

**Bichromophore Farbstoffsysteme mit
amphiphilem Charakter
Synthese, Charakterisierung,
Fluoreszenzeigenschaften, Potentialsensitivität**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

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

vorgelegt von

Lars Schneider

aus Ratingen

Düsseldorf 2001

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-D. Martin
2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Braun

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 2001

Für meine Eltern und Sonja

Herrn Prof. H.-D. Martin danke
ich für die Vergabe des Themas,
sowie für das Interesse und die
Anregungen, die diese Arbeit be-
gleitet haben.

1. Einleitung	1
2. Theoretische Grundlagen	7
2.1. Biologische Membranen	7
2.2. Membranpotentiale	8
2.3. Messung von Membranpotentialen	11
2.3.1. Fluoreszenzsonden zur Potentialbestimmung	11
2.3.2. <i>Slow-Response</i> - und <i>Fast-Response</i> Farbstoffe	13
2.4. Kombination von Chromophoren	16
2.5. Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)	19
3. Problemstellung	22
3.1. <i>Fast</i> - und <i>Slow-Response</i> -Farbstoffe - Nachteile	22
3.2. Bichromophore	22
3.3. Synthesestrategie	24
4. Synthese und Charakterisierung	28
4.1. Styrylpyridinium-Farbstoffe als Donoren	29
4.1.1. Dialkylaminobenzaldehyde	30
4.1.2. 4-Picoliniumcarbonsäurebromide	30
4.1.3. Styrylpyridiniumcarbonsäurebromide	32
4.1.4. Aminoderivate der Styrylpyridiniumcarbonsäurebromide	34
4.1.5. Tripyrrolidinochlorophosphoniumhexafluorophosphat (PyCloP)	39
4.1.6. ω -Bromcarbonsäuren	40
4.2. Cy-5 als Akzeptor	41
4.2.1. Synthese	42
4.2.2. 1,3,3-Triethoxypropen	43
4.2.3. 2,3,3-Trimethyl-6-sulfonatoindolenin	43
4.2.4. Quaternierte Bausteine	43
4.2.5. Cy-5	44
4.3. Bichromophore	47
4.3.1. Reinigung der Bichromophore	48
4.3.2. Charakterisierung der Bichromophore	49
4.4. Verbindungen mit erhöhter Hydrophilie	52
4.4.1. Bichromophore mit zusätzlicher Sulfonatogruppe im Spacer	53
4.4.2. Trichromophore	55
4.4.3. Charakterisierung	58
4.5. Bichromophore mit verlängertem Spacer	61
4.6. Referenzsubstanzen	66
5. Fluoreszenzspektroskopie	67
5.1. Fluoreszenzeigenschaften	67

5.1.1.	Fluoreszenzeigenschaften des Styrylteilchromophors _____	67
5.1.2.	Fluoreszenzeigenschaften von Cy-5 _____	68
5.1.3.	Fluoreszenzeigenschaften der Bichromophore _____	70
5.2.	Abhängigkeit des FRET von der Spacerkettenlänge _____	72
5.2.1.	Konzentrationsbereich _____	72
5.2.2.	Isotrope Lösungsmittel _____	74
5.2.3.	Kalium-Vesikelsuspension _____	77
5.3.	Berechnung des Förster-Radius _____	79
5.4.	Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten _____	83
5.5.	Bestimmung der relativen Geschwindigkeitskonstanten des FRET__	92
5.6.	Lösungs- und Einlagerungsverhalten der Bichromophore _____	95
5.7.	Potentialmessungen _____	97
5.8.	Bestimmung der Potentialsensitivität _____	99
5.8.1.	Überprüfung der Vesikelfunktionalität _____	100
5.8.2.	Ergebnisse der Potentialmessungen mit Bichromophoren _____	102
5.8.3.	Diskussion der Ergebnisse _____	107
5.9.	Bichromophor mit extrem verlängertem Spacer _____	110
6.	Zusammenfassung _____	115
7.	Experimentalteil _____	118
8.	Literatur _____	200

1. Einleitung

Mit der Entdeckung der ersten synthetischen Farbstoffe (siehe Abbildung 1) in der Mitte des 19. Jahrhunderts war der Grundstein zur Entwicklung der chemischen Großindustrie gelegt. Über Jahrzehnte war sie geprägt von der Nachfrage nach Textilfarbstoffen, zunächst für Naturprodukte, wie Baumwolle, Wolle und Seide, später dann für Kunstfasern und Kunststoffe. Entwicklungen und Innovationen auf diesen Gebieten forcierten die Entdeckung immer neuer Farbstoffe zur ästhetischen Farbgebung.

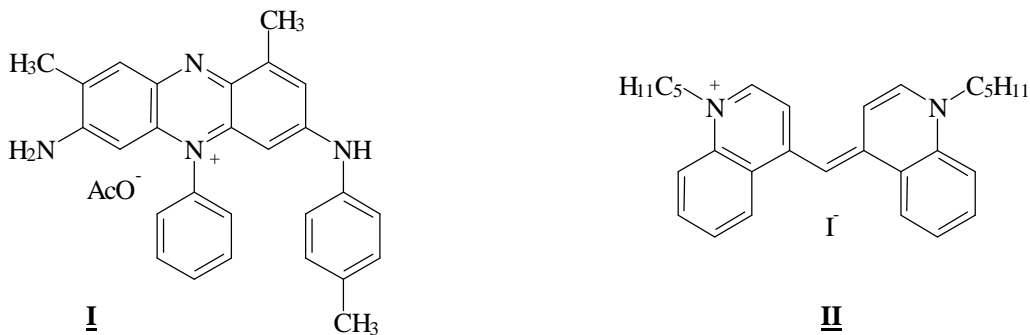


Abbildung 1: Mauvein I, erster Teerfarbstoff, 1856 von W. H. Perkin entdeckt. Williams Cyanin II, der erste Cyaninfarbstoff, entdeckt im gleichen Jahr von C. H. G. Williams^{[1],[2]}.

Das Gebiet der Textilfarbstoffe ist heute ausgereift und es finden nur noch selten Innovationen statt. Wenn überhaupt vorhanden konzentrieren sich Forschung und Entwicklung auf die Optimierung und Kostenreduzierung in bestehenden Prozessen. Welche Bedeutung der Farbstoffforschung heute zukommt, zeigt die starke Interdisziplinarität des Gebietes. Die physikalischen und chemischen Aspekte von Licht und von färbenden Substanzen gehen einher mit der Neurobiologie der Farbwahrnehmung. Große Fortschritte sind in den letzten Jahren auf dem Gebiet der Hirnforschung gemacht worden, kolorimetrische Systeme wie das CIE-System stellen einen quantitativen Zusammenhang zwischen farbigem Licht und dem im Auge ausgelösten Reiz her. Auf der anderen Seite steht die Rolle der Farbe in der Psychologie und in der Kunst und in anderen kulturellen Bereichen^[3]. Farbstoffforschung findet dagegen heute immer stärker im Bereich der funktionellen Farbstoffe statt, d. h. zur

Lichtabsorption und -emission fähige Moleküle, die eine andere Funktion als die der Farbgebung haben^[4]. Solche Farbstoffe werden heute für technische Anwendungen gezielt synthetisiert. Flüssigkristallanzeigen (LCD)^[5], Farbstofflaser^{[6], [7]}, Reprographie^{[8], [9]}, optische Datenspeicherung^[10], Umwandlung von Sonnenenergie^[11] und Photovoltaik^[12], Sensibilisierung von Silberhalogenidschichten^{[13], [14]} und Frequenzverdopplung (nichtlineare optische Eigenschaften, NLO)^[15], um nur einige Gebiete zu nennen, wären ohne die chromophoren Systeme mit den passenden Eigenschaften unmöglich.

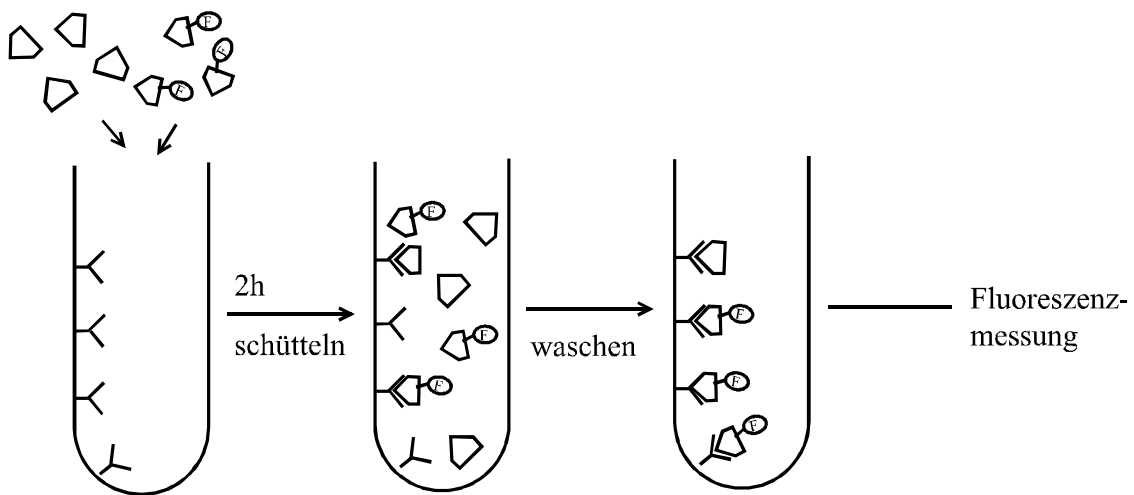


Abbildung 2: Prinzip eines Fluoreszenzimmunoassays (FIA). Kunststoffröhrchen, die auf der Innenwand mit Antikörpern beschichtet sind (links). Nach gleichzeitiger Zugabe von Analyt (Fünfecke, Probelösung) und Nachweisreagenz (fluoreszente Fünfecke) findet Konkurrenz um die im Unterschluß vorhandenen Bindungsstellen statt. Nach einem Waschvorgang läßt sich die Konzentration des Analyten in der Probelösung über die Fluoreszenz bestimmen, die um so kleiner ist, je größer die Analytkonzentration ist.

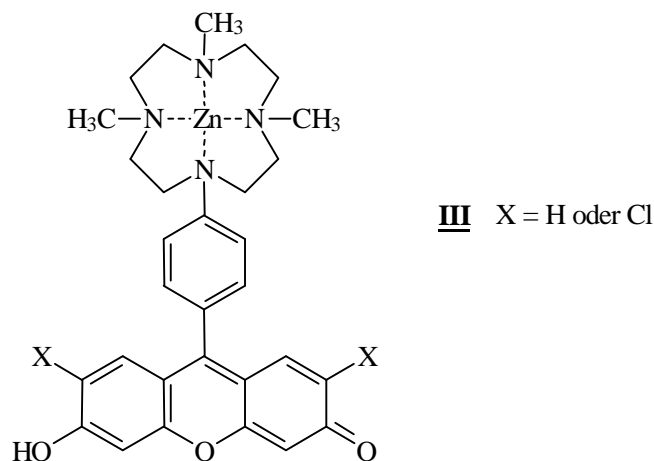
Insbesondere die moderne chemische Analytik, die Molekularbiologie und die medizinische Diagnostik "leben" vom Einsatz funktioneller Farbstoffe. Das Konzept der Biosonden und der molekularen Marker hat sich hier aufgrund seiner unschlagbaren Vorteile gegenüber anderen diagnostischen Methoden (z. B. der radioaktiven Markierung) durchgesetzt.

Es kombiniert in der Regel die Fluoreszenz eines geeigneten Chromophors als empfindlicher Nachweismethode mit der möglichst selektiven Affinität des Farbstoffs zum Analyten. Beispielsweise werden in den Fluoreszenzimmunoessays (FIA, siehe

Abbildung 2), die in der Medizin zum Nachweis und zur Quantifizierung körpereigener Substanzen (Hormone, Blutinhaltsstoffe etc.) routinemäßig eingesetzt werden, fluoreszent markierte Antikörper eingesetzt, die hochspezifisch an ein Molekül binden und das in Gegenwart etlicher anderer Verbindungen^[16].

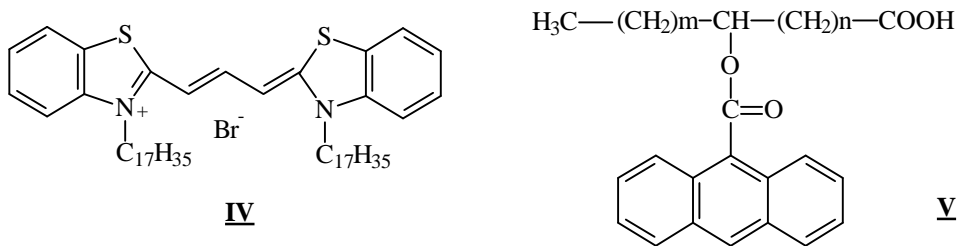
Die Bandbreite der analytischen Anwendungen funktioneller Farbstoffe ist schier unbegrenzt. An einigen ausgewählten Beispielen sollen die Einsatzgebiete aufgezeigt und die Vielfalt der Anwendungsmöglichkeiten von Fluoreszenzsonden dokumentiert werden:

- Es gibt eine ganze Palette von Sonden zur Bestimmung von Ionen, die physiologische Relevanz haben, von den klassischen pH-Indikatoren (Phenolphthalein) bis hin zu maßgeschneiderten Molekülen für Calcium, Magnesium, Natrium, Kalium, Chlorid u. a. Der Farbstoff **III** zeigt um so höhere Fluoreszenz, je größer die Zn^{2+} -Konzentration ist. Dabei fungiert er als spezifischer Chelatligand für Zink in Gegenwart von Na^+ -, K^+ -, Ca^+ - Mg^+ -Ionen^[17]. Er wird als Sonde zur Bestimmung von Zinkkonzentrationen in biologischen Systemen vorgeschlagen.

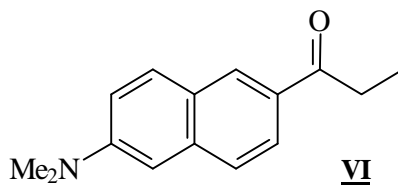


- Viskositätssonden: Sie dienen zur Untersuchung der Fluidität von Membranen und der Viskosität im Cytosol. Mit Hilfe des Cyaninfarbstoffs **IV** lassen sich Aussagen über physikalische Eigenschaften, z. B. Phasenübergangstemperaturen in Membranen machen. Durch die lipophilen Alkylreste lagert er sich in Membranen ein und ändert seine Fluoreszenzeigenschaften in Abhängigkeit des Membranzustands^[18].

Solche Moleküle werden auch zur Bestimmung von Membranviskositäten in FRAP-Experimenten (fluorescence recovery after photobleaching) genutzt^[19]. Untersuchungen zur Membranfluidität lassen sich mit Fluoreszenzsonden vom Typ **V** machen. Dabei läßt sich der Chromophor (Anthracen) durch Variation der Parameter n und m an eine definierte Stelle in der Membran bringen^[20].



- Polaritätssonden: Sie dienen zur Klärung der Topologie und Funktion von Proteinen, z. B. zur Beurteilung polarer Bindungsstellen. Die Farbstoffmoleküle haben ein Dipolmoment, das mit den Dipolmomenten der benachbarten Moleküle Wechselwirkungen eingeht. Die Stärke dieser Wechselwirkungen bestimmt die spektralen Eigenschaften des Chromophors. Der Farbstoff **VI** zeigt beispielsweise positive Solvatochromie in der Fluoreszenzemission^[21].



- Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen kann luminometrisch erfolgen, indem man die Bildung eines Fluoreszenzfarbstoffes an das Vorhandensein von Aminogruppen (im Protein) koppelt und die der Konzentration proportionale Fluoreszenz mißt. Hier eignet sich z. B. 3-(4-Carboxybezoyl)chinolin-2-carbaldehyd (CBQCA)^[22].

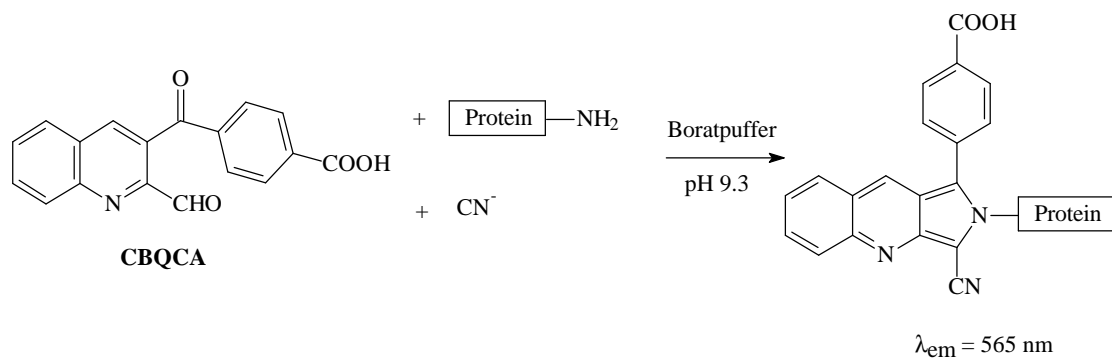
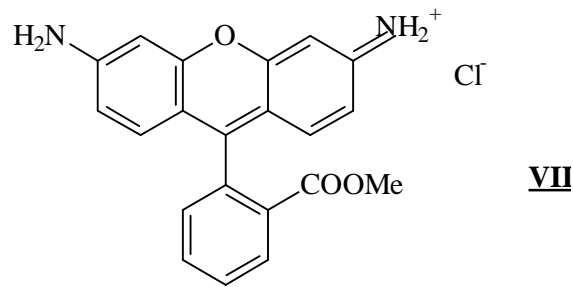


Abbildung 3: CBQCA-Essay zur quantitativen Erfassung von Proteinkonzentrationen.

- **Fluoreszenzanaloga:** Am Stofftransport durch biologische Membranen sind Vorgänge wie Endo- und Exocytose beteiligt. Um solche Vorgänge zu verstehen, ist eine Kenntnis der Bildung von Vesikeln, d. h. Informationen über Trennung und Fusion von Membranen, ihre laterale Organisation und ihre Dynamik von Bedeutung. Hier werden sogenannte Fluoreszenzanaloga eingesetzt, also Biomoleküle, die ein Fluoreszenzlabel tragen in ihrer biologischen Funktion aber nicht beeinträchtigt werden. In Frage kommen an Phospholipide, Fettsäuren oder Proteine gebundene fluoreszierende Farbstoffe (Pyren, Dansyl, Cy-5, Cumarinderivate etc.)^[23].
- Das Human Genom Project^[24] hat vor kurzem die Entschlüsselung des menschlichen Erbguts vorgestellt. Bei der Arbeit an diesem Projekt hat die Bioinformatik als junge Disziplin eine Schlüsselfunktion. Das Sammeln, Speichern und Auswerten der generierten Informationen ist bei den anfallenden Datenmengen nur noch automatisiert zu bewältigen. Bei der DNA-Analyse kommen auch hier fluoreszent gelabelte DNA-Fragmente zum Einsatz, die das Auswerten von Informationen erst einfach und effizient machen.
- **Potentialsonden:** Viele biologische Prozesse werden von elektrischen Potentialen an Biomembranen gesteuert. Mit dem Farbstoff Rhodamin 123 **VII** lassen sich zum Beispiel elektrische Potentiale an Mitochondrienmembranen bestimmen^[25].



Die Messung und Quantifizierung dieser Potentiale und Potentialänderungen liefert wichtige Erkenntnisse über potentialgekoppelte Vorgänge an Membranen und in Zellen. Die Bestimmung von ganzen Reizmustern an Nervengewebe ist von fundamentaler Bedeutung für die Neurobiologie. Diese Forschung auf molekularer Ebene korreliert mit Untersuchungen in Hirnforschung und Psychologie. Ein fernes Ziel ist die Erklärung von neuronalen Mechanismen wie Verhaltensmustern, Lernprozessen, Sprache, Wahrnehmung, Bewußtsein und die Antwort auf Umweltreize auf molekularer Ebene^{[26],[27], [28]}.

Auch hier werden seit wenigen Jahrzehnten Anstrengungen unternommen, mit Hilfe geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe, die potentialsensitive Eigenschaften haben, durch Anfärben des biologischen Materials *in vivo* Informationen zu sammeln^{[29], [30], [31]}. In diesem Bereich soll die vorliegende Arbeit einen Beitrag leisten.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Biologische Membranen

Jede Zelle ist von ihrer Umwelt durch eine biologische Membran getrennt, die nach dem Flüssig-Mosaik-Modell^[32] als komplexe Lösung von Proteinen und Steroiden in einer Matrix aus Lipiden aufgefaßt werden kann. Grundlage bildet eine Lipiddoppelschicht von ca. 5 nm Durchmesser. Die amphiphilen Lipidmoleküle bestehen meist aus Glycerin-3-phosphat, verestert mit langkettigen Alkancarbonsäuren (Fettsäuren). Ein Beispiel finden sich in Abbildung 4.

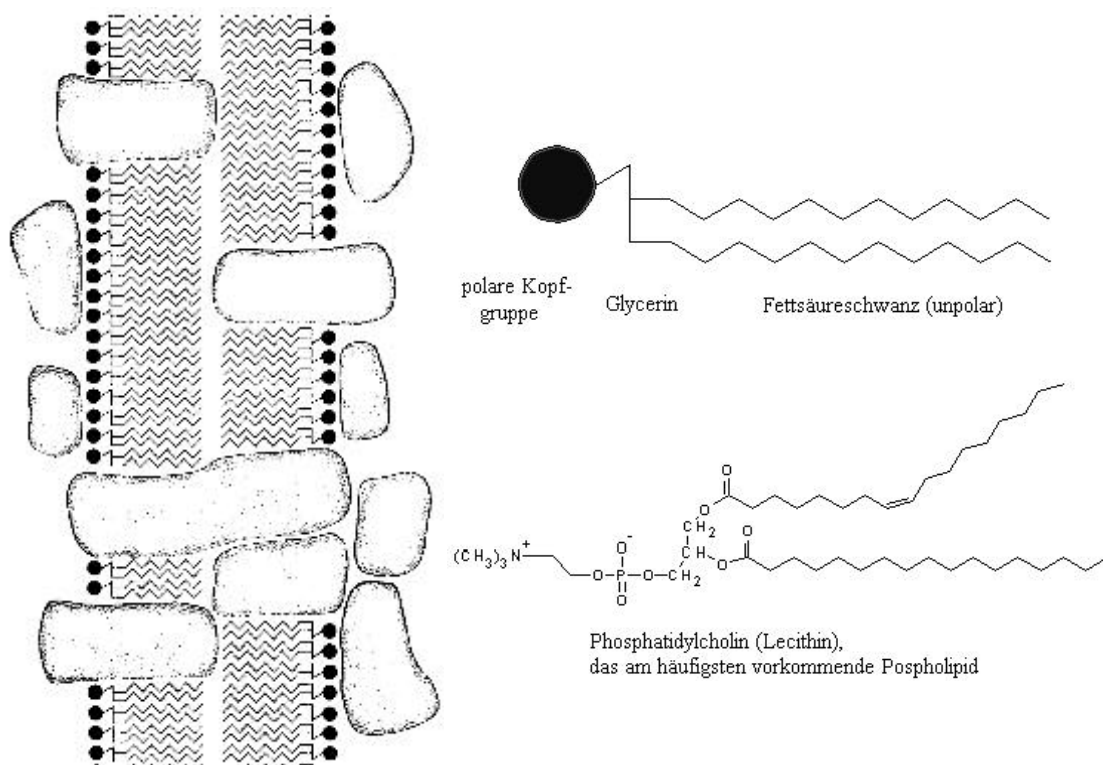


Abbildung 4: Aufbau der Zellmembran. Links die Lipiddoppelschicht mit ein- bzw. angelagerten Proteinen^[33]. Rechts: Lipid, schematische Darstellung, darunter ein typischer Vertreter.

Dabei sind die polaren Kopfgruppen der einzelnen Lipidmoleküle nach außen, die unpolaren Kohlenwasserstoffschwänze nach innen gewendet. In diese flüssige Matrix sind Proteine eingebettet, die die Funktion der jeweiligen Membran bestimmen.

Zur vollen Funktionstüchtigkeit der Membran ist ihre Fluidität Voraussetzung. Unterhalb einer bestimmten Mindesttemperatur geht die Matrix in eine Gelphase über, in der die Bewegung der Lipide stark eingeschränkt ist^[34]. Art der Lipide und Zusammensetzung der Matrix bestimmen diese Temperatur.

Die Membran ist semipermeabel und läßt trotzdem intensiven Stoffaustausch von Substraten, Stoffwechselprodukten, Ionen etc. mit der Umgebung zu. Der Transport durch die Membran erfolgt entweder passiv, d. h. durch direkte Diffusion, erleichterte Diffusion (mit Hilfe von Carriern) und über Membrankanäle (spezifisch für bestimmte Substanzen). Dabei kann der Status des Kanals (offen / geschlossen) von der Membranspannung oder von der Anwesenheit bestimmter Ionen oder Botenstoffe abhängen. Oder der Membrantransport erfolgt aktiv, d. h. unter Verbrauch von Energie, meist gekoppelt an ATP-gesteuerte Pumpen.

2.2. Membranpotentiale

Abbildung 5 zeigt den typischen Verlauf eines Transmembranpotentials. Es setzt sich aus zwei Anteilen zusammen: a) das Oberflächenpotential Ψ_S , das durch Konzentrationsgradienten von Ionen zwischen Oberfläche und Innerem der wäßrigen Lösung zustande kommt, b) das Dipolpotential Ψ_D , das durch induzierte Dipole in Wassermolekülen direkt auf der Oberfläche der Membran und im Bereich der polaren Kopfgruppen erzeugt wird. Das Transmembranpotential $\Delta\Psi$, das sich mit Elektroden zwischen den wäßrigen Phasen vor und hinter der Membran messen läßt, setzt sich additiv aus den vier Beiträgen zusammen. Dabei liegt Ψ_S in der Größenordnung einiger Zehntel Millivolt, Ψ_D dagegen beträgt mehrere hundert Millivolt und ist (vermutlich) positiv. Der Transport von Ionen über die Membran ist die Voraussetzung für das Zustandekommen des Membranpotentials.

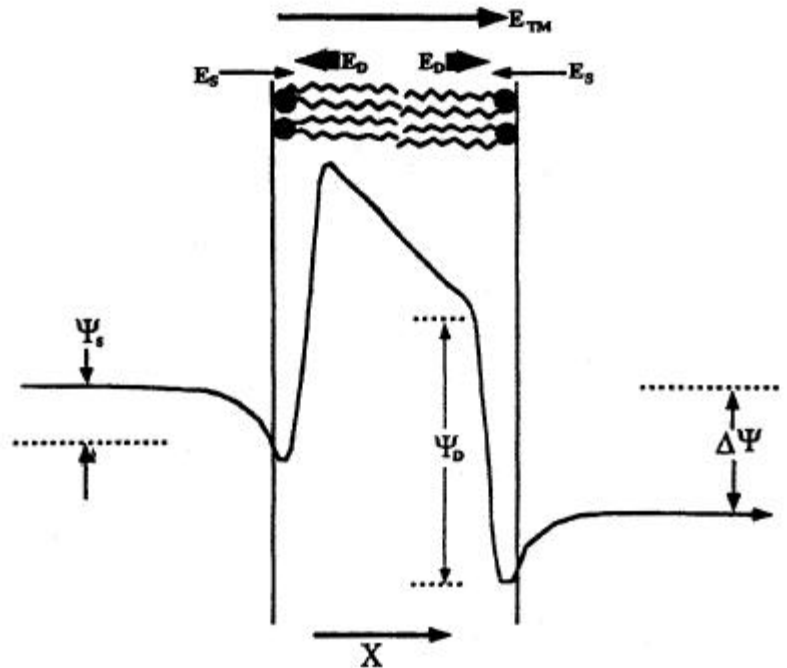


Abbildung 5: Die Pfeile über dem Schema geben Richtung, Ausdehnung und relative Stärke der elektrischen Felder wieder, die mit den Potentialen verbunden sind. Weitere Erklärungen siehe Text. Aus ^[35].

Der passive Transport erfolgt mit den Konzentrationsgradienten der betreffenden Ionen, ein aktiver Transport ist auch gegen die Konzentrationsgradienten möglich. Membranpotentiale spielen insbesondere bei der Erzeugung und Weiterleitung von elektrischen Impulsen als Antwort auf äußere Reize eine große Rolle. Die Zellen, die das leisten, sind die Neuronen. Ein Neuron kann über einen Meter lang werden und der Nervenimpuls wird als wandernde Welle von Ionenströmen transportiert. Zwischen einzelnen Neuronen erfolgt die Leitung chemisch mit Hilfe von Botenstoffen, den Neurotransmittern. Ein Transmembranprotein, die (Na^+/K^+) -ATPase, transportiert aktiv Kaliumionen durch die Membran vom Zelläußeren eines Neurons ins Zellinnere, Natriumionen in genau die entgegengesetzte Richtung. Pro Transportzyklus werden formal drei Natrium- und zwei Kaliumionen transportiert, was den Aufbau eines Potentialgradienten über die Membran zur Folge hat. Sie lädt sich innen negativ und außen positiv auf und das Gleichgewichtspotential für K^+ -Ionen beträgt ca. -80 mV (Säugerzellen).

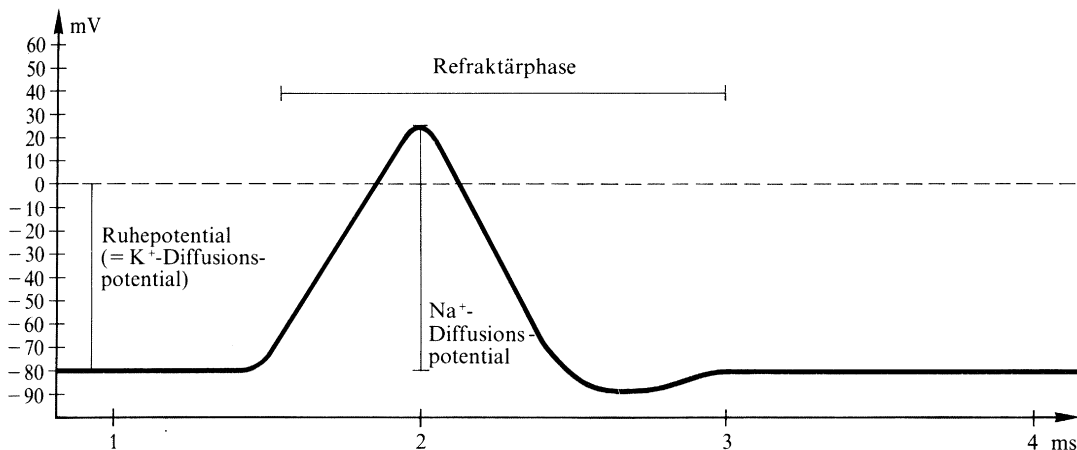


Abbildung 6: Zeitlicher Verlauf eines Aktionspotentials. Aus ^[36].

Da die Membran für Kationen nicht ganz undurchlässig ist, stellt sich im unerregten Neuron ein Ruhepotential von -60 bis -80 mV ein. Als Nervenimpuls bezeichnet man die vorübergehende Depolarisation der Membran (siehe Abbildung 6). Dabei stellt sich kurzfristig ein Potential von ca. +30 mV ein, das sofort wieder auf den Wert des K^+ -Gleichgewichtspotentials abfällt (Repolarisation) und dann langsamer das Ruhepotential erreicht (Hyperpolarisation). Die Vorgänge werden durch einen vorübergehenden Anstieg der Membranpermeabilität für Na^+ -Ionen gefolgt von einem Anstieg der K^+ -Permeabilität ausgelöst. Dabei werden durch elektrische Erregung ionenspezifische Transmembranproteine in ihrer Struktur verändert und so Ionenkanäle geöffnet und geschlossen. Das geschieht im Millisekundenbereich. Durch Einströmen von Na^+ -Ionen in die Nervenzelle bricht die negative Spannung zunächst zusammen, doch bevor das Gleichgewichtspotential der Na^+ -Ionen erreicht ist, werden die K^+ -Kanäle geöffnet und K^+ -Ionen strömen von innen nach außen., während sich die Na^+ -Kanäle wieder schließen. Wenn das K^+ -Gleichgewichtspotential erreicht ist, stellt die Ionenpumpe ((Na^+/K^+) -ATPase) das Ruhepotential wieder her. Die Zeit vom Beginn der Umpolung bis zum Wiedererreichen des Ruhepotentials (Refraktärphase) liegt bei etwa drei Millisekunden; in dieser Zeit ist die Membran nicht erregbar.

2.3. Messung von Membranpotentialen

Zur Bestimmung des Membranpotentials bieten sich drei wesentliche Möglichkeiten^[37]. Die einfachste ist eine Messung mit Glasmikroelektroden, die die Potentiale vor und hinter einer Membran messen und die Spannung direkt anzeigen. Dies ist nur an entsprechend großen Zellen, wie z. B. den Nervenzellen des Tintenfisches, möglich. Spannungen an kleinen Zellen oder an Organellen, die ebenfalls membranumgeschlossen sind, lassen sich so nicht bestimmen. Außerdem ist diese invasive Methode mit einer Zerstörung der Membran verbunden, was zu Ionenlecks und damit zu falschen Ergebnissen führen kann.

Der Einsatz von radioaktiv markierten Ionen, ähnlich wie bei den Radioimmunoassays (RIA), die sich Ende der fünfziger Jahre etabliert haben, ist mit erheblichen Nachteilen verbunden: Aufgrund der Halbwertszeit der Materialien ist die Haltbarkeit stark eingeschränkt, was wiederum die Nachweisempfindlichkeit beeinträchtigt. Dazu kommt ein hoher Aufwand durch behördliche Genehmigung und Sicherheitsvorschriften beim Umgang mit radioaktiven Stoffen.

Der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen zur Potentialmessung umgeht all diese Nachteile. Die Methode ist hochempfindlich, die Farbstoffe lassen sich bis in kleinste Zellkompartimente hinein applizieren, ohne die Zellen dabei zu zerstören und nahezu alle Zell- und Organelltypen sind zugänglich. Probleme bereitet allerdings die Zelltoxizität einiger Farbstoffe. Auch eine Schädigung durch photodynamisch erzeugten Singulett-Sauerstoff ist möglich. Schließlich muß die Möglichkeit der Wechselwirkung mit Zellbestandteilen als Fehlerquelle in Betracht gezogen werden.

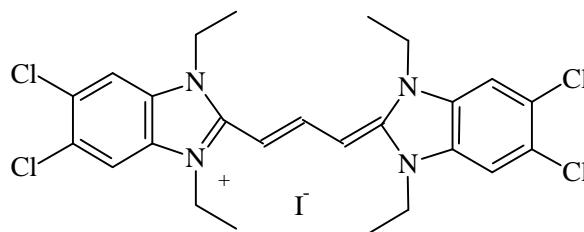
2.3.1. Fluoreszenzsonden zur Potentialbestimmung

Seit Anfang der siebziger Jahre werden Fluoreszenzsonden zur Membranpotentialbestimmung eingesetzt. Pionierarbeit haben hier Tasaki^[38], Cohen^[39], Ross^[40] und Conti^[41] geleistet. Erste Experimente wurden mit den Axonen des Tintenfisches durchgeführt; aufgrund seiner Größe konnten die spektroskopisch gewonnenen Er-

gebnisse mit Hilfe von Elektroden direkt überprüft werden. Bis heute sind hunderte von Farbstoffen auf ihre Potentialsensitivität getestet worden. Ein Übersichtsartikel von Waggoner^[42] zeigt die Potentialmessungen an einer Vielfalt von Zellen, einzelnen Organellen und Vesikeln und die jeweils benutzten Chromophore. Den universalen potentialsensitiven Farbstoff gibt es bis heute nicht und wird es wahrscheinlich auch nie geben. Für jedes spezielle Problem gibt es einen geeigneten Farbstoff, der individuell angepaßt ist.

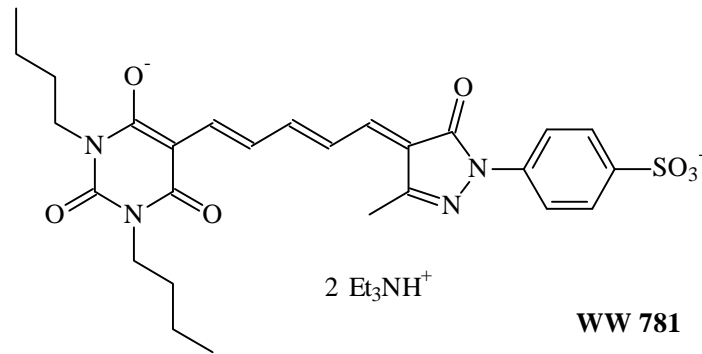
Die folgenden Beispiele von Potentialmessungen sollen die Vielfalt der eingesetzten Chromophore demonstrieren:

- Das Trimethincyanin JC-1 hat eine spezifische Affinität zu Mitochondrien-Membranen. In wäßriger Pufferlösung (pH 8) zeigt es eine Fluoreszenz bei 527 nm. Das Monomer steht im Gleichgewicht mit J-Aggregaten, die bathochrom verschoben bei 590 nm emittieren. Die Aggregatbildung ist abhängig von der chemischen Umgebung (Polarität, pH-Wert, Ionenstärke) und damit vom Potential^[43].

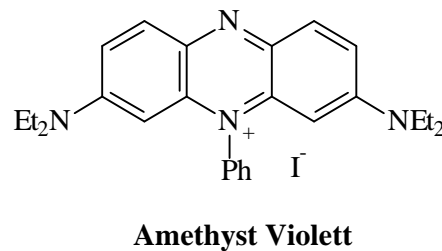
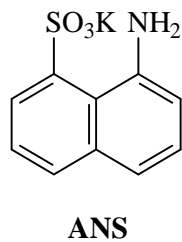


JC-1

- Der Farbstoff WW-781 lagert sich in Zellmembranen ein und reagiert mit Änderung der Fluoreszenzintensität auf Potentialänderung ohne dabei die Emissionswellenlänge zu verschieben^{[44], [45]}.



- Eine der einfachsten und ältesten Potentialsonden ist ANS (1,8-Anilino-naphthalinsulfonat). Sie wird zur Untersuchung von Transmembranpotentialen in Bakterien, Chloroplasten, Mitochondrien und submitochondrialen Partikeln angewendet^{[46], [47]}. Der Mechanismus der Sensitivität ist noch nicht vollständig geklärt, man nimmt sowohl Umverteilungsprozesse als auch elektrochrome Anteile an.



- Amethyst Violett, ein Phenazinium-Farbstoff, wird zur Bestimmung von Potentialen an kompletten Zellen eingesetzt^{[48], [49]}.

2.3.2. *Slow-Response-* und *Fast-Response* Farbstoffe

Von Waggoner wurden die potentialsensitiven Farbstoffe in zwei Klassen bezüglich der Geschwindigkeit ihrer Fluoreszenzantwort auf eine Potentialänderung eingeteilt. Zu den *Slow-Response* Farbstoffe gehören z. B. die Carbocyanine, Oxonole und Rhodaminderivate. Abbildung 7 zeigt einige oft eingesetzte Vertreter dieser Gruppe:

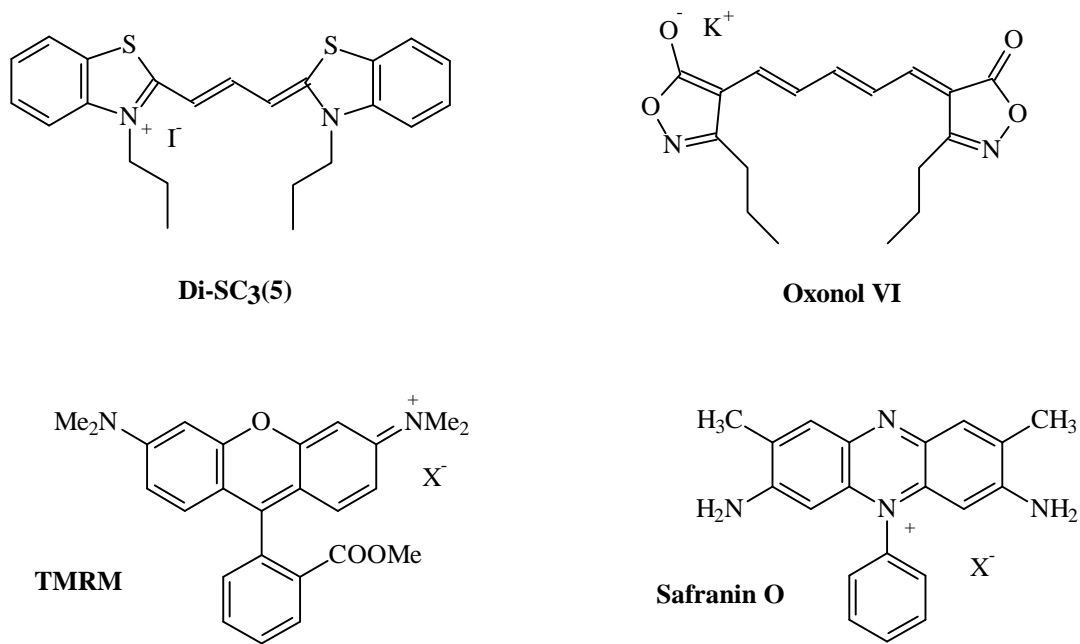
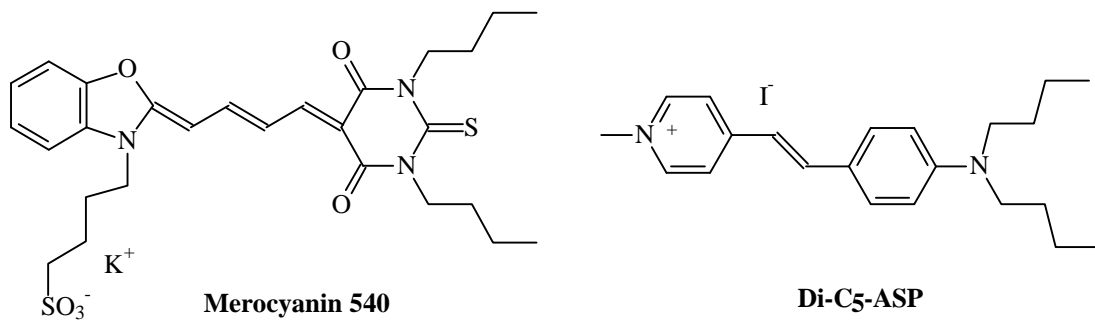


Abbildung 7: *Slow-Response*-Farbstoffe

Es sind kationische oder anionische Farbstoffe, die membranpermeabel sind und auf Potentialänderung mit einer Umverteilung über Innen- und Außenseite der Membran reagieren. Dieser Umverteilungsprozess ist diffusionskontrolliert und deshalb langsam, d. h. ein stationärer Zustand wird erst nach Minuten erreicht. Die Sensitivität ist aber sehr hoch und liegt typischerweise im Bereich von 80 bis 90 % Signaländerung bei Potentialänderung um 100 mV. Ein Nachteil der Farbstoffe besteht in einer oft hohen Zelltoxizität, besonders bei den Carbocyaninen.

Die *Fast-Response* Farbstoffe (Beispiele Abbildung 8) reagieren dagegen im Mikrosekundenbereich und sind deshalb besonders geeignet, die schnellen Potentialänderungen bei der Signalweiterleitung an Neuronen zu verfolgen. Sie sind membranimpermeabel und lagern sich in der Regel außen an die Membran an.

Abbildung 8: *Fast-Response*-Farbstoffe.

Dabei verhindern eine oder mehrere geladene Gruppen den Membrandurchtritt. Die Empfindlichkeit dieser Farbstoffe liegt aber nur bei ca. 10 % Signaländerung pro 100 mV. Insbesondere die Gruppe der Dialkylaminostyrylpyridiniumfarbstoffe (ASP-Farbstoffe), ihre Desvinylogen und höheren Homologen werden vielfach für unterschiedlichsten Probleme eingesetzt. Sie sind intensiv von Loew^{[50], [51]}, Fromherz^{[52], [53], [54], [55], [56], [57], [58]}, Grinvald^[59] und Clarke^{[60], [61]} untersucht worden.

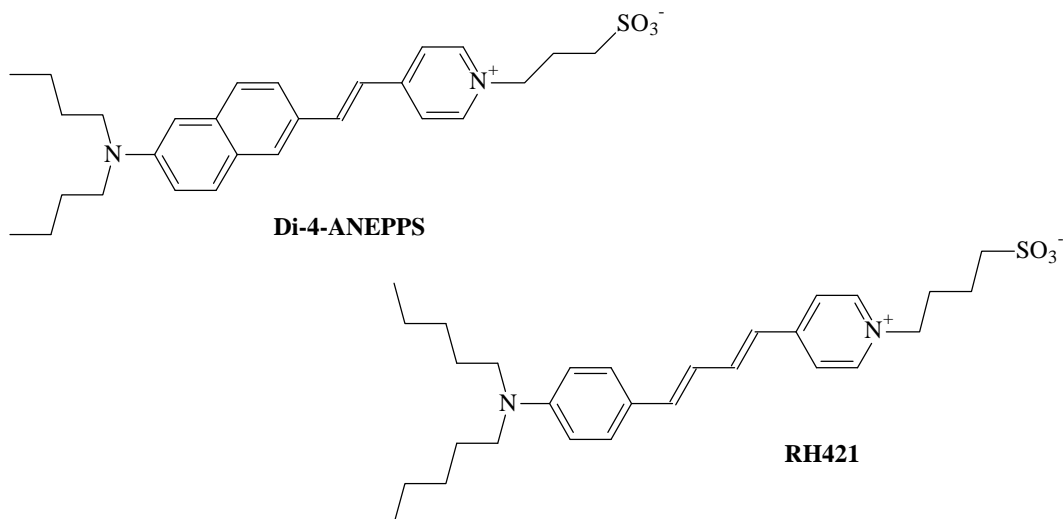


Abbildung 9: Beispiele für Dialkylaminostyrylpyridiniumfarbstoffe.

Als Beispiele seien Di-4-ANNEPS^[62] und RH-421^[63] (Abbildung 9) genannt, die in bestimmten Experimenten relative Fluoreszenzänderungen von über 10% gezeigt haben.

Die Mechanismen, nach denen die Änderung der Fluoreszenz erfolgt sind vielfältig und können sich auch überlagern:

-) Bei den *Slow-Response* Farbstoffen ist mit der Diffusion durch oder in die Membran eine Änderung der chemischen Umgebung verbunden. Die Fluoreszenz hängt empfindlich von der Umgebung (Solvatation etc.) ab.
-) Es sind Gleichgewichte zwischen fluoreszierendem Farbstoff und strahlungslosen Dimeren, Aggregaten mit der Membran oder Zellbestandteilen möglich.
-) Eine potentialabhängige Verteilung des Farbstoffs zwischen Membranoberfläche und wäßriger Lösung hat ein um so niedrigeres Signal zur Folge, je mehr Farbstoff sich in der wäßrigen Phase befindet, weil hier Fluoreszenz durch das polare Lösungsmittel gequencht wird.
-) Bei der großen Klasse der Aminostyrylpyridiniumfarbstoffe (ASP) und ihren phen- und vinylogen nimmt man einen zumindest partiellen elektrochromen Mechanismus an. Die Form der Moleküle erlaubt die senkrechte Einlagerung in die Membran, wobei geladene Gruppen die Verbindung an der Oberfläche fixieren. Das elektrische Feld über die Membran hat Einfluß auf die spektralen Eigenschaften, da bei Anregung Ladung entlang der Molekülachse und somit gegen das oder mit dem elektrischen Feld verschoben wird, was zu hypso- oder bathochromer Verschiebung der Absorption führt (Stark-Effekt).

2.4. Kombination von Chromophoren

1995 wurde von Gonzales und Tsien^[64] ein System vorgestellt, was die positiven Eigenschaften der *Fast-Response* Farbstoffe, also ihre schnelle Reaktion auf Potentialänderungen mit den positiven Eigenschaften der *Slow-Response* Farbstoffe, d. h. ihre große Potentialsensitivität, verbinden sollte. Siehe Abbildung 10.

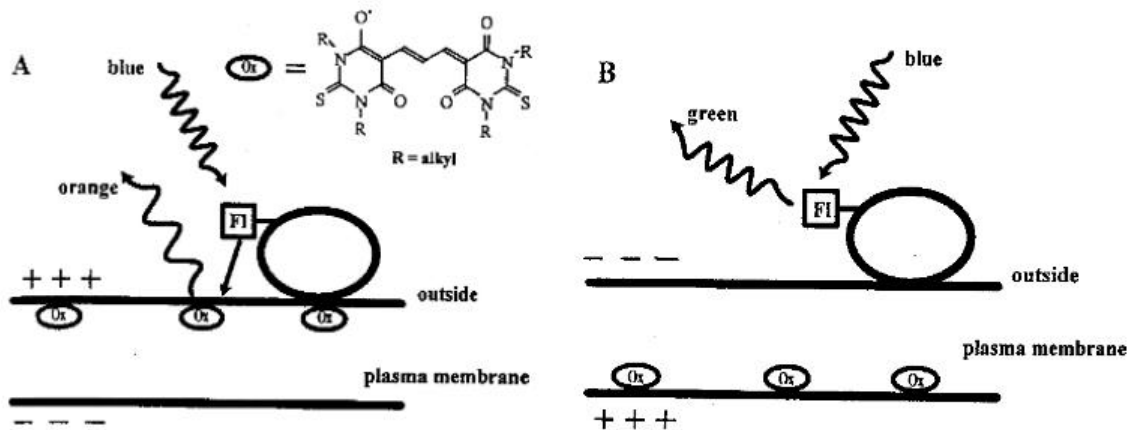


Abbildung 10: Fl = Fluorescein, Schlangenpfeile = strahlende Übergänge, gerader Pfeil = Förster-Transfer^[64].

Als *Fast-response*-Farbstoff dient ein Oxonol (DiSBAC₆(3)), das sich membrangebunden je nach Potentiallage an der Innen- oder Außenseite der Membran ansammelt. Als zweiter Farbstoff wird z. B. ein Fluoresceinderivat an der Membranaußenseite fixiert. Beide Farbstoffe bilden ein Donor-Akzeptor-Paar und zwischen ihnen ist Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) möglich. Wenn das Fluorescein angeregt wird, sieht man bei positivem Membranpotential seine grüne Fluoreszenz. Das Oxonol wird von den positiven Ladungen zur Innenseite der Membran gezogen und akkumuliert dort. Bei negativem Membranpotential dagegen sammelt sich das Oxonol an der Membranaußenseite. Jetzt ist die Distanz zwischen beiden Chromophoren so kurz, das Förster-Transfer möglich wird und die Fluoreszenz des Donors gequencht wird. Statt dessen sieht man nun die Fluoreszenz des Oxonols, das die Energie vom Fluorescein aufgenommen hat. Die Abstandsänderung wird somit über den FRET zu einem empfindlichen Werkzeug zur Messung von Potentialänderungen.

Da sich die Emissionen beider Chromophore bei Potentialänderung in entgegengesetzter Richtung ändern, liefert der Quotient beider Signale einen noch empfindlicheren Meßwert als ein Signal alleine. Das Oxonol bewegt sich im Millisekundenbereich in der Membran, kann also auf sehr schnelle Potentialänderungen reagieren. In einigen Experimenten beträgt die Signaländerung über 30 % bei 100 mV Poten-

tialänderung. Das System wurde mit verschiedenen Kombinationen von Farbstoffen weiterentwickelt und angewendet^{[65], [66]}.

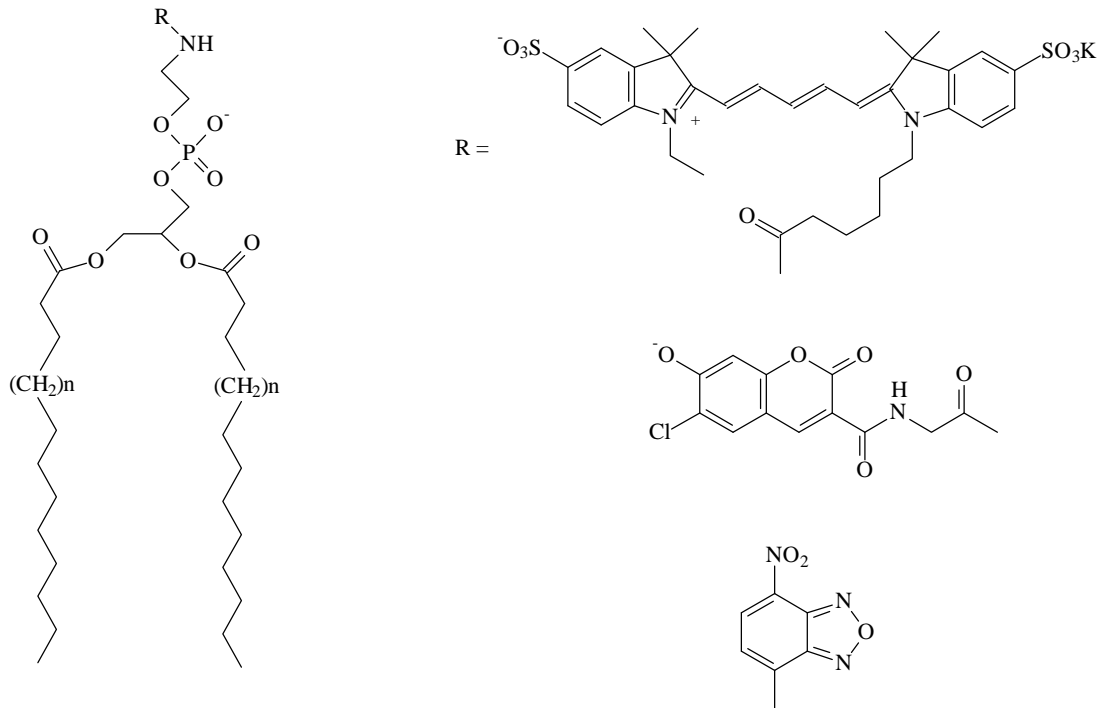


Abbildung 11: Von Gonzales und Tsien eingesetzte Verbindungen^[65].

Neben der Fixierung des einen Chromophors mit Glutinin oder Lectin, Eiweißstoffen, die spezifische Bindungsstellen für Kohlenhydrate aufweisen, wie sie auf den untersuchten Zellen zu finden sind, kommt noch die direkte Bindung an Membranbestandteile wie Phospholipide in Frage, was den Vorteil hat, den Farbstoff direkt auf die Membranoberfläche zu bringen. Dabei werden auch andere Kombinationen von Oxonolen mit einem zweiten Chromophor angegeben, wie Abbildung 11 zeigt.

Das System von Gonzales und Tsien weist jedoch einige gravierende Nachteile auf:

-) Es müssen zwei verschiedene relativ unpolare Farbstoffe in die Zellmembran gebracht werden, d. h. die Abstimmung der Konzentrationen in bezug auf einen effektiven FRET ist von Bedeutung.
-) Zur Färbung der Zellen mit besonders unpolaren Oxonolen müssen Hilfssubstanzen, wie β -Cyclodextrin verwendet werden.

-) Die Oxonole in der Membran verursachen beträchtliche photodynamische Schäden durch Erzeugung von Singulett-Sauerstoff; es müssen deshalb zusätzlich Schutzsubstanzen, wie Astaxanthin, ein Carotinoid mit Quenchereigenschaften für Singulett-Sauerstoff, appliziert werden.

Wie von Gonzales und Tsien gezeigt, stellt jedoch eine geeignete Kombination von Donor und Akzeptor ein brauchbares Werkzeug zur Bestimmung von Membranpotentialen dar.

2.5. Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)

Der Energietransfer als Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen Donor und Akzeptor erfolgt strahlungslos.

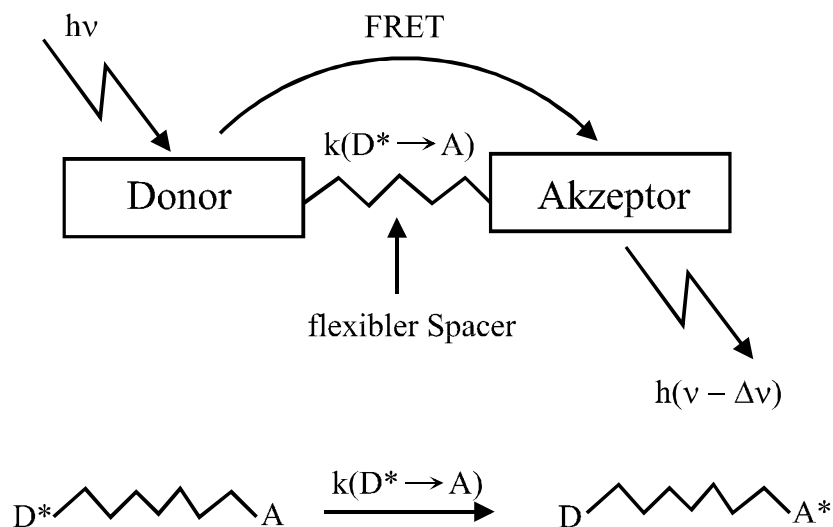


Abbildung 12: Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) nach Förster

Der Donor wird angeregt und überträgt die von ihm absorbierte Anregungsenergie auf den Akzeptor (Abbildung 12). Ein effektiver Transfer ist nur bei Überlappung von Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors möglich. Die Geschwindigkeit des Transfers ist zur sechsten Potenz des Abstands der Chromophore umgekehrt proportional, das bedeutet eine empfindliche Änderung

des FRET bei geringsten Abstandsänderungen. Nach Förster^[67] liegt der Bereich des effektiven Transfers bei 1 bis 10 nm. Für die Geschwindigkeitskonstante erhält man folgenden Ausdruck:

Gl. 1:

$$k(D^* \rightarrow A) = \frac{9000 \cdot (\ln 10) \cdot \kappa^2 \cdot f_D}{128 \cdot p^5 \cdot n^4 \cdot N \cdot \tau_0 \cdot R^6} \cdot \int_0^\infty F_D(\tilde{n}) \cdot \epsilon_A(\tilde{n}) \frac{d\tilde{n}}{\tilde{n}^4} = \frac{1}{\tau_0} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6$$

κ = Orientierungsfaktor, ϕ_D = Fluoreszenzquantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors, n = Brechungsindex, N = Avogadro-Konstante, τ_0 = Fluoreszenzlebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptors, r = Abstand Donor/Akzeptor, F_D = Fluoreszenz des Donors, ϵ_A = mol. dekad. Extinktionskoeffizient des Akzeptors, $\tilde{\nu}$ = Wellenzahl, R_0 = kritischer oder Förster-Radius, bei dem spontane Desaktivierung des Donors und Energietransfer gleich wahrscheinlich sind.

Es gibt ungezählte Beispiele aus der Molekularbiologie und anderen Disziplinen, die den FRET zu Proximitätsbestimmungen nutzen. Er dient als eine Art „spektroskopisches Lineal“^[68]. So kann die Funktion vieler Membranproteine (Kanäle, Reaktionszentren etc.) erst verstanden werden, wenn Informationen über Tertiär- und Quartärstruktur, so wie die Lage in der Membran bekannt sind^{[69], [70]}. Hier können Untersuchungen an kovalent markierten Proteinen unter Ausnutzung des FRET direkt in Membranen wertvolle Hinweise liefern^[71]. Es wird häufig auch die intrinsische Fluoreszenzfähigkeit von Proteinen ausgenutzt (GFP, Green Fluorescent Protein), die durch Reste wie Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan möglich wird^[72]. Ferner werden mit Hilfe von FRET Rezeptor/Ligand-Wechselwirkungen^[73], Struktur, Hybridisierung und Konformation von DNA, der Transport von Lipiden in der Membran^[74] und die Fusion von Membranen untersucht^[75].

Da heute eine Unzahl von Donor/Akzeptor-Paaren bekannt ist und für die gängigen funktionellen Gruppen in Biomolekülen eine breite Palette an Reaktivankern existiert, läßt sich für jedes Problem ein geeignetes System finden. Die Schwierigkeiten bestehen vielmehr in der Kalibrierung des Systems und in diesem Zusammenhang in der Abschätzung des Orientierungsfaktors κ . Sein Quadrat kann zwischen 0 und 4 liegen. Bei freier Rotation beider Chromophore liegt der Wert bei 2/3, wenn ge-

währleistet ist, daß die Rotation schnell ist im Vergleich zur Lebensdauer des angeregten Donors. Es hat nicht an Versuchen gefehlt, die freie Rotation von Donor und Akzeptor mit Hilfe von Fluoreszenzpolarisationsexperimenten und mathematischen Modellen genauer zu bestimmen^{[76], [77]}. Setzt man bei gehinderter Rotation $\kappa^2 = 2/3$, kann der scheinbare Abstand R stark vom wahren Wert abweichen.

3. Problemstellung

3.1. *Fast- und Slow-Response-Farbstoffe - Nachteile*

Den hohen Sensitivitäten der *Slow-Response* Farbstoffe steht die extrem lange Dauer der Einstellung von Gleichgewichten, bedingt durch diffusionskontrollierte Mechanismen, als Nachteil gegenüber. Damit lassen sich schnelle Potentialänderungen z. B. an Nervenzellen nicht verfolgen. Die *Fast-Response* Farbstoffe haben dagegen bei Ansprechzeiten im Millisekundenbereich nur geringe relative Fluoreszenzänderungen, die für eine exakte Potentialbestimmung zu ungenau sind.

3.2. **Bichromophore**

Um diese Nachteile zu umgehen, lassen sich Kombinationen von Chromophoren finden, die unter Ausnutzung des FRET die Vorteile, nämlich schnelle Reaktion auf Potentialänderungen und hohe Sensitivität vereinigen. Im Gegensatz zu den Systemen von Gonzales und Tsien sollte jedoch durch kovalente Kopplung eine wesentlich einfachere Anwendbarkeit der Sonde möglich sein. Zusätzlich kämen geringere Konzentrationen für eine Messung zur Anwendung. Dadurch wird jeder störende Einfluß der exogenen Farbstoffe auf die Zellfunktionalität verringert, was sich besonders im Hinblick auf die Zelltoxizität positiv auswirken sollte.

Versuche zur Synthese solcher Bichromophore wurden im Arbeitskreis unter anderem von Witzak^[81] und Meyer-Beeck^[80] unternommen. Dabei handelte es sich um eine Kombination von Dialkylaminostyrylpyridinium- und Pentamethincyanin-Farbstoffen, die sich durch ihre spektralen Eigenschaften ideal für einen effektiven FRET eignen (siehe Abbildung 14, weiter unten).

Von Witzak wurden beachtlich große Potentialsensitivitäten von -6 bis -38 % sowohl an Kalium- als auch an Natriumvesikeln als Modellsystem gefunden, verbunden mit einem sehr effektiven FRET, der zumindest teilweise zur Potentialsensitivität

beiträgt. Für das gefundene Verhalten der Farbstoffe konnten jedoch nur qualitative Hinweise gegeben werden, da verschiedene Cyanin- und Styrylfarbstoffe mit jeweils anderen Eigenschaften kombiniert wurden. Eine Korrelation der Ergebnisse mit der Spacerkettenlänge konnte nicht gemacht werden.

Meyer-Beeck hat vier Bichromophore mit einer um eine bzw. zwei Methylengruppen angewachsenen Spacerkette bestehend aus Styrylchromophor und Pentamethincyanin mit Indoleninendgruppen dargestellt, die Potentialsensitivitäten zwischen +3 und +14 % an Natriumvesikeln zeigten, also mit entgegengesetztem Vorzeichen zu den Ergebnissen von Witzak bei sehr ähnlichen Verbindungen. Eine Erklärung für dieses Verhalten konnte nicht gefunden werden und ein Zusammenhang zwischen den Eigenschaften und der Spacerkettenlänge war ebenfalls nicht zu erkennen.

In beiden Fällen waren die Sensitivitäten bei direkter Anregung des Akzeptors empfindlicher als bei indirekter Anregung über den FRET. Auch dafür gab es keine befriedigende Erklärung. Es spricht vieles dafür, daß die bisher synthetisierten Verbindungen zum Teil wie einfache Cyaninfarbstoffe reagieren, d. h. als Nernstfarbstoff verbunden mit einer Diffusion durch die Membran.

Das Ziel dieser Arbeit ist deshalb die Synthese einer ausreichenden Anzahl von Bichromophoren, die ausschließlich bezüglich der Spacerkettenlänge variiert wird, um quantitative Aussagen über den Mechanismus der Potentialsensitivität, des FRET und der Fluoreszenzquantenausbeuten machen zu können.

Dabei wird auch nach Bichromophoren mit gesteigerter Potentialsensitivität gesucht, die eine Verbesserung der Systeme von Gonzales und Tsien darstellen und höhere Sensitivität aufweisen sollen.

Abbildung 13 zeigt den qualitativen Zusammenhang zwischen Transfereffizienz E und dem Abstand R . Wie leicht zu erkennen ist, liegt E für kleine R im Bereich von 98 % und größer, d. h. geringe Abstandsänderungen haben kaum Einfluß auf die Akzeptorfluoreszenz. Bei R -Werten, die wesentlich größer sind als R_0 findet kaum noch Energietransfer statt und es ist fast keine Akzeptorfluoreszenz mehr zu detektieren. Befindet sich R aber im Bereich von R_0 , dann sind mit kleinsten Abstandsänderungen große Änderungen in E verbunden, hier hat die Kurve die größte Steigung.

Daraus lässt sich ableiten, dass ein gegebenes Donor-/Akzeptorpaar als Bichromophor dann am empfindlichsten reagiert, wenn die mit der Potentialänderung verbundene Abstandsänderung sich im Bereich des Försterradius R_0 bewegt, oder anders ausgedrückt: Die Spacerkette sollte eine Länge im Bereich von R_0 haben.

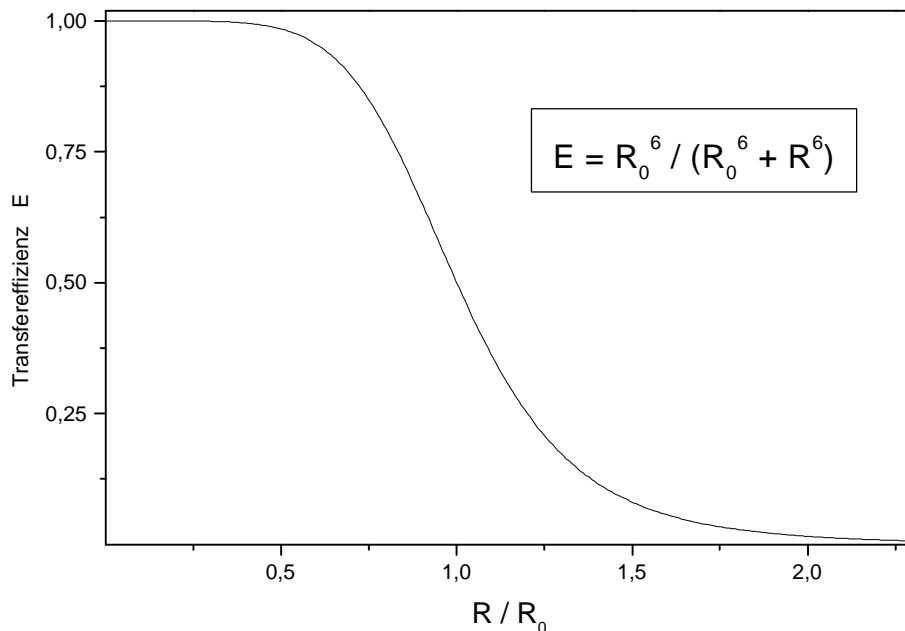


Abbildung 13: Qualitativer Zusammenhang zwischen der Transfereffizienz und dem Abstand zwischen Donor und Akzeptor in Einheiten von R_0 .

Wie im Kapitel „Fluoreszenzspektroskopie“ ausführlich erläutert wird, liegen alle bisher synthetisierten Bichromophore bezüglich ihrer Spacerkettenlänge deutlich unter dem für das Vesikelmodell bestimmbareren Försterradius R_0 . Es soll deshalb auch versucht werden, die Frage, warum dennoch Potentialsensitivität teilweise aufgrund von FRET beobachtet wurde, zu klären.

Aus diesem Grund werden neue Bichromophore synthetisiert, die zunächst ebenfalls bezüglich ihrer Spacerkettenlänge unterhalb von R_0 liegen, die andererseits aber beliebig ausbaufähig sind.

3.3. Synthesestrategie

Um die offenen Fragen zu beantworten, sollen auch hier Styrylpyridiniumfarbstoffe mit Pentamethincyaninen kombiniert werden. Dabei stellen die Styrylpyridinium-

farbstoffe den Donor-Teil der Bichromophore. Es sollen nur Derivate mit *n*-Butylresten am Anilinstickstoff synthetisiert werden.

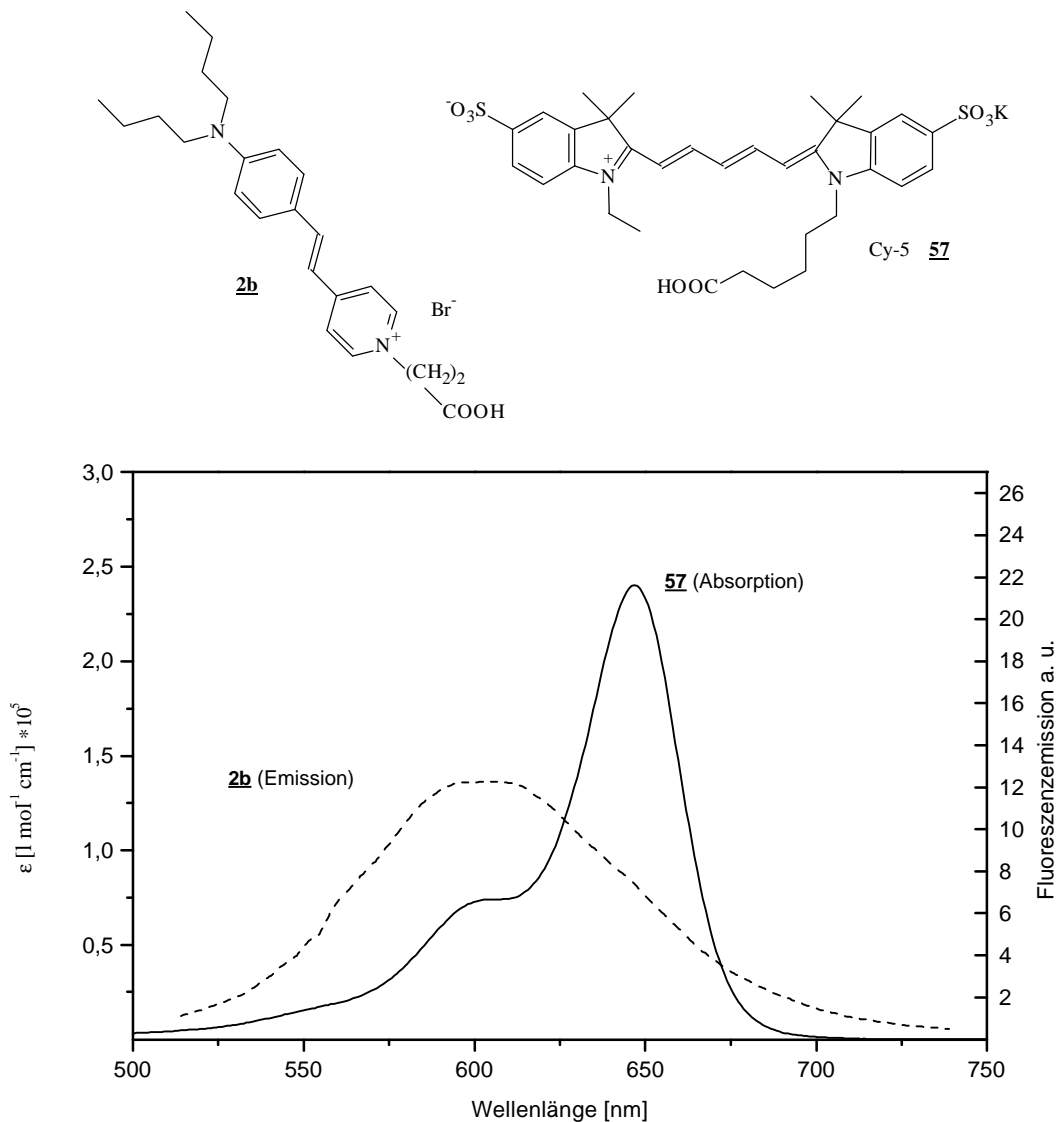


Abbildung 14: Fluoreszenzemission der Styrylpyridiniumcarbonsäure **2b** eingelagert in Kaliumvesikel in Pufferlösung und Absorptionsspektrum von **57** (Cy-5) in Pufferlösung in Gegenwart von Vesikeln.

Wie Untersuchungen von Hallmann^[10] zeigen, lagern sich diese fest in Membranen ein, was bei kürzeren Ketten nicht mehr der Fall ist, sind andererseits aber auch noch so gut wasserlöslich, daß sie in wäßrigem Medium auch ohne Schwierigkeit Zellen anfärben, ohne das zusätzliche Lösungsmittel eingesetzt werden müssen, wie es bei längeren Alkylketten der Fall ist.

Abbildung 14 zeigt die spektrale Überlappung eines solchen Farbstoffs mit dem Absorptionsspektrum von Cy-5, einem Pentamethincyanin mit zusätzlichen Sulfonatogruppen. Es ist zu sehen, daß ein effektiver FRET bezüglich der spektralen Eigenschaften möglich ist. Durch den Einsatz von Cy-5 als Akzeptor wird die Wasserlöslichkeit erhöht und gleichzeitig eine Membranlöslichkeit unterbunden. Damit wird verhindert, daß die Bichromophore sich wie Umverteilungsfarbstoffe verhalten und durch die Membran diffundieren. Wie bei Gonzales und Tsien sollte damit auch gewährleistet sein, daß ein Farbstoff ortsfest (Styrylfarbstoff in der Membran), der andere frei beweglich (Cy-5 in wäßriger Phase) ist, um eine potentialabhängige Abstands- und Orientierungsänderung auszuführen. Die räumliche Trennung von Cy-5 und Membran sollte zudem für diesen Teilchromophor photodynamische Schädigungen ganz unterbinden.

Durch kovalente Verknüpfung beider Chromophore ist bei einer Messung nur ein einzelner Färbeprozess durchzuführen. Die Konzentration beider Chromophore verhält sich immer wie 1:1. Gleichzeitig wird ein definiertes Abstandsintervall vorgegeben, in dem sich die Entfernung beider Chromophore zueinander bewegt.

Die Verknüpfung der beiden Farbstoffe soll über eine Amidbindung erfolgen. Im Arbeitskreis Martin wurde auf vielfältige Weise versucht, zwei Chromophore zu koppeln. Dabei sind die anfänglichen Versuche alle gescheitert. Die folgende Übersicht (Abbildung 15) zeigt die verschiedenen Ansätze. Die direkte Veresterung von Carbonsäure und Alkohol im sauren oder basischen oder mit DCC als Aktivierungsreagenz für Carbonsäuren gelingt nicht. Ebenso wenig die Umsetzung von Alkoholen mit Isothiocyanaten. Aromatische und aliphatische Amine dagegen bilden mit Isothiocyanaten Kopplungsprodukte. Einfache Chromophore, wie Aminopyridonfarbstoffe oder Aminoazobenzol lassen sich so kombinieren, Polymethinfarbstoffe mit Aminogruppe dagegen nicht^[78].

Die Aktivierung von Carbonsäuren zu isolierbaren Acylierungsmitteln war wenig erfolgreich^[79]. Carbonsäurechloride sind schwer handhabbar obwohl sich einige Umsetzungsprodukte mit Aminen charakterisieren lassen. Die NHS-Ester sind leicht isolierbar, können dafür aber nicht mit einem zweiten Chromophor mit Aminogruppe gekoppelt werden^[80].

Erfolgreich ist lediglich die doppelte Quaternierung mit 1,ω-Diodpoly-methylenen^[81] und eine aus der Peptidchemie bekannte Kondensation mit Hilfe von PyCloP^[82], bei der eine in-situ aktivierte Carbonsäure mit einem Amin umgesetzt wird. Die erste Methode hat den Nachteil, das nur Spacerkettenlängen von maximal vier Methylengruppen möglich sind. Hier lassen sich nur Chromophore kombinieren, die einen entsprechend kleinen Försterradius besitzen. Die zweite Methode ist im Arbeitskreis schon erfolgreich eingesetzt worden^[80]. Sie soll auch hier eingesetzt werden.

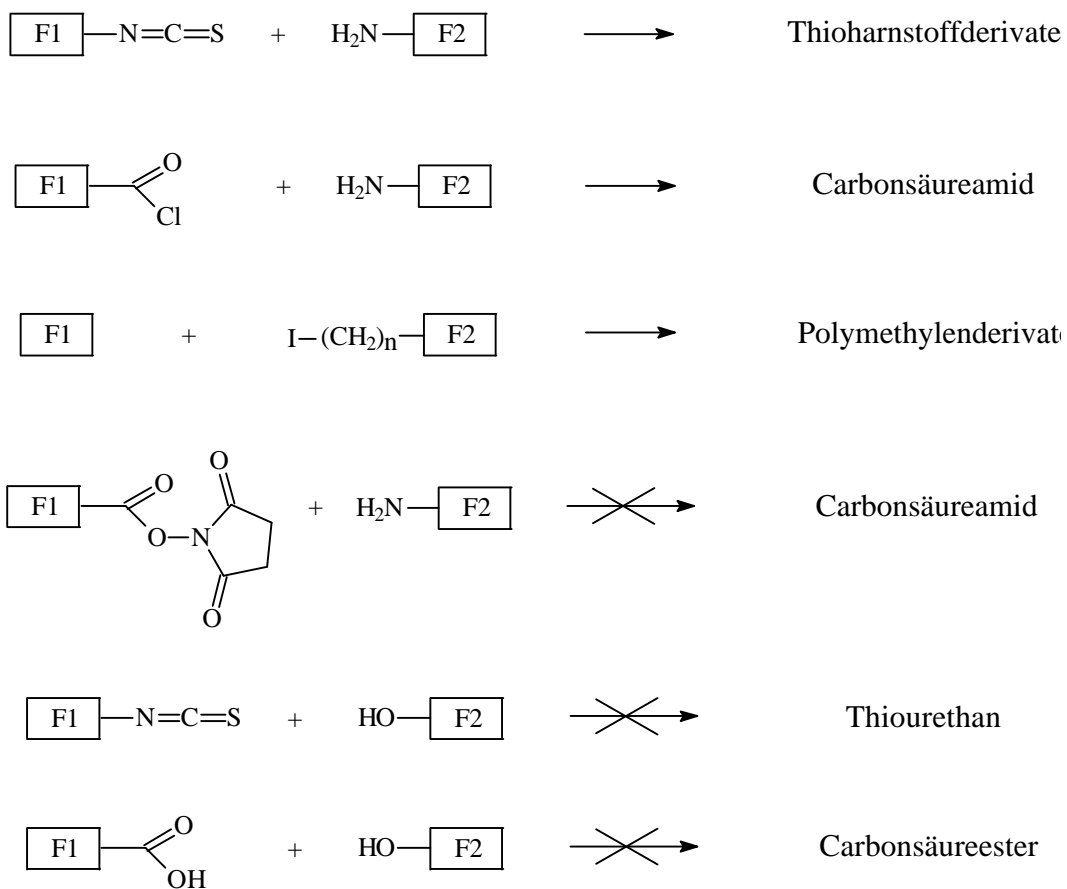


Abbildung 15: Im Arbeitskreis durchgeführte Kopplungsversuche zur Synthese von Bichromophoren.

Daraus folgt, daß der eine Farbstoff eine Aminogruppe, der andere eine Carboxylgruppe tragen muß.

4. Synthese und Charakterisierung

Die in Abbildung 16 dargestellte Syntheseroute zeigt den ersten durchgeführten Ansatz.

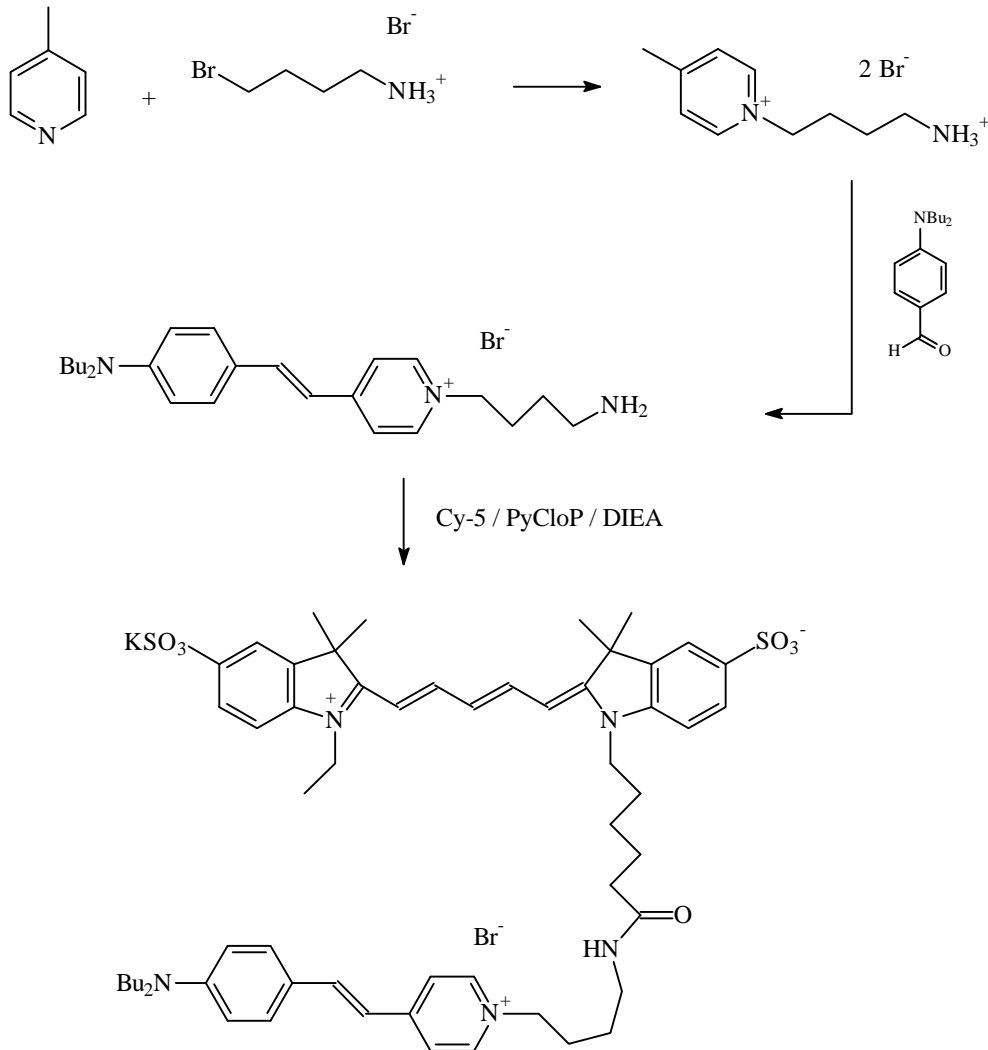


Abbildung 16: Synthese eines Bichromophors mit aliphatischer Amidbindung

Die Synthese ist erfolgreich, hat aber zwei gravierende Nachteile: Einmal ist die Isolierung der Styrylpyridiniumamine nicht trivial, da es sich um schlecht kristallisierende Substanzen handelt, zum anderen ist das resultierende aliphatische Amid nicht stabil. Eine Lösung des reinen Produkts nach säulenchromatografischer Reinigung zeigt nach Einengen am Rotationsverdampfer ein DC mit drei

Komponenten. Wesentlich vorteilhafter ist die folgende Route (Abbildung 17), da die Styrylpyridiniumcarbonsäuren sehr leicht zugänglich sind und sich äußerst stabile Produkte bilden, wenn dafür auch eine Stufe mehr anfällt. P-Phenylendiamin wird im ersten Schritt in dreifachem Überschuß eingesetzt, im zweiten Schritt erfolgt äquimolare Umsetzung.

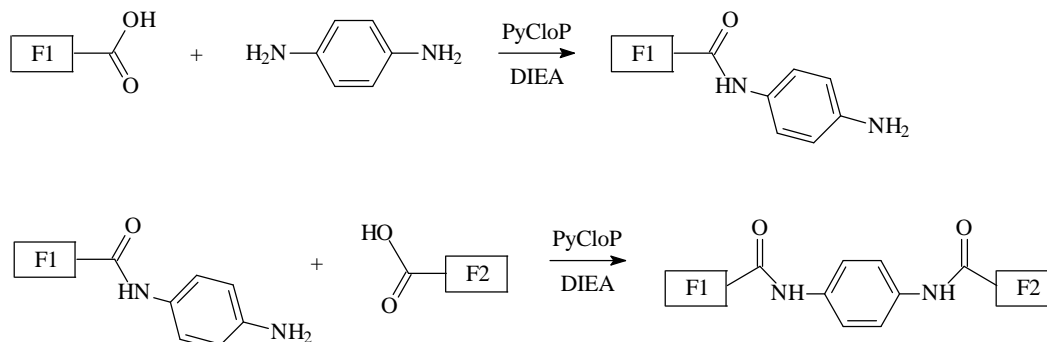


Abbildung 17: Verwendete Synthesefolge zur Darstellung der Bichromophore

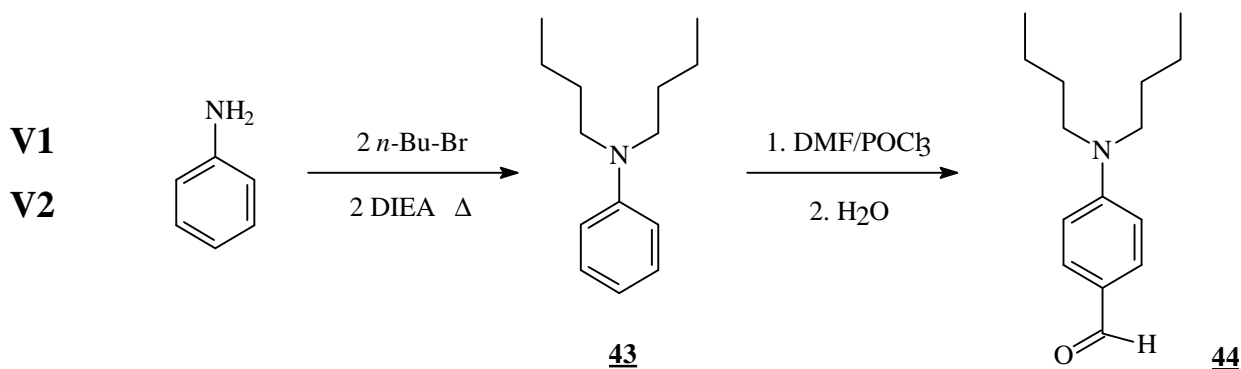
Überraschenderweise erhält man schlechte bzw. gar keine Ausbeuten, wenn man in Schritt 1 Cy-5 zum Amid umsetzt und in Schritt 2 mit Styrylpyridiniumcarbonsäure koppelt. Deshalb werden zuerst die Amide der Styrylpyridiniumcarbonsäuren synthetisiert, die in hohen Ausbeuten anfallen und gut kristallisieren, dann erfolgt Reaktion mit Cy-5. D. h. F1 ist der Styrylpyridiniumteilchromophor und F2 ist Cy-5. Ein spacerkettenlängenabhängige Reaktivität der Carbonsäuren, wie sie von Meyer-Beeck^[80] gefunden wurde, kann hier nicht bestätigt werden.

4.1. Styrylpyridinium-Farbstoffe als Donoren

Die oben beschriebenen Styrylpyridinium-Carbonsäuren lassen sich sehr einfach durch Knoevenagel-Kondensation zwischen einem aromatischen Aldehyd und einem entsprechend quaternierten γ -Picoliniumderivat nach der in meiner Diplomarbeit beschriebenen Methode darstellen. Diese Methode ist die weitaus schnellere und kostengünstigere, als die von Hassner^[83] beschriebene über eine Heck-Reaktion.

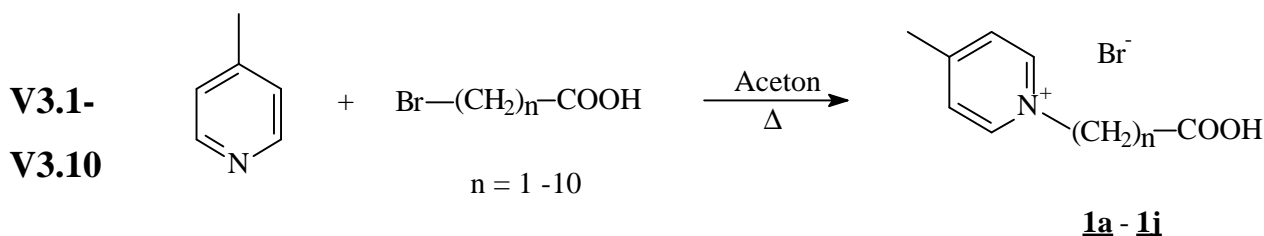
4.1.1. Dialkylaminobenzaldehyde

Die Synthese der (*N,N*-Di-*n*-alkylamino)-benzaldehyde erfolgt am einfachsten durch Vilsmeier-Formylierung^[84] der *N,N*-Di-*n*-alkylaniline, die wiederum durch Alkylierung von Anilin nach Hünig^[85] leicht zugänglich sind.



4.1.2. 4-Picoliniumcarbonsäurebromide

Die Synthese erfolgt durch Quaternierung von γ -Picolin mit der gewünschten ω -Bromalkancarbonsäure in Aceton^[51]. Die Ausbeuten sind mit ca. 90% sehr gut. Nur die Verbindung mit $n = 3$ (V 3.3) mußte auf andere Weise synthetisiert werden, da bei Quaternierung mit 4-Brombuttersäure unter der Wirkung der Base das γ -Lacton und 4-Picoliniumhydrobromid entstehen. Hier wird der Ethylester der 4-Brombuttersäure eingesetzt; hinterher erfolgt Hydrolyse mit Na_2CO_3 -Lösung zur freien Carbonsäure.



Die Reinigung der Verbindungen geschieht durch Umkristallisation aus Ethanol/Diethylether.

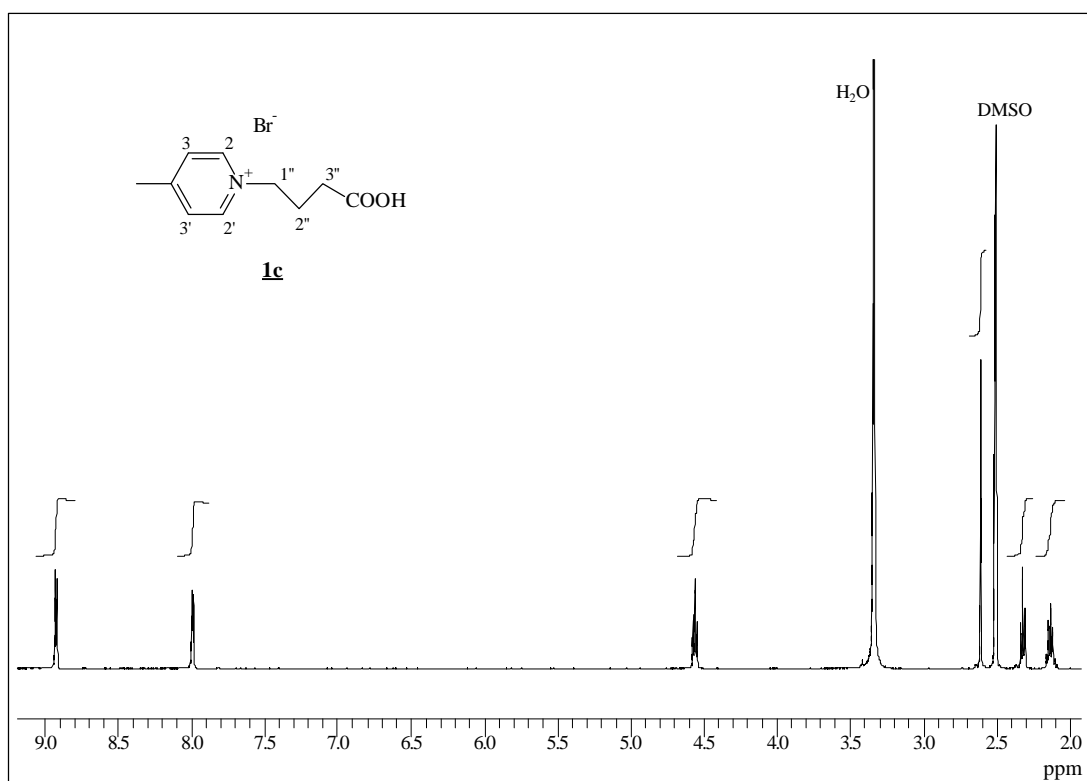

 Abbildung 18: $^1\text{H-NMR}_{500}$ -Spektrum von **1c** in $\text{DMSO-}[d_6]/\text{TMS}$.

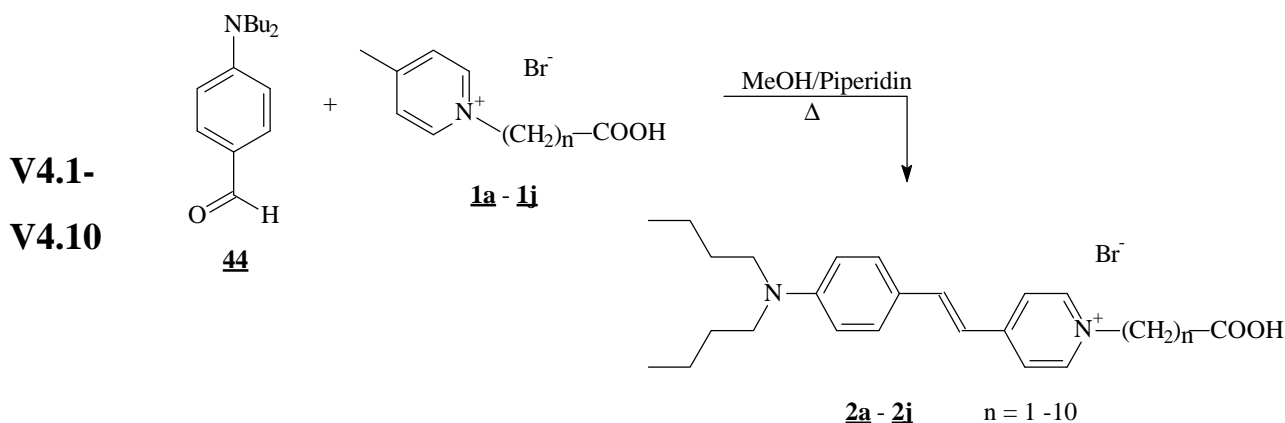
 Tabelle 1: FAB-Molekülionen-Peaks der Carbonsäuren **1a** - **1j**:

Verbindung	Anzahl $(\text{CH}_2)_n$	M(ber.) $-\text{Br}^-$ [g/mol]	M(gef.) $-\text{Br}^-$ [g/mol] Intensität (%)
1a	$n = 1$	152.2	152.1 (100)
1b	$n = 2$	166.2	166.1 (100)
1c	$n = 3$	180.2	180.0 (100)
1d	$n = 4$	194.3	194.1 (100)
1e	$n = 5$	208.3	208.2 (100)
1f	$n = 6$	222.3	222.2 (100)
1g	$n = 7$	236.3	236.2 (100)
1h	$n = 8$	250.4	250.1 (100)
1i	$n = 9$	264.4	264.2 (100)
1j	$n = 10$	278.4	278.2 (100)

Die Charakterisierung erfolgt durch $^1\text{H-NMR}$ -, IR- und FAB-Massenspektroskopie. Abbildung 18 zeigt das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **1c**. Die Dubletts der aromatischen Protonen (2, 2' und 3, 3') und die einzelnen Signale der Methylengruppen sowie das Singulett der Methylgruppe bei $\delta = 2.62$ ppm sind deutlich zu erkennen. Die Tabelle 1 zeigt die berechneten und gemessenen Daten aus den FAB-Massenspektren der Verbindungen **1a** bis **1j**.

4.1.3. Styrylpyridiniumcarbonsäurebromide

Zur Gewinnung der Styrylpyridiniumcarbonsäurebromide führt man die Knoevenagel-Kondensation am einfachsten in Methanol durch. Als Base nimmt man einen 2.5fachen Überschuß an Piperidin. Das Produkt läßt sich leicht und in ausreichender Reinheit für weitere Umsetzungen isolieren, da nach Entfernen des Großteils Methanol und Versetzen mit Wasser unter Zugabe von Bromwasserstoffsäure (48%) in kleinen Portionen die Carbonsäure kristallin ausgefällt wird. Hierdurch wird sichergestellt, daß der Farbstoff analysenrein als Hydrobromid und nicht als Betain vorliegt.



Wird der Kristallbrei zu sauer, geht der Farbstoff unter Bildung des gelben Hydrobromids wieder in Lösung, und man muß gegebenenfalls mit konzentrierter K_2CO_3 -Lösung versetzen, um den deprotonierten Farbstoff wieder möglichst quanti-

tativ auszufällen. Weitere Reinigung erfolgt durch Umkristallisieren aus Ethanol/Diethylether. Weitere Reinigung erfolgt durch Umkristallisieren aus Ethanol/Diethylether.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in $\text{DMSO-}[d_6]$ kann man bei gut getrockneten Verbindungen das Carboxylproton bei ca. 10 ppm sehen. Im IR-Spektrum findet sich die typische Carboxyl-Bande bei etwa 1700 cm^{-1} . Elementaranalysen bestätigen ebenfalls das Vorliegen des Hydrobromids (siehe Experimentaltteil). Abbildung 19 zeigt als Beispiel das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **2c**. Im aromatischen Teil (A) finden sich sechs Dubletts, von denen vier den o, o'- und den m, m'-Protonen an den aromatischen Ringen zuzuordnen sind. Die anderen beiden bei $\delta = 7.1$ und 7.9 ppm gehören zu den Vinylen-Protonen und haben eine Kopplungskonstante von $^3J_{\text{H,H}} = 16\text{ Hz}$, was Trans-Konfiguration beweist. Produkte mit Cis-Konfiguration sind offensichtlich nicht entstanden.

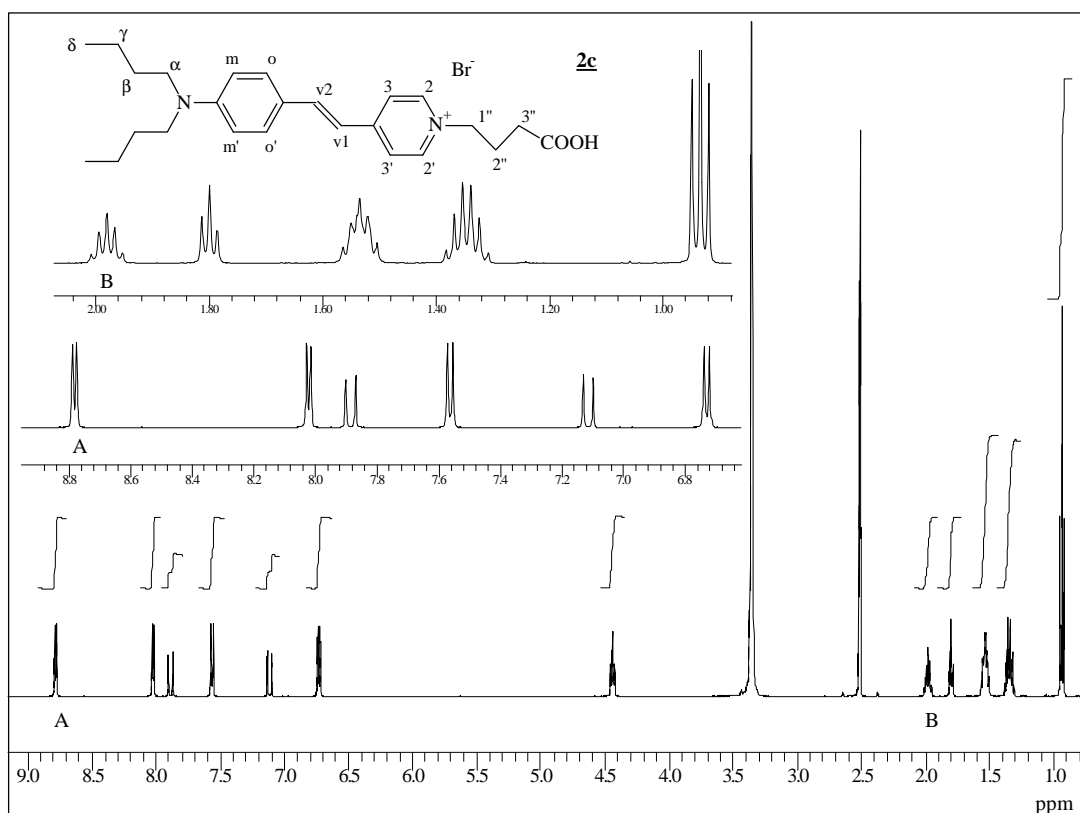


Abbildung 19: $^1\text{H-NMR}_{500}$ -Spektrum von **2c** in $\text{DMSO-}[d_6]/\text{TMS}$.

Bei $\delta = 4.4$ ppm findet sich das Triplett der α -Methylengruppe am Pyridiniumstickstoff. Alle anderen Gruppen geben ebenfalls getrennte Signale, die dem Anilinstick-

stoff benachbarten Methylengruppen fallen mit dem Wassersignal im DMSO zusammen und sind nicht zu sehen.

Dieses Signalmuster ist typisch für allen anderen Styrylpyridiniumcarbonsäuren und deren Derivate. Bei höheren Kettenlängen nehmen nur noch die Multipletts zwischen $\delta = 1.5$ und 1.9 ppm an Intensität zu.

Tabelle 2: FAB-Molekülionen-Peaks der Carbonsäuren **2a** - **2j**:

Verbindung	Anzahl (CH ₂) _n	M(ber.) -Br ⁻ [g/mol]	M(gef.) -Br ⁻ [g/mol] Intensität (%)
2a	n = 1	367.5	367.2 (49)
2b	n = 2	381.5	381.2 (100)
2c	n = 3	395.6	395.1 (100)
2d	n = 4	409.6	409.3 (100)
2e	n = 5	423.6	423.3 (100)
2f	n = 6	437.7	437.2 (100)
2g	n = 7	451.7	451.4 (100)
2h	n = 8	465.7	465.4 (100)
2i	n = 9	479.7	479.4 (100)
2j	n = 10	493.8	493.4 (100)

Die weitere Charakterisierung der Carbonsäuren erfolgt durch UV/VIS-Spektroskopie ($\lambda_{\max} = 495$ nm ($\epsilon_{\max} = 50000$, EtOH)), IR-Spektroskopie sowie FAB-Massenspektroskopie. Die Tabelle 2 gibt die berechneten und die in den FAB-Spektren gefundenen Molekülmassen der Carbonsäuren wieder.

4.1.4. Aminoderivate der Styrylpyridiniumcarbonsäurebromide

Hier wurde zunächst versucht, die Carbonsäuren mit klassischen Methoden über eine Amidbindung an Amine zu knüpfen. Die Aktivierung einer Carbonsäure mit DCC ist lange aus der Peptidchemie bekannt und ist auch hier erfolgreich. Allerdings liegen die Ausbeuten an Amid nur bei unter 30 %, da eine Nebenreaktion dominiert. Das

gewünschte Produkt ist dadurch schwer zu isolieren und die Gesamtausbeute an Bichromophor liegt letztendlich bei nur ca. 10 %.

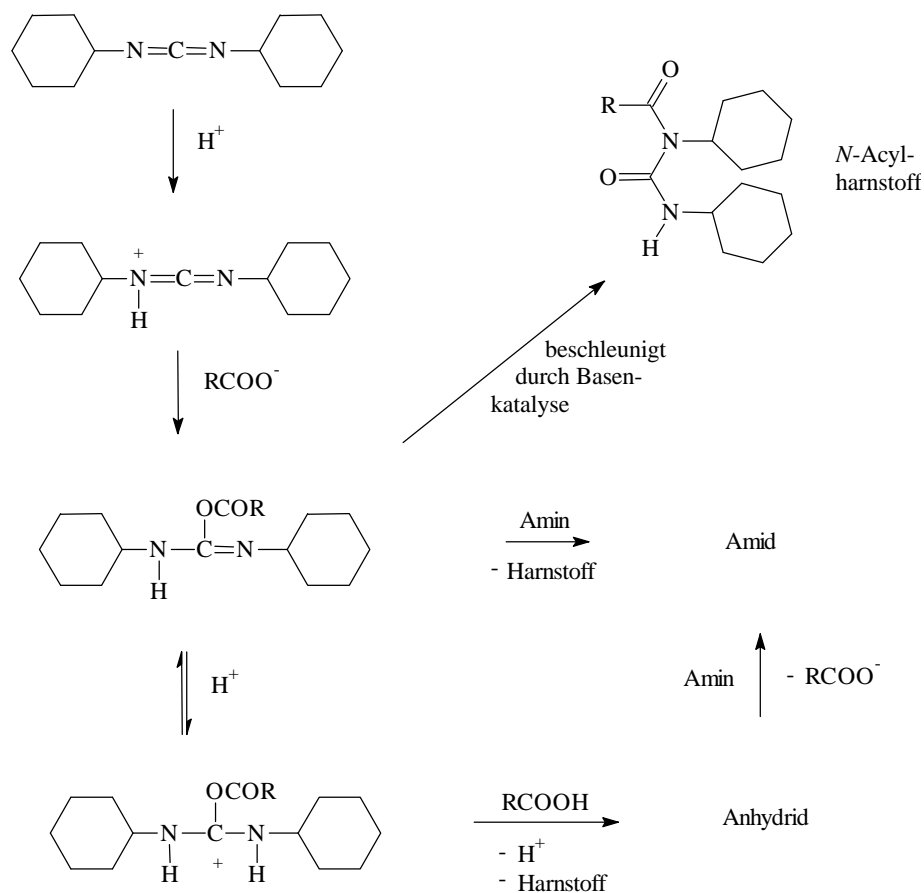


Abbildung 20: Schema der Reaktionen von Carbonsäuren mit Aminen unter DCC-Aktivierung.

Unter den basischen Bedingungen (Überschuß an *p*-Phenylendiamin, Dimethylamin in DMF) ist die Bildung des *N*-Acyl-Ureids als Umlagerungsprodukt der aktivierten Carbonsäure (*O*-Acylisoharnstoff) bevorzugt^[23], wie Abbildung 20 zeigt.

Das Ureid **5** konnte durch FAB-Massen- sowie NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden, wie in Abbildung 21 zu sehen ist. Charakteristisch für das Ureid ist das Dublett bei $\delta = 8.01$ ppm, $^3J_{H,H} = 8$ Hz, was dem N-H-Proton zuzuordnen ist. Die Cyclohexylmethinprotonen finden sich bei 3.74 und 3.26 ppm, und bei 1.00 bis 1.60 ppm finden sich die Cyclohexylmethylen-Signale. Es fehlen dagegen die Signale der aromatischen Protonen des *p*-Phenylendiamins bei ca. 6.5 und 7.3 ppm.

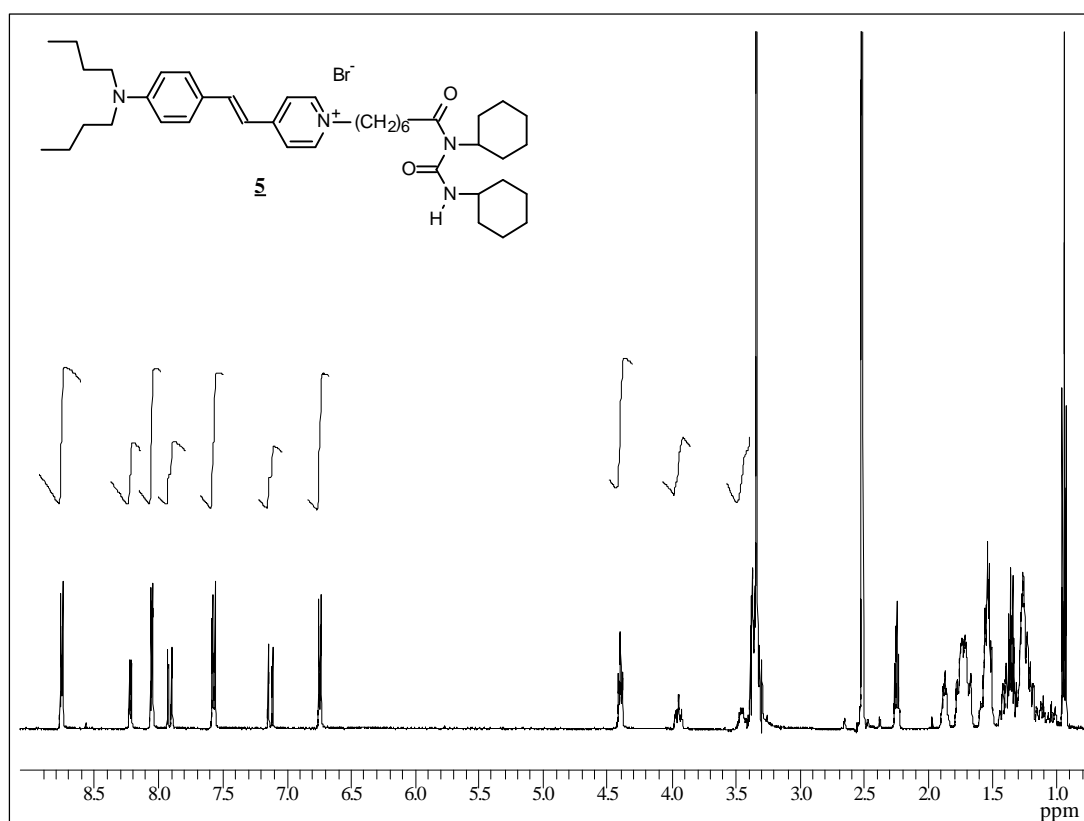


Abbildung 21: $^1\text{H-NMR}_{500}$ DMSO- $[\text{d}_6]$ /TMS.

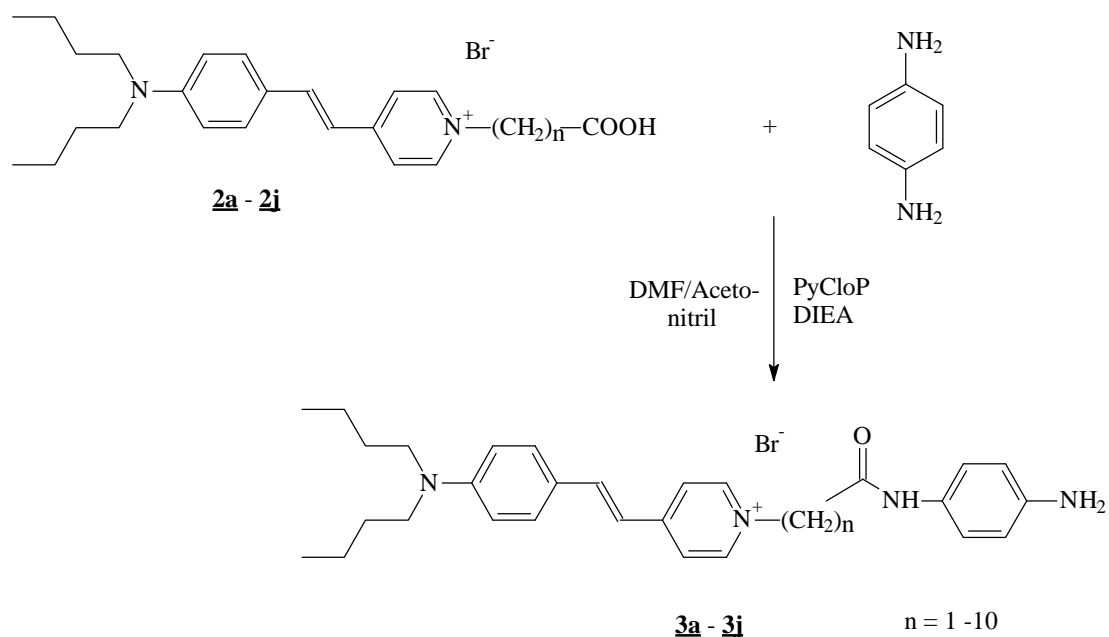
Weitere Beweise für die Bildung von **5** liefern die Massenspektroskopie und die Elementaranalyse:

FAB-Massen- ber.: 643.97 g/mol **EA** ber.: C 68.22 H 8.51 N 7.76
spektrum: gef.: 643.50 g/mol gef.: C 68.40 H 8.72 N 8.83

Ebenfalls erfolgreich war die Umsetzung mit PBr_3 und NEt_3 in Toluol^[86]. Hierzu wird die Carbonsäure in technischem Toluol mit der dreifachen Menge p-Phenylendiamin versetzt und solange am Wasserabscheider gekocht, bis kein Wasser mehr abgetrennt wird. Nach Abkühlung wird Triethylamin zugegeben und unter kräftigem Rühren das Phosphortribromid zugetropft, dann für 30 bis 45 min unter Rückfluß gekocht. Nach Erkalten scheidet sich das Produkt ab und das Toluol kann dekantiert werden. Nachteil ist jedoch die geringe Löslichkeit der Styrylpyridinium-

carbonsäuren und die hohen Temperaturen (die Stabilität der Farbstoffe ist hier gering). Die Ausbeute an Amid liegt daher auch bei dieser Methode unter 30 %.

Da diese beiden Kopplungsmethoden somit ausscheiden und die Möglichkeit isolierbarer Acylierungsmittel ebenfalls nicht gegeben ist, geschieht die Umsetzung der Carbonsäuren **2a** – **2j** mit p-Phenylendiamin am günstigsten nach der PyCloP-Methode.



Die Ausbeuten sind durchweg gut und liegen bei 70 - 80%. Die Produkte fallen aus und lassen sich durch Waschen mit unpolaren Lösungsmitteln in genügender Reinheit darstellen. Die Charakterisierung erfolgt analog zu den Styrylpyridiniumcarbonsäuren. Die UV/VIS-Spektren beider Verbindungsgruppen sind identisch, auch hier findet sich das längstwellige Absorptionsmaximum in Ethanol bei $\lambda = 495$ nm ($\epsilon_{\text{max}} = 50000$).

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum finden sich im Aromatenbereich zwei zusätzliche Dubletts für die o, o'- und m, m'-Protonen des Phenylendiamins, man sieht das Amidproton wie erwartet bei $\delta = 9.35$ ppm und bei $\delta = 4.6$ ppm findet sich das Singulett für die aromatische Aminogruppe. Als typisches Beispiel ist das Spektrum von **3c** in Abbildung 22 angegeben. Tabelle 3 gibt die Daten der FAB-Massenspektroskopie wieder.

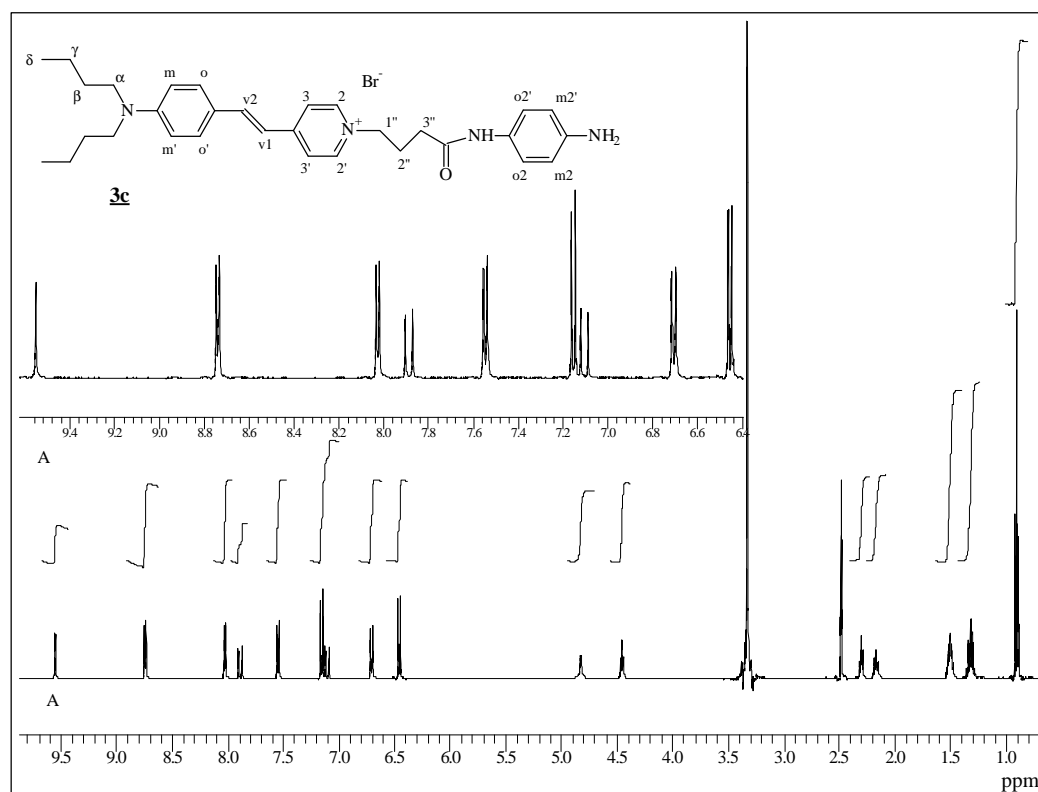
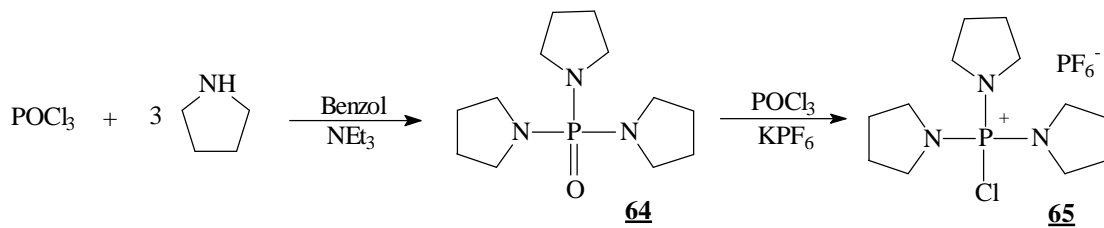

 Abbildung 22: $^1\text{H-NMR}_{500}$ -Spektrum von **3c** in $\text{DMSO-}[d_6]/\text{TMS}$.

 Tabelle 3: FAB-Molekülionenpeaks der Amide **3a** bis **3j**:

Verbindung	Anzahl $(\text{CH}_2)_n$	M(ber.) $-\text{Br}^-$ [g/mol]	M(gef.) $-\text{Br}^-$ [g/mol] Intensität (%)
3a	n = 1	457.6	457.3 (63)
3b	n = 2	471.7	471.3 (73)
3c	n = 3	485.7	485.3 (58)
3d	n = 4	499.7	499.2 (100)
3e	n = 5	513.8	513.2 (100)
3f	n = 6	527.8	527.3 (33)
3g	n = 7	541.8	541.2 (100)
3h	n = 8	555.8	555.4 (69)
3i	n = 9	569.9	569.3 (100)
3j	n = 10	583.9	583.4 (100)

4.1.5. Tripyrrolidinochlorophosphoniumhexafluorophosphat (PyCloP)

Die Synthese^[82] des PyCloP **65** geht von Phosphoroxchlorid aus, dessen Chloratome zunächst von drei Molekülen Pyrrolidin substituiert werden. In einer folgenden Stufe wird das so dargestellte Tripyrrolidinophosphoroxid **64** mit POCl_3 zum Produkt **65** umgesetzt.



Die Aktivierung von Carbonsäuren durch PyCloP besteht darin, daß das Chlorid am Phosphoratom nucleophil gegen Carboxylat ausgetauscht wird (Abbildung 23). Das entstehende Acylierungsmittel enthält Tripyrrolidinophosphoroxid als hervorragende Abgangsgruppe, die positive Ladung erhöht die Elektrophilie der Carbonylgruppe und verhindert eine Mesomeriestabilisierung der Carbonylgruppe durch den benachbarten Sauerstoff.

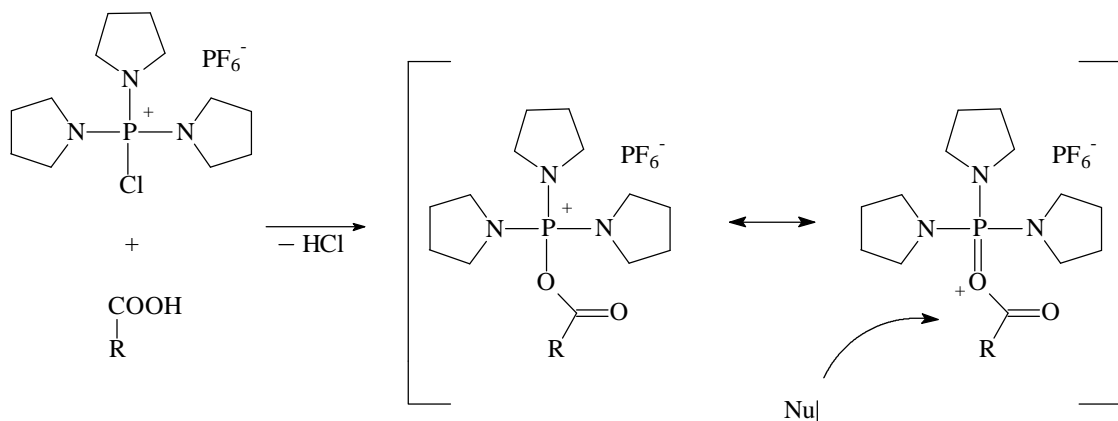


Abbildung 23: Aktivierungsmechanismus von Carbonsäuren mit PyCloP.

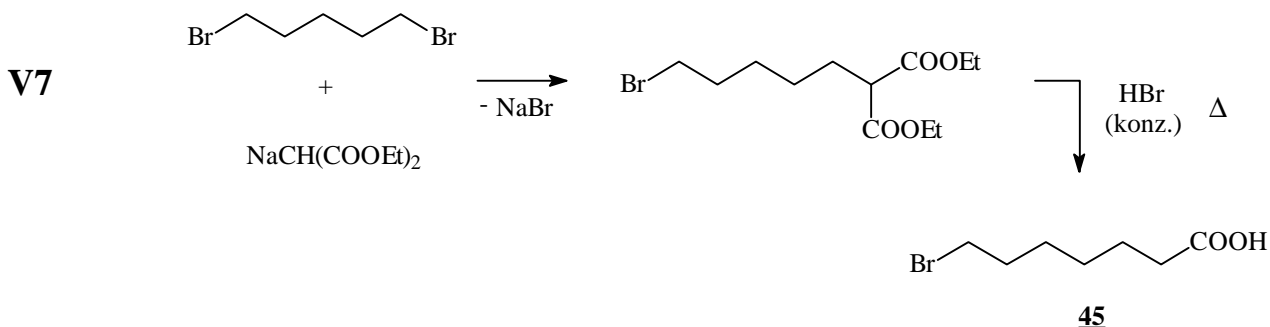
Die so aktivierte Carbonsäure kann von Nucleophilen wie z. B. Aminen angegriffen werden. Die bei der Anlagerung frei werdende Salzsäure wird von der Hilfsbase (DIEA) abgefangen. Dieser Mechanismus liegt bei Überschuß von PyCloP vor.

Wenn PyCloP äquimolar eingesetzt wird, konkurriert Carboxylat als Nucleophil mit dem Amin, und es bilden sich Carbonsäureanhydride, die dann als aktive Spezies mit dem Amin weiterreagieren^[82].

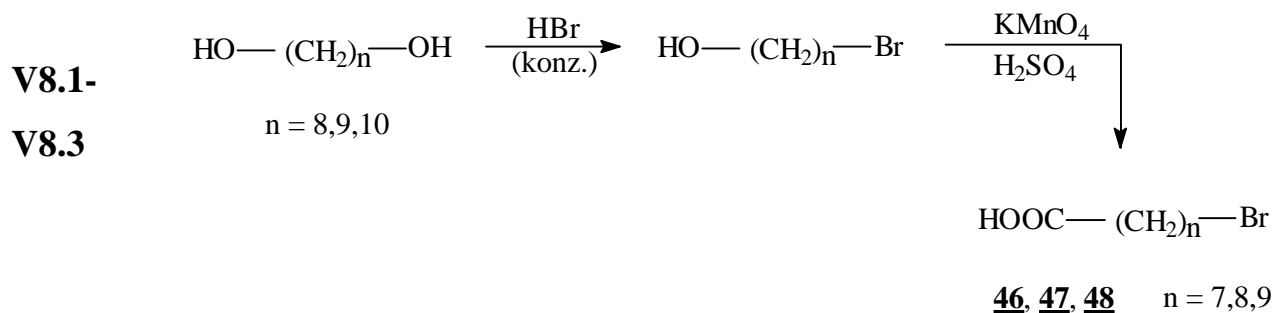
4.1.6. ω -Bromcarbonsäuren

Da nicht alle der zur Quaternierung von γ -Picolin benötigten ω -Bromcarbonsäuren kommerziell erhältlich sind, werden die fehlenden wie folgt synthetisiert:

7-Bromheptansäure: Sie wird aus 1,5-Dibrompentan und Natriummalonat mit anschließender Hydrolyse / Decarboxylierung synthetisiert^[87]:

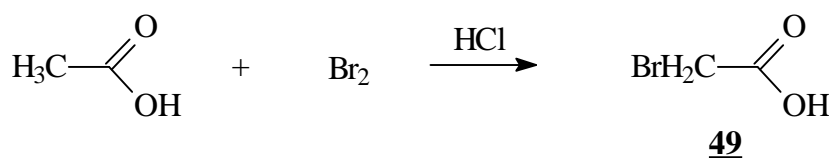


8-Bromooctan-, 9-Bromnonan-, 10-Bromdecansäure:



Die drei Säuren **46** - **48** werden in zwei Stufen aus den jeweiligen Diolen (1,8-Octandiol, 1,9-Nonandiol, 1,10-Decandiol) durch halbseitige Veresterung mit Bromwasserstoffsäure und anschließender Oxidation der verbleibenden Alkoholfunktion mit Kaliumpermanganat zur Säure dargestellt^[88].

Bromessigsäure: Nach einer Vorschrift von Natelson^[89] wird Essigsäure direkt bromiert.


V9

Bromessigsäure läßt sich destillativ reinigen. Die längerkettigen Säuren fallen als wachsartige Produkte an und werden ohne weitere Aufreinigung mit γ -Picolin umgesetzt, da hier die Reinigung des Produkts (Salz) durch Umkristallisieren wesentlich einfacher ist. Dafür nimmt man etwas geringere Ausbeuten in Kauf.

4.2. Cy-5 als Akzeptor

Die Synthese asymmetrischer Pentamethincyanine wie CY-5 erfolgt nach dem Schema in Abbildung 24. Der Endgruppe **a** wird mit einem geeigneten C₃-Baustein, wie 1,3,3-Triethoxypropen **b** umgesetzt. Durch die Gegenwart einer Sulfonatogruppe erhält man gut kristallisierende Zwischenprodukte **c**, die sich in einer weiteren Stufe mit der Endgruppe **d** zum Farbstoff **e** kondensieren lassen.

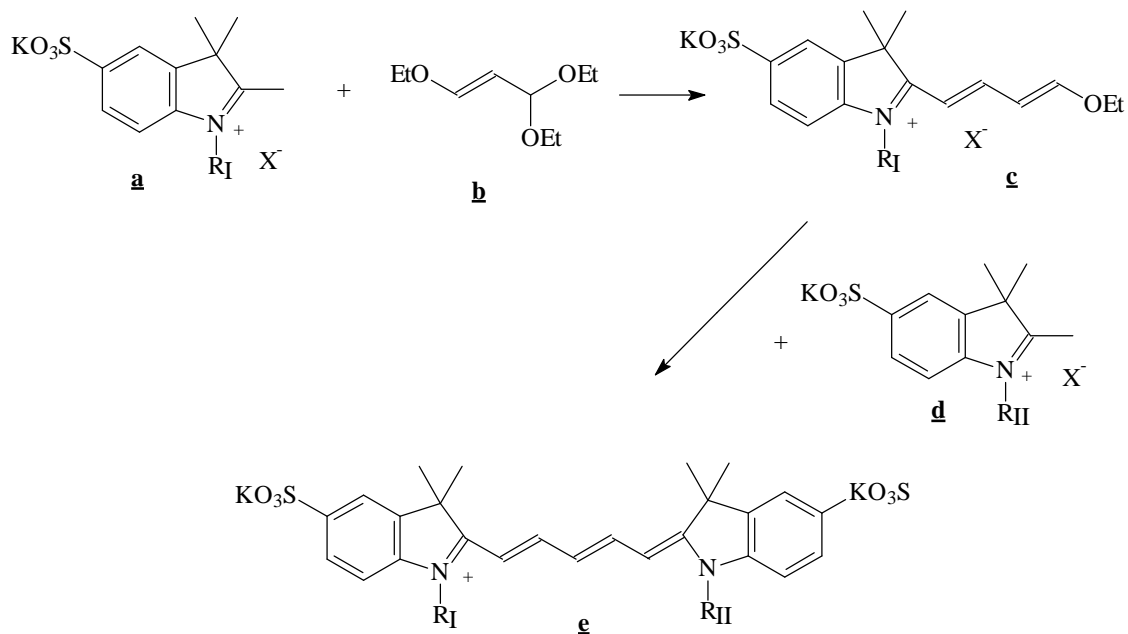


Abbildung 24: Schema der Synthese von 5, 5'-Disulfonatopentamethincyaninen.

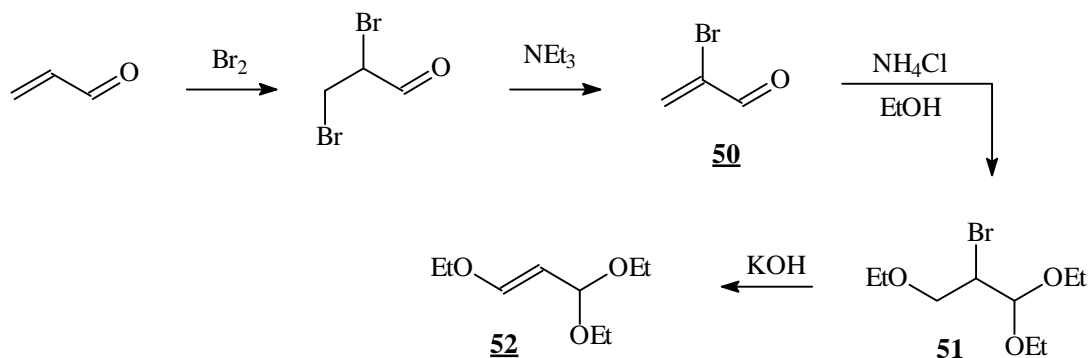
4.2.1. Synthese

Die in der Literatur von Mujumdar et al.^[90] beschriebene Synthese führt aufgrund recht drastischer Bedingungen (hohe Temperaturen) zu einer Palette unerwünschter Nebenprodukte und mäßigen Ausbeuten von ca. 40 %. Man benutzt MABPI (Malonaldehydbisphenyliminhydrochlorid) als C₃-Baustein und setzt ihn in Acetanhydrid und Pyridin 1:1 mit der einen Endgruppe in leichtem Unterschuß um. Das isolierte und gewaschene Butadienylbetain wird dann in mit der zweiten Endgruppe (mit Carboxylfunktion) zum Pentamethin kondensiert. Das Produkt muß für weitere Umsetzungen aufgrund des hohen Anteils an Nebenprodukten in jedem Fall durch Säulenchromatografie gereinigt werden.

Hier wird das von Mank et al.^[91] für die Synthese von Pentamethincyaninen angegebene Verfahren verwendet. Anstelle von MABPI wird 1,3,3-Triethoxypropen als C₃-Baustein benutzt und die Synthese kann durchgängig bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Unter geeigneten Reaktionsbedingungen erhält man das Cy-5 in einer Ausbeute von ca. 75%, wobei man durch Waschen mit Alkohol eine für weitere Umsetzungen ausreichende Reinheit erzielen kann.

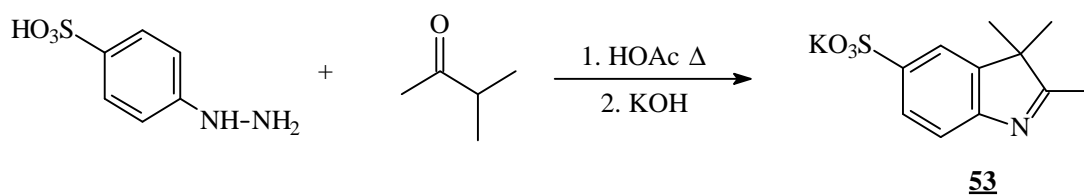
4.2.2. 1,3,3-Triethoxypropen

Es gibt in der Literatur verschiedene Routen, um 1,3,3-Triethoxypropen aus handelsüblichen Bausteinen zu synthetisieren, hier wird die Methode von Price und Moss verwendet^{[92], [93], [94]}.



4.2.3. 2,3,3-Trimethyl-6-sulfonatoindolenin

Dieser Baustein ist durch eine Fischer-Indolsynthese mit p-Hyrazinbenzolsulfonsäure und 3-Methyl-2-butanon zugänglich. Bei Anwendung von Essigsäure als Lösungsmittel läßt sich das 2,3,3-Trimethyl-Derivat als Hauptprodukt isolieren, das konstitutionsisomere 2-Isopropyl-derivat tritt nicht auf.

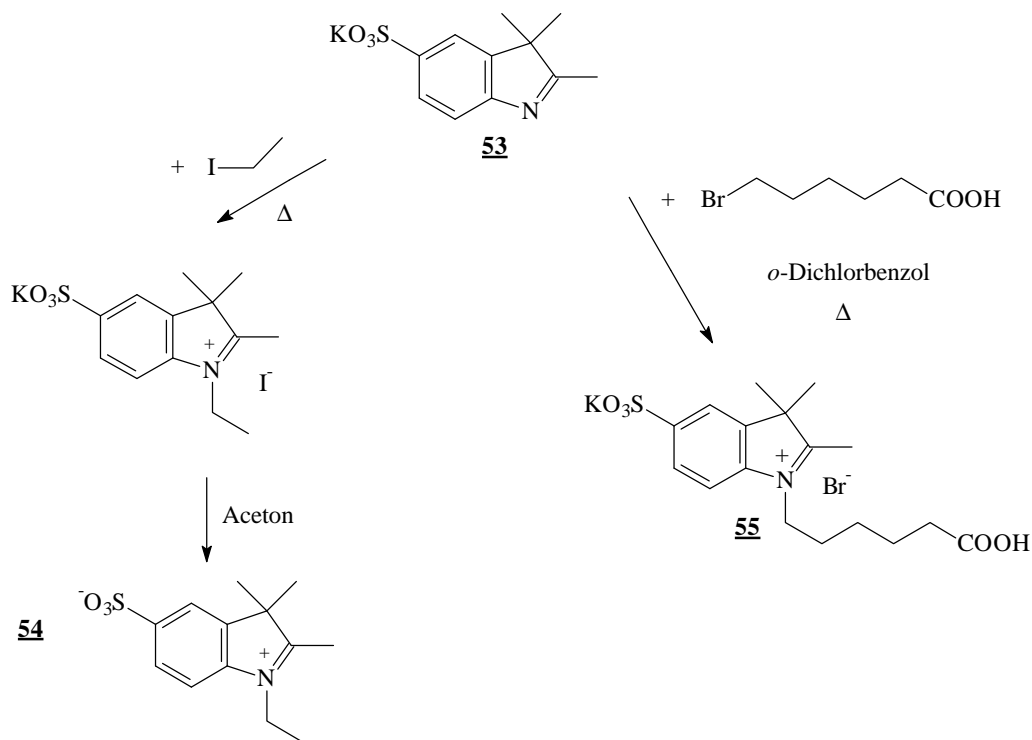


4.2.4. Quaternierte Bausteine

Die zur Cy-5-Synthese benötigten Bausteine erhält man durch Quaternierung von **53** mit geeigneten funktionalisierten Alkylhalogeniden. Die Quaternierung von Aminen

und anderen Stickstoffbasen ist von Menschutkin^[95] vor über hundert Jahren untersucht worden und findet sich als Menschutkin-Reaktion in der älteren Literatur.

V12
V13

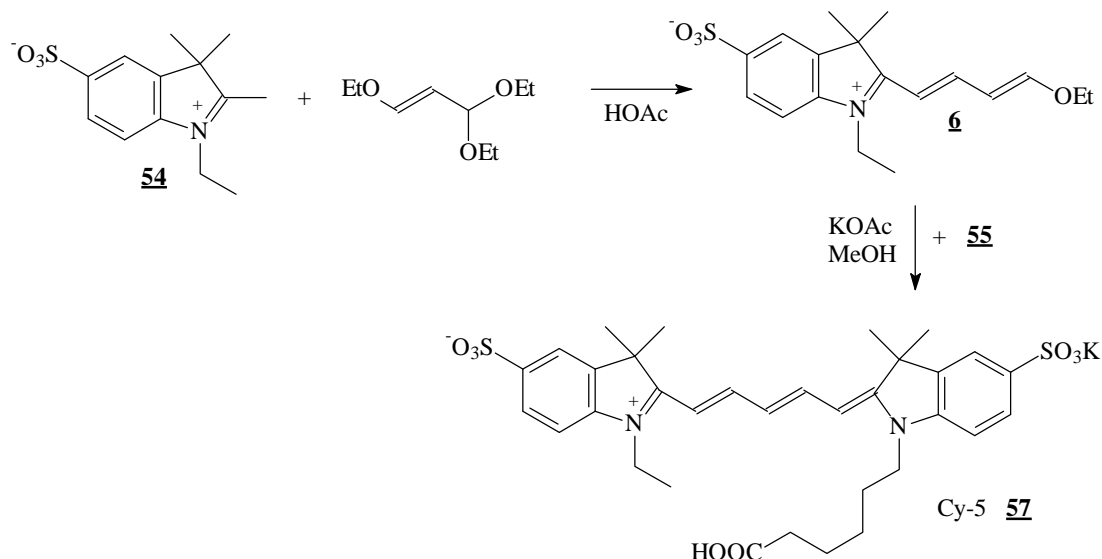


Zur Darstellung einfacher Alkylderivate erhitzt man einfach mit den Iodiden in Substanz und erhält Betaine, indem man Kaliumiodid mit Aceton herauswäscht. Das Carbonsäurederivat wird in *o*-Dichlorbenzol unter Stickstoff mit ω -Bromhexansäure synthetisiert^[90].

4.2.5. Cy-5

Die Endgruppe **54** wird zunächst, um das Monokondensationsprodukt zu erhalten, mit einem dreifachen Überschuß an 1,3,3-Triethoxypropen in Eisessig und unter Stickstoff bei Raumtemperatur umgesetzt. Das Butadienylbetain **6** ist in Essig gut löslich, während **54** in Eisessig zunächst einen unlöslichen Bodensatz bildet. Am Verschwinden dieses Bodensatzes ist der Fortgang der Reaktion gut zu beobachten. Die Lösung färbt sich anfangs blaß-gelb und ist am Ende dunkelbraun. Bei Gegenwart von Luftsauerstoff bildet sich sofort das symmetrische Pentamethincyanin, was

durch blaue bzw. grüne Färbung der Reaktionslösung angezeigt wird. Wenn die Reaktion beendet ist, was sich durch DC kontrollieren läßt, fällt man das Produkt mit Ethylacetat aus.



V14.1-

V14.2

Durch mehrmaliges Waschen läßt sich das Butadienylbetain **6** als gelbes Pulver und frei von überschüssigem Triethoxypropen isolieren. Dieses Intermediat wird nun äquimolar mit der zweiten Endgruppe **55** in abs. Methanol und mit Kaliumacetat als Base umgesetzt. Auch dieser Schritt läßt sich bei Raumtemperatur durchführen. Die Reaktion setzt unmittelbar ein, was an intensiver Blaufärbung zu erkennen ist.

Die Reinigung des Farbstoffs erfolgt durch Säulenchromatografie an Kieselgel 60 mit Dichlormethan / Methanol 2:1. Eine für weitere Umsetzungen genügend hohe Reinheit kann auch durch mehrmaliges Waschen mit Methanol/2-Propanol 1:1 erzielt werden. Abbildung 25 zeigt das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **57** (Cy-5). Das Signal bei 4.10 ppm gehört zu den α -Methylengruppen an den Heterostickstoffatomen (ein Triplet, ein Quartett). Sämtliche Methylgruppen finden sich in dem Signal bei 1,70 ppm (Singulets, ein Triplet).

Die weitere Charakterisierung erfolgt durch IR- und VIS-Spektroskopie. Das IR-Spektrum zeigt die symmetrische und asymmetrische Valenzschwingung der S=O-Bindung bei 1109 und 1022 cm^{-1} und bei 1718 cm^{-1} die C=O-Valenzschwingung der Carboxylgruppe.

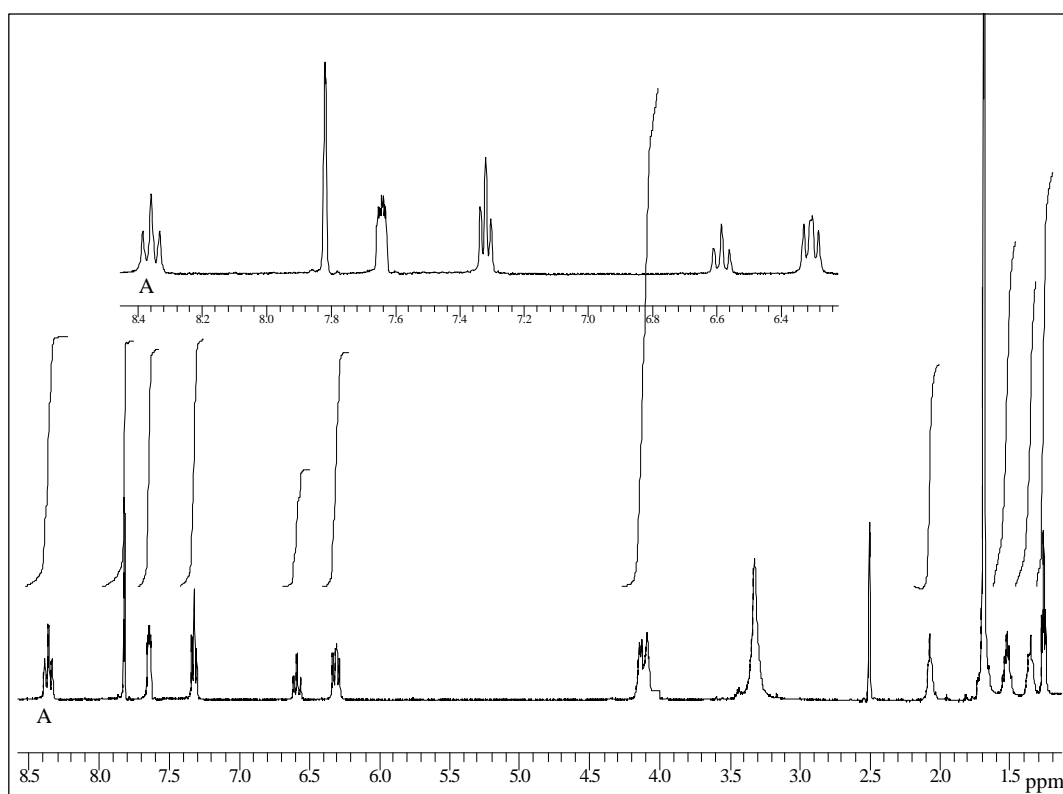


Abbildung 25: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **57** in $\text{DMSO-}[d_6]$ / TMS.

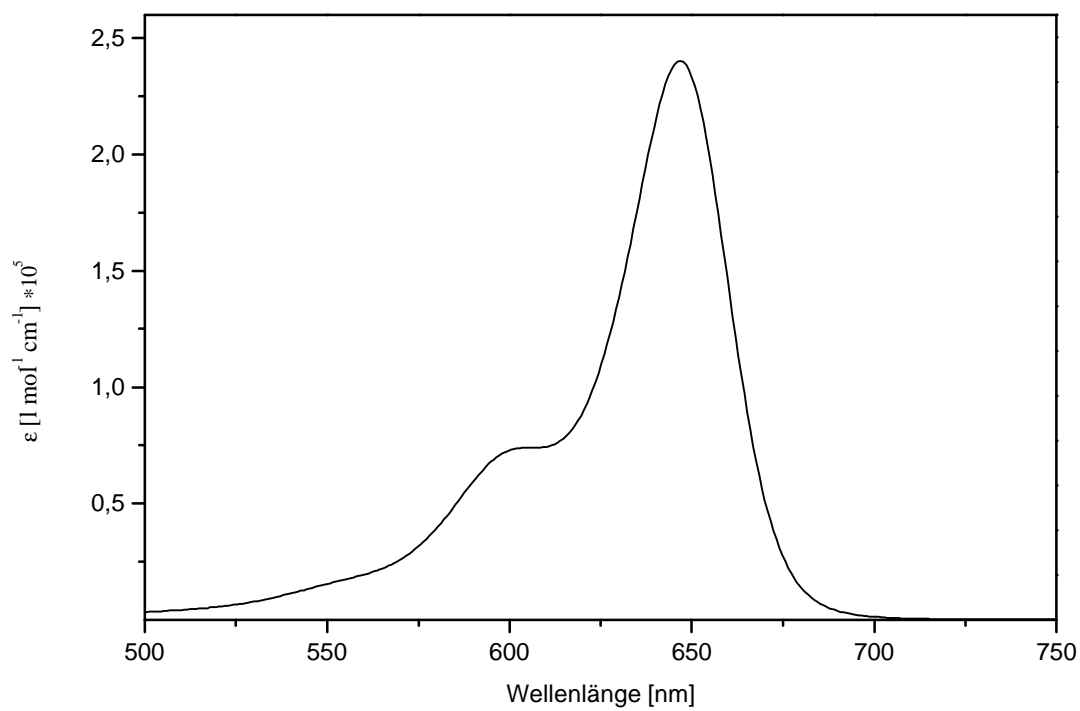
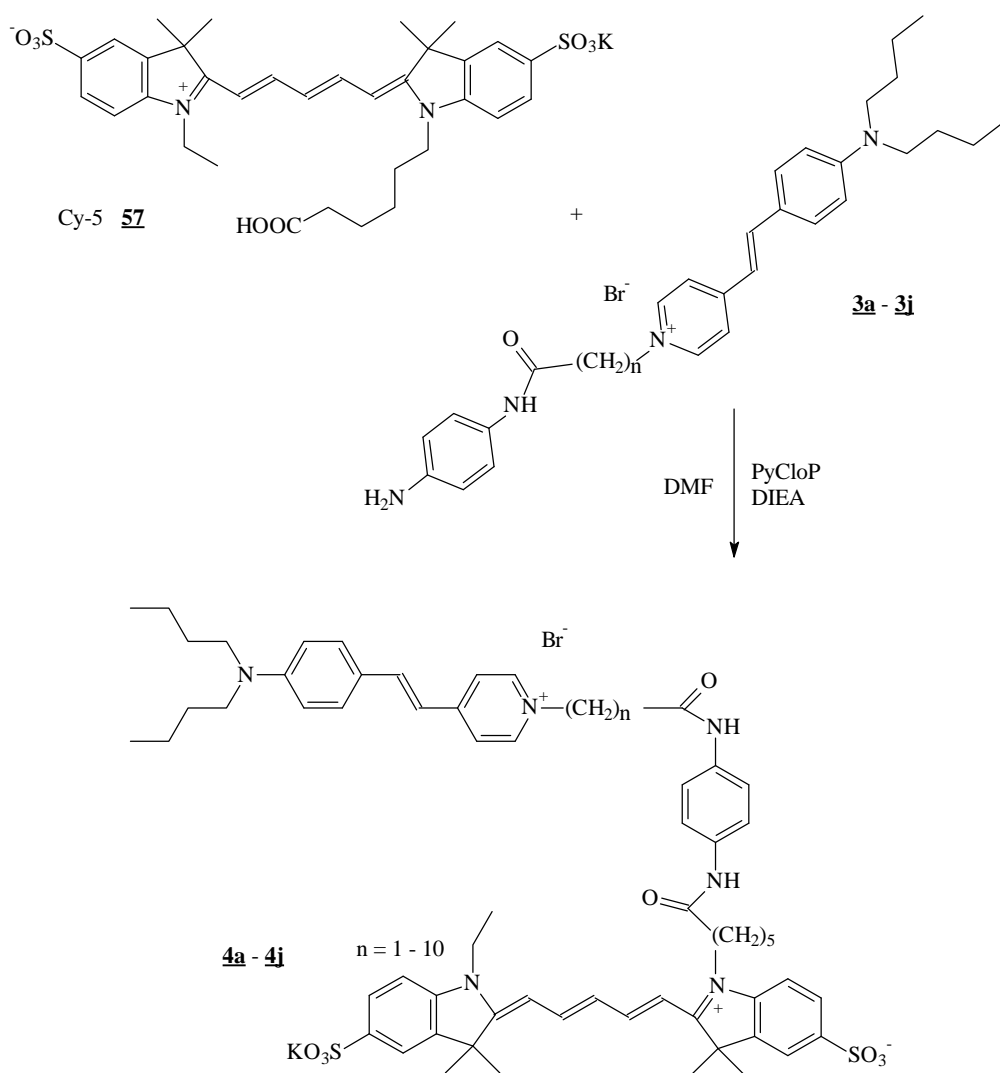


Abbildung 26: Absorptionsspektrum von Cy-5 (**57**) in Ethanol.

Das VIS-Spektrum der Verbindung (Abbildung 26) zeigt die typische Absorptionsbande der Pentamethincyanine.

4.3. Bichromophore

Wie oben beschrieben geschieht die Verknüpfung der Pentamethincyanincarbonsäure Cy-5 **57** mit den Aminoderivaten der Styrylpyridiniumcarbonsäuren **3a** - **3j** über die PyCloP-Aktivierung, analog zu den Versuchen **V5.1** - **V5.10** unter Verwendung von DIEA als Base und im Lösungsmittel DMF.



V6.1-
V6.10

Die Reaktion liefert gute Ausbeuten von 50 bis 70%, d. h. mit etwas geringeren Ausbeuten als bei der Umsetzung der Styrylpyridiniumcarbonsäuren mit p-Phenylendiamin.

4.3.1. Reinigung der Bichromophore

Es ist unmöglich, die Bichromophore durch mehrfaches Umkristallisieren zu reinigen. Das Produktgemisch enthält in der Regel den Bichromophor in Ausbeuten von ca. 60 %, blaue und rote Nebenprodukte, nicht umgesetztes Cy-5 und Styrylpyridiniumderivat und die Rückstände des PyCloP zusammen mit Diisopropylethylammoniumchlorid u. a.

Die Aufarbeitung geschieht deshalb durch quantitatives Ausfällen der Farbstoffe nach beendeter Reaktion mit Ether.

Der so erhaltene kristalline Rückstand wird in Methanol/Dichlormethan (1:1) gelöst, und säulenchromatografisch mit Kieselgel 60 und Methanol/Dichlormethan (1:3) vorgereinigt. Der so erhaltene Bichromophor ist von ca. 80 – 90 %iger Reinheit, enthält aber immer noch Spuren von Cy-5 oder dessen Derivaten, die sich an Kieselgel 60 nicht weiter trennen lassen.

Um eine definierte Verbindung zu erhalten (liegen betainische oder salzartige Strukturen vor, welche Gegenionen sind vorhanden ?), wird der rohe Bichromophor als nächstes in möglichst wenig Methanol/Dichlormethan (1:1) gelöst und in eine stark gerührte konzentrierte wässrige Kaliumbromid-Lösung getropft. Vom erhaltenen Niederschlag wird abdekantiert.

Der dritte Reinigungsschritt besteht wiederum aus einer säulenchromatografischen Trennung, diesmal an RP-18-Kieselgel mit Methanol/Wasser. Die Säule wird mit Methanol/Wasser (3:1) gepackt. Der gefällte Bichromophor wird in möglichst wenig Methanol/Dichlormethan (1:1) gelöst und aufgegeben. Dann wird mit Methanol/Wasser, anfangs (3:1), am Ende mit (1:1) eluiert. Bei einem Wasseranteil von mindestens 50 % ist der Bichromophor auf der Säule fixiert und die noch vorhandenen polareren Verunreinigungen lassen sich abtrennen. Jetzt lässt sich mit verdünnter Kaliumbromidlösung waschen, was der Simulation einer

Ionenaustauschchromatografie entspricht; hier werden alle Gegenionen endgültig gegen Kalium und Bromid ausgetauscht. Überschüssiges Kaliumbromid wird mit Methanol/Wasser (1:2) von der Säule gewaschen. Mit steigendem Methanolgehalt läßt sich dann der Bichromophor von der Säule waschen. Die erhaltene Lösung wird so schonend wie möglich am Rotationsverdampfer eingeengt. Die endgültige Reindarstellung erreicht man durch Gefriertrocknung. Die erhaltenen Elementaranalysen bestätigen die in den Abbildungen zu sehenden Formeln.

4.3.2. Charakterisierung der Bichromophore

Die ^1H -NMR-Spektren setzen sich additiv aus den Spektren der Verbindungen **3a** - **3j** und **Cy-5 (57)** zusammen. Es findet sich ein zusätzliches Signal für eine weitere Amidbindung. Diese beiden Singulets fallen ab Verbindung **3f**, d. h. ab einer Methylgruppenanzahl von $n = 6$ zusammen.

Die UV/VIS-Spektren setzen sich ebenfalls additiv aus den Spektren der Einzelchromophore zusammen, mit den beiden Absorptionsmaxima bei $\lambda = 495 \text{ nm}$ ($\epsilon = 51000$, Styrylpyridinium) und $\lambda = 650 \text{ nm}$ ($\epsilon = 242700$, Pentamethincyanin), gemessen in Ethanol. Als Beispiel ist das Absorptionsspektrum der Verbindung **4g** abgebildet.

Die Elementaranalysen (Tabelle 4) ergeben teilweise einige Abweichungen von den berechneten Werten. Das liegt zum einen an der Schwierigkeit einer geordneten Verbrennung aufgrund der sehr hohen Massen. Anders als in einfachen Kohlenwasserstoffen sind verschiedene Heteroelemente in den Verbindungen enthalten die zu weiteren Verbrennungsprodukten führen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, das Spuren von Kristallwasser enthalten sind, die ebenfalls zu Abweichungen in der Elementaranalyse führen.

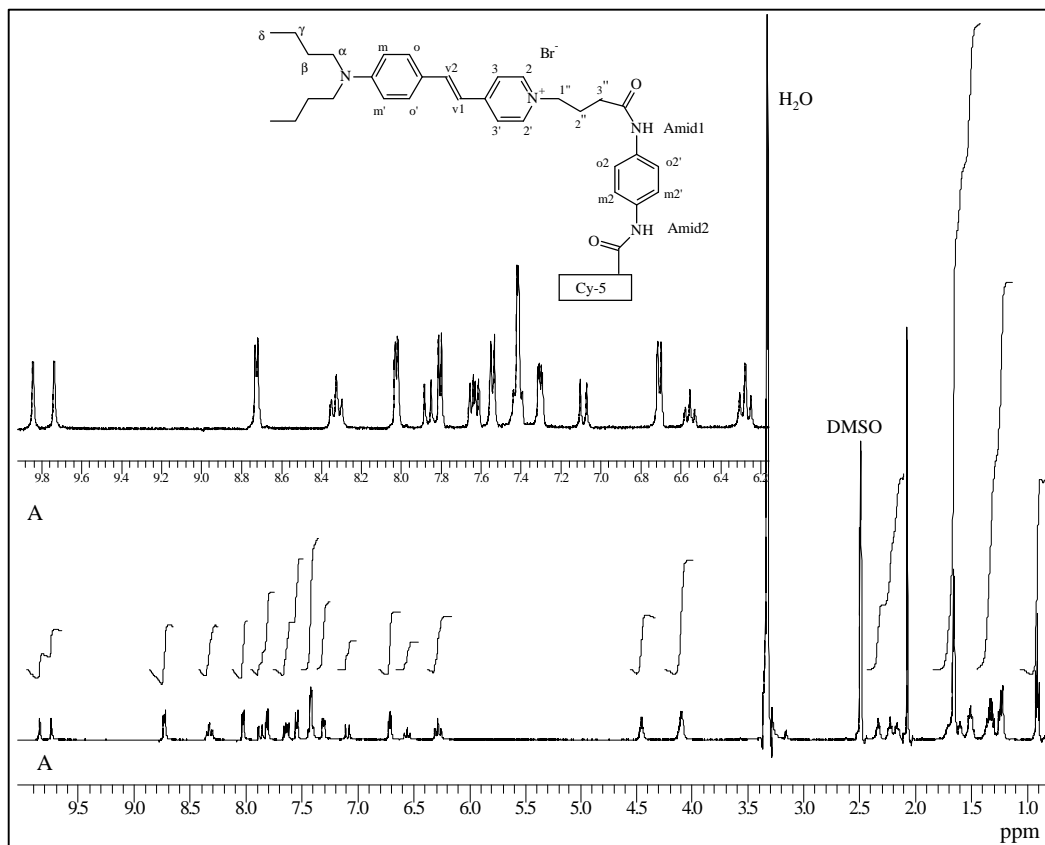


Abbildung 27: $^1\text{H-NMR}_{500}$ -Spektrum von **4c** in $\text{DMSO-}[d_6]/\text{TMS}$.

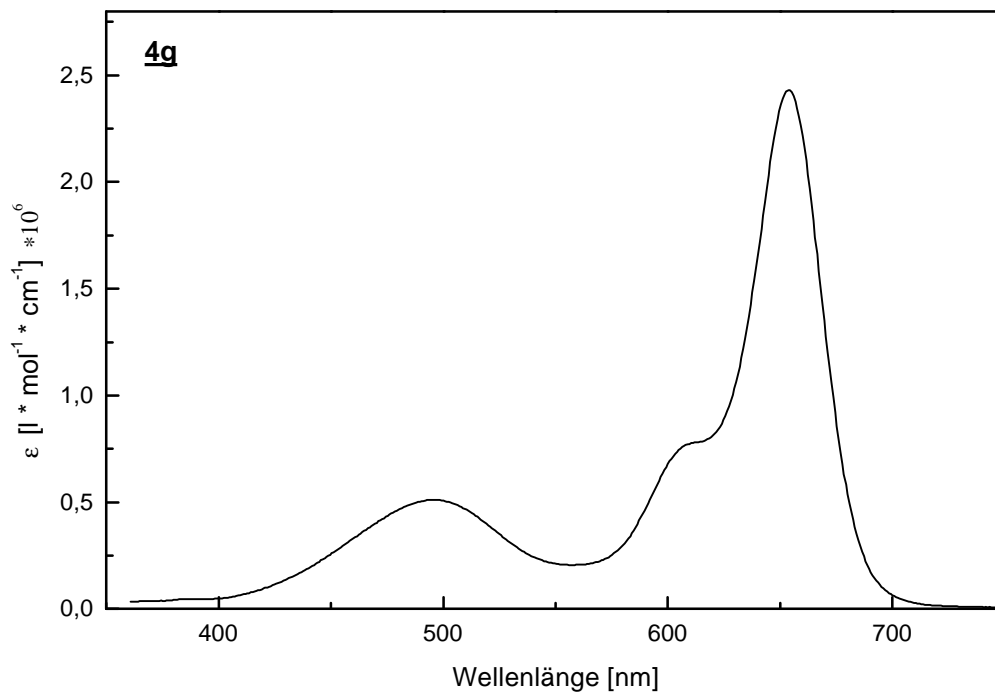


Abbildung 28: VIS-Spektrum des Bichromophors **4g** (in Ethanol).

Tabelle 4: Elementaranalysen der Bichromophore **4a** - **4j** und **41**:

Verbindung	Anzahl (CH ₂) _n	berechnet [%]			gefunden [%]		
		C	H	N	C	H	N
4a	n = 1	61.32	6.14	6.92	57.26	6.75	6.17
4b	n = 2	61.60	6.24	6.84	62.20	7.33	7.09
4c	n = 3	61.87	6.33	6.76	60.51	7.05	6.52
4d	n = 4	62.13	6.42	6.69	62.95	7.66	5.59
4e	n = 5	62.39	6.51	6.62	63.72	8.80	4.04
4f	n = 6	62.65	6.59	6.54	62.65	7.58	6.45
4g	n = 7	62.89	6.86	6.47	64.10	7.48	6.31
4h	n = 8	63.14	6.76	6.40	keine EA		
4i	n = 9	63.38	6.84	6.34	63.39	8.33	5.01
4j	n = 10	63.61	6.92	6.29	64.06	8.68	4.22
41	n = 7	57.65	6.05	5.93	57.33	7.06	4.98

Vergleicht man jedoch die berechneten Massen mit den berechneten Massen für andere Zusammensetzungen (Hexafluorophosphat statt Bromid als Gegenion, betainische Strukturen etc.), so lassen die gefundenen Elementaranalysen den Schluß zu, daß die Bichromophore tatsächlich ein Mol Kaliumbromid enthalten und in den Verbindungen vorliegen, wie sie in den Formelbildern gezeigt sind. Von **4h** und von **42** (s. u.) war keine stimmige Elementaranalyse zu erhalten. Zusätzlich ist die Elementaranalyse von **41** angegeben (s. u.).

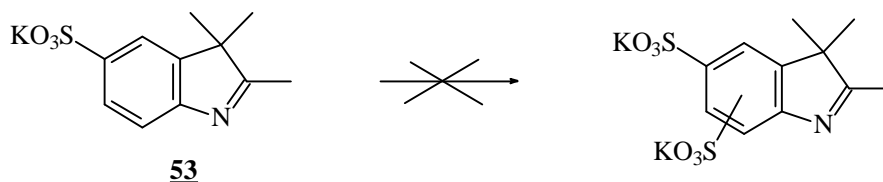
Tabelle 5 zeigt die massenspektroskopischen Daten der Bichromophore (FAB). die gefundenen Molekülmassen stimmen alle mit den berechneten überein. Die teilweise geringen Intensitäten der Molekülionenpeaks sind auf die hohen Massen der Verbindungen zurückzuführen.

Tabelle 5: FAB-Massenpeaks der Bichromophore **4a** - **4j**:

Verbindung	Anzahl (CH ₂) _n	M(ber.) -KBr [g/mol]	M(gef.) -KBr [g/mol] Intensität (%)
4a	n = 1	1095.4	1095.3 (47)
4b	n = 2	1109.5	1109.3 (7)
4c	n = 3	1123.5	1123.7 (97)
4d	n = 4	1137.5	1137.2 (7)
4e	n = 5	1151.6	1151.6 (71)
4f	n = 6	1165.6	1165.0 (100)
4g	n = 7	1179.6	1179.7 (60)
4h	n = 8	1193.6	1194.4 (15)
4i	n = 9	1207.7	1207.3 (34)
4j	n = 10	1221.7	1221.2 (2)

4.4. Verbindungen mit erhöhter Hydrophilie

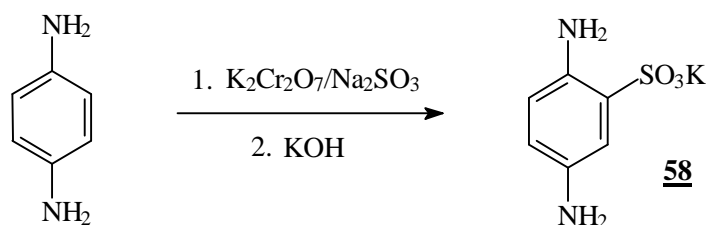
Einlagerungsversuche an lebenden Zellen, die bei der BAYER AG Wuppertal durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass die Bichromophore bei bestimmten Zelltypen in der Lage sind, zellinterne Membranen, wie z. B. von Zellkernen oder Mitochondrien, anzufärben. Dieser Prozeß beweist eine gewisse Membranpermeabilität der Bichromophore, deren Ursache unbestimmt ist und im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden kann. Um diese Membranpermeabilität zu unterbinden, soll die Hydrophilie des Pentamethincyananteils weiter gesteigert werden. Eine noch bessere Solvation in der wässrigen Phase sollte die Membrangängigkeit verhindern. Dies geschieht durch die Einführung weiterer Sulfonatogruppen.



Der naheliegende Versuch, ein Cy-5-Derivat mit zusätzlichen Sulfonatgruppen zu synthetisieren läßt sich nicht realisieren, da eine weitere Sulfonierung des Indolenins **53** zumindest mit gängigen Methoden nicht möglich ist. Weder der Einsatz von Oleum noch die Umsetzung mit Chlorsulfonsäure führten zum Erfolg. Das hat vermutlich sowohl sterische als auch elektronische Gründe, d. h. die schon vorhandenen Substituenten behindern einen weiteren elektrophilen Angriff und unter den Reaktionsbedingungen wird das Stickstoffatom protoniert oder durch Elektrophile komplexiert, so daß die Reaktivität des Aromaten im Sinne einer S_E -Reaktion zu stark herabgesetzt wird.

4.4.1. Bichromophore mit zusätzlicher Sulfonatogruppe im Spacer

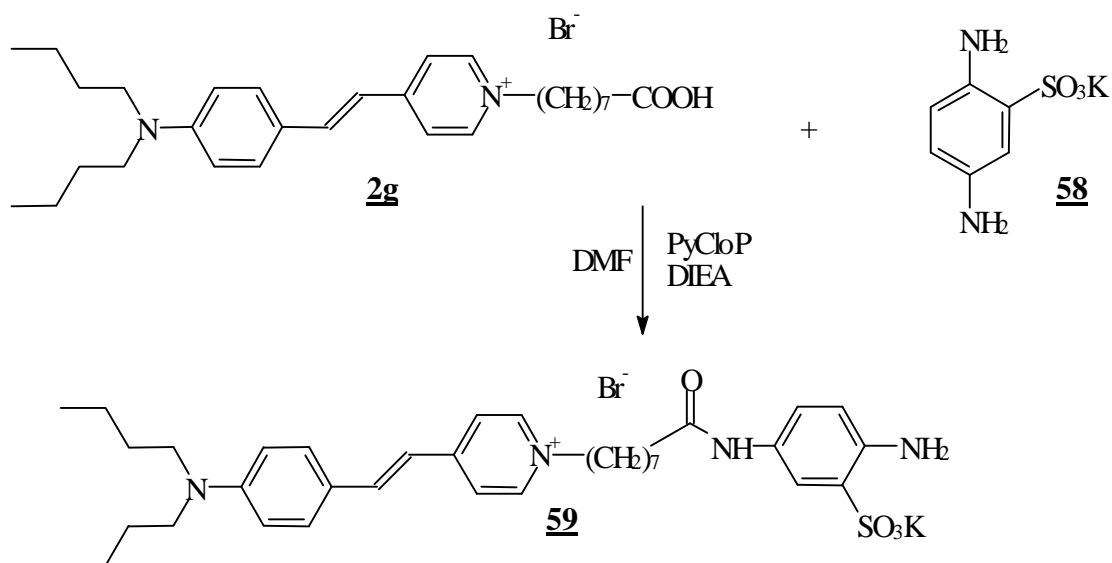
Eine weitere Sulfonatogruppe läßt sich in den Bichromophor einführen, wenn man zusätzlich den Aromaten in der Spacerkette sulfoniert^[96]. Dazu wird p-Phenyldiamin sulfoniert und das Produkt in die Spacerkette an Stelle des unsubstituierten p-Phenyldiamins eingeführt.



V15

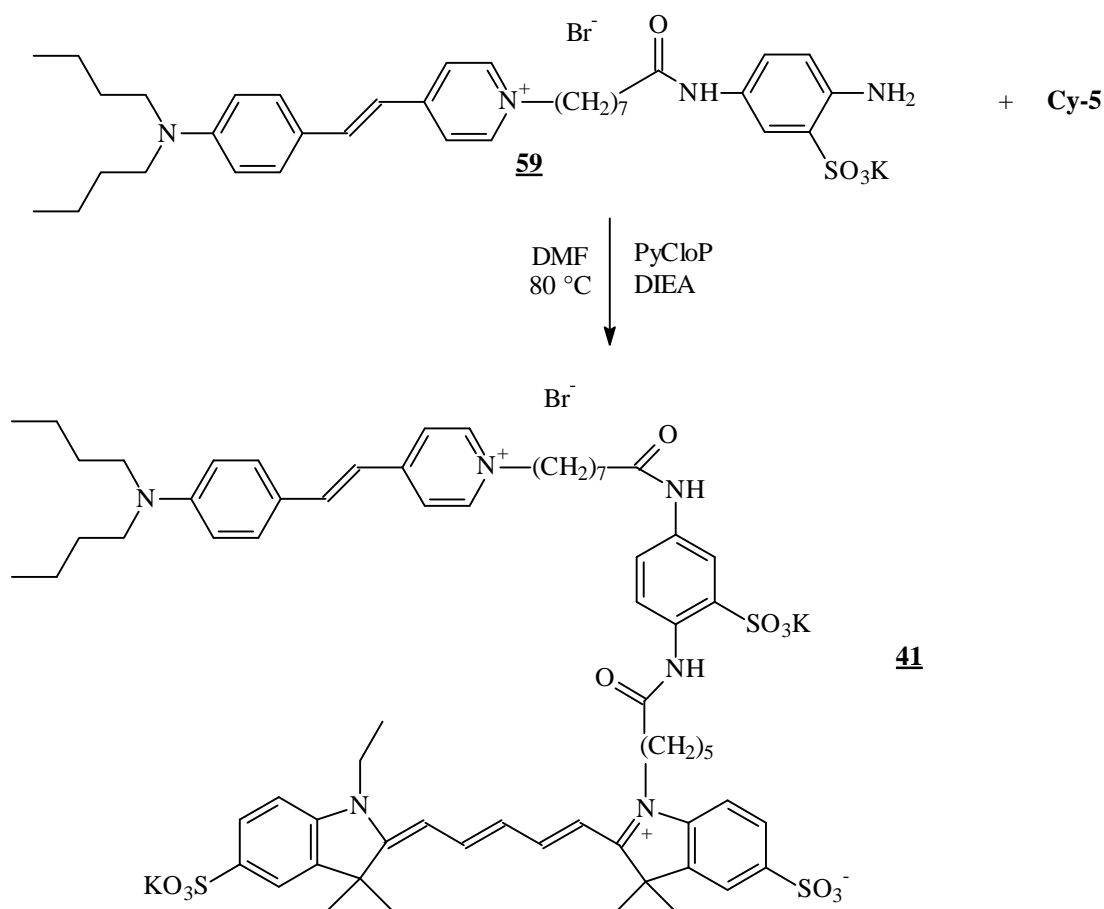
Die Umsetzung der Carbonsäure **2g** mit diesem Baustein zum Amid geschieht wie gewohnt in Gegenwart von PyCloP.

V16



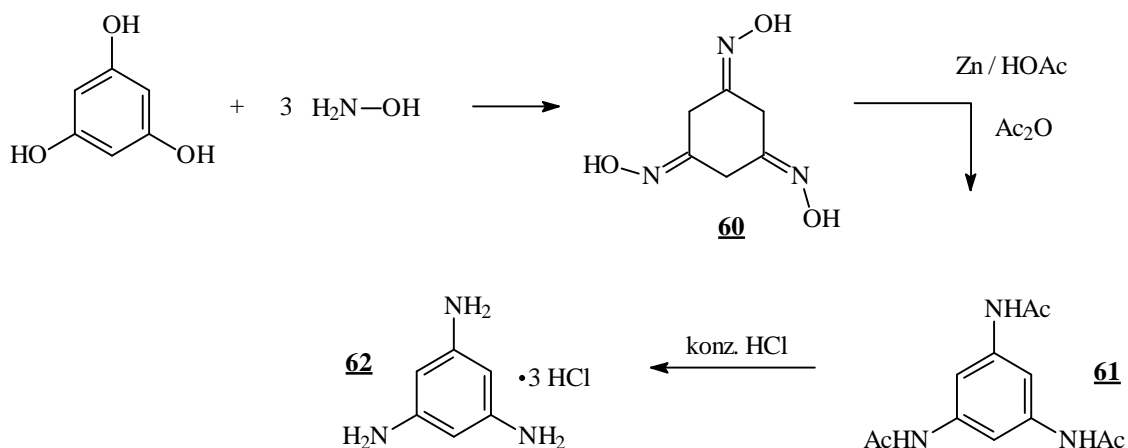
Aufgrund der unterschiedlichen Basizität der beiden Aminogruppen (-I-/-M-Effekt der Sulfonatogruppe einmal in ortho- einmal in meta-Position zu einer Aminogruppe) in **58** entsteht regioselektiv nur **59**, was durch das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung bewiesen wird (s. u.). Die Ausbeute beträgt 78 %. Reinigung erfolgt durch Umkristallisation aus Ethanol/Diethylether. Analytisch reines **59** erhält man durch säulenchromatografische Reinigung an Kieselgel 60 mit Dichlormethan/Methanol 5:1.

Die Umsetzung von **59** mit Cy-5 zum Bichromophor **41** erfolgt ebenfalls unter Aktivierung mit PyCloP, aufgrund der verminderten Basizität der verbleibenden Aminogruppe und einer zusätzlichen sterischen Hinderung durch die ortho-ständige Sulfonatogruppe muß diese Kopplung schon bei erhöhter Temperatur (80 °C) durchgeführt werden. Hier beträgt die Ausbeute 67 %. Die Reinigung erfolgt wie bei den einfachen Bichromophoren beschrieben.



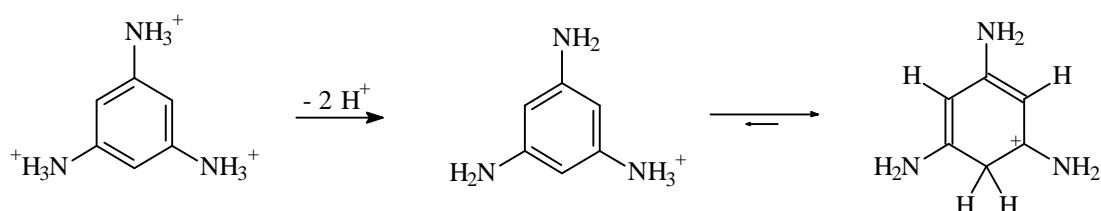
4.4.2. Trichromophore

Ein weiterer Ansatz, die Hydrophilie der neuartigen Potentialsonden zu erhöhen umfaßt die Einführung von gleich zwei Molekülen Cy-5 in das Kopplungsprodukt, was sogar zu einer Verdoppelung der Zahl an Sulfonatgruppen führt. Hierzu ist es nötig, ein Styrylpyridiniumderivat mit zwei freien Aminofunktionen zu synthetisieren. Dies geschieht durch den Ersatz von *p*-Phenylendiamin durch 1,3,5-Triaminobenzol, welches sich leicht in einer dreistufigen Synthese aus Phloroglucin darstellen läßt^{[97],[98]}. Das Triacetylderivat ist stabil und das freie Triaminobenzol läßt sich durch Kochen mit konzentrierter Salzsäure unter Stickstoff als Trihydrochlorid erhalten. Als solches kann es direkt eingesetzt werden; die unprotonierte Base wird dagegen an der Luft in kurzer Zeit zu braun-schwarzen teerartigen Produkten oxidiert.

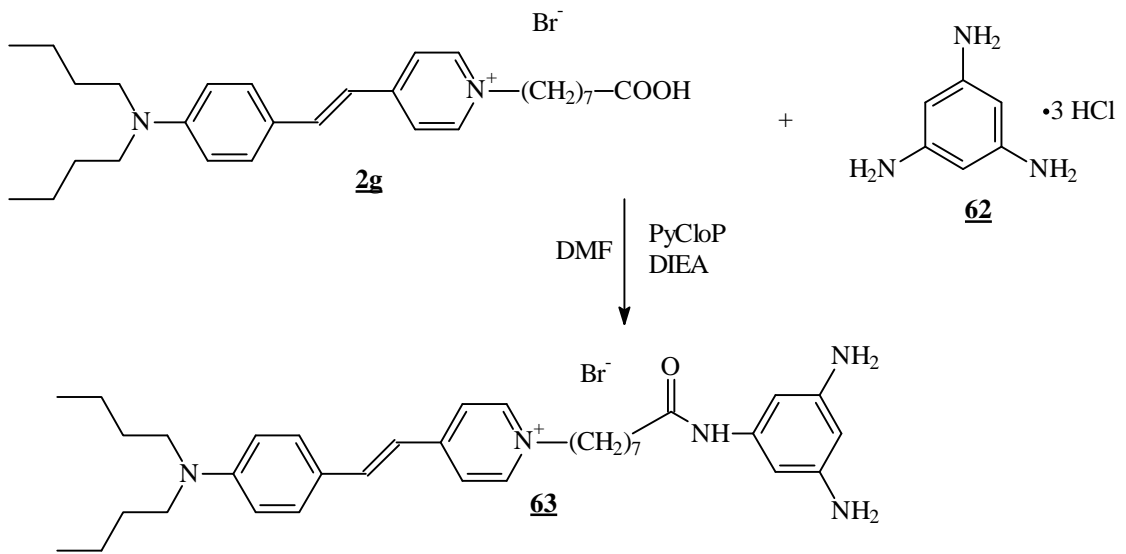
V18.1-
18.3


Charakteristisch für die Verbindung **62** $\cdot 3\text{HCl}$ sind im IR-Spektrum die Banden bei 2855 und 2594 cm^{-1} für die NH_3^+ -Gruppe. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum finden sich drei statt der zunächst erwarteten zwei Signale. Gelöst in DMSO liegt die Verbindung nur noch einfach protoniert vor und bildet unter diesen Bedingungen das stabilere Phenoniumion aus.

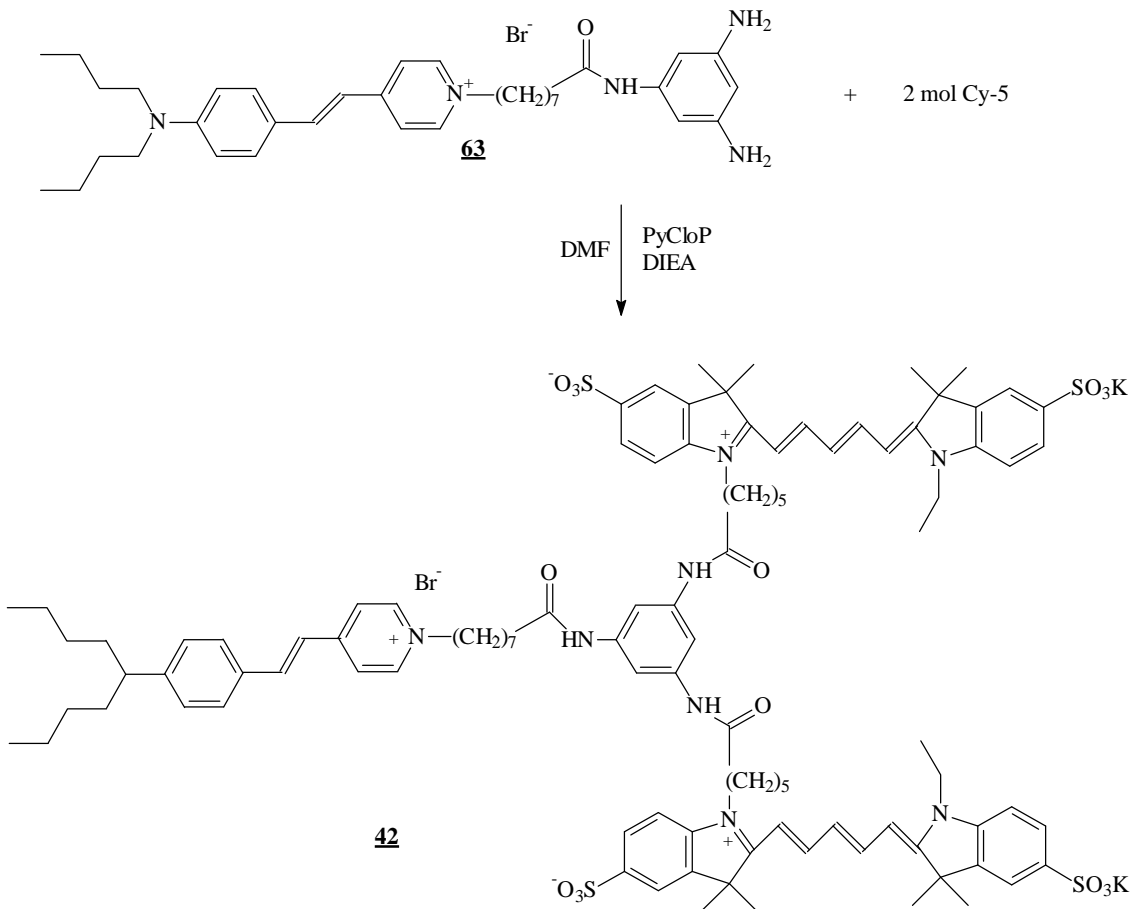
Man erhält ein $^1\text{H-NMR}$ -Signal für die beiden Methin-Protonen, eins für die sechs Aminoprotonen und eins für die Methylengruppe. Diese Beobachtung stimmt mit der Literatur überein^[99].



Die Umsetzung von **62** mit der Carbonsäure **2g** liefert das gewünschte Derivat mit zwei freien Aminogruppen. **62** wird in dreifachem Überschuß eingesetzt und es wird entsprechend mehr DIEA verwendet, um die Salzsäure zu neutralisieren.



Wenn man **63** mit zwei Mol Cy-5 koppelt, erhält man den Trichromophor. Die Ausbeuten liegen bei etwa 45 %. Ein Teil des Edukts **63** reagiert scheinbar nur zum Bichromophor mit einer freien Aminogruppe.



Auch hier erfolgt die Reinigung wie bei den einfachen Bichromophoren beschrieben.

4.4.3. Charakterisierung

¹H-NMR-Spektroskopie: Die Abbildung 29 zeigt im Vergleich den aromatischen Bereich der drei Aminoderivate **3g**, **59** und **63**. Bei tiefstem Feld befindet sich jeweils das Singulett des Amidprotons, bei höchstem Feld die der zwei bzw. vier Aminprotonen. Die Protonen des über die Amidbindung angebondenen Aromaten sind jeweils durch Pfeile gekennzeichnet. In **59** liegen die Signale von tiefem zu hohem Feld in der Reihenfolge A, B, C, was durch Inkrementsysteme zur Berechnung der chemischen Verschiebung aromatischer Protonen bestätigt wird^[100]. Für **63** liegen die Protonen A bei tieferem, das Proton B bei höherem Feld, ebenfalls durch Inkrementrechnung bestätigt.

Die NMR-Spektren der entsprechenden Bichromophore enthalten zusätzlich die Signale des Cy-5, bei dem Trichromophor **42** in doppelter Intensität, wie sich leicht am aromatischen Teil des Spektrums nachweisen läßt. Der Ausschnitt ist in Abbildung 30 gezeigt, die Signale des Styrylpyridiniumteilchromophors sind zur Vereinfachung mit Sternen markiert.

Das Spektrum zeigt bei $\delta = 9.9$ ppm zwei Singuletts (3 Protonen) für die Amidprotonen. Sämtliche aromatischen Protonen lassen sich durch Vergleich mit den Spektren der Einzelchromophore zuordnen.

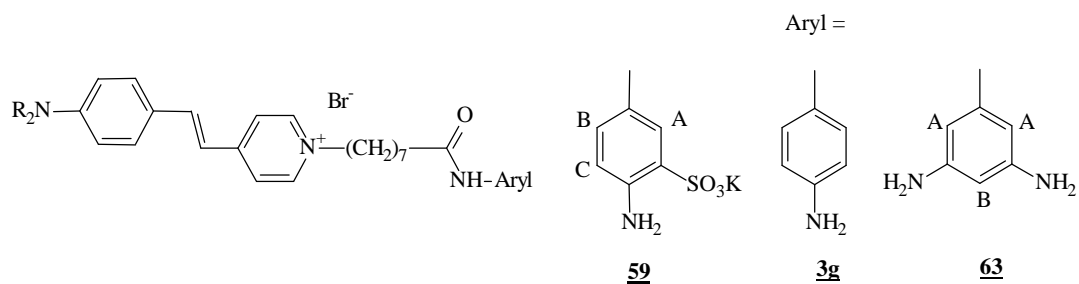
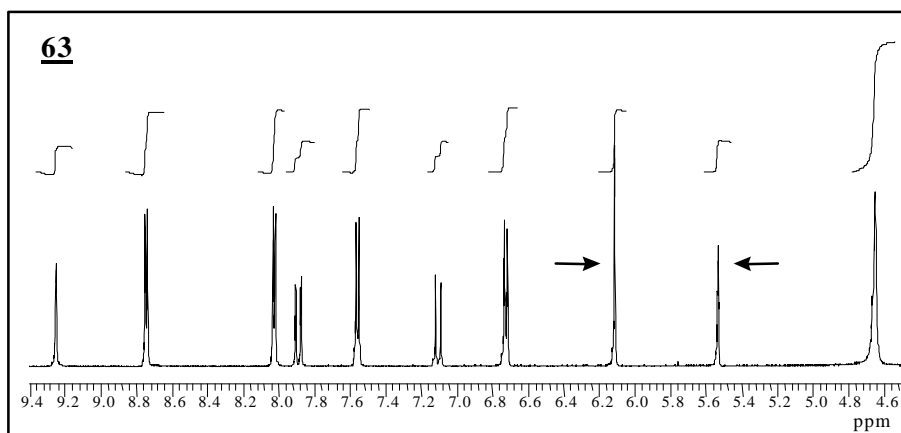
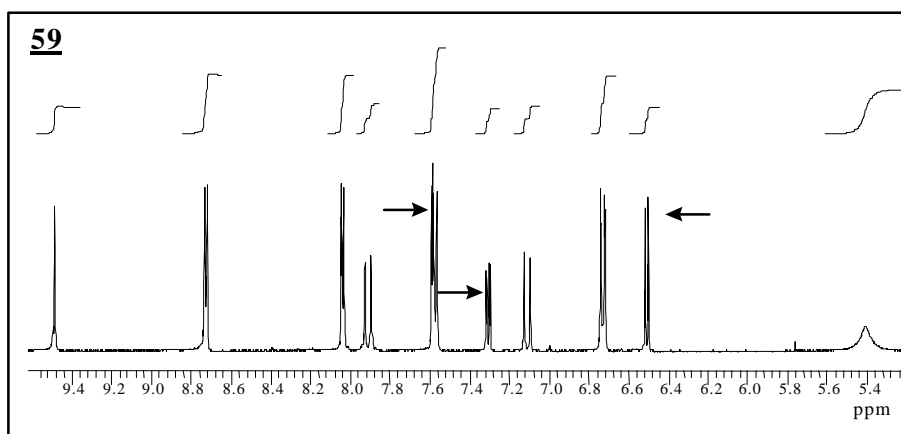
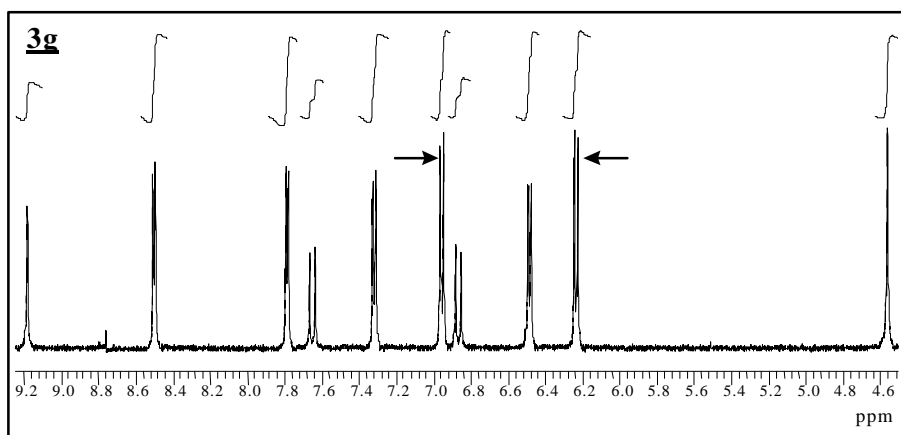
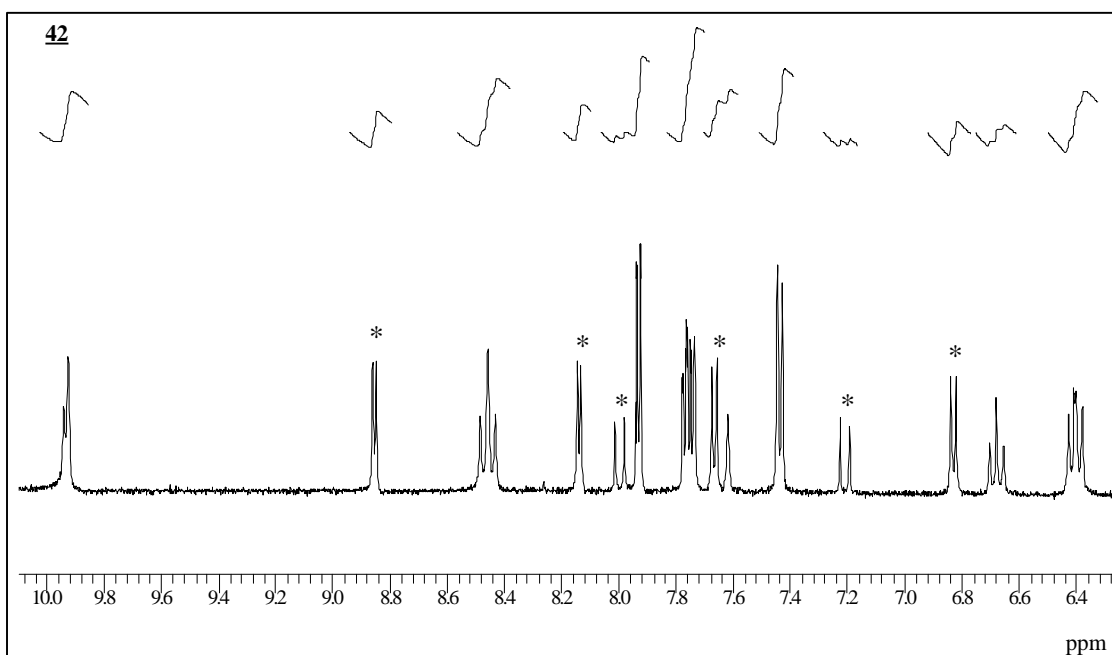


Abbildung 29: Aromatischer Teil der $^1H-NMR_{500}$ -Spektrn in $DMSO-[d_6]/TMS$.


 Abbildung 30: $^1\text{H-NMR}_{500}$ -Spektrum von **42** in $\text{DMSO-}[d_6]/\text{TMS}$

FAB-Massenspektroskopie: Von den Verbindungen **41** und **42** konnte aufgrund der hohen Massen von 1416.76 g/mol bzw. 1990.52 g/mol kein Spektrum erhalten werden. Die Daten der Amide finden sich in der Tabelle 6. Die geringe Intensität bei **63** liegt vermutlich an den beiden Aminogruppen, die Verbindung hat sich als sehr oxidabel erwiesen, wie es von allen aromatischen Polyaminen bekannt ist.

 Tabelle 6: FAB-massenspektroskopische Daten der Verbindungen **59** und **63**:

Verbindung	Anzahl $(\text{CH}_2)_n$	M(ber.) [g/mol] Intensität (%)	M(gef.) [g/mol] Intensität (%)
59	$n = 7$	620.9 (-KBr)	621.2 (-KBr) (100)
63	$n = 7$	556.8 (- Br)	557.2 (- Br) (1.6)

UV/VIS-Spektroskopie: Die Abbildung 31 zeigt die optischen Spektren der drei Verbindungen **4g**, **41**, **42**.

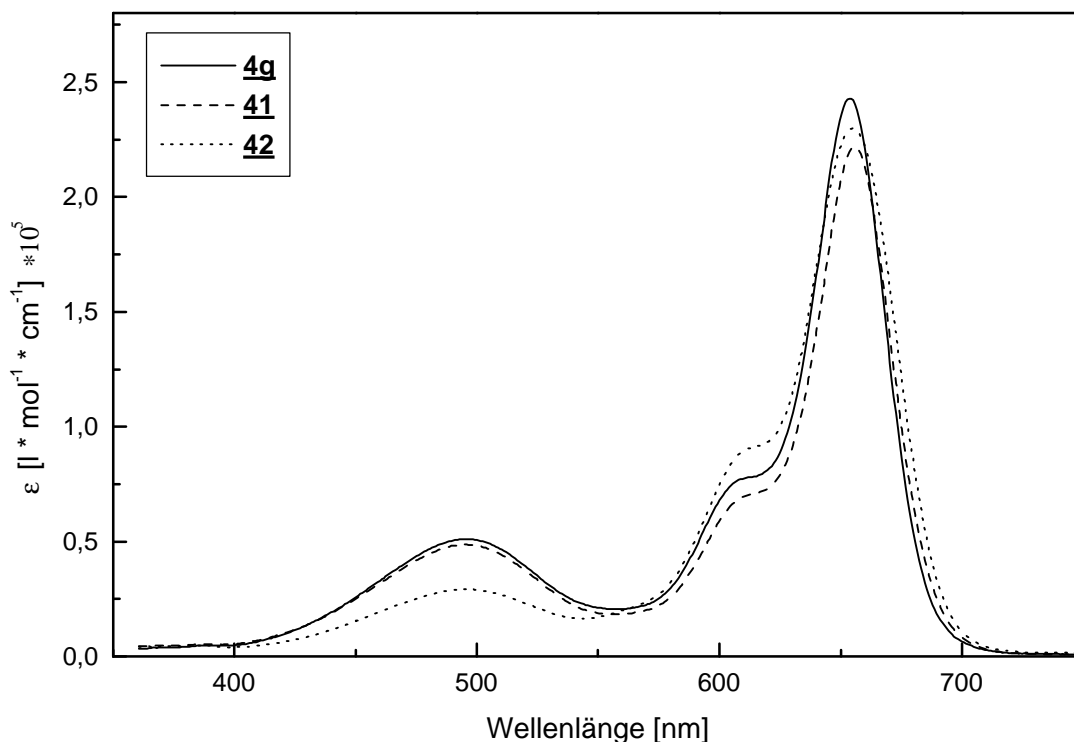


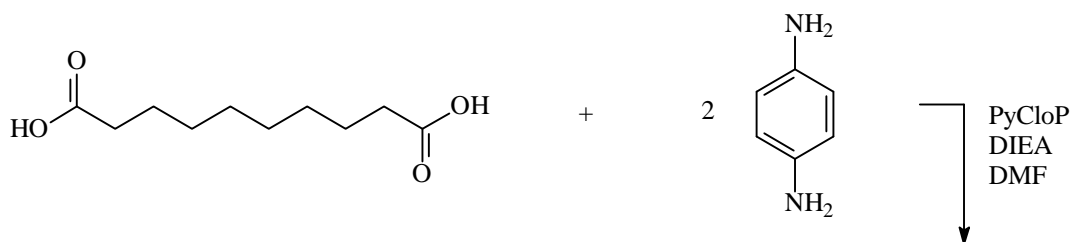
Abbildung 31: VIS-Spektren der Bichromophore **4g**, **41** und des Trichromophors **42** (Ethanol).

Wie man sieht hat die zusätzliche Sulfonatogruppe im Spacer der Verbindung **41** keinen Einfluß auf das Absorptionsverhalten der Chromophore. Für **42** ergibt sich wie erwartet nur noch die halbe Extinktion für den Styrylpyridinium-Teilchromophor. Die maximalen Extinktionskoeffizienten liegen bei ca. $\epsilon = 250000$ für den Pentamethincyaninteichromophor und bei $\epsilon = 50000$ für den Styrylpyridiniumteilchromophor, bzw. bei $\epsilon = 25000$ für **42**.

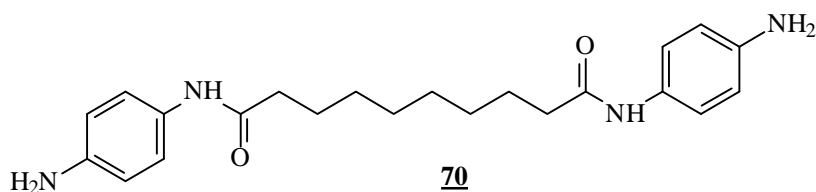
4.5. Bichromophore mit verlängertem Spacer

Um eine Verbindung mit erheblich verlängertem Spacer zu synthetisieren, wird 1,8-Octandicarbonsäure (Sebacinsäure) zweifach mit *p*-Phenylendiamin umgesetzt. Das entstandene Diamin wird wie *p*-Phenylendiamin bei den Bichromophoren **4a** - **4j** als

Spacer zwischen den Einzelchromophoren eingesetzt. Es wird die PyCloP-Methode verwendet.

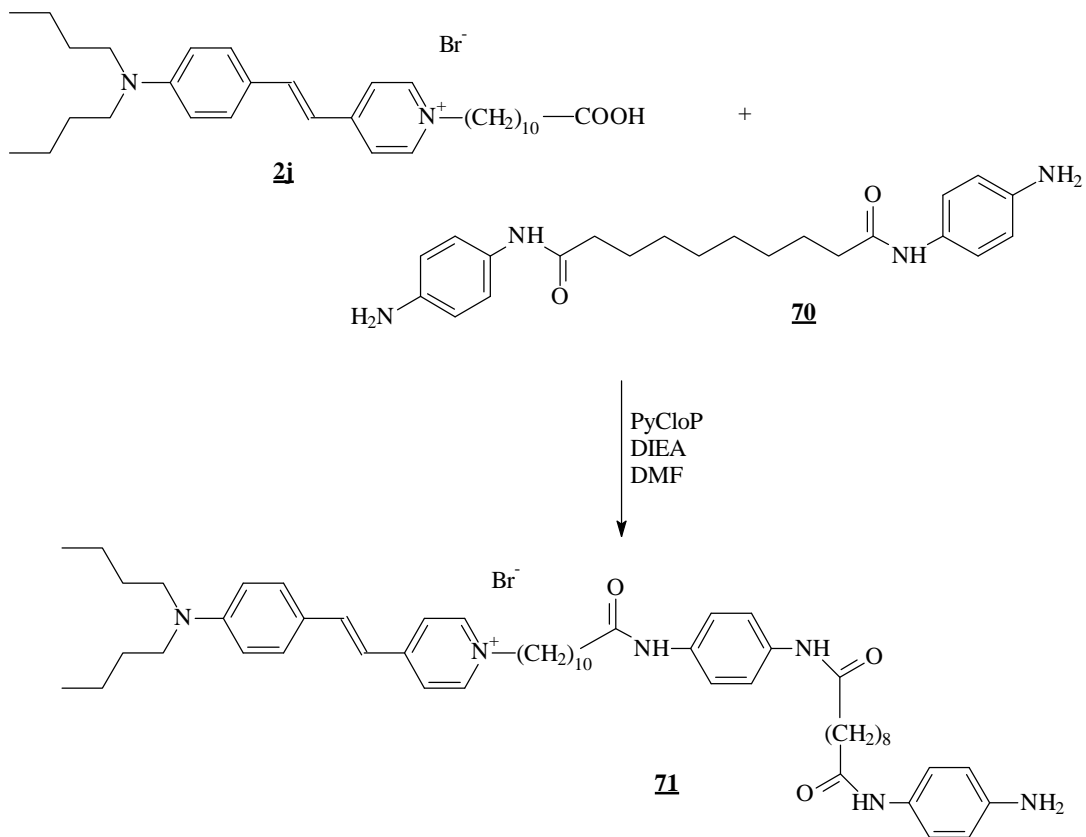


V22.1



Es ist dabei unnötig, das Amin in größerem Überschuß einzusetzen, um polymere Produkte zu vermeiden, denn freies *p*-Phenyldiamin reagiert immer leichter als die zweite Aminogruppe in schon gebildetem Amid, da die Amidgruppe in *para*-Stellung die Basizität der Aminogruppe verringert. Ein etwas mehr als zweifacher Überschuß an *p*-Phenyldiamin reicht deshalb aus. Die Ausbeute liegt bei 83 %. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt die erwarteten Signale (siehe Experimentaltteil) und die Verbindung wird nach Umkristallisation aus Ethanol/Ether ohne weitere Charakterisierung eingesetzt.

Die Umsetzung mit **2j** erfolgt in gleicher Weise wie bei den übrigen Bichromophoren. **70** wird dabei in dreifachem Überschuß eingesetzt. Die Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel 60 mit Dichlormethan/Methanol 6:1 (v/v). Die Ausbeute beträgt 76 %.



V22.2

Charakterisierung erfolgt durch VIS-, IR- und ^1H -NMR-Spektroskopie. Die Daten entsprechen dem Erwarteten und sind im Experimententeil zu finden. Die Abbildung 32 zeigt den Aromatenteil des ^1H -NMR-Spektrums. Charakteristisch sind die beiden Signale für die drei Amid-Protonen bei 9.55 ppm (Phenylring mit zwei Amidgruppen) und bei 9.17 ppm (endständiger Phenylring mit Aminogruppe). Die isochronen Protonen des Phenylrings mit den beiden Amidgruppen liefern ein Singulett bei 7.25 ppm. Bei ungefähr 1.25 ppm finden sich die zusätzlichen Protonen der acht Methylengruppen im Spacer.

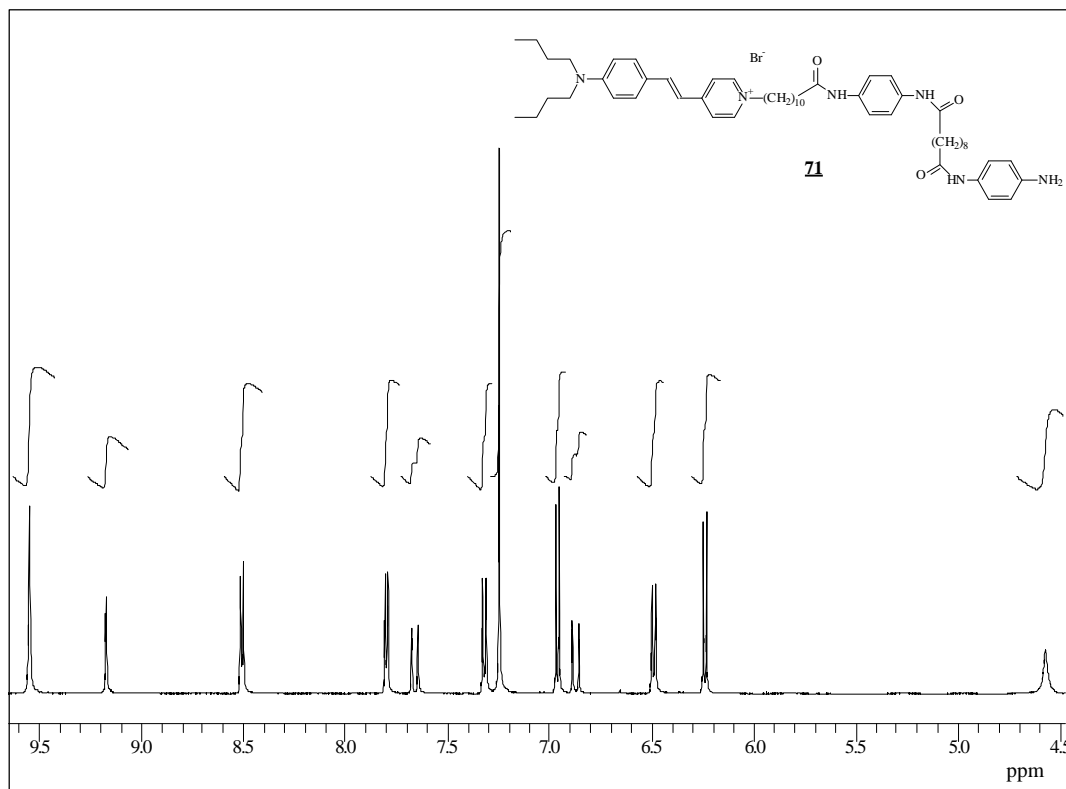


Abbildung 32: Aromatischer Teil des $^1\text{H-NMR}_{500}$ -Spektrums von **71** in $\text{DMSO-}[d_6]/\text{TMS}$.

Auch die Kopplung von **71** mit **57** (Cy-5) zum Bichromophor **72** geschieht mit Hilfe der PyCloP-Methode. Die Ausbeute beträgt 59 %. Reinigung erfolgt analog der Prozedur, wie sie für alle anderen Bichromophore beschrieben ist (siehe oben).

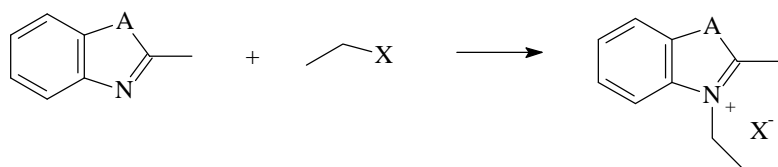
Die Charakterisierung erfolgt auch hier durch VIS-, FAB-Massen-, IR- und $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie. Abbildung 33 zeigt den Aromatenteil der Verbindung **72**. Das gefundene Signalmuster stimmt mit dem für die übrigen Bichromophore überein. Durch Vergleich der Spektren der Einzelchromophore läßt sich auch hier eine genaue Zuordnung aller Peaks durchführen. Charakteristisch ist das Multipllett bei 8.93 ppm für die vier Amidprotonen.

Die VIS-Spektren der Verbindungen **71** und **72** sind identisch mit denen der entsprechenden Verbindungen, die weiter oben abgebildet sind. Zur weiteren Charakterisierung siehe Experimentalteil.

4.6. Referenzsubstanzen

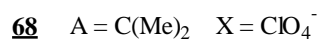
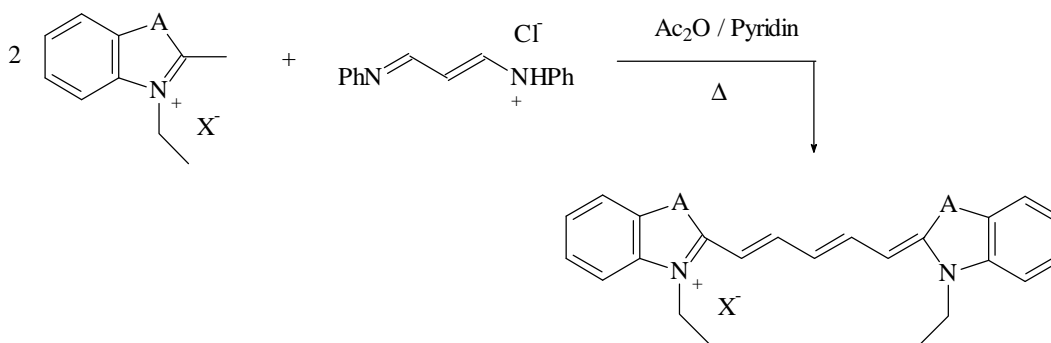
Zur Korrektur der Fluoreszenzspektren und zur Bestimmung der Funktionsfähigkeit der dargestellten Vesikel werden die literaturbekannten Pentamethincyanine **DTDC Iodid 67** und **DIDC Perchlorat 68** mit bekannten Eigenschaften synthetisiert. Dies geschieht nach allgemeinen Vorschriften von Hamer^[13] durch Kondensation der entsprechenden quaternierten Basen mit Malonaldehydbisphenyliminhydrochlorid (MABPI).

V23



V24

V25



5. Fluoreszenzspektroskopie

5.1. Fluoreszenzeigenschaften

Im folgenden sollen die Fluoreszenzeigenschaften der Einzelchromophore und der Bichromophore einander gegenübergestellt werden. Ferner wird die Solvatochromie in isotropen Lösungsmitteln und in Vesikelsuspensionen, die für die Potentialsensitivität von Bedeutung ist, untersucht. Die Darstellung der Vesikelsuspensionen ist im Experimenterteil beschrieben.

5.1.1. Fluoreszenzeigenschaften des Styrylteilchromophors

Als Beispiel für den Styrylteilchromophor sind in Abbildung 34 die Fluoreszenzspektren der Verbindung **2b** abgebildet. Es zeigt sich das typische Verhalten von Dialkylaminostyrylpyridiniumchromophoren. Die Ergebnisse sind konsistent mit Messungen in der Literatur^[54]. Die Fluoreszenz weist eine positive Solvatochromie auf, d. h. die Emissionsmaxima verschieben sich von kleinen nach großen Wellenlängen mit zunehmender Lösungsmittelpolarität. Gleichzeitig findet sich eine starke Abnahme der Fluoreszenzquantenausbeute mit zunehmender Lösungsmittelpolarität, in Wasser ist die Fluoreszenz ganz gelöscht. Die Quantenausbeute ist abhängig vom Ausmaß der Wechselwirkung zwischen Lösungsmittel und gelöstem Farbstoff. Je stärker diese Wechselwirkungen sind, desto schneller wird die thermische Desaktivierung und um so größer ist die Konkurrenz zwischen Lichtemission und thermischer Desaktivierung. Chloroform hat ein relativ kleines Dipolmoment, hier konkurriert die Fluoreszenz noch erfolgreich mit thermischer Desaktivierung. Ethanol und noch mehr Wasser sind dagegen zu starken Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und zusätzlich zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken fähig, was die thermische Desaktivierung in den Vordergrund treten läßt.

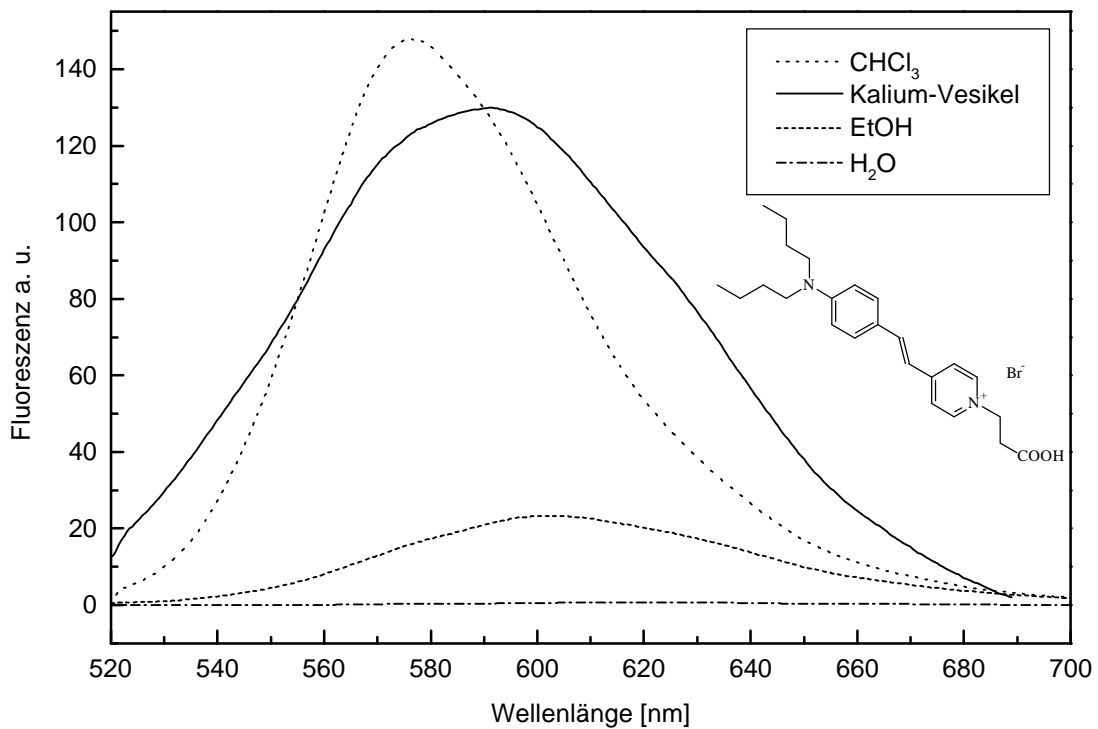


Abbildung 34: Fluoreszenzspektren in verschiedenen Lösungsmitteln bei konstanter Konzentration. Anregungswellenlänge 490 nm, T = 19 °C. Das Spektrum in Vesikelsuspension wurde nach 50 min Rühren aller Komponenten (2.5 ml Natrium-Pufferlösung, 30 µl Kalium-Vesikel, 20 µl ethanol. Farbstofflösung) aufgenommen.

Eingelagert in Vesikel befindet sich der Chromophor in ebenfalls relativ unpolarer Umgebung, die Fluoreszenzquantenausbeute ist entsprechend hoch. Gleichzeitig kommt es aber auch zu einer bathochromen Verschiebung und zu einer Bandenverbreiterung, wie sie für polarere Lösungsmittel typisch ist.

5.1.2. Fluoreszenzeigenschaften von Cy-5

Abbildung 35 zeigt die Absorptionsspektren von Cy-5 in verschiedenen Lösungsmitteln. In Abbildung 36 sind die Fluoreszenzspektren in den jeweiligen Lösungsmitteln zu sehen. Sowohl in Absorption als auch in Emission zeigt das Pentamethincyanin eine geringe negative Solvatochromie.

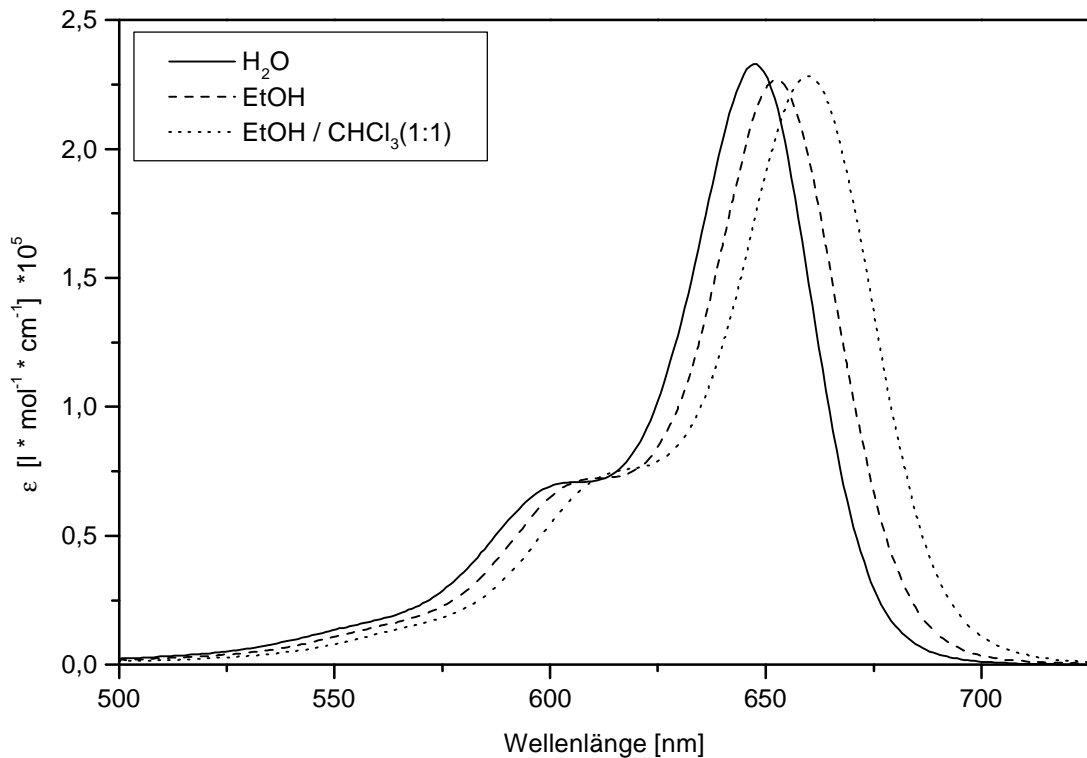


Abbildung 35: Absorptionsspektren von Cy-5 in verschiedenen Lösungsmitteln.

Das Absorptionsmaximum verschiebt sich hypsochrom von Chloroform/Ethanol zu Wasser um 13 nm, das Emissionsmaximum um 15 nm. Die Verbindung ist bezüglich des chromophoren Systems nahezu symmetrisch und die Ladungsverteilung ändert sich bei Absorption und Emission nur unwesentlich. Deshalb findet kaum Reorientierung der Solvathülle beim Übergang statt. Vermutlich hat die beobachtete Solvatochromie ihre Ursache in einer besseren Stabilisierung des Grundzustands gegenüber dem angeregten Zustand in polarerer Lösungsmitteln.

Die Fluoreszenzquantenausbeute ist wesentlich weniger vom Lösungsmittel abhängig als bei den Styrylfarbstoffen.

Die Fluoreszenzspektren in Wasser und in Kalium-Vesikelsuspension sind fast identisch. Eine mögliche Adsorption oder Wechselwirkung mit der Membranoberfläche scheint die Fluoreszenzemission also nicht zu beeinflussen..

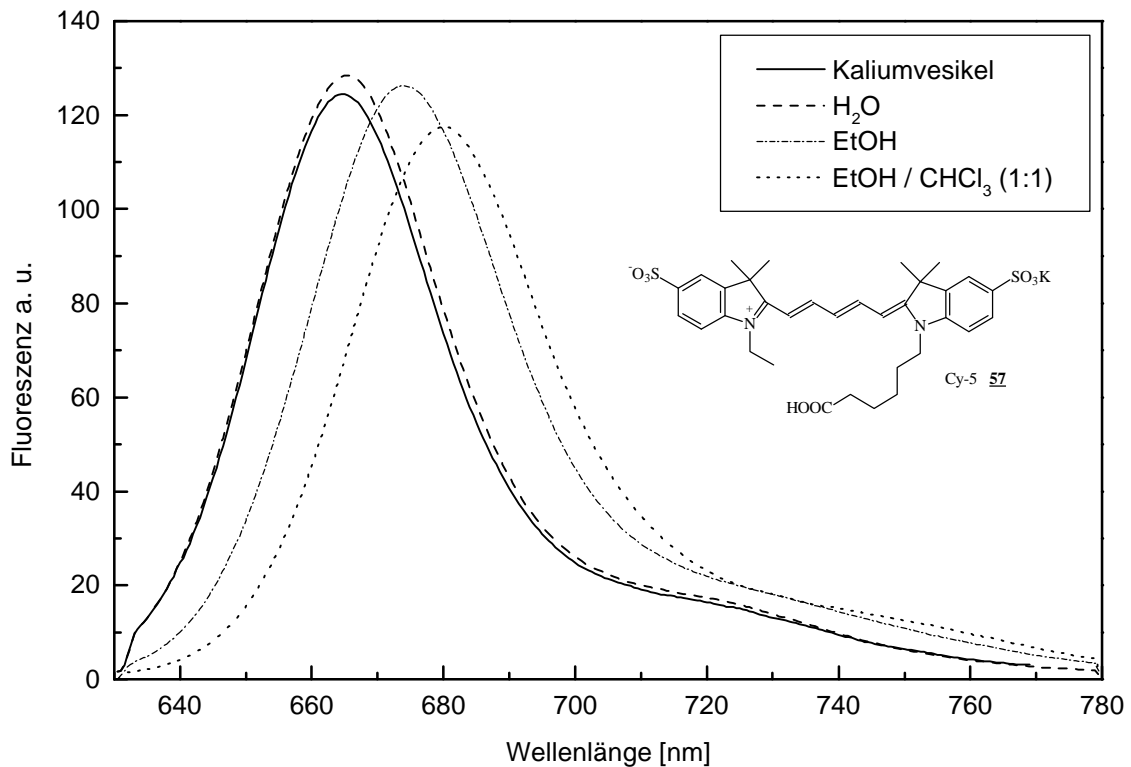


Abbildung 36: Fluoreszenzspektren von Cy-5 in verschiedenen Lösungsmitteln bei konstanter Konzentration. Anregungswellenlänge 600 nm, $T = 19\text{ }^{\circ}\text{C}$. Das Spektrum in Vesikelsuspension wurde nach 30 min Rühren aller Komponenten (2.5 ml Natrium-Pufferlösung, 30 μl Kalium-Vesikel, 20 μl ethanol. Farbstofflösung) aufgenommen.

5.1.3. Fluoreszenzeigenschaften der Bichromophore

Die Abbildung 37 zeigt als typisches Beispiel für alle dargestellten Bichromophore die Fluoreszenzspektren des Bichromophors **4b**. Maßgeblich für die Form dieser Spektren sind die Fluoreszenzeigenschaften des Styrylteilchromophors und die Absorptionseigenschaften des Cy-5, wie sie aus den vorangegangenen Spektren der Einzelchromophore abgeleitet werden können.

Angeregt wird bei 490 nm, also im Absorptionsmaximum des Styrylteilchromophors (dieser fungiert als Donor im Sinne des FRET). Wie man an den Absorptionsspektren von Cy-5 sieht (s. o.), findet hier keine direkte Anregung des Pentamethincyaninteilchromophors (Akzeptor) statt. Im Bereich um 600 nm findet man auch in CHCl_3 kaum Fluoreszenz des Donors, dagegen sieht man intensive Fluoreszenz bei 640 bis 780 nm, also im Bereich des Akzeptors. Das bedeutet, dass die Fluoreszenz

des Akzeptors auf einen effektiven FRET zurückzuführen ist und die Fluoreszenz des Donors fast ganz gelöscht wird.

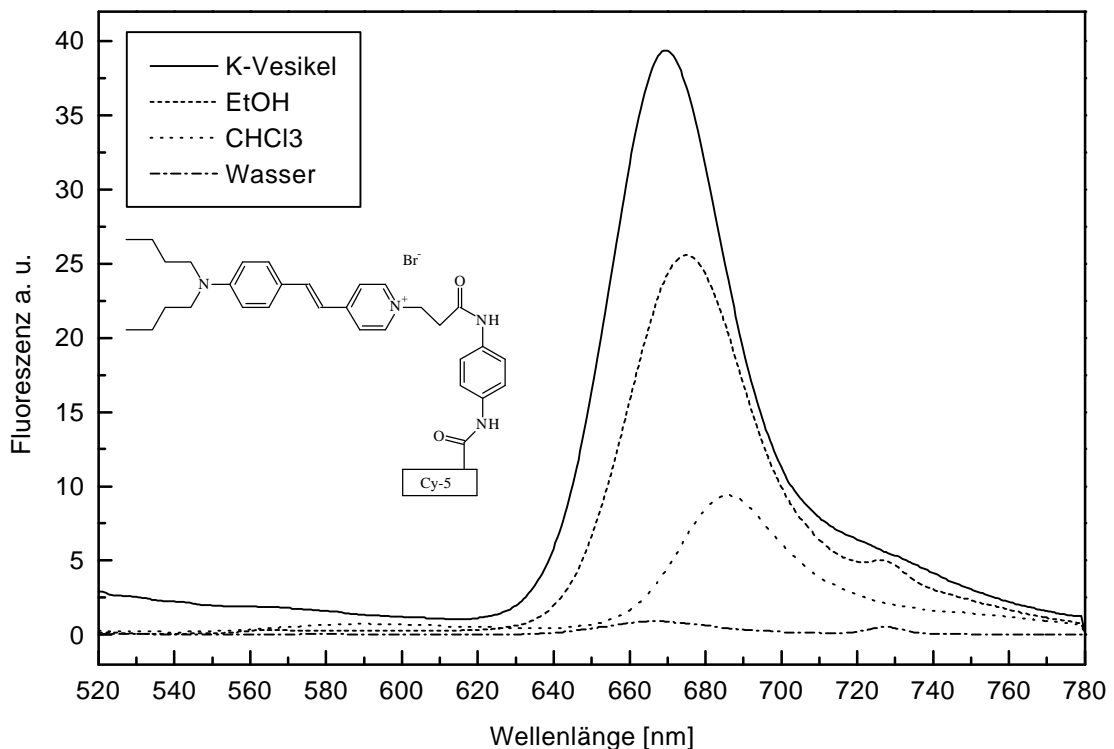


Abbildung 37: Fluoreszenzspektren in verschiedenen Lösungsmitteln bei konstanter Konzentration. Anregungswellenlänge 490 nm, $T = 19\text{ }^{\circ}\text{C}$. Das Spektrum in Vesikelsuspension wurde nach 120 min Rühren aller Komponenten (2.5 ml Natrium-Pufferlösung, 30 μl Kalium-Vesikel, 20 μl ethanol. Farbstofflösung) aufgenommen. Der Anstieg des Signals in der Vesikelmessung nach kürzeren Wellenlängen ist auf Tyndall-Streuung zurückzuführen. Die Vesikelsuspension erscheint schon mit bloßem Auge leicht trüb.

Die Lage der Emissionsbande entspricht der Lage der Bande des Cy-5 in dem jeweiligen Lösungsmittel, auch hier findet sich folglich eine schwache negative Solvatochromie.

Die Intensität der Bande spiegelt zunächst die Fluoreszenzquantenausbeute des Styrylteilchromophors in dem jeweiligen Lösungsmittel wieder. In Wasser wird die Anregungsenergie des Donors fast quantitativ schneller durch thermische Desaktivierung an die Umgebung abgegeben, als daß sich Fluoreszenz des Donors oder FRET ereignen, hier ist also kaum Fluoreszenz zu beobachten.

Bei den anderen drei Spektren befindet sich der Donor in mehr oder weniger unpolarer Umgebung und die thermische Desaktivierung wird zurückgedrängt. Es kommt zu effektivem FRET. Auf den ersten Blick würde man einen effektiveren FRET in

Chloroform als in Ethanol erwarten, analog der Fluoreszenzquantenausbeute des Styrylteilchromophors in diesen Lösungsmitteln (siehe Abbildung 34). Das offensichtlich der effektivere FRET in Ethanol und nicht in Chloroform vorliegt, kann folgendermaßen erklärt werden:

Wenn man davon ausgeht, das in beiden Lösungsmitteln der Abstand und die Orientierung der Teilchromophore gleich ist, dann hängt die Transferrate nur noch vom Brechungsindex und vom Überlappungsintegral ab. Die Geschwindigkeit des FRET ist umgekehrt proportional zur vierten Potenz des Brechungsindex des Lösungsmittels. Da Chloroform den größeren Brechungsindex hat, ist hier der FRET weniger effektiv. Wie sich aus den Spektren der Einzelchromophore ergibt, ist außerdem das Überlappungsintegral (in der Förster-Gleichung) in Chloroform geringer, weil die Fluoreszenzbande des Styrylchromophors in Chloroform gegenüber dem polareren Ethanol hypsochrom verschoben ist. Das führt ebenfalls zu geringerem FRET. Dazu kommt eine etwas geringere Fluoreszenzquantenausbeute des Akzeptors Cy-5 in unpolaren Lösungsmitteln (siehe Abbildung 36).

5.2. Abhängigkeit des FRET von der Spacerkettenlänge

5.2.1. Konzentrationsbereich

Um sicher zu stellen, daß der FRET nur in Abhängigkeit von der Spacerkettenlänge gemessen wird, muß zunächst der Konzentrationsbereich für alle Messungen festgelegt werden, da damit zu rechnen ist, daß es eine kritische Transferkonzentration gibt, ab der auch intermolekularer FRET stattfindet. Dazu werden die Fluoreszenzspektren des Bichromophors **4f** in Chloroform über einen größeren Konzentrationsbereich gemessen. Die Fluoreszenzmaxima der Teilchromophore werden gegen die Konzentration aufgetragen. Für beide Auftragungen sind im Bereich ausschließlich intramolekularen Transfers Geraden zu erwarten. Dies ist in Abbildung 38 dargestellt.

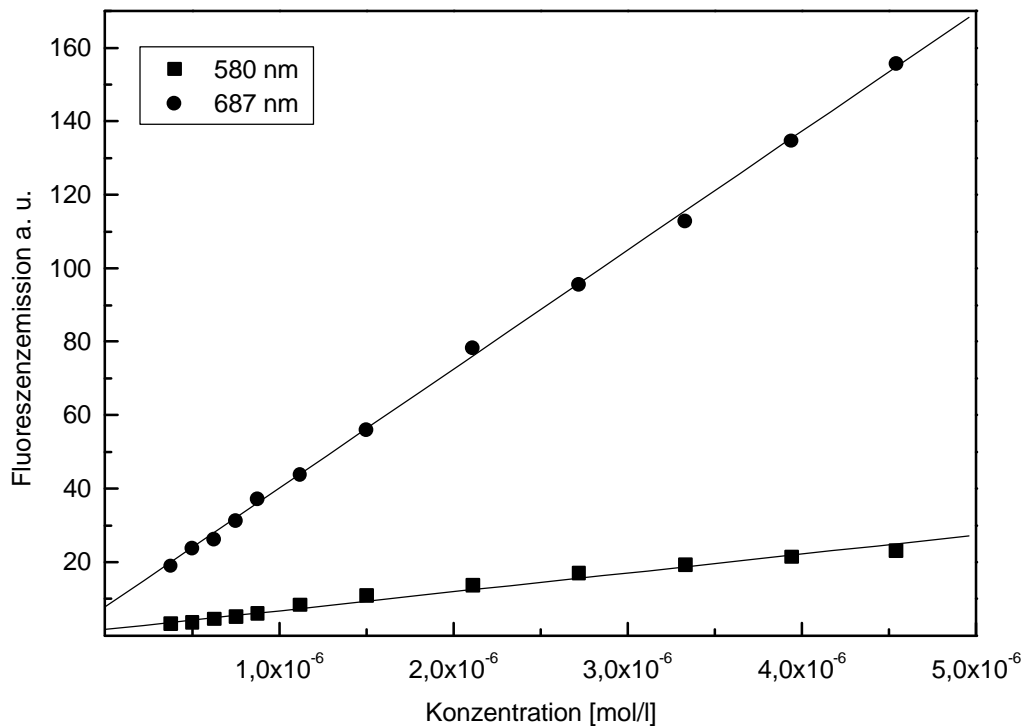


Abbildung 38: Fluoreszenzmaxima der Teilchromophore der Verbindung **4f** in Abhängigkeit von der Konzentration.

Man sieht, dass der Linearitätsbereich über ein weites Konzentrationsintervall eingehalten wird, intermolekularer Transfer also bis zu Konzentrationen von 5 μM nicht nachzuweisen ist. Um sicher zu sein, dass bei den spektroskopischen Untersuchungen tatsächlich nur der intramolekulare FRET detektiert wird, werden die Konzentrationen bei den nachfolgend beschriebenen Messungen kleiner als 1 μM gewählt.

Der FRET ist umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Abstands von Donor und Akzeptor. Mit zunehmender Spacerkettenlänge vergrößert sich dieser Abstand und die Intensität der Styrylfluoreszenz sollte anwachsen, die der Fluoreszenz des Cy-5 abfallen. Im folgenden werden die Fluoreszenzspektren der homologen Reihe der zehn Bichromophore **4a** bis **4j** unter diesem Aspekt diskutiert.

Zu allen Messungen ist zu sagen, dass sich die Verbindung **4a** ($n = 1$) oft nicht in das Gesamtbild integrieren lässt. Hier spielen vermutlich sterische Wechselwirkungen eine Rolle, die zu abweichenden Eigenschaften führen.

5.2.2. Isotrope Lösungsmittel

In Abbildung 39 sind die konzentrationsnormierten Fluoreszenzspektren der Bichromophore **4a** bis **4j** gelöst in Chloroform abgebildet. Der erwartete Zusammenhang zwischen zunehmender Spacerkettenlänge und abnehmender Intensität der Cy-5-Fluoreszenz, gleichzeitig zunehmender Styrylfluoreszenz läßt sich aus der gefundenen Reihenfolge der Spektren nicht ableiten. Es fällt auf, daß die Fluoreszenzbande des Styrylteilchromophors bei den kurzen Spacerketten mit abnehmender Länge bathochrom verschoben ist.

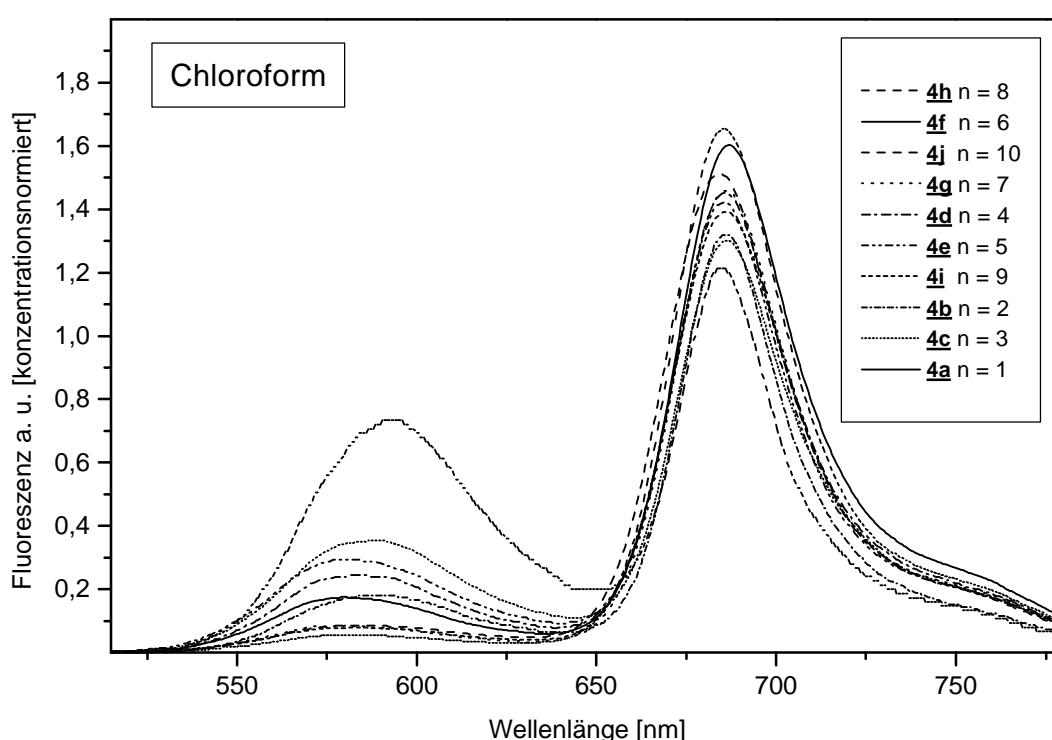


Abbildung 39: Fluoreszenzspektren der zehn Bichromophore **4a** bis **4j** in Chloroform. Die Legende gibt die Verbindungen in der Reihenfolge an, wie die Intensität des Fluoreszenzmaximums der Bande bei 686 nm abnimmt. Anregungswellenlänge 490 nm.

Um einen eventuellen Trend deutlich zu machen, kann man die Styrylfluoreszenz jeweils im Maximum auf einen konstanten Wert normieren. Ein Trend in der Fluoreszenz der Cy-5-Bande bezüglich der Kettenlänge sollte dadurch verstärkt werden. Dies ist in Abbildung 40 gezeigt. Auch hier zeigt sich keine eindeutige Abnahme der Cy-5-Fluoreszenz mit zunehmender Spacerkettenlänge. Abbildung 41 zeigt die Werte der Fluoreszenzmaxima aufgetragen gegen die Spacerkettenlänge. Es ergibt

sich kein linearer oder exponentieller Zusammenhang. Es fällt allerdings auf, daß für kürzere Spacerketten der FRET generell geringer ist, als für lange, d. h. bei kurzen Spacern sind die Teilchromophore weiter voneinander entfernt oder anders orientiert, als bei den langen.

Daß hier kein Zusammenhang sichtbar wird, hat vermutlich folgende Ursachen:

-) Der Effekt einer zusätzlichen Methylengruppe im Spacer ist bezüglich des FRET klein, da die Reihe der Verbindungen sich insgesamt in einem Bereich von R bewegt, der kleiner als der Försterradius ist und sich die Transfereffizienz deshalb nur geringfügig ändert.
-) Beide Chromophore sind geladen und mehr oder weniger polar. Im unpolaren Lösungsmittel Chloroform besteht deshalb die Möglichkeit der Bildung intramolekularer enger Ionenpaare (Styrylteilchromophor mit positiver, Cy-5 mit negativer Nettoladung), in denen der FRET sehr effektiv sein sollte. Das stimmt mit der Beobachtung überein, daß der FRET bei langen Spacern besonders effektiv ist (siehe Abbildung 41), da hier wegen höherer Flexibilität die Bildung solcher Ionenpaare begünstigt ist.
-) Der Spacer ist flexibel, d. h. jede Verbindung hat nicht einen Abstand R zwischen den Teilchromophoren, sondern eine Abstandsverteilung über ein gewisses Intervall. Diese Intervalle überlappen um so mehr, je länger der Spacer ist.
-) Bei den Verbindungen **4a**, **4b** und **4c** ($n = 1, 2, 3$) hängt der FRET nicht nur vom Abstand ab, sondern zusätzlich vom Überlappungsintegral, da die Fluoreszenzbanden des Styrylteilchromophors zu kürzerem Spacer leicht bathochrom verschoben sind ($\lambda_{\max} = 593, 589, 586$ nm, alle anderen 582 nm), was zu größerer Überlappung führt.

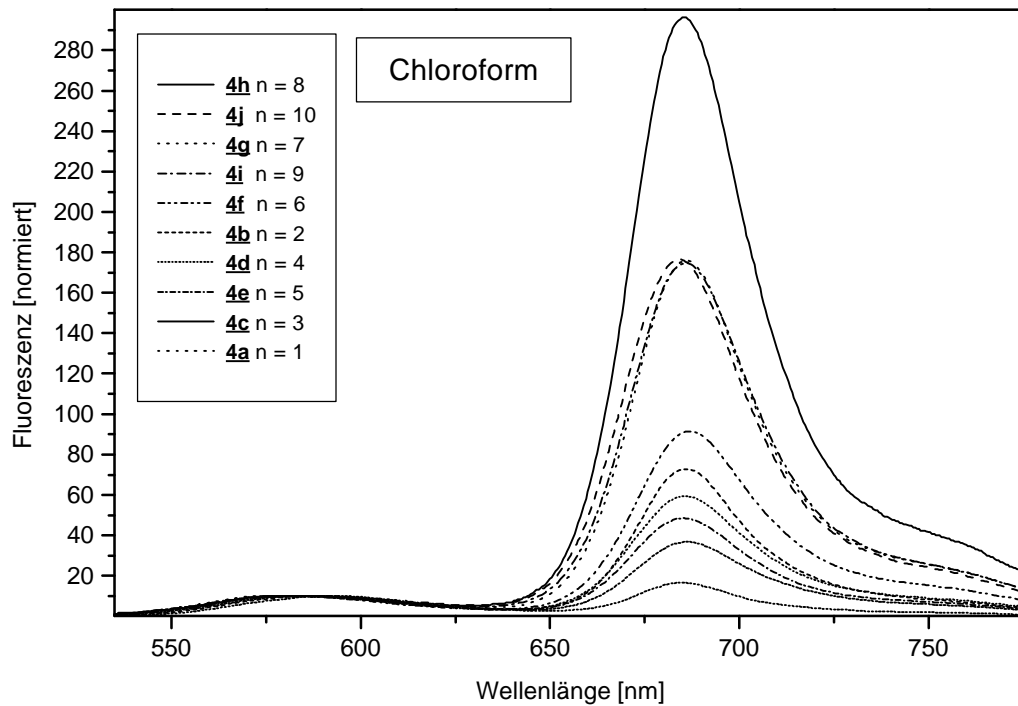


Abbildung 40: Fluoreszenzspektren der zehnjährigen Bichromophore **4a** bis **4j** in Chloroform. Die Legende gibt die Verbindungen in der Reihenfolge an, wie die Intensität des Fluoreszenzmaximums der Bande bei 686 nm abnimmt. Alle Spektren sind im Maximum der jeweiligen Styrylemissionsbande auf zehn normiert. Anregungswellenlänge 490 nm.

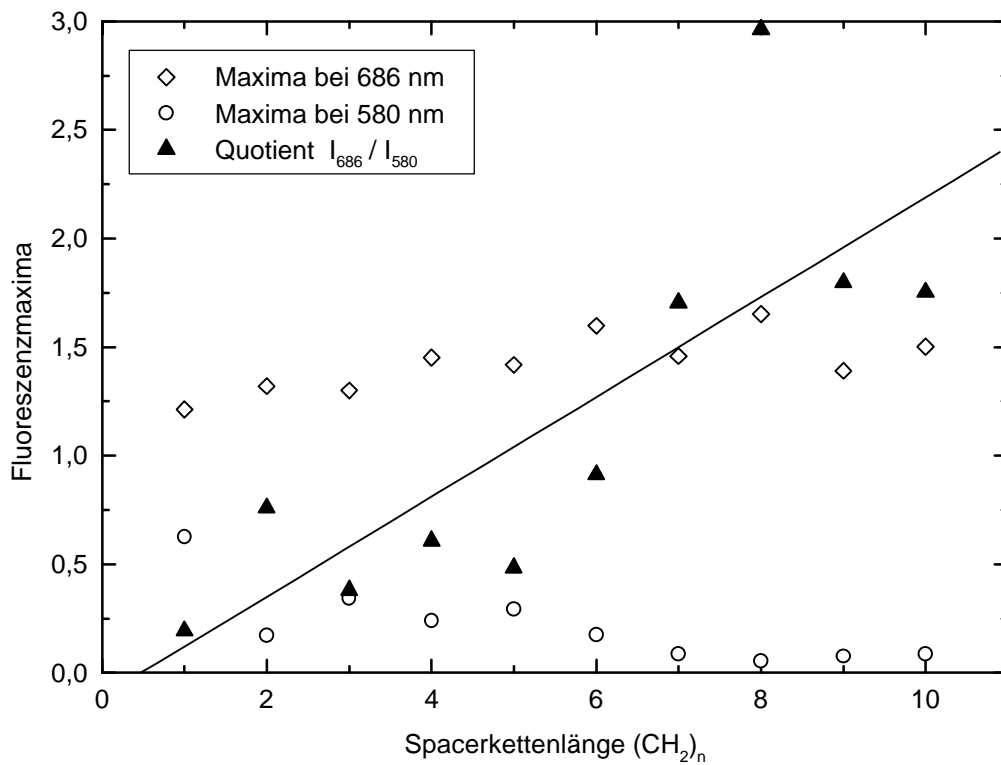


Abbildung 41: Fluoreszenzmaxima der Teilchromophore in Chloroform in Abhängigkeit von der Spacerkettenlänge.

In einem polarerem Lösungsmittel wie Ethanol sollte die Möglichkeit der Ionenpaarbildung zurückgedrängt sein, da beide Teilchromophore vollständig solvatisiert sein sollten. In Abbildung 42 sind die Fluoreszenzspektren der Bichromophore **4a** bis **4j** gelöst in Ethanol abgebildet. Auch hier findet sich kein direkter Zusammenhang zwischen der Spacerkettenlänge und dem FRET. Man sieht, daß der Transfer sehr effektiv ist, die Styrylfluoreszenz ist fast ganz gequencht. Außer bei den Verbindungen **4a** ($n = 1$) und **4b** ($n = 2$) scheint die Effektivität des FRET von gleicher Größenordnung zu sein. Die Unterschiede sind geringer als in Chloroform, hier ist vermutlich das wesentlich größere Überlappungsintegral verantwortlich, was zu noch effektiverem Transfer führt (siehe auch Kapitel 5.3.).

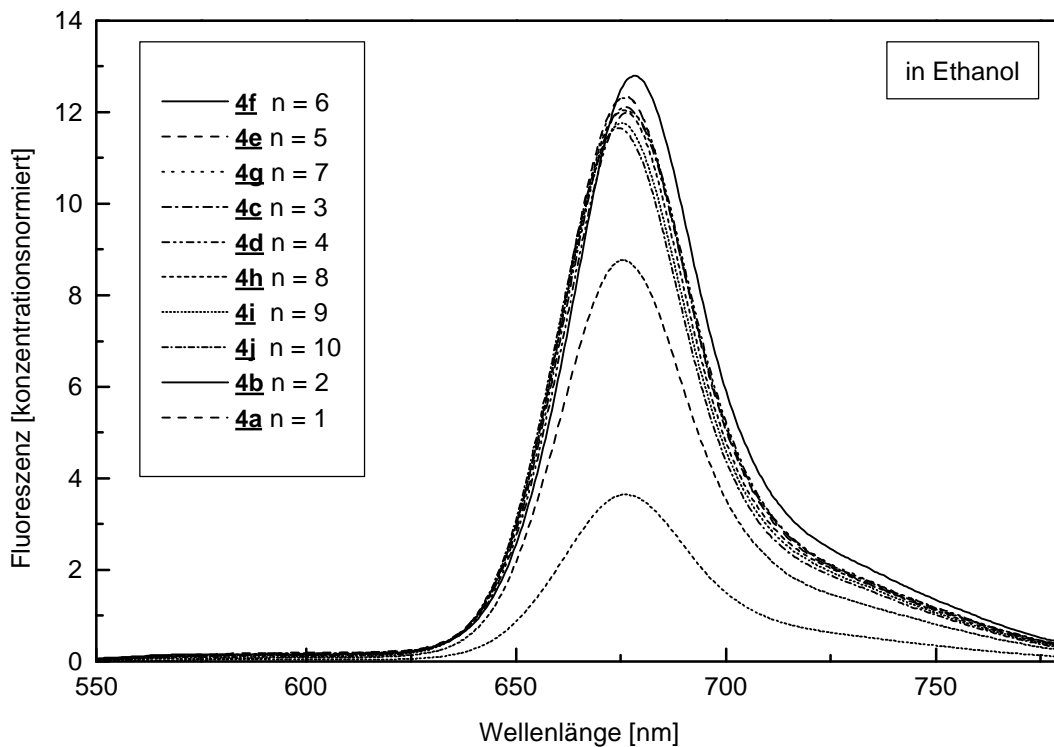


Abbildung 42: Fluoreszenzspektren der zehn Bichromophore **4a** bis **4j** in Ethanol. Die Legende gibt die Verbindungen in der Reihenfolge an, wie die Intensität des Fluoreszenzmaximums der Bande bei 676 nm abnimmt.

5.2.3. Kalium-Vesikelsuspension

In Abbildung 43 sind die Fluoreszenzspektren der Bichromophore **4a** bis **4j** eingelagert in Kalium-Vesikel in Natriumpufferlösung abgebildet. Die Daten stammen aus

Messungen mit in Kalium-Vesikeln eingelagerten Bichromophoren (30 μ l Vesikelsuspension in 2.5 ml Natriumpufferlösung und 10 μ l Farbstofflösung).

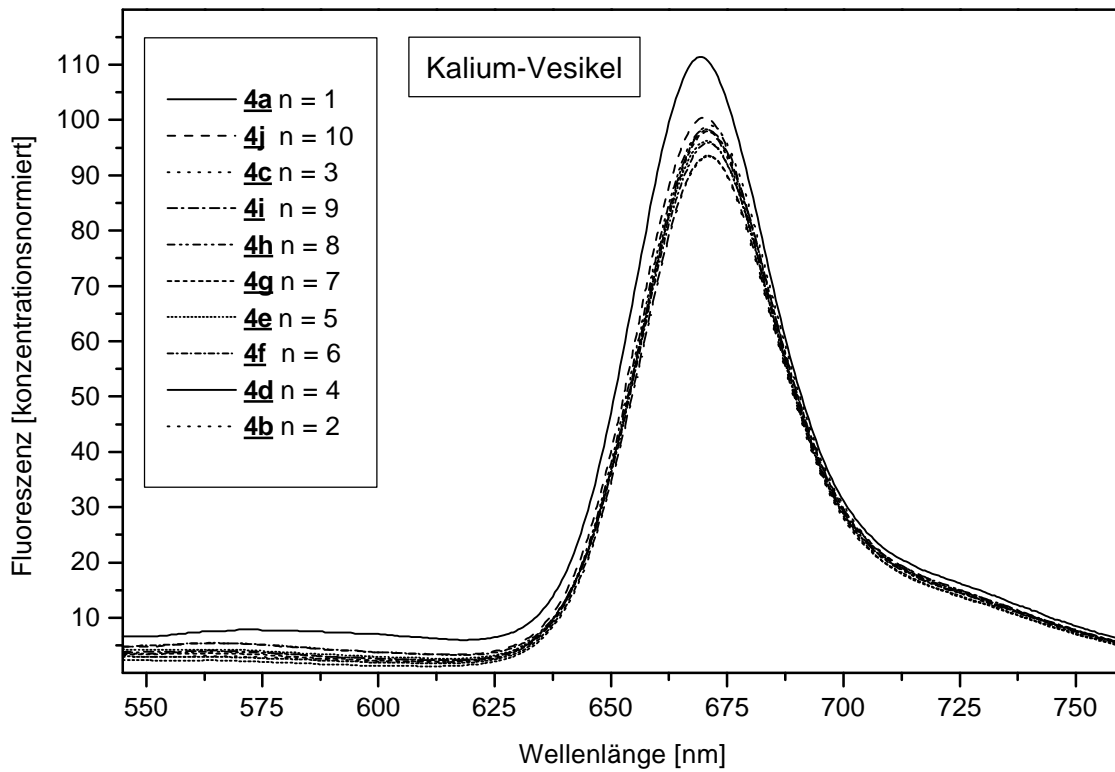


Abbildung 43: Konzentrationsnormierte Fluoreszenzspektren der zehn Bichromophore **4a** bis **4j** in Chloroform. Die Legende gibt die Verbindungen in der Reihenfolge an, wie die Intensität des Fluoreszenzmaximums der Bande bei 671 nm abnimmt. Anregungswellenlänge 490 nm.

Im Rahmen der Meßgenauigkeit der Fluoreszenz sind die Spektren identisch, d. h. die Unterschiede sind noch geringer, als in Ethanol. Der FRET ist also unabhängig von der Kettenlänge. Im Vesikelsystem liegt die Quantenausbeute des eingelagerten Styrylteilchromophores um den Faktor vier höher als in Ethanol ($\phi_{\text{Vesikel}} = 0.2$, $\phi_{\text{Ethanol}} = 0.05$). Fluoreszenz des Styrylteilchromophors wird nicht detektiert, sie wird quantitativ durch den Akzeptor Cy-5 gequenchet. Es liegt die Vermutung nahe, daß der Akzeptor fest mit der Membranoberfläche assoziiert ist, z. B. aufgrund von coulombschen Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Cholinendgruppen der Lipidmoleküle und den negativ geladenen Sulfonatogruppen der Cy-5-Moleküle und/oder durch spezifische Adsorption auf der Membranoberfläche. Damit ist der Abstand für alle zehn Verbindungen mehr oder weniger gleich. Gestützt wird diese

Theorie durch die gemessenen relativen Transferraten und deren Abhängigkeit von der Anzahl an Methylengruppen im Spacer (siehe weiter unten Abschnitt 5.5.).

5.3. Berechnung des Förster-Radius

Der Försterradius R_0 entspricht dem Abstand von Donor und Akzeptor, bei dem FRET und anderweitige Desaktivierung gleich wahrscheinlich sind. Die Transferrate beträgt bei R_0 also 50 %. R_0 ist aus spektroskopischen Daten leicht zu bestimmen^[68]. Man benötigt das Überlappungsintegral von Fluoreszenzemissionsspektrum des Donors (in unbestimmten Einheiten) und Absorptionsspektrum des Akzeptors (mol. dekad. Extinktionskoeffizient, gegen die Wellenlänge (in nm) aufgetragen). Das Überlappungsintegral J berechnet sich nach Gl. 2:

Gl. 2:

$$J = \frac{\int F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int F_D(\lambda) d\lambda} \quad [M^{-1} cm^{-1} nm^4]$$

F_D = wahre Fluoreszenz des Donors (in unbestimmten Einheiten), ϵ_A = molarer dekadischer Absorptionskoeffizient des Akzeptors, $d\lambda$ = Wellenlängenintervall, in dem beide Spektren endliche Werte haben.

Zur Berechnung von R_0 benötigt man weiterhin den Orientierungsfaktor κ , die Fluoreszenzquantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors im entsprechenden Medium und den Brechungsindex des Lösungsmittels, durch das der FRET erfolgt. Der Förster-Radius ergibt sich dann aus Gl. 3:

Gl. 3:

$$R_0^6 = 8.785 \cdot 10^{-5} \frac{\kappa^2 f_D J}{n^4} \quad [\text{Å}]$$

κ^2 = Orientierungsfaktor der Übergangsmomente der Einzelchromophore, f_D = Fluoreszenzquantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors, n = Brechungsindex.

a) **2b** in Kalium-Vesikel eingelagert, Cy-5 in Pufferlösung:

Die benötigten Daten werden der Literatur entnommen: κ^2 wird gleich $2/3$ gesetzt, da eine Bestimmung des tatsächlichen Orientierungsfaktors im Rahmen dieser Arbeit unmöglich ist, d. h. es wird von schneller Rotation beider Chromophore im Verhältnis zur Lebensdauer des angeregten Donors ausgegangen. Für Verbindung **2b** findet sich in der Literatur ein Wert von $\phi_D = 0.2$ für in Lipidvesikel eingelagerten Farbstoff^[51]. Für den Brechungsindex wird näherungsweise der Brechungsindex von Wasser mit $n_D^{20} = 1.33296$ gesetzt^[104]. Zur Berechnung des Überlappungsintegrals J werden das korrigierte Fluoreszenzemissionsspektrum der Verbindung **2b** in Kalium-Vesikelsuspension und das Absorptionsspektrum von Cy-5 in Wasser benutzt. Es ergibt sich ein Wert von $J = 6.575 \cdot 10^{14} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ nm}^4$. Wenn man diese Werte in Gl. 3 einsetzt, erhält man für den Förster-Radius einen Wert von $R_0 = 37 \text{ \AA}$.

b) In Ethanol:

κ^2 wird wieder gleich $2/3$ gesetzt. Für Verbindung **2b** findet sich in der Literatur ein Wert von $\phi_D = 0.05$ für ethanolische Lösung^[51]. Der Brechungsindex von Ethanol beträgt $n_D^{20} = 1.36155$ ^[104]. Zur Berechnung des Überlappungsintegrals J werden das korrigierte Fluoreszenzemissionsspektrum der Verbindung **2b** in Ethanol und das Absorptionsspektrum von Cy-5 in Ethanol benutzt. Es ergibt sich ein Wert von $J = 2.469 \cdot 10^{16} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ nm}^4$. Wenn man diese Werte in Gl. 3 einsetzt, erhält man für den Förster-Radius einen Wert von $R_0 = 53 \text{ \AA}$.

Beide Werte liegen im Bereich, wie er auch für bekannte Donor/Akzeptorsysteme in der Literatur^[77] angegeben wird. Der größere Wert für die ethanolische Lösung hängt mit der besseren Überlappung von Emissionsspektrum der Verbindung **2b** und Absorptionsspektrum von Cy-5 zusammen. Daraus resultiert ein um zwei Größenordnungen höheres Überlappungsintegral. Die schwache negative Solvatochromie von Cy-5 fällt dabei nicht ins Gewicht.

Eine weitere Möglichkeit, R_0 zu bestimmen, ergibt sich durch die Bestimmung der kritischen Transferkonzentration c_0 . Anschaulich entspricht diese Konzentration sta-

tistisch einem Akzeptormolekül in einem Kugelvolumen um den Donor mit dem Radius R_0 . Der Zusammenhang zwischen R_0 und c_0 ergibt sich aus :

Gl. 4:

$$R_0^3 = \frac{3000}{4p \cdot N \cdot c_0}$$

c_0 = kritische Transferkonzentration (mol/l), N = Avogadrozahl, Förster-Radius R_0 in cm.

Man kann c_0 über einen Stern-Volmer-Plot bestimmen, indem man die Löschung der Donorfluoreszenz in Abhängigkeit von der Akzeptorkonzentration mißt. Es gilt folgende Gleichung:

Gl. 5:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K \cdot [A] \quad \text{mit } K = k \cdot \tau$$

F_0 und F = Fluoreszenzintensitäten des Donors ohne und mit Akzeptorzusatz, K = dynamische Transferkonstante, $[A]$ = Akzeptorkonzentration, k = Geschwindigkeitskonstante des FRET, τ = scheinbare Fluoreszenzlebensdauer des Donors.

Man legt den Donor in einer definierten Konzentration vor und gibt Akzeptor in kleinen Portionen hinzu. Beobachtet wird die Abnahme der Donorfluoreszenz. Die Auftragung von $(F_0/F - 1)$ gegen $[A]$ ergibt eine Gerade mit der Steigung K . Wenn man den gefundenen Wert für K in Gl. 5 einsetzt, erhält man mit der Nebenbedingung, daß bei $[A] = c_0$ (d. h. 50 %ige Löschung der Fluoreszenz) der Ausdruck F_0/F gerade 2 beträgt, den Wert für c_0 .

In Abbildung 44 ist der Stern-Volmer-Plot dieser Messung im Lösungsmittel Ethanol dargestellt. Man erhält für die Steigung einen Wert von $K = 314107 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$. Eingesetzt in Gl. 5 ergibt sich für die kritische Transferkonzentration $c_0 = 3.18 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Setzt man diesen Wert in Gl. 4 ein, so erhält man für den Förster-Radius den Wert $R_0 = 499 \text{ \AA}$. Dieser Wert liegt eine Größenordnung über dem erwarteten. Diese zu hohen Werte wurden auch schon von Birnes^[78] gefunden (gleiche Meßapparatur), der am literaturbekannten System 2-Aminoanthracen/Bengalrosa einen Wert von 280 \AA fand. Der Literaturwert liegt bei 42 \AA . Die hohen Abweichungen sind also methodisch bedingt.

In unpolareneren Lösungsmitteln erwartet man aufgrund der Solvatochromie des Styrylchromophors (hypsochrome Verschiebung der Fluoreszenzbande) ein geringeres Überlappungsintegral und damit einen kleineren Förster-Radius. Um dies zu überprüfen, wurde eine analoge Titration im Lösungsmittel Chloroform/Ethanol (2:1 v/v) durchgeführt. In reinem Chloroform konnte aufgrund der Unlöslichkeit von Cy-5 nicht gearbeitet werden. Abbildung 45 zeigt den entsprechenden Stern-Volmer-Plot. Die leichte Abweichung von der Linearität wird durch die Änderung des Lösungsmittelverhältnisses von 2:1 während der Titration hervorgerufen, da mit ethanolischer Cy-5-Lösung gearbeitet wurde. Der Effekt ist aber vernachlässigbar.

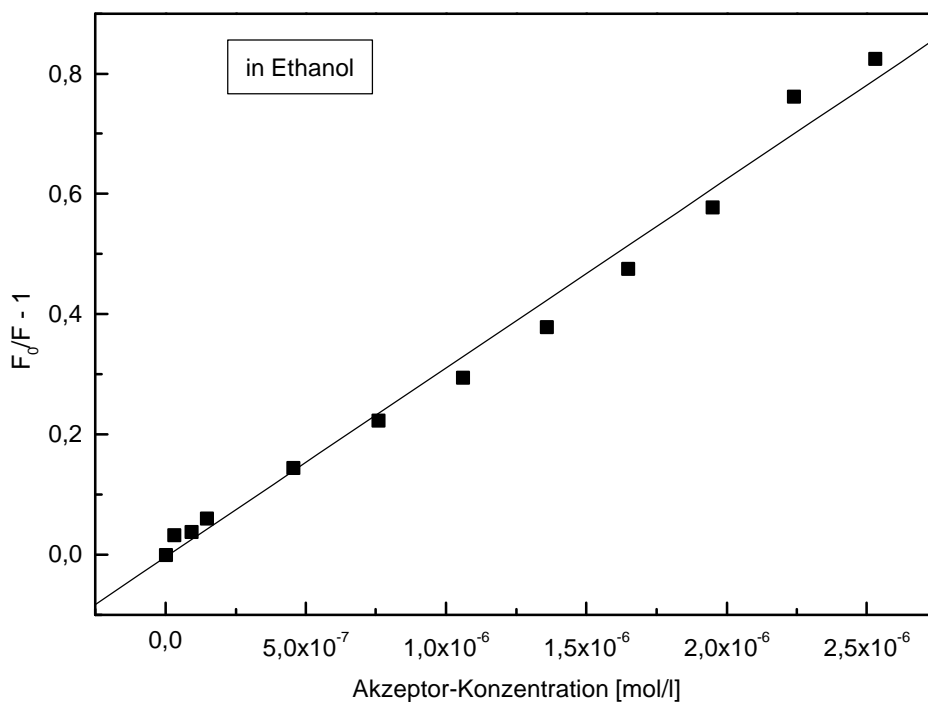


Abbildung 44: Stern-Volmer-Plot der Titration von **2b** mit Cy-5.

Mit der hier ermittelten Steigung von $250963 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}$ ergibt sich für die kritische Transferkonzentration in $\text{CHCl}_3 / \text{EtOH}$ (2:1) $c_0 = 3,99 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Damit berechnet sich der Försterradius hier zu $R_0 = 463 \text{ \AA}$. Dieses Ergebnis entspricht tatsächlich der erwarteten Abnahme von R_0 gegenüber den Verhältnissen in Ethanol.

Interessant wäre der Vergleich dieser Daten mit den Ergebnissen in Vesikelsuspension, d. h. in Vesikel eingelagertes **2b** in einer Titration mit Cy-5. Hier liegt jedoch keine homogene Lösung mehr vor. Der Styrylfarbstoff ist in der Membran der Vesikel fixiert und nicht homogen über das gesamte Volumen verteilt. Bei Zugabe von

Cy-5, das sich im Gegensatz dazu homogen in der wässrigen Lösung verteilt, wird somit nur ein Bruchteil der Cy-5-Moleküle als Quencher aktiv, die effektive Konzentration wäre wesentlich geringer als die tatsächliche (bekannte). Hier macht also ein Stern-Volmer-Plot keinen Sinn.

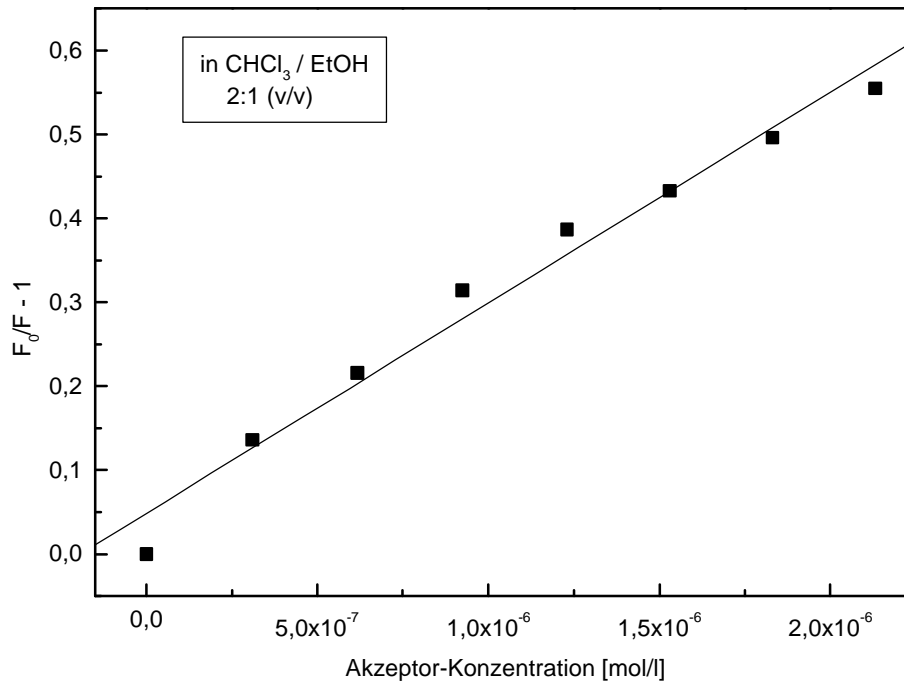


Abbildung 45: Stern-Volmer-Plot der Titration von **2b** mit Cy-5.

5.4. Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten

Die Lumineszenzquantenausbeute eines Farbstoffs stellt den Bruchteil angeregter Moleküle dar, der direkt nach Anregung ein Photon emittiert (Phosphoreszenz Φ_p und Fluoreszenz Φ_f). In der Regel liegt sie zwischen 0 und 1. Sie stellt eine wichtige photophysikalische Größe zur Charakterisierung der Lumineszenzeigenschaften eines Farbstoffs dar. In vielen Fällen ist sie gleich dem Quotienten aus emittierten und absorbierten Photonen.

Gl. 6:

$$\Phi = \frac{\text{Zahl emittierter Photonen}}{\text{Zahl absorbierter Photonen}} = \Phi_f + \Phi_p$$

Die absolute Bestimmung von Fluoreszenzquantenausbeuten stellt hohe Ansprüche an die apparative Ausstattung und ist aufwendig und zeitraubend. Es gibt aber relative Meßmethoden, bei denen eine Standardsubstanz bekannter Fluoreszenzquantenausbeute mit der zu messenden Substanz unter analogen Meßbedingungen verglichen wird. Bei Demas und Crosby^[101] sind verschiedene Methoden zur Bestimmung der Quantenausbeute beschrieben. Sehr einfach ist die Messung mit optisch verdünnten Lösungen, wo die Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes gegeben ist.

Gl. 7:

$$A = \log \frac{I}{I_0} = \epsilon \cdot c \cdot d$$

A = Absorbanz, I_0 = Intensität des einfallenden Lichtstrahls, I = Intensität des austretenden Lichtstrahls, ϵ = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient, c = Konzentration der Probe (mol/l), d = Schichtdicke (cm).

Mit der folgenden Formel läßt sich nun die Quantenausbeute der unbekannt Substanz bestimmen:

Gl. 8:

$$\Phi_x = \Phi_r \cdot \frac{A_r(I_r)}{A_x(I_x)} \cdot \frac{I_r(I_r)}{I_x(I_x)} \cdot \frac{n_x^2}{n_r^2} \cdot \frac{D_x}{D_r}$$

Φ = Quantenausbeute, A = Absorbanz bei der Anregungswellenlänge, I = Intensität des Anregungslichts, n = Brechungsindex, D = integrale Fluoreszenz des korrigierten Emissionsspektrums, r = Referenzsubstanz, x = unbekannte Substanz.

Man nimmt also für Referenzsubstanz (Index r) und zu untersuchende Substanz (Index x) ein Absorptionsspektrum und ein korrigiertes Fluoreszenzemissionsspektrum auf und bestimmt jeweils die Absorbanz A der Anregungswellenlänge und das Integral D der Fluoreszenzemission. Mit der bekannten Quantenausbeute Φ_r der Referenzsubstanz läßt sich die unbekannte Größe der Substanz x berechnen. Zwei weitere Korrekturterme ergeben sich, wenn für unbekannte und Referenzsubstanz in unter-

schiedlichen Lösungsmitteln gemessen wird und wenn bei verschiedenen Wellenlängen angeregt wird. Im ersten Fall gehen die Quadrate der Brechungsindizes n der Lösungsmittel ein, im zweiten die Intensitäten I der Anregungswellenlängen. Beides kann man umgehen, indem man eine Referenzsubstanz wählt, die im gleichen Lösungsmittel wie die unbekannte löslich ist und eine ähnliche Lage der Absorptionsbande hat. Dann können beide Substanzen bei gleicher Wellenlänge angeregt und die Intensitäten näherungsweise gleich gesetzt werden.

Folgende Voraussetzungen müssen gegeben sein, damit bei dieser relativen Methode brauchbare Ergebnisse erhalten werden:

- Die Absorbanz sollte einen Wert von 0.05 nicht überschreiten.
- Reabsorption und Reemission sollten vernachlässigbar sein.
- Gleiche Geometrie der Messanordnung, gleiche Reflexionsverluste, gleiche Streulichtverhältnisse für beide Substanzen.
- Es gilt die Annahme, daß die integrierte Fluoreszenzintensität dem absorbierten Lichtanteil proportional ist.

Wenn man die Fluoreszenzquantenausbeuten von in Vesikeln eingelagerten Bichromophoren bestimmen will, hat man das Problem einer großen Meßunsicherheit durch wellenlängenabhängiges Streulicht. Die Vesikelsuspensionen erscheinen schon mit bloßem Auge leicht trüb und die Streulichtsignale liegen bei Absorptions- und Emissionsspektren teilweise in der Größenordnung der eigentlichen Meßsignale. Da der Untergrund bei solchen Messungen von der Wellenlänge abhängig ist, ist er nicht einfach zu eliminieren. Wie von Litterscheid^[102] gezeigt wurde, lassen sich die Quantenausbeuten von Bichromophoren jedoch durch das im folgenden beschriebene Verfahren bestimmen. Im wesentlichen ersetzt man die Einmalmessung der Absorbanz und der integralen Fluoreszenz durch eine Größe, die aus mehreren konzentrationsabhängigen Messungen besteht und so die Möglichkeit zur Eliminierung der Streustrahlung gegeben ist:

Man legt eine Vesikelsuspension in Pufferlösung vor und gibt mehrmals Farbstofflösung hinzu. Sobald konstante Fluoreszenzsignale, also nach vollständiger Einlagerung, erhalten werden, nimmt man jeweils die Fluoreszenzspektren bei 490 nm und bei 600 nm Anregungswellenlänge und das Absorptionsspektrum auf. Aus den korri-

gierten Fluoreszenzspektren ermittelt man die integralen Fluoreszenzen und trägt diese gegen die Farbstoffzugabe auf. Die Steigung, die man durch lineare Interpolation erhält, ist der integralen Fluoreszenz proportional. Genauso verfährt man mit den Absorbanzen bei den entsprechenden Fluoreszenzanregungswellenlängen. Auch hier ergeben sich Steigungen, die der Absorbanz proportional sind und die durch einen linearen Zusammenhang zwischen Absorbanz und Farbstoffzugabe (Konzentration) die Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes beweisen. Da es sich um eine Relativmessung handelt, kann gegen Luft als Standard gemessen werden. Die erhaltenen Geraden der Auftragung Absorbanz gegen Farbstoffzugabe sind dann parallel verschoben, haben aber die gleiche Steigung.

Parameter der Messungen:

Vorlage:	30 μ l Kaliumvesikel-Suspension in 2.5 ml Natriumpuffer
Zugabe:	dreimal 10 μ l ethanolische Farbstofflösung
Anregungswellenlängen:	490 nm und 600 nm
Absorbanz:	gemessen bei den gleichen Wellenlängen

Als Referenzsubstanzen werden für den Styrylteilchromophor die Verbindung **2b** und für den Cy-5-Teilchromophor **DTDC Iodid** verwendet.

2b Fluoreszenzquantenausbeute (in Vesikeln)	$\Phi = 0.20^{[51]}$
DTDC Iodid Fluoreszenzquantenausbeute (in Methanol, 20°C)	$\Phi = 0.32^{[103]}$
Brechungsindex H ₂ O (Näherung für Vesikelsuspension)	$n_D^{20} = 1.33296^{[104]}$
Brechungsindex MeOH	$n_D^{20} = 1.32855^{[104]}$

Als Beispiel ergeben sich für den Bichromophor **4d** folgende Messungen:

Die Abbildung 46 zeigt die korrigierten Fluoreszenzspektren von **4d** bei drei verschiedenen Konzentrationen. Aus den Spektren wird die integrale Fluoreszenz bestimmt. Relevant ist nur der (abgebildete) Bereich der Cy-5-Emission. Abbildung 47 zeigt die analogen Messungen bei 600 nm Anregung.

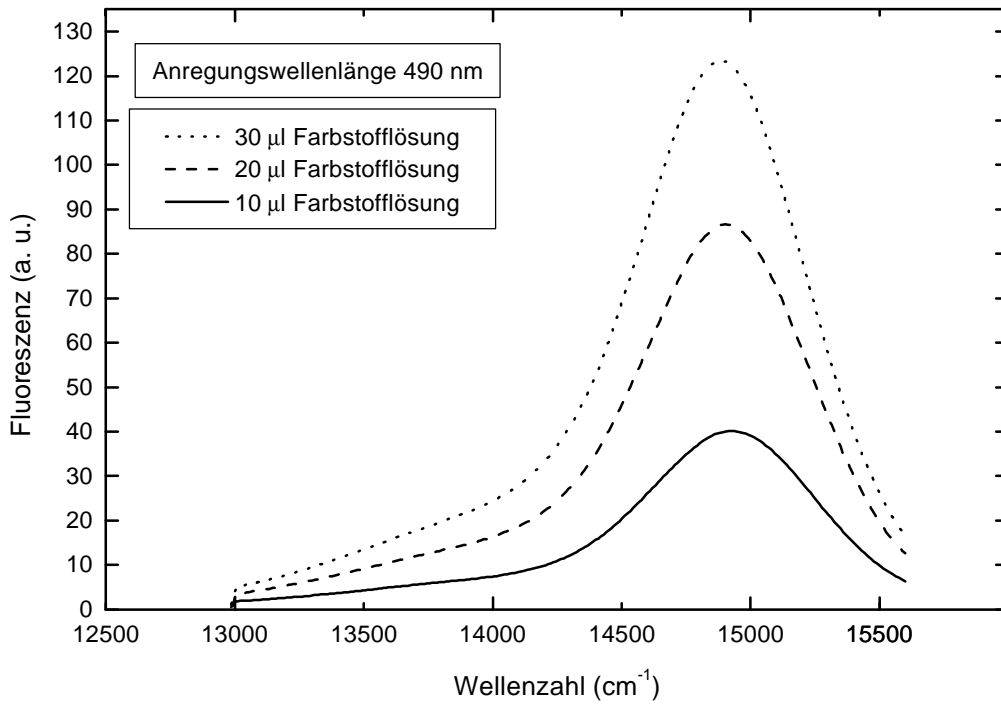


Abbildung 46: Fluoreszenzemissionsspektren von **4d** bei 490 nm Anregung.

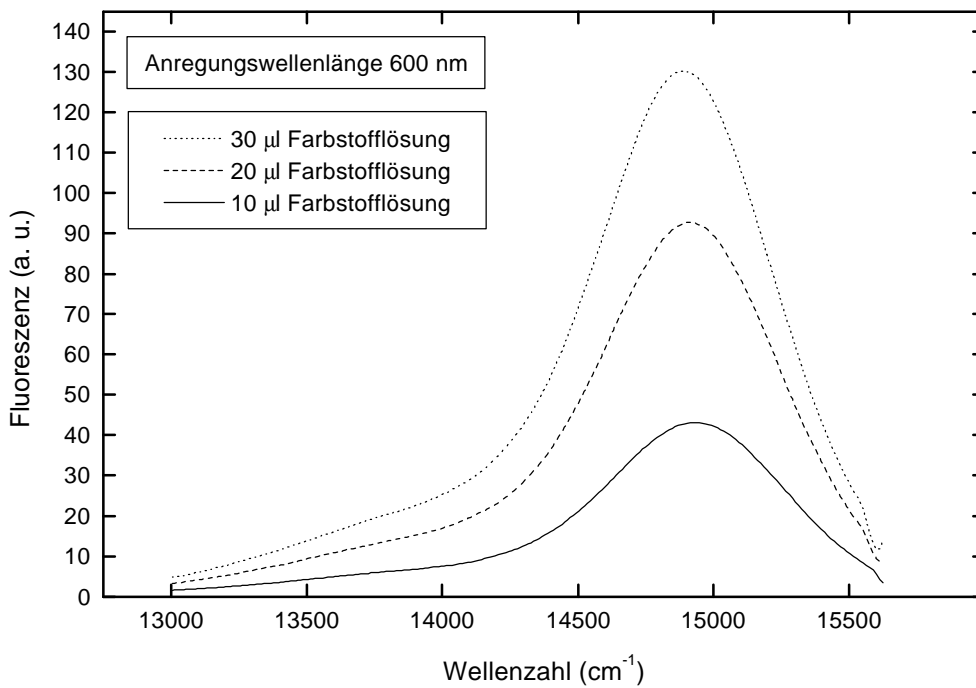


Abbildung 47: Fluoreszenzemissionsspektren von **4d** bei 600 nm Anregung.

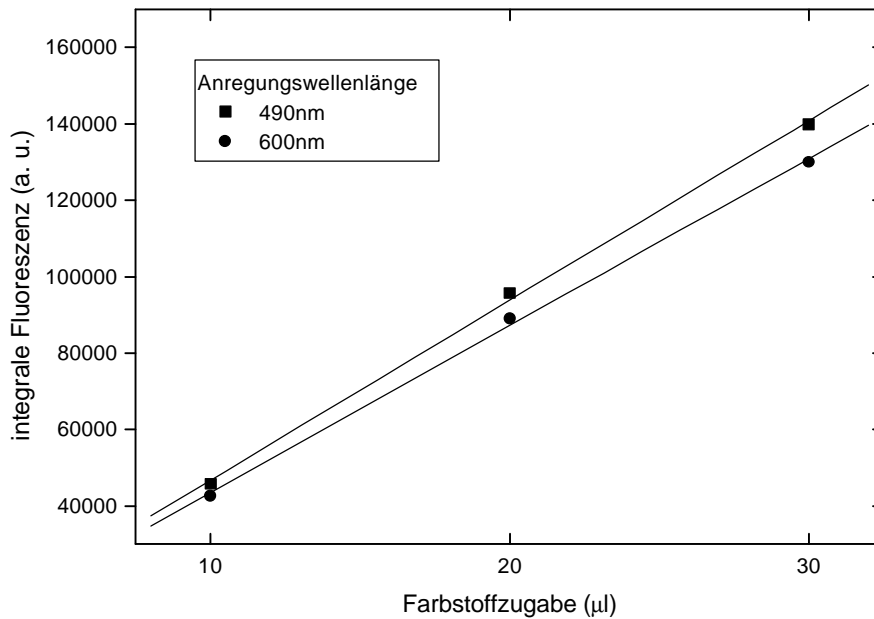


Abbildung 48: integrale Fluoreszenz von **4b** in Abhängigkeit von der Farbstoffzugabe.

Abbildung 48 zeigt die Linearität der integralen Fluoreszenz. Die Steigungen sind der integralen Fluoreszenz proportional.

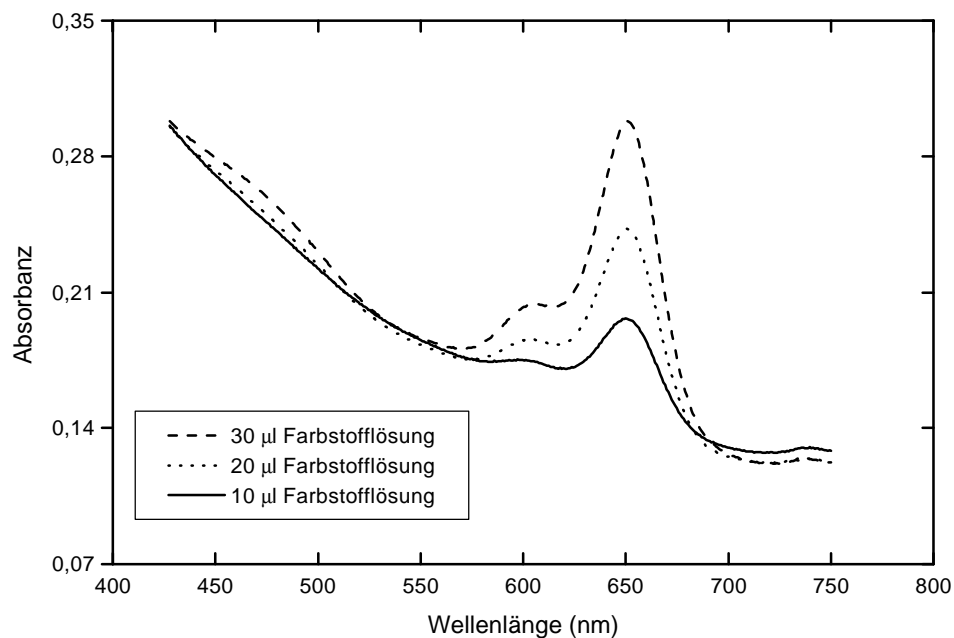


Abbildung 49: Absorptionsspektren von **4d** bei den drei verschiedenen Konzentrationen. Man sieht deutlich den Untergrund, der durch Streulicht hervorgerufen wurde, besonders im Bereich der Styrylabsorption.

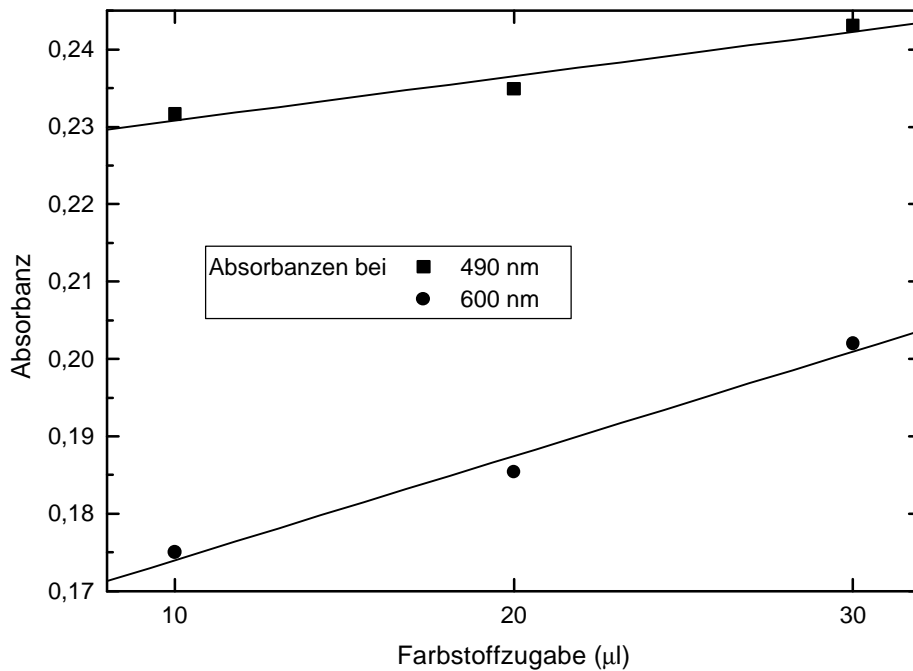


Abbildung 50: Absorbanz in Abhängigkeit von der Farbstoffzugabe.

Aus den Absorptionsspektren (gegen Luft gemessen, Abbildung 49) ergeben sich die Absorbanzen bei 490 und 600 nm. Der nach kürzeren Wellenlängen stark ansteigende Untergrund resultiert aus der mit zunehmender Frequenz wachsenden Tyndall-Streuung an den Vesikeln. Messung bei geringeren Vesikelkonzentrationen ist nicht möglich, da dann keine vollständige Einlagerung der Farbstoffe mehr gewährleistet ist.

Die Auftragung der Absorbanzen gegen die Farbstoffzugabe liefert ebenfalls den erwarteten linearen Zusammenhang (Abbildung 50).

Die beschriebene Prozedur wird für alle Bichromophore sowie die beiden Referenzsubstanzen analog durchgeführt. Dabei wird **2b** ebenfalls in Kalium-Vesikel eingelagert und **DTDC Iodid** wird in Methanol gemessen. Hier ergibt sich dann eine zusätzliche Korrektur für die Brechungsindices der unterschiedlichen Lösungsmittel.

Die Fluoreszenzquantenausbeuten bei 490 und 600 nm Anregung ergeben sich dann analog Gl. 9 bzw. Gl. 10 mit den Daten für die Referenzsubstanzen und den Literaturdaten aus folgenden Formeln:

Gl. 9:

$$\Phi_{490} = 0.2 \cdot \frac{0.00192}{m(A)_{490}} \cdot \frac{m(D)_{490}}{6133}$$

Gl. 10:

$$\Phi_{600} = 0.32 \cdot \frac{0.00794}{m(A)_{600}} \cdot \frac{m(D)_{600}}{16209} \cdot \frac{n^2(H_2O)}{n^2(MeOH)}$$

m(A) = Steigung der Absorbanzen, m(D) = Steigung der integralen Fluoreszenzen, jeweils bei 490 und 600 nm, n = Brechungsindex

Tabelle 7: Relative Fluoreszenzquantenausbeuten der Bichromophore

Verbindung	Anzahl (CH ₂) _n	m(A) ₄₉₀	m(A) ₆₀₀	m(D) ₄₉₀	m(D) ₆₀₀	Φ ₄₉₀	Φ ₆₀₀
<u>4a</u>	n = 1	4.24·10 ⁻⁴	8.72·10 ⁻⁴	3574	3167	0.47	0.57
<u>4b</u>	n = 2	4.94·10 ⁻⁴	1.90·10 ⁻³	4899	5293	0.67	0.44
<u>4c</u>	n = 3	1.26·10 ⁻³	2.33·10 ⁻³	4957	4980	0.25	0.34
<u>4d</u>	n = 4	5.74·10 ⁻⁴	1.35·10 ⁻³	4469	4370	0.48	0.51
<u>4e</u>	n = 5	6.26·10 ⁻⁴	1.31·10 ⁻³	3536	3320	0.33	0.40
<u>4f</u>	n = 6	5.92·10 ⁻⁴	1.04·10 ⁻³	3484	3459	0.37	0.53
<u>4g</u>	n = 7	1.18·10 ⁻³	2.25·10 ⁻³	3668	3679	0.20	0.26
<u>4h</u>	n = 8	8.36·10 ⁻⁴	1.61·10 ⁻³	3836	3762	0.28	0.37
<u>4i</u>	n = 9	1.08·10 ⁻³	2.00·10 ⁻³	3581	3536	0.21	0.28
<u>4j</u>	n = 10	4.63·10 ⁻⁴	1.40·10 ⁻³	3190	3136	0.42	0.35
<u>2b</u>		1.92·10 ⁻³	-	6133	-	-	-
DTDC Iodid		-	7.94·10 ⁻³	-	16209	-	-

Die Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse aller Bichromophore und der Referenzsubstanzen. Die Werte sollten zwischen Null und eins liegen, was für alle Messungen auch gefunden wird. Allerdings ist kein eindeutiger Trend zu erkennen, die Werte streuen sehr stark.

Die Werte sind in in Abbildung 51 graphisch gegen die Spacerkettenlänge aufgetragen. Sowohl für direkte als auch für indirekte Anregung findet sich mit zunehmender Kettenlänge ein Abwärtstrend. Mit wachsender Zahl an Methylengruppen bestehen mehr Freiheitsgrade der Bewegung (Rotationen, Schwingungen) im Molekül und thermische Desaktivierung wird stärker begünstigt. Unter bestimmten Voraussetzungen läßt sich aus den Quantenausbeuten die relative Geschwindigkeitskonstante des FRET bestimmen, wie im nächsten Abschnitt gezeigt werden soll.

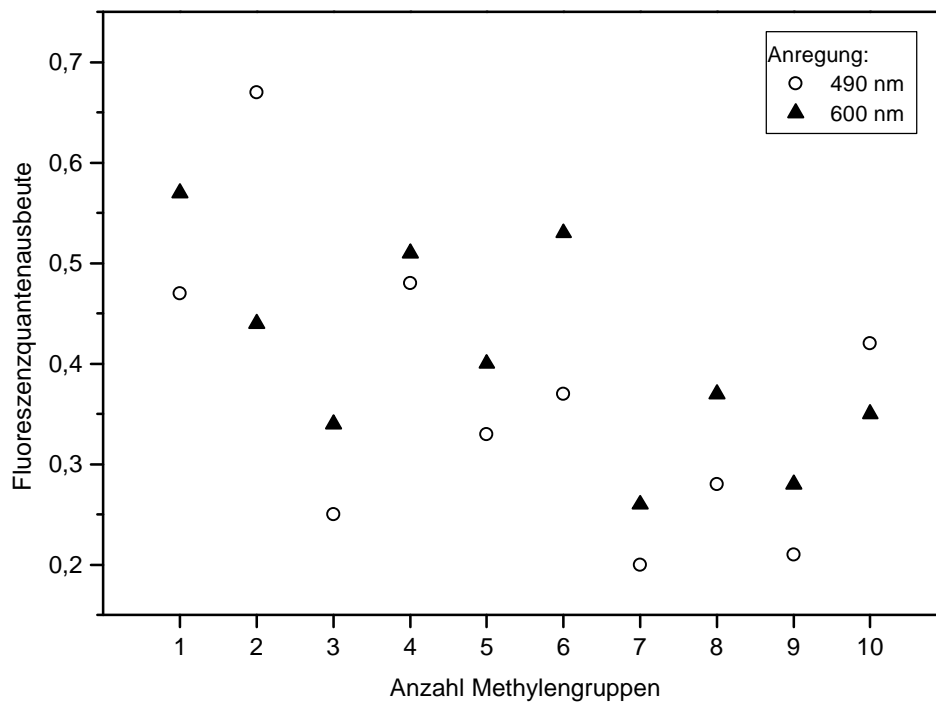


Abbildung 51: Fluoreszenzquantenausbeuten bei den Anregungswellenlängen 490 nm und 600 nm in Abhängigkeit von der Spacerkettenlänge.

5.5. Bestimmung der relativen Geschwindigkeitskonstanten des FRET

Das Verhältnis der gemessenen Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_{490} und Φ_{600} spiegelt die Geschwindigkeit des Resonanzenergietransfers in Abhängigkeit von der Spacerkettenlänge wieder. Die durch Anregung bei 600 nm bestimmte Quantenausbeute des Bichromophors ist der Quantenausbeute von Cy-5 proportional, da der Styrylteilchromophor bei dieser Anregungswellenlänge optisch inaktiv ist.

Gl. 11:

$$\Phi_{600} \sim \Phi_{\text{Cy-5}}$$

Die Fluoreszenz des Cy-5-Teilchromophors, die bei 490 nm angeregt wird, resultiert aus dem Resonanzenergietransfer vom Styryl- zum Cy-5-Teilchromophor. Hier ist die Quantenausbeute sowohl der Quantenausbeute des Cy-5 als auch der Försterttransferrate proportional.

Gl. 12:

$$\Phi_{490} \sim k(\text{D}^* \rightarrow \text{A}) \cdot \Phi_{\text{Cy-5}}$$

Die Geschwindigkeitskonstante des Transfers ist also dem Quotienten der Quantenausbeuten direkt proportional.

Gl. 13:

$$\frac{\Phi_{490}}{\Phi_{600}} \sim \frac{k(\text{D}^* \rightarrow \text{A}) \cdot \Phi_{\text{Cy-5}}}{\Phi_{\text{Cy-5}}} \sim k(\text{D}^* \rightarrow \text{A})$$

In der folgenden Tabelle und Abbildung sind die Ergebnisse der so bestimmten relativen Transferraten angegeben:

Tabelle 8: Förster-Transferraten der Bichromophore:

	4a	4b	4c	4d	4e	4f	4g	4h	4i	4i
(CH ₂) _n	n = 1	n = 2	n = 3	n = 4	n = 5	n = 6	n = 7	n = 8	n = 9	n = 10
Φ ₄₉₀	0.47	0.67	0.25	0.48	0.33	0.37	0.20	0.28	0.21	0.42
Φ ₆₀₀	0.57	0.44	0.34	0.51	0.40	0.53	0.26	0.37	0.28	0.35
k _{rel} (D* → A)	0.82	1.52	0.74	0.94	0.83	0.70	0.77	0.76	0.75	1.20

Von der Theorie her erwartet man einen exponentiellen Abfall von k_{rel} mit zunehmendem Abstand. Dabei gilt:

Gl. 14:

$$k(D^* \rightarrow A) = \frac{1}{\tau} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6$$

k = Transferrate des FRET, τ = tatsächliche Fluoreszenzlebensdauer des Donors, R₀ = Försterradius, R = Abstand.

Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 52 graphisch dargestellt. Im Bereich stärkster Krümmung ist der Abstand R gleich dem Förster-Radius R₀ und die Transferrate k wird gleich 1/τ.

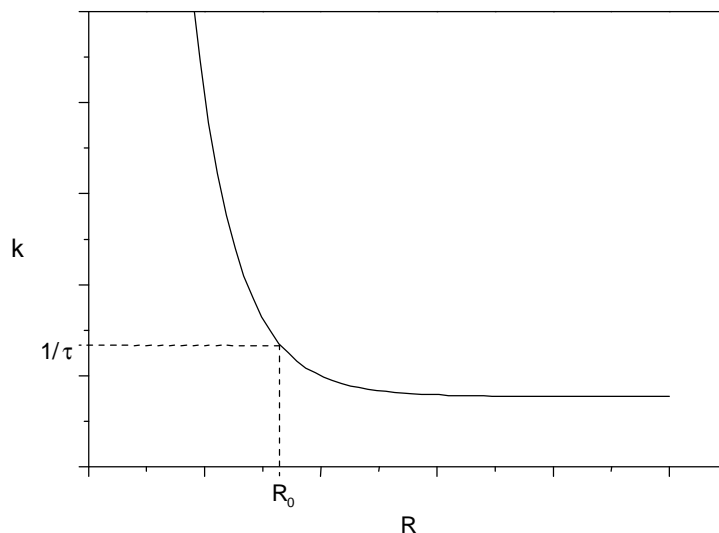


Abbildung 52: Qualitativer Verlauf der Transferrate des FRET in Abhängigkeit vom Abstand.

In Abbildung 53 ist die bestimmte relative Geschwindigkeitskonstante gegen die Anzahl an Methylengruppen im Spacer aufgetragen.

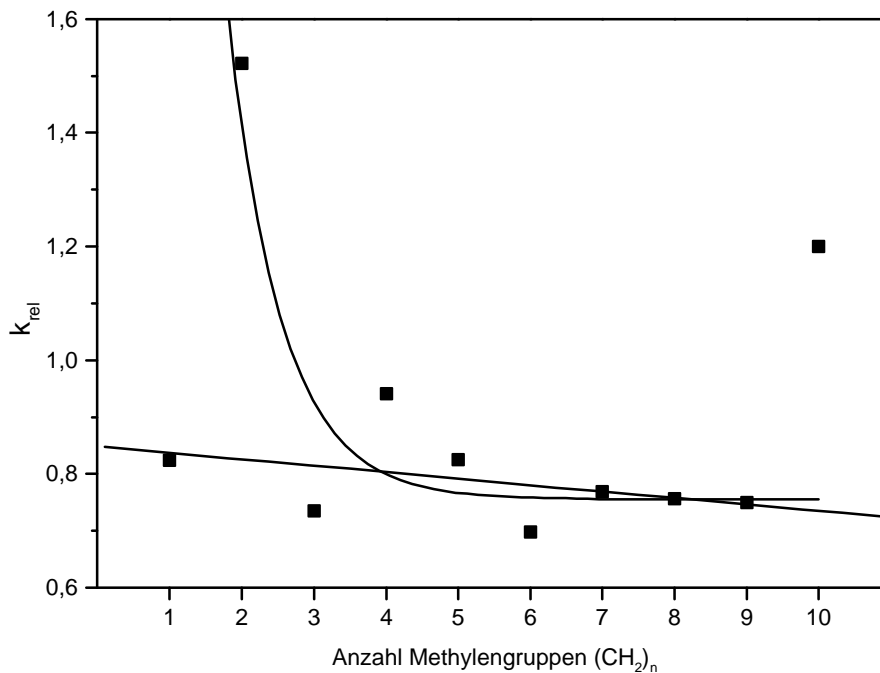


Abbildung 53: Relative Geschwindigkeitskonstante des FRET in Abhängigkeit von der Anzahl an Methylengruppen im Spacer. Weitere Erklärung im Text.

Um die Diskussion zu erleichtern, sind zusätzlich eine lineare Regression ohne Berücksichtigung der Werte mit $n = 2$ und 10 und eine exponentiell abfallende Ausgleichskurve ohne Berücksichtigung der Werte mit $n = 1$ und 10 eingezeichnet.

Beim Vergleich mit dem theoretisch erwarteten (Abbildung 52) läßt sich sowohl ein exponentieller Abfall als auch ein linearer Abfall mit zunehmender Zahl an Methylengruppen finden, je nachdem, wie groß man den Bereich für R wählt. Beide Anpassungen der Meßwerte sind aber sicherlich unkorrekt, und zwar aus folgenden Gründen:

Die Variation der Anzahl der Methylengruppen im Spacer entspricht einer bestimmten Änderung des Abstands R und damit einem bestimmten Abstandsintervall. Wie groß aber dieses ΔR tatsächlich ist, läßt sich nicht ermitteln und nicht mit der Zahl an Methylengruppen korrelieren.

Aus spektroskopischen Daten läßt sich für R_0 im Vesikelsystem ein Wert von 37 \AA bestimmen (s. o.). Wenn man den Abstand zwischen Donor und Akzeptor des längsten Bichromophors **4j** ($n = 10$, 24 Bindungen) qualitativ überschlägt, dann kommt

man auf eine Länge von 36 Å (1.5 Å pro Bindung), bei linearer Anordnung aller Bindungen. Dieser Wert verringert sich also in der Realität noch mal erheblich (Benzolring, Tetraederwinkel im Kohlenstoff etc.). Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich die apolaren Polymethyleneinheiten in der wäßrigen Lösung zusätzlich verknäulen, um der ungünstigen Wechselwirkung mit polaren Wassermolekülen entgegenzuwirken und damit den Abstand weiter verringern. Mit anderen Worten: Der Abstand zwischen Donor und Akzeptor liegt für alle zehn Bichromophore **4a** bis **4j** weit unter dem Försterradius und der Bereich ΔR , der abgedeckt wird ist klein relativ zum gesamtem Bereich, der in Abbildung 52 qualitativ eingezeichnet ist. Die zehn Bichromophore befinden sich also in einem Bereich deutlich unter R_0 , d. h. im stark abfallenden Segment in Abbildung 52 und eine exponentieller Fit macht keinen Sinn. Eine lineare Regression müßte dann aber eine sehr viel größere Steigung liefern, als tatsächlich gefunden wird, da sich k bei geringsten Änderungen von $R \ll R_0$ dramatisch ändert. Auch das ist nicht der Fall.

Es liegt also der Schluß nahe, daß bei allen zehn Bichromophoren, eingelagert in Kalium-Vesikel, eine feste Abstandsbeziehung herrscht, die sich in sehr geringen Änderungen in k_{rel} niederschlägt. Das ist auch der Grund für die starke Ähnlichkeit der Fluoreszenzspektren der Bichromophore in Kalium-Vesikeln (Abbildung 43). Die starken Abweichungen der Verbindungen mit $n = 2$ und $n = 10$ liegen wahrscheinlich daran, daß diese Verbindungen unter den experimentellen Bedingungen instabil sind.

5.6. Lösungs- und Einlagerungsverhalten der Bichromophore

Die Bichromophore haben sowohl hydrophile als auch hydrophobe Bereiche. Ihre Löslichkeit in Wasser ist nur mäßig, ebenso in organischen Lösungsmitteln, wie Ethanol und Chloroform. Gut löslich sind sie dagegen im Gemisch von Dichlormethan und Methanol (1:1).

Das Einlagerungsverhalten der Verbindungen in die DOPC-Vesikel zeigt keine Abhängigkeit von der Spacerkettenlänge. Die Zeit die nach Zugabe von Farbstoff zur Vesikelsuspension vergeht, bis ein konstantes Fluoreszenzsignal erreicht wird, liegt

typischerweise bei 80 bis 100 Minuten. Der zeitliche Verlauf der Einlagerung von **4f** ist in Abbildung 54 dargestellt.

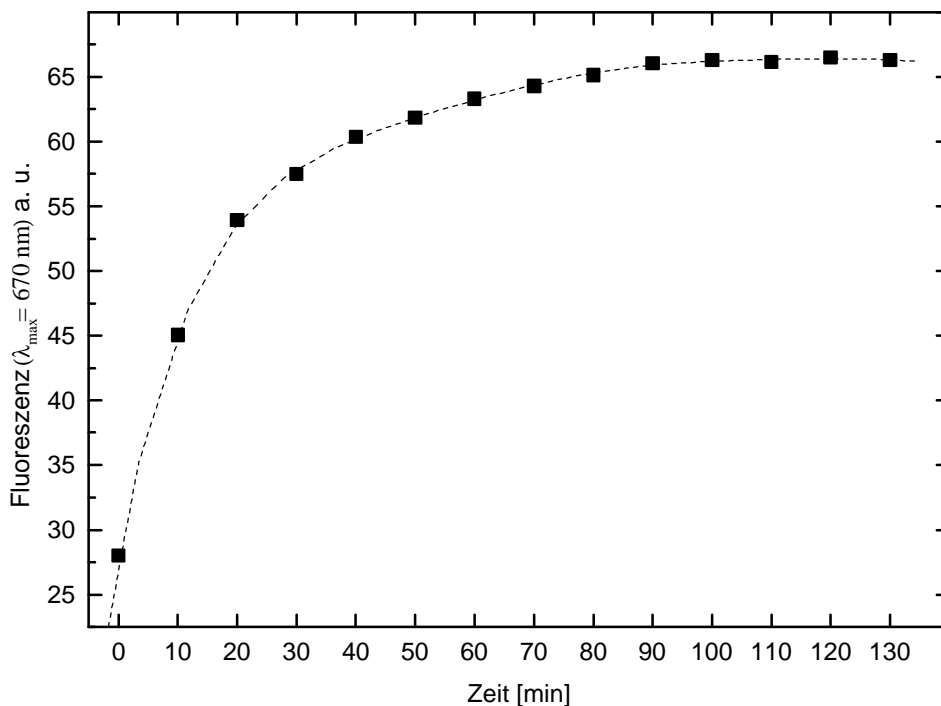


Abbildung 54: Zeitlicher Verlauf der Einlagerung des Bichromophors **4f** in Kalium-Vesikel.

Wie aus den Daten hervorgeht (siehe auch nächsten Abschnitt), ist die Dauer bis zur Gleichgewichtseinstellung extrem lang. Deshalb wurde darauf verzichtet, das genaue Einlagerungsverhalten und die Membranaffinität, die durch den Verteilungskoeffizienten γ bestimmt wird^[78], zu messen.

Abweichungen von dieser Kurve finden sich für die Verbindungen **41** (zusätzliche Sulfonatogruppe im Spacer), **42** (Trichromophor) und **72** (extrem verlängerter Spacer). **41** zeigt erst nach über 360 Minuten ein annähernd konstantes Fluoreszenzsignal. Bei **42** ist auch nach 24 Stunden keine konstante Fluoreszenz zu verzeichnen und im Verhältnis zu den Bichromophoren sehr gering, was darauf schließen lässt, dass ein Großteil der Moleküle noch solvatisiert in der wässrigen Phase vorliegt. Verantwortlich dafür sind wahrscheinlich thermodynamische Effekte. Mitten in der wässrigen Phase sind die Sulfonatogruppen solvatisiert. Vor der Vesikelmembran im Bereich der elektrolytischen Doppelschicht konkurrieren die Sulfonatogruppen mit anderen Ionen um solvatisierende Wassermoleküle, es kommt zu partieller Desolvatati-

on, was energetisch ungünstiger ist. Deshalb lagern die Verbindungen mit erhöhter Zahl an Sulfonatgruppen schlechter ein. Der umgekehrte Fall liegt bei **72** vor. Aufgrund des sehr langen und in weiten Bereichen unpolaren Spacers ist die Wasserlöslichkeit stark herabgesetzt und dadurch der Transport zu Vesikelmembran stark behindert.

5.7. Potentialmessungen

Um die Güte der Potentialsensitivität der dargestellten Bichromophore zu überprüfen, wird ein Modellsystem herangezogen, an dem sich eine Potentialänderung simulieren läßt.

Als einfachstes Zellmodell dienen Vesikel, die präparativ leicht zugänglich sind^[105]. Sie bestehen, ähnlich wie lebende Zellen, aus Phospholipidschichten, die in der flüssig-kristallinen Phase semipermeabel sind und damit wesentliche Eigenschaften echter Biomembranen nachbilden^[106].

In diese Vesikel werden die Bichromophore eingelagert und liefern ein spezifisches Fluoreszenzsignal. Durch Zugabe von Carrier-Molekülen läßt sich die Vesikelwand selektiv für bestimmte Ionen, z. B. bei Valinomycin Kalium, öffnen. Befinden sich Kaliumsalze auf nur einer Seite der Vesikelmembran (thermodynamisches Ungleichgewicht), dann kommt es zu einem Diffusionsprozess, der den Konzentrationsausgleich für Kaliumkationen in der flüssigen Phase (Vesikelinneres und -äußeres) zum Ziel hat. Damit ist eine Ladungstrennung verbunden, nämlich Kationen auf der einen, Anionen auf der anderen Seite der Membran, die der Diffusion entgegenwirkt. Hat sich das elektrochemische Gleichgewicht eingestellt, liegt ein Potential an der Membran an, was eine Änderung im Fluoreszenzsignal des Bichromophors zur Folge hat. Diese Änderung dient als Maß für die Potentialsensitivität der Bichromophore. Abbildung 55 veranschaulicht die Verhältnisse.

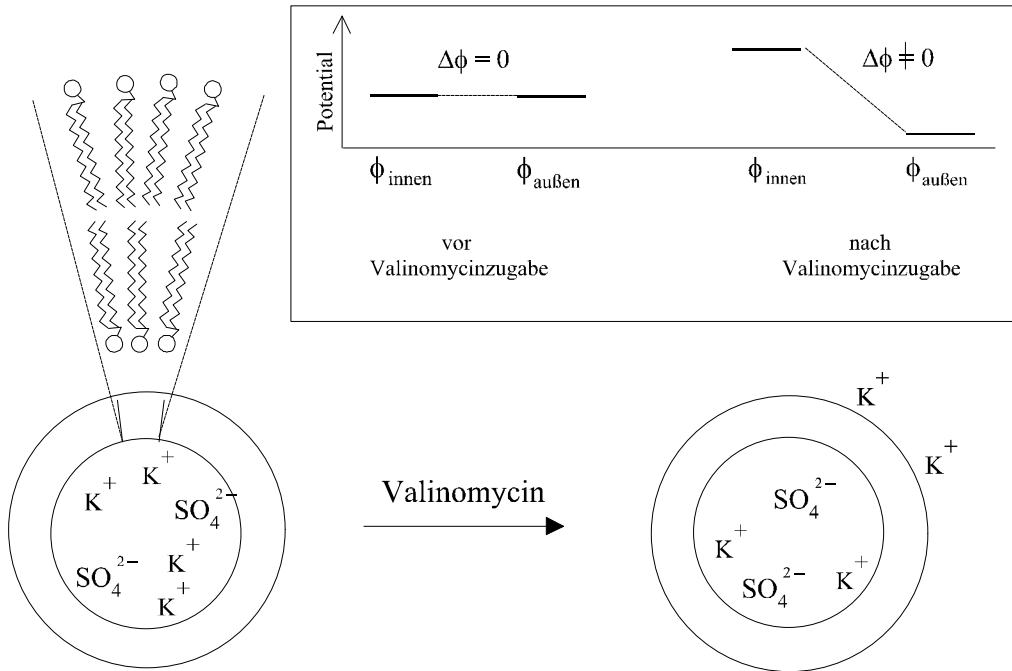


Abbildung 55: Schematische Darstellung der Potentialbildung an Vesikeln mit Valinomycin.

Hier wird Valinomycin als Carrier verwendet. Es handelt sich um einen Makrocyclus aus α -Amino- und α -Hydroxycarbonsäuren (Abbildung 56), der mit den Sauerstoffatomen der Carbonylgruppen ein Kaliumion im Inneren komplexiert, mit den Alkylresten auf der Außenseite des Komplexes eine hydrophobe Oberfläche schafft, die einen Membrantransport erleichtert^[27]. Damit ergeben sich prinzipiell zwei Experimente: Einmal mit kaliumgefüllten Vesikeln in Natriumpufferlösung; bei Zugabe von Valinomycin ergibt sich ein negatives Potential (Vesikelinneres negativ aufgeladen). Und natriumgefüllte Vesikel in Kaliumpufferlösung, hier resultiert ein positives Potential (Vesikelinneres positiv aufgeladen).

Als Lipid wird 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (DOPC) verwendet. Es hat eine Hauptumwandlungstemperatur (kristallin / fluid) von $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Messungen werden bei $19\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt, das notwendige Vorliegen der flüssigkristallinen Phase ist damit gewährleistet. Vesikelpräparation und benötigte Pufferlösungen sind im Experimentalteil beschrieben.

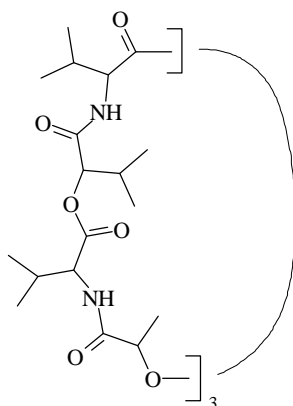


Abbildung 56: Valinomycin

5.8. Bestimmung der Potentialsensitivität

Von den Bichromophoren werden Stammlösungen in Ethanol im Konzentrationsbereich 10^{-5} bis 10^{-4} mol/l hergestellt.

Zur Bestimmung der Potentialsensitivität wird folgendes Experiment durchgeführt:

In einer Fluoreszenzküvette werden 2.5 ml Pufferlösung, 30 μ l Vesikelsuspension mit Vesikeln der entgegengesetzten Ionensorte und 20 μ l ethanolische Farbstofflösung vorgelegt und unter Rührung bei 19 °C thermostatisiert. Bis zur vollständigen Einlagerung der Bichromophore können bei diesen Konzentrationsverhältnissen 65 bis 105 min vergehen. Tabelle 9 zeigt die Dauer der Einlagerung aller Bichromophore.

Tabelle 9: Einlagerungsdauer der Bichromophore

	<u>4a</u>	<u>4b</u>	<u>4c</u>	<u>4d</u>	<u>4e</u>	<u>4f</u>	<u>4g</u>	<u>4h</u>	<u>4i</u>	<u>4j</u>	<u>4l</u>	<u>42</u>	<u>72</u>
Spacer (CH ₂) _n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	7	7	10 + 8
Zeit [min]	65	85	100	105	95	100	85	95	90	105	360	>360	>360

Erst wenn das Fluoreszenzsignal konstant ist, wird ein Emissionsspektrum aufgenommen. Nach Zugabe von 20 μ l ethanolischer Valinomycin-Lösung wird wieder

gewartet, bis die Fluoreszenz konstant ist und erneut ein Spektrum aufgenommen. Anregung erfolgt jeweils einmal bei 490 nm, also nahe dem Absorptionsmaximum des Styrylchromophors, und bei 600 nm, in der blauen Flanke des Pentamethincyanins, also mit direkter Anregung des Akzeptors, wo der Donor nicht mehr absorbiert. Die relative Fluoreszenzänderung ergibt sich nach der Formel:

Gl. 15:

$$\Delta F_{rel} = \frac{F_{Val} - F_{Vesikel}}{F_{Vesikel}}$$

ΔF_{rel} = relative Fluoreszenzänderung; F_{Val} = Fluoreszenz nach Valinomycin-Zugabe; $F_{Vesikel}$ = Fluoreszenz des in die Vesikel eingelagerten Farbstoffs

Die Werte für F entsprechen den Maxima der Emission bei konstantem Signal.

5.8.1. Überprüfung der Vesikelfunktionalität

Die Darstellung der Vesikel erfolgt nach literaturbekannten Vorschriften. Um zu prüfen, ob tatsächlich puffergefüllte Vesikel, die zur Potentialmessung geeignet sind, vorliegen, wird oben beschriebenes Experiment mit einem Farbstoff bekannter Potentialsensitivität durchgeführt. Als Sonde wird DTDC Iodid gewählt, ein Pentamethincyanin, dessen Potentialsensitivität genau untersucht wurde^[107].

Tabelle 10: Potentialsensitivität von DTDC Iodid:

	$F_{Vesikel}$	F_{Val}	ΔF_{rel} [%]
Kalium-Vesikel	100	55	- 45
Natrium-Vesikel	100	131	+ 31

Es findet eine potentialabhängige Verteilung zwischen Membraninnerem, wo die Fluoreszenz durch Dimerisierung und Aggregatbildung höherer Ordnung gequencht wird und wäßriger Phase (Nernstfarbstoff) statt.

Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse der Messung. Die starken Fluoreszenzänderungen (siehe Fluoreszenzspektren) beweisen die Funktionsfähigkeit der Vesikel. Je nach

Vesikelsorte findet die Änderung erwartungsgemäß in entgegengesetzte Richtung statt, d. h. bei den Kaliumvesikeln kommt es nach Zugabe von Valinomycin zu verstärktem Einwandern des Farbstoffs in die Membran aufgrund negativer Nettoladung auf der Membraninnenseite und einer Abnahme der Fluoreszenz durch Dimerisierung. Bei den Natriumvesikeln wird dagegen die Membranaußenseite durch Einstromen von Kaliumionen ins Vesikelinnere negativ aufgeladen, der positiv geladene Farbstoff wird von den negativen Überschussladungen in der wässrigen Phase angezogen und kann hier verstärkt fluoreszieren. In der Literatur finden sich bei analogen Vesikelexperimenten Fluoreszenzänderungen bis zu 90 %^[108], an roten Blutkörperchen 67 %^[109].

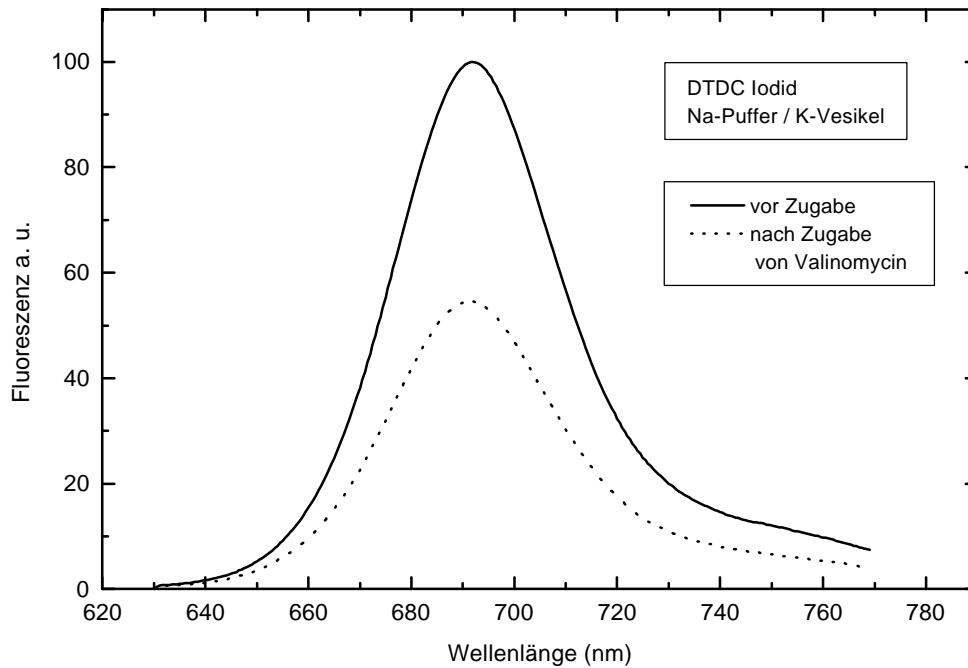


Abbildung 57: Potentialsensitivität von DTDC Iodid in Kalium-Vesikeln.

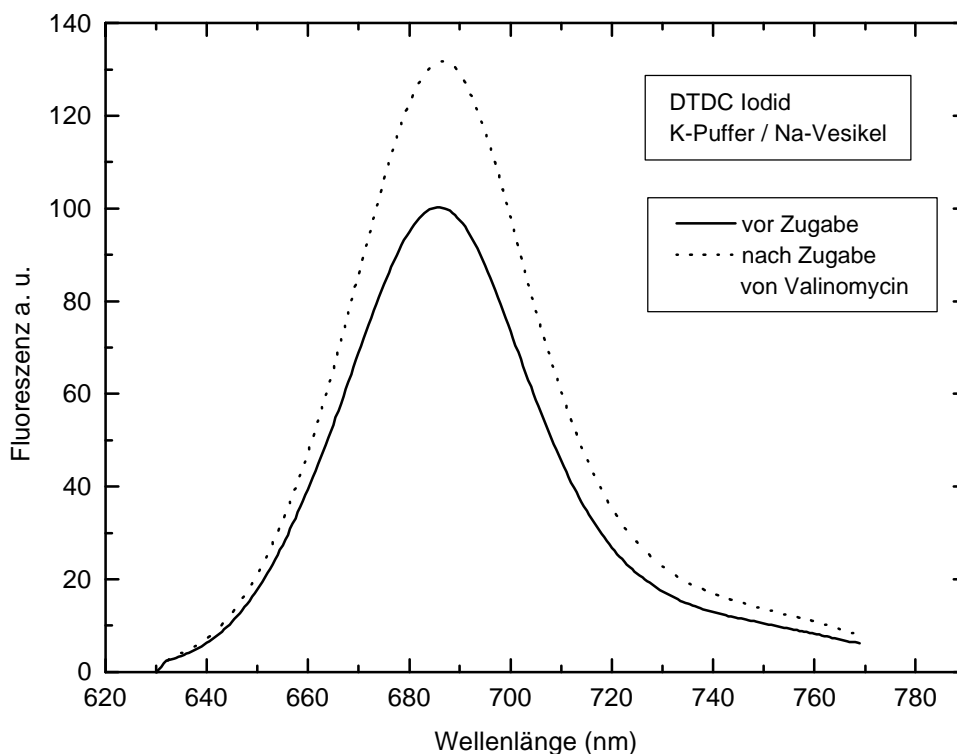


Abbildung 58: Potentialsensitivität von DTDC Iodid in Natrium-Vesikeln.

Da beide Vesikelsorten unter gleichen Bedingungen hergestellt wurden, sollte in beiden Experimenten die Potentialänderung den gleichen Betrag haben, damit sollte aber auch die Fluoreszenzänderung vom Betrag her gleich sein, was nicht der Fall ist. Der Grund dafür sind vermutlich Qualitätsunterschiede in den beiden Vesikelsorten. Abbildung 57 und Abbildung 58 zeigen die zugehörigen Fluoreszenzspektren.

5.8.2. Ergebnisse der Potentialmessungen mit Bichromophoren

Die folgenden Abbildungen zeigen die Fluoreszenzspektren bei einem typischen Experiment am Beispiel des Bichromophors **4c**.

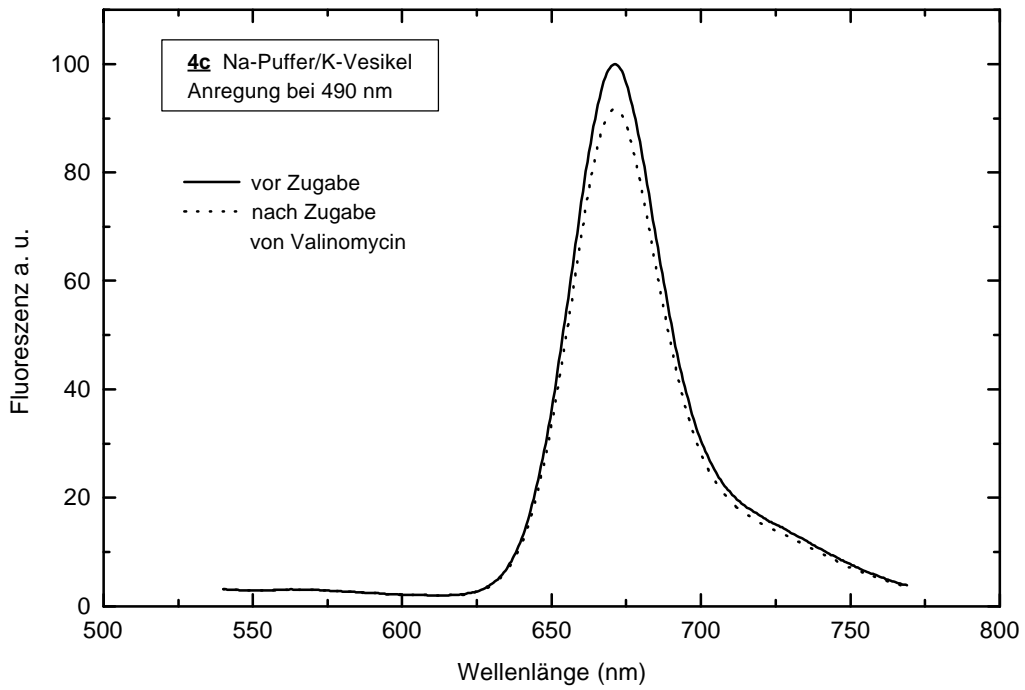


Abbildung 59: Potentialsensitivität von **4c** in Kalium-Vesikeln. Anregung bei 490 nm.

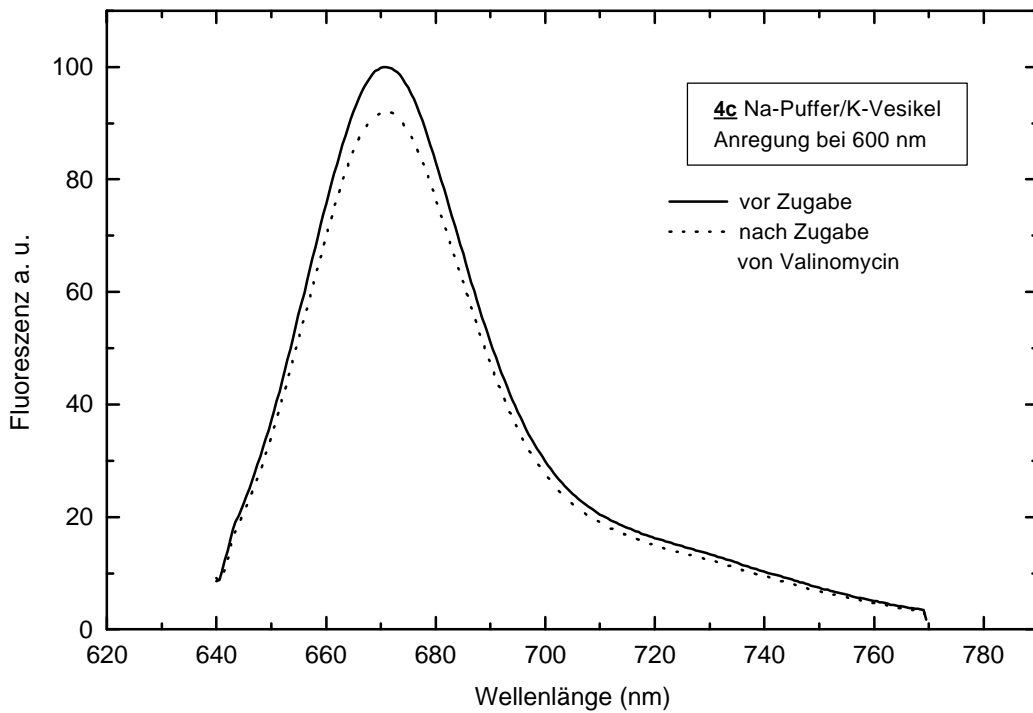


Abbildung 60: Potentialsensitivität von **4c** in Kalium-Vesikeln. Anregung bei 600 nm.

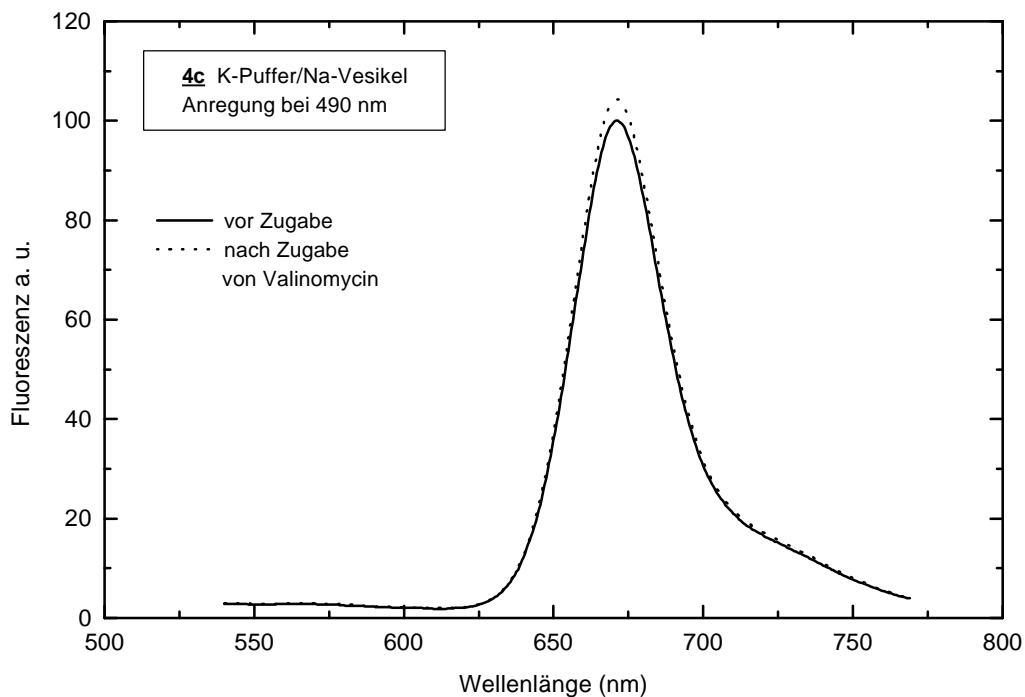


Abbildung 61: Potentialsensitivität von **4c** in Natrium-Vesikeln. Anregung bei 490 nm.

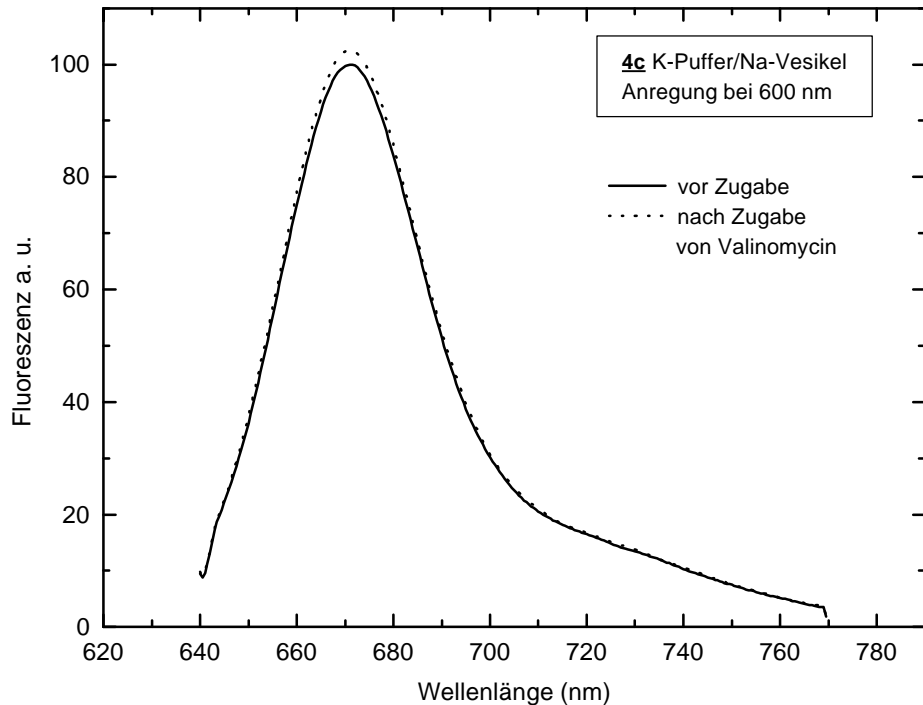


Abbildung 62: Potentialsensitivität von **4c** in Natrium-Vesikeln. Anregung bei 600 nm.

Die gezeigten Spektren sind typisch für alle anderen Bichromophore. Tabelle 11 zeigt die Ergebnisse für die zehn Bichromophore **4a** bis **4j** und der Verbindungen **41** und **42**. Die ΔF_{rel} -Werte sind gemittelte Werte über den Bereich intensiver Emission von 650 bis 700 nm. Zusätzlich sind die Ergebnisse eines Styrylfarbstoffes (**2b**) aufgenommen.

Tabelle 11: Potentialsensitivität der Bichromophore:

		Natrium-Vesikel		Kalium-Vesikel	
Anregungswellenlänge		490 nm	600 nm	490 nm	600 nm
Verbindung	Anzahl (CH ₂) _n	ΔF_{rel} [%]			
4a	n = 1	4.4	4.7	2.9	3.2
4b	n = 2	0.7	0.6	- 7.0	- 5.5
4c	n = 3	4.2	2.5	- 8.0	- 7.7
4d	n = 4	0.4	1.6	- 5.8	- 3.1
4e	n = 5	1.0	1.6	- 3.7	- 3.0
4f	n = 6	- 3.4	- 1.9	- 3.2	- 2.0
4g	n = 7	1.5	2.0	- 2.6	- 1.1
4h	n = 8	- 2.1	- 0.8	- 1.4	- 0.2
4i	n = 9	1.4	4.9	0.1	4.2
4j	n = 10	3.4	3.7	- 0.2	0.4
41	SO ₃ ⁻	0.2	0.3	- 4.3	- 3.0
42	Trichromophor	1.4	2.0	- 3.9	- 5.3
2b	Styryl n = 2	- 1.7	-	2.0	-

Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse in Abhängigkeit von der Anzahl Methylengruppen graphisch aufgetragen.

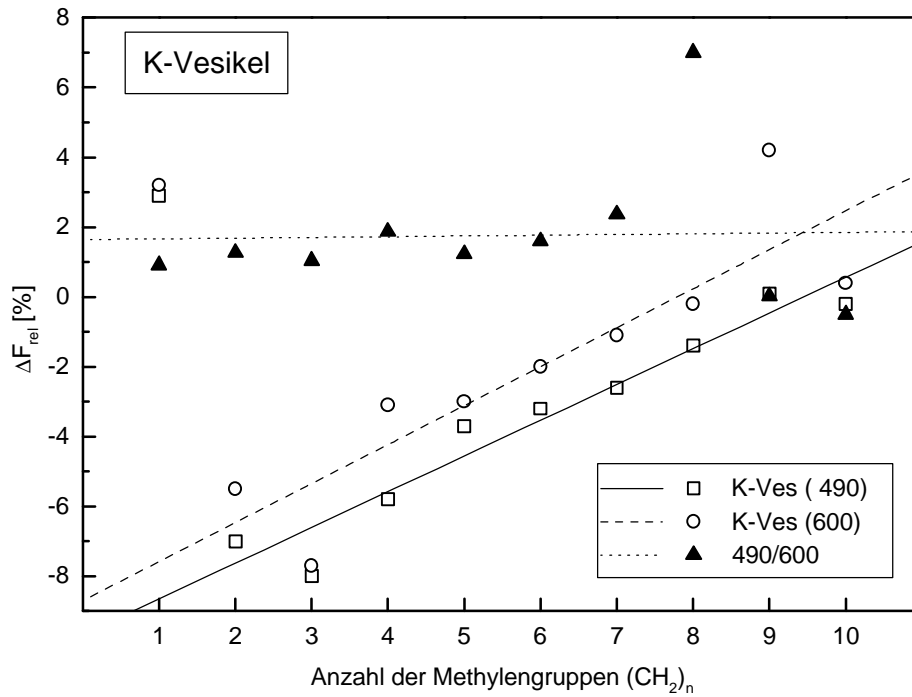


Abbildung 63: Potentialsensitivität in Kalium-Vesikeln.

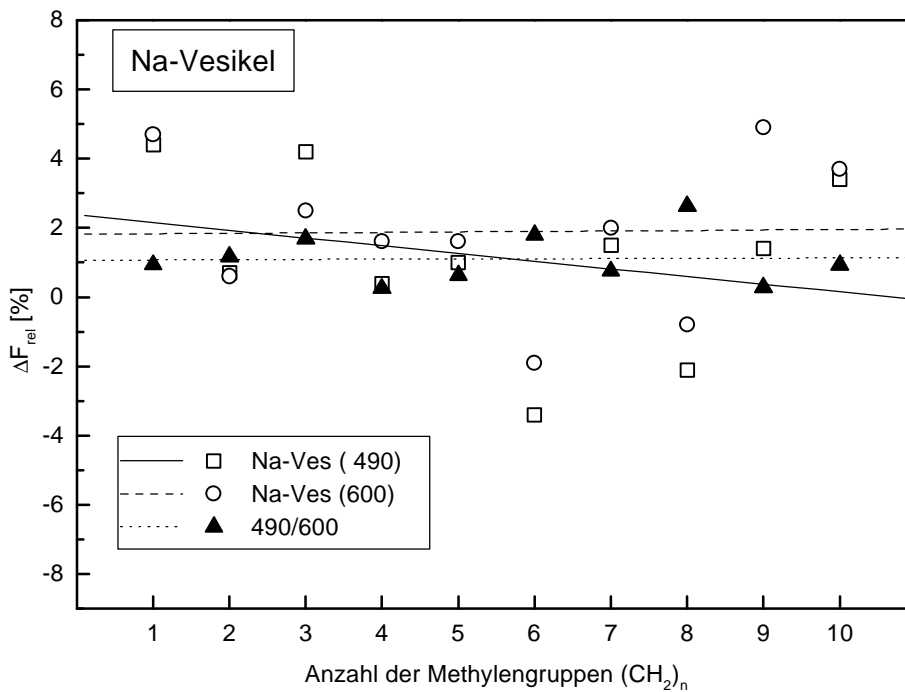


Abbildung 64: Potentialsensitivität in Natrium-Vesikeln.

Zusätzlich ist der Quotient aus Anregung bei 490 nm und 600 nm angegeben. Für alle drei Reihen ist jeweils die lineare Regression angegeben. Während bei den Kalium-Vesikeln der Regressionskoeffizient bei 0.8 bis 0.9 liegt, ist die Streuung der Werte bei den Natrium-Vesikeln sehr hoch, hier finden sich Werte von 0.3 und weniger.

5.8.3. Diskussion der Ergebnisse

Zunächst fällt auf, dass der Pentamethincyanin-Teilchromophor bei direkter Anregung ebenfalls potentialabhängige Fluoreszenzänderungen zeigt. Aus den Messungen der Fluoreszenzspektren an potentialfreien Kalium-Vesikeln (Abbildung 43) konnte geschlossen werden, daß der Cy-5-Teilchromophor in irgendeiner Weise mit der Membranoberfläche assoziiert ist. Durch Aufbau eines elektrischen Feldes mit Valinomycin wird auf die negative Nettoladung von Cy-5 eine Kraft ausgeübt, die den Teilchromophor wandern läßt. Bei Kalium-Vesikeln ist das Innere nach Valinomycinzugabe negativ, das äußere positiv aufgeladen, Cy-5 wird von der Membranoberfläche ins innere der wäßrigen Phase getrieben. Die Kraft, die dabei auf die Bindungen in der Spacerkette ausgeübt wird führt zu Deformationen der Bindungswinkel und -abstände und zwar um so stärker, je kürzer die Spacerkette ist. Dadurch werden zusätzliche Kanäle der thermischen Desaktivierung geöffnet und die Fluoreszenzquantenausbeute von Cy-5 sinkt, bei den kurzen Ketten am meisten und linear abnehmend mit zunehmender Kettenlänge, da bei längerer Kette mehr Möglichkeiten der konformativen Änderung („Entfaltung“ der Kette) gegeben sind. Da sich alle zehn Bichromophore im Bereich unterhalb von R_0 befinden und die Transfereffizienz immer groß ist, ist der Betrag von Transferenergie ebenfalls für alle zehn Verbindungen von gleicher Größenordnung und es macht keinen Unterschied, ob der angeregte Zustand des Akzeptors durch FRET oder durch direkte Anregung erreicht wird. Die Werte für direkte und indirekte Anregung bei Kalium-Vesikeln bilden annähernd Parallelen, was sich in der Quotientenbildung in Form einer Parallele zur Abszisse niederschlägt. Das bedeutet, daß der FRET keinen Anteil an der Potentialsensitivität hat.

Bei den Natrium-Vesikeln wirkt das elektrische Feld in entgegengesetzte Richtung, d. h. hier wird Cy-5 in Richtung Membran verschoben. Nach dem oben Gesagten ist hier der Spielraum für eine Bewegung jedoch minimal wenn überhaupt vorhanden. Es kommt daher nicht, wie im Fall der Kaliumvesikel zu einer spacerlängenabhängigen Deformation von Bindungswinkeln und / oder -längen und bei direkter Anregung findet sich eine Parallele zur Abszisse. Durch lineare Regression für die indirekte Anregung erhält man scheinbar eine schwache Abnahme von ΔF_{rel} mit zunehmender Kettenlänge. Die Streuung der Werte bei den Natrium-Vesikeln ist wesentlich größer als bei den Kalium-Vesikeln. Hier spielen vermutlich noch andere unbekannte Mechanismen eine Rolle. Deshalb ist fraglich, ob tatsächlich eine Abnahme mit einem entsprechend schlechten Regressionskoeffizienten vorliegt. Die Quotientenbildung liefert hier ebenfalls eine Parallele zur Abszisse. Fazit: Bei den Natrium-Vesikeln ist die Fluoreszenzantwort auf die Potentialbildung an der Membran bei allen zehn Bichromophoren gleich.

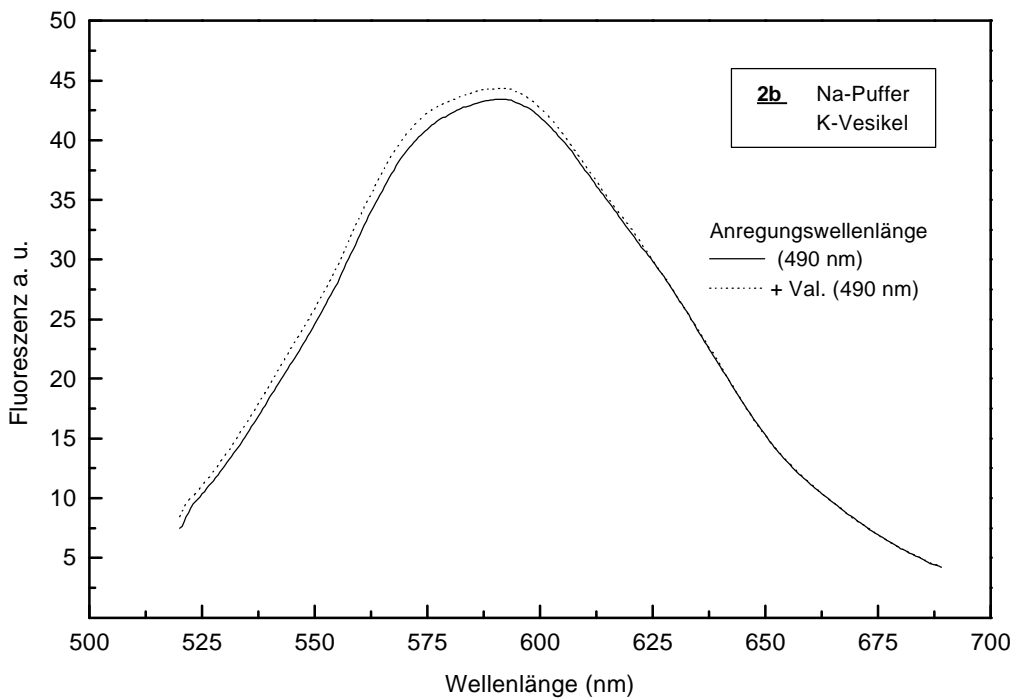


Abbildung 65: Potentialsensitivität von **2b** in Kalium-Vesikeln.

Der Styrylfarbstoff **2b** zeigt eine mit der Literatur^{[62], [58]} konforme Potentialsensitivität, die auch in der erwarteten Größenordnung liegt. Da der genaue Mechanismus der Sensitivität bei Styrylfarbstoffen bis heute nicht bekannt ist, können die vorlie-

genden Ergebnisse nur qualitativ interpretiert werden. Es wird angenommen, daß in fluiden Membranen sowohl elektrochrome als auch solvatochrome Anteile eine Rolle spielen. Bei positiver Aufladung des Vesikelinneren (Fall der Na-Vesikel) führt der elektrochrome Anteil zu einer Blauverschiebung (Hypsochromie), sowohl für Absorption als auch für Emission. Die positive Innenladung schiebt den positiv geladenen Farbstoff aber auch aus der Membran heraus, in Richtung der polarenen wäßrigen Phase, was in einer Blauverschiebung der Absorption und einer Rotverschiebung der Emission (Bathochromie) resultiert. Gleichzeitig verringert sich die Fluoreszenzquantenausbeute in der polarenen Umgebung, was eine geringere Fluoreszenzintensität (Hypochromie) zur Folge hat. In Abbildung 65 und Abbildung 66 sind die Fluoreszenzspektren von **2b** im Vesikelexperiment zu sehen.

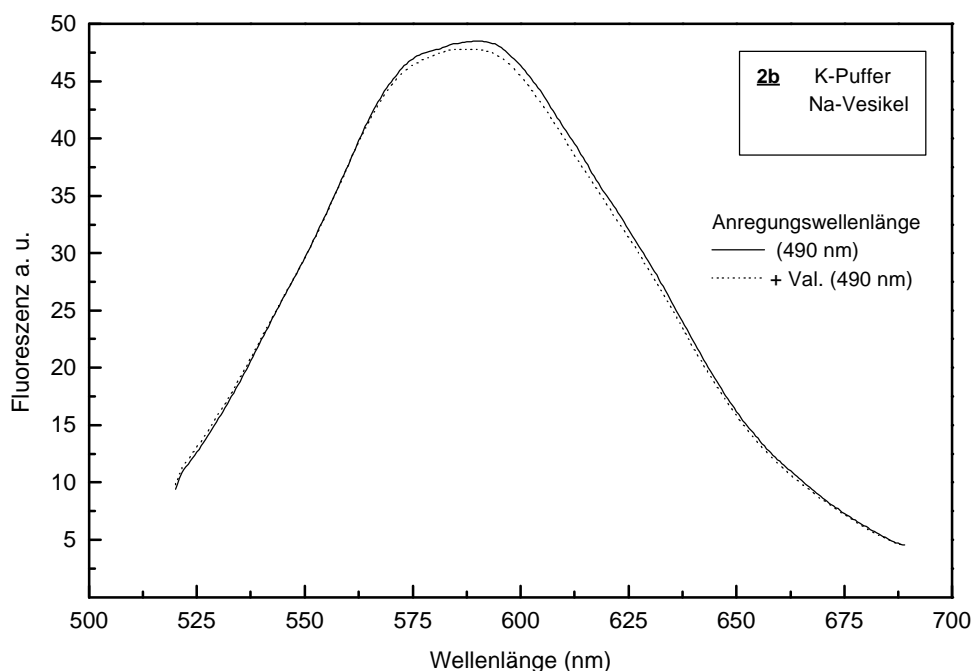


Abbildung 66: Potentialsensitivität von **2b** in Natrium-Vesikeln.

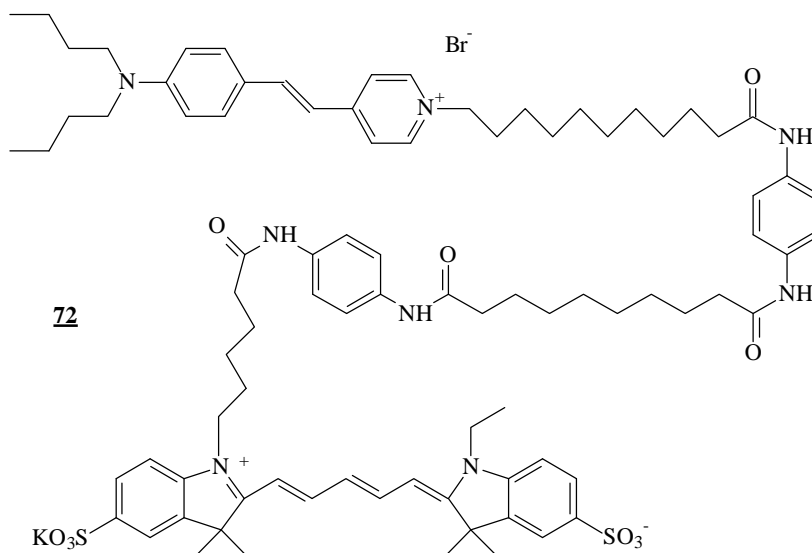
Eine hypso- oder bathochrome Verschiebung ist nur minimal zu erkennen, der solvatochrome Anteil an der Potentialsensitivität ist daher vermutlich ausschlaggebend. Die Potentialsensitivität von Styryl- und Pentamethincyaninteilchromophor wirken in entgegengesetzte Richtung und kompensieren sich daher teilweise. Das ist der Grund dafür, daß die gesamte Potentialsensitivität geringer ausfällt als erwartet.

Wenn man die Verbindung **4g** mit den Verbindungen **41** (zusätzliche Sulfonatomgruppe im Spacer) und **42** (Trichromophor) vergleicht, so zeigen die letzteren eine

etwas höhere Potentialsensitivität als der einfache Bichromophor. Ein Problem bei diesen Verbindungen ist aber die schlechte Affinität zu Vesikeln. **42** lagert sich nur sehr schlecht in Membranen ein, **41** hat extrem lange Einlagerungszeiten von bis zu vier Stunden.

5.9. Bichromophor mit extrem verlängertem Spacer

Um festzustellen, ob im Gegensatz zu den zehn Bichromophoren **4a** - **4j** signifikante Unterschiede bezüglich der Potentialabhängigkeit des FRET bestehen, wenn der Abstand R in den Bereich des Förster-Radius R_0 gelangt, wird die Verbindung **72** auf ihre spektralen Eigenschaften und ihre Potentialsensitivität untersucht.



In Abbildung 67 zeigen sich die Fluoreszenzspektren wie erwartet. In Ethanol findet sich der größere FRET aufgrund des besseren Überlappungsintegrals im Gegensatz zu Chloroform, auch ist eine Knäulung der unpolaren Polymethylen-Bereiche im polaren Ethanol wahrscheinlich. In Chloroform macht sich im Gegensatz zu den anderen Bichromophoren der wesentlich größere Abstand der Teilchromophore bemerkbar, da hier intensive Fluoreszenz des Styrylteilchromophors detektiert wird (vergl. Abbildung 37 und Abbildung 39).

Die folgenden vier Abbildungen zeigen die Potentialsensitivität von **72**, ermittelt mit oben beschriebenem Vesikelexperiment. Die Tabelle 12 gibt die gemittelten relativen Fluoreszenzänderungen wieder.

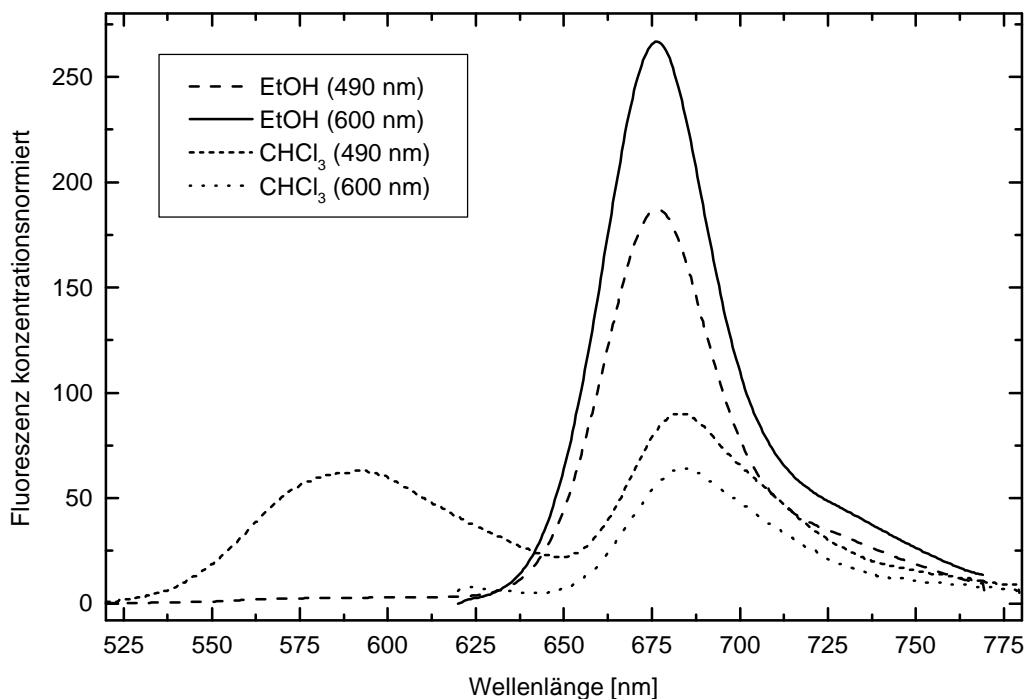


Abbildung 67: Fluoreszenzspektren von **72** in verschiedenen Lösungsmitteln bei 490 und 600 nm Anregung.

Tabelle 12: Potentialsensitivität von **72**:

		Natrium-Vesikel		Kalium-Vesikel	
Anregung		490 nm	600 nm	490 nm	600 nm
Verbindung	Anzahl (CH ₂) _n	$\Delta F_{\text{rel}} [\%]$			
72	n = 10	4.4	0.6	- 3.2	5.3

Wie sich zeigt, ist die Potentialsensitivität von gleicher Größenordnung wie bei den anderen Bichromophoren.

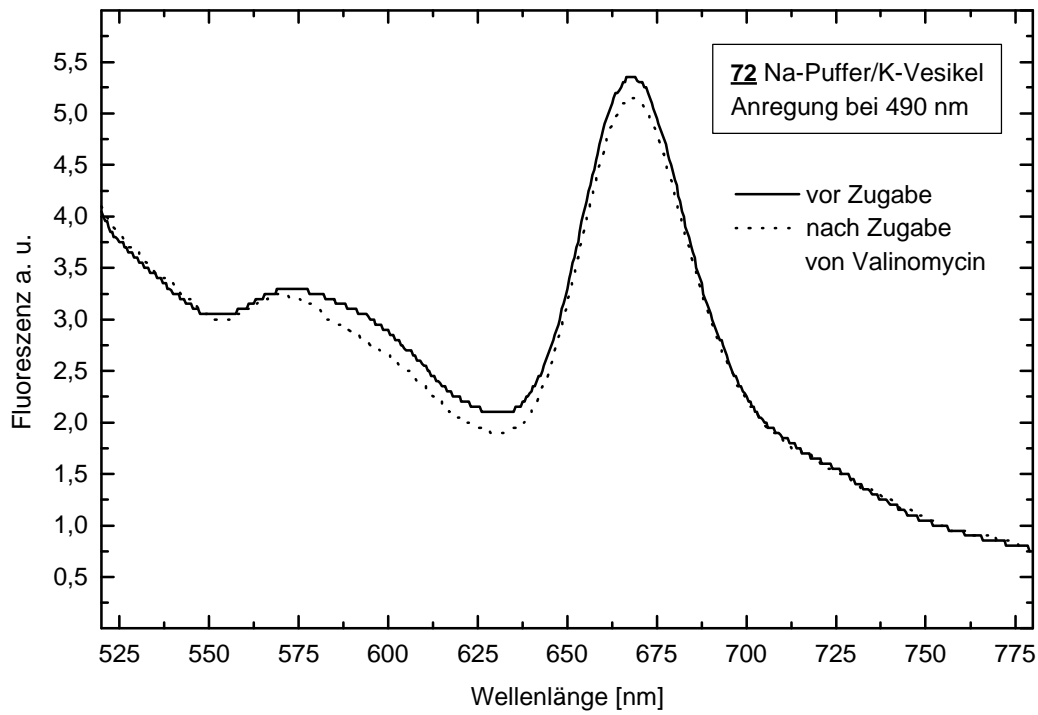


Abbildung 68: Potentialsensitivität von **72**.

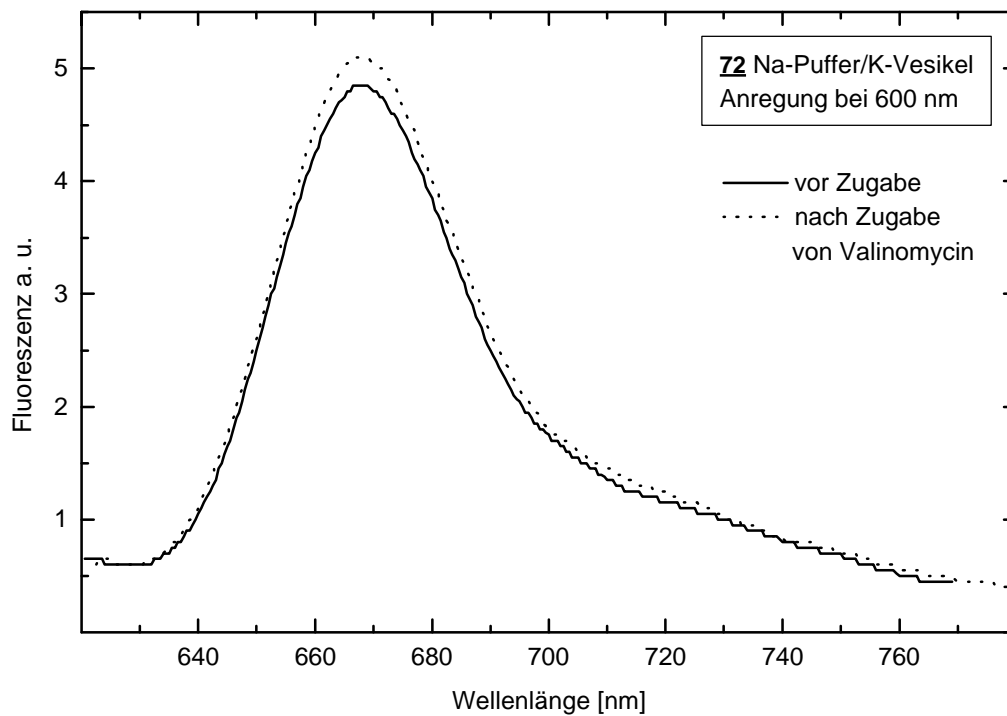


Abbildung 69: Potentialsensitivität von **72**.

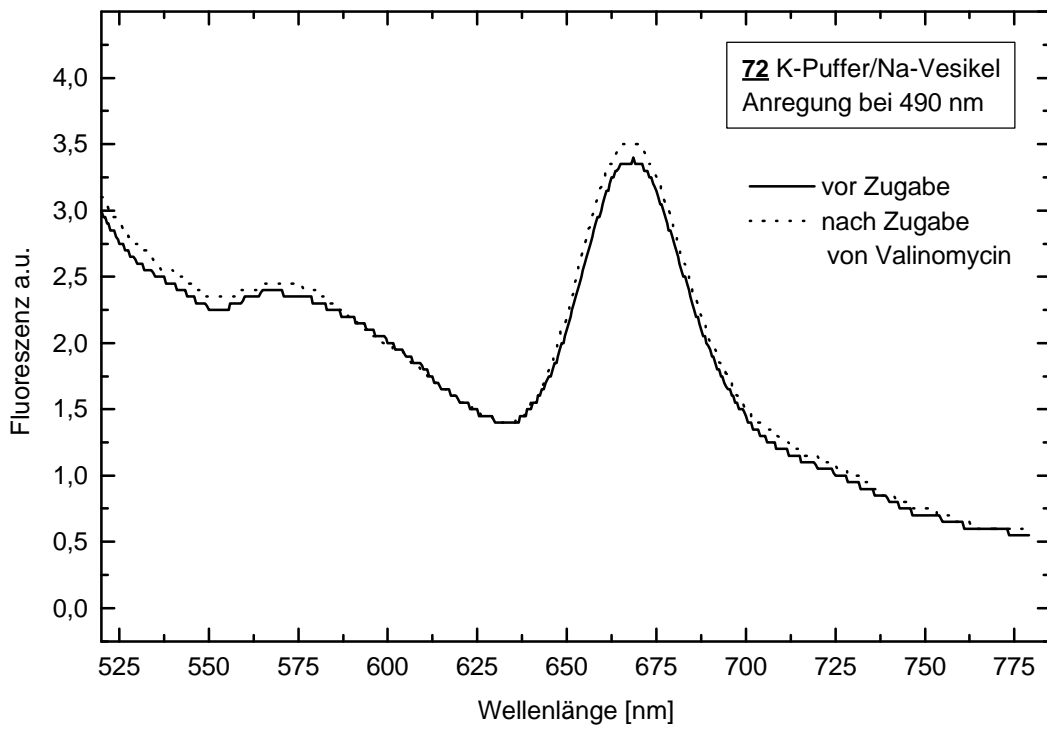


Abbildung 70: Potentialsensitivität von **72**.

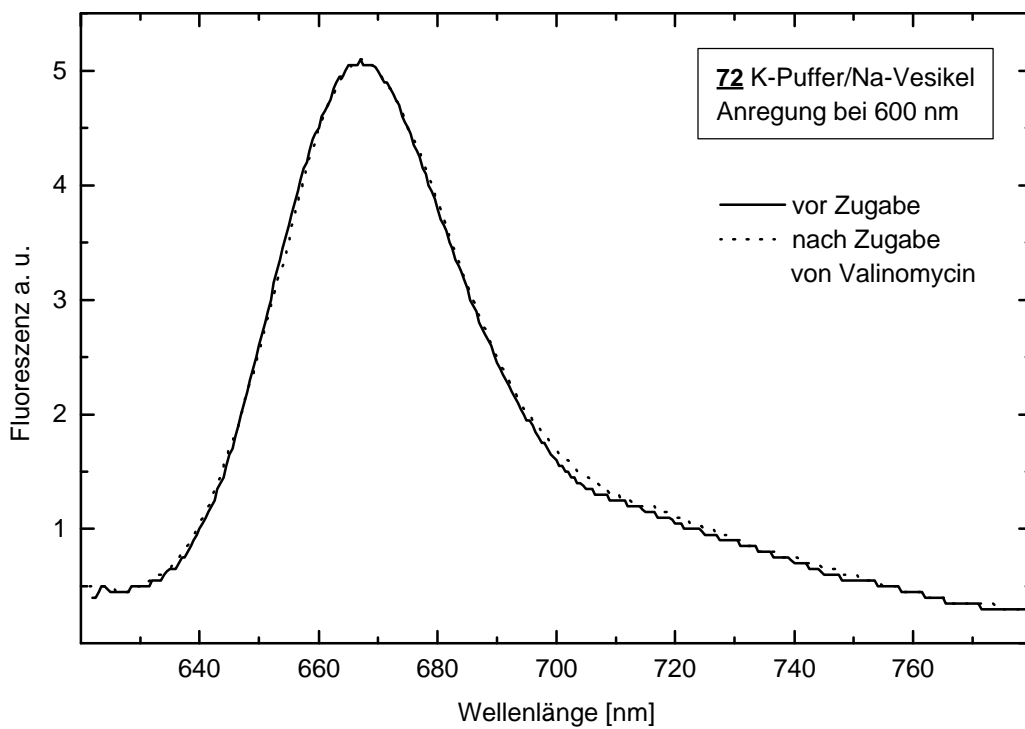


Abbildung 71: Potentialsensitivität von **72**.

Die Ergebnisse fügen sich in das zuvor Gesagte ein, bis auf die Ausnahme der Kaliumvesikel bei direkter Anregung. Hier finden sich bei allen Bichromophoren negative Werte, bei Verbindung **72** dagegen ein positiver Wert. Hierfür gibt es keine Erklärung.

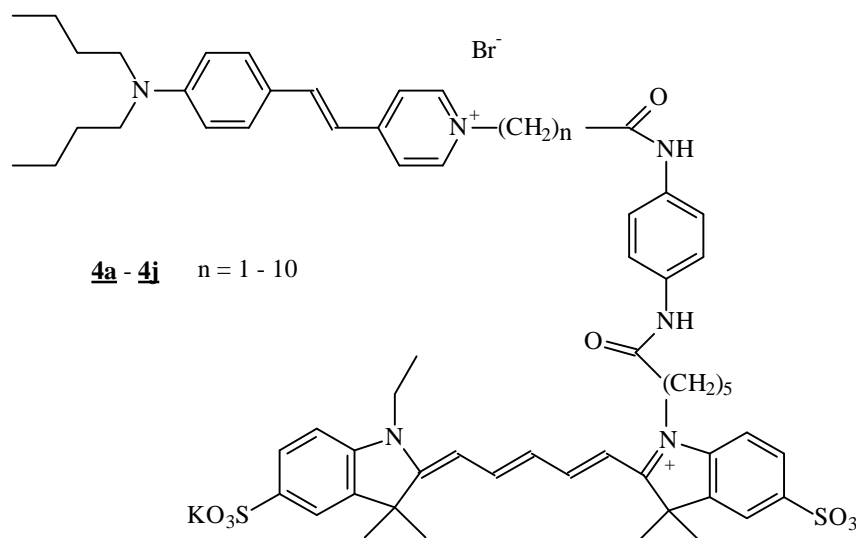
Aufgrund des wesentlich größeren Spacers scheint auch keine Assoziation des Cy-5-Teilchromophors mit der Vesikelmembran mehr vorzuliegen, da man eine deutliche Emission des Styryl-Donors sieht, sowohl ohne als auch mit Potential. Über die Ursachen läßt sich nur spekulieren. Wahrscheinlich ist, daß, wie oben schon vermutet, eine Knäulung der unpolaren Polymethylenbereiche in der wässrigen Phase eine Rolle spielt und den Akzeptor von der Membranoberfläche abschirmt.

Da keine genauen Fakten über den Aufenthaltsort der Bichromophore in oder an Vesikeln vorliegen, ist eine weitergehende Interpretation der Ergebnisse erst im Rahmen weiterer Untersuchungen möglich. Wie an den Spektren deutlich zu sehen ist, ist der Untergrund im Verhältnis zum Meßsignal sehr groß. Das liegt an der schlechten Einlagerung der Verbindung in die Vesikel. Die unpolaren Regionen des Moleküls erschweren den Transport durch die wässrige Phase zur Membran hin. Deshalb sind die Ergebnisse der Potentialmessung vorsichtig zu interpretieren, da ein großer Anteil nicht eingelagerten Farbstoffs vorliegt.

Die Tatsache, das man hier eine nennenswerte Styrylfluoreszenz messen kann, zeigt, das sich der Abstand von Donor und Akzeptor im Vesikelsystem stark vergrößert haben muß, denn bei den anderen Bichromophoren wurde sie fast vollständig gequenchet.

6. Zusammenfassung

Die gesteckten präparativen Ziele sind voll erreicht worden. Mit der gelungenen Synthese einer neuen Generation von Bichromophoren steht ein Werkzeug zur Verfügung, das sowohl hydrophile als auch lipophile Eigenschaften in sich vereinigt. Sie finden ihre Anwendung überall da, wo solche Eigenschaften unter Ausnutzung des Fluoreszenzresonanzenergietransfers gefordert sind.

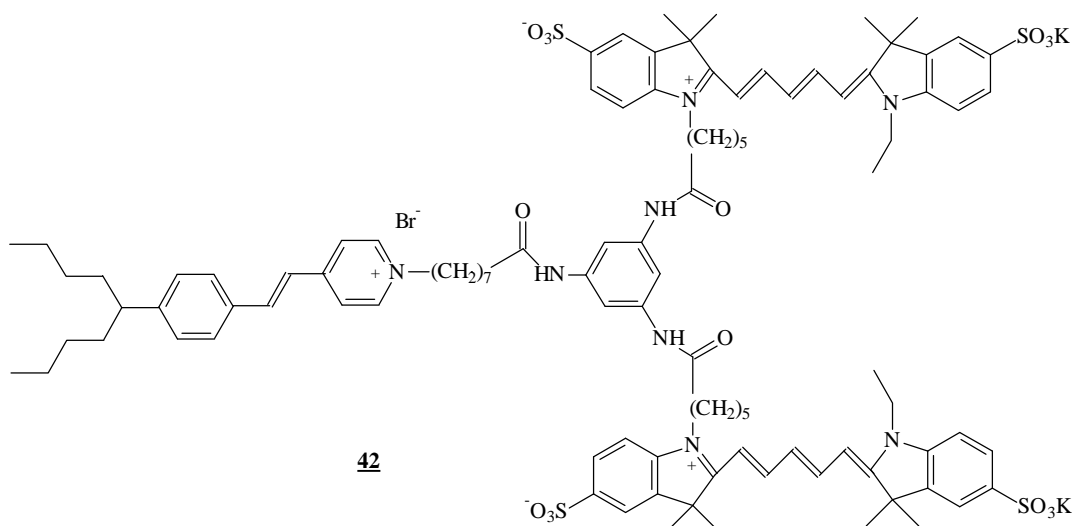
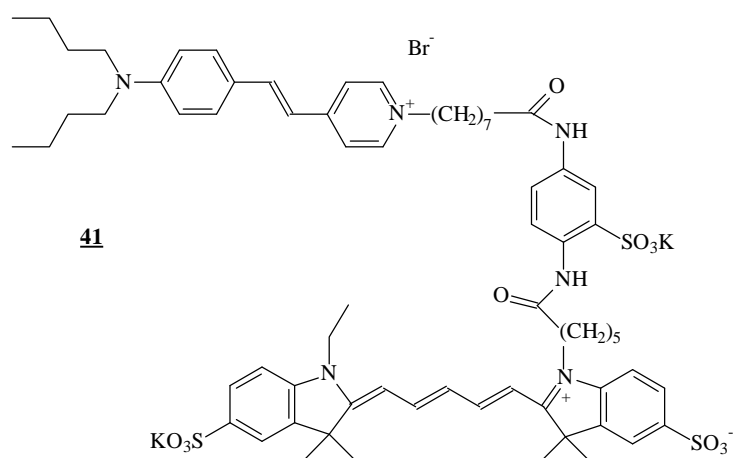


-) Wie gezeigt werden konnte ist der FRET bei den gewählten Einzelchromophoren effizient. Durch Variation der Kettenlängen über präparativ leicht zugängliche ω -Bromalkancarbonsäuren gibt es keine Limitierung bezüglich der Spacer-Größe mehr. Es konnte der Försterradius dieses Donor-Akzeptorpaars im Vesikelsystem bestimmt werden, damit ist eine beliebige Anpassung an geforderte Eigenschaften möglich.

-) Die PyCloP-Methode aus der Peptidchemie zur Verknüpfung der funktionellen Gruppen Carbonsäure und Amin eignet sich universell zur Kopplung auch komplizierterer Moleküle wie Farbstoffe. Da sowohl Amino- als auch Carboxyl-Funktionen leicht in alle denkbaren Chromophore einzubauen sind, steht hier eine ganze Palette von weiteren Möglichkeiten offen.

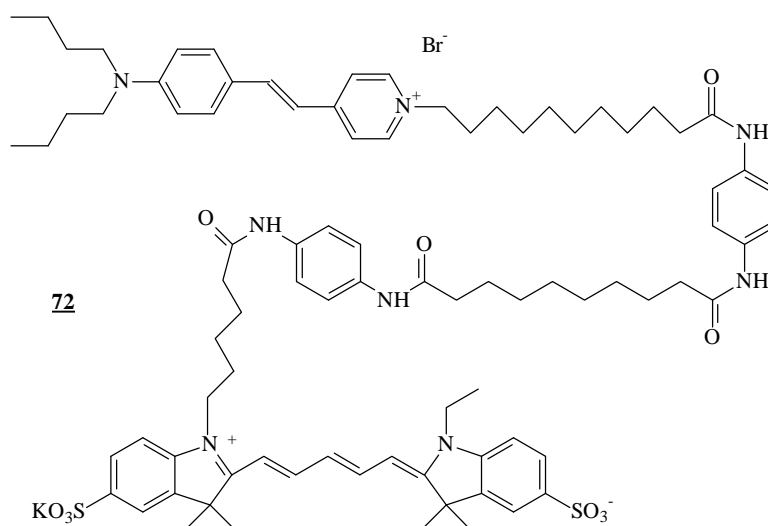
-) Die Nachteile des Gonzales-Tsien-Systems, wie aufwendige AnfärbeprozEDUREN, zusätzlicher Einsatz von Hilfsstoffen und Probleme bei der Einstellung eines bestimmten Konzentrationsverhältnisses, konnten mit den Bichromophoren ausgeschaltet werden.

-) Wie die erfolgreiche Synthese der Verbindungen **41**, **42** und **72** zeigt ist einerseits die Modifikation des Spacers möglich und im Hinblick auf die Potentialsensitivität von Bedeutung, andererseits gelingt mit dem Einsatz von 1, 3, 5-Triaminobenzol die Synthese von Multichromophoren mit erweiterten Eigenschaften. Diese Verbindung bietet die Möglichkeit, auch drei verschiedene Farbstoffe aufeinander abstimmen.



Die Verbindung zeigt, daß es möglich ist durch geeignete Kombination auch wesentlich längere Spacerketten in die Bichromophore einzuführen, als es bisher der Fall war.

Die größte Potentialsensitivität im Bereich von 8 % an Kalium-Vesikeln zeigen die Verbindungen **4b** und **4c**. Hier liegt der Ansatzpunkt zur Optimierung im Hinblick auf gesteigerte Sensitivität. Eine zukünftige Aufgabe wird es sein, die hier gewählte Kombination von Chromophoren durch andere Farbstoffe zu ersetzen, um Sonden zu erhalten, die auch für Natriumvesikel anwendbar sind.



Die präparativen Grundlagen dafür sind gelegt. Die durchgeführten Messungen an DOPC-Vesikeln als Modell für eine lebende Zelle stellen sicher nur eine grobe Annäherung dar. Einige Aspekte können im Rahmen dieser Experimente nur unzureichend beantwortet werden. Dazu gehört die Rolle des Orientierungsfaktors κ aus der Förstergleichung zur Transferrate des FRET. Die Wechselwirkung von geladenen Farbstoffen mit der polaren Membranoberfläche muß im Hinblick auf die freie Beweglichkeit in der wäßrigen Phase untersucht werden. Es sind weitere interdisziplinäre Experimente erforderlich, um die Mechanismen der Potentialsensitivität genauer zu bestimmen. Dies sprengt jedoch den Rahmen dieser Arbeit.

Im Rahmen der spektroskopischen Untersuchungen konnten die Försterradien des synthetisierten Systems in verschiedenen Medien bestimmt werden. Die Werte sind mit Literaturdaten anderer Verbindungen vergleichbar.

Wichtige Aussagen zur Solvatochromie von Bichromophoren und die Abhängigkeit des FRET von dieser Solvatochromie konnten anhand der gemessenen Absorptions- und Fluoreszenzspektren gemacht werden.

7. Experimentalteil

Allgemeines

Folgende Geräte und Materialien wurden zur Isolierung und Charakterisierung der dargestellten Verbindungen eingesetzt:

Dünnschichtchromatographie:	Merck DC-Alufolien Kieselgel 60, UV-Indikator F ₂₅₄
Säulenchromatographie:	Kieselgel 60, Kieselgel RP-18 für HPLC (Merck)
Schmelzpunkte:	Reichardt Thermovar, Büchi 510 (Schmelzpunkte sind nicht korrigiert)
Brechungsindices:	Carl Zeiss Refraktometer 90213
Infrarotspektroskopie:	Bruker Vektor 22
Massenspektroskopie:	Varian Mat 311 A 70 eV 100 mA , 250 °C Quellentemperatur
UV/VIS-Spektroskopie:	Perkin-Elmer Lambda 19
Fluoreszenzspektroskopie:	Perkin-Elmer LS 5 B mit Magnetührung und thermostatisierter Küvettenhalterung, Quantenzähler: Nilblau,
¹ H-NMR-Spektroskopie:	Bruker DRX 500 Varian VXR 300
Elementaranalysen:	Durchgeführt vom Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Material Vesikelpräparation:

1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylcholin	(Bachem)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA), p. a.	(Merck)
Histidin, p. a.	(Merck)
Magnesiumsulfat, p. a.	(Merck)
Kaliumsulfat, p. a.	(Merck)
Natriumsulfat, p. a.	(Merck)
Polycarbonat Membranfilter, Porengröße 100 nm	(Liposo Fast, Avestin Inc.)
Extruder	(Hamilton)
Lösungsmittel:	
zur Vesikeldarstellung	Wasser, zweifach deionisiert
UV/VIS- und Fluoreszenzspektroskopie	(Merck, Uvasol)

Zur Aufnahme der Fluoreszenzspektren:

Sämtliche Fluoreszenzspektren sind bei $T = 19\text{ °C}$ aufgenommen. Bei Anregung mit 490 nm wurden im Bereich von 730 nm eine Streulichtbande beobachtet. Hier wurde ein Kantenfilter (650 nm) zur Eliminierung eingesetzt. Die Korrektur der Spektren erfolgte im Bereich der Cy-5-Fluoreszenz durch Vergleich mit der Verbindung DIDC Perchlorat in *n*-Propanol und ihrem literaturbekannten wahren Emissionsspektrum^[110]. Im Bereich der Styrylfluoreszenz wurde die Sensitivität des Photomultipliers durch direkte Bestrahlung ermittelt.

Darstellung der Vesikel

4 ml einer DOPC-Stammlösung in Chloroform (19.36 g/l) werden in einen sauberen 50 ml Rundkolben gegeben und langsam unter Argonatmosphäre einrotiert (Wasserbadtemperatur 30°C), bis sich ein gleichmäßiger Lipidfilm gebildet hat. Dann wird der Film mit 3 ml Kalium- oder Natrium-Pufferlösung versetzt und 30 min unter Argon am Rotationsverdampfer bei 30 °C solubilisiert. Der verschlossene Kolben wird anschließend 25 min mit Ultraschall behandelt.

Von dieser Suspension werden 500 ml-Portionen mit einer Spritze aufgezogen und auf eine Kapillare des Extruders gesteckt. Mit Hilfe der zweiten Spritze wird nun die Suspension fünfzehnmal durch den Polycarbonat-Filter hin- und hergedrückt. Die so erhaltenen Vesikel lassen sich mehrere Wochen im Kühlschrank lagern.

Die Pufferlösungen haben folgende Zusammensetzung:

25 mmol/l	Histidin
0.5 mmol/l	EDTA
5 mmol/l	MgSO ₄
75 mmol/l	K ₂ SO ₄ bzw. Na ₂ SO ₄

In den folgenden Arbeitsvorschriften sind die komplizierteren Moleküle so beziffert, wie es der Positionsangabe der Protonen in den ¹H-NMR-Daten entspricht. Diese Bezifferung stimmt selbstverständlich *nicht* mit der Bezifferung nach IUPAC zur Namengebung der Moleküle überein und dient lediglich der leichteren Zuordnung der chemischen Verschiebungen zu den entsprechenden Protonen.

Dank gebührt folgenden Damen und Herren, ohne deren Hilfe die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

- Frau M. Beuer für die Aufnahme von NMR-Spektren.
- Herrn Dipl.-Chem. O. Körsgen und Herrn Dr. G. Broszeit für die Aufnahme von Massenspektren.
- Herrn R. Bürgel und Herrn Dr. P. Tommes für die Aufnahme der FAB-Massenspektren.
- Frau I. Menzel und Frau H. Webers für die Aufnahme von IR- und UV/VIS-Spektren.
- Frau I. Reinartz und Frau V. Foremny für Hilfe bei allen Sekretariatsangelegenheiten.
- Herrn Dr. S. Beutner für viele gute Tips und Hinweise rund um Synthese und Fluoreszenzspektroskopie und die kritische Durchsicht des Manuskripts.
- Herrn E. Schönstein für die hervorragende Versorgung mit Kaffee und Glas.
- Meinem Laborkollegen Herrn Dipl.-Chem. A. T. Bens, der bei allen EDV-Fragen wirklich *immer* eine Antwort wußte, und meiner Laborkollegin Dr. B. Reiffers, die es an manchen Tagen geschafft hat, das Labor spontan in eine Karaoke-Disco zu verwandeln. Es war toll mit Euch im Labor.
- Allen anderen Kollegen und Kolleginnen des Instituts, insbesondere den "Kellerkindern" für eine schöne und angenehme (Forschungs)zeit.

V1: *N,N*-Di-*n*-butylanilin 43

11.18 g Anilin (120.0 mmol), 37.00 g *n*-Butylbromid (270.0 mmol) und 46.53 g Ethyldiisopropylamin (DIEA, 360.0 mmol) werden innerhalb einer halben Stunde unter starkem Rühren von 90 auf 180 °C erhitzt, dann 2 h bei 180 °C gekocht. Bei 60 bis 70 °C wird dann eine konzentrierte Lösung von 44.89 g Kaliumhydroxid (800.0 mmol) zugetropft. Nach Abkühlung wird die Aminphase abgetrennt, die wäßrige Phase zweimal ausgeethert. Die vereinigten Produktphasen werden mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Ethers wird DIEA abdestilliert und der Rückstand einer fraktionierten Vakuumdestillation unterworfen.

C₁₄H₂₃N 205.35 g/mol

Ausbeute: 22.19 g (110.0 mmol), 90 % (Lit.: 98 %)

Siedepunkt: 76 °C (0.40 mbar)

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3050 (C-H arom.), 2840 –2950 (C-H aliph.), 1590/1490 (C=C arom.), 1350 C-N arom. Amin), 665/720 (monosubst. Aromat)

¹H-NMR₃₀₀ (CDCl₃/TMS): δ [ppm] = 7.18 (m, 2H, m-H), 6.61 (m, 3H, o,p-H), 3.24 (t, J = 7 Hz, 4H, 1-H), 1.55 (quint, J = 7 Hz, 4H, 2-H), 1.33 (sext, J = 7 Hz, 4H, 3-H), 0.93 (t, J = 7 Hz, 6H, 4-H)

V2: 4-(Di-*n*-butylamino)-benzaldehyd 44

Zu einer Mischung von 20.00 g (97.00 mmol) *N,N*-Di-*n*-butylanilin und 25 ml abs. DMF werden bei unter 20 °C 14.88 g (97.00 mmol) Phosphorylchlorid langsam zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird noch eine h bei 20 °C gerührt, dann für drei h auf dem Wasserbad erhitzt. Die Mischung wird unter Eiskühlung auf 100 g Eis ge-

gossen und mit 20 %iger Natronlauge auf pH 6 gebracht. Es wird dreimal mit je 200 ml Ether ausgeschüttelt, die Etherphasen mit 100 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Ethers wird im Vakuum fraktioniert destilliert.

C₁₅H₂₃NO 233.36 g/mol

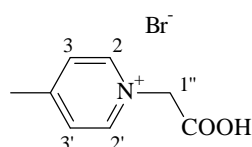
Ausbeute: 13.96 g (60.00 mmol), 62 % (Lit.: 70 %)

Siedepunkt: 117 °C (0.18 mbar)

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3000 - 3050 (C-H arom.), 2850 – 2940 (C-H aliph.), 2750 (C-H Aldehyd), 2680 (H-C=O Def.), 1650 (C=O Carbonyl), 1570 (C=C Aromat), 800 (1,4-disubst. Aromat)

¹H-NMR₃₀₀ (CDCl₃/TMS): δ [ppm] = 9.70 (s, 1H, Aldehyd-H), 7.70 (d, J = 9 Hz, 2H, o-H), 6.64 (d, j = 9 Hz, 2H, m-H), 3.35 (t, J = 7 Hz, 4H, 1-H), 1.60 (quint, J = 7 Hz, 4H, 2-H), 1.38 (sext, J = 7 Hz, 4H, 3-H), 0.97 (t, J = 7 Hz, 6H, 4-H)

V 3.1: 1-Carboxymethyl-4-methylpyridiniumbromid **1a**



Allgemeine Arbeitsvorschrift für 1-Carboxyalkyl-4-methyl-pyridiniumbromide:

3.00 g γ -Picolin (32.2 mmol) und 4.47 g Bromessigsäure (32.2 mmol) werden in 20 ml trockenem Aceton gelöst und 4 h unter Rückfluß gekocht. Am Ende destilliert man den Großteil des Acetons ab und schlämmt den erkalteten Rückstand mit 20 – 30 ml Diethylether auf. Das abgesaugte Rohprodukt wird aus Ethanol/Diethylether umkristallisiert.

C₈H₁₀BrNO₂ 232.08 g/mol

Ausbeute: 5.90 g (25.4 mmol), 79 %

Schmelzpunkt: 179 °C (Zersetzung)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3445 (O-H Carboxyl), 3109 (C-H aromat.), 2850 – 2960 (C-H aliphat.), 1746 (C=O Carboxyl), 1645 (C=C Pyridin), 830 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

$^1\text{H-NMR}_{500}$ (DMSO- $[\text{d}_6]$ /TMS): δ [ppm] = 8.79 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 7.87 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 5.21 (s, 2H, Methylen), 2.62 (s, 3H, Methyl)

MS (FAB): m/e [%] = 152.1 (M – Br, 100), 94.0 (M – C₂H₂O₂, 19)

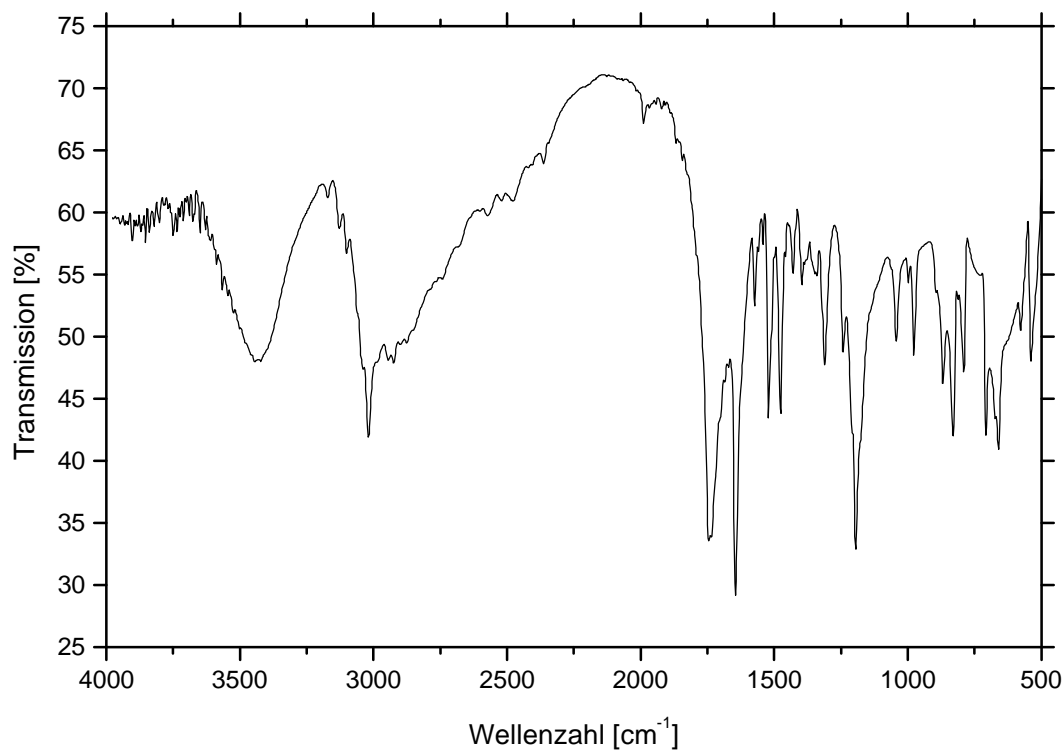
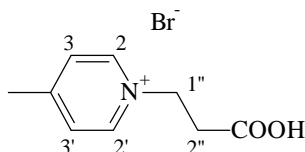


Abbildung 72: IR-Spektrum (KBr) von **1a**.

V 3.2: 1-(2-Carboxyethyl)-4-methylpyridiniumbromid 1b


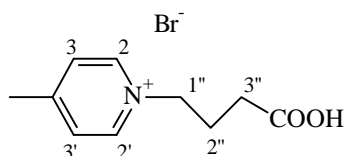
Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 2.72 g γ -Picolin (29.2 mmol) und 4.46 g 2-Brompropansäure (29.2 mmol) in 18 ml trockenem Aceton umgesetzt.

C₉H₁₂BrNO₂ 246.10 g/mol
Ausbeute: 6.32 g (25.7 mmol), 88 %
Schmelzpunkt: 161 °C

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3416 (O-H Carboxyl), 3021 (C-H aromat.), 2890 – 2990 (C-H aliphath.), 1716 (C=O Carboxyl), 1645 (C=C Pyridin), 833 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 8.72 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 7.76 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 4.50 (t, J = 7 Hz, 2H, 1''-H), 2.84 (t, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 2.38 (s, 3H, Methyl)

MS (FAB): m/e [%] = 166.1 (M – Br, 100), 154.1 (M – , 15), 136.0 (12)

V 3.3: 1-(3-Carboxypropyl)-4-methylpyridiniumbromid 1c


Es werden 3.00 g γ -Picolin (32.2 mmol) und 6.28 g 4-Brombuttersäureethylester (32.2 mmol) in 20 ml trockenem Aceton 12 h unter Rückfluß gekocht. Am Ende wird der Großteil des Acetons abdestilliert und der Rückstand mehrmals mit n-Hexan

gewaschen. Das harzige Rohprodukt wird am Rotationsverdampfer getrocknet und sofort weiterverarbeitet. Zur Esterspaltung wird in 18 ml Wasser aufgenommen und mit 6.36 g Natriumcarbonat (60.0 mmol) ca. zwei bis vier Stunden gekocht, bis kein Ester mehr vorhanden ist (DC-Kontrolle). Die Lösung wird im Vakuum eingedampft und der Rückstand mehrmals mit Ethanol/Diethylether (4:1) extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden unter Eiskühlung bis zur sauren Reaktion mit Bromwasserstoffsäure (62%) versetzt. Die saure Lösung wird mit Ether versetzt und der weiße Niederschlag abgesaugt. Umkristallisation erfolgt aus Ethanol/Diethylether.

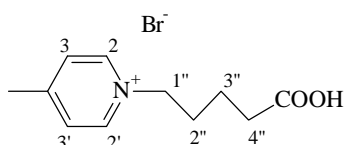
C₁₀H₁₄BrNO₂ 260.13 g/mol
Ausbeute: 4.45 g (17.1 mmol), 53 %
Schmelzpunkt: 125 °C

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3320 (O-H Carboxyl), 3041 (C-H aromat.), 2890 – 2940 (C-H aliph.), 1717 (C=O Carboxyl), 1640 (C=C Pyridin), 829 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 8.92 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 7.99 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 4.56 (t, J = 7 Hz, 2H, 1''-H), 2.61 (s, 3H, Methyl), 2.33 (t, J = 7 Hz, 2H, 3''-H), 2.13 (m, J = 7 Hz, 2H, 2''-H)

MS (FAB): m/e [%] = 180.0 (M – Br, 100), 136.0 (M – CO₂, 7), 107.0 (15), 89.0 (28), 77.0 (42)

V 3.4: 1-(4-Carboxybutyl)-4-methylpyridiniumbromid 1d



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 5.00 g γ -Picolin (53.7 mmol) und 9.72 g 5-Bromvaleriansäure (53.7 mmol) in 50 ml trockenem Aceton umgesetzt.

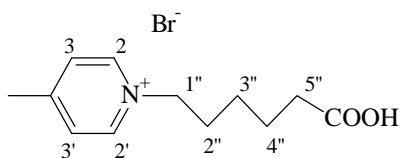
C₁₁H₁₆BrNO₂ 274.16 g/mol
Ausbeute: 12.81 g (46.7 mmol), 87 %
Schmelzpunkt: 112 °C

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3356 (O-H Carboxyl), 3046 (C-H aromat.), 2890 – 2934 (C-H aliphatic.), 1723 (C=O Carboxyl), 1640 (C=C Pyridin), 827 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (D₂O/TMS): δ [ppm] = 8.66 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 7.88 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 4.56 (t, J = 7 Hz, 2H, 1''-H), 2.65 (s, 3H, Methyl), 2.43 (t, J = 7 Hz, 2H, 4''-H), 2.04 (m, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 1.64 (m, J = 7 Hz, 2H, 3''-H)

MS (FAB): m/e [%] = 194.1 (M – Br, 100), 154 (27), 136.0 (M – CO₂, 20), 107.0 (12), 94.0 (35), 77.0 (13)

V 3.5: 1-(5-Carboxypentyl)-4-methylpyridiniumbromid 1e



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 2.96 g γ -Picolin (15.2 mmol) und 1.41 g 6-Bromhexansäure (15.2 mmol) in 20 ml trockenem Aceton umgesetzt.

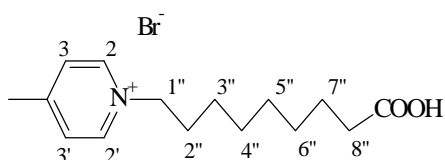
C₁₂H₁₈BrNO₂ 288.19 g/mol
Ausbeute: 4.21 g (14.6 mmol), 96 %
Schmelzpunkt: 128 °C

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3419 (O-H Carboxyl), 3044 (C-H aromat.), 2860 – 2936 (C-H aliphatic.), 1708 (C=O Carboxyl), 1638 (C=C Pyridin), 830 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

$^1\text{H-NMR}_{500}$ (DMSO- $[\text{d}_6]$ /TMS): δ [ppm] = 11.87 (s, 1H, Carboxyl-H), 8.78 (d, $J = 7$ Hz, 2H, 2,2'-H), 7.83 (d, $J = 7$ Hz, 2H, 3,3'-H), 4.36 (t, $J = 7$ Hz, 2H, 1''-H), 2.45 (s, 3H, Methyl), 2.06 (t, $J = 7$ Hz, 2H, 5''-H), 1.74 (t, $J = 7$ Hz, 2H, 2''-H), 1.37 (m, $J = 7$ Hz, 2H, 4''-H), 1.11 (m, $J = 7$ Hz, 2H, 3''-H)

MS (FAB): m/e [%] = 208.2 (M – Br, 100)

V 3.6: 1-(6-Carboxyhexyl)-4-methylpyridiniumbromid 1f



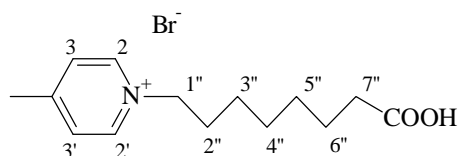
Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 4.47 g γ -Picolin (50.0 mmol) und 10.50 g 7-Bromheptansäure (50.0 mmol) in 40 ml trockenem Aceton umgesetzt.

$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{BrNO}_2$ 302.21 g/mol
Ausbeute: 14.20 g (47.0 mmol), 94 %
Schmelzpunkt: 125 °C

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3431 (O-H Carboxyl), 3040 (C-H aromat.), 2850 – 2921 (C-H aliph.), 1704 (C=O Carboxyl), 1638 (C=C Pyridin), 1467 (C-H – Def.), 829 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

$^1\text{H-NMR}_{500}$ (DMSO- $[\text{d}_6]$ /TMS): δ [ppm] = 11.83 (s, 1H, Carboxyl-H), 8.73 (d, $J = 7$ Hz, 2H, 2,2'-H), 7.78 (d, $J = 7$ Hz, 2H, 3,3'-H), 4.31 (t, $J = 7$ Hz, 2H, 1''-H), 2.40 (s, 3H, Methyl), 1.98 (t, $J = 7$ Hz, 2H, 6''-H), 1.67 (t, $J = 7$ Hz, 2H, 2''-H), 1.27 (m, $J = 7$ Hz, 2H, 5''-H), 1.11 (m, $J = 7$ Hz, 4H, 3''-H/4''-H)

MS (FAB): m/e [%] = 222.2 (M – Br, 100)

V 3.7: 1-(7-Carboxyheptyl)-4-methylpyridiniumbromid 1g


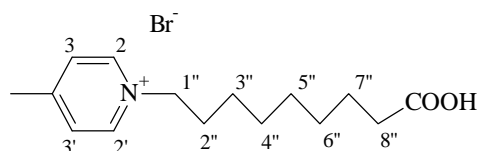
Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 5.59 g γ -Picolin (60.0 mmol) und 13.39 g 8-Bromooctansäure (60.0 mmol) in 30 ml trockenem Aceton umgesetzt.

C₁₄H₂₂BrNO₂ 316.24 g/mol
Ausbeute: 15.75 g (49.8 mmol), 83 %
Schmelzpunkt: 143 °C

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3325 (O-H Carboxyl), 3028 (C-H arom.), 2857 – 2934 (C-H aliph.), 1717 (C=O Carboxyl), 1638 (C=C Pyridin), 1470 (C-H – Def.), 824 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 11.98 (s, 1H, Carboxyl-H), 8.95 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 7.99 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 4.54 (t, J = 7 Hz, 2H, 1''-H), 2.61 (s, 3H, Methyl), 2.19 (t, J = 7 Hz, 2H, 7''-H), 1.89 (t, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 1.48 (m, J = 7 Hz, 2H, 6''-H), 1.27 (m, J = 7 Hz, 6H, 3''-H/4''-H/5''-H)

MS (FAB): m/e [%] = 236.2 (M – Br, 100)

V 3.8: 1-(8-Carboxyoctyl)-4-methylpyridiniumbromid 1h


Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 6.70 g γ -Picolin (72.0 mmol) und 17.62 g 9-Bromnonansäure (74.3 mmol) in 45 ml trockenem Aceton umgesetzt.

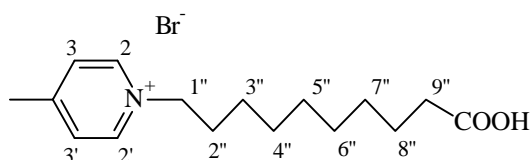
C₁₅H₂₄BrNO₂ 330.27 g/mol
Ausbeute: 18.31 g (55.4 mmol), 77 %
Schmelzpunkt: 141 °C

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3445 (O-H Carboxyl), 3042 (C-H aromat.), 2851 – 2920 (C-H aliph.), 1704 (C=O Carboxyl), 1638 (C=C Pyridin), 1470 (C-H – Def.), 829 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 11.88 (s, 1H, Carboxyl-H), 8.84 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 7.89 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 4.43 (t, J = 7 Hz, 2H, 1''-H), 2.51 (s, 3H, Methyl), 2.09 (t, J = 7 Hz, 2H, 8''-H), 1.79 (t, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 1.38 (m, J = 7 Hz, 2H, 7''-H), 1.27 (m, J = 7 Hz, 8H, 3''-/4''-/5''-/6''-H)

MS (FAB): m/e [%] = 250.1 (M – Br, 100)

V 3.9: 1-(9-Carboxynonyl)-4-methylpyridiniumbromid 1j



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 4.75 g γ -Picolin (51.0 mmol) und 13.00 g 10-Bromdecansäure (52.0 mmol) in 40 ml trockenem Aceton umgesetzt.

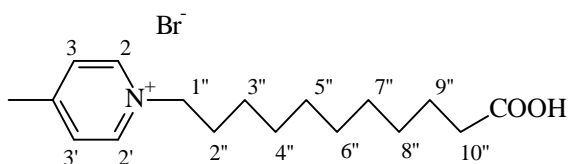
C₁₆H₂₆BrNO₂ 344.29 g/mol
Ausbeute: 14.40 g (41.8 mmol), 82 %
Schmelzpunkt: 153 °C

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3402 (O-H Carboxyl), 3044 (C-H aromat.), 2850 – 2920 (C-H aliph.), 1707 (C=O Carboxyl), 1637 (C=C Pyridin), 1468 (C-H – Def.), 830 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

$^1\text{H-NMR}_{500}$ (DMSO- $[\text{d}_6]$ /TMS): δ [ppm] = 11.95 (s, 1H, Carboxyl-H), 8.93 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 7.98 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 4.52 (t, J = 7 Hz, 2H, 1''-H), 2.61 (s, 3H, Methyl), 2.18 (t, J = 7 Hz, 2H, 9''-H), 1.88 (t, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 1.47 (m, J = 7 Hz, 2H, 8''-H), 1.27 (m, J = 7 Hz, 8H, 3''-/4''-/5''-/6''-/7''-H)

MS (FAB): m/e [%] = 264.2 (M – Br, 100)

V 3.10: 1-(10-Carboxydecyl)-4-methyl-pyridiniumbromid 1j



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 1.41 g γ -Picolin (15.0 mmol) und 4.47 g 11-Bromundecansäure (17.0 mmol) in 40 ml trockenem Aceton umgesetzt.

$\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{BrNO}_2$ 358.32 g/mol
Ausbeute: 4.89 g (13.7 mmol), 91 %
Schmelzpunkt: 156 °C

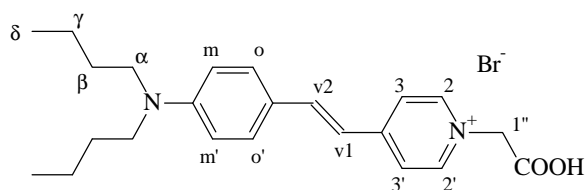
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3449 (O-H Carboxyl), 3044 (C-H aromat.), 2847 – 2919 (C-H aliph.), 1704 (C=O Carboxyl), 1638 (C=C Pyridin), 1467 (C-H – Def.), 829 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

$^1\text{H-NMR}_{500}$ (DMSO- $[\text{d}_6]$ /TMS): δ [ppm] = 11.78 (s, 1H, Carboxyl-H), 8.73 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 7.78 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 4.32 (t, J = 7 Hz, 2H, 1''-H), 2.40 (s,

3H, Methyl), 1.98 (t, J = 7 Hz, 2H, 10''-H), 1.68 (t, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 1.27 (m, J = 7 Hz, 2H, 9''-H), 1.27 (m, J = 7 Hz, 8H, 3''-/4''-/5''-/6''-/7''-/8''-H)

MS (FAB): m/e [%] = 278.2 (M – Br, 100)

V 4.1: 4-[p-(Di-*n*-butylamino)-styryl]-1-carboxymethylpyridiniumbromid 2a



Allgemeine Arbeitsvorschrift:

3.80 g **1a** (16.4 mmol) und 3.82 g (16.4 mmol) 4-(*N,N*-Di-*n*-butylamino)-benzaldehyd werden in 25 ml abs. Methanol gelöst und mit 3.45 g (41.0 mmol) Piperidin versetzt. Bei 80 –100 °C Ölbadtemperatur wird für sechs h gelinde unter Rückfluß gekocht. Am Ende wird der Großteil des Methanols abdestilliert und nach Erkalten mit 30 ml Wasser versetzt. Die Emulsion wird solange tropfenweise und unter Eiskühlung mit Bromwasserstoffsäure (48%) versetzt, bis ein dicker Niederschlag entsteht und die Reaktion schwach sauer ist (pH 6 bis 5). Eventuell muß mit Wasser verdünnt werden. Bei Anwendung von zuviel Säure muß die Lösung mit konz. K₂CO₃-Lösung versetzt werden, bis sich der Niederschlag zurückbildet. Das abgeseugte Rohprodukt wird aus Ethanol/Ether und ab **V 4.6** aus Ethanol/*n*-Hexan umkristallisiert.

C₂₃H₃₁BrN₂O₂	447.42 g/mol
Ausbeute:	4.79 g (10.7 mmol), 65 %
Schmelzpunkt:	160 °C
UV/VIS (EtOH):	λ _(max) (ε) = 487 nm (56 500)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3423 (O-H Carboxyl), 2871 – 2957 (C-H aliph.), 1719 (C=O Carboxyl), 1625 (C=C olefin.), 1586/1524 (C=C arom.), 1369 (CH_3 sym. Def.), 1181 (C-C_{v1/v2}), 818 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 8.63 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 8.05 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 7.92 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.62 (d, J = 9 Hz, 2H, o,o'-H), 7.16 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.78 (d, J = 9 Hz, 2H, m.m'-H), 4.94 (s, 2H, 1''-H), 1.59 (m, J = 7 Hz, 4H, β -H), 1.40 (m, J = 7 Hz, 4H, γ -H), 0.99 (t, J = 7 Hz, 6H, δ -H)

MS (FAB): m/e [%] = 367.2 (M – Br, 49), 322.2 (22), 307.1 (14), 154.1 (100), 136.0 (74), 107.0 (29), 89.0 (37), 77.0 (44)

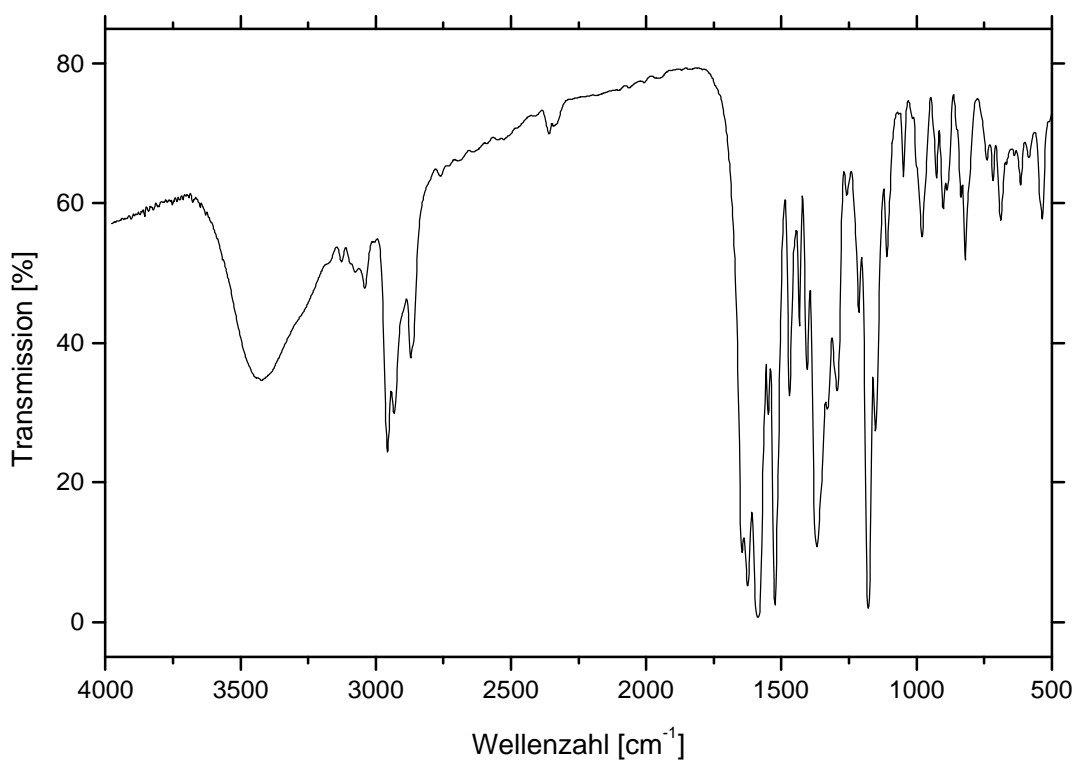
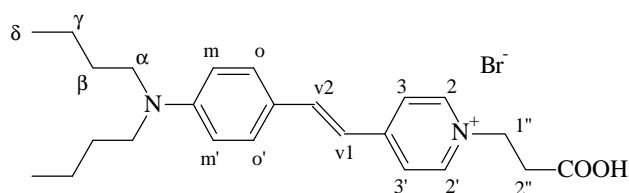


Abbildung 73: IR-Spektrum (KBr-Pressling) von **2a**.

V 4.2: 4-[p-(Di-*n*-butylamino)-styryl]-1-(2-carboxyethyl)-pyridiniumbromid

2b



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 1.67 g (6.80 mmol) **1b** und 1.58 g (6.80 mmol) 4-(Di-*n*-butylamino)-benzaldehyd sowie 1.43 g Piperidin (17.0 mmol) in 20 ml abs. Methanol umgesetzt.

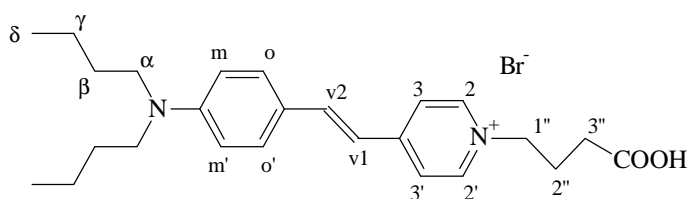
C₂₄H₃₃BrN₂O₂	461.44 g/mol
Ausbeute:	2.45 g (5.30 mmol), 78 %
Schmelzpunkt:	154 °C
UV/VIS (EtOH):	$\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 491 nm (52 000)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2870 – 2954 (C-H aliphatic.), 1717 (C=O Carboxyl), 1640 (C=C olefin.), 1580/1524 (C=C aromatic.), 1365 (CH₃ sym. Def.), 1170 (C-C_{v1/v2})

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 12.72 (s, 1H, Carboxy-H), 8.75 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 8.03 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 7.90 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.56 (d, J = 9 Hz, 2H, o,o'-H), 7.01 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.73 (d, J = 9 Hz, 2H, m,m'-H), 4.60 (t, J = 7 Hz, 2H, 1''-H), 3.03 (t, J = 7 Hz, 2H, 2''-H) 1.53 (m, J = 7 Hz, 4H, β -H), 1.34 (m, J = 7 Hz, 4H, γ -H), 0.93 (t, J = 7 Hz, 6H, δ -H)

MS (FAB): m/e [%] = 381.2 (M – Br, 100), 308.2 (16), 154.1 (43), 136.0 (32), 107.0 (12), 89.0 (18), 77.0 (20)

V 4.3: 4-[p-(Di-*n*-butylamino)-styryl]-1-(3-carboxypropyl)-pyridiniumbromid
2c



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 0.76 g (2.9 mmol) **1c** und 0.68 g (2.9 mmol) 4-(*N,N*-Di-*n*-butylamino)-benzaldehyd sowie 0.61 g Piperidin (7.3 mmol) in 15 ml abs. Methanol umgesetzt.

C₂₅H₃₅BrN₂O₂ 475.47 g/mol

Ausbeute: 1.24 g (2.60 mmol), 89 %

Schmelzpunkt: 132 °C

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 493 nm (58 000)

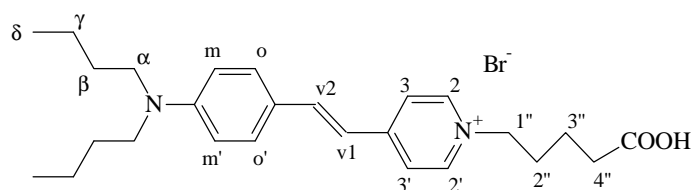
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3418 (O-H Carboxyl), 2871 – 2957 (C-H aliph.), 1642 (C=C olefin.), 1589/1524 (C=C arom.), 1171 (C-C_{v1/v2})

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 8.78 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 8.02 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 7.88 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.56 (d, J = 9 Hz, 2H, o,o'-H), 7.12 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.73 (d, J = 9 Hz, 2H, m,m'-H), 4.44 (t, J = 7 Hz, 2H, 1''-H), 1.98 (t, J = 7 Hz, 2H, 3''-H) 1.18 (m, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 1.53 (m, J = 7 Hz, 4H, β -H), 1.35 (m, J = 7 Hz, 4H, γ -H), 0.93 (t, J = 7 Hz, 6H, δ -H)

MS (FAB): m/e [%] = 395.1 (M – Br, 100), 349.0 (17), 322.2 (12), 265.1 (10)

V 4.4: 4-[p-(Di-*n*-butylamino)-styryl]-1-(4-carboxybutyl)-pyridiniumbromid

2d



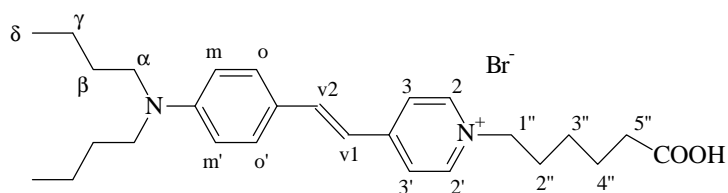
Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 1.88 g (6.90 mmol) **1d** und 1.61 g (6.90 mmol) 4-(*N,N*-Di-*n*-butylamino)-benzaldehyd sowie 1.45 g Piperidin (17.3 mmol) in 20 ml abs. Methanol umgesetzt.

C₂₆H₃₇BrN₂O₂	489.50 g/mol
Ausbeute:	2.70g (5.50 mmol), 80 %
Schmelzpunkt:	173 °C
UV/VIS (EtOH):	$\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 498 nm (49 800)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3433 (O-H Carboxyl), 3025 (C-H aromat.), 2871 – 2958 (C-H aliphat.), 1711 (Carboxyl-H), 1643 (C=C olefin.), 1579/1523 (C=C aromat.), 1170 (C-C_{v1/v2})

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 12.18 (s, 1H, Carboxy-H), 8.81 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 8.09 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 7.95 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.58 (d, J = 9 Hz, 2H, o,o'-H), 7.15 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.73 (d, J = 9 Hz, 2H, m,m'-H), 4.45 (t, J = 7 Hz, 2H, 1''-H), 2.29 (t, J = 7 Hz, 2H, 4''-H) 1.90 (m, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 1.52 (m, J = 7 Hz, 6H, β -H/3''-H), 1.34 (m, J = 7 Hz, 4H, γ -H), 0.93 (t, J = 7 Hz, 6H, δ -H)

MS (FAB): m/e [%] = 409.3 (M – Br, 100), 363.1 (20), 309.1 (11), 265.0 (14)

4.5: 4-[p-(Di-*n*-butylamino)-styryl]-1-(5-carboxypentyl)-pyridiniumbromid 2e


Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 1.69 g (5.90 mmol) **1e** und 1.37 g (5.90 mmol) 4-(*N,N*-Di-*n*-butylamino)-benzaldehyd sowie 1.24 g Piperidin (14.8 mmol) in 18 ml abs. Methanol umgesetzt.

C₂₇H₃₉BrN₂O₂ 503.53 g/mol
Ausbeute: 1.52 g (3.00 mmol), 52 %
Schmelzpunkt: 154 °C
UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\text{max})}$ (ϵ) = 498 nm (57 000)

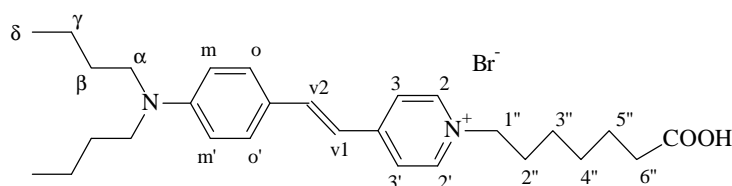
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3425 (O-H Carboxyl), 3025 (C-H aromat.), 2869 – 2955 (C-H aliphat.), 1708 (Carboxyl-H), 1642 (C=C olefin.), 1584/1525 (C=C aromat.), 1177 (C-C_{v1/v2})

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 8.81 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 8.10 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 7.96 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.52 (d, J = 9 Hz, 2H, o,o'-H), 7.17 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.79 (d, J = 9 Hz, 2H, m,m'-H), 4.37 (t, J = 7 Hz, 2H, 1''-H), 1.98 (t, J = 7 Hz, 2H, 5''-H) 1.65 (m, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 1.39 (m, J = 7 Hz, 6H, β -H/4''-H), 1.24 (m, J = 7 Hz, 6H, γ -H/3''-H), 0.92 (t, J = 7 Hz, 6H, δ -H)

MS (FAB): m/e [%] = 423.3 (M – Br, 100), 335.3 (15), 309.1 (11), 265.1 (13)

V 4.6: 4-[p-(Di-*n*-butylamino)-styryl]-1-(6-carboxyhexyl)-pyridiniumbromid

2f



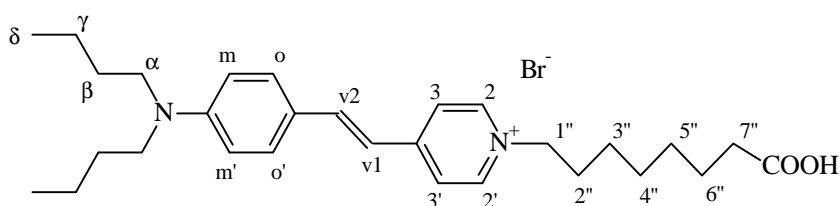
Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 1.40 g (4.60 mmol) **1f** und 1.08 g (4.60 mmol) 4-(*N,N*-Di-*n*-butylamino)-benzaldehyd sowie 0.97 g Piperidin (12 mmol) in 20 ml abs. Methanol umgesetzt.

C₂₈H₄₁BrN₂O₂ 517.55 g/mol
Ausbeute: 2.19 g (4.20 mmol), 92 %
Schmelzpunkt: 221 °C
UV/VIS (EtOH): λ_(max) (ε) = 498 nm (51 900)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3445 (O-H Carboxyl), 3025 (C-H aromat.), 2862 – 2957 (C-H aliphat.), 1715 (Carboxyl-H), 1641 (C=C olefin.), 1581/1524 (C=C aromat.), 1171 (C-C_{v1/v2})

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 8.94 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 8.23 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 8.09 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.75 (d, J = 9 Hz, 2H, o,o'-H), 7.21 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.92 (d, J = 9 Hz, 2H, m,m'-H), 4.49 (t, J = 7 Hz, 2H, 1''-H), 2.37 (t, J = 7 Hz, 2H, 6''-H) 2.01 (m, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 1.71 (m, J = 7 Hz, 6H, β-H/5''-H), 1.51 (m, J = 7 Hz, 8H, γ-H/3''-H/4''-H), 1.12 (t, J = 7 Hz, 6H, δ-H)

MS (FAB): m/e [%] = 437.2 (M – Br, 100), 154.1 (36), 136.0 (26)

V 4.7: 4-[p-(Di-*n*-butylamino)-styryl]-1-(7-carboxyheptyl)-pyridiniumbromid
2g


Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 2.23 g (7.10 mmol) **1g** und 1.65 g (7.10 mmol) 4-(*N,N*-Di-*n*-butylamino)-benzaldehyd sowie 1.49 g Piperidin (17.8 mmol) in 25 ml abs. Methanol umgesetzt.

C₂₉H₄₃BrN₂O₂	531.58 g/mol
Ausbeute:	2.87 g (5.40 mmol), 76 %
Schmelzpunkt:	130 °C
UV/VIS (EtOH):	$\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 497 nm (49 900)

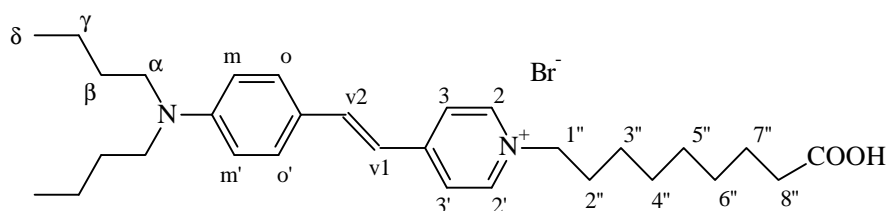
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3445 (O-H Carboxyl), 3025 (C-H aromat.), 2860 – 2950 (C-H aliphat.), 1717 (Carboxyl-H), 1645 (C=C olefin.), 1587/1524 (C=C aromat.), 1174 (C-C_{v1/v2}), 833 (1,4-disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[D₆]): δ [ppm] = 8.54 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 7.89 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 7.69 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.34 (d, J = 9 Hz, 2H, o,o'-H), 6.90 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.51 (d, J = 9 Hz, 2H, m,m'-H), 4.19 (t, J = 7 Hz, 2H, 1''-H), 1.96 (t, J = 7 Hz, 2H, 7''-H), 1.65 (m, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 1.29 (m, J = 7 Hz, 6H, β -H/6''-H), 1.10 (m, J = 7 Hz, 10H, γ -H/3''-H/4''-H/5''-H), 0.71 (t, J = 7 Hz, 6H, δ -H)

MS (FAB): m/e [%] = 451.4 (M – Br, 100), 265.1 (10), 154.1 (27), 136.1 (20)

V 4.8: 4-[p-(Di-*n*-butylamino)-styryl]-1-(8-carboxyoctyl)-pyridiniumbromid

2h



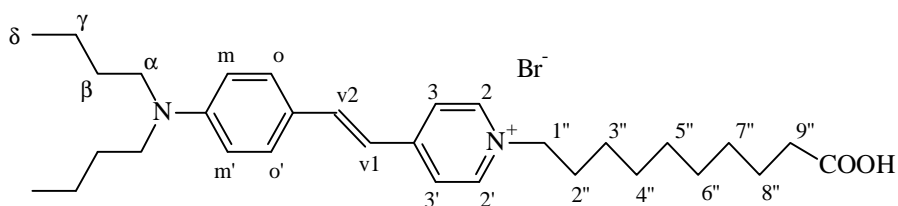
Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 1.38 g (4.20 mmol) **1h** und 0.98 g (4.20 mmol) 4-(*N,N*-Di-*n*-butylamino)-benzaldehyd sowie 0.88 g Piperidin (10.5 mmol) in 20 ml abs. Methanol umgesetzt.

C₃₀H₄₅BrN₂O₂ 545.61 g/mol
Ausbeute: 1.90 g (3.50 mmol), 83 %
Schmelzpunkt: 195 °C
UV/VIS (EtOH): λ_(max) (ε) = 502 nm (59 000)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3448 (O-H Carboxyl), 3025 (C-H aromat.), 2857 – 2958 (C-H aliph.), 1717 (Carboxyl-H), 1641 (C=C olefin.), 1583/1524 (C=C aromat.), 1173 (C-C_{v1/v2}), 813 (1,4-disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 8.77 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 8.05 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 7.92 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.57 (d, J = 9 Hz, 2H, o,o'-H), 7.12 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.73 (d, J = 9 Hz, 2H, m,m'-H), 4.41 (t, J = 7 Hz, 2H, 1''-H), 2.17 (t, J = 7 Hz, 2H, 8''-H), 1.87 (m, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 1.52 (m, J = 7 Hz, 6H, β-H/7''-H), 1.32 (m, J = 7 Hz, 10H, γ-H/3''-H/4''-H/5''-H/6''-H), 0.93 (t, J = 7 Hz, 6H, δ-H)

MS (FAB): m/e [%] = 465.4 (M – Br, 100), 265.1 (13)

V 4.9: 4-[p-(Di-*n*-butylamino)-styryl]-1-(9-carboxynonyl)-pyridiniumbromid
2i


Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 2.01 g (5.80 mmol) **1i** und 1.38 g (5.90 mmol) 4-(*N,N*-Di-*n*-butylamino)-benzaldehyd sowie 1.22 g Piperidin (14.5 mmol) in 25 ml abs. Methanol umgesetzt.

C₃₁H₄₇BrN₂O₂ 559.63 g/mol
Ausbeute: 2.31 g (4.10 mmol), 71 %
Schmelzpunkt: 170 °C
UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\text{max})}$ (ϵ) = 499 nm (49 800)

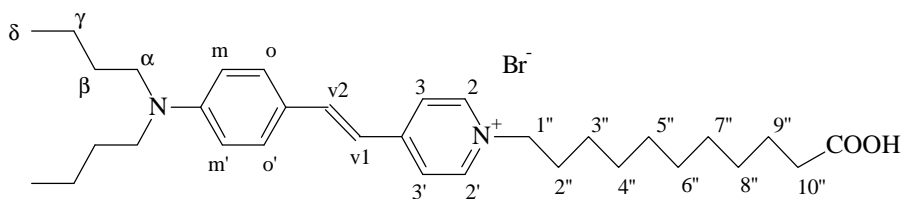
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3391 (O-H Carboxyl), 3025 (C-H arom.), 2856 – 2940 (C-H aliph.), 1715 (Carboxyl-H), 1643 (C=C olefin.), 1583/1524 (C=C arom.), 1172 (C-C_{v1/v2}), 810 (1,4-disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 8.52 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 7.81 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 7.67 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.32 (d, J = 9 Hz, 2H, o,o'-H), 6.88 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.59 (d, J = 9 Hz, 2H, m, m'-H), 4.16 (t, J = 7 Hz, 2H, 1''-H), 1.92 (t, J = 7 Hz, 2H, 9''-H), 1.63 (m, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 1.26 (m, J = 7 Hz, 6H, β -H/8''-H), 1.07 (m, J = 7 Hz, 10H, γ -H/3''-H/4''-H/5''-H/6''-H/7''-H), 0.69 (t, J = 7 Hz, 6H, δ -H)

MS (FAB): m/e [%] = 479.4 (M – Br, 100), 265.1 (11), 154.1 (32), 136.0 (24), 107.1 (10)

V 4.10: 4-[p-(Di-*n*-butylamino)-styryl]-1-(10-carboxydecyl)-pyridiniumbromid

2i



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 1.12 g (3.10 mmol) **1i** und 0.73 g (3.1 mmol) 4-(*N,N*-Di-*n*-butylamino)-benzaldehyd sowie 0.65 g Piperidin (7.8 mmol) in 20 ml abs. Methanol umgesetzt.

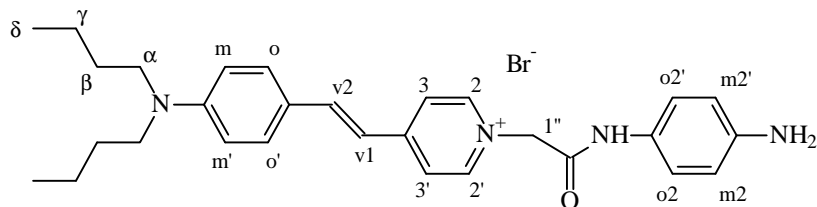
C₃₂H₄₉BrN₂O₂ 573.66 g/mol
Ausbeute: 1.15 g (2.00 mmol), 64 %
Schmelzpunkt: 193 °C
UV/VIS (EtOH): λ_(max) (ε) = 499 nm (47 500)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3444 (O-H Carboxyl), 3025 (C-H aromat.), 2854 – 2945 (C-H aliphat.), 1716 (Carboxyl-H), 1641 (C=C olefin.), 1585/1524 (C=C aromat.), 1173 (C-C_{v1/v2}), 835 (1,4-disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 8.68 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 7.97 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 7.83 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.49 (d, J = 9 Hz, 2H, o,o'-H), 7.04 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.66 (d, J = 9 Hz, 2H, m,m'-H), 4.33 (t, J = 7 Hz, 2H, 1''-H), 2.09 (t, J = 7 Hz, 2H, 10''-H), 1.80 (m, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 1.43 (m, J = 7 Hz, 6H, β-H/9''-H), 1.07 (m, J = 7 Hz, 10H, γ-H/3''-H/4''-H/5''-H/6''-H/7''-H/8''-H), 0.86 (t, J = 7 Hz, 6H, δ-H)

MS (FAB): m/e [%] = 493.4 (M – Br, 100), 307.1 (15), 154.1 (86), 136.0 (61), 107.1 (22)

V 5.1: 1-(*N*-*p*-aminophenylcarbamoyl)-4-[*p*-(*di-n*-butylamino)-styryl]-methylpyridiniumbromid 3a



Allgemeine Arbeitsvorschrift:

1.09 g Carbonsäure 2a (2.40 mmol), die dreifache Menge *p*-Phenylendiamin (0.79 g, 7.3 mmol) und die 1.2fache Menge PyCloP (1.22 g, 2.90 mmol) werden in 40 ml abs. Acetonitril und DMF (4:1) gelöst und mit der 4.2fachen Menge DIEA (1.30 g, 10.1 mmol) unter Rühren versetzt. Nach etwa einer Stunde beginnt ein roter Niederschlag auszufallen. Die Mischung wird für 24 h bei Raumtemperatur gerührt, dann wird mit 100 ml Ether versetzt und noch 30 min weitergerührt. Das Produkt wird abgesaugt und entweder aus Ethanol/Diethylether umkristallisiert oder an Kieselgel 60 mit Dichlormethan/Methanol (6:1) säulenchromatographisch gereinigt.

C₂₉H₃₇BrN₄O	537.55 g/mol
Ausbeute:	1.08 g (2.00 mmol), 84 %
Schmelzpunkt:	215 °C
UV/VIS (EtOH):	$\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 507 nm (66 500)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3418/3287/3161 (N-H Amid, N-H Amin asym., sym.), 3037 (C-H arom.), 2870 – 2957 (C-H aliph.), 1682 (C=O Amid), 1581/1523 (C=C arom.), 1176 (C-C_{v1/v2}), 830 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 9.71 (s, 1H, Amid-H), 8.77 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 8.12 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 7.99 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.63 (d, J = 9 Hz, 2H, o,o'-H), 7.34 (d, J = 9 Hz, 2H, o2,o2'-H), 7.20 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.78 (d, J = 9 Hz, 2H, m,m'-H), 6.58 (d, J = 9 Hz, 2H, m2/m2'-H), 5.48 (s, 2H, 1''-)

H), 5.15 (s, 2H, Amin-H), 1.58 (m, $J = 7$ Hz, 4H, β -H), 1.39 (m, $J = 7$ Hz, 4H, γ -H), 0.98 (t, $J = 7$ Hz, 6H, δ -H)

MS (FAB): m/e [%] = 457.3 (M - Br, 63), 322.2 (26), 265.1 (14), 154.1 (76), 136.0 (59), 107.0 (35), 89.0 (72), 77.0 (100)

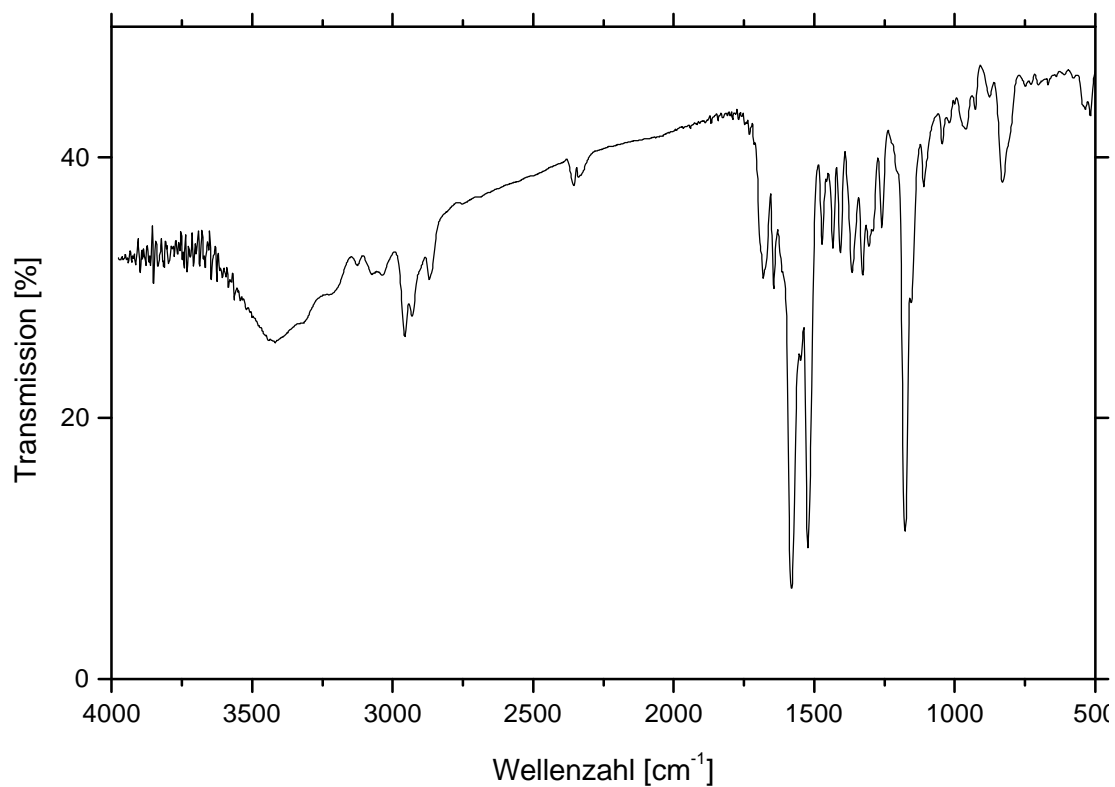
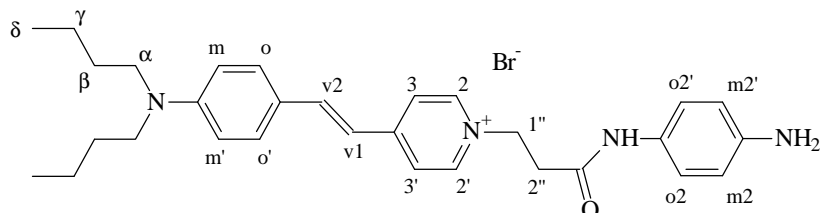


Abbildung 74: IR-Spektrum (KBr-Pressling) von 2a.

V 5.2: 1-[2-(*N*-*p*-aminophenylcarbamoyl)-ethyl]-4-[*p*-(di-*n*-butylamino)-styryl]-pyridiniumbromid **3b**


Nach der allgemeinen Vorschrift werden 0.94 g Carbonsäure **2b** (2.0 mmol), 0.66 g *p*-Phenylendiamin (6.1 mmol), 1.01 g PyCloP (2.40 mmol) und 1.09 g DIEA (8.40 mmol) in 32 ml abs. Acetonitril und DMF (4:1) umgesetzt.

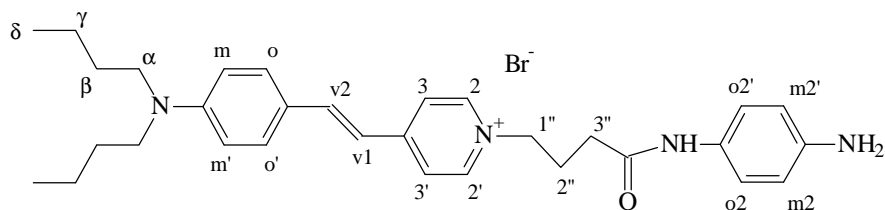
C₃₀H₃₉BrN₄O 551.57 g/mol
Ausbeute: 0.88 g (1.6 mmol), 81 %
Schmelzpunkt: 218 °C
UV/VIS (EtOH): λ_(max) (ε) = 503 nm (67 600)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3417/3217 (N-H Amid, N-H Amin asym.), 3037 (C-H aromat.), 2870 – 2957 (C-H aliph.), 1666 (C=O Amid), 1580/1523 (C=C aromat.), 1168 (C-C_{v1/v2}), 831 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 9.50 (s, 1H, Amid-H), 8.54 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 7.80 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 7.66 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.32 (d, J = 9 Hz, 2H, o,o'-H), 6.91 (d, J = 9 Hz, 2H, o2,o2'-H), 6.87 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.49 (d, J = 9 Hz, 2H, m/m'-H), 6.24 (d, J = 9 Hz, 2H, m2/m2'-H), 4.64 (s, 2H, Amin-H), 4.45 (t, 2H, 1''-H), 2.77 (t, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 1.29 (m, J = 7 Hz, 4H, β-H), 1.10 (m, J = 7 Hz, 4H, γ-H), 0.69 (t, J = 7 Hz, 6H, δ-H)

MS (FAB): m/e [%] = 471.3 (M – Br, 73), 309.2 (22), 265.1 (25), 154.1 (100), 136.0 (76), 77.0 (41)

V 5.3: 1-[3-(*N*-*p*-aminophenylcarbamoyl)-propyl]-4-[*p*-(*di-n*-butylamino)-styryl]-pyridiniumbromid **3c**



Nach der allgemeinen Vorschrift werden 0.97 g Carbonsäure **2c** (2.1 mmol), 0.55 g *p*-Phenylendiamin (5.1 mmol), 1.04 g PyCloP (2.50 mmol) und 1.11 g DIEA (8.60 mmol) in 38 ml abs. Acetonitril und DMF (4:1) umgesetzt.

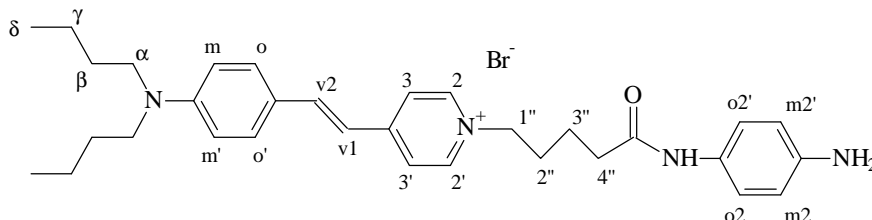
C₃₁H₄₁BrN₄O 565.60 g/mol
Ausbeute: 0.90 g (1.6 mmol), 76 %
Schmelzpunkt: 230 °C
UV/VIS (EtOH): λ_(max) (ε) = 501 nm (66 500)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3356/3285/3168 (N-H Amid, N-H Amin asym., sym.), 3035 (C-H aromat.), 2870 – 2956 (C-H aliph.), 1663 (C=O Amid), 1579/1522 (C=C arom.), 1170 (C-C_{v1/v2}), 832 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 9.34 (s, 1H, Amid-H), 8.53 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 7.81 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 7.68 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.33 (d, J = 9 Hz, 2H, o,o'-H), 6.94 (d, J = 9 Hz, 2H, o2,o2'-H), 6.90 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.49 (d, J = 9 Hz, 2H, m/m'-H), 6.24 (d, J = 9 Hz, 2H, m2/m2'-H), 4.61 (s, 2H, Amin-H), 4.25 (t, 2H, 1''-H), 2.09 (t, J = 7 Hz, 2H, 3''-H), 1.96 (m, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 1.20 (m, J = 7 Hz, 4H, β-H), 1.11 (m, J = 7 Hz, 4H, γ-H), 0.70 (t, J = 7 Hz, 6H, δ-H)

MS (FAB): m/e [%] = 485.3 (M – Br, 58), 307.1 (19), 265.1 (12), 177.1 (31) 154.1 (100), 136.0 (84), 107.0 (34), 77.0 (31)

V 5.4: 1-[4-(*N*-*p*-aminophenylcarbamoyl)-butyl]-4-[*p*-(*di-n*-butylamino)-styryl]-pyridiniumbromid **3d**



Nach der allgemeinen Vorschrift werden 1.61 g Carbonsäure **2d** (3.30 mmol), 1.07 g *p*-Phenylendiamin (9.90 mmol), 1.67 g PyCloP (4.00 mmol) und 1.91 g DIEA (14.8 mmol) in 50 ml abs. Acetonitril und DMF (4:1) umgesetzt.

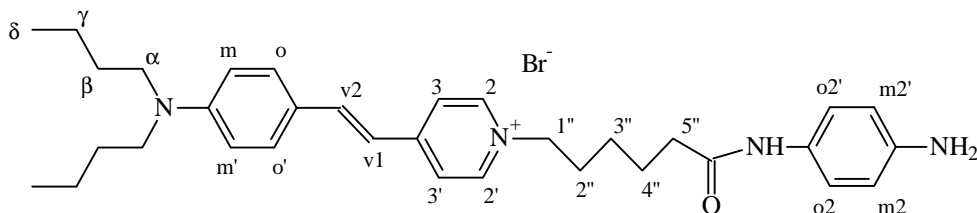
C₃₂H₄₃BrN₄O 579.63 g/mol
Ausbeute: 0.90 g (1.6 mmol), 76 %
Schmelzpunkt: 196 °C
UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 500 nm (59 300)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3352/3279/3161 (N-H Amid, N-H Amin asym., sym.), 3034 (C-H arom.), 2869 – 2954 (C-H aliph.), 1660 (C=O Amid), 1579/1522 (C=C arom.), 1170 (C-C_{v1/v2}), 832 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 9.41 (s, 1H, Amid-H), 8.60 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 7.86 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 7.72 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.37 (d, J = 9 Hz, 2H, o,o'-H), 7.02 (d, J = 9 Hz, 2H, o2,o2'-H), 6.93 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.53 (d, J = 9 Hz, 2H, m/m'-H), 6.28 (d, J = 9 Hz, 2H, m2/m2'-H), 4.63 (s, 2H, Amin-H), 4.26 (t, 2H, 1''-H), 2.11 (t, J = 7 Hz, 2H, 4''-H), 1.71 (m, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 1.52 (m, J = 7 Hz, 6H, β -H/3''-H), 1.14 (m, J = 7 Hz, 4H, γ -H), 0.74 (t, J = 7 Hz, 6H, δ -H)

MS (FAB): m/e [%] = 499.2 (M – Br, 100), 363.2 (20), 309.1 (17), 265.1 (22), 191.1 (21), 154.1 (32), 136.0 (23)

V 5.5: 1-[5-(*N*-*p*-aminophenylcarbamoyl)-pentyl]-4-[*p*-(*di-n*-butylamino)-styryl]-pyridiniumbromid 3e



Nach der allgemeinen Vorschrift werden 0.66 g Carbonsäure 2e (1.3 mmol), 0.35 g *p*-Phenylendiamin (3.3 mmol), 0.66 g PyCloP (1.6 mmol) und 0.71 g DIEA (5.5 mmol) in 30 ml abs. Acetonitril und DMF (4:1) umgesetzt.

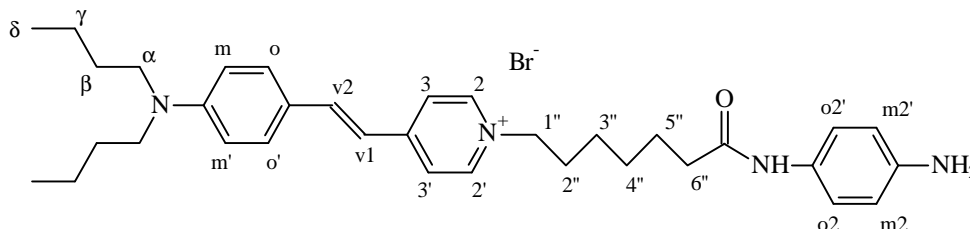
C₃₃H₄₅BrN₄O 593.65 g/mol
Ausbeute: 0.65 g (1.1 mmol), 83 %
Schmelzpunkt: 222 °C
UV/VIS (EtOH): λ_(max) (ε) = 500 nm (57 400)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3418/3265/3164 (N-H Amid, N-H Amin asym., sym.), 3034 (C-H arom.), 2867 – 2955 (C-H aliph.), 1648 (C=O Amid), 1580/1522 (C=C arom.), 1169 (C-C_{v1/v2}), 833 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 9.20 (s, 1H, Amid-H), 8.51 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 7.79 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 7.66 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.32 (d, J = 9 Hz, 2H, o,o'-H), 6.96 (d, J = 9 Hz, 2H, o2,o2'-H), 6.87 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.49 (d, J = 9 Hz, 2H, m/m'-H), 6.24 (d, J = 9 Hz, 2H, m2/m2'-H), 4.57 (s, 2H, Amin-H), 4.18 (t, 2H, 1''-H), 2.00 (t, J = 7 Hz, 2H, 5''-H), 1.67 (m, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 1.37 (m, J = 7 Hz, 2H, 4''-H), 1.31 (m, J = 7 Hz, 4H, β-H), 1.08 (m, J = 7 Hz, 6H, γ-H/3''-H), 0.69 (t, J = 7 Hz, 6H, δ-H)

MS (FAB): m/e [%] = 513.2 (M – Br, 100), 377.2 (11), 335.2 (21), 307.0 (24), 265.0 (20)

V 5.6: 1-[6-(*N*-*p*-aminophenylcarbamoyl)-hexyl]-4-[*p*-(*di-n*-butylamino)-styryl]-pyridiniumbromid **3f**



Nach der allgemeinen Vorschrift werden 0.62 g Carbonsäure **2f** (1.2 mmol), 0.40 g *p*-Phenylendiamin (3.6 mmol), 0.66 g PyCloP (1.5 mmol) und 0.68 g DIEA (5.3 mmol) in 28 ml abs. Acetonitril und DMF (4:1) umgesetzt.

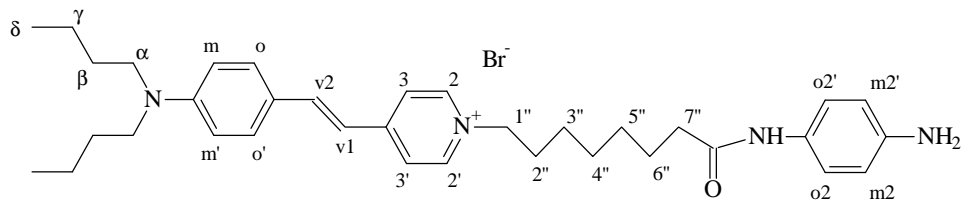
C₃₄H₄₇BrN₄O 607.68 g/mol
Ausbeute: 0.57 g (0.90 mmol), 78 %
Schmelzpunkt: 206 °C
UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 500 nm (51 400)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3424/3313/3159 (N-H Amid, N-H Amin asym., sym.), 3034 (C-H arom.), 2862 – 2956 (C-H aliph.), 1657 (C=O Amid), 1581/1523 (C=C arom.), 1169 (C-C_{v1/v2}), 809 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 9.43 (s, 1H, Amid-H), 8.76 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 8.04 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 7.90 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.57 (d, J = 9 Hz, 2H, o,o'-H), 7.20 (d, J = 9 Hz, 2H, o2,o2'-H), 7.12 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.73 (d, J = 9 Hz, 2H, m/m'-H), 6.48 (d, J = 9 Hz, 2H, m2/m2'-H), 4.82 (s, 2H, Amin-H), 4.41 (t, 2H, 1''-H), 2.22 (t, J = 7 Hz, 2H, 6''-H), 1.89 (m, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 1.55 (m, J = 7 Hz, 6H, β -H/5''-H), 1.34 (m, J = 7 Hz, 8H, γ -H/3''-H/4''-H), 0.94 (t, J = 7 Hz, 6H, δ -H)

MS (FAB): m/e [%] = 527.3 (M – Br, 33), 307.1 (16), 154.1 (100), 136.1 (74)

V 5.7: 1-[7-(*N*-*p*-aminophenylcarbamoyl)-heptyl]-4-[*p*-(*di-n*-butylamino)-styryl]-pyridiniumbromid 3g



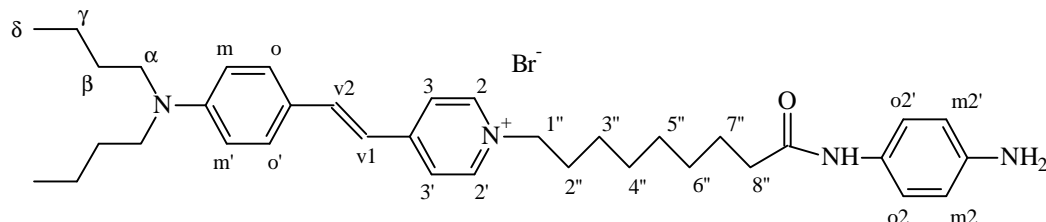
Nach der allgemeinen Vorschrift werden 0.48 g Carbonsäure 2g (0.9 mmol), 0.35 g *p*-Phenylendiamin (3.2 mmol), 0.59 g PyCloP (1.4 mmol) und 0.53 g DIEA (4.1 mmol) in 40 ml abs. Acetonitril und DMF (4:1) umgesetzt.

C₃₅H₄₉BrN₄O 621.71 g/mol
Ausbeute: 0.45 g (0.70 mmol), 80 %
Schmelzpunkt: 243 °C
UV/VIS (EtOH): λ_(max) (ε) = 499 nm (53 100)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3362/3251/3194 (N-H Amid, N-H Amin asym., sym.), 3034 (C-H arom.), 2859 – 2961 (C-H aliph.), 1682 (C=O Amid), 1580/1514 (C=C arom.), 1172 (C-C_{v1/v2}), 802 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 9.18 (s, 1H, Amid-H), 8.50 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 7.78 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 7.66 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.32 (d, J = 9 Hz, 2H, o,o'-H), 6.96 (d, J = 9 Hz, 2H, o2,o2'-H), 6.86 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.49 (d, J = 9 Hz, 2H, m/m'-H), 6.24 (d, J = 9 Hz, 2H, m2/m2'-H), 4.57 (s, 2H, Amin-H), 4.16 (t, 2H, 1''-H), 1.96 (t, J = 7 Hz, 2H, 7''-H), 1.63 (m, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 1.29 (m, J = 7 Hz, 6H, β-H/6''-H), 1.08 (m, J = 7 Hz, 10H, γ-H/3''-H/4''-H/5''-H), 0.69 (t, J = 7 Hz, 6H, δ-H)

MS (FAB): m/e [%] = 541.2 (M – Br, 100), 405.3 (20), 363.2 (21), 307.1 (96)

V 5.8: 1-[8-(*N*-*p*-aminophenylcarbamoyl)-octyl]-4-[*p*-(di-*n*-butylamino)-styryl]-pyridiniumbromid 3h


Nach der allgemeinen Vorschrift werden 0.51 g Carbonsäure 2h (0.9 mmol), 0.31 g *p*-Phenylendiamin (2.8 mmol), 0.56 g PyCloP (1.3 mmol) und 0.55 g DIEA (4.2 mmol) in 40 ml abs. Acetonitril und DMF (4:1) umgesetzt.

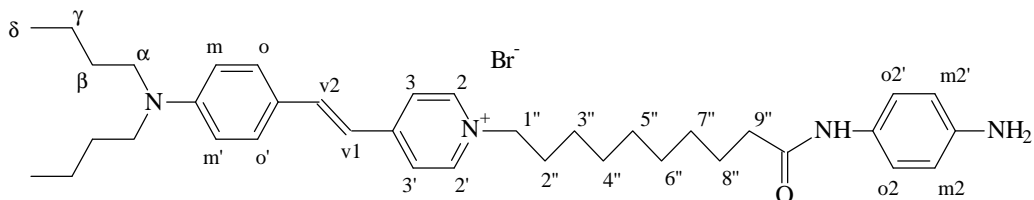
C₃₆H₅₁BrN₄O 635.74 g/mol
Ausbeute: 0.41 g (0.60 mmol), 71 %
Schmelzpunkt: 235 °C
UV/VIS (EtOH): λ_(max) (ε) = 500 nm (54 900)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3447 (N-H Amid), 3034 (C-H aromat.), 2850 – 2940 (C-H aliph.), 1582/1523 (C=C aromat.), 1171 (C-C_{v1/v2}), 833 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 9.49 (s, 1H, Amid-H), 8.82 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 8.09 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 7.96 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.62 (d, J = 9 Hz, 2H, o,o'-H), 7.26 (d, J = 9 Hz, 2H, o2,o2'-H), 7.17 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.79 (d, J = 9 Hz, 2H, m/m'-H), 6.54 (d, J = 9 Hz, 2H, m2/m2'-H), 4.87 (s, 2H, Amin-H), 4.46 (t, 2H, 1''-H), 2.26 (t, J = 7 Hz, 2H, 8''-H), 1.93 (m, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 1.59 (m, J = 7 Hz, 6H, β-H/7''-H), 1.38 (m, J = 7 Hz, 12H, γ-H/3''-H/4''-H/5''-H/6''-H), 0.99 (t, J = 7 Hz, 6H, δ-H)

MS (FAB): m/e [%] = 555.4 (M – Br, 69), 460.2 (25), 419.4 (34)

V 5.9: 1-[9-(*N*-*p*-aminophenylcarbamoyl)-nonyl]-4-[*p*-(*di-n*-butylamino)-styryl]-pyridiniumbromid **3i**



Nach der allgemeinen Vorschrift werden 0.86 g Carbonsäure **2i** (1.5 mmol), 0.58 g *p*-Phenylendiamin (5.4 mmol), 0.97 g PyCloP (2.3 mmol) und 0.91 g DIEA (6.9 mmol) in 45 ml abs. Acetonitril und DMF (4:1) umgesetzt.

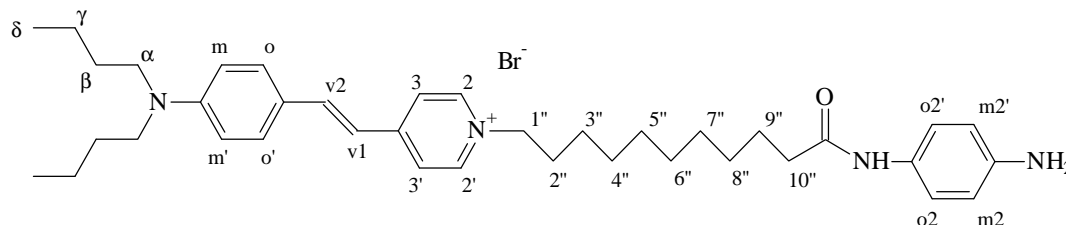
C₃₇H₅₃BrN₄O 649.76 g/mol
Ausbeute: 0.75 g (1.2 mmol), 77 %
Schmelzpunkt: 237 °C
UV/VIS (EtOH): λ_(max) (ε) = 499 nm (54 500)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3397/3318 (N-H Amid, N-H Amin asym.), 3034 (C-H aromat.), 2850 – 2940 (C-H aliphat.), 1655 (C=O Amid), 1586/1525 (C=C aromat.), 1176 (C-C_{v1/v2}), 823 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 9.50 (s, 1H, Amid-H), 8.81 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 8.09 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 7.95 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.62 (d, J = 9 Hz, 2H, o,o'-H), 7.26 (d, J = 9 Hz, 2H, o2,o2'-H), 7.17 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.79 (d, J = 9 Hz, 2H, m/m'-H), 6.54 (d, J = 9 Hz, 2H, m2/m2'-H), 4.89 (s, 2H, Amin-H), 4.45 (t, 2H, 1''-H), 2.26 (t, J = 7 Hz, 2H, 9''-H), 1.93 (m, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 1.59 (m, J = 7 Hz, 6H, β-H/8''-H), 1.36 (m, J = 7 Hz, 14H, γ-H/3''-H/4''-H/5''-H/6''-H/7''-H), 0.99 (t, J = 7 Hz, 6H, δ-H)

MS (FAB): m/e [%] = 569.3 (M – Br, 100), 335.3 (17), 265.2 (24)

V 5.10: 1-[10-(*N*-*p*-aminophenylcarbamoyl)-decyl]-4-[*p*-(*di-n*-butylamino)-styryl]-pyridiniumbromid **3j**



Nach der allgemeinen Vorschrift werden 1.09 g Carbonsäure **2j** (1.9 mmol), 1.03 g *p*-Phenylendiamin (9.5 mmol), 2.42 g PyCloP (5.7 mmol) und 0.74 g DIEA (5.7 mmol) in 60 ml abs. Acetonitril und DMF (4:1) umgesetzt.

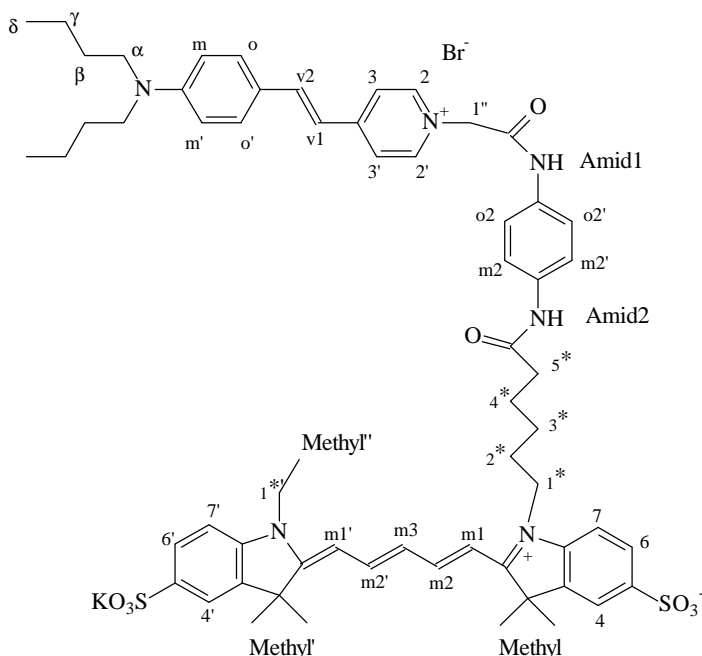
C₃₈H₅₅BrN₄O 663.79 g/mol
Ausbeute: 1.05 g (1.60 mmol), 83 %
Schmelzpunkt: 245 °C
UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 499 nm (49 800)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3414/3324/3169 (N-H Amid, N-H Amin asym., sym.), 3034 (C-H arom.), 2860 – 2955 (C-H aliph.), 1657 (C=O Amid), 1581/1523 (C=C arom.), 1170 (C=C_{v1/v2} Def.), 833 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 9.23 (s, 1H, Amid-H), 8.55 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 7.84 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 7.70 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.36 (d, J = 9 Hz, 2H, o,o'-H), 7.01 (d, J = 9 Hz, 2H, o2,o2'-H), 6.92 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.52 (d, J = 9 Hz, 2H, m/m'-H), 6.27 (d, J = 9 Hz, 2H, m2/m2'-H), 4.61 (s, 2H, Amin-H), 4.19 (t, 2H, 1''-H), 2.00 (t, J = 7 Hz, 2H, 10''-H), 1.66 (m, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 1.33 (m, J = 7 Hz, 6H, β -H/9''-H), 1.14 (m, J = 7 Hz, 4H, γ -H), 1.06 (m, J = 7 Hz, 12H, 3''-H/4''-H/5''-H/6''-H/7''-H/8''-H), 0.73 (t, J = 7 Hz, 6H, δ -H)

MS (FAB): m/e [%] = 583.4 (M – Br, 100), 335.2 (19), 265.2 (27)

V 6.1: Kalium-1-[5-(N-(4-(4-(*p*-N,N-di-*n*-butylaminostyryl)-pyridin-1-ium-methanoylamino)-phenylcarbamoyl)-pentyl]-2-[5-(1-ethyl-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3*H*-indol-2-yliden)-penta-1,3-dienyl]-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3*H*-indoliumbromid **4a**



Allgemeine Vorschrift zur Synthese und Reinigung der Bichromophore:

197 mg Amin **3a** (0.330 mmol), 229 mg Cy-5 (0.330 mmol), 165 mg PyCloP (0.390 mmol) und 190 mg DIEA (1.47 mmol) werden in 10 ml DMF (p. a.) gelöst und 24 h bei Raumtemperatur im geschlossenen Kolben gerührt. Es wird mit 50 ml Diethylether gefällt und abgesaugt. Das Rohprodukt wird in 5 ml Methanol/Dichlormethan (1:1) gelöst und säulenchromatografisch gereinigt: Säule 25 × 4 cm, Kieselgel 60, Laufmittel Methanol/Dichlormethan (1:3). Die Lösung des Bichromophors wird am Rotationsverdampfer eingengt, es wird mit Ether gefällt, in möglichst wenig Methanol/Dichlormethan (1:1) gelöst und in 70 ml einer konzentrierten wässrigen KBr-Lösung unter starkem Rühren eingetropft. Der Niederschlag wird abgesaugt, erneut in wenig Methanol/Dichlormethan (1:1) gelöst und an RP-18-Kieselgel säulenchromatografisch gereinigt: Säule 18 × 2.5 cm, 1) Methanol/Wasser (1:1), 2) 5 g Kaliumbromid in 25 ml Methanol/Wasser (1:10), 3) 50 ml Methanol/Wasser (1:10), 4) Gradientenelution mit Methanol/Wasser (1:10) bis (4:1). Die Lösung des reinen

Bichromophors wird schonend am Rotationsverdampfer eingeengt, die konzentrierte Lösung eingefroren und einer Gefriertrocknung unterworfen.

C₆₂H₇₄BrKN₆O₈S₂ 1214.44 g/mol

Ausbeute: 271 mg (0.220 mmol), 67 %

Schmelzpunkt: 302 °C

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 507 nm (33 800), 654 nm (130 500)

EA: konnte bisher nicht korrekt erhalten werden

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3260 (N-H Amid), 3060 (C-H aromat.), 2870 – 2950 (C-H aliph.), 1578/1522 (C=C aromat.), 1383 (Dimethylmethylen), 1167 (C=C_{v1/v2} Def.), 1107, 1019 (S=O sym., asym.), 827 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 10.50 (s, 1H, Amid1), 9.77 (s, 1H, Amid2), 8.57 (d, J = 7 Hz, 2H, 2/2'-H), 8.26 (t, J = 13 Hz, 2H, met2/met2'-H), 7.98 (d, J = 7 Hz, 2H, 3/3'-H), 7.88 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.75 (2s, 2H, 4/4'-H), 7.58 (m, 2H, 7/7'-H), 7.53 (d, J = 9 Hz, 2H, o/o'-H), 7.42 (dvd, J = 9 Hz, 4H, o2/o2'/m2/m2'-H), 7.24 (m, 2H, 6/6'-H), 7.08 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.67 (d, J = 9 Hz, 2H, m/m'-H), 6.51 (t, J = 13 Hz, 1H, met3-H), 6.23 (t, J = 13 Hz, 2H, met1/met1'-H), 5.32 (s, 2H, 1''-H), 4.04 (m, 4H, 1*/1*-H), 2.20 (t, J = 7 Hz, 2H, 5*-H), 1.53 – 1.70 (m, 15H, Methyl), 1.47 (m, 4H, 2*/4*-H), 1.24 – 1.35 (m, 6H, 3*/ β -H), 1.18 (m, 4H, γ -H), 0.86 (t, J = 7 Hz, 6H, δ -H)

MS (FAB): m/e [%] = 1095.3 (M – KBr, 47), 553.1 (50), 539.2 (52), 511.1 (76), 457.2 (100), 442.1 (48)

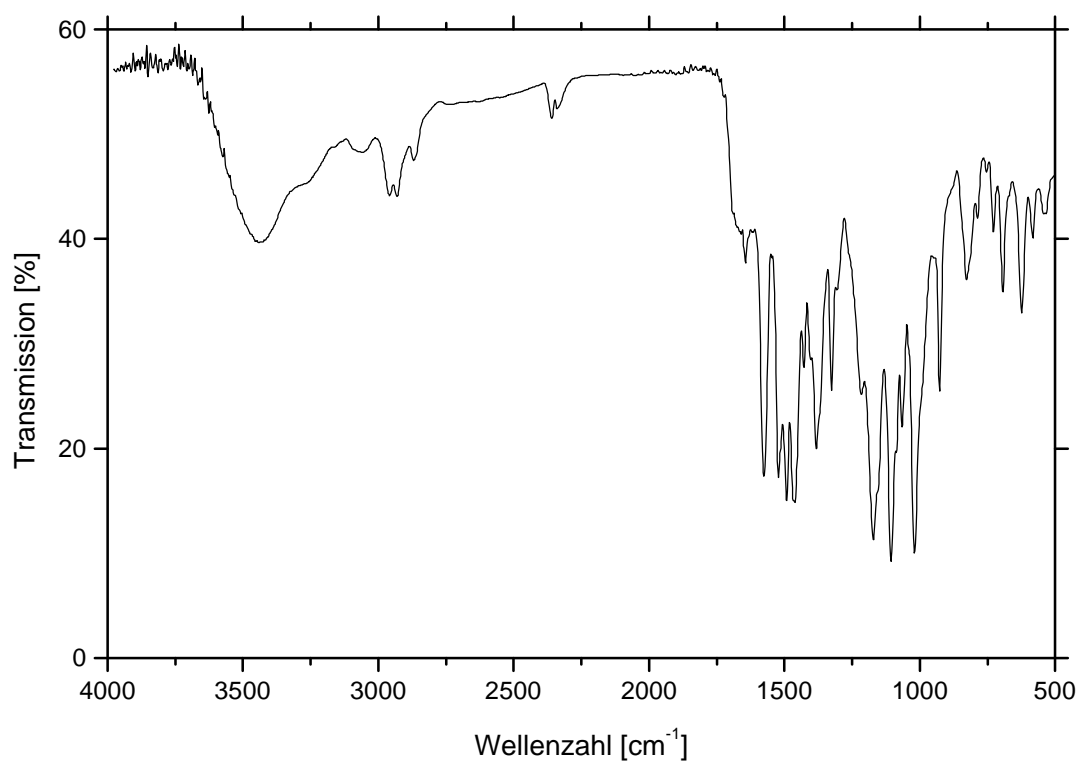
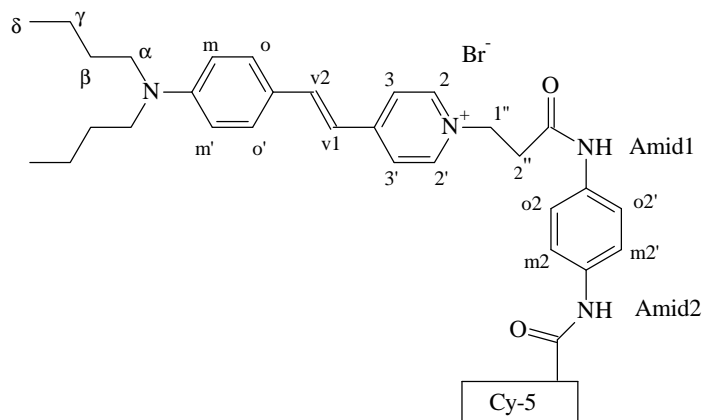


Abbildung 75: IR-Spektrum (KBr-Pressling) von **4a**.

V 6.2: Kalium-1-[5-(N-(4-(2-(4-(*p*-*N,N*-di-*n*-butylaminostyryl)-pyridin-1-*io*)-ethanoylamino)-phenylcarbamoyl)-pentyl)-2-[5-(1-ethyl-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3*H*-indol-2-yliden)-penta-1,3-dienyl]-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3*H*-indoliumbromid **4b**



Nach der allgemeinen Vorschrift werden 197 mg Amin **3b** (0.320 mmol), 222 mg Cy-5 (0.320 mmol), 162 mg PyCloP (0.380 mmol) und 173 mg DIEA (1.34 mmol) werden in 10 ml DMF (p. a.) zur Reaktion gebracht.

C₆₃H₇₆BrKN₆O₈S₂ 1228.47 g/mol

Ausbeute: 208 mg (0.170 mmol), 53 %

Schmelzpunkt: 292 °C

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 504 nm (54 500), 655 nm (187 000)

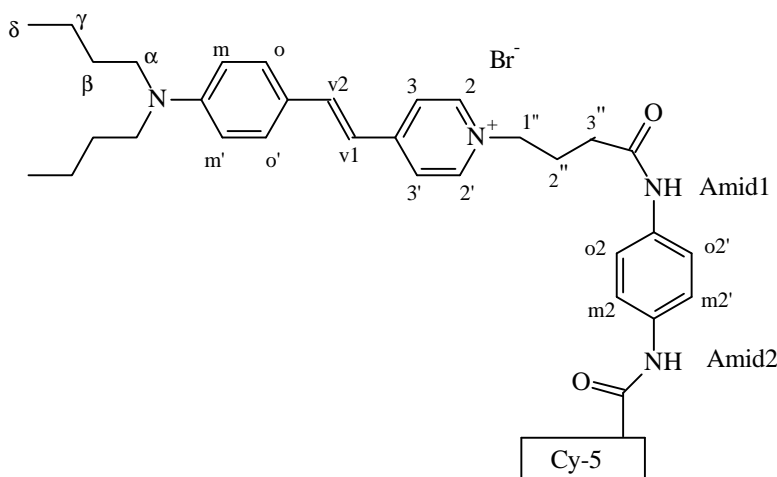
Elementaranalyse:	ber.(%):	C 61.60	H 6.24	N 6.84
	gef.(%):	C 62.20	H 7.33	N 7.09

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3260 (N-H Amid), 3060 (C-H aromat.), 2869 – 2950 (C-H aliph.), 1578/1523 (C=C aromat.), 1382 (Dimethylmethylen), 1166, (C=C_{v1/v2} Def.), 1107, 1019 (S=O sym., asym.), 827 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 10.13 (s, 1H, Amid1), 9.87 (s, 1H, Amid2), 8.85 (d, J = 7 Hz, 2H, 2/2'-H), 8.42 (t, J = 13 Hz, 2H, met2/met2'-H), 8.12 (d, J = 7 Hz, 2H, 3/3'-H), 7.98 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.91 (2s, 2H, 4/4'-H), 7.74 (m, 2H, 7/7'-H), 7.64 (d, J = 9 Hz, 2H, o/o'-H), 7.52 (dvd, J = 9 Hz, 4H, o2/o2'/m2/m2'-H), 7.41 (m, 2H, 6/6'-H), 7.19 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.80 (d, J = 9 Hz, 2H, m/m'-H), 6.66 (t, J = 13 Hz, 1H, met3-H), 6.39 (t, J = 13 Hz, 2H, met1/met1'-H), 4.78 (t, 2H, 1''-H), 4.19 (m, 4H, 1*/1*-H), 3.15 (t, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 2.34 (t, J = 7 Hz, 2H, 5*-H), 1.69 – 1.85 (m, 15H, Methyl), 1.61 (m, 4H, 2*/4*-H), 1.38 – 1.49 (m, 6H, 3*-/ β -H), 1.32 (m, 4H, γ -H), 1.01 (t, J = 7 Hz, 6H, δ -H)

MS (FAB): m/e [%] = 1109.3 (M – KBr, 7)

V 6.3: Kalium-1-[5-(N-(4-(3-(4-(*p*-*N,N*-di-*n*-butylaminostyryl)-pyridin-1-*io*)-propanoylamino)-phenylcarbamoyl)-pentyl]-2-[5-(1-ethyl-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3*H*-indol-2-yliden)-penta-1,3-dienyl]-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3*H*-indoliumbromid **4c**



Nach der allgemeinen Vorschrift werden 199 mg Amin **3c** (0.320 mmol), 219 mg Cy-5 (0.320 mmol), 160 mg PyCloP (0.380 mmol) und 171 mg DIEA (1.33 mmol) werden in 10 ml DMF (p. a.) zur Reaktion gebracht.

C₆₄H₇₈BrKN₆O₈S₂ 1242.50 g/mol

Ausbeute: 230 mg (0.190 mmol), 58 %

Schmelzpunkt: 286 °C

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 499 nm (57 000), 655 nm (254 900)

Elementaranalyse: ber.(%): C 61.87 H 6.33 N 6.76
gef.(%): C 60.51 H 7.05 N 6.52

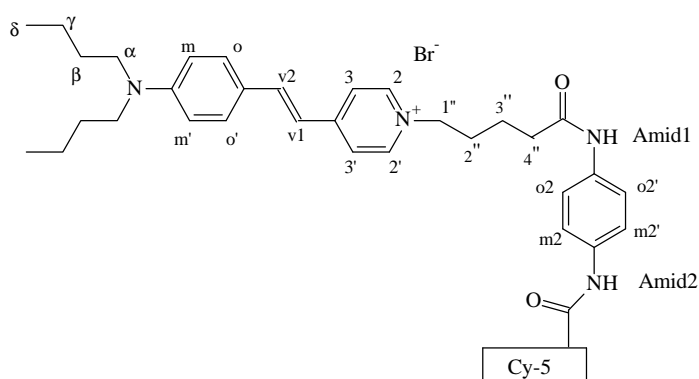
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3260 (N-H Amid), 3060 (C-H aromat.), 2869 – 2950 (C-H aliph.), 1578/1523 (C=C aromat.), 1382 (Dimethylmethylen), 1168 (C=C_{v1/v2} Def.), 1107, 1020 (S=O sym., asym.), 828 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 9.95 (s, 1H, Amid1), 9.84 (s, 1H, Amid2), 8.82 (d, J = 7 Hz, 2H, 2/2'-H), 8.43 (t, J = 13 Hz, 2H, met2/met2'-H), 8.13 (d, J = 7 Hz, 2H, 3/3'-H), 7.97 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.91 (2s, 2H, 4/4'-H), 7.74 (m, 2H, 7/7'-H), 7.65 (d, J = 9 Hz, 2H, o/o'-H), 7.52 (dvd, J = 9 Hz, 4H,

o2/o2'/m2/m2'-H), 7.40 (m, 2H, 6/6'-H), 7.18 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.81 (d, J = 9 Hz, 2H, m/m'-H), 6.66 (t, J = 13 Hz, 1H, met3-H), 6.38 (t, J = 13 Hz, 2H, met1/met1'-H), 4.56 (t, 2H, 1''-H), 4.20 (m, 4H, 1*/1*'-H), 2.44 (t, J = 7 Hz, 2H, 3''-H), 2.33 (t, J = 7 Hz, 2H, 5*-H), 2.27 (m, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 1.69 – 1.85 (m, 15H, Methyl), 1.62 (m, 4H, 2*/4*-H), 1.38 – 1.49 (m, 6H, 3*-/β-H), 1.34 (m, 4H, γ-H), 1.02 (t, J = 7 Hz, 6H, δ-H)

MS (FAB): m/e [%] = 1123.7 (M – KBr, 97), 581.5 (70), 511.4 (100)

V 6.4: Kalium-1-[5-(N-(4-(4-(4-(p-N,N-di-n-butylaminostyryl)-pyridin-1-yl)-butanoylamino)-phenylcarbamoyl)-pentyl]-2-[5-(1-ethyl-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3H-indol-2-yliden)-penta-1,3-dienyl]-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3H-indoliumbromid 4d



Nach der allgemeinen Vorschrift werden 246 mg Amin 3d (0.380 mmol), 265 mg Cy-5 (0.380 mmol), 192 mg PyCloP (0.460 mmol) und 221 mg DIEA (1.71 mmol) werden in 15 ml DMF (p. a.) zur Reaktion gebracht.

C₆₅H₈₀BrKN₆O₈S₂ 1256.52 g/mol

Ausbeute: 291 mg (0.230 mmol), 61 %

Schmelzpunkt: 270 °C

UV/VIS (EtOH): λ_(max) (ε) = 498 nm (65 700), 654 nm (294 900)

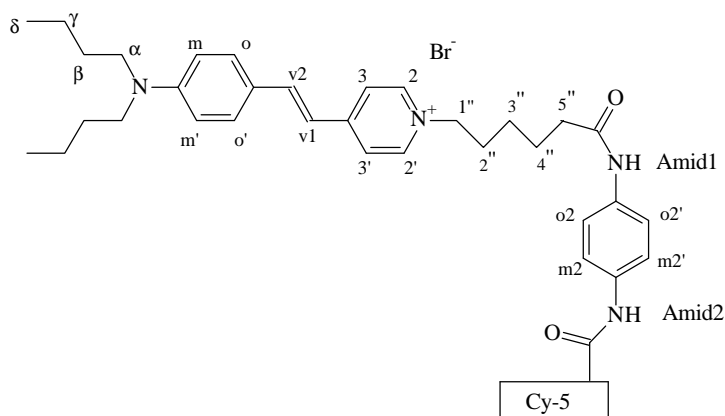
Elementaranalyse:	ber.(%):	C 62.13	H 6.42	N 6.69
	gef.(%):	C 62.95	H 7.66	N 5.59

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3260 (N-H Amid), 3060 (C-H aromat.), 2868 – 2950 (C-H aliph.), 1579/1522 (C=C aromat.), 1384 (Dimethylmethylen), 1168 (C=C_{v1/v2} Def.), 1107, 1020 (S=O sym., asym.), 828 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 9.74 (s, 1H, Amid1), 9.67 (s, 1H, Amid2), 8.66 (d, J = 7 Hz, 2H, 2/2'-H), 8.23 (t, J = 13 Hz, 2H, met2/met2'-H), 7.95 (d, J = 7 Hz, 2H, 3/3'-H), 7.79 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.71 (m, 2H, 4/4'-H), 7.55 (m, 2H, 7/7'-H), 7.46 (d, J = 9 Hz, 2H, o/o'-H), 7.34 (m, J = 9 Hz, 4H, o2/o2'/m2/m2'-H), 7.21 (m, 2H, 6/6'-H), 7.01 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.62 (d, J = 9 Hz, 2H, m/m'-H), 6.46 (t, J = 13 Hz, 1H, met3-H), 6.19 (dvd, J = 13 Hz, 2H, met1/met1'-H), 4.33 (t, 2H, 1''-H), 4.00 (m, 4H, 1*/1*'-H), 2.21 (t, J = 7 Hz, 2H, 4''-H), 2.15 (t, J = 7 Hz, 2H, 5*-H), 1.79 (m, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 1.64 – 1.50 (m, 15H, Methyl), 1.42 (m, 6H, 2*/4*-H/3''-H), 1.19 – 1.29 (m, 6H, 3*-/ β -H), 1.15 (m, 4H, γ -H), 0.82 (t, J = 7 Hz, 6H, δ -H)

MS (FAB): m/e [%] = 1137.2 (M – KBr, 7), 498.2 (11), 363.2 (51), 307.0 (100)

V 6.5: Kalium-1-[5-(N-(4-(5-(4-(*p*-N,N-di-*n*-butylaminostyryl)-pyridin-1-yl)-pentanoylamino)-phenylcarbamoyl)-pentyl]-2-[5-(1-ethyl-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3*H*-indol-2-yliden)-penta-1,3-dienyl]-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3*H*-indoliumbromid 4e



Nach der allgemeinen Vorschrift werden 241 mg Amin **3e** (0.370 mmol), 254 mg Cy-5 (0.370 mmol), 201 mg PyCloP (0.480 mmol) und 199 mg DIEA (1.54 mmol) werden in 15 ml DMF (p. a.) zur Reaktion gebracht.

C₆₆H₈₂BrKN₆O₈S₂ 1270.55 g/mol

Ausbeute: 338 mg (0.270 mmol), 72 %

Schmelzpunkt: 256 °C

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 496 nm (38 000), 654 nm (174 200)

Elementaranalyse:

ber.(%):	C 62.39	H 6.51	N 6.62
gef.(%):	C 63.72	H 8.80	N 4.04

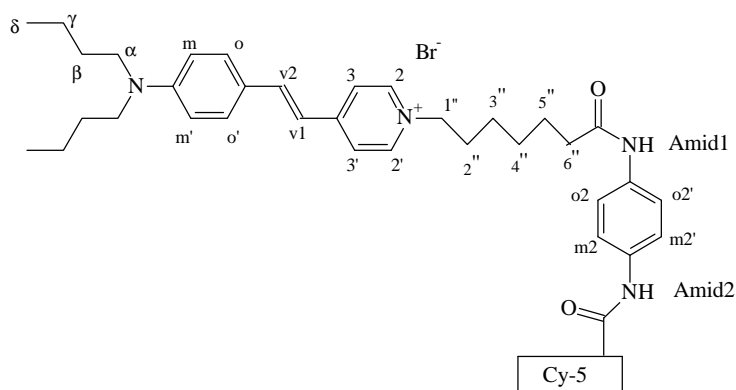
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3260 (N-H Amid), 3060 (C-H arom.), 2850 – 2940 (C-H aliph.), 1580/1523 (C=C arom.), 1382 (Dimethylmethylen), 1169 (C=C_{v1/v2} Def.), 1107, 1020 (S=O sym., asym.), 828 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 9.87(s, 1H, Amid1), 9.85 (s, 1H, Amid2), 8.84 (d, J = 7 Hz, 2H, 2/2'-H), 8.43 (t, J = 13 Hz, 2H, met2/met2'-H), 8.11 (d, J = 7 Hz, 2H, 3/3'-H), 7.97 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.91 (2s, 2H, 4/4'-H), 7.74 (m, 2H, 7/7'-H), 7.65 (d, J = 9 Hz, 2H, o/o'-H), 7.54 (m, J = 9 Hz, 4H, o2/o2'/m2/m2'-H),

7.41 (m, 2H, 6/6'-H), 7.19 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.81 (d, J = 9 Hz, 2H, m/m'-H), 6.66 (t, J = 13 Hz, 1H, met3-H), 6.38 (dvd, J = 13 Hz, 2H, met1/met1'-H), 4.50 (t, 2H, 1''-H), 4.20 (m, 4H, 1*/1*'-H), 2.35 (m, 4H, 5''-H/5*-H), 1.98 (m, 2H, J = 7 Hz, 2''-H), 1.81 (m, J = 7 Hz, 2H, 2*-H), 1.65 – 1.79 (m, 15H, Methyl), 1.62 (m, 4H, 4''-H/4*-H), 1.42 (m, 8H, 3''-H/3*-H/ β -H), 1.32 (m, 4H, γ -H), 1.01 (t, J = 7 Hz, 6H, δ -H)

MS (FAB): m/e [%] = 1151.6 (M – KBr, 71), 762.8 (20), 625.7 (100)

V 6.6: Kalium-1-[5-(N-(4-(6-(4-(*p*-N,N-di-*n*-butylaminostyryl)-pyridin-1-*io*)-hexanoylamino)-phenylcarbamoyl)-pentyl]-2-[5-(1-ethyl-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3*H*-indol-2-yliden)-penta-1,3-dienyl]-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3*H*-indoliumbromid **4f**



Nach der allgemeinen Vorschrift werden 269 mg Amin **3f** (0.390 mmol), 260 mg Cy-5 (0.390 mmol), 196 mg PyCloP (0.460 mmol) und 225 mg DIEA (1.74 mmol) werden in 15 ml DMF (p. a.) zur Reaktion gebracht.

C₆₇H₈₄BrKN₆O₈S₂ 1284.58 g/mol

Ausbeute: 381 mg (0.300 mmol), 76 %

Schmelzpunkt: 268 °C

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 497 nm (43 700), 654 nm (205 700)

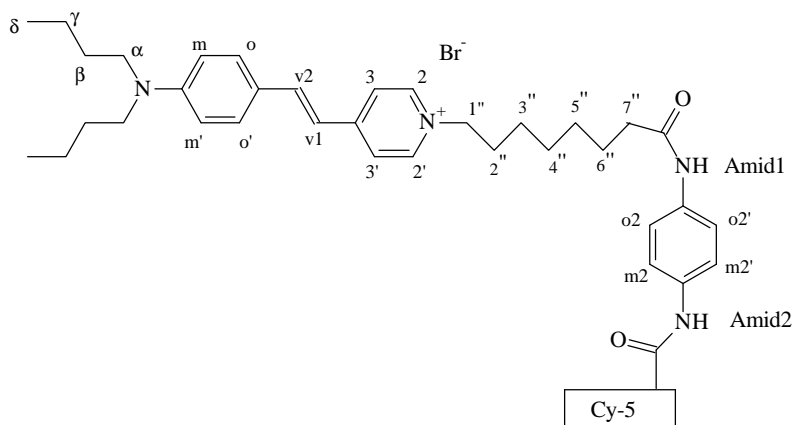
Elementaranalyse: ber.(%): C 62.65 H 6.59 N 6.54
gef.(%): C 62.65 H 7.58 N 6.45

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3260 (N-H Amid), 3060 (C-H aromat.), 2850 – 2940 (C-H aliph.), 1579/1523 (C=C aromat.), 1382 (Dimethylmethylen), 1170 (C=C_{v1/v2} Def.), 1108, 1020 (S=O sym., asym.), 829 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 9.85 (s, 2H, Amid1/Amid2), 8.85 (d, J = 7 Hz, 2H, 2/2'-H), 8.43 (t, J = 13 Hz, 2H, met2/met2'-H), 8.12 (d, J = 7 Hz, 2H, 3/3'-H), 7.98 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.90 (2s, 2H, 4/4'-H), 7.74 (m, 2H, 7/7'-H), 7.65 (d, J = 9 Hz, 2H, o/o'-H), 7.54 (m, J = 9 Hz, 4H, o2/o2'/m2/m2'-H), 7.41 (m, 2H, 6/6'-H), 7.19 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.81 (d, J = 9 Hz, 2H, m/m'-H), 6.65 (t, J = 13 Hz, 1H, met3-H), 6.38 (dvd, J = 13 Hz, 2H, met1/met1'-H), 4.49 (t, 2H, 1''-H), 4.20 (m, 4H, 1*/1*'-H), 2.34 (m, 4H, 6''-H/5*-H), 1.96 (m, 2H, J = 7 Hz, 2''-H), 1.82 (m, J = 7 Hz, 2H, 2*-H), 1.67 – 1.79 (m, 15H, Methyl), 1.62 (m, 6H, 3''-H/5''-H/4*-H), 1.42 (m, 8H, 4''-H/3*-H/ β -H), 1.33 (m, 4H, γ -H), 1.02 (t, J = 7 Hz, 6H, δ -H)

MS (FAB): m/e [%] = 1165.0 (M – KBr, 100), 623.2 (71), 553.0 (93), 527.2 (98)

V 6.7: Kalium-1-[5-(N-(4-(7-(4-(*p*-*N,N*-di-*n*-butylaminostyryl)-pyridin-1-yl)-heptanoylamino)-phenylcarbamoyl)-pentyl]-2-[5-(1-ethyl-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3*H*-indol-2-yliden)-penta-1,3-dienyl]-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3*H*-indoliumbromid **4g**



Nach der allgemeinen Vorschrift werden 240 mg Amin **3g** (0.390 mmol), 268 mg Cy-5 (0.390 mmol), 228 mg PyCloP (0.540 mmol) und 225 mg DIEA (1.74 mmol) werden in 14 ml DMF (p. a.) zur Reaktion gebracht.

C₆₈H₈₆BrKN₆O₈S₂ 1298.60 g/mol

Ausbeute: 289 mg (0.220 mmol), 57 %

Schmelzpunkt: 271 °C

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 496 nm (51 000), 654 nm (242 700)

Elementaranalyse:

ber.(%):	C 62.89	H 6.68	N 6.47
gef.(%):	C 64.10	H 7.48	N 6.31

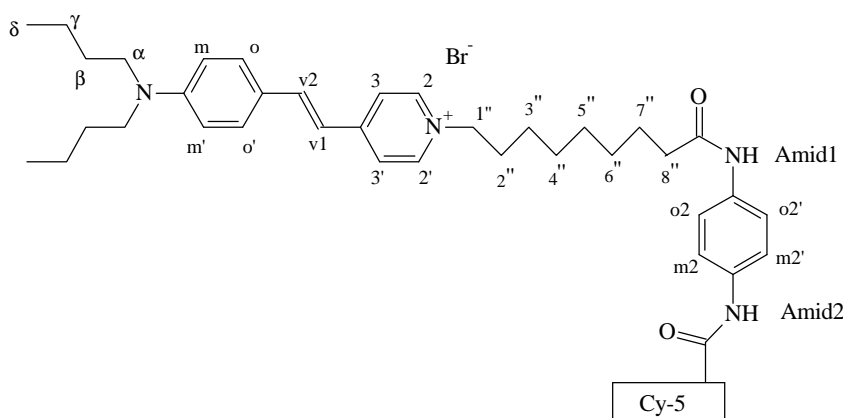
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3260 (N-H Amid), 3059 (C-H arom.), 2850 – 2940 (C-H aliph.), 1578/1523 (C=C arom.), 1382 (Dimethylmethylen), 1168 (C=C_{v1/v2} Def.), 1107, 1019 (S=O sym., asym.), 828 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 9.85 (s, 2H, Amid1/Amid2), 8.85 (d, J = 7 Hz, 2H, 2/2'-H), 8.43 (t, J = 13 Hz, 2H, met2/met2'-H), 8.12 (d, J = 7 Hz, 2H, 3/3'-H), 7.98 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.90 (2s, 2H, 4/4'-H), 7.74 (m, 2H, 7/7'-H), 7.65 (d, J = 9 Hz, 2H, o/o'-H), 7.54 (m, J = 9 Hz, 4H, o2/o2'/m2/m2'-H), 7.41 (m, 2H, 6/6'-H), 7.19 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.81 (d, J = 9 Hz, 2H, m/m'-H), 6.65 (t, J

= 13 Hz, 1H, met3-H), 6.38 (dvd, J = 13 Hz, 2H, met1/met1'-H), 4.49 (t, 2H, 1''-H), 4.20 (m, 4H, 1*/1*'-H), 2.34 (m, 4H, 7''-H/5*-H), 1.96 (m, 2H, J = 7 Hz, 2''-H), 1.81 (m, J = 7 Hz, 2*-H), 1.67 – 1.79 (m, 15H, Methyl), 1.62 (m, 8H, 3''-/4''-/6''-H/4*-H), 1.42 (m, 8H, 5''-H/3*-H/β-H), 1.34 (m, 4H, γ-H), 1.01 (t, J = 7 Hz, 6H, δ-H)

MS (FAB): m/e [%] = 1179.7 (M – KBr, 60), 638.6 (27), 595.5 (80), 567.4 (100)

V 6.8: Kalium-1-[5-(N-(4-(8-(4-(p-N,N-di-n-butylaminostyryl)-pyridin-1-yl)-octanoylamino)-phenylcarbamoyl)-pentyl]-2-[5-(1-ethyl-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3H-indol-2-yliden)-penta-1,3-dienyl]-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3H-indoliumbromid 4h



Nach der allgemeinen Vorschrift werden 283 mg Amin 3h (0.400 mmol), 281 mg Cy-5 (0.400 mmol), 256 mg PyCloP (0.610 mmol) und 235 mg DIEA (1.82 mmol) werden in 16 ml DMF (p. a.) zur Reaktion gebracht.

C₆₉H₈₈BrKN₆O₈S₂ 1312.63 g/mol

Ausbeute: 389 mg (0.300 mmol), 74 %

Schmelzpunkt: 259 °C

UV/VIS (EtOH): λ_(max) (ε) = 497 nm (48 500), 654 nm (238 100)

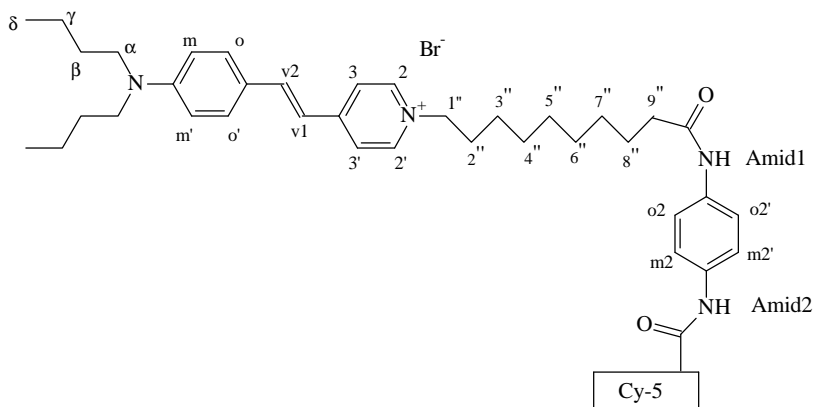
Elementaranalyse: konnte bisher nicht korrekt erhalten werden

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3262 (N-H Amid), 3059 (C-H aromat.), 2850 – 2940 (C-H aliph.), 1578/1523 (C=C aromat.), 1382 (Dimethylmethylen), 1169 (C=C_{v1/v2} Def.), 1107, 1019 (S=O sym., asym.), 827 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 9.84 (s, 2H, Amid1/Amid2), 8.85 (d, J = 7 Hz, 2H, 2/2'-H), 8.43 (t, J = 13 Hz, 2H, met2/met2'-H), 8.10 (d, J = 7 Hz, 2H, 3/3'-H), 7.98 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.91 (2s, 2H, 4/4'-H), 7.74 (m, 2H, 7/7'-H), 7.65 (d, J = 9 Hz, 2H, o/o'-H), 7.54 (m, J = 9 Hz, 4H, o2/o2'/m2/m2'-H), 7.41 (m, 2H, 6/6'-H), 7.20 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.81 (d, J = 9 Hz, 2H, m/m'-H), 6.64 (t, J = 13 Hz, 1H, met3-H), 6.38 (dvd, J = 13 Hz, 2H, met1/met1'-H), 4.49 (t, 2H, 1''-H), 4.20 (m, 4H, 1*/1*'-H), 2.33 (m, 4H, 8''-H/5*'-H), 1.96 (m, 2H, J = 7 Hz, 2''-H), 1.81 (m, J = 7 Hz, 2H, 2*-H), 1.66 – 1.80 (m, 15H, Methyl), 1.61 (m, 8H, 3''-/4''-/7''-H/4*-H), 1.41 (m, 10H, 5''-/6''-H/3*-H/ β -H), 1.32 (m, 4H, γ -H), 0.98 (t, J = 7 Hz, 6H, δ -H)

MS (FAB): m/e [%] = 1194.4 (M – KBr, 15)

V 6.9: Kalium-1-[5-(N-(4-(9-(4-(p-N,N-di-n-butylaminostyryl)-pyridin-1-io)-nonanoylamino)-phenylcarbamoyl)-pentyl]-2-[5-(1-ethyl-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3H-indol-2-yliden)-penta-1,3-dienyl]-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3H-indoliumbromid 4i



Nach der allgemeinen Vorschrift werden 239 mg Amin **3i** (0.330 mmol), 232 mg Cy-5 (0.330 mmol), 197 mg PyCloP (0.470 mmol) und 195 mg DIEA (1.51 mmol) werden in 14 ml DMF (p. a.) zur Reaktion gebracht.

C₇₀H₉₀BrKN₆O₈S₂ 1326.66 g/mol

Ausbeute: 302 mg (0.230 mmol), 69 %

Schmelzpunkt: 244 °C

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 497 nm (39 500), 654 nm (189 500)

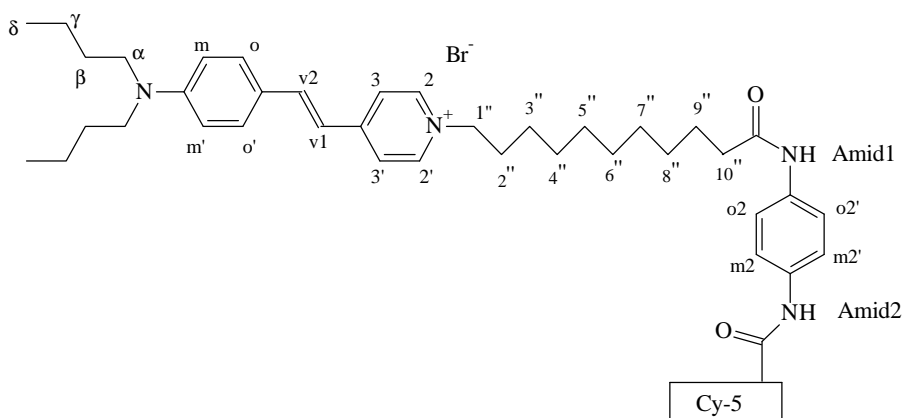
Elementaranalyse:	ber.(%):	C 63.38	H 6.84	N 6.34
	gef.(%):	C 63.39	H 8.33	N 5.01

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3262 (N-H Amid), 3059 (C-H aromat.), 2850 – 2940 (C-H aliph.), 1579/1523 (C=C aromat.), 1381 (Dimethylmethylen), 1169 (C=C_{v1/v2} Def.), 1107, 1020 (S=O sym., asym.), 827 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 9.79 (s, 2H, Amid1/Amid2), 8.83 (d, J = 7 Hz, 2H, 2/2'-H), 8.43 (t, J = 13 Hz, 2H, met2/met2'-H), 8.11 (d, J = 7 Hz, 2H, 3/3'-H), 7.97 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.91 (2s, 2H, 4/4'-H), 7.75 (m, 2H, 7/7'-H), 7.65 (d, J = 9 Hz, 2H, o/o'-H), 7.54 (m, J = 9 Hz, 4H, o2/o2'/m2/m2'-H), 7.41 (m, 2H, 6/6'-H), 7.19 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.81 (d, J = 9 Hz, 2H, m/m'-H), 6.64 (t, J = 13 Hz, 1H, met3-H), 6.38 (dvd, J = 13 Hz, 2H, met1/met1'-H), 4.47 (t, 2H, 1''-H), 4.16 (m, 4H, 1*/1*'-H), 2.33 (m, 4H, 9''-H/5*-H), 1.96 (m, 2H, J = 7 Hz, 2''-H), 1.81 (m, J = 7 Hz, 2H, 2*-H), 1.69 – 1.81 (m, 15H, Methyl), 1.61 (m, 6H, 3''-/8''-H/4*-H), 1.42 (m, 8H, 7''-H/3*-H/ β -H), 1.33 (m, 10H, γ -H/4''-/5''-/6''-H), 1.00 (t, J = 7 Hz, 6H, δ -H)

MS (FAB): m/e [%] = 1207.3 (M – KBr, 34)

V 6.10: Kalium-1-[5-(N-(4-(10-(4-(p-N,N-di-n-butylaminostyryl)-pyridin-1-yl)-decanoylamino)-phenylcarbamoyl)-pentyl]-2-[5-(1-ethyl-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3H-indol-2-yliden)-penta-1,3-dienyl]-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3H-indoliumbromid **4j**



Nach der allgemeinen Vorschrift werden 200 mg Amin **3i** (0.280 mmol), 190 mg Cy-5 (0.280 mmol), 233 mg PyCloP (0.340 mmol) und 163 mg DIEA (1.26 mmol) werden in 10 ml DMF (p. a.) zur Reaktion gebracht.

C₇₁H₉₂BrKN₆O₈S₂ 1340.69 g/mol

Ausbeute: 278 mg (0.210 mmol), 74 %

Schmelzpunkt: 254 °C

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 496 nm (41 500), 654 nm (194 300)

Elementaranalyse:	ber.(%):	C 63.61	H 6.92	N 6.29
	gef.(%):	C 64.06	H 8.68	N 4.22

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3259 (N-H Amid), 3045 (C-H aromat.), 2852 – 2945 (C-H aliph.), 1577/1522 (C=C aromat.), 1382 (Dimethylmethylen), 1167 (C=C_{v1/v2} Def.), 1106, 1019 (S=O sym., asym.), 827 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 9.64 (s, 2H, Amid1/Amid2), 8.79 (d, J = 7 Hz, 2H, 2/2'-H), 8.40 (t, J = 13 Hz, 2H, met2/met2'-H), 8.08 (d, J = 7 Hz, 2H, 3/3'-H), 7.97 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.90 (2s, 2H, 4/4'-H), 7.74 (m, 2H, 7/7'-H),

7.65 (d, J = 9 Hz, 2H, o/o'-H), 7.54 (m, J = 9 Hz, 4H, o2/o2'/m2/m2'-H), 7.41 (m, 2H, 6/6'-H), 7.17 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.81 (d, J = 9 Hz, 2H, m/m'-H), 6.62 (t, J = 13 Hz, 1H, met3-H), 6.38 (dvd, J = 13 Hz, 2H, met1/met1'-H), 4.45 (t, 2H, 1''-H), 4.16 (m, 4H, 1*/1*'-H), 2.33 (m, 4H, 10''-H/5*-H), 1.96 (m, 2H, J = 7 Hz, 2''-H), 1.81 (m, J = 7 Hz, 2H, 2*-H), 1.69 – 1.81 (m, 15H, Methyl), 1.59 (m, 6H, 3''-/9''-H/4*-H), 1.40 (m, 8H, 8''-H/3*-H/β-H), 1.32 (m, 12H, γ-H/4''-/5''-/6''-/7''-H), 0.98 (t, J = 7 Hz, 6H, δ-H)

MS (FAB): m/e [%] = 1221.2 (M – KBr, 2)

V 7: 7-Bromheptansäure 45

0.60 g Natrium (26.0 mmol) werden in 15 ml Methanol (abs.) aufgelöst, dann werden 6.00 g Malonsäurediethylester (37.0 mmol) zugegeben und auf dem Wasserbad unter Feuchtigkeitsausschluß bis zur klaren Lösung erwärmt. Die Malonatlösung wird zu einer Lösung von 12.00 g 1,5-Dibrompentan (52.00 mmol) in 20 ml absolutem Ether getropft. Bei einsetzender Reaktion kommt es zu starker Wärmeentwicklung und Bildung eines Niederschlages, eventuell muß mit dem Wasserbad gekühlt werden. Man rührt noch 8 h bei Raumtemperatur, dann wird mit 20 ml Wasser versetzt, die organische Phase abgetrennt, die wässrige Phase dreimal mit 15 ml Ether gewaschen, die vereinigten organischen Phasen vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Nach abfiltrieren und abdestillieren der Lösungsmittel wird der Rückstand mit 50 ml 48%iger Bromwasserstoffsäure versetzt und für 8 h gekocht. es wird viermal mit 20 ml Diethylether ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet und der Ether abdestilliert.

Der Rückstand, ein bräunlicher Kristallbrei, wird ohne weitere Reinigung mit 4-Picolin umgesetzt.

Rohausbeute: 4.39 g

V 8.1: 8-Bromoctansäure 46

12.00 g 1,8-Octandiol (82.00 mmol) und 23.77 g Bromwasserstoffsäure (48 %) werden mit 4.1 ml 98 %ige Schwefelsäure versetzt und 3 h refluxiert. Die Emulsion wird dreimal mit 40 ml Chloroform ausgeschüttelt, die vereinigten Chloroformphasen mit Wasser gewaschen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer vollständig entfernt. der Rückstand wird in 145 ml 20 %iger Schwefelsäure gelöst und unter kräftigem Rühren bei Temperaturen zwischen 12 und 16 °C portionsweise mit 12.95 g Kaliumpermanganat (82.00 mmol) versetzt. Nach Zugabe wird noch 3 h bei Raumtemperatur gerührt, dann wird vom Braunstein abfiltriert, mit Ether gewaschen und die Lösung mehrfach ausgeethert. Die Etherphasen werden über Natriumsulfat getrocknet, nach Filtration wird dann der Ether am Rotationsverdampfer vollständig entfernt.

Das zurückbleibende Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung sofort mit 4-Picolin umgesetzt.

Rohausbeute: 17.04 g

V 8.2: 9-Bromnonansäure 47

Analog **V8.1** werden 15.16 g 1,9-Nonandiol (95.00 mmol) und 27.74 g Bromwasserstoffsäure (48 %) mit 4.8 ml 98 %iger Schwefelsäure umgesetzt.. Die Oxidation erfolgt in 84 ml 20 %iger Schwefelsäure mit 14.22 g Kaliumpermanganat (90.00 mmol).

Rohausbeute: 18.20 g

V 8.3: 10-Bromdecansäure 48

Analog **V8.1** werden 12.11 g 1,10-Decandiol (69.00 mmol) und 20.15 g Bromwasserstoffsäure (48 %) mit 3.5 ml 98 %iger Schwefelsäure umgesetzt.. Die Oxidation erfolgt in 84 ml 20 %iger Schwefelsäure mit 10.90 g Kaliumpermanganat (69.00 mmol).

Rohausbeute: 12.81 g

V 9: Bromessigsäure 49

10 g Eisessig (0.17 mol) werden mit HCl-Gas gesättigt. Dann wird unter Eiskühlung mit 28.77 g Brom (180.0 mmol) versetzt und für 9 h auf 90 °C erhitzt. Die entstehenden HBr-Dämpfe werden mit einem NaOH-Bad aufgefangen. Das Rohprodukt wird im Wasserstrahlvakuum fraktioniert destilliert

C₂H₃BrO₂	138.95 g/mol
Ausbeute:	21.02 g (150.0 mmol), 89 %
Schmelzpunkt:	48 – 49 °C (Lit.: 49.4 °C)
Siedepunkt:	99 – 100 °C (20 mbar) (Lit.: 104 - 105 °C (27 mbar))

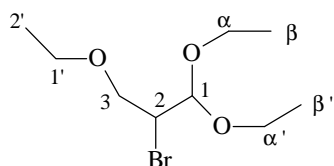
V 10.1: 2-Brompropenal 50

56.0 g frisch destilliertes Acrolein (1.0 mol) werden in 200 ml abs. Diethylether gelöst und bei 0 - 5 °C werden 159.3 g Brom (1.0 mol) zugetropft. Dann werden bei 0 °C 100.9 g Triethylamin (1.0 mol) zugetropft. Nach Abfiltrieren des Niederschlags

wird dieser mit Ether gewaschen. Der Ether wird am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand im Wasserstrahlvakuum fraktioniert.

C₃H₃BrO	135.06 g/mol
Ausbeute:	78.34 g (580.0 mmol), 58 % (Lit.: 68 %)
Siedepunkt:	32 - 33 °C (22 mbar) (Lit.: 49 - 50 °C (30 mbar))
Brechungsindex:	$n_D^{23} = 1.5065$ (Lit.: $n_D^{21} = 1.5083$)

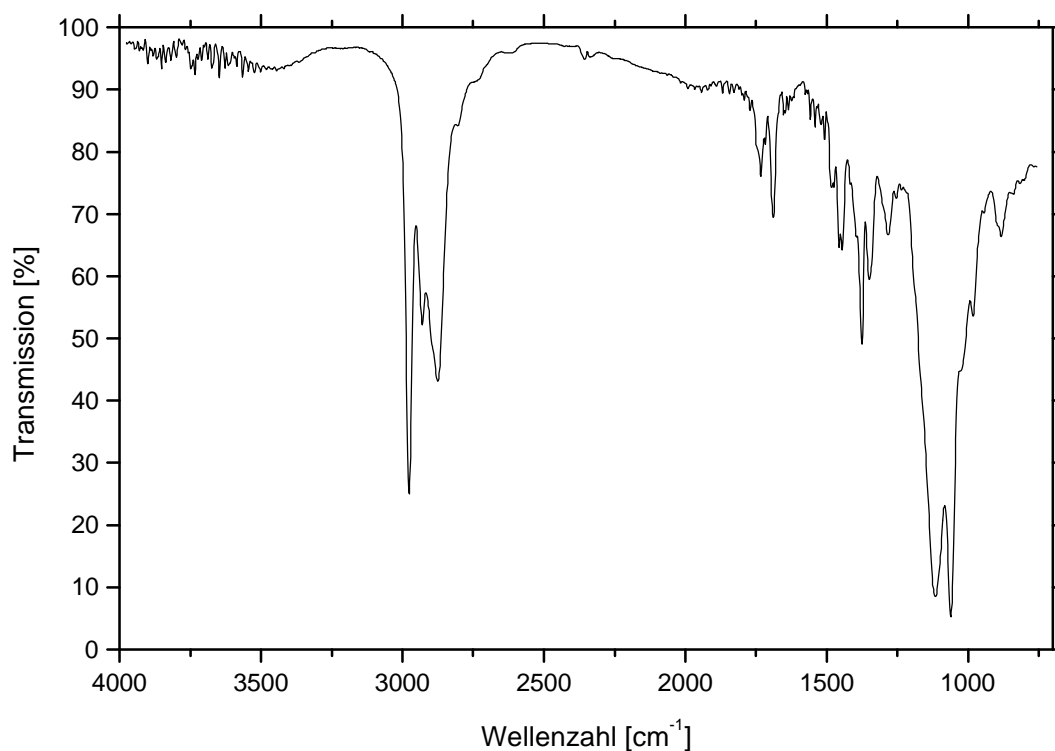
V 10.2: 2-Brom-1,1,3-triethoxypropan 51



1.80 g Ammoniumchlorid (33.7 mmol) werden vorgelegt und kurz mit wenig Ethanol (abs.) gewaschen. Nach Dekantieren werden 55 ml Ethanol (abs.) zugegeben und mit 43.50 g 2-Brompropenal (320.0 mmol) versetzt. Es wird eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt, dann wird innerhalb von drei Stunden auf 80 °C erwärmt. Es wird Natriumsulfat zugegeben und über Nacht getrocknet. Nach Abfiltrieren wird das Lösungsmittel abdestilliert und dann über eine 30 cm lange Vigreux-Kolonne im Vakuum fraktioniert.

C₉H₁₉BrO₃	256.04 g/mol
Ausbeute:	78.34 g (580.0 mmol), 29 % (Lit.: 34 %)
Siedepunkt:	68 – 69 °C (0.1 mbar) (Lit.: 89 - 91 °C (3.5 mbar))
Brechungsindex:	$n_D^{24} = 1.4482$ (Lit.: $n_D^{20} = 1.447$)

¹H-NMR₅₀₀ (CDCl₃/TMS): δ [ppm] = 4.65 (d, J = 5 Hz, 1H, 1-H), 4.08 (m, J = 5 Hz, 1H, 2-H), 3.73 – 3.85 (m, 4H, 3-H/1'-H), 3.52 – 3.66 (m, 4H, α,α'-H), 1.22, 1.24, 1.25 (drei t, J = 7 Hz, 9H, β,β'-H/2'-H)


 Abbildung 76: IR-Spektrum (KBr-Pressling) von 51.

V 10.3: 1,3,3-Triethoxypropen 52

14.61 g Kaliumhydroxid (260.0 mmol) werden in 50 ml Ethanol (abs.) gelöst, unter Stickstoff werden dann 23.82 g 2-Brom-1,1,3-triethoxypropan (93.00 mmol) zugegeben. Es wird für zwei Stunden refluxiert. Nach Eiskühlung wird abfiltriert, mit dem gleichen Volumen Ether versetzt und über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Nach Absaugen wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand über eine 30 cm lange Vigreux-Kolonnen im Vakuum fraktioniert.

C₉H₁₈O₃ 174.20 g/mol

Ausbeute: 7.89 g (45.0 mmol), 49 % (Lit.: 74 %)

Siedepunkt: 47 – 49 °C (0.4 mbar) (Lit.: 80 – 81 °C (10 mbar))

Brechungsindex: $n_D^{22} = 1.4240$ (Lit.: $n_D^{20} = 1.4249$)

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2879 – 2976 (C-H aliph.), 1656 (C=C), 1377 (Methyl sym. Def.), 1115/1063 (C-O Ether)

$^1\text{H-NMR}_{500}$ (CDCl_3/TMS): δ [ppm] = 6.10 (d, $J = 7$ Hz, 1H, 1-H), 5.39 (d, $J = 8$ Hz, 1H, 3-H), 4.57 (t, $J = 7$ Hz, 1H, 2-H), 3.82 (m, 2H, Methylen), 3.65 (m, 2H, Acetalmethylen), 3.53 (m, 2H, Acetalmethylen), 1.25 (t, $J = 7$ Hz, 3H, Methyl), 1.22 (t, $J = 7$ Hz, 6H, Acetalmethyl)

MS (EI): m/e [%] = 175.3 (M + H, 39), 147.3 (M – C_2H_3 , 57), 129.2 (M – OC_2H_5 , 21), 103.2 ($\text{HC}(\text{OEt})_2$, 83), 59.2 (EtOCH_2 , 100)

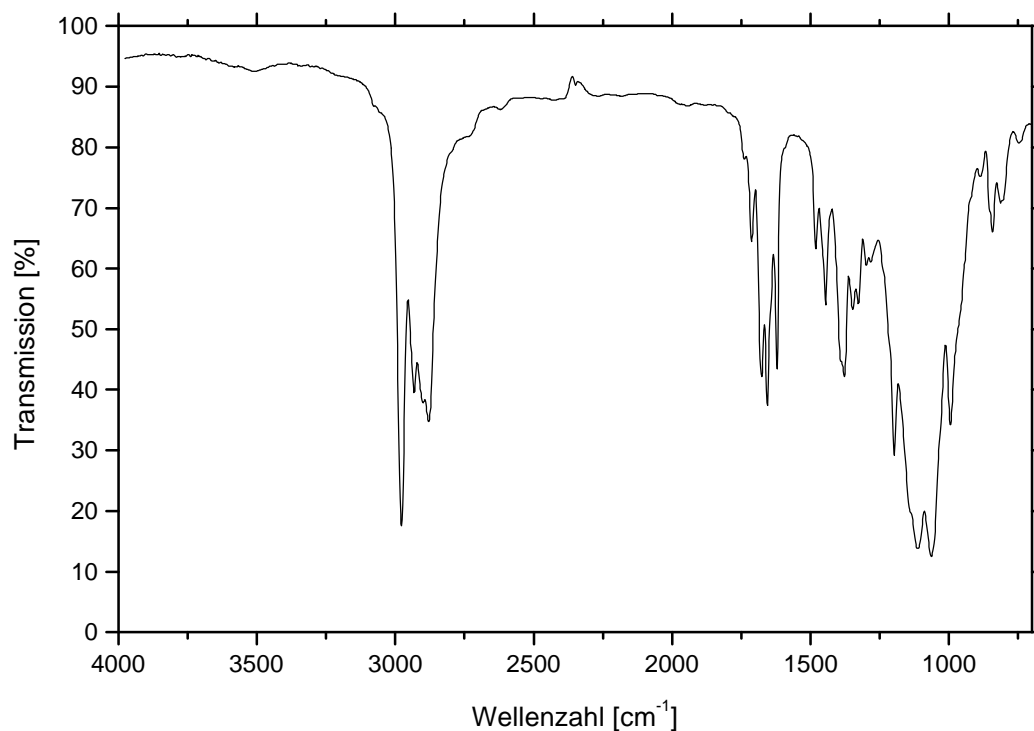
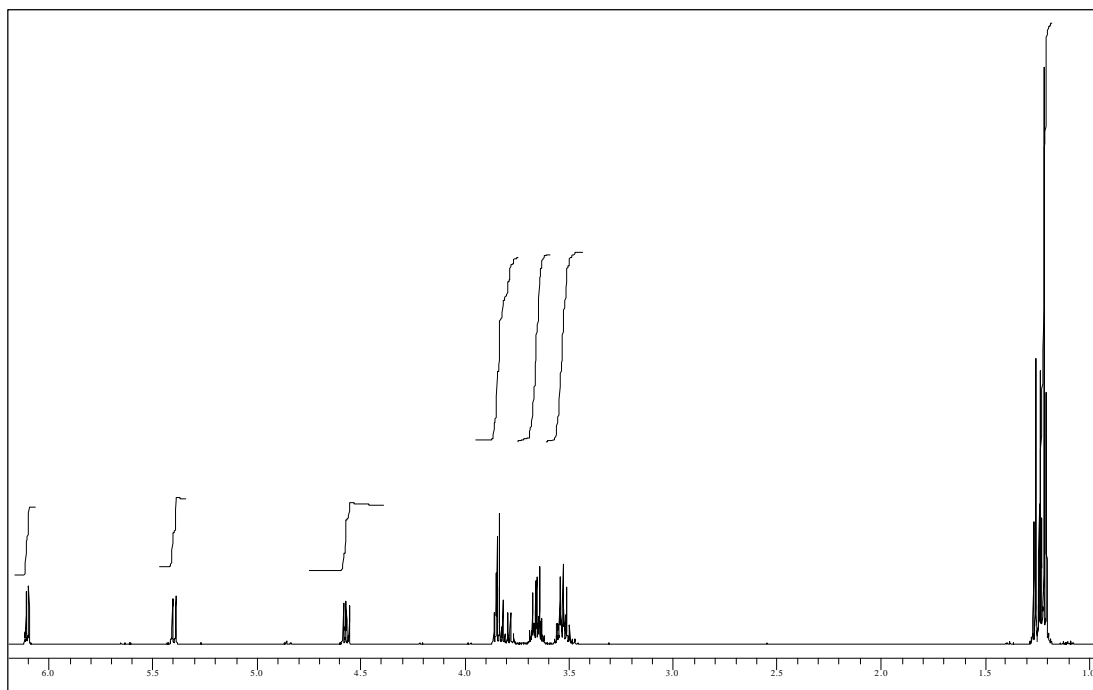


Abbildung 77: IR-Spektrum (KBr-Pressling) von **52**.


 Abbildung 78: $^1\text{H-NMR}_{500}$ (CDCl_3/TMS) von 1,3,3-Triethoxypropen **52**.

V 11: Kalium-2,3,3-Trimethyl-5-sulfonato-3*H*-indol **53**

13.06 g 3-Methyl-2-butanon (150.0 mmol) und 10.00 g p-Hydrazinobenzolsulfonsäure (53.00 mmol) werden in 30 ml Eisessig für drei Stunden unter Rückfluß gekocht. Der rosa Niederschlag wird am nächsten Tag abgesaugt und mehrmals mit kleinen Portionen Ether gewaschen. Dann wird in möglichst wenig Methanol gelöst. Zu dieser Lösung läßt man unter kräftigem Rühren eine Lösung aus 2.97 g Kaliumhydroxid (53 mmol) in Isopropanol zufließen. Der ockerfarbene Niederschlag wird abgesaugt, mit Diethylether/Isopropanol (1:1) gewaschen und getrocknet.

$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{KNO}_3\text{S}$ 277.39 g/mol

Ausbeute: 14.70 g (39.00 mmol), 73 %

$^1\text{H-NMR}_{500}$ (DMSO- $[\text{d}_6]$ /TMS): δ [ppm] = 7.63 (s, 1H, 4-H), 7.49 (dvd, $J = 8$ Hz, 1 Hz, 1H, 6-H), 7.27 (d, $J = 8$ Hz, 1H, 7-H), 2.26 (s, 3H, 2-Methyl), 1.27 (s, 6H, 3-Methyl)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2856 – 2974 (C-H aliph.), 1575 (C=C arom.), 1460 (C-H Def.), 1193 (sym. S=O)

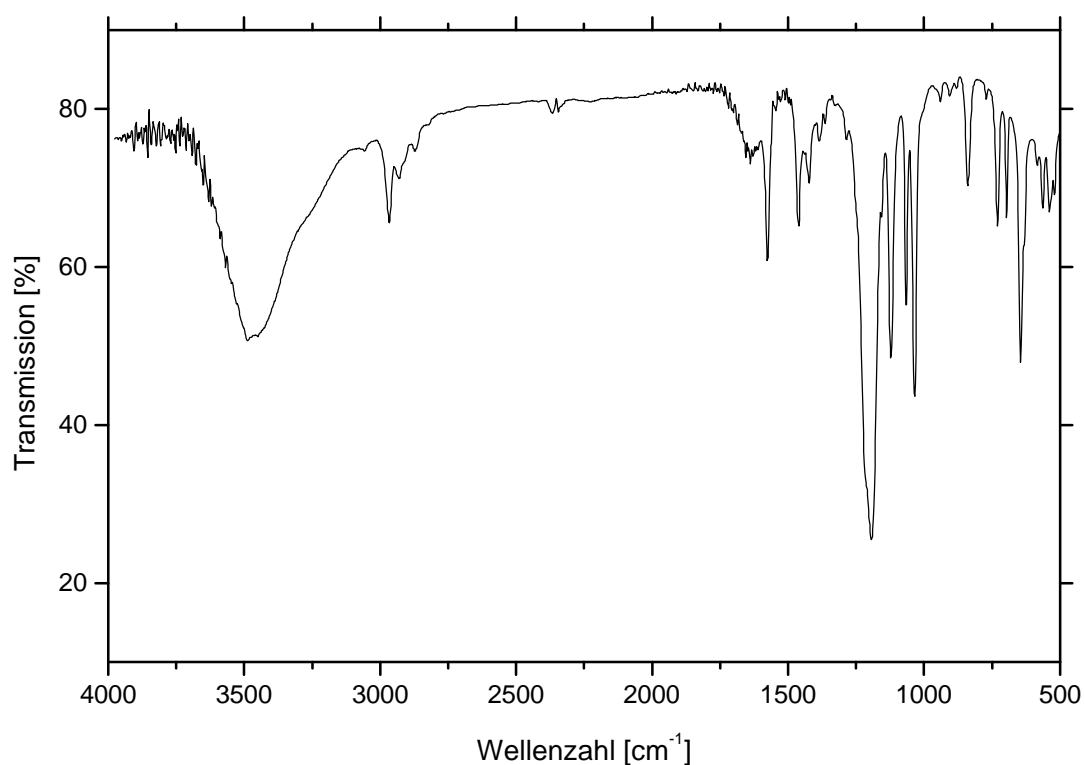
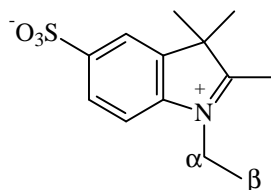


Abbildung 79: IR-Spektrum (KBr-Pressling) von 53

V 12: 1-Ethyl-2,3,3-trimethyl-3H-indolium-5-sulfonat 54


2.19 g **53** (7.90 mmol) werden mit 25 g Ethyliodid vermengt und unter Feuchtigkeitsausschluß 24 h unter Reflux gekocht. Vom überschüssigen Ethyliodid wird dekantiert und der Rückstand wird dreimal mit 50 ml Aceton gewaschen. Es wird abgesaugt und getrocknet.

C₁₃H₁₇NO₃S 267.35 g/mol

Ausbeute: 2.07 g (7.70 mmol), 98 %

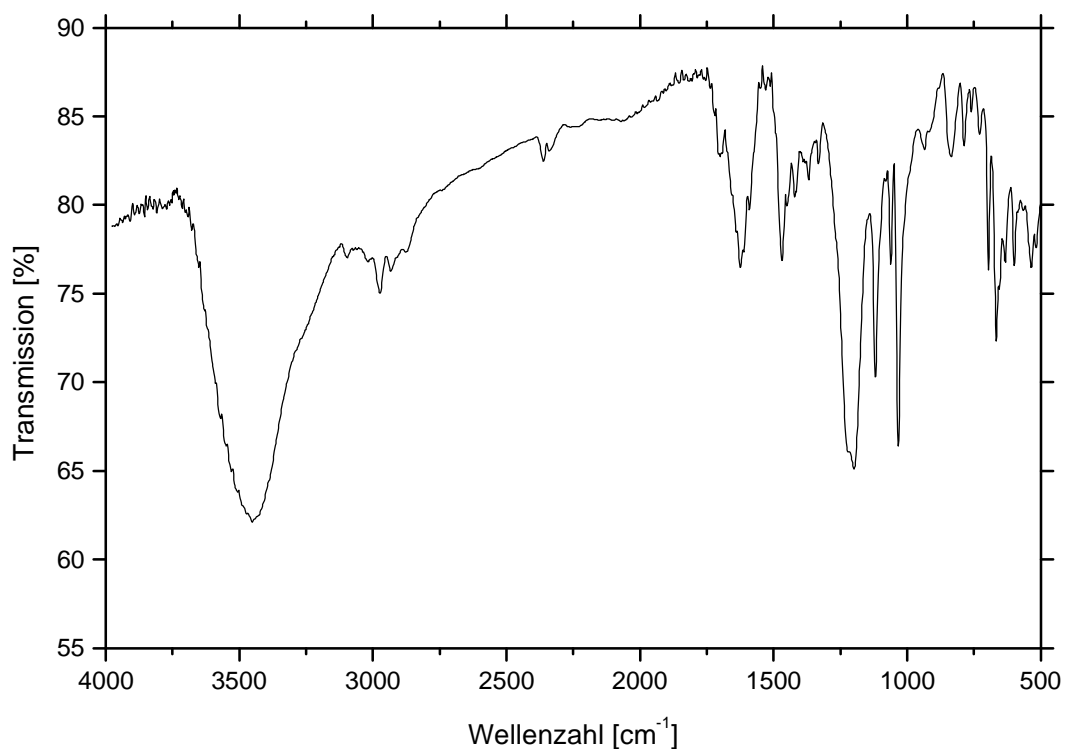


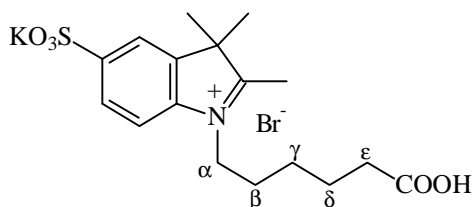
Abbildung 80: IR-Spektrum (KBr-Pressling) von **54**.

$^1\text{H-NMR}_{500}$ (DMSO- $[\text{d}_6]$ /TMS): δ [ppm] = 8.04 (s, 1H, 4-H), 7.91 (m, 1H, 7-H), 7.85 (m, 1H, 6-H), 4.48 (q, 2H, $^3J_{\text{H,H}} = 7$ Hz, α -H), 2.83 (s, 3H, 2-Methyl), 1.55 (s, 6H, 3-Methyl), 1.45 (t, 3H, $^3J_{\text{H,H}} = 7$ Hz, β -H)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2855 – 2971 (C-H aliph.), 1624 (C=C arom.), 1470 (C-H Def.), 1199 (sym. S=O)

V 13: 1-(5-Carboxypentyl)-2,3,3-Trimethyl-5-sulfonato-3H-indolium-bromid

55



2.00 g **53** (7.20 mmol) und 1.76 g 6-Bromhexansäure (9.00 mmol) werden in 18 ml o-Dichlorbenzol bei 130 °C Ölbadtemperatur 15 h unter Stickstoff gekocht. Nach Erkalten wird vom Lösungsmittel dekantiert, der Rückstand fein gemörstert und mehrmals mit Isopropanol, zuletzt mit Ether gewaschen, dann getrocknet.

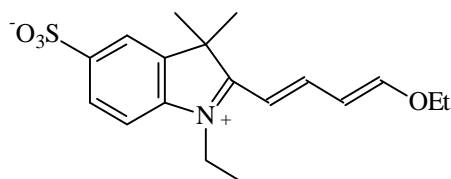
$\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{S}$ 472.44 g/mol

Ausbeute: 2.42 g (5.10 mmol), 71 %

$^1\text{H-NMR}_{500}$ (DMSO- $[\text{d}_6]$ /TMS): δ [ppm] = 8.05 (s, 1H, 4-H), 7.94 (m, 1H, 7-H), 7.82 (m, 1H, 6-H), 4.48 (q, 2H, $^3J_{\text{H,H}} = 7$ Hz, α -H), 2.80 (s, 3H, 2-Methyl), 2.30 (t, 2H, $^3J_{\text{H,H}} = 7$ Hz, ϵ -H), 1.85 (quint, 2H, $^3J_{\text{H,H}} = 7$ Hz, β -H), 1.65 (m, 4H, $^3J_{\text{H,H}} = 7$ Hz, γ , δ -H), 1.52 (s, 6H, 3-Methyl)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2850 – 2970 (C-H aliph.), 1719 (C=O Carboxyl), 1626 (C=C arom.), 1459 (C-H Def.), 1199 (sym. S=O)

V 14.1: 2-(4-Ethoxybuta-1,3-dienyl)-1-ethyl-3,3-dimethyl-3H-indolium-5-sulfonat 56

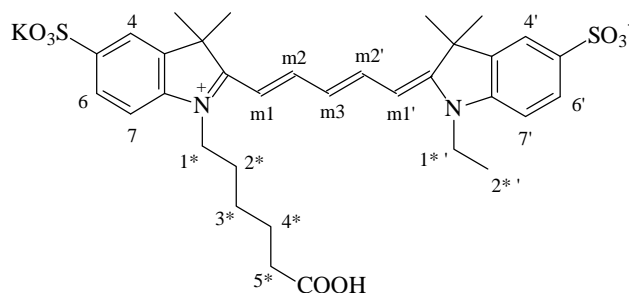


1.40 g 53 (5.20 mmol) werden in 25 ml Eisessig suspendiert und 15 min unter Rühren mit Stickstoff begast. Dann werden 2.72 g 1,3,3-Triethoxypropen (15.6 mmol) zugegeben; es wird bei Raumtemperatur unter Stickstoff weitergerührt, bis der Bodenkörper vollständig in Lösung gegangen ist. Per DC ermittelt man den vollständigen Umsatz. Dann wird mit Ethylacetat gefällt, zur Vervollständigung der Fällung stellt man über Nacht in den Kühlschrank und saugt dann ab. Zur vollständigen Entfernung des Triethoxypropens wird noch zweimal mit Ethylacetat gewaschen. Der gelbe Feststoff wird getrocknet und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

$C_{18}H_{23}NO_4S$ 349.45 g/mol

Ausbeute: 1.71 g (4.90 mmol), 95 %

V 14.2: Kalium-1-(5-Carboxypentyl)-2-[5-(1-ethyl-3,3-dimethyl-5-sulfonato - 3H-indol-2-yliden)-penta-1,3-dienyl]-3,3-dimethyl-3H-indolium-5-sulfonat (Cy-5) 57



1.71 g 56 (4.90 mmol) und 2.32 g 55 (4.90 mmol) werden in 60 ml Methanol (p. a.) gelöst und mit 0.73 g Kaliumacetat (7.4 mmol) versetzt. Es wird für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wird mit Diethylether gefällt und abgesaugt. Säure-

lenchromatografische Reinigung an Kieselgel 60, Laufmittel Methanol/Dichlormethan (1:2.5)

C₃₃H₃₉KN₂O₈S₂ 694.91 g/mol

Ausbeute: 2.78 g (4.00 mmol), 81 %

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 654 nm (243 700)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 8.36 (t, 2H, J = 13 Hz, m2-/m2'-H), 7.82 (s, 2H, 4,4'-H), 7.64 (m, 2H, 7,7'-H), 7.32 (t, J = 13 Hz, 2H, 6,6'-H), 6.59 (t, J = 13 Hz, 1H, m3-H), 6.31 (t, J = 13 Hz, 2H, m1,m1'-H), 4.14 (quart, J = 7 Hz, 2H, 1*'-H), 4.09 (quint, J = 7 Hz, 2H, 1*-H), 2.07 (t, J = 7 Hz, 2H, 5*-H), 1.69 (s, 15H, Methyl, 1.52 (quint, J = 7 Hz, 2H, 2*-H), 1.35 (quint, J = 7 Hz, 2H, 4*-H), 1.26 (t, J = 7 Hz, 2H, 3*-H)

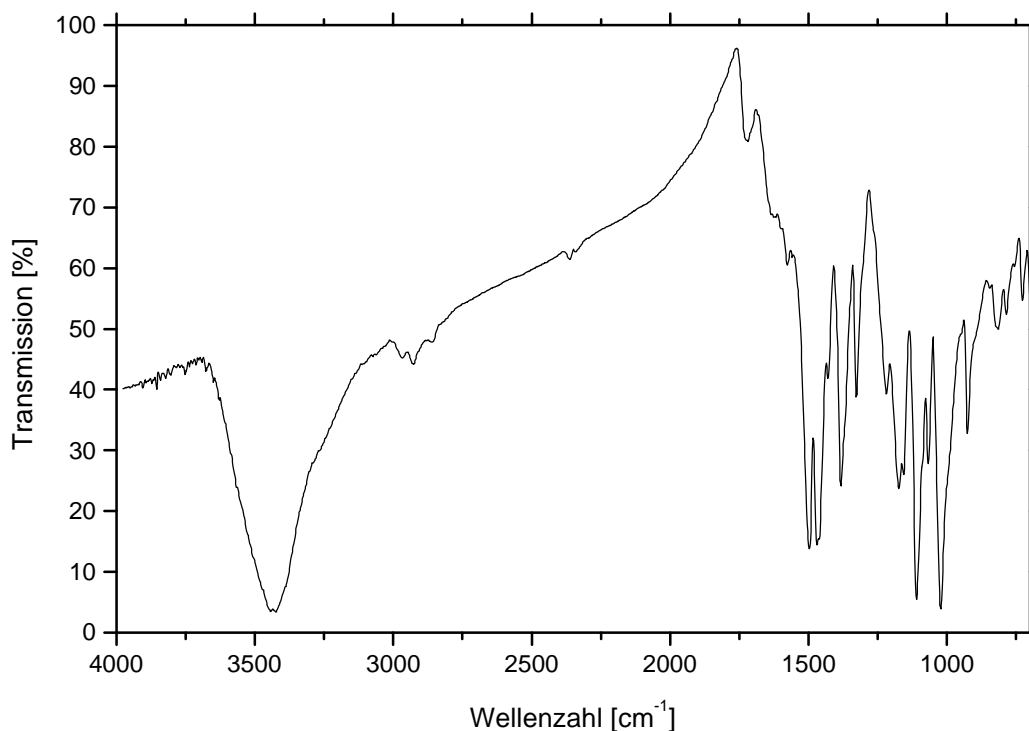


Abbildung 81: IR-Spektrum (KBr-Pressling) von **57**.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3424 (O-H Carboxyl), 3034 (C-H aromat.), 2840 – 2967 (C-H aliphat.), 1718 (C=O Carboxyl), 1496/1469 (C=C polyen.), 1109/1022 (S=O sym., asym.)

V 15: Kalium-2-sulfonato-p-phenylendiamin 58

10.0 g p-Phenylendiamin (92.5 mmol) werden in 75 ml Wasser suspendiert und mit 8 ml konz. Salzsäure sowie 12 ml Essigsäure versetzt. Unter Kühlung und Rühren wird eine Lösung von 23.0 g Natriumsulfit (182 mmol) in 32 ml Wasser zugegeben, dann wird mit 5.50 g Kaliumdichromat (18.7 mmol) gelöst in 67 ml Wasser versetzt. Nach einiger Zeit bildet sich ein Niederschlag. Zur Vervollständigung der Fällung wird über Nacht in den Kühlschrank gestellt, dann abgesaugt und aus Wasser umkristallisiert. Eine Aufarbeitung der Mutterlauge ist empfehlenswert. Der Feststoff wird im Vakuum getrocknet.

4.42 g der Sulfonsäure (19.7 mmol), die als Dihydrat vorliegt, werden in wenig Methanol gelöst und unter Kühlung und Rühren mit 1.11 g Kaliumhydroxid (19,7 mmol), in Methanol gelöst, versetzt. Das Kaliumsalz wird mit Isopropanol/Diethylether (1:3) ausgefällt, abgesaugt und getrocknet.

C₆H₇KN₂O₃S 226.30 g/mol

Ausbeute: 5.44 g (24.1 mmol), 26 %

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 6.84 (t, 1H, o-H), 6.36 (d, 2H, m-/p-H), 4.78 (s, 2H, o-Amin), 4.21 (s, 2H, m-Amin)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3454/3418 (N-H Valenz.), 3050 (C-H arom.), 1624 (N-H Def.), 1506 (C=C arom.), 1182/1024 (S=O sym., asym.), 839 (C-H 1,4 disubst. Aromat)

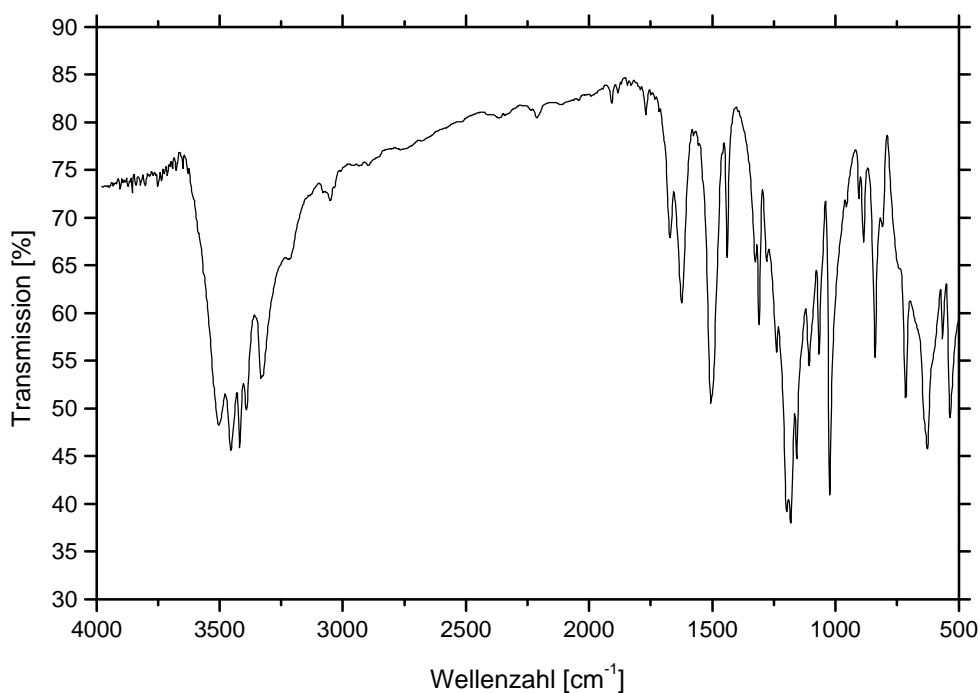


Abbildung 82: IR-Spektrum (KBr-Pressling) von **58**

V 16: Kalium-1-[7-(*N*-4-amino-3-sulfonatophenylcarbamoyl)-heptyl]-4-[*p*-(di-*n*-butylamino)-styryl]-pyridiniumbromid **59**

455 mg Carbonsäure **17** (0.860 mmol), 387 mg **58** (1.71 mmol), 541 mg PyCloP (1.28 mmol) und 498 mg DIEA (3.85 mmol) in 45 ml abs. DMF werden für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Es wird mit 100 ml Diethylether versetzt und abgesaugt. Dann kristallisiert man aus Ethanol/Diethylether um oder reinigt säulenchromatografisch an Kieselgel 60 mit Dichlormethan/Methanol (5:1).

C₃₅H₄₈BrKN₄O₄S 739.86 g/mol
Ausbeute: 493 mg (0.670 mmol), 78 %
Schmelzpunkt: 289 °C
UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 492 nm (29 800)

$^1\text{H-NMR}_{500}$ (DMSO- $[\text{d}_6]$ /TMS): δ [ppm] = 9.49 (s, 1H, Amid-H), 8.72 (d, $J = 7$ Hz, 2H, 2,2'-H), 8.04 (d, $J = 7$ Hz, 2H, 3,3'-H), 7.92 (d, $J = 16$ Hz, 1H, v2-H), 7.58 (m, 3H, o,o'-H/A-H), 7.31 (dvd, $^3J = 9$ Hz, $^4J = 2$ Hz, 1H, B-H), 7.11 (d, $J = 16$ Hz, 1H, v1-H), 6.73 (d, $J = 9$ Hz, 2H, m/m'-H), 6.51 (d, $^3J = 9$ Hz, 1H, C-H), 5.41 (s, 2H, Amin-H), 4.39 (t, 2H, 1''-H), 2.21 (t, $J = 7$ Hz, 2H, 7''-H), 1.86 (quint, $J = 7$ Hz, 2H, 2''-H), 1.54 (m, $J = 7$ Hz, 6H, β -H/6''-H), 1.32 (m, $J = 7$ Hz, 10H, γ -H/3''-H/4''-H/5''-H), 0.93 (t, $J = 7$ Hz, 6H, δ -H)

MS (FAB): m/e [%] = 621.2 (M – Br, 100), 405.2 (33), 309.2 (42), 265.1 (81)

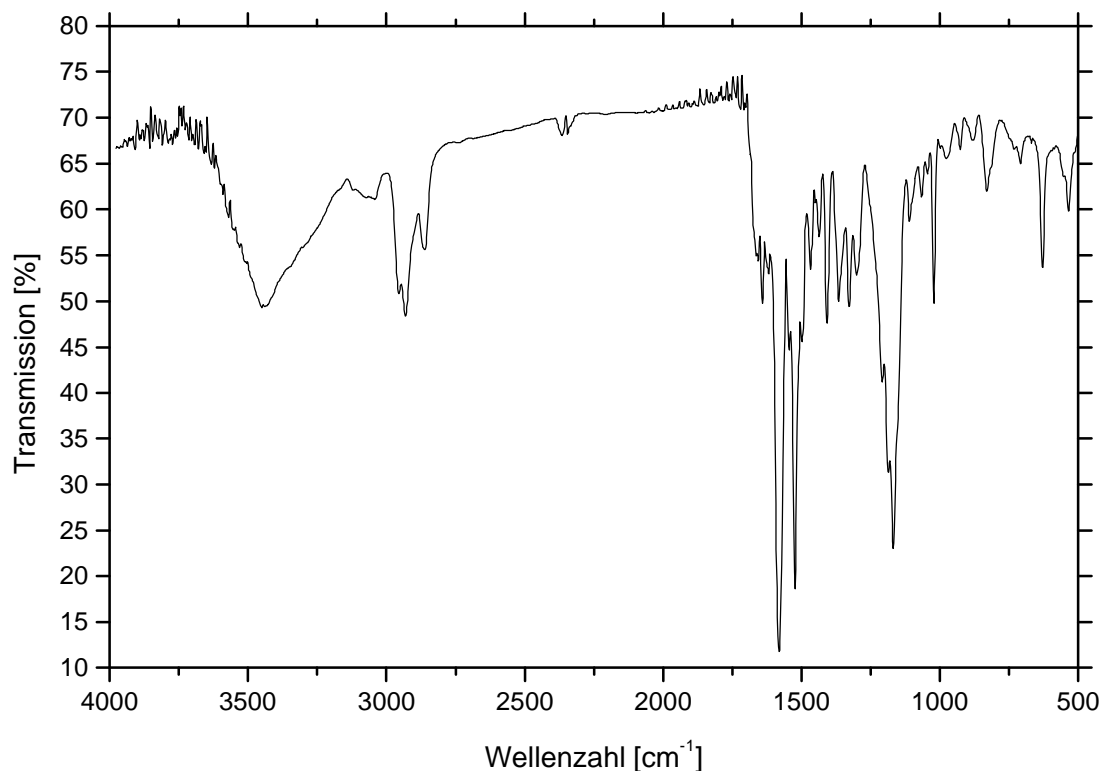


Abbildung 83: IR-Spektrum (KBr-Pressling) von **59**.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3360/3250/3190 (N-H Amid, N-H Amin asym., sym.), 3034 (C-H arom.), 2860 – 2965 (C-H aliph.), 1641 (C=O Amid), 1581/1524 (C=C arom.), 1169 (C-C $_{\text{v1/v2}}$), 830 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

V 17: Dikalium-1-[5-(*N*-(4-(7-(4-(*p*-*N,N*-di-*n*-butylaminostyryl)-pyridin-1-*io*)-heptanoylamino)-2-sulfonatophenylcarbamoyl)-pentyl]-2-[5-(1-ethyl-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3*H*-indol-2-yliden)-penta-1,3-dienyl]-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3*H*-indoliumbromid 41

204 mg Amin **59** (0.250 mmol), 176 mg Cy-5 (0.250 mmol), 149 mg PyCloP (0.350 mmol) und 147 mg DIEA (1.14 mmol) werden in 20 ml DMF (p. a.) unter Feuchtheitsausschluß und unter Stickstoff langsam auf 80 °C erhitzt und so für 3 h gerührt. Nach Abkühlen wird mit 100 ml Diethylether gefällt, abgesaugt und aus Ethanol/Diethylether umkristallisiert oder säulenchromatografisch an Kieselgel 60, Laufmittel Dichlormethan/Methanol (3:1), gereinigt.

C₆₈H₈₅BrK₂N₆O₁₁S₃ 1416.76 g/mol

Ausbeute: 237 mg (0.170 mmol), 67 %

Schmelzpunkt: 283 °C

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 495 nm (29 200), 656 nm (133 300)

Elementaranalyse:

ber.(%):	C 57.65	H 6.05	N 5.93
gef.(%):	C 57.33	H 7.06	N 4.98

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3259 (N-H Amid), 3045 (C-H arom.), 2852 – 2945 (C-H aliph.), 1577/1522 (C=C arom.), 1382 (Dimethylmethylen), 1167 (C=C_{v1/v2} Def.), 1106, 1019 (S=O sym., asym.), 827 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 10.42 (s, 1H, Amid 2), 9.96 (s, 1H, Amid1), 8.81 (d, J = 7 Hz, 2H, 2/2'-H), 8.43 (t, J = 13 Hz, 2H, met2/met2'-H), 8.27 (m, 1H, A-H), 8.11 (d, J = 7 Hz, 2H, 3/3'-H), 8.01 (m, 1H, B-H), 7.98 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.89 (2s, 2H, 4/4'-H), 7.72 (m, 3H, 7/7'-H/C-H), 7.64 (d, J = 9 Hz, 2H, o/o'-H), 7.42 (dvd, 2H, 6/6'-H), 7.18 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.79 (m, 3H, m/m'-H/met3-H), 6.42 (m, 2H, met1/met1'-H), 4.47 (t, 2H, 1''-H), 4.19 (m, 4H, 1*/1*'-H), 2.34 (m, 4H, 7''-H/5*-H), 1.96 (m, 2H, J = 7 Hz, 2''-H), 1.80 (m, J = 7 Hz, 2H, 2*-

H), 1.67 – 1.81 (m, 15H, Methyl), 1.62 (m, 8H, 3''-/4''-/6''-H/4*-H), 1.42 (m, 8H, 5''-H3*-H/β-H), 1.34 (m, 4H, γ-H), 0.99 (t, J = 7 Hz, 6H, δ-H)

MS (FAB): konnte nicht erhalten werden

V 18.1: 1,3,5-Cyclohexantriontrioxim 60

26.00 g Phloroglucindihydrat (160.0 mmol) und 33.43 g Hydroxylaminhydrochlorid (80.0 mmol) werden in 1130 ml Wasser gelöst. Unter Rühren gibt man in kleinen Portionen 33.20 g Kaliumcarbonat (240.0 mmol), so das die Gasentwicklung mäßig bleibt. Man rührt bis zum Ende der Gasentwicklung weiter, läßt über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Der graue Niederschlag wird abgesaugt, mit Wasser, dann mit wenig Aceton gewaschen und getrocknet. Aufgrund geringer Stabilität wird das Rohprodukt sofort und ohne weitere Reinigung umgesetzt.

C₆H₉KN₃O₃	171.16 g/mol
Ausbeute:	17.12 g (100.0 mmol), 63 %

V 18.2: 1,3,5-Triacetylaminobenzol 61

2.95 g 60 (17.2 mmol) werden im 70 ml Eisessig und 9.7 ml Acetanhydrid gelöst. Unter Rühren werden 8.7 g Zinkstaub zugegeben. Nach halbstündigem Rühren bei Raumtemperatur (Wasserbad) werden erneut 8.7 g Zinkstaub zugegeben, dann wird für eine Stunde bei 80 °C gerührt. Es werden wieder 8.7 g Zinkstaub zugegeben und für weitere zwei Stunden gerührt. Nach beendeter Reaktion wird das Zink abfiltriert und mit Essigsäure gewaschen. Die vereinigten Lösungen werden am Rotationsver-

dampfer im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird aus wässrigem Ethanol umkristallisiert.

C₁₂H₁₅KN₃O₃ 249.27 g/mol

Ausbeute: 3.34 g (13.4 mmol), 78 %

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3314 (N-H Amid), 3096 (C-H arom.), 1661 (Amid I), 1613 (C=C arom.), 1557 (Amid II), 862 (C-H arom., isoliertes H)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 9.75 (s, 3H, N-H), 7.46 (s, 3H, arom. H), 1.85 (s, 9H, Methyl)

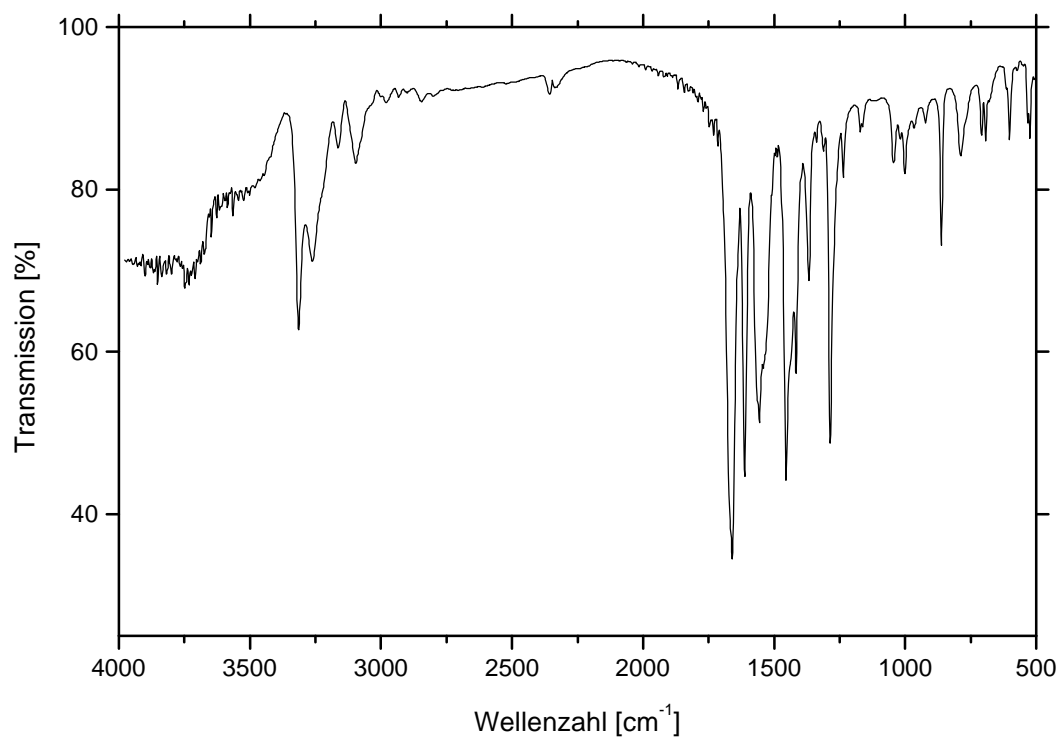


Abbildung 84: IR-Spektrum (KBr-Pressling) von **61**

V 18.3: 1,3,5-Triaminobenzoltrihydrochlorid 62

0.35 g **61** (1.4 mmol) werden in 25 ml konz. Salzsäure suspendiert und unter Stickstoff langsam erhitzt. Bei 110 °C Ölbadtemperatur wird solange erhitzt, bis sich ein weißer Niederschlag bildet. Dann läßt man langsam abkühlen und stellt über nacht in den Kühlschrank. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit konz. Salzsäure gewaschen und im Exsiccator über Calciumchlorid getrocknet.

$C_6H_{12}ClN_3$ 232.53 g/mol

Ausbeute: 0.28 g (1.2 mmol), 87 %

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2855 (NH_3^+ Valenz.), 2593 (NH_3^+ Ober-/Kombinations.), 1528 (C=C arom.), 862 (C-H arom., isoliertes H)

1H -NMR₅₀₀ (DMSO- $[d_6]$ /TMS): δ [ppm] = 6.96 (s, 2H, C-H), 4.51 (s, 6H, NH_2), 2.31 (s, 2H, CH_2)

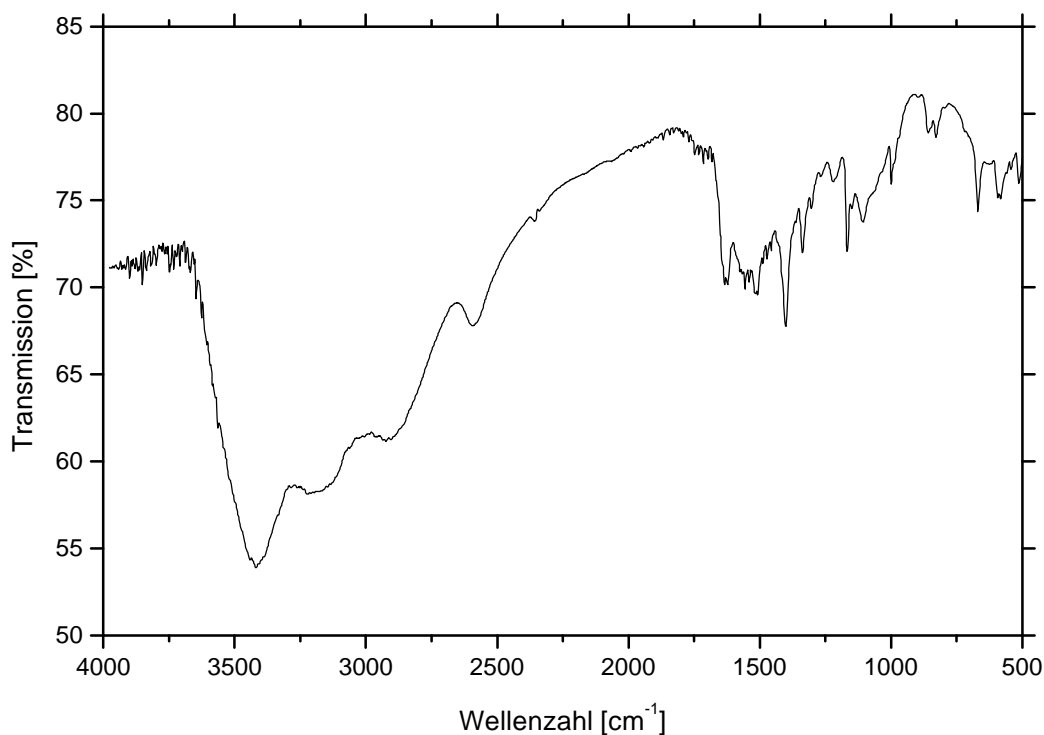
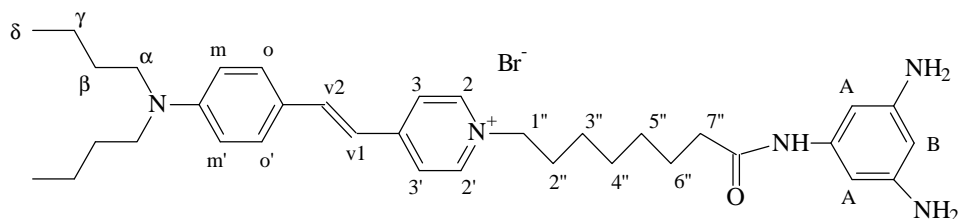


Abbildung 85: IR-Spektrum (KBr-Pressling) von **62**

V 19: 1-[7-(*N*-3,5-diaminophenylcarbamoyl)-heptyl]-4-[*p*-(di-*n*-butylamino)-styryl]-pyridiniumbromid **63**

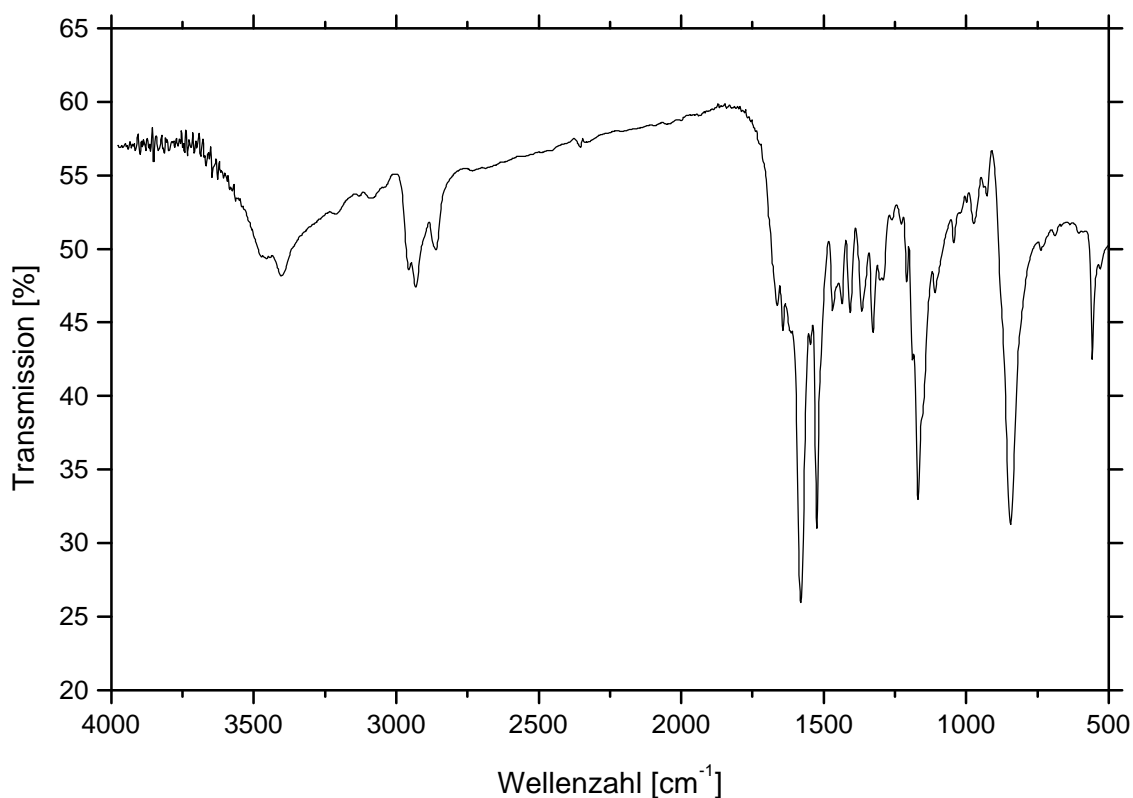


50 mg Carbonsäure **17** (0.09 mmol), 66 mg 1,3,5-Triaminobenzoltrihydrochlorid (0.30 mmol), 64 mg PyCloP (0.17 mmol) und 142 mg DIEA (1.10 mmol) in 4 ml abs. DMF umgesetzt.

C₃₅H₅₀BrN₅O 636.72 g/mol
Ausbeute: 25 mg (0.04 mmol), 44 %
Schmelzpunkt: 262 °C
UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\text{max})}$ (ϵ) = 499 nm (45 400)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3403/3245/3192 (N-H Amid, N-H Amin asym., sym.), 3032 (C-H aromat.), 2855 – 2961 (C-H aliph.), 1663 (C=O Amid), 1580/1524 (C=C aromat.), 1170 (C-C_{v1/v2}), 844 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 9.25 (s, 1H, Amid-H), 8.74 (d, J = 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 8.02 (d, J = 7 Hz, 2H, 3,3'-H), 7.89 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.56 (d, J = 9 Hz, 2H, o,o'-H), 7.10 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.73 (d, J = 9 Hz, 2H, m/m'-H), 6.11 (s, 2H, A-H), 5.53 (s, 1H, B-H), 4.65 (s, 4H, Amin-H), 4.40 (t, 2H, 1''-H), 2.12 (t, J = 7 Hz, 2H, 7''-H), 1.75 (m, J = 7 Hz, 2H, 2''-H), 1.39 (m, J = 7 Hz, 6H, β -H/6''-H), 1.15 (m, J = 7 Hz, 10H, γ -H/3''-H/4''-H/5''-H), 0.89 (t, J = 7 Hz, 6H, δ -H)

Abbildung 86: IR-Spektrum (KBr-Pressling) von **63**

V 20: Di-Kalium-1-(p-*N,N*-di-*n*-butylaminostyryl)-4-[7-(3,5-bis-(6-(2-[5-(1-ethyl-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3*H*-indol-2-yliden)-penta-1,3-dienyl]-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3*H*-indol-1-yl)-hexanoylamino)-phenylcarbonyl)-heptyl]-pyridinium-bromid **42**

22.00 mg Amin **63** (31.35 μmol), 44.00 mg Cy-5 (62.80 μmol), 40.00 mg PyCloP (94.05 μmol) und 37.00 mg DIEA (282.2 μmol) werden in 2 ml DMF (p. a.) unter Feuchtigkeitsausschluß und unter Stickstoff 24 h bei RT gerührt. Nach Abkühlen wird mit 40 ml Diethylether gefällt und abgesaugt. Reinigung erfolgt säulenchromatografisch an Kieselgel 60, Laufmittel Dichlormethan/Methanol (2:1), gereinigt. Die weitere Reindarstellung erfolgt wie bei **V6.1**, Verbindung **31**.

C₁₀₁H₁₂₄BrK₂N₉O₁₅S₄	1990.52 g/mol
Ausbeute:	26.00 mg (13.17 μmol), 42 %
Schmelzpunkt:	> 320 °C
UV/VIS (EtOH):	λ _(max) (ε) = 495 nm (29 200), 656 nm (133 300)
Elementaranalyse:	ber.(%): C 57.65 H 6.05 N 5.93
	gef.(%): C 57.33 H 7.06 N 4.9

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3260 (N-H Amid), 3060 (C-H aromat.), 2850 – 2940 (C-H aliph.), 1579/1523 (C=C aromat.), 1382 (Dimethylmethylen), 1170 (C=C_{v1/v2} Def.), 1108, 1020 (S=O sym., asym.), 829 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 10.42 (s, 1H, Amid 2), 9.96 (s, 1H, Amid1), 8.81 (d, J = 7 Hz, 2H, 2/2'-H), 8.43 (t, J = 13 Hz, 2H, met2/met2'-H), 8.27 (m, 1H, A-H), 8.11 (d, J = 7 Hz, 2H, 3/3'-H), 8.01 (m, 1H, B-H), 7.98 (d, J = 16 Hz, 1H, v2-H), 7.89 (2s, 2H, 4/4'-H), 7.72 (m, 3H, 7/7'-H/C-H), 7.64 (d, J = 9 Hz, 2H, o/o'-H), 7.42 (dvd, 2H, 6/6'-H), 7.18 (d, J = 16 Hz, 1H, v1-H), 6.79 (m, 3H, m/m'-H/met3-H), 6.42 (m, 2H, met1/met1'-H), 4.47 (t, 2H, 1''-H), 4.19 (m, 4H, 1*/1*-H), 2.34 (m, 4H, 7''-H/5*-H), 1.96 (m, 2H, J = 7 Hz, 2''-H), 1.80 (m, J = 7 Hz, 2H, 2*-H), 1.67 – 1.81 (m, 15H, Methyl), 1.62 (m, 8H, 3''-/4''-/6''-H/4*-H), 1.42 (m, 8H, 5''-H3*-H/β-H), 1.34 (m, 4H, γ-H), 0.99 (t, J = 7 Hz, 6H, δ-H)

MS (FAB): konnte nicht erhalten werden

V 21.1: Tripyrrolidinophosphoroxid 64

20.00 g Pyrrolidin (280.0 mmol) und 28.34 g Triethylamin (280.0 mmol) werden in 300 ml trockenem Benzol bei 0 °C vorgelegt und bei dieser Temperatur unter Rühren 13.49 g (0.090 mol) Phosphoroxychlorid in 60 ml Benzol zugetropft. Man läßt über Nacht rühren und destilliert das Lösungsmittel ab. Der Rückstand wird im Vakuum fraktioniert destilliert.

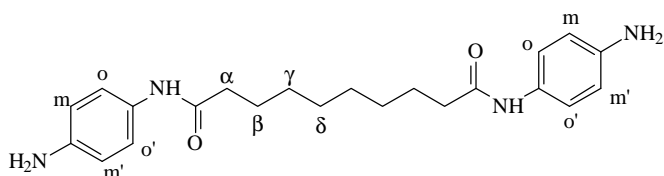
C₁₂H₂₄N₃OP	257.32 g/mol
Ausbeute:	21.07 g (80.00 mmol), 91 % (Lit.: 95 %)
Siedepunkt:	134 °C (0.1 mbar) (Lit.: 143 °C (0.7 mbar))
Brechungsindex:	n _D ²² = 1.5138 (Lit.: n _D ²⁵ = 1.5115)

V 21.2: Tripyrrolidinophosphoniumchloridhexafluorophosphat (PyCloP) 65

11.03 g **64** (50.00 mmol) und 7.38 g (50.0 mmol) Phosphoroxychlorid werden in je 6 ml trockenem Dichlormethan gelöst und **64** bei RT unter Rühren zum Phosphoroxychlorid zugetropft. Man läßt bei RT 30 min rühren und gibt dann schnell 8.87 g (0.05 mol) Kaliumhexafluorophosphat in 70 ml Wasser zu. Die wässrige Phase wird dekantiert und mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die organischen Phasen werden mit Natriumsulfat getrocknet, eingengt und mit Ether versetzt. Zur Vervollständigung der Kristallisation läßt man über Nacht im Kühlschrank stehen und saugt ab.

C₁₂H₂₄ClF₆N₃P₂	421.73 g/mol
Ausbeute:	12.49 g (30.00 mmol), 62 % (Lit.: 86 %)

V22.1: 1,8-Di-(4-aminophenylcarbamoyl)-octan 70



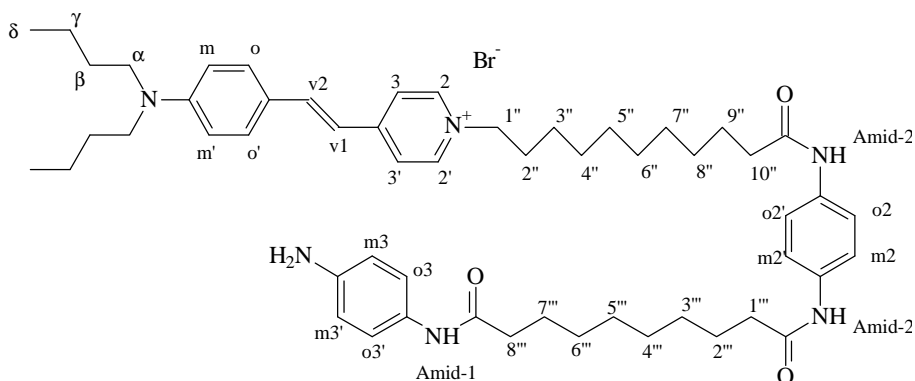
0.50 g (2.5 mmol) 1,8-Octandicarbonsäure werden mit 0.59 g (5.4 mmol) p-Phenylendiamin, 2.29 g (5.43 mmol) PyCloP, 2.87 g (22.2 mmol) DIEA und 50 ml

DMF (abs.) vermischt und bei RT für 24 h gerührt. Nach beendeter Reaktion wird mit Diethylether gefällt, abgesaugt und aus Ethanol/Diethylether umkristallisiert.

C₂₂H₃₀N₄O₂ 382.51 g/mol
Ausbeute: 0.78 g (2.1 mmol), 83 %
Schmelzpunkt: 134 °C

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 9.47 (s, 2H, Amid-H), 7.26 (d, 4H, o, o'-H), 6.54 (d, 4H, m, m'-H), 4.95 (s, 4H, Amino-H), 2.26 (t, 4H, α-H), 1.61 (m, 4H, β-H), 1.34 (m, 8H, γ-, δ-H)

V22.2: 1-[10-(4-(9-(4-aminophenylcarbamoyl)-nonanoylamino)-aminophenyl-carbamoyl)-decyl]-4-[p-(di-*n*-butylamino)-styryl]-pyridiniumbromid 71



201 mg (350 μmol) Carbonsäure 2j werden mit 268 mg (70.0 μmol) Diamin 70, 177 mg (420 μmol) PyCloP, 204 mg (1.58 mmol) DIEA und 22 ml DMF (abs.) vermischt und bei RT für 24 h gerührt. Nach beendeter Reaktion wird mit Diethylether gefällt, abgesaugt und an Kieselgel 60 mit Dichlormethan/Methanol 6:1 (v/v) säulenchromatographisch gereinigt.

C₅₄H₇₇BrN₆O₃ 938.16 g/mol
Ausbeute: 249 mg (270 μmol), 76 %

Schmelzpunkt: 269 °C

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 499 nm (48 200)

$^1\text{H-NMR}_{500}$ (DMSO- $[\text{d}_6]$ /TMS): δ [ppm] = 9.55 (s, 2H, Amid2-H), 9.17 (s, 1H, Amid1-H), 8.50 (d, $J = 7$ Hz, 2H, 2,2'-H), 7.80 (d, $J = 7$ Hz, 2H, 3,3'-H), 7.66 (d, $J = 16$ Hz, 1H, ν 2-H), 7.32 (d, $J = 9$ Hz, 2H, o,o'-H), 7.25 (s, 4H, o2, o2', m2,m2'-H), 6.96 (d, $J = 9$ Hz, 2H, o3,o3'-H), 6.87 (d, $J = 16$ Hz, 1H, ν 1-H), 6.49 (d, $J = 9$ Hz, 2H, m/m'-H), 6.24 (d, $J = 9$ Hz, 2H, m3/m3'-H), 4.57 (s, 2H, Amin-H), 4.19 (t, 2H, 1''-H), 2.26 (t, $J = 7$ Hz, 4H, 1''',8'''-H), 2.00 (t, $J = 7$ Hz, 2H, 10''-H), 1.66 (m, $J = 7$ Hz, 2H, 2''-H), 1.61 (m, $J = 7$ Hz, 4H, 2''',7'''-H), 1.35 (m, 14H, β -H/9''-H, 3''',4''',5''',6'''-H), 1.14 (m, $J = 7$ Hz, 4H, γ -H), 1.06 (m, $J = 7$ Hz, 12H, 3''-H/4''-H/5''-H/6''-H/7''-H/8''-H), 0.73 (t, $J = 7$ Hz, 6H, δ -H)

MS (FAB): m/e [%] = 858.1 (M – Br, 5)

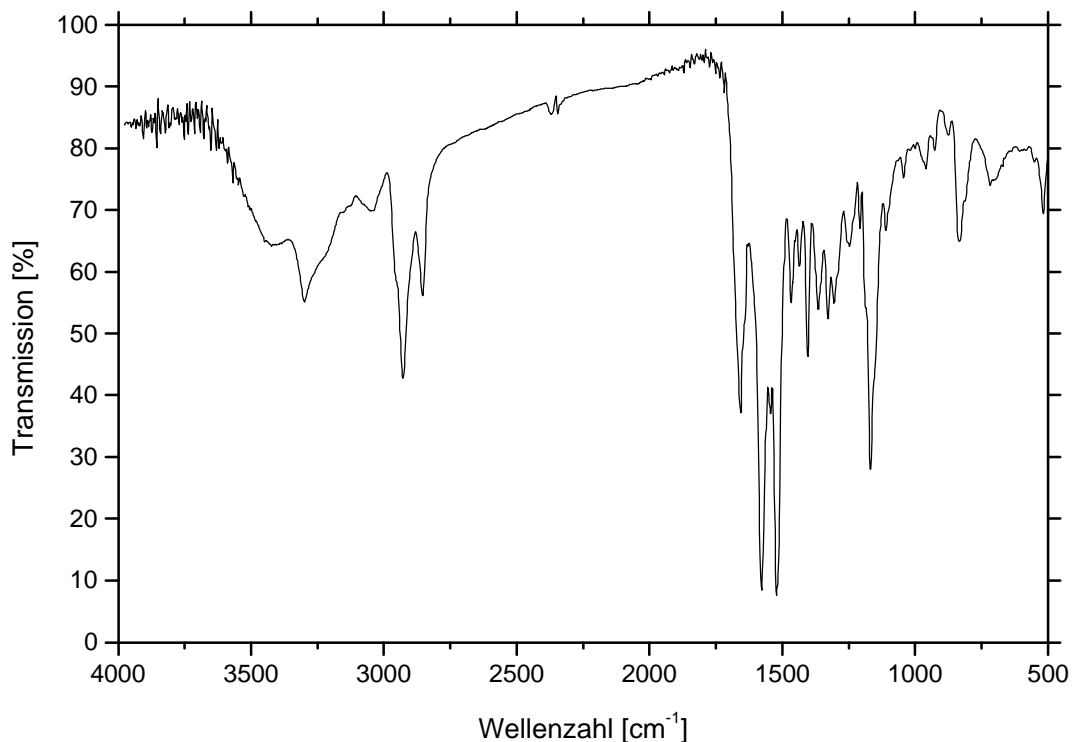
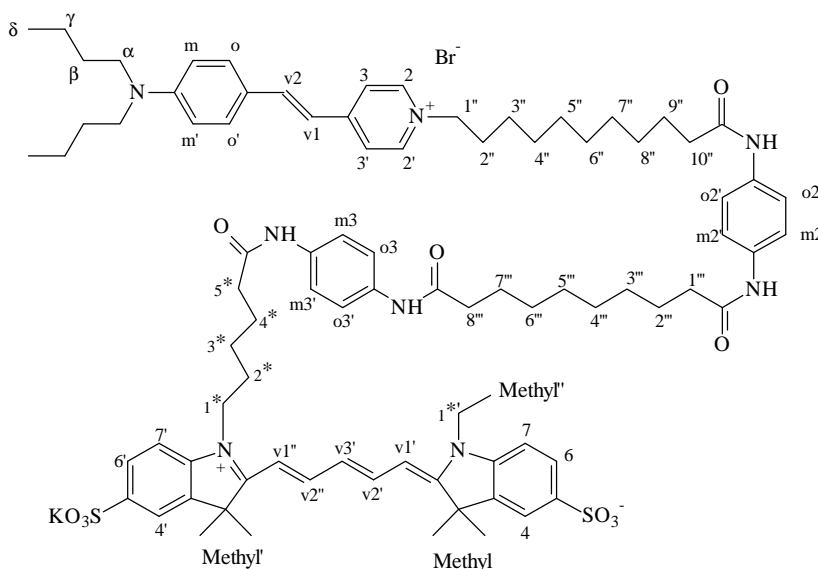


Abbildung 87: IR-Spektrum (KBr-Pressling) von **71**.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3299 (N-H Amin), 2928, 2855 (Methyl, Methylen C-H Valenz), 1656 (C=O Amid), 1578, 1522 (C=C arom.), 1168 (C=C_{v1/v2} Def.), 832 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

V22.3: Kalium-1-[5-(4-(9-(4-(11-(4-(p-N,N-di-n-butylaminostyryl)-pyridin-1-yl)-undecanoylamino)-phenylcarbonyl)-nonanoylamino)-phenylcarbonyl)-pentyl]-2-[5-(1-ethyl-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3H-indol-2-ylidene)-penta-1,3-dienyl]-3,3-dimethyl-5-sulfonato-3H-indoliumbromid 72



50 mg (54 μmol) Amin 71 werden mit 39 mg (55 μmol) Carbonsäure 57 (Cy-5), 30 mg (70 μmol) PyCloP, 32 mg (240 μmol) DIEA und 8 ml DMF (abs.) vermischt und bei RT für 24 h gerührt. Nach beendeter Reaktion wird mit Diethylether gefällt und abgesaugt. Die weitere Aufarbeitung geschieht wie bei Versuch **6.1** beschrieben.

C₈₇H₁₁₄BrKN₈O₁₀S₂

1615.05 g/mol

Ausbeute:

52 mg (32 μmol), 59 %

Schmelzpunkt:

231 °C

UV/VIS (EtOH):

$\lambda_{(\text{max})}$ (ϵ) = 499 nm (43 100), 654 nm, (231 300)

$^1\text{H-NMR}_{500}$ (DMSO- $[\text{d}_6]$ /TMS): δ [ppm] = 9.84 (m, 4H, Amid-H), 8.80 (d, $J = 7$ Hz, 2H, 2/2'-H), 8.40 (t, $J = 13$ Hz, 2H, met2/met2'-H), 8.08 (d, $J = 7$ Hz, 2H, 3/3'-H), 7.97 (d, $J = 16$ Hz, 1H, v2-H), 7.89 (2s, 2H, 4/4'-H), 7.72 (m, 2H, 7/7'-H), 7.65 (d, $J = 9$ Hz, 2H, o/o'-H), 7.53 (m, $J = 9$ Hz, 4H, o3/o3'/m3/m3'-H), 7.41 (m, 2H, 6/6'-H), 7.26 (m, 4H, o2, o2', m2, m2'), 7.19 (d, $J = 16$ Hz, 1H, v1-H), 6.80 (d, $J = 9$ Hz, 2H, m/m'-H), 6.62 (t, $J = 13$ Hz, 1H, met3-H), 6.35 (dvd, $J = 13$ Hz, 2H, met1/met1'-H), 4.39 (t, 2H, 1''-H), 4.12 (m, 4H, 1*/1*-H), 2.30 (m, 8H, 10'''-H/5*-H/1''', 8'''-H), 1.96 (m, 2H, $J = 7$ Hz, 2''-H), 1.81 (m, $J = 7$ Hz, 2H, 2*-H), 1.69 – 1.81 (m, 15H, Methyl), 1.58 (m, 10H, 3''-/9''-H/4*-H/2''', 7'''-H), 1.37 (m, 16H, 8''-H/3*-H/ β -H/3''', 4''', 5''', 6'''-H), 1.32 (m, 12H, γ -H/4''-/5''-/6''-/7''-H), 0.98 (t, $J = 7$ Hz, 6H, δ -H)

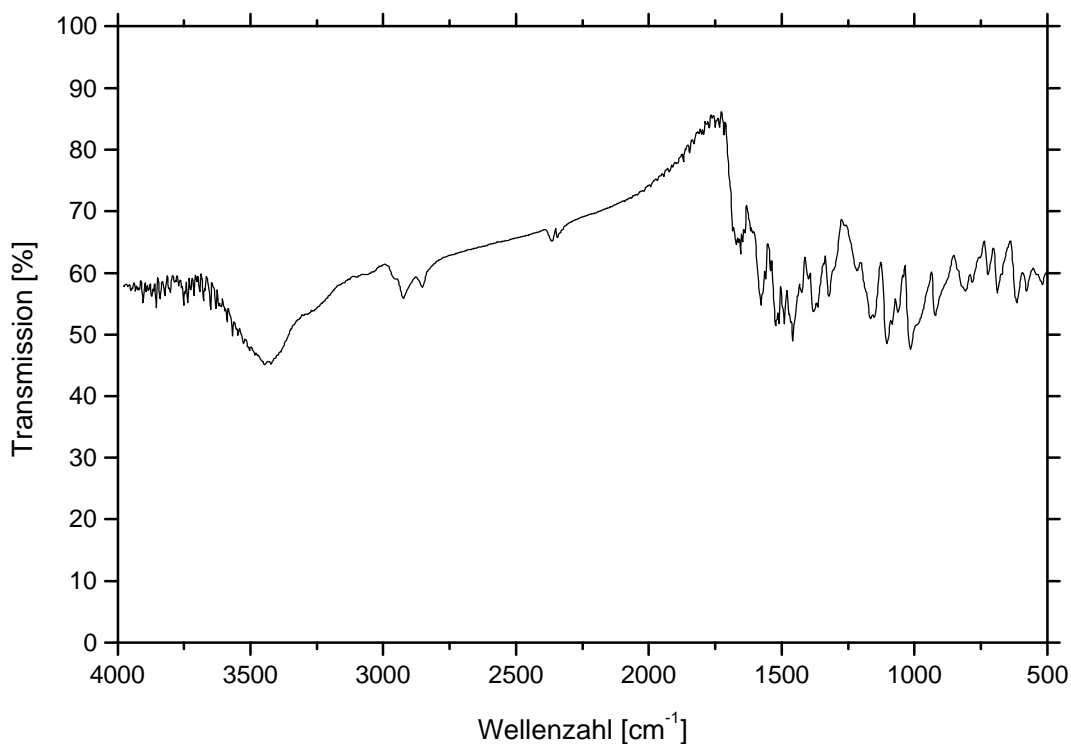
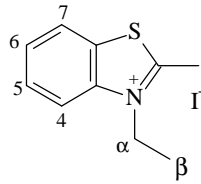


Abbildung 88: IR-Spektrum (KBr-Pressling) von 72.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2924, 2853 (Methyl, Methylen C-H Valenz), 1655 (C=O Amid), 1578, 1522 (C=C arom.), 1166 (C=C $_{\text{v1/v2}}$ Def.), 1104, 1015 (S=O sym., asym.)

V 23: 3-Ethyl-2-methylbenzothiazoliumiodid 66



4.7 g Ethyliodid (0.03 mol) und 4.48 g 2-Methylbenzothiazol (0.030 mol) werden 40 h lang bei 100 °C Badtemperatur erhitzt. Der entstandene Feststoff wird aus Ethanol umkristallisiert.

C₁₀H₁₂INS 305.18 g/mol

Ausbeute: 8.61 g (28.2 mmol), 94 %

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2855 (.), 2593 (.), 1528 (C=C arom.), 862 (C-H arom., isoliertes H)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 8.23 (dvd, 2H, 4-H, 7-H), 7.71 (dvt, 2H, 5-H, 6-H), 4.62 (qart, 2H, α -H), 3.07 (s, 3H, 2-Methyl), 1.35 (t, 3H, β -H)

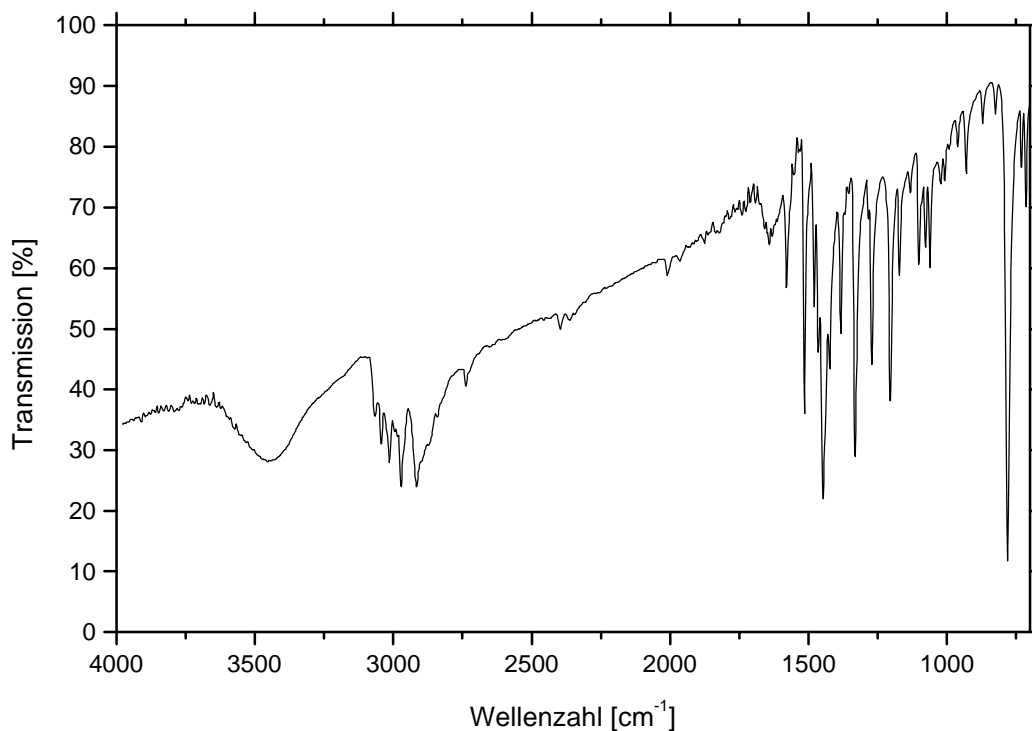
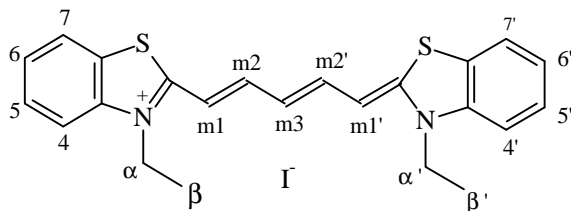


Abbildung 89: IR-Spektrum (KBr-Pressling) von 66

V 24: DTDC Iodid 67


600 mg **43** (1.97 mmol), 0.26 g Malonaldehydbisphenyliminhydrochlorid (MABPI, 1.0 mmol) und 0.52 g Kaliumacetat (5.3 mmol) werden für 3 h in 20 ml Pyridin und 20 ml Acetanhydrid gekocht. Der in der Kälte ausgefallene Feststoff wird säulenchromatografisch an Kieselgel 60 mit Dichlormethan/Methanol (6:1) gereinigt.

C₂₃H₂₃IN₂S₂ 518.49 g/mol

Ausbeute: 0.29 g (0.56 mmol), 56 %

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 655 nm (209 700)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 1573 (C=C arom.), 1456, 1438 (CH₃, CH₂-Def.), 1380 (CH₃ sym. Def.)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 7.77 (d, 2H, 4,4'-H), 7.56 (t, 2H, m2-/m2'-H), 7.51 (d, 2H, 7,7'-H), 7.34 (t, 2H, 6,6'-H), 7.12 (t, 2H, 5,5'-H), 6.33 (d, 2H, m1,m1'-H), 6.26 (t, 1H, m3-H), 4.18 (quart, 4H, α,α' -H), 1.10 (t, 6H, β,β' -H)

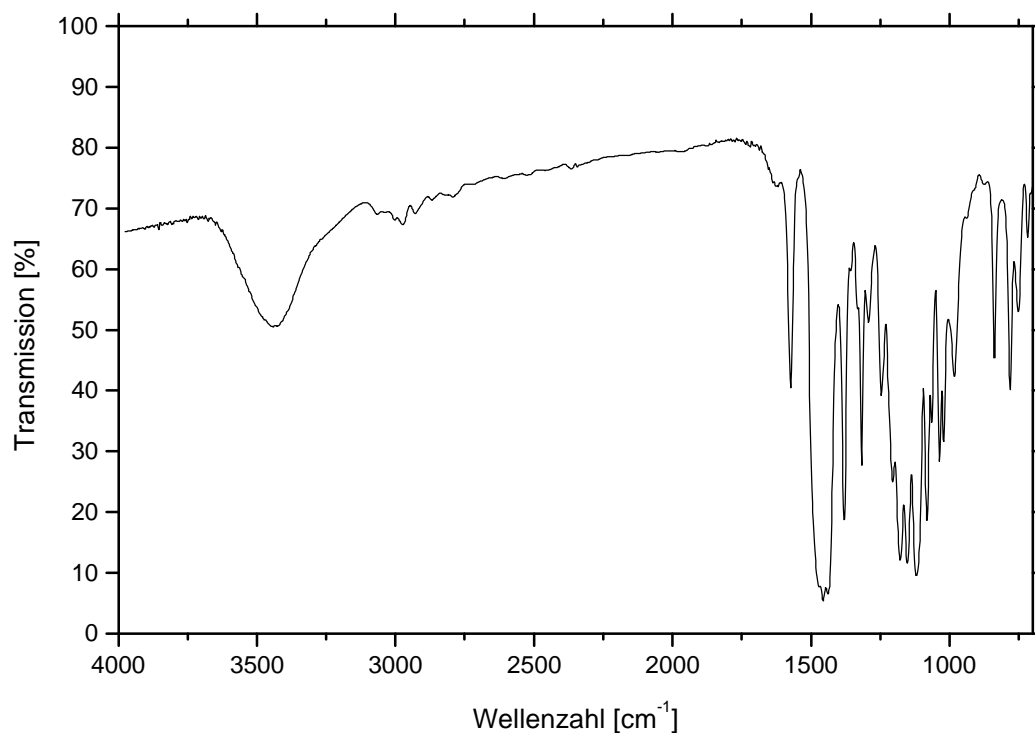
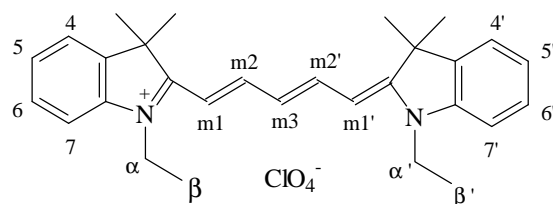


Abbildung 90: IR-Spektrum (KBr-Pressling) von **67**

V 25: DIDC Perchlorat 68



0.54 g 1-Ethyl-2,3,3-trimethyl-3*H*-indoliumperchlorat (1.9 mmol), 0.24 g Malonaldehydbisphenyliminhydrochlorid (MABPI, 0.94 mmol) und 0.46 g Kaliumacetat (4.7 mmol) werden für 3 h in 20 ml Pyridin und 20 ml Acetanhydrid gekocht. Der in der Kälte ausgefallene Feststoff wird abgesaugt und säulenchromatografisch an Kieselgel 60 mit Dichlormethan/Methanol (6:1) gereinigt.

C₂₉H₃₅ClN₂O₄ 511.06 g/mol
Ausbeute: 0.20 g (0.39 mmol), 42 %
UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 642 nm (205 800)

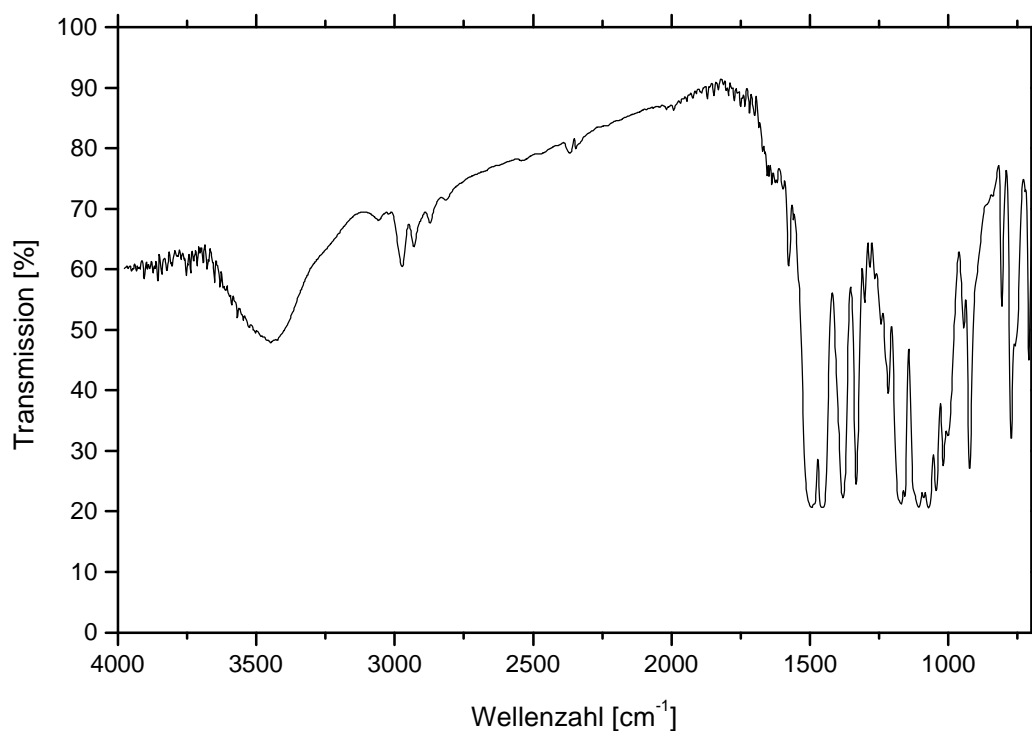


Abbildung 91: IR-Spektrum (KBr-Pressling) von **68**

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2960, 2850 (CH₃, CH₂ Valenz), 1493, 1456 (CH₃, CH₂-Def.), 1380 (CH₃ sym. Def. CMe₂)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-[d₆]/TMS): δ [ppm] = 7.77 (d, 2H, 4,4'-H), 7.56 (t, 2H, m2-/m2'-H), 7.51 (d, 2H, 7,7'-H), 7.34 (t, 2H, 6,6'-H), 7.12 (t, 2H, 5,5'-H), 6.33 (d, 2H, m1,m1'-H), 6.26 (t, 1H, m3-H), 4.18 (quart, 4H, α,α' -H), 1.10 (t, 6H, β,β' -H)

8. Literatur

- [1] H. Zollinger, *Color Chemistry*, 2. Aufl., VCH, Weinheim, **1991**.
- [2] D. M. Sturmer, Syntheses and Properties of Cyanine and related Compounds, in *Special Topics in Heterocyclic Compounds*, Vol. 30, Hrsg.: A. Weissberger, E. C. Taylor, 441-587, J. Wiley & Sons, New York, **1977**.
- [3] H. Zollinger, *Color - A Multidisciplinary Approach*, 1. Aufl., Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich, VCH, Weinheim, **1999**.
- [4] J. Griffith, *Chemie in unserer Zeit*, **1993**, 27, 21-31.
- [5] G. W. Gray, *Chimia*, **1980**, 34, 47-57.
- [6] M. Maeda, *Laser Dyes*, 1. Aufl., Academic Press, Tokio, **1984**.
- [7] R. Rane, Laser Dyes, 1. Aufl., in *Ullman's Encyclopedia in Industrial Chemistry*, 5. Aufl., VCH, Weinheim, **1991**, 308-316.
- [8] W. Fraß, *Chemie in unserer Zeit*, **1983**, 17, 10-20.
- [9] W. Fraß, *Chemie in unserer Zeit*, **1983**, 17, 33-40.
- [10] *Chem. Rev.*, **2000**, 100, gesamte Ausgabe.
- [11] M. Calvin, *Photochem. Photobiol.*, **1984**, 37, 349-360.
- [12] D. Meissner, *Solarzellen*, 1. Aufl., Vieweg - Verlag, Braunschweig, **1993**.
- [13] F. M. Hamer, Cyanine Dyes and related Compounds, in *The Chemistry of Heterocyclic Compounds*, Hrsg.: A. Weissberger, John Wiley & Sons, New York, **1964**.
- [14] T. H. James, *Adv. Photochem.*, **1986**, 13, 329-425.
- [15] D. J. Williams, *Angew. Chem.*, **1900**, 96, 637-651.
- [16] A. Mayer, S. Neuenhofer, *Angew. Chem.*, **1994**, 106, 1097-1126.
- [17] T. Hirano et al., *Angew. Chem.*, **2000**, 112, 1094-1100.
- [18] J. Sonderrmann, *Liebigs Ann. Chem.*, **1971**, 749, 183-197.
- [19] K. Kurihara et al., *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **1991**, 68, 69-78.
- [20] B. R. Leutz, Membrane Fluidity from Fluorescence Anisotropy Measurements, in *Spectroscopic Membrane Probes Vol. 1*, (Hrsg.: L. M. Loew), 1. Aufl., CRC Press, Boca Raton, **1988**.
- [21] G. Webber, F. J. Farris, *Biochemistry*, **1979**, 3075-3078.

- [22] W. W. You, R. P. Haughland, D. K. Ryan, *Anal. Biochem.*, **1997**, *244*, 277-282.
- [23] *Spectroscopic Membrane Probes Vol. 1*, (Hrsg.: L. M. Loew), 1. Aufl., CRC Press, Boca Raton, **1988**.
- [24] *Nature*, **2001**, *409*, verschiedene Artikel
- [25] *Spectroscopic Membrane Probes Vol. 2*, (Hrsg.: L. M. Loew), 1. Aufl., CRC Press, Boca Raton, **1988**.
- [26] *Brain Theory*, Hrsg.: G. Palm, A. Aertsen, Springer Verlag, Heidelberg, **1984**.
- [27] P. L. McGeer, Sir J. C. Eccles, E. G. McGeer, *Molecular Neurobiology of the Mamalian Brain*, 2. Aufl., Plenum Press, New York, **1987**.
- [28] *Brain and Mind*, Hrsg.: Gazzaniga, J. S. Altmann, HFSP, Straßburg, **1998**.
- [29] L. M. Loew, L. L. Simpson, *Biophys. J.*, **1981**, *34*, 353-365.
- [30] A. Grinvald, R. Hildesheimer, I. D. Faber, L. Anglister, *Biophys. J.*, **1982**, *39*, 301-308
- [31] A.L. Obaid, *J. Neurosci.*, **1999**, *19*, 3073-3093.
- [32] S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science*, **1972**, *175*, 720-731.
- [33] C. F. Fox, *Scientific American*, 1972, *226*, 30-38.
- [34] R. Winter, *Chemie in unserer Zeit*, 1990, *24*, 71-81.
- [35] E. Gross, R. S. Bedlack, L. M. Loew, *Biophys. J.*, 1994, *67*, 208-216.
- [36] W. Miriam, D. Krumwiede, *Informationsverarbeitung*, 1. Aufl., Schroedel Verlag, Hannover, **1985**.
- [37] T. Malinski, F. Kiechle, *Fluorescence Measurement of Membrane Potential Changes*, in *Applied Fluorescence Technology*, Vol. III, Lambda Fluoreszenz Technologie GmbH, **1991**.
- [38] I. Tasaki, L. Karnay, B. Sandlin, A. Watanabe, *Science*, **1969**, *163*, 683-685.
- [39] L. B. Cohen et al., *J. Membr. Biol.*, **1974**, *19*, 1-35.
- [40] W. N. Ross et al., *Biophys. J.*, **1974**, *14*, 983-986.
- [41] F. Conti, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **1975**, *4*, 287-310.
- [42] A. S. Waggoner, *The Enzymes of Biological Membranes*, Plenum Press, **1985**.
- [43] M. Reers et al., *Biochemistry*, **1991**, *30*, 4480-4486.
- [44] E. B. George et al., *J. Membr. Biol.*, **1988**, *103*, 245-253.

- [45] P. R. Pratap, *Biophys. J.*, **1990**, 57, 835-849.
- [46] A. Azzi, P. Gherardine, M. Santato, *J. Membr. Biol.*, **1971**, 246, 2035-2042.
- [47] J. Slavik, *Biochim. Biophys. Acta*, **1982**, 694, 1-25.
- [48] V. Mikes, *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **1979**, 44, 508-518.
- [49] B. Ehrenberg, V. Montana, M.-D. Wei, J. P. Wuskel, L. M. Loew, *Biophys. J.*, **1988**, 53, 785-794.
- [50] L. M. Loew, *Pure & Appl. Chem.*, **1996**, 68, 1405-1409.
- [51] E. Fluhler, V. G. Burnham, L. M. Loew, *Biochemistry*, **1985**, 24, 5749-5755.
- [52] H. Ephard, P. Fromherz, *J. Phys. Chem.*, **1991**, 95, 6792-6797.
- [53] H. Ephard, P. Fromherz, *J. Phys. Chem.*, **1989**, 93, 7717-7725.
- [54] H. Ephard, P. Fromherz, *J. Phys. Chem.*, **1993**, 97, 4540-4547.
- [55] P. Fromherz, C. Röcker, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **1994**, 98, 128-131.
- [56] P. Fromherz, C. O. Müller, *Biochim. Biophys. Acta*, **1993**, 1150, 111-122.
- [57] P. Fromherz, O. Schenk, *Biochim. Biophys. Acta*, **1994**, 1191, 299-308.
- [58] P. Fromherz et al., *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **1991**, 95, 1333-1345.
- [59] A. Grinvald, A. Fine, I. C. Faber, R. Hildesheimer, *Biophys. J.*, **1983**, 42, 195-198.
- [60] A. Zouni, R. J. Clarke, A. J. W. G. Visser, N. V. Visser, J. F. Holzwarth, *Biochim. Biophys. Acta*, **1993**, 1115, 203-212.
- [61] R. J. Clarke, P. Schimpf, M. Schöneich, *Biochim. Biophys. Acta*, **1992**, 1112, 142-152.
- [62] P. Fromherz, A. Lambacher, *Biochim. Biophys. Acta*, **1991**, 1068, 149-156.
- [63] A. Zhouni, R. J. Clarke, J. F. Holzwarth, *J. Phys. Chem.*, **1994**, 98, 1732-1738.
- [64] J. E. Gonzales, R. Y. Tsien, *Biophys. J.*, **1995**, 69, 1272-1280.
- [65] J. E. Gonzales, R. Y. Tsien, *Chemistry & Biology*, **1997**, 4, 269-277.
- [66] T. W. Cacciatore et al., *Neuron*, **1999**, 23, 449-459.
- [67] Th. Förster, *Discuss. Faraday Soc.*, **1959**, 27, 7-17.
- [68] L. Stryer, *Ann. Rev. Biochem.*, **1978**, 47, 819-846.
- [69] Y. Luo, J. L. Wu, J. Gergely, T. Tao, *Biophys. J.*, **1998**, 74, 3111-3119.
- [70] P. Mellet, C. Boudier, Y. Mely, J. G. Bieth, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273, 9119-9123.

- [71] B. S. Watson, T. L. Hazlett, J. F. Eccleston, C. Davis, D. M. Jameson, A. E. Johnson, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 7904-7912.
- [72] A. B. Cubitt et al., *Trans. Immun. Biol. Sci.*, **1995**, *20*, 448-456.
- [73] K. Toth, V. Sauermann, J. Langowski, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 8173-8179.
- [74] C. Gutierrez-Merino, I. C. Bonini de Romanelli, L. I. Pietrasanta, F. J. Barantes, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 4846-4855.
- [75] E. I. Pecheur, I. Martin, J. M. Ruyschaert, A. Bienvenue, D. Hoekstra, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 2361-2371.
- [76] P. Wu, L. Brand, *Biochemistry*, **1992**, *31*, 7939-7947.
- [77] P. Wu, L. Brand, *Anal. Biochem.*, **1994**, *218*, 1-13.
- [78] M. Birmes, Dissertation, **1996**, Universität Düsseldorf.
- [79] L. Schneider, Diplomarbeit, **1996**, Universität Düsseldorf.
- [81] U. Meyer-Beeck, Dissertation, **2000**, Universität Düsseldorf.
- [81] D. Witzack, Dissertation, **2000**, Universität Düsseldorf.
- [82] J. Coste, E. Frerot, P. Jouin, *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 2437-2446.
- [83] A. Hassner, D. Birnbaum, L. M. Loew, *J. Org. Chem.*, **1994**, *49*, 2546-2551.
- [84] Organikum, Hrsg.: H. G. O. Becker, 17. Aufl., VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, **1988**.
- [85] S. Hünig, M. Kiessel, *Chem. Ber.*, **1958**, *91*, 380-392.
- [86] H. W. Grimmel, A. Guenther, J. F. Morgan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1946**, *68*, 539-542.
- [87] F. Salman-Legagneur, M. Cecile Neven, A. Belot, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1957**, 1463-1469.
- [88] Nakatani et al., *Bull. Soc. Chim. Jp.*, **1986**, *59*, 3535-3539.
- [89] S. Natelson, S. Gottfried, *Org. Synth. Coll. Vol. 3*, **1955**, 381-384.
- [90] R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, S. A. Mujumdar, C. J. Lewis, A. S. Waggoner, *Bioconj. Chem.*, **1993**, *4*, 105-111.
- [91] A. J. G. Mank, H. T. C. van der Laan, H. Lingeman, C. Gooijer, U. A. Th. Brinkman, N. H. Velthorst, *Anal. Chem.*, **1995**, *67*, 1742-1748.
- [92] J. N. Wells, M. S. Strahl, *J. Pharm. Sci.*, **1971**, *60*, 533-536.
- [93] C. G. Alberti, R. Sollazzo, *Org. Synth. Coll. Vol. 3*, **1955**, 371-373.
- [94] R. W. Price, A. Moss, *J. Am. Chem. Soc.*, **1945**, *67*, 207-208.

- [95] J. Menshutkin, *Chem. Zentr.*, **1902**, 73, 86-98.
- [96] Houben-Weill – Methoden der Organischen Chemie, Bd. IX, *Schwefel-, Selen- Tellur-Verbindungen*, Hrsg: E. Müller, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1955**.
- [97] N. Tokura et al., *Bull. Chem. Soc. Jp.*, **1962**, 35, 722-725.
- [98] I. Arai et al., *J. Org. Chem.*, **1981**, 46, 4597-4599.
- [99] T. Yamaoka et al., *Tetrahedron*, **1968**, 24, 6203-6213.
- [100] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 3. Aufl., G. Thieme Verlag, Stuttgart, **1987**.
- [101] J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.*, **1971**, 75, 991-1024.
- [102] O. Litterscheid, Staatsarbeit, Universität Düsseldorf, **2000**.
- [103] P. F. Aramendia, R. Martin Negri, E. San Roman, *J. Phys. Chem.*, **1994**, 98, 3165-3173.
- [104] Landoldt-Börnstein, Zahlenwerte und Funktionen, 6. Aufl. II Band, 8. Teil, Optische Konstanten, Springer Verlag, Berlin, **1962**.
- [105] J. Schmitz, Diplomarbeit, Universität Düsseldorf, **1997**.
- [106] R. R. C. New, *Liposomes, A Practical Approach*, IRL Oxford University Press, **1990**.
- [107] L. M. Loew, L. Benson, P. Lazarovici, I. Rosenberg, *Biochemistry*, **1985**, 24, 2101-2104.
- [108] L. M. Loew, I. Rosenberg, M. Bridge, C. Gitler, *Biochemistry*, **1983**, 22, 837-844.
- [109] F. J. Sims, A. S. Waggoner, C.-H. Wang, J. F. Hoffmann, *Biochemistry*, **1974**, 13, 3315-3330.
- [110] V. A. Kuzmin, A. P. Darmanyan, *Chem. Phys. Letters*, **1978**, 54, 159-163.