

Cumarine als präzipitierende Fluorophore für HTS Anwendungen

Inaugural Dissertation

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

vorgelegt von

Diplom-Chemiker Jens Jablonski

aus Essen

Düsseldorf 2004

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

Referent: Prof. Dr. H.-D. Martin

Korreferent: Prof. Dr. M. Braun

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juni 2004

Herrn Prof. Dr. H.-D. Martin danke ich für die Vergabe des Themas, für den Freiraum, den er mir bei der Bearbeitung dieses Forschungsthemas gelassen hat, sowie seine Anregungen und stete Diskussionsbereitschaft.

*Naturwissenschaft ist der Versuch,
bei der Erklärung der Natur ohne
Wunder auszukommen.*

Hoimar v. Dithfurth

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Cumarine.....	1
1.1.1. Einführung.....	1
1.1.2. Cumarine als Farbstoffe.....	4
1.2. Funktionelle Farbstoffe.....	5
1.2.1. Allgemeines.....	5
1.2.2. Cumarine als funktionelle Farbstoffe.....	5
1.3. Das „High Throughput Screening“.....	7
1.3.1. Allgemeines.....	7
1.3.2. Aufbau eines HTS-Tests.....	8
1.3.3. Detektionsmethoden beim High Throughput Screening.....	8
1.4. Cumarine als Farbstoffe in Bio Assays.....	10
1.4.1. Cumarine als Substrat für Enzyme.....	10
1.4.2. ELF-Farbstoffe.....	12
2. Problemstellung.....	14
3. Hauptteil.....	18
3.1. Syntheseplanung.....	18
3.2. Synthesen verschiedener Salicylaldehydderivate.....	22
3.2.1. Synthese der Aminophenole.....	22
3.2.2. Synthese der Aminosalicylaldehyde.....	25
3.2.3. Synthese von 4-Nitrosalicylaldehyd.....	29
3.3. Synthese der CumarinGrundkörper.....	33
3.3.1. Allgemeines.....	33
3.3.2. Synthese der 7-Nitrocumarine.....	35
3.3.3. Synthese der 7-Hydroxycumarine.....	38
3.3.4. Synthese der 7-Aminocumarine.....	40
3.3.5. Synthese des Grundkörpers eines blauen Cumarins.....	41
3.3.6. Synthese des 7-[N-(4-Hydroxyphenyl)amino]cumarins.....	43
3.3.7. Synthese verschiedener Chlorethylaminocumarine.....	45

3.4. Synthese der vollständigen Farbstoffe.....	46
3.4.1. Allgemeines.....	46
3.4.2. Synthese der 7-Hydroxy-4-cyancumarine.....	48
3.4.3. Synthese der 7-[N-(2-Hydroxyethyl)-N-methylamino]-4-cyanocumarine.....	51
3.4.4. Synthese der 7-[N-(2-Chlorethyl)-methylamino]-4-cyanocumarine.....	55
3.5. Reaktionen der Cumarine mit Carbonsäurechloriden.....	59
3.5.1. Allgemeines.....	59
3.5.2. Reaktionen mit Essigsäurechlorid.....	59
3.5.3. Reaktionen mit Methoxyessigsäurechlorid.....	60
3.5.4. Reaktionen mit Anissäurechlorid.....	62
3.5.5. Demethylierung der Cumarine.....	64
3.5.6. Die Reaktion zu Dichlorphosphoryloxybenzoylchlorid.....	69
3.5.7. Reaktionen mit Dichlorphosphoryloxybenzoylchlorid.....	70
3.6. Die Veresterung zum Phosphorsäuremonoester.....	74
3.6.1. Reaktionen mit Phosphoroxychlorid.....	74
3.6.1.1. Die Synthese von 3-(2-Benzthiazolyl)-4-cyano-7-cumarinylphosphatsemipyridiniumsalz.....	74
3.6.1.2. Versuche, verschiedene Cumarine mit Phosphoroxychlorid umzusetzen.....	79
3.6.2. Reaktionen mit Polyphosphorsäure.....	83
3.6.3. Reaktionen mit Chloroxodioxaphospholan.....	84
3.6.4. Synthese von und Reaktionen mit o-Phenylenphosphorchloridat.....	88
3.6.5. Synthese von und Reaktionen mit Phosphordimorpholinoxibromid.....	91
4. Fluoreszenzspektroskopie.....	100
4.1. Allgemeines.....	100
4.2. Apparatur.....	100
4.3. Korrektur der Fluoreszenzspektren.....	101
4.4. Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten.....	101
4.5. Bestimmung der Quantenausbeute in DMSO.....	108
4.6. Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute in Ethanol.....	111
4.7. Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute in Chloroform.....	115
4.8. Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute in Wasser.....	119
4.9. Vergleich der Fluoreszenzquantenausbeuten	121

4.10. Untersuchungen zur Solvatochromie und des Stokes Shifts.....	124
4.11. Fazit.....	131
5. Zusammenfassung.....	133
6. Experimentalteil.....	138
6.1. Allgemeines.....	138
6.2. Versuchsdurchführungen.....	140
6.2.1. <i>Synthese der Aminophenole</i>	140
6.2.2. <i>Synthese der Salicylaldehyde</i>	146
6.2.3. <i>Synthese von 4-Nitrosalicylaldehyd und 5-Chlor-4-nitrosalicylaldehyd</i>	152
6.2.4. <i>Synthese von 2-Benzoxazolylacetonitril</i>	162
6.2.5. <i>Synthese der Cumarine</i>	163
6.2.6. <i>Einführen der Nitrilgruppe</i>	178
6.2.7. <i>Synthese zweier Phosphorylierungsreagenzien</i>	188
6.2.8. <i>Synthese von Phosphorhaltigen Bausteinen</i>	190
6.2.9. <i>Reaktionen mit Carbonsäurechloriden</i>	192
6.2.10. <i>Phosphorylierung mit Phosphoroxychlorid</i>	199
6.2.11. <i>Reaktionen mit Phosphordimorpholinoxibromid</i>	204
7. Abkürzungsverzeichnis.....	213
8. Übersicht über wichtige Verbindungen dieser Arbeit.....	214
9. Literaturverzeichnis.....	215

1. Einleitung

1.1. Cumarine

1.1.1. Einführung

Über die Isolierung von Cumarin (**Abbildung 1**) berichtete zuerst A. VOGEL^[1] im Jahre 1820. Er assoziierte den angenehmen Geruch der Tonkabohne aus Guyana mit dem von Klee (*Melilotus officinalis*), der für den charakteristischen Geruch frisch gemähten Grases verantwortlich ist. Aus beiden Pflanzen konnte er die gleichen farblosen Kristalle aus einem alkoholischen Auszug isolieren. So stammt der Name Cumarin von der karibischen Bezeichnung für den Tonkabaum: „Coumarou“.

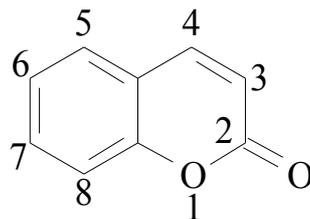


Abbildung 1: Cumarin

Chemisch gesehen wird mit Cumarin das 1,2-Benzopyron bezeichnet. Für seine Derivate haben sich eine Vielzahl von unsystematischen Namen etabliert, zum Teil sogar mehrere für die gleiche Verbindung. So ist das 7-Hydroxycumarin auch als Umbelliferon (nach seinem Vorkommen in den Pflanzen der Familie der *Umbelliferae*), Skimmetin und als Hydrangin bekannt.

Während man noch vor 30 Jahren glaubte, das natürliche Vorkommen von Cumarinen sei auf wenige Pflanzenfamilien beschränkt^[2], wurden seit dem weit über eintausend verschiedene Cumarine aus vielen Pflanzenfamilien^[3] und auch Mikroorganismen isoliert^[4].

Das vielleicht bekannteste natürliche Vorkommen des Cumarins ist die, als Geruchsstoff des Waldmeisters (*Asperula odorata*). Das im Waldmeister enthaltene geruchlose Cumaringlycosid setzt beim Welken der Blätter das Cumarin mit seinem typischen Aroma frei.

Doch auch mit der täglichen Nahrung nimmt der Mensch nicht unerhebliche Mengen von Cumarinen auf. So kommen Cumarine sowohl in Tee und Petersilie, als auch in Äpfeln und Zwiebeln vor^[5].

Nicht nur Pflanzen, sondern auch Pilze erzeugen Cumarine. Der Schimmelpilz *Aspergillus niger* erzeugt ein Gift namens *Aflatoxin*, das die Leber schädigt und cancerogen wirkt. Es wurde als ein Gemisch verschiedener Furanocumarine erkannt. Für die cancerogene Wirkung ist die besondere Struktur dieser Substanzen mit zwei gewinkelt angeordneten Furanringen und einer Doppelbindung in diesen Furanringen notwendig.



Abbildung 2: Aflatoxin B₁

und Aflatoxin G₂

So zeigt sich, daß die cancerogene Wirkung des *Aflatoxins* besonders auf dem Aflatoxin B₁ beruht^[6]. Der Verdacht, daß Cumarine grundsätzlich Krebs erzeugen können hat sich nicht bestätigt, da die cancerogene Wirkung auf einem Metaboliten beruht, der, durch den unterschiedlichen Abbau der Cumarine im Menschen und den als Modellorganismus benutzten Ratten, im Menschen nicht gebildet wird. Der wichtigste Metabolit des menschlichen Stoffwechsels stellt das 7-Hydroxycumarin dar, das als Glucuronid gut wasserlöslich ist und einfach ausgeschieden werden kann^[5].

Heute zeigen Studien, daß Cumarin und 7-Hydroxycumarin in niedriger Dosierung sogar einen positiven Einfluß auf den Verlauf von Krebserkrankungen haben können und nach einer Krebsbehandlung die Rückfallwahrscheinlichkeit verringern. Trotzdem darf es in Deutschland als Antioxidanz und als Aroma Lebensmitteln nicht zugesetzt werden und es gibt Grenzwerte für natürlich vorhandenes Cumarin^[7]. Allerdings wird es in großen Mengen als Duftstoff in Seifen, Cremes und Parfums verwendet, obwohl es besser durch die Haut aufgenommen wird als durch orale Gabe.

Verschiedene Cumarine werden auch als Medikament benutzt. So gilt der Waldmeister traditionell als zum Beispiel ödemhemmend und antiphlogistisch, also entzündungshemmend.

Ein Hefepilz namens *Streptomyces* produziert eine Reihe von Cumarinen, wie Novobiocin oder Coumermycin A₁, die als Antibiotika zum Einsatz kommen, also das Wachstum von Bakterien

hemmen können.

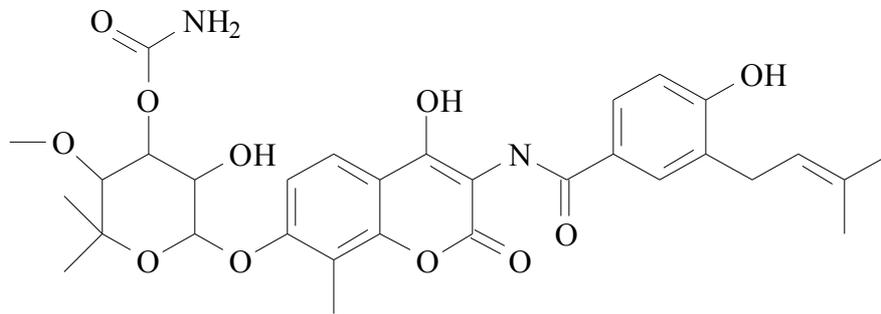


Abbildung 3: Novobiocin, ein Antibiotikum aus dem Hefepilz *Streptomyces*

In solchen Abwehraufgaben könnte auch ein Grund für das häufige Auftreten von Cumarinen in Pflanzen zu suchen sein, auch wenn ihre Bedeutung für die Pflanze in vielen Fällen noch unbekannt ist. So konnte gezeigt werden, daß sich Pflanzen aus der Familie der *Umbelliferae* mit dem Cumarin Xanthotoxin, einem linearen Furanocumarin, gegen Freßfeinde schützen.

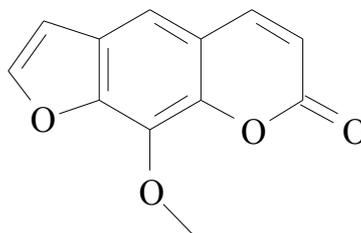


Abbildung 4: Xanthotoxin

Der Sellerie produziert bei Befall mit dem Pilz *Sclerotinia sclerotiorum* große Mengen dieser Substanz^[8]. Da dieses Cumarin phototoxisch wirkt, kam es dadurch zu Hautrötungen und Blasen bei Feldarbeitern, die mit den befallenen Pflanzen umgingen^[9]. Doch hilft das Xanthotoxin auch gegen Insekten. So kann die Larve der Motte *Spodoptera eridania*, die sich von vielen Pflanzen der Familie der *Umbelliferae* ernährt, nicht auf *Pastinaca sativa* überleben, einer Pflanze, die besonders viele lineare Furanocumarine enthält. Dies ist eindeutig auf die phototoxische Wirkung der Furanocumarine zurückzuführen, da die Giftwirkung im Labor unter Ausschluß von UV-Licht verloren geht^[10].

Auch andere Pflanzen nutzen Cumarine als natürliche Pflanzenschutzmittel, so verhindert Cumarin die Entwicklung von auf Pflanzenteilen abgelegten Eiern von *Drosophila melanogaster*,

der Fruchtfliege^[11]. Diese ovizide Wirkung versucht man sich zunutze zu machen, indem man Schafe mit einer Cumarinlösung wäscht, die die Eier der Goldfliege, *Lucila sericata*, deren Larve schwere Hautentzündungen (*Myiasis*) verursacht, die bei schwerem Befall bis zum Tode des Tieres führen können^[12,13], abtöten kann. So hat man ein billiges und auch noch für Menschen ungiftiges^[14] Insektizid gefunden.

Anders als in Pflanzen und in Pilzen, kommen Cumarine in Tieren kaum vor. Lediglich der Biber synthetisiert einige Cumarine, die Castoreum Pigmente. Sie konnten aus dem Sekret seiner Moschusdrüsen extrahiert werden.



Abbildung 5: Castoreum Pigmente

1.1.2. Cumarine als Farbstoffe

Cumarine werden bis heute nur selten wegen ihrer Farbigkeit eingesetzt. Erst 1958 wurde von H. HAEUSERMANN und J. VOLTZ^[59] ein Farbstoff auf Basis des Cumaringerüsts entwickelt. Mit diesem lassen sich Synthetikfasern in einem bis dahin unbekannt brilliantem grün-gelb färben. Der Erfolg dieses Farbstoffes führte zu weiteren Derivaten, bei denen im wesentlichen nur der Substituent in der 3-Position variiert wurde. Doch bei allen diesen Derivaten blieb die Farbe auf das grün-gelb beschränkt. Erst 1972 erweiterten W. MARCH und D. AUGART^[92] das Gerüst durch die Kondensation des Cumarinimins mit Malondinitril, so daß ein roter Farbstoff entstand. Durch die Einführung einer Nitrilgruppe in der 4-Position dieses Farbstoffes konnte von P. MOECKLI^[50] schließlich auch ein blauer Farbstoff erhalten werden.

Insgesamt ist die Palette der Cumarinfarbstoffe aber hinsichtlich der Strukturen weiterhin sehr begrenzt. Auch zeigen alle hier beschriebenen Beispiele eine starke Fluoreszenz, so daß sie als sogenannte „Shock-Farben“ nur ein kleines Einsatzgebiet haben. Die starke Fluoreszenz vieler Cumarinderivate ist eine Eigenschaft, die zu einem häufigen Einsatz dieser Verbindungen als funktionelle Farbstoffe führt.

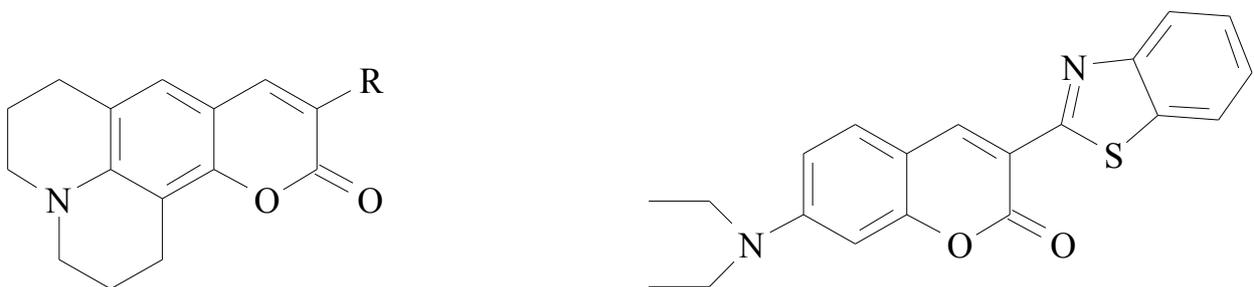
1.2. Funktionelle Farbstoffe

1.2.1. Allgemeines

Funktionelle Farbstoffe zeichnen sich dadurch aus, daß nicht ihre ästhetischen Eigenschaften für den Einsatz entscheidend sind, sondern ihre Anwendung auf bestimmten Funktionen beruht, die auf der Wechselwirkung mit elektromagnetischer Strahlung basieren.

1.2.2. Cumarine als funktionelle Farbstoffe

Während nur wenige Cumarine wegen ihrer Farbigkeit benutzt werden, so ist ihr Einsatz als funktioneller Farbstoff viel häufiger. So werden sie zum Beispiel als optische Aufheller eingesetzt. Hierbei emittieren farblose Cumarine, wie das 7-Hydroxy-4-methylcumarin (Methylumbelliferon), blaues Fluoreszenzlicht und lassen so Stoffe und Papier weißer erscheinen. Da das Methylumbelliferon nur in seiner deprotonierten Form, also als Phenolat und daher nur im Alkalischen gut fluoresziert, wurden später eher Derivate der 7-Dialkylaminocumarine eingesetzt^[15], die noch heute Verwendung bei der Behandlung von Polyamidfasern finden. Eine weitere wichtige Gruppe stellen die 3-Phenylcumarine dar, die besonders bei Polyestermaterialien als optische Aufheller zum Einsatz kommen^[16].



$R = \text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5, \text{COCH}_3, \text{CO}_2\text{H}$

Abbildung 6: Einige typische Laserfarbstoffe^[20]

Ein weiterer wichtiger Einsatzbereich von Cumarinen ist der in Farbstofflasern. Farbstofflaser bieten einige Vorteile, so lässt sich ihre Wellenlänge, durch den Einsatz verschiedener Farbstoffe, in einem weiten Bereich einstellen. Auch übertrifft die Konversion der Pumpenergie in Laserlicht oft 50%^[17,18] und es lassen sich sowohl sehr kurze Pulse^[19], als auch Pulse mit einer sehr hohen Energie erzeugen.

An die eingesetzten Farbstoffe werden hierbei besonders hohe Anforderungen bezüglich ihrer Lichteinheit und auch ihrer Stabilität gegen Sauerstoff gestellt. Diese werden vor allem von 7-Aminocumarinderivaten^[20] erfüllt. Dabei wird eine möglichst rigide Molekülstruktur angestrebt, die Energieverluste durch strahlungslose Desaktivierung verringert und so die Quantenausbeute der Fluoreszenz erhöht^[21].

Diese Farbstofflaser finden heute ein weites Anwendungsfeld in der Forschung aber auch in der Industrie. So lassen sich zum Beispiel mit Hilfe von Farbstofflasern Verbrennungsprozesse oder mit Hilfe der farbstofflaserinduzierten Fluoreszenz (LIF) der Abbau von Lignin bei der Papierherstellung aus Holz überwachen^[22]. Mit der farbstofflaserinduzierten Fluoreszenz lassen sich auch Schadstoffe, wie Stickoxide oder Schwefeldioxid, in der Atmosphäre einfach messen^[23].

Ein weiteres Feld ist der Einsatz als Label oder Fluoreszenzsonden^[24] in der Biochemie. Ein Aspekt dieses Einsatzgebietes ist Ausgangspunkt für diese Arbeit.

1.3. Das „High Throughput Screening“

1.3.1. Allgemeines

Vor dem Beginn der 80er Jahre war die Entdeckung der Leitstruktur eines bioaktiven Moleküls mit neuen Eigenschaften meist zufällig, wie die Entdeckung des Penicillins (**Abbildung 7**) durch Alexander Fleming im Jahre 1928^[25] oder war nur die Weiterentwicklung einer schon bekannten Substanz und beruhte nur selten auf analytischem Vorgehen.

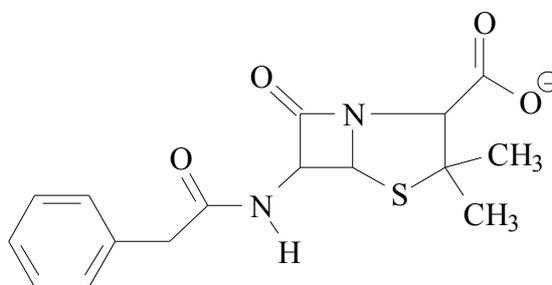


Abbildung 7: Benzylpenicillin

In den letzten Jahren wurden viele neue Rezeptoren und Enzyme, gefunden, die mit Krankheiten in Verbindung gebracht werden. Diese werden als *targets* bezeichnet und dienen als Ziele für die Wirkstoffentwicklung. Eine Schwierigkeit lag darin, daß nicht bekannt war, welche strukturellen Merkmale die neuen Medikamente haben mußten, um optimal zu den *targets* zu passen. Ein Weg um solche Zielmoleküle zu finden, ist das Testen einer großen Menge verschiedenster Verbindungen in einem biologischen Test, einem *assay*.

Früher mußten viele Chemiker diese Substanzen einzeln einem solchen Test unterziehen. So konnten nur wenige Substanzen im Jahr pro Chemiker untersucht werden. Da dieses Verfahren sehr teuer ist, wurden nur etwa 10.000 Substanzen an einem *target* getestet. Auch ist so, bei einem rein statistischen Verfahren, die Wahrscheinlichkeit gering, ein geeignetes Molekül zu finden.

Um eine große Menge strukturell möglichst verschiedener Substanzen testen zu können, muß der Test miniaturisiert und die Durchführung automatisiert werden. So lassen sich mehrere 100.000 Substanzen starke Bibliotheken in kurzer Zeit testen. Dieses Verfahren nennt man Hochdurchsatz Screening oder *high throughput screening* (HTS)^[26].

1.3.2. Aufbau eines HTS-Tests

Um einen neuen Wirkstoff gegen eine Krankheit durch das *high throughput screening* zu entdecken, ist es notwendig, daß ein geeignetes *target* bekannt ist, welches den Verlauf der Krankheit beeinflusst. Dieses *target*, kann nun entweder isoliert und gereinigt direkt mit den zu testenden Wirkstoffen zusammen gebracht werden, oder es wird eine Zelllinie, die das *target* enthält, verwendet. Im ersten Fall spricht man von einem *biochemischen assay*, das den Nachteil hat, die Zellumgebung im Test nicht zu berücksichtigen, im zweiten Fall spricht man von einem *cell-based assay*. Wirkstoffe, die in einem *cell-based assay* gefunden werden sollen, können die Zellmembran passieren, werden nicht oder nur schlecht von Zellbestandteilen metabolisiert und sind keine Zellgifte. Natürlich sinkt durch die hohen Anforderungen an den Wirkstoff so auch die Trefferquote und manch guter Ligand für einen Rezeptor wird unentdeckt bleiben.

In jedem Fall wird das *target* in einer Pufferlösung und mit weiteren Hilfsstoffen in die typischerweise 96, 384 oder sogar 1536 Kavitäten (*Wells*) einer Mikrotiterplatte gegeben und in jede Vertiefung wird ein anderer Wirkstoff zugegeben.

Um zu analysieren, wieviel Wirkstoff nun an einem Rezeptor gebunden ist, können radioaktiv markierte Wirkstoffe eingesetzt werden. Nach dem Ende der Reaktionszeit wird der freie Wirkstoff vom Wirkstoff-Rezeptor Komplex getrennt und die Radioaktivität des Komplexes ist ein Maß für die gebundene Wirkstoffmenge. Dieses Vorgehen ist vor allem beim *cell-based assay* problematisch, da vor der Abtrennung des Komplexes erst die Zellwand lysiert werden muß^[27].

1.3.3. Detektionsmethoden beim High Throughput Screening

Eine der am weitesten verbreiteten *cell-based assays* sind *reporter gene assays*. Hierbei wird die Anwesenheit oder eben auch die Abwesenheit eines bestimmten Genproduktes als Marker für Änderungen in der Zelle benutzt. Dieser Ersatzmarker ist üblicherweise ein einfach quantifizierbares und sonst nicht in der Zelle vorhandenes Protein, wie zum Beispiel eine Luciferase, die die Reaktion von Luciferin mit Adenosintriphosphat (ATP) katalysiert und so zu einer einfach zu erfassenden Emission von Photonen führt. Diese Lichtemission ist direkt proportional zur Luciferasekonzentration. Da diese Methode sehr empfindlich ist, lassen sich noch

Konzentrationen von 0,05 amol nachweisen^[28]. Da das Fluoreszenzlicht zudem noch einfach zu detektieren ist, werden heute die umständlich zu handhabenden radioaktiven Marker nur noch selten benutzt^[27]. Allerdings muß das Gen dazu in eine Zelllinie so eingeschleust werden, daß das Protein genau dann von der Zelle produziert wird, wenn ein bestimmter Rezeptor besetzt wird.

Eine weitere einfach anzuwendende Ersatzmarkerklasse sind die alkalischen Phosphatasen, eine Gruppe von Orthophosphorsäuremonoesterphosphohydrolasen, die eine hohe *turnover*-Rate aufweisen^[29]. Durch die Kombination der Phosphatasen mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen, kann hier eine Empfindlichkeit erreicht werden, welche die der Luciferase erreicht und manchmal sogar übertrifft (0,05-0,01 amol)^[30,31].

Dabei wird ein Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt, der mit Orthophosphorsäure verestert ist. Ist die Orthophosphorsäure an der richtigen Stelle angebracht, so kann die Fluoreszenz fast ganz unterdrückt werden. Wird nun Phosphatase durch die Besetzung eines Rezeptors erzeugt, so wird es die Esterbindung spalten und so den Fluoreszenzfarbstoff freisetzen. Dieser läßt sich nun mit einem Laser der geeigneten Wellenlänge anregen und die Fluoreszenz kann mittels eines Photonenzählers gemessen werden.

Beide Methoden sind sehr gut für das *high throughput screening* geeignet, da sie einfach anzuwenden sind und eine sehr hohe Empfindlichkeit aufweisen. So lassen sie sich auch soweit Miniaturisieren, daß sie in auf Mikrotiterplatten mit 1536 Vertiefungen durchgeführt werden können^[32,33].

1.4. Cumarine als Farbstoffe in Bio Assays

1.4.1. Cumarine als Substrat für Enzyme

In den 50er Jahren entdeckten J. A. R. MEAD, J.N. SMITH und J. T. WILLIAMS^[34], daß, obwohl 7-Hydroxycumarin (Umbelliferon) unter Bestrahlung mit ultraviolettem Licht stark fluoresziert,

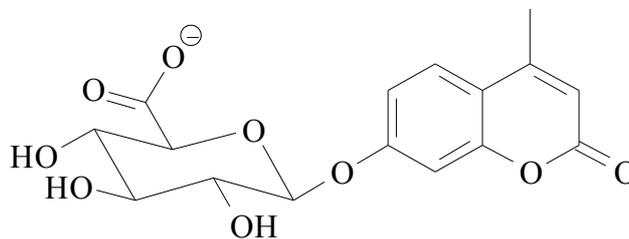


Abbildung 8: 4-Methylumbelliferyl- β -glucuronid, das erste Substrat auf Cumarinbasis für ein Enzym *assay*

einige seiner Ester nicht oder nur wenig fluoreszieren. Auch das einfach zu erhaltene Glucuronid des stark fluoreszierenden 4-Methylumbelliferons, fluoresziert praktisch nicht. So entwickelten sie auf der Grundlage dieses Esters ein *assay*, um die Aktivität des Enzyms β -Glucuronidase in verschiedenen Gewebeproben fluorometrisch zu bestimmen.

Das Enzym hydrolysiert die Esterbindung und setzt so das stark fluoreszierende 4-Methylumbelliferon frei. Der Anstieg dieser Fluoreszenz ($\lambda_{\text{ex}} = 364 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 448 \text{ nm}$) wird zur Bestimmung der Enzymaktivität benutzt. Schnell wurden weitere Ester für andere Enzyme, wie das 4-Methylumbelliferyl- β -glucosid für das Enzym β -Glucosidase oder auch das Acetat, Phosphat und Sulfat des 4-Methylumbelliferons, synthetisiert^[35,36]. Da diese Verbindungen den bis dahin benutzten Enzymsubstraten in bezug auf Empfindlichkeit, Geschwindigkeit und Einsatzmöglichkeit überlegen sind, sind viele Derivate heute kommerziell erhältlich und werden auch in vielen Standardtests verwendet. Zum Beispiel können mit diesen Tests *E. coli* Bakterien in Lebensmitteln, Wasser^[37] oder auch Urin aufgespürt werden^[38] oder die Diagnose bestimmter Krankheiten wird einfacher^[39,40].

Ein Nachteil der auf 7-Hydroxycumarin basierenden Substrate ist, daß das deprotonierte Anion

der eigentliche Fluorophor ist. Dadurch ergibt sich eine Abhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute vom pH-Wert. Die maximale Fluoreszenzquantenausbeute erhält man bei 7-Hydroxy-4-methylcumarin erst bei einem pH-Wert von 10 oder höher. Dies schränkt die Nutzbarkeit erheblich ein. Um die pK_s -Werte dieser Phenole zu senken und so ihren Anwendungsbereich zu erweitern, wurden entweder Fluoratome in der 6 und 8 Position oder eine Cyangruppe in der 3-Position des Cumarins eingeführt^[41]. So entstanden die Derivate **1** und **2** aus **Abbildung 9**.



Abbildung 9: Zwei 7-Hydroxycumarinderivate mit besonders niedrigem pK_s -Wert

Diese Derivate erreichen die maximale Fluoreszenzquantenausbeute schon bei einem pH-Wert ≥ 7 ^[42]. Damit lassen sie sich gut in biologischen Systemen einsetzen.

Um auch Substrate für die Enzyme Protease und Peptidase zu erhalten, wurden kurze Peptide an Chromophore wie p-Nitroanilin über eine Peptidbindung gekoppelt. Die Enzymaktivität wird durch colorimetrische Verfahren bestimmt. Doch unterscheiden sich die spektroskopischen Eigenschaften des Substrates und des freigesetzten Chromophors kaum, so daß das Produkt erst aufwendig extrahiert werden muß^[43]. Deshalb wurde auch hier nach den empfindlicheren und weniger aufwendig einsetzbaren Fluorophoren als Substrat gesucht. Sehr erfolgreiche Vertreter dieser Farbstoffgruppe sind die Amide des 7-Amino-4-methylcumarins (AMC)^[44,45]. Hier wird ein einfaches Peptid über eine Peptidbindung mit der Aminogruppe des Farbstoffes verbunden. Auch die so gewonnenen Substrate fluoreszieren nur sehr schwach. Diese Bindung kann dann in einem *assay* durch eine Protease oder eine Peptidase gespalten werden, so daß das stark fluoreszierende Cumarin ($\lambda_{ex} = 380$ nm, $\lambda_{em} = 460$ nm) freigesetzt wird.

Ein Nachteil ist, daß die Fluoreszenz dieses Cumarins in der Umgebung von Gewebeextrakt oft gequencht wird. Deshalb wurde die Methylgruppe durch eine Trifluormethylgruppe ersetzt. So erhielt man eine gelbe Substanz ($\lambda_{ex} = 400$ nm, $\lambda_{em} = 505$ nm), die neben der fluorometrischen auch eine photospektrometrische Bestimmung der Enzymaktivität erlaubt^[46]. Ein weiterer wichtiger Vorteil der 7-Amino-4-trifluormethylcumarinbasierenden Substrate (AFC) ist, daß die schwache

Fluoreszenz des Substrates blau ist, während die des freigesetzten Cumarins grün-gelb ist. So kann die Fluoreszenz des Substrates die Messung der Enzymaktivität nicht beeinflussen.

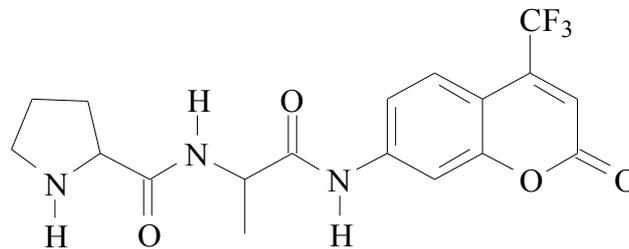


Abbildung 10: Einfaches Substrat für eine Peptidase mit AFC als Chromophor

1.4.2. ELF-Farbstoffe

Vor einiger Zeit entwickelte *Molecular Probes* ein neues Substrat für das Enzym alkalische Phosphatase mit neuen Eigenschaften, genannt ELF'97 (**Abbildung 12**). Der im Gegensatz zum gut wasserlöslichen Substrat kaum wasserlösliche Metabolit fällt am Ort der Phosphataseaktivität aus

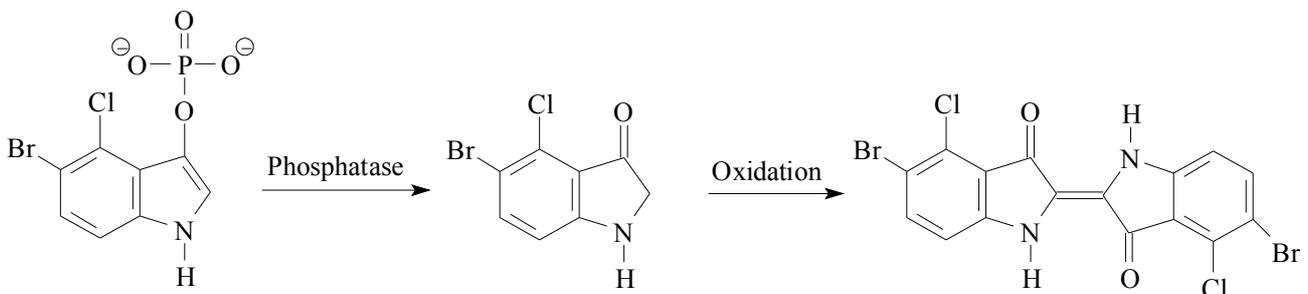


Abbildung 11: Mit 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat läßt sich am Ort der Enzymaktivität ein blauer Niederschlag erzeugen

und bildet einen grünlich fluoreszierenden, feinen Niederschlag. Vor der Entwicklung von ELF'97 konnte mit dem Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat ein blauer Niederschlag am Ort der Enzymaktivität durch die Oxidation des Metaboliten zu einem Indigofarbstoff erzeugt werden. Doch sind fluorometrische Methoden empfindlicher als colorimetrische. Außerdem ist der durch ELF'97 erzeugte Niederschlag extrem photostabil, so daß sich die Ergebnisse gut photographisch

dokumentieren lassen. Dieses Verfahren benennt *Molecular Probes* mit dem Akronym *ELF*, das für *Enzyme Labelled Fluorescence* steht.

Um die *ELF*-Detektion auch *in vivo* oder an lichtempfindlichem Gewebe wie der Retina durchführen zu können, ist es sehr wichtig, daß der eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff aber auch das zur Anregung nötige Licht die Zelle nicht schädigt. In solchen Fällen läßt sich ELF'97 mit einem Absorptionsmaximum bei $\lambda_{\max} = 350$ nm des Präzipitats nicht einsetzen, da die Anregungsstrahlung zu energiereich ist, so daß es zu Schädigungen oder Veränderungen in der Probe kommen kann.

Deshalb werden neue Farbstoffe benötigt, die so bathochrom absorbieren, daß Zellbestandteile bei der Anregung nicht mit angeregt oder geschädigt werden.

2. Problemstellung

Das Ziel dieser Dissertation ist es, Farbstoffe zu synthetisieren, die als *ELF*-Farbstoffe, als *enzyme labelled fluorescence*-Farbstoffe, im *high throughput screening* eingesetzt werden können.

Das bekannteste Farbstoffsystem für ELF Anwendungen ist das ELF'97 von *Molecular Probes*. Bei ELF'97 werden sowohl Absorption als auch Fluoreszenz durch die Veresterung mit Phosphorsäure beeinflusst. Der Phosphorsäureester ist gut löslich in Wasser und fluoresziert schwach blau. Wird der Farbstoff durch die alkalische Phosphatase hydrolysiert, entsteht das freie Phenol mit einer Absorption bei 355 nm, das nicht nur stark grün bei 530 nm fluoresziert, sondern auch wasserunlöslich ist. Dadurch fällt es am Ort der Phosphataseaktivität aus und zeigt dort Feststofffluoreszenz. Der große Stokes Shift von 175 nm erleichtert es, das Meßsignal vom gestreuten Anregungslicht zu trennen. Allerdings ist die Fluoreszenz bei 530 nm noch etwas kurzweilig, da auch einige Zellbestandteile in diesem Wellenlängenbereich Fluoreszenz zeigen und in biologischen *assays* gleichzeitig angeregt werden.

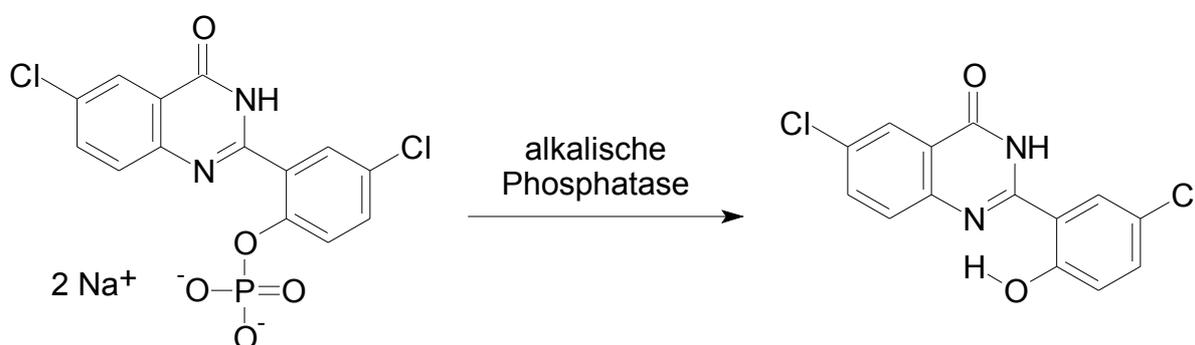


Abbildung 12: Prinzip des Farbstoffsystems ELF'97

Die Eigenschaften der zu synthetisierenden Farbstoffe sollen sich daher an denen des bekannten Systems ELF'97 orientieren, aber die Absorption soll bei etwa 500 nm liegen. Ist diese Bedingung erfüllt, läßt sich der Farbstoff optimal mit einem Argon Ionen Laser anregen, der in den meisten Meßapparaturen eingebaut ist. Dieser Laser erzeugt hauptsächlich zwei Linien, eine sehr intensive bei 488 nm und eine weitere bei 514 nm^[47]. Die Absorptionsbande des oben beschriebene ELF'97 endet schon bei etwa 400 nm, so daß dieser Farbstoff beim Bestrahlen mit diesem Laser nicht angeregt werden kann, was einen weiteren Nachteil dieses Systems darstellt.

Weiterhin kommt es bei einer Anregungswellenlänge von etwa 350 nm, wie bei dem ELF'97

System, bei *in vivo assays* zu lichtinduzierten Zellschädigungen. Durch die durch Anregung von Zellbestandteilen ausgelöste Emission verschlechtert sich das Signal zu Rausch Verhältnis und so die Empfindlichkeit des *assays*^[32].

Der neu zu synthetisierende Farbstoff soll einen Stokes Shift von mindestens 100 nm aufweisen, damit die Fluoreszenzemission einfach von der Anregungsstrahlung separieren zu können. Gleichzeitig liegt so die Fluoreszenzemission bei etwa 600 nm. Das rote Fluoreszenzlicht läßt sich einfach von eventuell entstehender Fluoreszenzemission von Zellbestandteilen unterscheiden, deren Stokes Shift im allgemeinen deutlich unter 100 nm liegt.

Um den neuen Farbstoff mit Phosphorsäure verestern zu können, soll er eine Hydroxygruppe tragen. Gleichzeitig soll er im Anwendungsmedium Wasser unlöslich sein. Dabei muß der Farbstoff eine sehr gute Lichtechtheit aufweisen, da eine Messung sich eventuell über ein längeres Zeitintervall erstrecken kann. In dieser Zeit darf der Farbstoff nicht ausbleichen. Desweiteren muß das Pigment Feststofffluoreszenz zeigen und sich mit Phosphorsäure verestern lassen. Der Phosphorsäureester muß wasserlöslich sein und sich durch Phosphatase spalten lassen.

Da bis jetzt als Substrat für die basische Phosphatase meist Phenolester eingesetzt wurden, ist es sinnvoll auch bei den neuartigen Systemen zunächst phenolische Phosphorsäureester anzustreben.

Sollte es dabei gelingen die Phosphorsäuregruppe direkt an dem Chromophor zu befestigen, sind bei der Abspaltung besonders große Farbänderungen zu erwarten. Neben einer Zunahme der Feststofffluoreszenz würden die neuartigen Systeme damit über eine weitere Observable verfügen, mit der die Aktivität der Phosphatase beobachtet werden könnte.

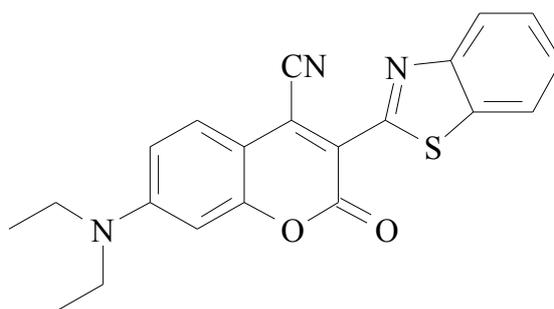


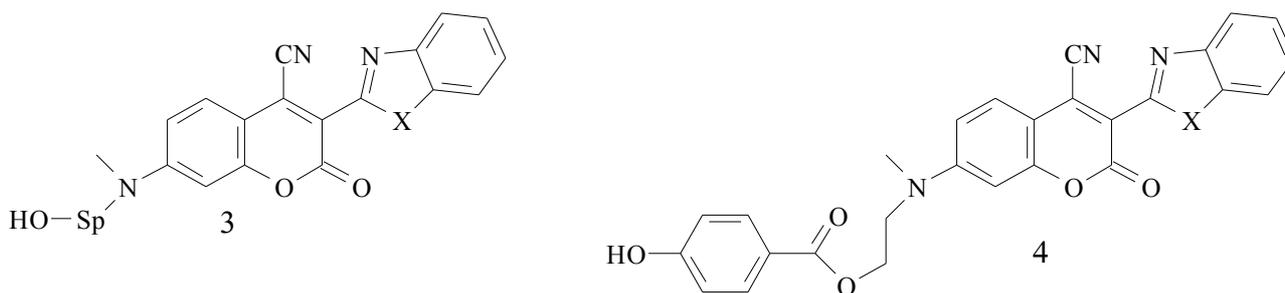
Abbildung 13: 3-(2-Benzthiazolyl)-4-cyano-7-(diethylamino)cumarin

Ein Farbstoff, der die meisten dieser Anforderungen erfüllt, ist das schon literaturbekannte 3-(2-Benzthiazolyl)-4-cyano-7-(diethylamino)cumarin^[48]. In Aceton absorbiert es bei 519 nm und

fluoresziert bei 635 nm. Damit liegt der Stokes Shift über 100 nm (3520 cm^{-1}). Es ist als fluoreszierendes Pigment bekannt^[49] und zeigt als Laserfarbstoff eine gute Lichteinheit. Auch die Synthese ist, zumindest schematisch^[50], in der Literatur beschrieben.

Das Ziel dieser Arbeit ist nun, den Farbstoff so zu funktionalisieren, daß er eine Hydroxyfunktion trägt. Durch Phosphorylierung der Hydroxyderivate soll eine Auswahl an Farbstoffsystemen entstehen. Die Untersuchung der physikalischen und optischen Eigenschaften werden zeigen, ob die neuen Farbstoffsysteme für einen Einsatz in *ELF-assays* geeignet sind. Dies scheint am leichtesten durch eine Modifikation an der Aminogruppe durchführbar zu sein. Allerdings wird der Chromophor dabei nicht durch die Hydroxygruppe beeinflusst.

Der so entstehende Farbstoff **3** mit Sp = Ethylen könnte noch mit *p*-Hydroxybenzoesäure verestert werden um eine phenolische Hydroxygruppe einzuführen. Dies könnte notwendig sein, falls mit dem Derivat mit Hydroxyalkylfunktion kein hydrolysierbares Substrat für die alkalische Phosphatase darzustellen ist. Es ergeben sich also folgende Zielstrukturen:

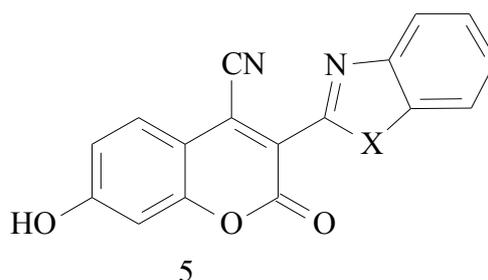


X = O, S, NH

Sp = Ethylen, Phenylen

Abbildung 14: Zielstrukturen

Will man bei der Abspaltung der Phosphorsäuregruppe auch eine Änderung der Farbe des Cumarins beobachten, so muß man die Phosphorsäuregruppe direkt über eine Hydroxygruppe am Chromophor befestigen. So ergeben sich die Zielmoleküle **5**. Diese sind zum Teil bereits von E. KOLLER und O. S. WOLFBELIS synthetisiert worden, die das Einführen der Cyanogruppe an das Cumaringerüst mit Natriumcyanid und Brom beschreiben^[51]. Da die Hydroxygruppe jedoch ein schlechterer Donor ist als die Aminogruppe, absorbieren Farbstoffe des Typs **5** entsprechend hypsochromer als die der Typen **3** und **4**. So absorbiert der Farbstoff **5** mit X = S bei 436 nm und



fluoresziert bei 530 nm. So ist die Fluoreszenz nicht bathochromer als beim Farbstoffsystem ELF '97, aber wird der Farbstoff phosphoryliert, so ändert sich das Absorptionsmaximum auf 414 nm. Diesen Unterschied kann man auch zur Messung der Phosphataseaktivität nutzen.

Auch läßt sich die Verbindung 5 mit $X = S$ bei einer Wellenlänge von 488 nm anregen. Bei dieser Wellenlänge werden keine Zellbestandteile angeregt, der Farbstoff läßt sich so in *in vivo assays* einsetzen, ohne das die Probe durch die Anregungsstrahlung verändert wird.

Die so gefundenen Hydroxyverbindungen müßten in einem letzten Schritt mit Phosphorsäure verestert werden, um die Verbindungen wasserlöslich zu machen.

Die Messung der Feststofffluoreszenzquantenausbeute ist im Arbeitskreis nicht möglich, da ein entsprechend ausgerüstetes Spektrofluorometer nicht vorhanden ist. Diese soll, genau wie die Untersuchungen zur Eignung der, im Rahmen dieser Arbeit entstehenden, Substanzen als Substrate für die alkalische Phosphatase, von der Bayer AG, dem Kooperationspartner dieser Arbeit, durchgeführt werden.

3. Hauptteil

3.1. Syntheseplanung

Zunächst soll die Synthese des Farbstoffes **3** diskutiert werden. Im letzten Schritt der Synthese des Zielfarbstoffes wird eine Cyanogruppe in die 4-Position des Cumarins eingeführt. Es ist schon lange bekannt, daß sich Cyanidionen an Styrylfarbstoffe addieren lassen. Das Additionsprodukt läßt sich dann einfach zu Tricyanovinylanilinen oxidieren^[52]. Die Einführung der Cyanogruppe führt zu einer bathochromen Verschiebung um 85 nm. Dieser Prozeß wurde von P. MOECKLI^[50] auf Cumarine mit 7-Diethylaminogruppe angewendet, deren Struktur den Styrylfarbstoffen ähnelt^[53]. O. S. WOLFBEIS wendete diese Reaktion auf verschiedene 7-Hydroxycumarine an^[54].

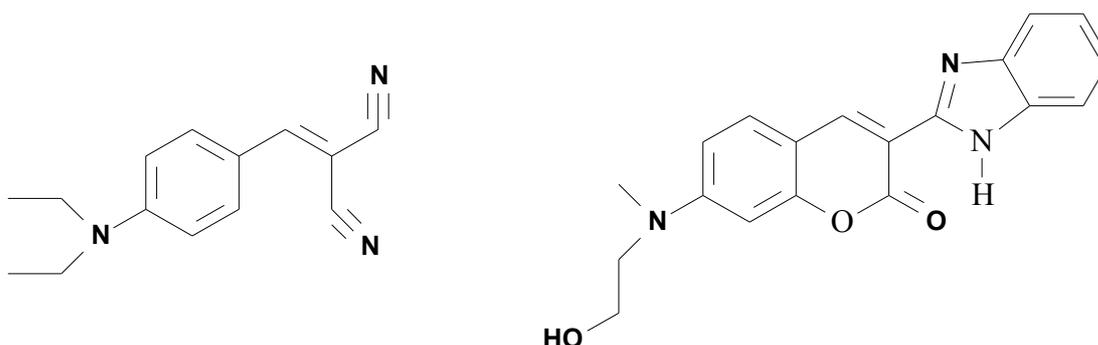


Abbildung 15: Die Struktur der Cumarine ähnelt der der Styrylfarbstoffe

Nun folgt der Aufbau des Cumaringerüsts. Hier gibt es zwei klassische Synthesewege, die Pechmannsche Cumarinsynthese und die Perkinsche Cumarinsynthese. H. VON PECHMANN fand, daß Cumarine aus Phenolderivaten mit Malonsäure^[55] oder β -Ketoestern^[56] in Gegenwart von Schwefelsäure kondensiert werden können. Diese Reaktion wurde von vielen weiterentwickelt und verbessert^[57]. So wurden auch andere Reagenzien als Schwefelsäure, wie Phosphoroxchlorid, Salzsäure oder verschiedene Lewissäuren, eingesetzt^[58].

Bei der Perkinschen Cumarinsynthese wird ein Salicylaldehyd mit einem Carbonsäurederivat verknüpft. Diese Synthese wurde 1958 von H. HAEUSERMANN und J. VOLTZ benutzt, um mit dem 3-(2-Benzthiazolyl)-7-(diethylamino)cumarin das erste synthetische, farbige Cumarin darzustellen und so eine neue Farbstoffklasse zu begründen^[59]. In den folgenden Jahren wurden eine ganze Reihe

von Derivaten dargestellt^[60]. Die Darstellung ist überwiegend in der Patentliteratur beschrieben. Besonders J. GRIFFITH und J. MAMA^[61] synthetisierten viele Derivate nach der Methode von H. HAEUSERMANN aber auch mit anderen, selbst entwickelten Vorstufen. Dabei benutzten sie auch einige Derivate mit Alkohol und Etherfunktionen als Reste an der Aminogruppe in 7-Position.

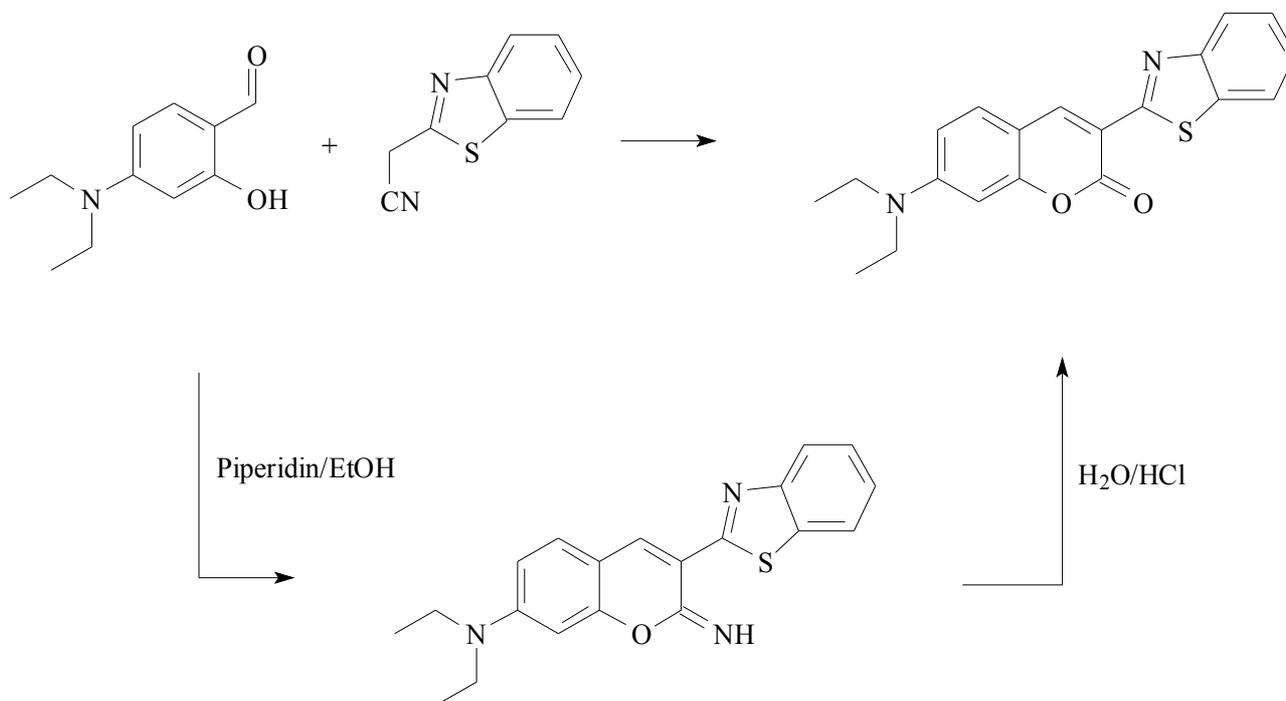
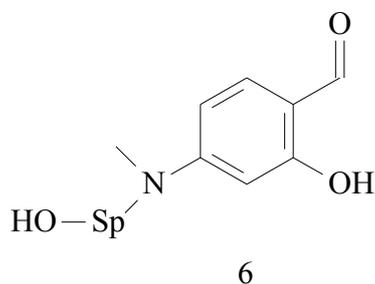


Abbildung 16: Perkinische Cumarinsynthese nach H. Haeusermann^[59]

Die im Rahmen dieser Arbeit zur Cumarinsynthese eingesetzten Nitrile sind meist kommerziell erhältlich. Nicht literaturbekannt sind allerdings die zur Synthese der Zielmoleküle nötigen



Sp = Phenylen, Ethylen

m-Aminosalicylaldehyde **6**. Sie sollten sich aus dem entsprechenden *m*-Aminophenol Mithilfe einer

Cumarine als präzipitierende Fluorophore - Hauptteil

Vilsmeier Formylierung^[62] herstellen lassen. Solche Reaktionen sind für *m*-Aminophenole allgemein auch im Organikum^[63] beschrieben. Dabei reagiert das *m*-Aminophenol mit Phosphoroxchlorid und DMF und wird dabei formyliert.

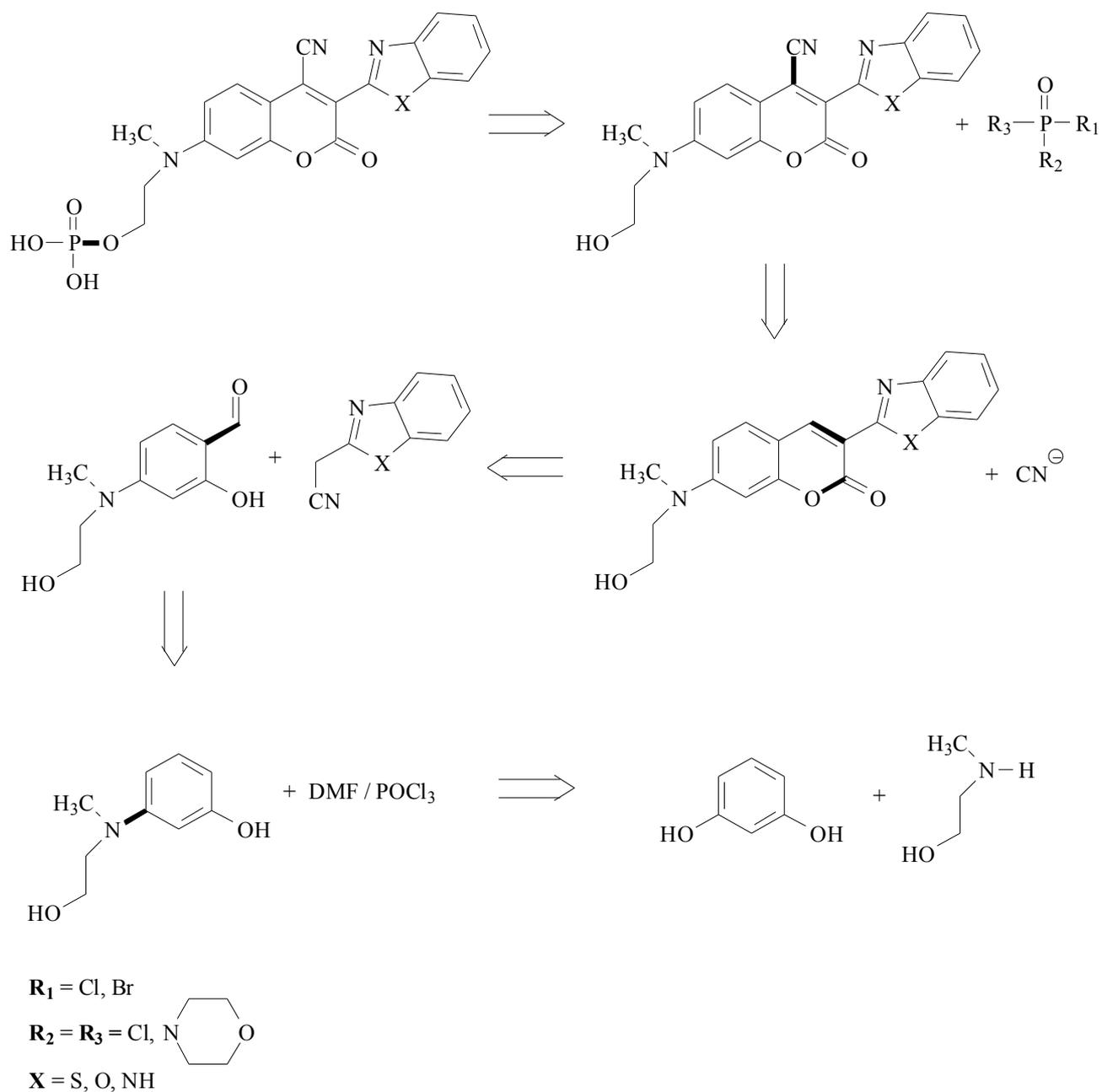


Abbildung 17: Retrosynthese der angestrebten Cumarine

Im ersten Schritt der Synthese muß ein *m*-Aminophenol hergestellt werden. In der Patentliteratur wird die Synthese von *N*-(2-Hydroxyalkyl)-3-aminophenolen beschrieben^[64]. Für die im Rahmen dieser Arbeit benötigten Verbindungen muß demnach Resorcin mit *N*-Methylaminoethanol und

Borsäure als Katalysator in Substanz umgesetzt werden.

Das fertig hergestellte Cumaringerüst **3** muß nun zum Cumarinhydroxyphosphat umgesetzt werden. In vielen Literaturstellen wird die Phosphorylierung mit Phosphoroxychlorid in Pyridin als Lösungsmittel und Base beschrieben^[51]. Dabei werden aber meist Phenole eingesetzt. Alkohole werden in Trimethylphosphat suspensiert und mit Phosphoroxychlorid versetzt^[65,66]. Y. KITADE berichtet^[67] von der Phosphorylierung einiger Moleküle an einer *N*-Methylaminoethanolgruppe, die auch in den Zielmolekülen **3** mit Sp = Ethylen vorkommt. Leider werden, außer dem Lösungsmittel Trimethylphosphat, die weiteren Reaktionsbedingungen nicht erwähnt.

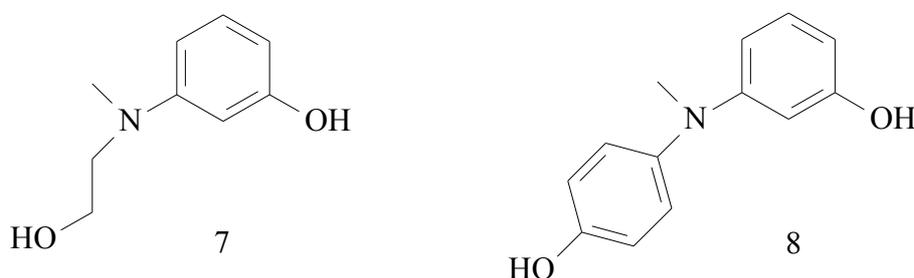
Zur Synthese der Zielmoleküle **4** muß das Hydroxyderivat **3** verestert werden. Dazu kommt Anissäurechlorid infrage aber auch verschiedene andere Methoxycarbonsäurechloride, um die Umgebung der Phosphorsäuregruppe zu variieren. Die Methoxygruppe muß dann noch gespalten werden, um die Hydroxygruppe zu erhalten. Die Schwierigkeit liegt hier darin, einen Ether zu spalten, ohne die benachbarte Estergruppe zu hydrolysieren. Dazu sind mindestens zwei Methoden beschrieben. Man kann den Methylether mit Trimethylsilylbromid zum Trimethylsilylether umsetzen und diesen mit Wasser zum fertigen Alkohol hydrolysieren^[68]. Desweiteren sind mehrere Methoden bekannt, bei denen Bortribromid benutzt wird, um Methylether zu spalten^[69], in einem Fall werden auch Methoxycumarine eingesetzt, die eine cyclische Estergruppe, einen Lactonring, trägt und Verbindungen bei denen Estergruppen und Ethergruppen in einem Molekül vorhanden sind^[70]. So sollten sich auch die angestrebten Cumarine **4** synthetisieren lassen.

Diese müssen nun auch mit Phosphorsäure verestert werden. Dazu sollte sich eine der Methoden für Phenole^[51] eignen.

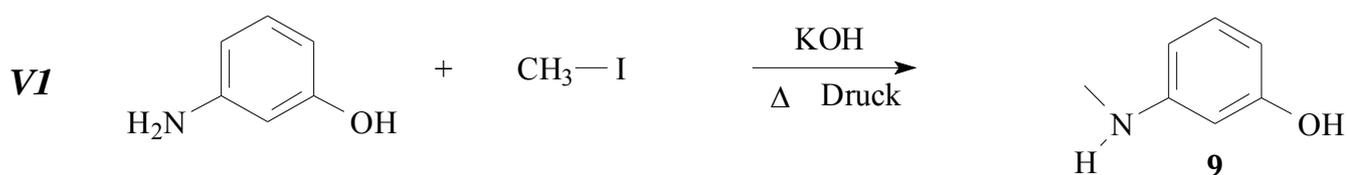
3.2. Synthesen verschiedener Salicylaldehydderivate

3.2.1. Synthese der Aminophenole

Um die oben beschriebenen Cumarine herstellen zu können, benötigt man 3-(*N*-2-Hydroxyethyl-*N*-methylamino)phenol **7** und 3-[*N*-(*p*-Hydroxyphenyl)-*N*-methylamino]phenol **8**.



Die erste Idee sah vor, 3-Aminophenol mit Iodmethan zu alkylieren und das Produkt mit Hydroxyalkylbromid oder Hydroxyarylbromid umzusetzen.



Dazu wurde 3-Aminophenol mit Iodmethan und Kaliumhydroxid gelöst in etwas Wasser im Autoklaven über Nacht auf 110 °C erwärmt^[71]. Nach Aufarbeitung und Destillation erhält man das hochviskose, farblose Öl 3-Hydroxy-*N*-methylanilin **9**. Nun sollte **9** mit 2-Bromethanol in der gleichen Weise umgesetzt werden, doch lieferte diese Reaktion kein Ergebnis. Auch der Versuch 3-Hydroxy-*N*-methylanilin **9** mit 2-Methoxyethylbromid umzusetzen scheiterte.

Deshalb wurde dieser Reaktionsweg aufgegeben und statt dessen nach einem Patent der BASF^[64] Resorcin mit *N*-Methylethanolamin und Borsäure ohne Lösungsmittel direkt zu **7** umgesetzt. Um die Borsäure aus dem Gemisch zu entfernen, wird diese mit Methanol zum Trimethylester umgesetzt. Der Borsäuretrimethylester lässt sich gut zusammen mit überschüssigem Methanol

Cumarine als präzipitierende Fluorophore - Hauptteil

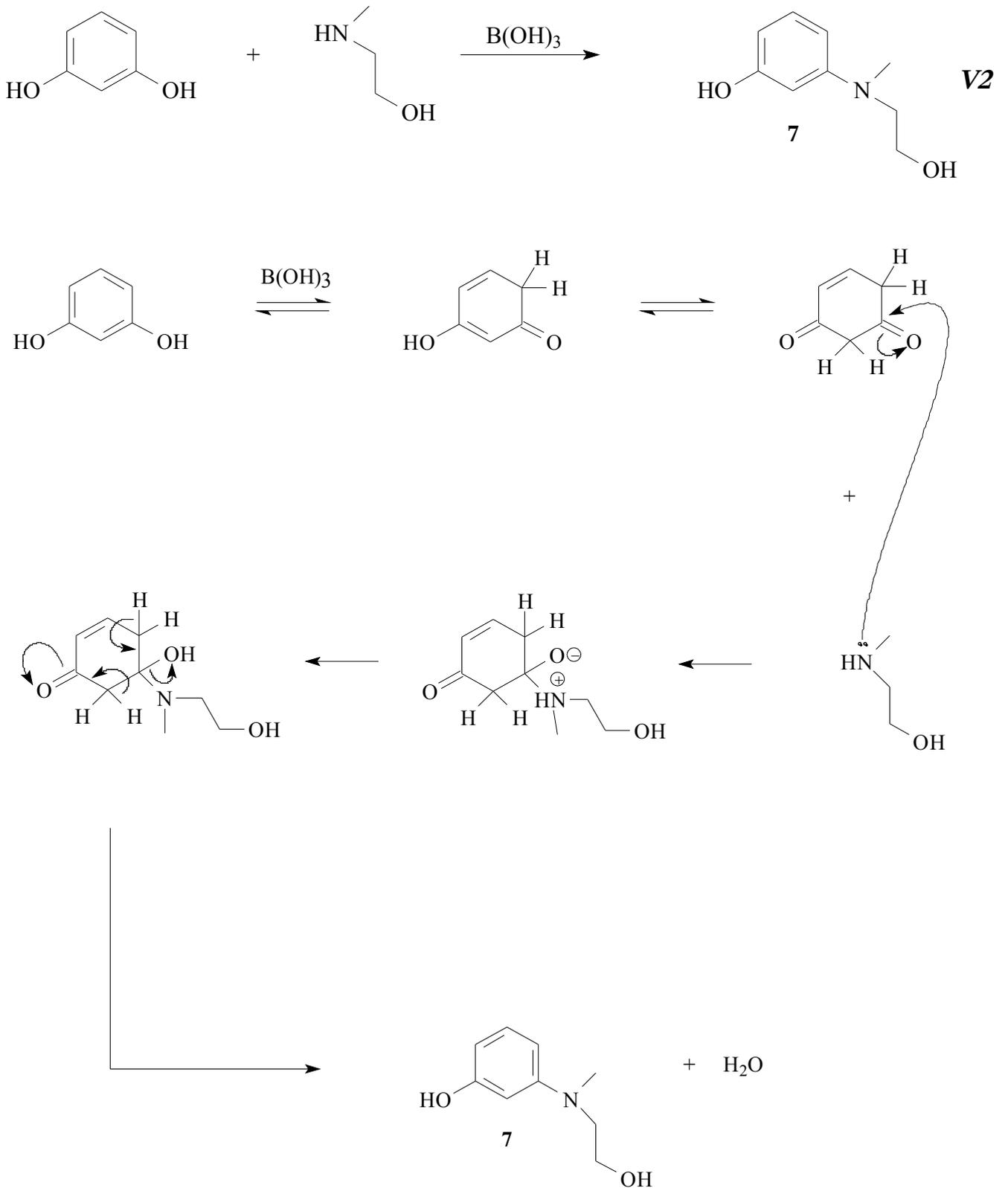


Abbildung 18: Mechanismus der Reaktion von Resorcin mit dem Amin zu 7

abdestillieren.

Nach der Aufarbeitung und der fraktionierten Destillation erhält man ein gelbes Öl, das nach einigen Tagen zu einem farblosen Feststoff auskristallisiert.

Diese Reaktion verläuft über das Diketon des Resorcins. Dabei dient die Borsäure dazu, die Tautomerie des Enols zum Keton zu katalysieren. Dann verläuft die Reaktion wie eine normale Carbonylreaktion mit einem Amin. Zum Schluß wird Wasser abgespalten und das aromatische System wiederhergestellt (**Abbildung 18**).

Die einfachste Methode ein Hydroxyphenylaminophenol darzustellen, um zu Strukturen wie **8** zu kommen, schien die Reaktion des aromatischenamins *p*-Anisidin mit Resorcin und Borsäure, nach der oben beschriebenen Methode zum *N*-(3-Hydroxyphenyl)-*N*-(4-methoxyphenyl)amin **11**. Man erhält nach Destillation und Umkristallisation aus Benzol^[72] das Produkt als farblose Kristalle.

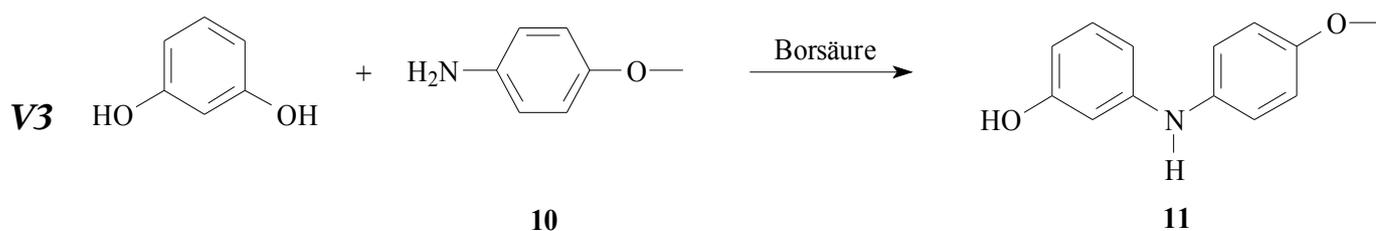


Abbildung 19: Reaktion zum *N*-(3-Hydroxyphenyl)-*N*-(4-methoxyphenyl)amin

Leider läßt sich Verbindung **11** nur schlecht nach Vilsmeier formylieren. Offensichtlich stört die freie Hydroxygruppe und muß vor der Formylierung geschützt werden. Dazu bietet sich die Veretherung an, da das Molekül schon eine als Methylether geschützte Hydroxygruppe besitzt, die dann beide in einem Schritt entschützt werden können.

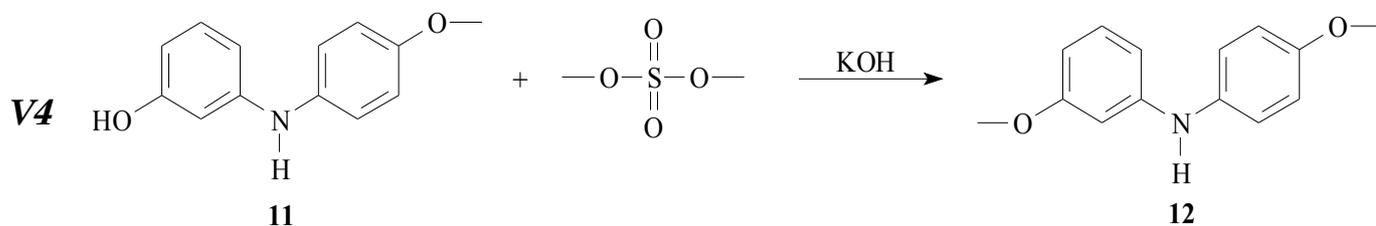


Abbildung 20: Synthese von *N*-(3-Methoxyphenyl)-*N*-(4-methoxyphenyl)amin **12**

Die Einführung der Methyletherfunktion als Schutzgruppe gelingt nach L. ERDAY^[72], indem *N*-(3-Hydroxyphenyl)-*N*-(4-methoxyphenyl)amin **11** mit etwas Kaliumhydroxid in Methanol gelöst

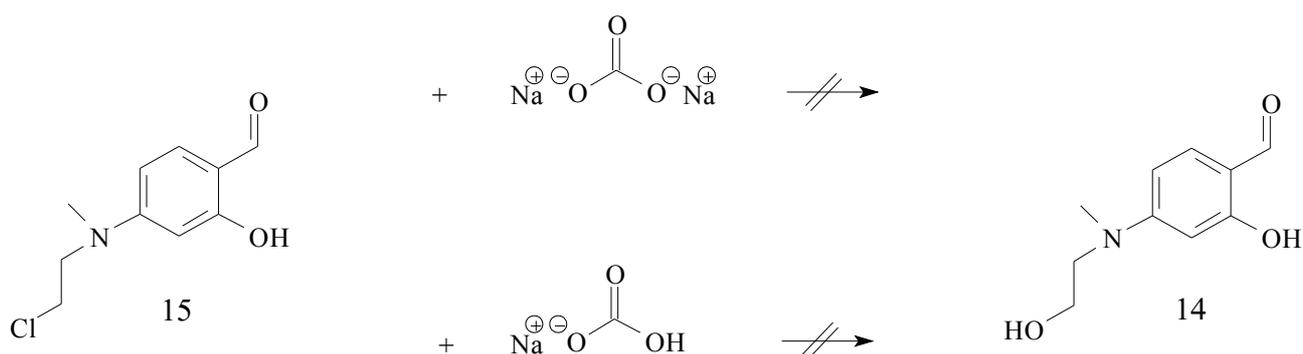
wird und Dimethylsulfat langsam zugetropft wird. Das bei der Aufarbeitung entstehende grüne Öl wird im Vakuum destilliert und gibt *N*-(3-Methoxyphenyl)-*N*-(4-methoxyphenyl)amin **12** als farblosen Feststoff in einer guten Ausbeute.

3.2.2. Synthese der Aminosalicylaldehyde

Die oben synthetisierten Aminophenole müssen zu den Aminosalicylaldehyden formyliert werden. Die Formylierung von 3-[*N*-(2-Hydroxyethyl)-*N*-methylamino]phenol **7** nach Vilsmeier stellte hier ein besonderes Problem dar, da bekannt ist, daß Alkoholgruppen mit Phosphoroxychlorid in DMF in einer nucleophilen Reaktion durch Chlorid ausgetauscht werden^[73]. M. BIRMES^[74] berichtet aber von einer inversen Vilsmeier Reaktion, die in Gegenwart von Alkoholgruppen glatt ablaufen soll ohne die Alkoholgruppe anzugreifen. Dabei wird das Phosphoroxychlorid unter Eiskühlung in DMF eingetropft und zu dieser Mischung wird dann eine Lösung des Alkohols in DMF bei 0 °C zugegeben und für einige Stunden gerührt. Nach dieser Vorschrift wird nun die Verbindung **7** umgesetzt. Man erhält nach der Hydrolyse mit Eiswasser einen farblosen Feststoff. Es zeigt sich jedoch, daß es unter diesen Bedingungen nicht zur Reaktion kommt. Selbst wenn für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt wird, läßt sich nur das Edukt **7** isolieren. Deshalb wird die Reaktion so wiederholt, daß die Mischung nach Zugabe des Alkohols bei 0 °C für eine halbe Stunde auf 95 °C erwärmt wird^[75]. Wieder läßt sich nach der Hydrolyse ein farbloser Feststoff isolieren. Die Elementaranalyse zeigt jedoch, daß in diesem Fall die Alkoholgruppe gegen Chlorid ausgetauscht wird. Scheinbar ist die Verbindung **7** nicht reaktiv genug für die Vilsmeier Variante nach M. BIRMES und bei Verschärfung der Reaktionsbedingungen wird die Alkoholgruppe ausgetauscht.

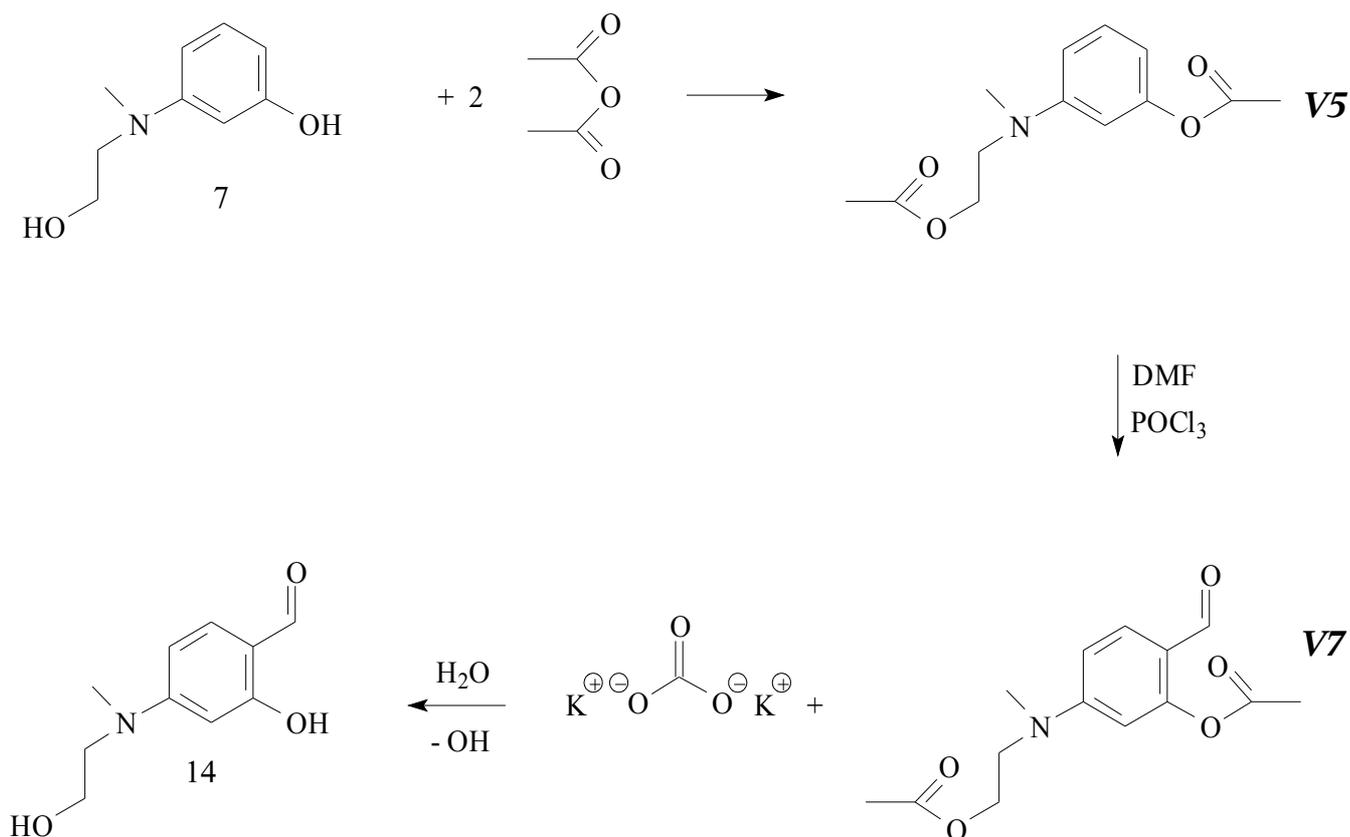
Der Austausch der Hydroxygruppe gegen ein Chlorid erfolgt wohl nach dem S_N2-Mechanismus. In der Literatur sind einige Beispiele für den Austausch von Chlorid gegen eine Hydroxygruppe beschrieben. Da es auf dem oben aufgezeigten Weg nicht möglich scheint das gewünschte Molekül 4-[*N*-(2-Hydroxyethyl)-*N*-methylamino]salicylaldehyd **14** direkt zu erhalten, soll nun versucht werden es aus 4-[*N*-(2-Chlorethyl)-*N*-methylamino]salicylaldehyd **15** zu synthetisieren. Dazu wird nach einer Vorschrift aus der Patentliteratur^[76,77] die Verbindung **15** in Ethanol gelöst und mit Natriumcarbonat gelöst in etwas Wasser versetzt. Die Mischung wird für sechs Stunden zum Sieden erhitzt und dann aufgearbeitet. Man erhält so einen grauen Feststoff, der nach der Auswertung von NMR-Spektrum und Massenspektrum leider nicht die gesuchte Verbindung **14** ist.

V6



So wird die Reaktion wiederholt, nur wird das Natriumcarbonat durch die schwächere Base Natriumhydrogencarbonat ersetzt, um durch sanftere Reaktionsbedingungen das Molekül nicht zu zerstören und so zum Ziel zu kommen. Doch das Ergebnis der Reaktion ist das gleiche. Das Molekül wird bei der Reaktion zerstört und es entsteht eine braune, hochviskose Masse, die sich jeder Analyse entzieht. In einem letzten Versuch wird das 4-[*N*-(2-Chlorethyl)-*N*-methyl-amino]-salicylaldehyd **15** in der unten noch zu beschreibenen Cumarinsynthese eingesetzt und der so erhaltene Farbstoff der gerade beschriebenen Reaktion unterworfen. Dabei wurde das Cumarin zerstört. Es wird ein schwarzer Feststoff erhalten. Dies wird in Kapitel 3.3.7 und in Kapitel 3.4.4 näher beschrieben.

Da sich die Hydroxygruppe in Verbindung **14** gut gegen Chlorid austauschen läßt, die Rückreaktion aber nicht gelingt, muß die Hydroxygruppe vorher geschützt werden. Eine kleine und einfach zu handhabende Schutzgruppe stellt die schon oben erwähnte Methylgruppe dar. Mit ihr sollte die Hydroxygruppe geschützt werden. Beschrieben^[78] ist die Reaktion des Ausgangsstoffes *N*-Methylethanolamin zu *N*-Methyl-*N*-(2-methoxyethyl)amin. Dabei wird das *N*-Methylethanolamin in Paraffinöl gelöst und mit Natriumhydrid deprotoniert. Das so entstandene Alkoholat soll mit dem zugetropften Methyljodid zum Produkt abreagieren. Unglücklicherweise erhält man so ein Gemisch aus *N*-Methylethanolamin und *N*-Methyl-*N*-(2-methoxyethyl)amin, das sich laut Literaturstelle destillativ trennen lassen soll. Dies ist jedoch trotz des Einsatzes einer Spaltrohrdestillationsapparatur nicht gelungen. Alle Fraktionen enthielten sowohl Produkt als auch Edukt. Deshalb wurde dieser Syntheseweg nicht weiter verfolgt.



Nun soll 3-[*N*-(2-Hydroxyethyl)-*N*-methylamino]phenol **7** geschützt werden. Der Nachteil ist dabei, daß beide Hydroxygruppen reagieren werden, da die phenolische Hydroxylgruppe reaktiver ist. Wenn die Schutzgruppe zu groß gewählt wird, kann das die nachfolgende Formylierung aus sterischen Gründen behindern.

Eine einfache Methode um einen Alkohol zu schützen ist die Acetylierung. So wird 3-[*N*-(2-Hydroxyethyl)-*N*-methylamino]phenol **7** in etwas Acetanhydrid für zwei Stunden auf 100°C erwärmt und dann auf Eiswasser gegossen. Nach Aufarbeitung und Destillation erhält man ein gelbes Öl.

Dieses läßt sich nun einfach in einer Vilsmeier Reaktion formylieren^[75]. Um die Schutzgruppen wieder abzuspalten, wird das aus der Vilsmeier Reaktion resultierende grüne Öl als Rohprodukt in einer Mischung aus gleichen Teilen Methanol und einer Lösung aus 7 % Kaliumhydroxid in Wasser für 48 Stunden gerührt. Nach der Aufarbeitung und Umkristallisation aus Ethanol erhält man die dunkelroten Kristalle von 4-[*N*-(2-Hydroxyethyl)-*N*-methylamino]salicylaldehyd **14**.

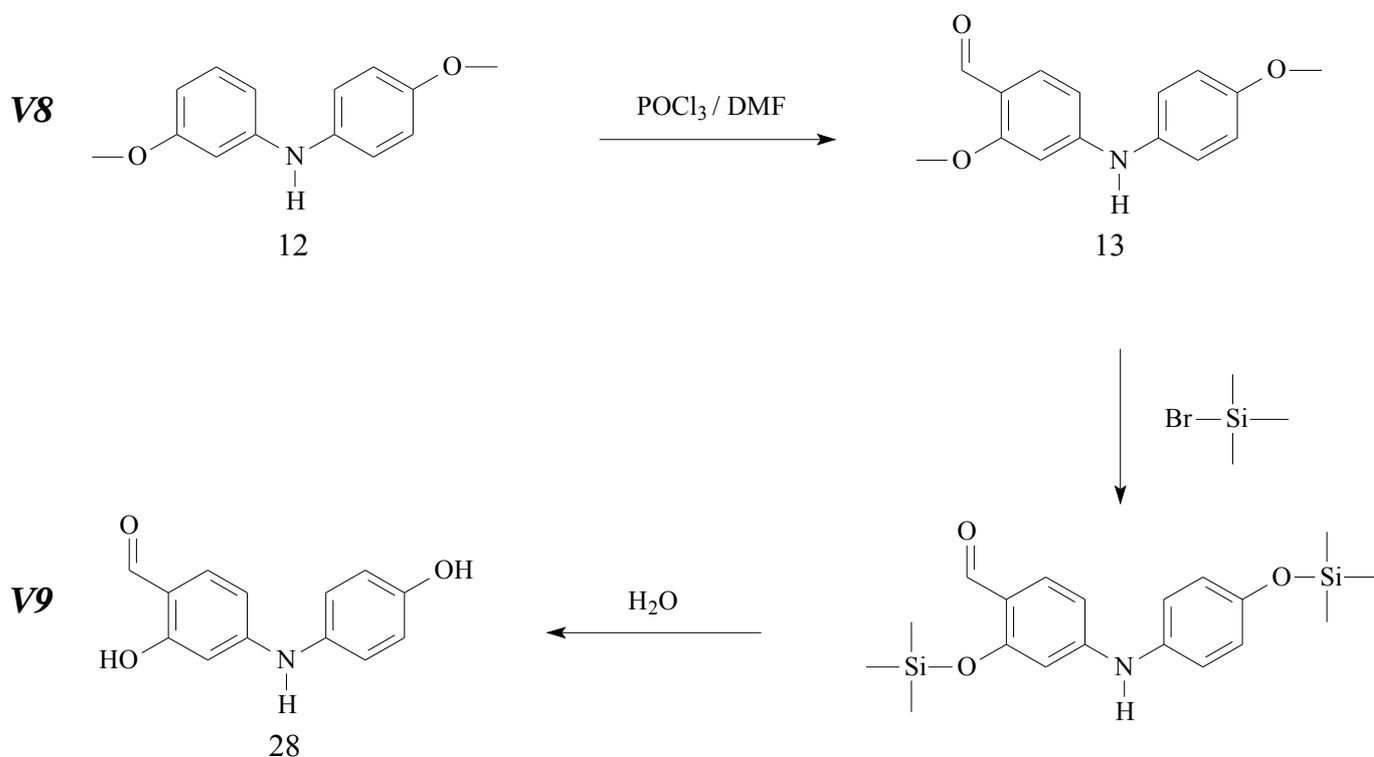
Auch das *N*-(3-Hydroxyphenyl)-*N*-(4-methoxyphenyl)amin **11** soll nun zum Salicylaldehyd formyliert werden. Da es aber eine Hydroxygruppe und ein Wasserstoff am Stickstoff enthält, wird das Phosphoroxychlorid im dreifachen Überschuß eingesetzt. Trotzdem läßt sich das als grünes

Pulver anfallende 4-[*N*-(*p*-Methoxyphenyl)amino]salicylaldehyd nur in schlechten Ausbeuten von etwa einem Prozent erhalten.

Deshalb wird besser das geschützte Derivat *N*-(3-Methoxyphenyl)-*N*-(4-methoxyphenyl)amin **12** eingesetzt. Es wird nach einer Standardvorschrift^[63] in DMF gelöst und Phosphoroxchlorid wird bei 0 °C langsam zugetropft. Dann wird für 24 Stunden auf 70 °C erwärmt und nach Hydrolyse und Aufarbeitung erhält man 4-[*N*-(*p*-Methoxyphenyl)amino]-2-methoxybenzaldehyd **13** als gelben Feststoff in guten Ausbeuten.

Um ein Cumarin nach der Vorschrift von H. HAEUSERMANN^[59] zu synthetisieren, wie in **Abbildung 16** auf Seite 19 gezeigt, müssen die Methoxygruppen gespalten werden, um die freien Hydroxygruppen zu erhalten. Da das Molekül auch eine recht oxidationsempfindliche Aldehydgruppe enthält, führt die einfachste Demethylierung mit Iodwasserstoffsäure nicht zum Erfolg. Das Ergebnis ist ein schwarzer unlöslicher Feststoff.

So wird der Aldehyd **13** in Chloroform gelöst und langsam Bromtrimethylsilan zugetropft^[68]. Dabei wird der Methylether gespalten und es bildet sich ein Trimethylsilylether. Da solche Ether sehr wasserempfindlich sind, wird das Produkt der Reaktion nach dem Entfernen des



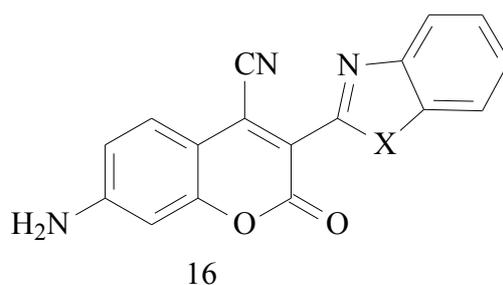
Lösungsmittels in Wasser gerührt und so der gewünschte 4-[*N*-(*p*-Hydroxyphenyl)-amino]-

salicylaldehyd **28** erhalten.

3.2.3. Synthese von 4-Nitrosalicylaldehyd

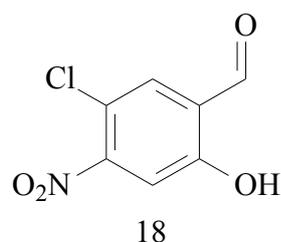
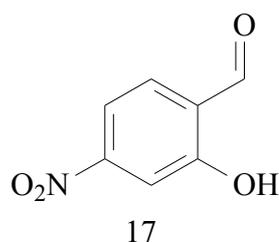
Ein weiterer möglicher Syntheseweg zu den angestrebten Cumarinen führt über die Darstellung der Aminocumarine **16**, deren Aminogruppe abschließend in gewünschter Weise alkyliert wird. Dieser Weg hat den Vorteil, daß sich verschiedene Reste einfach an dem Molekül anbringen lassen. So kann man die Umgebung der Phosphorsäure einfach variieren und das Substrat an die Phosphatase anpassen.

Da auch hier die Perkinsche Cumarinsynthese benutzt werden soll, benötigt man zur Synthese ein geeignetes Salicylaldehydderivat. Da die Aminogruppe recht empfindlich ist und bei vielen

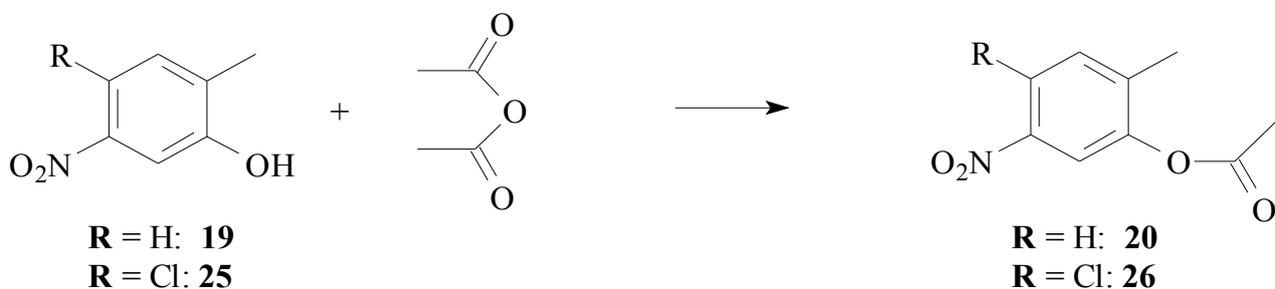


Reaktionen stören könnte, soll sie als Nitrogruppe maskiert werden, die dann im letzten Schritt durch eine Hydrierung zur Aminogruppe das Zielmolekül ergibt.

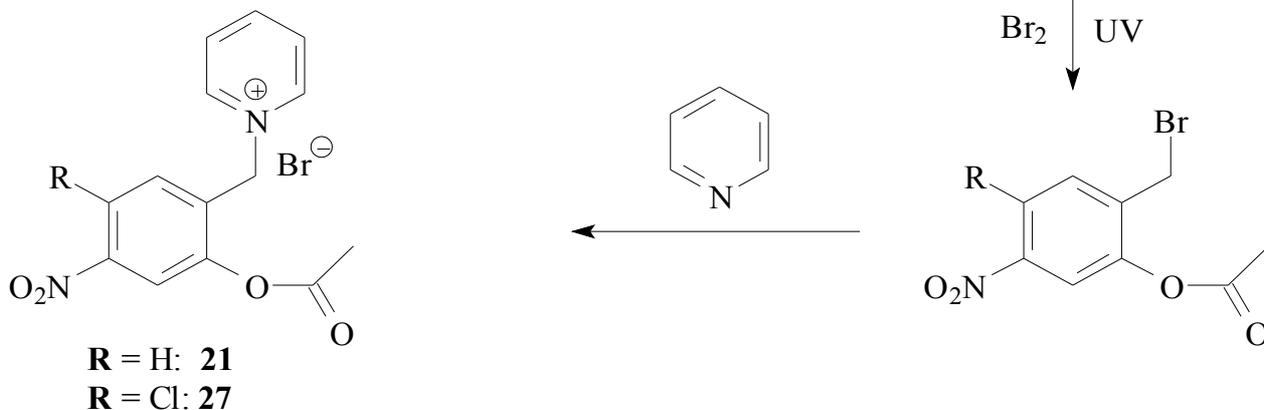
Die Synthese mehrfach substituierter Aromaten ist relativ kompliziert. Doch sind zwei sinnvolle Vorstufen, der 4-Nitrosalicylaldehyd **17** und der 5-Chlor-4-nitrosalicylaldehyd **18** bekannt.



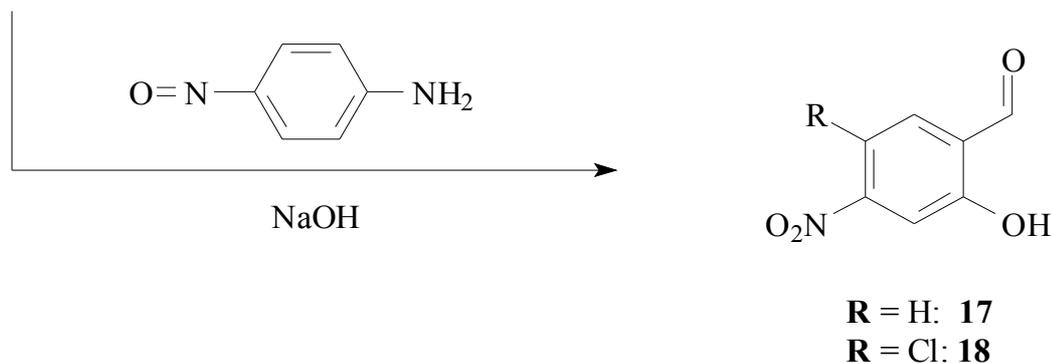
Als Edukt für die Synthese des 4-Nitrosalicylaldehyds **17** dient das käufliche 2-Hydroxy-4-nitrotoluol **19**. Um die saure und reaktive phenolische Hydroxygruppe zu schützen, wird sie durch eine Reaktion mit Essigsäureanhydrid acetyliert. Das acetylierte Produkt **20** wird in guten Ausbeuten erhalten. Das so erhaltene beige Pulver wird nun in Tetrachlorethan in der Siedehitze unter UV-Bestrahlung mit Brom umgesetzt^[79] und so an der Methylgruppe bromiert. Das so gewonnene Öl wird ungereinigt in Ethanol gelöst und mit Pyridin versetzt. In einer stark exothermen Reaktion wird das Pyridin alkyliert und über Nacht fällt das entstandene 2-Hydroxy-4-nitrobenzylpyridiniumbromid **21** in farblosen Kristallen aus. Die notwendige sanfte Oxidation zum Aldehyd wird durch Rühren des 2-Hydroxy-4-nitrobenzylpyridiniumbromid **21** in Ethanol mit



V13



V18

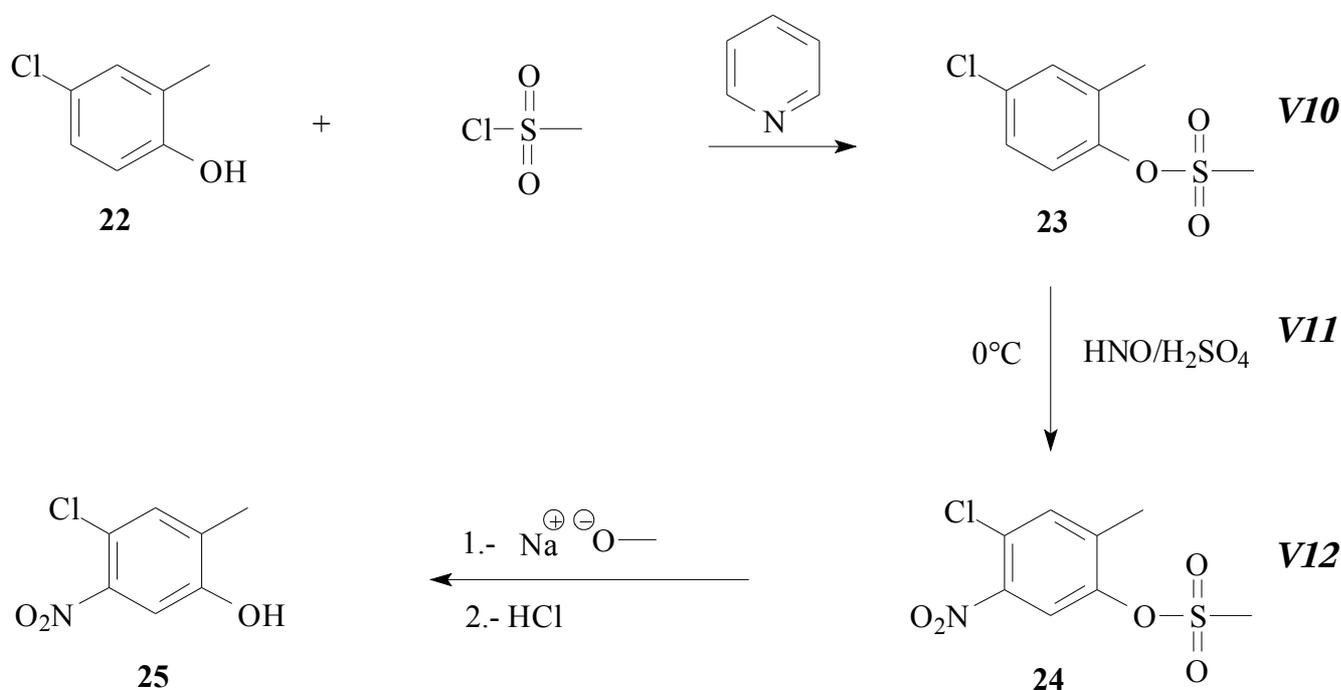


Nitrosoanilin und Natriumhydroxid erreicht.

Die starke Base Natriumhydroxid bewirkt gleichzeitig die Abspaltung der Acetylschutzgruppe, so daß nach der Umkristallisation aus Ethanol direkt ohne weiteren Reaktionsschritt das gewünschte Produkt **17** in mäßiger Ausbeute erhalten wird.

Die Reaktion zum 5-Chlor-4-nitrosalicylaldehyd **18** gestaltet sich durch den zusätzlichen Substituenten schwierig. Nach einem Patent der WELLA AG^[80] wird das käufliche 5-Chlor-2-hydroxytoluol **22** mit Methansulfonsäurechlorid in Pyridin zum (4-Chlor-2-methylphenyl)-methansulfonat **23** umgesetzt. Man erhält farblose Kristalle in befriedigenden Ausbeuten.

Das so hergestellte Sulfonat wird nun mit Nitriersäure bei 0 °C behandelt. So läßt sich nach der Aufarbeitung das isomerenreine (4-Chlor-2-methyl-5-nitrophenyl)methansulfonat **24** gewinnen. Da die Sulfonsäureschutzgruppe bei der nun folgenden Bromierung stört, wird sie mit Natriummethanolat in Methanol entfernt. Nach der Neutralisation mit Salzsäure erhält man 4-Chlor-2-methyl-5-nitrophenol **25** als gelbe Kristalle. Nun verläuft die Darstellung analog zu der oben beschriebenen Reaktion zu Verbindung **17**. Dazu muß **25** mit Essigsäureanhydrid acetyliert werden, dann wird in Tetrachlorethan in der Siedehitze und unter UV-Bestrahlung die Methylseitengruppe bromiert.



Die Zugabe von Pyridin zu einer ethanolischen Lösung des Rohproduktes der Bromierung ergibt

5-Chlor-2-hydroxy-4-nitrobenzylpyridiniumbromid **27**.

Dieses wird schließlich mit Nitrosoanilin und Natriumhydroxid zum Aldehyd **18** oxidiert. Auch hier wird die Acetylschutzgruppe in einem Schritt abgespalten. Zur Reinigung wird aus Ethanol und Essigsäure umkristallisiert. Die Oxidation mit Nitrosoanilin verläuft in beiden Fällen nur mit etwa 25 % Ausbeute.

3.3. Synthese der Cumarinringgrundkörper

3.3.1. Allgemeines

Die Synthese von Cumarin aus Salicylaldehyd und Carbonsäureanhydrid mit Natriumacetat als Base nach Sir W. H. PERKIN^[81,82] ist eine der ältesten technischen Lactonsynthesen, die aber in ihrer ursprünglichen Form nur etwa 27 % Ausbeute erzielt^[84]. In den folgenden Jahren wurde das Verfahren weiterentwickelt. Durch die Verwendung verschiedener Katalysatoren, wie Anilin^[83], Zinkchlorid oder Iod^[84], konnten die Ausbeuten auf bis zu 70 % gesteigert werden.

Der Reaktionsmechanismus wurde schon 1936 von I. M. HEILBRON, D. H. HEY und B. LYTHGOE^[85] vorgeschlagen und 1953 von M. CRAWFORD und J. A. M. SHAW^[86] experimentell bestätigt. Danach gibt es zwei Reaktionswege, die zum Cumarin führen. Beiden ist gemeinsam, daß die Doppelbindung in der 3-Position durch Eliminierung erst im letzten Schritt entsteht.

Beim ersten Reaktionsweg wird der Salicylaldehyd acetyliert und der Ringschluß zum Lacton findet unter Basenkatalyse mit anschließender Eliminierung statt.

Der zweite Reaktionsweg ist etwas komplizierter. Hierbei wird auch zuerst der Salicylaldehyd acetyliert, dann aber finden eine Kondensation mit dem Säureanhydrid und eine weitere Acetylierung statt. Erst dann folgen die Cyclisierung zum Lacton und die abschließende Eliminierung zum Cumarin.

Findet der Eliminierungsschritt schneller statt als die Cyclisierung, entsteht E-2-Hydroxycimtsäure, die aus sterischen Gründen nicht zum Cumarin cyclisieren kann. Je nach Reaktionsführung kann E-2-Hydroxycimtsäure auch als Nebenprodukt der Perkinschen Cumarinsynthese entstehen. Diese Nebenreaktion wird durch Zugabe katalytischer Mengen Iod verringert, das sich wahrscheinlich intermediär an die Doppelbindung in der Seitenkette addiert, die Drehbarkeit in dieser Molekülregion und so die für den Ringschluß notwendige Orientierung der Atome ermöglicht.

Cumarine als präzipitierende Fluorophore - Hauptteil

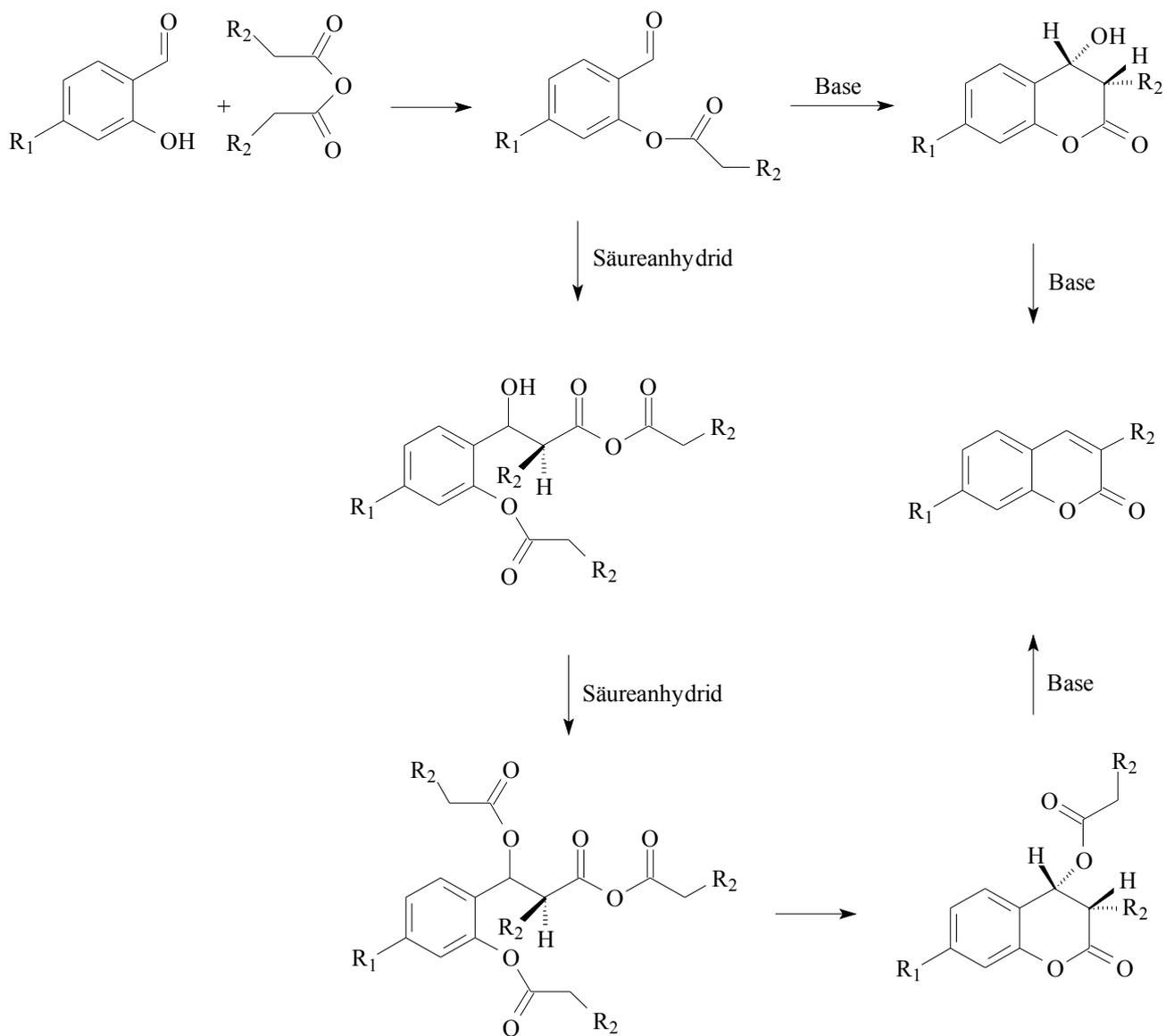


Abbildung 21: Die Reaktionsmechanismen der Perkinschen Cumarinsynthese

3.3.2. Synthese der 7-Nitrocumarine

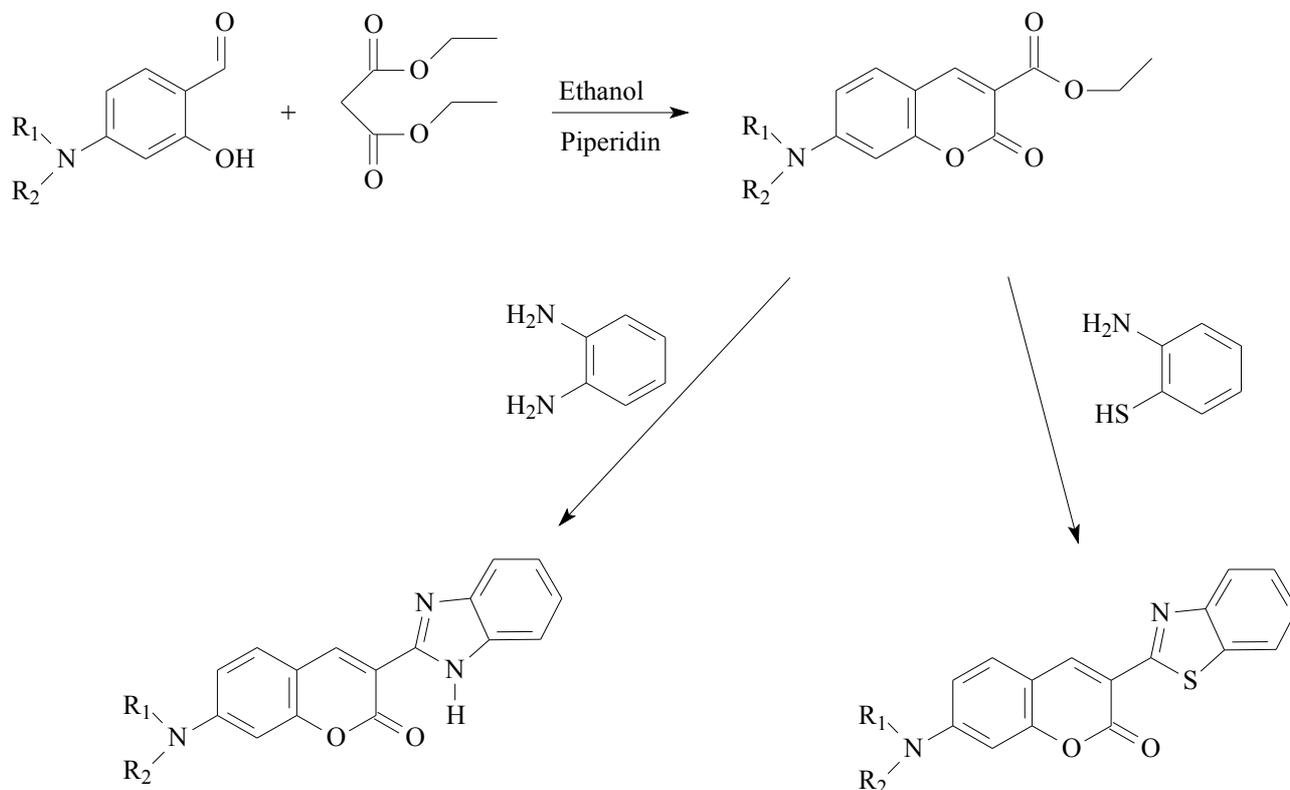


Abbildung 22: Cumarinsynthese nach LI SHUNYI und GAO YIMING

In einem ersten Versuch ein Cumarin nach PERKIN herzustellen, soll ein Cumarin des Typs **16** synthetisiert werden. LI SHUNYI und GAO YIMING^[87] berichten von der Synthese in 3-Position heterocyclensubstituierter Cumarine.

Dazu wird ein Salicylaldehydderivat mit Malonsäurediethylester in Ethanol gelöst und mit wenigen Tropfen Piperidin versetzt. Der entstandene Cumarincarbonsäureethylester wird mit *o*-Phenyldiamin oder *o*-Aminothiophenol zum fertigen Cumarin umgesetzt.

So soll der 7-Nitrocumarincarbonsäureethylester aus dem im vorherigen Kapitel beschriebenen Salicylaldehyd **17** hergestellt werden.

Leider versäumen es LI SHUNYI und GAO YIMING in ihrer Veröffentlichung genaue Angaben zur Durchführung ihrer Synthesen zu machen. So wird nach einer Vorschrift von H. ICHIBAGASE^[88] ein Gemisch von **17** und Malonsäurediethylester in Ethanol gelöst und mit einigen Tropfen Piperidin

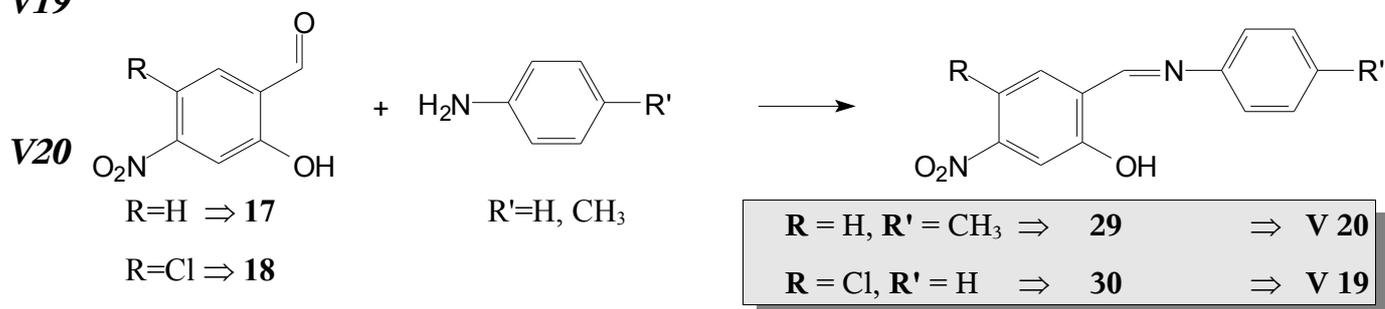
versetzt. Die Mischung wird für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Doch auch dann kann mittels Dünnschichtchromatographie kein Umsatz festgestellt werden. Deshalb wird die Reaktionsmischung nun auf 50 °C erwärmt und noch einmal für 24 Stunden gerührt. Trotzdem bleibt das Ergebnis das gleiche. Die Reaktion wird noch einmal mit Anilin als Base wiederholt, bei Raumtemperatur und bei 50 °C. Auch so lässt sich das gewünschte Cumarin nicht erhalten.

Deshalb wird nun der Salicylaldehyd **17** mit Toluidin zum *N*-(2-Hydroxy-4-nitrobenzyliden)-*p*-toluidin nach einem Patent von C. W. SCHELLHAMMER und K. W. MÜLLER^[89] umgesetzt. Das Patent berichtet von guten Ausbeuten bei der Synthese einer ganzen Reihe von Cumarinen aus Benzyliden-*p*-toluidinderivaten.

Dazu wird der Salicylaldehyd mit Toluidin in Toluol gelöst und für fünf Stunden mit wasserfreiem Magnesiumsulfat als Wasserfänger zum Sieden erhitzt. Das Produkt **29** fällt in bräunlichen Kristallen an.

Das 5-Chlor-2-hydroxy-4-nitrobenzylidenanilid **30** kann aus dem 5-Chlor-4-nitrosalicylaldehyd **18** durch Rühren mit etwas Anilin in absolutem Ethanol gewonnen werden. Das gewünschte Produkt **30** fällt als rotes Pulver nach wenigen Minuten aus der Reaktionslösung aus.

V19



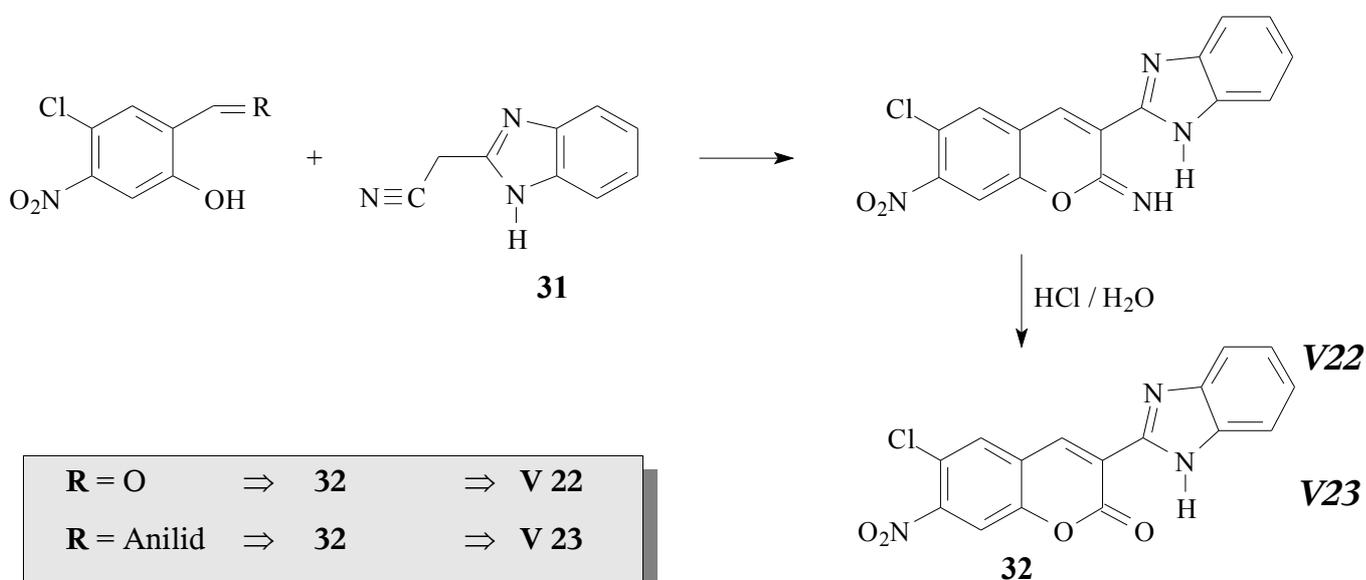
Mit diesen Derivaten wird nun die Reaktion nach H. ICHIBAGASE wiederholt, erst bei Raumtemperatur, dann bei 50 °C. Doch auch so erhält man die gewünschten Produkte nicht.

Da die basenkatalysierte Reaktion mit Malonsäurediethylester keinen Umsatz zeigt, wird nun eine sauerkatalysierte Variante mit Malonsäure getestet. Der Salicylsäureester **17** wird mit Malonsäure in Essigsäure für sechs Stunden auf 100 °C erwärmt^[90]. Laut Vorschrift sollen nach ein bis zwei Stunden gelbe Kristalle ausfallen. Leider ist dies hier nicht zu beobachten, es lässt sich kein Cumarin isolieren. So wird die Reaktion mit dem oben dargestellten Derivat **29** wiederholt, auch so lässt sich kein Cumarin synthetisieren.

Dieser Weg führt nicht zum Erfolg, es ist nicht möglich mit den oben synthetisierten Salicylaldehydderivaten die gewünschten Cumarincarbonsäurederivate zu erhalten. Ein anderer

Weg wird von H. HAEUSERMANN^[59] in einem Patent beschrieben. Dabei werden Salicylaldehyde mit Nitrilen umgesetzt und das Produkt wird mit verdünnter Salzsäure zum fertigen Cumarin hydrolysiert. Die Reaktion mit Nitrilen anstatt Säuren oder Estern soll wesentlich bessere Ausbeuten liefern.

Um ein Cumarin des Typs **16** darzustellen, wird 5-Chlor-4-nitrosalicylaldehyd **18** mit 2-Benzimidazolylacetonitril **31** in absolutiertem Ethanol gelöst und die Mischung auf 40 °C erwärmt. Dann werden einige Tropfen Piperidin hinzugefügt. Schon nach zehn Minuten beginnt ein gelber Feststoff auszufallen. Die Reaktion wird weitere 24 Stunden fortgeführt, dann wird abgekühlt und die gelben Kristalle werden abgefiltert, mit Ethanol gewaschen und in 2%iger Salzsäure suspendiert. Diese Mischung wird zum Rückfluß erhitzt. Dabei entsteht aus der Suspension eine tiefrote Lösung, aus der nach einigen Stunden 3-(2-Benzimidazolyl)-6-chlor-7-nitrocumarin **32** in Form von gelben Kristallen ausfällt. Diese werden abgesaugt und getrocknet.



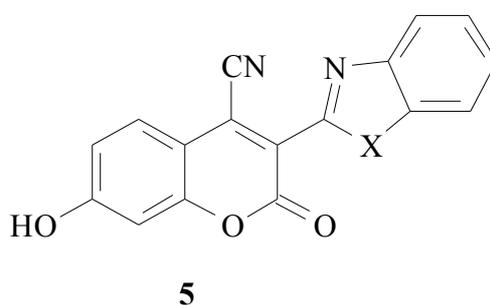
Diese Reaktion wird mit 5-Chlor-2-hydroxy-4-nitrobenzylidenanilid **30** und 2-Benzimidazolylacetonitril wiederholt. Hier fällt ein gelbes Pulver an, das ebenfalls für 24 Stunden in 2%iger Salzsäure zum Rückfluß erhitzt wird. Das 3-(2-Benzimidazolyl)-6-chlor-7-nitrocumarin **32** wird nach der üblichen Aufarbeitung als gelbes Pulver erhalten.

Der größere Aufwand durch die zusätzliche Reaktion zum Anilid lohnt sich nicht, da die Ausbeute dieser Variante um 15 Prozentpunkte geringer ausfällt. Deshalb wird bei weiteren Versuchen immer ein Salicylaldehydderivat eingesetzt.

3.3.3. Synthese der 7-Hydroxycumarine

Die Edukte für die Synthese der 7-Hydroxycumarine des Typs **5** sind kommerziell zu erhalten und die Cumarine sind literaturbekannt, sie wurden erstmals von O. WOLFBES beschrieben^[54].

Nach der im vorhergehenden Kapitel schon erwähnten Vorschrift von H. HAEUSERMANN wird 4-Hydroxysalicylaldehyd **33** mit 2-Benzthiazolylacetonitril **31** in Ethanol auf 40 °C erwärmt und



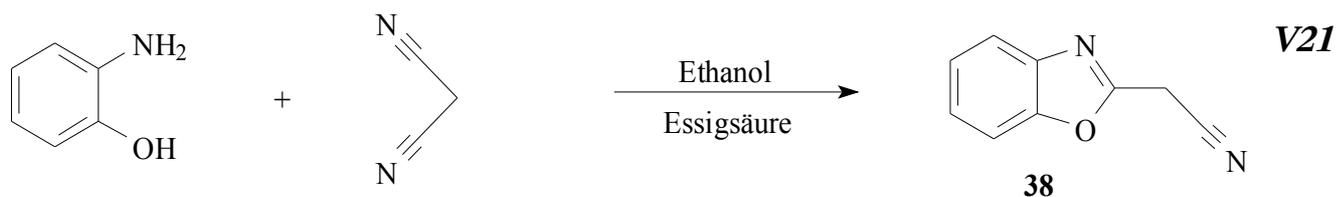
mit wenigen Tropfen Piperidin versetzt. Schon nach etwa zehn Minuten beginnt sich ein gelber Feststoff zu bilden, der aus dem Imid des gewünschten Cumarins besteht. Nach 24 Stunden rühren wird der gelbe Feststoff isoliert und in stark verdünnte Salzsäure suspendiert. Es wird zum Rückfluß erwärmt. Dabei bildet sich eine tiefrote Lösung aus der nach einigen Stunden ein gelber Feststoff ausfällt, der isoliert und getrocknet wird. Zur Reinigung wird die Substanz aus einer Mischung aus Ethanol, und 1,2-Dichlorbenzol umkristallisiert. Der gewünschte Farbstoff, 3-(2-Benzthiazolyl)-7-hydroxycumarin **34**, wird in Form gelber Kristalle erhalten.

Auch der zweite Vertreter der 7-Hydroxycumarine, das 3-(2-Benzimidazolyl)-7-hydroxycumarin **35**, sollte sich auf diesem Wege aus kommerziell erhältlichen Ausgangsstoffen darstellen lassen.

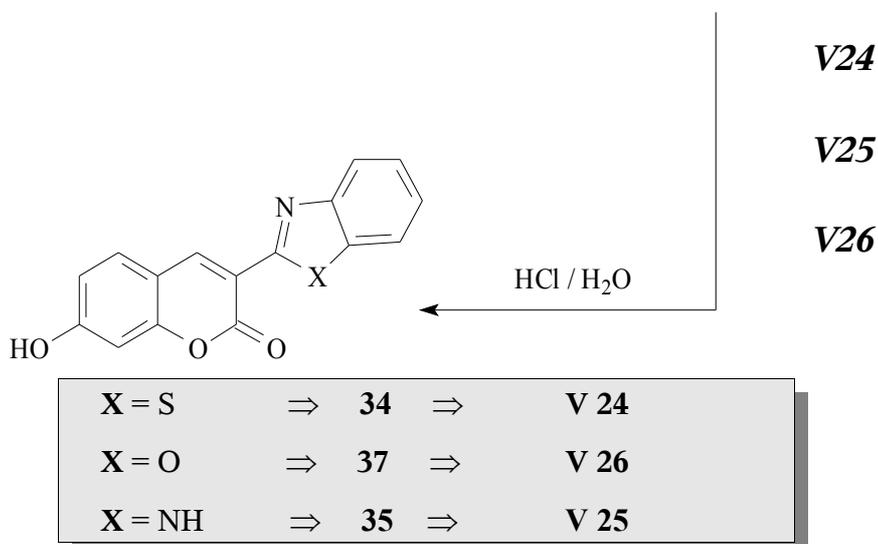
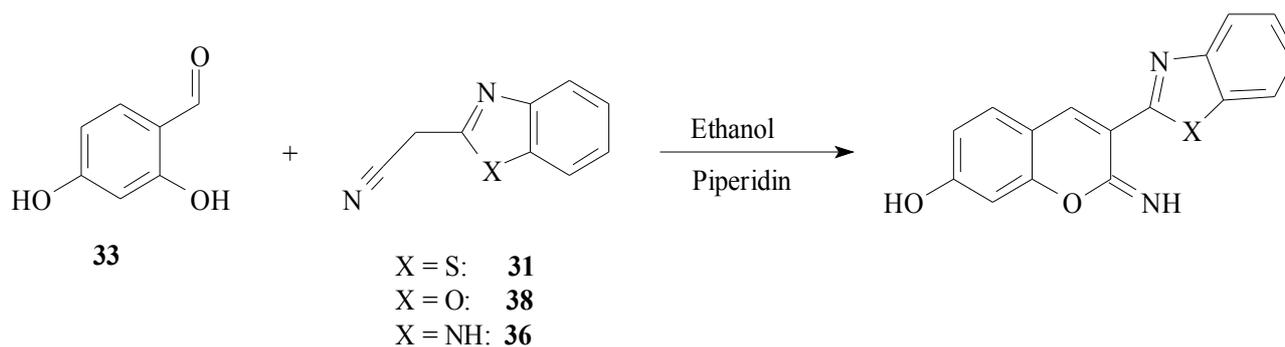
Wieder wird 4-Hydroxysalicylaldehyd **33** mit 2-Benzimidazolylacetonitril **36** in Ethanol auf 40 °C erwärmt und mit wenigen Tropfen Piperidin versetzt. Auch hier erhält man nach 24 Stunden rühren gelbe Kristalle, die nach 24 Stunden kochenden in 2%iger Salzsäure, nach Aufarbeitung und Umkristallisation aus Ethanol schließlich das gewünschte Produkt in Form gelber Kristalle ergeben.

Für das letzte angestrebte Derivat, das 3-(2-Benzoxazolyl)-7-hydroxycumarin **37**, muß in einem ersten Schritt das Edukt 2-Benzoxazolylacetonitril **38** dargestellt werden. Dies gelingt nach einer Vorschrift von J. SAKAMOTO^[91], nach welcher Aminophenol mit Malondinitril in Ethanol gelöst und

Cumarine als präzipitierende Fluorophore - Hauptteil



nach Zugabe von Essigsäure für 24 Stunden zum Rückfluß erhitzt wird.

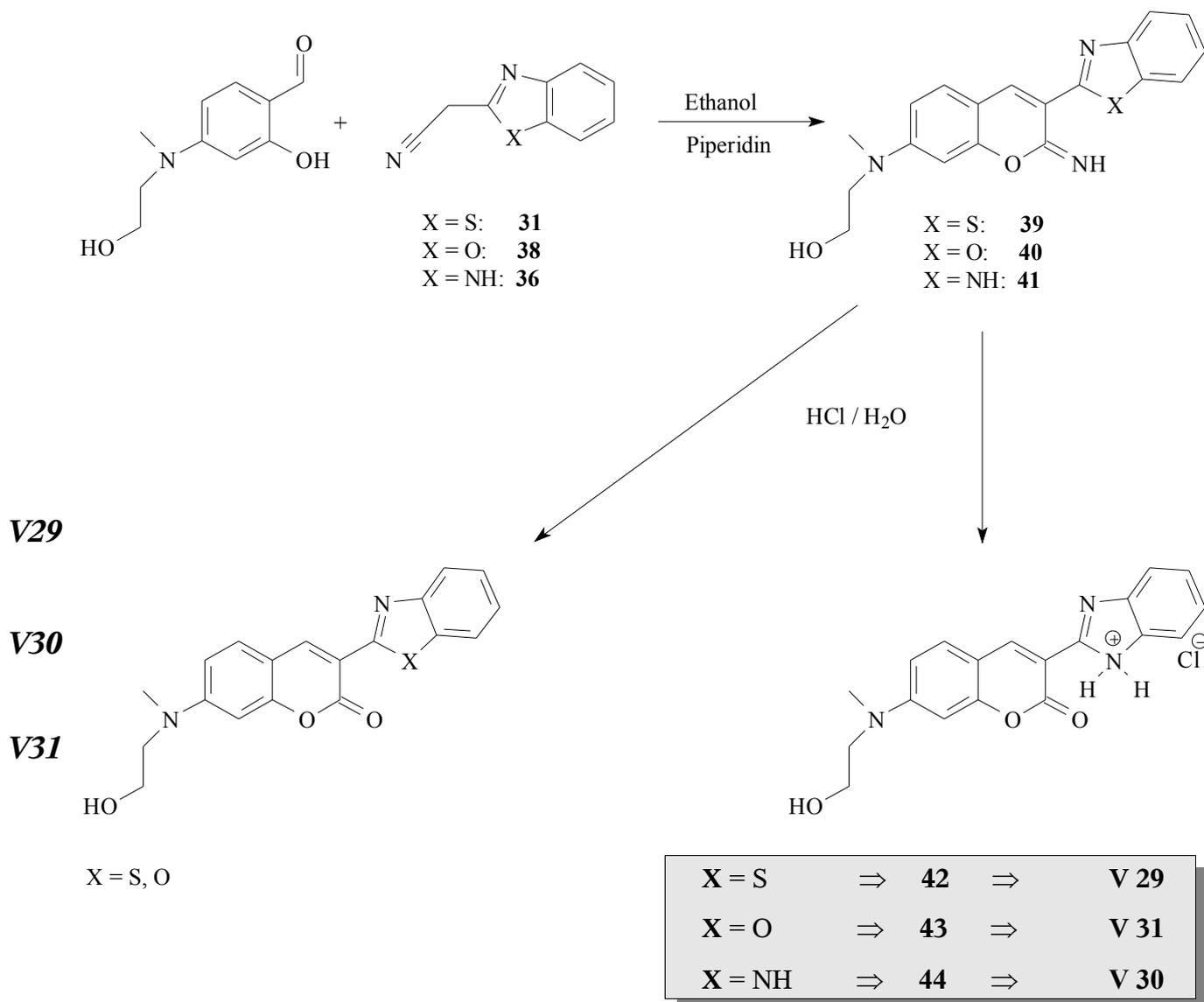


Die so erhaltene Lösung wird vom Lösungsmittel befreit, der Rückstand in Chloroform gelöst und die restliche Essigsäure durch Waschen mit Natriumhydrogencarbonatlösung entfernt. Nach der üblichen Aufarbeitung wird der dunkle Rückstand aus Ether und Hexan umkristallisiert. Man erhält gelbe Kristalle in mäßiger Ausbeute.

Die Reaktion des so erhaltenen 2-Benzoxazolylacetonitril **38** mit 4-Hydroxysalicylaldehyd **33** in Ethanol mit Piperidin als Base zum 3-(2-Benzoxazolyl)-7-hydroxycumarin **37** gestaltet sich wie

oben beschrieben. Man erhält ebenfalls gelbe Kristalle nach der Umkristallisation aus Ethanol.

3.3.4. Synthese der 7-Aminocumarine



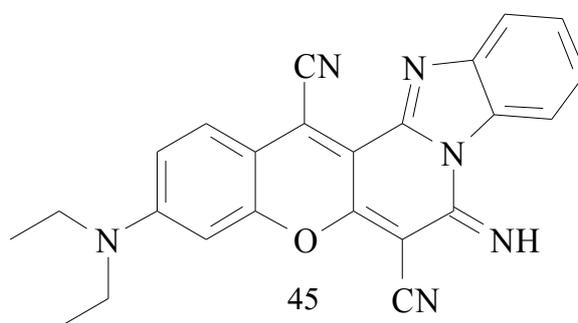
Auch die Synthese der nicht literaturbekannten, mit einer Alkoholgruppe funktionalisierten 7-[*N*-(2-Hydroxyethyl)-*N*-methylamino]cumarine erfolgt nach der Vorschrift von H. HAEUSERMANN. Es sollen drei Vertreter dieses Typs synthetisiert werden.

Hierzu wird das in Kapitel 3.2.2 beschriebene 4-[*N*-(2-Hydroxyethyl)-*N*-methylamino]salicylaldehyd **14** nacheinander mit den drei schon im letzten Kapitel beschriebenen Nitrilen **31**, **36** und **38** in Ethanol mit Piperidin als Base bei 40 °C umgesetzt. Nach der üblichen Aufarbeitung erhält man die drei Imidderivate **39**, **40** und **41** der gewünschten Cumarine, die dann durch 24 stündiges

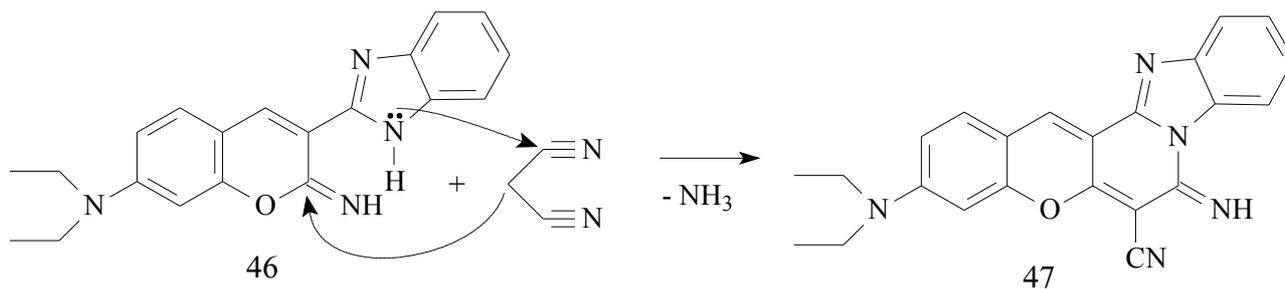
erhitzen zum Rückfluß in Salzsäure erhalten werden.

Nach der Umkristallisation erhält man 3-(2-Benzthiazolyl)-7-[N-(2-hydroxyethyl)-N-methylamino]cumarin **42**, 3-(2-Benzimidazolyl)-7-[N-(2-hydroxyethyl)-N-methylamino]cumarin **43** und 3-(2-Benzthiazolyl)-7-[N-(2-hydroxyethyl)-N-methylamino]cumarin **44** als orangefarbene Kristalle. Die Massenspektrometrie zeigt, daß die Verbindung **43** als Hydrochlorid vorliegt.

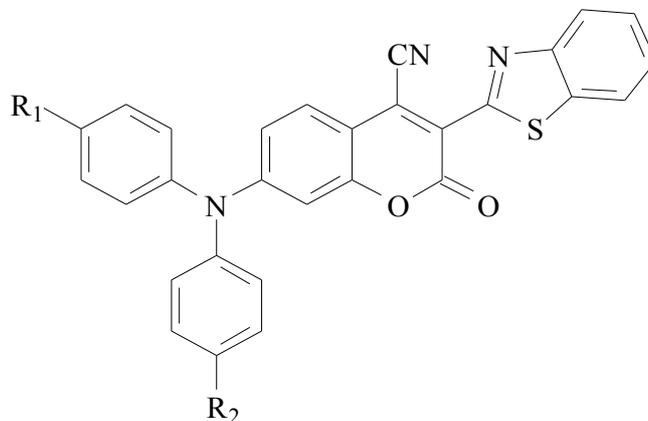
3.3.5. Synthese des Grundkörpers eines blauen Cumarins



In der Literatur^[50] wird ein blauer Cumarinfarbstoff **45** erwähnt, der von P. MOECKLI aus dem ersten je synthetisierten roten Cumarinfarbstoff erhalten wurde. Dieser wurde von W. MARCH *ET AL.* durch die Kondensation des Iminocumarins **46** mit Malondinitril unter gleichzeitigem Ringschluß erhalten^[92]. Der fertige Farbstoff **45** absorbiert bei 630 nm und das Fluoreszenzmaximum liegt bei 668 nm^[48]. Wenn es möglich ist diesen Farbstoff mit einer Alkoholgruppe zu funktionalisieren, die sich dann mit Phosphorsäure verestern läßt, entspricht der Farbstoff sehr gut den in der Problemstellung beschriebenen spektroskopischen Anforderungen an einen *ELF*-Farbstoff, da **45** ein fluoreszierendes Pigment ist.



Diese Reaktion soll nun mit dem oben beschriebenen Iminocumarin **41** durchgeführt werden. Dazu wird das isolierte, mit viel Ethanol gewaschene und getrocknete **41** mit Malondinitril in Glykolmonoethylether suspendiert und für zwei Stunden zum Rückfluß erhitzt. Dabei bildet sich eine dunkelrote Lösung, aus der nach einigen Stunden bei etwa 0 °C ein braunroter Feststoff ausfällt, der mit etwas Glykolmonoethylether und viel Methanol gewaschen wird. Man erhält nach dem Trocknen ein braunes Pulver, das allerdings nicht der gewünschte Farbstoff **48** ist. Das Massenspektrum zeigt einen Peak bei 354 und einen bei 427. Der Farbstoff **48** müßte einen M^+ -Peak bei 383 zeigen. An dieser Stelle zeigt das Spektrum kein Signal.

3.3.6. Synthese des 7-[N-(4-Hydroxyphenyl)amino]cumarins

$R_1=R_2=H, F, Cl, SMe$

Abbildung 23: Cumarine, synthetisiert von N. Ito

Aus dem in Kapitel 3.2.2 dargestellten 4-[N-(*p*-Hydroxyphenyl)amino]salicylaldehyd **28** soll nun das 3-(2-Benzthiazolyl)-7-[N-(*p*-hydroxyphenyl)amino]cumarin synthetisiert werden.

Über Cumarine die nur einen Phenylring an der Aminogruppe in der 7-Position tragen, wurde bis jetzt in der Literatur noch nicht berichtet. Allerdings beschreiben N. ITO^[93] und A. KARASOWA^[94] in einem Patent die Synthese einiger Cumarine, die zwei *para*-substituierte Phenylringe an dieser Aminogruppe tragen. Keine dieser Verbindungen besitzt jedoch eine Hydroxygruppe an dieser Stelle am Phenylring. Auch könnten zwei Hydroxyfunktionen an einem Cumarin zu einem Verlust der Pigmenteigenschaften in Wasser führen. Deshalb soll ein Derivat mit nur einem *p*-Hydroxyphenylrest synthetisiert werden.

Da den genannten Patenten nicht zu entnehmen ist, auf welchem Weg N. ITO diese Substanzen herstellte, wird hier wieder auf die bewährten Vorschriften H. HAEUSERMANN'S zurückgegriffen.

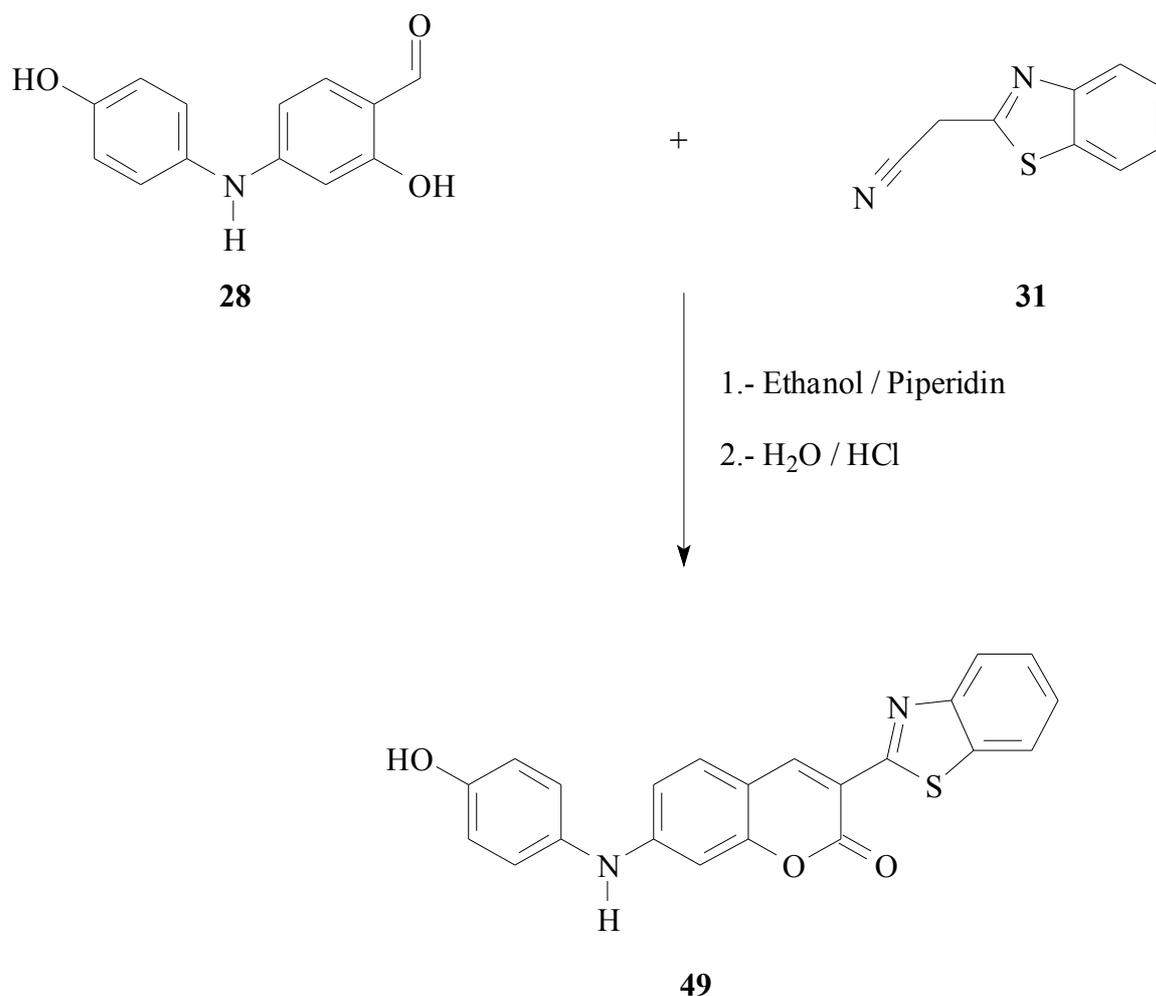
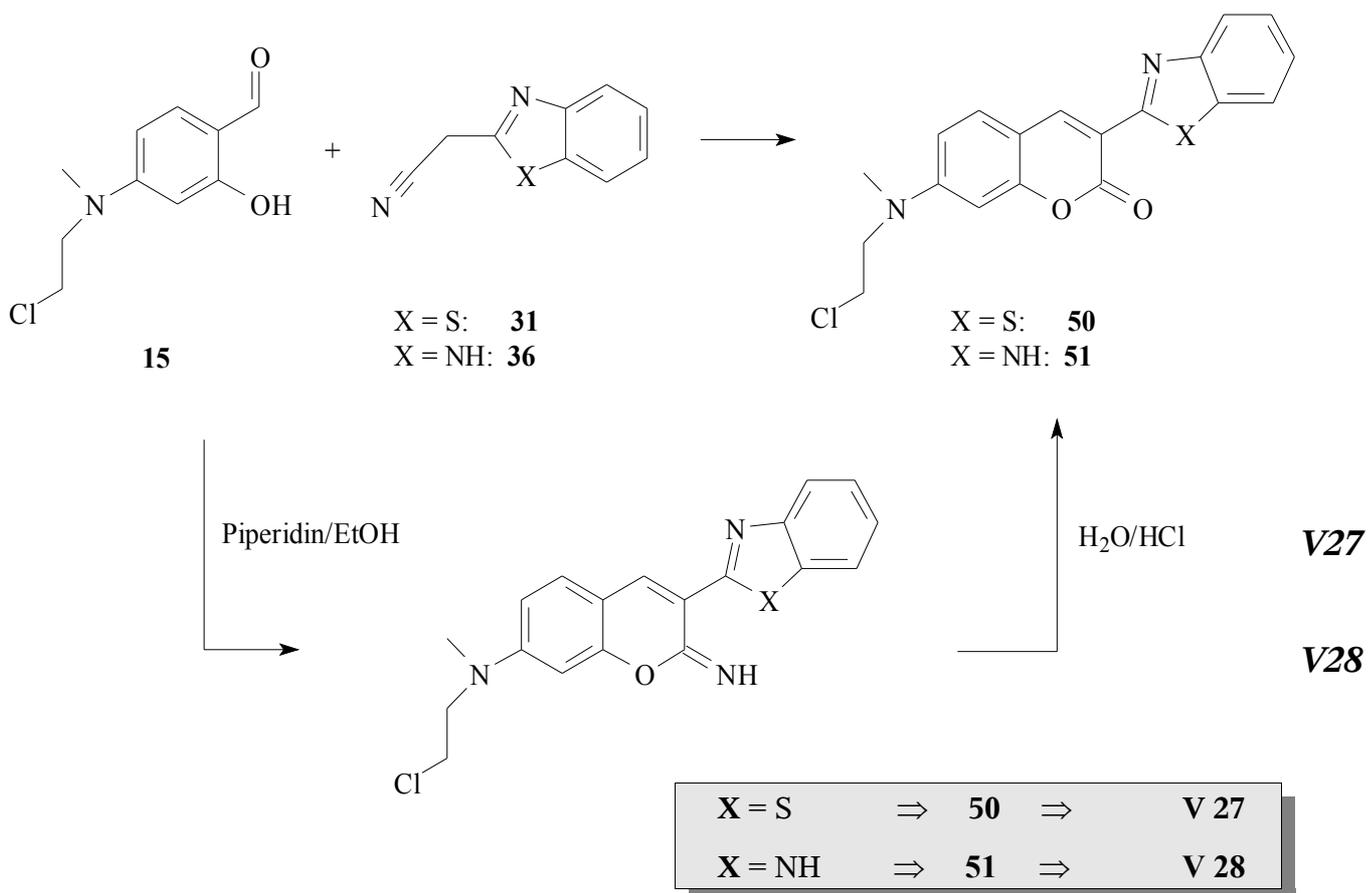


Abbildung 24: Geplante Synthese zum Cumarin **49**

Der schon beschriebene Reaktionsweg, das Erwärmen eines Reaktionsgemisches aus Salicylaldehyd und 2-Benzthiazolylacetonitril, gelöst in Ethanol mit etwas Piperidin als Katalysator für 24 Stunden, führt hier nur zu einer schwarzen Lösung, aus der sich kein Cumarin isolieren läßt. Wird die Reaktion aber bei Raumtemperatur durchgeführt, läßt sich nach 48 Stunden aus der dunklen Lösung ein orangefarbenes Pulver isolieren. Dieses wird nun für 24 Stunden in zweiprozentiger Salzsäure zum Rückfluß erhitzt, und das ausgefallene orangefarbene Pulver wird isoliert und getrocknet. Die Analyse mittels ¹H-NMR Spektroskopie und Massenspektrometrie zeigt allerdings, daß es sich bei diesem Pulver nicht um das angestrebte Cumarin handelt.

3.3.7. Synthese verschiedener Chlorethylaminocumarine

Auch aus dem in Kapitel 3.2.2 beschriebenen 4-(*N*-Chlorethyl-*N*-methyl)aminosalicylaldehyd **15** kann nach der bewährten Methode mit 2-Benzthiazolylacetonitril **31** oder mit 2-Benzdiazolylacetonitril **36** ein Cumarin dargestellt werden. Man erhält, nach 24 stündigen Sieden in Ethanol mit etwas Piperidin, ein gelbes Pulver, das nun ebenfalls 24 Stunden in verdünnter Salzsäure zum Rückfluß erhitzt wird. Die gewünschten Farbstoffe 3-(2-Benzthiazolyl)-7-[*N*-(2-chlorethyl)-*N*-methylamino]cumarin **50** und 3-(2-Benzdiazolyl)-7-[*N*-(2-chlorethyl)-*N*-methylamino]cumarin **51** fallen als gelbes Pulver an.



3.4. Synthese der vollständigen Farbstoffe

3.4.1. Allgemeines

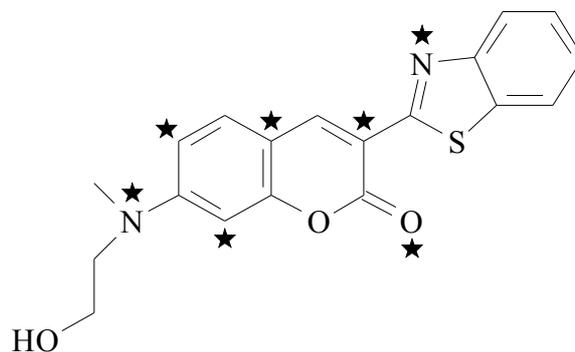
Nun soll das fertige Cumarinerüst mit einer Nitrilgruppe in der 4-Position versehen werden. Dies führt nicht nur zu einer bathochromen Verschiebung der Absorption und der Fluoreszenz um etwa 100 nm, der Farbstoff wird auch wesentlich unlöslicher und erhält so die gewünschten Pigmenteigenschaften.

Der Einfluß auf das Absorptionsmaximum des Farbstoffes durch das Einfügen der Nitrilgruppe läßt sich mit den Dewar Regeln erklären. Diese formulieren einige Leitsätze, mit denen man den qualitativen Effekt von Substituenten auf die Farbe und das Absorptionsmaximum eines Farbstoffes vorhersagen kann. Dabei werden die Atome eines Farbstoffes alternierend so gesternt, daß

1. niemals zwei benachbarte Atome gesternt sind
2. die Anzahl der gesternten Atome die der ungesterntes übertrifft.

Die Dewar Regeln besagen, daß dann jeder elektronenziehende Substituent an einer gesternten Position oder jeder elektronendonierende Substituent an einer ungesterntes Position einen großen hypsochromen Shift verursachen wird.

Dagegen wird jeder elektronenziehende Substituent an einer ungesterntes Position oder jeder elektronendonierende Substituent an einer gesternten Position einen kleineren bathochromen Shift verursachen^[95]. Dies führt im Falle der hier betrachteten Cumarine zu folgendem Bild.



Es ergeben sich sieben gesternte und sechs ungesterntes Positionen, wobei die Nitrilgruppe, eine elektronenziehende Gruppe, an dem ungesterntes Kohlenstoffatom der 3-Position eingeführt werden soll. Die Dewar Regeln sagen hier in Übereinstimmung mit der Literatur einen

bathochromen Shift voraus.

Der Reaktionsmechanismus ist für Styrylfarbstoffe bewiesen^[52] und soll so verlaufen, daß in einem ersten Schritt ein Cyanidion in einer michaelartigen Reaktion addiert wird. Die überzähligen Elektronen werden nun von dem Oxidationsmittel, hier dem Bleitetraacetat, übernommen.

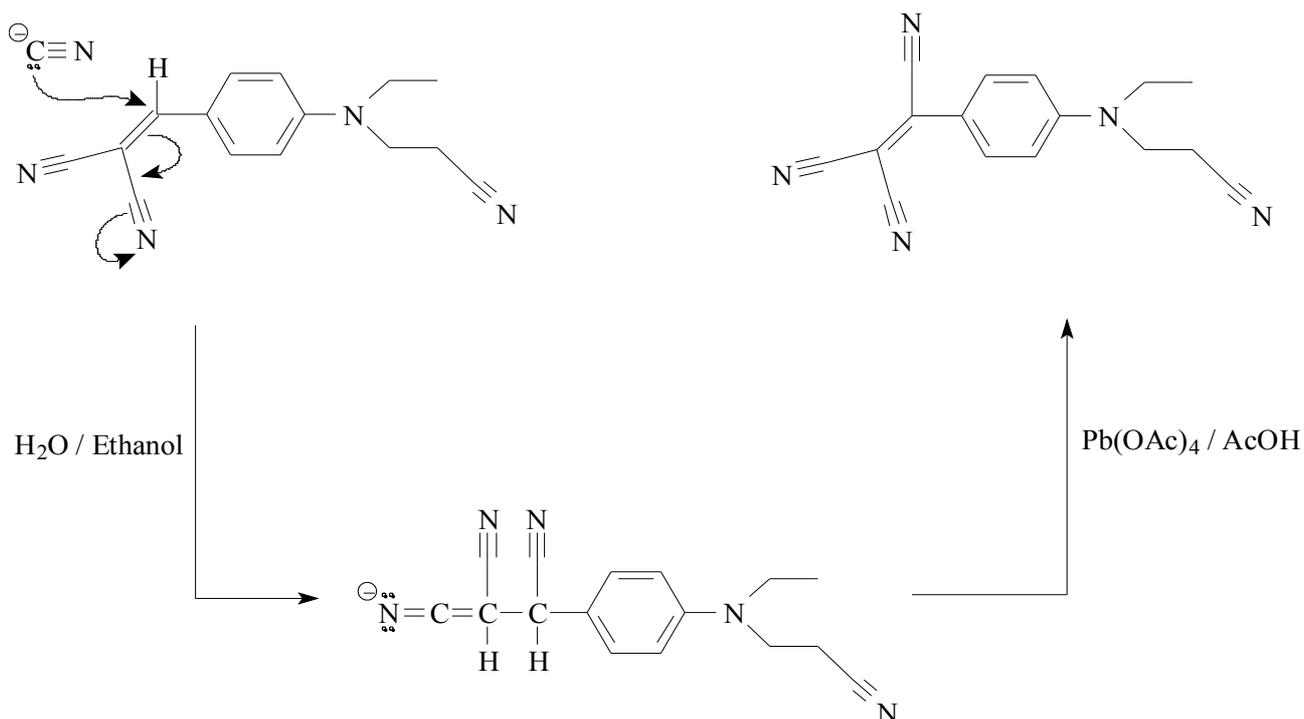
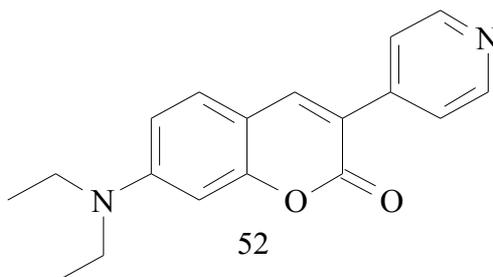


Abbildung 25: Mechanismus der Reaktion nach B. C. McKUSICK und R. E. HECKERT^[52]

Diese Reaktion ist nun von P. MOECKLI^[50] auf verschiedene Cumarine angewandt worden. Bei einigen Cumarinen, wie der Verbindung **52**, führte die Reaktion jedoch nicht zum Erfolg. Anscheinend ist der entscheidende Schritt der Reaktion die Addition des Cyanidions, die nicht

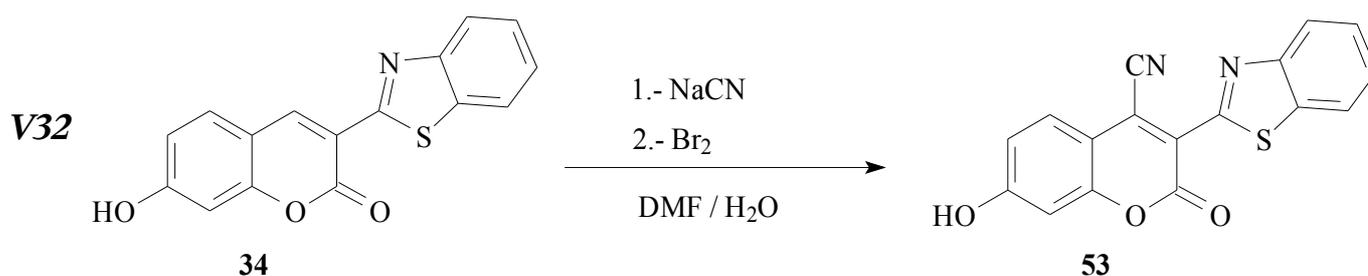


immer erfolgt. Leider konnte nicht geklärt werden, welche Voraussetzungen für eine erfolgreiche Addition notwendig sind.

Nach den Vorschriften von P. MOECKLI^[50] und O. S. WOLFBELIS^[54] soll nun das Cyanidion in die in Kapitel 3.3 synthetisierten Verbindungen eingeführt werden.

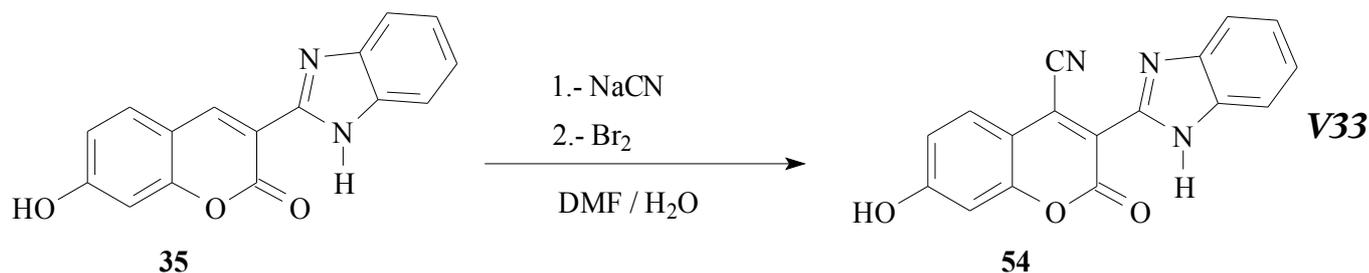
3.4.2. Synthese der 7-Hydroxy-4-cyancumarine

Die Synthese des Cumarins **53** sollte problemlos nach der Vorschrift von O. S. WOLFBELIS^[54,96] durchführbar sein. So wird 3-(2-Benzthiazolyl)-7-hydroxycumarin **34** in Dimethylformamid (DMF) suspendiert und mit gesättigter, wässriger Natriumcyanidlösung versetzt. Die Mischung wird für eine Stunde bei 40 °C gerührt. Dabei entsteht aus der grün fluoreszierenden Suspension eine dunkelrote Lösung.



Diese wird nun in Eis/Kochsalzbad auf 0 °C abgekühlt. Zur Oxidation wird langsam Brom zugetropft. Es wird eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt. Dabei bildet sich ein roter Niederschlag. Dieser wird abgesaugt und mit viel Wasser und Ethanol gewaschen. Der erhaltene Feststoff wird zur Reinigung aus Ethanol umkristallisiert. Das gewünschte Produkt 3-(2-Benzthiazolyl)-4-cyano-7-hydroxycumarin **53** fällt als hellrotes Pulver an.

Die Reaktion soll nun mit dem Cumarin **35** wiederholt werden, um das bisher nicht bekannte Cumarin **54** zu erhalten. Nach der beschriebenen Vorschrift wird 3-(2-Benzthiazolyl)-7-hydroxycumarin mit Natriumcyanidlösung behandelt und anschließend oxidiert. Doch das ¹H-NMR-Spektrum zeigt, daß der erhaltene hellrote Feststoff noch einen erheblichen Anteil Edukt enthält. Da es nicht gelang, das Cumarin **35** durch umkristallisieren von dem Produkt abzutrennen, wird die Mischung in Methanol an Kieselgel 60 chromatographiert und das Eluat wird mehrfach in DMSO gelöst und in Wasser gefällt. So erhält man das 3-(2-Benzthiazolyl)-4-cyano-7-hydroxycumarin **54** als hellrotes Pulver.



Wird diese Vorschrift auf das 3-(2-Benzoxazolyl)-7-hydroxycoumarin **37** angewandt, erhält man das Edukt zurück. Auch der Versuch die Natriumcyanidlösung zwei oder vier Stunden statt einer Stunde auf das Coumarin einwirken zu lassen, führen zum selben Ergebnis. Ebenso war eine Temperaturerhöhung auf 60 °C und schließlich auf 80 °C nicht geeignet das Produkt zu erhalten. Scheinbar wird das Coumarin bei zu hohen Temperaturen zerstört. So führt auch der Einsatz von Bleitetraacetat als Oxidationsmittel nicht zum Erfolg.

Die Reaktion läuft in der Reihenfolge Benzthiazolyl-, Benzdiazolyl- und Benzoxazolylrest in der drei Position immer schlechter ab. Während beim Coumarin **53** das Produkt mit guter Ausbeute erhalten wird, ergibt die Synthese zu Coumarin **54** ein Gemisch, das nur zu 30 % das gewünschte Produkt enthält. Der Rest besteht zu gleichen Teilen aus dem Edukt Coumarin **35** und einem beigen Nebenprodukt, bei dem der Lactonring des Coumarins geöffnet ist, die Reaktion mit dem Cyanidion jedoch nicht stattfand. Also wird wohl das Cyanidion nur zu einem kleinen Teil addiert. Mit dem 3-(2-Benzoxazolyl)-7-hydroxycoumarin **37** läuft die Reaktion nicht ab, da das Cyanidion nicht addiert wird.

Die Donorfähigkeit der Reste in der drei Position nehmen in der Reihenfolge Benzthiazolyl-, Benzoxazolyl- und Benzdiazolylrest zu. Dadurch wird in dieser Reihenfolge die Elektronendichte in der 4-Position erhöht und der Angriff des Cyanidions erschwert. So erklärt sich, dass die Reaktion zu Coumarin **53** problemlos abläuft, die Umsetzungen mit den Coumarinen **35** und **37** aber schlechter ablaufen. Eine mögliche Erklärung dafür, daß das Coumarin **35** besser reagiert als das Coumarin **37**, obwohl der Benzdiazolylrest der bessere Donor ist, ist daß das Proton der NH Gruppe eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Lactonsauerstoff eingehen kann und so der Übergangszustand stabilisiert wird. So kann der Angriff des Cyanidions leichter erfolgen als bei Coumarin **37**.

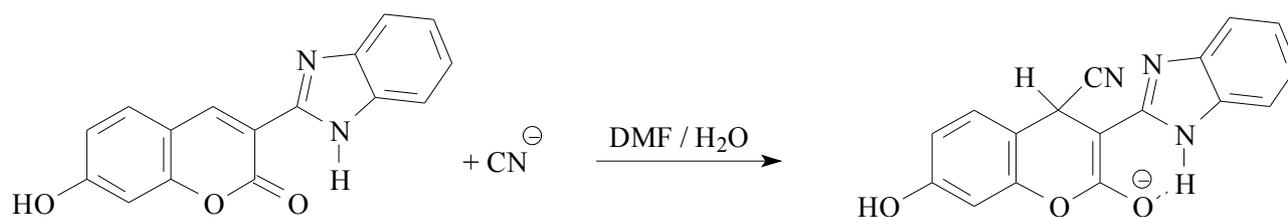
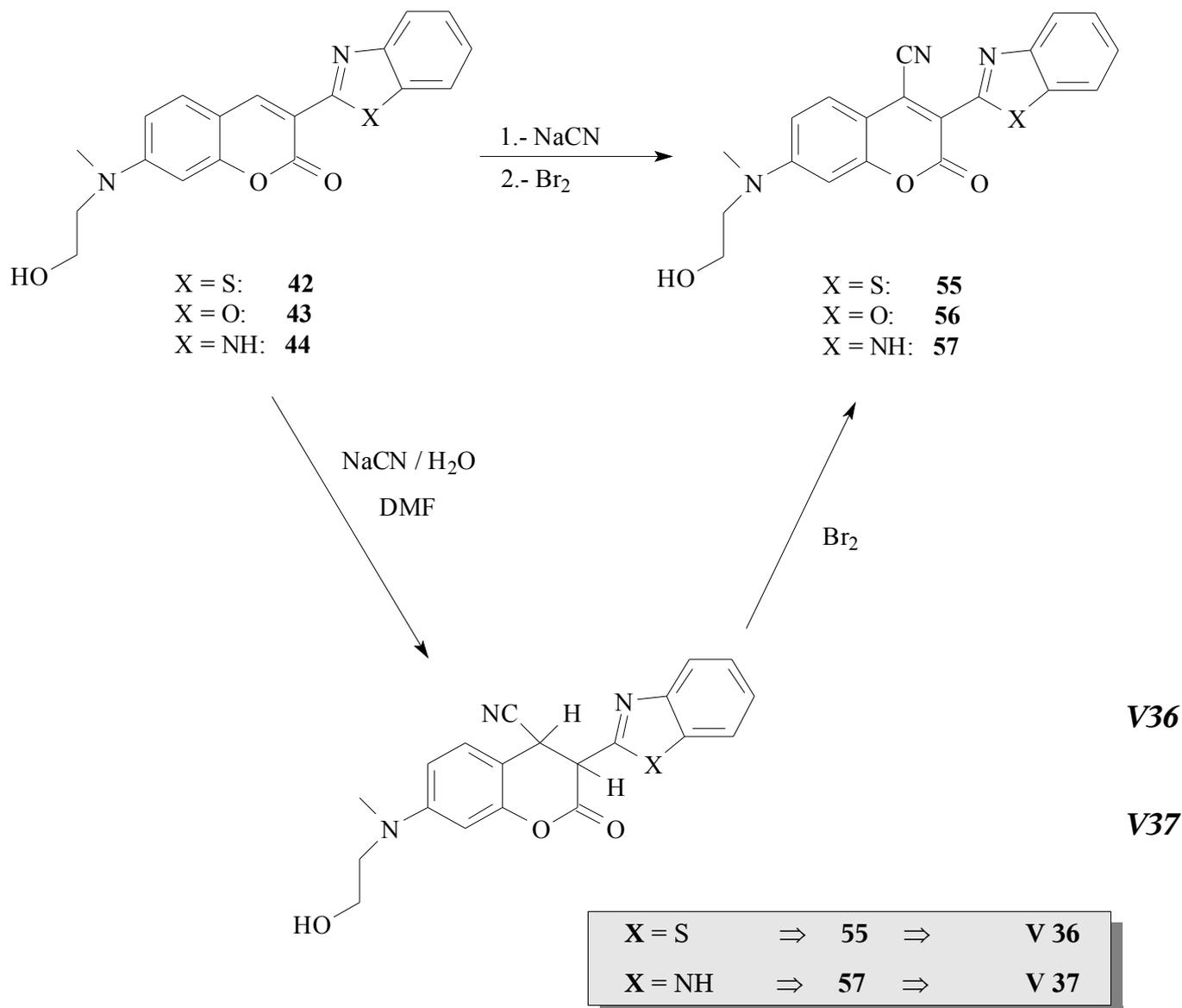


Abbildung 26: Reaktion von Cumarin 35 mit einem Cyanidion zum, durch eine Wasserstoffbrückenbindung stabilisierten, Zwischenprodukt

Diese Überlegung könnte durch Alkylierung des Benzdiazolylrestes, zum Beispiel mit Methyljodid überprüft werden. Dadurch sollte die Reaktivität von Cumarin 35 herabgesetzt werden, da die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung so verhindert wird. Die Durchführung dieses Versuches konnte aus Zeitgründen im Rahmen dieser Dissertation nicht mehr durchgeführt werden.

3.4.3. Synthese der 7-[N-(2-Hydroxyethyl)-N-methylamino]-4-cyanocumarine

Nun soll die in Kapitel 3.4.2 beschriebene Reaktion auf die Cumarine **42**, **43** und **44** angewandt werden.



So wird das 3-(2-Benzthiazolyl)-7-[N-(2-hydroxyethyl)-N-methylamino]cumarin **42** in Dimethylformamid (DMF) suspendiert und die Suspension auf 40 °C erwärmt. Dann wird gesättigte, wässrige Natriumcyanidlösung hinzugegeben und eine Stunde lang gerührt. Dabei bildet sich eine dunkle Lösung, die im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C gekühlt wird.

Zu dieser Mischung wird nun langsam Brom als Oxidationsmittel getropft. Dann wird eine weitere Stunde gerührt. Dabei bildet sich ein rotvioletter, feiner Niederschlag, der nun über eine Glasfritte abfiltriert, mit viel Wasser und Ethanol gewaschen und getrocknet wird.

Der erhaltene Farbstoff, das Cumarin **55**, ist in dieser Form dc-einheitlich.

So wird auch das 3-(2-Benzdiazoly)-7-[*N*-(2-hydroxyethyl)-*N*-methylamino]cumarin **44** in DMF suspendiert und die Suspension auf 40 °C erwärmt. Dann wird die gesättigte, wäßrige Natriumcyanidlösung hinzugegeben und eine Stunde lang gerührt. Dabei bildet sich eine dunkle Lösung, die im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C gekühlt wird.

Zu dieser Mischung wird nun langsam Brom als Oxidationsmittel zugetropft. Auch hier bildet sich ein feiner, rotvioletter Niederschlag, der abgesaugt, mit viel Wasser und Ethanol gewaschen und getrocknet wird. Leider ist das erhaltene dunkle Pulver nicht dc-einheitlich. Da sich das Cumarin **57** nicht durch umkristallisieren von den verschiedenen Nebenprodukten und etwas Edukt abtrennen läßt, wird die Mischung in Methanol an Kieselgel 60 chromatographiert und das Eluat mehrfach in DMSO gelöst und in Wasser gefällt.

So erhält man das 3-(2-Benzdiazoly)-4-cyano-7-[*N*-(2-hydroxyethyl)-*N*-methylamino]cumarin **57** als rotviolettes Pulver.

Als dritter Vertreter dieser Cumarine wird das 3-(2-Benzoxazoly)-7-[*N*-(2-hydroxyethyl)-*N*-methylamino]cumarin **43** in DMF suspendiert und die Suspension auf 40 °C erwärmt. Dann wird gesättigte, wäßrige Natriumcyanidlösung hinzugegeben und eine Stunde lang gerührt. Dabei bildet sich eine dunkle Lösung, die im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C gekühlt wird. Zu dieser Mischung wird nun langsam Brom als Oxidationsmittel getropft.

So enthält das gewonnene Pulver nur das nicht umgesetzte Edukt. Deshalb wird die Suspension des Cumarins **43** vier Stunden mit gesättigter, wäßriger Natriumcyanidlösung behandelt. Nach dem Abkühlen und der Zugabe des Broms, wird zwei Stunden bei 0 °C weitergerührt. Da kein Niederschlag entsteht, wird die Mischung in gesättigte Kochsalzlösung gegeben. Dabei entsteht ein dunkler Niederschlag, der nun abgesaugt, mit viel Wasser und Ethanol gewaschen und getrocknet wird.

Leider ist das erhaltene dunkle Pulver auch nach dieser Änderung der Reaktionsbedingungen nicht dc-einheitlich. So wird aus Methanol umkristallisiert. Man erhält ein rotes Pulver, das allerdings das Edukt ist. Es ist nicht möglich, Cumarin **43** in der beschriebenen Art zu **56** umzusetzen.

Cumarine als präzipitierende Fluorophore - Hauptteil

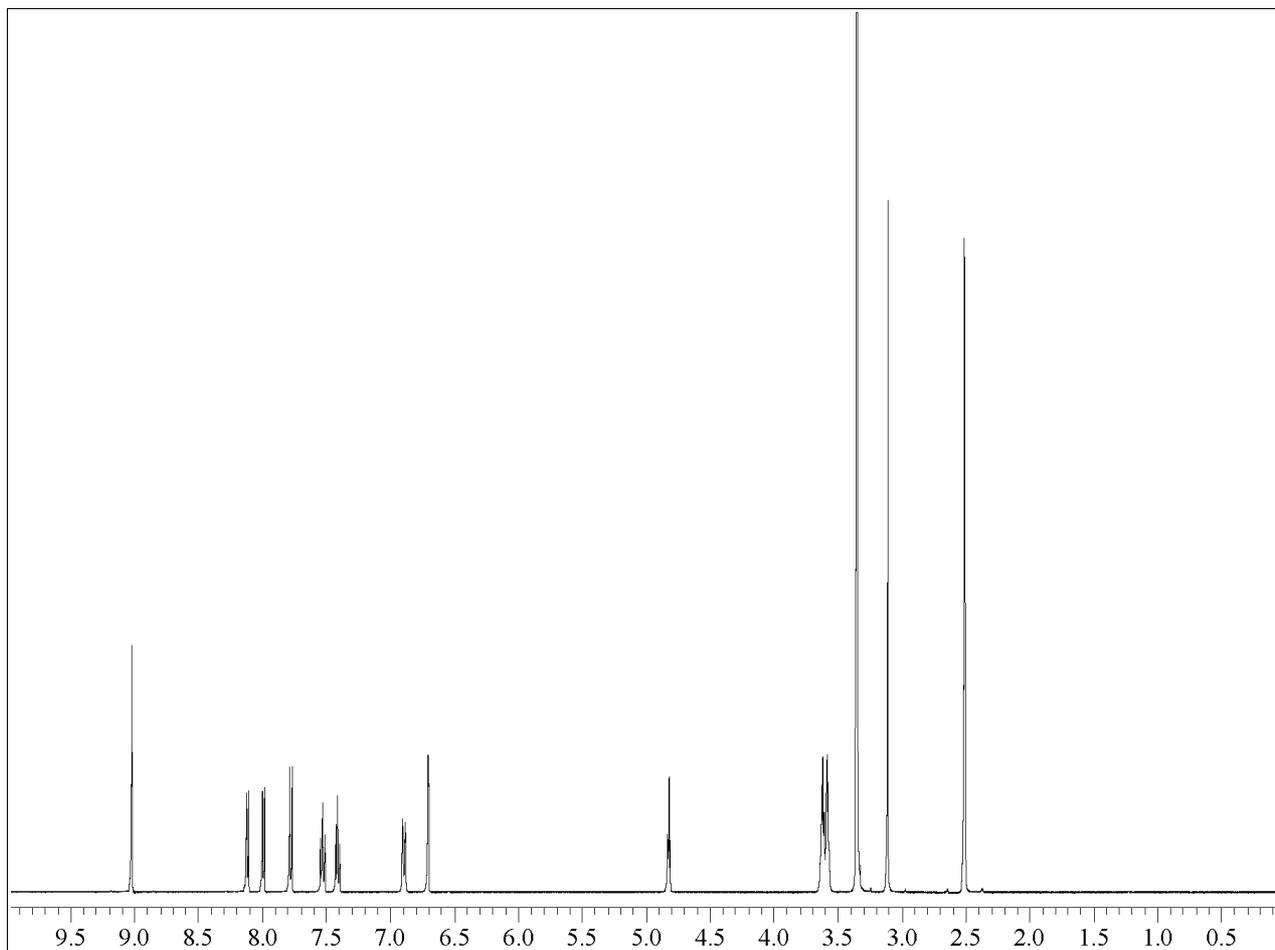


Abbildung 27: ^1H -NMR Spektrum von **42** in DMSO-d_6 (500 MHz)

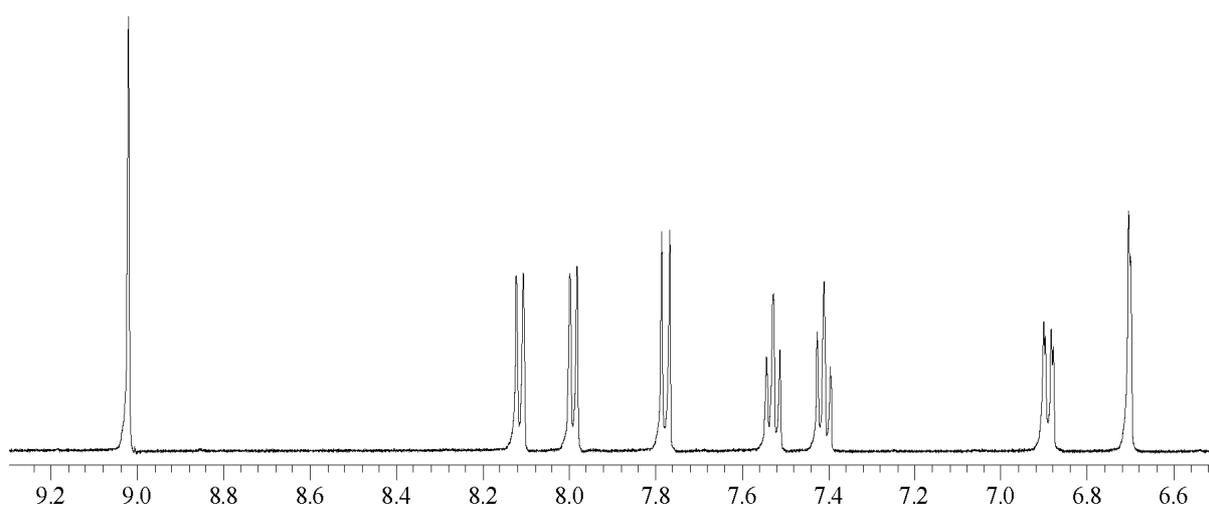


Abbildung 28: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR Spektrum von **42** in DMSO-d_6 (500 MHz)

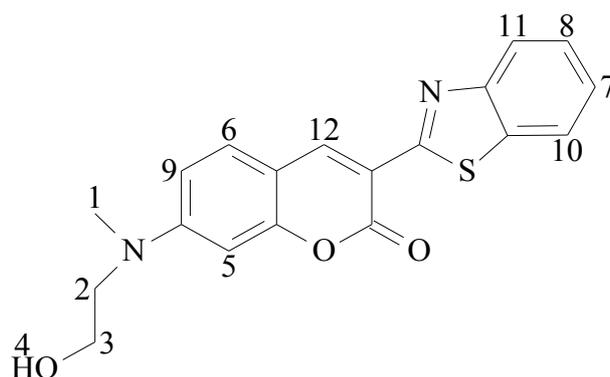


Abbildung 29: 3-(2-Benzthiazolyl)-7-[N-(2-hydroxyethyl)-N-methylamino]cumarin **42**

Tabelle 1: Zuordnung der $^1\text{H-NMR}$ Signale von **42**

Zuordnung	chem. Verschiebung (ppm)	Intensität	Multiplizität	Kopplung
DMSO	2,50		quin	
1	3,11	3H	s	
H ₂ O	3,35		s	
2	3,58	2H	d	$^3J_{\text{HH}} = 5,0 \text{ Hz}$
3	3,62	2H	m	
4	4,82	1H	t	$^3J_{\text{HH}} = 5,2 \text{ Hz}$
5	6,70	1H	s	
6	6,88	1H	dd	$^3J_{\text{HH}} = 9,0 \text{ Hz}$ $^4J_{\text{HH}} = 2,2 \text{ Hz}$
7	7,40	1H	dd	$^3J_{\text{HH}} = 7,5 \text{ Hz}$ $^3J_{\text{HH}} = 7,7 \text{ Hz}$
8	7,52	1H	dd	$^3J_{\text{HH}} = 7,9 \text{ Hz}$ $^3J_{\text{HH}} = 7,3 \text{ Hz}$
9	7,77	1H	d	$^3J_{\text{HH}} = 8,9 \text{ Hz}$
10	7,98	1H	d	$^3J_{\text{HH}} = 8,1 \text{ Hz}$
11	8,11	1H	d	$^3J_{\text{HH}} = 7,9 \text{ Hz}$
12	9,01	1H	s	

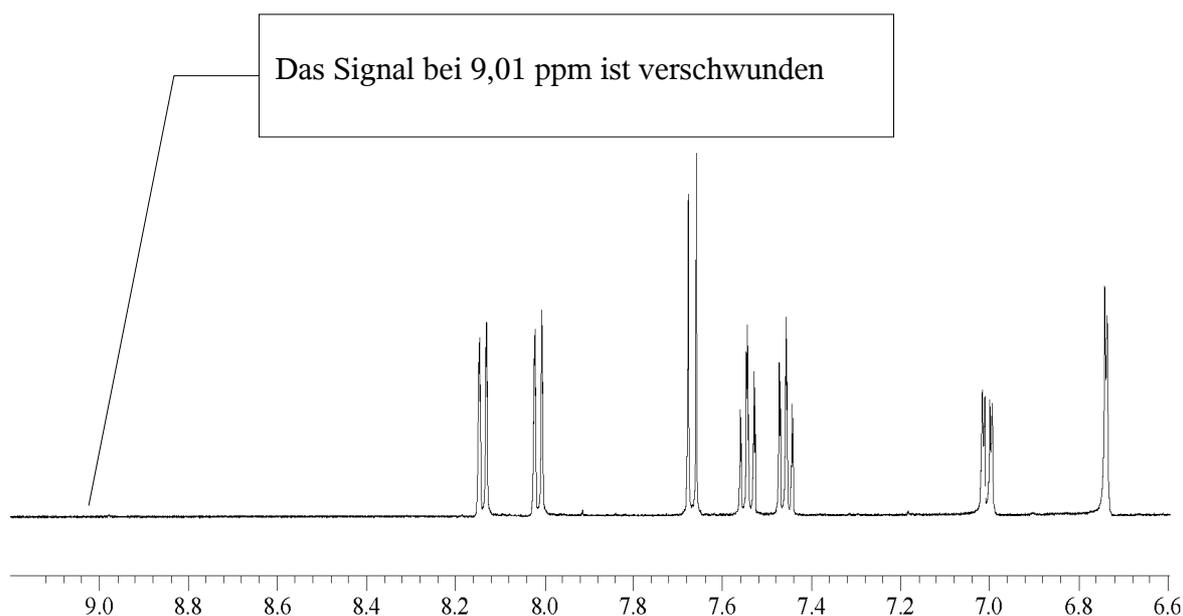


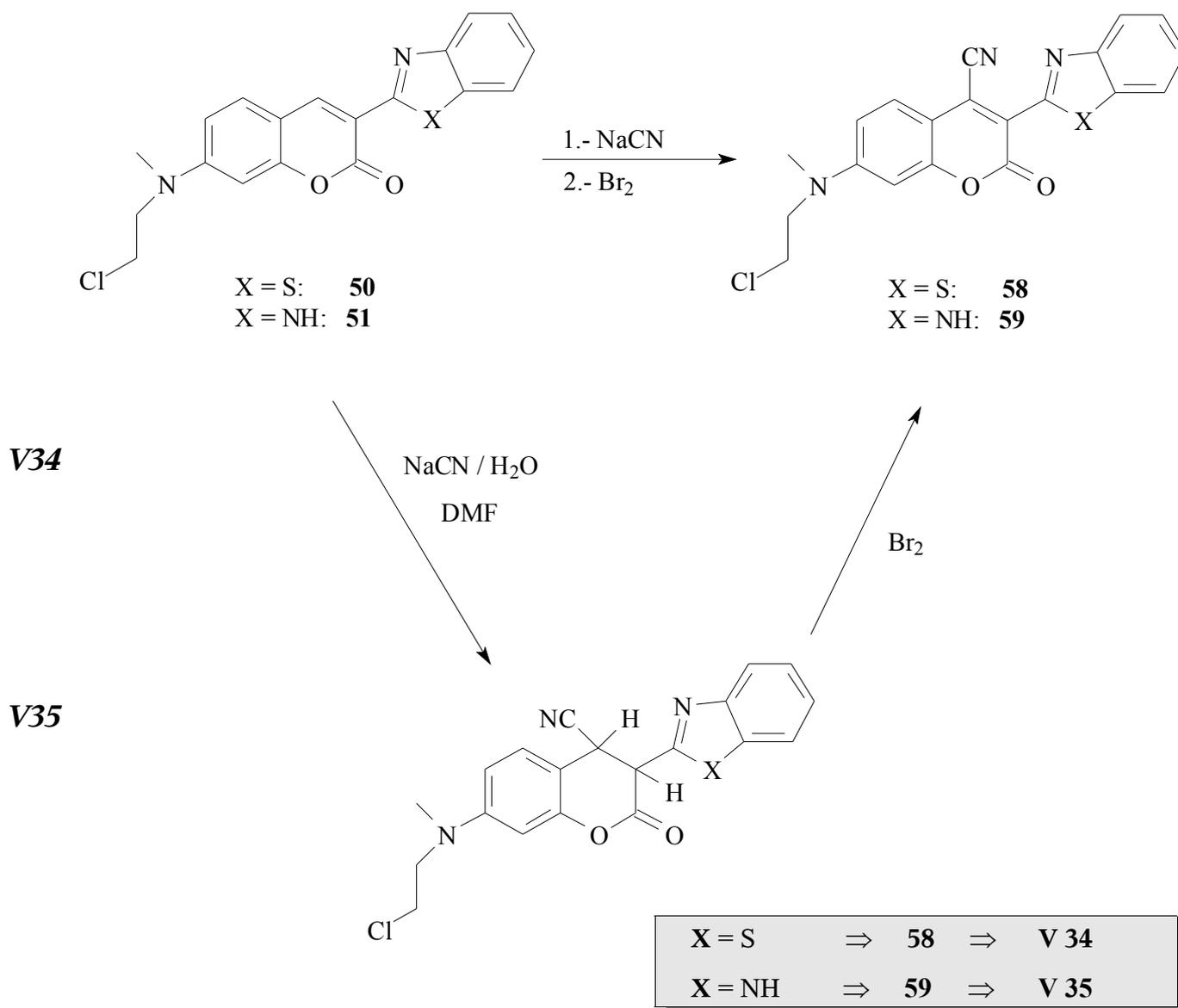
Abbildung 30: Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von **55** in DMSO-d_6 (500 MHz)

Der Erfolg der Synthese lässt sich einfach am $^1\text{H-NMR}$ belegen. Das Singulett für das Proton in der 4-Position im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von Cumarin **42**, bei einer chemischen Verschiebung von 9.02 ppm (**Abbildung 27** und **Abbildung 28**), verschwindet im Verlauf der Reaktion, da es durch die Nitrilgruppe ersetzt wird. Im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des Cumarins **55** in **Abbildung 30**, ist bei etwa 9 ppm kein Signal mehr zu erkennen. Das Edukt wurde also vollständig umgesetzt.

3.4.4. Synthese der 7-[N-(2-Chlorethyl)-methylamino]-4-cyanocumarine

Auch die in Kapitel 3.3.7 beschriebenen Cumarine 3-(2-Benzthiazolyl)-7-[N-(2-chlorethyl)-N-methylamino]cumarin **50** und 3-(2-Benzdiazolyl)-7-[N-(2-chlorethyl)-N-methylamino]cumarin **51** sollen nun nach der bewährten Vorschrift umgesetzt werden. Um später eine Phosphorsäuregruppe durch Veresterung anbringen zu können, soll das Chloratom in den beiden Farbstoffen durch eine nucleophile Substitution gegen eine Hydroxygruppe ausgetauscht werden, eine Reaktion, die in Kapitel 3.2.2 schon für andere Verbindungen beschrieben wurde.

So wird in einem ersten Schritt das 3-(2-Benzthiazolyl)-7-[N-(2-chlorethyl)-N-methylamino]cumarin **50** in Dimethylformamid (DMF) suspendiert und die Suspension auf 40 °C erwärmt. Dann wird gesättigte, wässrige Natriumcyanidlösung hinzugegeben und eine Stunde lang gerührt. Dabei bildet sich eine dunkle Lösung, die im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C gekühlt wird.



Zu dieser Mischung wird nun langsam Brom als Oxidationsmittel getropft. Dann wird eine weitere Stunde gerührt. Dabei bildet sich ein rotvioletter, feiner Niederschlag, der nun abgesaugt, mit viel Wasser und Ethanol gewaschen und getrocknet wird.

Der erhaltene, rotviolette Farbstoff 3-(2-Benzthiazolyl)-4-cyano-7-[N-(2-chlorethyl)-N-methylamino]cumarin **58** ist in dieser Form dc-einheitlich.

So wird auch das 3-(2-Benzthiazolyl)-7-[N-(2-chlorethyl)-N-methylamino]cumarin **51** in DMF suspendiert und die Suspension auf 40 °C erwärmt. Dann wird gesättigte, wässrige Natriumcyanidlösung zugegeben und eine Stunde lang gerührt. Dabei bildet sich eine dunkle Lösung, die im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C gekühlt wird.

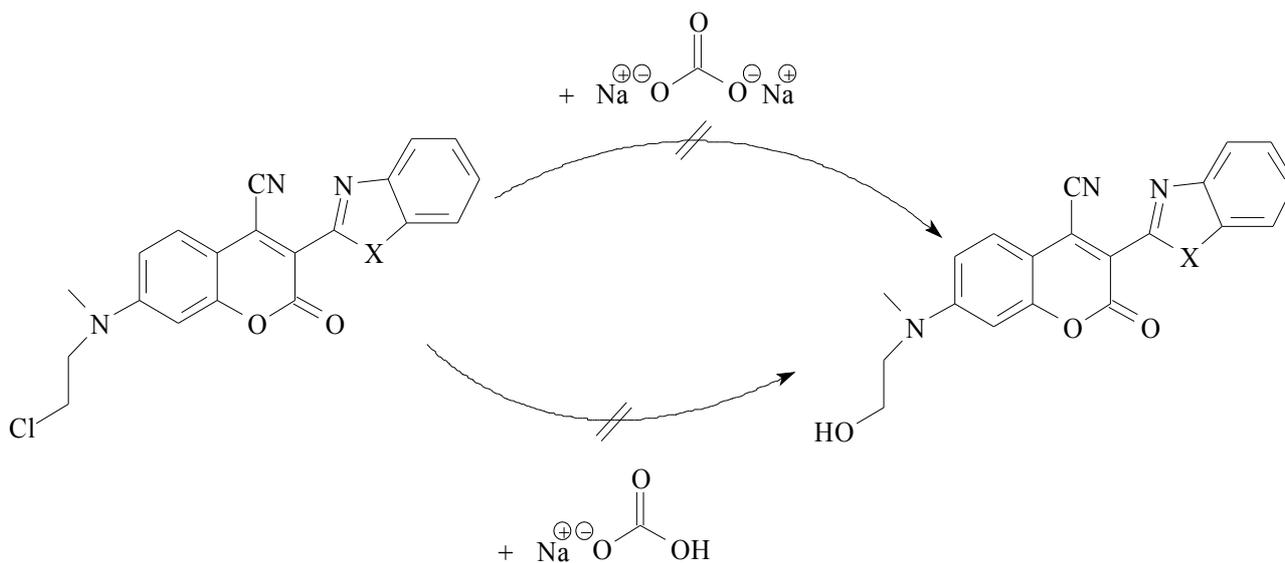
Zu dieser Mischung wird nun langsam Brom als Oxidationsmittel getropft. Auch hier bildet sich

ein feiner, rotvioletter Niederschlag, der abgesaugt, mit viel Wasser und Ethanol gewaschen und getrocknet wird. Da noch Reste des Eduktes durch Dünnschichtchromatographie nachweisbar sind, wird aus Ethanol umkristallisiert.

So erhält man das 3-(2-Benzdiazolyl)-4-cyano-7-[*N*-(2-chlorethyl)-*N*-methylamino]cumarin **59** als rotviolett Pulver.

Nun muß das Chloratom noch gegen eine Hydroxygruppe ausgetauscht werden. Dies soll nach den Vorschriften von W. MÜLLER, C. BERRES^[76,77] durchgeführt werden. Dazu wird das 3-(2-Benzthiazolyl)-4-cyano-7-[*N*-(2-chlorethyl)-*N*-methylamino]cumarin **58** in Ethanol suspendiert und mit etwas zehnpromzentiger Natriumcarbonatlösung versetzt. Diese Mischung wird nun für einige Stunden zum Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen wird der farblose, ausgefallene Feststoff abgesaugt und die Lösung eingengt, bis ein Feststoff ausfällt. Leider ist dieser Feststoff gelb und nicht wie erwartet violett. Das NMR zeigt, daß der Farbstoff zerstört wurde, der Lactonring des Cumaringerüsts wird unter diesen Reaktionsbedingungen geöffnet.

Da diese Reaktionsbedingungen zu aggressiv sind, wird das Natriumcarbonat gegen Natriumhydrogencarbonat ausgetauscht. Wieder wird das Cumarin **58** in Ethanol suspendiert und mit Natriumhydrogencarbonatlösung zum Rückfluß erhitzt. Das Ergebnis der Reaktion ist wieder ein gelber Feststoff, bei dem der Lactonring des Cumaringerüsts geöffnet wurde.



X = S, NH

Nun wird die Reaktion nach W. MÜLLER, C. BERRES mit 3-(2-Benzdiazolyl)-4-cyano-7-[*N*-(2-

chloroethyl)-*N*-methylamino]cumarin **59** in Ethanol und Natriumcarbonatlösung wiederholt. Wieder erhält man nach einigen Stunden Erhitzen unter Rückfluß einen gelben Feststoff, der nicht der angestrebte Farbstoff ist. Auch hier wird versucht die Reaktion unter milderen Bedingungen zu wiederholen. So wird auch hier das Natriumcarbonat gegen Natriumhydrogencarbonat ausgetauscht. Auch so wird das Cumaringerüst zerstört.

Nach diesen Versuchen wird dieser Ansatz nicht weiter verfolgt. Offensichtlich ist es wesentlich einfacher den Lactonring im Cumaringerüst zu öffnen, als das Chloratom in einer nucleophilen Substitution auszutauschen.

3.5. Reaktionen der Cumarine mit Carbonsäurechloriden

3.5.1. Allgemeines

Die im Rahmen dieser Arbeit neu synthetisierten Cumarinfarbstoffe **55**, **56** und **57** tragen als funktionelle Gruppe eine Hydroxyethylgruppe. Diese kann mit einem Phosphorsäurederivat zum Phosphorsäuremonoester umgesetzt werden.

Diese Ester sollen als Substrat für die basische Phosphatase dienen. Hierfür wurden bis jetzt nur Verbindungen mit phenolischen Hydroxygruppen verwendet.

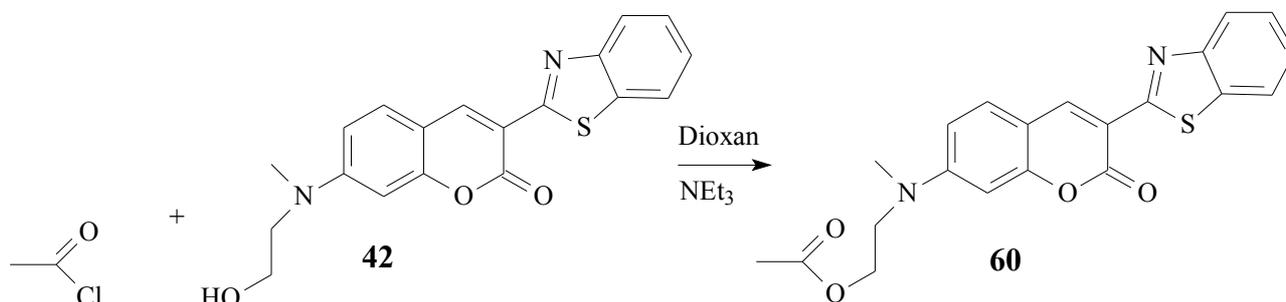
Um die Umgebung der Phosphorsäuregruppe in dem fertigen Cumarin zu beeinflussen und so vielleicht die Hydrolysegeschwindigkeit steuern zu können, soll versucht werden, eine Gruppe an den Cumarinfarbstoffen **55**, **56** oder **57** zu befestigen, die eine phenolische Hydroxygruppe oder eine weitere Alkylhydroxygruppe enthält.

Eine einfache Möglichkeit in die Cumarinfarbstoffe **55**, **56** und **57** eine solche Gruppe einzuführen, ist die Reaktion mit einem Säurechlorid. Da ein solcher Baustein nicht eine Hydroxygruppe neben einer Carbonsäurechloridgruppe enthalten kann, muß die Hydroxygruppe dieser Bausteine geschützt werden. Dies läßt sich zum Beispiel durch die Veretherung mit einer Methylgruppe erreichen. Um diese Schutzgruppe später wieder zu entfernen ohne die gerade geknüpfte Esterbindung wieder zu lösen, bietet sich die Reaktion mit Trimethylsilylbromid zum Trimethylsilylether oder die Reaktion mit Bortribromid zum Borsäureester an.

3.5.2. Reaktionen mit Essigsäurechlorid

Um zu testen, ob die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Cumarine mit Hydroxyalkylgruppe mit Carbonsäurechloriden reagieren, soll das Cumarin 3-(2-Benzthiazolyl)-7-[N-(2-hydroxyethyl)-N-methylamino]cumarin **42** mit Essigsäurechlorid umgesetzt werden. Dazu wird das Cumarin nach einer Vorschrift aus dem Organikum^[97] in etwas Pyridin gelöst und im Kochsalz/Eisbad auf 0 °C gekühlt. Anschließend wird zu dieser Mischung das Essigsäurechlorid langsam zugetropft. Man läßt einige Minuten nachrühren und gießt dann die Mischung in Eiswasser und neutralisiert vorsichtig mit Salzsäure. Doch fällt nicht wie erwartet der gewünschte Farbstoff aus, sondern man erhält ein Öl, aus dem sich kein Farbstoff isolieren läßt.

V43



Da der gewünschte Farbstoff so nicht zu erhalten ist, wird nun nach einer Vorschrift zur Synthese von Carbonsäureamiden aus Carbonsäurechloriden und Aminen^[98] das Cumarin **42** in Dioxan suspendiert und mit etwas Triethylamin versetzt. Zu dieser Mischung wird nun das Essigsäurechlorid gegeben und die Mischung solange geschüttelt, bis eine klare, gelbe Lösung entstanden ist. Nach 24 Stunden stehen bei Raumtemperatur, ist ein farbloser Feststoff ausgefallen, der abgesaugt wird. Das Filtrat wird zur Hydrolyse auf etwas Eis gegossen und die Lösung wird mit Essigester extrahiert. Die organische Phase wird getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Man erhält den gewünschten Farbstoff **60** als gelbes Pulver.

3.5.3. Reaktionen mit Methoxyessigsäurechlorid

Nach diesem Test wird die Reaktion nun mit Methoxyessigsäurechlorid wiederholt. Nach dem Entfernen der Methylschutzgruppe des aus dieser Reaktion resultierenden Moleküls, könnte man die neue Alkoholgruppe mit einem Phosphorsäurederivat verestern.

So wird das Cumarin **42** in Dioxan suspendiert und mit etwas Triethylamin versetzt. Zu dieser Mischung wird nun das Methoxyessigsäurechlorid gegeben und die Mischung solange geschüttelt, bis eine klare, gelbe Lösung entstanden ist. Nach 24 Stunden stehen bei Raumtemperatur ist ein farbloser Feststoff ausgefallen, der abgesaugt wird. Das Filtrat wird zur Hydrolyse auf etwas Eis gegossen und die Lösung wird mit Essigester extrahiert. Die organische Phase wird getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Das so erhaltene orangefarbene Pulver besteht aber aus dem Edukt **42**. Es ist keine Reaktion festzustellen.

Auch die Wiederholung der Reaktion mit anderen Basen, wie Diisopropylethylamin (DIEA) und Pyridin, führt zum selben Ergebnis.

Offensichtlich ist Methoxyessigsäurechlorid weniger reaktiv als Essigsäurechlorid. SEIJI TAKIMOTO, JUNJI INANAGA ET AL., berichten von einem Verfahren Ester aus Säurechloriden und Alkoholen Mithilfe von Silbercyanid als Reagenz herzustellen^[99]. So soll auch die Synthese sterisch gehinderter Ester mit guten Ausbeuten und schnell gelingen. Da die Reaktionsbedingungen mild sind, berichten die Autoren von keinen Einschränkungen durch weitere funktionelle Gruppen an den Edukten^[100,101].

Zuerst muß nun das Reagenz Silbercyanid hergestellt werden. Dazu gibt man eine Natriumcyanidlösung bei Raumtemperatur zu einer Silbernitratlösung. Es entsteht ein vollumfänglicher farblos-weißer Niederschlag, der abfiltriert und mit viel Wasser gewaschen wird. Nach dem Trocknen erhält man ein farblores Pulver.

Die Reaktion zum Ester kann nach SEIJI TAKIMOTO, JUNJI INANAGA ET AL. in Benzol oder in Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPA) durchgeführt werden. Da sich das Cumarin **42** nicht in Benzol dafür aber sehr gut in HMPA löst, wird dieses Lösungsmittel gewählt. Zu der Lösung wird das Silbercyanid im doppelten Überschuß zugegeben und das Methoxyessigsäurechlorid wird langsam zugetropft. Es wird nun bei 80 °C Ölbadtemperatur für eine Stunde gerührt. Dann wird auf Raumtemperatur abgekühlt und die Mischung in Eiswasser gegeben. Der so entstehende gelbe Feststoff wird abfiltriert, mit viel Wasser gewaschen und getrocknet.

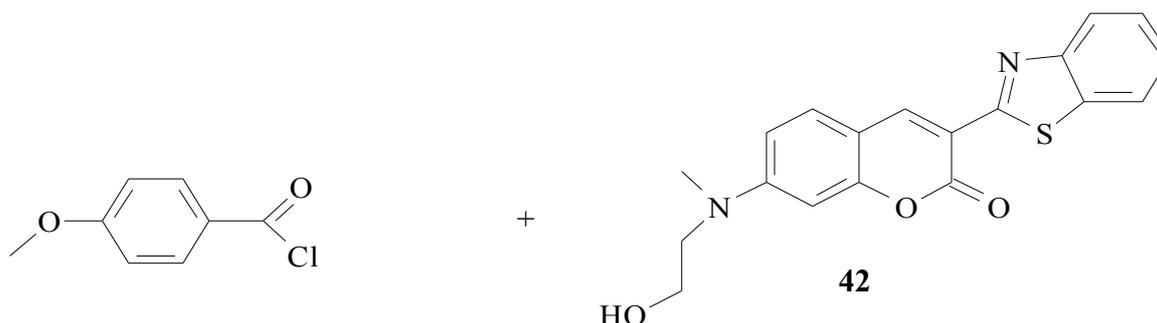
Das NMR-Spektrum zeigt, daß es sich um den Ausgangsstoff, das Cumarin **42** handelt. Es ist also nicht zu einer Reaktion gekommen.

Nun stellt sich die Frage, warum diese Reaktion nicht abläuft, obwohl sie mit Essigsäurechlorid mit guten Ausbeuten verläuft. Das Methoxyessigsäurechlorid ist ein schlankes Molekül, so daß wohl eine sterische Hinderung nicht in Frage kommt. Die Methoxygruppe sollte, wegen der hohen Elektronegativität des Sauerstoffatoms, zusätzlich Elektronendichte vom Carbonsäure Kohlenstoffatom abziehen, so daß der Angriff des freien Elektronenpaares des Alkoholsauerstoffes eigentlich erleichtert werden sollte.

Beobachtet man den Reaktionsverlauf mittels Dünnschichtchromatographie, so stellt man fest, das durchaus ein weiterer Punkt im Dünnschichtchromatogramm auftaucht, das Produkt also wohl entsteht. Doch nach der wäßrigen Aufarbeitung ist dieser Punkt nicht mehr vorhanden. Scheinbar ist das Produkt unter den leicht sauren Bedingungen nicht stabil und wird hydrolysiert.

3.5.4. Reaktionen mit Anissäurechlorid

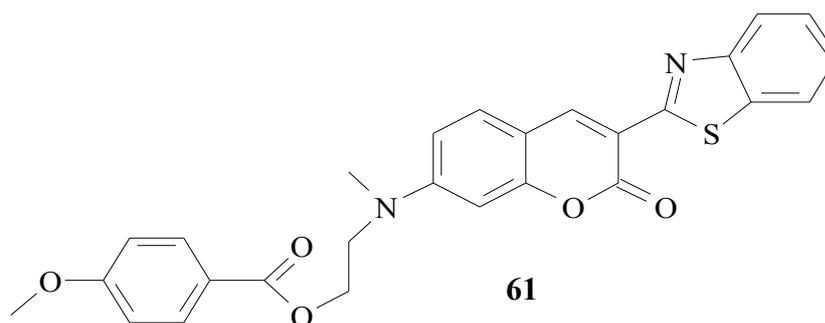
Da der Plan zur Modifizierung der neusynthetisierten roten Cumarine auch die Einführung einer Gruppe mit phenolischer Hydroxyfunktion vorsieht, soll nun das Cumarin **42** mit Anissäurechlorid umgesetzt werden.



V44

~ 50 % Ausbeute

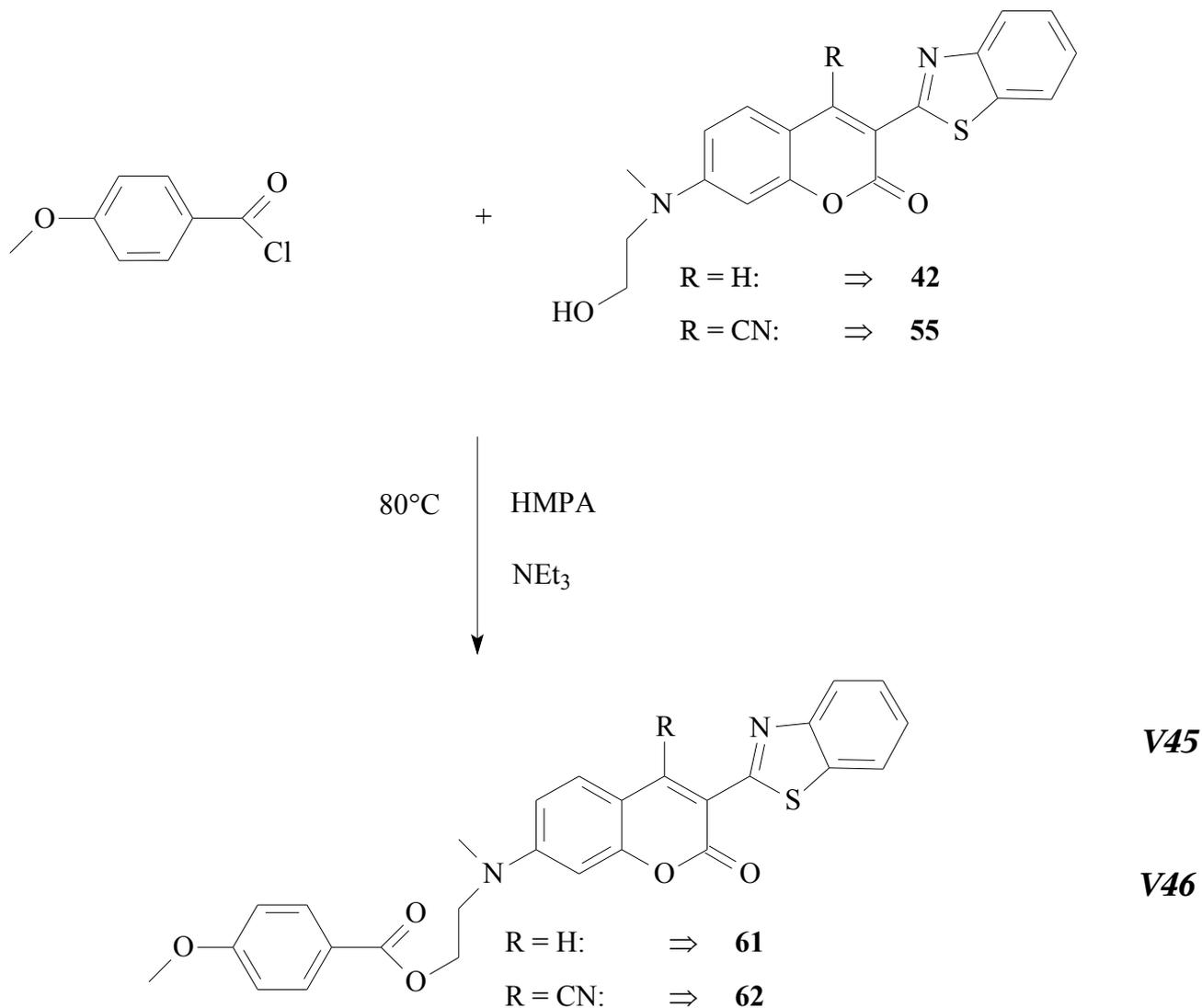
Dioxan
NEt₃



So wird das Cumarin **42** in Dioxan suspendiert und mit etwas Triethylamin versetzt. Zu dieser Mischung wird nun Anissäurechlorid gegeben und die Mischung solange geschüttelt, bis eine klare, gelbe Lösung entstanden ist. Nach 24 Stunden stehen bei Raumtemperatur ist ein farbloser Feststoff ausgefallen, der abgesaugt wird. Das Filtrat wird zur Hydrolyse auf etwas Eis gegossen und die

Cumarine als präzipitierende Fluorophore - Hauptteil

Lösung wird mit Essigester extrahiert. Die organische Phase wird getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Man erhält ein gelbes Pulver. Das NMR-Spektrum und auch die Dünnschichtchromatographie zeigen, daß es sich um eine äquimolare Mischung aus Cumarin **42** und dem gewünschten Esters handelt. Auch die Ausdehnung der Reaktionszeit auf mehrere Tage erhöht die Ausbeute nicht. Es gelingt allerdings, das gewünschte Produkt durch Säulenchromatographie an Kieselgel 60 mit Chloroform als Laufmittel rein zu erhalten.



R = H	⇒	61	⇒	V 45
R = CN	⇒	62	⇒	V 46

Die in Kapitel 3.5.3 beschriebenen Versuche zur Veresterung des Cumarins **42** haben gezeigt, das es in HMPA gut löslich ist. Deshalb soll dies nun das Dioxan ersetzen, damit die Reaktion aus

einer homogenen Lösung geführt werden kann.

So wird nun etwas 3-(2-Benzthiazolyl)-7-[N-(2-hydroxyethyl)-N-methylamino]cumarin **42** in wenigen Millilitern HMPA¹ gelöst und mit einem Überschuß an Triethylamin versetzt. Dazu wird nun das Anissäurechlorid bei Raumtemperatur langsam zugetropft. Dann wird für 36 Stunden bei 80 °C Ölbadtemperatur gerührt. Dabei entsteht ein orangener Niederschlag, der nach dem Abkühlen abgesaugt, mit viel Wasser gewaschen und schließlich getrocknet wird. Das so erhaltene Pulver ist nach der dünnschichtchromatographischen Untersuchung einheitlich.

Wesentlich für den vollständigen Ablauf der Reaktion ist die Einhaltung der richtigen Reaktionstemperatur. Bei Raumtemperatur und sogar noch bei einer Ölbadtemperatur von 60 °C läuft die Reaktion nicht vollständig ab und das so erhaltene Pulver muß zur Reinigung chromatographiert werden. Wählt man aber eine zu hohe Temperatur von zum Beispiel 100 °C, so erhält man ein dunkles Pulver, ein Großteil des Eduktes wird so zerstört.

Nun soll die Reaktion mit dem 3-(2-Benzthiazolyl)-4-cyano-7-[N-(2-hydroxyethyl)-N-methylamino]cumarin **55** wiederholt werden. Es wird in wenigen Millilitern HMPA¹ gelöst und mit einem Überschuß an Triethylamin versetzt. Dazu wird nun das Anissäurechlorid bei Raumtemperatur langsam zugetropft. Dann wird für 24 Stunden bei 80 °C Ölbadtemperatur gerührt. Schon nach wenigen Minuten entsteht soviel Niederschlag, daß der ganze Reaktionsansatz fest wird. Es wird auf Raumtemperatur abgekühlt und der violette Feststoff abgesaugt, mit viel Wasser gewaschen und schließlich getrocknet.

Das so erhaltene Cumarin **62**, ein dunkelrotes Pulver, ist nach der dünnschichtchromatographischen Untersuchung einheitlich.

3.5.5. Demethylierung der Cumarine

Die so synthetisierten Cumarine müssen nun von ihrer Schutzgruppe befreit werden, um die freien Alkohole zu erhalten, die dann in einem letzten Schritt mit Phosphorsäure verestert werden sollen. Um die Methylschutzgruppe abzuspalten, bietet sich die schon in Kapitel 3.2.2 angewandte Reaktion eines Methylethers mit Trimethylsilylbromid an^[68].

Dazu das Cumarin **62** in wenig über Calciumhydrid getrocknetem Chloroform gelöst. Unter
1 HMPA, das giftig und krebserregend ist, wird meist durch die gleiche Menge des weniger gefährlichen Lösungsmittels DMPU, N,N'-Dimethylpropylenharnstoff, ersetzt.

Argonatmosphäre wird nun bei Raumtemperatur das Trimethylsilylbromid langsam zugetropft. Man läßt die Mischung für fünf Stunden weiterrühren, dabei färbt sich die Lösung erst dunkel und nach einiger Zeit fällt ein gelber Feststoff aus. Das Lösungsmittel wird nun am Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand für einige Stunden in Wasser gerührt. Dabei entsteht ein roter Feststoff, der abgesaugt und getrocknet wird.

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt jedoch, daß das Edukt zurückerhalten wurde, es hat keine Reaktion stattgefunden. Offenbar waren die gewählten Reaktionsbedingungen nicht drastisch genug. Die meisten anderen Methoden eine Methoxyarylbindung zu spalten sind recht drastisch, erfolgen bei hohen Temperaturen und kommen so für die hier synthetisierten Cumarine, die neben der Ethergruppe auch eine Esterbindung enthalten, nicht infrage^[102], da die Esterbindung unter diesen Bedingungen meist auch gespalten wird^[103].

Somit wird die Etherspaltung mit Bortribromid getestet, die besonders zur Spaltung von Alkylarylether eingesetzt wird^[104]. Eine Reihe von Autoren^[105,106] berichten besonders über die Spaltung von Methylarylethern mit Bortribromid unter sehr milden Bedingungen, auch neben weiteren funktionellen Gruppen^[107,108]. Hierbei geht das Bortribromid eine koordinative Bindung zu dem Ether-Sauerstoffatom ein, die der Kohlenstoff-Sauerstoffbindungsspaltung vorausgeht. Dabei entsteht das Methylbromid und ein Boran, welches bei der wäßrigen Aufarbeitung schließlich hydrolysiert wird (**Abbildung 31**)^[109].

A. S. KENDE und K. KOCH ET AL. beschreiben die Demethylierung mit Bortribromid neben weiteren funktionellen Gruppen wie Estern und Lactonringen, die in dem Cumarin **61** vorkommen^[70]. So sollte diese Reaktion hier gut anwendbar sein. Cumarin **62** wird in wenig wasserfreiem Methylenchlorid gelöst und im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C abgekühlt. Nun wird das Bortribromid unter Argonatmosphäre als einmolare Lösung in Methylenchlorid langsam zugetropft. Dabei färbt sich die Lösung blau. Man läßt auf Raumtemperatur aufwärmen und rührt für zwei Tage. Laut Vorschrift sollte die Reaktion nun beendet sein. Die Reaktionskontrolle mittels Dünnschichtchromatographie zeigt jedoch, daß keine Reaktion stattgefunden hat. Da das Cumarin **61** zwei Stickstoffatome besitzt, die ebenfalls Bortribromid binden können, wird weiteres Bortribromid unter Kühlung im Eis/Kochsalzbad zugegeben und weitere zwei Tage bei Raumtemperatur gerührt. Dann gibt man die Mischung auf Eis zur Hydrolyse^[69]. Die organische Phase wird abgetrennt und die wäßrige Phase dreimal mit Methylenchlorid extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden getrocknet und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert. So erhält man einen dunklen Feststoff. Die Analyse des

gereinigten Feststoffes mittels NMR-Spektroskopie und Dünnschichtchromatographie zeigt, daß nicht nur die Methylgruppe, sondern die ganze Anissäuregruppe abgespalten wurde. So wurde das Cumarin **55** erhalten. Da dieses Verfahren hier nicht zum Erfolg führt, wird nun nach einer Vorschrift von G. GROSSMANN und U. SEQUIN^[110] das Cumarin **62**, gelöst in etwas trockenem Chloroform, im Aceton/Trockeneisbad auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Unter Argonatmosphäre wird nun das Bortribromid als einmolare Lösung in Methylenchlorid im vierfachen Überschuß langsam zugetropft. Es wird weitere zwei Stunden bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt und dann auf $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgewärmt. Es wird mit Ammoniumchloridlösung hydrolysiert.

Nach dem Aufwärmen auf Raumtemperatur wird die Methylenchloridphase abgetrennt und die wäßrige Phase mit Methylenchlorid extrahiert. Die organische Phase wird nun am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Es bleibt ein roter Feststoff zurück. Das ^1H – NMR-Spektrum zeigt, daß das Cumarin **62** zurückerhalten wurde.

Deshalb wird der Versuch so wiederholt, daß das Bortribromid unter Argonatmosphäre in eine Lösung des Cumarins **62** bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ langsam zugetropft wird. Nach einigen Minuten wird auf $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgewärmt und weiter gerührt. Alle 30 Minuten wird eine Probe genommen, mit Ammoniumchloridlösung hydrolysiert, aufgearbeitet und dünnschichtchromatographisch untersucht. So ist schon nach 30 Minuten ein zweiter roter Punkt mit einem R_F -Wert von 0,56 zu erkennen, der wohl zu dem gewünschten Produkt Cumarin **63** gehört. Nach 90 Minuten taucht ein dritter roter Punkt auf, dessen R_F -Wert von 0,69 dem des Cumarins **55** entspricht. Gleichzeitig ist aber noch viel Edukt in der Reaktionsmischung vorhanden. Nach zwei Stunden wird die Reaktion abgebrochen, da die Menge an **55** weiter zunimmt, obwohl der Umsatz nicht vollständig ist. Doch ist nach dieser Zeit das optimale Verhältnis von **63** zu **55** erreicht. Das Gemisch wird in gekühlte Ammoniumchloridlösung gegeben und wie oben beschrieben aufgearbeitet.

Es erscheint überflüssig, das entstandene Cumarin **63** rein zu isolieren. Die weiteren Bestandteile des Produktgemisches, das Edukt **62** und das als Nebenprodukt entstandene Cumarin **55** sollten nicht mit Phosphoroxychlorid reagieren. So werden Ausbeuteverluste bei der Reinigung vermieden.

Die Mischung wird in wenig über Calciumhydrid getrocknetem Pyridin gelöst und die Lösung im Eis/Kochsalzbad auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Dann wird das Phosphoroxychlorid langsam zugetropft. Es wird noch für zwei Stunden weitergerührt, dann wird die Reaktionsmischung zur Hydrolyse in Eiswasser gegeben. Da diese Mischung durch das Pyridin basisch ist, sollte der entstandene Phosphorsäuremonoester als Pyridiniumsalz in Lösung gehen und so einfach durch abfiltrieren von den unveränderten Cumarinen **55** und **62** abgetrennt werden. Doch läßt sich das angestrebte Produkt

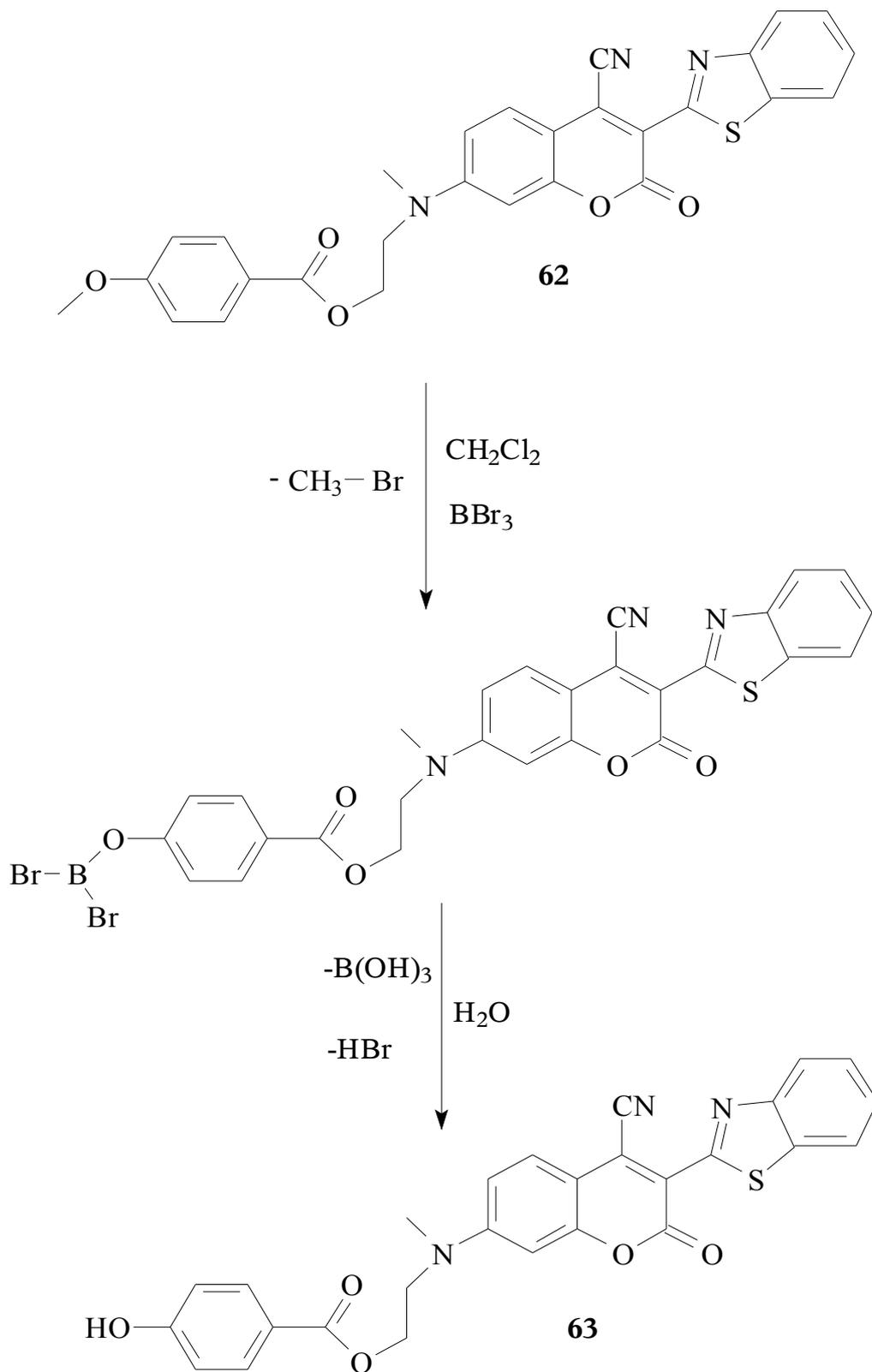
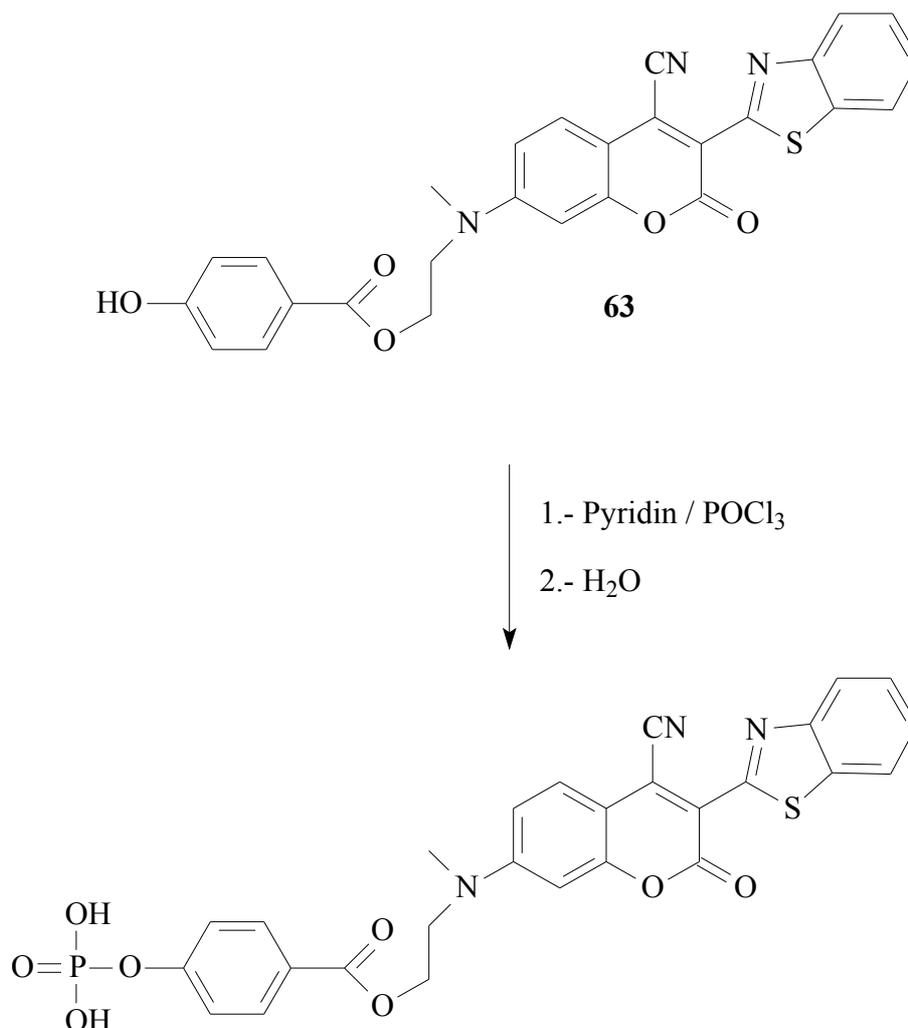


Abbildung 31: Mechanismus der Demethylierung mit Bortribromid nach McOmie^[109]

so nicht isolieren. Auch der Versuch das Produkt durch Säulenchromatographie zu erhalten, gelingt nicht, das Produkt läßt sich so nicht rein isolieren.

Deshalb wird nach einer alternativen Einführung der Phosphorsäureestergruppe gesucht. Hierbei werden die Möglichkeiten die Alkoholgruppe des Cumarins **55** mit einem Dihydroxybenzolderivat,



wie dem Resorcin, zu verethern oder die Alkoholgruppe mit Phosphorylbromid in ein Bromid umzuwandeln, um dann ein Amin zu alkylieren, verworfen. B. BLÖDORN^[111] hat im Arbeitskreis bei ähnlichen Verbindungen (hydroxyethylsubstituiertem 4-Dicyanomethylen-2-[4-(dimethyl-amino)styryl]-6-methyl-4*H*-pyran, *DCM*) so keine positiven Ergebnisse erzielen konnte.

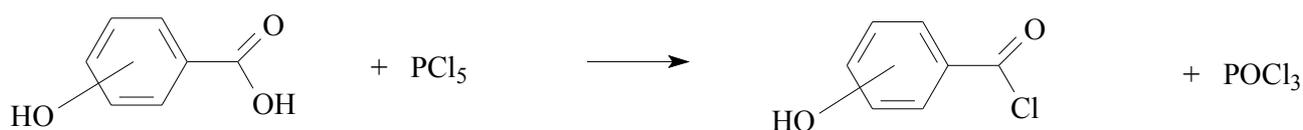
3.5.6. Die Reaktion zu Dichlorphosphoryloxybenzoylchlorid

Ein anderer Weg das Cumarin **63** darzustellen, scheint die Reaktion von Dichlorphosphoryloxybenzoylchlorid mit einem Alkohol zu sein. Ein Patent der Firma BAYER & Co berichtet, daß die Reaktion selektiv zum Carbonsäureester verläuft^[112]. Dabei wird erst Dichlorphosphoryloxybenzoylchlorid als ein reaktiver Baustein, welcher bereits eine Phosphorsäuregruppe trägt synthetisiert und dieser dann mit einem Alkohol verbunden. Darüber hinaus wird in der Literatur über die Verwendung dieses Bausteins zur Synthese von Carbonsäureestern nichts berichtet.

Das Dichlorphosphoryloxybenzoylchlorid wird nach einer Vorschrift von R. ANSCHÜTZ und G. D. MOORE synthetisiert^[113,114], indem ein Mol der sorgfältig vom Kristallwasser befreiten 4-Hydroxy-benzoesäure mit einem Mol Phosphorpentachlorid unter Wasserausschluß verrührt wird. Da die Reaktion sehr heftig unter Salzsäureentwicklung verläuft, wird mit einem Eisbad gekühlt. Es entsteht eine klare, hellgelbe Flüssigkeit, die zum Entfernen von gelöster Salzsäure kurz auf 100 °C erwärmt wird. Dann wird sofort bei 15 mm Druck destilliert. Nachdem das Phosphoroxychlorid, gemischt mit etwas Phosphorpentachlorid, abdestilliert ist, geht das Reaktionsprodukt bei 178 °C über. Man erhält eine wasserklare Flüssigkeit in einer Ausbeute von etwa 60 %.

Nach der gleichen Methode läßt sich auch die 3-Hydroxybenzoesäure mit Phosphorpentachlorid umsetzen. Die Reaktion verläuft weniger exotherm, es entsteht langsam eine gelbe Flüssigkeit, die nach der Destillation bei etwa 15 mm Druck und 170 °C bis 180 °C das gewünschte Produkt als wasserklare Flüssigkeit in einer Ausbeute von 92 % ergibt.

Cumarine als präzipitierende Fluorophore - Hauptteil

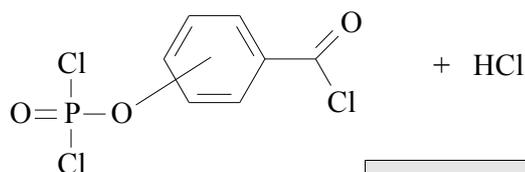


4-Hydroxy \Rightarrow **64**

3-Hydroxy \Rightarrow **65**

V41

V42



4-Hydroxy \Rightarrow **66** \Rightarrow **V 41**

3-Hydroxy \Rightarrow **67** \Rightarrow **V 42**

3.5.7. Reaktionen mit Dichlorphosphoryloxybenzoylchlorid

Nach dem Patent der Firma BAYER & Co^[112] reagiert das Dichlorphosphoryloxybenzoylchlorid mit Alkoholen nur an der Carboxylgruppe. Das Reagenz wird in einem aprotischen Lösungsmittel mit dem Alkohol gemischt und mit einer sterisch gehinderten Base versetzt. Dann wird entweder bei Raumtemperatur mehrere Tage stengelassen oder auch für einige Stunden erwärmt. Das entstehende Phosphorsäuredichlorid wird mit Wasser zu Phosphorsäure zersetzt. Nach diesem Vorbild soll nun das Cumarin 55 umgesetzt werden.

Es wird dazu in wenig DMPU gelöst und mit DIEA als sterisch gehinderter Base versetzt. Das Reagenz *p*-Dichlorphosphoryloxybenzoylchlorid **66** wird bei Raumtemperatur zugegeben und dann wird für 16 Stunden auf 80 °C erwärmt. Dabei entsteht ein tiefroter Feststoff, der abgesaugt und in Wasser gerührt wird. So entsteht eine rote Lösung, die mit Salzsäure angesäuert wird, bis ein rotbrauner Niederschlag entsteht. Dieser wird abgesaugt und wie üblich aufgearbeitet. Es wird ein rotgoldenes Pulver erhalten.

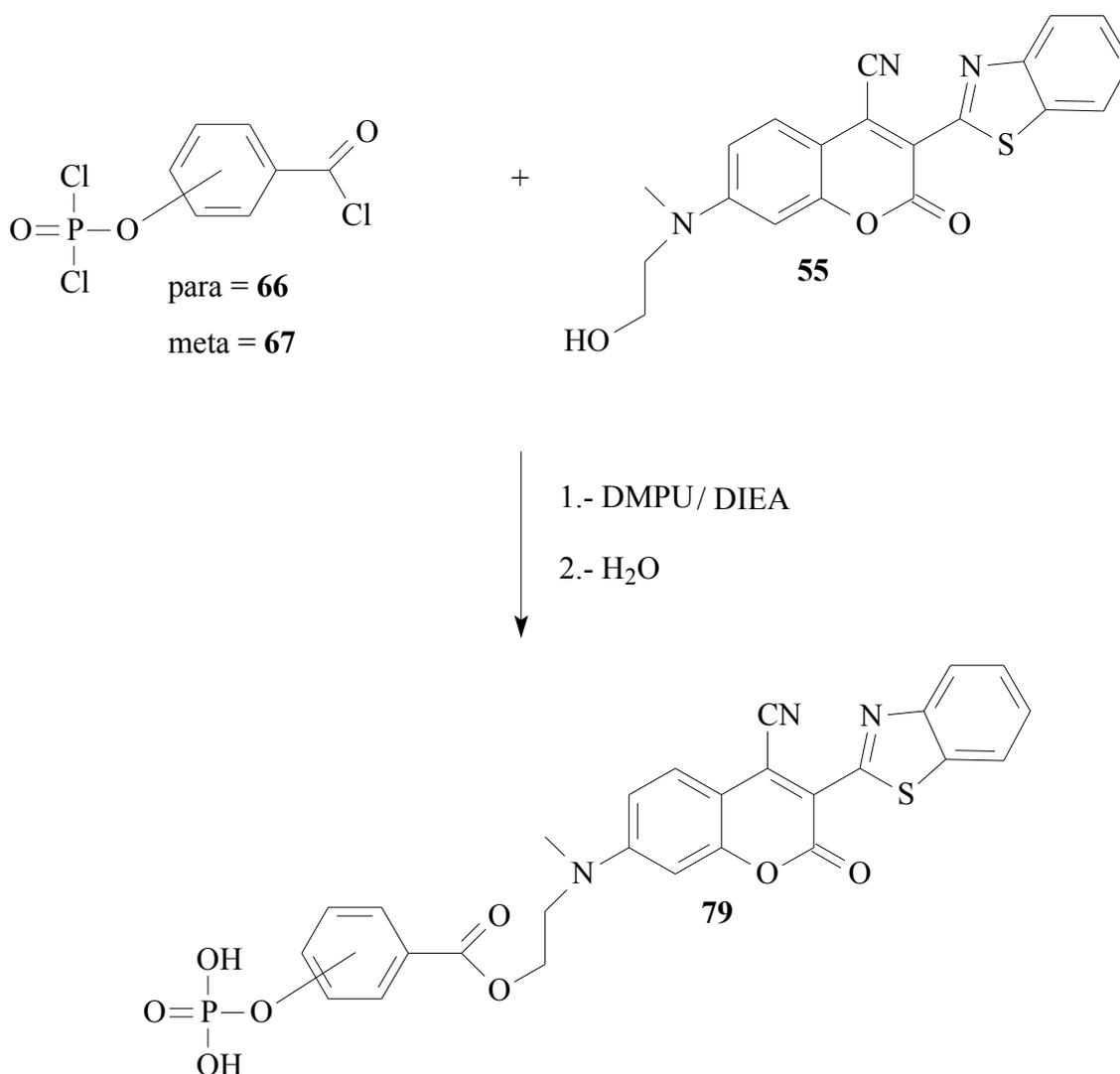


Abbildung 32: Cumarin **79** läßt sich so nur als Nebenprodukt erhalten. Hauptprodukt ist Cumarin **58** (siehe **Abbildung 33**)

Die Untersuchung mittels NMR-Spektroskopie zeigt jedoch, daß hier das schon früher synthetisierte Cumarin **58** entstanden ist. Wird allerdings das Filtrat der Reaktionslösung in Wasser gegeben und der pH mit verdünnter Salzsäure auf fünf eingestellt, so fällt nach Aufarbeitung und Trocknung ein rotes Pulver an. Dieser Stoff ist wasserlöslich und die spektroskopischen Untersuchungen legen Nahe, daß es sich hier um ein Gemisch handelt, das das gewünschte Cumarin enthält. Das Verhältnis von Cumarin **58** zum gewünschten Cumarin beträgt etwa sieben zu eins, das gewünschte Cumarin läßt sich auch durch mehrfaches Auflösen in verdünntem Ammoniak und anschließendem Ausfällen in verdünnter Salzsäure nicht rein isolieren.

Das Entstehen des Hauptprodukts Cumarin **58** läßt sich mit der Reaktion zum

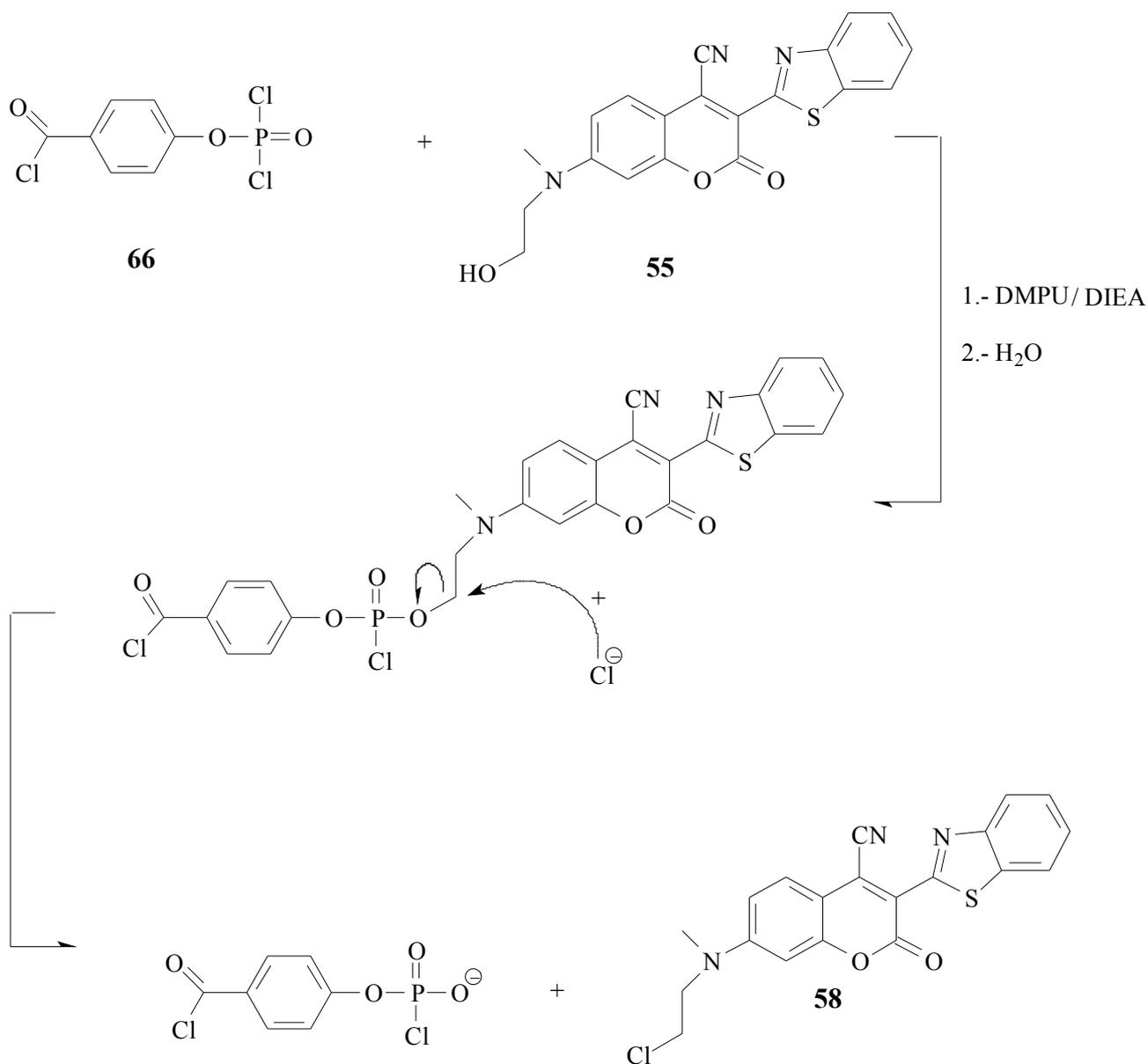


Abbildung 33: Wahrscheinlicher Reaktionsweg zum Hauptprodukt Cumarin **58**

Phosphorsäureester **69** erklären. Diese Gruppe ist, wie schon früher berichtet, eine gute Abgangsgruppe in einer S_Ni-Reaktion mit Spuren von Chlorid. Das gleiche Ergebnis ergibt die Umsetzung von Cumarin **55** mit dem Reagenz *m*-Dichlorphosphoryloxybenzoylchlorid **67**, es wird das Cumarin **58** als Hauptprodukt isoliert.

Dies läßt sich wohl damit erklären, daß durch das Weiterreagieren zum Cumarin **58** und das Ausfallen desselben, das Gleichgewicht zwischen Carbonsäureester und Phosphorsäureester in

Richtung Phosphorsäureester verschoben wird. Um dies zu verhindern, wird die Reaktion in Chloroform wiederholt, da das Cumarin **58** in diesem Lösungsmittel gut löslich ist. So sollte man das thermodynamisch stabilere Produkt erhalten. Tatsächlich aber erhält man so eine Lösung, aus der sich nach Hydrolyse und Reinigung durch Umkristallisation nur das Edukt als violette, grün schimmernde Kristalle gewinnen läßt.

Um das Cumarin **68** zu erhalten, wird, nach obiger Vorschrift, das Cumarin **55** in Chloroform gelöst und mit DIEA als sterisch gehinderter Base versetzt. Das Reagenz *m*-Dichlorphosphoryloxybenzoylchlorid **67**, beschrieben in Kapitel 3.5.6, wird zugegeben und dann wird für 16 Stunden zum Rückfluß erhitzt. Auch hier wird das Edukt zurückerhalten.

Durch die Reaktionsdurchführung in Chloroform konnte zwar verhindert werden, daß das unerwünschte Nebenprodukt **58** entsteht, doch scheint das Säurechlorid nicht reaktiv genug zu sein, um mit der wenig basischen Alkoholgruppe am Cumarin **55** zu reagieren.

3.6. Die Veresterung zum Phosphorsäuremonoester

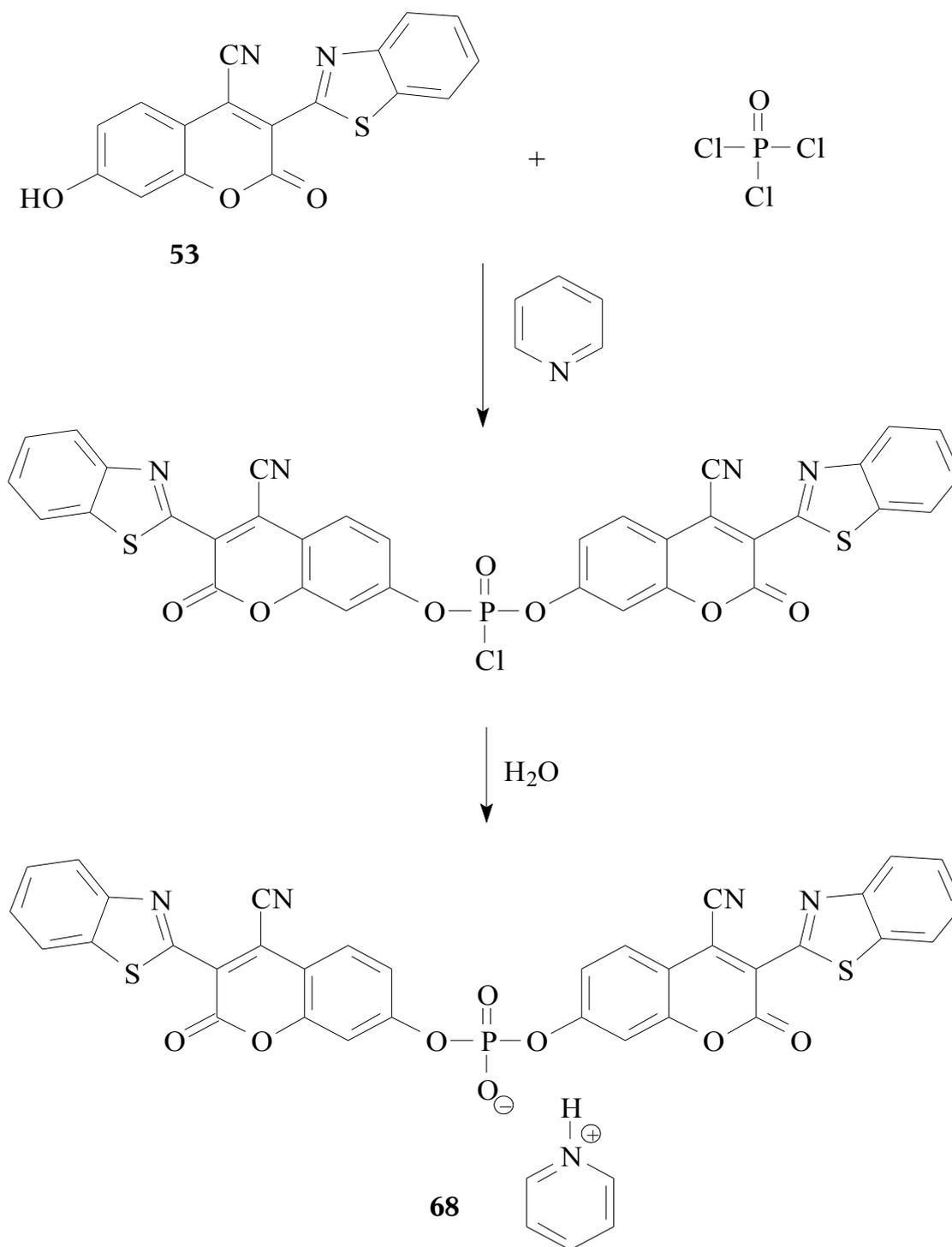
3.6.1. Reaktionen mit Phosphoroxychlorid

3.6.1.1. Die Synthese von 3-(2-Benzthiazolyl)-4-cyano-7-cumarinylphosphatsemipyridiniumsalz

In der Literatur lassen sich viele Methoden finden, Alkohole zu Phosphorsäuremonoestern umzusetzen. Eine besonders einfache ist die Reaktion mit Phosphoroxychlorid in einem Amin, wie Pyridin, als Base. Da O. WOLFBELIS^[51] eine Vorschrift zur Veresterung des oben beschriebenen Cumarins **53** bereits veröffentlicht hat, soll dieses Verfahren zunächst nachvollzogen werden.

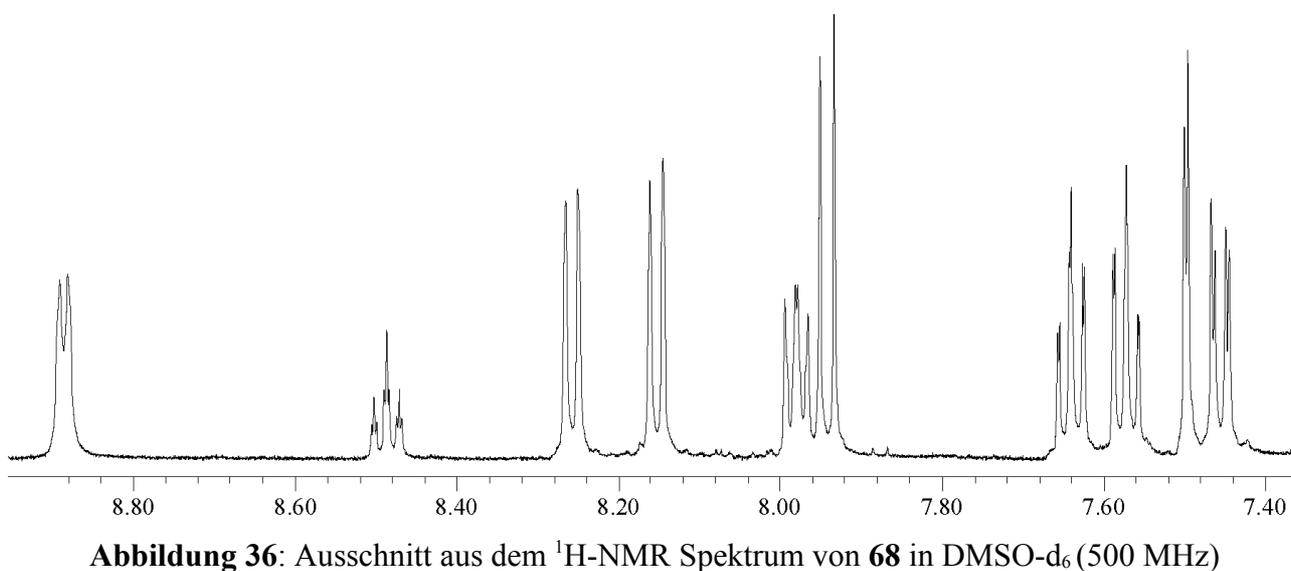
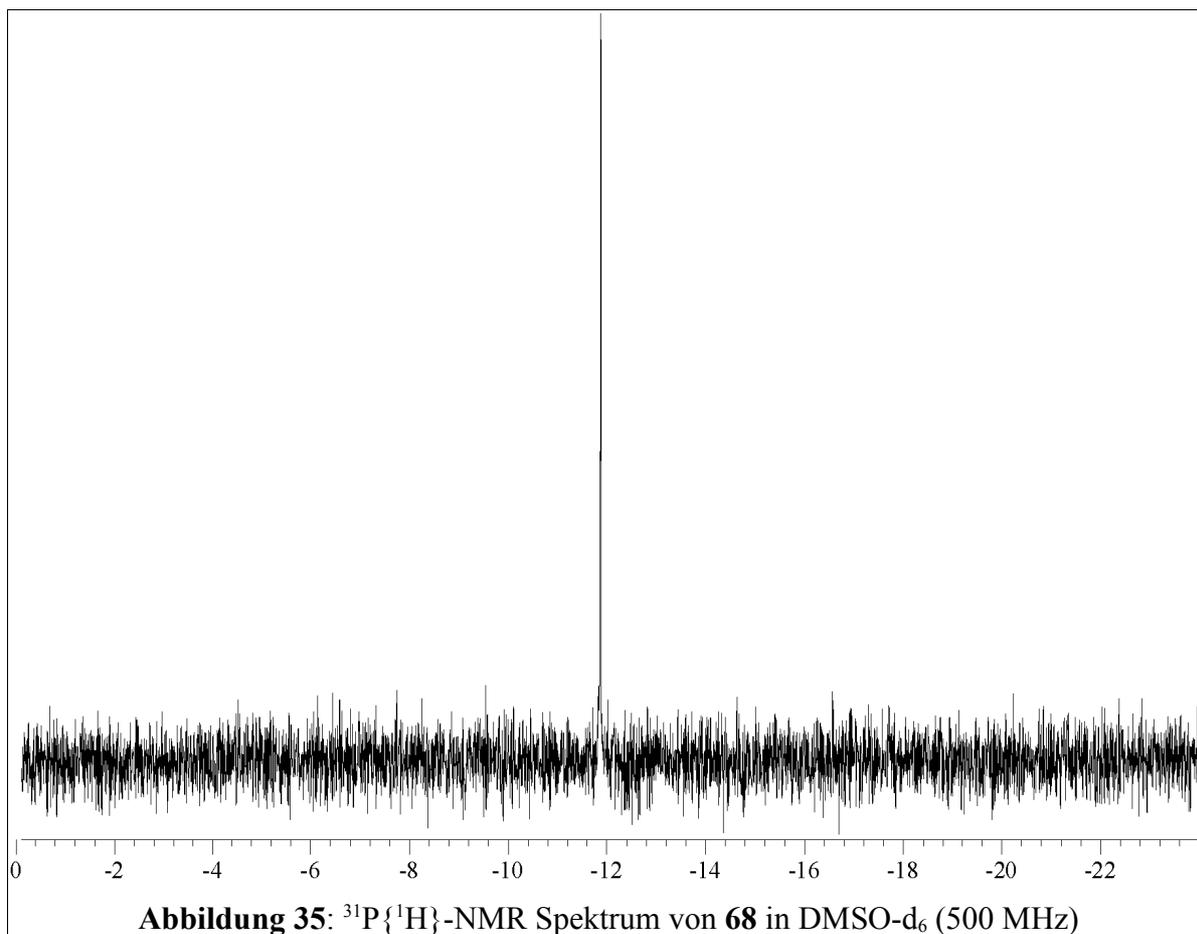
Allerdings führte der Versuch zu einem unerwarteten Ergebnis. Es wird etwas Phosphoroxychlorid in über Calciumhydrid getrocknetes Pyridin gegeben und die Mischung im Eis-/Kochsalzbad auf höchstens 0 °C gekühlt. Das Cumarin **53** wird nun in äquimolaren Mengen als Feststoff in kleinen Portionen über eine Stunde hinweg zugegeben. Dabei entsteht eine gelbe Suspension. Nach der Zugabe wird noch einige Zeit bei 0 °C gerührt, dann wird mit Eiswasser hydrolysiert. So erhält man eine rotbraune Lösung deren pH-Wert mit Pyridin so eingestellt wird, daß er zwischen 5 und 6 liegt^{II}. Diese wird filtriert, um nicht umgesetztes Cumarin **53** zu entfernen und dann am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird zur Reinigung aus einer Mischung aus Ethanol und Wasser umkristallisiert. Man erhält so ein gelbes Pulver. Die Struktur wird mittels ¹H-NMR, ³¹P{¹H}-NMR, IR-Spektrum und Elementaranalyse verifiziert. Das Verhältnis von zwei Molekülen Cumarin zu einem Molekül Pyridin läßt sich im ¹H-NMR gut erkennen, das ³¹P{¹H}-NMR zeigt nur einen Peak bei -11,9 ppm. Die Phosphorsäure, die als Nebenprodukt bei der Hydrolyse entsteht, läßt sich also durch die Umkristallisation gut entfernen. Doch das FAB-Massenspektrum zeigt neben dem erwarteten Massepeak bei 400 einen weiteren bei 702. Dies zeigt, zusammen mit dem, für aromatische Phosphorsäuremonoester ungewöhnlich weit verschobenen Peak im ³¹P{¹H}-NMR-Spektrum, daß hier, anders als in der Literatur beschrieben, der Diester Pyridiniumbis-[3-(benzthiazol-2-yl)-4-cyano-2-oxo-2H-chromen-7-yl]-phosphat **68** entstanden ist.

^{II} Abweichend von O. WOLFBELIS' Vorgehensweise, der mit Natronlauge neutralisiert und so das Dinatriumsalz erhält.



V47

Abbildung 34: Mechanismus der Veresterung mit Phosphoroxychlorid zum Cumarin 68



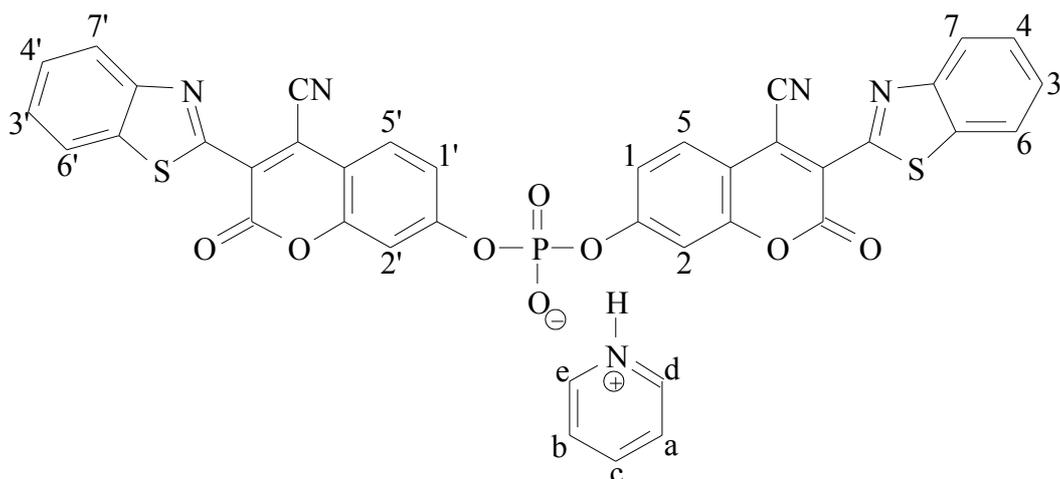


Abbildung 37: Pyridiniumbis-[3-(benzthiazol-2-yl)-4-cyano-2-oxo-2H-chromen-7-yl]phosphat **68**

Tabelle 2: Zuordnung der $^1\text{H-NMR}$ Signale von **68**

Zuordnung	chem. Verschiebung (ppm)	Intensität	Multiplizität	Kopplung
1	7,45	1H	dd	$^3J_{\text{HH}} = 8,8 \text{ Hz}$ $^4J_{\text{HH}} = 2,2 \text{ Hz}$
2	7,49	1H	d	$^4J_{\text{HH}} = 2,2 \text{ Hz}$
3	7,57	1H	t	$^3J_{\text{HH}} = 8,1 \text{ Hz}$
4	7,64	1H	t	$^3J_{\text{HH}} = 8,3 \text{ Hz}$
5	7,94	1H	d	$^3J_{\text{HH}} = 8,8 \text{ Hz}$
c,b	7,98	$\frac{1}{2}$ von 2H	t	$^3J_{\text{HH}} = 7,7 \text{ Hz}$
6	8,15	1H	d	$^3J_{\text{HH}} = 8,0 \text{ Hz}$
7	8,25	1H	d	$^3J_{\text{HH}} = 7,9 \text{ Hz}$
a	8,48	$\frac{1}{2}$ von 1H	t	$^3J_{\text{HH}} = 8,9 \text{ Hz}$
e,d	8,89	$\frac{1}{2}$ von 2H	d	$^3J_{\text{HH}} = 5,1 \text{ Hz}$

Cumarine als präzipitierende Fluorophore - Hauptteil

Um die Entstehung des Diesters zu verhindern wird nun ein zwanzigfacher Überschuß des Phosphoroxychlorids in Pyridin gelöst. Im Eis/Kochsalzbad bei 0 °C wird das in 50 ml Pyridin gelöste Cumarin **53** nun so langsam zugetropft, daß sich die Lösung gelb färbt, bevor der nächste Tropfen in die Mischung fällt. Durch ein größeres Lösungsmittelvolumen, eine bessere Verteilung des Cumarins **53** und einen großen Überschuß des Phosphoroxychlorids soll die Reaktion zum Monoester führen. Nach der Hydrolyse in Eiswasser wird die Lösung mit halbkonzentrierter Salzsäure stark sauer gestellt. Dabei entsteht ein voluminöser, orangener Niederschlag, der abgesaugt und getrocknet wird.

Nach der Umkristallisation aus einer Mischung aus Ethanol und Wasser erhält man so tatsächlich das bisher nicht bekannte Semipyridiniumsalz des 3-(2-Benzthiazolyl)-4-cyan-7-cumarinyl-phosphats **69** als gelbes Pulver.

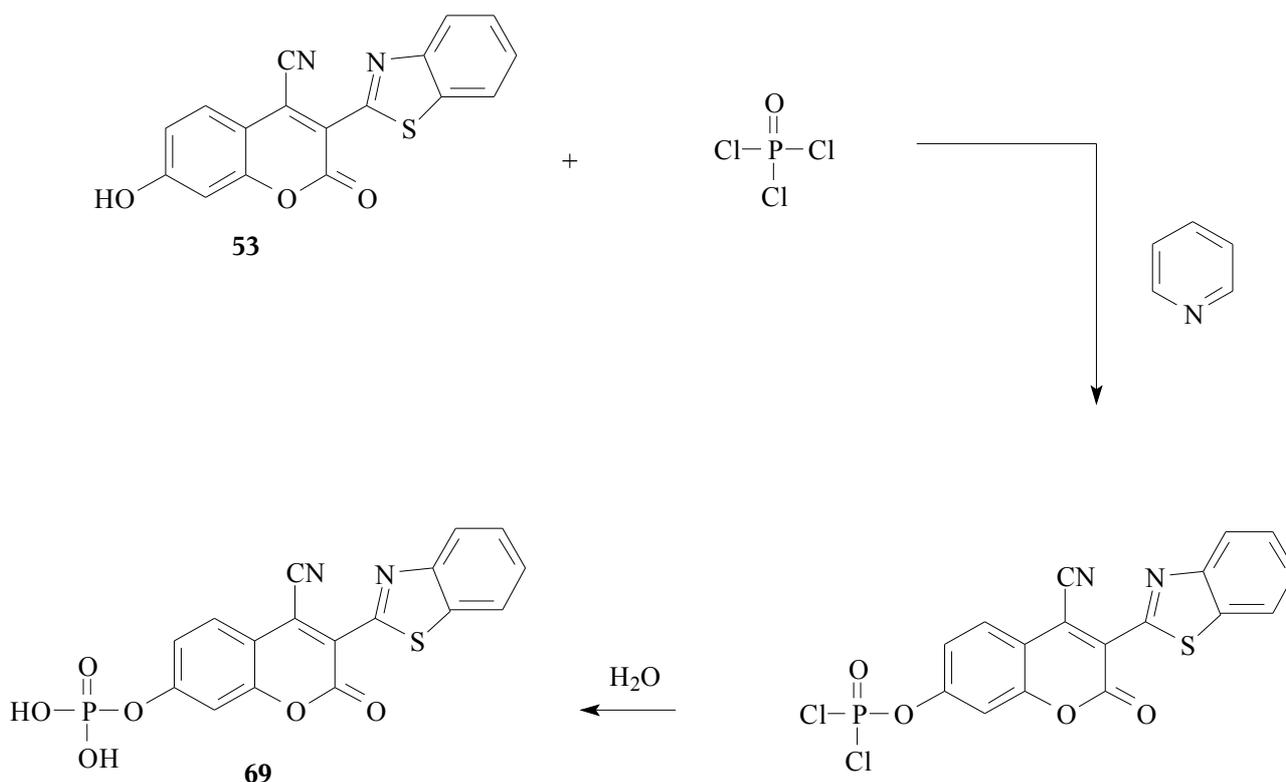


Abbildung 38: Mechanismus der Veresterung mit Phosphoroxychlorid zum Cumarin **69**

Die Cumarine **68** und **69** zeigen zwar gleich aussehende ^1H -NMR Spektren, doch lassen sie sich anhand der unterschiedlichen Massen- und $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Spektren gut voneinander unterscheiden. So liegt der Phosphorpeak von Cumarin **69** im $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Spektrum bei -5.5 ppm, der von Cumarin **68** aber bei -11.9 ppm.

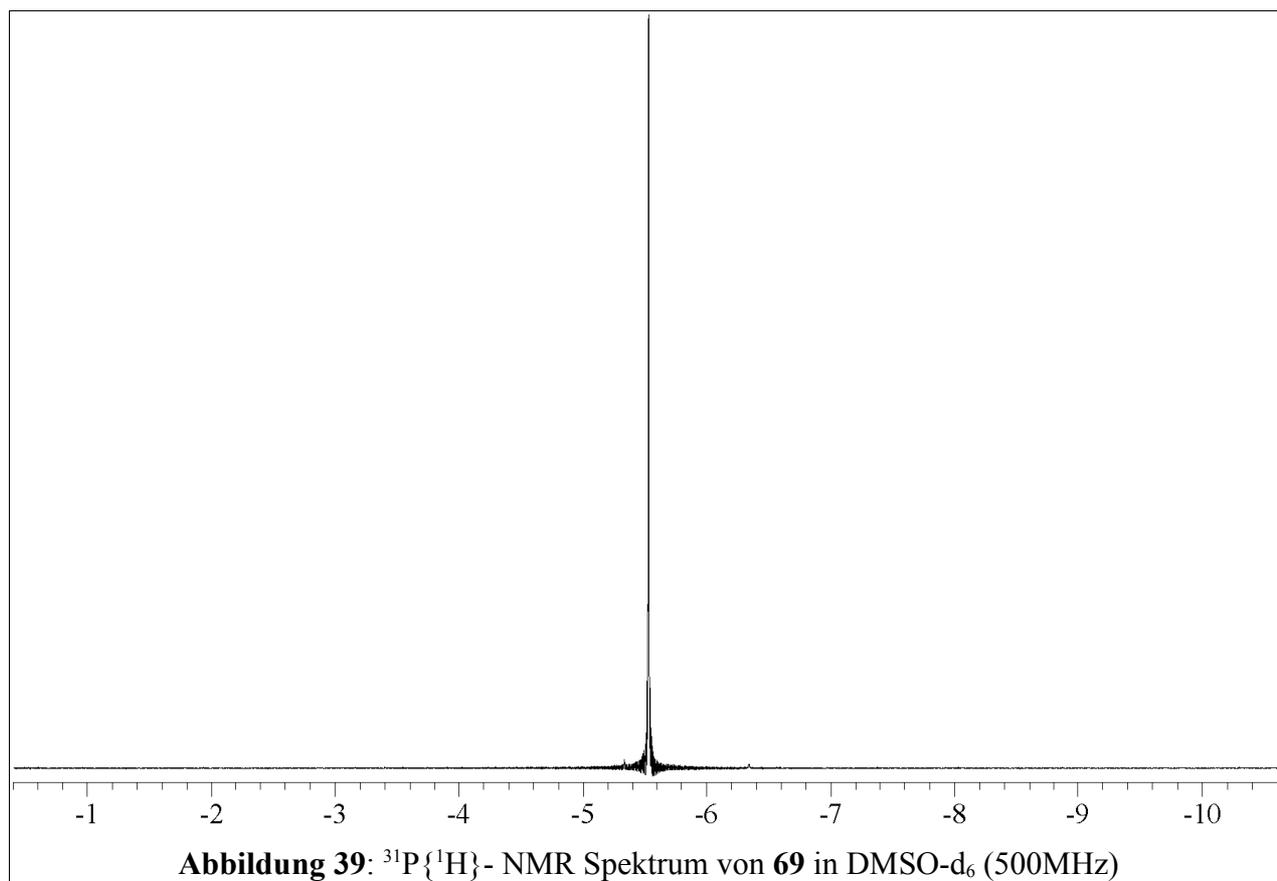


Abbildung 39: $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Spektrum von **69** in DMSO- d_6 (500MHz)

3.6.1.2. Versuche, verschiedene Cumarine mit Phosphoroxchlorid umzusetzen

Diese Reaktion soll nun auf das nicht literaturbekannte Cumarin **55** übertragen werden. Dazu wird das Cumarin in etwas trockenem Pyridin suspendiert. Bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ wird mit einer Spritze das Phosphoroxchlorid nun langsam zugetropft. Nach der Zugabe wird noch einige Zeit bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt, dann wird mit Eiswasser hydrolysiert. Dabei fällt ein roter Feststoff aus, der abfiltriert, mit viel Wasser gewaschen und getrocknet wird. Das $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum zeigt jedoch keinen Peak, es hat keine Reaktion stattgefunden.

So wird die Reaktion wiederholt, nur wird nach der Zugabe des Phosphoroxchlorids und einiger Zeit des Nachrührens bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ auf Raumtemperatur aufgewärmt und weitergerührt. In unregelmäßigen Abständen wird eine Probe hydrolysiert, aufgearbeitet und mittels $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR auf Phosphor untersucht. Da selbst nach vier Wochen sich noch kein Phosphor nachweisen lässt, wird die Reaktion ergebnislos abgebrochen.

Die Alkoholgruppe des Cumarins **55** ist weniger reaktiv als die phenolische Alkoholgruppe des

Cumarins **53**, da sie weniger sauer ist. Deshalb wird die Reaktion mit dem Cumarin **55** suspendiert in Pyridin wiederholt, nur wird das Phosphoroxychlorid bei Raumtemperatur zugetropft. Dabei entsteht unter Wärmeentwicklung eine rote Lösung, aus der nach einiger Zeit ein gelber Feststoff ausfällt. Dieser wird nach der Hydrolyse mit Eiswasser isoliert und getrocknet.

Die Untersuchung zeigt, daß kein Phosphor nachweisbar und der Lactonring des Cumarinringgrundkörpers geöffnet ist. Diese Reaktionsbedingungen führen zur Zerstörung des Moleküls.

Bis jetzt wurde die Reaktion mit dem Cumarin suspendiert in Pyridin durchgeführt. Eine Möglichkeit die Reaktivität zu steigern, ist, das Cumarin zu lösen und so die Konzentration an Cumarin zu erhöhen.

So wird das Cumarin **55** in trockenem Dioxan gelöst und mit Triethylamin versetzt. Dann wird das Phosphoroxychlorid bei 0 °C im Eis/Kochsalzbad zugetropft. Nach dem Aufwärmen auf Raumtemperatur wird in unregelmäßigen Abständen eine Probe hydrolysiert, aufgearbeitet und mittels $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektroskopie auf Phosphor untersucht. Da sich selbst nach vier Wochen noch kein Phosphor nachweisen läßt, wird die Reaktion ergebnislos abgebrochen. Offenbar ist die schlechte Reaktivität des Cumarins **55** nicht durch ein vollständiges Auflösen zu beseitigen.

Mehrere Autoren^[65,66] setzen zur Phosphorylierung von Alkylalkoholen mit Phosphoroxychlorid als Lösungsmittel Trimethylphosphat ein, in einem Fall^[67] findet sich die Struktureinheit *N*-(2-Hydroxyethyl)-*N*-methylamino, die so auch im Cumarin **55** vorkommt. So wird das Cumarin in wenig Trimethylphosphat suspendiert und im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C abgekühlt. Nun wird das Phosphoroxychlorid so zugetropft, daß sich die Innentemperatur nicht verändert. Dabei bildet sich eine dickflüssige, dunkelrote Lösung, die weitere acht Stunden bei 0 °C gerührt wird. Dann wird mit Eiswasser hydrolysiert, der pH-Wert mit Triethylamin auf 8 eingestellt und der entstehende Feststoff wird abgesaugt. Es wird mit viel Wasser gewaschen und der grünschimmernde Farbstoff getrocknet. Die Untersuchung mittels $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR und ^1H -NMR Spektroskopie zeigt, daß keine Reaktion stattgefunden hat, daß das Cumarin **55** unverändert aus der Reaktion hervorgegangen ist.

Eine Möglichkeit ist, daß die reaktive Spezies das Alkoholat ist und nicht der Alkohol selber. Während die Phenolgruppe des Cumarins **53** leicht deprotoniert werden kann, so läßt sich die Alkoholgruppe des Cumarins **55** von den bisher eingesetzten Aminen nicht deprotonieren. Deshalb sollen die Amine Pyridin und Triethylamin nun durch Natriumhydrid ersetzt werden. Dazu wird das Natriumhydrid in etwas trockenes Tetrahydrofuran (THF) suspendiert und gerührt. In diese Suspension wird das Cumarin **55** gegeben und wird, um eine vollständige Deprotonierung zu

erreichen, für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Dabei löst sich der Farbstoff vollständig auf und es entsteht eine dunkelrote Lösung. Dann wird das Phosphoroxychlorid langsam zugetropft und für eine Nacht gerührt. Das überschüssige Natriumhydrid wird mit eventuell entstandenem Natriumchlorid abfiltriert und das Filtrat mit Eiswasser hydrolysiert. Dabei fällt ein dunkelroter Feststoff aus, der aufgearbeitet und getrocknet wird. Auch hier ist kein Phosphor im $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektrum nachweisbar und das ^1H -NMR-Spektrum zeigt, daß der Farbstoff unverändert aus der Reaktion hervorgegangen ist. Deshalb wird die Reaktion nun wiederholt, nur wird die Mischung nach der Zugabe des Phosphoroxychlorids für die Dauer einer Nacht zum Rückfluß erhitzt. Dabei färbt sich die Mischung gelb, ein eindeutiges Zeichen dafür, daß der Farbstoff zerstört wurde. Das bestätigt sich nach der Aufarbeitung und Untersuchung mittels NMR Spektroskopie. Der Lactonring des Cumaringerüsts wurde geöffnet, doch konnte kein Phosphor nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung mit Phosphoroxychlorid funktioniert mit dem Cumarin 55 nicht, obwohl diese Reaktion mit ähnlichen Strukturen beschrieben ist. Um zu überprüfen, ob dies eine besondere Eigenschaft dieses Cumarins ist, wird die Reaktion mit dem literaturbekannten Perylenderivat 2-(2-Hydroxyethyl)thioxanthen[2,1,9-*def*]isoquinolin-1,3-dion^[115] **70**, welches ebenfalls eine Hydroxyethylaminogruppe trägt, wiederholt.

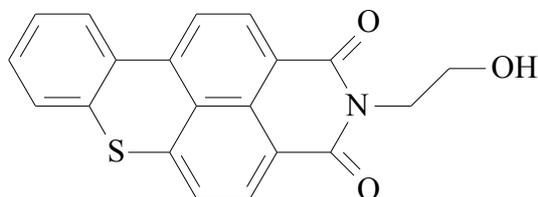


Abbildung 40: 2-(2-Hydroxyethyl)thioxanthen[2,1,9-*def*]isoquinolin-1,3-dion

70

So wird das Perylen **70** nach der Vorschrift von O. WOLFBEIS^[51] in trockenem Pyridin suspendiert und im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C abgekühlt. Das Phosphoroxychlorid wird mit einer Spritze langsam zugetropft. Nun wird für eine Stunde bei 0 °C nachgerührt, dann wird auf Raumtemperatur aufgewärmt und über Nacht gerührt. Nun wird hydrolysiert und abgearbeitet. Auch hier zeigt die Untersuchung mittels $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektroskopie, daß keine Reaktion stattgefunden hat, das Perylen wurde aber unverändert zurückerhalten. Deshalb werden nun drastischere Reaktionsbedingungen gewählt. So wird das Phosphoroxychlorid bei Raumtemperatur zugegeben

und dann für einen Tag bei Raumtemperatur gerührt. Da auch hier keine Reaktion zu beobachten war, wird nun bei verschiedenen Temperaturen für jeweils einen Tag gerührt, bei 40 °C, dann bei 60 °C und schließlich bei 80 °C. Bis zu einer Temperatur von 60 °C konnte keine Reaktion beobachtet werden, darüber hinaus wird das Perylengerüst zerstört.

So wird als letzter Versuch das Perylen mit Phosphoroxychlorid zur Reaktion zu bringen, etwas 2-(2-Hydroxyethyl)thioxanthen[2,1,9-*def*]isoquinolin-1,3-dion **70** in einer kleinen Menge Trimethylphosphat suspendiert und im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C abgekühlt. Nun wird das Phosphoroxychlorid mit einer Spritze so zugegeben, daß sich die Innentemperatur nicht verändert. Dabei bleibt die Suspension bestehen, anders als bei der Reaktion mit Cumarin **55** entsteht keine Lösung. Diese wird nun für acht Stunden bei 0 °C gerührt und anschließend wird mit Eiswasser hydrolysiert und aufgearbeitet. Es zeigt sich, daß auch hier keine Reaktion stattgefunden hat. Es konnte mittels $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektroskopie kein Phosphor nachgewiesen werden.

Da sich zumindest das Cumarin **53** mit der Phenolgruppe gut mit dem Phosphoroxychlorid umsetzen läßt, sollte dies auch mit dem Derivat 3-(2-Benzdiazolyl)-7-hydroxycumarin möglich sein. So wird das Cumarin in etwas trockenem Pyridin suspendiert. Bei 0 °C wird mit einer Spritze das Phosphoroxychlorid langsam zugetropft. Nach der Zugabe wird noch einige Zeit bei 0 °C gerührt, dann wird mit Eiswasser hydrolysiert. So erhält man eine rote Lösung deren pH-Wert mit Pyridin so eingestellt wird, daß er zwischen 5 und 6 liegt. Die Lösung wird filtriert, um nicht umgesetztes Cumarin **35** zu entfernen und dann am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird zur Reinigung aus einer Mischung von Ethanol und Wasser umkristallisiert. Es zeigt sich bei der Untersuchung des isolierten, gelben Feststoffes mittels $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR-Spektroskopie, daß kein Phosphor nachgewiesen werden kann, es wurde das unveränderte Cumarin zurückerhalten.

Obwohl die Struktur des Cumarins **35** der des Cumarins **53** sehr ähnlich ist, reagiert es nicht mit dem Phosphoroxychlorid. Diese Reaktion scheint nur mit den in der Literatur beschriebenen Strukturen zu funktionieren, schon kleine Änderungen machen einen Erfolg hier unmöglich. Deshalb wird nun nach anderen, universell einsetzbaren Methoden gesucht, um die Monophosphorsäureester, der in den obigen Kapiteln beschriebenen, Cumarinderivate zu synthetisieren.

3.6.2. Reaktionen mit Polyphosphorsäure

Eine weitere einfach durchzuführende Reaktion zur Phosphorylierung von Alkoholen ist die Hydrolyse von Polyphosphorsäure. In den meisten Vorschriften wird der Alkohol bei unterschiedlichen Temperaturen in Polyphosphorsäure im Vakuum gerührt, oft wird die Polyphosphorsäure aus Orthophosphorsäure H_3PO_4 und Phosphorpentoxid (P_2O_5) vor der eigentlichen Reaktion hergestellt, was die Schwierigkeit kleine Mengen der sehr zähflüssigen Polyphosphorsäure abzumessen, umgeht. P. KARRER und M. VISCONTINI^[116] lösen das Salz Natriumpolyphosphat in Orthophosphorsäure und setzten den Alkohol in diesem Gemisch um.

Mithilfe dieser Methode soll nun das Cumarin 55 umgesetzt werden. Dazu wird das Cumarin 55 mit Polyphosphorsäure und wenig Orthophosphorsäure zusammengegeben und im Ölpumpenvakuum in fünf Stunden langsam auf 180 °C erwärmt. Bei dieser Temperatur wird über Nacht gerührt^[117]. Dabei färbt sich die Mischung langsam von rot über blau und violett zu schwarz. So erhält man nach der Hydrolyse mit Eiswasser einen schwarzen Rückstand, der in allen Lösungsmitteln unlöslich ist. Der Farbstoff ist durch diese Reaktionsführung zerstört worden. Deshalb wird die Reaktion in einer milderer Variante wiederholt.

Dabei wird etwas Phosphorpentoxid in Orthophosphorsäure gegeben und bei 140 °C gerührt, bis eine zähflüssige Masse entstanden ist. Es wird auf 100 °C abgekühlt und das Cumarin 55 mit wenig Phosphorpentoxid vermischt zugegeben. Dabei entsteht eine blaue Lösung, die sich im Verlauf der Reaktion violett färbt. Es wird für eine Nacht bei 100 °C gerührt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Die resultierende Masse wird mit Eis hydrolysiert^[118]. Dabei fällt ein dunkler Feststoff aus. Um aus diesem das gewünschte Produkt zu isolieren, wird die Masse in konzentrierten Ammoniak gegeben. Dabei sollte sich ein Ammoniumsalz des Monophosphorsäureesters bilden und in Lösung gehen. Wichtig ist hierbei die Base nicht zu lange einwirken zu lassen, da bekannt ist, daß der Lactonring des Cumaringerüsts durch alle Basen relativ schnell geöffnet wird. So wird der nichtgelöste Rückstand abfiltriert und das Filtrat in halbkonzentrierte Salzsäure gegeben. Dabei wird der Monophosphorsäureester protoniert und ein roter Feststoff fällt in sehr geringen Mengen aus. Dieser wird abgesaugt, aufgearbeitet und getrocknet. Die NMR-spektroskopische Untersuchung zeigt einen Peak im $^3\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Spektrum, es ist also ein Phosphorsäureester entstanden aber das ^1H -NMR Spektrum zeigt, daß das Cumaringerüst zerstört wurde.

Auch bei diesen relativ milden Reaktionsbedingungen fällt also in der Hauptsache ein unlöslicher, dunkler Feststoff an, der Farbstoff wird zum größten Teil zerstört und auch der kleine Rest ist unerwünscht verändert. Das Erhitzen in einer starken Säure über einen längeren Zeitraum überstehen die hier eingesetzten Lactone nicht. Deshalb wird diese Art der Phosphorylierung aufgegeben und nach einer anderen Methode gesucht. Eine solche Methode muß unter sanften Reaktionsbedingungen ablaufen. Deshalb muß das Reagenz besonders reaktiv sein, um sich mit dem Cumarin **55** umsetzen zu lassen.

3.6.3. Reaktionen mit Chloroxodioxaphospholan

Ein häufig eingesetztes und kommerziell erhältliches Reagenz ist das Chloroxodioxaphospholan. Es trägt nur ein Chloratom und hat so nur eine reaktive Stelle. Dadurch kann es nur mit einem Partner reagieren, während ein Reagenz wie Phosphoroxychlorid drei Alkohole binden kann. Ein Nachteil ist, daß die Ethylenschutzgruppe nach der Phosphorylierung wieder abgespalten werden muß.

Die meisten Vorschriften lösen oder suspendieren den Alkohol, geben eine Base, wie ein Amin oder auch Natriumhydrid, hinzu und tropfen das Reagenz bei 0 °C zu. Um den Monophosphorsäureester freizusetzen wird die Schutzgruppe mit Natriumcyanid abgespalten^[119].

So wird das Cumarin **55** in trockenem Tetrahydrofuran (THF) suspendiert und mit Triethylamin (TEA) versetzt. Dann wird im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C abgekühlt und das Chloroxodioxaphospholan wird mit einer Spritze langsam zugetropft. Danach wird auf Raumtemperatur aufgewärmt und für weitere 24 Stunden gerührt^[120]. Die Untersuchung mittels Dünnschichtchromatographie zeigt, daß acht verschiedene Produkte entstanden sind. Diese werden durch Säulenchromatographie an Kieselgel 60 mit Dichlormethan/Methanol im Verhältnis 19 zu 1 voneinander getrennt. Die einzige rote Fraktion wird nach der Aufarbeitung mittels ³¹P{¹H}-NMR Spektroskopie untersucht. Dabei konnte kein Phosphor nachgewiesen werden. Das ¹H-NMR Spektrum zeigt, daß der Farbstoff nicht verändert wurde. Sehr gut läßt sich der Peak des Alkoholprotons erkennen. Es hat also keine Reaktion stattgefunden.

Da das Cumarin **55** in THF nur schlecht löslich ist, wird die Reaktion mit Dimethylsulfoxid (DMSO) wiederholt. Das Cumarin **55** wird in DMSO gelöst, mit TEA versetzt und auf 0 °C im Eis/Kochsalzbad abgekühlt. Dann wird das Chloroxodioxaphospholan mit einer Spritze langsam

zugetropft und anschließend auf Raumtemperatur aufgewärmt. Anschließend wird für weitere 24 Stunden gerührt. Dabei bildet sich ein roter Feststoff, der abgesaugt wird. Doch auch hier zeigen die NMR-spektroskopischen Untersuchungen, daß keine Reaktion stattgefunden hat.

Ein weiterer Ansatz wurde von B. LAL und A.K. GANGOPADHYAY für die Phosphorylierung von Forskolin, ein Labdan-Diterpen isoliert aus *Coleus forskohlii*^[121] mit pharmazeutisch interessanten Eigenschaften, beschrieben^[122]. Nach dieser Vorschrift wird das Cumarin 55 in Pyridin und Dichlormethan suspendiert, und bei Raumtemperatur wird das Chloroxodioxaphospholan mit einer Spritze langsam zugetropft. Dabei erwärmt sich die Mischung um etwa 5 °C. Es entsteht eine dunkle, schwach fluoreszierende Lösung, die nach acht Stunden nachrühren zur Hydrolyse in Eiswasser gegeben wird. Dabei entsteht ein Feststoff, der abgesaugt und NMR-spektroskopisch untersucht wird. Es zeigt sich, daß das Cumarin 55 unverändert zurückerhalten wurde.

Da die oben beschriebenen Verfahren nicht zum gewünschten Produkt führen, wird nun eine drastischere Methode probiert. Nach einer Vorschrift von B. EDWARDS^[123] wird das Cumarin 55 in frisch destilliertem Dimethylformamid (DMF) unter Argonatmosphäre suspendiert. Es wird Natriumhydrid in Mineralöl zugegeben, und zur Deprotonierung des Cumarins 55 wird für 30 Minuten gerührt. Dabei bildet sich eine dunkle Lösung. Es wird im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C abgekühlt, dann wird das Chloroxodioxaphospholan mit einer Spritze langsam zugetropft und weitere zwölf Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Feststoff, hauptsächlich Natriumhydrid, wird abgesaugt und das Lösungsmittel des Filtrates wird im Ölpumpenvakuum abdestilliert.

Um die Ethylenschutzgruppe abzuspalten und den Monophosphorsäureester freizusetzen, wird der so erhaltene Feststoff in trockenem Dimethylsulfoxid (DMSO), zusammen mit Natriumcyanid suspendiert. Bei 80 °C bildet sich unter rühren bei 50 mbar Druck eine Lösung. Diese wird für acht Stunden bei 80 °C gerührt und schließlich über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Da kein Feststoff ausfällt, wird die braune Lösung in Wasser gegeben. Es entsteht eine wachsartige, rotbraune Masse. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung zeigt, das diese Masse aus einer Vielzahl von Produkten besteht. Diese werden mit Hilfe der Säulenchromatographie voneinander getrennt. Doch die NMR-spektroskopische Untersuchung der farbigen Fraktionen zeigt, das nicht nur kein Phosphor vorhanden ist, auch das Cumaringerüst wurde zerstört.

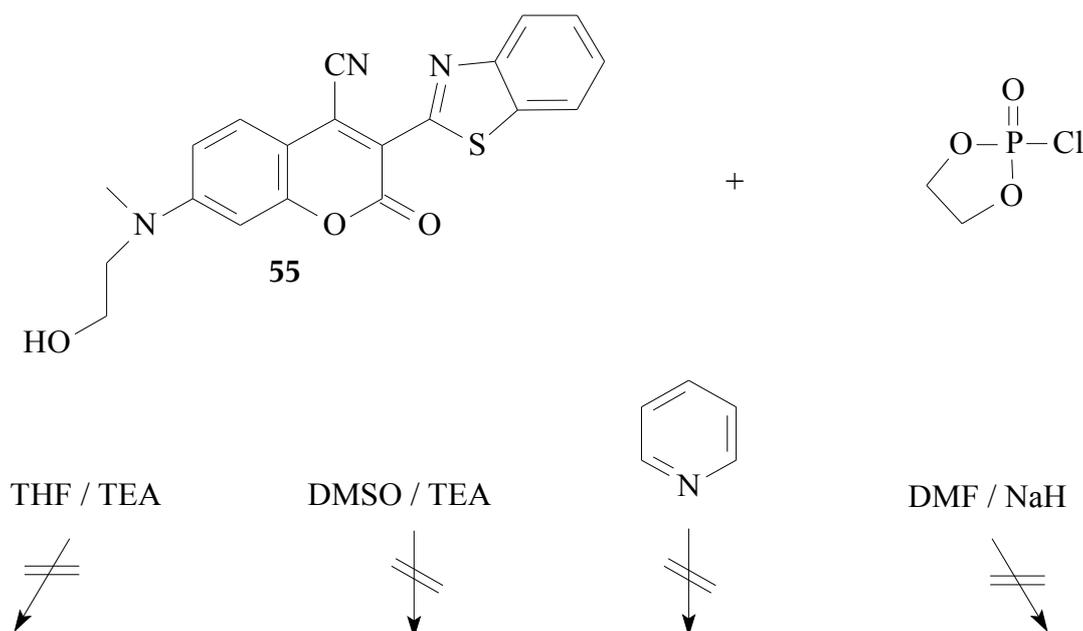


Abbildung 41: Versuchte Umsetzungen von Cumarin **55** und Chloroxodioxaphospholan mit verschiedenen Basen und Lösungsmitteln

Die Reaktion soll nun mit dem 2-(2-Hydroxyethyl)thioxanthen[2,1,9-*def*]isoquinolin-1,3-dion **70** wiederholt werden, da dessen Gerüst keinen Lactonring enthält und so stabiler ist.

So wird das Perylen **70** in frisch destilliertem Dimethylformamid (DMF) unter Argonatmosphäre suspendiert. Es wird Natriumhydrid in Mineralöl zugegeben, und zur Deprotonierung des Perylens **70** wird für 30 Minuten gerührt. Dabei bildet sich eine dunkle Lösung. Es wird im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C abgekühlt, dann wird das Chloroxodioxaphospholan mit einer Spritze langsam zugetropft und weitere 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Der Feststoff, hauptsächlich Natriumhydrid, wird abgesaugt und nun wird Natriumcyanid zugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird im Ölpumpenvakuum bei etwa 40 °C abdestilliert und der Rückstand wird in sieben molarem Ammoniak gerührt, um das Produkt als Ammoniumsalz in Lösung zu bringen. Es wird vom unlöslichen Rückstand abfiltriert und das Filtrat mit Salzsäure angesäuert. Da kein Feststoff ausfällt werden wenige Milliliter gesättigte Bariumchloridlösung zugegeben, da die Bariumsalze von Monophosphorsäureestern schwerlöslich sind. Tatsächlich entsteht ein orangener Niederschlag, der isoliert und getrocknet wird. So ist ein völlig unlöslicher Feststoff entstanden, der sich kaum untersuchen läßt. Auch eine stimmige Elementaranalyse war nicht zu erhalten.

Da das Reagenz Chloroxodioxaphospholan keinen Erfolg bringt, wird nach anderen, reaktiveren Substanzen gesucht.

Cumarine als präzipitierende Fluorophore - Hauptteil

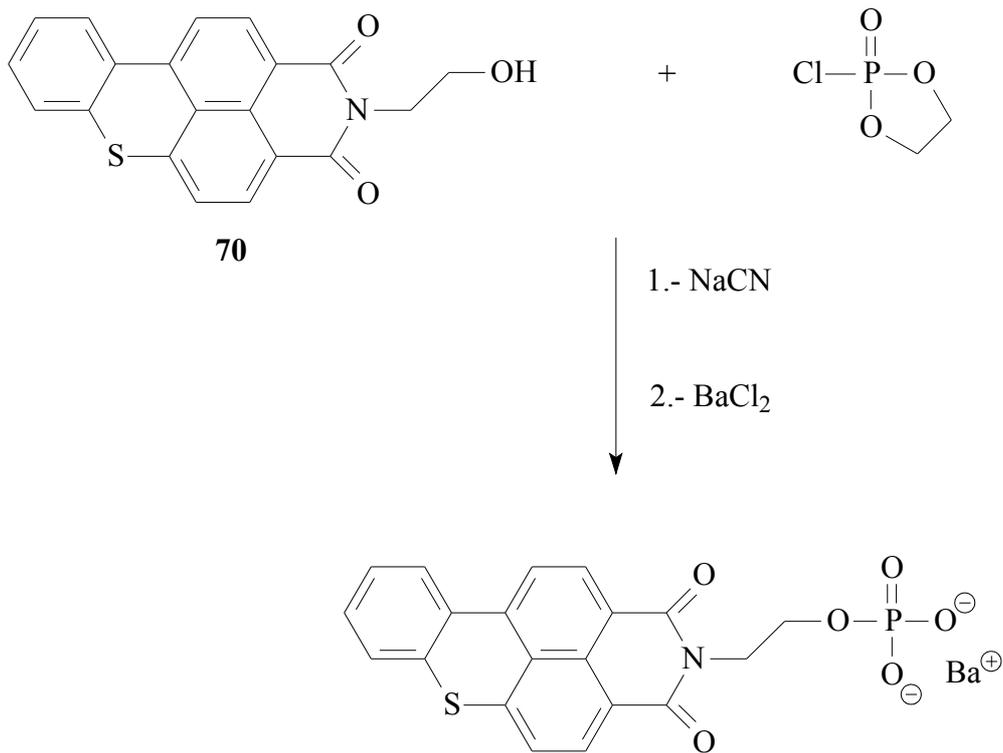


Abbildung 42: Versuch einer Phosphorylierung des 2-(2-Hydroxyethyl)-thioxanthen[2,1,9-def]isoquinolin-1,3-dions **70**

3.6.4. Synthese von und Reaktionen mit *o*-Phenylenphosphorchloridat

Bis jetzt haben die hier beschriebenen Versuche bestätigt, daß die meisten bekannten Phosphorylierungsmethoden nicht universell anwendbar sind^[124,125]. Gesucht wird nach einem monofunktionellen Reagenz, das sehr reaktiv ist und dessen Schutzgruppe gleichzeitig unter milden Bedingungen abspaltbar ist. Nicht zuletzt wäre wünschenswert, daß das Reagenz einfach herzustellen und zu lagern ist. Solch eine Verbindung glauben T.A. KHWAJA und C.B. REESE gefunden zu haben^[126]. Das *o*-Phenylenphosphorchloridat soll so reaktiv sein wie sonst nur Diphenylchlorphosphonat^[127] oder Dibenzylchlorphosphonat^[128,129], dabei aber lagerstabil und einfach zu handhaben.

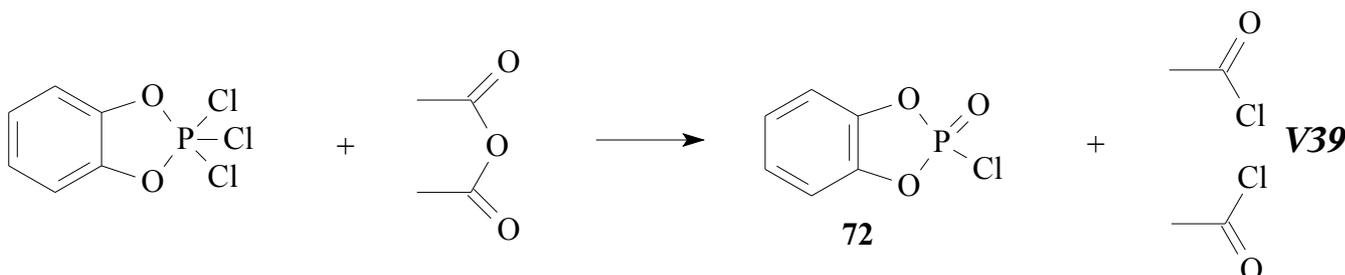
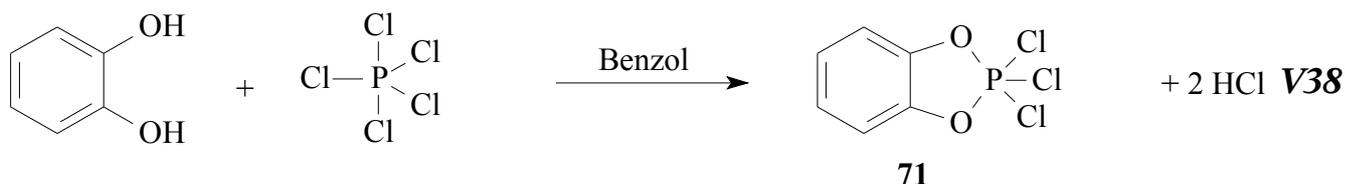
Schwieriger scheint die Freisetzung des Monophosphorsäureesters zu sein, empfohlen wird hier für kleine Mengen^{III} eine Oxidation mit Bromwasser^[130] oder bei größeren Mengen und empfindlichen Molekülen die Freisetzung mit einer Periodatlösung^[131] bei einem pH-Wert von 1 bis 2. Die fertigen Produkte werden dann als schwerlösliche Bariumsalze gefällt. Für derartige Versuche muß das nicht kommerziell erhältliche *o*-Phenylenphosphorchloridat jedoch zunächst synthetisiert werden.

Dazu wird Phosphorpentachlorid in trockenem Benzol suspendiert und *o*-Dihydroxybenzol (Catechol) wird unter rühren in kleinen Portionen zugegeben. Dann wird für zwei Stunden zum Rückfluß erhitzt und das Lösungsmittel schließlich abdestilliert. Der Rückstand wird im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert. So erhält man in guten Ausbeuten 2,2,2-Trichlor-1,2,3-benzdioxaphosphol **71** als hellgelbe, kristalline Substanz.

Diese Substanz **71** wird nun in einem zweiten Schritt in frisch destilliertes Essigsäureanhydrid gegeben und vorsichtig erwärmt. Die Reaktion verläuft unter starker Wärme- und Schaumentwicklung. Dabei destilliert man das bei der Reaktion entstehende Essigsäurechlorid kontinuierlich ab. Wenn die Reaktion beendet ist, wird die Mischung im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert. Man erhält *o*-Phenylenphosphorchloridat **72** als farblosen Feststoff.

III Diese Reaktion läßt sich bei Mengen von 2-3 mmol gut durchführen.

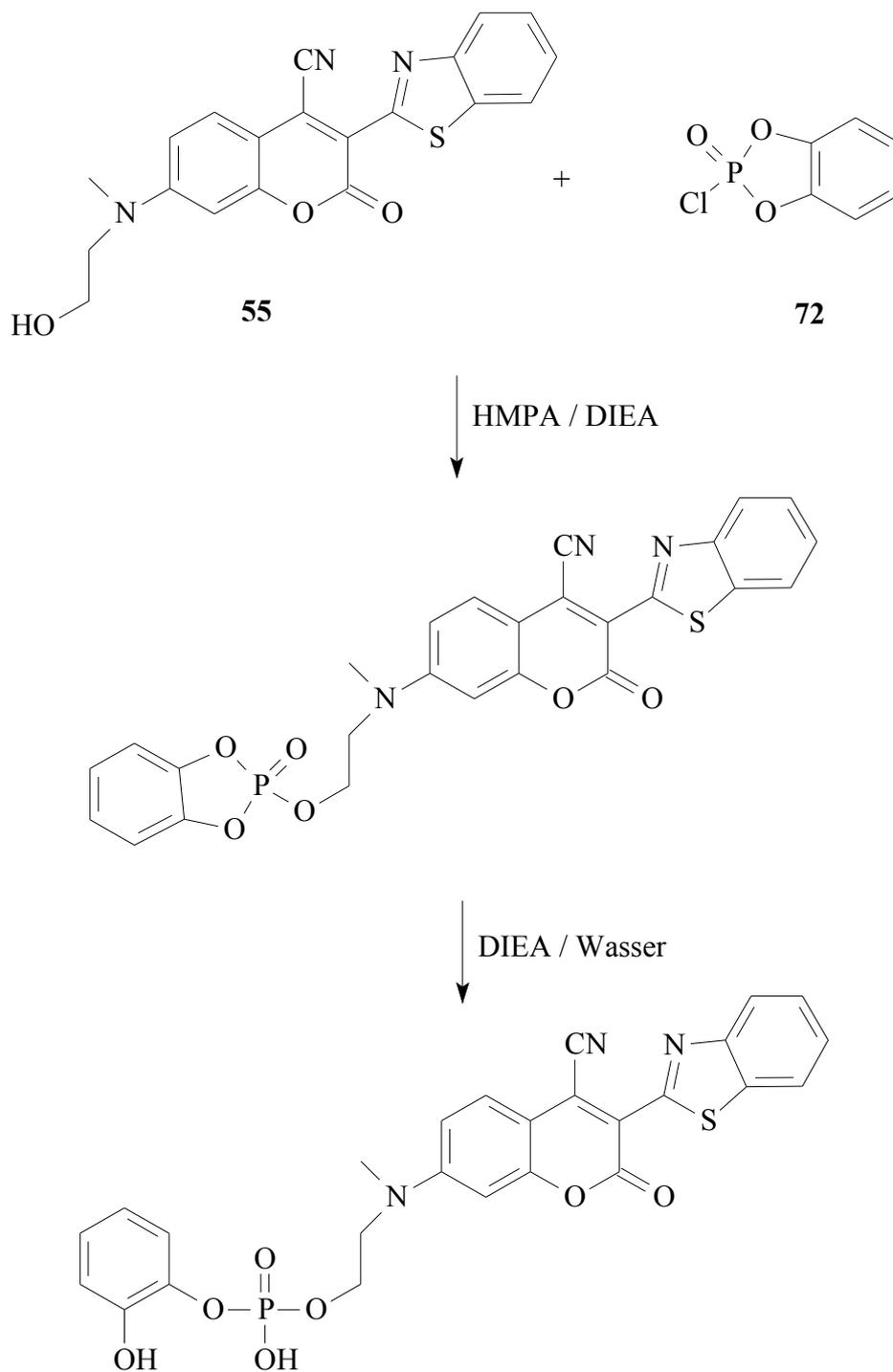
Cumarine als präzipitierende Fluorophore - Hauptteil



71	⇒	V 38
-----------	---	-------------

72	⇒	V 39
-----------	---	-------------

Das oben synthetisierte Reagenz soll nun mit dem Cumarin 55 umgesetzt werden. Da 55 in den von T.A. KHWAJA und C.B. REESE benutzten Lösungsmitteln weitgehend unlöslich ist, wird es in wenig Hexamethylphosphorsäuretriamid^[99] gelöst. Als Base wird eine sterisch anspruchsvolle Verbindung wie 2,6-Lutidin oder Diisopropylethylamin empfohlen, da das bei dieser Reaktion entstehende Phosphorsäuretriesterintermediat besonders anfällig für eine nucleophile Substitution ist. So läßt es sich in wenigen Minuten mit Triethylamin oder Pyridin umsetzen. Deshalb wird hier DIEA als Base zugesetzt und das Reagenz 72, gelöst in wenig HMPA, so zugetropft, daß die Temperatur der Reaktionsmischung nicht ansteigt. Dann wird über Nacht nachgerührt. Um die Schutzgruppe abzuspalten, wird in einem ersten Schritt weitere Base und etwas Wasser hinzugegeben. Es wird weitere zehn Stunden gerührt. Dabei soll ein *o*-Hydroxyphenylphosphat entstehen. Um die Substanz zu isolieren, wird die Reaktionsmischung in viel Wasser gegeben, so daß sich ein violetter Feststoff abscheidet. Dieser wird mit viel Wasser gewaschen, um ihn von anhaftendem HMPA zu befreien und anschließend getrocknet.



Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des so erhaltenen Feststoffs zeigt, daß nur ein sehr kleiner Teil des Eduktes **55** tatsächlich reagiert hat. So ist das Signal des Hydroxylprotons von **55** bei 4,85 ppm gut zu sehen. Gleichzeitig tauchen neben dem Multipllett bei 3,60 ppm der Methylengruppen von **55** zwei sehr kleine Signale bei etwa 3,80 ppm und 3,90 ppm auf. Diese stammen von den

Methylengruppen des Produktes. Anhand des Verhältnisses dieser Signale zueinander läßt sich sagen, daß nur etwa 20 Prozent des isolierten Feststoffes das gewünschte phosphorylierte Produkt sind. Deshalb ist im $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Spektrum des Feststoffes auch nur ein schwaches Phosphorsignal zu sehen. Auch das Reagenz *o*-Phenylenphosphorchloridat **72** hat sich als nicht reaktiv genug erwiesen, um mit den in dieser Arbeit beschriebenen Alkoholen zu reagieren. Die geringen entstandenen Mengen des angestrebten Farbstoffes ließen sich nicht rein isolieren.

Die besonders feste Bindung des Hydroxylprotons an das Sauerstoffatom in den hier beschriebenen Alkoholen, läßt sich schon im ^1H -NMR Spektrum gut beobachten. So zeigt das Hydroxylproton im NMR in DMSO- d_6 ein scharfes Triplet bei etwa 4,85 ppm (**Abbildung 44** auf Seite 94), während Hydroxygruppen sonst häufig breite, unstrukturierte Signale aufweisen, die auf ein Austauschen der Hydroxylprotonen hinweisen. Dieses Austauschen kann hier nicht gezeigt werden. Offenbar ist das

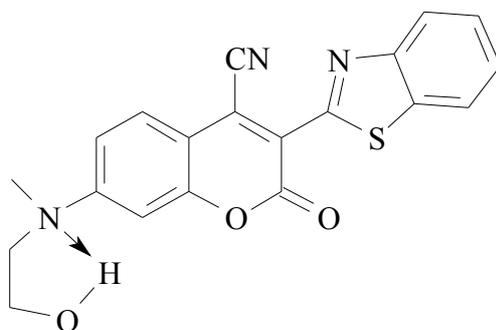


Abbildung 43: Diese Struktur erklärt die verhältnismäßig geringe Acidität der Verbindung

Proton in DMSO- d_6 fest an das Sauerstoffatom gebunden. Dies läßt sich durch eine Wasserstoffbrückenbindung des freien Elektronenpaares des Stickstoffes zum Proton der Hydroxygruppe erklären. So entsteht ein Fünfring indem das Proton, im Vergleich mit anderen Alkoholen, fest gebunden und so weniger acide ist^[132]. Dies kann die schlechte Reaktivität der Verbindungen erklären.

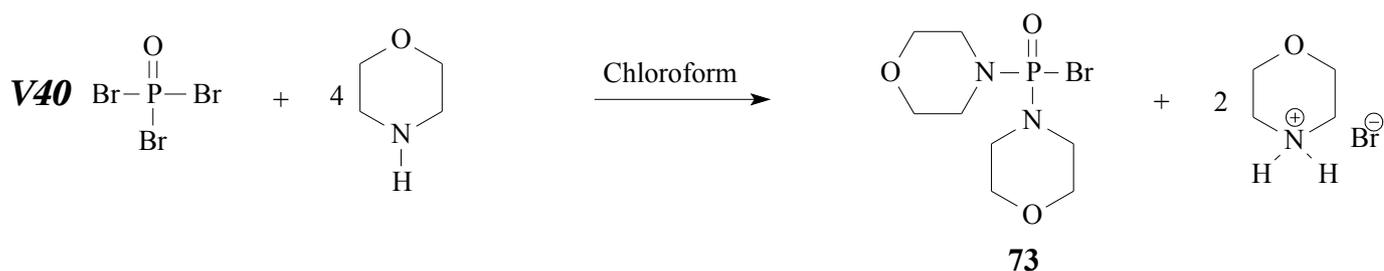
3.6.5. Synthese von und Reaktionen mit Phosphordimorpholinoxibromid

Unter all den im Rahmen dieser Arbeit bisher verwendeten Reagenzien zur Phosphorylierung von Alkoholen konnte keine Substanz gefunden werden, die ausreichende Reaktivität und einfaches Abspalten der Schutzgruppe in sich vereint. Reaktiver als die hier verwendeten Derivate des

Phosphorsäurechlorids sollen ihre Bromanaloge sein^[133]. So berichten H. A. C. MONTGOMERY und J. H. TURNBULL^[134,135] von Phosphordimorpholinobromid, welches nicht nur unter sehr milden Bedingungen mit Alkoholen aller Art reagiert, auch die beiden Morpholinoschutzgruppen lassen sich sehr schonend über eine saure Ionentauschersäule oder mit verdünnter Säure abspalten. Das von H. A. C. MONTGOMERY und J. H. TURNBULL auch untersuchte Phosphordimorpholinochlorid dagegen, reagiert mit Alkoholen nur nach längerem Erhitzen.

Die hohe Reaktivität des Phosphordimorpholinobromids hat aber den Nachteil, daß die Verbindung nicht lagerfähig ist. Sie muß vor jeder Reaktion frisch zubereitet werden. Auch kann sie nicht isoliert werden, sondern wird in Chloroform synthetisiert und so als Rohprodukt weiterverwendet. Dadurch ist eine genaue Dosierung schwierig.

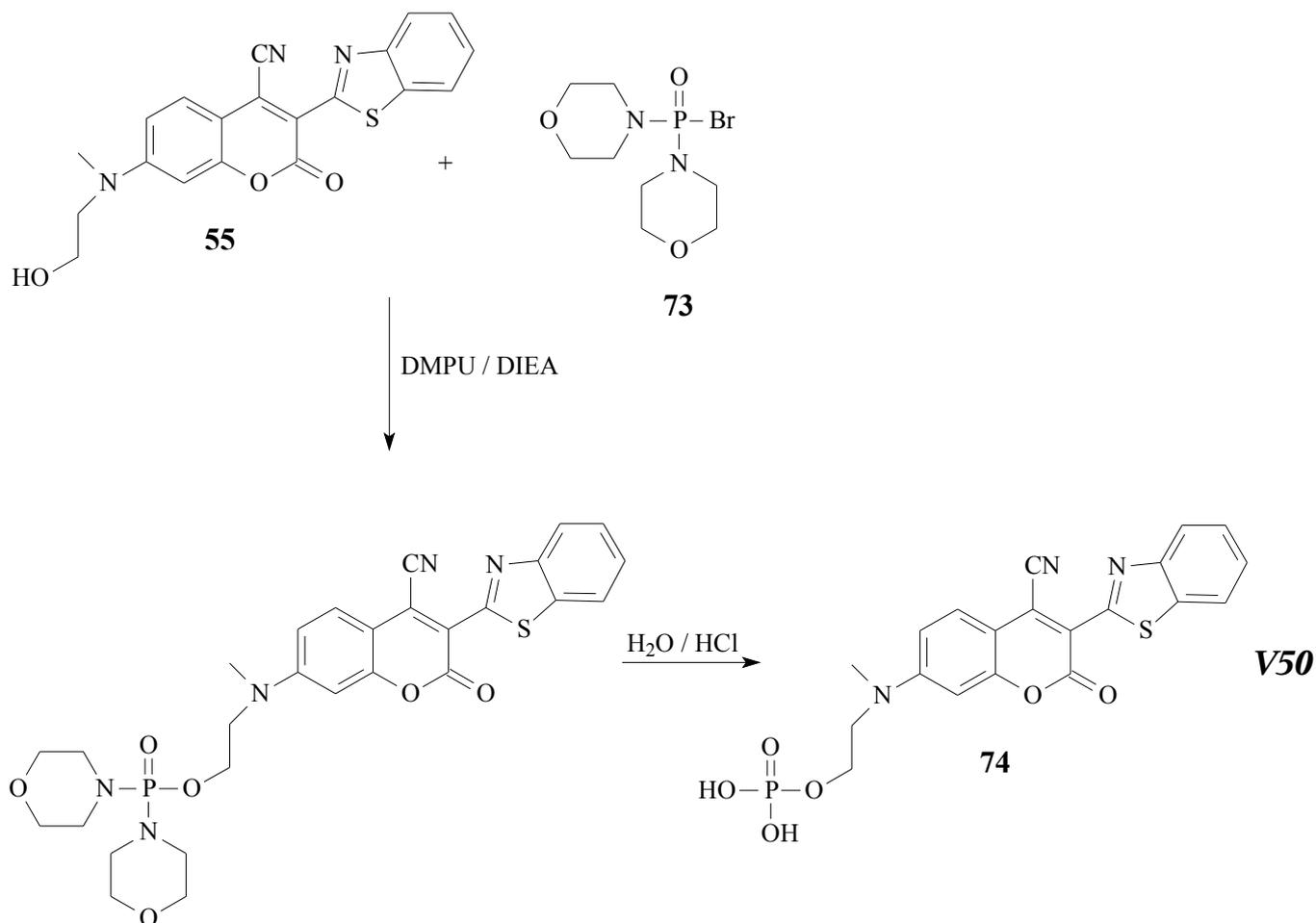
Zur Synthese des Phosphordimorpholinobromids wird das kommerziell erhältliche Phosphorylbromid in trockenem Chloroform gelöst und im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C abgekühlt. Dann wird die vierfache Menge Morpholin so zugetropft, daß die Temperatur 10 °C nicht übersteigt. Dabei wirkt das Morpholin sowohl als Reaktant, als auch als Base, die den entstehenden Bromwasserstoff neutralisiert. Dann wird auf Raumtemperatur aufgewärmt und weitere vier Stunden gerührt. Das entstandene farblose Morpholinohydrobromid wird abgefiltert, und das gelbliche Filtrat wird vorsichtig auf die Hälfte des Ausgangsvolumens eingengt. Die so erzeugte Lösung von Phosphordimorpholinobromid **73** in Chloroform soll bei 0 °C für einige Stunden stabil sein und wird ohne weitere Aufarbeitung weiterverwendet.



Um nun das Cumarin **55** mit dem Reagenz Phosphordimorpholinobromid **73** zu phosphorylieren wird es in wenig DMPU, *N,N*-Dimethylpropylenharnstoff, gelöst. Wie schon in Kapitel 3.6.4 beschrieben, wird auch hier eine sehr sterisch gehinderte Base zur Vermeidung einer auf die Phosphorylierung folgenden nucleophilen Substitution benötigt und so DIEA zugegeben. Die

Cumarine als präzipitierende Fluorophore - Hauptteil

Mischung wird auf 0 °C im Eis/Kochsalzbad abgekühlt^{IV}. Da sich die zähflüssige Lösung des Reagenzes **73** in Chloroform nur schlecht zutropfen läßt, wird sie in sechs Portionen im Abstand von je fünf Minuten zugegeben. Dann wird noch eine Stunde bei 0 °C weitergerührt, bevor auf Raumtemperatur aufgewärmt und weitere 24 Stunden weitergerührt wird.



Um die beiden Morpholinreste abzuspalten wird nun etwas verdünnte Salzsäure zugegeben und für einige Stunden weitergerührt. Dann wird die Reaktionsmischung in viel Wasser gegeben woraufhin ein violetter Feststoff ausfällt, der isoliert und getrocknet wird. Die Analyse mittels ¹H-NMR und ³¹P{¹H}-NMR Spektroskopie zeigt, daß der Feststoff neben dem Produkt Cumarin **74** noch nicht umgesetztes Cumarin **55** und Phosphorsäure enthält. Zur Reinigung wird die Mischung in konzentriertem Ammoniak gerührt. Dabei geht der Monophosphorsäureester **74** als Ammoniumsalz in Lösung. Der Rückstand wird abfiltriert und das Filtrat wird in verdünnte Salzsäure gegeben. Dabei erhält man das Produkt **74** als feines, violettes Pulver, welches isoliert

^{IV} HMPA ist hier als Lösungsmittel weniger geeignet, da es bereits bei 7 °C fest wird.

und getrocknet wird. Im Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ Spektren der Cumarine **55** und **74** sind die Unterschiede, die die Phosphorsäuregruppe an **74** hervorruft gut zu erkennen. So ist das Signal des Hydroxylprotons verschwunden und während bei **55** die vier Protonen der Ethylengruppe ein Signal geben, ist dieses bei **74** in zwei Peaks aufgespalten.

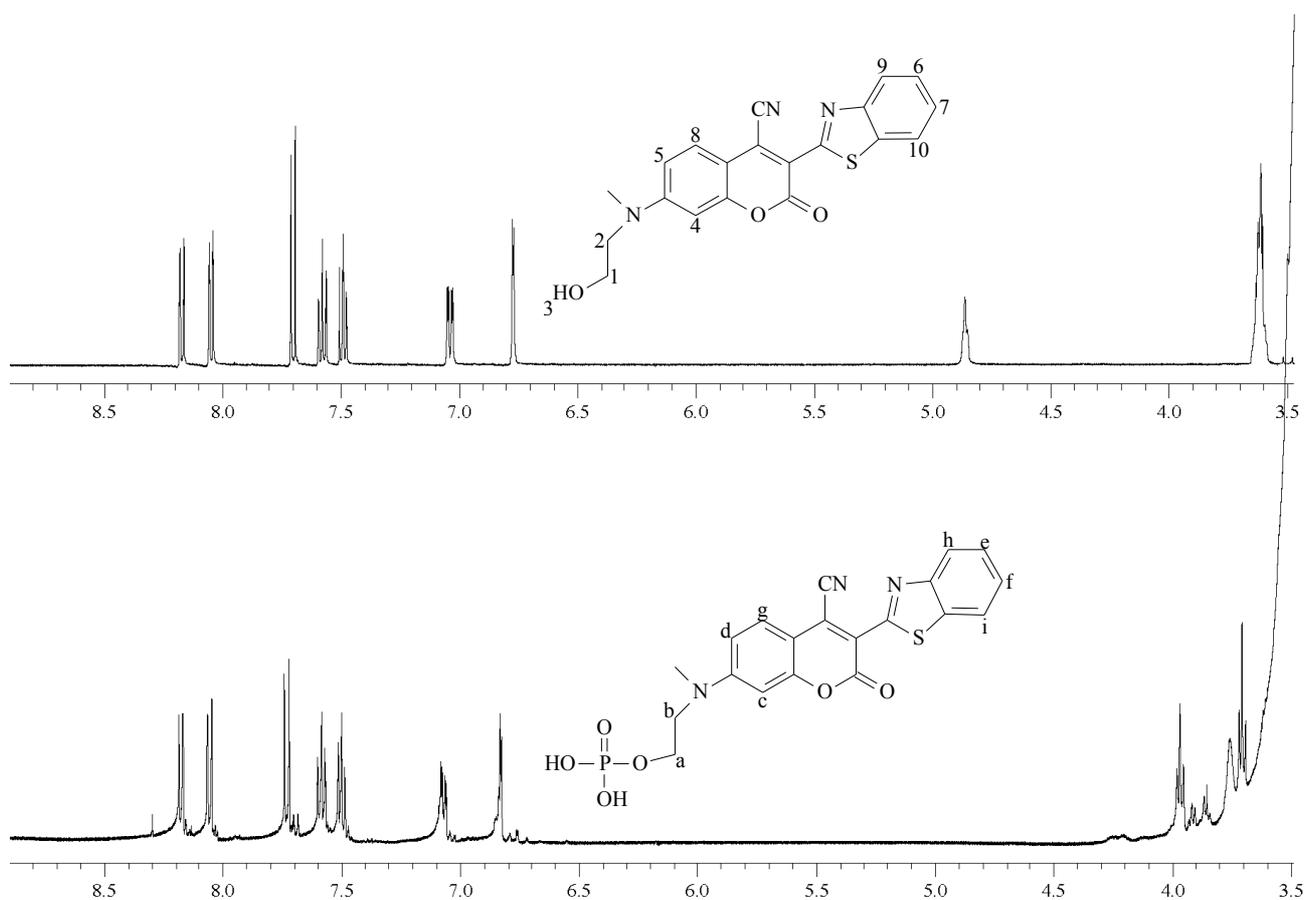


Abbildung 44: Ausschnitte aus den $^1\text{H-NMR}$ Spektren von **55** (oben) und **74** (unten) in DMSO-d_6 (500MHz)

Tabelle 3: Zuordnung der ^1H -NMR-Signale von **55** (Zahlen) und **74** (Buchstaben)

<i>Zuordnung</i>	<i>chem. Verschiebung (ppm)</i>	<i>Intensität</i>	<i>Multiplizität</i>	<i>Kopplung</i>
1,2	3,60	4H	s	
3	4,85	1H	s	
4	6,78	1H	s	
5	7,04	1H	dd	$^3J_{\text{HH}} = 9,3 \text{ Hz}$ $^4J_{\text{HH}} = 2,4 \text{ Hz}$
6	7,48	1H	t	$^3J_{\text{HH}} = 8,2 \text{ Hz}$
7	7,57	1H	t	$^3J_{\text{HH}} = 7,1 \text{ Hz}$
8	7,69	1H	d	$^3J_{\text{HH}} = 9,2 \text{ Hz}$
9	8,04	1H	d	$^3J_{\text{HH}} = 8,2 \text{ Hz}$
10	8,16	1H	d	$^3J_{\text{HH}} = 8,0 \text{ Hz}$
a	3,70	2H	t	$^3J_{\text{HH}} = 6,7 \text{ Hz}$
b	3,96	2H	t	$^3J_{\text{HH}} = 7,0 \text{ Hz}$
c	6,83	1H	s	
d	7,07	1H	dd	$^3J_{\text{HH}} = 9,2 \text{ Hz}$ $^4J_{\text{HH}} = 2,5 \text{ Hz}$
e	7,5	1H	t	$^3J_{\text{HH}} = 8,1 \text{ Hz}$
f	7,58	1H	t	$^3J_{\text{HH}} = 8,2 \text{ Hz}$
g	7,73	1H	d	$^3J_{\text{HH}} = 9,1 \text{ Hz}$
h	8,05	1H	d	$^3J_{\text{HH}} = 8,1 \text{ Hz}$
i	8,17	1H	d	$^3J_{\text{HH}} = 7,9 \text{ Hz}$

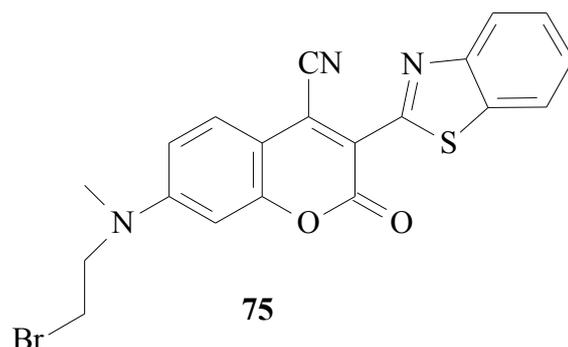
Auch das $^3\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR Spektrum zeigt, daß das gewünschte Produkt entstanden ist. Es ist genau ein Signal zu sehen, also konnten andere phosphorhaltige Produkte durch die gewählte Reinigungsmethode entfernt werden.

Mit dem Phosphordimorpholinobromid **73** scheint nun ein Reagenz gefunden, das reaktiv genug ist, um universell zur Phosphorylierung eingesetzt zu werden. Ein Nachteil allerdings ist die lange

Reaktionszeit. Es zeigt sich, das diese bei Durchführung bei Raumtemperatur mindestens 24 Stunden dauern muß, sonst wird der Anteil an nicht umgesetztem, isoliertem Edukt zu groß. Deshalb soll die Reaktion nun bei einer höheren Temperatur durchgeführt werden, um so die Reaktionszeit zu verkürzen.

Hierzu wird das Cumarin 55 in wenig DMPU gelöst. Als Base wird etwas DIEA zugesetzt. Die Mischung wird auf 0 °C im Eis/Kochsalzbad abgekühlt. Da sich die zähflüssige Lösung des Phosphordimorpholinobromids 73 in Chloroform nur schlecht zutropfen läßt, wird sie wiederum in sechs Portionen im Abstand von je fünf Minuten zugegeben. Dann wird noch eine Stunde bei 0 °C weitergerührt und schließlich auf 70 °C Ölbadtemperatur erwärmt. So wird für weitere zwei Stunden gerührt. Es schließt sich die übliche Aufarbeitung und Isolierung an. So erhält man ein violetteres Pulver. Das ¹H-NMR Spektrum zeigt auch hier, daß das Signal des Alkoholprotons bei 4,85 ppm verschwunden ist und auch die Methylenprotonen zeigen zwei Signale. Doch im ³¹P{¹H}-

V49



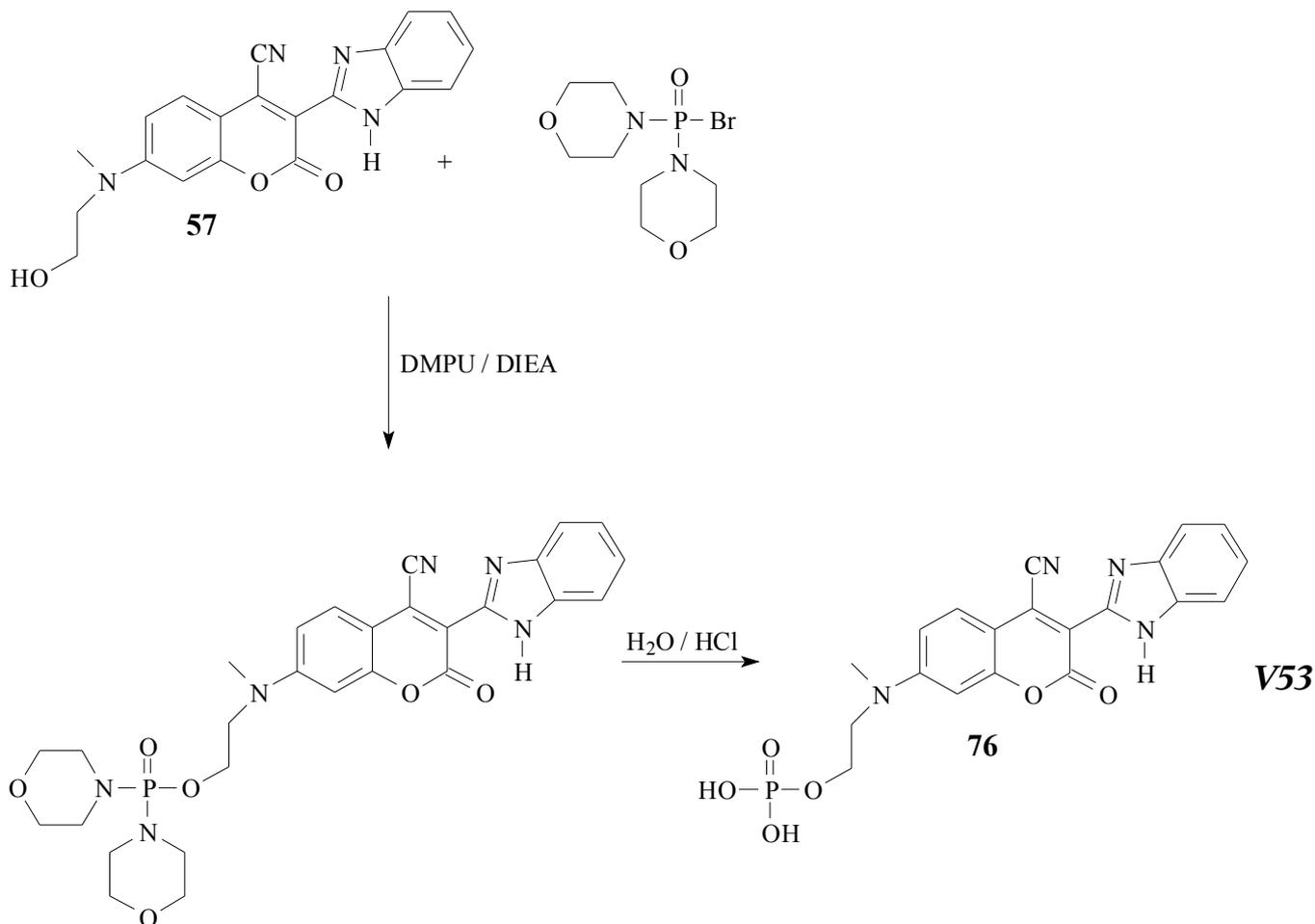
NMR Spektrum ist kein Signal zu erkennen. Die Identifizierung des Reaktionsproduktes gelingt mit Hilfe der Massenspektrometrie. Der M⁺-Peak von 440 zeigt, daß das bisher literaturunbekannte 3-(2-Benzthiazolyl)-4-cyano-7-[N-(2-bromomethyl)-N-methylamino]cumarin 75 erhalten wurde. Wie bei Phosphoroxchlorid beschrieben^[136], schließt sich auch an die Phosphorylierung durch 73 bei höheren Reaktionstemperaturen eine nucleophile Substitution durch das Halogenidion an, so daß das Halogenid statt des Monophosphorsäureesters erhalten wird. Will man also eine Phosphorylierung erzielen, muß die lange Reaktionsdauer hingenommen werden.

Analog wird daher das Cumarin 3-(2-Benzthiazolyl)-4-cyano-7-[N-(2-hydroxyethyl)-N-methylamino]cumarin 57 nach der bewährten Methode in wenig DMPU gelöst und die Mischung mit DIEA als Base versetzt. Die Mischung wird auf 0 °C im Eis/Kochsalzbad abgekühlt. Wiederum wird die zähflüssige Lösung des Reagenzes 73 in Chloroform in sechs Portionen wie oben beschrieben zugegeben. Dann wird noch eine Stunde bei 0 °C weitergerührt, bevor auf

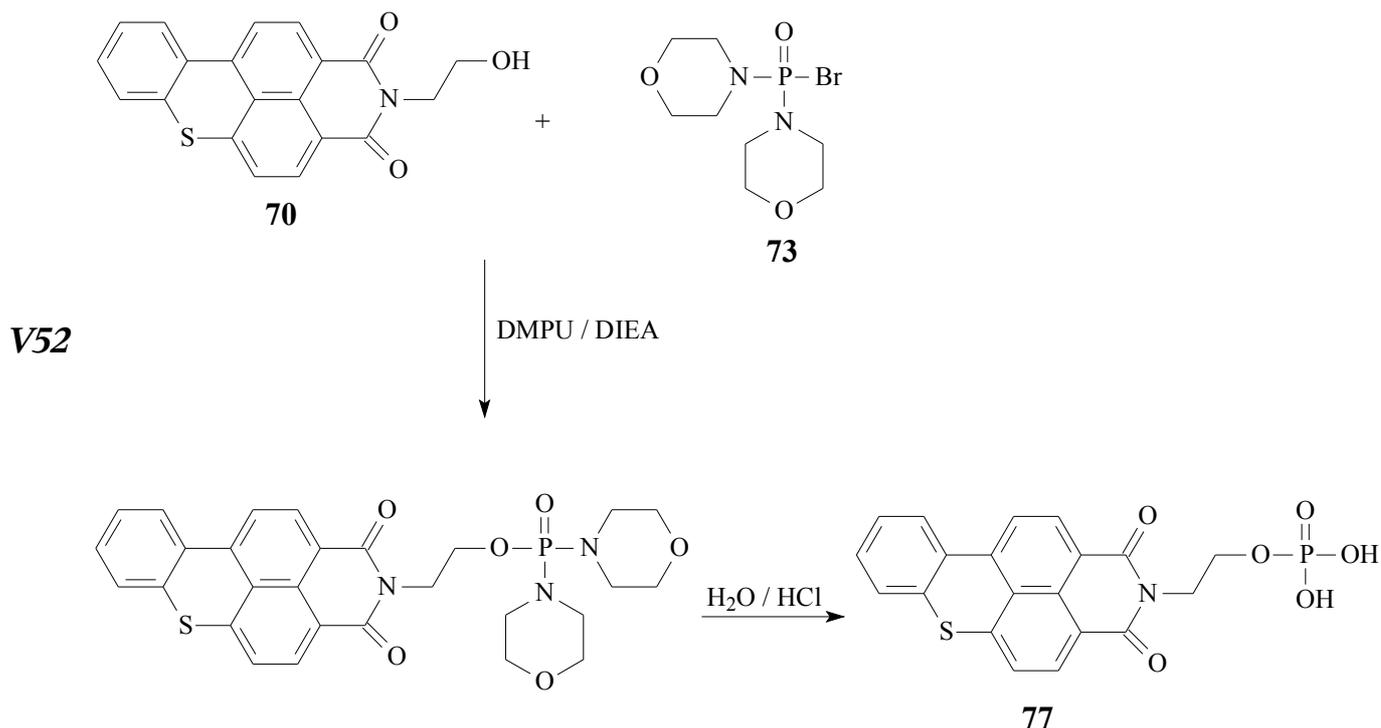
Raumtemperatur aufgewärmt und weitere 24 Stunden so weitergerührt wird.

Um die beiden Morpholinreste abzuspalten, wird nun etwas verdünnte Salzsäure zugegeben und für einige Stunden weitergerührt. Dann wird die Reaktionsmischung in viel Wasser gegeben woraufhin ein violetter Feststoff ausfällt, der isoliert und getrocknet wird. Die Analyse mittels $^1\text{H-NMR}$ und $^{31}\text{P-NMR}$ Spektroskopie zeigt, daß der Feststoff neben dem Produkt Cumarin **76** noch nicht umgesetztes Cumarin **57** und Phosphorsäure enthält. Zur Reinigung wird die Mischung in konzentriertem Ammoniak gerührt. Dabei geht der Monophosphorsäureester **76** als Ammoniumsalz in Lösung. Der Rückstand wird abfiltriert und das Filtrat wird in verdünnte Salzsäure gegeben. Dabei erhält man das Produkt **76** als feines, violettes Pulver, welches isoliert und getrocknet wird.

Das so erstmals synthetisierte Cumarin **76** ist in allen getesteten Lösungsmitteln gar nicht oder nur schlecht löslich. Am besten löst es sich in Basen wie konzentrierter Ammoniaklösung oder Natronlauge. Diese zerstören den Farbstoff jedoch recht schnell durch die Öffnung des Lactonringes.

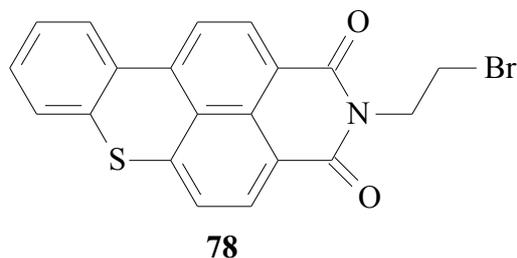


Als letztes soll auch das Perylen **70** mit dem Reagenz **73** umgesetzt werden. So wird **70** in wenig HMPA oder besser in wenig DMPU gelöst und mit DIEA als Base versetzt. Die Mischung wird auf 0 °C im Eis/Kochsalzbad abgekühlt und die zähflüssige Lösung des Reagenzes **73** in Chloroform in sechs Portionen im Abstand von je fünf Minuten zugegeben. Dann wird noch eine Stunde bei 0 °C weitergerührt, bevor auf Raumtemperatur aufgewärmt und weitere 24 Stunden so weitergerührt wird.



Um die beiden Morpholinreste abzuspalten wird nun etwas verdünnte Salzsäure zugegeben und für einige Stunden weitergerührt. Dann wird die Reaktionsmischung in viel Wasser gegeben woraufhin ein oranger Feststoff ausfällt, der isoliert und getrocknet wird. Die Untersuchung des Produktes **77** mittels ¹H-NMR Spektroskopie zeigt, daß das Signal des Alkoholprotons des Eduktes **70** bei 4,60 ppm verschwunden ist. Gleichzeitig zeigt das ³¹P{¹H}-NMR Spektrum genau ein Signal. Das gewünschte Produkt **77** konnte so synthetisiert werden.

Wird diese Reaktion so durchgeführt, daß die Reaktionsmischung einige Stunden auf 70 °C Ölbadtemperatur erwärmt wird oder wenn beim Zutropfen des Reagenzes **73** nicht ausreichend gekühlt wird, so daß die Temperatur der Mischung wärmer als 40 °C wird, erhält man statt des erwarteten Produktes **77** das bisher nicht literaturbekannte Perylen 2-(2-Bromethyl)thioxanthen-[2,1,9-*def*]isoquinolin-1,3-dion **78**.

**V51**

Mit dem Phosphordimorpholinbromid **73** konnte also ein Reagenz gefunden werden, das sich zur Phosphorylierung von Hydroxyalkylverbindungen hervorragend eignet. Trotz der recht aufwendigen Handhabung lohnt sich der Einsatz, da das Reagenz so reaktiv ist, daß unter sehr milden Bedingungen gearbeitet werden kann. Gleichzeitig ist das Reagenz gegen verdünnte Säuren unbeständig genug, um die Morpholinschutzgruppen einfach und schonend abzuspalten. So konnten die Monophosphorsäureester der Hydroxyalkylverbindungen Cumarin **55** und Cumarin **57**, sowie des Perylenderivates **77**, erfolgreich dargestellt werden.

4. Fluoreszenzspektroskopie

4.1. Allgemeines

Im Folgenden werden die Einflüsse unterschiedlicher funktioneller Gruppen der dargestellten Cumarinderivate auf das Fluoreszenzverhalten untersucht. Dazu wird die Fluoreszenzquantenausbeute in verschiedenen Lösungsmitteln ermittelt und mit der Fluoreszenzquantenausbeute der Phosphorsäureester in Wasser verglichen.

Da die apparativen Möglichkeiten im Arbeitskreis begrenzt sind, kann die Bestimmung der Feststofffluoreszenzquantenausbeute im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. Werden Proben des Pulvers aber der Strahlung einer UV-Lampe ausgesetzt (354 nm), so ist bei den 7-Aminocumarinderivaten **53**, **55**, **58**, **75**, **74**, **57**, **59**, **76** und **62** eine orange-rote Fluoreszenz zu erkennen, bei den Verbindungen **69** und **76** wird ein grün-oranges Fluoreszenzlicht beobachtet. Nur die Verbindungen **68** und **69** zeigen keine mit dem bloßen Auge erkennbare Fluoreszenz. Die Bestimmung der Feststofffluoreszenzquantenausbeute soll von der Firma Bayer als Teil einer Kooperation durchgeführt werden.

4.2. Apparatur

Die Fluoreszenzspektren werden auf einem Jasco FP-6200 Spektrofluorometer mit einer 90° Anordnung von Anregungslichtquelle und Fluoreszenzdetektor aufgenommen. Als Software zur Steuerung des Gerätes wird 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

4.3. Korrektur der Fluoreszenzspektren

Die in DMSO, in DMF, in Ethanol, in Chloroform und in Wasser aufgenommenen Emissionsspektren werden im Folgenden durch Vergleich mit dem literaturbekannten Emissionsspektrum von 4-Dicyanomethylen-2[4-(dimethylamino)styryl]-6-methyl-4H-pyran *DCM* in Acetonitril korrigiert^[137].

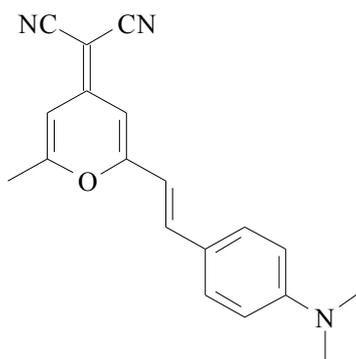


Abbildung 45: Struktur
von *DCM*

4.4. Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten

Die Lumineszenzquantenausbeute Φ stellt den Bruchteil angeregter Moleküle dar, der direkt nach der Anregung ein Photon emittiert, sei es als Phosphoreszenz (Φ_p) oder als Fluoreszenz (Φ_f). Der Wert liegt definitionsgemäß zwischen 0 und 1 und entspricht in vielen Fällen dem Quotienten aus emittierten und absorbierten Photonen.

Gleichung 1:

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

Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_f läßt sich auch durch folgende kinetische Größen beschreiben:

Gleichung 2:

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

mit:

k_F = Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz,

k_{IC} = Geschwindigkeitskonstante der Internal Conversion,

k_{ISC} = Geschwindigkeitskonstante des Intersystem Crossing,

k_{ET} = Geschwindigkeitskonstante des Energietransfers,

τ = Fluoreszenzlebensdauer,

I_F = Intensität der Fluoreszenz,

I_A = Intensität der Absorption.

Zur Ermittlung der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_f sind folgende Methoden prinzipiell geeignet:

Die Absolutbestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_f , bei der die eingestrahnten und emittierten Photonen direkt gemessen werden. Diese Methode ist allerdings sehr aufwendig und zeitraubend und setzt eine entsprechende apparative Ausstattung des Labors voraus.

Es gibt aber auch relative Meßmethoden, bei denen die Fluoreszenzquantenausbeute einer Standardsubstanz mit der Probe unter analogen Meßbedingungen verglichen wird. J. N. DEMAS und G. A. CROSBY^[138] beschreiben unter anderem auch die Methode der optisch verdünnten Lösungen, bei der die Fluoreszenzquantenausbeute über einen relativen Vergleich des Emissionsspektrums einer zu Untersuchenden Substanz X mit dem eines Referenzmoleküls R , dessen absolut gemessene Quantenausbeute Φ_f literaturbekannt ist, bestimmt wird. Dazu müssen die zu Untersuchenden Lösungen so verdünnt sein, daß für die Fluoreszenz ein linearer Zusammenhang zwischen Anregungslicht und Fluoreszenz angenommen werden kann. Dazu muß die Absorbanz unter einem Wert von 0,05 liegen, da die Intensität der Fluoreszenz I_F (Gleichung 2) nur bei kleinen Absorbanzen linear von der Konzentration abhängt^[143]. Gleichzeitig lassen sich so Fehler durch die Reabsorption des Fluoreszenzlichtes minimieren.

Die Absorbanz wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben (*Gleichung 3*).

Gleichung 3:

$$A = \log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon \cdot c \cdot d$$

mit:

A = Absorbanz,

I = Intensität des austretenden Lichtstrahls,

I_0 = Intensität des einfallenden Lichtstrahls,

ϵ = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient,

c = Konzentration der Probe (mol/l),

d = Schichtdicke (cm).

Mit folgender Formel läßt sich nun die Quantenausbeute einer unbekanntes Substanz einfach bestimmen:

Gleichung 4:

$$\Phi_X = \Phi_R \cdot \frac{F_X}{F_R} \cdot \frac{A_R(\lambda)}{A_X(\lambda)} \cdot \frac{n_X^2}{n_R^2} \cdot \frac{I_R(\lambda)}{I_X(\lambda)}$$

mit:

Index R für Referenzsubstanz, Index X für unbekanntes Substanz,

Φ = Fluoreszenzquantenausbeute,

F = integrale Fluoreszenz des korrigierten Emissionsspektrums,

$A(\lambda)$ = Absorbanz bei der Wellenlänge λ ,

n = Brechungsindex,

$I(\lambda)$ = relative Intensität des Anregungslichtes bei der Wellenlänge λ .

Es müssen also Absorptionsspektren und Fluoreszenzemissionsspektren der Referenzsubstanz und der zu untersuchenden Substanz aufgenommen werden. Letztere müssen korrigiert werden, um

die wellenlängenabhängig unterschiedliche Empfindlichkeit des Detektors auszugleichen. Aus diesen Spektren lassen sich die Absorbanz A und das Integral unter der Fluoreszenzemissionskurve F für beide Substanzen bestimmen. Mit der bekannten Fluoreszenzquantenausbeute Φ_R der Referenzsubstanz läßt sich nun die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_X der unbekanntes Substanz berechnen. Zwei weitere Korrekturterme berücksichtigen, daß die unbekanntes und die Referenzsubstanz in verschiedenen Lösungsmitteln gelöst seien können und das bei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt werden kann. Letzteres läßt sich in diesem Falle umgehen, da als Referenzsubstanz *DCM* gewählt wurde, dessen Absorptionsbande eine ähnliche Lage hat, wie die der unbekanntes Substanz. So lassen sich beide Fluoreszenzspektren bei der gleichen Anregungswellenlänge aufnehmen und die Intensitäten I können näherungsweise gleich gesetzt werden. So entfällt dann der Quotient der Intensitäten des Anregungslichtes aus I_R und I_X .

Voraussetzung für die Gültigkeit dieser Formel sind die Annahmen, daß:

- die Absorbanz einen Wert von 0,05 nicht überschreitet,
- Reabsorption und Reemission vernachlässigbar sind,
- für unbekanntes und Referenzsubstanz gleiche Streulichtverhältnisse gelten,
- die Geometrie der Meßanordnung und die Reflexionsverluste gleich sind^[138].

Diese Voraussetzungen werden von der verwendeten Meßapparatur und den Meßbedingungen erfüllt.

Von allen Farbstoffen werden, abhängig von ihrer Absorptionsbande, mindesten zwei Fluoreszenzspektren bei 420 nm und 470 nm oder bei 470 nm und 500 nm Anregungswellenlänge aufgenommen. Die so berechneten Werte werden gemittelt.

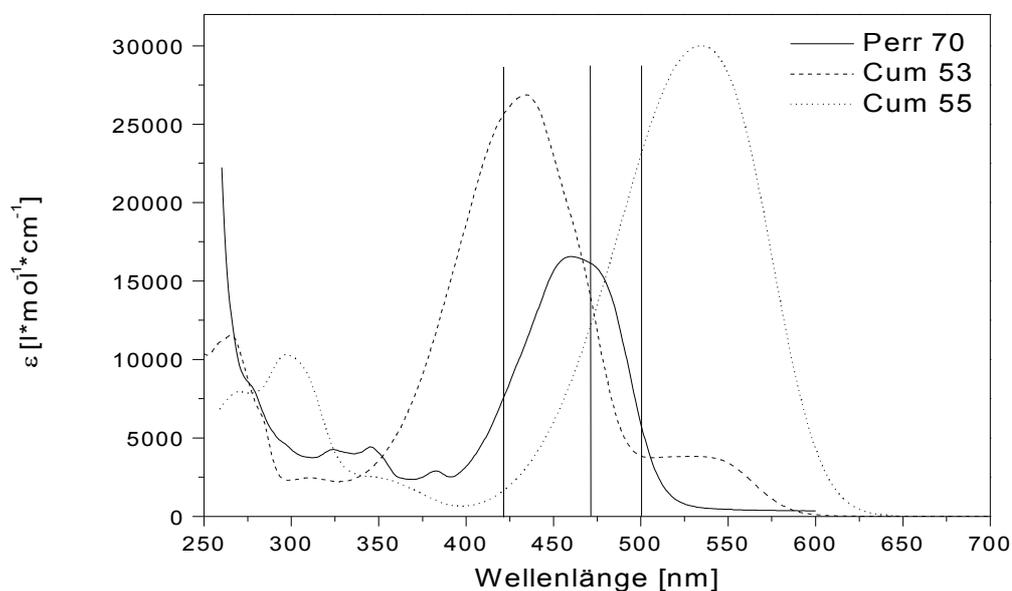


Abbildung 46: UV-Vis Spektren einiger untersuchter Substanzen Per **70**, Cum **53** und Cum **55** in Ethanol, mit Kennzeichnung der Anregungswellenlängen (420, 470 und 500 nm)

Die Anregungswellenlängen sind so gewählt, daß die Fluoreszenzquantenausbeute aller zu untersuchenden Verbindungen mit DCM als Referenzsubstanz bestimmt werden können.

Die Anregungswellenlänge von 420 nm trifft etwa das Absorptionsmaximum des Cumarinderivats **53** und die blaue Flanke des Perylenderivates **70**, während das Cumarin **55** hier kaum absorbiert. Deshalb werden die 7-Aminocumarinderivate bei dieser Wellenlänge nicht vermessen. Die Anregungswellenlänge von 470 nm trifft das Absorptionsmaximum der Verbindung **70**, die rote Flanke der Absorptionsbande von Cumarin **53** und die blaue Flanke des Cumarins **55**, während eine Anregungswellenlänge von 500 nm nur noch vom Cumarin **55** gut absorbiert wird. Messungen bei einer Anregungswellenlänge von 500 nm werden deshalb nur an den 7-Aminocumarinderivaten durchgeführt.

Im Spektrum der Verbindung Cumarin **53** ist ein kleines, zweites Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von etwa 550 nm zu sehen. Dies stammt von dem Phenolat des Cumarins und tritt in allen hier benutzten Lösungsmitteln auf. Das Gleichgewicht zwischen Phenol und Phenolat führt dazu, daß Absorptionsmaximum und auch Fluoreszenzmaximum der Verbindung pH-abhängig sind.

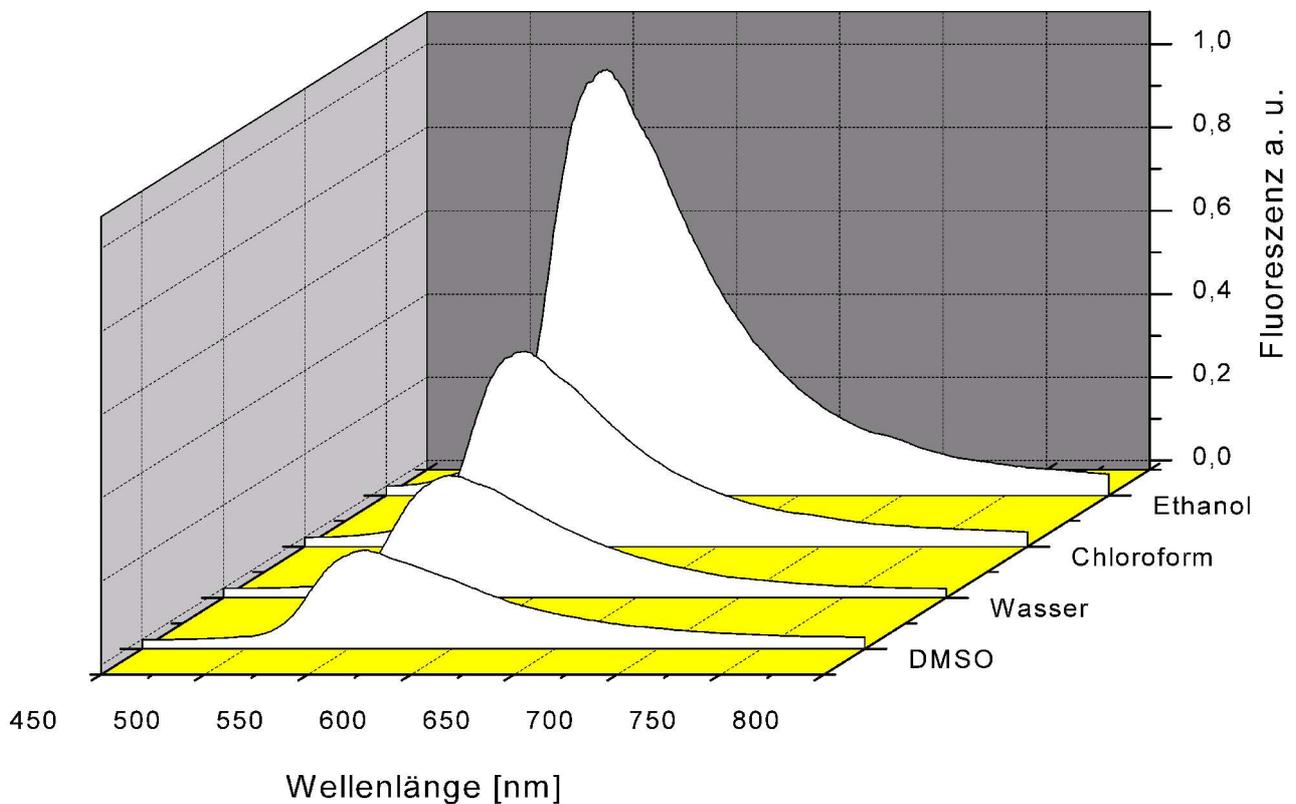


Abbildung 47: Korrigierte Fluoreszenzspektren von Cumarin **69** in verschiedenen Lösungsmitteln.
Anregungswellenlänge: 420 nm

In **Abbildung 48** auf *Seite 107* sind die untersuchten Substanzen mit ihren Strukturformeln abgebildet.

Cumarine als präzipitierende Fluorophore - Fluoreszenzspektroskopie

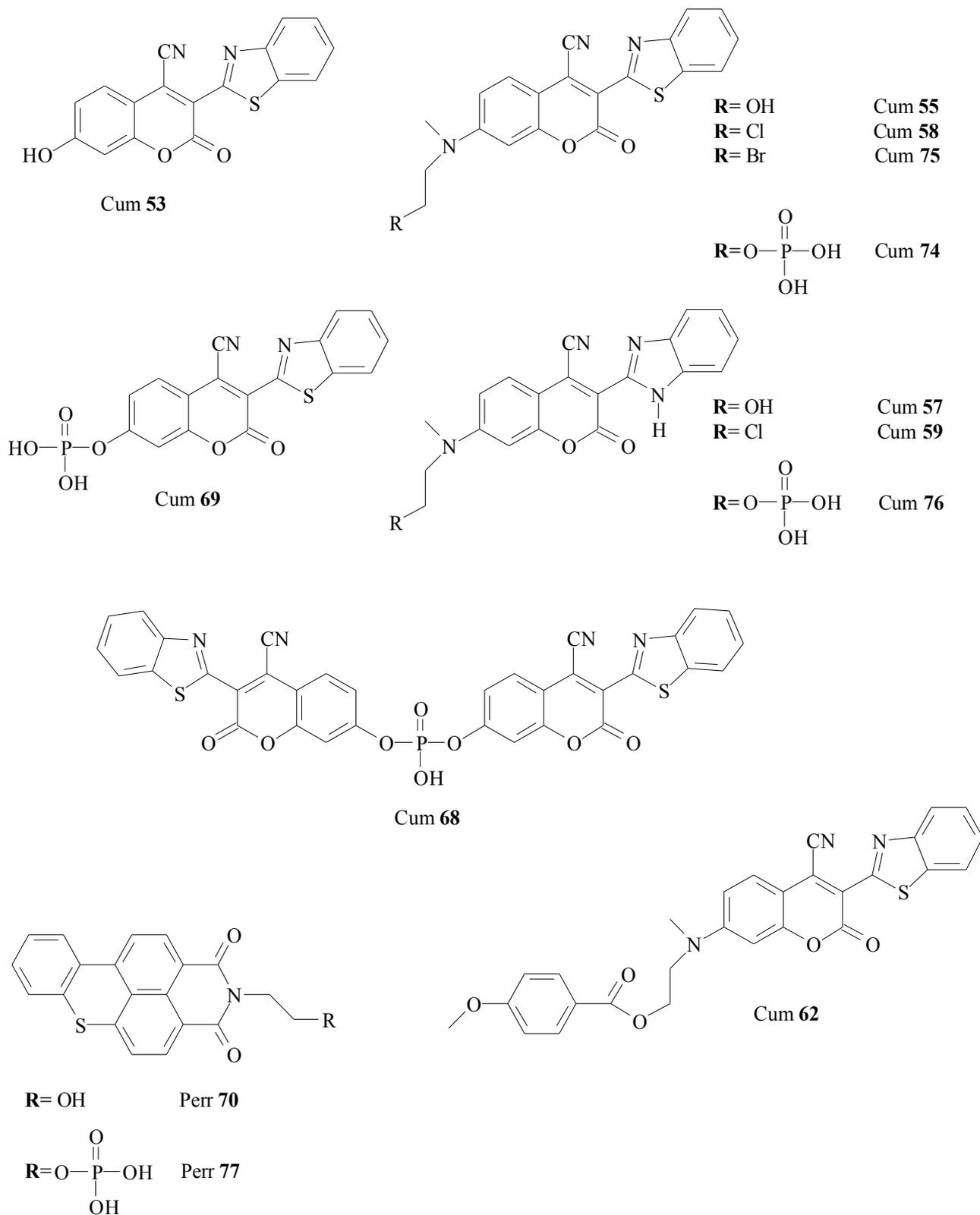


Abbildung 48: Übersicht der untersuchten Farbstoffe

4.5. Bestimmung der Quantenausbeute in DMSO

Tabelle 4: Fluoreszenzquantenausbeuten in DMSO. Referenz ist DCM mit $\Phi_f = 0,60^{[137]}$ in Acetonitril

Verbindung	λ_{exc} [nm]	λ_{em} [nm]	F	F_{max}	A	F/A	Φ_f	$\overline{\Phi_f}$
				[nm]				
DCM	420	500-800	5,33E+09	624	0,028180	1,89E+11	0,60	
in	470	500-800	8,67E+09	624	0,046440	1,87E+11	0,60	
Acetonitril	490	500-800	7,10E+09	624	0,036990	1,92E+11	0,60	
	500	500-800	5,52E+09	624	0,029110	1,90E+11	0,60	
Cum 55	470	500-800	2,19E+09	630	0,016620	1,32E+11	0,51	0,52
	500	500-800	4,28E+09	632	0,031280	1,37E+11	0,52	
Cum 74	470	500-800	4,02E+09	618	0,022220	1,81E+11	0,70	0,71
	500	500-800	6,92E+09	618	0,036950	1,87E+11	0,72	
Cum 57	470	500-800	4,10E+09	622	0,024260	1,69E+11	0,66	0,68
	500	500-800	6,09E+09	622	0,033980	1,79E+11	0,69	
Cum 62	470	500-800	3,97E+09	623	0,017760	2,23E+11	0,87	0,87
	500	500-800	7,09E+09	623	0,031500	2,25E+11	0,86	
Cum 76	470	500-800	6,16E+09	608	0,041270	1,49E+11	0,58	0,61
	490	500-800	7,70E+09	608	0,046490	1,66E+11	0,63	
Cum 58	470	500-800	8,91E+09	608	0,038700	2,30E+11	0,90	0,92
	500	500-800	1,11E+10	608	0,045520	2,45E+11	0,94	
Cum 59	470	500-800	5,77E+09	618	0,027380	2,11E+11	0,82	0,85
	500	500-800	9,61E+09	618	0,042400	2,27E+11	0,87	
Cum 53	420	450-800	1,73E+09	559	0,030680	5,63E+10	0,22	0,23

Cumarine als präzipitierende Fluorophore - Fluoreszenzspektroskopie

Verbindung	λ_{exc} [nm]	λ_{em} [nm]	F	F_{max}	A	F/A	Φ_f	$\bar{\Phi}_f$
				[nm]				
	470	450-800	1,18E+09	559	0,020240	5,81E+10	0,23	
Cum 69	420	450-800	7,64E+08	557	0,047440	1,61E+10	0,06	
	470	450-800	5,33E+08	559	0,010940	4,87E+10	0,19	
Cum 68	420	450-800	3,80E+08	557	0,047010	8,08E+09	0,03	
	470	450-800	2,95E+08	555	0,013270	2,23E+10	0,09	
Perr 70	420	450-800	3,51E+09	555	0,014030	2,50E+11	0,96	0,93
	470	450-800	7,85E+09	555	0,034340	2,29E+11	0,89	
Perr 77	420	450-800	2,22E+09	555	0,012670	1,75E+11	0,67	0,72
	470	450-800	5,24E+09	555	0,026600	1,97E+11	0,77	
Cum 75	420	500-800	1,05E+09	618	0,004220	2,49E+11	0,96	0,95
	470	500-800	6,24E+09	618	0,026210	2,38E+11	0,93	

Die Meßgenauigkeit der Fluoreszenzspektroskopie liegt im Bereich von $\pm 10\%$ ^[143]. Bei den 7-Aminocumarinderivaten liegen die Meßwerte der Fluoreszenzquantenausbeute für die Wellenlängen 470 nm und 500 nm für eine Substanz zwischen 1 % und 9 % auseinander. Damit kann angenommen werden, daß die Werte gleich sind und damit die Fluoreszenzquantenausbeute in diesem Bereich konstant ist. Deshalb können gemittelte Fluoreszenzquantenausbeuten angegeben werden. Das gleiche gilt für die Perylenderivate und das Cumarin 53. Die Phosphorsäureester **69** und **68** allerdings zeigen eine starke Abhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute von der Anregungswellenlänge. Gleichzeitig ist hier mit $\Phi_f = 0,06$ für Cumarin **69** und $\Phi_f = 0,03$ für Cumarin **68** eine signifikant geringere Fluoreszenzquantenausbeute, als bei der Stammverbindung Cumarin **53** mit $\Phi_f = 0,23$, zu beobachten. Der Phosphorsäurerest kann, direkt am Chromophor, die Fluoreszenz quenchen.

Die Fluoreszenzquantenausbeute der 7-Aminocumarinderivate mit Halogenresten ist, mit Werten von $\Phi_f = 0,92$ für Cumarin **58**, $\Phi_f = 0,95$ für Cumarin **75** und $\Phi_f = 0,85$ für Cumarin **59** besonders hoch. Die Werte unterscheiden sich nur um höchstens 11 % und sind bei der angegeben

Meßgenauigkeit gleich, wie auch die Fluoreszenzquantenausbeute $\Phi_f = 0,87$ des Cumarin **62**. Vergleicht man die Fluoreszenzquantenausbeute des Cumarins **55** mit Hydroxylrest mit $\Phi_f = 0,52$ mit dem phosphorylierten Derivat Cumarin **73** mit $\Phi_f = 0,71$, so ist entgegen der Erwartung kein Rückgang der Fluoreszenz, sondern sogar ein Anstieg zu beobachten. Auch die Fluoreszenzquantenausbeute $\Phi_f = 0,68$ des Cumarins **57** mit Hydroxylrest ist, im Rahmen der Meßgenauigkeit, nicht größer als die des phosphorylierten Derivates Cumarin **76** mit $\Phi_f = 0,61$. Bei diesen Verbindungen kann der Phosphorsäurerest die Fluoreszenz in DMSO nicht quenchen.

Ein Rückgang der Fluoreszenzquantenausbeute von 29 % ist bei der Phosphorylierung des Perylenderivates **70** ($\Phi_f = 0,93$) zu **77** ($\Phi_f = 0,72$) zu beobachten, obwohl die Phosphorsäuregruppe ähnlich weit vom Chromophor entfernt ist, wie bei den 7-Aminocumarinderivaten.

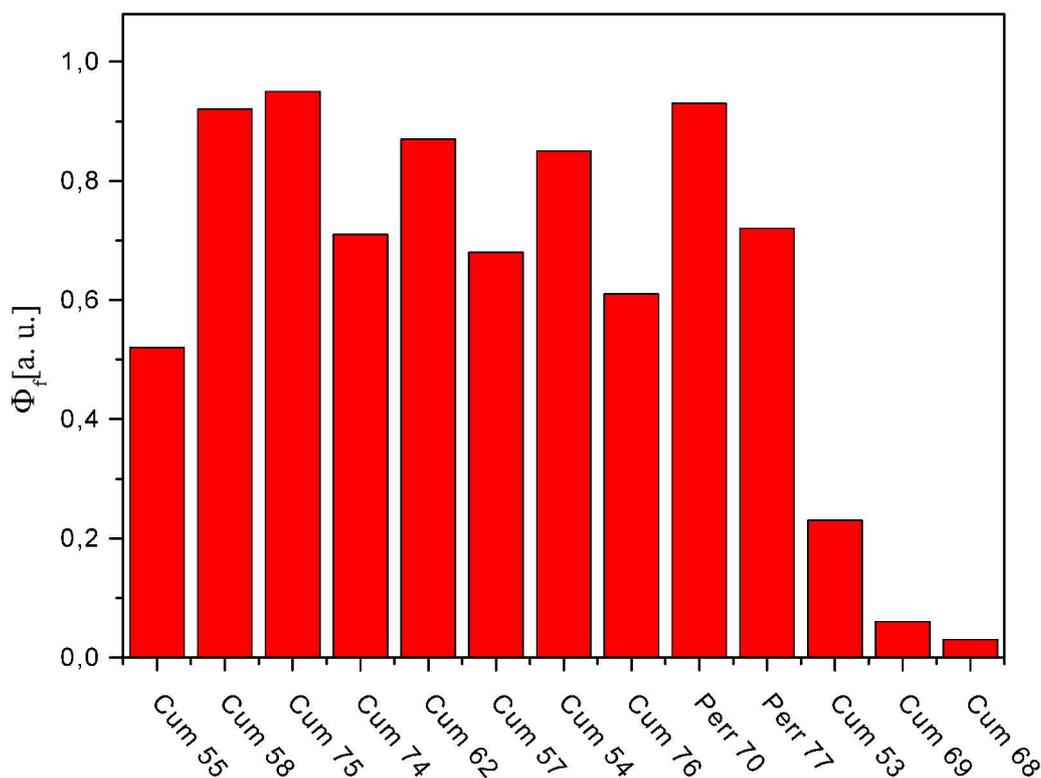


Abbildung 49: Mittlere Fluoreszenzquantenausbeute in DMSO, bei Cum **69** und Cum **68** die Fluoreszenzquantenausbeute bei einer Anregungswellenlänge von 420 nm

4.6. Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute in Ethanol

Tabelle 5: Fluoreszenzquantenausbeuten in Ethanol. Referenz ist DCM mit $\Phi_f = 0,60^{[137]}$ in Acetonitril

Verbindung	λ_{exc} [nm]	λ_{em} [nm]	F	F_{max} [nm]	A	F/A	Φ_f	$\overline{\Phi_f}$
DCM	420	500-800	5,33E+09	624	0,028180	1,89E+11	0,60	
in	470	500-800	8,67E+09	624	0,046440	1,87E+11	0,60	
Acetonitril	490	500-800	7,10E+09	624	0,036990	1,92E+11	0,60	
	500	500-800	5,52E+09	624	0,029110	1,90E+11	0,60	
Cum 55	470	500-800	2,86E+09	612	0,015430	1,85E+11	0,61	0,61
	500	500-800	7,73E+09	612	0,025200	1,88E+11	0,61	
Cum 74	470	500-800	7,82E+09	602	0,033380	2,34E+11	0,77	0,77
	500	500-800	1,09E+10	602	0,045750	2,39E+11	0,77	
Cum 57	470	500-800	6,50E+09	608	0,037070	1,75E+11	0,58	0,59
	500	500-800	7,68E+09	608	0,042290	1,82E+11	0,59	
Cum 62	470	500-800	2,37E+09	608	0,028010	8,45E+10	0,28	
	500	500-800	3,57E+09	608	0,033650	1,06E+11	0,34	
Cum 76	470	500-800	6,74E+09	598	0,041040	1,64E+11	0,54	0,56
	490	500-800	7,22E+09	598	0,040820	1,77E+11	0,57	
Cum 58	470	500-800	1,19E+10	598	0,046020	2,58E+11	0,85	0,86
	500	500-800	1,13E+10	598	0,042570	2,66E+11	0,86	
Cum 59	470	500-800	8,60E+09	601	0,030630	2,81E+11	0,92	0,93
	500	500-800	1,17E+10	601	0,040500	2,89E+11	0,93	
Cum 53	420	450-800	7,22E+09	559	0,041610	1,73E+11	0,56	0,59

Cumarine als präzipitierende Fluorophore - Fluoreszenzspektroskopie

Verbindung	λ_{exc} [nm]	λ_{em} [nm]	F	F_{max} [nm]	A	F/A	Φ_f	$\overline{\Phi_f}$
	470	450-800	4,24E+09	559	0,022620	1,87E+11	0,62	
Cum 69	420	450-800	3,46E+09	557	0,038620	8,97E+10	0,29	
	470	450-800	1,06E+09	557	0,010200	1,04E+11	0,34	
Cum 68	420	450-800	7,44E+08	557	0,045790	1,63E+10	0,05	
	470	450-800	2,33E+08	586	0,006200	3,76E+10	0,12	
Perr 70	420	450-800	5,03E+09	553	0,017300	2,91E+11	0,94	0,91
	470	450-800	1,11E+10	553	0,041140	2,69E+11	0,88	
Perr 77	420	450-800	3,30E+09	555	0,013700	2,41E+11	0,78	0,77
	470	450-800	7,38E+09	555	0,032310	2,29E+11	0,75	
Cum 75	420	500-800	1,89E+09	601	0,005989	3,15E+11	1,02	1,02
	470	500-800	9,05E+09	601	0,029180	3,10E+11	1,02	

In Ethanol stimmen die Werte der Fluoreszenzquantenausbeute der 7-Aminocumarinderivate, gemessen bei 470 nm und bei 500 nm, im Rahmen der Meßgenauigkeit überein. So wird auch hier für die Cumarine 55, 74, 57, 76, 58, 59 und 75 eine mittlere Fluoreszenzquantenausbeute bestimmt. Die Abweichungen zwischen den Meßwerten für eine Substanz liegen dabei zwischen 0 % und 6 %. Eine Ausnahme in dieser Reihe stellt das Cumarin 62 dar, bei dem eine Abhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute von der Wellenlänge beobachtet wurde. Gleichzeitig ist die gemessene Fluoreszenzquantenausbeute mit $\Phi_f = 0,34$ bei einer Anregungswellenlänge von 500 nm auch deutlich niedriger als die der restlichen 7-Aminocumarine, deren gemittelte Fluoreszenzquantenausbeute bei $\Phi_f = 0,72$ liegt. Dieser Effekt ist wohl auf die unpolare Struktur dieses Moleküls zurückzuführen, das im polaren Ethanol, selbst in dieser Verdünnung, Aggregate bildet, die nicht fluoreszieren.

Die Fluoreszenzquantenausbeuten der halogensubstituierten Cumarine 58, 75 und 59 sind im Rahmen der Meßgenauigkeit gleich.

Der Vergleich der Fluoreszenzquantenausbeute des hydroxylsubstituierten Cumarins 55

($\Phi_f = 0,61$) mit der Fluoreszenzquantenausbeute des phosphorylierten Derivates Cumarin **74** ($\Phi_f = 0,77$), wie auch der Vergleich zwischen dem hydroxylsubstituierten Cumarin **57** ($\Phi_f = 0,59$) und dem Derivat mit Phosphorsäurerest Cumarin **76** ($\Phi_f = 0,56$) zeigt, daß die Phosphorsäuregruppe die Fluoreszenz in Ethanol nicht quencht.

Die Fluoreszenzquantenausbeuten der Perylenderivate **70** und **77** sind ebenfalls unabhängig von der Wellenlänge, so daß gemittelte Fluoreszenzquantenausbeuten angegeben werden können. Bei diesen Verbindungen ist ein um 18 % größere Fluoreszenzquantenausbeute des Hydroxylderivates **70** ($\Phi_f = 0,91$) als bei dem phosphorylierten Derivat **77** ($\Phi_f = 0,77$) zu beobachten. Offensichtlich ist die Phosphorsäuregruppe in der Lage die Fluoreszenzquantenausbeute zu verringern.

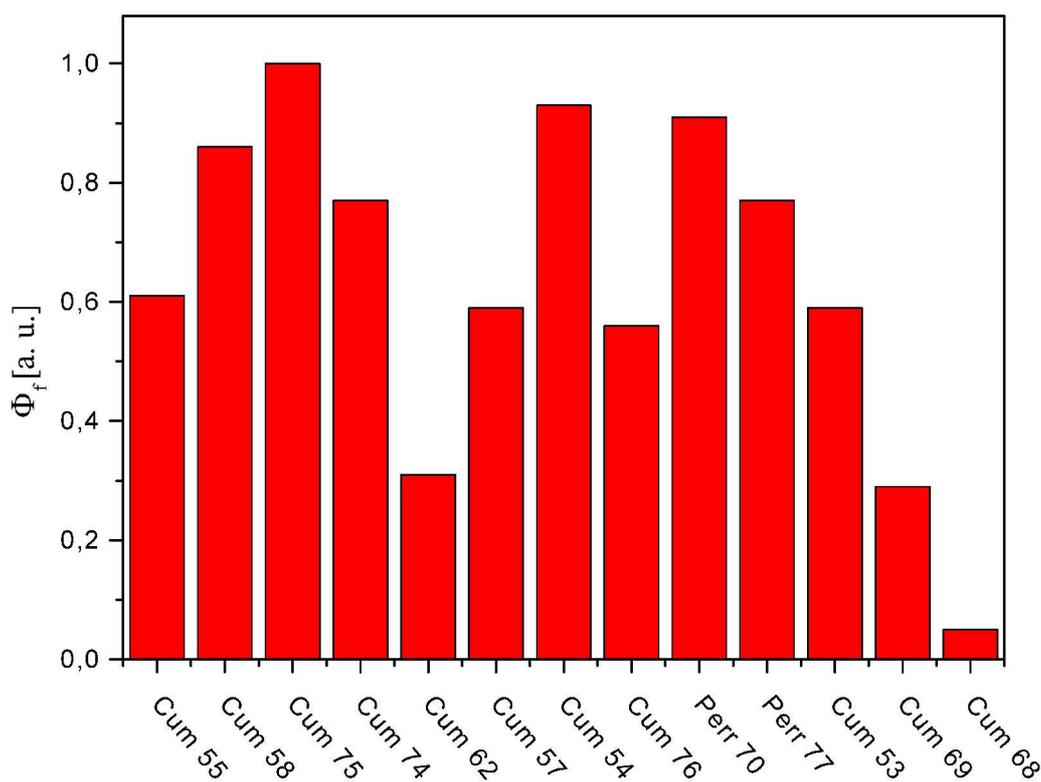


Abbildung 50: Mittlere Fluoreszenzquantenausbeute, bei Cum **62**, Cum **69** und Cum **68**
 Fluoreszenzquantenausbeute bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm, in Ethanol

Die 7-Hydroxycumarinderivate **53**, **69** und **68** zeigen eine Abhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute von der Anregungswellenlänge. Die Phosphorsäuregruppe senkt die Fluoreszenzquantenausbeute der Derivate **69** ($\Phi_f = 0,29$) und **68** ($\Phi_f = 0,05$) gegenüber der Stammverbindung **53** ($\Phi_f = 0,59$), alles gemessen bei einer Anregungswellenlänge von 420 nm, deutlich auf 50 %, respektive auf 8 % für das Derivat **68**. Direkt am Chromophor ist die Phosphorsäuregruppe in Ethanol in der Lage, die Fluoreszenzquantenausbeute stark zu verringern.

4.7. Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute in Chloroform

Tabelle 6: Fluoreszenzquantenausbeute in Chloroform. Referenz ist DCM mit $\Phi_f = 0,60^{[137]}$ in

Acetonitril

Verbindung	λ_{exc} [nm]	λ_{em} [nm]	F	F_{max} [nm]	A	F/A	Φ_f	$\overline{\Phi}_f$
DCM	420	500-800	5,33E+09	624	0,028180	1,89E+011	0,60	
in	470	500-800	8,67E+09	624	0,046440	1,87E+011	0,60	
Acetonitril	490	500-800	7,10E+09	624	0,036990	1,92E+011	0,60	
	500	500-800	5,52E+09	624	0,029110	1,90E+011	0,60	
Cum 55	470	500-800	8,65E+09	582	0,036600	2,36E+011	0,88	0,93
	500	500-800	1,21E+10	582	0,045000	2,68E+011	0,98	
Cum 74	470	500-800	7,21E+09	569	0,027360	2,64E+011	0,98	0,99
	500	500-800	9,49E+09	569	0,034960	2,71E+011	0,99	
Cum 57	470	500-800	8,80E+09	581	0,032270	2,73E+011	0,99	0,98
	500	500-800	1,26E+10	581	0,047390	2,66E+011	0,97	
Cum 62	470	500-800	6,87E+09	575	0,025710	2,67E+011	0,99	1,00
	500	500-800	9,93E+09	575	0,036330	2,73E+011	1,00	
Cum 76	470	500-800	7,47E+09	569	0,037980	1,97E+011	0,73	0,77
	490	500-800	9,55E+09	575	0,043180	2,21E+011	0,80	
Cum 58	470	500-800	9,41E+09	569	0,035380	2,66E+011	0,99	1,00
	500	500-800	1,21E+10	575	0,044240	2,73E+011	1,00	
Cum 59	470	500-800	9,51E+09	566	0,036600	2,60E+011	0,97	0,98
	500	500-800	1,21E+10	566	0,045000	2,68E+011	0,98	

Cumarine als präzipitierende Fluorophore - Fluoreszenzspektroskopie

Verbindung	λ_{exc} [nm]	λ_{em} [nm]	F	F_{max} [nm]	A	F/A	Φ_f	$\overline{\Phi}_f$
Cum 53	420	450-800	6,62E+09	555	0,040105	1,65E+011	0,61	
	470	450-800	4,29E+09	555	0,020410	2,10E+011	0,78	
Cum 69	420	450-800	1,53E+09	557	0,042180	3,64E+010	0,13	
	470	450-800	9,20E+08	557	0,014290	6,44E+010	0,24	
Cum 68	420	450-800	6,45E+08	557	0,041000	1,57E+010	0,06	0,06
	470	450-800	1,79E+08	559	0,011900	1,51E+010	0,06	
Perr 70	420	450-800	2,80E+09	553	0,011945	2,34E+011	0,86	0,85
	470	450-800	8,02E+09	553	0,035520	2,26E+011	0,84	
Perr 77	420	450-800	2,55E+09	553	0,014000	1,82E+011	0,67	0,70
	470	450-800	7,20E+09	553	0,036990	1,95E+011	0,72	
Cum 75	420	500-800	2,34E+09	566	0,008593	2,72E+011	1,00	1,00
	470	500-800	1,10E+10	566	0,041020	2,68E+011	1,00	

Die 7-Aminocumarinderivate **55**, **58**, **75**, **74**, **62**, **57**, **59** und **76** zeigen in Chloroform im Rahmen der Meßgenauigkeit keine Abhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute von der Anregungswellenlänge. So kann eine gemittelte Fluoreszenzquantenausbeute für diese Derivate angegeben werden. Diese gemittelten Fluoreszenzquantenausbeuten sind für alle 7-Aminocumarinderivate im Rahmen der Meßgenauigkeit gleich. Bildet man eine gemittelte Fluoreszenzquantenausbeute aller 7-Aminocumarinderivate so erhält man mit $\Phi_f = 0,96$ einen Wert von dem nur die phosphorylierte Verbindung **76** mit $\Phi_f = 0,77$ nach unten abweicht. Ob dies aber auf ein quenchen der Fluoreszenz durch die Phosphorsäuregruppe zurückzuführen ist scheint zweifelhaft, da das zweite Cumarin mit Phosphorsäurerest **74** mit $\Phi_f = 0,99$ eine sehr hohe Fluoreszenz zeigt. Insgesamt sind die Fluoreszenzquantenausbeuten der 7-Aminocumarinderivate in Chloroform sehr hoch.

Die Verringerung der Fluoreszenzquantenausbeute bei polaren Lösungsmitteln ist auf strahlungslose Desaktivierungen, als Konkurrenzprozeß zur Fluoreszenz, zurückzuführen. Im Falle

der positiven Solvatochromie ist bei polaren Lösungsmitteln eine bathochrome Verschiebung des Emissionsmaximums zu beobachten. Das bedeutet, daß sich der Grundzustand und der erste elektronisch angeregte Zustand energetisch annähern, wodurch die Wahrscheinlichkeit strahlungsloser Übergänge zunimmt und sich so die Fluoreszenzquantenausbeute verringert. Strahlungslose Übergänge zwischen verschiedenen Zuständen sind immer dann besonders wahrscheinlich, wenn sich die Potentialhyperflächen der entsprechenden Zustände berühren oder zumindest nahekomen^[139].

Die Fluoreszenzquantenausbeuten der Perylenderivate **70** und **77** in Chloroform zeigen keine Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge. Die gemittelte Fluoreszenzquantenausbeute der phosphorylierten Verbindung **77** ist mit $\Phi_f = 0,70$ um 18 % kleiner als die der Stammverbindung **70**. Auch in Chloroform ist der Phosphorsäurerest in der Lage, die Fluoreszenzquantenausbeute deutlich zu verringern.

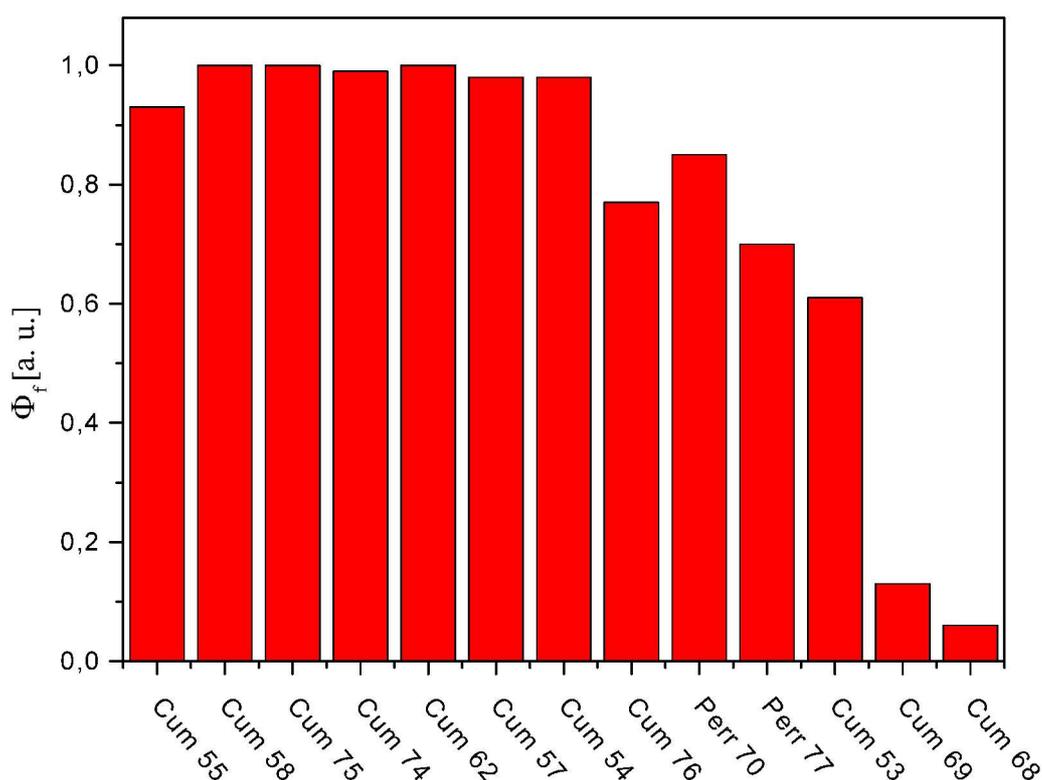


Abbildung 51: Mittlere Fluoreszenzquantenausbeute, bei Cum 53 und Cum 69
Fluoreszenzquantenausbeute bei einer Anregungswellenlänge von 420 nm, in Chloroform

Die Fluoreszenzquantenausbeuten der 7-Hydroxycumarinderivate **53** und **69** zeigt eine Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge. So kann nur für **68** eine gemittelte Fluoreszenzquantenausbeute angegeben werden. Die phosphorylierten Derivate **69** ($\Phi_f = 0,13$) und **68** ($\Phi_f = 0,06$) zeigen eine um 79 % bzw. um 90 % geringere Fluoreszenzquantenausbeute, verglichen mit der Verbindung **53** mit $\Phi_f = 0,61$, alle Werte gemessen bei einer Anregungswellenlänge von 420 nm. Auch in Chloroform verringert die Phosphorsäuregruppe die Fluoreszenzquantenausbeute der 7-Hydroxycumarine signifikant.

4.8. Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute in Wasser

Tabelle 7: Fluoreszenzquantenausbeute in Wasser. Referenz ist DCM mit $\Phi_f = 0,60^{[137]}$ in Acetonitril

Verbindung	λ_{exc} [nm]	λ_{em} [nm]	F	F_{max}	A	F/A	Φ_f	$\overline{\Phi_f}$
DCM	420	500-800	5,33E+09	624	0,028180	1,89E+11	0,60	
in	470	500-800	8,67E+09	624	0,046440	1,87E+11	0,60	
Acetonitril	490	500-800	7,10E+09	624	0,036990	1,92E+11	0,60	
	500	500-800	5,52E+09	624	0,029110	1,90E+11	0,60	
Cum 74	470	500-800	2,68E+08	625	0,028630	9,34E+09	0,03	
	500	500-800	4,21E+08	625	0,033010	1,28E+10	0,04	
Cum 76	470	500-800	4,18E+08	622	0,041140	1,02E+10	0,03	
	490	500-800	4,92E+08	622	0,030350	1,62E+10	0,05	
Cum 69	420	450-800	9,36E+08	559	0,038320	2,44E+10	0,08	0,08
	470	450-800	3,86E+08	565	0,015670	2,46E+10	0,08	
Cum 68	420	450-800	1,63E+08	590	0,033715	4,82E+09	0,01	0,01
	470	450-800	1,18E+08	588	0,029760	3,95E+09	0,01	
Perr 77	470	450-800	2,77E+09	547	0,041140	6,74E+10	0,21	0,22
	500	450-800	2,28E+09	547	0,030490	7,46E+10	0,23	

Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute in Wasser. Es fällt auf, daß die Fluoreszenzquantenausbeuten aller vermessenen Verbindungen sehr klein sind, viel kleiner als in den anderen untersuchten Lösungsmitteln. Auch die 7-Aminocumarinderivate zeigen in Wasser nur eine sehr schwache Fluoreszenz. Hier dient das Wasser als

Fluoreszenzlöscher.

Ein Lösungsmittel, wie zum Beispiel Wasser, dessen Schwingungsniveaux weit auseinander liegen, können die Quanten der elektronischen Übergänge übernehmen und so als Fluoreszenzlöscher wirken^[140].

Die prozentualen Abweichungen der Fluoreszenzquantenausbeute der Derivate **74** und **76** sind so groß, daß nicht von einer Unabhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute von der Anregungswellenlänge ausgegangen werden kann. Deshalb werden für diese Verbindungen keine gemittelten Fluoreszenzquantenausbeuten angegeben.

Das Perylenderivat **77** zeigt mit einer Fluoreszenzquantenausbeute von $\Phi_f = 0,22$ einen verhältnismäßig hohen Wert, während die 7-Hydroxyderivate Cumarin **69** und **68** in Wasser ähnlich kleine Werte zeigen wie in den anderen Lösungsmitteln. Das Perylenderivat zeigt in Wasser darüber hinaus eine starke Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Wellenlänge.

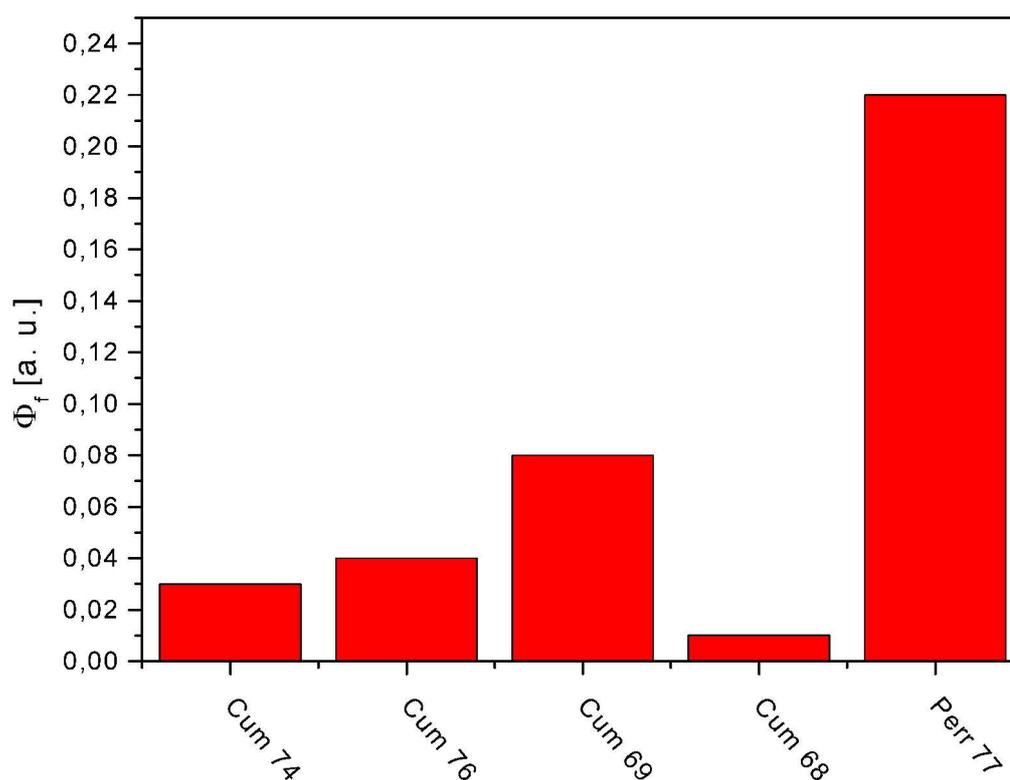


Abbildung 52: Mittlere Fluoreszenzquantenausbeuten, bei Cum **74** und Cum **76**
Fluoreszenzquantenausbeuten bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm, in Wasser

4.9. Vergleich der Fluoreszenzquantenausbeuten

Ein Farbstoffsystem, wie es im Rahmen dieser Arbeit angestrebt wird, zur Verwendung beim *high throughput screening* besteht aus einem phosphorylierten Farbstoff, der im Anwendungsmedium Wasser löslich ist und möglichst nicht fluoresziert. Wird durch die alkalische Phosphatase das Hydroxyderivat freigesetzt, entsteht ein fluoreszierender Niederschlag. Da die Feststofffluoreszenz im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden kann, soll nun die Fluoreszenzquantenausbeute der Hydroxyderivate in verschiedenen organischen Lösungsmitteln mit dem Fluoreszenzverhalten der phosphorylierten Derivate in Wasser verglichen werden.

Die Fluoreszenzquantenausbeute des Cumarins **55** mit Hydroxygruppe ist in organischen Lösungsmitteln signifikant höher als die Fluoreszenzquantenausbeute des phosphorylierten Derivates **74**. So sinkt die Fluoreszenzquantenausbeute von **55** von $\Phi_f = 0,93$ in Chloroform auf $\Phi_f = 0,03$ für die Fluoreszenzquantenausbeute von **74** in Wasser. Das sind 3 % der Ausgangsfluoreszenz. Vergleicht man den Wert für die Fluoreszenzquantenausbeute in Ethanol für **55** mit dem in Wasser für **74**, so ergibt sich eine Fluoreszenzquantenausbeute von 5 % und für DMSO von 6 % der Ausgangsfluoreszenz.

Beim Vergleich der Fluoreszenzquantenausbeute des Hydroxycumarins **57** mit der Fluoreszenzquantenausbeute des phosphorylierten Derivates **76**, ergibt sich eine Verringerung der Fluoreszenzquantenausbeute in Wasser auf 3 % der Fluoreszenzquantenausbeute in Chloroform, 5 % der Fluoreszenzquantenausbeute in Ethanol und 4 % der Fluoreszenzquantenausbeute in DMSO.

Durch die geringere Fluoreszenzquantenausbeute des 7-Hydroxycumarinderivates **53** in den getesteten organischen Lösungsmitteln, ist die Differenz zur Fluoreszenzquantenausbeute der phosphorylierten Derivate **69** und **68** geringer als bei den 7-Aminocumarinderivaten. So ergibt sich, beim Vergleich der Fluoreszenzquantenausbeute von **53** in Chloroform mit der Fluoreszenzquantenausbeute von **69** in Wasser, eine Verringerung auf 13 %, beim Vergleich mit der Fluoreszenzquantenausbeute von **68** in Wasser ein Rückgang auf 2 %. Für die entsprechenden Messungen in Ethanol werden 14 % der Fluoreszenzquantenausbeute von **53** für **69** und 2 % für **68** ermittelt. Die Messungen in DMSO, in dem für das Hydroxycumarinderivat **53** eine geringe Fluoreszenzquantenausbeute von $\Phi_f = 0,23$ zu beobachten ist, ergeben eine Fluoreszenz-

quantenausbeute für **69** von 35 % und für **68** von 4 % relativ zur Fluoreszenzquantenausbeute von **53**.

Das Perylenderivat **77** fluoresziert mit einer gemittelten Fluoreszenzquantenausbeute von $\Phi_f = 0,22$ relativ gut in Wasser. Dieser Wert entspricht 26 % der Fluoreszenzquantenausbeute von **70** in Chloroform, 24 % der Fluoreszenzquantenausbeute von **70** in Ethanol und 24 % der Fluoreszenzquantenausbeute von **70** in DMSO.

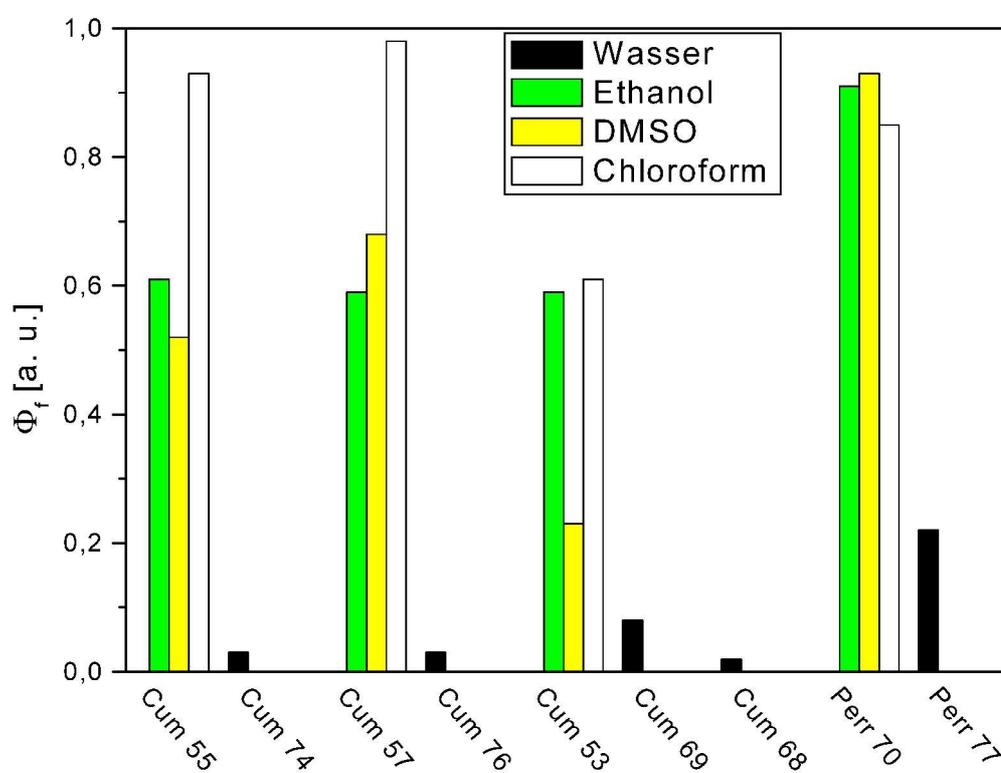


Abbildung 53: Vergleich der Fluoreszenzquantenausbeute verschiedener Hydroxyverbindungen in organischen Lösungsmitteln mit der Fluoreszenzquantenausbeute ihrer phosphorylierter Derivate in Wasser

Alle untersuchten Farbstoffsysteme zeigen einen großen Unterschied in den Fluoreszenzquantenausbeuten zwischen der phosphorylierten Form und dem Hydroxyderivat. Besonders die 7-Aminocumarinderivate entsprechen durch die geringe Fluoreszenzquantenausbeute

des phosphorylierten Derivats in Wasser, den im Kapitel 2 aufgestellten spektroskopischen Anforderungen an ein ELF-Farbstoffsystem für den Einsatz im *high throughput screening*.

4.10. Untersuchungen zur Solvatochromie und des Stokes Shifts

Der Stokes Shift ist die Wellenlängendifferenz zwischen dem Absorptions- und dem Emissionsmaximum. Dieser Wert ist charakteristisch für die jeweilige Substanz. In der folgenden Tabelle 8, ist die Lage der Absorptions- und Emissionsmaxima, sowie die Größe des Stokes Shifts für die untersuchten Substanzen in den verwendeten Lösungsmitteln DMSO, Ethanol, Chloroform und Wasser angegeben.

Tabelle 8: Absorptions- und Emissionsmaxima, sowie Stokes Shift

Verbindung	Lösungsmittel	λ_{\max}	λ_{\max}	Stokes Shift	Stokes Shift
		[nm]	[nm]	$(\lambda_{em}-\lambda_{exc})$ [nm]	$(\tilde{\nu}_{exc}-\tilde{\nu}_{em})$ [cm^{-1}]
		± 2	± 5	± 3	$\pm 5 \%$
Cum 55	DMSO	534	631	97	2879
	Ethanol	517	612	95	3002
	Chloroform	504	582	78	2659
Cum 74	DMSO	518	618	100	3124
	Ethanol	505	602	97	3191
	Chloroform	497	569	72	2546
	Wasser	497	625	128	4121
Cum 57	DMSO	509	622	113	3569
	Ethanol	493	608	115	3837
	Chloroform	503	581	78	2669
Cum 62	DMSO	523	623	100	3069
	Ethanol	513	608	95	3046
	Chloroform	497	575	78	2729

Cumarine als präzipitierende Fluorophore - Fluoreszenzspektroskopie

Verbindung	Lösungsmittel	λ_{\max}	F_{\max}	Stokes Shift	Stokes Shift
		[nm]	[nm]	$(\lambda_{em}-\lambda_{exc})$ [nm]	$(\tilde{\nu}_{exc}-\tilde{\nu}_{em})$ [cm^{-1}]
		± 2	± 5	± 3	$\pm 5 \%$
Cum 76	DMSO	496	608	112	3714
	Ethanol	480	598	118	4111
	Chloroform	492	572	80	2843
	Wasser	480	622	142	4756
Cum 58	DMSO	496	608	112	3714
	Ethanol	480	598	118	4111
	Chloroform	492	572	80	2843
Cum 59	DMSO	517	618	101	3161
	Ethanol	501	601	100	3321
	Chloroform	492	566	74	2657
Cum 53	DMSO	437	559	122	4994
	Ethanol	433	559	126	5206
	Chloroform	434	555	121	5023
Cum 69	DMSO	416	558	142	6117
	Ethanol	418	557	139	5970
	Chloroform	417	557	140	6027
	Wasser	421	562	141	5959
Cum68	DMSO	419	556	137	5881
	Ethanol	411	557	146	6378
	Chloroform	417	558	141	6060
	Wasser	443	589	146	5595
Perr 70	DMSO	458	555	97	3816

Verbindung	Lösungsmittel	λ_{\max}	F_{\max}	Stokes Shift	Stokes Shift
		[nm]	[nm]	$(\lambda_{em}-\lambda_{exc})$ [nm]	$(\tilde{\nu}_{exc}-\tilde{\nu}_{em})$ [cm^{-1}]
		± 2	± 5	± 3	$\pm 5 \%$
	Ethanol	460	553	93	3656
	Chloroform	464	553	89	3469
Perr 77	DMSO	459	555	96	3768
	Ethanol	464	555	91	3534
	Chloroform	463	553	90	3515
	Wasser	469	547	78	3040
Cum 75	DMSO	519	618	99	3087
	Ethanol	503	601	98	3242
	Chloroform	493	566	73	2616

Der über alle vermessenen Substanzen gemittelte Stokes Shift liegt in Chloroform bei 3512 cm^{-1} , in DMSO bei 3915 cm^{-1} , in Ethanol bei 4047 cm^{-1} und in Wasser bei 4253 cm^{-1} . Diese Abhängigkeit des Stokes Shiftes vom Lösungsmittel ist nur bei den 7-Aminocumarinderivaten zu beobachten. Der Stokes Shift der 7-Aminocumarinderivate liegt, gemittelt über alle vermessenen Derivate, in organischen Lösungsmitteln, mit 2695 cm^{-1} in Chloroform, 3290 cm^{-1} in DMSO und 3482 cm^{-1} in Ethanol etwas unter dem Durchschnitt aller Verbindungen. Doch entsprechen diese Werte der Stammverbindung 3-(2'-Benzthiazolyl)-4-cyano-7-diethylaminocumarin (**Abbildung 13**). Die auch in Wasser gemessenen Derivate Cumarin **74** und **76** zeigen mit 4121 cm^{-1} und 4756 cm^{-1} einen recht großen Stokes Shift. Besonders das Farbstoffsystem aus der Verbindung **57** und ihrem phosphorylierten Derivat **76** zeigen mit gemittelt 3358 cm^{-1} für **57** in organischen Lösungsmitteln und 4756 cm^{-1} für **76** in Wasser einen Stokes Shift, der eine einfache Abtrennung des Fluoreszenzlichtes von gestreutem Anregungslicht durch optische Filter ermöglicht.

Der Stokes Shift der Perylenderivate **70** und **77** ist innerhalb der Meßunsicherheit von 5 % für alle untersuchten Lösungsmittel gleich. Er liegt bei 3647 cm^{-1} für **70** und 3606 cm^{-1} für **77** in organischen Lösungsmitteln. Nur der Wert von **77** in Wasser ist mit 3040 cm^{-1} deutlich kleiner und

auch unter dem Durchschnitt aller gemittelter Meßwerte in Wasser.

Auch die Stokes Shifts der drei 7-Hydroxycumarinderivate **53**, **69** und **68** sind unabhängig vom Lösungsmittel, alle Werte liegen in der Fehlerbreite von 5 %. Hier weichen auch die beiden Werte von **69** und **68** in Wasser, mit 5959 cm^{-1} und 5595 cm^{-1} nicht ab. Auffällig sind hier die sehr großen Stokes Shifts. Sie liegen für alle drei Derivate deutlich über 5000 cm^{-1} . Cumarin **69** zeigt mit einem gemittelten Stokes Shift von 6018 cm^{-1} die höchsten Werte in dieser Meßreihe.

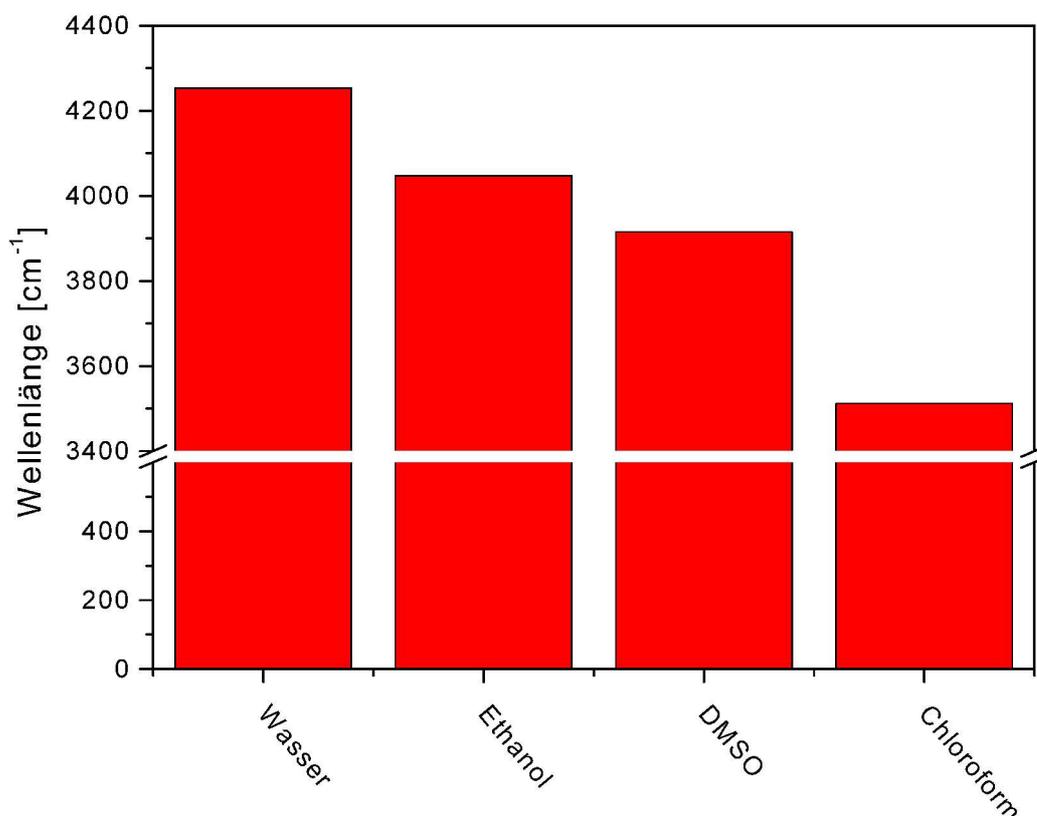


Abbildung 54: Stokes Shift, gemittelt über alle untersuchten Substanzen, in Wasser, Ethanol, DMSO und Chloroform

Die Wellenlänge der Emissionsmaxima der untersuchten 7-Aminocumarinderivate nimmt mit steigender Polarität des Lösungsmittels, von Chloroform, über Ethanol bis zum DMSO, zu (**Abbildung 55**). Dieser Trend ist auch für die Absorption der Derivate **55**, **74**, **62**, **59** und **75** zu beobachten. Die Absorptionsmaxima der Cumarine **57**, **76** und **58** steigen dagegen in der Reihenfolge Ethanol, Chloroform und DMSO an. Die Absorptionsmaxima des Cumarins **76** in Ethanol und Wasser sind mit 480 nm gleich. Die Absorption in Wasser ist bei allen vermessenen

Derivaten etwas hypsochrom verschoben. Dadurch ergibt sich gleichzeitig ein sehr großer Stokes Shift in Wasser. Die Substanzen zeigen also eine leichte positive Solvatochromie, die für Merocyanine dieses Typs zu erwarten ist^[141].

Der Prozeß der elektronischen Anregung findet in nur 10^{-15} Sekunden statt, dabei geht die Anregung vom untersten Schwingungsniveau des elektronischen Grundzustands S_0 aus in ein höheres Schwingungsniveau des Singulettzustandes S_1 , während die Reorientierung der Kerne und die Lösungsmittelmoleküle der Solvathülle mit 10^{-10} Sekunden wesentlich länger brauchen (Frank-Condon Prinzip)^[142]. Durch diese Neuorientierung wird die Energie des elektronisch angeregten Zustandes etwas abgesenkt. Erst jetzt erfolgt in einer Zeitspanne von etwa 10^{-9} Sekunden, nach der Relaxation in den vibronischen Grundzustand des angeregten Singulettzustandes S_1 , die Emission und Rückkehr in den elektronischen Grundzustand, bei der die Reorientierung der Kerne und der Solvathülle wieder um einen gewissen Zeitfaktor später erfolgen. So ist dieser Frank-Condon Zustand S_0^{FC} zum Zeitpunkt der Emission etwas energiereicher als der Zustand S_0 zu Beginn des Prozesses^[143].

Die elektronische Anregung der 7-Aminocumarinderivate ist ein *Charge-Transfer* Übergang, bei dem der angeregte Zustand S_1 polarer ist als der Grundzustand S_0 . Ein polares Lösungsmittel wird so den angeregten Zustand besser stabilisieren als ein weniger polares Lösungsmittel. In polaren Lösungsmitteln werden die Maxima der Emissionsbanden der 7-Aminocumarinderivate so bathochrom verschoben.

Zur Veranschaulichung des Lösungsmiteleinflusses auf die Lage des Emissionsmaximums, sind die Emissionsbanden des Cumarins **55** in Chloroform, Ethanol und DMSO in **Abbildung 56** auf *Seite 130* dargestellt.

Erfolgt die Emission allerdings besonders schnell, so bleibt der Solvathülle keine Zeit sich zu Reorientieren. Dann hat die Polarität des Lösungsmittels keinen Einfluß auf die Lage des Emissionsmaximums. Dies kann bei den 7-Hydroxycumarinderivaten Cumarin **53**, Cumarin **69** und Cumarin **68** beobachtet werden. Absorption und Emission sind in allen untersuchten Lösungsmitteln innerhalb der Meßunsicherheit gleich.

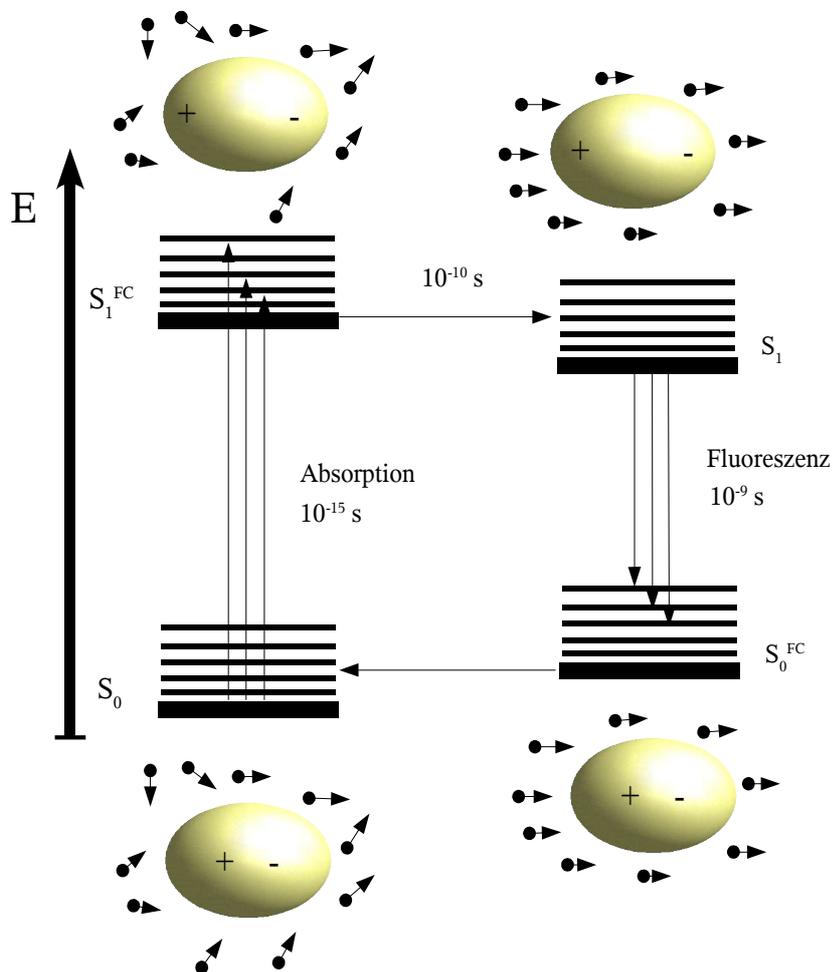


Abbildung 55: Schematische Darstellung der Wechselwirkung eines Fluorophores mit dem Lösungsmittel im Grundzustand und im angeregten Zustand

Auch bei den Perylenderivaten **70** und **77** lässt sich keine Solvatochromie beobachten. Alle Werte für die Absorptions- und Emissionsmaxima sind im Rahmen der Messgenauigkeit gleich. Nur die Absorption von **77** in Wasser ist mit 469 nm etwas bathochrom verschoben.

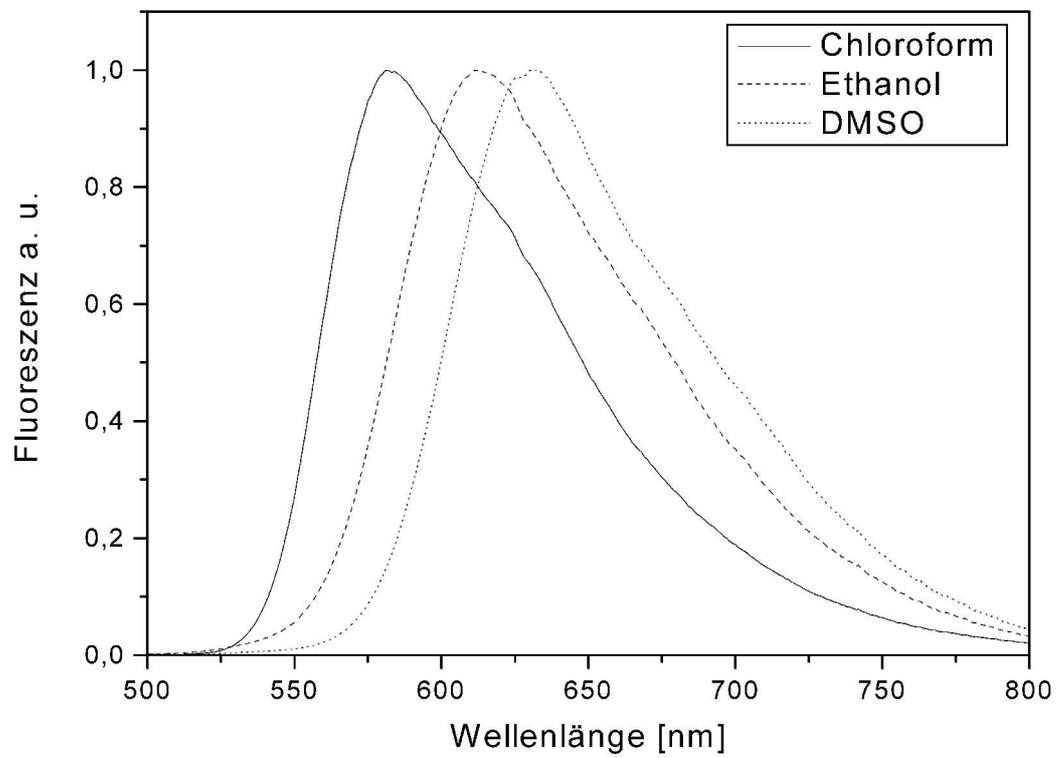


Abbildung 56: Korrigierte Fluoreszenzspektren des Cumarins **55** in verschiedenen Lösungsmitteln, alle normiert auf 1. Anregungswellenlänge: 470 nm

4.11. Fazit

Mit der optischen Spektroskopie konnte gezeigt werden, daß die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Verbindungen den in Kapitel 2 beschriebenen Anforderungen an ihre optischen Eigenschaften gerecht werden.

So zeigt das phosphorylierte Perylenderivat **77** in Wasser eine signifikant geringere Fluoreszenzquantenausbeute als **70** in den untersuchten organischen Lösungsmitteln. Der Stokes Shift von **70** ist in dem in Kapitel 2 beschriebenen Bereich.

Mit den im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Cumarinen wurden Farbstoffe erhalten, die eine sehr hohe Fluoreszenzquantenausbeute in organischen Lösungsmitteln zeigen. Hier sind vor allem die 7-Aminocumarinderivate zu nennen, die in Chloroform Fluoreszenzquantenausbeuten von gemittelt $\Phi_f = 0,98$ erreichen.

Es konnte gezeigt werden, daß mit einer Phosphorsäuregruppe funktionalisierte Derivate der 7-Aminocumarine in Wasser kaum fluoreszieren. Hierbei dient die Phosphorsäuregruppe hauptsächlich dazu, die Verbindungen wasserlöslich zu machen. Die Fluoreszenz der Cumarine wird vom Wasser gequencht. So lassen sich Farbstoffsysteme aus einer hydroxyfunktionalisierten Verbindung und ihrem phosphorylierten Derivat zusammenstellen, die sich dadurch auszeichnen, daß das gelöste, phosphorylierte Derivat im Anwendungsmedium Wasser nicht fluoresziert, das nicht wasserlösliche Hydroxyderivat aber als Feststoff eine starke Fluoreszenz zeigt.

Das Fluoreszenzmaximum der synthetisierten Derivate **55** und **57** liegt dabei in organischen Lösungsmitteln oberhalb von 600 nm. Die Separation dieses Fluoreszenzsignals von eventuell auftretender Hintergrundstrahlung durch Zellbestandteile ist durch optische Filter einfach möglich. Da das Absorptionsmaximum dieser Verbindungen in den untersuchten organischen Lösungsmitteln bei über 500 nm liegt, können die Farbstoffe angeregt werden ohne Zellbestandteile zu schädigen. Durch den großen Stokes Shift läßt sich das Fluoreszenzsignal einfach vom Anregungslicht unterscheiden. Die phosphorylierten Derivate **74** und **76** zeigen nur ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal. Der Anstieg der Fluoreszenz bei Freisetzung des unmaskierten Farbstoffes beträgt bis zu 3267 %. Dieser Unterschied sollte gut zu detektieren sein.

Auch ein Farbstoffsystem aus dem 7-Hydroxycumarin **53** und seinem phosphorylierten Derivat **69** ist möglich. Das Absorptionsmaximum des Cumarins **53** in organischen Lösungsmitteln ist mit etwa 430 nm bathochrom genug, um den Farbstoff anzuregen ohne Zellbestandteile zu schädigen.

Gleichzeitig fallen die 7-Hydroxycumarine durch einen besonders großen Stokes Shift auf, der die Detektion des Fluoreszenzsignales einfach macht. Durch die Stellung der Phosphorsäuregruppe direkt am Chromophor, läßt sich beim Freisetzen von **53** eine Farbänderung von gelb nach rot beobachten.

Mit diesen Farbstoffsystemen wird das *high throughput screening* auch *in vivo* oder an einzelnen Zellen möglich.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertationsschrift sind die gesteckten präparativen Ziele erreicht worden. Es gelang, einige 7-Aminocumarinderivate, das Cumarin 55 und das Cumarin 57 mit einer Hydroxylgruppe zu funktionalisieren. Dazu wurden bisher nicht literaturbekannte Salicylaldehyde als Vorstufen erfolgreich synthetisiert.



Abbildung 57: Zwei im Rahmen dieser Dissertation dargestellte Salicylaldehydderivate

Die so erhaltenen Cumarine mit wenig reaktiven aliphatischen Hydroxygruppen konnten durch eine im Arbeitskreis bisher nicht bekannte Phosphorylierung mit Dimorpholinphosphorylbromid zum fertigen Substrat für die alkalische Phosphatase umgesetzt werden. Hierbei bereitete der

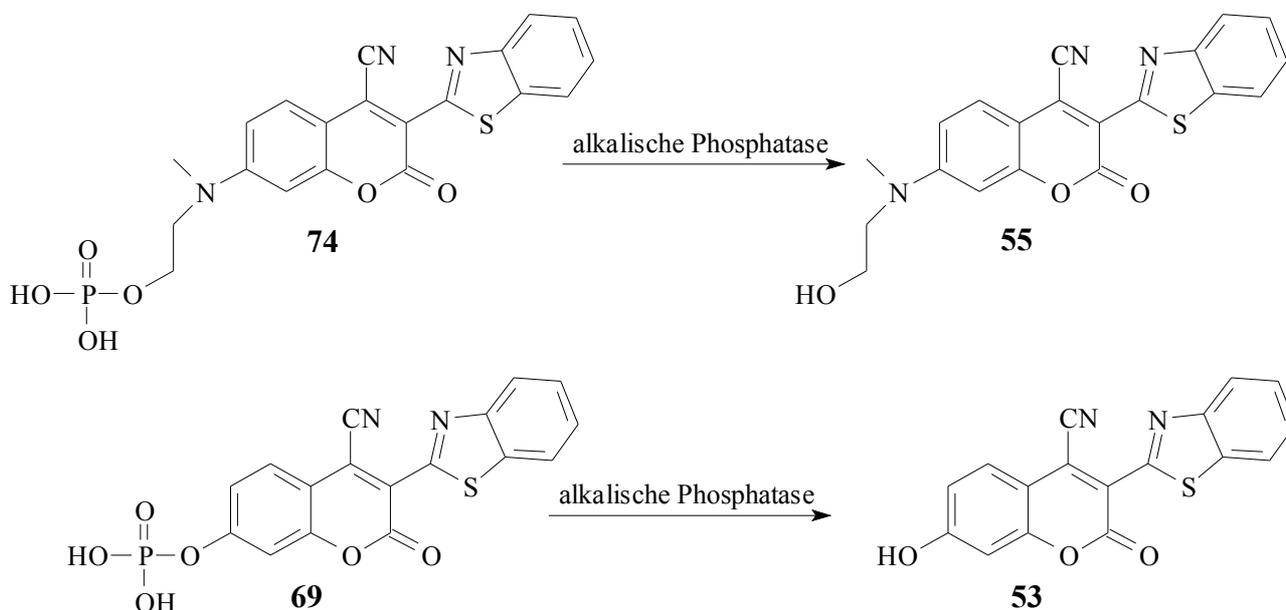


Abbildung 58: Cumarine als mögliches Substrat für die alkalische Phosphatase und die daraus entstehenden präzipitierenden Farbstoffe. Diese Untersuchungen müssen dem Kooperationspartner, der Bayer AG, überlassen bleiben

Pigmentcharakter der Cumarine Probleme, da sie sich, in den bisher für solche Reaktionen verwendeten Lösungsmitteln, nicht lösen. Auch gelingt die Reaktion nicht mit dem nur suspendierten Edukt. Diese Schwierigkeit konnte durch die Verwendung von HMPT und DMPU überwunden werden. So konnte die Synthese im Arbeitskreis etabliert werden.

Es konnten präzipitierende Farbstoffe erhalten werden, deren Absorptionen im Bereich von 480 nm bis 510 nm und deren Emissionen in organischen Lösungsmitteln über 620 nm liegen. Der so erreichte Stokes Shift liegt für **55** bei etwa 3000 cm^{-1} und für **57** bei 3400 cm^{-1} , jeweils gemittelt über alle untersuchten Lösungsmittel.

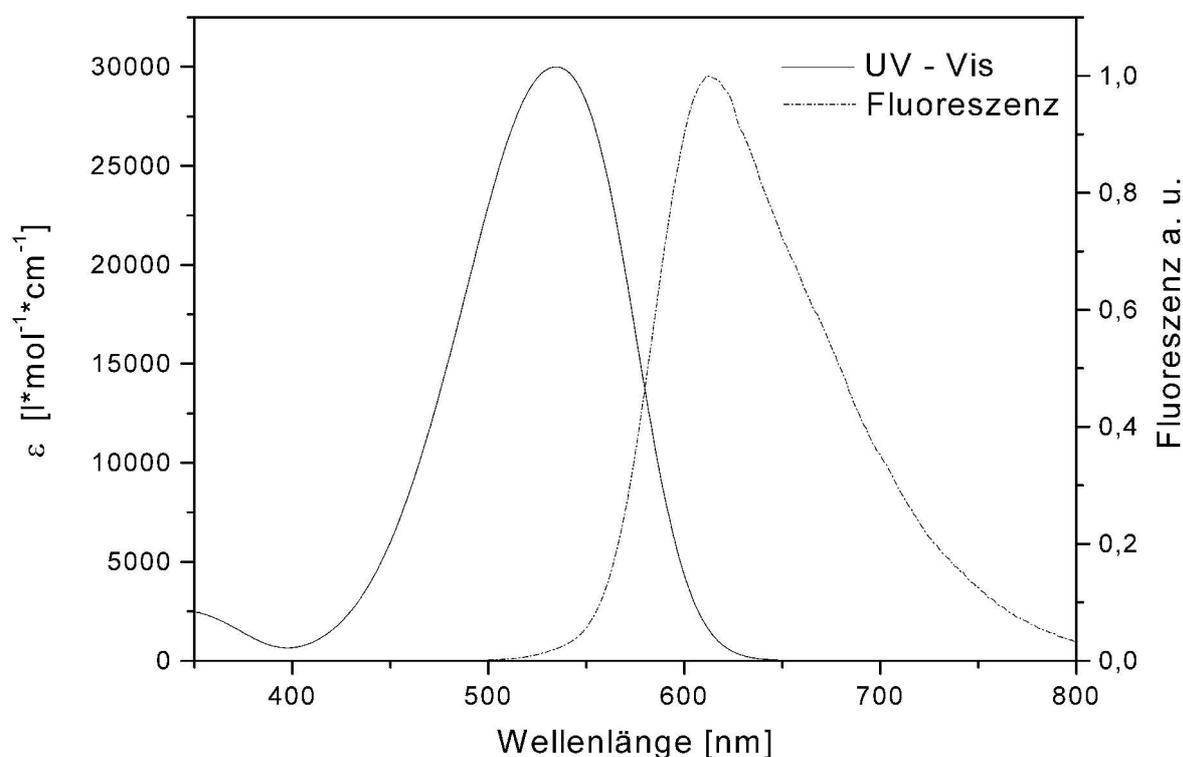
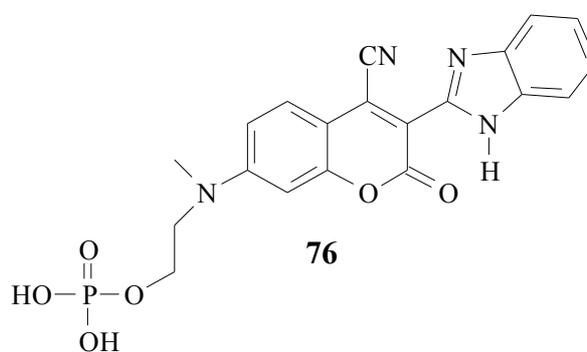
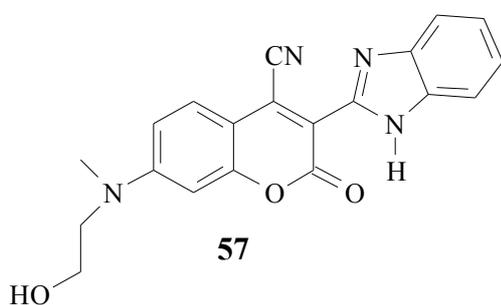
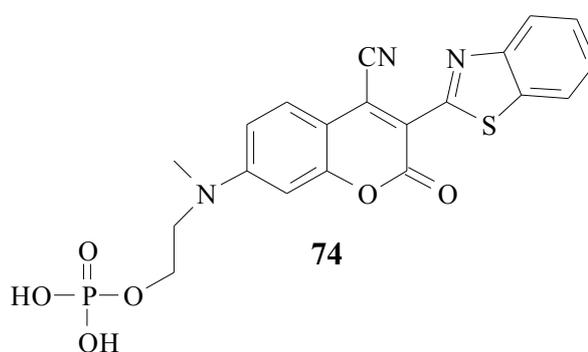
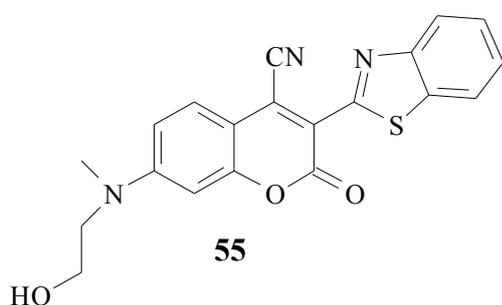


Abbildung 59: UV-Vis und Fluoreszenzspektren von Cumarin **55** in Ethanol zur Veranschaulichung des Stokes Shifts. Anregungswellenlänge des normierten und korrigierten Fluoreszenzspektrums: 470 nm

Die Feststofffluoreszenzeigenschaften der Cumarine konnten, mangels geeigneter Meßapparaturen, nur qualitativ bestimmt werden. Das Messen der Fluoreszenzquantenausbeute der Feststoffe muß, genau wie Untersuchungen zur Eignung der Substanzen als Substrat für die

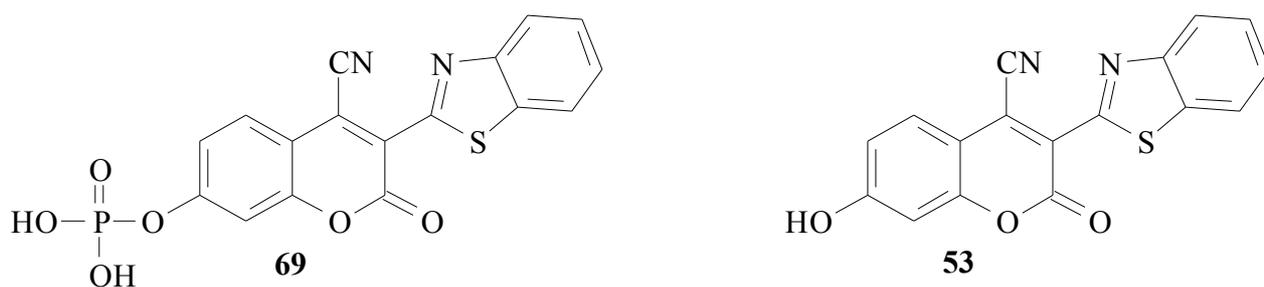
alkalische Phosphatase, dem Kooperationspartner, der Bayer AG, überlassen bleiben. Hier liegen bis jetzt noch keine Ergebnisse vor.

In den untersuchten organischen Lösungsmitteln zeigen die hydroxyfunktionalisierten Cumarine **55** und **57** eine Fluoreszenzquantenausbeute von bis zu $\Phi_f = 0,98$. In Wasser erreichten die phosphorylierten Derivate **74** und **76** nur eine Fluoreszenzquantenausbeute von $\Phi_f = 0,03$. Damit ist bei diesen beiden Farbstoffsystemen durch das Abspalten der Phosphorsäuregruppe eine bis zu 3267 % höhere Fluoreszenzquantenausbeute zu verzeichnen. Dieser Unterschied läßt sich in einem *high throughput screening* verwenden.



Durch die langwellige Emission wird die Sensitivität des *Enzyme Labelled Fluorescence assays* gesteigert, da das Fluoreszenzsignal einfach durch optische Filter von Hintergrundstrahlung separiert werden kann. Durch das langwellige Absorptionsmaximum kann wirkungsvoll verhindert werden, daß in *in vivo assays* Zellbestandteile angeregt werden und es so, durch die energiereichen Anregungsstrahlung, zu Schädigungen an den Zellen kommt. Dadurch werden *high throughput screening* Tests an lebenden Zellen möglich. Solche *assays* bekommen in der pharmazeutischen und medizinischen Forschung zur Wirkstoff- oder Rezeptorsuche eine stetig wachsende Bedeutung.

Daneben konnte das Cumarin **53** mit einer Hydroxygruppe in 7-Position erhalten werden. Auch diese Substanz wurde phosphoryliert und ergab so das Substrat Cumarin **69** für die alkalische Phosphatase. Mit einem Absorptionsmaximum von über 430 nm und einem Emissionsmaximum



von 557 nm ist es auch als präzipitierendes Substrat in *ELF assays* gut geeignet. Ein Farbstoffsystem aus diesen Substanzen weist einen Stokes Shift von etwa 5000 cm^{-1} , gemittelt über alle untersuchten Lösungsmittel, für das Hydroxyderivat **53** und eine Steigerung der Fluoreszenzquantenausbeute durch das Abspalten der Phosphorsäuregruppe an **69** von bis zu 975 % auf.

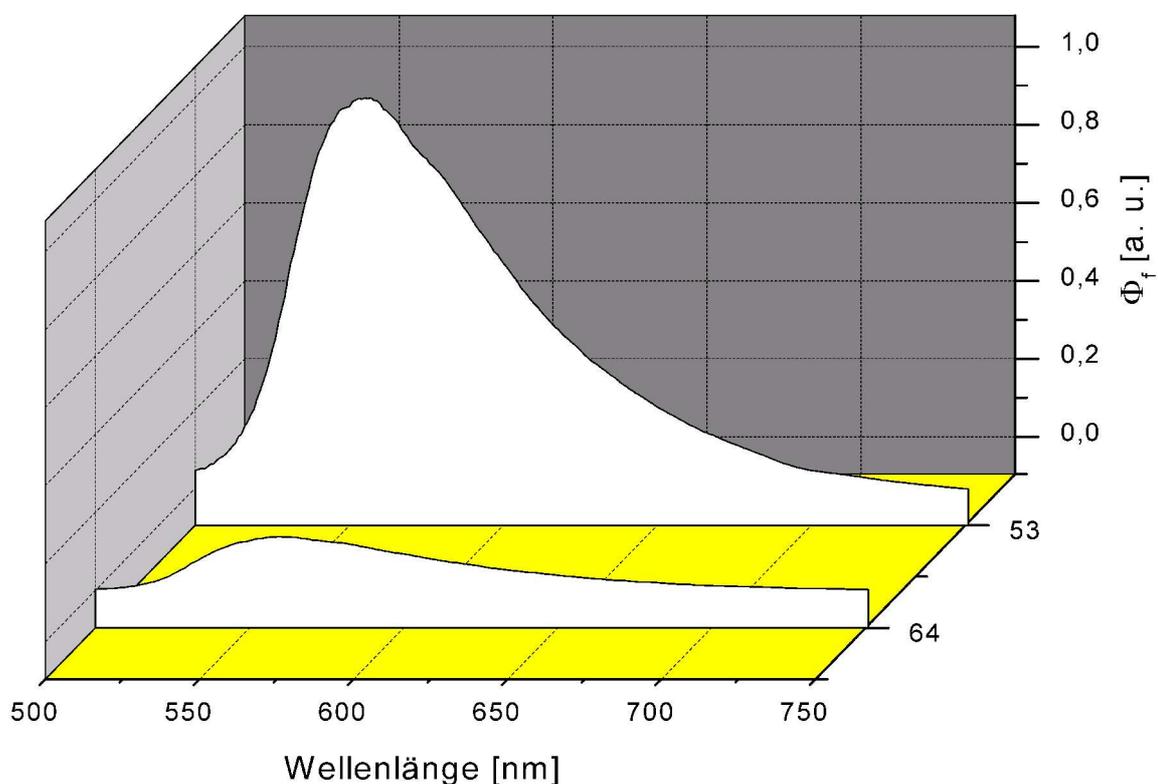
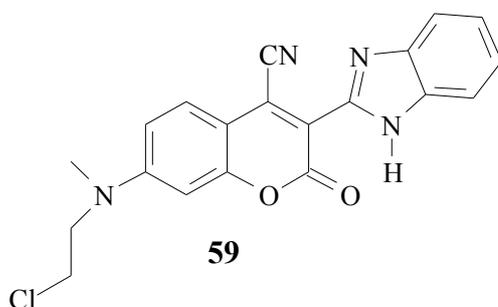
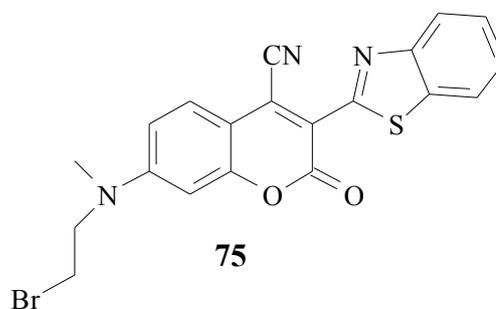
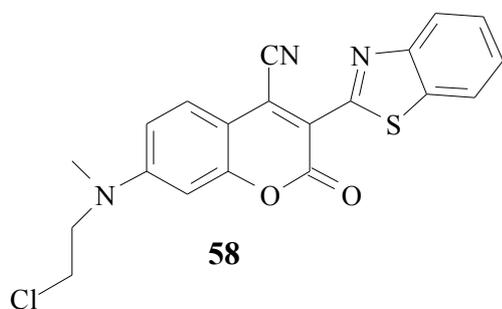


Abbildung 60: Vergleich der Fluoreszenz des Cumarins **53** in Chloroform, mit mit der Fluoreszenz des Cumarins **69** in Wasser, bei gleicher Konzentration, beide angeregt bei 420 nm

Des weiteren konnten die halogenierte Cumarine **59**, **58** und **75** dargestellt werden, die sich als herausragende Fluoreszenzfarbstoffe bewiesen haben. Mit einer Fluoreszenzquantenausbeute von $\Phi_f = 0,83$ bis etwa $\Phi_f = 1,00$ abhängig vom Lösungsmittel, bieten sich diese Farbstoffe als Laserfarbstoffe an.



Im Rahmen dieser Arbeit konnten nur einige erste Cumarine als neue Farbstoffsysteme für *ELF assays* dargestellt und untersucht werden. Die überzeugenden optischen Eigenschaften dieser Systeme legen eine weitere Forschung in diesem Bereich nahe. Dabei sollte versucht werden, durch Substitution am aromatischen System der Cumarine, die Löslichkeitseigenschaften der Farbstoffe so zu verbessern, daß sie in organischen Lösungsmitteln besser löslich werden ohne ihre Pigmenteigenschaften im Anwendungsmedium Wasser zu verlieren. Hier bietet sich die Einführung von Alkylresten und Sulfonsäureresten an, damit die phosphorylierten Derivate wasserlöslich bleiben.

6. Experimentalteil

6.1. Allgemeines

Folgende Materialien und Geräte wurden zur Darstellung und Charakterisierung der Verbindungen eingesetzt:

Dünnschichtchromatographie:	Merck DC-Alufolien Kieselgel 60, UV-Indikator F ₂₅₄
Säulenchromatographie:	Kieselgel 60, 230-400 mesh, Merck sowie Macherey & Nagel
Schmelzpunkte:	Reichardt Thermovar, Büchi 510, unkorrigiert
Brechungsindices:	Carl Zeiss Refraktometer 90213
Infrarotspektroskopie:	Bruker Vektor 22
Massenspektrometrie:	Varian Mat 311 A 70 eV 100 μ A, 250 °C Quelltemperatur
UV/Vis-Spektroskopie:	Perkin Elmer Lambda 19
Fluoreszenzspektroskopie:	Jasco FP-6200 Spektrofluorometer Küvetten: Hellma QS
¹ H-NMR ₅₀₀ -Spektroskopie:	Bruker AM 500
¹ H-NMR ₃₀₀ -Spektroskopie:	Varian VXR 300
³¹ P{ ¹ H}-NMR ₅₀₀ -Spektroskopie:	Bruker AM 500
Elementaranalysen:	Durchgeführt vom Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

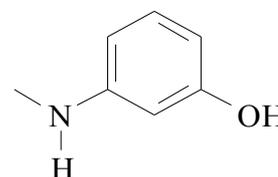
- Frau M. Beuer und dem NMR-Team der AC I für die Aufnahme von NMR-Spektren.
- Frau I. Menzel und Frau H. Webers für die Messung von IR- und UV/Vis-Spektren.
- Herrn Dr. S. Kubik für die Bereitstellung des Fluoreszenzspektrometers.
- Frau I. Reinartz für ihre freundliche Unterstützung bei allen Sekretariatsangelegenheiten.
- Herrn E. Schönstein für die prompte Bereitstellung von Stickstoffbomben und Glasgeräten.
- Herrn R. Bürgel und Herrn Dr. P. Tommes für die Aufnahme der Massenspektren.
- Herrn Dr. K. Schaper für manche Diskussion über Chemie, Politik und die ganze Welt, sowie die kritische Durchsicht dieser Arbeit.
- Frau Dr. B. Blödorn für viele Diskussionen über die Synthesen zu Phosphorsäureestern.
- Herrn Dr. S. Beutner für fruchtbare Diskussionen über optische Spektroskopie sowie die kritische Durchsicht dieser Arbeit.
- Frau S. Köhn für viel Unterstützung und Verständnis, sowie die Durchsicht dieser Arbeit.
- allen Institutskolleginnen und -kollegen für die gute Zusammenarbeit.

6.2. Versuchsdurchführungen

6.2.1. Synthese der Aminophenole

Versuch 1:

Darstellung von 3-(Methylamino)phenol (9)



10,9 g (100 mmol) 3-Aminophenol werden mit 14,2 g (100 mmol) Iodmethan und 5,6 g Kaliumhydroxid, gelöst in 30 ml Wasser, in einen Autoklaven gegeben und für zehn Stunden auf 110 °C Ölbadtemperatur erwärmt. Das so entstandene Öl wird im Scheidetrichter abgetrennt und in 200 ml 10%iger Natronlauge gelöst. Es wird vom ausgeschiedenen dunklen Harz abfiltriert. Das Filtrat wird mit Trockeneis neutralisiert und dreimal mit je 100 ml Ether extrahiert. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet und schließlich am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Das erhaltene braune Öl wird zur Reinigung im Ölpumpenvakuum bei 0,5 mbar destilliert.

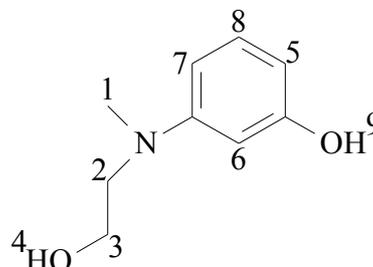
Man erhält ein farbloses Öl bei einer Temperatur von 110 °C.

Ausbeute: 9,1 g 74 mmol (74 %)

M = 123,15 g/mol C₇H₉NO

Versuch 2:

Darstellung von 3-[N-(2-Hydroxyethyl)-N-methylamino]phenol (7)



22,0 g (200 mmol) Resorcin werden mit 2,0 g (32 mmol) Borsäure und 17,2 g (230 mmol) 2-Hydroxyethylmethylamin in einen 100 ml Kolben gegeben und die Mischung unter Rühren auf 180 °C Ölbadtemperatur erwärmt. Die Mischung wird flüssig und beginnt zu sieden. Über eine 20 cm lange Vigreuxkolonne wird innerhalb von neun Stunden nun das bei der Reaktion entstehende Wasser (etwa 5,3 ml) abdestilliert. Die Ölbadtemperatur wird dabei langsam bis auf 245 °C erhöht. Nun wird auf 60 °C abgekühlt und 30 ml Methanol hinzugefügt. Dieses wird nun langsam wieder abdestilliert. Dann wird im Wasserstrahlvakuum nicht reagiertes 2-Hydroxyethylmethylamin entfernt und der dunkle Rückstand im Ölpumpenvakuum bei 0,1 mbar destilliert.

Man erhält bei einer Siedetemperatur von 155 °C ein gelbes Öl, das nach einigen Tagen zu einem farblosen Feststoff erstarrt.

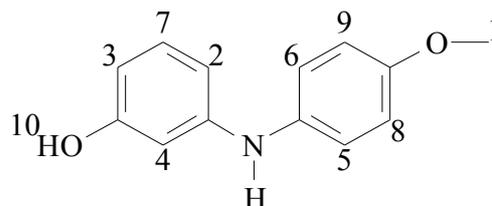
Ausbeute: 23,0 g 138 mmol (68 %) (Lit^[64]:78 %)

M = 167,21 g/mol C₉H₁₃NO₂

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,86 (3H; s; ; 1H); 3,31 (2H; t; ³J_{HH} = 6,5 Hz; 2H); 3,36 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO); 3,51 (2H; m; ; 3H); 4,64 (1H; s; ; 4H); 6,02 (1H; d; ³J_{HH} = 7,9 Hz; 7H); 6,08 (1H; s; ; 6H); 6,12 (1H; d; ³J_{HH} = 8,3 Hz; 5H); 6,91 (1H; t; ³J_{HH} = 8,10 Hz; 8H); 8,95 (1H;s; ; 9H)

Versuch 3:

Darstellung von *N*-(3-Hydroxyphenyl)-*N*-(4-methoxyphenyl)amin (11)



22,0 g (200 mmol) Resorcin werden mit 2,00 g (32 mmol) Borsäure und 24,6 g (200 mmol) *p*-Anisidin in einen 100 ml Kolben gegeben und die Mischung wird unter rühren auf 180 °C Ölbadtemperatur erwärmt. Die Mischung wird flüssig und beginnt zu sieden. Über eine 20 cm lange Vigreuxkolonne wird innerhalb von neun Stunden nun das bei der Reaktion entstehende Wasser (etwa 5,3 ml) abdestilliert. Die Ölbadtemperatur wird dabei langsam bis auf 245 °C. Nun wird auf 60 °C abgekühlt und 30 ml Methanol werden hinzugefügt. Dieses wird nun langsam wieder abdestilliert. Dann wird im Wasserstrahlvakuum nicht reagiertes *N*-(2-Hydroxyethyl)-*N*-methylamin entfernt und der dunkle Rückstand im Ölpumpenvakuum bei 0,6 mbar destilliert.

Man erhält bei 220 °C ein hellbraunes Öl, das über Nacht zu orangefarbenen Kristallen erstarrt. Diese werden zweimal aus Benzol umkristallisiert. Man erhält farblose Kristalle.

Ausbeute: 34,4 g 160 mmol (80 %)

Schmelzpunkt: 82 °C

M = 215,25 g/mol C₁₃H₁₃NO₂

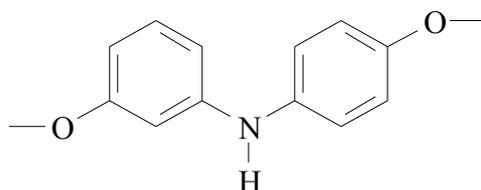
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3500 (-OH Valenz); 3399 (-NH Valenz); 3007 (=CH Valenz arom.); 2955 (-CH Valenz); 2834 (-CH₃ Valenz); 1597 (Ringschwingung arom.); 1509 (Ringschwingung arom.)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 3,70 (3H; s; ; 1H); 6,16 (1H; dd; ³J_{HH} = 7,9 Hz; ⁴J_{HH} = 1,8 Hz; 2H); 6,38 (1H; dd; ³J_{HH} = 7,9 Hz; ⁴J_{HH} = 2,1

Hz; 3H); 6,40 (1H; t; $^3J_{\text{HH}} = 2,2$ Hz; 4H); 6,85 (2H; d; $^3J_{\text{HH}} = 8,9$ Hz; 5H, 6H); 6,93 (1H; t; $^3J_{\text{HH}} = 8,0$ Hz; 7H); 7,04 (2H; d; $^3J_{\text{HH}} = 8,8$ Hz; 8H, 9H); 9,10 (1H; breites s; ; 10H)

Versuch 4:

Darstellung von *N*-(3-Methoxyphenyl)-*N*-(4-methoxyphenyl)amin (12)



12,9 g (60,0 mmol) *N*-(3-Hydroxyphenyl)-*N*-(4-methoxyphenyl)amin aus Versuch 3 werden mit 3,40 g (60,0 mmol) Kaliumhydroxid in 21 ml Ethanol gelöst. Zu dieser Mischung werden nun bei 50 °C 6,30 ml (60,0 mmol) 8,38 g Dimethylsulfat langsam getropft und dann wird für 5 h zum Rückfluß erwärmt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Mischung am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit, und der dunkle, ölige Rückstand wird in 200 ml Wasser gegeben. Es fällt ein braungrüner Feststoff an, der abfiltriert und im Ölpumpenvakuum einer Feststoffdestillation bei 0,1 mbar unterzogen wird.

Man erhält bei 178 °C ein hellgelbes Öl, das schnell zu farblosen Kristallen erstarrt.

Ausbeute: 8,9 g 38,8 mmol (65 %)

Schmelzpunkt: 68 °C - 69 °C

M = 229,28 g/mol C₁₄H₁₅NO₂

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3399 (-NH Valenz); 3160 (=CH Valenz arom.); 2954 (-CH₃ Valenz); 2833 (-O-CH₃ Valenz); 1600 (Ringschwingung arom.); 1508 (Ringschwingung arom.); (1462 -CH₃ Deform.); 1330 (-C-N- Valenz); 1242 (-C-O-C- Valenz)

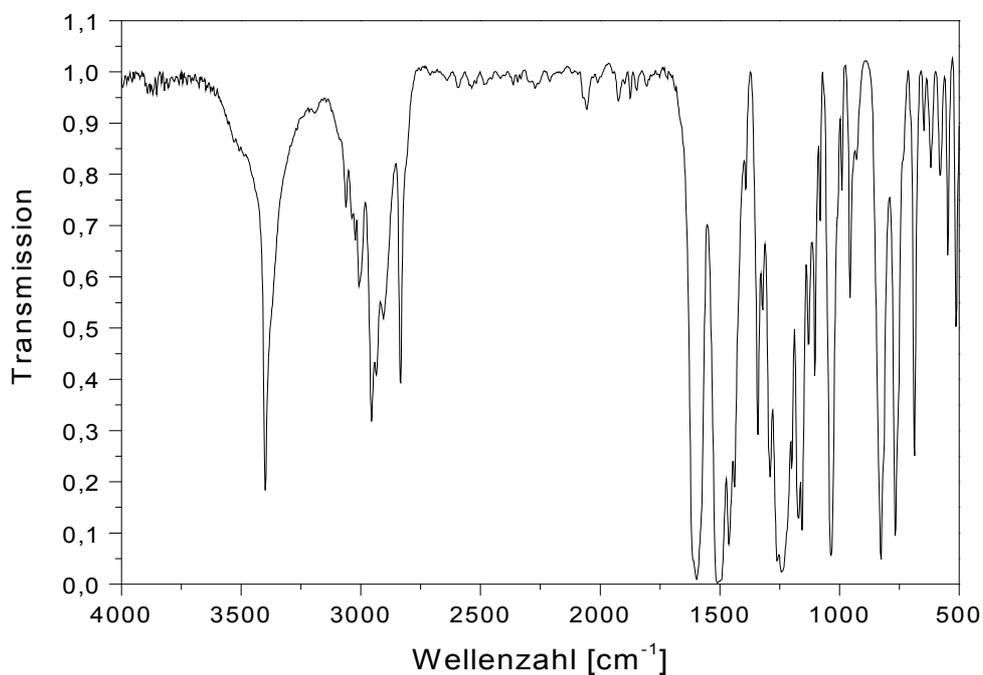
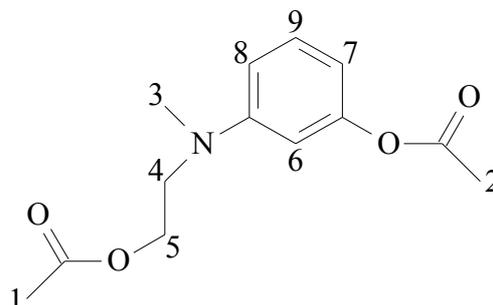


Abbildung 61: IR-Spektrum (KBr) von 12

Versuch 5:

Darstellung von 3-[N-(2-Acetoxyethyl)-N-methylamino]phenylacetat



12,6 g (75,0 mmol) 3-[N-(2-Hydroxyethyl)-N-methylamino]phenol werden mit 30 ml Essigsäureanhydrid übergossen und auf 100 °C Ölbadtemperatur erwärmt. Die Lösung färbt sich dunkelrot. Nach 2 h wird sie auf 200 ml Eis gegossen und für 1 h gerührt. Es entsteht ein dunkles Öl, das durch dreimaliges extrahieren mit je 100 ml Chloroform abgetrennt wird. Die organische Phase wird über

Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Man erhält ein violettes Öl, welches über eine 10 cm lange Vigreuxkolonne destilliert wird.

Man erhält bei einem Druck von 0,04 mbar und 130 °C Siedetemperatur als dritte Fraktion ein farbloses Öl.

Ausbeute: 15,0 g 59,7 mmol (80 %)

M = 251,28 g/mol C₁₃H₁₇NO₄

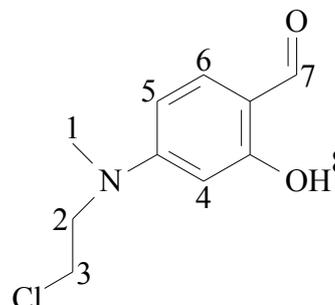
IR (flüssig, NaCl-Platten): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3050 (=CH Valenz arom.); 2951(-CH₃ Valenz); 2895 (-CH₂ Valenz); 2823 (-N-CH₃ Valenz); 1739 (-C=O ges. Alkylester); 1663 (C=C Valenz arom.); 1611 (Ringschwingung arom.); 1503 (Ringschwingung arom.); 1447 (-CH₃, -CH₂ Deform.); 1370 (-CH₃ Deform.); 1211 (-C-O Valenz Phenole)

¹H-NMR₅₀₀ (CDCl₃/ TMS) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,00 (3H; s; ;1H); 2,27 (3H; s; ; 2H); 2,95 (3H; s; ; 3H); 3,56 (2H; t; ³J_{HH} = 6,1 Hz; 4H); 4,23 (2H; t; ³J_{HH} = 6,1 Hz; 5H); 6,40 (2H; m; ; 6H, 7H); 6,58 (1H; dd; ³J_{HH} = 8,5 Hz; ⁴J_{HH} = 2,5 Hz; 8H); 7,19 (1H; t; ³J_{HH} = 8,3 Hz; 9H); 7,26 (Lösungsmittel: CHCl₃ in CDCl₃)

6.2.2. Synthese der Salicylaldehyde

Versuch 6:

Darstellung von 4-[N-(2-Chlorethyl)-N-methyl-amino] salicylaldehyd (15)



Unter Stickstoffatmosphäre werden 12 ml (20,0 g, 132 mmol) Phosphoroxchlorid langsam in 30 ml eisgekühltes, absolutiertes DMF getropft, so daß die Temperatur 5 °C nicht überschreitet. Dann wird für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und die Mischung schließlich wieder im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C abgekühlt. Nun wird eine Lösung aus 20,0 g (120 mmol) 3-[N-(2-Hydroxyethyl)-N-methylamino]phenol in 60 ml DMF so zugetropft, daß die Temperatur nicht über 10 °C steigt. Dann wird für 30 Minuten auf 90 °C erwärmt und schließlich auf Raumtemperatur abgekühlt. Die grünliche Lösung wird nun auf 400 ml Eiswasser gegeben und für 3 h gerührt. Dabei bildet sich ein farbloser Feststoff, der abgesaugt, mit viel Wasser gewaschen und getrocknet wird.

Das Rohprodukt wird zur Reinigung aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält graublau Kristalle.

Ausbeute: 16,4 g 76,8 mmol (71 %)

Schmelzpunkt: 76 °C

M = 213,67 g/mol C₁₀H₁₂NO₂Cl

Elementaranalyse:	C (ber): 56,21 %	H (ber): 5,66 %	N (ber): 6,56 %
	C (gef): 55,39 %	H (gef): 5,69 %	N (gef): 6,40 %

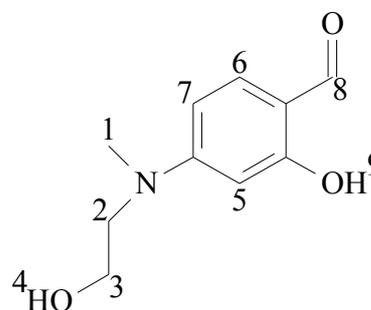
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3453 (-OH Valenz); 2979 (-CH Valenz); 2845 (-CH₂ Valenz); 1634 (-C=O Aldehyd); 1492 (Ringschwingung); 1435 (-CH₃, -CH₂ Deform.); 1396 (-CH₃ Deform.); 1336 (-C-N Valenz); 1215 (-C-O Valenz Phenole)

MS m/s (%) = 214 (3) [M+H]⁺; 213 (23) [M]⁺; 165 (10); 164 (100); 65 (6)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO-d₅ in DMSO-d₆); 3,05 (3H; s; ; 1H); 3,35 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO); 3,78 (4H; s; ; 2H, 3H); 6,14 (1H; d; ³J_{HH} = 2,4 Hz; 4H); 6,44 (1H; dd; ³J_{HH} = 8,9 Hz; ⁴J_{HH} = 2,4 Hz; 5H); 7,47 (1H; d; ³J_{HH} = 8,9 Hz; 6H); 9,70 (1H; s; ; 7H); 11,17 (1H; breites s; ; 8H)

Versuch 7:

Darstellung von 4-[N-(2-Hydroxyethyl)-N-methylamino]salicylaldehyd (14)



Unter Stickstoffatmosphäre werden 4,0 ml (6,7 g, 45 mmol) Phosphoroxychlorid langsam in eisgekühltes, absolutiertes DMF getropft, so daß die Temperatur 5 °C nicht überschreitet. Dann wird für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und die Mischung schließlich wieder im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C abgekühlt. Nun wird eine Lösung aus 10,0 g (40 mmol) 3-[N-(2-Acetoxyethyl)-N-methylamino]phenylacetat in 60 ml DMF so zugetropft, daß die Temperatur nicht über 10 °C steigt. Dann wird für 30 Minuten auf 90 °C erwärmt und schließlich auf Raumtemperatur abgekühlt. Die grünliche Lösung wird nun auf 400 ml Eiswasser gegeben und für 3 h gerührt. Es entsteht ein dunkles Öl, das durch dreimaliges extrahieren mit je 100 ml Chloroform abgetrennt wird. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird entfernt.

Das entstandene grüne Öl wird nun bei Raumtemperatur mit einer Mischung aus 50 ml Methanol und 50 ml 15%iger Kaliumcarbonatlösung übergossen und für 24 h gerührt. Dann wird mit ¼konzentrierter Salzsäure angesäuert und die rote Lösung dreimal mit 100 ml Chloroform extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Man erhält einen grünlichen Feststoff.

Das Rohprodukt wird zur Reinigung aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält dunkelrote

Kristalle.

Ausbeute: 4,0 g 20,5 mmol (40 %)

Schmelzpunkt: 83 °C

M = 195,22 g/mol C₁₀H₁₃NO₃

Elementaranalyse:	C (ber): 61,53 %	H (ber): 6,71 %	N (ber): 7,17 %
	C (gef): 61,53 %	H (gef): 6,62 %	N (gef): 7,21 %

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3425 (-OH Valenz); 2955 (-CH Valenz); 2847 (-CH₂ Valenz); 1639 (-C=O Aldehyd); 1596 (Ringschwingung); 1483 (Ringschwingung); 1433 (-CH₃, -CH₂ Deform.); 1394 (-CH₃ Deform.); 1337 (-C-N Valenz); 1209 (-C-O Valenz Phenole)

MS m/s (%) = 196 (2) [M+H]⁺; 195 (25) [M]⁺; 164 (100); 73 (23); 44 (30); 32 (72)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO-d₅ in DMSO-d₆); 3,02 (3H; s; ; 1H); 3,35 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO); 3,48 (2H; t; ³J_{HH} = 5,9 Hz; 2H); 3,56 (2H; m; ; 3H); 4,78 (1H; t; ³J_{HH} = 5,0 Hz; 4H); 6,08 (1H; d; ³J_{HH} = 2,3 Hz; 5H); 6,39 (1H; dd; ³J_{HH} = 9,0 Hz; ⁴J_{HH} = 2,3 Hz; 6H); 7,42 (1H; d; ³J_{HH} = 9,0 Hz; 7H); 9,63 (1H; s; ; 8H); 11,26 (1H; breites s; ; 9H)

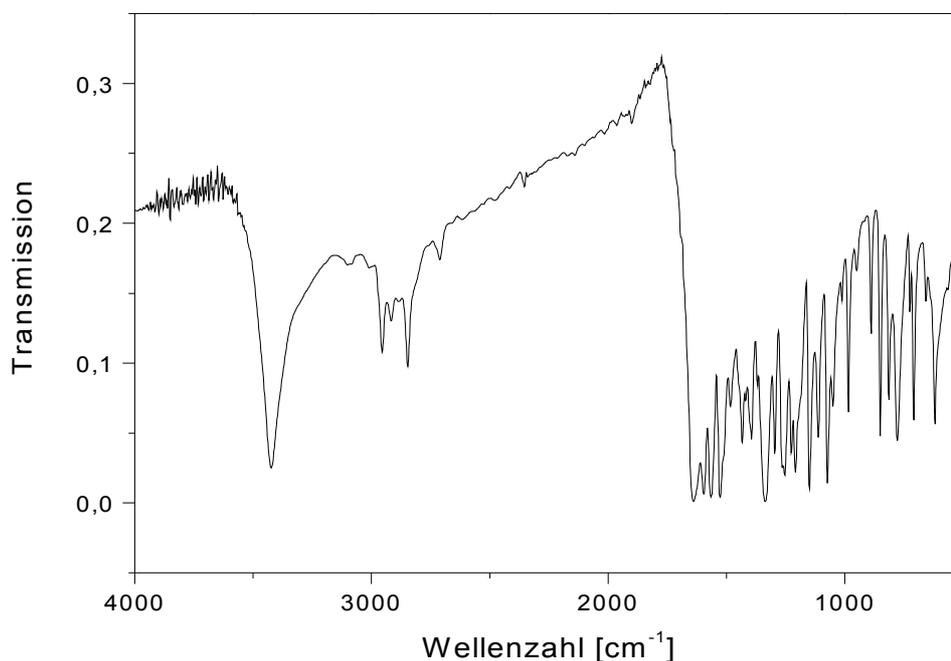
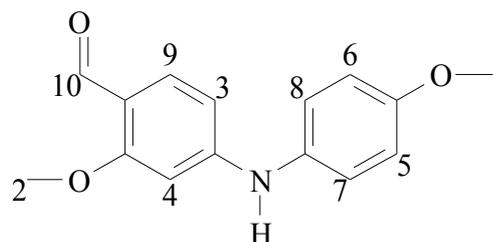


Abbildung 62: IR-Spektrum (KBr) von **14**

Versuch 8:

Darstellung 4-[N-(*p*-Methoxyphenyl)amino]-2-methoxybenzaldehyd (13**)**



16,5 g (72,0 mmol) *N*-(3-Methoxyphenyl)-*N*-(4-methoxyphenyl)amin aus **Versuch 4** werden in 25 ml DMF gelöst und im Eis/Kochsalzbad auf unter 0 °C gekühlt. Unter Stickstoffatmosphäre werden 6,6 ml (11,0 g, 72 mmol) Phosphoroxychlorid so zugetropft, daß die Temperatur nicht über 5 °C steigt. Die zähflüssige Mischung wird für 1 h bei Raumtemperatur gerührt, dann wird für 24 h

auf 70 °C erwärmt. Schließlich wird die Mischung auf 400 ml Eiswasser gegeben und für 3 h unter rühren hydrolysiert.

Es fällt ein gelber Feststoff aus, der zur Reinigung aus Methanol umkristallisiert wird. Man erhält feine, grüne Nadeln.

Ausbeute: 13,3 g 51,7 mmol (72 %)

Schmelzpunkt: 68 °C (Lit.: 68 °C^[72])

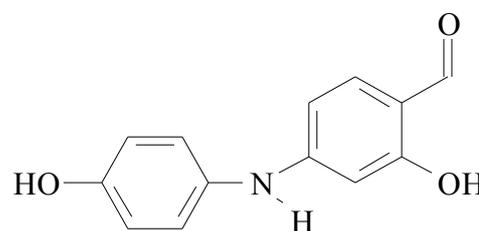
M = 257,29 g/mol C₁₅H₁₅NO₃

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3450 (-NH- Valenz); 3009 (=CH Valenz in Aromaten); 2942 (-CH Valenz); 2854 (-CH₂ Valenz); 1655 (-C=O Aldehyd); 1596 (Ringschwingung); 1506 (Ringschwingung); 1424 (-CH₃, -CH₂ Deform.); 1365 (-C-N Valenz)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 3,79, 3,81 (3H, 3H; s; s; 1H, 2H); 6,17 (1H; dd; ³J_{HH} = 8,9 Hz; ⁴J_{HH} = 2,2 Hz; 3H); 6,24 (1H; d; ³J_{HH} = 2,2 Hz; 4H); 7,03 (2H; d; ³J_{HH} = 8,9 Hz; 5H, 6H); 7,22 (2H; d; ³J_{HH} = 8,9 Hz; 7H, 8H); 7,45 (1H; d; ³J_{HH} = 8,9 Hz; 9H); 10,04 (1H; s; ; 10H)

Versuch 9:

Darstellung von 4-[N-(*p*-Hydroxyphenyl)amino]salicylaldehyd (17)



1,0 g (3,9 mmol) 4-[N-(*p*-Methoxyphenyl)amino]-2-methoxybenzaldehyd aus **Versuch 8** werden in 150 ml über Calciumhydrid getrocknetem Chloroform gelöst. Zu dieser Lösung werden langsam 5,0 g (33 mmol) Trimethylsilylbromid unter Stickstoffatmosphäre zugetropft. Die Mischung wird weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt, dann wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer

entfernt. 100 ml Wasser werden zu dem grünen Rückstand gegeben und es wird für 3 h zur Hydrolyse bei Raumtemperatur gerührt. Die entstandene Lösung wird dreimal mit je 50 ml Diethylether extrahiert und die wäßrige Phase anschließend am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Man erhält ein rotes Pulver, das zur Reinigung aus Methanol umkristallisiert wird.

4-[*N*-(*p*-Hydroxyphenyl)amino]salicylaldehyd fällt als orangefarbenes Pulver an.

Ausbeute: 0,6 g 2,8 mmol (72 %)

Schmelzpunkt: 105 °C

M = 229,23 g/mol C₁₃H₁₁NO₃

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3423 (-OH Valenz, -NH Valenz); 3001 (=CH Valenz); 1686 (-C=O Valenz); 1617 (Ringschwingung); 1481 (Ringschwingung); 1447 (-CH₃, -CH₂ Deform.); 1242 (-C-O- Valenz Phenol); 1223 (-C-O- Valenz Phenol)

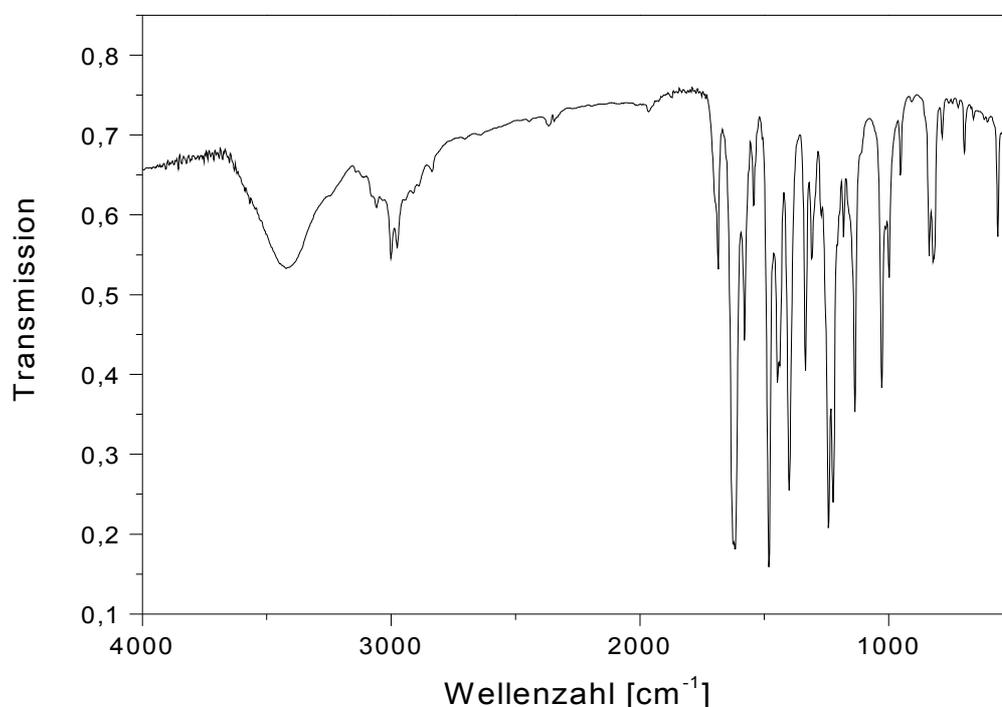
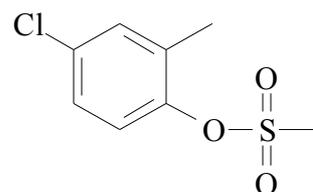


Abbildung 63: IR-Spektrum (KBr) von **17**

6.2.3. Synthese von 4-Nitrosalicylaldehyd und 5-Chlor-4-nitrosalicylaldehyd

Versuch 10:

Darstellung von (4-Chlor-2-methylphenyl)-methansulfonat (24)



25,0 g (180 mmol) 4-Chlor-2-methylphenol werden in 22 ml trockenem Pyridin suspendiert. Dann werden 17,0 ml (25,2 g, 220 mmol) Methansulfonsäure so zugetropft, daß die Temperatur 80 °C nicht überschreitet. Im Anschluß wird die braune Mischung für weitere 2 h bei 80 °C gerührt und anschließend auf 100 g Eis gegossen.

Die so entstandene Lösung wird fünfmal mit je 50 ml Diethylether extrahiert, die vereinigten Etherphasen werden mit 2N Salzsäure und anschließend mit Wasser neutral gewaschen und die Etherphase wird über Magnesiumsulfat getrocknet. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und der beige, wachsartige Rückstand in wenig Methanol gelöst. Über Nacht fallen bei 0 °C farblose Kristalle aus.

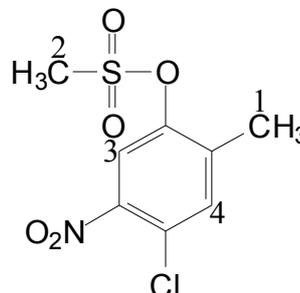
Ausbeute: 23,3 g 106 mmol (60 %)

Schmelzpunkt: 34 °C - 35° C

M = 220,68 g/mol C₈H₉ClO₃S

Versuch 11:

Darstellung von (4-Chlor-2-methyl-5-nitrophenyl)-methansulfonat (25)



35,0 g (160 mmol) (4-Chlor-2-methylphenyl)-methansulfonat werden unter Eis/Kochsalzbadkühlung langsam in 175 ml konzentrierter Schwefelsäure eingetragen. Anschließend werden 11 ml konzentrierter Salpetersäure bei einer Temperatur zwischen -5 °C und 0 °C langsam zugetropft. Dann wird für weitere 2 h bei 0 °C gerührt bevor die Mischung auf 300 ml Eis gegossen wird.

Es fällt ein gelber Feststoff aus, der abgesaugt mit Wasser gewaschen und getrocknet wird.

Ausbeute: 42,0 g 158 mmol (99 %)

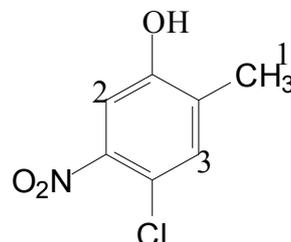
Schmelzpunkt: 99 °C

M = 265,67 g/mol C₈H₈ClNO₅S

¹H-NMR₃₀₀ (CDCl₃) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,44 (3H; s; ; 1H); 3,31 (3H; s; ; 2H); 7,26 (CHCl₃ in CDCl₃); 7,49 (1H; s; ; 3H); 7,91 (1H; s; ; 4H)

Versuch 12:

Darstellung von 4-Chlor-2-methyl-5-nitrophenol (26)



9,9 g (0,43 mol) Natrium wird vorsichtig in 570 ml Methanol gegeben. Wenn alles Natrium abreagiert hat, werden 27,8 g (110 mmol) (4-Chlor-2-methyl-5-nitrophenyl)-methansulfonat aus **Versuch 11** zugegeben. Es wird bei Raumtemperatur gerührt, bis sich eine klare Lösung gebildet hat. Es wird abfiltriert und das Filtrat auf etwa 50 ml eingengt. Es wird mit 2 N Salzsäure neutralisiert. Dabei färbt sich die rote Lösung erst gelb, dann fällt ein voluminöser Niederschlag aus. Dieser wird abgesaugt, mit viel Wasser gewaschen und getrocknet.

Man erhält ein gelbliches Pulver.

Ausbeute: 15,0 g 80,0 mmol (76 %)

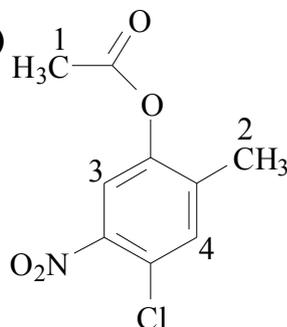
Schmelzpunkt: 134 °C

M = 187,58 g/mol C₇H₆ClNO₂

¹H-NMR₃₀₀ (CDCl₃) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,30 (3H; s; ; 1H); 7,26 (CHCl₃ in CDCl₃); 7,30 (1H; s; ; 3H); 7,40 (1H; s; ; 4H)

Versuch 13:

Darstellung von 2-Acetoxy-5-chlor-4-nitrotoluol (27)



5,0 g (27 mmol) 4-Chlor-2-methyl-5-nitrophenol wird in 5 ml Essigsäureanhydrid suspendiert und für 1 h bei 95 °C gerührt. Die entstandene Lösung wird in 30 ml Eiswasser gegeben. Es fällt ein beigefarbener Feststoff aus, der abgesaugt, mit viel Wasser gewaschen und getrocknet wird.

Man erhält cremefarbene Kristalle.

Ausbeute: 6,0 g 26,1 mmol (98 %)

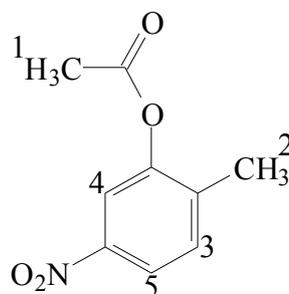
Schmelzpunkt: 119 °C

M = 229,62 g/mol C₉H₈ClNO₄

¹H-NMR₃₀₀ (CDCl₃) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,25 (3H; s; ; 1H); 2,36 (3H; s; ; 2H); 7,26 (CHCl₃ in CDCl₃); 7,43 (1H; s; ; 3H); 7,71 (1H; s; ; 4H)

Versuch 14:

Darstellung von 2-Acetoxy-4-nitrotoluol (21)



5,0 g (33 mmol) 2-Methyl-5-nitrophenol wird in 5 ml Essigsäureanhydrid suspendiert und für 1 h

bei 95 °C gerührt. Die entstandene Lösung wird in 30 ml Eiswasser gegeben. Es fällt ein beigefarbener Feststoff aus, der abgesaugt, mit viel Wasser gewaschen und getrocknet wird.

Man erhält cremefarbene Kristalle, rein genug um damit weiterzuarbeiten^[79].

Ausbeute: 5,5 g 30,7 mmol (95 %)

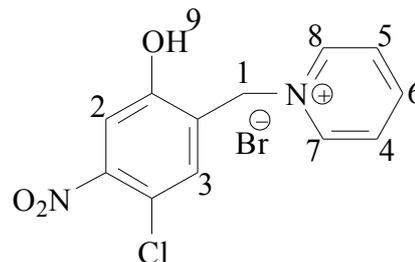
Schmelzpunkt: 70 °C - 74 °C (Lit.: 70 °C - 74 °C^[79])

M = 179,18 g/mol C₉H₉NO₄

¹H-NMR₃₀₀ (CDCl₃) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,29 (3H; s; ; 1H); 2,39 (3H; s; ; 2H); 7,26 (CHCl₃ in CDCl₃); 7,40 (1H; d; ³J_{HH} = 8,0 Hz; 3H); 7,93 (1H; d; ³J_{HH} = 2,2 Hz; 4H); 8,03 (1H; dd; ³J_{HH} = 8,3 Hz; ⁴J_{HH} = 2,3 Hz; 5H)

Versuch 15:

Darstellung von 5-Chlor-2-hydroxy-4-nitrobenzyl-pyridiniumbromid (28)



6,4 g (28 mmol) 2-Acetoxy-5-chlor-4-nitrotoluol werden mit einem Kristall Iod in 9 ml Tetrachlorethan gelöst. Unter Erwärmen zum Rückfluß und UV-Bestrahlung werden nun 9,0 g (56 mmol) Brom, gelöst in 2 ml Tetrachlorethan, in 3 h zugetropft. Es wird für weitere 2 h zum Rückfluß erhitzt, dann wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das resultierende braune Öl wird in 9 ml Ethanol gelöst und mit 3 ml Pyridin versetzt. Dabei wird die Lösung sehr warm. Über Nacht fallen braune Kristalle aus. Zur Reinigung wird aus Ethanol umkristallisiert.

Man erhält beige Kristalle.

Ausbeute: 5,6 g 16,2 mmol (58 %)

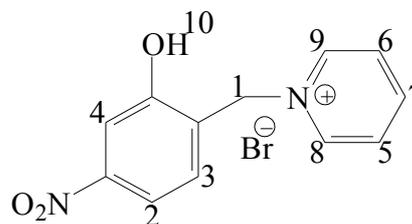
Schmelzpunkt: 254 °C

M = 345,58 g/mol C₁₂H₁₀BrClN₂O₃

$^1\text{H-NMR}_{300}$ (DMSO- d_6) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO- d_5 in DMSO- d_6); 3,45 (Lösungsmittel: H_2O in DMSO- d_6); 5,88 (2H; s; ; 1H); 7,52 (1H; s; ; 2H); 8,03 (1H; s; ; 3H); 8,18 (2H; t; $^3J_{\text{HH}} = 7,7$ Hz; 4H, 5H); 8,65 (1H; t; $^3J_{\text{HH}} = 7,8$ Hz; 6H); 9,16 (2H; d; $^3J_{\text{HH}} = 5,5$ Hz; 7H, 8H); 11,54 (1H; s; ; 9H)

Versuch 16:

Darstellung von 2-Hydroxy-4-nitrobenzyl-pyridiniumbromid (22)



5,5 g (28 mmol) 2-Acetoxy-4-nitrotoluol aus **Versuch 14** werden mit einem Kristall Iod in 9 ml Tetrachlorethan gelöst. Unter Erwärmen zum Rückfluß und UV-Bestrahlung werden nun 9,0 g (56 mmol) Brom, gelöst in 2 ml Tetrachlorethan, in 3 h zugetropft. Es wird für weitere 2 h zum Rückfluß erhitzt, dann wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das resultierende braune Öl wird in 9 ml Ethanol gelöst und mit 3 ml Pyridin versetzt. Dabei wird die Lösung sehr warm. Über Nacht fallen braune Kristalle aus. Zur Reinigung wird aus Ethanol umkristallisiert.

Man erhält beige Kristalle, rein genug um damit weiterzuarbeiten^[79].

Ausbeute: 6,7 g 21,5 mmol (76 %) (Lit.: 71 %^[79])

Schmelzpunkt: 265 °C (Lit.: 264 °C - 266 °C^[79])

M = 311,13 g/mol $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{BrN}_2\text{O}_3$

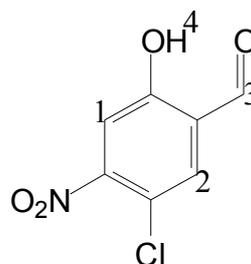
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3424 (-O-H Valenz breite Bande); 3037 (=CH Valenz); 2958 (- CH_3 Valenz); 1636 (Ringschwingung); 1527 (- NO_2 Valenz); 1489 (Ringschwingung); 1353 (- NO_2 Valenz)

$^1\text{H-NMR}_{300}$ (DMSO- d_6) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO- d_5 in DMSO- d_6); 3,43 (Lösungsmittel: H_2O in DMSO- d_6); 6,00 (2H; d;

$^3J_{\text{HH}} = 49,3 \text{ Hz}; 1\text{H}); 7,80 (2\text{H}; \text{m}; ; 2\text{H}, 3\text{H}); 8,70 (6\text{H}; \text{m}; ; 4\text{H}, 5\text{H}, 6\text{H}, 7\text{H}, 8\text{H}, 9\text{H}); 11,33 (1\text{H}; \text{s}; ; 10\text{H})$

Versuch 17:

Darstellung von 5-Chlor-4-nitrosalicylaldehyd (19)



5,6 g (16 mmol) 5-Chlor-2-hydroxy-4-nitrobenzylpyridiniumbromid aus Versuch 15 wird mit 2,4 g (16 mmol) Nitrosoanilin in 30 ml Ethanol suspendiert. Langsam wird unter starkem Rühren eine Lösung aus 1,3 g (32 mmol) Natriumhydroxid in 32 ml Wasser zugetropft. Dabei ändert sich die Farbe der Suspension von grün über braun nach rot. Es wird weitere 2 h gerührt, dann über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen.

Schließlich wird mit 5 N Salzsäure angesäuert und der entstehende braune Niederschlag wird isoliert. Zur Reinigung wird das Rohprodukt in einer Mischung aus Ethanol, Wasser und Essigsäure im Verhältnis 150/25/2 unter Zusatz von Aktivkohle in der Hitze gelöst. Es wird von der Aktivkohle abfiltriert und das Filtrat mit 80 ml Wasser versetzt und sofort filtriert. Aus dem Filtrat fallen beim Abkühlen goldschimmernde Kristalle aus, die isoliert und getrocknet werden.

Ausbeute: 0,8 g 4 mmol (25 %)

Schmelzpunkt: 154 °C

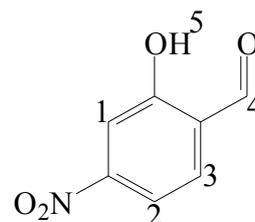
M = 201,57 g/mol C₇H₄ClNO₄

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3425 (-O-H Valenz breite Bande); 2899 (-CH Valenz); 1684 (-C=O Valenz); 1579 (Ringschwingung); 1533 (-NO₂ Valenz); 1470 (Ringschwingung); 1283 (-NO₂ Valenz); 717 (-C-Cl Valenz)

$^1\text{H-NMR}_{300}$ (CDCl_3) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 7,26 (CHCl_3 in CDCl_3); 7,41 (1H; s; ; 1H); 7,79 (1H; s; ; 2H); 9,96 (1H; s; ; 3H); 11,03 (1H; s; ; 4H)

Versuch 18:

Darstellung von 4-Nitrosalicylaldehyd (18)



6,7 g (21 mmol) 2-Hydroxy-4-nitrobenzylpyridinium-bromid aus Versuch 16 wird mit 3,2 g (21 mmol) Nitrosoanilin in 34 ml Ethanol suspendiert. Langsam wird unter starkem Rühren eine Lösung aus 1,7 g (42 mmol) Natriumhydroxid in 42 ml Wasser zugetropft. Dabei ändert sich die Farbe der Suspension von grün über braun nach rot. Es wird weitere 2 h gerührt, dann wird über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen.

Schließlich wird mit 5 N Salzsäure angesäuert und der entstehende braune Niederschlag wird isoliert. Zur Reinigung wird das Rohprodukt in einer Mischung aus Ethanol, Wasser und Essigsäure im Verhältnis 150/25/2 unter Zusatz von Aktivkohle in der Hitze gelöst. Es wird von der Aktivkohle abfiltriert und das Filtrat mit 80 ml Wasser versetzt und sofort filtriert. Aus dem Filtrat fallen beim Abkühlen goldschimmernde Kristalle aus, die isoliert und getrocknet werden.

Ausbeute: 1,9 g 12 mmol (68 %) (Lit.: 60%^[79])

Schmelzpunkt: 134 °C (Lit.: 134 °C^[79])

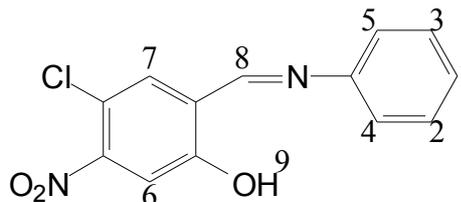
M = 167,18 g/mol $\text{C}_7\text{H}_5\text{NO}_4$

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3446 (-O-H Valenz breite Bande); 3110 (=CH Valenz); 1676 (-C=O Valenz); 1602 (Ringschwingung); 1538 (-NO₂ Valenz); 1475 (Ringschwingung); 1353 (-NO₂ Valenz)

$^1\text{H-NMR}_{300}$ (CDCl_3) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 7,26 (CHCl_3 in CDCl_3); 7,84 (3H; m; ; 1H, 2H, 3H); 10,06 (1H; s; ; 4H); 11,16 (1H; s; ; 5H)

Versuch 19:

Darstellung von 5-Chlor-2-hydroxy-4-nitrobenzylidenanilid (30)



500 mg (2,50 mmol) 5-Chlor-4-nitrosalicylaldehyd aus **Versuch 17** werden in 7 ml absolutem Ethanol gelöst und mit 231 mg (2,50 mmol) frisch destilliertem Anilin versetzt. Es entsteht sofort ein roter Niederschlag, der nach 3 h nachrühren isoliert wird.

Zur Reinigung wird aus Toluol umkristallisiert. Man erhält orangefarbene Kristalle.

Ausbeute: 560 mg 2,02 mmol (81 %)

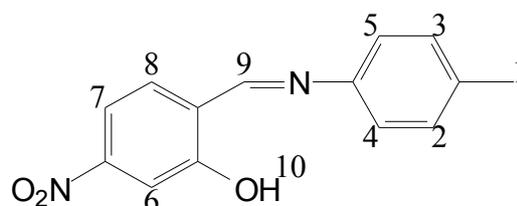
Schmelzpunkt: 153 °C

M = 276,68 g/mol $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{O}_3$

$^1\text{H-NMR}_{300}$ (DMSO-d_6) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO-d_5 in DMSO-d_6); 3,26 (Lösungsmittel: H_2O in DMSO-d_6); 7,40 (5H; m; ; 1H, 2H, 3H, 4H, 5H); 7,69 (1H; s; ; 6H); 8,08 (1H; s; ; 7H); 9,02 (1H; s; ; 8H); 10,00 (1H; s; ; 9H)

Versuch 20:

Darstellung von 2-Hydroxy-4-nitrobenzyliden-*p*-toluidin (29)



1,9 g (11 mmol) 4-Nitrosalicylaldehyd aus **Versuch 18** werden mit 1,2 g (11 mmol) *p*-Toluidin und 5,0 g wasserfreiem Magnesiumsulfat in 50 ml Toluol für 5 h zum Rückfluß erwärmt. Dann wird heiß vom Magnesiumsulfat abfiltriert. Beim Abkühlen fallen aus dem Filtrat braunrote Kristalle aus, die abgesaugt und getrocknet werden.

Zur Reinigung wird aus Toluol umkristallisiert. Man erhält rote Kristalle.

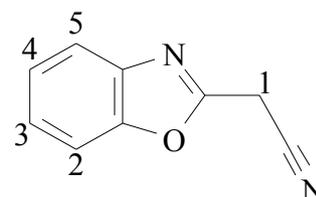
Ausbeute: 2,8 g 11 mmol (95 %)

Schmelzpunkt: 142 °C

M = 256,26 g/mol C₁₄H₁₂N₂O₃

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3443 (-O-H Valenz breite Bande); 3037 (=CH Valenz); 2923 (-CH₃ Valenz); 1680 (-C=N Valenz); 1612 (Ringschwingung); 1524 (-NO₂ Valenz); 1338 (-NO₂ Valenz)

¹H-NMR₃₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,35 (3H; s; ; 1H); 2,50 (Lösungsmittel: DMSO-d₅ in DMSO-d₆); 7,29 (2H; d; ³J_{HH} = 8,7 Hz; 2H, 3H); 7,40 (2H; d; ; 4H, 5H); 7,72 (1H; d; ³J_{HH} = 2,3 Hz; 6H); 7,80 (1H; dd; ³J_{HH} = 8,5 Hz; ⁴J_{HH} = 2,3 Hz; 7H); 7,96 (1H; d; ³J_{HH} = 8,6 Hz; 8H); 9,12 (1H; s; ; 9H); 10,38 (1H; s; ; 10H)

6.2.4. Synthese von 2-Benzoxazolylacetonitril**Versuch 21****Darstellung von 2-Benzoxazolylacetonitril (39)**

6,9 g (63 mmol) 2-Aminophenol und 12,5 g (189 mmol) Malonnitril werden in 160 ml Ethanol gelöst. Nach der Zugabe von 5 ml Essigsäure wird für 24 h zum Rückfluß erwärmt. Dann wird die dunkle Lösung am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der ölige Rückstand wird in 200 ml Chloroform gerührt. Es wird vom unlöslichen Rückstand abfiltriert. Das Filtrat wird mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und anschließend mit Wasser neutral gewaschen, dann wird die Lösung über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und schließlich am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit.

Zur Reinigung wird der grünliche Rückstand aus einer Mischung aus Ether und Hexan im Verhältnis von 5/1 umkristallisiert. Das Produkt fällt in gelben Kristallen an.

Ausbeute: 3,4 g 22 mmol (34 %)

Schmelzpunkt: 70 °C-72 °C (Lit: 70 °C - 72 °C^[91])

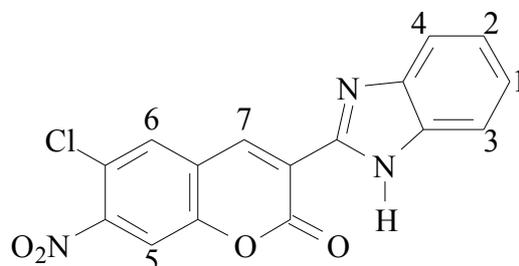
M = 158,16 g/mol C₉H₆N₂O

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO-d₅ in DMSO-d₆); 3,33 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO); 4,69 (2H; s; ; 1H); 7,42 (2H; m; ; 2H, 3H); 7,77 (2H; m; ; 4H, 5H)

6.2.5. Synthese der Cumarine

Versuch 22:

Darstellung von 3-(2-Benzimidazolyl)-6-chlor-7-nitrocumarin (32)



1,20 g (5,95 mmol) 5-Chlor-4-nitrosalicylaldehyd und 0,90 g (5,7 mmol) 2-Benzimidazolyl-acetonitril werden in 50 ml absolutiertem Ethanol gelöst und auf dem Ölbad auf 40 °C erwärmt. Nun wird 1 ml Piperidin hinzugefügt und für 24 h gerührt. Dabei färbt sich die braune Lösung sofort rot. Es fällt nach etwa zehn Minuten ein gelber Feststoff aus, der abgesaugt und in 750 ml 2%iger Salzsäure für 24 h zum Rückfluß erhitzt wird. Es entsteht eine rote Lösung, aus der nach einigen Stunden ein gelber Feststoff ausfällt. Dieser wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Das Rohprodukt wird zur Reinigung aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält feine, orange Kristalle.

Ausbeute: 1,60 g 4,68 mmol (84 %)

Schmelzpunkt: 201 °C (Sublimationspunkt)

M = 341,71 g/mol C₁₆H₈ClN₃O₄

UV/Vis: λ_{max} (log ε) = 389 nm (4,26) (EtOH)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3373 (-NH Valenz Amin); 3290 (-NH Valenz Amin); 3020 (=CH Valenz); 1705 (-C=O arom. Ester); 1615 (Ringschwingung); 1534 (-NO₂ Valenz); 1479 (Ringschwingung); 1237 (-NO₂ Valenz)

MS m/s (%) = 342 (18) [M+H]⁺; 341 (100) [M]⁺; 311 (10); 295 (20) [M-NO₂]⁺; 239 (16); 204 (16); 36 (29); 32 (63)

$^1\text{H-NMR}_{500}$ (DMSO- d_6) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO- d_5 in DMSO- d_6); 3,66 (Lösungsmittel: H_2O in DMSO); 7,36 (2H; m; ; 1H, 2H); 7,76 (2H; m; ; 3H, 4H); 8,39 (1H; s; ; 5H); 8,44 (1H; s; ; 6H); 9,17 (1H; s; ; 7H)

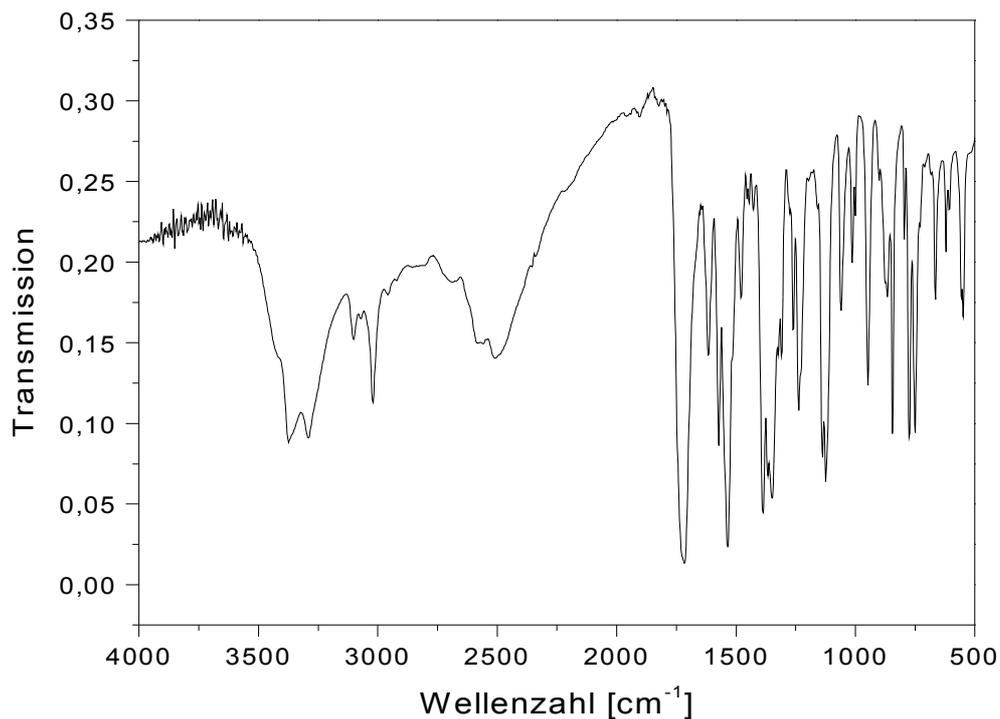
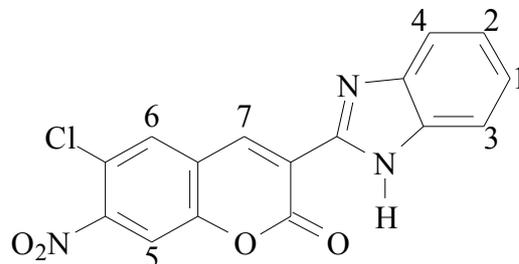


Abbildung 64: IR-Spektrum (KBr) von **32**

Versuch 23:

Darstellung von 3- (2-Benzimidazolyl)-6-chlor-7-nitrocumarin (32)



1,10 g (4,00 mmol) 5-Chlor-4-nitrosalicylaldehyd aus Versuch 17 und 0,60 g (4,0 mmol) 2-Benzimidazolylacetonitril werden in 50 ml absolutiertem Ethanol gelöst und auf dem Ölbad auf 40 °C erwärmt. Nun wird 1 ml Piperidin hinzugefügt und für 24 h gerührt. Dabei färbt sich die braune Lösung sofort rot. Es fällt nach etwa zehn Minuten ein gelber Feststoff aus, der abgesaugt und in 300 ml 2%iger Salzsäure für 24 h zum Rückfluß erhitzt wird. Es entsteht eine rote Lösung, aus der nach einigen Stunden ein gelber Feststoff ausfällt. Dieser wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Das Rohprodukt wird zur Reinigung aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält feine, gelbe Kristalle.

Ausbeute: 900 mg 2,63 mmol (69 %)

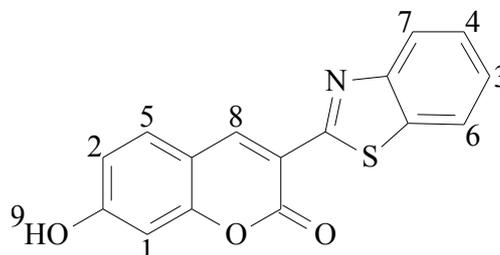
Schmelzpunkt: 201 °C (Sublimationspunkt)

M = 341,71 g/mol C₁₆H₈ClN₃O₄

Die Spektren entsprechen dem 3- (2-Benzimidazolyl)-6-chlor-7-nitrocumarin aus Versuch 22.

Versuch 24:

**Darstellung von 3-(2-Benzthiazolyl)-
7-hydroxycumarin (34)**



2,6 g (19 mmol) 4-Hydroxysalicylaldehyd werden mit 3,0 g (17 mmol) 2-Benzthiazolyl-acetonitril in 170 ml absolutiertem Ethanol gelöst und auf 40 °C Ölbadtemperatur erwärmt. Nun wird 1 ml Piperidin hinzugefügt und für 24 h gerührt. Es fällt ein gelber Feststoff aus, der abgesaugt und in 750 ml 2%iger Salzsäure für 24 h zum Rückfluß erhitzt wird. Es entsteht eine rote Lösung, aus der nach einigen Stunden ein gelber Feststoff ausfällt. Dieser wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Das Rohprodukt wird zur Reinigung aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält feine, gelbe Kristalle.

Ausbeute: 4,5 g 15 mmol (89 %)

Schmelzpunkt: 304 °C (Lit.: 305 °C^[144])

M = 295,31 g/mol C₁₆H₉NO₃S

UV/Vis: λ_{max} (log ε) = 394 nm (4,46) (EtOH)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3211 (-O-H Valenz breite Bande); 1688 (-C=O Valenz); 1616 (Ringschwingung); 1483 (Ringschwingung); 1295 (-C-O-C- Valenz); 1257 (-C-O Valenz Phenole); 1193 (-C-O-C Valenz)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO-d₅ in DMSO-d₆); 3,35 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO-d₆); 6,85 (1H; d; ⁴J_{HH} = 2,3 Hz; 1H); 6,92 (1H; dd; ³J_{HH} = 8,8 Hz; ⁴J_{HH} = 2,3 Hz; 2H); 7,45 (1H; t; ³J_{HH} = 8,0 Hz; 3H); 7,55 (1H; t; ³J_{HH} = 8,3 Hz; 4H); 7,91 (1H; d; ³J_{HH} = 8,6 Hz; 5H); 8,04 (1H; d; ³J_{HH} = 8,1 Hz; 6H);

8,15 (1H; d; $^3J_{\text{HH}} = 8,0 \text{ Hz}$; 7H); 9,15 (1H; s; ; 8H); 11,09 (1H; s; ; 9H)

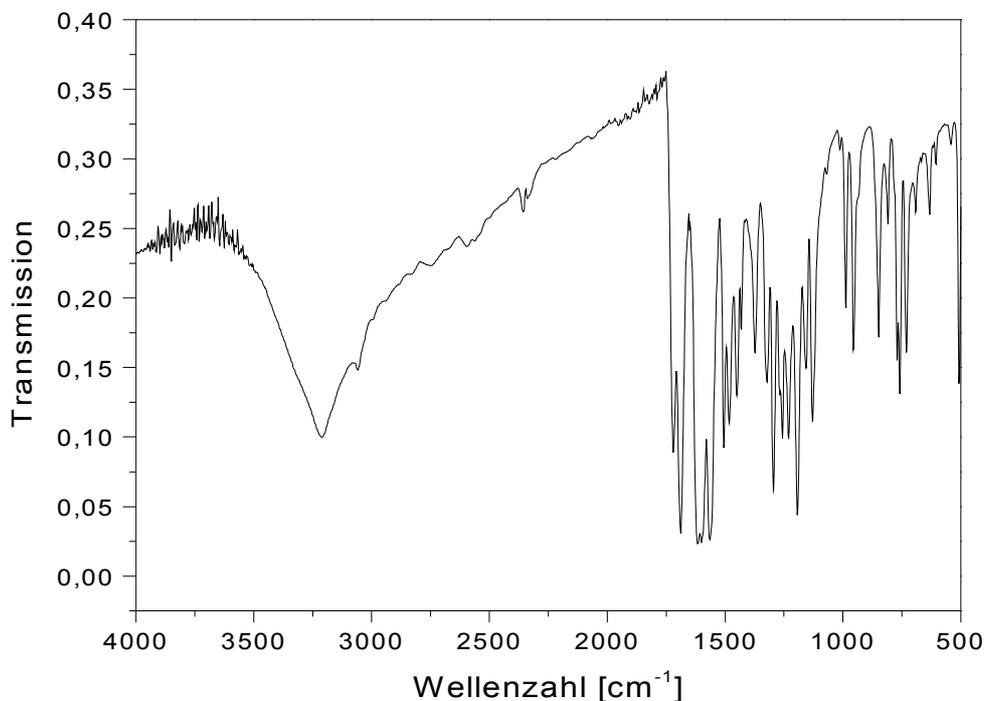
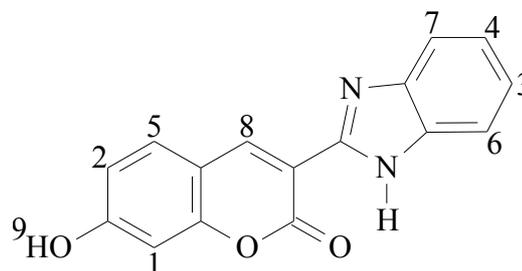


Abbildung 65: IR- Spektrum (KBr) von 34

Versuch 25:

**Darstellung von 3-(2-Benzimidazolyl)-
7-hydroxycumarin (35)**



3,0 g (22 mmol) 4-Hydroxysalicylaldehyd werden mit 3,1 g (20 mmol) 2-Benzimidazolyl-acetonitril in 180 ml absolutiertem Ethanol gelöst und auf 40 °C Ölbadtemperatur erwärmt. Nun wird 1 ml Piperidin hinzugefügt und für 24 h gerührt. Es fällt ein gelber Feststoff aus, der abgesaugt

und in 750 ml 2%iger Salzsäure für 24 h zum Rückfluß erhitzt wird. Es entsteht eine rote Lösung, aus der nach einigen Stunden ein gelber Feststoff ausfällt. Dieser wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Das Rohprodukt wird zur Reinigung aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält feine, gelbe Kristalle.

Ausbeute: 3,5 g 13 mmol (63 %)

Schmelzpunkt: 295 °C (Lit.: 295 °C^[145])

M = 278,27 g/mol C₁₆H₁₀N₂O₃

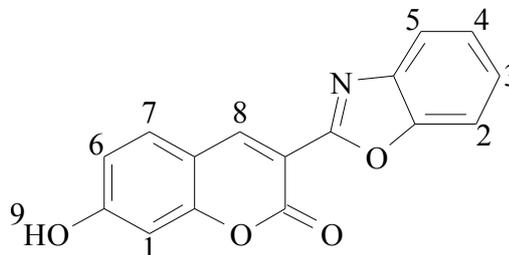
UV/Vis: λ_{max} (log ε) = 382 nm (4,32) (EtOH)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3500 (-N-H Valenz breite Bande); 3260 (-O-H Valenz breite Bande); 3059 (=C-H Valenz Aromaten); 1706 (-C=O Valenz); 1598 (Ringschwingung); 1568 (-N-H Deform.); 1460 (Ringschwingung); 1390 (-CH₃ Deform.); 1349 (-C-N Valenz); 1305 (-C-O-C- Valenz); 1241 (-C-O Valenz Phenole);

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO-d₅ in DMSO-d₆); 3,47 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO-d₆); 6,95 (1H; d; ⁴J_{HH} = 2,0 Hz; 1H); 7,01 (1H; dd; ³J_{HH} = 8,6 Hz; ³J_{HH} = 2,2 Hz; 2H); 7,51 (2H; m; ; 3H,4H); 7,76 (1H; d; ³J_{HH} = 7,6 Hz; 5H); 7,83 (2H; m; ; 6H, 7H); 9,33 (1H; s; ; 8H); 11,56 (1H; s; ; 9H);

Versuch 26:

**Darstellung von 3-(2-Benzoxazolyl)-
7-hydroxycumarin (37)**



4,3 g (30 mmol) 4-Hydroxysalicylaldehyd werden mit 4,4 g (27 mmol) 2-Benzoxazolylacetonitril in 170 ml absolutiertem Ethanol gelöst und auf 40 °C Ölbadtemperatur erwärmt. Nun wird 1 ml Piperidin hinzugefügt und für 24 h gerührt. Es fällt ein gelber Feststoff aus, der abgesaugt und in 750 ml 2%iger Salzsäure für 24 h zum Rückfluß erhitzt wird. Es entsteht eine rote Lösung, aus der nach einigen Stunden ein gelber Feststoff ausfällt. Dieser wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Das Rohprodukt wird zur Reinigung aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält feine, gelbe Kristalle.

Ausbeute: 6,7 g 24 mmol (89 %)

Schmelzpunkt: 305 °C (Lit.: 305 °C^[144])

M = 279,25 g/mol C₁₆H₉NO₄

UV/Vis: λ_{max} (log ε) = 423 nm (4,00) (EtOH)

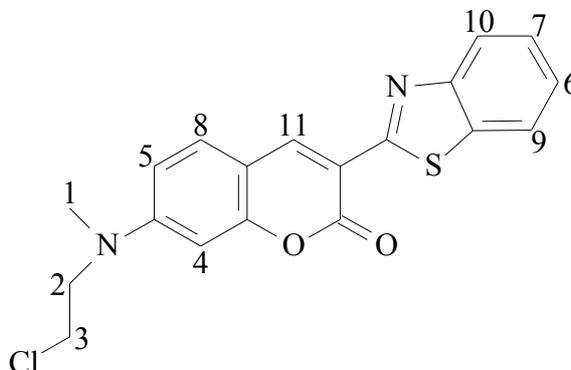
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3257 (-OH Valenz breite Bande); 1682 (-C=O Valenz); 1605 (Ringschwingung); 1375 (-CH₃ Deform.); 1334 (-C-N Valenz); 1284 (-C-O-C- Valenz)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO-d₅ in DMSO-d₆); 3,35 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO-d₆); 6,80 (2H; m; ; 1H, 2H); 6,90 (3H; m; ; 3H, 4H, 5H); 7,87 (1H; d; ³J_{HH} = 8,7 Hz; 6H); 8,38 (1H; dd; ³J_{HH} = 6,6 Hz;

$^4J_{\text{HH}} = 1,4 \text{ Hz; } 7\text{H}); 8,94 (1\text{H; s; ; } 8\text{H}); 10,15 (1\text{H; s; ; } 9\text{H})$

Versuch 27:

**Darstellung von 3-(2-Benzthiazolyl)-
7-[N-(2-chlorethyl)-N-methylamino]-
cumarin (50)**



3,7 g (17 mmol) 4-[N-(2-Chlorethyl)-N-methylamino]salicylaldehyd und 2,8 g (16 mmol) 2-Benzthiazolylacetonitril werden in 140 ml absolutiertem Ethanol gelöst und auf dem Ölbad auf 40 °C erwärmt. Nun wird 1 ml Piperidin hinzugefügt und für 24 h gerührt. Es fällt ein orangefarbener Feststoff aus, der abgesaugt und in 500 ml 2%iger Salzsäure für 24 h zum Rückfluß erhitzt wird. Es entsteht eine rote Lösung, aus der nach einigen Stunden ein orangefarbener Feststoff ausfällt. Dieser wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Das Rohprodukt wird zur Reinigung aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält feine, orangefarbene Kristalle.

Ausbeute: 5,0 g 14 mmol (85 %)

Schmelzpunkt: 213 °C

M = 370,86 g/mol C₁₉H₁₅N₂O₂SCl

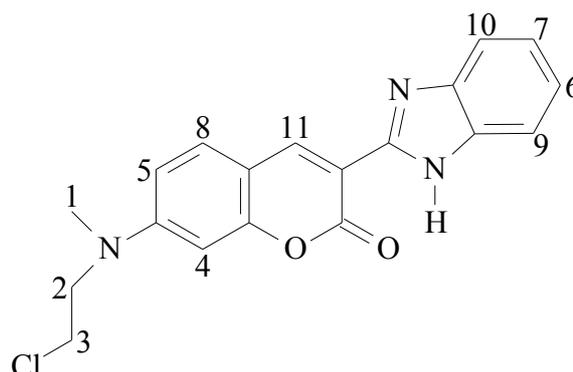
UV/Vis: λ_{max} (log ϵ) = 437 nm (4,53) (EtOH)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2955 (-CH Valenz); 1706 (-C=O Valenz); 1616 (-N-H Deform.); 1589 (Ringschwingung); 1515 (Ringschwingung); 1398 (-CH₃ und -CH₂ Deform.); 1309 (-C-N Valenz); 1194 (-C-O-C Valenz); 766 (-C-Cl Valenz)

$^1\text{H-NMR}_{500}$ (DMSO- d_6) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO- d_5 in DMSO- d_6); 3,13 (3H; s; ; 1H); 3,33 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO); 3,86 (4H; m; ; 2H,3H); 6,77 (1H; d; $^4J_{\text{HH}} = 2,2$ Hz; 4H); 6,93 (1H; dd; $^3J_{\text{HH}} = 9,0$ Hz; $^4J_{\text{HH}} = 2,4$ Hz; 5H); 7,41 (1H; t; $^3J_{\text{HH}} = 8,0$ Hz; 6H); 7,53 (1H; t; $^3J_{\text{HH}} = 8,2$ Hz; 7H); 7,81 (1H; d; $^3J_{\text{HH}} = 9,0$ Hz; 8H); 7,99 (1H; d; $^3J_{\text{HH}} = 8,1$ Hz; 9H); 8,11 (1H; d; $^3J_{\text{HH}} = 7,9$ Hz; 10H); 9,05 (1H; s; ; 11H)

Versuch 28:

Darstellung von 3-(2-Benzimidazolyl)-7-[N-(2-chlorethyl)-N-methylamino]-cumarin (51)



3,7 g (17 mmol) 4-[N-(2-Chlorethyl)-N-methylamino]salicylaldehyd und 2,5 g (16 mmol) 2-Benzimidazolylacetonitril werden in 140 ml absolutiertem Ethanol gelöst und auf dem Ölbad auf 40 °C erwärmt. Nun wird 1 ml Piperidin hinzugefügt und für 24 h gerührt. Es fällt ein orangefarbener Feststoff aus, der abgesaugt und in 750 ml 2%iger Salzsäure für 24 h zum Rückfluß erhitzt wird. Es entsteht eine rote Lösung, aus der nach einigen Stunden ein orangefarbener Feststoff ausfällt. Dieser wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Das Rohprodukt wird zur Reinigung aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält feine, orange Kristalle.

Ausbeute: 5,2 g 15 mmol (97 %)

Schmelzpunkt: 219 °C

M = 353,81 g/mol C₁₉H₁₆N₃O₂Cl

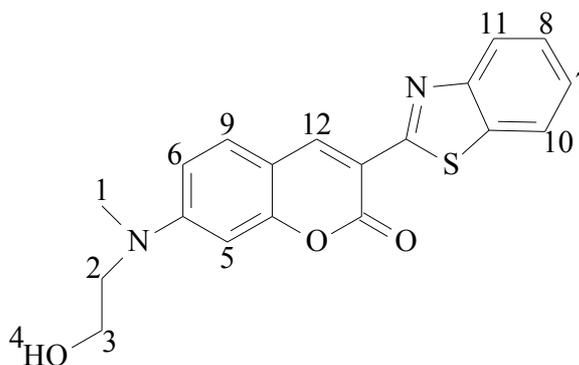
UV/Vis: λ_{max} (log ϵ) = 426 nm (4,66) (EtOH)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3422 (-N-H Valenz breite Bande); 2957 (-CH Valenz); 2729 (-N-CH₃ Valenz) 1721 (-C=O Valenz); 1618 (-N-H Deform.); 1587 (Ringschwingung); 1514 (Ringschwingung); 1403 (-CH₃ und -CH₂ Deform.); 1311 (-C-N Valenz); 1266 (-C-O-C- Valenz)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO-d₅ in DMSO-d₆); 3,16 (3H; s; ; 1H); 3,35 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO); 3,66 (2H; t; ³J_{HH} = 5,4 Hz; 2H,); 3,93 (2H; t; ³J_{HH} = 5,8 Hz; 3H); 6,84 (1H; d; ⁴J_{HH} = 2,4 Hz; 4H); 6,99 (1H; dd; ³J_{HH} = 9,0 Hz; ⁴J_{HH} = 2,4 Hz; 5H); 7,44 (2H; m; ; 6H, 7H); 7,68 (1H; d; ³J_{HH} = 9,0 Hz; 8H); 7,78 (2H; m; ; 9H, 10H); 9,12 (1H; s; ; 11H)

Versuch 29:

Darstellung von 3-(2-Benzthiazolyl)-7-[N-(2-hydroxyethyl)-N-methyl-amino]cumarin (42)



3.0 g (15 mmol) 4-[N-(2-Hydroxyethyl)-N-methylamino]salicylaldehyd und 2,8 g (16 mmol) 2-Benzthiazolylacetonitril werden in 130 ml absolutiertem Ethanol gelöst und auf dem Ölbad auf 40 °C erwärmt. Nun wird 1 ml Piperidin hinzugefügt und für 24 h gerührt. Es fällt ein orangener Feststoff aus, der abgesaugt und in 500 ml 2%iger Salzsäure für 24 h zum Rückfluß erhitzt wird. Es entsteht eine rote Lösung, aus der nach einigen Stunden ein orangefarbener Feststoff ausfällt. Dieser wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Das Rohprodukt wird zur Reinigung aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält feine, orangefarbene Kristalle.

Ausbeute: 4,8 g 14 mmol (89 %)

Schmelzpunkt: 225 °C

M = 352,41 g/mol C₁₉H₁₆N₂O₃S

UV/Vis: λ_{\max} ($\log \epsilon$) = 450 nm (4,76) (EtOH)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3393 (-OH Valenz); 2901 (-CH Valenz); 1705 (-C=O arom. Ester); 1616 (Ringschwingung); 1483 (Ringschwingung); 1455 (-CH₃, -CH₂ Deform.); 1397 (-CH₃ Deform.); 1359 (-C-N Valenz); 1195 (-C-O Valenz Phenole)

MS m/s (%) = 353 (9) [M+H]⁺; 352 (44) [M]⁺; 321 (100); 278 (61); 250 (20); 222 (34); 139 (16); 44 (18); 42 (49); 32 (95)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO-d₅ in DMSO-d₆); 3,10 (3H; s; ; 1H); 3,35 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO); 3,61 (4H; m; ; 2H, 3H); 4,81 (1H; t; ³J_{HH} = 5,3 Hz; 4H); 6,70 (1H; m; ; 5H); 6,88 (1H; dd; ³J_{HH} = 9,0 Hz; ⁴J_{HH} = 2,2 Hz; 6H); 7,42 (1H; t; ³J_{HH} = 7,5 Hz; 7H); 7,58 (1H; t; ³J_{HH} = 7,3 Hz; 8H); 7,77 (1H; d; ³J_{HH} = 9,0 Hz; 9H); 8,00 (1H; d; ³J_{HH} = 7,8 Hz; 10H); 8,11 (1H; d; ³J_{HH} = 7,9 Hz; 11H); 9,04 (1H; s; ; 12H)

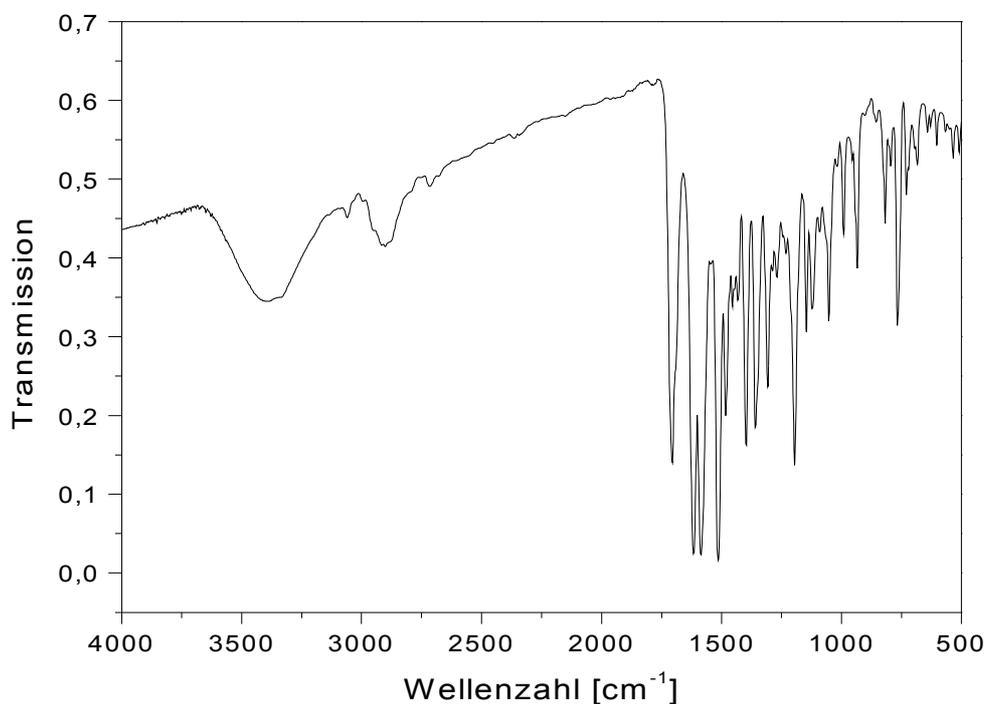
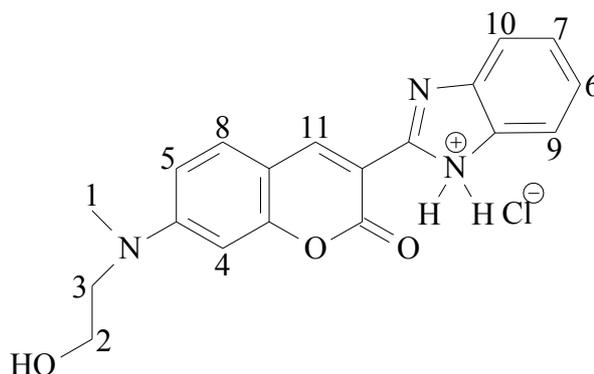


Abbildung 66: IR-Spektrum (KBr) von 42

Versuch 30:

**Darstellung von 3-(2-Benzimidazolyl)-
7-[N-(2-hydroxyethyl)-N-methyl-amino]
cumarin (44)**



3,6 g (17 mmol) 4-[N-(2-Hydroxyethyl)-N-methylamino]salicylaldehyd und 2,5 g (16 mmol) 2-Benzimidazolylacetonitril werden in 150 ml absolutiertem Ethanol gelöst und auf dem Ölbad auf

40 °C erwärmt. Nun wird 1 ml Piperidin hinzugefügt und für 24 h gerührt. Es fällt ein gelber Feststoff aus, der abgesaugt und in 750 ml 2%iger Salzsäure für 24 h zum Rückfluß erhitzt wird. Es entsteht eine rote Lösung, aus der nach einigen Stunden ein orangefarbener Feststoff ausfällt. Dieser wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Das Rohprodukt wird zur Reinigung aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält feine, orangefarbene Kristalle.

Ausbeute: 5,2 g 14 mmol (88 %)

Schmelzpunkt: 256 °C

M = 371,82 g/mol C₁₉H₁₈N₃O₃Cl

UV/Vis: λ_{max} (log ε) = 460 nm (4,68) (EtOH)

Elementaranalyse:	C (ber): 61,37 %	H (ber): 4,90 %	N (ber): 11,30 %
	C (gef): 61,27 %	H (gef): 5,07 %	N (gef): 11,06 %

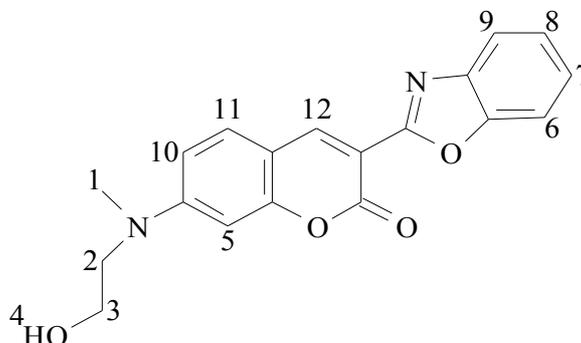
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3422 (-N-H Valenz breite Bande); 1686 (-C=O Valenz); 1613 (Ringschwingung); 1561 (-N-H Deform.); 1510 (Ringschwingung); 1404 (-CH₃ Deform.); 1362 (-C-N Valenz); 1310 (-C-O-C- Valenz)

MS m/s (%) = 337 (23) [M+H]⁺; 336 (88) [M]⁺; 307 (17); 289 (30); 165 (21); 152 (22); 136 (24); 107 (30); 89 (93); 77 (100); 63 (76); 51 (76)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO-d₅ in DMSO-d₆); 3,14 (3H; s; ; 1H); 3,38 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO); 3,62 (4H; m; ; 2H, 3H); 6,77 (1H; d; ⁴J_{HH} = 2,3 Hz; 4H); 6,96 (1H; dd; ³J_{HH} = 9,1 Hz; ⁴J_{HH} = 2,4 Hz; 5H); 7,49 (2H; m; ; 6H, 7H); 7,60 (1H; d; ³J_{HH} = 9,1 Hz; 8H); 7,80 (2H; m; ; 9H, 10H); 9,15 (1H; s; ; 11H)

Versuch 31:

**Darstellung von 3-(2-Benzoxazolyl)-
7-[N-(2-hydroxyethyl)-N-methyl-amino]
cumarin (43)**



3.6 g (17 mmol) 4-[N-(2-Hydroxyethyl)-N-methylamino]salicylaldehyd und 2,5 g (16 mmol) 2-Benzthiazolylacetonitril werden in 150 ml absolutiertem Ethanol gelöst und auf dem Ölbad auf 40 °C erwärmt. Nun wird 1 ml Piperidin hinzugefügt und für 24 h gerührt. Es fällt ein orangner Feststoff aus, der abgesaugt und in 500 ml 2%iger Salzsäure für 24 h zum Rückfluß erhitzt wird. Es entsteht eine rote Lösung, aus der nach einigen Stunden ein orangefarbener Feststoff ausfällt. Dieser wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Das Rohprodukt wird zur Reinigung aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält feine, orangefarbene Kristalle.

Ausbeute: 4,2 g 13 mmol (79 %)

Schmelzpunkt: 251 °C

M = 336,35 g/mol C₁₉H₁₆N₂O₄

UV/Vis: λ_{\max} (log ϵ) = 426 nm (4,82) (EtOH)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3139 (-N-H Valenz breite Bande); 1698 (-C=O Valenz); 1613 (Ringschwingung); 1510 (Ringschwingung); 1455 (-CH₃ Deform.); 1205 (-C-O-C- Valenz)

MS m/s (%) = 336 (1) [M]⁺; 323 (6); 247 (15); 246 (100); 159 (39); 80 (12); 63 (5); 42 (7)

$^1\text{H-NMR}_{500}$ (DMSO- d_6) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO- d_5 in DMSO- d_6); 3,11 (3H; s; ; 1H); 3,35 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO); 3,61 (4H; m; ; 2H, 3H); 4,81 (1H; breites s; 5,30; 4H); 6,69 (1H; s; ; 5H); 6,80 (1H; m; ; 6H); 6,90 (3H; m; ; 7H, 8H, 9H); 7,72 (1H; d; $^3J_{\text{HH}} = 9,1$ Hz; 10H); 8,38 (1H; dd; $^3J_{\text{HH}} = 8,2$ Hz; $^4J_{\text{HH}} = 1,4$ Hz; 11H); 8,80 (1H;s; ; 12H)

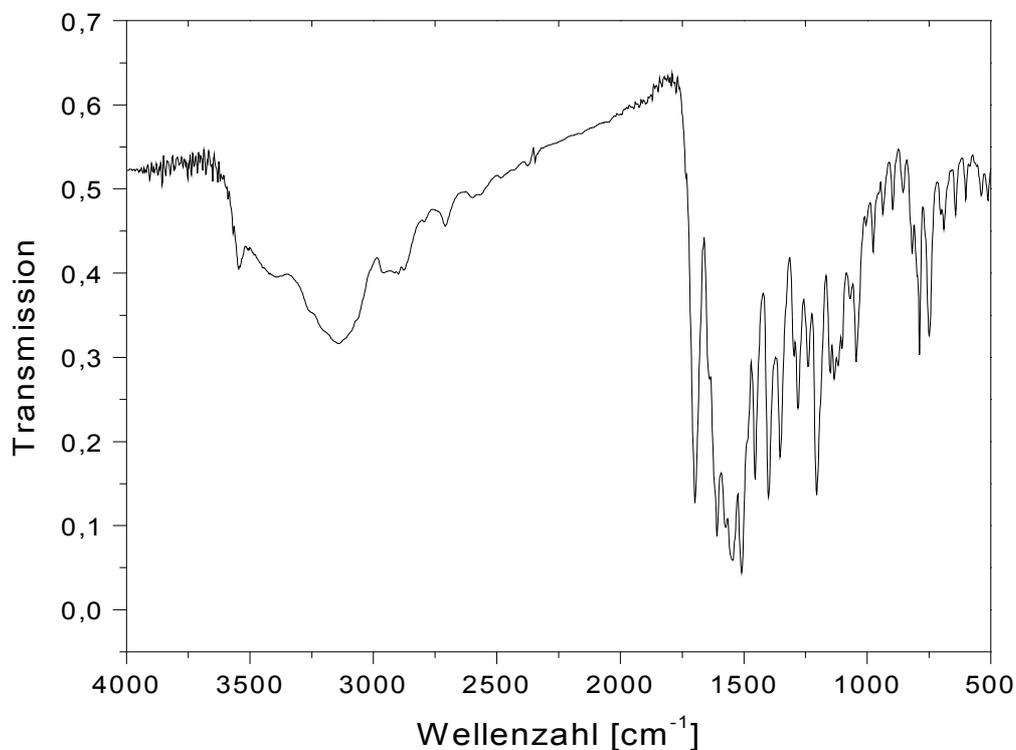
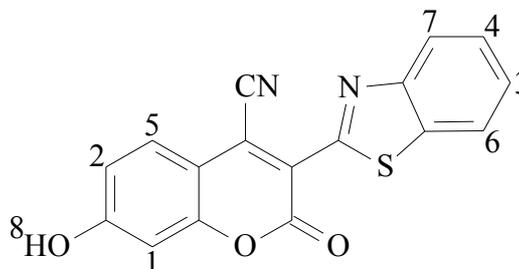


Abbildung 67: IR-Spektrum (KBr) von 43

6.2.6. Einführen der Nitrilgruppe

Versuch 32:

Darstellung von 3-(2-Benzthiazolyl)- 4-cyano-7-hydroxycumarin (53)



3,0 g (10 mmol) 3-(2-Benzthiazolyl)-7-hydroxycumarin werden in 25 ml DMF suspendiert und mit einer Lösung aus 1,0 g (20 mmol) Natriumcyanid in 3 ml Wasser behandelt. Die Mischung wird nun bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C für 1 h gerührt. Die dabei entstandene Lösung wird filtriert und das Filtrat im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C abgekühlt. Nun werden 0,52 ml (10 mmol) Brom in 30 Minuten zugetropft und anschließend wird eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt. Der entstandene Feststoff wird abgesaugt, dann mit viel Wasser und etwas Ethanol gewaschen.

Das Rohprodukt wird durch Umkristallisation aus Ethanol gereinigt. Man erhält hellrote, feine Kristalle.

Ausbeute: 2,8 g 8,7 mmol (87 %)

Schmelzpunkt: 336 °C (Lit.: 336 °C-338 °C^[54])

M = 320,32 g/mol

UV/Vis: λ_{\max} (log ϵ) = 433 nm (4,43) (EtOH)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3332 (-O-H Valenz breite Bande); 1725 (-C=O Valenz); 1618 (Ringschwingung); 1475 (Ringschwingung); 1366 (-CN Valenz); 1294 (-C-O-C- Valenz); 1264 (-C-O Valenz Phenole); 1134 (-C-O-C Valenz)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50

(Lösungsmittel: DMSO-d₅ in DMSO-d₆); 3,35 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO-d₆); 6,91 (1H; d; ⁴J_{HH} = 2,3 Hz; 1H); 7,06 (1H; dd; ³J_{HH} = 8,8 Hz; ⁴J_{HH} = 2,3 Hz; 2H); 7,54 (1H; t; ³J_{HH} = 7,2 Hz; 3H); 7,61 (1H; t; ³J_{HH} = 7,1 Hz; 4H); 7,86 (1H; d; ³J_{HH} = 8,8 Hz; 5H); 8,11 (1H; d; ³J_{HH} = 8,2 Hz; 6H); 8,22 (1H; d; ³J_{HH} = 8,0 Hz; 7H); 11,38 (1H; s; ; 8H)

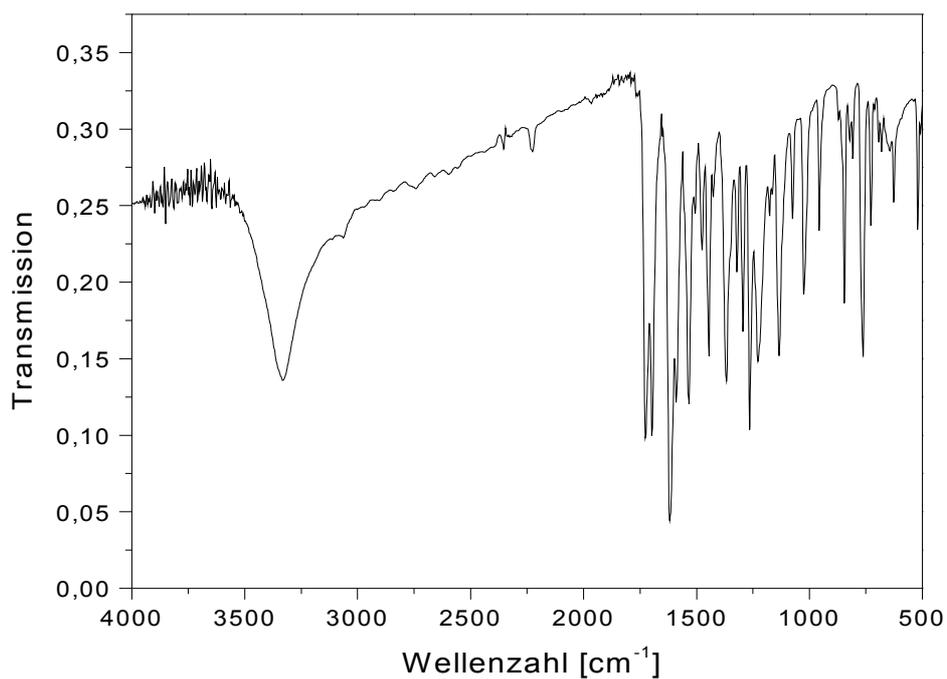
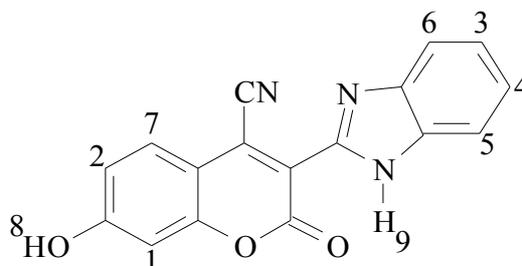


Abbildung 68: IR-Spektrum (KBr) von **53**

Versuch 33:

Darstellung von 3-(2-Benzimidazolyl)-4-cyano-7-hydroxycumarin (54)



2,8 g (10 mmol) 3-(2-Benzimidazolyl)-7-hydroxycumarin werden in 25 ml DMF suspendiert und mit einer Lösung aus 1,0 g (20 mmol) Natriumcyanid in 3 ml Wasser behandelt. Die Mischung wird nun bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C für 1 h gerührt. Die dabei entstandene Lösung wird filtriert und das Filtrat im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C abgekühlt. Nun werden 0,52 ml (10 mmol) Brom in 30 Minuten zugetropft und anschließend wird eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt. Der entstandene Feststoff wird abgesaugt, dann mit viel Wasser und etwas Ethanol gewaschen.

Das Rohprodukt wird aus Ethanol umkristallisiert. Man erhält hellrote, feine Kristalle, die noch mit dem Edukt verunreinigt sind. Deshalb wird an Kieselgel 60 mit Methanol als mobiler Phase chromatographiert. Das Eluat wird vom Lösungsmittel befreit und der rote Rückstand wird mehrfach in DMSO gelöst und mit Wasser ausgefällt. So wird 3-(2-Benzimidazolyl)-4-cyano-7-hydroxycumarin schließlich als rotes Pulver erhalten.

Ausbeute: 0,9 g 2,9 mmol (28 %)

Schmelzpunkt: 322 °C (Lit.: 322 °C^[54])

M = 303,28 g/mol

UV/Vis: λ_{\max} (log ϵ) = 438 nm (4,09) (EtOH)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3246 (-O-H Valenz breite Bande und -N-H Valenz); 3078 (=C-H Valenz)

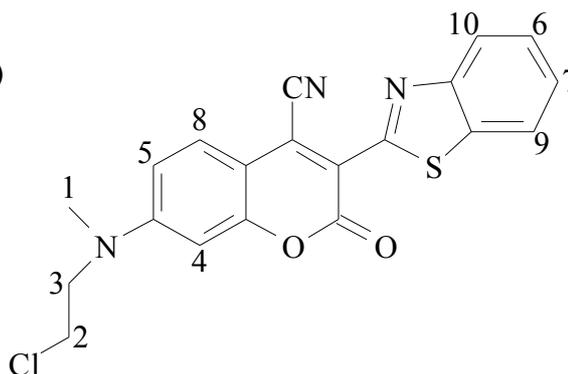
bei Aromaten); 2250 (-CN Valenz); 1722 (-C=O Valenz); 1617 (Ringschwingung); 1506 (Ringschwingung); 1341 (-CN Valenz); 1227 (-C-O Valenz Phenole); 1138 (-C-O-C- Valenz);

$^1\text{H-NMR}_{500}$ (DMSO- d_6) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO- d_5 in DMSO- d_6); 3,35 (Lösungsmittel: H_2O in DMSO- d_6); 6,91 (1H; d; ; $^4J_{\text{HH}} = 2,2$ Hz; 1H); 7,03 (1H; dd; $^3J_{\text{HH}} = 8,8$ Hz; $^4J_{\text{HH}} = 2,3$ Hz; 2H); 7,29 (2H; m; ; 3H, 4H); 7,72 (2H; m; ; 5H, 6H); 7,81 (1H; d; $^3J_{\text{HH}} = 8,7$ Hz; 7H); 11,24 (1H; breites s; ; 8H); 12,72 (1H; breites s; ; 9H)

Versuch 34:

Darstellung von 3-(2-Benzthiazolyl)-4-cyano-

7-[*N*-(2-chlorethyl)-*N*-methylamino]cumarin (58)



3,5 g (10 mmol) 3-(2-Benzthiazolyl)-7-[*N*-(2-chlorethyl)-*N*-methylamino]cumarin werden in 50 ml DMF suspendiert und mit einer Lösung aus 1,0 g (20 mmol) Natriumcyanid in 3 ml Wasser behandelt. Die Mischung wird nun bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C für 1 h gerührt. Die dabei entstandene Lösung wird filtriert und das Filtrat im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C abgekühlt. Nun werden 0,52 ml (10 mmol) Brom in 30 Minuten zugetropft und anschließend wird eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt. Der entstandene Feststoff wird abgesaugt und mit viel Wasser und etwas Ethanol gewaschen.

Das Rohprodukt wird durch Umkristallisation aus Ethanol gereinigt. Man erhält violette, metallisch glänzende Kristalle.

Ausbeute: 3,3 g 8,4 mmol (84 %)

Schmelzpunkt: 261 °C - 263 °C

M = 395,86 g/mol C₂₀H₁₄ClN₃O₂S

UV/Vis: λ_{max} (log ε) = 513 nm (4,54) (Ethanol)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3050 (=C-H Valenz); 2920 (-CH₃ Valenz); 2227 (-CN Valenz); 1704 (-C=O Valenz); 1615 (Ringschwingung); 1563 (-N-H Deform.); 1510 (Ringschwingung); 1483 (-CH₃ und -CH₂ Deform.); 1398 (-CH₃ Deform.); 1254 (-C-O-C- Valenz); 1153 (-C-N Valenz)

MS m/s (%) = 396 (11) [M+H]⁺; 395 (39) [M]⁺; 346 (100); 173 (12); 44 (55)

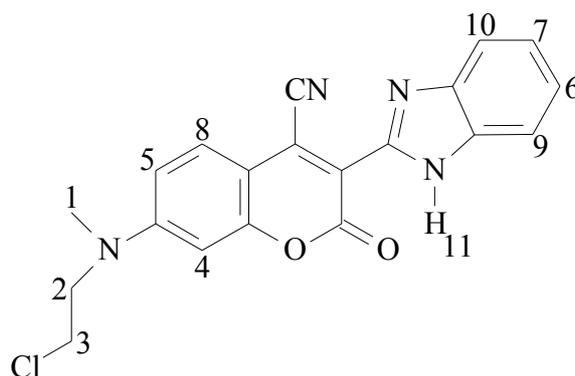
¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO-d₅ in DMSO-d₆); 3,17 (3H; s; ; 1H); 3,36 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO); 3,87 (2H; t; ³J_{HH} = 6,3 Hz; 2H); 3,95 (2H; t; ³J_{HH} = 6,4 Hz; 3H); 6,88 (1H; d; ⁴J_{HH} = 2,5 Hz; 4H); 7,11 (1H; dd; ³J_{HH} = 9,2 Hz; ⁴J_{HH} = 2,5 Hz; 5H); 7,51 (1H; m; ; 6H); 7,60 (1H; m; ; 7H); 7,76 (1H; d; ³J_{HH} = 9,1 Hz; 8H); 8,08 (1H; d; ³J_{HH} = 8,1 Hz; 9H); 8,20 (1H; d; ³J_{HH} = 8,7 Hz; 10H)

Versuch 35:

Darstellung von 3-(2-Benzimidazolyl)-4-cyano-

7-(N-(2-chlorethyl)-N-methylamino]

cumarin (59)



3,5 g (10 mmol) 3-(2-Benzimidazolyl)-7-[N-(2-hydroxyethyl)-N-methylamino]cumarin werden in 100 ml DMF suspendiert und mit einer Lösung aus 1,0 g (20 mmol) Natriumcyanid in 3 ml

Wasser behandelt. Die Mischung wird nun bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C für 1 h gerührt. Die dabei entstandene Lösung wird filtriert und das Filtrat im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C abgekühlt. Nun werden 0,52 ml (10 mmol) Brom in 30 Minuten zugetropft und anschließend wird eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt. Der entstandene Feststoff wird abgesaugt und mit viel Wasser und etwas Ethanol gewaschen.

Das Rohprodukt wird durch Umkristallisation aus Ethanol gereinigt. Man erhält violette, metallisch glänzende Kristalle.

Ausbeute: 3,2 g 8,5 mmol (84 %)

Schmelzpunkt: 250 °C - 252 °C

M = 378,82 g/mol C₂₀H₁₅N₄O₂Cl

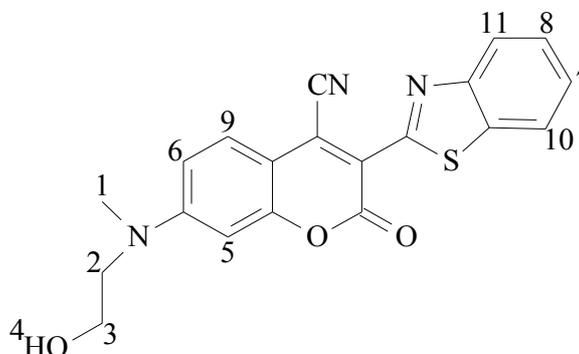
UV/Vis: λ_{max} (log ε) = 496 nm (4,52) (DMSO)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3377 (-N-H Valenz breite Bande, -OH Valenz); 2922 (-CH₃ Valenz); 2227 (-CN Valenz); 1703 (-C=O Valenz); 1615 (Ringschwingung); 1568 (-N-H Deform.); 1525 (Ringschwingung); 1445 (-CH₃ und -CH₂ Deform.); 1397 (-CH₃ Deform.); 1352 (-C-N Valenz); 1157 (-C-O-C- Valenz)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO-d₅ in DMSO-d₆); 3,15 (3H; s; ; 1H); 3,35 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO); 3,85 (2H; t; ³J_{HH} = 5,4 Hz; 2H); 3,91 (2H; t; ³J_{HH} = 5,7 Hz; 3H); 6,85 (1H; d; ⁴J_{HH} = 2,4 Hz; 4H); 7,06 (1H; dd; ³J_{HH} = 9,1 Hz; ³J_{HH} = 2,5 Hz; 5H); 7,26 (2H; m; ; 6H, 7H); 7,70 (3H; m; ; 8H, 9H, 10H); 12,65 (1H; s; ; 11H)

Versuch 36:

Darstellung von 3-(2-Benzthiazolyl)-4-cyano-7-[N-(2-hydroxyethyl)-N-methylamino]cumarin (55)



3,5 g (10 mmol) 3-(2-Benzthiazolyl)-7-[N-(2-hydroxyethyl)-N-methylamino]cumarin werden in 50 ml DMF suspendiert und mit einer Lösung aus 1,0 g (20 mol) Natriumcyanid in 3 ml Wasser behandelt. Die Mischung wird nun bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C für 1 h gerührt. Die dabei entstandene Lösung wird filtriert und das Filtrat im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C abgekühlt. Nun werden 0,52 ml (10 mmol) Brom in 30 Minuten zugetropft und anschließend wird eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt. Der entstandene Feststoff wird abgesaugt und mit viel Wasser und etwas Ethanol gewaschen.

Das Rohprodukt wird durch Umkristallisation aus Ethanol gereinigt. Man erhält violette, metallisch glänzende Kristalle.

Ausbeute: 2,9 g 7,7 mmol (77 %)

Schmelzpunkt: 266 °C

M = 377,42 g/mol C₂₀H₁₅N₃O₃S

UV/Vis: λ_{max} (log ε) = 515 nm (4,19) (EtOH)

Elementaranalyse:	C (ber): 63,65 %	H (ber): 4,01 %	N (ber): 11,13 %
	C (gef): 63,46 %	H (gef): 4,12 %	N (gef): 11,12 %

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3448 (-OH Valenz); 2927 (-CH Valenz); 1703 (-C=O arom. Ester); 1615 (Ringschwingung); 1485 (Ringschwingung); 1448 (-CH₃, -CH₂ Deform.); 1400 (-CH₃ Deform.); 1352 (-C-N Valenz); 1209 (-C-O Valenz Phenole) 1158, 1108 (-C-O-C Valenz in Estern)

MS m/s (%) = 378 (4) [M+H]⁺; 377 (37) [M]⁺; 348 (100); 173 (12); 44 (17); 32 (95)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO-d₅ in DMSO-d₆); 3,13 (3H; s; ; 1H); 3,35 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO); 3,61 (4H; m; ; 2H, 3H); 4,86 (1H; t; ³J_{HH} = 5,0 Hz; 4H); 6,77 (1H; d; ⁴J_{HH} = 2,5 Hz; 5H); 7,04 (1H; dd; ³J_{HH} = 9,3 Hz; ⁴J_{HH} = 2,5 Hz; 6H); 7,49 (1H; t; ³J_{HH} = 8,1 Hz; 7H); 7,58 (1H; t; ³J_{HH} = 7,3 Hz; 8H); 7,69 (1H; d; ³J_{HH} = 9,2 Hz; 9H); 8,04 (1H;d; ³J_{HH} = 8,2 Hz; 10H); 8,12 (1H;d; ³J_{HH} = 8,0 Hz; 11H)

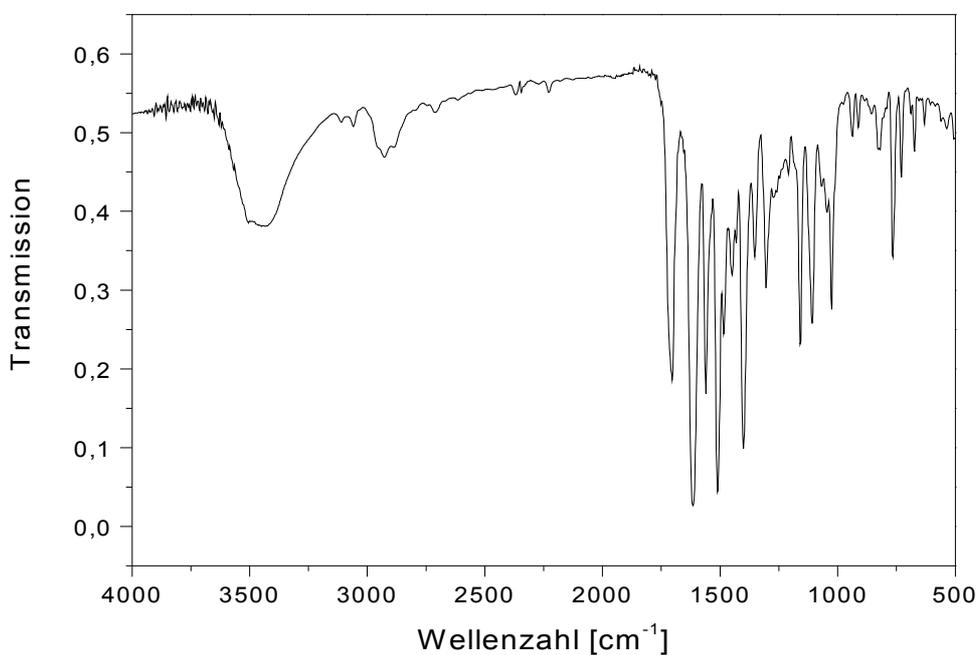
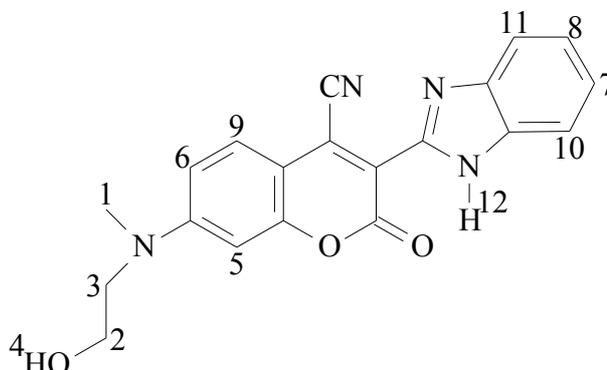


Abbildung 69: IR-Spektrum (KBr) von **55**

Versuch 37:

Darstellung von 3-(2-Benzimidazolyl)-4-cyano-7-[N-(2-hydroxyethyl)-N-methylamino]cumarin (57)



2,5 g (7,5 mmol) 3-(2-Benzimidazolyl)-7-[N-(2-hydroxyethyl)-N-methylamino]cumarin werden in 150 ml DMF suspendiert und mit einer Lösung aus 0,73 g (15 mmol) Natriumcyanid in 2 ml Wasser behandelt. Die Mischung wird nun bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C für eine Stunde gerührt. Die dabei entstandene Lösung wird filtriert und das Filtrat im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C abgekühlt. Nun werden 0,38 ml (7,5 mmol) Brom in 30 Minuten zugetropft und anschließend wird eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt. Die rote Lösung wird in 200 ml Wasser gegossen. Der entstandene Feststoff wird abgesaugt und mit viel Wasser und etwas Ethanol gewaschen.

Das Rohprodukt wird durch Umkristallisation aus *o*-Dichlorbenzol/Ethanol gereinigt. Man erhält violette, metallisch glänzende Kristalle.

Ausbeute: 1,3 g 3,6 mmol (54 %)

Schmelzpunkt: 274 °C - 275 °C

M = 360,37 g/mol C₂₀H₁₆N₄O₃

UV/Vis: λ_{max} (log ε) = 492 nm (4,40) (EtOH)

Elementaranalyse:	C (ber): 66,66 %	H (ber): 4,47 %	N (ber): 15,55 %
	C (gef): 66,29 %	H (gef): 4,57 %	N (gef): 15,45 %

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3370 (-N-H Valenz breite Bande, -OH Valenz); 2926 (-CH₃ Valenz); 1703

(-C=O Valenz); 1616 (Ringschwingung); 1562 (-N-H Deform.); 1526 (Ringschwingung); 1447 (-CH₃ und -CH₂ Deform.); 1398 (-CH₃ Deform.); 1344 (-C-N Valenz); 1158 (-C-O-C- Valenz)

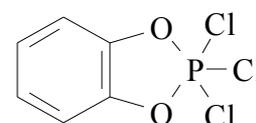
MS m/s (%) = 361 (10) [M+H]⁺; 360 (41) [M]⁺; 329 (100); 314 (14); 164 (15); 44 (10); 32 (20)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO-d₅ in DMSO-d₆); 3,11 (3H; s; ; 1H); 3,35 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO); 3,59 (4H; m; ; 2H, 3H); 4,83 (1H; t; ³J_{HH} = 5,3Hz; 4H); 6,76 (1H; d; ⁴J_{HH} = 2,4 Hz; 5H); 7,00 (1H; dd; ³J_{HH} = 9,2 Hz; ⁴J_{HH} = 2,5 Hz; 6H); 7,25 (2H; m; ; 7H, 8H); 7,67 (3H; m; ; 9H, 10H, 11H); 12,59 (1H; s; ; 12H)

6.2.7. Synthese zweier Phosphorylierungsreagenzien

Versuch 38:

Darstellung von 2,2,2-Trichlor-1,3,2-benzdioxaphosphol (71)



68,0 g (327 mmol) Phosphorpentachlorid werden bei Raumtemperatur in 320 ml Benzol suspendiert. 30,0 g (272 mmol) Catechol werden unter Rühren in kleinen Portionen innerhalb von 2 h hinzugegeben. Dann wird für weitere zwei Stunden zum Rückfluß erhitzt und schließlich das Lösungsmittel abdestilliert. Der Rückstand wird einer fraktionierten Destillation im Ölpumpenvakuum bei 1 mbar unterworfen. Man erhält bei 105 °C ein gelbes Öl, das nach weniger Minuten zu gelben Kristallen erstarrt.

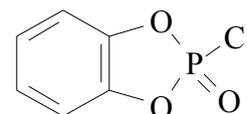
Die Kristalle werden ohne weitere Untersuchung weiterverwendet.

Ausbeute: 60,5 g 251 mmol (92 %)

M = 241,39 g/mol C₆H₄O₂PCl₃

Versuch 39:

Darstellung von *o*-Phenylenphosphorchloridat (72)



50,0 g (200 mmol) 2,2,2-Trichlor-1,3,2-benzdioxaphosphol aus Versuch 38 werden in 20 ml Acetanhydrid gegeben und erwärmt, bis das entstehende Acetylchlorid bei 52 °C abdestilliert. Der

Rückstand wird im Ölpumpenvakuum bei 0,3 mbar fraktioniert destilliert. Bei 89 °C erhält man ein farbloses Öl, das nach einigen Tagen im Kühlschrank zu farblosen Kristallen erstarrt.

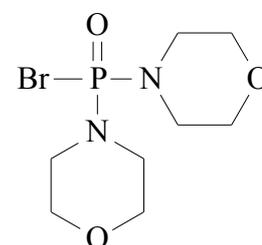
Die Kristalle können ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt werden.

Ausbeute: 35,1 g 184 mmol (92 %)

M = 190,52 g/mol C₆H₄O₃PCl

Versuch 40:

Darstellung von Phosphordimorpholinoxibromid (73)



10 g (30 mmol) Phosphorylbromid werden in 40 ml absolutiertem Chloroform gelöst und 12,2 g (140 mmol) frisch destilliertes Morpholin werden unter Kühlung im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C, unter starkem Rühren zugetropft. Dann wird auf Raumtemperatur aufgewärmt und für 5 h gerührt. Dann wird das ausgefallene Morpholinohydrobromid abgesaugt und das Filtrat wird durch Abkondensieren des Lösungsmittels auf etwa 10 ml eingeengt.

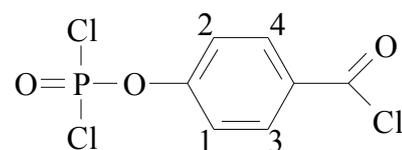
Die so erhaltene Lösung wird ohne Charakterisierung sofort als Phosphorylierungsreagenz eingesetzt.

M = 299,10 g/mol C₈H₁₆N₂O₃PBr

6.2.8. Synthese von Phosphorhaltigen Bausteinen

Versuch 41:

Darstellung von *p*-Dichlorphosphorylbenzoesäurechlorid (66)



20,0 g (150 mmol) 4-Hydroxybenzoesäure werden ohne Lösungsmittel mit 40,0 g (192 mmol) Phosphorpentachlorid unter starkem Rühren gemischt. Dabei kommt es zu einer stark exothermen Reaktion, bei der ein gelbes Öl entsteht. Nach einer Stunde wird das Gemisch für 30 Minuten auf 80 °C erwärmt. Das resultierende, gelbe Öl wird im Ölpumpenvakuum bei $6,50 \cdot 10^{-2}$ mbar fraktioniert destilliert.

Man erhält ein farbloses Öl bei 109 °C - 111 °C.

Ausbeute: 9,0 g 33 mmol (23 %) (Lit.: 46 %^[113])

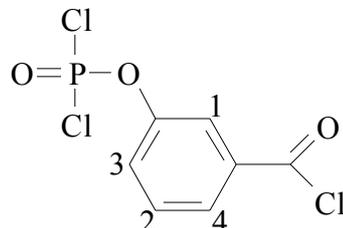
M = 273,44 g/mol C₇H₄ClO₃P

¹H-NMR₅₀₀ (CDCl₃) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 7,48 (2H; s; ; 1H, 2H); 8,23 (2H; s; ; 3H, 4H);

³¹P{¹H}-NMR₅₀₀ (CDCl₃) δ [ppm] = 4,28

Versuch 42:

Darstellung von m-Dichlorphosphorylbenzoesäurechlorid (67)



20,0 g (150 mmol) 3-Hydroxybenzoesäure werden ohne Lösungsmittel mit 40,0 g (192 mmol) Phosphorpentachlorid unter starkem Rühren gemischt. Dabei kommt es zu einer stark exothermen Reaktion, bei der ein gelbes Öl entsteht. Nach einer Stunde wird das Gemisch für 30 Minuten auf 80 °C erwärmt. Das resultierende, gelbe Öl wird im Ölpumpenvakuum bei $3,60 \cdot 10^{-2}$ mbar fraktioniert destilliert.

Man erhält ein farbloses Öl bei 99 °C.

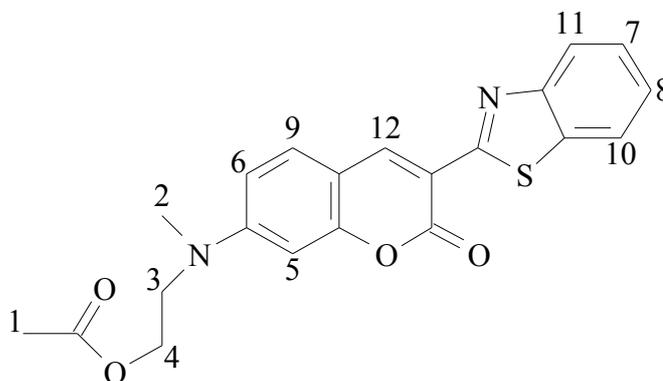
Ausbeute: 12,0 g 43,9 mmol (30 %) (Lit.: 46 %^[113])
M = 273,44 g/mol C₇H₄ClO₃P

¹H-NMR₅₀₀ (CDCl₃) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 7,26 (CHCl₃ in CDCl₃); 7,64 (2H; m; ; 1H, 2H); 8,01 (1H; m; ; 3H); 8,10 (1H; m; ; 4H)

³¹P{¹H}-NMR₅₀₀ (CDCl₃) δ [ppm] = 5,23

6.2.9. Reaktionen mit Carbonsäurechloriden**Versuch 43:**

Darstellung von 3-(2-Benzthiazolyl)-7-[N-(2-acetylethyl)-N-methylamino]cumarin (60)



100 mg (0,28 mmol) 3-(2-Benzthiazolyl)-7-[N-(2-hydroxyethyl)-N-methylamino]cumarin aus **Versuch 29** werden in 2,0 ml trockenem Dioxan suspendiert und mit 0,2 ml Triethylamin versetzt. Langsam werden bei Raumtemperatur 0,5 ml Acetylchlorid so zugetropft, daß die Temperatur nicht ansteigt. Dann wird für einige Zeit stark gerührt, wobei aus der Suspension eine gelbe Lösung wird. Aus dieser fällt nach einigen Stunden ein farbloser Feststoff aus, der abfiltriert wird. Das Filtrat wird zur Hydrolyse auf wenig Eis gegossen. Die so erhaltene Lösung wird dreimal mit je 10 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser neutral gewaschen. Dann wird über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und die Lösung schließlich am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit.

Man erhält das Cumarin als roten Feststoff.

Ausbeute: 92 mg 2,33 mmol (82 %)

Schmelzpunkt: 171 °C

M = 394.44 g/mol C₂₁H₁₈N₂O₄S

UV/Vis: λ_{\max} (log ϵ) = 440 nm (4,65) (EtOH)

Elementaranalyse: C (ber): 63,95 % H (ber): 4,60 % N (ber): 7,10 %
 C (gef): 62,40 % H (gef): 4,58 % N (gef): 6,83 %

In dieser Elementaranalyse sind die gefundenen Werte für Kohlenstoff und auch für Stickstoff um etwa 3 % zu klein. Dies kann durch einkristallisiertes Wasser erklärt werden.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2950 (-CH₃ Valenz); 1739 (-C=O Valenz); 1707 (-C=O Valenz); 1618 (Ringschwingung); 1486 (Ringschwingung); 1432 (-CH₃ und -CH₂ Deform.); 1403 (-CH₃ Deform.)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 1,96 (3H; s; ; 1H); 2,50 (Lösungsmittel: DMSO-d₅ in DMSO-d₆); 3,09 (3H; s; ; 2H); 3,34 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO-d₆); 3,77 (2H; t; ³J_{HH} = 5,6 Hz; ; 3H); 4,23 (2H; t; ³J_{HH} = 5,6 Hz; 4H); 6,74 (1H; d; ⁴J_{HH} = 2,4 Hz; 5H); 6,91 (1H; dd; ³J_{HH} = 9,0 Hz; ⁴J_{HH} = 2,4 Hz; 6H); 7,41 (1H; t; ³J_{HH} = 7,9 Hz; 7H); 7,52 (1H; t; ³J_{HH} = 8,1 Hz; 8H); 7,95 (1H; d; ³J_{HH} = 9,0 Hz; 9H); 7,99 (1H; d; ³J_{HH} = 8,2 Hz; 10H); 8,15 (1H; d; ³J_{HH} = 7,9 Hz; 11H); 9,03 (1H; s; ; 12H)

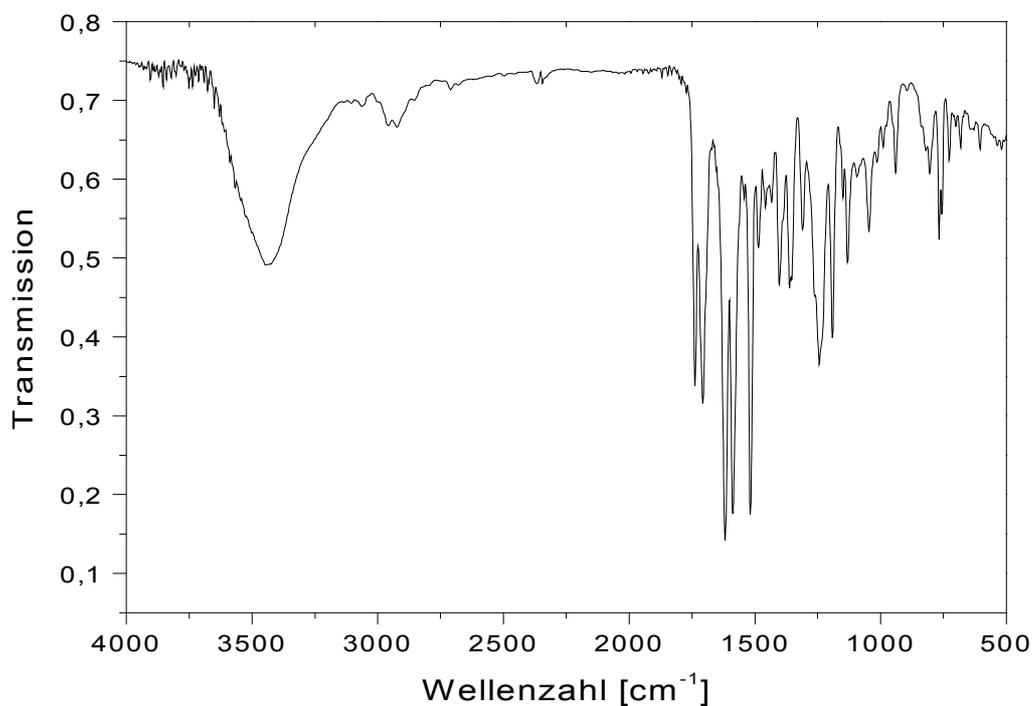
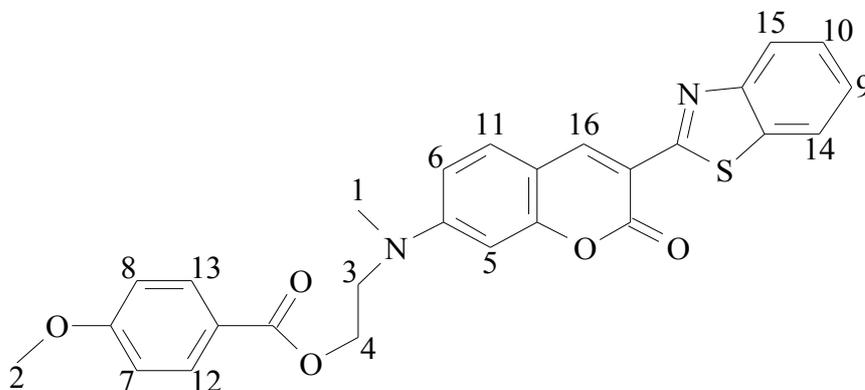


Abbildung 70: IR-Spektrum (KBr) von 60

Versuch 44:

Darstellung von {2-[(3-Benzthiazol-2-yl)-2-oxo-2H-chromen-7-yl)-methylamino]ethyl}4-methoxybenzoat (61)



350 mg (1,0 mmol) 3-(2-Benzthiazolyl)-7-[N-(2-hydroxyethyl)-N-methylamino]cumarin aus **Versuch 29** werden in 60 ml trockenem Dioxan suspendiert und mit 1,5 ml Triethylamin versetzt. Langsam werden bei Raumtemperatur 0,35 ml (2,6 mmol) Anissäurechlorid so zugetropft, daß die Temperatur nicht ansteigt. Dann wird für einige Zeit stark gerührt, wobei aus der Suspension eine gelbe Lösung wird. Aus dieser fällt nach einigen Stunden ein farbloser Feststoff aus, der nach 24 h Rühren abfiltriert wird. Das Filtrat wird zur Hydrolyse auf wenig Eis gegossen. Die so erhaltene Lösung wird dreimal mit je 10 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser neutral gewaschen. Dann wird über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und die Lösung schließlich am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit.

Zur Reinigung wird der orangefarbene Rückstand an Kieselgel 60 mit Chloroform als Laufmittel chromatographiert. Man erhält das Cumarin, nach dem entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer als hellgelben Feststoff.

Ausbeute: 200 mg 0,41 mmol (41 %)

Schmelzpunkt: 215 °C - 216 °C

M = 486,54 g/mol C₂₇H₂₂N₂O₅S

UV/Vis: λ_{max} (log ε) = 458 nm (4,51) (DMSO)

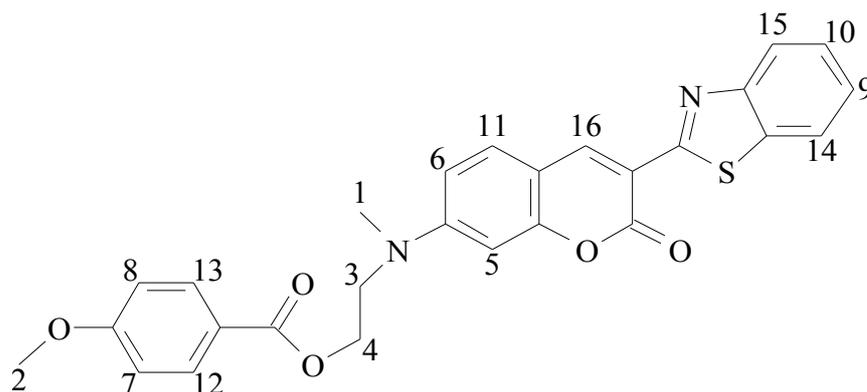
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2964 (-CH₃ Valenz); 1709 (-C=O Valenz); 1617 (Ringschwingung); 1483 (Ringschwingung); 1399 (-CH₃ Deform.); 1258 (-C-O-C- Valenz)

MS m/s (%) = 487 (12) [M+H⁺]; 486 (39) [M]⁺; 334 (36) [M-Anissäure]⁺; 321 (100) [Dimethylaminocumarin]; 278 (14); 136 (25) [Anissäure]; 43 (18)

¹H-NMR₂₀₀ (CDCl₃) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 3,17 (3H; s; ; 1H); 3,85 (5H; m; ; 2H, 3H); 4,52 (2H; t; ³J_{HH} = 5,6 Hz; ;4H); 6,67 (1H; d; ⁴J_{HH} = 2,4 Hz; 5H); 6,80 (1H; dd; ³J_{HH} = 8,9 Hz; ⁴J_{HH} = 2,5 Hz; 6H); 6,87 (2H; d; ³J_{HH} = 9,0 Hz; 7H, 8H); 7,26 (CHCl₃ in CDCl₃); 7,45 (3H; m; ; 9H, 10H, 11H); 7,97 (4H; m; ; 12H, 13H, 14H, 15H); 8,91 (1H; s; ; 16H)

Versuch 45:

Darstellung von {2-[(3-Benzthiazol-2-yl)-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl]-methylamino}ethyl-4-methoxybenzoat (61)



350 mg (1,0 mmol) 3-(2-Benzthiazolyl)-7-[*N*-(2-hydroxyethyl)-*N*-methylamino]cumarin aus **Versuch 29** werden in 15 ml HMPA gelöst und mit 3 ml Triethylamin versetzt. Zu dieser Mischung werden bei Raumtemperatur 0,35 ml (2,6 mmol) Anissäurechlorid gegeben. Die Lösung wird für 24 h bei starkem Rühren auf 80 °C erwärmt. Schon nach kurzer Zeit beginnt ein gelber Feststoff auszufallen. Es wird auf Raumtemperatur abgekühlt, der Feststoff abgesaugt, mit wenig HMPA und viel Wasser gewaschen, schließlich getrocknet. Das so erhaltene rote Pulver ist dc-einheitlich.

Ausbeute: 413 mg 0,85 mmol (85 %)

Schmelzpunkt: 215 °C - 216 °C

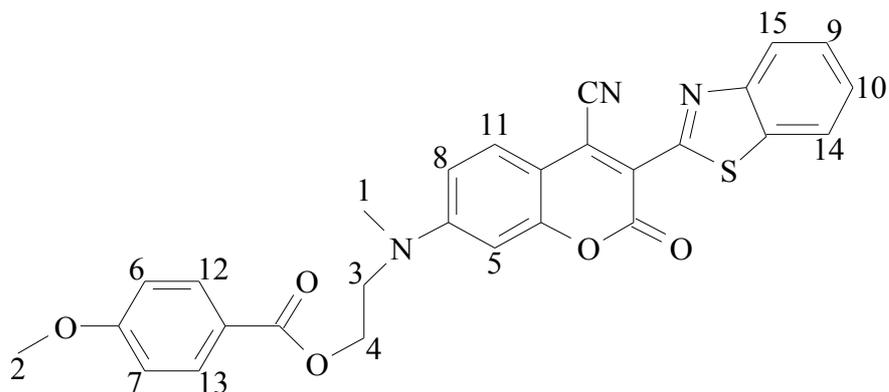
M = 486,54 g/mol C₂₇H₂₂N₂O₅S

Die Spektren entsprechen dem Produkt aus **Versuch 44**.

Versuch 46:

Darstellung von {2-[(3-Benzthiazol-2-yl)-4-cyano-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl]methylamino}ethyl-

4-methoxybenzoat (62)



750 mg (2,0 mmol) 3-(2-Benzthiazolyl)-4-cyano-7-[N-(2-hydroxyethyl)-N-methylamino]cumarin aus **Versuch 36** werden in 15 ml HMPA gelöst und mit 3 ml Triethylamin versetzt. Zu dieser Mischung werden bei Raumtemperatur 0,70 ml (5,2 mmol) Anissäurechlorid gegeben. Die Lösung wird für 24 h unter starkem Rühren auf 80 °C erwärmt. Schon nach 2 h ist soviel eines voluminösen, violetten Feststoffes ausgefallen, daß die ganze Mischung fest wird. Nach 24 h wird auf Raumtemperatur abgekühlt, der Feststoff abgesaugt, mit wenig HMPA und viel Wasser gewaschen, schließlich getrocknet. Das so erhaltene rote Pulver ist dc-einheitlich.

Ausbeute: 800 mg 1,6 mmol (80 %)

Schmelzpunkt: 278 °C

M = 511.55 g/mol C₂₈H₂₁N₃O₅S

UV/Vis: λ_{max} (log ε) = 520 nm (4,16) (EtOH)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3400 (-N-H Valenz breite Bande, -OH Valenz); 2926 (-CH₃ Valenz); 2362 (-CN Valenz); 1712 (-C=O Valenz); 1618 (Ringschwingung); 1511 (Ringschwingung); 1401 (-CH₃ Deform.); 1166 (-C-O-C- Valenz)

MS m/s (%) = 512 (81) [M+H]⁺; 511 (83) [M]⁺; 377 (17); 359 (36); 346 (100)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50

(Lösungsmittel: DMSO-d₅ in DMSO-d₆); 3,19 (3H; s; ; 1H); 3,34 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO-d₆); 3,77 (3H; s; ; 2H); 3,99 (2H; t; ³J_{HH} = 5,6 Hz; ; 3H); 4,49 (2H; t; ³J_{HH} = 5,5 Hz; 4H); 6,91 (1H; d; ⁴J_{HH} = 2,4 Hz; 5H); 6,97 (2H; d; ³J_{HH} = 9,0 Hz; 6H, 7H); 7,14 (1H; dd; ³J_{HH} = 9,4 Hz; ⁴J_{HH} = 2,6 Hz; 8H); 7,51 (1H; t; ³J_{HH} = 8,2 Hz; 9H); 7,60 (1H; t; ³J_{HH} = 8,3 Hz; 10H); 7,71 (1H; d; ³J_{HH} = 9,2 Hz; 11H); 7,83 (2H; d; ³J_{HH} = 9,0 Hz; 12H, 13H); 8,07 (1H; d; ³J_{HH} = 8,1 Hz; 14H); 8,20 (1H; d; ³J_{HH} = 8,2 Hz; 15H)

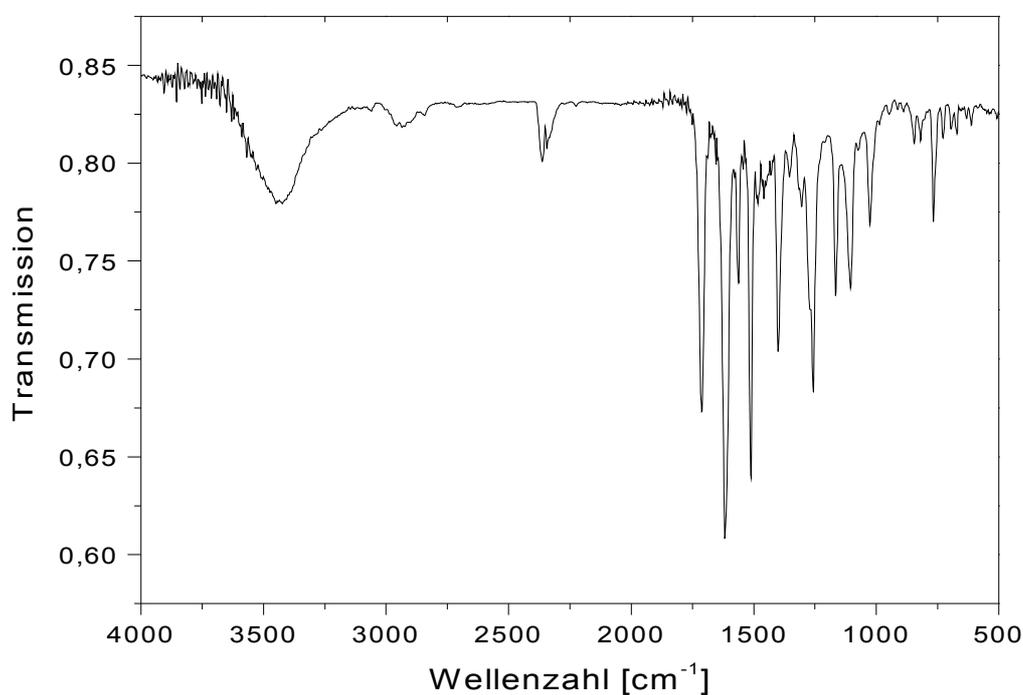
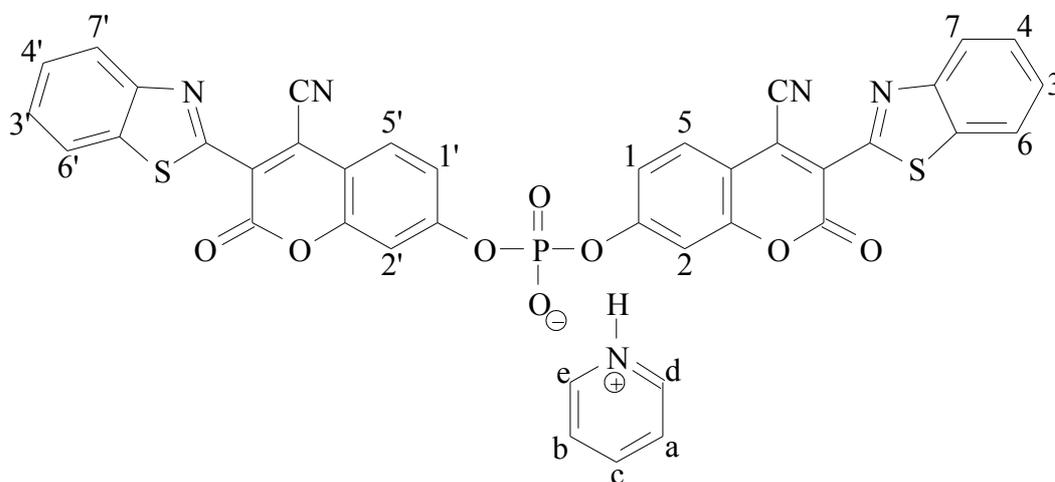


Abbildung 71: IR-Spektrum (KBr) von 62

6.2.10. Phosphorylierung mit Phosphoroxchlorid

Versuch 47:

Darstellung von Pyridiniumbis-3-(benzthiazol-2-yl-4-cyano-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)phosphat (68)



0,23 ml (2,5 mmol) Phosphoroxchlorid werden zu 12 ml über Calciumhydrid absolutiertem Pyridin gegeben und im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C abgekühlt. Innerhalb von 45 Minuten werden nun 0,80 g (2,5 mmol) 3-(2-Benzthiazolyl)-4-cyano-7-hydroxycumarin als Feststoff in kleinen Mengen zugegeben. Dabei entsteht eine gelbe Suspension. Es wird eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt, dann wird die Mischung auf 200 ml Eiswasser gegossen. Die orangefarbene Lösung wird filtriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Der orangefarbene Feststoff wird zur Reinigung aus Ethanol/Wasser im Verhältnis 4/1 umkristallisiert. Man erhält gelbe, feine Kristalle.

Ausbeute: 0,35 g 0,45 mmol (18 %)

Schmelzpunkt: 177 °C - 178 °C

M = 781,71 g/mol $C_{39}H_{20}N_5O_8PS_2$

UV/Vis: λ_{\max} (log ϵ) = 414 nm (4,39) (EtOH/H₂O im Verhältnis 2/1)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3418 (-O-H Valenz breite Bande); 3070 (=C-H Valenz); 2225 (-CN Valenz); 1727 (-C=O Valenz); 1610 (Ringschwingung); 1538 (-N-H Deform.); 1496 (Ringschwingung); 1432 (-CH₃ und -CH₂ Deform.) 1357 (-CN Valenz); 1294 (-C-O-C- Valenz); 1092 (-C-O-C Valenz)

MS (FAB+NBA) m/s (%) = 725 (2) [M+Na]; 703 (1) [M+H]⁺; 702 (2) [M]⁺

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO-d₅ in DMSO-d₆); 3,35 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO-d₆); 7,44 (2H; dd; ³J_{HH} = 8,8 Hz; ⁴J_{HH} = 2,3 Hz; 1H, 1'H); 7,49 (2H; d; ³J_{HH} = 2,2 Hz; 2H, 2'H); 7,56 (2H; t; ³J_{HH} = 8,2 Hz; 3H, 3'H); 7,63 (2H; t; ³J_{HH} = 8,3 Hz; 4H, 4'H); 7,93 (2H; d; ³J_{HH} = 8,8 Hz; 5H, 5'H); 7,97 (2H; t; ³J_{HH} = 7,7 Hz; aH, bH); 8,14 (2H; d; ³J_{HH} = 8,0 Hz; 6H, 6'H); 8,24 (2H; d; ³J_{HH} = 7,9 Hz; 7H, 7'H); 8,78 (1H; t; ³J_{HH} = 7,8 Hz; cH); 8,87 (2H; d; ³J_{HH} = 5,1 Hz; dH, eH)

³¹P{¹H}-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] = -11,88

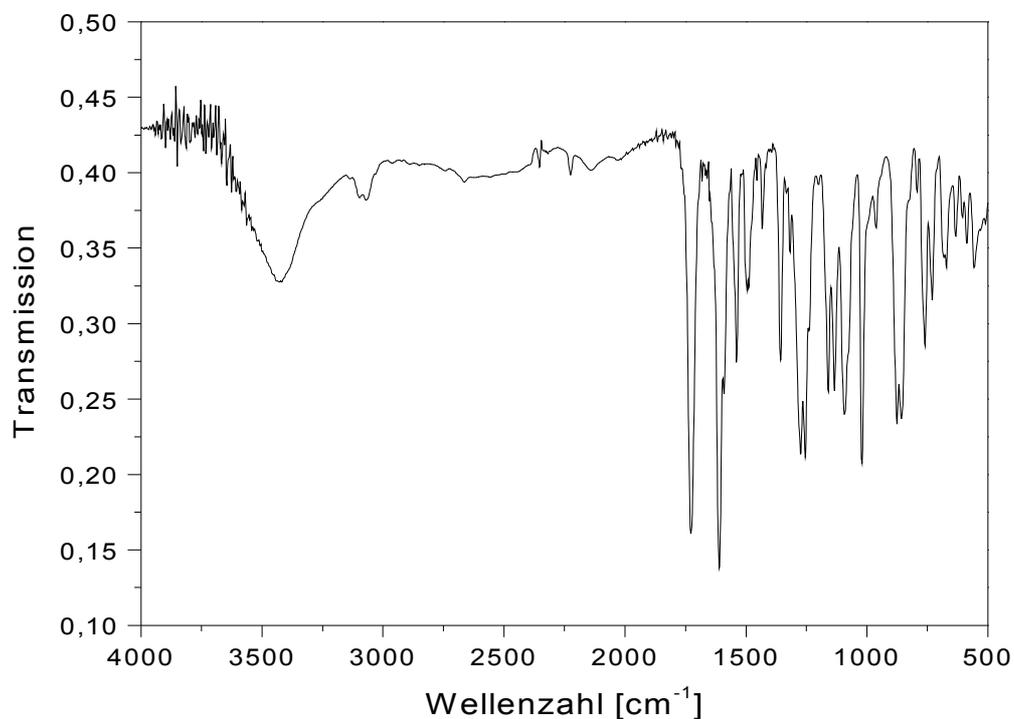
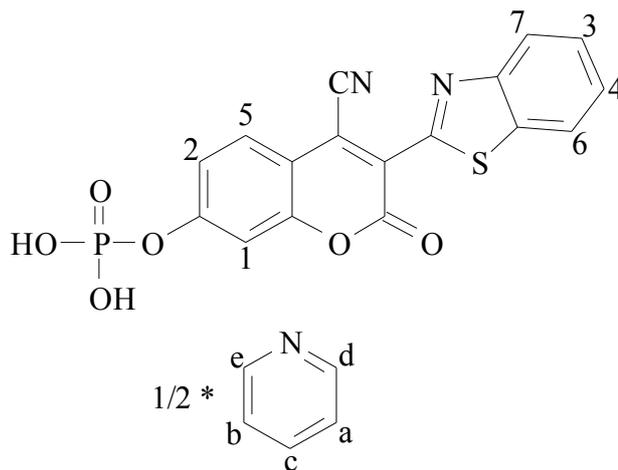


Abbildung 72: IR-Spektrum (KBr) von **68**

Versuch 48:

Darstellung von 3-(2-Benzthiazolyl)-4-cyano-7-cumarinylphosphat (**69**)



4,6 ml (50 mmol) Phosphoroxchlorid werden zu 12 ml über Calciumhydrid absolutiertem Pyridin gegeben und im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C abgekühlt. Über 2 h werden nun 0,80 g

(2,5 mmol) 3-(2-Benzthiazolyl)-4-cyano-7-hydroxycumarin, gelöst in 50 ml Pyridin zugetropft. Dabei entsteht eine gelbe Suspension. Es wird eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt, dann wird die Mischung auf 200 ml Eiswasser gegossen. Die orangefarbene Lösung wird filtriert und das Filtrat wird mit halbkonzentrierter Salzsäure stark sauer gemacht. Es entsteht ein voluminöser, orangefarbener Niederschlag, der abgesaugt und mit Wasser neutral gewaschen und getrocknet wird.

Zur Reinigung wird aus Ethanol/Wasser im Verhältnis 4/1 umkristallisiert. Man erhält orangefarbene, feine Kristalle.

Ausbeute: 0,8 g 1,8 mmol (73 %)

Schmelzpunkt: 279 °C

M = 400,30 + 39,55 g/mol C₁₇H₉N₂O₆PS * ½ C₅H₅N

UV/Vis: λ_{max} (log ε) = 423 nm (4,40) (EtOH)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3424 (-O-H Valenz breite Bande); 3102 (=C-H Valenz); 2240 (-CN Valenz); 1725 (-C=O Valenz); 1613 (Ringschwingung); 1536 (-N-H Deform.); 1500 (Ringschwingung); 1431 (-CH₃ und -CH₂ Deform.) 1359 (-CN Valenz); 1280 (-C-O-C- Valenz); 1073 (-C-O-C Valenz)

MS (FAB+NBA) m/s (%) = 423 (14) [M+Na]; 401 (15) [M+H]⁺; 400 (6) [M]⁺

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO-d₅ in DMSO-d₆); 4,62 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO-d₆); 7,40 (1H; d; ³J_{HH} = 1,8 Hz; 1H); 7,43 (1H; dd; ³J_{HH} = 8,7 Hz; ⁴J_{HH} = 1,7 Hz; 2H); 7,57 (1H; t; ³J_{HH} = 8,1 Hz; 3H); 7,64 (1H; t; ³J_{HH} = 8,3 Hz; 4H); 7,95 (½ * 2H; t; ³J_{HH} = 6,0 Hz; aH, bH); 8,00 (1H; d; ³J_{HH} = 8,7 Hz; 5H); 8,14 (1H; d; ³J_{HH} = 8,0 Hz; 6H); 8,25 (1H; d; ³J_{HH} = 7,7 Hz; 7H); 8,45 (½ * 1H; t; ³J_{HH} = 7,8 Hz; cH); 8,87 (½ * 2H; d; ³J_{HH} = 3,8 Hz; dH, eH)

³¹P{¹H}-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] = -5,31

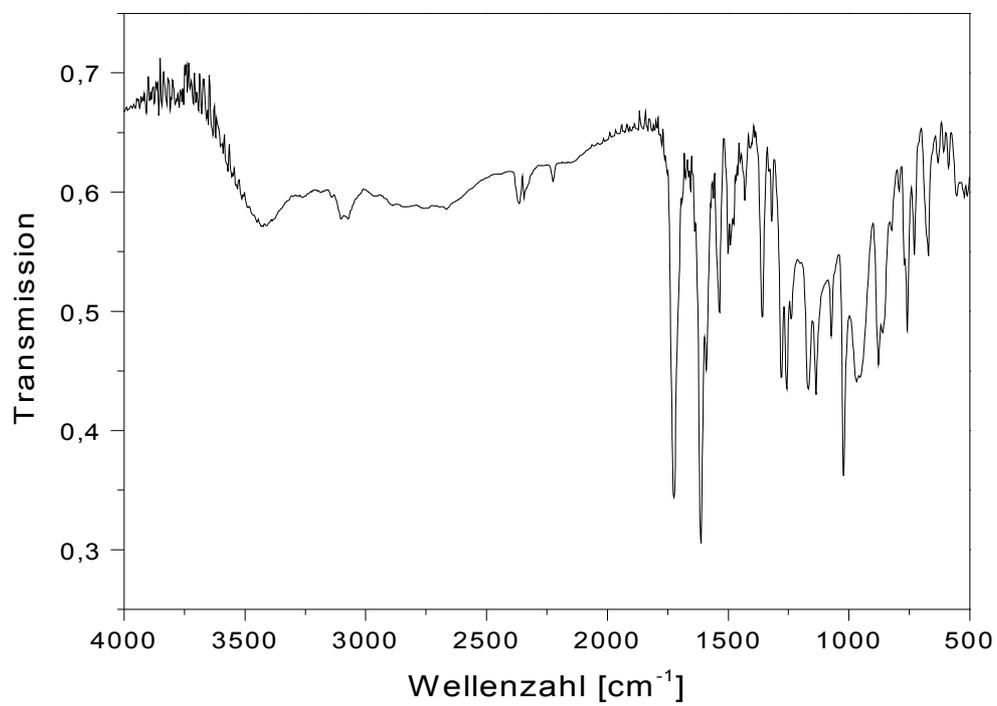
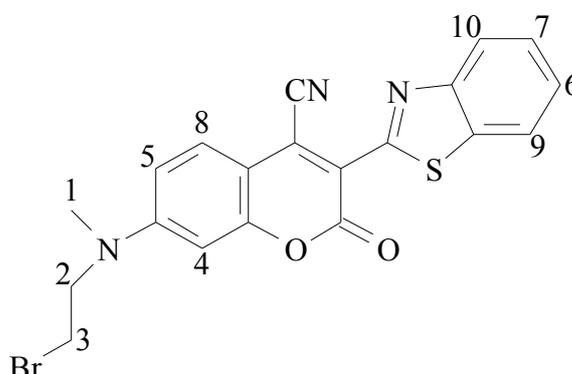


Abbildung 73: IR-Spektrum (KBr) von **69**

6.2.11. Reaktionen mit Phosphordimorpholinoxibromid

Versuch 49:

Darstellung von 3-(2-Benzthiazolyl)-4-cyano-7-[N-(2-bromethyl)-N-methylamino]cumarin (75)



377 mg (1,00 mmol) 3-(2-Benzthiazolyl)-4-cyano-7-[N-(2-hydroxyethyl)-N-methylamino]-cumarin werden in 8,0 ml DMPU gelöst und 0,60 ml DIEA werden als Base hinzugegeben. Dann werden 2,5 ml der in Versuch 40 dargestellten Lösung von Phosphordimorpholinoxibromid in Chloroform bei Raumtemperatur zugetropft. Es wird für 1 h bei Raumtemperatur und weitere 1 h bei 70 °C Ölbadtemperatur gerührt. Dabei fällt ein violetter Niederschlag aus, der abgesaugt und mit viel Wasser gewaschen wird.

So erhält man ein violettes Pulver.

Ausbeute: 417 mg 0,95 mmol (95 %)

Schmelzpunkt: 264 °C

M = 440,31 g/mol C₂₀H₁₄BrN₃O₂S

UV/Vis: λ_{\max} (log ϵ) = 520 nm (4,67) (DMSO)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2225 (-CN Valenz); 1716 (-C=O Valenz); 1617 (Ringschwingung); 1511

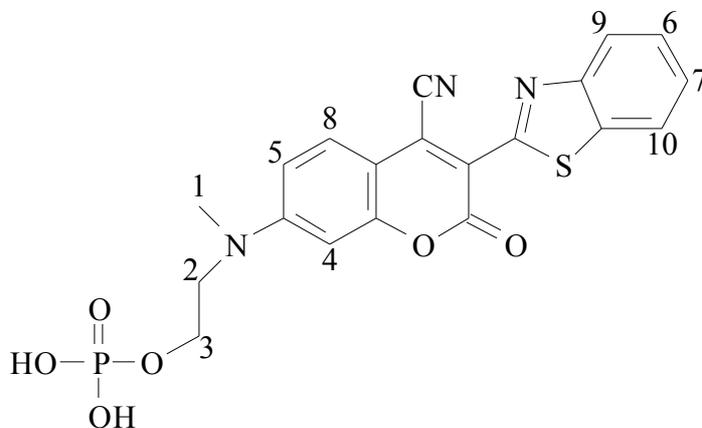
(Ringschwingung); 1484 (-CH₃ und -CH₂ Deform.) 1345 (-CN Valenz); 1156 (-C-O-C- Valenz); 1110 (-C-O-C Valenz); 766 (-C-Br Valenz)

MS m/s (%) = 441 (6) [M+H]⁺; 440 (28) [M]⁺; 359 (10); 346 (100); 333 (50) [M-CH₂CH₂Br]; 173 (18)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO-d₅ in DMSO-d₆); 3,13 (3H; s; ; 1H); 3,35 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO); 3,61 (4H; m; ; 2H, 3H); 6,77 (1H; d; ⁴J_{HH} = 2,5 Hz; 4H); 7,04 (1H; dd; ³J_{HH} = 9,3 Hz; ⁴J_{HH} = 2,5 Hz; 5H); 7,49 (1H; t; ³J_{HH} = 8,1 Hz; 6H); 7,58 (1H; t; ³J_{HH} = 7,2 Hz; 7H); 7,69 (1H; d; ³J_{HH} = 9,2 Hz; 8H); 8,04 (1H;d; ³J_{HH} = 8,2 Hz; 9H); 8,12 (1H;d; ³J_{HH} = 8,0 Hz; 10H)

Versuch 50:

Darstellung von {2-[(2-Benzthiazol-2-yl-4-cyano-2-oxo-2H-chromen-7-yl)methylamino]ethyl}phosphat (74)



377 mg (1,00 mmol) 3-(2-Benzthiazolyl)-4-cyano-7-[N-(2-hydroxyethyl)-N-methylamino]-cumarin werden in 8,0 ml DMPU gelöst und 0,60 ml DIEA werden als Base hinzugegeben. Es wird im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C abgekühlt. Dann werden 2,5 ml der in **Versuch 40** dargestellten Lösung von Phosphordimorpholinoxibromid in Chloroform zugetropft. Es wird für 1 h bei 0 °C und weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die resultierende tiefrote Lösung wird in 300 ml Wasser

gegeben und mit 20 ml konzentrierter Salzsäure versetzt. Dann wird für eine Stunde zum Rückfluß erhitzt. Der entstehende Feststoff wird abgesaugt und getrocknet.

Zur Reinigung wird der erhaltene Feststoff aus Wasser umkristallisiert. Man erhält grünlich schimmernde Kristalle.

Ausbeute: 460 mg 0,77 mmol (77 %)

Schmelzpunkt: 239 °C - 241 °C

M = 595,61 g/mol C₂₀H₁₆N₃O₆PS

UV/Vis: λ_{\max} (log ϵ) = 503 nm (3,91) (EtOH)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3398 (-O-H Valenz breite Bande); 2960 (-CH₃ Valenz); 2345 (-CN Valenz); 1704 (-C=O Valenz); 1618 (Ringschwingung); 1561 (-N-H Deform.); 1510 (Ringschwingung); 1458 (-CH₃ und -CH₂ Deform.) 1350 (-CN Valenz);

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO-d₅ in DMSO-d₆); 3,13 (3H; s; ; 1H); 3,35 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO); 3,61 (4H; m; ; 2H, 3H); 6,77 (1H; d; ⁴J_{HH} = 2,5 Hz; 4H); 7,04 (1H; dd; ³J_{HH} = 9,3 Hz; ⁴J_{HH} = 2,5 Hz; 5H); 7,49 (1H; t; ³J_{HH} = 8,1 Hz; 6H); 7,58 (1H; t; ³J_{HH} = 7,2 Hz; 7H); 7,69 (1H; d; ³J_{HH} = 9,2 Hz; 8H); 8,04 (1H;d; ³J_{HH} = 8,2 Hz; 9H); 8,12 (1H;d; ³J_{HH} = 8,0 Hz; 10H)

³¹P{¹H}-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] = 0,18

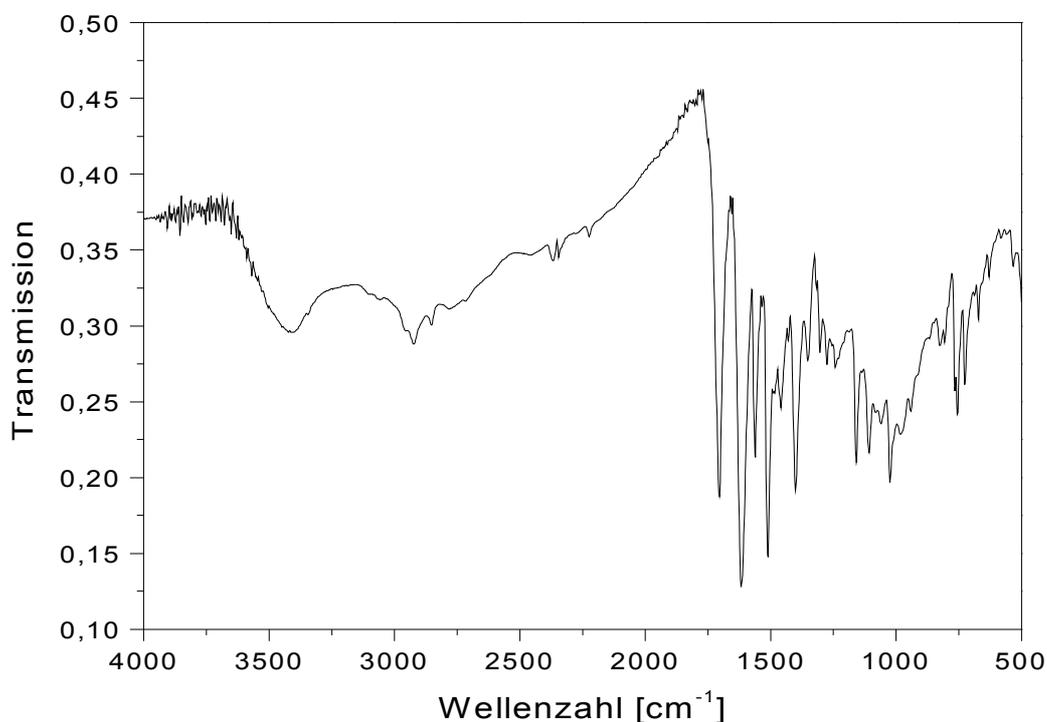
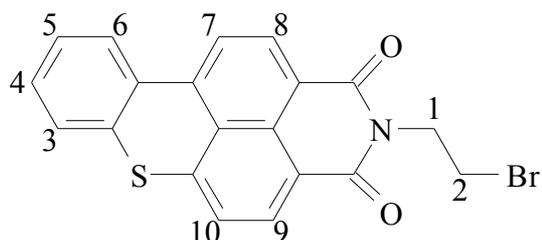


Abbildung 74: IR-Spektrum (KBr) von 74

Versuch 51:

**Darstellung von 2-(2-Bromethyl)-thioxanthen
[2,1,9-*def*]isoquinolin-1,3-dion (78)**



347 mg (1,00 mmol) 2-(2-Hydroxyethyl)thioxanthen[2,1,9-*def*]isoquinolin-1,3-dion werden in 8,0 ml DMPU gelöst und 0,60 ml DIEA werden als Base hinzugegeben. Dann werden 2,5 ml der in ***Versuch 40*** dargestellten Lösung von Phosphordimorpholinoxibromid in Chloroform bei Raumtemperatur zugetropft. Es wird für 1 h bei Raumtemperatur und weitere 10 h bei 70 °C Ölbadtemperatur gerührt. Es fällt ein orangefarbener Feststoff aus, der abgesaugt und mit viel

Wasser gewaschen und schließlich getrocknet wird.

Ausbeute: 400 mg 0,98 mmol (97 %)

Schmelzpunkt: 191 °C - 193 °C

M = 410,28 g/mol C₂₀H₁₂BrNO₂S

UV/Vis: $\lambda_{\max}(\log \epsilon) = 460 \text{ nm} (4,22)$ (EtOH)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2960 (-CH₃ Valenz); 1686 (-C=O Valenz); 1647 (-C=C- Valenz bei Aromaten); 1581 (Ringschwingung); 1508 (Ringschwingung); 1380 (-CH₃ Deform.); 762 (-C-Br Valenz)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO-d₅ in DMSO-d₆); 3,51 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO); 3,59 (2H; t; ³J_{HH} = 6,8 Hz; 1H); 4,05 (2H; t; ³J_{HH} = 6,8 Hz; 2H); 7,39 (4H; m; ; 3H, 4H, 5H, 6H); 8,10 (4H; m; ; 7H, 8H, 9H, 10H)

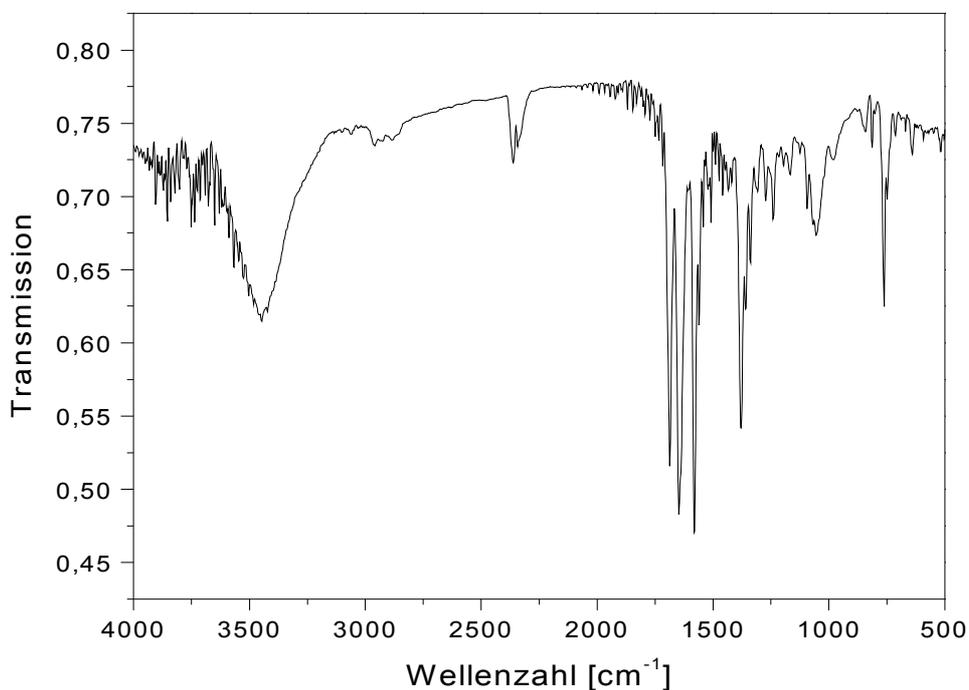
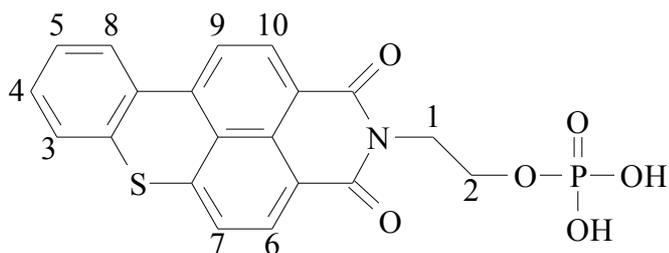


Abbildung 75: IR-Spektrum (KBr) von 78

Versuch 52

Darstellung von Phosphorsäure-2-(2-hydroxyethyl)thioxanthen[2,1,9-def]-isoquinolin-1,3-dionester (77)



347 mg (1,00 mmol) 2-(2-Hydroxyethyl)-thioxanthen[2,1,9-def]-isoquinolin-1,3-dion werden in 8,0 ml DMPU gelöst und 0,60 ml DIEA werden als Base hinzugegeben. Dann werden 2,5 ml der in Versuch 40 dargestellten Lösung von Phosphordimorpholinoxibromid in Chloroform unter Kühlung im Eis/Kochsalzbad bei höchstens 0 °C zugetropft. Es wird für eine weitere Stunde bei 0 °

C und weitere 10 h bei Raumtemperatur gerührt. Es fällt ein orangefarbener Feststoff aus, der abgesaugt und mit viel Wasser gewaschen und schließlich getrocknet wird.

Ausbeute: 308 mg 0,72 mmol (72 %)

Schmelzpunkt: 183 °C - 185 °C

M = 427,37 g/mol C₂₀H₁₄NO₆PS

UV/Vis: λ_{\max} (log ϵ) = 459 nm (4,29) (EtOH)

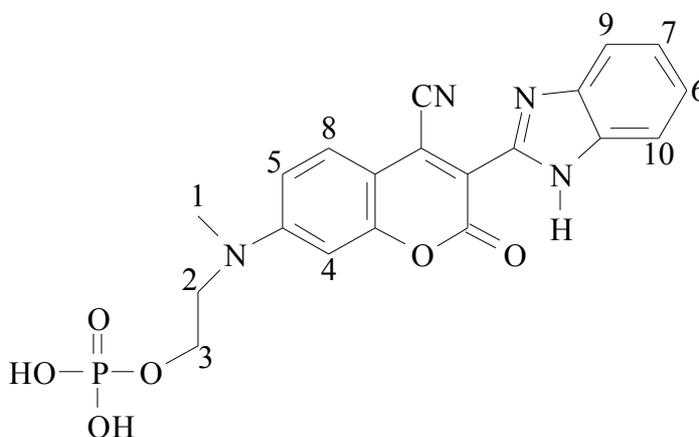
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3500 (-O-H Valenz breite Bande); 3110 (=CH Valenz); 2960 (-CH₃ Valenz); 1686 (-C=O Valenz); 1645 (-C=C- Valenz bei Aromaten); 1580 (Ringschwingung); 1432 (-CH₃ und -CH₂ Deform.); 1380 (-CH₃ Deform.)

¹H-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO-d₅ in DMSO-d₆); 3,45 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO); 3,60 (2H; t; ³J_{HH} = 6,5 Hz; 1H); 4,08 (2H; t; ³J_{HH} = 6,8 Hz; 2H); 7,45 (3H; m; ; 3H, 4H, 5H); 7,53 (1H; d; ³J_{HH} = 8,0 Hz; 6H); 8,13 (1H; d; ³J_{HH} = 8,0 Hz; 7H); 8,27 (3H; m; ; 8H, 9H, 10H)

³¹P{¹H}-NMR₅₀₀ (DMSO-d₆) δ [ppm] = 0,10

Versuch 53:

Darstellung von Phosphorsäuremono-{2-[(3-benzimidazol-2-yl-4-cyano-2-oxo-2H-chromen-7-yl)methylamino]-ethyl}ester (76)



360 mg (1,00 mmol) 3-(2-Benzthiazolyl)-4-cyano-7-[N-(2-hydroxyethyl)-N-methylamino]-cumarin aus **Versuch 37** werden in 8,0 ml DMPU gelöst und 2,4 ml DIEA werden als Base hinzugegeben. Es wird im Eis/Kochsalzbad auf 0 °C abgekühlt. Dann werden 2,5 ml der in **Versuch 40** dargestellten Lösung von Phosphordimorpholinoxibromid in Chloroform zugetropft. Es wird für 1 h bei 0 °C und weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die resultierende tiefrote Lösung wird in 300 ml Wasser gegeben und mit 20 ml konzentrierter Salzsäure versetzt. Dann wird für 30 Minuten zum Rückfluß erhitzt. Der entstehende Feststoff wird abgesaugt und getrocknet.

Zur Reinigung wird der erhaltene Feststoff aus Wasser umkristallisiert. Man erhält grünlich schimmernde Kristalle.

Ausbeute: 410 mg 0,93 mmol (93 %)

Schmelzpunkt: 258 °C

M = 440,35 g/mol C₂₀H₁₇N₄O₆P

UV/Vis: λ_{max} (log ε) = 480 nm (4,18) (EtOH)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3385 (-N-H Valenz breite Bande); 3000 (=CH Valenz); 2960 (-CH₃ Valenz); 1702 (-C=O Valenz); 1617 (Ringschwingung); 1570 (-N-H Deform.); 1450 (-CH₃ und -CH₂ Deform.); 1154 (-C-O-C- Valenz)

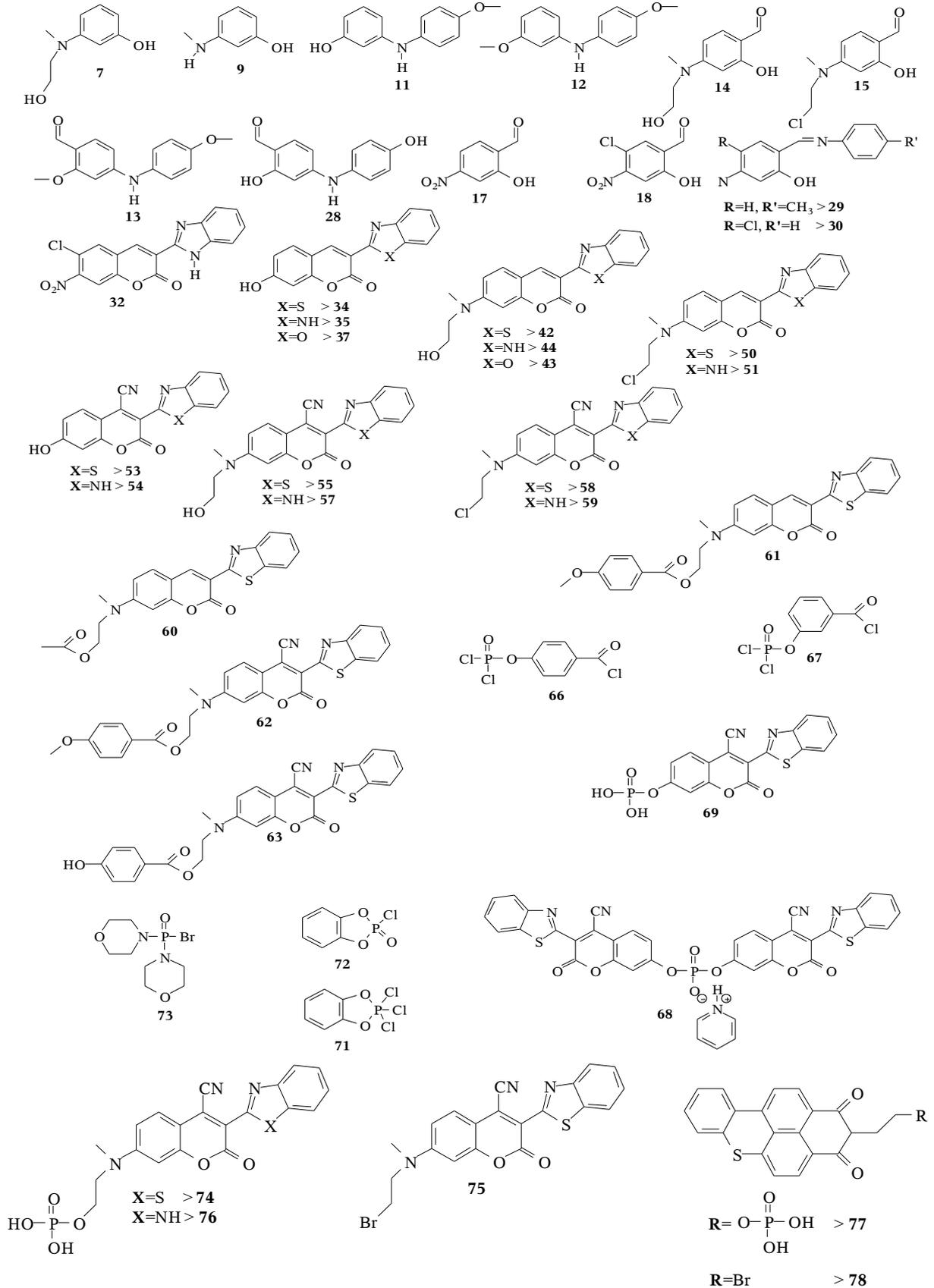
$^1\text{H-NMR}_{500}$ (DMSO- d_6) δ [ppm] (Intensität; Multiplizität; Kopplungskonstante; Zuordnung) = 2,50 (Lösungsmittel: DMSO- d_5 in DMSO- d_6); 3,14 (3H; s; ; 1H); 3,42 (Lösungsmittel: H₂O in DMSO); 3,70 (2H; t; $^3J_{\text{HH}} = 6,6$ Hz; 2H); 3,95 (2H; t; $^3J_{\text{HH}} = 6,5$ Hz; 3H); 6,84 (1H; d; $^4J_{\text{HH}} = 2,4$ Hz; 4H); 7,05 (1H; dd; $^3J_{\text{HH}} = 9,2$ Hz; $^4J_{\text{HH}} = 2,5$ Hz; 5H); 7,27 (2H; m; ; 6H, 7H); 7,70 (3H; m; ; 8H, 9H, 10H)

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}\text{-NMR}_{500}$ (DMSO- d_6) δ [ppm] = 0,09

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Absorbanz
AFC	7-Amino-4-trifluormethylcumarin
a. u.	<i>arbitrary units</i>
DC	<i>Dünnschichtchromatographie</i>
DCM	4- <i>Dicyanomethylen</i> -2[4-(dimethylamino)styryl]-6-methyl-4 <i>H</i> -pyran
DIEA	<i>Diisopropylethylamid</i>
DMF	<i>Dimethylformamid</i>
DMPU	<i>N,N</i> -Dimethylpropylenharnstoff (<i>N,N</i> - <i>Dimethylpropylenurea</i>)
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
F	Integral unter der Fluoreszenzemissionskurve
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i>
ELF	<i>Enzyme Labelled Fluorescence</i>
HMPA	<i>Hexamethylphosphorsäuretriamid</i>
HTS	<i>HighThroughput Screening</i>
LIF	<i>laserinduzierte Fluoreszenz</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy</i>
Sp	<i>Spacer</i> (Platzhalter)
TEA	<i>Triethylamin</i>
THF	<i>Tetrahydrofuran</i>
UV	<i>Ultraviolett</i>
VIS	<i>visible</i>
ϵ	Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge
Φ	Fluoreszenzquantenausbeute

8. Übersicht über wichtige Verbindungen dieser Arbeit



9. Literaturverzeichnis

- [1] A. VOGEL, *Gilbert's Ann. Phys.* **1820**, 64, 161.
- [2] P. DUQUENOIS, *Pharm. Weekbl [Sci]* **1967**, 102, 443-455.
- [3] R.D.H. MURRAY, J. MÉNDEZ, S.A. BROWN, *The natural coumarins: occurrence, chemistry and biochemistry*, John Wiley & Sons, **1982**.
- [4] R. HEGENAUER, *Chemotaxonomie der Pflanzen Vol 1-11*, Birkhäuser, **1962-1994**.
- [5] R. O'KENNEDY, R.D. THORNES, *Coumarines: Biology, Applications and Mode of Action*, John Wiley & Sons, **1997**, Seite 334.
- [6] R.C. GARNER, E.C. MILLER, J.A. MILLER, *Cancer Res.* **1972**, 32, 2058-2066.
- [7] Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft, *Richtlinie des Rates zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedsstaaten über Aromen zur Verwendung in Lebensmitteln und über Ausgangsstoffe für ihre Herstellung*. Official Gazette L 184, 15. July **1988**.
- [8] L.D. SCHEEL, V.B. PERONE, R.L. LARKIN, R.E. KUPPEL, *Biochemistry* **1963**, 2, 1127-1131.
- [9] V.B. PERONE, *Microb. Toxins* **1972**, 8, 67.
- [10] M. BERENBAUM, *Science* **1978**, 201, 532-534.
- [11] S. NAKAJIMA, K. KAWAZU, *Agric. Biol. Chem.* **1980**, 44, 2893-2899.
- [12] R.D. THORNES, P.G. WALL, *Veterinary Record* **1991**, 129, 496.
- [13] P. FISHER, R. WALL, *Bull. Entomol. Res.* **1998**, 88, 611-616.
- [14] D. COX, R. O'KENNEDY, R. THORNES, *Human Toxicology* **1989**, 8, 501-506.
- [15] F. ACKERMANN, Patent US 2 791 564, Ciba AG, **1952**.
- [16] T. YANAGISAWA, O. KOTOYORI, Patent US 3 514 471, Showa Chemical Industries Ltd., **1968**.
- [17] F. BOS, *Appl. Opt.* **1981**, 20, 1886-1890.
- [18] W. W. MOREY in *Proceedings of the international Conference on Lasers '79*, STS Press, McLean, **1980**, Seiten: 365-373.
- [19] J. A. VALDMANIS, R. L. FORK, *Opt. Lett.* **1985**, 10, 131-133.
- [20] M. MAEDA, *Laser Dyes*, Academic Press, New York, **1984**.

- [21] K. H. DREXHAGE in *Dye Lasers*, Springer Verlag, New York, **1977**, Seiten: 144-193.
- [22] D. KLICK in *Dye Laser Principles*, Academic Press, New York, **1990**, Kapitel 8.
- [23] J. D. BRADSHAW, M. O. RODGERS, *Appl. Opt.* **1982**, *21*, 2493-2500.
- [24] Y. KANAOKA , *Angew. Chemie* **1977**, *89*, 142-152; Int. Ed. Engl. **1977**, *16*, 137-147.
- [25] L. STRYER , *Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, New York, 3rd Edition, **1988**.
- [26] J. P. DEVLIN in *High Throughput Screening: The Discovery of bioactive Substances*, Marcel Dekker, Inc., New York, **1997**, Kapitel 1.
- [27] R. W. WALLACE, M. E. GOLDMAN in *High Throughput Screening: The Discovery of bioactive Substances*, Marcel Dekker, Inc., New York, **1997**, Kapitel 15.
- [28] M. PAZZAGALI, J. H. DEVINE, D. O. PETERSON, T. O. BALDWIN, *Anal. Biochem.* **1992**, *204*, 315-323.
- [29] J. BERGER, J. HAUBER, R. HAUBER, R. GEIGER, B. R. CULLEN, *Gene* **1988**, *66*, 1-10.
- [30] I. BRONSTEIN, J. J. FORTIN, *BioTechniques* **1994**, *17*, 172.
- [31] M. FISCHER, S. HARBRON, B. R. RABIN, *Anal. Biochem.* **1995**, *227*, 73-79.
- [32] R. MACARRÓN, R. P. HERTZBERG in *High throughput screening: Methods and Protocols*, Humana Press, Totowa, **2002**, Kapitel 1.
- [33] J. R. COMLEY, T. REEVES, *J. Biomol. Screening* **1998**, *3*, 217-226.
- [34] J. A. R. MEAD, J. N. SMITH, J. T. WILLIAMS, *Biochem. J.* **1955**, *61*, 569-573.
- [35] D. ROBINSON, *Biochem. J.* **1956**, *63*, 39-44.
- [36] D. H. LEABACK, *Biochem. J.* **1961**, *78*, 22-23.
- [37] Z. ZHANG, R. C. STANTON, K. APSE, J. PANG, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 40042-40047.
- [38] M. BULTE, G. REUTER, *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* **1989**, *188*, 284-293.
- [39] E. E. GREBNER, D. A. WENGER, *Prenat. Diagn.* **1987**, *7*, 419-423.
- [40] N. A. PETRUSHKOVA, I. K. KOZLOVA, I. V. TSVETKOVA, G. YA. VIDERSHAIN, *Biokhimica* **1988**, *53*, 1539-1545; Engl. Ed. **1988**, *53*, 1339-1345.

- [41] W. SUN, K. R. GEE, R.P. HAUGLAND, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3107-3110.
- [42] R. P HAUGLAND, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, Molecular Probes, 9th Edition, **2002**, Seite 68.
- [43] R. O'KENNEDY, R. D. THORNES, *Coumarines: Biology, Applications and Mode of Action*, John Wiley & Sons, **1997**.
- [44] M. ZIMMERMAN, G. PATEL, E. YUREWICZ, *Anal. Biochem.* **1976**, *70*, 258-262.
- [45] Y. KANAOKA, T. TAKAHASHI, H. NAKAYAMA, K. TAKADA, T. KUNURA, S. SAKAKIBARA, *Chem. Pharm. Bull.* **1977**, *25*, 3126-3128.
- [46] J. R. TCHOUBE, T. MOREAU, F. GAUTHIER, J. G. BIETH, *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, *1076*, 149-151.
- [47] R. P HAUGLAND in *Optical Microscopy for Biology*, Wiley-Liss Inc., **1990**.
- [48] M. OKAWARA, T. KITAO, T. HIRASHIMA, M. MATSUOKA, *Organic Colorants*, Kodansha & Elsevier, **1988**.
- [49] A. SEILMEIER, J. P. MAIER, F. WONDRAZEK, W. KAISER, *J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 104-108.
- [50] P. MOECKLI, *Dyes and Pigments* **1980**, *1*, 3-15.
- [51] E. KOLLER, O. S. WOLFBEIS, *Monatshefte für Chemie* **1985**, *116*, 65-75.
- [52] B. C. MCKUSICK, R. E. HECKERT, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 2806-2815.
- [53] D. ELITE, E. GANZ, *SVF Fachorg. TextVeredl.* **1968**, *3*, 389.
- [54] O. S. WOLFBEIS, E. KOLLER, P. HOCHMUTH, *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1985**, *58*, 731-734.
- [55] H. V. PECHMANN, *Ber.* **1884**, *17*, 929-936.
- [56] H. V. PECHMANN, C. DUISBERG, *Ber.* **1883**, *16*, 2119-2128.
- [57] H. KRÖPER, *Houben-Weyl, Bd VI/2*, 641-681.
- [58] S. SETHNA, R. PHADKE, *Organic Reactions, Vol. 7*, Wiley & Sons, New York, **1953**, 1-35.
- [59] H. HAEUSERMANN, J. VOLTZ, Patent Ger. Offen. 2 253 538, **1972**.
- [60] R. SUZUKI, A. OTSUJI, Patent JP 96-105 126, **1996**.

- [61] J. GRIFFITH, J. MAMA, V. MILLAR, Patent EP 1 002 020, Nycomed Amersham PLC, **2000**.
- [62] A. VILSMEIER, *Chemiker-Zeitung* **1951**, *75*, 133-135.
- [63] AUTORENKOLLEKTIV, *Organikum* VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, 17. Auflage, **1988**, Seiten 328-329.
- [64] Patent GB 1 190 274, BASF, **1967**.
- [65] M. A. VAN VLIET, J. VISSCHER, *Nucleosides & Nucleotides* **1994**, *10*, 2113-2124.
- [66] J. WEIJLARD, *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, *64*, 2279-2282.
- [67] Y. KITADE, M. HAYASHI, C. YATOME, M. CHAJIMA, H. NAGASE, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 833-836.
- [68] ZE-QI XU, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7697-7701.
- [69] J. J. ARES, P. E. OUTT, J. L. RANDALL, P. D. MURRAY, P. S. WEISSHAAR, L. M. O'BRIEN, B. L. EMS, S. V. KAKODKAR, G. R. KELM, W. C. KERSHAW, K. M. WERCHOWSKI, A. PARKINSON, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4937-4943.
- [70] A. S. KENDE, K. KOCH, C. A. SMITH, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2210-2218.
- [71] J. BIEHRINGER, *Chemiker-Zeitung* **1912**, *43*, 389.
- [72] L. ERDAY, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1957**, *12*, 251-258.
- [73] Patent Ger. Offen. 711 665, I.G. Farbenindustrie, **1935**.
- [74] M. BIRMES, Dissertation, Heinrich Heine Universität Düsseldorf, **1995**, 227.
- [75] D. P. SPECHT, *Tetrahedron* **1982**, *38*, 1203-1211.
- [76] W. MÜLLER, C. BERRES, Patent US 2 141 090, **1936**.
- [77] W. MÜLLER, K. BERRES, Patent DE 711 665, **1941**.
- [78] G. BETTERMANN, *Phosphorus Sulfur* **1986**, *28*, 327-336.
- [79] A. A. GOLDBERGER, H. A. WALKER, *J. Chem. Soc.* **1954**, 2540-2543.
- [80] T. CLAUSEN, D. ROSE, Patent EP 342 532, Wella AG, **1989**.
- [81] W. H. PERKIN, *J. Am. Chem. Soc.* **1868**, *21*, 53.

- [82] W. H. PERKIN, *J. Am. Chem. Soc.* **1877**, *31*, 388.
- [83] E. KNOEVENAGEL, *Ber.* **1898**, *31*, 2596-2619.
- [84] T. YANAGISAWA, H. KONDO, *J. Pharm. Soc. Japan* **1921**, *472*, 498.
- [85] I. M. HEILBRON, D. H. HEY, B. LYTHGOE, *J. Chem. Soc.* **1936**, 295-300.
- [86] M. CRAWFORD, J. A. M. SHAW, *J. Chem. Soc.* **1953**, 3435-3439.
- [87] S. LI, Y. GAO, *Kexue Tongbao* **1988**, *33*, 1617-1623 .
- [88] H. ICHIBAGASE, *J. Pharm. Soc. Japan* **1955**, *75*, 1477-1486.
- [89] C. W. SCHELLHAMMER, K. W. MÜLLER , Patent BE 660 602, Bayer AG, **1965**.
- [90] V. M. FEDOSOVA, O. U. MAECDSON, *Zhur. Obshchei Khim.* **1948**, *18*, 1459-1466.
- [91] J. SAKAMOTO, A. NOZAKA, M. SHIMAMOTO, H. OZAKI, Y. SUZUKI, S. YOSHIOKA, M. OKAMURA, T. DATE, O. TAMURA, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1995**, *13*, 1759-1770.
- [92] W. MARCH, D. AUGART, H. SCHEUERMANN, Patent Ger. Offen. 1 098 125, BASF, **1972**.
- [93] N. ITO, Patent JP 91-66 117, **1991**.
- [94] A. KARASOWA, N. ITO, T. OGUCHI, Patent JP 90-417 814, **1990**.
- [95] P. F. GORDON, P. GREGORY, *Organic Chemistry in Colour*, Springer Verlag Berlin, **1983**,
Seiten 136-137.
- [96] O. S. WOLFBEIS, J. H. BAUSTERT, *J. Heterocyclic Chem.* **1985**, *22*, 1215-1218.
- [97] AUTORENKOLLEKTIV, *Organikum*, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, 17. Auflage,
1988, Seite 407.
- [98] A. M. EL-NAGGAR, F. S. M. AHMED, A. M. ABD EL-SALAM, M. A. RADI, M. S. A. LATIF, *J. Heterocyclic Chem.* **1981**, *18*, 1203-1207.
- [99] S. TAKIMOTO, J. INANAGA, T. KATSUKI, M. YAMAGUCHI, *Bull. Chem. Soc. Japan* **1976**, *49*, 2335-2336.
- [100] E. M. KAISER, R. A. WOODRUFF, *J. Org. Chem.* **1970**, *35*, 1198-1199.
- [101] R. C. PARISH, L. M. STOCK, *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 927-929.

- [102] A. K. SINHABABU, M. KAWASE, R. T. BORCHARDT, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 4139-4142.
- [103] T. W. GREENE, P. G. M. WUTS, *Protective groups in organic chemistry*, John Wiley & Sons, 2. Ausgabe, **1991**, Seite 146-148.
- [104] A. J. PEARSON, W. J. ROUSH, *Activating agents and protective groups*, John Wiley & Sons, **1999**, Seite 63.
- [105] F. L. BENTON, T. E. DILLON, *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, *64*, 1128-1129.
- [106] J. F. W. McOMIE, M. L. WATTS, *Chem. Ind.* **1963**, 1658.
- [107] D. TAUB, N. N. GIROTRA, R. D. HOFFSOMMER, C. H. KUO, H. L. SLATES, S. WEBER, N. L. WENDLER, *Tetrahedron* **1968**, *24*, 2443-2461.
- [108] I. VLATTAS, I. T. HARRISON, L. TOKES, J. H. FRIED, A. D. CROSS, *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 4176-4179.
- [109] J. F. W. McOMIE, M. L. WATTS, D. E. WEST, *Tetrahedron*, **1968**, *24*, 2289-2292.
- [110] G. GROSSMANN, U. SEQUIN, *Synlett* **2001**, *2*, 278-281.
- [111] B. BLÖDORN, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2003**.
- [112] Patent DE 280 000, Bayer&Co, **1913**.
- [113] R. ANSCHÜTZ, G. D. MOORE, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1887**, *239*, 333-349.
- [114] A. G. PINKUS, P. G. WALDREP, *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 575-581.
- [115] P. H. GRAYSHAN, A. M. KADHIM, A. T. PETERS, *J. Heterocycl. Chem.* **1974**, *11*, 33-38.
- [116] P. KARRER, M. VISCONTINI, *Helv. Chim. Acta* **1946**, *29*, 711-718.
- [117] E. CHERBULIEZ, J. RABINOWITZ, *Helv. Chim. Acta* **1954**, *41*, 1168-1175.
- [118] E. L. JACKSON, *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 395-399.
- [119] L. JACOB, M. JULIA, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1990**, *127*, 719-733.
- [120] P. CHABRIER, N. T. THUONG, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1975**, *9-10*, 2048-2088.
- [121] S. V. BHAT, B. S. BAJWA, H. DORNAUER, N. J. DE SOUZA, H.-W. FEHLHABER, *Tetrahedron Lett.* **1977**, 1669-1672.

- [122] B. LAL, A. K. GANGOPADHYAY, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1992**, 1993-1999.
- [123] B. EDWARDS, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 6225-6229.
- [124] D. M. BROWN in *Organic Chemistry: Methods and Results, Vol. 3*, Interscience, New York, **1963**, Seite 75.
- [125] H. G. KHORANA, *Some Recent Developments in the Chemistry of Phosphate Esters of Biological Interest*, Wiley, New York, **1961**, Seite 14.
- [126] T. A. KHWAJA, C. B. REESE, J. C. M. STEWART, *J. Chem. Soc. (C)* **1970**, 2092-2100.
- [127] P. BRIGL, H. MÜLLER, *Chem. Ber.* **1939**, *72*, 2121-2130.
- [128] F. R. ATHERTON, H. T. OPENSHAW, *J. Chem. Soc.* **1945**, 382-385.
- [129] L. ZERVAS, *Naturwiss.* **1939**, *27*, 317.
- [130] V. M. CLARK, D. W. HUTCHINSON, G. W. KIRBY, A. TODD, *J. Chem. Soc.* **1961**, 715-721.
- [131] C. A. BUNTON, J. HELLYER, *Tetrahedron Lett.* **1969**, 187-190.
- [132] K. SCHAPER, mündliche Mitteilung.
- [133] K. MICHAELIS, *Annalen* **1903**, *326*, 129-258.
- [134] H. A. C. MONTGOMERY, J. H. TURNBULL, *Proc. Chem. Soc.* **1957**, 178.
- [135] H. A. C. MONTGOMERY, J. H. TURNBULL, *J. Chem. Soc.* **1958**, 1963-1967.
- [136] H. R. CHRISTEN, F. VÖGTLE, *Organische Chemie: Von den Grundlagen zur Forschung, Band 1*, Otto Salle Verlag, 1. Auflage, **1988**, Seiten 482-486.
- [137] H. DU, R. A. FUH, J. LI, L. A. CORKAN, J. S. LINDSEY, *Photochemistry and Photobiology* **1998**, *68*, 141-142.
- [138] J. N. DEMAS, G. A. CROSBY, *J. Phys. Chem.* **1972**, *75*, 991-1024.
- [139] M. KLESSINGER, J. MICHL, *Lichtabsorption und Photochemie organischer Moleküle*, VCH Verlag Weinheim, New York, **1990**, Seite 217.
- [140] P. W. ATKINS, *Physikalische Chemie*, VCH Verlag, 1. Auflage, **1990**, Seite 484.
- [141] L. G. S. BROOKER, A. C. CRAIG, D. W. HESELTINE, P. W. JENKINS, L. L. LINCOLN, *J. Am. Chem.*

Soc. **1965**, 87, 2443-2450.

[142] H. G. O. BECKER, *Einführung in die Photochemie*, Deutscher Verlag der Wissenschaft Berlin, 3. bearbeitete Auflage, **1991**, Seite 72.

[143] W. SCHMIDT, *Optische Spektroskopie: Eine Einführung*, Wiley-VCH Verlag, 2. Auflage, **2000**, Seiten 197-209.

[144] Patent DE 1 098 125, Geigy AG, **1959**.

[145] M. H. ELNAGDI, S. O. ABDALLAH, *Chem. Res. Miniprint* **1997**, 2, 375-384.