

---

---

# Synthese und Charakterisierung hochgeordneter peptidmodifizierter Silicananoporen als Modellsysteme für biologische Hybridmaterialien

---



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des Grades

Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

**Dissertation**

von

**Martin Brodrecht**

Erstgutachter: Prof. Dr. Buntkowsky

Zweitgutachter: Prof. Dr. Reggelin

Darmstadt 2019

---

---

Tag der Einreichung: \_\_\_\_\_

Tag der mündlichen Prüfung: \_\_\_\_\_

Brodrecht, Martin: Synthese und Charakterisierung hochgeordneter peptidmodifizierter Silicananoporen als Modellsysteme für biologische Hybridmaterialien

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2019

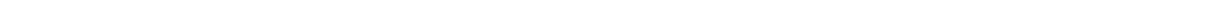
URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-88832

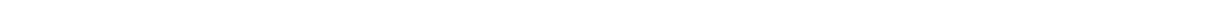
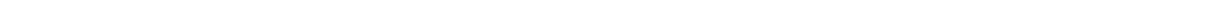
Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2019

Veröffentlicht unter CC BY-NC-ND 4.0 International

<https://creativecommons.org/licenses/>







---

Die vorliegende Arbeit wurde am Eduard-Zintl-Institut für Anorganische und Physikalische Chemie der Technischen Universität Darmstadt unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Gerd Buntkowsky in der Zeit von März 2015 bis März 2019 durchgeführt.

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

#### Wissenschaftliche Veröffentlichungen als Erstautor

- [1] M. Brodrecht\*, E. Klotz\*, C. Lederle, H. Breitzke, B. Stühn, M. Vogel, G. Buntkowsky  
A Combined Solid-State NMR, Dielectric Spectroscopy and Calorimetric Study of Water in Lowly Hydrated MCM-41 Samples  
*Zeitschrift für Physikalische Chemie* **2018**, 232, 1003.
- [2] M. Weigler\*, M. Brodrecht\*, H. Breitzke, F. Dietrich, M. Sattig, G. Buntkowsky, M. Vogel  
<sup>2</sup>H NMR Studies on Water Dynamics in Functionalized Mesoporous Silica  
*Zeitschrift für Physikalische Chemie*, **2018**, 232, 1041.
- [3] M. Brodrecht, H. Breitzke, T. Gutmann, G. Buntkowsky  
Biofunctionalization of Nano Channels by Direct In-Pore Solid-Phase Peptide Synthesis  
*Chemistry – A European Journal* **2018**, 24, 17814-17822.
- [4] M. Weigler\*, M. Brodrecht\*, G. Buntkowsky, M. Vogel  
Reorientation of Deeply Cooled Water in Mesoporous Silica: NMR Studies of the Pore-Size Dependence  
*The Journal of Physical Chemistry B*, **2019**, 123, 2123-2134.
- [5] M. Brodrecht\*, B. Kumari\*, A.S. Sofia Lilly Thankamony, H. Breitzke, T. Gutmann, G. Buntkowsky  
Structural insights into peptides bound to the surface of silica nanopores  
*Chemistry – A European Journal* **2019**, 25, 5214-5221.
- [6] M. Brodrecht, K. Herr, S. Bothe, M. de Oliveira Jr., T. Gutmann and G. Buntkowsky  
Efficient building-blocks for solid state peptide synthesis of spin-labeled peptides for EPR and DNP applications  
*ChemPhysChem*, **2019**, 20, 1475.

#### Wissenschaftliche Veröffentlichungen als Review

- [7] M. Brodrecht, B. Kumari, H. Breitzke, T. Gutmann, G. Buntkowsky  
Chemically Modified Silica Materials as Model Systems for the Characterization of Water-Surface Interactions  
*Zeitschrift für Physikalische Chemie*, **2018**, 232, 1127.

\*These authors contributed equally to this work

---

---

## Wissenschaftliche Veröffentlichungen aus Kooperationen

- [8] B. Kumari, M. Brodrecht, H. Breitzke, M. Werner, B. Grünberg, H.-H. Limbach, S. Forg, E. P. Sanjon, B. Drossel, T. Gutmann, G. Buntkowsky  
Mixtures of Alcohols and Water confined in Mesoporous Silica: A Combined Solid-State NMR and Molecular Dynamics Simulation Study  
*The Journal of Physical Chemistry C*, **2018**, 122, 19540-19550.
- [9] J. Liu, Y. Xu, P. B. Groszewicz, M. Brodrecht, C. Fasel, K. Hofmann, X. Tan, T. Gutmann, G. Buntkowsky  
Novel dirhodium coordination polymers: the impact of side chains on cyclopropanation  
*Catalysis Science & Technology* **2018**, 8, 5190-5200.
- [10] A. S. Kiryutin, G. Sauer, D. Tietze, M. Brodrecht, S. Knecht, A. V. Yurkovskaya, K. L. Ivanov, O. Avrutina, H. Kolmar and G. Buntkowsky  
Ultrafast Single-Scan 2D NMR Spectroscopic Detection of a PHIP-Hyperpolarized Protease Inhibitor  
*Chemistry – A European Journal* **2019**, 25, 4025-4030.
- [11] S. Schöttner, M. Brodrecht, E. Uhlein, C. Dietz, H. Breitzke, A. Tietze, G. Buntkowsky, M. Gallei  
Amine-Containing Block Copolymers for the Bottom-Up Preparation of Functional Porous Membranes  
*Macromolecules*, **2019**, 52, 2631-2641.

## Vorträge:

- [1] M. Brodrecht, M. Werner, H. Breitzke, G. Buntkowsky  
Projekt Report Forschergruppe FOR 1583  
Jahrestreffen - FOR 1583, Rückersbach, 05/2015.
- [2] M. Brodrecht, H. Breitzke, G. Buntkowsky  
Chemically modified silica materials / Immobilization of collagen-like peptides on mesoporous silica materials  
Doktorandenseminar - FOR 1583, Darmstadt, 08/2015.
- [3] M. Brodrecht, H. Breitzke, G. Buntkowsky  
Projekt Report Forschergruppe FOR 1583  
Jahrestreffen - FOR 1583, Rückersbach, 05/2016.
- [4] M. Brodrecht, H. Breitzke, G. Buntkowsky,  
Synthesis and solid-state NMR characterization of biofunctionalized silica-nanopores: “Chemically modified silica materials as model systems for characterization of water-surface interactions” Doktorandenseminar - FOR 1583, Halle an der Saale, 08/2016.
- [5] M. Brodrecht, S. Hadjiali, H. Breitzke, G. Buntkowsky,  
Projekt Report LOEWE iNAPO - Peptide functionalization of silica-nanopores iNAPO  
Jahrestreffen, Schmitten, 11/2016.
-

- 
- [6] M. Brodrecht, H. Breitzke, G. Buntkowsky  
Projekt Report Forschergruppe FOR 1583 - Chemical modification of silica-nanopores  
Jahrestreffen - FOR 1583, Rückersbach, 03/2017.
- [7] M. Brodrecht, H. Breitzke, G. Buntkowsky  
Solid state NMR studies of functionalized silica Nanopores  
AK Treffen, Kirchen, 03/2017.
- [8] M. Brodrecht, S. Hadjiali, H. Breitzke, G. Buntkowsky,  
Projekt Report LOEWE iNAPO - Synthesis and characterization of surface-modified  
mesoporous silica by NMR-Spectroscopy  
iNAPO Jahrestreffen, Grasellenbach, 10/2017.
- [9] M. Brodrecht, K. Herr, M. de Oliveira Jr., V. Klimavičius, G. Buntkowsky,  
Introducing Labels into Biosystems  
Projekttreffen DFG/RFBR (Russian Foundation for Basic Research)  
Kooperationsprojekt, Darmstadt, 03/2019.

### Konferenz- und Tagungsbeiträge

- [1] M. Brodrecht, M. Werner, H. Breitzke, A. S. Thankamony, T. Gutmann, G. Buntkowsky,  
Synthesis and Solid State NMR Characterization of Noval Peptide/Silica Hybrid  
Materials, GDCh FGMR 37th Annual Meeting, Darmstadt Germany, Book of Abstracts  
2015.
- [2] M. Brodrecht, H. Breitzke, A. S. Thankamony, T. Gutmann, G. Buntkowsky,  
Synthesis and solid state NMR characterization of biofunctionalized silica-nanopores",  
Euromar Aarhus European Magnetic Resonance Meeting, Aarhus Denmark, Book of  
Abstracts 2016.
- [3] M. Brodrecht, H. Breitzke, T. Gutmann, G. Buntkowsky,  
Biofunctionalized silica-nanopores: Synthesis and characterization by solid state CP-  
MAS-NMR, 253th ACS National Meeting & Exposition, San Francisco, California, Book  
of Abstracts 2017.
- [4] M. Brodrecht, S. Hadjiali, H. Breitzke, T. Gutmann, G. Buntkowsky,  
Synthesis and characterization of biofunctionalized silica-nanopores, iNAPO  
Workshop, Darmstadt Germany, 2017.
- [5] M. Brodrecht, B. Kumari, H. Breitzke, T. Gutmann, G. Buntkowsky,  
Synthesis and Characterization of Tunable High Dense Peptide Functionalized Nano  
Channels: A solid state CP-MAS-NMR and DNP-NMR Study, 59th Experimental  
Nuclear Magnetic Resonance Conference, Orlando Florida, Book of Abstracts 2018.
- [6] M. Brodrecht, B. Kumari, H. Breitzke, T. Gutmann, G. Buntkowsky,  
Synthesis and Characterization of Tunable High Dense Peptide Functionalized Nano  
Channels, Doktorandentag. Darmstadt, Germany 2018
- [7] M. Brodrecht, K. Herr, B. Kumari, H. Breitzke, T. Gutmann, G. Buntkowsky,  
Synthesis of Peptide Functionalized Silica Nano Pores and their Characterization by  
Solid State NMR, AMPERE NMR School, Zakopane Poland, Book of Abstracts 2018.
-

---

---

## Danksagung

---

Das Anfertigen einer Dissertation ist ein ständiges Auf und Ab. Solch ein Projekt ist nur mit der Unterstützung von anderen Menschen möglich, sei es durch eine wissenschaftliche Beratung, einen guten Ratschlag, eine kreative Mittagspause, eine persönliche Unterhaltung oder eine helfende Hand. Bei all den Menschen, die in der gesamten Zeit für mich da waren, möchte ich mich hiermit bedanken.

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Gerd Buntkowsky für sein Vertrauen und die Möglichkeiten bedanken, die er mir während der Promotion überlassen hat. Speziell durch das Betreten eines thematischen Neulandes mit viel Verantwortung und neuen Herausforderungen konnte ich mich enorm weiterentwickeln.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Reggelin für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens meiner Arbeit.

Speziell bedanken möchte ich mich weiterhin bei Herrn Dr. Hergen Breitzke und Herrn PD Dr. Torsten Gutmann für die Durchführung der Festkörper NMR-Messungen und Betreuung und Durchführung von DNP-NMR-Messungen. Beide konnte mich im Laufe der Arbeit an die Technik der Festkörper-NMR heranführen und standen mir sowohl wissenschaftlich als auch persönlich immer zur Seite.

Für ihr enormes Engagement danke ich all meinem HiWi (Msc. Kevin Herr), meinen Bacheloranden (Bsc. Christopher Roß und Bsc. Till Wissel) und Masteranden (Bsc. Christopher Roß und Msc. Kevin Herr), die nicht nur eine massive Entlastung waren, sondern auch für ihre wissenschaftliche Arbeit, die mir über viele Stolpersteine geholfen hat, womit sie enorm zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders möchte ich weiterhin den Kollegen danken, ohne die viele Ergebnisse dieser Arbeit nie entstanden wären. Hierzu gehören Dr. A.S. Sofia Lilly Thankamony, Msc. Bharti Kumari und Msc. Sarah Bothe für die Durchführung von DNP-NMR-Messungen und Dr. Marcos de Oliveira Jr. für die Unterstützung bei den EPR-Messungen.

Des Weiteren gilt mein großer Dank all meinen Kollegen aus dem Arbeitskreis. Man kann nur so gut arbeiten, wie es einem durch das Arbeitsumfeld ermöglicht wird. Ich habe mich in all den Jahren enorm wohlfühlt und habe nicht nur Wissenschaftler, sondern auch Freunde

---

---

---

kennengelernt. Das beste Zeugnis für die Kollegen ist es, wenn man jeden einzelnen Morgen gern zur Arbeit kommt.

Wissenschaftliches Arbeiten ist keine Einzeldisziplin. Ich hatte die Chance in mehreren Projekten mit einer Vielzahl von Wissenschaftler/innen zusammenarbeiten zu können.

Daher danke ich im Folgenden Herrn Prof. Dr. Micheal Vogel und seiner Arbeitsgruppe für die Zusammenarbeit in der Forschergruppe und dem iNAPO-Projekt danken. Speziell erwähnt seien hierbei Dr. Markus Rosenstihl, Edda Klotz, Max Weigler und Sarah Schneider für die intensive Zusammenarbeit in vielen verschiedenen Bereichen und dem interdisziplinären, wissenschaftlichen Austausch.

Weiterhin danke ich Frau Prof. Dr. Annette Andrieu-Brunsen, Dr. Markus Gallei, Robert Brilmayer und Sebastian Schöttner, mit denen im Rahmen des iNAPO-Projekts neue Projektideen entwickelt und in Folgeprojekten weiterverfolgt werden konnten. Auch danke ich allen anderen Doktoranden die ich über diese Projekte kennenlernen durfte. Auch wenn nicht immer wissenschaftlich zusammengearbeitet wurde, so schweißt das gemeinsame Projekt enorm zusammen.

Außerdem danke ich allen Korrekturlesern für die kritische Betrachtung und das Feedback zu dieser Arbeit, insbesondere PD Dr. Torsten Gutmann, Msc. Kevin Herr und Msc. Lorenz Rösler.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Christian Hess und Dr. Philip Ruff für die Bereitstellung und Einweisung in die TGA. Ebenso danke ich Christiane Rudolph für die Anfertigung der Massenspektren und ihre wissenschaftliche Hilfeleistung.

Ich möchte all meinen Freunden danken. Sie haben mir stets den Rücken gestärkt und waren sowohl innerhalb als auch außerhalb der Uni immer für mich da. Ein spezieller Dank geht hierbei an Aki, Anka, David, Jonas, Marco, Sebastian und Steffen ohne deren Unterstützung ich es nie soweit geschafft hätte.

Nicht zuletzt geht der größte Dank an meine Familie. Ganz besonders geht dies an meine Eltern. Ihr habt mich mein ganzes Leben unterstützt und mir all das ermöglicht, was ich erreichen konnte.

---



---

---

## Inhaltsverzeichnis

---

Abkürzungsverzeichnis .....	ii
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Hochporöse Trägersysteme auf Silicabasis .....</b>	<b>4</b>
2.1. Mobil Composition of Matter No. 41 (MCM-41)	7
2.2. Santa Barbara <i>amorphous silica-15</i> (SBA-15)	8
<b>3. Organische Funktionalisierung von Silicaoberflächen .....</b>	<b>10</b>
3.1. Postsynthetische Funktionalisierung ( <i>Grafting</i> )	10
3.2. Direkte Funktionalisierung (Co-Kondensation)	12
3.3. Aminosäureanbindung an funktionalisierte Silicaoberflächen	13
<b>4. Charakterisierung organisch funktionalisierter Silicahybride .....</b>	<b>20</b>
4.1. Stickstoffadsorption nach BRUNAUER–EMMETT–TELLER (BET)	21
4.1.1. Spezifische Oberfläche und Porenvolumen	24
4.1.2. Porengrößenverteilung	26
4.2. Festkörper-Kernspinresonanz-Spektroskopie (ssNMR)	27
4.2.1. Eindimensionale Experimente	28
4.2.2. Zweidimensionale Experimente	33
<b>5. Peptidchemie .....</b>	<b>35</b>
5.1. Festphasen-Peptidsynthese (SPPS)	35
5.1.1. Kopplungsreagenzien	37
5.2. Spin-Labeling	39
5.2.1. Anwendung von Spin-Labeln in DNP und EPR	40
5.2.2. Herstellung spinmarkierter Peptide	42
<b>6. Aufgabenstellung .....</b>	<b>45</b>
<b>7. Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>47</b>
7.1. Hochgeordnete, poröse Silicamaterialien	47
7.2. Funktionalisierung poröser Silicamaterialien	75
7.3. Anbindung von Aminosäuren an poröse Silicamaterialien	77
7.4. Anbindung von stimuli-responsiven Gruppen in porösen Silicamaterialien	97
7.5. Funktionalisierung von Aminosäuren für DNP-Anwendungen	103
<b>8. Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>139</b>
<b>9. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>142</b>

---

---

---

## Abkürzungsverzeichnis

---

AG	Abgangsgruppe
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BJH	Barret, Joyner and Halenda
BOC	Butyloxycarbonyl
Bzl	Benzyl
CLCT	<i>cooperative liquid-crystal templating</i>
CP	<i>cross polarization</i> (Kreuzpolarisation)
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DFT	Dichtefunktionaltheorie
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DNP	<i>dynamic nuclear polarization</i> (Dynamische Kernspinpolarisation)
DSC	dynamische Differenzkalorimetrie
EA	Elementaranalyse
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EI	Elektronenstoß-Ionisation
EPR	<i>electron paramagnetic resonance</i> (Elektronenspinresonanz)
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
HATU	[ <i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium-hexafluorophosphat]
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazol
IR	Infrarot
MAS	<i>magic angle spinning</i>
MCM-41	Mobil Composition of Matter No. 41
MS	Massenspektrometrie
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
Oxyma	Hydroxyiminocyanessigsäureethylester
PEG	Polyethylenglykol
PPG	Polypropylenglykol
PROXYL	(2,2,5,5-Tetramethylpyrrolidin-1-yl)oxyl
PS	Polystyrol
REDOR	<i>Rotational Echo Double-Resonance</i>
REM	Rasterelektronenmikroskopie
SBA-15	Santa Barbara <i>amorphous silica</i> -15
SG	Schutzgruppe
SPPS	<i>solide phase peptide synthesis</i>
ssNMR	( <i>solid state</i> ) Festkörper-Kernspinresonanz-Spektroskopie
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMPO	(2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl
TEOS	Tetraethylorthosilicat
TGA	thermogravimetrische Analyse
TIPS	Triisopropylsilan
TLCT	<i>true liquid-crystal templating</i>
TMOS	Tetramethylorthosilicat
TOTAPOL	1-(TEMPO-4-oxy)-3-(TEMPO4-amino)propan-2-ol
TRT	Trityl(Triphenylmethyl)

---

---

## 1. Einleitung

---

Die lebende Natur inspiriert die Wissenschaft schon seit Jahrhunderten. Speziell die Materialvielfalt der Natur und deren damit verbundene Eigenschaftspalette ist ein oft untersuchtes Thema. Schon lange ist dieses Feld allerdings kein reines Thema der Biologie mehr, sondern erstreckt sich über viele Teilbereiche der Naturwissenschaften. Dies rührt vor allem daher, dass natürlich vorkommende Materialien oft Hybride aus organischen und anorganischen Bestandteilen sind, deren Zusammenwirken neue Materialeigenschaften ergeben. Diese sogenannten Biohybride bieten ein enormes Potential für die Entwicklung neuer Materialien für Wissenschaft und Technik. Sie eröffnen eine Materialgattung mit einer Vielzahl von Anwendungsfeldern in *drug delivery*, Nanomedizin, Sensorik, Elektronik, Katalyse und erneuerbaren Energien.<sup>[1-4]</sup>

Natürliche Hybride weisen oft poröse Strukturen auf und dienen Wissenschaftlern in den letzten Jahren immer mehr als Vorbild für ihre Forschung. Knochenmaterialien und Kieselalgen bestehen beispielsweise aus einem porösen, anorganischen Trägersystem und organischen Anteilen, die mit dem Trägersystem verbunden sind. Insbesondere das Zusammenspiel von Robustheit und deren gleichzeitiger Flexibilität machen Knochen zu einem faszinierenden Materialvorbild für moderne Hochleistungsmaterialien. Die synthetische Nachbildung solcher bioverträglichen Hochleistungsmaterialien könnten weiterhin als künstliche Knochen- und Knorpelersatzmaterial für Implantate verwendet werden. Weiterhin sind biomedizinische Anwendungsgebiete wie *drug delivery* und *tissue engineering* naheliegend. Die meisten biologischen Hybride basieren auf Kalziumcarbonat (Schalen und Kutikula), Phosphaten (Knochen und Zähne) und Silicaten (Kieselalgen, Schwämme). Im Bereich der industriellen Anwendungen synthetischer Hybridmaterialien finden von diesen Beispielen die silicabasierten Systeme die meisten Anwendungen.<sup>[1, 5]</sup>

Kieselalgen (*Diatomeen*) gehören wohl zu den ungewöhnlichsten Lebewesen, für dessen Aufbau Silicate einen essenziellen Bestandteil bilden. Bei ihnen handelt es sich um einzellige Organismen, die in einer Silicaschale leben. Im Inneren dieser Schale befinden sich Biomoleküle wie Proteine, Enzyme und Antikörper, was die Einzeller zu einer Art hybridem Bioreaktor macht. Da diese Lebewesen auf biologische Reize reagieren, bieten sie ein Vorbild für sensorische Funktionen. Die Schale, auch „Frustel“ genannt, bildet eine Vielzahl von hochkomplexen, hierarchisch aufgebauten Formen aus, deren Komplexität zwar schon lange bekannt, aber deren Entstehung bisher kaum verstanden ist (Abbildung 1.1).

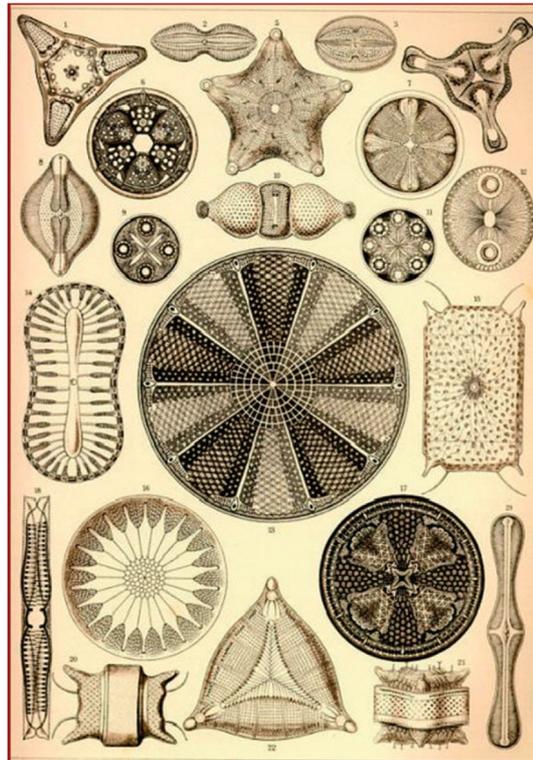


Abbildung 1.1: Kieselalgen von Ernst Haeckel in „Kunstformen der Natur“ 1904

Für die Kieselalgen ist die Schönheit der Formen allerdings nicht das Entscheidende, denn für sie ist die Funktionalität dieser Schalen ausschlaggebend. Auf der einen Seite ist der Silicatträger mechanisch hoch belastbar, um das fragile Innere zu schützen, auf der anderen Seite muss die Schale porös sein, um Nährstoffen und Metaboliten die Diffusion ins Innere zu erlauben. Um diese spezielle Materialklasse hat sich ein eigenes Wissenschaftsfeld entwickelt, die „*Diatom Nanotechnology*“.<sup>[6]</sup> Dieses interdisziplinäre Feld erstreckt sich von der Biologie, Chemie und Physik über die Materialwissenschaft bis hin zu den Ingenieurwissenschaften. Hauptziel dieser Forschung ist es der Natur nachempfundene Hybridmaterialien zu entwickeln. Diese sind bisher synthetisch nicht herstellbar aufgrund der Komplexität ihrer Strukturen. Um diese Materialien nachbilden zu können, müssen zunächst die natürlichen Vorbilder besser verstanden werden.<sup>[1, 6, 7]</sup> Ein Ansatz besteht darin, natürlich vorkommende Kieselalgen genau zu charakterisieren und aus den gewonnenen Erkenntnissen Rückschlüsse für die Synthese zu ziehen (*top down*). Ein anderer Ansatz beschäftigt sich damit, weniger komplexe Modellsysteme herzustellen und zu charakterisieren. Die Komplexität der Modellsysteme kann im Anschluss schrittweise gesteigert werden, um sich dem natürlichen Material anzunähern (*bottom up*). In beiden Fällen muss sowohl der anorganische Träger als auch dessen organische Funktionalisierung im Detail verstanden werden. In der vorliegenden Arbeit wird der zweite Ansatz verfolgt.<sup>[1, 2, 8]</sup>

Die Herausforderung bei der Herstellung der Hybridmaterialien liegt sowohl in der Kontrolle der Größe, Form und Einheitlichkeit der Porenstruktur des Trägermaterials, als auch in der

---

gezielten und einheitlichen Funktionalisierung der Oberflächen mit organischen Molekülen. Da sich häufig auch die Natur templatbasierter Verfahren zur Herstellung solcher Hybride zu Nutze macht, kommen diese Verfahren auch für die Nachbildung der Hybride in Frage.

In der vorliegenden Arbeit soll der Syntheseweg des *bottom up* Ansatzes zur Herstellung organisch/anorganischer Hybride auf Silicabasis dargestellt werden:

Zunächst werden in Kapitel 2 die Grundlagen und Mechanismen der templatbasierten Synthese poröser Silicamaterialien diskutiert, sowie eine Auswahl bekannter Materialien dieser Gattung dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit wird der *bottom up* Ansatzes zur Herstellung einer Reihe neuartiger organisch/anorganischer Hybride auf Silicabasis für unterschiedliche Anwendungen eingesetzt. Die Arbeit ist kumulativ aufgebaut und wie folgt strukturiert:

Im Anschluss an die Einleitung werden in Kapitel 2 die Grundlagen und Mechanismen der templatbasierten Synthese poröser Silicamaterialien diskutiert, sowie eine Auswahl bekannter Materialien dieser Gattung vorgestellt.

Anschließend werden in Kapitel 3 sowohl Linker zur Oberflächenmodifikation der Trägersysteme als auch Anbindungsstrategien für Aminosäuren und Peptide vorgestellt und deren Vor- und Nachteile diskutiert.

Danach werden in Kapitel 4 die Grundlagen der beiden wichtigen Charakterisierungsmethoden (Festkörper-NMR und Gasadsorptionstheorie) für organisch funktionalisierte, poröse Silicamaterialien vorgestellt, sowie deren Potential und Grenzen aufgezeigt.

In Kapitel 5 werden die Grundlagen der Festphasen-Peptidsynthese beschrieben und Kopplungsstrategien zur Verknüpfung und chemischen Modifikation von natürlichen Aminosäuren vorgestellt.

Nach kurzer Darstellung der Ziele dieser Arbeit in Kapitel 6, werden die Ergebnisse der Arbeit in Kapitel 7 vorgestellt und diskutiert. Dies geschieht in kumulativer Form. Dies beginnt mit der Synthese hochgeordneter Silicananoporen, deren Modifikation mit organischen Linkern und anschließender Funktionalisierung mit verschiedenen organischen Molekülen wie Aminosäuren, Peptiden und Farbstoffen. Anschließend wird die Synthese von modifizierten Aminosäuren für spezielle NMR-Anwendungen beschrieben.

Abschließend werden die erhaltenen Ergebnisse in Kapitel 8 zusammengefasst, diskutiert und Vorschläge für weitere Forschungsvorhaben auf Basis dieser Arbeit aufgezeigt.

Hieran schließt sich das Literaturverzeichnis an.

---

---

## 2. Hochporöse Trägersysteme auf Silicabasis

---

Die Herstellung hochporöser Silicamaterialien mit hohen spezifischen Oberflächen ist ein großes Thema in der aktuellen Wissenschaft.<sup>[2, 9]</sup> Poröse Materialien werden abhängig von ihren Porengrößen in verschiedene Klassen unterteilt. Hierzu zählen laut IUPAC die mikro-, meso- und makroporösen Materialien (Tabelle 2.1).<sup>[10-12]</sup>

Tabelle 2.1: Klassifizierung poröser Materialien und deren Porengrößen nach IUPAC.

Klassifizierung	Porendurchmesser [nm]
Mikroporen	< 2
Mesoporen	2 – 50
Makroporen	> 50

Schon im 19. Jahrhundert wurde die Gruppe der Zeolithe entdeckt und wird für eine Vielzahl von Anwendungen, in der Medizin, der Katalyse bis in die Materialwissenschaften, eingesetzt.<sup>[2, 13, 14]</sup> In Zeolithen sind die Porengrößen allerdings recht klein (<2 nm) und daher für viele Anwendungen nicht geeignet. Anfang der 1990er Jahren wurde ein völlig neues Syntheseverfahren für silicabasierte poröse Materialien entwickelt (MCM-41)<sup>[15]</sup>, welches Ende der 1990er Jahre weiterentwickelt wurde (SBA-15)<sup>[16]</sup>. Diese neuen, templatbasierten Synthesewege ermöglichen deutlich größere Porendurchmesser mit einstellbaren Porengrößen.<sup>[17]</sup> Zu Beginn wurden diese Materialien ausschließlich aufgrund ihrer hohen Ordnung und spezifischen Oberfläche z.B. als Molekularsiebe eingesetzt.<sup>[15]</sup> Ihr Anwendungspotential lässt sich jedoch durch chemische Funktionalisierung noch einmal deutlich steigern. Die Oberflächen der Materialien sind dicht mit Silanolgruppen bedeckt, welche eine verhältnismäßig einfache chemische Modifikation der Oberflächen erlauben.<sup>[18-24]</sup> Dieses Merkmal hebt diese Klasse von Silicamaterialien deutlich vor anderen porösen, anorganischen Materialien, wie z.B. Kohlenstoff-Nanomaterialien, hervor. So eignen sich diese Trägersysteme zur Herstellung einer Vielzahl anorganisch-organischer Hybridmaterialien.

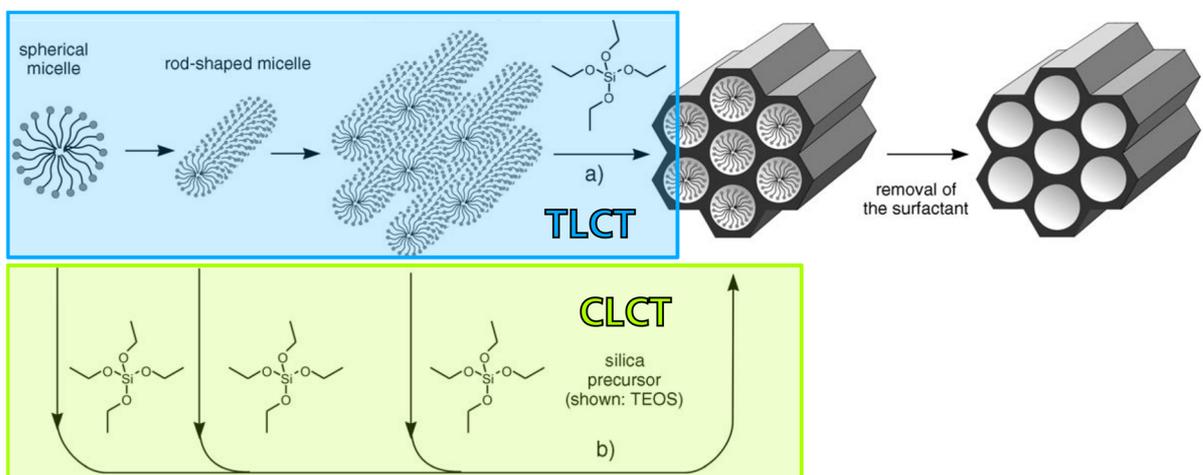
Die typische Struktur des Silicaporensystems in MCM-41 oder SBA-15 ist periodisch, mit engen Porengrößenverteilungen und einstellbaren Porengrößen in einem Bereich von 2 bis 30 nm. Dieses hochgeordnete, mesoporöse Porensystem führt zu extrem hohen spezifischen Oberflächen von über 1000 qm/g und Porenvolumina über 1 cm<sup>3</sup>/g.<sup>[17, 25]</sup>

Über die Jahre entwickelten sich neben MCM-41 und SBA-15 weitere templatbasierte Syntheseverfahren für Silicamaterialien, wie z.B. MCM-48, MCM-50 und SBA-1, SBA-3, SBA-6, SBA-16 durch die sich viele verschiedene Porenarchitekturen erzeugen lassen.<sup>[26-28]</sup>

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen mit MCM-41 und SBA-15 die bekanntesten Vertreter dieser Materialklasse. Während der Synthesen beider Materialien kommen Templatmoleküle

zum Einsatz, die Form und Dimensionen des Porensystems vorgeben. Diese Templatmoleküle bilden unter passenden Bedingungen eine hexagonale, lyotrope, flüssigkristalline Phase aus und geben so den eingesetzten Silicapräkursoren die Ordnung des Silicamaterials vor. Als Präkursoren werden für gewöhnlich Silicaquellen wie Tetraethylorthosilicat (TEOS) oder Tetramethylorthosilicat (TMOS) eingesetzt (Schema 2.1). Als oberflächenaktives Template (engl. *Surfactant*) kommen vor allem eine Vielzahl von Molekülen mit einer kleinen polaren Kopfgruppe und einer langen, unpolaren Schwanzgruppe zum Einsatz. Wie genau die Bildung des hochgeordneten Silicasystems vonstattengeht wird schon seit Jahren diskutiert.<sup>[29]</sup> Bis heute wurden zwei mögliche Reaktionswege/Mechanismen vorgeschlagen, zum einen das *true liquid-crystal templating* (TLCT) und zum anderen das *cooperative liquid-crystal templating* (CLCT).<sup>[25]</sup>

Das TLCT erfolgt meist bei hohen Surfactantkonzentrationen. Es geht davon aus, dass sich dabei nach dem Lösen des Templates erst sphärische, dann röhrenförmige Mizellen ausbilden und daraus direkt die flüssigkristalline Phase entsteht (Schema 2.1a). In die Zwischenräume dieser Struktur können sich anschließend die Präkursormoleküle einlagern, woraus die Porenstruktur des Silicamaterials entsteht (a).<sup>[25, 29, 30]</sup>



Schema 2.1: Bildung des mesoporösen Materials nach *true liquid-crystal templating* (TLCT) und dem *cooperative liquid-crystal templating* (CLCT) adaptiert von Hoffmann et.al.<sup>[25]</sup>

Bei geringeren Surfactantkonzentrationen verläuft die Bildung des Porensystems eher nach dem Modell des CLCT. Hier können die Template alleine keine vollständig flüssigkristalline Phase ausbilden. Erst mit Hilfe weiterer Interaktionen zu anderen Molekülen in Lösung ist dies möglich. Die Template bilden daher, je nach Bedingungen, zuerst sphärische oder röhrenförmige Mizellen, um die sich einige Monolagen des Silicapräkursors anlagern. Nach der Anlagerung aggregieren diese Röhren dann zum fertigen, hexagonalen Porensystem (Schema 2.1b).<sup>[25, 29, 31-33]</sup>

Diese beiden Reaktionswege lassen sich allerdings nur sehr schwer eindeutig für das gewählte System vorhersagen. Es spielt nicht nur die Surfactantkonzentration eine ausschlaggebende Rolle, sondern noch viele weitere Reaktionsparameter, wie z.B. der pH-Wert oder die Temperatur. Es kann also auch bei recht geringen Surfactantkonzentrationen zu einem TLCT Verlauf kommen, sofern genügend andere Reaktionsparameter die Bildung der flüssigkristallinen Phase unterstützen. Der Einfluss dieser Parameter lässt sich meist durch die Interaktion zwischen der Kopfgruppe des Templates und dem Silicapräkursor erklären (Abbildung 2.1).<sup>[34, 35]</sup> Findet die Reaktion beispielsweise im basischen Milieu statt, liegen die Silicapräkursoren als anionische Cluster vor, die mit einer positiv geladenen Kopfgruppe des Surfactants interagieren können und so dessen Anlagerung fördern (Abbildung 2.1a).<sup>[32, 33]</sup> Findet die Reaktion im stark sauren Bereich ( $\text{pH} < 2$ ) Cluster (Abbildung 2.1b).<sup>[36]</sup>

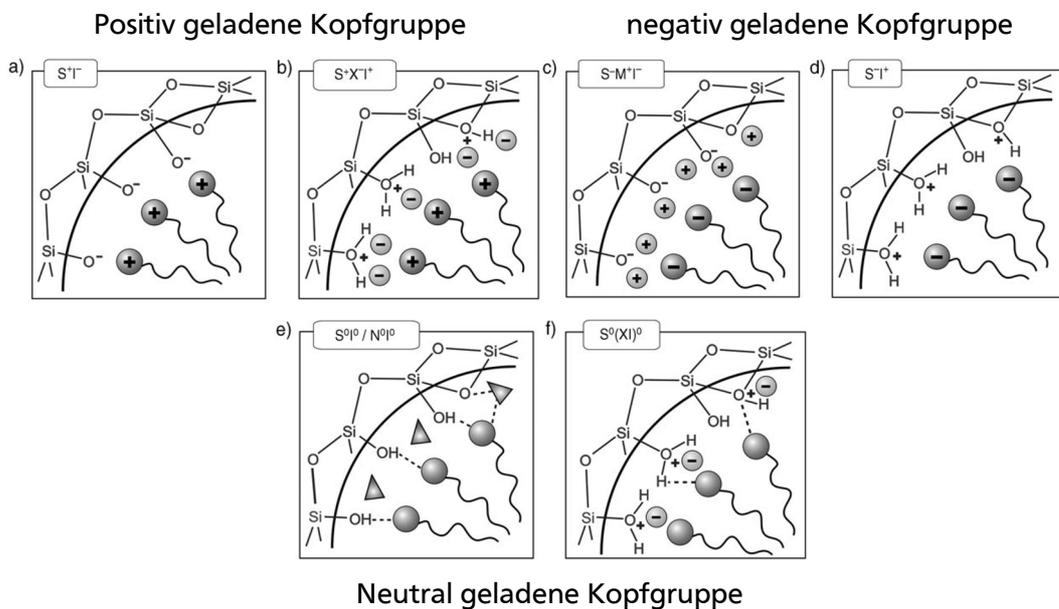


Abbildung 2.1: Mögliche Interaktionen zwischen der anorganischen Silicaspezies und den Kopfgruppen der verwendeten Surfactants in Abhängigkeit des pH-Wertes adaptiert von Hoffmann et.al.<sup>[25]</sup>

Genau entgegengesetzt verhalten sich anionische Templates in basischer bzw. saurer Umgebung. (Abbildung 2.1c,d). Hier dominiert bei der Interaktion zwischen Template und Präkursor ein elektrostatischer Effekt, weshalb sich der Ablauf der Reaktion durch Variation des pH-Werts bzw. der verwendeten ionischen Spezies maßgeblich verändern lässt. Beim Einsatz nichtionischer Surfactants spielen Interaktionen, wie Wasserstoffbrückenbindungen, die übergeordnete Rolle (Abbildung 2.1e,f).<sup>[25, 37]</sup> In allen Synthesewegen entsteht am Ende ein hochgeordnetes Silicaporensystem, welches mit dem eingesetzten Template gefüllt ist. Um das Porensystem zu öffnen, muss das Template entfernt werden. Dies kann, je nach Art des Templates, über verschiedene extraktive Methoden erfolgen. In den meisten Fällen wird der

organische Surfactant durch Calcination des Materials bei 500-600°C verbrannt. Das bei diesen Temperaturen stabile Silicagerüst bleibt dabei erhalten und das Porensystem wird freigelegt. Die bisher beschriebenen Parameter stellen nur die wichtigsten Einflussfaktoren für die Synthese von hochporösen Silicamaterialien dar, die über templatbasierte Routen hergestellt werden können. So kompliziert die Synthese durch die vielen Einflussfaktoren auf das Ergebnis auch ist, so weitreichend ist auch das Spektrum der erzeugbaren Strukturen, die ein enormes Potential für die Herstellung maßgeschneiderter Materialien bieten. Nachfolgend werden die beiden Materialklassen, die in dieser Arbeit im Fokus stehen, genauer erläutert.

## 2.1. Mobil Composition of Matter No. 41 (MCM-41)

Einer der bekanntesten Vertreter der hochporösen Silicate ist das *Mobil Composition of Matter No. 41* (MCM-41). Dieses wurde erstmals Anfang der 1990er Jahre von der *Mobil Research and Development Corporation* hergestellt, um es als Träger für Katalysatoren und als Molekularsieb zu verwenden.<sup>[15]</sup> Diese neue Materialklasse stellte eine Revolution im Bereich der porösen Silicamaterialien dar. Sie überschritt erstmals die Porengrößen der bis dato verwendeten Zeolithe, bei vergleichbaren spezifischen Oberflächen. Bis dahin waren hoch geordnete Silicate nur in Form von Zeolithen zugänglich, die allerdings nur einen sehr kleinen Porendurchmesser von 1-2 nm erreichen konnten.<sup>[38]</sup> Materialien mit größeren Porendurchmessern ließen sich nur als parakristalline und amorphe Silicastrukturen erhalten. Die 1992 von der *Mobil Research and Development Corporation* beschriebene Synthese ließ es erstmals zu, Materialien mit definierten Porengrößen im Bereich von 2-10 nm gezielt darzustellen. Dabei entsteht eine hexagonale Anordnung (Raumgruppe  $p6mm$ ) aus linearen Poren mit einer Wanddicke von 1-3 nm.<sup>[15, 17]</sup> Für die Synthese werden klassische Template aus der Gruppe der Alkyl-Trimethylammonium-Salze **1** eingesetzt. Sie bestehen aus einer positiv geladenen, hydrophilen, kationischen Kopfgruppe ( $\text{CH}_3\text{N}^+$ ), mit einem Halogenid-Ion ( $\text{Hal}^-$ ) als Gegenion und einer langen, hydrophoben Alkylkette (R) als Schwanzgruppe (Abbildung 2.2). In wässriger, basischer Lösung sind diese in der Lage röhrenförmige Mizellen zu bilden und als Templat für die Ausbildung der Porensysteme zu dienen.

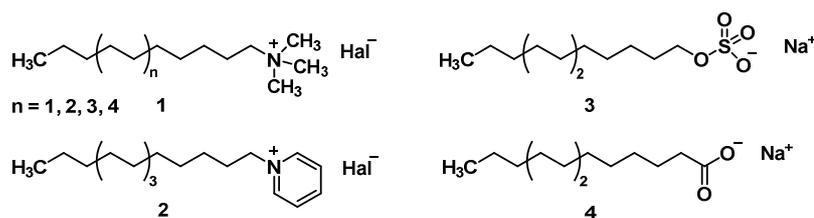


Abbildung 2.2: Allgemein Strukturformel möglicher Surfactants für die MCM-Synthese

---

Die Synthese von MCM-41 Materialien wurde über viele Jahre weiter erforscht, um Mechanismus und Einfluss der verschiedenen Reaktionsparameter genauer zu verstehen.<sup>[39-43]</sup> Im Zuge dessen wurden auch neue Arten von Templaten wie z.B. Alkyl-Pyridinium-Salze **2**<sup>[42]</sup> oder später auch langkettige Sulfonate **3** (R-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) und Carboxylate **4** (R-COO<sup>-</sup>) verwendet<sup>[44]</sup> (Abbildung 2.2). Die Verwendung dieser Template führte allerdings oft zu einer neuen Namensgebung, und die daraus resultierenden Materialien sind meist nicht mehr unter dem klassischen Namen MCM-41 zu finden, folgen aber prinzipiell der altbekannten Synthesestrategie.

## 2.2. Santa Barbara *amorphous silica-15* (SBA-15)

Im Jahre 1998 wurde eine neue Variante der hochporösen Silicamaterialien von ZHAO *et al.*<sup>[16]</sup> an der *University of California* in Santa Barbara vorgestellt und erhielt daher den Namen *Santa Barbara Amorphous silica* (SBA-15). Hierbei handelt es sich ebenfalls um ein Material mit hexagonaler Porenanordnung und der Raumgruppe p6mm. Im Vergleich zum schon bekannten MCM-41 konnten mit SBA-15 deutlich größere Porendurchmesser von bis zu 20 nm und fast doppelt so dicken Wandstärken von 3-6 nm erreicht werden.<sup>[16]</sup> Gerade die größere Wandstärke sorgt für eine Stabilisierung des Materials, was SBA-Materialien für die nachträgliche Weiterverarbeitung deutlich attraktiver macht als MCM-41. Gerade wenn in den Poren sehr große Moleküle, wie Proteine oder Katalysatoren, untergebracht werden sollen, ist auch der größere Porendurchmesser von Vorteil.

Die geordnete Porenstruktur von SBA-15 wird zwar, wie bei MCM-41, durch die Bildung einer flüssigkristallinen Phase spezieller Template erreicht, allerdings unterscheiden sich sowohl die eingesetzten Template, als auch die Syntheseparameter drastisch im Vergleich zu MCM-41. Es werden sogenannte Poloxamere, d.h. amphiphile Block-Copolymere aus Polyethylenglycol (PEG) und Polypropylenglycol (PPG), als nichtionische Template eingesetzt. Diese Polymerklasse wurde bereits in den 1950er Jahren von der Firma *BASF* entwickelt. Seither werden sie unter dem Namen *Pluronic*® vertrieben und als Tenside vielfältig in der medizinischen Forschung eingesetzt.<sup>[45]</sup> Bei der klassischen SBA-15 Synthese von ZHAO *et al.* wird ein symmetrisches Poloxamer mit der Zusammensetzung PEG<sub>20</sub>-PPG<sub>70</sub>-PEG<sub>20</sub> (Abbildung 2.3) eingesetzt. Die Kombination aus äußerem, hydrophilen PEG-Teil und innerem, hydrophoberen PPG-Teil bildet in saurer, wässriger Umgebung das flüssigkristalline System zur Herstellung der hochgeordneten Silicastruktur.<sup>[16]</sup>

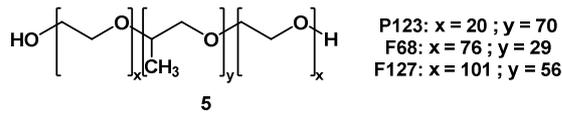


Abbildung 2.3: Allgemein Strukturformel von Pluronic P123, F127, P68

Selbst bei Verwendung des gleichen Templates, mit der Zusammensetzung 20-70-20, lassen sich Parameter wie Porendurchmesser, Wandstärke, spezifische Oberfläche und Porenvolumen, durch die Veränderung diverser Reaktionsparameter, wie Temperatur und pH-Wert, variieren.<sup>[16, 46, 47]</sup> In späteren Weiterentwicklungen der SBA-15 Synthese wurden auch Einflüsse der Block-Copolymergröße und -zusammensetzung sowie deren Einfluss auf das entstehende Porensystem untersucht.<sup>[16, 48]</sup> Durch den Einsatz von größeren Polymeren, wie zum Beispiel dem *Pluronic*<sup>®</sup> F127, konnten auch deutliche größere Porendurchmesser, von bis zu 30 nm, erreicht werden.<sup>[49, 50]</sup>

---

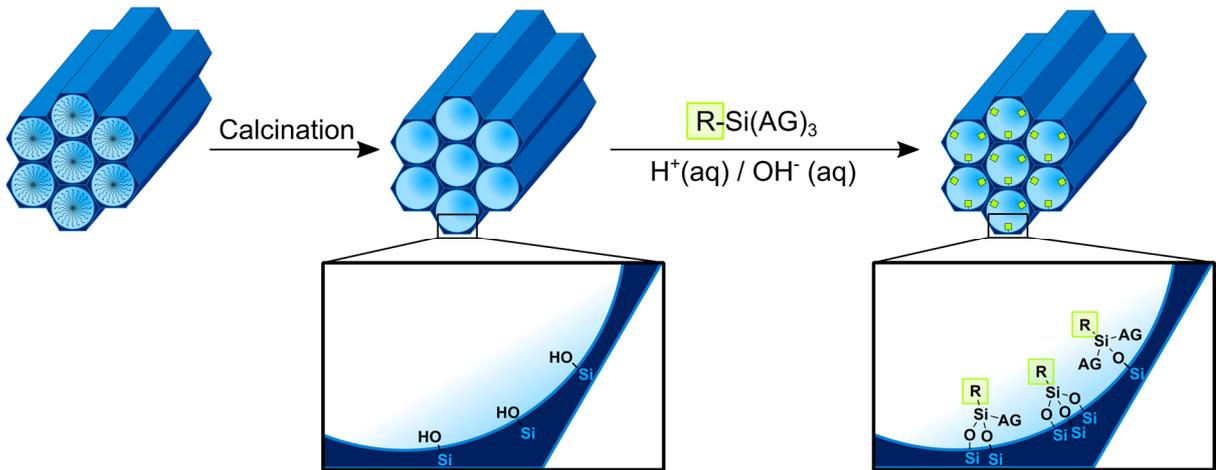
### 3. Organische Funktionalisierung von Silicaoberflächen

---

Während zu Beginn der 1990er Jahre die neu gefundenen hochporösen Silicastrukturen MCM-41 und später SBA-15 meist ohne weitere Modifizierung zum Einsatz kamen, werden diese in der modernen Forschung immer öfter vor der eigentlichen Verwendung mit organischen Molekülen funktionalisiert.<sup>[9, 25]</sup> Die Kombination aus hochspezifischem, porösem Träger mit genau definierter Porengröße und einer nachträglichen Funktionalisierung eröffnet enormes Potential für Anwendungen in der Materialforschung und Katalyse. Solche hybriden Systeme lassen sich auf verschiedene Weise realisieren. Die anspruchsvollste, aber auch potenteste Variante, setzt eine kovalente chemische Verbindung zwischen dem anorganischen Silicaträger und der gewünschten Funktionalisierung voraus. Um solch eine kovalente Bindung herzustellen stehen zwei Wege zu Verfügung. Bei postsynthetischen Funktionalisierungen wird der zuvor hergestellte anorganische Silicaträger mit einem Organosilicalinker umgesetzt (*Grafting*). Die direkte Funktionalisierung, schon während der Ausbildung des Silicaträgersystems, verwendet eine gleichzeitige Kondensation des Organosilicalinkers mit dem verwendeten Silicapräkursor (Co-Kondensation). Diese beiden Methoden sollen in den folgenden zwei Abschnitten erläutert und gegenübergestellt werden.

#### 3.1. Postsynthetische Funktionalisierung (*Grafting*)

Die *Grafting* Methode beschreibt die Anbindung eines organischen Linkers an die Oberfläche des bereits zuvor hergestellten Silicaträgers. Dieser Prozess wird für zwei Silane auch Silanisierung genannt. Allgemein werden hierfür Silane mit der typischen Zusammensetzung  $R_x \text{ Si}(AG)_y$  eingesetzt, wobei R für den organischen Teil und AG für eine hydrolysierbare Abgangsgruppe steht. Diese hydrolysierbare Gruppe wird im Zuge der Oberflächenfunktionalisierung abgespalten und der Linker somit durch Kondensation an die Si-OH Gruppen der Silicaoberfläche gebunden (Schema 3.1).<sup>[25, 44]</sup> Je nach Art des Linkers und der Effizienz der Anbindung können einfach, zweifach oder dreifach gebundene Linkerspezies an der Oberfläche entstehen.



Schema 3.1: Calcination und darauffolgendes *Grafting* zur organisch Modifikation von mesoporösen Silicaoberflächen mit Organosilanen des Typs  $R-Si(AG)_3$ . R=organische funktionelle Gruppe, AG=Abgangsgruppe.

Für diese Art von Funktionalisierung steht eine Vielzahl von Linkern zur Verfügung. Die bekanntesten Vertreter nutzen als Abgangsgruppe (AG) Alkoxyreste (-OAlkyl) oder Chlorid (-Cl). Üblich sind Methoxy (-OCH<sub>3</sub>) oder Ethoxy (-OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) Abgangsgruppen. Die Art der Abgangsgruppe bestimmt dabei die Geschwindigkeit der Reaktion. Aufgrund ihrer hohen Reaktionsgeschwindigkeit kommen die Chloridderivate für eine gleichmäßige, kontrollierte Anbindung nicht in Frage. Die Hydrolyse Alkoxyderivate hingegen erfolgt langsam genug, um eine gleichmäßige Anbindung zu gewährleisten. Die Kondensation mit der Oberfläche beginnt für die Methoxyspezies bei Raumtemperatur und für das Ethoxyderivat erst ab Temperaturen >100 °C.<sup>[44]</sup> Diese Unterschiede in den Reaktionsbedingungen können für das jeweilige Anwendungsgebiet gezielt gewählt werden. Da diese Linker in den meisten Fällen als Ankergruppe für eine weitere organische Funktionalisierung der Oberfläche dienen sollen, werden für R funktionelle Gruppen verwendet, die im Anschluss weiter umgesetzt werden können. Eine Auswahl der wichtigsten Vertreter ist in Abbildung 3.1 gezeigt.

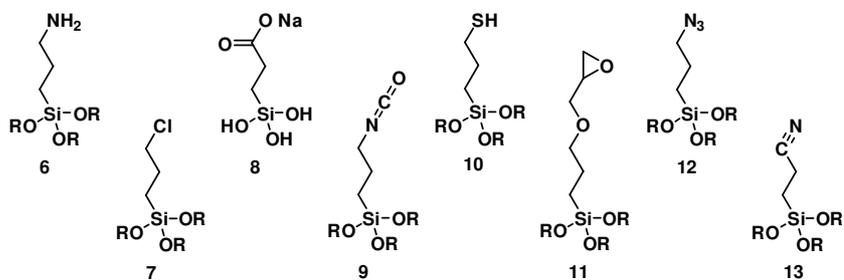


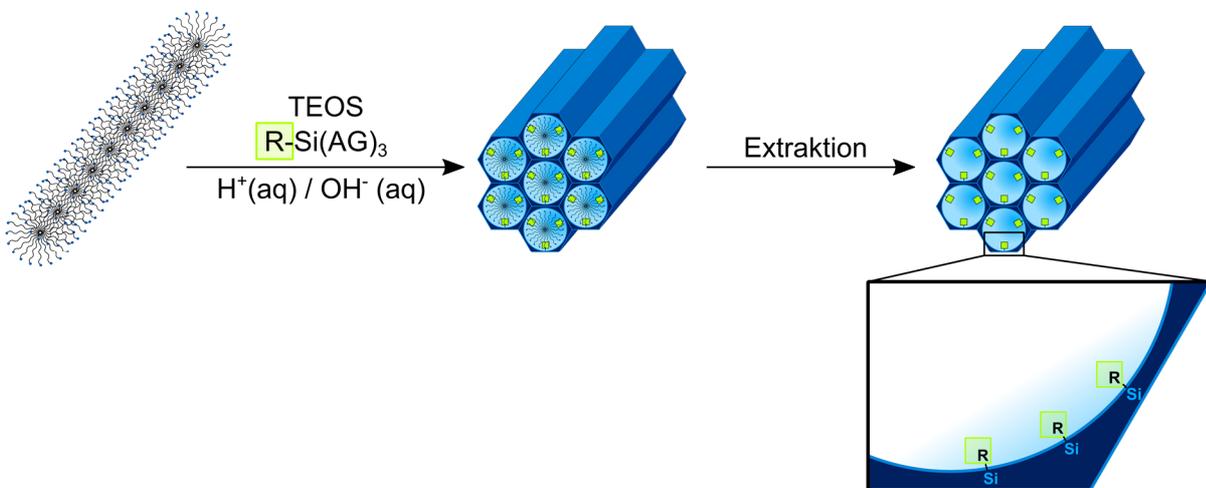
Abbildung 3.1: Strukturformeln einiger Beispiele für mögliche Linker zur Anbindung an Silicaoberflächen (R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)

Diese Linkervielfalt macht die *Grafting* Methode vielseitig einsetzbar. Da das hochgeordnete Silicaporensystem vor der Funktionalisierung durch *Grafting*, schon voll ausgebildet ist, wird

dieses durch die Funktionalisierung nicht beeinträchtigt. Durch das Aufpfropfen des Linkers wird allerdings eine weitere Schicht auf das bereits existierende Silicanezwerk aufgebracht, was oft eine deutliche Reduktion der spezifischen Oberfläche und des Porenvolumens zur Folge hat. Der größte Nachteil dieser Methode ergibt sich allerdings durch die Limitierungen der Diffusion im Porensystem. Gerade im Falle von MCMs und SBAs mit ihren sehr hohen Aspektverhältnissen erreichen die Linkermoleküle oft nicht das Innere der Pore. Diese Diffusionsproblematik kann daher zu ungleichmäßiger Linkerverteilung an der Porenoberfläche oder, im schlimmsten Fall, zum Verstopfen der Poreneingänge führen.<sup>[25]</sup>

### 3.2. Direkte Funktionalisierung (Co-Kondensation)

Die Co-Kondensationsmethode bedient sich, im Gegensatz zur *Grafting*-Methode, eines „one pot“ Ansatzes. Die Linker werden hierbei schon während der Ausbildung des Silicaporensystems zur Reaktionslösung zugegeben. Dadurch wird der Linker noch während der Bildung der Porensysteme in das Silicanezwerk integriert (Schema 3.1). Für diese Herangehensweise eignen sich gängige Silicapräkursorren wie TEOS oder TMOS in Verbindung mit den bereits vorgestellten Alkoxysilanen der allgemeinen Formel  $R-Si(AG)_3$ .



Schema 3.2: Co-Kondensationsmethode zur organisch Modifikation von mesoporösen Silicaoberflächen mit Organosilanen des Typs  $R-Si(AG)_3$ . R=organische funktionelle, Gruppe AG=Abgangsgruppe.

Für die Co-Kondensation lassen sich, im Gegensatz zum *Grafting*, nicht alle Linker verwenden. Durch die Zugabe des Linkers darf das fragile Templatsystem, das für die hohe Ordnung des Materials sorgen soll, nicht negativ beeinflusst werden.<sup>[48]</sup> Daher lassen sich leicht hydrolysierbare oder besonders reaktive funktionelle Gruppen, wie beispielsweise die Epoxidfunktion des (3-Glycidylxypropyl)triethoxysilan **9**, die Isocyanatgruppe des

---

(3-Isocyanatopropyl)triethoxysilan **11**, oder die halogenierte Form des (3-Chlorpropyl)triethoxysilan **7**, auf diesem Wege nicht umsetzen.<sup>[9, 29, 51, 52]</sup> Auf der anderen Seite ist die Inkorporation von Carboxylaten wie Carboxyethylsilantriol **8**<sup>[48, 53, 54]</sup>, freien Aminen wie (3-Aminopropyl)triethoxysilan **6**<sup>[48, 55-59]</sup> oder Cyanoderivaten wie (2-Cyanoethyl)triethoxysilan **13**<sup>[60]</sup> möglich. Um negative Auswirkungen des Linkers auf das entstehende Porensystem zu vermeiden, werden sie erst deutlich nach dem Silicapräkursor zugegeben. Dieser zusätzliche Reaktionsparameter erhöht die Vielfältigkeit der Synthese allerdings erheblich. Schon kleinste Variationen in der Zugabezeit können zu einer starken Qualitätsminderung oder gar Zerstörung des Porensystems führen.<sup>[25]</sup> Auch ein zu hoher Linkergehalt, bezogen auf den Präkursor, kann die mesoskopische Ordnung des Materials stark beeinträchtigen, da sich um das Siliziumatom des Linkers kein stabiles Silicanetzwerk ausbilden kann.<sup>[57, 58]</sup> Bei Materialien, die durch Co-Kondensation hergestellt wurden, lässt sich das Templat nicht durch Calcination entfernen, da sonst der angebrachte Linker mitverbrennen würde. Das zurückgebliebene Templat muss daher durch sanftere, extraktive Methoden (z.B. Soxhlet-Extraktion) aus dem Porensystem entfernt werden.<sup>[18, 61, 62]</sup> Den bisher genannten Nachteilen der Co-Kondensation stehen allerdings einige bedeutende Vorteile gegenüber. Da der Linker während der Synthese direkt in die oberen Schichten der Silicaporen eingebaut wird, wird die spezifische Oberfläche und das Porenvolumen des Materials deutlich weniger durch die Funktionalisierung beeinflusst. Der wohl größte Vorteil liegt allerdings in der Verteilung des Linkers im Porensystem. Da der Linker bereits während der Ausbildung des Porensystems zugesetzt wird, entfällt das beim *Grafting* vorhandene Problem der Diffusion. Daher lassen sich bei Materialien die durch Co-Kondensation hergestellt werden, deutlich homogenere Funktionalisierungen erreichen, die auch das Innere der Poren einschließen. Ebenso wird das Problem der Porenverstopfung damit nahezu ausgeschlossen.<sup>[25, 29]</sup>

### **3.3. Aminosäureanbindung an funktionalisierte Silicaoberflächen**

Wie im vorherigen Unterkapitel vorgestellt, stehen zur Funktionalisierung einer Silicaoberfläche eine Vielzahl von Linkern, und damit eine Vielzahl von funktionellen Gruppen, zur Verfügung. In diesem Abschnitt soll nun konkret die Anbindung von Aminosäuren oder Peptiden an die Oberfläche diskutiert werden, wobei das Ziel darin besteht eine möglichst allgemeine Strategie zu entwickeln mit der ein Großteil der chemischen Funktionalitäten der natürlichen Aminosäuren (Abbildung 3.2) abgedeckt werden kann.

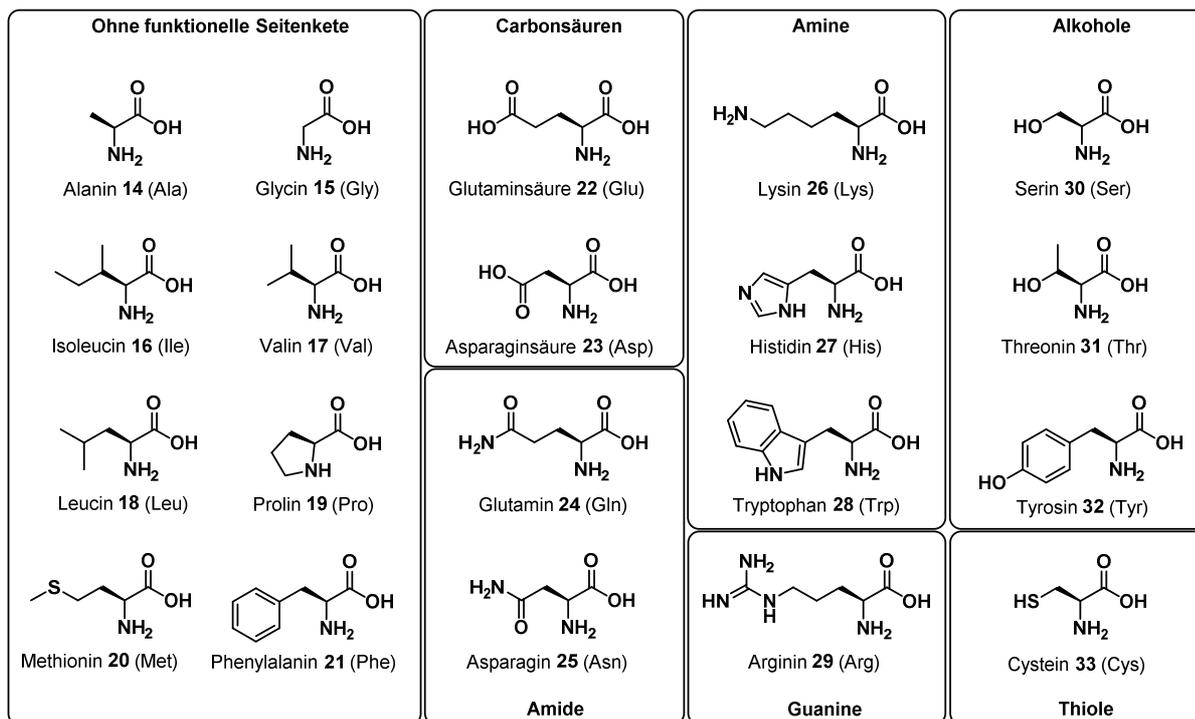


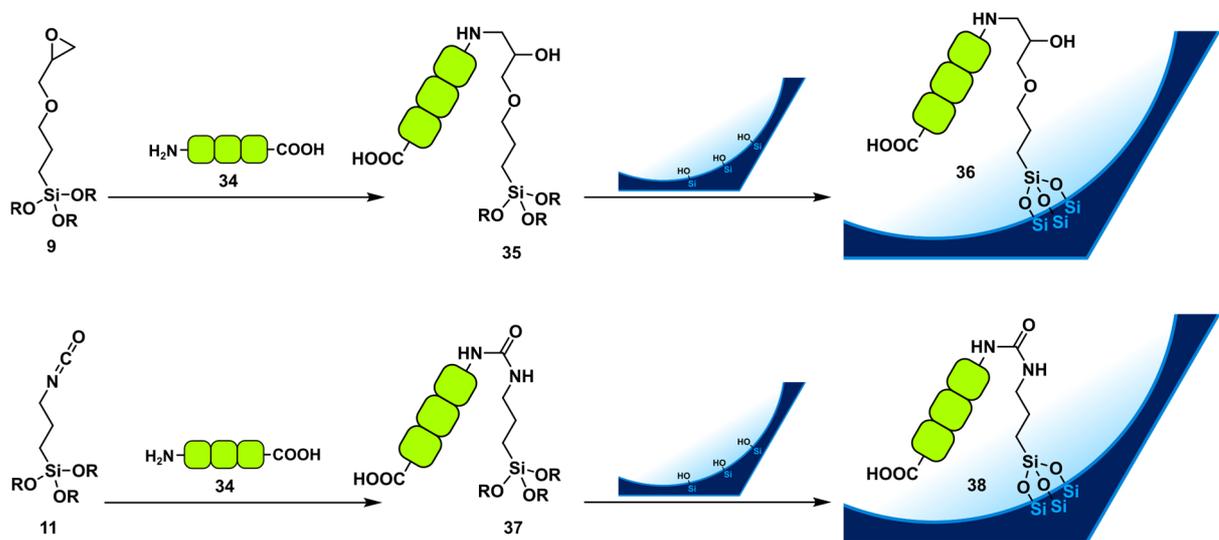
Abbildung 3.2: Strukturformeln der 20 natürlichen  $\alpha$ -Aminosäuren in der L-Konfiguration.

Um eine Anbindungsstrategie für eine Aminosäure oder ein Peptid zu entwickeln, muss zuvor überlegt werden welche funktionellen Gruppen zur Kopplung an Aminosäuren zur Verfügung stehen. Hier gilt, dass bei allen Aminosäuren prinzipiell die namensgebenden Carbonsäure- (-COOH) und Aminogruppen (-NH<sub>2</sub>) für die Anbindung zur Verfügung stehen. Zusätzlich zu diesen Gruppen besteht die Möglichkeit die Seitenkette der Aminosäuren zu verwenden. Beispielsweise tragen sowohl die Asparaginsäure (Asp) **23**, als auch die Glutaminsäure (Glu) **22** eine zusätzliche COOH-Gruppe in der Seitenkette. Daneben weist das Lysin (Lys) **26** eine zusätzliche NH<sub>2</sub> Gruppe auf. Eine weitere wichtige funktionelle Gruppe sind die Alkohole. Aminosäuren mit dieser Funktionalität sind das Serin (Ser) **30**, das Threonin (Thr) **31** und das Tyrosin (Tyr) **32**. Das Cystein (Cys) **33** stellt mit seiner Thiolgruppe einen Einzelfall dar. Aufgrund dieser Einzigartigkeit wird vor allem in komplexen Peptiden oder gar Proteinen gern eine Modifikation dieser speziellen Seitenkette vorgenommen.<sup>[63-68]</sup>

Fast alle dieser funktionellen Gruppen sind denkbare Reaktionspartner für die bereits vorgestellten Linker. Welche dieser Linker sich in der Praxis für eine spezifische Anbindung an die Silicoberfläche eignen, muss allerdings genau abgewogen werden.

Als erste Gruppe potenzieller Linker soll die Gruppe der Epoxide **9** und Isocyanate **11** diskutiert werden. Hierbei handelt es sich um die Linker mit den reaktivsten funktionellen Gruppen. Daher sind viele Kopplungspartner in der Haupt- und Seitenkette der Aminosäuren denkbar, allerdings ergeben sich durch die hohe Reaktivität der Linker auch Nachteile. Wie bereits im

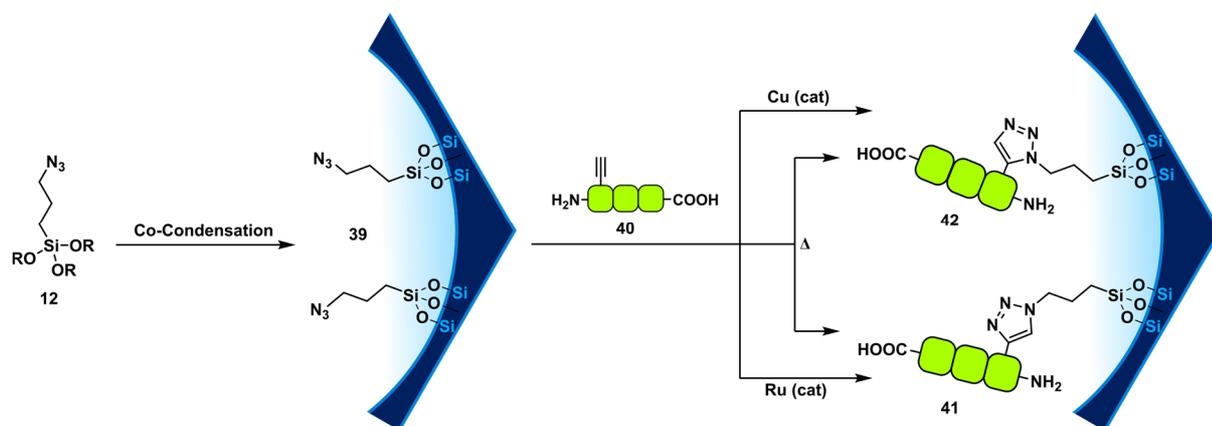
vorherigen Kapitel dargestellt, können diese Linker nicht für Silicasynthesen mittels Co-Kondensation eingesetzt werden. Auch ein nachträgliches *Grafting* dieser Linker an die Oberfläche gestaltet sich schwierig, da die funktionellen Gruppen an der Silicaoberfläche meist nicht stabil sind.<sup>[69, 70]</sup> Epoxide **9** und Isocyanate **11** reagieren mit Nucleophilen wie Aminen, Alkoholen oder sogar Wasser und damit auch mit Silanolgruppen oder Wasser an der Silicaoberfläche.<sup>[71, 72]</sup> In der Vergangenheit wurden einige Ansätze unternommen, um Peptide über diese Linker an Silicaoberflächen zu binden. Im Falle der Epoxide wurde (3-Glycidyloxypropyl)triethoxysilan **9** mit dem N-Terminus des Peptids **34** zunächst in Lösung umgesetzt und der Silan/Peptidkomplex anschließend auf die Oberfläche gepfropft (Schema 3.3).<sup>[73, 74]</sup> Für die Isocyanate wurden diverse äquivalente Versuche mit (3-Isocyanatopropyl)triethoxysilan **11** unternommen.<sup>[69, 70, 75, 76]</sup> Aufgrund der hohen Reaktivität der Linker müssen die Peptide allerdings speziell vorbereitet werden. Für eine spezifische Anbindung darf nur ein reaktives Nucleophil im Peptid vorhanden sein. Somit müssen der C- oder N-Terminus, sowie alle funktionellen Gruppen der Peptidseitenketten, geschützt sein. Weiterhin verringert sich die Qualität des Porensystems durch diese Art der Anbindung enorm, da es kaum möglich ist die großen Peptid/Linker-Komplexe gleichmäßig in der Pore anzubinden.



Schema 3.3: Mögliche Anbindung eines Peptids **34** an eine Silicaoberfläche mit Hilfe des (3-Glycidyloxypropyl)triethoxysilans **9** (oben) bzw. (3-Isocyanatopropyl)triethoxysilans **11** (unten)

Eine deutlich spezifischere Anbindung lässt sich über die Verwendung einer Azidgruppe erzielen. Der (3-Azidopropyl)triethoxysilan **12** Linker bietet den Vorteil auch in einer Co-Kondensation an das Silicaträgermaterial gebunden werden zu können.<sup>[77, 78]</sup> Die

Azidgruppe kann im Anschluss gezielt mit Alkinen **40** in einer „Click-Reaktion“ zu verschiedenen Heterocyclen **41/42** umgesetzt werden (Schema 3.4).<sup>[79]</sup>

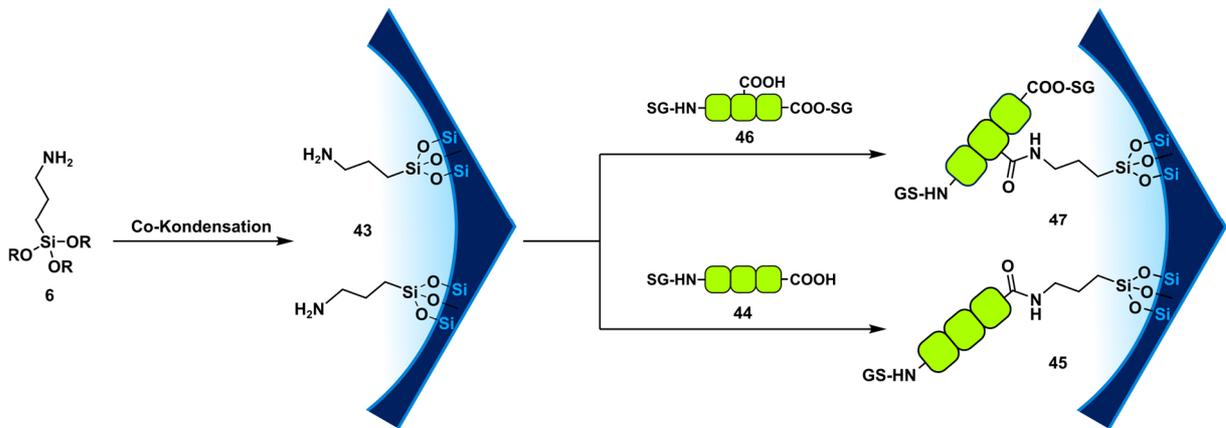


Schema 3.4: Mögliche Anbindung eines Peptids **40** an eine Silicaoberfläche mit Hilfe des (3-Azidopropyl)triethoxysilan **12** und die zwei möglichen Reaktionsprodukte **41/42** der „Click-Reaktion“

Eine Reaktion mit anderen funktionellen Gruppen des Peptids ist ausgeschlossen, weshalb diese Kopplungsvarianten oft in großen, komplexen biologischen Systemen verwendet werden.<sup>[80-82]</sup> Auch diese Route wurde in der Literatur verfolgt, indem Peptide an Glasträger<sup>[83]</sup> und Proteine an mesoporöses Silicamaterial<sup>[84]</sup> gebunden wurden. Im Falle der Glasträger wurde die Anbindung der Peptide allerdings nur über den Nachweis des mit angebondenen Fluoreszenzmarkers gezeigt. Im zweiten Beispiel fand der Nachweis der Anbindung mit Hilfe von IR-Spektroskopie statt. In Falle des porösen Systems wurde weiterhin nicht überprüft, ob das Porensystem durch die Funktionalisierung verändert oder geschädigt wurde. Ein großer Nachteil dieser Methode ist die Notwendigkeit des Alkins als Kopplungspartner des Azids. Da diese Gruppe in den natürlichen Aminosäuren nicht vorkommt, müssen also synthetische und oft teure Aminosäuren mit Alkinmodifikation eingesetzt werden.

Abschließend werden die funktionellen Gruppen der Amine und Carbonsäuren betrachtet. Diese Linkergruppen sind weit verbreitet und werden schon seit vielen Jahren für diverse Oberflächenmodifikationen von Glasträgern, Silicananopartikeln und mesoporösen Silicamaterialien eingesetzt.<sup>[48, 51, 58, 69, 85]</sup> Beide funktionelle Gruppen lassen sich zuverlässig bei der Silicasynthese in einer Co-Kondensationsroute einsetzen.<sup>[48, 55-59]</sup> Wo die Amino- oder Carboxyoberfläche direkt durch Verwendung des (3-Aminopropyl)triethoxysilan **6** (APTES) erzeugt werden kann, lässt sich eine carboxy-funktionalisierte Oberfläche direkt oder über einen Umweg und den Einsatz eines Cyanolinkers (2-Cyanoethyl)triethoxysilan **13** sowie die nachträgliche Oxidation zur Carbonsäure erzeugen.<sup>[60, 86]</sup> Für eine Peptidanbindung mittels Aminolinker kommt die Anbindung an den C-Terminus des Peptids **44** in Frage, wodurch eine Amidbindung generiert

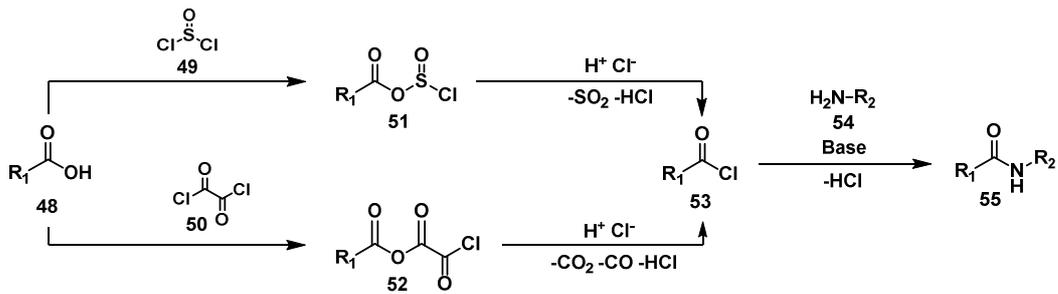
wird (Schema 3.5). Andererseits lässt sich eine carboxyfunktionalisierte Oberfläche mit dem N-Terminus eines Peptids umsetzen.



Schema 3.5: Mögliche Anbindungen zweier Peptide **44/46** an eine Silicaoberfläche **43** mit Hilfe des (3-Aminopropyl)triethoxysilans **6** (APTES) über die Carboxyseitenkette (oben) bzw. den C-Terminus (unten) des Peptids, SG=Schutzgruppe.

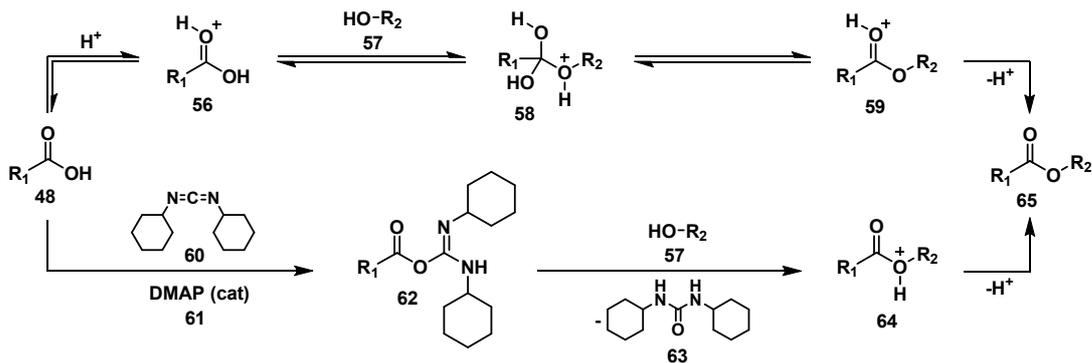
Weiterhin sind Kopplungen über diverse Seitenketten der Aminosäuren möglich. Denkbar sind Reaktionen der COOH-Seitenkette des Peptids **46** (z.B. Asparaginsäure (Asp) **23** oder Glutaminsäure (Glu) **22** mit der aminofunktionalisierten Oberfläche **43** (Schema 3.5). Äquivalent hierzu ist eine Anbindung über die NH<sub>2</sub>-Seitenkette des Lysins (Lys) **26** an eine carboxyfunktionalisierte Oberfläche denkbar. In all diesen Fällen entsteht eine klassische Amidbindung an der Kopplungsstelle. Um solch eine Reaktion durchführen zu können müssen die COOH-Gruppen, egal ob am Peptid oder an der Oberfläche, zunächst aktiviert werden. Diese Aktivierung wird in der Peptidchemie in der Regel durch die Bildung von Aktivestern erzielt.<sup>[87, 88]</sup>

Zur Aktivierung von Carbonsäuren existieren eine Vielzahl von Varianten, die im späteren Abschnitt (Festphasenpeptidsynthese 5.1) der Arbeit genauer beleuchtet werden. Abseits der speziellen Peptidkopplungsreagenzien existieren weitere gängige Methoden zur Aktivierung der Carboxygruppe. Ein Beispiel ist die Erzeugung eines Säurechlorids **53** (Schema 3.6). Diese reaktive Spezies lässt sich unter basischen Bedingungen mit Aminen **54** zum Amid **55** umsetzen.<sup>[89-91]</sup> Der Nachteil dieser Methode liegt allerdings in der Stabilität des Säurechlorids selbst. Aufgrund ihrer Tendenz zur Hydrolyse lassen sich Säurechloride **53** für gewöhnlich nicht, oder nur sehr kurz an der Luft oder in Lösung, lagern. Zum anderen sind die meisten Silicamaterialien labil gegenüber nucleophilen Basen, die das Silicagerüst beschädigen können. Daher werden Säurechloride für Anbindungen an Silicaoberflächen für gewöhnlich nicht genutzt.



Schema 3.6: Schematische Darstellung der Aktivierung einer Carbonsäure **48** mit Hilfe von Thionylchlorid **49** (oben) und Oxalylchlorid **50** (unten) und anschließende Kopplung des Säurechlorids **53** zum Amid **55**

Neben einer Anbindung der Aminosäure bzw. eines Peptids über die beschriebene Amidbindung wäre auch eine Anbindung durch Ausbildung eines Esters denkbar. Bei der Verwendung einer carboxyfunktionalisierten Oberfläche stünden hier die Alkoholseitenketten der Aminosäuren Serin (Ser) **30**, Threonin (Thr) **31** und Tyrosin (Tyr) **32** zur Verfügung. Im Falle des Cystein (Cys) **33** könnte mit der Thioseitenkette analog ein Thioester ausgebildet werden.



Schema 3.7: Schematische Darstellung der Veresterung einer Carbonsäure **48** über die FISCHER-Veresterung (oben) und STEGLICH-Veresterung (unten) zur Synthese des Esters **65**

Für die Esterbildung können die klassischen Veresterungsvarianten, wie FISCHER- und STEGLICH-Veresterung, verwendet werden. Bei der FISCHER-Veresterung wird die Carbonsäure **48** unter sauren Bedingungen, in Gegenwart von katalytischen Mengen Wasser, zum Ester **65** umgesetzt (Schema 3.7). Bei dieser klassischen Gleichgewichtsreaktion wird für gewöhnlich Wasser aus der Reaktion entfernt, um eine vollständige Umsetzung zu erhalten.<sup>[92, 93]</sup> Die Steglich-Veresterung verwendet das *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) **60** mit einer katalytischen Menge 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) **61** (Schema 3.7). Hierbei wird das Carbodiimid **60** während der Reaktion zum Harnstoff **63** umgesetzt, was zur vollständigen Umsetzung der Carbonsäure und des Alkohols zum Ester führt.<sup>[93, 94]</sup> Speziell in der Peptidchemie haben sich weitere Abwandlungen der Steglich-Veresterung etabliert, die statt

DCC andere Carbodiimide wie *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (DIC) **66** oder 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) **67** verwenden, um sterisch anspruchsvolle Ester zu generieren oder Racemisierung zu verhindern.<sup>[93, 95]</sup> Bisher werden diese Veresterungsreaktionen zwar in Lösung, zur Modifikation von Aminosäureseitenketten angewendet, allerdings wurden sie an Silicaoberflächen bisher nicht verwendet. Sollen ganze Peptide angebunden werden, muss stets gewährleistet werden, dass nur eine Aminosäure mit Hydroxygruppe im Peptid zur Verfügung steht. Bei einzelnen Aminosäuren wird öfter auf die Anbindung über den C- oder N-Terminus zurückgegriffen.<sup>[52, 85, 96]</sup>

Welche Strategien für die Anbindung eines speziellen Peptids oder einer speziellen Aminosäure am besten geeignet sind, muss für die jeweilige Anforderung speziell evaluiert werden. Aus Sicht des Silicamaterials eignen sich Azid-, Amin- und Carboxygruppen am besten für eine Anbindung. Diese Gruppen lassen sich mittels Co-Kondensation, und damit homogen, in das geordnete SBA Silicasystem einbauen, um das Porensystem zu modifizieren.<sup>[48, 56, 77]</sup> Demgegenüber bieten Amin- und Carboxygruppen, im Gegensatz zum Azid, für jede Aminosäure bzw. jedes Peptid eine Kopplungsmöglichkeit, womit auf den Einbau von speziellen, unnatürlichen Aminosäuren verzichtet werden kann.

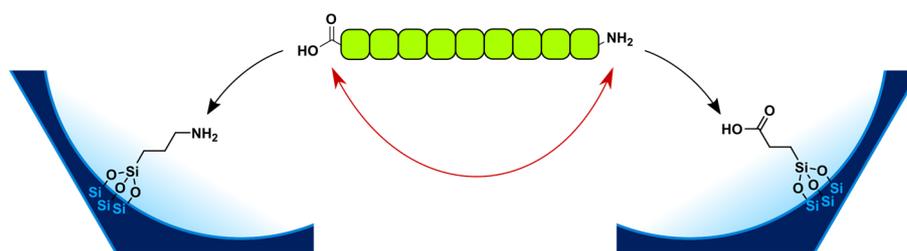


Abbildung 3.3: Mögliche Reaktionen des C- und N-Terminus eines Peptids mit einer carboxy- bzw. aminofunktionalisierten Silicaoberfläche und die damit verbundenen Nebenreaktionen

Um eine optimale Peptid- bzw. Aminosäureanbindung an eine amino- oder carboxy-funktionalisierte Silicaoberfläche zu gewährleisten, müssen jegliche Nebenreaktionen ausgeschlossen werden. Da bei der Anbindung eines Peptids über den C- bzw. N-Terminus Peptid-Kopplungsbedingungen herrschen, muss das jeweils andere Ende des Peptids geschützt werden. Ist das nicht der Fall können eine Serien von ungewünschten Nebenreaktionen ablaufen. Zum einen können Mehrfachanbindungen des Peptids bzw. der Aminosäure an die Oberfläche stattfinden. Zum anderen könnte das Peptid bzw. die Aminosäure schon vorher intra- oder intermolekular reagieren und die Oberfläche nicht erreichen (Abbildung 3.3). Soll ein längeres Peptid angebunden werden müssen weiterhin die funktionellen Seitenketten des Peptids betrachtet werden. Sollten hier Amin- oder Carbonsäuregruppen vorhanden sein, müssen diese ebenfalls geschützt werden, da sonst äquivalente Probleme auftreten können.

---

## 4. Charakterisierung organisch funktionalisierter Silicahybride

---

Für die zuverlässige Charakterisierung einer organisch funktionalisierten Silicaoberfläche sind verschiedene Materialparameter zu bestimmen. Hierbei müssen sowohl das poröse Trägersystem selbst als auch die chemische Struktur und Menge der angebundenen Funktionalisierung untersucht werden.

Um die Ordnung des porösen Silicaträgers in analytischen Größen greifbar zu machen, werden Größen wie die spezifische Oberfläche, das Porenvolumen und der Porendurchmesser ermittelt. Diese Werte geben Aufschluss über die Homogenität des Porensystems und die Zugänglichkeit des Poreninneren, wodurch sie unumgänglich für die Beurteilung der Materialqualität sind. Diese Größen können mittels Gasadsorptionsmessungen nach der Brunauer-Emmett-Teller (BET) Theorie ermittelt werden.<sup>[97, 98]</sup> Um die äußere Oberfläche und Morphologie des Materials beurteilen zu können sind mikroskopische Techniken notwendig. Hierfür eignen sich beispielsweise die Rasterelektronenmikroskopie (REM) oder, für kleinere Korngrößen, die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Durch die so ermittelten Korngrößen in Kombination mit BET-Messungen lassen sich das Verhältnis der inneren zur äußeren Oberfläche oder auch Porenkanallängen abschätzen.

Zur Analyse der chemischen Zusammensetzung des Silicaträgersystems können Techniken wie Infrarotspektroskopie (IR), Elementaranalyse (EA) und Festkörper-Kernspinresonanz-Spektroskopie (ssNMR) herangezogen werden. Hierbei kann die Elementaranalyse Informationen über die atomare Zusammensetzung, also beispielsweise das Si/O Verhältnis oder eventuelle Verunreinigungen liefern. Infrarotspektroskopie (IR) und Festkörper-Kernspinresonanz-Spektroskopie (ssNMR) liefern Informationen über die chemische Umgebung innerhalb des Silicanetzwerks und dessen Oberfläche. Die IR-Spektroskopie zeigt dabei, neben Schwingungen des SiO<sub>2</sub>-Netzwerks, auch Banden der Si-OH Gruppen der Materialoberfläche.<sup>[57, 99, 100]</sup> Deutlich detailliertere Informationen liefert die Festkörper-Kernspinresonanz-Spektroskopie. Im Falle der Silicamaterialien können mit Hilfe der auftretenden Resonanzen in <sup>29</sup>Si Spektren die direkten chemischen Umgebungen der jeweiligen Kerne ermittelt werden.<sup>[48, 51, 101, 102]</sup>

Wird an das Trägermaterial ein organisches Molekül gebunden, nimmt der analytische Anspruch deutlich zu. Zur Analyse der Morphologie und Porenstruktur sind wieder BET und REM/TEM Techniken von Bedeutung. Diese dienen in erster Linie dem Nachweis, dass die Funktionalisierung des Materials keine signifikanten strukturellen Änderungen des Trägermaterials bewirkt hat. BET-Messungen können allerdings auch Indizien für eine erfolgreiche Funktionalisierung liefern. Beispielsweise spricht eine Verringerung des Porendurchmessers für eine erfolgreiche Funktionalisierung im Inneren der Pore.<sup>[103]</sup> Auch die

---

bisher genannten Techniken, wie IR-Spektroskopie, EA und ssNMR eignen sich für den Nachweis der organischen Funktionalisierung. In der IR-Spektroskopie lassen sich zusätzliche Banden der organischen Verbindungen finden.<sup>[48, 56]</sup> Die Auflösung der IR-Spektroskopie ist allerdings oft unbefriedigend und wichtige Veränderungen durch die Funktionalisierung sind zum Teil nur schwer identifizierbar.<sup>[57, 58]</sup> Eine deutlich mächtigere Technik stellt die ssNMR dar. Diese liefert zwar in den meisten Fällen keine quantitativen Informationen über die Funktionalisierung, kann allerdings deutlich differenziertere Informationen über ihre chemische Zusammensetzung liefern. Speziell bei organischen Funktionalisierungen auf Silicaoberflächen können Trägersysteme (<sup>29</sup>Si) und die organische Funktionalisierung (<sup>13</sup>C; <sup>15</sup>N; u.W.) separat charakterisiert werden und darüber hinaus die Wechselwirkungen zwischen den beiden Komponenten analysiert werden. Um den organischen Anteil des hergestellten Hybridmaterials zu quantifizieren stehen Techniken wie EA oder die thermogravimetrische Analyse (TGA) zur Verfügung. Diese erlauben die Bestimmung des molaren Anteils von (z.B. Kohlenstoff, Stickstoff und Wasserstoff) des organischen Gewichtsanteils des Materials. Eine bedachte Auswahl und Kombination dieser Techniken liefert somit detaillierte Informationen über das poröse Silicatträgersystem und die Art und Menge der organischen Funktionalisierung.

#### **4.1. Stickstoffadsorption nach BRUNAUER–EMMETT–TELLER (BET)**

Eine der wichtigsten Techniken zur Bestimmung von Porositäten in mikro- und mesoporösen Materialien ist die Gasadsorptionsmessung nach BRUNAUER–EMMETT–TELLER (BET). Diese Technik liefert Größen wie die spezifische Oberfläche, das Porenvolumen sowie den Porendurchmesser und lässt sich hervorragend für poröse Silicamaterialien wie SBA-15 und MCM-41 einsetzen. Hierbei wird das Adsorptionsverhalten eines Adsorbaten (meist Stickstoff) am porösen Material analysiert. Das getrocknete Material wird hierzu im Hochvakuum mit Flüssigstickstoff (-195.8°C; 77.35 K) gekühlt. Anschließend wird das Adsorbat in kleinen Mengen hinzudosiert und der Gleichgewichtsdruck ( $p$ ) im System aufgezeichnet, bis der Sättigungsdruck ( $p_0$ ) erreicht ist. Durch Auftragung des adsorbierten Gasvolumens ( $V_{ads}$ ) gegen den Relativdruck ( $p/p_0$ ) wird eine Adsorptionsisotherme erhalten. Nach erreichtem Sättigungsdruck wird der Druck wieder kontinuierlich verringert, um so die passende Desorptionsisotherme zu ermitteln.

Beim Sorptionsverhalten wird zwischen zwei verschiedenen Formen unterschieden, der Chemisorption und der Physisorption. Bei der Physisorption handelt es sich um die schwächere der beiden Wechselwirkungen. Sie wird von Kräften wie Van der Waals Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen dominiert. Chemisorption existiert nur dann, wenn beim Sorptionsprozess eine Änderung der elektronischen Orbitalzustände eintritt, wie es zum

Beispiel bei einer chemischen Reaktion zwischen Material und Adsorbat der Fall ist. Damit ist die Physisorption stets reversibel, bei Chemisorption ist das nicht zwingend der Fall.<sup>[11, 104]</sup> Da für Adsorptionsanalysen chemisch inerte Gase verwendet werden, wird in der BET stets von reiner Physisorption ausgegangen. Je nach Porosität der Probe unterscheiden sich die Verläufe dieser Physisorptionsisothermen (Abbildung 4.1).<sup>[12, 104, 105]</sup>

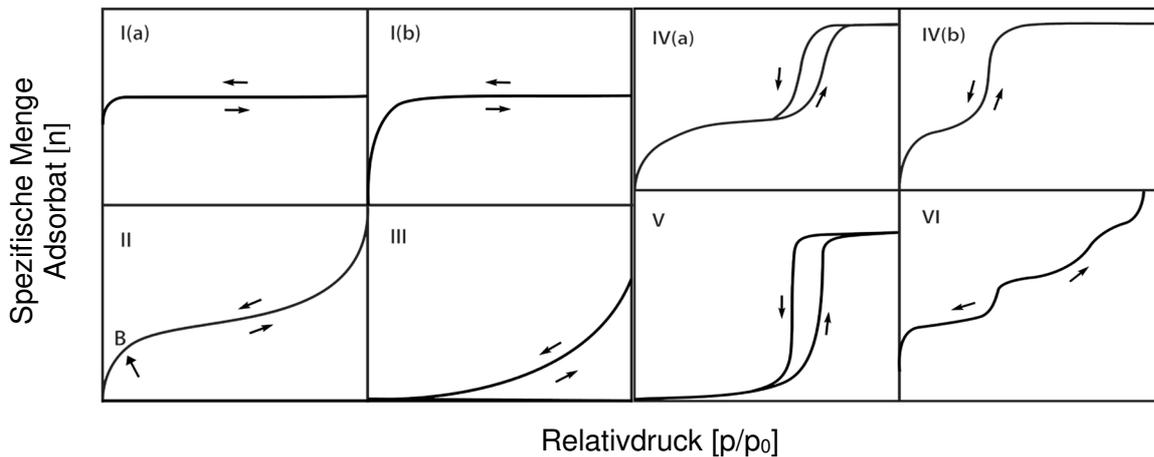


Abbildung 4.1: Typische Adsorptionsisothermen-Typen adaptiert von Thommes et. al.<sup>[105]</sup>

Typ I Isothermen zeichnen sich durch einen starken Anstieg der Isotherme im niedrigen Relativdruckbereich ( $p/p_0$ ) aus, welcher durch Adsorption in mikroporösen Materialien mit geringer äußerer Oberfläche (z.B. Aktivkohle, Molsiebe und Zeolithe) hervorgerufen wird. Die obere Adsorptionsgrenze ist durch das vorhandene Mikroporenvolumen limitiert. Typ II Isothermen sind typisch für unporöse oder makroporöse Materialien, bei denen eine ungehinderte Multilagenadsorption stattfindet. Der vollständig konvexe Verlauf der Typ III Isothermen ist eher ungewöhnlich. Hier spielt die Interaktion zwischen den Adsorbatmolekülen eine größere Rolle, als die Interaktion mit der Oberfläche. Dieser Typ wird nur für unporöse und makroporöse Materialien erhalten.<sup>[11]</sup>

Typ IV Isothermen sind der wichtigste Isothermentyp für mesoporöse Materialien. Für niedrige Relativdrücke ähnelt der Verlauf dem der Typ II Isothermen und beginnt mit Monolagen-, gefolgt von Multilagenadsorption. Das markanteste Merkmal dieses Typs (Typ IVa) ist allerdings die Hystereseschleife bei höheren Relativdrücken. Dieser steile Anstieg und das unterschiedliche Sorptionsverhalten zwischen Adsorption und Desorption lässt sich durch Kapillarkondensation des Adsorbats in Mesoporen erklären (Abbildung 4.2).<sup>[105]</sup> Hysterese tritt allerdings nur oberhalb eines bestimmten Porendurchmessers auf, je nach Temperatur und Adsorbat. Bei Porendurchmessern unterhalb dieser kritischen Größe (ungefähr 4 nm für  $N_2$  bei  $-195.8^\circ C$ ) tritt keine Hysterese auf (Typ IVb).

Typ V Isothermen sind wieder seltener und zeigen zu Beginn einen Verlauf ähnlich der Typ III Isothermen, weisen allerdings zusätzlich eine Hysterese durch mesoporöse Anteile auf. Dies wird bei schwachen Adsorbat-Oberflächen-Interaktionen beobachtet. Typ VI Isothermen zeigen einen schrittweisen Anstieg der adsorbierten Gasmenge bei Relativdruckanstieg. Dieser Anstieg lässt sich auf eine schrittweise Adsorption des Adsorbaten in einzelnen Monolagen erklären. Dies geschieht in der Praxis sehr selten und kann ausschließlich bei sehr einheitlichen Materialien beobachtet werden.

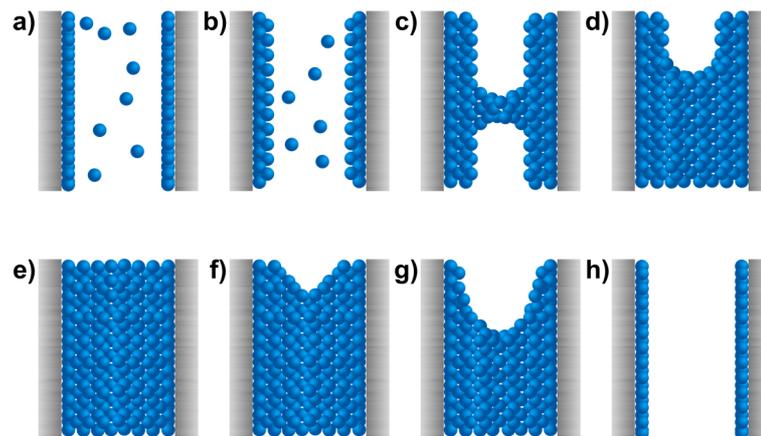


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Adsorptions- und Desorptionsprozesses in Mesoporen

Die in den Typ IV Isothermen auftretende Hystereseschleife ist ein essentielles Merkmal der in dieser Arbeit im Fokus stehenden mesoporösen Silicatträgermaterialien, wie SBA-15 (meist Typ IVa) und MCM-41 (meist Typ IVb). Der Ursprung dieser Hystereseschleife lässt sich am besten bei schrittweiser Betrachtung des Adsorptions - bzw. Desorptionsvorgangs erläutern (Abbildung 4.2). Zu Beginn der Hysterese tritt Monolagenadsorption ein (a), die in Multilagenadsorption übergeht (b). Dabei setzt die Kapillarkondensation ein und das Adsorbat beginnt damit sich nicht mehr an die Oberfläche des Materials, sondern an die anderen Adsorbatmoleküle, anzulagern (c). Dies hat einen steilen Anstieg der adsorbierten Gasmenge zur Folge. Je nach Durchmesser der Mesopore setzt die Kapillarkondensation bei unterschiedlichen Relativdrücken ein. Daher ergibt die Lage der Hystereseschleife die Information über die Porengröße des Materials. Ist die Pore vollständig gefüllt, (d), setzt Kondensation an der äußeren Oberfläche des Materials ein und die Isotherme flacht ab. Ein ähnlicher Kurvenverlauf wird für den Desorptionsprozess beobachtet. Mechanistisch folgt die Leerung der Poren einem anderen Verlauf als die Füllung. Bei der Desorption verlassen die Adsorbatmoleküle die Pore unter Bildung eines Meniskus (e/f/g), was dazu führt, dass die Porenleerung bei geringeren Relativdrücken erfolgt als die Füllung. Dieser Versatz des Relativdrucks zwischen Adsorption

und Desorption führt zur typischen Hystereseschleife. Nicht nur die Lage, sondern auch die Form der Hysterese beinhaltet wertvolle Informationen über die Porengeometrie des Materials. Auch bei den Hystereseschleifen werden deshalb unterschiedliche Typen unterschieden (Abbildung 4.3).

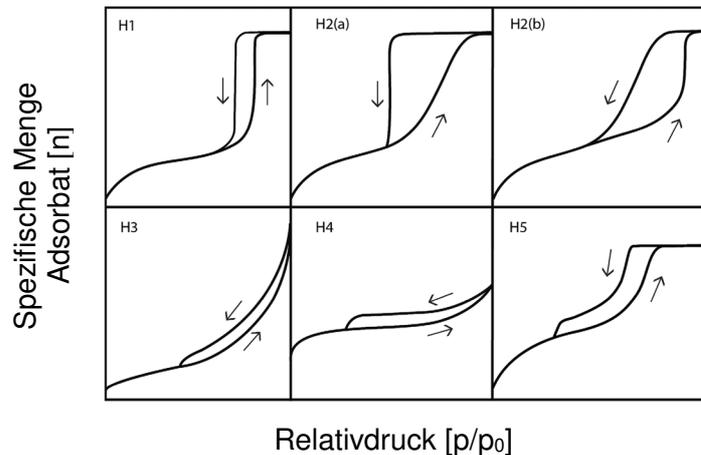


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung verschiedener Hystereseschleifen mesoporöser Materialien adaptiert von Thommes et. al.<sup>[105]</sup>

Hysteresetyp HI ist charakteristisch für mesoporöse Materialien mit zylindrischen und einheitlichen Porenkanälen.<sup>[106]</sup> Dieser Typ wird für ein einheitliches Porensystem wie in MCM- und SBA-Materialien erwartet. Typ HIII wird bei sogenannten *ink-bottle* Poren erhalten. Das namensgebende Tintenfass steht hierbei für die Form der Pore. Sie zeichnet sich durch einen engen Poreneingang und ein großes Porenvolumen, mit deutlich höherem Porendurchmesser im inneren Bereich aus.<sup>[107]</sup> Diese Art von Isothermen können auch bei MCM- und SBA-Materialien gefunden werden. Meist ist die Ursache allerdings eine Verstopfung an den Poreneingängen, die auf ungleichmäßige Funktionalisierung oder uneinheitliche Porenarchitekturen zurückzuführen ist.<sup>[11, 104]</sup> Schlitzförmige Poren führen zu einer Hysterese des Typs HIII, die kein oberes Relativdrucklimit aufweist. Diese Formen werden meist durch Materialien erzeugt, die sich durch Aggregation in Schichten zusammenlagern (z.B. Graphit).<sup>[108]</sup> Ähnliches gilt für Typ HIV und HV, welche zusätzlich Mikroporen aufweisen.<sup>[10-12, 105]</sup>

#### 4.1.1. Spezifische Oberfläche und Porenvolumen

Mit Hilfe der BET Theorie lässt sich die spezifische Oberfläche eines Materials bestimmen.<sup>[97]</sup> Die spezifische Oberfläche eines Materials ist hierbei als zugängliche bzw. detektierbare Fläche pro Masse definiert und wird meist in  $\text{cm}^2/\text{g}$  angegeben. Diese Oberfläche kann je nach Technik,

anhand derer sie bestimmt wird, variieren. Diese kann aus der gemessenen Isotherme mit Hilfe des sogenannten BET-Plots bestimmt werden (Abbildung 4.4). Grundlage für diese Auswertung bildet die BET-Gleichung (Gleichung 1) mit Gleichgewichtsdruck ( $p$ ), Sättigungsdruck ( $p_0$ ), Adsorbierter Gasmenge ( $n_a$ ), Monolagenkapazität ( $n_m$ ) und BET-Konstante ( $C$ ).

$$\frac{p}{n_a(p_0-p)} = \frac{(C-1)}{n_m C} \cdot \frac{p}{p_0} + \frac{1}{n_m C} \quad (1)$$

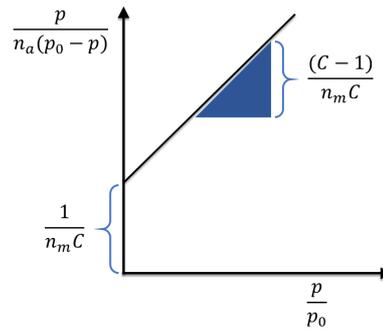


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung des BET Plots und der allgemeinen BET-Gleichung

Gemäß des BET-Plots ist ein linearer Zusammenhang für eine Auftragung von  $p/(n_a(p_0-p))$  gegen den Relativdruck ( $p/p_0$ ) gegeben, wodurch es möglich ist, sowohl über die Steigung als auch über den Achsenabschnitt die einzige Unbekannte  $n_m$  zu bestimmen. Dieser lineare Zusammenhang ist nicht für den kompletten Relativdruckbereich gegeben. Der klassische BET-Bereich ist meist mit  $0.05 < p/p_0 < 0.35$  angegeben, kann allerdings für unterschiedliche Proben variieren.<sup>[11, 12, 97]</sup> Durch die erhaltene Monolagenkapazität  $n_m$  kann im Anschluss, durch Multiplikation mit der molekularen Querschnittsfläche ( $A_m$ ) und der Avogadro-Konstanten ( $N_A$ ), die spezifische BET-Oberfläche ( $A_{BET}$ ) des Materials ermittelt werden (Gleichung 2).

$$A_{BET} = n_m \cdot A_m \cdot N_A \quad (2)$$

Ein weiterer wichtiger Parameter für poröse Systeme ist das spezifische Porenvolumen. Diese Größe lässt sich relativ einfach aus der Adsorptionsisotherme bestimmen. Hier wird die Menge an adsorbiertem Gas ( $V_{ads(g)}$ ) nahe des Sättigungsdrucks ( $p_0$ ) abgelesen, also genau dort, wo nahezu alle Poren des Systems mit flüssigem Adsorbat gefüllt sind. Das bekannte Volumen des gasförmigen Adsorbaten ( $V_{ads(g)}$ ) kann mit Gleichung 3 in das äquivalente Volumen des Gases in flüssiger Form ( $V_{ads(l)}$ ) umgerechnet werden.

$$V_{pore} = V_{ads(l)} = \frac{V_{ads(g)} \cdot p_{atm} \cdot V_{N_2}}{R \cdot T} \quad (3)$$

---

Mit den weiteren bekannten Größen, wie dem Umgebungsdruck ( $p_{\text{atm}}$ ), dem molaren Volumen des Stickstoffs ( $V_{N_2}$ ), der idealen Gaskonstanten ( $R$ ) und der Temperatur ( $T$ ), lässt sich so das Volumen der gefüllten Poren ( $V_{\text{pore}}$ ) errechnen.<sup>[98]</sup>

#### 4.1.2. Porengrößenverteilung

Für die Bestimmung der Porengrößenverteilung bzw. der absoluten Porengrößen aus der Sorptionsisotherme stehen mehrere Methoden zur Verfügung. Für Poren im mesoporösen und makroporösen Bereich liegt den meisten Ansätzen die Kelvingleichung (Gleichung 4) zu Grunde.

$$r_K = \frac{2 \cdot \gamma \cdot V_{N_2}}{R \cdot T \cdot \ln \frac{p}{p_0}} \quad (4)$$

Sie beschreibt den Zusammenhang zwischen Dampfdruck und Kelvin-Radius ( $r_K$ ) an einer gekrümmten Oberfläche. Im Falle der Adsorption in mesoporösen Materialien wird somit ein Zusammenhang zwischen dem Relativdruck ( $p/p_0$ ) und dem Radius der Pore ( $r_{\text{pore}}$ ) geschaffen. Hierfür werden erneut bekannte Parameter, wie das molare Volumen des Stickstoffs ( $V_{N_2}$ ), die ideale Gaskonstanten ( $R$ ), die Temperatur ( $T$ ) und die Oberflächenspannung des Stickstoffs ( $\gamma$ ), benötigt. Die meistverbreitete Methode zur Bestimmung der Porengrößenverteilung auf dieser Basis ist die Methode nach BARRET, JOYNER and HALENDA (BJH).<sup>[98]</sup> Sie reduziert die Kelvin Gleichung für die Verwendung von Stickstoff als Adsorbat unter Flüssigstickstoffkühlung auf Gleichung 5.

$$r_K = \frac{-0,953}{\ln \frac{p}{p_0}} \quad (5)$$

Da in dieser Annahme der Kelvin-Radius ( $r_K$ ) den Radius der zweiten adsorbierten Schicht an der Porenwand beschreibt, wird zum Errechnen des tatsächlichen Porenradius ( $r_{\text{pore}}$ ) die Dicke der ersten Monolagen-Stickstoffschicht ( $d_{N_2}$ ) zum Kelvin-Radius addiert (Gleichung 6).

$$r_{\text{pore}} = r_K + d_{N_2} \quad (6)$$

Neben der BJH-Methode existieren noch weitere Verfahren, die das Errechnen von Porengrößen aus den Sorptionsisothermen erlauben. Für Mikroporen kann beispielsweise die Kelvingleichung nicht als Basis verwendet werden, da hier das Verhalten des Adsorbaten nicht mehr mit seinen *bulk* Eigenschaften beschrieben werden kann.<sup>[98]</sup> Für diese kleinen Poren

---

kommen weitere Theorien, wie die Methode nach HORVATH-KAWAZOE und SITO FOWLY, zum Einsatz.<sup>[109, 110]</sup> Neuere Ansätze bedienen sich der Dichtefunktionaltheorie (DFT), um die experimentelle Isotherme so gut wie möglich durch Berechnung einer Idealisotherme anzunähern und so eine Porengröße zu errechnen.<sup>[111-114]</sup> Da die BJH-Methode allerdings weiterhin die anerkannteste und meistverwendete Methode für mesoporöse Materialien wie SBA-15 und MCM-41 ist, wird sie in dieser Arbeit hauptsächlich verwendet und auf die anderen Methoden nicht im Detail eingegangen.

## **4.2. Festkörper-Kernspinresonanz-Spektroskopie (ssNMR)**

Die besondere Herausforderung bei der Analyse von organisch funktionalisierten Silicamaterialien besteht darin eine detaillierte strukturelle Analyse des organischen Anteils der Probe durchführen zu können. Dies beinhaltet sowohl die Identifikation aller organischen Spezies auf der Oberfläche, als auch den Nachweis der funktionellen Gruppe, die für die kovalente Bindung zur Oberfläche verantwortlich ist.

Eine wertvolle Technik zur Analyse solcher organisch funktionalisierter Silicamaterialien stellt die ssNMR dar. Sie bietet, im Gegensatz zu vielen anderen Techniken, wie beispielsweise der IR-Spektroskopie, das Potential deutlich detaillierte Informationen über die oberflächengebundenen Strukturen liefern zu können. Zum Beispiel ist dies durch die Aufnahme von Spektren unterschiedlicher NMR-aktiver Kerne möglich, was den Informationsgehalt der Technik deutlich erhöht. Für die Ausschöpfung des vollen Potentials der Technik spielen allerdings eine Reihe von Faktoren eine wichtige Rolle, die über den Erfolg der Technik entscheiden.

Zum einen sorgt die Anisotropie der chemischen Umgebungen in festen Proben für eine starke Verbreiterung der NMR-Signale womit hohe Auflösungen, wie in flüssig-NMR Spektren, nicht erreicht werden können. Hierdurch kommt es zur Überlappung von Signalen in den Spektren und eine Dekonvolution der Signale wird notwendig, um die Spektren zu analysieren. Aus dem gleichen Grund können Verschiebungen von Signalen nur dann zum Beweis der Anbindung verwendet werden, wenn die Änderung der chemischen Umgebung ausreichend groß ist. Zum anderen ist die NMR eine relativ unempfindliche Methode. Das heißt, um ein ausreichend großes Signal in akzeptabler Messzeit erhalten zu können, müssen genügend Spins im System vorhanden sein. Eine Erhöhung der Anzahl der Spins im System ist natürlich durch eine Erhöhung der Probenmenge möglich, die für die NMR-Messung verwendet wird. Für die Messung eines Festkörper-NMR-Spektrums lässt sich diese Probenmenge allerdings aus praktischen Gründen nicht beliebig erhöhen. Weiterhin stehen komplexe oder aufwändig hergestellte Materialien oft nur in geringen Mengen zur Verfügung. Wird eine funktionalisierte

---

Oberfläche untersucht, muss somit auch der Funktionalisierungsgrad ausreichend hoch sein, um die aufgetragene Funktionalisierung mittels Festkörper-NMR detektieren zu können. Bei der Analyse von funktionalisierten Oberflächen stellt dies ein enormes Problem dar. Oft ist für den Nachweis einer Oberflächenspezies oder einer kovalenten Bindung zur Oberfläche nur eine einzige Resonanz im Spektrum ausschlaggebend. Diese Spezies macht aber nur einen kleinen molaren Anteil in der Gesamtprobe aus und kann in vielen Fällen gar nicht detektiert werden. Um also in geringen Probenmengen möglichst große Mengen an Funktionalisierung unterzubringen, sind folgende Parameter zu maximieren: Zum einen die spezifische BET-Oberfläche des Silicamaterials und zum anderen die Funktionalisierungsdichte. Die Anwendung von Festkörper-NMR zur Strukturuntersuchung stellt also relativ hohe Ansprüche an die herzustellenden Materialien. Im Gegenzug liefert sie jedoch detaillierte strukturelle Informationen über die hergestellten Materialien.

#### 4.2.1. Eindimensionale Experimente

Um die Funktionalisierung an einer Silicaoberfläche nachweisen zu können, muss im ersten Schritt die chemische Umgebung der Oberfläche charakterisiert werden. Die wertvollsten Informationen für poröse Silicamaterialien, liefert die Festkörper-NMR mit Hilfe von  $^{29}\text{Si}$  CP MAS Messungen. CP steht hier für *cross polarization* (Kreuzpolarisation). Diese Technik für Festkörper-NMR Messungen erlaubt die Übertragung der Polarisation von Heterokernen (hier  $^{29}\text{Si}$ ) auf Wasserstoff ( $^1\text{H}$ ), was hauptsächlich durch die schnelle Relaxation der Protonen zu X-Kernen, zu einer erheblichen Messzeitersparnis führt.<sup>[115, 116]</sup> MAS steht hierbei für *magic angle spinning*, was zu einer Minimierung der anisotropischen Signalverbreiterung führt und somit für eine höhere Auflösung der Spektren sorgt.<sup>[117, 118]</sup> Ein wichtiger Aspekt bei den so aufgenommenen CP MAS NMR-Spektren ist allerdings, dass die Signalintensitäten nicht quantitativ verglichen werden können. Durch die Kreuzpolarisation ist die Signalintensität der Siliziumatome unter anderem von der Menge an Wasserstoffatomen in deren Umgebung abhängig. Dadurch zeigen Siliziumatome an der Materialoberfläche meist größere Signale als Siliziumatome im Inneren des Materials. Dies sorgt für nicht quantitative  $^{29}\text{Si}$  CP MAS NMR-Spektren. Für eine qualitative Analyse ist allerdings hier die Messzeitersparnis der ausschlaggebende Parameter. Weiterhin ist die Information über die chemische Umgebung der Siliziumspezies an der Materialoberfläche wichtiger, als die Information über die Siliziumspezies im Inneren des  $\text{SiO}_2$ -Netzwerks. Gerade bei nachträglicher Funktionalisierung der Oberfläche müssen Veränderungen der Oberflächenspezies detektiert werden. Ein typisches  $^{29}\text{Si}$  CP MAS NMR-Spektrum einer porösen Silicaoberfläche ist in Abbildung 4.5 dargestellt.<sup>[51]</sup>

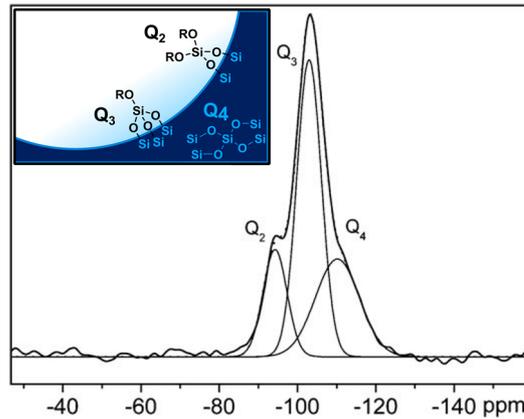


Abbildung 4.5: Beispiel für ein  $^{29}\text{Si}$  CP MAS NMR-Spektrum eines unfunktionalisierten porösen Silicamaterials (rechts) und Zuordnung der Siliziumspezies (links) adaptiert von Grünberg et al.<sup>[51]</sup>

Für ein unfunktionalisiertes, poröses Silicamaterial zeigt das  $^{29}\text{Si}$ -CP-MAS-Spektrum ein breites Signal zwischen -130 ppm und -80 ppm, welches sich aus den Signalen der sogenannten Q-Gruppen zusammensetzt, bei denen die Siliziumatome direkt an vier benachbarte Sauerstoffatome gebunden sind. Innerhalb der Q-Gruppen kann dabei zwischen den  $\text{Q}_4$ -,  $\text{Q}_3$ -,  $\text{Q}_2$ - und  $\text{Q}_1$ -Gruppen differenziert werden. Die Unterschiede liegen hierbei nur im nächsten Nachbaratom hinter dem direkt gebundenen Sauerstoff. Bei  $\text{Q}_4$ -Gruppen sind alle vier nächsten Nachbarn weitere Siliziumatome ( $-\text{O}-\text{Si}$ )<sub>4</sub>. Somit gehören die  $\text{Q}_4$ -Gruppen meist zum Inneren des  $\text{SiO}_2$ -Netzwerks. Die  $\text{Q}_3$ -Gruppen tragen analog nur noch drei weitere ( $-\text{O}-\text{Si}$ )<sub>3</sub>-, die  $\text{Q}_2$ -Gruppen zwei ( $-\text{O}-\text{Si}$ )<sub>2</sub>- und die  $\text{Q}_1$ -Gruppen eine weitere ( $-\text{O}-\text{Si}$ )-Spezies. Die fehlenden Bindungspartner sind im Falle der porösen Silicamaterialien meist Hydroxyspezies ( $-\text{O}-\text{H}$ ), es könnte allerdings auch andere Spezies ohne Silizium folgen ( $-\text{O}-\text{X}$ ). Die  $\text{Q}_3$ -,  $\text{Q}_2$ -, und  $\text{Q}_1$ -Gruppen befinden sich meist an der Materialoberfläche, sie können aber auch zu hydrolisierten Fehlstellen innerhalb des Siliziumnetzwerks gehören.<sup>[46, 51, 58, 119]</sup>

Soll nun eine organische Funktionalisierung an der Siliziumoberfläche nachgewiesen werden, können  $^{29}\text{Si}$  CP MAS NMR-Spektren weitere essentielle Informationen über den Erfolg der Anbindung liefern. In Abbildung 4.6 ist als Beispiel das Spektrum einer APTES-funktionalisierten SBA-3 Oberfläche dargestellt.

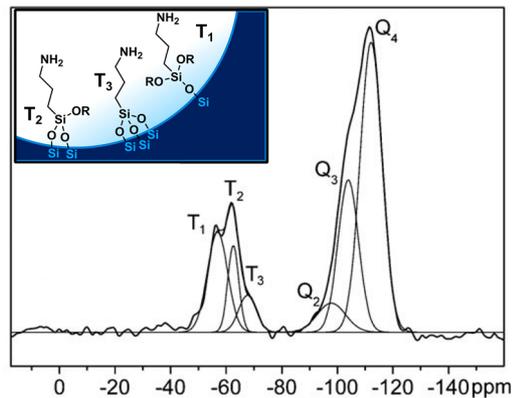


Abbildung 4.6: Beispiel für ein  $^{29}\text{Si}$  CP MAS NMR Spektrum eines APTES-funktionalisierten porösen Silicamaterials (rechts) und Zuordnung der Siliziumspezies (links) adaptiert von Grünberg et al.<sup>[51]</sup>

Hier lassen sich neben den bereits beschriebenen Q-Gruppen weitere Gruppen von Siliziumspezies mit Signalen im Bereich von -80 ppm bis -40 ppm beobachten. Die Siliziumatome der sogenannten T-Gruppen haben gegenüber denen der Q-Gruppen nur drei direkte Sauerstoffnachbarn. Der vierte Bindungspartner ist nun ein Kohlenstoffatom das zum angebondenen Linker gehört.<sup>[48, 51, 120]</sup> Analog der Q-Gruppen lassen sich auch T-Gruppen weiter unterteilen. Siliziumatome der  $T_1$ -,  $T_2$ - und  $T_3$ -Gruppen unterscheiden sich ebenfalls nur über den Bindungspartner, der zwei chemische Bindungen entfernt ist. Die Benennung erfolgt hier analog der Q-Gruppen:  $T_3$ -Gruppen sind von drei (-O-Si)-,  $T_2$ -Gruppen noch von zwei (-O-Si)- und  $T_1$ -Gruppen nur noch von einer (-O-Si)-Spezies umgeben.  $T_2$ - und  $T_1$ -Gruppen tragen statt der dritten Siliziumspezies eine weitere Kohlenstoffspezies (-O-C) oder Hydroxyspezies (-O-H) in der Nachbarschaft. Die Existenz von T-Gruppen gibt Aufschluss über die Anbindung zwischen der Kohlenstoffkette des Linkers und einem Siliziumatom der Silicaoberfläche.<sup>[25, 58, 120, 121]</sup>

Neben  $^{29}\text{Si}$  stehen nach einer Funktionalisierung der Silicaoberfläche mit organischen Linkern weitere NMR-aktive Kerne zur Verfügung. Der erste und wichtigste Vertreter ist hierbei der Kohlenstoff. Mit Hilfe von  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR-Spektren kann gezielt die organische Modifikation, also der angebundene Linker, analysiert werden. Somit lassen sich die Funktionalisierungen der durch *Grafting* oder Co-Kondensation hergestellten, organisch modifizierten Silicamaterialien zuverlässig charakterisieren.<sup>[48, 55-59]</sup> Ein großer Vorteil von Silica als Trägermaterial ist, dass der Träger selbst nicht im  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR-Spektrum zu sehen ist. Dadurch tritt keine Überlagerung zwischen Signalen des Trägers und der Funktionalisierung auf.<sup>[25]</sup> Würde beispielsweise ein Polymer, oder eine andere organische Komponente, als Träger genutzt, wäre die Charakterisierung deutlich erschwert.

---

Auch wenn in Einzelfällen adsorptiv gebundene Moleküle an Oberflächen mit ssNMR untersucht werden, so ist in den meisten Fällen eine kovalente Anbindung der Funktionalisierung mit der Silicaoberfläche angestrebt.<sup>[122-126]</sup>

Während der Nachweis einer kovalenten Bindung zwischen einem Linker und einer Silicaoberfläche mittels <sup>29</sup>Si und <sup>13</sup>C NMR-Messungen noch verhältnismäßig einfach nachzuweisen ist, wird der lückenlose Nachweis weiterer Reaktionsschritte deutlich schwieriger. Oft führt die Komplexität von Peptiden, Katalysatoren oder gar Proteinen dazu, dass in <sup>13</sup>C CP MAS NMR-Spektren keine klare Differenzierung zwischen den einzelnen Spezies möglich ist. Beispielsweise ist es selbst mit modernen Festkörper-NMR Methoden oft nicht möglich komplexe organische Silicahybride im Detail zu analysieren. In vielen Fällen können zwar grob die erwarteten Resonanzbereiche der Kohlenstoffatome, wie beispielsweise aliphatische, aromatische oder allylische Regionen, differenziert werden, eine genaue strukturelle Analyse der organischen Komponenten ist allerdings fast unmöglich.<sup>[127-130]</sup> Erste Ansätze mit sehr einfachen organischen Molekülen, wie zum Beispiel kurzen Peptiden, erlaubten es allerdings in der Vergangenheit solche Funktionalisierungen nachzuweisen.<sup>[52]</sup>

Auch wenn in einigen Ansätzen die Kohlenstoffregionen grob aufgelöst werden konnten, so ist die große Herausforderung weiterhin die kovalente Bindung eines Moleküls an den Linker zweifelsfrei nachzuweisen. Hierzu müssen die aufgenommenen NMR-Spektren die entsprechende Auflösung liefern, da die Anbindung meist nur an einem bzw. zwei Signalen im gesamten Spektrum nachgewiesen werden kann. Wird ein Peptid beispielsweise über dessen C- oder N-Terminus an eine Carboxyl- oder Aminogruppe angebunden, entsteht bei der Anbindung aus einer Carbonsäure ein Amid. Diese Änderung führt zu einer Verschiebungsänderung des Carbonylkohlenstoffes. Diese Änderung ist allerdings so klein, dass sie in <sup>13</sup>C CP MAS NMR-Spektren meist nicht auflösbar ist.<sup>[52, 128]</sup> Wird die Anbindung über eine andere chemische Reaktion umgesetzt, die in einer größeren <sup>13</sup>C Shiftänderung resultiert, sind die Nachweise einfacher, erfordern jedoch oft komplexere Synthesewege.<sup>[69, 77]</sup> Allerdings setzen auch diese Ansätze voraus, dass sich keine Signale überlagern.

Alternativ können zum Nachweis solcher Anbindungen andere NMR-aktive Kerne verwendet werden, deren Resonanzen eine deutlich größere Verschiebungsänderung erfahren. Oft werden hierfür Kerne wie <sup>15</sup>N oder <sup>31</sup>P verwendet. Mit 100% natürlicher Häufigkeit ist die Verwendung des <sup>31</sup>P Kerns in der Festkörper-NMR weit verbreitet. Eine Anbindung von Peptiden oder Biomolekülen, die Phosphor als Bindungspartner verwenden, ist allerdings kaum vorstellbar. Für andere Anwendungsbereiche, wie zum Beispiel die Anbindung von Katalysatoren an Oberflächen, kann die Aufnahme von <sup>31</sup>P Festkörper-NMR-Spektren allerdings schnelle und verlässliche Ergebnisse über die Phosphorkoordination liefern.<sup>[131-133]</sup> Der für Anbindungsnachweise von Peptiden oder Biomolekülen besser geeignete Kern ist <sup>15</sup>N, der

allerdings aufgrund seiner geringen natürlichen Häufigkeit nur mit Isotopenanreicherung verwendet werden kann. Er kommt in allen Aminosäuren vor und seine Signale erfahren bei Änderungen der chemischen Umgebung eine signifikante Verschiebungsänderung. Dies erlaubt selbst die Detektion kleinster Änderungen wie die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen.<sup>[124, 134, 135]</sup> Somit lassen sich Verschiebungsänderungen durch Ausbildung kovalenter Bindungen, wie im oben genannten Fall der Amin- zur Amidumsetzung, relativ einfach nachweisen (Abbildung 4.7).<sup>[52]</sup>

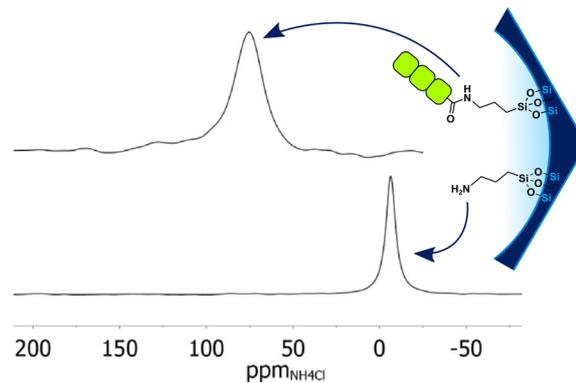


Abbildung 4.7: Nachweis der kovalenten Anbindung eines Kollagen-Modellpeptids mit dessen N-Terminus an eine COOH funktionalisierte Silicaoberfläche mittels DNP-verstärkter  $^{15}\text{N}$  Festkörper-NMR-Messungen adaptiert von Werner et al.<sup>[52]</sup>

Natürlich lassen sich damit nicht nur Umsetzungen vom Amin zum Amid, sondern auch diverse andere stickstoffhaltige Strukturen an Oberflächen auf deren chemische Zusammensetzung untersuchen.<sup>[136-143]</sup> Leider hat die Verwendung von  $^{15}\text{N}$  NMR einen großen Nachteil, und zwar deren Unempfindlichkeit aufgrund der natürlichen Häufigkeit des NMR-aktiven Isotops  $^{15}\text{N}$  mit lediglich 0.366%. Daher sind  $^{15}\text{N}$  NMR-Messungen sehr zeitaufwändig oder, aufgrund der geringen Gesamtmenge an  $^{15}\text{N}$ -Spins im System, praktisch unmöglich. Dieses Problem lässt sich prinzipiell mit Isotopenmarkierung umgehen. Solch eine Markierung ist allerdings meist sehr teuer und in vielen Fällen chemisch schwer umsetzbar.

In den letzten Jahren hat sich allerdings eine neue Methode in der Festkörper-NMR entwickelt, die auch ohne Isotopenmarkierung die notwendige Sensitivität liefern kann. Dabei handelt es sich um *dynamic nuclear polarization* verstärkte Festkörper NMR, kurz DNP-NMR. Diese Methode erlaubt es Elektronenspinpolarisation auf Kernspinpolarisation zu transferieren und ermöglicht es auch geringe Konzentrationen seltener Isotope zu detektieren.<sup>[144-147]</sup> Das Potential dieser Methode für die Charakterisierung von Hybridmaterialien wird im (Abschnitt 5.2.1) verdeutlicht.

---

Zusammengefasst bietet die eindimensionale Festkörper-NMR Spektroskopie potentiell die Möglichkeiten der Charakterisierung von Hybridmaterialien bis auf den atomaren Level, stellt allerdings auch gewisse Voraussetzungen an das zu analysierende Material.

#### 4.2.2. Zweidimensionale Experimente

Analog zu NMR-Experimenten in der flüssigen Phase existieren auch in der Festkörper-NMR, neben den bisher beschriebenen eindimensionalen Techniken, zweidimensionale Experimente. Die Vielzahl von bekannten 2D-NMR-Techniken soll hier allerdings nicht im Detail beleuchtet werden. Durch ihre zweite Frequenzachse erlauben es 2D-NMR-Spektren detaillierte Informationen über die zu analysierende Substanz zu erhalten. Die Intensität der Signale wird hierbei in der dritten Dimension dargestellt.

Die wohl wertvollste Information eines 2D-Spektrums ist die über die heteronuklearen Korrelationen der gemessenen Kerne. Diese Korrelationen beruhen in der Festkörper-NMR meist auf dipolaren Kopplungen räumlich benachbarter Spins. Die abtastbare Distanz dieser Interaktionen wird experimentell über die sogenannte Kontaktzeit gesteuert. Spektren, die mit kurzer Kontaktzeit aufgenommen werden, zeigen also kurzreichweitigere Korrelationen als Spektren, die mit längerer Kontaktzeit aufgenommen werden. Gewöhnliche Kontaktzeiten für zweidimensionale Festkörper-NMR-Messungen erstrecken sich über den Bereich von  $50\ \mu\text{s}$  bis hin zu ca. 10 ms.

Wird also ein Spektrum mit kurzer Kontaktzeit aufgenommen, tauchen nur Kreuzpeaks zwischen den Spezies auf, die im Material nahe beieinander liegen. Dabei müssen die Kerne nicht chemisch miteinander verbunden sein, sondern sich nur in räumlicher Nähe befinden. Das erlaubt die Analyse von Molekülorientierungen oder von Grenzflächen innerhalb des Materials. Der Vergleich von Spektren mit unterschiedlichen Kontaktzeiten kann also Kerne in Abhängigkeit ihrer räumlichen Umgebung differenzieren.<sup>[51, 101, 123, 129, 130, 132, 142, 148, 149]</sup>

Die Aufnahme solcher 2D-Spektren ist generell sehr zeitintensiv. Eine Korrelation kann nur dann detektiert werden, wenn sich zwei NMR-aktive Kerne in räumlicher Nähe befinden. Aus diesem Grund werden in natürlicher Häufigkeit meist nur heteronukleare Korrelationsspektren zwischen  $^1\text{H}$  (99.99%) und einem Heterokern X (z.B.  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ,  $^{31}\text{P}$ ) durchgeführt, bei denen die Wahrscheinlichkeit der räumlichen Nähe eines NMR-aktiven  $^1\text{H}$  Nukleus und eines der genannten Heterokerne hinreichend hoch ist. Würde beispielsweise ein  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  Experiment in natürlicher Häufigkeit durchgeführt werden, besteht nur eine Wahrscheinlichkeit von  $1,10\%$  ( $^{13}\text{C}$ )  $\times$   $0,366\%$  ( $^{15}\text{N}$ ), also nur  $0,004\%$  eine Korrelation zu erhalten. Solche Experimente können ohne Isotopenmarkierung praktisch nicht in ökonomischer Messzeit durchgeführt werden.<sup>[150]</sup>

---

Trotz aller Nachteile bezüglich langer Messzeiten bieten zweidimensionale Festkörper-NMR-Experimente ein enormes Potential für die Analyse von funktionalisierten Materialien. Zum Beispiel erlauben sie die Auftrennung von Signalen in einer zweiten Ebene, was die Analyse von Spektren deutlich erleichtern kann, da weniger Signale überlappen. Dies ist speziell für die Charakterisierung von komplexen Molekülen, wie Proteinen oder anderen Biomolekülen, hilfreich.<sup>[137, 145, 151, 152]</sup>

Die Analyse von Molekülorientierungen kann mit speziellen Methoden sehr detailliert durchgeführt werden. Mit der *Rotational Echo Double-Resonance-NMR* (REDOR) können Distanzen auf der Angströmskala zwischen zwei Kernen bestimmt werden.<sup>[153, 154]</sup> Diese Methode kann zur Analyse von Bindungstaschen in Enzymen, zur Strukturaufklärung von biologischen Hybridmaterialien oder Distanzbestimmung in biologischen Aggregaten verwendet werden.<sup>[120, 122, 124, 155-157]</sup> Trotz oft langer Messzeiten bietet die zweidimensionale Festkörper-NMR-Spektroskopie also eine der stärksten Techniken zur Analyse einer Vielzahl von Materialien auf der nanoskaligen Ebene.

## 5. Peptidchemie

In dieser Arbeit steht die Anbindung einer Vielzahl von Aminosäuren und Peptiden an Oberflächen für spezielle Anwendungen in der Festkörper-NMR im Vordergrund. Um dafür passende Peptide herstellen zu können, sind Kenntnisse über die Peptidsynthese und die chemischen Eigenschaften von Aminosäuren und Peptiden unerlässlich. Im Folgenden sollen die Grundlagen der chemischen Peptidsynthese und die Möglichkeit der chemischen Modifikation von Aminosäure und Peptiden genauer erläutert werde.

### 5.1. Festphasen-Peptidsynthese (SPPS)

Heutzutage werden synthetische Peptide meist mit Hilfe der Festphasen-Peptidsynthese, oder auch *solid phase peptide synthesis* (SPPS), hergestellt. Diese Strategie wurde 1963 erstmals von MERRIFIELD<sup>[158]</sup> vorgestellt und einige Jahre später von SHEPPARD<sup>[159, 160]</sup> weiterentwickelt. In beiden Syntheseverarianten werden die Peptide in einer Schritt für Schritt Synthese aufgebaut, bis die gewünschte Peptidsequenz erreicht ist (Schema 5.1). Vor der Etablierung dieser Methoden wurden die Peptide in Lösung gekoppelt und nach jedem Kopplungsschritt isoliert. Die Synthesen von MERRIFIELD und SHEPPARD bedienten sich erstmals der Synthese an einer festen Phase (Harz). Der Aufbau des Peptids geschieht vom C- zum N-Terminus. Als Harz werden in den meisten Fällen quervernetzte Polystyrolharze eingesetzt. Diese sind gegen die meisten Lösemittel resistent und durch ihre Quervernetzung unlöslich. Je nach Vernetzungsgrad ist es dem Harz möglich lösemittelabhängig zu quellen, um die Zugänglichkeit der Aminosäuren an das Harz zu gewährleisten. Die Harze sind mit einer Linkergruppe versehen, die eine Anbindung des C-Terminus der Aminosäure an das Harz ermöglicht. Je nach Peptidlänge, den verwendeten Aminosäuren und anderen Faktoren gibt es Harze mit verschiedenen Vernetzungsgraden, Linkergruppen, Funktionalisierungsdichten u.v.m. Eine Auswahl an Linkern ist in Abbildung 5.1 dargestellt.

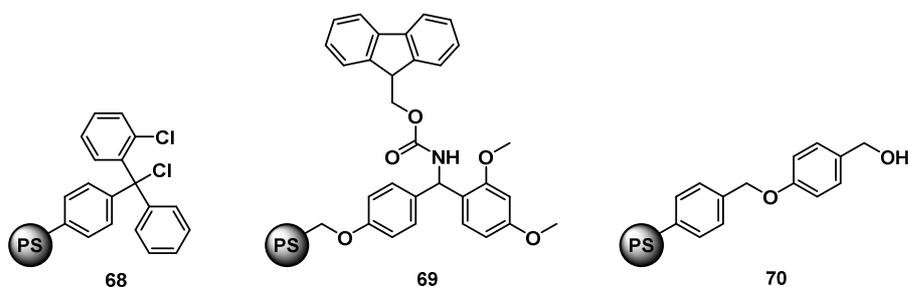


Abbildung 5.1: Strukturformeln der bekanntesten Linkergruppen, die für eine SPPS eingesetzt werden können am Beispiel des 2-Chlortritylchlorid- **68**, Rink-Amid- **69** und Wang- **70** Harz-Linker

Grundsätzlich erfolgt der Peptidaufbau am Harz in vier Schritten. Im ersten Schritt wird die erste Aminosäure mit dem C-Terminus an das Harz gebunden. Um eine Mehrfachanbindung der Aminosäuren und andere Nebenreaktionen in Lösung zu verhindern, müssen die übrigen funktionellen Gruppen der Aminosäure mit Schutzgruppen versehen sein. Hierzu gehört besonders der N-Terminus und im Falle von Aminosäuren mit funktionellen Seitenketten wie Alkohole, Thiole, Carbonsäuren oder Amine. Hier ergeben sich Unterschiede zwischen den Syntheseverfahren nach MERRIFIELD und SHEPPARD. Während MERRIFIELD als Schutzgruppe tert-Butyloxycarbonyl (BOC) für den N-Terminus verwendete, wechselte SHEPPARD einige Jahre später zur Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) Schutzgruppe. Während die BOC-Schutzgruppe nur unter stark sauren Bedingungen (z.B. 95% TFA oder HF/HBr) abgespalten werden kann, erlaubt die Verwendung der Fmoc-Schutzgruppe eine Abspaltung unter basischen, deutlich milderen Bedingungen (z.B. 20% Piperidin).<sup>[161, 162]</sup> Die meisten Harze lassen grundsätzlich beide Varianten zu. Die Unterschiede werden erst im letzten Schritt der SPPS deutlich, der hier später beleuchtet wird.

Im zweiten Schritt der SPPS wird die Schutzgruppe am N-Terminus der Aminosäure abgespalten, um die Anbindung der nächsten Aminosäure zu ermöglichen (Schema 5.1). Trägt die Aminosäure eine funktionelle Seitenkette mit Schutzgruppe muss gewährleistet werden, dass diese Schutzgruppe bei Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppe nicht mit abgespalten wird, sonst kann es in den nächsten Schritten zu Nebenreaktionen kommen. Nach SHEPPARD werden daher an den Seitenketten säurelabile Schutzgruppen, wie beispielsweise die Triphenylmethyl- (TRT) oder die *tert*-Butyl-Gruppe (*t*Bu) eingesetzt. Diese Orthogonalität zur N-terminalen Fmoc-Gruppe ist ein Schlüsselement der SPPS.<sup>[87]</sup> Um diese Orthogonalität zu wahren müssen die Schutzgruppen der Seitenketten, je nach Verwendung der Boc- oder Fmoc-Strategie, korrekt gewählt werden. Dadurch ergibt sich eine grundlegende Form der Aminosäuren, die für den Einsatz der SPPS geeignet ist (Abbildung 5.2).

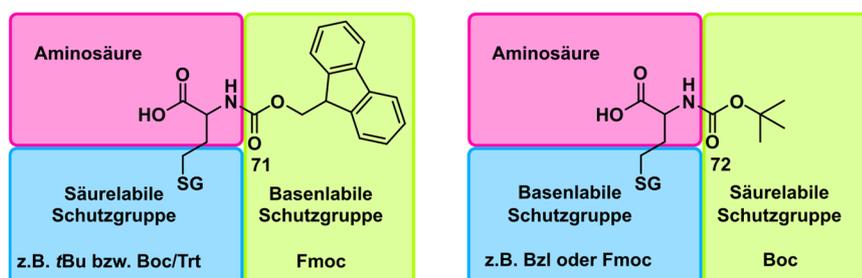
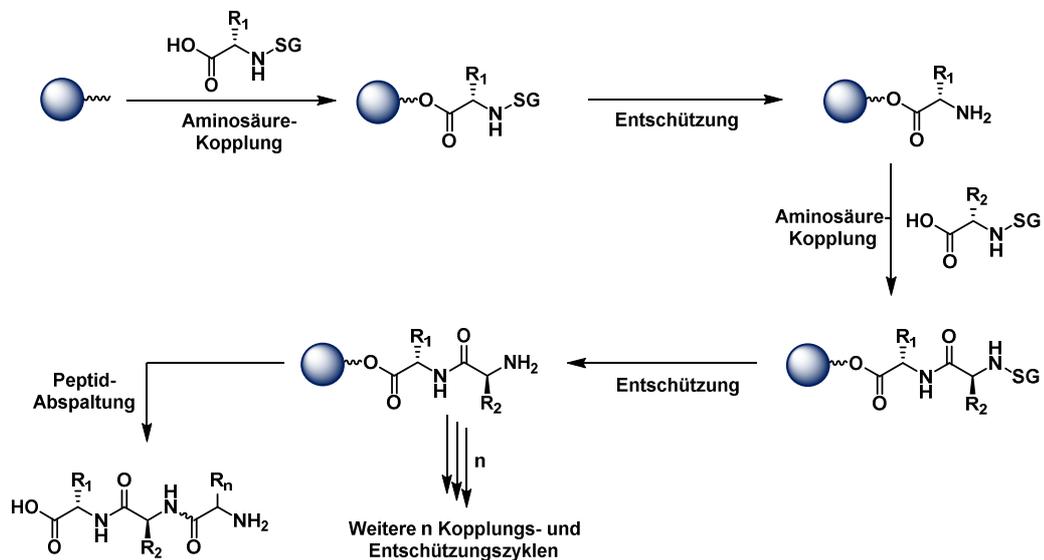


Abbildung 5.2: Grundlegende Form für die SPPS geeigneten Aminosäure nach MERRIFIELD **71** (links) und SHEPPARD **72** (rechts). Lila dargestellt ist der Grundkörper der Aminosäure, in Blau die Schutzgruppen der Seitenkette und in Grün die N-terminale Schutzgruppe.

Der dritte Schritt der SPPS wird oft als Verlängerungs- oder Wachstumsschritt bezeichnet und besteht aus der Wiederholung der C-terminalen Aminosäure-Kopplung mit anschließender N-terminaler Entschützung. Somit entsteht am Harz Schritt für Schritt die Peptidkette (Schema 5.1).



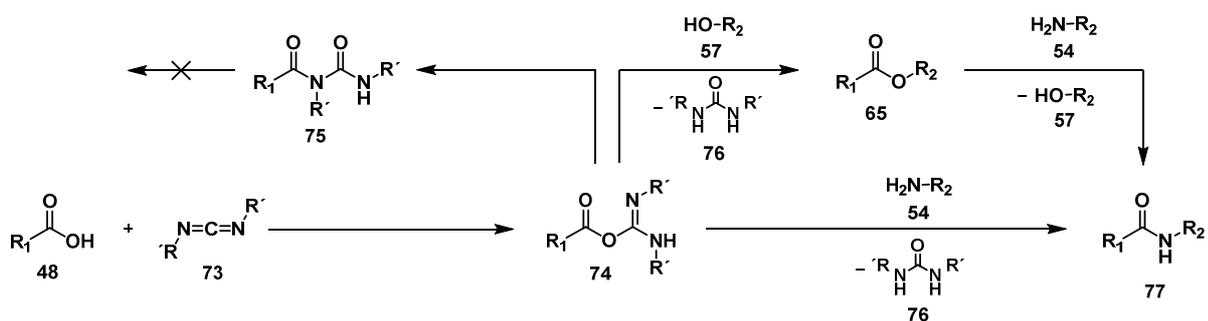
Schema 5.1: Schematische Darstellung der SPPS

Der letzte Schritt ist die Abspaltung des fertigen Peptids vom Harz, wobei die Bindung zwischen der ersten Aminosäure und dem Linker des Harzes gespalten wird (Schema 5.1). Bei der klassischen Fmoc-Peptidsynthese wird hierbei eine stark saure Abspaltlösung, bestehend aus 95% TFA, Anisol und Triisopropylsilan (TIPS), verwendet. Wird die Boc-Strategie verwendet, müssen für die Abspaltung deutlich drastischere Bedingungen verwendet werden (z.B. HF), da die Bindung zwischen der ersten Aminosäure und dem Harz stabiler ist. Wäre dies nicht der Fall, würde das unfertige Peptid schon bei den Boc-Entschützungen während des Kettenaufbaus vom Harz getrennt. Gerade weil das Arbeiten mit HF möglichst vermieden wird, setzte sich die Fmoc-Strategie durch. Gleichzeitig mit der Peptidabspaltung werden in beiden Fällen auch die Schutzgruppen an den Seitenketten aller Aminosäuren abgespalten. Damit geht das fertige Peptid in Lösung und kann in einem organischen Lösemittel wie Diethylether oder Methyl-*tert*-butylether (MTBE) gefällt werden. Das fertige Peptid kann im Anschluss gewaschen und bei Bedarf weiter chromatographisch aufgereinigt werden.

### 5.1.1. Kopplungsreagenzien

Für die Kopplung zwischen COOH- und NH<sub>2</sub>-Gruppe der Aminosäuren können verschiedene Kopplungsstrategien verwendet werden. Um die beiden funktionellen Gruppen zum Amid

umzusetzen muss die COOH-Gruppe **48** aktiviert werden, sodass ein nukleophiler Angriff des Amins am Carbonylkohlenstoff der Carbonsäure erfolgen kann. Diese Aktivierung erfolgt meist über die Bildung eines Aktivesters, welcher als Abgangsgruppe am Carbonylkohlenstoff fungiert. Eine weit verbreitete Variante bedient sich dabei der Carbodiimide **73** (Schema 5.2). Diese Variante wurde bereits im Abschnitt 3.3 mit DCC zur Esterbildung erläutert. Der hier entstehende *O*-acylisoharnstoff **74** kann durch Umsetzung mit dem Amin **54** in das gewünschte Amid **77** überführt werden. Alternativ ist der Umweg über die Bildung eines Aktivesters **65** mit anschließender Umsetzung zum Amid **77** möglich (Schema 5.2).



Schema 5.2: Schematische Darstellung der Umsetzung des N-Terminus einer Aminosäure **48** mit Hilfe eines Carbodiimides **73** zur Knüpfung einer Peptidbindung **77**

Ein großes Problem dieses Prozesses ist die Reaktivität des *O*-acylisoharnstoff **74**.<sup>[87]</sup> Dieser lagert sich in Abwesenheit eines Nucleophils zum unreaktiven *N*-acylharnstoff **75** um, was zum Abbruch der Reaktion führt. Diese Nebenreaktion findet besonders schnell in DMF statt, welches standardmäßig bei der SPPS verwendet wird. Daher wird diese Route selten in der SPPS eingesetzt.<sup>[163, 164]</sup> Dieses Problem kann durch den Zusatz von tertiären Aminen, wie beispielsweise dem bereits erwähnten DMAP **61**, umgangen werden. Diese begünstigen die Umsetzung zum Aktivester **65**.<sup>[165]</sup>

Zur Bildung des Aktivesters stehen in der SPPS viele verschiedene Kandidaten zur Verfügung. Die bekanntesten und effizientesten Vertreter sind hier das 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol **78** (HOAt) und der Hydroxyiminocyanessigsäureethylester **79** (Oxyma) (Abbildung 5.3).<sup>[166, 167]</sup> Viele klassische Aktivesterformen kommen aufgrund ihrer hohen Reaktivität nicht in Frage.<sup>[168]</sup> In den letzten Jahren hat sich in der SPPS eine völlig neue Klasse von Kopplungsreagenzien durchgesetzt. Dabei handelt es sich um die Klasse der Aminium/Uronium-Salze, die erstmals in den 1990er Jahren vorgestellt wurden.<sup>[169]</sup> Der wichtigste Vertreter dieser Stoffklasse, der auch in dieser Arbeit im Vordergrund steht, ist das *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat **80** (HATU) (Abbildung 5.3).

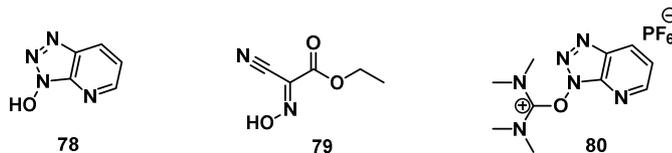
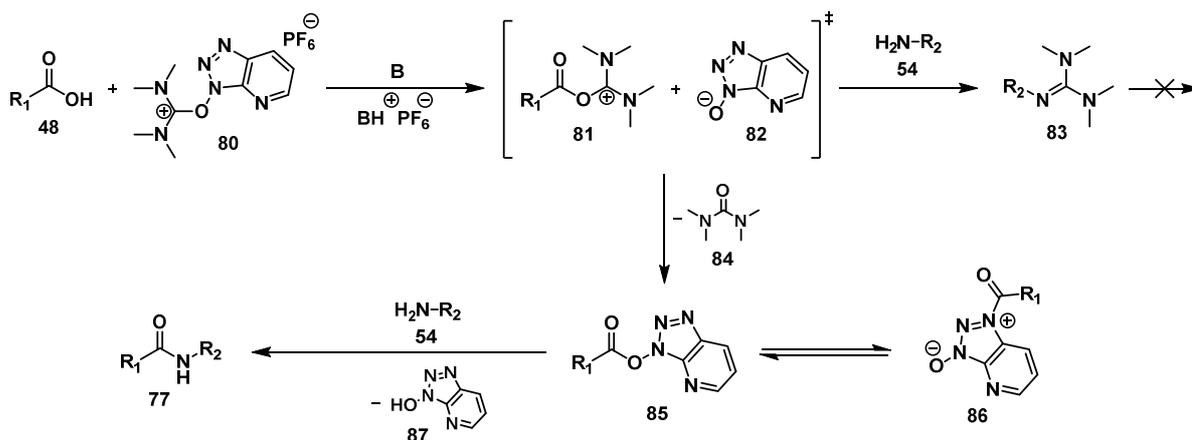


Abbildung 5.3: Strukturformeln des 1-Hydroxy-7-azabenzotriazol **78** (HOAt), des Hydroxyiminocyanessigsäureethylester **79** (Oxyma) und des *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N,N*-tetramethyluronium-hexafluorosphat **80** (HATU)

Unter Verwendung einer nicht nukleophilen Base, meist eines tertiärenamins, wie Diisopropylethylamin (DIEA), bildet HATU **80** mit dem C-Terminus des Peptids **48** einen Aktivester und reagiert anschließend, unter Abspaltung des Harnstoffderivats **84**, zur Aminium/Uronium-Form **85/86**. Der N-Terminus der nächste Aminosäure **54** reagiert anschließend mit dem Aktivester unter Abspaltung des Heteroaromaten **87** zur finalen Peptidbindung **77** (Schema 5.3).<sup>[87]</sup> Das Kopplungsreagenz wird hierbei immer im leichten Überschuss eingesetzt, da ein Überschuss des Salzes zur Abreaktion des Amins **54** zum Guanidin **83**, und damit zum Abbruch der Peptidkette, führt.<sup>[170]</sup>



Schema 5.3: Schematischer Reaktionsweg Knüpfung der Peptidbindung **77** zwischen Carbonsäure **48** und Amin **54** mit Hilfe des Aminiumsalzes HATU **80**<sup>[87]</sup>

In den letzten Jahren haben sich diese Kopplungsreagenzien durchgesetzt. Dies liegt vor allem daran, dass sie eine Voraktivierung des C-Terminus erlauben, ohne den Aktivester zu zersetzen. Weiterhin unterdrücken sie hervorragend die Racemisierung der Aminosäuren.<sup>[87]</sup>

## 5.2. Spin-Labeling

Ein Spin-Label bezeichnet meist ein organisches Molekül, welches ein ungepaartes Elektron trägt. Gezielt an ein Zielmolekül angebracht, kann dessen paramagnetischer Charakter für viele

---

analytische Methoden als eine Sonde fungieren. Speziell das „*Spin-Labeling*“, oder deutsch „Spinmarkierung“, von Biomolekülen wie Peptiden oder Proteinen ist weit verbreitet.<sup>[147, 171]</sup> Um ein Spin-Label in ein solches Biomolekül einzubinden existieren verschiedene Methoden, die im Späteren genauer betrachtet werden. Ist das Spin-Label erfolgreich eingebracht kann klassisch die Elektronenspinresonanz, auch *electron paramagnetic resonance* (EPR), zur lokalen Analyse verwendet werden.<sup>[171]</sup> Hier kann das Label analog zur in der NMR verwendeten Isotopenmarkierung benutzt werden. In den letzten Jahren macht sich auch die in Kapitel 4.2.1 beschriebene DNP-verstärkte Festkörper NMR solche Spin-Label zunutze, um Strukturaufklärung durchzuführen.<sup>[147, 172]</sup>

### 5.2.1. Anwendung von Spin-Labeln in DNP und EPR

Das Anwendungsspektrum von EPR und DNP ist sehr groß, sodass im Rahmen dieser Arbeit nur ein kleiner Teil ihrer Möglichkeiten aufgezeigt werden soll. Die sehr sensitive EPR wird schon seit vielen Jahrzehnten zur Charakterisierung von Materialien verwendet. Unter dem Gesichtspunkt der Spinmarkierung können gezielt markierte Materialien, wie Proteine oder Peptide, mittels EPR auf deren lokale Strukturen in der Umgebung des Labels untersucht werden. Werden zwei Label an bekannten Positionen platziert, können Distanzen zwischen den paramagnetischen Zentren sehr genau bestimmt werden. Werden also beispielsweise zwei verschiedene Moleküle markiert, kann die Entfernung der Moleküle bestimmt werden. Wird innerhalb eines Moleküls mehrfach markiert, wie oft in großen Proteinen üblich, können Distanzen im Molekül und dadurch auch Veränderungen in der Konformation dieser Stoffe untersucht werden.<sup>[64, 67, 68, 171, 173, 174]</sup>

Eine höhere Gewichtung in dieser Arbeit hat die DNP-NMR. Auch ohne gezielte Spinmarkierung kann die DNP-NMR für die Strukturaufklärung bereits beeindruckende Ergebnisse liefern. Der zu Grunde liegende Effekt, der die DNP-NMR so wertvoll macht, wurde Anfang der 1950er Jahre entdeckt.<sup>[175, 176]</sup> Hierbei konnte gezeigt werden, dass die, sonst für NMR-Anwendungen nachteiligen, Elektronenspins der Radikale dazu genutzt werden können, um NMR-Signale zu verstärken. Wird auf die radikalhaltige Probe elektromagnetische Strahlung nahe der Resonanzfrequenz der Elektronen des Radikals eingestrahlt, kann die Polarisierung der Elektronenspins auf die Kernspins in der Nähe übertragen werden. Durch die damit verbundene Veränderung der Spinpopulation der nahen Kernspins, erfahren diese eine drastische Polarisierungserhöhung, und damit ergibt sich eine drastische Signalverstärkung bei der Detektion des NMR-Signals.<sup>[147, 172]</sup> Nachdem das Equipment zur Erzeugung der nötigen Mikrowellenstrahlung deutlich verbessert werden konnte, etablierte sich die Methode in den 2000er Jahren auch für den Hochfeldbereich der NMR. Erstmals konnten so per NMR vorher

nicht nachweisbare Spezies an Oberflächen detektierbar gemacht werden.<sup>[120]</sup> Gerade für die Detektion gering konzentrierter, oberflächengebundener Spezies ist die DNP-verstärkte Festkörper-NMR eine wertvolle Ergänzung zur konventionellen Festkörper-NMR.<sup>[142, 148, 177, 178]</sup> Auch zur Charakterisierung von biologischen Systemen, wie Proteinen oder Hybridmaterialien, wird die DNP in den letzten Jahren vermehrt eingesetzt.<sup>[130, 137, 145, 152, 179]</sup>

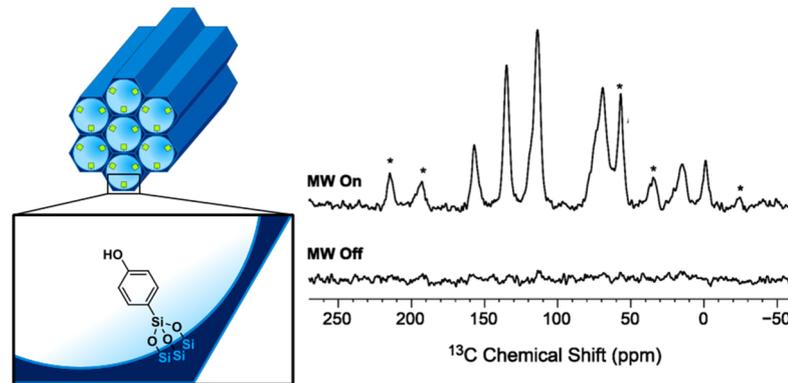


Abbildung 5.4: Schematische Darstellung einer funktionalisierten, porösen Oberfläche (links). Vergleich der DNP-verstärkten  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR-Spektren mit und ohne Mikrowelleneinstrahlung (rechts) adaptiert von Lesage et al..<sup>[120]</sup> MW=Mikrowelle

Die bisher beschriebenen Möglichkeiten ergeben sich bereits ohne gezielte Spinmarkierung. Das Radikal wird lediglich undefiniert zur Probe gegeben. Ein wichtiger Faktor für die Verstärkung ist die Distanz zwischen Kernspin und Radikal. Befindet sich die Spezies von Interesse zu nah am Radikal sorgt die schnelle Relaxation des Kernspins durch das Radikal dafür, dass die Spezies im NMR-Spektrum nicht detektiert werden kann. Ist das Radikal zu weit entfernt, ist bei direkter Polarisation keine Übertragung der Elektronenspinpopulation in Kernspinpopulation möglich. Alle Kerne im geeigneten Abstand zum Radikal werden dagegen verstärkt detektiert.<sup>[147]</sup> Diese Eigenschaft kann nun gezielt eingesetzt werden, wenn Spinmarkierung verwendet wird. Beispielsweise können so komplexe Systeme, wie Proteine, in Abhängigkeit der Markierungsposition systematisch analysiert werden.<sup>[141, 180]</sup> Eine weitere Möglichkeit ist das Labeln zweier Proteine, um im Anschluss deren Interaktion nachzuweisen.<sup>[181]</sup> Analog lässt sich dies für Protein-Ligand/Inhibitor Interaktion realisieren.<sup>[182, 183]</sup> Selbst in hochkomplexen Biosystemen, wie in Zellen, können so NMR-Charakterisierungen in der Nähe einer gezielt eingebrachten Markierung durchgeführt werden.<sup>[152]</sup> All diese Erfolge beruhen auf der Tatsache, dass durch die gezielte Markierung Signale von Kernen, die sich weiter entfernt vom Label befinden, nicht sichtbar sind. Weiterhin erlaubt das Label die Analyse von selbst gering konzentrierten Spezies im geeigneten Abstand zum Radikal, insofern direkte Polarisation verwendet wird.<sup>[180]</sup> Erfolgt hier eine DNP-Messung über unspezifisch zur Probe gegebene Radikale findet die Polarisationsübertragung unspezifisch über die in der Probe enthaltenen Wasserstoffatome statt. Auch wenn die gezielte

Spinmarkierung weiterhin eine Übertragung der Polarisation über die dem Radikal benachbarten Wasserstoffatome voraussetzt lassen sich so deutlich zielgerichtete Analysen durchführen. Eingebrachte Spinmarkierung können folglich enorme analytische Vorteile bietet erfordern allerdings auch eine komplexe Probenpräparation.

### 5.2.2. Herstellung spinmarkierter Peptide

Die spezifische Einführung von Spin-Labels in Peptide oder Proteinen ist eine große Herausforderung in der organischen Chemie und Biochemie. Die am häufigsten verwendeten organischen Spin-Label besitzen sogenannte Nitroxyl-Gruppen wie z.B. (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl (TEMPO) **88**, (2,2,5,5-Tetramethylpyrrolidin-1-yl)oxyl (PROXYL) **89**, 1-(TEMPO-4-oxy)-3-(TEMPO4-amino)propan-2-ol (TOTAPOL) **90**, oder 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-N-oxyl-4-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl-amino)-4-Carbonsäure (Fmoc-TOAC) **91** (Abbildung 5.5).

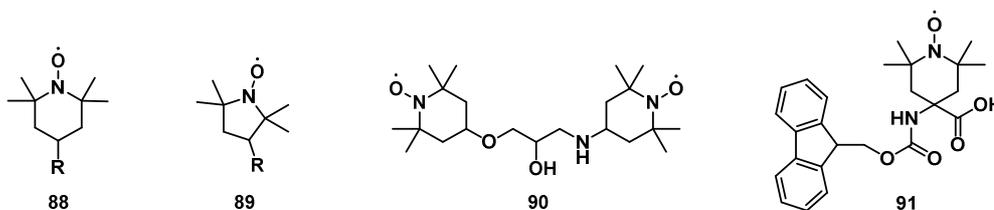


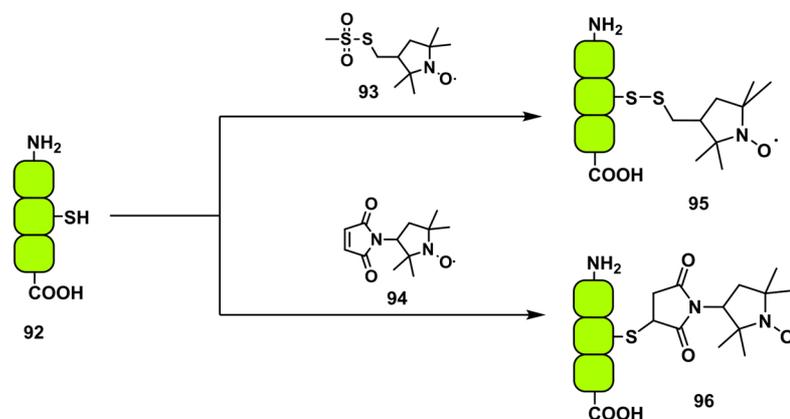
Abbildung 5.5: Strukturformeln der verbreiteten Spin-Label TEMPO **88**, PROXYL **89**, TOTAPOL **90** und Fmoc-TOAC **91**

Die sterisch anspruchsvollen Methylgruppen in direkter Nachbarschaft des Nitroxyl-Radikalzentrums verhindern, dass sich die Radikale zu nahekommen und dimerisieren. Weiterhin stabilisiert deren positiver isomerer Effekt das Radikalzentrum. Sowohl TEMPO **88**, als auch PROXYL **89** bieten die Möglichkeit einer chemischen Modifikation an den Positionen 3 bzw. 4, um am gewünschten Punkt angebinden werden zu können. TOTAPOL **90** bietet sowohl eine Alkoholgruppe als auch ein sekundäres Amin, worüber weitere Reaktionen erfolgen können. Im zu markierenden Peptid muss allerdings eine passende Funktionalität zur Kopplung vorhanden sein.

Der verbreitetste Weg Peptide zu markieren, ist ein postsynthetischer Ansatz. Hierbei wird das Peptid chemisch oder biologisch hergestellt und das Label anschließend an der gewünschten Stelle angebracht. Diese spezifische Markierung ist aufgrund der Vielfalt funktioneller Gruppen, die in den Seitenketten von Aminosäuren vorkommen können, schwierig. Um also eine Markierung an einer genau definierten Position erreichen zu können, muss eine spezifische Funktionalität zur Kopplung mit dem Spin-Label an der gewünschten Stelle vorhanden sein.

Diese kann zum Beispiel eine natürliche Aminosäureseitenkette sein, die nur einmal im zu markierenden Peptid vorkommt. Da dies bei großen Peptiden allerdings recht unwahrscheinlich ist, besteht die andere Option im Einbau von nicht natürlichen Aminosäuren, die spezielle Funktionalitäten in der Seitenkette mitbringen. Egal welcher dieser Wege gewählt wird, ist eine Schritt für Schritt Synthese des Peptids mittels SPPS notwendig, um die passende funktionelle Gruppe an der gewünschten Position zu platzieren. Trotz der erfolgreichen Durchführbarkeit der postsynthetischen Kopplung des Spin-Labels ist dieser Ansatz oft mit geringen Ausbeuten oder geringer Selektivität verbunden.<sup>[184]</sup>

Bei Peptiden und Proteinen wird für die Funktionalisierung häufig Cystein und damit dessen Thiolseitenkette verwendet, da diese unter den natürlichen Aminosäuren nur dort vorkommt.<sup>[63, 141, 183, 185-188]</sup> Die dadurch zwischen Cysteinseitenkette und Spin-Label entstehende Disulfidbrücke ist allerdings sehr labil gegenüber oxidativen oder reduktiven Bedingungen.<sup>[66, 82]</sup> Neuere Ansätze verwenden hier keine Disulfidbrücken, sondern eine Maleimid-Kopplung, die deutlich stabiler ist (Schema 5.4).<sup>[80-82]</sup> Voraussetzung für die Kopplung über Cystein ist allerdings, dass das Peptid kein weiteres Cystein tragen darf, da sonst keine spezifische Kopplung mehr möglich ist.



Schema 5.4: Schematische Darstellung der Kopplung eines Spin-Labels über die Cysteinseitenketten eines Peptids **92**. Oben: Verknüpfung über das Thiosulfonat **93** zum Disulfid **95**. Unten: Verknüpfung über das Maleimidderivat **94** zum Thioether **96**.

Die postsynthetische Kopplung kann alternativ über den Einbau von nicht natürlichen Aminosäuren erfolgen. Weit verbreitet ist hier eine Kopplung auf Basis der "Click-Chemie", die bereits im Abschnitt 3.3 erwähnt wurde.<sup>[80, 81]</sup> Hier erfolgt die Kopplung spezifisch zwischen einem Azid und einem Alkin zum Heterozyklus. Auch dieser bioorthogonale Ansatz erfordert den Einbau des Azids oder Alkins in das Peptid während der Synthese. Die hierfür benötigten *Building-Blocks* sind oft teuer oder nicht kommerziell erhältlich. Darüber hinaus verwendet die Click-Chemie einen Kupferkatalysator, der mit vielen biologischen Systemen nicht kompatibel

---

ist.<sup>[81, 82]</sup> Einige Ansätze bedienen sich eines Umwegs: Hierbei wird das Peptid am Harz hergestellt und vom Harz abgespalten, ohne die Schutzgruppen an den Seitenketten zu entfernen. Im Anschluss erfolgt die Anbindung des Labels nicht an der Seitenkette, sondern am frei gewordenen C-Terminus des Peptids.<sup>[189]</sup> Diese Methode erlaubt folglich allerdings nur eine C-terminale Anbindung des Labels und keinen modularen Einbau an einer gewünschten Stelle in der Peptidsequenz.

Im Gegensatz zur Anbindung des Spin-Labels nach der Peptidsynthese existieren auch Co-synthetische Ansätze, bei denen das Label direkt während der SPPS in das Peptid integriert wird. Diese Ansätze sind allerdings hinreichend schwieriger, da das paramagnetische Spin-Label seinen Radikalcharakter während der Synthese und der Aufreinigung des Peptids nicht verlieren darf. Weiterhin darf das reaktive Radikal mit der in der SPPS verwendeten Kopplungschemie nicht interferieren. Der einzige kommerziell erhältliche *Building-Block*, der solch ein Vorgehen erlaubt, ist das Fmoc-TOAC **91** (Abbildung 5.5), welches die Nitroxylgruppe in das Rückgrat des Peptids einbaut.<sup>[190-194]</sup> Der Einbau des Labels in das Rückgrat kann jedoch die Sekundärstruktur und Flexibilität des Peptids maßgeblich beeinträchtigen. Der große Vorteil eines solchen Einbaus ist, dass er während der Peptidsynthese geschieht und so kein nachträglicher spezifischer Kopplungsschritt mit dem Spin-Label erfolgen muss. Allerdings verlangt diese Markierungsstrategie sowohl ein umfangreiches Wissen über die Chemie der Peptidsynthese, als auch über das eingesetzte Label.

Sowohl die postsynthetische als auch die Co-synthetische Markierung bieten Vor- und Nachteile und müssen daher für das System gezielt gewählt werden. Der einfachere und damit häufiger verwendete Ansatz ist die nachträgliche Markierung.

---

## 6. Aufgabenstellung

---

Wie in vorherigen Kapitel gezeigt, bietet die Materialklasse der natürlich inspirierten Hybridmaterialien ein enormes Potential für viele Teilbereiche in Wissenschaft und Technik. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher der bereits vorgestellte *bottom-up* Ansatz genutzt werden, um detaillierte Informationen über die Struktur und Oberflächenanbindung von Peptiden an porösen Trägersystemen zu generieren. Speziell soll hierbei auf deren Charakterisierung mit diversen Techniken der Festkörper-NMR eingegangen werden, welche besondere Anforderungen an die herzustellenden Materialien stellen.

Im ersten Schritt dieser Arbeit soll die Synthese eines geeigneten Silicatträgersystems im Vordergrund stehen. Um die Frustel der Kieselalgen möglichst gut zu imitieren bieten sich als Basis die vorgestellten porösen Silicamaterialien (MCM-41 und SBA-15) an. Der besondere Anspruch an die herzustellenden Träger ist dabei ein hierarchisches und hoch definiertes Porensystem. Nur dieses lässt die später angestrebte homogene Funktionalisierung des Materials zu. Außerdem erreichen nur definierte Materialien hohe spezifische Oberflächen, die für die Analyse mittels Festkörper-NMR-Techniken unerlässlich sind. Da die Porengröße für die Bedingungen im Inneren der Pore ausschlaggebend ist, muss auch dieser Parameter perfekt einstellbar sein.

Im zweiten Schritt muss eine Linkergruppe für die Anbindung von Peptiden an den Poreninnenwänden angebracht werden. Hierbei sind die vorher schon beschriebenen Ansätze des *Graftings* und der Co-Kondensation gegeneinander abzuwägen und eine geeignete Methode zu etablieren.

Im finalen Schritt sollen die linkermodifizierten Strukturen gezielt mit kurzen Peptidsequenzen modifiziert und im Detail mit Festkörper-NMR-Techniken auf deren chemische Struktur untersucht werden. Die besondere Herausforderung liegt hierbei in der Wahl einer passenden Kombination aus Linkergruppe und funktioneller Gruppe im Peptid. Da die Vielfalt der vorgestellten Techniken groß ist, werden im Rahmen der Arbeit nur die wirksamsten Kombinationen detaillierter untersucht. Die Wahl der Kopplungsvariante steht hierbei in direkter Korrelation mit der Wahl der geeigneten Strategie zur Anbringung des Linkers am Silicatträger mittels *Grafting* oder Co-Kondensationsmethode (Abbildung 6.1).

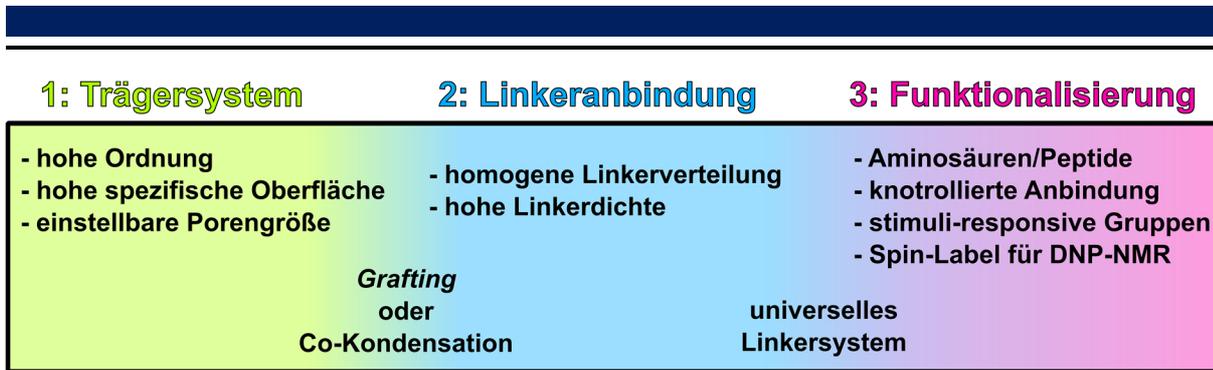


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung der drei zu bearbeitenden Schritte zur Herstellung funktionalisierter Materialien mit den zugehörigen wichtigen Parametern jedes Schrittes

Ziel ist es eine Oberflächenfunktionalisierung mit hoher Funktionalisierungsdichte und einheitlicher Oberflächenbehandlung zu realisieren. Dies setzt voraus, dass Nebenreaktionen an der Trägeroberfläche, wie Mehrfachanbindungen, unbedingt vermieden werden müssen. Das Ziel ist die kovalente Anbindung der Peptide am Linker. Um adsorbierte Peptide oder Aminosäuren an der Oberfläche ausschließen zu können, muss die kovalente Bindung zwischen Peptid und Linker zweifelsfrei nachgewiesen werden. Sind all diese Voraussetzungen erfüllt kann der Einsatz der sonst messzeitintensiven NMR-Techniken den Nachweis der oberflächengebundenen Spezies und der kovalenten Bindung zwischen organischer Funktionalisierung und Silicaoberfläche liefern.

Nach Entwicklung einer zuverlässigen Funktionalisierungsstrategie sollen im Rahmen dieser Arbeit auch andere organische Moleküle angebunden und untersucht werden. Denkbar sind hier stimuli-responsive Moleküle oder funktionelle Gruppen, wie Spin-Labels, für spezielle DNP-NMR-Anwendungen.

Der Schritt für Schritt Prozess der Synthese geeigneter Träger, der anschließende Weg zur Anbringung der Linkergruppe sowie die Kopplung von Peptiden an diese Oberflächen ist in kumulativer Form in Kapitel 7 dargestellt.

---

## 7. Ergebnisse und Diskussion

---

Im folgenden Kapitel werden die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen wissenschaftlichen Ergebnisse vorgestellt und diskutiert. Diese bestehen aus bereits in wissenschaftlichen Fachpublikationen veröffentlichten und einigen noch nicht publizierten Ergebnissen. In Folge dessen werden diese Ergebnisse in folgende Kapitel unterteilt:

- I. Herstellung unfunktionalisierter Silicananoporen, in Form von MCM-41, mit verschiedenen Porendurchmessern (Abschnitt 7.1).
- II. Herstellung von aminofunktionalisierten Silicananoporen auf SBA-15 Trägern über die *Grafting* Route (Abschnitt 7.2).
- III. Herstellung von aminofunktionalisierten Silicananoporen auf SBA-15 Trägern über die Co-Kondensationsroute und anschließende Funktionalisierung mit Aminosäuren (Abschnitt 7.3).
- IV. Anbindung von stimuli-responsiven Gruppen an aminofunktionalisierten SBA-15 Trägern (Abschnitt 7.4).
- V. Herstellung von spinmarkierten Aminosäuren für eine potenzielle Oberflächenanbindung an aminofunktionalisierten SBA-15 Trägern für DNP-NMR-Anwendungen (Abschnitt 7.5).

### 7.1. Hochgeordnete, poröse Silicamaterialien

Die definierte Herstellung von porösen Silicaträgern erfordert eine genaue Planung der Synthese in Abhängigkeit der angestrebten Porengrößen. während MCM-41 Materialien im Bereich zwischen 2 und 4 nm homogene Porendurchmesser liefern, eignen sich Systeme wie SBA-15, eher für größere Poren ab 5 nm. Zur Herstellung verschiedener Silicaträger über einen großen Porengrößenbereich bietet es sich folglich an, MCM-41 Materialien für kleine und SBA-15 Materialien für größere Poren zu verwenden. Für die Synthese beider Materialien ist die Wahl der Reaktionsparameter essenziell für die Qualität und folglich auch für die Porengröße der resultierenden Porensysteme.

Porengrößen lassen sich bei MCM-41 basierten Materialien am besten über die Wahl des Templates einstellen. Die Länge der hydrophoben Alkylkette des Alkyl-Trimethylammonium-Salzes bestimmt hier maßgeblich die Mizellengröße und somit auch die Größe der entstehenden Silicaporen.

Natürlich spielt nicht nur die Wahl des Templates, sondern auch die Reaktionsführung mit ihren variablen Parametern eine entscheidende Rolle. Im Folgenden wird nur eine Auswahl der einflussnehmenden Faktoren genannt.

---

Schon beim Ansatz der Reaktion müssen, neben dem bereits diskutierten Templat-Typ, Faktoren wie pH-Wert und Templatkonzentration geeignet gewählt werden. Um eine optimale Mizellenbildung zu gewährleisten, müssen anschließend Faktoren wie Rührgeschwindigkeit, Mizellenbildungszeit und die Mizellenbildungstemperatur genau eingehalten werden. Die anschließende Zugabe des Silicapräkursors bringt weitere Parameter wie Zugaberate, Hydrolysezeit und Hydrolysetemperatur mit sich. Nach vollständiger Hydrolyse folgt das sogenannte „aging“. Hierbei wird die Suspension längere Zeit in einem druckdichten Behälter gelagert, um die finale Ausbildung des Porensystems zu garantieren. Auch in diesem Schritt sind Temperatur und Zeit ausschlaggebend.

All diese Faktoren müssen perfekt aufeinander abgestimmt sein, um eine verlässliche und reproduzierbare MCM-41 Synthese durchführen zu können, die zu einer Reihe von Materialien mit definierten Porendurchmessern führt. Im Rahmen einer Syntheseoptimierung konnten hierbei MCM-41 Materialien mit einstellbaren Porendurchmessern zwischen 2,1 nm und 4,0 nm hergestellt und charakterisiert werden. Zu einer vollständigen Charakterisierung gehören hier BET-Messungen zur Bestimmung der Porendurchmesser, der spezifischen BET-Oberfläche und des Porenvolumens. Weiterhin gehören auch elektronenmikroskopische Aufnahmen (REM) zur Bestimmung der Morphologie des Materials dazu. Festkörper-NMR-Messungen dienen zur Charakterisierung der Silicaumgebung ( $^{29}\text{Si}$  CP MAS) und der Kontrolle, dass die Poren templatfrei vorliegen ( $^{13}\text{C}$  CP MAS).

Im Rahmen von Fragestellungen aus Kooperationsprojekten (FOR1583) wurden diese Materialien mittels  $^2\text{H}$  NMR-Messungen untersucht. Diese Methode erlaubt die Beobachtung des dynamischen Verhaltens von Gastmolekülen in den Poren, die sich in Abhängigkeit des Porendurchmessers ändern. Hierzu konnten, neben der Bereitstellung der Materialien selbst, auch dynamische Differenzkalorimetrie-Messungen (DSC) an gefüllten Poren beigesteuert werden. Weiterhin wurde mittels  $^1\text{H}$  Festkörper-NMR-Messungen das Füllverhalten von Wasser in MCM-41 Materialien untersucht und so eine Probenpräparationsstrategie für das Projekt entwickelt.

Die Ergebnisse dieses Abschnittes sind veröffentlicht in *Zeitschrift für Physikalische Chemie* und *The Journal of Physical Chemistry B*:

M. Brodrecht\*, E. Klotz\*, C. Lederle, H. Breitzke, B. Stühn, M. Vogel, G. Buntkowsky  
A Combined Solid-State NMR, Dielectric Spectroscopy and Calorimetric Study of Water in  
Lowly Hydrated MCM-41 Samples  
*Zeitschrift für Physikalische Chemie* **2018**, 232, 1003.

"Reproduced with permission of de Gruyter in the format Thesis/Dissertation via Copyright  
Clearance Center." Die elektronische Version dieses Artikels ist als  
(DOI: 10.1515/zpch-2017-1030) abrufbar.

und

M. Weigler\*, M. Brodrecht\*, G. Buntkowsky, M. Vogel  
Reorientation of Deeply Cooled Water in Mesoporous Silica: NMR Studies of the Pore-Size  
Dependence  
*The Journal of Physical Chemistry B*, **2019**, 123, 2123-2134.

"Reprinted with permission from M. Weigler, M. Brodrecht, G. Buntkowsky, M. Vogel, *J.  
Phys. Chem. B*, **2019**, 123, 2123-2134., American Chemical Society." Die elektronische  
Version dieses Artikels ist als (DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b12204) abrufbar.

Martin Brodrecht<sup>a</sup>, Edda Klotz<sup>a</sup>, Christina Lederle, Hergen Breitzke, Bernd Stühn, Michael Vogel\* and Gerd Buntkowsky\*

## A Combined Solid-State NMR, Dielectric Spectroscopy and Calorimetric Study of Water in Lowly Hydrated MCM-41 Samples

<https://doi.org/10.1515/zpch-2017-1030>

Received September 8, 2017; accepted November 9, 2017

**Abstract:** The processes of drying mesoporous silica materials and their refilling with water have been examined by magic-angle spinning (MAS) solid-state NMR, broadband dielectric spectroscopy (BDS), and differential scanning calorimetry (DSC). It is shown that different drying protocols strongly influence the amount and types of hydroxy-species inside the pores. It is found that a very good vacuum ( $\approx 10^{-6}$  bar) is necessary to remove all H<sub>2</sub>O molecules from the silica matrices in order to accurately refill them with very low amounts of water such as e.g. a mono- or submonolayer coverage of the surface. Time-dependent <sup>1</sup>H-NMR-spectra recorded after loading the samples indicate a very specific course of water first existing in a bulk-like form inside the pores and then distributing itself through the pores by hydrogen bonding to surface silanol groups. After assuring accurate sample loading, we were able to investigate lowly hydrated samples of water confined in MCM-41 via DCS and BDS at temperatures below the freezing point of free bulk-water (0 °C) and find two non-crystallizing water species with Arrhenius behavior and activation energies of 0.53 eV (51.1 kJ/mol).

**Keywords:** broadband dielectric spectroscopy; confinement; solid-state NMR; water; wetting.

<sup>a</sup>**Martin Brodrecht and Edda Klotz:** These authors contributed equally to this work.

\***Corresponding authors: Michael Vogel,** Institut für Festkörperphysik, Technische Universität Darmstadt, 64289 Darmstadt, Germany, e-mail: michael.vogel@physik.tu-darmstadt.de; and **Gerd Buntkowsky,** Institut für Physikalische Chemie, Technische Universität Darmstadt, 64287 Darmstadt, Germany, e-mail: gerd.buntkowsky@chemie.tu-darmstadt.de

**Martin Brodrecht and Hergen Breitzke:** Institut für Physikalische Chemie, Technische Universität Darmstadt, 64287 Darmstadt, Germany

**Edda Klotz, Christina Lederle and Bernd Stühn:** Institut für Festkörperphysik, Technische Universität Darmstadt, 64289 Darmstadt, Germany

## 1 Introduction

Due to its variety of anomalies and properties that are not fully understood, even after tens of years of studies, water still provides an interesting field of research. The reason for the anomalous behavior of bulk water is widely believed to be found in the so-called no man's land between 150 and 135 K [1, 2]. To prevent water from crystallizing in that temperature regime, it is often studied inside a geometrically confined geometry.

There is a great variety of confinement types [3] which influence, e.g. freezing and melting properties of confined liquids [4–7]. In particular water or binary water mixtures in confinement have been thoroughly investigated by broadband dielectric spectroscopy (BDS) [8–15], NMR [16–23] and differential scanning calorimetry (DSC) [9, 24]. The interpretation of the results of those various studies is, however, still discussed controversially [3]. Our recent approach of investigating water confined in MCM-41 shows [25], that the discrepancies existing between some results on water in lowly hydrated confinement could very well be the consequence of different ways of sample preparation. In order to gain a deeper insight into this process, the drying of the MCM-41 material as well as the process of filling water into the pores have been investigated via  $^1\text{H-NMR}$  and BDS. Those measurements reveal the immense importance of the protocol for sample drying and filling, especially when preparing lowly hydrated samples, where a coexistence of surface (“non-freezable”) and bulk-water like (“freezable”) water exists (for details see the reviews [18, 26] and references therein). The hydrated samples prepared by applying the obtained knowledge were then investigated with BDS to reveal the dynamics of water layers near the pore surface.

## 2 Experimental details

MCM-41 was synthesized based on a method of Grünberg et al. [27] and Grün et al. [28] with a precursor of tetradecyltrimethylammoniumbromid (MTAB) with a C-chain length of C14. 0.55 g (0.14 eq.) of MTAB was dissolved in 140 mL deionized water using ultrasonic. The mixture was heated to 35 °C (308 K) and 2.9 mL ammonia solution (25%) was added. The solution was stirred for another 10 min under treatment of ultrasonic. 3.00 g (1.00 eq.) tetraethoxysilane (TEOS) was slowly added. After the addition was complete the suspension was further treated with ultrasonic for 1 h. The resulting suspension was transferred into a Teflon-bottle and aged at 80 °C (353 K) for 72 h. After ageing the white precipitate was filtered off. The solid was washed with deionized water and diethyl ether and afterwards dried over night at 100 °C (373 K). The leftover template was removed at 650 °C (923 K) by calcination.

The porosity and specific surfaces area of the material was characterized by nitrogen adsorption at 77 K, employing a Thermo Fisher Scientific Surfer BET analyzer. From the BET measurements a specific pore volume of 0.77 cm<sup>3</sup>/g (Gurvich), a specific surface area of 1000.2 m<sup>2</sup>/g (BET) and a specific pore diameter of 3.6 nm (BJH) were determined.

CP-MAS solid state NMR measurements were carried out at room temperature on a Bruker AVANCE II+ spectrometer at 400 MHz proton resonance frequency, employing a Bruker 4 mm double resonance probe. Measurements were performed utilizing a Bruker background suppression pulse sequence employing a 30° pulse, a delay time of 10 s and a MAS spinning rate of 10 kHz [29].

DSC experiments were performed using a Q1000 from TA Instruments. The samples were placed in hermetically sealed aluminum pans and the data was acquired during heating runs at 10 K/min. The complex dielectric permittivity,  $\varepsilon(\omega) = \varepsilon'(\omega) - i\varepsilon''(\omega)$ , was measured using a Novocontrol Alpha-N High Resolution Dielectric Analyzer. The sample temperature was controlled by a Novocontrol Quatro Cryosystem with a temperature stability better than  $\pm 0.2$  K and an absolute accuracy of  $\pm 0.5$  K. A sample cell similar to that introduced by Wagner and Richert [30] was employed. The distance of the capacitor plates was 400  $\mu\text{m}$ .

The dielectric permittivity was analyzed by fitting to a conductivity term and a sum of Cole–Cole (CC) functions

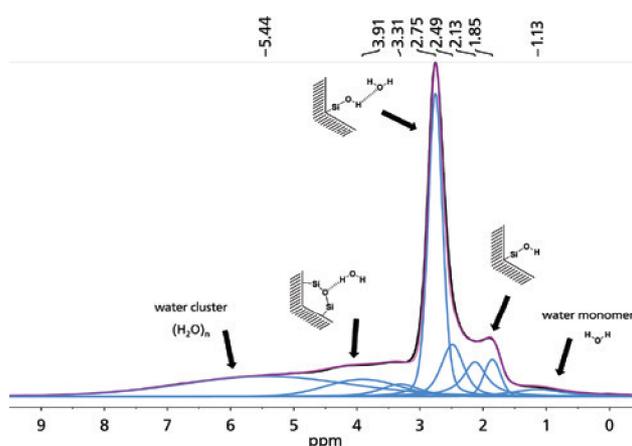
$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\sigma_{\text{dc}}}{i\varepsilon_0\omega} + \sum_{j=1}^N \frac{\Delta\varepsilon_j}{1 + (i\omega\tau_j)^{\alpha_j}}$$

here,  $\varepsilon_\infty$  is the high-frequency limit of the permittivity,  $\varepsilon_0$  the vacuum permittivity, and  $\sigma_{\text{dc}}$  denotes the dc conductivity. The CC processes are characterized by their relaxation strength  $\Delta\varepsilon_j$ , relaxation time  $\tau_j$ , and width parameter  $\alpha_j$ . Several previous studies showed that CC functions well describe symmetrically broadened loss peaks associated with heterogeneous dynamics of confined water [8, 9, 12, 13]. Here, we use CC fits mainly to determine the peak positions and, thus, the relaxation times  $\tau_j$ .

## 3 Sample preparation

### 3.1 Drying of MCM-41 materials

The synthesized and untreated MCM-41 material was filled into a tared 4 mm NMR rotor ( $m_{\text{rotor}} = 744.1$  mg). Subtracting the rotor mass from the total mass of the filled rotor ( $m_{\text{total}} = 780.5$  mg) results in the sample mass of  $m_{\text{sample}} = 36.4$  mg.



**Fig. 1:**  $^1\text{H}$  solid-state NMR spectrum of water in a conventionally stored and not dried sample of MCM-41 at 10 kHz (black). Deconvolution (blue), sum of deconvolution (pink), and assignment of water species to the peaks according to Grünberg et al. [25].

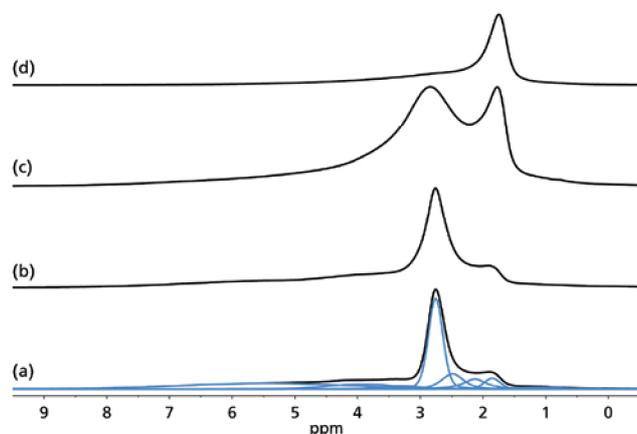
To check the hydration state of the untreated sample  $^1\text{H}$ -MAS-NMR measurements were carried out (Figure 1).

The chemical shifts of the water species in these spectra are determined by the local environments of the H-atoms. At high fields (0.8–1.5 ppm) single, isolated water molecules can be found. Surface bound silanol groups are located at around 1.7–1.8 ppm. The signals from 2.1 to 2.8 ppm are assigned to water molecules associated to the surface silanol groups, whereas clustered water is found at low fields (4.5–5.5 ppm). The chemical shift values of the observed peaks are the result of the weighted average of the individual shifts of the different hydroxy-species in the sample and are assigned accordingly [25].

In order to investigate the behavior of well-defined amounts of guest molecules, the host surface has to be prepared into a well-defined state. This means that the sample has to be dried until only silanol groups are present.

Since mesoporous silica materials are strongly hygroscopic and tend to absorb water fast, all drying procedures were performed with the sample inside the NMR rotor. Treating the sample outside of the rotor and transferring it for the measurement would expose the sample to humidity, which results in a wet sample again. The  $^1\text{H}$ -NMR measurements after different drying protocols are compared in Figure 2.

First the sample was exposed to high temperatures (180 °C/453 K) over night. The resulting spectrum is practically identical with the spectrum of the untreated sample. It can therefore be concluded that high temperatures alone are not

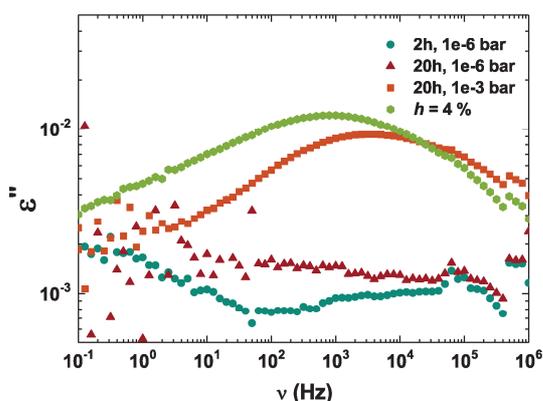


**Fig. 2:**  $^1\text{H}$  solid-state NMR spectra of the MCM-41 samples at 10 kHz: (a) Untreated sample and corresponding deconvolution (blue). (b) Sample dried at  $180\text{ }^\circ\text{C}$  (453.15 K) under atmospheric pressure for 24 h. (c) Sample dried at room temperature under mild vacuum ( $10^{-1}$  mbar, 24 h). (d) Sample dried at room temperature under high vacuum ( $10^{-6}$  mbar, 24 h). All spectra are normalized to equal height.

sufficient to remove water from the MCM-41 sample sufficiently. Second, the same sample was treated with moderate vacuum ( $10^{-1}$  mbar) over night. The  $^1\text{H}$ -NMR spectrum shows a significant decrease of surface associated water species and the loss of all water clusters. Consequently water was removed from the sample but surface associated water is still present. Subsequently the sample was treated using a turbomolecular pump ( $10^{-6}$  mbar) for 24 h. The resulting  $^1\text{H}$ -NMR spectrum shows the absence of surface associated water. Only the isolated silanol groups remain, so all water was removed sufficiently. Finally, we wish to note that there is a weak broad signal between ca. 4 and 2 ppm, which indicates the presence of a small amount of very strongly bound water molecules, which we attribute to trapped water. Similar results of trapped water molecules, which could not be removed by heating to ca.  $100\text{ }^\circ\text{C}$  under vacuum were also reported previously by some of us [25].

Now the mass of the dried sample can be determined by subtracting the rotor mass ( $m_{\text{rotor}} = 744.1$  mg) from the new total mass of the dried sample including the rotor ( $m_{\text{total(dry)}} = 779.7$  mg). Therefore the dry sample mass was found to be  $m_{\text{sample(dry)}} = 35.6$  mg.

In parallel to NMR, BDS is used to study the suitability of different drying methods for MCM-41 materials. Figure 3 shows the dielectric loss of MCM-41 samples that have been dried by different means and for different periods of time. A sample that has been dried in a vacuum oven at  $10^{-3}$  bar exhibits a



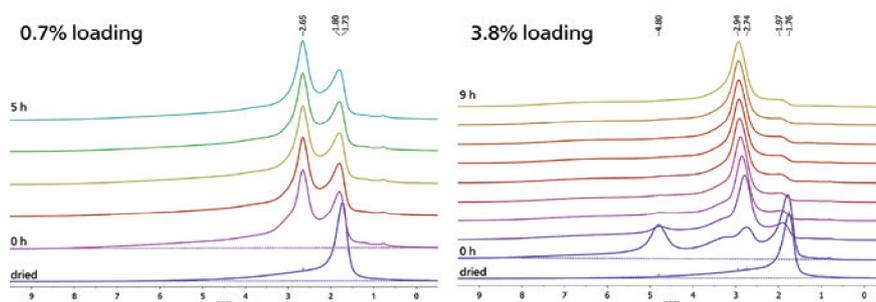
**Fig. 3:** Dielectric loss  $\varepsilon''(\nu)$  of MCM-41 C14 samples at  $T=150$  K after different drying methods. Specifically, the samples have been dried using a turbomolecular pump at a vacuum level of  $10^{-6}$  bar and room temperature for 2 h and 20 h, respectively, or using a vacuum oven at vacuum level of  $10^{-3}$  bar and room temperature for 20 h. For comparison, the dielectric loss is shown for a sample that has been completely dried and deliberately filled to a hydration level of  $h=4\%$ .

distinct dielectric signal, even after a long drying time. This signal arises from the rotational motion of remaining water molecules. Actually, the dielectric loss of this sample resembles that of a sample, which has been deliberately filled to a hydration level of  $h=4\%$ . By contrast, samples that have been dried for 2 or 20 h with a turbomolecular pump at  $10^{-6}$  mbar show no dielectric signal at all, indicating that essentially all water has been removed.

### 3.2 Sample loading

Based on the BET results 100% sample loading was defined as completely filling the determined pore volume of the sample. The pore volume was found to be  $0.765 \text{ cm}^3/\text{g}$ , therefore adding  $0.765 \text{ }\mu\text{L}$  of water for each mg of sample is defined as 100% pore filling, for the present sample under test. A well-defined amount of water was added onto the sample using a micro pipette. After loading the sample, the rotor was closed with a spin cap and the  $^1\text{H-NMR}$  measurements were started. In order to monitor the diffusion process into equilibrium, one spectrum per hour was recorded, until no change was observed anymore.

After equilibrium was reached, the rotor was removed from the spectrometer and the sample inside the rotor was dried again, according to the procedure described above. The dried sample was loaded again with slightly higher amounts of water and the  $^1\text{H}$ -spectra were recorded as described, until the equilibrium was

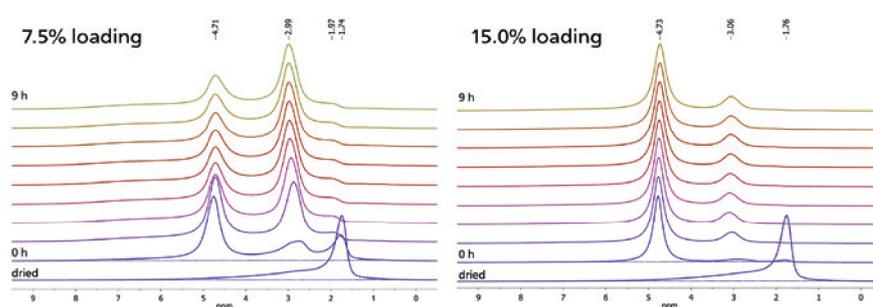


**Fig. 4:**  $^1\text{H}$  solid-state NMR spectra of the MCM-41 at low filling states at 10 kHz. Sample filled with 0.7% (left) and 3.8% (right) of water referred to the pore volume. Spectra measured at time intervals of 1 h. Bottom: the dry sample. To show that there is spectral intensity at low fields the straight lines in the dried and 0 h spectra show the NMR baseline.

reached again. Nominal sample loadings of 0.7%, 3.8%, 7.5% and 15.0% have been used. During these repeated drying and loading cycles no signs of irreversible pore changes were observed.

First  $^1\text{H}$ -spectra for two low filling states of 0.7% and 3.8% are depicted in Figure 4. At nominally 0.7% filling a peak of the silanol groups (1.75 ppm), and a peak of surface associated water at 2.65 ppm can be found. Consequently only a part of the surface seems to be covered with water. The spectra do not show any change after the first hours. Therefore the sample reaches an equilibrium state rather quickly.

The filling with nominally 3.8% of water shows bulk water at 4.8 ppm immediately after filling, which vanishes within the first hour. In addition it also shows the peak at around 2.74 ppm and the silanol peak at 1.76 ppm. After several hours the latter peak vanishes and the peak at 2.74 ppm shifts to lower fields. This indicates that the water is inhomogeneously distributed within the sample immediately after loading, forming bulk water outside the pores or close to the pore opening. Over time the water molecules diffuse inside the silica until finally the inner surface (note: the outer surface of the silica particles is ca. three orders of magnitude smaller than the inner surface and can be neglected) is completely covered by a monomolecular water layer, indicated by the growing peak at around 2.7 ppm and the decreasing silanol peak. Equilibrium is reached after 4 h. Filling the sample with nominally 7.5%, results in a spectrum similar to the previous case of 3.8% filling. However, the bulk water peak at around 4.7 ppm is still present after equilibrium is reached (Figure 5). Furthermore, the silanol peak is decreased but still present. That is, despite the presence of bulk water, the sample surface still possesses regions which are either not yet reached on this time scale or are completely inaccessible to water molecules.



**Fig. 5:**  $^1\text{H}$  solid-state NMR spectra of the MCM-41 at low filling states at 10 kHz. Sample filled with 7.5% (left) and 15.0% (right) of water referred to the pore volume. Spectra measured at time intervals of 1 h. Bottom: the dry sample.

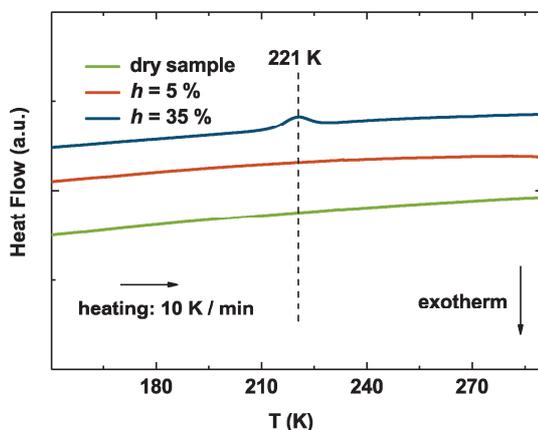
It is known that many pore systems tend to fill several pores completely whereas some pores are only covered with monolayers of water [25]. But it can be concluded that a filling of 7.5% results in an equilibrium state in which bulk-like water is present.

To complete these experiments we investigated also 15.0% filling (Figure 5). Here the equilibrium is reached quickly. The silanol groups disappear completely during pore filling. Even the surface associated species are dominated by the bulk water peak at 4.73 ppm.

Therefore a nominal filling of 15.0% seems to be way too high to investigate the surface associated water species. On the other hand a nominal filling of at least 15.0% should be used to investigate the bulk-like water species inside the pores, i.e. those water molecules, which are not in direct contact with the silica surface, but surrounded by other water molecules. For investigating only the surface associated water species a loading between 3.8 and 7.5% is ideal.

### 3.3 Water dynamics in weakly hydrated MCM-41

First, we use DSC to study water behaviors in mesoporous silica. Figure 6 shows heating curves obtained for a dry and two weakly hydrated MCM-41 C14 samples. While the dry sample and the one with a low hydration level of  $h=5\%$  yield no calorimetric signal, the sample with a moderate filling of  $h=35\%$  shows a small endothermic peak at  $T_m = 221$  K, indicating melting of a small ice fraction. Thus, at low fillings, no freezable water with bulk-like properties exists since essentially all molecules are adsorbed on the inner silica surfaces, consistent with the above MAS NMR results. Only at higher hydration levels, adsorbed water coexists with



**Fig. 6:** DSC heating curves for MCM-41 C14 at different filling states. Results for various hydration levels  $h$  are vertically shifted for clarity. The heating rate was 10 K/min. While no calorimetric signals are observed for low hydration levels, a small melting peaking at  $T_m = 221$  K is observed for  $h = 35\%$ , as marked by the dashed line.

freezable water, which resides at sufficiently large distances to the pore wall and freezes upon cooling. The melting temperature  $T_m = 221$  K observed for the latter partially filled sample is in agreement with results of previous studies on completely filled MCM-41 C14, which reported melting points between 220 and 230 K, in harmony with the Gibbs–Thomson equation for phase transition in confined geometries [24, 31].

Next, BDS is used to investigate the rotational dynamics of water in weakly hydrated MCM-41 C14. Figure 7 shows the dielectric loss  $\epsilon''(\nu)$  for samples with  $h = 4\%$  and  $h = 38\%$ . The sample with the lower hydration level exhibits, apart from a conductivity contribution, a single process in the studied temperature range. This process will hereafter be denoted as P1. It shows CC form and shifts to lower frequencies when decreasing the temperature. Its width parameter  $\alpha$  decreases from 0.5 to 0.3 upon cooling, indicative of a broad distribution of correlation times. For the sample with the higher water content, it is evident that the dielectric loss cannot be described by a single process. Rather, a slower second process appears, while the first one loses intensity. This second process will be referred to as P2 in the following. Both processes of this sample can be approximately described by CC peaks with width parameters  $\alpha$  comparable to that found for  $h = 4\%$ . In Figure 8, we display the relaxation times  $\tau$  of the observed processes. For  $h = 4\%$ , we see that P1 follows an Arrhenius law with an activation energy of  $E_a = 0.53$  eV (51 kJ/mol). Since the typical bond energy of an OH $\cdots$ O–hydrogen bond is ca. 20 kJ/mol and for a molecular water rotation

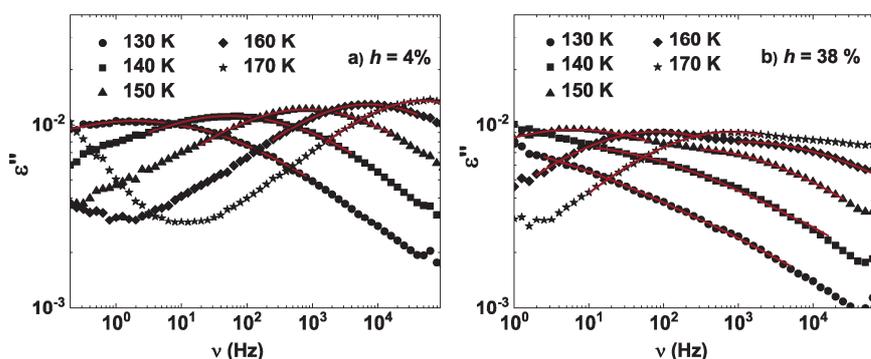
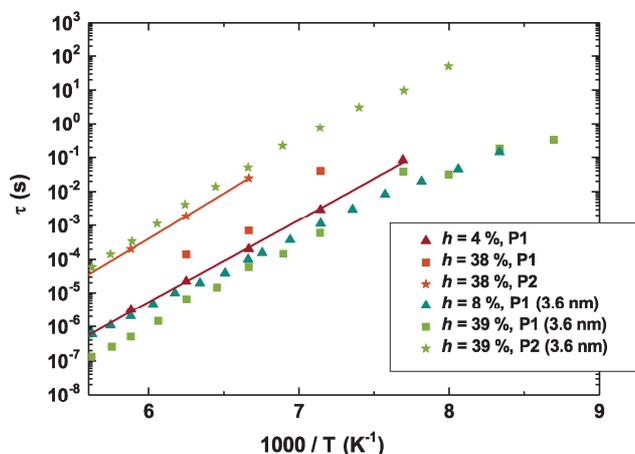


Fig. 7: Dielectric loss  $\varepsilon''(\nu)$  characterizing water reorientation in MCM-41 at different temperatures: (a)  $h=4\%$  and (b)  $h=38\%$ . The lines are interpolations using one (4%) and two (38%) CC processes, respectively.

at least two hydrogen bonds need to be broken, we tentatively assign this activation energy to the hydrogen bonds of the water molecule. However, the exact mechanism of water reorientation in water remains elusive. For  $h=38\%$ , P1 shows comparable behavior with somewhat larger  $\tau$  values. P2 exhibits substantially longer relaxation times, which can also be described by an Arrhenius law. The obtained activation energy of  $E_a = 0.53$  eV for P2 agrees within the error margins with that of P1. The present results for P1 and P2 well agree with previous findings in a BDS study on water in silica pores with a larger diameter of  $\sim 3.6$  nm [13], see Figure 8. There, it was shown in more detail that P2 increases in expense of process P1 when increasing the hydration level until the latter process eventually vanishes at water contents higher than that of the present study. Moreover, the origin of deviations from an Arrhenius law at sufficiently high hydration levels  $h$  was discussed [13]. However, this issue remains very controversial [3, 9–15], e.g. it was attributed to a transition between high-density and low-density forms of liquid water or to a crossover from primary ( $\alpha$ ) to secondary ( $\beta$ ) relaxation.

Thus, present and previous findings yield a consistent picture of water dynamics in mesoporous silica. P1 is the only process at low hydration levels, while it disappears for high water contents. Hence, we attribute this process to the reorientation of water molecules, which are adsorbed on the inner silica surface and form at least one hydrogen bond to the silanol-groups. At intermediate hydration levels, such water molecules coexist with water molecules that do belong to a well-established network. Then, P1 coexists with P2, which can be assigned to the latter species. P2 is the only process at high hydration levels, at which all water molecules are part of a three-dimensional hydrogen-bond network. In



**Fig. 8:** Relaxation times  $\tau$  for the observed dynamic processes of water in MCM-41 C14 at the indicated hydration levels  $h$ . For comparison, results from a previous BDS study on water in larger MCM-41 pores ( $d=3.6$  nm) are included [13]. The lines are Arrhenius fits, yielding activation energies of  $E_a = 0.48$  eV (46.3 kJ/mol) for process P1 at  $h=4\%$  and  $E_a = 0.52$  eV (50.2 kJ/mol) for process P2 at  $h=38\%$ .

narrow confinements, this network is, however, affected by the inner surfaces and, hence, deviates from that of bulk water. Consequently, P2 corresponds to the widely known relaxation process of water in different types of confinements [23, 32, 33].

## 4 Conclusion

In conclusion, it has been shown that sample preparation and thus the sample history has a major influence on the water structure and distribution in lowly hydrated MCM-41 samples. The investigation of those lowly hydrated samples with DSC and BDS shows that even at temperatures far below the freezing point in confinement, no crystallization takes place. Instead, for hydration levels below 30% we find a single amorphous water species that can be assigned to  $H_2O$  molecules hydrogen bound to the silanol groups of the pore walls. With increasing amounts of water, a second, dynamically distinguishable species arises that represents water in hydrogen-bond networks near interfaces. Altogether, the combination of CP-MAS solid state NMR, DSC and BDS leads to a better understanding of the pore filling, and thereby of the different water species existing inside MCM-41 confinement and their dynamics.

**Acknowledgements:** Financial support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft in the framework of Forschergruppe FOR 1583 through grants Bu-911/18-1/2, STU 191/6-2 and Vo-905/8-1/2 is gratefully acknowledged.

## References

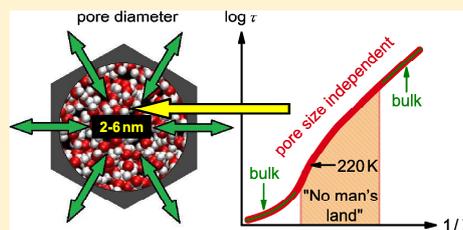
1. P. H. Poole, F. Sciortino, U. Essmann, H. E. Stanley, *Nature* **360** (1992) 324.
2. O. Mishima, H. E. Stanley, *Nature* **396** (1998) 329.
3. S. Cerveny, F. Mallamace, J. Swenson, M. Vogel, L. Xu, *Chem. Rev.* **116** (2016) 7608.
4. E. Gedat, A. Schreiber, J. Albrecht, T. Emmler, I. Shenderovich, G. H. Findenegg, H. H. Limbach, G. Buntkowsky, *J. Phys. Chem. B* **106** (2002) 1977.
5. W. Masierak, T. Emmler, E. Gedat, A. Schreiber, G. H. Findenegg, G. Buntkowsky, *J. Phys. Chem. B* **108** (2004) 18890.
6. C. Alba-Simionesco, B. Coasne, G. Dosseh, G. Dudziak, K. Gubbins, R. Radhakrishnan, M. Sliwinska-Bartkowiak, *J. Phys. Condens. Mat.* **18** (2006) 15.
7. M. Febles, N. Perez-Hernandez, C. Perez, M. L. Rodriguez, C. Foces-Foces, M. V. Roux, E. Q. Morales, G. Buntkowsky, H. H. Limbach, J. D. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 10008.
8. R. Bergman, J. Swenson, *Nature* **403** (2000) 283.
9. H. Jansson, J. Swenson, *Eur. Phys. J. E* **12** (2003) 51.
10. A. Faraone, L. Liu, C.-Y. Mou, C.-W. Yen, S.-H. Chen, *J. Chem. Phys.* **121** (2004) 10843.
11. A. Spanoudaki, B. Albela, L. Bonnevot, M. Peyrard, *Eur. Phys. J. E* **17** (2005) 21.
12. J. Hedström, J. Swenson, R. Bergman, H. Jansson, S. Kittaka, *Eur. Phys. J. Spec. Top.* **141** (2007) 53.
13. J. Sjöström, J. Swenson, R. Bergman, S. Kittaka, *J. Chem. Phys.* **128** (2008) 154503.
14. F. Mallamace, C. Corsaro, P. Baglioni, E. Fratini, S.-H. Chen, *J. Phys.: Condens. Matter* **24** (2012) 064103.
15. J. Swenson, S. Cerveny, *J. Phys.: Condens. Matter* **27** (2014) 033102.
16. A. Vyalikh, T. Emmler, E. Gedat, I. Shenderovich, G. H. Findenegg, H. H. Limbach, G. Buntkowsky, *Solid State Nucl. Mag.* **28** (2005) 117.
17. F. Mallamace, M. Broccio, C. Corsaro, A. Faraone, U. Wanderlingh, L. Liu, C.-Y. Mou, S. H. Chen, *J. Chem. Phys.* **124** (2006) 161102.
18. G. Buntkowsky, H. Breitzke, A. Adamczyk, F. Roelofs, T. Emmler, E. Gedat, B. Grünberg, Y. Xu, H.-H. Limbach, I. Shenderovich, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **9** (2007) 4843.
19. A. Vyalikh, T. Emmler, B. Grünberg, Y. Xu, I. Shenderovich, G. H. Findenegg, H. H. Limbach, G. Buntkowsky, *Z. Phys. Chem.* **221** (2007) 155.
20. A. Vyalikh, T. Emmler, I. Shenderovich, Y. Zeng, G. H. Findenegg, G. Buntkowsky, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **9** (2007) 2249.
21. M. Sattig, M. Vogel, *J. Phys. Chem. Lett.* **5** (2014) 174.
22. M. F. Harrach, B. Drossel, W. Winschel, T. Gutmann, G. Buntkowsky, *J. Phys. Chem. C* **119** (2015) 28961.
23. M. Rosenstihl, K. Kämpf, F. Klameth, M. Sattig, M. Vogel, *J. Non-Cryst. Solids* **407** (2015) 449.
24. S. Jähnert, F. V. Chávez, G. Schaumann, A. Schreiber, M. Schönhoff, G. Findenegg, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10** (2008) 6039.

25. B. Grünberg, T. Emmeler, E. Gedat, I. Shenderovich, G. H. Findeneegg, H.-H. Limbach, G. Buntkowsky, *Chem. Eur. J.* **10** (2004) 5689.
26. R. Richert, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **62** (2011) 65.
27. B. Grünberg, A. Grünberg, H.-H. Limbach, G. Buntkowsky, *App. Magn. Res.* **44** (2013) 189.
28. M. Grün, K. K. Unger, A. Matsumoto, K. Tsutsumi, *Microporous Mesoporous Mater.* **27** (1999) 207.
29. D. G. Cory, W. M. Ritchey, *J. Magn. Res.* **80** (1988) 128.
30. H. Wagner, R. Richert, *J. Phys. Chem. B* **103** (1999) 4071.
31. S. Kittaka, S. Ishimaru, M. Kuranishi, T. Matsuda, T. Yamaguchi, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **8** (2006) 3223.
32. S. Cerveny, G. A. Schwartz, R. Bergman, J. Swenson, *Phys. Rev. Lett.* **93** (2004) 245702.
33. J. Swenson, H. Jansson, R. Bergman, *Phys. Rev. Lett.* **96** (2006) 247802.

## Reorientation of Deeply Cooled Water in Mesoporous Silica: NMR Studies of the Pore-Size Dependence

M. Weigler,<sup>†,§</sup> M. Brodrecht,<sup>‡,§</sup> G. Buntkowsky,<sup>\*,‡,§</sup> and M. Vogel<sup>\*,†,§</sup><sup>†</sup>Institut für Festkörperphysik, Technische Universität Darmstadt, Hochschulstr. 6, 64289 Darmstadt, Germany<sup>‡</sup>Eduard-Zintl-Institut für Anorganische und Physikalische Chemie, Technische Universität Darmstadt, Alarich-Weiss-Str. 8, 64287 Darmstadt, Germany

**ABSTRACT:** We apply  $^3\text{H}$  NMR to investigate water reorientation in mesoporous silica. Using synthesized MCM-41 and purchased SBA-15 materials, we systematically study the dependence on the pore diameter. For a characterization of the properties of the silica matrices, scanning electron microscopy and nitrogen gas adsorption are employed. To ascertain the thermodynamic behavior of the confined water, we utilize differential scanning calorimetry. The dynamical properties are analyzed in a broad temperature range from the weakly to the deeply cooled regime using a combination of  $^2\text{H}$  spin-lattice relaxation and stimulated-echo experiments. We find that the reorientation of confined water is governed by prominent heterogeneity. The peak correlation time  $\tau_p$  of the distribution is independent of the pore diameter in a range of ca. 2–6 nm. It shows a dynamical crossover at  $\sim 220$  K in all studied confinements, including wide silica pores where the effect occurs below  $T_m$  and, hence, in the two-phase region with coexisting liquid and solid water fractions. Above and below the no-man's land of water, the pore-size-independent correlation times  $\tau_p$  of confined water are consistent with those of the bulk liquid, suggesting that we probe a dynamical process that is a characteristic feature of water. We argue that none of the proposed origins of the dynamical crossover is fully consistent with all observations and discuss possible new directions.



## INTRODUCTION

Water exhibits various anomalies in thermodynamic, structural, and dynamical properties.<sup>1–3</sup> The origins of these anomalous behaviors are widely believed to be found in the supercooled regime,<sup>4</sup> making it essential to develop means to avoid crystallization and cool water down to the no-man's land,  $\sim 150$ – $235$  K.<sup>5</sup> This temperature range was proposed to encompass a liquid–liquid critical point associated with a phase transition between high-density and low-density liquid phases of water<sup>6</sup> as well as a fragile-to-strong transition in the temperature dependence of the structural ( $\alpha$ ) relaxation near 225 K.<sup>7</sup>

Confining water to nanometer-sized geometries shifts crystallization to lower temperatures,<sup>8–10</sup> opening up the interesting possibility to investigate the properties of deeply cooled liquid water.<sup>11–13</sup> For such studies, various types of nanoscopic confinements proved useful,<sup>14,15</sup> ranging from clays<sup>16</sup> and zeolites<sup>17</sup> to proteins.<sup>18–21</sup> Particularly suited host materials are the mesoporous silica MCM-41 and SBA-15 because they feature cylindrical pores with defined and adjustable diameters  $d$  in the nanometer range.<sup>22</sup> To this day, the dynamical properties of liquid water in nanoscopic confinements and their relations to the bulk behaviors are subject of controversial discussions.<sup>11–13</sup> Some studies observed crossovers in short-range or long-range dynamics of confined water near 225 K and took them as evidence for the

existence of a fragile-to-strong transition related to a liquid–liquid phase transition of bulk water.<sup>23–26</sup> Other studies attributed such dynamic crossovers, however, to finite-size effects. For example, it was argued that the  $\alpha$  relaxation is altered when its growing cooperativity interferes with the confinement size.<sup>11,14</sup> Alternatively, it was proposed that the dynamical behavior changes in response to fractional freezing of confined water.<sup>27–31</sup>

To discriminate between different explanations, it is useful to investigate water dynamics in confinements of various sizes. While dynamic crossovers caused by confinement effects should significantly depend on the confinement size, findings representative of bulk behavior should be unchanged in various types of confining matrices. In previous studies, silica materials with pore diameters  $d \approx 2$  nm were often utilized since they suppress the formation of stable ice crystals in the relevant temperature range near 225 K but still accommodate several water molecules across the pore diameter and, hence, may allow for bulklike water dynamics. However, it is also worth using wider silica pores to explore possible changes in the water dynamics when the liquid fraction becomes accompanied by a solid fraction upon partial crystallization in these

Received: December 19, 2018

Revised: February 5, 2019

Published: February 12, 2019

confinements.<sup>30</sup> Unlike the pore diameter, the pore length received limited attention. However, straightforward interpretation of experimental results necessitates that the water molecules do not leave the pores and, hence, that the pore length is much larger than the molecular displacements on the experimental time scale. A priori, pore exit and water motion between different silica particles cannot be excluded, as revealed by analogous studies of water in zeolites.<sup>17,32</sup>

Here, we exploit that <sup>2</sup>H NMR provides detailed insights into D<sub>2</sub>O dynamics in silica pores. We characterize temperature-dependent reorientation of confined water for various pore diameters, utilizing both MCM-41 and SBA-15 materials. In detail, we analyze <sup>2</sup>H spin-lattice relaxation (SLR) and stimulated-echo (STE) experiments to explore a dynamic range of about 12 orders of magnitude. These capabilities of <sup>2</sup>H NMR were exploited for exemplary small pore diameters in previous works.<sup>27–31</sup> Here, we use specially prepared MCM-41 materials together with SBA-15 matrices to systematically vary the pore diameter in the range  $d = 2–10$  nm in the present contribution. In addition, we ascertain the role of water exchange between different pores by comparing NMR results for samples that do and do not contain an ice matrix encompassing the silica particles and, hence, feature capped and uncapped pore ends, respectively. To characterize the synthesized MCM-41 materials, we utilize scanning electron microscopy (SEM) and nitrogen gas adsorption. In addition, we perform differential scanning calorimetry (DSC) measurements to ascertain the freezing and melting behaviors of water in the used silica confinements.

## NMR BACKGROUND

**Methods.** In <sup>2</sup>H NMR studies, we probe the quadrupolar frequencies  $\omega_Q$  of D<sub>2</sub>O deuterons<sup>33,34</sup>

$$\omega_Q(\theta) \approx \pm \frac{\delta}{2} (3 \cos^2 \theta - 1) \quad (1)$$

Here,  $\delta = 2\pi \times 161$  kHz characterizes the strength of their quadrupolar interaction.<sup>28</sup> Moreover,  $\theta$  is the angle between the O–D bond and the applied magnetic field  $B_0$ . Hence, the quadrupolar frequency  $\omega_Q$  depends on the molecular orientation, rendering <sup>2</sup>H NMR a valuable tool for studies of water reorientation.

Details of our <sup>2</sup>H SLR and STE approaches to confined water can be found in previous works.<sup>20,21,27,28</sup> Briefly, in <sup>2</sup>H SLR studies, we consider that liquid (l) and solid (s) water inside the silica pores can coexist with hexagonal (h) ice outside the pores and fit the buildup of the magnetization  $M(t_r)$  to a sum of stretched exponentials or, equivalently, Kohlrausch–Williams–Watts (KWW) functions ( $n = l, s, h$ )

$$\frac{M(t_r)}{M_\infty} = 1 - \sum_n p_n \exp \left[ - \left( \frac{t_r}{T_{1,n}} \right)^{\beta_{1,n}} \right] \quad (2)$$

Here,  $M_\infty$  is the equilibrium magnetization and the <sup>2</sup>H SLR steps of different water species are characterized by their signal fractions  $p_n$ , relaxation times  $T_{1,n}$ , and stretching parameters  $\beta_{1,n}$ .

We find that the SLR of the liquid fraction is exponential through the weakly cooled regime but becomes nonexponential in the deeply cooled one. Although we will discuss implications of this change in the shape of the magnetization buildup, we will restrict quantitative analysis to the temper-

ature range where  $\beta_{1,l} = 1$ . Under such circumstances, the SLR time  $T_{1,l}$  is related to the spectral density  $J_2(\omega)$ , characterizing the reorientation of liquid water inside the pores according to<sup>35</sup>

$$\frac{1}{T_{1,l}} = \frac{2}{15} \delta^2 [J_2(\omega_0) + 4J_2(2\omega_0)] \quad (3)$$

where  $\omega_0$  is the <sup>2</sup>H Larmor frequency. Motivated by findings in broadband dielectric spectroscopy (BDS) on water reorientation in mesoporous silica,<sup>18,30,36</sup> we assume a Cole–Cole (CC) form of the spectral density

$$J_2(\omega) = \frac{\omega^{-1} \sin\left(\frac{\pi}{2}\beta_C\right) (\omega\tau_C)^{\beta_C}}{1 + 2 \cos\left(\frac{\pi}{2}\beta_C\right) (\omega\tau_C)^{\beta_C} + (\omega\tau_C)^{2\beta_C}} \quad (4)$$

The CC spectral density is characterized by the width parameter  $\beta_C$  and the correlation time  $\tau_C$ . Obtaining the value of  $\beta_C$  from the temperature-dependent minimum of  $T_{1,l}$ ,<sup>27–31</sup> correlation times  $\tau_C(T)$  can be determined from the  $T_{1,l}$  data. The resulting time constants  $\tau_C$  can be identified with the peak positions  $\tau_p$  of the underlying symmetric CC distributions of correlation times  $G_C(\log \tau)$ . Also, they correspond to the peak positions of the related dynamic susceptibility,  $\tau_p = 1/\omega_p$ . As the solid internal and external water fractions show nonexponential <sup>2</sup>H SLR ( $\beta_{1,s/h} < 1$ ), we use the  $\Gamma$  function to calculate mean <sup>2</sup>H SLR times ( $T_{1,s/h}$ ) =  $(T_{1,s/h}/\beta_{1,s/h})\Gamma(1/\beta_{1,s/h})$  from the fit parameters for these SLR steps.

<sup>2</sup>H STE experiments allow one to correlate the respective quadrupolar frequencies and, thus, water orientations, during two evolution times  $t_e$  separated by a longer mixing time  $t_m$ . In detail, this approach provides access to the rotational correlation functions<sup>33,34</sup>

$$F_2^{cc}(t_m) \propto \langle \cos[\omega_Q(0)t_e] \cos[\omega_Q(t_m)t_e] \rangle \quad (5)$$

$$F_2^{ss}(t_m) \propto \langle \sin[\omega_Q(0)t_e] \sin[\omega_Q(t_m)t_e] \rangle \quad (6)$$

For quantitative analysis, we consider that not only water reorientation but also spin relaxation can lead to an attenuation of STE signals. In addition, we again take into account that there are water species with distinguishable reorientation and relaxation behaviors. While the signal from external ice can largely be suppressed, a bimodal nature of the correlation functions results from a coexistence of liquid and solid water species inside the pores; see below. For both species ( $n = l, s$ ), we denote the signal fraction  $p_n$  and describe the correlation loss due to water dynamics by a KWW function,  $D_n(t_m) = \exp[-(t_m/\tau_{K,n})^{\beta_{K,n}}]$ , featuring the time constant  $\tau_{K,n}$  and stretching parameter  $\beta_{K,n}$ . Likewise, we describe the signal decay due to SLR during the mixing time by  $R_n(t_m) = \exp[-(t_m/T_{1,n}^*)^{\beta_{1,n}^*}]$ . Finally, we add a residual correlation  $F_\infty$  to allow for an anisotropy of water reorientation or the existence of additional immobile species. Altogether, we fit the <sup>2</sup>H STE data to

$$F_2^{cc/ss}(t_m) = F_\infty + (1 - F_\infty) \sum_n p_n D_n(t_m) R_n(t_m) \quad (7)$$

In the case of  $F_2^{cc}$ ,  $T_{1,n}^* = T_{1,n}$  and  $\beta_{1,n}^* = \beta_{1,n}$  so that these parameters can be determined in independent SLR experiments and fixed in the fits. By contrast, in measurements of  $F_2^{ss}$ , the relaxation behavior of a different spin state is relevant and,

hence,  $T_{1\rho}^*$  and  $\beta_{1\rho}^*$  need to be treated as free fit parameters. Considering this difference, we mostly focus on  $F_2^C$ . From the fit results, we again calculate peak correlation times  $\tau_{p,n}$  of corresponding susceptibility maxima, resulting from numerical Fourier transformation of the KWW functions.<sup>31</sup> In this way, straightforward comparison of the  $^2\text{H}$  SLR and STE results is possible. We note that the peak correlation times  $\tau_{p,n}$  characterize, for each species, the most abundant of distributed reorientation behaviors and, hence, they are not sensitive to the fast and slow parts of the respective distributions.

**Experimental Details.**  $^2\text{H}$  SLR measurements used the saturation-recovery sequence in combination with a solid-echo detection, utilizing an echo delay of 20  $\mu\text{s}$ . In the  $^2\text{H}$  STE experiments, a saturation sequence preceded appropriate STE sequences. For the latter, suited phase cycles were applied to cancel out unwanted single and double quantum coherences and the common three-pulse sequences were supplemented by a fourth pulse at a delay of 20  $\mu\text{s}$  to overcome the dead time of the receiver.<sup>33,34</sup> The relaxation delay  $t_r$  between saturation and acquisition was systematically varied, as will be discussed below.

All measurements were performed from low to high temperatures to avoid uncontrolled crystallization during data acquisition. The temperature was controlled employing liquid-nitrogen cryostats. The temperature accuracy was better than  $\pm 1$  K, and the temperature stability was better than  $\pm 0.5$  K. Further information about the used setups can be found in previous works.<sup>28,37,38</sup>

## ■ SAMPLE PREPARATION AND CHARACTERIZATION

**Synthesis of MCM-41 Materials.** The MCM-41 materials were synthesized following a protocol of Grünberg and co-workers.<sup>39</sup> To obtain MCM-41 silicas with various pore diameters  $d$ , we vary the number of the carbon atoms in the alkyl chain of the template in the range  $n = 10$ –16. We denote the produced silica materials  $C_n$ , explicitly, C10, C12, C14, and C16. For the synthesis, 36.3 mmol (0.15 equiv) of alkyltrimethylammonium bromide was dissolved in 672 mL of deionized water. The mixture was heated to 35  $^\circ\text{C}$ , and 58.5 mL of ammonia solution (25%) was added. The solution was stirred for 90 min. Then, 56.0 g (269 mmol, 1.00 equiv) of tetraethoxysilane was slowly added. After completing the addition, the suspension was stirred for 1 h. The suspension was transferred into a Teflon bottle and aged at 80  $^\circ\text{C}$  for 72 h. Subsequently, the white precipitate was filtered off. The solid was washed with deionized water, and the leftover template was removed at 650  $^\circ\text{C}$  by calcination.

**SEM Characterization of MCM-41 Materials.** The size and the shape of the synthesized MCM-41 particles were investigated by scanning electron microscopy (SEM). For the measurements, a FEI/Philips XL30 FEG with accelerating voltages between 5 and 30 kV was used. The SEM samples were coated with gold for 100 s at 30 mA using a Quorum Q300T D sputter coater. In Figure 1, a SEM image of the produced MCM-41 C12 material is presented as a typical example. Analogous SEM studies of the other MCM-41 samples reveal similar properties. We see that the shape of the MCM-41 particles is nearly spherical and the size amounts to about 400 nm. The distribution of the particle size is narrow. Hence, MCM-41 particles feature silica confinements for which the pore length exceeds the pore diameter by far. However, the spherical shape leads to a distribution of pore

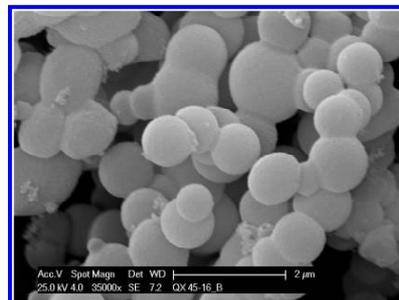


Figure 1. SEM image of MCM-41 C12. The particles have a nearly spherical shape and a size of about 400 nm.

lengths for each particle. Previously, these and other aspects of pore geometry and architecture in mesoporous silica were addressed in NMR studies using pulsed field gradients.<sup>40,41</sup>

**Brunauer–Emmett–Teller (BET) Characterization of MCM-41 Materials.** The porosity, specific surface area, and pore volume of the MCM-41 materials were characterized by nitrogen adsorption at 77 K, employing a Thermo Fisher Scientific Surfer BET. Prior to the measurements, the samples were dried for 2 days in vacuum ( $10^{-5}$  mbar) at 323 K, using a turbomolecular pump. The specific surface was determined by applying the Brunauer–Emmett–Teller (BET) method and analyzing the curves in the  $P/P_0$  range between 0.03 and 0.3.<sup>42</sup> The pore volume was obtained by the Gurvich method, and the  $P/P_0$  value at 95% of the step height was used. The  $\text{N}_2$  adsorption isotherms of all studied MCM-41 materials are shown in Figure 2. It is evident that the curves shift to lower  $P/P_0$  values when the alkyl chain length of the template is reduced from C16 to C10, indicating a decrease of the pore diameter.

MCM-41 materials have pores that can be regarded neither as classical nanopores nor as classical mesopores. Therefore, it is not straightforward to determine the pore diameter on an absolute scale. The common Barrett–Joyner–Halenda method is imprecise for small mesopores, and it even fails for our

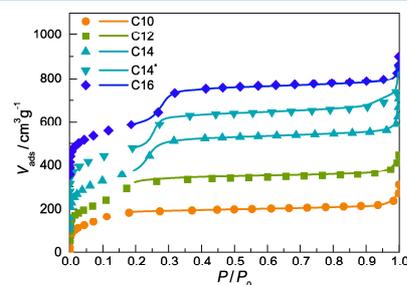


Figure 2. Nitrogen adsorption (symbols) and desorption (lines) isotherms of MCM-41 materials obtained from template molecules with various lengths of the alkyl tails from C10 to C16 at 77 K. The isotherm of a previously synthesized sample C14\* is included for comparison. For clarity, results for different samples are vertically shifted.

narrow pores.<sup>43</sup> Thus, other approaches are required. A method based on density functional theory (NLDFT) proved useful for a variety of materials but tends to overestimate the pore diameters of silica materials. Two other approaches to the microporous and borderline mesoporous regions are the Horvath–Kawazoe (HK) and the Saito–Foley (SF) methods.<sup>44,45</sup> The HK method is optimized for systems with slit pores. The SF method uses the HK method as a basis and is adapted to analyze Argon adsorption of zeolites. Therefore, none of the methods is fully applicable to the synthesized MCM-41 materials. However, a combination of the HK, SF, and NLDFT methods is useful to obtain absolute values of the pore diameter in our case.

The results of our BET analysis are compiled in Table 1. In agreement with previous BET studies,<sup>8–10,46</sup> we find that the

**Table 1. Pore Diameters and Pore Volumes of Prepared MCM-41 Materials, as Obtained from BET Analysis, and of Purchased SBA-15 Silica, as Provided by the Suppliers Sigma-Aldrich (SA) and ACS Material<sup>a</sup>**

sample	pore diameter (nm)	pore volume (cm <sup>3</sup> /g)
C10	2.1	0.34
C12	2.4	0.49
C14	2.8	0.70
C14*	2.8	0.68
C16	3.3	0.69
SBA-15 (SA)*	6.0	0.5–0.7
SBA-15 (ACS)*	10.7	0.68

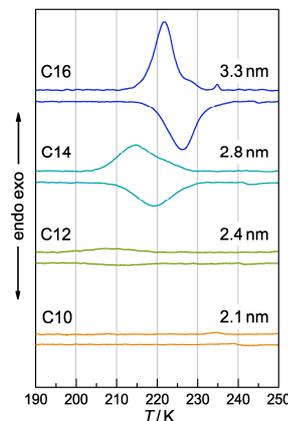
<sup>a</sup>Asterisks mark samples, which were not specially prepared in this work.

pore diameter and the pore volume systematically decrease from C16 to C10, forming a solid basis for pore-size-dependent studies of water dynamics. Table 1 shows also the BET results for a previously prepared and studied C14 sample,<sup>28,30</sup> which will be discussed for comparison and denoted C14\* in the present work. Although the N<sub>2</sub> adsorption isotherms of the C14 and C14\* silicas show minor differences, the same pore diameter of  $d = 2.8$  nm is obtained in both cases. For all prepared MCM-41 materials, the pore size distributions have approximately Gaussian shape and a half width of ca. 0.2 nm, slightly depending on the used analysis method and slightly increasing with decreasing pore diameter.

In addition to these MCM-41 materials, we use purchased SBA-15 silica to confine water. The pore diameters and pore volumes of the SBA-15 silica, as provided by the suppliers Sigma-Aldrich and ACS material, are included in Table 1.

**DSC Measurements.** DSC studies were performed on a Netzsch DSC 214 Polyma calorimeter to investigate the freezing and melting behaviors of water inside the silica pores. For the measurements, 4–5 mg of silica powder was mixed with 10  $\mu$ L of water. After an incubation period of 1 day, which ensures to reach equilibrium states,<sup>47</sup> the samples were filled in alumina crucibles and cooled from 298 to 133 K with a rate of 5 K/min using liquid nitrogen. After a waiting time of 5 min at 133 K, the samples were reheated back to 298 K with the same rate of 5 K/min.

The DSC thermograms obtained for the MCM-41 materials from these cooling–heating cycles are presented in Figure 3. Evidently, the freezing and melting temperatures of confined H<sub>2</sub>O are strongly reduced with respect to those of the bulk



**Figure 3.** DSC freezing and melting behaviors of H<sub>2</sub>O in MCM-41 silicas with different pore diameters (2.1–3.3 nm). Sloped baselines were subtracted from the measured DSC traces.

liquid. When the pore diameter  $d$  decreases, the corresponding peaks shrink and shift to lower temperatures. Explicitly, the samples C16 and C14 show pronounced freezing and melting peaks of internal ice, whereas these features are very weak for C12 and no longer discernible for C10. Table 2 summarizes

**Table 2. Freezing ( $T_f$ ) and Melting ( $T_m$ ) Temperatures of H<sub>2</sub>O in the Studied MCM-41 and SBA-15 ( $d = 6.0$  nm) Materials as Obtained from DSC Thermograms**

sample	freezing: $T_f$ (K)	melting: $T_m$ (K)
C10		
C12	209	210
C14	215	219
C16	222	226
SBA-15	250	258

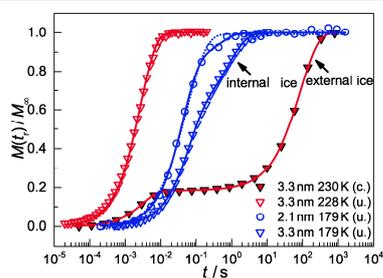
the freezing and melting temperatures obtained from the peak positions, including results from analogous studies on H<sub>2</sub>O in SBA-15 with a pore diameter of  $d = 6.0$  nm. Our observations are fully consistent with results of previous DSC approaches to water in silica pores.<sup>8–10</sup> In those studies, the pore-size-dependent depression of the melting point  $T_m$  in MCM-41 and SBA-15 materials was successfully described using the Gibbs–Thomson relation. However, it was necessary to consider the existence of a nonfreezable interfacial layer, in particular, for silicas with narrow confinements such as C12–C16. The absence of freezing and melting peaks in DSC thermograms for C10 suggests that crystallization is largely suppressed in pores with diameters  $d \leq 2.1$  nm. However, adiabatic calorimetry studies reported calorimetric signals even for such confinements,<sup>48,49</sup> although the origin of these features is still controversial.<sup>50</sup>

**Preparation of NMR Samples.** To ascertain the role of water exchange between silica pores, we prepared samples that do and do not have freezable water between the silica particles and, hence, feature capped and uncapped pore ends at subzero temperatures. Prior to use, all porous silica were carefully dried in high vacuum.<sup>47</sup> For the preparation of uncapped samples,

appropriate amounts of D<sub>2</sub>O were added, as calculated based on the mass of the dried silicas and the specific pore volumes; see Table 1. Samples with capped pore ends were obtained by supplying D<sub>2</sub>O in excess. For the used silica materials, we found that water amounts corresponding to about 1000–1500% of the specific pore volumes allow one to embed the silica particles in a spanning ice matrix at subzero temperatures. Therefore, this approach should allow us to cap the vast majority of the silica pores. The water-loaded silicas were filled into NMR tubes, which were subsequently flame-sealed to avoid a loss of water. Prior to the measurements, the samples were stored for several days to ensure that water is adsorbed inside the silica pores.

## RESULTS

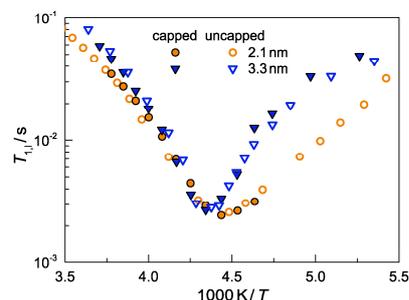
**<sup>2</sup>H NMR Spin-Lattice Relaxation.** To ascertain confinement effects on D<sub>2</sub>O reorientation, we first analyze <sup>2</sup>H SLR. Figure 4 shows the buildup of magnetization  $M(t_i)$  for different



**Figure 4.** Buildup of normalized <sup>2</sup>H magnetization  $M(t_i)/M_\infty$  for D<sub>2</sub>O in MCM-41 C10 (2.1 nm) and C16 (3.3 nm) at characteristic temperatures. For C16, results for capped (c) and uncapped (u) pore ends are compared. The solid lines are fits to eq 2. For C10, the dotted line is the exponential buildup expected if there was a liquid fraction without a solid fraction of internal water.

pore sizes and for capped and uncapped pore ends. The buildup is exponential at higher temperatures but bimodal at lower ones. These results are in harmony with the outcome of previous <sup>2</sup>H SLR approaches to D<sub>2</sub>O in MCM-41,<sup>27–31</sup> which led to the conclusion that the bimodality in the low-temperature range results from a coexistence of liquid ( $T_{1l}$ ) and solid ( $T_{1s}$ ) water phases inside the silica pores. The bimodality is evident for C16, but closer analysis reveals that the major short-time step is also complemented by a minor long-time step for C10, although the above DSC study provided no evidence for crystallization in the very narrow confinements of this sample. For samples with capped pores, the buildup curves are dominated by the contribution from the ice matrix, which encloses the silica particles and is expected to have hexagonal structure.

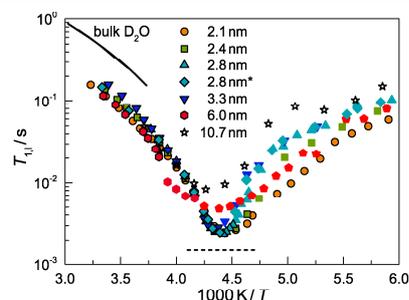
To determine <sup>2</sup>H SLR times, we fit the buildup curves  $M(t_i)$  to eq 2. First, we focus on the results for the fast relaxation step associated with the liquid water fraction. Comparing  $T_{1l}$  for capped and uncapped samples in Figure 5, we find that the existence of an external ice matrix does not have a significant effect. Hence, water reorientation is highly comparable in capped and uncapped pores, i.e., effects of water exchange between different pores are negligible in the present case.



**Figure 5.** Temperature-dependent <sup>2</sup>H SLR times  $T_{1l}$  for liquid D<sub>2</sub>O fractions in MCM-41 C10 (2.1 nm) and C16 (3.3 nm). Results for samples with capped (solid symbols) and uncapped (open symbols) pore ends are compared.

Therefore, we do not distinguish between capped and uncapped pores henceforth.

In Figure 6, we compare  $T_{1l}$  for D<sub>2</sub>O confined to MCM-41 or SBA-15 with pore diameters  $d = 2.1–10.7$  nm. At ambient



**Figure 6.** Temperature-dependent <sup>2</sup>H SLR times  $T_{1l}$  for liquid D<sub>2</sub>O fractions in silica pores with the indicated diameters. Bordered and nonbordered symbols mark results above and below the melting points  $T_m$ , respectively. For  $d = 2.8$  nm, data (diamonds) from previous work on the C14\* sample are included for comparison. <sup>2</sup>H  $T_{1l}$  values of bulk water are shown as a solid line.<sup>51</sup> The minimum <sup>2</sup>H SLR time expected for an exponential correlation function and, equivalently, a Lorentzian spectral density is marked as a dashed horizontal line.

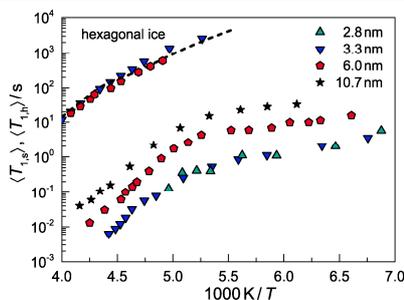
temperatures,  $T_{1l}$  weakly depends on the diameter but <sup>2</sup>H SLR is faster in confinement than in the bulk. Near 260 K,  $T_{1l}$  shows a jump for  $d = 6.0$  nm due to partial crystallization, whereas the behavior is continuous for the other samples. Upon further cooling, we observe  $T_{1l}$  minima at  $\sim 225$  K, indicating correlation times of  $\tau_p = 0.6/\omega_0 \approx 2 \times 10^{-9}$  s. Below the minima, the  $T_{1l}$  values of the samples differ significantly but there is no systematic pore-size dependence. In the later discussion, we will argue that the latter findings can be rationalized on the basis of the respective freezing behaviors, limiting the temperature ranges of meaningful  $T_{1l}$  analysis.

The  $T_{1l}$  minima are similar for the MCM-41 matrices, in particular, for C10–C14 but higher for the SBA-15 materials. The height of a <sup>2</sup>H  $T_{1l}$  minimum is determined by the shape of  $J_2(\omega)$ ,<sup>34</sup> allowing us to determine the width parameter of the

used CC spectral densities. We obtain  $\beta_C = 0.70$  for MCM-41 with  $d = 2.1\text{--}2.8$  nm where the minimum occurs above the melting point  $T_m$  and  $\beta_C = 0.37$  for SBA-15 with  $d = 6.0$  nm where it is located below  $T_m$ . Hence, the underlying CC distribution of correlation times  $G_C(\log \tau)$  is significantly broader in the two-phase than in the one-phase regime. We refrain from detailed analysis of  $T_{1,l}$  for SBA-15 with  $d = 10.7$  nm for which the values suffer from substantial uncertainties because the signal of the liquid fraction is much weaker than that of the solid one in the case of very wide pores.

Using the thus-obtained spectral densities  $J_2(\omega)$ , we determine correlation times  $\tau_p = \tau_C$  from the  $T_{1,l}$  data; see eqs 3 and 4. However, it is necessary to consider that the shape of the spectral density can change due to partial crystallization. Therefore, we distinguish whether the  $T_{1,l}$  minimum is located in the one-phase region above  $T_m$  or in the two-phase region below. In the former case, this phenomenon characterizes the reorientation of liquid water when the complete volume of the silica pores is explored. This situation is met for narrow pores with diameters 2.1–2.8 nm, where  $\beta_C = 0.70$ . For these samples, we restrict SLR analysis to  $T > T_m$ . By contrast, the  $T_{1,l}$  minimum occurs below  $T_m$  for the larger pore diameter of 6.0 nm. Then, the minimum characterizes the rotational motion of liquid water sandwiched between silica walls and ice cores and  $\beta_C = 0.37$ . In this case, we limit our approach to  $T < T_m$ . Despite these restrictions, the fact that the melting points  $T_m$  of the studied samples are substantially different, see Table 2, allows us to perform SLR analysis in a sufficiently broad common temperature range and, hence, to investigate the pore-size dependence. Only for C16 with an intermediate pore diameter of 3.3 nm, the  $T_{1,l}$  minimum and fractional freezing occur at similar temperatures so that SLR analysis does not yield meaningful insights into water dynamics. The correlation times obtained from the described SLR analysis will be presented together with those of the STE study below.

We move on to the slower SLR steps. Due to their nonexponential nature, Figure 7 presents the mean time constants  $\langle T_{1,s} \rangle$  and  $\langle T_{1,h} \rangle$  for various pore diameters. We see that  $\langle T_{1,s} \rangle$  associated with internal ice is similar for the MCM-41 samples, i.e., for  $d \leq 3.3$  nm, whereas it increases with increasing pore diameters for larger  $d$  values. Still, for all studied pores,  $\langle T_{1,s} \rangle$  is much smaller than  $\langle T_{1,h} \rangle$  originating from external ice. This means that internal ice shows much

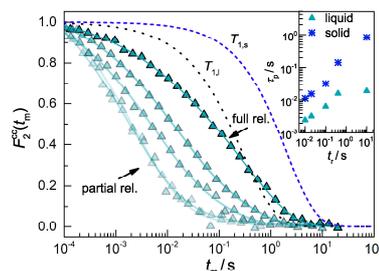


**Figure 7.** Temperature-dependent mean  $^2\text{H}$  SLR times  $\langle T_{1,s} \rangle$  of internal  $\text{D}_2\text{O}$  ice and  $\langle T_{1,h} \rangle$  of external  $\text{D}_2\text{O}$  ice, if existent, for the indicated pore diameters. The dashed line indicates literature data<sup>52</sup> for bulk hexagonal  $\text{D}_2\text{O}$  ice at the same Larmor frequency  $\omega_0$ .

faster water reorientation than external ice, most probably, as a consequence of highly disturbed crystal structures in narrow confinements. By contrast,  $\langle T_{1,h} \rangle$  agrees with the bulk value for  $\text{D}_2\text{O}$  hexagonal ice,<sup>52</sup> confirming the largely unperturbed structure of the external ice component in all studied samples. Hence, water fractions inside and outside the pores can be clearly distinguished below 273 K based on their different  $^2\text{H}$  SLR behaviors. As for internal water, we find that a steeper rise of  $\langle T_{1,s} \rangle$  is replaced by a flatter one when cooling through 190 K. While this kink implies a change of some property of confined water at this temperature, the exact cause of this effect remains elusive.

**$^2\text{H}$  NMR Stimulated-Echo Experiments.** To measure correlation functions of slow water reorientation at low temperatures, we perform  $^2\text{H}$  STE studies. In this approach, it can be a useful strategy to single out contributions from specific water species on the basis of their different SLR behaviors. After complete destruction of the magnetization at the beginning of the experiment, it rebuilds during an adjustable relaxation delay  $t_r$  before acquisition is started. Hence, water species with SLR times much shorter and much longer than the relaxation delay do and do not contribute to the observed signal, respectively. In previous STE studies,<sup>17–29</sup> this effect was exploited to select contributions from liquid water and to suppress those from internal and external ices by performing partially relaxed measurements with  $T_{1,l} \ll t_r \ll T_{1,s}, T_{1,h}$ . This approach works for separated and exponential SLR steps, whereas there is a risk of failure for overlapping nonexponential SLR steps. Because the latter situation may be met in the present study at low temperatures, we explore the role of the relaxation delay in more detail.

In Figure 8, we show  $F_2^{\text{cc}}(t_m)$  of C14 measured at 153 K with various relaxation delays  $t_r$ . It can be seen that the correlation



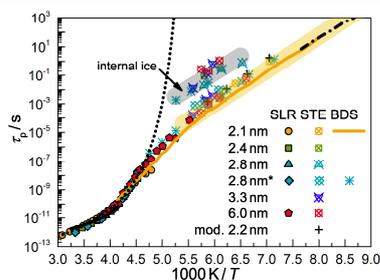
**Figure 8.** Comparison of fully relaxed and partially relaxed STE measurements of  $F_2^{\text{cc}}(t_m)$  for  $\text{D}_2\text{O}$  in MCM-41 C14 at 153 K ( $t_c = 9 \mu\text{s}$ ). An uncapped sample was used to avoid contributions from external ice. SLR functions of the liquid (dotted line) and solid (dashed line) fractions of confined water are indicated. The decays shift to shorter times when the relaxation delay  $t_r$  is reduced. The inset shows time constants  $\tau_p$  obtained from fits of the STE decays to eq 7 as a function of the relaxation delay  $t_r$ .

functions shift to shorter times when the relaxation delay is reduced from the full-relaxation to the partial-relaxation limit. For none of the delays  $t_r$ , contributions from liquid and solid water species are well separated. Nonetheless, closer inspection of the data indicates a superposition of two stretched decays. Therefore, we analyze the  $^2\text{H}$  STE results by fitting to eq 7. In doing so, we explain that the number of free parameters can be

reduced when the outcome of the above analysis is used to fix the SLR damping of the STE amplitude. This approach yields good interpolations for all relaxation delays. In the inset, it is evident that the peak correlation times  $\tau_p$  calculated from the fit parameters decrease with decreasing relaxation delay. Thus, partially relaxed experiments do not allow us to single out specific water species and determine reliable correlation times in the present case. Therefore, we focus on fully relaxed STE measurements henceforth.

Except for the smallest and largest pore diameters, we find bimodal STE decays in these fully relaxed measurements, allowing us to obtain rotational correlation times for both the liquid and solid fractions of confined water. For  $d = 2.1$  nm, unimodal decays are observed, i.e., the STE experiment does not resolve the very minor solid fraction, which was observed in the SLR measurements; see Figure 4. For  $d = 10.0$  nm, the long-time decay of  $F_2^C(t_m)$  is fully described by spin relaxation so that information about molecular reorientation cannot be obtained. The available peak correlation times of all studied samples will be presented in the next section.

**Correlation Times.** Combining the  $^2\text{H}$  SLR and STE results, we are able to cover a dynamic range of about 12 orders of magnitude and, thus, to ascertain the rotational motion of confined water from ambient to cryogenic temperatures. The results of this combined approach are compiled in Figure 9. In the following discussion, we again distinguish between one-phase and two-phase situations.



**Figure 9.** Correlation times  $\tau_p$  obtained from  $^2\text{H}$  SLR and STE experiments on  $\text{D}_2\text{O}$  in MCM-41 and SBA-15 matrices with various pore diameters. The dotted line is a Vogel–Fulcher–Tamman (VFT) fit of the SLR data for the pore diameter  $d = 2.1$  nm above 225 K, which is extrapolated to lower temperatures. The STE results for the liquid/glassy fraction follow an Arrhenius law with  $E_a = 0.5$  eV (yellow bar) and those of the solid fraction are ca. 2 orders of magnitude longer (gray bar). For comparison, previous SLR, STE, and BDS results for  $\text{D}_2\text{O}$  in C14\* ( $2.8$  nm\*),<sup>30</sup> STE data for  $\text{D}_2\text{O}$  in a surface-functionalized MCM-41 sample with a pore diameter of  $2.2$  nm,<sup>47</sup> and BDS findings for  $\text{H}_2\text{O}$  in a MCM-41 C10 sample,<sup>11</sup> are included. Moreover, rotational correlation times of bulk  $\text{D}_2\text{O}$  are shown: (black solid line)  $^2\text{H}$  SLR data<sup>53</sup> for the  $\text{D}_2\text{O}$  bulk liquid and (black dash-dotted line) BDS results obtained upon heating deuterated bulk high-density amorphous ice.<sup>54</sup>

In the weakly cooled temperature range, rotational correlation times are obtained from  $^2\text{H}$  SLR analysis. For C10–C14 ( $2.1$ – $2.8$  nm), the  $T_{1,l}$  minimum is located in the one-phase region where all confined water is liquid so that the above described SLR analysis allowed us to determine peak correlation times  $\tau_p$  describing the reorientation of water

exploring the whole pore space. In Figure 9, it is evident that the value of  $\tau_p$  very weakly depends on the pore diameter. Furthermore, the correlation times of confined water only weakly deviate from those of bulk water.<sup>53</sup> For  $d = 2.1$ – $2.8$  nm, the temperature dependence of  $\tau_p$  can be described by the Vogel–Fulcher–Tamman (VFT) relation

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{B}{T - T_0}\right) \quad (8)$$

down to  $\sim 220$  K. The resulting fit parameters are  $\tau_0 = 1.0 \times 10^{-14}$  s,  $B = 621$  K, and  $T_0 = 176$  K. Extrapolating this VFT behavior to lower temperatures suggests a correlation time of  $\tau_p = 10^2$  s and, hence, a glass transition near 190 K. However, there are indications for deviations from this temperature dependence below 220 K. Unfortunately, the SLR results for C10–C14 do not allow us to settle this question because the appearance of a solid water fraction interferes with meaningful analysis at lower temperatures.

We turn toward SBA-15 with  $d = 6.0$  nm where the  $T_{1,l}$  minimum occurs well inside the two-phase region with coexisting liquid and solid fractions of confined water. In this case, water reorientation can be expected to occur in thin nonfreezable layers between silica walls and ice crystallites. In Figure 9, we see that the rotational correlation times  $\tau_p$  of water molecules restricted to such interfacial regions agree with those of water molecules exploring the whole pore volumes of C10–C14 in the common range. For SBA-15, the analysis can be extended to lower temperatures since partial crystallization does not change the shape of the spectral density below the  $T_{1,l}$  minimum. We find a clear dynamic crossover at ca. 220 K for the nonfreezable water in silica pores with diameters of 6.0 nm. Under such circumstances, the change of the dynamics from a higher to a lower temperature dependence cannot be attributed to a transition from one-phase to two-phase behavior because a solid fraction of confined water exists well above and below the crossover temperature. Below the dynamic crossover, the correlation times  $\tau_p$  from the SLR analysis of the SBA-15 sample extrapolate to those obtained from our STE measurements, which will be discussed next.

In the deeply cooled temperature range,  $^2\text{H}$  STE analysis yields valuable information about water reorientation in the two-phase systems. Specifically, the above described bimodal fits of the STE decays allow us to determine correlation times for both phases at  $T \leq 180$  K. In Figure 9, we see that water reorientation in neither of the two phases significantly depends on the pore diameter, at least in the range  $d = 2.1$ – $6.0$  nm. Based on the continuous evolution of the SLR times upon cooling, these phases can be identified with the liquid and solid fractions observed in the two-phase region. However, the question arises whether the former fraction is still in the liquid state or already in the glassy state at the lower temperatures of the STE study,  $T \leq 180$  K, since the above VFT extrapolation of the SLR high-temperature data suggested a glassy arrest near 190 K. Due to this ambiguity, we refer to this water species as the liquid/glassy fraction in the STE analysis. For all studied MCM-41 and SBA-15 samples, the peak correlation times  $\tau_p$  of the liquid/glassy fraction follow a common Arrhenius law with an activation energy of  $E_a = 0.5$  eV in the low-temperature range. The correlation times of the solid fraction forming during partial crystallization are only about 2 orders of magnitude longer than those of the liquid/glassy fraction. Because of the interference of SLR effects, the STE results for

the solid species, however, suffer from larger statistical uncertainty. Therefore, we refrain from more detailed analyses of the activation energy and of the size dependence for this species of confined water.

Our findings can be compared with rotational correlation times from previous BDS and NMR studies on H<sub>2</sub>O or D<sub>2</sub>O in MCM-41 pores. Exemplary literature data<sup>30,55</sup> for pore diameters of 2.1 and 2.8 nm are included in Figure 9. This comparison confirms that liquid/glassy and solid water species exhibit very similar low-temperature reorientation dynamics under various confinement conditions. For the liquid/glassy fraction, the  $\tau_p$  values of our SLR and STE analyses agree with those from BDS studies on water reorientation in silica pores of various diameters.<sup>11–13,30</sup> This agreement not only implies that the reorientation of this water species hardly depends on the pore size but also confirms that differences between H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O dynamics are only mild in confinement,<sup>30,56</sup> whereas stronger isotope effects were reported for low-temperature dynamics of bulk water.<sup>56</sup> Similar correlation times of water reorientation were found in functionalized silica pores<sup>30</sup> and various aqueous solutions,<sup>11,55,57</sup> implying that the chemical structure of confining walls does not play a major role for the peak times  $\tau_p$ . Likewise, the findings of the present STE study for the solid fraction of confined water are in harmony with BDS correlation times for frozen D<sub>2</sub>O species in C14\*,<sup>30</sup> which in turn were found to agree with results for ice phases in protein matrices.<sup>58</sup> We emphasize that these findings for the peak correlation times do not exclude that dynamics of water molecules in the immediate vicinity of an inner surface depends on the properties of the surface, as will be discussed below.

## DISCUSSION

The above <sup>2</sup>H SLR and STE analyses showed that the reorientation of nonfreezable water in silica pores with various diameters is characterized by distributions of correlation times with similar positions of the maximum, but different widths of the distribution. Specifically, the peak positions  $\tau_p$  obtained for D<sub>2</sub>O in all studied MCM-41 and SBA-15 materials agree in a dynamic range of about 12 orders of magnitude. However, the CC width parameters  $\beta_C$  indicate that the heterogeneity of water reorientation is high in the one-phase regime above  $T_m$  but even higher in the two-phase regime below this temperature, where the pore space accessible to the liquid phase is further restricted by the existence of a solid phase.

It may surprise that our <sup>2</sup>H SLR analysis yields correlation times  $\tau_p$  that do not depend on the pore diameter and resemble bulk behavior, while the corresponding  $T_{1\rho}$  data differ. In this context, it is important to consider that the degree of dynamical heterogeneity varies among the systems. Specifically, the observations can be rationalized based on insights from molecular dynamics simulations of water in porous confinements.<sup>29,51,59</sup> These computational approaches enabled position-resolved studies of translational and rotational water motion and revealed strong mobility gradients across pores with diameters of 2–5 nm. Whereas bulk behavior was observed in the pore center, water dynamics was found to strongly slow down and become more heterogeneous when approaching a pore wall. Thus, interfacial water layers with slow and heterogeneous dynamics cause low-frequency contributions to the spectral density, which are considered using a CC shape in the present SLR analysis. At ambient temperatures, i.e., well above the  $T_{1\rho}$  minimum, these low-

frequency contributions from water near pore walls govern the SLR behavior and lead to shorter  $T_{1\rho}$  values than in the bulk, whereas bulklike water reorientation in the pore center has a decisive influence on the most probable correlation time of the distribution,  $\tau_p$ , which, thus, hardly differs from the bulk value, consistent with our observations. Hence, we conclude that shorter  $T_{1\rho}$  values in confinement than in the bulk, see Figure 6, may not be taken as evidence for a slowdown of water reorientation throughout the pores. Likewise, we infer that the discontinuity of  $T_{1\rho}$  for SBA-15 with  $d = 6.0$  nm at  $T_m$  does not result from an increase of the most probable correlation time but from a broadening of the distribution during partial crystallization, which is indicated by substantially different  $\beta_C$  values in the one-phase and two-phase regions. In other words, the  $T_{1\rho}$  values at ambient temperatures inform about slowed dynamics in water layers at inner surfaces, which are known to depend on not only the chemical structure but also the roughness and rigidity of these surfaces,<sup>51,60,61</sup> whereas the peak correlation times  $\tau_p$  specify the most abundant of distributed water dynamics and, hence, characterize water species at large distances to inner surfaces, at least in sufficiently wide confinements.

At temperatures below the  $T_{1\rho}$  minimum, we observed a substantial, but unsystematic pore-size dependence of the SLR behavior. Explicitly,  $T_{1\rho}$  increases steadily for narrow and wide pores, whereas there is a particularly steep rise for medium-sized pores in C14 and C16 in the range 210–225 K; see Figure 6. One may be tempted to take this finding as evidence for an enhanced temperature dependence of water dynamics in pores with diameters of  $\sim 3$  nm. However, it is important to consider that fractional freezing, which occurs for medium-sized pores in this temperature range, alters the shape of the spectral density. Therefore, unlike a previous <sup>2</sup>H SLR approach,<sup>28</sup> we refrain from quantitative analysis of  $T_{1\rho}$  data of MCM-41 samples at  $T < T_m$ .

It is a key question to what extent the reorientation of confined water agrees with that of bulk water. In Figure 9, we compare the present results with literature data for bulk water at high and low temperatures, whereas such comparison is not possible in the no-man's land. Above 240 K, we find that  $\tau_p$  is in reasonable agreement with rotational correlation times from <sup>2</sup>H SLR studies on the D<sub>2</sub>O bulk liquid.<sup>53</sup> The extrapolation of  $\tau_p$  to low temperatures matches with BDS rotational correlation times observed upon heating deuterated bulk high-density amorphous ice.<sup>54</sup> These consistent high-temperature and low-temperature dynamics suggest that our findings for confined water are relevant for bulk water. Moreover, our finding that water reorientation hardly depends on the properties of the confinement also suggests that the observed dynamics is a characteristic water property, possibly representative for bulk water, but not necessarily for its  $\alpha$  relaxation in the whole temperature range, as will be discussed in more detail in the following.

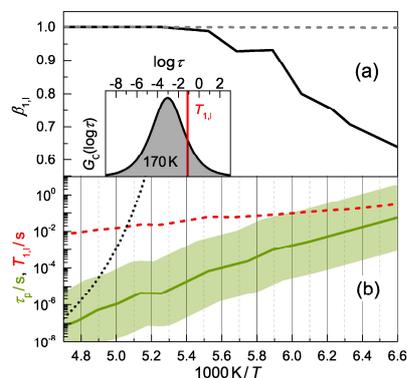
Another intriguing problem is the origin of the dynamic crossover of confined water at ca. 220 K. We found that the effect is largely independent of the pore size and that it also occurs well inside the two-phase regime, i.e., when the motion of the liquid fraction is influenced by a solid fraction both above and below the crossover temperature. These findings do not support arguments that simple geometrical restriction causes the  $\alpha$  process to change from bulklike to confinement-governed. The pore-size-independent dynamics is difficult to reconcile with a behavior governed by a growing length scale of

cooperative dynamics that starts to interfere with the size of the confinement upon cooling.<sup>11</sup> Still, one may argue that the effective size of the confinement acting at the dynamic crossover can be varied only in a relatively narrow range because crystallization is not suppressed in wide pores. Moreover, a dynamic crossover well inside the two-phase regime appears to be inconsistent with the proposal that the effect occurs in response to further reduction of the accessible pore space during such partial crystallization.<sup>27,30</sup> Other workers took the phenomenon as evidence for a fragile-to-strong transition related to a liquid–liquid phase transition of bulk water, which ends in a second critical point.<sup>23–26</sup> This interpretation rests on the assumption that a bulklike  $\alpha$  process is probed above and below the crossover temperature. If this assumption is correct, then our finding of an unaltered dynamic crossover in the thin interfacial layers of nonfreezable water means that the  $\alpha$  process of water is bulklike even in extremely narrow confinement and, hence, its cooperativity is negligible. Moreover, the conjecture that water properties under such extreme confinement conditions are representative of the bulk behaviors requires that growing correlation lengths of fluctuations in the vicinity of the second critical point are not affected under such circumstances. While such limited or irrelevant length scales of cooperativity or fluctuations cannot be ruled out completely, this scenario is also very unlikely.

Alternatively, it was conjectured that the dynamical crossover results from a transition from a structural  $\alpha$  relaxation to a local  $\beta$  relaxation upon cooling.<sup>11,14</sup> In this scenario, the  $\alpha$  relaxation either disappears due to a too high cooperativity or undergoes a glass transition near the crossover temperature, whereas the  $\beta$  process causes the much-debated glass-transition step of water at 136 K so that this calorimetric feature does not indicate a liquid-to-glass transition but rather a freezing of local water reorientation.<sup>11–13</sup> In the following, we exploit that, in  $^2\text{H}$  NMR, the shape of the magnetization buildup yields information about the existence of an ergodicity restoring process on the time scale of the experiment, as was discussed in detail in a comprehensive review.<sup>34</sup>

In general, a distribution of correlation times  $\tau$  results in a distribution of  $^2\text{H}$  SLR times  $T_1$  and, thus, a nonexponential buildup of magnetization, i.e.,  $\beta_1 < 1$ . This argument is true when the molecules keep their  $\tau$  and, thus,  $T_1$  values during the buildup of the magnetization. Such situation is found, e.g., for molecular glass formers at  $T < T_g$  when the  $\alpha$  relaxation is too slow to be relevant and  $\beta$  relaxations determine  $^2\text{H}$  SLR.<sup>34</sup> By contrast, an exchange of  $\tau$  values averages the distribution of  $T_1$  values and, hence, leads to exponential  $^2\text{H}$  SLR, i.e.,  $\beta_1 = 1$ . This situation is typical of molecular glass formers at  $T > T_g$  where the  $\alpha$  relaxation mixes the local environments during the buildup of magnetization.<sup>34</sup> Thus, for heterogeneous systems, the stretching parameter  $\beta_1$  reveals whether or not an ergodicity restoring process exists on the time scale of  $T_1$ .

In Figure 10a, we show the temperature dependence of  $\beta_1$  resulting from our  $^2\text{H}$  SLR studies on  $\text{D}_2\text{O}$  in SBA-15 with  $d = 6.0$  nm. We see that  $^2\text{H}$  SLR is exponential down to at least 185 K, consistent with previous<sup>27–29</sup> and present (not shown) results for MCM-41 samples with various pore diameters  $d$ . This means that an ergodicity restoring process occurs on the time scale of  $T_1 \approx 0.1$  s down to at least 185 K. Hence, our findings provide evidence against a scenario with a glass transition significantly above 185 K leaving only a local  $\beta$  relaxation below this temperature. Rather, at least one of the following situations applies: (i) the  $\alpha$  relaxation continues to



**Figure 10.** Temperature-dependent  $^2\text{H}$  NMR results for the liquid/glassy fraction of  $\text{D}_2\text{O}$  in SBA-15 with  $d = 6.0$  nm: (a) SLR stretching parameter  $\beta_{1,l}$  (solid line) and (b) SLR time constant  $T_{1,l}$  (dashed line) together with SLR and STE peak correlation times  $\tau_p$  (solid line). The shaded area indicates the width of the distribution of correlation times, explicitly, the full width at half-maximum of the obtained CC distribution  $G_C(\log \tau)$ . Moreover, the VFT extrapolation  $\tau_{\text{VFT}}$  of the high-temperature correlation times is included (dotted line). The inset compares  $G_C(\log \tau)$  expected at 170 K with  $T_{1,l}$  at this temperature.

occur but withstands direct experimental observation. In this scenario, the observed correlation times reflect some kind of secondary relaxation, which governs the loss of orientational correlation, whereas ergodicity is restored by structural relaxation, which is slower but still active on laboratory time scales. (ii) The probed dynamics is a nonlocal  $\beta$  relaxation, i.e., it leads to an exploration of a substantial part of the pore space and, thus, causes an exchange of  $\tau$  values by itself. For example, one may argue that water shows translational diffusion governed by a disordered energy landscape, which is imprinted by the pore walls and internal ice, resembling situations found for dynamics of plasticizer molecules or mobile ions in glassy matrices. Because none of these possibilities can be ruled out, findings for  $\beta_{1,l}$  cannot be used as arguments for or against a fragile-to-strong transition near 220 K.

To further examine these possibilities, we compare  $T_{1,l}$  with the correlation times  $\tau_{\text{VFT}}$  resulting from an extrapolation of the VFT behavior above the dynamic crossover and  $\tau_p$  values obtained from the above SLR and STE analyses in Figure 10b. We see that the intersect of  $T_{1,l}$  and  $\tau_{\text{VFT}}$  occurs at ca. 200 K, whereas that of  $T_{1,l}$  and  $\tau_p$  is located below 150 K. The observation that the former temperature is somewhat higher, but still comparable to the first onset of nonexponential  $^2\text{H}$  SLR near 185 K, was used as evidence for a breakdown of ergodicity due to a glassy arrest in this temperature range.<sup>27–29</sup> Here, we perform a more detailed analysis, which shows that the decrease of  $\beta_{1,l}$  starts near 185 K but clearly develops only near 170 K and considers that a broad distribution of correlation times governs the reorientation of confined water. In Figure 10b, we see that the slow parts of the distribution  $G_C(\log \tau)$  reach the time scale of  $T_{1,l}$  already at 170 K, suggesting that  $^2\text{H}$  SLR turns nonexponential when the probed process becomes slow on the experimental time scale. Thus, the present more detailed analysis reveals that the results for

the temperature dependence of  $\beta_{1,1}$  do not necessarily indicate a glassy arrest of an otherwise unobserved  $\alpha$  relaxation, but the findings can also be rationalized in terms of the common reorientation process observed for various types of confined water at low temperatures when we assume that this process involves an exchange of  $\tau$  values and, hence, an exploration of a substantial part of the pore space so that it is capable of restoring ergodicity.

Altogether, none of the previous conjectures is consistent with all experimental findings related to the dynamic crossover. Therefore, an unequivocal explanation of this phenomenon is still lacking. One may argue that confined water enters a structural state upon cooling, which differs from that of most other glass-forming liquids. For example, one may propose that fluctuating icelike network structures are established in the bulk but also in confinement and at interfaces. Consistently, calorimetric features in the vicinity of the dynamic crossover were taken as indication that liquid water and distorted icelike structures are in thermodynamic equilibrium.<sup>50</sup> Thus, one may speculate that the dynamic crossover occurs in response to a change from a structurally homogeneous state to one with very local heterogeneities.

### SUMMARY

Using a well-established protocol,<sup>39</sup> we synthesized MCM-41 C10–C16 materials. SEM images together with BET analysis revealed that the prepared MCM-41 particles have nearly spherical shapes with typical diameters of ca. 400 nm and comprise well-defined pores with diameters in the range from 2.1 nm (C10) to 3.3 nm (C16). These MCM-41 materials and additional SBA-15 silica showing pore diameters of 6.0 and 10.7 nm were carefully loaded with D<sub>2</sub>O allowing us to systematically investigate the reorientation dynamics of confined water in dependence of the pore diameter using a combination of <sup>2</sup>H NMR methods.

We found that the reorientation of liquid water is very similar in the studied MCM-41 and SBA-15 matrices. In the weakly cooled regime, <sup>2</sup>H SLR analysis yielded correlation times  $\tau_p$  that show a common VFT-like temperature dependence. Near 220 K, the  $\tau_p$  values exhibit a clear dynamical crossover in all pores. In the strongly cooled regime, the correlation times have a weaker temperature dependence, in particular, <sup>2</sup>H STE studies yielded pore-size-independent values, which follow an Arrhenius law with an activation energy of  $E_a = 0.5$  eV below 180 K, consistent with BDS results.<sup>11,15,55</sup>

In harmony with previous studies,<sup>27,28,30</sup> we observed that the temperature range of the dynamical crossover coincides with that of partial crystallization in narrow MCM-41 pores with diameters  $d = 2.1$ – $2.9$  nm. Here, we found a very similar kink in the temperature dependence of  $\tau_p$  at  $\sim 220$  K for a wide SBA-15 pore with  $d = 6.0$  nm, where the liquid water fraction coexists with a solid ice fraction inside the confinement well above and below the crossover temperature and, hence, the effect is not directly related to a change from a one-phase to a two-phase confined state. The correlation times of the confined ice are only about 2 orders of magnitude longer than those of the confined liquid, implying highly distorted structures of the crystallites.

The pore-size-independent correlation times  $\tau_p$  obtained for confined water in silica pores were found to agree with those reported for the bulk water specimen above and below the normal's land. This finding suggests that the probed reorientation

is a characteristic feature of water and, hence, of relevance for the bulk liquid. However, none of the previous hypothesis for the origin of the dynamical crossover of bulk and confined waters allowed us to rationalize all findings related to this phenomenon. Therefore, we speculate that water exists in a remarkable structural state below 220 K featuring fluctuating icelike networks that are intimately intermingled with more distorted regions.

### AUTHOR INFORMATION

#### Corresponding Authors

\*E-mail: [gerd.buntkowsky@chemie.tu-darmstadt.de](mailto:gerd.buntkowsky@chemie.tu-darmstadt.de) (G.B.).

\*E-mail: [michael.vogel@physik.tu-darmstadt.de](mailto:michael.vogel@physik.tu-darmstadt.de) (M.V.).

#### ORCID

G. Buntkowsky: 0000-0003-1304-9762

M. Vogel: 0000-0003-2706-3522

#### Author Contributions

<sup>§</sup>M.W. and M.B. contributed equally.

#### Notes

The authors declare no competing financial interest.

### ACKNOWLEDGMENTS

Financial support of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) in the framework of Forschergruppe FOR 1583 through grants Bu-911/18-2 and Vo-905/8-2 is gratefully acknowledged.

### REFERENCES

- (1) Speedy, R. J.; Angell, C. A. Isothermal compressibility of supercooled water and evidence for a thermodynamic singularity at  $-45^\circ\text{C}$ . *J. Chem. Phys.* **1976**, *65*, 851.
- (2) Angell, C. A. *Supercooled Water*. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1983**, *34*, 593–630.
- (3) Prielmeier, F. X.; Lang, E. W.; Speedy, R.; Ludemann, H.-D. Diffusion in Supercooled Water to 300 MPa. *Phys. Rev. Lett.* **1987**, *59*, 1128–1131.
- (4) Debenedetti, P. G. Supercooled and Glassy Water. *J. Phys.: Condens. Matter* **2003**, *15*, R1669–R1726.
- (5) Mishima, O.; Stanley, H. E. The Relationship Between Liquid, Supercooled and Glassy Water. *Nature* **1998**, *396*, 329–335.
- (6) Poole, P. H.; Sciortino, F.; Essmann, U.; Stanley, H. E. Phase behaviour of metastable water. *Nature* **1992**, *360*, 324–328.
- (7) Starr, F. W.; Angell, C. A.; Stanley, H. E. Prediction of entropy and dynamic properties of water below the homogeneous nucleation temperature. *Phys. A* **2003**, *323*, 51–66.
- (8) Kittaka, S.; Ishimaru, S.; Kuranishi, M.; Matsuda, T.; Yamaguchi, T. Enthalpy and interfacial free energy changes of water capillary condensed in mesoporous silica, MCM-41 and SBA-15. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 3223–3231.
- (9) Jähnert, S.; Chavez, F.; Schaumann, G. E.; Schreiber, A.; Schönhoff, M.; Findenegg, G. H. Melting and freezing of water in cylindrical nanopores. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 6039–6051.
- (10) Deschamps, J.; Audonnet, F.; Brodie-Linder, N.; Schoeffel, M.; Alba-Simionesco, C. A thermodynamic limit of the melting/freezing processes of water under strongly hydrophobic nanoscopic confinement. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 1440–1443.
- (11) Swenson, J.; Cervený, S. Dynamics of deeply supercooled interfacial water. *J. Phys.: Condens. Matter* **2015**, *27*, No. 033102.
- (12) Cervený, S.; Mallamace, F.; Swenson, J.; Vogel, M.; Xu, L. Confined Water as Model of Supercooled Water. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 7608–7625.
- (13) Swenson, J. Possible relations between supercooled and glassy confined water and amorphous bulk ice. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, *20*, 30095–30103.

- (14) Cervený, S.; Schwartz, G. A.; Bergman, R.; Swenson, J. Glass Transition and Relaxation Processes in Supercooled Water. *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, No. 245702.
- (15) Vogel, M. NMR Studies on Simple Liquids in Confinement. *Eur. Phys. J. Spec. Top.* **2010**, *189*, 47–64.
- (16) Bergman, R.; Swenson, J. Dynamics of supercooled water in confined geometry. *Nature* **2000**, *403*, 283–286.
- (17) Pahlke, H.; Lusceac, S. A.; Geil, B.; Fujara, F. NMR Study of Local and Long Range Dynamics of Adsorbed Water in Zeolite NaY(Br). *Z. Phys. Chem.* **2012**, *226*, 1093–1113.
- (18) Swenson, J.; Jansson, H.; Bergman, R. Relaxation processes in supercooled confined water and implications for protein dynamics. *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *96*, No. 247802.
- (19) Khodadadi, S.; Pawlus, S.; Sokolov, A. P. Influence of Hydration on Protein Dynamics: Combining Dielectric and Neutron Scattering Spectroscopy Data. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 14273–14280.
- (20) Vogel, M. Origins of Apparent Fragile-to-Strong Transitions of Protein Hydration Waters. *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *101*, No. 225701.
- (21) Lusceac, S. A.; Vogel, M. R.; Herbers, C. R.  $^2\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Studies on the Temperature-Dependent Water and Protein Dynamics in Hydrated Elastin, Myoglobin and Collagen. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **2010**, *1804*, 41–48.
- (22) Grün, M.; Unger, K. K.; Matsumoto, A.; Tsutsumi, K. Novel pathways for the preparation of mesoporous MCM-41 materials: control of porosity and morphology. *Microporous Mesoporous Mater.* **1999**, *27*, 207–216.
- (23) Faraone, A.; Liu, L.; Mou, C.-Y.; Yen, C.-W.; Chen, S.-H. Fragile-to-strong liquid transition in deeply supercooled confined water. *J. Chem. Phys.* **2004**, *121*, No. 10843.
- (24) Liu, L.; Chen, S.-H.; Faraone, A.; Yen, C.-W.; Mou, C.-Y. Pressure Dependence of Fragile-to-Strong Transition and a Possible Second Critical Point in Supercooled Confined Water. *Phys. Rev. Lett.* **2005**, *95*, No. 117802.
- (25) Mallamace, F.; Broccio, M.; Corsaro, C.; Faraone, A.; Wanderlingh, U.; Liu, L.; Mou, C.-Y.; Chen, S.-H. The fragile-to-strong dynamic crossover transition in confined water: nuclear magnetic resonance results. *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, No. 161102.
- (26) Mallamace, F.; Broccio, M.; Corsaro, C.; Faraone, A.; Liu, L.; Mou, C.-Y.; Chen, S.-H. Dynamical properties of confined supercooled water: an NMR study. *J. Phys.: Condens. Matter* **2006**, *18*, 2285–2297.
- (27) Sattig, M.; Vogel, M. Dynamic Crossovers and Stepwise Solidification of Confined Water: A  $^2\text{H}$  NMR Study. *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 174–178.
- (28) Sattig, M.; Reutter, S.; Fujara, F.; Werner, M.; Buntkowsky, G.; Vogel, M. NMR studies on the temperature-dependent dynamics of confined water. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 19229–19240.
- (29) Rosenstihl, M.; Kämpf, K.; Klameth, F.; Sattig, M.; Vogel, M. Dynamics of interfacial water. *J. Non-Cryst. Solids* **2015**, *407*, 449–458.
- (30) Lederle, C.; Sattig, M.; Vogel, M. Effects of Partial Crystallization on the Dynamics of Water in Mesoporous Silica. *J. Phys. Chem. C* **2018**, *122*, 15427.
- (31) Demuth, D.; Sattig, M.; Steinrück, E.; Weigler, M.; Vogel, M.  $^2\text{H}$  NMR studies on the dynamics of pure and mixed hydrogen-bonded liquids in confinement. *Z. Phys. Chem.* **2018**, *232*, 1059–1087.
- (32) Caro, J.; Hocevar, S.; Kärger, J.; Riekert, L. Intracrystalline self-diffusion of  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{CH}_4$  in ZSM-5 zeolites. *Zeolites* **1986**, *6*, 213–216.
- (33) Schmidt-Rohr, K.; Spiess, H. W. *Multidimensional Solid-State NMR and Polymers*; Academic Press, 1994.
- (34) Böhmer, R.; Diezemann, G.; Hinze, G.; Rössler, E. Dynamics of Supercooled Liquids and Glassy Solids. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2001**, *39*, 191–267.
- (35) Bloembergen, N.; Purcell, E. M.; Pound, R. V. Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption. *Phys. Rev.* **1948**, *73*, 679–712.
- (36) Sjöström, J.; Swenson, J.; Bergman, R.; Kittaka, S. Investigating Hydration Dependence of Dynamics of Confined Water: Monolayer, Hydration Water and Maxwell-Wagner Processes. *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, No. 154503.
- (37) Lusceac, S. A.; Vogel, M.  $^2\text{H}$  NMR Study of the Water Dynamics in Hydrated Myoglobin. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 10209–10216.
- (38) Herbers, C. R.; Sauer, D.; Vogel, M.  $^2\text{H}$  NMR studies of glycerol dynamics in protein matrices. *J. Chem. Phys.* **2012**, *136*, No. 124511.
- (39) Grünberg, B.; Emmeler, T.; Gedat, E.; Shenderovich, I.; Findenegg, G. H.; Limbach, H.-H.; Buntkowsky, G. Hydrogen Bonding of Water Confined in Mesoporous Silica MCM-41 and SBA-15 Studied by  $^1\text{H}$  Solid-State NMR. *Chem. - Eur. J.* **2004**, *10*, 5689–5696.
- (40) Stallmach, F.; Kärger, J.; Krause, C.; Jeschke, M.; Oberhagemann, U. Evidence of Anisotropic Self-Diffusion of Guest Molecules in Nanoporous Materials of MCM-41 Type. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9237–9242.
- (41) Naumov, S.; Valiullin, R.; Kärger, J.; Pichumani, R.; Coppens, M.-O. Tracing Pore Connectivity and Architecture in Nanostructured Silica SBA-15. *Microporous Mesoporous Mater.* **2008**, *110*, 37–40.
- (42) Brunauer, S.; Emmett, P. H.; Teller, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 309–319.
- (43) Barrett, E. P.; Joyner, L. G.; Halenda, P. P. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 373–380.
- (44) Horváth, G.; Kawazoe, K. Method for the calculation of effective pore size distribution in molecular sieve carbon. *J. Chem. Eng. Jpn.* **1983**, *16*, 470–475.
- (45) Saito, A.; Foley, H. C. Argon porosimetry of selected molecular sieves: experiments and examination of the adapted Horvath-Kawazoe model. *Microporous Mater.* **1995**, *3*, 531–542.
- (46) Morishige, K.; Kawano, K. Freezing and melting of water in a single cylindrical pore: The pore size dependence of freezing and melting behavior. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 4867–4872.
- (47) Brodrecht, M.; Klotz, E.; Lederle, C.; Breitzke, H.; Stühn, B.; Vogel, M.; Buntkowsky, G. A Combined Solid-State NMR, Dielectric Spectroscopy and Calorimetric Study of Water in Lowly Hydrated MCM-41 Samples. *Z. Phys. Chem.* **2018**, *232*, 1003–1015.
- (48) Oguni, M.; Kanke, Y.; Nagoe, A.; Namba, S. Calorimetric Study of Water's Glass Transition in Nanoscale Confinement, Suggesting a Value of 210 K for Bulk Water. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 14023–14029.
- (49) Kittaka, S.; Takahara, S.; Matsumoto, H.; Wada, Y.; Satoh, T. J.; Yamaguchi, T. Low Temperature Phase Properties of Water Confined in Mesoporous Silica MCM-41: Thermodynamic and Neutron Scattering Study. *J. Chem. Phys.* **2013**, *138*, No. 204714.
- (50) Tombari, E.; Johari, G. P. On the State of Water in 2.4 nm Cylindrical Pores of MCM from Dynamic and Normal Specific Heat Studies. *J. Chem. Phys.* **2013**, *139*, No. 064507.
- (51) Geske, J.; Harrach, M.; Heckmann, L.; Horstmann, R.; Klameth, F.; Müller, N.; Pafong, E.; Wohlfromm, T.; Drossel, B.; Vogel, M. Molecular dynamics simulations of Water, Silica, and Aqueous Mixtures in Bulk and Confinement. *Z. Phys. Chem.* **2018**, *232*, 1187–1225.
- (52) Löw, F.; Amann-Winkel, K.; Loerting, T.; Fujara, F.; Geil, B. Ultra-slow dynamics in low density amorphous ice revealed by deuterium NMR: indication of a glass transition. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 9308–9314.
- (53) Qvist, J.; Mattea, C.; Sunde, F. P.; Halle, B. Rotational Dynamics in Supercooled Water from Nuclear Spin Relaxation and Molecular Simulations. *J. Chem. Phys.* **2012**, *136*, No. 204505.
- (54) Lemke, S.; Handle, P. H.; Plaga, L. J.; Stern, J. N.; Seidl, M.; Fuentes-Landete, V.; Amann-Winkel, K.; Köster, K. W.; Gainaru, C.; Loerting, T.; Böhmer, R. Relaxation dynamics and transformation kinetics of deeply supercooled water: Temperature, pressure, doping,

and proton deuterium isotope effects. *J. Chem. Phys.* **2017**, *147*, No. 034506.

(55) Elamin, K.; Jansson, H.; Kittaka, S.; Swenson, J. Different behavior of water in confined solution of high and low solute concentrations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 18437.

(56) Novikov, V. N.; Sokolov, A. P. Quantum Effects in Dynamics of Water and Other Liquids of Light Molecules. *Eur. Phys. J. E* **2017**, *40*, 57.

(57) Lusceac, S. A.; Gainaru, C.; Ratzke, D. A.; Graf, M. F.; Vogel, M. Secondary Water Relaxation in a Water/Dimethyl Sulfoxide Mixture Revealed by Deuteron Nuclear Magnetic Resonance and Dielectric Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 11588–11596.

(58) Gainaru, C.; Fillmer, A.; Böhm, R. Dielectric Response of Deeply Supercooled Hydration Water in the Connective Proteins Collagen and Elastin. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 12628–12631.

(59) Klameth, F.; Vogel, M. Structure and dynamics of supercooled water in neutral confinements. *J. Chem. Phys.* **2013**, *138*, No. 134503.

(60) Bagchi, B. Water Dynamics in the Hydration Layer around Proteins and Micelles. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 3197–3219.

(61) Ball, P. Water as an Active Constituent in Cell Biology. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 74–108.

---

## 7.2. Funktionalisierung poröser Silicamaterialien

Im folgenden Abschnitt wird die Funktionalisierung von Silicananoporen dargestellt. Hierbei geht es zunächst um die Linkeranbindung an die Oberfläche. In dieser Arbeit soll eine terminale Anbindung von Peptiden im Vordergrund stehen. Daher sind Linkersysteme, die eine Seitenketten-Kopplung am Peptid verwenden, ungeeignet. Dies schließt somit Anbindungen über Alkohole oder Thiole am Peptid aus. Weiterhin wird die Gruppe der Isocyanat- und Epoxidlinker ausgeschlossen, da sie zu viele Nebenreaktionen begünstigen. Um ein möglichst homogenes und gut definiertes Material zu erzeugen, fällt die Wahl folglich auf die Amin- und Carboxylinker. Beide Linker lassen sich sowohl mittels der *Grafting*-Methode als auch über die Co-Kondensationsroute an die Silicaoberfläche anbinden. Im Gegensatz zum Carboxylinker bietet der Aminolinker (APTES) den Vorteil, dass er häufiger in der Literatur beschrieben und untersucht wird. Damit stehen bei Verwendung des APTES-Linkers deutlich mehr Vorarbeiten zur Verfügung. Einige Routen und Anwendungen wurden dabei in folgendem Review vorgestellt.<sup>[195]</sup>

In ersten Versuchen konnten SBA-15 Materialien erfolgreich mit dem APTES-Linker modifiziert werden. Diese Materialien wurde anschließend im Rahmen der Forschergruppe FOR1583 von Kooperationspartnern aus der Gruppe von Prof. Dr. Michael Vogel mittels <sup>2</sup>H NMR-Messungen dynamischen Verhaltens von Wasser in den Poren untersucht.<sup>[196]</sup> Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde allerdings die Co-Kondensationsmethode zur Funktionalisierung der Porenoberflächen intensiver verfolgt, da diese deutlich homogenere Funktionalisierungen erzeugen kann. Um hierfür eine passende Syntheseroute zu etablieren, muss das im vorherigen Kapitel vorgestellte Reaktionssystem um einige Parameter erweitert werden. Während der Hydrolyse wird nicht nur der Silicapräkursor (TEOS), sondern auch der Linker (APTES) als weitere Komponente zugegeben. Somit existiert für dieses System eine weitere Zugaberate und Hydrolysezeit. Weiterhin spielt auch die Zeit zwischen Präkursor- und Linkerzugabe eine entscheidende Rolle. Der Präkursor wird stets vor dem Linker zugegeben, was dafür sorgt, dass die ersten Hydrolyseschritte ungehindert ablaufen können. Die Zeit zwischen den Zugaben muss allerdings für jeden Ansatz individuell bestimmt werden. Wird APTES zu früh zugegeben, kann es zu einem Kollaps der Mizellenstruktur kommen, was in einem amorphen Material resultiert. Erfolgt die Zugabe des Linkers zu spät, besetzt er nur die äußere Oberfläche und die Porengänge, was zu einer Verstopfung des Porensystems führt. Im Falle der Co-Kondensation spielt ebenso das Entfernen des Templates eine entscheidende Rolle. Da hier keine Calcination mehr durchgeführt werden kann, müssen extraktive Prozesse zur Entfernung des Templates verwendet werden. Somit kommt mit der Wahl des Extraktionsmittels ein weiterer Parameter hinzu.

---

Unter Berücksichtigung dieser Randbedingungen wurde eine optimierte Syntheseroute entwickelt, mit der es möglich war, sehr homogene, APTES-funktionalisierte SBA-15 Silicaporensysteme herzustellen. Diese wurden dann in Folgeschritten für die Peptidanbindungen verwendet (siehe Abschnitt 7.3)

---

### 7.3. Anbindung von Aminosäuren an poröse Silicamaterialien

In diesem Abschnitt wird die Anbindung von Aminosäuren an die durch Co-Kondensation erhaltenen APTES-funktionalisierten SBA-15 Silicaporensysteme beschrieben.

Der erste Schritt zur Entwicklung einer verlässlichen Anbindungsstrategie ist die Entscheidung über die Wahl der Kopplungsbedingungen zwischen Aminosäure und Oberfläche. Da ein APTES-funktionalisiertes SBA-15 als Grundlage dient, muss die Anbindung an den C-Terminus der Aminosäure erfolgen. Da im Rahmen der SPPS die Kopplungsvariante unter Verwendung von HATU und DIEA die beste Kopplungseffizienz liefert, wurde diese Variante auf die Funktionalisierung übertragen. Wie im Kapitel 5.1.1 (Kopplungsreagenzien) schon beleuchtet, spielt die Stöchiometrie zwischen Aminosäure und HATU eine entscheidende Rolle für die vollständige Umsetzung. Daher ist die Charakterisierung des APTES-funktionalisierten SBA-15 essenziell für den Syntheserfolg. Die Bestimmung der Aminfunktionalisierungsdichte erfolgt hierbei mittels EA und TGA. Die daraus bestimmte molare Beladung der Oberfläche dient zur Bestimmung der geeigneten Stöchiometrie der Reaktion. Weiterhin müssen, im Vergleich zur Reaktion in Lösung, andere Parameter, wie die Reaktionszeit, angepasst werden, um die langsame Diffusion in den Poren zu kompensieren.

Im zweiten Schritt muss der richtige Kopplungspartner für die Aminogruppe an der Oberfläche gefunden werden. Da eine normale Aminosäure sowohl eine Aminogruppe, als auch eine Carboxygruppe trägt, kommt es bei Peptidkopplungsbedingungen zur Reaktion der Aminosäuren in Lösung oder zur Mehrfachanbindung an einer APTES-Bindungsstelle. Somit sollte der N-Terminus der Aminosäure geschützt vorliegen, um eine homogene Anbindung zu gewährleisten. Die Analogie zur Vorgehensweise in der SPPS ist hier unverkennbar. Es wurde daher ein SPPS-ähnlicher Ansatz verfolgt und eine Fmoc-geschützte Aminosäure (Fmoc-Glycin) verwendet. Nach erfolgreicher Anbindung der Fmoc-Aminosäure konnte die Fmoc-Entschützung der Aminosäure an der Oberfläche durchgeführt werden, was in einer Dipeptid-funktionalisierten Oberfläche resultiert. Der Nachweis von Anbindung und Entschützung erfolgte mittels  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR.

Im nächsten Schritt stellte sich die Frage, ob auch eine zweite Anbindung möglich ist. Daher wurde eine weitere Aminosäure (Fmoc-Phenylalanin) angebunden und ebenso die zugehörige Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe durchgeführt. Für diesen Schritt wurde bewusst eine andere Aminosäure verwendet, um die Anbindung zweifelsfrei mittels  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR verfolgen zu können. Das Signal des Aromaten, in der Phenylalaninseitenkette, hebt sich deutlich von den Signalen des Glycins ab.

Weiterhin konnten Anbindungseffizienzen mittels EA und TGA bestimmt werden. Es wurde auch der Einfluss der Anbindung auf das Porensystem mittels BET untersucht. Somit konnte

---

eine SPPS-artige Synthese an den Poreinnenwänden des Silicamaterials durchgeführt werden und eine schrittweise Charakterisierung erfolgen. Die zugehörigen Ergebnisse können dem angehängten Manuskript entnommen werden.

Die Ergebnisse dieses Abschnittes sind veröffentlicht in *Chemistry – A European Journal*:

M. Brodrecht, H. Breitzke, T. Gutmann, G. Buntkowsky

Biofunctionalization of Nano Channels by Direct In-Pore Solid Phase Peptide Synthesis

*Chemistry – A European Journal* **2018**, *24*, 17814-17822.

"Reprinted with permission of John Wiley and Sons © **2018**". Die Electronic Supplementary Information ist nicht abgedruckt und ist in der elektronischen Version dieses Artikels (DOI: 10.1002/chem.201804065) abrufbar.



## Hybrid Materials

## Biofunctionalization of Nano Channels by Direct In-Pore Solid-Phase Peptide Synthesis

Martin Brodrecht, Hergen Breitzke, Torsten Gutmann, and Gerd Buntkowsky<sup>\*[a]</sup>

**Abstract:** Diatom biosilica are highly complex inorganic/organic hybrid materials. To get deeper insights on their structure at a molecular level, model systems that mimic the complex natural compounds were synthesized and characterized. A simple and efficient peptide immobilization strategy was developed, which uses a well-ordered porous silica material as a support and commercially available Fmoc-amino acids, similar to the known solid-phase peptide synthesis. As an example, Fmoc-glycine and Fmoc-phenylalanine are immobilized on the silica support. The success of functionalization was investigated by <sup>13</sup>C CP MAS and <sup>29</sup>Si CP MAS solid-state NMR. Thermogravimetric analysis (TGA) and elemental analysis (EA) were performed to quantify the functionalization. Changes of the specific surface area, pore

volume, and pore diameters in all modification steps were studied by Brunauer–Emmett–Teller based nitrogen adsorption–desorption measurements (BET). The combination of the analytical methods provided high grafting densities of  $2.1 \pm 0.2$  molecules/nm<sup>2</sup> on the surface. Furthermore, they allowed for monitoring chemical changes on the pore surface and changes of the pore properties of the material during the different functionalization steps. This universal approach is suitable for the selective synthesis of pores with tunable surface-peptide functionalization, with applications to the synthesis of a big variety of silica–peptide model systems, which in the future may lead to a deeper understanding of complex biological systems.

## Introduction

Biomineralization is a highly complex material-formation process occurring in nature. Different forms of this process are present everywhere in nature starting from bone materials to microalgae such as diatoms.<sup>[1]</sup> In particular, diatoms are of special interest since they have a broad spectrum of applications in nanotechnology and other fields of research.<sup>[2]</sup> However, understanding their structure property relationship is a challenge in analytical chemistry.<sup>[3]</sup> Here, solid-state NMR can provide important information on the structural composition of these organic/inorganic hybrids.<sup>[3a,4]</sup> Accordingly a number of studies focused on the understanding of natural diatoms by using solid-state NMR methods including DNP-assisted solid-state NMR.<sup>[4a,b,5]</sup> However, it is still hard to obtain detailed information on the structural composition of these materials due to their complexity and the low concentration of the organic compounds on the silica surface, which lead to overlapping of signals in solid-state NMR. In particular, the mainly peptide containing silaffins on the diatom surface have not been analyzed in detail.

Thus, there is a demand for well-defined model systems with high order and high degree of functionalization, to analyze the binding and interaction of amino acids and peptide structures with the inorganic matrix. A versatile synthesis procedure to obtain many different peptide-functionalized porous silica structures allows for the custom construction of a peptide/silica hybrid material fitting to many applications. This can either lead to a deeper understanding of biological hybrids, such as diatoms, and may also allow for the construction of unique synthetic hybrid materials usable in material and life science.<sup>[6]</sup> Starting from drug delivery systems to tissue engineering, modified porous silica materials close the gap between biology, inorganic chemistry and materials sciences.<sup>[6a,7]</sup>

Although many works focused on the synthesis of porous hybrid materials and their functionalization, there is still a need of an easy universal approach to synthesize such materials with a high density of functionalization and a well-defined structure with reproducible quality. Furthermore, the obtained structures must be well-characterized to validate the quality of the material. In the present paper we will present a synthesis strategy that allows the step by step functionalization of porous SBA-15 materials with amino acids, which enables a specific functionalization of the pores combined with a high grafting density. This is achieved by a solid phase peptide synthesis (SPPS)<sup>[8]</sup> strategy, which allows the use of simple ingredients and a well-known, straight forward synthesis strategy. It is shown that by adapting few synthesis parameters, such as for example, the reaction time to overcome the slow diffusion inside the pores, the SPPS can be efficiently performed inside

[a] M. Brodrecht, Dr. H. Breitzke, Dr. T. Gutmann, Prof. Dr. G. Buntkowsky  
TU Darmstadt; Eduard-Zintl-Institute for Inorganic and Physical Chemistry  
Alarich-Weiss-Straße 8, 64287 Darmstadt (Germany)  
E-mail: gerd.buntkowsky@chemie.tu-darmstadt.de

Supporting information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under:  
<https://doi.org/10.1002/chem.201804065>.

the porous confinement.<sup>[9]</sup> Furthermore, functionalization of the inner pore surface of MCM-41 or SBA-15 can lead to a specific tuning of their surface polarity.

In the past few years, many approaches in the synthesis of well-ordered porous silica supports have been developed. These combine highly ordered pores, and additionally a high degree of functionalization with different functional groups. The most common approaches are the post grafting of linker molecules to the surface, and the co-condensation approach, which incorporates the linker directly in the synthesis of the silica network.<sup>[10]</sup> Post grafting requires an additional synthesis step, and in many cases cannot reach the grafting density of the co-condensation strategy. Furthermore, post grafting suffers from the restricted accessibility of the inner pore surface, due to mass transport limitation of the reactants in the pores and pore blockings.<sup>[10d,11]</sup> In contrary, co-condensation approaches offer the possibility of high grafting densities. However, they are more difficult to handle since not all linker systems are compatible with a co-condensation synthesis. Generally, homo-condensation between the linker molecules is preferred over condensation of the linker molecules resulting to an incorporation onto the surface silica. Wrong timings and ratios during synthesis can lead to disordered and unstable pore systems.<sup>[10d,11]</sup>

The immobilized linker provides the anchor point for further functionalization. Concerning further surface modification there are several approaches including various coupling groups. One of the most popular strategies is the click chemistry reaction which allows the coupling of an azide group with a propargyl group. This selective reaction produces high yields but requires copper as a catalyst and is restricted to non-common functional groups.<sup>[12]</sup> In peptide synthesis and bio-functionalization, usually coupling of NH<sub>2</sub> and COOH groups, which form peptide bonds, are of interest. These reactions require an activation of the acid group via an activated ester. This activation includes the reaction with reagents such as acyl chloride or carbodiimide (see for example ref. [13]) and classical peptide coupling compounds such as 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate (HATU) or 3-[Bis(dimethylamino)methylumyl]-3*H*-benzotriazol-1-oxide hexafluorophosphate (HBTU).<sup>[14]</sup>

Coupling of an amino acid to the surface requires a coupling partner for the COOH or the NH<sub>2</sub> group of the amino acid. Therefore, a COOH or NH<sub>2</sub> functionalized surface is typically used. Irrespective of the choice of the surface functional group, one of the functional groups (COOH or NH<sub>2</sub>), of the amino acids, has to be protected during the reaction with the surface, otherwise multiple coupling or a reaction between the amino acids will occur. In our case the Fmoc protection group is used to cap the NH<sub>2</sub> group of the amino acid, which is not cleaved while coupling, but still can be cleaved under mild conditions if desired. This allows us to use commercially available Fmoc-protected amino acids for the synthesis.

The N-terminal Fmoc group can be cleaved after the amino acid has been bound to the silica support. This makes it feasible to couple a second amino acid to the NH<sub>2</sub> group of the first amino acid. For coupling, the well-known HATU/HBTU

coupling agents are used. The reaction is well established in solid-state peptide synthesis, which makes it very attractive for our approach.<sup>[8a,9a]</sup>

The present work aims to present a powerful toolkit for the functionalization of silica nanopores. This approach allows the coupling of amino acids covalently to the pore walls and the manufacturing of peptide-functionalized surfaces in a well-defined order together with a high degree of functionalization. As a support, amino-functionalized mesoporous SBA-15 is used. The desired peptide sequence is obtained by a step by step coupling process of every single amino acid after another, carried out with commercially available Fmoc-protected amino acids (in our case Fmoc-glycine and Fmoc-phenylalanine). Coupling is achieved by reaction of the C-terminus of the amino acid and the NH<sub>2</sub> group present on the surface. To guarantee a well-defined peptide sequence (avoid multiple coupling), Fmoc-protected amino acids are used and deprotected after every coupling step. Each reaction step is monitored by <sup>13</sup>C solid-state NMR spectroscopy, and quantified by thermogravimetric analysis (TGA) and elemental analysis (EA). The specific surface area and pore size distribution of the materials are investigated by N<sub>2</sub> adsorption-desorption techniques.

## Experimental Section

### Synthesis

**General.** Chemicals were purchased from Acros, Sigma-Aldrich, Carl Roth, ABCR and Iris Biochem. Chemicals were used without further purification unless explicitly mentioned.

**Synthesis of functionalized SBA-15 porous silica.** Amino-functionalized SBA-15 was synthesized by an optimized protocol based on a method of Wang et al.<sup>[15]</sup> and Zeidan et al.<sup>[10c]</sup> In a typical procedure, 7.10 g (0.017 equiv) Pluronic P123 was dissolved in 191.2 mL (165.0 equiv) of deionized water and 36.0 mL (6.0 equiv) of 37w% HCl was added, which results in a HCl concentration of 1.9 mol L<sup>-1</sup>. The solution was heated to 40 °C and 12.0 g (0.8 equiv) of tetraethyl orthosilicate (TEOS) was added slowly while stirring. Stirring was continued for 1 h which results in a white precipitate. After this prehydrolysis step, 3.19 g (0.2 equiv) of (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) was added. The suspension was stirred for 24 h at 40 °C and then transferred into a polypropylene (PP) bottle. The bottle was stored under static conditions at 100 °C for 48 h. The white precipitate was filtered off and washed two times with deionized water, ethanol and acetone. The product was dried in an oven at 90 °C over night. The leftover template was removed by Soxhlet extraction with ethanol for 48 h. The product was dried under high vacuum yielding 3.19 g of the functionalized SBA-15.

**Amino acid coupling and protection group cleavage.** Fmoc-glycine was coupled by activating its COOH group with 1-[bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate (HATU) and *N*-ethyl-*N*-(propan-2-yl)propan-2-amine (DIEA). 1.61 g (1.0 equiv) of Fmoc-glycine and 2.07 g (0.98 equiv) of HATU were dissolved in 18 mL of dry DMF. The solution was activated by adding 0.81 g (6.0 equiv) of DIEA and by shaking it for 2 min. 400 mg of dried amino-functionalized SBA-15 was added to the activated amino acid solution. The suspension has been shaken at 1000 rpm at RT for 16 h. The solid was filtered off and washed two times with each DMF, deionized water and acetone. The functionalized SBA-15 was dried under reduced pres-

sure at room temperature, which resulted in 475 mg colorless solid. Fmoc deprotection followed an adapted procedure which is generally used in solid-phase peptide synthesis.<sup>[8a,9a]</sup> 390 mg of the Fmoc-glycine functionalized SBA-15 was suspended in 15 mL of a 20 vol.-% piperidine solution in DMF. The suspension has been shaken at 1000 rpm at RT for 16 h. The solid was filtered off and washed two times with each DMF, deionized water and acetone. The glycine-functionalized SBA-15 was dried under reduced pressure at RT, which resulted in 321 mg colorless solid.

Phenylalanine coupling followed the same procedure used for the glycine coupling. 1.10 g (1.0 equiv) of Fmoc-phenylalanine, 1.06 g (0.98 equiv) HATU and 0.43 g (6.0 equiv) DIEA in 9.5 mL dry DMF were used to functionalize 210 mg of glycine-functionalized SBA-15. This results in 230 mg colorless solid. Phenylalanine deprotection followed the same procedure used for Fmoc-glycine functionalized SBA-15 yielding 143 mg phenylalanine-glycine-functionalized SBA-15.

### Characterization

**Solid-state NMR.** <sup>13</sup>C-CP-MAS and <sup>29</sup>Si CP-MAS solid-state NMR measurements were carried out at room temperature on a Bruker AVANCE II+ 400 spectrometer corresponding to a frequency of 400.13 MHz for <sup>1</sup>H, 100.62 MHz for <sup>13</sup>C, and 79.48 MHz for <sup>29</sup>Si employing a Bruker 4 mm double resonance probe. Spectra were recorded with a contact time of 1.5 ms for <sup>13</sup>C and 6.5 ms for <sup>29</sup>Si employing a recycle delay of 2 s. Protons were decoupled during data acquisition employing the tppm 15 decoupling sequence.<sup>[16]</sup> Referencing was performed with respect to TMS (0 ppm) employing adamantane (−38.5 ppm) and kaolin (−92.5 ppm) as external standards for <sup>13</sup>C and <sup>29</sup>Si, respectively.

**Thermogravimetric analysis (TGA).** Thermogravimetric analysis (TGA) was performed by a TGA/SDTA851e from Mettler Toledo. Synthetic air was used as purge gas. The heating/cooling rates in all experiments were set to 10 K min<sup>−1</sup> for all non-isothermal steps. To dry the samples, they were heated to 100 °C and held at 100 °C for 60 min. For organic decomposition the samples were heated to 550 °C and held at this temperature for another 80 min to guarantee total decomposition.

**Elemental analysis (EA).** Elemental analysis was performed with a VarioEL III CHN from Elementar. 2–3 mg of the samples were combusted under O<sub>2</sub> atmosphere. This results in the formation of CO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>, H<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O. The NO<sub>x</sub> compounds were reduced to N<sub>2</sub> using elemental copper. The gases were separated by gas chromatography and detected quantitatively by a thermal conductivity detector (TCD). Acetanilide was used for calibration.

**Brunauer–Emmett–Teller (BET).** The porosity and specific surfaces area of the materials were characterized by nitrogen adsorption at 77 K, employing a Thermo Fisher Scientific Surfer BET analyzer using N<sub>2</sub> gas as adsorbent. The specific surface was obtained by the Brunauer Emmett Teller (BET) method analyzing the curve in the  $p/p^0$  range between 0.03 and 0.3. The pore volume was obtained by the Gurvich method and the  $p/p^0$  value at 0.95 was used. Pore size distributions were obtained by applying the Barrett–Joyner–Halenda (BJH) method analyzing the adsorption-desorption isotherms in the  $p/p^0$  range between 0.3 and 0.95.

**Scanning electron microscopy (SEM).** For Scanning electron microscopy (SEM) a FEI/Philips XL30 FEG with accelerating voltages between 5 and 30 kV was used. The SEM samples were coated with gold for 100 s at 30 mA using a Quorum Q300T D sputter coater.

## Results and Discussion

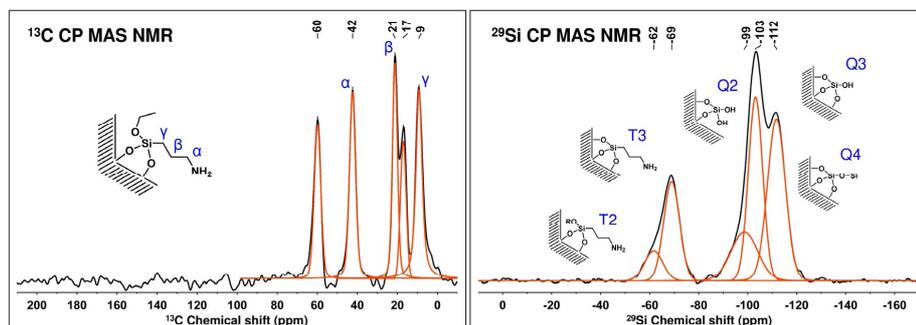
### Optimizing the co-condensation approach

To obtain the highest degree of structural order and amount of functionalization we optimized the synthesis procedure described in ref.<sup>[10c]</sup> Essential for the preparation of high quality materials is the equilibration time for micelle formation because it is directly associated to the structural order of the porous system. Furthermore, the hydrolysis time of the TEOS precursor has to be chosen long enough to generate a stable network for linker incorporation. Therefore, both the equilibration time and prehydrolysis time have been stepwise increased in our batches to obtain the desired results. Since the purification step after co-condensation cannot be performed by calcination, due to possible decomposition of the organic linkers upon heat treatment, extraction has to be used. Compared to thermal treatment which guarantees full condensation of all linker residues, this is not the case for purification via extraction methods. Therefore, some ethoxy species may remain on the surface. Since these do not interfere with our reaction, and in most cases, have already condensed or react in the following synthesis steps, their appearance does not significantly disturb the quality of the final material.

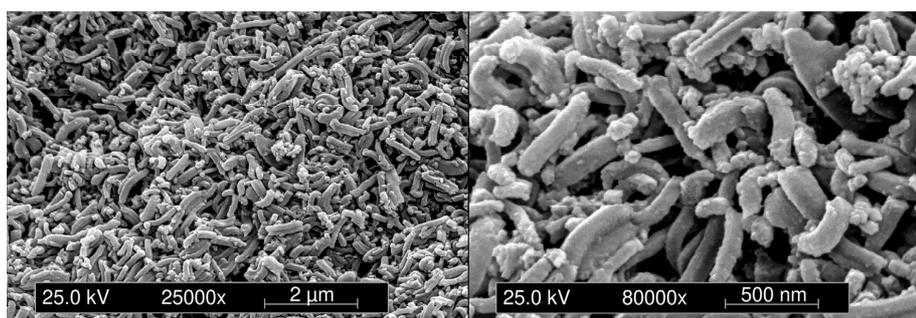
### Characterization of the mesoporous support material

To investigate the chemical composition of the amino-functionalized SBA-15 support material <sup>13</sup>C and <sup>29</sup>Si CP MAS solid-state NMR spectra were recorded (Figure 1). Looking at the <sup>13</sup>C CP MAS spectrum the signals at 9, 21 and 42 ppm are assigned to the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  carbon atoms of the APTES-linker. The additional signals at 17 and 60 ppm are assigned to not fully hydrolyzed ethoxy-groups of either APTES or TEOS. The <sup>29</sup>Si CP MAS spectrum shows signals between −112 and −98 ppm, which are assigned to Q-groups of the bulk silica material and signals between −69 and −61 ppm, attributed to T-groups that represent the covalent binding of linker groups on the silica surface.<sup>[6b,17]</sup> Deeper analysis of the T-groups clearly enables the distinguishing between T<sub>3</sub>-groups and T<sub>2</sub>-groups. The remaining O-R in the case of T<sub>2</sub> groups refers to a free binding site of the linker molecule, where R stands for H or Et. In our case signals of Et-O- groups are occurring in the <sup>13</sup>C CP MAS spectrum, which suggests that the T<sub>2</sub>-groups contain Si-O-Et groups that are not hydrolyzed.

The morphology and microscopic structure of the functionalized SBA-15 was studied by SEM (Figure 2). The SEM images show a worm-like structure. An average length of the particles of 757 nm ± 139 nm and a diameter of 145 nm ± 33 nm is obtained, which results in an aspect ratio of 5 ± 2. Combining this with the results of our BET measurements, the channel length of 757 nm ± 139 nm and the channel diameter of 5.9 nm ± 0.3 nm results in an aspect ratio of 128 ± 30.



**Figure 1.** Left panel:  $^{13}\text{C}$  CP MAS spectrum of the synthesized amino-functionalized SBA-15 at 8 kHz. Right panel:  $^{29}\text{Si}$  CP MAS spectrum of the synthesized amino-functionalized SBA-15 at 5 kHz spinning and assignments of T- and Q-groups. The corresponding deconvolution of the spectra is shown in orange.



**Figure 2.** SEM images of the amino-functionalized SBA-15. The scale bar corresponds to 2  $\mu\text{m}$  (left) and 500 nm (right).

#### Optimizing coupling conditions for pore functionalization

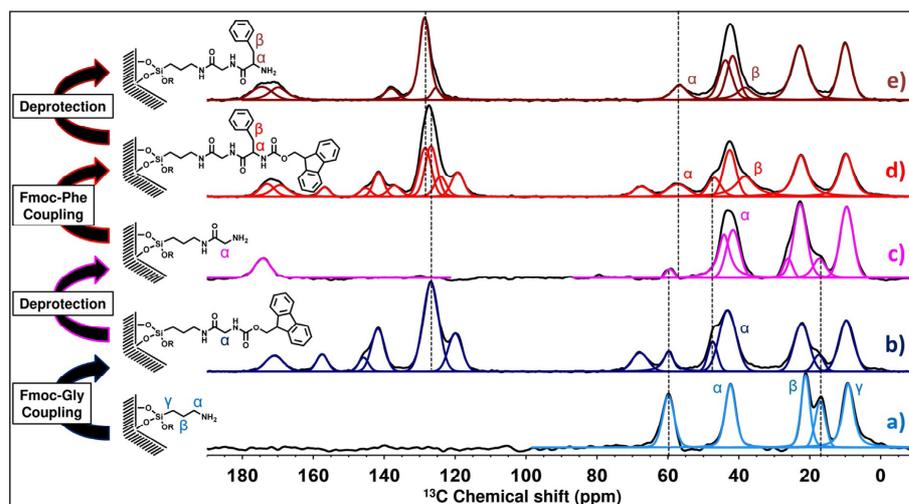
The coupling of  $\text{NH}_2$  and  $\text{COOH}$  functional groups with HATU is commonly used in solution and also there are established protocols for the usage in solid phase peptide synthesis.<sup>[8a,9]</sup> However, such reaction with a solid phase like a polymer resin is not feasible for our pore functionalization approach. Polymer resins are engineered to swell which provides high amount of accessibility for the coupling. In contrary, the porous SBA material used in our approach is not capable of swelling. Therefore, diffusion inside the pores becomes the limiting factor for an efficient functionalization. To overcome this issue, the reaction time was drastically increased. Additionally, the amino acids were preactivated with HATU before adding them to the silica support to allow a direct reaction with the functionalized pore surface. Another challenge is the mechanical stress the fragile pore structure is exposed to during the reaction. To minimize the damage of pores, the suspension was only shaken gently instead of stirring it with a stir bar.

#### Proof of functionalization by solid-state NMR

To monitor the success of each modification step,  $^{13}\text{C}$  CP MAS spectra were recorded (Figure 3). The first coupling step is per-

formed with Fmoc-glycine (Figure 3b) followed by the Fmoc-deprotection (Figure 3c). After this coupling, in the aliphatic region at 10, 22 and 43 ppm the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  carbon atoms of the APTES-linker are still obtained, which suggests that the linker is attached to the surface. The newly introduced  $\alpha$  carbon of the glycine is visible in the spectrum (Figure 3b) at around 43–44 ppm and overlapping with the  $\alpha$  carbon of the APTES linker. Most importantly, a signal at 171.0 ppm appears, which is clearly assigned to the newly formed carbonyl carbon of the amide bond. This strongly indicates the covalent binding of the amino acid to the surface. The signal at 158 ppm is characteristic for the carbamate carbon of the Fmoc group. The signals between 141 and 145 ppm are assigned to the quaternary aromatic carbon atoms. The remaining signals located between 120 and 127 ppm correspond to the non-quaternary aromatic carbon atoms of the Fmoc group. The residual signals at 68 and 47 ppm belong to the two carbon atoms connecting the aromatic carbon atoms and the carbamate group of the Fmoc group. Additionally, peaks at 18 and 60 ppm are present, which are assigned to some remaining ethoxy-groups.

After the Fmoc-deprotection (Figure 3c), all aromatic signals between 120 and 145 ppm have vanished. Additionally, the



**Figure 3.** Comparison of the  $^{13}\text{C}$  CP MAS spectra of the functionalized SBA-15 at 12 kHz (8 kHz for a) spinning. From bottom to the top spectra of the APTES functionalized SBA-15 (a), Fmoc-glycine functionalized species (b), glycine functionalized species (c), Fmoc-phenylalanine-glycine functionalized species (d), phenylalanine-glycine functionalized species (e).

signal of the carbamate carbon at 158 ppm, as well as the two aliphatic carbon atoms of the protection group at 68 and 47 ppm have disappeared. The small signals at 60 and 18 ppm are still present in the spectrum, which most probably refers to residual ethoxy-groups of the linker. The disappearance of the signals of the Fmoc group clearly proves the successful and full conversion in the deprotection step. Furthermore, the peak of the carbonyl carbon of the amid bond shifts to a lower field (174 ppm). This is caused by the change in the chemical environment of the amide carbon, due to removal of the Fmoc group. At 43–44 ppm two overlapping signals appeared, which correspond to the earlier mentioned  $\alpha$  carbon atoms of the introduced glycine and the APTES linker. After deprotection the two signals can be distinguished due to the removal of the  $\text{CH}_2$  group of the Fmoc group at 47 ppm and a small chemical shift change for the  $\alpha$  carbon of the glycine. All signals of the APTES linker are still present in the spectrum, which clearly demonstrates that a complete deprotection can be achieved on the surface without affecting the surface attached linker groups. Finally, the comparison of the  $^{29}\text{Si}$  CP MAS spectra obtained in the different synthesis steps (Figure S1 in the Supporting Information) clearly illustrate that the T-groups are preserved and thus the stability of the bound linker molecules.

The second coupling step is performed with Fmoc-phenylalanine followed by Fmoc-deprotection. The  $^{13}\text{C}$  CP MAS spectra of the second amino acid coupling is shown in Figure 3d. Fmoc-phenylalanine coupling adds signals to the spectrum at 157 ppm; 119–141 ppm; 47 and 68 ppm, which are characteristic for carbamate, aromatic and the aliphatic carbon atoms of the Fmoc-group. More importantly, the coupling results in a second signal between 169 and 173 ppm which refers to the

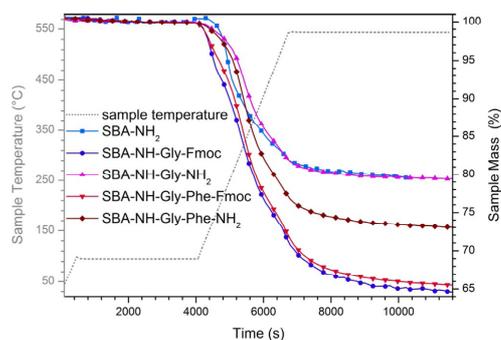
still present APTES-glycine amide bond, and the newly formed glycine-phenylalanine amide bond. Two additional signals are obtained at 38 and 57 ppm. These are characteristic for  $\alpha$  and  $\beta$  carbon atoms of the phenylalanine. Furthermore, additional signals are visible at 137 ppm that are attributed to the  $\gamma$  carbon of the phenylalanine side chain. The rest of the aromatic side chain carbon atoms overlap with the aromatic carbon atoms between 119 and 129 ppm.

After removing the Fmoc group, the characteristic  $^{13}\text{C}$  signals of Fmoc at 157 ppm; 119–141 ppm; 47 and 68 ppm (Figure 3e) disappeared, indicating the full removal of the protection group. The signals at 38 and 57 ppm are preserved, which correspond to the  $\alpha$  and  $\beta$  carbon atoms of the phenylalanine. Signals at 125–128 and 137 ppm are attributed to the aromatic carbon atoms of the phenylalanine. After complete removal of the Fmoc group, the aromatic carbon atoms of the phenylalanine (125–128 ppm) are distinguishable from the aromatic carbon atoms of the Fmoc group (120–127 ppm). Finally, the second signal of the amide bond is preserved after cleaving the protection group, which demonstrates that the second amino acid has been successfully attached to the surface via the previously attached glycine.

#### Quantifying functionalization by thermogravimetric analysis elemental analysis

Since CP MAS NMR experiments do not deliver quantitative information on the surface functionalization, thermogravimetric analysis (TGA) and elemental analysis (EA) are applied to obtain specific information on the composition and quantity of the organic components of the material. The TGA curves of

the materials obtained in the different synthesis steps show a loss of mass during heating up to 550 °C under air (Figure 4). The temperature and the oxygen atmosphere guarantee a complete decomposition of the organic components of the hybrid material, while SiO<sub>2</sub> is stable under this condition. Thus, the mass loss is equivalent to the amount of organic compounds in the sample.<sup>[10b]</sup>



**Figure 4.** TGA comparison between all synthesis steps of the amino-functionalized SBA-15 (right axis; solid line). Temperature profile for the measurement on the left axis (dashed line).

However, an exact quantification of the functionalization is challenging due to the existence of residual ethoxy-groups and Si–OH groups, which are also removed by heating the sample.<sup>[20]</sup> Therefore, the remaining mass after heating represents only the SiO<sub>2</sub> matrix of the material. The mass of the decomposed fraction consists of the linker (–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), the residual ethoxy-groups (–O–CH<sub>2</sub>–CH<sub>3</sub>) and the –OH groups of the surface silanol groups.

After the first synthesis step an increase of the organic content from 20.5% to over 35% is clearly visible. This indicates the successful reaction of the SBA-NH<sub>2</sub> materials with Fmoc-glycine. Cleaving the Fmoc-group results in a decrease of the organic content close to the initial state of around 20.5%. This change is representative for the successful deprotection step, and underlines the results from <sup>13</sup>C CP MAS spectra that all aromatics are removed by cleaving the Fmoc-group. It is notable that there is nearly no difference in the organic content between the initial state (SBA-NH<sub>2</sub>) and the glycine functionalized material after the deprotection step (SBA-Gly-NH<sub>2</sub>). This can be

understood as follows. Hydrolysis cleaves most of the surface ethoxy-groups during Fmoc-glycine binding and Fmoc deprotection. Therefore, the organic content is decreased by the removal of surface ethoxy-groups but increased by the newly introduced glycine. This creates a small offset in the organic content as illustrated in the TGA that shows a slightly lower organic content for the following synthesis steps. Finally, the organic content increases after Fmoc-phenylalanine coupling (SBA-Gly-Phe-Fmoc) and again decreases after Fmoc-deprotection (SBA-Gly-Phe-NH<sub>2</sub>). In both cases the organic content is considerably higher than in the initial state.

To further confirm the success of the reaction, and to take a closer look at the composition of the organic part, elemental analysis (EA) was performed. This method delivers the mass fraction of hydrogen (H), carbon (C) and nitrogen (N) in the whole sample (Table 1). Since only these three elements are detected the missing percentages can be assigned to silicon (Si) and oxygen (O).

Combined with the results from the TGA measurements, this allows us a deeper analysis of the composition of the organic component. The residual mass obtained from TGA and the mass fraction obtained for Si + O, by elemental analysis, are in good agreement. The value obtained by TGA, however, is lower, an effect which may be explained by thermal dehydration of the surface. Information about the chemical composition is obtained from the nitrogen content of the samples. The molar nitrogen and carbon loading per gram of sample are displayed in Table 2.

**Table 2.** Molar nitrogen and carbon content of the samples obtained by elemental analysis.

Sample	Nitrogen content [mmol g <sup>-1</sup> ]	Carbon content [mmol g <sup>-1</sup> ]
SBA-NH <sub>2</sub>	1.8 ± 0.2	8.7 ± 0.0
SBA-NH-Gly-Fmoc	2.9 ± 0.2	20.9 ± 0.5
SBA-NH-Gly-NH <sub>2</sub>	3.0 ± 0.1	10.2 ± 0.5
SBA-NH-Gly-Phe-Fmoc	3.5 ± 0.3	19.7 ± 0.3
SBA-NH-Gly-Phe-NH <sub>2</sub>	3.2 ± 0.1	14.4 ± 0.3

Following the nitrogen content for the first synthesis step, an increase is obtained by coupling Fmoc-glycine to the APTES linker. Since the nitrogen content increases significantly it can be assumed that the majority of the NH<sub>2</sub> groups reacted with the amino acid, although the coupling inside of pores is steri-

**Table 1.** Weight fractions of the samples obtained by elemental analysis and thermogravimetric analysis.

Sample	N content (EA) [wt %]	C content (EA) [wt %]	H content (EA) [wt %]	Si + O content (EA) [wt %]	SiO <sub>2</sub> content (TGA) [wt %]
SBA-NH <sub>2</sub>	2.6 ± 0.2	10.4 ± 0.0	3.3 ± 0.1	83.6 ± 0.1	79.4 ± 1.0
SBA-NH-Gly-Fmoc	4.1 ± 0.3	25.1 ± 0.6	3.4 ± 0.1	67.4 ± 0.9	64.7 ± 1.0
SBA-NH-Gly-NH <sub>2</sub>	4.1 ± 0.2	12.3 ± 0.5	3.1 ± 0.6	80.5 ± 0.6	79.5 ± 0.5
SBA-NH-Gly-Phe-Fmoc	4.7 ± 0.4	23.5 ± 0.4	3.4 ± 0.2	68.4 ± 0.9	65.5 ± 1.0
SBA-NH-Gly-Phe-NH <sub>2</sub>	4.3 ± 0.2	17.2 ± 1.0	3.3 ± 0.1	75.1 ± 1.1	73.2 ± 0.7

cally demanding. Cleaving the Fmoc-group does not change the nitrogen content, which confirms the stability of the coupled glycine in the deprotection step. Coupling Fmoc-phenylalanine increases the nitrogen content again, which indicates the success of the second coupling step. Since Fmoc-phenylalanine is bigger than Fmoc-glycine, the coupling efficiency is lower compared to the first coupling step. After deprotection, the nitrogen content stays the same within the error margin which proves the stability of the phenylalanine bonding. The carbon content of the sample increases significantly for each Fmoc-amino acid coupling step, and decreases for each deprotection step, since the carbon content is mostly influenced by the Fmoc group (15 carbon atoms) compared to the only two carbon atoms of the glycine and the nine carbon atoms of the phenylalanine. Finally, the overall carbon content increases after all steps of functionalization, since the organic content of the sample increases.

#### Evaluating pore modifications by nitrogen adsorption

The pore structure of the as-synthesized amino-functionalized SBA-15 was investigated by nitrogen adsorption. The adsorption-desorption isotherm show a type IV isotherm (Figure 5),

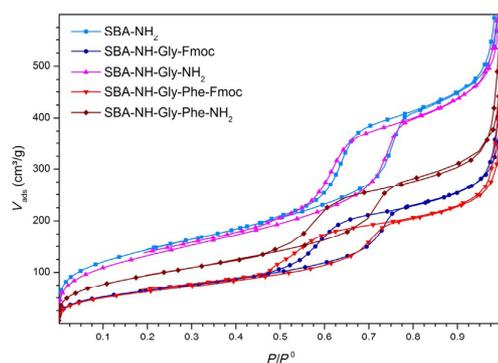


Figure 5. N<sub>2</sub> adsorption-desorption isotherms of the functionalized SBA-15 for each amino acid coupling and deprotection step.

which is characteristic for mesoporous materials with an open pore structure.<sup>[18]</sup> The symmetric hysteresis at 0.6–0.7  $p/p^0$  indicates a narrow pore size distribution.<sup>[19]</sup> The specific surface area was analyzed by the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method and was found to be  $527 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ,<sup>[18b]</sup> and the pore volume (Gurvich) was determined as  $0.74 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ .<sup>[19]</sup> Pore size distributions were obtained by applying the Barrett Joyner Halenda (BJH) method. This distribution shows a maximum at a diameter of 5.8 nm. The N<sub>2</sub> adsorption-desorption isotherms of the materials obtained in the different synthesis steps are also shown in Figure 5. The symmetrical hysteresis is preserved in all reaction steps, which shows the high stability of the pore structure. Furthermore, the chemical modification of the pores

Table 3. Pore volume (Gurvich at  $p/p^0$  0.95) specific surface area (BET) and median pore diameter (BJH) for each synthesis step.

Sample	Pore volume [ $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$ ]	Surface Area [ $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$ ]	Median pore diameter [nm]
SBA-NH <sub>2</sub>	$0.74 \pm 0.02$	$527 \pm 16$	$5.9 \pm 0.2$
SBA-NH-Gly-Fmoc	$0.43 \pm 0.01$	$242 \pm 7$	$5.3 \pm 0.3$
SBA-NH-Gly-NH <sub>2</sub>	$0.72 \pm 0.02$	$488 \pm 15$	$5.6 \pm 0.2$
SBA-NH-Gly-Phe-Fmoc	$0.38 \pm 0.01$	$234 \pm 7$	$4.8 \pm 0.5$
SBA-NH-Gly-Phe-NH <sub>2</sub>	$0.52 \pm 0.02$	$349 \pm 10$	$5.1 \pm 0.3$

results in a change of the specific surface area and pore size of the material, as illustrated by the values in Table 3.

After the Fmoc-glycine coupling in the first synthesis step, the pore volume and surface area decrease significantly. The following deprotection enlarges the pore volume and surface area again. This observation excludes any kind of irreversible damage of the pore system. Thus, it can be concluded that the decrease of volume and surface area in the first coupling step originates from the introduction of the sterically demanding Fmoc amino acid. The grafted glycine after deprotection has no consequently a reduced influence on the surface area, pore size and pore volume of the material due to its small size. Similar observations are found for the Fmoc-phenylalanine coupling and deprotection.

Based on the BJH method a median pore size distribution is obtained (Figure 6) for the functionalized SBA materials.<sup>[19]</sup> The raw material shows a pore size distribution centered at 5.9 nm

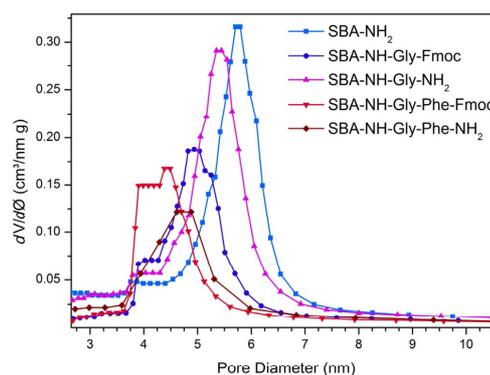


Figure 6. BJH curves of the functionalized SBA-15 for each amino acid coupling and deprotection step.

diameter. Functionalization results in a distribution of similar width centered at 5.3 nm. As observed for the other pore parameters the deprotection step increases the median pore size nearly to the initial value. We observe the same trend for the phenylalanine coupling and deprotection, whereby the absolute change in pore diameter is bigger after the reactions with the second amino acid. Again, this originates from the bulkiness of the phenylalanine.

Taking into account the obtained BET surface for the functionalized SBA-15 support of  $527 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , and the obtained loading of nitrogen by elemental analysis of  $1.84 \text{ mmol g}^{-1}$ , the grafting density can be calculated by

$$\text{Molecules/nm}^2 = \frac{\text{nitrogen loading [mol/g]}}{\text{specific surface area [m}^2\text{/g]}} \times N_a \quad (1)$$

This results in a nitrogen/linker density of  $3.5 \times 10^{-21} \pm 0.4 \times 10^{-21} \text{ mmol/nm}^2$  or  $2.1 \pm 0.2 \text{ molecules/nm}^2$ . Since on an area of one  $\text{nm}^2$  there are only  $2.5\text{--}5.0^{(21)}$  silanol groups available for reaction with a linker molecule, this clearly shows that almost half of all available silanol groups are covered by linker groups. Taking into account that the introduced linker is sterically more demanding than the surface silanol groups, this indicates that nearly the maximum possible grafting density is reached with our proposed synthetic approach.

## Summary and Conclusions

Highly ordered silica nanopores were synthesized and successfully functionalized with peptides by performing Fmoc solid-state peptide synthesis within the pores of a porous silica support. Amino functionalized silica nanopores with densely packed linker groups ( $2.1 \pm 0.2 \text{ molecules/nm}^2$ ) inside of the pore walls were obtained by co-condensation. Further modification with a dipeptide of glycine and phenylalanine, specifically in this order, was achieved using Fmoc protected amino acids, and deprotection of the N-terminus after each coupling step to avoid multiple coupling. The success of the functionalization of the SBA-15 was analyzed by  $^{29}\text{Si}$  and  $^{13}\text{C}$  solid-state NMR spectroscopy. Elemental analysis (EA) and thermogravimetric analysis (TGA) were used to quantify the functionalization in all modification steps. The combination of both methods suggests an increasing carbon and nitrogen content of the material during the peptide grafting process. Finally, the specific surface area, pore volume and pore diameters of the materials were obtained for the different synthesis steps by adsorption-desorption measurements. The detailed analysis of the data provides a clear correlation between pore size, pore volume and specific surface area and size of the introduced molecule.

This presented toolkit eases the manufacturing of synthetic organic/inorganic hybrid materials. Employing the pool of available amino acids, the synthesis of a variety of tunable peptide functionalized surfaces will be feasible. This experimental approach can be used in future to create simple model systems for a deeper understanding of biomineralization.

## Acknowledgements

Financial support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft in the framework of Forschergruppe FOR 1583 through grants Bu-911/18-1/2 is gratefully acknowledged. The authors further thank the project iNAPO by the Hessen State Ministry of Higher Education, Research and the Arts for financial support.

The authors thank Prof. Christian Hess and his group (Physical Chemistry Department, TU Darmstadt) for their analytical support (TGA).

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

**Keywords:** biomineralization · hybrid materials · mesoporous silica · solid-phase peptide synthesis · solid-state NMR

- a) A. S. Schenk, Y.-Y. Kim, *MRS Bull.* **2015**, *40*, 499; b) A. Akiva-Tal, S. Kababya, Y. S. Balazs, L. Glazer, A. Berman, A. Sagi, A. Schmidt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 14763.
- a) J. M. Galloway, J. P. Bramble, S. S. Staniland, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 8710; b) C. Jeffryes, S. N. Agathos, G. Rorrer, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *33*, 23; c) N. Kröger, E. Brunner, *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* **2014**, *6*, 615; d) I. E. Pamirsky, K. S. Golokhvast, *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 3155; e) J. Pires, A. C. Fernandes, R. Avo, *J. Mater. Sci.* **2014**, *49*, 6087; f) H. C. Schröder, X. H. Wang, W. Tremel, H. Ushijima, W. E. G. Müller, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 455.
- a) E. Brunner, K. Lutz, in *Handbook of Biomineralization* **2007**, (Ed.: E. Bäuerlein), Wiley-VCH, Weinheim, pp. 19–38; b) H. Ehrlich, E. Brunner, P. Simon, V. V. Bazhenov, J. P. Botting, K. R. Tabachnick, A. Springer, K. Kummer, D. V. Vyalikh, S. L. Molodtsov, D. Kurek, M. Kammer, R. Born, A. Kovalev, S. N. Gorb, P. G. Koutsoukos, A. Summers, *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21*, 3473; c) P. Richthammer, M. Börmel, E. Brunner, K. H. van Pée, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1362.
- a) Y. Geiger, H. E. Gottlieb, Ü. Akbey, H. Oschkinat, G. Goobes, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 5561; b) R. Gertman, I. Ben Shit, S. Kababya, A. Schmidt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13425; c) C. Gröger, K. Lutz, E. Brunner, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2009**, *54*, 54; d) R. Hedrich, S. Machill, E. Brunner, *Carbohydr. Res.* **2013**, *365*, 52.
- a) M. Ndao, G. Goobes, P. S. Emami, G. P. Drobny, *Langmuir* **2018**, *34*, 8678; b) A. Jantschke, E. Koers, D. Mance, M. Weingarth, E. Brunner, M. Baldus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 15069; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 15284; c) D. Wisser, S. I. Brückner, F. M. Wisser, G. Althoff-Ospelt, J. Getzschmann, S. Kaskel, E. Brunner, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2015**, *66–67*, 33; d) G. Goobes, *Isr. J. Chem.* **2014**, *54*, 113; e) I. Ben Shit, S. Kababya, T. Amitay-Rosen, Y. S. Balazs, A. Schmidt, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 5989.
- a) T. Gutmann, I. del Rosal, B. Chaudret, R. Poteau, H.-H. Limbach, G. Buntkowsky, *ChemPhysChem* **2013**, *14*, 3026; b) T. Gutmann, A. Grünberg, N. Rothermel, M. Werner, M. Srouf, S. Abdulhussain, S. Tan, Y. Xu, H. Breitzke, G. Buntkowsky, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2013**, *55–56*, 1; c) T. Gutmann, B. Walaszek, X. Yeping, M. Wächtler, I. del Rosal, A. Grünberg, R. Poteau, R. Axet, G. Lavigne, B. Chaudret, H.-H. Limbach, G. Buntkowsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11759; d) F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, M. Fröba, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3216; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3290; e) N. Nassif, J. Livage, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 849; f) M. Sarikaya, C. Tamerler, A. K. Y. Jen, K. Schulten, F. Baneyx, *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 577.
- a) C. Tamerler, M. Sarikaya, *Acta Biomater.* **2007**, *3*, 289; b) M. Mrksich, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 794; c) S.-f. Ye, M.-m. Tian, T. – x. Wang, L. Ren, D. Wang, L.-h. Shen, T. Shang, *Nanomedicine* **2012**, *8*, 833; d) L. Addadi, S. Weiner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1992**, *31*, 153; *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 159.
- a) R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149; b) J. C. Sheehan, D. A. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 158.
- a) A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557; b) E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606.
- a) E. Da'na, A. Sayari, *Chem. Eng. J.* **2011**, *166*, 445; b) A. Maria Chong, X. Zhao, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 12650; c) R. K. Zeidan, S. J. Hwang, M. E. Davis, *Angew. Chem.* **2006**, *45*, 6332; d) M. Colilla, I. Izquierdo-Barba, S. Sánchez-Salcedo, J. L. G. Fierro, J. L. Hueso, M. Vallet-Regí, *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 6459; e) S. Fiorilli, B. Onida, B. Bonelli, E. Garrone, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 16725; f) I. K. Mbaraka, D. R. Radu, V. S. Y. Lin.

- B. H. Shanks, *J. Catal.* **2003**, *219*, 329; g) X. Wang, S. Cheng, J. C. Chan, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 2156; h) J. Aguado, J. M. Arsuaga, A. Arencibia, *Microporous Mesoporous Mater.* **2008**, *109*, 513.
- [11] M. Brodrecht, B. Kumari, H. Breitzke, T. Gutmann, G. Buntkowsky, *Z. Phys. Chem.* **2018**, *232*, 1127.
- [12] a) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *40*, 2004; *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056; b) R. Ranjan, W. J. Brittain, *Macromolecules* **2007**, *40*, 6217; c) A. Schlossbauer, D. Schaffert, J. Kecht, E. Wagner, T. Bein, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12558.
- [13] M. Werner, A. Heil, N. Rothermel, H. Breitzke, P. B. Groszewicz, A. S. Thankamony, T. Gutmann, G. Buntkowsky, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2015**, *72*, 73.
- [14] a) M. A. Booth, K. Kannappan, A. Hosseini, A. Partridge, *Langmuir* **2015**, *31*, 8033; b) K. Jiang, L. S. Schadler, R. W. Siegel, X. Zhang, H. Zhang, M. Terrones, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 37; c) K. Khaldi, S. Sam, A. C. Gouget-Laemmel, C. Henry de Villeneuve, A. Moraillon, F. Ozanam, J. Yang, A. Kermad, N. Ghellai, N. Gabouze, *Langmuir* **2015**, *31*, 8421; d) S. Sam, L. Touahir, J. Salvador Andresa, P. Allongue, J. N. Chazalviel, A. C. Gouget-Laemmel, C. Henry de Villeneuve, A. Moraillon, F. Ozanam, N. Gabouze, S. Djebbar, *Langmuir* **2010**, *26*, 809; e) D. Sehgal, I. K. Vijay, *Anal. Biochem.* **1994**, *218*, 87.
- [15] X. Wang, K. S. K. Lin, J. C. C. Chan, S. Cheng, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 1763.
- [16] A. E. Bennett, C. M. Rienstra, M. Auger, K. V. Lakshmi, R. G. Griffin, *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 6951.
- [17] A. Grünberg, X. Yeping, H. Breitzke, G. Buntkowsky, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 6993.
- [18] a) S. Brunauer, P. H. Emmett, E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 309; b) K. S. W. Sing, D. H. Everett, R. A. W. Haul, L. Moscou, R. A. Pierotti, J. Rouquerol, T. Siemieniowska, in *Handbook of Heterogeneous Catalysis*, (Ed.: G. Ertl), Wiley-VCH, Weinheim, **1984**, pp. 427–582.
- [19] E. P. Barrett, L. G. Joyner, P. P. Halenda, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 373.
- [20] B. Grünberg, T. Emmler, E. Gedat, I. Shenderovich, G. H. Findenegg, H. H. Limbach, G. Buntkowsky, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5689.
- [21] a) T. Kimura, S. Saeki, Y. Sugahara, K. Kuroda, *Langmuir* **1999**, *15*, 2794; b) R. Palkovits, C.-M. Yang, S. Olejnik, F. Schüth, *J. Catal.* **2006**, *243*, 93; c) C.-m. Yang, M. Kalwei, F. Schüth, K.-j. Chao, *Appl. Catal. A* **2003**, *254*, 289; d) L. T. Zhuravlev, *Langmuir* **1987**, *3*, 316.

Manuscript received: August 8, 2018

Revised manuscript received: September 14, 2018

Accepted manuscript online: September 19, 2018

Version of record online: November 8, 2018

Der endgültige Beweis der kovalenten Bindung zwischen Aminosäure und Linker war im nächsten Schritt möglich. Die Verschiebung der Resonanz des Carbonylkohlenstoffes der angebundenen Aminosäure, von der Carbonsäure zum Amid, konnte schon in den vorherigen  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR-Messungen beobachtet werden. Dank der hohen Funktionalisierungsdichte konnte an den hergestellten Hybridmaterialien auch ohne  $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkierung, mit Hilfe von DNP-verstärkter  $^{15}\text{N}$  CP MAS NMR, erfolgreich die kovalente Bindung zwischen der Oberfläche und den Aminosäuren bewiesen werden. Der Nachweis erfolgte hierbei durch die Verschiebung der Resonanz der Aminospezies der APTES-funktionalisierten Oberfläche zur Amidspezies nach der Aminosäureanbindung.

Eine weitere wichtige Frage für das Verständnis von Biohybriden ist die Interaktion zwischen den gebundenen Biomolekülen und der zugehörigen Oberfläche. Daher wurden diverse zweidimensionale NMR-Techniken, mit und ohne DNP-Verstärkung, an den Materialien durchgeführt. Hierbei konnte die Verknüpfung innerhalb der Aminosäurekette validiert und die einzelnen Anbindungs- und Entschützungs-schritte im Detail analysiert werden. Weiterhin konnten Erkenntnisse über die Assoziation der Aminosäuren zur Oberfläche gewonnen werden. Die zugehörigen Ergebnisse können dem angehängten Manuskript entnommen werden.

Dieser vielseitige und modulare Synthesansatz erlaubt die Synthese diverser peptidfunktionalisierter Silicananoporen. Hierbei können Peptide schrittweise und gezielt an APTES-funktionalisierten Silicaoberflächen aufgebaut und im Detail charakterisiert werden. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass mehrere Reaktionsschritte an solch einer Oberfläche durchgeführt werden können, um das Poreninnere durch die Funktionalisierung zu modellieren, ohne das Porensystem zu beeinträchtigen. Zusammen mit den detaillierten Charakterisierungsmethoden der Festkörper-NMR eröffnet dieses Verfahren den Zugang zu einer neuen Klasse einfach erzeugbarer Hybridmaterialien.

Die Ergebnisse dieses Abschnittes sind veröffentlicht in *Chemistry – A European Journal*:

M. Brodrecht\*, B. Kumari\*, A.S. Sofia Lilly Thankamony, H. Breitzke, T. Gutmann, G. Buntkowsky

Structural insights into peptides bound to the surface of silica nanopores

*Chemistry – A European Journal*, **2019**, *25*, 5214-5221.

"Reprinted with permission of John Wiley and Sons © 2019". Die Electronic Supplementary Information ist nicht abgedruckt und ist in der elektronischen Version dieses Artikels (10.1002/chem.201805480) abrufbar.

## Hybrid Materials

## Structural Insights into Peptides Bound to the Surface of Silica Nanopores

Martin Brodrecht<sup>†</sup>, Bharti Kumari<sup>†</sup>, A. S. Sofia Lilly Thankamony, Hergen Breitzke, Torsten Gutmann,\* and Gerd Buntkowsky<sup>\*[a]</sup>

**Abstract:** The structure and surface functionalization of biologically relevant silica-based hybrid materials was investigated by 2D solid-state NMR techniques combined with dynamic nuclear polarization (DNP). This approach was applied to a model system of mesoporous silica, which was modified through in-pore grafting of small peptides by solid-phase peptide synthesis (SPPS). To prove the covalent binding of the peptides on the surface, DNP-enhanced solid-state NMR was used for the detection of <sup>15</sup>N NMR signals in natural abundance. DNP-enhanced heterocorrelation experiments with frequency switched Lee–Goldburg homonuclear proton

decoupling (<sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N CP MAS FSLG HETCOR) were performed to verify the primary structure and configuration of the synthesized peptides. <sup>1</sup>H FSLG spectra and <sup>1</sup>H–<sup>29</sup>Si FSLG HETCOR correlation spectra were recorded to investigate the orientation of the amino acid residues with respect to the silica surface. The combination of these NMR techniques provides detailed insights into the structure of amino acid functionalized hybrid compounds and allows for the understanding for each synthesis step during the in-pore SPPS.

## Introduction

Bioinspired organic–inorganic hybrid materials have become an important research topic in the last years. This reaches from bioinspired materials for materials science applications to complex naturally occurring materials formed by biomineralization.<sup>[1]</sup> The biomineralization process leads to materials with complex structures containing a broad spectrum of properties, such as those found in bone materials or diatoms.<sup>[2]</sup> The diversity of biomineralization makes this process interesting for the design of new materials with applications in nanotechnology and many other fields of research.<sup>[1–3]</sup> However, most of these multicomponent materials have not yet been fully understood, concerning their structural composition.<sup>[4]</sup> In principle, solid-state NMR can deliver important information on their structural composition.<sup>[5]</sup> Nevertheless, many of the natural occurring materials ranging from algae to diatoms are difficult to analyze due to their inorganic–organic hybrid structure containing in many cases only low amounts of the organic component. To overcome this issue, very recently we have introduced a new method for the synthesis of peptide functionalized silica-based

nanochannels as a model system for these materials by performing direct solid-phase peptide synthesis (SPPS) inside the silica pores. The combination of different analytical techniques, such as thermogravimetric analysis (TGA), elemental analysis (EA), nitrogen adsorption–desorption measurements, <sup>13</sup>C and <sup>29</sup>Si cross-polarization magic-angle spinning (CP MAS) solid-state NMR allowed us to probe the structure of these materials. A well-ordered porous structure with high surface areas and a high peptide grafting density of  $2.1 \pm 0.2$  molecules per nm<sup>2</sup> has been obtained.

Although the chemical composition of the synthesizable materials has been extensively characterized, there remained still a number of open questions concerning all reaction steps during in-pore SPPS.<sup>[6]</sup> Furthermore, the detailed local structure of the peptide functionalization and interactions of the peptide with the silica surface has to be investigated. To answer these questions, more sophisticated solid-state NMR experiments, such as two-dimensional correlation techniques employing homonuclear proton frequency switched Lee–Goldburg (FSLG) decoupling (<sup>1</sup>H FSLG and <sup>1</sup>H–<sup>29</sup>Si CP MAS FSLG HETCOR) as well as DNP-enhanced (<sup>15</sup>N CP MAS, <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N and <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C CP MAS FSLG HETCOR) are necessary. Employing these solid-state NMR techniques, for example, detailed information on the linkage of amino acids<sup>[7]</sup> and peptides<sup>[8]</sup> to the surface as well as on their orientation<sup>[4b,9]</sup> have been obtained. DNP-enhanced solid-state NMR experiments of non-isotope-labeled amino acids or peptides grafted on silica surfaces,<sup>[10]</sup> or on MOFs<sup>[11]</sup> have been able to confirm the binding and interaction between the peptide or amino acid and the carrier material. In particular, the application of <sup>15</sup>N solid-state NMR allows for the direct observation of the chemical shift of the amino acid nitrogen atoms

[a] M. Brodrecht,<sup>†</sup> B. Kumari,<sup>†</sup> Dr. A. S. S. L. Thankamony, Dr. H. Breitzke, Dr. T. Gutmann, Prof. Dr. G. Buntkowsky  
Institut für Physikalische Chemie, Technische Universität Darmstadt  
64287 Darmstadt (Germany)  
E-mail: gutmann@chemie.tu-darmstadt.de  
gerd.buntkowsky@chemie.tu-darmstadt.de

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

Supporting information and the ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under:  
<https://doi.org/10.1002/chem.201805480>.

for each functionalization step, which may prove the covalent surface bindings and the correct linkage between the single amino acids during SPPS.<sup>[7b,10–12]</sup> Furthermore, DNP-enhanced solid-state NMR experiments have been successfully applied for surface characterization.<sup>[13]</sup> This includes the monitoring of organic reactions on silica surfaces<sup>[14]</sup> and the fast characterization of the surface functionalization of silica materials.<sup>[15]</sup> Finally, these techniques have been employed to investigate the binding sites of transition-metal complexes on surface-modified silica materials,<sup>[16]</sup> as well as for the three-dimensional structure determination of an organometallic complex on an amorphous silica surface.<sup>[17]</sup>

In the present work, the detailed solid-state NMR characterization of our previously published peptide–silica hybrid model system<sup>[6]</sup> is presented. The model system is composed of highly ordered (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES)-functionalized silica material as the organic–inorganic support (SBA-15), which is functionalized with the dipeptide Gly–Phe. The two amino acids (glycine and phenylalanine) were consecutively bound to the surface through the NH<sub>2</sub> group of this linker, employing the solid-phase peptide synthesis, as recently developed by us.<sup>[6]</sup> DNP-enhanced <sup>15</sup>N CP MAS NMR was applied to confirm covalent bindings between the COOH group of the amino acid and the NH<sub>2</sub> group on the surface for each coupling step. Furthermore, DNP-enhanced solid-state NMR was used to measure <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C heterocorrelation spectra with frequency switched Lee–Goldberg homonuclear proton decoupling (FSLG HETCOR) to gain information on the configuration of the amino acids. To obtain deeper insights into the surface association of the amino acids <sup>1</sup>H FSLG measurements were performed as a function of the hydration degree of the sample. These experiments further help to reliably reference the proton dimension of the <sup>1</sup>H–<sup>29</sup>Si and <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N CP MAS FSLG HETCOR experiments.

## Results and Discussion

### Proof of covalent binding by <sup>15</sup>N DNP NMR

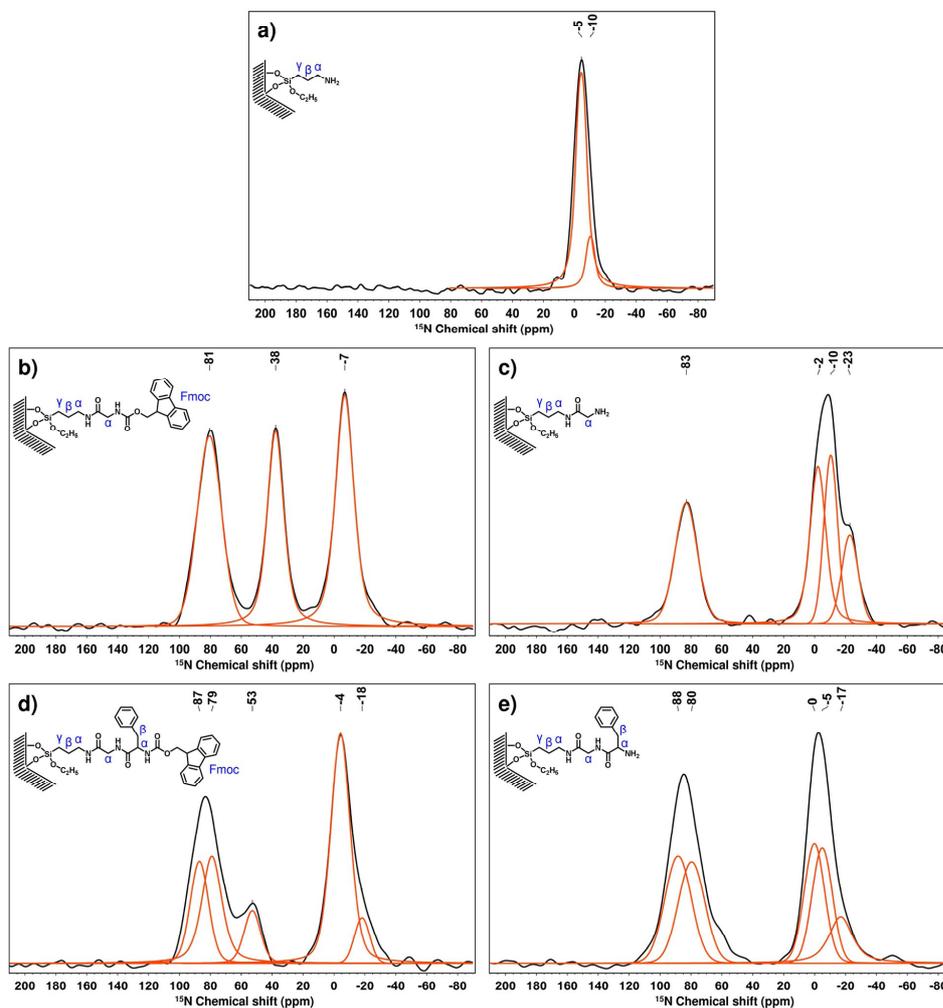
To investigate the binding situation between the surface bound NH<sub>2</sub> group and the COOH group of the coupled amino acid, DNP-enhanced <sup>15</sup>N CP MAS NMR was applied for each reaction step (Figure 1). By comparison of the <sup>1</sup>H MAS spectra recorded with MW on and MW off for each sample (not shown) the enhancement for the DNP-enhanced <sup>15</sup>N CP MAS NMR was approximated. On average, an enhancement factor of 30 was found, which is equal to a time-saving factor of 900. This clearly demonstrates the power of the DNP approach for fast structure analysis. Considering the DNP-enhanced <sup>15</sup>N CP MAS spectrum of the silica support material functionalized with APTES linkers (Figure 1a), a signal at 5 ppm containing a shoulder at –10 ppm was obtained. The former signal is assigned to the protonated form of the nitrogen (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) or a surface-associated (NH<sub>2</sub>–O–Si) form of the NH<sub>2</sub> group of the APTES linker, whereas the latter is attributed to NH<sub>2</sub> groups according to reference [18]. After the first Fmoc-glycine coupling step (Figure 1b) two new signals at 38 and 81 ppm appeared, which

are assigned to the newly formed amide group (81 ppm) between the COOH group of the glycine and the NH<sub>2</sub> group of the APTES linker, and to the carbamate group (38 ppm) present in the Fmoc protecting group. This is a clear indication for a covalent binding of the glycine to the APTES linker. The signal of the free amine group of the APTES linker at –7 ppm was still observed. This suggests that not all NH<sub>2</sub> groups of the surface-bound APTES linker reacted with glycine. This is consistent with our previous reports, in which we have found that not all linker groups are available for reaction,<sup>[19]</sup> as well as with the work of Zagdoun et al.,<sup>[14]</sup> who have found an incomplete conversion of azide groups, which they have attributed to the inaccessibility of some of these surface groups. At this point it must be remarked that all <sup>15</sup>N chemical shifts, for the different reaction steps, can vary to a certain degree. This observation most probably originates from small variations in the local conformation or chemical environments in the proximity of the nitrogen atoms or small differences in the local hydrogen-bonding situation.

After the cleavage of the Fmoc protecting groups (Figure 1c), the signal of the amide bound at 83 ppm was still present, which clearly shows that the covalent binding of glycine is preserved. The signal of the carbamate group vanished, which proves a full conversion in the Fmoc deprotection step. Furthermore, three signals in the amine region (–2, –10, and –23 ppm) were observed. In comparison to the previous spectrum (Figure 1b), an additional peak is present (–23 ppm), which corresponds to the free amine group of the coupled glycine. This is the result of the conversion of the carbamate nitrogen present in the Fmoc protecting group to the free amine. Considering the phenylalanine coupling step (Figure 1d), five signals at 87, 79, 53, –4, and –18 ppm were observed. The signals at 87 and 79 ppm are attributed to the amide nitrogen atoms, one between the previously observed APTES linker and the glycine, and one newly formed between the glycine and the phenylalanine. The signal at 53 ppm belongs to the nitrogen atom of the phenylalanine protecting Fmoc group. The residual signals between –4 and –18 ppm are attributed to still unreacted APTES linker and their protonated/surface-associated form. After final deprotection (Figure 1e) the signal of the carbamate vanished. This clearly demonstrates the successful deprotection of the Fmoc protecting group. Both signals of the amino acid amide bonds were still present at 88 and 80 ppm. The deprotection of the phenylalanine resulted in the conversion of the carbamate nitrogen to the free amine, which was indicated by an additional peak in the amine region, in which two of the three signals (–5 and –17 ppm) are attributed to the unreacted APTES linker and the signal at 0 ppm to the free amine group of the phenylalanine.

### Investigating carbon linkage by DNP-enhanced <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C CP MAS HETCOR measurements

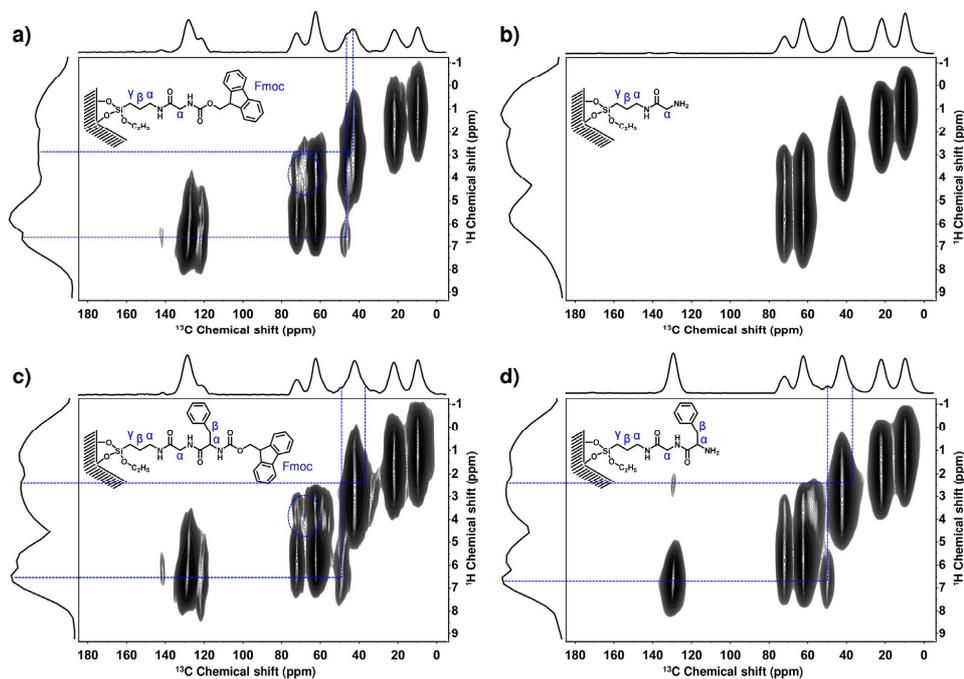
DNP-enhanced <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C CP MAS FSLG HETCOR spectra were recorded for all reaction steps (Figure 2) to inspect the carbon linkage between the amino acids and the linker. By comparison



**Figure 1.** Comparison of the DNP-enhanced  $^{15}\text{N}$  CP MAS spectra of functionalized SBA-15 recorded at 8 kHz spinning rate nominally at 110 K. Spectra of the APTES functionalized SBA-15 (a), Fmoc-glycine functionalized species (b), glycine functionalized species (c), Fmoc-phenylalanine-glycine functionalized species (d) and phenylalanine-glycine functionalized SBA-15 (e). Note that spectra (a) and (c–e) were recorded within 20–50 min of measurement time, whereas spectrum (b) was measured within 15 h to get an appropriate S/N ratio.

of the  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  CP MAS spectra recorded with MW on and MW off for each sample (not shown) the enhancement for the DNP-enhanced  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  CP MAS FSLG HETCOR was approximated. On average, an enhancement factor of 50 was found, which is equal to a time-saving factor of 2500. This clearly demonstrates the power of the DNP approach to record these 2D spectra with a high S/N ratio very rapidly. A contact time of 0.2 ms was employed to allow for the observation of hydrogen-carbon correlations from carbon and hydrogen atoms that are in close proximity. For the coupling step of Fmoc-gly-

cine (Figure 2a), several correlations were observed. The two carbons at 10 and 20 ppm show correlations to aliphatic hydrogens in the chemical shift range between 0 and 2 ppm. These correlations are attributed to the  $\gamma$  and  $\beta$  carbons of the APTES linker and to their corresponding hydrogens. Another set of signals is visible at carbon shifts of 40 to 45 ppm. These signals correlate to hydrogen shifts in the range between 2 and 4 ppm and are attributed to the  $\alpha$   $\text{CH}_2$  group of the linker and to the  $\alpha$  carbon of the glycine, which overlap. At a carbon chemical shift of 47 ppm a correlation to hydrogen atoms with



**Figure 2.** Comparison of DNP-enhanced  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  CP MAS FSLG HETCOR spectra of functionalized SBA-15 at 8 kHz spinning rate nominally at 110 K and a contact time of 0.2 ms. Spectra of Fmoc-glycine functionalized species (a), glycine functionalized species (b), Fmoc-phenylalanine-glycine functionalized species (c) and phenylalanine-glycine functionalized SBA-15 (d). The typical measurement time for the spectra was between 2.5 h and 5 h.

a chemical shift of 3–5 ppm is observed. This is attributed to the non-aromatic CH group of the Fmoc group. Therefore, this carbon atom also shows a correlation to aromatic hydrogen atoms at 6–7 ppm because this is directly adjacent to the aromatic hydrogen atoms of the Fmoc group.

The broad peaks in the carbon chemical shift range between 60 and 75 ppm refer to glycerol present in the used DNP matrix. The second non-aromatic  $\text{CH}_2$  group, which is expected to be at a carbon shift around 65 ppm, is therefore overlapped by the signal of the DNP matrix. Finally, correlation peaks of the signals between 115 and 130 ppm in the  $^{13}\text{C}$  dimension to signals at 5.5–7.0 ppm in the  $^1\text{H}$  dimension are visible in the spectrum. These correlation peaks can clearly be assigned to the aromatic carbon atoms of the Fmoc group. Furthermore, these aromatic protons (5.5–7.0 ppm) show a correlation to the above assigned non-aromatic carbon atoms of the Fmoc group at 47 ppm, which confirms the assignment. At 142 ppm carbon shift and 6.5 ppm hydrogen shift, a weak correlation is visible, which originates from the two quaternary carbon atoms of the Fmoc group to the residual hydrogen atoms of the aromatic system. In the  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  CP MAS FSLG HETCOR spectra recorded with a longer contact time of 3 ms (Supporting Information, Figure S01 a), an additional correlation at 173 ppm appeared, which is characteristic for the carbon of the amide

group between the glycine and the linker. This correlation only shows up at long contact times because it does not have any directly attached hydrogen atom.

After Fmoc deprotection (Figure 2b), the correlations attributed to the linker ( $\beta$  and  $\gamma$ ) were still present at 10 and 20 ppm. In the carbon chemical shift range between 40 and 45 ppm, one strong correlation to hydrogen chemical shifts between 2 and 4 ppm was observed, which is attributed to the  $\alpha$   $\text{CH}_2$  group of the linker and the glycine. Furthermore, several signals vanished, namely the correlations at a carbon chemical shift of 47 ppm associated to the non-aromatic CH group of the Fmoc group. Finally, all aromatic correlations in the carbon chemical shift range between 115 and 130 ppm vanished. It must be noted that at long contact time (Supporting Information, Figure S01 b) the peak of the amide carbon at 174 ppm was still present. This again shows that the binding of glycine to the surface is not affected and demonstrates the full conversion in the deprotection step. After coupling of Fmoc-phenylalanine (Figure 2c) the correlation spectrum looks similar to the spectrum of bound Fmoc-glycine (Figure 2a). A deeper analysis showed that a new correlation of the carbon signal at 37 ppm with the proton signal at 2.5 ppm becomes visible, but overlapping with the correlations of the  $\alpha$   $\text{CH}_2$  group of the linker and the glycine at 43 ppm carbon shift.

This correlation is attributed to the  $\beta$  CH<sub>2</sub> group of the phenylalanine. Furthermore, a correlation at the carbon shift of 50 ppm appeared, which is attributed to the carbon of the  $\alpha$  CH group of the phenylalanine. This  $\alpha$  carbon shows correlations to the protons at 6–7 ppm. Since these protons are also correlated to the aromatic carbons at 130 ppm, they can be attributed to the phenyl group of the phenylalanine side chain. Furthermore, the two previously described non-aromatic correlations of the Fmoc group (CH) at 47 ppm and (CH<sub>2</sub>) at around 65 ppm appeared again but both overlap either with the matrix or the newly  $\alpha$  carbon correlations of the phenylalanine. Again, the quaternary carbons of the Fmoc group at 141 ppm carbon shift and their correlation to the aromatic protons at 6.5 ppm is visible.

After final deprotection (Figure 2d) the aromatic correlations at 120 and 141 ppm in the <sup>13</sup>C with 6–7 ppm in the <sup>1</sup>H dimension have vanished. In comparison to the Fmoc-glycine deprotection (Figure 2b), however, some aromatic correlation peaks at 130 ppm are still observed, which are attributed to the phenylalanine.

#### Deeper investigation of the proton dimension and surface association by <sup>1</sup>H FLSG, <sup>1</sup>H–<sup>29</sup>Si CP MAS FSLG HETCOR, and DNP-enhanced <sup>1</sup>H–<sup>15</sup>N CP MAS FSLG HETCOR experiments

Additional solid-state NMR experiments were performed on the final product (SBA–Gly–Phe) to obtain more structural details and to study the interaction between the organic and inorganic components of the material. In particular, the <sup>1</sup>H dimension of the 2D spectra contains useful information concerning chemical structure and orientation of the peptides/amino acids. However, the <sup>1</sup>H dimension is difficult to reference correctly in 2D experiments. Thus, <sup>1</sup>H FLSG NMR experiments for SBA–Gly–Phe were performed, for which the direct proton dimension can be referenced easily. The <sup>1</sup>H FLSG spectrum of the wet sample (Figure 3, wet) shows five diagonal peaks at around 0.8, 1.8, 3.4, 5.0, and 6.8 ppm. From our previous works,<sup>[19,20]</sup> it is known that the peak at 0.8 ppm can be attributed to non-hydrogen-bound water and the peak at 1.75 ppm represents the silanol groups of the silica surface. Furthermore,

the peak at around 3–3.5 ppm corresponds to water molecules in fast exchange between liquid and adsorbed state.<sup>[19–21]</sup> The broad peak at approximately 5.0 ppm is attributed to mobile water and the peak at around 6.8 ppm is most probably assigned to the aromatic hydrogen atoms of phenylalanine.

To verify if the assignment of the peaks at 0.8, 3, and 5 ppm to water is correct and to determine which proton signals belong to the peptide, the sample was dried under high vacuum to remove water. Comparing the <sup>1</sup>H FLSG spectra of the dried (Figure 3, dry) and the wet samples (Figure 3, wet), it was observed that the diagonal peaks for the hydrogen species between 0 and 4 ppm had shifted and appeared broader after drying. The new main diagonal peaks appeared at around 0.9 ppm and 2.8 ppm. These hydrogen chemical shift changes are most probably the result of variations in the hydrogen-bond network, which reportedly induce such changes.<sup>[19–21]</sup> Considering that the water content has decreased drastically, the low chemical shift peaks (0–2 ppm) could also be assigned to the  $\beta$  and  $\gamma$  hydrogen atoms of the APTES linker, which are now more dominant. The higher chemical shift ranges of the diagonal peaks between 2 and 4 ppm are in good agreement with the previously found hydrogen chemical shifts in the <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C correlation spectra for the  $\alpha$  hydrogens of the APTES linker and the amino acids (Figure 2). An exact assignment is not feasible due to the overlap of several peaks. Furthermore, the peak at 4–6 ppm vanished for the dried sample; however, the peak at 6.8 ppm was still present. This leads to the assumption that this 6.8 ppm peak corresponds to aromatic hydrogen atoms.

Considering that the wet sample does not allow for the investigation of the hydrogen chemical shifts of the peptide, the <sup>1</sup>H–<sup>29</sup>Si CP MAS FSLG HETCOR spectrum was recorded by using the dry SBA–Gly–Phe sample (Figure 4). The experiment was performed with a long contact time of 6.5 ms to make long-distance correlations between protons of the peptide and the silica surface visible. The <sup>1</sup>H–<sup>29</sup>Si CP MAS FSLG HETCOR spectrum (Figure 4) shows a broad correlation peak in the <sup>1</sup>H dimension between 0 and 3 ppm with the <sup>29</sup>Si dimension between –120 and –100 ppm. The main proton correlations are found to be at around 0.8 and 2.5 ppm. These are comparable

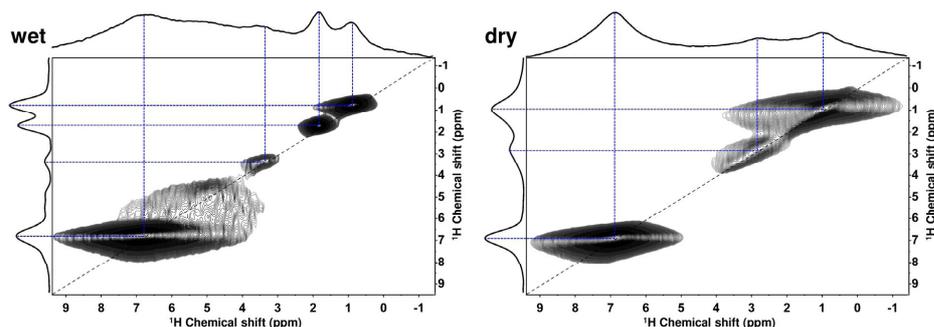


Figure 3. Room-temperature <sup>1</sup>H FLSG spectra of wet and dried phenylalanine–glycine functionalized SBA-15 at 5 kHz spinning speed.

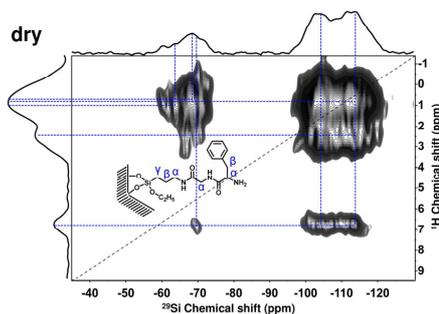


Figure 4. Room temperature  $^1\text{H}$ - $^{29}\text{Si}$  CP MAS FSLG HETCOR spectrum of phenylalanine-glycine functionalized SBA-15 at 5 kHz spinning and a contact time of 6.5 ms.

to the main species found in the  $^1\text{H}$  FSLG spectrum of the dry sample (Figure 3, dry). The lower chemical shifts (0 to 2 ppm) can be attributed to the hydrogen atoms of free silanol groups on the silica surface (1.75 ppm), according to reference [19] and [20], as well as to the  $\beta$  and  $\gamma$  hydrogens of the APTES linker, which are close to the silica surface. The higher chemical shifts (2–3.5 ppm) most likely are attributed to the aliphatic hydrogen atoms of the peptide and the  $\alpha$  hydrogen of the linker, which is consistent with the interpretation of the  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  CP MAS FSLG HETCOR spectra. The Q groups also show a correlation to hydrogen species at 6.5–7 ppm. These again can be attributed to the aromatic hydrogen atoms of the phenylalanine. These aromatic hydrogen signals also show a weak correlation to the T groups. This leads to the conclusion that the aromatic side chain of the phenylalanine is near the Q groups of the silica surface and still shows correlation to the linker along the amino acid chain.

Another correlation was obtained in the  $^1\text{H}$  dimension between 0 and 1.5 ppm with the  $^{29}\text{Si}$  dimension between  $-75$  and  $-60$  ppm. These  $^{29}\text{Si}$  signals refer to the T groups of the bound linker. The main correlation is found to hydrogen atoms with a chemical shift of 0.7 ppm; the latter can clearly be attributed to the  $\gamma$  hydrogen atoms of the linker. This is expected because these are the nearest hydrogen atoms of the T group silicon atoms. A weaker correlation was obtained to hydrogens with slightly higher chemical shift (1.1 ppm), which are attributed to the  $\beta$  hydrogen atoms of the linker. It is important to note that the correlation maxima in the hydrogen dimension between 0 and 2 ppm are different for the Q and T groups. This agrees with the binding situation of the peptides, considering that the hydrogens of the APTES linker ( $\gamma$  and  $\beta$ ) should be the closest to the T groups, whereas the residual hydrogen atoms of glycine and phenylalanine should be closer to neighboring Q groups, which bend towards the surface.

Finally, a DNP-enhanced  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  CP MAS FSLG HETCOR experiment was performed (Figure 5). It has to be noted that such a spectrum could not be recorded using a dry sample because an aqueous matrix was necessary for the DNP sample

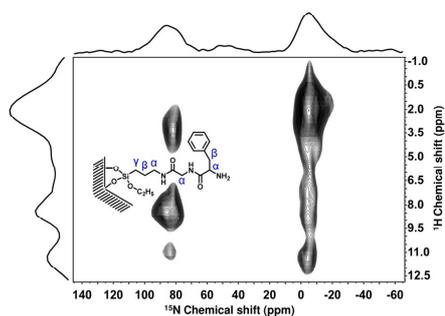


Figure 5. DNP-enhanced  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  CP MAS FSLG HETCOR spectrum of phenylalanine-glycine functionalized SBA-15 measured at 110 K and a contact time of 0.2 ms. It must be noted that the spectrum was recorded within 21.5 h of measurement time.

preparation. The  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HETCOR spectrum in Figure 5 shows correlations of protons with nitrogen atoms in the chemical shift regions of  $-15$ – $0$  ppm and  $80$ – $90$  ppm. These correlations are assigned to amine ( $-15$ – $0$  ppm) and amide ( $80$ – $90$  ppm) nitrogen atoms according to the DNP-enhanced  $^{15}\text{N}$  CP MAS spectra (Figure 1 d).

A detailed analysis shows that the amide nitrogen atoms correlate with protons at 2.5–3.5, 6.5–9.5, and 11 ppm. Considering that with the short contact time of 0.2 ms only protons that are in close vicinity of the nitrogen atoms are visible, a tentative assignment of the signals can be performed. The signal at 11 ppm stems most probably from protons, which are directly attached to the nitrogen atom of the amide group. Surprisingly, such a high proton chemical shift was not obtained in the  $^1\text{H}$  FSLG spectra in Figure 3, which may indicate a fast exchange of this proton at room temperature. The signal at 2.5–3.5 ppm is attributed to the protons at the  $\alpha$  carbon atoms of the glycine and the linker. The signal at 6.5–9.5 ppm cannot be clearly assigned because protons from water, as well as further directly bound protons on amide nitrogen may overlap in this chemical shift region. Also, the correlation of aromatic protons with the amide nitrogen within one peptide chain and between peptide chains cannot be excluded due to the high grafting density of the peptide on the surface.

A detailed analysis of the amine signal ( $-15$  to 0 ppm) shows correlations with protons at 0–2.0, 3.5–5, 6–9.5, and 10–11.5 ppm. The signal at 10–11.5 ppm stems most probably from protons, which are directly attached to the nitrogen atom of the amine group, similar to the assignment for the amide group. The signal at 6–9.5 ppm can refer to different types of protons as already discussed for the amide. The signal at 3.5–5 ppm is tentatively attributed to protons at the  $\alpha$  carbon atom of the phenylalanine. Finally, the signal at 0–2.0 ppm probably refers to Si–OH groups interacting with the nitrogen atom of the amine group or to protons of the aliphatic chain of free APTES linker, which is consistent with the interpretation of the  $^1\text{H}$  FSLG and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  CP MAS FSLG HETCOR spectra. Comparing the obtained proton correlations for the amine nitrogen

and for the amide nitrogen, it is obvious that for the amine a broader distribution of proton chemical shifts is found. This observation is not very surprising because amines are more likely to form hydrogen bonds than amides. To summarize, with the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  CP MAS FSLG HETCOR more details on the structural linkage between nitrogen atoms and protons as well as assignments were obtained.

## Conclusion

Advanced solid-state NMR techniques were used to investigate the binding situation of a surface bound peptide on a porous silica support (SBA-15) coupled by in-pore solid-phase peptide synthesis. With the help of DNP-enhanced solid-state NMR,  $^{15}\text{N}$  CP MAS spectra were recorded without any isotope labeling, which clearly evidences the covalent binding between the amino acids and the linker on the silica surface. Furthermore, DNP-enhanced  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  CP MAS FSLG HETCOR spectra were applied to investigate the carbon binding situation between the amino acids to ensure the correct amino acid order. For the final product of the pore functionalization (SBA-Gly-Phe) the hydrogen species were investigated by  $^1\text{H}$  FLSG NMR experiments of the wet and dry samples. The gained proton chemical shift information was then used to investigate the surface association of the peptides by applying  $^1\text{H}$ - $^{29}\text{Si}$  CP MAS FSLG HETCOR NMR. This showed that the peptide chain tends to bend towards the pore wall rather than pointing into the inner part of the pore. Furthermore, DNP-enhanced  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  CP MAS FSLG HETCOR NMR spectra were recorded, which show the amide and amine chemical shifts and their correlation to the neighboring hydrogen atoms, and proves the intact structure of the bonded peptide. The combination of these techniques provide deeper insights into the final state of the functionalized material. Finally, in combination with our previously reported synthetic strategy, we developed an easy and versatile model study of functionalized silica-based biohybrid materials. Each SPPS reaction step on the silica surface was quantified and, together with the here presented NMR study, investigated in depth. This approach can be used in the future to generate individual and specific peptide-modified surfaces.

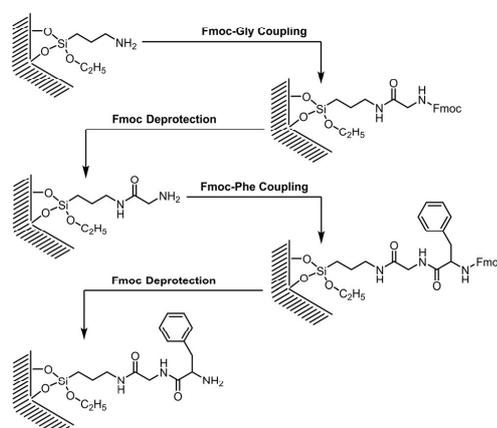
## Experimental Section

### Synthesis of peptide-functionalized SBA-15 porous silica

The here investigated materials were synthesized according to the protocol reported in our previous work<sup>[6]</sup> and resulted in an APTES-functionalized SBA-15 material modified with glycine and phenylalanine. The strategy of this synthesis is displayed in Scheme 1. The linker grafting density was found to be  $(3.5 \pm 0.4) \times 10^{-21}$  mmol per  $\text{nm}^2$  or  $2.1 \pm 0.2$  molecules per  $\text{nm}^2$ , respectively.

### Characterization

**Solid-state NMR:** All solid-state NMR measurements were performed employing the samples synthesized and described in our previous work without any isotope labeling.  $^1\text{H}$ - $^{29}\text{Si}$  CP MAS FSLG HETCOR measurements were carried out at room temperature on a Bruker AVANCE II+ 400 spectrometer corresponding to a fre-



**Scheme 1.** SPPS-type synthetic route from APTES-functionalized silica to phenylalanine-glycine functionalized silica through a step-by-step reaction with Fmoc-protected amino acids.

quency of 400.13 MHz for  $^1\text{H}$ , and 79.48 MHz for  $^{29}\text{Si}$ , employing a Bruker 4 mm double resonance probe. Spectra were recorded with a contact time of 6.5 ms for  $^{29}\text{Si}$ , employing a recycle delay of 2 s and FSLG field strength of 70 kHz. Heteronuclear decoupling was performed during data acquisition employing the tppm15 decoupling sequence.<sup>[22]</sup> Referencing was done with respect to TMS (0 ppm) employing kaolin ( $-92.5$  ppm) as the external standard for  $^{29}\text{Si}$ . The  $^1\text{H}$  dimension of the 2D spectra was referenced by combination with  $^1\text{H}$  measurements under FSLG decoupling employing the same field strength as for the  $^1\text{H}$ - $^{29}\text{Si}$  CP MAS FSLG HETCOR measurements. The two known peaks at 1.76 and 6.65 ppm in the direct proton dimension were used for scaling the indirect proton dimension of the FSLG HETCOR experiment.

**DNP NMR measurements:** Samples for DNP experiments were prepared following the procedure described in the literature.<sup>[23]</sup> Typically, approximately 15 mg of the sample with 15  $\mu\text{l}$  of a 15 mM AMUPol<sup>[24]</sup> in glycerol- $d_6$ /D $_2$ O/H $_2$ O (60:30:10, v/v/v) solution. Samples were packed into 3.2 mm sapphire rotors and sealed with a Teflon plug and ZrO $_2$  driving cap.

All DNP experiments were performed with a Bruker Avance III 400 DNP spectrometer equipped with an Ascend 400 DNP magnet system and a low temperature  $^1\text{H}/\text{X}/\text{Y}$  probe. DNP-enhanced spectra were measured with microwave irradiation (MW on). All DNP-enhanced spectra were recorded at a field of 9.4 T corresponding to frequencies of 400.25 MHz for  $^1\text{H}$ , 100.58 MHz for  $^{13}\text{C}$ , and 40.53 MHz for  $^{15}\text{N}$ , at nominally 110 K and at a spinning rate of 8 kHz. The recycle delay was taken as  $1.3 T_1(^1\text{H})$  according to reference [25], in which  $T_1(^1\text{H})$  is the built-up time for  $^1\text{H}$  obtained from a saturation recovery experiment recorded with microwave irradiation. During data acquisition, tppm20<sup>[22]</sup> heteronuclear decoupling was applied for the  $^{15}\text{N}$  CP MAS spectra. The  $^{15}\text{N}$  CP MAS spectra were recorded with contact times of 2 ms and referenced with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  as an external standard (chemical shift 0 ppm).

All  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  CP MAS FSLG HETCOR spectra were recorded using spinal64<sup>[26]</sup> ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) and tppm20 ( $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ) decoupling during data acquisition. FSLG homonuclear decoupling<sup>[27]</sup> was utilized with a decoupling field of 90 kHz during the evolution of the  $^1\text{H}$ -chemical shift.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  CP MAS FSLG HETCOR experiments were per-

formed with contact times of 0.2 and 3 ms, respectively. The  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  CP MAS FSLG HETCOR experiment was performed with a contact time of 0.2 ms. The  $^{13}\text{C}$  dimension was referenced to TMS employing adamantane ( $-38.5$  ppm) as the external standard. The  $^{15}\text{N}$  dimension was referenced according to the  $^{15}\text{N}$  CP MAS spectra, employing  $\text{NH}_4\text{Cl}$  as the external standard (0 ppm). The  $^1\text{H}$  dimension of the 2D spectra were referenced by using the chemical shifts of the two known peaks at 0.9 or 1.7 ppm and 6.0 ppm in case of the  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  CP MAS FSLG HETCOR. To reference the  $^1\text{H}$  dimension in the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  CP MAS FSLG HETCOR spectrum an additional  $^1\text{H}$  FSLG spectrum was recorded with the same parameters (FSLG decoupling, offset, etc.). This  $^1\text{H}$  FSLG spectrum was referenced in the direct  $^1\text{H}$  dimension employing sodium-trimethylsilylpropionate (TSP) (0 ppm) as the external standard. According to this reference, the  $^1\text{H}$  indirect dimension in the  $^1\text{H}$  FSLG spectrum, and finally the  $^1\text{H}$  indirect dimension in the HETCOR spectrum, could be referenced.

### Acknowledgements

Financial support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft within the framework of Forschergruppe FOR 1583 through grants Bu-911/18-1/2 is gratefully acknowledged. The authors also thank the LOEWE project iNAPO by the Hessen State Ministry of Higher Education, Research, and the Arts for financial support.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

**Keywords:** biomineralization • dynamic nuclear polarization • hybrid materials • mesoporous silica • solid-phase peptide synthesis

- [1] a) E. Dujardin, S. Mann, *Adv. Eng. Mater.* **2002**, *4*, 461; b) A. S. Schenk, Y.-Y. Kim, *MRS Bull.* **2015**, *40*, 499.
- [2] a) A. S. Schenk, I. Zlotnikov, B. Pokroy, N. Gierlinger, A. Masic, P. Zaslansky, A. N. Fitch, O. Paris, T. H. Metzger, H. Cölfen, P. Fratzl, B. Aichmayer, *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22*, 4668; b) M. Sumper, E. Brunner, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1187.
- [3] a) N. Nassif, J. Livage, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 849; b) M. Sarikaya, C. Tamerler, A. K. Y. Jen, K. Schulten, F. Baneyx, *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 511.
- [4] a) H. C. Schröder, X. H. Wang, W. Tremel, H. Ushijima, W. E. G. Müller, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 455; b) R. Hedrich, S. Machill, E. Brunner, *Carbohydr. Res.* **2013**, *365*, 52.
- [5] a) G. Goobes, *Isr. J. Chem.* **2014**, *54*, 113; b) I. Ben Shir, S. Kababya, I. Katz, B. Pokroy, A. Schmidt, *Chem. Mater.* **2013**, *25*, 4595; c) T. Amitay-Rosen, S. Kababya, S. Vega, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6267; d) S. Jayanthi, V. Frydman, S. Vega, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 10398.
- [6] M. Brodrecht, H. Breitzke, T. Gutmann, G. Buntkowsky, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 17814.
- [7] a) I. Ben Shir, S. Kababya, A. Schmidt, *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 9691; b) I. Ben Shir, S. Kababya, A. Schmidt, *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 7901.
- [8] a) Y. Geiger, H. E. Gottlieb, Ü. Akbey, H. Oschkinat, G. Goobes, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 5561; b) P. A. Mirau, R. R. Naik, P. Gehring, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18243.
- [9] A. Jantschke, E. Koers, D. Mance, M. Weingarth, E. Brunner, M. Baldus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 15069; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 15284.
- [10] M. Werner, A. Heil, N. Rothermel, H. Breitzke, P. B. Groszewicz, A. S. Thankamony, T. Gutmann, G. Buntkowsky, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2015**, *72*, 73.
- [11] a) T. K. Todorova, X. Rozanska, C. Gervais, A. Legrand, L. N. Ho, P. Berruyer, A. Lesage, L. Emsley, D. Farrusseng, J. Canivet, C. Mellot-Draznieks, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 16531; b) A. J. Rossini, A. Zagdoun, M. Lelli, J. Canivet, S. Aguado, O. Ouari, P. Tordo, M. Rosay, W. E. Maas, C. Coperet, D. Farrusseng, L. Emsley, A. Lesage, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 123; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 127.
- [12] I. G. Shenderovich, G. Buntkowsky, A. Schreiber, E. Gedat, S. Sharif, J. Albrecht, N. S. Golubev, G. H. Findenegg, H.-H. Limbach, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 11924.
- [13] a) A. J. Rossini, A. Zagdoun, M. Lelli, A. Lesage, C. Coperet, L. Emsley, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 1942; b) M. Brodrecht, B. Kumari, H. Breitzke, T. Gutmann, G. Buntkowsky, *Z. Phys. Chem.* **2018**, *232*, 1127.
- [14] A. Zagdoun, G. Casano, O. Ouari, G. Lapadula, A. J. Rossini, M. Lelli, M. Baffert, D. Gajan, L. Veyre, W. E. Maas, M. Rosay, R. T. Weber, C. Thieuleux, C. Coperet, A. Lesage, P. Tordo, L. Emsley, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 2284.
- [15] a) M. Lelli, D. Gajan, A. Lesage, M. A. Caporini, V. Vitthum, P. Mieville, F. Herogue, F. Rascon, A. Roussey, C. Thieuleux, M. Boualleg, L. Veyre, G. Bodenhausen, C. Coperet, L. Emsley, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2104; b) T. Kobayashi, F. A. Perras, U. Chaudhary, Slowing II, W. Y. Huang, A. D. Sadow, M. Pruski, *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2017**, *87*, 38; c) O. Lafon, A. S. L. Thankamony, T. Kobayashi, D. Carnevale, V. Vitthum, Slowing II, K. Kandel, H. Vezin, J. P. Amoureux, G. Bodenhausen, M. Pruski, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 1375; d) T. Kobayashi, O. Lafon, A. S. L. Thankamony, Slowing II, K. Kandel, D. Carnevale, V. Vitthum, H. Vezin, J. P. Amoureux, G. Bodenhausen, M. Pruski, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 5553.
- [16] a) T. Gutmann, J. Liu, N. Rothermel, Y. Xu, E. Jaumann, M. Werner, H. Breitzke, S. T. Sigurdsson, G. Buntkowsky, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 3798; b) T. Gutmann, G. Buntkowsky in *Modern Magnetic Resonance* (Ed.: G. A. Webb), Springer, Cham, **2017**, pp. 1; c) J. Liu, P. B. Groszewicz, Q. Wen, A. S. L. Thankamony, B. Zhang, U. Kunz, G. Sauer, Y. Xu, T. Gutmann, G. Buntkowsky, *J. Phys. Chem. C* **2017**, *121*, 17409; d) J. Camacho-Bunquin, M. Ferrandon, H. Sohn, D. L. Yang, C. Liu, P. A. Ignacio de Leon, F. A. Perras, M. Pruski, P. C. Stair, M. Delferro, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 3940; e) E. Pump, J. Viger-Gravel, E. Abou-Hamad, M. K. Samantaray, B. Hamzaoui, A. Gurinov, D. H. Anjum, D. Gajan, A. Lesage, A. Bendjeriou-Sedjerari, L. Emsley, J. M. Basset, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 284.
- [17] P. Berruyer, M. Lelli, M. P. Conley, D. L. Silverio, C. M. Widdifield, G. Siddiqui, D. Gajan, A. Lesage, C. Coperet, L. Emsley, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 849.
- [18] A. Dos, V. Schimming, S. Tosoni, H.-H. Limbach, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 15604.
- [19] M. Brodrecht, E. Klotz, C. Lederle, H. Breitzke, B. Stühn, M. Vogel, G. Buntkowsky, *Z. Phys. Chem.* **2017**, *232*, 1003.
- [20] B. Grünberg, T. Emmler, E. Gedat, I. Shenderovich, G. H. Findenegg, H. H. Limbach, G. Buntkowsky, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5689.
- [21] J. Trébosc, J. W. Wiench, S. Huh, V. S. Y. Lin, M. Pruski, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3057.
- [22] A. E. Bennett, C. M. Rienstra, M. Auger, K. V. Lakshmi, R. G. Griffin, *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 6951.
- [23] A. Lesage, M. Lelli, D. Gajan, M. A. Caporini, V. Vitthum, P. Mieville, J. Alauzun, A. Roussey, C. Thieuleux, A. Mehdi, G. Bodenhausen, C. Coperet, L. Emsley, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15459.
- [24] C. Sauvée, M. Rosay, G. Casano, F. Aussenac, R. T. Weber, O. Ouari, P. Tordo, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10858; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 11058.
- [25] S. Lange, A. H. Linden, Ü. Akbey, W. Trent Franks, N. M. Loening, B.-J. Rossum, H. Oschkinat, *J. Magn. Reson.* **2012**, *216*, 209.
- [26] B. M. Fung, A. K. Khitrin, K. Ermolaev, *J. Magn. Reson.* **2000**, *142*, 97.
- [27] B. J. van Rossum, I. Förster, H. J. M. de Groot, *J. Magn. Reson.* **1997**, *124*, 516.

Manuscript received: November 1, 2018

Accepted manuscript online: February 18, 2019

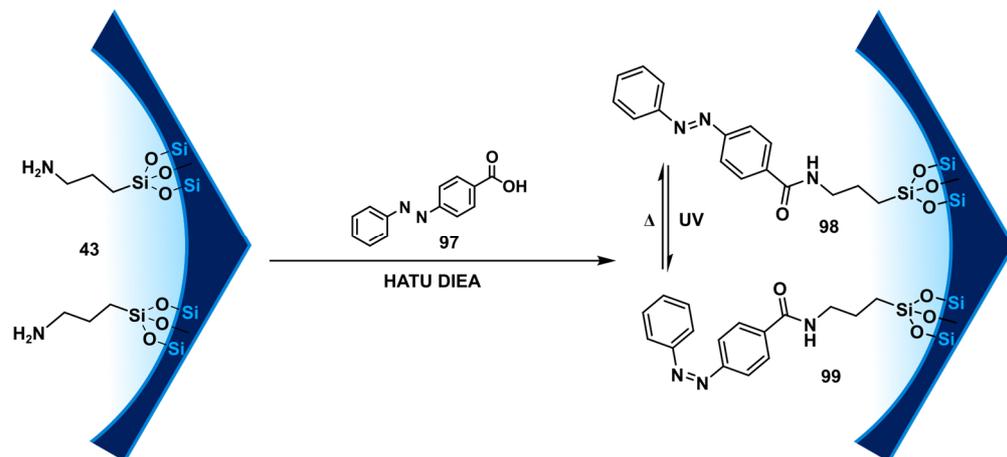
Version of record online: March 13, 2019

## 7.4. Anbindung von stimuli-responsiven Gruppen in porösen Silicamaterialien

Im letzten Abschnitt werden einige erste Ansätze zur erweiterten Funktionalisierung von Silicananoporen mit schaltbaren bzw. stimuli-responsiven Gruppen gezeigt.

Im ersten Teil sollen Ideen zur Synthese von lichtschtbaren Porensystemen vorgestellt werden. Eines der bekanntesten lichtschtbaren organischen Moleküle ist die Gruppe der Azobenzole. Deren Azogruppe kann in *cis*- und *trans*-Form vorliegen. Diese *cis/trans*-Übergänge lassen sich mit Licht bestimmter Wellenlänge schalten. Die Anbindung solcher durch externe Stimuli schaltbaren Moleküle an Oberflächen bietet enormes Potential für eine neue Klasse schaltbarer Hybridmaterialien. Die Schaltbarkeit der Azogruppe konnte an der Oberfläche bisher allerdings nicht ausreichend charakterisiert werden.<sup>[197-200]</sup>

Um das Potential der bereits etablierten Kopplungsstrategie ausschöpfen zu können, soll diese auch hier verwendet werden, um einen Farbstoff anzubinden (Schema 7.1).



Schema 7.1 Anbindung des Azofarbstoffes **97** an eine APTES-funktionalisierte Silicaoberfläche **43** unter Verwendung von HATU und DIEA zur Herstellung des modifizierten Silicamaterials **98/99**

Für die Anbindung des Azofarbstoffes an eine APTES-funktionalisierte Oberfläche **43** wird ein carboxyfunctionalisiertes Derivat **97** des Azofarbstoffes benötigt. Die Anbindung dieses kommerziell erhältlichen Farbstoffes **97** wurde, analog der bisherigen Strategie, mittels HATU und DIEA, durchgeführt. Diese Anbindung konnte anschließend mit Hilfe von <sup>13</sup>C CP MAS NMR-Messungen nachgewiesen werden (Abbildung 7.1).

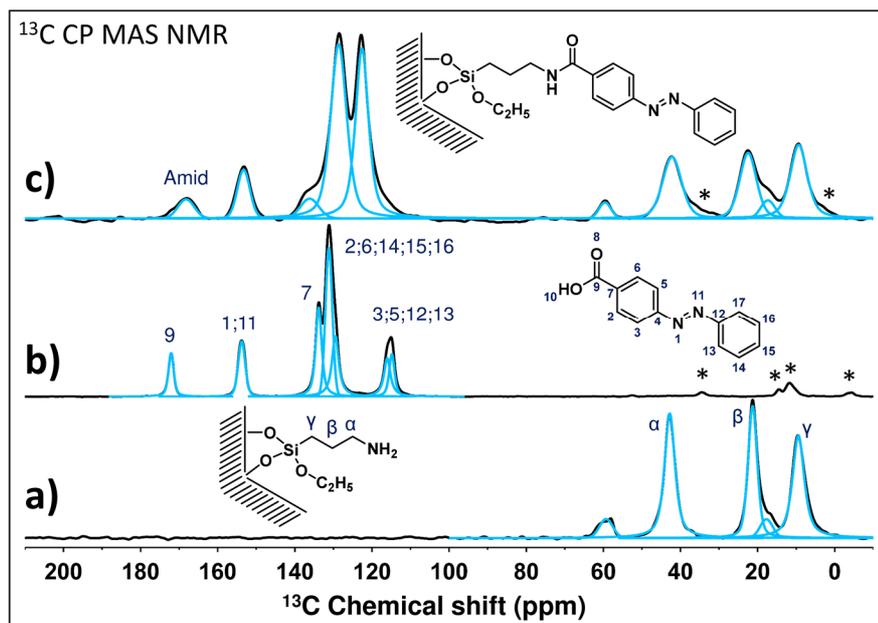
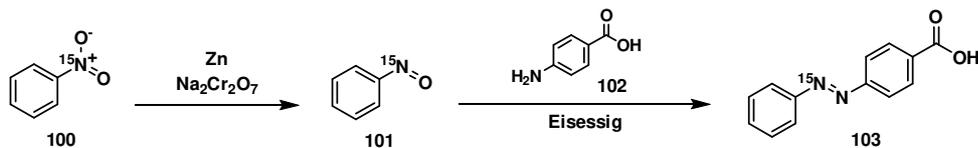


Abbildung 7.1: Vergleich der  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR-Spektren von funktionalisiertem SBA-15 und dem angebotenen Azofarbstoff. a): APTES-funktionalisiertes SBA-15 **43** mit Signalzuordnung (6kHz). b): carboxy-funktionalisierter Azofarbstoff **97** mit Signalzuordnung (12kHz). c): Azofarbstoff-APTES-funktionalisiertes SBA-15 **98/99** (12kHz).

Das  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR-Spektrum der APTES-funktionalisierten Oberfläche (Abbildung 7.1a) **43** zeigt Resonanzen bei 9 ppm, 21 ppm und 43 ppm, welche den  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kohlenstoffatomen des APTES-Linkers zugeordnet werden können. Ebenso sind zwei schwache Resonanzen bei 17 und 59 ppm zu erkennen, die der Ethoxygruppe des APTES-Linkers zugewiesen werden. Das  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR-Spektrum des Carboxy-Azofarbstoffes (Abbildung 7.1b) **97** zeigt Resonanzen zwischen 115 und 134 ppm, eine Resonanz bei 154 ppm und eine Resonanz bei 172 ppm. Die Gruppe der Resonanzen zwischen 115 ppm und 134 ppm kann hierbei den aromatischen Kohlenstoffen der Phenylringe zugeordnet werden. Weiterhin werden die Resonanzen bei 154 ppm den Kohlenstoffen in direkter Nachbarschaft zur Azogruppe und bei 172 ppm dem Carbonylkohlenstoff zugeordnet. Das  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR-Spektrum der Azofarbstoff-APTES-funktionalisierten Oberfläche (Abbildung 7.1c) **98/99** zeigt alle bisher beschriebenen Resonanzen, sowohl des APTES-Linkers **43** als auch des Carboxy-Azofarbstoffes **97**. Durch die Oberflächenanbindung resultiert eine Linienverbreiterung und Verschiebung einiger Resonanzen. Hierdurch überlappen beispielsweise die Signale der aromatischen Kohlenstoffe der Phenylringe. Ebenso ist eine Verschiebung der Carbonylkohlenstoffresonanz von 172 ppm auf 168 ppm zu beobachten. Diese Änderung ist durch die Reaktion von der Carbonsäure zum Amid zu erwarten. Wie signifikant dieser Nachweis für die Bildung der Amidbindung zu bewerten ist wurde bereits ausführlich in Abschnitt 7.3 beleuchtet.

In einem weiteren Schritt muss nicht nur die Anbindung nachgewiesen werden, sondern vor allem die Schaltbarkeit des Moleküls untersucht werden. Um die Schaltbarkeit an Oberflächen

nachzuweisen werden für gewöhnlich UV/Vis-Messungen durchgeführt. Prinzipiell sollte allerdings auch ein Nachweis mittels  $^{15}\text{N}$  NMR-Messungen möglich sein, da sich durch die Konfigurationsänderung die chemische Verschiebung der Brückenstickstoffatome ändert.<sup>[201]</sup> Um diese Änderung an Oberflächen messbar zu machen wird eine  $^{15}\text{N}$ -isotopenmarkierte Form des Azofarbstoffes **103** benötigt. Diese Synthese konnte über die Reduktion des  $^{15}\text{N}$ -isotopenmarkierten Nitrobenzols **100** zur Nitrosoform **101** und anschließender Kopplung mit 4-Aminobenzoesäure **102** zum  $^{15}\text{N}$ -isotopenmarkierten Farbstoff **103** realisiert werden (Schema 7.2).<sup>[199, 202]</sup>



Schema 7.2 Synthese des  $^{15}\text{N}$ -isotopenmarkierten Azofarbstoffes **103** durch Reduktion des  $^{15}\text{N}$ -isotopenmarkierten Nitrobenzols **100** zum Nitrosobenzol **101** und anschließender Kopplung mit 4-Aminobenzoesäure **102**

Die Isotopenmarkierung wurde hierbei mittels Massenspektrometrie (MS) nachgewiesen. Zum Nachweis der erfolgreichen Einführung der  $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkierung werden die Massenspektren des hergestellten  $^{15}\text{N}$ -markierten Derivates **103** (Abbildung 7.2a) und des nicht isotopenmarkierten Derivates **97** (Abbildung 7.2b) gegenübergestellt.

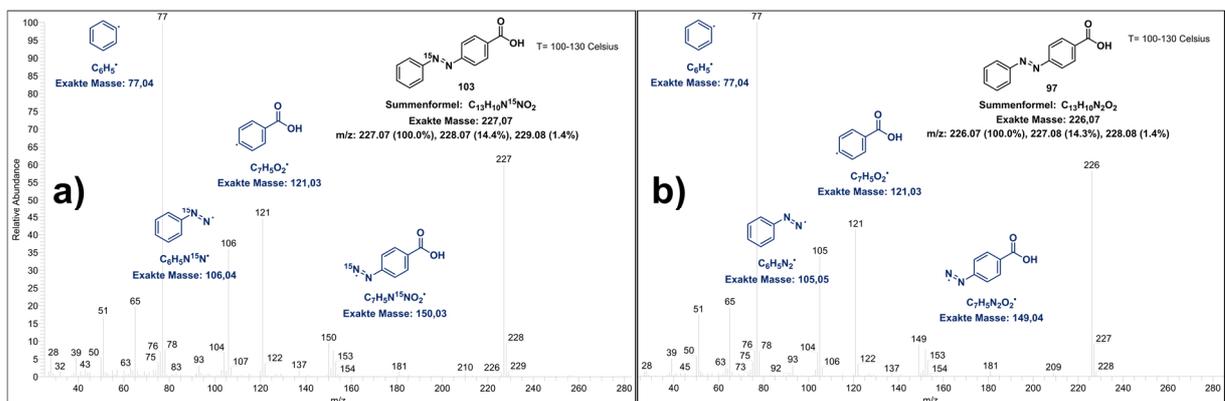


Abbildung 7.2: Vergleich der EI-Massenspektren des  $^{15}\text{N}$ -markierten Derivates **103** (a) und des nicht isotopenmarkierten Azofarbstoffes **97** (b). Weiterhin dargestellt die Zielstrukturen (schwarz) und die durch Elektronenstoß-Ionisation erhaltenen Molekülfragmente (blau).

Im Vergleich der beiden Massenspektren wird ersichtlich, dass durch die Isotopenmarkierung der Molekülionenpeak von 226 m/z für den unmarkierten Azofarbstoff **97** auf 227 m/z für das  $^{15}\text{N}$ -markierte Derivat **103** ansteigt. Für den unmarkierten Azofarbstoff **97** können zwei Fragmentierungswege beobachtet werden. Eine Fragmentierung führt zum Benzylradikal

( $m/z = 77$ ) und dem Diazylbenzoesäureradikal mit  $m/z = 149$ . Die zweite Fragmentierung erfolgt auf der anderen Seite der Azobrücke, wobei das Diazylbenzolradikal ( $m/z = 105$ ) und das Benzoesäureradikal ( $m/z = 121$ ) entstehen. Für den  $^{15}\text{N}$ -markierten Farbstoff **103** können ebenfalls beide Fragmentierungswege beobachtet werden, allerdings unterscheiden sich die Massen zweier Fragmente im Vergleich zum unmarkierten Azofarbstoff **97**. Für das Diazylbenzoesäure- ( $m/z = 106$ ), als auch das Diazylbenzolradikal ( $m/z = 150$ ) erhöht sich das Massen/Ladungs-Verhältnis um Eins. Die Massen der anderen Fragmente bleiben unverändert, was die Isotopenmarkierung eines Stickstoffes in der Azobrücke bestätigt.

Um die Schaltbarkeit des Azofarbstoffes zu untersuchen, wurden  $^{15}\text{N}$  Festkörper-NMR-Messung, sowohl am reinen  $^{15}\text{N}$ -markierten Azofarbstoff **103** (Abbildung 7.3a) als auch an der oberflächengebundenen Spezies (Abbildung 7.3b) durchgeführt.

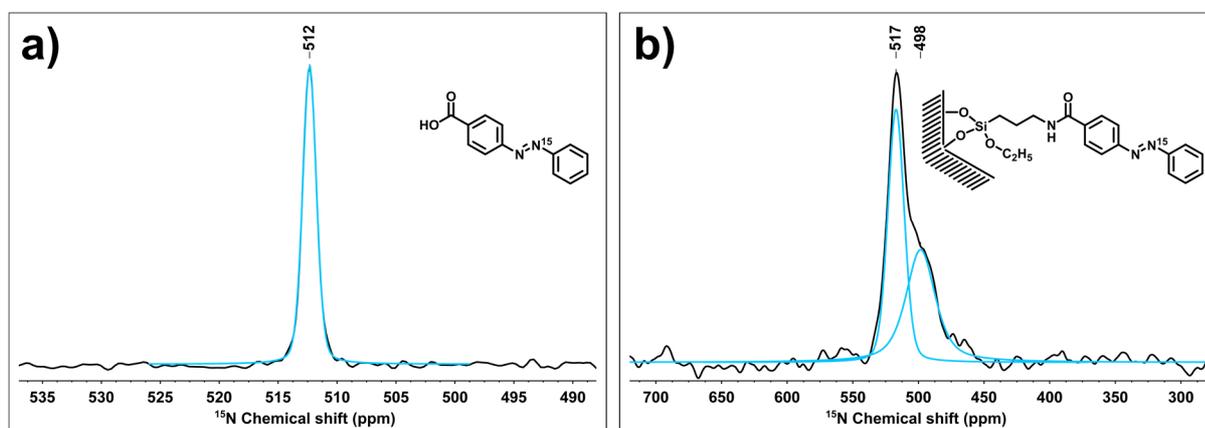
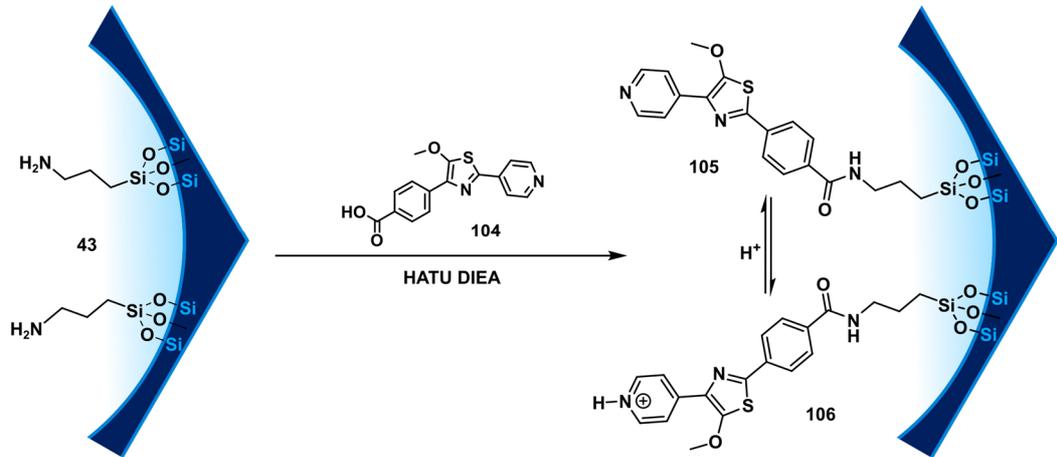


Abbildung 7.3: Links:  $^{15}\text{N}$  CP MAS NMR-Spektrum des carboxyfunktionalisierten Azofarbstoffes **103** (12kHz). Rechts:  $^{15}\text{N}$  CP MAS NMR-Spektrum des Azofarbstoff-APTES-funktionalisierten SBA-15 (12kHz). Die Verschiebungen sind bezogen auf Ammoniumchlorid (0 ppm) mit Glycin (33,7 ppm) als externer Standard.

Das  $^{15}\text{N}$  CP MAS NMR-Spektrum des  $^{15}\text{N}$ -markierten Azofarbstoffes **103** zeigt eine Resonanz bei 512 ppm, welche dem  $^{15}\text{N}$ -markierten Stickstoffatom der Azobrücke zugeordnet werden kann. Das Spektrum der oberflächengebundenen Spezies des markierten Farbstoffes zeigt zwei Resonanzen bei 498 ppm und 517 ppm. Auch diese können dem markierten Stickstoffatom der Azobrücke zugeordnet werden. Hierbei ist anzumerken, dass die Resonanzen der oberflächengebundenen Spezies deutlich größere Linienbreiten aufweisen. Die Aufspaltung der Stickstoffresonanz in zwei Resonanzen lässt das Vorliegen von sowohl *cis*- als auch *trans*-Isomeren an der Oberfläche vermuten. Weiter Untersuchungen dieses schaltbaren Farbstoffes und der zugehörigen oberflächengebundenen Spezies sind jedoch notwendig, um diese Vermutung zu bestätigen.

Im Rahmen des LOEWE iNAPO-Kooperationsprojektes konnte weiterhin die Anbindung eines Fluoreszenzfarbstoffes **104** an APTES-funktionalisierten Materialien **43**, unter Verwendung äquivalenter Kopplungsbedingungen, erreicht werden (Schema 7.3).



Schema 7.3: Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffes **104** an eine APTES-funktionalisierte Silicaoberfläche **43** unter Verwendung von HATU und DIEA zur Herstellung des modifizierten Silicamaterials **105/106**

Die Anbindung an die Oberfläche wurde auch hier mittels <sup>13</sup>C CP MAS NMR-Messungen überprüft (Abbildung 7.4). Das <sup>13</sup>C CP MAS NMR-Spektrum der APTES-funktionalisierten Oberfläche **43** (Abbildung 7.4a) zeigt die zuvor beschriebenen Resonanzen.

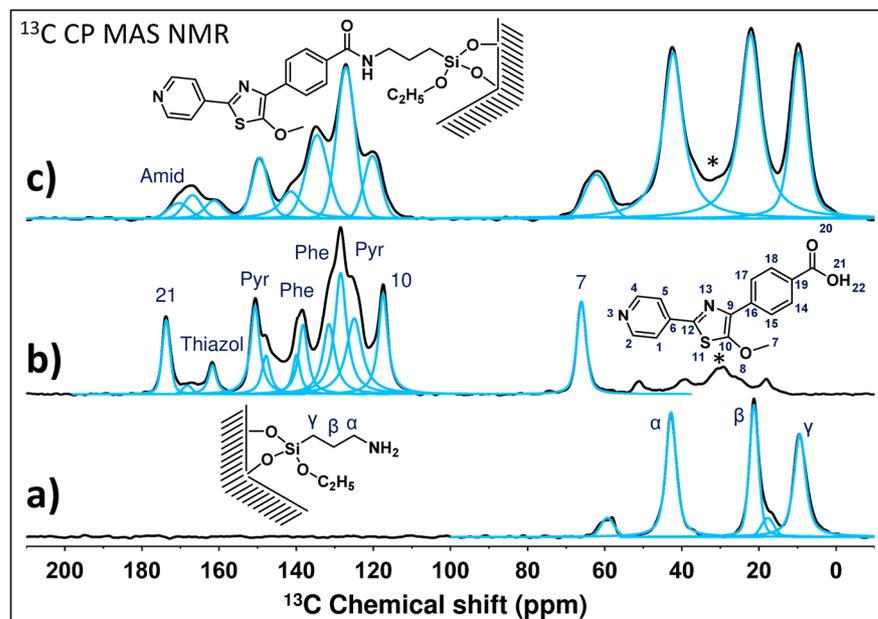


Abbildung 7.4: Vergleich der <sup>13</sup>C CP MAS NMR-Spektren von funktionalisiertem SBA-15 und dem angebondenen Fluoreszenzfarbstoff. a): APTES-funktionalisiertes SBA-15 **43** mit Signalzuordnung (6kHz). b): Fluoreszenzfarbstoff **104** mit Signalzuordnung (10kHz). c): Fluoreszenzfarbstoff-APTES-funktionalisiertes SBA-15 **105/106** (10kHz). Phe = Phenyl; Pyr = Pyridin

---

Das  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR-Spektrum des Fluoreszenzfarbstoffes **104** (Abbildung 7.4b) zeigt eine Resonanz bei 66 ppm, eine Gruppe von Resonanzen zwischen 117 ppm und 150 ppm, eine Resonanz bei 162 ppm und eine Resonanz bei 174 ppm. Hierbei kann das Signal bei 66 ppm der Methylgruppe des Ethers zugewiesen werden. Die Resonanzgruppe zwischen 117 ppm und 150 ppm lässt sich den aromatischen Kohlenstoffen des Phenyls, Pyridins und Thiazols zuordnen. Eine genaue Zuordnung der Signale ist aufgrund der Linienbreite nicht möglich. Die Resonanz bei 162 ppm lässt sich den beiden Kohlenstoffatomen des Thiazols zuordnen, welche die Brücke zu den anderen beiden Aromaten bilden. Weiterhin lässt sich die Resonanz bei 174 ppm dem Carbonylkohlenstoff zuordnen. Analog zur Beobachtung der Anbindung des Azofarbstoffes zeigt das Spektrum der Fluoreszenzfarbstoff-APTES-funktionalisierten Oberfläche **105/106** (Abbildung 7.4c) alle zuvor beschriebenen Resonanzen des APTES-Linkers **43**, als auch des Fluoreszenzfarbstoffes **104**. Es resultiert durch die Oberflächenanbindung eine Linienverbreiterung und Verschiebung einiger Resonanzen. Die Verschiebung der Carbonylkohlenstoffresonanz bei 174 ppm zu geringeren Werten ist ein starkes Indiz für die Ausbildung einer Amidbindung.

Dieser Farbstoff ließ sich mit dem hier entwickelten Kopplungssystem weiterhin auf APTES-funktionalisierte Glaträger für optische Anwendungen übertragen. Der hier angebrachte Farbstoff kann am Stickstoff des Pyridins protoniert werden, was zu einer Änderung der Fluoreszenzeigenschaften führt. Somit lässt er sich als pH-Sensor verwenden.

Um eine solche Protonierung zu untersuchen und um die Anbindung über Amide im vorangegangenen Abschnitt eindeutig nachzuweisen, sind  $^{15}\text{N}$ -Festkörper-NMR-Messungen notwendig. Diese erfordern jedoch eine kostenintensive  $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkierung oder DNP-verstärkte Festkörper-NMR-Messungen, die den Rahmen dieser Arbeit übersteigen und in einem Folgeprojekt durchgeführt werden.

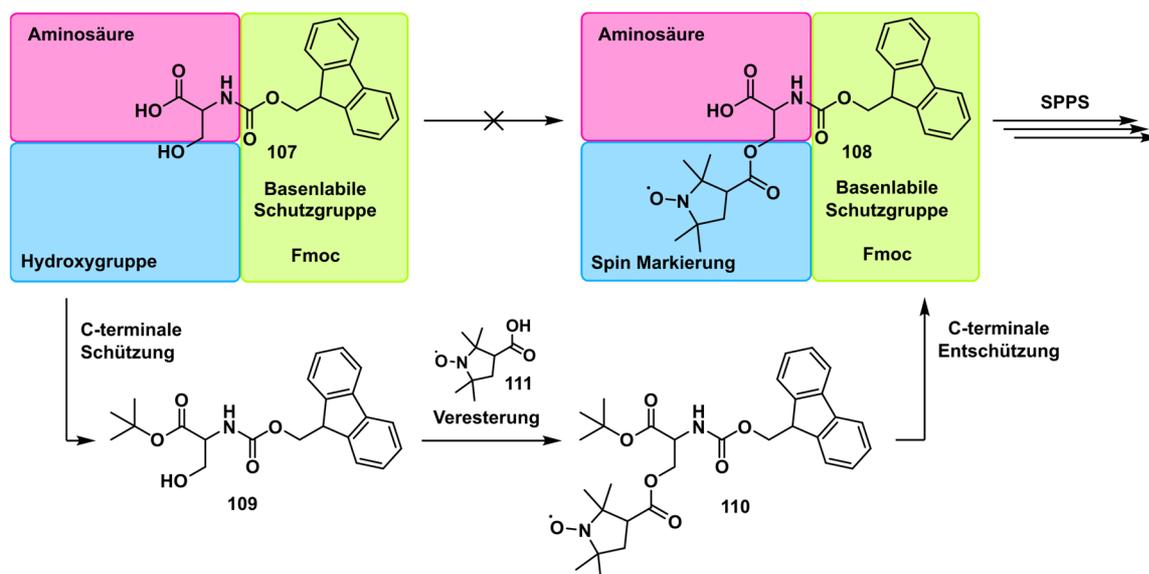
---

## 7.5. Funktionalisierung von Aminosäuren für DNP-Anwendungen

Das Potential der DNP-verstärkten Festkörper-NMR für die Charakterisierung von funktionalisierten Oberflächen wurde im letzten Abschnitt bereits eindrucksvoll gezeigt. Weiterhin wurde in Kapitel 5.2.2 (Herstellung spinmarkierter Peptide) verdeutlicht, dass diese ein hohes Anwendungspotential für EPR- und DNP Untersuchungen besitzen. Eine gezielte Spinmarkierung oberflächengebundener Peptide sollte die orts aufgelöste Strukturaufklärung erlauben. Die Nachteile von postsynthetischen Wegen zur Spinmarkierung von Peptiden wurden bereits erläutert. Da oberflächengebundene Peptide sehr schlecht für weitere Markierungen zugänglich sind, ist der postsynthetische Weg hierfür noch deutlich ungeeigneter. Daher bietet sich hier der direkte Einbau der Spinmarkierung während der Peptidsynthese an.

Das Ziel ist deshalb die Herstellung eines Aminosäurepräkursors, der es erlaubt eine Spinmarkierung gezielt, mittels SPPS-Strategie, in ein Peptid einzubringen. Ein dafür geeigneter Aminosäurepräkursor muss die Spinmarkierung an der Seitenkette, eine freie COOH-Gruppe am C-Terminus und eine Fmoc-Schutzgruppe am N-Terminus tragen **108** (Schema 7.4). Um den hier präsentierten Ansatz vielseitig anwendbar zu machen, soll die Hydroxygruppe der Aminosäure zur Seitenkettenmodifikation genutzt werden, da sie an den drei Aminosäuren Serin (Ser) **30**, Threonin (Thr) **31** und Tyrosin (Tyr) **32** vorhanden ist. Als Kopplungsreaktion mit dem (Carboxy)Label **111** kommt prinzipiell eine Veresterung der Seitenkette in Frage. Wird eine gewöhnliche Fmoc-Aminosäure **107**, mit freier COOH- und Hydroxygruppe, klassischen Veresterungsbedingungen ausgesetzt, findet jedoch eine intramolekulare Nebenreaktion zwischen diesen beiden Gruppen statt. Um diese Problematik zu umgehen kommt eine Schützung der C-terminalen COOH-Gruppe mit anschließender Veresterung der Hydroxyseitenkette mit dem Carboxylabel **111** als Alternative zum Einsatz. Anschließende Abspaltung dieser Schutzgruppe führt zum gewünschten Präkursor **108** (Schema 7.4).

Die C-terminale Schutzgruppe muss hierbei so gewählt werden, dass bei deren Abspaltung die basisch spaltbare Fmoc-Gruppe am N-Terminus der Aminosäure nicht abgespalten wird. Folglich kommen nur sauer abspaltbare Schutzgruppen für die Schützung des C-Terminus in Betracht.



Schema 7.4: Schematischer Syntheseweg von der Fmoc-geschützten Aminosäure **107** über die Funktionalisierung der Hydroxyseitenkette zum spinmarkierten Aminosäurepräkursor **108** für SPPS-Anwendungen am Beispiel der Aminosäure Serin

Der so hergestellte Präkursor kann per SPPS in ein beliebiges Peptid eingesetzt werden, was die gezielte Spinmarkierung von Peptiden erlaubt. Dieser Ansatz wurde für die drei Aminosäuren Serin, Tyrosin und Hydroxyprolin umgesetzt. Im Anschluss konnte mit den Präkursoren ein Beispielpeptid mittels SPPS hergestellt werden und die Aktivität der eingebrachten Spinmarkierung mittels EPR und DNP-NMR nachgewiesen werden. Die zugehörigen Ergebnisse sind zur Publikation eingereicht und befinden sich unter Revision. Die letzte Version dieses Manuskriptes ist im Folgenden angehängt. Dieser Ansatz ist ebenfalls kompatibel zum zuvor beschriebenen Funktionalisierungsprinzip von Oberflächen mit Fmoc-Aminosäuren und erlaubt somit auch eine gezielte Markierung von oberflächengebundenen Peptiden.

Die Ergebnisse dieses Abschnittes sind zur Publikation eingereicht in *ChemPhysChem*:

M. Brodrecht, K. Herr, S. Bothe, M. de Oliveira Jr., T. Gutmann and G. Buntkowsky  
Efficient building-blocks for solid state peptide synthesis of spin-labeled peptides for EPR and DNP applications

*ChemPhysChem*, **2019**, 20, 1475.

"Reprinted with permission of John Wiley and Sons © 2019". Die Electronic Supplementary Information ist abgedruckt und ist in der elektronischen Version dieses Artikels

(10.1002/cphc.201900211) abrufbar.

# Efficient Building Blocks for Solid-Phase Peptide Synthesis of Spin Labeled Peptides for Electron Paramagnetic Resonance and Dynamic Nuclear Polarization Applications

Martin Brodrecht,<sup>[a]</sup> Kevin Herr,<sup>[a]</sup> Sarah Bothe,<sup>[a]</sup> Marcos de Oliveira, Jr.,<sup>[a]</sup> Torsten Gutmann,<sup>[a, b]</sup> and Gerd Buntkowsky<sup>\*[a]</sup>

Specific spin labeling allows the site-selective investigation of biomolecules by EPR and DNP enhanced NMR spectroscopy. A novel spin labeling strategy for commercially available Fmoc-amino acids is developed. In this approach, the PROXYL spin label is covalently attached to the hydroxyl side chain of three amino acids hydroxyproline (Hyp), serine (Ser) and tyrosine (Tyr) by a simple three-step synthesis route. The obtained PROXYL containing building-blocks are N-terminally protected by the Fmoc-protection group, which makes them applicable for the use in solid-phase peptide synthesis (SPPS). This approach allows the insertion of the spin label at any desired position during SPPS, which makes it more versatile than the widely

used post synthetic spin labeling strategies. For the final building-blocks, the radical activity is proven by EPR. DNP enhanced solid-state NMR experiments employing these building-blocks in a TCE solution show enhancement factors of up to 26 for <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C (<sup>1</sup>H→<sup>13</sup>C cross-polarization). To proof the viability of the presented building-blocks for insertion of the spin label during SPPS the penta-peptide Acetyl-Gly-Ser(PROXYL)-Gly-Gly-Gly was synthesized employing the spin labeled Ser building-block. This peptide could successfully be isolated and the spin label activity proved by EPR and DNP NMR measurements, showing enhancement factors of 12.1 ± 0.1 for <sup>1</sup>H and 13.9 ± 0.5 for <sup>13</sup>C (direct polarization).

## 1. Introduction

Structure determination of biological molecules, such as peptides or proteins is a major challenge in biological, chemical and medical research. In the last years, methods like high-resolution dynamic nuclear polarization (DNP) solid-state nuclear magnetic resonance (ssNMR)<sup>[1–6]</sup> and electron paramagnetic resonance (EPR)<sup>[7–11]</sup> significantly contributed to the structural characterization of these biomolecules. Both techniques require a paramagnetic residue within the sample and in order to perform local analyses, these paramagnetic residues must also have a specific location in the molecule.<sup>[12,13]</sup>

The most frequently used organic spin labels consist of nitroxyl derived radicals such as (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-yl)oxyl (TEMPO) or (2,2,5,5-Tetramethylpyrrolidin-1-yl)oxyl (PROXYL), respectively their derivatives. The site specific insertion of these paramagnetic centers into a biomolecule, the so-called spin labeling, is a major challenge in organic chemistry and biochemistry. The most common way to spin label peptides or proteins is a post synthetic approach. In this approach, the target molecules are synthesized chemically or biologically and the spin label is chemically attached after the synthesis. While

this approach seems conceptually easy, it is in reality challenging due to the variety of functional groups exposed in the large amount of amino acids present in these biomolecules. In order to achieve a specific labeling at one position, a unique binding site, e.g. a unique amino acid, must be inserted at the targeted position in the peptide or protein. Even when this challenging step is achieved, the post synthetic coupling of the spin label often suffers from low conversion or poor selectivity.<sup>[14,15]</sup> For peptides, proteins and enzymes mostly cysteine sites are used for subsequent functionalization.<sup>[16–22]</sup> An alternative post-synthetic approach is the labelling via tyrosine residues.<sup>[23,24]</sup>

A conceptually elegant approach to solve the labeling problem was proposed by Vitzhum et al.<sup>[25]</sup> They first synthesize the desired peptide without spin label by solid-phase peptide synthesis and afterwards add the spin label to the C-terminus at the free carboxyl-group of the cleaved peptide. The drawback of this approach is that the spin label can be attached only at one end (C-terminus) of the peptide chain and not in any position inside the chain, which renders it less attractive e.g. for EPR applications like PELDOR/DEER.<sup>[10,26–30]</sup>

Another post-synthetic approach employs “click-chemistry” based synthesis strategies, due to their selectivity to certain functional groups, which are not present in any natural amino acid.<sup>[31,32]</sup> However click-chemistry requires special functional precursors for the coupling including reactive groups such as azides (N=N=N) or alkynes (C≡C). These precursors have to be inserted in the form of a non-natural amino acid during peptide/protein synthesis, which is mostly done by solid-phase peptide synthesis (SPPS). Afterwards the specific functional group is coupled to the corresponding functional group at the spin label. These precursors are often expensive or not

[a] M. Brodrecht, K. Herr, S. Bothe, Dr. M. de Oliveira, Jr., Dr. T. Gutmann, Prof. Dr. G. Buntkowsky  
Institut für Physikalische Chemie, Technische Universität Darmstadt, 64287 Darmstadt, Germany  
E-mail: gerd.buntkowsky@chemie.tu-darmstadt.de

[b] Dr. T. Gutmann  
University Kassel, Institute for Chemistry, Heinrich-Plett-Straße 40, D-34132 Kassel

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/cphc.201900211>

commercially available at all. Moreover, although there are copper free approaches,<sup>[33]</sup> which were successfully employed for orthogonal spin labeling<sup>[34]</sup> common click-chemistry uses a copper catalyst, which is not compatible with many biological systems.<sup>[32,35]</sup>

An alternative approach to post-synthetic modification is the insertion of the spin label during synthesis of the target molecule, employing e.g. non-natural amino acid radicals as spin label. Until now, this approach is not widely used, since the spin label must preserve its paramagnetic character through the whole synthesis and purification process of SPSS. The only reported radical spin label, which fulfills this criterion is Fmoc-TOAC **01** (Figure 1).<sup>[36–40]</sup> Since the strong geometric constraints

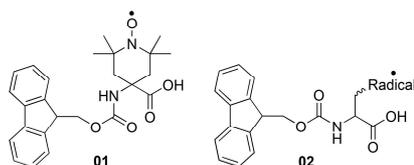


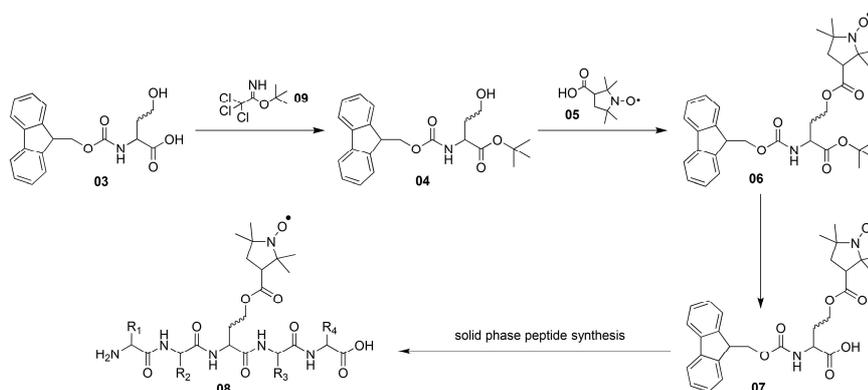
Figure 1. Chemical structure of the commonly used TOAC (left) and the schematic structure of a side chain functionalized amino acid (right).

of the TOAC-radical influence the secondary structure of the peptide backbone, its application is restricted to those cases,<sup>[7,14,41]</sup> where the secondary structure of the peptide/protein close to the spin label is of minor concern to the spectroscopic question.

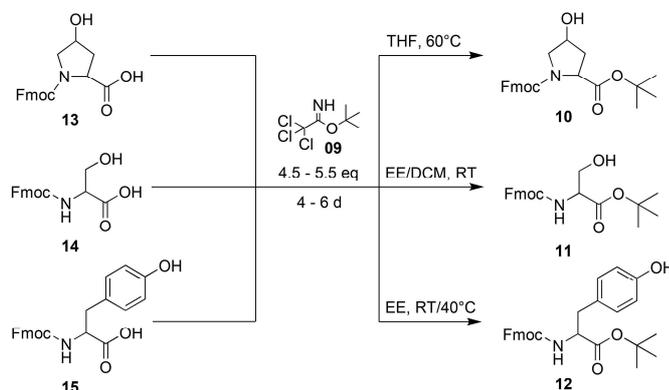
For these reasons, we decided to develop a robust and versatile spin labeling strategy, where the peptide conformation and configuration is only minimally distorted. Our approach is based on non-natural amino acid radicals, which carry a stable radical on its side chain **02** and can be used in SPSS (Figure 1).

In this work, an efficient way to modify hydroxyl side chains of amino acids (hydroxyproline, serine, tyrosine) with a PROXYL radical is presented, which makes them applicable in SPSS as a building-block. This approach allows the introduction of the spin label at any position in a peptide or protein without weakening the secondary structure seriously. Furthermore, it eases the synthesis of peptide-based bio-compatible radicals for DNP applications by SPSS. As a requirement, the SPSS building-block needs to carry a Fmoc-protection group at its nitrogen and must have an accessible COOH group to couple it during the SPSS. The general synthetic pathway to achieve the PROXYL radical coupling to the hydroxyl group of an amino acid by preserving the Fmoc-group at the N-terminus is illustrated in Scheme 1. The first reaction step is to protect the carboxylic group of the amino acid **03** to avoid intermolecular reactions during the next reaction steps. The protected amino acid **04** is coupled then in an esterification reaction with 3-carboxy-PROXYL **05** to obtain the spin labeled amino acid **06**. After that, the 'Bu protection group has to be cleaved to recover the carboxylic group resulting in the final amino acid building-block **07**. Finally, the obtained building-block **07** could be incorporated into any peptide of choice at any position by SPSS resulting in the spin labeled peptide **08**.

The success of our strategy is demonstrated for the commercially available Fmoc-amino acids hydroxyproline, serine and tyrosine, which are modified with a stable radical via their OH side chain. EPR and DNP NMR are performed to show that the radicals at the building-block side chains stay active after all reaction steps. It is also demonstrated that the presented building-blocks are feasible for the use in SPSS. Therefore, one building-block is incorporated into a small peptide by a standard SPSS protocol and the spin label activity in the peptide is proved by EPR and DNP NMR measurements.



Scheme 1. General synthesis of the PROXYL functionalized amino acid building-block **07** by protection of the amino acid **03**, esterification reaction with 3-carboxy-PROXYL **05** and final deprotection of the 'Bu ester **06**. Standard SPSS protocols can be used to obtain the spin labeled peptide **08**.



**Scheme 2.** Synthesis of <sup>t</sup>Bu protected amino acids Fmoc-NH-Hyp(OH)-O<sup>t</sup>Bu **10**, Fmoc-NH-Ser(OH)-O<sup>t</sup>Bu **11**, Fmoc-NH-Tyr(OH)-O<sup>t</sup>Bu **12** by the reaction of the Fmoc-amino acids Fmoc-NH-Hyp(OH)-OH **13**, Fmoc-NH-Ser(OH)-OH **14**, Fmoc-NH-Tyr(OH)-OH **15** with acetimidate **09**.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Synthesis of PROXYL Side-Chain-Modified Amino Acids

The synthesis of the <sup>t</sup>Bu protected amino acids Fmoc-NH-Hyp(OH)-O<sup>t</sup>Bu **10**, Fmoc-NH-Ser(OH)-O<sup>t</sup>Bu **11**, Fmoc-NH-Tyr(OH)-O<sup>t</sup>Bu **12** was adapted from the synthesis strategy described in the literature (Scheme 2).<sup>[42,43]</sup> Tert-butyl 2,2,2-trichloroacetimidate **09** was used to protect the carboxylic group of the appropriate amino acids Fmoc-NH-Hyp(OH)-OH **13**, Fmoc-NH-Ser(OH)-OH **14**, Fmoc-NH-Tyr(OH)-OH **15**. To ensure full conversion of the carboxylic group, a large excess of acetimidate **09** and long reaction times were chosen. These conditions allowed us to use the crude product without further purification in the next reaction step. This conversion product, however, does not interfere with the next reaction step.

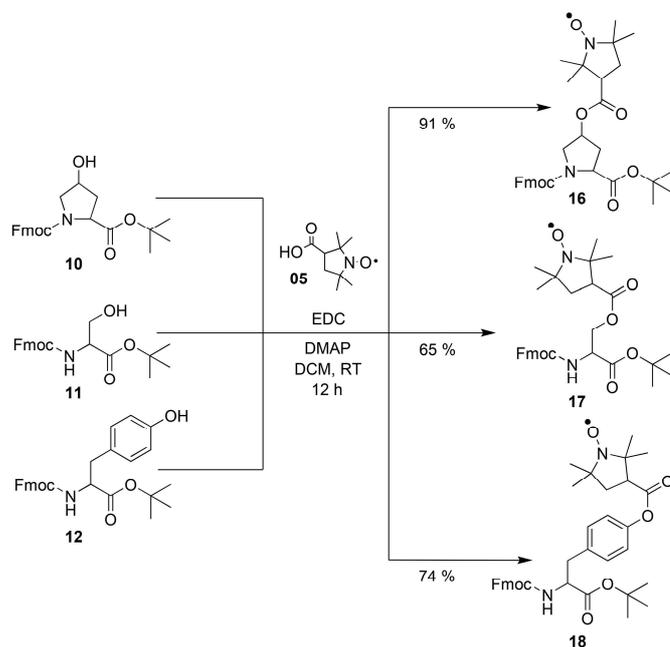
The synthesis of the spin labeled amino acids Fmoc-NH-Hyp(OOC-Proxyl)-O<sup>t</sup>Bu **16**, Fmoc-NH-Ser(OOC-Proxyl)-O<sup>t</sup>Bu **17**, Fmoc-NH-Tyr(OOC-Proxyl)-O<sup>t</sup>Bu **18** was achieved by an adapted synthesis strategy from the literature (Scheme 3).<sup>[44]</sup> The esterification between the amino acids **10**, **11**, **12** hydroxyl groups and the 3-carboxy-PROXYL **05** spin label was realized by using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid hydrochloride **19** (EDC·HCl) and 4-dimethylaminopyridine **20** (DMAP) as coupling agents. The reaction for all three amino acids were successfully performed with minimal adjustments of the reaction conditions. Excellent yields ranging from 65% to 91% were found. Both coupling agents could be removed after the reaction by aqueous extraction. Minimal impurities of the urea derivative from converted EDC do not interfere in the next reaction step.

The final building-blocks Fmoc-NH-Hyp(OOC-Proxyl)-OH **21**, Fmoc-NH-Ser(OOC-Proxyl)-OH **22** and Fmoc-NH-Tyr(OOC-Proxyl)-OH **23** have been obtained by <sup>t</sup>Bu deprotection of the esters **16**, **17** and **18** in a DCM/TFA mixture according to the literature.<sup>[45]</sup> The reaction was successful for all amino acids in

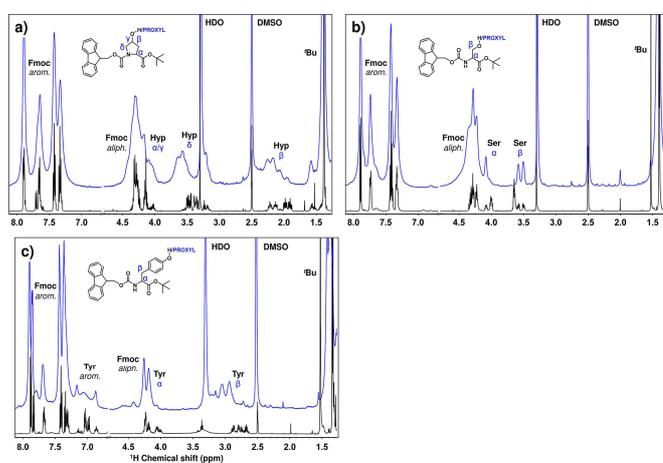
good yields (Scheme 4). Although, after this final step, a precise column chromatographic purification had to be performed for all products since their usage in SPPS and spin labeling applications requires high purities. This slightly reduces the yield but results in purities obtained by HPLC (ESI) of >99% for all final building-blocks.

### 2.2. Proof of Radical Activity by EPR and Solid-State DNP NMR

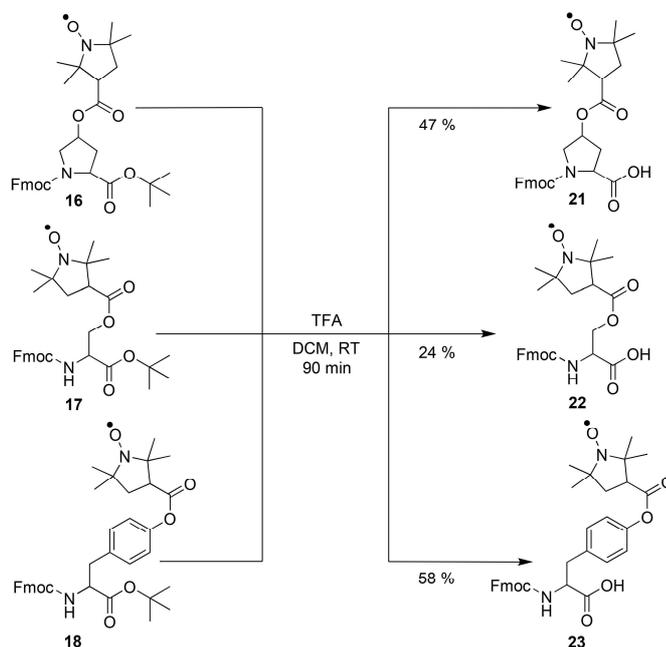
Despite the paramagnetic character of the spin label, solution-state NMR characterization after the esterification reaction between the amino acids **10**, **11**, **12** and the spin label 3-carboxy-PROXYL **05** gives first hints, whether the spin label was correctly coupled to the amino acid. Therefore, <sup>1</sup>H-NMR measurements of the PROXYLated species **16**, **17**, **18** were performed and compared with the spectra before the spin label was attached (Figure 2). By comparing the spectra of all amino acids before (black) and after (blue) introduction of the spin label a broadening of all signals is obtained. This broadening is related to the paramagnetic character of the spin label and clearly indicates that the spin label is active.<sup>[46-50]</sup> Furthermore, the comparison shows that all signals are preserved during the coupling step. Some signals are shifted which implies a proximity of these nuclei to the radical in the sample.<sup>[48,51,52]</sup> This particularly applies to hydrogens close to the spin label such as the α (β, γ, δ) groups of the amino acids. The signals of the Fmoc-group are also broadened but not shifted because they are weaker influenced by the spin label. Since the signal broadening comes along with a decrease in resolution the assignment and therefore the structural analysis of the spin labeled amino acids becomes challenging. Therefore, the proof of covalent binding of the spin label is analyzed in detail by mass spectrometry, since the amino acids can be reliably analyzed by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) under mild ionization without fragmentation. For all synthe-



**Scheme 3.** Synthesis of the side chain PROXYLated amino acids Fmoc-NH-Hyp(OOC-PROXYL)-O<sup>t</sup>Bu 16, Fmoc-NH-Ser(OOC-PROXYL)-O<sup>t</sup>Bu 17, Fmoc-NH-Tyr(OOC-PROXYL)-O<sup>t</sup>Bu 18 by the esterification reaction of the <sup>t</sup>Bu protected amino acids Fmoc-NH-Hyp(OH)-O<sup>t</sup>Bu 10, Fmoc-NH-Ser(OH)-O<sup>t</sup>Bu 11, Fmoc-NH-Tyr(OH)-O<sup>t</sup>Bu 12 with 3-Carboxy-PROXYL 05.



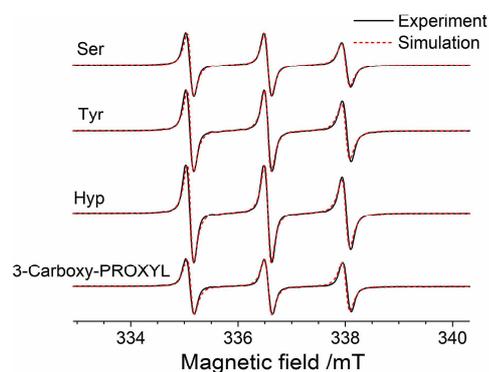
**Figure 2.** Comparison of the <sup>1</sup>H-NMR spectra before and after the PROXYL coupling for each amino acid recorded at RT and 500 MHz. a) Fmoc-NH-Hyp(OH)-O<sup>t</sup>Bu 10 (black), Fmoc-NH-Hyp(OOC-PROXYL)-O<sup>t</sup>Bu 16 (blue); b) Fmoc-NH-Ser(OH)-O<sup>t</sup>Bu 11 (black), Fmoc-NH-Ser(OOC-PROXYL)-O<sup>t</sup>Bu 17 (blue); c) Fmoc-NH-Tyr(OH)-O<sup>t</sup>Bu 12 (black), Fmoc-NH-Tyr(OOC-PROXYL)-O<sup>t</sup>Bu 18 (blue).



**Scheme 4.** Synthesis of the amino acid building-blocks Fmoc-NH-Hyp(OOC-Proxyl)-OH **21**, Fmoc-NH-Ser(OOC-Proxyl)-OH **22**, Fmoc-NH-Tyr(OOC-Proxyl)-OH **23** by deprotection of the carboxylic group of the t-Bu esters Fmoc-NH-Hyp(OOC-Proxyl)-O<sup>t</sup>Bu **16**, Fmoc-NH-Ser(OOC-Proxyl)-O<sup>t</sup>Bu **17**, Fmoc-NH-Tyr(OOC-Proxyl)-O<sup>t</sup>Bu **18**.

sized building-blocks the expected masses were found in the ESI-MS spectra ( $[M+H]^+$  = 577.3 m/z for Hyp,  $[M+H]^+$  = 551.3 m/z for Ser and  $[M+H]^+$  = 551.3 m/z for Tyr), which exactly fit the calculated masses including their corresponding isotope pattern (ESI S20, S22 and S24). In addition, also doubly protonated  $[M+2H]^+$  and sodium adducts  $[M+Na]^+$  were found.

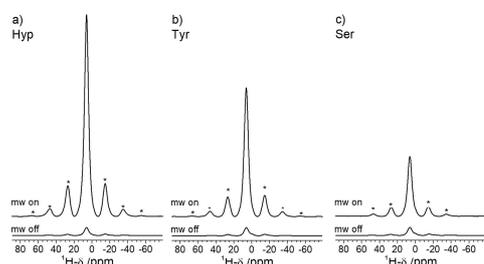
After the final deprotection step, the purified building-blocks were analyzed by EPR to probe their paramagnetic activity. Figure 3 shows EPR spectra for all three paramagnetic building-blocks (**21**, **22**, **23**) and for the 3-carboxyl-PROXYL precursor (**05**), measured at 298 K (black curves in Figure 3). Samples were diluted in 1,1,2,2-Tetrachlorethan (TCE) at concentrations of 1 mM. All substrate amino acids (**13**, **14**, **15**) and protected amino acids before PROXYL coupling (**10**, **11**, **12**) do not show any EPR signal. The EPR spectra for all PROXYL-containing samples (Figure 3) show a triplet characteristic of nitroxide radicals, originated by the hyperfine interaction between the unpaired electron spin to the  $^{14}\text{N}$  nitrogen ( $S=1$ ) in a fast motion regime. The observed lines could be satisfactorily simulated (red curves in Figure 3) by considering axial  $A$ - and  $g$ -tensors, with  $g_{\perp}=2.0071$ ,  $g_{\parallel}=2.0026$ ,  $A_{\perp}=12$  MHz,  $A_{\parallel}=98$  MHz, and isotropic Brownian rotational diffusion. Best-fit simulations were obtained for rotational correlation times of  $0.5 \pm 0.2$  ns for the 3-carboxyl-PROXYL, and of the



**Figure 3.** Experimental (black curves) and simulated (red curves) EPR spectra of the final building-blocks for each amino acid and for the 3-carboxyl-PROXYL precursor **05**; (Hyp: hydroxyproline **21**; Tyr: tyrosine **23**; Ser: serine **22**) measured at 298 K. Experimental conditions were identical for all samples. Samples were measured at concentrations of 1 mM in TCE. For the simulations axial symmetry was considered for the  $A$ - and  $g$ -tensors, with  $g_{\perp}=2.0071$ ,  $g_{\parallel}=2.0026$ ,  $A_{\perp}=12$  MHz,  $A_{\parallel}=98$  MHz. The simulations also consider isotropic Brownian rotational diffusion, with rotational correlation times of  $0.5 \pm 0.2$  ns (3-carboxyl-PROXYL),  $1.2 \pm 0.2$  ns (Hyp) and  $1.3 \pm 0.2$  ns (Tyr, Ser). Convolution with a Lorentzian line with peak-to-peak width of 0.1 mT was performed in order to reproduce the observed linewidths.

order of 1 ns for the amino acid building-blocks. The presence of EPR activity demonstrates that the nitroxyl spin label stays active after all reaction steps of the building-block synthesis. Within the margin of error ( $\pm 5\%$ ) the intensity of the EPR spectra, measured as area under the integrated spectra, of all three building blocks is the same as the intensity observed for the precursor 05. This confirms the quantitative functionalization of the building blocks.

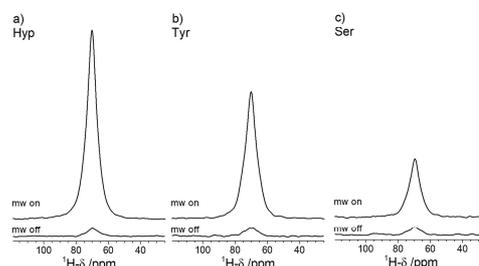
$^1\text{H}$  MAS and  $^1\text{H}\rightarrow^{13}\text{C}$  CP MAS spectra for the paramagnetic building-blocks 21, 22, 23 were recorded to inspect the efficiency of the synthesized building-blocks for DNP applications. The samples were prepared as 60 mM TCE solutions, a concentration where the best DNP enhancement was found for Fmoc-NH-Hyp(OOC-PROXYL)-OH 21 in  $^1\text{H}$  MAS and  $^1\text{H}\rightarrow^{13}\text{C}$  CP MAS experiments (see Figures S27 and S28 in the supplementary material). In the  $^1\text{H}$  MAS spectra (Figure 4), a signal is visible



**Figure 4.**  $^1\text{H}$  MAS spectra recorded at 8 kHz spinning with background suppression with (mw on) and without microwave (mw off) irradiation for 60 mM of the building-block radical in TCE for a) Fmoc-NH-Hyp(OOC-PROXYL)-OH 21, b) Fmoc-NH-Tyr(OOC-PROXYL)-OH 23 and c) Fmoc-NH-Ser(OOC-PROXYL)-OH 22. Spectra are normalized by the maximum intensity of the mw off spectra in order to better show the different enhancement factors. Asterisks indicate spinning sidebands.

at around 6 ppm for all three samples, which clearly refers to the isotropic signal of the solvent TCE. Comparing the  $^1\text{H}$  MAS spectra (Figure 4 a,b,c) with (mw on) and without (mw off) microwave irradiation, it is obtained that the signals in the MW on spectra are enhanced by factors of 25.9 for the hydroxyproline, 16.6 for the tyrosine and 7.8 for the serine building-block (Table 1) compared to the MW off spectra. Very similar signal enhancements (Table 1) are also observed in the  $^{13}\text{C}$  CP MAS spectra of these samples for the signal at 70 ppm of the carbons of TCE (Figure 5). This observation is consistent with a

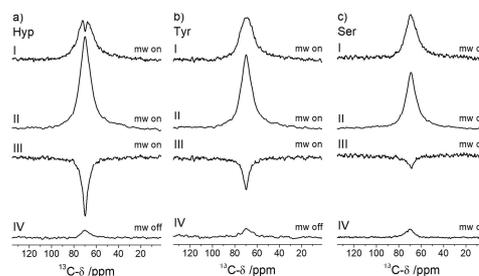
	Hyp (21)	Ser (22)	Tyr (23)
$^1\text{H}$ MAS	25.9 $\pm$ 0.1	16.6 $\pm$ 0.1	7.8 $\pm$ 0.1
$^1\text{H}\rightarrow^{13}\text{C}$ CP MAS	24 $\pm$ 1	16 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1
$^{13}\text{C}$ MAS (direct channel)	12 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1



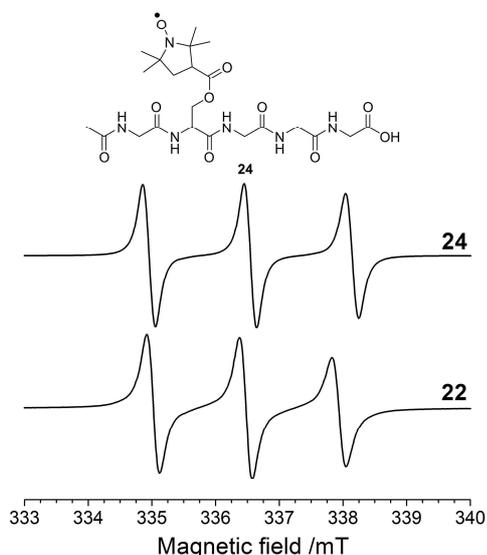
**Figure 5.**  $^1\text{H}\rightarrow^{13}\text{C}$  CP MAS NMR spectra recorded at 8 kHz with (mw on) and without microwave (mw off) irradiation for 60 mM of the building-block radical in TCE for a) Fmoc-NH-Hyp(OOC-PROXYL)-OH 21, b) Fmoc-NH-Tyr(OOC-PROXYL)-OH 23 and c) Fmoc-NH-Ser(OOC-PROXYL)-OH 22. Spectra are normalized by the maximum intensity of the mw off spectra in order to figure out the different enhancement factors.

homogeneous polarization of all  $^1\text{H}$  nuclei in the TCE matrix, which transfer their polarization uniformly to the  $^{13}\text{C}$  nuclei in the CP experiment.<sup>[53]</sup> Thus, all three building-blocks exhibit DNP enhancement.

To quantify the DNP efficiency in  $^{13}\text{C}$  direct polarization experiments,  $^{13}\text{C}$  MAS experiments were recorded employing the saturation recovery pulse sequence. Since next to the direct polarization transfer to  $^{13}\text{C}$  (direct channel), an alternative polarization pathway may occur, where polarization is transferred via the proton spin reservoir (indirect channel),<sup>[54–58]</sup> additional experiments with a pulse sequence containing rotor synchronized  $180^\circ$  pulses on the  $^1\text{H}$  channel<sup>[57]</sup> were recorded. The spectra for the different  $^{13}\text{C}$  MAS experiments are shown in Figure 6. As also found in other systems, the vicinity of the radicals broadens the line-width of the  $^{13}\text{C}$ -signals in the direct channel, compared to the line-width in the indirect channel.<sup>[54–57]</sup>



**Figure 6.**  $^{13}\text{C}$  spectra recorded at 8 kHz spinning of 15 mM of the building-block in TCE for a) Fmoc-NH-Hyp(OOC-PROXYL)-OH 21, b) Fmoc-NH-Tyr(OOC-PROXYL)-OH 23 and c) Fmoc-NH-Ser(OOC-PROXYL)-OH 22. (I)  $^{13}\text{C}$  MAS spectra recorded with microwave (MW on) irradiation, (II) Direct channel  $^{13}\text{C}$  MAS spectra recorded with microwave (MW on) irradiation using the modified  $^{13}\text{C}$  MAS pulse sequence where  $180^\circ$  pulses are employed on the  $^1\text{H}$  channel during build-up of the  $^{13}\text{C}$  magnetization, (III) Indirect channel spectrum calculated as difference of (I) and (II), and (IV)  $^{13}\text{C}$  MAS spectra recorded without microwave (MW off) irradiation.



**Figure 7.** Experimental X-band EPR spectra of the synthesized peptide Acetyl-Gly-Ser(OOC-PROXYL)-Gly-Gly-Gly **24** in water (top) and used hydroxyproline Fmoc-NH-Ser(OOC-PROXYL)-OH **22** building-block in TEC (bottom) measured at 298 K. Spectra were normalized by the maximum intensity. Experimental conditions were identical for all two samples. Samples were measured at concentrations of 15 mM at ambient pH.

The enhancement for  $^{13}\text{C}$  MAS direct polarization (direct channel) was extracted by comparing the mw on spectra in Figure 6 II and the mw off spectra in Figure 6 IV. Enhancement factors of  $12 \pm 1$ ,  $9 \pm 1$  and  $7 \pm 1$  (Table 1) were obtained for the hydroxyproline, tyrosine and serine building blocks, respectively. These enhancements are smaller compared to the enhancements observed in the  $^1\text{H}$  and  $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$  CP MAS experiments. A feasible explanation is the field dependence of the  $^{13}\text{C}$  enhancement, which may differ from the  $^1\text{H}$  enhancement (see for example<sup>[54]</sup>). The detailed investigation of this field dependency or an optimization of the transfer conditions and in particular the polarization field is however beyond the scope of the present work. Comparing the three building blocks, the best enhancements are obtained for the hydroxyproline (**21**) with enhancements of 25.9, 24, and 12 for  $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$  CP MAS,  $^1\text{H}$  MAS and  $^{13}\text{C}$  MAS (direct channel) respectively.

The obtained  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -enhancement factors are one order of magnitude smaller than the typical enhancements obtainable by "DNP juice" biradical solutions under favorite conditions. However, the "DNP juice" approach does not permit site-selective spin labelling. Comparing the enhancements obtained by our approach to the previously reported ones employing a tethered biradical (TOTAPOL),<sup>[21,22,25]</sup> which allow site-labelling only on the C-terminus, it is evident that our approach is more versatile with respect to the position of the

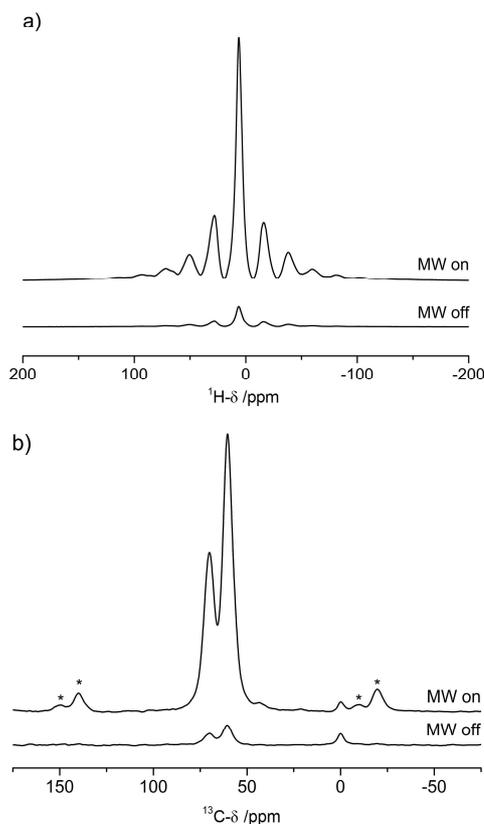
label and the enhancements obtained by us are of the same size or exceed them.

### 2.3. EPR- and DNP Activity of the Spin Labels in a Synthesized Peptide

In the next step the stability and the EPR- and DNP activity of the building-blocks inside an SPPS-synthesized peptide has to be validated. For this, the five-residue peptide with the sequence Acetyl-Gly-Ser(OOC-PROXYL)-Gly-Gly-Gly **24** was synthesized as a simple model-peptide using a standard SPPS protocol<sup>[59,60]</sup> on a chlorotriyl resin, by using the synthesized building-block the Fmoc-NH-Ser(OOC-PROXYL)-OH **22** in the same way as a standard Fmoc-protected amino acid. The peptide cleavage from the resin was performed using strongly acidic conditions of 95% TFA, which is the most common condition for the cleavage step. The peptide was analyzed and purified by HPLC (S25). In the ESI-MS spectra (S26) the calculated mass of the peptide **24** ( $[\text{M} + 2\text{H}]^+ = 545.3 \text{ m/z}$ ) was found as well as the mass of the ionized peptide dimer at  $[\text{2M} + 3\text{H}]^+ = 1090.6 \text{ m/z}$ , which clearly states the successful synthesis and incorporation of the PROXYLated building-block **22** into the peptide sequence.

Figure (Figure 7) compares the X-band EPR spectra of the neat building block **22** and the model peptide **24** in an aqueous solution. As is evident from the spectra, both samples exhibit the same hyperfine coupling profile. This proves not only the EPR activity of the building block inside a peptide, but also verifies the stability of the introduced spin label during SPPS and peptide cleavage from the resin.

Since the concentration of real biomolecule samples usually contains lower concentrations than 60 mM, a smaller peptide concentration of 15 mM was employed to show the capability of the spin label, even at lower concentrations. Figure 8 validates the DNP activity of the spin label inside the model peptide **24** by comparing the  $^1\text{H}$  MAS and  $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$  CP MAS spectra of the synthesized peptide **24** with and without microwave irradiation. The  $^1\text{H}$  MAS spectra (Figure 8a) show a signal at around 6 ppm which clearly refers to the signal of the used glycerol/water matrix. Comparing the  $^1\text{H}$  MAS spectra with (MW on) and without (MW off) microwave irradiation, it is evident that the signals in the MW on spectra are enhanced by factors of  $12.1 \pm 0.1$ . Looking at the  $^{13}\text{C}$  CP MAS spectra, two signals at 60 and 70 ppm are observed, which refer to the carbons of the glycerol-d8. For these signals, similar enhancements of  $13.9 \pm 0.5$  are observed. The enhancements obtained for the peptide **24** are even higher than those of the corresponding building-block **22** at 15 mM concentration. These are excellent enhancements for mono radical systems used in spin labeling,<sup>[61–63]</sup> and even compared to other approaches that reached enhancements between 10 and 27 by using biradical systems, which normally tend to result in drastically higher enhancements.<sup>[22,25]</sup> Since many factors such as the matrix and the structure<sup>[6,55,64]</sup> of the radical itself strongly influence the enhancements, this change is not very surprising. Finally, it can be clearly stated that the synthesized peptide was successfully and specifically



**Figure 8.** a)  $^1\text{H}$  MAS Spectra of 15 mM Acetyl-Gly-Ser(OOC-PROXYL)-Gly-Gly-Gly **24** in a glycerol- $\text{d}_8/\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  matrix with (MW on) and without (MW off) microwave irradiation measured at 8 kHz spinning. b)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  CP MAS spectra of 15 mM Acetyl-Gly-Ser(OOC-PROXYL)-Gly-Gly-Gly **24** in a glycerol- $\text{d}_8/\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  matrix measured with MW on/off. Note: The small signal at 0 ppm is attributed to the silicon plug, used to tightly close the liquid in the NMR rotor. Asterisks indicate the spinning side bands of the glycerol.

labeled with our synthesized building-block. EPR activity as well as signal enhancement in DNP NMR measurements is clearly demonstrated. Moreover, the spin labeling with mono-radicals is an efficient way for creating samples for DEER/PELDOR experiments, e.g. in structural biochemistry or biophysics. This shows the big potential of the presented strategy for their use in biologically relevant peptides.

## Experimental Section

### Synthesis

#### General

Chemicals were purchased from Acros, Sigma-Aldrich, Carl Roth and Iris Biochem. Chemicals were used without further purification unless explicitly mentioned.

### Characterization

#### Liquid NMR

Solution-state NMR measurements have been conducted using a Bruker ARX 500 spectrometer ( $^1\text{H}$ -NMR 500.16 MHz,  $^{13}\text{C}$  NMR 125.78 MHz) at the service department of the TU Darmstadt. The chemical shifts are given in ppm. As internal standard the shift of the solvent peak was used.

#### Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) for analytical analysis was conducted using a Water HPLC Setup consisting a Water Alliance e2695 equipped with a Water 2998 PDA detector. The detection wave length was chosen depending on the analyte between 214, 254, 280 and 301 nm. The eluent system for the HPLC system comprised eluent A (0.1% aq. TFA) and eluent B (99.9% acetonitrile containing 0.1% TFA). Unless otherwise specified analytical HPLC runs were conducted at a flow rate of 2 ml/min with an eluent gradient from 20% to 80% of eluent A over 10 min. For building-block analysis a RP 18 HP column from CS Chromatographie (3  $\mu\text{m}$ , 120  $\text{\AA}$ ) was used. For peptide analysis a Nucleosil 100-5C18 column from Macerey-Nagel (5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ ) was used. Preparative purification of the peptide was performed on a Knauer Multokrom RP18 column 20 $\times$ 250 mm (5  $\mu\text{m}$ , 100  $\text{\AA}$ ) employing a flow rate of 8 mL/min and a ACN gradient from 2% to 20% in 33 min.

#### Mass Spectrometry (MS)

ESI (electron spray ionization) mass spectra were recorded with a Bruker Esquire-LC mass spectrometer at the service department of the TU Darmstadt.

#### Electron Paramagnetic Resonance (EPR)

The EPR spectra for all samples were measured on an EPR Miniscope MS-400 (Magnettech, Germany) equipped with an A TC H03 temperature controller and a rectangular TE102 resonator operating at 9.43 GHz. All EPR spectra were recorded with a modulation amplitude of 0.1 mT and a modulation frequency of 100 kHz. Unless otherwise specified spectra were taken under 30 dB of microwave attenuation with a mantissa gain of 1 and an exponential gain of 1. Measurements were performed at 298 K. A magnetic field range of 25 mT was swept with a center  $B_0$  field of 337 mT with a sweeping time of 120 s to acquire 2048 points. The spectra of the peptide were measured directly after chromatographic purification under acidic conditions without adjusting the pH to activate all radical sites. Simulations of the EPR spectra were performed by assuming a fast-motional regime, using the function "garlic" from the EasySpin<sup>®</sup> simulation package<sup>[65]</sup> in MATLAB (MathWorks, Inc).

## Dynamic Nuclear Polarization (DNP) NMR Experiments

A 3.2 mm triple resonance  $^1\text{H}/\text{X}/\text{Y}$  low-temperature MAS probe was used to carry out the solid-state DNP experiments at a Bruker Avance III 400 MHz NMR spectrometer. The spectrometer was equipped with an Ascend™ 400 sweep-able DNP magnet and a 9.7 T Bruker gyrotron system generating a  $\mu\text{Wave}$  frequency of 263 GHz. A MAS frequency of 8 kHz was employed for all  $^1\text{H}$  MAS,  $^1\text{H}\rightarrow^{13}\text{C}$  CP MAS (cross polarization magic angle spinning), and  $^{13}\text{C}$  MAS NMR spectra. A sample temperature of 107 K (without  $\mu\text{W}$ ) and 117 K (with  $\mu\text{W}$ ) was nominally noted, where the  $\mu\text{Wave}$  irradiation is the cause for higher sample temperature at fixed maximum cooling power stabilized by a Bruker BioSpin MAS low temperature cooling system. All  $^1\text{H}$  MAS,  $^1\text{H}\rightarrow^{13}\text{C}$  CP MAS and  $^{13}\text{C}$  MAS NMR spectra were measured once without microwave irradiation (MW off) and afterwards with the same parameters with microwave irradiation (MW on). The frequencies were 400.02 MHz for  $^1\text{H}$  and 100.59 MHz for  $^{13}\text{C}$ , respectively. For  $^1\text{H}$  MAS spectra a background suppression pulse sequence was applied where two  $180^\circ$  refocusing pulses after a  $90^\circ$  excitation pulse were employed with a spacing of 0.1  $\mu\text{s}$  between the pulses. The pulse lengths for the  $90^\circ$  excitation pulses were set to 2.58  $\mu\text{s}$  and 16 scans were used. The repetition delay was set to three times  $T_1$  of the protons, which was 7 s for Fmoc-NH-Hyp(OOC-PROXYL)-OH **21**, 4 s for Fmoc-NH-Ser(OOC-PROXYL)-OH **22** and 5 s for Fmoc-NH-Tyr(OOC-PROXYL)-OH **23**. To measure the proton  $T_1$  times,  $^1\text{H}$  saturation recovery experiments were performed, where variable delays for 12 data points varying from 0.01 s to 240 s were employed. The calculation for the  $T_1$  times were done using the Bruker topspin software package.  $^1\text{H}\rightarrow^{13}\text{C}$  CP MAS NMR spectra were measured with 16 scans, a repetition delay of three times  $T_1$  of the protons, and a contact time of 2000  $\mu\text{s}$ . SPINAL-64 was used for decoupling.<sup>[66]</sup> All building-blocks have been measured at a concentration of 60 mM in TCE and the peptide **24** at a concentration of 15 mM in glycerol-8d/ $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$  (v/v/v).

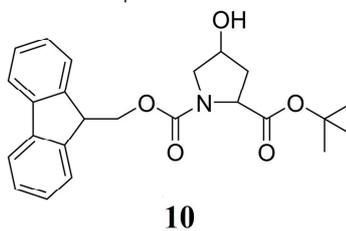
Direct polarization  $^{13}\text{C}$  MAS experiments were performed as saturation recovery experiments with and without suppression of the indirect channel. In the saturation recovery experiments with indirect channel suppression<sup>[27]</sup> a string of rotor synchronized  $180^\circ$  pulses of 5.15  $\mu\text{s}$  on the proton channel was applied during the build-up time to suppress the build-up of  $^1\text{H}$ -magnetization and thus to suppress indirect channel resonances in the spectra. The initial saturation pulse train to quench the thermal  $^{13}\text{C}$  magnetization consists of twenty 2.2  $\mu\text{s}$  pulses with 5 ms pulse spacing. A build-up time of 650 s was employed. Spectra were recorded with 16 scans and SPINAL-64 decoupling was applied during data acquisition.<sup>[66]</sup>

To analyze the signal enhancements, the spectra were fitted with a Lorentz function. Using the data of the fits, calculation of the enhancement factors was conducted by dividing the peak heights from the spectra with MW irradiation ( $I_{\text{MWon}}$ ) through the corresponding spectra without MW irradiation ( $I_{\text{MWoff}}$ ). The respective deviations for the enhancement  $\Delta\varepsilon$  were estimated according to eq. 1. The enhancement  $\varepsilon$  is multiplied by the sum of the noise intensity to signal intensity ratio from the MW on and MW off spectra. The noise intensities ( $\text{noise}_{\text{MWon}}$  and  $\text{noise}_{\text{MWoff}}$ ) used for the calculations with eq. 1 are the maximum levels of noise determined individually for the MW on and MW off spectrum, and  $I_{\text{MWon}}$  and  $I_{\text{MWoff}}$  are the absolute intensities of the signals, determined by the Lorentz fit, of the MW on and MW off spectrum. Other influences caused by for example depolarization effects<sup>[67–70]</sup> were not considered in this calculation.

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon \cdot \left( \frac{\text{noise}_{\text{MWon}}}{I_{\text{MWon}}} + \frac{\text{noise}_{\text{MWoff}}}{I_{\text{MWoff}}} \right) \quad (1)$$

 $^t\text{Bu}$  Protection of the Hydroxyl Group of Hyp, Ser, and TyrSynthesis of Fmoc-NH-Hyp(OH)-O $^t$ Bu **10**

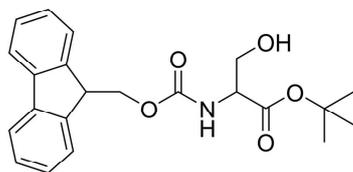
$^t\text{Bu}$  protection of the Fmoc-amino acids has been performed by adapted syntheses from literature.<sup>[42,43]</sup> Fmoc-NH-Hyp(OH)-OH **13** (2.88 g, 8.0 mmol, 1.00 equiv) was dissolved in 40 ml THF. After cooling to  $0^\circ\text{C}$  tert-Butyl 2,2,2-trichloroacetimidate **09** (1.98 ml, 10.7 mmol, 1.33 equiv) was added slowly. The next two hours, every hour two additions of **09** (each 1.98 ml, 10.7 mmol, 1.33 equiv) followed. The reaction mixture was stirred at  $60^\circ\text{C}$  for 4 d. One final addition of **09** (0.75 ml, 4.0 mmol, 0.50 equiv) and 2 h of reaction time resulted in full conversion of the substrate **13** as proved by HPLC. THF was removed under reduced pressure and the obtained solid redissolved in DCM. The insoluble solid was filtered off and the DCM filtrate was washed with a saturated aqueous solution of  $\text{NaHCO}_3$ , 0.1 M  $\text{NaOH}_{\text{aq}}$ , distilled water and sat. aq. NaCl solution (brine). The solution was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and the solvent removed under reduced pressure to give 3.67 g of crude **10** as colorless solid. The product was used for the next reaction steps without further purification.



HPLC:  $t_R = 6.26$  min; ESI-MS:  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 410.2$  m/z (calc. 410.2 m/z);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz):  $\delta$ [ppm] = 7.89, 7.65, 7.42, 7.34, 4.29, 4.26, 4.14, 3.39, 1.90, 1.38 ppm.;  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz):  $\delta$ [ppm] = 162.81, 153.88, 143.72, 140.68, 127.63, 127.05, 125.04, 120.09, 80.47, 67.63, 66.59, 58.49, 54.97, 46.51, 37.85, 27.26 ppm.

Synthesis of Fmoc-NH-Ser(OH)-O $^t$ Bu **11**

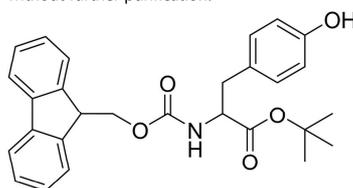
According to the hydroxyproline  $^t\text{Bu}$  protection procedure, Fmoc-NH-Ser(OH)-OH **14** (2.67 g, 8.0 mmol, 1.00 equiv) was dissolved in 40 ml of a 1:1 mixture of ethyl acetate and DCM. After cooling to  $0^\circ\text{C}$  tert-Butyl 2,2,2-trichloroacetimidate **09** (1.98 ml, 10.7 mmol, 1.33 equiv) was added slowly. The next two hours, every hour two additions of **09** (each 1.98 ml, 10.7 mmol, 1.33 equiv) followed. The reaction mixture was stirred at RT for 4 d. One final addition of **09** (0.35 ml, 2.0 mmol, 0.25 equiv) and 2 h of reaction time resulted in full conversion of the substrate **14** as proved by HPLC. The ethyl acetate/DCM mixture was removed under reduced pressure and the solid redissolved in DCM. The insoluble solid was filtered off and the DCM filtrate was washed with a saturated aqueous solution of  $\text{NaHCO}_3$ , 0.1 M  $\text{NaOH}_{\text{aq}}$ , distilled water and brine. The solution was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and the solvent removed under reduced pressure to give 4.32 g of crude **11** as colorless solid. The product was used for the next reaction steps without further purification.

**11**

HPLC:  $t_R = 6.17$  min; ESI-MS:  $[M + H]^+ = 384.19$  m/z (calc. 384.18 m/z);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz):  $\delta$ [ppm] = 7.88, 7.73, 7.42, 7.33, 6.92, 4.29, 4.22, 4.01, 3.50, 1.39 ppm.;  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz):  $\delta$ [ppm] = 162.81, 155.98, 143.76, 140.67, 127.58, 127.00, 25.20, 120.04, 80.53, 65.65, 61.34, 57.24, 46.60, 27.66 ppm.

#### Synthesis of Fmoc-NH-Tyr(OH)-O'Bu 12

According to the hydroxyproline  $^t\text{Bu}$  protection procedure, Fmoc-NH-Tyr(OH)-OH **15** (0.79 g, 2.0 mmol, 1.00 equiv) was dissolved in 20 ml ethyl acetate. The next three hours, every hour tert-butyl 2,2,2-trichloroacetimidate **09** (each 0.49 ml, 2.7 mmol, 1.33 equiv) was added at RT. The reaction mixture was stirred at RT for 3 d. One addition of **09** (0.20 ml, 1.0 mmol, 0.5 equiv) followed. After 24 h the reaction mixture was heated to 40 °C. Two more additions of **09** (each 0.20 ml, 1.0 mmol, 0.5 equiv) followed. The solution was stirred for 2 h to result in full conversion of the substrate **15** which was proved by HPLC. Ethyl acetate was removed under reduced pressure and the solid was redissolved in DCM. The insoluble solid was filtered off and the DCM filtrate was washed with a saturated aqueous solution of  $\text{NaHCO}_3$ , 0.1 M  $\text{NaOH}_{\text{aq}}$ , distilled water and brine. The solution was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and the solvent removed under reduced pressure to give 1.16 g crude **12** as colorless solid. The product was used for the next reaction steps without further purification.

**12**

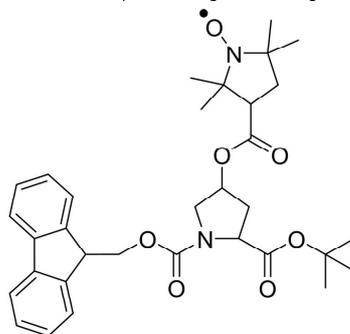
HPLC:  $t_R = 8.07$  min; ESI-MS:  $[M + H]^+ = 460.21$  m/z (calc. 460.2 m/z),  $[(M)_2 + H]^+ = 919.42$  m/z (calc. 919.42 m/z);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz):  $\delta$ [ppm] = 8.99, 7.87, 7.67, 7.41, 7.34, 7.03, 6.68, 4.23, 4.18, 4.05, 2.80, 1.53 ppm.;  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz):  $\delta$ [ppm] = 171.07, 155.78, 143.70, 140.64, 129.99, 127.20, 121.29, 119.93, 114.89, 65.56, 56.35, 46.58, 35.95, 26.89 ppm.

#### Nitroxide Coupling to the Side Chain

#### Synthesis of Fmoc-NH-Hyp(OOC-PROXYL)-O'Bu 16

PROXYLation by esterification reaction has been performed by an adapted synthesis from literature.<sup>[44]</sup> Fmoc-NH-Hyp(OH)-O'Bu **10** (1135 mg, 2.40 mmol, 1.00 equiv) was dissolved in 23 ml DCM. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid hydrochloride **19** ( $\text{EDC} \times \text{HCl}$ ) (510 mg, 2.64 mmol, 1.10 equiv), 4-Dimethylaminopyridine **20** (DMAP) (33 mg, 0.26 mmol, 0.11 equiv) and 3-Carboxy-

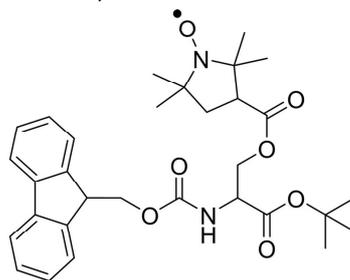
PROXYL **05** (502 g, 2.64 mmol, 1.10 equiv) were added. The solution was stirred at RT for 12 h. The reaction progress was monitored by HPLC. After reaction was completed the solution was washed with 0.5 M  $\text{HCl}_{\text{aq}}$ , a saturated aqueous solution of  $\text{NaHCO}_3$  and brine. The solution was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and the solvent removed under reduced pressure to give **16** (1.26 g, 90.9%) as a yellow solid.

**16**

HPLC:  $t_R = 9.40$  min; ESI-MS:  $[M + H]^+ = 577.3$  m/z (calc. 577.3 m/z),  $[M + \text{Na}]^+ = 600.3$  m/z (calc. 600.3 m/z).

#### Synthesis of Fmoc-NH-Ser(OOC-PROXYL)-O'Bu 17

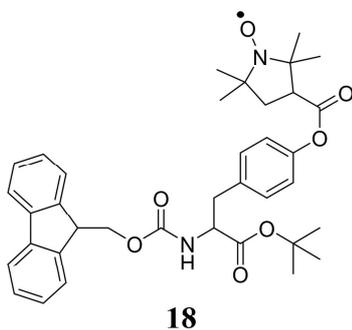
According to the hydroxyproline esterification reaction procedure, Fmoc-NH-Ser(OH)-O'Bu **11** (215 mg, 0.50 mmol, 1.00 equiv), **19** ( $\text{EDC} \times \text{HCl}$ ) (107 mg, 0.55 mmol, 1.10 equiv), 4-dimethylaminopyridine **20** (DMAP) (7 mg, 0.06 mmol, 0.11 equiv) and 3-carboxy-PROXYL **05** (105 mg, 0.55 mmol, 1.10 equiv) give 180 mg (65.3%) of crude **17** as yellow solid.

**17**

HPLC:  $t_R = 9.04$  min; ESI-MS:  $[M + H]^+ = 551.3$  m/z (calc. 551.3 m/z),  $[M + H]^+ = 552.3$  m/z (calc. 552.3 m/z),  $[M + 2H]^+ = 553.3$  m/z (calc. 553.3 m/z).

#### Synthesis of Fmoc-NH-Tyr(OOC-PROXYL)-O'Bu 18

According to the hydroxyproline esterification reaction procedure Fmoc-NH-Tyr(OH)-O'Bu **12** (278 mg, 0.50 mmol, 1.00 equiv), **19** ( $\text{EDC} \times \text{HCl}$ ) (105 mg, 0.55 mmol, 1.10 equiv), 4-Dimethylaminopyridine **20** (DMAP) (7 mg, 0.06 mmol, 0.11 equiv) and 3-Carboxy-PROXYL **05** (107 mg, 0.55 mmol, 1.10 equiv) give 227 mg (74%) of crude **12** as yellow solid.

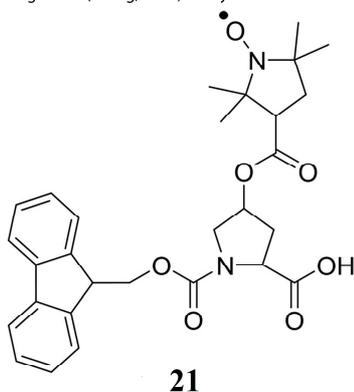


**HPLC:**  $t_R$  = 7.82 min; **ESI-MS:**  $[M]^+$  = 627.3 m/z (calc. 627.3 m/z),  $[M+H]^+$  = 628.3 m/z (calc. 628.3 m/z),  $[M+2H]^+$  = 629.3 m/z (calc. 629.3 m/z).

#### <sup>t</sup>Bu Deprotection to Restore the Carboxyl Group

##### Synthesis of Fmoc-NH-Hyp(OOC-PROXYL)-OH 21

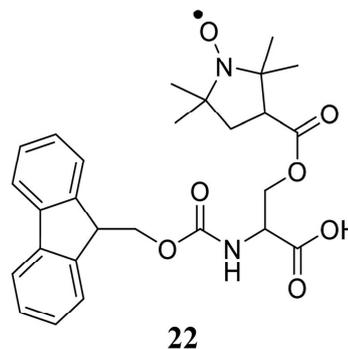
Deprotection reaction has been performed according to adapted syntheses from literature.<sup>[45]</sup> Fmoc-NH-Hyp(OOC-PROXYL)-O<sup>t</sup>Bu **16** (1.26 g, 2.2 mmol, 1.00 equiv) was dissolved in 14 ml DCM and cooled to 0°C. While cooling TFA (15.63 ml, 194.0 mmol, 89.00 equiv) was added, which turns the solutions black. The solution was allowed to warm up to RT and the solvent was removed under reduced pressure to dryness. The residual solid was redissolved in DCM and washed three times with a small amount of distilled water and brine (DCM:washing solution = 3:1). The solution was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and the solvent removed under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (n-hexane: Ethyl acetate:Acetic acid = 47.5:47.5:5) to give **21** (0.54 g, 47%) as a yellow solid.



**HPLC:**  $t_R$  = 5.47 min; **ESI-MS:**  $[M]^+$  = 521.2 m/z (calc. 521.2 m/z),  $[M+H]^+$  = 522.2 m/z (calc. 522.2 m/z),  $[M+2H]^+$  = 523.2 m/z (calc. 523.2 m/z).

##### Synthesis of Fmoc-NH-Ser(OOC-PROXYL)-OH 22

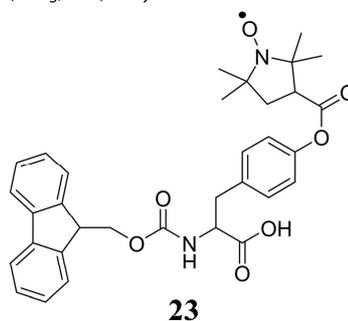
According to the hydroxyproline <sup>t</sup>Bu deprotection procedure Fmoc-NH-Ser(OOC-PROXYL)-O<sup>t</sup>Bu **17** (0.18 g, 0.3 mmol, 1.00 equiv) and TFA (2.33 ml, 28.9 mmol, 89.00 equiv) in 2 ml DCM give 100 mg crude **22** as yellow solid, which was purified by column chromatography (n-hexane: Ethyl acetate:Acetic acid = 1:1) to give **22** (0.04 g, 24%) as a yellow solid.



**HPLC:**  $t_R$  = 5.44 min; **ESI-MS:**  $[M]^+$  = 496.21 m/z (calc. 496.21 m/z),  $[M+H]^+$  = 497.21 m/z (calc. 497.21 m/z),  $[M+2H]^+$  = 498.21 m/z (calc. 498.21 m/z),  $[M+Na]^+$  = 518.20 m/z (calc. 518.20 m/z),  $[M+NH_4]^+$  = 513.20 m/z (calc. 513.20 m/z).

##### Synthesis of Fmoc-NH-Tyr(OOC-PROXYL)-OH 23

According to the hydroxyproline <sup>t</sup>Bu deprotection procedure Fmoc-NH-Tyr(OOC-PROXYL)-O<sup>t</sup>Bu **18** (0.23 g, 0.4 mmol, 1.00 equiv) and TFA (2.65 ml, 32.9 mmol, 89.00 equiv) in 2.4 ml DCM give 150 mg crude **18** as yellow solid, which was purified by column chromatography (n-hexane: Ethyl acetate:Acetic acid = 47.5:47.5:5) to give **23** (0.12 g, 58%) as a yellow solid.



**HPLC:**  $t_R$  = 6.30 min; **ESI-MS:**  $[M]^+$  =  $[M]^+$  = 571.2 m/z (calc. 571.2 m/z),  $[M+H]^+$  = 572.2 m/z (calc. 572.2 m/z),  $[M+2H]^+$  = 573.2 m/z (calc. 573.2 m/z).

##### Synthesis of Acetyl-Gly-Ser(OOC-PROXYL)-Gly-Gly-Gly 24 Peptide

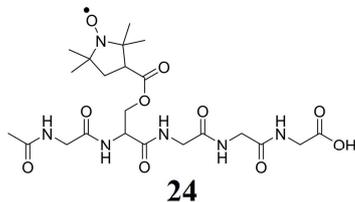
Peptide synthesis has been performed according to adapted syntheses from literature.<sup>[59]</sup> Pre-dried chlorotrityl resin (0.3 g, 0.46 mmol, 1.00 equiv, maximum loading 1.52 mmol/g) was placed

in a 10 mL synthetic syringe with frit bottom and swollen in DMF for 30 min. The resin is pre-activated with 2.5 ml of a diisopropylethylamine (DIEA)/dimethylformamide (DMF) mixture (v/v = 1/7) for 60 min.

**Amino acid coupling:** Each amino acid coupling was carried out twice before Fmoc cleavage. A coupling time of 30 min was used for each coupling step. After each coupling step the resin is washed 4 times with DMF. The first amino acid was coupled to the activated resin using Fmoc-Gly-OH (0.27 g, 0.91 mmol, 2.00 equiv) and DIEA (0.24 g, 1.82 mmol, 4.00 equiv) in 1.7 mL DMF. For the second and third double coupling step Fmoc-Gly-OH (0.27 g, 0.91 mmol, 2.00 equiv), 1-[bis(Dimethylamin)methylen]-1H-1,2,3-triazol[4,5-b]pyridinium-3-oxid-hexafluorophosphat (HATU) (0.34 g, 0.90 mmol, 1.98 equiv) and DIEA (0.24 g, 1.82 mmol, 4.00 equiv) in 1.7 mL DMF were used. Building-block coupling was performed using Fmoc-NH-Ser(OOC-PROXYL)-OH **22** (0.29 g, 0.57 mmol, 1.25 equiv), HATU (0.21 g, 0.56 mmol, 1.23 equiv) and DIEA (0.15 g, 1.14 mmol, 2.50 equiv) in 1.2 mL DMF. The last double coupling step was performed using Ac-Gly-OH (0.11 g, 0.91 mmol, 2.00 equiv), HATU (0.34 g, 0.90 mmol, 1.98 equiv) and DIEA (0.24 g, 1.82 mmol, 4.00 equiv) in 1.9 mL DMF.

**Fmoc cleavage:** Fmoc deprotections was performed after each amino acid double coupling with a solution of 20% (v/v) piperidine in DMF for 5 min and in a second step for 15 min. After the second deprotection step the resin was washed 6 times with DMF before the next amino acid is coupled. Ac-Gly-OH coupling is not followed by a deprotections step.

**Peptide cleavage:** Before peptide cleavage the loaded resin was washed 6 times with DCM and dried over night at high vacuum. For cleavage 3 mL of cleavage solution (95% trifluoroacetic acid/anisole/triisopropylsilane = 95/2.5/2.5 (v/v/v)) is used over the cleavage time of 3 h. The peptide was precipitated in cold Methyl tert-butyl ether (MTBE), followed by an incubation at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 30 minutes. The precipitated peptide was washed once with MTBE and once with diethyl ether to give spin labeled peptide **24** (113 mg, 46%) as a white solid. After preparative purification by HPLC and basic workup to remove TFA 43 mg (17%) of spin labeled peptide **24** was obtained with a purity (HPLC) of >95%.



HPLC:  $t_R = 8.29$  min; ESI-MS:  $[M + 2H]^+ = 545.3$  m/z (calc. 545.3 m/z),  $[2M + 3H]^+ = 1089.5$  m/z (calc. 1089.5 m/z).

### 3. Conclusion

The amino acids hydroxyproline (Hyp), serine (Ser) and tyrosine (Tyr) were spin labeled by PROXYL at their hydroxyl side chain in three reaction steps. The synthesized building-blocks showed activity of the nitroxyl species in electron paramagnetic resonance (EPR) measurements. DNP enhancements of TCE solutions of up to 25.9 for protons and carbons were obtained using a spin label concentration of 60 mM. The final building-blocks were N-terminally protected by a Fmoc-protection group

and C-terminally accessible for coupling reactions. The presented approach allowed the synthesis of side chain spin labeled amino acids that show EPR activity and chemical stability even under the harsh acidic conditions occurring in SPPS. This was demonstrated by the synthesis of a small peptide starting from one of the presented building-blocks and showing spin label activity by EPR and DNP NMR measurements. In the latter enhancement factors of  $12.1 \pm 0.1$  for  $^1\text{H}$  and  $13.9 \pm 0.5$  for  $^{13}\text{C}$  were obtained using a peptide concentration of 15 mM. This will allow the use of these building-blocks in solid-phase peptide synthesis to create specifically spin labeled peptides or mini-proteins for ligation studies employing DEER or PELDOR or to create peptide-based radicals for DNP NMR applications in future. Finally, this universal spin labeling strategy is available for a wide variety of amino acids, which provide a hydroxyl group at their sidechain.

### Acknowledgements

Financial support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft in the framework of grants Bu-911/24-1 is gratefully acknowledged. Dr. Marcos de Oliveira Jr. thanks for financial support by the Alexander von Humboldt Research Foundation.

### Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

**Keywords:** amino acids · EPR · hyperpolarization · solid-state NMR · spin labeling

- [1] V. S. Bajaj, M. L. Mak-Jurkauskas, M. Belenky, J. Herzfeld, R. G. Griffin, *J. Magn. Reson.* **2010**, *202*, 9–13.
- [2] G. T. Debelouchina, M. J. Bayro, A. W. Fitzpatrick, V. Ladizhansky, M. T. Colvin, M. A. Caporini, C. P. Jaronec, V. S. Bajaj, M. Rosay, C. E. MacPhee, M. Vendruscolo, W. E. Maas, C. M. Dobson, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 19237–19247.
- [3] I. Gelis, V. Vitzthum, N. Dhimole, M. A. Caporini, A. Schedlbauer, D. Carnevale, S. R. Connell, P. Fucini, G. Bodenhausen, *J. Biomol. NMR.* **2013**, *56*, 85–93.
- [4] M. Renault, A. Cukkemane, M. Baldus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8346–8357.
- [5] U. Akbey, W. T. Franks, A. Linden, M. Orwick-Rydmark, S. Lange, H. Oschkinat, in *Dynamic nuclear polarization enhanced NMR in the solid-state*, Vol. 1, Springer, **2013**, pp.181–228.
- [6] A. S. Lilly Thankamony, J. J. Wittmann, M. Kaushik, B. Corzilius, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2017**, *102–103*, 120–195.
- [7] M. Gerölin, M. Zerbetto, A. Moretto, F. Formaggio, C. Toniolo, M. van Son, M. H. Shabestari, M. Huber, P. Calligari, A. Polimeno, *J. Phys. Chem. B.* **2017**, *121*, 4379–4387.
- [8] I. D. Sahu, R. M. McCarrick, G. A. Lorigan, *Biochemistry.* **2013**, *52*, 5967–5984.
- [9] L. Garbuio, E. Bordinon, E. K. Brooks, W. L. Hubbell, G. Jeschke, M. Yulikov, *J. Phys. Chem. B.* **2013**, *117*, 3145–3153.
- [10] G. Jeschke, *ChemPhysChem* **2002**, *3*, 927–932.
- [11] G. Jeschke, Y. Polyhach, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 1895–1910.
- [12] T. Viennet, A. Viegas, A. Kuepper, S. Arens, V. Gelev, O. Petrov, T. N. Grossmann, H. Heise, M. Eitzkorn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 10526–10526.
- [13] H. Eckert, *ChemPubSoc.* **2017**, *23*, 5893–5914.

- [14] A. Polese, D. J. Anderson, G. Millhauser, F. Formaggio, M. Crisma, F. Marchiori, C. Toniolo, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11071–11078.
- [15] J. Jiang, L. Yang, Q. Jin, W. Ma, L. Moroder, S. Dong, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 17679–17682.
- [16] L. J. Berliner, J. Grunwald, H. O. Hankovszky, K. Hideg, *Anal. Biochem.* **1982**, *119*, 450–455.
- [17] C. P. Jaroniec, *J. Magn. Reson.* **2015**, *253*, 50–59.
- [18] P. S. Nadaud, J. J. Helmus, N. Höfer, C. P. Jaroniec, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7502–7503.
- [19] M. R. Fleissner, E. M. Brustad, T. Kálai, C. Altenbach, D. Cascio, F. B. Peters, K. Hideg, S. Peuker, P. G. Schultz, W. L. Hubbell, *Proceedings of the Nat. Academy Sci.* **2009**, *106*, 21637–21642.
- [20] R. Rogawski, A. E. McDermott, *Arch. Biochem. Biophys.* **2017**, *628*, 102–113.
- [21] R. Rogawski, I. V. Sergeev, Y. Li, M. F. Ottaviani, V. Cornish, A. E. McDermott, *J. Phys. Chem. B.* **2017**, *121*, 1169–1175.
- [22] M. A. Voinov, D. B. Good, M. E. Ward, S. Milikisijants, A. Marek, M. A. Caporini, M. Rosay, R. A. Munro, M. Ljumovic, L. S. Brown, V. Ladizhansky, A. I. Smirnov, *J. Phys. Chem. B.* **2015**, *119*, 10180–10190.
- [23] S. Stoller, G. Sicoli, T. Y. Baranova, M. Bennati, U. Diederichsen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9743–9746.
- [24] M. Lorenzi, C. Puppo, R. Lebrun, S. Lignon, V. Roubaud, M. Martinho, E. Mileo, P. Tordo, S. R. Marque, B. Gontero, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9108–9111.
- [25] V. Vitzthum, F. Borcard, S. Jannin, M. Morin, P. Mieville, M. A. Caporini, A. Sienkiewicz, S. Gerber-Lemaire, G. Bodenhausen, *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 2929–2932.
- [26] A. D. Milov, A. B. Ponomarev, Y. D. Tsvetkov, *Chem. Phys. Lett.* **1984**, *110*, 67–72.
- [27] R. E. Martin, M. Pannier, F. Diederich, V. Gramlich, M. Hubrich, H. W. Spiess, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2833–2837.
- [28] E. Narr, A. Godt, G. Jeschke, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4063–4066.
- [29] A. Weber, O. Schiemann, B. Bode, T. F. Prisner, *J. Magn. Reson.* **2002**, *157*, 277–285.
- [30] O. Schiemann, T. F. Prisner, *Quarterly rev. biophys.* **2007**, *40*, 1–53.
- [31] R. Breinbauer, M. Köhn, *ChemBioChem.* **2003**, *4*, 1147–1149.
- [32] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- [33] T. Kálai, M. R. Fleissner, J. Jekő, W. L. Hubbell, K. Hideg, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 2747–2749.
- [34] S. Kucher, S. Korneev, S. Tyagi, R. Apfelbaum, D. Grohmann, E. A. Lemke, J. P. Klare, H.-J. Steinhoff, D. Klose, *J. Magn. Reson.* **2017**, *275*, 38–45.
- [35] A. B. Lowe, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 17–36.
- [36] P. Hanson, D. J. Anderson, G. Martinez, G. Millhauser, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, C. Vita, *Mol. Phys.* **1998**, *95*, 957–966.
- [37] J. J. Inbaraj, T. B. Cardon, M. Laryukhin, S. M. Grosser, G. A. Lorigan, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9549–9554.
- [38] R. Marchetto, S. Schreier, C. R. Nakaie, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11042–11043.
- [39] C. Toniolo, M. Crisma, F. Formaggio, *Pept. Sci.* **1998**, *47*, 153–158.
- [40] C. Toniolo, E. Valente, F. Formaggio, M. Crisma, G. Pilloni, C. Corvaja, A. Toffoletti, G. V. Martinez, M. P. Hanson, G. L. Millhauser, C. George, J. L. Flippen-Anderson, *J. Pept. Sci.* **1995**, *1*, 45–57.
- [41] E. F. Vicente, L. G. M. Basso, G. F. Cespedes, E. N. Lorenzon, M. S. Castro, M. J. S. Mendes-Giannini, A. J. Costa, E. M. Cilli, *PLoS One* **2013**, *8*.
- [42] M. Heuckendorff, H. H. Jensen, *Carbohydr. Res.* **2017**, *439*, 50–56.
- [43] P. J. Knerr, W. A. van der Donk, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7648–7651.
- [44] A. Ikeda, K. Terada, M. Shiotsuki, F. Sanda, *J. Polym. Sci. Part A* **2011**, *49*, 3783–3796.
- [45] J. J. Koivisto, E. T. T. Kumpulainen, A. M. P. Koskinen, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2103–2116.
- [46] Z. W. Qiu, D. M. Grant, R. J. Pugmire, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 2747–2753.
- [47] Z. W. Qiu, D. M. Grant, R. J. Pugmire, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 557–563.
- [48] X.-C. Su, G. J. J. o. B. N. Otting, *J. Biomol. NMR.* **2010**, *46*, 101–112.
- [49] J. M. Crane, C. Mao, A. A. Lilly, V. F. Smith, Y. Suo, W. L. Hubbell, L. L. Randall, *J. Mol. Biol.* **2005**, *353*, 295–307.
- [50] T. Stockner, A. Mullen, F. MacMillan, *Biochem. Soc. Trans.* **2015**, *43*, 1023.
- [51] J. M. Bobbitt, N. A. Eddy, C. X. Cady, J. Jin, J. A. Gascon, S. Gelpi-Dominguez, J. Zakrzewski, M. D. Morton, *J. Phys. Chem.* **2017**, *82*, 9279–9290.
- [52] G. Otting, *Ann. Rev. Biophys.* **2010**, *39*, 387–405.
- [53] D. P. Burum, in *Cross Polarization in Solids, Vol.*, **2007**, pp.1–8.
- [54] S. Bothe, M. M. Hoffmann, T. Gutmann, G. Buntkowsky, *J. Phys. Chem. C.* **2017**, *121*, 27089–27097.
- [55] S. Bothe, J. Nowag, V. Klimavičius, M. Hoffmann, T. I. Troitskaya, E. V. Amosov, V. M. Tormyshev, I. Kirilyuk, A. Taratayko, A. Kuzhelev, D. Parkhomenko, E. Bagryanskaya, T. Gutmann, G. Buntkowsky, *J. Phys. Chem. C.* **2018**, *122*, 11422–11432.
- [56] M. M. Hoffmann, S. Bothe, T. Gutmann, G. Buntkowsky, *J. Phys. Chem. C.* **2017**, *121*, 22948–22957.
- [57] M. M. Hoffmann, S. Bothe, T. Gutmann, F.-F. Hartmann, M. Reggelin, G. Buntkowsky, *J. Phys. Chem. C.* **2017**, *121*, 2418–2427.
- [58] D. Daube, V. Aladin, J. Heiliger, J. J. Wittmann, D. Barthelmes, C. Bengs, H. Schwalbe, B. Corzilius, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 16572–16575.
- [59] M. Amblard, J.-A. Fehrentz, J. Martinez, G. Subra, *Mol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 239–254.
- [60] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154.
- [61] R. G. Griffin, **2000**.
- [62] A. N. Smith, M. A. Caporini, G. E. Fanucci, J. R. Long, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1542–1546.
- [63] O. Jaldetchai, V. Denysenkov, J. Becker-Baldus, B. Dutagaci, T. F. Prisner, C. Glaubitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15533–15536.
- [64] A. Zagdoun, G. Casano, O. Ouari, M. Schwarzwälder, A. J. Rossini, F. Aussenac, M. Yulikov, G. Jeschke, C. Copéret, A. Lesage, P. Tordo, L. Emsley, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12790–12797.
- [65] S. Stoll, A. Schweiger, *J. Magn. Reson.* **2006**, *178*, 42–55.
- [66] B. M. Fung, A. K. Khitrin, K. Ermolaev, *J. Magn. Reson.* **2000**, *142*, 97–101.
- [67] F. Mentink-Vigier, S. Paul, D. Lee, A. Feintuch, S. Hediger, S. Vega, G. De Paëpe, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 21824–21836.
- [68] A. J. Perez-Linde, S. Chinthalapalli, D. Carnevale, G. Bodenhausen, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 6415–6422.
- [69] K. R. Thurber, R. Tycko, *J. Chem. Phys.* **2012**, *137*, 084508.
- [70] K. R. Thurber, R. Tycko, *J. Chem. Phys.* **2014**, *140*, 184201.

Manuscript received: March 1, 2019  
 Revised manuscript received: March 22, 2019  
 Accepted manuscript online: April 5, 2019  
 Version of record online: May 13, 2019

---

**CHEMPHYSICHEM**

Supporting Information

© Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 69451 Weinheim, 2019

**Efficient Building Blocks for Solid-Phase Peptide Synthesis  
of Spin Labeled Peptides for Electron Paramagnetic  
Resonance and Dynamic Nuclear Polarization Applications**

Martin Brodrecht, Kevin Herr, Sarah Bothe, Marcos de Oliveira, Jr., Torsten Gutmann, and  
Gerd Buntkowsky\*

# Efficient building-blocks for solid state peptide synthesis of spin-labeled peptides for EPR and DNP applications

Martin Brodrecht<sup>a</sup>, Kevin Herr<sup>a</sup>, Sarah Bothe<sup>a</sup>, Dr. Marcos de Oliveira Jr.<sup>a</sup>, Dr. Torsten Gutmann<sup>a,b</sup> and Prof. Dr. Gerd Buntkowsky<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Institut für Physikalische Chemie, Technische Universität Darmstadt, 64287 Darmstadt, Germany

<sup>b</sup> University Kassel, Institute for Chemistry, Heinrich-Plett-Straße 40, D-34132 Kassel

## Contents

<sup>1</sup>H liquid NMR spectra

<sup>13</sup>C liquid NMR spectra

HPLC measurements

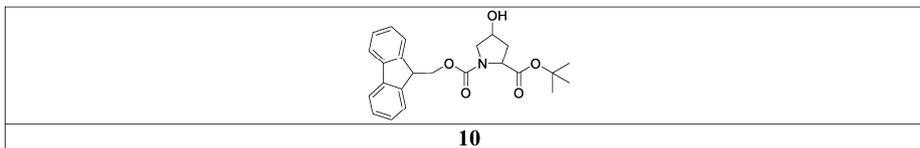
MS measurements

DNP enhanced <sup>1</sup>H MAS and <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C CP MAS measurements

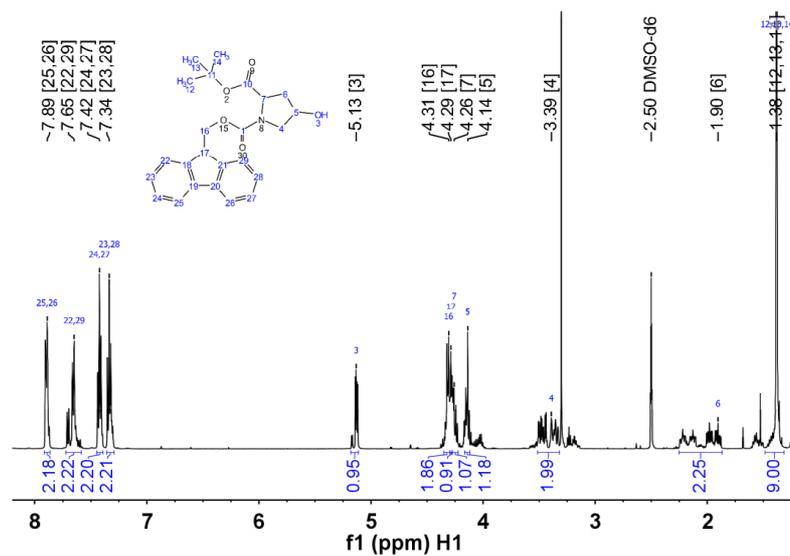
1. <sup>t</sup>Bu protection of the hydroxyl group
  - 1.1. Fmoc-NH-Hyp(OH)-OtBu **10**
  - 1.2. Fmoc-NH-Ser(OH)-OtBu **11**
  - 1.3. Fmoc-NH-Tyr(OH)-OtBu **12**
2. Nitroxide coupling to the side chain
  - 2.1. Fmoc-NH-Hyp(OOC-PROXYL)-OtBu **16**
  - 2.2. Fmoc-NH-Ser(OOC-PROXYL)-OtBu **17**
  - 2.3. Fmoc-NH-Tyr(OOC-PROXYL)-OtBu **18**
3. <sup>t</sup>Bu deprotection to restore carboxyl group
  - 3.1. Fmoc-NH-Hyp(OOC-PROXYL)-OH **21**
  - 3.2. Fmoc-NH-Ser(OOC-PROXYL)-OH **22**
  - 3.3. Fmoc-NH-Tyr(OOC-PROXYL)-OH **23**
4. Synthesis of Acetyl-Gly-Ser(OOC-PROXYL)-Gly-Gly-Gly **24** peptide
5. Concentration dependence of DNP enhanced <sup>1</sup>H MAS and <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C CP MAS spectra of the spin label Fmoc-NH-Hyp(OOC-PROXYL)-OH **21**

## 1 <sup>t</sup>Bu protection of the hydroxyl group

### 1.1 Fmoc-NH-Hyp(OH)-O<sup>t</sup>Bu **10**

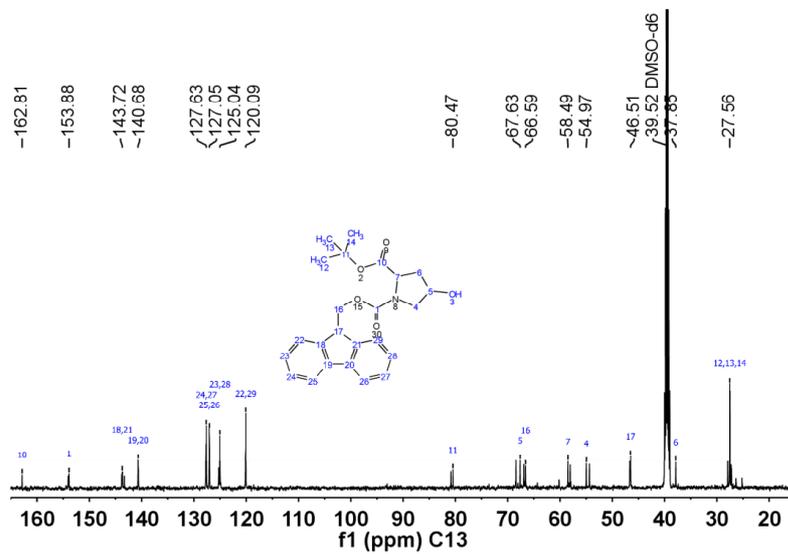


#### 1.1.1 <sup>1</sup>H liquid NMR



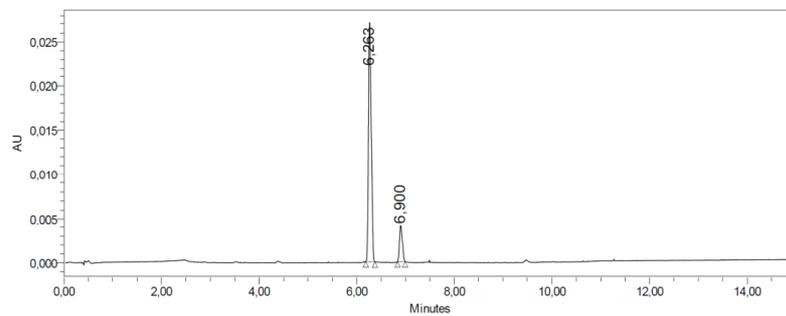
S01: <sup>1</sup>H-NMR spectrum of Fmoc-NH-Hyp(OH)-O<sup>t</sup>Bu **10** in DMSO-d<sub>6</sub> (500 MHz, RT).

### 1.1.2 <sup>13</sup>C liquid NMR



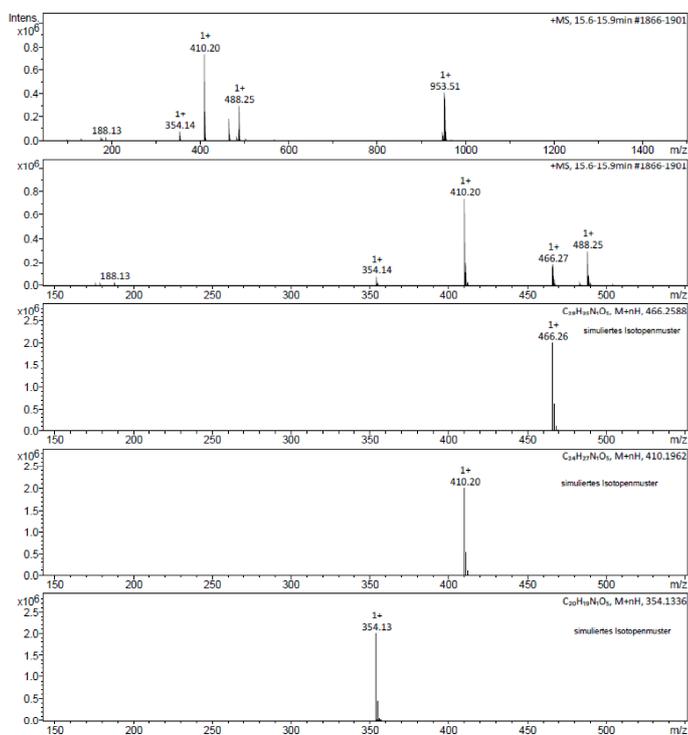
S02: <sup>13</sup>C-NMR spectrum of Fmoc-NH-Hyp(OH)-O'Bu **10** in DMSO-d<sub>6</sub> (125 MHz, RT).

### 1.1.3 HPLC measurements



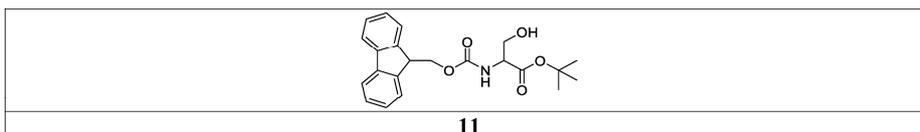
S03: HPLC chromatogram of Fmoc-NH-Hyp(OH)-O'Bu **10** detected at 301 nm.

### 1.1.4 MS measurements

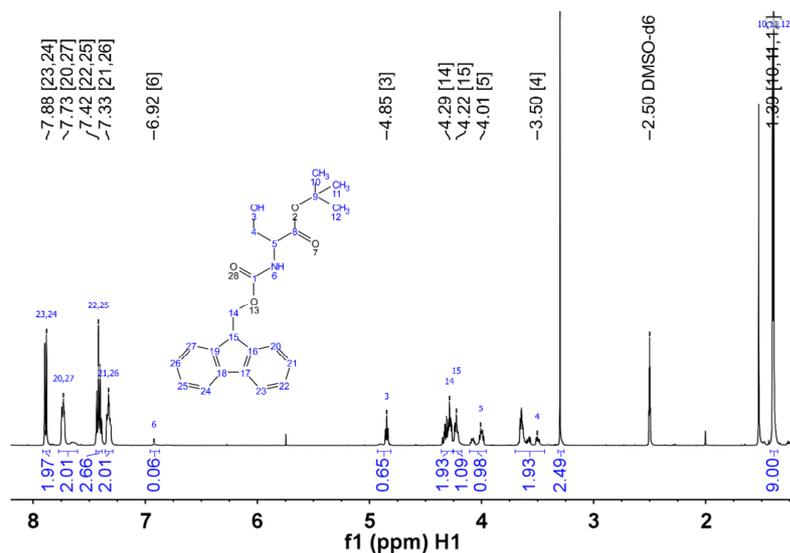


S04: Mass spectrum of Fmoc-NH-Hyp(OH)-O<sup>t</sup>Bu **10** ionized by electron spray (ESI). Top two: Experimental spectra. Bottom three: simulated spectra for given molecular formulas.

### 1.2 Fmoc-NH-Ser(OH)-O<sup>t</sup>Bu **11**

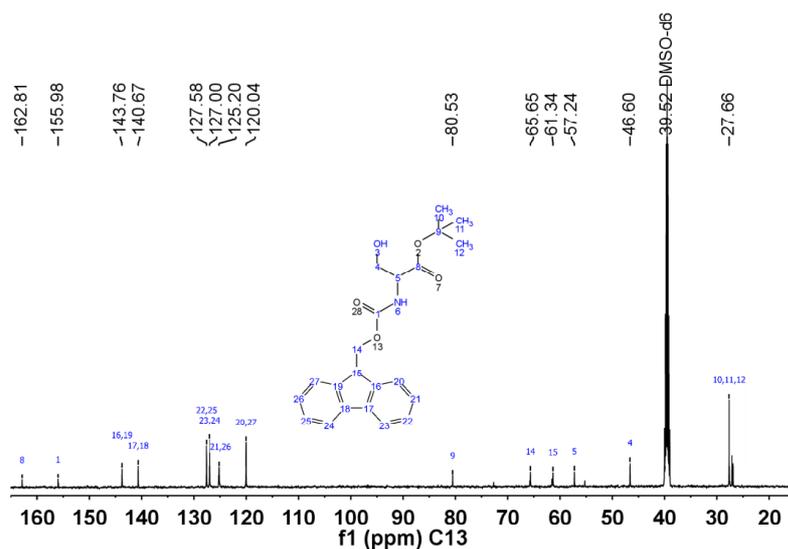


### 1.2.1 <sup>1</sup>H liquid NMR



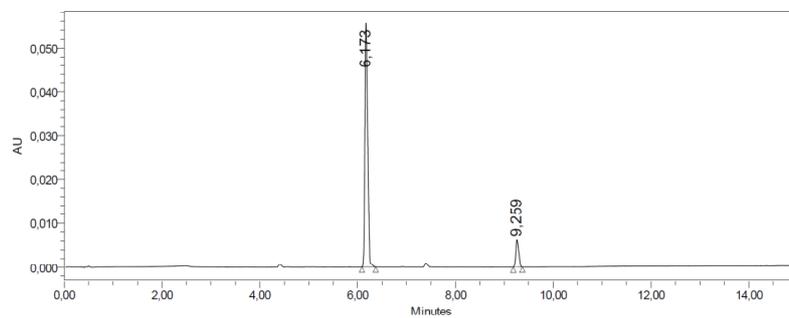
S05: <sup>1</sup>H-NMR spectrum of Fmoc-NH-Ser(OH)-O-Bu 11 in DMSO-d<sub>6</sub> (500 MHz, RT).

### 1.2.2 <sup>13</sup>C liquid NMR



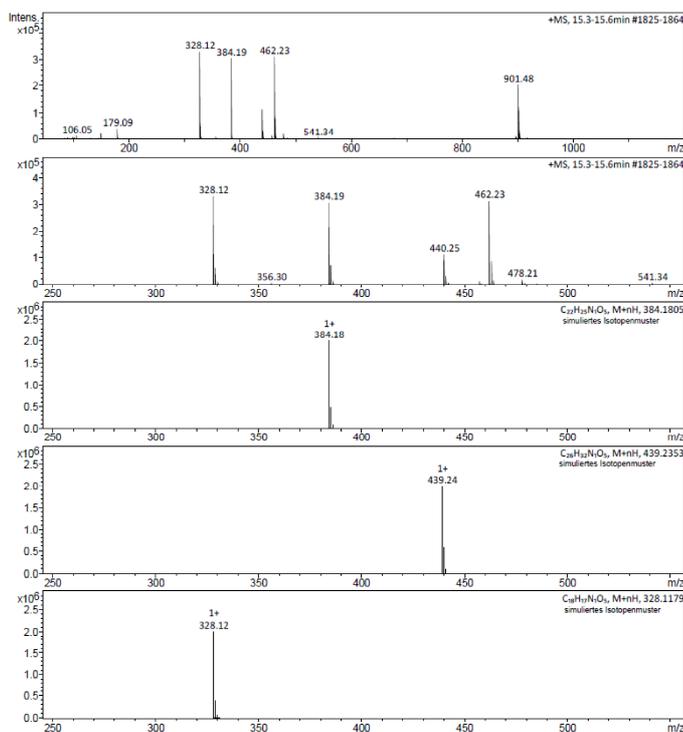
S06: <sup>13</sup>C-NMR spectrum of Fmoc-NH-Ser(OH)-O-Bu 11 in DMSO-d<sub>6</sub> (125 MHz, RT).

### 1.2.3 HPLC measurements



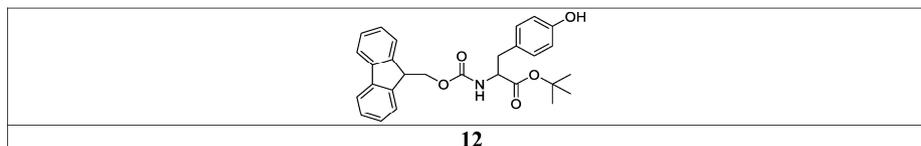
S07: HPLC chromatogram of Fmoc-NH-Ser(OH)-O'Bu **14** detected at 301 nm.

### 1.2.4 MS measurements

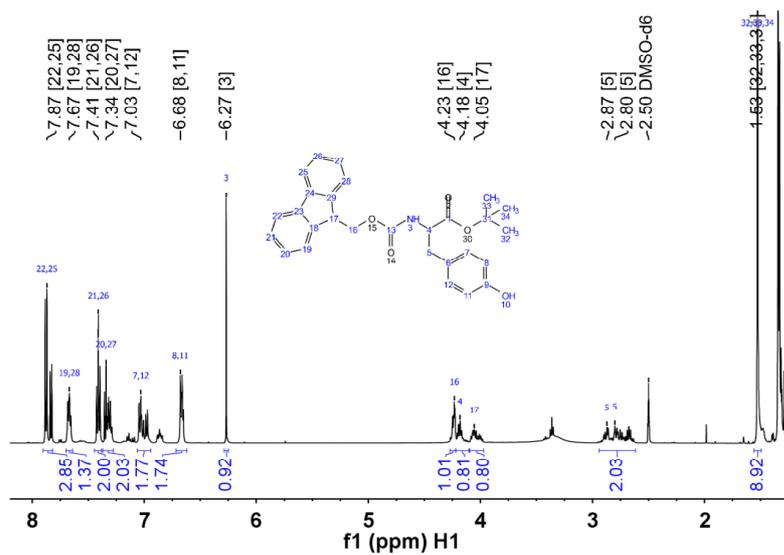


S08: Mass spectrum of Fmoc-NH-Ser(OH)-O'Bu **14** ionized by electron spray (ESI). Top two: Experimental spectra. Bottom three: simulated spectra for given molecular formulas.

### 1.3 Fmoc-NH-Tyr(OH)-O<sup>t</sup>Bu 12

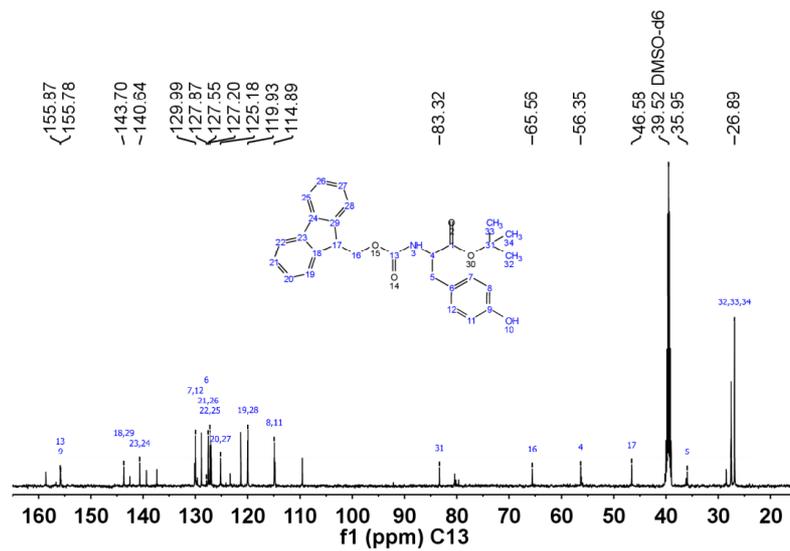


#### 1.3.1 <sup>1</sup>H liquid NMR



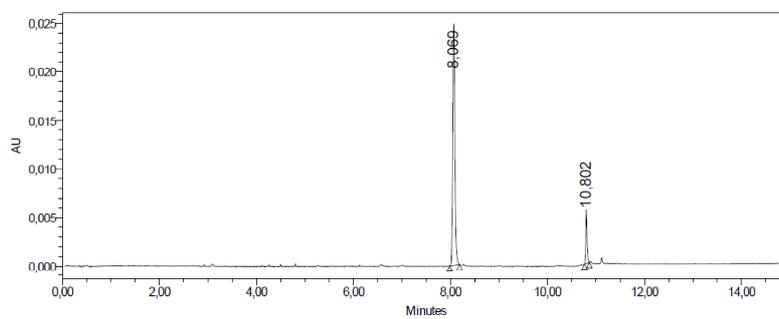
S09: <sup>1</sup>H-NMR spectrum of Fmoc-NH-Tyr(OH)-O<sup>t</sup>Bu 12 in DMSO-d<sub>6</sub> (500 MHz, RT).

### 1.3.2 $^{13}\text{C}$ liquid NMR



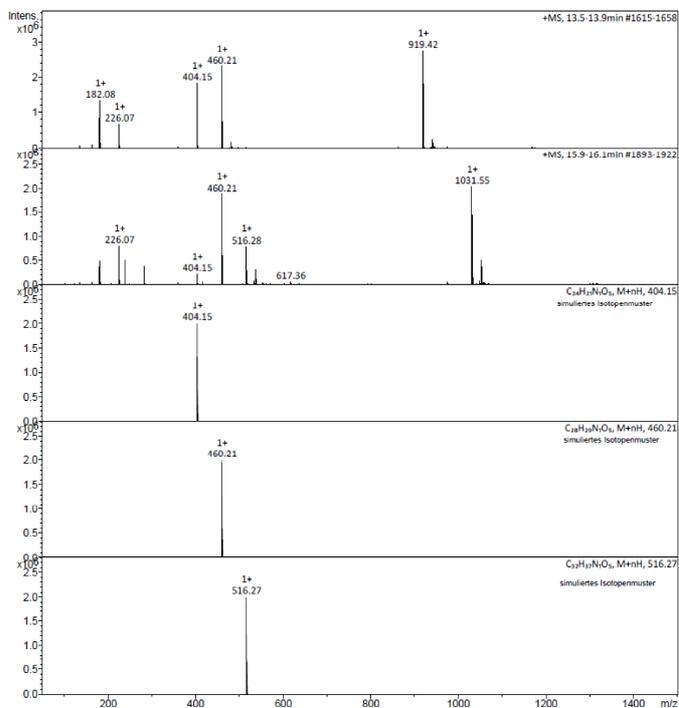
S10:  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of Fmoc-NH-Tyr(OH)-O'Bu **12** in DMSO- $d_6$  (125 MHz, RT).

### 1.3.3 HPLC measurements



S11: HPLC chromatogram of Fmoc-NH-Tyr(OH)-O'Bu **12** detected at 301 nm.

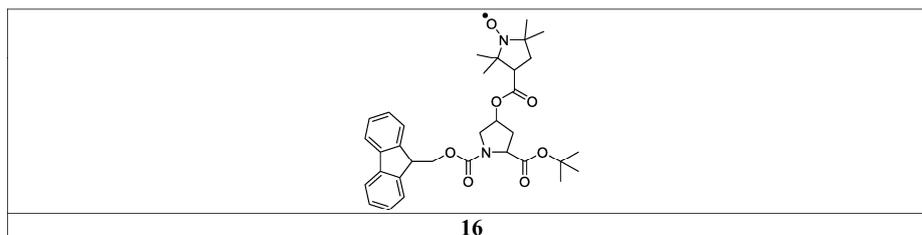
### 1.3.4 MS measurements



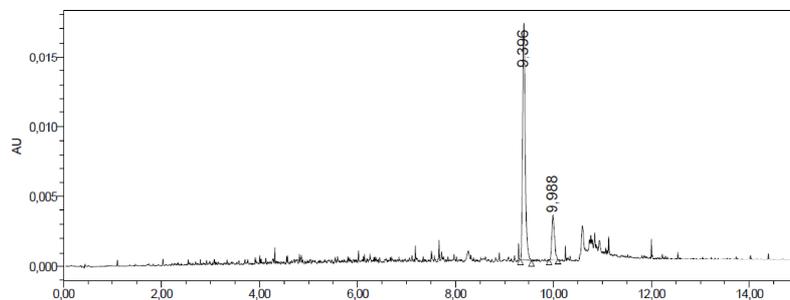
S12: Mass spectrum of Fmoc-NH-Tyr(OH)-O<sup>t</sup>Bu **12** ionized by electron spray (ESI). Top two: Experimental spectra. Bottom three: simulated spectra for given molecular formulas.

## 2 Nitroxide coupling to the side chain

### 2.1 Fmoc-NH-Hyp(OOC-PROXYL)-O<sup>t</sup>Bu **16**

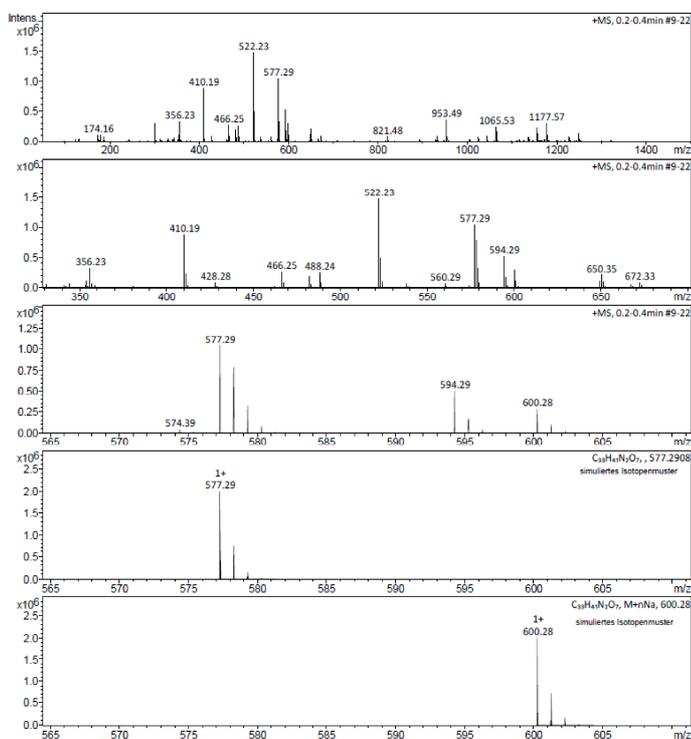


### 2.1.3 HPLC measurements



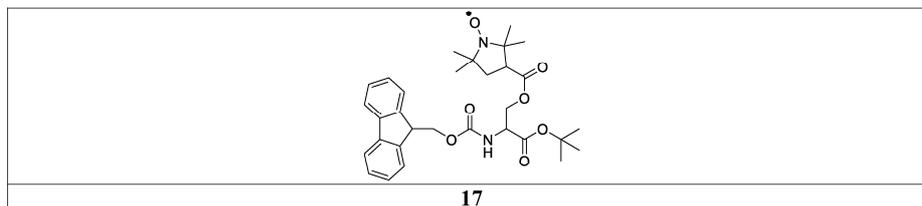
S13: HPLC chromatogram of Fmoc-NH-Hyp(OOC-PROXYL)-O'Bu **16** detected at 301 nm.

### 2.1.4 MS measurements

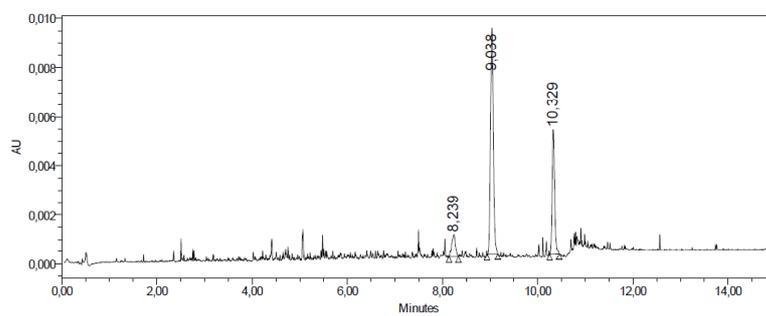


S14: Mass spectrum of Fmoc-NH-Ser(OH)-O'Bu **14** ionized by electron spray (ESI). Top three: Experimental spectra. Bottom two: simulated spectra for given molecular formulas.

## 2.2 Fmoc-NH-Ser(OOC-PROXYL)-O<sup>t</sup>Bu **17**

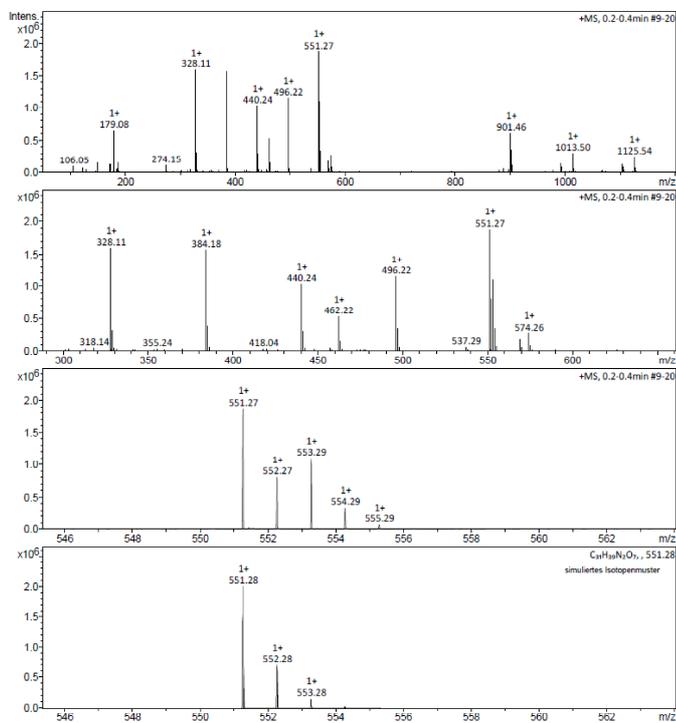


### 2.2.3 HPLC measurements



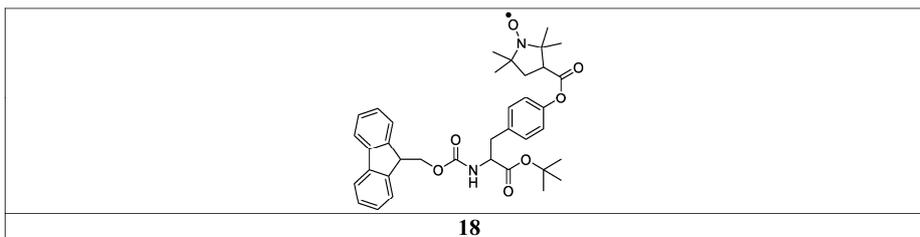
S15: HPLC chromatogram of Fmoc-NH-Ser(OOC-PROXYL)-O<sup>t</sup>Bu **17** detected at 301 nm.

## 2.2.4 MS measurements

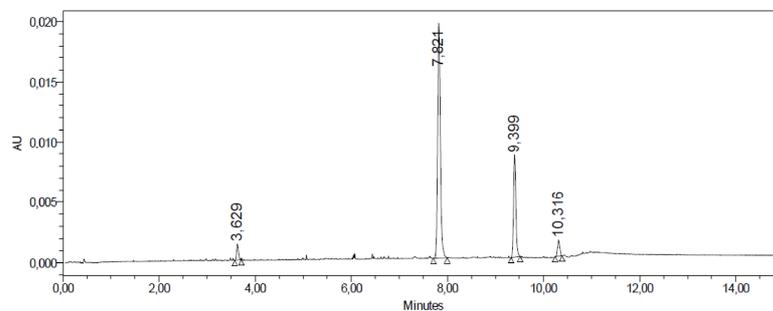


S16: Mass spectrum of Fmoc-NH-Ser(OOC-PROXYL)-O'Bu **17** ionized by electron spray (ESI). Top three: Experimental spectra. Bottom one: simulated spectra for given molecular formulas.

## 2.3 Fmoc-NH-Tyr(OOC-PROXYL)-O'Bu **18**

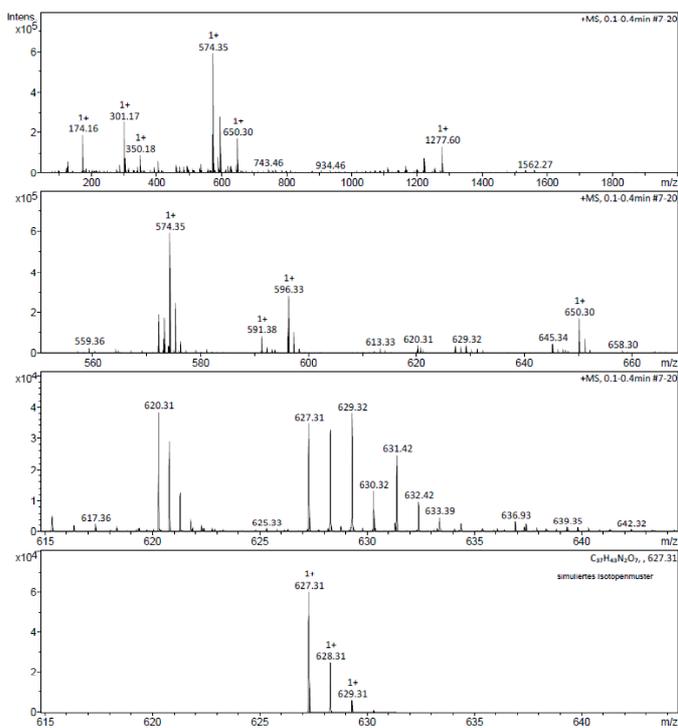


### 2.3.1 HPLC measurements



S17: HPLC chromatogram of Fmoc-NH-Tyr(OOC-PROXYL)-O'Bu **18** detected at 301 nm.

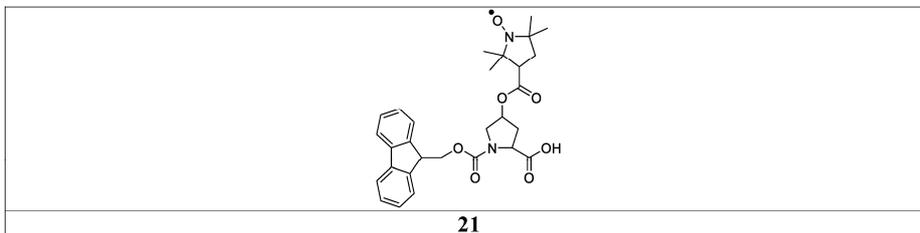
### 2.3.2 MS measurements



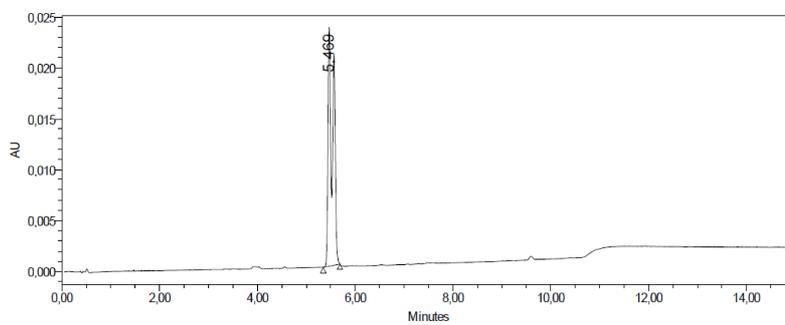
S18: Mass spectrum of Fmoc-NH-Tyr(OOC-PROXYL)-O'Bu **18** ionized by electron spray (ESI). Top three: Experimental spectra. Bottom one: simulated spectra for given molecular formulas.

### 3 'Bu deprotection to restore carboxyl group

#### 3.1 Synthesis of Synthesis of Fmoc-NH-Hyp(OOC-PROXYL)-OH **21**

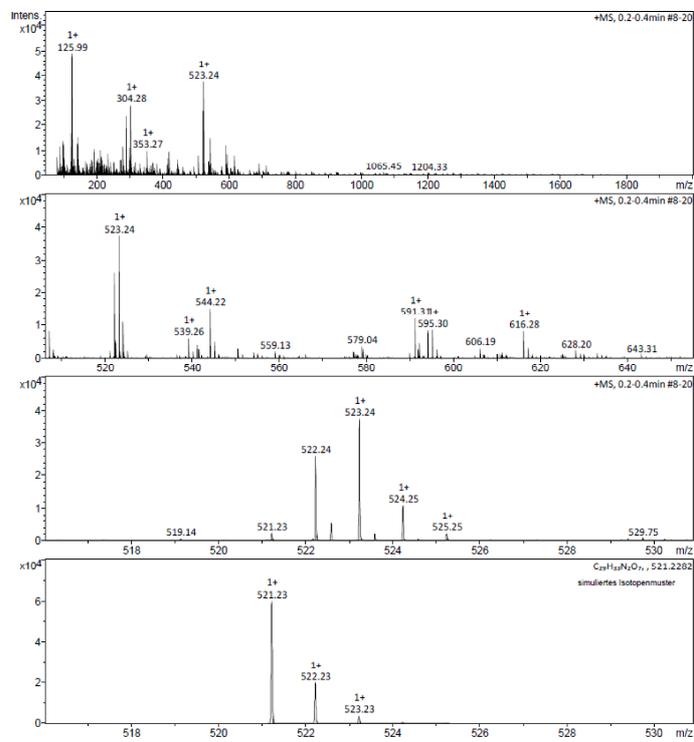


#### 3.1.3 HPLC measurements



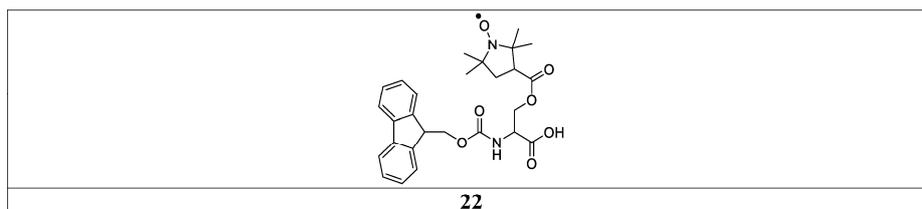
S19: HPLC chromatogram of Fmoc-NH-Hyp(OOC-PROXYL)-OH **21** detected at 301 nm.

### 3.1.4 MS measurements

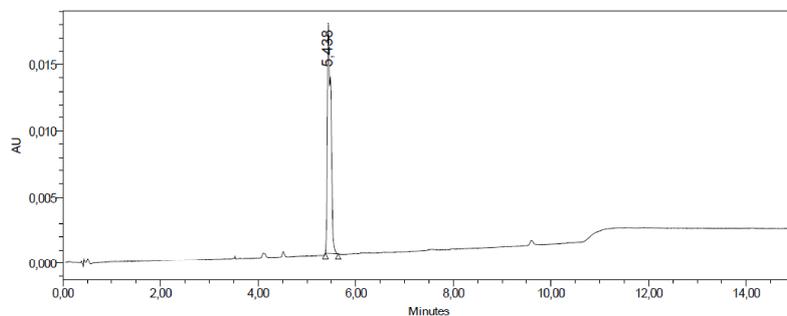


S20: Mass spectrum of Fmoc-NH-Hyp(OOC-PROXYL)-OH **21** ionized by electron spray (ESI). Top three: Experimental spectra. Bottom one: simulated spectra for given molecular formulas.

### 3.2 Fmoc-NH-Ser(OOC-PROXYL)-OH **22**

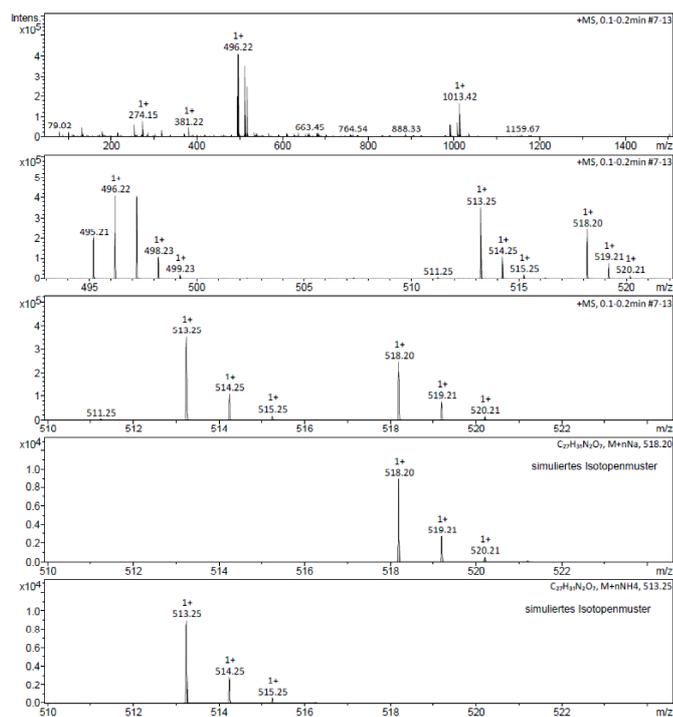


### 3.2.3 HPLC measurements



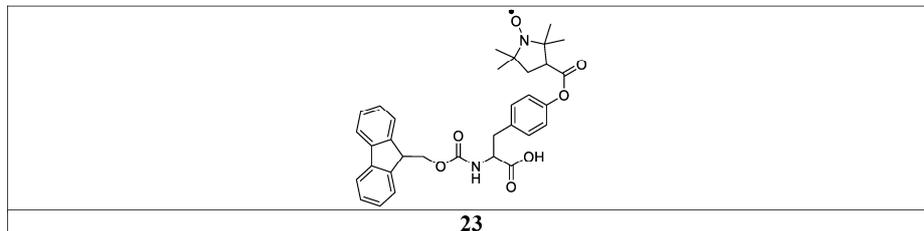
S21: HPLC chromatogram of Fmoc-NH-Ser(OOC-PROXYL)-OH **22** detected at 301 nm.

### 3.2.4 MS measurements

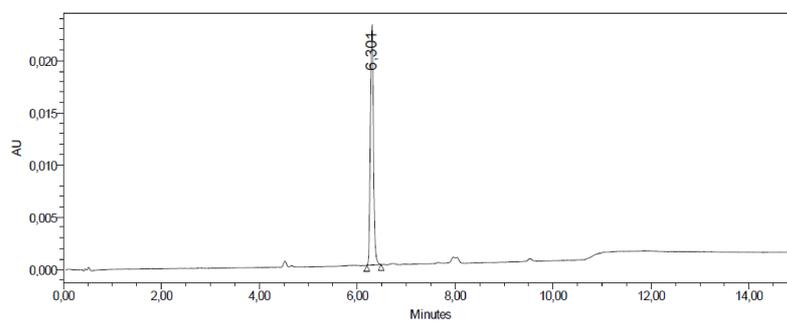


S22: Mass spectrum of Fmoc-NH-Ser(OOC-PROXYL)-OH **22** ionized by electron spray (ESI). Top three: Experimental spectra. Bottom two: simulated spectra for given molecular formulas.

### 3.3 Fmoc-NH-Tyr(OOC-PROXYL)-OH **23**

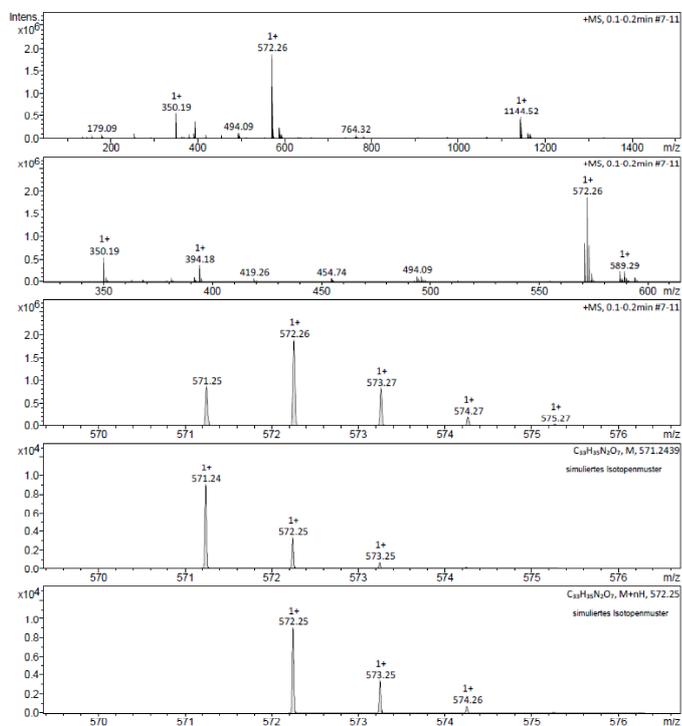


#### 3.3.1 HPLC measurements



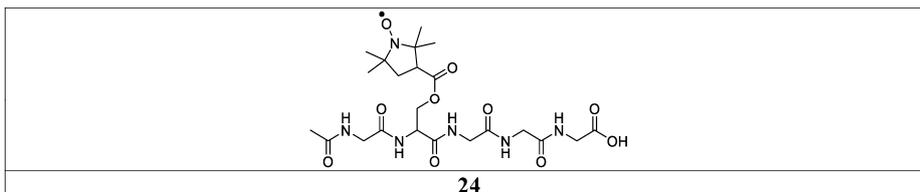
S23: HPLC chromatogram of Fmoc-NH-Tyr(OOC-PROXYL)-OH **23** detected at 301 nm.

### 3.3.1 MS measurements

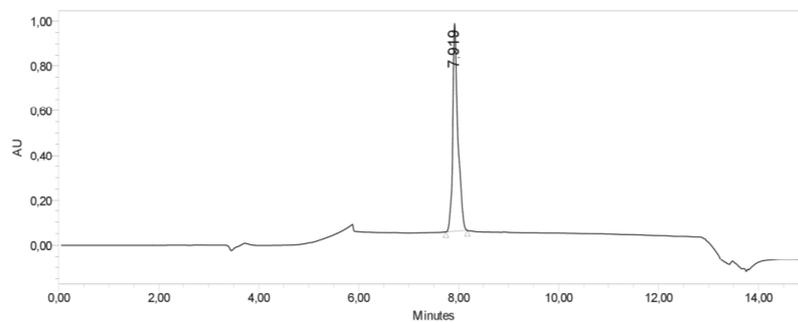


S24: Mass spectrum of Fmoc-NH-Tyr(OOC-PROXYL)-OH **23** ionized by electron spray (ESI). Top three: Experimental spectra. Bottom two: simulated spectra for given molecular formulas.

## 4 Synthesis of Acetyl-Gly-Ser(OOC-PROXYL)-Gly-Gly-Gly **24** peptide

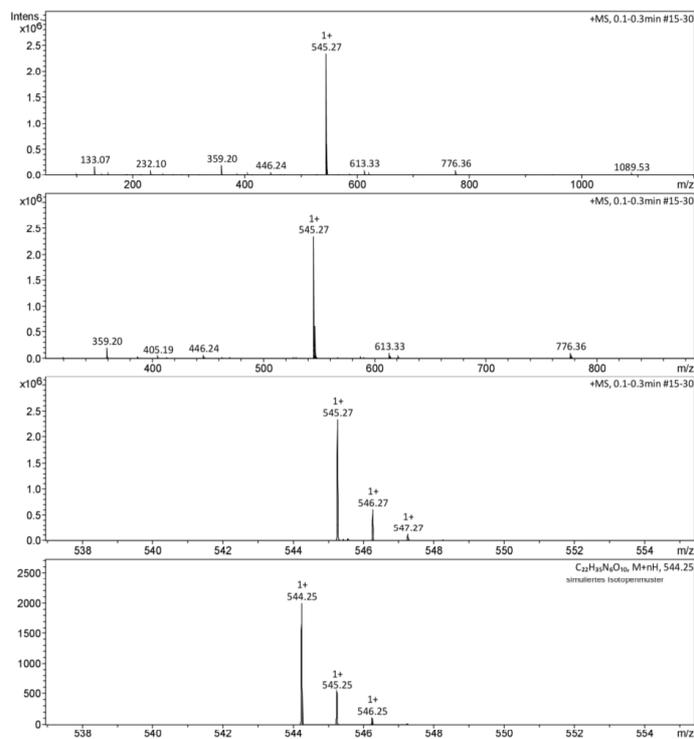


## 4.1 HPLC measurements



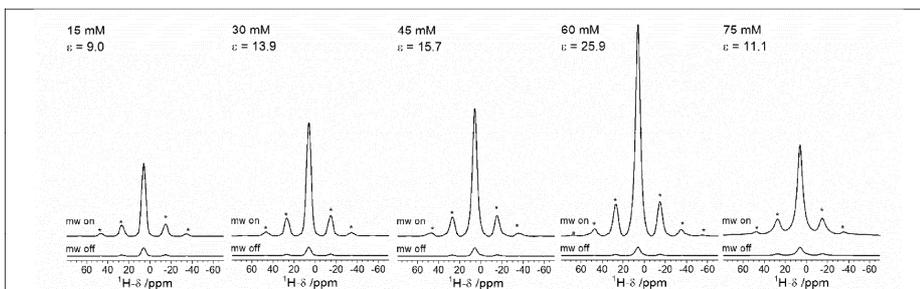
S25: HPLC chromatogram of Acetyl-Gly-Ser(OOC-PROXYL)-Gly-Gly-Gly **24** detected at 214 nm.

## 4.2 MS measurements

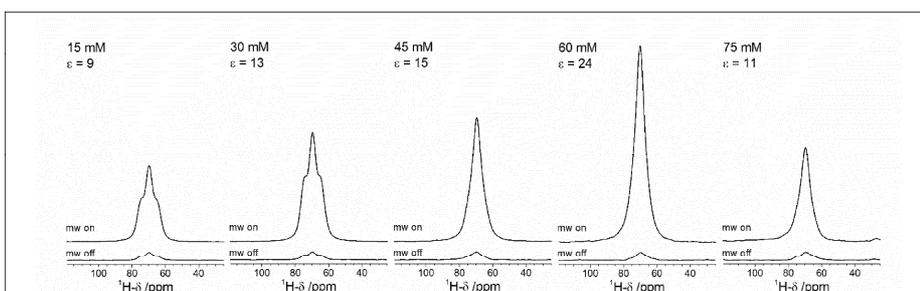


S26: Mass spectrum of Acetyl-Gly-Ser(OOC-PROXYL)-Gly-Gly-Gly **24** ionized by electron spray (ESI). Top three: Experimental spectra. Bottom: simulated spectra for given molecular formulas.

## 5 Concentration dependence of DNP enhanced $^1\text{H}$ MAS and $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ CP MAS spectra of the spin label Fmoc-NH-Hyp(OOC-PROXYL)-OH **21**



S27:  $^1\text{H}$  MAS spectra recorded at 8 kHz with (mw on) and without microwave (mw off) irradiation as a function of the concentration for the Fmoc-NH-Hyp(OOC-PROXYL)-OH **21** building-block in TCE. The concentrations are shown on the figure. Spectra are normalized by the maximum intensity of the mw off spectra in order to better show the different enhancement factors. Asterisks indicate spinning sidebands.



S28:  $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$  CP MAS NMR spectra recorded at 8 kHz with (mw on) and without microwave (mw off) irradiation as a function of the concentration for the Fmoc-NH-Hyp(OOC-PROXYL)-OH **21** building-block in TCE. Spectra are normalized by the maximum intensity of the mw off spectra in order to better show the different enhancement factors.

---

## 8. Zusammenfassung und Ausblick

---

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine verlässliche und reproduzierbare Synthesestrategie zur Herstellung von Hybridmaterialien auf Basis poröser Silicastrukturen (SBA-15 und MCM-41) entwickelt werden. Durch die Kombination exakt definierbarer Porendimensionen des Trägers, hoher und gleichmäßiger Linkeranbindung an die Oberfläche und einer universell einsetzbaren Funktionalisierungsstrategie für Aminosäuren, Peptide und weitere organische Moleküle mit COOH-Gruppen, lassen sich eine Vielzahl von Hybridmaterialien realisieren.

Die systematische Optimierung aller Parameter der templatbasierten Synthesen zur Herstellung von SBA-15 und MCM-41 erlaubte es hierarchische Silicaporensysteme von knapp unter 2 nm bis über 6 nm Porendurchmesser gezielt und definiert herzustellen. Die Oberfläche dieser Materialien konnte erfolgreich mit diversen Linkern, sowohl mittels *Grafting* als auch mittels Co-Kondensation modifiziert werden. Zur homogenen Anbindung des für die späteren Funktionalisierung benötigten organischen Linkers, konnte die Co-Kondensationsmethode für den Aminolinker (APTES) mit hohen Funktionalisierungsdichten von über 2 mmol/g optimiert werden.

Die so hergestellten Materialien konnten mit elektronenmikroskopischen (REM), und Gasadsorptionsmethoden (BET), auf ihre Beschaffenheit und Porosität untersucht werden. Die hohe Linkerdichte erlaubte es weiterhin detaillierte Festkörper-NMR Untersuchungen durchzuführen, die die Funktionalisierung nachweisen konnte. Diese Messungen legen eine wichtige Basis für die weiteren Funktionalisierungsschritte der Materialien. Der, aufgrund seiner vielseitigen Kopplungsmöglichkeiten, gewählte APTES-Linker erlaubte die Anbindung verschiedener organischer Moleküle mit COOH-Gruppe.

Um die generierte Oberfläche gezielt mit Aminosäuren/Peptiden zu funktionalisieren, wurde eine innovative SPPS-analoge Kopplungsmethode zur Schritt für Schritt Anbindung einzelner Aminosäuren an die APTES-modifizierte Oberfläche entwickelt. Hierzu wurden N-terminal geschützte Fmoc-Aminosäuren über deren COOH-Gruppe mit einer speziell optimierten Kopplungsschemie auf Basis von HATU und DIEA an die APTES-Oberfläche gebunden. Nach anschließender Abspaltung der Fmoc-Gruppe konnten weitere Aminosäuren angebinden werden. Diese Vorgehensweise erlaubt es hoch spezifische Peptidsequenzen an die Porenninnenwände poröser Silicaträger zu binden. Durch BET-Messungen konnte sowohl die Stabilität der Poren als auch deren Größenentwicklung in Abhängigkeit der Funktionalisierung gezeigt werden. Die hierdurch erzielbaren hohen Funktionalisierungsdichten, in Kombination

---

mit den hohen spezifischen Oberflächen des Trägersystems, erlaubten weiterhin die Durchführung von Festkörper-NMR Messungen.

Durch die Aufnahme von  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR-Spektren war es möglich jeden einzelnen Funktionalisierungs- und Entschützungs-schritt im Poreninneren zu verfolgen. Mit Hilfe von DNP-verstärkter Festkörper-NMR konnten weiterhin  $^{15}\text{N}$  CP MAS NMR-Messungen durchgeführt werden, welche die kovalente Bindung zwischen C-Terminus der Aminosäuren und dem N-Terminus der Oberfläche beweisen konnte. Der Einsatz von zweidimensionalen NMR-Experimenten ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ;  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ;  $^1\text{H}$ - $^{29}\text{Si}$ ) kombiniert mit DNP führte zu detaillierten Erkenntnissen über die Struktur der oberflächengebundenen Peptidspezies und deren Interaktion mit der Silicaoberfläche. Diese Erkenntnisse liefern die Grundlage für die Analyse von oberflächengebundenen Biomolekülen an anorganischen Oberflächen. In Zukunft sollen mit Hilfe dieses universellen Ansatzes dann komplexere Peptide an Oberflächen gebunden und untersucht werden. Dies verfolgt den bereits vorgestellten *bottom-up* Ansatz zur Herstellung von Natur inspirierten Hybridmaterialien.

Die universelle Einsetzbarkeit der APTES-funktionalisierten Trägersysteme und die Vielseitigkeit der HATU/DIEA-basierten Kopplungsbedingungen konnte weiterhin durch die Anbindung eines carboxy-funktionalisierten Azobenzolderivates und eines carboxy-funktionalisierten Fluoreszenzfarbstoffes gezeigt werden. Diese ersten Studien der Anbindung stimuli-responsiver organischer Moleküle soll weiteren Projekten als Grundlage dienen. So wurde in dieser Arbeit eine einfach zugängliche Route zur Einführung einer  $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkierung in die Azobrücke etabliert, um später die *cis/trans*-Übergänge der Azobrücke des Azobenzols an der Oberfläche mit Hilfe von  $^{15}\text{N}$  NMR-Messungen untersuchen zu können. Der Erfolg der Isotopenmarkierung wurde in dieser Arbeit bereits mit ersten  $^{15}\text{N}$  Festkörper-NMR-Messungen gezeigt. Ebenso wurde die Anbindung der beiden Farbstoffe an die Oberfläche mit  $^{13}\text{C}$  Festkörper-NMR-Messungen nachgewiesen

Um DNP-verstärkte NMR-Messungen noch spezifischer für die Untersuchung von Peptiden einsetzen zu können wurde eine Strategie zur Synthese von spinmarkierten Peptiden entwickelt. Diese basiert auf der Herstellung von seitenkettenfunktionalisierten Aminosäure-*Building-Blocks*. Diese tragen eine Spinmarkierung in Form eines stabilen Radikals an ihrer Hydroxyseitenkette, welche über eine Esterbindung angebunden wurde. Der N-Terminus trägt eine Fmoc-Schutzgruppe, was diese *Building-Blocks* für die Peptidsynthese via SPPS einsetzbar macht. In einer ersten eingereichten Publikation konnte die Synthesestrategie

---

dieser Bausteine vorgestellt und deren Einsatzbarkeit in SPPS und Funktion für DNP- und EPR-Anwendungen gezeigt werden.

Dieser neue, universelle Ansatz des Einbaus von Spinmarkierungen in Peptide, mit Hilfe von SPPS, erlaubt gleich zwei große Anwendungsmöglichkeiten. Zum einen können größere Biomoleküle gezielt markiert werden und mit Hilfe von DNP und EPR untersucht werden. Zum anderen lassen sich die Bausteine durch ihre Kompatibilität mit klassischer SPPS ebenso für die hier vorgestellte Oberflächenfunktionalisierungsstrategie einsetzen. Somit sollten sich diese Label auch gezielt in Peptidsequenzen an Silicaoberflächen integrieren lassen. Dieser Ansatz konnte allerdings im Rahmen der Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht weiterverfolgt werden.

Zusammenfassend konnte die enorme Vielfalt der hier entwickelten Synthesestrategien für die Herstellung von maßgeschneiderten organisch/anorganischen Hybriden gezeigt werden, die Aufschluss über Natur inspirierte Hybridmaterialien geben können. Speziell durch ein- und zweidimensionale Festkörper-NMR-Messungen konnten Informationen über diese Materialklasse gesammelt werden. Die Synthese von speziellen Aminosäuren für DNP und EPR-Anwendungen soll in Zukunft noch detailliertere Strukturinformationen liefern. Das universelle Potential der vorgestellten Strategie zeigt sich weiterhin durch die Anwendbarkeit auf andere organische Moleküle, die über das Spektrum der Aminosäuren hinausgehen.

---

## 9. Literaturverzeichnis

---

- [1] N. Nassif, J. Livage, *Chemical Society Reviews* **2011**, *40*, 849-859.
- [2] E. Dujardin, S. Mann, *Advanced Engineering Materials* **2002**, *4*, 461-474.
- [3] M.-H. Sun, S.-Z. Huang, L.-H. Chen, Y. Li, X.-Y. Yang, Z.-Y. Yuan, B.-L. Su, *Chemical Society Reviews* **2016**, *45*, 3479-3563.
- [4] M. Vallet-Regí, F. Balas, D. Arcos, *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 7548-7558.
- [5] M. Hildebrand, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4855-4874.
- [6] R. Gordon, D. Losic, M. A. Tiffany, S. S. Nagy, F. A. S. Sterrenburg, *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 116-127.
- [7] R. W. Drum, R. Gordon, *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 325-328.
- [8] K. J. C. van Bommel, A. Friggeri, S. Shinkai, *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42*, 980-999.
- [9] A. Stein, *Adv. Mat.* **2003**, *15*, 763-775.
- [10] D. H. Everett, G. D. Parfitt, K. S. W. Sing, R. Wilson, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1974**, *24*, 199-219.
- [11] P. Klobes, R. G. Munro, *Vol. 960-17*, NIST: National Institute of Standards and Technology, **2006**.
- [12] K. S. W. Sing, in *Pure Appl. Chem.*, Vol. 57, **1985**, p. 603.
- [13] N. Kröger, E. Brunner, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2014**, *6*, 615-627.
- [14] R. Hassert, A. G. Beck-Sickinger, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2013**, *85*, 69-77.
- [15] C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, J. S. Beck, *Nature* **1992**, *359*, 710.
- [16] D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G. H. Fredrickson, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, *Science* **1998**, *279*, 548-552.
- [17] X. S. Zhao, G. Q. Lu, G. J. Millar, *Industrial & Engineering Chemistry Research* **1996**, *35*, 2075-2090.
- [18] T. Kimura, S. Saeki, Y. Sugahara, K. Kuroda, *Langmuir* **1999**, *15*, 2794-2798.
- [19] R. Palkovits, C.-M. Yang, S. Olejnik, F. Schüth, *J. Catal.* **2006**, *243*, 93-98.
- [20] S. Perathoner, P. Lanzafame, R. Passalacqua, G. Centi, R. Schlögl, D. S. Su, *Micropor. Mesopor. Mat.* **2006**, *90*, 347-361.
- [21] L. Wang, R. T. Yang, *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115*, 21264-21272.
- [22] C.-m. Yang, M. Kalwei, F. Schüth, K.-j. Chao, *Applied Catalysis A: General* **2003**, *254*, 289-296.
- [23] X. S. Zhao, G. Q. Lu, A. K. Whittaker, G. J. Millar, H. Y. Zhu, *The Journal of Physical Chemistry B* **1997**, *101*, 6525-6531.
- [24] L. T. Zhuravlev, *Langmuir* **1987**, *3*, 316-318.
- [25] F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, M. Froba, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 3216-3251.
- [26] K. Schumacher, P. I. Ravikovitch, A. Du Chesne, A. V. Neimark, K. K. Unger, *Langmuir* **2000**, *16*, 4648-4654.
- [27] Y. Sakamoto, M. Kaneda, O. Terasaki, D. Y. Zhao, J. M. Kim, G. Stucky, H. J. Shin, R. Ryoo, *Nature* **2000**, *408*, 449.
- [28] P.-A. Albouy, A. Ayrál, *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 3391-3397.
- [29] J. Y. Ying, C. P. Mehnert, M. S. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, *38*, 56-77.
- [30] A. Steel, S. W. Carr, M. W. Anderson, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 1571-1572.
- [31] C.-Y. Chen, S. L. Burkett, H.-X. Li, M. E. Davis, *Microporous Materials* **1993**, *2*, 27-34.

- [32] A. Firouzi, D. Kumar, L. M. Bull, T. Besier, P. Sieger, Q. Huo, S. A. Walker, J. A. Zasadzinski, C. Glinka, J. Nicol, *Science* **1995**, 267, 1138.
- [33] A. Firouzi, F. Atef, A. G. Oertli, G. D. Stucky, B. F. Chmelka, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 3596-3610.
- [34] Q. Huo, D. I. Margolese, U. Ciesla, D. G. Demuth, P. Feng, T. E. Gier, P. Sieger, A. Firouzi, B. F. J. C. o. M. Chmelka, *Chem. Mater* **1994**, 6, 1176-1191.
- [35] Q. Huo, D. I. Margolese, U. Ciesla, P. Feng, T. E. Gier, P. Sieger, R. Leon, P. M. Petroff, F. Schüth, G. D. Stucky, *Nature* **1994**, 368, 317.
- [36] S. Ikeda, *Surfactants in Solution*, Plenum, New York, **1984**.
- [37] C. G. Goltner, M. Antonietti, *Adv. Mater.* **1997**, 9, 431-436.
- [38] C. S. Cundy, P. A. Cox, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 663-702.
- [39] H.-P. Lin, S. Cheng, C.-Y. Mou, *Microporous Materials* **1997**, 10, 111-121.
- [40] P. Selvam, S. K. Bhatia, C. G. Sonwane, *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2001**, 40, 3237-3261.
- [41] F. Di Renzo, H. Cambon, R. Dutartre, *Microporous Materials* **1997**, 10, 283-286.
- [42] M. Grün, K. K. Unger, A. Matsumoto, K. Tsutsumi, *Micropor. Mesopor. Mat.* **1999**, 27, 207-216.
- [43] H. Naono, M. Hakuman, T. Tsunehisa, N. Tamura, K. Nakai, *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, 224, 358-365.
- [44] T. Yokoi, Y. Kubota, T. Tatsumi, *Applied Catalysis A: General* **2012**, 421-422, 14-37.
- [45] S. M. Moghimi, A. C. Hunter, *Trends Biotechnol.* **2000**, 18, 412-420.
- [46] M. Kruk, M. Jaroniec, C. H. Ko, R. Ryoo, *Chem. Mater.* **2000**, 12, 1961-1968.
- [47] N. Brodie-Linder, G. Dosseh, C. Alba-Simonesco, F. Audonnet, M. Impéror-Clerc, *Mater. Chem. Phys.* **2008**, 108, 73-81.
- [48] M. Colilla, I. Izquierdo-Barba, S. Sánchez-Salcedo, J. L. G. Fierro, J. L. Hueso, M. Vallet-Regí, *Chem. Mater.* **2010**, 22, 6459-6466.
- [49] D. R. Dunphy, P. H. Sheth, F. L. Garcia, C. J. Brinker, *Chem. Mater.* **2015**, 27, 75-84.
- [50] A. Katiyar, S. Yadav, P. G. Smirniotis, N. G. Pinto, *Journal of Chromatography A* **2006**, 1122, 13-20.
- [51] A. Grünberg, X. Yeping, H. Breitzke, G. Buntkowsky, *Chemistry – A European Journal* **2010**, 16, 6993-6998.
- [52] M. Werner, A. Heil, N. Rothermel, H. Breitzke, Pedro B. Groszewicz, Aany S. Thankamony, T. Gutmann, G. Buntkowsky, *Solid State Nucl. Mag. Res.* **2015**, 72, 73-78.
- [53] S. Fiorilli, B. Onida, B. Bonelli, E. Garrone, *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, 109, 16725-16729.
- [54] C.-m. Yang, Y. Wang, B. Zibrowius, F. Schuth, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, 6, 2461-2467.
- [55] E. Da'na, A. Sayari, *Chemical Engineering Journal* **2011**, 166, 445-453.
- [56] S. Hao, H. Chang, Q. Xiao, Y. Zhong, W. Zhu, *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, 115, 12873-12882.
- [57] A. Maria Chong, X. Zhao, *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, 107, 12650-12657.
- [58] X. Wang, K. S. K. Lin, J. C. C. Chan, S. Cheng, *The Journal of Physical Chemistry B* **2005**, 109, 1763-1769.
- [59] R. K. Zeidan, S. J. Hwang, M. E. Davis, *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, 45, 6332-6335.
- [60] C. M. Yang, Y. Q. Wang, B. Zibrowius, F. Schuth, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, 6, 2461-2467.
- [61] L. T. Zhuravlev, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1993**, 74, 71-90.

- [62] L. T. Zhuravlev, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2000**, *173*, 1-38.
- [63] L. J. Berliner, J. Grunwald, H. O. Hankovszky, K. Hideg, *Anal. Biochem.* **1982**, *119*, 450-455.
- [64] J. M. Crane, C. Mao, A. A. Lilly, V. F. Smith, Y. Suo, W. L. Hubbell, L. L. Randall, *J. Mol. Biol.* **2005**, *353*, 295-307.
- [65] G. Jeschke, Y. Polyhach, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 1895-1910.
- [66] A. Polese, D. J. Anderson, G. Millhauser, F. Formaggio, M. Crisma, F. Marchiori, C. Toniolo, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11071-11078.
- [67] Y. Polyhach, E. Bordignon, G. Jeschke, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 2356-2366.
- [68] T. Stockner, A. Mullen, F. MacMillan, *Biochem. Soc. Trans.* **2015**, *43*, 1023.
- [69] S. Jebors, S. Cecillon, C. Faye, C. Enjalbal, M. Amblard, A. Mehdi, G. Subra, J. Martinez, *Journal of Materials Chemistry B* **2013**, *1*, 6510-6515.
- [70] S. Jebors, C. Enjalbal, M. Amblard, A. Mehdi, G. Subra, J. Martinez, *Journal of Materials Chemistry B* **2013**, *1*, 2921-2925.
- [71] J. Gorzynski Smith, *Synthesis* **1984**, *1984*, 629-656.
- [72] R. Yosomiya, K. Morimoto, T. Suzuki, **1984**, *29*, 671-679.
- [73] K. Lim, R. R. Y. Chua, R. Saravanan, A. Basu, B. Mishra, P. A. Tarnbyah, B. Ho, S. S. J. Leong, *Acs Applied Materials & Interfaces* **2013**, *5*, 6412-6422.
- [74] B. R. Coad, M. Jasieniak, S. S. Griesser, H. J. Griesser, *Surf. Coat. Technol.* **2013**, *233*, 169-177.
- [75] M. Y. Xue, H. X. Huang, Y. X. Ke, C. H. Chu, Y. Jin, X. M. Liang, *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216*, 8623-8629.
- [76] S. Jebors, C. Enjalbal, M. Amblard, G. Subra, A. Mehdi, J. Martinez, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 7670-7674.
- [77] J. Gao, X. Zhang, S. Xu, J. Liu, F. Tan, X. Li, Z. Qu, Y. Zhang, X. Quan, *Chemistry – An Asian Journal* **2014**, *9*, 908-914.
- [78] Y. Khaniani, A. Badiei, G. M. Ziarani, *J. Mater. Res.* **2012**, *27*, 932-938.
- [79] L. Liang, D. Astruc, *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255*, 2933-2945.
- [80] R. Breinbauer, M. Köhn, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1147-1149.
- [81] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [82] A. B. Lowe, *Polymer Chemistry* **2010**, *1*, 17-36.
- [83] J. Cabanas-Danes, C. Nicosia, E. Landman, M. Karperien, J. Huskens, P. Jonkheijm, *Journal of Materials Chemistry B* **2013**, *1*, 1903-1908.
- [84] A. Schlossbauer, D. Schaffert, J. Kecht, E. Wagner, T. Bein, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12558-12559.
- [85] K. Jiang, L. S. Schadler, R. W. Siegel, X. Zhang, H. Zhang, M. Terrones, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 37-39.
- [86] N. Ardès-Guisot, J.-O. Durand, M. Granier, A. Perzyna, Y. Coffinier, B. Grandidier, X. Wallart, D. Stievenard, *Langmuir* **2005**, *21*, 9406-9408.
- [87] A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557-6602.
- [88] S.-Y. Han, Y.-A. Kim, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2447-2467.
- [89] E. Bouron, G. Goussard, C. Marchand, M. Bonin, X. Panneconcke, J.-C. Quirion, H.-P. Husson, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7227-7230.
- [90] U. Ragnarsson, L. Grehn, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 494-501.
- [91] F. Sánchez-Sancho, E. Mann, B. Herradon, *Synlett* **2000**, *2000(4)*, 509-513.
- [92] E. Fischer, A. Speier, *Eur. J. Inorg. Chem.* **1895**, *28*, 3252-3258.
- [93] M. Tsakos, E. S. Schaffert, L. L. Clement, N. L. Villadsen, T. B. Poulsen, *Natural Product Reports* **2015**, *32*, 605-632.
- [94] B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem.* **1978**, *90*, 556-557.

- [95] A. Ikeda, K. Terada, M. Shiotsuki, F. Sanda, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2011**, *49*, 3783-3796.
- [96] M. A. Booth, K. Kannappan, A. Hosseini, A. Partridge, *Langmuir* **2015**, *31*, 8033-8041.
- [97] S. Brunauer, P. H. Emmett, E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 309-319.
- [98] E. P. Barrett, L. G. Joyner, P. P. Halenda, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 373-380.
- [99] R. P. W. Scott, *Silica gel and bonded phases: their production, properties, and use in LC*, Vol. 4, John Wiley & Sons Inc, **1993**.
- [100] L. D. White, C. P. Tripp, *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *232*, 400-407.
- [101] B. Kumari, M. Brodrecht, H. Breitzke, M. Werner, B. Grünberg, H.-H. Limbach, S. Forg, E. P. Sanjon, B. Drossel, T. Gutmann, G. Buntkowsky, *The Journal of Physical Chemistry C* **2018**, *122*, 19540-19550.
- [102] J. Trébosc, J. W. Wiench, S. Huh, V. S. Y. Lin, M. Pruski, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3057-3068.
- [103] M. Brodrecht, H. Breitzke, T. Gutmann, G. Buntkowsky, *Chemistry-a European Journal* **2018**, *24*, 17814-17822.
- [104] M. B. Lüchinger, ETH Zurich (Dissertation Nr. 15847), **2004**.
- [105] M. Thommes, K. Kaneko, V. Neimark Alexander, P. Olivier James, F. Rodriguez-Reinoso, J. Rouquerol, S. W. Sing Kenneth, in *Pure Appl. Chem.*, Vol. 87, **2015**, p. 1051.
- [106] R. Voß, MPI für Kolloid und Grenzflächenforschung (Dissertation), **2005**.
- [107] Y. Zeng, C. Fan, D. D. Do, D. Nicholson, *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2014**, *53*, 15467-15474.
- [108] G. Srinivas, Y. Zhu, R. Piner, N. Skipper, M. Ellerby, R. Ruoff, *Carbon* **2010**, *48*, 630-635.
- [109] A. Saito, H. C. Foley, *Microporous Materials* **1995**, *3*, 531-542.
- [110] Horv, Aacute, G. Th, Eacute, Za, K. Kawazoe, *J. Chem. Eng. Jpn.* **1983**, *16*, 470-475.
- [111] D. Henderson, *Fundamentals of inhomogeneous fluids*, Vol. Kapitel 5, CRC Press, **1992**.
- [112] J. P. Olivier, *Journal of Porous Materials* **1995**, *2*, 9-17.
- [113] P. I. Ravikovitch, A. Vishnyakov, A. V. Neimark, *Physical Review E* **2001**, *64*, 011602.
- [114] P. I. Ravikovitch, D. Wei, W. T. Chueh, G. L. Haller, A. V. Neimark, *The Journal of Physical Chemistry B* **1997**, *101*, 3671-3679.
- [115] S. R. Hartmann, E. L. Hahn, *Phys. Rev.* **1962**, *128*, 2042-2053.
- [116] A. Pines, M. G. Gibby, J. S. Waugh, *Chem. Phys. Lett.* **1972**, *15*, 373-376.
- [117] E. R. Andrew, A. Bradbury, R. G. Eades, *Nature* **1958**, *182*, 1659.
- [118] I. J. Lowe, *Phys. Rev. Lett.* **1959**, *2*, 285-287.
- [119] B. Grünberg, T. Emmler, E. Gedat, I. Shenderovich, G. H. Findenegg, H. H. Limbach, G. Buntkowsky, *Chemistry-A European Journal* **2004**, *10*, 5689-5696.
- [120] A. Lesage, M. Lelli, D. Gajan, M. A. Caporini, V. Vitzthum, P. Miéville, J. Alauzun, A. Roussey, C. Thieuleux, A. Mehdi, G. Bodenhausen, C. Coperet, L. Emsley, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15459-15461.
- [121] Z. Zhou, F. Piepenbreier, V. R. R. Marthala, K. Karbacher, M. Hartmann, *Catalysis Today* **2015**, *243*, 173-183.
- [122] I. Ben Shir, S. Kababya, T. Amitay-Rosen, Y. S. Balazs, A. Schmidt, *The Journal of Physical Chemistry B* **2010**, *114*, 5989-5996.
- [123] I. Ben Shir, S. Kababya, A. Schmidt, *The Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116*, 9691-9702.
- [124] I. Ben Shir, S. Kababya, A. Schmidt, *The Journal of Physical Chemistry C* **2014**, *118*, 7901-7909.
- [125] P. A. Mirau, R. R. Naik, P. Gehring, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18243-18248.
- [126] K. J. Cluff, M. Schnellbach, C. R. Hilliard, J. Blümel, *J. Organomet. Chem.* **2013**, *744*, 119-124.
- [127] R. Hedrich, S. Machill, E. Brunner, *Carbohydr. Res.* **2013**, *365*, 52-60.

- [128] S. Ray, M. Takafuji, H. Ihara, *Journal of Chromatography A* **2012**, 1266, 43-52.
- [129] A. Jantschke, E. Koers, D. Mance, M. Weingarth, E. Brunner, M. Baldus, *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, 54, 15069-15073.
- [130] Y. Geiger, H. E. Gottlieb, Ü. Akbey, H. Oschkinat, G. Goobes, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 5561-5567.
- [131] A. Grunberg, Y. P. Xu, H. Breitzke, G. Buntkowsky, *Chemistry-a European Journal* **2010**, 16, 6993-6998.
- [132] T. Gutmann, A. Grünberg, N. Rothermel, M. Werner, M. Srouf, S. Abdhussain, S. Tan, Y. Xu, H. Breitzke, G. Buntkowsky, *Solid State Nucl. Mag. Res.* **2013**, 55-56, 1-11.
- [133] T. Posset, J. Guenther, J. Pope, T. Oeser, J. Blumel, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 2059-2061.
- [134] A. Dos, V. Schimming, S. Tosoni, H.-H. Limbach, *The Journal of Physical Chemistry B* **2008**, 112, 15604-15615.
- [135] I. G. Shenderovich, G. Buntkowsky, A. Schreiber, E. Gedat, S. Sharif, J. Albrecht, N. S. Golubev, G. H. Findenegg, H.-H. Limbach, *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, 107, 11924-11939.
- [136] M. Rosay, J. C. Lansing, K. C. Haddad, W. W. Bachovchin, J. Herzfeld, R. J. Temkin, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 13626-13627.
- [137] G. T. Debelouchina, M. J. Bayro, A. W. Fitzpatrick, V. Ladizhansky, M. T. Colvin, M. A. Caporini, C. P. Jaroniec, V. S. Bajaj, M. Rosay, C. E. MacPhee, M. Vendruscolo, W. E. Maas, C. M. Dobson, R. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 19237-19247.
- [138] T. Gutmann, J. Liu, N. Rothermel, Y. Xu, E. Jaumann, M. Werner, H. Breitzke, S. T. Sigurdsson, G. Buntkowsky, *Chemistry – A European Journal* **2015**, 21, 3798-3805.
- [139] A. S. Lilly Thankamony, C. Lion, F. Pourpoint, B. Singh, A. J. Perez Linde, D. Carnevale, G. Bodenhausen, H. Vezin, O. Lafon, V. Polshettiwar, *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, 54, 2190-2193.
- [140] T. K. Todorova, X. Rozanska, C. Gervais, A. Legrand, L. N. Ho, P. Berruyer, A. Lesage, L. Emsley, D. Farrusseng, J. Canivet, C. Mellot-Draznieks, *Chemistry – A European Journal* **2016**, 22, 16531-16538.
- [141] M. A. Voinov, D. B. Good, M. E. Ward, S. Milikisiyants, A. Marek, M. A. Caporini, M. Rosay, R. A. Munro, M. Ljumovic, L. S. Brown, V. Ladizhansky, A. I. Smirnov, *The Journal of Physical Chemistry B* **2015**, 119, 10180-10190.
- [142] A. Zagdoun, G. Casano, O. Ouari, G. Lapadula, A. J. Rossini, M. Lelli, M. Baffert, D. Gajan, L. Veyre, W. E. Maas, M. Rosay, R. T. Weber, C. Thieuleux, C. Coperet, A. Lesage, P. Tordo, L. Emsley, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 2284-2291.
- [143] L. Zhao, W. Li, A. Plog, Y. Xu, G. Buntkowsky, T. Gutmann, K. Zhang, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, 16, 26322-26329.
- [144] E. Bénédicte, R. G. Griffin, Massachusetts Institute of Technology (Masterthesis), **2000**.
- [145] M. Renault, A. Cukkemane, M. Baldus, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, 49, 8346-8357.
- [146] T. Maly, G. T. Debelouchina, V. S. Bajaj, K.-N. Hu, C.-G. Joo, M. L. Mak-Jurkauskas, J. R. Sirigiri, P. C. A. van der Wel, J. Herzfeld, R. J. Temkin, R. G. Griffin, *The Journal of chemical physics* **2008**, 128, 052211-052211.
- [147] A. S. Lilly Thankamony, J. J. Wittmann, M. Kaushik, B. Corzilius, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2017**, 102-103, 120-195.
- [148] A. J. Rossini, A. Zagdoun, M. Lelli, A. Lesage, C. Copéret, L. Emsley, *Acc. Chem. Res.* **2013**, 46, 1942-1951.
- [149] F. Pourpoint, A. S. L. Thankamony, C. Volkringer, T. Loiseau, J. Trebosc, F. Aussenac, D. Carnevale, G. Bodenhausen, H. Vezin, O. Lafon, J.-P. Amoureux, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 933-935.

- [150] R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions, Vol. 14*, Clarendon Press Oxford, **1987**.
- [151] I. Gelis, V. Vitzthum, N. Dhimole, M. A. Caporini, A. Schedlbauer, D. Carnevale, S. R. Connell, P. Fucini, G. Bodenhausen, *J. Biomol. NMR* **2013**, *56*, 85-93.
- [152] T. Viennet, A. Viegas, A. Kuepper, S. Arens, V. Gelev, O. Petrov, T. N. Grossmann, H. Heise, M. Etzkorn, *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 10904-10908.
- [153] S. M. Holl, G. R. Marshall, D. D. Beusen, K. Kociolek, A. S. Redlinski, M. T. Leplawy, R. A. McKay, S. Vega, J. Schaefer, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4830-4833.
- [154] D. P. Raleigh, M. H. Levitt, R. G. Griffin, *Chem. Phys. Lett.* **1988**, *146*, 71-76.
- [155] I. Ben Shir, S. Kababya, I. Katz, B. Pokroy, A. Schmidt, *Chem. Mater.* **2013**, *25*, 4595-4602.
- [156] R. Gertman, I. Ben Shir, S. Kababya, A. Schmidt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13425-13432.
- [157] D. Tietze, S. Voigt, D. Mollenhauer, M. Tischler, D. Imhof, T. Gutmann, L. González, O. Ohlenschläger, H. Breitzke, M. Görlach, G. Buntkowsky, *Angewandte Chemie, International Edition* **2011**, *50*, 2946-2950.
- [158] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- [159] E. Atherton, H. Fox, D. Harkiss, C. J. Logan, R. C. Sheppard, B. J. Williams, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1978**, 537-539.
- [160] E. Atherton, C. J. Logan, R. C. Sheppard, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1981**, 538-546.
- [161] C.-D. Chang, J. Meienhofer, *Chemical Biology & Drug Design* **1978**, *11*, 246-249.
- [162] G. B. Fields, R. L. Noble, *Chemical Biology & Drug Design* **1990**, *35*, 161-214.
- [163] J. C. Sheehan, G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067-1068.
- [164] M. Ślebioda, Z. Wodecki, A. M. Kołodziejczyk, *Chemical Biology & Drug Design* **1990**, *35*, 539-541.
- [165] L. A. Carpino, A. El-Faham, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 6813-6830.
- [166] R. Subirós-Funosas, R. Prohens, R. Barbas, A. El-Faham, F. Albericio, *Chemistry – A European Journal* **2009**, *15*, 9394-9403.
- [167] A. El-Faham, F. Albericio, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009*, 1499-1501.
- [168] F. Albericio, K. Burger, J. Ruíz-Rodríguez, J. Spengler, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 597-600.
- [169] M. Gairí, P. Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 7363-7366.
- [170] F. Albericio, J. M. Bofill, A. El-Faham, S. A. Kates, *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63*, 9678-9683.
- [171] H. Eckert, *ChemPubSoc* **2017**, *23*, 5893-5914.
- [172] U. Akbey, W. T. Franks, A. Linden, M. Orwick-Rydmark, S. Lange, H. Oschkinat, in *Hyperpolarization Methods in NMR Spectroscopy*, Springer, **2013**, pp. 181-228.
- [173] M. Gerolin, M. Zerbetto, A. Moretto, F. Formaggio, C. Toniolo, M. van Son, M. H. Shabestari, M. Huber, P. Calligari, A. Polimeno, *The Journal of Physical Chemistry B* **2017**, *121*, 4379-4387.
- [174] I. D. Sahu, R. M. McCarrick, G. A. Lorigan, *Biochemistry* **2013**, *52*, 5967-5984.
- [175] T. R. Carver, C. P. Slichter, *Phys. Rev.* **1953**, *92*, 212-213.
- [176] A. W. Overhauser, *Phys. Rev.* **1953**, *92*, 411-415.
- [177] F. Blanc, S. Y. Chong, T. O. McDonald, D. J. Adams, S. Pawsey, M. A. Caporini, A. I. Cooper, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 15290-15293.
- [178] T. Gutmann, B. Kumari, L. Zhao, H. Breitzke, S. Schöttner, C. Rüttiger, M. Gallei, *The Journal of Physical Chemistry C* **2017**, *121*, 3896-3903.
- [179] A. N. Smith, M. A. Caporini, G. E. Fanucci, J. R. Long, *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54*, 1542-1546.
- [180] E. A. W. van der Crujisen, E. J. Koers, C. Sauvée, R. E. Hulse, M. Weingarth, O. Ouari, E. Perozo, P. Tordo, M. Baldus, *Chemistry-a European Journal* **2015**, *21*, 12971-12977.

- 
- [181] B. J. Wylie, B. G. Dzikovski, S. Pawsey, M. Caporini, M. Rosay, J. H. Freed, A. E. J. J. o. b. N. McDermott, *J. Biomol. NMR* **2015**, *61*, 361-367.
- [182] E. J. Koers, E. A. W. van der Cruijssen, M. Rosay, M. Weingarth, A. Prokofyev, C. Sauvée, O. Ouari, J. van der Zwan, O. Pongs, P. Tordo, W. E. Maas, M. J. J. o. B. N. Baldus, *J. Biomol. NMR* **2014**, *60*, 157-168.
- [183] R. Rogawski, I. V. Sergeyev, Y. Li, M. F. Ottaviani, V. Cornish, A. E. McDermott, *The Journal of Physical Chemistry B* **2017**, *121*, 1169-1175.
- [184] J. Jiang, L. Yang, Q. Jin, W. Ma, L. Moroder, S. Dong, *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19*, 17679-17682.
- [185] C. P. Jaroniec, *J. Magn. Reson.* **2015**, *253*, 50-59.
- [186] P. S. Nadaud, J. J. Helmus, N. Höfer, C. P. Jaroniec, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7502-7503.
- [187] M. R. Fleissner, E. M. Brustad, T. Kálai, C. Altenbach, D. Cascio, F. B. Peters, K. Hideg, S. Peuker, P. G. Schultz, W. L. Hubbell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 21637-21642.
- [188] R. Rogawski, A. E. McDermott, *Archives of biochemistry and biophysics* **2017**, *628*, 102-113.
- [189] V. Vitzthum, F. Borcard, S. Jannin, M. Morin, P. Mieville, M. A. Caporini, A. Sienkiewicz, S. Gerber-Lemaire, G. Bodenhausen, *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 2929-2932.
- [190] P. Hanson, D. J. Anderson, G. Martinez, G. Millhauser, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo, C. Vita, *Mol. Phys.* **1998**, *95*, 957-966.
- [191] J. J. Inbaraj, T. B. Cardon, M. Laryukhin, S. M. Grosser, G. A. Lorigan, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9549-9554.
- [192] R. Marchetto, S. Schreier, C. R. Nakaie, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11042-11043.
- [193] C. Toniolo, M. Crisma, F. Formaggio, *Peptide Science* **1998**, *47*, 153-158.
- [194] C. Toniolo, E. Valente, F. Formaggio, M. Crisma, G. Piloni, C. Corvaja, A. Toffoletti, G. V. Martinez, M. P. Hanson, G. L. Millhauser, C. George, J. L. Flippen-Anderson, *J. Pept. Sci.* **1995**, *1*, 45-57.
- [195] M. Brodrecht, B. Kumari, H. Breitzke, T. Gutmann, G. Buntkowsky, *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **2018**, *232*, 1127.
- [196] M. Weigler, M. Brodrecht, H. Breitzke, F. Dietrich, M. Sattig, G. Buntkowsky, M. Vogel, *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **2018**, *232*, 1041.
- [197] L. Gao, Y. Wang, J. Wang, L. Huang, L. Shi, X. Fan, Z. Zou, T. Yu, M. Zhu, Z. Li, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 6844-6850.
- [198] A. S. Kumar, T. Ye, T. Takami, B.-C. Yu, A. K. Flatt, J. M. Tour, P. S. Weiss, *Nano Letters* **2008**, *8*, 1644-1648.
- [199] J. Timm, U. Schürmann, L. Kienle, W. Bensch, *Micropor. Mesopor. Mat.* **2016**, *228*, 30-36.
- [200] K. G. Yager, C. J. Barrett, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2006**, *182*, 250-261.
- [201] P. Lorente, I. G. Shenderovich, N. S. Golubev, G. S. Denisov, G. Buntkowsky, H.-H. Limbach, *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, S18-S29.
- [202] H. J. Shine, H. Zmuda, H. Kwart, A. G. Horgan, M. Brechbiel, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5181-5184.

---

Darmstadt,

### **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt und noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

---

Martin Brodrecht

---

Darmstadt,

### **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass die elektronische Version der Doktorarbeit mit der schriftlichen Version übereinstimmt. Die elektronische Version liegt dem Prüfungssekretariat vor.

---

Martin Brodrecht

### Erklärung zum Eigenanteil an den Veröffentlichungen

Im Folgenden ist aufgelistet, mit welchem Anteil ich an den Veröffentlichungen beteiligt war.

Mein Anteil an der folgenden Veröffentlichung beträgt 50%.

(MCM-41 Synthesen, Propenpräparation, Charakterisierung mittels BET, Konzeptionierung der Festkörper-NMR Messungen, Auswertung und Interpretation)

M. Brodrecht\*, E. Klotz\*, C. Lederle, H. Breitzke, B. Stühn, M. Vogel, G. Buntkowsky  
A Combined Solid-State NMR, Dielectric Spectroscopy and Calorimetric Study of Water in  
Lowly Hydrated MCM-41 Samples  
*Zeitschrift für Physikalische Chemie* **2018**, 232, 1003.

Mein Anteil an der folgenden Veröffentlichung beträgt 100%.

(Konzeptionierung, APTES-SBA-15 Synthesen, Entwicklung der Funktionalisierungsstrategien,  
Funktionalisierung, Charakterisierung mittels TGA, BET, REM und Festkörper-NMR,  
Auswertung und Interpretation)

M. Brodrecht, H. Breitzke, T. Gutmann, G. Buntkowsky  
Biofunctionalization of Nano Channels by Direct In-Pore Solid-Phase Peptide Synthesis  
*Chemistry – A European Journal* **2018**, 24, 17814-17822.

Mein Anteil an der folgenden Veröffentlichung beträgt 50%.

(MCM-41 Synthesen, Charakterisierung mittels BET, REM und DSC)

M. Weigler\*, M. Brodrecht\*, G. Buntkowsky, M. Vogel  
Reorientation of Deeply Cooled Water in Mesoporous Silica: NMR Studies of the Pore-Size  
Dependence  
*The Journal of Physical Chemistry B*, **2019**, 123, 2123-2134.

\*These authors contributed equally to this work

---

Mein Anteil an der folgenden Veröffentlichung beträgt 50%  
(Konzeptionierung, APTES-SBA-15 Synthesen, Charakterisierung mittels TGA, BET und REM,  
Auswertung und Interpretation)

M. Brodrecht\*, B. Kumari\*, A.S. Sofia Lilly Thankamony, H. Breitzke, T. Gutmann, G.  
Buntkowsky  
Structural insights into peptides bound to the surface of silica nanopores  
Chemistry – A European Journal, **2019**, *25*, 5214-5221.

Mein Anteil an der folgenden Veröffentlichung beträgt 80%  
(Konzeptionierung, Entwicklung der Synthesestrategie, Synthesen der Spin-Label  
Building-Blocks, Einbau der Building-Blocks in Peptide (SPPS), Charakterisierung mittels  
HPLC, fNMR und MS, Auswertung und Interpretation)

M. Brodrecht, K. Herr, S. Bothe, M. de Oliveira Jr., T. Gutmann and G. Buntkowsky  
Efficient building-blocks for solid state peptide synthesis of spin-labeled peptides for EPR and  
DNP applications  
ChemPhysChem, **2019**, *20*, 1475.

\*These authors contributed equally to this work

---

Martin Brodrecht

## Erklärung zur Begutachtung der Veröffentlichungen

Referent: Prof. Dr. Gerd Buntkowsky  
Korreferent: Prof. Dr. Michael Reggelin

Darmstadt,

Weder Referent (Prof. Dr. Gerd Buntkowsky) noch Korreferent (Prof. Dr. Michael Reggelin) der vorliegenden kumulativen Doktorarbeit waren an der Begutachtung nachstehender Veröffentlichungen beteiligt:

M. Brodrecht\*, E. Klotz\*, C. Lederle, H. Breitzke, B. Stühn, M. Vogel, G. Buntkowsky  
A Combined Solid-State NMR, Dielectric Spectroscopy and Calorimetric Study of Water in Lowly Hydrated MCM-41 Samples  
*Zeitschrift für Physikalische Chemie* **2018**, 232, 1003.

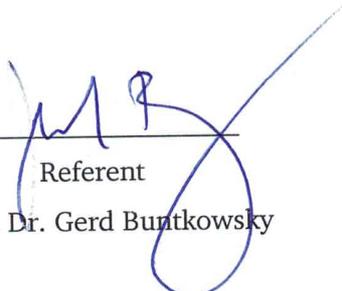
M. Brodrecht, H. Breitzke, T. Gutmann, G. Buntkowsky  
Biofunctionalization of Nano Channels by Direct In-Pore Solid-Phase Peptide Synthesis  
*Chemistry – A European Journal* **2018**, 24, 17814-17822.

M. Weigler\*, M. Brodrecht\*, G. Buntkowsky, M. Vogel  
Reorientation of Deeply Cooled Water in Mesoporous Silica: NMR Studies of the Pore-Size Dependence  
*The Journal of Physical Chemistry B*, **2019**, 123, 2123-2134.

M. Brodrecht\*, B. Kumari\*, A.S. Sofia Lilly Thankamony, H. Breitzke, T. Gutmann, G. Buntkowsky  
Structural insights into peptides bound to the surface of silica nanopores  
*Chemistry – A European Journal*, DOI:10.1002/chem.201805480

M. Brodrecht, K. Herr, S. Bothe, M. de Oliveira Jr., T. Gutmann and G. Buntkowsky  
Efficient building-blocks for solid state peptide synthesis of spin-labeled peptides for EPR and DNP applications  
*ChemPhysChem*, **In Revision**

\*These authors contributed equally to this work

  
Referent  
Prof. Dr. Gerd Buntkowsky

  
Korreferent  
Prof. Dr. Michael Reggelin