

Synthesekontrolle in der kombinatorischen Chemie durch Suspensions-¹H-MAS-NMR-Untersuchungen an einzelnen Harzpartikeln

Matthias Pursch, Götz Schlotterbeck, Li-Hong Tseng,
Klaus Albert* und Wolfgang Rapp

Professor Ernst Bayer zum 70. Geburtstag gewidmet

Die Festphasen-Peptidsynthese hat sich seit ihrer Einführung durch R. B. Merrifield^[1] auf vielen Gebieten der Organischen Chemie einen festen Platz erobert und wurde fortlaufend weiterentwickelt. In jüngster Zeit erlebt die Organische Chemie an der festen Phase ein stürmisches Wachstum und wird auf breiter Basis in neuen Bereichen angewendet^[2]. Durch kombinatorische Methoden werden hunderte bis mehrere tausend Verbindungen parallel und meist automatisch an der polymeren Phase aufgebaut. Diese Methoden werden derzeit verstärkt als Werkzeug zum Auffinden neuer Leitstrukturen in der Wirkstoffforschung und -entwicklung eingesetzt^[3, 4]. Wegen der hohen Durchsatzraten bei Assays (high throughput assays) können heute hunderte von Verbindungen pro Tag getestet werden. Durch weitere Verbesserung der Testmethoden wird ein wesentlich höherer Probendurchsatz angestrebt. Gleichzeitig muß auch in der Synthese der Durchsatz erhöht werden: Dies ist nur durch weitere Optimierung und Miniaturisierung unter kombinatorischen Aspekten möglich.

Wir haben ein System entwickelt, das sowohl die Suche nach neuen Wirkstoffen als auch die Optimierung der chemischen Reaktionen an der festen Phase (in miniaturisierter Form im nanomolaren Bereich) ermöglicht^[5–7]. Bei der Festphasensynthese dient der polymere Träger (das Harz) als Gesamtreaktionsraum. Dieser Reaktionsraum lässt sich in diskrete, kleinste Räume unterteilen. Jede einzelne Trägerpartikel repräsentiert somit einen Mikroreaktionsraum.

Die heute gebräuchlichen Synthesearze weisen Partikelgrößen von 40 bis 130 µm auf. Die Beladung der einzelnen Partikel mit reaktiven Gruppen liegt im Bereich von 10 bis 300 pmol pro Harzkugel. Häufig ist diese Beladung für eine sequentielle Abspaltung und eine anschließende Produktidentifizierung zu gering. Wir haben daher auf der Basis von Tentakel-Polymeren^[8] Harzpartikel mit 400 bis 750 µm Durchmesser entwickelt. Hierbei handelt es sich um Polystyrol-Polyoxyethylen-Pfropfco-polymeren, deren Kapazität (in Abhängigkeit von der Partikelgröße) im Bereich von 10 bis 65 nmol pro Harzkugel liegt. Wegen dieser bis zu tausendfach höheren Kapazität können Reaktionen an einzelnen Kugeln durchgeführt, die trägergebundenen Zwischenprodukte untersucht sowie die fortschreitenden Reaktionen verfolgt werden. Die Harzkugeln können somit als Mikroreaktoren betrachtet werden. Ein wesentlicher Vorteil der Verringerung des Reaktionsraumes auf eine Kugel ist, daß mit sehr geringen Mengen an Lösungsmitteln gearbeitet werden kann. Mit einem Millimol Synthesebaustein lassen sich unter den beschriebenen Bedingungen 200 bis 500 Reaktionen durchführen. Da in der kombinatorischen Chemie hunderte von Reaktionen parallel durchgeführt werden, lassen sich so die vorhandenen Ressourcen bedeutend effektiver nutzen.

[*] Priv.-Doz. Dr. K. Albert, Dipl.-Chem. M. Pursch,
Dipl.-Chem. G. Schlotterbeck, L.-H. Tseng

Institut für Organische Chemie der Universität
Auf der Morgenstelle 18, D-72076 Tübingen
Telefax: Int. + 7071/295246

E-mail: klaus.albert@uni-tuebingen.de

Dr. W. Rapp, Rapp Polymere GmbH
Ernst-Simon-Straße 9, D-72072 Tübingen

Die schnelle und genaue Charakterisierung von trägerfixierten Synthesebausteinen ist eine Herausforderung für die Analytik. Als wichtige Untersuchungsmethoden zur Strukturaufklärung bieten sich vor allem die FT-IR-/Raman-Spektroskopie, die Matrix-assisted-laser-desorption-ionization-time-of-flight-(MALDI-TOF)-Massenspektrometrie sowie die ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie in Suspension (Gelphasen-NMR-Spektroskopie) an. Wegen großer Linienbreiten in den ¹H-NMR-Spektren (mindestens 50 bis 100 Hz) ist eine exakte Strukturanalyse nicht möglich; ¹³C-NMR-Spektren in Suspension weisen durch verminderte dipolare Kopplungen und wegen der größeren chemischen Verschiebungsdispersion geringe Linienbreiten auf^[9–11], allerdings werden wegen der geringeren Empfindlichkeit des ¹³C-Kerns wesentlich längere Meßzeiten für ein Spektrum benötigt.

Mit der vor kurzem eingeführten ¹H-Magic-Angle-Spinning(MAS)-NMR-Spektroskopie von Synthesearzen in Suspension konnten sehr gute Auflösungen der Signale erzielt werden^[12–17]. Durch schnelle Probenrotation im Magischen Winkel (MAS) werden Suszeptibilitätsunterschiede in der Probe sowie dipolare Kopplungen eliminiert, während skalare Kopplungen erhalten bleiben. Dadurch lässt sich eine Auflösung erzielen, die der Lösungs-NMR-Spektroskopie sehr nahe kommt.

An einem derart miniaturisierten, auf eine einzelne Harzkugel reduzierten Reaktionsraum wurden mit kombinatorischen Methoden Hydantoine parallel synthetisiert und die Verbindungen jeder Synthesestufe durch hochaufgelöste ¹H-MAS-NMR-Spektroskopie charakterisiert. Eine im Lösungsmittel ($[D_6]$ -DMSO, $CDCl_3$) gequollene Harzkugel wurde in einem Insert fixiert und in einem handelsüblichen 4-mm-Festkörper-NMR-Rotor plaziert (Abb. 1). Das Detektionsvolumen lag je nach Größe der Kugel im oberen Nanoliterbereich (200 bis 400 nL). Für die Suspensions-MAS-NMR-Messungen wurde ein konventioneller CP/MAS-NMR-Probenkopf verwendet.

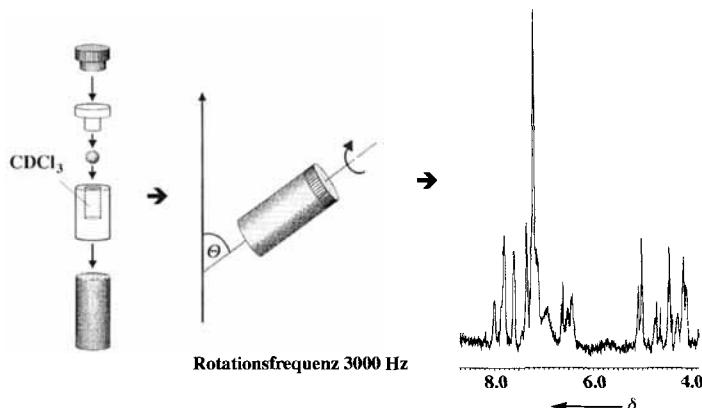


Abb. 1. Schematischer Aufbau zur Aufnahme hochaufgelöster ¹H-Suspensions-MAS-NMR-Spektren von einzelnen Harzpartikeln. Das ¹H-NMR-Spektrum (rechts) ist ein Ausschnitt von Abbildung 2c.

Die hochaufgelösten ¹H-MAS-NMR-Spektren der Reaktionssequenz sind in Abbildung 2 dargestellt. Die Aufnahmezeit für ein solches Spektrum mit 128 bis 160 Transienten beläuft sich auf 6 bis 8 min. Durch den Polyoxyethylen-Spacer der Tentakel-Polymeren ist eine hohe Mobilität der trägerfixierten Synthesebausteine vorgegeben; daher liegt die Halbwertsbreite der ¹H-NMR-Signale zwischen 5 und 8 Hz. Die einzelnen Syntheseschritte können damit direkt an einer einzelnen Harzpartikel des polymeren Trägers verfolgt werden. Mit jedem weiteren Synthe-

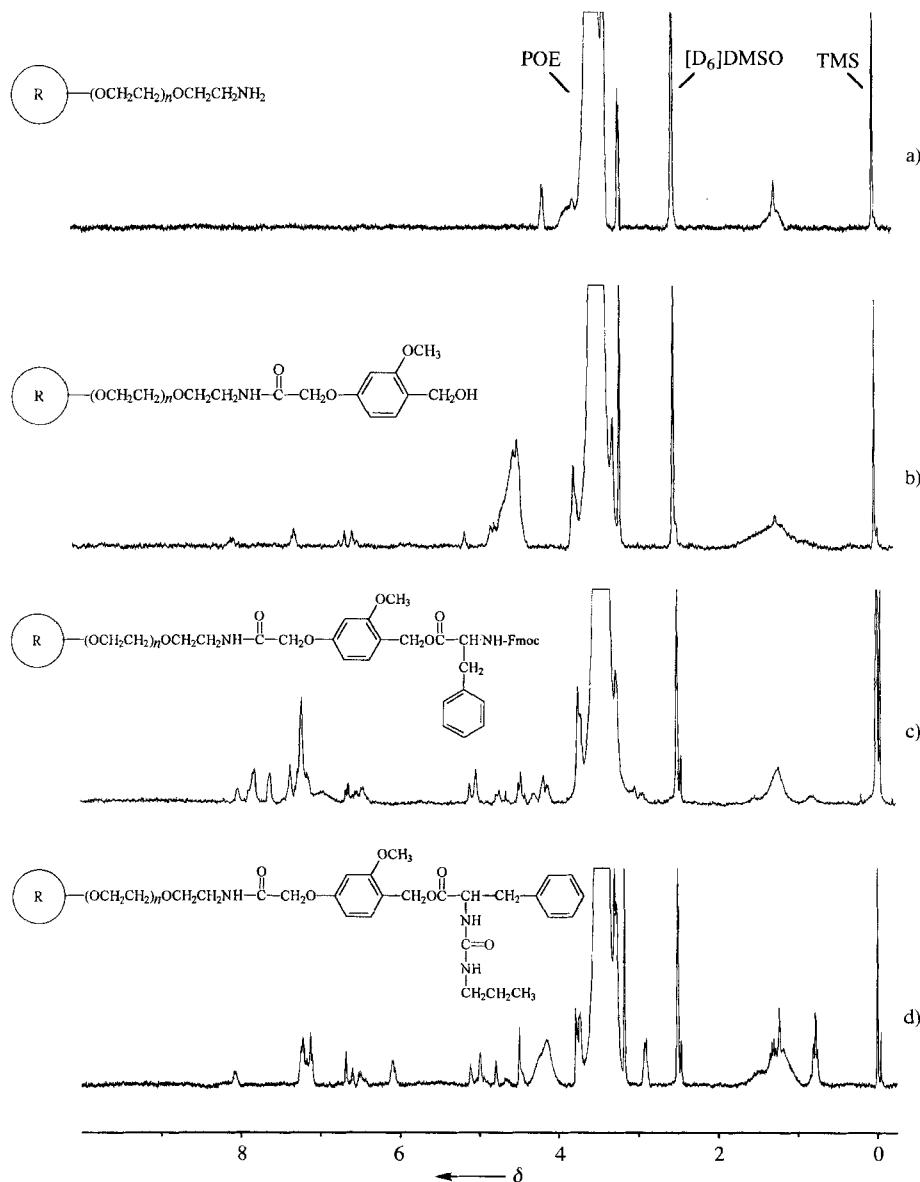
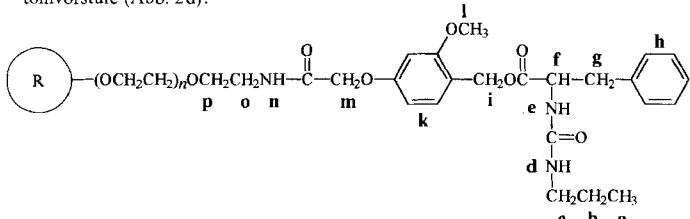


Abb. 2. Suspensions-¹H-MAS-NMR-Spektren von einzelnen Harzpartikeln der Hydantoin-Reaktionssequenz: Spektren von trägerfixiertem Polyoxyethylen(POE)-Spacer (a), mit säurelabilem Linker (b), nach Umsetzung mit Phenylalanin-Fmoc (c), nach Abspaltung der Fmoc-Gruppe und Umsetzung mit Isocyanat (d).

Tabelle 1. Signalzuordnung anhand des ¹H-MAS-NMR-Spektrums einer Hydantoinvorstufe (Abb. 2d).



Position	funktionelle Gruppe	δ	Position	funktionelle Gruppe	δ
a	CH ₃	0.75	i	CH ₂ O	5.1
b	CH ₂	1.2	k	H _{ar}	6.5, 6.6, 7.2
c	CH ₂	2.9	l	OCH ₃	3.75
d	CO-NH	6.0	m	CH ₂ O	4.8
e	NH-CO	6.1	n	CO-NH	8.05
f	OCO-CH	3.5	o	CH ₂ -NH	3.15
g	CH ₂	3.5	p	OCH ₂ CH ₂	3.3
h	H _{ar}	7.1			

schritt sind neben dem Hauptsignal der OCH₂CH₂-Einheiten ($\delta = 3.5$) die charakteristischen Signale der Verbindung der jeweiligen Synthesestufe detektierbar, so daß eine genaue Strukturzuordnung ermöglicht wird (Abb. 2). Ein säurelabiler Linker am Träger (Abb. 2a) führt im ¹H-MAS-NMR-Spektrum zu zusätzlichen Signalen im Arenbereich ($\delta = 6$ bis 7.5). Außerdem liegen Signale für die CH₂O- und die Methoxygruppe vor ($\delta = 4.8$ bzw. 3.75; Abb. 2b). Im nachfolgenden Reaktionsschritt wurde Phenylalanin-9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (Fmoc) mit dem trägerfixierten Linker verknüpft. Deutlich sind die Protonensignale der Schutzgruppe im aromatischen Bereich erkennbar (Abb. 2c). Anschließend wurde die Fmoc-Schutzgruppe abgespalten und das so aktivierte Harz mit *n*-Propylisocyanat umgesetzt. Dies ist nachweisbar durch die Intensitätsabnahme der Signale im Aromatenbereich und die zusätzlichen Signale im Alkylbereich (Abb. 2d). Besonders bemerkenswert ist die gute Auflösung der Signale; man erkennt im Spektrum dieser Verbindung, einer Hydantoinvorstufe, die durch skalare Kopplungen aufgespaltene Signale der terminalen *n*-Propylgruppe (Tabelle 1). Anhand der NMR-Spektren der Sequenz ist eine Reaktionskontrolle an nur einer Harzpartikel in kurzer Zeit (etwa 6 min pro Spektrum) möglich. Somit sind relativ zeitaufwendige Abspaltungs- und Isolierungsschritte nicht notwendig.

Der Polystyrolträger des Propfcopolymers ist in [D₆]DMSO (anders als in CDCl₃) nur mäßig quellfähig. Aus den kurzen T_2^* -Relaxationszeiten re-

sultieren extrem breite NMR-Signale; daher sind in den ¹H-MAS-NMR-Spektren (Abb. 2) keine Polystyrolprotonensignale zu erkennen. Der Einfluß unterschiedlicher Lösungsmittel auf die Linienbreiten in den ¹H-MAS-NMR-Spektren von Syntheseharzen wurde vor kurzem ausführlich diskutiert^[15, 16].

Neben der ¹H-MAS-NMR-Spektroskopie zur direkten Synthesekontrolle am polymeren Träger sind zweidimensionale (2D-) NMR-Techniken für die Strukturanalyse von großer Wichtigkeit. In Abbildung 3 ist als Beispiel ein 2D-Suspensions-MAS-NMR-Spektrum (¹H,¹H-COSY) dargestellt, das in einer Meßzeit von nur 40 min aufgenommen wurde. Anhand der Kreuzpeaks lassen sich die Signale der *n*-Propylgruppe identifizieren. Mit der *n*-Propylgruppe als Synthesemarker könnte so eine spektroskopische Charakterisierung Aufschluß über den Erfolg der Synthese geben.

Die ¹H-MAS-NMR-Spektroskopie im Nanoliterdetektionsbereich ist damit bei Verwendung nur eines Mikroreaktionsraums ein schnelles und effizientes Verfahren zur Synthesekontrolle in der kombinatorischen Chemie.

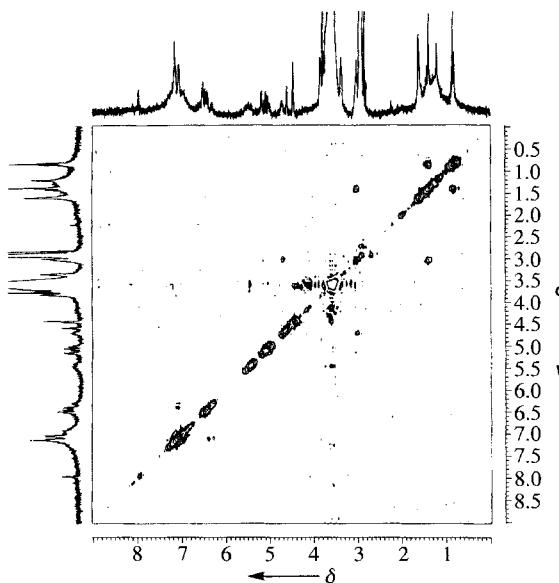


Abb. 3. 2D-Suspensions-MAS-NMR-Spektrum (COSY45) von einer Hydantoinvorstufe.

Experimentelles

Die Harzkugeln waren mit unterschiedlichen Fmoc-geschützten Aminosäuren beladen, die über die säurelabile 3-Methoxy-4-hydroxymethylphenoxyessigsäure als Ankergruppe mit dem Harz verknüpft waren. Die Umsetzungen wurden in Glaskapillaren durchgeführt (Länge: 100 mm, Durchmesser: 2.6 mm), die oben offen und unten mit einer Glasfilterfritte ausgestattet waren. Bis zu vier der mit Aminosäure beladenen Kugeln wurden in die Glaskapillaren gegeben. Die Quantifizierung der Beladung erfolgte UV-spektroskopisch nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit Piperidin. Nach sorgfältigem Auswaschen der Schutzgruppe wurde mit je 25 µL einer 1 M Isocyanaatlösung umgesetzt. Dies entspricht einem hundert- bis tausendfachen Überschuß an Reagens. Nach 3 h Reaktionszeit wurden die Harzkugeln gewaschen, um das überschüssige Isocyanat zu entfernen.

NMR-Parameter: Bruker-ASX-300-Spektrometer, 4-mm-CP/MAS-Probenkopf, Rotationsfrequenz 3000 Hz, 128 bis 160 Transienten pro FID, Pulswinkel 60°, Wartezeit 1.5 s, Zeitdomäne 16 K (1 K = 1024) Datenpunkte (TD) mit Spektralbreite (SW) 3800 Hz, Akquisitionszeit 1.1 s.

COSY45: 16 Transienten pro FID, Zeitdomäne 2 K Datenpunkte (TD2) mit Spektralweite (SW2) 4300 Hz, 128 Inkremente (TD1), Akquisitionszeit 127 ms; Zerofilling in t_1 auf 1 K Datenpunkte, Multiplikation mit einer Sinus-Apodisierungsfunktion in F1- und F2-Richtung.

Für die Aufnahme der 1D-Messungen (in $[D_6]DMSO$) wurde der Deuteriumlock des Lockkanals verwendet. Das Locksignal wurde über die Heterokernspule des CP/MAS-Probenkopfes detektiert. Das COSY45-Spektrum wurde in $CDCl_3$ aufgenommen, wegen des geringen Lösungsmittelvolumens war die Intensität des Locksignals zu gering.

Eingegangen am 29. Mai 1996 [Z9163]

Stichworte: Festphasensynthesen · Kombinatorische Chemie · NMR-Spektroskopie

- [1] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149.
- [2] J. S. Früchtel, G. Jung, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 19; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 17.
- [3] M. C. Desai, R. N. Zuckermann, W. H. Moos, *Drug Dev. Res.* **1994**, *33*, 174.
- [4] M. A. Gallop, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Foder, E. M. Gordon, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1233.
- [5] W. Rapp, K. H. Wiesmüller, B. Fleckenstein, V. Gnau, G. Jung in *Peptides 1994* (Hrsg.: H. L. S. Maia), Escom, Leiden, **1995**, S. 87.
- [6] W. Rapp in *Peptides, Chemistry, Structure and Biology, Proceedings of the 13th American Peptide Symposium* (Hrsg.: T. P. Kaumaya, R. S. Hodges), Escom, Leiden, **1995**, S. 313.
- [7] W. Rapp in *Innovations and Perspectives in Solid-Phase Synthesis and Related Technologies, Collected Papers, 4th International Symposium* (Hrsg.: R. Epton), Mayflower, Edinburgh, **1995**, im Druck.
- [8] Tentakel-Polymer sind unter dem Namen TentaGel von der Firma Rapp Polymer GmbH erhältlich.
- [9] W. Schoknecht, K. Albert, G. Jung, E. Bayer, *Liebigs Ann. Chem.* **1982**, 1514.

- [10] K. Albert, B. Evers, E. Bayer, *J. Magn. Reson.* **1985**, *62*, 428.
- [11] E. Bayer, K. Albert, H. Willisch, W. Rapp, B. Hemmasi, *Macromolecules* **1990**, *23*, 1937.
- [12] W. L. Fitch, G. Detre, C. P. Holmes, J. N. Shoolery, P. A. Keifer, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7955.
- [13] R. C. Anderson, M. A. Jarema, M. J. Shapiro, J. P. Stokes, M. Ziliox, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2650.
- [14] R. C. Anderson, J. P. Stokes, M. Shapiro, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5311.
- [15] P. A. Keifer, L. Baltusis, D. M. Rice, A. A. Tymak, J. N. Shoolery, *J. Magn. Reson.* **1996**, *119*, 65.
- [16] P. A. Keifer, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1558.
- [17] S. K. Sarkar, R. S. Garigipati, J. L. Adams, P. A. Keifer, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2305.

Die experimentelle Bestimmung der Ionisationsenergien von Berkelium und Californium**

Stefan Köhler, Nicole Erdmann, Martin Nunnemann, Günter Herrmann, Gerhard Huber, Jens Volker Kratz, Gerd Passler und Norbert Trautmann*

Die Ionisationsenergie neutraler Atome ist als fundamentale Größe der Elemente für viele physikalische und chemische Prozesse von großer Bedeutung. Ihre präzise Bestimmung ermöglicht es, systematische Trends in den Energien, mit denen die Elektronen gebunden sind, zu erkennen und daraus auf den elektronischen Aufbau der Atome zu schließen, da die Ionisationsenergie direkt mit dem atomaren Spektrum verknüpft ist: Die Energieniveaus können entweder als (negative) Bindungsenergien angegeben werden, wobei die Ionisationsgrenze den energetischen Nullpunkt darstellt, oder als (positive) Anregungsenergien. In diesem Fall erreicht die Energie der Niveaus E_n für $n \rightarrow \infty$ die Ionisationsenergie.

Zuverlässige Angaben über die Elektronenstruktur der schwersten Elemente sind die Voraussetzung dafür, daß Aussagen darüber gemacht werden können, ob die Systematik des Periodensystems bis zu diesen Elementen erhalten bleibt, oder ob sie mehr oder weniger stark durchbrochen wird^[1]. Die Ionisationsenergie ist eine Größe, die empfindlich auf relativistische Effekte anspricht, wie sie bei den schwersten Elementen als Folge des relativistischen Massenzuwachses der inneren Elektronen zu erwarten sind^[2]. Die genaue Bestimmung der Ionisationsenergie dieser Elemente ermöglicht es deshalb auch, die Aussagekraft relativistischer Multikonfigurations-Dirac-Fock-Rechnungen^[3] zu beurteilen. Weiterhin ist die Ionisationsenergie eine wichtige Größe im Born-Haber-Cyclus^[4].

Die präzisesten Bestimmungen der Ionisationsenergien wurden laserspektroskopisch durchgeführt. So konnten die Ionisationsenergien der Lanthanoide sowie von Uran und den leichten Transuranen Neptunium und Plutonium aus der Konvergenz langer Serien hochangeregter Rydberg-Zustände abgeleitet werden^[5–8]. Um eine korrekte Interpretation der häufig durch

[*] Dr. N. Trautmann, Dr. S. Köhler, Dipl.-Phys. N. Erdmann, Prof. Dr. G. Herrmann, Prof. Dr. J. V. Kratz
Institut für Kernchemie der Universität
Fritz-Straßmann-Weg 2, D-55128 Mainz
Telefax: Int. + 6131/394-488
Dipl.-Phys. M. Nunnemann, Prof. Dr. G. Huber, Dr. G. Passler
Institut für Physik der Universität Mainz

[**] Diese Arbeit wurde vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, vom Bundesamt für Strahlenschutz, vom Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie, von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom United States Department of Energy unterstützt.