

POTENTIALSENSITIVE FLUORESZENZFARBSTOFFE

MIT

BICHROMOPHORER STRUKTUR

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ulfert Meyer-Beeck

aus Braunschweig

Düsseldorf 2000

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Berichterstatter Prof. Dr. H.-D. Martin
2. Berichterstatter Prof. Dr. C. Kryschi

Tag der mündlichen Prüfung: 26.6.2000

Inhalt

Inhalt	i
1. Einleitung und Literaturübersicht	1
1.1. Farbstoffe in der Natur	1
1.2. Funktionelle Farbstoffe	2
1.3. Biomembranen	4
1.4. Funktionelle Fluoreszenzfarbstoffe zur Messung von Membranpotentialen	5
1.4.1. Cyanine und andere slow-response-Potentialsonden	6
1.4.2. Fast-response-Sonden: Styrylfarbstoffe	7
1.4.3. Reaktivfarbstoffe	15
1.5. Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)	15
2. Problemstellung	17
2.1. Reaktivgruppen	18
2.1.1. Reaktivgruppen im engeren Sinne	18
2.1.2. Aktivierungreagenzien	18
2.2. Chromophore	19
2.3. Bichromophore	20
2.4. Charakterisierung	21
3. Hauptteil	22
3.1. Syntheseplanung	22
3.2. Darstellung von Chromophoren	24
3.2.1. Styrylpyridine und Styrylpridinium-Farbstoffe	24

3.2.2. 4-(6-N,N-Dialkylaminonaphth-2-ylvinyl-)pyridine <u>5a-f</u>	25
3.2.3. 4-(4-(p-N,N-Dialkylaminophenyl-)butadien-1-yl-)pyridine <u>9</u>	26
3.2.4. Cyaninfarbstoffe	30
3.2.5. Sonstige Chromophore	31
3.3. Funktionelle Gruppen	33
3.3.1. Farbstoffe mit Carbonsäuregruppen	34
3.3.1.1. Styrylpyridinium	34
3.3.1.2. Cyanine	35
3.3.2. Farbstoffe mit Aminogruppen	38
3.3.3. Reaktivgruppen	39
3.3.3.1. Zur Funktion der NHS-Ester-Reaktivgruppe	39
3.3.3.2. Darstellung aus aliphatischen ω -Bromcarbonsäuren	41
3.3.3.3. Darstellung der NHS-Estergruppe in Farbstoffen mit Carbonsäure-Gruppe	45
3.3.4. Aktivierungsreagenzien zur Darstellung von Amidien aus Carbonsäuren	46
3.3.4.1. Das Reagenz 11	46
3.3.4.2. Anilino-chlor-phenoxyphosphinoxid	48
3.4. Bichromophore	49
3.4.1. Intermolekularer FRET (Tsien-Gonzalez)	49
3.4.2. Darstellung der Bichromophoren Systeme	51
3.4.3. Charakterisierung der Bichromophore <u>39a-d</u>	54
3.4.3.1. $^1\text{H-NMR}_{300}$	54
Abb. 10: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CD}_3\text{CN/TMS})$ von <u>39c</u>	57
3.4.3.2. FAB-Massenspektrometrie	58
3.4.3.3. UV-VIS-Spektroskopie	60

3.5. Untersuchungen zur Fluoreszenz	62
3.5.1. Fluoreszenzspektren in Ethanol	62
3.5.2. Fluoreszenzquantenausbeuten in Chloroform	63
3.6. Potentialsensitivität	66
3.6.1. Aufbau von Membranen	66
3.6.1.1. Lipide	66
3.6.1.2. Sterole	68
3.6.1.3. Oligopeptide und Proteine	68
3.6.2. Membranpotentiale	70
3.6.3. Potentialsensitivität der Cyanine	72
3.6.4. Messung an <u>39a-d</u>	75
3.6.5. Quantitative Auswertung:	81
3.6.5.1. Auf der Basis der Intensitäten	81
3.6.5.2. Auf der Basis der integralen Fluoreszenz	82
4. Zusammenfassung	85
4.1. Synthetische Ergebnisse	85
4.1.1. Chromophore	85
4.1.2. Funktionelle Gruppen	86
4.1.3. Verknüpfung zu Bichromophoren	87
4.2. Meßergebnisse	89
4.2.1. FRET in Lösung	89
4.2.2. Potentialabhängigkeit auf Zellmembranen	89
4.2.3. Verwendung der Reaktivfarbstoffe als Fluoreszenz-Marker	90
5. Experimenteller Teil	91

5.1. Allgemeines	91
5.2. Beschreibung der Versuche	93
Literatur	170

1. Einleitung und Literaturübersicht

1.1. Farbstoffe in der Natur

Schon früh in seiner Kulturgeschichte hat es der Mensch verstanden, sich natürlicher Farbstoffe und Pigmente zu bedienen, um sein Umfeld farbiger zu gestalten¹. Er imitierte damit die Farbigkeit der Natur, die vielen Tieren, Pflanzen und Mineralien eine verschwenderische Farbenpracht verliehen hat, nur eben nicht ihm, der eine eher 'farblose' Erscheinung ist. Erst spät, nämlich mit Perkins Synthese des Mauveins im Jahre 1856, begann er, auch synthetische Farbstoffe herzustellen. Dabei standen stets ästhetische Gesichtspunkte im Vordergrund, während die Natur stets demonstriert hat, wie Farbstoffe und Pigmente auch als Funktionsträger eingesetzt werden können.

So ist die Rolle des Chlorophylls als zentrale Funktionseinheit bei der Photosynthese, die der Carotinoide als Antioxidantien (übrigens auch beim Menschen, wie vermutet wird), die der Blütenfarbstoffe als Signalfarben für Insekten u. v. m. seit langem allgemein bekannt.

Wenn den Farben im Pflanzenreich i. allg. eine Funktion zukommt, so gilt das auch im Tierreich. Bekannte Beispiele sind hier Hämoglobin, das Sehpigment Rhodopsin, Tarnfarben u. a.

Ein Beispiel mag das veranschaulichen: zwar ist schon seit langem bekannt, welches Carotinoid für die rosa Farbe der Flamingofedern verantwortlich ist. Aber erst in neuester Zeit haben Experimente gezeigt, wozu diese Farbe dient: Der Flamingo bezieht den Farbstoff aus seiner Nahrung; wird in einem Experiment dem Flamingo zwar ausreichend Nahrung zur Verfügung gestellt, der Farbstoff jedoch vorenthalten, so bleibt er weiß, ohne daß seine Konstitution sonst Schaden nimmt. Ein weißer Flamingo wird aber von seinen Artgenossen abgelehnt, so daß jeder Fortpflanzungserfolg ausbleibt. Die rosa Farbe des Gefieders signalisiert also Artgenossen gegenüber die Tauglichkeit seines Trägers zum Ernährer der Jungen.

Imitierte der Mensch also die *Farbigkeit* der Natur, so beachtete er dabei nur die *ästhetische* Komponente. Da aber die Natur im allgemeinen nichts verschwendet, muß davon ausgegangen werden, daß alle Farben in der belebten Natur eine *Funktion* haben, auch wenn diese oft nicht erkannt wird. Die Funktion der meisten Farben in der Tierwelt dürfte sich in der Regel ähnlich erklären lassen wie die der Flamingos. Es handelt sich also meist nicht um *ästhetische*, sondern um *funktionelle* Farbgebung.

Seit wenigen Jahrzehnten ist nun auch der Mensch dazu übergegangen, sich das *funktionelle* Potential der Farbstoffe zunutze zu machen. Eine dieser Anwendungen ist Gegenstand dieser Arbeit.

1.2. Funktionelle Farbstoffe

Der Begriff *funktionaler Farbstoff* soll hier noch enger gefaßt werden, als dies in der Fachliteratur üblich ist: er umfaßt dort einerseits solche farbigen Verbindungen, deren Funktion immer noch auf ihrer Farbigkeit beruht, also z. B. Laserfarbstoffe, Signalfarben, optische Aufheller usw. Auch die Tarnfarben in der Natur kann man hier einordnen. Andererseits gibt es solche farbigen Verbindungen, deren *Farbigkeit* eigentlich keine Rolle mehr spielt. Sie ist vielmehr eine notwendige Folge aus ihrer Lichtabsorption im sichtbaren Bereich des Spektrums, also bei Wellenlängen zwischen ca. 400 und 700 nm (auch Farbstoffe mit Absorptionen bei größeren Wellenlängen, also im nahen Infrarot, werden gelegentlich als Farbstoffe bezeichnet, auch wenn ihre Farbe für das menschliche Auge gar nicht sichtbar ist. Man spricht dann von NIR-Farbstoffen). Diese Absorption dient aber ganz anderen Zwecken als dem, Farbe hervorzubringen: es handelt sich vielmehr um eine Art *molekularer Geräte* (*molecular devices*).

Das Beispiel Chlorophyll ist ein solches molekulares Gerät, dessen optischer Farbeindruck ohne Bedeutung ist. seine Absorption von sichtbarem Licht bei ca. 430 und 680 nm (Chlorophyll a) bzw. bei ca. 450 und 650 nm (Chlorophyll b), d. h. im roten und im blauen (cyanfarbenen) Bereich, liefert die Energie, die zum (endothermen) Aufbau von Kohlenhydraten aus CO₂ und Wasser notwendig ist.

Wäre die erforderliche Energie höher (entsprechend einer Absorption bei kleineren Wellenlängen) so hätten die Blätter der Bäume und Pflanzen eben eine andere Farbe, z. B. violett oder gelb bzw. wären bei einer Absorption im nahen UV-Bereich sogar farblos.

Synthetische Vertreter aus dieser Klasse funktioneller Farbstoffe werden im Hinblick auf die Konversion von Sonnenlicht in chemische Energie nach dem Vorbild der Natur erforscht²: wie dort, so soll auch in der Technik Wasser in molekularen Wasserstoff und Sauerstoff gespalten werden. Wasserstoff könnte dann als Energiequelle zur Erzeugung von Wärme und Elektrizität dienen. Wenn die Entwicklung solcher künstlichen Systeme auch noch weit von einer technischen Einsetzbarkeit entfernt ist, so „kann doch nicht bezweifelt werden, daß das Problem der Wasserphotolyse gelöst werden wird, da die Natur es in der Photosynthese ebenfalls gelöst hat. Die abiotische Variante läßt sogar höhere Wirkungsgrade erwarten, da die biologischen Systeme nicht auf Energiespeicherung optimiert sind³.“

Wenn die Farbe des Chlorophylls immerhin noch mit seiner photochemischen Funktion verknüpft ist, so hat beispielsweise die Farbe des Hämoglobins mit dessen Funktion wahrscheinlich gar nichts mehr zu tun. Hier kann man schon von einer bloßen Zufälligkeit der Farbe eines funktionellen Farbstoffs sprechen.

Offensichtlich wird aber die Entwicklung synthetischer funktioneller Farbstoffe die Farbe nicht rein zufällig hervorbringen, denn welche molekularen Strukturmerkmale die Farbigkeit herbeiführen, ist wohlbekannt. Aufgrund einfacher, empirischer Farbgelgesetze läßt sich sogar die Lage der Lichtabsorption für einen Farbstoff recht genau vorhersagen, der noch gar nicht existiert. Unter dem Begriff „funktioneller Farbstoff“ soll hier also eine farbige Verbindung verstanden werden, deren Farbe direkt mit ihrer photochemischen bzw. photophysikalischen Funktion verknüpft ist, wie dies beim Chlorophyll der Fall ist.

1.3. Biomembranen

In der Natur fungieren Biomembranen als Trennwände, die biochemische Prozesse in Kompartimente einschließen⁴. Sie bilden einen wesentlichen Bestandteil der alle Zellen umgebenden Hüllen und schließen, bei den Eukaryonten, auch innerhalb des Cytosols einzelne Funktionseinheiten ein, z. B. den Zellkern, die Chloroplasten, die Mitochondrien, das endoplasmatische Retikulum, den Golgi-Apparat u. a.

Zu den für das Leben grundlegenden Prozessen, die an Biomembranen ablaufen, zählen etwa die Photosynthese, die an der inneren Membran der Chloroplasten abläuft und zum Aufbau von Kohlenhydraten aus CO₂ und Wasser führt, sowie die Prozesse, die durch Oxidation von Nährstoffen in die Erzeugung von Adenosintriphosphat (ATP) münden, der universellen Energiewährung der Zelle. Besonders hervorgehoben sei die Funktion der Membranen für die Fortpflanzung von Nervenreizen.

Biomembranen bestehen aus Lipiden, Proteinen und Cholesterol in wechselnden Anteilen sowie geringen Mengen an Kohlenhydraten (s. [Kap. 3](#)). Als Barrieren, die das Membraninnere vom äußeren Medium trennen, sind sie jedoch nicht vollkommen impermeabel. Vielmehr regeln sie den Stoffein- und austritt durch sogenannte Pumpen und Kanäle; erstere transportieren spezifische Ionen *gegen* einen elektrochemischen Gradienten (s. u.), letztere ermöglichen deren Durchtritt *mit* einem solchen Gradienten. Auf diese Weise regeln solche membranresidenten Proteine das Transmembranpotential.

1.4. Funktionelle Fluoreszenzfarbstoffe zur Messung von Membranpotentialen

Zur Messung solcher Potentiale gibt es indirekte Methoden, bei denen auf non-invasive Weise mit Hilfe von optischen Indikatoren Messungen unternommen werden können. Hierzu gehören Lichtstreuung, Absorption, Transmission, Fluoreszenz und Circular dichroismus intrinsischer (d. h. zur Zelle gehörender) oder extrinsischer (eigens für das Experiment eingeführter) Verbindungen. Dabei ist die Hauptstoßrichtung der Untersuchungen das Studium von Nervengewebe, und hier ist insbesondere eine Technik von Interesse, die die simultane Beobachtung vieler Nerven in einfachen Ganglien erlaubt.

Eine dieser Methoden basiert auf der Beobachtung, daß in die Zellmembran eingebrachte Farbstoffe auf die Veränderung des Membranpotentials mit Veränderungen in ihren Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften reagieren. Es war zu Beginn der Arbeiten auf diesem Gebiet noch unklar, welchem Mechanismus diese Potentialsensitivität gehorcht. Folgende Möglichkeiten werden diskutiert⁵:

- ❶ eine potentialabhängige Umverteilung des Farbstoffs zwischen dem Zellinneren und dem externen wäßrigen Medium. Insbesondere bei Cyanin-Farbstoffen (s. das Kapitel über [Cyanine](#) im Hauptteil) führt eine Anreicherung im Zellinneren zur Bildung von Aggregaten, die nicht fluoreszieren.
- ❷ eine potentialabhängige Umverteilung zwischen dem äußeren Medium und der Membran. Die Änderung der spektralen Eigenschaften ist hier eine Folge der Ausbildung von Dimeren in der wäßrigen Phase.
- ❸ eine potentialabhängige Dimerisierung in der Membran.

Diese drei Mechanismen sind vor allem für Cyanine wahrscheinlich.

- ❹ direkte Elektrochromie (Stark-Effekt), d. h. bei Anregung des Chromophors erfolgt eine signifikante Ladungsverschiebung von einem Ende des Moleküls zum anderen. Das Übergangsdipolmoment tritt mit dem äußeren elektrischen Feld in

Wechselwirkung, und die Folge ist eine Verschiebung der Maxima im Absorptions- und Fluoreszenzspektrum um einen Betrag $\Delta\nu$, dessen Feldabhängigkeit durch Gleichung 2 gegeben ist⁶:

$$h \cdot \Delta\nu = (\bar{\mu}_g - \bar{\mu}_e) \cdot \bar{F} + \frac{1}{2}(\alpha_g - \alpha_e) \cdot F^2$$

hierin sind:

$\bar{\mu}_g, \bar{\mu}_e$: Dipolmomente des Grund- bzw. angeregten Zustandes

F: el. Feldstärke

α_g, α_e : Polarisierbarkeiten

Der lineare Term ist stark von der Ausrichtung des Moleküls abhängig und bewirkt größere Effekte als der quadratische Term, der von der Ausrichtung weniger abhängig ist⁷.

1.4.1. Cyanine und andere slow-response-Potentialsonden

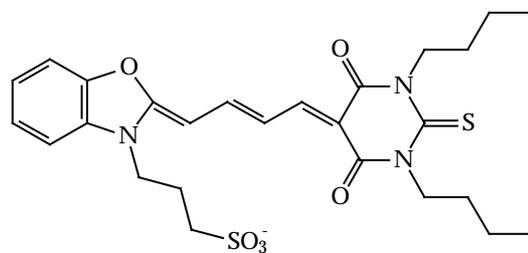
Schon Ende der sechziger Jahre, nachdem Tasaki⁸ 1968 erstmals die Änderung der spektroskopischen Eigenschaften extrinsischer Fluorophore mit der Änderung des Membranpotentials beobachtet hatte, wurden Fluoreszenzfarbstoffe im Hinblick auf ihre Eignung als Potentialsonden hin untersucht⁹. Zu ihnen gehörten zunächst typische hochfluoreszente Chromophore wie Fluorescein, Rhodamin, Aminonaphthalensulfonsäuren¹⁰ und Acridinorange¹¹. Da aber nicht unbedingt die absolute Größe des Fluoreszenzsignals ausschlaggebend für die Eignung eines Farbstoffs ist, sondern die Größe der relativen Änderung seiner Fluoreszenz bei einer Änderung des Membranpotentials um einen physiologisch realistischen Wert von ca. ± 100 mV, etablierten sich bald andere Fluorophore, deren Fluoreszenzquantenausbeute zwar niedriger, deren Fluoreszenzänderung aber um so höher ist. Zu dieser Gruppe gehören z. B. die Cyanin-, Oxonol- und Merocyaninfarbstoffe¹². Sie zeigen ein weit besseres Signal/Rausch-Verhältnis als die oben erwähnten Verbindungen. So wurde von Loew et al.¹³ N,N'-Diethylthiadicarbocyaniniodid (Di-S-C₂(5)) verwendet, um die Kinetik von Ionophoren und Membrankanälen an künstlichen Liposomen zu charakterisieren. Hier tritt jedoch eine unliebsame Eigenschaft vieler Farbstoffe in den

Vordergrund: die photodynamische Schädigung der untersuchten Zelle¹⁴. Es ist bekannt, daß Cyanine und andere Farbstoffe effiziente Singulett-Sauerstoff-Sensibilisatoren sind. Singulett-Sauerstoff zerstört aber sehr schnell das Gewebe. Im ungünstigsten Fall ist das zu untersuchende Objekt bereits durch photodynamische Schädigung zu stark in Mitleidenschaft gezogen, bevor die Messung überhaupt begonnen hat. Dieser Nachteil konnte für die Cyanin-Chromophore von Gupta et al.¹⁵ teilweise überwunden werden, indem nicht primär Absorption oder Fluoreszenz als Detektionssignal verwendet wurden, sondern die Doppelbrechung. Sie tritt auch bei Wellenlängen fernab des Absorptionsmaximums auf und kann ohne gleichzeitige Erzeugung von Singulett-Sauerstoff für die Messung von Potentialänderungen genutzt werden.

1.4.2. Fast-response-Sonden: Styrylfarbstoffe

Fast-response-Sonden sind solche extrinsischen Fluorophore, deren Ansprechzeit nicht wie bei den Cyaninen und Oxonolen im Bereich von Sekunden bis Minuten liegt, sondern im Bereich Millisekunden und schneller. Farbstoffe, für die das zutrifft, sind Merocyanine, wie z. B. Derivate des Merocyanins M 540¹⁶, obwohl

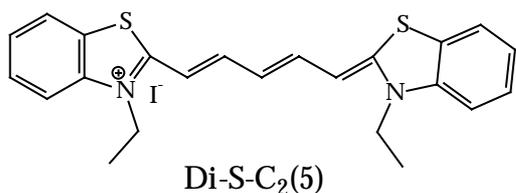
ihre Anwendung besonders stark durch photodynamische Schädigung der Zelle beeinträchtigt wird; ferner die Styrylfarbstoffe, die auf Potentialänderungen mit direkter Elektrochromie reagieren. Dieses Konzept zu verfolgen schien



M 540

besonders vielversprechend, da dieser Mechanismus quasi augenblicklich auch auf die schnellsten Potentialänderungen reagiert. Darum wurden systematische Untersuchungen durchgeführt, um optimale Kandidaten hierfür zu finden bzw. zu entwickeln. Bereits für Potentialmessungen verwendete Farbstoffe wurden Extended-Hückel-Rechnungen unterzogen, um die Ladungsverteilungen im Grundzustand (HOMO) und im ersten angeregten Zustand (LUMO) zu ermitteln. Dabei wurde davon ausgegangen, daß der langwelligste Übergang für das betrachtete Problem der maßgebliche ist. Aus der Ladungsverteilung in HOMO

und LUMO läßt sich direkt beurteilen, ob das betrachtete Molekül ein geeigneter



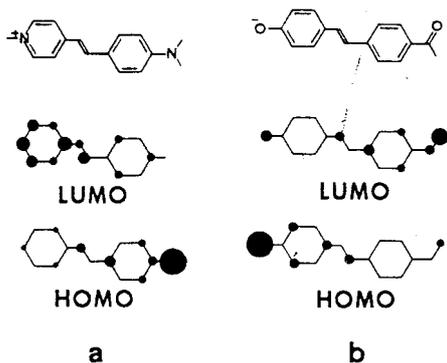
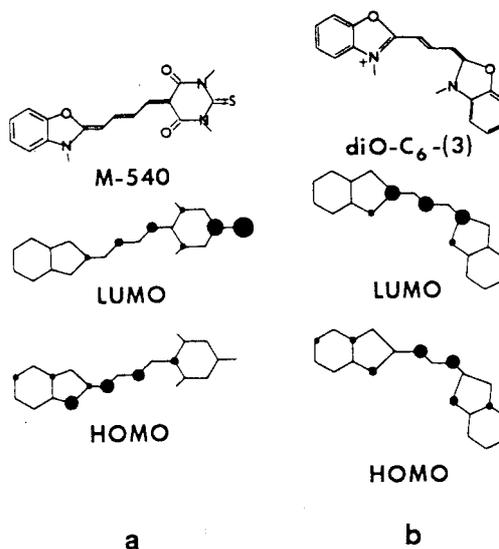
Kandidat für Elektrochromie ist oder nicht. Zum Beispiel haben

symmetrische Cyanine wie diO-C₆-(3) oder diS-C₂-(5) und Oxonole im Grund-

zustand wie im angeregten Zustand eine symmetrische Ladungsverteilung. Sie sind daher ungeeignet für Messungen, die die Elektrochromie nutzen sollen.

Dagegen zeigen Farbstoffe, die den 4-(p-Aminostyryl)-pyridinium-, einen entsprechenden Oxonol-Chromophor oder einen Merocyaninchromophor aufweisen, eine ausgeprägte Ladungsverschiebung bei Anregung.

Neben der Ladungsverschiebung ist für eine elektrochrome Sonde ein zweiter Aspekt essentiell: die Ausrichtung des Moleküls in der Membran.



Diese muß notwendigerweise senkrecht zur Membranoberfläche sein. Daher war es notwendig, die optimalen strukturellen Eigenschaften einer Verbindung unter diesem Gesichtspunkt zu ermitteln. Symmetrische Cyanine scheiden auch hier von vornherein aus, denn es besteht keine Veranlassung für das eine Ende des Mole-

küls, sich an der polaren Grenzfläche zwischen Membran und wässriger Phase aufzuhalten, während das andere Ende sich zum unpolaren Inneren der Membran hin orientiert. Erste Bedingung ist also, daß das Molekül unsymmetrisch ist. Das eine Ende muß stark polar sein, so daß es nicht in die Membran hineingelangen kann und sich nur an der Phasengrenze aufhält. Dazu ist das Vorhandensein einer

weitgehend lokalisierten Ladung an diesem Ende notwendig. Das andere Ende muß so lipophil sein, daß es das ganze Molekül im Inneren der Membran verankert. Dies ist durch Einführen von Alkylgruppen möglich. Ein 4-(N,N-Dialkylaminostyryl)-pyridinium-Farbstoff z.B. würde allen diesen Forderungen entsprechen.

Daher wurde das 4-(p-Dipentylaminostyryl)-pyridiniumiodid (Di-5-ASP) hergestellt¹⁷, um den theoretischen Ansatz im Experiment zu verifizieren. Überlegungen zur Solvatochromie zeigen, daß das Absorptionsspektrum dieses Moleküls beim Übergang von Wasser zu weniger polaren Lösungsmitteln wie Ethanol oder Butanol eine bathochrome Verschiebung zeigen sollte, da der polare Grundzustand durch diese zunehmend destabilisiert, der weniger polare angeregte Zustand zunehmend stabilisiert wird. Dieses Verhalten wird auch gefunden: Di-5-ASP absorbiert in Wasser bei 475 nm, in Ethanol bei 494 nm und in Butanol bei 498 nm. Die Einlagerung eines Moleküls in eine Lipid-Schicht, die im Wesentlichen die Polarität eines Kohlenwasserstoffs besitzt, läßt daher eine weitere Rotverschiebung erwarten. Darum war es aus dieser einfachen Solvatochromiebetrachtung heraus überraschend, daß eine signifikante Blauverschiebung gefunden wurde. Diese läßt sich aber erklären, wenn man annimmt, daß der Farbstoff in der unten angegebenen Weise in der Membran orientiert ist.

Diese Anordnung stabilisiert den Grundzustand optimal: das geladene Ende des Moleküls befindet sich in einer wässrigen, das unpolare in einer lipophilen Umgebung. Bei vertikaler Anregung erhält der Anilin-Stickstoff eine positive Teilladung, wobei in dieser Umgebung eine Destabilisierung des angeregten Zustandes gegenüber Wasser anzunehmen ist. Dieses

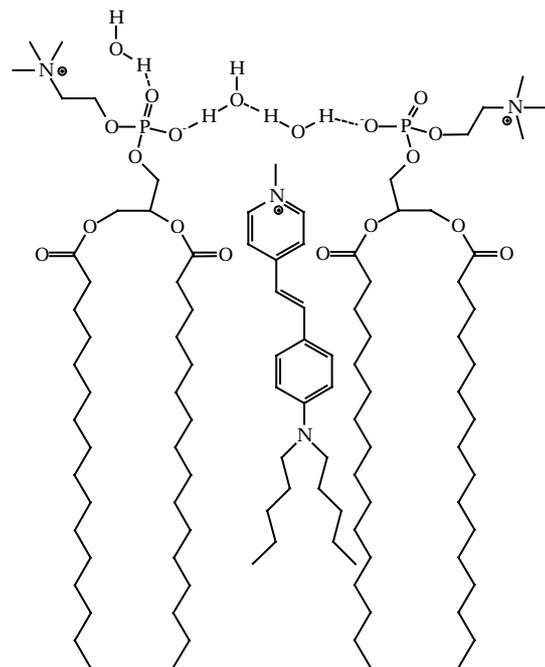


Abb. 2: Orientierung von Di-5-ASP in einer Lipid-Membran

Verhalten wird als differenzierte Solvatation (*differential solvation*) bezeichnet.

Dem Bild entspricht auch die Quantenausbeute der Fluoreszenz, die in Wasser sehr gering und in der Lipid-Schicht um den Faktor 100 höher ist: im relaxierten, solvatisierten angeregten Zustand (wahrscheinlich S_1) können starke polare Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel Wege zur thermischen Desaktivierung eröffnen. Im Inneren der Membran kann die positive Ladung nur sehr schlecht solvatisiert werden, dadurch ist die Lebensdauer des angeregten Zustandes klein und der strahlende Übergang zum Grundzustand wird bevorzugt¹⁸.

Um diese Theorie zu erhärten, wurden differenziertere spektroskopische Messungen unternommen: auf den unteren Teil einer hemisphärischen Membran, die mit Di-5-ASP gefärbt war, wurde linear polarisiertes Laserlicht der Wellenlänge 442 nm gerichtet. Die Intensität des von der Probe emittierten Fluoreszenzlichtes wurde bei 570 nm in einem Winkel von 90° zum einfallenden Lichtstrahl gemessen. Ein Molekül kann nur angeregt werden, wenn der E-Vektor des einfallenden Lichtes parallel zum Vektor von dessen Übergangsmoment liegt. Dieser liegt bei den ASP-Chromophoren im Wesentlichen parallel zur Molekülachse. Daher können die Farbstoffmoleküle in der beschriebenen Versuchsanordnung nur dann von senkrecht zur Membranoberfläche polarisiertem Licht angeregt werden, wenn sie auch senkrecht zu dieser Oberfläche angeordnet sind. Man erwartet also eine relativ hohe Fluoreszenzintensität für senkrecht polarisiertes Licht und eine relativ geringe für waagrecht polarisiertes Licht. Diese Erwartung wurde im Experiment auch bestätigt.

Mit diesen Richtlinien für das Aussehen eines elektrochromen Fluoreszenzfarbstoffs für die Messung von Membranpotentialen blieb noch zu beweisen, daß ein solcher Farbstoff auch tatsächlich nach einem elektrochromen Mechanismus auf eine Potentialänderung reagiert. Darum wurden die Transmissions- und Fluoreszenzspektren von Modellmembranen gemessen, die mit ASP-Farbstoffen angefärbt waren und an die ein regelbares Potential angelegt werden konnte. Die Richtung des elektrischen Feldes wurde dabei so gewählt, daß die Ladungsverschiebung bei Anregung des Chromophors gegen das elektrische Feld erfolgte¹⁹. Dies entspricht der Hyperpolarisation (s. o.). Absorptions- und

Fluoreszenzspektren mußten also eine Blauverschiebung aufweisen. Geeignete Größen, um die Empfindlichkeit eines Farbstoffs auf eine Potentialänderung diagrammatisch darzustellen, sind die relativen Änderungen der Intensitäten in Transmission ($\Delta T/T$) bzw. Fluoreszenz ($\Delta F/F$) als Funktionen der Wellenlänge λ . Dabei ist die Fluoreszenzmessung in Anregung (die Anregungswellenlänge wird variiert, die Fluoreszenzintensität bei der Wellenlänge des ‘cross-over‘ der Emissionsspektren wird gemessen) derjenigen in Emission vorzuziehen, da das Anregungsspektrum genau dem Absorptionsspektrum entspricht. Auf diese Weise werden nicht-elektrochrome Beiträge eliminiert, die das Emissionsspektrum evtl. stark mitbestimmen würden. Solche Sekundärprozesse wurden postuliert²⁰, sind jedoch noch immer hypothetisch: infolge Lichtabsorption erreicht das Molekül den ersten angeregten Zustand (S_1), aus dem es durch Emission eines Lichtquants in den Grundzustand übergehen kann. Es kann aber auch durch eine Verdrillung um die zentrale Doppelbindung in den TICT-Zustand (**T**wisted **I**nternal **C**harge **T**ransfer) mit zusätzlicher positiver Ladung am Anilin-Stickstoff übergehen, aus dem es strahlungslos in den Grundzustand wechselt. Durch ein Drehmoment, das das elektrische Feld auf die im S_1 am Anilin-Stickstoff lokalisierte positive Ladung ausübt, wird das Molekül quasi-parallel zur Grenzfläche Membran/Wasser ausgerichtet (*field-induced resolution*). Hier wird der angeregte Zustand besser solvatisiert als im unpolaren Inneren der Membran, außerdem tritt keine Wechselwirkung mehr mit dem elektrischen Feld ein, die Fluoreszenz wird rotverschoben. Der unter diesen Bedingungen stärker begünstigte (und darum längerlebige) TICT-Zustand führt zu einer Abnahme der Quantenausbeute der Fluoreszenz.

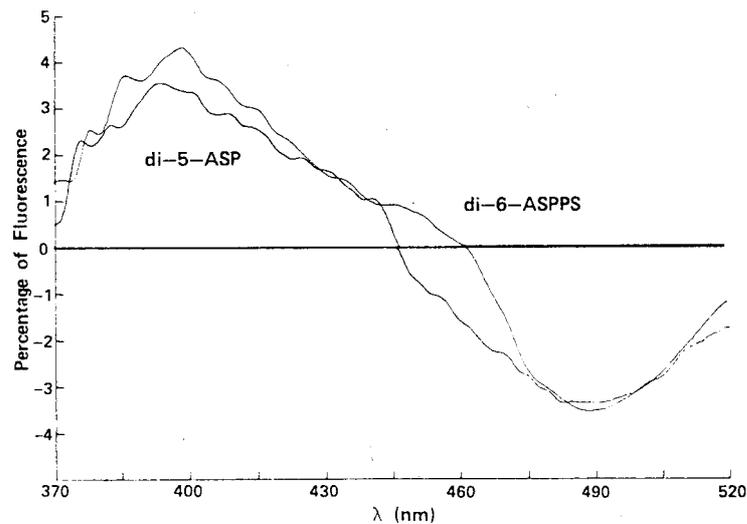
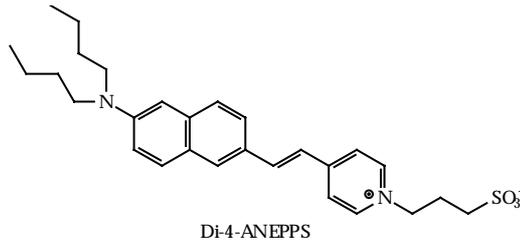


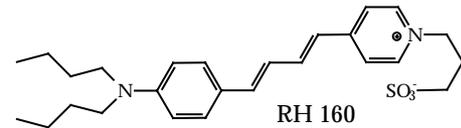
Abb. 3: Relative Änderung der Fluoreszenz von di-5-ASP und di-6-ASPPS in % infolge eines Membranpotentials von 100 mV

Die Ergebnisse der Messungen sind mit einem elektrochromen Mechanismus vereinbar. Insbesondere die starke Ähnlichkeit der Diagramme für das positiv geladene Di-5-ASP und das ungeladene Di-6-ASPPS spricht gegen einen Mechanismus, der auf irgendeiner feldinduzierten Bewegung des Moleküls basiert. Selbst das zweifach positiv geladene RH 460 zeigt keine signifikante Abweichung von diesem Befund. Auch wurde auf der Basis der Spektren für ASP-Chromophore die Ladungsverschiebung bei Anregung berechnet²¹. Diese stimmte mit dem aus Molekülrechnungen erhaltenen Wert sehr gut überein, was abermals einen elektrochromen Mechanismus nahelegt.

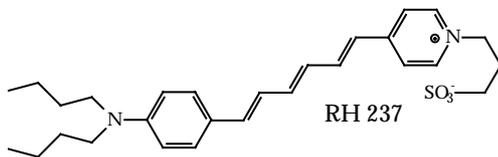


Mit der so gewonnenen Kenntnis der strukturellen Anforderungen an einen elektrochromen Fluoreszenzfarbstoff konnten in der Folgezeit viele neue Farbstoffe hergestellt werden, in denen

die Länge der Kohlenwasserstoffketten in dem Sulfonatoalkylrest und in der Dialkylamino-Gruppe sowie die Zahl der Vinyl-Einheiten zwischen den Aromaten



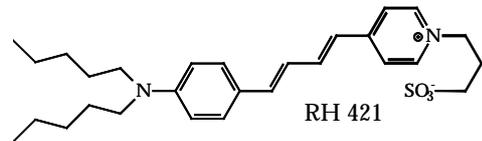
variiert wurden. Mit einigen dieser neuen



Farbstoffe konnten die Empfindlichkeit der Messung und das Signal/Rausch-Verhältnis erheblich verbessert werden²².

Z. B. bringt die Einführung einer bzw. zweier weiterer Vinylgruppen zwischen den Aromaten eine auffällige Steigerung

der Empfindlichkeit. Wenn dies bei Fluoreszenzfarbstoffen wie RH 160 oder RH 237 auch nicht überraschen kann, so kommt die beinahe Verdopplung der Empfindlichkeit bei dessen Di-Pentyl-Analogen RH 421 durchaus unerwartet (die Empfindlichkeit wird angegeben als



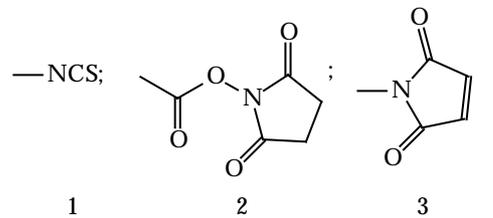
$\Delta F/F$ pro 100 mV Membranpotentialänderung in Prozent und beträgt bei RH 160 12 %, bei RH 421 21 %). Es konnte jedoch in einer Überschlagsrechnung gezeigt werden, daß die maximale zu erwartende Empfindlichkeit für einen rein elektrochromen Farbstoff bei 10 % liegt. Die angegebenen Meßwerte wurden alle an derselben Zellart (Neuroblastom der Maus) ermittelt und sehen bei einem anderen System völlig anders aus: Messungen an Vesikeln aus Ei-Phosphatidylcholin ergaben Werte um 4 %, die voneinander auch weniger abweichen. In diesem System kommt indessen ein anderer Farbstoff der theoretischen Grenze am nächsten: mit einer Änderung der Fluoreszenzintensität von 8 % bei Fluoreszenz-Anregungsmessungen ist Di-4-ANEPPS der bisher beste elektrochrome Farbstoff, wenn man davon ausgeht, daß RH 421 und RH 160 nicht ausschließlich über einen elektrochromen Mechanismus auf die Potentialänderung ansprechen (Farbstoffe, die über eine Umverteilung reagieren, zeigen Empfindlichkeiten von

ca. 80-90%). Dieser Sachverhalt zeigt deutlich, wie stark man bei der Feinabstimmung der Eigenschaften neu zu synthetisierender Farbstoffe auf das Experiment angewiesen ist. Probleme bereitete jedoch noch immer die Übertragung der Methode von künstlichen Membranen oder einzelnen, kultivierten Zellen auf natürliche Systeme. Die optimistische Annahme, daß ein optimaler Farbstoff einmal an einer Modellmembran geeicht werden und dann ohne weiteres auf alle anderen Systeme übertragen werden könnte, erwies sich als unrealistisch. Vielmehr muß davon ausgegangen werden, daß für jede Anwendung ein optimal geeigneter Farbstoff erst gefunden und dann an diesem bestimmten System geeicht werden muß.

Darüber hinaus konnte bisher die photodynamische Schädigung der Zelle nicht abgestellt werden, unter anderem weil deren Mechanismus noch unbekannt ist. Daß es sich nicht immer um eine Oxidation durch Singulett-Sauerstoff handelt, konnte durch Versuche unter Schutzgas erwiesen werden. Auch die Beeinflussung des Meßergebnisses durch den eingelagerten Farbstoff selbst ohne Bestrahlung kann nicht ausgeschlossen werden²³, insbesondere wenn dieser eine Nettoladung aufweist.

1.4.3. Reaktivfarbstoffe

Anders als die reinen Styrylfarbstoffe, die gewissermaßen das biochemische Pendant zu den direktziehenden Farbstoffen sind, werden Reaktivfarbstoffe möglichst gezielt an den Ort des Geschehens gebracht: sie enthalten Reaktivgruppen, die unter physiologischen Bedingungen mit den typischen funktionellen Gruppen der Proteine reagieren, vor allem -SH (Sulfhydryl-) und -NH₂ (Amino-). Als Reaktivgruppen steht eine Vielzahl von funktionellen Gruppen zur Verfügung, die gängigsten sind nebenstehend gezeigt (s. Abbildung).



1=Isothiocyanat

2=NHS-(N-Hydroxysuccinimid-)Ester,
beide spezifisch für Aminogruppen

3 = Maleinimid, spezifisch für -SH-Gruppen

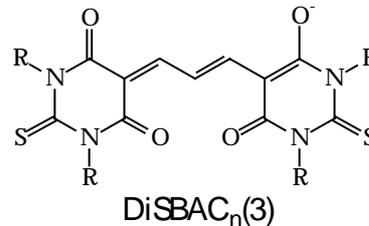
Die so reaktiv funktionalisierten Farbstoffe werden dann an spezifische Antikörper gebunden, die ihrerseits selektiv an membranresidente Proteine binden. Auf diese Weise kann erreicht werden, daß ein bestimmter Luminophor sich nur an bestimmten Membranproteinen findet, so daß etwaige Änderungen in seinen spektralen Eigenschaften sich sicher nur mit solchen Veränderungen in der Membran korrelieren lassen, die mit dem betreffenden Membranprotein in Zusammenhang stehen.

1.5. Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Der Versuch, Membranpotentiale über die Änderung des abstandsabhängigen FRET zwischen *zwei verschiedenen* Chromophoren statt über die Änderung der Fluoreszenz eines einzelnen zu messen, ist in zwei Arbeiten von Tsien und Gonzalez bereits unternommen worden, in denen dieser Energietransfer zwischen nicht verbundenen Chromophoren genutzt wurde^{24,25}. Die Änderung des Abstandes wird dort durch die potentialabhängige Umverteilung eines der beiden

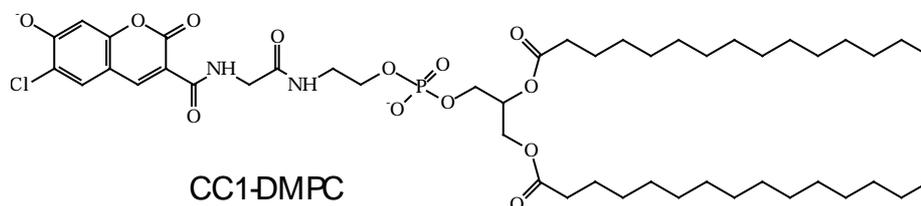
FRET-Partner besorgt, während der andere durch seine kovalente Bindung an die die Membran konstituierenden Moleküle ortsfest bleiben muß.

Als Farbstoffsysteme für die Verwirklichung dieses Konzeptes wurden zum einen klassische *slow-response*-Farbstoffe gewählt, nämlich Trimethinoxonole vom Typ DiSBAC_n(3). Sie werden aus der äußeren Pufferlösung der Zelle angeboten, auf die sie selbsttätig aufziehen (gemäß ihrem Verteilungskoeffizienten).



Ihr Absorptionsmaximum liegt bei ca. 540 nm. Ihr Stoke-Shift ist klein, und die Emission liegt schon bei 560 nm.

Ein Teil der Phospholipidmoleküle, die im Experiment die Zellmembran aufbauen, sind entweder mit Fluorescein oder einem Coumarin-Derivat markiert. Die Kombination aus dem Coumarin-Farbstoff und dem Dimyristoylphosphatidylcholin wird mit dem Arbeitskürzel CC1-DMPC bezeichnet.



Aufgrund der hohen Quantenausbeute des Fluoreszenz-Donors und der (zwar geringen) spektralen Überlappung ist zwischen diesen Farbstoffen ein abstandabhängiger FRET meßbar (s. [Hauptteil](#)).

2. Problemstellung

Die Behebung der Unzulänglichkeiten von membranpotentialsensitiven Farbstoffen anzugehen soll in dieser Arbeit auf dreierlei Weise versucht werden:

1. Die Darstellung reaktiver Gruppen bzw. die Anwendung von peptidchemischen Aktivierungsreagenzien eröffnet einerseits die Möglichkeit, *fast-response*-Farbstoffe an Membranproteine zu binden, andererseits lassen sich damit vielleicht kovalente bichromophore Systeme herstellen (vgl. das Kapitel [Bichromophore](#) im Hauptteil).

2. Chromophore mit geeigneten spektralen Eigenschaften und den entsprechenden funktionellen Gruppen müssen dargestellt werden. Prinzipielle Möglichkeiten für ihre Synthese sind i. a. bekannt, müssen aber erarbeitet und ggf. verbessert bzw. adaptiert werden. Es handelt sich dabei einerseits um Styrylpyridinium-Farbstoffe im weitesten Sinne, weil diese eine schnelle Reaktion auf Potentialänderungen zeigen; andererseits um Cyaninfarbstoffe, weil sie große Fluoreszenzänderungen bei Änderung des Potentials zeigen, aber auch weil sie günstige spektrale Eigenschaften für Bichromophore haben: ihre Absorptionsbande überlappt stark mit der Fluoreszenzbande der Styrylpyridine, und ihre Fluoreszenzquantenausbeute ist hoch.

3. Reaktivgruppen oder Methoden zur Aktivierung funktioneller Gruppen in Farbstoffmolekülen sollen zur Darstellung von bichromophoren Systemen genutzt werden. Dabei müssen die so darzustellenden Spacer einerseits möglichst lang, andererseits möglichst variabel sein, um ein Experimentieren mit dem Abstand der Chromophore zu ermöglichen.

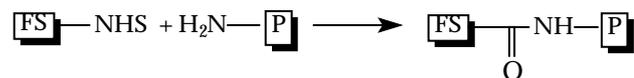
4. Die so erhaltenen funktionellen Farbstoffe sind zu charakterisieren, ihre fluorimetrischen Eigenschaften sind zunächst in Lösung, dann in [Biomembranen](#) bzw. deren Analoga zu ermitteln; schließlich ist ihre Reaktion auf Potentialänderungen an solchen Membranen zu untersuchen.

2.1. Reaktivgruppen

2.1.1. Reaktivgruppen im engeren Sinne

Von den vielen reaktiven Gruppen, die in der Peptidchemie gebräuchlich sind, erscheint die NHS-Estergruppe neben dem Isothiocyanat am meisten zu versprechen. Indessen ist in anderen Arbeiten^{26, 27, 28} bereits mit der Isothiocyanatgruppe gearbeitet worden. Ihr Potential für die Art der Anwendungen in dieser Arbeit ist jedoch offenbar sehr begrenzt. Zudem ist ihre Synthese deutlich aufwendiger als die der NHS-Estergruppe. Es sollen daher hier Farbstoffe mit NHS-Estergruppe synthetisiert werden, damit sie spezifisch an die freien Aminogruppen von Proteinen gebunden werden können.

FS = Farbstoff; P = Protein



Diese Eigenschaft soll dazu genutzt werden, *fast-response*-Chromophore über spezifische Antikörper an Membranproteine anzukuppeln um sie damit so nahe wie möglich an den Ort des Geschehens zu bringen. Zu diesem Zweck wird der Antikörper mit dem Farbstoff in gepufferter wässriger Lösung zur Reaktion gebracht, so daß er nun kovalent mit diesem Antikörper verbunden ist. Nach der Isolierung des Antikörper-Fluoreszenz-Markers wird dieser dann unter physiologischen Bedingungen an das Protein gebunden, das das für den Antikörper spezifische Substrat ist. So ist sichergestellt, daß der Fluoreszenzfarbstoff nur in der Umgebung des interessierenden membranresidenten Proteins anzutreffen ist.

2.1.2. Aktivierungreagenzien

Eine Alternative zu den Reaktivgruppen stellen Aktivierungreagenzien vom Typ des Dicyclohexylcarbodiimids (DCC) dar. Sie sind in großer Zahl beschrieben. Obwohl sie sich nicht für die Markierung von Antikörpern oder anderen Proteinen eignen, kann man mit ihrer Hilfe vielleicht bichromophore Farbstoffsysteme

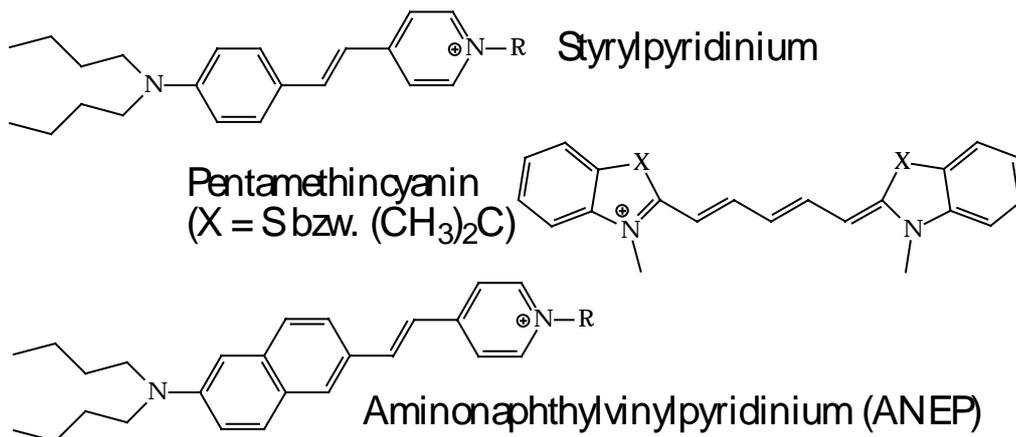
herstellen (s. nächster Abschnitt). Da sie i. a. der Peptidchemie entstammen, funktionieren sie in der Regel so, daß entweder zwei Moleküle der Carbonsäure unter Wasserabgabe zu einem Anhydrid umgesetzt werden, das dann leicht mit primären oder sekundären Aminen zum Amid reagiert; oder es wird aus einem Äquivalent Carbonsäure unter basischen Bedingungen ein aktivierter Ester gebildet, der dann direkt mit einem Amin zu einem Amid reagiert. Auch in diesem Fall wird netto ein Äquivalent Wasser freigesetzt. Im Falle des DCC wird daraus Dicyclohexylharnstoff gebildet. Im Fall neuerer Entwicklungen wird die hohe Affinität des Phosphors zu Sauerstoff genutzt, um der Reaktion die nötige Triebkraft zu verleihen.

Um diese Technik nutzen zu können, müßten zunächst nicht zwei verschieden funktionalisierte Farbstoffe dargestellt werden, etwa mit Amino- bzw. Carbonsäuregruppe, sondern beide müßten die gleiche funktionelle Gruppe tragen, vorzugsweise die Carbonsäuregruppe, wegen deren leichterem Präparation. Diese beiden Farbstoff-Säuren könnten dann unter der Wirkung eines peptidchemischen Aktivierungsreagenzes mit einem Diamin zu einem bichromophoren System verknüpft werden.

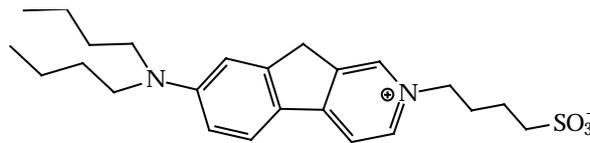
Die Darstellung solcher Aktivierungsreagenzien und die Erarbeitung einer Synthesestrategie für Bichromophore mit ihrer Hilfe wird in dieser Arbeit unternommen.

2.2. Chromophore

Folgende Chromophore aus dem Bereich der bekannten potentialsensitiven Fluoreszenzfarbstoffe sollen hier dargestellt und auf ihre Eignung für die zu entwickelnden Arbeitstechniken hin geprüft werden.



Es soll auch in Anknüpfung an eine Arbeit von Fromherz²⁹ ein amphiphiler Anilinopyridinium-Farbstoff mit einem starren



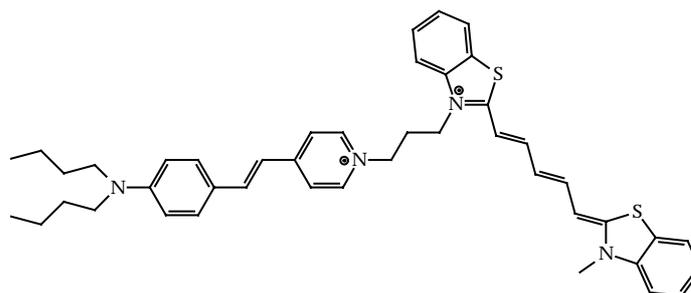
Molekülgerüst dargestellt werden, um zu prüfen, ob sich die daran von Fromherz in Lösung ermittelte verbesserte Fluoreszenzquantenausbeute positiv auf die Potentialabhängigkeit in der Membran auswirkt. Hierzu muß die dort verwendete prinzipielle Synthesemethode abgewandelt werden.

2.3. Bichromophore

Reaktivgruppen bzw. Aktivierungsreagenzien sollen genutzt werden, um je zwei Farbstoffmoleküle kovalent aneinander zu binden. Bei geeigneter Auswahl der Chromophore bezüglich ihrer spektroskopischen Eigenschaften könnte damit ein abstandabhängiger Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) erzielt werden (s. Hauptteil). Eine potentialabhängige Änderung dieses Abstandes würde dann eine neue Methode der Potentialmessung eröffnen.

Daß die hier ausgesuchte Kombination von Styrylpyridinium-/Cyaninfarbstoff sich für die Darstellung von bichromophoren Systemen mit FRET eignet, ist auch von D. Witzak³⁰ gezeigt worden. Die spektrale Überlappung (s. Förstergleichung) ist indessen so groß, daß

bei dem dort gewählten geringen Abstand die Effizienz des Energietransfers ohnehin 100% ist, auch



unabhängig von etwaigen (hypothetischen) Änderungen des Abstandes bzw. der gegenseitigen Orientierung der beiden Chromophore. Zudem besteht der Spacer nur aus einer einfachen Trimethylen-Brücke ohne funktionelle Gruppen, die seine Solvatisierung im wässrigen Medium begünstigen. Dies wird aber für Lumineszenzmarker und andere Luminophore für biochemische Anwendungen empfohlen^{31,32}.

Es erscheint daher sinnvoll, eine Synthesestrategie für Bichromophore zu suchen, die die Erweiterung des interchromophoren Abstandes und die gleichzeitige Einführung von hydrophilen Gruppen gestattet. Die Knüpfung von Amidbindungen zur kovalenten Verknüpfung von funktionalisierten Farbstoffen scheint daher in idealer Weise die gestellten Anforderungen erfüllen, auch weil ihre Bildung unter sehr milden Bedingungen möglich ist.

2.4. Charakterisierung

Die Strukturaufklärung der synthetisierten neuen Verbindungen muß mit Hilfe von Methoden wie NMR und FT-IR, UV sowie mit FAB-MS erfolgen. Um zu entscheiden, ob Bichromophore vorliegen, läßt sich auch die Fluoreszenzspektroskopie heranziehen. Substantieller Energietransfer in verdünnter Lösung läßt keine andere Erklärung zu, als daß die beteiligten Chromophore kovalent verbunden sind.

Davon abgesehen kann die Charakterisierung von Vorstufen, zumal wenn diese bereits literaturbekannt sind, auch über Schmelz- und Siedepunkte erfolgen.

Schließlich wird die Messung potentialabhängiger Fluoreszenzspektren an Liposomen eine wichtige Charakterisierung sein. Die dazu benötigten Liposomen aus Dioleoylphosphatidylcholin werden mit Hilfe der sog. Extrusionsmethode³³ hergestellt.

3. Hauptteil

3.1. Syntheseplanung

1. Die Darstellung der p-N,N-Dialkylaminonaphthylvinylpyridine **5a-f** erfolgt nach einem in der Literatur beschriebenen Verfahren. Die wichtigsten Schritte sind hier die Bucherer-Reaktion zur Darstellung von 6-Brom-2-naphthylamin **3** aus 6-Brom-2-naphthol **2**, dessen Alkylierung und die nachfolgende Heck-Reaktion (s. dort).
2. Für die Synthese des N-Hydroxysuccinimid-Esters **1a** der 3-Brompropionsäure existiert eine Vorschrift³⁴, jedoch keine für längerkettige NHS-Ester **1b-e**. Solche sollen hier mit verschiedenen Alkylkettenlängen dargestellt werden. Die Synthese erfolgt mit Hilfe von DCC als Aktivierungsreagenz für die Carbonsäuregruppe, die dann in abs. Essigester mit N-Hydroxysuccinimid reagiert. Eine andere Methode, die ebenfalls beschrieben ist, geht vom Säurechlorid der 3-Brompropionsäure aus, die mit N-Hydroxysuccinimid zur Reaktion gebracht wird. Diese wird hier ebenfalls erprobt.
3. Die Darstellung eines Anilinopyridinium-Farbstoffs mit planarisiertem, starrem Molekülgerüst gelang Fromherz in einer Reaktionsfolge, die die Darstellung amphiphiler Derivate nicht zulässt. Es soll hier versucht werden, solche auf anderem Weg herzustellen.
4. Ein vinylog verlängerter Styrylfarbstoff mit reaktiver Gruppe, einerseits zur Markierung von Membranproteinen, andererseits zur eventuellen Darstellung von bichromophoren Systemen, wird versucht. Zentrales Problem ist die Darstellung der Vorstufe **9**.

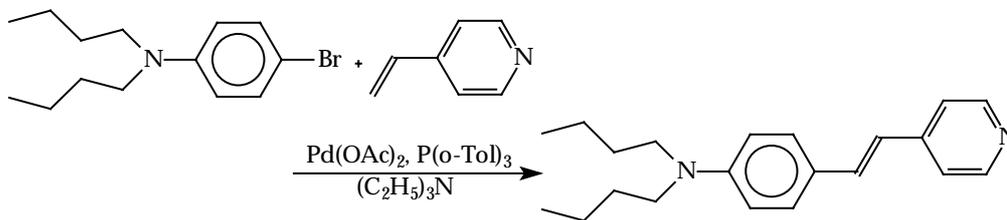
5. Schließlich ist die Darstellung unsymmetrischer Bichromophore das Hauptthema der vorliegenden Arbeit. Mögliche Methoden sind beschrieben worden, sie eignen sich aber meist nicht für die Darstellung der hier interessierenden Verbindungen. Daher müssen Alternativen gefunden werden. Prinzipiell stehen zwei Wege offen: zum Einen die Verknüpfung zweier Farbstoffe mittels reaktiver Gruppen. Zum Anderen die Verwendung peptidchemischer Aktivierungsreagenzien für Carbonsäuren, die in beiden Fällen mit Aminen zu Amiden reagieren sollen.

In dem folgenden Abschnitt 3.2. werden zunächst Möglichkeiten für die Darstellung der benötigten Farbstoff-Chromophore erörtert, in Abschnitt 3.3. wird dargestellt, wie diese Chromophore geeignet funktionalisiert werden können.

3.2. Darstellung von Chromophoren

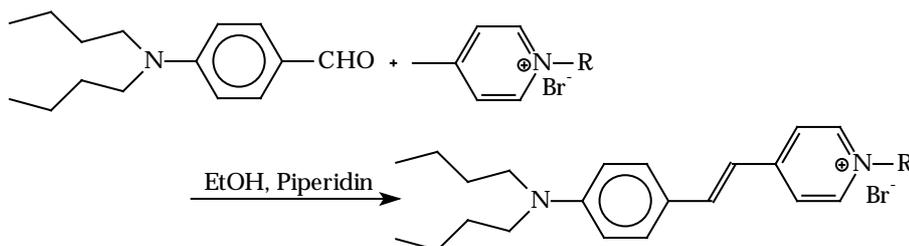
3.2.1. Styrylpyridine und Styrylpyridinium-Farbstoffe

Styrylpyridine (genauer: 4-(4-N,N-Di-n-alkylaminostyryl-)pyridine) werden im Allgemeinen in einer Heck-Reaktion³⁵ dargestellt. Hierzu werden die entsprechenden N,N-Dialkyl-4-bromaniline^{36,37,38} in einer palladiumkatalysierten Reaktion mit 4-Vinylpyridin umgesetzt:



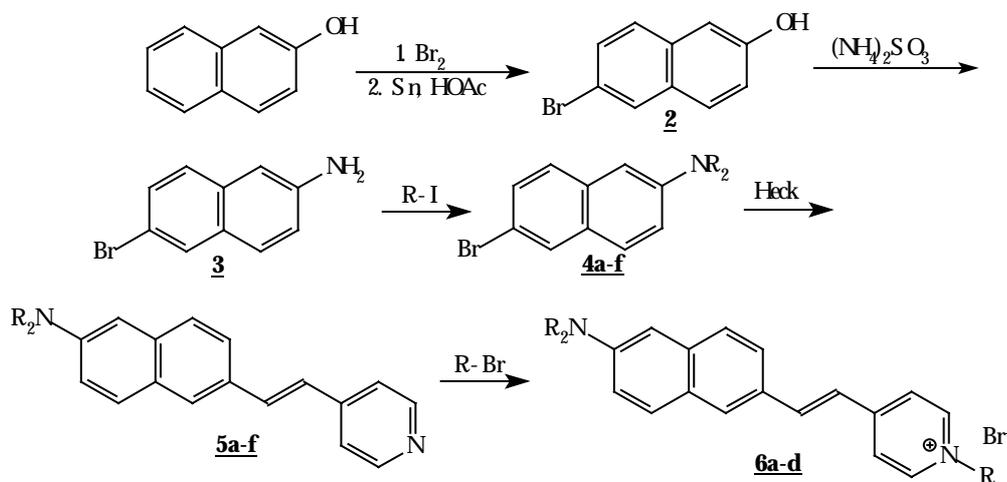
Auf diese Weise erhält man sog. Farbstoff-Basen, die in einem Folgeschritt mit Alkylhalogeniden quarternisiert werden können.

Styrylpyridinium-Farbstoffe werden auch durch Aldol-Kupplung dargestellt³⁹. Dazu werden 4-N,N-Dialkylaminobenzaldehyde mit N-Alkyl-4-Picoliniumsalzen kondensiert:



3.2.2. 4-(6-N,N-Dialkylaminonaphth-2-ylvinyl)pyridine **5a-f**

Zu ihrer Darstellung wird käufliches 2-Naphthol nach dessen Bromierung in einer Bucherer-Reaktion^{40,41} zum Amin **3** umgesetzt. Für die Bucherer-Reaktion sind verschiedene Verfahrensweisen beschrieben worden, teils allgemeine Arbeitsvorschriften, teils auch Vorschriften für die Darstellung des 6-Brom-2-naphthylamins **3** selbst.



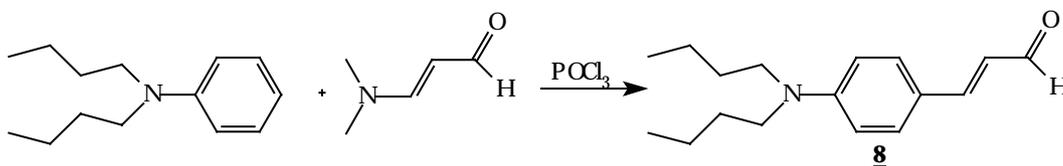
Sie unterscheiden sich einerseits in den stöchiometrischen Verhältnissen, in denen die Reaktanden miteinander zur Reaktion gebracht werden, andererseits in den Reaktionsbedingungen. Der wichtigste Unterschied besteht jedoch in der jeweiligen Verwendung von Schwefeldioxid bzw. Ammoniumsulfid ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$). Da letzteres fest, kostengünstiger und auch sicherer in der Handhabung ist als das gasförmige Schwefeldioxid, wurde ihm hier der Vorzug gegeben. Darüberhinaus läuft die Reaktion auch wesentlich besser auf diese Weise. Den hier erreichten fünfzig Prozent Ausbeute stehen zwar in den Literaturvorschriften deutlich höhere Ausbeuten gegenüber. Diese konnten jedoch auch bei genauer Befolgung dieser Vorschriften nicht annähernd erreicht werden.

Das 6-Brom-2-naphthylamin **3** wird dann alkyliert und anschließend in einer Heck-Reaktion (s. o.) mit 4-Vinylpyridin zur Farbstoff-Base **5a-f** umgesetzt. Alkylierung des Pyridin-Stickstoffs mit einem beliebigen Alkylierungsmittel (in der Regel mit Bromalkyl-Verbindungen) führt dann zu dem fertigen Farbstoff vom Typ des ANEPPS.

3.2.3. 4-(4-(p-N,N-Dialkylaminophenyl)-butadien-1-yl)-pyridine **9**

Farbstoffe dieses Typs sind ebenfalls durch Aldol-Kupplung zugänglich⁴², jedoch nicht durch eine Heck-Reaktion, denn dazu bräuchte man entweder 4-Butadienylpyridin oder 4-Bromvinyl-N,N-dialkylaniline. Beide sind nicht bekannt.

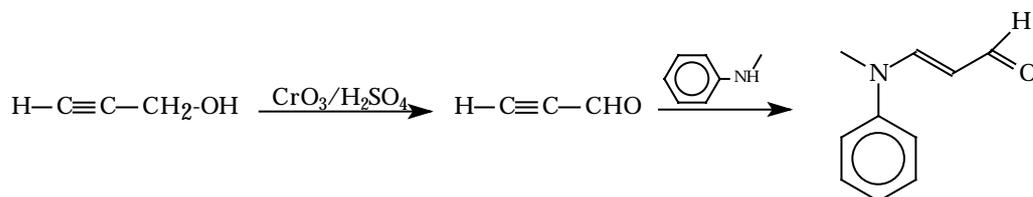
Für die Aldol-Reaktion nimmt man in diesem Fall nur die entsprechenden Zimtaldehyde **8**, die durch vinyloge Vilsmeier-Reaktion aus dem entsprechenden N,N-Dialkylanilin und N,N-Dimethylaminoacrolein unter der Wirkung von Phosphoroxychlorid dargestellt werden können^{43,44}:



Der Nachteil an dieser Darstellungsmethode ist der hohe Preis für N,N-Dimethylaminoacrolein. Daher wurde versucht alternative Synthesewege zu finden, um die Synthese kostengünstiger zu gestalten.

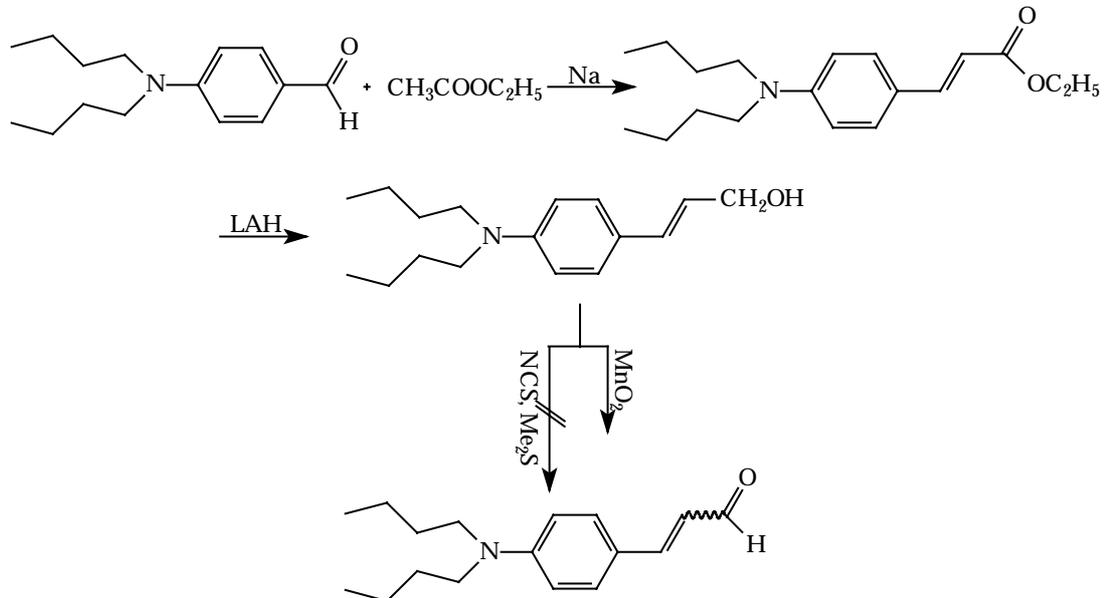
Dazu sind mehrere Methoden denkbar:

-Darstellung von N-Methylanilinoacrolein aus Propargylalkohol durch Oxidation⁴⁵ und nachfolgende Anlagerung von N-Methylanilin⁴⁶:



Bei Verwendung von N-Methylanilinoacrolein werden der Literatur zufolge in der vinylogen Vilsmeier-Reaktion bessere Ausbeuten erzielt als mit N,N-Dimethylaminoacrolein. Diese Methode führte aber nicht zu befriedigenden Ergebnissen⁴⁷, da die Ausbeuten bei der Darstellung von N-Methylanilinoacrolein zu gering waren um die Kosten effektiv zu reduzieren.

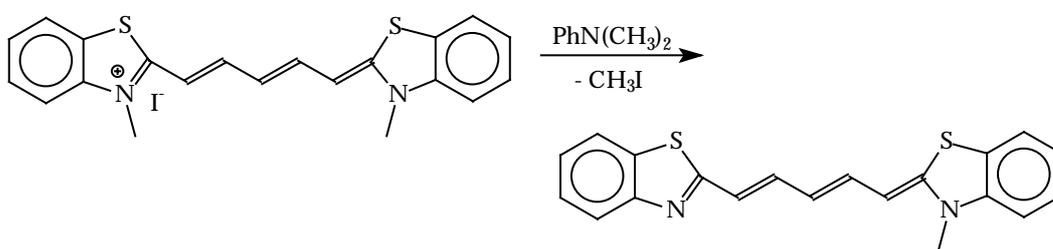
-Kondensation von p-N,N-Dialkylaminobenzaldehyd mit Essigester⁴⁸, Reduktion mit LAH und Oxidation mit Braunstein, Pyridiniumchlorochromat oder mit N-Chlorsuccinimid/Dimethylsulfid^[49,50].



Zwar sind analoge Reaktionen beschrieben, nur nicht für die Darstellung von länger-kettigen Dialkylamino-Verbindungen. Dieser Substituent verschlechtert aber so gut wie immer die Ausbeuten und erschwert die Reinigung der Produkte.

Dagegen wurde hier intensiv untersucht, wie evtl. die Aldol-Route auch zur Darstellung der Farbstoffbasen genutzt werden kann. Offensichtlich müßte dazu ein Picolinium-Salz eingesetzt werden, dessen Substituent am Stickstoff nach der Kupplung wieder entfernt werden kann⁵¹. Dazu sind mehrere Methoden beschrieben. So schreibt Brooker⁵², daß die sonst nicht zugänglichen Farbstoffbasen der Cyanine durch Dequarternisierung erhalten werden können.

Dazu wird zum Beispiel ein Pentamethinthiocyaniniodid in siedendem Dimethylanilin erhitzt:



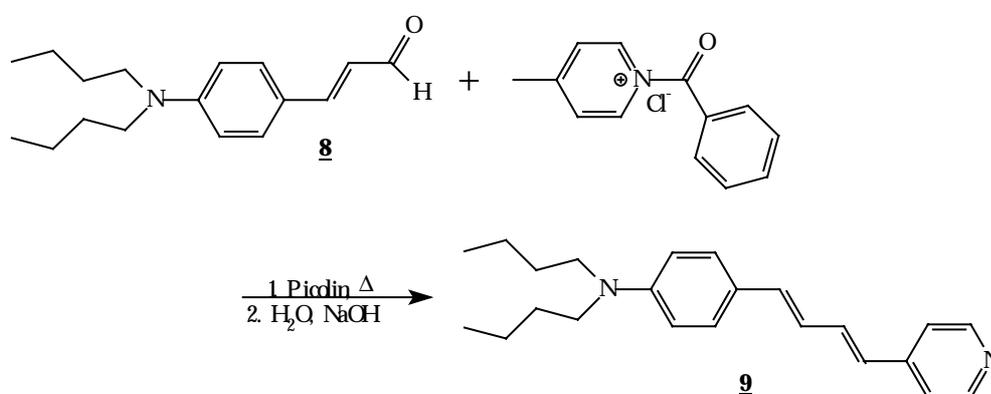
Es wurde daher hier versucht, diese Methode auf einen Styrylpyridinium-Farbstoff anzuwenden, jedoch ohne Erfolg. Die strengen Reaktionsbedingungen führen in jedem Fall zur Zersetzung des Eduktes und wahrscheinlich auch des Produktes. Nur in Ausnahmefällen konnten minimale Mengen isoliert werden.

Eine Alternative zur Quarternisierung/Dequarternisierung ist es, das 4-Picolin vor der Aldolkupplung nicht regelrecht zu quarternisieren, sondern mit einer Lewis-Säure zu komplexieren. Nach der Aldol-Kupplung kann dann die Lewis-Säure durch alkalische wässrige Aufarbeitung leicht entfernt werden. Eine solche Methode beschreibt z. B. Vasilev⁵³: 4-Picolin wird mit Bortrifluorid komplexiert und anschließend in Acetanhydrid mit dem entsprechenden Benzaldehyd kondensiert. Die alkalische Aufarbeitung ergibt dann das Styrylpyridin in guten Ausbeuten. Diese Reaktion jedoch auf die Kondensation mit Zimtaldehyden zu übertragen gelang nicht.

Pentimalli⁵⁴ beschreibt die Kondensation von Picolin-N-oxiden mit Benzaldehyden. Das gebildete N-Oxid des entsprechenden Styrylpyridins wird dann mit Eisen reduziert. Auch diese Methode konnte für die vinylogenen Verbindungen nicht genutzt werden.

Eine letzte Methode ist die von Kost⁵⁵ et al. beschriebene Kondensation von aromatischen Aldehyden mit Addukten aus Picolin und einem Säurechlorid. Die Reaktion wird dort in siedendem Pyridin durchgeführt und führt zu Ausbeuten zwischen 50 und 80%.

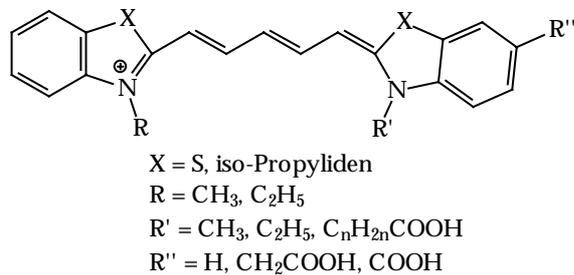
Die Methode von Kost wurde zum Ausgangspunkt für die Entwicklung einer Synthese von 4-(4-(p-N,N-Di-n-butylaminophenyl-)butadien-1-yl)pyridin genommen. Das Säurechlorid ist in diesem Fall Benzoylchlorid. Als Base, die die Aldol-Kondensation katalysiert, wurde ein Überschuß 4-Picolin genommen.



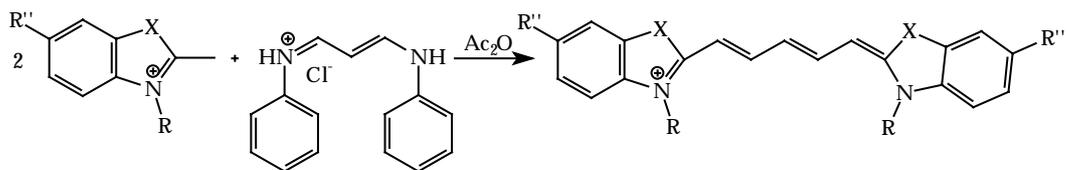
Beim fünfstündigen Erhitzen der Reaktionsmischung auf 155°C wird auch unter Stickstoffatmosphäre viel Teer gebildet, der durch Chromatographie entfernt werden muß. Die Ausbeute ist trotzdem schlecht. Da eine alternative Synthese aber nicht zur Verfügung steht, muß man sich mit dieser behelfen. Größere Produktmengen als ca. 1g pro Ansatz sind sinnvollerweise nicht zu erhalten, da der einzusetzende Zimtaldehyd kostspielig darzustellen ist.

3.2.4. Cyaninfarbstoffe

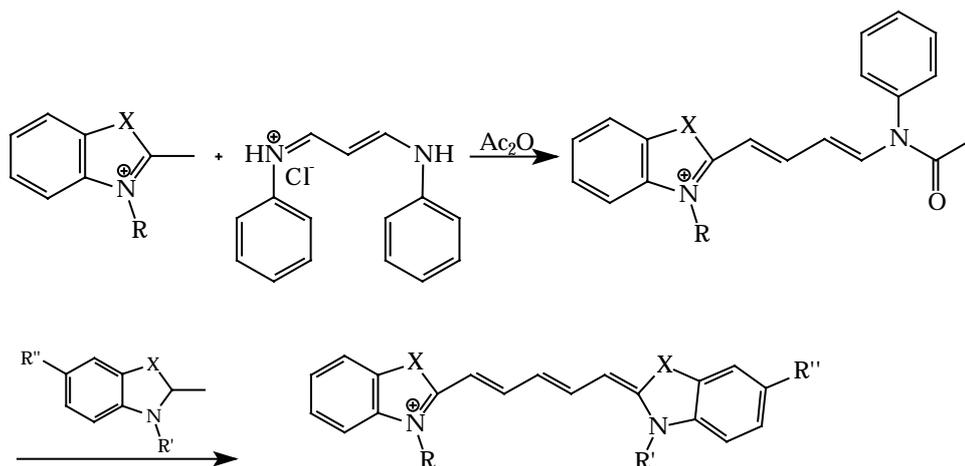
Für die Darstellung von Cyaninfarbstoffen, genauer von Thia- bzw. Indodicarbocyaninen, stehen bereits alte Synthesevorschriften zur Verfügung. Sie sind üblicherweise auf die Darstellung



symmetrischer Farbstoffe ausgelegt, so daß die quartären Heterocyclen nur mit einem C_3 -Baustein wie Malonaldehydbisphenyliminhydrochlorid oder Triethoxypropen umgesetzt werden müssen. Offensichtlich stellt sich aber hier das Problem, daß man auf diese Weise nur eine und dieselbe Endgruppe einsetzen kann. Der Farbstoff enthält dann entweder keine oder zwei funktionelle Gruppen R' bzw. R'' .



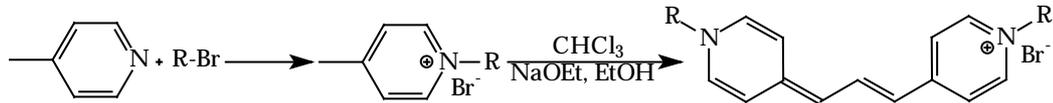
Um unsymmetrische Farbstoffe zu erhalten, muß die normalerweise einstufige Reaktion in zwei Stufen geführt werden:



Zuerst wird die eine Endgruppe mit dem C_3 -Baustein zu einem Zwischenprodukt umgesetzt, das isoliert wird. Danach wird dieses Zwischenprodukt mit der anderen Endgruppe zum Cyanin-Farbstoff umgesetzt.

3.2.5. Sonstige Chromophore

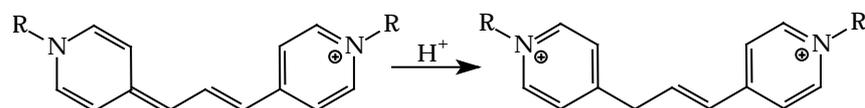
Ein weiterer Chromophor, der aufgrund seiner Struktur und Absorptionslage als für den Einsatz als Akzeptor in einem bichromophoren System geeignet scheint, ist das in der folgenden Weise zugängliche symmetrische Cyanin:



Es zeichnet sich durch seine einfache und schnelle Darstellung^[56,57,58] aus Standardreagenzien wie 4-Picolin und beliebigen Alkylierungsmitteln aus. Funktionelle Gruppen an den als R gekennzeichneten Substituenten müssen allerdings den Reaktionsbedingungen standhalten.

Die Struktur dieses Farbstoffs läßt eine eindeutige Zuordnung zu der Gruppe der Tri- bzw. Pentamethincyanine nicht zu. Es nimmt eine Zwischenstellung ein, was auch sein Absorptionsmaximum bei 608 nm (gemessen in Ethanol) demonstriert. Die Bande ist typisch cyaninartig, d. h. scharf und intensiv mit einer Schulter auf der kurzwelligen Seite. Die spektrale Überlappung mit der Fluoreszenzbande eines Styrylpyridinium-Farbstoffs ist also ausreichend gegeben.

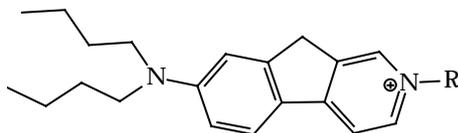
Was sich jedoch sofort als nachteilig bemerkbar macht ist die Unbeständigkeit des Chromophors gegenüber Wasser. Während der einfachste Vertreter (mit R = CH₃) nicht wasserlöslich ist, sind gut wasserlösliche Derivate mit Carboxyalkylgruppen bzw. deren Salzen schon nach kurzem Stehenlassen in Wasser entfärbt. Spuren von Säure in der wässrigen Lösung beschleunigen die Entfärbung deutlich, was als Mechanismus den folgenden Reaktionsverlauf nahelegt:



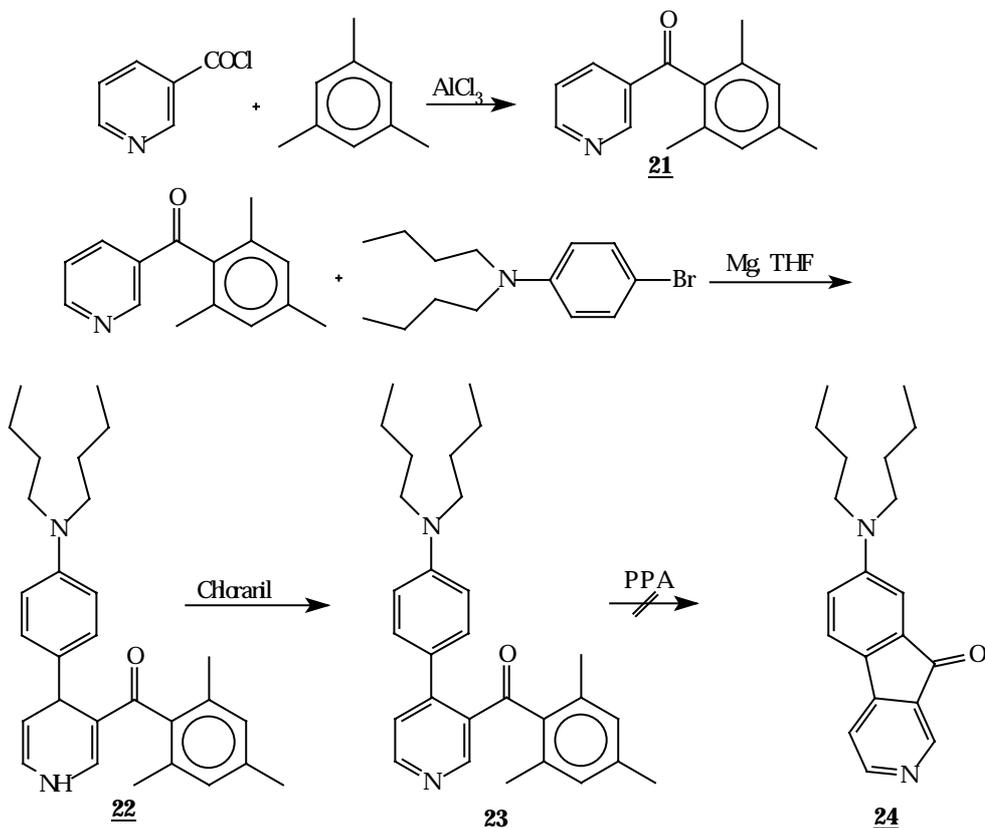
Hierdurch geht das delokalisierte π -System zugunsten zweier ungestörter Aromaten verloren, und damit auch die kräftige blaue Farbe. Obwohl zu erwarten wäre, daß sich ein Protolysegleichgewicht einstellt, verläuft die Protonierung irreversibel.

Da das Anwendungsmedium für die angestrebten Bichromophore wässrig ist, scheidet der Einsatz dieses Chromophors aus.

Nicht gelungen ist indessen die Synthese des folgenden planarisierten Azafluoren-Farbstoffs:



Er sollte zugänglich sein durch Quarternisierung der durch Reduktion der Vorstufe, d. h. des 2-Azafluorens **24**, darstellbaren Base⁵⁹. Leider scheitert die Synthese an eben diesem Keton. Die folgende Reaktionssequenz zeigt, wie weit diese theoretisch achtstufige Synthese im experimentellen Teil beschrieben wird:

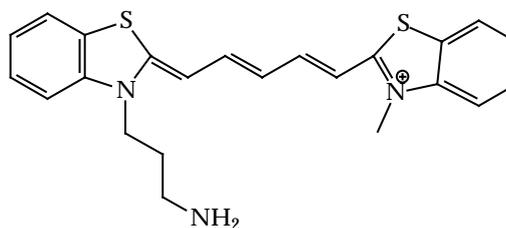


Da die Cyclisierung mit Polyphosphorsäure auf keine Weise erreicht werden konnte mußte das Projekt auf der vorletzten Stufe aufgegeben werden.

3.3. Funktionelle Gruppen

Ein wesentlicher Teil der hier geleisteten synthetischen Arbeit besteht in der Funktionalisierung von bereits bekannten Chromophoren. Zu den eingeführten funktionellen Gruppen gehören u. a. die Carboxylgruppe und die Aminogruppe. Dabei ist es allgemein nicht sinnvoll zu versuchen, in einen bereits bestehenden Chromophor eine funktionelle Gruppe einzuführen. Diese sollte schon auf der Stufe einer frühen Ausgangsverbindung vorhanden sein, da Chromophore Reaktionen zur Einführung von funktionellen Gruppen oft nicht überstehen. Allerdings hat sich gezeigt, daß die Annahme, eine bestimmte funktionelle Gruppe werde auch als Teil eines beliebigen Farbstoffmoleküls mit dessen besonderen Eigenschaften wie (oft) geringer Löslichkeit, ausgedehntem π -System u. a. die für sie typischen Reaktionen zeigen, sich oft nicht bewahrheitet. So ist es klar, daß die Aminogruppe als Teil eines aromatischen Systems nicht die gleiche Basizität besitzt wie bei einem aliphatischen Amin. Reaktionen, die eine gewisse Basizität des beteiligtenamins erfordern, können daher oft nicht mit Anilin oder dessen Derivaten durchgeführt werden. Dagegen sollte eine Aminogruppe, die zwar an ein größeres π -System gebunden ist, ohne aber mit ihrem freien Elektronenpaar daran beteiligt zu sein, eine primären aliphatischen Aminen vergleichbare Reaktivität besitzen. Dies ist jedoch oft nicht der Fall, wie das folgende Beispiel zeigt:

Das N-Methyl-N'-(3-aminopropyl-)thiadicyanin kann mit reaktiven Gruppen, die auf Amine spezifisch sind, nicht zur Reaktion gebracht werden. Reaktivgruppen, die hierfür eingesetzt worden sind, werden nachfolgend beschrieben.

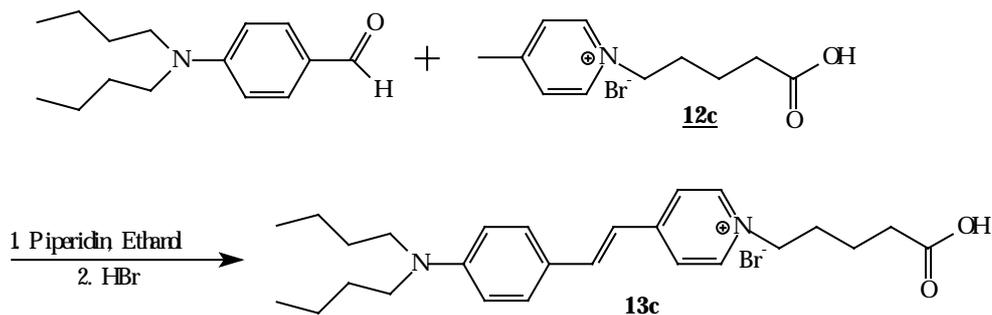


3.3.1. Farbstoffe mit Carbonsäuregruppen

3.3.1.1. Styrylpyridinium

Für die Einführung einer Carbonsäuregruppe in einen Styrylpyridinium-Farbstoff ist es am zweckmäßigsten, diese in Form einer ω -Bromalkansäure einzuführen. Dies kann einmal in der Weise geschehen, daß das Styrylpyridin mit der Säure quarternisiert wird, oder so, daß zunächst 4-Picolin quarternisiert und dann eine Aldol-Kondensation mit dem entsprechenden Aldehyd durchgeführt wird. Die zweite Methode ist offensichtlich einfacher und liefert bessere Ausbeuten.

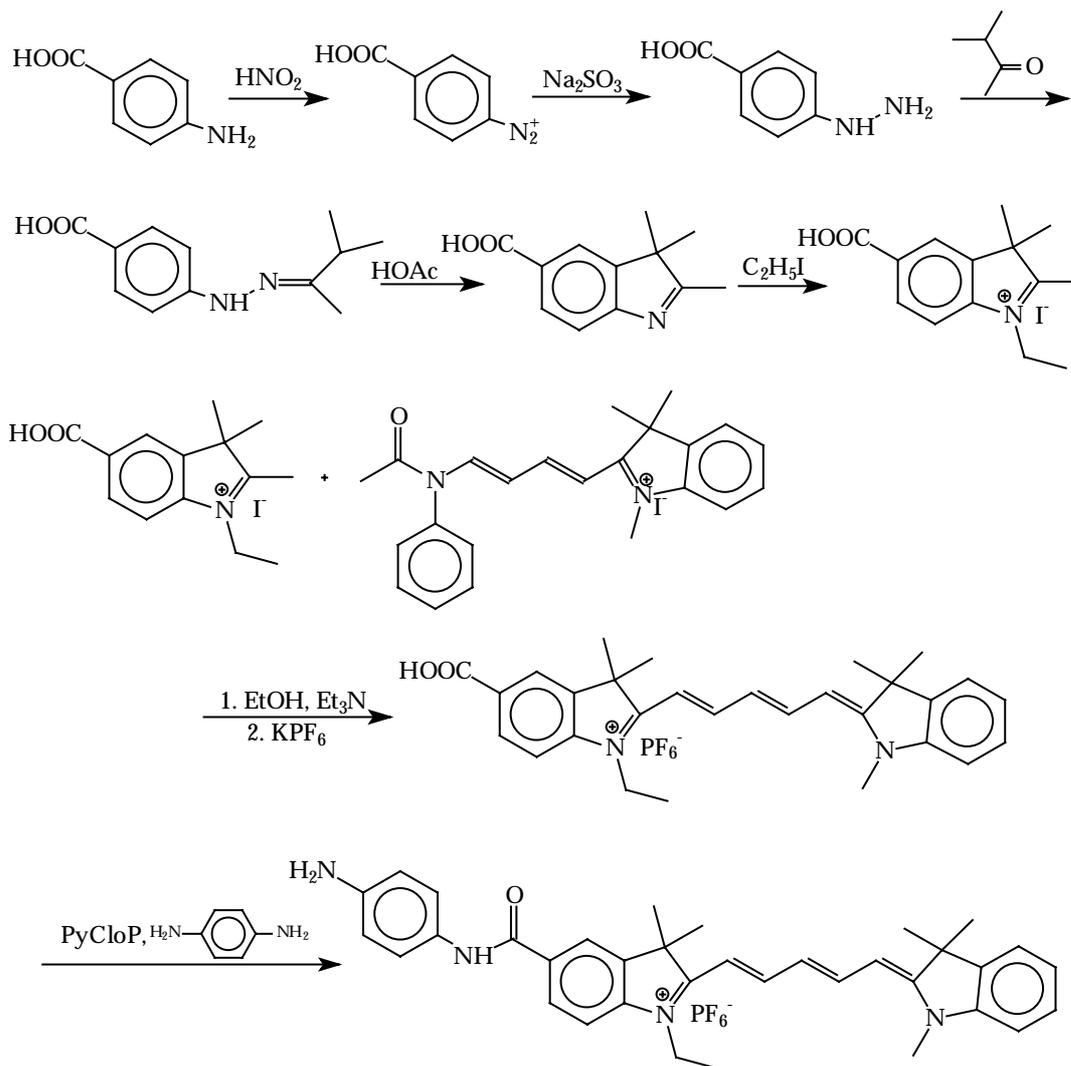
Nach erfolgter Aldol-Kupplung liegt die Farbstoff-Säure als Piperidiniumsalz vor. Aus ihm wird erst durch Zugabe von Essigsäure im Überschuß die Säure **13c** freigesetzt. Danach wird sie aus der alkoholischen Lösung durch Zugabe von Wasser ausgefällt.



3.3.1.2. Cyanine

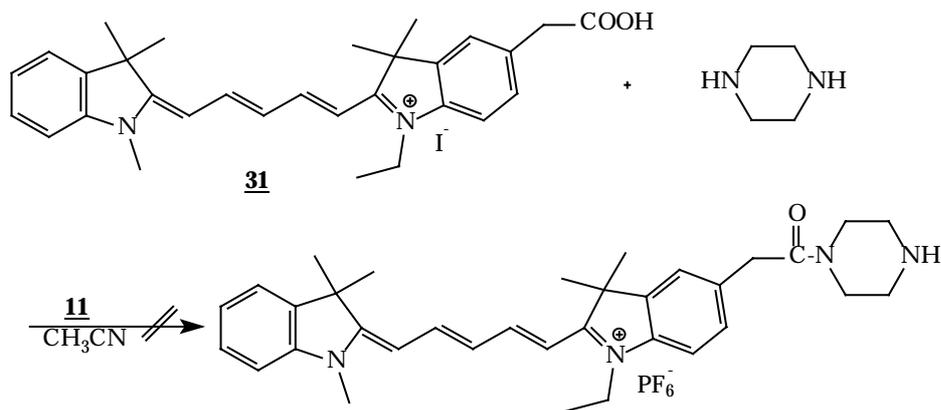
Cyaninfarbstoffe mit Säuregruppen können auf mehrere Weise dargestellt werden. Allen gemeinsam ist, daß für die Darstellung eines unsymmetrischen Cyanins zunächst eine Vorstufe hergestellt wird, wie oben bereits dargestellt.

Für die Einführung der Säuregruppe in ein Pentamethincyanin können Prinzipiell zwei Möglichkeiten angewendet werden: zum einen die Quarternisierung einer der Endgruppen mit einer Bromcarbonsäure analog zu der oben beschriebenen Darstellung der Styrylpyridinium-Farbstoffe, zum anderen die Einführung einer Carbonsäuregruppe am aromatischen Ring der Endgruppe. Im letzteren Fall kann in der Regel kein käuflicher Heterocyclus (hier also Trimethylindolenin bzw. 2-Methylbenzothiazol) verwendet werden. Vielmehr muß der funktionalisierte Heterocyclus erst aus einfachen Vorstufen aufgebaut werden. Er kann die funktionelle Gruppe direkt am Benzenkern haben (also als Derivat der Benzoesäure) oder es wird von einem Derivat der Phenyllessigsäure ausgegangen. Im ersteren Fall wird p-Aminobenzoesäure diazotiert und das erhaltene Diazoniumsalz mit Natriumsulfit reduziert. Das erhaltene Hydrazin wird dann mit Methyl-iso-propylketon zu dessen Hydrazone umgesetzt, das anschließend in Eisessig (analog zur Fischerschen Indolsynthese) cyclisiert wird. Nach Quarternisierung des Indolenins kann entweder mit Malonaldehydbisphenyliminhydrochlorid zum symmetrischen Cyanin oder mit einem entsprechenden Salz zu einem unsymmetrischen Cyanin umgesetzt werden. Aus dieser Carbonsäure und p-Phenylendiamin wird dann mit Hilfe des Aktivierungsreagenzes **11** das Amid hergestellt, das noch eine freie Aminogruppe trägt. Auf der folgenden Seite wird der Reaktionsweg dargestellt:

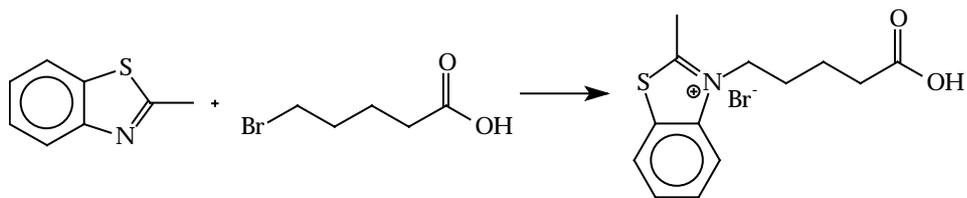


Das entsprechende Derivat der käuflichen p-Aminophenyllessigsäure kann entsprechend diesem Syntheseweg ebenfalls dargestellt werden. Nach der Diazotierung und Reduktion des Diazoniumsalzes (in diesem Fall mit Zinn(II)chlorid) zum Hydrazin erfolgt die Indol-Synthese nach Fischer, indem das Carboxymethylphenylhydrazin mit 3-Methyl-2-butanon kondensiert wird. Das gebildete Derivat des 2,3,3-Trimethylindolenins wird dann mit Ethyliodid quarternisiert. Darauf folgt die Kondensation des Produktes mit dem bereits erwähnten Zwischenprodukt zum funktionalisierten Cyanin.

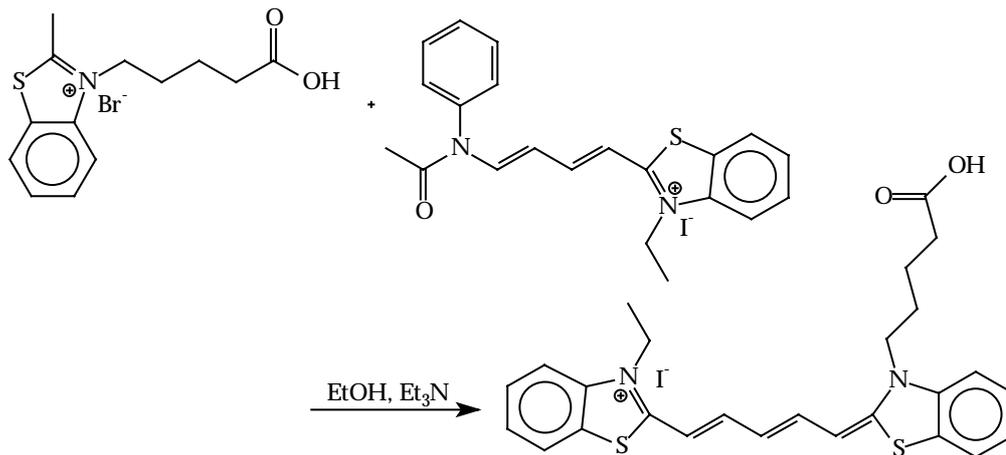
Das folgende Reaktionsschema zeigt als letzten Schritt die Umsetzung dieses Cyanins mit Piperazin und **11**. Der Versuch dieser Umsetzung führt aber bei diesem wie bei anderen Cyaninen zu dessen Zersetzung durch das Piperazin. Während sich eine Base dieser Stärke also für Styrylpyridine sehr gut eignet, ist sie für den Cyanin-Teil eines Bichromophors nicht einsetzbar.



Ein anderes funktionalisiertes Cyanin konnte auf der Basis von 2-Methylbenzothiazol dargestellt werden. Es verfügt über eine Carbonsäuregruppe in einer Seitenkette am Cyanin-Stickstoff. Seine Darstellung erfolgt analog zu der der entsprechenden Styrylfarbstoffe.



Dazu wird zunächst 2-Methylbenzothiazol mit einer ω -Bromcarbonsäure quarternisiert. Das Produkt dieser ersten Stufe wird dann mit dem Zwischenprodukt aus 2-Methylbenzothiazolethyljodid und Malonaldehydbisphenyliminhydro-chlorid in Ethanol zur Reaktion gebracht. Als Produkt konnte das unsymmetrische N-Ethyl-N'-carboxybutylthiadicarbocyanin erhalten werden:

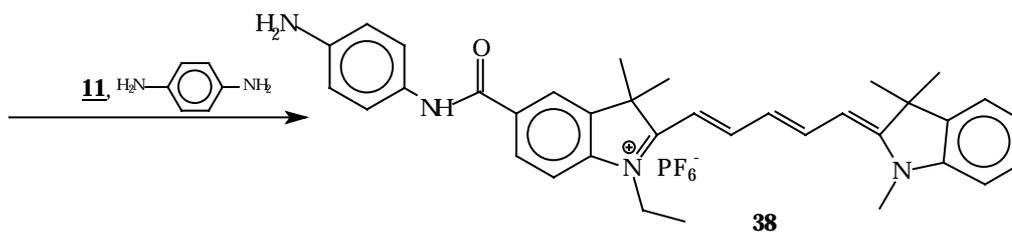


Bei Umsetzung dieser Carbonsäure mit dem Aktivierungsreagenz **11** zeigt sich bei DC-Kontrolle zwar eine Veränderung des Eduktes, ein Produkt in Form eines Amids konnte jedoch bisher nicht isoliert werden. Auch DCC zeigt eine Reaktion mit dieser Säure, Versuche zur Kupplung mit Aminen führten jedoch zur Zersetzung des Cyanins.

3.3.2. Farbstoffe mit Aminogruppen

Ein Cyaninfarbstoff mit Aminogruppe in der Seitenkette wurde bereits am Anfang dieses Abschnitts erwähnt. Er wurde aus dem Phthalimid dieser Verbindung dargestellt⁶⁰. Dabei wird die heterocyclische Endgruppe mit N-(3-Brompropyl-)phthalimid quarternisiert. Nach der gewöhnlichen Cyaninsynthese (s.o.) wird das Imid mit Salzsäure hydrolysiert. Leider ist die Hydrolyse nicht trivial, und die Isolierung des Endproduktes ist nicht gesichert. Jedenfalls zeigt es keine für Amine typischen Reaktionen.

Einfacher lassen sich Cyanine und Styrylpyridiniumfarbstoffe mit Aminogruppen darstellen, indem man zunächst die Carbonsäuren darstellt, diese dann in die Amide von Diaminen umwandelt und so eine freie Aminogruppe im Molekül erhält.



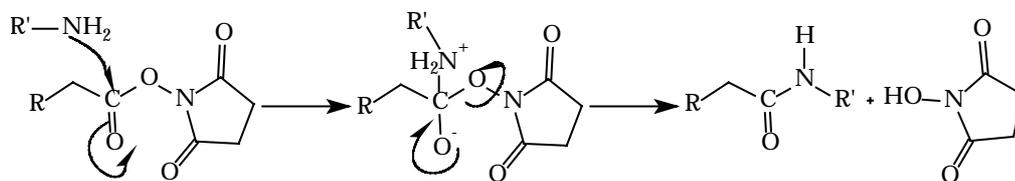
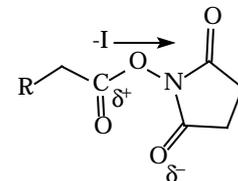
Ein anderes Diamin, mit dem dies möglich ist, ist Piperazin, jedoch ist seine Basizität zu groß, als daß es für Cyanine geeignet wäre. Sie überstehen den Angriff nicht. Nur die Styrylpyridiniumfarbstoffe gestatten die glatte Umsetzung mit Piperazin.

3.3.3. Reaktivgruppen

3.3.3.1. Zur Funktion der NHS-Ester-Reaktivgruppe

Diese Reaktivgruppe ist bekannt und wurde der Peptidchemie entlehnt, wo speziell Reaktivgruppen für bestimmte Substrate von Interesse sind, die unter physiologischen Bedingungen eingesetzt werden können. Sie kann entweder im schon bestehenden Farbstoffmolekül eingeführt werden, wie es für Pentamethincyanine beschrieben wurde⁶¹, oder aber ein einfacher Baustein mit NHS-Estergruppe wird zunächst synthetisiert und mit seiner Hilfe dann ein Farbstoff hergestellt.

Die Reaktivität der NHS-Estergruppe gegenüber Lewis-Basen beruht offensichtlich auf der stark elektronenziehenden Wirkung des Succinimid-Teils, der das Carbonyl-C-Atom leicht nucleophil angreifbar macht. Andererseits ist das Produkt, das mit einem primären oder sekundären Amin gebildet wird, also das entsprechende Amid, deutlich stabiler als die NHS-Estergruppe selbst.



Indessen reicht die Lewis-Basizität von Alkoholen oder Wasser im Allgemeinen nicht aus, um mit dieser Reaktivgruppe merklich zu reagieren, d. h. die Reaktionsgeschwindigkeit ist hier viel kleiner (ca. eintausendmal). Trotzdem tritt merkliche Zersetzung durch Luftfeuchtigkeit ein, wenn NHS-Ester für längere Zeit ohne Ausschluß von Feuchtigkeit gelagert werden. Wenn ein ω -Bromcarbonsäure-NHS-Ester längere Zeit gelagert wurde, so stimmt oft der

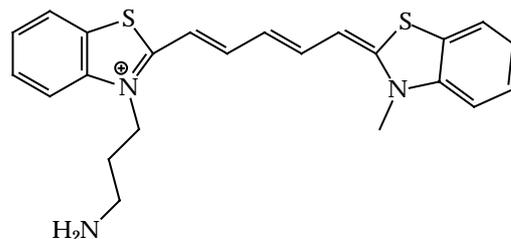
Schmelzpunkt nicht mehr mit dem Ausgangswert überein und es tritt merklich der Geruch der freien Säure hervor. In solchen Fällen kann die Reinigung sehr leicht entsprechend der Vorschrift für die Darstellung erfolgen: man löst die Substanz in abs. Ethylacetat, filtriert von nicht Gelöstem ab und dampft die Lösung im Vakuum wieder ein. Das erhaltene Öl nimmt man mit der entsprechenden Menge abs. Ethanol auf und läßt im Kühlschrank auskristallisieren. Nach Abfiltrieren und Trocknen ist die ursprüngliche Reinheit wieder gegeben.

Die Stabilität des aktivierten Komplexes bei der Reaktion von NHS-Estern mit nukleophilen ist offensichtlich abhängig von der Lewis-Basizität des angreifenden Nucleophils. Sie ist nur bei Aminen und Alkoxiden bzw. dem Hydroxid-Anion groß genug. Außerdem muß für die Vervollständigung der Reaktion am Nucleophil ein Wasserstoffatom vorhanden sein. Aus diesen Gründen reagieren Amide oder tertiäre Amine ebensowenig wie Wasser oder Alkohole. Zu beachten ist aber, daß z. B. Dimethylformamid, das bei Quarternisierungsreaktionen ein häufig angewendetes Lösungsmittel ist, stets geringe Mengen an Dimethylamin enthält, mit dem der NHS-Ester leicht reagiert.

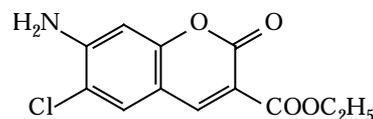
Die Amidbildung ist zudem in folgender Weise von der Struktur der an die Reaktivgruppe bzw. an die Aminogruppe gebundenen Reste abhängig:

- längere Alkylketten erhöhen durch ihren +I-Effekt die Reaktivität des Amins, senken andererseits aber die nukleophile Angreifbarkeit der Reaktivgruppe geringfügig ab.
- elektronenziehende Gruppen am Alkylrest (insbesondere wenn dieser ein Substituent an einem quartären Stickstoffatom ist!) erhöhen die Reaktivität der NHS-Ester, senken aber diejenige des Amins.

Der erste Punkt kommt vor allem bei den hier dargestellten länger-kettigen NHS-Estern neben evtl. sterischen Effekten zum Tragen, der zweite führt wahrscheinlich zu der geringen Reaktivität eines in der Seitenkette aminosubstituierten Cyanin-Farbstoffs gegenüber NHS-Estern.

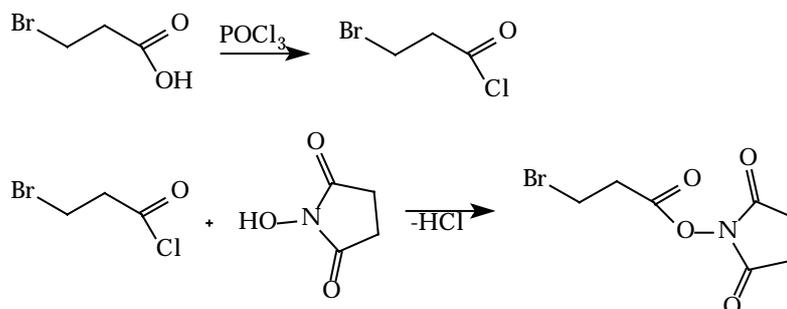


Ein anderer Amino-substituierter Farbstoff, der in dieser Weise nicht reagiert, ist das nebenstehende Coumarin-Derivat⁶². Auch hier leuchtet sofort ein, daß die Elektronenarmut des Amin-Stickstoffs eine basische Reaktion nicht erlaubt.

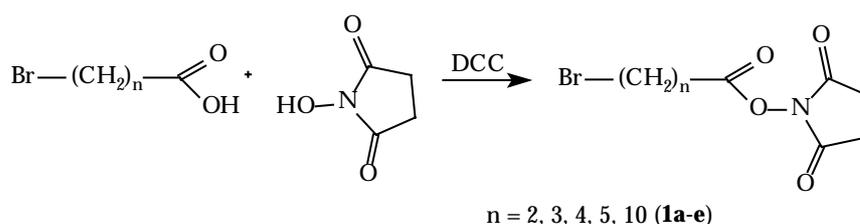


3.3.3.2. Darstellung aus aliphatischen ω -Bromcarbonsäuren

Die andere Alternative ist z. B. mit einem Baustein wie dem NHS-Ester der 3-Brompropionsäure oder einer anderen aliphatischen ω -Bromcarbonsäure möglich. Seine zweistufige Synthese aus 3-Brompropionylchlorid und N-Hydroxysuccinimid nach Vorschriften von Hamilton⁶³ und Pollak⁶⁴ ist unbefriedigend und unnötig aufwendig.

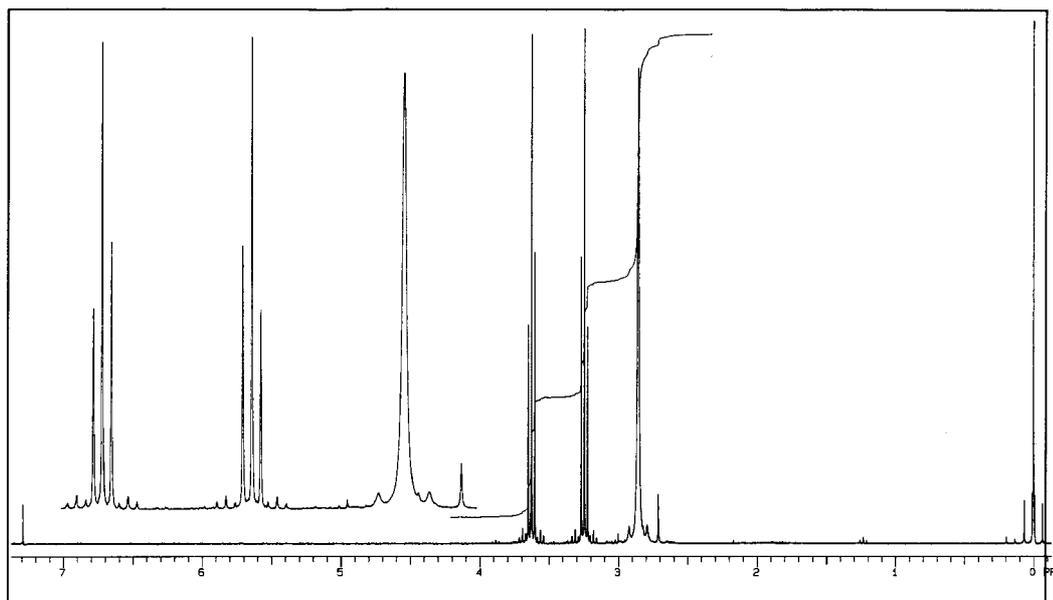
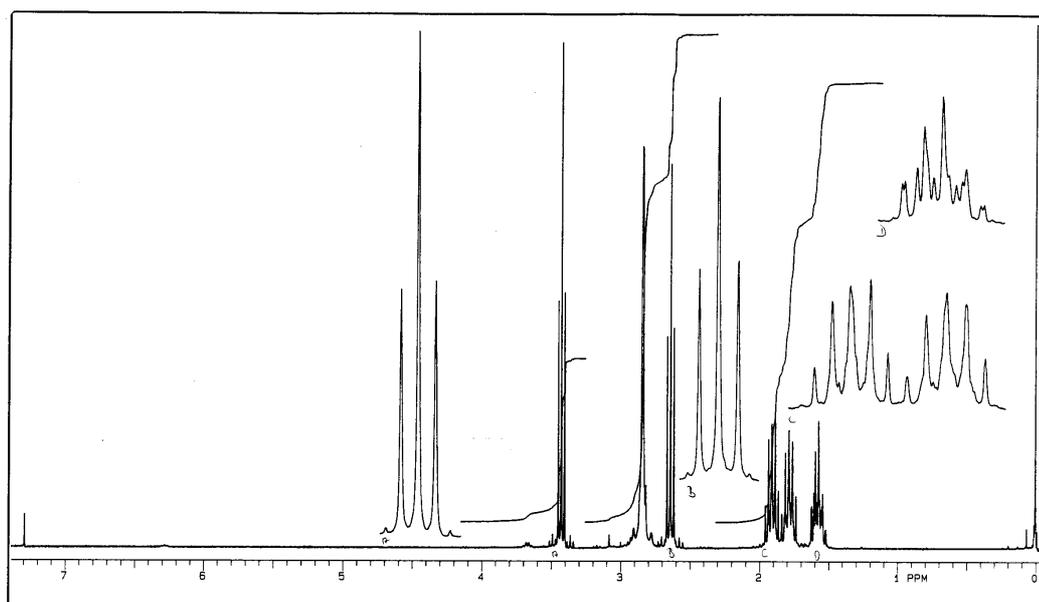


Besser wird sie durch die Veresterung der Carbonsäure mit N-Hydroxysuccinimid mit Hilfe von DCC in Ethylacetat durchgeführt.



Für die Darstellung der länger-kettigen NHS-Ester wurde die Literatur-Vorschrift von Elliott auf längere ω -Bromcarbonsäuren erweitert. Dabei konnten ohne Schwierigkeiten alle erhältlichen Säuren mit guten Ausbeuten um 70% in die entsprechenden NHS-Ester überführt werden. Es handelt sich ausnahmslos um gut kristallisierende, farblose Verbindungen, die unter Feuchtigkeitsausschluß eine Zeit lang haltbar sind.

Für die Charakterisierung konnte nur beim bekannten Derivat der 3-Brompropionsäure auf den Schmelzpunkt zurückgegriffen werden. Alle anderen dargestellten NHS-Ester sind als noch unbeschriebene Verbindungen anzusehen. Ihre Charakterisierung kann mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}_{300}$ -Spektren hinreichend erfolgen. Das Singulett für die vier äquivalenten Protonen des N-Hydroxysuccinimids zeigt eine signifikante Veränderung nur bei der Veresterung. Dagegen haben alle NHS-Ester annähernd die gleiche chemische Verschiebung bezüglich dieser Protonengruppe bei ca. 2.8 ppm. Als Beispielspektren für diese Gruppe von Verbindungen seien hier die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von 1-(3-Brom-1-oxy-propoxy-)pyrrolidin-1,5-dion (3-Brompropionsäure-NHS-Ester), 1-(6-Brom-1-oxy-hexoxy-)pyrrolidin-1,5-dion (6-Bromhexansäure-NHS-Ester) eingefügt (Interpretation im experimentellen Teil). Hingewiesen sei auf die annähernd unveränderliche Lage der genannten Protonengruppe bei 2.86 bzw. 2.84. Die fast konstante chemische Verschiebung läßt evtl. auch auf eine gleichbleibende Reaktivität dieser Gruppe schließen, unabhängig vom restlichen Molekül.

Abb. 4: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von **1a**Abb. 5: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von **1d**

Als weitere Abbildung das Spektrum von Di-4-ASPECA-NHS **7a**, dessen Succinimid-Protonen bei 2.83 ppm liegen:

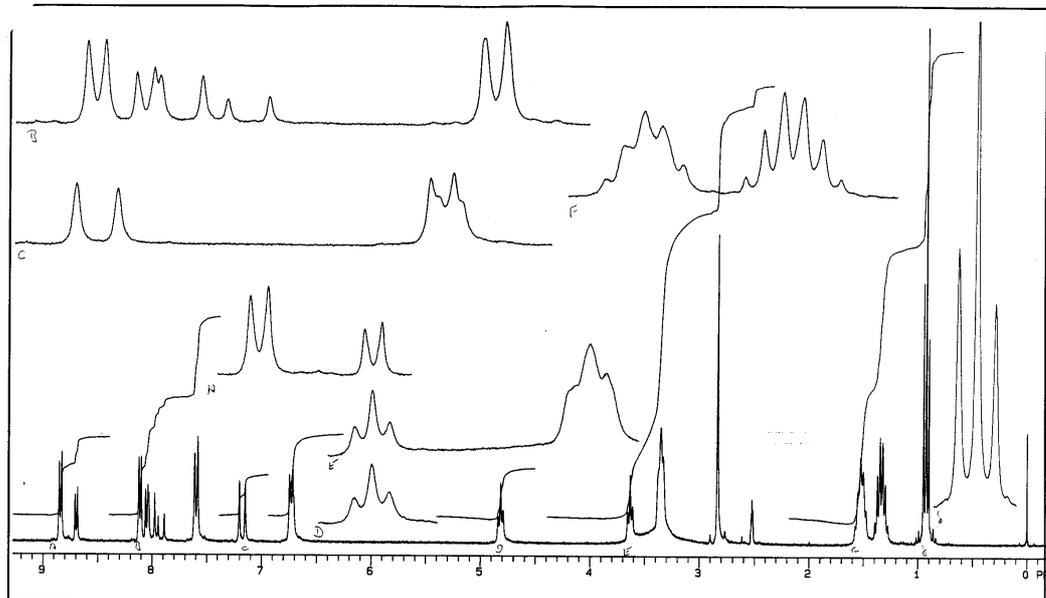
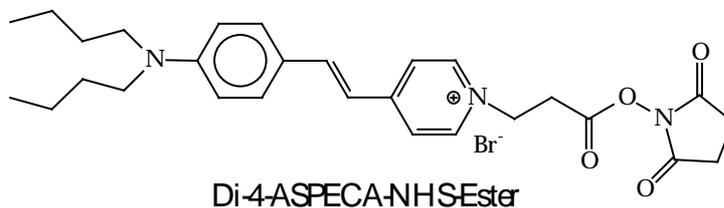


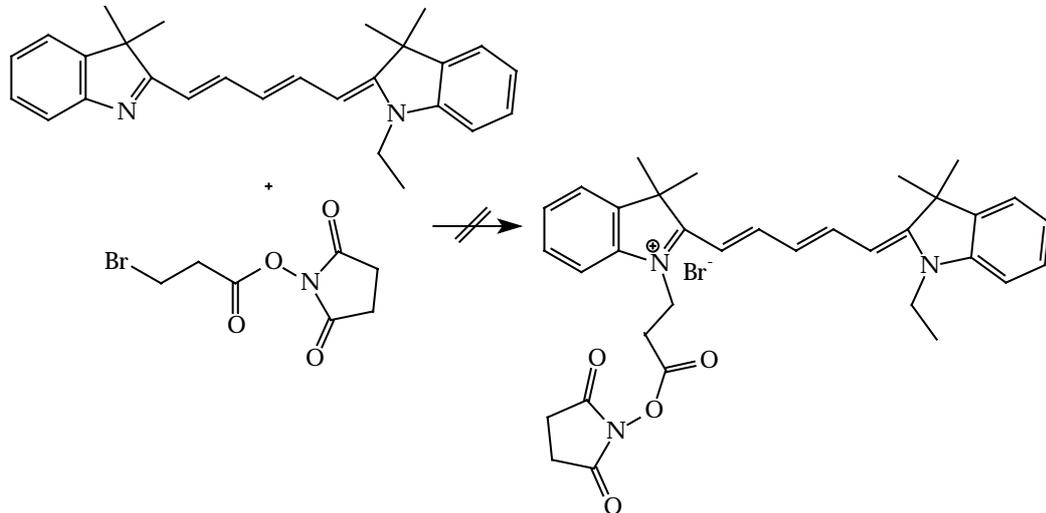
Abb. 6: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{DMSO/TMS})$ von Di-4-ASPECA-NHS-Ester **7a**

Dieser und viele andere Reaktivfarbstoffe können leicht aus den verschiedenen beschriebenen Styrylpyridinen bzw. Aminonaphthylvinylpyridinen und den obigen NHS-Estern dargestellt werden, die als Quarternierungsreagenzien für Farbstoff-Basen



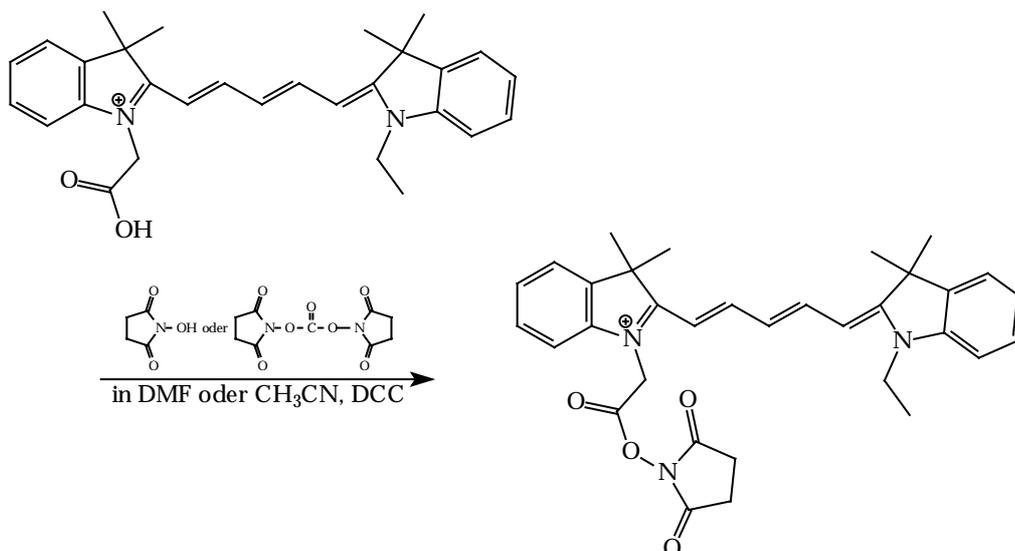
eingesetzt werden können. So erhält man aus p-N,N-Di-n-butylaminostyrylpyridin und 1-(3-Brom-1-oxy-propoxy-)pyrrolidin-1,5-dion leicht und schnell durch Erhitzen der Edukte in Substanz und anschließendes Umkristallisieren den NHS-Ester des Styrylfarbstoffs Di-4-ASPECA.

Die analoge Darstellung eines Cyanin-NHS-Esters scheitert indessen an der schwierigen Darstellbarkeit der Cyanin-Base, obwohl ähnliche Verbindungen beschrieben werden⁶⁵. Andererseits sind solche Verbindungen auch nicht mehr leicht quarternisierbar.



3.3.3.3. Darstellung der NHS-Estergruppe in Farbstoffen mit Carbonsäure-Gruppe

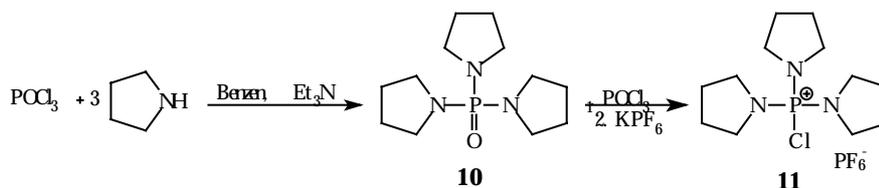
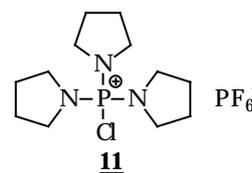
Diese Methode erfordert offensichtlich nur einen beliebigen Farbstoff mit Carbonsäuregruppe (s. o.). Dieser wird dann mit Hilfe von DCC (Dicyclohexylcarbodiimid) und N-Hydroxysuccinimid oder Disuccinimidylcarbonat in DMF oder Acetonitril zum NHS-Ester umgesetzt. Diese Methode konnte für die vorliegenden Farbstoffe allerdings nicht mit gutem Erfolg eingesetzt werden.



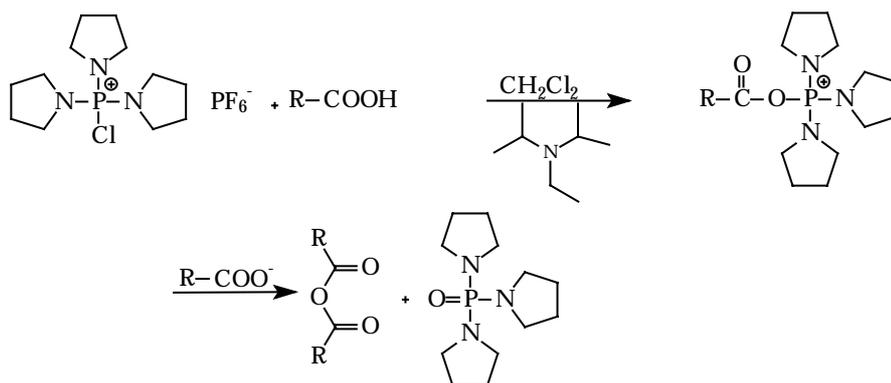
3.3.4. Aktivierungsreagenzien zur Darstellung von Amid aus Carbonsäuren

3.3.4.1. Das Reagenz **11**

Ein anderes Reagenz aus der Peptidchemie, dessen Eignung für die Darstellung von bichromophoren Systemen untersucht wurde, ist Tripyrrolidinochlorphosphoniumhexafluorophosphat **11**⁶⁶. Es entsteht in einer zweistufigen Reaktion, indem Phosphoroxichlorid zunächst mit drei Äquivalenten Pyrrolidin zum Amid umgesetzt wird, das in der zweiten Stufe mit weiterem Phosphoroxichlorid zu **11** reagiert. Zur Isolierung wird dieses aus wässriger Kaliumhexafluorophosphat-Lösung ausgefällt.



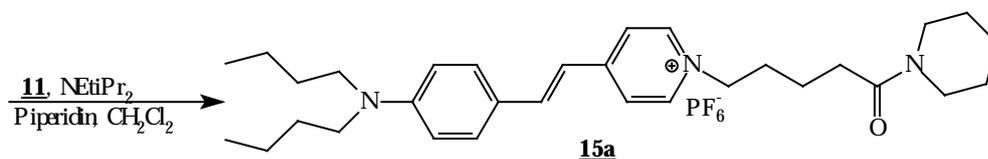
11 hat die Eigenschaft, aus Carbonsäuren unter basischen Bedingungen Anhydride zu machen, die dann leicht mit primären oder sekundären Aminen weiterreagieren.



Setzt man **11** im Überschuß ein, so kann das Amid auch direkt aus dem Acylphosphoniumsalz gebildet werden. Die Bildung des Amids aus dem Anhydrid und einem Amin erfolgt unter sehr milden Bedingungen, und zwar in Dichlormethan, besser noch Acetonitril bei Raumtemperatur.

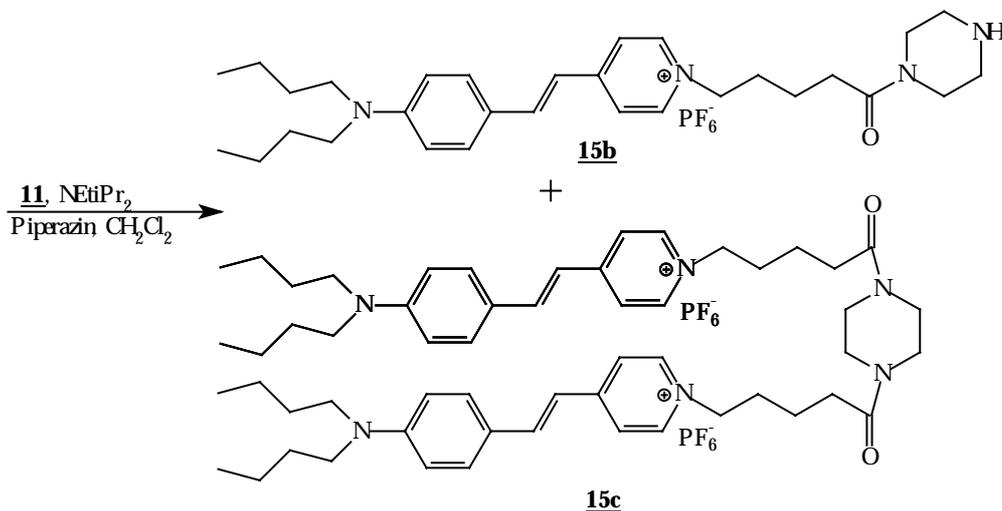
Die Säure wird dazu in Acetonitril gelöst und nach Zugabe von Ethyl-di-isopropylamin und **11** mit dem primären oder sekundären Amin in demselben Lösungsmittel versetzt. Die Verwendung eines absoluten Lösungsmittels ist nicht erforderlich. Danach rührt man über Nacht. Die Reaktion erfolgt allerdings mitunter außerordentlich rasch.

Um diese Reaktion zu testen wurde zunächst Piperidin genommen, weil es eine recht starke Base ist und weil es nur eine reaktive Funktion hat. Aus dem Reaktionsgemisch konnte das Amid **15a** in sehr guter Ausbeute isoliert werden.



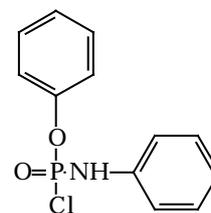
Nachdem diese Reaktion gut funktionierte wurde als nächstes die Säure mit einem bifunktionellen Amin umgesetzt, und zwar mit Piperazin. Dabei zeigt sich, daß in diesem Fall die Reaktion etwas anders geführt werden muß, da sonst hauptsächlich der symmetrische Bichromophor **15c** entsteht. Dazu rührt man zunächst die Mischung aus Farbstoff-Säure **13c** in Methylenchlorid mit Ethyl-di-iso-propylamin und **11** über Nacht.

Die erhaltene Lösung tropft man dann in eine Lösung von überschüssigem Piperazin in Methylchlorid und lässt wieder einen Tag lang rühren. Es entsteht zwar auch so immer etwas Bichromophor **15c**, aber dieser lässt sich leicht durch Umkristallisieren von dem Hauptprodukt **15b** abtrennen.



3.3.4.2. Anilino-chlor-phenoxyphosphinoxid⁶⁷

Ein anderes Phosphorreagenz, Anilino-chlor-phenoxyphosphinoxid, das in der neueren Literatur für die Darstellung von bichromophoren Systemen benutzt worden ist, erwies sich für die hier vorliegenden Farbstoffe nicht als brauchbar. Obwohl für die Verknüpfung von Cyanin-



Carbonsäuren mit Aminoporphyrinen Ausbeuten von 50-75% erhalten wurden, konnte hier keine Umsetzung beobachtet werden.

3.4. Bichromophore

3.4.1. Intermolekularer FRET (Tsien-Gonzalez)

Nach Förster⁶⁸ gilt für die Geschwindigkeitskonstante k des Energietransfers:

$$k_{(D^* \rightarrow A)} = \frac{9000 \ln 10 \cdot K^2 \cdot \Phi_D}{128 \cdot \pi^5 \cdot n^4 \cdot N \cdot \tau_D \cdot R^6} \cdot \int_0^{\infty} F_D(\bar{\nu}) \cdot \epsilon_A(\bar{\nu}) \frac{d\bar{\nu}}{\bar{\nu}^4}$$

Hierin sind:

K: Orientierungsfaktor (er berücksichtigt die gegenseitige Ausrichtung von Donor und Akzeptor); τ_D : natürliche Fluoreszenzlebensdauer des Donors; n : Brechungsindex des Lösungsmittels; N : Avogadro-Konstante; R : räumlicher Abstand von Donor und Akzeptor; F_D : normierte Fluoreszenz des Donors; ϵ_A : molarer dekadischer Absorptionskoeffizient des Akzeptors; $\bar{\nu}$: Wellenzahl; Φ_D : Fluoreszenzquantenausbeute des Donors

Daraus geht hervor, daß die Effizienz des Energietransfers, und damit die Intensität der letztlich zu messenden Fluoreszenz des Akzeptors, in einem konkreten Fall von mehreren Variablen abhängt.

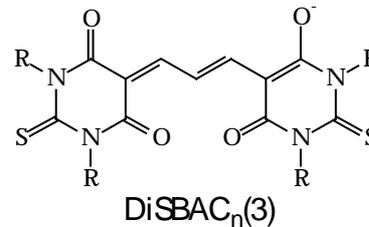
Dies sind:

- der Abstand R der beiden Chromophore
- ihre wechselseitigen Orientierung, was durch den Faktor K ausgedrückt wird
- die (eventuell veränderliche) Fluoreszenzquantenausbeute Φ_D des Donors
- die Lebensdauer τ_D des Donors

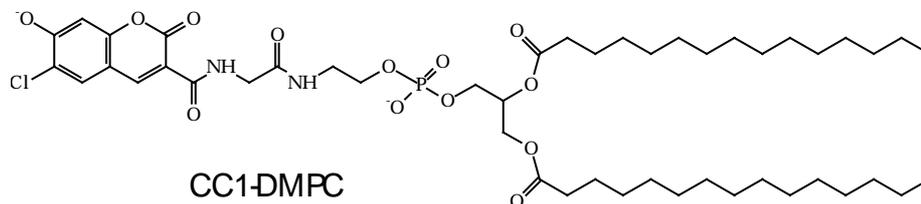
Es wurde bereits weiter oben ausgeführt, daß die Fluoreszenzquantenausbeute und die Lebensdauer der Fluoreszenz eines Styrylfarbstoffs von der Stärke eines elektrischen Feldes abhängen kann. Auch die potentialabhängige Migration vieler Farbstoffe ist beschrieben worden. Damit liegt der Gedanke nahe, daß diese Eigenschaften von potentialsensitiven Fluoreszenzfarbstoffen zu einem Ganzen verknüpft werden könnten. So ist es zwar klar, daß die Umverteilung von

Farbstoffmolekülen in einer Membran recht langsam erfolgt. Demgegenüber zeigt der Abfall der Effizienz des Energietransfers bei Vergrößerung des Abstandes zwischen zwei Partnern eines FRET-Paares bzw. bei entsprechender Änderung der gegenseitigen Orientierung viel schneller meßbare Effekte, denn er erfolgt ja mit der sechsten Potenz dieser Änderung. Der Ansatz ist daher vernünftig, die Abstandsänderung zur Verbesserung der Eigenschaften bestehender Potentialsonden zu nutzen. Indessen ist in den Arbeiten von Tsien und Gonzalez kein *fast-response*-Farbstoff genutzt worden, der auch die günstigen Eigenschaften dieser Farbstoffklasse mit in den FRET-Ansatz einbrächte. Vielmehr ist dort folgende Kombination gewählt worden:

Klassische *slow-response*-Farbstoffe, nämlich Trimethinoxonole vom Typ DiSBAC_n(3), werden aus der äußeren Pufferlösung der Zelle angeboten, auf die sie selbsttätig aufziehen (gemäß ihrem Verteilungskoeffizienten). Ihr Absorptionsmaximum liegt bei ca. 540 nm. Ihr Stoke-Shift ist klein, und die Emission liegt schon bei 560 nm.



Ein Teil der Phospholipidmoleküle, die im Experiment die Zellmembran aufbauen, sind entweder mit Fluorescein oder einem Coumarin-Derivat markiert. Das Produkt aus dem Coumarin-Farbstoff und dem Dimyristoylphosphatidylcholin wird mit dem Arbeitskürzel CC1-DMPC bezeichnet.



Das Absorptionsmaximum des Coumarins, das hier als FRET-Donor aufzufassen ist, befindet sich bei 414 nm. Sein Stoke-Shift ist ebenfalls klein, es emittiert bei ca. 440 nm. Es wird erkennbar, daß die spektrale Überlappung von Donor-Fluoreszenz und Akzeptor-Absorption bei dieser Kombination sehr gering ist. Wenn trotzdem Energietransfer stattfindet, so liegt das nur an den sehr hohen

Fluoreszenzquantenausbeuten beider Chromophore. Insbesondere die des Donors, die in der Förster-Gleichung explizit auftaucht, ist praktisch gleich 1. Damit ist die Effizienz des Energietransfers sehr hoch, und der sogenannte kritische Försterradius (R_0), d. h. derjenige Abstand zwischen Donor und Akzeptor, bei dem diese Effizienz bei 50% liegt, ist mit ca. 50 nm weit größer als die Dicke der Membran.

Die Änderung einer so hohen Effizienz zu verfolgen ist aber sehr schwer. Parameter, die hier noch optimiert werden könnten sind offensichtlich:

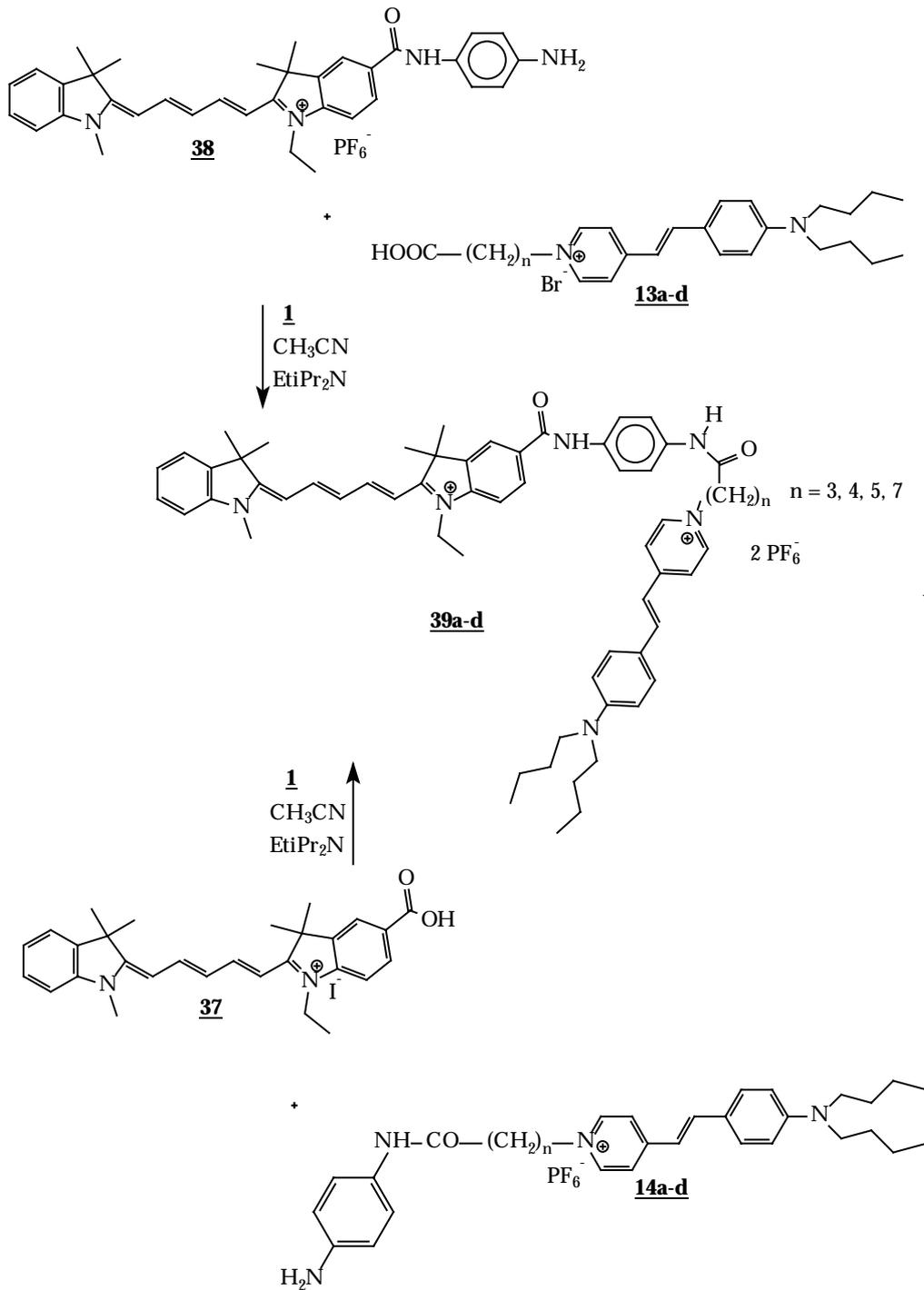
- die Quantenausbeute des Donors (sie sollte weit unter 1 liegen)
- die gegenseitige Orientierung
- der wechselseitige Abstand der Chromophore
- die Geschwindigkeit der potentialabhängigen Reaktion des gesamten Aufbaus

Es dürfte leichter sein, die Orientierung und den Abstand zu kontrollieren, indem die Chromophore kovalent über einen Spacer miteinander Verknüpft werden. Für die Geschwindigkeit und die Quantenausbeute des Donors erscheinen die Styrylfarbstoffe als die geeigneten Kandidaten, denn sie zeigen bei geringer Quantenausbeute die höchste Geschwindigkeit. Einzig die Größe ihrer Potentialabhängigkeit ist immer noch unbefriedigend. Aber dieser Nachteil könnte mit einem kombinierten FRET-Ansatz behoben werden.

3.4.2. Darstellung der Bichromophoren Systeme

Um die in 3.3.4.1. geschilderte Kupplungsreaktion für die Darstellung von Bichromophoren aus einem Styrylpyridinium-Teil und einem Cyanin zu nutzen, geht man am besten von zwei entsprechenden Farbstoffen mit Carbonsäuregruppen aus, die durch ein bifunktionelles Amin verbrückt werden. Dieses kann prinzipiell aliphatisch, alicyclisch oder aromatisch sein. Als konkrete synthetische Bausteine sind also α,ω -Diamine, Piperazin und Phenylendiamin (1,4) zu prüfen gewesen.

Die Darstellung der bichromophoren Systeme aus den wie oben beschrieben funktionalisierten Farbstoffen kann in zweierlei Weise erfolgen: nachdem sowohl Pentamethincyanin als auch Styrylpyridin mit freien Carbonsäure-Gruppen versehen wurden, kann in der vorletzten Stufe entweder das eine oder das andere zum Amid des p-Phenylendiamins mit freier Amino-Gruppe umgesetzt werden. Diese Reaktion, wie auch die letzte Stufe, d. h. die Umsetzung diesesamins mit der freien Farbstoff-Säure zum Bichromophor, erfolgen unter identischen Bedingungen. Die Edukte werden in Acetonitril gelöst oder suspendiert, und das Aktivierungsreagenz **11** besorgt die Kupplung von Amin mit freier Säure. Ob in der letzten Stufe der Styrylpyridinium-Farbstoff oder das Cyanin als freie Säure eingesetzt wird, richtet sich nach der jeweiligen Reaktivität. Erfahrungsgemäß zeigen die Amide **14** aus p-Phenylendiamin und den Styrylpyridinen mit einer Kettenlänge der Säure ab acht C-Atome keine ausreichende Reaktivität mehr gegenüber der Cyanin-Säure **36**. Hier muß daher von dem Amid **38** des Cyanins ausgegangen werden. Die gleiche Vorgehensweise ist auch für die kürzerkettigen Farbstoffsäuren **13a** und **13b** anwendbar, jedoch sind ihre Amide viel leichter darzustellen als das des Cyanins **36**. Deshalb wird bei der Darstellung der Bichromophore **39a-c** von den Amid **14a-c** ausgegangen, während der Bichromophor **39d** aus dem Amid **38** des Cyanins dargestellt wird. Leider ist die Reaktivität weder der Farbstoffsäure **13e** noch die des Amids **14e** mit elf C-Atomen ausreichend, um auf eine dieser beiden Methoden den Bichromophor zu erhalten. Dieser wird darum auch hier nicht beschrieben.



V39

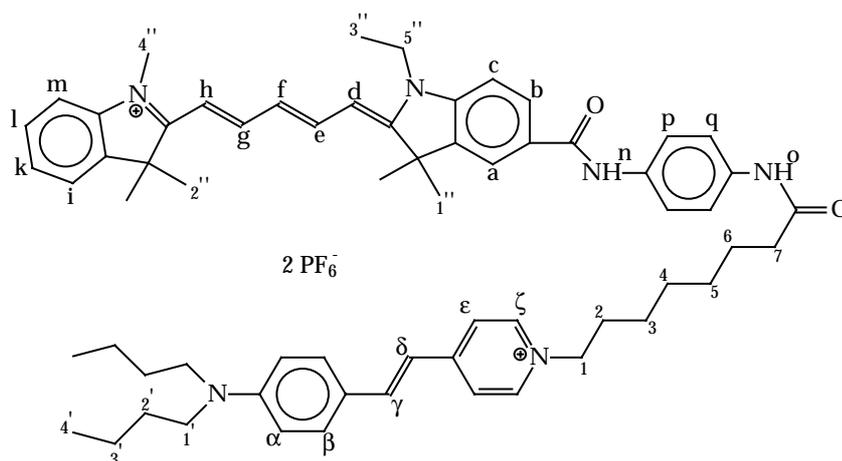
Abb. 7: Alternativen zur Darstellung der Bichromophore **39a-d**

3.4.3. Charakterisierung der Bichromophore 39a-d

Da von den vier hier beschriebenen Bichromophoren trotz ihrer Reinigung mit präparativer Schichtchromatographie noch keine Elementaranalysen erhalten werden konnten, basiert ihre Charakterisierung stark auf den anderen zur Verfügung stehenden analytischen Methoden. Dies sind $^1\text{H-NMR}_{300}$, FAB-Massenspektrometrie, UV- und Fluoreszenzspektroskopie.

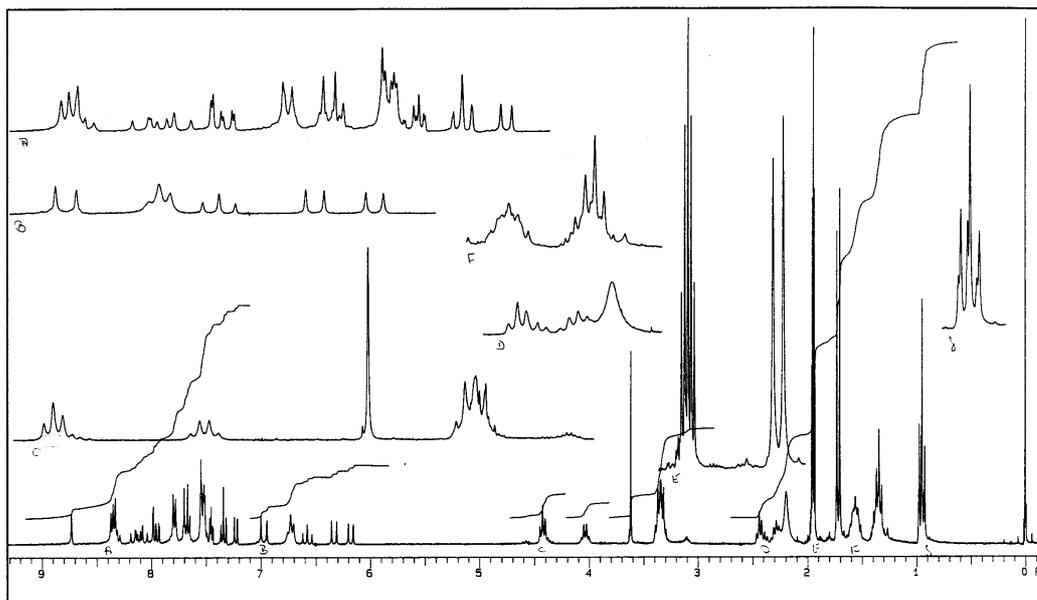
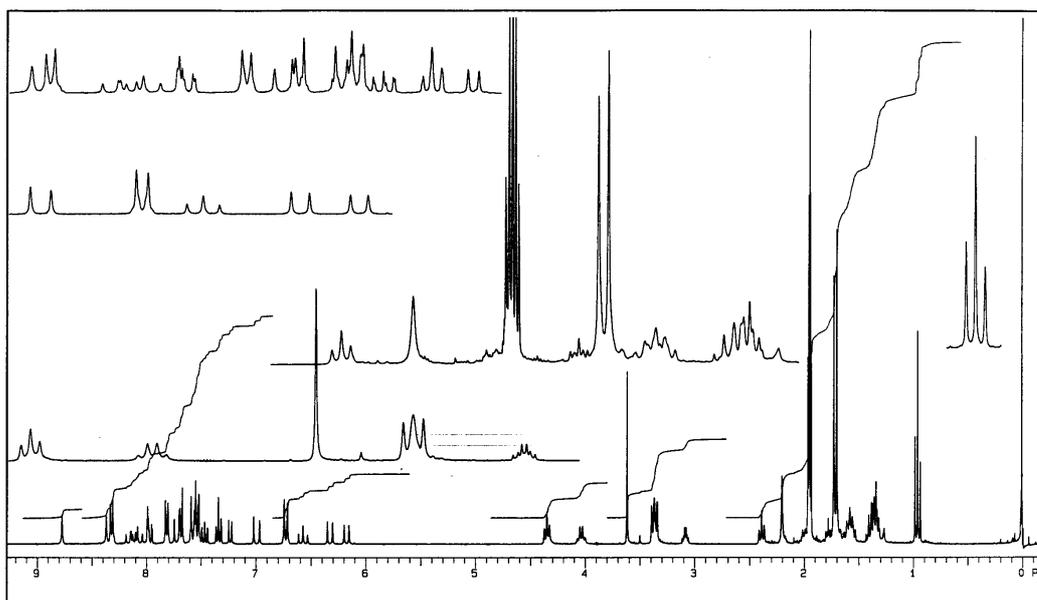
3.4.3.1. $^1\text{H-NMR}_{300}$

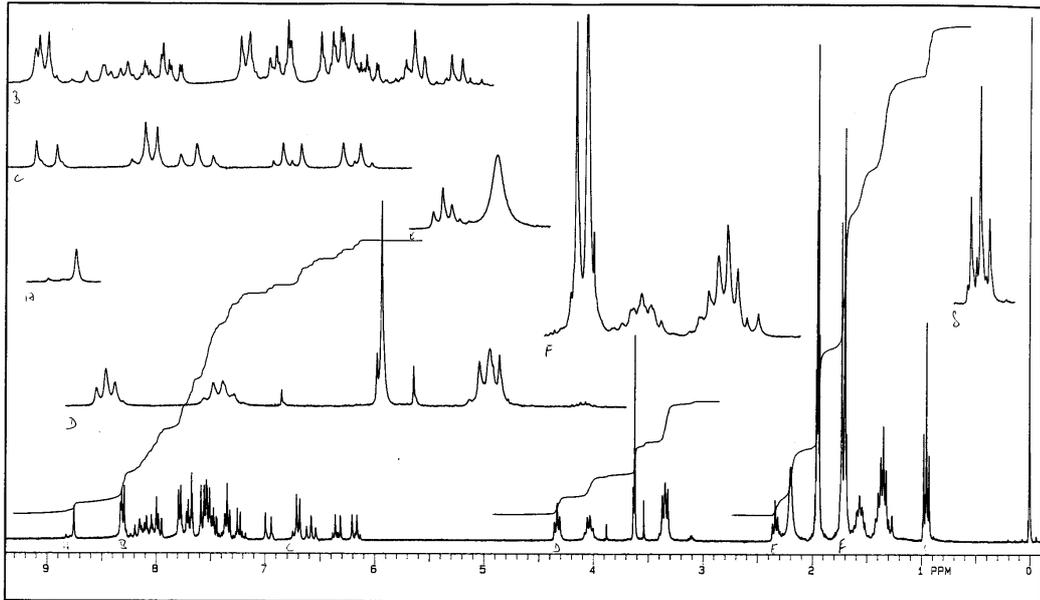
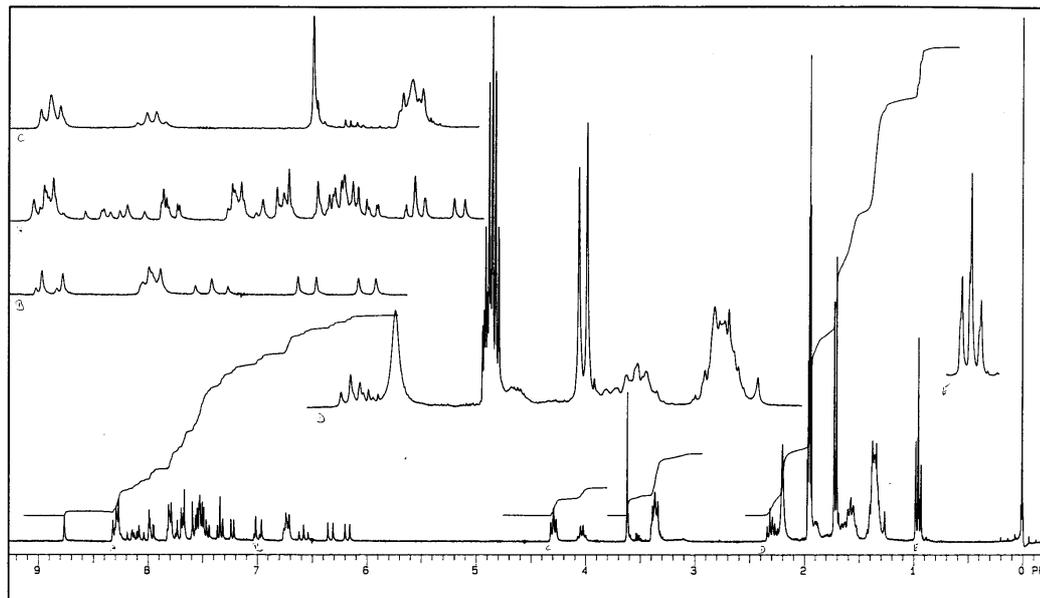
Der Strukturbeweis, der aus den NMR-Spektren erhalten werden kann, besteht einerseits in Zusammensetzung des Gesamtspektrums aus den beiden Teilspektren der Einzelchromophore, andererseits im Auftreten der charakteristischen Amid-Banden bei ca. 8.7 ppm und 8.3 ppm. Dabei dürfte das Signal bei der höheren chemischen Verschiebung dem Derivat eines Benzanilids zuzuordnen sein, dasjenige bei der niedrigeren Verschiebung dem Derivat eines Acetanilids. Dies ist mit dem +I-Effekt der langen Alkyl-Ketten der Säurereste zu erklären. Demgegenüber sitzt die andere Amidgruppierung an einem Benzen-Ring, der in p-Stellung akzeptorsubstituiert ist. Die folgende Zeichnung zeigt die Numerierung der Protonengruppen, auf die sich die in Tabelle 1 angegebenen Daten beziehen.



	39a	39b	39c	39d
1	4.42; 2H; T	4.34; 2H; T	4.32; 2H; T	4.28; 2H; T
2	2.28; 2H; M	1.77; 2H; M	1.74; 2H; M	1.89; 2H; M
3	2.43; 2H; T	1.37; 2H; M	1.36; 2H; M	1.33; 2H; M
4	×	3.08; 2H; T	1.36; 2H; M	1.33; 2H; M
5	×	×	2.33; 2H; T	1.33; 2H; M
6	×	×	×	1.78 ; 2H; M
7	×	×	×	2.25 ; 2H; T
1'	0.95; 6H; T	3.36; 4H; T	3.35; 4H; T	3.33; 4H; T
2'	1.34; 4H; M	1.57; 4H; M	1.56; 4H; M	1.57; 4H; M
3'	1.56; 4H; M	1.33; 4H; M	1.36; 4H; M	1.33; 4H; M
4'	3.34; 4H; T	0.95; 6H; T	0.95; 6H; T	0.95; 6H; T
α	6.72; 2H; D	6.72; 2H; D	6.71; 2H; D	6.72; 2H; D
β	7.54; 2H; D	7.53; 2H; D	7.54; 2H; D	7.54; 2H; D
γ	7.74; 1H; D	7.74; 1H; D	7.73; 1H; D	7.78; 1H; D
δ	6.97; 1H; D	6.98; 1H; D	6.98; 1H; D	6.98; 1H; D
ε	7.79; 2H; D	7.80; 2H; D	7.77; 2H; D	7.80; 2H; D
ζ	8.33; 2H; D	8.30; 2H; D	8.29; 2H; D	8.28; 2H; D
a	7.33; 1H; S	7.33; 1H; S	7.33; 1H; S	7.33; 1H; S
b	7.23; 1H; D	7.23; 1H; D	7.23; 1H; D	7.22; 1H; D
c	7.3-8.0; 1H	7.3-8.0; 1H	7.3-8.0; 1H	7.3-8.0; 1H
d	6.32; 1H; D	6.32; 1H; D	6.33; 1H; D	6.33; 1H; D
e	8.03-8.18; 1H; DD	8.03-8.18; 1H; DD	8.03-8.18; 1H; DD	8.03-8.18; 1H; DD
f	6.57; 1H; T	6.56; 1H; T	6.57; 1H; T	6.57; 1H; T
g	8.03-8.18; 1H; DD	8.03-8.18; 1H; DD	8.03-8.18; 1H; DD	8.03-8.18; 1H; DD
h	6.17; 1H; D	6.17; 1H; D	6.17; 1H; D	6.17; 1H; D
i	7.3-8.0; 1H	7.3-8.0; 1H	7.3-8.0; 1H	7.3-8.0; 1H
k	7.3-8.0; 1H	7.3-8.0; 1H	7.3-8.0; 1H	7.3-8.0; 1H
l	7.3-8.0; 1H	7.3-8.0; 1H	7.3-8.0; 1H	7.3-8.0; 1H
m	7.3-8.0; 1H	7.3-8.0; 1H	7.3-8.0; 1H	7.3-8.0; 1H
n	8.72; 1H; S	8.76; 1H; S	8.75; 1H; S	8.77; 1H; S
o	8.36; 1H; S	8.35; 1H; S	8.32; 1H; S	8.33; 1H; S
p	7.3-8.0; 2H	7.3-8.0; 2H	7.3-8.0; 2H	7.3-8.0; 2H
q	7.3-8.0; 2H	7.3-8.0; 2H	7.3-8.0; 2H	7.3-8.0; 2H
1''	1.72; 6H; S	1.70; 6H; S	1.70; 6H; S	1.70; 6H; S
2''	1.70; 6H; S	1.72; 6H; S	1.72; 6H; S	1.72; 6H; S
3''	1.34; 3H; T	2.38; 3H; T	2.19; 3H; T	2.31; 3H; T
4''	3.61; 3H; S	3.61; 3H; S	3.61; 3H; S	3.61; 3H; S
5''	4.03; 2H; Q	4.03; 2H; Q	4.03; 2H; Q	4.03; 2H; Q

Tab. 1: $^1\text{H-NMR}_{300}$ -Daten der Verbindungen **39a-d** ($\text{CD}_3\text{CN/TMS}$)

Abb. 8: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CD}_3\text{CN/TMS})$ von **39a**Abb. 9: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CD}_3\text{CN/TMS})$ von **39b**

Abb. 10: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CD}_3\text{CN/TMS})$ von **39c**Abb. 11: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CD}_3\text{CN/TMS})$ von **39d**

3.4.3.2. FAB-Massenspektrometrie

Anhand der FAB-Massenspektren läßt sich folgendes typische Fragmentierungsmuster für alle bichromophore Systeme unabhängig von der Kettenlänge ihres Spacers angeben (Fragmente, die auch aus einem Gemisch der Teilchromophore stammen könnten, werden nicht als Strukturbeweis angeführt):

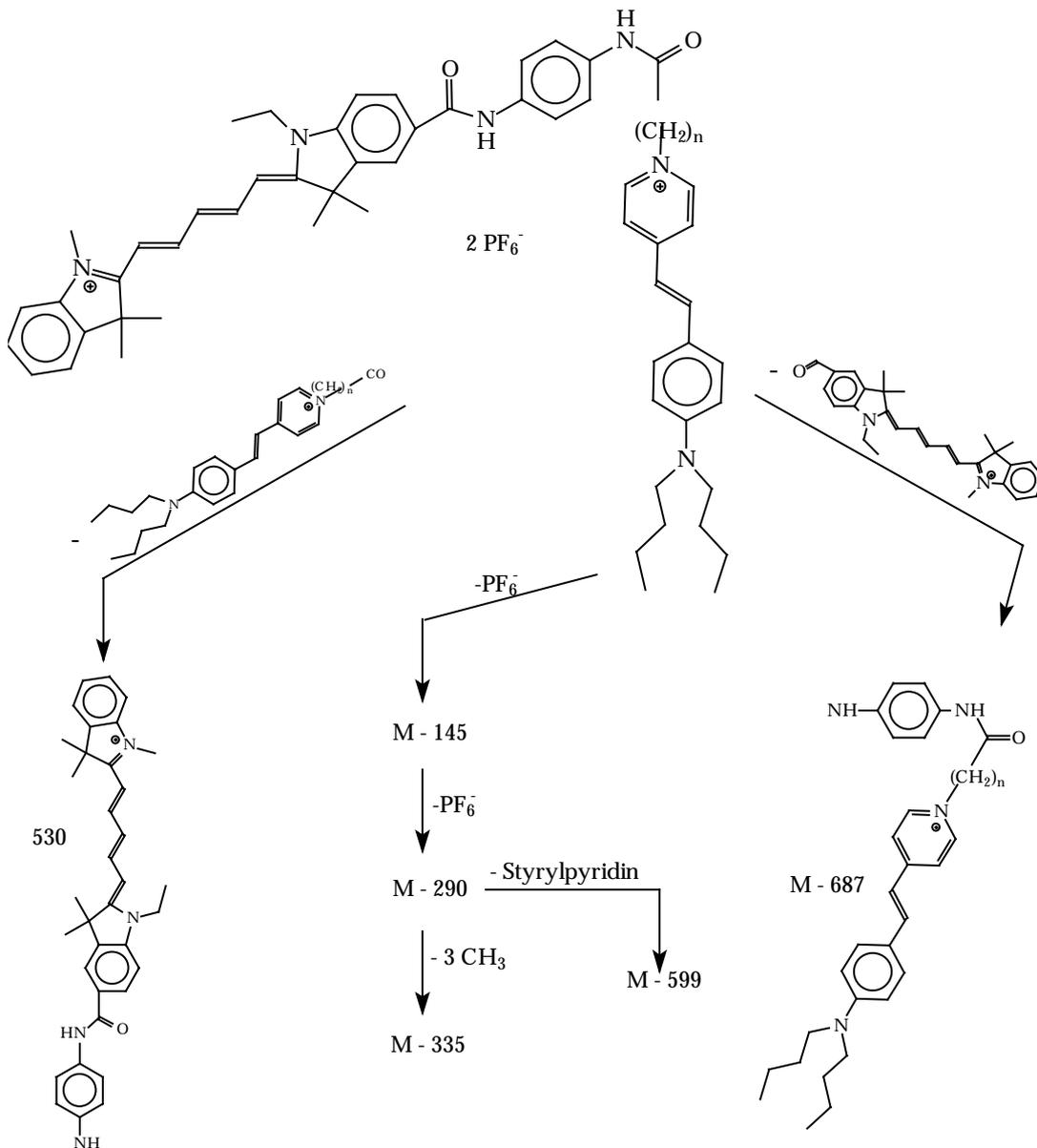


Abb. 12: Fragmentierung der Bichromophore nach FAB-MS

Nachdem die beiden Anionen eins nach dem anderen abdissoziieren wird demnach bevorzugt die Bindung zwischen den beiden Teilchromophoren zu beiden Seiten des Phenylendiamins gespalten. Alternativ dazu werden mehrere Methylgruppen abgespalten. Außerdem wird noch oft das Styrylpyridin vom Rest des Bichromophors abgetrennt. Auf diese Grobfragmentierung des Bichromophors erfolgt dann die Fragmentierung der Einzelkomponenten. Diese unterscheidet sich jedoch nicht von der Fragmentierung der Edukte, so daß sie hier nicht diskutierbar ist. Die folgende Tabelle zeigt die Fragmentierung, wie sie in den Spektren gefunden wird (die Genauigkeit der Massen beträgt eine Vorkommastelle):

Fragment	39a	39b	39c	39d
M ⁺	-	1213	-	1255
M ⁺ - H	1198	-	-	-
M ⁺ - PF ₆ ⁻	1054	1068	1082	1110
M ⁺ - PF ₆ ⁻ - 3 CH ₃	1007	-	-	-
(M ⁺ - 2 PF ₆ ⁻) = M'	909	923	937	965
M' - CH ₃	893	908	922	950
M' - 2CH ₃	879	893	907	935
M' - 3CH ₃	863	878	892	920
M' - Styrylpyridin	599	614	628	656
Cyanin-NH	530	530	530	530
M' - Cyanin	512	526	540	568

Tab. 2: Die wichtigsten Fragmente in den FAB-Spektren der vier Bichromophore

3.4.3.3. UV-VIS-Spektroskopie

Die folgenden Abbildungen zeigen die UV-Spektren der vier isolierten Bichromophore in Ethanol:

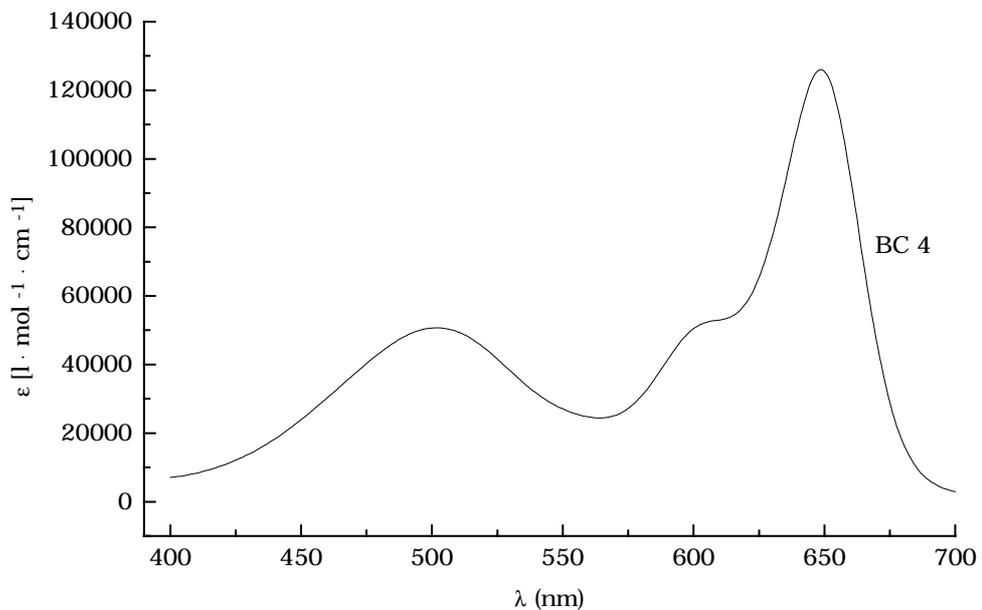


Abb. 13: UV-Spektrum von **39a** (in Ethanol)

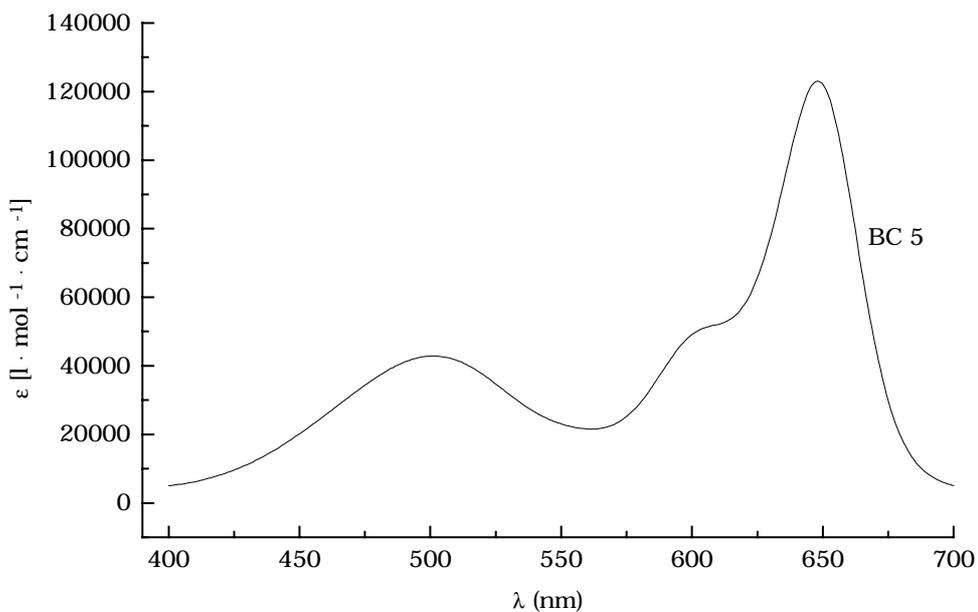
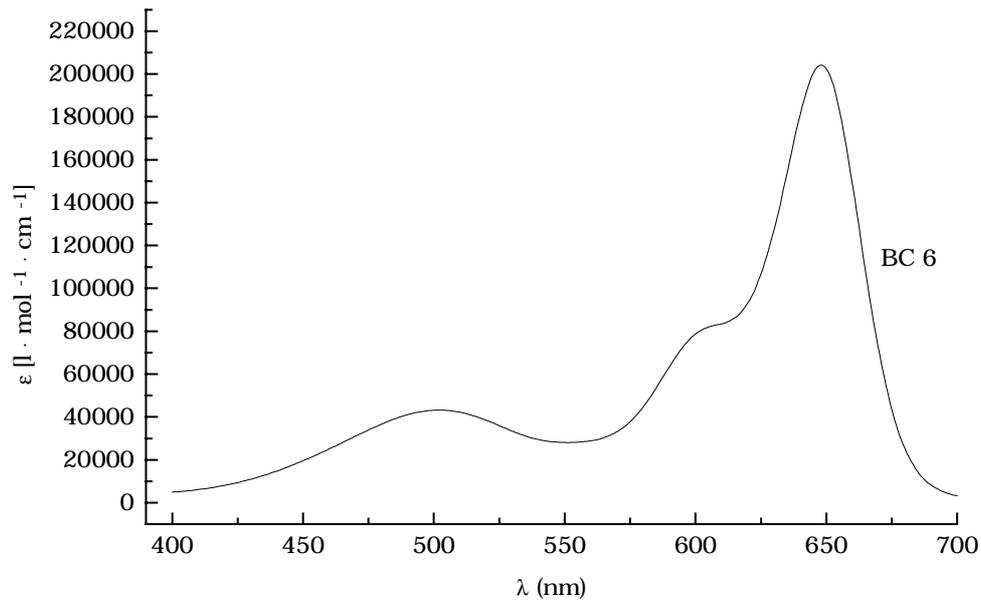
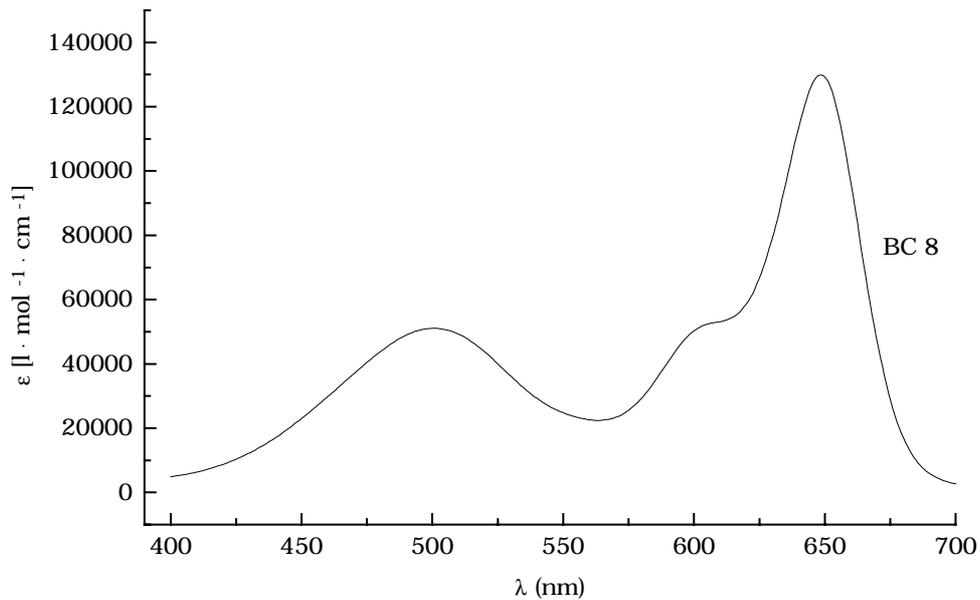


Abb. 14: UV-Spektrum von **39b** (in Ethanol)

Abb. 15: UV-Spektrum von **39c** (in Ethanol)Abb. 16: UV-Spektrum von **39d** (in Ethanol)

Es wird erkennbar, daß die Spektren der Verbindungen **39a, b** und **d** ähnlich sind, während sich bei **39c** ein anderes Verhältnis der Peakhöhen ergibt. Hier ist die Bande des Cyanins nicht nur ca. dreimal, sondern fast fünfmal so hoch wie die des Styryl-Teils. Dies ist wahrscheinlich auf einen gewissen Anteil an Cyanin als Verunreinigung des Bichromophors zurückzuführen, die nicht durch präparative Schichtchromatographie entfernt werden kann.

3.5. Untersuchungen zur Fluoreszenz

3.5.1. Fluoreszenzspektren in Ethanol

Abb. 17 zeigt die normierten Fluoreszenzspektren der Verbindungen **39a-d**. Die Spektren wurden in Ethanol mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ aufgenommen. Anregungswellenlänge war in allen vier Fällen 500 nm, das Absorptionsmaximum des Styryl-Teils, der den FRET-Donor darstellt. Die Fluoreszenzintensität des Akzeptors am Maximum (ca. 670 nm) wurde dann auf 1 normiert.

Wie erkennbar wird, zeigt der Bichromophor **8** erwartungsgemäß die größte Eigenfluoreszenz für den Donor. Man sollte eigentlich erwarten, daß diese Eigenfluoreszenz, die auf eine Effizienz des Energietransfers von weniger als 100% schließen läßt, umso kleiner wird, je kleiner der Abstand zwischen den beiden Teilchromophoren wird. Die Graphik zeigt indessen, daß die Annahme, die Effizienz werde nur durch die Länge des Spacers bestimmt, unzureichend ist. Während die erwartete Reihenfolge mit abnehmender Intensität **39d**, **39c**, **39b**, **39a** wäre, ist die tatsächliche Reihenfolge **39d**, **39a**, **39b**, **39c**. Wahrscheinlich laufen hier zwei Effekte einander entgegen: die Verringerung der Länge des Spacers läßt den *räumlichen Abstand* der beiden Teilchromophore abnehmen, was eine *Erhöhung* der Transferrate mit sich bringt; die gleichzeitige Zunahme des Anteils an *planaren* und weitgehend *starr* sp^2 -Zentren (von 52% in **39d** über 61% in **39c** und 67% in **39b** bis hin zu 73% in **39a**) schafft eine rigide und wahrscheinlich ungünstige *räumliche Orientierung*, mit der Folge der *Absenkung* der Transferrate.

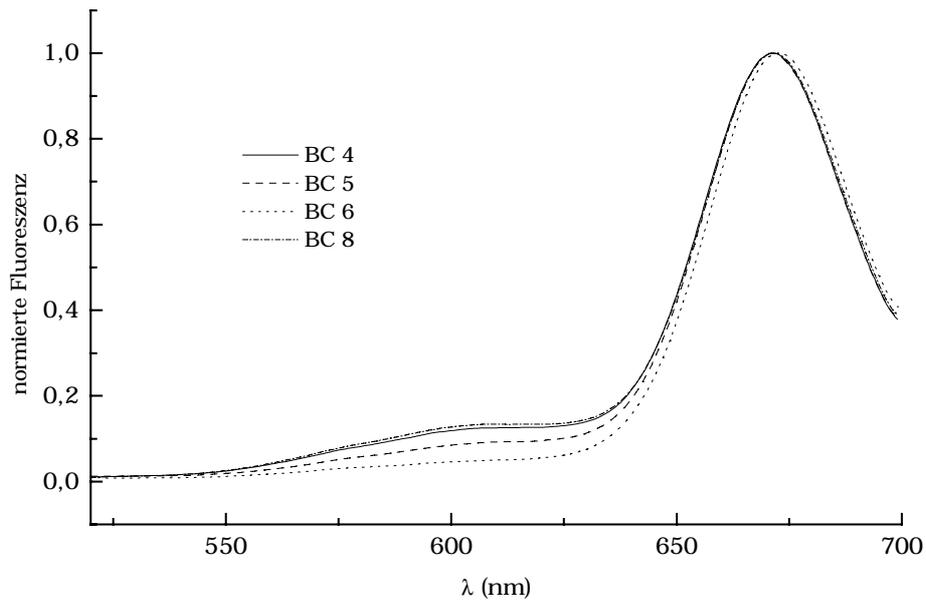


Abb. 17: normierte Fluoreszenzspektren der vier Bichromophore

3.5.2. Fluoreszenzquantenausbeuten in Chloroform

Da die Quantenausbeuten der Fluoreszenz in Ethanol sehr gering sein werden, wurden sie in Chloroform bestimmt. Die in der Literatur bekannten Quantenausbeuten der Einzelchromophore mögen damit verglichen werden.

Für die Messung der Quantenausbeuten wurde die sogenannte Relativmethode für Lösungen geringer optischer Dichte nach Parker und Rees^{69,70} verwendet. Folgende Formel lässt sich für die Methode aus dem Lambert-Beerschen Gesetz herleiten:

$$\Phi_x = \Phi_r \cdot \frac{A_r(\lambda_r)}{A_x(\lambda_x)} \cdot \frac{I(\lambda_r)}{I(\lambda_x)} \cdot \frac{n_x^2}{n_r^2} \cdot \frac{D_x}{D_r}$$

Hierin sind:

Φ_x : zu bestimmende Quantenausbeute

Φ_r : bekannte Quantenausbeute einer Standardsubstanz

$A_r(\lambda_r)$: Absorbanz dieser Standardsubstanz bei der Einstrahlungswellenlänge λ_r

$A_x(\lambda_x)$: Absorbanz der zu bestimmenden Substanz bei der Einstrahlungswellenlänge λ_x

$I(\lambda_r), I(\lambda_x)$: Intensität der Strahlungsquelle bei den Wellenlängen λ_r bzw. λ_x

n_x, n_r : Brechungsindizes der jeweiligen Lösungsmittel

D_x, D_r : Integrale der Fluoreszenzspektren

Die Schwierigkeit, die Intensität der Lichtquelle in Abhängigkeit von der Wellenlänge zu ermitteln erübrigt sich, wenn man die Referenz und Substanz unbekannter Quantenausbeute bei derselben Wellenlänge bestrahlt. Dann brauchen nur noch Lösungen beider Substanzen mit bekannter Absorbanz $A(\lambda)$ hergestellt und im Fluorimeter gemessen zu werden. Mit Literaturwerten für Φ_r , n_r und n_x ergibt sich dann leicht Φ_x .

Die mit dieser Methode und Fluorescein-Natrium ($\Phi_r = 0.9$ in 0.1 N NaOH) als Standard ermittelten Quantenausbeuten zeigt Tabelle 3. Als Einstrahlungswellenlänge wurde im Hinblick auf die spätere Charakterisierung 470 nm verwendet.

Substanz	$A_x(470\text{nm})$	$D_x(490 \text{ bis } 700\text{nm})$	Φ_x
<u>39a</u>	0.016	91268	0.046
<u>39b</u>	0.022	119580	0.044
<u>39c</u>	0.018	46240	0.021
<u>39d</u>	0.019	95904	0.041

Tab. 3: Fluoreszenzquantenausbeuten
der Bichromophore in Chloroform

Bei der angegebenen optischen Dichte ist das Lambert-Beersche Gesetz sicher gültig, und Fehler durch Konzentrationslöschung oder Reabsorption bzw. Reemission sollten auf ein Minimum beschränkt bleiben. Bei einem der Methode inhärenten systematischen Fehler von ca. 5% sind drei der vier Werte als annähernd identisch zu betrachten. Die starke Abweichung für **39c** ist dadurch nicht zu erklären.

Die annähernde Gleichheit der Quantenausbeuten kommt nicht überraschend: da die Quantenausbeute des Cyaninteils (ca. 50%) weitgehend unabhängig vom Lösungsmittel ist, die des Styrylpyridins jedoch starke Solvatochromie aufweist (Φ beträgt weniger als 1% in Wasser, aber bis zu 50% in Chloroform) tritt hier der Fall ein, daß eine Verringerung der Transfereffizienz infolge erhöhtem Abstand sich kaum bemerkbar macht, denn die Emission eines Photons aus einem der beiden Chromophore ist in Chloroform gleich wahrscheinlich. In einem anderen Lösungsmittel wären nicht nur die Quantenausbeuten anders, sondern auch ihre Unterschiede untereinander.

3.6. Potentialsensitivität

Die Untersuchung der Potentialsensitivität der Fluoreszenz der Bichromophore **39a-d** erfolgt unter Verwendung von Liposomen aus Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC). Diese dienen für die Charakterisierung von Fluoreszenzfarbstoffen für Potentialmessungen als Modellsysteme, die eingesetzt werden können, bevor die kompliziertere Charakterisierung unter Verwendung von lebenden Zellen durchgeführt wird.

3.6.1. Aufbau von Membranen

Biomembranen in lebenden Zellen bestehen aus Lipiden, Proteinen und Cholesterol in wechselnden Anteilen sowie geringen Mengen an Kohlenhydraten (s. Einleitung). Als Barrieren, die das Membraninnere vom äußeren Medium trennen, sind sie jedoch nicht vollkommen impermeabel. Vielmehr regeln sie den Stoffein- und -austritt durch sogenannte Pumpen und Kanäle; erstere transportieren spezifische Substanzen *gegen* einen elektrochemischen Gradienten (s. u.), letztere ermöglichen deren Durchtritt *mit* einem solchen Gradienten.

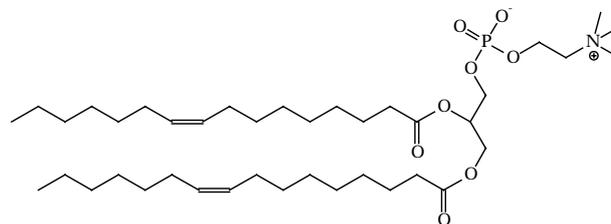
3.6.1.1. Lipide

Lipide haben ihren Namen von ihrer chemischen Verwandtschaft zu den Fetten (gr. λίπος = Fett). Bekanntermaßen sind Fette Glycerin-Triester von langkettigen Fettsäuren mit geradzahligem

Kohlenwasserstoffketten

zwischen 14 und 20, meist aber 16 oder 18 C-Atomen.

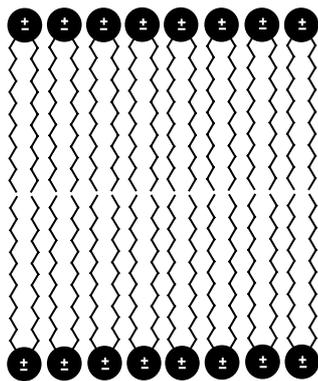
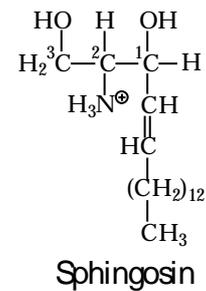
Viele dieser Fettsäuren sind (z. T. mehrfach) ungesättigt, die



Doppelbindungen weisen dann in aller Regel die cis-Konfiguration auf. Fette sind indessen in der Membran nicht vertreten, wohl aber Lipide. Man unterscheidet Phosphoglyceride (auch Phospholipide genannt) und Sphingolipide. Die wichtigste Gruppe der Phospholipide bilden die Phosphatidylcholine oder Lecithine, bei denen nur zwei Hydroxyl-Gruppen des Glycerins mit Fettsäuren

verestert sind. Die dritte OH-Gruppe ist mit Phosphorsäure kondensiert, die außerdem an Cholin (Hydroxethyltrimethylammonium) gebunden ist. Die lipophilen Fettsäurereste und das Phosphocholin als hydrophile Kopfgruppe verleihen dem Lipid seine typischen amphiphilen Eigenschaften.

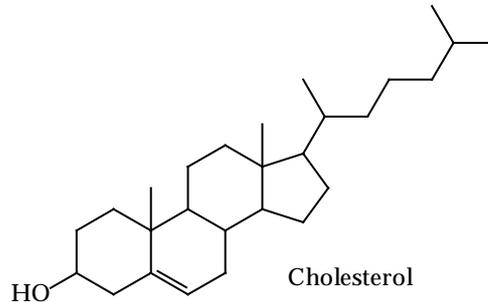
Sphingolipide sind chemische Derivate des Aminoalkohols Sphingosin sowie von dessen Dihydro-Derivat. Bei den Sphingolipiden ist ein Fettsäurerest an C-Atom 2 als Amid gebunden, an C-Atom 3 kann entweder Phosphocholin sein (Sphingomyeline) oder ein Zucker (meist Galaktose oder Glucose; dann spricht man von Cerebrosiden) oder, in den Gangliosiden, ein Oligosaccharid. Die letzteren beiden Gruppen sind vor allem in den neuronalen Membranen des Gehirns anzutreffen, woher sie ihre Namen haben.



Obwohl die Strukturen von Phospholipiden und Sphingolipiden sich deutlich voneinander unterscheiden, ähneln sie sich doch in einer grundlegenden Eigenschaft, nämlich sich selbsttätig zu Lipid-Doppelschichten zu organisieren, die letztlich oft den größeren Teil der Biomembranen ausmachen. Lipide zeigen diese Eigenschaft, weil sie sich in wässriger Umgebung auf diese Weise am besten solvatisieren lassen: die unpolaren Kohlenwasserstoffreste solvatisieren sich gewissermaßen gegenseitig im Innern der Doppelschicht, während die hydrophilen Gruppen dem äußeren wässrigen Medium präsentiert werden. Eine wässrige Suspension solcher Lipide bildet multilamellare Vesikel aus, in denen die Lipiddoppelschichten wie Zwiebelschalen angeordnet sind. Wird eine solche Suspension dem Ultraschall ausgesetzt, so lagern sich diese Vesikel um zu monolamellaren Liposomen, d. h. wassergefüllten Bläschen von mehreren Hundert Å Durchmesser, die von einer einzigen, globulären Doppelschicht eingeschlossen werden. Eine solche Lipiddoppelschicht ist ca. 60 Å dick und schließt das innere wässrige Medium vollständig vom äußeren ab. Das eröffnet die Möglichkeit, Liposomen herzustellen, die in ihrem Innern eine andere wässrige Lösung enthalten als die sie außen umgebende.

3.6.1.2. Sterole

Eine weitere wichtige Komponente zumindest der tierischen Plasmamembran ist das Cholesterol. Während in pflanzlichen Zellen kaum Cholesterol vorkommt (Pflanzen enthalten statt dessen andere Sterole), kann es in tierischen Zellmembranen bis zu 25% Gew. ausmachen. Die OH-Gruppe des Cholesterols verbunden mit dem



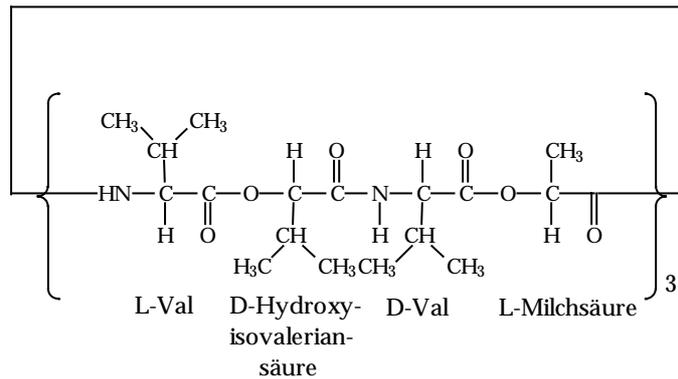
unpolaren Kohlenwasserstoff-Ringsystem verleiht auch ihm einen schwach amphiphilen Charakter. Andererseits ist sein Kohlenstoffgerüst bedeutend starrer als das der Lipide, weshalb ihm eine besondere Rolle bei der Feinregulierung der Membraneigenschaften zukommt: es beeinflusst die plastischen Eigenschaften der Membran und bestimmt ihre Übergangstemperatur, d. h. die Temperatur, bei der sie vom ungeordneten Zustand einer zweidimensionalen Flüssigkeit in den geordneten, eher flüssig-kristallinen Zustand wechselt.

Wenn Cholesterol selbst auch keine Doppelschichtmembran ausbildet, so lassen sich doch aus teilweise oxidiertem Cholesterol hemisphärische Doppelschichten von hoher Stabilität erzeugen. Diese sogenannten HLBs (hemispherical lipid bilayers; auch Black LBs genannt) können als Modellmembranen für biochemische bzw. biophysikalische Untersuchungen dienen.

3.6.1.3. Oligopeptide und Proteine

Membranproteine, die meist nicht weniger als die Hälfte der gesamten Membran ausmachen, werden in zwei Gruppen unterteilt: intrinsische oder integrale und extrinsische oder periphere Proteine. Zudem gibt es mobile Oligopeptide wie Gramicidin A, das aus 15 Aminosäuren aufgebaut ist und durch Dimerisierung in der Membran Ionenkanäle eröffnet, sowie das cyclische Depsipeptid Valinomycin, dessen Struktur neben Amid- auch Esterbindungen enthält. Sie fungieren in der Natur als Ionophore, d. h. sie erhöhen die Permeabilität der Membran für bestimmte Ionen.

Intrinsische Membranproteine sind in der Membran vor allem durch hydrophobe Wechselwirkungen verankert. Der membranresidente Teil des Proteins ist dann eher aus lipophilen Aminosäuren wie Alanin, Valin oder Methionin aufgebaut. Dagegen sind



Valinomycin

extrinsische Proteine eher locker über elektrostatische Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen an intrinsische Membranproteine gebunden. Daneben können auch die polaren Kopfgruppen der Lipide Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Protein eingehen.

Über intrinsische (integrale) Membranproteine erfolgt z. B. die Kommunikation zwischen Zellen. Diese sogenannten *Gap Junctions* sind Gebilde aus sechs stabförmigen Untereinheiten, die hexagonal gepackt einen Kanal ergeben, der sich abhängig von der Ca^{2+} -Konzentration öffnet und schließt. Jeweils zwei solcher hexagonalen Komplexe in den Membranen benachbarter Zellen aggregieren und bilden so eine Schleuse, durch die Moleküle mit Molekülmassen bis zu 1200 D passieren können. Kleinere Ionen und Kohlenhydrate können also hindurchgelangen, Makromoleküle wie Proteine oder Nukleinsäuren jedoch nicht.

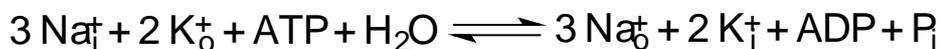
Darüber hinaus sind Membranproteine asymmetrisch in der Membran orientiert: intrinsische nur in einer Richtung, extrinsische nur an einer Seite der Membran. Weitere Beispiele für intrinsische Membranproteine sind Bakteriorhodopsin, das photosynthetische Reaktionszentrum und die Na,K-ATPase. Alle drei sind in der Membran wahrscheinlich über jeweils mehrere hydrophobe α -Helices gebunden, die die Membran durchdringen. Dabei enthalten die ersteren beiden auch natürliche funktionelle Farbstoffe.

So hat etwa Bakteriorhodopsin sieben solcher Helices. Es handelt sich um eine durch Licht angetriebene Protonenpumpe, deren prosthetische Gruppe Retinal als Schiffsche Base an Lys-216 gebunden ist und die bei Belichtung eine

photochemische cis-trans-Isomerisierung durchläuft. Infolgedessen kommt es zu einer Kaskade von konformativen Änderungen im umgebenden Protein mit der Folge des Protonentransportes durch die Membran hindurch. Die dabei umgesetzte Energie wird für die ATP-Synthese verwendet. Das photosynthetische Reaktionszentrum, in dem der erste photochemische Schritt der Photosynthese erfolgt, hat wahrscheinlich 11 hydrophobe α -Helices, und die Na,K-ATPase, eine ATP-getriebene Ionenpumpe, ist aus vier paarweise identischen Untereinheiten aufgebaut ($(\alpha\beta)_2$ -Aufbau), von denen der α -Teil wohl 8 hydrophobe α -Helices besitzt, der β -Teil nur eine. Das Protein, das auch als Na,K-Pumpe bezeichnet wird, hat in der Zelle die Aufgabe, Na^+ -Ionen aus ihr hinaus und K^+ -Ionen in sie hinein zu befördern, wobei intrazellulär ATP verbraucht wird.

3.6.2. Membranpotentiale

Die Stöchiometrie des durch die Na,K-Pumpe bewirkten Transportprozesses sieht wie folgt aus (mit den Indices i für innen und o für außen):



P_i bezeichnet den abgespaltenen Phosphatrest. Das Wasser wird für die Hydrolyse der Phosphorsäureanhydrid-Bindung verbraucht. Wie erkennbar wird, ist ein Pumpcyclus mit dem Umsatz einer positiven Nettoladung verbunden, die die Zelle verläßt. Damit ermöglicht die Na,K-Pumpe u. a. die Auslösung und Fortpflanzung von Nervenimpulsen.

Der Abfall des elektrochemischen Potentials der durch die Zellmembran getrennten wäßrigen Lösungen verschiedener Ionen über diese Membran ist grundlegend für alle Lebensvorgänge. Das Transmembranpotential, das hauptsächlich durch die Ionen Na^+ , K^+ und Cl^- erzeugt wird, läßt sich durch die GOLDMANN-Gleichung darstellen:

$$\Delta\Psi = \frac{RT}{F} \ln \frac{\sum P_c [C(\text{out})] + \sum P_a [A(\text{in})]}{\sum P_c [C(\text{in})] + \sum P_a [A(\text{out})]}$$

Hierin bedeuten: die Indices c bzw. a Kation bzw. Anion; in bzw. out innen bzw. außen, die Koeffizienten P stehen für die Permeabilitätskoeffizienten der jeweiligen Ionenspezies.

Dieses Membranpotential beinhaltet die Energie, die für den Aufbau von ATP benötigt wird. Es ist ferner verantwortlich für den Aktivitätszustand von Nervenzellen. Grund genug für die biophysikalische Forschung, über Methoden für die Messung solcher Potentiale nachzudenken.

So erfolgte schon früh die Entwicklung von Mikroelektroden (Ling und Gerard 1949), die intrazelluläre elektrische Potentiale der Messung zugänglich machten⁷¹. Nachfolgende Untersuchungen an natürlichen Systemen führten u.a. zum Verständnis der ionischen Natur zellulärer Ruhe- und Aktionspotentiale, des Zusammenhangs von Ionenbewegungen mit deren Triebkraft sowie zur Charakterisierung von Ionenkanälen durch die Analyse von Strom- und Spannungsänderungen. Obwohl auch Versuche unternommen wurden, diese Methode auf Mitochondrien (also Zellorganellen) und Bakterien zu übertragen, war sie in der Vergangenheit stets auf solche Zellen beschränkt, die ausreichend groß waren, um das Einführen einer Elektrode zu gestatten. Auch mußten ihre Membranen sich der Sonde soweit anschmiegen, daß das entstandene Loch hinreichend versiegelt wurde und Ionenströme durch Lecks in der Membran weitgehend ausgeschlossen waren. Es muß jedoch trotzdem davon ausgegangen werden, daß alle Ergebnisse aus Messungen mit Mikroelektroden mehr oder weniger durch solche Lecks verfälscht wurden⁷².

Im vorliegenden Experiment werden Liposomen aus DOPC verwendet, die in ihrem Inneren eine bekannte Konzentration an Natrium-Kationen haben. Sie werden in einer wässrigen Lösung suspendiert, die eine ebensogroße Konzentration an Kalium-Kationen aufweist. Da die Membran zunächst als Isolator wirkt, liegt kein Membranpotential vor. An dieser Stelle wird der Farbstoff zugegeben und das Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Das aus der Goldman-Gleichung erchenbare Potential wird erst wirksam, wenn Valinomycin als Ionencarrier zugegeben wird, denn dann wird die Membran für Kalium permeabel und es kann sich ein Diffusionspotential einstellen. Nach der

Zugabe von Valinomycin wird nochmals das Spektrum aufgenommen und die beiden Spektren dann miteinander verglichen.

3.6.3. Potentialsensitivität der Cyanine

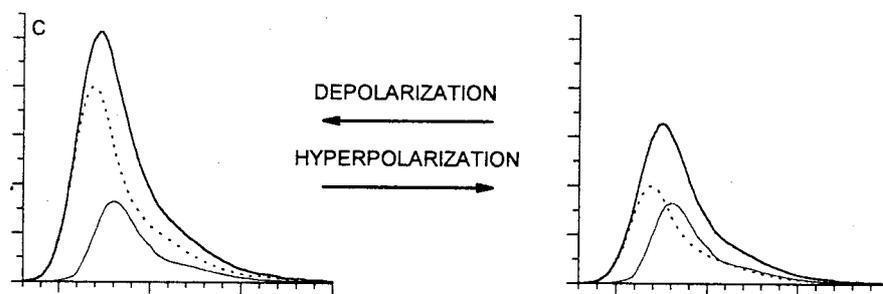
Trotz der in der Einleitung erwähnten photodynamischen Schädigung der Zelle durch den Singulett-Sauerstoff, den die Cyanine bei Belichtung erzeugen können, bleibt die Fluoreszenzmessung mit Cyaninen im Zentrum des Interesses, und zwar wahrscheinlich wegen ihrer großen Verbreitung in analytischen Labors. Neben den oben dargelegten möglichen [Mechanismen](#) für die Potentialsensitivität vieler Farbstoffe ist die Art der Änderung interessant zu betrachten: kationische Farbstoffe können durch die Membran diffundieren und erreichen nach kurzer Zeit ihre jeweiligen Gleichgewichtskonzentrationen im Cytosol, in der Membran und im extrazellulären Medium. Im Innern der Membran sind sie nicht gut löslich, jedoch befinden sich, so wird angenommen, spezifische Bindungsstellen an der Grenzfläche zwischen Membran und wäßriger Phase. Um nun die Änderungen der spektralen Eigenschaften eines Pentamethincyanins zu verstehen (dies gilt für Thia-, Oxa- und Indocyanine gleichermaßen; für Pentamethinoxonole oder Trimethincyanine gelten andere Gesetzmäßigkeiten), müssen auf molekularer Ebene drei verschiedene Zustände mit ihren zugehörigen spektralen Eigenheiten unterschieden werden:

- Der monomere Farbstoff in Lösung mit relativ hoher Fluoreszenzquantenausbeute.
- Der in Lösung bei erhöhten Konzentrationen oder Ionenstärken zu H-Aggregaten zusammengelagerte Farbstoff mit blauverschobener Absorption (H steht für hypsochrom) und gelöschter Fluoreszenz.
- Der mit den spezifischen membranseitigen Bindungsstellen assoziierte Farbstoff mit rotverschobener Absorption und Fluoreszenz sowie leicht erhöhter Fluoreszenzquantenausbeute. Diese Zustandsform ähnelt in ihren spektralen Eigenschaften stark den J-Aggregaten (J für Jelly⁷³), von denen man weiß, daß

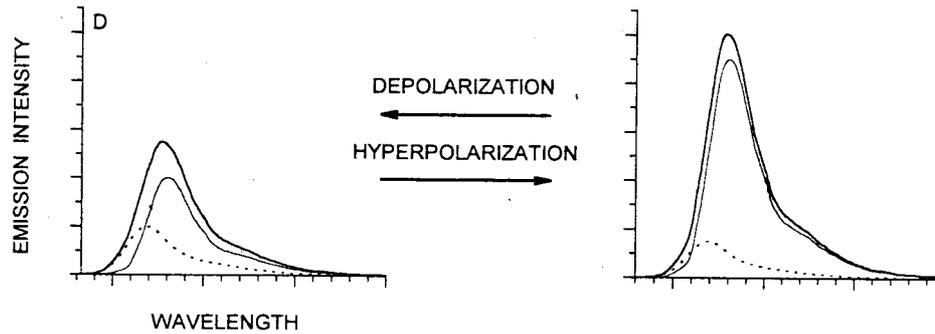
Farbstoffe vom Typ der Pentamethincyanine sie ausbilden können. Welcher Aggregatetyp sich bildet, hängt vom Medium ab.

Infolge dieser drei Zustände wird nun die Änderung des Fluoreszenzsignals bei Hyperpolarisation (das Potential auf der Innenseite der Membran ändert sich in negativer Richtung) abhängig von Konzentration und Wahl der Beobachtungswellenlänge⁷⁴. Folgende Situationen mögen betrachtet werden:

☞ Ist die Konzentration des Farbstoffs hoch verglichen mit der Konzentration der Zellen oder Liposomen, so ist der Beitrag der gebundenen Form relativ klein, da nicht sehr viele Bindungsstellen zur Verfügung stehen. Bei Hyperpolarisation strömt zusätzlicher Farbstoff aus dem äußeren Medium in die Zelle hinein, wodurch sich die intrazelluläre Konzentration erhöht. Das Gleichgewicht zwischen den drei obengenannten Zuständen kann sich nicht merklich auf die Seite der gebundenen Form verschieben, weil die membranseitigen Bindungsstellen quasi gesättigt sind. Daher kann das Gleichgewicht nur in Richtung auf H-Aggregation ausweichen, wodurch die Fluoreszenz gelöscht wird. Das Ergebnis der Messung ist also eine Abnahme der Fluoreszenzintensität.

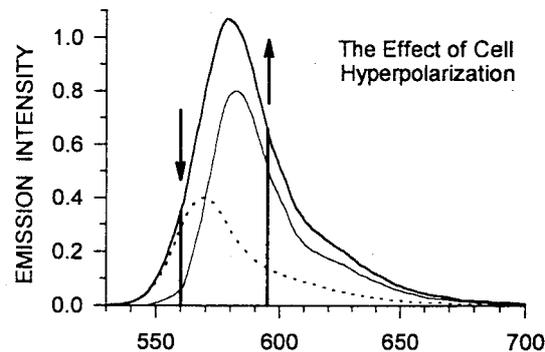


Ist die Konzentration des Farbstoffs klein gegenüber der Konzentration der Zellen, so dominiert die Fluoreszenz der gebundenen Form. Dabei ist zu beachten, daß das Fluoreszenzmaximum nun etwa 15 bis 20 nm bathochrom zur vorigen Situation verschoben ist. Wieder führt Hyperpolarisation zu einer Erhöhung der Farbstoffkonzentration im Innern der Zelle. Das Gleichgewicht hat die Möglichkeit, in Richtung der gebundenen Form auszuweichen, was mit einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität einhergeht.



Betrachten wir zuletzt den zufälligen Fall, daß die Beiträge der gebunden bzw. freien Form in etwa gleich sind. Dies entspricht auch dem Fall in etwa ausgeglichener Konzentrationen von Farbstoff und Zellen. Die Fluoreszenzsignale der beiden Formen verschmelzen auch in diesem Fall zu einer einzigen, eventuell leicht verbreiterten Kurve (in der nebenstehenden Abbildung als Referenzzustand bezeichnet). Bei Hyperpolarisation verringert sich nun die Fluoreszenzintensität der freien Form infolge Aggregation, während sich die der gebundenen Form infolge zusätzlicher Besetzung von Bindungsstellen erhöht.

Dabei verschiebt sich das Maximum des gemischten Fluoreszenzsignals um wenige Nanometer bathochrom, während die Gesamtintensität unter Umständen gleich bleibt. Abhängig von der Beobachtungswellenlänge kann

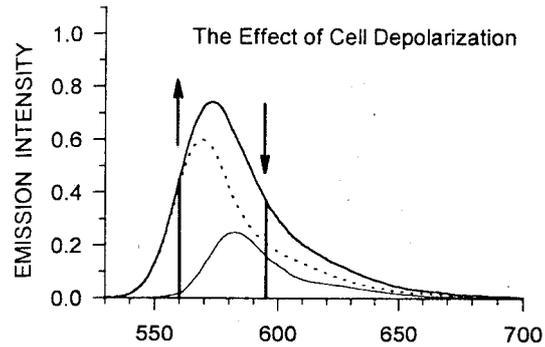


hier folgendes gemessen werden, was gleichzeitig die Wichtigkeit der sorgfältigen Auswahl der Beobachtungswellenlänge hervorhebt:

- ① liegt die Beobachtungswellenlänge in der blauen Flanke, so wird eine Abnahme der Fluoreszenzintensität beobachtet.
- ② liegt die Beobachtungswellenlänge in der roten Flanke, so wird eine Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachtet.
- ③ bei Messung auf dem *Fluoreszenzmaximum* kann eine Fluoreszenzänderung bei Potentialänderung u. U. übersehen werden. Sie ändert sich wenig oder gar nicht.

Der Vollständigkeit halber sei hier noch die Folge einer Depolarisation gezeigt. Sie ist genau gegenläufig zur Hyperpolarisation.

3.6.4. Messung an 39a-d



Für die Messung der Potentialsensitivität wurde zunächst so vorgegangen, daß die Farbstofflösung in den K-Puffer gegeben wurde. Danach wurde die Vesikelsuspension hinzugegeben. Dann erfolgte die Messung der Fluoreszenz. An dieser Stelle konnte aber zumeist kein deutliches Fluoreszenzsignal gefunden werden. Wahrscheinlich ist der schwerlösliche Farbstoff schon vor der Vesikelzugabe ausgefallen. Der deutlich blau gefärbte Rührkern in der Küvette belegt das.

Statt dieser Vorgehensweise wurde dann umgekehrt verfahren. In die Pufferlösung (4 ml) mit bereits enthaltenen Vesikeln wurde jeweils die Farbstofflösung ($2.5 \cdot 10^{-5}$ mol/l in DMSO) gegeben.

Die Farbstoffkonzentration lag damit rechnerisch bei $6.25 \cdot 10^{-9}$ mol/l. Es darf jedoch nicht vergessen werden, daß es sich hier nicht um eine homogene Lösung mehr handelt. Aufgrund der hohen Membranaffinität dieser Farbstoffe befindet sich fast der gesamte Farbstoff jeweils in der Membran. Daher ist die tatsächliche Konzentration bedeutend höher.

Es wurde danach ein deutliches Fluoreszenzsignal im Vergleich zum Spektrum der reinen Vesikellösung gefunden. Die Fluoreszenz des Cyanins dominiert hier stark. Bei Anregung bei 630 nm ist nur seine Fluoreszenz sichtbar. Regt man aber bei 480 nm an, so sieht man noch eine Restfluoreszenz des Styrylfarbstoffs.

Nach der Aufnahme des ersten Spektrensatzes wurde abgewartet, bis sich das Verteilungsgleichgewicht des Farbstoffs zwischen Membran und wässriger Phase vollständig eingestellt hatte. Das ist bei 39a fast augenblicklich der Fall, dauert bei 39c und bei 39d etwa 20 Minuten und bei 39b deutlich länger. Erst nach ca.

40 Minuten ist kaum noch eine zeitliche Veränderung des Fluoreszenzsignals zu erkennen.

Nun werden 20 µl einer Valinomycin-Lösung zugegeben. Erste Versuche zeigten, daß weniger Valinomycin nicht ausreicht. Sofort danach wird das Spektrum aufgenommen. In allen Fällen zeigt sich eine deutliche Verstärkung der Fluoreszenz.

Die Potentialeinstellung führt vermutlich zu keiner spannungsabhängigen räumlichen Veränderung der Orientierung der beiden Chromophore zueinander, sonst müßte man erwarten, daß wegen der veränderten Transferrate für die Anregungsenergie das Fluoreszenzsignal des einen Teils zugunsten des anderen abnimmt. Es wird aber durchgängig gefunden, daß *beide* Teilchromophore bei Zugabe von Valinomycin eine *Erhöhung* der Fluoreszenz zeigen. Da kein neuer Farbstoff zusätzlich hinzugegeben wird und die Zugabe von Valinomycin eher mit einer (geringfügigen) Verdünnung der Lösung verbunden ist, muß daher von einer erhöhten Fluoreszenzquantenausbeute für beide Teilchromophore ausgegangen werden, die wahrscheinlich durch eine Interaktion des Valinomycins mit dem Farbstoff zu erklären ist. Die nachstehenden Abbildungen zeigen im Einzelnen die erhaltenen Fluoreszenzspektren.

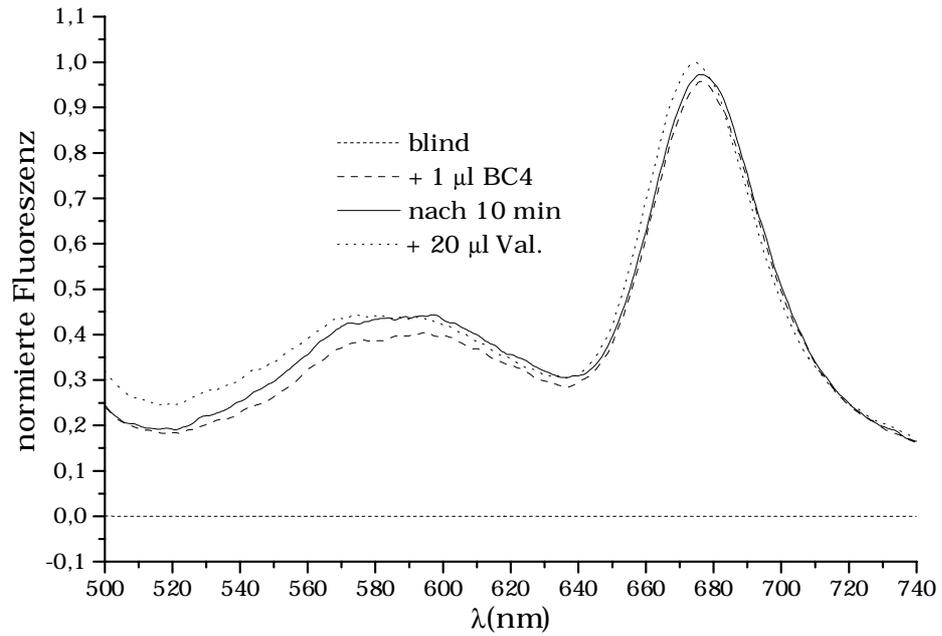


Abb. 18: Normierte Fluoreszenzkurven für **39a** über den gesamten Meßbereich
(Anregung bei 480 nm; in wässr. Pufferlösung)

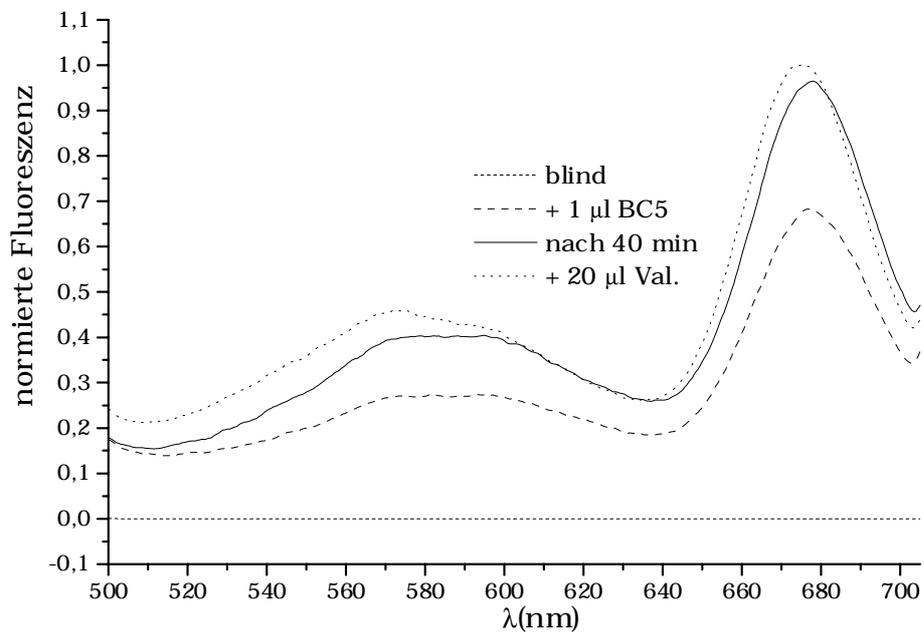


Abb. 19: Normierte Fluoreszenzkurven für **39b** über den gesamten Meßbereich
(Anregung bei 480 nm; in wässr. Pufferlösung)

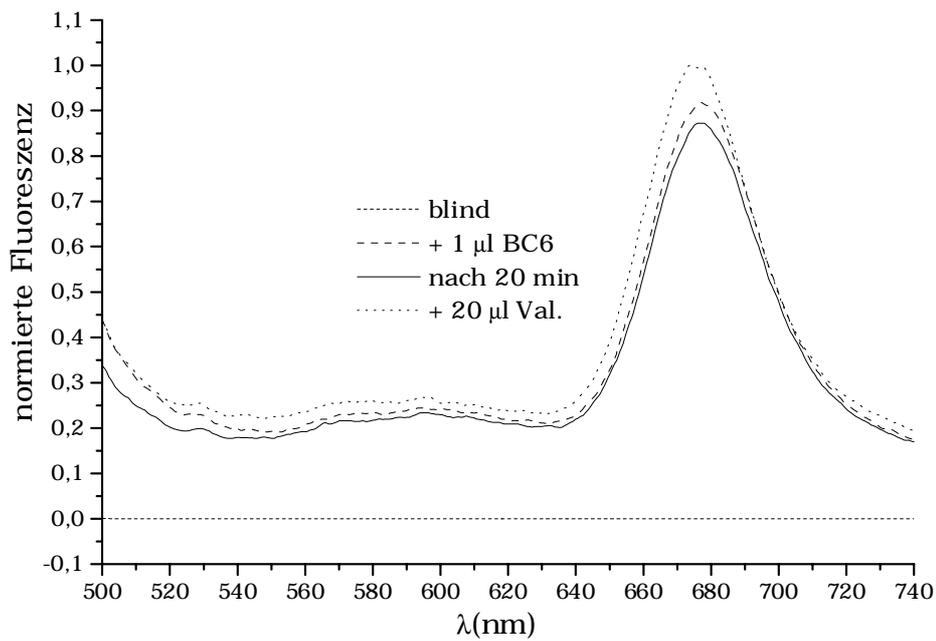


Abb. 20: Normierte Fluoreszenzkurven für **39c** über den gesamten Meßbereich
(Anregung bei 480 nm; in wässr. Pufferlösung)

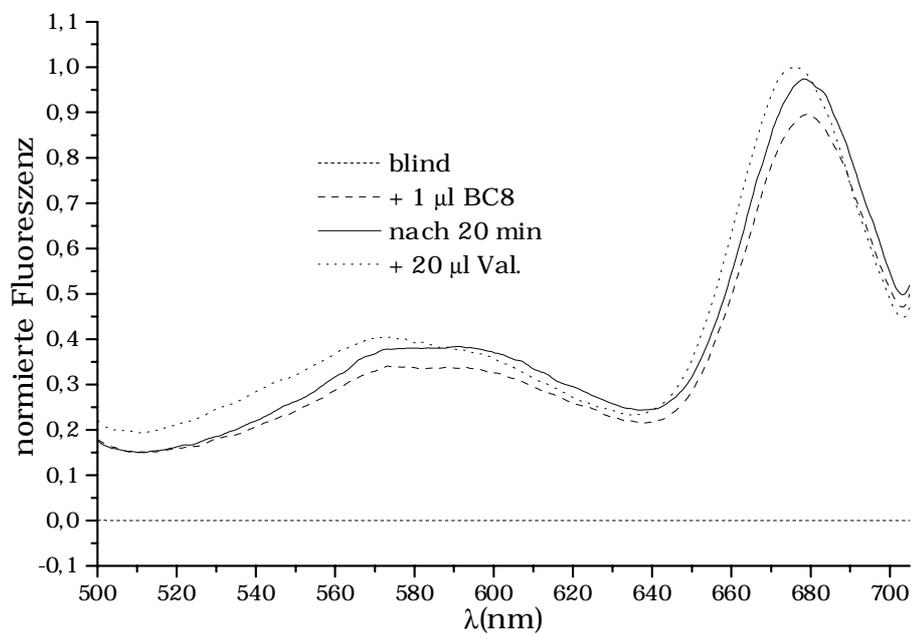


Abb. 21: Normierte Fluoreszenzkurven für **39d** über den gesamten Meßbereich
(Anregung bei 480 nm; in wässr. Pufferlösung)

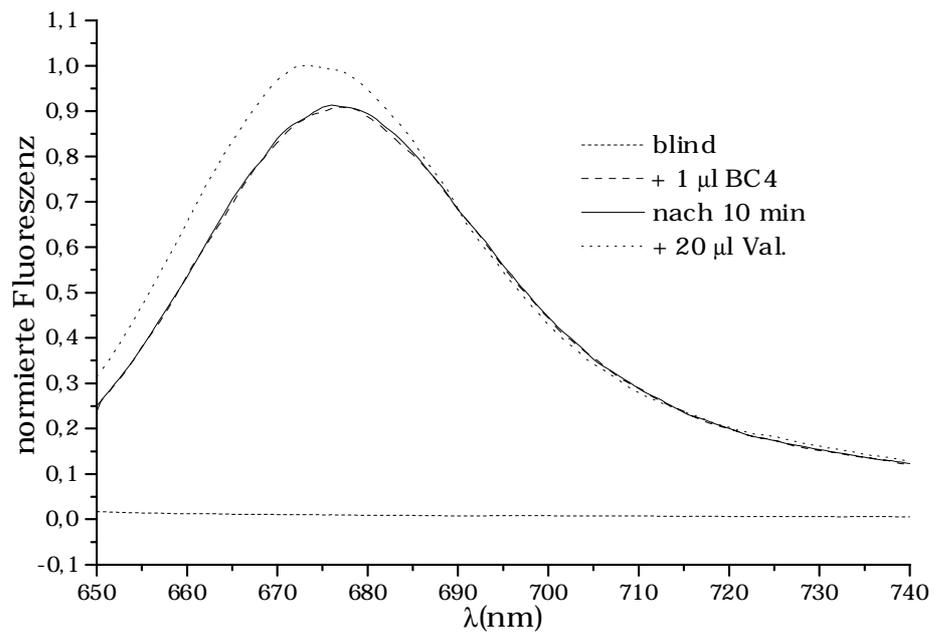


Abb. 22: Normierte Fluoreszenzkurven für **39a** (Anregung bei 630nm; in wässr. Pufferlösung)

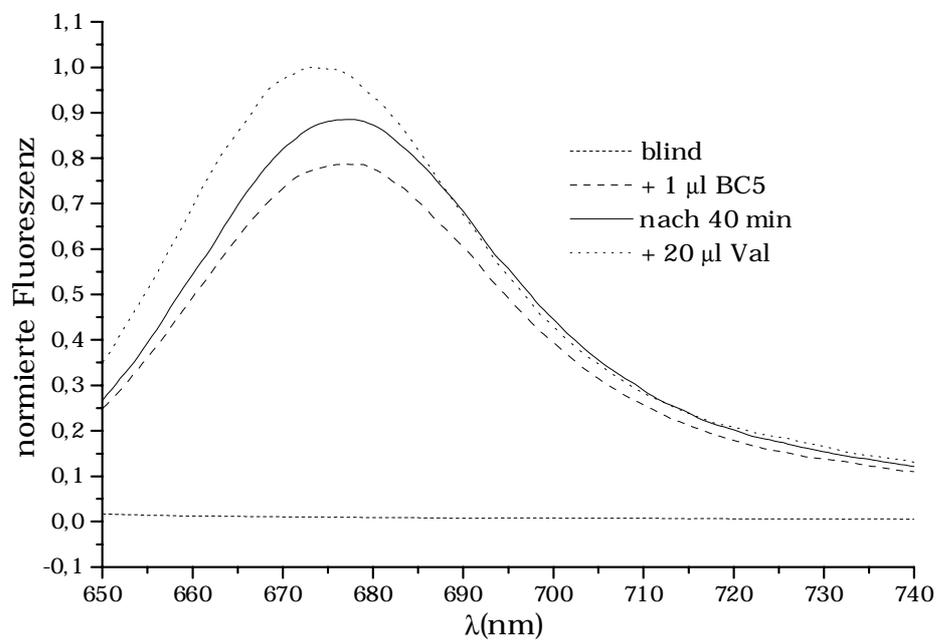


Abb. 23: Normierte Fluoreszenzkurven für **39b** (Anregung bei 630nm; in wässr. Pufferlösung)

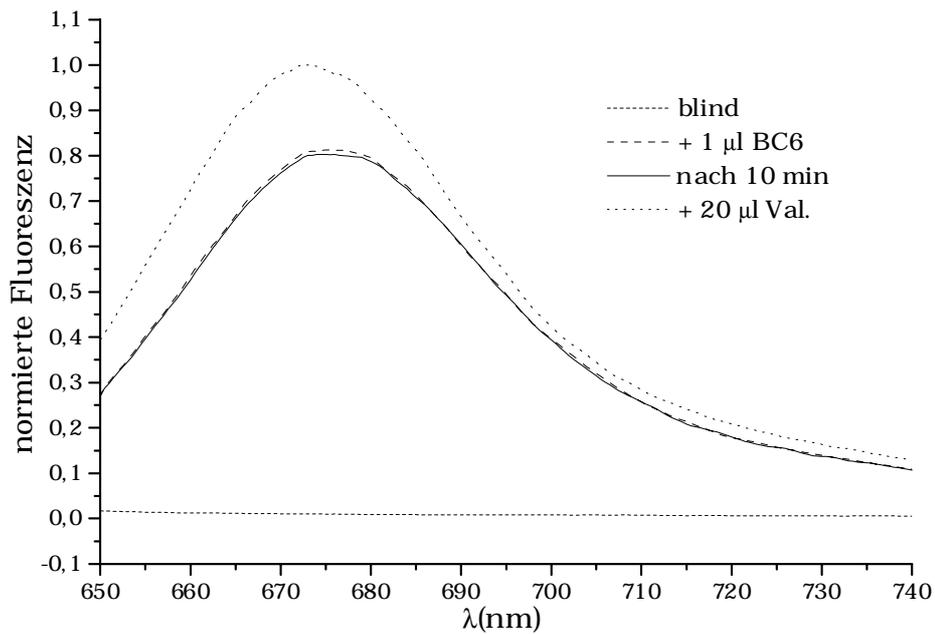


Abb. 24: Normierte Fluoreszenzkurven für **39c** (Anregung bei 630nm; in wässr. Pufferlösung)

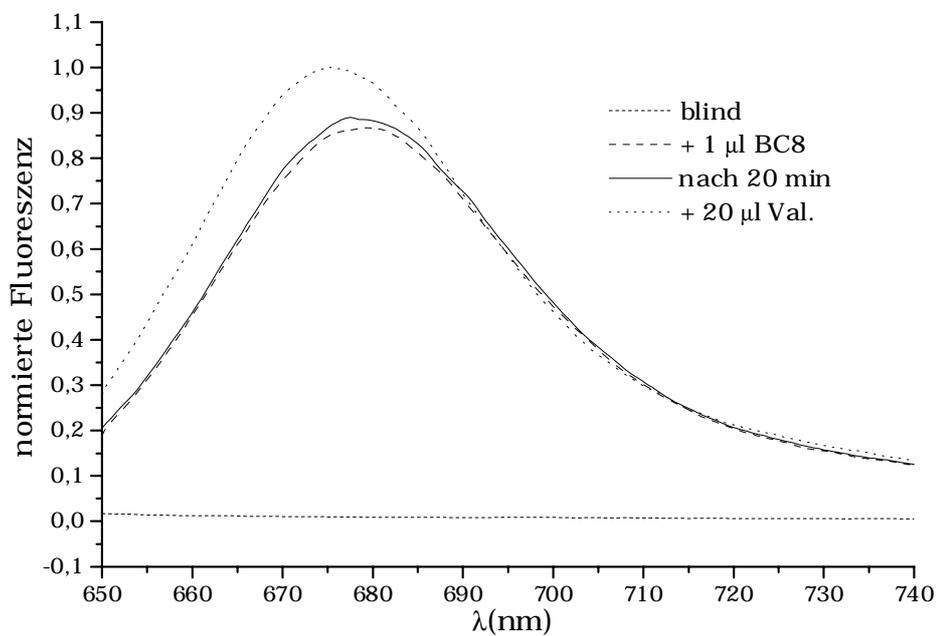


Abb. 25: Normierte Fluoreszenzkurven für **39d** (Anregung bei 630nm; in wässr. Pufferlösung)

3.6.5. Quantitative Auswertung:

3.6.5.1. Auf der Basis der Intensitäten

Die Größe der Fluoreszenzänderung bei Potentialänderung (oder durch andere Einflüsse) wird durch den Bruch $\Delta F/F$ wiedergegeben, d. h. durch das Verhältnis der Änderung der Fluoreszenzintensität zu der Intensität vor dieser Änderung. Diese Änderungen sind in allen vorliegenden Fällen positiv. Die konkreten Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Bichromophor	$\Delta F/F_{\text{FRET}}$ (%)	$\Delta F/F_{\text{Acc.}}$ (%)
<u>39a</u>	2.78 (max) 4.02 (674)	9.53 (max) 13.15 (673)
<u>39b</u>	3.69(max); 5.25 (675)	12.96 (max) 14.79 (673.5)
<u>39c</u>	14.66 (max) 16.83 (674)	24.55 (max) 24.86 (673)
<u>39d</u>	2.64 (max) 4.19 (676)	12.31 (max) 15.35 (675)

Tab. 4: Relative Fluoreszenzänderung der Bichromophore
auf der Basis der Peak-Höhen

Zugrundegelegt wurden für die Berechnung der Werte für $\Delta F/F_{\text{FRET}}$ und $\Delta F/F_{\text{Acc}}$ zweierlei Wertepaare: zum einen die jeweiligen Intensitäten bei der Wellenlänge des Maximums der Fluoreszenz nach Valinomycinzugabe (die Wellenlänge ist in Klammern angegeben). Zum anderen, da die genauen Wellenlängen der Peaks vor bzw. nach Potentialeinstellung aber nicht übereinstimmen (mit der Änderung der Fluoreszenz geht auch eine leichte Verschiebung des Peaks einher) wurde zusätzlich das Verhältnis der Fluoreszenzmaxima vor bzw. nach Valinomycinzugabe ermittelt (max-Werte). Zum Vergleich sind den Änderungen $\Delta F/F_{\text{FRET}}$ für den Energietransfer nach Anregung bei 480 nm diejenigen bei direkter Anregung des Emitters (Akzeptors, $\Delta F/F_{\text{Acc.}}$) bei 630 nm gegenübergestellt. Ein Vergleich mit den Änderungen der Restfluoreszenz des Donors (Absorbers), deren Maxima zwischen 570 und 600 nm liegen, ist nicht sinnvoll, da die Kurven hier bei geringer Intensität stark unregelmäßig verlaufen

und sich zum Teil in der Nähe der Maxima überschneiden. Auch ist ein klares Maximum in der Regel nicht auszumachen.

Die Fluoreszenzänderungen bei direkter Anregung des Cyanins bei 630 nm sind mit 10 bis 25% recht hoch, wie dies für einen *slow-response* Farbstoff auch zu erwarten ist. Der teilweise recht erhebliche Unterschied zwischen den Werten bei derselben Wellenlänge bzw. bei den etwas unterschiedlichen Wellenlängen der Maxima (max-Werte in Tab. 4) ist durch die hypsochrome Verschiebung der Fluoreszenzspektren zu erklären, die mit bloßem Auge in den Auftragungen erkennbar ist. Dies steht allerdings im Widerspruch zu den eingangs gemachten Angaben, denen zufolge eine Erhöhung der Fluoreszenz mit einer Rotverschiebung einhergehen sollte. Hierfür kann keine Erklärung gegeben werden außer daß das Verhalten des Cyanin-Teils im Bichromophor anders ist als für das isolierte Cyanin.

3.6.5.2. Auf der Basis der integralen Fluoreszenz

Für die Berechnung wurden bei den Meßkurven, für die bei 480 nm angeregt wurde, der Wellenlängenbereich vom Peak bis zum kurzwelligen Minimum und um den gleichen Wellenlängenbetrag in langwelliger Richtung integriert. Wenn das nicht möglich war, so wurde vom langwelligen Minimum bis zum Peak und um den gleichen Betrag darüber hinaus integriert.

Bei Anregung bei 630 nm wurde für die Kurven vor Valinomycinzugabe einfach der Bereich vom Beginn des Meßbereichs (650 nm) bis zum Peak und um den gleichen Betrag darüber hinaus integriert. Für die entsprechende Kurve nach Valinomycinzugabe wurde dann über denselben Bereich integriert.

In Tabelle 5 sind die einzelnen Integrationsbereiche aufgeführt. A(nm) bzw. A_{val}(nm) bedeuten hier die Flächen unter den Fluoreszenzkurven vor bzw. nach Valinomycinzugabe bei Anregung mit der Wellenlänge (nm).

	A _{val} (480)	A(480)	Peak	A _{val} (630)	A(630)	Peak
39a	635-713	637-715	674, 676	650-702	650-702	676
39b	649,5-	652,5-703,5	675,678	650-705	650-705	677,5
39c	631-717	635-721	674, 678	650-702	650-702	676
39d	651.5-	654-703	676, 678.5	650-705	650-705	677.5

Tab. 5: Wellenlängenbereiche für die Integration der Fluoreszenzkurven für die Ermittlung der integralen Fluoreszenzänderung

Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse aus diesen Berechnungen.

	A _{val} (480)	A(480)	(A _{val} /A)-	A _{val} (630)	A(630)	(A _{val} /A)-1
39a	47.88786	47.31803	1,20	37.46313	34,23124	9,44
39b	38,00411	36,92654	2,92	39,02387	35,04218	11,36
39c	49,64508	43,67775	13,66	38,3476	31,22049	22,83
39d	37,0886	36,47476	1,68	38,61156	34,34822	12,41

Tab. 6: Ergebnisse der Berechnung der integralen Fluoreszenzänderungen

Es wird erkennbar, daß die Verhältnisse der Integrale die gleiche Tendenz aufweisen, wie die einfachen Peakhöhen: **39a** und **39d** zeigen etwa die gleiche Änderung, **39b** liegt etwas darüber und **39c** weist eine viel größere Änderung auf. Auch der Vergleich der Verhältnisse bei direkter Anregung des Akzeptors mit denen für die Anregung bei 480 nm zeigt den gleichen Unterschied wie oben: sie sind deutlich größer bei direkter Anregung.

Die Fluoreszenzänderung für den Fall des Energietransfers fällt deutlich geringer aus als bei direkter Anregung des Cyanin-Teils bei 630 nm. Dies steht zum Einen im Einklang mit der bereits erwähnten Tatsache der zurückgegangenen Fluoreszenzquantenausbeute. Freilich können über die Änderung der Quantenausbeuten bei Einlagerung in die Liposomen keine Aussagen gemacht werden, da wegen der Schwerlöslichkeit der Farbstoffe in Wasser keine Vergleichswerte vorliegen. Nur **39c** zeigt eine auffällig große Änderung. Während die Werte der anderen Bichromophore im Bereich einiger Prozent liegen, d. h. nicht besser sind als die für einen Styrylfarbstoff, zeigt **39c** eine Änderung von ca. 15%, was im Bereich der besten *fast-response* Farbstoffe liegt. Hier Meßwerte für

die Zeitabhängigkeit zu erhalten wäre sehr interessant. Denn wie es scheint, ist es hier gelungen, einen FRET-Farbstoff zu entwerfen, der große potentialabhängige Änderungen in kurzer Zeit aufweist.

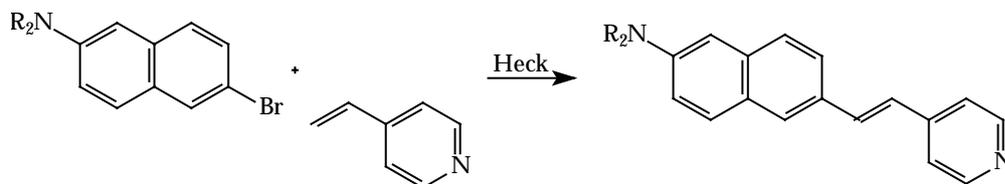
4. Zusammenfassung

Als Ergebnisse dieser Arbeit seien folgende zwei Gebiete zusammengefaßt dargestellt: erstens die neu synthetisierten Produkte (die den Nummern entsprechenden Formeln finden sich im Formelregister auf der letzten Seite); zweitens die Ergebnisse der mit diesen Verbindungen durchgeführten Messungen.

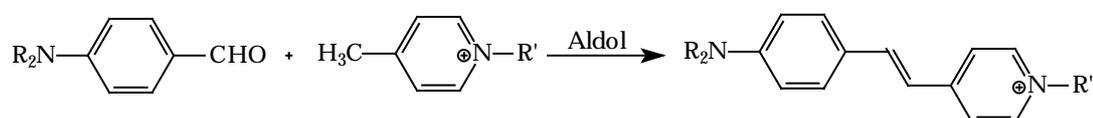
4.1. Synthetische Ergebnisse

4.1.1. Chromophore

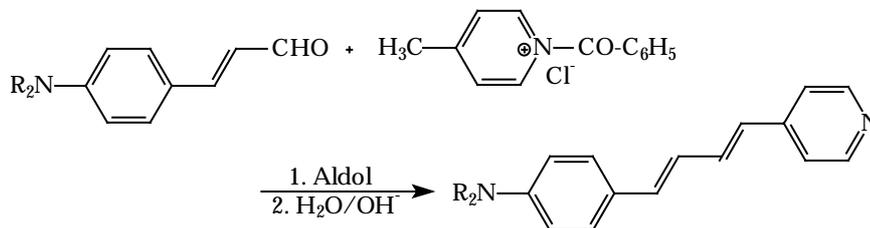
Zur Darstellung der unterschiedlichen Chromophore (Styrylpyridinium-, Aminonaphthylvinylpyridin-, Aminophenylbutadienylphenyl- und Pentamethincyanin-Chromophore) konnten synthetische Zugänge entwickelt werden, die meist einen einfachen Zugang zu den benötigten Verbindungen ermöglichen. Es sind dies die Heck-Reaktion für die Aminonaphthylvinylpyridin-Chromophore (**5 a-f** mit $R = C_nH_{2n+1}$; $n = 2,3,4,5,6,8$):



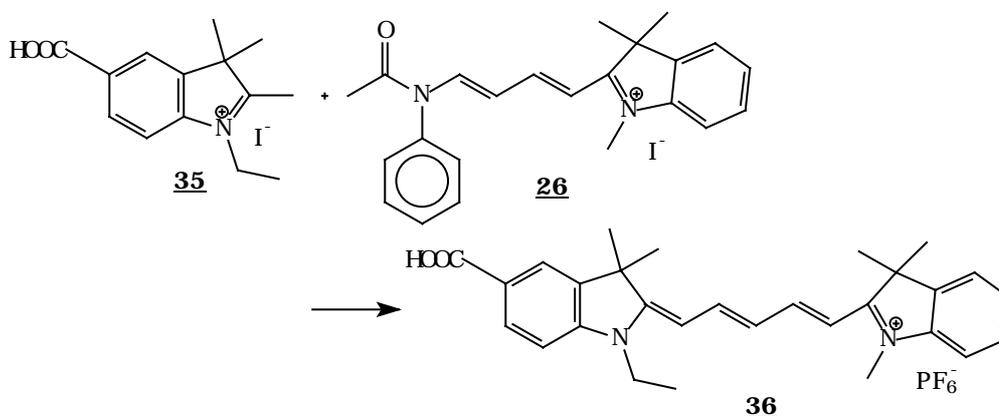
Die Aldolkondensation für die Styrylpyridinium-Farbstoffe (**13a-e**):



Eine modifizierte Aldolkondensation mit nachfolgender Dequarternisierung zur Darstellung des Aminophenylbutadienyl-pyridins **9**:



Die konventionelle Pentamethincyaninsynthese nach Hamer⁷⁵, die die Darstellung funktionalisierter Pentamethincyanine gestattet:



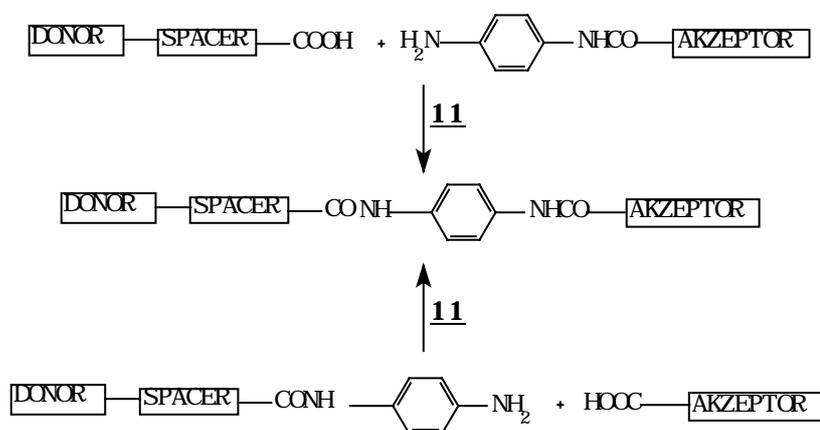
Auf diese Weise wurden auch die der Verbindung **36** entsprechende Dicarbonsäure **37** sowie die Pentamethincyaninessigsäure **31** dargestellt.

4.1.2. Funktionelle Gruppen

Die Funktionalisierung der Farbstoffe erfolgt stets bereits bei der Synthese der Chromophore. Entweder enthalten die Vorstufen bereits eine Carbonsäuregruppe (Verbindungen **13 a-e**), oder es wird eine Farbstoff-Base wie **5** mit einem Bromalkyl-NHS-Ester **1 a-e** quarternisiert (Verbindungen **6 a-c**, **7 a-d**). Die nachträgliche Einführung von funktionellen Gruppen (Reaktivgruppen) in ein bestehendes Farbstoff-Molekül, wie sie in der Literatur mancherorts beschrieben wird, führte in der vorliegenden Arbeit in keinem Falle zum Ziel. Die einzige Ausnahme hiervon ist, trivialerweise, die Einführung der Aminogruppe in Form von p-Phenylendiamin an einer Säurefunktion (Verbindungen **14 a-d**, s. nächsten Abschnitt).

4.1.3. Verknüpfung zu Bichromophoren

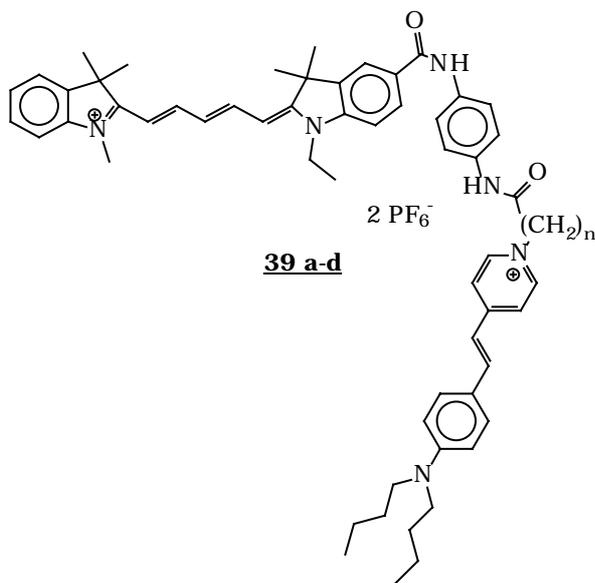
Die Verknüpfung von funktionalisierten Farbstoffen wurde auf mehrere Weise versucht. Dabei führte die Verknüpfung von NHS-Estern mit aminosubstituierten Farbstoffen wie **14** oder **38** nicht zum Ziel. Dagegen gelang die Synthese von Bichromophoren in zwei Schritten: zunächst wird einer der beiden Farbstoffe mit Säurefunktion (also z. B. **13** oder **36**) mit p-Phenylendiamin unter der Wirkung des Aktivierungsreagenz **11** zur Reaktion gebracht, wodurch ein Amid gebildet wird, das noch eine freie Aminogruppe trägt. Danach wird dieses Amid wiederum unter der Wirkung von **11** mit dem anderen säurefunktionalisierten Farbstoff verknüpft.



So wurden die Verbindungen **39 a-d** dargestellt. Ein evtl. störender Einfluß des aromatischen Systems des p-Phenylendiamins konnte nicht vermieden werden, da aliphatische bzw. alicyclische Diamine zwar mit den Säurefunktionen im Sinne einer Amidbildung reagieren, für die Weiterreaktion zum bichromophor jedoch zu stark sind und so zur Zersetzung führen.

Auf der letzten Stufe läßt sich im Einzelfall der jeweilige Bichromophor auf zweierlei Weise darstellen: das in der vorletzten Stufe gebildete Amid mit freier Amin-Funktion kann aus beiden Teilchromophoren gebildet werden, Donor (Styrylpyridinium-Farbstoff) oder Akzeptor (Pentamethincyanin; die Bezeichnung Donor bzw. Akzeptor innerhalb des Bichromophors bezieht sich auf die unten dargestellten Fluoreszenzeigenschaften). Welche Route jeweils beschriftet wird, muß anhand der synthetischen Machbarkeit entschieden werden (s.

Experimentalteil). Die Charakterisierung der so erhaltenen Bichromophore **39 a-d** erfolgte mit $^1\text{H-NMR}_{300}$ -Spektroskopie, FAB-Massenspektrometrie und (indirekt) durch die Auswertung der Fluoreszenz-eigenschaften. Letztere weisen durch das Vorhandensein eines konzentrationsunabhängigen Energietransfers auf die kovalente Bindung zwischen den beiden Teilchromophoren hin. Zur Auswertung der FAB-Massenspektren sowie der NMR-Spektren s. Hauptteil, Abschnitte 3.4.3.1. und 3.4.3.2.



4.2. Meßergebnisse

4.2.1. FRET in Lösung

In ethanolischer Lösung zeigen die hier vorgestellten Bichromophore **39 a-d** effizienten Energietransfer, der nicht konzentrationsabhängig ist. Der Energietransfer ist so zu verstehen, daß die von dem Styrylpyridin bei Anregung durch Licht von ca. 500 nm aufgenommene Energie strahlungslos intramolekular an das Pentamethincyanin weitergegeben wird, dessen Absorptionsmaximum in der Nähe des Emissionsmaximums des Styrylfarbstoffs liegt. Die Effizienz des Transfers wird dabei nicht nur durch die Länge des Spacers bestimmt, sondern hängt offensichtlich auch von der gegenseitigen räumlichen Orientierung der beiden Teilchromophore ab, die durch den Anteil an sp^2 -Zentren im Spacer bestimmt wird. Damit ergibt sich kein stetiger Zusammenhang zwischen der rechnerischen Länge des Spacers und der Effizienz des Energietransfers. Die Quantenausbeuten der Fluoreszenz sind (in Chloroform) ebenfalls unabhängig von der Spacerlänge.

4.2.2. Potentialabhängigkeit auf Zellmembranen

Sowohl Berechnungen auf der Basis der Peakhöhen als auch solche auf der Basis der integrierten Peakflächen zeigen, daß die Potentialabhängigkeit der Fluoreszenz der vier dargestellten Bichromophore keine einheitliche Tendenz zeigen. Während **39a** und **39d** in etwa die gleiche Potentialabhängigkeit aufweisen (2-4%), ist die von **39b** etwas größer (3-5%). Die Fluoreszenz von **39c** schließlich zeigt eine deutlich stärkere Änderung (13-17%). Insgesamt sind diese Änderungen bei Energietransfermessungen deutlich geringer als bei direkter Anregung des Cyanin-Teils (Akzeptors) des Bichromophors. Ob diese Änderung allerdings wirklich potentialabhängig ist und nicht vielmehr durch eine Wechselwirkung mit dem eingesetzten Valinomycin hervorgerufen werden, muß durch zukünftige Untersuchungen nachgewiesen werden.

4.2.3. Verwendung der Reaktivfarbstoffe als Fluoreszenz-Marker

Obgleich die Marker-Substanzen **6a** - **6c** und **7a** - **7d** dargestellt werden konnten, sind Messungen unter ihrer Verwendung nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit zustande gekommen, da die dazu nötige interdisziplinäre Kooperation scheiterte. Eine spätere Arbeit mag dazu noch Ergebnisse erbringen.

5. Experimenteller Teil

5.1. Allgemeines

Zur Charakterisierung der dargestellten Verbindungen wurden folgende Geräte und Materialien verwendet:

Schmelzpunkte

SMD 20, Fa. Büchi, Flaviil/Schweiz (nicht korrigiert)

$^1\text{H-NMR}$ -Spektren

300 MHz: Varian VXR 300

IR-Spektren

Perkin Elmer 710 B

UV-Spektren

LKB Ultrospec II

Massenspektren

MAT 311 A (70 eV)

Dünnschichtchromatographie

DC-Aluminiumfolien F 254, Fa. Merck

Säulenchromatographie

Für alle Trennungen wurde eine Säule von 20 cm Länge und 9 cm Durchmesser mit einer G3-Fritte verwendet. Als stationäre Phase diente Kieselgel MN 60 der Firma Macherey und Nagel

Für die Durchführung der Messungen danke ich:

Frau Beuer

$^1\text{H-NMR}$

Herrn Dr. Steigl

Frau Menzel UV/IR

den Herren Dr. G. Broszeit MS

und Dr. J. Heller

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle meinen Kollegen für die freundschaftliche Zusammenarbeit und viele wertvolle Diskussionen, Frau Dr. C. Fuchs für ihre unschätzbare Hilfe bei den Potentialmessungen und insbesondere Dr. S. Beutner für die Unterstützung bei technischen und organisatorischen Problemen.

5.2. Beschreibung der Versuche

Versuch 1: Darstellung der 1-(n-Brom-1-oxy-alkoxy-)pyrrolidin-1,5-dione **1a-e**

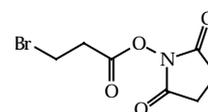
Die einzelnen Produkte werden alle auf die gleiche Weise dargestellt. Hierzu werden in einem 2-l-Dreihalskolben mit Stickstoffeinleitungsrohr 43.1 mmol n-Bromalkansäure, 4.96 g (43.1 mmol) N-Hydroxysuccinimid und 8.89 g (43.1 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in dieser Reihenfolge in 1200 ml Essigsäureethylester (über Calciumchlorid getrocknet und destilliert) gelöst. Die Lösung wird mit Stickstoff gespült und 2 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Sie wird dann vom gebildeten Dicyclohexylharnstoff abgesaugt und bei 25°C unter Vakuum einrotiert. Der Rückstand wird mit 25 ml Essigester aufgenommen und erneut filtriert. Das Filtrat wird eingedampft und das erhaltene Öl mit 50 ml Ethanol versetzt. Man läßt im Kühlschrank auskristallisieren und saugt ab. Der Rückstand wird mit Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Versuch 1.1.: 1-(3-Brom-1-oxy-propoxy-)pyrrolidin-1,5-dion **1a**

Ausbeute: 7.43 g $\hat{=}$ 29.7 mmol $\hat{=}$ 69% (Lit.: 72%)

Smp.: 84 -86°C (86°C)

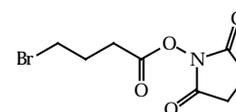
$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 3.63 (2H; T); 3.25 (2H; T); 2.86 (4H; S)



Versuch 1.2.: 1-(4-Brom-1-oxy-butoxy-)pyrrolidin-1,5-dion **1b**

Ausbeute: 5.80 g $\hat{=}$ 22.0 mmol $\hat{=}$ 50% (Lit.: 72%)

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 3.52 (2H; T); 2.85 (4H; S); 2.84 (2H; T); 2.30 (2H; M)



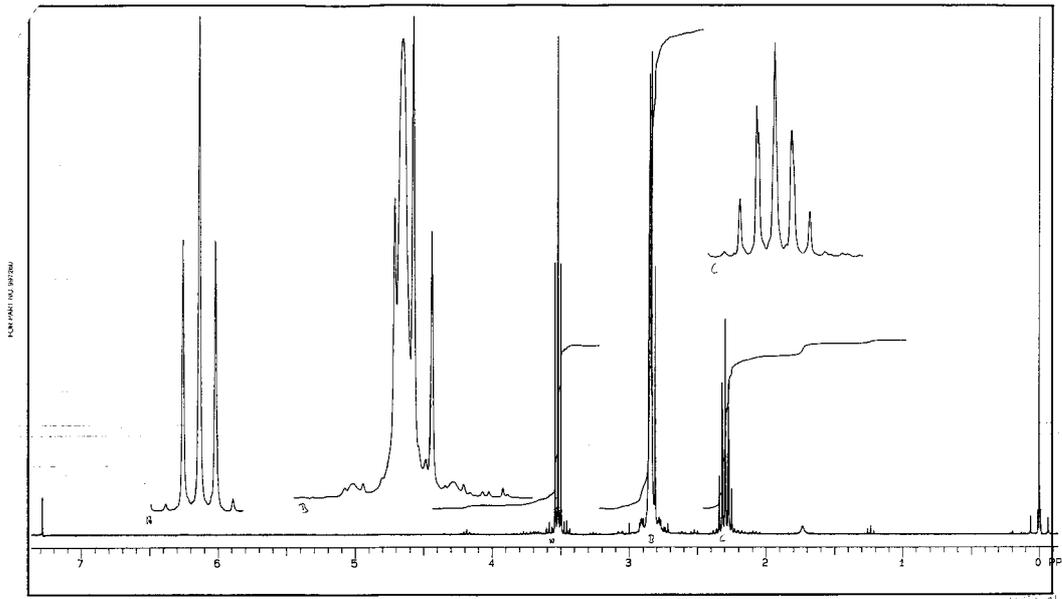


Abb. 26: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von **1b**

Versuch 1.3.: 1-(5-Brom-1-oxypentoxy)pyrrolidin-1,5-dion **1c**

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 3.45 (2H; T); 2.84 (4H; S); 2.67 (2H; T); 1.94 (4H; M)

Ausbeute: 7.80 g $\hat{=}$ 28.0 mmol $\hat{=}$ 65% (Lit.: 72%)

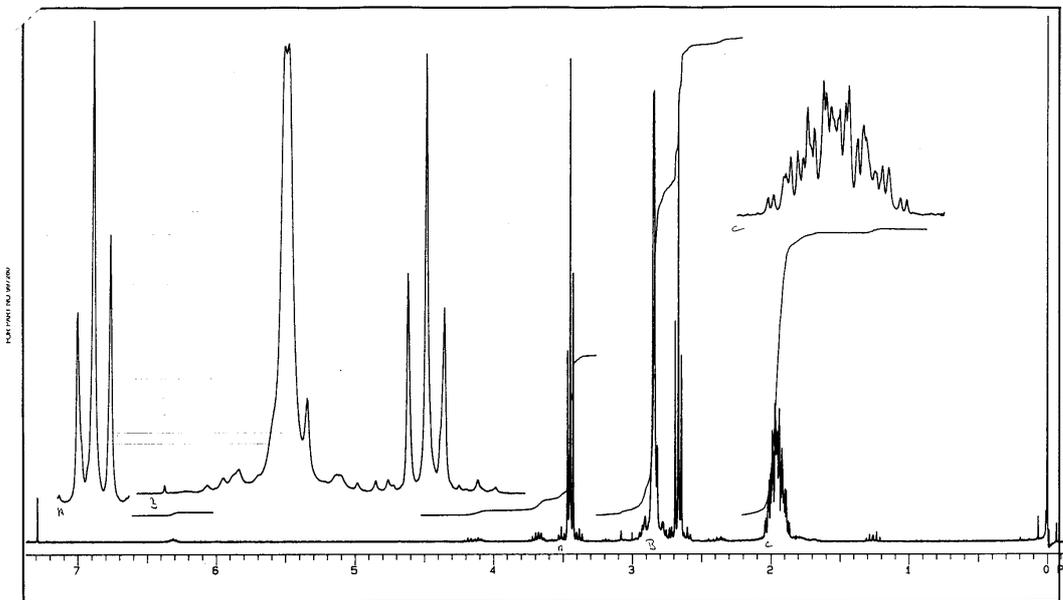
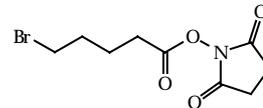
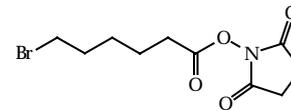


Abb. 27: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von **1c**

Versuch 1.4.: 1-(6-Brom-1-oxy-hexoxy-)pyrrolidin-1,5-dion 1dAusbeute: 8.98 g $\hat{=}$ 30.8 mmol $\hat{=}$ 73% $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 3.42 (2H; T); 2.84 (4H; S);

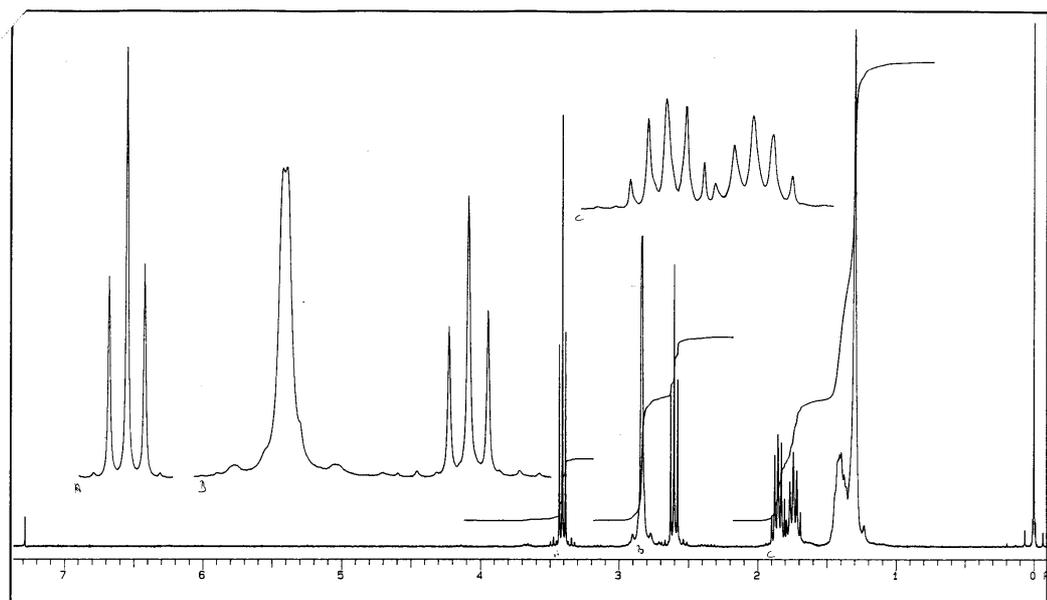
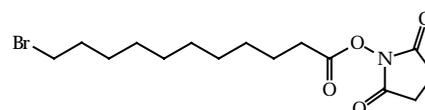
2.64 (2H; T); 1.88 (2H; M); 1.78 (2H; M); 1.57 (2H; M)

**Versuch 1.5.: 1-(11-Brom-1-oxy-undecoxy-)pyrrolidin-1,5-dion 1e**Ausbeute: 11.11 g $\hat{=}$ 31.0 mmol $\hat{=}$ 71% $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 3.41 (2H; T);

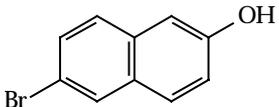
2.84 (4H; S); 2.60 (2H; T); 1.85 (2H; M);

1.74 (2H; M); 1.30 - 1.42 (12 H; M, nicht

aufgelöst)

Abb. 28: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von 1e

Versuch 2: 6-Brom-2-naphthol⁷⁶ 2

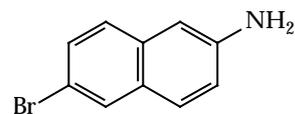
In einem 2-l-Dreihalskolben mit Magnetrührer, Rückflußkühler, Tropftrichter und Thermometer werden  72.0 g (0.5 mol) 2-Naphthol in 200 ml Eisessig vorgelegt. Zu dieser Lösung werden innerhalb von 30 min 160.0 g (1.0 mol) Brom in 50 ml Eisessig zugetropft. Gegen Ende der Zugabe wird etwas mit Eiswasser gekühlt. Nach Zugabe von 50 ml Wasser wird die Reaktionsmischung aufgeköcht. Bei 100°C werden nun 12.5 g Zinnpulver zugegeben. Dann wird gekocht bis das Zinn sich aufgelöst hat. Die Lösung schäumt dabei stark auf. Eine weitere Portion von 12.5 g Zinn wird zugegeben und wieder wird bis zur vollständigen Auflösung gekocht. Nach Zugabe weiterer 50.0 g Zinn (insgesamt also 0.63 mol) wird dann noch 3 Stunden lang gekocht. Nach Abkühlen der Reaktionsmischung auf 50°C wird der Rückstand abgesaugt und mit 50 ml Eisessig nachgewaschen. Das Filtrat wird in 1500 ml Wasser gegossen, einige Zeit gerührt und dann abgesaugt. Der Niederschlag wird in 500 ml Wasser suspendiert, 30 min lang gerührt und erneut abgesaugt. So wird ein rosafarbener Feststoff erhalten, der noch große Mengen Wasser enthält. Zu dessen Entfernung läßt man über Nacht an der Luft trocknen, danach im Vakuum-Trockenschrank bei 100°C, schließlich im Exsikkator über P₂O₅.

Ausbeute: 107.0 g $\hat{=}$ 0.48 mol $\hat{=}$ 96% (Lit.: 96-100%)

Smp.: 128.6°C (Lit.:127-129°C)

Versuch 3: 6-Brom-2-naphthylamin 3

In einem 300 ml-Autoklaven mit Glaseinsatz werden 15.0 g (0.067 mol) 6-Brom-2-Naphthol **2** und 40.0 g (0.325 mol) Ammoniumsulfid in 80 ml (1.18 mol)



Ammoniakwasser (25%) angeteigt. Der Autoklav wird verschlossen und 24 Stunden lang auf 160°C erhitzt. Der Druck steigt dabei auf 18 bar an. Nach Erkalten des Autoklavs wird die Reaktionsmischung, die nun unter dem Ammoniakwasser einen festen, harten Kuchen von beiger Farbe bildet, zerkleinert und mit Hilfe von Chloroform und Wasser in Lösung gebracht. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen und ohne Trocknung eingedampft. Der feste Rückstand wird mit 10%-iger Salzsäure viermal ausgezogen und jedesmal heiß abgesaugt. Die erkaltete Lösung wird nochmals filtriert und dann mit Natronlauge neutralisiert. Der gebildete Niederschlag wird mit Chloroform und Natronlauge aufgenommen und die organische Phase mehrmals mit Natronlauge gewaschen. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der so erhaltene grünliche Feststoff ist rein genug für die weiteren Reaktionen.

Ausbeute: 7.5 g $\hat{=}$ 33.9 mmol $\hat{=}$ 50%

Smp.: 106°C (Lit.: 109-111°C)

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 7.82 (1H; S; H-5); 7.53 (1H; D; H-7); 7.41; 2H; H-4 + H-8); 6.92 (1H; D; H-3); 6.90 (1H; S; H-1); 3.84 (2H; S; -NH₂)

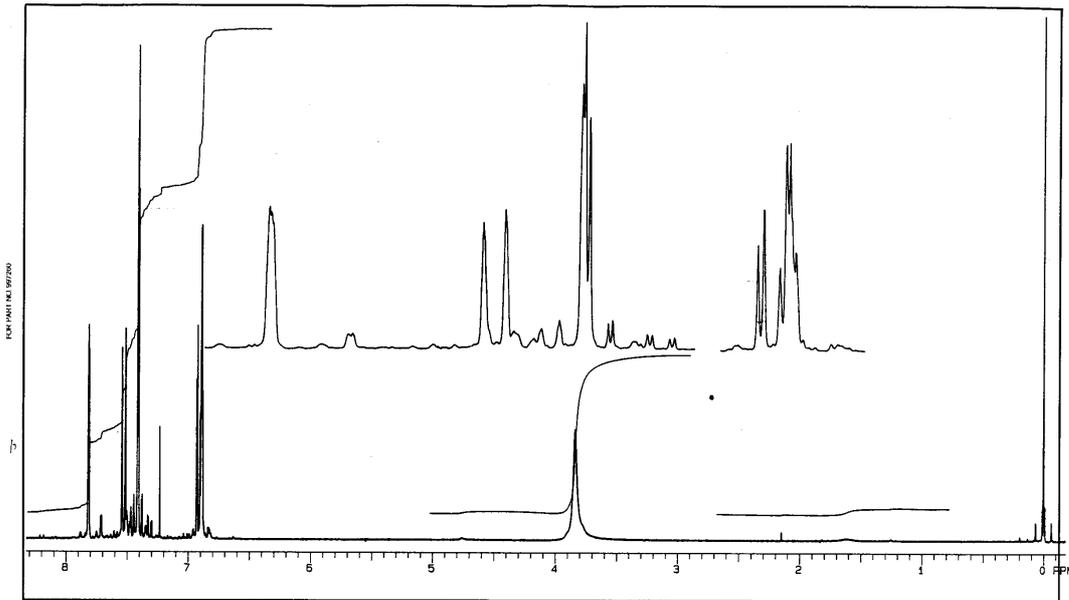


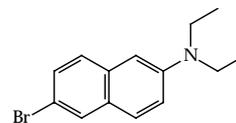
Abb. 29: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von **3**

Versuch 4: Darstellung der N,N-Di-n-alkyl-6-brom-2-naphthylamine **4a-f**

Allgemeine Vorschrift: In einem Zweihalskolben wird 6-Brom-2-naphthylamin (1 mol) und Butyliodid (3 mol) in 1.25 l Dimethylformamid gelöst. Nach Zugabe von wasserfreiem Kaliumcarbonat (2 mol) wird die Mischung mit Stickstoff gespült und unter Stickstoffatmosphäre 20 Stunden lang auf 130°C erhitzt. Nach Beendigung der Reaktion wird die Mischung mit 1.5 l Wasser versetzt und dreimal mit je 1.5 l Chloroform ausgeschüttelt. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und dann eingedampft. Die weitere Aufarbeitung erfolgt durch fraktionierte Destillation bzw. säulenchromatographisch (s. die einzelnen Produkte).

Versuch 4.1.: N,N-Diethyl-6-brom-2-naphthylamin 4a

Die Darstellung erfolgt nach der allgemeinen Vorschrift (s.o.). Die Reinigung erfolgt durch Destillation. Das Produkt erstarrt nach der Destillation zu einem schwach gelben Feststoff.



Ausbeute: 11.8 g $\hat{=}$ 42 mmol $\hat{=}$ 85%

Smp.: 49-53°C

Sdp.: 170-180°C (0.01 mbar)

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 6.79 - 7.78 (6H; Aromat, s.o.); 3.43 (4 H; Q); 1.20 (6H; T)

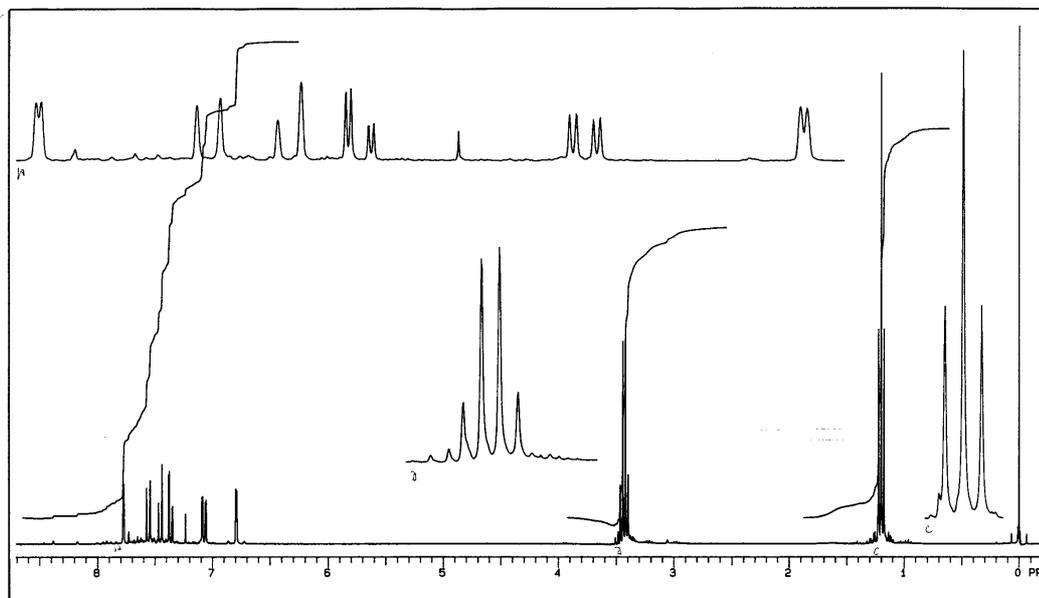
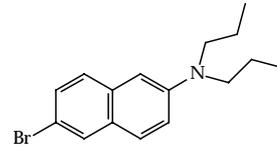


Abb. 30: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von 4a

Versuch 4.2.: N,N-Di-n-propyl-6-brom-2-naphthylamin 4b

Die Darstellung erfolgt nach der allgemeinen Vorschrift (s.o.). Die Reinigung erfolgt durch Destillation. Das Produkt erstarrt nach der Destillation zu einem gelblichen Feststoff.



Ausbeute: 13.6 g $\hat{=}$ 47 mmol $\hat{=}$ 85%

Smp.: 48-51°C

Sdp.: 160-170°C (0.01 mbar)

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 6.73 - 7.76 (6H; Aromat, s.o.); 3.29 (4H; T); 1.64 (4H; M); 0.94 (6H; T)

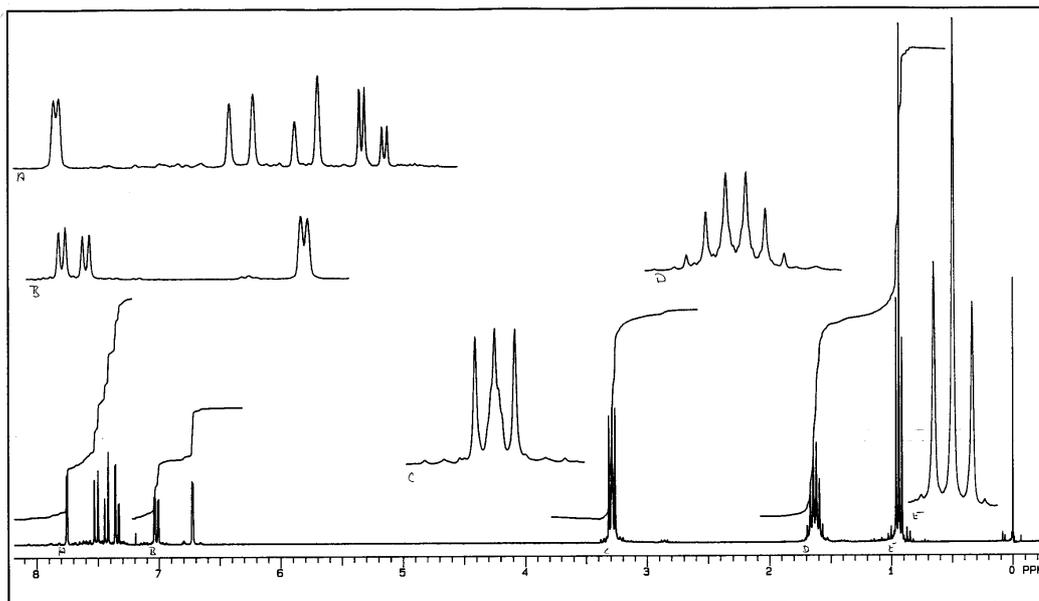
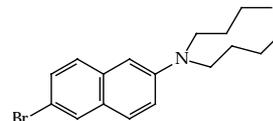


Abb. 31: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von 4b

Versuch 4.3.: N,N-Di-n-butyl-6-brom-2-naphthylamin 4c

Die weitere Aufarbeitung nach Entfernen des Lösungsmittels erfolgt durch fraktionierte Destillation im Vakuum. Hierzu verwendet man eine Zinke ohne



Kolonne. Die Temperatur des Heizbades muß unbedingt über 200°C sein (ggf. das Bad mit doppelter Aluminiumfolie umwickeln). Zunächst geht bei 0.01 mbar als tiefersiedende Fraktion das Monobutyl-Derivat bei 158-161°C über, unmittelbar darauf (bei 169-180°C) die Hauptfraktion als gelbes Öl, das erst viel später kristallisiert.

Ausbeute: 7.6 g $\hat{=}$ 22.6 mmol $\hat{=}$ 67% (Lit.: 70%)

Sm.Ber.: 26.7 - 31.7°C

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 6.74 - 7.77 (6H; Aromat, s.o.); 3.31 (4H; T); 1.60 (4H; M); 1.35 (4H; M); 0.97 (6H; T)

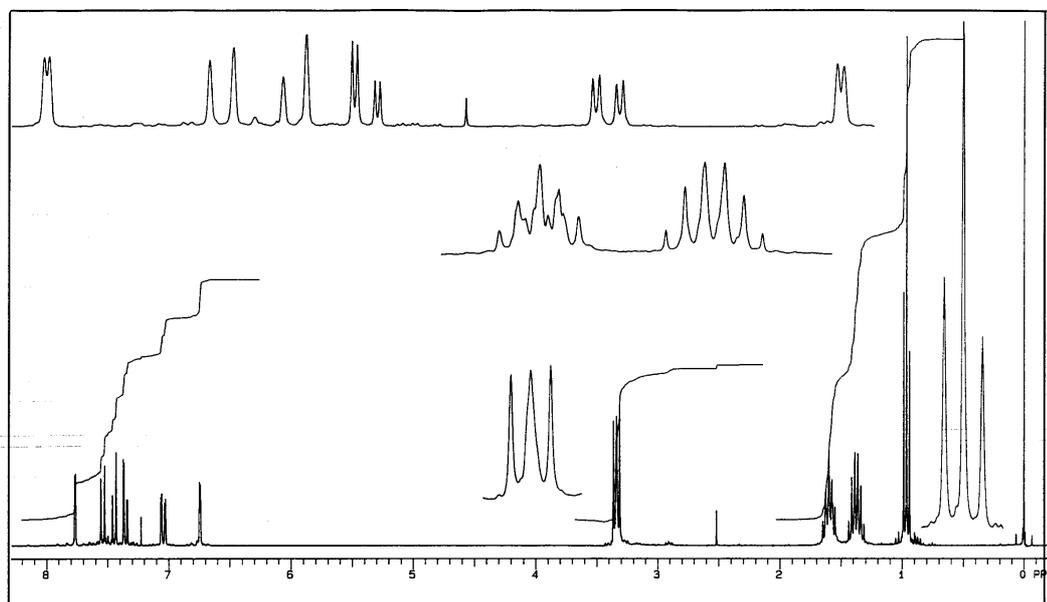
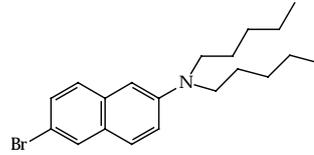


Abb. 32: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von 4c

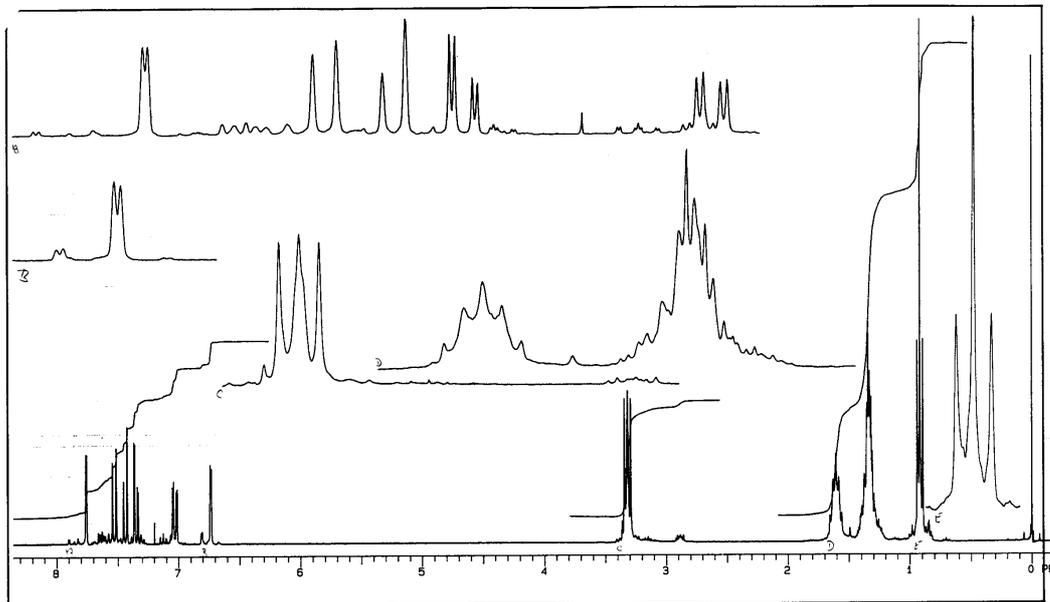
Versuch 4.4.: N,N-Di-n-pentyl-6-brom-2-naphthylamin 4d

Die Aufarbeitung erfolgt säulenchromatographisch mit Hexan/Ethylacetat 95:5 als Elutionsmittel. Das Produkt ist ein gelbes Öl.



Ausbeute: 19.0 g $\hat{=}$ 52 mmol $\hat{=}$ 79%

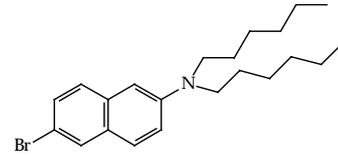
$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 6.73 - 7.76 (6H; Aromat, s.o.); 3.32 (4H; T); 1.61 (4H; M); 1.35 (8H; M); 0.92 (6H; T)



$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von 4d

Versuch 4.5.: N,N-Di-n-hexyl-6-brom-2-naphthylamin **4e**

Die Aufarbeitung erfolgt säulenchromatographisch mit Hexan/Ethylacetat 95:5 als Elutionsmittel. Das Produkt ist ein gelbes Öl.



Ausbeute: 5.8 g $\hat{=}$ 14.9 mmol $\hat{=}$ 66%

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 6.72 - 7.77 (6H; Aromat, s.o.); 3.33 (4H; T; 1.61 (4H; M); 1.33 (12 H; M, nicht aufgelöst); 0.90 (6H; T)

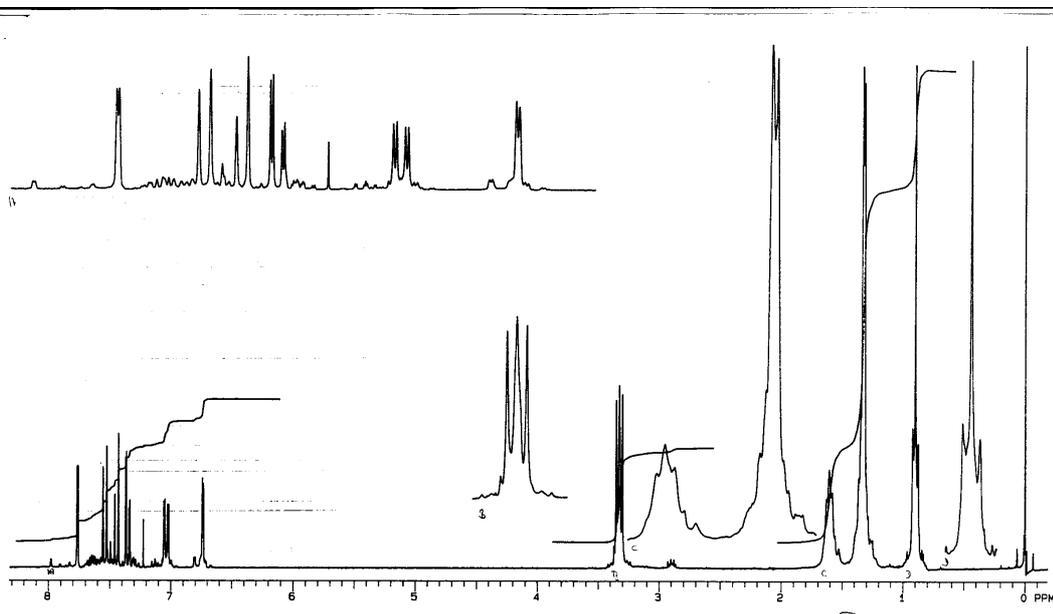
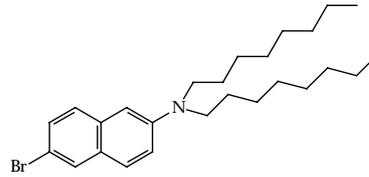


Abb. 33: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von **4e**

Versuch 4.6.: N,N-Di-n-oktyl-6-brom-2-naphthylamin 4f

Die Aufarbeitung erfolgt säulenchromatographisch mit Hexan/Ethylacetat 95:5 als Elutionsmittel. Das Produkt ist ein gelbes Öl.

Ausbeute: 17.6 g $\hat{=}$ 39 mmol $\hat{=}$ 84%



$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 6.73 - 7.77 (6 H; Aromat, s.o.); 3.33 (4H; T); 1.61 (4H; M); um 1.30 (20H; M, nicht aufgelöst); 0.88 (6H; T)

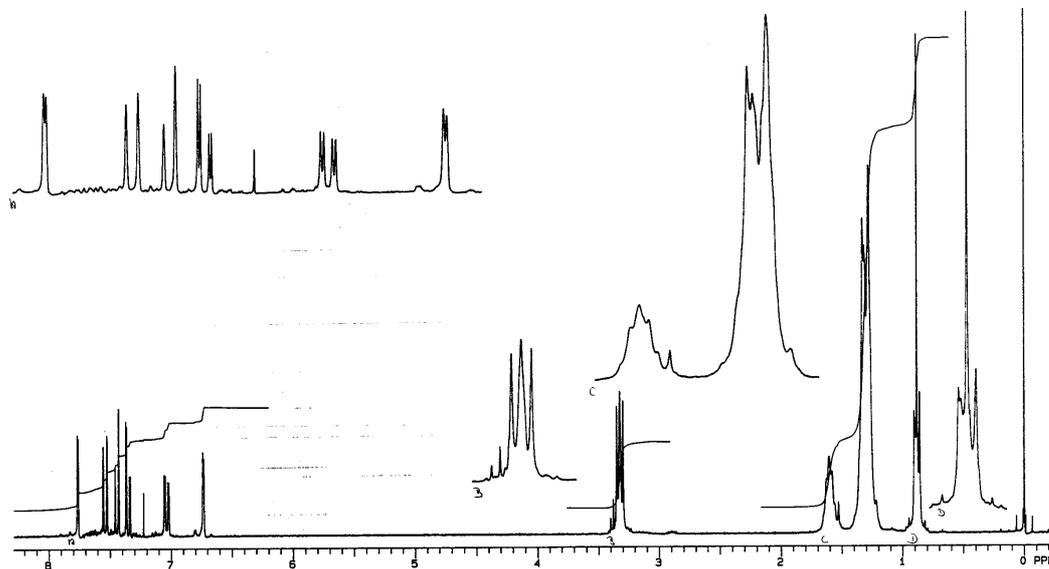


Abb. 34: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von 4f

Versuch 5: Darstellung der 6-(N,N-Di-n-alkylamino-)naphth-2-ylvinylpyridine **5a-f**

Allgemeine Vorschrift: In einem Zweihalskolben wird N,N-Di-n-alkyl-6-brom-2-naphthylamin **4** (1 mol), 4-Vinylpyridin (1.25 mol), Palladiumacetat (0.02 mol) und Tri-*o*-tolylphosphin (0.04 mol) in 500 ml Triethylamin gelöst. Die Lösung wird mit Stickstoff gespült und 72 Stunden lang unter Stickstoffatmosphäre auf 110°C erhitzt. Nach 20 Stunden werden dem Reaktionsgemisch, das inzwischen einen halbfesten Brei darstellt, erneut 450 ml Triethylamin zugegeben, um es wieder zu verflüssigen. Nach Beendigung der Reaktion wird Wasser zu dem Reaktionsgemisch gegeben. Mit Hilfe von Chloroform wird dieses dann aufgelöst. Die wässrige Phase wird zweimal mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wird mit Wasser annähernd neutral gewaschen. Sie wird dann über K₂CO₃ getrocknet. Nach dem Einrotieren wird das Rohprodukt aus Diethylether umkristallisiert.

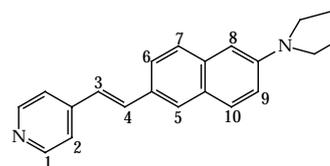
Versuch 5.1.: 6-(N,N-Diethylamino-)naphth-2-ylvinylpyridin **5a**

Ausbeute: 4.13 g \approx 13.7 mmol \approx 65%

Smp.: 193-201°C

IR (KBr-Preßling): 3453 cm⁻¹ (C=N-Val.);

2971 (C-H-Val.); 1618, 1596 (Ringschw.);



¹H-NMR₃₀₀(CDCl₃/TMS): 8.55 (2H; AB-System,

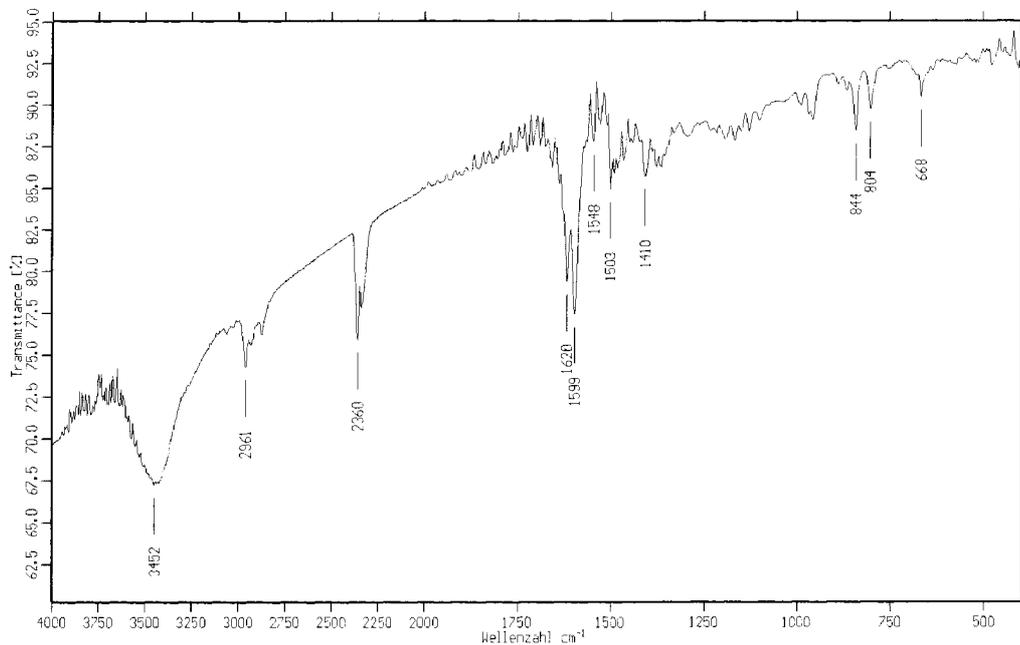
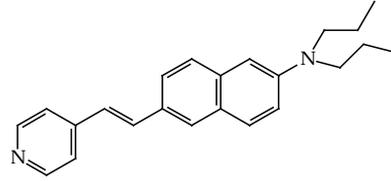
1); 7.34 (2H; AB-System; 2); 7.35 (1H; D; 3); 6.98 (1H; D; 4); 7.70 (1H; S, 5); 7.68 (1H; D; 6); 7.59 (2H; S; 7 + 10); 7.10 (1H; DD; 9); 6.84 (1H; D; 8); 3.47 (4H; Q); 1.22 (6H; T)

Versuch 5.2.: 6-(N,N-Di-n-propylamino-)naphth-2-ylvinylpyridin **5b**Ausbeute: 9.97 g $\hat{=}$ 30 mmol $\hat{=}$ 71%

Smp.: 136-41°C

IR (KBr-Preßling): 3452 cm^{-1} (C=N-Val.); 2961 (C-H-Val.); 1620, 1599 (Ringschw.); $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 6.77 - 8.54 (12 H;

Aromaten- und Vinyl-H, s.o.); 3.33 (4H; T); 1.65 (4H; M); 0.96 (6H; T)

Abb. 37: FTIR-Spektrum von **5b** (KBr-Preßling)

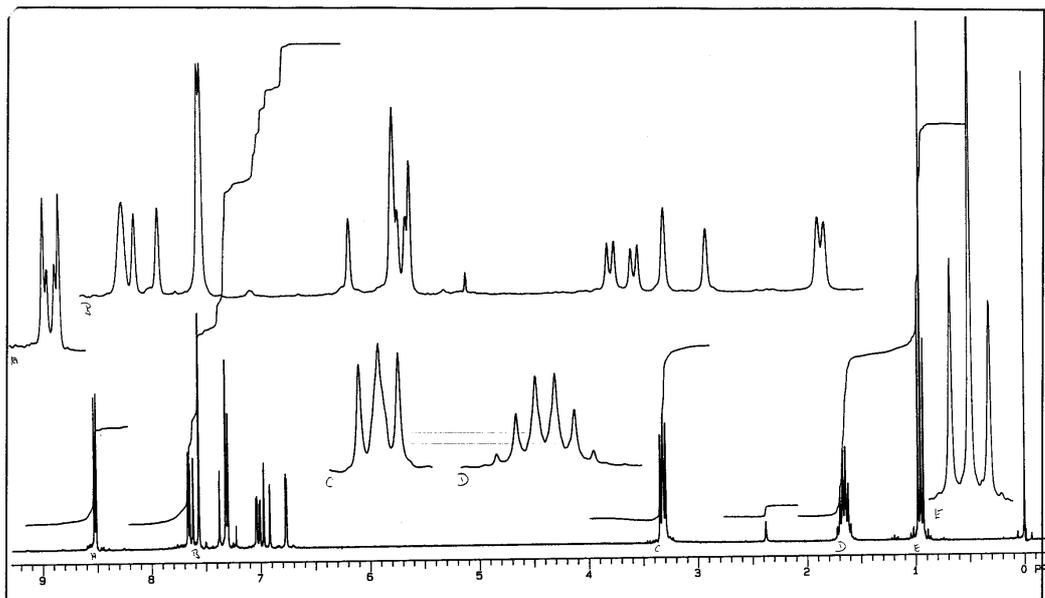


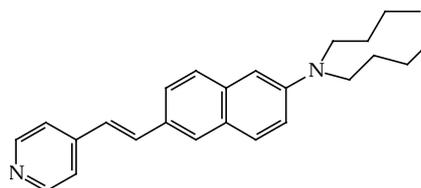
Abb. 38: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von **5b**

Versuch 5.3.: 6-(N,N-Di-n-butylamino-)naphth-2-ylvinylpyridin **5c**

Ausbeute: 6.34 g \cong 17.7 mmol \cong 79%

Smp.: 111-117°C

IR (KBr-Preßling): 3426 cm^{-1} (C=N-Val.);
2957 (C-H-Val.); 1619, 1598 (Ringschw.);



$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 6.77 - 8.57 (12 H; Aromaten- und Vinyl-H, s.o.); 3.38 (4H; T); 1.63 (4H; M); 1.40 (4H; M); 0.98 (6H; T)

Elementaranalyse: Ber.: C: 83.70; H: 8.44; N: 7.81

Gef.: C: 83.79; H: 8.69; N: 7.72

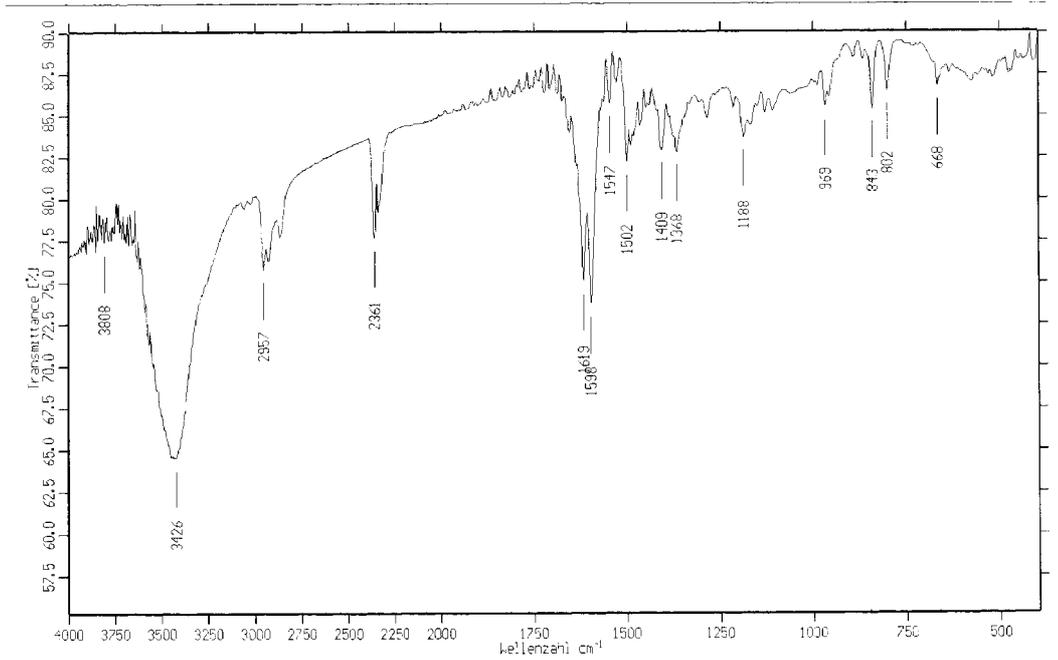


Abb. 39: FTIR-Spektrum von **5c** (KBr-Preßling)

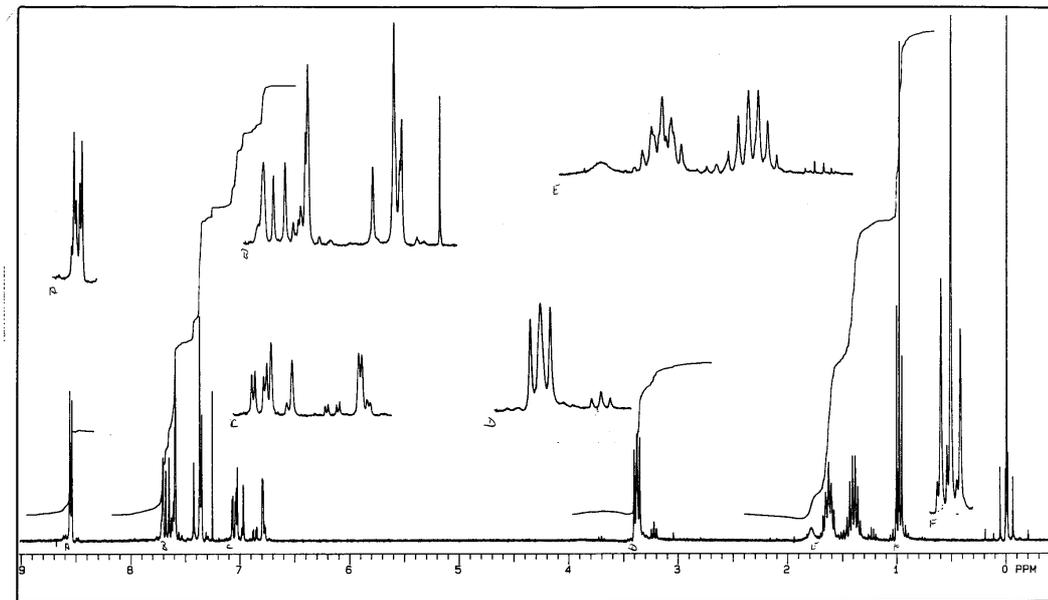
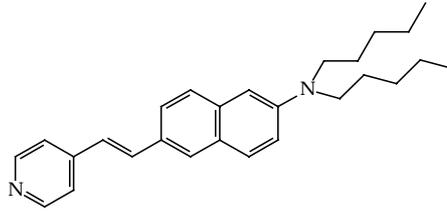
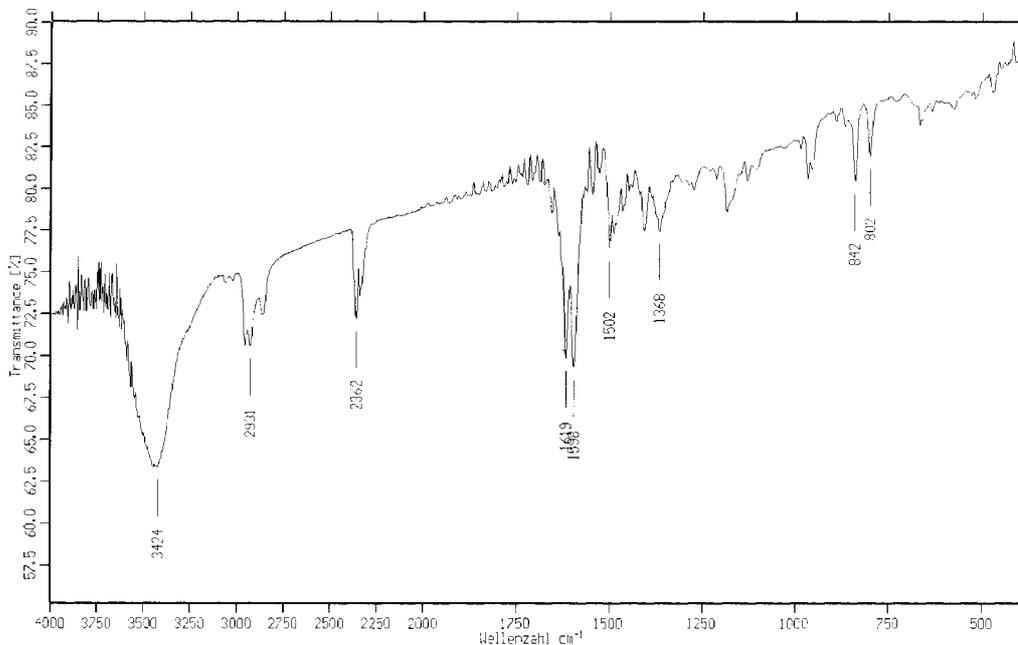
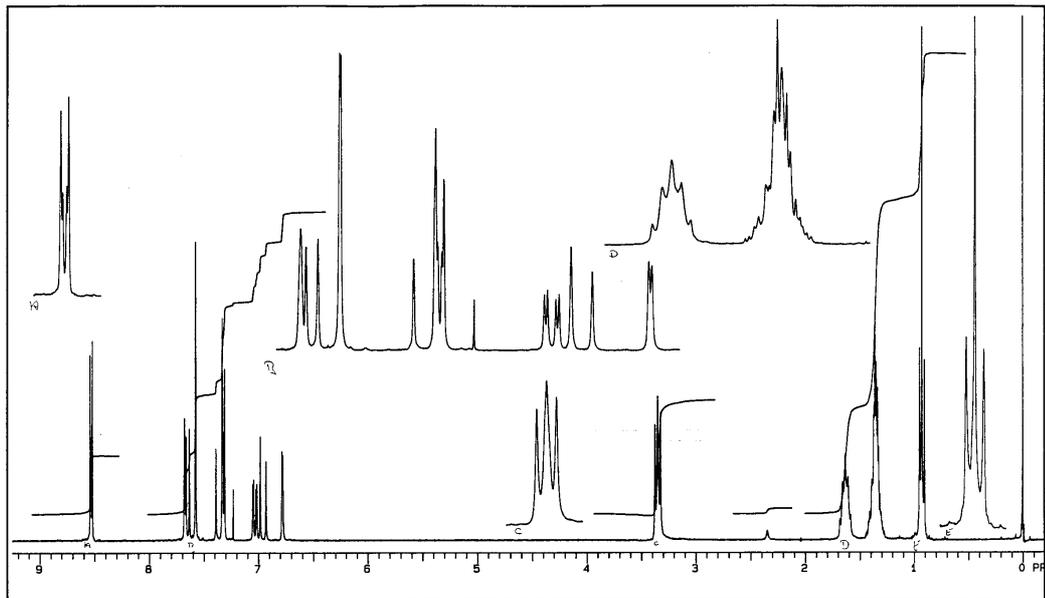


Abb. 40: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von **5c**

Versuch 5.4.: 6-(N,N-Di-n-pentylamino-)naphth-2-ylvinylpyridin **5d**Ausbeute: 10.10 g $\hat{=}$ 26 mmol $\hat{=}$ 51%

Smp.: 91-96°C

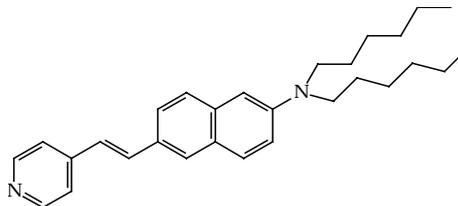
IR (KBr-Preßling): 3424 cm^{-1} (C=N-Val.);
2931 (C-H-Val.); 1619, 1598 (Ringschw.); $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 6.78 - 8.54 (12 H; Aromaten- und Vinyl-H, s.o.); 3.35 (4H; T); 1.63 (4H; M); 1.36 (8H; M, nicht aufgelöst); 0.93 (6H; T)Abb. 41: FTIR-Spektrum von **5d** (KBr-Preßling)

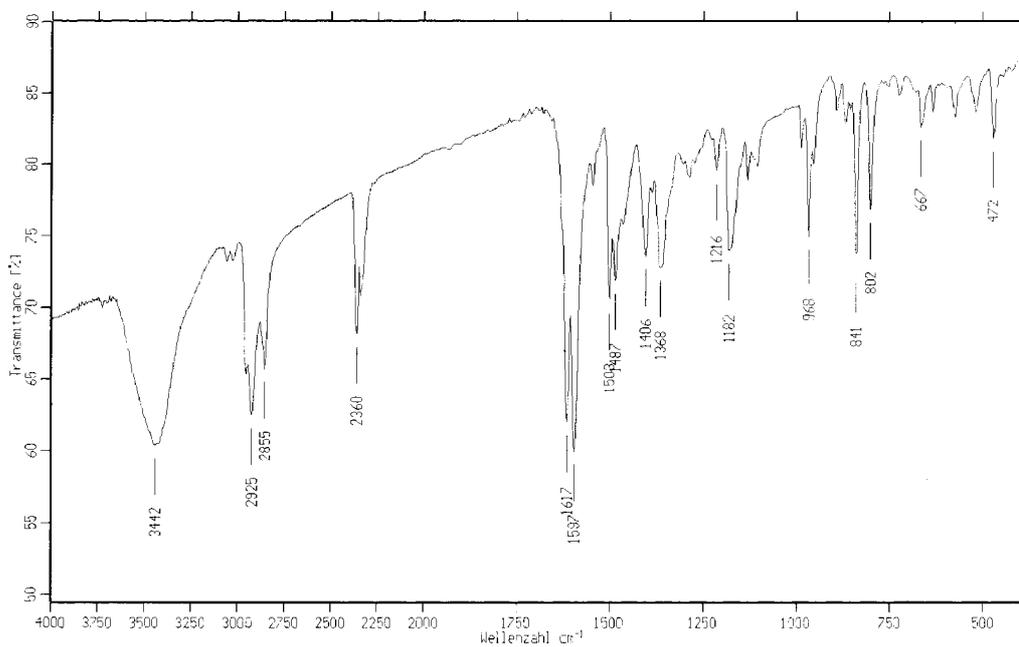
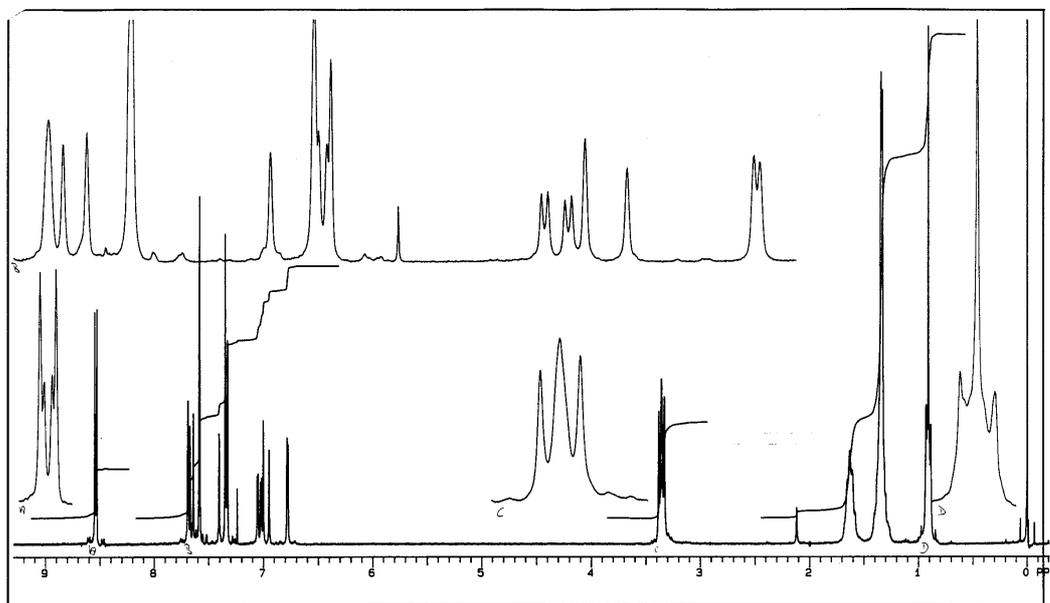
Abb. 42: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von **5d****Versuch 5.5.:** 6-(N,N-Di-n-hexylamino-)naphth-2-ylvinylpyridin **5e**Ausbeute: 1.80 g \cong 4.3 mmol \cong 30%

Smp.: 76-80°C

IR (KBr-Preßling): 3442 cm^{-1} (C=N-Val.);
2925, 2855 (C-H-Val.); 1617, 1597

(Ringschw.);

 $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 6.77 - 8.57 (12 H; Aromaten- und Vinyl-H, s.o.); 3.36 (4H; T); 1.63 (4H; M); 1.35 (12H; M, nicht aufgelöst); 0.91 (6H; T)

Abb. 43: FTIR-Spektrum von **5e** (KBr-Preßling)Abb. 44: ¹H-NMR₃₀₀(CDCl₃/TMS) von **5e**

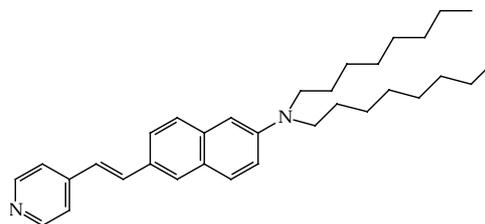
Versuch 5.6: 6-(N,N-Di-n-oktylamino-)naphth-2-ylvinylpyridin **5f**Ausbeute: 8.10 g $\hat{=}$ 17.2 mmol $\hat{=}$ 51%

Smp.: 56-62°C

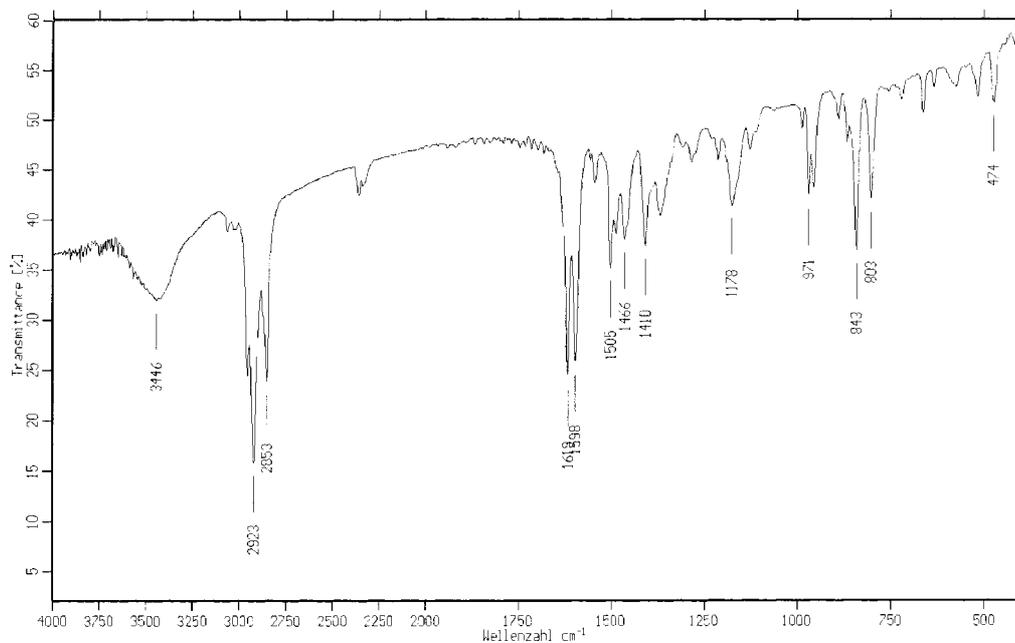
IR (KBr-Preßling): 3446 cm^{-1} (C=N-Val.);

2923, 2853 (C-H-Val.); 1619, 1598

(Ringschw.);

 $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 6.78 - 8.55 (12 H; Aromaten- und Vinyl-H, s.o.); 3.35

(4H; T); 1.63 (4H; M); um 1.29 (10H; M, nicht aufgelöst); 0.89 (6H; T)

Abb. 45: FTIR-Spektrum von **5f** (KBr-Preßling)

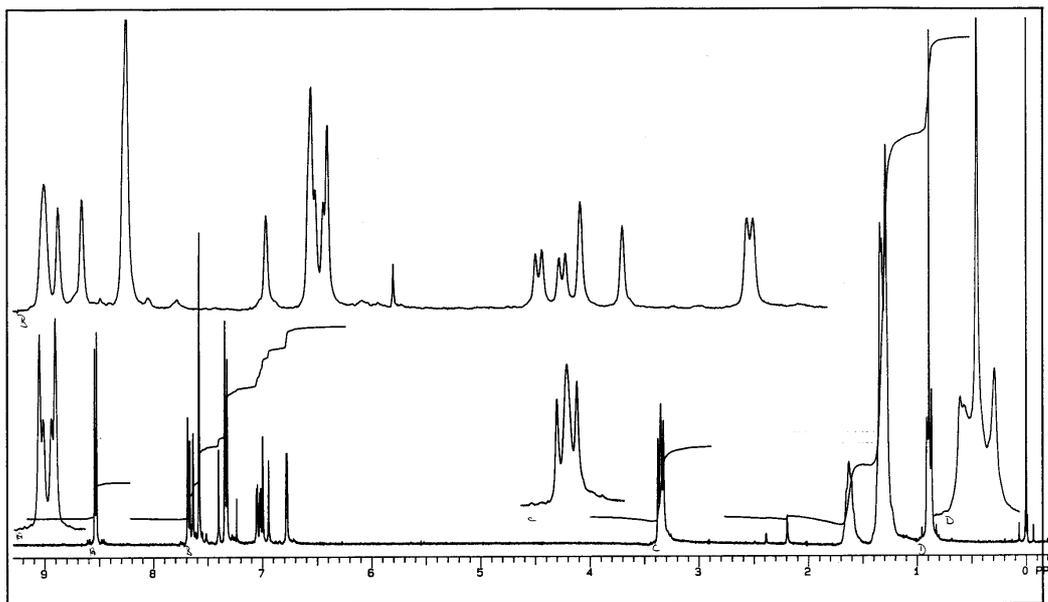
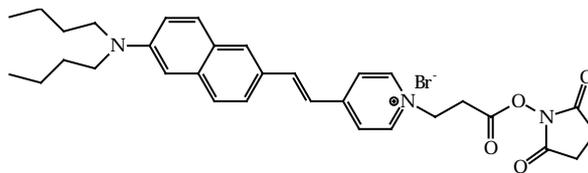


Abb. 46: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von **5f**

Versuch 6: Reaktivfarbstoffe aus **5a-f** und **1a-e**.**Versuch 6.1.:** 1-(3-Succinimidoxy-3-oxoprop-1-yl)-4-(2-(6-N,N-di-n-butylamino-naphth-2-yl)-vinyl)-pyridiniumbromid **6a**

500 mg (1.4 mmol) **5c** und 370 mg (1.4 mmol) **1a** werden in Substanz auf 110°C erhitzt. Die anfangs feste Mischung schmilzt



dabei zunächst auf, um sich nach wenigen Minuten wieder zu verfestigen. Nach zehn Minuten wird die Reaktionsmischung etwas abgekühlt, in wenig Chloroform aufgelöst und das Produkt mit Essigester ausgefällt. Nach dem Absaugen wird es im Vakuum getrocknet.

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 0.93 (6H; T); 1.35 (4H; M); 1.52 (4H; M); 2.83 (4H; S); 3.35 (4H T); 3.63 (2H; T); 4.81 (2H; T); 7.0 bis 9.2 (12 H; M; Aromaten und Vinyl-H)

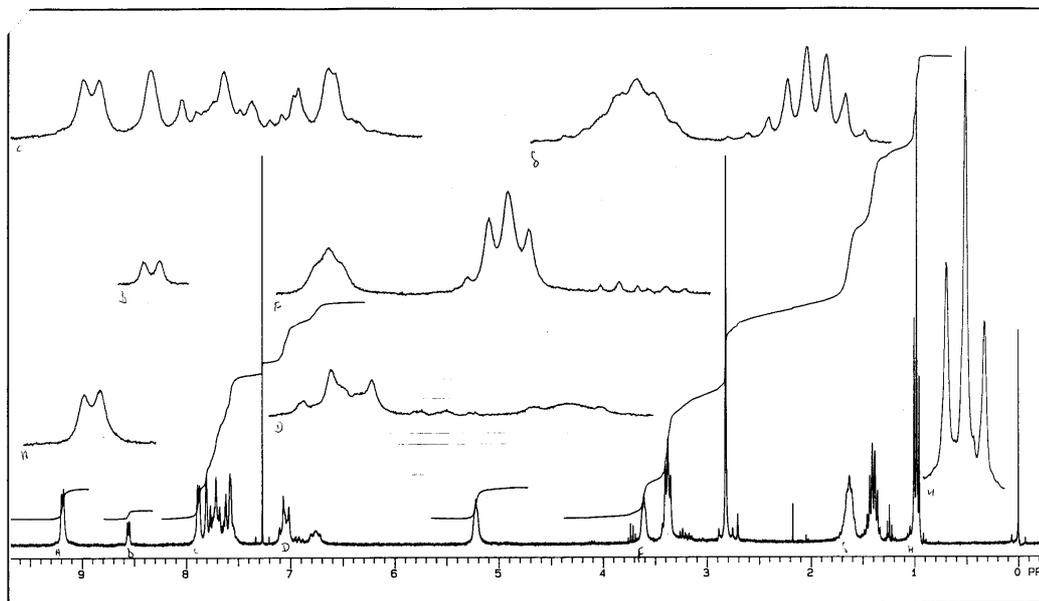


Abb. 47: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von **6a**

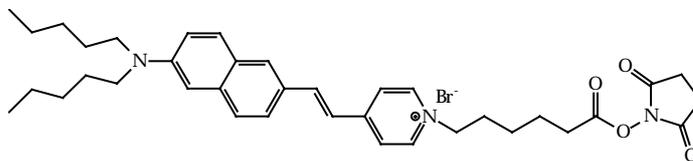
Versuch 6.2.: 1-(6-Succinimidoxy-6-oxylhex-1-yl)4-(2-(6-N,N-di-n-pentylamino-naphth-2-yl)-vinyl)-pyridiniumbromid **6b**

500 mg (1.3 mmol) **5d**

und 400 mg (1.3 mmol)

1d werden in Substanz

auf 110°C erhitzt. Die



anfangs feste Mischung schmilzt dabei zunächst auf, um sich nach wenigen Minuten wieder zu verfestigen. Nach zehn Minuten wird die Reaktionsmischung etwas abgekühlt, in wenig Chloroform aufgelöst und das Produkt mit Essigester ausgefällt. Nach dem Absaugen wird es im Vakuum getrocknet.

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 0.93 (6H; T); 1.36 (8H; M); 1.47 (2H; M); 1.62 (4H; M); 1.74 (2H; T); 2.00 (2H; M); 2.58 (2H; T); 2.81 (4H; S); 3.34 (4H; T); 4.64 (2H; T); 7.06 (1H; D); 7.73 (1H; D); 7.5 bis 7.8 (5H; M; Naphthalin); 7.99 (2H; D); 8.98 (2H; D)

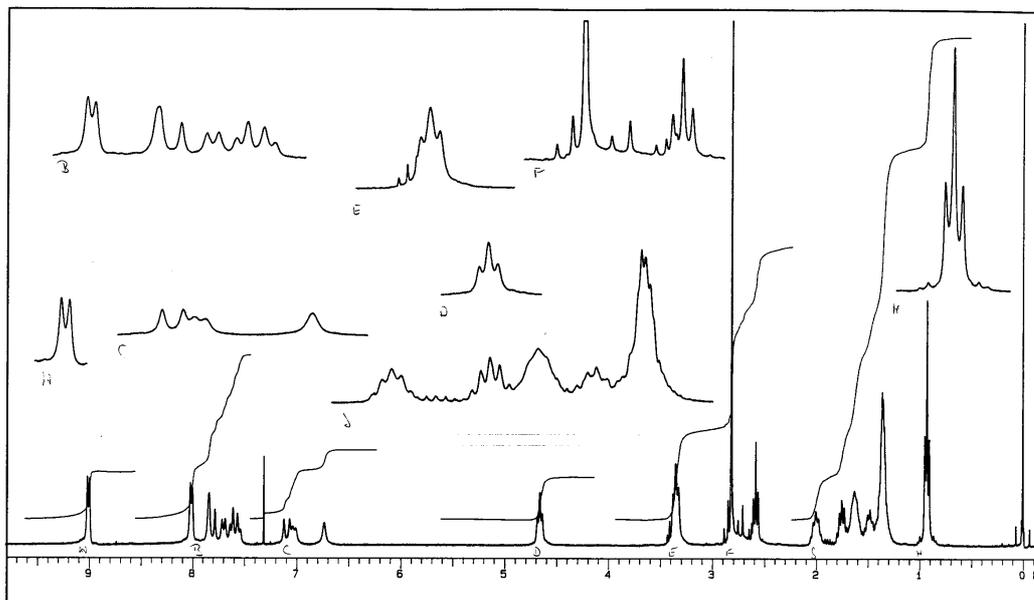
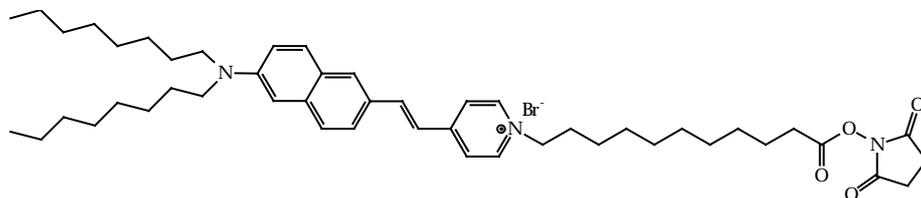


Abb. 48: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von **6b**

Versuch 6.3.: 1-(11-Succinimidoxy-11-oxoundec-1-yl)-4-(2-(6-N,N-di-n-octylaminonaphth-2-yl)-vinyl)-pyridiniumbromid **6c**



500 mg (1.1 mmol) **5f** und 416 mg (1.1 mmol) **1e** werden in Substanz auf 110°C erhitzt. Die anfangs feste Mischung schmilzt dabei zunächst auf, um sich nach wenigen Minuten wieder zu verfestigen. Nach zehn Minuten wird die Reaktionsmischung etwas abgekühlt, in wenig Chloroform aufgelöst und das Produkt mit Essigester ausgefällt. Nach dem Absaugen wird es im Vakuum getrocknet.

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 0.90 (6H; T); 1.35 (32H; M); 1.65 (6H; M); 1.92 (2H; M); 2.56 (2H; T), 2.84 (4H; S); 3.36 (4H; T); 4.63 (2H; T); 7.08 (1H; D); 7.73 (1H; D); 7.03 (1H; D); 7.5 bis 7.8 (5H; M; Naphthalin); 8.03 (2H; D); 9.00 (2H; D)

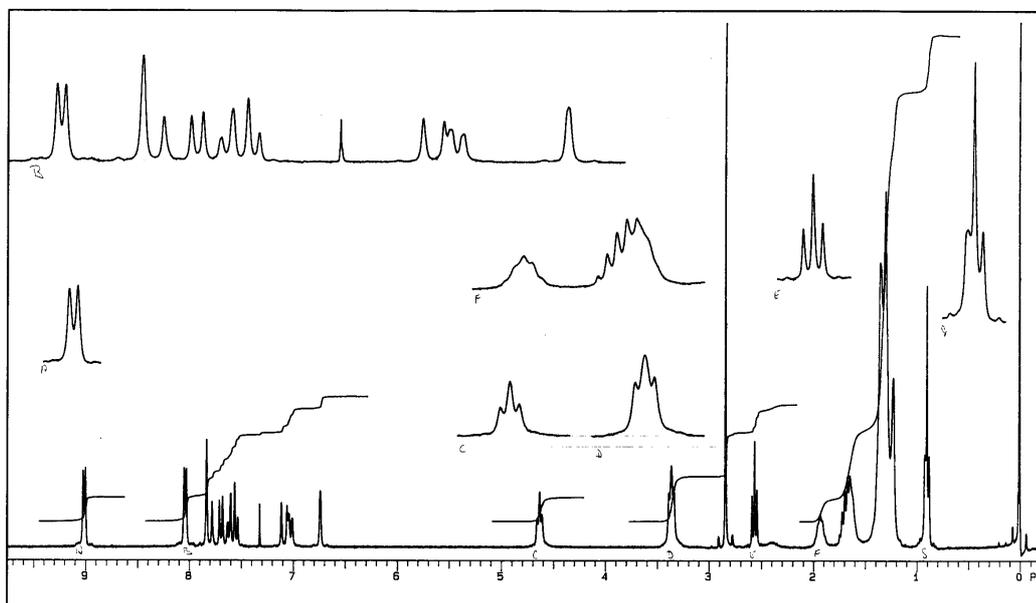
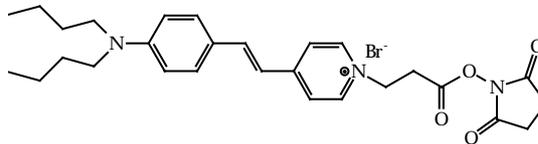


Abb. 49: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von **6c**

Versuch 7: Weitere Reaktivfarbstoffe mit NHS-Estergruppe**Versuch 7.1.:** 1-(3-Succinimidoxy-3-oxyprop-1-yl)-4-(p-N,N-di-n-butylaminostyryl)-pyridiniumbromid **7a**

500 mg (1.6 mmol) 4-(p-N,N-Di-n-butylaminostyryl)-pyridin und 426 mg (1.6 mmol) 1-(3-Brom-1-oxypropoxy)-pyrrolidin-1,5-dion werden

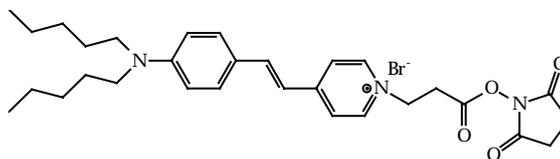


in Substanz auf 110°C erhitzt. Die anfangs feste Mischung schmilzt dabei zunächst auf, um sich nach wenigen Minuten wieder zu verfestigen. Nach zehn Minuten wird die Reaktionsmischung etwas abgekühlt, in wenig Chloroform aufgelöst und das Produkt mit Essigester ausgefällt. Nach dem Absaugen wird es im Vakuum getrocknet.

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{DMSO}/\text{TMS})$: 0.93 (6H; T); 1.35 (4H; M); 1.52 (4H; M); 2.83 (4H; S); 3.33 (4H; T); 3.63 (2H, T); 4.81 (2H; T); 6.72 (2H; AB-System; Anilin); 7.18 (1H; D); 7.60 (2H; D); 8.00 (1H; D); 8.11 (2H; D); 8.84 (2H; D)

Versuch 7.2.: 1-(3-Succinimidoxy-3-oxyprop-1-yl)4-(p-N,N-di-n-pentylaminostyryl-)pyridiniumbromid **7b**

500 mg (1.5mmol) 4-(p-N,N-Di-n-pentylaminostyryl-)pyridin und 400 mg (1.5 mmol) 1-(3-Brom-1-oxypropoxy-)pyrrolidin-1,5-dion



werden in Substanz auf 110°C erhitzt. Die anfangs feste Mischung schmilzt dabei zunächst auf, um sich nach wenigen Minuten wieder zu verfestigen. Nach zehn Minuten wird die Reaktionsmischung etwas abgekühlt, in wenig Chloroform aufgelöst und das Produkt mit Essigester ausgefällt. Nach dem Absaugen wird es im Vakuum getrocknet.

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{DMSO/TMS})$: 0.89 (6H; T); 1.32 (8H; M); 1.54 (4H; M); 2.83 (4H; S); 3.32 (4H; T), 3.62 (2H, T); 4.80 (2H; T); 6.73 (2H; D); 7.16 (1H; D); 7.59 (2H; D); 7.99 (1H; D); 8.08 (2H; D); 8.82 (2H; D)

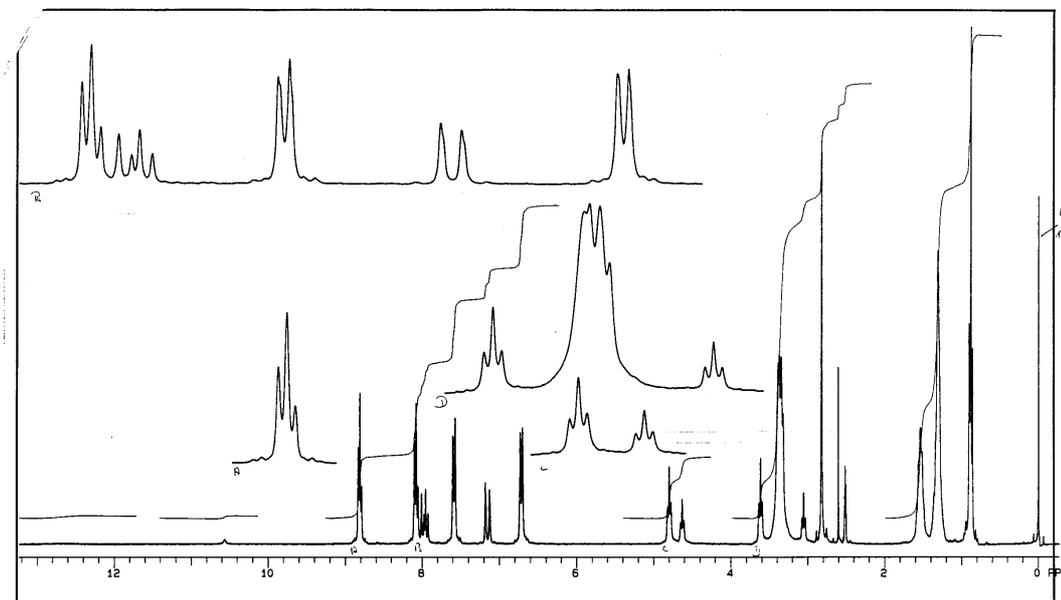
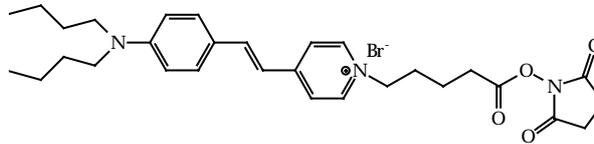


Abb. 50: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{DMSO/TMS})$ von **7b**

Versuch 7.3.: 1-(5-Succinimidoxy-5-oxypent-1-yl)4-(p-N,N-di-n-butylamino-styryl-)pyridiniumbromid **7c**

500 mg (1.6 mmol) 4-(p-N,N-Di-n-butylaminostyryl-)pyridin
und 471 mg (1.6 mmol) 1-(5-



Brom-1-oxypentoxy-)pyrrolidin-1,5-dion werden in Substanz auf 110°C erhitzt. Die anfangs feste Mischung schmilzt dabei zunächst auf, um sich nach wenigen Minuten wieder zu verfestigen. Nach zehn Minuten wird die Reaktionsmischung etwas abgekühlt, in wenig Chloroform aufgelöst und das Produkt mit Essigester ausgefällt. Nach dem Absaugen wird es im Vakuum getrocknet.

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{DMSO/TMS})$: 0.97 (6H; T); 1.38 (4H; M); 1.59 (4H; M); 1.89 (2H; M); 2.14 (2H; M); 2.73 (2H; T); 2.86 (4H; S); 3.33 (4H; T); 4.77 (2H; T); 6.63 (2H; D); 6.87 (1H; D); 7.51 (2H; D); 7.62 (1H; D); 7.83 (2H; D); 9.05 (2H; D)

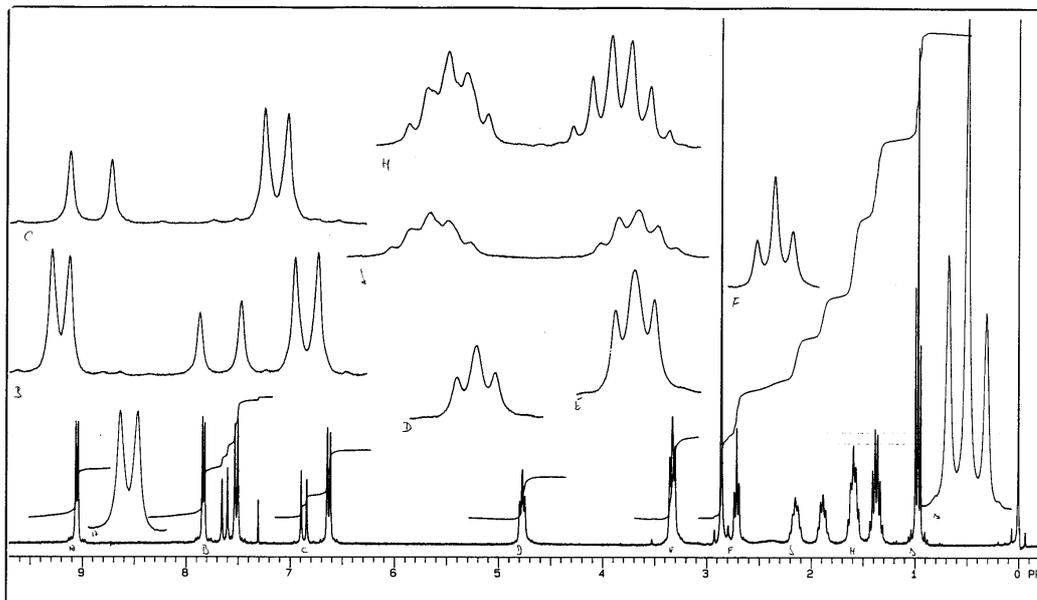
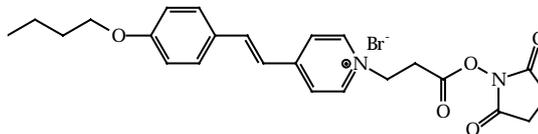


Abb. 51: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{DMSO/TMS})$ von **7c**

Versuch 7.4.: 1-(3-succinimidoxy-3-oxyprop-1-yl)4-(p-n-butoxystyryl)pyridiniumbromid **7d**

405 mg (1.6 mmol) 4-(p-butoxystyryl)pyridin und 426 mg (1.6 mmol) 1-(3-Brom-1-oxypropoxy-)pyrrolidin-1,5-dion werden in Substanz auf 110°C erhitzt. Die anfangs feste Mischung schmilzt dabei zunächst auf, um sich nach wenigen Minuten wieder zu verfestigen. Nach zehn Minuten wird die Reaktionsmischung etwas abgekühlt, in wenig Chloroform aufgelöst und das Produkt mit Essigester ausgefällt. Nach dem Absaugen wird es im Vakuum getrocknet.



propoxy-)pyrrolidin-1,5-dion werden in Substanz auf 110°C erhitzt. Die anfangs feste Mischung schmilzt dabei zunächst auf, um sich nach wenigen Minuten wieder zu verfestigen. Nach zehn Minuten wird die Reaktionsmischung etwas abgekühlt, in wenig Chloroform aufgelöst und das Produkt mit Essigester ausgefällt. Nach dem Absaugen wird es im Vakuum getrocknet.

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{DMSO}/\text{TMS})$: 0.94 (3H; T); 1.46 (2H; M); 1.72 (2H; M); 2.83 (4H; S); 3.67 (2H; T); 4.05 (2H; T); 4.89 (2H; T); 7.06 (2H; D); 7.42 (1H; D); 7.74 (2H; D); 8.10 (1H; D); 8.26 (2H; D); 9.00 (2H; D);

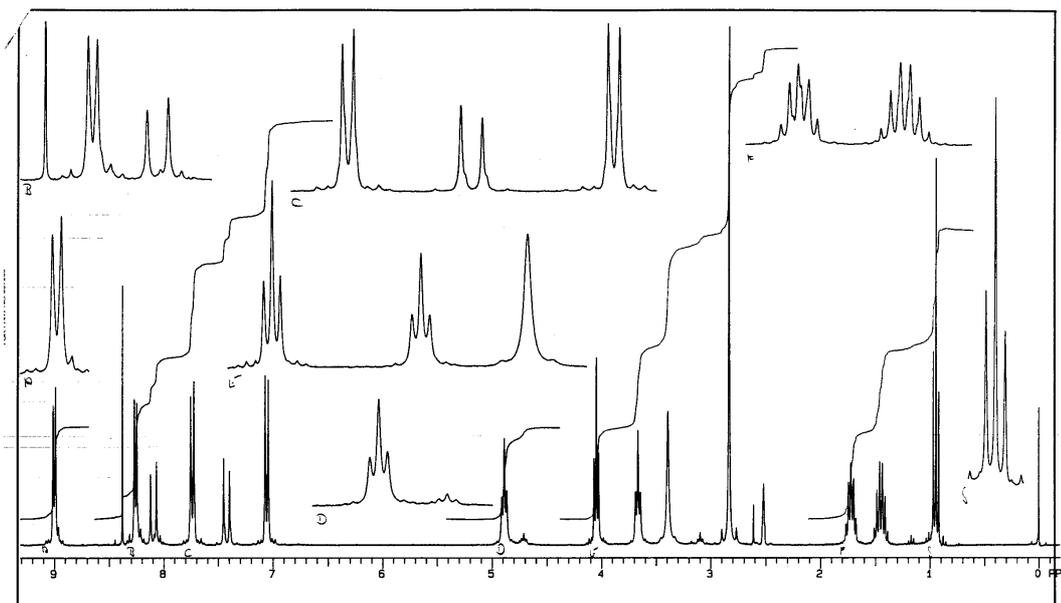
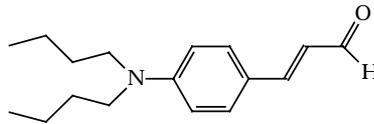


Abb. 52: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{DMSO}/\text{TMS})$ von **7d**

Versuch 8: 4-N,N-Di-n-butylaminozimaldehyd **8**

Zu einer Lösung von 14.0 g (0.141 mol) N,N-Dimethylaminoacrolein und 35.6 g (0.173 mol) N,N-Di-n-butylanilin in 141 ml abs. THF läßt



man innerhalb einer halben Stunde unter Kühlung mit Eis/Kochsalz 22.5 g (0.147 mol) frisch destilliertes Phosphoroxychlorid in 85 ml abs. THF zutropfen. Man läßt noch zwei Stunden lang weiter rühren und läßt dann über Nacht stehen. Danach erhitzt man noch 6 h lang auf 60°C. Während der letzten Stunde wird das THF abdestilliert. Der Rückstand wird in 30 ml Methanol gelöst und 120 g Eis werden zugegeben. Nach Zugabe von 90 5N Natronlauge wird mit Chloroform extrahiert. Das Chloroform wird neutral gewaschen und über Kaliumkarbonat getrocknet. Nach dem Abrotieren des Lösungsmittels wird der Rückstand über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt (Elutionsmittel Hexan/Essigester 9 : 1). Das Produkt ist ein gelbes Öl.

Ausbeute: 13.4 g $\hat{=}$ 52 mmol $\hat{=}$ 36%

$^1\text{H-NMR}_{300}$: $\delta(\text{ppm}) = 0.96$ (6H; T), 1.35 (4H; M), 1.57 (4H; M), 3.30 (4H; T), 6.50 (1H; DD), 6.60 (2H; D), 7.32 (1H; D), 7.39 (2H; D), 9.55 (1H; D)

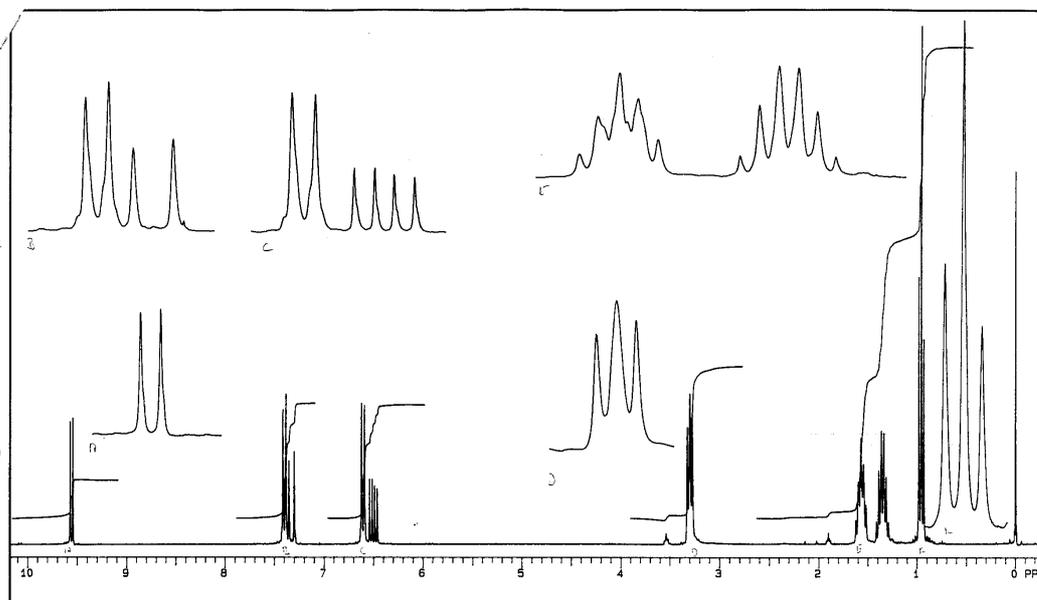
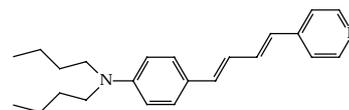


Abb. 53: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von **8**

Versuch 9: 4-N,N-di-n-butylaminophenylbutadienylpyridin **9**

In einem 100 ml-Zweihalskolben mit Rückflußkühler, Trockenrohr und Stickstoffeinleitungsrohr werden 1.62 g (17.3 mmol) γ -Picolin vorgelegt und mit einer Eis/Kochsalz-Mischung unter Feuchtigkeitsausschluß gekühlt. Unter Rühren werden 2.44 g (17.3 mmol) Benzoylchlorid dazugetropft. Die Mischung erstarrt daraufhin. Nun werden 5.80 g (17.3 mmol) p-N,N-Di-n-butylaminozimtaldehyd **8** in 4.5 ml Picolin zugetropft und das Gemisch eine halbe Stunde lang bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wird die Apparatur mit Stickstoff gespült und 5 h lang auf 155°C erhitzt. Nach Abkühlen und Zugabe von 30 ml konz. Salzsäure unter Rühren werden 80 ml 5 N NaOH zugegeben. Dann wird dreimal mit je 50 ml Chloroform ausgeschüttelt, das Chloroform neutral gewaschen und über Kaliumkarbonat getrocknet. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wird über Kieselgel säulenchromatographisch aufgearbeitet (Elutionsmittel: Essigester). Das Produkt ist ein hellroter Feststoff, der in Lösung gelb erscheint.



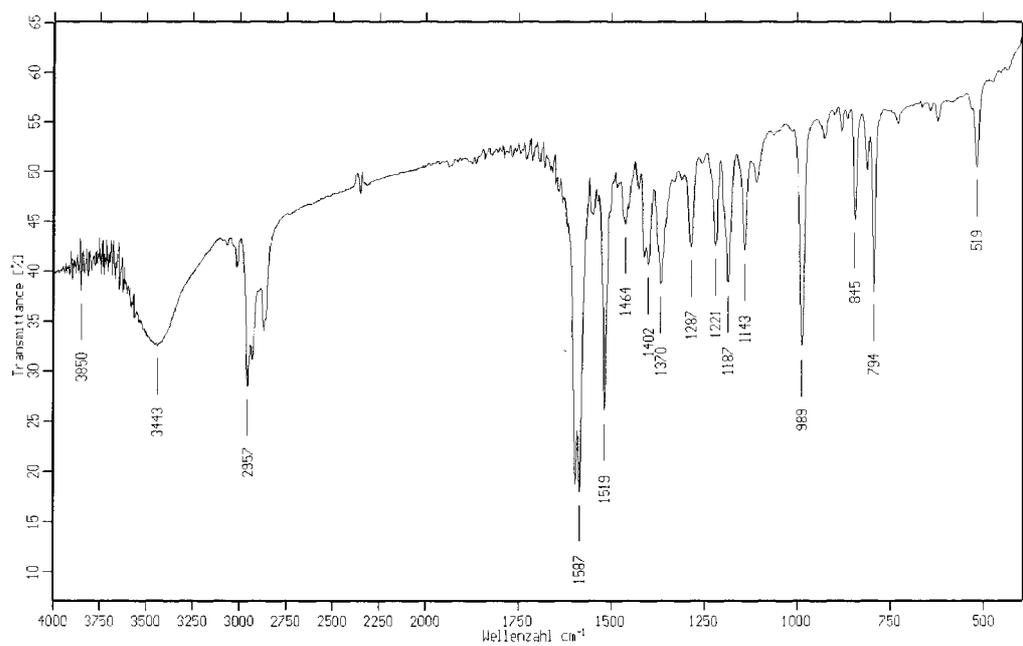
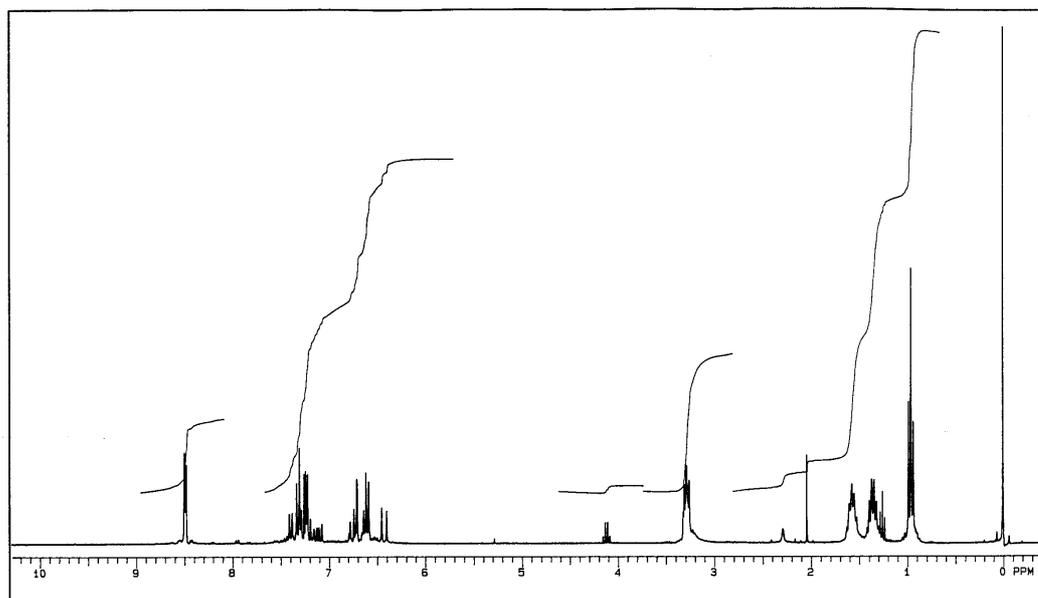
Ausbeute: 11-17 %

Elementaranalyse: Ber.: C: 82.59; H: 9.04; N: 8.37

Gef.: C: 82.37; H: 8.94; N: 8.15

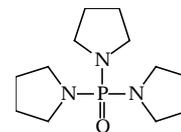
$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: $\delta(\text{ppm}) = 0.96$ (6H; T), 1.35 (4H; M), 1.57 (4H; M), 3.28 (4H; T), 6.42 (1H; D), 6.60 (2H; D), 6.73 (1H; D), 7.13 (1H; DD), 7.24 (2H; D), 7.32 (2H; D), 7.39 (1H; D), 8.48 (2H; D)

IR (KBr-Preßling): 3443 cm^{-1} (C=N-Val.); 2957 (C-H-Val.); 1587, 1519 (Ringschw.);

Abb. 54: FTIR-Spektrum von **9** (KBr-Preßling)Abb. 55: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von **9**

Versuch 10: Tripyrrolidinophosphinoxid⁷⁷ **10**

In einem 11-3-Halskolben mit Magnetrührer, Rückflußkühler mit Trockenrohr, Innenthermometer und Tropftrichter werden 120.0 g (1.2 mol) Triethylamin und 85.3 g (1.2 mol) Pyrrolidin in 600 ml trockenem Benzen vorgelegt und auf 5°C gekühlt. Zu dieser Mischung läßt man 60.0 g (0.4 mol) Phosphoroxchlorid in 200 ml Benzen tropfen, wobei die Temperatur 40°C nicht überschreiten sollte. Nach beendigter Zugabe wird noch über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt. Dann wird vom Niederschlag abgesaugt und das Benzen im Vakuum abdestilliert. Das zurückbleibende Öl wird im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert.



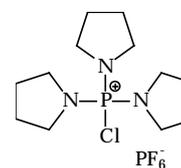
Ausbeute: 76.0 g \cong 0.3 mol \cong 75 %

n_D^{20} : 1.5137 (Lit.: n_D^{25} : 1.5115)

Sdp.: 153°C (0.01 mbar) (Lit.: 143°C/0.5 mm)

Versuch 11:**Chlortripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat 11**

In einem 250 ml-Zweihalskolben werden 15.3 g (0.1 mol) Phosphoroxchlorid in 15 ml abs. Methylenchlorid vorgelegt. Bei Raumtemperatur werden 25.7 g (0.1 mol) **10** in 15 ml Methylenchlorid innerhalb von 20 min zugetropft. Dann wird die Lösung noch 20 min. lang gerührt. 18.5 g (0.1 mol) Kaliumhexafluorophosphat werden währenddessen in 200 ml Wasser aufgelöst. Die Reaktionsmischung wird mit einem Intensivkühler versehen. Die KPF_6 -Lösung wird dann in einem Guß unter starkem Rühren hinzugegeben. Die Mischung kocht spontan auf. Nach dem Erkalten wird das Produkt zweimal mit Methylenchlorid extrahiert, die organische Phase wird mit Wasser nachgewaschen und dann über Natriumsulfat getrocknet. Die Lösung wird dann eingedampft und der so erhaltene Feststoff aus Methylenchlorid/Ether umkristallisiert.



Ausbeute: 34.5 g \cong 0.077 mol \cong 77 % (Lit.: 82%)

Smp.: 137°C (Lit.: 150-151°C)

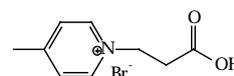
Versuch 12:

Darstellung der 1-(n-Carboxyalk-1-yl)-4-Picoliniumbromide

Die Darstellung erfolgt für alle Verbindungen analog. 4-Picolin wird mit der äquimolaren Menge der entsprechenden ω -Bromcarbonsäure 6 h lang auf 110°C erhitzt. Danach wird das Produkt aus abs. Ethanol/Aceton umkristallisiert.

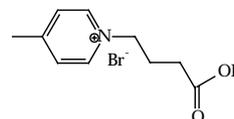
Versuch 12.1: 1-(2-Carboxyethyl)-4-Picoliniumbromid **12a**

Die Darstellung dieses Produktes konnte nicht auf die oben dargestellte Weise erreicht werden. Statt einer kovalenten Verbindung bildet sich eine ionische, die durch Basen leicht wieder gespalten wird. Auf das kürzeste Glied dieser homologen Reihe muß deshalb hier verzichtet werden.

**Versuch 12.2:** 1-(3-Carboxyprop-1-yl)-4-Picoliniumbromid **12b**

Auch die Darstellung dieser Verbindung ist nicht ohne Schwierigkeiten. Daher wird die Synthese hier abgewandelt:

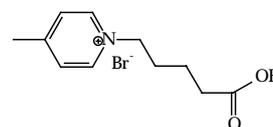
5.0 g (54 mmol) 4-Picolin und 4.5 g (27 mmol) 4-Brombuttersäure werden gemeinsam für 7 h auf 120°C erhitzt. Das ölige Rohprodukt wird ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt.



Ausbeute: ca. 30%

Versuch 12.3: 1-(4-Carboxybut-1-yl)-4-Picoliniumbromid **12c**

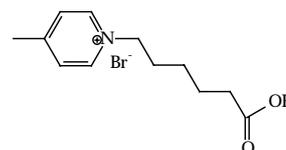
Die Synthese erfolgt ohne Abwandlung nach der obigen allgemeinen Vorschrift.



Ausbeute: 13.4 g $\hat{=}$ 50 mmol $\hat{=}$ 72%

Versuch 12.4: 1-(5-Carboxypent-1-yl)-4-Picoliniumbromid **12d**

Die Synthese erfolgt ohne Abwandlung nach der obigen allgemeinen Vorschrift.

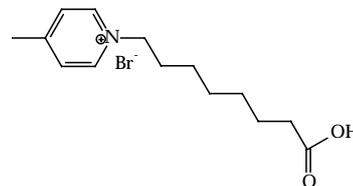


Ausbeute: 5.5 g $\hat{=}$ 19 mmol $\hat{=}$ 89%

Versuch 12.5: 1-(7-Carboxyhept-1-yl)-4-Picoliniumbromid **12e**

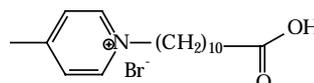
Die Synthese erfolgt ohne Abwandlung nach der obigen allgemeinen Vorschrift.

Ausbeute: 5.0 g $\hat{=}$ 15.7 mmol $\hat{=}$ 71%

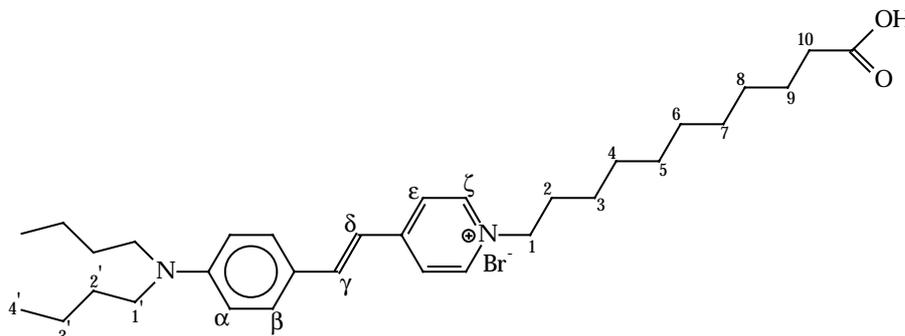
**Versuch 12.6.:** 1-(10-Carboxydec-1-yl)-4-Picoliniumbromid **12f**

Die Synthese erfolgt ohne Abwandlung nach der obigen allgemeinen Vorschrift.

Ausbeute: 5.1 g $\hat{=}$ 15 mmol $\hat{=}$ 75%



Smp.: 150.3-155.6°C

Versuch 13: Darstellung der 1-(n-Carboxyalk-1-yl)-4-(4-N,N-di-n-butylaminostyryl-)pyridiniumbromide **13a** bis **13e**

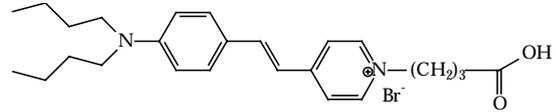
Zur Darstellung dieser Produkte werden die einzelnen Picoliniumsalze **12b** bis **12f** in abs. Ethanol (ca. 3 l/mol) gelöst. Nach Zugabe von 1.1 mol p-N,N-di-n-Butylaminobenzaldehyd und 2 mol Piperidin wird die Lösung für 6 h unter Rückfluß gekocht. Nach beendeter Reaktion wird die Lösung gekühlt und mit einem Überschuß Essigsäure versetzt. Dann wird etwa die doppelte Menge Wasser hinzugegeben und die Mischung zur Kristallisation für ca. 1 h in den Kühlschrank gestellt. Das Produkt wird abgesaugt und aus Ethanol umkristallisiert.

	13a	13b	13c	13d	13e
1'	3.34; 4H; T	3.35; 4H; T	3.35; 4H; T	3.35; 4H; T	3.36; 4H; T
2'	1.52; 4H; M	1.53; 4H; M	1.52; 4H; M	1.50; 4H; M	1.51; 4H; M
3'	1.34; 4H; M	1.34; 4H; M	1.35; 4H; M	1.32; 4H; M	1.34; 4H; M
4'	0.92; 6H; T	0.93; 6H; T	0.93; 6H; T	0.93; 6H; T	0.93; 6H; M
α	6.71; 2H; D	6.73; 2H; D	6.73; 2H; D	6.72; 2H; D	6.73; 2H; D
β	7.55; 2H; D	7.59; 2H; D	7.59; 2H; D	7.58; 2H; D	7.57; 2H; D
γ	7.11; 1H; D	7.17; 1H; D	7.17; 1H; D	7.15; 1H; D	7.13; 2H; D
δ	7.89; 1H; D	7.97; 1H; D	7.96; 1H; D	7.95; 1H; D	7.92; 2H; D
ϵ	8.03; 2H; D	8.10; 2H; D	8.09; 2H; D	8.08; 2H; D	8.06; 2H; D
ζ	8.75; 2H; D	8.83; 2H; D	8.82; 2H; D	8.82; 2H; D	8.78; 2H; D
1	4.43; 2H; T	4.47; 2H; T	4.44; 2H; T	4.43; 2H; T	4.41; 2H; T
2	2.10; 2H; M	1.91; 2H; M	1.89; 2H; M	1.87; 2H; M	1.87; 2H; M
3	2.11; 2H; T	1.55; 2H; M	1.53; 2H; M	1.29; 2H; M	1.24; 2H; M
4	×	2.30; 3H; T	1.52; 2H; M	1.29; 2H; M	1.24; 2H; M
5	×	×	2.23; 2H; T	1.29; 2H; M	1.24; 2H; M
6	×	×	×	1.48; 2H; M	1.24; 2H; M
7	×	×	×	2.16; 2H; T	1.24; 2H; M
8	×	×	×	×	1.24; 2H; M
9	×	×	×	×	1.55; 2H; M
10	×	×	×	×	2.18; 2H; T

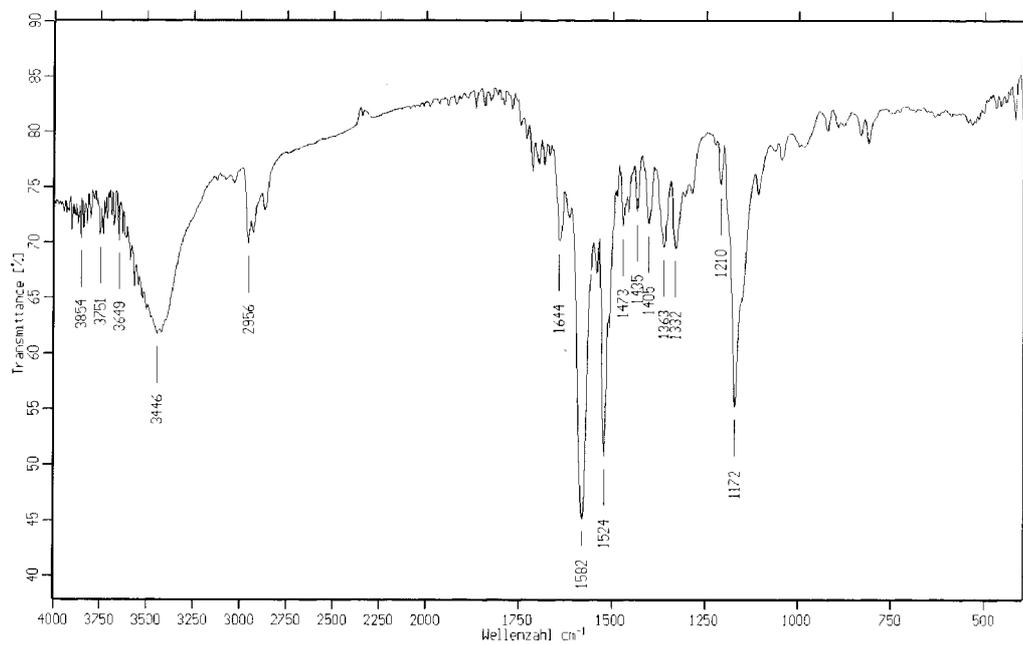
Tab. 7: $^1\text{H-NMR}_{300}$ -Daten der Verbindungen **13a-e** (DMSO/TMS)

Versuch 13.1.:1-(3-Carboxyprop-1-yl)-4-(4-N,N-di-n-butylaminostyryl)-pyridinium-bromid **13a**

Ausbeute:

1.11 g $\hat{=}$ 2.3 mol $\hat{=}$ ca. 10%IR (KBr-Preßling): 3446 cm^{-1} (O-H-

Val.); 2956 (C-H-Val.); 1644 (C=O-Val.); 1582, 1524 (Ringschw.);

Abb. 56: FTIR-Spektrum von **13a** (KBr-Preßling)

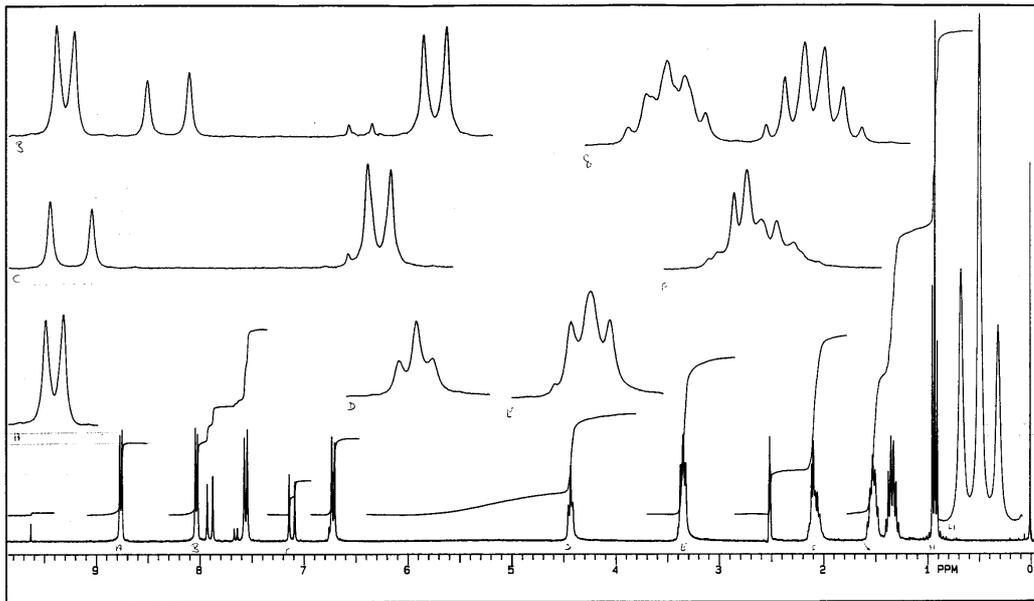
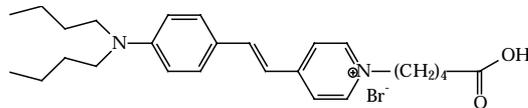


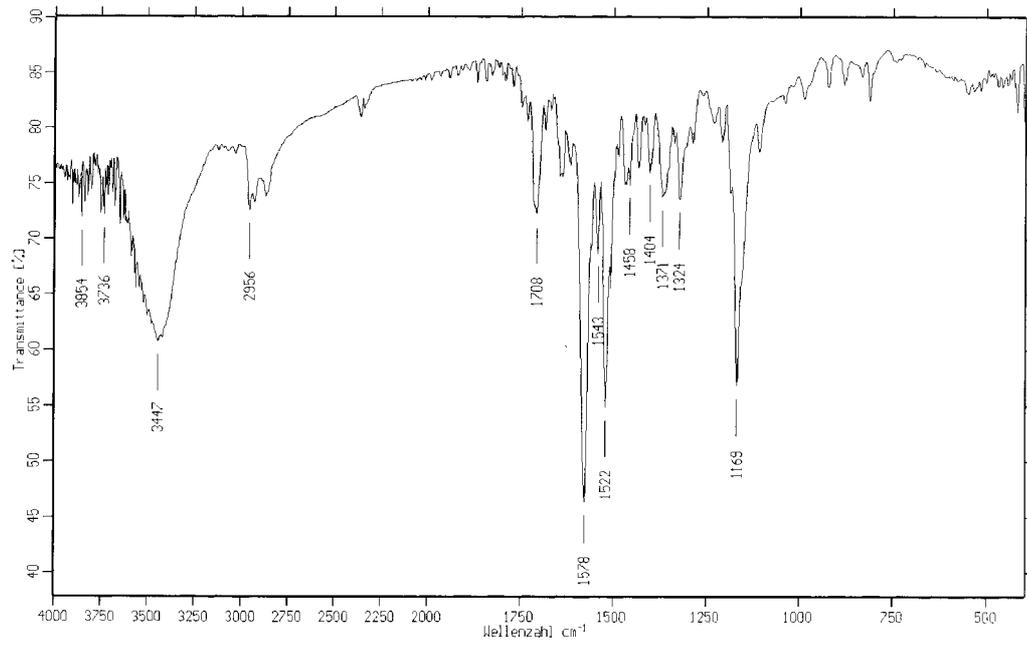
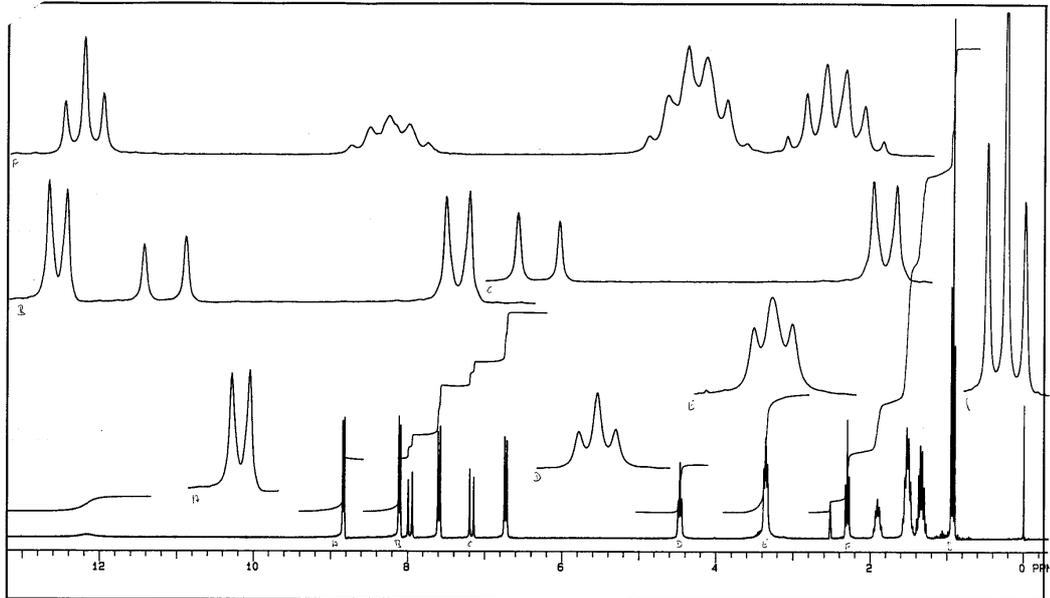
Abb. 57: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{DMSO/TMS})$ von **13a**

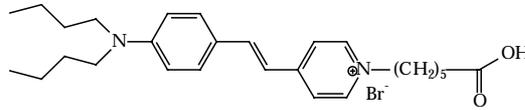
Versuch 13.2.: 1-(4-Carboxybut-1-yl)-4-(4-N,N-di-n-butylaminostyryl)pyridiniumbromid **13b**

Ausbeute: 3.0 g $\hat{=}$ 6 mmol $\hat{=}$ 70 %

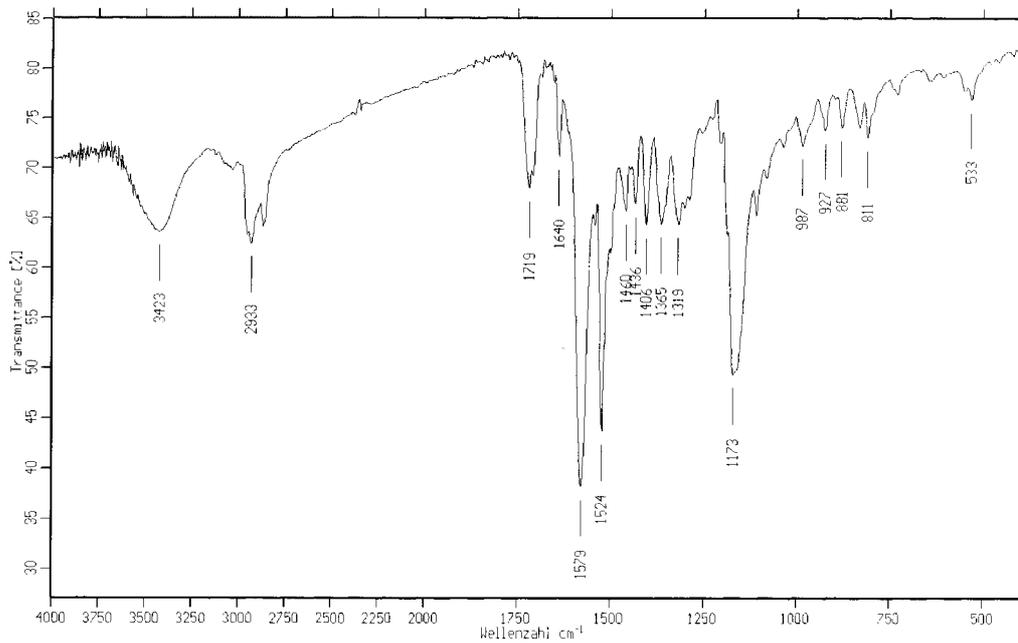


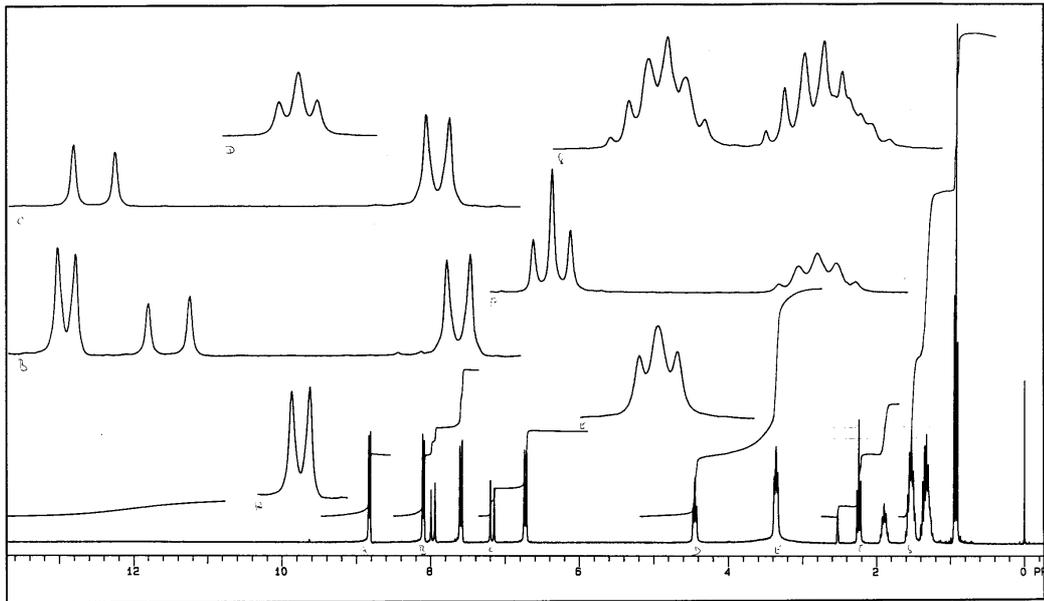
IR (KBr-Preßling): 3447 cm^{-1} (O-H-Val.); 2956 (C-H-Val.); 1708 (C=O-Val.); 1578, 1522 (Ringschw.);

Abb. 58: FTIR-Spektrum von **13b** (KBr-Preßling)Abb. 59: ¹H-NMR₃₀₀(DMSO/TMS) von **13b**

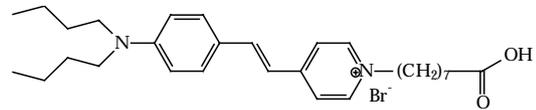
Versuch 13.3.:1-(5-Carboxypent-1-yl)-4-(4-N,N-di-n-butylaminostyryl)-pyridiniumbromid **13c**Ausbeute: 4.7 g $\hat{=}$ 9.3 mmol $\hat{=}$ 53%IR (KBr-Preßling): 3423 cm^{-1} (O-H-

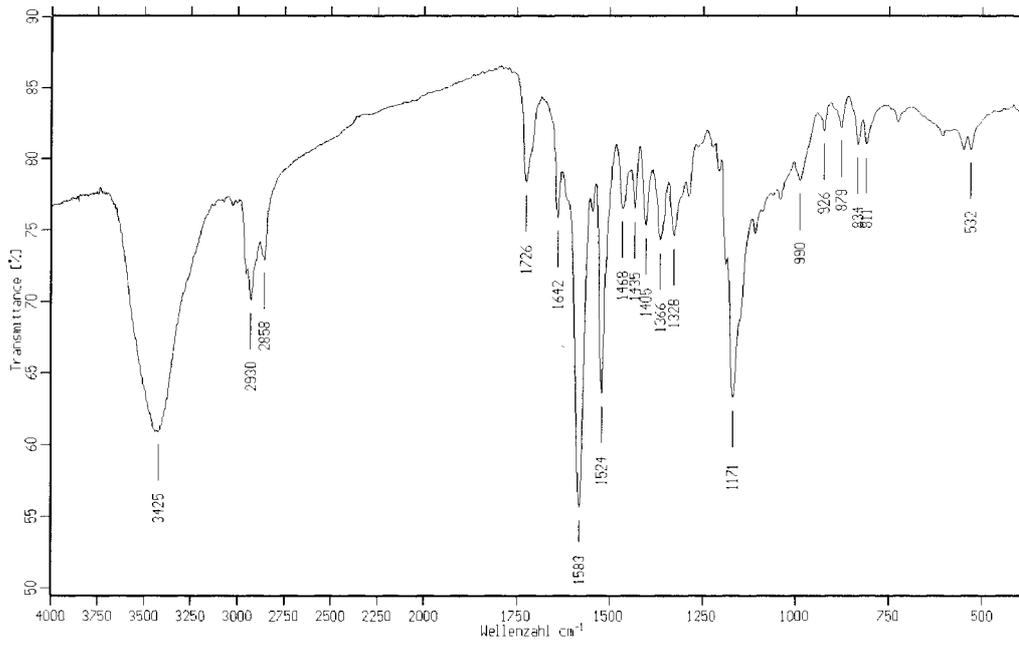
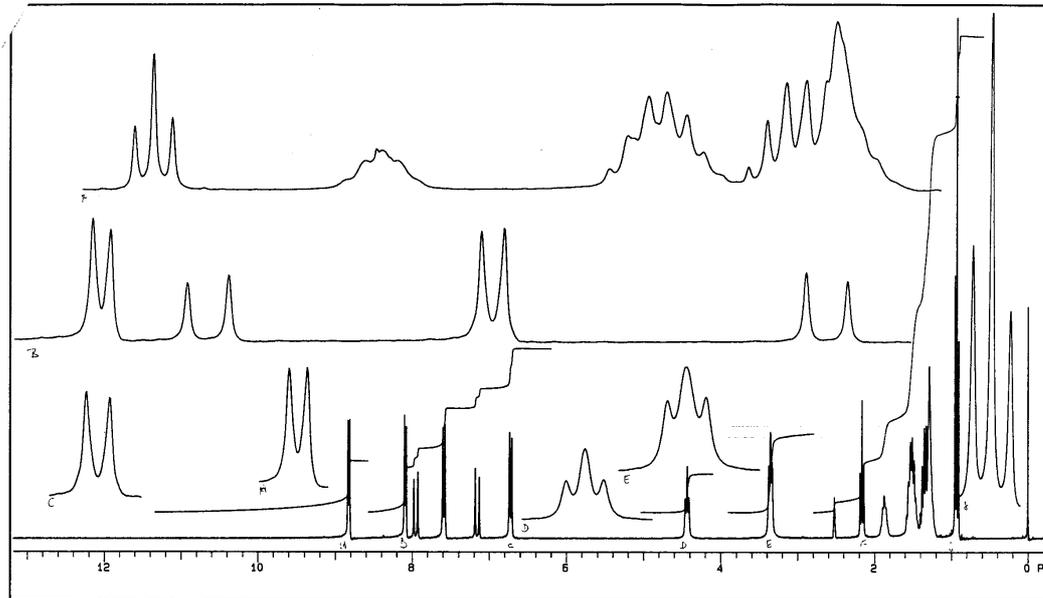
Val.); 2933 (C-H-Val.); 1719 (C=O-Val.); 1579, 1524 (Ringschw.);

Abb. 60: FTIR-Spektrum von **13c** (KBr-Preßling)

Abb. 61: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{DMSO/TMS})$ von **13c****Versuch 13.4.:**1-(7-Carboxyhept-1-yl)-4-(4-N,N-di-n-butylaminostyryl-)pyridiniumbromid **13d**Ausbeute: 4.3 g $\hat{=}$ 8 mmol $\hat{=}$ 64%IR (KBr-Preßling): 3425 cm^{-1} (O-H-

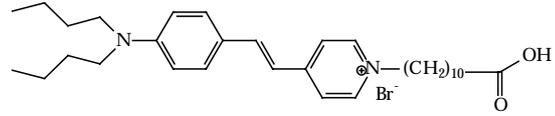
Val.); 2930, 2858 (C-H-Val.); 1726, 1642 (C=O-Val.); 1583, 1524 (Ringschw.);



Abb. 62: FTIR-Spektrum von **13d** (KBr-Preßling)Abb. 63: ¹H-NMR₃₀₀(DMSO/TMS) von **13d**

Versuch 13.5.: 1-(10-Carboxydec-1-yl)-4-(4-N,N-di-n-butylaminostyryl)pyridiniumbromid **13e**

Ausbeute: 5.5 g $\hat{=}$ 9.5 mmol $\hat{=}$ 71%



IR (KBr-Preßling): 3446 cm^{-1} (O-H-

Val.); 2923, 2854 (C-H-Val.); 1716, 1641 (C=O-Val.); 1583, 1524 (Ringschw.);

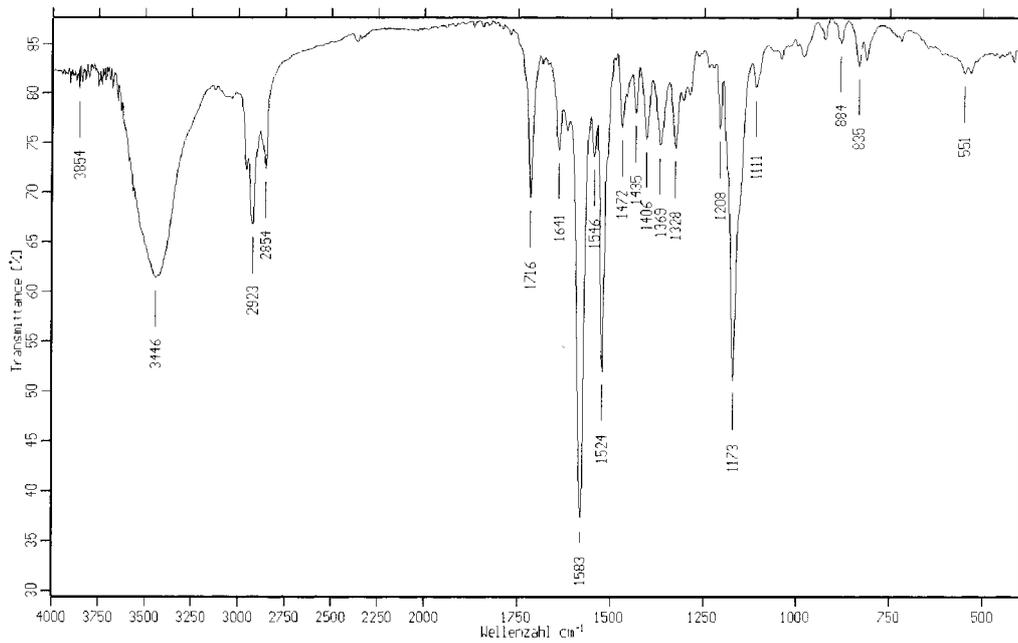


Abb. 64: FTIR-Spektrum von **13e** (KBr-Preßling)

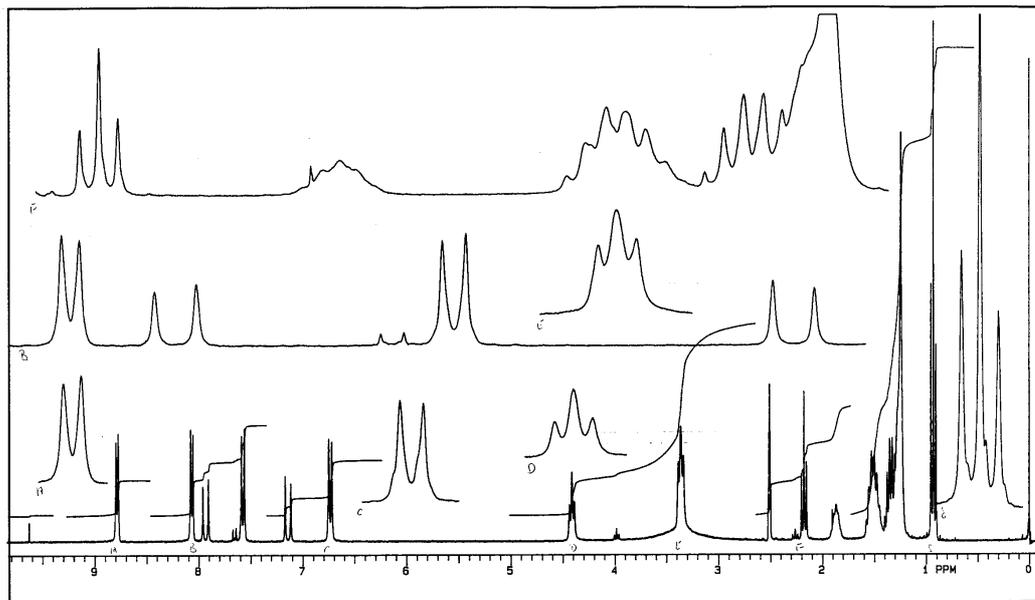


Abb. 65: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{DMSO/TMS})$ von **13e**

Versuch 14: Darstellung der Amide **14a** bis **14e** aus p-Phenylendiamin und **13a** bis **13e**.

1 mmol der jeweiligen Carbonsäure **13a-e** wird mit 1 mmol **11** und 3 mmol Di-iso-propyl-ethylamin in 10 ml Acetonitril gelöst und für ca. 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt. 3 mmol p-Phenylendiamin werden während dieser Zeit in 5 ml Acetonitril aufgelöst. Unter Rühren wird nun die erste Mischung langsam zu dem p-Phenylendiamin zugetropft. Anschließend wird die Lösung (bzw. Suspension) noch 24 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt fällt aus und kann sofort abgesaugt und mit Acetonitril gewaschen werden. Nach Vakuumtrocknung besitzt es i. d. R. bereits eine ausreichende Reinheit.

Versuch 14.1.: 1-(3-(4-Aminophenylcarbamoyl)prop-1-yl)-4-(4-N,N-di-n-butylaminostyryl)-pyridinium Hexafluorosphat **14a**

Ausbeute: gering (unter 20%). Das Produkt ist zudem nicht rein, da die Umsetzung nicht vollständig ist.

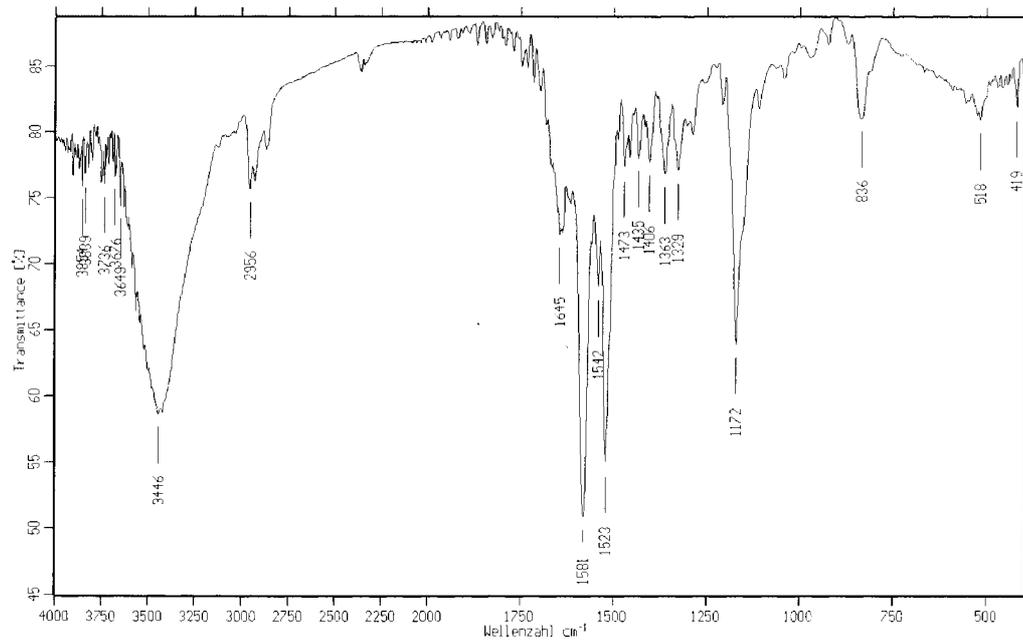
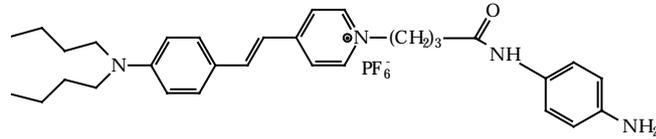


Abb. 66: FTIR-Spektrum von **14a** (KBr-Preßling)

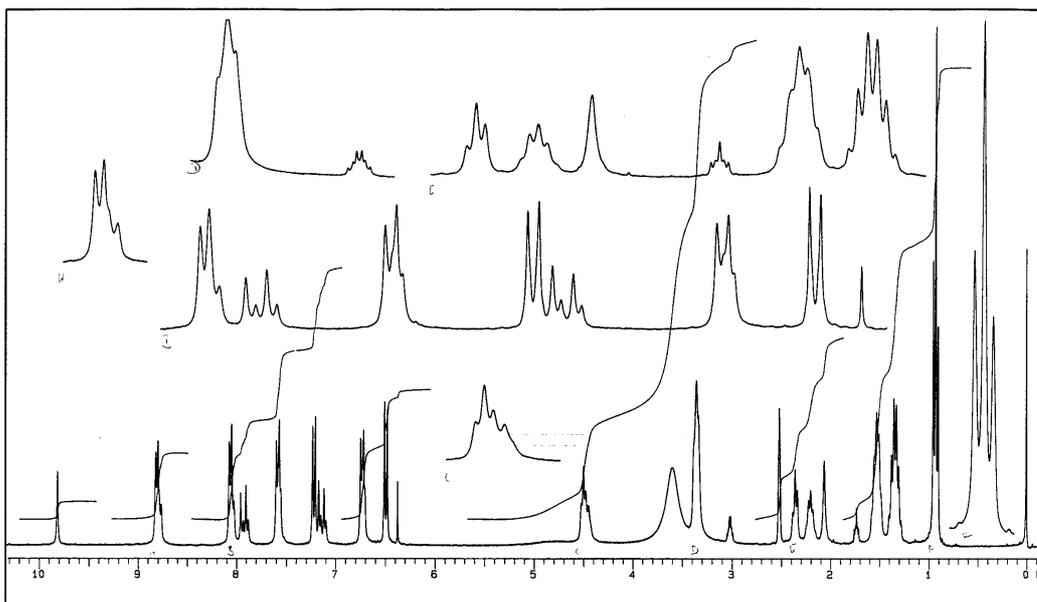


Abb. 67: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{DMSO/TMS})$ von **14a**

Versuch 14.2.: 1-(4-(4-Aminophenylcarbamoyl)-but-1-yl)-4-(4-N,N-di-n-butylaminostyryl)-pyridinium Hexafluorosphat **14b**

Ausbeute: 63%

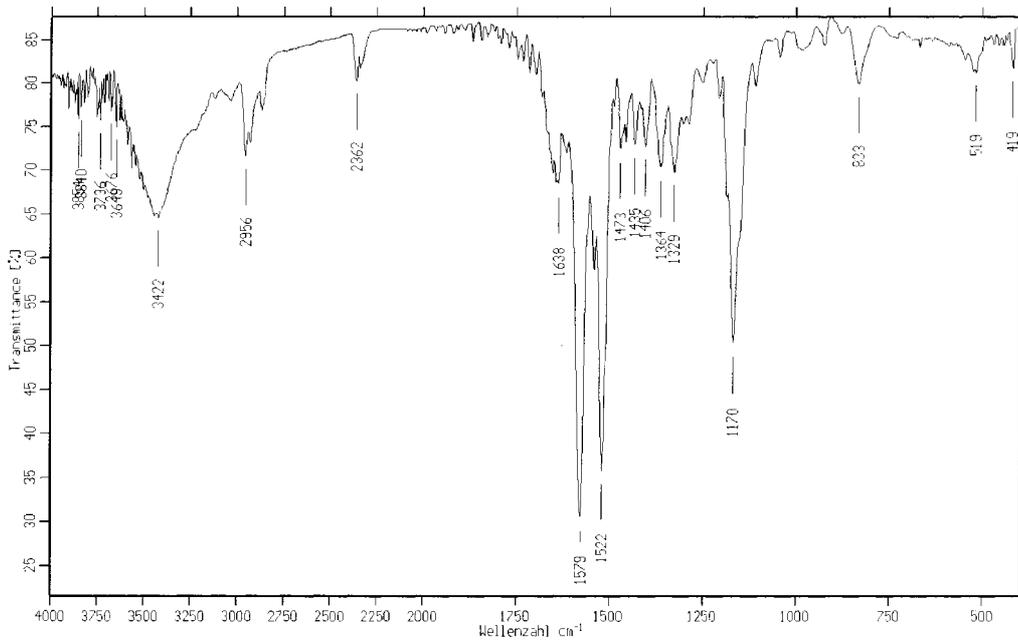
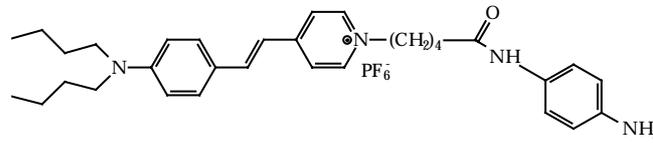


Abb. 68: FTIR-Spektrum von **14b** (KBr-Preßling)

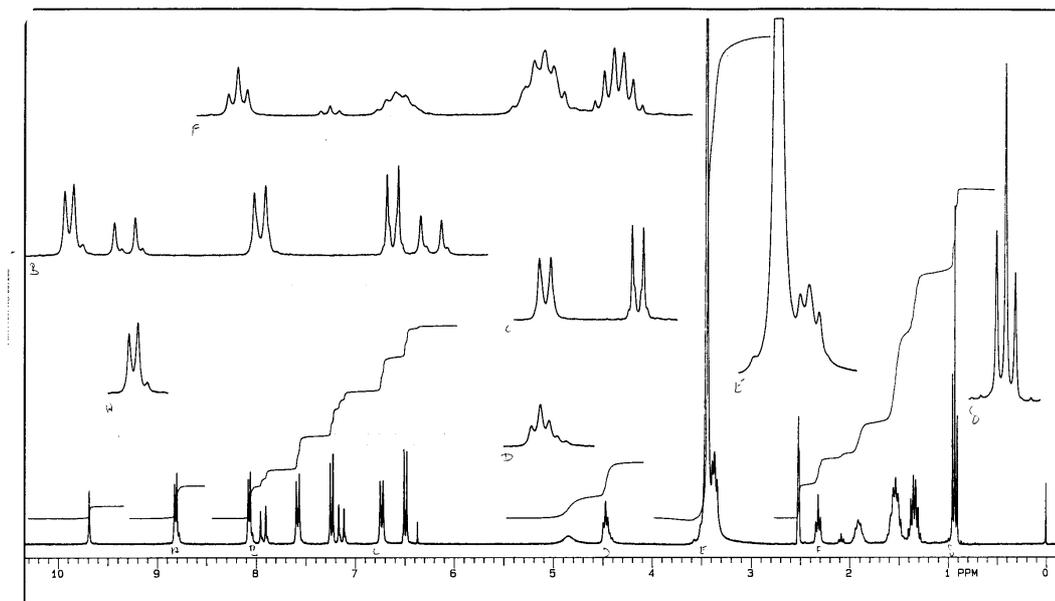
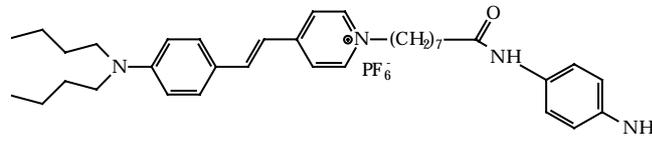


Abb. 69: $^1\text{H-NMR}_{300}$ (DMSO/TMS) von **14b**

Versuch 14.4.: 1-(7-(4-Aminophenylcarbamoyl)-hept-1-yl)-4-(4-N,N-di-n-butylaminostyryl)-pyridinium Hexafluorosphat **14d**



Ausbeute: 49%

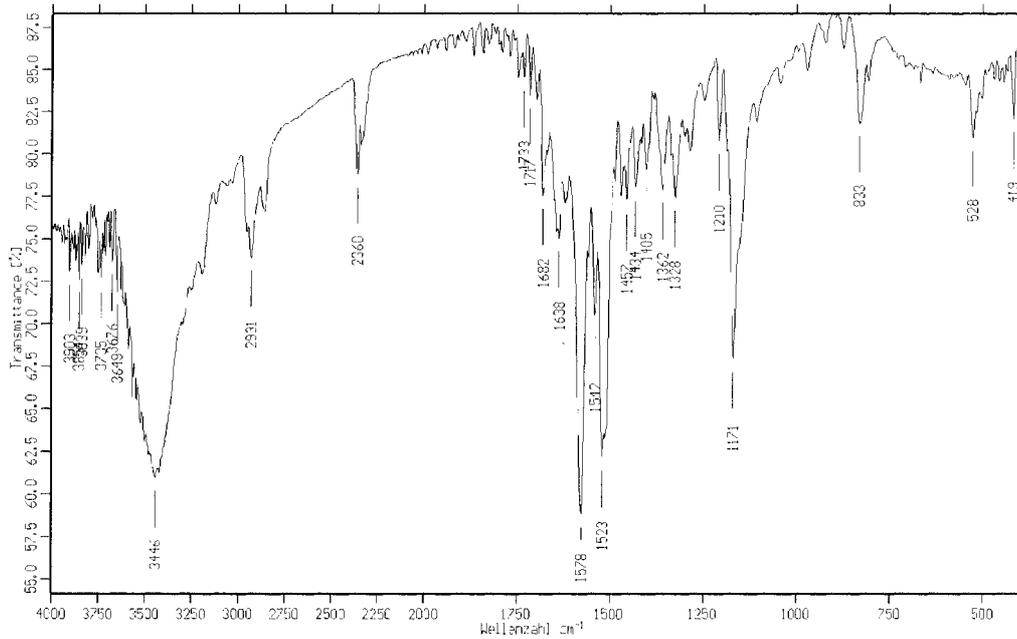


Abb. 72: FTIR-Spektrum von **14d** (KBr-Preßling)

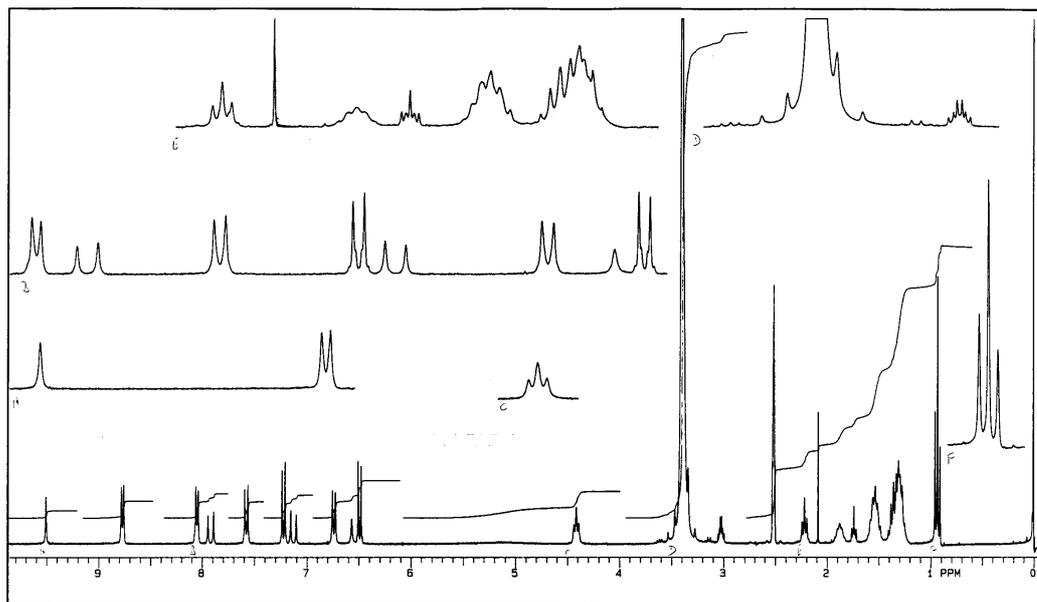


Abb. 73: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{DMSO}/\text{TMS})$ von **14d**

Versuch 14.5.: 1-(10-(4-Aminophenylcarbamoyl)-dec-1-yl)-4-(p-N,N-di-n-butylaminostyryl)-pyridinium Hexafluorosphat **14e**

Ausbeute: 57%

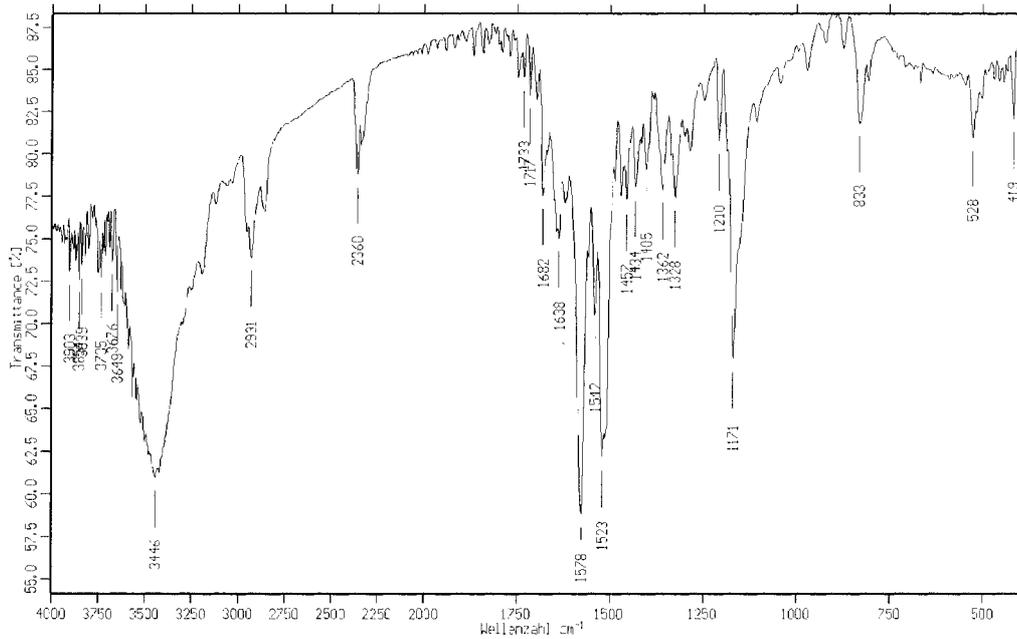
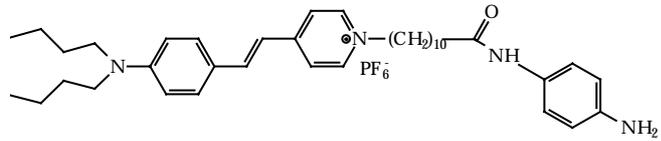


Abb. 74: FTIR-Spektrum von **14e** (KBr-Preßling)

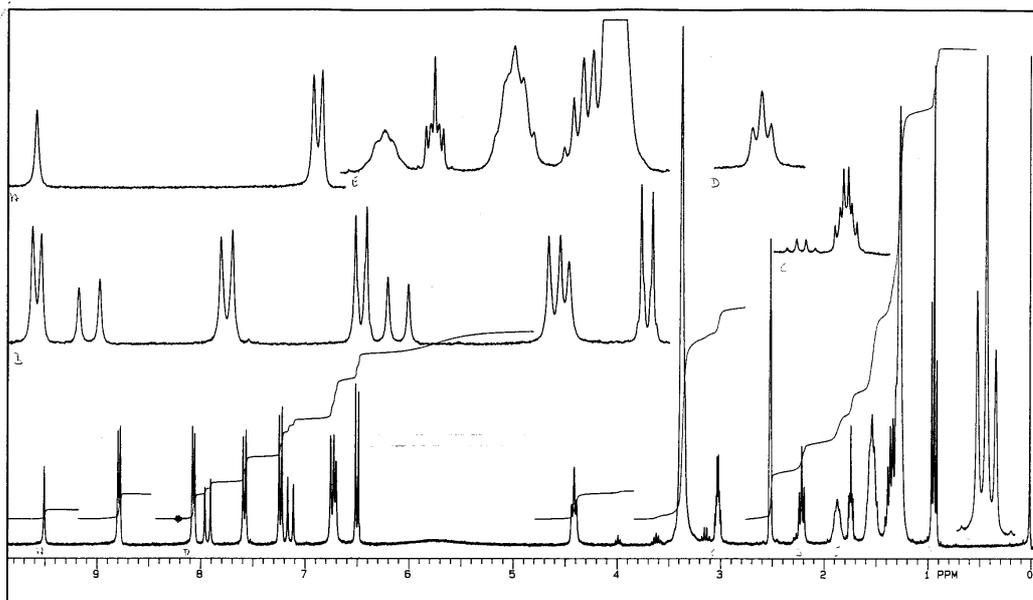


Abb. 75: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{DMSO/TMS})$ von **14e**

$^1\text{H-NMR}_{300}$ -Daten der Verbindungen **14a** bis **14e** (DMSO/TMS):

Die Spektren enthalten alle Signale der Vorstufen weitestgehend unverändert und zeigen zusätzlich die Signale für ein primäres aromatisches Amin (2 H; breit; η), für ein Anilid (1H; S; θ) und für einen 1,4-disubstituierten Aromaten (2·2H; D; $\iota+\kappa$):

	14a	14b	14c	14d	14e
η	4.83 (2H)	ca. 4.9 (2H)	ca. 5.4 (2H)	ca. 5.2 (2H)	ca.5.75 (2H)
θ	9.82; 1H; S	9.69; 1H; S	9.62; 1H; S	9.51; 1H; S	9.51; 1H; S
ι	6.49; 2H; D	6.49; 2H; D	6.50; 2H; D	6.49; 2H; D	6.49; 2H; D
κ	7.23; 2H; D	7.23; 2H; D	7.25; 2H; D	7.23; 2H; D	7.22; 2H; D

Tab. 8: $^1\text{H-NMR}_{300}$ -Daten der Verbindungen **14a-e** (DMSO/TMS)

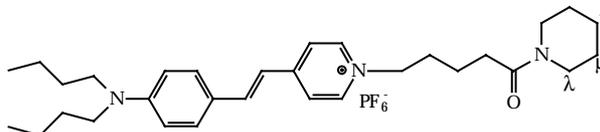
	N-H-Val.	C-H-Val.	C=O-Val.	Ringschw.
14a	3446	2956	1645	1581; 1523
14b	3422	2956	1638	1579; 1522
14c	3420	2956	1645	1579; 1523
14d	3346	2931	1638	1578; 1523
14e	3446	2926	1637	1579; 1522

Tab. 9: IR-Daten der Verbindungen **14a-e**

Versuch 15.1.:

1-(5-Piperidino-5-oxypent-1-yl)-4-(4-N,N-di-n-butylaminostyryl-)pyridiniumhexafluorophosphat **15a**

250 mg (510 μmol) **14c** werden in 10 ml Methylenchlorid suspendiert. Nach Zugabe von



178 mg (1.53 mmol) Diisopropylethylamin entsteht eine klare Lösung. Nun werden 44 mg (510 μmol) Piperidin und 227 mg (510 μmol) **11** zugegeben und die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wird aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 238 mg $\hat{=}$ 383 μmol $\hat{=}$ 75%

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ (Die Zuordnung erfolgt nach der Beschriftung in Versuch 11/12; für das Piperidin werden zusätzlich die Protonengruppen λ , μ und ν benötigt): 8.33, 7.68 (4H; AB-System; Pyridinium); 7.47, 6.62 (4H; AB-System; Anilin); 7.61 (1H; D); 6.76 (1H; D); 4.35 (2H; T; 1); {3.50 (2H; T; λ); 3.38 (2H; T; λ) = Methylengruppen des Piperidins, α -ständig zur Amid-Gruppe, die nicht magnetisch äquivalent sind}; 3.33 (4H; T; 1'); 2.40 (2H; T; 4); 2.00 (2H; M; 2); 1.59 (4H; M; 2'); 1.59 (4H; M; μ); 1.59 (2H; M; ν); 1.59 (2H; M; 3); 1.39 (4H; M; 3'); 0.97 (6H; T; 4')

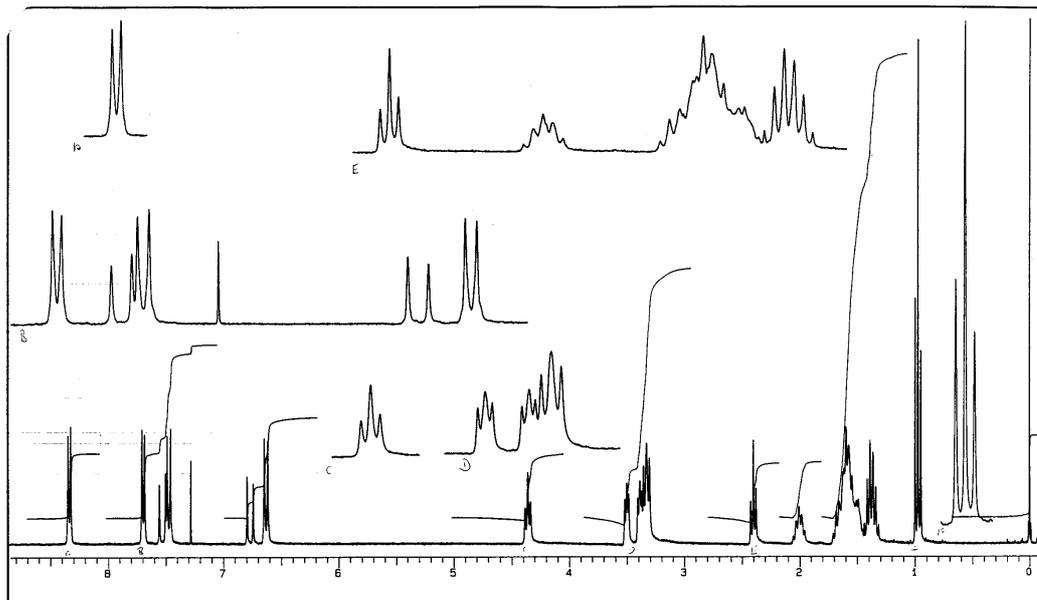


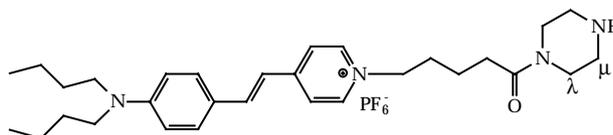
Abb. 76: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von **15a**

Versuch 15.2.:

1-(5-Piperazino-5-oxypent-1-yl)-4-(4-N,N-di-n-butylaminostyryl-)pyridiniumhexafluorophosphat **15b**

250 mg (510 μmol) **14c** werden

in 10 ml Methylenchlorid suspendiert. Nach Zugabe von



178 mg (1.53 mmol) Diisopropylethylamin entsteht eine klare Lösung. Zu dieser Lösung werden 227 mg (510 μmol) **11** gegeben und die Mischung 1 h lang bei RT gerührt. Sie wird dann langsam bei Raumtemperatur in eine Lösung aus 88 mg (1.02 mmol) Piperazin getropft. Die Bildung des Amids ist sofort abgeschlossen. Das Produkt wird aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 251 mg \cong 398 μmol \cong 78 %

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS})$: 8.62 (2H; D; ζ); 7.96 (2H; D; ϵ); 7.82 (1H; D; δ); 7.59 (2H; D; β); 7.05 (1H; D; γ); 6.72 (2H; D; α); 4.47 (2H; T; 1); 3.83 (4H; M; λ); 3.39 (4H; T; 1'); 3.20 (4H; T; μ); 2.57 (2H; T; 4); 2.03 (2H; M; 2); 1.65 (2H; M; 3); 1.60 (4H; M; 2'); 1.39 (4H; M; 3'); 0.98 (6H; T; 4') (Numerierung s. Vers. 11/12!).

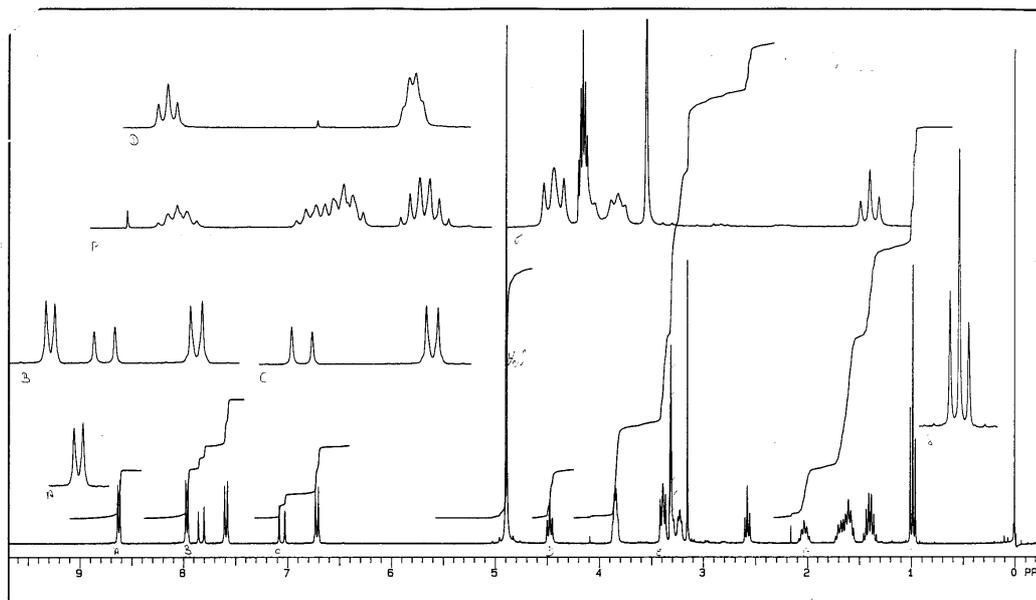
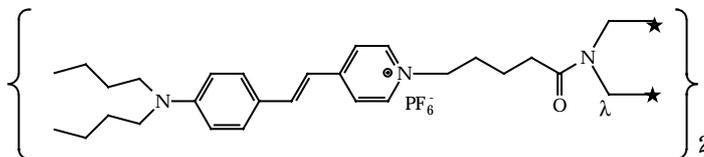


Abb. 77: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS})$ von **15b**

Versuch 15.3.: 1,4-Piperazinylden-di-1-(5-oxypentyl)-4-(p-N,N-di-n-butylaminostyryl)-pyridiniumhexafluorosphat **15c**

Die Darstellung verläuft wie in 15.2. Jedoch wird jetzt die Lösung von nur 44 mg (510 μmol)



Piperazin zu der Reaktionsmischung gegeben. Auch hier ist die Reaktion sofort beendet. Das Produkt wird aus Aceton umkristallisiert.

Ausbeute: 236 mg $\hat{=}$ 204 μmol $\hat{=}$ 80%

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{DMSO}/\text{TMS})$: 8.75 (2H; D; ζ); 8.05 (2H; D; ϵ); 7.90 (1H; D; δ); 7.57 (2H; D; β); 7.08 (1H; D; γ); 6.73 (2H; D; α); 4.43 (2H; T; 1); 3.41 (8H; S; λ); 3.33 (4H; T; 1'); 2.40 (2H; T; 4); 1.90 (2H; M; 2); 1.52 (2H; M; 3); 1.52 (4H; M; 2'); 1.34 (4H; M; 3'); 0.93 (6H; T; 4') (Zur Numerierung s. Formelbild zu Versuch 11/12!).

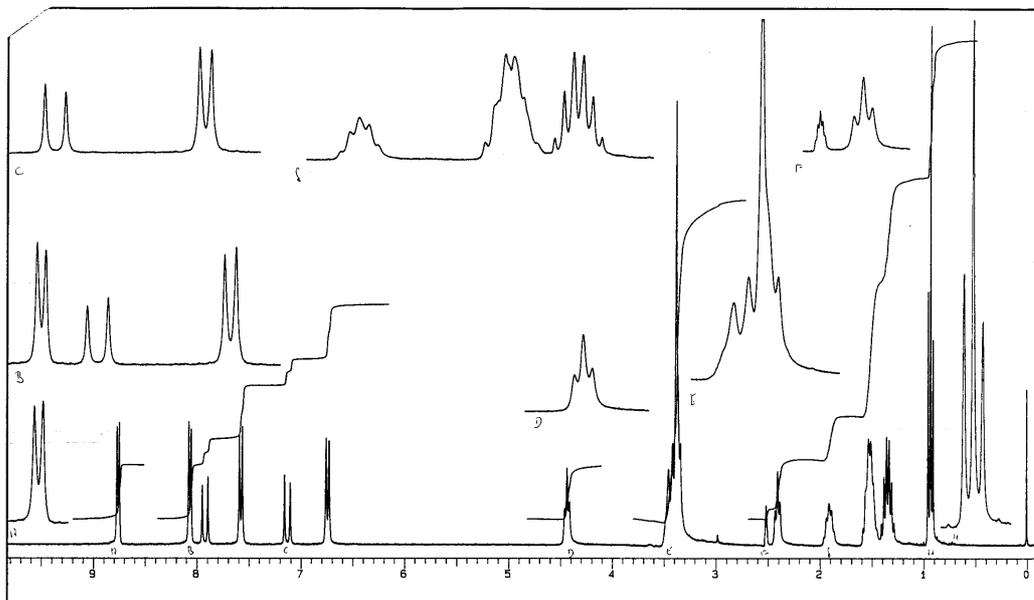
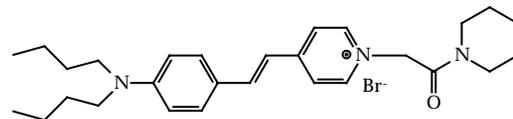


Abb. 78: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{DMSO}/\text{TMS})$ von **15c**

Versuch 15.4.: 1-(2-Piperidino-2-oxyethyl)-4-(4-N,N-di-n-butylaminostyryl-)pyridiniumbromid **15d**

Die Darstellung erfolgte in drei Stufen:

zunächst wird 4-Picolin mit Methylbromacetat quarter-nisiert. Diese



Reaktion erfolgt augenblicklich unter starker Wärmeentwicklung. Das entstandene Picoliniumsalz wird dann einer Aminolyse mit Piperidin unterworfen. Hierzu werden die beiden Edukte für 6 h in Methanol unter Rückfluß erhitzt. Anschließend erfolgt eine Aldolkondensation mit p-N,N-Di-n-butylaminobenzaldehyd nach der gleichen Vorschrift wie in Versuch 13. Das Produkt kann aus Ethanol umkristallisiert werden.

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: Das Spektrum ähnelt sehr dem Spektrum unter 15.1. Folgende Signale sind grundlegend anders: die Rotationsbarriere der Amidbindung ist nicht so hoch wie dort. Daher fallen die zur Amid-Gruppe α -ständigen Protonengruppen λ zusammen. Sie liegen bei 3.53 ppm und sind nur etwas verbreitert. Die Multiplizität müßte 5 sein. Die Gruppe ν liegt bei 1.73 ppm und ist ebenfalls verbreitert und nicht aufgelöst. μ liegt unter dem Signal für $2'$. Die einzige Methylengruppe im Spacer schließlich liegt als Singulett der Intensität 2 bei 6.10 ppm vor.

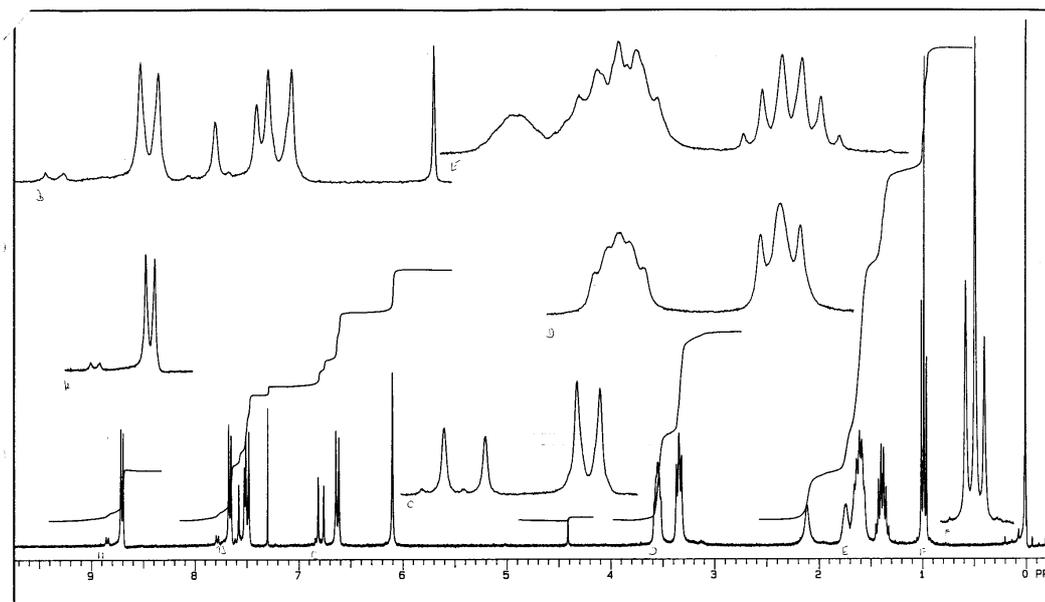
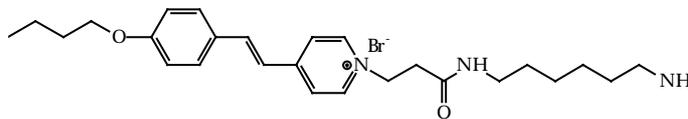


Abb. 79: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von **15d**

Versuch 15.5.: 1-(2-(6-Aminoethyl)-carbamoyl)4-(p-butoxystyryl)pyridiniumbromid **15e**

Die Darstellung erfolgt aus dem NHS-Ester **7d** und



Hexamethyldiamin im Überschuß. Dazu wird **7d** in Methylenchlorid suspendiert und zu dieser Lösung überschüssiges Amin in Methylenchlorid zugegeben. Der vorher suspendierte Farbstoff löst sich auf und das Produkt kristallisiert nach einiger Zeit aus.

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{DMSO}/\text{TMS})$: 0.94 (3H; T); 1.08 (2H; M); 1.25 (2H; M); 1.43 (2H; M); 1.71 (2H; M); 2.85 (2H; T); 2.95 (2H; M); 3.5 (8H; Methylen- und Aminogruppen; nicht aufgelöst); 4.04 (2H; T); 4.69 (2H; T); 7.06 (2H; D); 7.37 (1H; D); 7.70 (2H; D); 8.00 (1H; D); 8.17 (2H; D); 8.88 (2H; D)

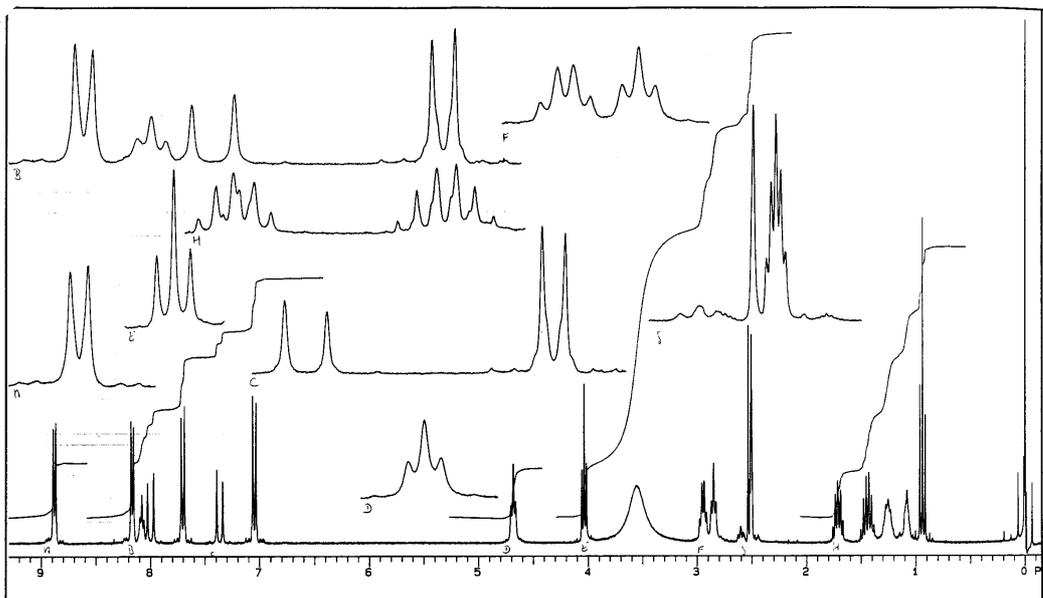
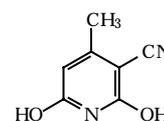


Abb. 80: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{DMSO}/\text{TMS})$ von **15e**

Versuch 16: 3-Cyano-2,6-dihydroxy-4-methylpyridin⁷⁸ **16**

28.8 g (0.22 mol) Ethylacetoacetat, 18.4 g (0.22 mol) Cyanacetamid und 18.7 g (0.22 mol) Piperidin werden in 70 ml Methanol 45 h lang unter Rückfluß gekocht. Das Methanol wird abgedampft und der Rückstand in 100 ml heißem Wasser gelöst. Dazu werden 12 ml konz. Salzsäure gegeben. Das Produkt läßt man im Kühlschrank auskristallisieren. Es wird dann abgesaugt, mit kaltem Wasser nachgewaschen und dann getrocknet.

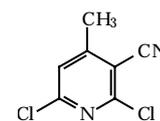


Ausbeute: 23.7 g $\hat{=}$ 0.16 mol $\hat{=}$ 72%

Smp.: 289-93°C (Lit.: 286-88°C bzw. 295-300°C)

Versuch 17: 3-Cyano-2,6-dichlor-4-methylpyridin⁷⁹ **17**

In einem 300-ml-Rührautoklav mit Glaseinsatz werden 40.0 g (0.26 mol) **16** und 96 ml (1.04 mol) Phosphoroxychlorid 4-6 h lang auf 180°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Mischung auf Eis gegossen. Der entstandene Niederschlag wird abgesaugt und aus 100 ml Ethanol umkristallisiert.

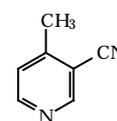


Ausbeute: 29.3 g $\hat{=}$ 0.16 mol $\hat{=}$ 59% (Lit.: 88-96%)

Smp.: 109°C (Lit.: 109-110.°C)

Versuch 18: 3-Cyano-4-picolin **18**

In einem 1-l-Einhalskolben werden 20.0 g (0.1 mol) **17** in 500 ml Methanol gelöst. Nach Zugabe von 16.4 g (0.2 mol) Natriumacetat und 5 g Palladium auf Aktivkohle wird die Reaktionsmischung ca. 4.5 h lang hydriert. Danach werden die Feststoffe abgesaugt und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wird mit Wasser und Ether aufgenommen und das Produkt mit Ether extrahiert. Die etherische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Man erhält als Rohprodukt 5.0 g (ca. 0.04 mol = 40% d. Th.) eines klaren, farblosen Öls. Nach Destillation im Vakuum (ca. 80°C/0.1 mbar) erhält man noch 2.3 g Öl, das bald kristallisiert.



Ausbeute: 2.3 g $\hat{=}$ 18.4 mmol $\hat{=}$ 18% (Lit.: 87%)

Smp.: 43°C (Lit.: 43-46°C)

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 2.58 (3H; S); 7.32 (1H; DQ); 8.63 (1H; D); 8.80 (1H; S)

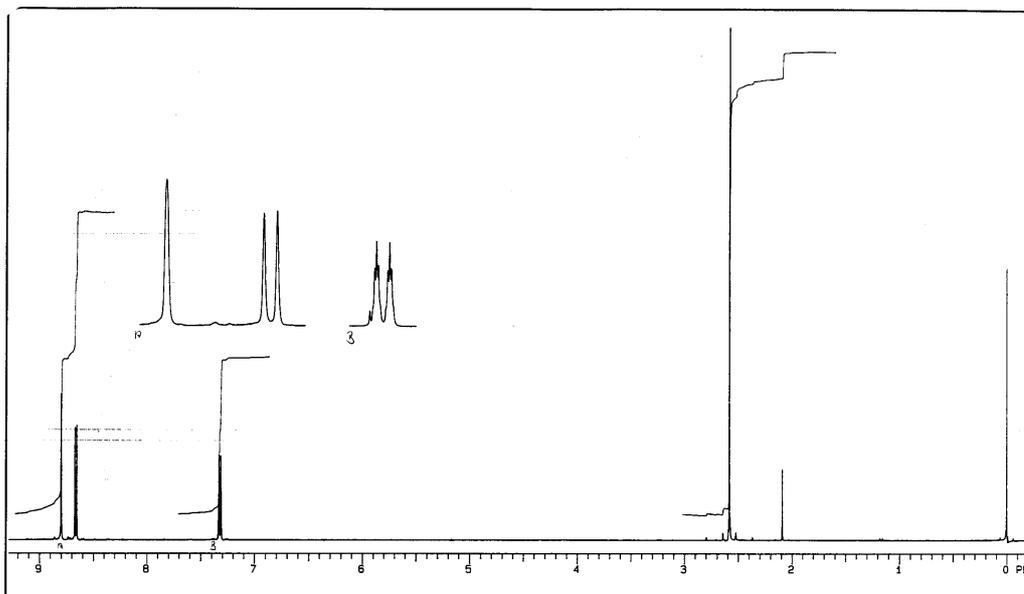
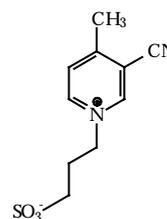


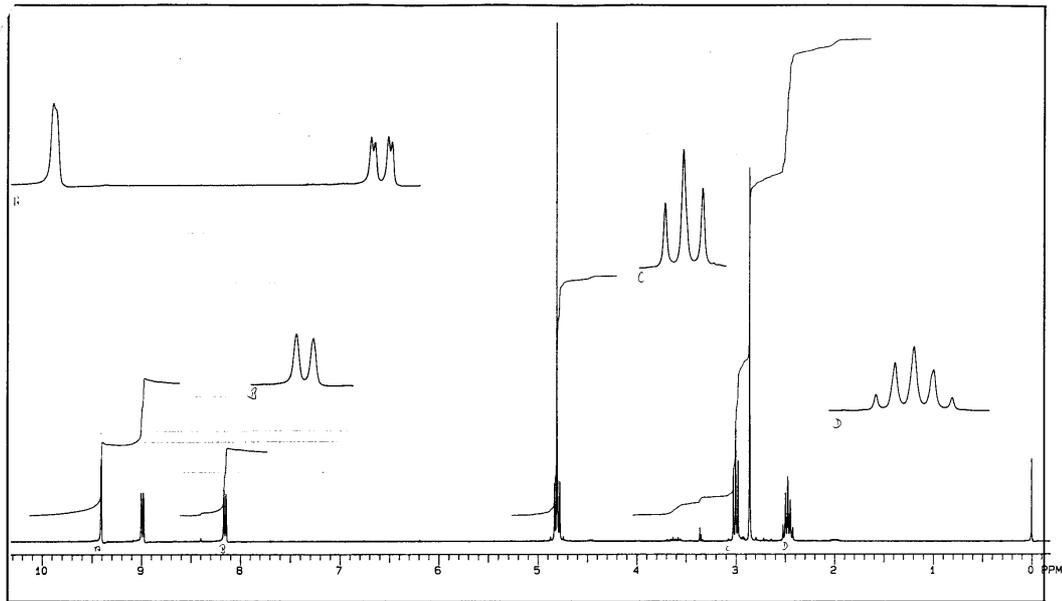
Abb. 81: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von **18**

Versuch 19: 1-(3-Sulfopropyl)-3-cyano-4-picoliniumbetain

1.0 g (8.5 mmol) **18** und 20.4 g (167 mmol) Propansulton werden 2 h lang auf 110°C erhitzt. Das überschüssige Propansulton wird im Vakuum abdestilliert (und so zurückgewonnen!). Der Rückstand wird aus Aceton umkristallisiert.

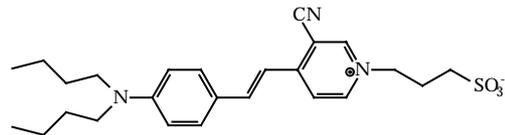


$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{D}_2\text{O}/\text{TSP})$: 2.47 (2H; Quint.); 2.86 (3H; S); 3.00 (2H; T); 4.81 (2H; T); 8.16 (1H; D); 8.99 (1H; DD); 9.41 (1H; S);

Abb. 82: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{D}_2\text{O/TSP})$ von **19****Versuch 20:**

1-(3-Sulfopropyl)-3-cyano-4-(4-N,N-di-n-butylamino-) styrylpyridiniumbetain **20**

850 mg (3.5 mmol) **19** und 820 mg (3.5 mmol) p-N,N-Di-n-butylaminobenzaldehyd werden in 20 ml abs. Ethanol

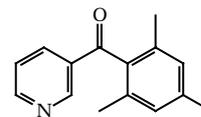


gelöst. Nach Zugabe von 5 Tropfen Piperidin wird 3.5h lang unter Rückfluß gekocht. Das Produkt läßt man dann über Nacht im Kühlschrank auskristallisieren. Die weitere Aufarbeitung erfolgt Säulenchromatographisch über Kieselgel. Elutionsmittel ist Methanol.

$\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$: 557 nm

Versuch 21: 3-Mesitylpyridin 21

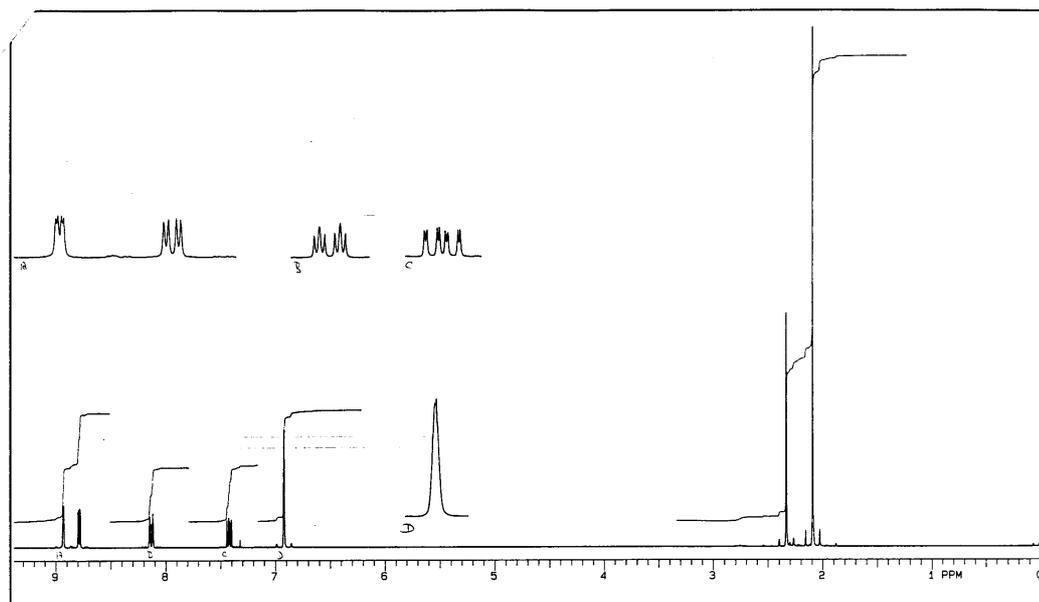
In eine Mischung von 100.0 g (0.568 mol) Nicotinylnchlorid-Hydrochlorid und 353.4 g (2.940 mol) Mesitylen, die unter Rühren in einem Eis/Kochsalz-Bad auf -12°C gekühlt wird, werden 281,2 g (2.11 mol) Aluminiumchlorid in Portionen von 10 g eingetragen. Danach läßt man die Reaktionsmischung sich auf Raumtemperatur aufwärmen und erwärmt dann vorsichtig im lauwarmen Wasserbad. Dann wird 6 h lang bei 100°C gerührt (KPG-Rührer). Danach wird die Mischung über Nacht stehengelassen. Sie wird dann mit Eis/konz. HCl zersetzt und mit Natronlauge alkalisch gemacht. Dann wird das Produkt mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel einschließlich Mesitylen abdestilliert (nicht abrotiert!). Nach Überführung des Rückstandes in eine kleinere Apparatur wird das Produkt im Vakuum destilliert. Es handelt sich um ein schwach gelbes Öl.



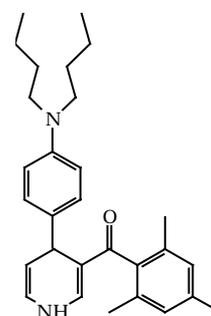
Ausbeute: 96.0 g $\hat{=}$ 0.426 mol $\hat{=}$ 75% (Lit.: 50.5%)

Sdp.: 123°C (0.05 mbar)

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 2.09 (6H; S); 2.33 (3H; S); 6.92 (2H; S); 7.42 (1H; DQ); 8.13 (1H; DT); 8.79 (1H; DD); 8.93 (1H; DD)

Abb. 83: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von **21****Versuch 22:**3-Mesityl-4-(4-N,N-di-n-butylaminophenyl)-1,4-dihydropyridin⁸⁰ **22**

2.05 g (0.084 mol) Magnesiumspäne werden zu Aktivierung einen Tag lang mit dem Magnetrührer gerührt. Dann werden 24.00 g (0.084 mol) p-Brom-N,N-di-n-butylanilin in 125 ml abs. THF unter leichtem Erwärmen innerhalb einer halben Stunde zugetropft. Dann wird langsam zum Rückfluß erwärmt, wobei eine Schale mit Eis stets griffbereit stehen sollte, da die Reaktion sehr plötzlich anspringt und dann nicht mehr über einen Rückflußkühler gekühlt werden kann. In jedem Fall ist ein 40-cm-Intensivkühler zu verwenden. Es wird dann 18 h lang unter Rückfluß gekocht. Dann werden in der Siedehitze 9.50 g (0.042 mol) **21** in der gleichen Menge THF innerhalb von 10 min. zugetropft. Daraufhin wird noch 1 h lang gekocht. Nach Zugabe von 100 ml ges. Ammoniumchlorid-Lösung wird die Mischung mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wird über Kaliumcarbonat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält gelbe Prismen.

Ausbeute: 9.30 g $\hat{=}$ 22 mmol $\hat{=}$ 52%

Smp.: 153-155°C

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 0.93 (6H; T); 1.33 (4H; M); 1.52 (4H; M); 1.73 (3H; S); 2.04 (3H; S); 2.23 (3H; S); 3.20 (4H; T); 4.53 (1H; D); 4.89 (1H; T); 5.69 (1H; DD); 6.52 (2H; D); 6.55 (1H; S); 6.66 (1H; S); 6.71 (1H; S); 7.09 (2H; D);

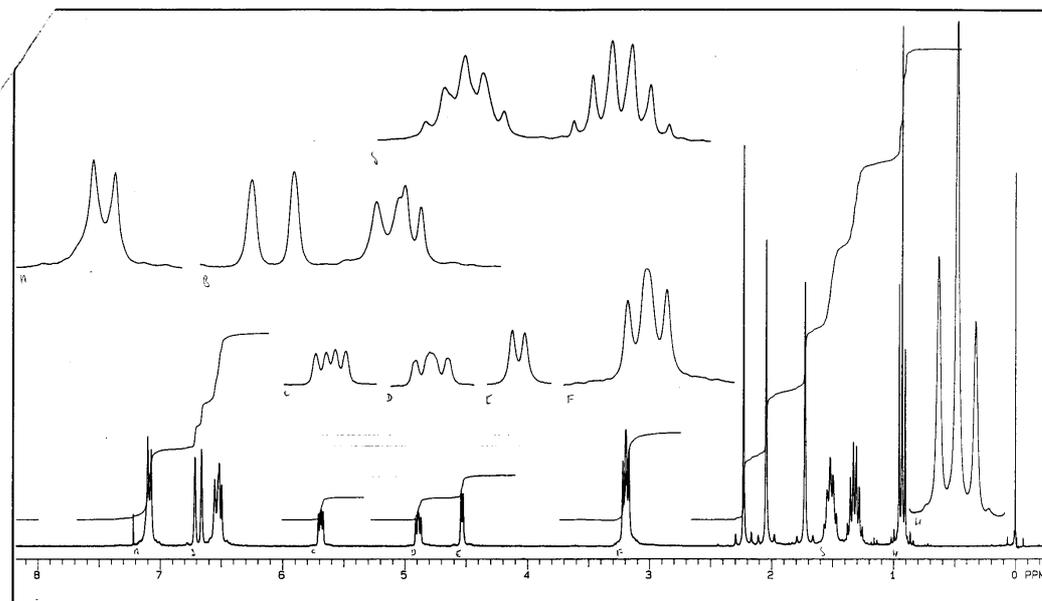
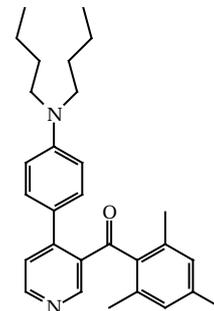


Abb. 84: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von 22

Versuch 23: 3-Mesityl-4-(4-N,N-di-n-butylaminophenyl-)pyridin⁸¹ **23**

44.1 g (0.103 mol) **22** und 24.9 g (0.103 mol) Chloranil werden in 700 ml Benzen 8 h lang gekocht. Die erkaltete Lösung wird mit 10 proz. Natronlauge fünfmal ausgeschüttelt. Die organische Phase wird eingedampft und der Rückstand mit Chloroform aufgenommen. Die Lösung wird über Kaliumkarbonat getrocknet und eingedampft. Das Rohprodukt



wird dann säulenchromatographisch aufgearbeitet (Kieselgel; Elutionsmittel: Essigester/Hexan 4 : 6). Man erhält ein DC-einheitliches, gelbes Öl.

Ausbeute: 44.14 g = 0.01

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 0.97 (6H; T); 1.36 (4H; M); 1.56 (4H; M); 2.13 (6H; S); 2.24 (3H; S); 3.27 (4H; T); 6.55 (2H; D); 6.76 (2H; S); 7.18 (2H; D); 7.30 (1H; D); 8.63 (1H; D); 8.66 (1H; S)

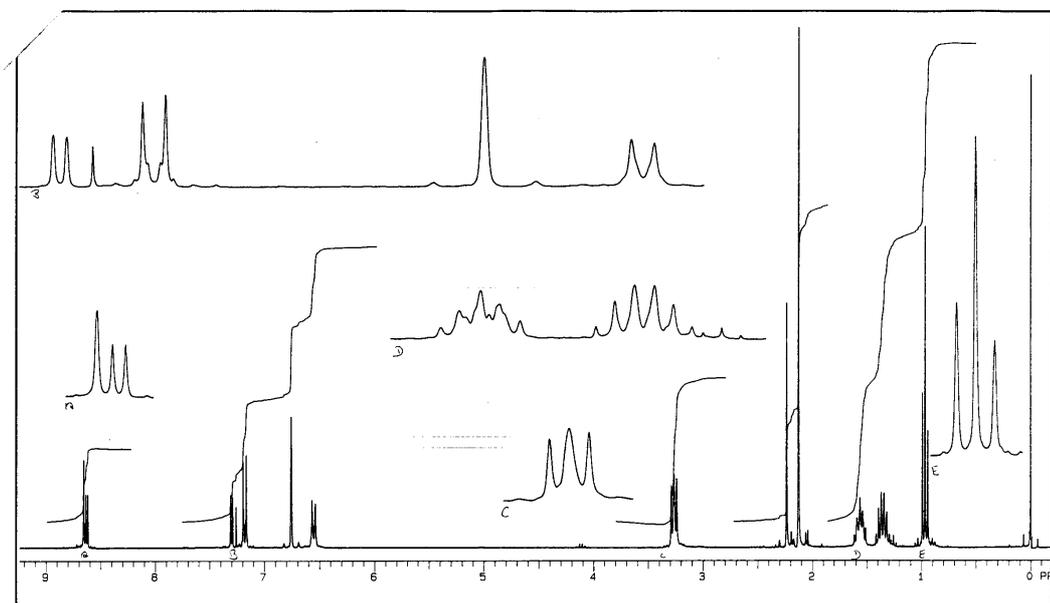


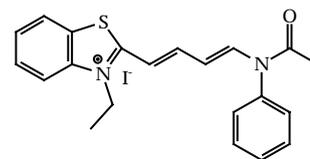
Abb. 85: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von **23**

Versuch 24: 7-N,N-Di-n-butylamino-2-azafluorenon **24**

In einem 25 ml- Zweihalskolben wurden 5.0 g (12 mmol) **23** zusammen mit 18.8 g Polyphosphorsäure 1.5 Stunden lang bei einem Druck von 20 mm auf 200°C erhitzt. Dabei war nur sehr langsames Rühren möglich. Es ließ sich etwas Mesitylen abdestillieren. Nach Auflösen in Wasser und Neutralisation mit NaOH war aber kein Produkt isolierbar. Auch Versuche mit mehr PPA bzw. bei höherer Reaktionstemperatur waren nicht erfolgreich. Bei niedrigerer Temperatur ist kein Mesitylen zu erhalten, das bei der Reaktion entstünde.

Versuch 25:2-(4-Acetanilidobutadienyl)-1-ethylbenzothiazoliumiodid **25**

10.0 g (33 mmol) 2-Methylbenzothiazolethyl-iodid und
12.6 g (50 mmol) Malonaldehyd-
bisphenyliminhydrochlorid werden in 26 ml abs.

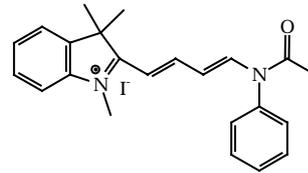


Acetanhydrid gelöst und für 70 min. auf 100°C erhitzt. Die Lösung wird im Eisfach über Nacht gekühlt und der Niederschlag abgesaugt. Dieser wird dann erst mit Wasser und dann mit Aceton gewaschen und getrocknet. Das Produkt wird ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Ausbeute: 11.8 g $\hat{=}$ 25 mol $\hat{=}$ 75% (Lit.: %)

Versuch 26: 2-(4-Acetanilidobutadien-1-yl)-1,3,3-trimethyl-3H-indoliumiodid **26**

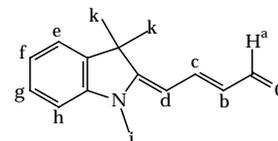
1,2,3,3-Tetramethyl-3H-indoliumiodid und Malonaldehydbisphenyliminhydrochlorid werden in abs. Acetanhydrid gelöst und 15 min. lang auf 120°C erhitzt. Die Lösung wird dann gekühlt und unter gutem Rühren in kalten Diethylether gegossen. Das Produkt fällt als Feststoff aus und wird abgesaugt. Ohne weitere Reinigung wird es so eingesetzt.



Ausbeute: 2.75 g \approx 5.6 mmol \approx 88% (Lit.: %)

Versuch 27: 4-(1,3,3-Trimethyl-2,3-dihydro-1H-indol-2-yliden)-2-butenal **27**

In 15 ml abs. Ethanol werden 250 mg (1.44 mmol) Triethoxypropen und 552 mg (1.44 mmol) **26** 48 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach



säulenchromatographischer Aufarbeitung der Reaktionsmischung läßt sich eine geringe Menge des Aldehyds isolieren.

Ausbeute: ca. 20 %

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$: 9.46 (1H; D; a; $\{J_{ab}= 8.25 \text{ Hz}\}$); 7.73 (1H; DD; c; $\{J_{cb}= 14.23 \text{ Hz}\}$); 7.23 (2H; M; f + g); 6.98 (1H; DT; e); 6.77 (1H; D; h); 5.97 (1H; DD; b; $\{J_{ba}= 8.25 \text{ Hz}\}$); 5.55 (1H; D; d; $\{J_{dc}=12.58 \text{ Hz}\}$); 3.24 (3H; S; i); 1.63 (6H; S; k)

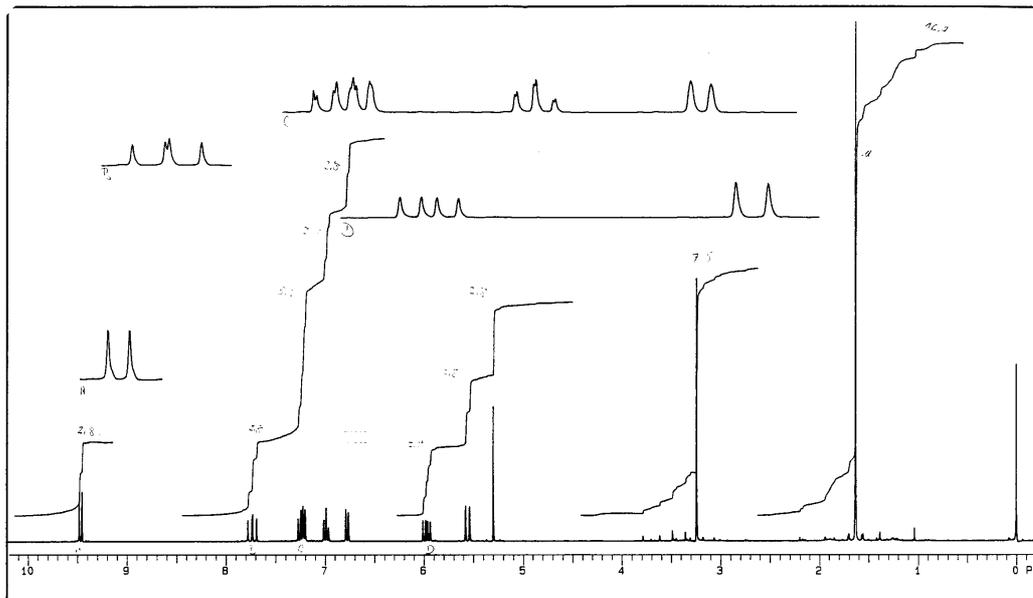
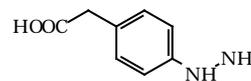


Abb. 86: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CDCl}_3/\text{TMS})$ von **27**

Versuch 28: Hydrazinophenyllessigsäure^{82,83} **28**

In einem 250-ml Zweihalskolben mit Innenthermometer, Tropftrichter und Magnetrührer werden 80.00 g konz. Salzsäure vorgelegt und im Eis/Kochsalzbad vorgekühlt. 7.50 g (0.05 mol) p-Aminophenyllessigsäure werden in 30 ml Wasser suspendiert und mit 5 n Natronlauge tropfenweise bis zur Auflösung versetzt. Nach Zugabe von 3.45 g (0.05 mol) Natriumnitrit wird die Lösung gekühlt und so zu der Salzsäure zutropft, daß die Innentemperatur 0°C nicht übersteigt.

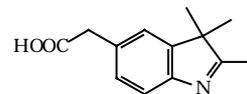


Die so erhaltene Diazoniumsalz-Lösung wird in eine eisgekühlte Lösung von 60.00 g (0.27 mol) $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in 120 ml konz. Salzsäure getropft. Nach 24 h Stehenlassen im Kühlschrank wird abgesaugt und mit etwas Wasser nachgewaschen. Der Niederschlag wird in 30 ml Wasser suspendiert und nach Zugabe von etwas Eis mit 8 mol/mol Natronlauge versetzt. Dabei ist Erwärmung durch Zugabe von Eis zu vermeiden. Durch Zugabe von 0.1 mol Essigsäure wird das Produkt ausgefällt. Nach dem Absaugen wird mit Wasser nachgewaschen und dann getrocknet.

Ausbeute: 10.60 g \cong 48 mmol \cong 96 % (als Trihydrat)

Versuch 29: 2,3,3-Trimethylindolenin-5-essigsäure **29**

11.3 g (0.05 mol) **28** und 13.0 g (0.15 mol) Methylisopropylketon werden in 30 ml Essigsäure 3 h lang unter Rückfluß erhitzt. Die Reaktionslösung wird heiß

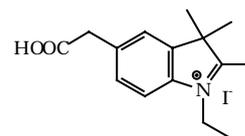


abgesaugt und nach dem Erkalten in 150 ml Wasser gegossen. Über Nacht wird im Kühlschrank auskristallisieren gelassen und dann abgesaugt. Der Niederschlag wird aus Methanol umkristallisiert. Man erhält eine feinkristalline, beigefarbene, schwerlösliche Verbindung.

Ausbeute: 4.1 g $\hat{=}$ 18.6 mol $\hat{=}$ 37%

Versuch 30: 5-Carboxymethyl-1-ethyl-2,3,3-trimethyl-3H-indolium-iodid **30**

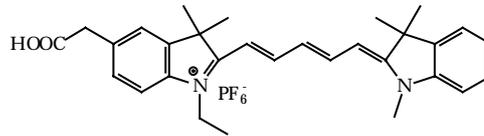
4.1 g (18.6 mmol) **29** und 9.0 g (58 mmol) Ethyliodid werden 20 h lang unter Rückfluß erhitzt. Von überschüssigem Ethyliodid wird abgesaugt und der Rückstand aus Ethanol umkristallisiert.



Ausbeute: 4.1 g $\hat{=}$ 11.0 mol $\hat{=}$ 59%

Vesuch 31: 1-Ethyl-3,3,1',3',3'-pentamethylindodicarbocyanin-5-essigsäure Hexafluorophosphat **31**

Analog zu **36** erfolgt die Synthese von **31**. 2.25 g (6.2 mmol) **30** und 2.83 g (6.2 mmol) **26** werden in 35 ml abs. Ethanol

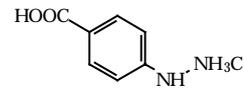


gelöst und aufgeköcht. Nach Zugabe von 2.49 g (24.8 mmol) Triethylamin wird die Reaktionsmischung 10 min. lang zum Rückfluß erhitzt. Die Lösung wird dann auf ca. ein Drittel eingengt und in eine verd. wässr. Lösung von KPF_6 mit etwas Essigsäure getropft (von beidem etwa der dreifache Überschuß). Das Rohprodukt fällt sofort aus und kann abgesaugt werden. Die weitere Reinigung erfolgt säulenchromatographisch. Laufmittel ist $CH_2Cl_2/MeOH$ (85:15).

Ausbeute: 1.49 g = 40%

Vesuch 32: 4-Hydrazinobenzoesäure^{84,85} **32**

In einem 1-l-Dreihalskolben mit Innenthermometer und Tropftrichter werden 27.4 g (0.2 mol) p-Aminobenzoesäure

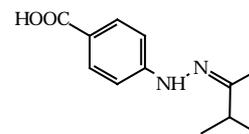


in 400 ml Wasser und 40 ml konz. Salzsäure gelöst. Die Mischung wird im Eisbad gekühlt. Bei 0-5°C werden nun 15.0 g Natriumnitrit in 50 ml Wasser zugetropft. Dabei entsteht eine homogene Lösung. Die Reaktionsmischung wird nun in eine gekühlte Lösung von 63.0 g (0.5 mol) Natriumsulfit in Wasser gegossen. Es bildet sich zunächst eine rote Lösung, die sich nach und nach aufhellt. Die Lösung wird eine Stunde lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Zugabe von 20 ml Eisessig und einer Spatelspitze Zinkpulver wird die Lösung eine Stunde lang auf 80°C erwärmt. Dabei ist zu starke Erwärmung zu vermeiden. Nach dem Abkühlen werden 750 ml konz. Salzsäure hinzugegeben und die Lösung im Eisbad gekühlt. Nach mehrstündigem Rühren wird der Niederschlag abgesaugt und mit verd. Salzsäure nachgewaschen. Zur weiteren Reinigung kann das Produkt abermals in Wasser gelöst und mit konz. Salzsäure gefällt werden. Statt dessen fällt man es aber hier besser als das Hydrazon (s. u.), das in der nächsten Stufe benötigt wird.

(keine Literaturangabe)

Versuch 33: Methyl-iso-propyl-(4-carboxyphenyl-)hydrazon⁸⁶ **33**

Die rohe 4-Hydrazinobenzoesäure **32** (höchstens 0.2 mol) und ein doppelter Überschuß Methyl-iso-propylketon (34.4 g $\hat{=}$ 0.4 mol) werden in Wasser (5 l/mol) gelöst. Schon nach



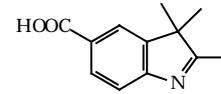
wenigen Minuten fällt das Hydrazon **33** spontan aus. Man rührt noch 2 h lang bei Raumtemperatur, stellt die Lösung zum Auskristallisieren in den Kühlschrank und saugt nach einigen Stunden ab. Das Produkt kann aus Ethanol/Wasser umkristallisiert werden, jedoch bringt dies keinen Vorteil gegenüber dem Rohprodukt.

Ausbeute: 19.2 g $\hat{=}$ 87 mmol $\hat{=}$ 44% (bezogen auf 0.2 mol p-Aminobenzoesäure als Edukt in Versuch 29).

Smp.: 182-190°C (Lit.: 191-93°C)

Vesuch 34: 2,3,3-Trimethylindolenin-5-carbonsäure **34**

1.970 g Methyl-iso-propyl-(4-carboxyphenyl)-hydra-zon werden in 15 ml Essigsäure 3.5 h lang zum Rückfluß erhitzt. Nach beendeter Reaktion wird die Essigsäure abgedampft und der ölige Rückstand aus Methanol umkristallisiert.

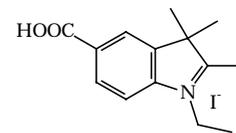


Ausbeute: 935 mg \approx 50% (Lit.: 77%)

Smp.: 209-212°C (Lit.: 210-212°C)

Vesuch 35: 5-Carboxy-1-ethyl-2,3,3-trimethyl-3H-indoliumiodid **35**

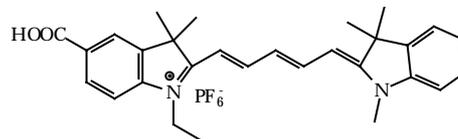
3.9 g (11 mmol) **34** wird in einem Bombenrohr mit der dreifachen Menge Ethyliodid 24 h lang auf 110°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die halb feste Masse aus Ethanol umkristallisiert.



Ausbeute: 70% (Lit.: 32%)

Vesuch 36: 1-Ethyl-3,3,1',3',3'-pentamethylindodicarbocyanin-5-carbonsäure Hexafluorophosphat **36**

2.23 g (6.2 mmol) **35** und 2.83 g (6.2 mmol) **26** werden in 35 ml abs. Ethanol gelöst und aufgeköcht. Nach Zugabe von 2.49 g (24.8 mmol) Triethylamin wird die Reaktionsmischung 10 min. lang zum Rückfluß erhitzt. Die Lösung wird dann auf ca. ein Drittel eingeeengt und in eine verd. wässr. Lösung von KPF_6 mit etwas Essigsäure getropft (von beidem etwa der dreifache Überschuß). Das Rohprodukt fällt sofort aus und kann abgesaugt werden. Dabei sollte das Filtrat kaum noch gefärbt sein! Die weitere Reinigung erfolgt säulenchromatographisch. Laufmittel ist $CH_2Cl_2/MeOH$ (85:15).



Ausbeute 3.52 g = 6 mmol

IR (KBr-Preßling): 3442 cm^{-1} (OH-Val.); 1607 (C=O-Val.); 1500, 1477, 1462 (Ringschw.);

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{DMSO/TMS})$: 1.26 (3H; T); 1.70 (12H; S); 3.72 (3H; S); 4.10 (2H; Q); {6.26 (1H; D); 6.46 (1H; D); 6.61 (1H; T); 8.2 - 8.5 (2H; M) Methinprotonen}; {7.00 - 8.13 (7H; M) Aromaten} 9.94 (1H; S; O-H)

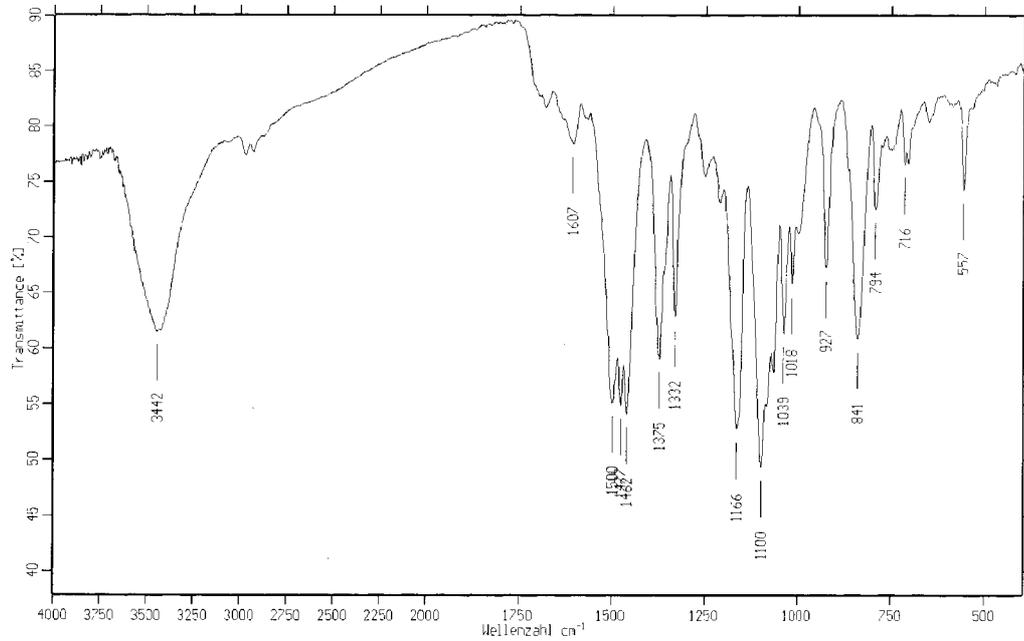


Abb. 87: FTIR-Spektrum von **36** (KBr-Preßling)

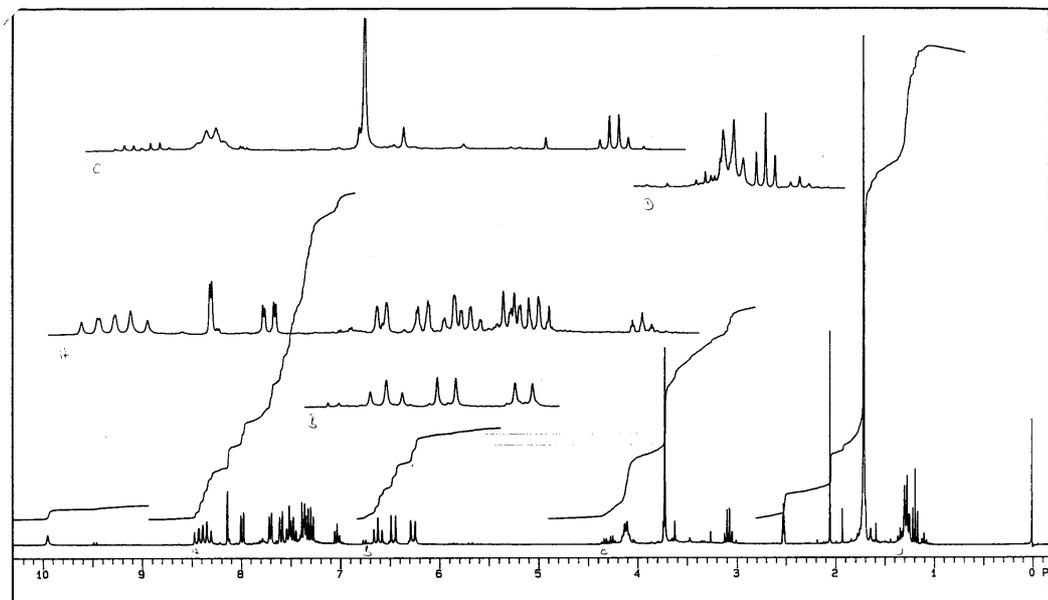
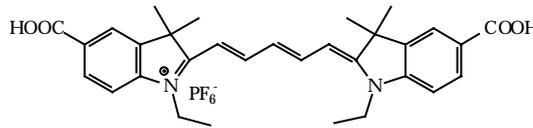


Abb. 88: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{DMSO/TMS})$ von **36**

Versuch 37: 1,1'-Diethyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanin-5,5'-dicarbonsäure Hexafluorophosphat **37**

250 mg 1-Ethyl-2,3,3-trimethyl-5-carboxy-3H-indoliumiodid und 90 mg Malonaldehydbisphenyl-

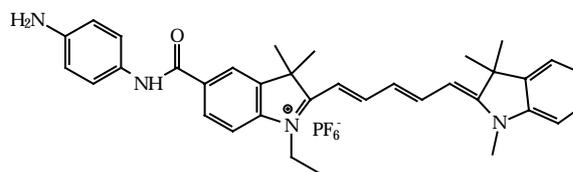


iminhydrochlorid werden in 10 ml wasserfreiem Acetanhydrid 30 min. lang auf 120°C erhitzt. Die Lösung wird eingedampft und der Rückstand mit wenig Acetonitril aufgenommen. Diese Lösung wird unter starkem Rühren in eine Lösung von der doppelten berechneten Menge Kaliumhexafluorophosphat in Wasser eingetropfet. Der Farbstoff fällt sofort vollständig aus und wird abgesaugt und im Vakuum bei 80°C getrocknet.

Ausbeute: 143 mg (67%)

Vesuch 38: 5-(4-Aminophenylcarbamoyl)-1-ethyl-3,3,1',3',3'-pentamethylindodicarbocyanin Hexafluorophosphat **38**

50 mg (83 µmol) **36** und je ein dreifacher Überschuß an p-Phenylendiamin, Ethyl-di-isopropylamin und **11** werden in 5 ml

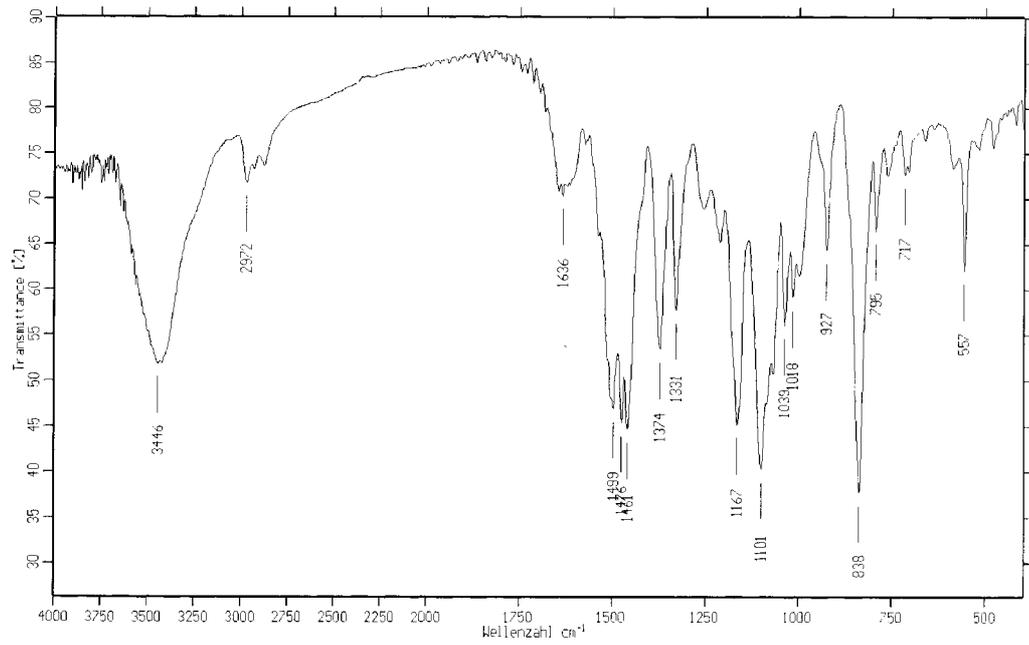
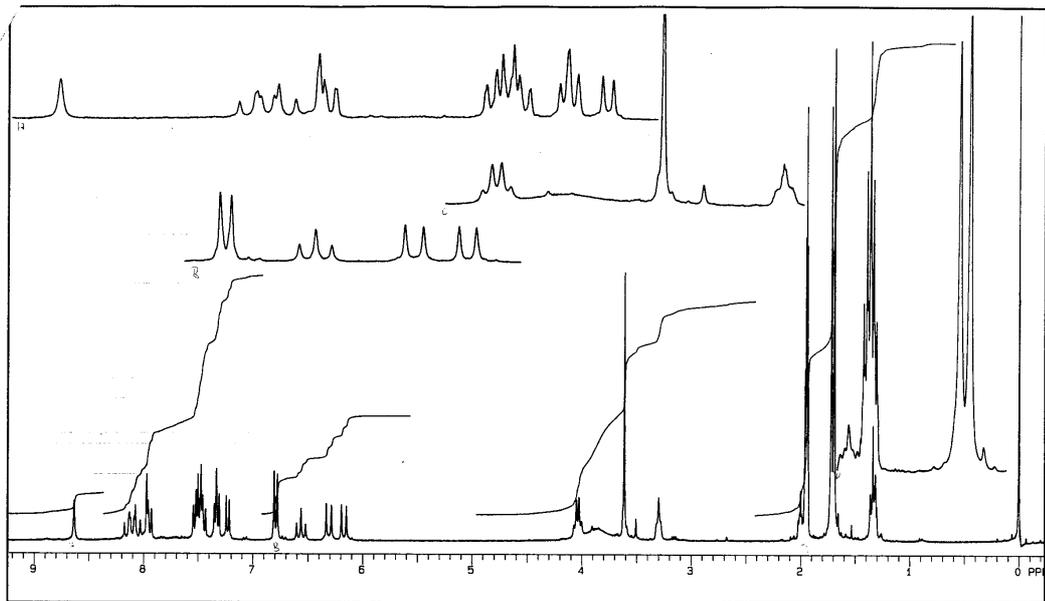


Acetonitril gelöst und für 24 h gerührt. Die Aufarbeitung der Reaktionsmischung erfolgt säulenchromatographisch.

Ausbeute: 28 mg $\hat{=}$ 41 µmol $\hat{=}$ 50%

$^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CD}_3\text{CN/TMS})$: $\delta(\text{ppm}) = 1.33$ (3H; T); 1.69, 1.72 (12H; S); 3.61 (3H; S); 3.85 (2H; br.); 4.03 (2H; Q); 6.16 (1H; D); 6.30 (1H; D); 6.55 (1H; T); 6.79, 7.48 (4H; AB-System); 7.22 (1H;); 7.32 (2H; T); 7.42-7.53 (2H; M); 7.96 (1H; S); 7.94 (1H; D); 8.10 (2H; 2xDD); 8.63 (1H; S)

IR (KBr-Preßling): 3446 cm^{-1} (N-H-Val.); 2972 (C-H-Val.); 1636 (C=O-Val.); 1499, 1476, 1461 (Ringschw.);

Abb. 89: FTIR-Spektrum von **38** (KBr-Preßling)Abb. 90: $^1\text{H-NMR}_{300}(\text{CD}_3\text{CN/TMS})$ von **38**

Versuch 39: Darstellung der Bichromophore aus **38** und **13a-d**

Die Darstellung der Bichromophore kann in zweierlei Weise erfolgen. Für **39c** und **39d** empfiehlt es sich, von dem Cyanin-Carboxamid **38** und der Styrylpyridinium-Carbonsäure **13c** bzw. **13d** auszugehen. Die gleiche Vorgehensweise eignet sich auch für **39a** und **39b**, jedoch ist es hier einfacher, umgekehrt vorzugehen, d. h. von der Cyanin-Carbonsäure **36** und dem Carboxamid des Styrylpyridins, also **14a** bzw. **14b**, auszugehen. In allen Fällen jedoch gibt man zum Amid, bezogen auf 1 mmol, 2 mmol der Säure und je 3 mmol Di-iso-propylethylamin bzw. **11** in insgesamt ca. 30 ml Acetonitril. Nach 24 stündigem Rühren bei Raumtemperatur wird die Lösung eingedampft und der Rückstand aus abs. Ethanol umkristallisiert. Der Niederschlag wird abfiltriert und mit Hilfe präparativer Schichtchromatographie isoliert (Laufmittel ist Methanol/Essigsäure 9 : 1)

Versuch 39.1.: 5-(4-(4-(4-(4-N,N-di-n-butylaminostyryl-)pyridinio-)butyramido-)phenylcarbamoyl)-1-ethyl-3,3,1',3',3'-pentamethylindodicarbocyanin

Dihexafluorophosphat **39a**

FAB-Massenspektrum: 1198 (M-H); 1054 (M-PF6); 1007 (M- PF6-3 CH3)909 (M-2 PF6); 893 (M'-CH3); 879 (M'-2 CH3); 863 (M'-3 CH3); 599 (M'-Styrylpyridin); 530 (Cyanin-NH); 512 (M'-Cyanin)

Versuch 39.2.: 5-(4-(5-(4-(4-N,N-di-n-butylaminostyryl-)pyridinio-)valeramido-)phenylcarbamoyl)-1-ethyl-3,3,1',3',3'-pentamethylindodicarbocyanin

Dihexafluorophosphat **39b**

FAB-Massenspektrum: 1213 (M); 1068 (M-PF6); 923 (M-2 PF6); 908 (M'-CH3); 893 (M'-2 CH3); 878 (M'-3 CH3); 614 (M'-Styrylpyridin); 530 (Cyanin-NH); 526 (M'-Cyanin)

Versuch 39.3.: 5-(4-(6-(4-(4-N,N-di-n-butylaminostyryl-)pyridinio-)capronamido-)phenylcarbamoyl)-1-ethyl-3,3,1',3',3'-pentamethylindodicarbocyanin Dihexafluorophosphat **39c**

FAB-Massenspektrum von: 1082 (M-PF6); 937 (M-2 PF6); 922 (M'-CH3); 907 (M'-2 CH3); 892 (M'-3 CH3); 628 (M'-Styrylpyridin); 530 (Cyanin-NH); 540 (M'-Cyanin)

Versuch 39.4.: 5-(4-(8-(4-(4-N,N-di-n-butylaminostyryl-)pyridinio-)caprylamido-)phenylcarbamoyl)-1-ethyl-3,3,1',3',3'-pentamethylindodicarbocyanin Dihexafluorophosphat **39d**

FAB-Massenspektrum von: 1255 (M); 1110 (M-PF6); 965 (M-2 PF6); 950 (M'-CH3); 935 (M'-2 CH3); 920 (M'-3 CH3); 656 (M'-Styrylpyridin); 530 (Cyanin-NH); 568 (M'-Cyanin)

Literatur

- ¹ Griffiths: Colour and Constitution of Organic Molecules, London 1974
- ² H. Zollinger: Color Chemistry, VCH Weinheim 1987
- ³ Zitat aus nicht angegebener Quelle
- ⁴ D. Voet, J. G. Voet: Biochemistry Kap. 11, 2nd ed. 1995, John Wiley & Sons, New York
- ⁵ L. M. Loew, G.W. Bonneville, J. Surow: Biochemistry **17(19)**, 4065-71, (1978)
- ⁶ B. Chance, M. Baltscheffsky: Biomembranes 7, **1975**, 33
- ⁷ A. S. Waggoner, A. Grinvald: Ann. N.Y. Acad. Sci. **303** , 217-41, (1977)
- ⁸ I. Tasaki, A. Watanabe, R. Sandlin, L. Carnay: Proc. N. A. S. *61*, **1968**, 883
- ⁹ I. Tasaki, L. Carnay, A. Watanabe: Proc. N. A. S. *64*, **1969**, 1362-68
- ¹⁰ I. Tasaki: Ann. N. Y. Acad. Sci. **1974**, 247-67
- ¹¹ I. Tasaki, L. Carnay, R. Sandlin: Science *163*, **1969**, 683-85
- ¹² L. B. Cohen et al.: J. Membrane. Biol. *19*, **1974**, 1-36
- ¹³ 22. L. M. Loew, I. Rosenberg, M. Bridge, C. Gitler: Biochemistry *22(4)*, **1983**, 837-44
- ¹⁴ W. N. Ross, B. M. Salzberg, L. B. Cohen, A. Grinvald, H. V. Davila, A. S. Waggoner, C. H. Wang: J. Membr. Biol. *33*, **1977**, 141-83
- ¹⁵ R. K. Gupta et al.: J. Membr. Biol. *58*, **1981**, 123-37
- ¹⁶ W. N. Ross et al.: Biophys. J. *14*, **1974**, 983-86
- ¹⁷ L. M. Loew, L. L. Simpson, A. Hassner, V. Alexanian:
J. Am. Chem. Soc. **101(18)**, 5439-40, (1979)
- ¹⁸ E. Fluhler, V. G. Burnham, L. M. Loew: Biochemistry **24**,
5749-55, (1985)
- ¹⁹ P. Fromherz et al.: Ber. Bunsenges. Phys. Chem. **95**, 1333-1345, (1991b)
- ²⁰ P. Fromherz et al.: Biochim. Biophys. A. **1068**, 149-156, (1991a)
- ²¹ L. M. Loew, L. L. Simpson.: Biophys. J. **34(3)**, 353-65, (1981)

-
- ²² A. Grinvald, A. Fine, I. C. Farber, R. Hidesheim: *Biophys. J.* **42**, 195-98, (1983)
- ²³ Waggoner: *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **8**, 847-68, (1979)
- ²⁴ Tsien, Gonzalez: *Chemistry & Biology* **4**, **1997**, 269-77
- ²⁵ Tsien, Gonzalez: *Biophys. J.* **69**, **1995**, 1272-80
- ²⁶ B. Reiffers: Dissertation in Vorbereitung, Universität Düsseldorf
- ²⁷ C. Fuchs: Dissertation 1999, Universität Düsseldorf
- ²⁸ M. Birmes: Dissertation, Universität Düsseldorf 1995
- ²⁹ P. Fromherz: *J. Phys. Chem.* **96**, **1992**, 6864-66
- ³⁰ D. Witzak: Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2000
- ³¹ A. Mayer, S. Neuenhofer: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33**, **1994**, 1044-1173
- ³² Y. Kanaoka: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **16**, **1977**, 137-147
- ³³ J. Hallmann: Dissertation in Vorbereitung, Universität Düsseldorf
- ³⁴ R. D.Elliott: *J. Med. Chem.* **29**, **1986**, 1056-61
- ³⁵ R. F. Heck: *Accs. Chem. Res.* **12**, 146-151, (1979)
- ³⁶ J. H. Billman et. al.: *J. Am. Chem. Soc.* **64**, **1942**, 2977-78
- ³⁷ J. H. Billman et. al.: *J. Am. Chem. Soc.* **68**, **1946**, 895-96
- ³⁸ L. Hellerman et al.: *J. Am. Chem. Soc.* **68**, **1946**, 1890-93
- ³⁹ A. Hassner, D. Birnbaum, L.M. Loew: *J. Org. Chem.* **49**, 2546-51, (1984)
- ⁴⁰ R. Schröter (in: Houben Weyl Bd. 11/1, S.152)
- ⁴¹ M. S. Newman, R. H. B. Galt: *J. Org. Chem.* **25**, **1960**, 215
- ⁴² A. Grinvald, R. Hildesheim, I. C. Farber, L. Anglister: *Biophys J.* **39**, **1982**, 301-8
- ⁴³ C. Jutz: *Chem. Ber.* **91**, **1958**, 850-61
- ⁴⁴ E. Breitmaier: *Synthesis* **1983**, 641-45
- ⁴⁵ M. G. Veliev, M. M. Guseinov: *Synthesis* **1980**, **6**, 461

-
- ⁴⁶ Badische Anilin- und Sodafabrik (Franz Willie, Inventor): Ger. **1956**, 946, Aug. 2, 440
- ⁴⁷ B. Rath: Staatsarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **1996**
- ⁴⁸ Herbert S. I. Chao: Synth. Communic. *18 (14)*, **1988**, 1641-50
- ⁴⁹ E. J. Corey, C. U. Kim: Tetrahedron Letters *42*, **1972**, 4339-42
- ⁵⁰ Corey, Kim: J. Amer. Chem. Soc. *94 (21)*, **1972**, 7586-87
- ⁵¹ W. Groß: Diplomarbeit, Universität Düsseldorf **1997**
- ⁵² L. G. S. Brooker et al.: J. Am. Chem. Soc. *62*, **1940**, 1116-25
- ⁵³ Vasilev, Muschkalo: Zh. Obsh. Khim. *62(9)*, **1992**, 2087-90
- ⁵⁴ Pentimalli, L: Gazz. Chim. Ital. *61*, **1961**, 991-1004
- ⁵⁵ A. N. Kost et al.: Zh. Obsh. Khim. *34 (12)*, **1964**, 4046-54
- ⁵⁶ Kreuzberger: Arch. Pharm. *299*, **1966**, 988
- ⁵⁷ F. M. Hamer: The Cyanine Dyes and Related Compounds, Wiley & Sons, London **1964**, S. 90
- ⁵⁸ E. Rosenhauer, F. Barlet: Ber. *62*, **1929**, 2724
- ⁵⁹ O. Perin-Roussel, P. Jacquignon: C. R. Acad. Sc. Paris *278*, **1974**, 279-81
- ⁶⁰ V. Reingen: Staatsarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **1996**
- ⁶¹ A. J. G. Mank et al.: Anal. Chem. *67*, **1995**, 1742-48
- ⁶² J. Jablonski: Dissertation in Vorbereitung, Universität Düsseldorf
- ⁶³ C. S. Hamilton et al.: J. Am. Chem. Soc. *51*, **1929**, 3158-61
- ⁶⁴ Pollak et al.: J. Am. Chem. Soc. *Vol. 102, No. 20*, **1980**, 6334
- ⁶⁵ E. Daltrozzo et al. (Pat.): Ger. Offen. DE 3,533,772 (Cl. C09B23/00) 09 Apr. 1987, Appl. 21 Sep. 1985 (s. auch CAS Vol. 107, 1987, 135892r)
- ⁶⁶ J. Coste et al.: J. Org. Chem. *59*, **1994**, 2437-46
- ⁶⁷ R. Mestres, C. Palomo: Synthesis **1982**, 288
- ⁶⁸ T. Förster: Discuss. Faraday. Soc. *27*, **1959**, 7
- ⁶⁹ C. A. Parker, W. T. Rees: Analyst (London) *85*, **1960**, 587

-
- ⁷⁰ J. N. Demas, G. A. Crosby: *J. Phys. Chem.* **75**, **1971**, 991
- ⁷¹ Freedman, Laris: *Int. Rev. Cytol. Suppl.* **12**, **1981**, 177-246
- ⁷² Malinski et al: *Appl. Fluoresz. Technol. III Nr. 1*, **1991**, 1-7
- ⁷³ E. E. Jelley: *Nature* **139**, **1937**, 631
- ⁷⁴ 12. J. Plásek, K. Sigler: *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **33**, **1996**, 101-24
- ⁷⁵ F. M. Hamer: *J. Chem. Soc.* **1949**, 32-37
- ⁷⁶ C. F. Koelsch: *Org. Synth. Coll. Vol. 3*, 132-33
- ⁷⁷ H. Bestian et al.: *Ann.* **566**, **1950**, 210-44
- ⁷⁸ M. Lounasmaa, C. J. Johansson: *Tetrahedron* **33**, **1976**, 113-17
- ⁷⁹ Bobbit, Scola: *J. Org. Chem.* **25**, **1960**, 560-64
- ⁸⁰ A. Mendel: *J. Organometal. Chem.* **6**, **1966**, 97-99
- ⁸¹ A. R. F. Fuson, J.J. Miller: *J. Am. Chem. Soc.* **79**, **1957**, 3478-80
- ⁸² I. M. Hunsberger et al.: *J. Org. Chem.* **21**, **1956**, 394-99
- ⁸³ P.W. Neber: *Ber.* **55**, **1922**, 826-48
- ⁸⁴ E. Fischer: *Ann.* **212**, **1882**, 337-38
- ⁸⁵ Veibel, S., Hauge, N.: *Bull. Soc. Chim.* **5**, **1938**, 1506-9
- ⁸⁶ J. S. Lindsey et al.: *Tetrahedron* **45**, **1989**, 4845-66
- ⁸⁶ L. M. Loew: *Nature (London)*, **281(5731)**, 497-99, (1979)
- ⁸⁷ L. M. Loew: *J. Biochem. Biophys. Meth.* **6(3)**, 243-60, (1982)
- ⁸⁸ L. M. Loew, L. B. Cohen, B. M. Salzberg, A. L. Obaid,
F. Bezanilla: *Biophys. J.* **47(1)**, **1985**, 71-77
- ⁸⁹ Loew, Benson, Lazarovici, Rosenberg: *Biochemistry* **24(9)**, **1985**, 2101-4
- ⁹⁰ L. M. Loew: *Spectroscopic Membrane Probes Vol. 1-3*,
CRC-Press, Boca Raton, Fla. **1988**
- ⁹¹ B. P. Bammel et al.: *Biocim. Biophys. Acta* **1024**, 1990, 61-81
- ⁹² N. V. Visser, H. J. Appel et al.: *Biochemistry* **34**, **1995**, 11777-84

⁹³ H. Ti Tien: *J. Mol. Biol.* *16*, **1966**, 577-80

⁹⁴ J. Frank et al.: *Biophys. Biochim. Acta* *1280*, **1996**, 51-64

⁹⁵ D. Y. Malkov, V. S. Sokolov: *Biochim. Biophys. Acta* *1278*, **1996**, 197-204