

Protonen-Spin-Gitter-Relaxation und interne Beweglichkeit von Molekülen

Untersuchung über die Konformation von Frangulanin, einem cyclischen Peptidalkaloid

Ernst Haslinger* und Wolfgang Robien

Institut für Organische Chemie, Universität Wien, A-1090 Wien, Österreich

(Eingegangen 2. Februar 1979. Angenommen 27. März 1979)

Proton-Spin-Lattice Relaxation and Internal Movement of Molecules. Studies on the Conformation of Frangulanin, a Cyclic Peptide Alkaloid

Relaxation rates can be used as assignment tool in NMR-spectroscopy; even conformational changes in the cyclic peptide alkaloid frangulanin (**1**) can be monitored by proton-relaxation measurements. The results are compared with a force-field calculation of (**1**).

(Keywords: Cyclic peptide alkaloid; Conformation; Spin-lattice-relaxation; Force field calculation; Partially relaxed NMR spectrum)

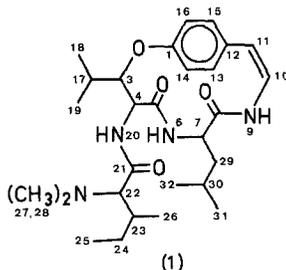
Einleitung

Die Messung von Spin-Gitter-Relaxationszeiten ist durch Einführung der *Fourier*-Transformation in die NMR-Spektroskopie besonders einfach geworden¹. T_1 -Experimente können Information zur Zuordnung von Kernresonanzlinien liefern, weil sie Aussagen über die Beweglichkeit von Molekülen oder Molekülteilen gestatten²⁻⁶. Damit ist daraus Information über die Konfiguration und Konformation von Molekülen ableitbar.

Frangulanin (**1**), ein Peptidalkaloid vom Pandamintyp^{7,8} ist erstmals von *Tschesche* et al.⁹ aus *Rhamnus frangula L.* isoliert worden. Untersuchungen über die Konformation in Lösung sind in letzter Zeit mit Hilfe der ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie durchgeführt worden¹⁰.

Wir berichten hier, daß T_1 -Experimente einerseits die Zuordnung

überlappender Signale im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **1** erlauben, andererseits Information über die interne Beweglichkeit einzelner Gruppen und Konformationswechsel liefern.



Theorie

In verdünnten Lösungen und magnetisch inerten Lösungsmitteln, wird die Spin-Gitter-Relaxationszeit eines Kernes hauptsächlich durch intramolekulare Dipol-Dipol-Wechselwirkungen bestimmt². Dabei tritt ein Transfer der magnetischen Energie des Kernes A auf die Umgebung (das Gitter) ein. Dieser Energieaustausch wird durch fluktuierende Magnetfelder vermittelt¹¹. Diese Felder werden im oben erwähnten Fall ausschließlich durch die relative Bewegung von Kern A gegenüber magnetischen Nachbarkernen erzeugt. Die Relaxationsrate ($= T_{1A}^{-1}$) des Kernes A, der durch einen magnetischen Nachbarkern B relaxiert wird, kann im *extreme narrowing limit*¹⁹ wie folgt beschrieben werden:

$$(T_{1A})^{-1} = k \cdot \gamma_A^2 \cdot \gamma_B^2 \cdot r_{AB}^{-6} \cdot \tau_c$$

In dieser Gleichung ist k eine Proportionalitätskonstante, γ_A und γ_B sind die entsprechenden gyromagnetischen Verhältnisse, r_{AB} ist der Kernabstand und τ_c die Korrelationszeit, die die Umorientierung des Vektors \vec{r}_{AB} beschreibt.

Protonen sind die Hauptrelaxationsquelle in organischen Molekülen, weil sie ein besonders hohes gyromagnetisches Verhältnis besitzen. Da die Wechselwirkung mit der sechsten Potenz der Kernabstand abnimmt, liefern nur die allernächsten Kerne signifikante Beiträge zu T_{1A} . Für die Relaxation eines Protons in einer Methylgruppe, läßt sich diese Gleichung noch weiter vereinfachen, da nur die beiden anderen Protonen am gleichen Kohlenstoff-Atom einen wesentlichen Beitrag leisten können. Diese haben immer gleiche Distanz vom betrachteten Kern, somit kann r_{AB} in die Proportionalitätskonstante einbezogen werden und es resultiert:

$$T_{1A}^{-1} = k' \cdot \tau_c.$$

Die Relaxationszeit ist also in diesem Falle nur von der Korrelationszeit, also der Beweglichkeit der Methylgruppen abhängig.

Methylgruppen, die verschiedene Positionen in großen, starren Molekülen einnehmen, sind somit durch ihre Korrelationszeit bzw. Relaxationszeit zu unterscheiden.

Ergebnisse und Diskussion

Relaxation der Protonen am Macrocyclus

Die Protonen am starren Ringsystem besitzen alle die gleiche Korrelationszeit, Unterschiede in der Relaxationszeit sind also nur durch verschiedene Distanzen zum jeweiligen Relaxationspartner bestimmt. Bei den Protonen in Position 4 und 7 wird die Relaxationszeit zum Teil vom benachbarten H am Stickstoff bestimmt. Wird dieses durch Deuterium ersetzt, so verlängert sich T_1 dieser beiden Protonen entsprechend, da Deuterium auf Grund seines geringeren gyromagnetischen Verhältnisses nur einen verschwindenden Beitrag zur Relaxation leistet (Tab. 1).

Das Proton in Position 3, dessen Relaxationsrate hauptsächlich durch H-4 und H-17 bestimmt wird, kann als interner Standard für die Änderung der Korrelationszeit des starren Ringsystems herangezogen werden.

Tabelle 1. *Relaxationszeiten der Protonen in Position 3, 4 und 7 in den Lösungsmitteln CDCl_3 bzw. $\text{CDCl}_3 + 10 \text{ Vol}\% \text{ CD}_3\text{OD}$.*
 $\alpha = T_1(\text{CDCl}_3)/T_1(\text{CDCl}_3 + 10 \text{ Vol}\% \text{ CD}_3\text{OD})$

	T_1 -Werte		α
	CDCl_3	$\text{CDCl}_3 + 10 \text{ Vol}\% \text{ CD}_3\text{OD}$	
H-3	0,80	0,70	1,14
H-4	0,90	1,30	0,69
H-7	1,00	1,30	0,77

Partiell relaxierte Spektren¹²

Da die Methylgruppen in Frangulanin verschiedenen Abstand vom Macrocyclus und damit verschiedene interne Beweglichkeit besitzen, werden nach einem *Inversion-recovery*-Experiment die Nulldurchgänge der entsprechenden Signale zu verschiedenen Zeiten erfolgen. Somit ist es möglich, den durch Überlagerung komplizierten Methylgruppenbereich des NMR-Spektrums von **1** (Abb. 1) zu vereinfachen. Die Methylgruppen 18 und 19, die relativ starr am Macrocyclus haften,

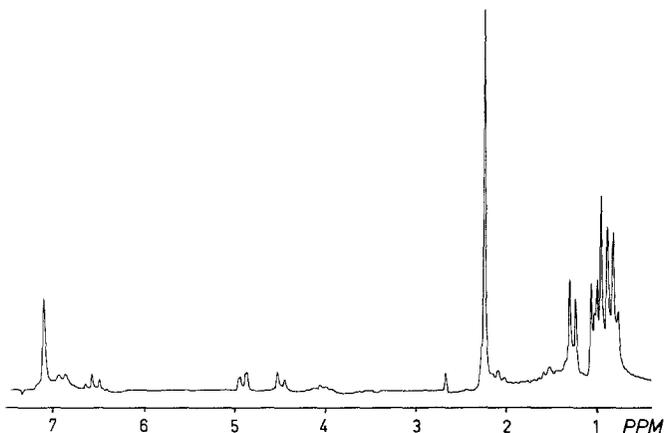


Abb. 1. 100MHz- ^1H -NMR-Spektrum von Frangulanin (**1**) in $\text{CDCl}_3 + 10 \text{ Vol}\% \text{CD}_3\text{OD}$

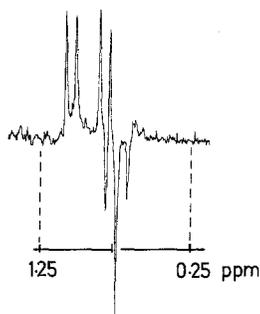


Abb. 2. Partiiell relaxiertes ^1H -NMR-Spektrum von Frangulanin 450 ms nach dem 180° -Puls. Es sind nur die Methylgruppen 18, 19 (positiv) und 25 (negativ) zu sehen. (Lösungsmittel: $\text{CDCl}_3 + 10 \text{ Vol}\% \text{CD}_3\text{OD}$)

besitzen eine längere Korrelationszeit τ_c (also eine kürzere Relaxationszeit T_1) als die Methylgruppen 26, 31 und 32 in der flexiblen Seitenkette. CH_3 -25 besitzt erwartungsgemäß die längste Relaxationszeit (Abb. 2). Die Zuordnung aller Methylgruppen des Frangulanins ist mit dieser Technik bei 100 MHz möglich.

Relaxation der Methylgruppen

Tab. 2 gibt die Relaxationszeiten der Methylgruppen 18, 19, 25, 26, 27, 28, 31 und 32 in beiden Lösungsmitteln wieder. Mit Ausnahme von

CH₃-25 werden die Relaxationszeiten aller anderen Methylgruppen bei Zusatz von CD₃OD kürzer.

Dies zeigt eine Änderung der Gesamtbewegung des Moleküls an.

Durch Messung der ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren unter denselben Bedingungen, konnte vor einiger Zeit Konformationsänderung durch Öffnung der in **1** angedeuteten Wasserstoffbrücke festgestellt werden¹⁰.

Tabelle 2. *Relaxationszeiten der Protonen der Methylgruppen in den Lösungsmitteln CDCl₃ und CDCl₃ + 10 Vol% CD₃OD.*
 $\alpha = T_1(\text{CDCl}_3)/T_1(\text{CDCl}_3 + 10 \text{ Vol}\% \text{CD}_3\text{OD})$

CH ₃ in Position	$T_1(\text{CDCl}_3)$	$T_1(\text{CDCl}_3 + 10 \text{ Vol}\% \text{CD}_3\text{OD})$	α
18	0,58	0,51	1,14
19	0,62	0,57	1,09
25	0,87	1,01	0,86
26	0,77	0,68	1,13
27,28	0,51	0,49	1,04
31,32	0,71	0,65	1,09

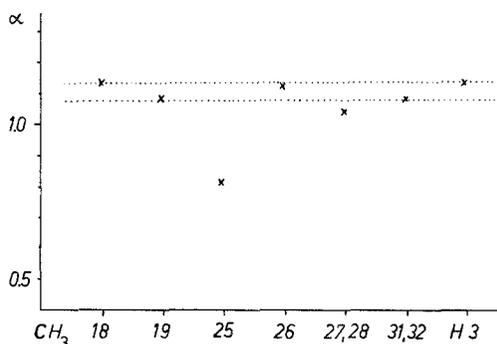


Abb. 3. α -Werte der Methylgruppen und von H-3

Die Öffnung dieser Brücke zwischen NH-6 und CO-21 bewirkt, daß die Dimethylisoleucinseitenkette größere interne Beweglichkeit erhält. Dies sollte sich auf die Korrelationszeiten von CH₃-25, CH₃-27, CH₃-28 und CH₃-26 auswirken. Wird durch Quotientenbildung

$$\alpha = \frac{T_{1\text{CDCl}_3}}{T_{1\text{CDCl}_3 + 10 \text{ Vol}\% \text{CD}_3\text{OD}}}$$

die geänderte Gesamtbewegung des Moleküls berücksichtigt, so sieht

man deutlich den Einfluß der Seitenkettenentfaltung auf CH_3 -25. Die α -Werte von CH_3 -27 und CH_3 -28 sind etwas geringer als jene der anderen Methylgruppen, was als Hinweis für erhöhte interne Beweglichkeit angesehen werden kann (Abb. 3). Die α -Werte der Methylgruppe 26, 31 und 32 zeigen, daß diese Gruppen auch nach Öffnung der Brückenbindung sterischen Wechselwirkungen unterliegen und daher in beiden Konformationen ähnliche interne Beweglichkeit besitzen. Der α -Wert von H-3 ist in sehr guter Übereinstimmung mit denjenigen von CH_3 -18 und CH_3 -19, die beide nahe am starren Macrocyclus gebunden sind. Die Ergebnisse der Relaxationsexperimente sind somit in vollem Einklang mit den bisherigen NMR-spektroskopischen Konformationsuntersuchungen von **1**¹⁰.

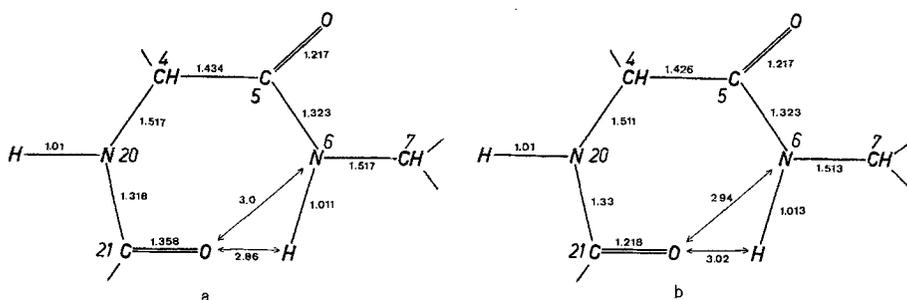


Abb. 4. Ergebnisse der *Force-field*-Berechnungen: *a* geschlossene Wasserstoffbrückenbindung, *b* geöffnete Wasserstoffbrückenbindung. (Intramolekulare Distanzen in Å)

Force-field-Berechnungen

Ergänzend zu den bisherigen NMR-spektroskopischen Untersuchungen haben wir *Force-field*-Berechnungen¹³ durchgeführt. Die Berücksichtigung der Wasserstoffbrücke erfolgte nach dem Partialladungskonzept von Hagler, Huler und Lifson^{14, 15}. Die bei Öffnung der Wasserstoffbrücke eintretende Entfaltung der Dimethylisoleucinseitenkette bewirkt eine drastische Änderung des Diederwinkels der Atome C-5, C-4, N-20 und C-21 um 53°. Die Carbonylgruppe in Position 21 besitzt bei geschlossener Brückenbindung eine größere Bindungslänge, also partiellen Einfachbindungscharakter (Abb. 4a). Bei Öffnung der Bindung vergrößert sich nicht nur der Abstand von CO-21 und NH-6, sondern auch die Bindung von C-21 nach N-20 wird, offenbar durch Spannungsrelaxation, verlängert (Abb. 4b).

In beiden Konformationen findet man deutlich sterische Wechselwirkungen beider Seitenketten im Bereich der Methylgruppen 26, 31

und 32, was im Einklang mit den vorher berichteten Ergebnissen, insbesondere den α -Werten dieser CH_3 -Gruppen steht. Der 14gliedrige Ring ist relativ starr und ändert seine Konformation kaum. Bemerkenswert ist eine starke Abweichung des Benzolkerns von der planaren Anordnung. Die Torsionswinkel weichen bis zu 16° von der Benzolgeometrie ab.

Da der Einfluß der Solvatation in der Rechnung nicht explizit berücksichtigt werden kann, ist eine Korrelation der bei unserer Rechnung erhaltenen Strukturen mit den Konformationen von Frangulanin **1** in beiden Lösungsmitteln mit entsprechender Vorsicht zu betrachten. Vor allem deshalb, weil es schwierig ist, Solvenseinflüsse in einem relativ polaren Lösungsmittelgemisch und dem Alkaloidmolekül, das mehrere stark polare Gruppen enthält, vorauszusehen.

Trotz der erwähnten Schwierigkeiten sind die Ergebnisse der *Force-field*-Berechnungen im besten Einklang mit den Resultaten der Relaxationsmessungen.

Dank

Diese Arbeit wurde vom Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung in Österreich im Rahmen des Forschungsprojektes 3574 unterstützt.

Herrn Prof. Dr. K. Schlögl danken wir für sein förderndes Interesse.

Wir danken Prof. S. Lison, Dr. M. Levitt und A. Warshel für die Zurverfügungstellung eines QCFF/PI-Programmdecks. Unser Dank gilt weiters Herrn Doz. H. Lischka für zahlreiche Diskussionen und Anregungen, Herrn Prof. P. Schuster und Dr P. Wolschann danken wir für die Erlaubnis Einrichtungen des Inst. f. Theoret. Chemie u. Strahlenchemie zu benutzen, dem interfakultären Rechenzentrum der Universität Wien für die großzügige Zuteilung von Rechenzeit und Herrn W. Fietz für wertvolle Anregungen bei der Programmadaptierung.

Experimenteller Teil

Die *Inversion-recovery*-Pulsexperimente wurden auf einem Varian XL-100-15 Kernresonanzspektrometer, das mit einem 16k-L-100 *on line* Computer kombiniert war, durchgeführt. Es wurden Meßröhrchen mit 5 mm Durchmesser verwendet. Die Deuteriumresonanz des Lösungsmittels diente als *Lock*-Signal zur Feld-Frequenz-Stabilisierung. Die Meßtemperatur betrug in allen Fällen 34° .

Typische Parameter für die Pulsexperimente:

Spectral width: 1000 Hz. *Acquisition time*: 4 s. *Pulsdelay*: 8 s. *Digitale Auflösung*: 0.25 Hz/point. 90° -Puls: 32 s; 180° -Puls: 64 s.

Pro Spektrum wurden 2000 *Pulsresponse* akkumuliert. Die T_1 -Werte werden durch Regressionsanalyse aus den anfänglichen Relaxationsraten* bestimmt (R -Werte $\geq 0,99$), wir nehmen ihre Genauigkeit zu $\pm 5\%$ an.

* Die Relaxation von Methylgruppen kann streng genommen nicht durch eine Exponentialfunktion allein beschrieben werden⁶. Allerdings sind die beiden Komponenten nur bei guter Auflösung nahe dem Nulldurchgang zu trennen.

Literatur

- ¹ D. A. Netzel und F. P. Mikis, Applied Spectroscopy **31**, 365 (1977).
- ² L. D. Hall, Chem. Soc. Rev. **4**, 401 (1975).
- ³ I. S. Deniss, J. K. M. Sanders und J. C. Waterton, Chem. Commun. **1976**, 1049.
- ⁴ K. Bock, B. Meyer und J. Thiem, Angew. Chem. **90**, 472 (1978).
- ⁵ J. K. M. Sanders, J. C. Waterton und I. S. Denniss, J. C. S. Perkin I, **1978**, 1150.
- ⁶ E. Haslinger und R. M. Lynden-Bell, J. Mag. Res. **31**, 33 (1978).
- ⁷ E. W. Warnhoff, Peptide Alkaloids in Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe **28**, 163 (1970).
- ⁸ R. Tschesche und E. U. Kaufmann, The Cyclopeptide Alkaloids, in R. M. Manske: Alkaloids Vol. **15**, 165 (1975).
- ⁹ R. Tschesche, H. Last und H.-W. Fehlhaber, Chem. Ber. **100**, 3937 (1967).
- ¹⁰ E. Haslinger, Tetrahedron **34**, 685 (1978).
- ¹¹ R. Freeman, H. D. W. Hill, B. L. Tomlinson und L. D. Hall, J. Chem. Phys. **61**, 4466 (1974).
- ¹² E. Haslinger, Mh. Chem. **109**, 523 (1978).
- ¹³ A. Wershel, M. Levitt und S. Lifson, J. Mol. Spect. **33**, 84 (1970).
- ¹⁴ A. T. Hagler, E. Huler und S. Lifson, J. Amer. Chem. Soc. **96**, 5319 (1974).
- ¹⁵ A. T. Hagler und S. Lifson, J. Amer. Chem. Soc. **96**, 5327 (1974).
- ¹⁶ M. Pailer und E. Haslinger, Mh. Chem. **103**, 1399 (1972).
- ¹⁷ A. Warshel und M. Karplus, J. Amer. Chem. Soc. **94**, 5613 (1972).
- ¹⁸ S. Lifson und A. Warshel, J. Chem. Phys. **49**, 516 (1968).
- ¹⁹ F. W. Wehrli, Organic structure assignments using ¹³C spin-relaxation data, in: Topics in Carbon-13 NMR-Spectroscopy, Vol. **2**, S. 347 (1976).