

**FT-IR-Kartierung – ein neues Werkzeug zur
ortsaufgelösten Charakterisierung von
polymergebundenen kombinatorischen Ver-
bindungsbibliotheken mit IR-Mikroskopie****

Wolfgang J. Haap, Tilmann B. Walk und Günther Jung*

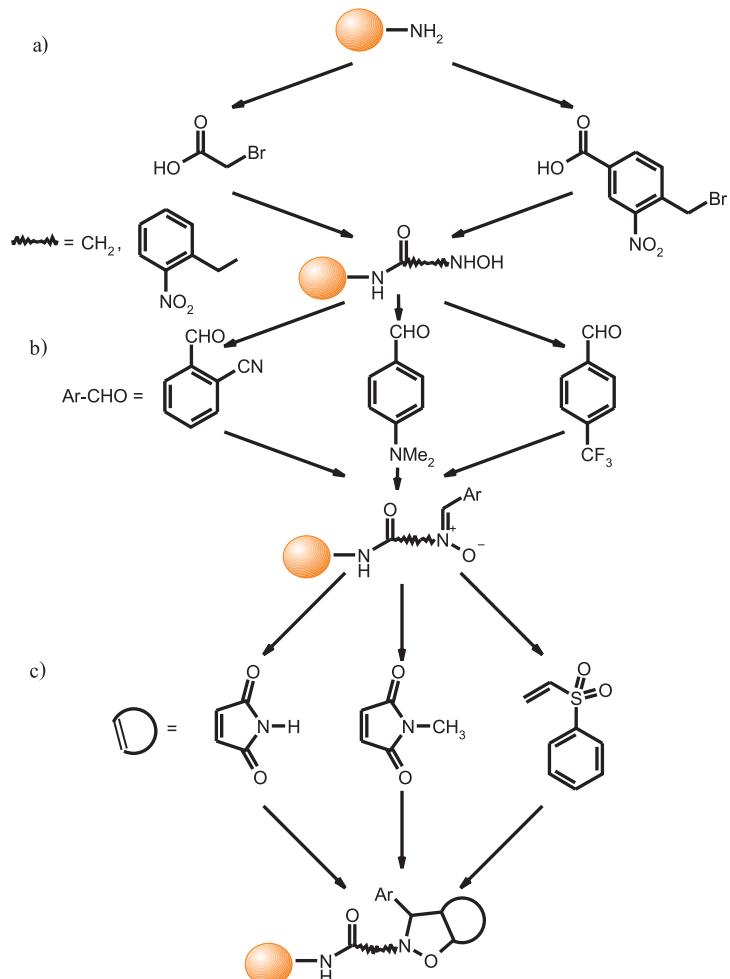
Entscheidender Vorteil der kombinatorischen organischen Festphasenchemie^[1-5] zur Leitstrukturfindung ist ihr verglichen mit herkömmlichen Synthesemethoden höherer Durchsatz, da vorzugsweise leicht automatisierbare Reaktionen an polymeren Trägerharzen durchgeführt werden.^[6] Weitere Steigerungen der Effizienz zielen auf eine zunehmende Miniaturisierung sowohl der Synthese als auch des Screenings der hergestellten Verbindungen ab. Große Bedeutung bei der Entwicklung solcher Technologien kommt der Harzbead-Analytik zu. Mit den mittlerweile etablierten Verfahren zur Analytik einzelner Harzbeads, wie der NMR-Spektroskopie,^[7, 8] der matrixunterstützten Laserdesorptions/ionisations-Flugzeit(MALDI-TOF)-Massenspektrometrie und der FT-IR-Mikroskopie,^[9-11] konnten bisher nur polymergebundene Einzelverbindungen analysiert werden. In der kombinatorischen Chemie werden jedoch insbesondere Verfahren benötigt, mit denen gleichzeitig eine Vielzahl von Verbindungen analysiert werden kann.

Aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit, des geringen apparativen Aufwandes und des hohen Probendurchsatzes ist die IR-Mikroskopie für die parallele Analytik geeignet. Die Kombination eines FT-IR-Mikroskops mit einem motorgetriebenen *x*-*y*-Verstellschiebeträger ermöglicht das automatische spektrale Abrastern von Oberflächen und darin eingelagerten Objekten. Werden einzelne Harzbeads in einem KBr-Fenster durch Pressen eingebettet, können sie mit dieser Meßanordnung in Form einer IR-Karte abgebildet werden. Die in Abbildung 1 dargestellte Überlagerung des sichtbaren Videobildes von einigen Harzkugeln mit der zugehörigen IR-Karte zeigt die gute Korrelation beider Darstellungsarten. Zur IR-Rekonstruktion wurde in diesem Fall die typische Polystyrol-Kombinationsschwingung bei 1942 cm⁻¹ verwendet.

Durch Abrastern größerer Flächen lassen sich hunderte von eingebetteten Harzbeads erfassen und die daran gebundenen Verbindungen identifizieren. Um die Leistungsfähigkeit dieser Methode aufzuzeigen, wurde eine Modellbibliothek von Isoxazolidinen^[12] am Rink-Amid-A-RAM-Harz nach der Split/Combine-Methode^[13] synthetisiert (Schema 1). Die so erhaltene trägergebundene Bibliothek besteht aus insgesamt 18 Verbindungen. Betrachtet man die variablen Bausteine der Synthese, so enthalten jeweils 50% der



Abb. 1. UV/Vis-Videobild und IR-Rekonstruktion von vier Polystyrol-Harzbeads mit einem Durchmesser von ca. 80 µm. Die IR-Karte wurde mit einem motorgetriebenen *x*-*y*-Verstellschiebeträger in Kombination mit einem IR-Mikroskop erhalten. Zur Rekonstruktion der Harzbeads wurde das Integral der Polystyrol-Kombinationsschwingung bei 1942 cm⁻¹ verwendet.



Schema 1. Festphasensynthese von Isoxazolidinen nach der Split/Combine-Methode. a) Aufteilung des Harzes in zwei gleiche Portionen, Kupplung mit Bromcarbonsäuren mit DIC, Vereinigung des Harzes, Substitution mit Hydroxylamin; b) Aufteilung des Harzes in drei gleiche Portionen, Kondensation mit drei verschiedenen aromatischen Aldehyden zu den entsprechenden Nitronen, Vereinigung des Harzes; c) Aufteilung des Harzes in drei gleiche Portionen, Cycloaddition mit drei verschiedenen Dipolarophilen zum Isoxazolidin, Vereinigung des Harzes.

[*] Prof. Dr. G. Jung, Dipl.-Chem. T. B. Walk
Institut für Organische Chemie der Universität
Auf der Morgenstelle 18, D-72076 Tübingen
Fax: (+49) 7071-296925
E-mail: guenther.jung@uni-tuebingen.de

Dr. W. J. Haap
Ciba Spezialitätenchemie, Grenzach-Wyhlen

[**] Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Bildung, Forschung und Technologie BMBF (FKZ 0311000; Librarian II, Teilprojekt „Kombinatorische Chemie und Synthesemonitoring“) gefördert. Herrn Dr. A. Rager (Bruker, Karlsruhe) danken wir für die technische Unterstützung.

Verbindungen eine Nitrogruppe bzw. den Carboxamidomethylrest, jeweils 33 % eine Cyan-, *N,N*-Dimethylamino- oder Trifluormethylgruppe und jeweils 33 % eine Succinimid-, *N*-Methylsuccinimid- oder Sulfongruppe. Um den Erfolg der Synthese dieser Bibliothek zu verifizieren, wurde ein Teil des Harzes entnommen, und die Verbindungen wurden mit Trifluoressigsäure vom Polymer abgespalten und durch HPLC-Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie analysiert. Alle angegebenen Verbindungen konnten nachgewiesen werden. Bei der Cycloaddition der Maleinimide werden *endo/exo*-Isomere und im Falle des Vinylsulfons Regioisomere erhalten. Dies hat komplexe Chromatogramme isomerer Verbindungsgemische zur Folge; häufig treten Coelutionen auf. Eine Quantifizierung der einzelnen Verbindungen ist nicht möglich, und die Peakflächen in der UV-Spur (Detektion bei 214 nm) korrelieren nicht mit denen der Totalionenstromaufzeichnung im Massenspektrum.

Die nach Schema 1 dargestellte Isoxazolidinbibliothek wurde in einem KBr-Fenster durch Pressen eingebettet. Eine Fläche von $3 \times 3 \text{ mm}^2$ wurde automatisch abgerastert. Wird zur Visualisierung der IR-Karte die Polystyrolabsorption bei 1942 cm^{-1} verwendet, so werden alle in der Fläche enthaltenen Harzkugeln angezeigt (Abb. 2). Durch Wahl unterschiedlicher Absorptionsbanden zur Visualisierung lassen sich aus dieser Bibliothek von insgesamt 297 Harzbeads selektiv die „herausfischen“, die eine bestimmte funktionelle Gruppe tragen. Beispielsweise werden die Harzbeads mit der *N*-Methylsuccinimidgruppe durch Visualisierung über die Carbonylabsorption bei 1715 cm^{-1} aus der Harzmischung spektroskopisch extrahiert. Insgesamt befinden sich in der abgerasterten Fläche 116 Harzbeads (39.1 %) mit dieser Gruppierung (Abb. 3). Analoge IR-Karten können für weitere funktionelle Gruppen erhalten werden (Abb. 4).

Die Schwierigkeit bei der IR-Analyse trägegebundener Moleküle ist die starke Eigenabsorption der Polymermatrix. So können im IR-Spektrum neben den Polymer- und Ankerabsorptionen z.B. weder die *N,N*-Dimethylamino- noch

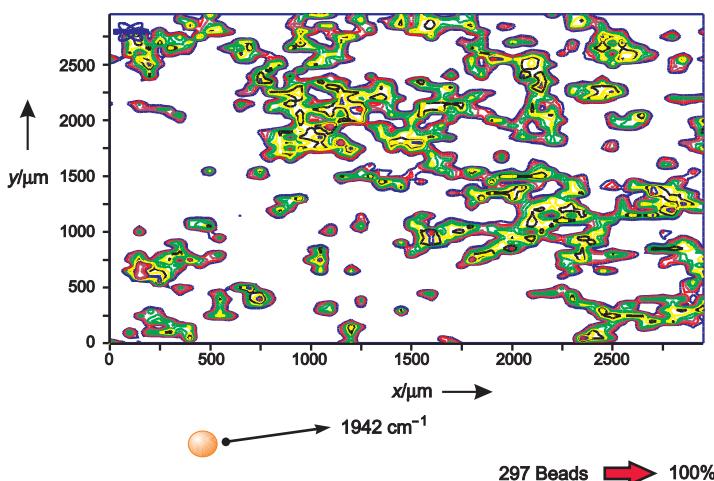


Abb. 2. IR-Karte einer $3 \times 3 \text{ mm}^2$ großen Fläche eines KBr-Fensters, in dem Harzkugeln der Isoxazolidinbibliothek eingebettet sind. Bei Verwendung der Polystyrolabsorption bei 1942 cm^{-1} werden alle Harzkugeln angezeigt. Weiße Bereiche: KBr-Fenster; farbige Bereiche: Harzkugeln. Insgesamt befinden sich in der abgerasterten Fläche 297 Harzkugeln.

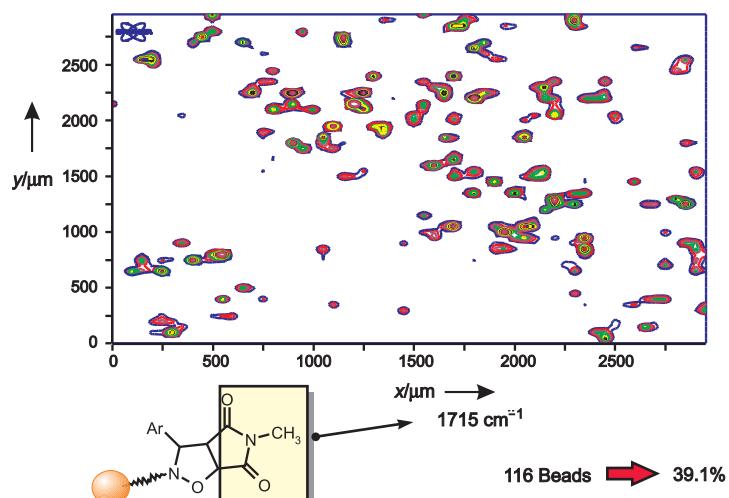


Abb. 3. Aus der Harzbibliothek extrahierte „*N*-Methylsuccinimid“-Harzbeads durch Visualisierung über die Carbonylabsorption bei 1715 cm^{-1} .

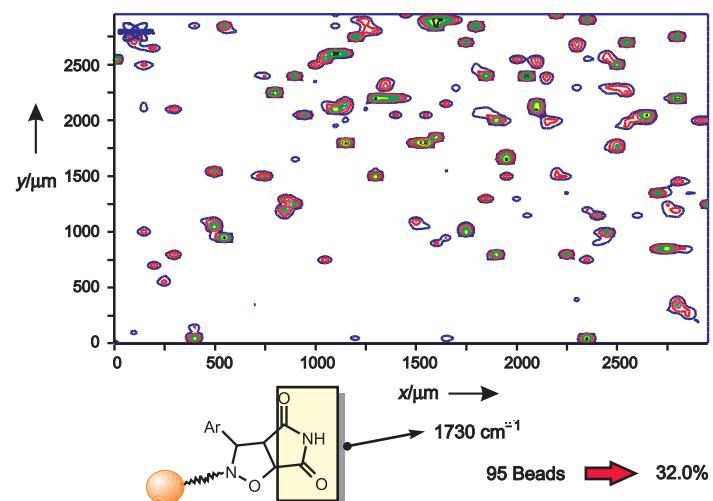


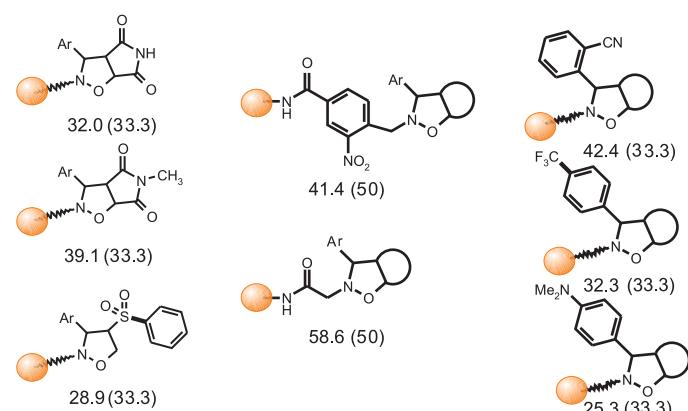
Abb. 4. Aus der Harzbibliothek extrahierte „Succinimid“-Harzbeads durch Visualisierung über die Carbonylabsorption bei 1730 cm^{-1} .

die Carboxamidomethylgruppe erkannt werden. Da aber alle weiteren funktionellen Gruppen eindeutig voneinander unterschieden werden können, ergibt sich die Zahl der diese Gruppe tragenden Harzbeads durch das Ausschlußprinzip. Wird diese Methode auf alle Harzbeads angewendet, so kann durch einfaches Auszählen der Harzkugeln durch Bildverarbeitungsprogramme die Verteilung aller funktionellen Gruppen bestimmt werden (Tabelle 1).

Trotz der relativ geringen Menge an Harzbeads im abgerasterten Bereich sind keine auffallenden Abweichungen von der erwarteten statistischen Verteilung der einzelnen funktionellen Gruppen zu beobachten. Die Carboxamidomethyl-, Cyan- und *N*-Methylimidgruppe sind zwar etwas überrepräsentiert, deren Anteile liegen allerdings in der gleichen Größenordnung. Neben einer LC-MS-Analyse ermöglicht die IR-Kartierung über eine statistische Auswertung somit eine rasche Qualitätskontrolle der nach der Split/Combine-Methode synthetisierten Bibliothek.

Der entscheidende Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, daß die IR-Analytik im Unterschied zur Massenspektrome-

Tabelle 1. Statistische Verteilung [%] (in Klammern sind die theoretischen Werte angegeben) von Harzbeads mit bestimmten funktionellen Gruppen.



trie zerstörungsfrei und ortsaufgelöst durchgeführt wird. Zusätzlich ist auch eine direkte Identifizierung harzgebundener Moleküle durch Superposition der IR-Karten möglich. Werden z. B. die Karten der Imid- (1730 cm^{-1}), Nitro- (1360 cm^{-1}) und Cyanabsorption (2225 cm^{-1}) übereinander gestapelt, so lassen sich die Harzbeads, die ausschließlich Verbindung **1** tragen, ortsaufgelöst über die überlappenden Bereiche (Sterne in Abb. 5) der funktionellen Gruppen identifizieren. Die aus den Karten extrahierten FT-IR-Spektren der einzelnen Harzkugeln belegen eindeutig die Beladung der Harzbeads mit **1** (Abb. 6).

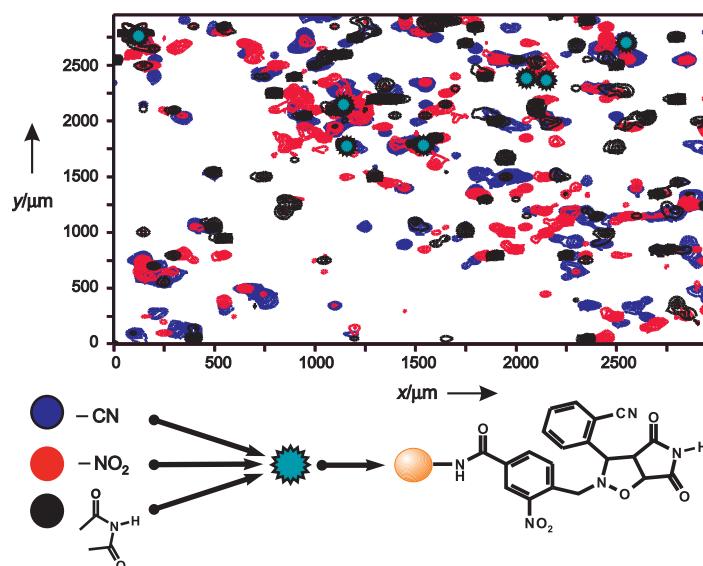


Abb. 5. „FT-IR-Tagging“ durch Superposition der IR-Karten von Imid- (1730 cm^{-1}) , Nitro- (1360 cm^{-1}) und Cyanabsorption (2225 cm^{-1}) . Harzbeads, auf denen **1** immobilisiert ist, werden durch überlappende Bereiche aller IR-Karten identifiziert.

Insgesamt wurde eine Methode entwickelt, die ortsaufgelöst und zerstörungsfrei eine Charakterisierung und Qualitätskontrolle von polymergebundenen Verbindungsbibliotheken ermöglicht. Zusätzlich können durch Superposition der verschiedenen IR-Karten an einzelne Harzkugeln immobilisiert werden.

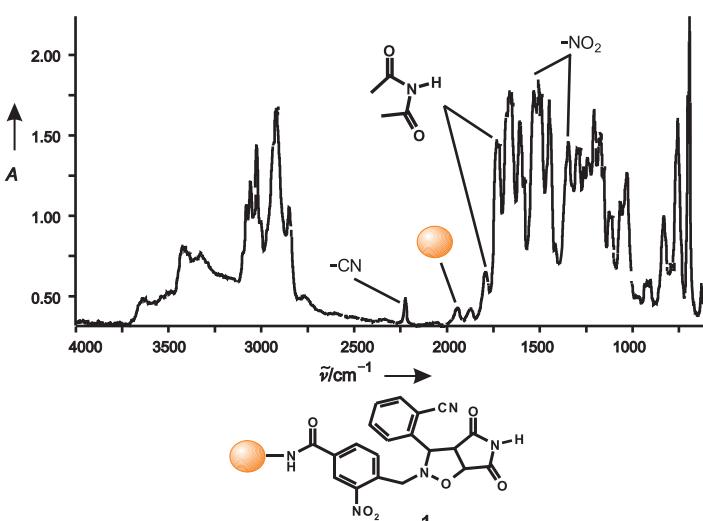


Abb. 6. FT-IR-Spektrum eines einzelnen Harzbeads mit darauf immobilisiertem **1**

sierte Verbindungen identifiziert werden. Durch verbesserte Einbettungstechniken lassen sich selbst größere Flächen mit mehr Harzbeads sehr schnell abrastern. Diese Methode kann somit einen wertvollen Beitrag zur Entwicklung miniaturisierter Synthesen an einzelnen Harzbeads leisten. Die IR-Kartierung in Kombination mit MS- und HPLC-MS-Analytik ermöglicht einen Verzicht auf Tagging-Konzepte; es könnten sogar technische Verfahren zur automatisierten Harzsortierung entwickelt werden.

Experimentelles

Die FT-IR-Kartierung wurde mit einem Bruker-IRScope-II-Gerät durchgeführt. Hierzu wurden die nach Schema 1 modifizierten Harzkugeln in einem KBr-Fenster unter leichtem Druck eingebettet. Eine Fläche von $3 \times 3 \text{ mm}^2$ wurde mit dem IR-Mikroskop abgerastert. Mit einer Schrittweite von $50 \mu\text{m}$ wurden sowohl in x - als auch in y -Richtung 60 Datenpunkte aufgenommen, sodaß insgesamt 3600 IR-Spektren für die IR-Kartierung registriert wurden. Bei einer Auflösung von 4 cm^{-1} und einer Summation von 4 Scans pro Datenpunkt betrug die Meßzeit 5 h.

Eingegangen am 13. Mai 1998 [Z11849]

Stichwörter: Festphasensynthesen • IR-Spektroskopie • Kombinatorische Chemie • Mikroskopie

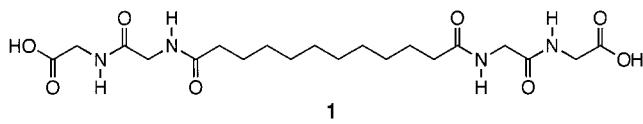
- [1] F. Balkenhohl, C. von dem Bussche-Hünnefeld, A. Lansky, C. Zechel, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2436–2488; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2289–2337.
 - [2] J. S. Früchtel, G. Jung, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 19–46; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 17–42.
 - [3] E. M. Gordon, M. A. Gallop, D. V. Patel, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 144–154.
 - [4] *Combinatorial Peptide and Non-peptide Libraries* (Hrsg.: G. Jung), VCH, Weinheim, **1996**.
 - [5] L. A. Thompson, J. A. Ellman, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 555–600.
 - [6] P. H. H. Hermkens, H. C. J. Ottenheijm, D. C. Rees, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 5643–5678.
 - [7] M. Pursch, G. Schlotterbeck, L.-H. Tseng, K. Albert, W. Rapp, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 3043–3036; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2867–2869.
 - [8] S. K. Sarkar, R. Garigipati, J. L. Adams, P. A. Keifer, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2305–2306.

- [9] a) B. Yan, G. Kumaravel, H. Anjaria, A. Wu, R. C. Petter, C. F. Jewell, Jr., J. R. Wareing, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5736–5738; b) B. Yan, J. B. Fell, G. Kumaravel, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7467–7472.
 - [10] B. Yan, G. Kumaravel, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 843.
 - [11] a) K. Russell, D. C. Cole, F. M. McLaren, D. E. Pivonka, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7941–7945; b) D. E. Pivonka, K. Russell, T. Giero, *Appl. Spectr.* **1996**, *50*, 1471.
 - [12] W. J. Haap, D. Kaiser, T. B. Walk, G. Jung, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3705–3724.
 - [13] A. Furka, F. Sebestyen, M. Asgedom, G. Dibo, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1991**, *37*, 487–493.

Molekulare Querschnitts-Abbildung supramolekularer Mikrotuben mit Kontakt-Kraft-Mikroskopie

Toshimi Shimizu,* Satomi Ohnishi und Masaki Kogiso

Raster-Mikroskopie-Techniken, insbesondere die Kraft-Mikroskopie (Atomic-Force-Mikroskopie, AFM), sind nützliche Methoden, um molekular aufgelöste Bilder von der Orientierung und der Ordnung in organischen Selbstaggregaten zu erhalten.^[1, 2] Insbesondere wurde die AFM dazu verwendet, zweidimensional angeordnete organische Moleküle zu untersuchen, die auf definierten Oberflächen adsorbiert sind oder an Phasengrenzen vorliegen.^[3] Während die Zahl der Berichte über die AFM-Abbildung biologischer Makromoleküle^[4-6] ständig steigt, sind die Morphologie und die molekulare Orientierung synthetisch hergestellter supramolekularer Aggregate nur in wenigen Arbeiten^[7-10] beschrieben. Über diese Aggregate konnten bisher durch AFM noch keine detaillierten Informationen mit molekulärer Auflösung, insbesondere entlang der molekularen Längsachsen dieser Aggregate erhalten werden. Inzwischen wurden supramolekulare selbstorganisierte Fasern und ihr molekularer Aufbau mit Raster- und Transmissions-Elektronenmikroskopie untersucht.^[11-13] Kürzlich analysierten wir chirale, über Wasserstoffbrückenbindungen selbstassoziierte Fasern^[14] sowie Mikrotuben,^[11, 15, 16] die aus synthetischen Zucker- und Peptid-Bolaamphiphilen bestehen.^[17] Im Hinblick auf die breite Anwendbarkeit der AFM untersuchten wir das vertikale Profil entlang der Moleküllängsachse in Mikrotuben, die aus dem Glycylglycin-Bolapeptid **1** aufgebaut waren.^[15]



[*] Dr. T. Shimizu, Dr. S. Ohnishi, M. Kogiso
National Institute of Materials and Chemical Research
1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8565 (Japan)
Fax: (+81) 298-54-4422
E-mail: tshmz@ccmail.nimr.go.jp

Hier berichten wir über die molekulär aufgelöste Abbildung einer Schichtstruktur innerhalb röhrenförmiger Membranen durch Kontakt-AFM an Luft.

Abbildung 1a zeigt eine nicht gefilterte AFM-Aufnahme ($19 \mu\text{m} \times 19 \mu\text{m}$) supramolekularer, aus **1** aufgebauter Mikrotuben mit Vesikeleinschlüssen. Wir beobachteten ein klares

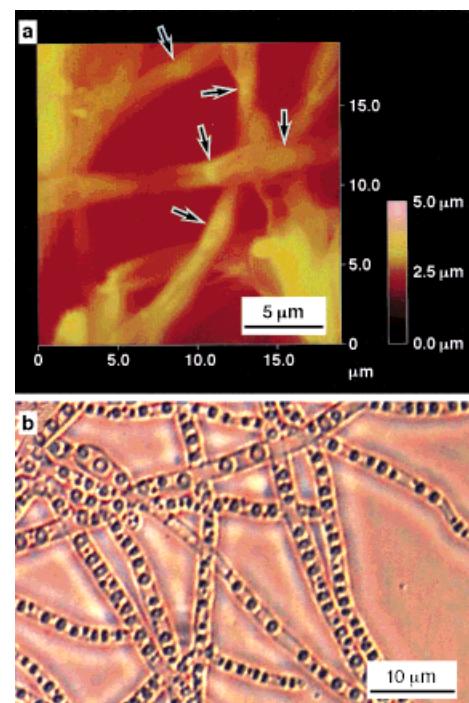


Abb. 1. a) AFM-Höhenaufnahme ($19 \mu\text{m} \times 19 \mu\text{m}$) von aus **1** aufgebauten Mikrotuben mit Vesikel einschlüssen (durch Pfeile gekennzeichnet) und b) Phasenkontrast-lichtmikroskopische Aufnahme der Mikrotuben (bei 25°C in Wasser).

Bild, ähnlich dem, das man mit Phasenkontrast- oder Dunkelfeld-Lichtmikroskopie erhält (Abb. 1b). Kugelförmige, hellere Bereiche (in Abb. 1a durch Pfeile gekennzeichnet) entsprechen topographisch höher liegenden Regionen und weisen auf den Einschluß von Vesikelaggregaten in diesem Kompartiment hin.^[15] Eine Querschnittsanalyse der Bereiche ohne und mit Vesikeleinschlüssen gab Aufschluß über die Dicke der röhrenförmigen Membranen, die mit <100 nm weniger als 30–40 Molekülschichten entspricht.^[10] Weiterhin weist eine hochauflöste AFM-Aufnahme der Röhrenoberflächen auf eine unregelmäßige hexagonale Anordnung der Peptidkopfgruppen hin.^[10] Diese Befunde zeigen, daß die AFM ein sehr nützliches Instrument zum Studium der molekularen Packung und der morphologischen Abmessungen supramolekularer Aggregate ist.

Abbildung 2 zeigt die Oberflächenmorphologie eines einzelnen Tubus. Die AFM-Aufnahme ($1.45 \mu\text{m} \times 1.45 \mu\text{m}$) lässt einen Riß in der Röhrenmembran erkennen. Man erkennt einige Bereiche, die sich wie Fischschuppen am oberen Rand der Röhre anordnen, sowie im Bereich des Risses stäbchenförmige Domänen, die parallel zusammengelagert sind. Die Oberflächen scheinen keine homogene kristalline Ordnung im Mikrometerbereich aufzuweisen. Die Durchmesser der Domänen am oberen Ende der Röhre betragen $20 - 100 \text{ nm}$;