

Fluorophore für Anwendungen im High Throughput Screening

Synthese, Charakterisierung,
Fluoreszenzeigenschaften

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

vorgelegt von
Diplom-Chemikerin Britta Blödorn
aus Solingen

Düsseldorf 2003

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

Referent: Professor Dr. H.-D. Martin

Korreferent: Professor Dr. M. Braun

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juli 2003

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

Inhalt

1	Einleitung	9
1.1	High Throughput Screening (HTS)	9
1.2	Funktionelle Farbstoffe für Anwendungen in der Pharmaforschung	10
1.2.1	Intrinsische Fluoreszenz.....	11
1.2.2	Extrinsische Fluoreszenz und Fluoreszenzsonden.....	12
1.3	Funktionelle Farbstoffe als Enzymaktivitätssonden.....	13
1.3.1	Das Markierungsenzym <i>Alkalische Phosphatase</i>	13
1.3.2	Enzyme Labeled Fluoreszenz (ELF)	14
1.3.3	Optische Detektionssysteme für <i>Alkalische Phosphatase</i>	15
1.3.4	Lumineszenz-Detektionssysteme für <i>Alkalische Phosphatase</i>	16
1.4	Funktionelle Farbstoffe als Akzeptorfarbstoffe in Resonanz-Energie- Transfer-Assays	18
2	Problemstellung.....	23
2.1	Fluorogene präzipitierende Substrate für die <i>Alkalische Phosphatase</i>	23
2.1.1	Synthesestrategie für die ELF-Substrate.....	24
2.2	Fluorogene Markierung von Proteinen: Farbstoffe für BRET-Systeme.....	25
2.2.1	Synthesestrategie für Fluoreszenzfarbstoff für BRET-Systeme	27
3	Synthese und Charakterisierung.....	29
3.1	Darstellung des aliphatischen AP-Substrats für ELF-Assays.....	29
3.1.1	Syntheseplanung: Variation (1)	29
3.1.2	Synthese von 4-Dicyanomethylen-2,6-dimethyl-4 <i>H</i> -pyran (1)	29
3.1.3	Darstellung des Aldehyds 2	30
3.1.4	Darstellung des Farbstoffs	32
3.1.5	Phosphorylierung der aliphatischen Hydroxygruppe des Farbstoffs DCM-1	33
3.2	Beiträge zur Darstellung weiterer AP-Substrate für ELF-Assays mit DCM als Leitstruktur nach Variante (1)	41

3.2.1	Beiträge zur Darstellung von 4-[<i>N</i> -(4-Hydroxybenzyl)- <i>N</i> -methyl- amino]-benzaldehyd (9)	41
3.2.2	Beiträge zur Darstellung phenolischer Ester über das DCM - Carbonsäurederivat DCM-7	47
3.2.3	Beiträge zur Darstellung phenolischer Amide über das Säurederivat DCM-7	51
3.2.4	Beiträge zur Darstellung phenolischer Ester von DCM-1	53
3.2.5	Beiträge zur Veretherung von DCM-1 mit Resorcin	54
3.3	Beiträge zur Darstellung weiterer AP-Substrate für ELF-Assays mit DCM als Leitstruktur nach Variante (3)	59
3.3.1	Einführung einer Hydroxygruppe an einer Methylgruppe des Pyranrings	59
3.3.2	Vereetherung des bromierten Pyranderivats 19 mit Resorcin	60
3.4	Synthese des phenolischen AP-Substrat für ELF-Assays nach Variante (2)	62
3.4.1	Darstellung des Aldehyds 7	63
3.4.2	Darstellung des Farbstoffs DCM-4	63
3.4.3	Phosphorylierung der phenolischen Hydroxygruppe von DCM-4	64
3.5	Darstellung eines für BRET geeigneten Farbstoffs mit DCM als Leitstruktur	68
3.5.1	Einführung einer Carboxylgruppe und Aktivierung zum Succinimidylester	68
3.5.2	Synthese des Aldehyds 14	69
3.5.3	Synthese des Laserfarbstoffs DCM als spektroskopischer Referenzsubstanz	72
3.5.4	Synthese des carboxylfunktionalisierten Farbstoffs DCM-7	73
3.5.5	Aktivierung des Farbstoffs DCM-7 zum <i>N</i> - Hydroxysuccinimidylester DCM-20	77
3.5.6	Erhöhung der Hydrophilie des Farbstoffs durch Einführung wasserlöslicher Gruppen	79
3.5.7	Darstellung des sulfonierten hydrophilen Farbstoffs DCM-22	83
3.5.8	Aktivierung zum <i>N</i> -Hydroxysuccinimidylester	92

4	NMR-Spektroskopische Untersuchung der photochemisch induzierten <i>E,Z</i> -Isomerisierung der DCM -Derivate	95
4.1	<i>E,Z</i> -Isomerisierung von DCM	95
4.2	<i>E,Z</i> -Isomerisierung von DCM-21	99
4.3	<i>E,Z</i> -Isomerisierung von DCM-1	100
4.4	Diskussion der Ergebnisse	101
5	Optische Spektroskopie	105
5.1	Absorptionsspektroskopie	105
5.2	Fluoreszenzspektroskopie	105
5.3	Aufnahme und Korrektur der Fluoreszenzspektren	106
5.3.1	Apparatur:	106
5.3.2	Probenvorbereitung	106
5.3.3	Korrektur der Fluoreszenzspektren:	106
5.4	Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten	106
5.4.1	Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F in DMSO	109
5.4.2	Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute in Chloroform	117
5.4.3	Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_F in Wasser	122
5.5	Untersuchung der Solvatochromie und des Stokesshift in verschiedenen Lösungsmitteln	126
5.6	Diskussion der Ergebnisse	132
5.6.1	Fluoreszenz der an der Aminofunktion modifizierten DCM -Derivate	135
5.6.2	Fluoreszenz der phenolischen DCM -Derivate	136
5.6.3	Fluoreszenz der sulfonierten DCM -Derivate	137
5.6.4	Einfluss der Lösungsmittelpolarität auf den Stokesshift	138
6	Zusammenfassung	143
7	Experimentalteil	147
7.1	Allgemeines	147
7.2	Beschreibung der Versuche	149

8	Abkürzungsverzeichnis	197
9	Literatur.....	199

1 Einleitung

1.1 High Throughput Screening (HTS)

Bis Anfang der 90er Jahre erfolgte die Suche nach neuen, zur Entwicklung von Medikamenten geeigneten Wirkstoffen hauptsächlich „von Hand“, d.h. jede zu prüfende Substanz wurde einzeln in zeitaufwendigen Tests auf ihre Wirksamkeit untersucht. Dieses Verfahren war äußerst arbeitsintensiv und konnte Monate oder sogar Jahre dauern^[1].

Mit der Einführung des High Throughput Screenings (HTS) konnte der Zeitaufwand für die Wirkstofffindung durch Automatisierung erheblich verringert werden, indem vollautomatisch und roboterunterstützt große Substanzzahlen mit Hilfe geeigneter Verfahren getestet werden können. Gleichzeitig lassen sich die Testverfahren durch die HTS-Technik miniaturisieren und der Verbrauch zu untersuchender Wirkstoffe und teurer Reagenzien auf ein Minimum begrenzen.

Der Begriff „Screening“ bedeutet in diesem Zusammenhang, dass alle Komponenten einer Substanzbibliothek systematisch auf ihre Reaktivität mit einem Zielmolekül, dem sogenannten Target, untersucht werden. Sämtliche Substanzen werden hierfür mit dem gleichen Testverfahren, „Assay“ genannt, geprüft. Handelt es sich bei dem Target beispielsweise um einen biologischen Rezeptor, so sollen über das Screening die Verbindungen der Substanzbibliothek identifiziert werden, die mit dem Rezeptor eine Bindung eingehen können, die sogenannten „Liganden“. Diese mittels Screening gefundenen Substanzen sind dabei potentielle Kandidaten für einen Wirkstoff, der die Funktion des betreffenden Rezeptors beeinflusst^[2]. Bei einem Probendurchsatz zwischen 10.000 und 100.000 Proben am Tag spricht man von HTS (High Throughput Screening), während sich bei einem Durchsatz von mehr als 100.000 Proben am Tag der Begriff UHTS (Ultra High Throughput Screening) durchgesetzt hat.

Die High Throughput Screenings werden auf standardisierten Mikrotiterplatten mit 96, 384 oder 1536 Wells (Kavitäten) durchgeführt, wobei mit jeder Vervierfachung der Plattenkapazität das maximale Volumen pro Well verringert wird. Das Volumen eines Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte beträgt beispielsweise 100 bis 200 μl ^[3], bei einer 1536-Well-Mikrotiterplatte nur noch 8 μl ^[4]. Die Substanzen werden mit Pipettierautomaten, die derzeit mit bis zu 96 Spitzen simultan pipettieren können, auf die Mikrotiterplatten aufgebracht. Die Detektion erfolgt meist über optische Methoden wie

Fluoreszenz, Lumineszenz oder Absorption, seltener über den Nachweis von Radioaktivität mittels Szintillation. Radioaktive Assays werden zunehmend durch Lumineszenz- und Fluoreszenzassays ersetzt.

Des Weiteren ist ein Trend zur Weiterentwicklung zellulärer (*in vivo*) Assays zu erkennen, welche die Untersuchung komplexer Fragestellungen in der Zelle erlauben^[3]. Bei den heutigen HTS-Verfahren werden die an Zellen gemessenen, optischen Signale über einige hundert bis tausend Zellen gemittelt. Zur detaillierten Untersuchung der Molekülaktivität auf zellulärer bzw. subzellulärer Ebene werden verfeinerte, auf einzelnen Zellen basierende Screening-Methoden angestrebt^[5].

Durch die Miniaturisierung der Assays werden hohe Anforderungen an die Detektionsgeräte gestellt: Ein geringes Probenvolumen bedingt bei Lumineszenzmessungen eine geringe Signalintensität für die optische Detektion, was die Sensitivität der Messung beeinträchtigt. Absorptionsmessungen werden dabei durch den in kleinen Probenräumen variablen Meniskuseffekt der Flüssigkeitsoberfläche gestört. Fluoreszenzmessungen unterliegen zwar keiner Volumeneinschränkung, ihre Empfindlichkeit wird jedoch durch die Autofluoreszenz des Kunststoffmaterials der Mikrotiterplatten begrenzt^[3].

Des Weiteren ist eine zeitlich synchrone Detektion von 96 Wells notwendig, wenn die Flüssigkeitszugabe in die Mikrotiterplatte über 96 Spitzen eines Pipettierautomaten gleichzeitig erfolgt. Beim Einsatz herkömmlicher Detektionssysteme (1-, 8- und 12-Kanalreader) war die zeitliche Gleichbehandlung der Proben nicht erfüllt. So betrug die Lesezeit des Einkanalsystems, bei dem der Detektor die Platte Well für Well sequentiell abtastet, etwa 0.1 Sekunden pro Well. Das Auslesen einer Mikrotiterplatte mit 1536 Wells dauerte somit ca. drei Minuten^[3]. In solchen Apparaturen können jedoch keine kinetischen Messungen durchgeführt werden.

Dieses Problem ist erst vor kurzem durch die Entwicklung eines 96-fachen Mehrkanaldetektors für UHTS gelöst worden. Ein Mini-Linsenarray vereint 96 Einzelobjektive im Rastermaß einer Mikrotiterplatte^[3].

1.2 Funktionelle Farbstoffe für Anwendungen in der Pharmaforschung

Bei der Suche nach neuen pharmakologischen Wirkstoffen ist es meist unumgänglich, die Struktur und Dynamik von Proteinen und deren Wechselwirkungen mit anderen Biomolekülen zu betrachten.

Nachdem früher zur Untersuchung der Struktur und Umgebung von Biomolekülen radioaktive Marker eingesetzt wurden, die schwierig zu handhaben und noch schlechter zu entsorgen waren, wird heutzutage vielfach auf Fluoreszenzmarker zurückgegriffen.

Fluoreszenzmarker bieten im Vergleich zur ebenfalls häufig verwendeten Absorptionsmarkern wesentliche Vorteile: Da das von dem Marker emittierte Licht direkt gemessen wird und im Unterschied zu Absorptionsmarkern kein Vergleich mit einer Referenz notwendig ist, erhöht sich die Empfindlichkeit um zwei bis drei Größenordnungen. Zusätzlich lassen sich aus den Emissionsspektren wesentlich mehr Informationen über das untersuchte System erhalten als durch die Messung der Absorbanz. So lassen sich neben der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F auch die Fluoreszenzlebensdauer τ , der Stokesshift $\Delta\lambda$, die Reichweite R für strahlungslosen Energietransfer wie FRET (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer) bzw. BRET (Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer) und die Polarisation p bestimmen.

Die typischen Fluoreszenzlebensdauern τ liegen in der Größenordnung von 10^{-9} bis 10^{-7} s. Daher eignet sich die Fluoreszenzspektroskopie besonders für Messungen von Prozessen, deren Dauer in dieser Größenordnung bzw. darunter liegt. In diesem Zeitfenster laufen bei Raumtemperatur in Lösung eine Vielzahl molekularer Ereignisse ab, wie z. B. Diffusion, Rotation und Konformationsänderungen von makromolekularen Biomolekülen sowie Lösungsmittelrelaxation, Energietransfer auf andere Moleküle, Quenching und Rotationsdiffusion. Diese Ereignisse verändern eine oder mehrere der spektralen Observablen und können durch Analyse der Fluoreszenzemission gemessen werden und so Aufschluss über die Umgebung des Fluorophors geben.

1.2.1 Intrinsische Fluoreszenz

Wenn ein zu untersuchendes Biomolekül fluoreszierende Gruppen enthält, die für Fluoreszenzuntersuchungen verwendet werden können, und keine zusätzlichen Fluorophore in das Molekül eingebaut werden müssen, bezeichnet man den Prozess der Fluoreszenz als „intrinsische Fluoreszenz“. In Proteinen ist beispielsweise die fluoreszierende aromatische Aminosäure Tryptophan ($\lambda_{\text{exc}} \approx 280$ nm, $\lambda_{\text{em}} \approx 300 - 350$ nm) als Sonde für die Polarität ihrer Umgebung geeignet, da Tryptophan in polarer Umgebung eine bathochrom verschobene Fluoreszenz zeigt.

1.2.2 Extrinsische Fluoreszenz und Fluoreszenzsonden

Wenn in das zu untersuchende Biomolekül zusätzliche nichtbiologische Fluorophore durch kovalente oder nichtkovalente Bindung eingefügt werden, spricht man von extrinsischer Fluoreszenz. Die dabei verwendeten Fluorophore werden als Fluoreszenzmarker oder -Sonden bezeichnet.

Je nach avisiertem Zweck muss der Einbau von Fluoreszenzsonden in Biomoleküle verschiedenen Anforderungen genügen. Für praktische Anwendungen, z. B. die Herstellung fluoreszierender Antikörper, ist lediglich eine möglichst starke Fluoreszenz des Proteins erforderlich. Zur Untersuchung räumlicher Strukturen von Proteinen hingegen ist es notwendig, Anzahl und Ort der eingeführten Fluorophore zu kennen.

Zur Markierung von Proteinen werden die Fluoreszenzsonden kovalent an Amino-, Thio- oder Carbonsäuregruppen des Proteins gebunden. So gehen beispielsweise zu einem NHS-Ester aktivierte Carboxylgruppen oder Isothiocyanatgruppen des Fluorophors leicht kovalente Bindungen mit Aminogruppen des zu markierenden Proteins ein. Es entstehen so Carbonsäureamide bzw. Thioharnstoffderivate.

Nukleinsäuren hingegen können durch das nichtkovalent gebundene Ethidiumbromid, welches in die doppelsträngige DNA interkaliert, markiert werden^[6]. Zur Untersuchung von Biomembranstrukturen eignen sich wiederum hydrophobe Fluoreszenzsonden wie Diphenylhexatrienderivate.

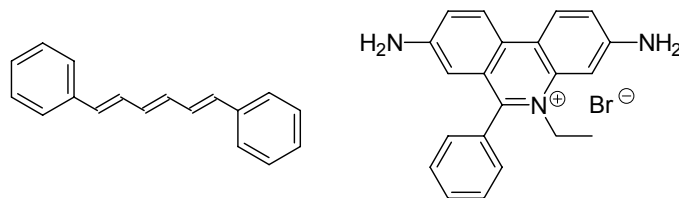


Abbildung 1: Diphenylhexatrien und Ethidiumbromid.

Durch die Entwicklung speziell designter extrinsischer Fluorophore, die sich in ihrer Sensibilität gegenüber Umgebungseinflüssen wie z. B. Polarität oder pH des Lösungsmittels, aber auch durch die Lage und Breite der Absorptions- und Emissionsbanden sowie der Größe ihres Stokesshifts unterscheiden, resultieren für die Fluoreszenzspektroskopie zahlreiche Anwendungen in der Biochemie und Zellbiologie. Mit Hilfe von Fluoreszenzsonden lassen sich so neben dem analytischen Nachweis und der Quantifizierung von Biomolekülen auch die Fluidität von Membranen, Konformationsänderungen sowie die Diffusions- und Rotationsparameter bestimmen.

Potentialsensitive Fluorophore eignen sich als „molekulare Voltmeter“ für die Untersuchung von Membranpotentialen^{[7],[8]}, andere Sonden zeigen die Polarität der Umgebung an. Weitere Anwendungen sind pH-Messungen in Zellkompartimenten, Abstandsbestimmungen und Fluoreszenzmikroskopie. Wichtige Methoden aus dem Bereich der biochemischen Fluoreszenzspektroskopie sind die Immunfluoreszenzassays (ELISA), Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und Enzyme Labeled Fluoreszenz (ELF).

1.3 Funktionelle Farbstoffe als Enzymaktivitätssonden

1.3.1 Das Markierungsenzym *Alkalische Phosphatase*

Alkalische Phosphatase (AP) wird sowohl als direktes als auch als indirektes Markierungsenzym verwendet. In direkten Systemen werden die Sonden direkt und kovalent mit Alkalischer Phosphatase als signalgebender Reportergruppe verknüpft. Nach der Hybridbildung von markierter Sonde und DNA-Target erfolgt der Nachweis über eine Signalerzeugung durch eine Enzymreaktion der direkt gebundenen Reportergruppe mit einem Substrat-Chromogen bzw. einem Substrat-Fluorogen.

So wird AP für die direkte Markierung von Oligonucleotiden genutzt. Die Kopplung erfolgt über bifunktionelle Linker. Da für jede Hybridisierungssequenz eine eigene Sonde kovalent mit der AP verknüpft werden muss, werden die direkt AP-gekoppelten Oligonucleotide vorwiegend für Standardreaktionen mit Standardsequenzen verwendet. AP-markierte Primer werden beispielsweise zur Sequenzierung in Blotformaten (DBE, *direct blotting electrophoresis*) eingesetzt^[9].

In indirekten Systemen werden die Sonden über eine zusätzliche nichtkovalente Wechselwirkung zwischen einer Sondenmodifikationsgruppe und einer universellen Detektionseinheit nachgewiesen. Die Detektionseinheit enthält neben der Reporterkomponente AP eine Bindungskomponente, die sich spezifisch und hochaffin an die Modifikationsgruppe der Sonde anlagert^[10]. Die Signalerzeugung erfolgt wiederum über eine Enzymreaktion der Reportergruppe mit einem Substrat-Chromogen bzw. –Fluorogen.

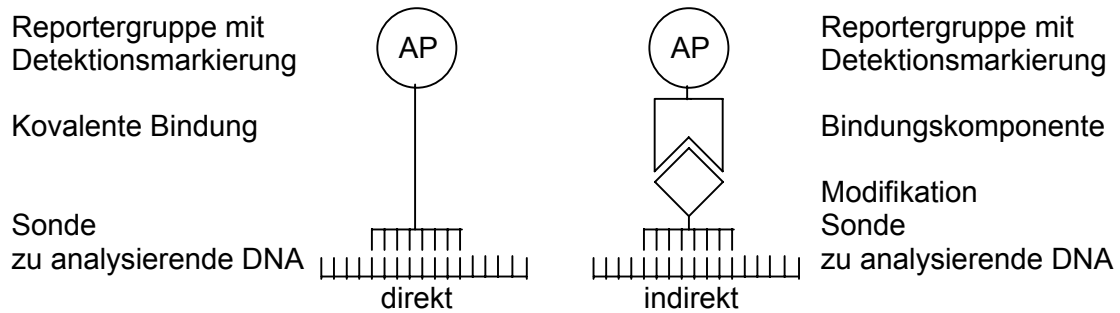


Abbildung 2: Schematische Darstellung direkter und indirekter Reportersysteme^[10].

So wird im Digoxigenin:Anti-Digoxigenin-System (DIG-System), welches zur spezifischen Detektion von Subpikogramm-Mengen von DNA und RNA verwendet wird, das Markierungsenzym AP als Reportergruppe in Form eines kovalenten Konjugats eines DIG-spezifischen Antikörpers als Bindungskomponente eingesetzt. Der DIG-Antikörper bindet sich hochaffin an die mit Digoxigenin modifizierte Sonde^[11].

Derartige auf universellen Antikörper-Markierenzym-Konjugaten beruhende Verfahren werden auch als Enzym-gekoppelte Immunosorbent-Verfahren (ELISA, *enzyme linked immunosorbent assay*) bezeichnet^[12].

Indirekte Systeme bieten den Vorteil größerer Empfindlichkeit durch die Möglichkeit einer Signalverstärkung, indem sie mehrere Reporterkomponenten (und somit mehrere Enzymmoleküle) an eine Bindungskomponente binden können. Ein weiterer Vorzug ist die hohe Flexibilität der indirekten Systeme, da die Sonden mit den unterschiedlichsten Detektionsarten (enzymatisch, Absorption, Fluoreszenz, Lumineszenz) gekoppelt werden können.

1.3.2 Enzyme Labeled Fluorescence (ELF)

Mit einem ELF-Test lässt sich die Aktivität der *Alkalischen Phosphatase* (AP) am Ort ihrer Aktivität beobachten und quantitativ über Fluoreszenzmessungen bzw. Fluoreszenz-Mikroskopie bestimmen.

Der ELF-Test basiert auf einem Fluorophor, der als Substrat für die *Alkalische Phosphatase* eingesetzt wird. Der Fluorophor wird durch eine Phosphatgruppe maskiert und gleichzeitig wasserlöslich gemacht. Bei der enzymatischen Abspaltung der Phosphatgruppe wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und fällt am Ort der

Enzymaktivität aus. Diese kann über die Zunahme der präzipitativen Feststofffluoreszenz beobachtet werden.

Als Fluorogen wird meist das kommerziell erhältliche *Alkalische-Phosphatase*-Substrat ELF-97-Phosphat verwendet. Dieses schwach blau fluoreszierende Substrat präzipitiert nach enzymatischer Abspaltung der Phosphatgruppe in Form eines stark gelb-grün fluoreszierenden Niederschlags. Dabei zeichnet sich das ELF-97-Phenol durch einen großen Stokesshift und hohe Photostabilität aus^{[13],[14]}. Das ELF-97-System kann in unterschiedlichen Applikationen angewendet werden, z. B. zur endogenen AP-Detektion^{[15],[16]}, bei mRNA *in situ* Hybridisierungsmethoden^[17], bei Zellmarkierungen^[18] sowie in der Immunohistochemie^{[19],[20]}.

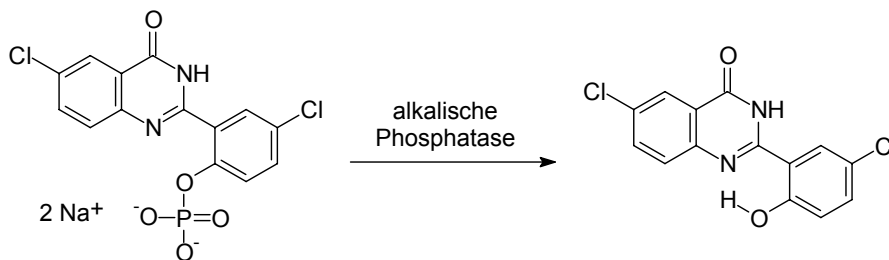


Abbildung 3: Das ELF-97-System: Das wasserunlösliche Phenol zeigt ein Absorptionsmaximum bei $\lambda_{exc} = 345 \text{ nm}$ und ein Emissionsmaximum bei ca. $\lambda_{em} = 530 \text{ nm}$ (siehe Abbildung 11), während das wasserlösliche Phosphat keine langwellige Fluoreszenz zeigt.

1.3.3 Optische Detektionssysteme für *Alkalische Phosphatase*

Das ELF-97-System ist eine Fortentwicklung der optischen enzymatischen Detektionssysteme für AP. Diese basieren auf der enzymatischen Umwandlung von Farbsubstraten, wodurch eine Änderung der Absorptionseigenschaften und der Löslichkeit erreicht wird. Zur präzipitativen optischen Detektion der AP-Aktivität werden häufig Mischungen der Farbmittel 5-Brom-4-chlor-indolylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT) verwendet. Nach der enzymatischen Phosphatabspaltung führt eine gekoppelte Redoxreaktion zu tiefblauviolett gefärbten Präzipitaten in Form von Indigo bzw. Formazan. Das Schema dieser gekoppelten Redoxreaktion ist in Abbildung 4 wiedergegeben.

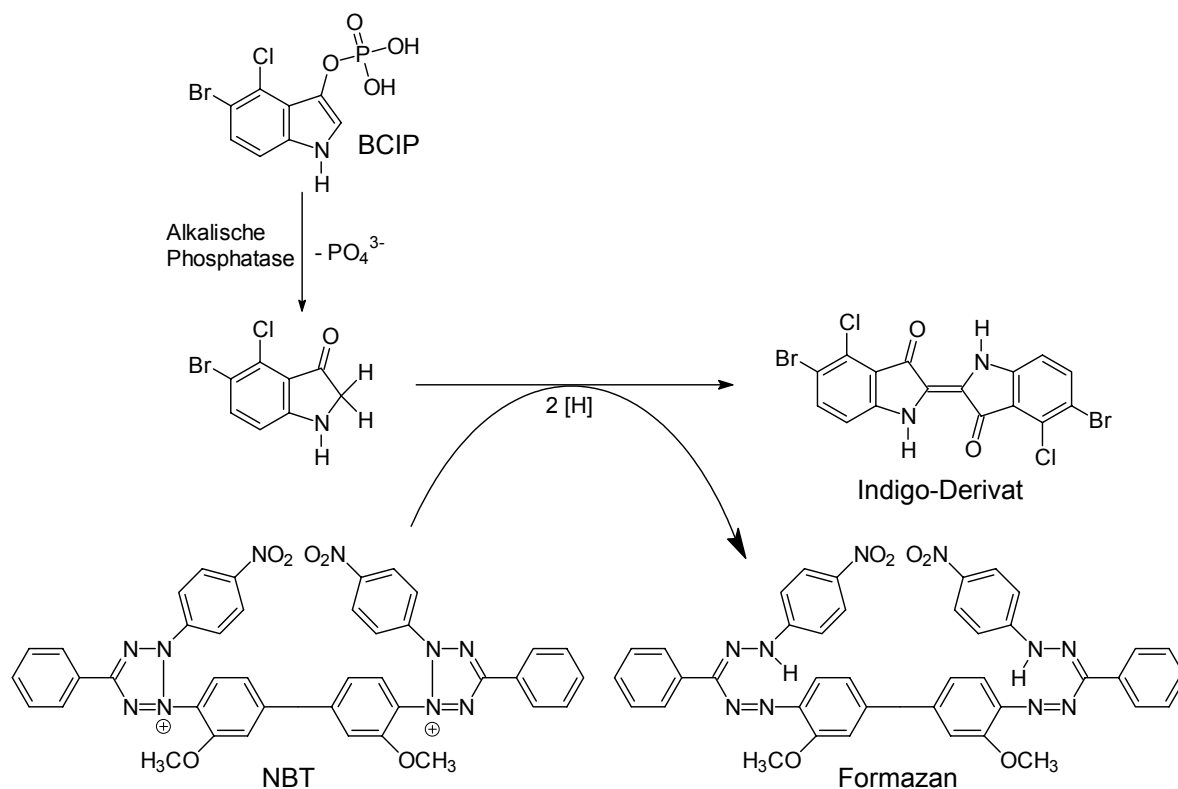


Abbildung 4: Mechanismus der optischen Enzym-Detektion mittels NBT/BCIP.

1.3.4 Lumineszenz-Detektionssysteme für *Alkalische Phosphatase*

Lumineszenz-Systeme stellen eine weitere Möglichkeit zur Detektion der AP-Aktivität dar. Sie beruhen auf der chemischen, biochemischen oder elektrochemischen Aktivierung von Phosphatase-Substraten, die unter Aussendung von Lumineszenzlicht in den Grundzustand zurückfallen.

Für die Chemilumineszenzdetektion der AP-Aktivität werden als Substrate gewöhnlich Derivate des AMPPD[®] (3-(2'-Spiroadamantyl)-4-methoxy-4-(3'-phosphoryloxy)-phenyl-1,2-dioxetan) eingesetzt, deren Formulierungen sich in der Struktur der stabilisierenden Reste am AMPPD[®] sowie durch den Zusatz von Stabilisatoren unterscheiden, z. B. CDP-Star[®] (2-Chlor-5-(4-methoxyspiro-{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chlor)-tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl)-1-phenylphosphat) und CSDP[®] (3-(4-Methoxyspiro-{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chlor)-tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl)-phenylphosphat), wodurch sich unterschiedliche Zerfallsgeschwindigkeiten und Lumineszenzintensitäten ergeben.

Nach enzymatischer Abspaltung des Phosphatrests des AMPPD ist die Dioxetanbindung im entstandenen AMPD-Anion (Adamantyl-Methoxy-Phenyl-Dioxetan-Anion)

geschwächt. Es reagiert zu einem angeregten, instabilen Zustand, aus dem es unter Emission von Chemilumineszenz einer Wellenlänge von ca. 477 nm zerfällt^[21].

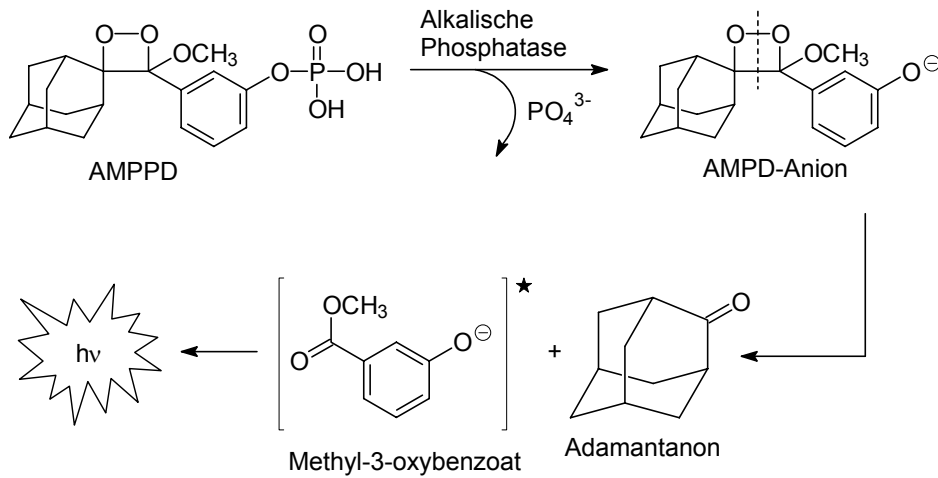


Abbildung 5: Mechanismus der Dioxetan-Chemilumineszenzreaktion durch AP-Aktivierung des Chemilumineszenzsubstrats.

Zur Bestimmung der AP-Aktivität über Biolumineszenzdetektion wird D-Luciferin-O-Phosphat als AP-Substrat verwendet. Nach Phosphatabspaltung durch AP wird das gebildete D-Luciferin durch Luciferase (z. B. aus *Photinus pyralis*, Leuchtkäfer) in Anwesenheit von ATP, molekularem Sauerstoff und Magnesium-(II)-Ionen unter Lichtemission in Oxyluciferin umgewandelt^[22].

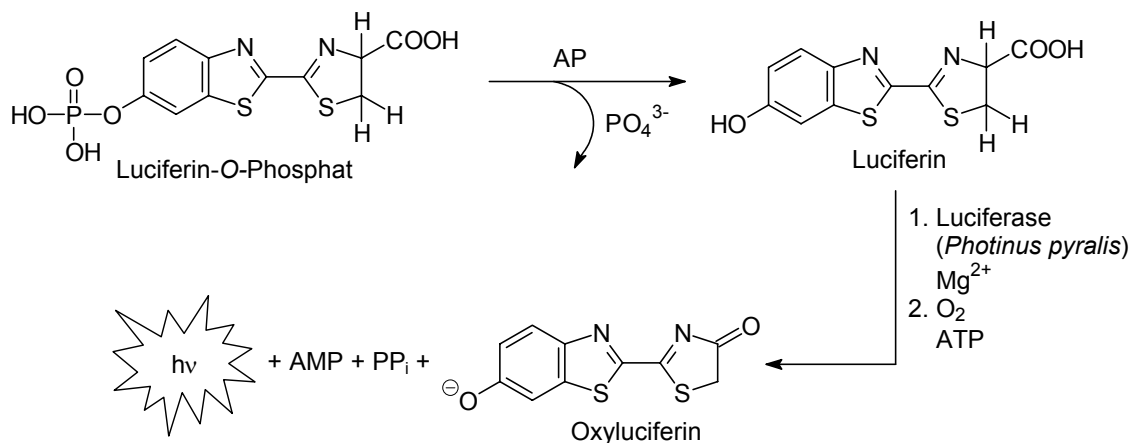


Abbildung 6: Mechanismus der Luciferin-Biolumineszenz mit AP-Aktivierung des Biolumineszenzsubstrats Luciferin-O-Phosphat.

1.4 Funktionelle Farbstoffe als Akzeptorfarbstoffe in Resonanz-Energie-Transfer-Assays

Der erstmals von FÖRSTER mathematisch beschriebene Resonanz-Energie-Transfer (RET) zeichnet sich durch den strahlungslosen Transfer der von einem Donor absorbierten Anregungsenergie zu einem Akzeptormolekül aus^[23]. Voraussetzung für diesen RET ist eine Überlappung des Emissionsspektrums des Donors und des Absorptionsspektrums des Akzeptors sowie eine geeignete Orientierung der Übergangsdipolmomente von Donor und Akzeptor. Die Effizienz des Energie-Transfers ist stark abhängig von der Distanz R zwischen Donor und Akzeptor, da die Geschwindigkeit des Transfers umgekehrt proportional zur sechsten Potenz dieses Abstands ist. Somit lassen sich schon geringste Abstandsänderungen durch eine Änderung des RET erkennen. Für die Geschwindigkeitskonstante ergibt sich folgender Ausdruck:

Gleichung 1:

$$k(D^* \rightarrow A) = \frac{1}{\tau_0} \cdot \left(\frac{R_0}{R} \right)^6$$

*τ_0 = natürliche Lumineszenzlebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptors,
 R = Abstand Donor/Akzeptor, R_0 = kritischer oder Förster-Radius, aus dem spontane Deaktivierung des Donors und RET gleich wahrscheinlich sind.*

Der Bereich des effektiven RET liegt nach FÖRSTER bei 1 bis 10 nm^[24] und ist somit zur Untersuchung der meisten biologischen Protein-Protein- und Protein-DNA-Wechselwirkungen geeignet. Die beiden auf RET basierenden Technologien Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) und Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET) sind daher hervorragend zur Analyse der Wechselwirkungen von Biomakromolekülen geeignet.

Beim FRET wird die Energie eines durch eine externe Lichtquelle angeregten Donor-Fluorophors strahlungslos auf einen Akzeptor-Fluorophor übertragen, welcher bei einer anderen Wellenlänge fluoresziert.

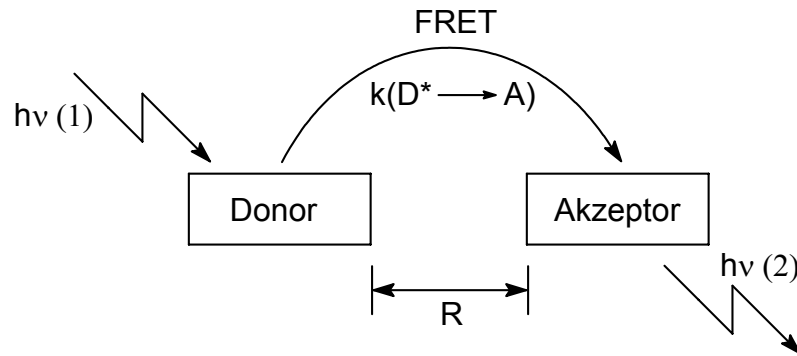


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Fluoreszenzresonanzenergietransfers (FRET) nach FÖRSTER, R = Abstand zwischen Donor und Akzeptor.

FRET-Assays finden in der Untersuchung einer Vielzahl molekularbiologischer Phänomene, die mit einer Abstandsänderung einhergehen, Verwendung, so z. B. als „spektroskopisches Lineal“ bei Proximitätsbestimmungen^{[25],[26]}, zur Charakterisierung der Struktur und Konformation von Proteinen^{[27],[28]}, bei der Untersuchung von Rezeptor/Ligand-Wechselwirkungen^[29], der Verteilung und dem Transport von Lipiden in der Membran^[30] und der Fusion von Membranen^[31], sowie der Bestimmung der Struktur, Konformation^{[32],[33]} und Hybridisierung^[34] von Nucleinsäuren.

Die Anwendbarkeit der FRET-Assays wird jedoch durch die bekannten Nachteile aller Fluoreszenztechniken wie Photobleichung, Lichtstreuung und Autofluoreszenz begrenzt. Zudem kann FRET nicht in lichtempfindlichen oder photorespondierenden Geweben; z. B. der Retina; verwendet werden, da diese durch das Anregungslicht verändert oder zerstört werden würden.

Auf BRET basierende Untersuchungsmethoden vermeiden diese Nachteile, da die Assays durch die Verwendung eines Bioluminophores als Donor ohne externe Lichtquelle durchgeführt werden können. BRET ist ein in der Natur vorkommendes Phänomen. So emittiert beispielsweise das reine Photoprotein Aequorin der Qualle *Aequorea* blaues Licht. In vivo jedoch liegt das Aequorin mit GFP (Green Fluorescent Protein) assoziiert vor, die Energie vom Aequorin wird strahlungslos auf das GFP übertragen und es resultiert die grüne Fluoreszenz des GFP^[35].

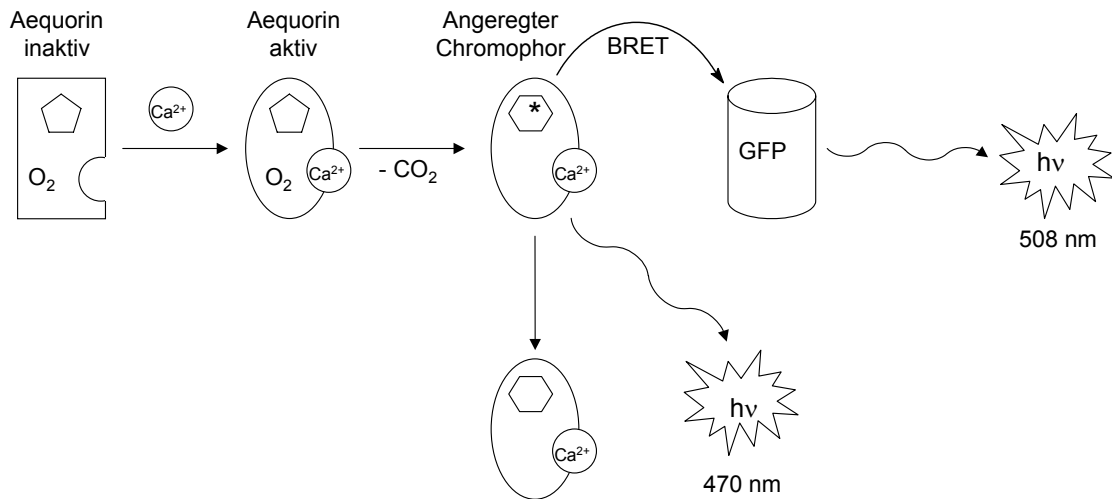


Abbildung 8: Schematische Darstellung der *Aequorea victoria* Biolumineszenz: Aktivierung von Aequorin durch Calcium-Ionen, Oxidation von Coelenterazin (Fünfeck) zu Coelenteramid (Sechseck). Übergang in den Grundzustand durch Biolumineszenz bzw. *in vivo* durch BRET auf GFP; Fluoreszenz von GFP.

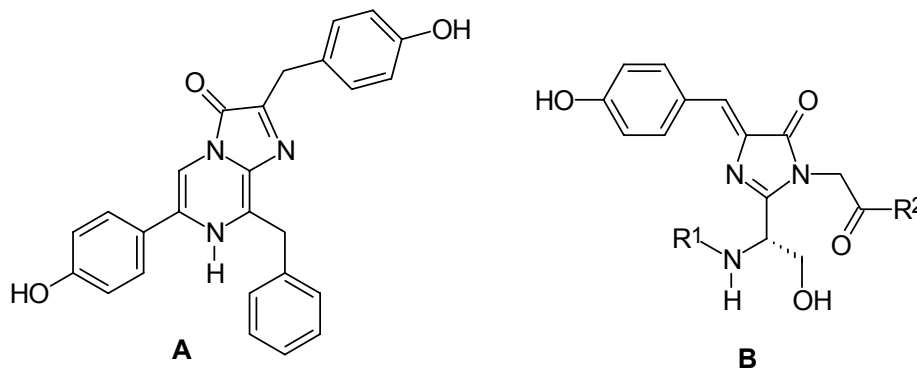


Abbildung 9: A: Der Luminophor Coelenterazin. B: Der Fluorophor des GFP, ein *p*-Hydroxybenzylidenimidazolidon, besteht aus den Resten 65-67 (Ser-Tyr-Gly) des GFP. R^1 = Rest 1 – 64; R^2 = Rest 68 – 238.

Im BRET-Assay-System erster Generation wird *Renilla reniformis* Luciferase (Rluc) als Donor, Coelenterazin-h als Substrat und ein gelb fluoreszierendes Protein (YFP) als Akzeptor verwendet^[36]. Das YFP ist eine Variante des GFP, bei der der Chromophor (vergleiche Abbildung 9) als Phenolat vorliegt. Durch den Austausch von Threonin203 durch Tyrosin werden π - π -Wechselwirkungen zwischen dem Fluorophor und Tyrosin203 möglich, wodurch die bathochrome Emission hervorgerufen wird^[37].

In Anwesenheit von Sauerstoff katalysiert Rluc die Umwandlung des Coelenterazin-h zu Coelenteramid unter Lichtemission bei 475-480 nm. Nach BRET auf das YFP fluoresziert dieses bei 525-530 nm. Durch die breite Emissionsbande von Rluc, welche die Emissionsbande des YFP stark überlappt, und den geringen Abstand der Emissionen

von lediglich 45-55 nm ist die spektrale Auflösung dieses BRET-Systems jedoch sehr schlecht und die Detektion schwierig.

In einer Weiterentwicklung des BRET-Assays wird als Substrat für den Biolumineszenzdonor Renilla Luciferase ein verändertes Coelenterazinderivat, DeepBlueC (DBC), verwendet. Die Reaktion des Substrats DBC mit der Luciferase erzeugt Licht einer Wellenlänge von 395 nm. Als Akzeptor wird aufgrund des besser geeigneten Absorptionsspektrums GFP verwendet, welches nach BRET eine scharfe Fluoreszenzemission bei 510 nm zeigt. Die große spektrale Verschiebung von ca. 115 nm erlaubt eine eindeutige Detektion der Signale^{[38],[39]}.

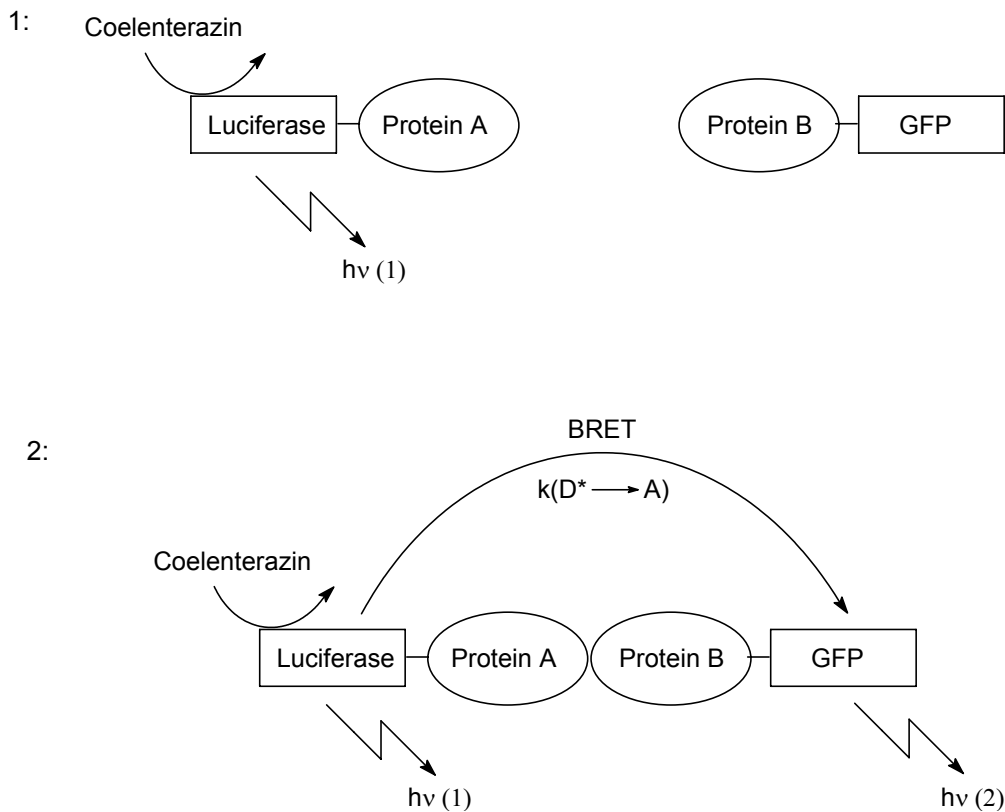


Abbildung 10: Prinzip des Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfers (BRET).

1: Keine Wechselwirkung zwischen den Proteinen A und B, großer Abstand, es wird nur das Licht der Luciferase/Coelenterazin-Reaktion ($h\nu(1)$, Donor) detektiert.

2: Die Proteine A und B treten miteinander in Wechselwirkung, der Abstand verringert sich stark. Es findet ein BRET statt. Zusätzlich zur Emission der Luciferase/Coelenterazin-Reaktion ($h\nu(1)$, Donor) kann die Emission des GFP ($h\nu(2)$, Akzeptor) detektiert werden.

Die BRET-Assay-Technologie wird sowohl *in vitro* als auch überwiegend *in vivo* zur Detektion der Wechselwirkung verschiedener Liganden, wie z. B. Proteinen, DNA,

Wirkstoffen, Enzymen oder Hormonen, innerhalb einer Zelle bzw. Zellorganelle angewendet^{[36],[40]}.

2 Problemstellung

Zur Entwicklung neuartiger Luminophore für Anwendungen im High Throughput Screening wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Zielsetzungen festgelegt:

2.1 Fluorogene präzipitierende Substrate für die *Alkalische Phosphatase*

In den Enzyme Labeled Fluoreszenz (ELF) Assays soll der Fluoreszenzfarbstoff durch eine Phosphatgruppe maskiert und wasserlöslich gemacht werden. Eine enzymatische Abspaltung dieser Schutzgruppe durch die *Alkalische Phosphatase* bewirkt die Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs. Er fällt aus dem wässrigen Medium aus, wobei er die Gebiete mit Enzymaktivität markiert. Die Enzymaktivität wird über die Zunahme der Feststofffluoreszenz beobachtet.

Bisher steht nur das System ELF-97 von Molecular Probes zur Verfügung, dessen Präzipitat bei ca. 530 nm grüngelb fluoresziert.

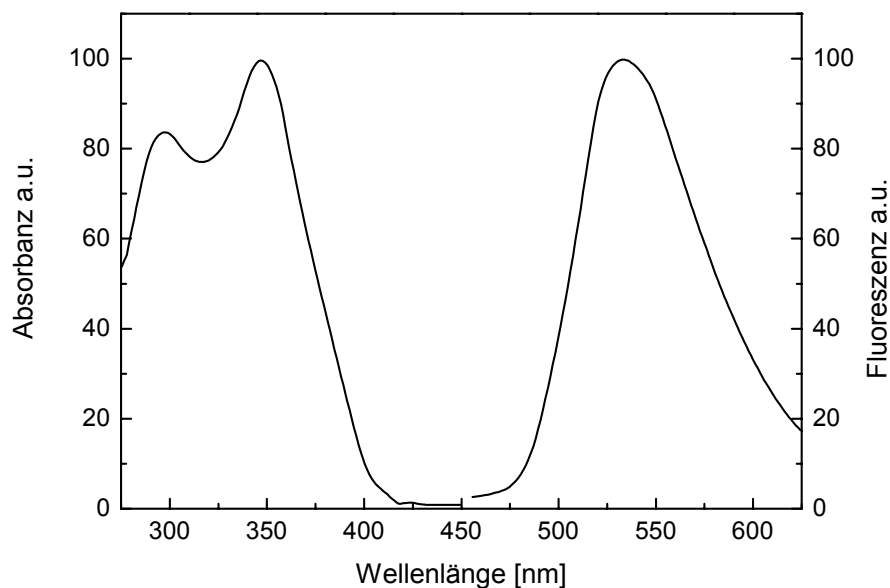


Abbildung 11: Normalisierte Absorptions- und Emissionsspektren des phenolischen ELF 97-Präzipitats, welches durch enzymatische Spaltung des löslichen ELF 97-Substrats gebildet wird^[41].

Ein Nachteil des ELF-97-Systems liegt in der relativ kurzwelligen Lage der Emissionsbande des phenolischen Präzipitats. Wie bei allen auf Fluoreszenz

basierenden Assays treten Störsignale durch unspezifische Hintergrundstrahlung oder Fluoreszenz von Reaktionskomponenten, z. B. Serumbestandteilen wie Hämoglobin auf, deren Fluoreszenz bis in den Wellenlängenbereich der Emission des ELF-97-Präzipitats hineinreichen und somit die Detektion der Feststofffluoreszenz des Präzipitats erschweren und die Sensitivität herabsetzen.

Die Anwendung von ELF-Assays *in vivo* oder an lichtempfindlichem Gewebe, z. B. der Retina, ist problematisch, da die Feststofffluoreszenz des Präzipitats aufgrund der Lage des Absorptionsmaximums bei $\lambda = 350 \text{ nm}$ mit sehr energiereicher Strahlung angeregt werden muss, was zu Schädigungen oder Veränderungen der Probe führen kann.

Diese beiden Nachteile könnten mit einem ELF-Farbstoff, der eine langwelligere Absorption und Emission mit einem großen Stokesshift zeigt, vermieden werden.

Durch die Verschiebung der Emission des ELF-Präzipitats zu Wellenlängen oberhalb von 600 nm ergäbe sich aufgrund des großen spektralen Abstands die Möglichkeit, einen Großteil der eventuell auftretenden Störlumineszenz über optische Filter ohne Intensitätsverluste der ELF-Signale abzutrennen und somit die Empfindlichkeit des ELF-Assays erheblich zu erhöhen. Ein längerwelliges Absorptionsmaximum würde dabei die Verwendung energieärmerer Strahlung zur Detektion der ELF-Fluoreszenz-Signale erlauben, so dass die Untersuchung lichtempfindlicherer Materialien und von *in vivo*-Assays möglich würde.

Ein Ziel dieser Arbeit ist es somit, Substrate für *Alkalische Phosphatase* darzustellen, welche nach enzymatischer Spaltung im wässrigen Medium unlösliche Fluorophore freisetzen, deren Feststoffemissionen oberhalb von 600 nm liegen. Die Substrate müssen rasch von Alkalischer Phosphatase gespalten werden und die Präzipitate sollen sich selektiv am Ort der Enzymaktivität absetzen.

2.1.1 Synthesestrategie für die ELF-Substrate

Aufgrund seiner hervorragend geeigneten spektroskopischen Eigenschaften wird der Laserfarbstoff **DCM** (4-Dicyanomethylen-2-[4-(dimethylamino)styryl]-6-methyl-4H-pyran) als Leitstruktur bei der Synthese langwellig emittierender ELF-Substrate ausgewählt. **DCM** zeigt in Methanol ein Absorptionsmaximum bei 469 nm^[42] und ein Emissionsmaximum bei 625 nm^[43].

Damit der Farbstoff als Substrat mit Alkalischer Phosphatase reagieren kann, muss eine Phosphatgruppe im Molekül vorhanden sein. Diese soll durch Phosphorylierung aliphatischer oder phenolischer Hydroxygruppen dargestellt werden. In einem ersten

Schritt muss demnach eine Hydroxygruppe in das Molekül eingefügt werden, welche dann anschließend phosphoryliert wird. Besonders gut für Substitutionen geeignet erscheinen die Methylgruppen der Aminogruppe (1), der Benzolring (2) und die Methylgruppe (3) am Pyranring.

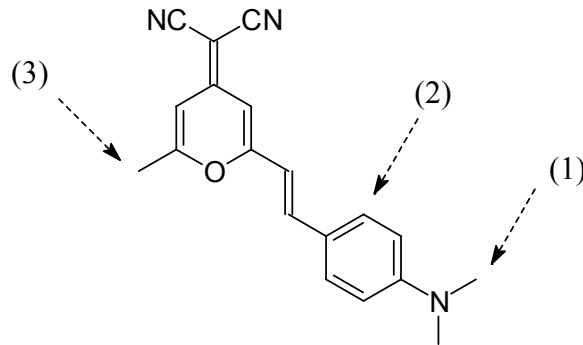


Abbildung 12: Der Laserfarbstoff **DCM**. Die Pfeile markieren die zur Einführung von Hydroxygruppen geeigneten Positionen.

2.2 Fluorogene Markierung von Proteinen: Farbstoffe für BRET-Systeme

Das ursprünglich etablierte BRET-System, welches auf Renilla Luciferase/Coelenterazin-h als Biolumineszenzquelle und YFP als Akzeptor basiert, weist einige Nachteile auf. So ist das Biolumineszenzsignal sehr breit und relativ unstrukturiert und überlagert teilweise das Signal des über BRET angeregten YFP, dessen Maximum nur ca. 50 nm bathochromer liegt. Bei Verwendung des GFP als Akzeptorprotein verringert sich dieser Abstand sogar noch auf etwa 30 nm. Die exakte Unterscheidung zwischen Biolumineszenzsignal und BRET-Signal ist folglich schwierig, für BRET-Assays aber essentiell, da die Bestimmung der Effizienz des BRET über das Verhältnis beider Intensitäten erfolgt. Um den Stokesshift zwischen Lumineszenzquelle und Akzeptor zu vergrößern, bieten sich zweierlei Ansatzpunkte an. Zum einen kann bei Beibehaltung des Akzeptors die Biolumineszenzquelle variiert werden, so dass sie kurzwellige Strahlung emittiert. Das ist im BRET²-Assay durch Verwendung eines veränderten Luciferasesubstrats, DeepBlueC, realisiert worden, bei dem das Maximum der Biolumineszenzemission bei ca. 395 nm liegt. Als Akzeptor wird das bei 510 nm emittierende GFP verwendet, so dass der Stokesshift auf 115 nm ansteigt. Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass die Lumineszenzsignale damit in einem Wellenlängenbereich liegen, in dem Störsignale durch unspezifische

Hintergrundstrahlung oder Fluoreszenz von Reaktionskomponenten, z. B. Serumbestandteilen wie Hämoglobin, auftreten und die Empfindlichkeit des Assays herabsetzen.

Eine weitere Möglichkeit, die Sensitivität des Assays zu optimieren und gleichzeitig den Stokesshift zu vergrößern, bestünde somit darin, das ursprüngliche Biolumineszenzsystem Luciferase/Coelenterazin-h beizubehalten und die Akzeptorproteine GFP bzw. YFP durch einen Fluoreszenzfarbstoff mit großem Stokesshift zu ersetzen. Dadurch würde die BRET-Fluoreszenz bathochrom verschoben werden, was die Anzahl der eher kurzweilig auftretenden Störsignale verringern würde. Gleichzeitig könnten Biolumineszenzsignal und BRET-Signal durch Auswahl eines geeigneten Fluoreszenzfarbstoffs mit großem Stokesshift optimal getrennt werden.

Durch den Ersatz der recht voluminösen und schweren Markierungsproteine GFP und YFP durch einen vergleichsweise kleinen und leichten Fluoreszenzfarbstoff umgeht man zudem einen Teil eines weiteren Problems, das bei der Anwendung der BRET-Assays aufgetreten ist. Die Markierungsproteine GFP, YFP und Renilla Luciferase (35 kD) führen in einigen Fällen aufgrund ihrer Größe zu sterischer Hinderung und behindern somit die zu untersuchenden Protein-Protein-Wechselwirkungen^[44]. Zusätzlich tritt bei einigen mit dem zylindrischen GFP markierten Proteinen Inaktivität aufgrund einer durch die Markierung verursachten Änderung der Quartärstruktur aufgrund unkorrekter Faltung auf^[45].

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist deshalb die Synthese eines für BRET-Assays mit Renilla Luciferase/Coelenterazin-h als Biolumineszenzquelle geeigneten Fluoreszenzfarbstoffs.

Hierbei ergibt sich das folgende Anforderungsprofil an den Fluoreszenzfarbstoff:

- Das Biolumineszenzsystem Luciferase/Coelenterazin-h zeigt eine sehr breite und unstrukturierte Lumineszenz zwischen ca. 430 und 530 nm. Um einen optimalen BRET zu erzielen, muss der Akzeptorfarbstoff in diesem Wellenlängenbereich eine breite Absorption aufweisen.
- Um das Biolumineszenzsignal bei 475 nm spektral weit von der BRET-Fluoreszenz des Akzeptorfarbstoffs zu separieren, sollte der Stokesshift des Akzeptorfarbstoffs ausreichend groß sein. Dabei sollte die Emissionsbande möglichst schmal sein und die Lumineszenzbande der Luciferase nur gering überlappen.
- Um eine hohe Empfindlichkeit und effizienten BRET zu erzielen, muss der Akzeptorfarbstoff eine große Quantenausbeute aufweisen.

- Um den Akzeptorfarbstoff kovalent an die zu untersuchenden Proteine zu binden, wird eine reaktive Gruppe im Farbstoffmolekül benötigt.
- Um die Wasserlöslichkeit des modifizierten Proteins zu gewährleisten, muss der Farbstoff hydrophile Eigenschaften aufweisen.

2.2.1 Synthesestrategie für Fluoreszenzfarbstoff für BRET-Systeme

Die spektralen Eigenschaften des Laserfarbstoffs **DCM** decken sich ausgezeichnet mit den oben beschriebenen Anforderungen an einen BRET-Farbstoff, wie das Absorptions- und Emissionsspektrum von **DCM** in DMSO in Abbildung 13 zeigt.

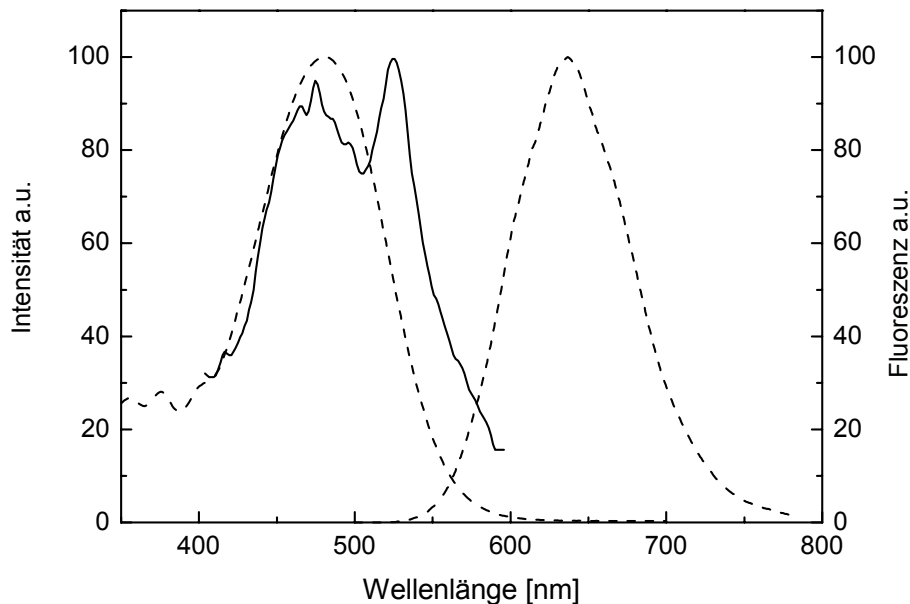
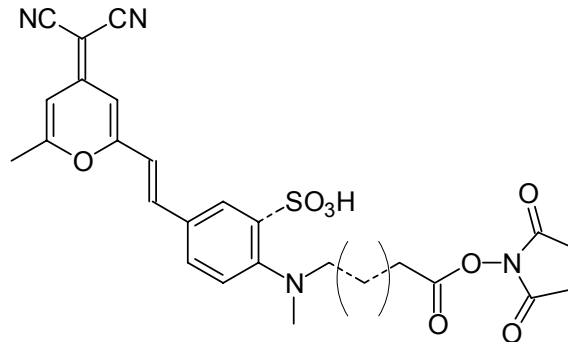


Abbildung 13: Signale des BRET-Systems Renilla Luciferase/YFP (durchgezogene Linie)^[38] und Absorptions- und Emissionsspektrum von **DCM** in DMSO (gestrichelt). Die Fluoreszenzquantenausbeute von **DCM** in DMSO liegt bei 0.78^[46].

Um **DCM** kovalent an ein Protein binden zu können, muss eine reaktive Gruppe eingefügt werden. Für Reaktionen mit den Aminogruppen eines Proteins bieten sich beispielsweise Succinimidylester an, welche mit Aminen zu Carbonsäureamiden reagieren. Zur Synthese eines Succinimidylesters wird eine Carbonsäurefunktion im **DCM**-Derivat benötigt. Um die Flexibilität der Reaktivgruppe zu bewahren, erscheint eine Substitution an einer der Methylgruppen der Dimethylamiongruppe mit einer nicht zu kurzketigen Carbonsäure am günstigsten.

Der hydrophobe Laserfarbstoff **DCM** kann durch Einführung hydrophiler Gruppen, z. B. Sulfonsäuregruppen, wasserlöslich gemacht werden. Besonders der Benzolring erscheint für eine elektrophile Sulfonierung geeignet.



*Abbildung 14: Der Laserfarbstoff **DCM** und die möglichen Positionen (gestrichelt) zur Einführung der angestrebten funktionellen Gruppen.*

Ziel ist es deshalb, die Hydrophilie des Laserfarbstoff **DCM** durch Einfügen einer Sulfonsäuregruppe zu erhöhen, sowie die Fähigkeit zur kovalenten Bindung des Farbstoffs an Proteine über einen Succinimidylester, zu erreichen. Dabei ist der Ort der Variationen letztlich unerheblich, solange die spektroskopischen Eigenschaften des Farbstoffs erhalten bleiben.

3 Synthese und Charakterisierung

3.1 Darstellung des aliphatischen AP-Substrats für ELF-Assays

3.1.1 Syntheseplanung: Variation (1)

Als Leitstruktur wird aufgrund seiner guten spektroskopischen Eigenschaften der Laserfarbstoff **DCM** ausgewählt, der an der Aminogruppe mit einer Hydroxyethylgruppe und einer Methylgruppe anstelle zweier Methylgruppen funktionalisiert werden soll. Durch Phosphorylierung dieser aliphatischen Hydroxygruppe soll der als ELF-Substrat geeigneten Farbstoff **DCM-2** erhalten werden.

Die Darstellung dieses Farbstoffs soll über eine Aldolkondensation des entsprechenden Aldehyds **2** mit 4-Dicyanomethylen-2,6-dimethyl-4*H*-pyran (**1**) und anschließende Phosphorylierung erfolgen.

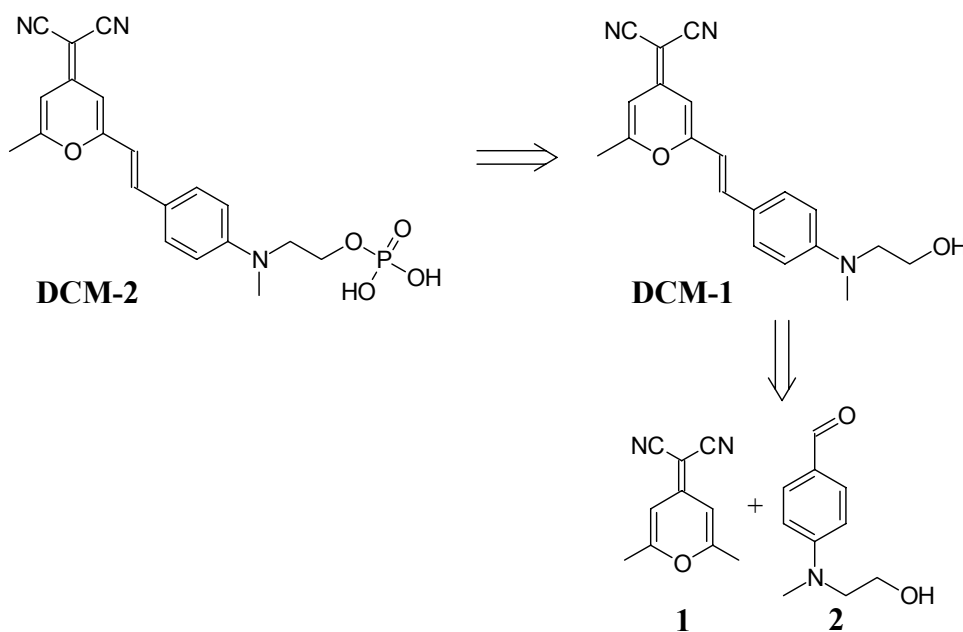
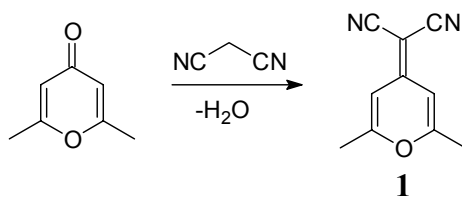


Abbildung 15: Retrosynthetische Darstellung des als ELF-Substrat geeigneten DCM-Derivats **DCM-2**.

3.1.2 Synthese von 4-Dicyanomethylen-2,6-dimethyl-4*H*-pyran (**1**)

Zur Synthese des 4-Dicyanomethylen-2,6-dimethyl-4*H*-pyran (**1**) wird kommerziell erhältliches 2,6-Dimethyl-4-pyranon wie bei WOODS^[47] beschrieben in einer Knoevenagelreaktion mit Malonsäuredinitril in Acetanhydrid kondensiert.

V1

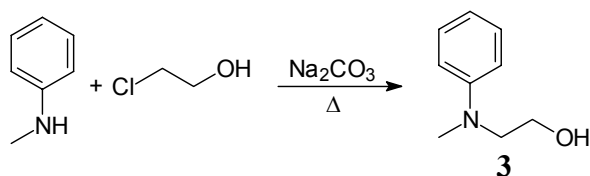


Das Pyranderivat **1** erhält man nach Umkristallisation aus Ethanol in Übereinstimmung mit der Literatur in Form beige-brauner Kristalle. Es hat sich jedoch gezeigt, dass das lediglich durch Umkristallisation gereinigte Produkt noch erhebliche Mengen an Verunreinigungen enthält, die bei einigen Folgeversuchen, z. B. der Bromierung oder der Synthese der Farbstoffe, die Reaktion bzw. die Reinigung der Folgeprodukte erheblich stören. Das Produkt wird deshalb über Säulenchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan gereinigt und in Form hellgelber Kristalle erhalten. Die Ausbeute beträgt bei säulenchromatographischer Reinigung 60 % und ist damit deutlich höher als die Ausbeute, die nach mehrfacher Umkristallisation zur erhalten wäre. Auch dies spricht neben der größeren Reinheit für eine säulenchromatographische Isolierung.

3.1.3 Darstellung des Aldehyds 2

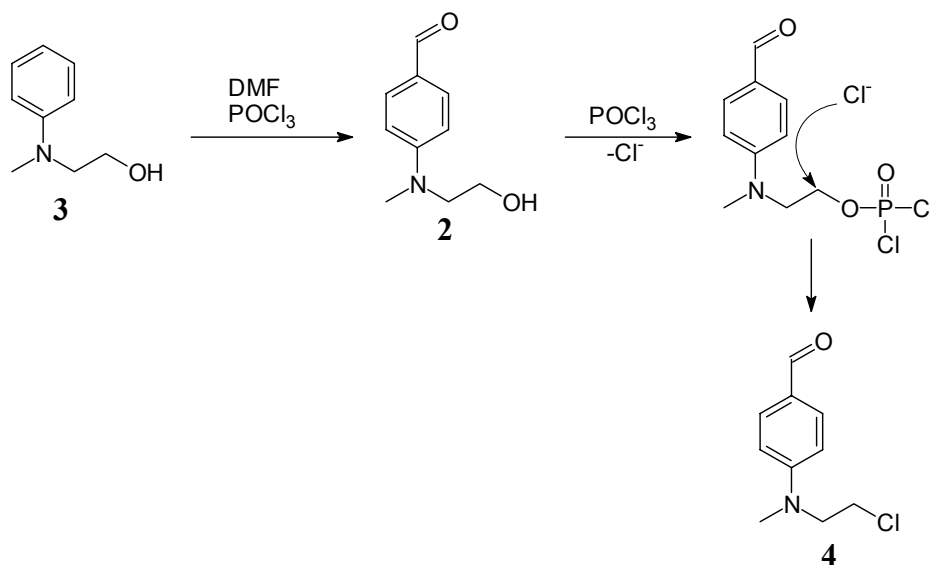
Zunächst wird 2-(*N*-Methyl-*N*-phenylamino)-ethanol **3** durch nucleophile Substitution von Chlorethanol mit *N*-Methylanilin in Anlehnung an Vorschriften von ROSS und RINDFUSZ et al. dargestellt^[48,49].

V2



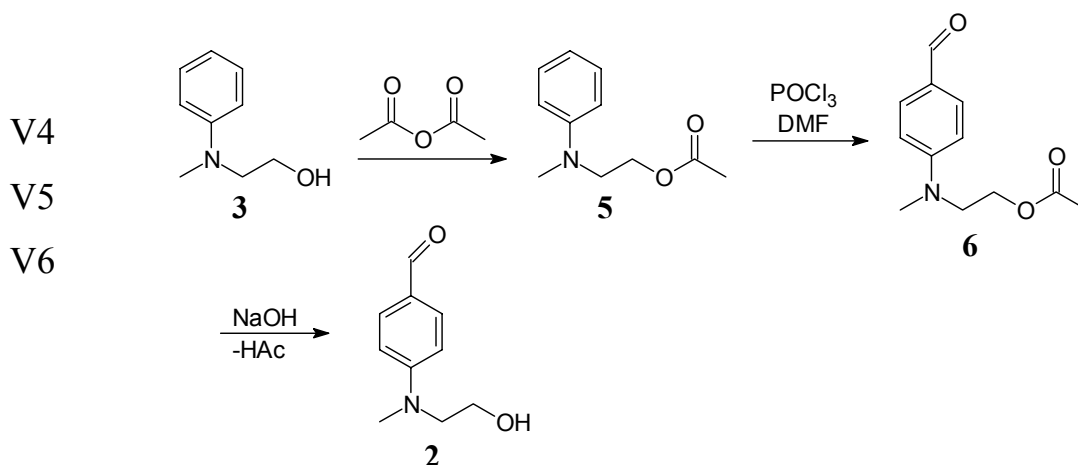
Man erhält eine orange ölige Flüssigkeit mit einer Ausbeute von 60 %.

Es folgt die Formylierung des Benzolrings in *para*-Stellung zur Aminogruppe. In elektronenreichen Aromaten bietet sich dazu die Vilsmeier-Formylierung an. Bei Verbindung **3** jedoch erfolgt bei der Reaktion neben der vorgesehenen Formylierung des Benzolrings auch Substitution der aliphatischen Hydroxygruppe durch Chlorid, so dass als Hauptprodukt das 2-[*N*-Methyl-*N*-(4-formylphenyl)amino]-ethylchlorid **4** über das Bisulfitaddukt isoliert werden kann. Neben der direkten Substitution der Hydroxygruppe durch Chloridionen ist unter den Reaktionsbedingungen der Vilsmeier-Formylierung auch eine indirekte Substitution über den Phosphorsäureester, der eine ausgezeichnete Abgangsgruppe darstellt, möglich.



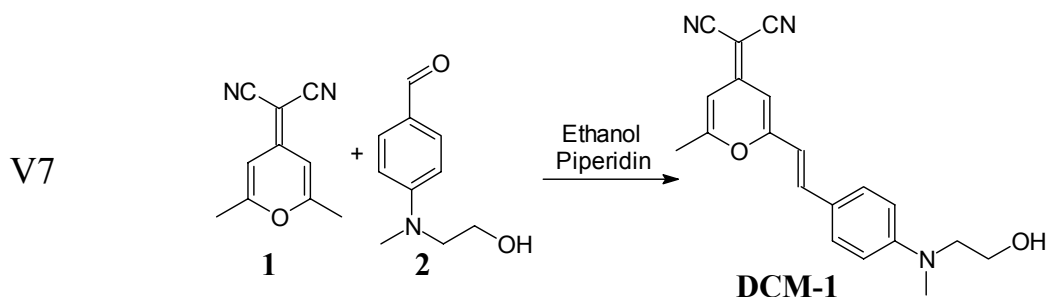
Es besteht deshalb die Notwendigkeit, die Hydroxygruppe während der Vilsmeier-Formylierung zu schützen. Hierzu bietet sich eine Acylierung mit überschüssigem Acetanhydrid zum 2-(*N*-Methyl-*N*-phenylamino)ethyl-acetat **5** an. Dabei wird nach einer exemplarischen Arbeitsvorschrift aus dem HOUBEN-WEYL^[50] in Anlehnung an eine Synthese von BURGSTRAHLER^[51] verfahren. Bei der Alkoholyse von Anhydriden ist zu beachten, dass pro Molekül Anhydrid nur ein Acyl-Äquivalent zur Veresterung verfügbar ist. Aus diesem Grund wird das Acetanhydrid im Überschuss zugegeben, so dass es gleichzeitig als Lösungsmittel dient. Die Acylierung wird durch den Zusatz von konz. Schwefelsäure beschleunigt. Nach Aufarbeitung und Destillation erhält man **5** als gelbe Flüssigkeit in einer 86%igen Ausbeute.

Die Vilsmeier-Formylierung gelingt nach HICKOMOTT nun glatt zum 2-[*N*-Methyl-*N*-(4-formylphenyl)amino]ethyl-acetat (**6**)^[52]. Dazu wird das Edukt **5** zu einem auf 10 °C gekühlten Gemisch aus Phosphorylchlorid und Dimethylformamid getropft. Nach 2.5 Stunden Rühren bei 95 °C wird mit Eiswasser hydrolysiert und mit 20%iger Natronlauge neutralisiert. Nach der Extraktion erhält man ein braunes Öl, welches ohne weitere Aufarbeitung zu **2** in 10%iger Natronlauge verseift werden kann. Der Aldehyd **2** wird durch Umkristallisation aus Dichlormethan in Form gelber bis roter Kristalle mit einer Ausbeute von 77 % erhalten.



3.1.4 Darstellung des Farbstoffs

Der Aldehyd **2** wird in Anlehnung an die Vorschrift von BOURSON und VALEUR^[46] mit dem Pyranderivat **1** in einer basisch katalysierten Aldolkondensation in Ethanol mit Piperidin als Katalysator zum Fluoreszenzfarbstoff **DCM-1** umgesetzt. Er lässt sich leicht über eine Säulenchromatographie (Kieselgel, Dichlormethan/Ether 1:1) und durch anschließende Umkristallisation aus Dichlormethan/Ether isolieren und fällt in Form violetter Nadeln aus.



Die säurekatalysierte Variante der Aldolkondensation in Acetanhydrid nach HAMMOND^[53] ist für die Darstellung dieser Verbindung nicht geeignet, da als Nebenreaktion die Hydroxygruppe acyliert werden würde.

Der in Lösung orangerot fluoreszierende Farbstoff zeigt die erwarteten pigmentartigen Eigenschaften, so ist er beispielsweise in Chloroform und Diethylether unlöslich, in Dichlormethan mäßig und nur in den sehr polaren Lösungsmitteln Aceton und DMSO recht gut löslich. In Wasser ist er jedoch nicht löslich. Das UV/Vis-Spektrum von **DCM-1** ist in Abbildung 16 dargestellt.

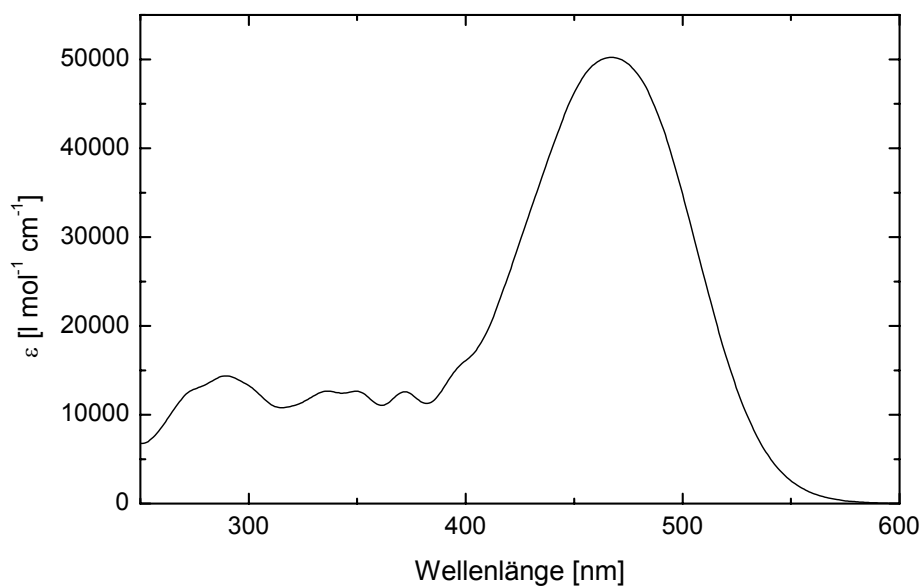
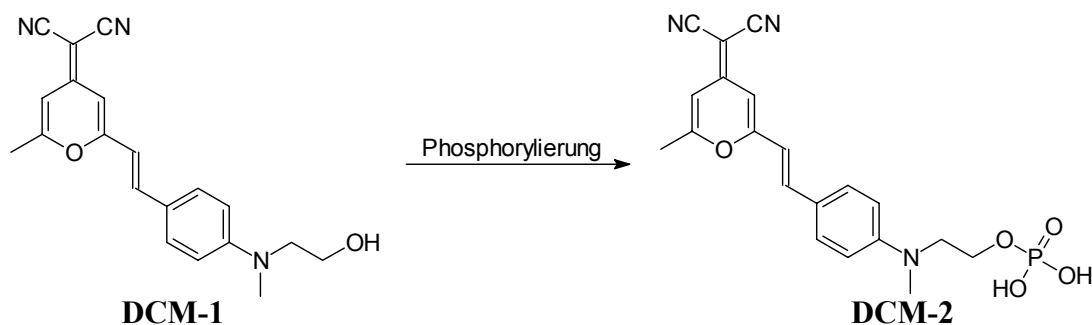


Abbildung 16: Absorptionsspektrum von **DCM-1** in Acetonitril.

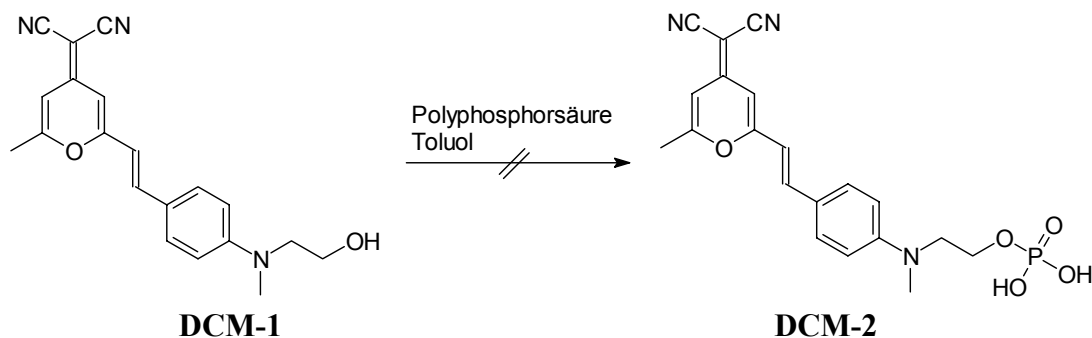
3.1.5 Phosphorylierung der aliphatischen Hydroxygruppe des Farbstoffs **DCM-1**



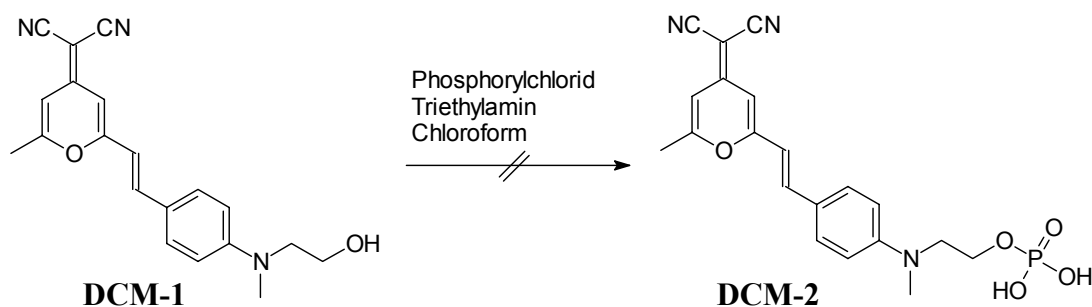
Die Phosphorylierung der wenig reaktiven aliphatischen Hydroxygruppe von **DCM-1** erweist sich als schwierig. Einen Hinweis auf die geringe Acidität der Hydroxygruppe gibt schon das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **DCM-1** in DMSO-d_6 : der Wasserstoff der Hydroxygruppe koppelt mit der benachbarten Methylengruppe, so dass als Signal ein Triplet beobachtet wird. Die Kopplung von Hydroxyprotonen mit vicinalen CH-Protonen kann normalerweise nur bei ganz reinen wasser- und säurefreien Alkoholen erkannt werden^[54]. Das hier verwendete stark hygroskopische DMSO-d_6 weist jedoch einen im NMR-Spektrum deutlich sichtbaren Wassergehalt auf. Der Wasserstoff der Hydroxygruppe tauscht in **DCM-1** demnach nicht oder nur sehr langsam aus. Dies deutet darauf hin, dass der Wasserstoff nicht leicht substituiert werden kann. (Das

¹H-NMR-Spektrum von **DCM-1** in DMSO-d₆ ist in anderem Zusammenhang im Kapitel 4 abgebildet.)

Zur Phosphorylierung der Hydroxygruppe stehen verschiedene Methoden mit unterschiedlichen Reagenzien zur Verfügung.



Zunächst wird eine Phosphorylierung mit Polyphosphorsäure (PPA) in Toluol versucht^[55]. Diese Methode erweist sich als ungeeignet, da zum einen mit sehr geringen Substanzmengen (~200 mg (0.6 mmol) Farbstoff; 125 mg (0.4 mmol) PPA) gearbeitet werden muss, die zähflüssige Polyphosphorsäure jedoch kaum zu dosieren und in diesen kleinen Mengen zu handhaben ist, und da zum anderen **DCM-1** in Toluol schlecht löslich ist. Dennoch wird in Vorversuchen 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt, dann wird durch Zugabe von Diethylether ein Feststoff ausgefällt. Sowohl das Filtrat als auch der Feststoff werden hinsichtlich ihrer Wasserlöslichkeit und ihrer Löslichkeit in Basen untersucht, da der angestrebte Monophosphorsäureester **DCM-2** im basischen wässrigen Medium sehr gut löslich sein sollte. Da diese Tests negativ verlaufen und die ¹H-NMR- und die Massenspektren nur Signale des Edukts aufweisen, hat offensichtlich keine ausreichende Umsetzung stattgefunden.

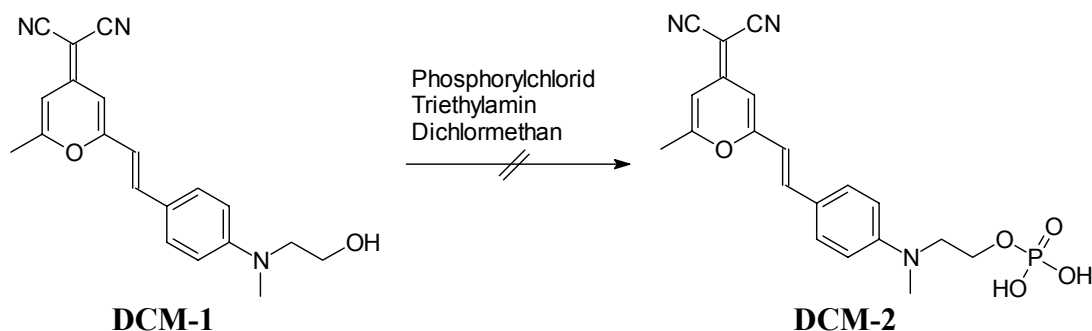


Eine weitere Möglichkeit zur Darstellung des Phosphorsäureesters **DCM-2** besteht in der Umsetzung von **DCM-1** mit POCl₃ in Gegenwart von Triethylamin in Chloroform nach EGGERER et al.^[56], denen mit dieser Synthese die Darstellung des biochemisch interessanten 3-Methylbuten-(2)-yl-(1)-orthosphats (Isopentenylorthosphat)

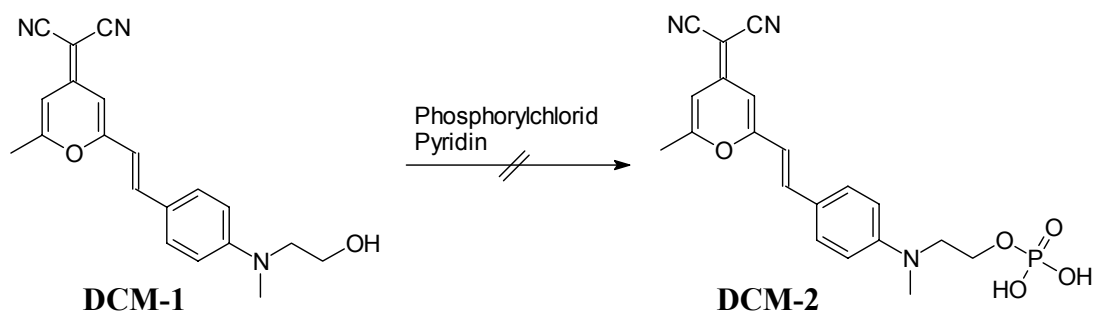
gelang. Bei dieser Reaktion wird zunächst die Hydroxygruppe mit Phosphorylchlorid verestert und anschließend mit Wasser zum Phosphorsäureester hydrolysiert.

In einem Vorversuch wird der schwerlösliche Alkohol (0.47g, 1.4 mmol) in 10 ml absolutem Chloroform aufgeschlemmt und mit 3.5 ml (25 mmol) absolutem Triethylamin versetzt. Unter Eiskühlung werden 0.39 ml (4.2 mmol) Phosphorylchlorid in 3 ml absolutem Chloroform langsam bei 0 °C zugetropft, dann wird das Gemisch noch 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das entstandene Produkt wird mit 12 g Eis hydrolysiert, die Chloroformschicht abgetrennt, und die mit verdünnter Kalilauge basisch gestellte wässrige Phase zur Entfernung des Amins mit Ether mehrfach extrahiert. Die wässrige Phase wird anschließend mit halbkonzentrierter Salzsäure angesäuert, mit Ammoniumchlorid gesättigt und mit Essigester extrahiert.

Nach der Aufarbeitung liegen im ^{31}P -NMR drei Signale vor. Vermutlich wurde das Produkt nicht vollständig hydrolysiert oder es bildeten sich Di- und Triester. Der angestrebte Monophosphorsäureester kann jedoch aus diesem Produktgemisch nicht isoliert werden.



Da **DCM-1** in Chloroform sehr wenig löslich ist, wird die gleiche Reaktion in absolutem Dichlormethan, in dem das Pigment etwas besser löslich ist, wiederholt. Das Lösungsmittelvolumen wird so gewählt, dass der Farbstoff darin größtenteils gelöst vorliegt. Die Vorgehensweise entspricht der oben beschriebenen. Über DC-Kontrolle (Dichlormethan) kann ein minimaler Umsatz beobachtet werden. Es kann jedoch kein Produkt isoliert werden, nach der Aufarbeitung erhält man nur das Edukt zurück.



Eine weitere Phosphorylierungsreaktion für phenolische Hydroxygruppen wird von KOLLER und WOLFBEIS beschrieben, denen es gelang, das Pyridiniumsalz von 7-(3-Phenylcoumarinyl)-phosphat zu synthetisieren^[57]. Als Phosphorylierungsreagenz wird wiederum Phosphorylchlorid verwendet, das Lösungsmittel ist jedoch absolutes Pyridin, welches gleichzeitig als Base zum Abfangen der entstehenden Salzsäure dient. Es wird versucht, diese Reaktion auch auf aliphatische Hydroxygruppen anzuwenden. Dazu werden im Vorversuch 500 mg (1.50 mmol) des Farbstoffs in 10 ml absolutem Pyridin gelöst und unter Eiskühlung während 30 Minuten mit 230 mg (1.50 mmol) Phosphorylchlorid versetzt. Nach einer Stunde Rühren bei Raumtemperatur wird der Reaktionsansatz auf 200 ml Eiswasser gegeben, drei Stunden lang gerührt und mit 20%iger Natronlauge basisch gestellt. Bei der Extraktion des Pyridins mit Dichlormethan aus dem wässrigen Reaktionsgemisch fällt **DCM-1** quantitativ aus der wässrigen Phase aus und geht teilweise in die organische Phase über. Der angestrebte Phosphorsäureester **DCM-2** sollte allerdings im Gegensatz zum Edukt im basischen Milieu wasserlöslich sein. Da auch die ³¹P-NMR-Spektren des isolierten Feststoffs kein Phosphorsignal zeigen, hat wiederum kein Umsatz stattgefunden.

Diese Methode nach KOLLER und WOLFBEIS scheint ausschließlich zur Darstellung der reaktiveren phenolischen Phosphorsäureester geeignet zu sein und wird im Folgenden bei der Darstellung des phenolischen Phosphats des **DCM**-Farbstoffs erfolgreich eingesetzt (siehe Kapitel 3.4).

Bei ähnlichen im Arbeitskreis durch JABLONSKI^[58] synthetisierten Verbindungen, Coumarinen mit Hydroxyethyl-substituierten Aminogruppen, gelingt die Phosphorylierung nach den oben genannten Verfahren ebenfalls nicht.

JABLONSKI testete außerdem die Methode von THUONG und CHABRIER, bei der als Phosphorylierungsreagenz das als Dioxaphospholan geschützte Phosphorylchlorid verwendet wird^[59]. Da er mit dieser Methode keinen Phosphorsäureester darstellen konnte, wurde auf Parallelversuche verzichtet und stattdessen auf eine von

MONTGOMERY und TURNBULL^[60] erstmals beschriebene Phosphorylierungsmethode zurückgegriffen, welche sich des Dimorpholinobromphosphats als Phosphorylierungsreagenz bedient. Mit dieser eleganten Methode werden aliphatische und ungesättigten Alkohole selektiv zu Monophosphorsäureestern phosphoryliert. So konnten MONTGOMERY und TURNBULL auf diese Weise beispielsweise aus den entsprechenden Alkoholen die biologisch wichtigen Allyl- und 2-(4-Methyl-5-thiazolyl)ethylphosphorsäureester darstellen.

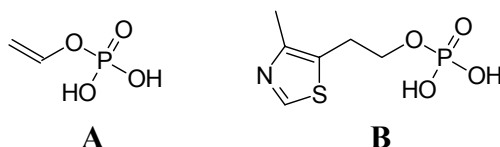


Abbildung 17: Das von MONTGOMERY und TURNBULL synthetisierte Allylphosphat **A** spielt eine wichtige Rolle im Metabolismus des *Aspergillus Niger*. Der 2-(4-Methyl-5-thiazolyl)-ethylphosphorsäureester **B** stellt den integralen Part des von Thiamin (Vitamin B₁) abstammenden Thiaminpyrophosphats TPP, einem Coenzym zur α -Ketocarbonsäure-Decarboxylierung, dar.

Das aus Morpholin und Phosphorylbromid POBr₃ dargestellte Dimorpholinobromphosphat phosphoryliert Alkohole in Gegenwart einer organischen Base glatt zu Dimorpholinamidophosphorsäureestern. Als organische Base wird das sterisch gehinderte tertiäre Amin 2,6-Lutidin (2,6-Dimethylpyridin) verwendet, um Nebenreaktionen wie Eliminierung zu unterdrücken. Die Monophosphorsäureester werden durch saure Hydrolyse der Dimorpholinamidophosphorsäureestern freigesetzt.

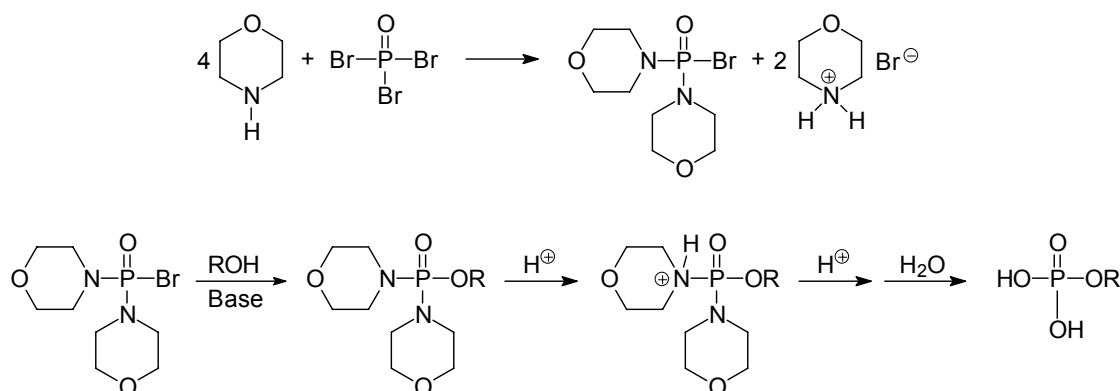


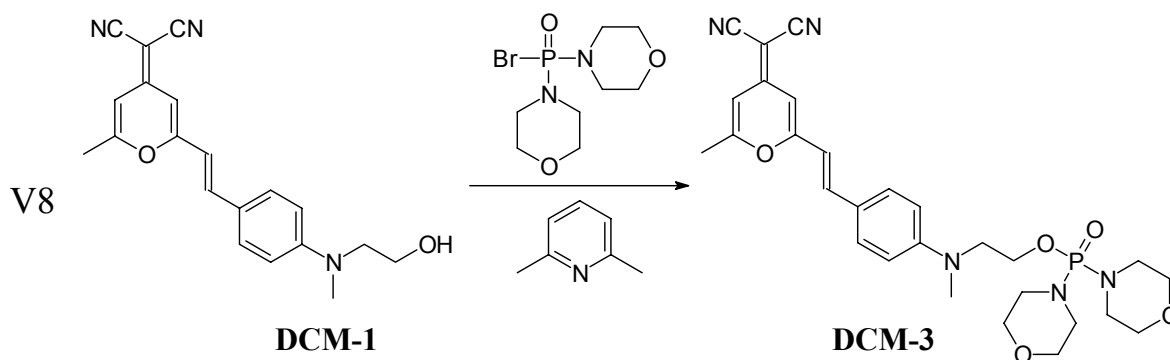
Abbildung 18: Syntheschema der Phosphorylierung über das Dimorpholinobromphosphat als Phosphorylierungsreagenz.

Zur Darstellung des Dimorpholinobromphosphats wird zunächst kristallines POBr₃ unter Schutzgasatmosphäre in absolutem, alkoholfreiem Chloroform gelöst. Das zur Stabilisierung dem käuflichen Chloroform zugesetzte Ethanol wird vorher durch Sieden

über Phosphorpentoxid und anschließende Destillation entfernt. Unter Eiskühlung wird bei 10 °C die vierfache Menge destilliertes Morpholin zugetropft und anschließend vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die bei der Reaktion des Phosphorylbromids mit jeweils zwei Molekülen Morpholin freiwerdenden Protonen werden vom überschüssigen Morpholin abgefangen, und farbloses, kristallines Morpholiniumbromid fällt als Niederschlag aus, welcher vor der folgenden Umsetzung durch Absaugen über eine Glasfritte entfernt wird.

Ein Einengen der chloroformischen Dimorpholinobromphosphat-Lösung wie von MONTGOMERY und TURNBULL beschrieben ist nicht sinnvoll, da aufgrund der Schwerlöslichkeit des umzusetzenden **DCM-1** in größeren Lösungsmittelvolumina als in der Vorschrift angegeben gearbeitet werden muss. Das so dargestellte äußerst hydrolyseempfindliche Reagenz ist verdünnt nur kurze Zeit bei 0 °C und unter Feuchtigkeitsausschluss stabil, die Hydrolysereaktion erfolgt stark exotherm. Es ist daher notwendig, das Phosphorylierungsreagenz jeweils frisch darzustellen.

Die chloroformische Lösung des Dimorpholinobromphosphat wird bei Raumtemperatur zu einer Lösung des Farbstoffs und 2,6-Lutidin in absolutem, ethanolfreien Chloroform gegeben und unter Stickstoffatmosphäre 48 Stunden gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer kann der rotfluoreszierende Rückstand über eine Säulenchromatographie an Kieselgel mit Aceton gereinigt werden und man erhält den lagerstabilen rotfluoreszierenden Dimorpholinamidophosphorsäureester **DCM-3**. Das ³¹P-NMR-Spektrum zeigt ein Singulett bei 14.66 ppm.



Aufgrund der Schwerlöslichkeit von **DCM-1** in Chloroform wird die Reaktion in absolutem und alkoholfreiem Dichlormethan wiederholt. So kann die Ausbeute von 40 % in Chloroform auf 58 % in Dichlormethan gesteigert werden.

Die Dimorpholinamidophosphorsäureester werden durch saure Hydrolyse in die freien Phosphorsäureester umgewandelt. Dabei erfolgt der Angriff eines Protons auf das

Morpholidat-Stickstoffatom, gefolgt von einem P-N-Bindungsbruch, so dass nacheinander zunächst das Monohydroxyphosphat und dann das Dihydroxyphosphat entstehen.

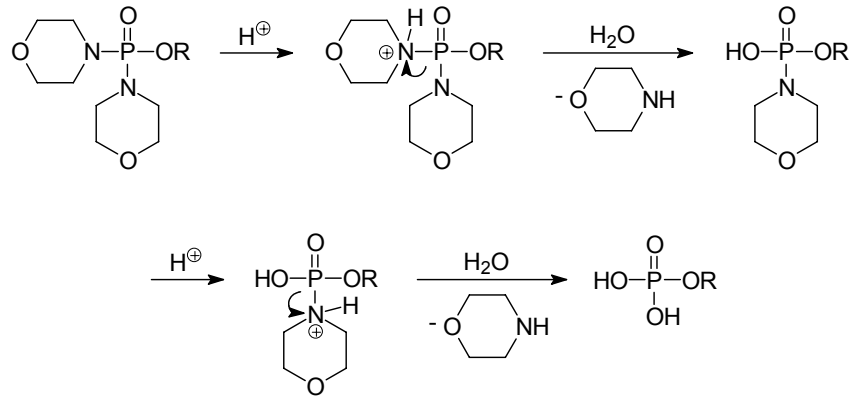
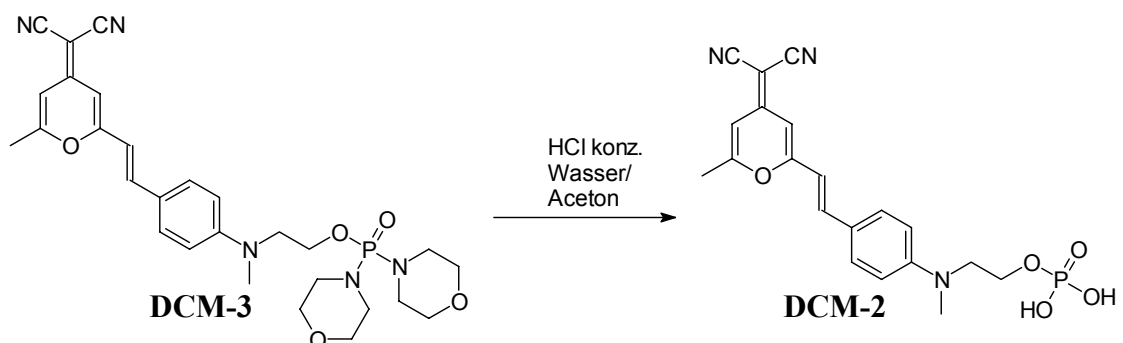


Abbildung 19: Mechanismus der Hydrolyse des Dimorpholinamidophosphorsäureesters zum Monophosphorsäureester.

MONTGOMERY und TURNBULL wandeln die Dimorpholinamidophosphorsäureester durch wässrige Hydrolyse an einem protonierten Ionenaustauscherharz in die freien Phosphorsäureester um. Diese Methode liefert bei der Hydrolyse des **DCM-3** kein befriedigendes Ergebnis, da die Substanz in Wasser völlig unlöslich ist und deshalb nicht auf eine Ionenaustauschersäule aufgebracht werden kann. Stattdessen wird das Phosphat in einer wässrigen Aufschlammung mit festem Ionenaustauscher im Rundkolben hydrolysiert, wonach jedoch das Produkt aus einer erheblichen Menge an wässriger Lösung isoliert werden muss. Zur Hydrolyse wird deshalb ein anderes Verfahren entwickelt, welches der Hydrophobie der Ausgangsverbindung gerecht wird.



V9

Zu einer wässrigen Aufschlammung von **DCM-3** wird gerade soviel Aceton gegeben, dass eine homogene Lösung vorliegt. Nach Zugabe von konzentrierter Salzsäure wird die rote Lösung bis zur Entfärbung unter Rückfluss erhitzt, wobei der freie Phosphorsäureester in Form braunorangener Nadeln ausfällt. Der Niederschlag wird

abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Hierbei vertieft sich die Farbe der Nadeln. In DMSO gelöst fluoresziert die Verbindung orangerot. Das Absorptionsspektrum in Wasser ist in Abbildung 21 dargestellt. Die Elementaranalyse und das ^1H -NMR-Spektrum zeigen ein Äquivalent Kristallwasser pro Äquivalent Phosphorsäureester. Das in Abbildung 20 gezeigte ^1H -NMR-Spektrum von **DCM-2** zeigt bei 3.6 ppm ein sehr breites Signal, welches durch den schnellen Austausch der Protonen des Kristallwassers und der Phosphatgruppe verursacht wird. Die Lage dieses Signals ist konzentrationsabhängig, die Integration ergibt vier Protonen, zwei aus dem Phosphorsäureester und zwei aus dem Kristallwasser.

Das ^{31}P -NMR-Spektrum zeigt ein Singulett bei 0.20 ppm. Demnach handelt es sich um einen einheitlichen Ester.

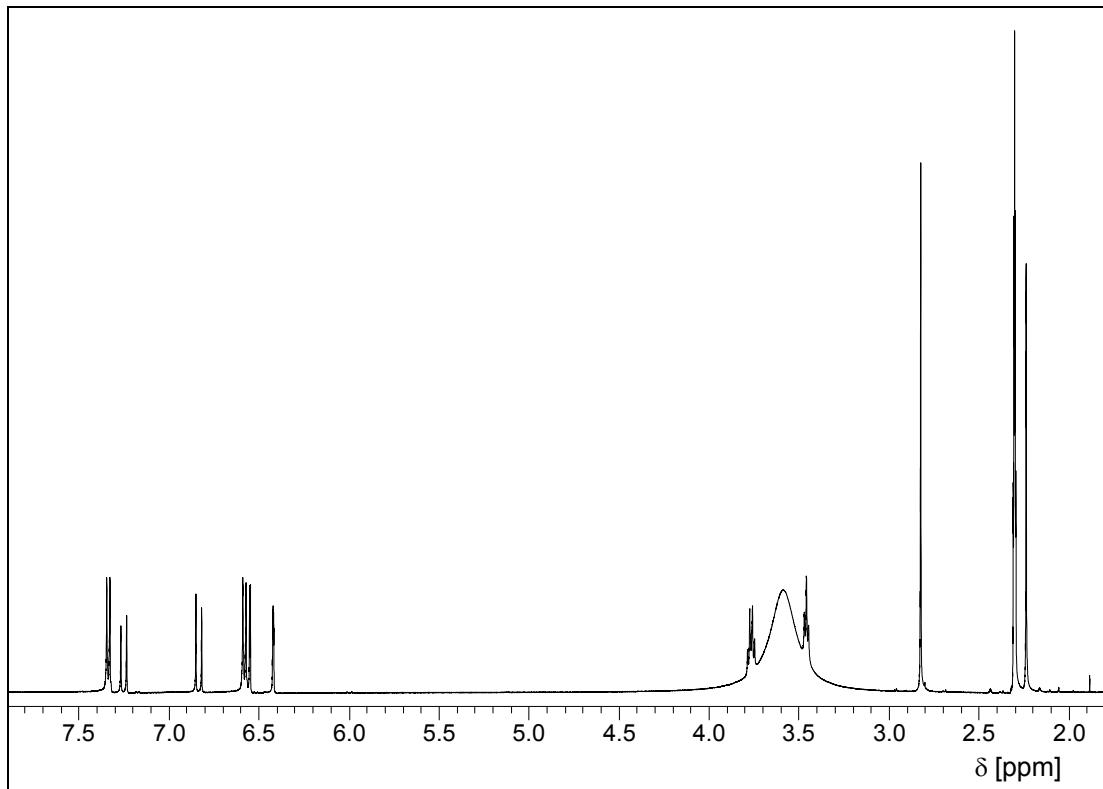


Abbildung 20: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von **DCM-2**.

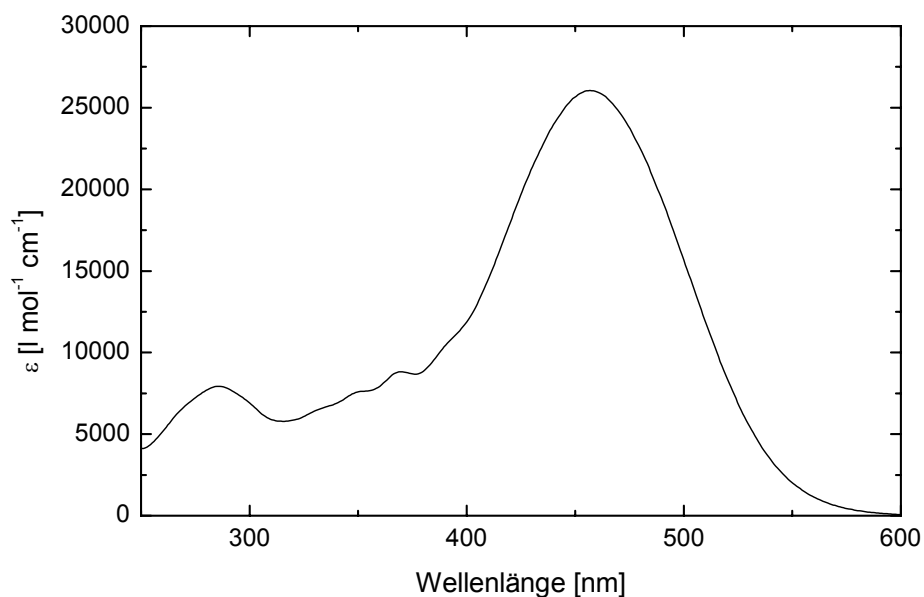


Abbildung 21: Absorptionsspektrum von **DCM-2** in Wasser.

3.2 Beiträge zur Darstellung weiterer AP-Substrate für ELF-Assays mit DCM als Leitstruktur nach Variante (1)

3.2.1 Beiträge zur Darstellung von 4-[*N*-(4-Hydroxybenzyl)-*N*-methyl-amino]-benzaldehyd (9)

Nachdem die Darstellung eines aliphatischen ELF-Substrats mit der Synthese von **DCM-2** gelang, wird nun die Darstellung eines phenolischen ELF-Substrats angestrebt. Dazu soll die Alkoholfunktion von 4-Hydroxybenzylalkohol in einer nucleophilen Substitution durch *N*-Methylanilin substituiert werden zu Verbindung **8**. Anschließend soll über eine Vilsmeier-Formylierung die Aldehydgruppe eingefügt und über eine Aldolkondensation mit dem Pyranderivat **1** der Farbstoff **DCM-6** dargestellt werden.

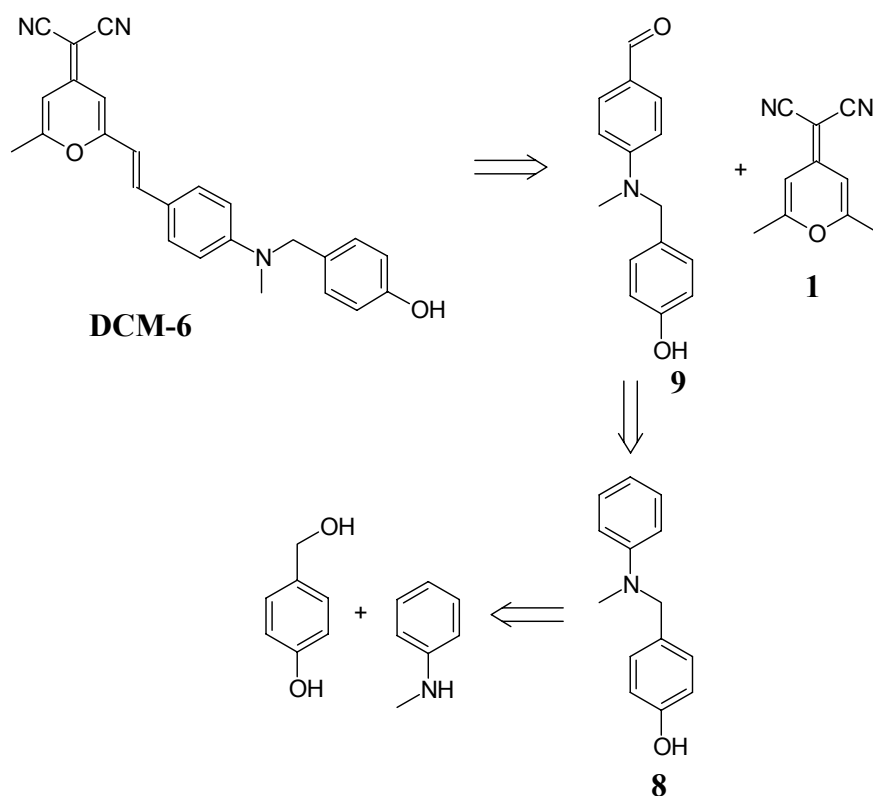
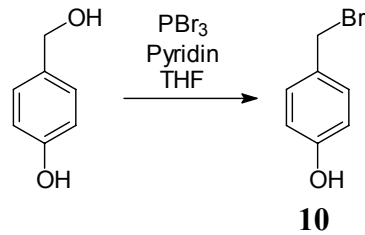


Abbildung 22: Retrosynthetisches Prinzip zur Darstellung eines phenolischen DCM-Derivats, welches sich zu einem AP-Substrat für ELF-Assays funktionalisieren lässt.

Die Substitutionsreaktion von 4-Hydroxybenzylalkohol mit *N*-Methylanilin zu **8** wird zunächst über das Bromid **10** versucht.

Die Bromierung des 4-Hydroxybenzylalkohols wird mit Phosphortribromid zunächst nach einer Vorschrift von THAKKAR et al.^[61] in absolutem Dichlormethan bei 0 °C durchgeführt, wobei jedoch das Edukt zu einem Polyether polymerisiert. Die Literaturvorschrift bezieht sich auf 4-Methoxybenzylalkohol als Edukt und ist offenbar nicht auf 4-Hydroxybenzylalkohol übertragbar.

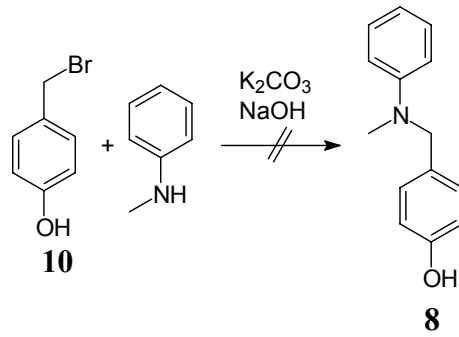
Aus diesem Grund wird die Reaktion nach einer Vorschrift von WISSNER et al.^[62] unter sorgfältiger Reaktionskontrolle wiederholt. Dabei wird PBr₃ in absolutem THF unter Argon vorgelegt und bei –5 °C mit Pyridin versetzt. Erst dann wird der Alkohol in THF gelöst bei –5 °C langsam zugetropft.



V10

Das sehr reaktive Bromid **10** wird vor der weiteren Umsetzung aufgrund der Polymerisationsneigung nicht isoliert, sondern direkt nach dem Entfernen des Lösungsmittels weiter umgesetzt.

Die nucleophile Substitution des Bromids **10** mit *N*-Methylanilin wird in Ethanol mit Kaliumcarbonat und Natronlauge nach einer allgemeinen Vorschrift zur Einführung benzylicher Schutzgruppen in Amine durchgeführt^[63].



In diesem Fall versagt jedoch diese Methode, da die Polykondensation des 4-Hydroxybenzylbromids zum Polyether über den Mechanismus der Williamson-Ethersynthese schneller stattfindet als die Substitutionsreaktion mit *N*-Methylanilin.

Benzylbromid gibt leicht ein Bromid-Ion ab, wodurch ein mesomeriestabilisiertes p-Chinomethan entsteht, welches mit dem Phenol **10** reagiert. Es kann kein tertiäres Amin isoliert werden, bei der Destillation des Ansatzes erhält man das Edukt *N*-Methylanilin quantitativ zurück.

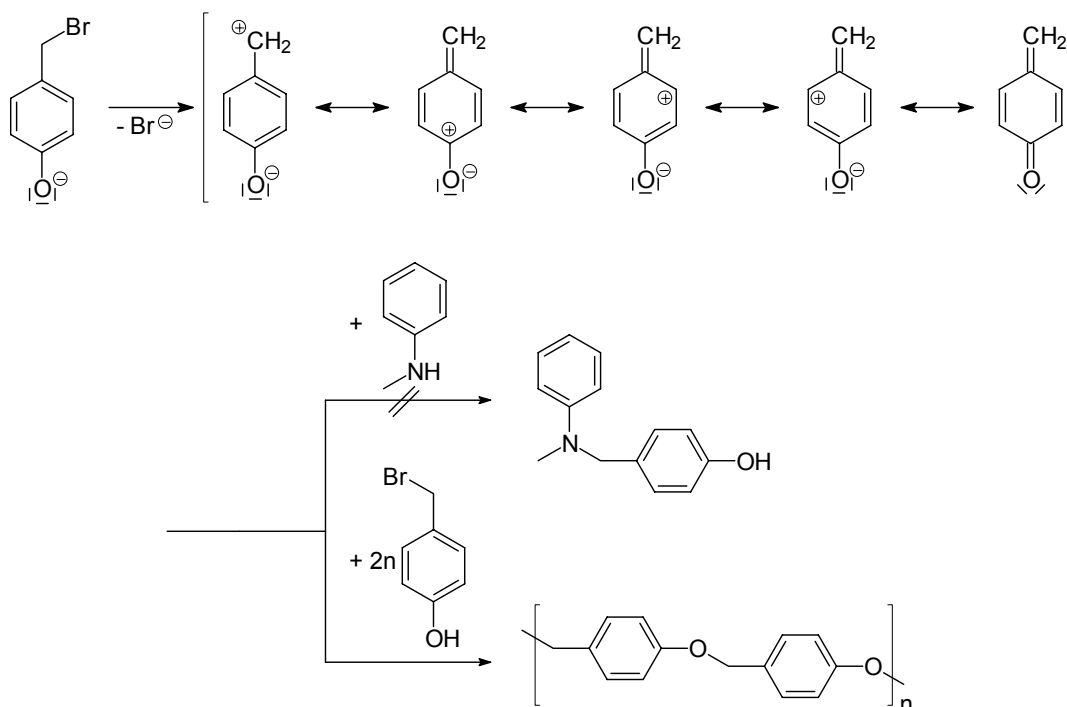
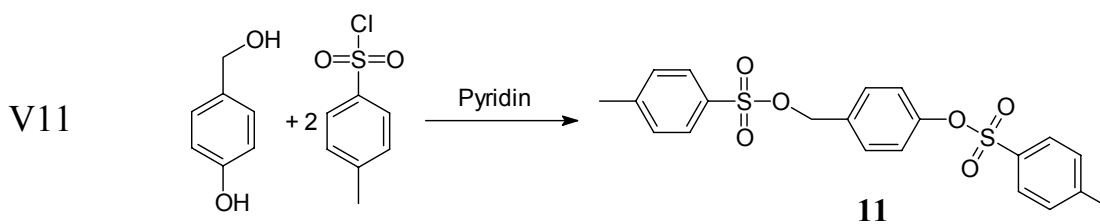


Abbildung 23: Mesomeriestabilisiertes *p*-Chinomethan von **10** und Folgereaktion.

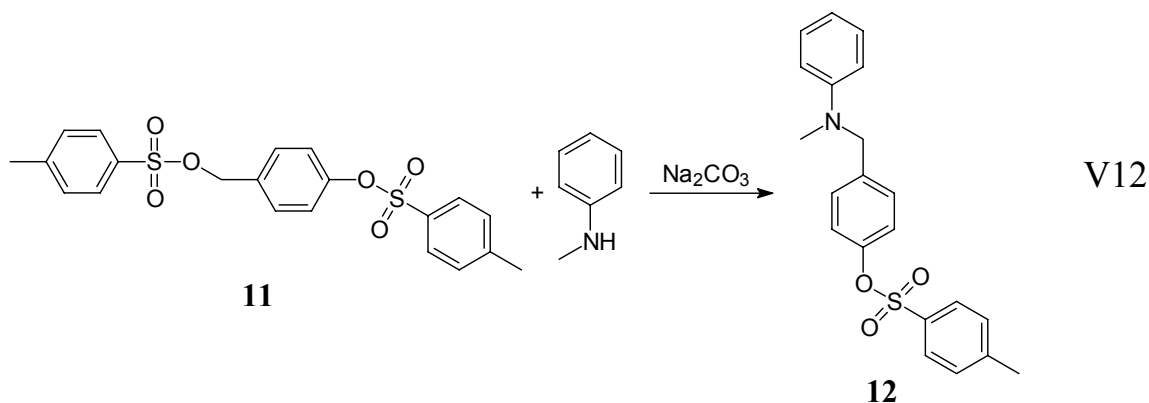
Da das angestrebte 4-Hydroxybenzylbromid **10** offenkundig zu reaktiv für die Darstellung des tertiären Amins ist, wird anstelle des Bromids ein Tosylat als Abgangsgruppe eingeführt. Bei der Tosylierung der aliphatischen Hydroxygruppe wird gleichzeitig auch die phenolische Hydroxygruppe zum Tosylat umgesetzt und somit geschützt.



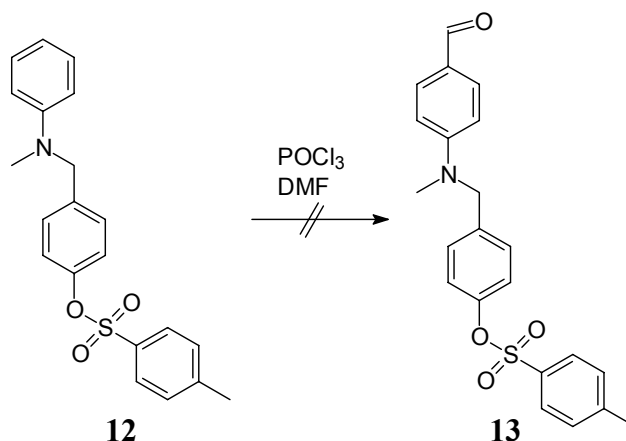
Die phenolische Hydroxygruppe ist acider als die aliphatische so dass erstere schneller tosyliert wird. Bei einem Eduktverhältnis von 1:1 zwischen Alkohol und Tosylchlorid reagiert nur die phenolische Hydroxygruppe. Das Ditosylat wird nach einer allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Alkoholyse von Sulfonsäurechloriden dargestellt^[64]. Dabei wird ein Äquivalent des 4-Hydroxybenzylalkohols und zwei Äquivalente des *p*-Toluolsulfonsäurechlorids in Chloroform vorgelegt, wobei der Alkohol unlöslich ist. Bei 0-3 °C Innentemperatur wird absolutes Pyridin sehr langsam zugetropft, anschließend wird die Mischung 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach der

Aufarbeitung fällt das Ditosylat aus der chloroformischen Lösung in Form farbloser voluminöser Kristalle aus und kann aus Chloroform umkristallisiert werden. Im $^1\text{H-NMR}$ ist doppelt substituiertes Produkt und Pyridin zu erkennen.

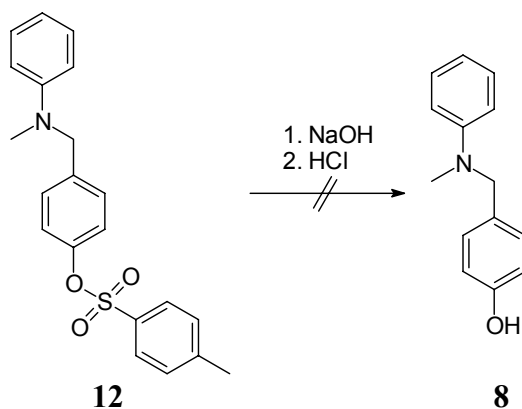
Das Tosylat wird in einer nucleophilen Substitutionsreaktion mit N-Methylanilin in absolutem Ethanol in Anwesenheit einer anorganischen Base umgesetzt. Mit wasserfreiem Kaliumcarbonat bzw. Natriumhydroxid als Base erfolgt keine Reaktion, mit wasserfreiem Natriumcarbonat hingegen kann in Anlehnung an eine Vorschrift von SHIRLEY et al.^[65] nach 48 Stunden Sieden unter Rückfluss das Substitutionsprodukt **12** in Form eines gelben Pulvers durch Umkristallisation aus Ethanol isoliert werden.



Verbindung **12** soll über eine Vilsmeier-Formylierung in der para-Position des Anilinrings formyliert werden. Die Verbindung ist jedoch in dem als Lösungsmittel verwendeten absoluten DMF völlig unlöslich. Deshalb wird in diesem Fall die Vilsmeier-Formylierung nach der klassischen Variante durchgeführt, bei der die zu formylierende Verbindung in DMF suspendiert vorgelegt wird und der Komplex aus DMF und Phosphorylchlorid bei 10 °C zutropft wird^{[66],[67]}. Obwohl die Vilsmeier-Formylierung normalerweise stark exotherm ist, kann hier beim Zutropfen keine Erhöhung der Temperatur des Reaktionsgemisches beobachtet werden. Die Lösung wird für vier Stunden bei 60 °C und anschließend 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und danach wie üblich aufgearbeitet, es bildet sich jedoch kein Bisulfitaddukt. Da von einem festen Produkt ausgegangen wird, kann nicht destilliert werden. Im $^1\text{H-NMR}$ des aufgearbeiteten Reaktionsgemisches ist kein Aldehyd-Signal zu beobachten. Es hat demnach keine Reaktion stattgefunden. Das liegt wahrscheinlich an der Unlöslichkeit des Edukts im verwendeten Lösungsmittel DMF. In anderen für diese Formylierung geeigneten Lösungsmitteln wie Benzol und Chlorbenzol^[68] ist das Edukt jedoch gleichfalls schwer löslich.

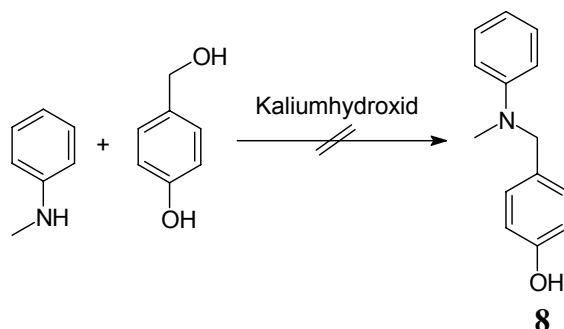


Durch Verseifen der Sulfonsäureesterfunktion wird die Phenolgruppe freigesetzt. Aufgrund der damit einhergehenden Erhöhung der Polarität sollte die Löslichkeit in DMF verbessert werden. Die Verseifung wird in ethanolischer Kalium- bzw. Natriumhydroxidlösung versucht, wobei die Reaktionstemperatur von Raumtemperatur bis zur Siedehitze variiert wird. Nach Entfernen des Ethanols aus dem Reaktionsgemisch und nach Ansäuern kann jedoch kein Produkt extrahiert werden. Die Esterfunktion des Toluolsulfonsäureesters **12** ist offenbar so stabil, dass sie nur unter drastischen Bedingungen, bei denen jedoch das Molekül zerstört werden würde, gespalten werden kann.



Dieser Syntheseweg erweist sich als Sackgasse, deshalb wird nochmals die direkte Darstellung des Phenols aus *N*-Methylanilin und 4-Hydroxybenzylalkohol in Gegenwart von Kaliumhydroxid versucht. Nach einer Vorschrift von NODA et al. konnten so erfolgreich primäre aromatische Amine und primäre Alkohole unter Wasseraustritt zu sekundären Aminen kondensiert werden^[69]. Dazu wird das Amin mit dem Alkohol in ethanolischer Kaliumhydroxidlösung mehrere Tage lang zum Sieden erhitzt.

Dünnschichtchromatographisch lässt sich ein Umsatz feststellen. Bei der säulenchromatographischen Reinigung stellt sich jedoch heraus, dass nur ein minimaler Anteil Produkt entsteht.



Auch nach mehrtägiger Reaktionszeit erhöht sich der Umsatz nicht nennenswert. Offenbar ist die sterische Hinderung sekundärer Amine für eine derartige Substitution von Alkoholen zu groß.

3.2.2 Beiträge zur Darstellung phenolischer Ester über das DCM-Carbonsäurederivat DCM-7

Das in Kapitel 3.5 dargestellte DCM-Derivat DCM-7 trägt einen Carbonsäuresubstituenten. Durch eine Veresterung mit Resorcin oder Dihydrochinon kann ein phenolisches DCM-Derivat dargestellt werden. Es besteht einerseits die Möglichkeit, den fertigen Farbstoff DCM-7 zu verestern, andererseits kann auch der entsprechende Vorläufer des Farbstoffs, der Aldehyd **14**, verestert und dann erst zum Farbstoff umgesetzt werden.

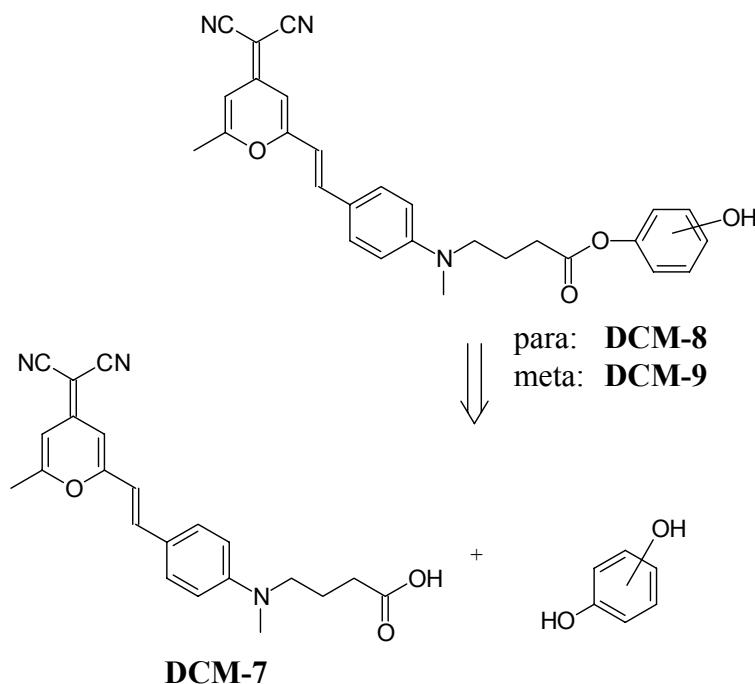


Abbildung 24: Retrosynthese der phenolischen DCM-Derivate, welche durch Phosphorylierung zu AP-Substraten für ELF-Assays funktionalisiert werden können.

Da der Aldehyd **14** leichter zu erhalten ist als der Farbstoff und damit auch in größerer Menge zur Verfügung steht, wird die Veresterung zunächst auf dieser Stufe versucht. Die Synthese des Aldehyds **14** und des Farbstoffs **DCM-7** sind in Kapitel 3.5 beschrieben.

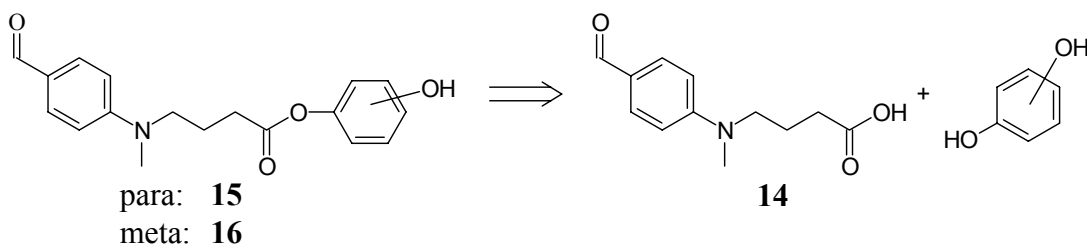
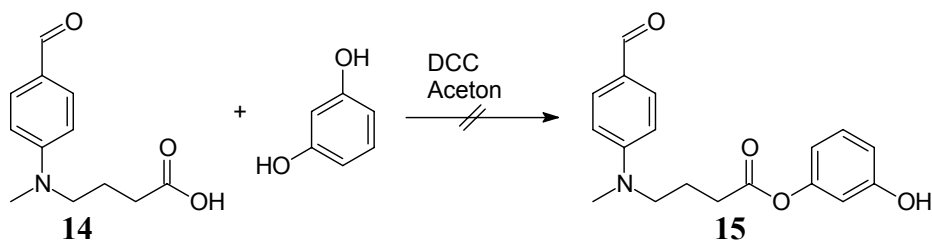


Abbildung 25: Retrosynthese der phenolischen Aldehyde.

Sehr schonende Veresterungen können mit Hilfe von Kupplungsreagenzien, z. B. DCC (Dicyclohexylcarbodiimid), durchgeführt werden. In Gegenwart des Kupplungsreagenz DCC reagieren Alkohole mit Carbonsäuren schon bei Raumtemperatur, es muss keine Säure als Katalysator zugegeben werden^[70]. Dabei wird die Hydroxygruppe der Carbonsäure durch 1,2-Addition an das DCC in eine bessere Abgangsgruppe verwandelt. Als Nebenprodukte treten Dicyclohexylharnstoff, der sich aufgrund der schlechten Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln meist gut abtrennen lässt, und *N*-Acylharnstoff, ein Umlagerungsprodukt der Zwischenstufe, auf^[71].

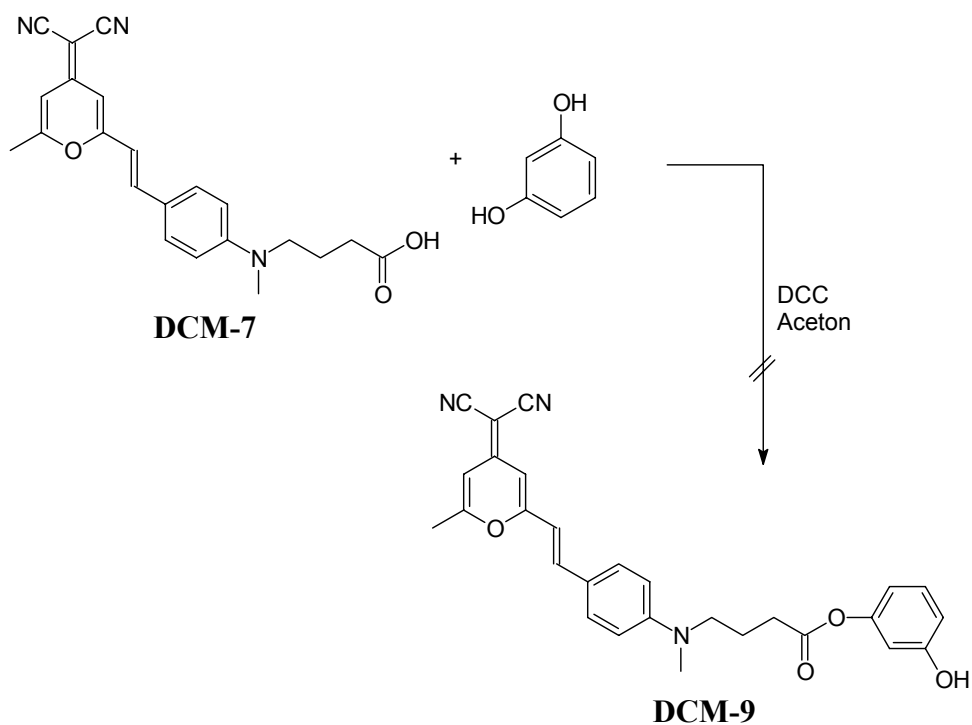
Der Aldehyd **14** wird in trockenem Aceton mit einem dreifachen Überschuss an Resorcin unter Stickstoffatmosphäre in Anwesenheit der Kupplungsreagenz DCC gerührt.



Durch den Überschuss an Resorcin soll die Bildung des Monoesters begünstigt und die Neigung zur Veresterung der zweiten Hydroxygruppe vermindert werden. Schon nach wenigen Minuten fällt ein weißer Niederschlag aus, im DC sind neben dem Eduktsignal zwei neue Flecken zu erkennen. Diese können vom Mono- und Diester des Resorcins herrühren. Der entstandene Niederschlag weist auf eine Umsetzung des DCC zu Dicyclohexylharnstoff, dem Nebenprodukt der Veresterung in Anwesenheit von DCC, hin. Ein vollständiger Umsatz wird jedoch auch nach längerer Reaktionszeit nicht beobachtet. Über eine säulenchromatographischen Reinigung können zwar die beiden Produktfraktionen voneinander getrennt werden, im DC taucht bei jeder dieser Fraktionen jedoch auch immer das Eduktsignal auf. Die nach der Säulenchromatographie zunächst erhaltenen weißen Kristalle wandeln sich innerhalb weniger Minuten in ein gelbes Öl um. Die bei der Reaktion entstandenen Ester sind offenbar instabil und zersetzen sich schon auf dem leicht sauren Säulenmaterial bzw. direkt nach der Isolierung. Im $^1\text{H-NMR}$ der Produkte sind die Signale des Aldehyds zu erkennen. Die Signale der aromatischen Protonen und der eventuell noch freien Hydroxygruppe des Resorcins fehlen ganz. Dafür gibt es sehr viele Signale im Bereich zwischen 1 und 3 ppm, die nicht durch die Edukte, Produkte oder das Lösungsmittel erklärt werden können. Vermutlich wurde ein Umlagerungsprodukt der Zwischenstufe, der acylierte Dicyclohexylharnstoff, isoliert^[72], welcher nicht mit Alkoholen reagiert und der sich bei der Aufarbeitung in das Edukt und Dicyclohexylharnstoff zersetzt.

Parallelversuche mit Dihydrochinon ergeben ebenfalls ein instabiles Produkt, das sich nach der Isolierung zersetzt und vermutlich auch aus dem Umlagerungsprodukt besteht.

Bei Einsatz der freien Säure des Farbstoffs **DCM-7** in trockenem Aceton mit DCC ist ebenso nach kurzer Zeit ein Niederschlag und eine Umsetzung im DC zu erkennen, nach der säulenchromatographischen Reinigung ist jedoch kein Phenolester des Farbstoffs isolierbar.



Offenbar erfolgt sowohl mit dem Aldehyd **14** als auch mit dem Farbstoff **DCM-7** nach der 1,2-Addition der Carbonsäure an das Kupplungsreagenz die Umlagerung zum Acylharnstoff schneller als der Angriff des Nucleophils, so dass lediglich das instabile Nebenprodukt isoliert werden kann.

3.2.3 Beiträge zur Darstellung phenolischer Amide über das Säurederivat DCM-7

Eine weitere Möglichkeit zur Darstellung eines phenolischen DCM-Derivats besteht in der Amidierung von DCM-7 mit para-Aminophenol.

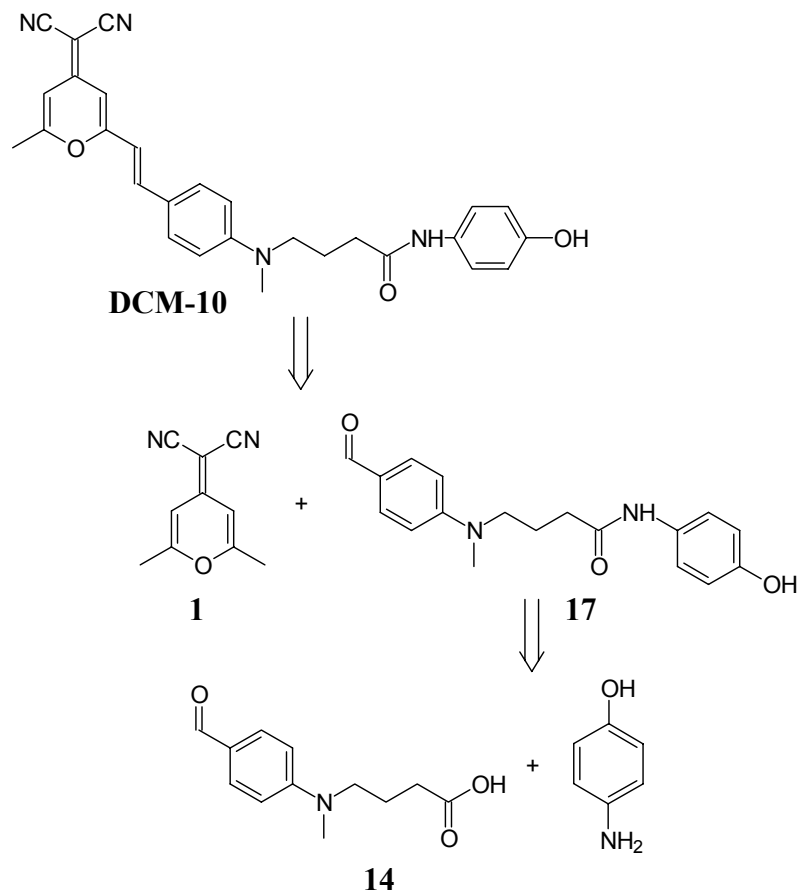


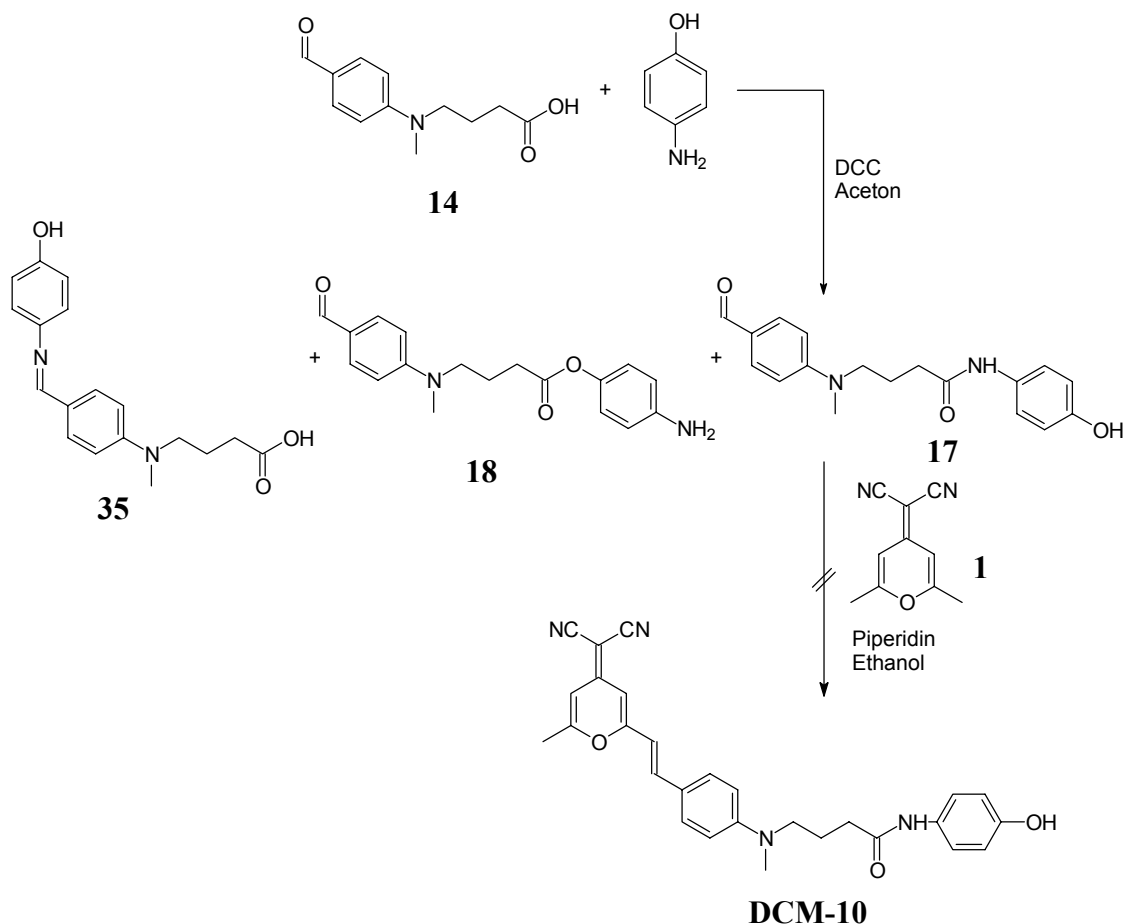
Abbildung 26: Retrosynthese des phenolischen DCM-Derivats über Amidierung.

Obwohl die Behandlung von Carbonsäuren mit Aminen auf direktem Wege keine Amide liefert, kann deren Reaktion in Anwesenheit des Kupplungsreagenz DCC schon bei Raumtemperatur und in guten Ausbeuten durchgeführt werden. Im Gegensatz zu anderen Beispielen für Carboxylaktivierung, bei denen gemischte Anhydridbildung auftritt, ist diese Reaktion unempfindlich gegenüber Feuchtigkeit und kann sogar in wässriger Lösung durchgeführt werden^[73]. Es hat sich jedoch gezeigt, dass in aprotischen Lösungsmitteln die Ausbeuten deutlich höher sind^[73].

Die Selektivität der so aktivierten Carbonsäuren gegenüber Aminen ist sehr hoch, so muss beispielsweise bei der Acylierung des Methylesters von L-Tyrosin die phenolische Hydroxygruppe nicht geschützt werden^[74].

Der im vorangegangenen Abschnitt beschriebene Reaktionsweg wird durch Substitution des Resorcins durch p-Aminophenol modifiziert. Da die Selektivität der Reaktion gegenüber Aminen sehr hoch ist, ist es auf diese Weise eventuell möglich, die Umlagerung der Zwischenstufe zum Acylharnstoff zu unterdrücken und ein Amid zu erhalten.

Die möglichen Produkte einer Reaktion mit der Säure des Aldehyds **14** in Gegenwart von DCC sind das Amid **17** mit der angestrebten phenolischen Hydroxygruppe, und als Nebenprodukt der Ester **18** sowie das Imin **35**. Aufgrund der hohen Selektivität der Reaktion und nach den oben gewonnenen Erkenntnissen sollten jedoch weder der Ester noch das Imin gebildet werden. Das entstandene Amid wird über eine Aldolkondensation mit dem Pyranderivat **1** zum entsprechenden Farbstoff **DCM-10** umgesetzt.



Äquimolare Mengen des Aldehyds und p-Aminophenol werden in absolutem DMF gelöst und unter Stickstoffatmosphäre mit der gleichen Menge DCC versetzt. Das Gemisch wird 48 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt, dann wird der entstandene weiße Niederschlag, der aus Dicyclohexylharnstoff, dem Reaktionsprodukt des DCC, besteht, abgesaugt und das Filtrat eingedunstet. Reste an Dicyclohexylharnstoff werden

durch Ausfällen aus Ethanol abgetrennt. Da eine weitere Aufreinigung weder säulenchromatographisch noch durch Umkristallisation gelingt, wird der schwarze Rückstand in Ethanol aufgenommen, mit dem Pyranderivat **1** und Piperidin versetzt und für 8 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Dabei entsteht durch Aldolkondensation ein roter fluoreszierender Farbstoff, der mittels Säulenchromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan und anschließender Umkristallisation aus einem Gemisch aus Toluol und wenig Ethanol isoliert wird. Die $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Untersuchung zeigt, dass in der dargestellten Substanz lediglich die aromatischen Protonen des Farbstoffgerüsts vorliegen. Es liegen keine aromatischen Protonen des Aminophenolrestes vor, ebenso fehlt ein Hinweis auf phenolische Hydroxygruppen. Eine Vielzahl von Signalen zwischen 1 und 3 ppm deutet auf die Entstehung des acylierten Dicyclohexylharnstoffs als Umlagerungsprodukt hin. Die massenspektrometrische Untersuchung der Probe liefert einen von Verbindung **DCM-10**, aber auch vom Edukt und Acyldicyclohexylharnstoff abweichenden Molekülpeak, der durch ein FAB-Massenspektrum bestätigt wird. Die gewünschte Verbindung **DCM-10** ist demnach nicht entstanden und ist ebenso wie der oben beschriebene Ester auf diesem Weg nicht darstellbar.

3.2.4 Beiträge zur Darstellung phenolischer Ester von **DCM-1**

Eine weitere Möglichkeit, ein phenolisches Derivat des **DCM**-Farbstoffs zu erhalten, besteht in der Veresterung des verhältnismäßig leicht darstellbaren **DCM-1** mit käuflichem Anissäurechlorid und anschließender Demethylierung der Methoxygruppe mit Bortribromid. Die Alkohololyse des Säurechlorids erfolgt nach der HIRSCHHORN-Variante in absolutem Pyridin^[64]. Die Hydroxygruppe des Farbstoffs hat sich allerdings schon bei den Versuchen zur Phosphorylierung als äußerst unreaktiv herausgestellt. So ist auch bei dieser Veresterung bei Raumtemperatur kein Umsatz zu beobachten und selbst nach mehrstündigem Sieden keine Veränderung des Edukts feststellbar. Es kann kein Produkt isoliert werden, man erhält das als Edukt eingesetzte **DCM-1** zurück.

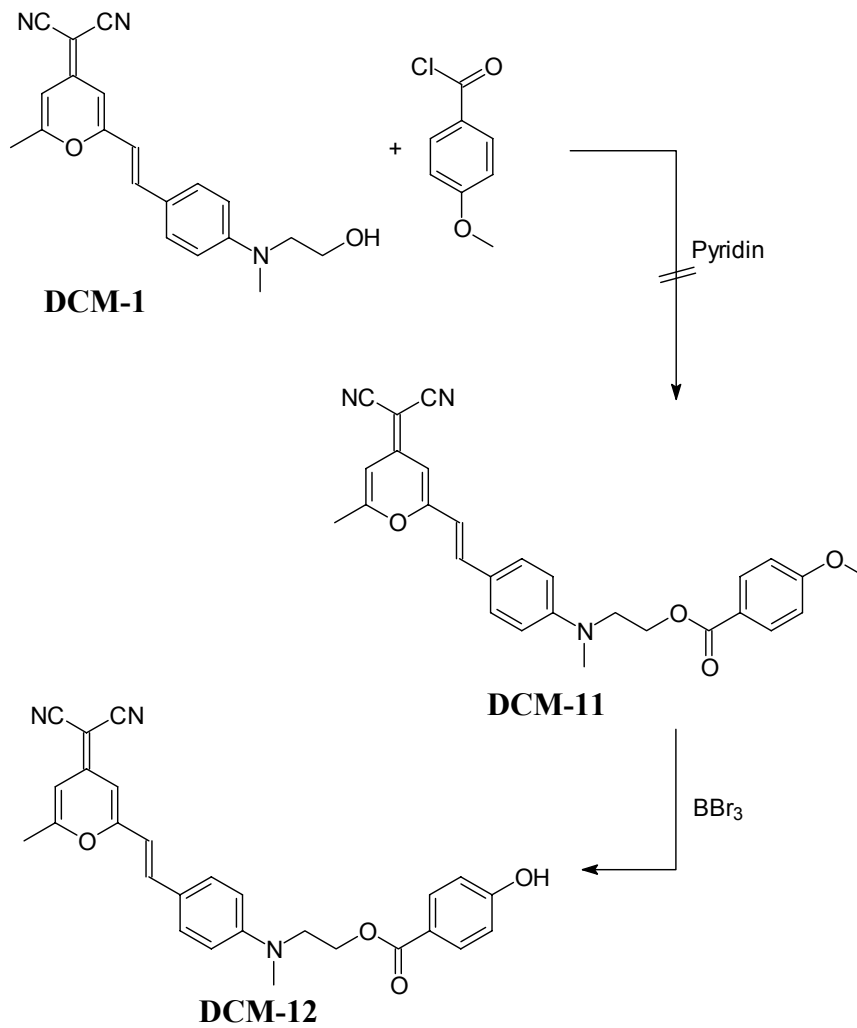
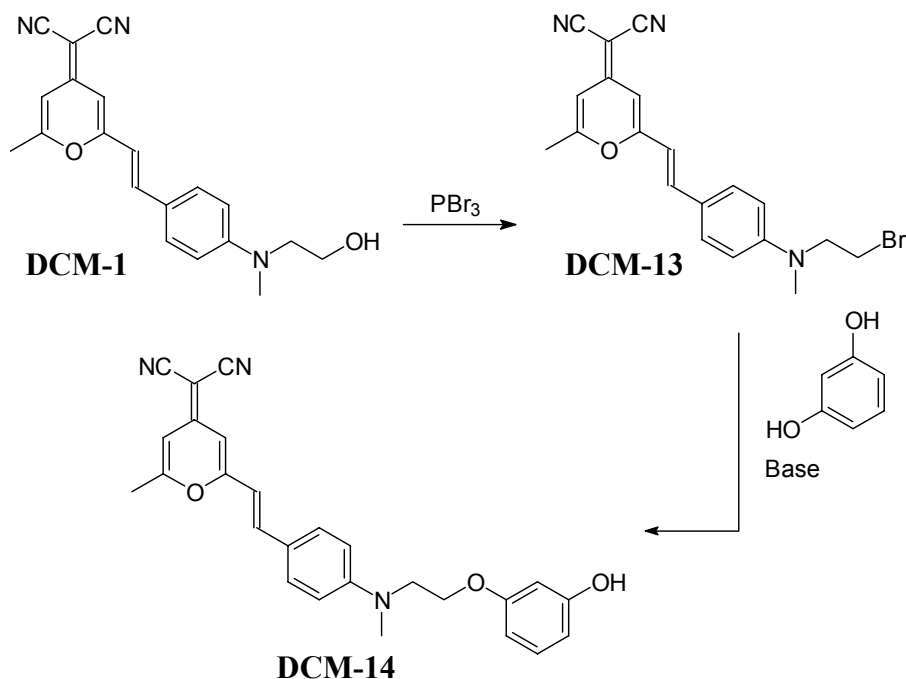


Abbildung 27: Syntheseprinzip des phenolischen DCM-Derivats über Veresterung von **DCM-1**.

3.2.5 Beiträge zur Veretherung von DCM-1 mit Resorcin

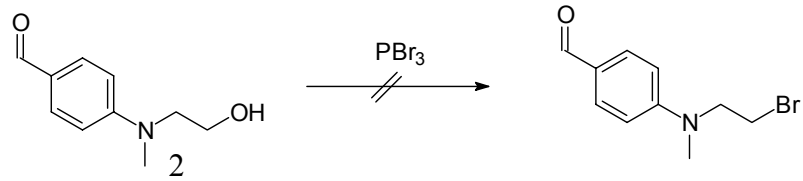
Nachdem alle Versuche der Veresterung der Hydroxygruppe fehlschlagen, wird versucht, Resorcin als Ether an den Farbstoff zu kondensieren. Dazu wird die Hydroxygruppe des Farbstoffs mit Phosphortribromid zum Bromid substituiert und dann in einer Williamson-Ethersynthese verethert.



Es wird nach einer Vorschrift von THOMAS et al. vorgegangen, bei der die Hydroxygruppe von *N*-Methyl-*N*-(2-hydroxyethyl)anilin durch Bromid substituiert wird^[75]. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit sollte diese Vorschrift wenn nicht auf den Farbstoff **DCM-1**, dann doch zumindest auf dessen Vorläufer, den Aldehyd **2**, anwendbar sein.

Der Farbstoff **DCM-1** wird in trockenem Dichlormethan gelöst und unter Stickstoff und Eiskühlung wird Phosphortribromid vorsichtig zugegeben. Dabei färbt sich die Lösung gelb und der Farbstoff fällt quantitativ in Form gelber Kristalle aus. Durch die bei der Reaktion freiwerdende Säure und den resultierenden sehr niedrigen pH-Wert der Lösung wird die tertiäre Aminogruppe trotz der Beteiligung des freien Elektronenpaares an der Konjugation protoniert, wodurch die rote Farbe des Merocyanins verloren geht, da die Donoreigenschaften des Amins aufgehoben werden. Der protonierte Farbstoff ist in Dichlormethan unlöslich und fällt aus, wodurch er für die Substitutionsreaktion nicht mehr zur Verfügung steht. Es wird sukzessive trockenes Pyridin zugegeben, bis die Farbstoffmoleküle deprotoniert und wieder vollständig gelöst sind. Es können jedoch trotzdem nur minimale Ausbeuten erreicht werden.

Versuche, den entsprechenden Aldehyd **2** nach dieser Vorschrift zu bromieren, misslingen, da auch der Aldehyd bei Zugabe von Phosphortribromid an der Aminogruppe protoniert wird und aus dem Reaktionsgemisch ausfällt.



Auch hier ist selbst nach Zugabe von Pyridin kein nennenswerter Umsatz festzustellen. Da angenommen wird, dass auch das in der Originalvorschrift eingesetzte *N*-Methyl-*N*-(2-hydroxyethyl)-anilin aus Dichlormethan bei Zugabe von Phosphortribromid aufgrund der unverändert darin vorkommenden störenden Aminogruppe ausfallen wird und es in der Vorschrift keinerlei Hinweise hierauf gibt, wird die Reproduzierbarkeit der Vorschrift angezweifelt.

Um die Löslichkeitsprobleme zu umgehen, soll anstelle der Bromierung eine Tosylat-Abgangsgruppe in **DCM-1** eingeführt werden. In einer Variante der Williamson-Ethersynthese entsteht über eine nucleophile Substitution mit Resorcin in Anwesenheit einer Base der Ether **DCM-14**.

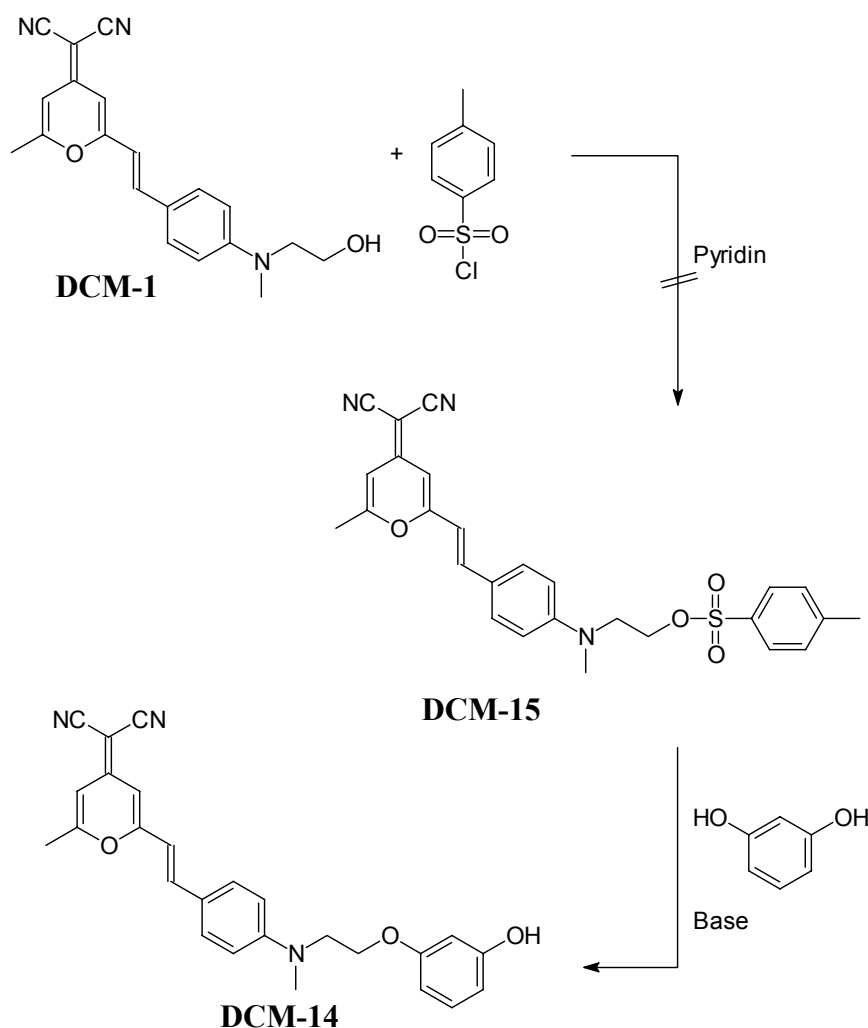
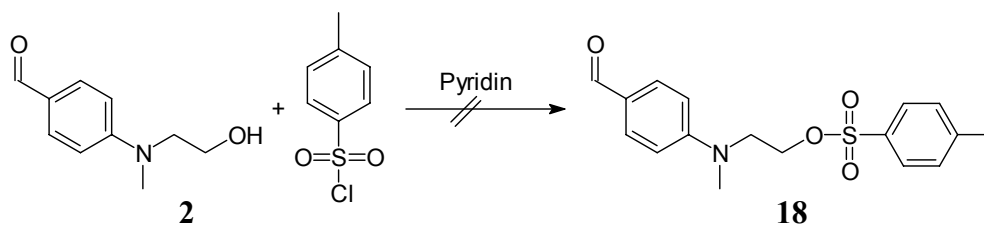


Abbildung 28: Prinzip der Darstellung eines Ethers von **DCM-1** über das Tosylat.

Nach einer allgemeinen Vorschrift zur Tosylierung^[76] wird **DCM-1** unter inerten Bedingungen in absolutem Dichlormethan gelöst und mit einem Eisbad auf 0 °C gekühlt. p-Toluolsulfonsäurechlorid wird in wenig absolutem Dichlormethan gelöst und zugegeben. Bei 0 – 10 °C wird nun absolutes Pyridin unter starkem Rühren vorsichtig zugetropft. Eine starke Erwärmung des Reaktionsgemisches sollte dabei den Beginn der Reaktion kennzeichnen, das Reaktionsgemisch zeigt jedoch keinerlei Temperaturänderung. Auch nach 12 Stunden Rühren bei Raumtemperatur und anschließendem Erhitzen bis zum Rückfluss ist dünnschichtchromatographisch kein Umsatz erkennbar. Bei der Aufarbeitung können nur die Edukte isoliert werden. Wie schon bei der fehlgeschlagenen Reaktion mit Anissäurechlorid scheint auch hier die Hydroxygruppe des Farbstoffs zu inaktiv für eine Reaktion mit einem Säurechlorid zu sein.

Die Reaktion wird deshalb mit der Farbstoffvorstufe, dem Aldehyd **2** wiederholt.



Die Reaktion wird unter analogen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Auch hier ist keine Erwärmung des Reaktionsgemisches bei Zutropfen von Pyridin festzustellen. Die säulenchromatographische Aufarbeitung über Kieselgel mit Dichlormethan/Diethylether (4:1) liefert die Edukte.

3.3 Beiträge zur Darstellung weiterer AP-Substrate für ELF-Assays mit DCM als Leitstruktur nach Variante (3)

3.3.1 Einführung einer Hydroxygruppe an einer Methylgruppe des Pyranrings

Bei der Darstellung einer wasserlöslichen Variante des Laserfarbstoffs **DCM** gelingt es, den Pyranring an einer der Methylgruppen zu bromieren (Verbindung **19**, siehe Kapitel 3.5.6). Das Bromid **19** kann nun in Anlehnung an eine Vorschrift von BABU et al.^[77] von Hydroxid-Ionen in einer nucleophilen Substitutionsreaktion verseift werden, wodurch ein aliphatischer Alkohol entsteht. Dieser wiederum ist zum Farbstoff mit p-Dimethylaminobenzaldehyd umgesetzt für eine Phosphorylierung geeignet und kann somit als AP-Substrat für ELF-Assays Verwendung finden.

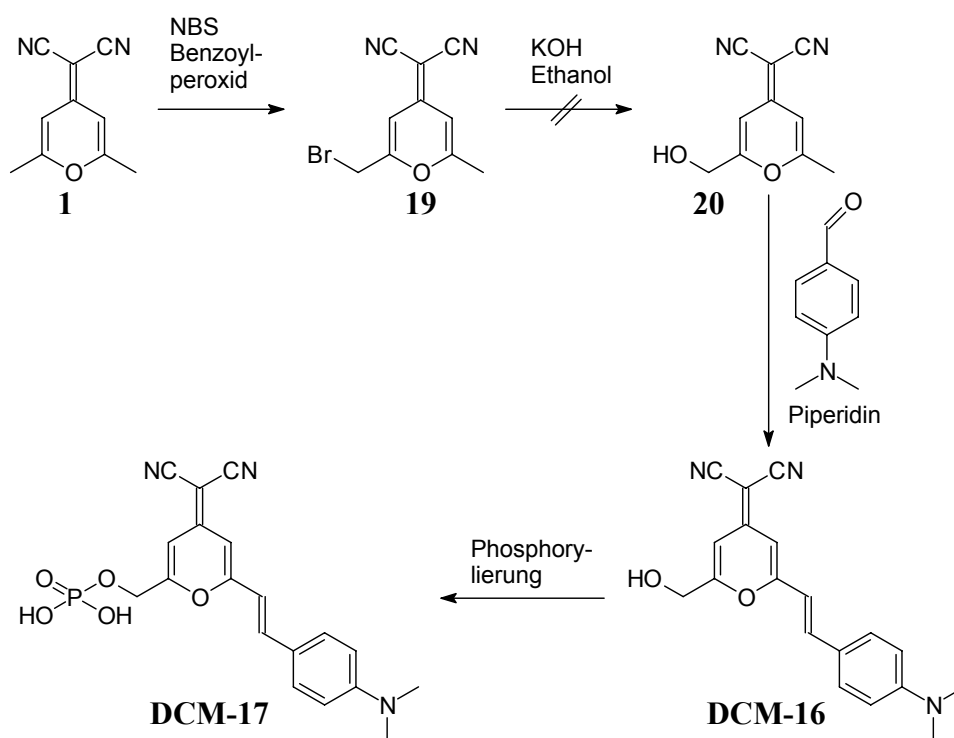


Abbildung 29: Prinzip zur Darstellung eines an der Methylgruppe des Pyranrings phosphorylierten DCM-Derivats.

Brompyran wird in Ethanol aufgeschlemmt. Unter Stickstoffatmosphäre wird dann eine äquimolare Menge an in Ethanol gelöstem Kaliumhydroxid zugegeben. Nach der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches lässt sich jedoch das gewünschte Produkt nicht isolieren. Es stellt sich heraus, dass die Cyanogruppen des Eduktes von der starken Base hydrolysiert wurden, die Verbindung hat sich zersetzt.

Die Reaktion wird deshalb unter milderen Bedingungen mit Hilfe der Phasentransferkatalyse wiederholt. Dazu wird Brompyran in Dichlormethan gelöst und mit 15%iger Kalilauge überschichtet. Nach Zugabe des Phasentransferkatalysators Tetrabutylammoniumbromid erfolgt spontane Schwarzfärbung der Dichlormethanphase. Nach 20 Minuten Rühren bei 40 °C ist dünnschichtchromatographisch kein Edukt- oder Produktpeak mehr nachweisbar, die Cyanogruppen werden in kürzester Zeit hydrolysiert und die Verbindung zersetzt sich zu einem braunen unlöslichen Feststoff.

Aufgrund der Basenlabilität der Cyanogruppen, ist die Einführung einer Hydroxygruppe auf dieser Stufe nicht möglich.

3.3.2 Vereetherung des bromierten Pyranderivats 19 mit Resorcin

Ausgehend von Substanz 19 bietet sich die Möglichkeit, über eine Williamson-Estersynthese mit Resorcin eine phenolische Hydroxygruppe einzuführen. Nach Umsetzung mit p-Dimethylaminobenzaldehyd und anschließender Phosphorylierung lässt sich so ein weiterer für ELF-Anwendungen geeignetes AP-Substrat erhalten.

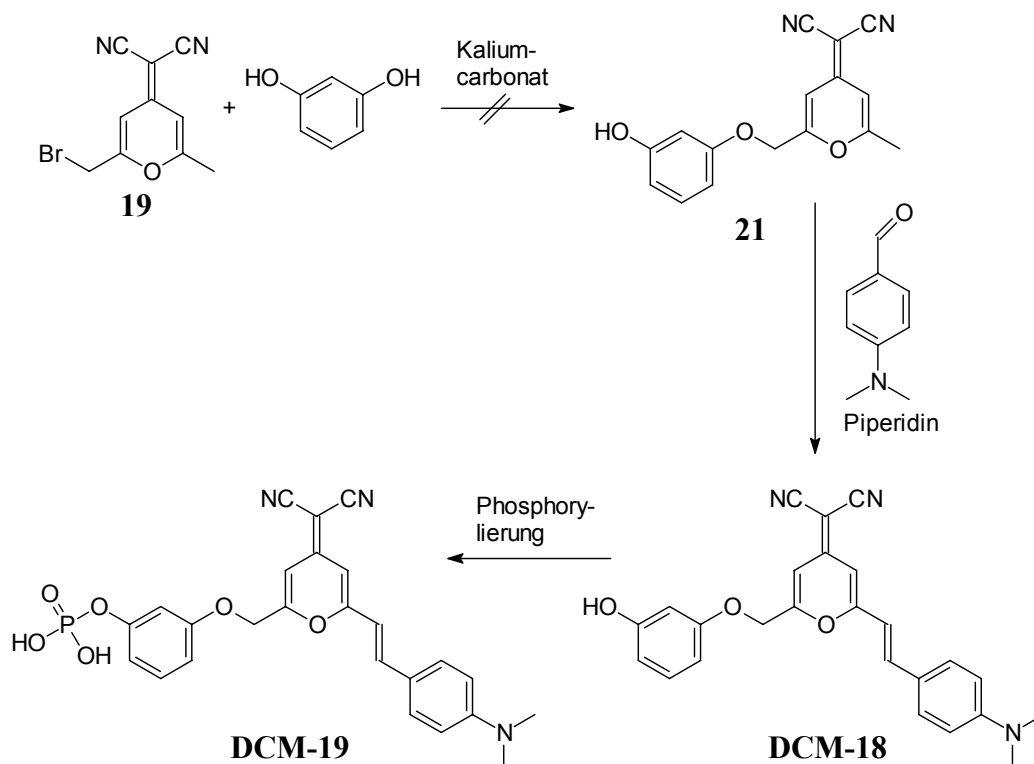


Abbildung 30: Prinzip zur Darstellung eines an der Methylgruppe des Pyranrings phosphorylierten DCM-Derivats.

Auch bei der Williamson Ethersynthese wird im basischen Milieu gearbeitet, was wiederum die Gefahr der Hydrolyse der Cyanogruppen nach sich zieht. Bei der Veretherung von Phenolen kann jedoch die Reaktion unter relativ milden Bedingungen durchgeführt werden^{[78], [79], [80]}. So werden äquimolare Mengen Resorcin und Kaliumcarbonat in Aceton für 30 Minuten leicht erwärmt. Dann wird bei Raumtemperatur unter Stickstoff in Aceton gelöstes Brompyran zugegeben und zum Sieden erhitzt. Die helle Lösung färbt sich sofort schwarz, was ein Indiz für die Zersetzung des Edukts ist. Tatsächlich kann dünnschichtchromatographisch die zunehmende Zersetzung des Brompyrans verfolgt werden, während keine Produktpeaks auftreten. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels und Säulenchromatographie über Kieselgel mit Dichlormethan kann kein Produkt isoliert werden, der größte Teil des Edukts hat sich zu einem unlöslichen braunen Feststoff zersetzt.

Um die Problematik der sehr leicht hydrolysierbaren Cyanogruppen zu umgehen, wird 2,6-Dimethyl-4-pyranon vor dem Einführen der Dicyanomethylengruppe mit NBS und Benzoylperoxid in Tetrachlorkohlenstoff nach einer Vorschrift von YAMAMOTO et al. in Allylstellung bromiert^[81].

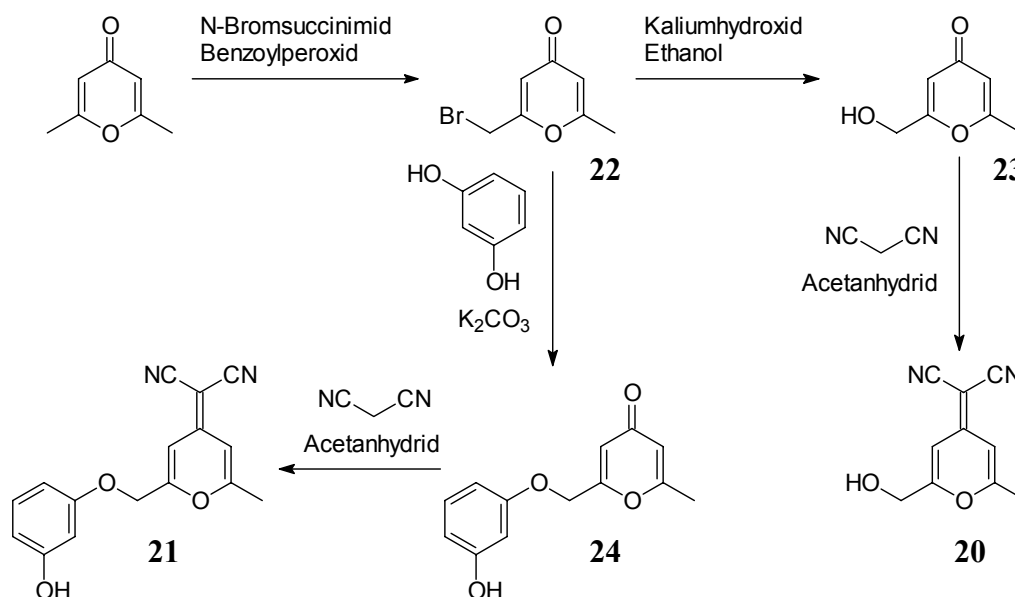


Abbildung 31: Prinzip eines alternativen Synthesewegs zur Darstellung der an der Methylgruppe des Pyranrings substituierten DCM-Derivate.

Es entstehen jedoch, anders als in der Vorschrift angegeben, nicht nur das monobromierte Derivat **22**, sondern auch viele mehrfach bromierte Produkte, welche nur äußerst aufwendig abtrennbar sind. Auch eine Verkürzung der Reaktionszeiten von 4.5 Stunden auf 2 Stunden verringert lediglich den Gesamtumsatz, nicht aber die

Anzahl der Nebenprodukte. Dieser äußerst unökonomische Reaktionsweg wird deshalb verworfen.

3.4 Synthese des phenolischen AP-Substrat für ELF-Assays nach Variante (2)

Nachdem es, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, nicht gelang, an den Positionen (1) und (3) des **DCM** phenolische Hydroxygruppen einzuführen, wird nun versucht, diese an Position (2) einzuführen (vergleiche Kapitel 2.1.1), wodurch allerdings der Chromophor verändert wird.

Die vierstufige Synthese geht von kommerziell erhältlichem 3-Dimethylaminophenol aus, welches in einer Vilsmeier-Formylierung zum 2-Hydroxy-4-dimethylaminobenzaldehyd **7** umgesetzt wird, und ebenfalls käuflichem 2,6-Dimethyl-4*H*-pyranon, welches in einer Knoevenagelreaktion mit Malonsäuredinitril zum 4-Dicyanomethylen-2,6-dimethyl-4*H*-pyran **1** kondensiert wird (Versuch 1). Es folgt eine Aldolkondensation zum Farbstoff **DCM-4**, welcher dann an der phenolischen Hydroxygruppe phosphoryliert wird.

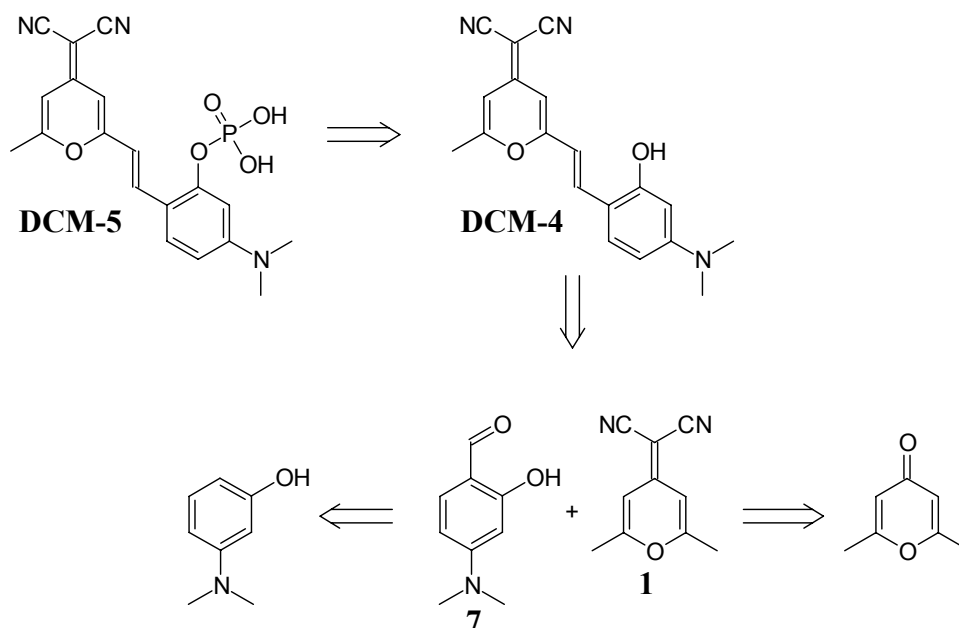
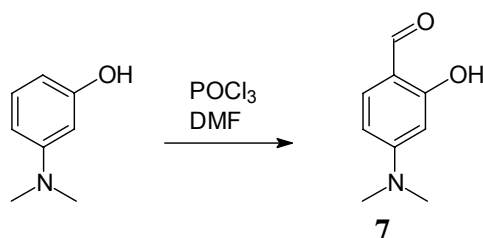


Abbildung 32: Retrosynthetischer Syntheseweg des phenolischen ELF-Farbstoffs **DCM-5**.

3.4.1 Darstellung des Aldehyds 7

Die Formylierung des 3-Dimethylaminophenols zum 2-Hydroxy-4-dimethylaminobenzaldehyd **7** erfolgt nach Vorschriften von TAKADATE et al.^[82] bzw. SPECHT et al.^[83] über eine Vilsmeier-Formylierung. Es wird ein Gemisch aus äquimolaren Mengen Phosphorylchlorid und DMF vorgelegt und das in DMF gelöste Phenol bei 10 °C zugetropft. Danach wird das Gemisch 30 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend 3 Stunden bei 80 °C gerührt. Nach der Hydrolyse und Neutralisierung des Reaktionsgemisches fällt das Produkt als Feststoff in Form beiger Nadeln aus und kann durch Filtration aus dem Reaktionsgemisch isoliert werden. Die Reinigung erfolgt über Umkristallisation aus Ethanol.



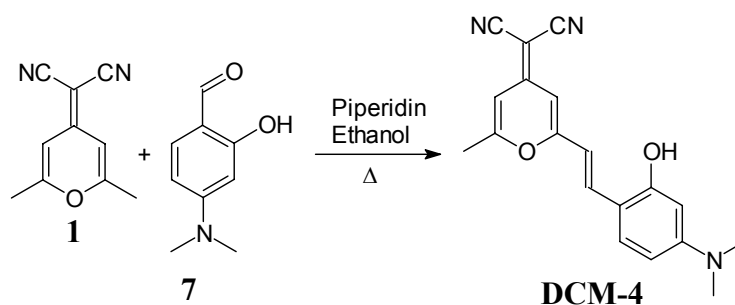
V13

Die Formylierung verläuft glatt und mit guten Ausbeuten, da es sich um einen durch die +M-Effekte der Hydroxygruppe und der Aminogruppe elektronenreichen aktivierten Aromaten handelt. Da beide Substituenten ortho- und para-dirigierend sind, ist eine Formylierung an den Positionen 2, 4 und 6 möglich. Es entsteht jedoch hauptsächlich das an Position 6 substituierte Produkt, welches durch die Möglichkeit einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Hydroxygruppe und der Carbonylgruppe stabilisiert wird, während die Entstehung der anderen beiden Isomere sterisch durch die beiden Methylgruppen am Stickstoff gehindert ist.

3.4.2 Darstellung des Farbstoffs DCM-4

Die Aldolkondensation des Pyranderivats **1** mit dem Aldehyd **7** in Ethanol mit Piperidin als basischem Katalysator liefert, in Anlehnung an die Vorschrift von BOURSON und VALEUR^[46], den Farbstoff **DCM-4**.

V14



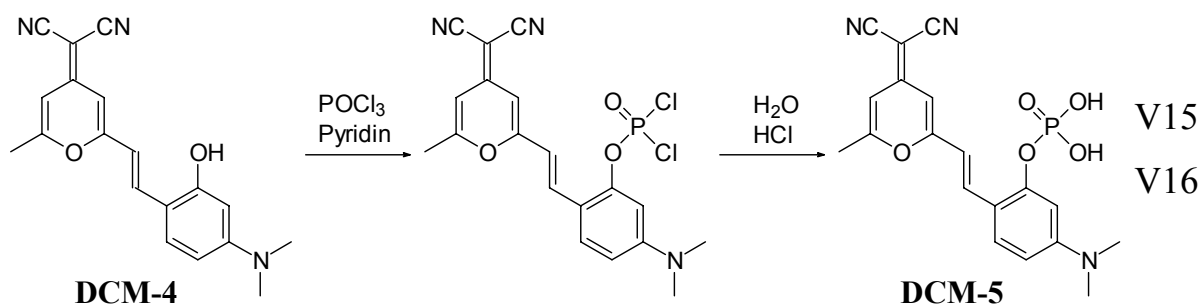
Bei dieser Reaktion bilden sich neben dem orangerot fluoreszierenden Farbstoff sehr schnell dunkelrote bis violette nicht fluoreszierende Nebenprodukte, vermutlich Oxidations oder thermische Zersetzungsprodukte des phenolischen Farbstoffs, welche sehr schwierig von **DCM-4** abzutrennen sind und die Ausbeute verringern. Die Reaktionsdauer sollte deshalb auch bei unvollständigem Umsatz nicht zu lang gewählt werden und die Reaktion unter DC-Kontrolle durchgeführt werden. Eine Reaktionszeit von sieben Stunden hat sich als optimal erwiesen. Um die Oxidation der Phenole durch Luftsauerstoff zu verhindern, wird auf den Rückflusskühler ein Überdruckventil gesetzt, welches das Eindringen von Luft in die Apparatur verhindert. Zusätzlich wird die Reaktion unter Schutzgas (Stickstoff) durchgeführt. Die Reinigung des Farbstoffs erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan/Ether 10:1 und mit einer anschließenden Umkristallisation aus Benzol/Cyclohexan. Aufgrund seiner phenolischen Hydroxygruppe ist der dunkelrote pulverige Farbstoff leicht durch Luftsauerstoff oxidierbar und muss deshalb bei längerer Lagerung unter Schutzgas aufbewahrt werden.

3.4.3 Phosphorylierung der phenolischen Hydroxygruppe von DCM-4

Die Phosphorylierung der phenolischen Hydroxygruppe erfolgt mit Phosphorylchlorid in absolutem Pyridin in Anlehnung an die Vorschrift von KOLLER und WOLFBEIS, denen es auf diese Weise gelang, Phosphorsäureester von phenolischen Coumarinen darzustellen^[84]. Aufgrund der größeren Acidität der Phenole gegenüber den aliphatischen Alkoholen ist der Weg der Phosphorylierung über die Zwischenstufe des Dimorpholinamidophosphorsäureesters bei der Umsetzung phenolischer Hydroxygruppen nicht notwendig. Bei der Phosphorylierung von Phenolen sind weiterhin keine unerwünschten Nebenreaktionen wie z. B. eine Eliminierung oder eine nucleophile Substitution des Phosphorsäureesters durch Chlorid zu erwarten, welche bei aliphatischen Alkoholen durch die Bildung des Dichlorphosphorsäureesters, einer sehr guten Abgangsgruppe, begünstigt werden.

Der Farbstoff **DCM-4** wird in wenig absolutem Pyridin gelöst und bei 0 °C im Stickstoffgegenstrom mit Phosphorylchlorid versetzt. Danach wird noch zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Eis hydrolysiert. Nicht umgesetztes Edukt ist in diesem Wasser-Pyridin-Gemisch unlöslich und wird durch Filtration abgetrennt.

Nach der Vorschrift von KOLLER und WOLFBEIS wird zur Aufarbeitung die zunächst basische Lösung neutralisiert und die Lösungsmittel Wasser und Pyridin am Rotationsverdampfer entfernt^[84]. Diese Aufarbeitung ist zeitaufwendig und ineffektiv, da auf diese Weise das Produkt immer mit anorganischen Salzen verunreinigt erhalten wird. Es wird eine elegante und zeitsparende Aufarbeitungsmethode entwickelt, bei der der Phosphorsäureester durch vorsichtiges Ansäuern mit konzentrierter Salzsäure aus dem Wasser-Pyridin-Gemisch ausgefällt wird und je nach eingestelltem pH-Wert und Aufarbeitungsmethode als freie Säure oder Pyridinium-Salz isoliert werden kann.



Wird das Reaktionsgemisch vorsichtig mit konz. Salzsäure auf pH = 3 angesäuert, fällt ein sehr feiner Niederschlag aus. Durch kurzzeitiges Erhitzen auf 80 °C wird die Bildung größerer und damit filtrierbarer dunkelroter Kristalle initiiert. Der so isolierte Phosphorsäureester **DCM-5** enthält in Übereinstimmung von ¹H-NMR-Spektrum und Elementaranalyse 1.5 Äquivalente Kristallwasser.

Das breite Signal bei 4.5 ppm des in Abbildung 33 gezeigten ¹H-NMR-Spektrums resultiert aus dem schnellen Austausch von Phosphat- und Kristallwasserprotonen.

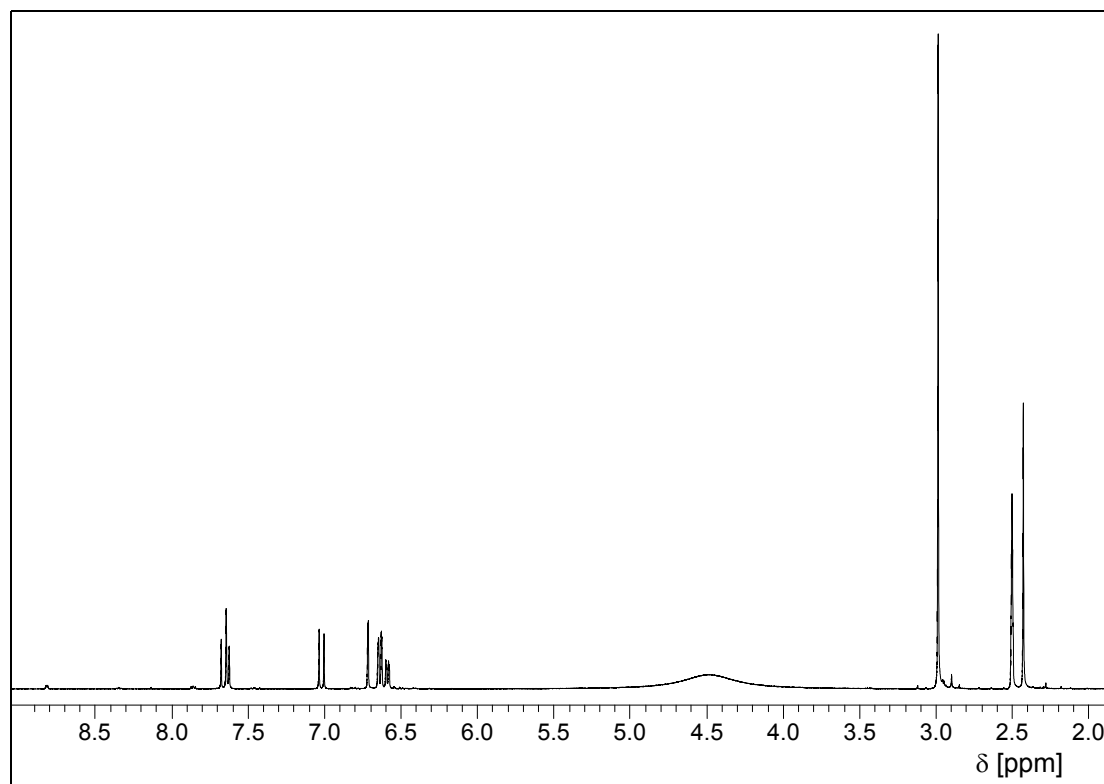


Abbildung 33: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) von **DCM-5**.

Bei schnellem Ansäuern des Reaktionsgemisches auf $\text{pH} = 0-1$ flockt ein voluminöser dunkelroter Niederschlag aus, der sich gut abnutschen lässt. Dieser Niederschlag besteht aus dem Pyridiniumsalz des Phosphorsäureesters **DCM-5Py**. Elementaranalyse und ^1H -NMR-Spektroskopie ergeben ein 1:1 Verhältnis zwischen Pyridinium-Kation und Phosphat-Anion und einen Kristallwassergehalt von drei Äquivalenten Wasser. In dem in Abbildung 34 dargestellten ^1H -NMR-Spektrum treten neben dem breiten Signal der Säure- und der Kristallwasserprotonen bei 4.8 ppm im Bereich von 7.9 – 9.1 ppm die drei Pyridinium-Signale auf.

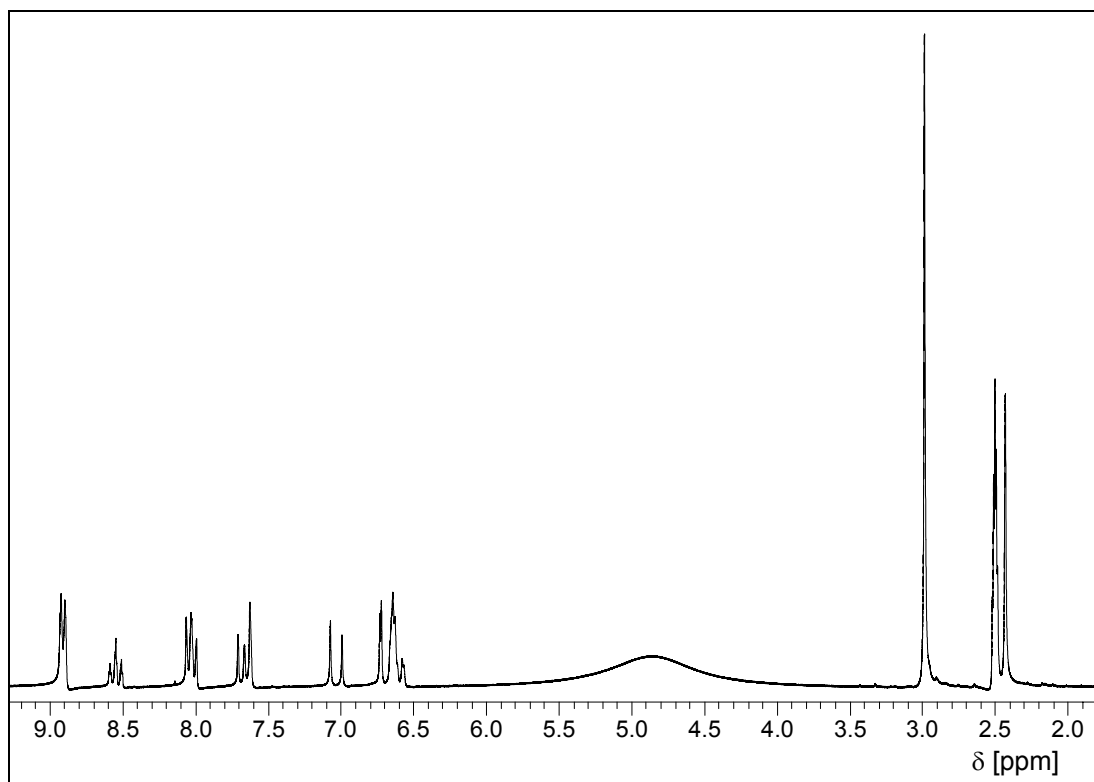


Abbildung 34: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (200 MHz, DMSO-d_6) von **DCM-5Py**.

3.5 Darstellung eines für BRET geeigneten Farbstoffs mit DCM als Leitstruktur

An einen für BRET geeignet Fluoreszenzfarbstoff werden folgende Ansprüche gestellt:

- Spektroskopische Anforderungen:

Um einen optimalen BRET mit dem Biolumineszenzsystem Renilla Luciferase/Coelenterazin-h zu erzielen, muss der Akzeptorfarbstoff im Wellenlängenbereich von 430 bis 530 nm eine breite Absorption aufweisen. Gleichzeitig soll er einen großen Stokesshift und eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute haben.

- Strukturelle Anforderungen:

Um den Akzeptorfarbstoff kovalent an die zu untersuchenden Proteine zu binden, wird eine reaktive Gruppe im Farbstoffmolekül benötigt, und um die Wasserlöslichkeit des modifizierten Proteins zu gewährleisten, muss der Farbstoff hydrophile Eigenschaften aufweisen.

Der als Leitstruktur ausgewählte Laserfarbstoff **DCM** genügt den spektroskopischen Anforderungen optimal. Die strukturellen Anforderungen betreffend bedarf es jedoch einiger Modifikationen, um den Farbstoff auf sein vorhergesehenen Einsatzgebiet zielorientiert zu optimieren.

Da keine reaktive Gruppe, die zu einer kovalenten Bindung mit Proteinen geeignet ist, im Farbstoff **DCM** vorliegt, muss der Farbstoff beispielsweise über eine Carboxylgruppe funktionalisiert werden. Carboxylgruppen gehen, zum Succinimidylester aktiviert, leicht kovalente Bindungen mit Aminogruppen von Proteinen ein. Der hydrophobe Laserfarbstoff **DCM** sollte durch Einfügen hydrophiler Gruppen, z. B. Sulfonsäuregruppen, wasserlöslich gemacht werden können.

3.5.1 Einführung einer Carboxylgruppe und Aktivierung zum Succinimidylester

Der funktionalisierte Farbstoff wird über eine Aldolkondensation des entsprechenden Aldehyds mit 4-Dicyanomethylen-2,6-dimethyl-4*H*-pyran (**1**) erhalten:

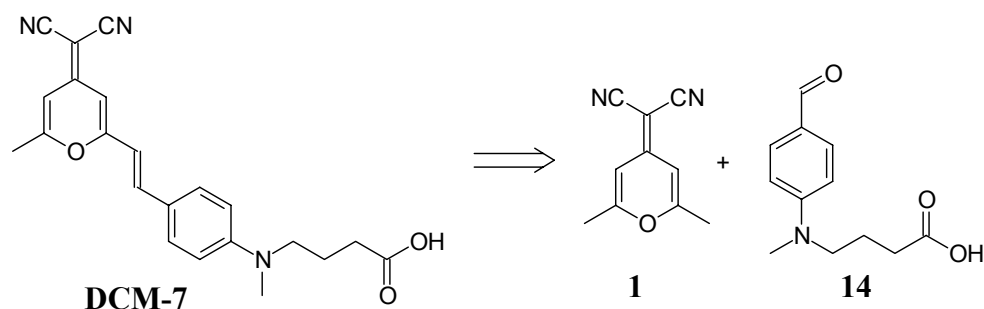


Abbildung 35: Retrosynthese von **DCM-7**.

Über die Carboxylfunktion soll der Farbstoff kovalent an Aminogruppen von Proteinen gebunden werden. Dazu wird die Carboxylgruppe durch Umsetzung zu einem Succinimidyl-Ester aktiviert.

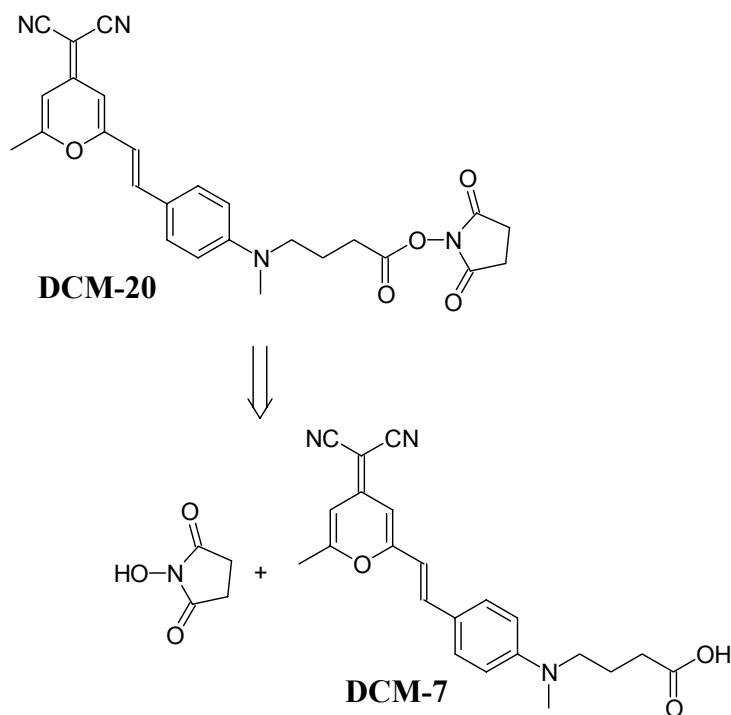
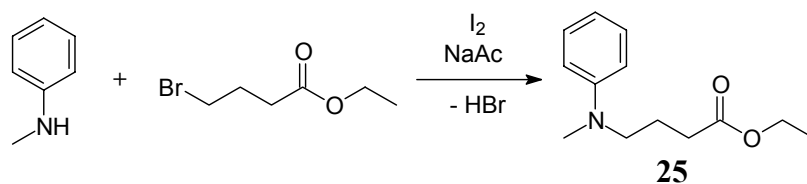


Abbildung 36: Retrosynthese des *N*-Succinimidylesters von **DCM-7**.

3.5.2 Synthese des Aldehyds 14

Für die Synthese des mit einer Carboxylgruppe funktionalisierten Farbstoffs **DCM** wird der Aldehyd **14** benötigt. Als Ausgangssubstanz bietet sich kommerziell erhältliches *N*-Methylanilin an, welches als Nucleophil in einer nucleophilen Substitution nach S_N2 mit 4-Brombuttersäureethylester in Gegenwart von elementarem Iod nach einer Vorschrift von CHEN^[85] in Substanz umgesetzt wird.

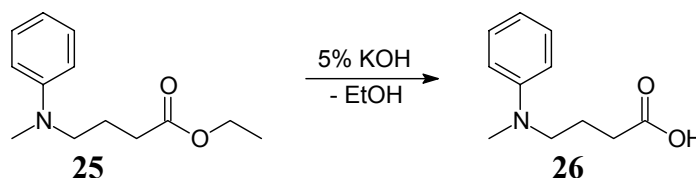
V17



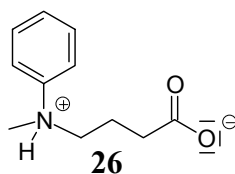
Der entstandene *N*-Methyl-*N*-phenylaminobutansäureethylester **25** lässt sich über eine fraktionierte Destillation im Ölpumpenvakuum als gelbe klare Flüssigkeit mit einem Siedepunkt von 95 °C bei 0.013 mbar erhalten. Die Ausbeute beträgt 67 %. Es hat sich dabei als unerheblich erwiesen, ob wasserfreies Natriumacetat oder das Hydrat als Säurefänger zum Abfangen des entstehenden Bromwasserstoffs aus dem Reaktionsgleichgewicht verwendet wird. Die Ausbeuten sind in beiden Fällen vergleichbar.

Es folgt die Darstellung der freien γ -Aminosäure durch basische Hydrolyse des *N*-Methyl-*N*-phenylaminobutansäureethylesters **25** mit wässriger Kaliumhydroxidlösung nach CHEN^[85].

V18

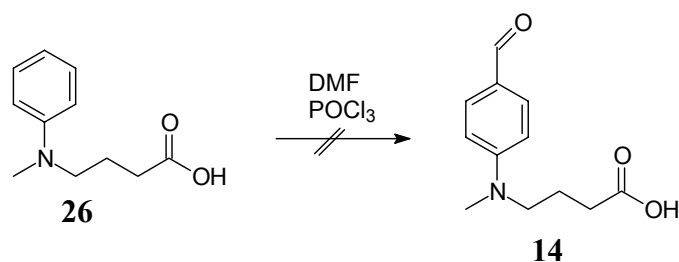


Die entstandene Carbonsäure **26** verhält sich wie eine Aminosäure und lässt sich an ihrem isoelektrischen Punkt (pH = 5) aus wässriger Lösung ausfällen.



Man erhält eine zähflüssige farblose Substanz. Der Umsatz ist annähernd quantitativ, die Ausbeute beträgt 92 %.

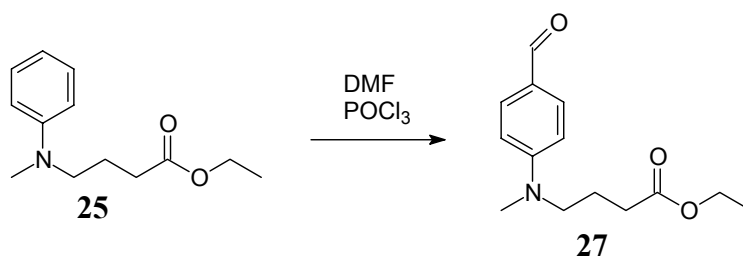
Die Formylierung der freien Aminosäure über eine Vilsmeier-Formylierung nach einer allgemeinen Vorschrift^[66] gelingt jedoch nicht.



Beim Zutropfen der Aminosäure zu dem Komplex aus DMF und POCl_3 erfolgt keine Erwärmung des Reaktionsgemisches, es kann auch kein formyliertes Produkt isoliert werden, man erhält das Edukt zurück.

Die Vilsmeier-Formylierung eignet sich für aktivierte, elektronenreiche Aromaten mit Substituenten mit +M-Effekt, z. B. Amine und Phenole. Die hier eingesetzte Aminosäure liegt jedoch nicht ungeladen, sondern in der Betainform vor. Der protonierte Stickstoff hat kein freies Elektronenpaar, welches er dem aromatischen System zur Verfügung stellen kann, vielmehr senkt er mit seiner positiven Ladung die Elektronendichte des aromatischen Systems. Der +M-Effekt der Aminogruppe geht durch die Protonierung verloren, der Aromat wird somit deaktiviert und reagiert nicht mit dem elektrophilen Komplex aus DMF und POCl_3 .

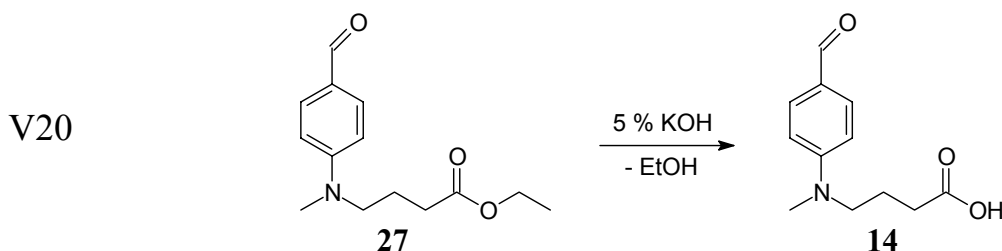
Die Vilsmeier-Formylierung des Ethylesters **25** der Aminosäure hingegen gelingt glatt. Durch Verwendung dieser Vorstufe entfällt das Einfügen einer Schutzgruppe für die Carboxylfunktion, um die Protonierung des Stickstoffs zu verhindern und eine erfolgreiche Vilsmeierformylierung zu erzielen.



V19

Zu einem Gemisch aus DMF und Phosphorylchlorid wird bei $10\text{ }^\circ\text{C}$ der Ester **25** in DMF gelöst zugetropft. Nach drei Stunden Rühren bei $80\text{-}90\text{ }^\circ\text{C}$ wird der Ansatz mit Eiswasser hydrolysiert und mit 40%iger Natronlauge neutralisiert. Nach der Extraktion und Destillation fällt der Aldehyd **27** als honigartige gelbe Flüssigkeit an, welche bei $146\text{ }^\circ\text{C}$ und 0.012 mbar siedet, jedoch kein Bisulfitaddukt bildet. Die Ausbeute beträgt 75 %.

Die Esterfunktion bleibt während der Reaktion und der anschließenden Hydrolyse des Zwischenprodukts erhalten und wird im Anschluss mit wässriger Kaliumhydroxidlösung verseift.



Das Zweiphasengemisch aus der wässrigen Kalilauge und dem Ester **27** wird solange bei Raumtemperatur gerührt, bis nur noch eine Phase vorliegt. Eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit ist durch Erwärmen des Reaktionsgemisches nicht möglich, da in diesem Fall die Zersetzung des Aldehyds erfolgt. Die Dauer der Reaktion kann jedoch durch Erhöhen der Konzentration der Kalilauge von 3 Stunden bei 5%iger auf 2 Stunden mit 10%iger Kalilauge gesenkt werden, ohne dass Ausbeuteverluste auftreten. Die Säure **14** lässt sich wie **26** an ihrem isoelektrischen Punkt bei pH 5 aus wässrigem Millieu ausfällen, sie zeigt die typischen Eigenschaften einer Aminosäure und liegt in ihrer Betainstruktur vor. Man erhält eine farblose, kristalline Substanz, die im UV-Licht blau fluoresziert und sich bei Raumtemperatur an Licht langsam grün färbt. Die Ausbeute beträgt 99 %.

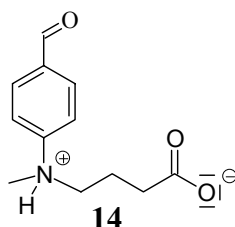


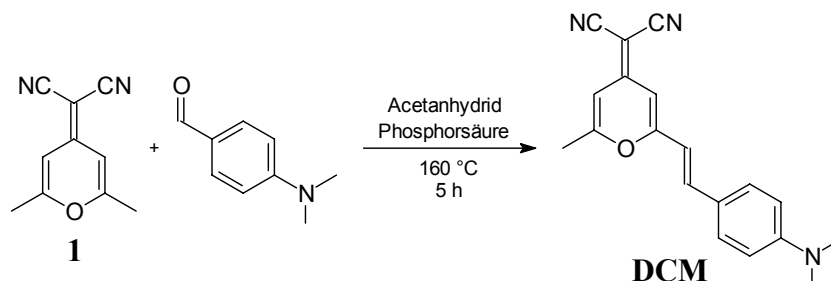
Abbildung 37: Betainstruktur von **14**.

3.5.3 Synthese des Laserfarbstoffs DCM als spektroskopischer Referenzsubstanz

Das als Laserfarbstoff verwendete **DCM** wird als Referenz-Substanz für die spektroskopischen Untersuchungen benötigt. Von HAMMOND wird die Synthese des **DCM** über eine säurekatalysierte Aldolkondensation beschrieben^[53], während von BOURSON und VALEUR die basenkatalysierte Variante bevorzugt wird^[46], wobei die Ausbeuten bei beiden Varianten lediglich bei 11 % liegen, die Reaktionszeiten bei HAMMOND jedoch bedeutend kürzer sind. BOURSON und VALEUR synthetisierten

mit ihrer Variante auch einige am Styrylring substituierte **DCM**-Derivate, allerdings lediglich mit Ausbeuten zwischen 2 % und 8.5 %.

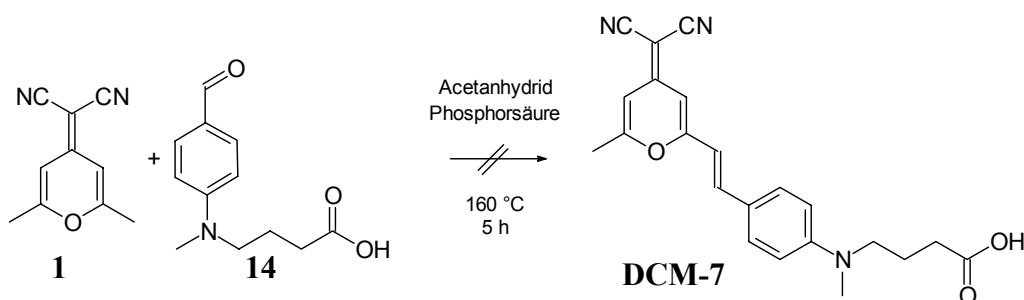
Nach der Methode von HAMMOND wird p-Dimethylaminobenzaldehyd in Acetanhydrid in Gegenwart von Phosphorsäure mit 4-Dicyanomethylen-2,6-dimethyl-4*H*-pyran **1** für fünf Stunden auf 150 °C erhitzt.



Nach dem von HAMMOND beschriebenen Verfahren zur Aufarbeitung des Reaktionsgemisches über mehrfache Extraktion und Umkristallisation aus Ethylacetat und Benzol ist es nicht möglich, ein für UV/Vis- und fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen angemessen reines Produkt zu erhalten. Die Verunreinigungen bestehen hauptsächlich aus den Edukten und dem doppelt substituierten Produkt und erweisen sich als schwierig abzutrennen. Aus diesem Grund wird der Farbstoff über eine Säulenchromatographie an Kieselgel mit Methylenchlorid/Ether (5:1) als Laufmittel vorgereinigt. Aus der roten fluoreszierenden Fraktion wird anschließend mittels einer Säulenchromatographie an Kieselgel mit Toluol/Essigsäureethylester (4:1) der reine Farbstoff isoliert. Der resultierende orangerote fluoreszierende Farbstoff hat einen etwas höheren Extinktionskoeffizient als in der Literatur beschrieben ($\lambda_{\text{max}} = 463$ nm (56250), Lit.^[46]: $\lambda_{\text{max}} = 460$ (44900), in Acetonitril) und entspricht im Rahmen der Messgenauigkeit somit den Reinheitsanforderungen an einen Standard zur Bestimmung von Fluoreszenzquantenausbeuten.

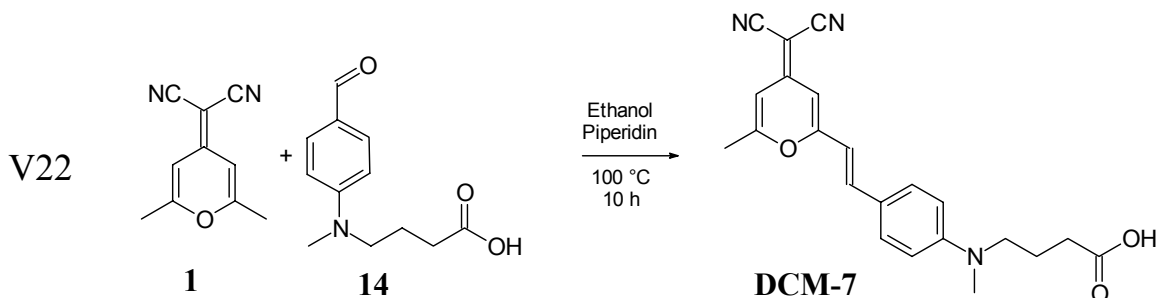
3.5.4 Synthese des carboxylfunktionalisierten Farbstoffs DCM-7

Zur Synthese des carboxylfunktionalisierten Farbstoffs erweist sich die zur Darstellung des Laserfarbstoffs **DCM** verwendete Methode über eine säurekatalysierte Aldolkondensation nach HAMMOND als ungeeignet.



Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt, es wird dabei keinerlei Produktbildung beobachtet. Der Aldehyd **14** ist bei der recht hohen Reaktionstemperatur in Gegenwart von Säure nicht stabil und zersetzt sich.

Die basenkatalysierte Variante der Aldolkondensation nach VALEUR und BOURSON wird in siedendem Ethanol mit Piperidin als Base durchgeführt. Die beschriebenen Reaktionszeiten sind zwar erheblich länger, 48 Stunden im Gegensatz zu 5 Stunden bei HAMMOND, aber die Reaktionsbedingungen sind milder, so dass auch empfindlichere Aldehyde, z.B. Verbindung **14**, eingesetzt werden können.



Durch DC-Kontrolle des Reaktionsverlaufs der Synthese des Farbstoffs **DCM-7** zeigt sich, dass die von VALEUR und BOURSON beschriebenen langen Reaktionszeiten ungünstig sind, da mit steigender Reaktionszeit mehr doppelt substituiertes Nebenprodukt gebildet wird. Aus diesem Grund wird die Reaktion nach 10 Stunden abgebrochen. Der orangefarbene Farbstoff wird zur Reinigung an Kieselgel mit Dichlormethan/Diethylether/Ameisensäure im Verhältnis (60:20:5) chromatographiert. Man erhält den Farbstoff nach Entfernen des Laufmittels als **DCM**-Ameisensäure-Addukt. Die so gebundene Ameisensäure lässt sich auch durch längeres Trocknen im Vakuum nicht entfernen. Die Elementaranalyse und das ¹H-NMR-Spektrum belegen ein **DCM**-Ameisensäureverhältnis von 1:1, was auf ein Säureaddukt schließen lässt.

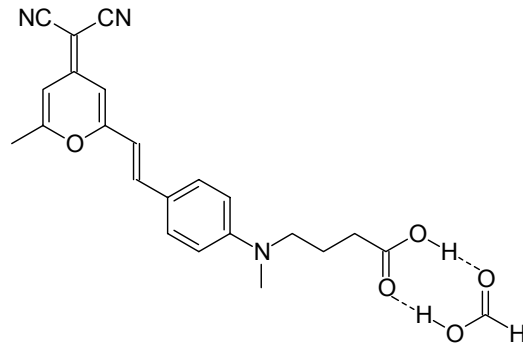


Abbildung 38: **DCM-7**-Ameisensäureaddukt.

Der Farbstoff **DCM-7** zeigt keine Aminosäure-Eigenschaften. Aus wässriger Lösung lässt er sich im Bereich seines pK_a von $pH = 5$ ausfällen. Da er aber dabei seine rote Farbe behält, liegt er nicht in der für Aminosäuren typischen Betainstruktur vor, sondern als protonierte ungeladene Aminocarbonsäure. Durch die Protonierung des Anilin-Stickstoffs würde nämlich dessen für das Merocyanin wichtige Donoreigenschaft zerstört werden und der Farbstoff gelb erscheinen. Der Farbumschlag von rot nach gelb tritt jedoch erst bei sehr niedrigen pH-Werten auf. Die geringe Basizität des Anilin-Stickstoffs lässt sich mit der Konjugation seines freien Elektronenpaares mit dem starken Akzeptor Dicyanomethylen erklären.

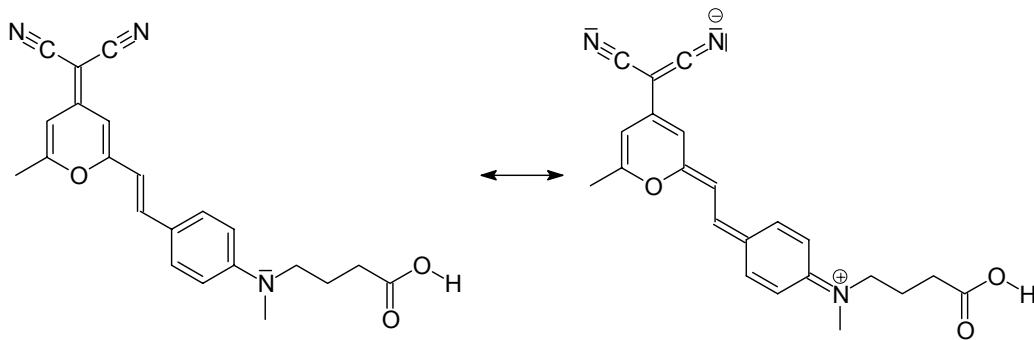


Abbildung 39: Resonanzstrukturen von **DCM-7**.

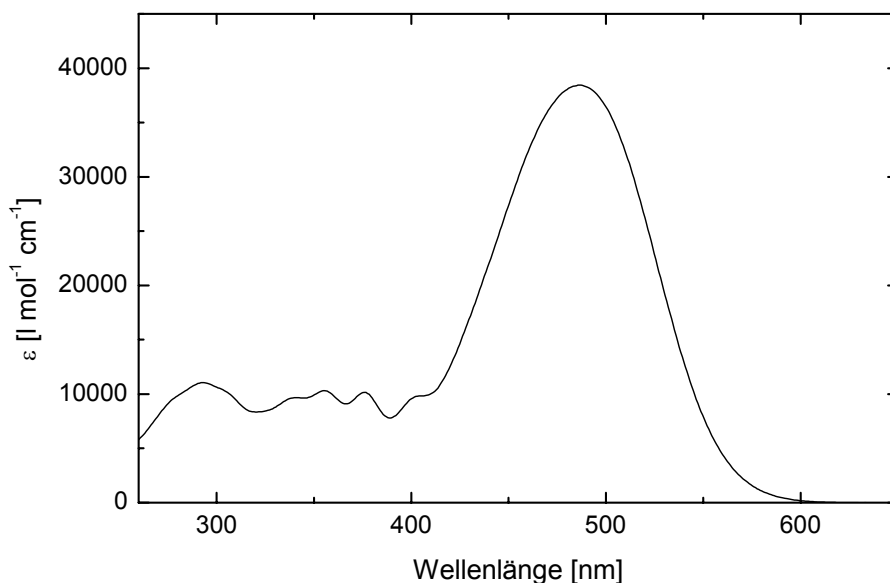
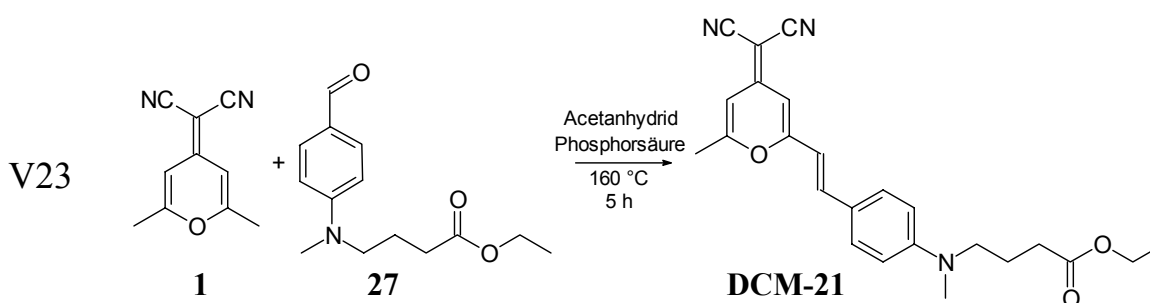


Abbildung 40: Absorptionsspektrum von **DCM-7** in DMSO.

Da sich die Synthese und Reinigung des Farbstoffs **DCM-7** als sehr aufwendig erweist, wird eine alternative Syntheseroute erwogen. Dazu soll der Aldehyd **27** mit dem Pyran-Derivat zum Farbstoff kondensiert werden und die Estergruppe erst dann verseift werden. Der Vorteil ist, dass der Ester **DCM-21** erheblich leichter von den Nebenprodukten zu trennen ist als die freie Säure, und dass so die Säure in freier Form und nicht als Ameisensäure-Addukt erhalten werden kann.

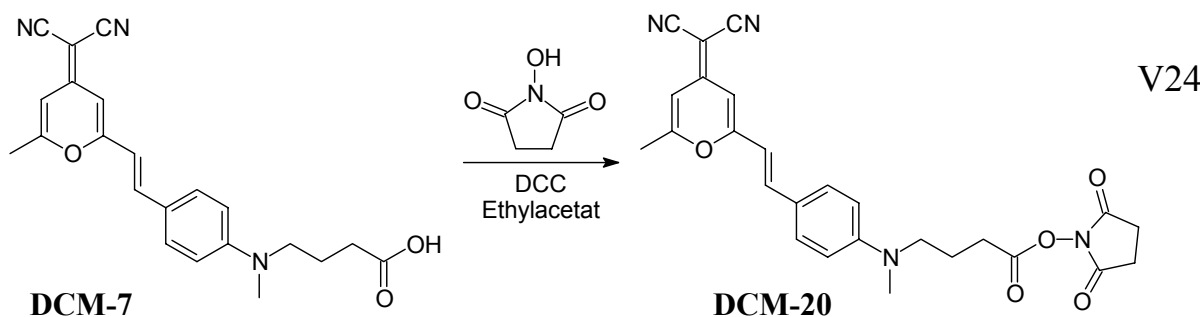


Die Synthese über eine saure Aldolkondensation verläuft glatt, die Estergruppe wird dabei nicht verseift. Als Nebenprodukt wird auch hier der doppelt substituierte Farbstoff erhalten, wie über NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie nachgewiesen werden konnte. Die Abtrennung der Nebenprodukte gelingt wiederum nur über mehrfache Säulenchromatographie. Man erhält einen roten fluoreszierenden Feststoff.

Die basische Verseifung des Esters mit 5%iger Kalilauge gelingt jedoch nicht, da der Farbstoff in stark alkalischem Medium nicht stabil ist. Die Nitrilgruppen des Farbstoffs werden von Hydroxidionen sehr leicht zu Carbonsäuregruppen hydrolysiert, wodurch der Akzeptor des Merocyanins und somit auch die rote Farbe verloren gehen.

3.5.5 Aktivierung des Farbstoffs DCM-7 zum *N*-Hydroxysuccinimidylester DCM-20

Damit der Farbstoff **DCM-7** kovalent an Proteine gebunden werden kann, wird die Carboxylgruppe mit *N*-Hydroxysuccinimid zu einem *N*-Hydroxysuccinimidylester (NHS-Ester) aktiviert, welcher sehr bereitwillig mit den Aminogruppen tragenden Seitenketten von Proteinen reagiert.



Für diese Aktivierung wird ein Verfahren verwendet, das bereits von FUCHS^[86] erfolgreich im Arbeitskreis angewandt wurde und eine Abwandlung der allgemeinen Vorschrift von NIELSON und BUCHARDT darstellt^[87]. Letztere arbeiten die Reaktion jedoch wässrig auf, was aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit des Produkts zu hohen Ausbeuteverlusten führt.

Der Farbstoff und *N*-Hydroxysuccinimid werden in absolutem Ethylacetat in Anwesenheit der Kupplungsreagenz Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) bei Raumtemperatur verestert. Die dünnschichtchromatographische Kontrolle des Reaktionsverlaufs ergibt, dass auch nach 36 Stunden noch kein vollständiger Umsatz erzielt werden kann, woraufhin die Reaktion abgebrochen wird. Der als Nebenprodukt entstandene Dicyclohexylharnstoff ist in Ethylacetat unlöslich und kann durch Filtration leicht abgetrennt werden. Der *N*-Succinimidylester **DCM-20** wird durch Säulenchromatographie über eine kurze Filtersäule an Kieselgel mit Dichlormethan/Diethylether (10:1) als Laufmittel vom Edukt **DCM-7** getrennt, welches aufgrund seiner Carbonsäuregruppe sehr polar ist und in diesem Laufmittel auf der Säule adsorbiert wird. Die Länge der Säule wird sehr kurz gewählt, da der

wasserempfindliche Ester während der Elution langsam von Wasserspuren im Laufmittel und vom leicht sauren Kieselgel hydrolysiert wird. Dennoch beträgt die Ausbeute 82 %. Im Gegensatz zur freien Säure **DCM-7** liegt der Succinimidyler **DCM-20** in Form roter sehr voluminöser Kristalle vor. Bei Ausschluss von Feuchtigkeit ist der Farbstoff bei Raumtemperatur stabil.

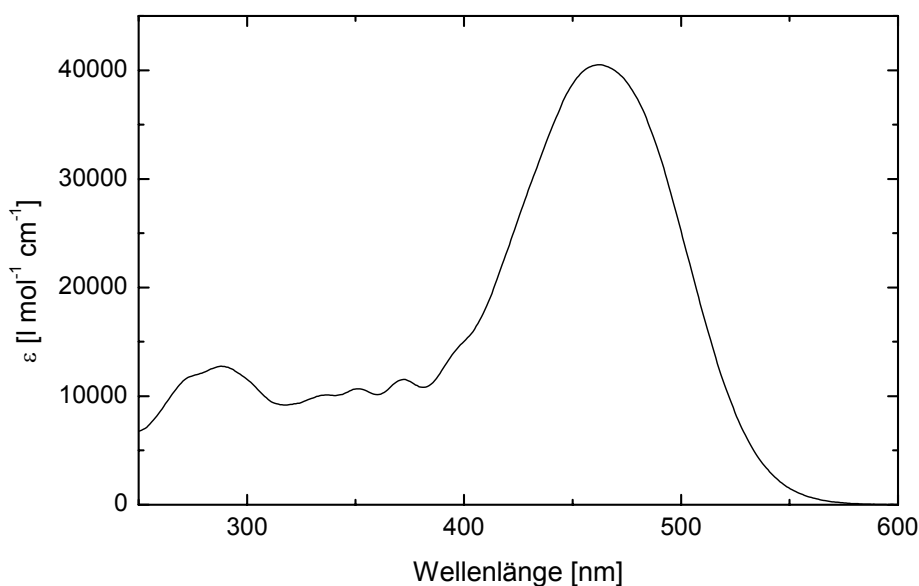


Abbildung 41: Absorptionsspektrum von **DCM-20** in Acetonitril.

Die hydrophilen Eigenschaften der Carboxylfunktion sind mit der Veresterung verloren gegangen, der Succinimidyler ist nicht wasserlöslich, wie dies auch bei der Synthese des Ethylesters **DCM-21** beobachtet wird.

Der Succinimidyler **DCM-20** wurde von ARNOST et al. nach einem ähnlichen Verfahren dargestellt^[88]. Sie schildern jedoch eine Hydrophilie des Succinimidylesters und geben als Absorptionsmaximum in Wasser 471 nm und als Emissionsmaximum 615 nm an. Eigene Versuche ergeben jedoch, dass **DCM-20** in Wasser unlöslich ist, wobei jedoch bei Behandlung der Probe im Ultraschallbad nach 30 Minuten der Succinimidyler gespalten und die wasserlösliche Carbonsäure **DCM-7** freigesetzt wird. Für diese eindeutig charakterisierte Verbindung wird in Wasser ein Absorptionsmaximum von 461 nm und ein Emissionsmaximum von 652 nm gemessen. Da ARNOST et al. keine weiteren spektroskopischen Daten angeben, muss davon

ausgegangen werden, dass es sich bei der von ARNOST et al. beschriebenen Substanz nicht um **DCM-20** handelt.

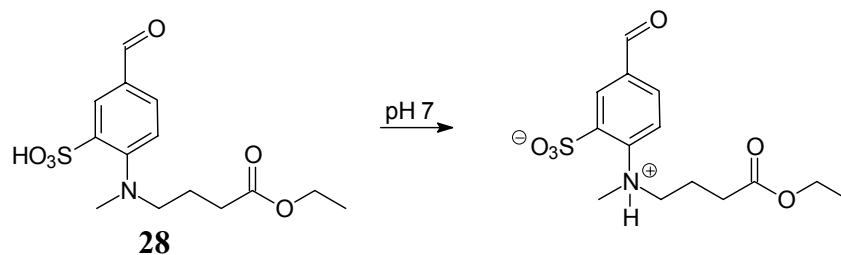
3.5.6 Erhöhung der Hydrophilie des Farbstoffs durch Einführung wasserlöslicher Gruppen

Der Farbstoff **DCM-7** ist nach der Veresterung der Carbonsäuregruppe wasserunlöslich, wie anhand der Darstellung des Succinimidylesters **DCM-20** und des Ethylesters **DCM-21** gezeigt werden kann.

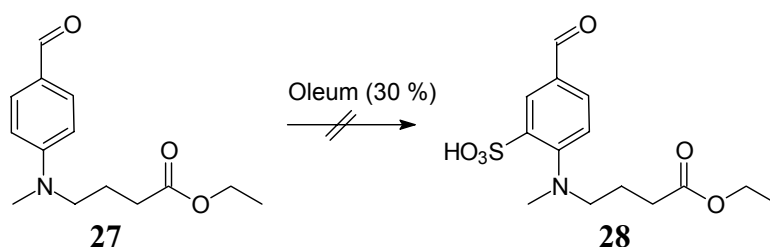
Bei physiologischen Untersuchungen ist es jedoch wichtig, dass der verwendete Farbstoff die Eigenschaften der zu markierenden Proteine nicht ändert. Dazu zählt auch die Hydrophilie der Oberfläche des Proteins, welche durch Reaktion der primären Aminogruppen mit dem hydrophoben Farbstoff bei hohen Substitutionsgraden beeinträchtigt werden kann. Ein weiteres Problem bei hydrophoben Farbstoffen ist die ungewollte Adsorption des Farbstoffs an unpolare Zellkompartimenten sowie eventuelle Haftung an Gefäßwandungen, welche High Throughput Screenings stören und die Probenvorbereitung erschweren. Zusätzlich kann es bei höherer Farbstoffkonzentration zur Aggregatbildung kommen, was Auswirkung auf die Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffs hat.

Durch eine Steigerung der Hydrophilie und der Polarität des Farbstoffs lassen sich diese Probleme vermeiden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass dadurch der Chromophor nicht beeinflusst werden darf, um eine Verminderung der Fluoreszenzquantenausbeute oder Änderung der Absorptionseigenschaften zu vermeiden.

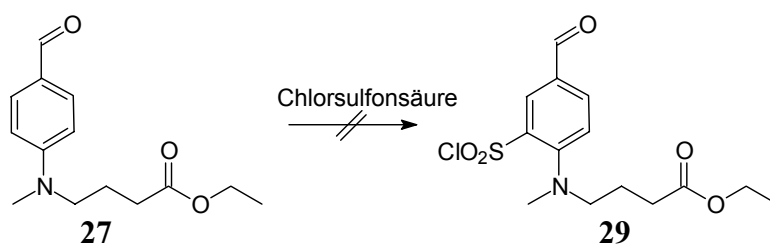
Zunächst wird versucht, durch das Einfügen von Sulfonsäuregruppen am Styrylrest eine Wasserlöslichkeit des Farbstoffs zu erreichen. Da die Nitrilgruppen des Farbstoffs bei den heftigen Bedingungen für aromatische Sulfonierungen, Erhitzen in Gegenwart einer starken Säure, zu Carbonsäuregruppen hydrolysiert werden würden, wird eine Vorstufe des Farbstoffs, der Aldehyd **27**, mit Oleum sulfoniert^[89]. Es wird erwartet, dass sich ein in Wasser schwerlösliches inneres Salz aus protonierter Aminogruppe und deprotonierter Sulfonsäuregruppe bildet.



Doch trotz Variation der Reaktionsbedingungen und der Aufarbeitungsverfahren kann kein Produkt isoliert werden. Das Reaktionsgemisch färbt sich bei Zugabe des Oleums schwarz und es lässt sich bei der Aufarbeitung auch kein schwerlösliches Calciumsulfonat-Salz aus der wässrigen Lösung ausfällen. Selbst nach Entfernen des Lösungsmittels erhält man keine organische Verbindung. Dies deutet darauf hin, dass sich der Aldehyd während der Reaktion zersetzt hat.



Des Weiteren wird die Sulfonierung mit Chlorsulfonsäure versucht^[76]. Das dabei entstehende Sulfonsäurechlorid kann leicht zur Sulfonsäure hydrolysiert werden und hat den Vorteil, dass es häufig destillierbar und damit leicht zu isolieren ist. Doch auch hier färbt sich der Reaktionsansatz schwarz und es lässt sich kein Produkt isolieren. Offensichtlich zersetzt sich der Aldehyd auch bei dieser Reaktion. Das Einfügen einer acetalischen Schutzgruppe für die Aldehydfunktion gelingt nicht.

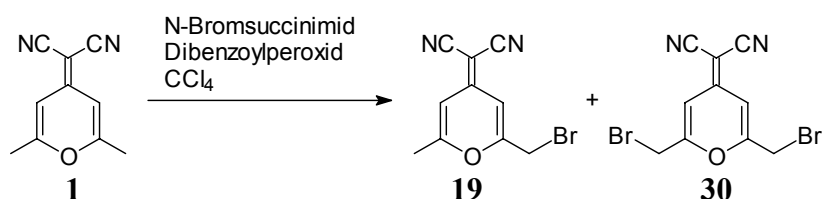


Eine Sulfonierung einer früheren Vorstufe wird nicht in Erwägung gezogen, weil durch die Sulfonierung des Amins die para-Stellung blockiert werden würde, da die Aminogruppe ortho- und para-dirigierend ist. Zudem ist die Sulfonierung von Aromaten reversibel, d.h. bei einer Folgereaktion, z. B. der Vilsmeier-Formylierung, könnte die Sulfonsäuregruppe wieder abgespalten werden. Durch die Bildung des inneren Salzes ergeben sich zudem Löslichkeitsprobleme, auch ließe sich die Substanz nicht mehr destillativ reinigen. Da sich die Aufarbeitung von wasserlöslichen Substanzen somit

extrem schwierig und aufwendig gestaltet, soll die hydrophile Gruppe erst in einem möglichst späten Stadium eingeführt werden.

Als Alternative zur Sulfonsäuregruppe kann zur Erhöhung der Hydrophilie eine Phosphonsäuregruppe eingeführt werden.

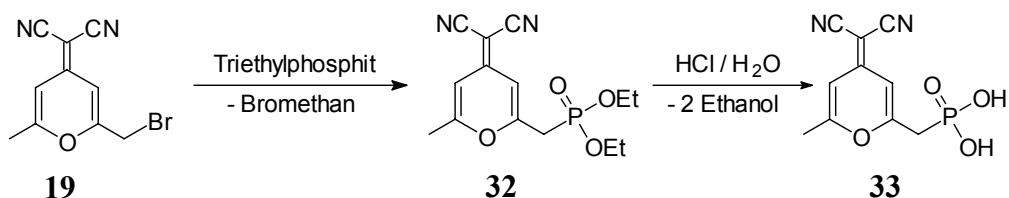
Dazu wird das Pyranderivat **1** zunächst mit *N*-Bromsuccinimid in Tetrachlorkohlenstoff radikalisch in Allylstellung bromiert. Bei dieser Reaktion entsteht ein Gemisch einfach und zweifach bromierten Pyrans. Eine allylische Bromierung von 2,6-Dimethyl-4-pyranon mit NBS in Benzol zum 2-Brommethyl-6-methyl-4-pyranon wird von YAMAMOTO et al. beschrieben^[90], das 4-Dicyanomethylen-2,6-dimethyl-4*H*-pyran (**1**) selbst wurde bisher noch nicht bromiert.



Durch einen Überschuss an **1**, kann die Bildung des monobromierten Produktes **19** begünstigt werden. Dennoch entsteht immer auch zweifach bromiertes Produkt **30**, welches nur sehr schwer und unter erheblichen Ausbeuteverlusten durch mehrfaches Umkristallisieren abgetrennt werden kann. Aufgrund der ähnlichen Polaritäten von **19**, **30** und unbromiertem Edukt **1** ist eine säulenchromatographische Trennung nicht möglich.

Das Bromid **19** ist unter Luftausschluss bei 4 °C über Monate stabil. Für die Substitutionsreaktionen wird jeweils das Gemisch aus **19** und **30** verwendet.

Zur Einführung der Phosphonsäuregruppe wird das Bromid **19** in einer Michaelis-Arbuzov-Reaktion durch Triethylphosphit substituiert^[91], und aus der so entstandenen Diethylphosphonsäure in einer sauren Hydrolyse die freie Phosphonsäure freigesetzt.



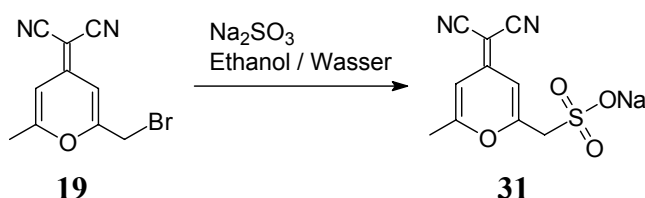
Das Bromid **19** wird in einem Überschuss an Triethylphosphit für 6 Stunden auf 150 °C erhitzt, wobei der Umsatz des Eduktes an der Menge entstandenem Bromethans, welches während der Reaktion abdestilliert wird, beobachtet werden kann. Anschließend wird das nicht umgesetzte Triethylphosphit im Wasserstrahlvakuum entfernt. Die Hydrolyse des entstandenen Phosphonsäureesters gelingt jedoch nicht in

verdünnter siedender Salzsäure, es kann auch nach 6 Stunden Rückfluss keine Reaktion beobachtet werden. Bei der Hydrolyse in konzentrierter siedender Salzsäure hingegen werden auch die Cyanogruppen der Verbindung hydrolysiert, so dass nur eine minimale Menge an Produkt isoliert werden kann. Da sich die oben beschriebene Sulfonierung viel eleganter und mit guten Ausbeuten durchführen lässt, wird die Phosphonsäurevariante verworfen.

Die drastischen Bedingungen einer Hydrolyse, bei der die Nitrilgruppen verseift werden, können vermieden werden, indem das Bromid **19** mit Natriumsulfit zu einer Sulfonsäure substituiert wird. Diese Substitutionsreaktion lässt sich unter sehr milden Reaktionsbedingungen durchführen.

Zum Einführen der Sulfonsäuregruppe wird das Bromid nach einer abgewandelten Vorschrift von MARVEL et al., denen die Darstellung von Natrium-2-bromethylsulfonat aus 1,2-Dibromethan durch Erhitzen in einem Ethanol-Wassergemisch mit Natriumsulfit gelang^[92], umgesetzt. Dabei wird das Bromid durch eine Sulfonsäuregruppe in einer nucleophilen Substitution substituiert. Das Lösungsmittelgemisch muss so eingestellt werden, dass in der Siedehitze sowohl das in Ethanol lösliche und in Wasser unlösliche Bromid gelöst ist als auch das in Ethanol unlösliche anorganische Natriumsulfit.

V26



Die entstandenen Mono- und Disulfonsäuren lassen sich durch fraktionierte Umkristallisation aus Ethanol trennen, zuerst kristallisiert die Monosulfonsäure **31** aus. Die Sulfonsäure **31** liegt als Natriumsalz vor, ist sehr gut wasserlöslich und hat einen Schmelzpunkt oberhalb von 300 °C. Aufgrund des hohen Schmelzpunkts und des ionischen Charakters lässt sich von der Verbindung kein Massenspektrum aufnehmen. Auch eine Elementaranalyse ist nicht möglich, da die Verbindung nicht vollständig verbrennt.

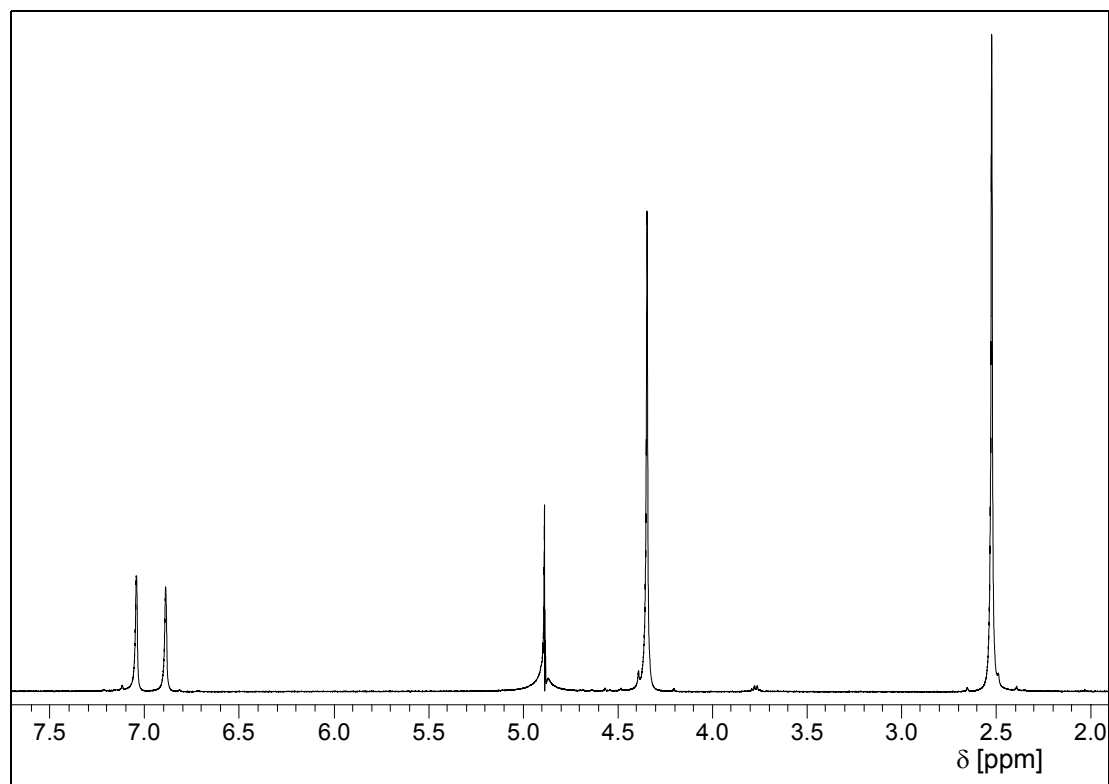
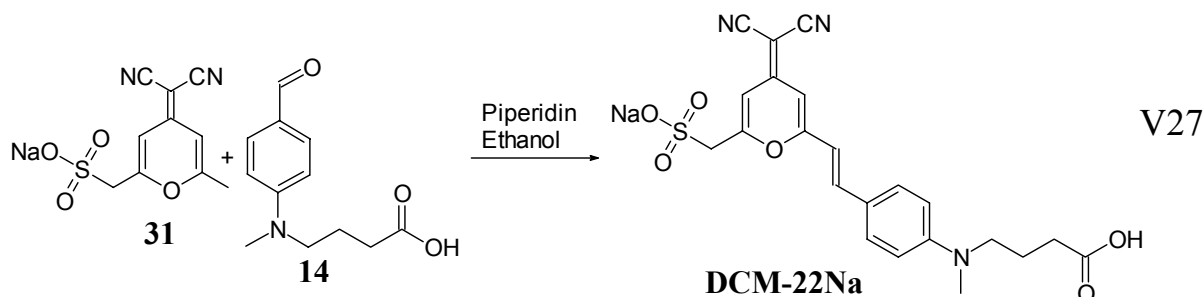


Abbildung 42: ^1H -NMR- Spektrum mit Wasserunterdrückung von **31** in Deuteriumoxid.

3.5.7 Darstellung des sulfonierten hydrophilen Farbstoffs DCM-22

Das sulfonierte Pyranderivat **31** und der Aldehyd **14** werden in äquimolaren Mengen in einer basisch katalysierten Aldolkondensation in Ethanol mit Piperidin als Katalysator zum Farbstoff nach einer Vorschrift von BOURSON und VALEUR^[46] umgesetzt.



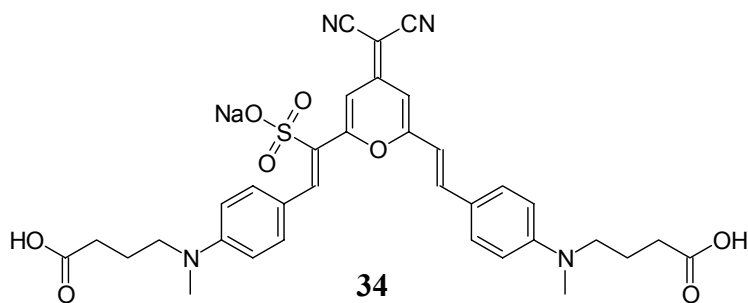
Der Umsatz ist nicht quantitativ, da sich bei längeren Reaktionszeiten die Zahl der Nebenprodukte, z. B. des doppelt substituierten Farbstoffs, häufen, auch wenn erst ein geringer Teil der Eduktmenge umgesetzt worden ist. Die Reaktion muss deshalb dünnschichtchromatographisch kontrolliert und zu gegebenem Zeitpunkt abgebrochen werden. Die Trennung des Farbstoffs von den Nebenprodukten erweist sich wegen der Polarität und Hydrophilie der Substanzen als sehr schwierig. Aufgrund der

Wasserlöslichkeit des Produkts sowie der Nebenprodukte und der Edukte, mit denen das Produkt verunreinigt ist, und wegen der geringen Löslichkeit in organischen, mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmitteln sind extraktive Trennmethode nicht durchführbar. Versuche zur Umkristallisation misslingen wegen des geringen Produktanteils und der Vielzahl der Verunreinigungen. Eine säulenchromatographische Reinigung über Kieselgel ist ebenfalls nicht möglich, weil das Produkt und die Verunreinigungen aufgrund ihrer hohen Polarität gleichermaßen vom Säulenmaterial adsorbiert werden und lediglich mit Methanol eluiert werden können, wobei jedoch keine Trennung erfolgt.

Eine Reinigung des Produkts gelingt erst durch Verwendung eines Ionenaustauschers. Das bietet gleichzeitig den Vorteil, dass die Gegenionen der Sulfonsäure- und Carboxylgruppen definiert werden können. Da der Farbstoff mit der Sulfonsäuregruppe und der Carboxylgruppe stark saure Gruppen trägt, wird der schwach basische Anionenaustauscher Amberlite[®] IRA-67 in der Chlorid-Form gewählt. Die freie Base-Form des Ionenaustauschers kann aufgrund der Empfindlichkeit des Substrats gegenüber Basen nicht verwendet werden. Als funktionelle Gruppen trägt der Ionenaustauscher protonierte tertiäre Alkylaminogruppen. Die schwache Basizität soll gewährleisten, dass das Substrat reversibel adsorbiert wird. Bei der Verwendung stark basischer Ionenaustauscher besteht die Gefahr, dass stark saure Verbindungen irreversibel gebunden werden. Die Matrix von Amberlite[®] IRA-67 besteht aus einer Polyacrylstruktur, welche hydrophiler ist als Ionenaustauscherharze auf Polystyrolbasis und dadurch geringere Affinität für aromatische organische Substanzen zeigt, wodurch die für die präparative Chemie wichtige Reversibilität der Haftung organischer Moleküle am Ionenaustauscherharz gewährleistet ist^[93].

Die positiv geladenen Trialkylammoniumgruppen des Ionenaustauschers ziehen die durch die Sulfonsäuregruppe und die Carboxylgruppe zweifach negativ geladenen Farbstoffmoleküle **DCM-22** an und binden diese reversibel. Ebenfalls gebunden wird das sulfonierte Edukt **31**, welches aber nur eine negativ geladene Gruppe trägt und deshalb leichter vom Ionenaustauscher desorbiert wird als der Farbstoff. Auch das Edukt 4-[*N*-Methyl-*N*-(4-formylphenyl)-amino]butansäure **14** ist aufgrund der durch die Aminosäurefunktion hervorgerufenen Betainstruktur nur leicht sauer und haftet deshalb auch nur wenig am schwach basischen Ionenaustauscher. Sehr stark gebunden wird hingegen das Nebenprodukt, die durch eine zweifache Aldolkondensation

entstandene Verbindung **34**, da sie eine Sulfonsäuregruppe und zwei Carboxylgruppen trägt und damit am stärksten negativ geladen ist.



Es wird die Säulenteknik (Filterverfahren) angewendet, bei der die Lösung der zu trennenden Substanzen und das Elutionsmittel in einer Säule über den Ionenaustauscher fließen. Auf diese Art wird ein effektiver Kontakt zwischen Ionenaustauscherharz und Medium erreicht.

Die Wanderungsgeschwindigkeit einer ionisierten Verbindung hängt von ihrer relativen Konzentration und der Stärke der Bindung zum Festion ab. Für die Elution müssen demnach Bedingungen gewählt werden, die unterschiedliche Austauschkonstanten für die einzelnen zu trennenden Substanzen ergeben. Dazu prinzipiell geeignet sind eine stufenweise Elution mit Puffern sinkender pH-Werte oder eine Erhöhung der Ionenstärke in der mobilen Phase. Häufig wird eine Gradientenelution mit linear oder exponentiell ansteigenden Gradienten der Ionenstärke eingesetzt.

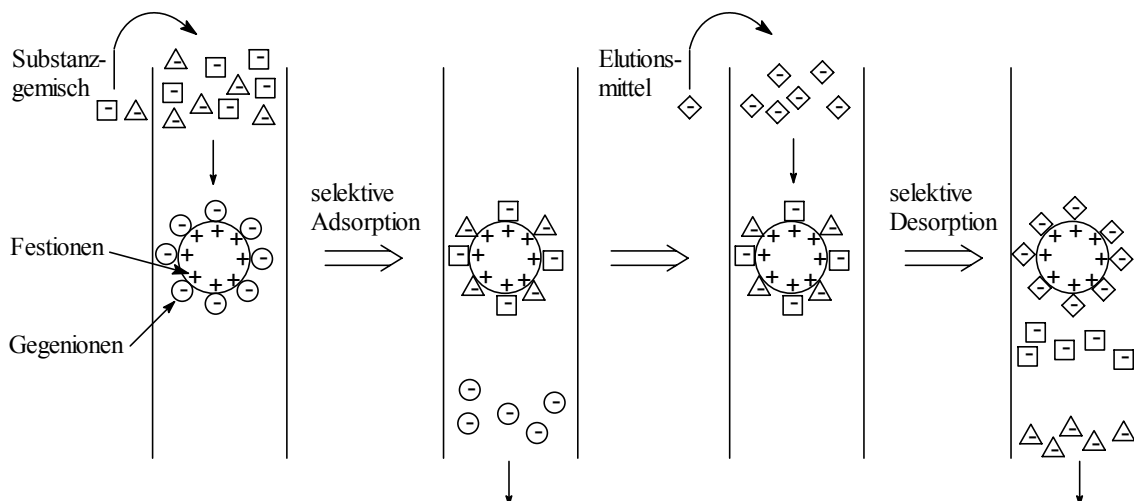


Abbildung 43: Prinzip der Trennung von Substanzgemischen über einen Ionenaustauscher^[94].

Zunächst werden Tests zur Bestimmung des Aufzugsverhalten des Farbstoffs durchgeführt. Dazu wird eine kleine Säule (Länge 10 cm, Ø 1.5 cm) mit dem

Ionenaustauscher gefüllt und mit einer kleinen Menge an wässriger Lösung des Reaktionsgemisches beschickt. Die Säule wird mit Wasser gespült, bis die eluierte Flüssigkeit farblos ist.

Mit der so beladenen Säule werden nun Versuche zur Ermittlung einer geeigneten Desorptionsmethode durchgeführt. Zunächst wird versucht, den Farbstoff über eine Erniedrigung des pH-Wertes des Elutionsmittels zu desorbieren. Dabei sollen die Sulfonsäure- und Carboxylgruppen des Farbstoffs protoniert werden, wodurch dessen elektrostatische Anziehung zu den positiven Trialkylammoniumgruppen des Ionenaustauschers aufgehoben wird.

Versuche mit einem ansteigenden Gradienten eines Essigsäure/Wasser-Gemischs zeigen, dass der Farbstoff nicht eluiert wird sondern sich stattdessen auf der Säule gelb färbt. Offensichtlich wird vor der Protonierung der Sulfonsäure- bzw. Carboxylgruppen zunächst die Aminogruppe des Farbstoffs protoniert, obwohl diese aufgrund der Konjugation des freien Elektronenpaars mit dem aromatischen System des Farbstoffs nur sehr schwach basisch ist. Auch die abzutrennenden Edukte und Nebenprodukte verbleiben auf der Säule. Zusätzliche Versuche mit wässrigen konzentrierten Ammoniumsulfat-Lösungen zeigen ebenfalls keine Trennwirkung und ermöglichen auch keine Elution des Farbstoffs. Es folgen Tests zur Ermittlung eines geeigneten Anions zur Steigerung der Ionenstärke der mobilen Phase zur Elution des Farbstoffs über einen Salz-Gradienten. Es werden folgende Salze jeweils in Konzentrationsreihen von 0.01 bis 1.0 molaren wässrigen Lösungen getestet (in der Reihenfolge ansteigender Elutionseigenschaften):

Natiumsulfat (keine Elution) < Ammoniumchlorid < Kaliumbromid \approx Ammoniumbromid < Tetraethylammoniumbromid (optimale Elution).

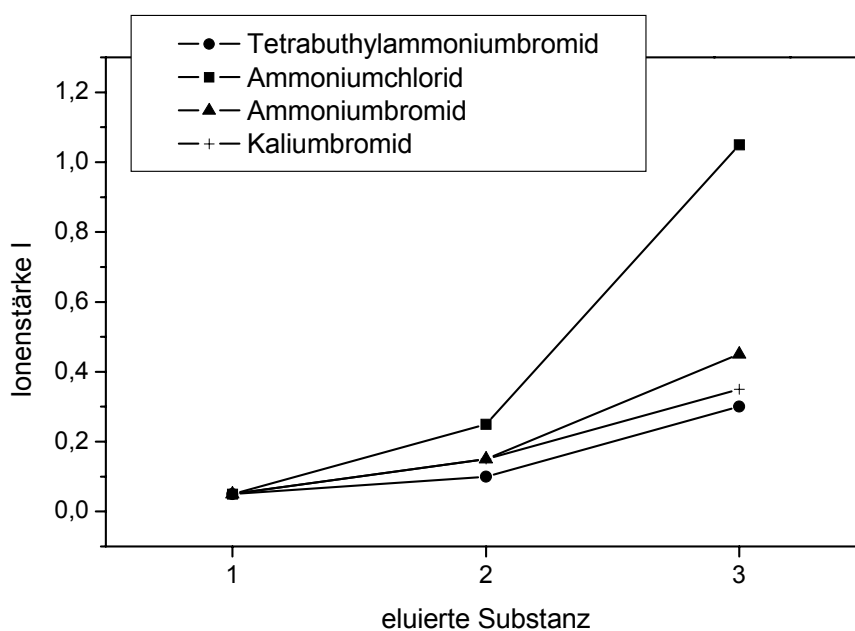


Abbildung 44: Die zur Elution der jeweiligen Substanz (1: **14**; 2: **31**; 3: **DCM-22**) benötigte Mindestionenstärke I. Elutionsmittel: wässrige Lösungen von: Tetrabutylammoniumbromid, Ammoniumchlorid, Ammoniumbromid, Kaliumbromid.

Da Tetraethylammoniumbromid als Phasentransferkatalysator sehr schlecht vom Substrat abtrennbar ist und sein Einsatz aufgrund der großen benötigten Mengen des recht teuren Salzes aus ökonomischen Gründen nicht vertretbar ist, wird Ammoniumbromid-Lösung als Elutionsmittel ausgewählt. Weitere Tests mit verschiedenen Konzentrationen der Lösung (0.05 M bis 0.5 M) dienen der Bestimmung des Konzentrationsbereichs, in dem die Nebenprodukte bzw. der Farbstoff eluiert werden. Dabei wird in einem kationischen TRIS-HCl-Puffer (0.05 M, pH 8, jeweils gleiche Teile einer 0.2 M TRIS-Lösung und einer 0.1 M Salzsäure auf zwei Teile Wasser) gearbeitet, um einen stabilen und reproduzierbaren pH-Wert und damit Protonierungsgrad des Ionenaustauschers und der Substrate einzustellen. Anionische Puffer-Systeme können nicht verwendet werden, da diese am Anionenaustauscher adsorbiert würden.

Das Desorptionsverhalten der Substrate entspricht den oben beschriebenen anhand der jeweiligen Ladung angenommenen Erwartungen. Das Edukt *N*-Methyl-*N*-(4-formylphenyl)-aminobutansäure **14** ist lediglich über seine Carbonsäuregruppe an den Ionenaustauscher gebunden. Schon die Ionenstärke der Pufferlösung ohne Salzzusatz

genügt zur Desorption. Nach vollständiger Elution wird eine TRIS-Puffer (0.05 M)/Ammoniumbromid-Lösung (0.16 M) zur Elution des sulfonierten Pyrenderivats **31**, das aufgrund der Sulfonsäuregruppe polarer ist als die Carbonsäure, verwendet. Die Konzentration an Ammoniumbromid wird bis zur vollständigen Elution von **31** nach und nach auf 0.2 M gesteigert und die Elution des Edukts UV/Vis-spektroskopisch verfolgt. Dabei ist zu beachten, dass bei zu hoher Salzkonzentration der Farbstoff mit eluiert wird. Die Elution des Pyrans kann also durch Steigerung der Konzentration des Ammoniumbromids und damit der Ionenstärke nicht beschleunigt werden.

Vor der Elution des Farbstoffs **DCM-22**, der aufgrund der Sulfonsäure- und der Carbonsäuregruppe mit zwei negativen Ladungen fester an den Ionenaustauscher gebunden ist, wird die Säule gründlich mit Wasser gespült, um den TRIS-HCl-Puffer zu entfernen. Der Farbstoff wird dann mit einer 2 M wässrigen Ammoniumbromid-Lösung ohne Pufferzusatz eluiert. Die hohe Ionenstärke des Elutionsmittels erzeugt ein sehr konzentriertes Eluat des Farbstoffs. Dadurch ist eine zeitökonomische Aufarbeitung der erhaltenen wässrigen Lösung, die neben dem Farbstoff große Mengen an Ammoniumbromid enthält, gegeben. Das doppelsubstituierte Nebenprodukt **34** verbleibt aufgrund der noch größeren Anzahl an negativen Ladungen auf der Säule.

Substanz	M (TRIS-HCl-Puffer)	c (NH ₄ Br)	Ionenstärke I
14	0.05 M	-	0.05
31	0.05	0.16 – 0.20	0.21 – 0.25
DCM-22NH₄	-	2.00	>0.25 - 2.00
34 (NH₄⁺-Salz)	-	>> 2.00	>> 2.00

Tabelle 1: Die zur Elution der jeweiligen Substanz benötigten Ionenstärken und Konzentrationen der Lösungen (Ammoniumbromid-Gradient).

Überschüssiges Ammoniumbromid wird nach Entfernen des Lösungsmittels durch wiederholte Extraktion des Farbstoffs mit Aceton abgetrennt. Das Ammoniumsalz des Farbstoffs **DCM-22NH₄** fällt als violett-schwarzes hygroskopisches Pulver an. Das ¹H-NMR-Spektrum zeigt mit einem sehr breiten Signal bei 12.12 ppm, dass die Carbonsäurefunktion protoniert vorliegt. Es wird also das Monoammoniumsalz isoliert.

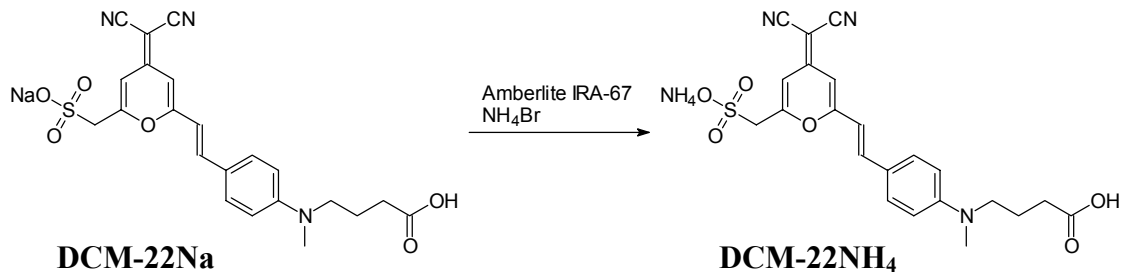


Abbildung 45: Umwandlung des Natriumsalzes von DCM-22 in das Ammoniumsalz durch Verwendung eines schwach basischen Ionenaustauschers.

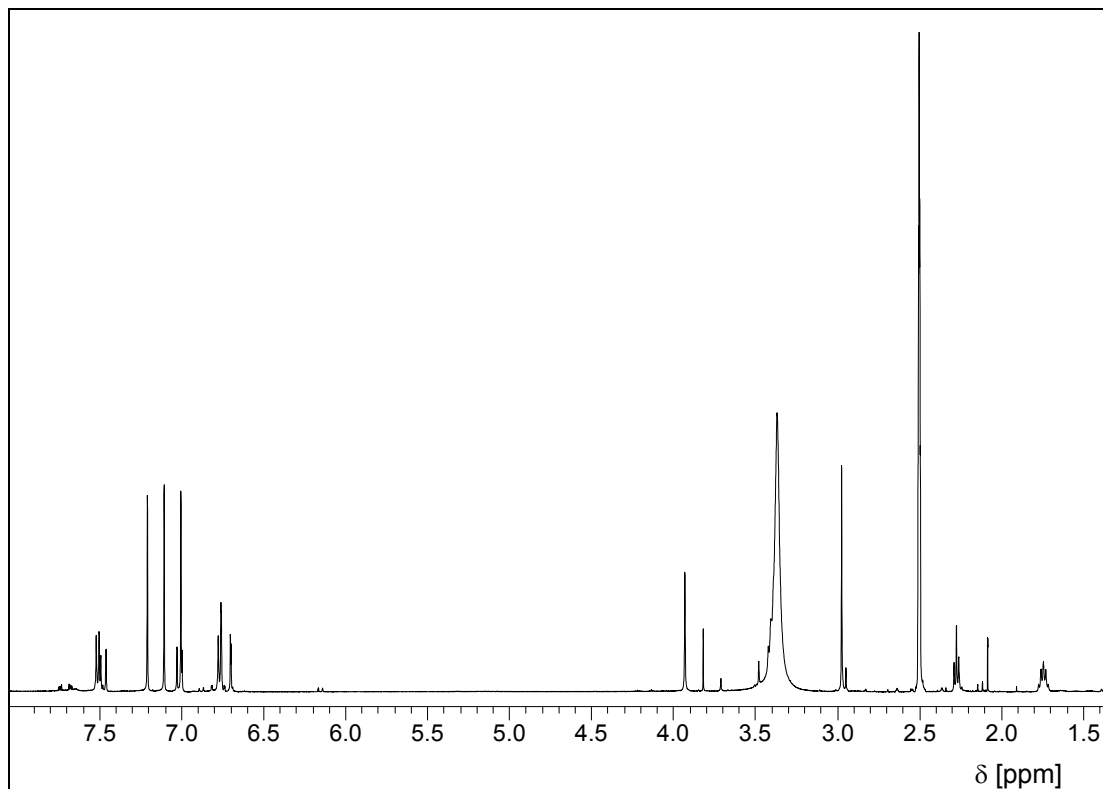


Abbildung 46: Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **DCM-22NH₄** in $\text{DMSO-}d_6$.

Eine weitere Charge des Farbstoffs wird aus dem Ionenaustauscher als Dikaliumsalz eluiert. Dazu wird, nachdem die Edukte mit einem Gradienten von 0.06 M bis 0.15 M Kaliumbromid-Lösung in einem TRIS-HCl-Puffer (0.05 M, pH = 8) entfernt wurden, der Farbstoff mit einer 1.5 M wässrigen Kaliumbromid-Lösung eluiert.

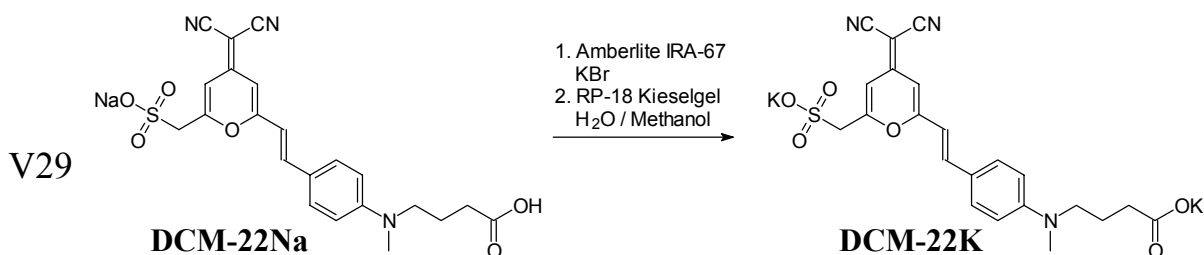
Substanz	M (TRIS-HCl-Puffer)	c (KBr)	Ionenstärke I
14	0.05 M	-	0.05
31	0.05	0.06 – 0.15	0.11 – 0.20
DCM-22K	-	1.50	>0.20 – 1.50
34 (K⁺-Salz)	-	>> 1.50	>> 1.50

Tabelle 2: Die zur Elution der jeweiligen Substanz benötigten Ionenstärken und Konzentrationen der Lösungen (Kaliumbromid-Gradient).

Der Farbstoff **DCM-22K** kann von der großen Menge an überschüssigem Kaliumbromid nicht durch Extraktion getrennt werden, da sowohl Farbstoff als auch Kaliumbromid in den Lösungsmitteln Methanol, Ethanol und Aceton eine ähnliche Löslichkeit aufweisen. So werden beispielsweise bei einer Soxhlet-Extraktion des Farbstoff-KBr-Gemisches mit Methanol auch große Mengen des anorganischen Salzes gelöst, wobei der Farbstoff eher schlecht löslich ist und nicht vollständig aus dem Salz extrahiert werden kann.

Eine Möglichkeit zur vollständigen Trennung von Farbstoff und anorganischem Salz besteht in einer säulenchromatischen Trennung an Reversed-Phase Kieselgel RP-18 mit einem Wasser/Methanol-Gradienten. Dazu wird eine wässrige Lösung des Farbstoffs **DCM-22K** auf eine RP-18-Säule aufgetragen.

Die organische Substanz wird aufgrund ihrer unpolaren Anteile auf dem Kieselgel adsorbiert, während das Kaliumbromid nicht adsorbiert wird und mit Wasser vollständig eluiert werden kann. Der Farbstoff wird anschließend mit Methanol eluiert, wobei geringe Mengen einer blauen Verunreinigung auf der Säule zurückbleiben. Diese ist vermutlich ein Oxidationsprodukt der 4-[N-Methyl-N-(4-formylphenyl)-amino]-butansäure **14** und offensichtlich mit dem Farbstoff aus dem Ionenaustauscher eluiert worden.



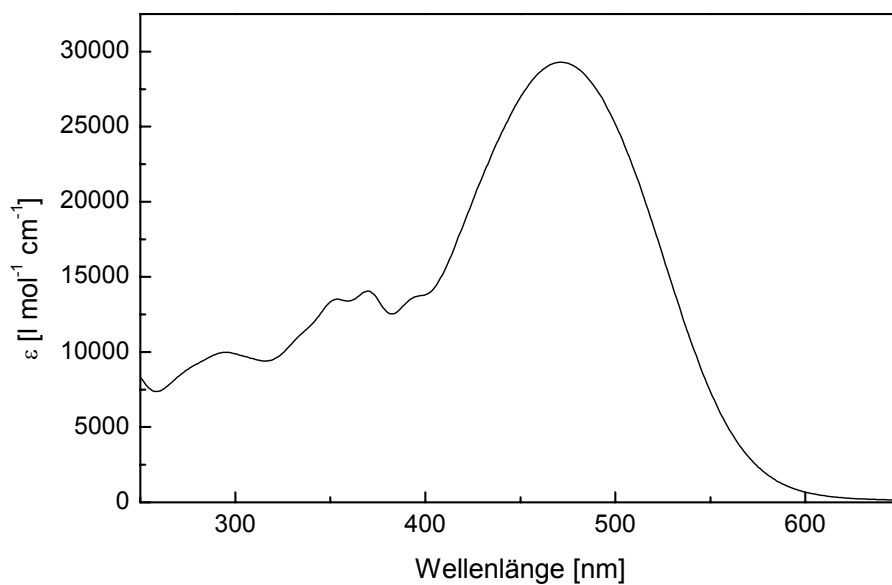


Abbildung 47: Absorptionsspektrum des Dikaliumsalzes **DCM-22K** in Wasser.

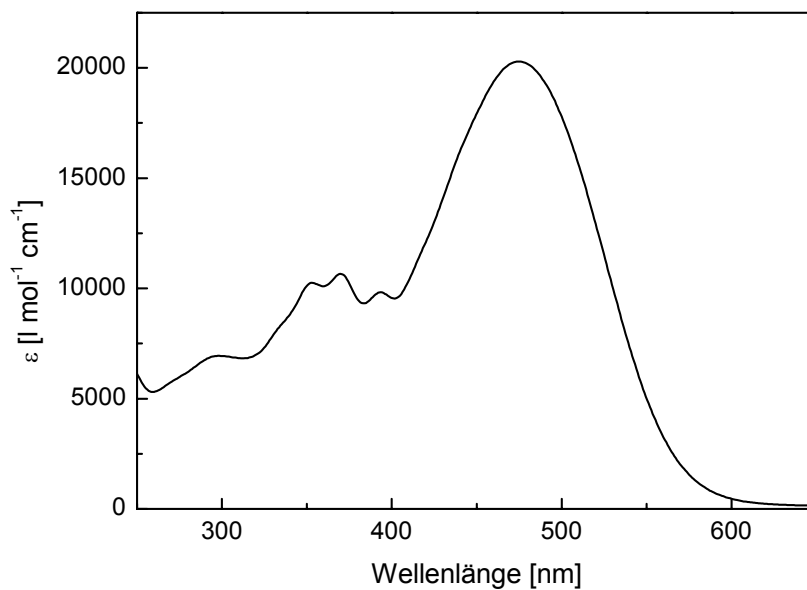


Abbildung 48: Absorptionsspektrum des Ammoniums Salzes **DCM-22NH₄** in Wasser.

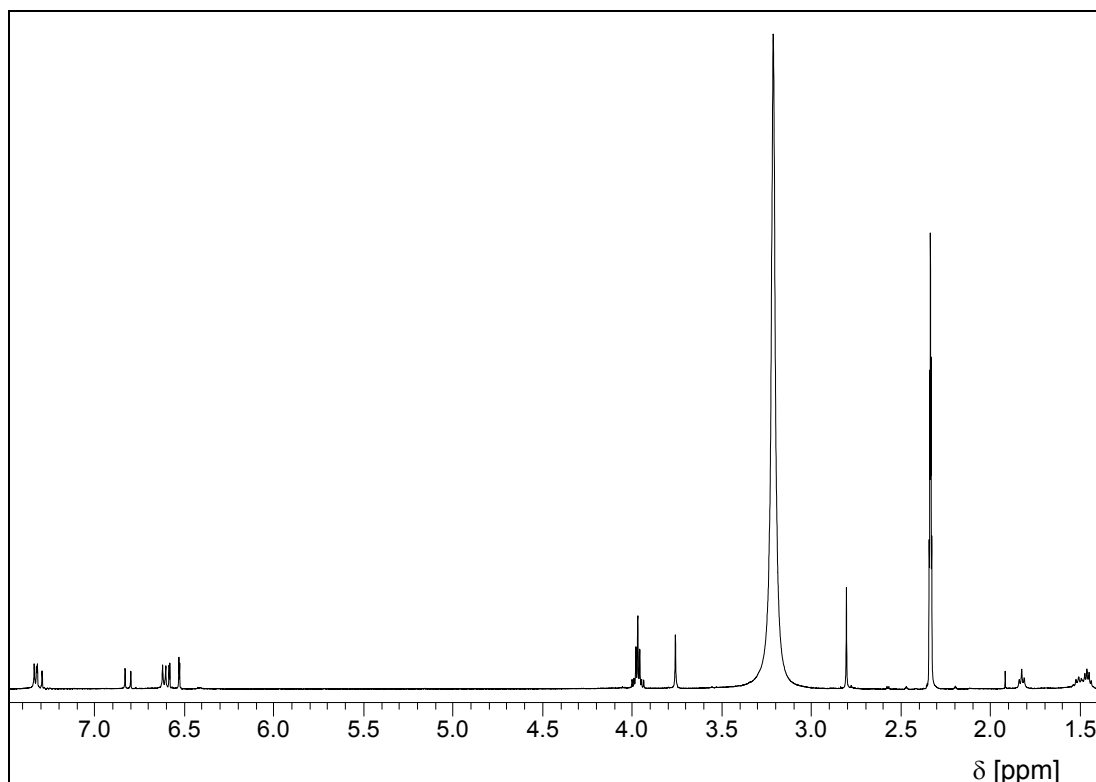


Abbildung 49: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **DCM-22K** in DMSO-d_6 .

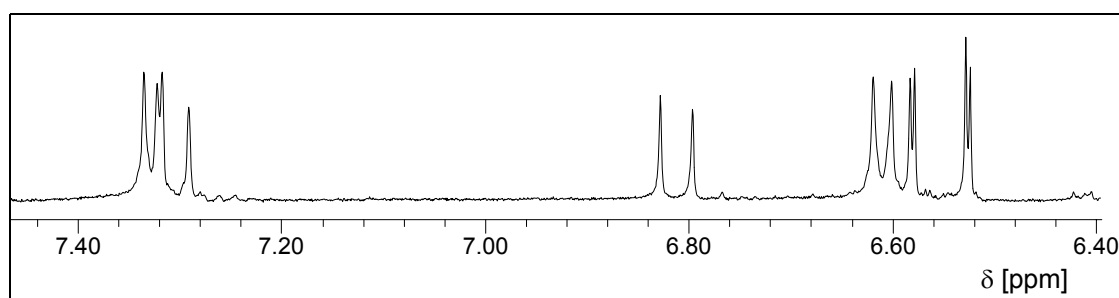


Abbildung 50: Gedehnter Ausschnitt aus dem Aromatenteil des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von **DCM-22K** in DMSO-d_6 .

3.5.8 Aktivierung zum *N*-Hydroxysuccinimidylester

Bei der Darstellung des aktivierten Succinimidylesters^[71] des wasserlöslichen Farbstoffs **DCM-22** mit *N*-Hydroxysuccinimid und DCC bereitet zunächst die Schwerlöslichkeit des Salzes in organischen Lösungsmitteln Probleme. Wenig polare und aprotische Lösungsmittel, wie das häufig für diese Form der Veresterung verwendete Ethylacetat, aber auch Chloroform, Dichlormethan und Aceton scheiden aus, da das Farbstoffsalz darin völlig unlöslich ist. In Frage kommen lediglich DMF und DMSO, da die

protischen Lösemittel Methanol und Ethanol, in denen sich das Salz recht gut löst, für die Veresterung mit DCC ungeeignet sind und zudem mit dem Reaktionsprodukt zum Methyl- bzw. Ethylester reagieren.

Zur Darstellung des Succinimidylesters wird das Monoammoniumsalz des Farbstoffs **DCM-22NH₄** in absolutem DMF gelöst und mit *N*-Hydroxysuccinimid versetzt. Als Kupplungsreagenz wird im Argongegenstrom Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) hinzugegeben. Nach 48-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wird der ausgefallene Niederschlag, der aus Dicyclohexylharnstoff besteht, abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wird aus Chloroform umkristallisiert.

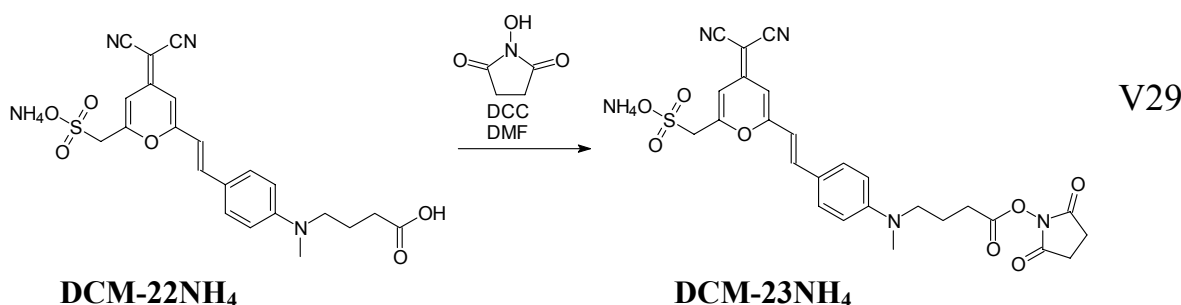
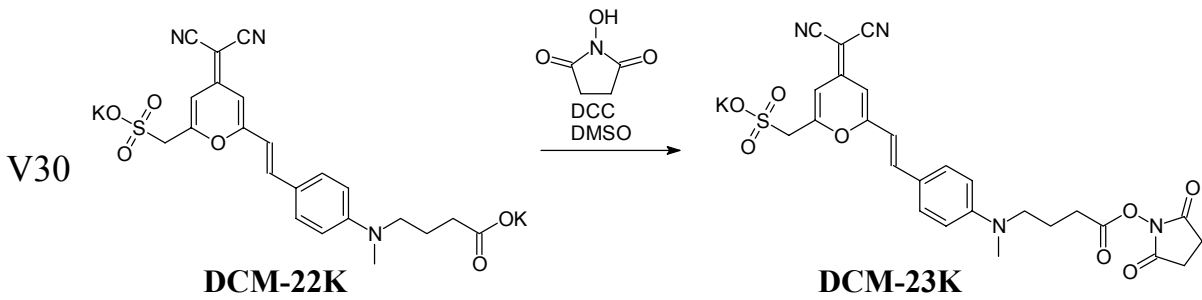


Abbildung 51: Prinzip der Synthese des Succinimidylesters **DCM-23NH₄**.

Wegen der geringen eingesetzten Substanzmengen von jeweils ca. 30 mg erweist sich die Aufarbeitung als sehr schwierig. Sowohl das Edukt als auch das Produkt sind hydrophil und sehr polar. Sie können deshalb über konventionelle Säulenchromatographie nicht voneinander getrennt werden. Aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit des Succinimidylesters ist eine Trennung über eine Reversed Phased Säulenchromatographie nicht möglich, weil dort ein Wasser/Methanol- oder ein Wasser/Acetonitril-Gradient als mobile Phase verwendet wird. Da Edukt und Produkt sehr ähnliche multifunktionelle Verbindungen sind, können sie durch Umkristallisation nicht vollständig voneinander getrennt werden.

Das Dikaliumsalz des Farbstoffs **DCM-22K** zeigt eine noch geringere Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln. So ist das reine Salz weder in Aceton noch in DMF löslich, so dass die Veresterung mit *N*-Hydroxysuccinimid und DCC in DMSO durchgeführt werden muss. Die Reaktionszeit beträgt fünf Tage. Die Umsetzung und Aufarbeitung entspricht der des Monoammoniumsalzes **DCM-23NH₄**.



Auch der Succinimidylester **DCM-23K** kann aufgrund der Hydrophilie und Hydrolyseempfindlichkeit nicht vollständig von der Ausgangsverbindung abgetrennt werden. Die Charakterisierung beider Succinimidylester erfolgt über FAB-Massenspektrometrie mit 3-Nitrobenzylalkohol (NBA) als Matrix.

Die Farbstoffe **DCM-23NH₄** und **DCM-23K** werden zur Anfärbung von Proteinen verwendet. Da letztere nach der Anfärbung leicht gereinigt werden können und müssen, ist der Reinheitsgrad der Farbstoffe für die praktische Anwendung ausreichend.

4 NMR-Spektroskopische Untersuchung der photochemisch induzierten *E,Z*-Isomerisierung der DCM-Derivate

Als Bezugspunkt zur Fixierung der δ -Skala der ^1H -NMR-Spektren wurde in DMSO-d_6 das Restsignal des undeuterten DMSO ($\delta = 2.50$ ppm) und in Deuteriochloroform des Chloroforms ($\delta = 7.26$ ppm) verwendet. Bei den in Deuteriochloroform gemessenen Spektren tritt aufgrund des nicht zu vermeidenden geringen Wassergehalts des Lösungsmittels ein Wassersignal bei ca. $\delta = 1.5$ ppm auf. Bei den in DMSO-d_6 gemessenen Spektren liegt das Wassersignal bei ca. $\delta = 3.5$ ppm.

4.1 *E,Z*-Isomerisierung von DCM

Der Laserfarbstoff **DCM** trägt eine dem Stilben analoge Doppelbindung und kann so als *E*-Isomer und als *Z*-Isomer vorliegen. Bei der Synthese des Farbstoffs über eine Aldolkondensation von 4-Dimethylaminobenzaldehyd mit 4-Dicyanomethylen-2,6-dimethyl-4*H*-pyran (**1**) wird bevorzugt das *E*-Isomer gebildet.

DRAKE et al. haben beobachtet, dass der Farbstoff **DCM** in bestimmten Lösungsmitteln bei Bestrahlung mit Raumlicht partiell zum *Z*-Isomer isomerisiert^[95]. Bei Lösungen, die im Dunkeln bzw. unter Rotlicht angesetzt wurden, konnte nur das *E*-Isomer identifiziert werden, wohingegen nach Äquilibration dieser Lösungen unter Raumlicht zusätzlich das *Z*-Isomer gefunden wurde. Diese Beobachtungen werden durch die Anwesenheit von Signalen des *Z*-Isomers im ^1H -NMR-Spektrum des hier synthetisierten **DCM** bestätigt.

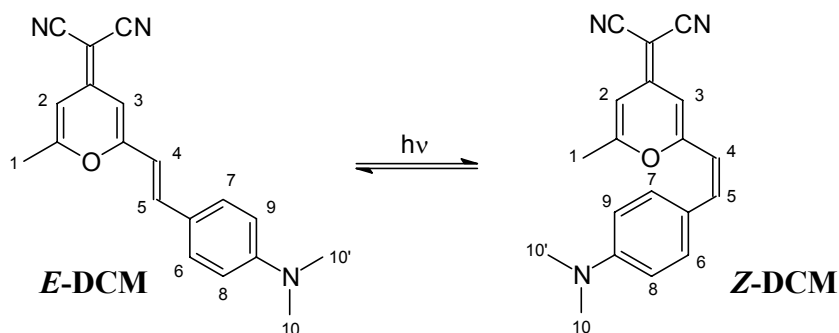


Abbildung 52: *E,Z*-Isomerisierung des Laserfarbstoffs **DCM**.

DRAKE et al. beobachteten, dass eine Äquilibrationszeit von vier Stunden zur Einstellung des Gleichgewichts ausreicht. Um sicherzustellen, dass sich das System im Gleichgewicht befindet, wurden die in dieser Arbeit untersuchten Proben vor jeder

Messung der ^1H -NMR-Spektren für acht Stunden Raumlicht ausgesetzt und die Messungen nach weiteren acht Stunden Bestrahlung wiederholt.

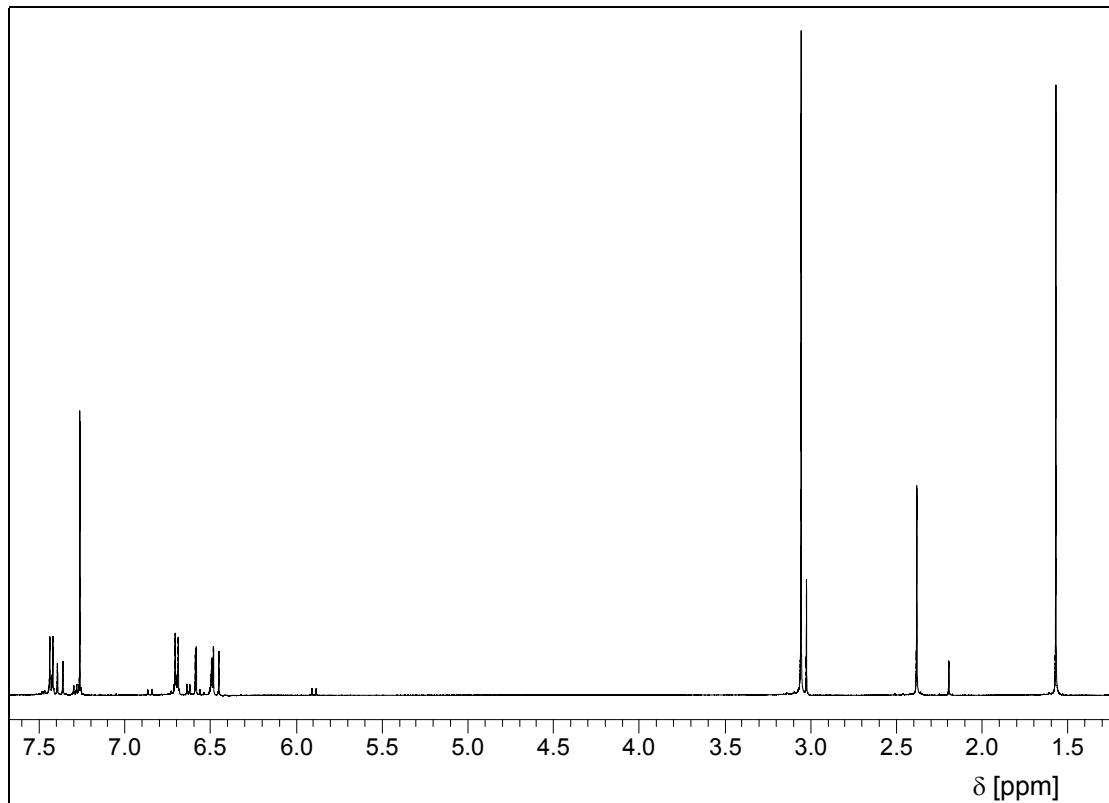


Abbildung 53: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, CDCl_3) von **DCM**.

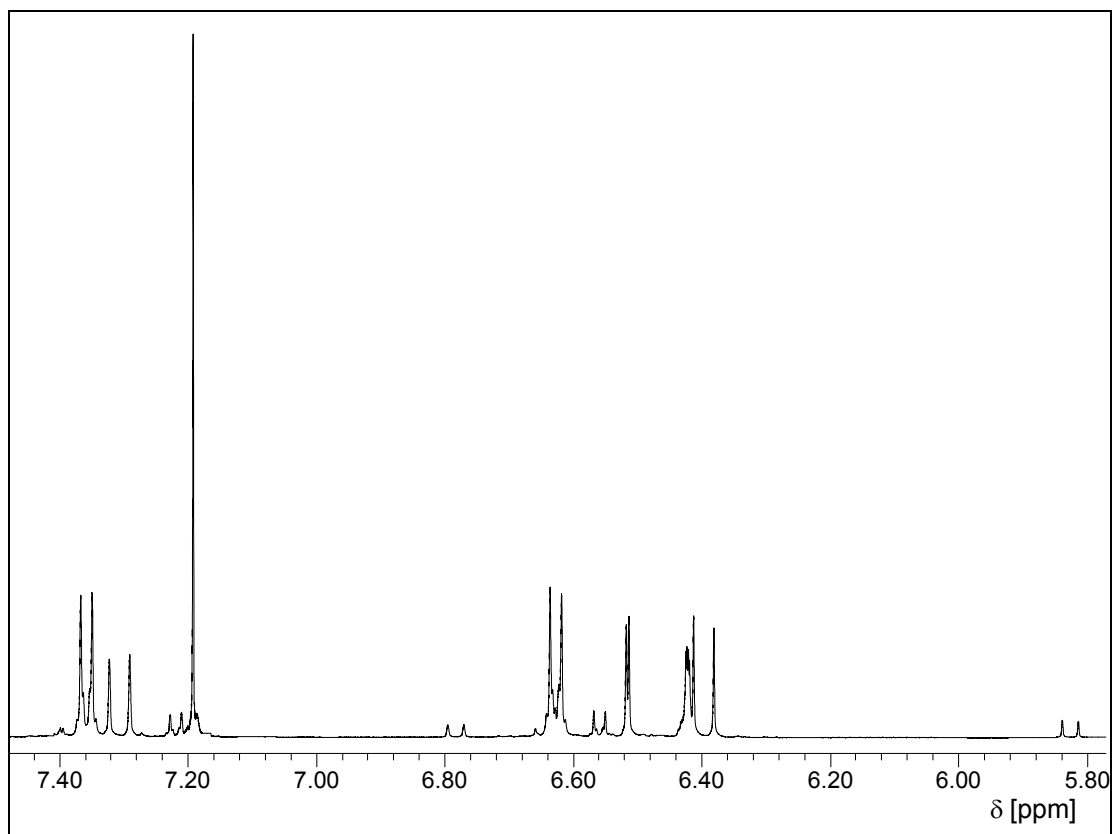


Abbildung 54: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, CDCl_3) von **DCM**. Gedehnter Ausschnitt des Aromatenteils von 5.80 bis 7.40 ppm.

Zuordnung	Multiplizität	<i>E</i> -Isomer			<i>Z</i> -Isomer		
		δ [ppm]	Integration	J [Hz]	δ [ppm]	Integration	J [Hz]
1-H	d	2.37	3.0	0.9	2.19	0.6	0.7
10-H; 10'-H	s	3.05	6.0	-	3.02	1.2	-
4-H	d	6.45	1.0	16.1	5.90	0.2	12.5
2-H	m	6.47	1.0	2.2; 0.9	6.50	0.2	2.0; 0.9
3-H	d	6.56	1.0	2.2	6.70	0.2	2.0
8-H; 9-H	m	6.69	2.0	8.8	6.63	0.4	8.9
5-H	d	7.37	1.0	16.1	6.85	0.2	12.5
6-H; 7-H	m	7.42	2.0	8.8	7.29	0.4	8.9

Tabelle 3: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, CDCl_3) von **DCM**, *E*- und *Z*-Isomer.

Die Zuordnung der Signale zu den Isomeren gelingt mit Hilfe der Kopplung zwischen den Protonen 4-H und 5-H. Im *E*-Isomer beträgt $J_{4,5}$ 16.1 Hz, im *Z*-Isomer dagegen nur

$J_{4,5}$ auf 12.5 Hz. Es wird auch eine deutliche Veränderung der chemischen Verschiebung der Doppelbindungsprotonen beobachtet. Die chemische Verschiebung der olefinischen Protonen 4-H und 5-H im *Z*-Isomer korreliert mit den über das Inkrementsystem berechneten δ -Werten, so wird für 4-H eine chemische Verschiebung von 5.63 ppm und für 5-H eine chemische Verschiebung von 6.39 ppm berechnet^[96]. Es wird eine ebenfalls erhebliche Änderung der chemischen Verschiebung der Protonen 1-H und 3-H beobachtet. Diese kann durch den Anisotropie-Kegel des Aromaten erklärt werden. In Deuteriochloroform liegt **DCM** im Gleichgewicht zu etwa 20 % als *Z*-Isomers vor.

4.2 *E,Z*-Isomerisierung von DCM-21

Auch im Protonenspektrum der Verbindung **DCM-21** in Deuteriochloroform lassen sich nach Äquilibrierung bei Raumlicht Signale des *Z*-Isomers erkennen.

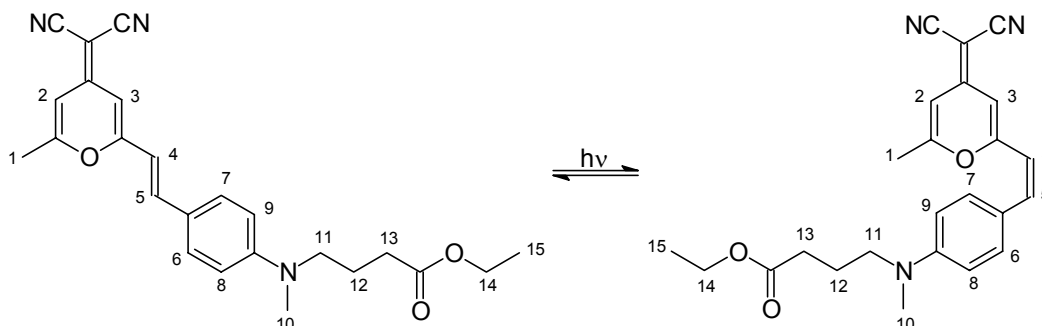


Abbildung 55: *E,Z*-Isomerisierung des Fluoreszenzfarbstoffs **DCM-21**.

Zuordnung	Multiplizität	<i>E</i> -Isomer			<i>Z</i> -Isomer		
		δ [ppm]	Integration	J [Hz]	δ [ppm]	Integration	J [Hz]
15-H	t	1.26	3.0	7.3	1.25	0.3	7.3
12-H	tt	1.94	2.0	7.3; 7.3	1.94	0.2	7.3; 7.3
13-H	t	2.36	2.0	6.9	2.34	0.2	7.3
1-H	d	2.37	3.0	0.6	2.19	0.3	0.6
10-H	s	3.02	3.0	-	3.00	0.3	-
11-H	t	3.44	2.0	7.3	3.42	0.2	7.3
14-H	q	4.14	2.0	7.3	4.13	0.2	7.3
4-H	d	6.45	1.0	15.8	5.88	0.1	12.2
2-H	m	6.48	1.0	0.6; 2.2	6.49	0.1	0.6; 2.2
3-H	d	6.57	1.0	2.2	6.69	0.1	2.2
8-H; 9-H	d	6.70	2.0	8.8	6.63	0.2	8.8
5-H	d	7.36	1.0	15.8	6.83	0.1	12.2
6-H; 7-H	d	7.41	2.0	8.8	7.28	0.2	8.8

Tabelle 4: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, CDCl_3) von **DCM-21**, *E*- und *Z*-Isomer.

Jedoch ist der Anteil des *Z*-Isomers im Gleichgewicht etwas geringer als bei **DCM-24**. Der Anteil an *Z*-Isomer im Gleichgewicht beträgt ca. 10 %. Die Kopplungskonstanten der olefinischen Protonen 4-H und 5-H im *E*- und *Z*-Isomer entsprechen denen von

DCM. Auch hier tritt eine Änderung der chemischen Verschiebung der Protonen 1-H und 3-H auf, die mit der Anisotropie des Aromaten erklärt werden kann.

4.3 *E,Z*-Isomerisierung von DCM-1

Die *E,Z*-Isomerisierung der verschiedenen Farbstoffderivate wird nur bei in Deuteriochloroform gelösten Proben beobachtet. Bei dem in CDCl_3 schwer löslichen Pigment **DCM-1**, dessen Protonenspektren in DMSO-d_6 gemessen wurden, treten auch nach längerer Äquibrierung bei Raumlicht keine Signale der *Z*-Isomere auf.

Nachdem in DMSO keine Isomerisierung von *E*-**DCM-1** zu beobachten war, wurde eine 1.0×10^{-4} molare Lösung von *E*-**DCM-1** in Chloroform angesetzt und über mehrere Tage zur Einstellung des Gleichgewichts bei Raumlicht aufbewahrt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und die Probe in DMSO-d_6 gelöst vermessen. Im Aromatenteil des Protonenspektrums zeigten sich deutliche Signale des *Z*-Isomers, welches zu einem Anteil von 28 % vorliegt.

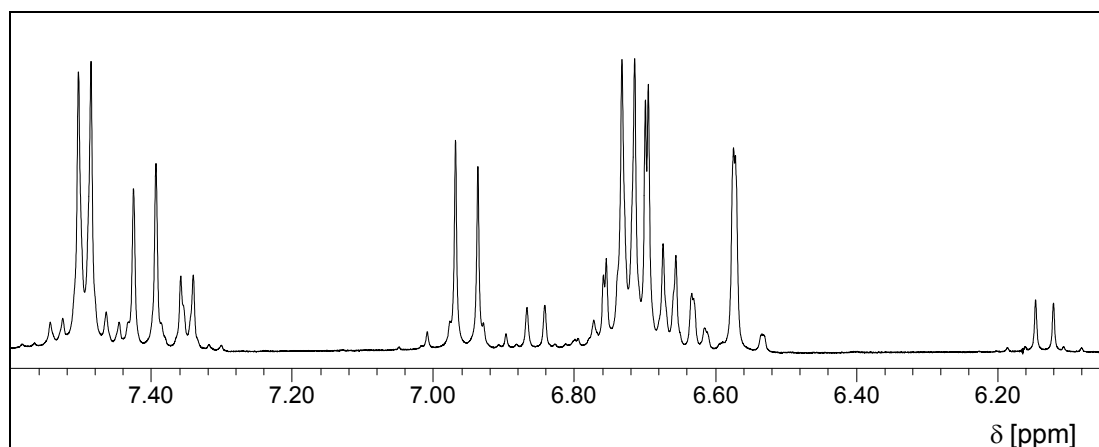
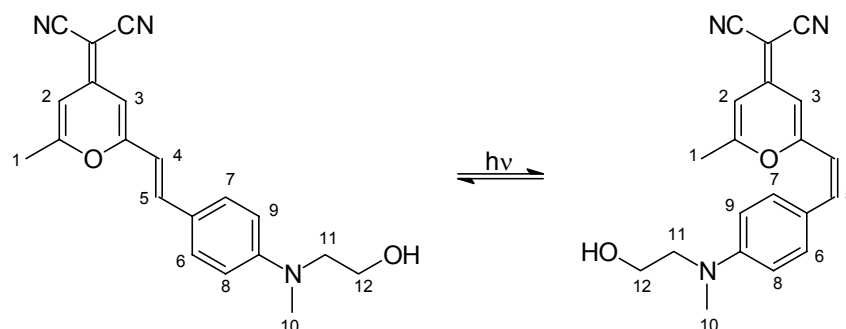


Abbildung 56: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d_6) von **DCM-1** nach Isomerisierung in Chloroform. Gedehter Ausschnitt des Aromatenteils von 6.10 bis 7.60 ppm, bei den nicht ausgewerteten Peaks handelt es sich um Rotationsseitenbanden.


 Abbildung 57: *E,Z*-Isomerisierung des Fluoreszenzfarbstoffs **DCM-1**.

Zuordnung	Multi- plizität	<i>E</i> -Isomer			<i>Z</i> -Isomer	
		δ [ppm]	Inte- gration	J [Hz]	δ [ppm]	J [Hz]
2-H	m	6.57	1.0	1.2	6.63	1.5
3-H	d	6.70	1.0	2.2	6.76	2.0
8-H; 9-H	d	6.72	2.0	8.9	6.66	8.9
4-H	d	6.96	1.0	15.8	6.13	12.7
5-H	d	7.41	1.0	15.8	6.85	12.7
6-H; 7-H	d	7.50	2.0	8.9	7.35	8.9

 Tabelle 5: Aromatenteil des ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d_6) von **DCM-1**, *E*- und *Z*-Isomer.

Das *Z*-Isomer zeigt die typische Kopplungskonstante der Doppelbindungsprotonen 4-H und 5-H von 12.7 Hz. Für das *E*-Isomer wird eine Kopplungskonstante von 15.8 Hz gemessen. Die chemischen Verschiebungen der Signale im nichtaromatischen Teil des Spektrums des *E*- und des *Z*-Isomers sind annähernd gleich, die Signale überlagern sich. Nach einer neuerlichen Äquilibrierung in DMSO-d_6 über eine Woche bei Raumlicht wurde die Probe nochmals vermessen, wobei keine Signale des *Z*-Isomers mehr zu erkennen waren. In DMSO-d_6 liegt das Gleichgewicht offensichtlich weit auf der Seite der stabileren *E*-Isomere.

4.4 Diskussion der Ergebnisse

Neben den in den vorhergehenden Abschnitten vorgestellten **DCM**-Derivaten **DCM**, **DCM-1** und **DCM-21** liegen alle im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten **DCM**-Derivate nach Äquilibrierung bei Raumlicht in Deuteriochloroform als *E,Z*-Isomeren-

gemischt vor. In DMSO-d₆ hingegen kann nach Äquilibrierung für kein **DCM**-Derivat ein *Z*-Isomerenanteil nachgewiesen werden.

Schon DRAKE et al. stellten fest, dass das Isomerenverhältnis lösungsmittelabhängig ist und ermittelten folgende *E,Z*-Anteile:

Lösungsmittel	% <i>Z</i> -Isomer	Fluoreszenzquantenausbeute
DMSO	8	0.80 ± 0.05
Acetonitril	25	0.44 ± 0.05
Chloroform	45	0.35 ± 0.08

Tabelle 6: Fluoreszenzquantenausbeute und *Z*-Isomerisierungsrate in Abhängigkeit vom Lösungsmittel bei einer Konzentration von 1.0×10^{-4} mol/l nach DRAKE et al.^[95].

Ein nahezu ausgeglichenes Verhältnis zwischen *E*- und *Z*-Isomer, wie es DRAKE et al. in Chloroform beschreiben, kann in keinem Fall beobachtet werden, obwohl durch Verlängerung der Belichtungszeiten und Wiederholungsmessungen davon ausgegangen werden kann, dass sich die untersuchten Systeme im Gleichgewicht befunden haben. Ein Grund für den geringeren *Z*-Isomerenanteil könnte die relativ hohe Farbstoffkonzentration von ca. 0.05 mol/l der zur Messung der Protonenspektren verwendeten Lösungen sein. DRAKE et al. stellten eine Konzentrationsabhängigkeit der *Z*-Isomerenanteils von **DCM** fest und ermittelten bei ihren Untersuchungen die höchsten *Z*-Isomerenanteile in stark verdünnte Lösungen mit einer Konzentration von 1.0×10^{-4} mol/l. Das Verhältnis beider Isomere wurde von ihnen über HPLC-Messungen bestimmt.

Auch die photophysikalischen Eigenschaften von **DCM** wie Quantenausbeute und Fluoreszenzlebensdauer werden stark von der Art des Lösungsmittels beeinflusst. In DMSO wird ein sehr großer Teil der aufgenommenen Energie des angeregten Farbstoffs über Fluoreszenz abgegeben, während in Chloroform offensichtlich strahlungslose Prozesse, z. B. die *E,Z*-Isomerisierung oder die strahlungslose $S_1 \rightarrow S_0$ Deaktivierung, dominieren. Die niedrige Fluoreszenzquantenausbeute in Chloroform (vergleiche auch Kapitel 5.4) könnte dann entweder durch die Konkurrenzreaktion der Isomerisierung hervorgerufen werden, oder dadurch, dass das entstandene *Z*-Isomer seinerseits nicht zur Fluoreszenz in der Lage ist. Letztere Vermutung wurde allerdings von MEYER et al. widerlegt, die nachwiesen, dass auch das *Z*-Isomer fluoresziert^[97]. Diese Feststellung stimmt mit folgenden Beobachtungen überein. Die dünnschichtchromatographische

Untersuchung von in Chloroform oder in Dichlormethan gelösten und von Raumlicht bestrahlten **DCM**-Derivaten zeigen immer zwei fluoreszierende Spezies. Eine davon kann isoliert und als *E*-Isomer identifiziert werden, während die nur in sehr geringen Mengen vorliegende zweite Substanz bislang nicht zweifelsfrei als *Z*-Isomer identifiziert werden konnte, da sich bei der Reinigung und Aufarbeitung in dem entsprechenden Lösungsmittel jeweils ein neues Gleichgewicht zwischen *E*- und *Z*-Isomer einstellt.

MEYER et al. zeigten, dass die Relaxation des **DCM** aus dem angeregten Zustand durch die Konkurrenz der Fluoreszenz und der strahlungslosen Prozesse wie $S_1 \rightarrow S_0$ Deaktivierung und *E,Z*-Isomerisierung kontrolliert wird. Intersystem Crossing zum Triplett-Zustand erweist sich als ineffizient.

Derartige Photoisomerisationen können mit unterschiedlichen Mechanismen beschrieben werden:

Die eingeschränkte Drehbarkeit eines Alkens um die C=C-Doppelbindung im Grundzustand ist auf die Überlappung der p-Orbitale, welche die π -Elektronen enthalten, zurückzuführen.

Die Anregung eines planaren Alkens erzeugt nach dem Franck-Condon-Prinzip zunächst ein planares elektronisch angeregtes Molekül. Diese planare $\pi\pi^*$ -Spezies relaxiert schnell durch die Rotation der Endgruppen um 90° um die zentrale Bindung. Sie nimmt dann die Konformation mit der geringsten Energie, ein biradikaloides Minimum, ein. In diesem Übergangszustand der Isomerisierung überlappen die beiden p-Orbitale nicht, die π -Bindung ist gebrochen. Die Rotation um die σ -Bindung und somit die *E,Z*-Umwandlung ist nun möglich.

Über das Zustands-Korrelationsdiagramm kann der *E,Z*-Isomerisierungsmechanismus als eine Anregung des *E*-Isomers gefolgt von einem nichtadiabatischen Kurvenkreuzungsprozess, bei dem eine Oberflächenkreuzung direkt zum *Z*- bzw. *E*-Isomer führt, beschrieben werden^[98]. Eine andere Theorie zieht die Bildung eines Übergangszustands aus dem angeregten *E*-Isomer in Betracht, gefolgt von einer Aufteilung zu den *E*- und *Z*-Grundzuständen^[99]. Ein derartiger Übergangszustand lässt sich als „twisted internal charge transfer (TICT) state“ interpretieren^[100]. Die Anwesenheit von Elektronendonoren und Akzeptoren an jeder Seite einer Doppelbindung eines unsymmetrischen Olefins mindert den Doppelbindungscharakter. So kann im angeregten ${}^1\pi\pi^*$ -Zustand ein zwitterionischer orthogonaler Zustand,

welcher durch stark polare Lösungsmittel stabilisiert wird, anstelle des diradikaloiden Zustands vorliegen. Diese Theorie des Vorliegens eines solchen TICT-Zustands stimmt gut mit der Beobachtung der starken Solvatochromie des Farbstoffs überein. Zudem sind über Doppelbindungen konjugierte Donor- und Akzeptorgruppen im Molekül vorhanden, die für Charge-Transfer-Eigenschaften sprechen. Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass die Geometrie des angeregten Moleküls verdrillt ist.

5 Optische Spektroskopie

5.1 Absorptionsspektroskopie

Die Absorptionsspektren der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten **DCM**-Derivate unterscheiden sich in Bandenform und Bandenlage kaum von dem Absorptionsspektrum des Laserfarbstoffs **DCM** (vergleiche die Abbildungen der UV/Vis-Spektren in Kapitel 1 und Kapitel 1). Die in der Problemstellung geforderte Bewahrung der spektroskopischen Eigenschaften des Farbstoffs nach Einfügen verschiedener funktioneller Gruppen ist, was die Absorbanz betrifft, somit erreicht.

Die Absorptionsspektren aller hier untersuchten **DCM**-Derivate zeigen eine starke positive Solvatochromie. Sie werden zusätzlich, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, durch das lösungsmittel- und lichtabhängige Auftreten eines *E,Z*-Isomerengleichgewichts der Farbstoffe beeinflusst. Um eine fälschliche Verringerung der Extinktionskoeffizienten bei der Messung der UV/Vis-Spektren der *E*-Isomere durch Bildung von *Z*-Isomeren zu verhindern, wurden alle Lösungen direkt vor der Messung frisch angesetzt und bis zur Messung im Dunkeln gelagert.

In den Absorptionsspektren der dargestellten **DCM**-Derivate können keinerlei Hinweise auf eine Aggregation der Farbstoffmoleküle gefunden werden.

5.2 Fluoreszenzspektroskopie

Im Folgenden werden die Einflüsse der unterschiedlichen funktionellen Gruppen der dargestellten **DCM**-Derivate auf das Fluoreszenzverhalten im Vergleich zum Laserfarbstoff **DCM** untersucht. Dazu werden die Fluoreszenzquantenausbeuten der dargestellten **DCM**-Derivate in unterschiedlich polaren Lösungsmitteln ermittelt und mit den Fluoreszenzquantenausbeuten des Laserfarbstoffs **DCM** verglichen. Des Weiteren wird die Solvatochromie und der Lösungsmiteleinfluss auf den Stokesshift der **DCM**-Derivate untersucht sowie für einige ausgewählte Derivate die Differenz des Dipolmoments des angeregten Zustands und des Grundzustands ermittelt.

5.3 Aufnahme und Korrektur der Fluoreszenzspektren

5.3.1 Apparatur:

Die Fluoreszenzspektren wurden auf einem Jasco FP-6200 Spektrofluorometer der AG von Dr. S. Kubik mit einer 90°-Anordnung von Anregungslichtquelle und Fluoreszenzdetektor aufgenommen. Als Software zur Ansteuerung des Geräts wurde der Jasco Spectra Manager Ver. 1.53J verwendet.

Alle Fluoreszenzspektren wurden mit folgenden Einstellungen aufgenommen:

Excitationsspalt: 5 nm

Emissionsspalt: 5 nm

Response: Auto

Aufnahmegeschwindigkeit: 250 nm/min

5.3.2 Probenvorbereitung

Die Probelösungen wurden zur Einstellen des *E,Z*-Isomerengleichgewichts vor der Messung über vier Stunden Raumlicht ausgesetzt.

5.3.3 Korrektur der Fluoreszenzspektren:

Die in DMSO und in Wasser aufgenommenen Emissionsspektren wurden durch Vergleich mit dem literaturbekannten korrigierten Emissionsspektrum von **DCM** in Acetonitril korrigiert^[101]. Da der Bereich der **DCM**-Fluoreszenz in Chloroform lediglich im Bereich geringer **DCM**-Fluoreszenz in Acetonitril und damit des Korrekturspektrums liegt, erfolgte hier die Korrektur des Emissionsspektrums über den Vergleich mit dem literaturbekannten korrigierten Emissionsspektrum von **DCM** in Chloroform^[102].

5.4 Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten

Die Lumineszenzquantenausbeute Φ ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass ein von einem Molekül absorbiertes Photon wieder als Lichtquant emittiert wird, sei es als Fluoreszenz (Φ_F) oder Phosphoreszenz (Φ_P).

Gleichung 2:

$$\Phi = \frac{\text{Zahl der emittierten Photonen}}{\text{Zahl der absorbierten Photonen}} = \Phi_F + \Phi_P$$

Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F lässt sich danach durch folgende kinetische Größen beschreiben:

Gleichung 3:

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC} + k_{ET} + k_{EZ}} = k_F \cdot \tau = \frac{I_F}{I_A}$$

mit:

k_F = Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz,

k_{IC} = Geschwindigkeitskonstante der Internal Conversion,

k_{ISC} = Geschwindigkeitskonstante des Intersystem Crossing,

k_{ET} = Geschwindigkeitskonstante des Energie-Transfers,

k_{EZ} = Geschwindigkeitskonstante der E.Z-Isomerisierung,

τ = Fluoreszenzlebensdauer,

I_F = Intensität der Fluoreszenz,

I_A = Intensität der Absorption.

Die Werte für die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F liegen demzufolge definitionsgemäß zwischen 0 und 1 und sind charakteristisch für ein Molekül in einer gegebenen Umgebung.

Zur Ermittlung der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F sind folgende Methoden prinzipiell geeignet:

Bei der Absolutbestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F werden die eingestrahlenen und die emittierten Photonen direkt gemessen. Diese Methode setzt jedoch sehr hohe Maßstäbe an experimentellen Aufwand und apparative Ausstattung des Labors^[103].

Die hier ermittelten Fluoreszenzquantenausbeuten wurden deshalb mittels der Methode der optisch verdünnten Lösungen über einen relativen Vergleich des Emissionsspektrums des zu untersuchenden Moleküls X mit dem eines Referenzmoleküls R, dessen absolute Quantenausbeute Φ_F literaturbekannt ist, bestimmt. Die zu untersuchenden Lösungen müssen dazu so verdünnt sein, dass ihre Fluoreszenz und Absorbanz in einem Bereich liegen, in dem die Linearität von Anregungslicht und Fluoreszenz für Fluorophore gegeben ist. Dies ist nur bis zu einer Absorbanz von 0.05 sichergestellt. Die Absorbanz ist dabei durch das Lambert-Beersche-Gesetz (Gleichung 4) definiert.

Gleichung 4:

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

A = Absorbanz,
I = Intensität des austretenden Lichtstrahls,
I₀ = Intensität des einfallenden Lichtstrahls,
ε = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient,
c = Konzentration der Probe (mol/l),
d = Schichtdicke (cm).

Die Fluoreszenzquantenausbeute lässt sich dann über folgende Formel (Gleichung 5) bestimmen:

Gleichung 5:

$$\Phi_X = \Phi_R \cdot \frac{F_X}{F_R} \cdot \frac{A_R(\lambda_R)}{A_X(\lambda_X)} \cdot \frac{n_X^2}{n_R^2} \cdot \frac{I(\lambda_R)}{I(\lambda_X)}$$

mit Index X für die zu untersuchende Substanz, Index R für die Referenzsubstanz,
Φ = Fluoreszenzquantenausbeute,
F = integrierte Fläche unter dem korrigierten Emissionsspektrums,
A(λ) = Absorbanz bei der Anregungswellenlänge λ,
n = Brechungsindex,
I(λ) = relative Intensität des Anregungslichts bei der Wellenlänge λ.

Voraussetzungen für die Gültigkeit dieser Formel sind die Annahmen, dass die integrierte Fluoreszenzintensität proportional dem Anteil an absorbiertem Licht ist, dass alle geometrischen Faktoren sowie Reflexionsverluste für Referenz und Probe identisch sind, Reabsorption und Reemission vernachlässigt werden können und dass das Licht, das die Küvette verlässt, isotrop ist^[103]. Diese Voraussetzung sind bei der verwendeten Versuchsanordnung erfüllt.

Zunächst werden von den stark verdünnten, bei Raumlicht über vier Stunden äquilibrierten Lösungen von Referenz und Probe ($c \approx 10^{-7}$ mol/l) Vis-Spektren im Bereich der Anregungswellenlängen aufgenommen und daraus die Absorbanz *A* bei der Anregungswellenlänge bestimmt. Die Fluoreszenzspektren werden gemessen und korrigiert. Nach Auftragung der korrigierten Fluoreszenzwerte gegen die Wellenzahl erfolgt die integrative Bestimmung von *F*. Da mit **DCM** eine Referenzsubstanz gewählt wird, die eine ähnliche Lage der Absorptionsbande wie die zu vermessenden Proben

hat, können Referenz und Probe bei jeweils gleichen Wellenlängen angeregt werden. Somit ist es möglich, die Intensitäten I des Anregungslichtes gleichzusetzen, so dass der Quotient der Intensitäten des Anregungslichts I_X und I_R als Korrekturterm entfällt. Bei der Messung der Fluoreszenzspektren von Referenz und Probe im selben Lösungsmittel kann zusätzlich der Korrekturterm der Quadrate der Brechungsindizes n_X und n_R gekürzt werden.

Die Farbstoffe werden bei vier verschiedenen Wellenlängen (430, 450, 470 und 490 nm) angeregt, um zu überprüfen, ob die Fluoreszenzquantenausbeute über einen größeren Anregungswellenlängenbereich konstant ist. Eine über einen breiten Anregungswellenlängenbereich konstante Fluoreszenzquantenausbeute ist Voraussetzung für eine universell einsetzbare Fluoreszenzreferenzsubstanz, mit der Quantenausbeuten von neuen Verbindungen bestimmt werden können.

5.4.1 Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F in DMSO

Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F der **DCM**-Derivate in DMSO bietet sich besonders an, da die Referenzsubstanz **DCM** in DMSO gelöst neben einer hohen Fluoreszenzquantenausbeute eine hohe Stabilität aufweist und auch in Form einer DMSO-Lösung als Laserfarbstoff technisch eingesetzt wird. Ein weiterer Vorteil ist, dass das Fluoreszenzverhalten und die Photochemie von **DCM** in diesem Lösungsmittel umfassend untersucht worden sind. So scheint der Anteil an *E,Z*-Photoisomerisierung als Konkurrenzreaktion zur Fluoreszenz nach Äquilibrierung der Lösung bei Tageslicht in DMSO im Gegensatz zu anderen Lösungsmitteln sehr gering zu sein. DRAKE et al. fand in einer belichteten DMSO-Lösung von **DCM** einen Anteil von 92 % *E*-Isomer und 8 % *Z*-Isomer^[104], während MEYER et al. wiederholt keinerlei Hinweise auf das Vorliegen von *Z*-Isomeren in DMSO ermitteln konnte^[105,42]. Bei den in dieser Arbeit dargestellten **DCM**-Derivaten konnten in DMSO über ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchungen keine Tendenzen zur Photoisomerisierung beobachtet werden (vergleiche Kapitel 1).

In Abbildung 58 sind für vier exemplarische **DCM**-Derivate die Absorptionsspektren mit Kennzeichnung der verschiedenen Anregungswellenlängen wiedergegeben. Man sieht deutlich, dass die Anregung bei 430 nm in einem Bereich geringer Absorbanz in der blauen Flanke der Bande erfolgt. Auch die Anregungen bei 450 und 470 nm erfolgen in der blauen Flanke, die Absorbanz ist jedoch deutlich größer. Die

Anregungen bei 470 und 490 nm liegen bei etwa gleicher Absorbanz um das Absorptionsmaximum herum, letztere Anregung folglich schon in der roten Flanke der Bande. Lediglich bei Verbindung **DCM-2**, deren Absorptionsspektrum aufgrund eines veränderten Chromophors um 18 nm bathochrom verschoben ist, liegen alle Anregungswellenlängen in der blauen Flanke.

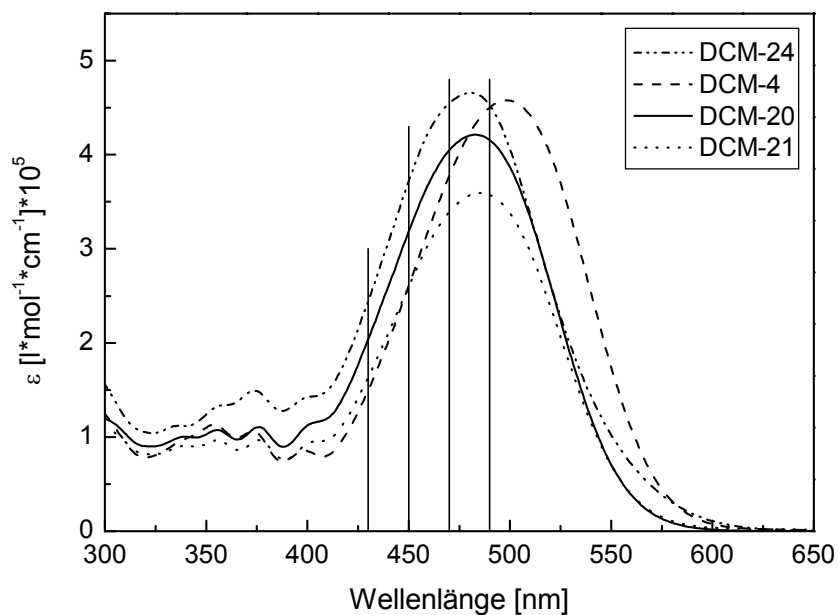


Abbildung 58: UV-Vis-Spektren der **DCM-Derivate** mit besonders hoher (**DCM-20**, **DCM-21**) und besonders niedriger Fluoreszenzquantenausbeute (**DCM-4**, **DCM-24**) in DMSO mit Kennzeichnung der Anregungswellenlängen (430, 450, 470 und 490 nm).

Die nach der Relativ-Methode ermittelten Quantenausbeuten sind mit den dazugehörigen Messwerten und dem Literaturwert für die Quantenausbeute der Referenzsubstanz in Tabelle 7 gelistet. In Abbildung 59 sind die untersuchten Substanzen mit ihren Strukturformeln abgebildet.

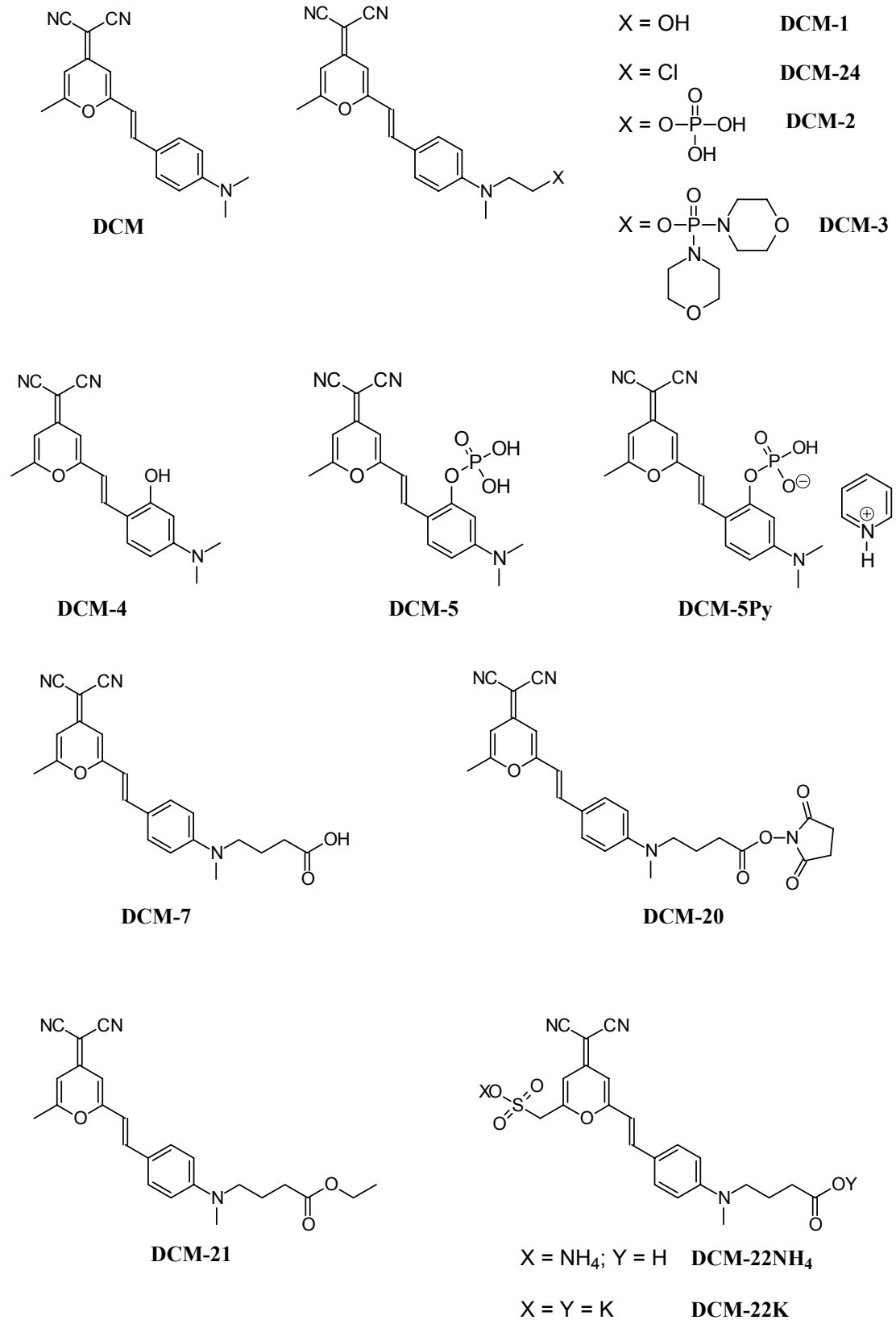


Abbildung 59: Übersicht der untersuchten Farbstoffe.

Verbindung	λ_{exc}	λ_{em}	F	A	Φ_F	$\bar{\Phi}_F$
	[nm]	[nm]				
DCM	430	500 - 800	33917	0.01754	0.78 ^[46]	
(Referenz)	450	500 - 800	55139	0.02629	0.78 ^[46]	
	470	500 - 800	74669	0.03223	0.78 ^[46]	
	490	500 - 800	76455	0.03227	0.78 ^[46]	
DCM-1	430	500 - 800	36320	0.01611	0.91	0.90
	450	500 - 800	63061	0.02577	0.91	± 0.01
	470	500 - 800	92170	0.03470	0.89	
	490	500 - 800	101675	0.03784	0.88	
DCM-2	430	500 - 800	32119	0.01400	0.92	0.89
	450	500 - 800	56407	0.02346	0.89	± 0.02
	470	500 - 800	84090	0.03236	0.87	
	490	500 - 800	94599	0.03585	0.87	
DCM-3	430	500 - 800	56078	0.04361	0.52	0.61
	450	500 - 800	90307	0.05445	0.62	± 0.04
	470	500 - 800	121780	0.06219	0.66	
	490	500 - 800	122233	0.06184	0.65	
DCM-4	430	500 - 800	29097	0.01471	0.80	0.69
	450	500 - 800	48885	0.02543	0.71	± 0.04
	470	500 - 800	70062	0.03644	0.65	
	490	500 - 800	79905	0.04331	0.61	
DCM-5	430	500 - 800	22526	0.01356	0.67	0.71
	450	500 - 800	41558	0.02179	0.71	± 0.02
	470	500 - 800	66104	0.03054	0.73	
	490	500 - 800	81012	0.03640	0.73	
DCM-5Py	430	500 - 800	25377	0.01296	0.79	0.81
	450	500 - 800	46552	0.02139	0.81	± 0.01
	470	500 - 800	73715	0.03077	0.81	
	490	500 - 800	89810	0.03653	0.81	

Verbindung	λ_{exc} [nm]	λ_{em} [nm]	F	A	Φ_{F}	$\bar{\Phi}_{\text{F}}$
DCM-7	430	500 - 800	66981	0.02589	1.04	0.96
	450	500 - 800	115324	0.04339	0.99	± 0.06
	470	500 - 800	168140	0.06074	0.93	
	490	500 - 800	185837	0.07008	0.87	
DCM-20	430	500 - 800	43934	0.01760	1.01	0.99
	450	500 - 800	74094	0.02775	0.99	± 0.01
	470	500 - 800	104634	0.03577	0.98	
	490	500 - 800	110868	0.03689	0.99	
DCM-21	430	500 - 800	43483	0.01714	1.02	1.00
	450	500 - 800	74638	0.02754	1.01	± 0.01
	470	500 - 800	107133	0.03597	1.00	
	490	500 - 800	115680	0.03803	1.00	
DCM-22K	430	500 - 800	38725	0.02104	0.74	0.81
	450	500 - 800	65256	0.02931	0.83	± 0.04
	470	500 - 800	94355	0.03771	0.84	
	490	500 - 800	103327	0.04102	0.83	
DCM-22NH₄	430	500 - 800	16674	0.01170	0.57	0.69
	450	500 - 800	28092	0.01520	0.69	± 0.07
	470	500 - 800	40257	0.01795	0.76	
	490	500 - 800	43663	0.01928	0.74	
DCM-24	430	500 - 800	58371	0.03303	0.71	0.67
	450	500 - 800	90126	0.04937	0.68	± 0.03
	470	500 - 800	114136	0.05858	0.65	
	490	500 - 800	108254	0.05533	0.64	

Tabelle 7: Fluoreszenzquantenausbeuten in DMSO. Referenz: **DCM** in DMSO mit $\Phi_{\text{F}} = 0.78^{[46]}$.

Die Quantenausbeuten der **DCM**-Derivate sind in DMSO wie die der Referenzsubstanz **DCM** sehr hoch, sie liegen alle zwischen 0.6 und 1.0. Zur Veranschaulichung sind die mittleren Fluoreszenzquantenausbeuten aller untersuchten **DCM**-Derivate in Abbildung 60 dargestellt. Die Standardabweichungen der über die vier Anregungswellenlängen

gemittelten Fluoreszenzquantenausbeuten liegen zwischen 1 und 7 % und damit im Rahmen der Messgenauigkeit in der Fluoreszenzspektroskopie, bei der eine Standardabweichung von 10 % angenommen wird^[106].

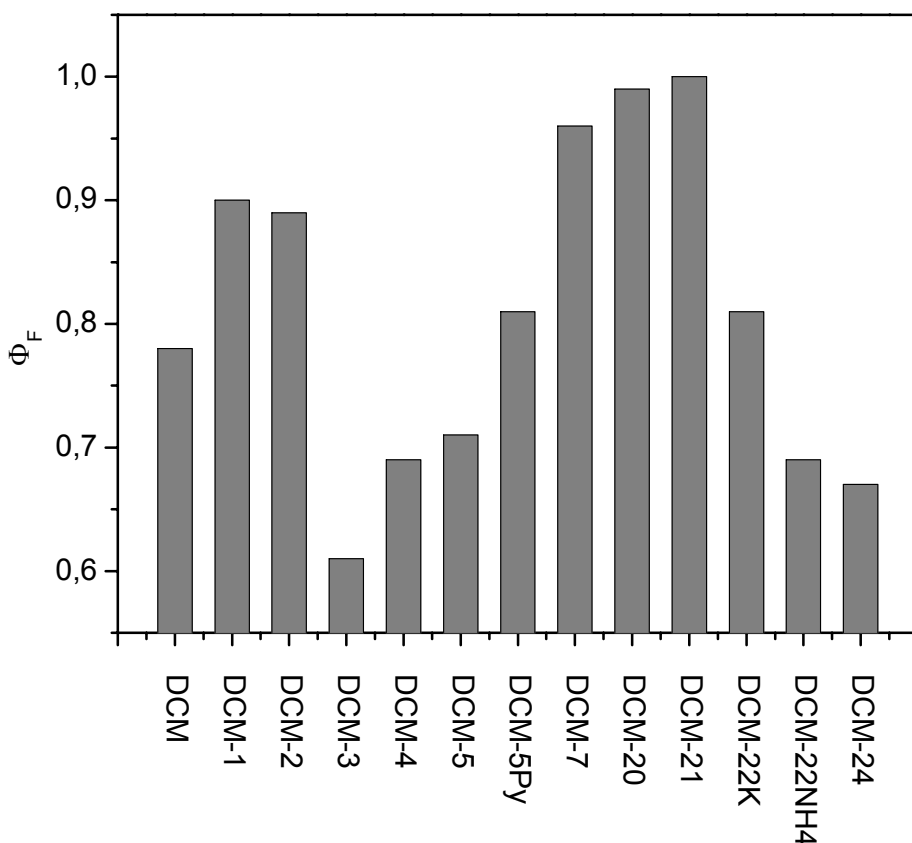


Abbildung 60: Mittlere Fluoreszenzquantenausbeuten in DMSO

Die Quantenausbeuten streuen größtenteils in den Bereich von $\Phi_F(\mathbf{DCM}) = 0.78 \pm 0.1$. Auffällig sind die sehr hohen Fluoreszenzquantenausbeuten von **DCM-7** ($\Phi_F = 0.96 \pm 0.06$), **DCM-20** ($\Phi_F = 0.99 \pm 0.01$) und **DCM-21** ($\Phi_F = 1.00 \pm 0.01$). Sie liegen 22 - 28 % über dem Wert für die Referenz **DCM** ($\Phi_F = 0.78$), d.h. selbst bei einem möglichen Fehler von 20 %^[106] sind diese Substanzen effizienter als **DCM**. Es handelt sich dabei um die Derivate, die an der Methylaminostyryl-Gruppe eine C₄-Kette mit einer Carbonsäurefunktion bzw. einer Estergruppe tragen. Offensichtlich ist in diesen Molekülen der Weg der strahlungslosen Deaktivierung gehindert. Abbildung 61 zeigt exemplarisch die korrigierten und auf die Absorbanz normierten Emissionsspektren von Verbindung **DCM-21**.

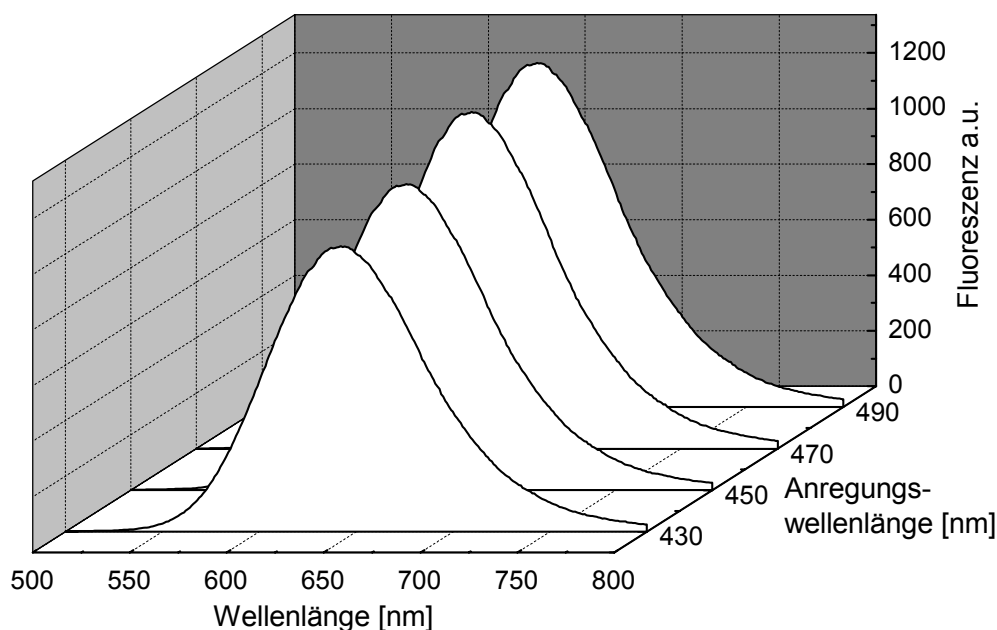


Abbildung 61: Korrigierte Emissionsspektren von **DCM-21** in DMSO bei konstanter Konzentration. Anregungswellenlängen: 430, 450, 470 und 490 nm. Die Spektren sind auf die Absorbanz der Probe bei der Anregungswellenlänge normiert.

Im Vergleich mit den anderen untersuchten **DCM**-Derivaten erscheinen die Werte für Φ_F von **DCM-3** ($\Phi_F = 0.61$) und **DCM-24** ($\Phi_F = 0.67$) sehr niedrig.

Die Derivate **DCM-24** und **DCM-1** unterscheiden sich nur durch einen Chlorethyl- bzw. Hydroxyethylrest an der Methylaminostyrylgruppe. Dennoch zeigen sie ein sehr unterschiedliches Fluoreszenzverhalten bei vergleichbarer Löslichkeit in DMSO. Während die Quantenausbeute von **DCM-1** bei 0.90 liegt, ist die von **DCM-24** ausgesprochen niedrig bei 0.67. Offensichtlich ist das relativ schwere Chloratom des Chlorethyl-Substituenten in der Lage, die Fluoreszenzemission in einem gewissen Maße zu quenchen, obwohl es sich nicht in direkter Nähe des Chromophors befindet.

Eine Substitution der Hydroxygruppe von **DCM-1** durch eine Dimorpholinamidophosphatgruppe in **DCM-3** senkt die Quantenausbeute noch stärker auf $\Phi_F = 0.61$. Das Kennzeichen dieser Gruppe ist einerseits das zentrale Phosphoratom und andererseits ihre ausgesprochene Sperrigkeit. Das Einführen eines einfachen Phosphatrests hat jedoch keinen Einfluss auf die Effizienz der Fluoreszenz, da der Phosphorsäureester **DCM-2** mit $\Phi_F = 0.89$ eine ähnlich hohe Fluoreszenzquantenausbeute aufweist wie der Alkohol **DCM-1**. Eine Fluoreszenzlöschung durch den Phosphatrest wie im ELF-97-Substrat tritt hier demnach nicht auf.

Die phenolische Verbindung **DCM-4** und der dazugehörige Phosphorsäureester **DCM-5** belegen diese Folgerung, denn sie zeigen ähnliche Quantenausbeuten ($\Phi_F(\mathbf{DCM-4}) = 0.69$; $\Phi_F(\mathbf{DCM-5}) = 0.71$), wobei jedoch bei **DCM-4** eine starke Anregungswellenlängenabhängigkeit zu beobachten ist. Die Quantenausbeute nimmt mit zunehmender Anregungswellenlänge ab, von $\Phi_F = 0.80$ bei 430 nm auf $\Phi_F = 0.61$ bei 490 nm. Eventuell liegt eine Verunreinigung vor, die in dem Bereich von 450 bis 490 nm absorbiert, aber keine Fluoreszenz zeigt. Denkbar wäre beispielsweise eine Zunahme der Phenolatkonzentration. Bei Messungen im „sauren“ Chloroform tritt dieses Phänomen nicht auf.

5.4.2 Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute in Chloroform

In Chloroform wurden die Fluoreszenzquantenausbeuten der **DCM**-Derivate mit einer Anregungswellenlänge von 430, 450, 470 und 490 nm bestimmt, als Referenzsubstanz diente **DCM** in Chloroform. Infolge der positiven Solvatochromie der **DCM**-Derivate sind die Absorptionsspektren zu kleineren Wellenlängen verschoben, so dass die Anregungen bei 430 und 450 nm in der blauen Flanke der Bande, die Anregung bei 470 nm nahe am Absorptionsmaximum und jene bei 490 nm deutlich in der roten Flanke der Bande liegen. In Abbildung 62 sind die UV/Vis-Spektren einiger exemplarischer **DCM**-Derivate in Chloroform abgebildet.

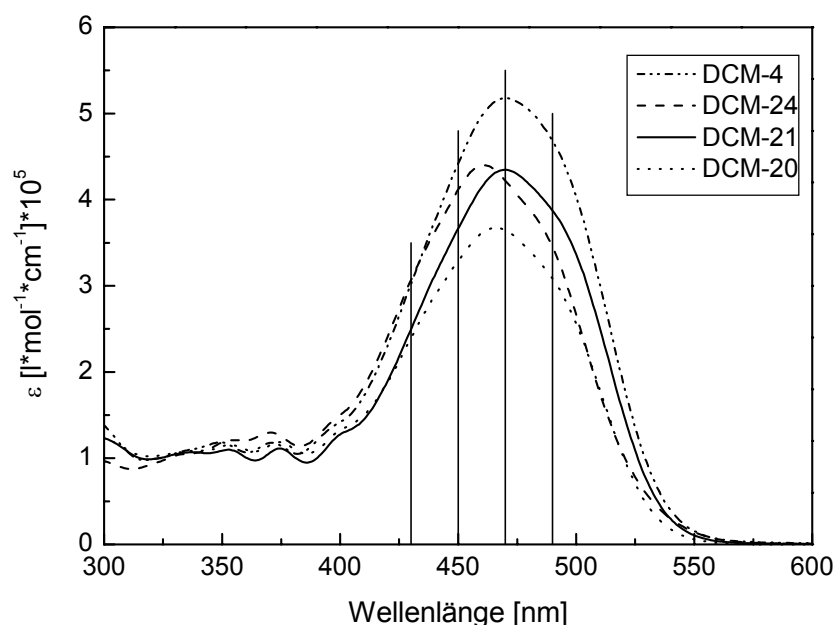


Abbildung 62: UV-Vis-Spektren der **DCM**-Derivate mit besonders hoher (**DCM-21**, **DCM-4**) und besonders niedriger Fluoreszenzquantenausbeute (**DCM-20**, **DCM-24**) in Chloroform mit Kennzeichnung der Anregungswellenlängen (430, 450, 470 und 490 nm).

Die nach der Relativ-Methode ermittelten Quantenausbeuten sind mit den dazugehörigen Messwerten und dem Literaturwert für die Quantenausbeute der Referenzsubstanz in Tabelle 8 gelistet.

Verbindung	λ_{exc} [nm]	λ_{em} [nm]	F	A	Φ_{F}	$\bar{\Phi}_{\text{F}}$
DCM (Referenz)	430	510 - 720	16731	0.02494	0.35 ^[107]	
	450	510 - 720	24983	0.03416	0.35 ^[107]	
	470	510 - 720	31025	0.03912	0.35 ^[107]	
	490	510 - 720	28119	0.03453	0.35 ^[107]	
DCM-1	430	510 - 720	32541	0.03750	0.31	0.32
	450	510 - 720	45479	0.04886	0.32	± 0.01
	470	510 - 720	52137	0.05071	0.33	
	490	510 - 720	45219	0.04614	0.32	
DCM-2	430	510 - 720	37283	0.03512	0.38	0.39
	450	510 - 720	55387	0.04857	0.39	± 0.01
	470	510 - 720	67732	0.05478	0.40	
	490	510 - 720	57420	0.04720	0.40	
DCM-3	430	510 - 720	13282	0.01504	0.32	0.32
	450	510 - 720	17672	0.01882	0.32	± 0.00
	470	510 - 720	19146	0.01894	0.32	
	490	510 - 720	15272	0.01522	0.33	
DCM-4	430	510 - 720	23911	0.02283	0.38	0.39
	450	510 - 720	37782	0.03159	0.41	± 0.02
	470	510 - 720	50270	0.03896	0.41	
	490	510 - 720	42238	0.03890	0.36	
DCM-5	430	510 - 720	7337	0.01256	0.21	0.24
	450	510 - 720	10025	0.01461	0.24	± 0.02
	470	510 - 720	12375	0.01502	0.26	
	490	510 - 720	9532	0.01352	0.23	
DCM-5Py	430	510 - 720	15252	0.02095	0.26	0.29
	450	510 - 720	21539	0.02575	0.29	± 0.02
	470	510 - 720	25216	0.02747	0.29	
	490	510 - 720	21491	0.02398	0.30	

Verbindung	λ_{exc} [nm]	λ_{em} [nm]	F	A	Φ_{F}	$\bar{\Phi}_{\text{F}}$
DCM-7	430	510 - 720	26831	0.02337	0.41	0.42
	450	510 - 720	40654	0.03460	0.41	± 0.01
	470	510 - 720	52560	0.03973	0.42	
	490	510 - 720	47574	0.03706	0.42	
DCM-20	430	510 - 720	3694	0.00799	0.17	0.21
	450	510 - 720	5341	0.00915	0.20	± 0.02
	470	510 - 720	6531	0.00962	0.22	
	490	510 - 720	5963	0.00853	0.23	
DCM-21	430	510 - 720	16731	0.01474	0.41	0.42
	450	510 - 720	24983	0.02044	0.42	± 0.01
	470	510 - 720	31025	0.02470	0.40	
	490	510 - 720	28119	0.02127	0.44	
DCM-22K	430	510 - 720	1094	0.01075	0.04	0.04
	450	510 - 720	1647	0.01243	0.05	± 0.01
	470	510 - 720	2067	0.01363	0.05	
	490	510 - 720	1284	0.01261	0.03	
DCM-22NH₄	430	510 - 720	2340	0.01310	0.06	0.08
	450	510 - 720	3575	0.01628	0.08	± 0.01
	470	510 - 720	4697	0.01716	0.09	
	490	510 - 720	4002	0.01606	0.08	
DCM-24	430	510 - 720	21005	0.03346	0.23	0.27
	450	510 - 720	30034	0.04043	0.26	± 0.03
	470	510 - 720	35453	0.04063	0.28	
	490	510 - 720	30680	0.03417	0.30	

Tabelle 8: Fluoreszenzquantenausbeuten in Chloroform. Als Referenz dient **DCM** in Chloroform mit $\Phi_{\text{F}} = 0.35$.^[107]

Die Fluoreszenzquantenausbeuten in Chloroform sind bei den **DCM**-Derivaten viel geringer als in DMSO, bei der Referenzsubstanz **DCM** sinken sie um mehr als die Hälfte von $\Phi_F = 0.78$ in DMSO auf $\Phi_F = 0.35$. Die ermittelten Quantenausbeuten der einzelnen Verbindungen liegen zwischen 0.2 und 0.4 mit Ausnahme der Quantenausbeuten der salzartigen Verbindungen **DCM-22K** und **DCM-22NH₄**, welche lediglich bei 0.04 bzw. 0.08 liegen (vergleiche Abbildung 63).

Die Viskosität von Chloroform ist deutlich geringer als die von DMSO, so dass strahlungslose Deaktivierung durch Molekülbewegungen begünstigt werden, was zu kleineren Fluoreszenzquantenausbeuten führt.

Die Standardabweichungen der über alle vier Anregungswellenlängen gemittelten Quantenausbeuten sind kleiner als bei der Messung in DMSO und liegen zwischen 0 und 3 %. Im Bereich von 430 bis 490 nm zeigen die vermessenen **DCM**-Derivate in Chloroform keine Wellenlängenabhängigkeit der Fluoreszenz.

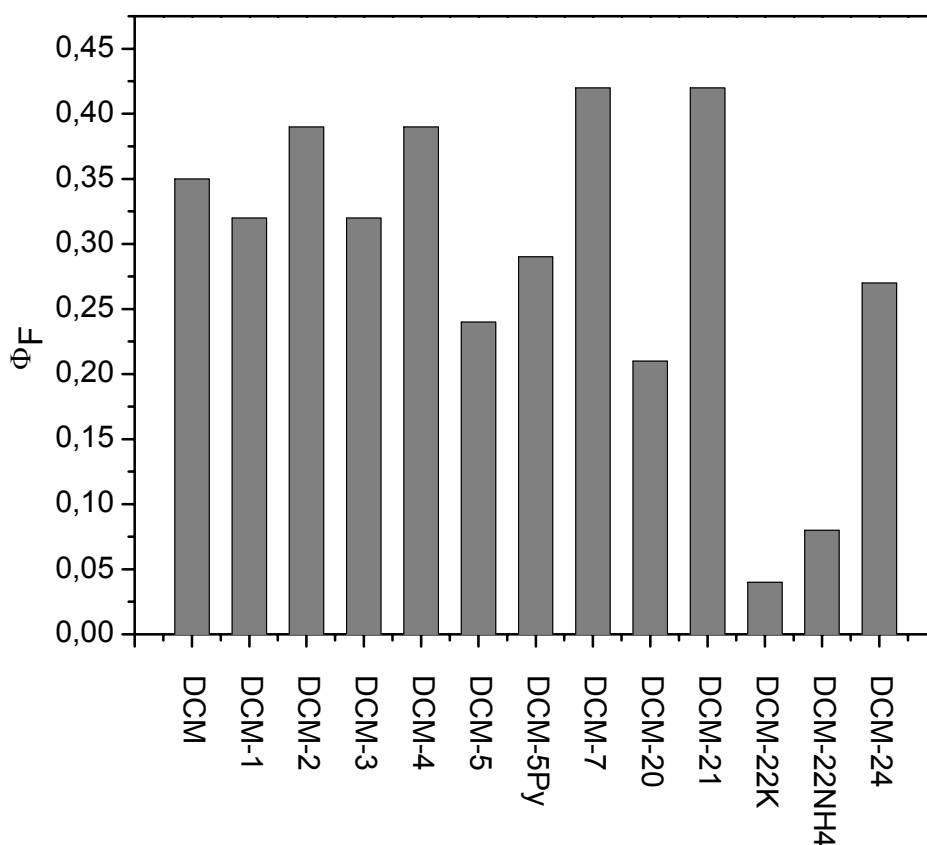


Abbildung 63: Mittlere Fluoreszenzquantenausbeuten in Chloroform.

Die Sulfonsäuresalze **DCM-22K** und **DCM-22NH₄** sind in Chloroform äußerst schlecht löslich. Es wurde mit optisch klaren Lösungen sehr geringer Konzentration gemessen, es läßt sich aber nicht ausschließen, dass die Salze dennoch nicht molekular dispers vorlagen. Aufgrund der geschlossenen Versuchsanordnung war es unmöglich, eventuell auftretende Tyndallstreuung zu beobachten.

Die **DCM**-Derivate **DCM-7** und **DCM-21**, die an der Methylaminostyryl-Gruppe eine C₄-Kette mit einer Carbonsäurefunktion bzw. einer Estergruppe tragen, zeigen, wie in DMSO, auch in Chloroform besonders hohe Fluoreszenzquantenausbeuten ($\Phi_F = 0.42$). Für den NHS-Ester **DCM-20**, der ebenfalls eine C₄-Kette an der Methylaminostyryl-Gruppe trägt und in DMSO eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute aufweist, wird in Chloroform eine Fluoreszenzquantenausbeute von $\Phi_F = 0.21$ bestimmt. Diese ist lediglich halb so groß ist wie die der strukturverwandten Verbindungen **DCM-7** und **DCM-21** und eine der niedrigsten aller untersuchten **DCM**-Derivate. Offensichtlich eröffnet der Succinimidylrest einen Kanal zur strahlungslosen Deaktivierung.

Das chlorierte **DCM**-Derivat **DCM-24** zeigt auch in Chloroform eine vergleichsweise kleine Fluoreszenzquantenausbeute $\Phi_F = 0.27$. Diese Beobachtung bekräftigt die Annahme des Vorliegens eines Schweratomeffekts durch das Chloratom.

5.4.3 Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_F in Wasser

Die wasserlöslichen **DCM**-Derivate wurden in einer Konzentration von ca. 10^{-7} mol/l in Wasser (Merck, LiChrosolv für die Spektroskopie) vermessen. Die Carbonsäure **DCM-7** wurde aufgrund der schlechten Löslichkeit bei pH-Werten < 7 in einer mit Natronlauge auf pH 8 eingestellten wässrigen Lösung vermessen. Die Proben wurden bei 430, 450, 470 und 490 nm angeregt. Abbildung 64 gibt einen Überblick über die Lage der Anregungswellenlängen in den UV/Vis-Spektren der vermessenen Substanzen.

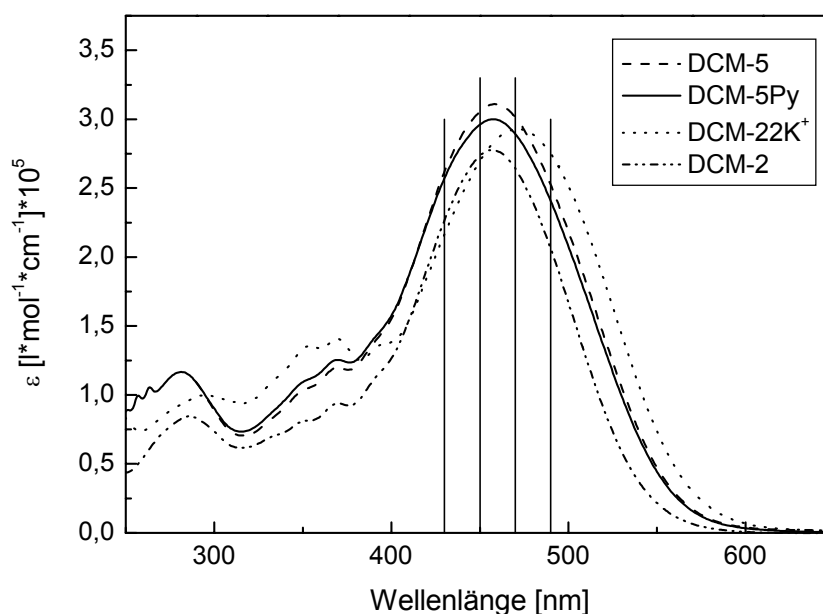


Abbildung 64: UV-Vis-Spektren der wasserlöslichen **DCM**-Derivate in Wasser mit Kennzeichnung der Anregungswellenlängen (430, 450, 470 und 490 nm).

Die Ergebnisse der Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten in Wasser sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

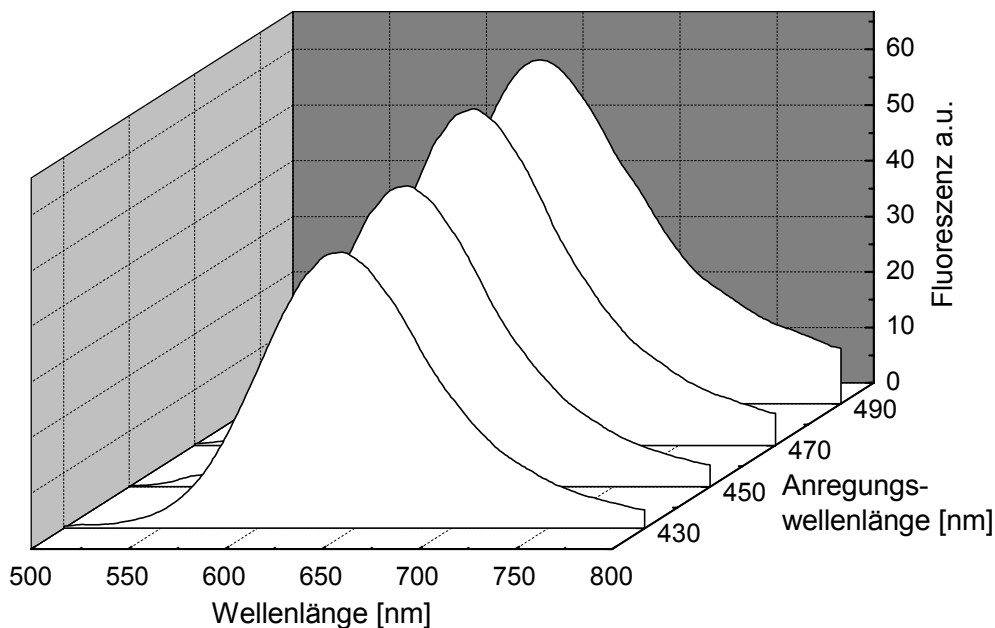
Verbindung	λ_{exc} [nm]	λ_{em} [nm]	F	A	Φ_{F}	$\bar{\Phi}_{\text{F}}$
DCM-2	430	500 - 800	15504	0.03545	0.14	0.13
	450	500 - 800	16014	0.04120	0.12	± 0.01
	470	500 - 800	17336	0.03994	0.12	
	490	500 - 800	14961	0.03146	0.13	
DCM-5	430	500 - 800	2860	0.02102	0.04	0.05
	450	500 - 800	3506	0.2366	0.04	± 0.01
	470	500 - 800	3897	0.02306	0.05	
	490	500 - 800	3697	0.01998	0.05	
DCM-5Py	430	500 - 800	6474	0.04169	0.05	0.05
	450	500 - 800	7879	0.04673	0.05	± 0.00
	470	500 - 800	8714	0.04472	0.05	
	490	500 - 800	7649	0.03641	0.06	
DCM-7 Natriumsalz	430	500 - 800	7584	0.04150	0.06	0.06
	450	500 - 800	10127	0.05105	0.06	± 0.00
	470	500 - 800	11802	0.05184	0.06	
	490	500 - 800	10530	0.04293	0.07	
DCM-22K	430	500 - 800	2797	0.04376	0.02	0.02
	450	500 - 800	3243	0.04904	0.02	± 0.00
	470	500 - 800	3558	0.04866	0.02	
	490	500 - 800	3241	0.04347	0.02	
DCM-22NH₄	430	500 - 800	1620	0.04460	0.01	0.02
	450	500 - 800	2294	0.04905	0.01	± 0.01
	470	500 - 800	2983	0.04093	0.02	
	490	500 - 800	3030	0.03551	0.02	

Tabelle 9: Fluoreszenzquantenausbeuten in Wasser. Als Referenz dient **DCM** in DMSO, Φ_{F} wurde bestimmt unter Verwendung des Brechungsindexkorrekturgliedes nach Gleichung 5 mit $n_{\text{D}}^{20}(\text{DMSO}) = 1.4783$ und $n_{\text{D}}^{20}(\text{Wasser}) = 1.3330$.

In Wasser ist bei allen darin untersuchten **DCM**-Derivaten eine sehr breite Fluoreszenzbande zu beobachten, die stark bathochrom in den Bereich von 550 bis über 800 nm verschoben ist. Die Emissionsspektren konnten aus apparativen Gründen jedoch nur bis zu einer Wellenlänge von 800 nm gemessen werden, die Spektren wurden sozusagen „abgeschnitten“.

Oberhalb von 700 nm ließ außerdem die Empfindlichkeit des verwendeten Detektors stark nach, was sich durch einen „Knick“ im unkorrigierten Spektrum bemerkbar machte. Dieser Wellenlängenbereich liegt im Bereich geringer **DCM**-Fluoreszenz des Korrekturspektrums. Daher ist nicht sichergestellt, dass der abnehmenden Spektrometerempfindlichkeit über die Korrektur des Spektrums genügend Rechnung getragen wurde.

Die tatsächlichen Fluoreszenzquantenausbeuten sind aus diesen Gründen größer als die hier gemessenen. Abbildung 65 zeigt zur Verdeutlichung der oben genannten Problematik die Emissionsspektren bei den verschiedenen Anregungswellenlängen von **DCM-5** in Wasser.



*Abbildung 65: Korrigierte Emissionsspektren von **DCM-5** in Wasser bei konstanter Konzentration. Anregungswellenlängen: 430, 450, 470 und 490 nm. Die Spektren sind auf die Absorbanz der Probe bei der Anregungswellenlänge normiert.*

Die in Wasser bestimmten Fluoreszenzquantenausbeuten Φ_F der wasserlöslichen **DCM**-Derivate liegen zwischen 0.13 und 0.02 und somit erheblich niedriger als die in DMSO

bzw. Chloroform ermittelten Fluoreszenzquantenausbeuten. Diese teilweise extrem kleinen Werte können nicht alleine durch die oben angegebenen Probleme bei der Messung und Auswertung erklärt werden. Wasser wirkt hier als Fluoreszenzlöcher.

Die Standardabweichungen der über die vier Anregungswellenängen gemittelten Fluoreszenzquantenausbeuten liegen zwischen 0 und 1 %. Die Quantenausbeute ist im Bereich von 430 bis 490 nm wellenlängenunabhängig.

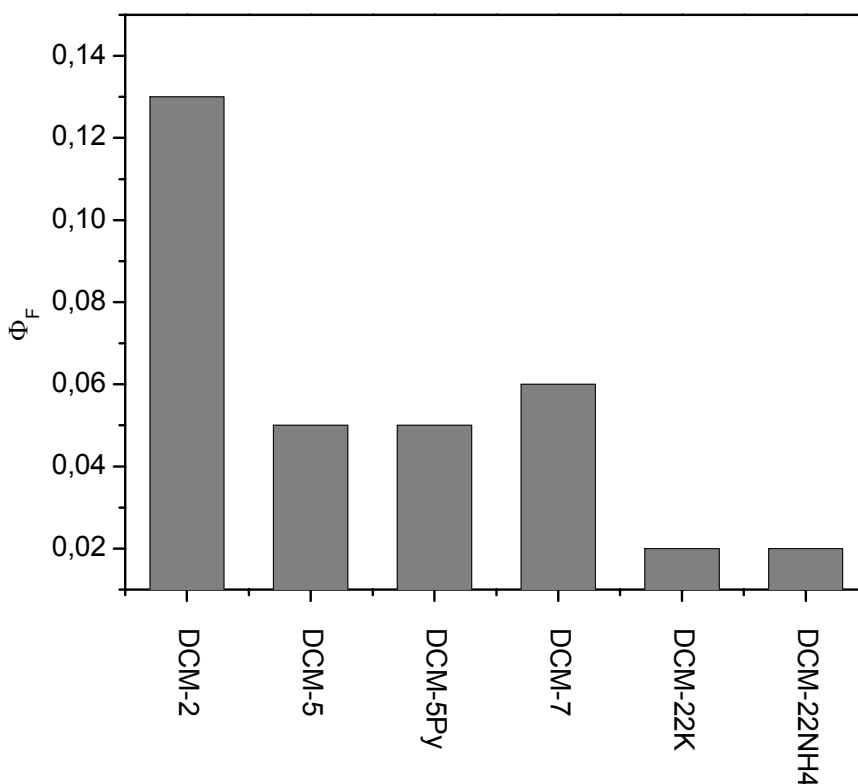


Abbildung 66: Mittlere Fluoreszenzquantenausbeuten in Wasser.

Während der Phosphorsäureester **DCM-2** mit $\Phi_F = 0.13$ noch eine vergleichsweise hohe Fluoreszenzquantenausbeute aufweist, fällt diese bei der Carbonsäure **DCM-7** und dem phenolischen Phosphorsäureester **DCM-5** auf $\Phi_F = 0.05$ ab. Die **DCM**-Derivate, die an der Methylgruppe des Pyranrings eine Sulfonsäuregruppe tragen, zeigen unabhängig von der Art des Gegenions nur noch eine Fluoreszenzquantenausbeute von $\Phi_F = 0.02$.

5.5 Untersuchung der Solvatochromie und des Stokesshift in verschiedenen Lösungsmitteln

Der Stokesshift ist die Wellenlängendifferenz zwischen dem Absorptions- und dem Emissionsmaximum. Er ist charakteristisch für das jeweilige Molekül. In der folgenden Tabelle 10 ist die Lage der Absorptions- und Emissionsmaxima sowie die Größe des Stokesshift für die untersuchten Substanzen in den Lösungsmitteln DMSO und Chloroform, für die wasserlöslichen Substanzen auch in Wasser, angegeben.

Substanz	Lösungsmittel	λ_{exc}	λ_{em}	Stokesshift	Stokesshift
		[nm] ± 5	[nm] ± 5	$(\lambda_{em} - \lambda_{exc})$ [nm]	$(\tilde{\nu}_{Exc} - \tilde{\nu}_{Em})$ [cm ⁻¹]
DCM	DMSO	480	646	166	5350
	Chloroform	470	575	105	3890
DCM-1	DMSO	488	648	160	5060
	Chloroform	458	571	113	4320
DCM-2	DMSO	483	648	165	5270
	Chloroform	467	570	103	3870
	Wasser	456	646	190	6450
DCM-3	DMSO	479	634	155	5100
	Chloroform	460	560	100	3880
DCM-4	DMSO	498	634	136	4310
	Chloroform	471	572	101	3750
DCM-5	DMSO	482	642	160	5170
	Chloroform	460	571	111	4230
	Wasser	458	646	188	6350
DCM-5Py	DMSO	478	644	166	5390
	Chloroform	467	570	103	3870
	Wasser	457	644	187	6350
DCM-7	DMSO	486	644	158	5050
	Chloroform	467	571	104	3900
	Wasser	461	652	191	6350

Substanz	Lösungsmittel	λ_{exc}	λ_{em}	Stokesshift	Stokesshift
		[nm]	[nm]	$(\lambda_{\text{em}} - \lambda_{\text{exc}})$	$(\tilde{\nu}_{\text{Exc}} - \tilde{\nu}_{\text{Em}})$
		± 5	± 5	[nm]	[cm ⁻¹]
DCM-20	DMSO	482	642	160	5170
	Chloroform	466	567	101	3820
DCM-21	DMSO	485	642	157	5040
	Chloroform	470	568	98	3670
DCM-22K	DMSO	484	642	158	5080
	Chloroform	471	580	109	3990
	Wasser	471	670	199	6310
DCM-22NH₄	DMSO	483	642	159	5130
	Chloroform	470	580	110	4040
	Wasser	471	670	199	6310
DCM-24	DMSO	480	633	153	5040
	Chloroform	461	580	119	4450

Tabelle 10: Absorptions- und Emissionsmaxima sowie Stokesshift.

In Abbildung 67 sind die Größen des jeweiligen Stokesshifts der einzelnen Verbindungen in DMSO, Chloroform und Wasser dargestellt.

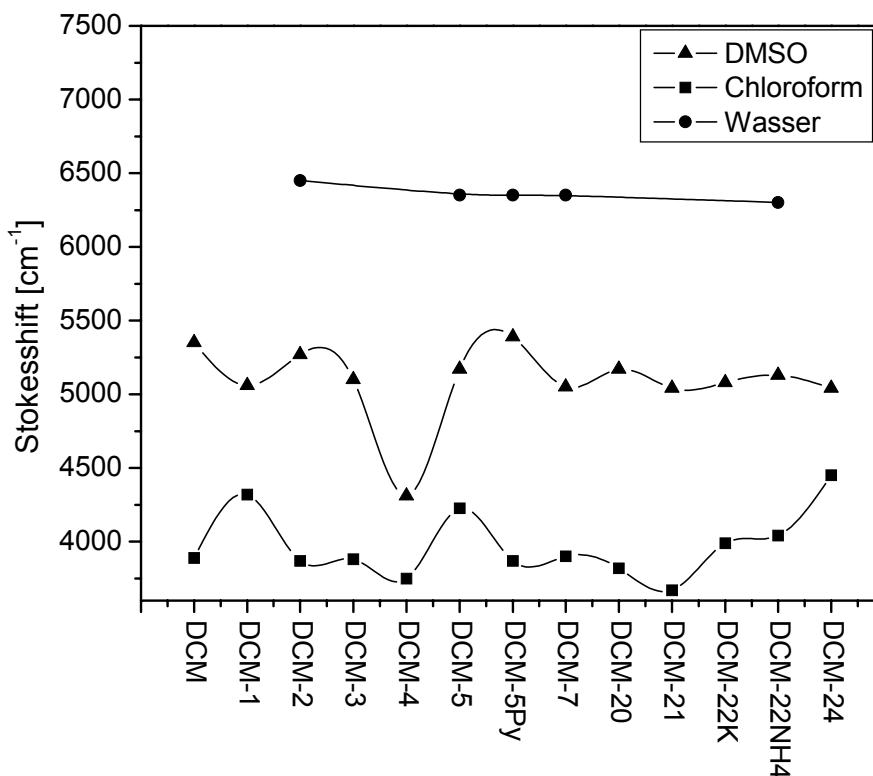


Abbildung 67: Stokes shift der DCM-Derivate in DMSO, Chloroform und Wasser.

Die **DCM**-Derivate zeigen die für schwach polare Merocyanine, z. B. den Brooker Merocyaninen VI und VII, typische positive Solvatochromie^[108]. Mit steigender Polarität des Lösungsmittels nimmt die Wellenlänge des Absorptions- bzw. Emissionsmaximums zu, mit Ausnahme der Absorption in Wasser, die einen leichten hypsochromen Trend aufweist. Gleichzeitig vergrößert sich der Stokes shift, wie in Abbildung 67 deutlich zu erkennen ist.

Zur Veranschaulichung des Lösungsmiteleinflusses auf die Lage der Emissionsmaxima sowie auf die Quantenausbeute sind die Emissionsspektren von **DCM-2** in Wasser, Chloroform und DMSO in Abbildung 68 dargestellt.

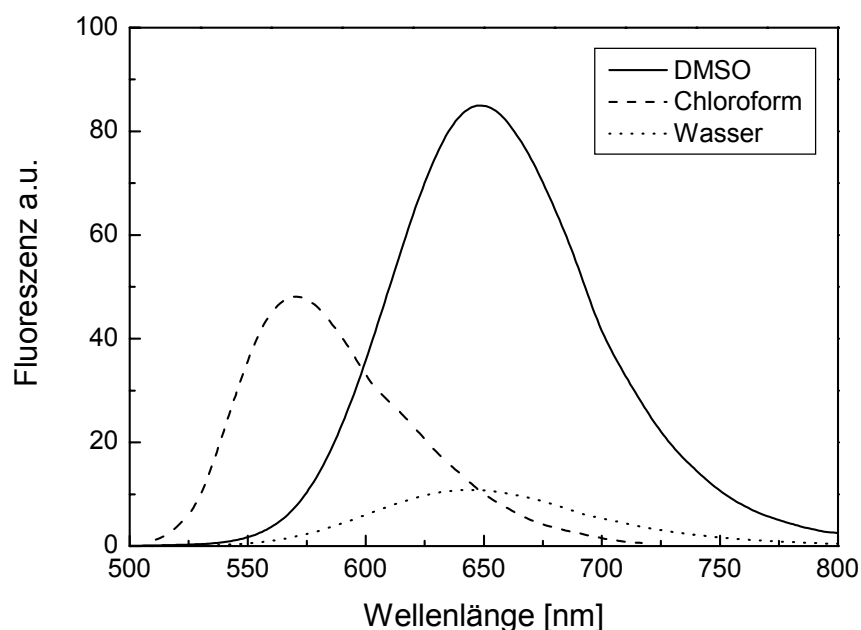


Abbildung 68: Korrigierte und auf die Fluoreszenzquantenausbeuten normierte Fluoreszenzspektren von **DCM-2** in Wasser, Chloroform und DMSO. Anregungswellenlänge 470 nm.

In Wasser haben die **DCM**-Derivate einen mittleren Stokesshift von etwa 6350 cm^{-1} , die Abweichungen sind sehr gering. Der Stokesshift ist in Wasser unabhängig von Art und Ort der hydrophilen Gruppe (Carbonsäure, Phosphorsäureester oder Sulfonsäureester). Der phenolische Phosphorsäureester **DCM-5** zeigt trotz des veränderten Chromophors die gleiche Stokesverschiebung wie die anderen wasserlöslichen **DCM**-Derivate.

In DMSO liegt der mittlere Stokesshift bei etwa 5150 cm^{-1} , und damit deutlich kurzwelliger als in Wasser. Lediglich der phenolische Farbstoff **DCM-4** weist einen sichtlich kleineren Stokesshift auf. Hier macht sich der veränderte Chromophor bemerkbar: Die phenolischen **DCM**-Derivate **DCM-4** und **DCM-5** bzw. **DCM-5Py** tragen im Styrylring in ortho-Position eine zusätzliche phenolische Hydroxygruppe.

Das Absorptionsspektrum von **DCM-4** in DMSO ist im Vergleich zu dem von **DCM** um ca. 18 nm (750 cm^{-1}) bathochrom verschoben, die Lösung hat im Gegensatz zur orangeroten Lösung von **DCM** einen auffallend dunkleren roten Farbton ohne Gelbstich.

In Abbildung 69 sind zum Vergleich die UV/Vis-Spektren von **DCM** und **DCM-4** in Chloroform und DMSO abgebildet.

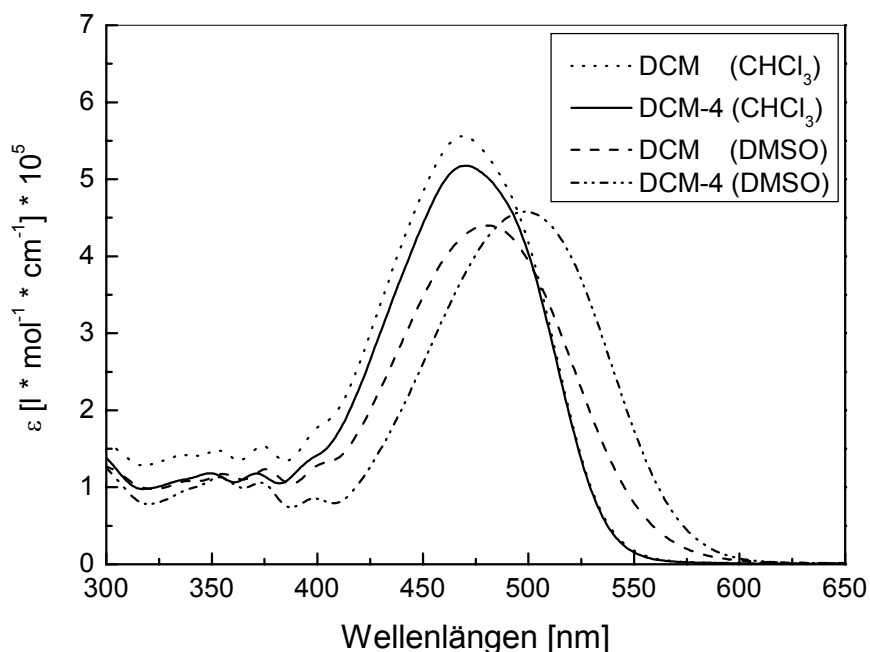


Abbildung 69: UV/Vis-Spektren von **DCM** und **DCM-4** in Chloroform und DMSO.

Die Abwandlung des Chromophors macht sich nur in den UV/Vis-Spektren des freien Phenols **DCM-4** in DMSO bemerkbar. In Chloroform und nach Phosphorylierung zu **DCM-5** bzw. **DCM-5Py** ist in den UV/Vis-Spektren kein Unterschied zu **DCM** zu erkennen. Die Absorptionsmaxima der UV/Vis-Spektren von **DCM-4**, **DCM-5** und **DCM-5Py** liegen in Chloroform bei etwa 470 nm, die Emissionsmaxima entsprechend zwischen 575 und 579 nm und damit im Bereich der Absorption und Emission von **DCM**.

Die zusätzliche Hydroxygruppe im Chromophor von **DCM-4** hat nur Auswirkungen auf die Absorptions- und Emissionsspektren in DMSO. Sie verursacht dort eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums und gleichzeitig eine hypsochrome Verschiebung des Emissionsmaximums, wodurch ein geringerer Stokesshift resultiert.

Eine Erklärung für die bathochrome Verschiebung des Absorptionsspektrums besteht darin, dass die phenolische Hydroxygruppe in DMSO aufgrund ihrer Acidität teilweise deprotoniert vorliegen kann, wodurch sie zu einem zusätzlichen starken Donor für das Merocyanin wird. Im sauren Chloroform wird diese Gruppe als Hydroxygruppe

vorliegen. Diese ist jedoch, wie auch der Phosphatrest in **DCM-5** und **DCM-5Py**, ein viel schwächerer Donor. Damit ist der Einfluss dieser Hydroxygruppe auf die spektralen Eigenschaften der Verbindung in Chloroform oder nach Phosphorylierung wie beobachtet nur sehr klein.

In Chloroform ist der Stokesshift mit durchschnittlich 3970 cm^{-1} deutlich kleiner als in DMSO oder in Wasser. Die Verbindungen **DCM-1**, **DCM-5** und **DCM-24** zeigen in Chloroform auffallend große Stokesverschiebungen. Es ist allerdings kein einheitlicher Trend festzustellen: Bei dem Alkohol **DCM-1** und dem Phosphorsäureester **DCM-5** resultiert der größere Stokesshift aus dem in Vergleich zu **DCM** leicht hypsochrom verschobenen Absorptionsspektrum. Das strukturverwandte Chlorid **DCM-24** zeigt zusätzlich ein bathochrom verschobenes Emissionsspektrum.

In Abbildung 70 sind die Emissionsspektren von **DCM-5** in den verschiedenen Lösungsmitteln unter Beachtung der Quantenausbeute dargestellt.

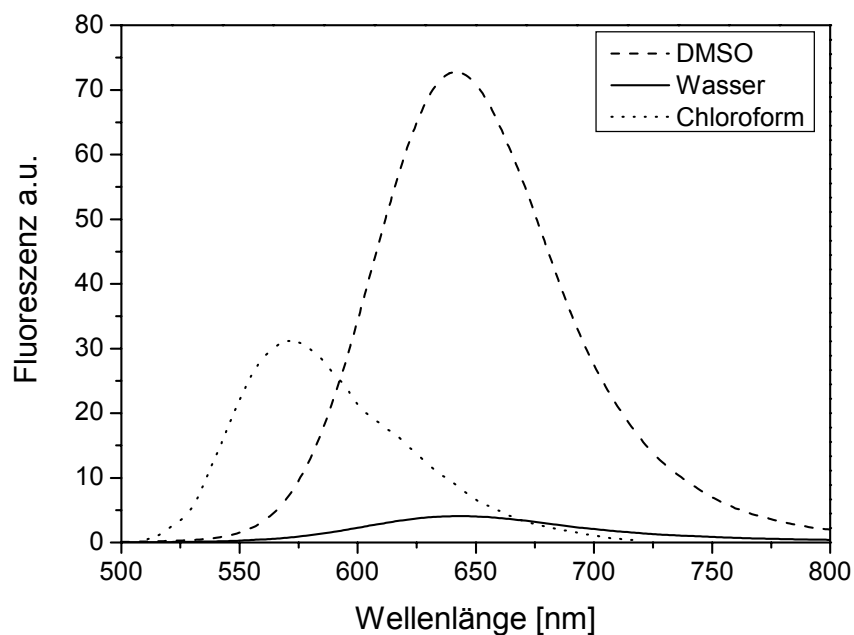


Abbildung 70: Korrigierte und auf die Fluoreszenzquantenausbeuten normierte Fluoreszenzspektren von **DCM-5** in Wasser, Chloroform und DMSO. Anregungswellenlänge 470 nm.

5.6 Diskussion der Ergebnisse

Der Laserfarbstoff **DCM** gehört zu den Neutrocyaninen und im weiteren Sinn zu den Merocyaninen. Der Donor, die aromatische Dimethylaminogruppe, ist über ein recht rigides konjugiertes π -System mit dem Akzeptor, der Dicyanomethylengruppe, verbunden. Neben einer ausgeprägten, bei wenig polaren Merocyaninen zu erwartenden, positiven Solvatochromie^[108] zeigt **DCM** bei einer hohen Fluoreszenzquantenausbeute einen außerordentlich großen Stokesshift und eine bemerkenswert geringe Überlappung zwischen dem Absorptions- und dem Emissionsspektrum. Trotz der Planarität des Moleküls können keine Aggregationseffekte beobachtet werden, da Absorptions- und Emissionsspektren konzentrationsunabhängig sind^[109,110].

Der starke Einfluss des Donors auf das Absorptions- und Fluoreszenzverhalten und den Farbeindruck der Verbindung wurde von BOURSON und VALEUR gezeigt, die die aromatische Aminogruppe in einen Makrocyclus (Monoaza-15-Krone-5) integrierten. Der so erhaltene Fluoroionophor zeigt nahezu identische photophysikalische Eigenschaften wie **DCM**, jedoch weisen die Absorptionsspektren nach Komplexierung des Kronenethers mit Erdalkalitionen einen starken hypsochromen Shift bei gleichzeitiger Hypochromie auf, und auch die Fluoreszenzquantenausbeute wird deutlich verringert^[46].

Bei allen untersuchten **DCM**-Derivaten wird ein großer Stokesshift und eine geringe Überlappung von Absorptions- und Emissionsspektrum sowie positive Solvatochromie beobachtet, wie in Abbildung 71 exemplarisch an **DCM-21** verdeutlicht wird.

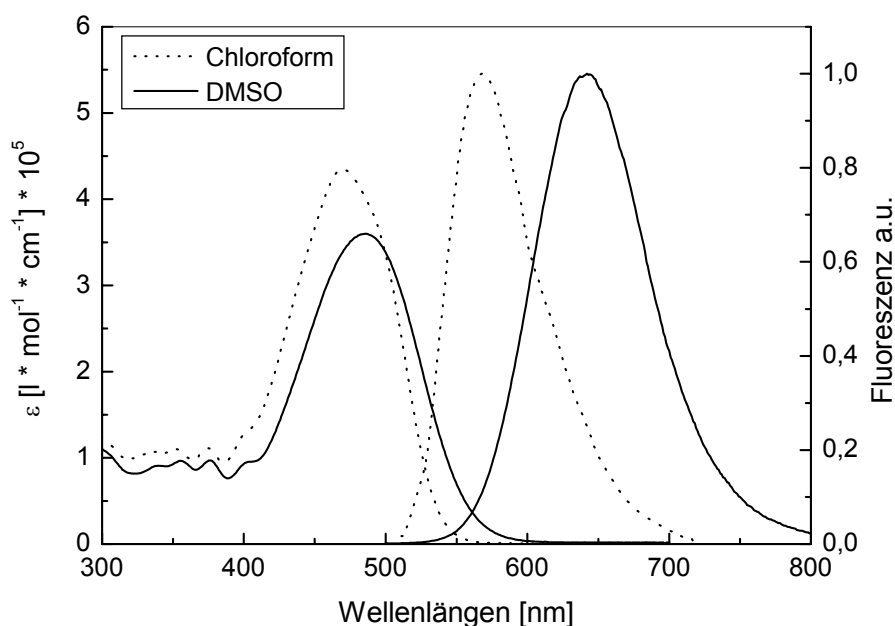


Abbildung 71: Absorptions- und korrigierte Fluoreszenzspektren von **DCM-21** in **DMSO** und **Chloroform** zur Veranschaulichung des Stokesshift. Die Fluoreszenzspektren wurden bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm aufgenommen und auf 1 normiert.

Die Absorptions- und Emissionsspektren der untersuchten **DCM**-Derivate unterscheiden sich in Bandenform und Lage im Vergleich zu denen von **DCM** nur wenig. Damit ist die Forderung aus der Problemstellung erfüllt, die spektroskopischen Eigenschaften des **DCM**-Chromophors durch das Einfügen funktioneller Gruppen nicht zu verändern. Die zu beobachtenden Unterschiede sind hauptsächlich auf eine veränderte Löslichkeit und damit auf eine differierende Solvatisierbarkeit der unterschiedlich funktionalisierten **DCM**-Derivate zurückzuführen. So ist z. B. der Phosphorsäureester **DCM-2** im Gegensatz zu **DCM** wasserlöslich und sehr schwerlöslich in Chloroform.

Die Fluoreszenzquantenausbeuten von **DCM** und den hier untersuchten **DCM**-Derivaten ist in **DMSO** deutlich größer als in Chloroform. In **DMSO** lassen sich generell sehr hohe Fluoreszenzquantenausbeuten bestimmen, da die Viskosität des Lösungsmittels im Gegensatz zu der von Chloroform sehr viel höher ist und dadurch Deaktivierung durch Molekülbewegungen erschwert. In Chloroform ist auch eine Schweratom-induzierte äußere Fluoreszenzlöschung durch das chlorierte Lösungsmittel denkbar^[111].

Bei den untersuchten **DCM**-Derivaten tritt in Chloroform *E,Z*-Isomerisierung auf. Die *E,Z*-Isomerisierung beeinflusst zwar die Höhe der gemessenen Fluoreszenzquantenausbeute in Chloroform, mit ihr kann jedoch nicht der große Unterschied der Quantenausbeuten in DMSO und Chloroform erklärt werden.

Da die Proben vor der Messung der Fluoreszenzspektren zur Äquilibration bei Tageslicht aufbewahrt wurden, befand sich das System zum Zeitpunkt der Messung im Gleichgewicht. Das *Z*-Isomer hat ein vom *E*-Isomer deutlich verschiedenes Absorptionsspektrum^[104]. In die Berechnung der Fluoreszenzquantenausbeuten fließt die gemessene Absorbanz bei der jeweiligen Anregungswellenlänge mit ein, in diesem Fall bei 430, 450, 470 und 490 nm. In diesem Bereich zeigt das Absorptionsspektrum des *Z*-Isomers jedoch nur geringe Absorbanz, während der Extinktionskoeffizient des *E*-Isomers gerade im Bereich von 450 und 470 nm besonders hoch ist. Daher sollte eine „Verunreinigung“ der Probe durch das *Z*-Isomer bei den Fluoreszenzquantenausbeuten dieser Anregungswellenlängen weniger ins Gewicht fallen als bei den Anregungswellenlängen 430 und 490 nm. D. h. es wird in jedem Fall eine zu niedrige Fluoreszenzquantenausbeute bestimmt, wobei jedoch für die Anregungswellenlängen 450 und 470 nm eine höhere Fluoreszenzquantenausbeute bestimmt wird als für 430 und 490 nm. Voraussetzung dafür ist die Annahme, dass das *Z*-Isomer aufgrund der Verdrillung des Aromaten und des Pyranrings eine bedeutend kleinere Fluoreszenzquantenausbeute hat als das planare *E*-Isomer. Die Standardabweichungen der mittleren Fluoreszenzquantenausbeute der untersuchten **DCM**-Derivate liegen in Chloroform jedoch zwischen ± 0.00 und ± 0.03 und die bei den einzelnen Anregungswellenlängen bestimmten Messwerte weichen kaum voneinander ab. Daher wirkt sich das *E,Z*-Isomerenverhältnis offenbar nicht in der oben geschilderten Weise auf die Ergebnisse der Messung aus. Ein Grund dafür könnte sein, dass auch das *Z*-Isomer fluoresziert (vergleiche Kapitel 4.4).

Da bei der Relativmethode zur Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten die Absorbanz der Referenz bei der jeweiligen Anregungswellenlänge durch die Absorbanz der Probe dividiert wird, besteht zudem die Möglichkeit, dass der Anteil der Absorbanz des *Z*-Isomers herausgekürzt wird. Auch die Lösungen der Referenzsubstanz wurden vor der Messung bei Raumlicht äquilibriert und enthielten somit einen ähnlich hohen Anteil an *Z*-Isomer wie die Probe.

In Wasser sinkt die Fluoreszenzquantenausbeute aller wasserlöslichen Derivate stark ab auf Werte zwischen 0.02 und 0.12. Die Schwingungsniveaus der Wassermoleküle liegen weit auseinander und können deshalb die großen Quanten der elektronischen Übergänge übernehmen und so die Fluoreszenz löschen^[112]. Die Emissionsspektren sind sehr breit, unstrukturiert und stark bathochrom verschoben, was auf eine ausgeprägte Polarisierbarkeit der Moleküle hindeutet. Die leicht hypsochrom verschobenen Absorptionsspektren werden durch eine Stabilisierung des Grundzustands z. B. durch Wasserstoffbrücken hervorgerufen. Der resultierende Stokesshift der wasserlöslichen Derivate ist dementsprechend extrem groß.

5.6.1 Fluoreszenz der an der Aminofunktion modifizierten DCM-Derivate

Einen Überblick über alle gemessenen Fluoreszenzquantenausbeuten gibt Abbildung 72.

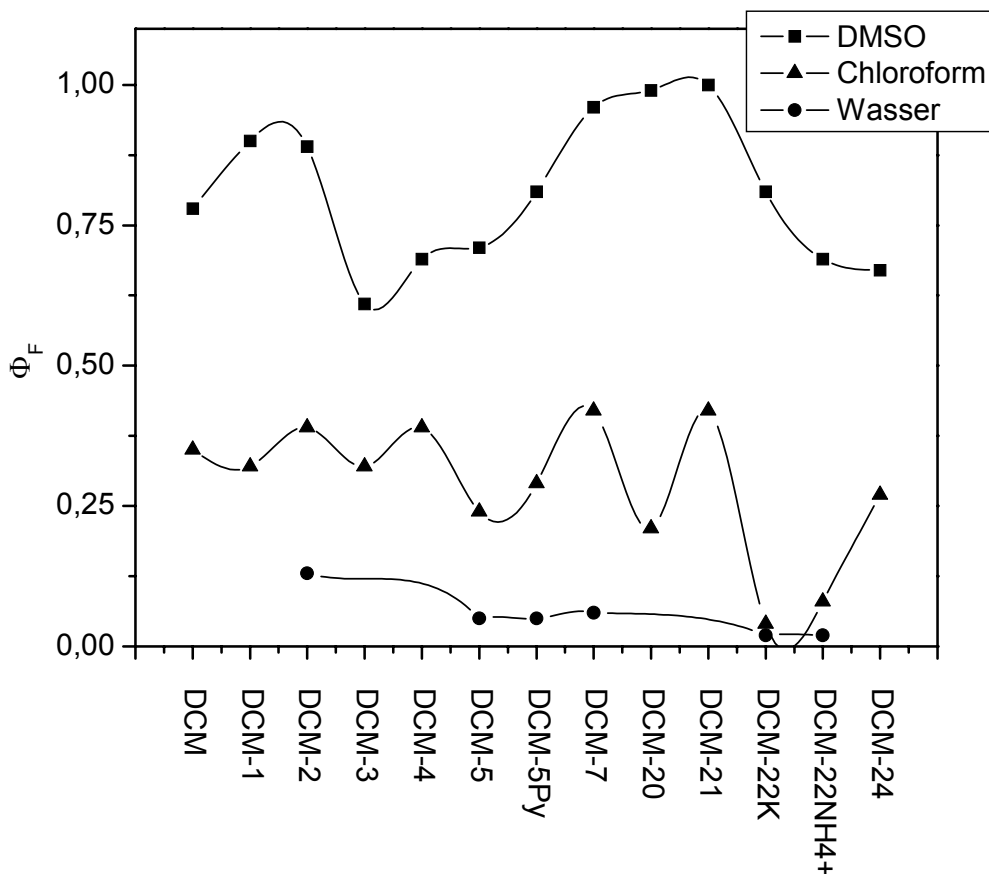


Abbildung 72: Übersicht über alle mittleren Fluoreszenzquantenausbeuten in DMSO, Chloroform und Wasser.

Die Derivate **DCM-1** und **DCM-24**, welche sich lediglich durch eine Hydroxy- bzw. Chloridengruppe als Substituent an der C₂-Kette unterscheiden, zeigen charakteristische Unterschiede in den Fluoreszenzquantenausbeuten. Der Alkohol zeigt sowohl in DMSO als auch in Chloroform höhere Quantenausbeuten als das Chlorid, wobei der Unterschied in DMSO deutlicher ist. Die geringen Quantenausbeuten in DMSO von **DCM-24** deuten auf die Möglichkeit einer Fluoreszenzlöschung durch den Schweratomeffekt, in diesem Fall durch das Chloratom, hin. Der Schweratomeffekt kann auch durch das chlorierte Lösungsmittel Chloroform ausgelöst werden und so neben anderen Ursachen die geringen Quantenausbeuten in diesem Lösungsmittel verursachen.

Der freie Phosphorsäureester **DCM-2** hingegen zeigt in DMSO, Chloroform und Wasser im Vergleich zu den anderen **DCM**-Derivaten sehr hohe Quantenausbeuten. Die Phosphatgruppe quencht demnach die Fluoreszenz nicht.

Des Weiteren fällt auf, dass die mit C₄-Ketten mit unterschiedlichen Endgruppen substituierten Verbindungen **DCM-7** und **DCM-21** in DMSO und Chloroform, **DCM-20** nur in DMSO, eine höhere Fluoreszenzquantenausbeute als **DCM** aufweisen. Offensichtlich behindern die langen Alkylketten die strahlungslose Deaktivierung und ermöglichen so eine größere Fluoreszenzeffizienz.

5.6.2 Fluoreszenz der phenolischen **DCM**-Derivate

Bei den Derivaten **DCM-4** und **DCM-5** wird der **DCM**-Chromophor durch Einführen einer phenolischen Hydroxygruppe in ortho-Position zur Vinylgruppe am Benzolring modifiziert. Dadurch resultiert bei dem Phenol **DCM-4** in DMSO ein bathochromer Shift des Absorptionsspektrums von 18 nm in Relation zur Absorption von **DCM**, wobei jedoch die Form der Banden identisch bleibt. Im Emissionsspektrum zeigt sich ein hypsochromer Shift von 12 nm in Bezug auf **DCM**. Vermutlich liegt das Molekül in DMSO zum Teil in deprotonierter Form als Phenolat vor. Im aciden Chloroform können diese Effekte nicht beobachtet werden, Absorption und Emission von **DCM-4** liegen im Bereich der Absorption und Emission von **DCM**.

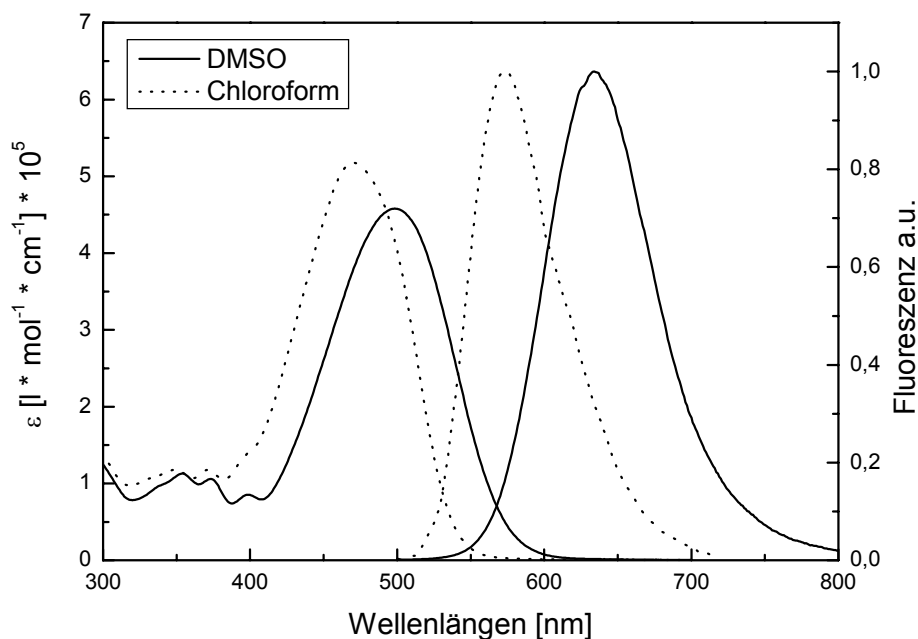


Abbildung 73: Absorptions- und korrigierte Fluoreszenzspektren von **DCM-4** in DMSO und Chloroform zur Veranschaulichung des Stokesshift. Die Fluoreszenzspektren wurden bei einer Anregungswellenlänge von 490 nm aufgenommen und auf 1 normiert.

Das phosphorylierte Phenol **DCM-5** und das Pyridiniumsalz **DCM-5Py** zeigen im Gegensatz zu **DCM-4** keine Besonderheiten in ihren Spektren in DMSO und Chloroform, die Lage ihrer Übergänge entspricht in etwa der des **DCM**, obwohl die Phosphorsäureester in Chloroform ausgesprochen schwerlöslich sind. Ein Quenchen der Fluoreszenz durch die Nähe des Phosphoratoms zum Chromophor erfolgt nicht.

5.6.3 Fluoreszenz der sulfonierten DCM-Derivate

Bei dem **DCM**-Derivat **DCM-22** wird an der Methylgruppen des Pyranrings eine Sulfonsäuregruppe eingeführt und die Verbindung als Dikaliumsalz bzw. Monoammoniumsalz isoliert. Auch hier ändern sich Lage und Form der Banden im UV/Vis- und im Emissionsspektrum in DMSO in Vergleich zu **DCM** nicht, in Chloroform sind die Salze jedoch so schlecht löslich, dass die UV/Vis-Spektren bei einer Konzentration von ca. 1×10^{-7} mol/l aufgenommen werden mussten. Da die UV/Vis-Spektren am Limit der Messempfindlichkeit aufgenommen wurden, konnten deren Maxima nur ungenau bestimmt werden. Ebenso sind die Maxima der in Chloroform aufgenommenen Emissionsspektren aufgrund der geringen Fluoreszenz-

quantenausbeuten und Unschärfe der Peaks schwierig zu bestimmen, so dass die beobachtete bathochrome Verschiebung um 10 nm in Bezug auf **DCM** durchaus auf Fehler bei der Bestimmung der Maxima zurückgeführt werden kann.

Die Sulfonsäuren **DCM-22** zeigen unabhängig vom Gegenion in DMSO eine dem **DCM** entsprechende Fluoreszenzquantenausbeute, in Chloroform jedoch fällt der Wert sehr stark ab. Vermutlich lagen die Salze trotz optisch klarer Lösungen nicht molekular dispers vor.

5.6.4 Einfluss der Lösungsmittelpolarität auf den Stokesshift

Die Verschiebung des Fluoreszenzspektrums zu längeren Wellenlängen in Lösungsmitteln ansteigender Polarität ist auf ein für schwach polare Merocyanine typisches vergrößertes Dipolmoment nach Anregung und auf die Wechselwirkung dieses Dipols mit dem polaren Lösungsmittelkäfig zurückzuführen.

Mit Gleichung 6 wird die Lösungsmittelpolaritätsbeziehung Δf nach einer Theorie von LIPPERT^[113, 114] und MATAGA^[115] für die Lösungsmittel Chloroform, DMSO und Wasser berechnet (siehe Tabelle 11).

Gleichung 6:

$$\Delta f = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1}$$

mit ε = Dielektrizitätskonstante und n = Brechungsindex.

Lösungsmittel	Dielektrizitätskonstante ε (20 °C) ^[116]	Brechungsindex n_D^{20} ^[116]	Δf
Chloroform	4.7	1.4459	0.149
DMSO	49.0	1.4783	0.264
Wasser	78.5	1.3330	0.320
Methanol	33.6	1.3288	0.309
Acetonitril	37.5	1.3442	0.305

Tabelle 11: Lösungsmittelparameter zur Berechnung von Δf .

Eine Auftragung des Stokesshifts ($\tilde{\nu}_{Exc} - \tilde{\nu}_{Em}$) (Tabelle 10) der wasserlöslichen **DCM**-Derivate gegen Δf ergibt jeweils eine Gerade. Exemplarisch ist in Abbildung 74 der

Graph für **DCM-5Py** gezeigt, die Werte der Geradengleichungen aller Derivate werden in Tabelle 12 angeführt.

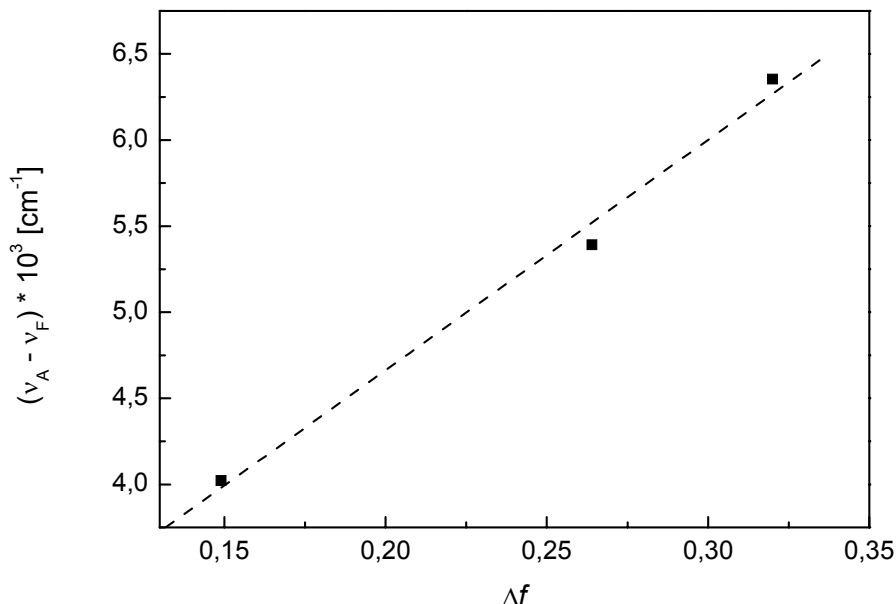


Abbildung 74: Auftragung des Stokesshifts gegen die Lösungsmittelpolaritätsfunktion Δf für **DCM-5Py**.

	Steigung $m / 10^3$ [cm ⁻¹]	Achsenabschnitt $n / 10^3$ [cm ⁻¹]	$(\mu_e - \mu_g)$ [D]
DCM-2	13.70	1.90	26.5
DCM-5	11.05	2.68	23.8
DCM-5Py	13.38	2.09	26.2
DCM-7	12.94	2.08	25.7
DCM-22K	11.84	2.39	24.6
DCM-22NH₄	11.79	2.32	24.6

Tabelle 12: Werte für Steigung und Achsenabschnitt für

$$(\tilde{\nu}_{Exc} - \tilde{\nu}_{Em}) = m \cdot \Delta f + n$$

für die wasserlöslichen **DCM-Derivate**, sowie die aus der Steigung m berechnete Differenz zwischen dem angeregten und dem Grundzustandsdipolmoment $(\mu_e - \mu_g)$.

MEYER und MIALOCQ fanden in einer Auftragung der in 24 Lösungsmitteln einer Polarität von $0.09 \leq \Delta f \leq 0.31$ ermittelten Stokesshifts ($\tilde{\nu}_{Exc} - \tilde{\nu}_{Em}$) von **DCM** gegen Δf einen Korrelationskoeffizienten von 0.94 mit einer Geradengleichung von

Gleichung 7:

$$(\tilde{\nu}_{Exc} - \tilde{\nu}_{Em}) = 7.94 \cdot \Delta f + 2.74^{[117]}.$$

Die bei den wasserlöslichen **DCM**-Derivaten gefundenen Steigungen sind signifikant größer, was auf einen stärkeren Einfluss der Lösungsmittelpolarität auf den Stokesshift und somit auf ein größeres Dipolmoment als in **DCM** hindeutet.

Es existiert ein theoretischer Zusammenhang zwischen der Steigung der gefundenen Geraden und der Differenz zwischen dem angeregten und Grundzustandsdipolmoment:

Gleichung 8:

$$m = \frac{2}{hc_0} \cdot \frac{(\mu_e - \mu_g)^2}{a^3}$$

mit $(\mu_e - \mu_g)$ = Differenz zwischen dem angeregten und Grundzustandsdipolmoment (in D), a = Radius des sphärischen Raums im Onsager Modell des Reaktionsfeldes (in Å), h = Planck-Konstante, c_0 = Lichtgeschwindigkeit.

In einer ersten Näherung wird der Betrag der Länge der Bindungsachse des **DCM**-Moleküls auf die wasserlöslichen **DCM**-Derivate übertragen. Das Einfügen einer flexiblen aliphatischen Kette außerhalb des Chromophors hat keinen Einfluss auf die Länge des durch Donor- und Akzeptorgruppen charakterisierten Dipols. Deshalb kann in einer Näherung $a = 8 \text{ \AA}$ als die Hälfte der Länge der Längsachse der **DCM**-Derivate eingesetzt werden. Die für $(\mu_e - \mu_g)$ erhaltenen Werte sind in Tabelle 12 angegeben.

MEYER und MIALOCQ berechneten über eine Vektoranalyse der verschiedenen Gruppendipolmomente für **DCM** und Vergleich mit substituierten Stilbenderivaten ein Grundzustandsdipolmoment von $\mu_g = 6.1 \text{ D}$.

Sie erhielten für **DCM**:

$$(\mu_e - \mu_g) (\text{DCM}) = 20.2 \text{ D}$$

und

$$\mu_e (\text{DCM}) = 26.3 \text{ D}.$$

Es fällt auf, dass die berechneten Differenzen des angeregten und Grundzustandsdipolmoments für die hier untersuchten **DCM**-Derivate viel höher als die in der

Literatur beschriebene Differenz für **DCM** sind. Sie liegen im Bereich des von MEYER und MIALOCQ bestimmten Anregungsdipolmoments. Da dieselben Parameter verwendet wurden, sind die Unterschiede auf die gemessenen Stokesshifts zurückzuführen. Tatsächlich fällt bei einem Vergleich der in Chloroform und DMSO sowie in Acetonitril bestimmten Stokesshift von **DCM** auf, dass die Werte von MEYER und MIALOCQ generell etwa 10 nm unterhalb der hier bestimmten Werte liegen. Das lässt darauf schließen, dass sie mit unkorrigierten Fluoreszenzspektren den Stokesshift bestimmt haben, da in unkorrigierten Fluoreszenzspektren die Maxima je nach verwendeter Apparatur um ca. 10 – 20 nm hypsochrom verschoben sind^[106].

Aus diesem Grund werden die von MEYER und MIALOCQ ermittelten Werte unter den im Rahmen dieser Arbeit gültigen Messbedingungen überprüft, um eine Aussage über die Auswirkung der Substituenten auf die Polarität des Farbstoffs zu erhalten. Der Stokesshift von **DCM** wird in vier Lösungsmitteln bestimmt und nach der obigen Vorgehensweise ($\mu_e - \mu_g$) bestimmt.

Lösungsmittel	λ_{exc} [nm]	λ_{em} [nm]	Stokesshift ($\lambda_{em} - \lambda_{exc}$) [nm]	Stokesshift ($\tilde{\nu}_{Exc} - \tilde{\nu}_{Em}$) [cm ⁻¹]
Methanol	466	625	159	5459
Acetonitril	463	624	161	5573
DMSO	480	646	166	5353
Chloroform	470	575	105	3885

Tabelle 13: Stokesshift von **DCM** in verschiedenen Lösungsmitteln.

Für die Auftragung von ($\tilde{\nu}_{Exc} - \tilde{\nu}_{Em}$) gegen Δf erhält man als Geradengleichung

$$(\tilde{\nu}_{Exc} - \tilde{\nu}_{Em}) = 10.43 \cdot \Delta f + 2.39$$

mit einem Korrelationskoeffizienten $r = 0.981$. Der Wert der Steigung für **DCM** liegt zwar immer noch unterhalb der für die wasserlöslichen Derivate bestimmten Steigungen, ist aber erheblich größer als der von MEYER und MIALOCQ ermittelte Wert ($m = 7.94$).

Aus der Steigung m lässt sich nun die Differenz zwischen dem angeregten und dem Grundzustandsdipolmoment ($\mu_e - \mu_g$) nach Gleichung 8 berechnen zu

$$(\mu_e - \mu_g) (\mathbf{DCM}) = 23.1 \text{ D},$$

das Dipolmoment des angeregten Zustands berechnet sich mit dem Grundzustandsdipolmoment $\mu_g = 6.1 \text{ D}$ zu:

$$\mu_e (\mathbf{DCM}) = 6.1 \text{ D} + 23.1 \text{ D} = 29.2 \text{ D}.$$

Die Differenzen der Dipolmomente des angeregten und Grundzustands ($\mu_e - \mu_g$) aller wasserlöslicher **DCM**-Derivate sind größer als der Wert für ($\mu_e - \mu_g$) von **DCM** (23.1 D) (siehe Tabelle 12).

Ein Anregungsdipolmoment dieser Größenordnung weist auf einen Charge-Transfer-Anregungszustand hin und verursacht die starke Solvatochromie der Verbindungen, da die Polarität des Lösungsmittels eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des angeregten Zustands spielt.

Die Fluoreszenz der **DCM**-Derivate resultiert aus einem intramolekularen Charge Transfer (ICT) der Donoreinheit (Aminogruppe) zur Akzeptoreinheit (Dicyanomethylengruppe)^[46]. Da zur Stabilisierung dieses ICT-Zustands eine umfangreiche Neuorientierung der Lösungsmittelmoleküle notwendig ist, schlagen BOURSON und VALEUR den Begriff des „relaxierten intramolekularen Charge-Transfer-(RICT)-Zustands“ nach RULLIÈRE et al.^[118] vor. Dieser Term beschreibt den speziellen Fall eines TICT (Twisted Intramolecular Charge-Transfer) Zustands, bei dem die Ladungstrennung durch eine Verdrillung um die C-N-Bindung vergrößert wird^[46]. DRAKE et al. gehen von einer verzerrten Geometrie aus, die zwischen der cis- und trans- Konfiguration des angeregten Zustands liegt^[104]. Nach einer Klassifizierung der Fluorophore nach BERLMANN können **DCM** und seine Derivate aufgrund ihrer Absorptions- und Emissionseigenschaften in die Klasse der Fluorophore mit planarem Grundzustand und nichtplanarem angeregten Zustand eingeordnet werden^[119]. Diese Theorie deckt sich mit den in Kapitel 1 beschriebenen Beobachtungen zur *E,Z*-Isomerisierung.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertationsschrift sind die gesteckten präparativen Ziele erreicht worden.

- Fluorogen präzipitierende Substrate für die *Alkalische Phosphatase*

Mit der erfolgreichen Synthese der neuartigen langwellig-fluorogen präzipitierenden Substrate für die *Alkalische Phosphatase*, **DCM-2** und **DCM-5**, ist es durch bathochrome Verschiebung der Anregungswellenlänge des Präzipitats **DCM-1** bzw. **DCM-4** in den Bereich um 480 – 500 nm und Verschiebung der Emissionswellenlänge auf über 600 nm gelungen, die Sensitivität des Enzyme Labeled Fluorescence (ELF) Assays durch Minderung des Einflusses von Hintergrundstrahlung erheblich zu erhöhen.

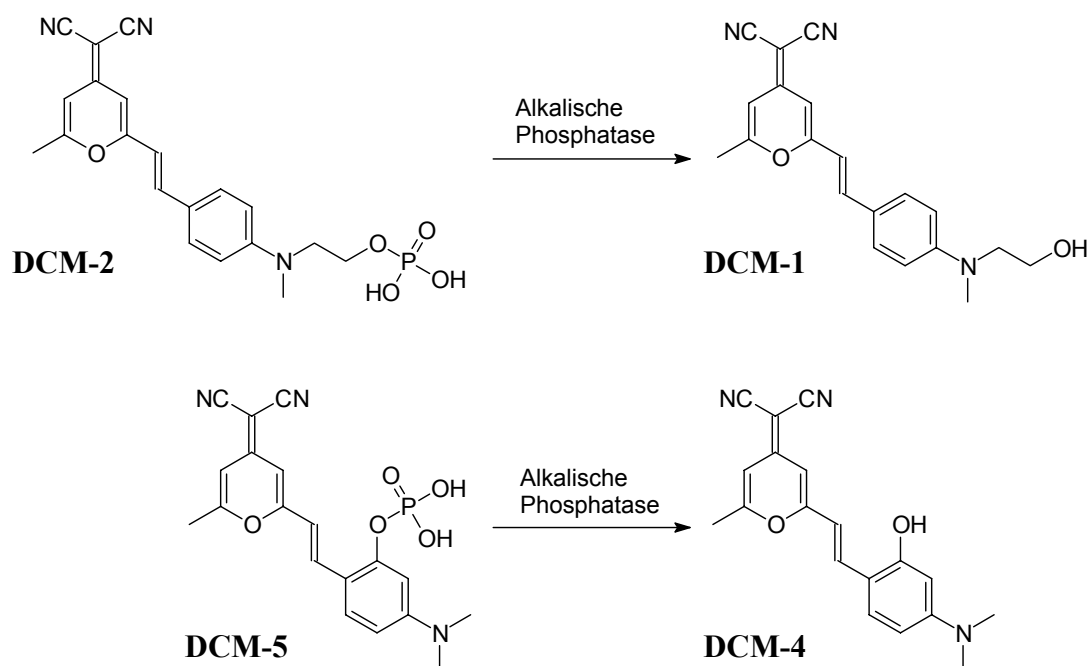


Abbildung 75: Die Phosphatase-Substrate **DCM-2** und **DCM-5** sowie die Präzipitate **DCM-1** und **DCM-4**.

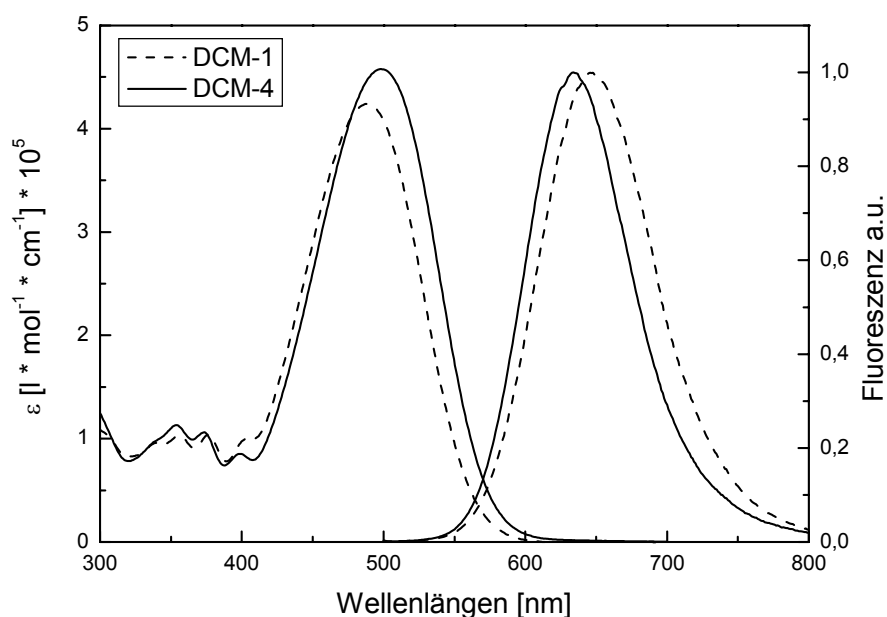


Abbildung 76: Absorptions- und korrigierte und normalisierte Fluoreszenzspektren der Präzipitate **DCM-1** und **DCM-4** in DMSO, Anregungswellenlänge jeweils 490 nm.

Zugleich weitet sich die Anwendungsbreite des ELF-Assays von einem reinen *in vitro*-Assay auf moderne *in vivo* High Throughput Screening (HTS) Tests an lebenden Zellen aus, da durch die neuen bathochrom absorbierenden ELF-Substrate **DCM-2** und **DCM-5** die Verwendung energieärmer und daher weniger zellschädigender Anregungsstrahlung möglich ist. Die Etablierung neuer Assays für *in vivo* Untersuchungen an lebenden Zellen ist besonders attraktiv, da diese derzeit in der pharmazeutischen und medizinischen Forschung bei der auf High Throughput Screening basierenden Wirkstoff- bzw. Rezeptorsuche eine stetig wachsende Bedeutung erlangen.

- Innerhalb dieser Synthesen konnte eine bisher im Arbeitskreis noch nicht angewendete Methode zur Phosphorylierung wenig aktiver aliphatischer Hydroxygruppen mittels Dimorpholinophosphorylbromid etabliert werden.
- Fluorogene Farbstoffe für BRET-Systeme

Mit der Synthese der Verbindungen **DCM-23K** und **DCM-23NH₄** steht ein neuer Fluoreszenzfarbstoff zur Verwendung in BRET-Assays zur Verfügung.

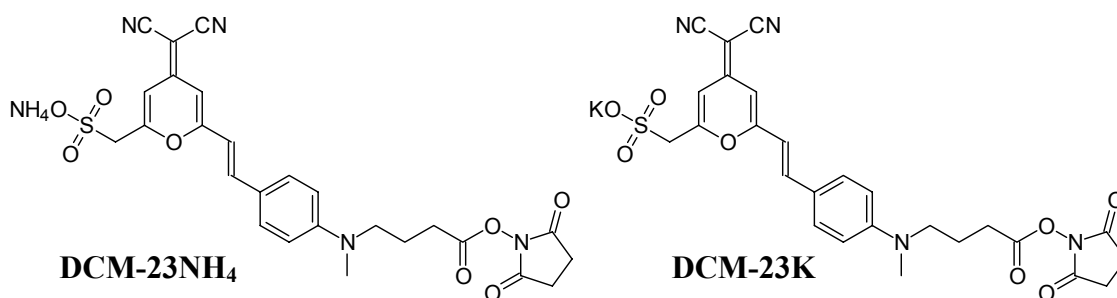


Abbildung 77: Fluoreszenzfarbstoffe **DCM-23NH₄** und **DCM-23K** zur fluorogenen Markierung von Proteinen in BRET-Systemen.

Die Farbstoffabsorption deckt sich optimal mit der Lage der Luminszenzbanden des Luminszenzsystems Luciferase/Coelenterazin-h. Gleichzeitig weist der Farbstoff einen großen Stokesshift auf, so dass die Signale der Biolumineszenz und des BRET optimal separiert sind, wie Abbildung 78 verdeutlicht. Dieses System kann noch durch eine Steigerung der Fluoreszenzquantenausbeute in Wasser optimiert werden.

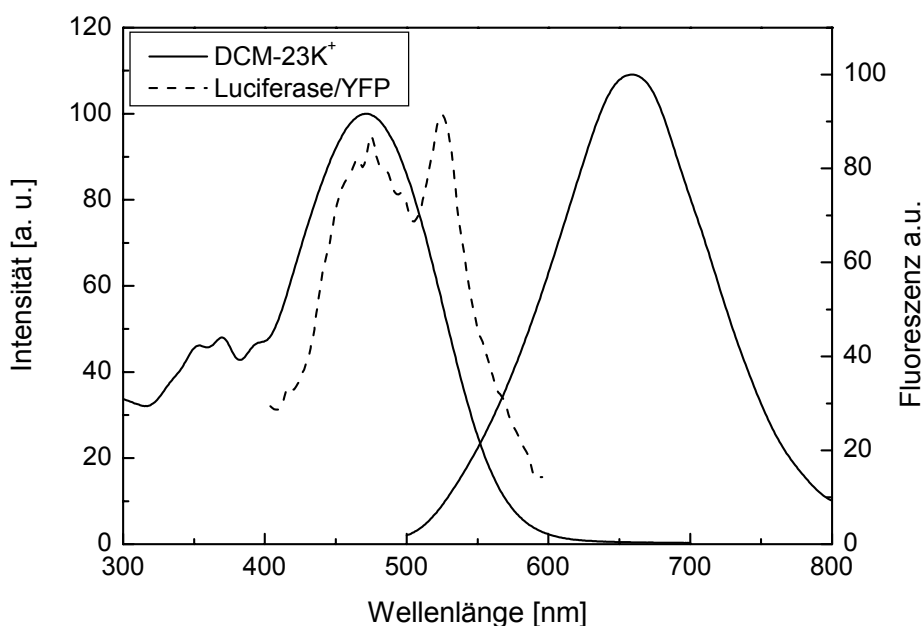


Abbildung 78: Durchgezogene Linie: UV/Vis- und korrigiertes Fluoreszenzspektrum von **DCM-23K** in Wasser, Anregungswellenlänge 430 nm. Gepunktete Linie: Signale des BRET-Systems Renilla Luciferase/YFP. Alle Spektren sind normalisiert.

Über die mit einem Succinimidylester aktivierte Carbonsäurefunktion kann der Farbstoff kovalent an die zu markierenden Proteine gebunden werden, die Sulfonsäuregruppe sorgt für die notwendige Hydrophilie des Farbstoffs.

Damit steht jetzt ein Farbstoff zur Verfügung, mit dem ein BRET-System zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen etabliert werden kann, welches spektroskopisch optimal auf das Lumineszenzsystem Renilla Luciferase/Coelenterazin-h abgestimmt ist und zusätzlich ohne sperrige Markierungsproteine wie GFP und YFP auskommt und daher sehr flexibel eingesetzt werden kann.

Aufgrund der Sensitivität des Farbstoffs gegenüber der Polarität seiner Umgebung kann er auch als Polaritätssonde verwendet werden.

- An ausgewählten **DCM**-Derivaten wurden kernresonanzspektroskopische Untersuchungen zur *E,Z*-Isomerisierung durchgeführt. Dabei konnte neben der schon bekannten Lösungsmittelabhängigkeit ein Zusammenhang zwischen Struktur und Isomerenverhältnis hergestellt werden.
- Es wurden die Fluoreszenzquantenausbeuten, der Stokesshift und die Solvatochromie aller dargestellten **DCM**-Derivate in DMSO, Chloroform, und bei ausreichender Hydrophilie der Verbindung auch in Wasser, bestimmt und hinsichtlich der Molekülstruktur diskutiert. Es konnten neue Zusammenhänge zwischen Molekülstruktur und Fluoreszenzquantenausbeute herausgestellt werden.
- Für die hydrophilen **DCM**-Derivate wurde der Einfluss der Lösungsmittelpolarität auf den Stokesshift untersucht. Dabei wurde eine direkte Proportionalität zwischen der nach einer Theorie von LIPPERT und MATAGA berechneten Lösungsmittelpolaritätsfunktion Δf und dem Betrag des Stokesshifts festgestellt. Aus der Steigung konnte die Differenz zwischen dem angeregten und dem Grundzustandsdipolmoment ($\mu_e - \mu_g$) bestimmt und mit dem von **DCM** verglichen werden.

7 Experimentalteil

7.1 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 (Merck), Kieselgel RP-18 (Merck)
Ionenaustauscher:	Amberlite IR-67
Schmelzpunkte:	Reichardt Thermovar, Büchi 510
Infrarotspektroskopie:	Bruker Vektor 22
Massenspektrometrie:	Varian Mat 311 A, Anregungsenergie 70 eV, Quellentemperatur 250 °C
UV/Vis-Spektroskopie:	Perkin-Elmer Lambda 19
Fluoreszenzspektroskopie:	Jasco FP-6200 Spektrofluorometer des AK S. Kubik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Kernresonanzspektroskopie:	Bruker DRX 500 Varian VXR 300 Bruker DRX 200
Elementaranalysen:	Durchgeführt vom Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

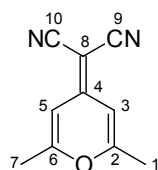
Für ihre Unterstützung möchte ich mich an dieser Stelle bei folgenden Damen und Herren noch einmal ganz herzlich bedanken:

- Frau M. Beuer und dem NMR-Team aus der AC1 für die Aufnahme der NMR-Spektren
- Herrn R. Bürgel und Herrn Dr. P. Thommes für die Aufnahme der Massenspektren
- Frau I. Menzel und Frau H. Webers für die Messung von IR- und UV/Vis-Spektren
- Herrn Dr. S. Kubik für die Bereitstellung des Fluoreszenzspektrometers
- Frau I. Reinartz für ihre freundliche Unterstützung bei allen Sekretariatsangelegenheiten und für die nette Gesellschaft beim Mittagessen
- Herrn Schönstein für die prompte Bereitstellung von Glasgeräten
- Herrn Dr. B. Mayer und Herrn Dr. S. Schaper für Anregungen und Tipps zu den Synthesen sowie für die kritische Durchsicht dieser Arbeit
- Herrn Dr. S. Beutner für seine Ratschläge und Anregungen rund um die Fluoreszenzspektroskopie sowie für die kritische Durchsicht dieser Arbeit
- Herrn Dr. L. Schneider für viele gute Tipps und Hinweise zum Umgang mit Sulfonsäuren
- allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für die gute Zusammenarbeit
- insbesondere allen meinen Gangkolleginnen und –kollegen für die freundschaftliche Atmosphäre und Kollegialität im „Parallelgang“

7.2 Beschreibung der Versuche

In den folgenden Arbeitsvorschriften sind die Moleküle so beziffert, wie es der Positionsangabe der Kohlenstoffatome in den ^{13}C -NMR- bzw. ^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 Kohlenstoffatomen bzw. Protonen.

Versuch 1: Darstellung von 4-Dicyanomethylen-2,6-dimethyl-4H-pyran (1)



3.3 g (50 mmol) Malonodinitril, 6.1 g (50 mmol) 2,6-Dimethyl-4-pyranon und 25 ml Essigsäureanhydrid werden für 1 h unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Das Lösungsmittel wird anschließend im Wasserstrahlvakuum abdestilliert, das Produkt mit 50 ml Wasser für wenige Minuten aufgekocht, abgesaugt und anschließend mit wenig Ether gewaschen. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Dichlormethan) und aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält blassgelbe Kristalle.

Ausbeute: 5.2 g (30 mmol) (60 %) Lit.^[120]: 90 %

M ($\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$) = 172.2

Schmelzpunkt: 193 °C ; Lit.^[120]: 191 °C

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3090 (=C-H-Valenz), 2208 und 2187 (-C \equiv N-Valenz), 1664 (-C=C-Valenz), 1584 und 1509 (Ringschwingung), 1437 und 1379 (-CH₃-Deform), 1342, 1275, 1223 und 1180 (-C-O-C-Valenz), 986, 921 und 847(=C-H-Deform)

^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ [ppm] = 2.30 (6H, s, 2 \times CH₃), 6.51 (2H, s, 2 \times CH)

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ [ppm] = 17.89 (1-C und 7-C), 56.45 (8-C), 104.72 (3-C und 5-C), 112.92 (9-C und 10-C), 154.86 (4-C), 161.05 (2-C und 6-C)

UV/Vis (Acetonitril): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]) = 347 (29000)

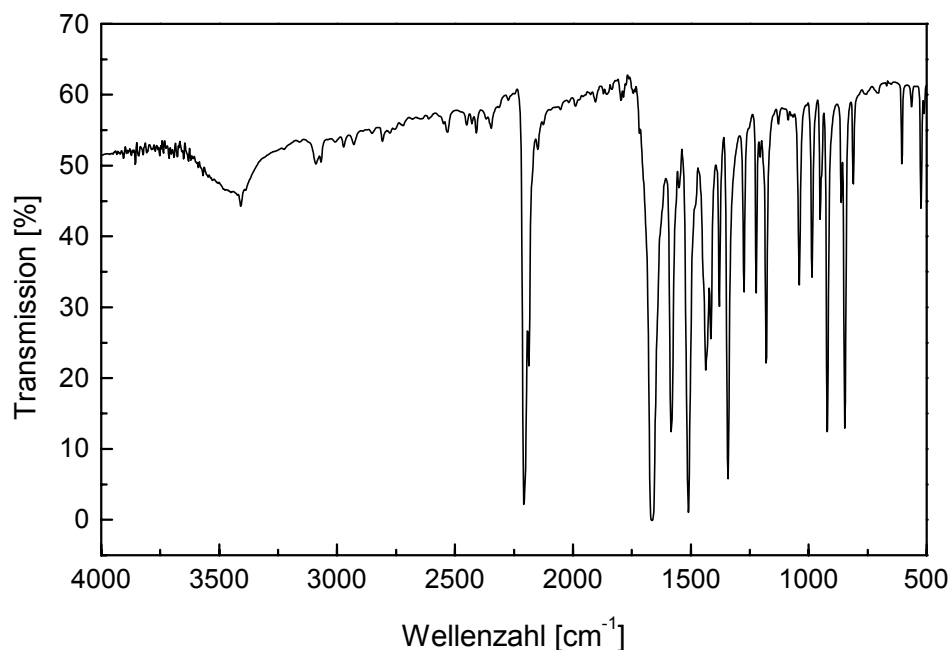
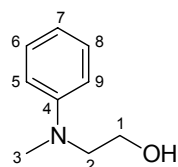


Abbildung 79: IR-Spektrum (KBr) von 1.

Versuch 2: 2-(*N*-Methyl-*N*-phenylamino)-ethanol (3)



In einem 100-ml-Kolben werden 21.4 g (200 mmol) *N*-Methylanilin, 24.2 g (300 mmol) 2-Chlorethanol und 24.0 g (200 mmol) wasserfreies Natriumcarbonat unter Rühren für 4 h refluxiert. Nach dem Abkühlen wird das Natriumcarbonat über eine Fritte (Pore 3) abgesaugt und mit viel Diethylether gewaschen. Nach Entfernen des Ethers am Rotationsverdampfer wird der braune Rückstand fraktioniert im Wasserstrahlvakuum destilliert. Man erhält das Produkt bei einer Übergangstemperatur von 149 °C (25 mbar) als orange ölige Flüssigkeit.

Ausbeute: 18.0 g (119 mmol) (60 %)

$M(C_9H_{13}NO) = 151.21 \text{ g/mol}$

Siedepunkt: 149 °C (25 mbar) Lit.^[121]: 149 °C (12 Torr)

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3355 (-O-H-Valenz), 3061 und 3026 (=C-H-Valenz), 2960 und 2878 (-C-H₃-Valenz) 2821 (-N-CH₃-Valenz), 1600 und 1506 (Ringschwingung), 1449 (-CH₃ und -CH₂-Deform), 1357 und 1194 (-C-N-Valenz), 1046 (-C-O-Valenz), 749 (=C-H-Deform)

MS (EI, Pt: 40 °C): m/e (%) = 151 (17) [M]⁺, 120 (100.0), 105 (8), 91 (4), 77 (14), 51 (4), 42 (5)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] = 3.00 (3H, s, 3-H), 3.50 (2H, t, J = 5.7 Hz, 2-H), 3.83 (2H, t, J = 5.7 Hz, 1-H), 6.80 (1H, m, A-Teil eines A[BM]₂-Systems, J_{A,M} = 7.3 Hz, J_{A,B} = 0.9 Hz, 7-H), 6.85 (2H, m, B-Teil eines A[BM]₂-Systems, J_{B,M} = 8.8 Hz, 5-H und 9-H), 7.29 (2H, m, M-Teil eines A[BM]₂-Systems, J_{M,B} = 8.8 Hz, J_{M,A} = 7.3 Hz, 6-H und 8-H)

¹³C-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] = 39.19 (3-C), 55.85 (2-C), 60.46 (1-C), 113.48 (5-C und 9-C), 117.62 (7-C), 129.64 (6-C und 8-C), 150.48 (4-C)

UV/Vis (Chloroform): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]) = 254 (9700); 300 (1700)

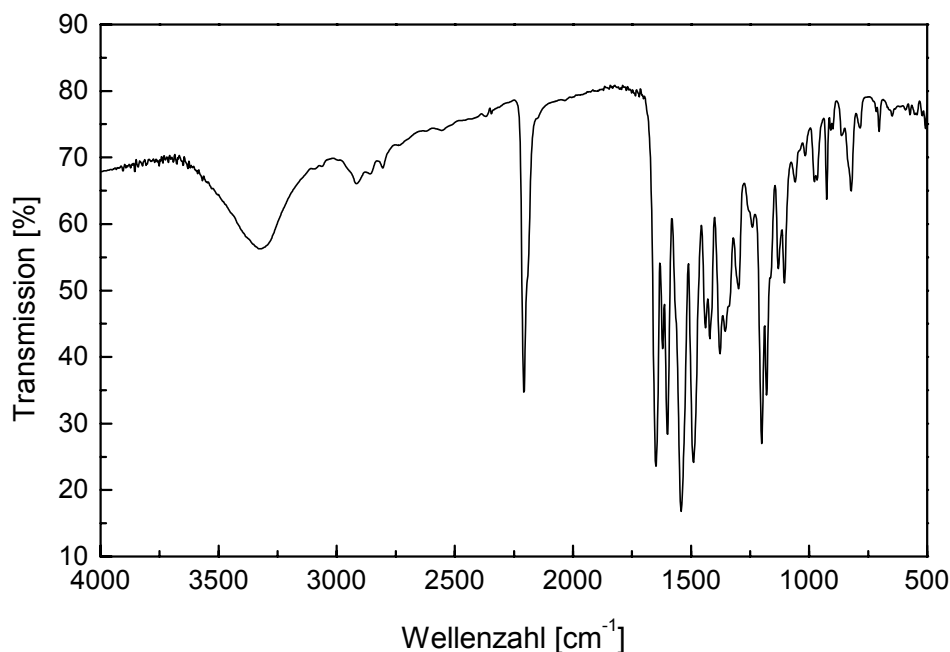
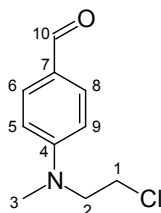


Abbildung 80: IR-Spektrum (Film) von 3.

Versuch 3: 2-[N-(4-Formylphenyl)-N-methylamino]ethylchlorid (4)



In einem 250 ml 3-Halskolben mit KPG-Rührer, Innenthermometer und Tropftrichter mit Druckausgleich und Trockenrohr werden zu 18.4 g (0.120 mol) Phosphorylchlorid 11 ml DMF vorsichtig bei RT zugetropft und mit einem Eisbad auf 10 °C gekühlt. Es werden 17.9 g (0.120 mol) 2-(N-Methyl-N-phenylamino)ethanol (**3**) in 22 ml DMF langsam zugetropft, wobei die Innentemperatur 15 °C nicht überschreiten darf. Anschließend wird der Ansatz 36 h lang bei RT gerührt. Dann werden 125 g Eis zugegeben und mit Natronlauge (20 %) pH = 6 eingestellt. Dabei färbt sich der vorher braune Ansatz grün. Das Produkt wird mit Ether mehrfach extrahiert und anschließend nach leichter Einengung des Lösungsmittels als Bisulfitaddukt gefällt. Man erhält einen weißen Niederschlag, der mit viel Ether gewaschen wird. Der Niederschlag wird in 10%iger Schwefelsäure erwärmt, der dabei entstehende orangene Niederschlag wird mit

Dichlormethan extrahiert, die organische Phase mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhält man das Produkt in Form orangener Kristalle.

Ausbeute: 2.2 g (0.012 mol) (10 %)
 $M(C_{10}H_{12}NOCl) = 197.5 \text{ g/mol}$

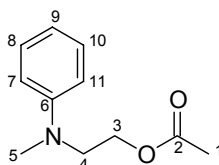
Schmelzpunkt: 66 °C

MS (EI, Pt.: 30 °C): m/e (%) = 199 (8), 197 (25), 148 (100), 132 (18), 105 (5), 91 (5), 77 (16), 65 (4), 42 (7)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] = 3.14 (3H, s, 3-H), 3.67 (2H, t, $J_{2,1} = 6.9 \text{ Hz}$, 2-H), 3.79 (2H, t, $J_{1,2} = 6.9 \text{ Hz}$, 1-H), 6.69 (2H, m, A-Teil eines [AM]₂-Systems, $J_{AM} = 8.8 \text{ Hz}$, 5-H und 9-H), 7.62 (2H, m, M-Teil eines [AM]₂-Systems, $J_{MA} = 8.8 \text{ Hz}$, 6-H und 8-H), 9.77 (1H, s, 10-H)

Elementaranalyse: C ber. 60.77 %	H ber. 6.12 %	N ber. 7.10 %
C gef. 60.76 %	H gef. 6.15 %	N gef. 7.10 %

Versuch 4: 2-(*N*-Methyl-*N*-phenylamino)ethyl-acetat (**5**)



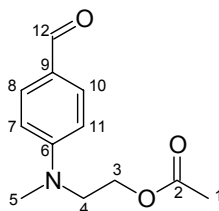
20.5 g (0.200 mol) Acetanhydrid und 30.9 g (0.200 mol) 2-(*N*-Methyl-*N*-phenylamino)-ethanol **3** werden in einem 250-ml-Rundkolben mit aufgesetztem Rückflusskühler und Calciumchloridrohr mit 10 Tropfen konz. Schwefelsäure versetzt. Sobald die exotherme Reaktion nachlässt, erwärmt man noch für 2 h auf dem siedenden Wasserbad. Nach dem Abkühlen wird in 150 ml Eiswasser gegossen und mehrfach mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Sodalösung entsäuert, mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer erhält man das Produkt durch fraktionierte Destillation bei einer Übergangstemperatur von 85 – 90 °C (1.5×10^{-2} mbar) als gelbe Flüssigkeit.

Ausbeute: 33.1 g (0.171 mol) (86 %)
M (C₁₁H₁₅NO₂): 193.25 g/mol
Siedepunkt: 85 – 90 °C (0.015 mbar)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] = 1.93 (3H, s, 1-H), 2.89 (3H, s, 5-H), 3.51 (2H, t, J = 6.15 Hz, 4-H), 4.17 (2H, t, J = 6.15 Hz, 3-H), 6.68-6.61 (3H, m, 8-H, 9-H und 10-H), 7.13-7.18 (2H, m, 7-H und 11-H)

Die spektralen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.

Versuch 5: 2-[N-(4-Formylphenyl)-N-methylamino]ethyl-acetat (6)



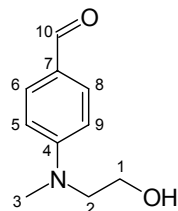
In einem 250-ml-Dreihalskolben mit Rückflusskühler mit Calciumchloridrohr, Tropftrichter und Innenthermometer werden 21.6 g (0.170 mol) Phosphorylchlorid mit 16 ml Dimethylformamid bei Raumtemperatur versetzt und mit einem Eisbad auf 10 °C gekühlt. 33.1 g (0.170 mol) 2-(N-Methyl-N-phenylamino)-ethylacetat **5** werden in 34 ml Dimethylformamid unter Eiskühlung so langsam zugetropft, dass die Innentemperatur 20 °C nicht überschreitet. Anschließend wird 15 min lang bei Raumtemperatur gerührt und dann für 2.5 h auf 95 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird mit 320 g Eiswasser hydrolysiert und mit Natronlauge (20 %) pH = 6 eingestellt. Nach der Extraktion mit Dichlormethan wird die organische Phase mit Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer erhält man als Rohprodukt ein braunes Öl, welches ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt wird.

Rohausbeute: ca. 50 g braunes Öl

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] = 1.93 (3H, s, 1-H), 3.02 (3H, s, 5-H), 3.63 (2H, t, J = 6.0 Hz, 4-H), 4.21 (2H, t, J = 6.0 Hz, 3-H), 6.69 (2H, m, A-Teil eines [AM]₂-

Systems, 7-H und 11-H), 7.67 (2H, m, M-Teil eines [AM]₂-Systems, 8-H und 10-H), 9.68 (1H, s, 12-H)

Versuch 6: 2-[N-(4-Formylphenyl)-N-methylamino]-ethanol (2)



Das Rohprodukt **6** aus Versuch 5 (ca. 50 g) wird mit 150 ml Natronlauge (10 %) versetzt. Dann wird gerade so viel Ethanol zugegeben bis die Lösung homogen ist (ca. 100 ml). Die Lösung wird für 30 Minuten unter Rückfluss erhitzt, danach wird das Ethanol am Rotationsverdampfer entfernt und die resultierende wässrige Lösung mit Dichlormethan extrahiert und mit Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der braune Rückstand aus Dichlormethan umkristallisiert. Man erhält gelbe Kristalle. Zur Vergrößerung der Ausbeute wird aus der Mutterlauge mit Diethylether weiteres Produkt gefällt.

Ausbeute: 23.3 g (0.130 mol) (77 % ausgehend von Versuch 5)
(Ausbeute Lit.^[52]: 39 %)

M (C₁₀H₁₃NO₂): 179.22 g/mol

Schmelzpunkt: 66 °C

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3387 (-O-H-Valenz), 2935, 2910, 2881 und 2830 (-C-H₃-Valenz), 2740 (-N-CH₃-Valenz), 1653 (-C=O-Valenz), 1594 und 1530 (Ringschwingung), 1387 (-CH₃-Deform), 1170 (-C-N-Valenz), 1049 (-C-O-Valenz), 816 (=C-H-Deform)

MS (EI, Pt: 120 °C): m/e (%) = 179 (19) [M]⁺, 148 (100.0), 132 (15), 119 (7), 104 (5), 91 (6), 77 (16), 51 (7), 42 (8)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] = 3.07 (3H, s, 3-H), 3.57 (2H, t, J_{2,1} = 6.0 Hz, 2-H), 3.81 (2H, t, J_{1,2} = 6.0 Hz, 1-H), 6.69 (2H, m, A-Teil eines [AM]₂-Systems, J_{AM} = 8.8

Hz, 5-H und 9-H), 7.62 (2H, m, M-Teil eines [AM]₂-Systems, $J_{MA} = 8.8$ Hz, 6-H und 8-H), 9.68 (1H, s, 10-H)

UV/Vis (Chloroform): λ_{\max} [nm] (ϵ [l mol⁻¹ cm⁻¹]) = 336 (23500)

Elementaranalyse: C ber. 67.02 %	H ber. 7.31 %	N ber. 7.82 %
C gef. 66.19 %	H gef. 7.36 %	N gef. 7.91 %

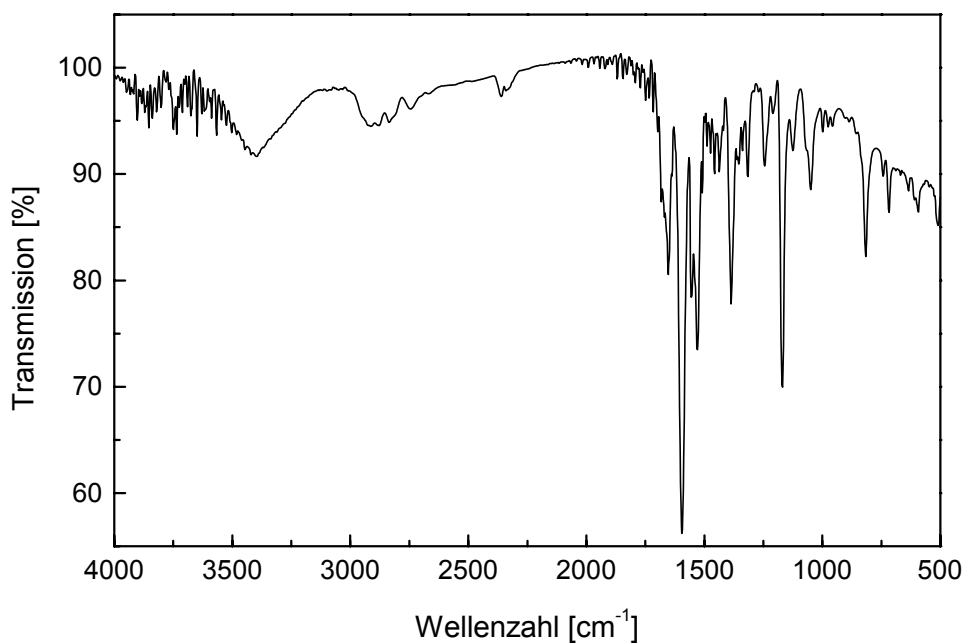
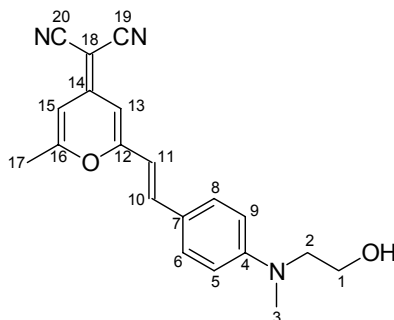


Abbildung 81: IR-Spektrum (Film) von 2.

Versuch 7: 4-Dicyanomethylen-2-{4-[*N*-(2-hydroxyethyl)-*N*-methylamino]-styryl}-6-methyl-4*H*-pyran (DCM-1)



1.2 g (6.7 mmol) 4-Dicyanomethylen-2,6-dimethyl-4*H*-pyran (**1**) und 1.2 g (6.7 mmol) Aldehyd **2** werden in 35 ml Ethanol (abs.) gelöst und mit 0.3 ml Piperidin versetzt. Es wird für 12 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird über Kieselgel chromatographiert (Dichlormethan/Ether, 1:1) und anschließend aus Dichlormethan/Ether umkristallisiert. Man erhält violette Nadeln.

Ausbeute: 0.85 mg (2.5 mmol) (38 %)

$M(C_{20}H_{19}N_3O_2) = 333.4 \text{ g/mol}$

Schmelzpunkt: 231 °C

IR (KBr): $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 3490$ (-O-H-Valenz), 2917 (-C-H-Valenz), 2204 (-C≡N-Valenz), 1650 (-C=C-Valenz), 1597, 1546 und 1492 (Ringschwingung), 1420 (-CH₃ u. -CH₂-Deform), 1380 (-CH₃-Deform), 1304, 1210 (-C-O-C-Valenz), 1175 (-C-O-Valenz), 1042 (-C-O-Valenz), 813 (=C-H-Deform)

MS (EI, Pt: 210 °C): m/e (%) = 333 (18) [M]⁺, 302 (75), 260 (9), 215 (9), 190 (10), 151 (15), 127 (12), 115 (11), 68 (13), 43 (100)

¹H-NMR (DMSO-D₆, 500 MHz): δ [ppm] = 2.41 (3H, s, 17-H), 3.00 (3H, s, 3-H), 3.46 (2H, t, $J_{2,1} = 6.3 \text{ Hz}$, 2-H), 3.56 (2H, dt, $J_{1,\text{OH}} = 5.6 \text{ Hz}$, $J_{1,2} = 6.3 \text{ Hz}$, 1-H), 4.75 (1H, t, $J_{\text{OH},1} = 5.6 \text{ Hz}$, OH), 6.57 (1H, m, 15-H), 6.70 (1H, d, $J_{13,15} = 2.2 \text{ Hz}$, 13-H), 6.72 (2H, d, A-Teil eines [AM]₂-Systems, $J_{\text{AM}} = 8.9 \text{ Hz}$, 5-H und 9-H), 6.96 (1H, d, $J_{11,10} = 15.8 \text{ Hz}$, 11-H), 7.41 (1H, d, $J_{10,11} = 15.8 \text{ Hz}$, 10-H), 7.50 (2H, d, M-Teil eines [AM]₂-Systems, $J_{\text{MA}} = 8.9 \text{ Hz}$, 6-H und 8-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- D_6 , 500 MHz): δ [ppm] = 19.71 (17-C), 39.04 (3-C), 54.21 oder 54.30 (2-C), 58.51 (1-C), 105.23 (13-C oder 15-C), 105.76 (13-C oder 15-C), 111.98 (5-C und 9-C), 112.79 (11-C), 130.26 (6-C und 8-C), 138.98 (10-C), 116.23, 122.15, 151.15, 156.92, 161.50, 163.98

UV/Vis (Acetonitril): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]) = 348 (12650), 372 (12600), 467 (50200)

Elementaranalyse: C ber. 72.05 % H ber. 5.74 % N ber. 12.60 %
C gef. 72.08 % H gef. 5.78 % N gef. 12.62 %

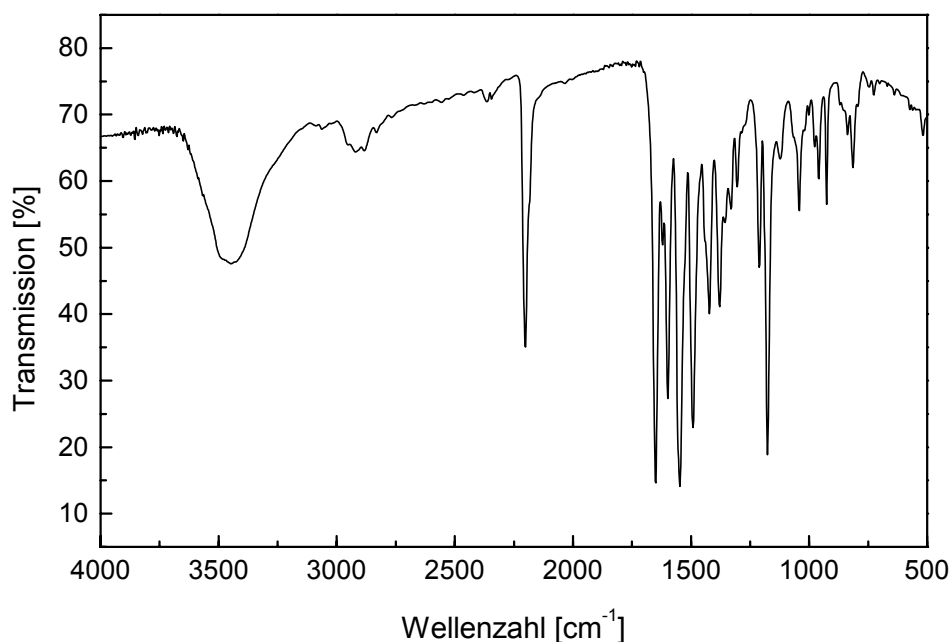
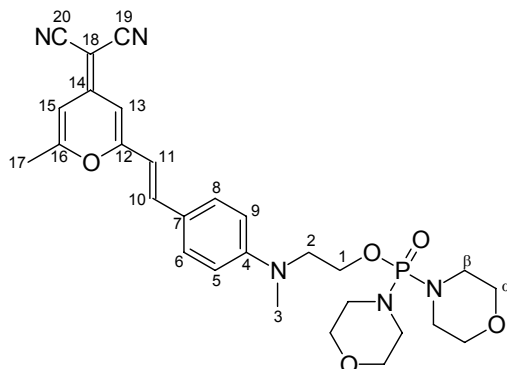


Abbildung 82: IR-Spektrum (KBr) von **DCM-1**.

Versuch 8: 2-({4-[2-(4-Dicyanomethylen-6-methyl-4*H*-pyran-2-yl)-vinyl]-phenyl}-methylamino)-ethyloxo-dimorpholinido-oxo-phosphor (DCM-3)



A: Dimorpholinobromphosphat

In einem 250-ml-Dreihalskolben mit Stickstoffaufleitung, Tropftrichter und Innenthermometer werden 440 mg (1.50 mmol) Phosphorylbromid in 30 ml absolutem Dichlormethan unter Schutzgas gelöst. Unter Eiskühlung werden 500 mg (5.70 mmol) frisch destilliertes Morpholin in 30 ml absolutem Dichlormethan unter Stickstoff bei 10 °C Innentemperatur langsam zugetropft, anschließend wird die Mischung bei Raumtemperatur 4 h lang gerührt.

B: DCM-3

In einem 250-ml-Zweihalskolben werden 300 mg (0.900 mmol) **DCM-1** in 50 ml absolutem Dichlormethan gelöst und mit 0.8 ml 2,6-Dimethylpyridin versetzt. Über eine Fritte (Pore 3) wird die Dimorpholinobromphosphat-haltige Dichlormethanphase von Teil A im Wasserstrahlvakuum unter Rühren in den Kolben gesaugt und anschließend unter Stickstoff 48 h gerührt. Die Lösung wird nach dem Entfernen des Lösungsmittels über Kieselgel/Aceton chromatographiert und aus Dichlormethan umkristallisiert.

Ausbeute: 291 mg (0.528 mmol) (58 %)
 $M(C_{28}H_{34}N_5O_5P) = 551.58 \text{ g/mol}$

Schmelzpunkt: 160 °C

IR (KBr): $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 2963$ und 2849 (-C-H-Valenz), 2208 (-C≡N-Valenz), 1651 (-C=C-Valenz), 1600 , 1546 und 1488 (Ringschwingung), 1418 (-CH₃ u. -CH₂-Deform), 1383 (-CH₃-Deform), 1334 (-C-N-Valenz), 1308 , 1257 1220 (-C-O-C-Valenz), 1178 (-C-O-Valenz), 1044 (-P-O-Alkyl-Valenz), 971 (=C-H-Deform), 809 (=C-H-Deform)

¹H-NMR (DMSO-D₆, 200 MHz): δ [ppm] = 2.45 (3H, d, $J_{17,15} = 0.8$ Hz, 17-H), 2.92 (8H, dt, $J_{\beta,\alpha} = 4$ Hz, $J_{\beta,P} = 2$ Hz, β -H und β' -H), 3.04 (3H, s, 3-H), 3.46 (8H, t, $J_{\alpha,\beta} = 4$ Hz, α -H und α' -H) 3.74 (2H, t, $J_{2,1} = 4.8$ Hz, 2-H), 4.01 (2H, dt, $J_{1,P} = 6.0$ Hz, $J_{1,2} = 4.8$ Hz, 1-H), 6.63 (1H, dt, $J_{15,17} = 0.8$ Hz, $J_{15,13} = 2.1$ Hz, 15-H), 6.76 (1H, d, $J_{13,15} = 2.1$ Hz, 13-H), 6.82 (2H, d, A-Teil eines [AM]₂-Systems, $J_{AM} = 9.0$ Hz, 5-H und 9-H), 7.05 (1H, d, $J_{11,10} = 15.8$ Hz, 11-H), 7.46 (1H, d, $J_{10,11} = 15.8$ Hz, 10-H), 7.55 (2H, d, M-Teil eines [AM]₂-Systems, $J_{MA} = 9.0$ Hz, 6-H und 8-H)

¹³C-NMR (DMSO-D₆, 500 MHz): δ [ppm] = 19.72 (17-C), 38.80 (3-C), 44.52 (β -C und β' -C), 51.54 (2-C), 54.64 (1-C), 62.31 und 66.71 (α -C und α' -C), 105.45 (13-C), 105.83 (15-C), 112.34 (5-C und 9-C), 113.36 (11-C), 116.12 (19-C und 20-C), 122.74, 130.14 (6-C und 8-C), 138.78 (10-C), 150.96, 156.94, 161.38, 163.95

³¹P-NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ [ppm] = 14.66 (s)

UV/Vis (DMSO): λ_{\max} [nm] (ϵ [l mol⁻¹ cm⁻¹]) = 355 (10550), 376 (11200), 479 (43500)

Elementaranalyse: C ber. 60.97 % H ber. 6.21 % N ber. 12.70 %
 C gef. 59.91 % H gef. 6.35 % N gef. 11.80 %

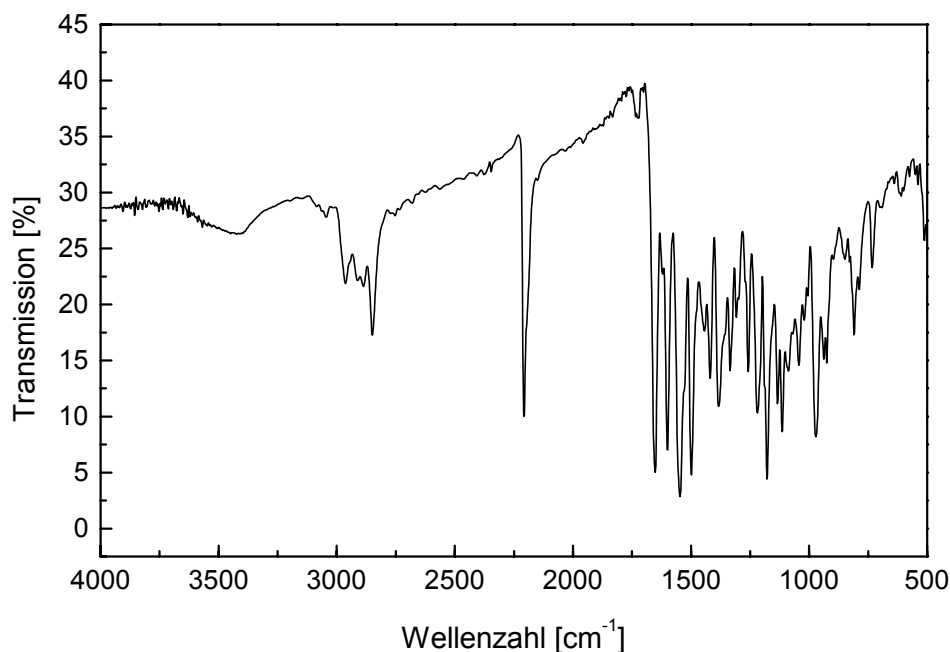
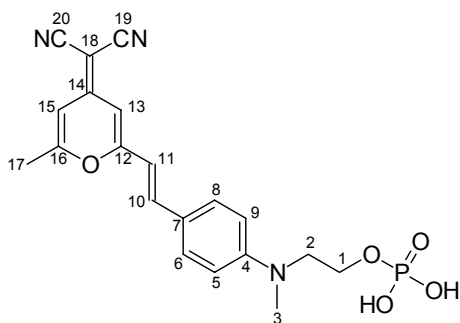


Abbildung 83: IR-Spektrum (KBr) von **DCM-3**.

Versuch 9: 2-({4-[2-(4-Dicyanomethylen-6-methyl-4H-pyran-2-yl)-vinyl]-phenyl}-methylamino)-ethylphosphat (DCM-2**)**



Zu 200 mg (0.360 mmol) **DCM-3** werden 25 ml Wasser und gerade soviel Aceton gegeben, dass eine homogene Aufschlemmung vorliegt. Nach Zugabe von 1 ml konz. Salzsäure wird die Mischung für 8 h unter Rückfluss gerührt. Nach dem Abkühlen fallen braune Nadeln aus der Lösung aus, welche mit wenig kaltem Wasser gewaschen und dann im Ölpumpenvakuum getrocknet werden.

Ausbeute: 100 mg (0.242 mmol) (67 %)

M (C₂₀H₂₀N₃O₅P) = 413.35 g/mol

Schmelzpunkt: 165 °C

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3422 (-O-H-Valenz), 3061 (=C-H-Valenz), 2964, 2900 und 2840 (-C-H-Valenz), 2205 (-C≡N-Valenz), 1650 (-C=C-Valenz), 1597, 1543 und 1497 (arom. Ringschwingung), 1419 (CH₃- und CH₂-Deform), 1378 (CH₃-Deform), 1211, 1176 und 1079 (-C-O-C-Valenz), 967 (=C-H-Deform), 815 (=C-H-Deform)

MS (FAB, NBA + NaI): m/e (%) = 458 (16) [M-H+2Na]⁺, 436 (21) [M+Na]⁺, 414 (7) [M+H]⁺, 413 (5) [M]⁺

¹H-NMR (DMSO-D₆, 500 MHz): δ [ppm] = 2.43 (3H, d, J_{17,15} = 0.63 Hz, 17-H), 3.02 (3H, s, 3-H), 3.66 (2H, t, J_{2,1} = 5.7 Hz, 2-H), 3.96 (2H, dt, J_{1,p} = 7.6 Hz, J_{1,2} = 5.6 Hz, 1-H), zwischen 3.00 und 4.50 (s, sehr breites Signal, 2×OH + H₂O), 6.61 (1H, dt, J_{15,17} = 0.6 Hz, J_{15,13} = 2.2 Hz, 15-H), 6.74 (1H, d, J_{13,15} = 2.2 Hz, 13-H), 6.78 (2H, d, A-Teil eines [AM]₂-Systems, J_{AM} = 9.1 Hz, 5-H und 9-H), 7.03 (1H, d, J_{11,10} = 16.1 Hz, 11-H), 7.44 (1H, d, J_{10,11} = 16.1 Hz, 10-H), 7.53 (2H, d, M-Teil eines [AM]₂-Systems, J_{MA} = 8.8 Hz, 6-H und 8-H)

¹³C-NMR (DMSO-D₆, 500 MHz): δ [ppm] = 19.73 (17-C), 39.02 (3-C), 51.81 (2-C), 54.48, 62.86 (1-C), 105.41 (13-C), 105.82 (15-C), 112.21 (5-C und 9-C), 113.31 (11-C), 116.18 (19-C und 20-C), 122.71, 130.27 (6-C und 8-C), 138.86 (10-C), 150.79, 156.96, 161.44, 164.08

³¹P-NMR (DMSO-D₆, 500 MHz): δ [ppm] = 0.20 (s)

UV/Vis (DMSO): λ_{\max} [nm] (ϵ [l mol⁻¹ cm⁻¹]) = 483 (46300), 375 (13100), 355 (13000)

Elementaranalyse: C ber. 55.68 % H ber. 5.15 % N ber. 9.75 %

C gef. 55.25 % H gef. 4.95 % N gef. 9.52 %

(Berechnet für C₂₀H₂₀N₃O₅P × 1H₂O, da die Substanz ein Äquivalent Kristallwasser enthält.)

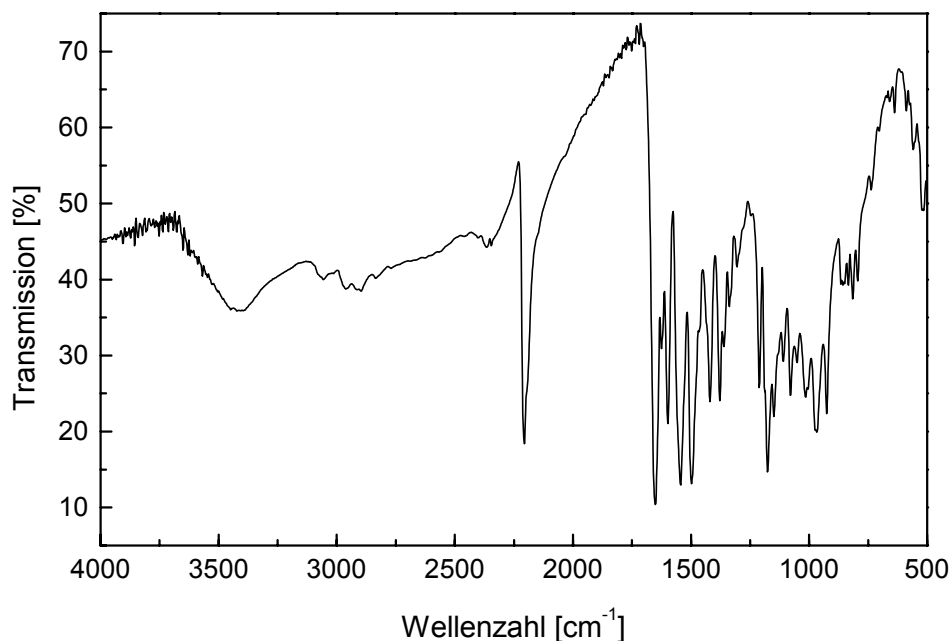
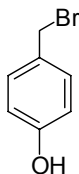


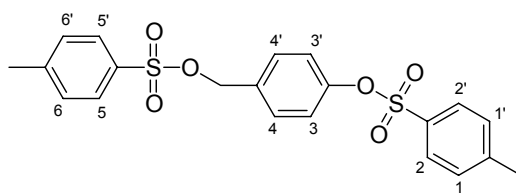
Abbildung 84: IR-Spektrum (KBr) von **DCM-2**.

Versuch 10: 4-Hydroxybenzylbromid (10)



Eine Lösung aus 9.1 g (0.034 mol) Phosphortribromid in 10 ml absolutem THF wird in einem 500 ml Dreihalskolben mit Tropftrichter, Innenthermometer und Rückflusskühler mit Gasableitung mit einem Kochsalz/Eis-Bad auf -10 °C gekühlt und unter Argon mit einer Lösung aus 1.32 ml (0.016 mol) absolutem Pyridin in 2.5 ml absolutem THF versetzt. Anschließend wird bei -10 °C eine Lösung aus 12.4 g (0.100 mol) 4-Hydroxybenzylalkohol langsam zugetropft. Das Gemisch wird 18 Stunden lang bei Raumtemperatur stehen gelassen, über Celite filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Es bleibt ein braunes Öl zurück, welches ohne weitere Aufarbeitung weiter eingesetzt wird.

Versuch 11: 4-Tosyloxy-benzyltosylat (11)



In einem 1 l Dreihalskolben mit Kühler, Innenthermometer, Tropftrichter und Trockenrohr werden 37.2 g (0.300 mol) p-Hydroxybenzylalkohol und 104.9 g (0.6000 mol) p-Toluolsulfonsäurechlorid in 100 ml Chloroform gelöst und mit einem Eisbad gekühlt. Bei 0-3 °C Innentemperatur werden 80.7 ml (1.00 mol) Pyridin abzugetropft, dann wird das Gemisch 12 h bei RT gerührt. Unter Eiskühlung wird eine Mischung aus 200 g Eis und 140 ml konz. Salzsäure vorsichtig zugegeben. Nach dem Auftauen wird die Chloroformschicht abgetrennt und dreimal mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Die Lösung wird über Nacht in den Kühlschrank gestellt, es fällt ein weißer Niederschlag aus, welcher abgesaugt und mit Chloroform gewaschen wird. Nach der Umkristallisation aus Chloroform erhält man weiße Kristalle, die aus dem Tosylat und Pyridin im Verhältnis 1:1 bestehen.

Ausbeute: 35.1 g (68.6 mmol) (27 %)
 $M(C_{21}H_{14}O_4S) = 432.51 \text{ g/mol}$
 $M(C_{21}H_{14}O_4S \times C_5H_5N) = 511.61 \text{ g/mol}$
Schmelzpunkt: 181 °C

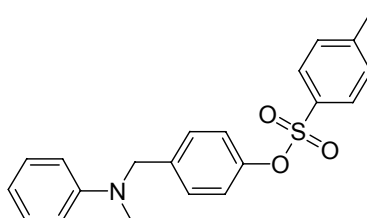
MS (EI, Pt.: 250 °C): m/e (%) = 432 (9), 352 (15), 277 (23), 261 (19), 197 (14), 155 (59), 139 (5), 107 (27), 91 (100)

¹H-NMR (DMSO-D₆, 500 MHz): δ [ppm] = 2.29 (3H, s, CH₃), 2.42 (3H, s, CH₃), 5.85 (2H, s, CH₂), 7.12 (4H, m, A-Teil der Tosylat-AB-Systeme, arom. Protonen: 1-H, 1'-H, 6-H, 6'-H), 7.49 (4H, m, B-Teil der Tosylat-AB-Systeme, arom. Protonen: 2-H, 2'-H, 5-H, 5'-H), 7.55 (2H, m, A-Teil des AB-Systems des Hydroxybenzylalkoholrestes, arom. Protonen: 4-H, 4'-H), 7.76 (2H, m, B-Teil des AB-Systems des Hydroxybenzylalkoholrestes, arom. Protonen: 3-H, 3'-H), 8.18 (2H, m, Pyridin), 8.64 (1H, m, Pyridin), 9.18 (2H, m, Pyridin)

Elementaranalyse: C ber. 61.06 % H ber. 4.93 % N ber. 2.74 %
 C gef. 60.70 % H gef. 4.86 % N gef. 2.67 %

(Die Elementaranalyse bezieht sich auf die Verbindung $C_{21}H_{14}O_4S \times C_5H_5N$.)

Versuch 12: {4-[(*N*-Methyl-*N*-phenylamino)-methyl]-phenyl}-tosylat (12**)**



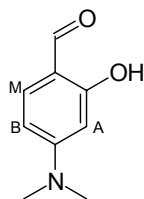
In einem 250 ml Zweihalskolben mit Rückflusskühler und Trockenrohr werden 10.0 g (23.0 mmol) des Tosylats **11**, 2.5 g (23 mmol) *N*-Methylanilin und 2.4 g Natriumcarbonat in 30 ml Ethanol abs. aufgeschlemmt und für 48 h zum Sieden erhitzt (DC-Kontrolle, Dichlormethan). Nach dem Abkühlen wird das Gemisch mit 150 ml Wasser verdünnt und mehrfach mit Dichlormethan extrahiert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels erhält man einen braunen Feststoff, der aus Ethanol umkristallisiert wird. Man erhält ein beiges Pulver.

Ausbeute: 4.0 g (11 mmol) (47 %)
 M ($C_{21}H_{21}NO_3S$) = 367.46 g/mol

Schmelzpunkt: 185-186 °C

MS (EI, Pt.: 200 °C): m/e (%) = 367 (21), 261 (19), 213 (8), 155 (70), 107 (100), 106 (76), 91 (95), 77 (46)

Versuch 13: 2-Hydroxy-4-(dimethylamino)-benzaldehyd (7)



In einem 250 ml Dreihalskolben mit Tropftrichter, Rückflusskühler, Innenthermometer und Stickstoffaufleitung werden 14 ml DMF (abs) vorgelegt. 22.4 g (0.150 mol) Phosphorylchlorid werden unter Eiskühlung und Rühren vorsichtig zugetropft. 10.0 g (70.0 mmol) 3-Dimethylaminophenol werden in 50 ml DMF (abs) gelöst und bei 10 °C Innentemperatur und unter starkem Rühren langsam zugetropft. Anschließend wird das Reaktionsgemisch 0.5 h bei Raumtemperatur und dann 3 h bei 80 °C gerührt. Das erkaltete Reaktionsgemisch wird auf 500 ml Eiswasser gegossen, mit Natronlauge (20 %) auf pH = 6 gebracht und über Nacht in den Kühlschrank gestellt, um die Fällung zu vervollständigen. Nach der Umkristallisation aus Ethanol erhält man beige Nadeln.

Ausbeute: 5.4 g (33 mmol) (45 %)

$M(C_9H_{11}NO_2) = 165.19 \text{ g/mol}$

Schmelzpunkt: 78 °C Lit.^[122]: 78–79 °C

IR (Film, Chloroform): $\tilde{\nu} [cm^{-1}] = 2835$ (-CH₃-Valenz), 1660 (-C=O-Valenz), 1635 (-C=C-Valenz), 1607 und 1534 (Ringschwingung), 1401 (-CH₃-Deform), 1341 und 1248 (-C-N-Valenz), 1211 (-C-O-Valenz), 827 (=C-H-Deform),

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] = 3.06 (6H, s, N-(CH₃)₂), 6.07 (1H, d, A-Teil eines ABM-Systems, $J_{A-B} = 2.4 \text{ Hz}$, H-A), 6.27 (1H, q, B-Teil eines ABM-Systems, $J_{B-A} = 2.4 \text{ Hz}$, $J_{B-M} = 8.8 \text{ Hz}$, H-B), 6.27 (1H, d, M-Teil eines ABM-Systems, $J_{M-B} = 8.8 \text{ Hz}$, H-M), 9.51 (1H, d, $J = 0.4 \text{ Hz}$, CHO), 11.6 (1H, s, -OH)

UV/Vis (Chloroform): $\lambda_{max} [nm] (\epsilon [l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}]) = 261 (5400), 344 (37300)$

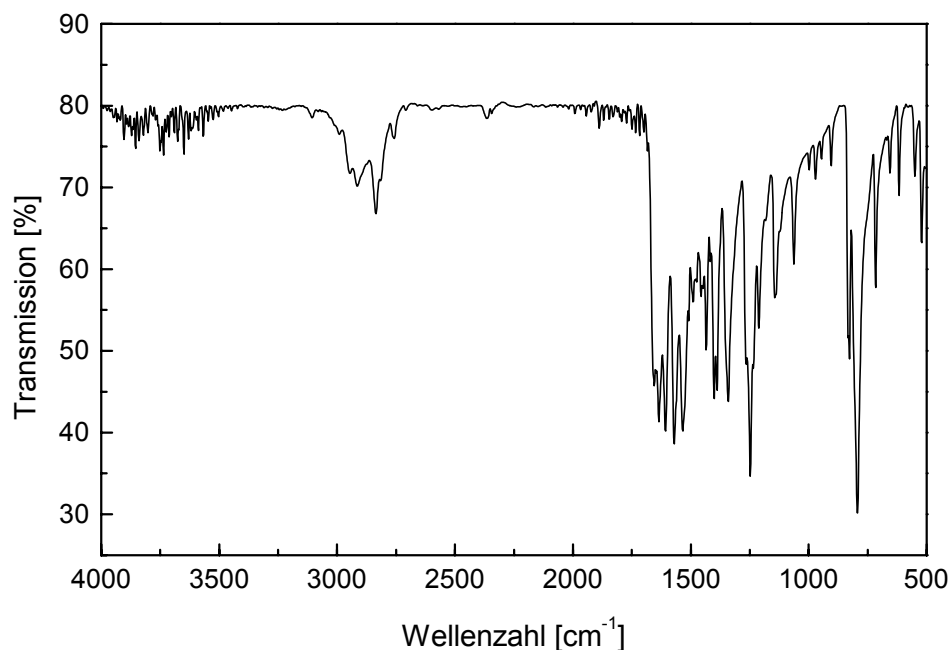
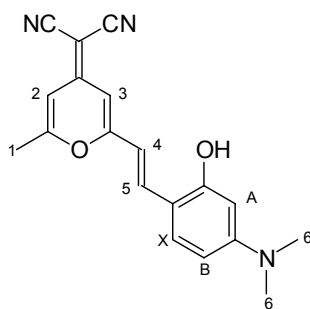


Abbildung 85: IR-Spektrum (Film, Chloroform) von 7.

Versuch 14: 4-Dicyanomethylen-2-methyl-6-[*o*-hydroxy-*p*-(dimethylamino)-styryl]-4*H*-pyran (DCM-4)



Es werden 5.0 g (30 mmol) 4-Dicyanomethylen-2.6-dimethyl-4*H*-pyran (**1**) und 6.0 g (30 mmol) 2-Hydroxy-4-dimethylaminobenzaldehyd (**7**) in 200 ml Ethanol gelöst, mit 0.1 ml Piperidin versetzt und unter Stickstoffatmosphäre 8 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird säulenchromatographisch aufgearbeitet (Kieselgel/Dichlormethan/Ether 10:1). Die rote fluoreszierende Fraktion wird aus Benzol/Cyclohexan umkristallisiert. Man erhält den Farbstoff in Form dunkelroter Kristalle.

Ausbeute: 350 mg (1.12 mmol) (4 %)

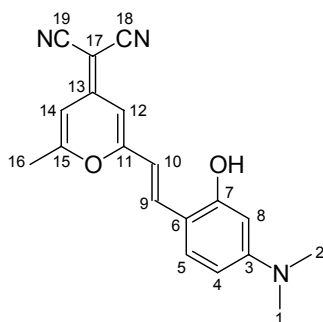
$M(C_{19}H_{17}N_3O_2) = 319.36 \text{ g/mol}$

Schmelzpunkt: 251 °C

IR (KBr): $\tilde{\nu} [cm^{-1}] = 3328$ (-O-H-Valenz), 2915, 2864 und 2806 (-C-H-Valenz), 2208 (-C \equiv N-Valenz), 1648 (-C=C-Valenz), 1600, 1542 und 1490 (Ringschwingung), 1438 und 1420 (-CH₃- und -CH₂-Deform), 1378 (-CH₃-Deform), 1299, 1201, 1180 und 1105 (-C-O-C-Valenz), 966 und 822 (=C-H-Deform),

MS (EI, Pt: 220°C): m/e (%) = 319 (100) [M]⁺, 304 (13), 276 (8), 254 (24), 186 (23), 159 (14), 42 (17)

¹H-NMR (DMSO-D₆, 500 MHz): δ [ppm] = 2.49 (3H, d, J = 0.6 Hz, 1-H), 3.02 (6H, s, 2×6-H), 6.23 (1H, d, A-Teil eines ABM-Systems, J_{A-B} = 2.5 Hz, A-H), 6.37 (1H, q, B-Teil eines ABM-Systems, J_{B-A} = 2.3 Hz, J_{B-M} = 8.8 Hz, B-H), 6.64 (1H, m, 2-H), 6.71 (1H, d, J = 2.0 Hz, 3-H), 7.00 (1H, d, J₄₋₅ = 15.9 Hz, 4-H), 7.53 (1H, d, M-Teil eines ABM-Systems, J_{M-B} = 8.9 Hz, M-H), 7.76 (1H, d, J₅₋₄ = 15.9 Hz, 5-H)



¹³C-NMR (DMSO-D₆, 500 MHz): δ [ppm] = 18.63 (16-C), 39.26 (1-C und 2-C), 52.52 (17-C), 97.07 (5-C), 103.46 (12-C), 104.21 (4-C), 104.51 (14-C), 109.60 (6-C), 110.57 (10-C), 115.26 und 115.31 (18-C und 19-C), 128.47 (8-C), 133.34 (9-C), 152.34, 155.70, 157.55, 161.07 und 162.64 (3-C, 6-C, 11-C, 13-C und 15-C, nicht zuzuordnen)

UV/Vis (DMSO): $\lambda_{max} [nm]$ ($\epsilon [l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$) = 353 (11300), 373 (10600), 398 (8500), 498 (45800)

Elementaranalyse: C ber. 71.46 % H ber. 5.37 % N ber. 13.16 %
 C gef. 70.18 % H gef. 5.65 % N gef. 12.65 %

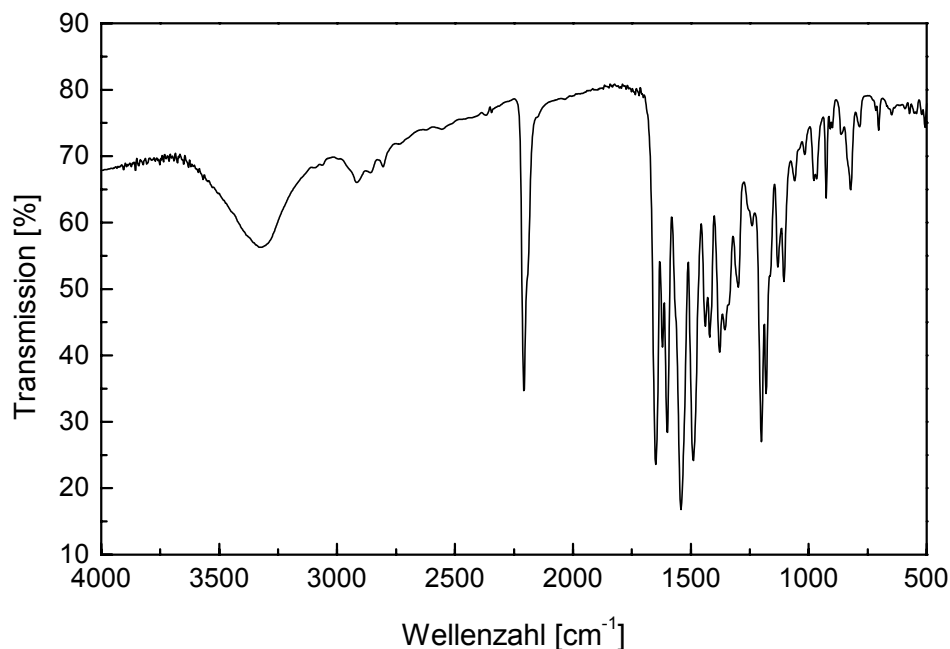
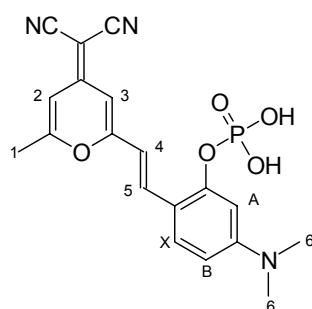


Abbildung 86: IR-Spektrum (KBr) von **DCM-4**.

Versuch 15: mono-{2-[2-(4-Dicyanomethylen)-6-methyl-4H-pyran-2-yl)-vinyl]-5-(dimethylamino)phenyl}-phosphat (DCM-5**)**



In einem 250 ml Kolben mit Stickstoffaufleitung werden 102 mg (0.320 mmol) **DCM-4** in 10 ml absolutem Pyridin gelöst und mit einem Eisbad auf 0 °C gekühlt. Im Stickstoffgegenstrom werden vorsichtig 49 mg (0.32 mmol) Phosphorylchlorid zutropft, dann wird das Eisbad entfernt und noch 2 h bei RT gerührt. Anschließend wird der Ansatz auf 250 ml Eis gegossen und über Nacht zum Auftauen stehen gelassen. Nach einer Filtration wird die Lösung mit konzentrierter Salzsäure auf pH = 3

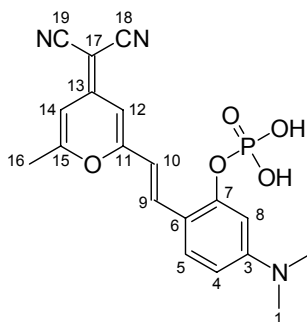
angesäuert, wobei ein feinkristalliner Niederschlag entsteht. Um die Kristalle zu vergrößern, wird das Gemisch im Wasserbad für wenige Minuten auf 80 °C erhitzt und dann zur Vervollständigung der Fällung über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Man erhält nach dem Absaugen über einen Hirschhorntrichter dunkelrote feine Kristalle.

Ausbeute: 64 mg (0.15 mmol) (47 %)
 $M(C_{19}H_{18}N_3O_5P \times 1.5 H_2O) = 426.36 \text{ g/mol}$
Schmelzpunkt: 208 °C

IR (KBr): $\tilde{\nu} [cm^{-1}] = 3417$ (-O-H-Valenz), 3070, 2926, 2852 und 2814 (-C-H-Valenz), 2209 (-C \equiv N-Valenz), 1651 (-C=C-Valenz), 1602, 1550 und 1495 (Ringschwingung), 1420 (-CH₃- und -CH₂-Deform), 1371 (-CH₃-Deform), 1292, 1205, 1183 und 1104 (-C-O-C-Valenz), 974 und 850 (=C-H-Deform),

MS (FAB, NBA + NaI): m/e (%) = 444 (68) [M-H+2Na]⁺, 422 (100) [M+Na]⁺, 399 (21) [M]⁺

¹H-NMR (DMSO-D₆, 500 MHz): δ [ppm] = 2.42 (3H, d, J = 0.5 Hz, 1-H), 2.98 (6H, s, 2×6-H), 4.54 (ca. 10 H, s, sehr breit, 2× -OH und Wasser aus DMSO), 6.58 (1H, m, A-Teil eines ABM-Systems, J_{A-B} = 2.5 Hz, J_{A-M} = 8.9 Hz, A-H), 6.62 (1H, m, B-Teil eines ABM-Systems, B-H), 6.64 (1H, m, 2-H), 6.71 (1H, d, J = 2.2 Hz, 3-H), 7.02 (1H, d, J₄₋₅ = 16.1 Hz, 4-H), 7.63 (1H, d, M-Teil eines ABM-Systems, J_{M-B} = 9.3 Hz, M-H), 7.64 (1H, d, J₅₋₄ = 16.2, 5-H)



¹³C-NMR (DMSO-D₆, 500 MHz): δ [ppm] = 19.95 (16-C), ca. 40 (1-C und 2-C, verdeckt von DMSO), 54.76 (17-C), 65.16, 70.70, 103.67 (14-C), 105.85 (12-C), 106.10 (4-C), 109.17 (8-C), 114.11 (10-C), 116.40 (18-C und 19-C), 129.10 (5-C), 133.37 (9-C), 153.09, 161.73, 164.25

^{31}P -NMR (DMSO, 500 MHz): δ [ppm] = -5.09 (s)

UV/Vis (Wasser): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]) = 458 (31100)

Elementaranalyse: C ber. 53.57 % H ber. 4.97 % N ber. 9.86 %
 C gef. 53.62 % H gef. 4.98 % N gef. 9.59 %

(Bezogen auf M ($\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_5\text{P} \times 1.5 \text{H}_2\text{O}$) = 426.36 g/mol, da die Substanz 1.5 Äquivalente Kristallwasser enthält.)

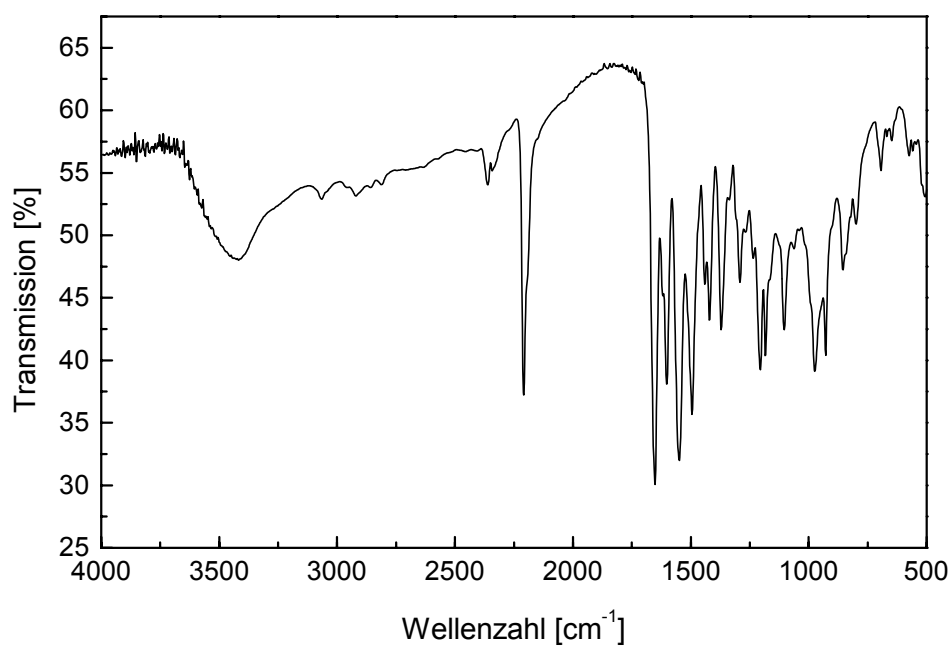
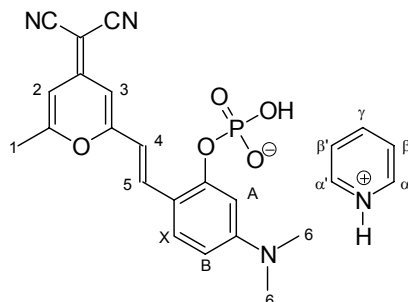


Abbildung 87: IR-Spektrum (KBr) von **DCM-5**.

Versuch 16: Pyridinium-{2-[2-(4-dicyanomethylen-6-methyl-4H-pyran-2-yl)-vinyl]-5-(dimethylamino)phenyl}-phosphat (DCM-5Py)



In einem 250 ml Kolben werden 100 mg (0.320 mmol) **DCM-4** in 10 ml absolutem Pyridin gelöst und unter Eiskühlung langsam mit 49 mg (0.32 mmol) Phosphorylchlorid versetzt. Der Ansatz wird 2 h bei RT gerührt, dann auf 200 ml Eiswasser gegossen und filtriert. Das Filtrat wird unter Eiskühlung mit konzentrierter Salzsäure stark angesäuert (pH 0-1), bis ein voluminöser Niederschlag ausflockt. Dieser wird abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Man erhält ein dunkelrotes hygroskopisches Pulver.

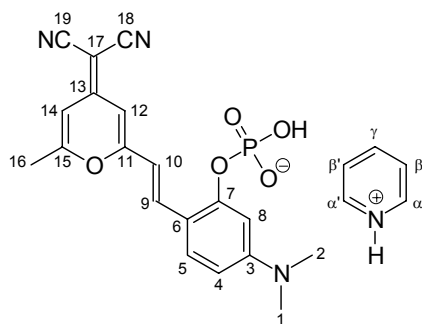
Ausbeute: 109 mg (0.205 mmol) (64 %)

M ($C_{19}H_{17}N_3O_5P \times 1 C_5H_6N \times 3 H_2O$) = 532.49 g/mol

Schmelzpunkt: 179 °C

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3406 (-O-H-Valenz), 3058 (=C-H-Valenz), 2805 (-C-H-Valenz), 2208 (-C≡N-Valenz), 1655 (-C=C-Valenz), 1602, 1544 und 1483 (Ringschwingung), 1421 (-CH₃- und -CH₂-Deform), 1371 (-CH₃-Deform), 1293, 1203, 1182 und 1104 (-C-O-C-Valenz), 974 und 850 (=C-H-Deform)

¹H-NMR (DMSO-D₆, 200 MHz): δ [ppm] = 2.43 (3H, s, 1-H), 2.98 (6H, s, 2×6-H), 4.84 (ca. 15 H, s, sehr breit, 2× -OH, Kristallwasser und Wasser aus DMSO), 6.59 (1H, m, A-Teil eines ABM-Systems, $J_{A-B} = 2.5$ Hz, $J_{A-M} = 8.2$ Hz, A-H), 6.63 – 6.66 (2H, m, B-Teil eines ABM-Systems, B-H und 2-H), 6.72 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, 3-H), 7.03 (1H, d, $J_{4-5} = 16.0$ Hz, 4-H), 7.64 (1H, d, M-Teil eines ABM-Systems, $J_{M-B} = 7.7$ Hz, M-H), 7.66 (1H, d, $J_{5-4} = 16.0$, 5-H), 8.03 (2H, m, β -H und β' -H vom Pyridinium), 8.55 (1H, m, $J = 7.8$ Hz, γ -H vom Pyridinium), 8.91 (2H, d, $J = 5.0$ Hz, α -H und α' -H vom Pyridinium)



$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- D_6 , 500 MHz): δ [ppm] = 19.95 (16-C), ca. 40 (1-C und 2-C, verdeckt von DMSO), 54.76 (17-C), 65.16, 70.70, 103.67 (14-C), 105.85 (12-C), 106.10 (4-C), 109.17 (8-C), 114.11 (10-C), 116.40 (18-C und 19-C), 127.55 (β -C und β' -C, Pyridinium), 129.10 (5-C), 133.37 (9-C), 143.10 (α -C und α' -C, Pyridinium), 145.91 (γ -C und γ' -C, Pyridinium), 153.09, 161.73, 164.25

$^{31}\text{P-NMR}$ (DMSO- D_6 , 200 MHz): δ [ppm] = -5.12

UV/Vis (Wasser): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]) = 263 (10500), 281 (11600), 457 (29100)

Elementaranalyse: C ber. 54.14 % H ber. 5.49 % N ber. 10.52 %
 C gef. 54.40 % H gef. 5.00 % N gef. 10.35 %
 (berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5\text{P} \times 1 \text{ C}_5\text{H}_6\text{N} \times 3 \text{ H}_2\text{O}$)

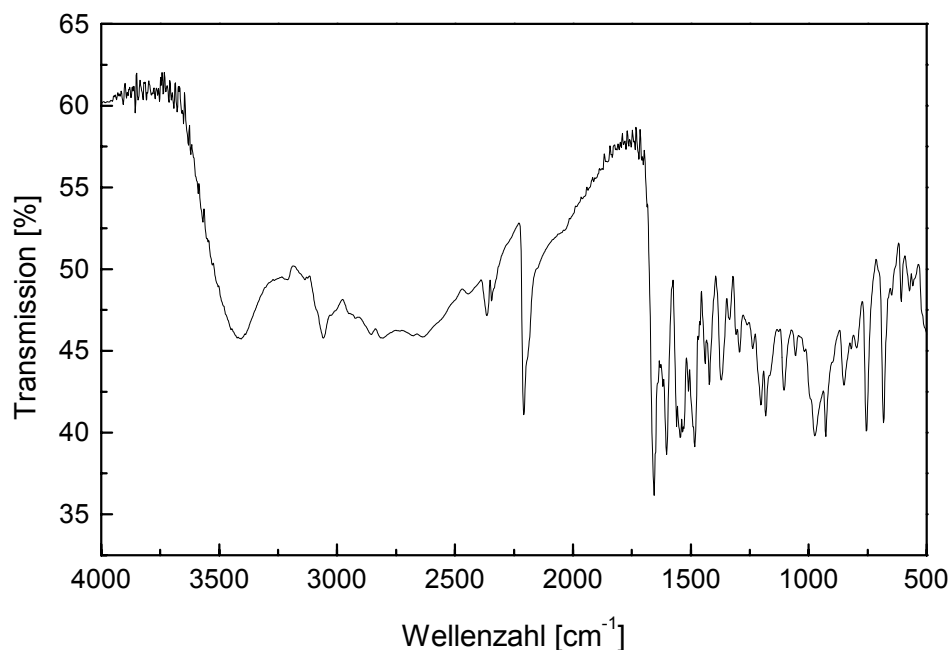
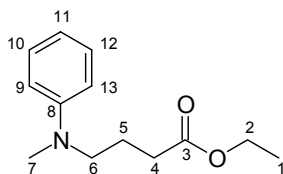


Abbildung 88: IR-Spektrum (KBr) von **DCM-5Py**.

Versuch 17: 4-(*N*-Methyl-*N*-phenylamino)butansäure-ethylester (25)



7.6 g (70 mmol) *N*-Methylanilin, 13.7 g (70.0 mmol) 4-Brombutansäureethylester, 6.0 g Natriumacetat-Trihydrat und 0.1 g Iod werden für 16 h unter Rückfluss und Rühren auf 110 °C erhitzt.

Nach dem Erkalten der Mischung wird mit 200 ml Wasser verdünnt, mit Natronlauge (40%) basisch gestellt und mit Ether extrahiert, bis die Etherphase farblos bleibt. Die vereinigten Etherphasen werden über Natriumsulfat getrocknet, eingengt und im Vakuum fraktioniert destilliert.

Ausbeute: 9.4 g (42 mmol) (67 % , Lit.^[123]: 79.5 %)

M (C₁₃H₁₉NO₂) = 221.3 g/mol

Siedepunkt: 95°C (0.013 mbar) Lit.^[123]: 116-118°C (0.33 mbar)

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3026 (=C-H-Valenz), 2980 (m, C-H-Valenz), 2821 (m, -C-H-Valenz), 1733 (s, C=O-Valenz), 1600 (s, arom. C=C-Valenz), 1507 (arom. Ringschwingung), 1372 (m, C-H-Deform.), 1177 und 1033 (-C-O-Valenz), 749 und 693 (s, =CH-Deform., monosubstituierter Aromat)

MS (): m/e (%) = 249 (2.9) $[\text{M}]^+$, 221 (6.8), 148 (12.1), 120 (100.0), 77 (10.2)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ [ppm] = 1.29 (3H, t, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, 1-H), 1.95 (2H, tt, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, 5-H), 2.38 (2H, t, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, 4-H), 2.95 (3H, s, 7-H), 3.39 (2H, t, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, 6-H), 4.17 (2H, q, $^3J_{\text{HH}} = 7.3$ Hz, 2-H), 6.70 – 6.77 (3H, m, A- und B-Teil eines $\text{A}[\text{BM}]_2$ -Systems, $J_{\text{B,M}} = 8.2$ Hz, $J_{\text{A,M}} = 7.3$ Hz, arom. H: 9, 11, 13), 7.26 (2H, m, M-Teil eines $\text{A}[\text{BM}]_2$ -Systems, $J_{\text{M,B}} = 8.5$ Hz, $J_{\text{M,A}} = 7.3$ Hz, arom. H: 10, 12)

UV/Vis (Chloroform): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]) = 256 (14000), 304 (2800)

Die spektroskopischen Daten stimmen mit den in der Literatur angegebenen überein.

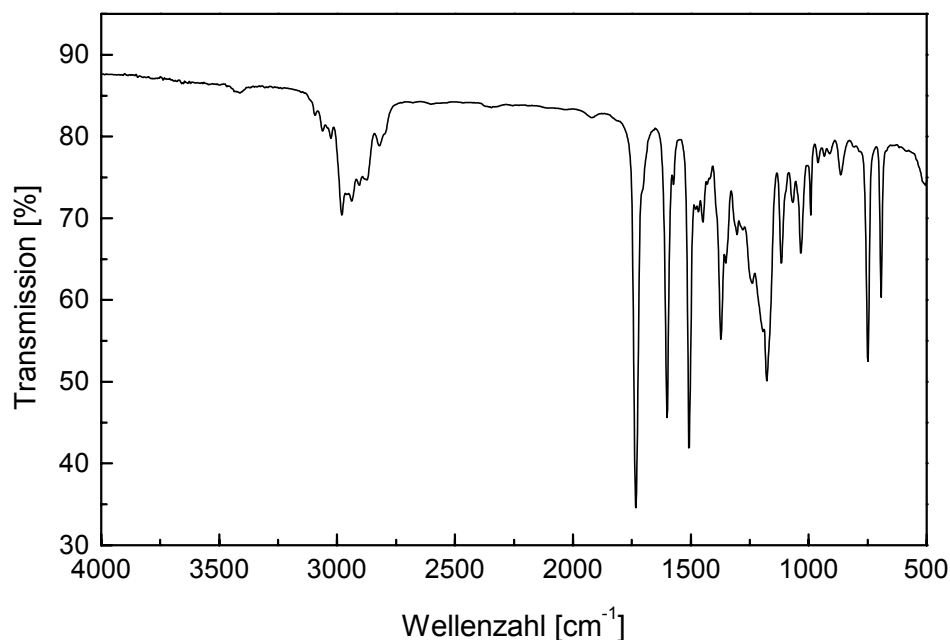
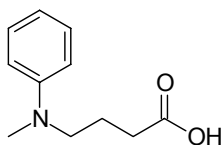


Abbildung 89: IR-Spektrum (Film) von 25.

Versuch 18: 4-[(N-Methyl-N-phenyl)-amino]-butansäure (26)



Ein Gemisch aus 9.35 g (42.0 mmol) **25** und 150 ml wässriger 5%iger Kaliumhydroxidlösung wird für 2 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Reaktionsgemisch mit Ether gewaschen und die wässrige, basische Phase anschließend mit konzentrierter Salzsäure vorsichtig auf pH 5.5 eingestellt. Die als Öl ausgefallene Aminosäure wird mit jeweils 100 ml Ether dreimal extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer erhält man das reine Produkt als eine farblose honigartige Flüssigkeit.

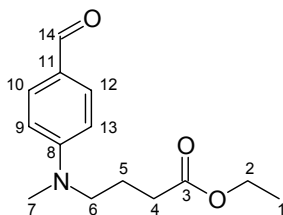
Ausbeute: 7.45 g (38.6 mmol) (92 %)

$M(C_{11}H_{15}NO_2) = 193.25 \text{ g/mol}$

Siedepunkt: Substanz zersetzt sich beim Erhitzen

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ [ppm] = 1.95 (2H, tt,), 2.45 (2H, t,), 2.97 (3H, s,), 3.40 (2H, t,), 6.77 (3H, B und M-Teil eines $[\text{AB}]_2\text{M}$ -Systems), 7.27 (2H, A-Teil eines $[\text{AB}]_2\text{M}$ -Systems)

Versuch 19: 4-[(N-Methyl-N-(4-formylphenyl)-amino]butansäure-ethylester (27)



In einer Apparatur mit KPG-Rührer, Innenthermometer und Tropftrichter mit Trockenrohr werden bei RT 10.0 g (70.0 mmol) Phosphorylchlorid und 13 ml DMF vorgelegt und mit einem Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Es wird ein Gemisch aus 14.4 g (70.0 mmol) **25** und 4 ml DMF langsam zugetropft, so dass die Temperatur nicht über 10°C steigt. Anschließend wird für 3h im Wasserbad auf 80-90 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird mit 50 g Eis unter Eiskühlung vorsichtig hydrolysiert, mit Natronlauge

(40%) ein pH-Wert von 6 eingestellt und mit Ether extrahiert. Die vereinigten Etherextrakte werden mit Natriumsulfat getrocknet, eingeengt und im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert.

Ausbeute: 12.2 g (48.9 mmol) (75 %)

M (C₁₄H₁₉NO₃) = 249.3 g/mol

Siedepunkt: 146 °C (0.012 mbar)

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2980 (m, C-H-Valenz), 2808 und 2734 (w, CHO-Valenz), 1731 (s, C=O-Valenz), 1666 (s, C=C-N-Valenz), 1596 (s, arom. C=C-Valenz), 1468 u. 1439 (m, C-H-Deform.), 1387 (m, C-H-Deform.), 818 (m, C-H-Deform. 1,4-subst. Arom.)

MS (): m/e (%) = 249 (2.9) [M]⁺, 221 (6.8), 148 (12.1), 120 (100.0), 77 (10.2)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] = 1.26 (3H, t, ³J_{1,2} = 7.2 Hz, 1-H), 1.95 (2H, tt, ³J_{5,4} = 7.2 Hz, ³J_{5,6} = 7.6 Hz, 5-H), 2.36 (2H, t, ³J_{4,5} = 7.2 Hz, 4-H), 3.06 (3H, s, 7-H), 3.48 (2H, t, ³J_{6,5} = 7.6 Hz, 6-H), 4.14 (2H, quartett, ³J_{2,1} = 7.2 Hz, 2-H), 6.73 (2H, m, A-Teil eines [AB]₂-Systems, arom. H: 9, 13), 7.73 (2H, m, B-Teil eines [AB]₂-Systems, arom. H: 10, 12), 9.73 (1H, s, 14-H)

¹³C-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] = 14.23 (1-C), 22.10 (5-C), 31.23 (4-C), 38.48 (7-C), 51.49 (6-C), 60.62 (2-C), 110.94 (9-C und 13-C), 125.23 (11-C), 132.13 (10-C und 12-C), 153.42 (8-C), 172.90 (3-C), 190.22 (14-C)

¹³C-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] = 14.22 (1-C), 22.10 (5-C), 30.83 (4-C), 38.48 (7-C), 51.49 (6-C), 60.62 (2-C), 111.00 (9-C und 13-C), 125.23 (10-C und 12-C), 132.13 (11-C), 153.42 (8-C), 172.90 (3-C), 190.22 (14-C)

UV/Vis (Chloroform): λ_{\max} [nm] (ϵ [l mol⁻¹ cm⁻¹]) = 339 (32300)

Elementaranalyse: C ber. 67.45 %	H ber. 7.68 %	N ber. 5.62 %
C gef. 67.36 %	H gef. 7.76 %	N gef. 5.62 %

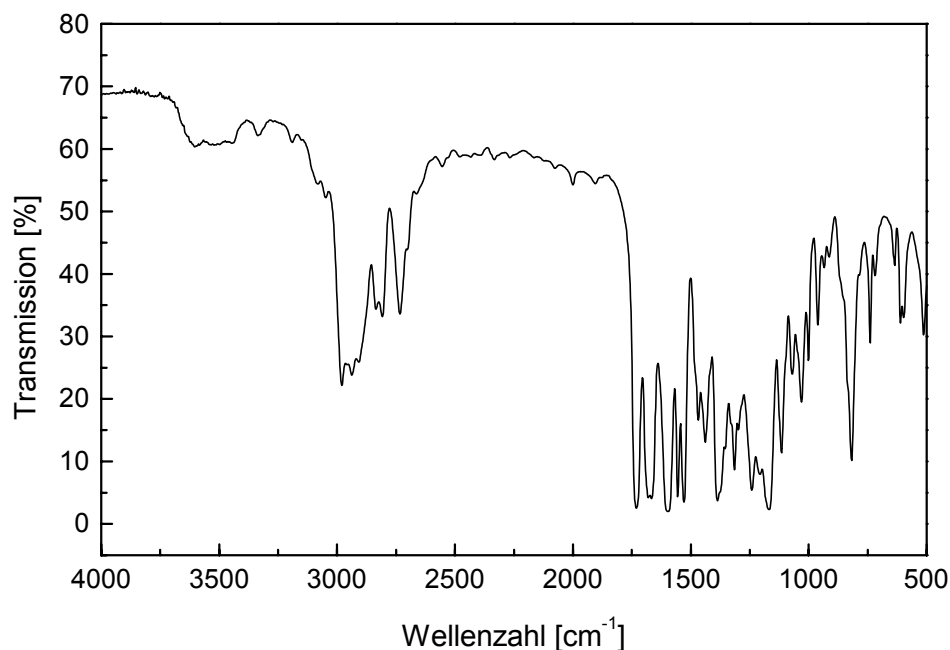
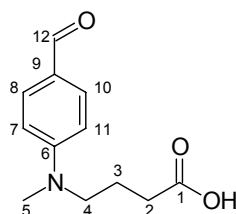


Abbildung 90: IR-Spektrum (Film) von 27.

Versuch 20: 4-[N-Methyl-N-(4-formylphenyl)amino]butansäure (14)



3.07 g (12.0 mmol) **27** werden bei RT mit 50 ml Kaliumhydroxid-Lösung (5 %) 3 h gerührt, bis aus dem Zweiphasensystem ein homogenes geworden ist. Die Lösung wird mit wenig Ether gewaschen und anschließend wird zur wässrigen Phase solange Salzsäure konz. zutropft, bis die Aminosäure ausflockt (pH = 5.3). Es wird mit Dichlormethan zweimal extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel entfernt. Das Produkt fällt als gelbliches Pulver an.

Ausbeute: 2.59 g (11.7 mmol) (98 %)

M (C₁₂H₁₅NO₃) = 221.26 g/mol

Schmelzpunkt: 209 °C

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2937 (m, O-H-Valenz), 2582 (w, N-H-Valenz), 1721 (m, C=O-Valenz), 1600 (s, C=C-Valenz), 1534 (m, COO⁻-Valenz), 1388 (m, O-H-Deform.), 1174 (s, C-O-Valenz), 817 (m, C-H-Deform. 1,4-subst. Arom.)

MS (): m/e (%) = 221 (21) [M]⁺, 193 (7), 160 (4), 148 (100), 120 (55), 77 (20), 57 (7)

¹H-NMR (DMSO-D₆, 500 MHz): δ [ppm] = 1.95 (2H, tt, ³J_{HH} = 7.6 Hz, ³J_{HH} = 7.6 Hz, 3-H), 2.28 (2H, t, ³J_{HH} = 7.1 Hz, 2-H), 3.00 (3H, s, 5-H), 3.44 (2H, t, ³J_{HH} = 7.6 Hz, 4-H), 6.81 (2H, m, A-Teil eines [AB]₂-Systems, 7-H und 11-H), 7.67 (2H, m, B-Teil eines [AB]₂-Systems, 8-H und 10-H), 9.65 (1H, s, 12-H)

¹³C-NMR (DMSO-D₆, 500 MHz): δ [ppm] = 20.28 (3-C), 29.29 (2-C), 36.64 (5-C), 49.32 (4-C), 109.52 (7-C und 11-C), 123.05 (9-C), 130.29 (8-C und 10-C), 151.89 (6-C), 172.79 (1-C), 188.33 (12-C)

UV/Vis (Chloroform): λ_{\max} [nm] (ϵ [l mol⁻¹ cm⁻¹]) = 338 (33000)

Elementaranalyse: C ber. 65.14 %	H ber. 6.83 %	N ber. 6.33 %
C gef. 64.74 %	H gef. 7.01 %	N gef. 6.53 %

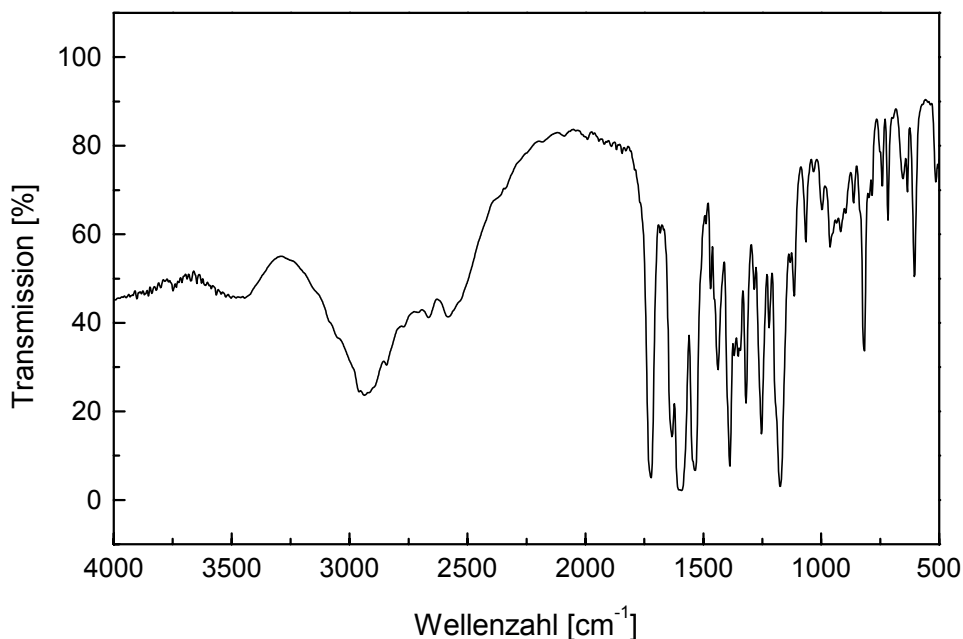
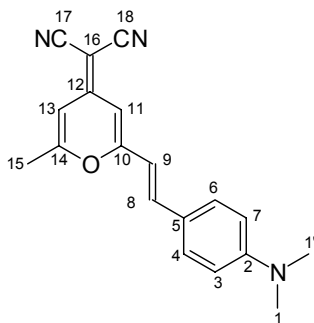


Abbildung 91: IR-Spektrum (KBr) von 14.

Versuch 21: 4-(Dicyanomethylen)-2-[4-(dimethylamino)styryl]-6-methyl-4H-pyran (DCM)



In einem 250 ml Kolben werden 4.6 g (0.027 mol) 4-Dicyanomethylen-2,6-dimethyl-4H-pyran **1**, 5.0 g (0.033 mol) 4-Dimethylaminobenzaldehyd, 0.5 ml Phosphorsäure und 25 ml Acetanhydrid für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das Lösungsmittel im Wasserstrahlvakuum entfernt und der Farbstoff durch mehrfache Säulenchromatographie gereinigt (1. Kieselgel, Dichlormethan/Diethylether 5:1; 2. Kieselgel, Dichlormethan/Diethylether 20:1; 3. Kieselgel, Toluol/Essigester 4:1), wobei jeweils die orangerot fluoreszierenden Fraktionen gesammelt werden. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels erhält man den Farbstoff in Form roter Kristalle.

Ausbeute: Die Ausbeute wurde nicht bestimmt, da nur ein geringer Teil des Ansatzes für spektroskopische Zwecke gereinigt wurde.

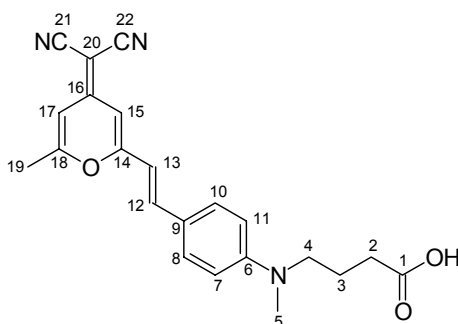
Ausbeute Lit^[53]: 11 %

M (C₁₉H₁₇N₃O) = 303.4 g/mol

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] = 2.37 (3H, d, J_{15,13} = 0.9 Hz, 15-H), 3.05 (6H, s, 1-H und 1'-H), 6.45 (1H, d, J_{13,12} = 16.1 Hz, 9-H), 6.47 (1H, m, J_{13,15} = 0.9 Hz, J_{13,11} = 2.2 Hz, 13-H), 6.56 (1H, d, J_{11,13} = 2.2 Hz, 11-H), 6.69 (2H, m, A-Teil eines [AB]₂-Systems, J_{A,B} = 8.8 Hz, 3-H und 7-H), 7.37 (1H, d, J_{8,9} = 16.1 Hz, 8-H), 7.42 (2H, m, B-Teil eines [AB]₂-Systems, J_{B,A} = 8.8 Hz, 4-H und 6-H)

UV/Vis (Acetonitril): λ_{max} [nm] (ε [l mol⁻¹ cm⁻¹]) = 463 (56200)

Versuch 22: 4-Dicyanomethylen-2-methyl-6-(4-{N-[4-(3-carboxypropyl)]-N-methylamino}-styryl)-4H-pyran (DCM-7)



In einem 100 ml Kolben werden 1.89 g (11.0 mmol) 4-Dicyanomethylen-2,6-dimethyl-4H-pyran **1** und 2.53 g (11.0 mmol) 4-N-Methyl-N-(4-formylphenyl)aminobutansäure **14** in 50 ml Ethanol gelöst und mit 0.5 ml Piperidin versetzt. Das Gemisch wird für 10 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird das in Ethanol schlecht lösliche 4-Dicyanomethylen-2,6-dimethyl-4H-pyran **1** abfiltriert, der Rückstand mit Ethanol gewaschen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die gelblichen Edukte werden über eine kurze Filtersäule (Kieselgel, Dichlormethan) abgetrennt, das sehr polare Produkt verbleibt dabei auf dem oberen Teil der Säule und wird schließlich mit Methanol eluiert. Danach wird der nach Entfernen des Lösungsmittels zurückgebliebene Rückstand, ein rotes Öl, durch Säulenchromatographie über Kieselgel mit dem ternären Gemisch Dichlormethan/Diethylether/Ameisensäure (60:20:5) weiter aufgereinigt, vorsichtig mit verdünnter Natronlauge gewaschen, um überschüssige

Ameisensäure zu entfernen und über Natriumsulfat getrocknet. Die Lösung wird dann am Rotationsverdampfer eingeeengt und man erhält den Farbstoff als dunkelrotes Pulver in Form eines 1:1-Addukts von Farbstoff und Ameisensäure. Alternativ lässt sich der Farbstoff am isoelektrischen Punkt (pH 5) aus wässriger Lösung ausfällen.

Ausbeute: 0.35 g (0.83 mmol) (8 %)
 $M(C_{22}H_{21}N_3O_3 \cdot CH_2O_2) = 421.55 \text{ g/mol}$

Schmelzpunkt: 165 °C

IR (Film, Chloroform): $\tilde{\nu} [\text{cm}^{-1}] = 2976$ und 2925 (-C-H-Valenz), 2207 (-C≡N-Valenz), 1705 (-C=O-Valenz), 1651 (-C=C-Valenz), 1598 (arom. Ringschwingung), 1548 , 1497 (arom. Ringschwingung), 1420 (-CH₃ und -CH₂-Deform), 1211 und 1174 (-C-O-C-Valenz), 926 und 811 (=C-H-Deform)

MS (EI, Pt: 200 °C): m/e (%) = 375 (15.9), 302 (100.0), 289 (15.6), 193 (10.2), 148 (14.2), 134 (20.0), 120 (55.2), 77 (10.9), 57 (25.3), 44 (62.4)

¹H-NMR (DMSO-D₆, 500 MHz): δ [ppm] = 1.74 (2H, tt, $J_{3,4} = 7.6 \text{ Hz}$, $J_{3,2} = 7.3 \text{ Hz}$, 3-H), 2.27 (2H, t, $J_{2,3} = 7.3 \text{ Hz}$, 2-H), 2.43 (3H, s, 19-H), 2.97 (3H, s, 5-H), 3.40 (2H, t, $J_{4,3} = 7.6 \text{ Hz}$, 4-H), 6.61 (1H, m, $J_{17,19} = 0.9 \text{ Hz}$, 17-H), 6.73 (1H, d, $J_{15,17} = 2.2 \text{ Hz}$, 15-H), 6.75 (2H, d, A-Teil eines [AB]₂-Systems, $J_{A,B} = 8.8 \text{ Hz}$, 7-H und 11-H), 7.00 (1H, d, $J_{13,12} = 16.1 \text{ Hz}$, 13-H), 7.43 (1H, d, $J_{12,13} = 16.1 \text{ Hz}$, 12-H), 7.52 (2H, d, B-Teil eines [AB]₂-Systems, $J_{B,A} = 8.8 \text{ Hz}$, 8-H und 10-H), 12.13 (1H, s, O-H)

¹³C-NMR (DMSO-D₆, 500 MHz): δ [ppm] = 19.72 (19-C), 22.04 (3-C), 31.08 (2-C), 38.26 (5-C), 51.05 (4-C), 54.37 (20-C), 105.29 (15-C), 105.79 (17-C), 112.01 (7-C und 11-C), 112.98 (21-C und 22-C), 116.21 (13-C), 122.30 (9-C), 130.32 (8-C und 10-C), 138.95 (12-C), 150.89 (6-C), 156.94 (16-C), 161.50 (14-C und 18-C), 174.57 (1-C)

UV/Vis (DMSO): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]) = 486 (38500), 376 (9000), 355 (9000)
 (Acetonitril): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]) = 466 (35000), 372 (9600), 351 (9600)

Elementaranalyse: C ber. 65.53 % H ber. 5.50 % N ber. 9.97 %
 C gef. 65.24 % H gef. 5.61 % N gef. 9.56 %

Die Elementaranalyse wird für das Ameisensäure-Farbstoff-Addukt ($C_{22}H_{21}N_3O_3 \cdot CH_2O_2$) berechnet.

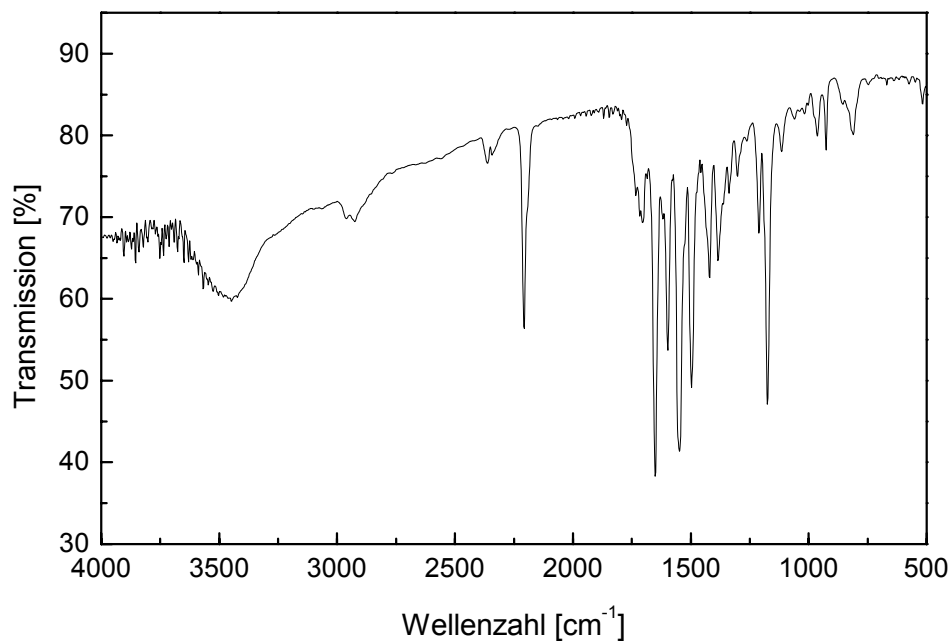
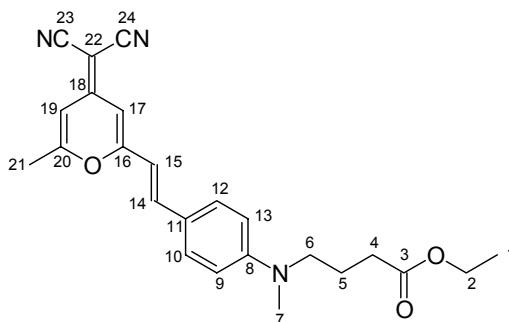


Abbildung 92: IR-Spektrum (Film, Chloroform) von **DCM-7**.

Versuch 23: 4-({4-[2-(4-Dicyanomethylen-6-methyl-4H-pyran-2-yl)-vinyl]-phenyl}-methylamino)-butansäureethylester (**DCM-21**)



Es werden 2.0 g (12 mmol) 4-Dicyanomethylen-2,6-dimethyl-4H-pyran und 2.9 g (12 mmol) **27** in 200 ml Ethanol gelöst, mit 0.5 ml Piperidin versetzt und für 12 h unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird zunächst über Kieselgel mit Toluol/Diethylether im

Verhältnis 10:1 säulenchromatographiert. Anschließend erfolgt eine weitere Säulenchromatographie der erhaltenen roten Fraktionen über Kieselgel mit CH_2Cl_2 . Man erhält dunkelrote Kristalle.

Ausbeute: 0.8 g (2 mmol) (17 %)
 $M(\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3) = 403.5 \text{ g/mol}$

Schmelzpunkt: 143 °C

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3059 (=C-H-Valenz), 2976 (-C-H-Valenz), 2206 und 2189 (-C \equiv N-Valenz), 1736 (-C=O-Valenz), 1649 (-C=C-Valenz), 1599 (Ringschwingung), 1545, 1496 (Ringschwingung), 1372 (-CH₃-Deform), 1311 (-C-N-Valenz), 1214, 1172 und 1117 (-C-O-C-Valenz), 970, 925 und 810 (=C-H-Deform)

MS (EI, Pt: 190 °C): m/e (%) = 403 (42.2) $[\text{M}]^+$, 358 (6.3), 302 (100.0), 151 (8.5)

¹H-NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ [ppm] = 1.26 (3H, t, $J_{1,2} = 7.3 \text{ Hz}$, 1-H), 1.94 (2H, tt, $J_{5,4} = J_{5,6} = 7.3 \text{ Hz}$, 5-H), 2.36 (2H, t, $J_{4,5} = 6.9 \text{ Hz}$, 4-H), 2.37 (3H, d, $J_{21,19} = 0.6 \text{ Hz}$, 21-H), 3.02 (3H, s, 7-H), 3.44 (2H, t, $J_{6,5} = 7.3 \text{ Hz}$, 6-H), 4.14 (2H, q, $J_{2,1} = 7.2 \text{ Hz}$, 2-H), 6.45 (1H, d, $J_{15,14} = 15.8 \text{ Hz}$, 15-H), 6.48 (1H, m, $J_{19,21} = 0.6 \text{ Hz}$, $J_{19,17} = 2.2 \text{ Hz}$, 19-H), 6.57 (1H, d, $J_{17,19} = 2.2 \text{ Hz}$, 17-H), 6.70 (2H, d, A-Teil eines $[\text{AM}]_2$ -Systems, $J_{\text{AM}} = 8.8 \text{ Hz}$, 9-H und 13-H), 7.36 (1H, d, $J_{14,15} = 15.8 \text{ Hz}$, 14-H), 7.41 (2H, d, M-Teil eines $[\text{AM}]_2$ -Systems, $J_{\text{MA}} = 8.8 \text{ Hz}$, 10-H und 12-H)

UV/Vis (Acetonitril): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]) = 350 (11500), 372 (12200), 466 nm (46900)

Elementaranalyse:	C ber. 71.44 %	H ber. 6.25 %	N ber. 10.41 %
	C gef. 70.82 %	H gef. 6.31 %	N gef. 10.27 %

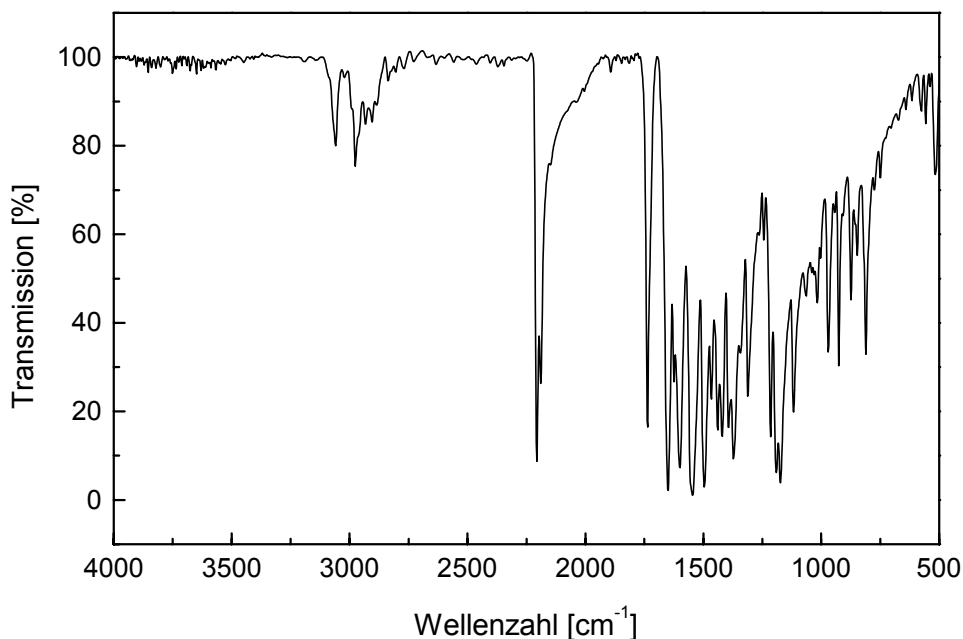
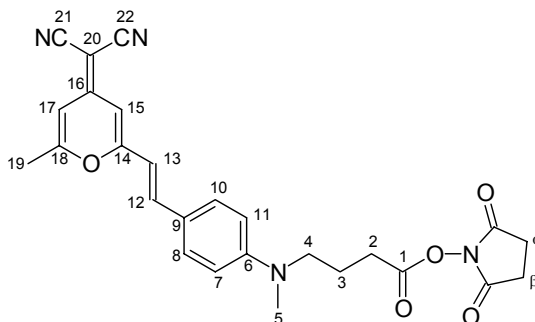


Abbildung 93: IR-Spektrum (KBr) von **DCM-21**.

Versuch 24: 4-({4-[2-(4-Dicyanomethylen-6-methyl-4*H*-pyran-2-yl)-vinyl]-phenyl}-methylamino)-butansäure-succinimidylester (DCM-20**)**



In einem 250 ml Zweihalskolben mit Argonaufleitung werden 110 mg (0.290 mmol) **DCM-7** und 34 mg (0.29 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid in 125 ml absolutem Ethylacetat gelöst und mit 60 mg (0.29 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid DCC bei RT versetzt und 36 h lang gerührt. Die jetzt trübe Lösung wird filtriert und das Filtrat eingengt. Anschließend muss der Farbstoff über eine kleine Filtersäule (Kieselgel, CH₂Cl₂/Diethylether 10:1) von nicht umgesetztem Edukt gereinigt werden. Nach dem Entfernen des Laufmittels erhält man hellrote voluminöse Kristalle.

Ausbeute: 112 mg (0.237 mmol) (82 %)

M (C₂₆H₂₄N₄O₅) = 472.50 g/mol

Schmelzpunkt: 89 °C

IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3030 (=C-H-Valenz), 2939 (-C-H-Valenz), 2207 (-C≡N-Valenz), 1812, 1782 und 1738 (-C=O-Valenz), 1650 (-C=C-Valenz), 1597 (arom. Ringschwingung), 1548, 1497 (arom. Ringschwingung), 1418 (-CH₃ und -CH₂-Deform), 1381 (-CH₃-Deform), 1303 (-C-N-Valenz), 1209, 1175 und 1086 (-C-O-C-Valenz), 964, 926 und 813 (=C-H-Deform)

MS (EI, Pt: 250 °C): m/e (%) = 472 (3) [M]⁺; 302 (100.0); 115 (42); 99 (25); 55 (49)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] = 2.05 (2H, tt, J_{3,4} = 7.6, J_{3,2} = 7.3 Hz, 3-H), 2.38 (3H, s, 19-H), 2.68 (2H, t, J_{2,3} = 7.3, 2-H), 2.84 – 2.86 (4H, s, α -H und β -H), 3.05 (3H, s, 5-H), 3.52 (2H, t, J_{4,3} = 7.6, 4-H), 6.47 (1H, d, J_{13,12} = 15.8 Hz, 13-H), 6.49 (1H, m, J_{17,19} = 0.9 Hz, J_{17,15} = 2.2 Hz, 17-H), 6.58 (1H, d, J_{15,17} = 2.2 Hz, 15-H), 6.71 (2H, m, A-Teil eines [AB]₂-Systems, J_{A,B} = 8.8 Hz, 7-H und 11-H), 7.36 (1H, d, J_{12,13} = 15.8 Hz, 12-H), 7.42 (2H, m, B-Teil eines [AB]₂-Systems, J_{B,A} = 8.8 Hz, 8-H und 10-H)

¹³C-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] = 19.99 (19-C), 22.07 (3-C), 25.66 (α -C und β -C), 28.28 (2-C), 38.55 (5-C), 50.99 (4-C), 54.37 (20-C), 105.56 (15-C), 106.26 (17-C), 112.01 (7-C und 11-C), 112.75 (13-C), 116.21, 122.65 (9-C), 129.90 (8-C und 10-C), 138.67 (12-C), 150.65 (6-C), 156.94 (16-C), 160.52 (14-C oder 18-C), 161.73 (14-C oder 18-C), 169.10 (1-C)

UV/Vis (Acetonitril): λ_{\max} [nm] (ϵ [l mol⁻¹ cm⁻¹]) = 462 (41500); 372 (6300)

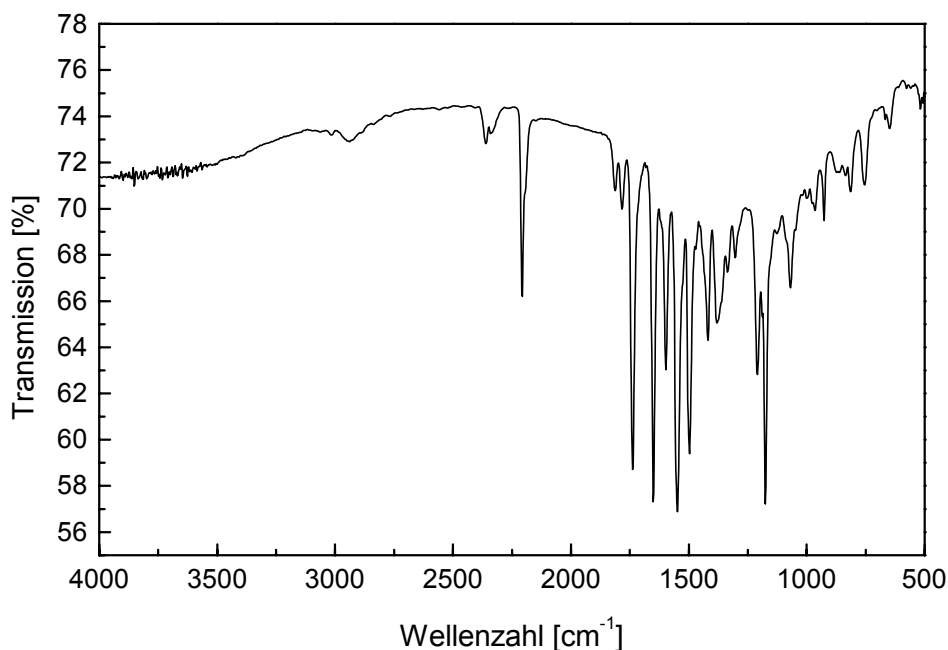
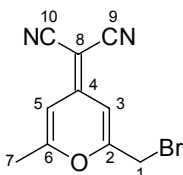


Abbildung 94: IR-Spektrum (Film, Chloroform) von **DCM-20**.

Versuch 25: 2-Brommethyl-4-dicyanomethylen-6-methyl-4H-pyran (19)



In einem 500 ml Zweihalskolben mit Rückflusskühler werden 5.0 g (0.029 mol) 4-Dicyanomethylen-2,6-dimethyl-4H-pyran, 6.7 g (0.038 mol) *N*-Bromsuccinimid und 3 Spatelspitzen Dibenzoylperoxid in 70 ml Tetrachlorkohlenstoff vorgelegt und für 7.5 h unter Rückfluss erhitzt. Im Abstand von 2 h wird jeweils neuer Starter zugegeben. Aus dem noch lauwarmen Reaktionsgemisch wird anschließend der Feststoff über eine Fritte abgesaugt und mit wenig kaltem Tetrachlorkohlenstoff nachgewaschen. Aus dem Filtrat kristallisiert im Kühlschrank über Nacht das Produkt aus. Es wird aus wenig Ethanol umkristallisiert und fällt in Form gelber Kristalle an. Als Produkt erhält man einfach und doppelt bromiertes Edukt (2-Brommethyl-6-brommethyl-4-dicyanomethylen-4H-pyran) im Verhältnis 1:1. Dieses wird ohne weiter Reinigung weiter eingesetzt.

Rohausbeute: 5.2 g (0.021 mol) (72 %)

$M(C_{10}H_7BrN_2O) = 251.08 \text{ g/mol}$

IR (KBr): $\tilde{\nu} [cm^{-1}] = 3064$ (=C-H-Valenz), 2215 (-C≡N-Valenz), 1660 (-C=C-Valenz), 1590 und 1520 (Ringschwingung), 1419 (-CH₃- und -CH₂-Deform), 1354 (-CH₃-Deform), 1284 (-C-O-C-Valenz), 1178 (-C-O-Valenz), 933 (=C-H-Deform)

MS (EI, Pt.: 110 °C): m/e (%) = 252 (15) $[C_{10}H_7^{81}BrN_2O]^+$, 250 (15) $[C_{10}H_7^{79}BrN_2O]^+$, 172 (100), 171 (50), 116 (10), 90 (6), 43 (34)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] = 2.36 (3H, d, $J_{7,5} = 0.9 \text{ Hz}$, 7-H), 4.18 (2H, s, 1-H), 6.56 (1H, m, $J_{5,7} = 0.9 \text{ Hz}$, $J_{5,3} = 2.2 \text{ Hz}$, 5-H), 6.78 (1H, d, $J_{3,5} = 2.2 \text{ Hz}$, 3-H)

UV/Vis (Chloroform): $\lambda_{max} [nm]$ ($\epsilon [l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$) = 351 (24600)

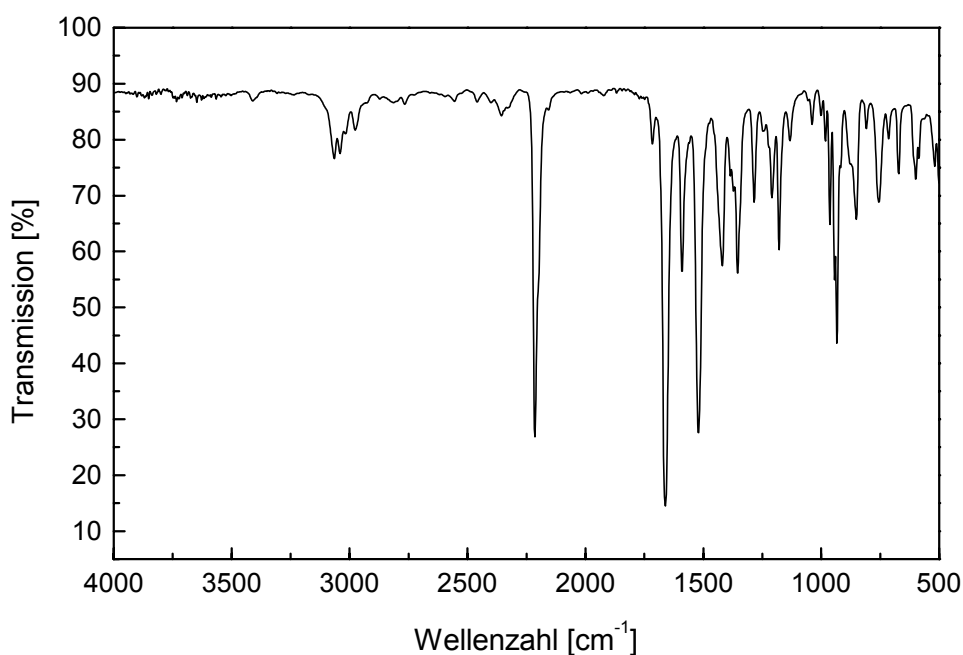
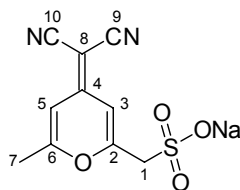


Abbildung 95: IR-Spektrum (KBr) von **19**.

Versuch 26: Natrium-(4-dicyanomethylen-6-methyl-4*H*-pyran-2-yl)-methylsulfonat (31)



Zu einer warmen Lösung aus 12.1 g (48.0 mmol) 2-Brommethyl-4-dicyanomethylen-6-methyl-4*H*-pyran **19** und 500 ml Ethanol wird eine Lösung aus 6.07 g (48.0 mmol) Natriumsulfit in 250 ml Wasser gegeben und für 4 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand mit insgesamt 1.5 l Ethanol mehrfach ausgekocht und heiß filtriert. Die ethanolische Lösung wird auf ca. 500 ml eingengt, wobei das monosubstituierte Produkt **31** auszufallen beginnt. Zur Vervollständigung der Fällung wird die Lösung über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

Ausbeute: 3.60 g (13.1 mmol) (27 % bzw. 20 % bezogen auf Versuch 26)

$M(C_{10}H_7N_2O_2SNa) = 274.23 \text{ g/mol}$

Schmelzpunkt: > 300 °C

IR (KBr): $\tilde{\nu} [cm^{-1}] = 3464$ und 3055 (-O-H-Valenz), 3002 (=C-H-Valenz), 2219 (-C≡N-Valenz), 1655 (-C=C-Valenz), 1580 und 1505 (Ringschwingung), 1424 (-SO₂-Valenz), 1358 (-CH₃-Deform), 1277 und 1230 (-C-O-C-Valenz), 1100 (-C-O-Valenz), 1054 (-S=O-Valenz)

¹H-NMR (D₂O, 500 MHz): δ [ppm] = 2.11 (3H, d, $J_{7,5} = 0.6 \text{ Hz}$, 7-H), 3.93 (2H, s, 1-H), 6.46 (1H, m, $J_{5,7} = 0.6 \text{ Hz}$, $J_{5,3} = 2.2 \text{ Hz}$, 5-H), 6.62 (1H, d, $J_{3,5} = 2.2 \text{ Hz}$, 3-H)

¹³C-NMR (DMSO-D₆, 500 MHz): δ [ppm] = 19.73 (7-C), 55.05 (8-C), 55.32 (1-C), 106.68 (5-C), 108.29 (3-C), 115.77 (9-C und 10-C), 157.46 (4-C), 162.13 (6-C), 165.41 (2-C)

UV/Vis (DMSO): $\lambda_{max} [nm]$ ($\epsilon [l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$) = 355 (16100)

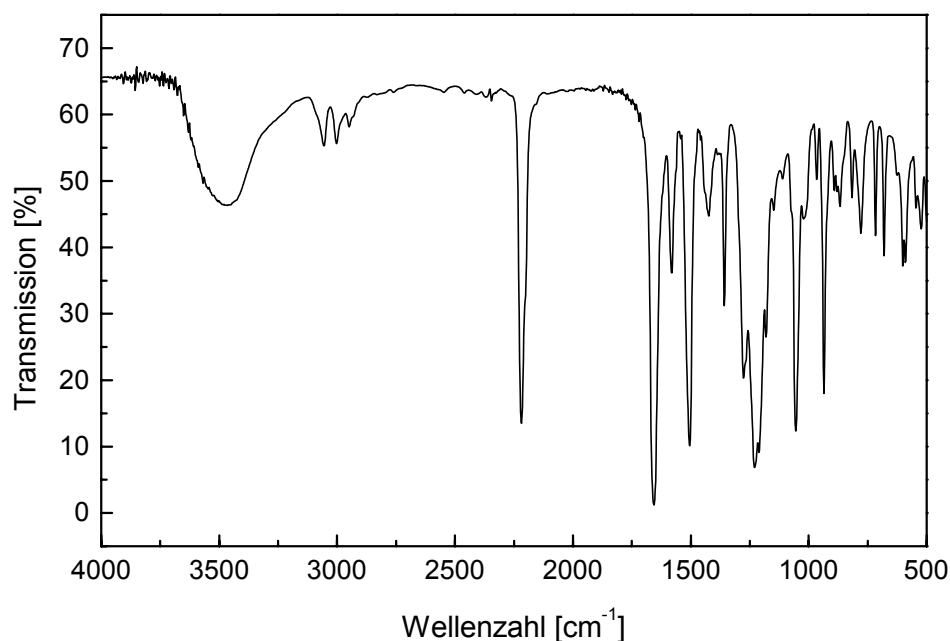
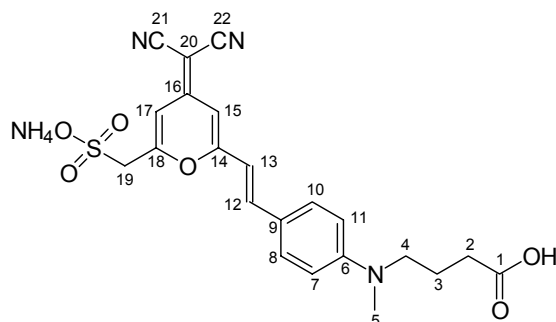


Abbildung 96: IR-Spektrum (KBr) von **31**.

Versuch 27: Ammonium-[6-(2-{4-[(3-carboxypropyl)-methylamino]-phenyl}-vinyl)-4-dicyanomethylen-4*H*-pyran-2-yl]-methylsulfonat (DCM-22NH₄)



In einem 500 ml Kolben werden 3.01 g (12.0 mmol) **31** und 2.66 g (12.0 mmol) **14** in 400 ml Ethanol gelöst und nach der Zugabe von 0.5 ml Piperidin für 8 h unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird abdestilliert, der Rückstand in destilliertem Wasser gelöst und auf einen schwach basischen Ionenaustauscher (Amberlite IRA-67) gegeben. Zunächst werden die schwach polaren Substanzen mit einem TRIS-Puffer (0.05 M, pH 8) eluiert, anschließend die polareren Nebenprodukte mit einem Ammoniumbromid-Gradienten von 0.06 M bis 0.15 M in TRIS-Puffer (0.05 M) bei einer Elutionskontrolle über UV/Vis-Spektroskopie, bis das Spektrum des Farbstoffs nicht mehr überlagert wird

von Nebenproduktspektren. Vor dem Eluieren des Farbstoffs wird der Ionenaustauscher gründlich mit destilliertem Wasser gespült, um den TRIS-Puffer zu entfernen. Der Farbstoff wird schließlich mit einer Ammoniumbromidlösung (1.5 M, dest. H₂O) ohne Zusatz von Puffer eluiert. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Farbstoff durch wiederholtes heißes Auskochen des Rückstands mit Aceton erhalten. Es wird aus Aceton/Ethanol umkristallisiert. Der Farbstoff fällt in Form eines schwarzen hygroskopischen Feststoffs als Monoammonium-Salz an.

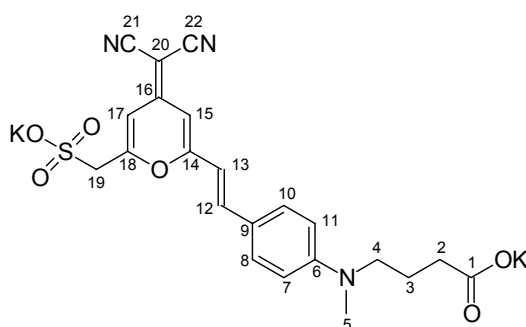
Ausbeute: wurde nicht bestimmt, da nur ein kleiner Teil als Ammoniumsalz isoliert wurde.

$$M(C_{22}H_{24}N_4O_6S) = 472.52 \text{ g/mol}$$

MS (FAB, NBA + NaI): m/e = 453 [Dianion]⁺

¹H-NMR (DMSO-D₆, 500 MHz): δ [ppm] = 1.74 (2H, tt, J_{3,4} = 7.6, J_{3,2} = 7.3 Hz, 3-H), 2.27 (2H, t, J_{2,3} = 7.3, 2-H), 2.97 (3H, s, 5-H), 3.40 (2H, t, J_{4,3} = 7.6, 4-H), 3.93 (2H, s, 19-H), 6.70 (1H, d, J_{17,15} = 2.2 Hz, 17-H), 6.76 (1H, d, J_{15,17} = 2.2 Hz, 15-H), 6.77 (2H, d, A-Teil eines [AB]₂-Systems, J_{A,B} = 8.8 Hz, 7-H und 11-H), 7.00 (1H, d, J_{13,12} = 15.8 Hz, 13-H), 7.47 (1H, d, J_{12,13} = 15.8 Hz, 12-H), 7.51 (2H, d, B-Teil eines [AB]₂-Systems, J_{B,A} = 8.8 Hz, 8-H und 10-H), 7.11 (4H, t, J_{H,N} = -51.1 Hz, NH₄⁺), 12.12 (1H, s, sehr breit, O-H)

Versuch 28: Dikalium-[6-(2-{4-[3-propylcarboxylato)-methylamino]-phenyl}-vinyl)-4-dicyanomethylen-4H-pyran-2-yl]-methylsulfonat (DCM-22K)



Darstellung und Reinigung wie Versuch 28. Der Farbstoff wird allerdings mit einer KBr-Lösung (1.5 M) aus dem Ionenaustauscher eluiert. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Farbstoff anschließend mehrfach mit siedendem

Methanol abs. aus dem Rückstand extrahiert. Die methanolischen Lösungen werden vereinigt und eingengt, der Farbstoff in destilliertem Wasser aufgenommen und auf eine RP-18 Kieselgelchromatographiesäule gegeben. Zunächst werden KBr und weitere Verunreinigungen mit destilliertem Wasser als Laufmittel entfernt, dann wird der Farbstoff durch Zugabe von Methanol zum Laufmittel eluiert. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Farbstoff im Ölpumpenvakuum getrocknet. Der Farbstoff fällt in Form eines schwarzen elektrostatischen Feststoffs als Dikalium-Salz an.

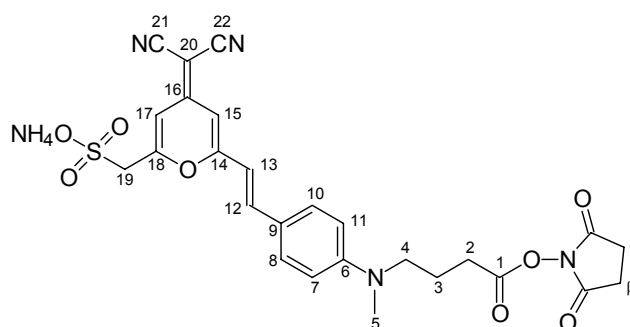
Ausbeute: wurde nicht bestimmt, da nur ein kleiner Teil als Dikaliumsalz isoliert wurde.

$$M(\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{K}_2\text{N}_3\text{O}_6\text{S}) = 531.67 \text{ g/mol}$$

¹H-NMR (DMSO-D₆, 500 MHz): δ [ppm] = 1.67 (2H, tt, $J_{3,4} = 7.6$, $J_{3,2} = 7.3$ Hz, 3-H), 1.99 (2H, t, $J_{2,3} = 7.3$, 2-H), 2.97 (3H, s, 5-H), 3.40 (2H, t, $J_{4,3} = 7.6$, 4-H) verdeckt durch Wasserpeak, 3.92 (2H, s, 19-H), 6.69 (1H, d, $J_{17,15} = 2.2$ Hz, 17-H), 6.75 (1H, d, $J_{15,17} = 2.2$ Hz, 15-H), 6.78 (2H, d, A-Teil eines [AB]₂-Systems, $J_{A,B} = 8.8$ Hz, 7-H und 11-H), 6.98 (1H, d, $J_{13,12} = 15.8$ Hz, 13-H), 7.47 (1H, d, $J_{12,13} = 15.8$ Hz, 12-H), 7.49 (2H, d, B-Teil eines [AB]₂-Systems, $J_{B,A} = 8.8$ Hz, 8-H und 10-H)

UV/Vis (Wasser): λ_{max} [nm] (ϵ [l mol⁻¹ cm⁻¹]) = 295 (10000), 370 (14100), 471 (30000)

Versuch 29: Ammonium-[6-(2-{4-[3-(succinimidyl-carboxypropyl)-methylamino]-phenyl}-vinyl)-4-dicyanomethylen-4*H*-pyran-2-yl]-methylsulfonat (DCM-23NH₄)



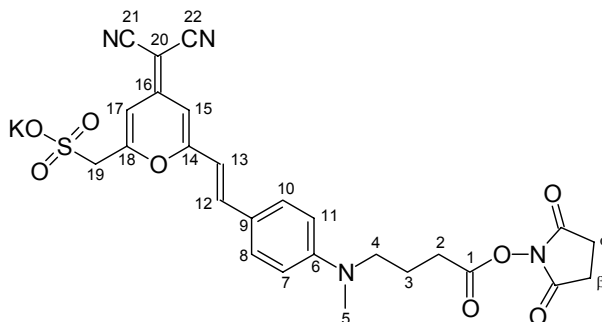
In einem 50 ml Zweihalskolben werden 30 mg (0.060 mmol) des Farbstoffs **DCM-22NH₄**, 25 mg (0.060 mmol) DCC und 9 mg (0.06 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid in 20 ml DMF abs. für 48 h bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Der entstandene weiße Niederschlag wird über eine Fritte abgesaugt und das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt. Nach der Umkristallisation aus Chloroform erhält man einen rotschwarzen klebrigen Feststoff.

Ausbeute: 14 mg (0.025 mmol) (41 %)
 $M(C_{26}H_{27}N_5O_8S) = 569.59 \text{ g/mol}$

MS (FAB, + NBA): $m/e = 551 [Anion]^+$

UV/Vis (Methanol): $\lambda_{max} [nm] (\epsilon [l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}]) = 353 (6400), 474 (15000)$

Versuch 30: Kalium-[6-(2-{4-[3-(succinimidyl-carboxypropyl)-methylamino]-phenyl}-vinyl)-4-dicyanomethylen-4*H*-pyran-2-yl]-methylsulfonat (DCM-23K)



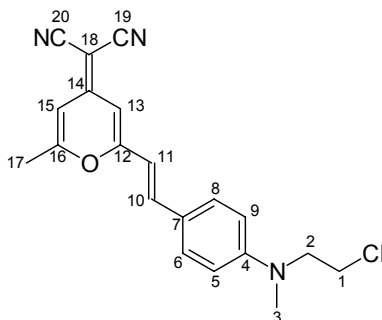
30 mg (0.056 mmol) des Farbstoffs **DCM-23K** werden in 30 ml DMSO gelöst und mit 7 mg (0.06 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid und 23 mg (0.12 mmol) DCC versetzt. Nach fünftägigem Rühren bei Raumtemperatur wird das Lösungsmittel im Ölpumpenvakuum entfernt und der Rückstand in Aceton aufgenommen. Der unlösliche Anteil wird über eine Glasfritte abgesaugt, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt aus Aceton umkristallisiert. Es fällt in Form eines dunkelroten klebrigen Feststoffs an.

Ausbeute: 13 mg (0.022 mmol) (37 %)
 $M(C_{26}H_{23}K_1N_4O_8S) = 590.64 \text{ g/mol}$

MS (FAB, + NBA): $m/e = 551$ [Anion]⁺

UV/Vis (Methanol): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]) = 355 (7000), 476 (16300)

Versuch 31: 4-Dicyanomethylen-2-methyl-6-{4-[N-(2-chlorethyl)-N-methylamino]-styryl}-4H-pyran (DCM-24)



1.0 g (6.0 mmol) 2-(*N*-Methyl-*N*-phenylamino)-ethylchlorid **4**, 1.1 g (6.0 mmol) 4-Dicyanomethylen-2.6-dimethyl-4*H*-pyran **1** und 0.3 ml Piperidin werden in 30 ml Ethanol für 27 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird der Farbstoff durch eine Säulenchromatographie (Kieselgel, Dichlormethan/Diethylether, 10:1) gereinigt und anschließend aus Dichlormethan umkristallisiert.

Ausbeute: 0.36 g (1.0 mmol) (17 %)
M (C₂₀H₁₈ClN₃O) 351.84 g/mol

Schmelzpunkt: 198 °C

IR (Film, Chloroform): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2907, 2827 und 2868 (-C-H-Valenz), 2198 (-C≡N-Valenz), 1650 (-C=C-Valenz), 1598, 1541 und 1489 (Ringschwingung), 1419 (-CH₃ u. -CH₂-Deform), 1376 (-CH₃-Deform), 1338 (-C-N-Valenz), 1208 (-C-O-C-Valenz), 1177 (-C-O-Valenz), 960 (=C-H-Deform), 833 (=C-H-Deform)

MS (EI, Pt.:170 °C): m/e (%) = 351 (3) [M]⁺, 302 (8), 84 (60), 49 (100)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] = 2.31 (3H, d, J_{17,15} = 0.8 Hz, 17-H), 3.11 (3H, s, 3-H), 3.66 (2H, t, J_{2,1} = 6.7 Hz, 1-H), 3.76 (2H, t, J_{1,2} = 6.7 Hz, 2-H), 6.48 (1H, d, J_{11,10} = 15.8 Hz, 11-H), 6.49 (1H, m, 15-H), 6.59 (1H, d, J_{13,15} = 2.0 Hz, 13-H), 6.71 (2H, d, A-Teil eines [AM]₂-Systems, J_{AM} = 9.0 Hz, 5-H und 9-H), 7.36 (1H, d, J_{10,11} = 15.8 Hz, 10-H), 7.43 (2H, d, M-Teil eines [AM]₂-Systems, J_{MA} = 9.0 Hz, 6-H und 8-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- D_6 , 500 MHz): δ [ppm] = 18.83 (17-C), 37.91 (3-C), 39.60 (1-C), 52.64 oder 55.37 (2-C), 104.39 (11-C), 104.89 (15-C), 110.82 (5-C und 9-C), 112.00 (13-C), 114.51 und 114.54 (19-C und 20-C), 122.90, 128.81 (6-C und 8-C), 137.46 (10-C), 148.97, 155.48, 159.54, 161.26

UV/Vis (Acetonitril): λ_{max} [nm] (ϵ [$\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]) = 369 (13700), 457 (45700)

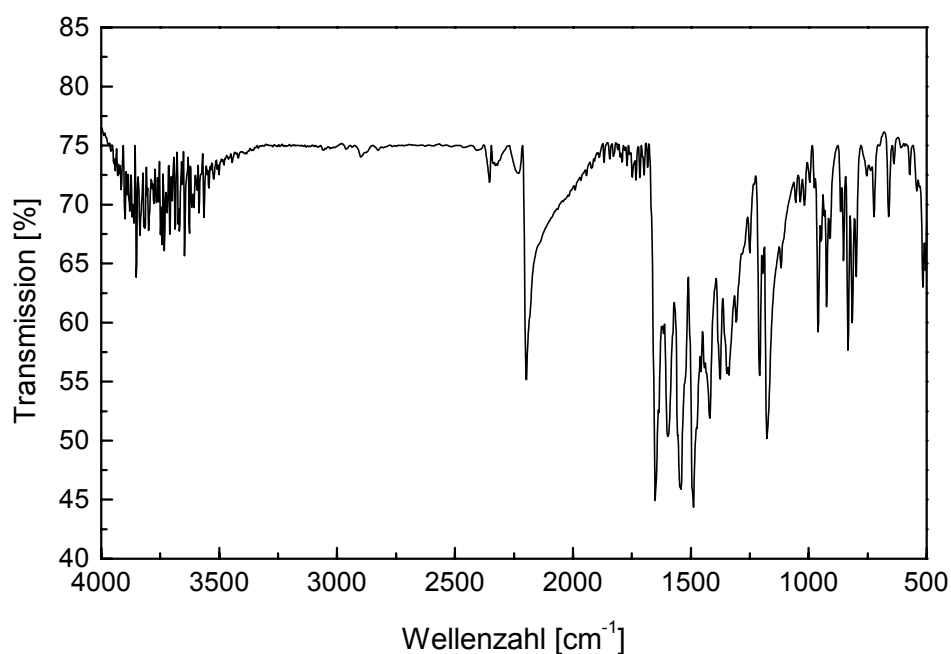


Abbildung 97: IR-Spektrum (Film, Chloroform) von **DCM-24**.

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Absorbanz
AMPD	Adamantyl-Methoxy-Phenyl-Dioxetan
AMPPD [®]	3-(2'-Spiroadamantyl)-4-methoxy-4-(3'-phosphoryloxy)-phenyl-1,2-dioxetan
AP	Alkalische Phosphatase
a. u.	arbitrary units
BRET	BiolumineszenzResonanz Energie Transfer
CDCl ₃	Deuteriochloroform
CDP- <i>Star</i> [®]	2-Chlor-5-(4-methoxyspiro-{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chlor)-tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)-1-phenylphosphat
CSDP [®]	3-(4-Methoxyspiro-{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chlor)-tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)-phenylphosphat
DBE	Direct Blotting Electrophoresis
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
FAB	Fast Atom Bombardment
ELF	Enzyme Labeled Fluorescence
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Stunde
HTS	High Throughput Screening
kDa	Kilodalton
min	Minute
NBA	3-Nitrobenzylalkohol
NHS	N-Hydroxysuccinimid
RLuc	Renilla Luciferase
RP	Reversed Phase

Abkürzungsverzeichnis

RT	Raumtemperatur
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
Vis	visible
YFP	Yellow Fluorescent Proteine
ϵ	Extinktionskoeffizient

9 Literatur

- [1] Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Firmeninformation.
- [2] H. Arp, *LifeScience Technologien*, Februar 2000.
- [3] K. Mlejnek, C. Fattinger, *LifeScience Technologien*, Februar 2000.
- [4] W. Paffhausen, Bayer Wuppertal, persönliche Mitteilung, 2001.
- [5] C. Fattinger, *Innovation* (Carl Zeiss), **2002**, *12*, 4-5.
- [6] J.B. LePercq, C. Paoletti, *Anal. Biochem.*, **1966**, *17*, 100-107.
- [7] D. Witzak, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2000**.
- [8] L. Schneider, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2001**.
- [9] S.J. Augood, J.L. Ruth, P.C. Emson, *Nucleic Acid Res.*, **1990**, *18*, 4291.
- [10] F. Lottspeich, H. Zorbach, Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1. Auflage, **1998**.
- [11] P. Richterich, G.M. Church, *Methods in Enzymology*, **1993**, *218*, 187-222.
- [12] D.J. Reen, *Methods Mol. Biol.*, **1994**, *32*, 461-466.
- [13] Z. Huang, E. Terpetschnig, W. You, R.P. Haugland, *Anal. Biochem.*, **1992**, *207*, 32-39.
- [14] D.L. Williams, A. Heller, *J. Phys. Chem.*, **1970**, *74*, 4473.
- [15] W.G. Cox, V.L. Singer, *J. Histochem Cytochem*, **1999**, *47*, 1443-1456.
- [16] D. Bueno, J. Skinner, H. Abud, J.K. Heath, *Trends Genet.*, **1996**, *12*, 385-387.
- [17] J.F. Breining, D.G. Baskin, *J. Histochem. Cytochem.*, **2000**, *48*, 1593-1599.
- [18] R.P. Haugland, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, Eugene, 9. Auflage, 2002.
- [19] W.G. Telford, W.G. Cox, V.L. Singer, *Cytometry*, **2001**, *43*, 117-125.
- [20] W.G. Telford, W.G. Cox, D. Stiner, V.L. Singer, S.B. Doty, *Cytometry*, **1999**, *37*, 314-319.
- [21] I. Bronstein, B. Edwards, J.C. Voyta, *J. Bioluminescence and Chemiluminescence*, **1989**, *4*, 99-111.
- [22] H.R. Christen, F. Vögtle, *Organische Chemie, Band II*, Otto Salle Verlag, Frankfurt a. M., Verlag Sauerländer, Aarau, 1. Auflage, **1990**.
- [23] T. Förster, *Ann. Phys.*, **1948**, *6*, 54-75.
- [24] T. Förster, *Discuss. Faraday Soc.*, **1959**, *27*, 7-17.

- [25] L. Stryer, R.P. Haugland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**, *58*, 719-726.
- [26] C.G. Remedios, P.D. Moens, *J. Struct. Biol.*, **1995**, *115*, 175-185.
- [27] P. Mellet, C. Boudier, Y. Mely, J.G. Bieth, *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 9119-9123.
- [28] J. Xing, H.C. Cheung, *Biochemistry*, **1995**, 6475-6487.
- [29] W. Berger, H. Prinz, J. Striessnig, H.C. Kang, R. Haugland, H. Glossmann, *Biochemistry*, **1994**, *33*, 11875-11883.
- [30] D.E. Wolf, A.P. Winiski, A. E. Ting, K. M. Bocian, R. E. Pagano, *Biochemistry*, **1992**, *31*, 2865-2873.
- [31] D.K. Struck, D. Hoeckstra, R.E. Pagano, *Biochemistry*, **1981**, *20*, 4093-4099.
- [32] W.S. Furey, C.M. Joyce, M.A. Osborne, D. Klenerman, J.A. Peliska, S. Balasubramanian, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 2979-2990.
- [33] K. Toth, V. Sauermann, J. Langowski, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 8173-8179.
- [34] S. Sixou, F.C. Szoka Jr., G.A. Green, B. Giusti, G. Zon, D.J. Chin, *Nucleic Acids Res.*, **1994**, *22*, 662-668.
- [35] T. Wilson, J.W. Hastings, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **1998**, *14*, 197-230.
- [36] Y. Xu, D.W. Piston, C.H. Johnson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*, 151-156.
- [37] M. Ormö, A.B. Cubitt, K. Kallio, C.A. Gross, R.Y. Tsien, S.J. Remington, *Science*, **1996**, *273*, 1392-1395.
- [38] E. Joly, B. Houle, P. Dionne, S. Taylor, L. Ménard, Packard BioScience, Application Note BRT-001, **2001**.
- [39] P. Dionne, B. Houle, E. Joly, L. Ménard, S. Taylor, *Luminescence Biotechnology Instruments and Applications*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, **2001**.
- [40] M.S. Lesney, *Moderne Drug Discovery*, **2001**, *4*, 40-47.
- [41] R.P. Haugland, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, Eugene, 9. Auflage, **2002**.
- [42] M. Meyer, J.-C. Mialocq, B. Perly, *J. Phys. Chem.*, **1990**, *94*, 98-104.
- [43] H. Du, R. A. Fuh, J. Li, A. Corkan, J. S. Lindsey, *Photochemistry and Photobiology*, 1998, *68*, 141-142.

- [44] Y. Xu, D.W. Piston, and C.H. Johnson, *The Spectrum*, Center for Photochemical Sciences, Bowling Green State University, USA, **1999**, 9-14.
- [45] T.W. Gadella Jr., G.N. van der Krogt, T. Bisseling, *Trends Plant Sci.* **1999**, *4*, 287-291.
- [46] J. Bourson, B. Valeur, *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 3871-3876.
- [47] L. Woods, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 1440-1442.
- [48] W.C. J. Ross, *J. Chem. Soc.* **1949**, 183-184.
- [49] R.E. Rindfus, V. L. Harnack, *J. Am. Chem. Soc.* **1920**, *42*, 1720-1725.
- [50] T. Eicher, B. Irmisch-Pielartzik, H. Pielartzik in *Methoden der organischen Chemie* (Houben-Weyl), Bd. E5/1, **1985**.
- [51] Z. J. Bithos, A. W. Burgstrahler, *Org. Synth. Coll. Vol.* **1962**, *5*, 591-595.
- [52] P.W. Hickomott, *J. Chem. Soc.* **1964**, 883-887.
- [53] P. R. Hammond, *Optics Communications*, **1979**, *29*, 331-333.
- [54] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Kapitel 3.1 und 3.3, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 5. Auflage, **1995**.
- [55] E. Cherbuliez, J. Rabinowitz, *Helv. Chim. Acta* **1958**, *41*, 1168-1175.
- [56] H. Eggerer, F. Lynen, *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1960**, *630*, 58-70.
- [57] E. Koller, O. S. Wolfbeis, *Monatshefte für Chemie* **1985**, *116*, 65-75.
- [58] J. Jablonski, Dissertation in Vorbereitung, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- [59] N. T. Thuong, P. Charbrier, *Bull. Soc. Chim. France* **1975**, *9-10*, 2083-2088.
- [60] H. A. C. Montgomery, J. H. Turnbull, *J. Chem. Soc.* **1958**, 1963-67.
- [61] K. Thakkar, R. C. Geahlen, M. Cushman, *J. Med. Chem* **1993**, *36*, 2950-2955.
- [62] A. Wissner, M.L. Carroll, K. E. Green, S. S. Kerwar, W. C. Pickett, R. E. Schaub, L. W. Torley, S. Wrenn, C. A. Kohler, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 1650-1662.
- [63] H. G. O. Becker et al., *Organikum* S. 234, 20. Auflage, Johann Ambrosius Barth Verlag, Heidelberg, Leipzig, **1996**.
- [64] H. G. O. Becker et al., *Organikum* S. 606, 20. Auflage, Johann Ambrosius Barth Verlag, Heidelberg, Leipzig, **1996**.
- [65] D.A. Shirley, J.R. Ziets, W.H. Reedy, *J. Org. Chem.* **1952**, 378-381.
- [66] A. Vilmeyer, A. Haack, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1927**, *60*, 119-122.

- [67] O. Bayer, in *Methoden der Organischen Chemie* (Houben-Weyl) Bd. 7/1, **1954**, 20-29.
- [68] G. Simcken, in *Methoden der Organischen Chemie* (Houben-Weyl), Bd. E3, **1983**, 36-85.
- [69] M. Noda, H. Shimaoka, S. Nagase, *J. Org. Chem.* **1959**, 24, 512-515.
- [70] M. Smith, J.G. Moffat, H.G. Kjorana, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 6204-6212.
- [71] J. March: *Advanced Organic Chemistry*, 3rd Edition, Wiley, New York, **1985**.
- [72] N.F. Albertson, *Org. React.* 12, 205-218.
- [73] J.C. Sheehan, G.P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 1067-1068.
- [74] R. A. Boissonnas, S. Guttmann, *Helv. Chim. Acta* **1960**, 43, 190-200.
- [75] K.G. Thomas, V. Biju, M.V. George, D.M. Guldi, P.V. Kamat, *J. Phys. Chem. A* **1998**, 102, 5341-5348.
- [76] F. Muth in *Methoden der Organischen Chemie* (Houben-Weyl), Bd. 9, **1955**, 663-682.
- [77] S.D. Babu, M.D. Hrytsak, T. Durst, *Can. J. Chem.* **1989**, 67, 1071-1076.
- [78] C.F.H. Allen, J.W. Gates Jr, *Org. Synth. Coll. Vol. III*, **1955**, 140-141.
- [79] A. Bourras, N. Boggetto, Z. Benatalah, E. de Rosny, S. Sicsic, M. Reboud-Ravaux, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 957-962.
- [80] N. Hoffmann, J.-P. Pete, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6952-6960.
- [81] M. Yamamoto, S. Iwasa, K. Takatsuki, K. Yamada, *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 346-349.
- [82] A. Takadate, I. Yagashiro, M. Irikura, H. Fujino, S. Goya, , *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37, 373-376.
- [83] D.P. Specht, P.A. Martic, S. Farid, *Tetrahedron* **1982**, 38, 1203-1211.
- [84] E. Koller, O. S. Wolfbeis, *Monatshefte für Chemie*, **1985**, 116, 65-75.
- [85] H. Chen, W. Herkstroeter, J. Perlstein, K. Law, D. Whitten, *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 5138-5146.
- [86] C. Fuchs, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **1999**.
- [87] O. Nielsen, O. Buchardt, *Synthesis*, **1991**, 819-821.
- [88] M.J. Arnost, S. Inbar, F.A. Menghini, P.S. Palumbo, S.G. Stroud, C.M. Zepp, US 4886744, Polaroid Corporation, **1986**.
- [89] Patent 95829, Kalle und Co. in Biebrich a. Rh., **1896**.

- [90] M. Yamamoto, S. Iwasa, K. Takatsuka, K. Yamada, *J. Org. Chem.* **1986**, *3*, 346-349.
- [91] J.C. Horne, G. J. Blanchard, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6336-6344.
- [92] C.S. Marvel, C.F. Bailey, M. S. Sparberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1927**, *49*, 1833-1837.
- [93] Produktinformation Fluka, Laborchemikalienkatalog **2001/2002**.
- [94] H.P. Kleber, D. Schlee, W. Schöpp, *Biochemisches Praktikum*, 4. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart **1990**.
- [95] J.M. Drake, M.L. Lesiecki, D.M. Camaioni, *Chem. Phys. Letters* **1985**, *113*, 530-534.
- [96] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Kapitel 3.1 und 3.3, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 5. Auflage, **1995**.
- [97] M. Meyer, J.C. Mialocq, *Opt. Comm.* **1987**, *64*, 264-268.
- [98] S. Velsko, G. Fleming, *Chem. Phys.* **1982**, *66*, 59.
- [99] C. Rullière, *Chem. Phys. Letters* **1976**, *43*, 303.
- [100] Z.R. Grabowsky, K. Rotkiewicz, *Nouv. J. Chim.* **1979**, *3*, 443.
- [101] H. Du, R. A. Fuh, J. Li, A. Corkan, J. S. Lindsey, *Photochemistry and Photobiology*, **1998**, *68*, 141-142.
- [102] B. Boldrini, E. Cavalli, A. Painelli, F. Terenziani, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 6286-6294.
- [103] J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.* **1972**, *75*, 991-1024.
- [104] J. M. Drake, *Chem. Phys. Lett.* **1985**, *113*, 530-534.
- [105] M. Meyer, J.C. Mialocq, M. Rougee, *Chem. Phys. Lett.* **1988**, *150*, 484.
- [106] W. Schmidt, *Optische Spektroskopie*, VCH Weinheim, **1994**.
- [107] J. M. Drake, M. L. Lesiecki, D. M. Camaioni, *Chem. Phys. Lett.*, **1985**, *113*, 530-534.
- [108] L.G.S. Brooker, A.C. Craig, D.W. Heseltine, P.W. Jenkins, L.L. Lincoln, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 2443-2450.
- [109] Z. Hsing-Kang, M. Ren-Lan, N. Er-Pin, G. Chu, *J. Photochem.* **1985**, *29*, 397.
- [110] D. J. S. Birch, G. Hungerford, R. E. Imhof, A. S. Holmes, *Chem. Phys. Lett.* **1991**, *178*, 177-184.
- [111] H. Dreeskamp, E. Koch, M. Zander, *Ber. Bunsenges.* **1974**, *78*, 1328-1334.

- [112] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, VCH Weinheim, **1990**.
- [113] E. Lippert, *Z. Naturforschung* **1955**, *10a*, 541.
- [114] E. Lippert, *Z. Elektrochemie* **1957**, *61*, 962.
- [115] N. Mataga, Y. Kaifu, M. Koizumi, *Bull. Chem. Soc. Japan* **1956**, *29*, 465.
- [116] Merck-Katalog, **2001**.
- [117] M. Meyer, J.C. Mialocq, *Opt. Comm.* **1987**, *64*, 264-268.
- [118] A. Declémy, C. Rullière, P. Kottis, *Chem. Phys. Lett.* **1983**, *101*, 401.
- [119] I. B. Berlmann, *J. Phys. Chem.* **1970**, *74*, 3085-3093.
- [120] M. Ohta, H. Kato, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1959**, *32*, 707-710.
- [121] Lattes, Verdier, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1965**, 2037-2041.
- [122] H. Fujino, S. Goya, M. Irikura, A. Takadate, I. Yagashiro, *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 373-376.
- [123] H. Chen, W. G. Herkstroeter, J. Perlstein, K. Law, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 5138-5146.