a Carboxylic Acid in the Presence of a Tertiary Amine. An X-Ray Crystallographic Proof of Structure of α -Chloro- α -chlorosulfonyl-4-nitro-2,5-dimethoxyphenylacetyl Chloride, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*(23), 5838–5844.
- [131] R. Schnabel, Synthesis of deuterated polyethylene glycols, *J. Labelled Compd. Rad.* **1992**, *31*(2), 91–94.
- [132] P. Wegener, Verfahren zur Herstellung von deuterierten organischen Verbindungen, **1988**.
- [133] C. M. Moorhoff, W. D. Cook, Partial Deuterium Labeling of Dimethacrylate Monomers, *Monatsh. Chem.* **2006**, *137*, 449–454.
- [134] T. Kaino, M. Tanaka, H. Miyagawa, H. Takeuchi, Jpn., *Chem. Abstr.* **1986**.
- [135] T. Maegawa, Y. Fujiwara, Y. Inagaki, H. Esaki, Y. Monguchi, H. Sajiki, Mild and Efficient H/D Exchange of Alkanes Based on CH Activation Catalyzed by Rhodium on Charcoal, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*(29), 5394–5397.
- [136] J. C. Nicholson, B. Crist, Hydrogen-deuterium exchange for labeling polyethylene, *Macromolecules* **1989**, *22*(4), 1704–1708.
- [137] T. Maegawa, Y. Fujiwara, Y. Inagaki, Y. Monguchi, H. Sajiki, A Convenient and Effective Method for the Regioselective Deuteration of Alcohols, *Adv. Syn. Catal.* **2008**, *350*(14-15), 2215–2218.
- [138] V. Derdau, J. Atzrodt, W. Holla, H/D-exchange reactions with hydride-activated catalysts, *J. Labelled Compd. Rad.* **2007**, *50*(5-6), 295–299.
- [139] J. Atzrodt, V. Derdau, T. Fey, J. Zimmermann, Die Renaissance des H/D-Austausches, *Angew. Chem.* **2007**, *119*(41), 7890–7911.

- [140] S. S. D. Büchler, G. Kummerlöwe, B. Luy, Naturally occurring biodegradable polymers as the basis of chiral gels for the distinction of enantiomers by partially oriented NMR spectroscopy, *Int. J. Artif. Organs* **2011**, *34*(2), 134–138.
- [141] W. Peti, J. Meiler, R. Brüsweiler, C. Griesinger, Model-Free Analysis of Protein Backbone Motion from Residual Dipolar Couplings, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*(20), 5822–5833.
- [142] J.-M. Péchiné, A. Meddour, J. Courtieu, Monitoring the differential ordering of enantiomers included into cyclodextrins through deuterium NMR in lyotropic liquid crystals., *Chem. Commun.* **2002**, 1734–1735.
- [143] C. Schmuck, B. Engels, T. Schirmeister, R. Fink, *Chemie für Mediziner*, Pearson Studium, **2008**.
- [144] baua: Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin , Stand 05/2013.
- [145] A.-T. Karlberg, K. Magnusson, U. Nilsson, Air oxidation of d-limonene (the citrus solvent) creates potent allergens, *Contact Dermatitis* **1992**, *26*(5), 332–340.
- [146] M. Müller, C. M. Orben, N. Schützenmeister, M. Schmidt, A. Leonov, U. M. Reinscheid, B. Dittrich, C. Griesinger, The Absolute Configuration of (+)- and (–)-erythro-Mefloquine, *Angew. Chem.* **2013**, *52*(23), 6047–6049.
- [147] K. S. Kang, G. T. Veeder, P. J. Mirrasoul, T. Kaneko, I. W. Cottrell, Agar-like polysaccharide produced by *Pseudomonas* species: production and basic properties, *Appl. Environ. Microbiol.* **1982**, *43*, 1086.
- [148] M. S. Kuo, A. Dell, A. J. Mort, Identification and location of L-glycerate, an unusual substituent in gellan gum, *Carbohydr. Res.* **1986**, *156*, 173.
- [149] P. E. Jansson, B. Lindberg, P. A. Sandford, Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*, *Carbohydr. Res.* **1983**, *124*, 135.
- [150] M. A. O’Neill, R. R. Selvendran, V. J. Morris, Structure of the acidic extracellular gelling polysaccharide produced by *Pseudomonas elodea*, *Carbohydr. Res.* **1983**, *124*, 123.
- [151] *KELCOGEL gellan gum Book*, 5th Edition, www.cpkelco.com, **2007**.
- [152] H. Grasdalen, O. Smidsrod, Gelation of gellan gum, *Carbohydr. Polym.* **1987**, *7*, 371.
- [153] G. Kummerlöwe, B. Luy, Residual dipolar couplings as a tool in determining the structure of organic molecules, *TrAC-Trend. Anal. Chem.* **2009**, *28*(4), 483–493.

- [154] R. R. Gil, Constitutional, Configurational, and Conformational Analysis of Small Organic Molecules on the Basis of NMR Residual Dipolar Couplings, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*(32), 7222–7224.
- [155] G. Kummerlöwe, F. Halbach, B. Laufer, B. Luy, Precise measurement of RD-Cs in water and DMSO based gels using a silicone rubber tube for tunable stretching, *Open Spectrosc. J.* **2008**, *2*, 29–33.
- [156] A. Schuetz, T. Murakami, N. Takada, J. Junker, M. Hashimoto, C. Griesinger, RDC-Enhanced NMR Spectroscopy in Structure Elucidation of Sucro-Neolambertellin, *Angew. Chem.* **2008**, *120*(11), 2062–2064.
- [157] E. Reich, A. J. Shatkin, E. L. Tatum, Bacteriocidal action of mitomycin C., *Biochim. Biophys. Acta* **1960**, *45*, 608–610.
- [158] M. Sekiguchi, Y. Takagi, Effect of mitomycin C on the synthesis of bacterial and viral deoxyribonucleic acid, *Biochim. Biophys. Acta* **1960**, *41*, 434–443.
- [159] B. Sokoloff, M. Fujisawa, K. Enomoto, C. C. Saelhof, T. R. Miller, B. McConnell, K. Nakabayashi, G. Renninger, W. Trauner, Experimental studies on mitomycin C. 2. Cytotoxicity, *Biochim. Biophys. Acta* **1960**, *24*, 1–27.
- [160] D. J. Pohlod, L. D. Saravolatz, E. L. Quinn, M. M. Somerville, Effect of clavulanic acid on minimal inhibitory concentrations of 16 antimicrobial agents tested against *Legionella pneumophila*, *Antimicrob. Agents Ch.* **1980**, *18*(2), 353–354.
- [161] M. Matsuura, H. Nakazawa, T. Hashimoto, S. Mitsuhashi, Combined antibacterial activity of amoxicillin with clavulanic acid against ampicillin-resistant strains, *Antimicrob. Agents Ch.* **1980**, *17*(6), 908–911.
- [162] R. Voigt, A. G. Maa Bared, Chemical analysis of capreomycin, *Pharmazie* **1970**, *8*, 471–472.
- [163] Q. Wang, L. Liu, C. Lin, H. Sun, W.-X. Zhang, Z. Xi, Hydride-induced cleavage of C-O bond in pyran ring of 2-pyranylidene carbene complexes: mechanism and synthetic application, *Dalton Trans.* **2009**, 10433–10435.
- [164] D. Jakubczyk, C. Barth, A. Kubas, F. Anastassacos, P. Koelsch, K. Fink, U. Schepers, G. Brenner-Weiß, S. Bräse, Deuterium-labelled *N*-acyl-l-homoserine lactones (AHLs)-inter-kingdom signalling molecules-synthesis, structural studies, and interactions with model lipid membranes, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*(2), 473–482.
- [165] A. E. Mutlib, Application of Stable Isotope-Labeled Compounds in Metabolism and in Metabolism-Mediated Toxicity Studies, *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*(9), 1672–1689.

- [166] A. T. Tran, V. A. Huynh, E. M. Friz, S. K. Whitney, D. B. Cordes, A general method for the rapid reduction of alkenes and alkynes using sodium borohydride, acetic acid, and palladium, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*(16), 1817–1819.
- [167] C. A. Brown, V. K. Ahuja, Catalytic hydrogenation. VI. Reaction of sodium borohydride with nickel salts in ethanol solution. P-2 Nickel, a highly convenient, new, selective hydrogenation catalyst with great sensitivity to substrate structure, *J. Org. Chem.* **1973**, *38*(12), 2226–2230.
- [168] N. Amara, R. Mashlach, D. Amar, P. Krief, S. A. H. Spieser, M. J. Bottomley, A. Aharoni, M. M. Meijler, Covalent Inhibition of Bacterial Quorum Sensing, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*(30), 10610–10619.
- [169] M. Boyer, F. Wisniewski-Dye, Cell-cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum, *FEMS Microbiol. Ecol.* **2009**, *70*(1), 1–19.
- [170] N. Ni, M. Li, J. Wang, B. Wang, Inhibitors and antagonists of bacterial quorum sensing, *Med. Res. Rev.* **2009**, *29*(1), 65–124.
- [171] S. R. Chhabra, C. Harty, D. S. W. Hooi, M. Daykin, P. Williams, G. Telford, D. I. Pritchard, B. W. Bycroft, Synthetic Analogues of the Bacterial Signal (Quorum Sensing) Molecule N-(3-Oxododecanoyl)-l-homoserine Lactone as Immune Modulators, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*(1), 97–104.
- [172] J. Olsen, R. Severinsen, T. Rasmussen, M. Hentzer, M. Givskov, J. Nielsen, Synthesis of new 3- and 4-substituted analogues of acyl homoserine lactone quorum sensing autoinducers, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*(3), 325–328.
- [173] J. W. Costerton, P. S. Stewart, E. P. Greenberg, Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections, *Science* **1999**, *284*, 1318–1322.
- [174] M. Cooley, S. R. Chhabra, P. Williams, N-Acylhomoserine Lactone-Mediated Quorum Sensing: A Twist in the Tail and a Blow for Host Immunity, *Chem. Biol.* **2008**, *15*(11), 1141–1147.
- [175] D. Jakubczyk, C. Merle, G. Brenner-Weiss, B. Luy, S. Bräse, Deuterium and Tritium Labelling of N-Acyl-L-homoserine Lactones (AHLs) by Catalytic Reduction of a Double Bond in the Layer-by-Layer Method, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*(24), 5323–5330.
- [176] J. Yan, F. Delaglio, A. Kaerner, A. D. Kline, H. Mo, M. J. Shapiro, T. A. Smitka, G. A. Stephenson, E. R. Zartler, Complete Relative Stereochemistry of Multiple Stereocenters Using Only Residual Dipolar Couplings, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*(15), 5008–5017.

- [177] U. M. Reinscheid, M. Köck, C. Cychon, V. Schmidts, C. M. Thiele, C. Griesinger, The Absolute Configuration of Dibromopalau'amine, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 2010(36), 6900–6903.
- [178] R. Ordidge, A. Connelly, J. Lohman, Image-selected in Vivo spectroscopy (ISIS). A new technique for spatially selective nmr spectroscopy, *J. Magn. Reson.* **1986**, 66(2), 283–294.
- [179] L. A. Weisenberger, J. L. Koenig, NMR imaging of diffusion processes in polymers: measurement of the spatial dependence of solvent mobility in partially swollen PMMA rods, *Macromolecules* **1990**, 23(9), 2445–2453.
- [180] W. Kuhn, P. Barth, S. Hafner, G. Simon, H. Schneider, Material Properties Imaging of Cross-Linked Polymers by NMR, *Macromolecules* **1994**, 27(20), 5773–5779.
- [181] W. Kozmiński, Application of Spatially Resolved NMR Spectroscopy for High Resolution Spectra of Heterogeneous Samples, *Pol. J. Chem.* **2000**, 8, 1185.
- [182] P. C. Lauterbur, D. M. Kramer, W. V. House, C.-N. Chen, Zeugmatographic high resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. Images of chemical inhomogeneity within macroscopic objects, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97(23), 6866–6868.
- [183] M. A. Brown, R. C. Semelka, *MRI - Basic Principles and Applications*, Fourth Edition, Wiley-Blackwell, **2010**.
- [184] J. Keeler, *Understanding NMR Spectroscopy*, Second Edition, John Wiley & Sons, Ltd, **2005**.
- [185] N. Giraud, M. Joos, J. Courtieu, D. Merlet, Application of a ^1H δ -resolved 2D NMR experiment to the visualization of enantiomers in chiral environment, using sample spatial encoding and selective echoes, *Magn. Reson. Chem.* **2009**, 47(4), 300–306.
- [186] N. Giraud, L. Béguin, J. Courtieu, D. Merlet, Nuclear Magnetic Resonance Using a Spatial Frequency Encoding: Application to J-Edited Spectroscopy along the Sample, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49(20), 3481–3484.
- [187] R. Verpoorte, Y. Choi, H. Kim, NMR-based metabolomics at work in phytochemistry, *Phytochemistry Rev.* **2007**, 6(1), 3–14.
- [188] H. K. Kim, R. Verpoorte, Sample preparation for plant metabolomics, *Phytochem. Analysis* **2010**, 21(1), 4–13.
- [189] N. Schauer, A. R. Fernie, Plant metabolomics: towards biological function and mechanism, *Trends Plant Sci.* **2006**, 11(10), 508–516.

- [190] J. C. Lindon, J. K. Nicholson, E. Holmes, J. R. Everett, Metabonomics: Metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids, *Concepts Magnetic Res.* **2000**, *12*(5), 289–320.
- [191] L. Le Moyec, A. Pruna, M. Eugène, J. Bedrossian, J. M. Idatte, J. F. Huneau, D. Tomé, Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of Urine and Plasma in Renal Transplantation Follow-Up, *Nephron* **1993**, *65*, 433–439.
- [192] K. P. Gartland, C. R. Beddell, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, Application of pattern recognition methods to the analysis and classification of toxicological data derived from proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine, *Mol. Pharmacol.* **1991**, *39*, 629–642.
- [193] J. Maisch, K. Kreppenhof, S. S. D. Büchler, C. Merle, S. Sobich, B. Luy, R. Ahrens, P. Nick, A. Guber, A BioMEMS copy of plant tissues for complex metabolic engineering using NMR spectroscopy, *in preparation* .
- [194] A. Zhang, H. Sun, X. Wang, Recent highlights of metabolomics for Traditional Chinese Medicine, *Pharmazie* **2012**, *67*(8), 667–675.
- [195] P. U. Unschuld, *Traditionelle Chinesische Medizin*, 2. Auflage, C.H. Beck Wissen, **2004**.
- [196] S. Joos, B. Brinkhaus, C. Maluche, N. Maupai, R. Kohnen, E. Hahn, D. Schuppan, Akupunktur und Moxibustion als ergänzende Therapie bei M. Crohn, *Dt. Ztschr. f. Akup.* **2005**, *48*, 6–17.
- [197] <http://www.tagesspiegel.de/wissen/krebsforschung-donnerfuerst-zerstoert-tumorzellen/7268012.html> , Stand 12.06.2013.
- [198] A. Shang, K. Huwiler, L. Nartey, P. Jüni, M. Egger, Placebo-controlled trials of Chinese herbal medicine and conventional medicine comparative study, *Int. J. Epidemiol.* **2007**, *36*(5), 1086–1092.
- [199] T. Efferth, Mechanistic perspectives for 1,2,4-trioxanes in anti-cancer therapy, *Drug. Resist. Update* **2005**, *8*(1–2), 85–97.
- [200] T. Efferth, P. C. Li, V. S. B. Konkimalla, B. Kaina, From traditional Chinese medicine to rational cancer therapy, *Trends Mol. Med.* **2007**, *13*(8), 353–361.
- [201] J.-L. Vanherweghem, M. Depierreux, Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: Association with slimming regimen, *Lancet* **1993**, *341*(8842), 387.
- [202] J.-L. Vanherweghem, Misuse of Herbal Remedies: The Case of an Outbreak of Terminal Renal Failure in Belgium (Chinese Herbs Nephropathy), *J. Altern. Complem. Med.* **1998**, *4*(1), 1–9.

- [203] J. Nortier, M.-C. Martinez, H. Schmeiser, Urothelial Carcinoma Associated with the Use of a Chinese Herb (*Aristolochia fangchi*), *N. Engl. J. Med.* **2000**, *342*, 1686–1692.
- [204] J. Wang, R. van der Heijden, S. Spruit, T. Hankermeier, K. Chan, J. van der Greef, G. Xu, M. Wang, Quality and safety of Chinese herbal medicines guided by a systems biology perspective, *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *126*(1), 31–41.
- [205] M. Wang, J. Van der Greef, R. Witkamp, Method for determining the impact of a multicomponent mixture on the biological profile of a disease, EP1512970-A1, **2005**.
- [206] M. Wang, R.-J. A. N. Lamers, H. A. A. J. Korthout, J. H. J. van Nesselrooij, R. F. Witkamp, R. van der Heijden, P. J. Voshol, L. M. Havekes, R. Verpoorte, J. van der Greef, Metabolomics in the context of systems biology: bridging traditional Chinese medicine and molecular pharmacology, *Phytother. Res.* **2005**, *19*(3), 173–182.
- [207] M. Spraul, B. Schütz, P. Rinke, E. Koswig, Susanne Humpfer, H. Schäfer, M. Mörtter, F. Fang, U. C. Marx, A. Minoja, NMR-Based Multi Parametric Quality Control of Fruit Juices: SGF Profiling, *Nutrients* **2009**, *1*, 148–155.
- [208] M. Spraul, B. Schütz, E. Humpfer, M. Mörtter, H. Schäfer, S. Koswig, P. Rinke, Mixture analysis by NMR as applied to fruit juice quality control, *Magn. Reson. Chem.* **2009**, *47*(S1), S130–S137.
- [209] *Dokumentation von Amix* , Stand 2011.
- [210] *Metabolomics Training Course* , vom 17. bis 20. Juli 2011 in Rheinstetten.
- [211] U. Bomme, *Kulturanleitung für Medizinal- Rhabarber (*Rheum palmatum* und *R. officinale*) zur Produktion von *Rhei radix* bzw. der TCM-Droge *Dahuang**, 1. Auflage, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), **2010**.
- [212] L. Verdier, P. Sakhaii, M. Zweckstetter, C. Griesinger, Measurement of long range H,C couplings in natural products in orienting media: a tool for structure elucidation of natural products, *J. Magn. Reson.* **2003**, *163*(2), 353–359.
- [213] F. Delaglio, S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, A. Bax, NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes, *J. Biomol. NMR* **1995**, *6*, 277–293.

F. Lebenslauf

Zu meiner Person

Adresse Steubenstraße 3, 76185 Karlsruhe
Geburtsdatum 13.09.1984
Geburtsort Karlsruhe

Studium

04/2005 – 04/2010 Chemiestudium, Universität Karlsruhe (TH)
06/2010 – 10/2013 Promotionsstudium am Karlsruher Institut für Technologie

Wehrpflicht

07/2004 – 04.2005 1./Panzergrenadierbataillon 294 in 72510 Stetten a.k.M.

Schule

06/2004 Abitur am Albertus-Magnus-Gymnasium

G. Danksagung

Herrn Prof. Burkhard Luy danke ich sehr für die interessante Aufgabenstellung, die herzliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Betreuung meiner Arbeit. Desweiteren danke ich den Mitgliedern des AK Luy für die lustige und entspannte Arbeitsatmosphäre, für die Hilfen und Diskussionen rund um das Thema NMR. Silke Büchler und Benjamin Görling danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit und für das Auffinden so mancher Tippfehler.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre Unterstützung und die wertvollen Gespräche während meines Studiums. Silke und Moritz, ohne euch wäre ich nie soweit gekommen und wäre nicht derjenige, der ich heute bin.