

Bichromophore Fluoreszenzfarbstoffe als Sonden für Membranpotentiale

Synthese und Untersuchungen zum spektralen und potentialsensitiven Verhalten

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
JOCHEN HALLMANN
aus Langenfeld (Rheinland)

Düsseldorf 2004

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juli 2004

Herrn Prof. Dr. H.-D. Martin danke ich für die interessante Themenstellung, sowie für den mir gewährten Freiraum zur Gestaltung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Die klassische Farbstoffchemie	7
1.2	Funktionelle Farbstoffe	8
2	Theoretische Grundlagen	10
2.1	Zellmembranen	10
2.1.1	Permeabilität und Stofftransport	12
2.1.2	Membranpotentiale	14
2.2	Potentialsensitive Fluoreszenzfarbstoffe	16
2.2.1	Slow-Response und Fast-Response Farbstoffe	19
2.2.2	Kombination von Chromophoren	22
2.3	Förster-Resonanz-Energietransfer	25
3	Problemstellung	28
4	Synthesen	33
4.1	Synthese der Styrylpyridiniumfarbstoffe	34
4.1.1	Palladium-Kupplung nach Heck	35
4.1.2	Knoevenagel-Route	37
4.1.2.1	Synthese der <i>N,N</i> -Dialkylaniline	38
4.1.2.2	Synthese der <i>N,N</i> -Di-Alkyl-Aminobenzaldehyde	39
4.1.2.3	Synthese der 7-Bromheptansäure	41
4.1.2.4	Synthese der quarternierten Picoliniumderivate	42
4.1.2.5	Synthese der Aminostyrylpyridiniumfarbstoffe	44
4.2	Synthese der Aminophenylpyridiniumfarbstoffe	48
4.2.1	Synthese über Grignard-Reagentien	48
4.2.2	Synthese über Diethyl-(4-pyridinyl)-boran	49
4.2.2.1	Synthese von Diethylmethoxyboran	50
4.2.2.2	Synthese von 4-Diethylboranyl-pyridin	52
4.2.2.3	Synthese der <i>N,N</i> -Dialkylaminophenylpyridine	53
4.2.3	Synthese mit Hilfe von Cyanurchlorid	54
4.2.4	Synthese der <i>N,N</i> -Dialkylaminophenylpyridiniumfarbstoffe	56
4.2.5	Charakterisierung der <i>N,N</i> -Dialkylaminophenylpyridine und -pyridiniumfarbstoffe	57
4.3	Synthese der bichromophoren Farbstoffe	61
4.3.1	Synthese von Tripyrrolidinochlorophosphoniumhexafluorophosphat (PyCloP)	63

4.3.2	Kopplung zu Bichromophoren.....	65
5	Fluoreszenzspektroskopie.....	72
5.1	Fluoreszenzeigenschaften.....	72
5.2	Fluoreszenzquantenausbeuten.....	79
5.3	Untersuchungen in Membranen.....	88
5.3.1	Einlagerungsverhalten in Vesikel.....	90
5.3.2	Untersuchung der potentialsensitiven Eigenschaften.....	96
6	Zusammenfassung.....	112
7	Experimentalteil.....	118
7.1	Allgemeines.....	118
7.2	Vesikelpräparation.....	118
	Versuchsbeschreibungen.....	122
Versuch 1	7-Bromheptansäure.....	122
Versuch 2	<i>N,N</i> -Di- <i>n</i> -propylanilin.....	123
Versuch 3	<i>N,N</i> -Di- <i>n</i> -butylanilin.....	123
Versuch 4	Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der [<i>N,N</i> - Dialkylaminophenyl]pyridine mit Hilfe von Cyanurchlorid.....	124
Versuch 5	Diethylborylpivalat.....	127
Versuch 6	Diethyl-methoxy-boran.....	127
Versuch 7	4-Pyridyllithium.....	128
Versuch 8	Diethyl-(4-pyridyl)-boran.....	128
Versuch 9	Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der [<i>N,N</i> - Dialkylaminophenyl]pyridine über Diethyl-(4-pyridyl)-boran ...	129
Versuch 10	<i>p-N,N</i> -Di- <i>n</i> -propylaminobenzaldehyd.....	141
Versuch 11	<i>p-N,N</i> -Di- <i>n</i> -butylaminobenzaldehyd.....	142
Versuch 12	Synthese der Picoliniumsalze.....	143
Versuch 13	Allgemeine Vorschrift zur Synthese der Styrylfarbstoffe.....	147
Versuch 14	Tripyrrolidinophosphanoxid.....	159
Versuch 15	Chlortripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat (PyCloP).....	159
Versuch 16	Kopplung der ASP-Farbstoffe mit 1,4-Phenylendiamin.....	160
Versuch 17	Synthese der Bichromophore.....	170
8	Literaturverzeichnis.....	210

1 Einleitung

1.1 Die klassische Farbstoffchemie

Farbe ist heutzutage für jeden eine Selbstverständlichkeit. In der Art und Weise seine Umwelt zu erleben oder den Möglichkeiten eben diese zu beeinflussen und zu verändern, ist der Einsatz von Farbe kein beschränkendes Kriterium mehr. Daß dies noch vor nicht zu allzu langer Zeit anders war, sei nur mit dem Hinweis auf die Entwicklung von Farbfilmen für Fotografie und Film und dem Farbfernsehen in Erinnerung gerufen. Die Menschen der Cro-Magnon-Kultur (ca. 35000 – 8000 v. Chr.) bedienten sich der eingeschränkten Palette naturgegebener Farben in Form farbiger Erden um sich auszudrücken. Die Erden wurden in erhärtende Öle eingerührt und aufgetragen und sind so noch heute z.B. in der berühmten Höhle in Altamira (Spanien) erhalten [1]. Daß urzeitliche Methoden auch Impulse für die gegenwärtige Entwicklung von Farbstoffen haben können, zeigt die Erforschung der Maya-Kultur. Erst vor kurzem wurde das Rätsel gelöst, warum sich die blaue Farbe in den Wandgemälden über die Jahrhunderte so gut erhalten hat. Die Maya mischten Ton und Indigo und erhitzen das Gemenge. Auf diese Weise wurde ein Pigment erhalten, das sehr stabil ist und zudem umweltverträglich, da es ohne chemische Zusätze für Haltbarkeit und Leuchtkraft auskommt. Diese Technik soll Anwendung in der Entwicklung moderner Pigmente finden [2]. Der Umgang mit Farbe verbesserte sich schnell und schon die Ägypter beherrschten vor über 4000 Jahren die Küpenfärbung mit Indigo 1 [3].

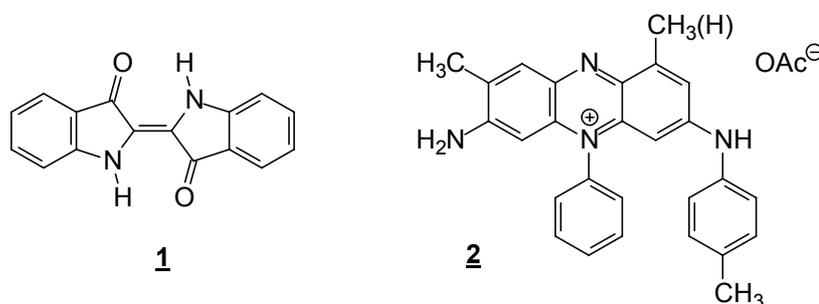


Abbildung 1: Strukturen von Indigo 1 und Mauvein 2.

Doch erst in der Mitte des 19. Jahrhunderts gelang die erste synthetische Darstellung eines Farbstoffs in Form des Mauveins 2 durch Perkin (1856) [4], das auch die erste großtechnisch hergestellte Chemikalie wurde und somit den Beginn der chemischen Großindustrie darstellt. Im weiteren Verlauf der Entwicklung der chemischen Industrie, nahmen Erforschung und Entwicklung von Farbstoffen lange einen großen Stellenwert ein. Bis heute ist deren Produktion ein wichtiger Bestandteil des Gesamtumsatzes der chemischen Industrie. Innovationen im Bereich der klassischen Farbstoffe, haben in jüngerer Zeit jedoch stark abgenommen.

1.2 Funktionelle Farbstoffe

Die Farbstoffforschung findet heutzutage mit einem großem Schwerpunkt in der Entwicklung funktioneller Farbstoffe statt, also von zur Lichtabsorption und –emission fähigen Molekülen, die eine andere Funktion als die der Farbgebung haben [5]. So finden Farbstoffe Einsatz in der analytischen Chemie als pH-Indikatoren [6], in der Spektroskopie als Laserfarbstoffe [7,8], in der Fotografie als Sensibilisatoren [9], bei der optischen Datenspeicherung [10,11,12], bei der Solarenergiegewinnung [13], als Indikator im High Throughput Screening [14] und in der Tumorthherapie [15,16].

Neben der letztgenannten und vielen weiteren Anwendungen im medizinischen Bereich, haben funktionelle Farbstoffe auch in der Erforschung der Funktion des Nervensystems als Werkzeuge erhebliche Beiträge geleistet. Diese Arbeiten haben in der Medizin zentrale Bedeutung, da von den Sinnesorganen alle Reize über das Nervensystem zu Hirn und Rückenmark übermittelt und von dort in Bruchteilen einer Sekunde entsprechende Reaktionen an Muskulatur und Organe zurückgeschickt werden. Dadurch sind ein schnelles Erkennen und die entsprechende Reaktion auf Umweltreize gewährleistet.

Aber nicht nur schnelle und aktive Reaktionen, sondern auch unbewußte, langsame und zum Teil ebenso lebenswichtigen Funktionen des Körpers werden vom zentralen Nervensystem gesteuert, wie die Atmung oder die Verdauung.

Die Signalübertragung erfolgt in beiden Fällen mit Hilfe von elektrischen Impulsen – in Form der Änderung von Membranpotentialen –, die über die Nervenbahnen als Leitung für den Austausch von Informationen sorgen.

Die Änderung von Membranpotentialen spielt aber nicht nur bei der Reizleitung eine Rolle, sondern auch – wie in Kapitel 2.1.1 und 2.1.2 ausgeführt – in vielen weiteren Zellprozessen, wie den Stofftransport über die Zellmembran oder die Funktion von Membranenzymen.

Aus den genannten Gründen ist das Messen der Stärke und der Änderung solcher Potentiale ein wichtiger Bestandteil der Untersuchung von Zellprozessen. Die Methodenentwicklung auf diesem Gebiet hat mit dem Einsatz funktioneller Farbstoffe sicherlich eine ihrer bedeutungsvollsten Innovationen erfahren.

Mit der Entwicklung von verbesserten membranpotentialsensitiven Farbstoffen, soll die vorliegende Arbeit einen Beitrag in diesem Bereich liefern.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Zellmembranen

Membranen sind die Grenze zwischen Leben und Tod [17]. Alle lebenden Zellen besitzen eine Membran, die Zellinneres von Zelläußerem trennt. Zellen stellen die kleinste eigenständig lebensfähige und daher über einen eigenen Energie- und Stoffwechsel verfügende Grundeinheit aller Lebewesen von den Einzellern bis zum Menschen dar. Eine Zelle enthält verschiedene Organellen wie den Zellkern, die Mitochondrien oder Vakuolen. Diese Zellbestandteile trennen sich wiederum durch Membranen von ihrer Umgebung ab. Über die Membran erfolgt auf vielfältige Weise ein geregelter Austausch von Substanzen, die für die Aufrechterhaltung der Zellfunktionen notwendig sind (siehe Kapitel 2.1.1 „Permeabilität und Stofftransport“).

Biomembranen können nach dem Flüssig-Mosaik-Modell [18] als komplexe Lösung von Proteinen und Steroiden in einer Matrix aus Lipiden aufgefaßt werden. Als Lipide bezeichnet man im weitesten Sinne Moleküle mittleren Gewichts (zwischen 100 und 5000 g/mol), die einen hohen Anteil an aliphatischen oder aromatischen Kohlenwasserstoffen besitzen [19]. Zu der Klasse der Lipide gehören einfache Kohlenwasserstoffe, Steroide, Seifen oder Detergentien, aber auch komplexere Moleküle, wie z.B. Phospholipide, die beim Aufbau von Membranen am verbreitetsten sind.

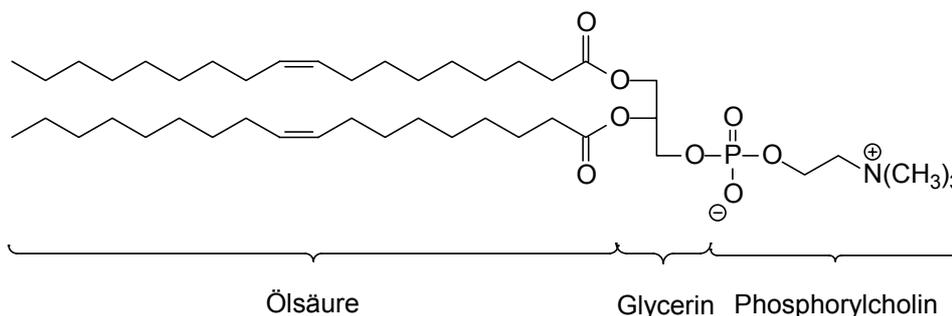


Abbildung 2 Das Phospholipid Dioleoylphosphatidylcholin (DOPC)

Die Phospholipide besitzen ein Glycerin-Grundgerüst, das durch einen Phosphatrest und zwei langkettige Acylverbindungen substituiert ist. In den meisten Fällen handelt es

sich dabei um C_{14} - bis C_{24} -Fettsäuren. Der Phosphatrest trägt wiederum eine polare Kopfgruppe, wie z.B. Serin, Ethanolamin oder, wie in Abbildung 2 gezeigt, Cholin. Zusammen mit den lipophilen Fettsäureestern verleiht diese polare Kopfgruppe dem Lipid einen amphiphilen Charakter.

In wässrigem Medium lagern sich Phospholipide spontan zu Aggregaten zusammen, bei denen die polaren Kopfgruppen nach außen und die Fettsäureketten nach innen weisen. Abhängig von den Bedingungen erfolgt der Zusammenschluß zu Mizellen oder zu Lipiddoppelschichten in Form von Lamellen oder Vesikeln (Abbildung 3).

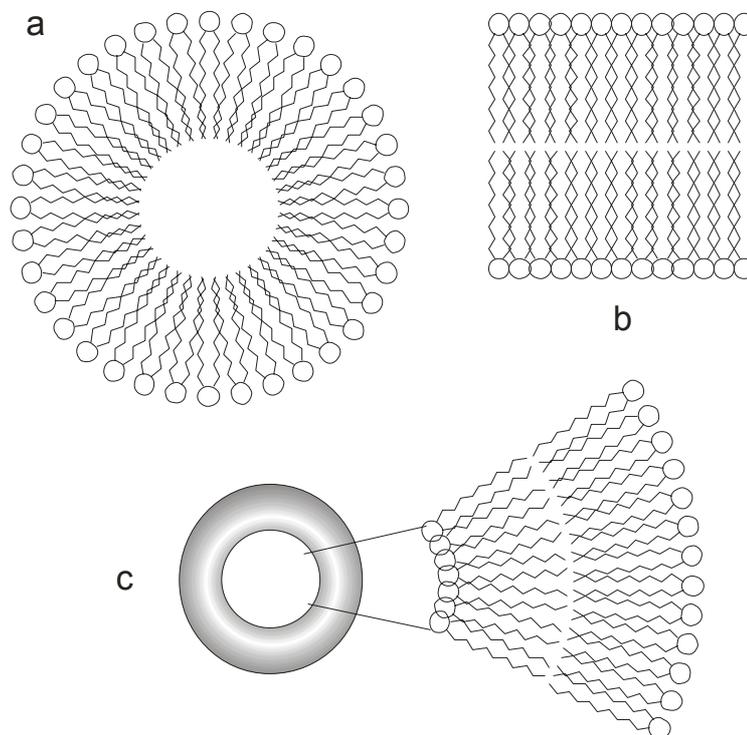


Abbildung 3 Schematische Darstellung der Anordnung von Lipiden in wässrigem Medium zu a: Mizellen, b: Lamellen und c: Vesikeln

Durch die Behandlung von wässrigen Lipidsuspensionen mit Ultraschall [20], durch Dialyse wasserlöslicher Lipid-Detergens-Komplexe [20] oder Extrusion durch Kernporemembranen [21] ist es möglich Lipidvesikel definierter Größe und Art herzustellen. Vesikel können zudem gezielt so hergestellt werden, daß sie bestimmte Substanzen sowohl in der Lipidschicht, als auch im inneren wässrigen Kompartiment enthalten [22,23,24].

Aufgrund der genannten Eigenschaften eignen sich Lipidvesikel sehr gut als vereinfachendes Modell für Biomembranen. Vesikel auf Basis der in Abbildung 2 gezeigten

DOPC Lipide, dienen in der vorliegenden Arbeit als Standardsystem zur Untersuchung der Eigenschaften der dargestellten Fluoreszenzfarbstoffe in Membranen.

2.1.1 Permeabilität und Stofftransport [25,26]

Wegen ihres unpolaren Innenbereichs sind Membranen für kleine ungeladene Moleküle wie O₂, N₂, CO₂, NH₃, andere Gase und Wasser permeabel. Größere Moleküle können die Membran nur dann durchdringen, wenn sie unpolar sind, also eine hydrophobe Oberfläche besitzen.

Alle Zellen und Zellorganellen besitzen spezifische Transportsysteme in ihren Membranen, mit denen sie Moleküle für ihren Stoffwechsel aufnehmen und ihre Abbauprodukte wieder abgeben, Ionengleichgewichte erzeugen und diese zur Energiegewinnung und Signalübertragung nutzen können. Auf diese Weise finden auch polare Moleküle und Ionen ihren Weg durch die Membran.

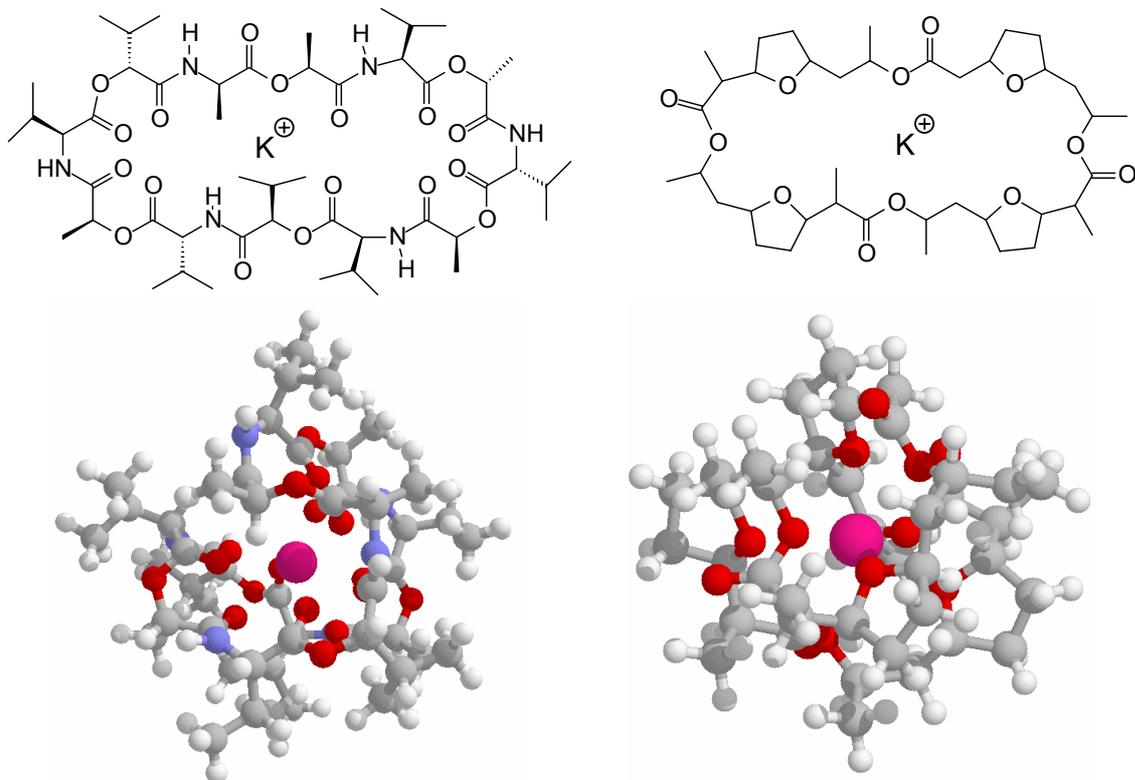


Abbildung 4 Strukturformeln und Ball-and-Stick-Darstellungen von Valinomycin (links) und Nonactin (jeweils mit Kalium-Ion)

Der selektive Transport durch Membranen erfolgt durch Membranproteine als Carrier oder mittels Ionophoren (Iontträger). Als Ionophore können bestimmte Gruppen von Substanzen variabler chemischer Struktur fungieren, die Ionen durch die Membran transportieren. Als Beispiel für solche Ionophore sei Valinomycin und Nonactin genannt (Abbildung 4).

Valinomycin ist ein cyclisches Depsipeptid, das aus drei identischen Einheiten von L-Lactat-, L-Valin-, D-Hydroxyvaleriat- und D-Valinresten aufgebaut ist. Die Reste sind dabei derart verknüpft, daß je eine Ester- und eine Amidbindung sich abwechseln. Im Nonactin wird ein Ring aus vier Molekülen Nonactinsäure gebildet. Die Ionophore wirken entweder, indem sie Transmembrankanäle bilden oder als Trägerstoffe, die von einer Seite der Membran zur anderen wechseln. Für letzteren Fall ist Nonactin und Valinomycin ein Beispiel. Die Sauerstoffatome koordinieren sich an das Zentralatom und bilden einen Chelatkomplex. Dabei wenden sich die Methyl- und Isopropylreste nach Außen und geben dem Komplex einen lipophilen Charakter, der somit membranpermeabel wird. Die Spezifität von Ionophoren kann sehr ausgeprägt sein, zum Beispiel hat Valinomycin eine 10000fach höhere Affinität zu K^+ als zu Na^+ . Das Nonactin, in seinem Aufbau dem Valinomycin recht ähnlich, besitzt dagegen eine nur um den Faktor 50 höhere Affinität für K^+ im Vergleich zu Na^+ .

Folgt der Stofftransport in der Membran einem Konzentrationsgradienten, spricht man von passivem Transport, wird dagegen eine Substanz gegen einen Konzentrationsgradienten transportiert, so ist dazu Energie notwendig - man spricht von aktivem Transport. Die erforderliche Energie kann zum Beispiel durch Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) bereitgestellt werden. Das Phänomen des ATP-getriebenen Transports ist besonders wichtig für die Aufrechterhaltung der Ionengradienten von Na^+ , K^+ , H^+ und Ca^{2+} .

Die Verteilung der bedeutenden Elektrolyte ist außerordentlich ungleich: Na^+ und Cl^- kommen vorwiegend extrazellulär vor, das zelluläre Milieu enthält im wesentlichen K^+ und organische Anionen.

Der Konzentrationsgradient wird dadurch aufrechterhalten, daß ständig Na^+ durch ein aktives Transportsystem nach außen und K^+ nach innen befördert wird, wofür das Membran-Protein Na^+/K^+ -austauschende ATPase (kurz Na^+/K^+ -ATPase) verantwortlich ist, das ATP zu ADP (Adenosindiphosphat) und Phosphat spaltet und einen Teil der frei werdenden Energie zum Ionttransport gegen den Konzentrations-Gradienten nutzt.

2.1.2 Membranpotentiale

Die zuvor beschriebene ungleiche Verteilung von anorganischen Ionen zwischen Extra- und Intrazellulärraum, bedeutet die Entstehung von elektrischen Potentialdifferenzen. Potentialgefälle zwischen Zellinnerem und Umgebung wurden erstmals Mitte des vorigen Jahrhunderts entdeckt [27] und treten in nahezu allen lebenden Zellen auf. Besondere Bedeutung kommt hierbei dem transmembranären Kaliumionengradienten zu.

Im Ruhezustand ist das Innere der Zelle gegenüber dem Außenmedium negativ aufgeladen. Diese Potentialdifferenz beträgt bei Säugetieren beispielsweise -40 bis -80 mV und wird als Ruhepotential bezeichnet. Die Zellmembranen sind durch ihre Funktionen (Kompartimentierung und aktiver Ionentransport) wesentlich an der Erhaltung des Potentials beteiligt.

Bestimmte Zellen, hauptsächlich Nerven- und Muskelzellen, haben die Eigenschaft, elektrisch erregbar zu sein. Wird ein elektrisches Signal (Reiz) übermittelt, steigt das Potential sehr schnell auf maximal +40 bis +50 mV an, um anschließend auf einen Wert abzufallen, der wenig unter dem Ruhepotential liegt, bevor das Potential wieder bis zum Ausgangswert ansteigt. Dieser typische Verlauf eines Aktionspotentials ist in Abbildung 5 veranschaulicht. Folgende Phasen sind erkennbar:

1. Ruhepotential (Latenzperiode)
2. Depolarisationsphase
3. Repolarisation (Rückkehr zum Ruhepotential)
4. Hyperpolarisationsphase (Tendenz zum Gleichgewichtspotential von K^+)

Die Reizweiterleitung in benachbarte Zellregionen geschieht mit konstanter Geschwindigkeit ohne Verformung bis zum Ende der Nervenfaser.

Da einerseits das Membranpotential an der Weiterleitung von Informationen und am Stofftransport beteiligt ist, andererseits viele Zellreaktionen mit Membranpotentialänderung einhergehen, kommt seiner quantitativen Bestimmung grundlegende Bedeutung zu.

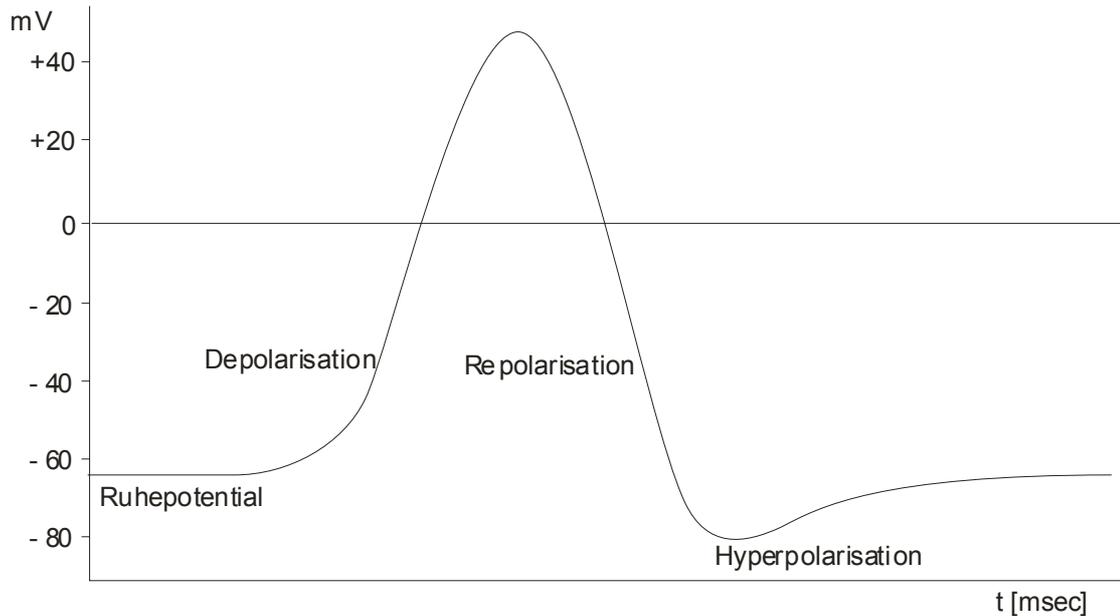


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Aktionspotentials [28]

Es gibt verschiedene Methoden zur Bestimmung von Membranpotentialen. Die wichtigsten sind:

- Direkte Messung durch Einführung von Elektroden bzw. Mikroelektroden in die Zelle („Patch-Clamp“ - Methode). Eine sehr verbreitete, jedoch experimentell aufwendige Technik. Die Meßergebnisse können zum Teil durch Lecks an der Einstichstelle verfälscht werden und nicht anwendbar auf sehr dünne Zellfasern.
- Bestimmung der Verteilung von radioaktiv markierten geladenen Teilchen. Diese Methode zeichnet sich durch eine hohe Nachweisempfindlichkeit aus. Dem stehen jedoch gravierende Nachteile wie Toxizität der verwendeten Substanzen und hohe Entsorgungskosten gegenüber.
- Messung mit Hilfe von Farbstoffen, für die die Zellmembran verschieden permeabel ist und die bei Potentialänderung durch verschiedene Mechanismen (z.B. Elektrochromie und Umverteilung) ihre optischen Eigenschaften, vor allem Absorptions- und Fluoreszenzverhalten, ändern.

Diese letzte Methode ist besonders bedeutsam hinsichtlich ihrer großen Anwendungsbreite auf nahezu alle Zellarten, Organellen und Vesikel. Sie ist hochempfindlich, die Farbstoffe lassen sich bis in kleinste Zellkompartimente hinein applizieren, ohne die Zelle dabei zu zerstören. Probleme bereiten allerdings die Zelltoxizität einiger Farb-

stoffe. Auch eine Schädigung durch photodynamisch erzeugten Singulett-Sauerstoff ist möglich. Schließlich muß auch die Wechselwirkung mit anderen Zellbestandteilen in Betracht gezogen werden.

Da die Darstellung neuer Fluoreszenzfarbstoffe als Potentialsonden Gegenstand dieser Arbeit ist, wird im folgenden Kapitel eine Einführung zu diesem Thema gegeben.

2.2 Potentialsensitive Fluoreszenzfarbstoffe

Lage, Form und Intensität von Absorptions- und Emissionsspektren hängen ursächlich von den energetischen Zuständen im Molekül ab. Durch die Abstände der Energieniveaus von elektronischen, Rotations- und Schwingungszuständen ergeben sich die Energiebeträge in denen eine Anregung des Moleküls bzw. eine Abgabe der Energie in Form von Licht erfolgen kann. Dabei können äußere Einflüsse Auswirkungen auf den energetischen Zustand des Moleküls haben und damit das optische Verhalten verändern. Wellenlängenbereich und Intensität von Fluoreszenzspektren hängen besonders empfindlich von Temperatur, Bindung, Viskosität oder Polarität des Lösungsmittels ab.

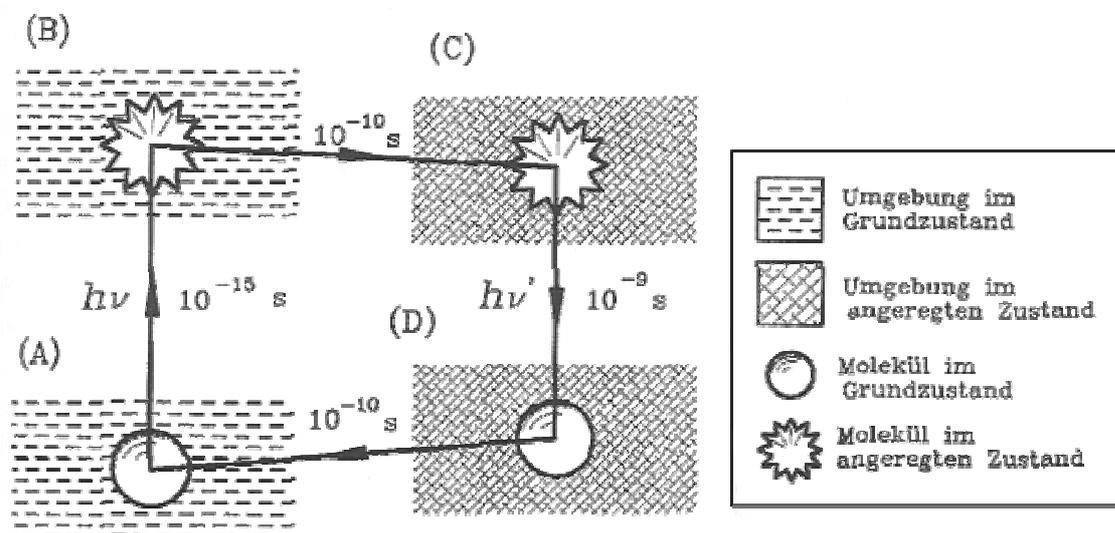


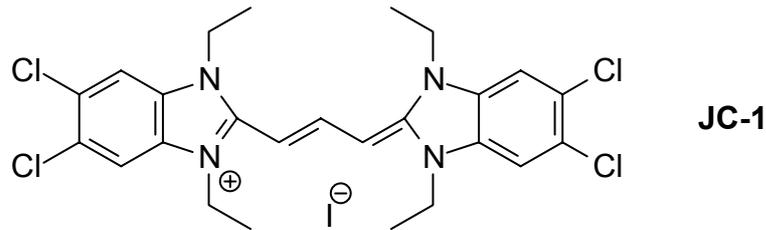
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen eines Fluorophors mit dem Lösungsmittel im Grundzustand und im ersten angeregten Zustand [29].

Für beispielsweise eine bathochrome Verschiebung in Lösungsmitteln zunehmender Polarität sind zwei Dinge verantwortlich (Abbildung 6). Einmal dehnt sich durch die elektronische Anregung die Elektronenwolke aus und vergrößert im Allgemeinen ihre Pola-

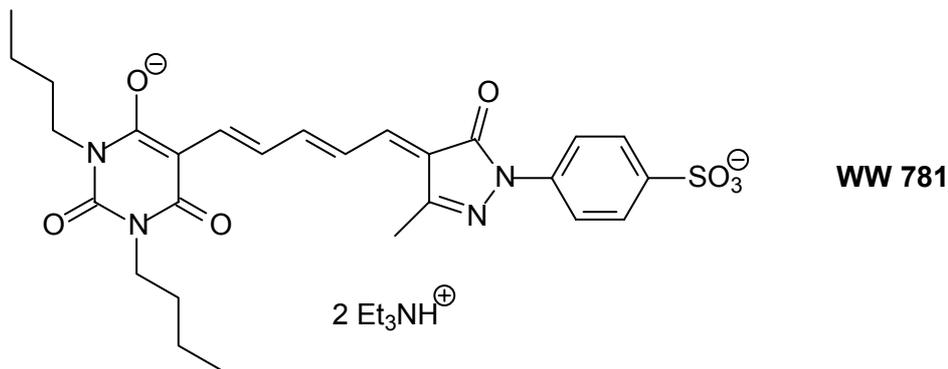
risierbarkeit und erniedrigt damit die Anregungsenergie. Zum anderen findet der Prozeß der elektronischen Anregung innerhalb von nur ca. 10^{-15} s statt, während die Änderung der Kernabstände, sowie die Reorganisation der Lösungsmittelmoleküle mit ca. 10^{-10} s wesentlich länger braucht (Franck-Condon-Prinzip). Innerhalb einer folgenden Zeitspanne von 10^{-9} s findet von diesem Zustand aus nun die Fluoreszenzemission statt. Wiederum „hinkt“ die Änderung der Kernabstände und Reorganisation von Lösungsmittelmolekülen beim Übergang in den Grundzustand etwas hinterher. Je stärker nun durch das Lösungsmittel oder allgemein die chemische Umgebung des Fluorophors dessen angeregte Zustände stabilisiert werden, desto mehr wird die Fluoreszenz bathochrom verschoben. Erfolgen derartige Änderungen der Mikroumgebung eines Fluorophors in Abhängigkeit von der Änderung eines Potentials, kann die daraus folgende Änderung der Fluoreszenz als Maß für Änderung des Potentials genommen werden.

Seit Anfang der siebziger Jahre werden Fluoreszenzsonden zur Membranpotentialbestimmung eingesetzt. Pionierarbeit haben hier Tasaki [30], Cohen [31], Ross [32] und Conti [33] geleistet. Erste Experimente wurden mit Tintenfischaxonen durchgeführt. Diese Nervenfasern sind rund 10 cm lang und haben mit 500 – 1000 μm einen rund 100fach größeren Durchmesser als Säugetieraxone. Aufgrund dieser Größe konnten die spektroskopischen gewonnenen Ergebnisse mit Hilfe von entsprechend fein ausgezogenen Metall-Elektroden direkt überprüft werden. Bis heute sind zahlreiche Farbstoffe auf ihre Potentialsensitivität getestet worden. Ein Übersichtsartikel von Waggoner [34] zeigt die Potentialmessungen an einer Vielfalt von Zellen, einzelnen Organellen und Vesikeln und die dabei benutzten Chromophore. Den universalen potentialsensitiven Farbstoff gibt es bis heute nicht und wird es wahrscheinlich auch nie geben. Jedoch gibt es bereits für eine Vielzahl von Problemen jeweils geeignete Farbstoffe, die optimale Meßergebnisse gewährleisten. Die folgenden Beispiele von Potentialmessungen sollen die Vielfalt der hierbei eingesetzten Chromophore demonstrieren:

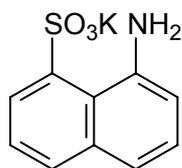
- Das Trimethincyanin JC-1 hat eine spezifische Affinität zu Mitochondrien-Membranen. In wäßriger Pufferlösung (pH 8) zeigt es eine Fluoreszenz bei 527 nm. Das Monomere steht im Gleichgewicht mit J-Aggregaten, die bathochrom verschoben bei 590 nm emittieren. Die Aggregatbildung ist abhängig von der chemischen Umgebung (Polarität, pH-Wert, Ionenstärke) und damit vom Potential [35].



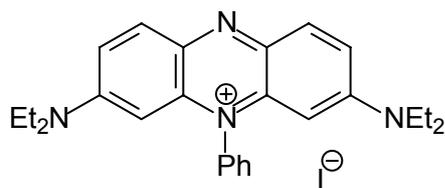
- Das Oxonol WW-781 lagert in Zellmembranen ein und reagiert mit Änderung der Fluoreszenzintensität auf Potentialänderung ohne dabei die Emissionswellenlänge zu verschieben [36,37].



- Eine der einfachsten und ältesten Potentialsonden ist ANS (1,8-Anilino-naphthalinsulfonat). Sie wird zur Untersuchung von Transmembranpotentialen in Bakterien, Chloroplasten, Mitochondrien und submitochondrialen Partikeln angewendet [38] [39], Der Mechanismus der Sensitivität ist noch nicht vollständig geklärt, man nimmt sowohl Umverteilungsprozesse als auch elektrochrome Anteile an.



ANS



Amethyste Violett

- Amethyst Violett, ein Phenazinium-Farbstoff wird zur Bestimmung von Potentialen an kompletten Zellen eingesetzt [40,41].

2.2.1 Slow-Response und Fast-Response Farbstoffe

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

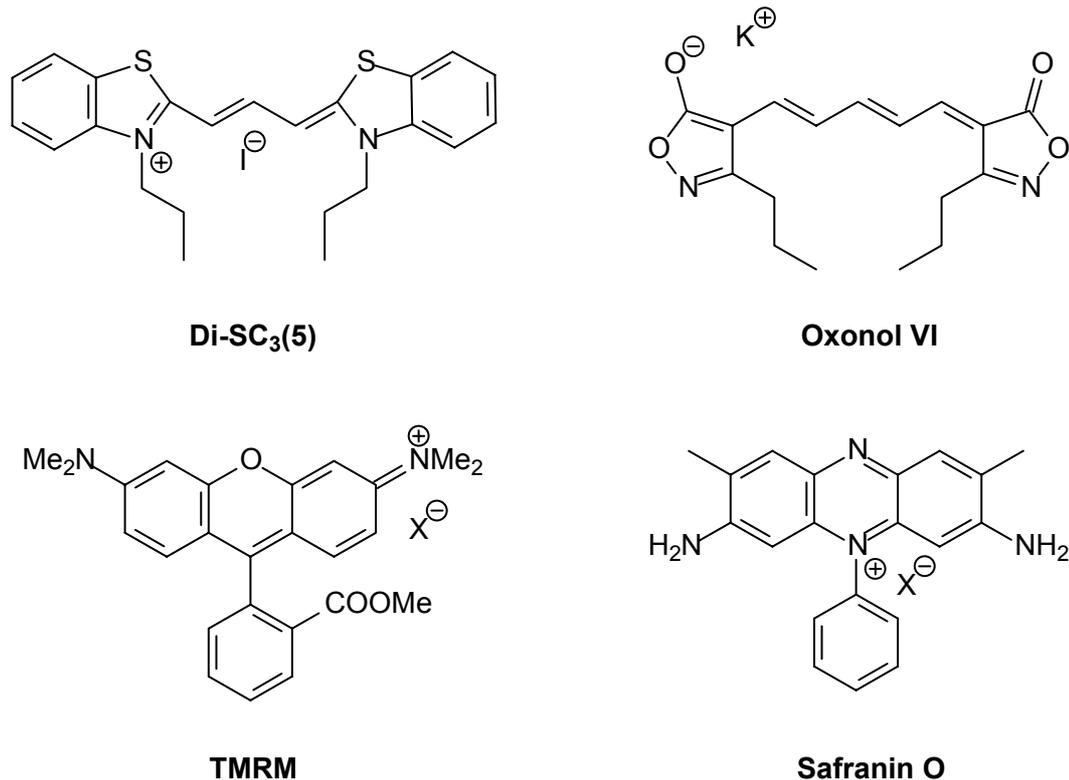


Abbildung 7: Slow-Response Farbstoffe

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

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

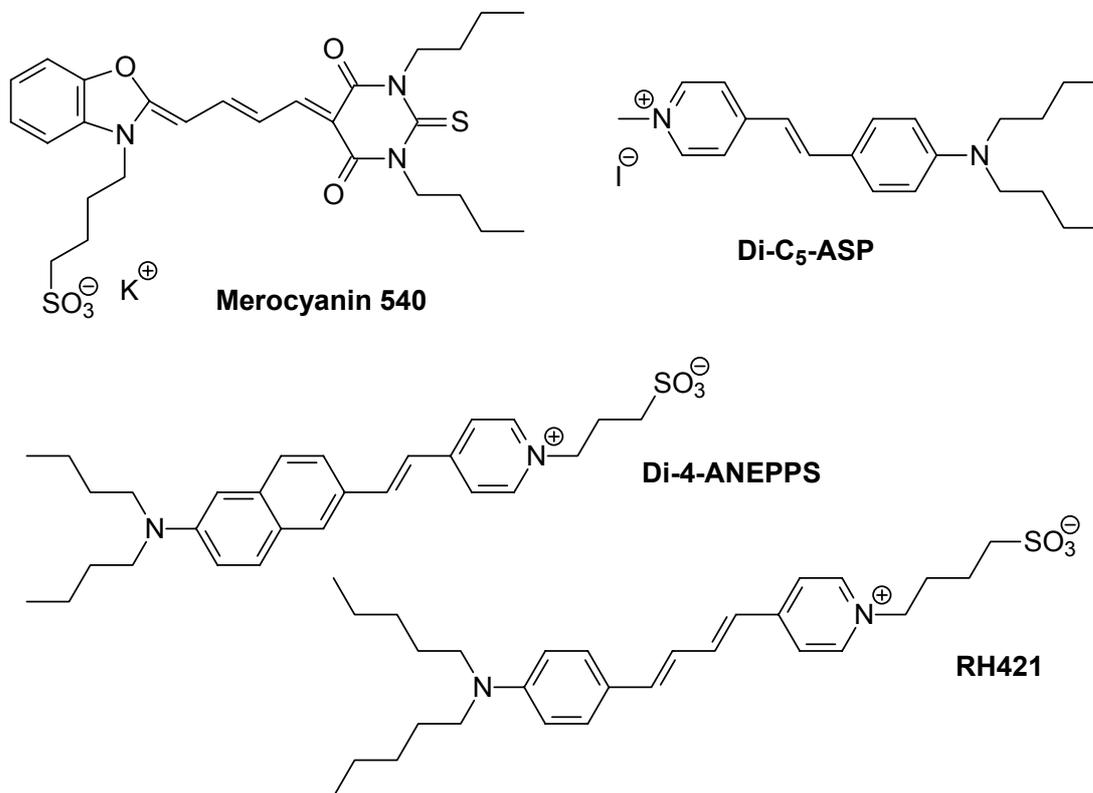


Abbildung 8: Fast-Response Farbstoffe

Dabei verhindern eine oder mehrere geladene Gruppen den Membrandurchtritt. Die Empfindlichkeit dieser Farbstoffe liegt aber nur bei ca. 10 % Signaländerung pro 100 mV. Insbesondere die Gruppe der *N,N*-Dialkylaminostyrylpyridiniumfarbstoffe (ASP-Farbstoffe), ihre Desvinylogen und höheren Homologen werden vielfach für unterschiedlichste Probleme eingesetzt. Sie sind intensiv von Loew [42,43] Fromherz [44,45,46,47,48,49,50] Grinvald [51] und Clarke [52,53] untersucht worden. Der von Loew et. al. synthetisierte Styrylpyridiniumfarbstoff Di-C₅-ASP (Abbildung 8) erwies sich als elektrochrom. Bei Anregung des Farbstoffs mit polarisiertem Licht an sphärischen Doppelschichten aus oxidiertem Cholesterol wurden potentialabhängige Absorption- und Fluoreszenzspektren erhalten. Die Experimente zeigen, daß die Richtung des Übergangsmomentes des Farbstoffes parallel zu den Fettsäureestern der

Lipidmembran angeordnet ist. Weitere Beispiele sind Di-4-ANNEPS [54] und RH-421 [55] (Abbildung 8) genannt, die in bestimmten Experimenten relative Fluoreszenzänderungen deutlich über 10% gezeigt haben.

Fluoreszenzänderungen können durch zahlreiche Faktoren bewirkt werden. Es spielen Änderungen des Absorptionskoeffizienten des Farbstoffs, die Anzahl der Farbstoffmoleküle, die an der Änderung des Absorptionskoeffizienten beteiligt sind, die Quantenausbeute des Farbstoffs und nichtspezifische Fluoreszenz, die nicht in die Potentialänderung eingeht, eine Rolle. So kann z.B. die Fluoreszenzänderung durch unspezifische Bindung des Farbstoffs an Zellbestandteile beträchtlich reduziert werden. Basierend auf den in Kapitel 2.2 beschriebenen Grundlagen kann man verschiedene Mechanismen formulieren, nach denen die Änderung der Fluoreszenz erfolgen kann. Diese können sich auch überlagern:

- Bei den Slow-Response Farbstoffen ist mit der Diffusion durch oder in die Membran eine Änderung der chemischen Umgebung verbunden. Die Fluoreszenz hängt empfindlich von der Umgebung (Solvatation etc.) ab.
- Es sind Gleichgewichte zwischen fluoreszierendem Farbstoff und strahlungslosen Dimeren, Aggregaten mit der Membran oder Zellbestandteilen möglich (z.B. Rotations-Dimer-Mechanismus [56]).
- Eine potentialabhängige Verteilung des Farbstoffs zwischen Membranoberfläche und wässriger Lösung hat ein um so niedrigeres Signal zur Folge, je mehr Farbstoff sich in der wässrigen Phase befindet, weil hier Fluoreszenz durch das polare Lösungsmittel gequencht wird (z.B. On-Off-Mechanismus [57]).
- Bei der großen Klasse der Aminostyrylpyridiniumfarbstoffe (ASP) und ihren phen- und vinylogenen nimmt man einen zumindest partiellen elektrochromen Mechanismus an [58]. Die Struktur der Moleküle erlaubt die senkrechte Einlagerung in die Membran, wobei geladene Gruppen die Farbstoffe an der Oberfläche fixieren. Das elektrische Feld über die Membran hat Einfluß auf die spektralen Eigenschaften, da bei Anregung Ladung entlang der Molekülachse und somit gegen das oder mit dem elektrischen Feld verschoben wird. Dies führt zu hypso- oder bathochromer Verschiebung von Absorption und Fluoreszenz (Stark-Effekt).

Die Frequenzverschiebung infolge des Stark-Effekts, wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\Delta\nu = -\frac{1}{h} \cdot \Delta\mu \cdot F - \frac{1}{2h} \cdot \Delta\alpha \cdot F^2$$

Gleichung 1: $\Delta\nu$: Frequenzverschiebung, $\Delta\mu$: Dipolmomentänderung des Chromophors, $\Delta\alpha$: Änderung der Polarisierbarkeit des Chromophors nach Anregung, F : Stärke des elektrischen Feldes, h : Planck'sches Wirkungsquantum

Für diesen Effekt ist eine Verschiebung des Chromophors in der Membran nicht erforderlich. Eine Reaktion auf eine Potentialänderung kann daher im Subnanosekundenbereich erfolgen. Potentialänderungen im physiologischen Bereich, die normalerweise im Mikrosekundenbereich erfolgen, können so ohne Probleme erfaßt werden.

Experimentell zeigen die Farbstoffe jedoch Reaktionszeiten im Millisekundenbereich, was wahrscheinlich macht, daß der elektrochrome Effekt von Reorganisationseffekten überlagert wird.

Dem großen Vorteil der sehr schnellen Reaktion auf Potentialänderungen, steht als limitierender Faktor in der Anwendbarkeit die oft geringe Sensibilität der „Fast-Response“ – Farbstoffe gegenüber. Durch die im folgenden Kapitel beschriebene Kombination von Chromophoren wird ein Ansatz verfolgt die guten Eigenschaften von Slow- und Fast-Response-Farbstoffen zu vereinen.

2.2.2 Kombination von Chromophoren

1995 wurde von Gonzalez und Tsien [59] ein System vorgestellt, was die positiven Eigenschaften der Fast-Response Farbstoffe, also ihre schnelle Reaktion auf Potentialänderungen, mit den positiven Eigenschaften der Slow-Response Farbstoffe, d.h. ihre große Potentialsensitivität, verbinden sollte (Abbildung 9). Als Fast-Response Farbstoff dient ein Oxonol (DiSBAC₆(3)), das sich membrangebunden je nach Potentiallage an der Innen- oder Außenseite einer Membran ansammelt. Als zweiter Farbstoff wird z.B. ein Fluoresceinderivat an der Membranaußenseite fixiert. Beide Farbstoffe bilden ein Absorber-Emitter-Paar, bei dem Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) möglich ist (ausführliche Grundlagen zum Förster-Transfer in Kapitel 2.3).

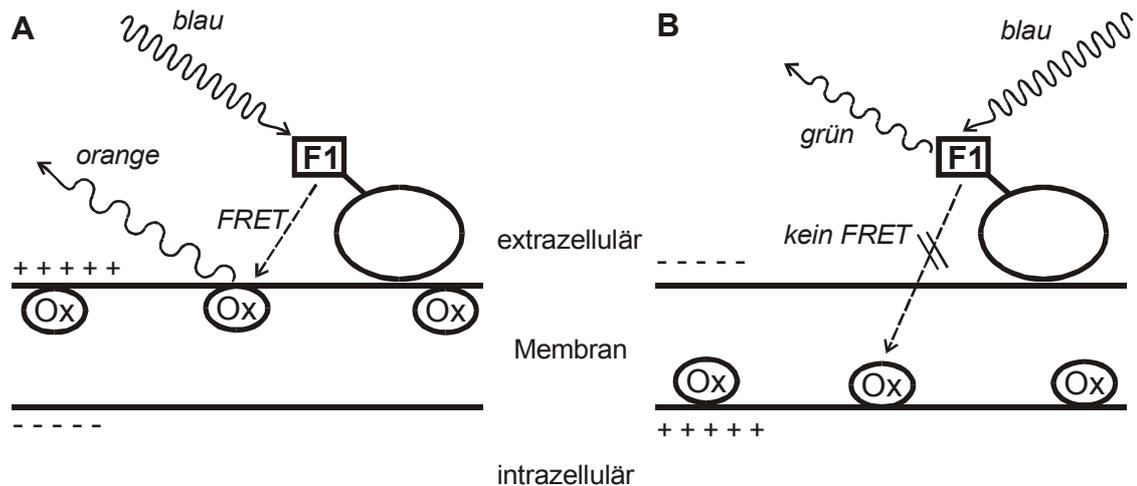


Abbildung 9 Konzept des Gonzalez-Tsien-Systems. F1: Fluorescein, Ox: Oxonol-Farbstoff, Schlangenhäufchen: strahlende Übergänge, gerader Pfeil: Förster-Transfer [59].

Bei positivem Membranpotential wird das Oxonol zur Innenseite der Membran gezogen und akkumuliert dort. Wird nun das Fluorescein angeregt, sieht man bei positivem Membranpotential seine grüne Fluoreszenz. Bei negativem Membranpotential dagegen sammelt sich das Oxonol an der Membranaußenseite. Jetzt ist seine Distanz zum Fluorescein so kurz, dass Förster-Transfer möglich wird und dessen Fluoreszenz gequenchet wird. Bei Anregung des Fluorescein sieht man daher nun die Fluoreszenz des Oxonols, das die Anregungsenergie vom Fluorescein aufgenommen hat. Die Abstandsänderung wird somit über den FRET zu einem empfindlichen Werkzeug zur Messung von Potentialänderungen. Da sich die Emissionen beider Chromophore bei Potentialänderung in entgegengesetzter Richtung ändern, liefert der Quotient beider Signale einen noch empfindlicheren Meßwert als ein Signal alleine. Das Oxonol bewegt sich im Millisekundenbereich in der Membran, kann also auf sehr schnelle Potentialänderungen reagieren. In einigen Experimenten beträgt die Signaländerung über 30 % bei 100 mV Potentialänderung. Dieses Konzept wurde mit verschiedenen Kombinationen von Farbstoffen weiterentwickelt und angewendet [60,61].

Neben der Fixierung des einen Chromophors mit Glutinin oder Lectin, Eiweißstoffen, die spezifische Bindungsstellen für Kohlenhydrate aufweisen, wie sie auf den untersuchten Zellen zu finden sind, kommt noch die direkte Bindung an Membranbestandteile wie Phospholipide in Frage, was den Vorteil hat, den Farbstoff direkt auf die Membranoberfläche zu bringen. Dabei werden auch andere Kombinationen von Oxonolen mit einem zweiten Chromophor angegeben, wie Abbildung 10 zeigt.

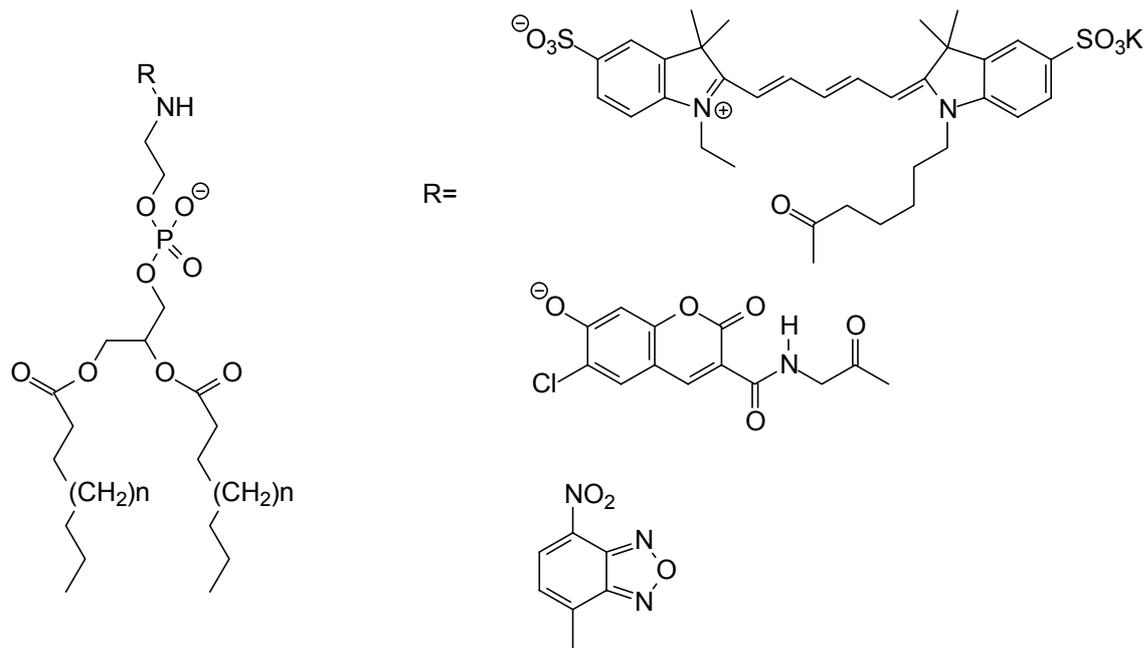


Abbildung 10 von Gonzalez und Tsien eingesetzte Verbindungen [60].

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

- Es müssen zwei verschiedene, relativ unpolare Farbstoffe in die Zellmembran gebracht werden.
- Es sind hohe Konzentrationen der Farbstoffe nötig, um einen effektiven FRET gewährleisten zu können.
- Zur Färbung der Zellen mit besonders unpolaren Oxonolen müssen Hilfssubstanzen, wie β -Cyclodextrin verwendet werden.
- Die Oxonole in der Membran verursachen beträchtliche photodynamische Schäden durch Erzeugung von Singulett-Sauerstoff; es müssen deshalb zusätzlich Schutzsubstanzen, wie z.B. Astaxanthin, ein Carotinoid mit Quenchereigenschaften für Singulett-Sauerstoff, appliziert werden.

Wie von Gonzales und Tsien gezeigt, stellt jedoch eine geeignete Kombination von Absorber- und Emitter-Farbstoffen ein brauchbares Werkzeug zur Bestimmung von Membranpotentialen dar.

2.3 Förster-Resonanz-Energietransfer

Beim Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) handelt es sich um eine strahlungslose Übertragung elektronischer Anregungsenergie von einem atomaren oder molekularen elektronischem System auf ein anderes. Dabei können die beiden beteiligten Farbstoffe über eine kovalente Bindung miteinander verbunden sein, müssen es aber notwendigerweise nicht.

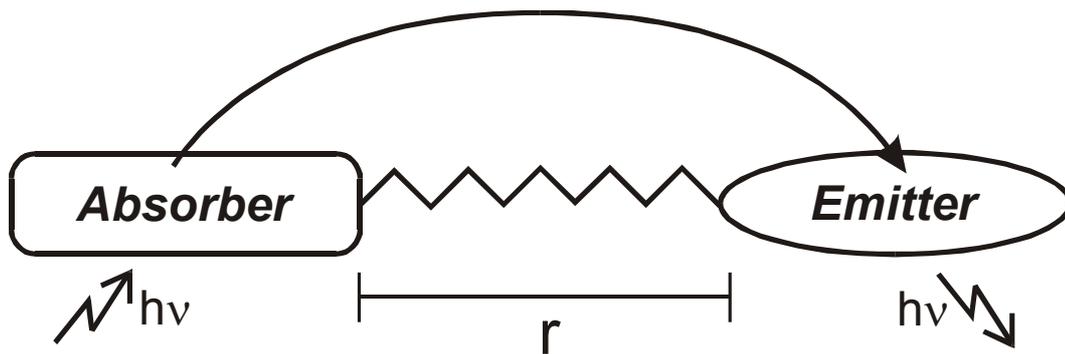


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Förster-Resonanz-Energietransfers (FRET) mit zwei kovalent gebundenen chromophoren Systemen.

Vorraussetzung für einen effektiven FRET ist eine Überlappung des Fluoreszenzspektrums des hypsochromer absorbierenden Absorbers, mit dem Absorptionsspektrum des bathochromer absorbierenden Emitters. Strahlt man im Absorptionsbereich des Absorbers ein, wird dann die Anregungsenergie strahlungslos auf den Emitter, der dann wiederum durch Fluoreszenz in den Grundzustand relaxiert.

Für die Geschwindigkeit des Förster-Transfers gilt die folgende Beziehung [62]:

$$k(A^* \rightarrow E) = \frac{9000 \cdot (\ln 10) \cdot K^2}{128 \cdot \pi^5 \cdot n^4 \cdot N \cdot \tau_0 \cdot r^6} \cdot \int_0^\infty F_A(\tilde{\nu}) \cdot \varepsilon_E(\tilde{\nu}) \frac{d\tilde{\nu}}{\tilde{\nu}^4} \quad \text{mit } \tau_0 = \frac{\tau}{\phi_A}$$

Gleichung 2 mit: K = Orientierungsfaktor, n = Brechungsindex, N = Avogadro-Konstante, r = räumlicher Abstand Absorber/Emitter, F_A = normierte Fluoreszenzintensität des Absorbers, ϕ_A = Absorber-Fluoreszenzquantenausbeute in Abwesenheit des Emitters, τ_0 = natürliche Fluoreszenzlebensdauer des Absorbers, τ = apparente Lebensdauer des angeregten Zustandes des Absorbers, ε_E = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient des Emitters, $\tilde{\nu}$ = Wellenzahl.

Wie aus Gleichung 2 ersichtlich, ist die Geschwindigkeit des Energietransfers abhängig von der Überlappung von Fluoreszenz- und Absorptionsspektrum, sowie der Orientierung und dem räumlichen Abstand r der beiden Chromophore zueinander. Da dieser

Abstand mit $1/r^6$ in Formel für die Geschwindigkeit des FRET mit eingeht, sind besonders empfindliche Änderungen des FRET bei geringsten Abstandsänderungen zu erwarten.

Förster konnte zeigen, daß ein so genannter kritischer Förster-Radius R_0 existiert, bei dem spontane Desaktivierung des Absorbers und Energietransfer auf den Emitter gleich wahrscheinlich sind. Somit stellt R_0 den räumlichen Abstand der beiden Systeme dar, bei dem ein 50%iger Energietransfer stattfindet.

Mit Hilfe des kritischen Radius R_0 kann die Fähigkeit von Farbstoffpaaren zu einem Förster-Energietransfer bewertet werden, da dieser mit der Effektivität des FRET zunimmt. Aus der Betrachtung von Gleichung 3 und Gleichung 4 geht hervor, daß R_0 sowohl mit der Absorber-Quantenausbeute als auch mit dem Überlappungsintegral der beiden Chromophore zunimmt. Typische Werte für R_0 liegen in einem Bereich von 5 – 10 nm.

$$k(A^* \rightarrow E) = \frac{1}{\tau} \cdot \left(\frac{R_0}{r} \right)^6$$

Gleichung 3 mit: r = räumlicher Abstand Absorber/Emitter, $1/\tau$ = Geschwindigkeitskonstante der Absorber-Fluoreszenz in Abwesenheit des Emitters, R_0 = kritischer Radius.

$$R_0^6 = \frac{9000 \cdot (\ln 10) \cdot K^2 \cdot \phi_A}{128 \cdot \pi^5 \cdot n^4 \cdot N} \cdot \int_0^\infty F_A(\tilde{\nu}) \cdot \epsilon_E(\tilde{\nu}) \frac{d\tilde{\nu}}{\tilde{\nu}^4}$$

Gleichung 4 mit: K = Orientierungsfaktor, ϕ_A = Absorber-Fluoreszenzquantenausbeute in Abwesenheit des Emitters, n = Brechungsindex, N = Avogadro-Konstante, r = räumlicher Abstand Absorber/Emitter, F_A = normierte Fluoreszenzintensität des Absorbers, ϵ_E = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient des Emitters, $\tilde{\nu}$ = Wellenzahl.

Es gibt ungezählte Beispiele aus der Molekularbiologie und anderen Disziplinen, die den FRET zu Abstandsmessungen nutzen. Er dient als eine Art „spektroskopisches Lineal“ [63]. So kann die Funktion vieler Membranproteine (Kanäle, Reaktionszentren etc.) erst verstanden werden, wenn Informationen über Tertiär- und Quartärstruktur, so wie die Lage in der Membran bekannt sind [64,65]. Hier können Untersuchungen an kovalent markierten Proteinen unter Ausnutzung des FRET direkt in Membranen wertvolle Hinweise liefern [66]. Es wird häufig auch die intrinsische Fluoreszenzfähigkeit von Proteinen ausgenutzt (GFP, Green Fluorescent Protein), die durch

Reste wie Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan möglich wird [67]. Ferner werden mit Hilfe von FRET Rezeptor / Ligand-Wechselwirkungen [68] Struktur, Hybridisierung und Konformation von DNA, der Transport von Lipiden in der Membran [69] und die Fusion von Membranen untersucht [70].

Da heute eine große Zahl von Absorber/Emitter-Paaren bekannt ist und für die gängigen funktionellen Gruppen in Biomolekülen eine breite Palette an Reaktivkern existiert, läßt sich für fast jedes Problem ein geeignetes System finden. Die Schwierigkeiten bestehen eher in der Kalibrierung des Systems und in diesem Zusammenhang in der Abschätzung des Orientierungsfaktors κ . Sein Quadrat kann zwischen 0 und 4 liegen. Bei freier Rotation beider Chromophore liegt der Wert bei $2/3$, wenn gewährleistet ist, daß die Rotation schnell ist im Vergleich zur Lebensdauer des angeregten Absorbers. Es hat nicht an Versuchen gefehlt, die freie Rotation von Absorber und Emitter mit Hilfe von Fluoreszenzpolarisierungsexperimenten und mathematischen Modellen genauer zu bestimmen [71,72]. Setzt man bei gehinderter Rotation $\kappa^2 = 2/3$, kann der scheinbare Abstand R stark vom wahren Wert abweichen.

3 Problemstellung

Diese Arbeit soll neue Fluoreszenzfarbstoffe zur Bestimmung von Membranpotentialen auf Basis des Konzeptes bichromophorer Systeme liefern.

Grundlegend sollen neue Farbstoffe eine hohe Sensitivität und eine geringe Ansprechzeit auf Potentialänderungen zeigen. Dabei handelt es sich um Eigenschaften, die sich für einen Farbstoff bislang gegenseitig ausschlossen und zu einer Unterscheidung in Slow- und Fast-Response-Farbstoffe geführt haben (Kapitel 2.2.1).

Ein Konzept zur Vereinigung dieser Gegensätze ist das in Kapitel 2.2.2 ausgeführte System von Gonzalez und Tsien, das mit der Kombination zweier Chromophore unter der Ausnutzung des FRET sowohl hohe Intensität, als auch eine schnelle Reaktion auf Potentialänderung zeigt. Wie beschrieben weist dieses System jedoch mit der zwingend hohen Konzentration der Farbstoffe, den notwendigen Hilfsstoffen und der damit einhergehenden hohen Zelltoxizität gravierende Nachteile auf.

Wie in Kapitel 2.2 weiter ausgeführt, gibt es eine Vielzahl von Fluoreszenzfarbstoffen mit membranpotentialsensitiven Eigenschaften, deren Verhalten sich auf die verschiedensten Mechanismen und Eigenschaften zurückführen lassen. Dies eröffnet wiederum zahlreiche Ansätze, um neue Fluoreszenzfarbstoffe mit verbesserten Eigenschaften zu synthetisieren. Durch eine kovalente Kopplung geeigneter Chromophore kann eine bessere Anwendbarkeit erwartet werden, da die Farbstoffe in geringeren Konzentrationen eingesetzt und damit ein nachteiliger Einfluß auf die Zellfunktionen minimiert werden können. Versuche zur Synthese solcher Bichromophore wurden im Arbeitskreis bereits von Birnes [73], Meyer-Beeck [74], Witzak [75], Reiffers [76] und Schneider [77] unternommen. Dabei wurden die Bichromophore in den spektralen Eigenschaften und der Membranaffinität der Einzelchromophore, sowie der Art der Verknüpfung variiert. Allen Konzepten gemeinsam war die Idee einen Umverteilungsfarbstoff mit einem Farbstoff zu kombinieren, der fest in die Membran einlagert. Durch die Bewegung des Umverteilungsfarbstoffs relativ zum zweiten Chromophor in Folge einer Potentialänderung sollte eine empfindliche Änderung des FRET zu erwarten sein, der wiederum eine deutliche Änderung der Fluoreszenz des Emitters zur Folge hat. Tatsächlich wurden verschiedene Bichromophore mit potentialsensitiven Eigenschaften dargestellt, jedoch konnte die Intensität und die Richtung der Fluoreszenzänderung in Abhängigkeit

von der Änderung des Potentials nicht befriedigend durch Struktur-Wirkungs-Beziehungen erklärt werden. So fand Witzak [75] mit einer Kombination von Dialkylaminostyrylpyridinium- und Pentamethincyanin-Farbstoffen beachtlich große Potentialsensitivitäten von -6 bis -38%, sowohl an Kalium-, als auch an Natriumvesikeln als Modellsystem. Meyer-Beeck [74] dagegen fand mit ähnlichen Verbindungen (Kombination von Styrylchromophoren und Pentamethincyaninen mit Indoleninendgruppe) genau umgekehrte Potentialsensitivitäten von +3 bis +14% an Natriumvesikeln. Eine Erklärung für die fehlende Richtungsspezifität konnte nicht gefunden werden. In beiden Fällen waren die Sensitivitäten bei direkter Anregung des Emitters empfindlicher als bei indirekter Anregung über den FRET. Es ist anzunehmen, daß sich die Sensitivität der Farbstoffe mehr aufgrund eines Verhaltens als Umverteilungsfarbstoff, als aus einer durch FRET bedingten Sensitivität erklären läßt.

Generell erweist es sich bei allen bisher synthetisierten Bichromophoren als schwierig Aussagen über ihr Verhalten in bzw. an der Membran zu treffen. Da jedoch genau diese Information essentiell für die Interpretation der Meßergebnisse und die daraus folgende Optimierung potentialsensitiver Bichromophore ist, soll in dieser Arbeit eine Farbstoffkombination als Bichromophor entwickelt werden, die eindeutig in ihrer Membranaffinität ist.

Darüber hinaus soll dieses System aus meßtechnischen Gründen ein Fluoreszenzmaximum des Emitters von kleiner als 700 nm aufweisen.

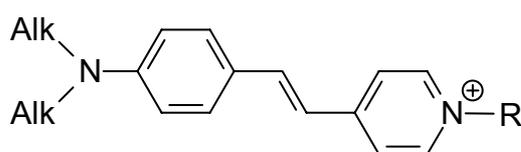


Abbildung 12: allgemeine Struktur der *N,N*-Dialkylaminostyrylpyridiniumfarbstoffe.

Als eine Farbstoffklasse mit hoher Membranaffinität bieten sich *N,N*-Dialkylaminostyrylpyridinium-Farbstoffe (Abbildung 12) an. *N,N*-Dialkylaminostyrylpyridiniumfarbstoffe lagern sich gut in Membranen ein. Die Membranaffinität nimmt mit wachsender Alkylkettenlänge zu und strebt ab Butylresten gegen einen Grenzwert [78]. Das Absorptionsmaximum typischer *N,N*-Dialkylaminostyrylpyridiniumfarbstoffe liegt im Bereich von 500 nm, das Fluoreszenzmaximum bei etwa 650 nm (Abbildung 13).

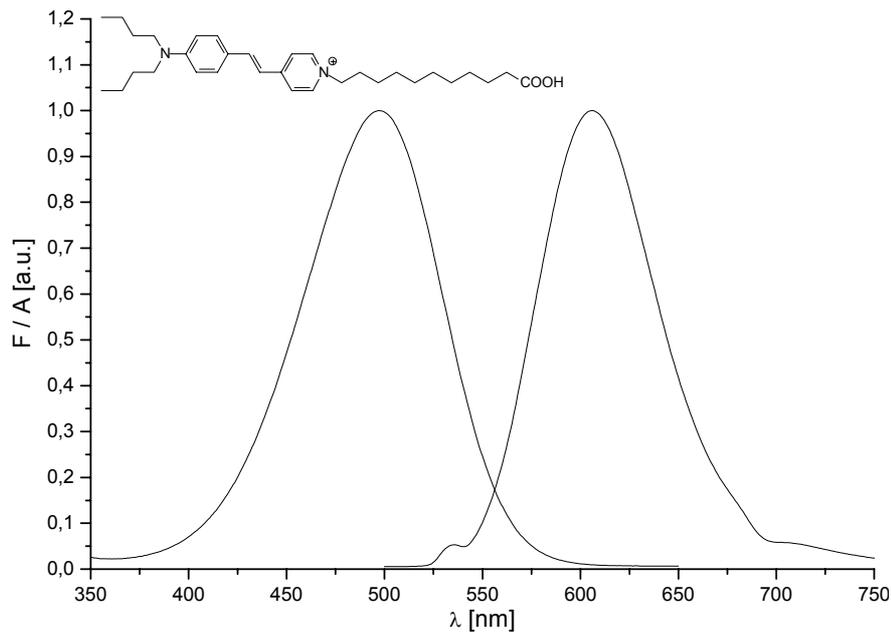


Abbildung 13: Absorption- und Fluoreszenzspektrum von Di-4-ASP-C₁₀COOH in Ethanol; $\lambda_{\text{max, Abs.}} = 497 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max, Flu.}} = 606 \text{ nm}$

Entsprechend der oben gestellten Forderung, daß das bichromophore System ein Fluoreszenzmaximum von unter 700 nm aufweisen sollte, muß der Styrylpyridinium-Chromophor die Funktion des Emitters erfüllen. Als Absorber kommen demnach nur möglichst einfach strukturierte Farbstoffe mit gutem Einlagerungsverhalten in Membranen in Frage, deren Fluoreszenzmaximum im Bereich von 500 nm liegt. Dieses Anforderungsprofil wird sehr gut von *N,N*-Dialkylaminophenylpyridiniumfarbstoffen (APP) erfüllt (Abbildung 14).

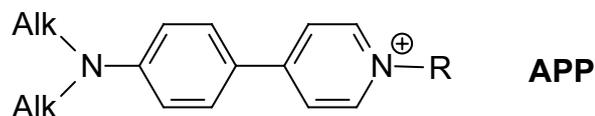


Abbildung 14: allgemeine Struktur von *N,N*-Dialkylaminophenylpyridiniumfarbstoffen (APP).

Diese Farbstoffe ähneln offensichtlich den Aminostyrylpyridiniumfarbstoffe strukturell und zeigen auch ein ähnliches Verhalten bezüglich ihrer Einlagerung in Membranen. Die Verkleinerung des π -Systems um eine Doppelbindung gegenüber den Aminostyrylpyridiniumfarbstoffen hat einen hypsochromen Shift des Absorptionsmaximums um rund 50 nm zur Folge. Aminophenylpyridinium-Farbstoffe absorbieren bei etwa 450 nm. Das Maximum der Fluoreszenz liegt im Bereich von 550 nm (Abbildung 15).

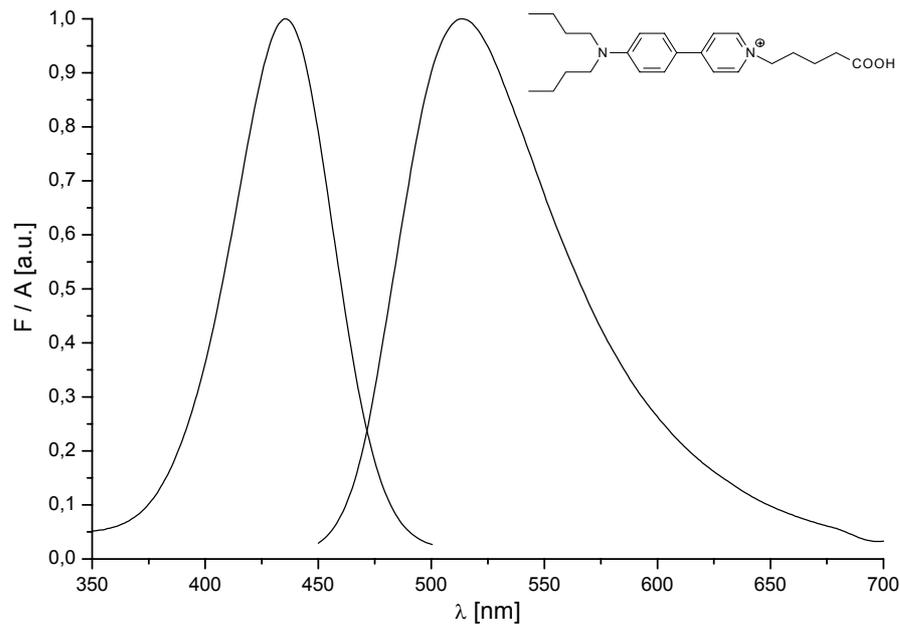


Abbildung 15: Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von Di-4-APP-C₄COOH in Ethanol
 $\lambda_{\text{max,Abs.}} = 435 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max,Flu.}} = 513 \text{ nm}$

Wie in Kapitel 2.2.1 auf Seite 21 beschrieben, nimmt man zur Erklärung der Potentialsensitivität beider Farbstofftypen einen zumindest partiellen elektrochromen Mechanismus an. Aber auch die Verschiebung der Farbstoffe in der Membran infolge der Potentialänderung und die damit verbundene Änderung der Umgebung der Moleküle bewirkt eine Änderung der Fluoreszenz.

Bei einer Verwendung beider Farbstoffe in einem Bichromophor ist somit – entsprechend der in Kapitel 2.2.2 gemachten Ausführungen – bei einer Verschiebung innerhalb der Membran auch eine Änderung des FRET und damit eine empfindliche Änderung des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit vom Membranpotential zu erwarten. Wie Abbildung 16 zeigt, hat die Absorptionsbande der ASP-Farbstoffe eine ausreichende Überlappung mit der Fluoreszenzbande der APP-Farbstoffe, um einen Förster-Transfer zu erwarten.

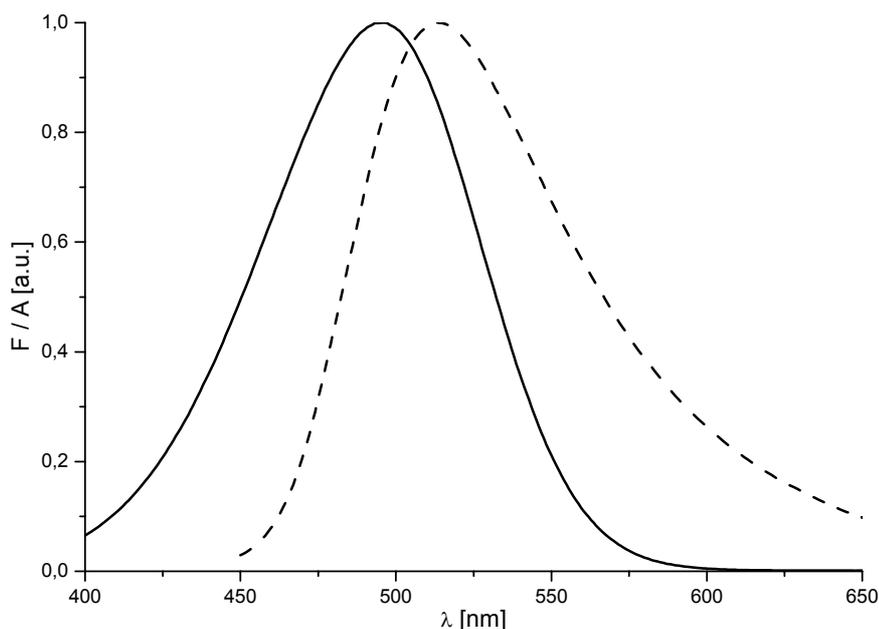


Abbildung 16: normiertes Fluoreszenzspektrum von Di-4-APP-C₄COOH ($\lambda_{\text{Ex}} = 435$ nm, $\lambda_{\text{max}} = 513$ nm, gestrichelte Linie) und Absorptionsspektrum von Di-4-ASP-C₄COOH ($\lambda_{\text{max}} = 495$ nm, durchgezogene Linie) in EtOH.

Durch die Kombination von Aminostyryl- und Aminophenylpyridinium-Farbstoffen in einem Bichromophor sollte also ein System mit hoher Membranaffinität und eindeutigen Einlagerungsverhalten zu erwarten sein, das einen FRET aufweisen kann. Wie bereits schon erfolgreich im Arbeitskreis durchgeführt, sollen die Farbstoffe unter Verwendung von 1,4-Phenylendiamin unter Bildung von Amidbindungen zum Bichromophor gekoppelt werden.

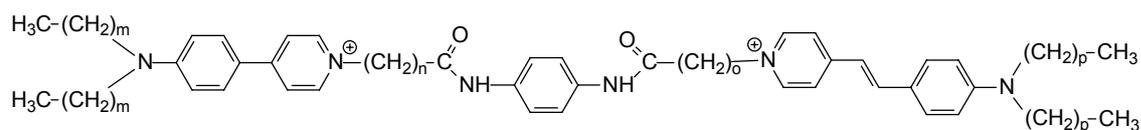


Abbildung 17: allgemeine Formel des angestrebten bichromophoren Systems (mit $m, p = 0 - 3$ und $n, o = 2, 4, 6$ und 10)

Dieser Typ Bichromophor soll bezüglich seiner Sensitivität auf Änderungen des Membranpotentials, sowie auf sein Einlagerungsverhalten eingehend untersucht werden. Dazu werden die Kettenlängen der N-Alkylketten, sowie der Alkyl-Spacer zwischen Pyridinium-Stickstoff und Amidgruppe variiert. Dies sollte einen Einfluß auf die Lipophilie des Bichromophors und damit auf sein Einlagerungsverhalten haben. Durch das eindeutige Verhalten in Membranen sollte es möglich sein den Einfluß des FRET auf die Sensitivität des Bichromophors zu untersuchen.

4 Synthesen

Die Synthese der bichromophoren Farbstoffe unterteilt sich in die Synthese der Styrylpyridiniumfarbstoffe (Kapitel 4.1) und der Aminophenylpyridiniumfarbstoffe (Kapitel 4.2) als Einzelchromophore, sowie der anschließenden Kopplung über 1,4-Phenylendiamin zum angestrebten Bichromophor (Kapitel 4.3).

Um in dieser Arbeit die Benennung der Farbstoffe zu erleichtern, wird folgende Systematik angewendet: Die Aminostyrylpyridinium (ASP) - und Aminophenylpyridinium (APP) -chromophore und die sich von diesen Verbindungen ableitenden Vor- und Zwischenprodukte, werden nach der Anzahl der C-Atome in ihren N-Alkylketten und Alkancarbonsäuren und ihrem Chromophortyp benannt, die nicht quarternierten Verbindungen nur nach der Länge der Alkylketten. In Abbildung 18 ist diese Systematik an Beispielen erläutert.

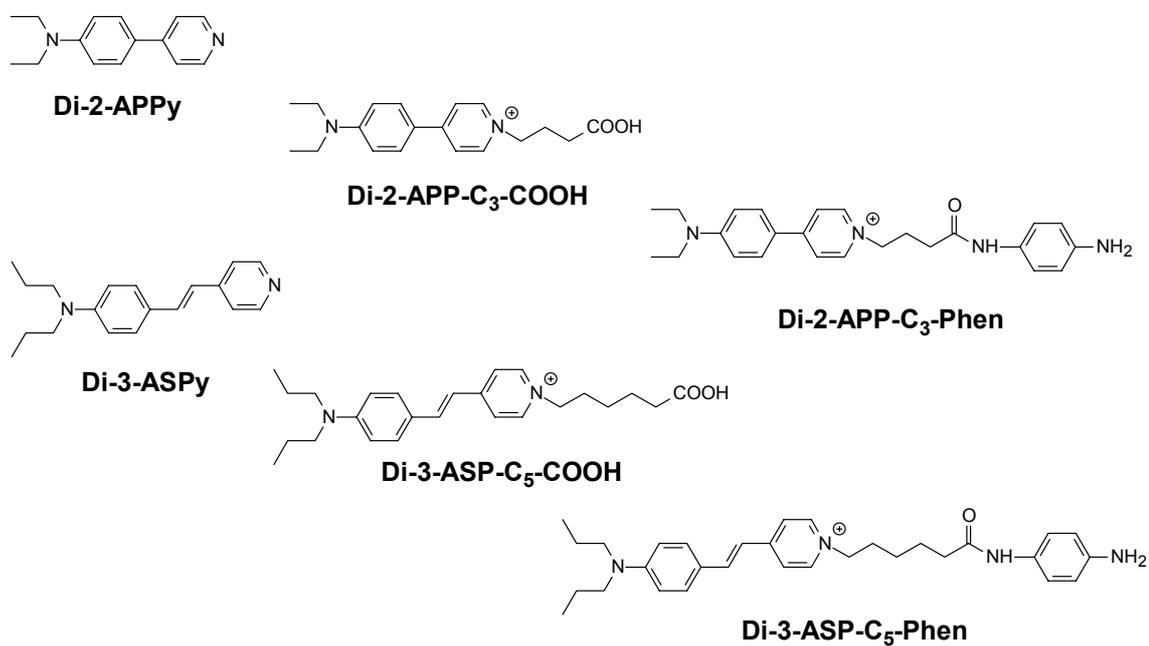
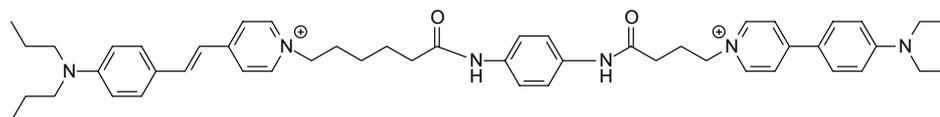


Abbildung 18: Benennung der Aminostyrylpyridinium- und Aminophenylpyridiniumfarbstoffe und der häufig verwendeten Zwischenstufen.

Die hier bearbeiteten Bichromophore setzen sich aus ASP- und APP-Chromophoren zusammen, die über 1,4-Phenylendiamin verbunden sind. Die Benennung erfolgt entsprechend der Zahl der C-Atome in den Alkylketten der Teilchromophore, beginnend mit dem ASP- und dann mit dem APP-Chromophor.



Bichromophor 3/5/3/2

Abbildung 19: Benennung der Bichromophore

Der aus den Einzelchromophoren aus Abbildung 18 synthetisierte Bichromophor (Abbildung 19) erhält somit die Bezeichnung Bichromophor 3/5/3/2.

4.1 Synthese der Styrylpyridiniumfarbstoffe

In der Literatur sind von Hassner et. al. zwei wichtige Routen zur Synthese von Styrylpyridiniumfarbstoffen beschrieben, die in Abbildung 20 zusammengefasst sind [79].

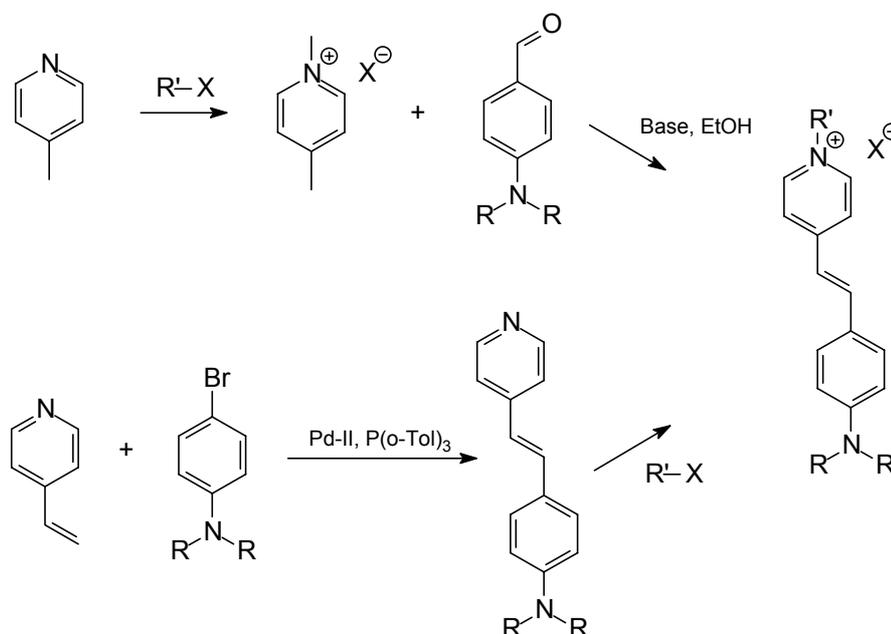


Abbildung 20: Allgemeines Syntheseprinzip für Styrylpyridiniumfarbstoffe via Knoevenagel- bzw. Heck-Route.

Auf dem Wege der Knoevenagel-Route wird zunächst das Picolin mit ω -Brom-carbonsäure quarterniert. Im Anschluß wird *N,N*-Dialkylamino-p-benzaldehyd in einer Knoevenagel-Reaktion zur Zielverbindung umgesetzt.

Beim Weg über die Heck-Reaktion wird zuerst 4-Vinylpyridin und *N,N*-Dialkyl-p-bromanilin zum *N,N*-Dialkylaminostyrylpyridin gekuppelt und erst im Anschluß die Zielverbindung durch Quarternierung mit ω -Brom-carbonsäure erhalten.

Beide Reaktionsführungen sind prinzipiell möglich und wurden auf ihre Anwendbarkeit untersucht.

4.1.1 Palladium-Kupplung nach Heck

Die Heck-Reaktion stellt eine Arylierung bzw. Vinylierung von Olefinen dar. Die E-Stereoselektivität ist durch den Mechanismus dieser Palladium-katalysierten C-C-Verknüpfungsreaktion bedingt, bei der ein vinylisches H-Atom durch eine Vinyl-, Benzyl- oder Arylgruppe ersetzt wird. Als Katalysator dient eine Pd^0 -Verbindung (PdL_2), die in situ aus $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, Triethylamin NEt_3 und Tri-*o*-Toluyolphosphin (L) erzeugt wird. Zum Mechanismus der Heck-Reaktion besteht folgende Vorstellung:

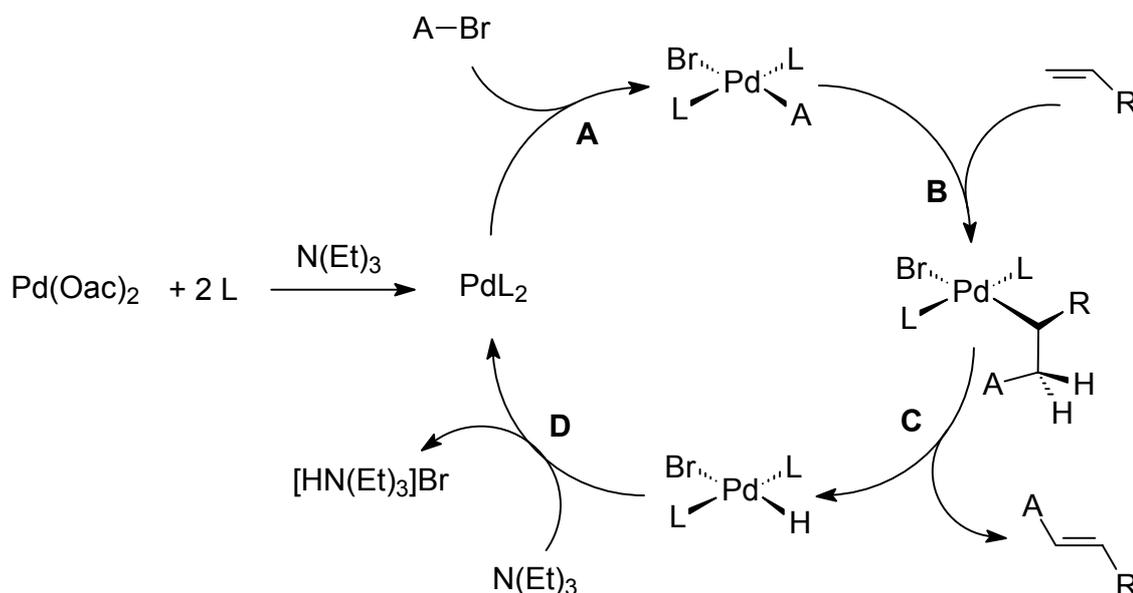


Abbildung 21: Schema des Katalysezyklus der Heck-Reaktion

Durch oxidative Addition des aromatischen Bromids A-Br an PdL_2 bildet sich zunächst der trans-konfigurierte Komplex A-PdL₂-Br (A). Damit dieser Komplex nicht unter β -Eliminierung zerfällt, darf A-Br keinen Wasserstoff am β -C-Atom tragen, muß also ein Aryl-, Benzyl- oder Vinylbromid (bzw. allgemein -halogenid) sein.

Nach Olefin-Insertion in die Pd-C-Bindung (B) (formal eine syn-Addition von Pd-C an das Olefin) erfolgt Eliminierung von H-Pd-L₂-Br unter Freisetzung des substituierten Olefins (C). Durch Reaktion mit Triethylamin, das hierdurch in stöchiometrischer Menge verbraucht wird, wird der Katalysator PdL_2 regeneriert und steht für einen neuen Reaktionszyklus zur Verfügung (D) [80]. Die Stereoselektivität zum trans-Produkt ergibt sich aus der Tatsache, daß H-Pd-Br in einer β -Eliminierung (C) entsteht, in der Pd und H in synperiplanarer Anordnung zueinander stehen [81].

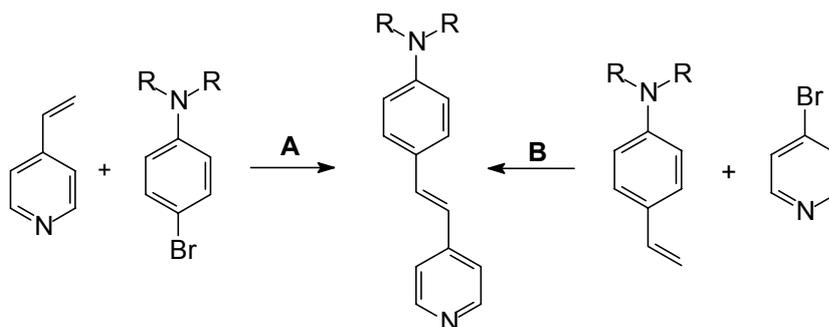


Abbildung 22: Mögliche Edukte für die Reaktionsführung über die Heck-Reaktion

Prinzipiell kann die Heck-Reaktion über die Umsetzung von 4-Vinylpyridin mit 4-Brom-phenyl-Dialkylamin (A in Abbildung 22) oder die Reaktion von Dialkyl-(4-vinylphenyl)-amin und 4-Brompyridin erfolgen (B in Abbildung 22). Da jedoch das Vinylamin in letzterer Variante leicht zu Polymerisation neigt und auch das 4-Brompyridin relativ instabil ist, wird der Variante unter Einsatz von 4-Vinylpyridin der Vorzug gegeben.

Die Heck-Reaktion liefert das neutrale Aminostyrylpyridin, das im Anschluß zum Aminostyrylpyridiniumfarbstoff quarterniert wird. Auf diese Weise ist durch Variation des Quarternierungsreagenz leicht eine Vielzahl von Derivaten eines einheitlichen Grundkörpers zugänglich. Darüber hinaus bietet dies den Vorteil, daß immer Vinylpyridin eingesetzt werden kann und nicht wie bei der Knoevenagel-Route verschiedene Picoliniumderivate zuvor synthetisiert werden müssen.

Die möglichen Reaktionswege zeigen jedoch im Vergleich mit der Knoevenagel-Route deutlich niedrigere Gesamtausbeuten. Dies, die einfachere Reaktionsführung und die vergleichsweise preiswerteren Edukte führten dazu, daß die Aminostyrylpyridiniumfarbstoffe auf dem Wege der Knoevenagel-Route synthetisiert wurden.

4.1.2 Knoevenagel-Route

Bei der Knoevenagel-Route erfolgt die Umsetzung eines quarternierten γ -Picoliniumderivats mit einer Benzaldehydkomponente. Die Quarternierung des γ -Picolin steigert die CH-Acidität der Methylgruppe erheblich und erlaubt unter Einwirkung von Basen den Methylketonen vergleichbare Reaktionen. Das erzeugte Anion kann seine Ladung über das elektronenarme aromatische System delokalisieren. Die Carbonylgruppe der Aldehydkomponente wird elektrophil angegriffen und nach Wasserabspaltung bildet sich die E-Doppelbindung aus.

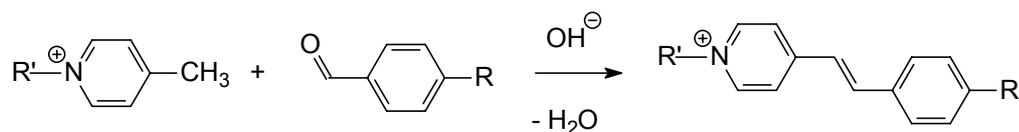


Abbildung 23: allgemeine Darstellung des Syntheseverlaufs zur Darstellung von Styrylpyridiniumfarbstoffen über die Knoevenagel-Route.

Die *N,N*-Dialkylaminobenzaldehyde werden aus durch Formylierung von *N,N*-Dialkyl-anilinen nach Vielsmeier erhalten, welche wiederum aus der *N*-Alkylierung von Anilin mit Bromalkanen zugänglich sind. γ -Picolin kann mit ω -Bromcarbonsäuren in Aceton leicht quarterniert werden. Die Gesamtsynthese der *N,N*-Dialkylaminostyrylpyridiniumfarbstoffe ist in Abbildung 24 zusammengefaßt.

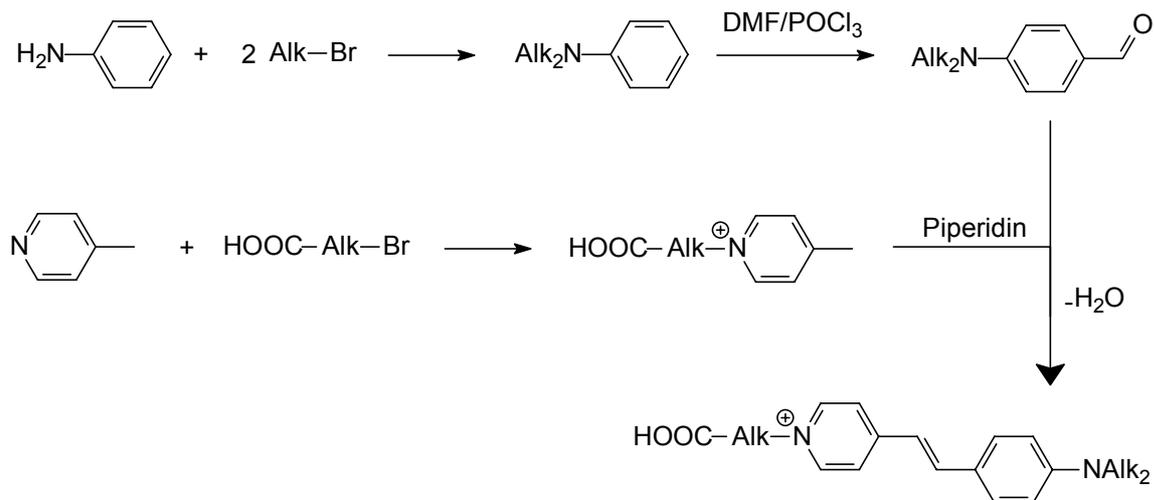


Abbildung 24: Gesamtschema der Synthese der Aminostyrylpyridiniumfarbstoffe

4.1.2.1 Synthese der *N,N*-Dialkylaniline

Die Verbindungen *N,N*-Dipropylanilin und *N,N*-Dibutylpropylanilin werden durch nukleophile Substitution von Anilin mit 1-Iodpropan und 1-Iodbutan in Dimethylformamid mit Kaliumcarbonat als Base hergestellt. Die alkylierten Aniline liegen nach destillativer Reinigung in Ausbeuten von 50 – 70% vor [79].

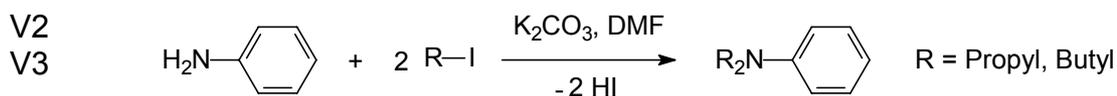


Abbildung 25: Alkylierung von Anilin

Beispielhaft ist hier das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum von *N,N*-Dibutylanilin angegeben:

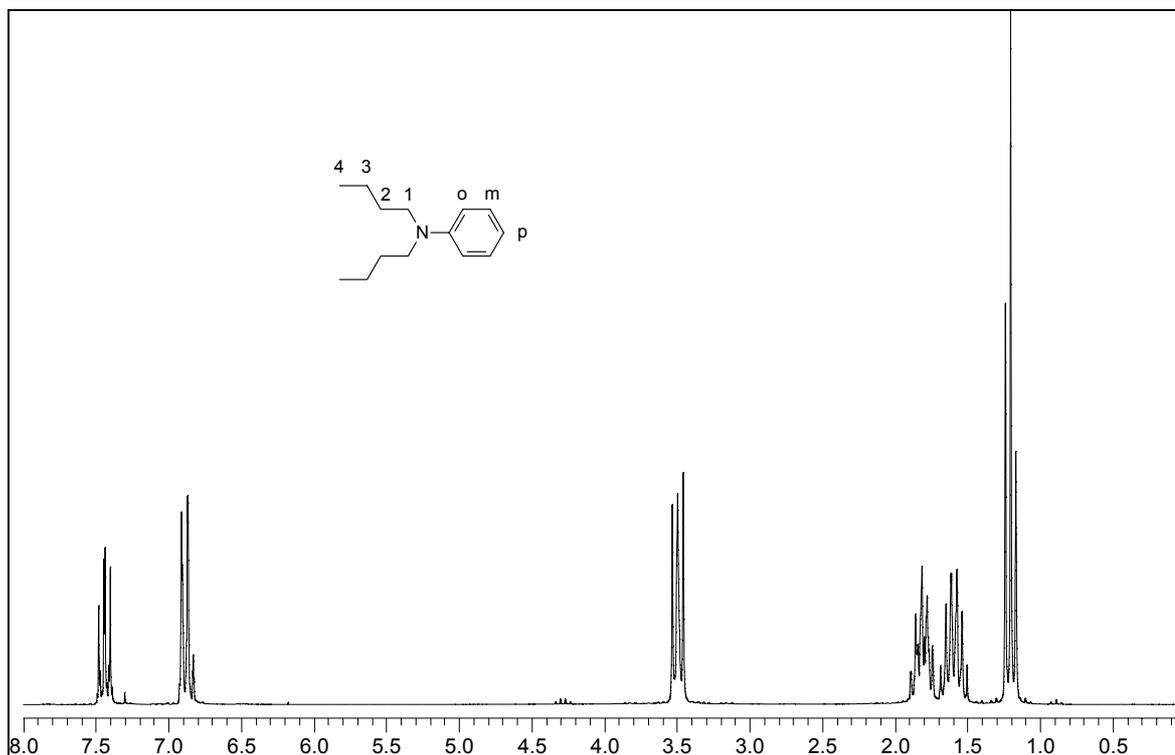


Abbildung 26: $^1\text{H-NMR}_{200}$ -Spektrum von *N,N*-Dibutylanilin in CDCl_3/TMS .

Zuordnung	δ [ppm], Mult., J [Hz], Int.	Zuordnung	δ [ppm], Mult., J [Hz], Int.
4-H	0.95, t, 7.4, 6H	1-H	3.25, t, 7.7, 4H
3-H	1.31-1.38, m, 4H	o-, p-H	6.59-6.64, m, 3H
2-H	1.53-1.59, m, 4H	m-H	7.17-7.21, m, 2H

Tabelle 1: Zuordnung der $^1\text{H-NMR}_{200}$ -Daten von *N,N*-Dibutylanilin in CDCl_3/TMS .

4.1.2.2 Synthese der *N,N*-Di-Alkyl-Aminobenzaldehyde

p-N,N-Di-propylaminobenzaldehyd und *p-N,N*-Di-butylaminobenzaldehyd werden aus der Formylierung der entsprechenden *N,N*-Dialkylaniline nach Vielsmeyer erhalten. Dazu läßt man unter Eiskühlung Phosphorylchlorid in Dimethylformamid auf die *N,N*-Dialkylaniline einwirken.

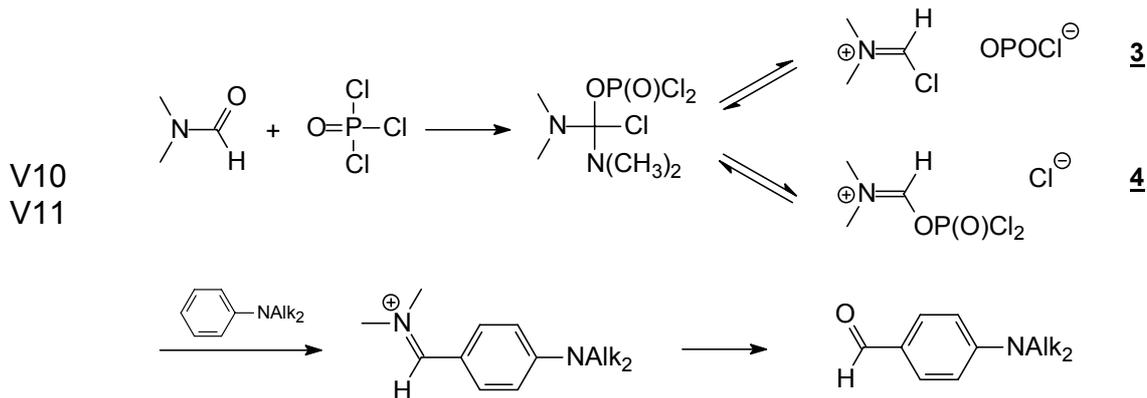


Abbildung 27: Formylierung nach Vielsmeyer

Im ersten Reaktionsschritt reagiert Phosphorylchlorid und Dimethylformamid zu den im Gleichgewicht stehenden Iminiumsalzen **3** und **4** (Abbildung 27). Diese Elektrophile reagieren in einer Substitutionsreaktion mit dem elektronenreichen *N,N*-Dialkylanilin zu einem weiteren Iminiumsalz, das leicht zu dem formylierten Aromaten hydrolysiert werden kann. Nach destillativer Reinigung erhält man die gewünschten Benzaldehyde in ca. 75%iger Ausbeute [82].

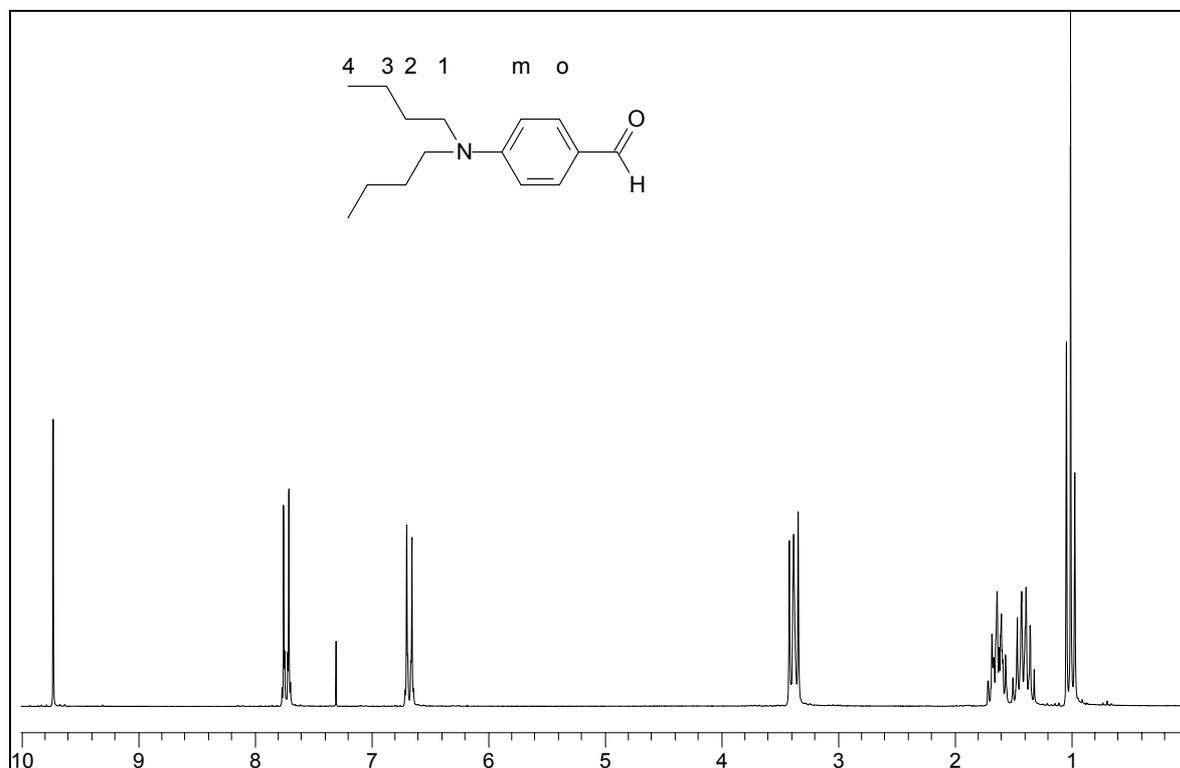


Abbildung 28: $^1\text{H-NMR}_{200}$ -Spektrum von *N,N*-Dibutyl-aminobenzaldehyd in CDCl_3/TMS .

Zuordnung	δ [ppm], Mult., J [Hz], Int.	Zuordnung	δ [ppm], Mult., J [Hz], Int.
4-H	1.00, t, 7,15, 6H	o-H	7.73, m, 2H
3-H	1.40, m, 4H	p-H	6.67, m, 2H
2-H	1.63, m, 4H	CO-H	9.72, s, 1H
1-H	3.38, t, 7.65, 4H		

Tabelle 2: Zuordnung der $^1\text{H-NMR}_{200}$ -Daten von *N,N*-Dibutyl-aminobenzaldehyd in CDCl_3/TMS .

Als Beispiel ist in Abbildung 28 das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von *N,N*-Dibutyl-aminobenzaldehyd angegeben. Die gelungene Einführung der Aldehydgruppe ist anhand der Resonanz des Aldehydprotons Protons bei 9.7 ppm und des charakteristischen Signalmusters der verbliebenen aromatischen Protonen zwischen 6.5 und 8 ppm zu erkennen.

4.1.2.3 Synthese der 7-Bromheptansäure

Die käuflich nicht zugängliche 7-Bromheptansäure läßt sich nach einer Vorschrift von Salmon-Legagneur und Neveu [83] in 60%iger Ausbeute darstellen. Der aus Natriumethanolat und Diethylmalonat leicht zugängliche Natriummalonsäurediethylester reagiert in einer nukleophilen Substitution mit 1,5-Dibrompentan. Durch die sich anschließende säurekatalysierte Esterhydrolyse wird die 1,3-Dicarbonsäure freigesetzt, die durch mildes Erhitzen unter CO_2 -Verlust in die 7-Bromheptansäure übergeht und destillativ abgetrennt werden kann.

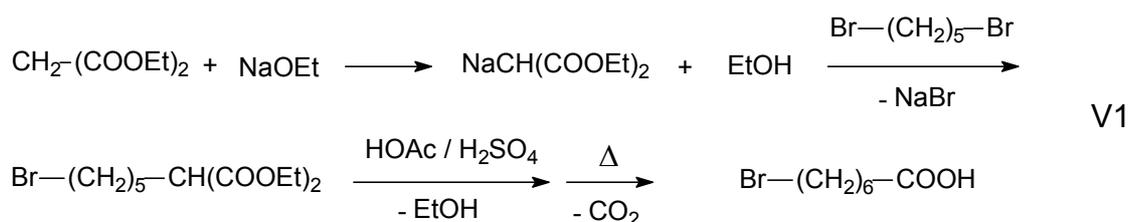


Abbildung 29: Synthese von 7-Bromheptansäure

Die 7-Bromheptansäure fällt wachsartig an und wird ohne weitere Aufreinigung mit γ -Picolin umgesetzt, da die Reinigung des dabei entstehenden Produktes durch Umkristallisieren wesentlich einfacher ist.

4.1.2.4 Synthese der quarternierten Picoliniumderivate

Die Quarternierung zur Darstellung der Picoliniumderivate gelingt leicht nach einer von Hassner et. al. [79] publizierten Vorschrift in Ausbeuten von 75-85%. Dabei addiert sich die entsprechende Bromalkansäure an das γ -Picolin indem 3 h unter Rückfluß in absolutem Aceton erhitzt wird. Der ausfallende farblose Feststoff wird mit Diethylether gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

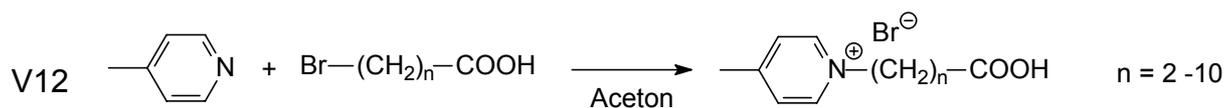


Abbildung 30: Quarternierung von γ -Picolin mit ω -Bromcarbonsäuren

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum für 1-(10-Carboxy-decyl)-4-methyl-pyridiniumbromid ($n=10$) ist exemplarisch für diese Verbindungsklasse in Abbildung 31 zu sehen. Im Bereich von 12 ppm tritt eine breite Bande auf, die dem Säureproton zuzuordnen ist und damit die Existenz eines Betains ausschließt.

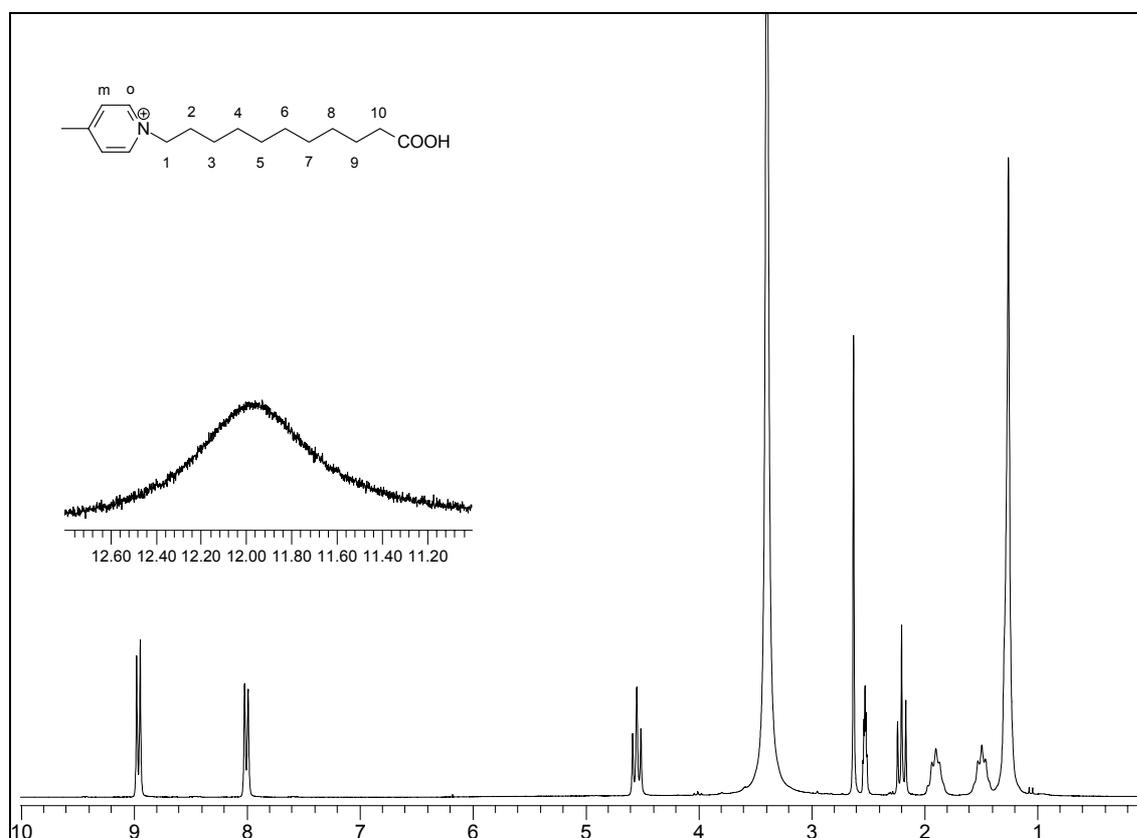


Abbildung 31: $^1\text{H-NMR}_{200}$ von 1-(10-Carboxydecyl)-4-methyl-pyridiniumbromid in DMSO_{d6} .

Zuordnung	δ [ppm], Mult., J [Hz], Int.	Zuordnung	δ [ppm], Mult., J [Hz], Int.
3-H – 8-H	1.25, m, 12 H	CH ₃	2.62, s, 3H
9-H	1.49, m, 2H	1-H	4.54, t, 7.28, 2H
2-H	1.90, m, 2H	m-H	8.00, d, 6.27, 2H
10-H	2.20, t, 7.23, 4H	o-H	8.96, d, 6.78, 2H

Tabelle 3: Zuordnung der ¹H-NMR₂₀₀-Daten von 1-(10-Carboxydecyl)-4-methyl-pyridiniumbromid in DMSO_{d6}.

Das IR-Spektrum (1-(10-Carboxydecyl)-4-methyl-pyridiniumbromid als Beispiel in Abbildung 32) zeigt nicht nur bei 3430 cm⁻¹ die gewünschte OH-Valenz, sondern darüber hinaus ebenfalls die C=O-Valenz bei 1700 cm⁻¹, die bei dem Vorliegen einer Betainstruktur nicht zu beobachten wären. Das Vorhandensein der freien Säure sollte somit gesichert sein.

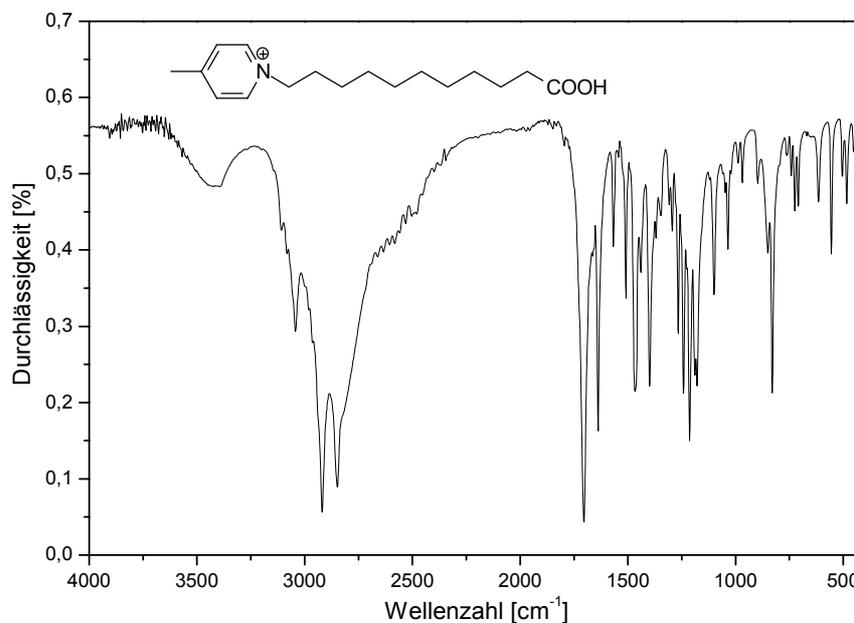


Abbildung 32: IR-Spektrum von 1-(10-Carboxydecyl)-4-picoliniumbromid

Wellenzahl [cm ⁻¹]		Wellenzahl [cm ⁻¹]	
3430	O-H-Carboxyl	1700	C=O Carboxyl
3040	C-H aromatisch	1640	C=C Pyridin
2920, 2850	C-H aliphatisch	830	C=C 1,4-disubst. Aromat

Tabelle 4: Zuordnung der Signale des IR-Spektrums von 1-(10-Carboxydecyl)-4-picoliniumbromid

4.1.2.5 Synthese der Aminostyrylpyridiniumfarbstoffe

Zur Gewinnung der Aminostyrylpyridiniumcarbonsäurebromide führt man die Knoevenagel-Kondensation in Methanol durch. Als Base nimmt man einen 25fachen Überschuß an Piperidin. Das Produkt läßt sich leicht und in ausreichender Reinheit für weitere Umsetzungen isolieren, da nach Entfernen des Großteils Methanol und Versetzen mit Wasser unter Zugabe von Bromwasserstoffsäure (48%) in kleinen Portionen der Farbstoff kristallin ausgefällt wird. Hierdurch wird sichergestellt, daß der Farbstoff analysenrein als Hydrobromid und nicht als Betain vorliegt.

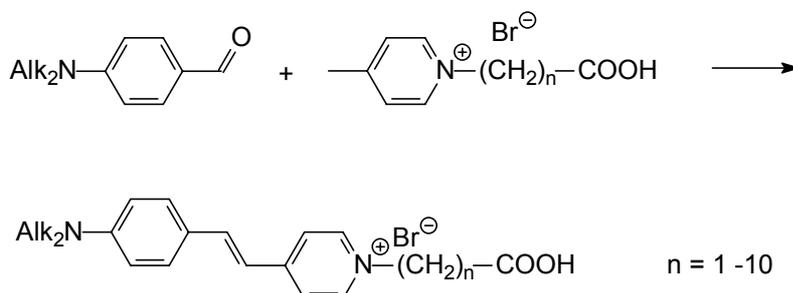


Abbildung 33: Synthese der Styrylpyridiniumfarbstoffe

Wird der Kristallbrei zu sauer, geht der Farbstoff unter Bildung des gelben Hydrobromids wieder in Lösung, und man muß gegebenenfalls mit konzentrierter K_2CO_3 -Lösung versetzen, um den deprotonierten Farbstoff wieder möglichst quantitativ auszufällen. Weitere Reinigung erfolgt durch Umkristallisieren aus Ethanol / Diethylether.

Im 1H -NMR-Spektrum in $DMSO-[d_6]$ kann man bei gut getrockneten Verbindungen das Carboxylproton bei ca. 10 ppm sehen. Abbildung 34 zeigt als Beispiel das 1H -NMR-Spektrum von Di-4-ASP- C_4COOH . Im aromatischen Teil von 6.5 bis 9 ppm finden sich sechs Dubletts, von denen vier den o, o'- und den m, m'-Protonen an den aromatischen Ringen zuzuordnen sind. Die anderen beiden bei $\delta = 7.1$ und 7.8 ppm gehören zu den Vinylprotonen und haben eine Kopplungskonstante von $^3J_{H,H} = 16$ Hz, was E-Konfiguration beweist. Z-konfiguriertes Produkt ist offensichtlich nicht entstanden. Bei $\delta = 4.5$ ppm findet sich das Triplet der α -Methylengruppe am Pyridiniumstickstoff.

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

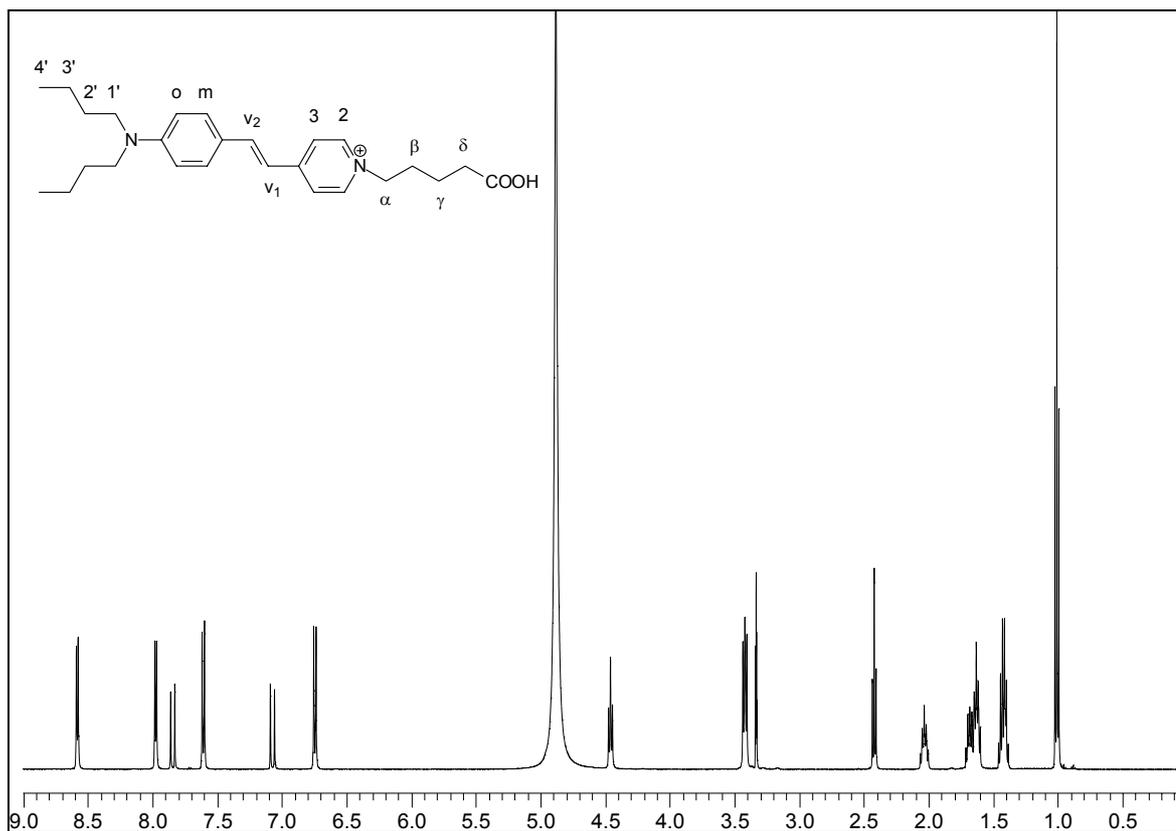


Abbildung 34: $^1\text{H-NMR}_{500}$ von Di-4-ASP- C_4COOH in Methanol_{d4} .

Zuordnung	δ [ppm], Mult., J [Hz], Int.	Zuordnung	δ [ppm], Mult., J [Hz], Int.
4'-H	1.00, t, 7.4, 6 H	α -H	4.46, t, 7.3, 2H
3'-H	1.42, m, 2H	m-H	6.74, d, 9.1, 2H
2'-H	1.63, m, 4H	v_2 -H	7.07, d, 15.8, 2H
γ -H	1.68, m, 2H	o-H	7.61, d, 9.1, 2H
β -H	2.03, m, 2H	v_1 -H	7.84, d, 16.0, 2H
δ -H	2.42, t, 7.3, 2H	3-H	7.97, d, 6.9, 2H
1'-H	3.42, t, 7.7, 4H	2-H	8.58, d, 6.9, 2H

Tabelle 5: Zuordnung der $^1\text{H-NMR}_{500}$ -Daten von Di-4-ASP- C_4COOH in Methanol_{d4} .

Die Aminostyrylpyridiniumfarbstoffe zeigen im UV-Spektrum in Ethanol eine maximale Absorption im Bereich von etwa 490 nm mit einem Extinktionskoeffizienten im Bereich von $50000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Beispiel Di-4-ASP- C_{10}COOH in Abbildung 35). Eine zunehmende Länge der N-Alkylketten wirkt sich dabei in einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums aus. So absorbieren die ASP-Farbstoffe mit Methyl-Substituenten in Ethanol bei rund 480 nm, diejenigen mit Butyl-Substituenten bei etwa 495 nm. Eine Änderung der Alkylkettenlänge am Pyridin-Stickstoff zeigt dagegen keinen Effekt auf das Absorptionsmaximum.

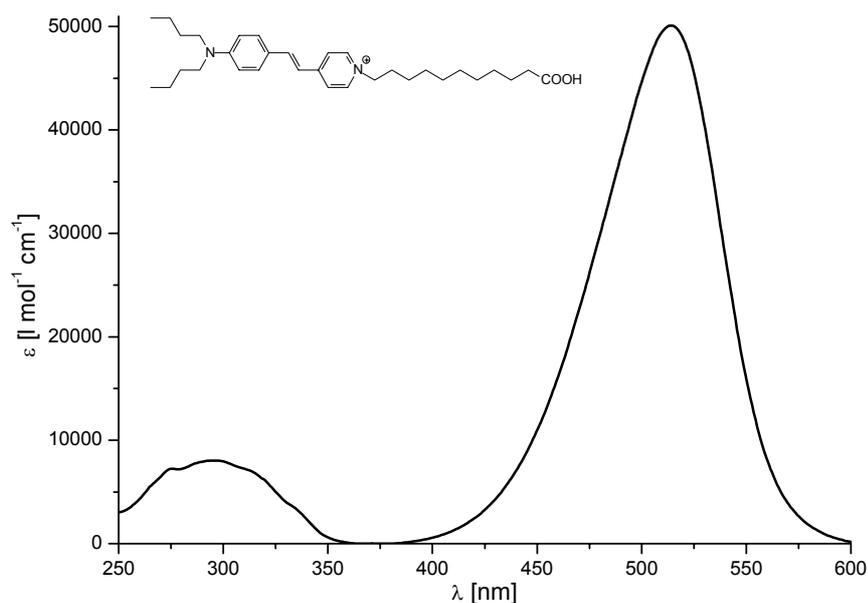


Abbildung 35: UV-Spektrum von Di-4-ASP-C₁₀COOH in Ethanol ($\lambda_{\text{max}} = 497 \text{ nm}$, $\epsilon_{\text{max}} = 50000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Die Infrarot-Spektren der ASP-Farbstoffe ähneln sich sehr stark. Beispielhaft sei hier das Spektrum von Di-4-ASP-C₄COOH in Abbildung 36 gezeigt. Wichtig im Bezug auf den Syntheseweg ist vor allem das Auftreten der charakteristischen Schwingung der in Konjugation mit den aromatischen Ringen stehen Doppelbindung bei etwa 1625 cm^{-1} . Diese Bande von mittlerer Intensität belegt im IR-Spektrum die Bildung des gewünschten Produktes unter Ausbildung einer C-C-Doppelbindung.

Wie für alle Salze bzw. schwer verdampfaren Substanzen kommt als massenspektrometrische Ionisationsmethode für die Styrylpyridiniumfarbstoffe bevorzugt das Fast-Atom Bombardement (FAB) in Frage. Da hierzu die Probe in eine Matrix (üblicherweise Glycerin oder 3-Nitrobenzylalkohol) eingebettet werden muß, ist eine Zuordnung der Fragmentierung aufgrund der Überlagerung mit dem Matrixspektrum problematisch.

Aus diesem Grund wird aus dem FAB-Spektrum nur der Molekülpeak als Beleg für die gelungene Synthese des gewünschten Produktes herangezogen (siehe Experimententeil).

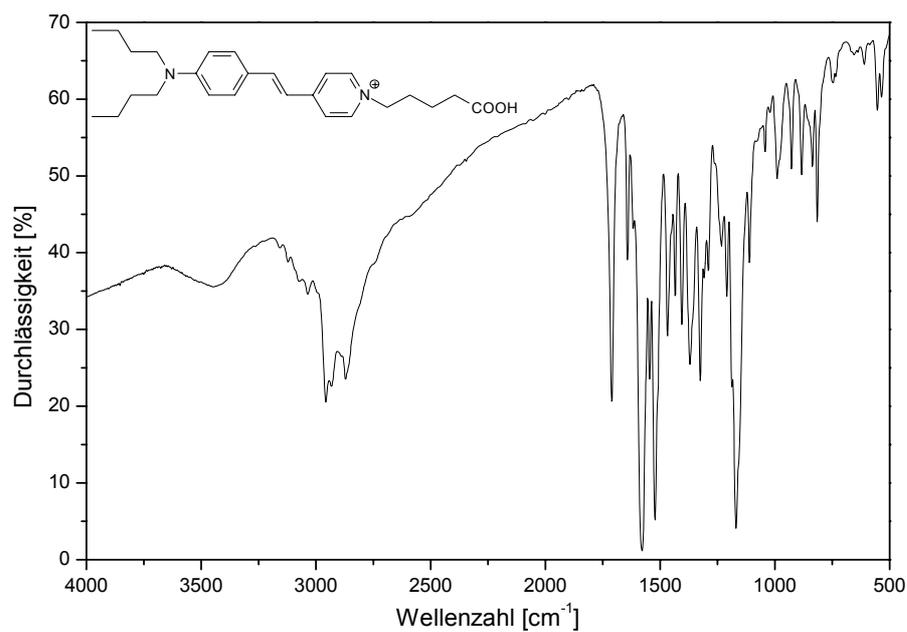


Abbildung 36: IR-Spektrum von Di-4-ASP-C₄COOH (KBr-Pressling)

Wellenzahl [cm ⁻¹]		Wellenzahl [cm ⁻¹]	
3400	O-H-Carboxyl	1578 / 1522	C=C aromat.
3000 – 2750	C-H aliphat.	1325	CH ₃ sym. Def.
1710	C=O Carboxyl	1169	C-C _{v1/v2}
1642	C=C olefin.	815	C=C 1,4 disubst.
			Aromat

Tabelle 6: Zuordnung der Schwingungen im IR-Spektrum von Di-4-ASP-C₄COOH (KBr-Pressling)

4.2 Synthese der Aminophenylpyridiniumfarbstoffe

Obwohl die Synthese von Aryl- und Heteroarylpyridinen bereits auf vielfältigen Wegen gelungen ist, hat die direkte Arylierung des Pyridinkerns, aufgrund der begrenzten Anwendbarkeit der Arylgruppe und einer geringen Regioselektivität, nur geringe Anwendung gefunden [84]. Brauchbare Methoden sind mit der regioselektiven nukleophilen Addition von Aryl-Grignard-Reagentien oder Aryl-Cupraten an die 2- oder 4-Position des Pyridins [85,86,87,88] oder der übergangsmetallkatalysierten Kreuzkupplung zwischen Halogenpyridinen und Metall-Arylen (Mg, Zn) [89,90,91,92] gefunden worden. Einem ähnlichen Konzept folgend, wurde von M. Terashima et. al. eine der Suzuki-Kupplung verwandte Reaktion veröffentlicht, die unter der Verwendung von Diethyl-(4-Pyridyl)-Boranen den direkten Zugang zu 4-Aryl- und 4-Heteroaryl-Pyridinen ermöglicht [93].

Durch Umsetzung von *N,N*-Dialkylanilinen mit Pyridinen in Anwesenheit von Cyanurchlorid und AlCl_3 gelang G.I. Migachev und B.I. Stepanov in einfacher Weise die Synthese von 4-[*p*-(Dialkylamino)-phenyl]-pyridinen [94].

Alle drei Möglichkeiten – die Nutzung der Grignard-Reaktion (Kapitel 4.2.1), die Kreuzkupplung (Kapitel 4.2.2) und die Umsetzung in Anwesenheit von Cyanurchlorid (Kapitel 4.2.3) – wurden im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Anwendbarkeit überprüft.

Da die Charakterisierung der Aminophenylpyridine aus den verschiedenen Synthesewegen identisch ist, wurde diese im Kapitel 4.2.5 im Anschluß an die Beschreibung der Synthesen zusammengefaßt.

4.2.1 Synthese über Grignard-Reagentien

Die Synthese des 4-(*N,N*-Dialkylaminophenyl)-Pyridins erfolgt über Grignard-Reagentien als Zwischenstufen nach einer Vorschrift von R.C. Fusion und J.J. Miller [95]. Dabei erzeugt man durch Umsetzung von *N,N*-Dialkyl-*p*-bromanilin mit Magnesium das Grignard-Reagenz, das im Anschluß mit Pyridin zu der Dihydroverbindung reagiert. Eine Dehydrierung mittels Chloranil liefert das gewünschte *N,N*-Dialkylaminophenylpyridin (Abbildung 37).

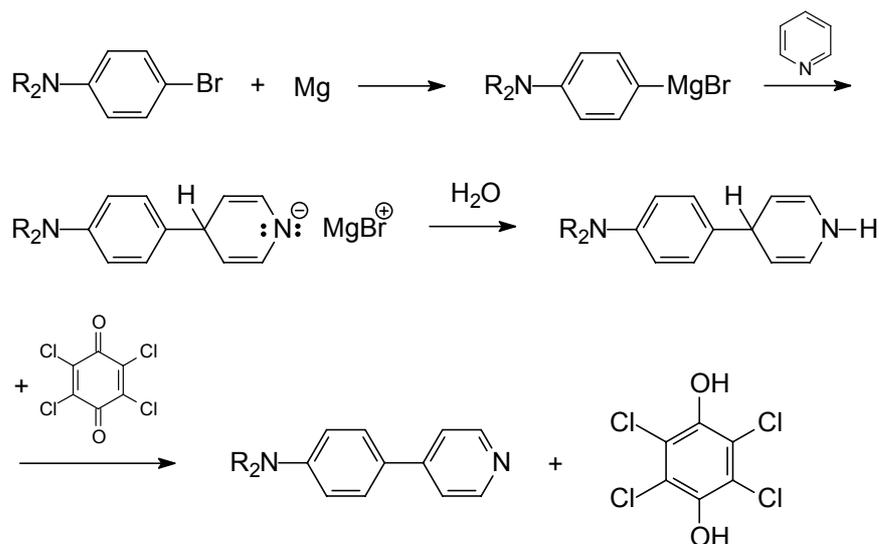


Abbildung 37: Synthese des APP-Grundkörpers über die Grignard-Route

Allgemein sind nukleophile Angriffe am Pyridin in den Positionen 2 und 6 begünstigt, da die negative Ladung des Adduktes zusätzlich mesomer auf den Ring-Stickstoff delokalisiert werden kann. Eine Addition in Position 4 des Pyridinrings geschieht nur unter energischeren Bedingungen und konkurriert immer mit der Addition in Position 2 und 6. In der Synthese fallen die Dihydroverbindung als dunkle Öle an. Kristallisationsversuche gelangen nur unter starken Ausbeuteverlusten und in unbefriedigender Reinheit. Auch eine säulenchromatographische Reinigung hat vor allem eine Zersetzung des Produktes zur Folge. Aus diesem Grund werden die Rohprodukte mit Chloranil dehydriert. Auch hier fallen dunkle Öle als Rohprodukte an, die aber über eine Säule mit Ethylacetat / Hexan als Laufmittelgemisch aufgetrennt werden können. Die Produkte kristallisieren anschließend zu blaßgelben Kristallen. Die Ausbeuten liegen zwischen 25 und 30 %.

4.2.2 Synthese über Diethyl-(4-pyridinyl)-boran

Das Gesamtschema der Darstellung von Aminophenylpyridinen auf dem Wege der Umsetzung von Diethyl-(4-pyridinyl)-boranen mit *N,N*-Dialkyl-(*p*-bromanilinen) ist in Abbildung 38 dargestellt. Zentraler Schritt ist dabei die Palladium-katalysierte Kreuzkupplung von 4-Diethylboranyl-pyridin mit *N,N*-Dialkyl-*p*-bromanilin zu *N,N*-Dialkylaminophenylpyridinen. 4-Diethylboranyl-pyridin ist zugänglich aus der Umsetzung von

4-Lithio-pyridin mit Diethylmethoxyboran [96]. Ersteres ist leicht durch einen Metall-Halogen-Austausch von 4-Brom-Pyridin mit Butyllithium zu erhalten [97]. Letzteres kann nach Köster et. al. in einer mit Diethylborylpivalat katalysierten Reaktion von Triethylboran mit Methanol synthetisiert werden [98].

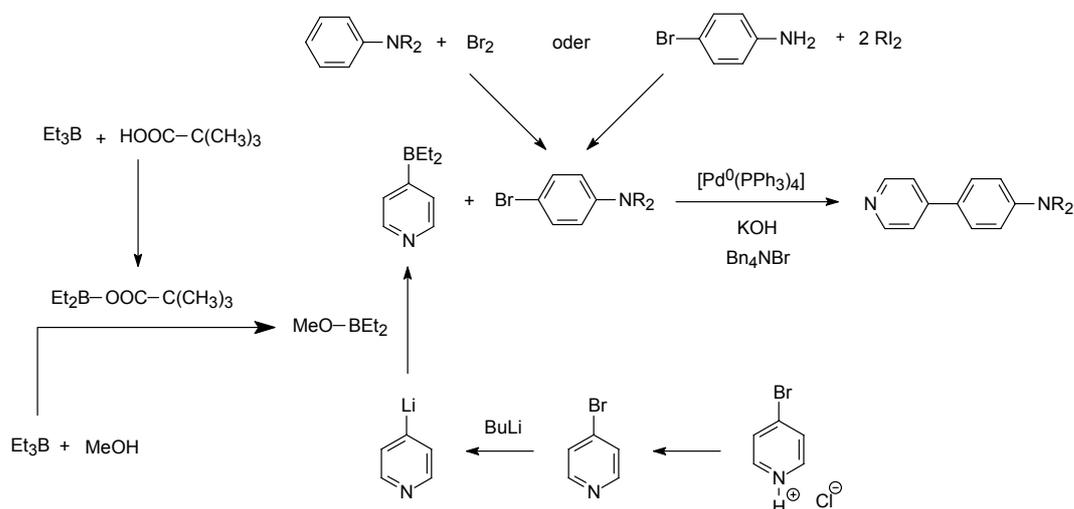


Abbildung 38: Gesamtschema der Synthese von Aminophenylpyridinen in einer Kreuzkupplung.

4.2.2.1 Synthese von Diethylmethoxyboran

Die Umsetzung von Trialkylboranen mit Alkoholen führt erst ab Temperaturen oberhalb von 120 °C zu den gewünschten Dialkylalkoxyboranen bzw. Alkanen [99]. Dabei kann es infolge von Dehydroborierungen zu Alken- und Wasserstoffabspaltungen oder Ligandenaustausch am Bor kommen [100,101,102] oder Isomerisierungen der Alkylreste eintreten [103,104]. Funktionelle Gruppen können dabei durch die intermediär auftretende B-H-Gruppierung reduziert werden. Zudem ist es bei erhöhten Temperaturen auch oft nicht möglich nur eine B-C-Bindung der Trialkylborane selektiv zu spalten.

Unter Verwendung von Pivalinsäure oder Diethylborylpivalat als Katalysator wird die für die Reaktion notwendige Temperatur derart herabgesetzt, daß die genannten Neben- und Folgereaktionen vermieden werden.

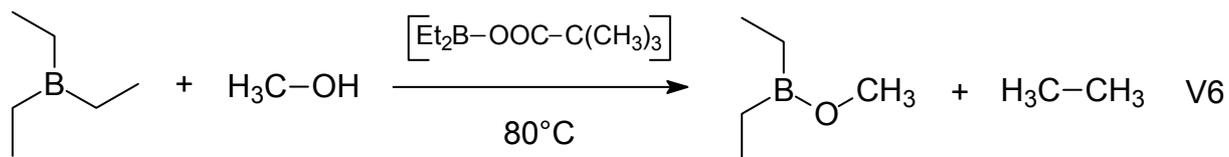


Abbildung 39: Synthese von Diethylmethoxyboran

Als Mechanismus für die katalysierte Umsetzung wird eine Zwischenstoffkatalyse angenommen [105], die entsprechend der in Abbildung 40 dargestellten Weise als Zwei-stufenzyklus formuliert werden kann.

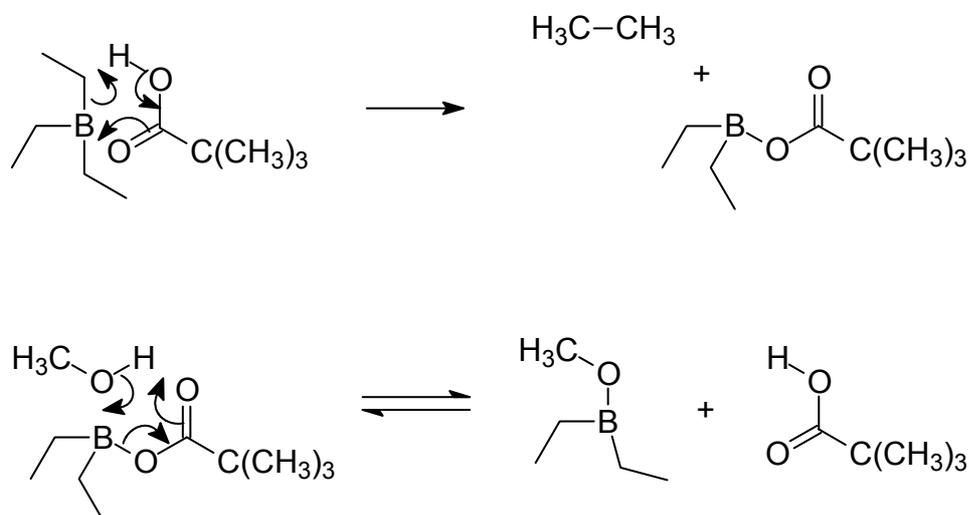


Abbildung 40: Mechanismus der Dialkylborylierung von Pivalinsäure und Wirkung des Diethylborylpivalat als Katalysator der der Dialkylborylierung von Methanol.

Wird Pivalinsäure als Katalysator eingesetzt, so erfolgt zunächst wie in Abbildung 40 dargestellt, die Bildung von Diethylborylpivalat aus Pivalinsäure und Triethylboran, das dann mit Methanol zum gewünschten Diethylmethoxyboran weiterreagiert und dabei wieder Pivalinsäure freisetzt. Bei beiden Reaktionen wird höchst wahrscheinlich die besonders günstige Sechsringanordnung durchlaufen. Beide Reaktionsschritte können isoliert nachvollzogen werden. So reagiert Triethylboran mit Pivalinsäure schon bei 0°C schnell zu Diethylborylpivalat.

Noch bessere Ergebnisse können jedoch erzielt werden, wenn der Zwischenstoff Diethylborylpivalat direkt zugesetzt wird. Die Umsetzung von Triethylboran mit Pivalin-

säure erfolgt schon bei 0 °C schnell zum Diethylborylpivalat, das im Gegensatz zu nahezu allen anderen Diethylborylestern der aliphatischen Carbonsäuren bei Raumtemperatur flüssig und daher gut handhabbar ist.

4.2.2.2 Synthese von 4-Diethylboranyl-pyridin

Die Synthese von 4-Diethylboranyl-pyridin erfolgt aus der Umsetzung von 4-Lithio-pyridin mit 4-Diethylmethoxyboran. Das 4-Lithiopyridin wird dabei in situ aus 4-Brompyridin und Butyllithium erzeugt.

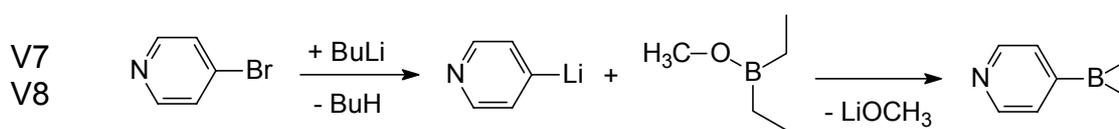


Abbildung 41: Synthese von 4-Diethylboranyl-pyridin

Aus dem Arylbromid und dem n-Butyllithium entsteht zunächst ein Lithiumsalz. Sein Anionenteil enthält ein zweibindiges, negativ geladenes Br-Atom mit zehn Valenzelektronen. Diese Spezies wird als Bromat-Ion bezeichnet. Das Lithiumsalz nennt man entsprechend „-at-Komplex“. Dieser -at-Komplex zerfällt durch den elektrophilen Angriff des Lithium-Ions an eine der C-Br-Bindungen (Abbildung 42). Der Angriff auf die Br-n-Butyl-Bindung bedeutet die Rückreaktion, ein Angriff auf die Br-Aryl-Bindung liefert den gewünschten Lithiumaromaten. Letzterer ist bevorzugt, da der aromatische Rest besser als der n-Butyl-Rest in der Lage ist, eine negative Ladung zu stabilisieren. Aus diesem Grund lässt sich auch die gewählte Methode des Metall-Halogen-Austausches praktisch nur auf Arylhalogenide anwenden.

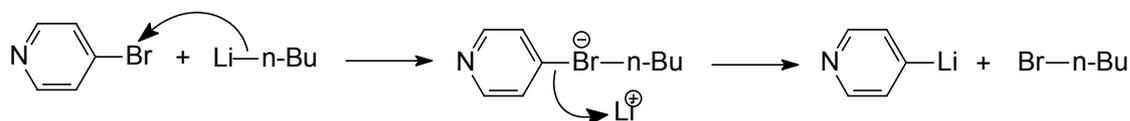


Abbildung 42: Mechanismus des Metall-Halogen-Austauschs zur Darstellung von 4-Lithio-Pyridin

Eine Konkurrenzreaktion ist die Alkylierung des Pyridins. Der Metall-Halogen-Austausch ist jedoch, als vergleichsweise schnelle Reaktion, bei tiefen Temperaturen bevorzugt und daher bei -70 °C durchgeführt wird.

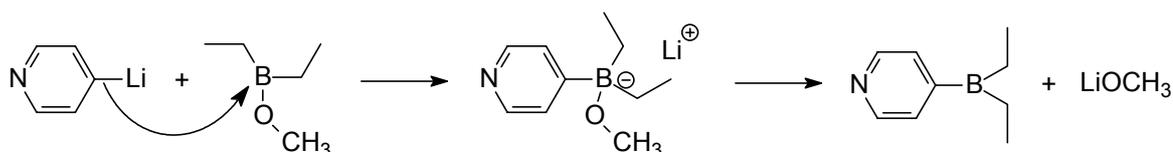


Abbildung 43: Mechanismus der Umsetzung von 4-Lithio-Pyridin mit Diethylmethoxyboran zu 4-Diethyl-boranyl-pyridin.

Der folgende nukleophile Angriff 4-Lithio-Pyridins an das B-Atom des Diethylmethoxyborans liefert intermediär ein Lithiumsalz, das schnell zum 4-Diethyl-boranyl-pyridin und Lithiummethanolat zerfällt.

Für die Umsetzung wird das 4-Brompyridin aus 4-Brompyridinhydrochlorid durch Ausschütteln mit Na_2CO_3 -Lösung freigesetzt, in THF aufgenommen und über NaSO_4 getrocknet. Zu dieser etherischen Lösung wird bei -75°C unter Stickstoffatmosphäre Butyllithium zugegeben und im Anschluß für 2 Stunden gerührt. Die etherische Lösung wird so weiter umgesetzt.

4.2.2.3 Synthese der *N,N*-Dialkylaminophenylpyridine

Zur Darstellung der *N,N*-Dialkylaminophenylpyridine wird eine Palladium-katalysierte Kreuzkupplung von 4-Diethylboranyl-pyridin mit *N,N*-Dialkyl-*p*-bromanilin durchgeführt. Der Mechanismus gleicht dem der Suzuki-Reaktion [106,107,108] und kann am besten in einem katalytischen Zyklus mit den folgenden Phasen beschrieben werden (Abbildung 44):

- A** Oxidative Addition. Umsetzung des Halogenids mit dem Palladium(0)komplex unter Bildung einer Palladium(II)spezies.
- B** Transmetallierung. Übertragung des Pyridin-Restes vom Bor auf das Palladium. Generierung einer Palladium(II)spezies, die bereits beide zu verknüpfende Reste enthält.
- C** Reduktive Eliminierung zum Substitutionsprodukt unter Regeneration des Katalysators zum Palladium(0)komplex.

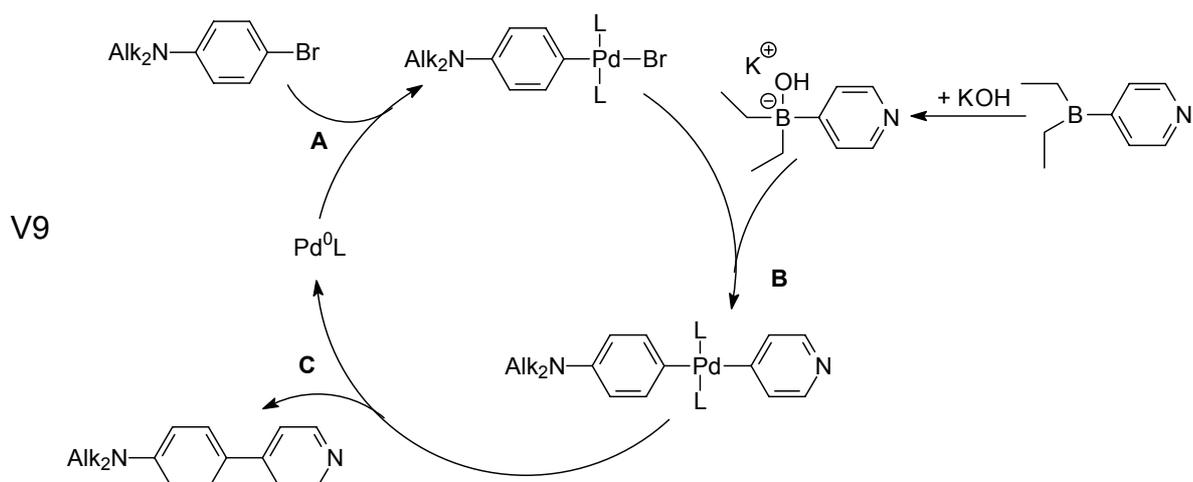


Abbildung 44: Katalysezyklus der Palladium-katalysierten Kreuzkupplung von 4-Diethylboranylpyridin mit *N,N*-Dialkyl-*p*-bromanilin

Eine Besonderheit der Suzuki-Reaktion zeigt sich in der wichtigen Rolle der Base bei der Umsetzung. Im Gegensatz zur Stille-Kupplung und zur Heck-Reaktion erfolgt keine Kupplung unter neutralen Reaktionsbedingungen, da mit der Base eine, in der Umsetzung notwendigen Weise, aktivierte Boranyl-Spezies mit einem tetravalenten Boratom entsteht.

Zur Synthese wird die Mischung von Diethyl-(4-Pyridyl-)boran und *N,N*-Dialkyl-*p*-bromanilin, gepulvertem KOH, Bu_4NBr und $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$ absolutem THF unter Stickstoff 12 Stunden refluxiert. Die Mischung wird verdünnt, mit Ethylacetat und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel abgezogen wurde, wird der Rückstand säulenchromatographisch mit Hexan / Ethylacetat (2:1) gereinigt und man erhält das Reinprodukt in etwa 60 %iger Ausbeute (Versuch 9).

4.2.3 Synthese mit Hilfe von Cyanurchlorid

Eine präparativ sehr wenig aufwendige Methode für die Synthese des APP-Grundbausteins ist die Umsetzung von *N,N*-Dialkylanilinen mit Pyridin in Gegenwart von Cyanurchlorid und AlCl_3 analog einer Vorschrift von G.I. Migachev und B.I. Stepanov [109].

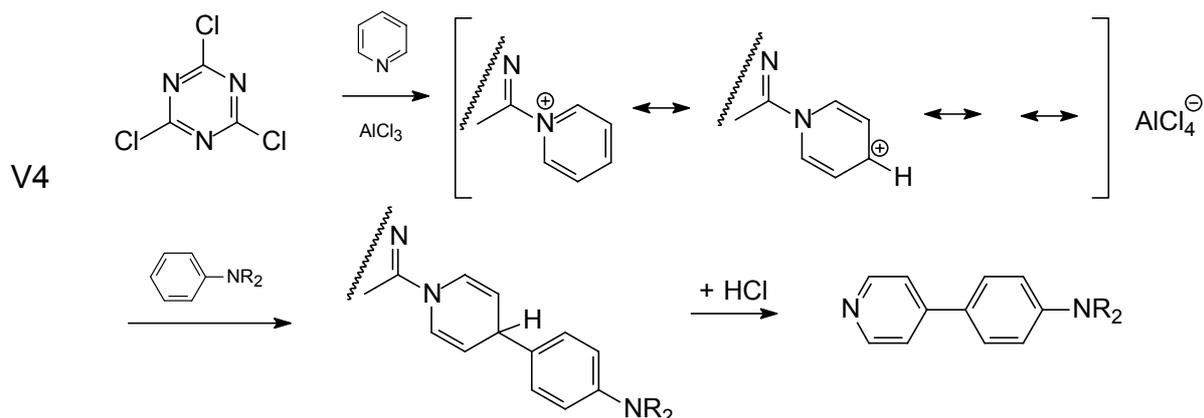


Abbildung 45: Mechanismus der Umsetzung von *N,N*-Dialkylanilinen mit Pyridin in Anwesenheit von Cyanurchlorid und AlCl_3 nach G.I. Migachev und B.I. Stepanov [109].

Im ersten Reaktionsschritt bildet sich aus dem Cyanurchlorid (2,4,6-Trichlor-*s*-Triazin), AlCl_3 und Pyridin ein 1-*s*-Triazinylpyridinium-Salz. Der in den Positionen 1, 2 und 4 positivierte Pyridin wird bevorzugt in der Position 4 angegriffen. Nach wäßriger Aufarbeitung wird unter Rearomatisierung das *N,N*-Dialkylaminophenylpyridin abgespalten (Abbildung 45).

Für die Reaktion wird eine Mischung Cyanurchlorid und Pyridin für 15 Minuten bei 70°C gerührt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Im Anschluß werden wird das *N,N*-Dialkylanilin zugegeben. Unter kräftigem Rühren wird in Folge Aluminiumchlorid portionsweise zugegeben, so daß die Reaktionstemperatur 30°C nicht übersteigt. Das Reaktionsgemisch wird 1,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluß im Verlauf von 1 Stunde auf 100°C gebracht. Bei 100°C wird 2 Stunden gerührt. Man läßt im Anschluß auf Raumtemperatur abkühlen. Während des Refluxierens färbt sich die Mischung schwarz-blau und wird beim Abkühlen hochviskos und schwer zu rühren. Das zähflüssige Reaktionsgemisch wird mit 120 ml 10%iger Salzsäure gelöst, mit gekörnter Aktivkohle gekocht, abfiltriert und das Filtrat mit 15%iger Natronlauge neutralisiert. Das orangerote Produkt wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen, getrocknet und über eine kurze Filtersäule mit Aceton von Nebenprodukten befreit.

Die Methode mit Hilfe von Cyanurchlorid erweist sich als brauchbar für *N,N*-Dialkylaminophenylpyridine mit kürzeren Kettenlängen wie Methyl und Ethyl. Sie führt mit billigen Edukten in einem Schritt in befriedigenden Ausbeuten zum gewünschten Produkt, auch wenn die Aufarbeitung schwierig und mühevoll ist. Bei der Synthese der Verbindungen mit Propyl- und besonders Butylketten, wird die Aufarbeitung nahezu

unmöglich, da die oben beschriebene schwarz-blaue Mischung beim Abkühlen, teerartig wird und schnell aushärtet. Die Hydrolyse ist dann praktisch nicht kontrolliert durchzuführen und führt nur mit geringen und vor allem stark schwankenden Ausbeuten zum gewünschten Produkt.

Dagegen ist die Synthese über die Pd-katalysierte Kreuzkupplung vor allem wegen der zusätzlichen Synthese der Hilfssubstanzen und Katalysatoren, sowie den in vielen Schritten notwendig inerten Bedingungen aufwendiger, führt aber sicherer zum gewünschten Produkt.

Der Unterschied in den beiden Methoden liegt dabei nicht so sehr in den Ausbeuten, sondern in der kritischen Aufarbeitung der *N,N*-Dialkylaminophenylpyridine mit langen Alkylketten bei Anwendung der Methode mit Cyanurchlorid. Dies rechtfertigt den Aufwand der Methode der Pd-katalysierten Kreuzkupplung. Für die *N,N*-Dialkylaminophenylpyridine mit kurzen Alkylketten wird dagegen die Methode mit Cyanurchlorid genutzt.

4.2.4 Synthese der *N,N*-Dialkylaminophenylpyridiniumfarbstoffe

Zur Darstellung der Farbstoffe werden die *N,N*-Dialkylaminophenylpyridine mit ω -Bromcarbonsäuren im Verhältnis 1 : 2 in möglichst wenig Aceton refluxiert. Nach 4 bis 6 Stunden fällt der gelbe Farbstoff aus der Lösung aus.

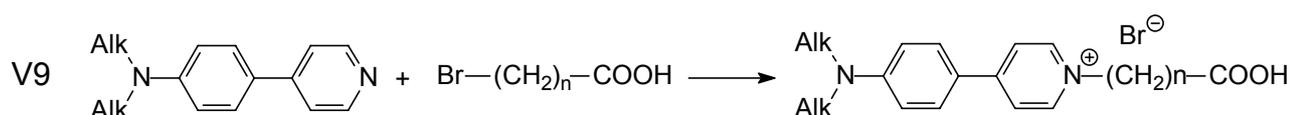


Abbildung 46: Quarternierung der Aminophenylpyridine mit ω -Bromcarbonsäuren

Der Farbstoff liegt in den meisten Fällen in ausreichender Reinheit für die weitere Umsetzung vor. Sollte eine weitere Reinigung notwendig sein, so wird aus Aceton umkristallisiert oder an Kieselgel 60 mit Dichlormethan / Methanol als Eluent gesäult.

Die Charakterisierung der *N,N*-Dialkylaminophenylpyridiniumfarbstoffe erfolgt zusammen mit der der *N,N*-Dialkylaminophenylpyridine im folgenden Kapitel 4.2.5.

4.2.5 Charakterisierung der *N,N*-Dialkylaminophenylpyridine und -pyridiniumfarbstoffe

Typisch für das $^1\text{H-NMR}$ der Aminophenylpyridine (Beispiel in Abbildung 47) und –pyridiniumfarbstoffe (Beispiel in Abbildung 48) sind die vier Signale der aromatischen Protonen des Anilin- und des Pyridinrings zwischen 6.5 und 9 ppm. Nach Quarternierung des Pyridinrings verschieben sich besonders die Signale der Protonen in 2- und m-Position zu tieferem Feld. Die Protonen der *N*-Alkylsubstituenten zeigen ihre Resonanzen zwischen 0.9 und 1.5 ppm. Nur die dem *N*-Atom direkt benachbarten Protonen sind mit 3.3 ppm erwartungsgemäß tieffeldverschoben.

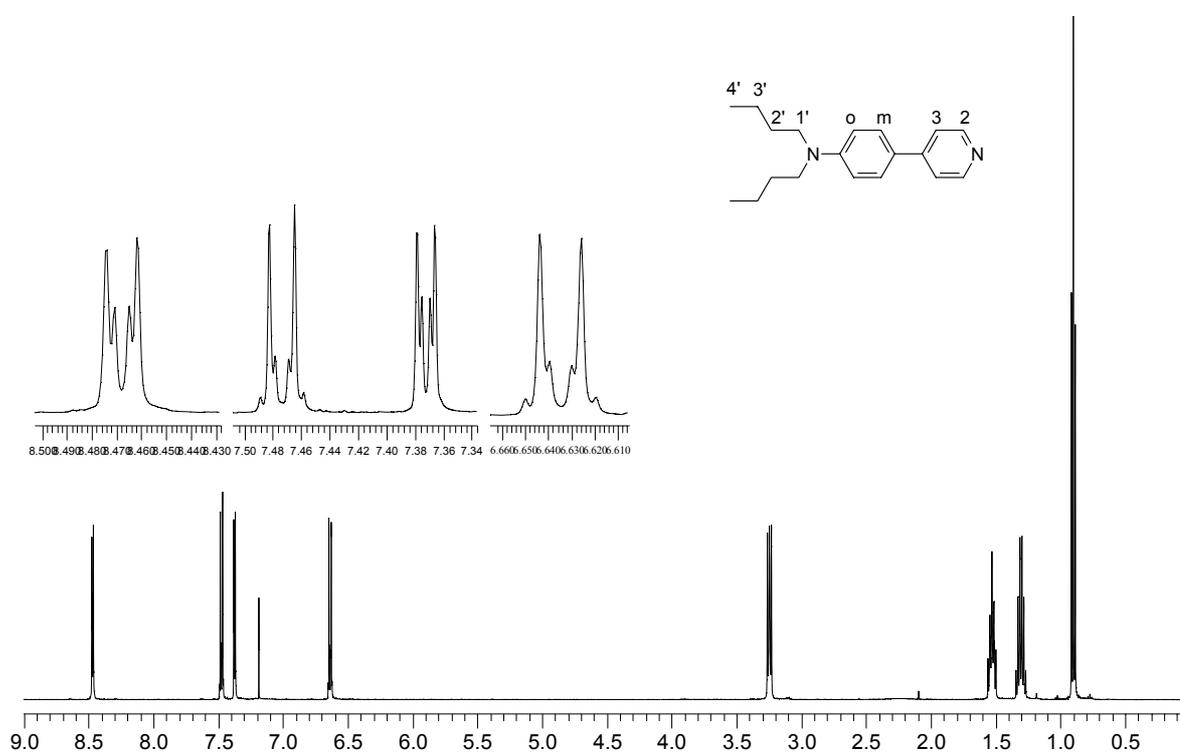
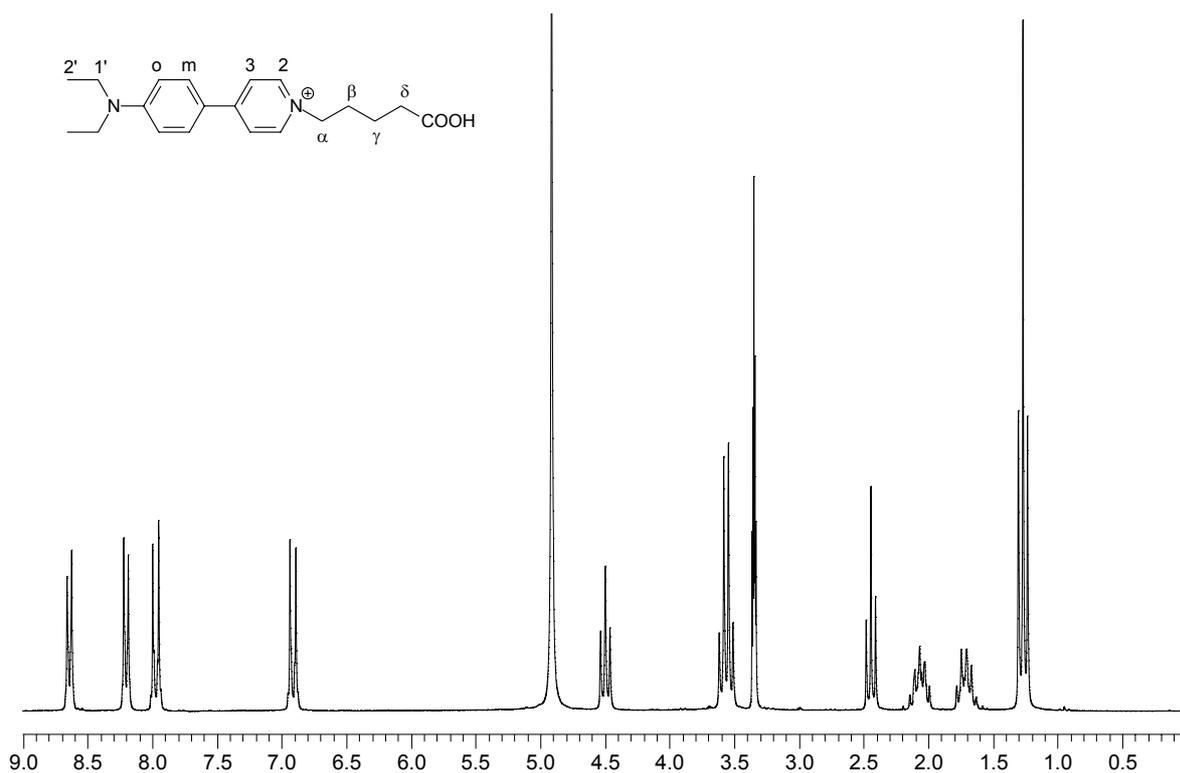


Abbildung 47: $^1\text{H-NMR}_{500}$ -Spektrum von Di-4-APP in CDCl_3 .

Zuordnung	δ [ppm], Mult., J [Hz], Int.	Zuordnung	δ [ppm], Mult., J [Hz], Int.
4 ² -H	0.90, t, 7.4, 6H	o-H	6.63, m, 2H
3 ² -H	1.30, m, 4H	m-H	7.37, m, 2H
2 ² -H	1.53, m, 4H	3-H	7.47, m, 2H
1 ² -H	3.25, t, 7.7, 4H	2-H	8.47, m, 2H

Tabelle 7: Zuordnung der $^1\text{H-NMR}_{500}$ -Daten von Di-4-APPy in CDCl_3 .


 Abbildung 48: $^1\text{H-NMR}_{200}$ -Spektrum von Di-2-APP- C_4COOH in CD_3OD

Zuordnung	δ [ppm], Mult., J [Hz], Int.	Zuordnung	δ [ppm], Mult., J [Hz], Int.
2'-H	1.27, t, 7.0, 6H	α -H	4.50, t, 7.3, 2H
γ -H	1.70, m, 2H	o-H	6.91, m, 2H
β -H	2.07, m, 2H	m-H	7.97, m, 2H
δ -H	2.44, t, 7.2, 2H	3-H	8.20, m, 2H
1'-H	3.51, q, 7.1, 4H	2-H	8.64, m, 2H

 Tabelle 8: Zuordnung der Signale des $^1\text{H-NMR}_{200}$ -Spektrum von Di-2-APP- C_4COOH in CD_3OD

Im UV-Spektrum der *N,N*-Dialkylaminophenylpyridine in Ethanol liegt das Absorptionsmaximum bei etwa 330 nm mit einem maximalen Extinktionskoeffizienten im Bereich von $21000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Die quarternierten Farbstoffe absorbieren erwartungsgemäß langwelliger mit einem Maximum bei etwa 430 nm und einem Extinktionskoeffizienten im Bereich von $32000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Beispiel Di-1-APPy und Di-1-APP- C_{10}COOH in Abbildung 49). Wie auch bei den Aminostyrylpyridiniumfarbstoffen bewirkt bei beiden Verbindungstypen eine zunehmende Länge der N-Alkylketten eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums.



Abbildung 49: UV-Spektrum von Di-1-APP-C₁₀COOH in Ethanol; $\lambda_{\text{max}} = 437 \text{ nm}$; $\epsilon_{\text{max}} = 33800 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ und Di-1-APPy in CHCl₃; $\lambda_{\text{max}} = 336 \text{ nm}$; $\epsilon_{\text{max}} = 20900 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Spektren auf das Absorptionsmaximum normiert.

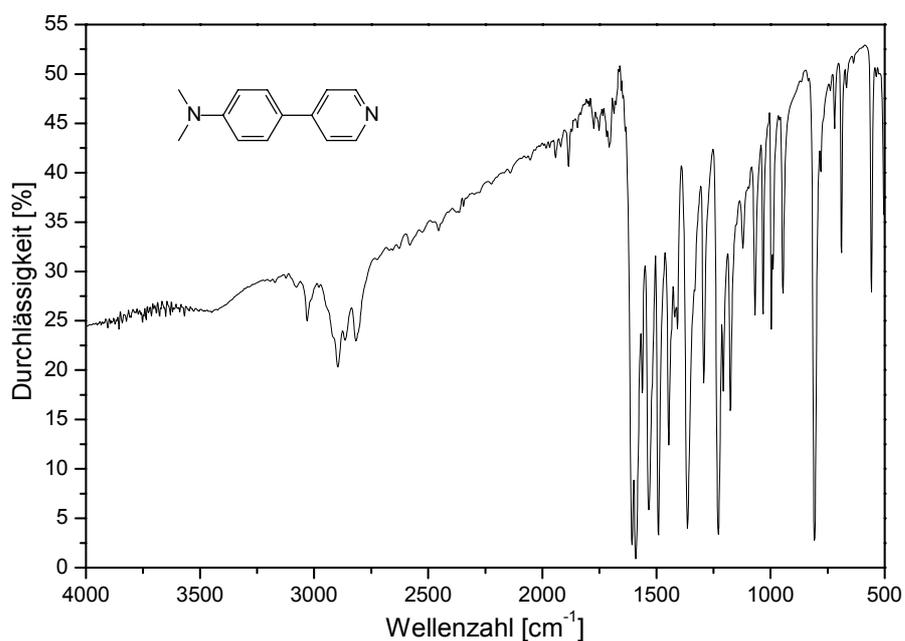


Abbildung 50: IR-Spektrum von Di-1-APPy (KBr-Pressling)

Wellenzahl [cm ⁻¹]		Wellenzahl [cm ⁻¹]	
3030	Aryl-H	1364	CH ₃ sym. Def.
2890 - 2880	C-H aliphatic	807	C=C 1,4 disubst. Ar.
1590 / 1533	C=C aromatic		

Tabelle 9: Zuordnung der Schwingungen im IR-Spektrum von Di-1-APPy (KBr-Pressling)

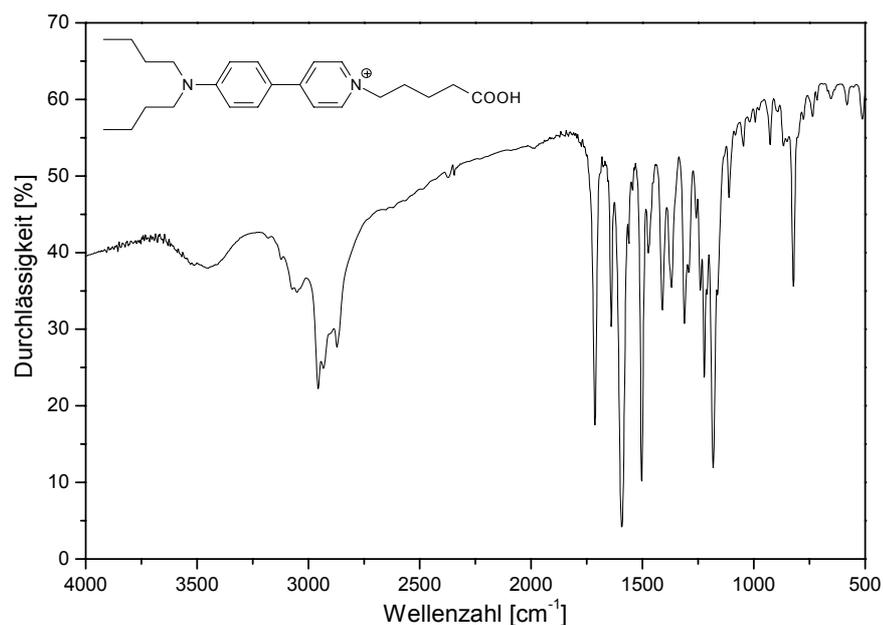


Abbildung 51: IR-Spektrum von Di-4-APP-C₄COOH (KBr-Pressling)

Wellenzahl [cm ⁻¹]		Wellenzahl [cm ⁻¹]	
3500	O-H-Carboxyl	1592 / 1503	C=C aromat.
2956	C-H aliphatic	1311	CH ₃ sym. Def.
1713	C=O Carboxyl	815	C=C 1,4 disubst. Ar.
1639	C=C olefin.		

Tabelle 10: Zuordnung der Schwingungen im IR-Spektrum von Di-4-APP-C₄COOH (KBr-Pressling)

Die IR-Spektren der Aminophenylpyridine und der Aminophenylpyridiniumfarbstoffe zeigen weitreichend gleiche Absorptionen. Gut zu sehen sind die zusätzlichen Absorptionen bei 3500 und 1700 cm⁻¹ der Schwingungen der Carboxylgruppe der mit ω-Brom-carbonsäuren quarternierten Farbstoffe.

4.3 Synthese der bichromophoren Farbstoffe

Im Arbeitskreis Martin wurde auf vielfältige Weise versucht, zwei Chromophore zu koppeln. Dabei ergaben sich häufig bei der Anwendung ansonsten erprobter Synthesekonzepte unerwartete Schwierigkeiten. So gelingt z.B. die direkte Veresterung von Carbonsäuren und Alkohol im sauren oder basischen oder mit DCC als Aktivierungsreagenz für Carbonsäuren nicht. Ebenso wenig war eine Umsetzung von Alkoholen mit Isothiocyanaten erfolgreich. Während aromatische und aliphatische Amine mit Isothiocyanaten Kopplungsprodukte bilden, reagieren auch einfache Chromophore, wie Aminopyridonfarbstoffe mit Aminogruppe dagegen nicht [73]. Für die in dieser Arbeit angestrebten Bichromophore lieferte die Kopplung über Isothiocyanate in Vorversuchen keine brauchbaren Ergebnisse. Auch die Aktivierung von Carbonsäuren zu isolierbaren Acylierungsmitteln war wenig erfolgreich [110]. Sowohl die Umsetzung von Aminen mit Carbonsäurechloriden, als auch den NHS-Estern, lieferte nur schlechte oder gar keine Ausbeuten an Bichromophor.

Erfolgreich war lediglich die doppelte Quarternierung mit 1, ω -Diiodpolymethylen [75] und die aus der Peptidchemie bekannte Kondensation mit Hilfe von PyCloP [130], bei der eine in situ aktivierte Carbonsäure mit einem Amin umgesetzt wird. Die erste Methode hat den Nachteil, daß nur Spacerkettenlängen von maximal vier Methylengruppen möglich sind. Hier lassen sich also nur Chromophore kombinieren, die einen entsprechend kleinen Försterradius besitzen. Die zweite Methode wurde bereits mehrfach im Arbeitskreis erfolgreich eingesetzt und zeigte sich auch für einen Teil der in dieser Arbeit gewünschten Verbindungen als geeignet.

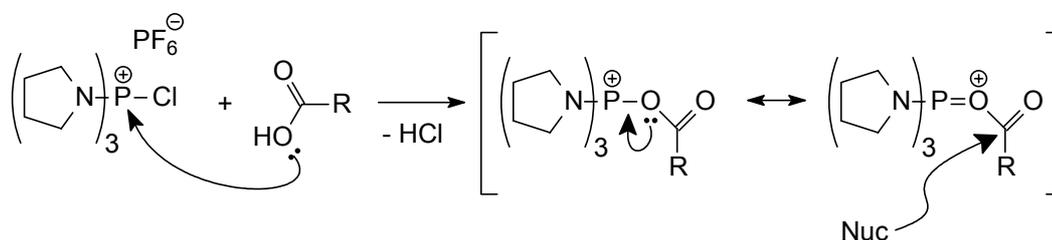


Abbildung 52: Mechanismus der Aktivierung von Carbonsäuren mit PyCloP.

Die Aktivierung von Carbonsäuren durch PyCloP besteht darin, daß das Chlorid am Phosphoratom nucleophil gegen Carboxylat getauscht wird (Abbildung 52). Das ent-

stehende Acylierungsmittel enthält Tripyrrolidinophosphoroxid als hervorragende Abgangsgruppe, die positive Ladung erhöht die Elektrophilie der Carbonylgruppe und verhindert eine Mesomeriestabilisierung der Carbonylgruppe durch den benachbarten Sauerstoff.

Die so aktivierte Carbonsäure kann von Nucleophilen wie z.B. Aminen angegriffen werden. Die bei der Anlagerung frei werdende Salzsäure wird von der Hilfsbase DIEA abgefangen. Der beschriebene Mechanismus gilt für einen Überschuss von PyCloP. Wenn PyCloP äquimolar eingesetzt wird, konkurriert das Carboxylat als Nucleophil mit dem Amin, und es bilden sich Carbonsäureanhydride, die dann als aktive Spezies mit dem Amin weiterreagieren [130].

Wenn jedoch das Löslichkeitsverhalten von Produkten und Edukten in der Synthese die Verwendung von DMF als Lösungsmittel erfordert, ist der Einsatz von PyCloP problematisch, da die Gefahr der Nebenreaktion von DMF mit Aminen zu Formamidinen besteht [111]:

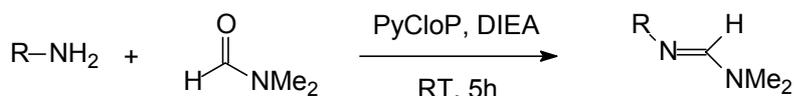


Abbildung 53: Durch PyCloP aktivierte Reaktion von DMF mit Aminen zu Formamidinen

Dabei greift der Carbonyl-Sauerstoff des Amids am Phosphor an und substituiert das Chlor. Der nun positivierte Carbonyl-Kohlenstoff wird wiederum vom Amin angegriffen. Aus dem Molekül spaltet sich in Folge Tripyrrolidinophosphinoxid ab und setzt das Formamidin frei.

Aus diesem Grund wird für Kopplungen in DMF und stärker polaren Medien auf das Kopplungsreagenz TBTU zurückgegriffen [112].

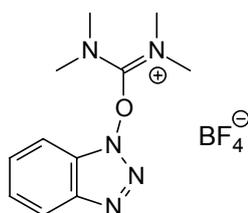


Abbildung 54: Kopplungsreagenz TBTU

Die Aktivierung der Carboxyl-Funktion mit Hilfe von TBTU erfolgt durch Bildung eines Benzotriazolesters. Die Aktivierung ist hauptsächlich auf der Tatsache begründet, daß das Benzotriazol-1-ol Anion eine hervorragende Abgangsgruppe ist. Der Bildung des Benzotriazolesters geht jedoch zunächst ein Angriff des Sauerstoffs der Carboxyl-Funktion auf den Carbonyl-Kohlenstoff des Tetramethylharnstoffs voraus (Abbildung 55).

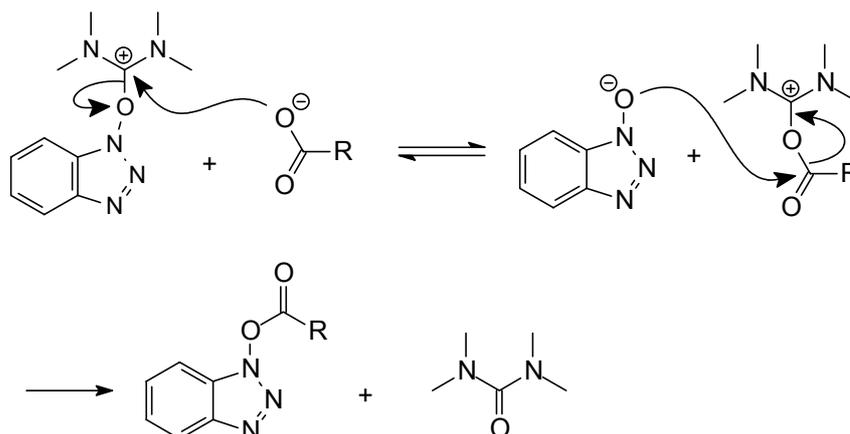


Abbildung 55: Mechanismus der Aktivierung von Carbonsäuren mit TBTU.

Das entstehende Acyluronium-Derivat steht mit seinen Edukten im Gleichgewicht. Es ist selbst sehr kupplungsaktiv. Es wird jedoch schnell vom freigesetzten Benzotriazol-1-ol Anion angegriffen und der Benzotriazolester gebildet. Treibende Kraft ist dabei die Bildung des Tetramethylharnstoffs.

4.3.1 Synthese von Tripyrrolidinochlorophosphoniumhexafluorophosphat (PyCloP)

Die Synthese des PyCloP [130] geht von Phosphoroxychlorid aus, dessen Chloratome zunächst von drei Molekülen Pyrrolidin substituiert werden. In einer folgenden Stufe wird das so dargestellte Tripyrrolidinophosphoroxid mit POCl_3 zum Produkt umgesetzt.

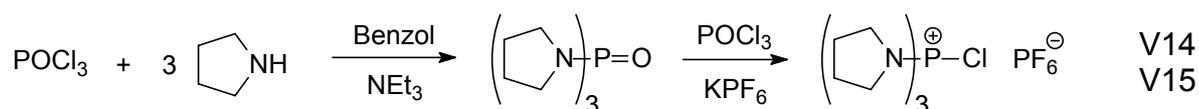


Abbildung 56: Synthese von PyCloP

Das ^1H -NMR Spektrum von PyCloP (Abbildung 57) weist die zwei Multipletts des Pyrrolidins bei 3,30 und 1,97 ppm auf. Das ^{31}P -NMR zeigt zum einen das Singulett des Phosphor-Kations bei +37 ppm und zum anderen das Septett PF_6^- -Anions bei -140 ppm ($^1\text{J}(\text{P},\text{F}) = 712 \text{ Hz}$).

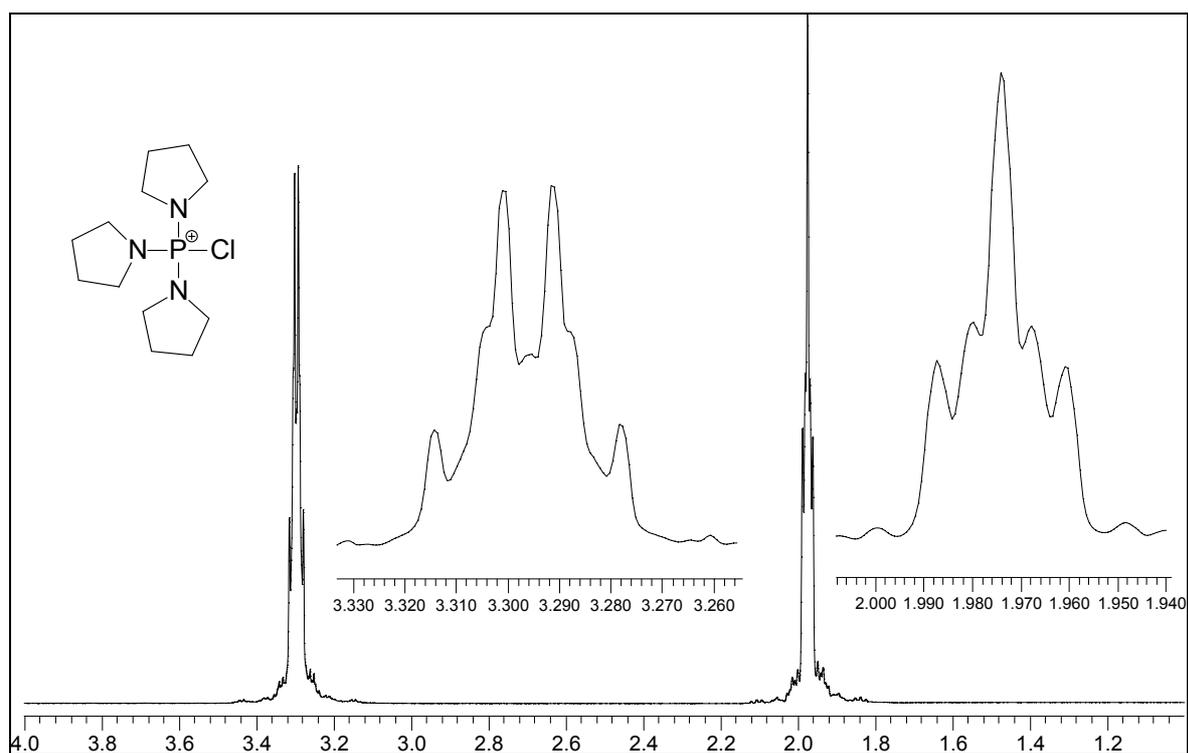


Abbildung 57: ^1H -NMR $_{500}$ -Spektrum von PyCloP in CD_3OD

Zuordnung	δ [ppm], Mult., J [Hz], Int.
2,2'-H	3.30, m, 12H
3,3'-H	1.97, m, 12H

Tabelle 11: Zuordnung der Signale des ^1H -NMR $_{500}$ -Spektrum von PyCloP in CD_3OD

4.3.2 Kopplung zu Bichromophoren

Die Einzelchromophore werden über 1,4-Phenylendiamin in zwei aufeinander folgenden Reaktionen zu den gewünschten Bichromophoren gekoppelt. Dabei hat sich gezeigt, daß es bei der Aufarbeitung günstiger ist zunächst die Aminophenylpyridiniumfarbstoffe mit 1,4-Phenylendiamin zum Amid umzusetzen und dann im Anschluß mit dem Aminostyrylpyridiniumfarbstoff den Bichromophor zu erzeugen.

Der Aminophenylpyridiniumfarbstoff wird mit der dreifachen Menge 1,4-Phenylendiamin, der 1,2fachen Menge PyCloP in absolutem Acetonitril bzw. TBTU in absolutem DMF gelöst und mit der 4,2fachen Menge DIEA unter Rühren versetzt. Die Mischung wird für 24h bei Raumtemperatur gerührt. Während dieser Zeit fällt unter Umständen schon Produkt aus. Im Anschluß wird die Mischung in das 5fache Volumen Diethylether getropft und der Farbstoff so ausgefällt. Er wird abgesaugt und entweder aus Ethanol/Diethylether umkristallisiert oder an Kieselgel 60 mit Dichlormethan/Methanol (5:1) säulenchromatographisch gereinigt.

V16
V17

Das erhaltene Amid wird nach der Aufreinigung analog mit dem zweiten Farbstoff im Verhältnis 1:1 oder mit einem leichten Überschuß des Aminostyrylpyridiniumfarbstoffs zum Bichromophor gekoppelt und ebenso aufgereinigt.

Die NMR- und IR-Spektren der Bichromophore setzen sich in ihrem Erscheinen im Wesentlichen aus den Spektren der einzelnen Bausteine zusammen. Zusätzlich treten allein die Signale der neu entstandenen Amidgruppe auf.

Da sich die IR-Spektren sehr ähneln ist hier beispielhaft für alle anderen Bichromophore das IR-Spektrum von Bichromophor 4/4/4/4 (Abbildung 58) angegeben.

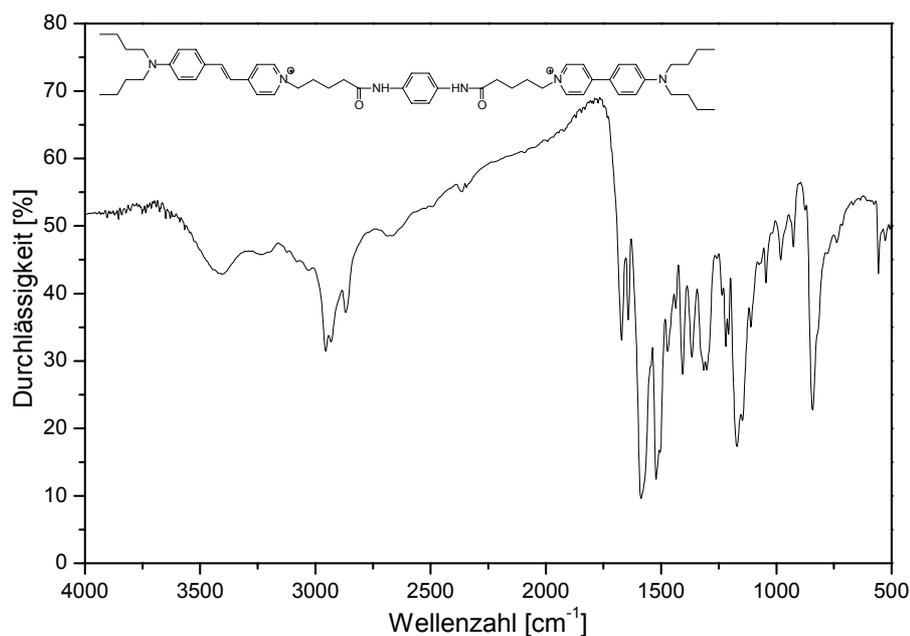


Abbildung 58: IR-Spektrum von Bichromophor 4/4/4/4 (KBr-Pressling)

Wellenzahl [cm ⁻¹]		Wellenzahl [cm ⁻¹]	
3250 – 3000	N-H in Amiden	1587 / 1522	C=C aromat.
2950	C-H aromat.	1315	CH ₃ sym. Def.
2900	C-H aliphat.	1170	C-C _{v1/v2}
1670	C=O Carboxyl	843	C=C 1,4 disubst.
1642	C=C olefin.		Aromat

Tabelle 12: Zuordnung der Schwingungen im IR-Spektrum von Bichromophor 4/4/4/4 (KBr-Pressling)

Als Beispiel für einen mit 1,4-Phenylendiamin gekoppelten ASP-Farbstoff ist unten das ¹H-NMR-Spektrum von 1-[3-(4-Amino-phenylcarbamoyl)-butyl]-4-[2-(4-dimethylaminophenyl)-vinyl]-pyridiniumbromid (Versuch 16.3) dargestellt.

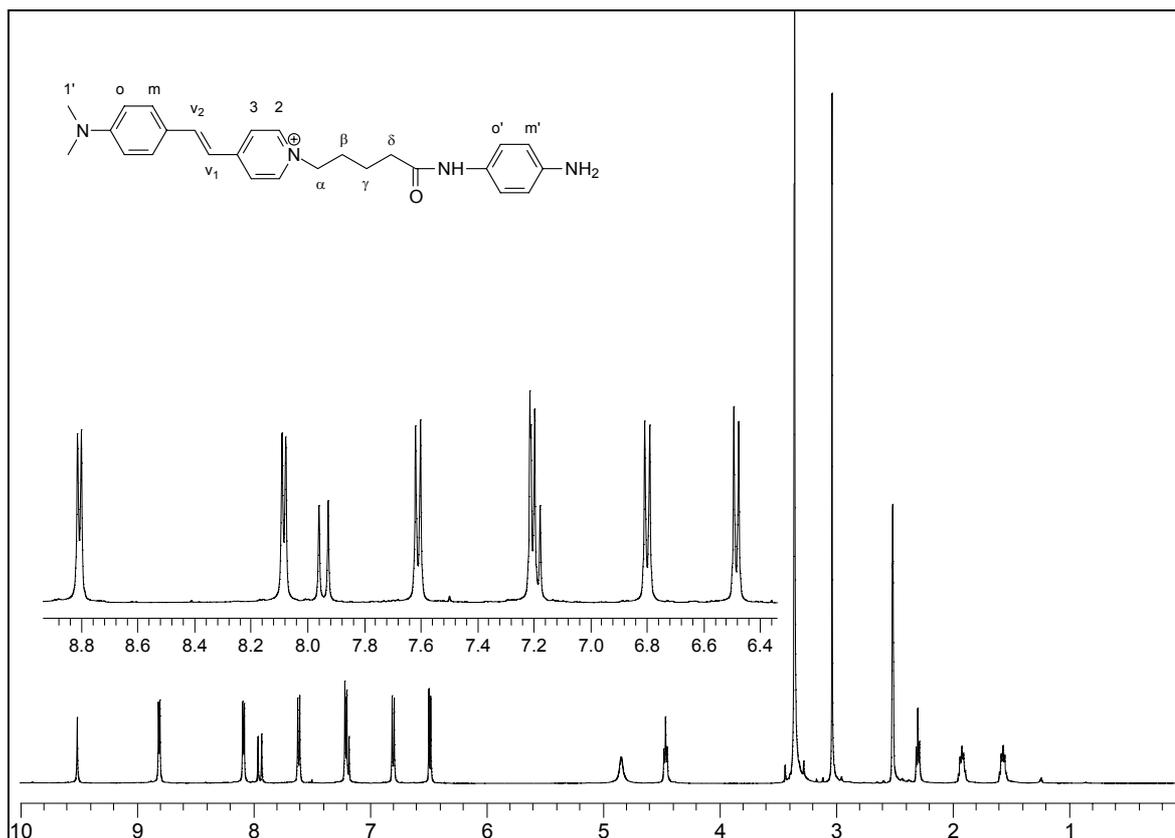


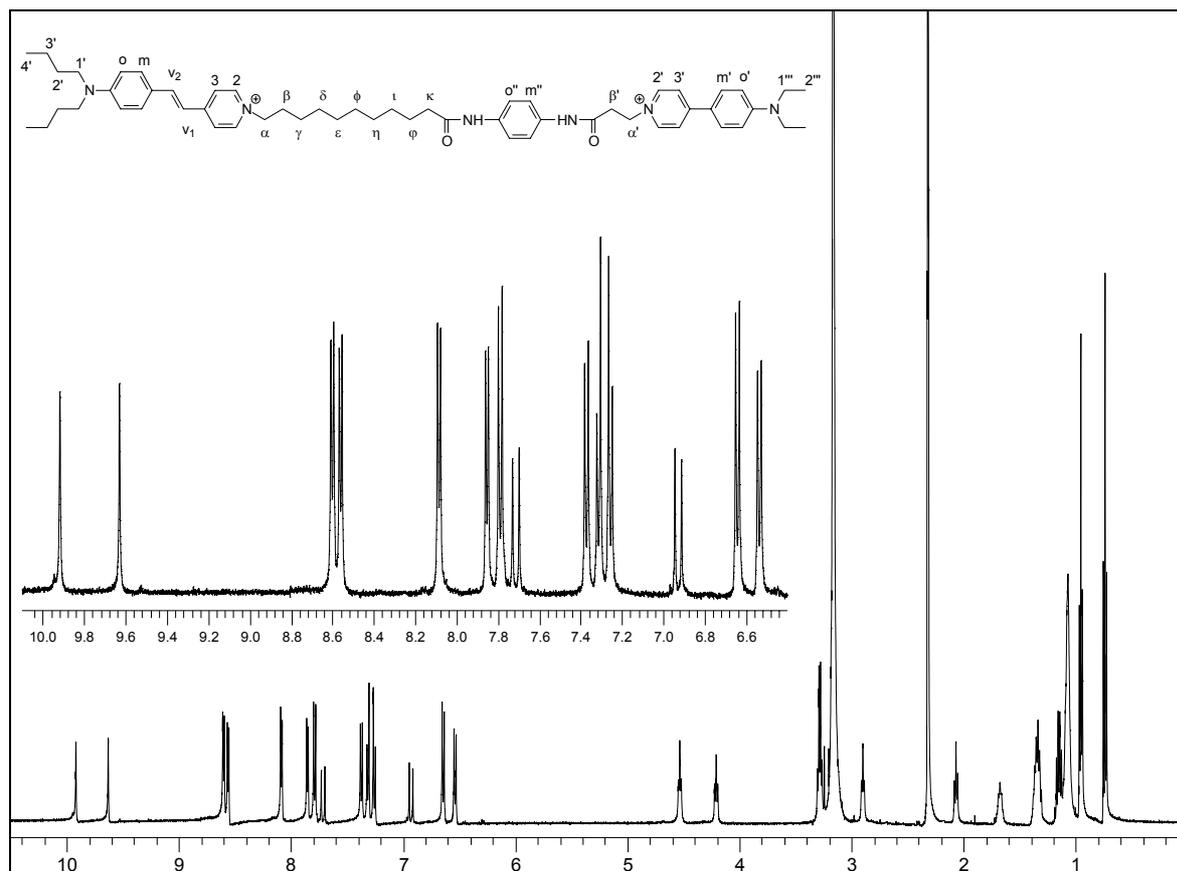
Abbildung 59: $^1\text{H-NMR}_{500}$ -Spektrum von Di-1-ASP- $\text{C}_5\text{OONH-Phen-NH}_2$ in CD_3OD

Zuordnung	δ [ppm], Mult., J [Hz], Int.	Zuordnung	δ [ppm], Mult., J [Hz], Int.
γ -H	1.57, m, 2H	v_2 -H	7.19, d, 16.39, 1H
β -H	1.92, m, 2H	m-H	7.21, m, 2H
δ -H	2.30, t, 7.12, 2H	o-H	7.61, m, 2H
$1'$ -H	3.03, s, 6H	v_1 -H	7.94, d, 16.39, 1H
α -H	4.46, t, 6.94, 2H	3-H	8.08, m, 2H
NH_2	4.84, s, 2H	2-H	8.81, m, 2H
m' -H	6.48, d, 8.20, 2H	NH	9.51, s, 1H
o' -H	6.80, d, 8.83, 2H		

Tabelle 13: Zuordnung der Signale des $^1\text{H-NMR}_{500}$ -Spektrums von Di-1-ASP- $\text{C}_5\text{OONH-Phen-NH}_2$ in CD_3OD .

Gegenüber dem Spektrum des ungekoppelten Farbstoffs sind nur die Signale des Amid-Protons bei 9,5 ppm und der Aminogruppe bei 4,8 ppm hinzugekommen.

Auch im $^1\text{H-NMR}$ des Bichromophors findet man alle Signale der Synthesebausteine wieder. Wiederum treten nur zusätzlich die Signale der beiden Amidprotonen bei 9,63 und 9,92 ppm und des Phenylrings aus dem 1,4-Phenylendiamin bei 6,48 und 6,80 ppm auf.


 Abbildung 60: $^1\text{H-NMR}_{500}$ -Spektrum von Bichromophor 4/10/2/2 in DMSO

Zuordnung	δ [ppm], Mult., J [Hz], Int.	Zuordnung	δ [ppm], Mult., J [Hz], Int.
4'-H	0.74, t, 7.4, 6H	v ₂ -H	6.93, d, 16.0, 1H
2'''-H	0.96, t, 6.9, 6H	m-H	7.26, d, 9.0, 2H
δ - bis ι -H	1.00 – 1.20, 10 H	m'-H	7.31, d, 9.0, 2H
ϕ -, γ -H	1.3 – 1.4, 4H	o-H	7.37, d, 8.9, 2H
β -H	1.68, m, 2H	v ₁ -H	7.71, d, 16.0, 1H
κ -H	2.07, t, 7.5, 2H	o'-H	7.79, d, 9.2, 2H
β^2 -H	2.90, t, 6.5, 2H	3-H	7.85, d, 6.9, 2H
1 ² -H	unter H ₂ O bei 3.16	3''-H	8.09, d, 7.1, 2H
1'''-H	3.28, q, 6.9, 4H	2-H	8.56, d, 6.9, 2H
α^2 -H	4.21, t, 7.2, 2H	2'-H	8.60, d, 7.0, 2H
α^2 -H	4.53, t, 6.4, 2H	NH	9.63, s, 1H
o''-H	6.54, d, 9.0, 2H	NH	9.92, s, 1H
m''-H	6.54, d, 9.0, 2H		

 Tabelle 14: Zuordnung der Signale des $^1\text{H-NMR}_{500}$ -Spektrum von Bichromophor 4/10/2/2 in DMSO

Die UV/Vis-Spektren in Ethanol setzen sich mit Maxima bei etwa 450 und 550 nm ebenfalls additiv aus den Spektren der Einzelchromophore zusammen. In Abbildung 61 ist als Beispiel das Absorptionsspektrum des Bichromophors 4/10/10/4 zusammen mit den Absorptionsspektren der Einzelchromophore dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt die Summe beider Spektren der Einzelchromophore, normiert auf das kurzwellige Maximum. Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung mit dem Spektrum des Bichromophors.

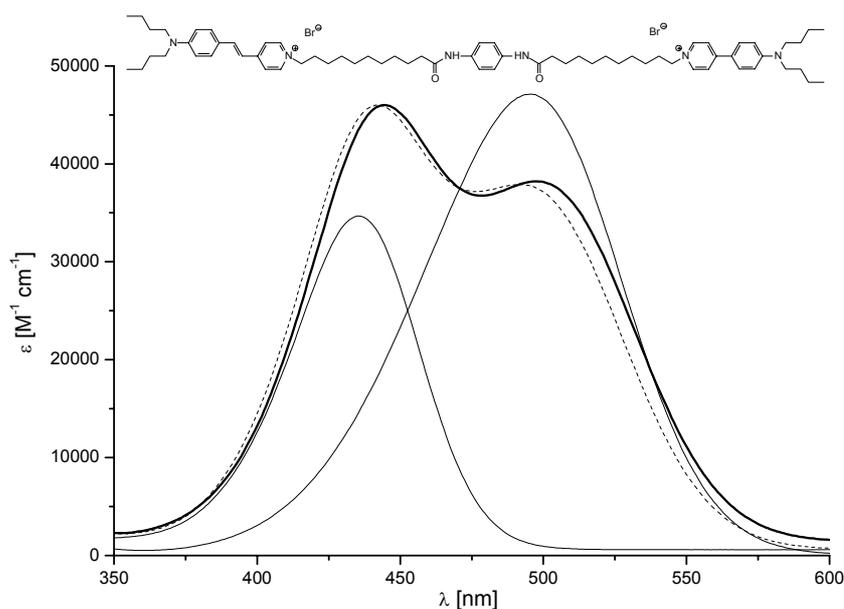


Abbildung 61: Absorptionsspektren von Bichromophor 4/10/10/4 in Ethanol (dicke Linie; $\lambda_{\text{max}} = 445$ nm ($\epsilon_{\text{max}} = 46000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und $\lambda_{\text{max}} = 498$ nm ($\epsilon_{\text{max}} = 38200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und der entsprechenden Einzelchromophore. Die gestrichelte Linie stellt die Summe der Spektren der Einzelchromophore dar, normiert auf das Maximum bei 442 nm.

Wie auch schon für die Styryl- und Aminophenylpyridiniumfarbstoffe wird aus dem FAB-Spektrum in NBA-Matrix nur der Molekülpeak als Beleg für die gelungene Synthese des gewünschten Produktes ausgewertet (siehe Experimententeil).

Wie auch schon bei der Synthese der APP- und ASP-Farbstoffe, erweist sich die Aufarbeitung der Bichromophore als schwierig. Durch die Kombination von apolaren Alkylketten und den polaren Bereichen des quaternierten Pyridins erhält das Molekül amphiphile Eigenschaften. Mit zunehmender Kettenlänge und Gesamtgröße des Zielmoleküls steigt der lipophile Charakter. Diese für die Einlagerung in Membranen gewünschten Eigenschaften, bewirken, daß die Produkte in der Synthese als wachsartige Masse

anfallen und dadurch die Aufarbeitung erschweren. Diese Wachse enthalten Lösungsmittel und Salze aus der Reaktionslösung, was eine langwierige Trocknung notwendig macht. Aufgrund der amphiphilen Eigenschaften, gestaltet sich auch die Suche nach geeigneten Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittelgemischen für die Umkristallisation und Säulenchromatographie sehr schwierig. Da die Aufarbeitung mit hohen Ausbeuteverlusten verbunden ist, wird auf dem Syntheseweg bei den Zwischenstufen soweit es geht auf eine Aufarbeitung verzichtet und das Rohprodukt weiter eingesetzt. Erst bei der Synthese der Bichromophors wird das Produkt wie im Folgenden beschrieben gereinigt. Der Bichromophor kann prinzipiell als Betain oder salzartige Struktur vorliegen und auch das Gegenion ist nicht definiert. Daher wird der rohe Bichromophor in möglichst wenig Methanol/Dichlormethan (1:1) gelöst und in eine stark gerührte konzentrierte wäßrige Kaliumbromid-Lösung getropft. Vom erhaltenen Niederschlag wird abdekantiert. Der wachsartige Rückstand wird in Methanol/Dichlormethan (1:1) gelöst, und säulenchromatographisch mit Methanol/Dichlormethan an Kieselgel 60 gereinigt. Das optimale Mischungsverhältnis von Methanol und Dichlormethan hängt stark von der Molekülgröße ab und schwankt zwischen 1:4 und 1:10. Es muß jeweils in Vorversuchen gefunden werden.

Die erhaltene Lösung wird so schonend wie möglich am Rotationsverdampfer eingengt. Wiederum stellt sich dabei das Problem, daß die Substanzen schnell wachsartig anfallen und Lösungsmittel hartnäckig einschließen. Um eine bessere Kristallisation zu erreichen, hat sich das Animpfen der stark konzentrierten Lösungen bewährt. Auch wiederholte Abkühl- und Auftauzyklen brachten oft eine Kristallisation.

Sollte der Bichromophor dann nicht in ausreichender Reinheit vorliegen, muß der Vorgang wiederholt werden. Eine Trennung über eine Reversed-Phase-Kieselgel-Säule brachte keinen Erfolg und schied daher aus. Eine endgültige Reindarstellung erreicht man durch Gefriertrocknung.

Die Kopplungen der ASP-Farbstoffe mit 1,4-Phenylendiamin erfolgt etwa mit 40 bis 50 % Ausbeute, die Kopplung zum Bichromophor gelingt mit Ausbeuten zwischen 20 und 40 %. Es kommt jedoch häufig vor, daß die Kopplungen trotz sorgfältiger Durchführung gänzlich ohne Erfolg verlaufen, was wahrscheinlich auf unzureichende Reinheit und Stabilität der Kopplungsreagenzien zurückzuführen ist. Generell haben sich die selbst synthetisierten Reagenzien gegenüber den gekauften besser bewährt.

Um systematische Untersuchungen anzustellen, werden, wie in der Problemstellung ausgeführt, die Bichromophore in der Länge der N-Alkylketten, sowie der Alkyl-Spacer variiert (Abbildung 17). Da eine vollständige Matrix aller möglichen Bichromophore aus 256 Molekülen besteht, wurde eine Auswahl getroffen, die in Tabelle 15 aufgelistet ist. Zunächst wurde eine vollständige Submatrix der Bichromophore mit *N,N*-Dimethylsubstituenten in beiden Teilchromophoren dargestellt, ebenso für die Bichromophore mit *N,N*-Dibutylsubstituenten in beiden Teilchromophoren. Für die Bichromophore bestehend aus einem *N,N*-Dibutyl-ASP-Teilchromophor und einem *N,N*-Dimethyl-APP-Teilchromophor und vice versa, wurden Spacerkettenlängenkombinationen von 4/4, 2/10, 10/2 und 10/10 synthetisiert. Für die übrigen Kombinationen von *N,N*-Dialkylketten wurden jeweils symmetrische Spacerkettenlängenkombinationen von 4/4 und 10/10 gewählt. Somit sollte ein ausreichendes Spektrum von Bichromophoren zur Verfügung stehen, um in Reihenuntersuchungen deren Verhalten eingehend zu untersuchen. Insgesamt wurden 64 Bichromophore hergestellt.

	1	2	3	4
1	2/2 2/4 2/6 2/10 4/2 4/4 4/6 4/10 6/2 6/4 6/6 6/10 10/2 10/4 10/6 10/10	4/4 10/10	4/4 10/10	4/4 2/10 10/2 10/10
2	4/4 10/10	4/4 10/10	4/4 10/10	4/4 10/10
3	4/4 10/10	4/4 10/10	4/4 10/10	4/4 10/10
4	4/4 2/10 10/2 10/10	4/4 10/10	4/4 10/10	2/2 2/4 2/6 2/10 4/2 4/4 4/6 4/10 6/2 6/4 6/6 6/10 10/2 10/4 10/6 10/10

Tabelle 15: Übersicht über alle dargestellten Bichromophore. Die Spaltenüberschriften stellen die Länge der N-Alkylketten am ASP-Chromophor, die Zeilenüberschrift die Länge der N-Alkylketten am APP-Chromophor dar. In den Zellen sind die Kombinationen der Spacerkettenlänge aufgeführt, zuerst die des ASP-, dann die des APP-Chromophors. Das grau hinterlegte Feld stellt also den Bichromophor 4/2/10/1 dar.

5 Fluoreszenzspektroskopie

Um die Eigenschaften der dargestellten Farbstoffe zu untersuchen, werden Vesikel aus DOPC-Lipiden (Abbildung 2, Seite 10) als einfaches Modellsystem benutzt, in dem sich durch Zugabe von Valinomycin Potentialänderungen erzeugen lassen. Die generellen Eigenschaften der Farbstoffe, ihr Einlagerungsverhalten in Vesikel, sowie ihr Verhalten bei Änderung des transmembranen Potentials wird mit Hilfe der UV- und Fluoreszenzspektroskopie untersucht.

Sämtliche Fluoreszenzspektren sind bei 25 °C aufgenommen. Die Korrektur der Spektren erfolgt durch Vergleich mit der Verbindung Coumarin-1 in Ethanol und ihrem literaturbekannten wahren Emissionsspektrum [113].

5.1 Fluoreszenzeigenschaften

Die Absorptionsspektren der Mono- und Bichromophore wurden im Syntheseteil bereits angegeben (Abbildung 35 auf Seite 46, Abbildung 49 auf Seite 59 und Abbildung 61 auf Seite 69). Im Folgenden werden die Fluoreszenzspektren der Farbstoffe weiter besprochen.

Beispielhaft sind für den Styrylteilchromophor in Abbildung 62 die Fluoreszenzspektren von Di-4-ASP-C₄COOH in Chloroform, Ethanol und nach vollständiger Einlagerung in Lipidmembran abgebildet. Es zeigt das typische Verhalten von *N,N*-Dialkylaminostyrylpyridiniumchromophoren. Die Fluoreszenz weist eine positive Solvatochromie auf, d.h. die Emissionsmaxima verschieben sich mit zunehmender Lösungsmittelpolarität von kleinen nach großen Wellenlängen. Gleichzeitig findet sich eine starke Abnahme der Fluoreszenzquantenausbeute mit zunehmender Lösungsmittelpolarität, in Wasser ist die Fluoreszenz ganz gelöscht (in der Abbildung nicht dargestellt). Die Ergebnisse sind konsistent mit Messungen in der Literatur [46].

Die Größe der Quantenausbeute wird beeinflusst vom Ausmaß der Wechselwirkung zwischen Lösungsmittel und gelöstem Farbstoff. Je stärker diese Wechselwirkungen sind, in desto größerem Maße erfolgt die Abgabe von Energie auf dem Wege der thermischen Desaktivierung zu Lasten des Weges über die Lichtemission. Chloroform hat ein relativ kleines Dipolmoment, hier konkurriert die Fluoreszenz noch erfolgreich mit

thermischer Desaktivierung. Ethanol und noch mehr Wasser sind dagegen zu starken Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und zusätzlich zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken fähig, was die thermische Desaktivierung bevorzugt.

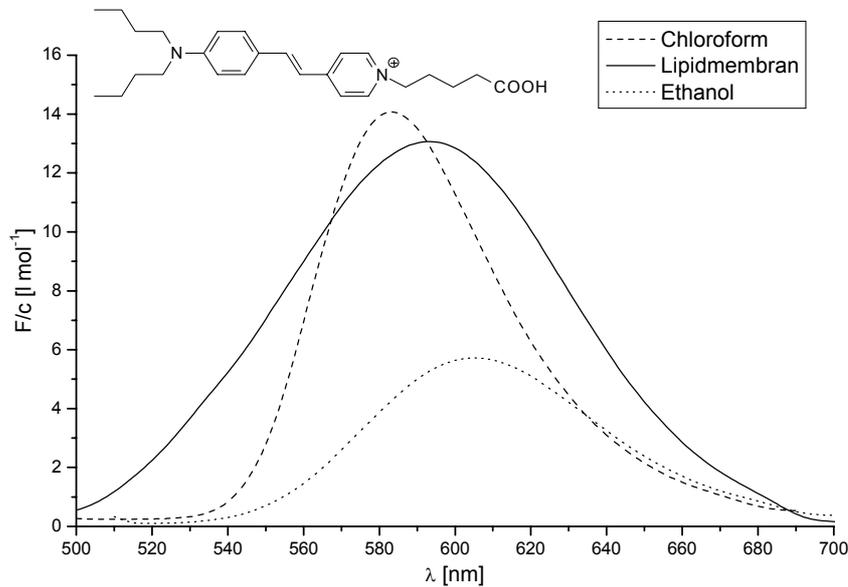


Abbildung 62: Fluoreszenzspektren von Di-4-ASP-C₄COOH in Ethanol, Chloroform und nach vollständiger Einlagerung in Lipid-Vesikeln ($\lambda_{\text{Ex}} = 490 \text{ nm}$; konzentrationsnormiert)

Eingelagert in Lipidmembran zeigt der Farbstoff ein Emissionsspektrum, wie es für polare Lösungsmittel typisch ist. Messungen des Stokes-Shift von Styrylfarbstoffen in Lösungsmitteln mit variierender Orientierungspolarisierbarkeit und Vergleich mit dem Stokes-Shift eingelagerter Farbstoffe hat für Lipid-Membranen eine Orientierungspolarisierbarkeit von etwa 0,3 ergeben [78]. Dies ist vergleichbar mit den Werten von Wasser oder Ethanol. Somit ist es plausibel, anzunehmen, daß sich der Styrylchromophor im polaren Kopfbereich der Lipidmembran einlagert. Die vergleichsweise hohe Fluoreszenzquantenausbeute erklärt sich durch die rigide Umgebung des Farbstoffs in der Membran, die weniger Möglichkeiten der strahlungslosen Relaxation durch Wechselwirkung mit der Umgebung ermöglicht.

Ein analoges Verhalten zeigt sich für bei den Fluoreszenzspektren der Phenylpyridiniumfarbstoffe (Abbildung 63). Mit steigender Lösungsmittelpolarität werden auch deren Emissionsspektren bathochrom verschoben.

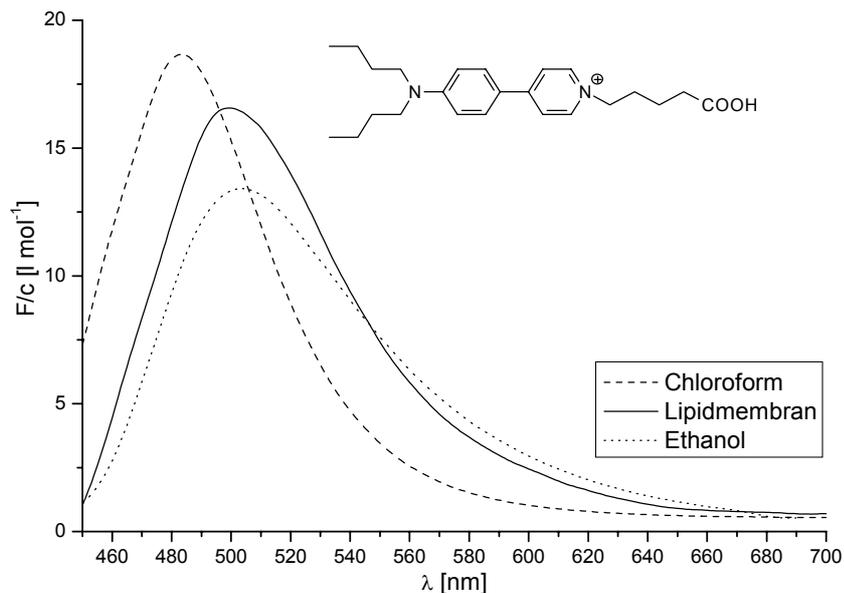


Abbildung 63: Fluoreszenzspektren von Di-4-APP-C₄COOH in Chloroform, Ethanol und Lipid-Vesikeln ($\lambda_{\text{Ex}} = 420 \text{ nm}$; auf die Konzentration normiert).

Ebenso gleichen die Spektren der in Lipidmembran eingelagerten Farbstoffe denen der in polaren Lösungsmitteln und genauso wie die Styrylfarbstoffe zeigen sie dort aber eine höhere Quantenausbeute. Die Steigerung der Quantenausbeute in Lipidmembran ist aber weniger stark ausgeprägt.

Wie in Abbildung 61 auf Seite 69 dargestellt, setzen sich die Absorptionsspektren der Bichromophoren aus denen der Einzelchromophore zusammen. Um Fluoreszenz anzuregen, kann man nun in den Absorptionbereich des APP-Chromophors (Absorber) oder den des ASP-Chromophors (Emitter) einstrahlen. In Abbildung 64 sind die Fluoreszenzspektren von Bichromophor 4/4/4/4 mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{Ex}} = 420 \text{ nm}$ und 500 nm in Ethanol, Chloroform und in Lipidmembran angegeben. Eine Anregung bei $\lambda_{\text{Ex}} = 420 \text{ nm}$ ergibt eine Fluoreszenzbande mit einem Maximum um 600 nm . Dies spricht für einen gut funktionierenden FRET, bei dem die Anregungsenergie vom Absorber- (APP) auf den Emitterteil (ASP) des Bichromophors übertragen wird. Aus Abbildung 61 wird aber auch deutlich, daß auch bei einer möglichst kurzwelligen Anregung im Bereich von 400 nm eine direkte Anregung des Emitters in geringem Maße nicht auszuschließen ist.

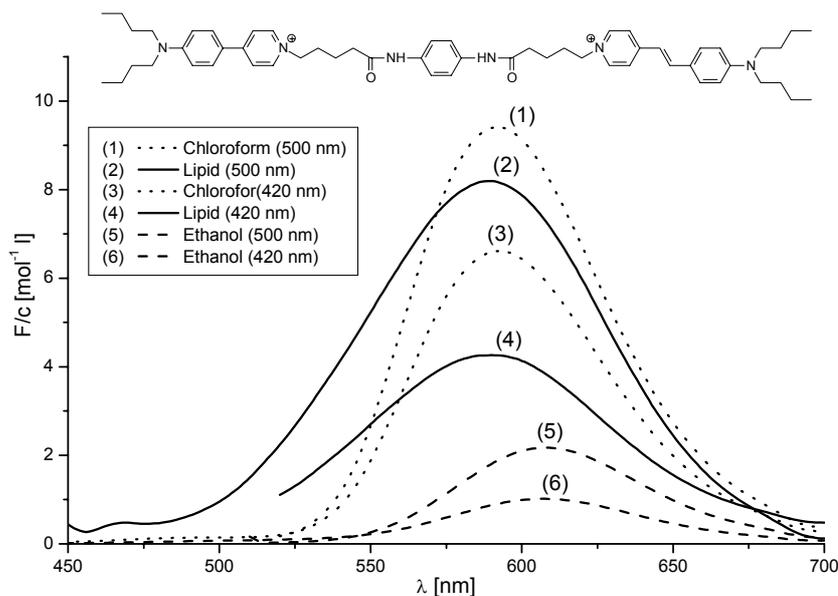


Abbildung 64: auf die Konzentration normierte Fluoreszenzspektren von Bichromophor 4/4/4 in Chloroform, Ethanol und Lipid-Vesikeln, angeregt bei 420 oder 500 nm. Die Legende ist nach abnehmender Größe des Fluoreszenzmaximums geordnet.

Ganz wie bei den Einzelchromophoren zeigt auch der Bichromophor positive Solvatochromie, steigt seine Fluoreszenzquantenausbeute in Lösungsmitteln mit abnehmender Polarität an und weist er das gleiche Verhalten in Lipid-Vesikeln auf. In Wasser ist auch seine Fluoreszenz praktisch gelöscht. Bei direkter Anregung des Emitterteils ist die Fluoreszenzquantenausbeute naturgemäß größer. Mißt man die Emissionsspektren des Bichromophors in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge, so erhält man die in Abbildung 65 und Abbildung 66 gezeigten Darstellungen. Die 3-dimensionale Auftragung zeigt zwei Maxima. In der Konturdarstellung sind diese Maxima einer Anregung von 410 und 470 nm und einem identischen Emissionsmaximum von 588 nm zuzuordnen. Dies spricht für einen vollständigen FRET, da sowohl bei direkter, wie indirekter Anregung, das gleich Emissionsmaximum im Bereich der Fluoreszenz des Emitters erhalten wird. Legt man aber die Schnitte der Emissionsspektren bei 410 und 470 nm übereinander (Abbildung 67), so ist erkennbar, daß die durch indirekte Anregung bei 410 nm erhaltene Bande breiter ausgeprägt ist und man daher annehmen muß, daß sich die durch indirekte Anregung erhaltene Emissionsbande aus den Emissionen des Absorbers und des Emitters zusammensetzt. Wenn man für diese Banden die Maxima der Fluoreszenzen der Einzelchromophore annimmt, so erhält man die in Abbildung 68 dargestellten Banden, deren Summe die registrierte Fluoreszenzbande des Bichromophors bei indirekter Anregung gut wiedergibt.

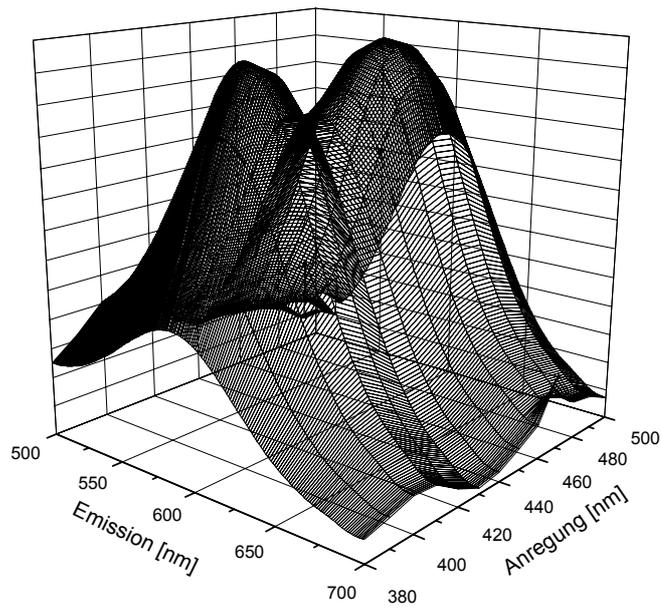


Abbildung 65: 3D-Plot der Emissionsspektren von Bichromophor 4/4/4/4 in Ethanol in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge.

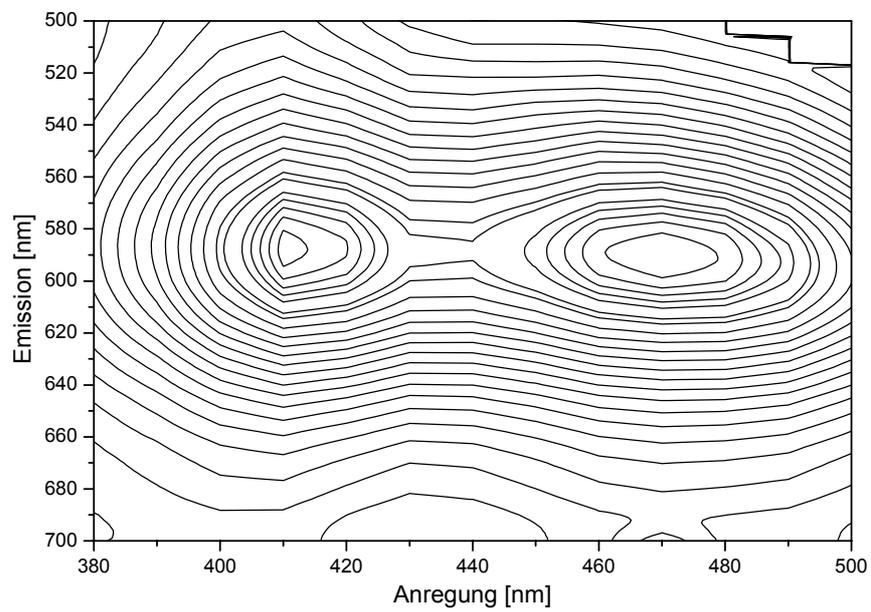


Abbildung 66: 2D-Plot der Emissionsspektren von Bichromophor 4/4/4/4 in Ethanol in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge.

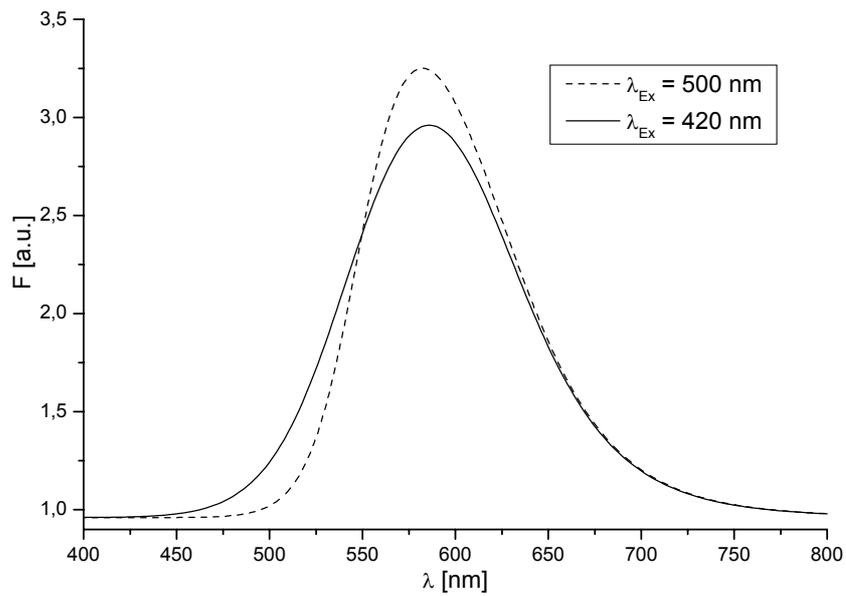


Abbildung 67: Vergleich der Emissionsbanden von Bichromophor 4/4/4/4 nach Anregung bei 420 nm (durchgezogene Linie) und 500 nm (gestrichelte Linie)

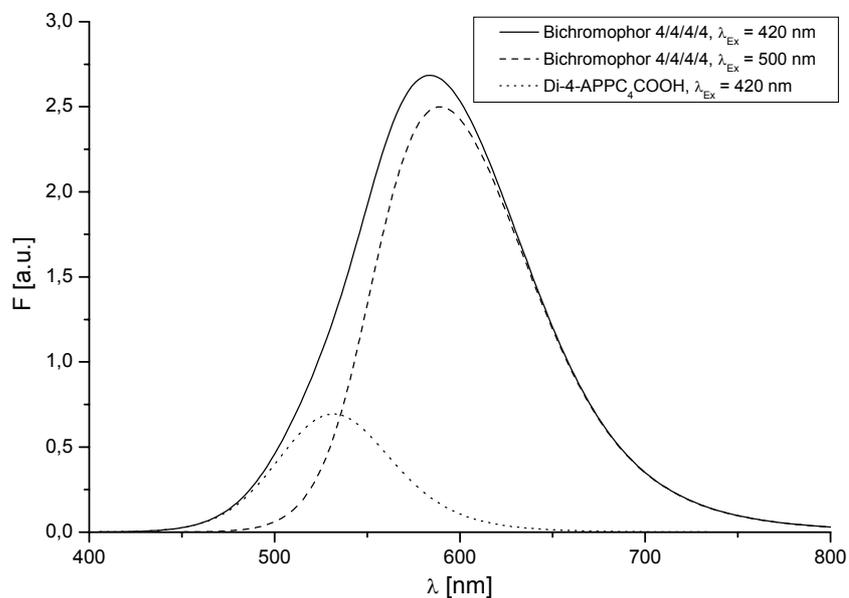


Abbildung 68: Emissionsbande von Bichromophor 4/4/4/4 nach Anregung bei 420 nm (durchgezogene Linie). Die gestrichelten Banden stellen die Emission des Bichromophors 4/4/4/4 nach Anregung bei 500 nm und die Emission des Monochromophors di-4-APPC₄COOH dar. Die Banden sind so gefittet, daß ihre Summe die Emissionsbande des indirekt angeregten Bichromophors ergibt.

Der FRET ist also nicht vollständig und das registrierte Signal bei indirekter Anregung setzt sich aus der direkt angeregten Emission des Absorbers und der des Emitters nach erfolgtem FRET zusammen. Dies und die Tatsache, daß eine direkte Anregung des Emitters auch bei 420 nm nicht auszuschließen ist, muß bei der Interpretation der Ergebnisse der Untersuchungen zur Potentialsensitivität der Bichromophore berücksichtigt werden.

Um auszuschließen, daß ein intermolekularer FRET stattfindet, müssen die Lösungen ausreichend verdünnt sein. Von Schneider wurden an Bichromophoren mit ASP-Teilchromophor Untersuchungen angestellt, nach denen bei Konzentrationen bis 5 μM kein intermolekularer FRET nachzuweisen ist [77]. Sämtliche Messungen werden demzufolge unterhalb dieser Konzentration durchgeführt.

5.2 Fluoreszenzquantenausbeuten

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

$$\Phi = \frac{\text{Zahl emittierter Photonen}}{\text{Zahl absorbierter Photonen}} = \Phi_f + \Phi_p \quad \text{Gleichung 5}$$

Die absolute Bestimmung von Fluoreszenzquantenausbeuten stellt hohe Ansprüche an die apparative Ausstattung, ist aufwendig und zeitraubend. Es gibt aber relative Meßmethoden, bei denen eine Standardsubstanz bekannter Fluoreszenzquantenausbeute mit der zu messenden Substanz unter analogen Meßbedingungen verglichen wird. Bei Demas und Crosby [114] sind verschiedene Methoden zur Bestimmung der Quantenausbeute beschrieben. Sehr wichtig ist dabei immer die Linearität des Fluoreszenzsignals. Oberhalb einer optischen Dichte von ca. $A = 0.05$ zeigen Fluorophore ausnahmslos eine starke Nichtlinearität von Absorption und Fluoreszenz. Daher muß die Messung mit optisch verdünnten Lösungen durchgeführt werden, bei denen die Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes gegeben ist.

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

Gleichung 6 mit: A = Absorbanz, I_0 = Intensität des einfallenden Lichtstrahls, I = Intensität des austretenden Lichtstrahls, ε = molarer dekadischer Extinktionskoeffizient, c = Konzentration der Probe (mol/l), d = Schichtdicke (cm).

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

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

Gleichung 7 mit Φ = Quantenausbeute, A = Absorbanz bei der Anregungswellenlänge, I = Intensität des Anregungslichts, n = Brechungsindex, D = integrale Fluoreszenz des korrigierten Emissionsspektrums, r = Referenzsubstanz, x = unbekannte Substanz.

Man nimmt also für die Referenzsubstanz (Index r) und zu untersuchende Substanz (Index x) ein Absorptionsspektrum und ein korrigiertes Fluoreszenzemissionsspektrum auf und bestimmt jeweils die Absorbanz A der Anregungswellenlänge und das Integral D der Fluoreszenzemission. Mit der bekannten Quantenausbeute Φ_r der Referenzsubstanz läßt sich die unbekannte Größe der Substanz x berechnen. Zwei weitere Korrekturterme ergeben sich, wenn für unbekannte und Referenzsubstanz in unterschiedlichen Lösungsmitteln gemessen und wenn bei verschiedenen Wellenlängen angeregt wird. Im ersten Fall gehen die Quadrate der Brechungsindizes n der Lösungsmittel ein, im zweiten die Intensitäten I der Anregungswellenlängen. Beides kann man umgehen, indem man eine Referenzsubstanz wählt, die im gleichen Lösungsmittel wie die unbekannte löslich ist und eine ähnliche Lage der Absorptionsbande hat. Dann können beide Substanzen bei gleicher Wellenlänge angeregt und die Intensitäten näherungsweise gleich gesetzt werden. Folgende Voraussetzungen müssen gegeben sein, damit bei dieser relativen Methode brauchbare Ergebnisse erhalten werden:

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

Wenn man die Fluoreszenzquantenausbeuten von in Lipidmembranen eingelagerten Bichromophoren bestimmen will, hat man das Problem einer großen Meßunsicherheit durch wellenlängenabhängiges Streulicht. Auch bei augenscheinlich klaren Lösungen kann es zu Streuung kommen, die die Messung verfälscht und den Spektren einen Untergrund gibt. Da der Untergrund bei solchen Messungen von der Wellenlänge abhängig ist, ist er nicht einfach zu eliminieren. Zudem kann es aufgrund der Einlagerung in die Membran zu lokalen Konzentrationen kommen, die über dem Linearitätsbereich liegen. Des weiteren ergeben verdünnte Lösungen mit einer Absorption kleiner 0.05 in Lipidmembran oft Spektren mit einem ungünstigen Signal-Rausch-Verhältnis und sind daher schlecht auszuwerten. Wie von Litterscheid [115] gezeigt wurde, läßt sich durch das im Folgenden beschriebene Verfahren der Untergrund eliminieren und die Quanten-

ausbeuten von Bichromophoren auch mit höher konzentrierten Lösungen bestimmen. Im Wesentlichen ersetzt man die Einmalmessung der Absorbanz und der integralen Fluoreszenz durch eine Größe, die aus mehreren konzentrationsabhängigen Messungen besteht und so die Möglichkeit zur Eliminierung der Streustrahlung gegeben ist. Man legt eine Vesikelsuspension in Pufferlösung vor und gibt mehrmals Farbstofflösung hinzu. Sobald nach vollständiger Einlagerung ein konstantes Fluoreszenzsignal erhalten wird, nimmt man jeweils die Fluoreszenzspektren bei 490 nm und bei 600 nm Anregungswellenlänge und das Absorptionsspektrum auf. Aus den korrigierten Fluoreszenzspektren ermittelt man die integralen Fluoreszenzen und trägt diese gegen die Farbstoffzugabe auf. Hierbei ist ein linearer Anstieg der Fluoreszenz zu erwarten, sofern intermolekularer Energietransfer und allgemein Reabsorptionsphänomene auszuschließen ist. Die Linearität belegt somit ausreichend verdünnte Lösungen. Genauso verfährt man mit den Absorbanzen bei den entsprechenden Fluoreszenzanregungswellenlängen. Auch hier ergeben sich Steigungen, die der Absorbanz proportional sind und die durch einen linearen Zusammenhang zwischen Absorbanz und Farbstoffzugabe (Konzentration) die Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes beweisen. Da es sich um eine Relativmessung handelt, kann gegen Luft als Standard gemessen werden. Die erhaltenen Geraden der Auftragung Absorbanz gegen Farbstoffzugabe sind dann parallel verschoben, haben aber die gleiche Steigung. Die Messungen wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt (Präparation und Konzentration der Lösungen in Kapitel 7.2):

- Vorlage: 30 μ l Kaliumvesikel-Suspension in 2.5 ml Natriumpuffer
- Zugabe: dreimal 10 μ l ethanolische Farbstofflösung
- Anregungswellenlängen: 420 nm und 500 nm
- Absorbanz: gemessen bei gleichen Wellenlängen

Als Referenzsubstanz für den ASP-Teilchromophor wird die Verbindung *N,N*-Dibutyl-Aminostyrylpyridiniumpropionsäurebromid (Versuch 13.19) und für den APP-Teilchromophor das *N,N*-Dibutyl-Aminophenylpyridiniumbutylsulfonat verwendet. Die Fluoreszenzquantenausbeuten für beide Verbindungen sind literaturbekannt:

- Di-4-APP-C₄SO₃: $\Phi = 0.019$ (in Lecithin) [46]
- Di-4-ASP-C₂COOH: $\Phi = 0.20$ (in Vesikeln) [43]

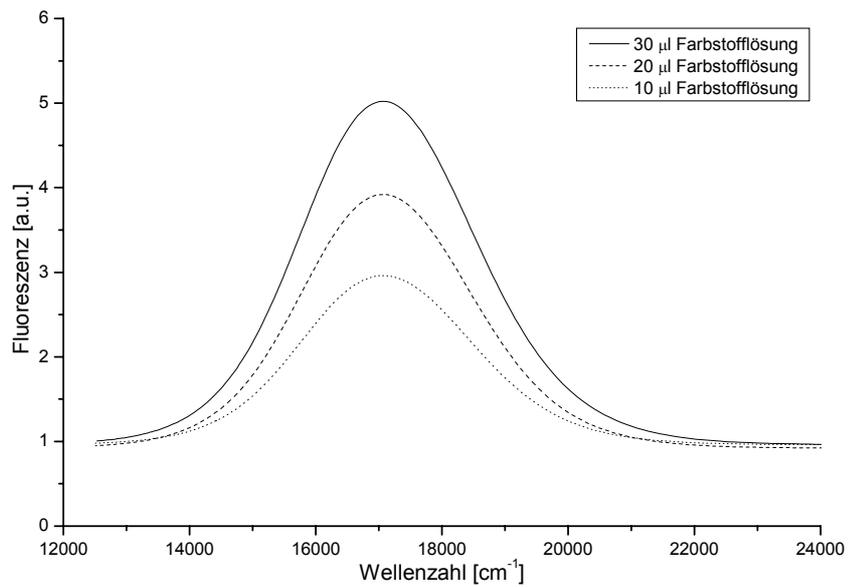


Abbildung 69: Fluoreszenzspektren von 4/4/4 nach Zugabe von jeweils 10 µl Farbstofflösung; Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{Ex}} = 420 \text{ nm}$

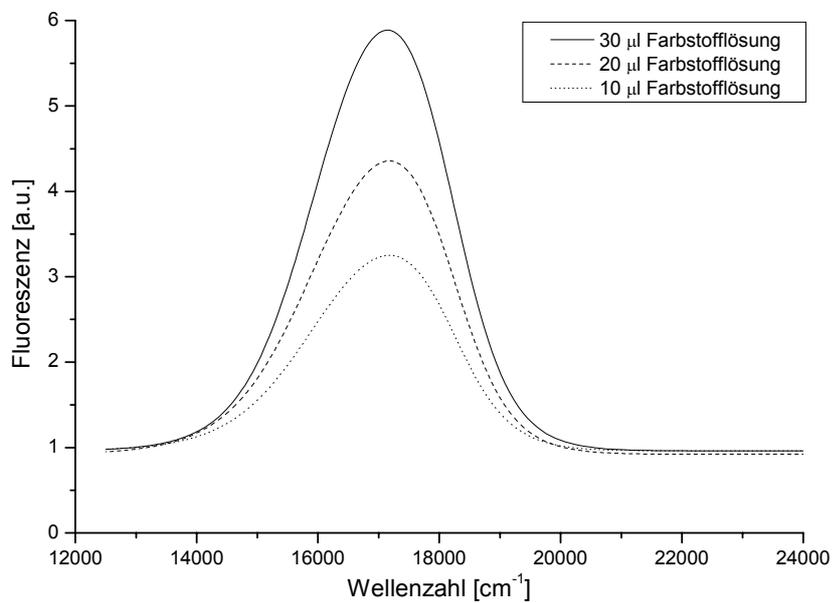


Abbildung 70: Fluoreszenzspektren von 4/4/4 nach Zugabe von jeweils 10 µl Farbstofflösung; Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{Ex}} = 500 \text{ nm}$

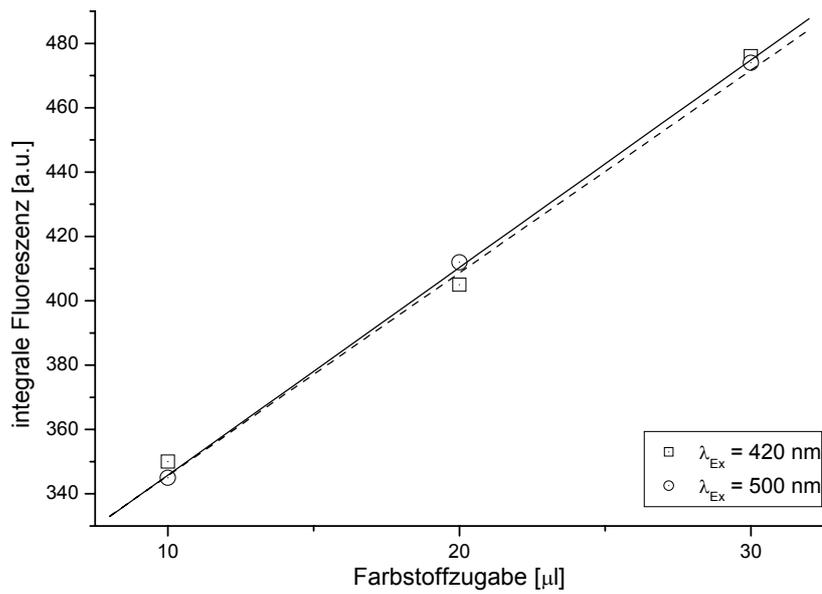


Abbildung 71: integrale Fluoreszenzen des Bichromophors 4/4/4 mit Anregung bei 420 und 500 nm in Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration

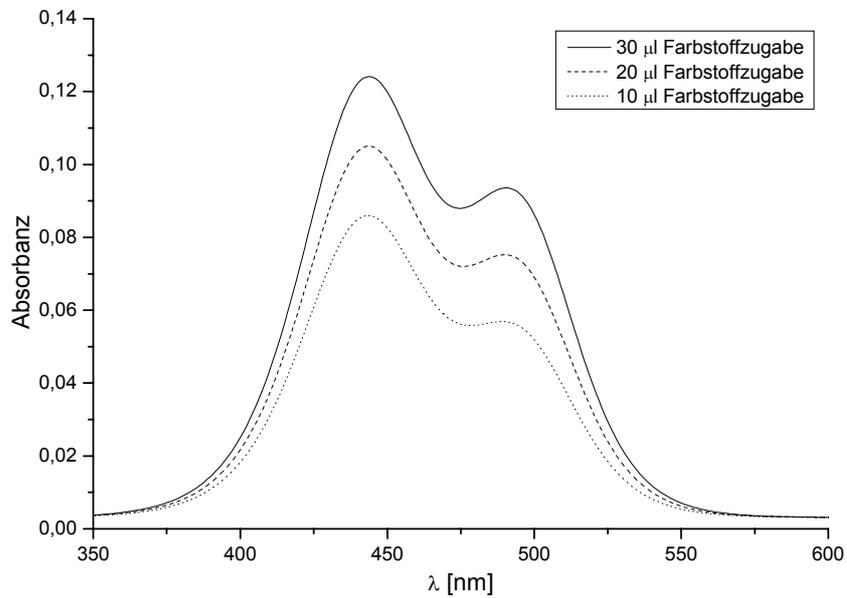


Abbildung 72: Absorptionsspektren von Bichromophor 4/4/4 nach Zugabe von jeweils 10 μl Farbstofflösung.

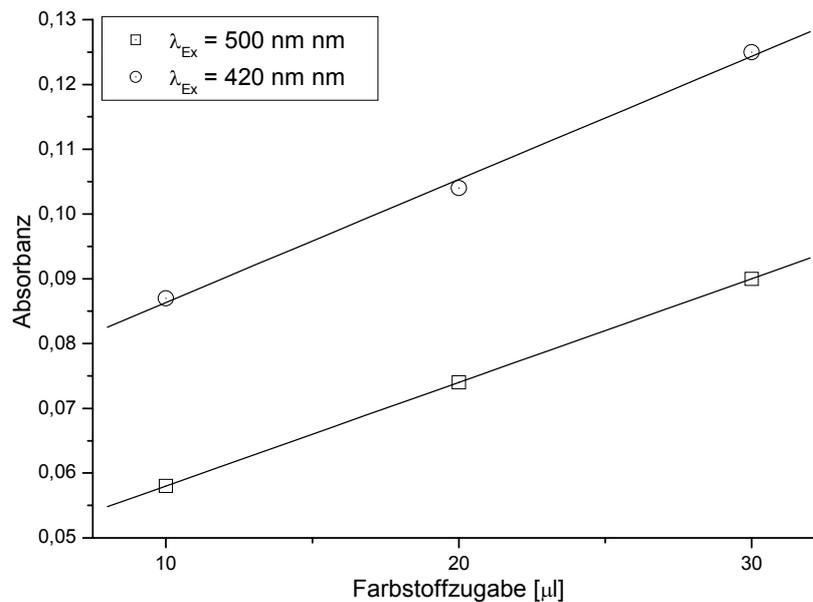


Abbildung 73: Absorbanz von Bichromophor 4/4/4/4 bei 420 und 500 nm in Abhängigkeit von der Farbstoffzugabe

Abbildung 69 zeigt die korrigierten Fluoreszenzspektren von Bichromophor 4/4/4/4 angeregt bei 420 nm und drei verschiedenen Konzentrationen. Aus den Spektren wird die integrale Fluoreszenz bestimmt. Relevant ist nur der (abgebildete) Bereich der Emission des ASP-Teilchromophors. Abbildung 70 zeigt die analogen Messungen mit einer Anregungswellenlänge von 500 nm. Abbildung 71 ist die Auftragung der ermittelten integralen Fluoreszenzen gegen die Farbstoffmenge. Es zeigt sich ein guter linearer Zusammenhang.

Die beschriebene Prozedur wird für eine Auswahl von Bichromophoren, sowie die beiden Referenzsubstanzen analog durchgeführt. Für die Referenzsubstanzen ergeben sich folgende Daten:

- Di-4-APP-C₄SO₃: $m(A)_{420} = 0.0192$
 $m(D)_{420} = 6.31$
- Di-4-ASP-C₂COOH: $m(A)_{420} = 0.0161$
 $m(D)_{420} = 6.45$

Die Quantenausbeuten der Fluoreszenz nach Anregung bei 420 und 500 nm ergeben sich dann gemäß Gleichung 7 und den Daten für die Referenzsubstanzen aus den folgenden Formeln:

$$\Phi_{420} = 0.019 \cdot \frac{0.0192}{m(A)_{420}} \cdot \frac{m(D)_{420}}{6.31} \quad \text{Gleichung 8}$$

$$\Phi_{500} = 0.2 \cdot \frac{0.0161}{m(A)_{500}} \cdot \frac{m(D)_{500}}{6.45} \quad \text{Gleichung 9}$$

In Abbildung 74 und Abbildung 75 sind die aus diesen Gleichungen berechneten Fluoreszenzquantenausbeuten für alle Bichromophore des Typs 4/x/x/4 dargestellt, angeregt bei 420 bzw. 500 nm.

Bei den Messungen zeigt sich keine signifikante Varianz der Fluoreszenzquantenausbeuten in Abhängigkeit von der N-Alkylkettenlänge der Teilchromophore. Die N-Alkylkettenlänge wirkt sich auf die Membranaffinität und somit auf die Einlagerungsgeschwindigkeit aus, zeigt aber keinen Effekt im Bezug auf die Quantenausbeute. Die Abhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute von der Spacerkettenlänge wird daher beispielhaft für die Bichromophore, deren Teilchromophore jeweils mit Butylketten N-alkyliert sind dargestellt.

Generell gilt der Trend, daß mit wachsender Länge der gesamten Spacerkette, eine größere Quantenausbeute ermöglicht wird. Dies gilt sowohl für die direkte Anregung des ASP-Teilchromophors bei 500 nm, als auch für die indirekte Anregung über den APP-Teilchromophor bei 420 nm.

Sehr deutlich wird aber der Unterschied von direkter zu indirekter Anregung bei der Betrachtung der Änderungen der Fluoreszenzquantenausbeute mit Variation der Spacerkettenlänge nur eines Teilchromophors. Im Falle einer direkten Anregung des ASP-Teilchromophors (Abbildung 75) steigt bei gleicher Kettenlänge des APP-Teilchromophors die Fluoreszenzquantenausbeute mit wachsender Kettenlänge des ASP-Teilchromophors stetig an. Umgekehrt hat aber eine Änderung der Länge der Spacerkette auf Seiten des APP-Teilchromophors praktisch keinen Einfluß auf die Fluoreszenzquantenausbeute.

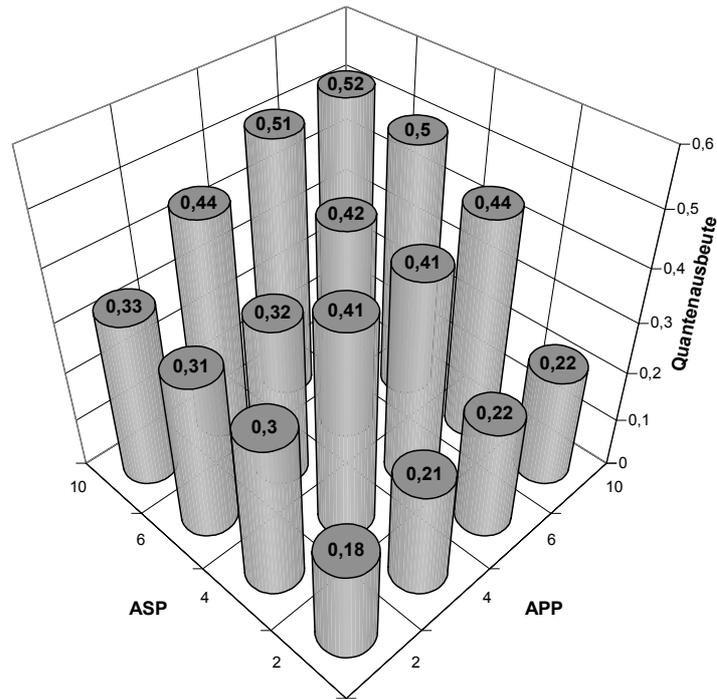


Abbildung 74: Fluoreszenzquantenausbeuten der Bichromophore in Abhängigkeit von der Spacerkettenlänge; Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{Ex}} = 420 \text{ nm}$

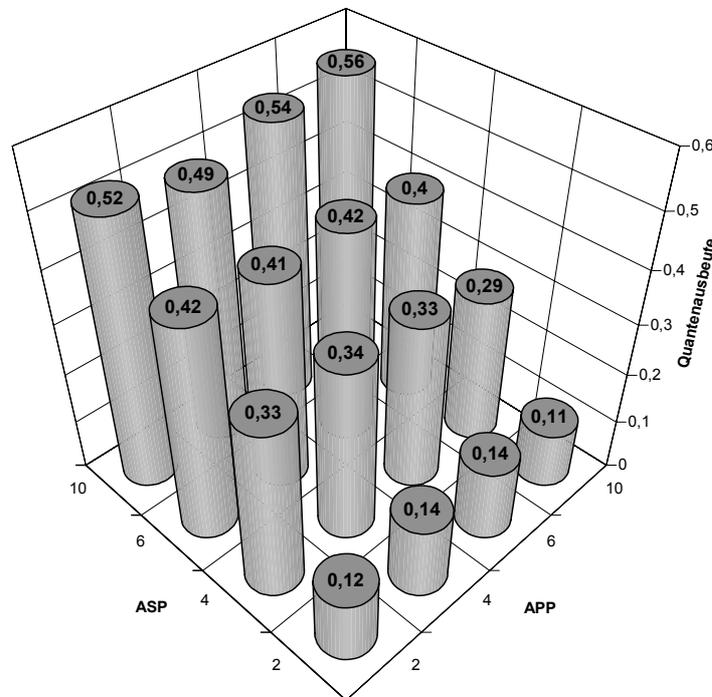


Abbildung 75: Fluoreszenzquantenausbeute der Bichromophore in Abhängigkeit von der Spacerkettenlänge; Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{Ex}} = 500 \text{ nm}$

Bei indirekter Anregung über den APP-Teilchromophor (Abbildung 74) ist hingegen deutlich zu erkennen, daß mit Zunahme der Länge der Spacerkette auf Seiten des APP-Teilchromophors, bei gleich bleibender Länge der Spacerkette des ASP-Teilchromophors, eine Zunahme der Fluoreszenzquantenausbeute erfolgt. Ebenso wie auch bei direkter Anregung steigert sich die Fluoreszenzquantenausbeute mit wachsender Länge der Spacerkette auf Seiten des ASP-Teilchromophors, bei gleich bleibender Länge des APP-Teilchromophors. Generell weist ein Bichromophor bei indirekter Anregung eine größere Quantenausbeute auf, als bei direkter Anregung. Dies ist plausibel, wenn man annimmt, daß sich die gemessene Quantenausbeute aus den Quantenausbeuten der Fluoreszenzen der einzelnen Prozesse der direkten Anregung des Emitters bei 420 nm, der Anregung über den FRET und der Fluoreszenz des Absorbers zusammensetzt.

Durch Anregung bei 500 nm fallen die beiden letztgenannten Prozesse weg und die bestimmte Quantenausbeute des Bichromophors ist im Wesentlichen durch das Verhalten des ASP-Teilchromophors bestimmt und proportional zur Quantenausbeute des ASP-Chromophors. Die Meßergebnisse zeigen, daß längere Spacerketten eine bessere Einlagerung in für die Fluoreszenz günstigere Bereiche der Membran erlauben, was größere Quantenausbeuten bewirkt. Daß dabei die Länge der Spacerkette des APP-Teilchromophors keine Rolle spielt, zeigt, daß dieser Teil zusammen mit dem 1,4-Phenylendiamin nicht mit dem ASP-Teilchromophor in die Membran einlagert. Aufgrund der hohen Membranaffinität der APP-Farbstoffe und der Abhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute bei indirekter Anregung von der Länge der Spacerkette des APP-Teilchromophors, liegt nahe, daß auch der Absorber des Bichromophors in die Membran einlagert. Auch hier ermöglicht eine gesteigerte Kettenlänge eine günstigere Einlagerung in die Membran mit verbesserter Quantenausbeute der Fluoreszenz und letztlich einem gesteigerten FRET. Das 1,4-Phenylendiamin kommt auf der Membranoberfläche zu liegen, was erklärt, daß die beiden Spacerketten jeweils nur die Eigenschaften des jeweiligen Teilchromophors beeinflussen. Das Einlagerungsverhalten der Einzelchromophore, sowie der Bichromophore wird im Folgenden in Kapitel 5.3.1 näher untersucht.

5.3 Untersuchungen in Membranen

Wie in Kapitel 2.1 ausgeführt, lassen sich aus DOPC-Lipiden (Abbildung 2, Seite 10) mit den verschiedensten Methoden Vesikel (Abbildung 3c, Seite 11) definierter Größe herstellen. Sie bestehen wie lebende Zellen aus einer Lipid-Doppelschicht, die im flüssig-kristallinen Zustand semipermeabel ist und damit wesentliche Eigenschaften echter Biomembranen zeigen [20]. Die Hauptumwandlungstemperatur kristallin/fluid von DOPC-Lipiden beträgt -22 °C . Bei Messungen bei Raumtemperatur befindet sich die Membran also im flüssigkristallinen Zustand.

Von Schmitz wurden eine große Anzahl von Methoden zur Darstellung von unilamellaren Vesikeln auf ihre Anwendbarkeit untersucht [116]. Als geeignet für die in dieser Arbeit gestellten Anforderungen wird die Extrusionsmethode gefunden. Eine genaue Beschreibung der Ausführung dieser Methode ist in Kapitel 7.2 zu finden.

Mit ihrer Hilfe lassen sich Vesikel definierter Größe herstellen, in deren Inneres eine bestimmte Ionensorte eingeschlossen werden kann. Lagert man also z.B. im Vesikelinneren Kaliumsalze ein und gibt sie in ein kaliumfreies Milieu, so wird durch Zugabe eines Kalium-Carriers wie Valinomycin (Abbildung 4, Seite 12) ein Kaliumtransport in Richtung des Konzentrationsgefälles vom Zellinnerem zum Zelläußeren bewirkt. Dies hat eine Ladungstrennung zur Folge, die der Diffusion entgegenwirkt und schließlich zu einem Gleichgewicht mit einem gleich bleibenden Potentialgefälle über die Membran führt. Valinomycin transportiert etwa 10^5 K-Ionen pro Sekunde [117], so daß die Einstellung des Potentials sehr schnell erfolgt.

In die Membran eingelagerte Potentialsonden reagieren auf diese Potentialänderung mit einer Änderung ihres Fluoreszenzsignals. Diese Änderung des Fluoreszenzsignals kann somit als Maß für das bestehende Membranpotential genommen werden.

Für die Messungen werden in einer Fluoreszenzküvette $30\text{ }\mu\text{l}$ Vesikelsuspension und $30\text{ }\mu\text{l}$ Farbstofflösung in $2,5\text{ ml}$ Pufferlösung der entgegengesetzten Ionensorte zusammengegeben. Nachdem sich das Einlagerungsgleichgewicht eingestellt hat, werden $30\text{ }\mu\text{l}$ ethanolischer Valinomycinlösung hinzu gegeben, um ein Potential einzustellen (Zusammensetzung der Lösungen siehe Kapitel 7.2 Seite 118).

Nach Schmitz ergibt eine Extrusion der Vesikelsuspension durch Kernporenmembranen mit 100 nm Durchmesser Vesikel, von denen 75% eine Größe von $88 \pm 38\text{ nm}$ und eine

Konzentration von $8,47 \pm 1,06$ mg/ml besitzen [116]. Mit einer Molmasse von 786,10 g/mol für DOPC entspricht das $10,77 \pm 1,35$ mmol/l. Die ethanolischen Farbstofflösungen werden in Konzentrationen im Bereich von 10^{-5} mol/l angesetzt. Die ethanolische Valinomycinlösung hat eine Konzentration von 10^{-3} mol/l.

Damit ergeben sich aus den angegebenen Volumina in 2,5 ml Puffer folgende Konzentrationen in der Küvette:

- Lipid: $0,13 \cdot 10^{-3}$ mol/l
- Valinomycin: $11,84 \cdot 10^{-3}$ mol/l
- Farbstoff: 10^{-6} mol/l
- Ionenkonzentration: $75 \cdot 10^{-3}$ mol/l

Die Größe des durch den Transport der K-Ionen aufgebauten Membranpotentials V_m läßt sich näherungsweise durch die Nernst'sche Gleichung berechnen:

$$V_m = \frac{2.303 \cdot R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \log \frac{C_a}{C_i}$$

Gleichung 10: V_m = Membranpotential, R = allgemeine Gaskonstante, T = absolute Temperatur, z = Ionenladung, F = Faraday-Konstante, C_a bzw. C_i = Konzentration der betreffenden Ionensorte außerhalb bzw. innerhalb des Vesikels

Nach der Zugabe von Valinomycin entsteht demnach mit den in der Meßsuspension vorliegenden K-Ionenkonzentrationen ($C_a \approx 75$ mM, $C_i \approx 0$ mM) ein Membranpotential von ca. 100 mV.

C. Huang hat die molare Masse eines 25 nm durchmessenden Vesikels mit $2,1 \cdot 10^6$ g/mol bestimmt [118]. Da die verwendeten Vesikel einen 3,52fach größeren Radius haben, muß unter Berücksichtigung der Formel der Oberfläche einer Kugel $O_{Kugel} = 4 \cdot \pi \cdot r^2$ das Molekulargewicht um das 12,39fache erhöht werden. Man erhält somit ein Molekulargewicht von $26,02 \cdot 10^6$ g/mol. Das bedeutet, daß ein Vesikel aus DOPC-Lipiden ($M = 786,1$ g/mol) aus rund 33000 Lipidmolekülen besteht.

Mit einer 10^{-5} molaren Konzentration der Farbstofflösung und einer Lipidkonzentration von 8,47 mg/ml ergibt sich für die Anzahl der Farbstoffmoleküle pro Lipid:

$$\frac{10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}}{8,47 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}} = 0,12 \cdot 10^{-6} \frac{\text{mol}(\text{Farbstoff})}{\text{g}(\text{Lipid})} = \frac{0,12 \cdot 10^{-6} \text{ mol}(\text{Farbstoff})}{1,27 \cdot 10^{-3} \text{ mol}(\text{Lipid})} = 92,81 \cdot 10^{-6} \frac{\text{Farbstoff}}{\text{Lipid}}$$

Damit folgt ein Verhältnis von Farbstoffmolekülen zu Lipidmolekülen von etwa 1:10000 und einer Beladung eines Vesikels mit etwa 3 Farbstoffmolekülen, wenn der Farbstoff vollständig aufgezogen ist. Bezogen auf eine Kugeloberfläche von ca. 30000 nm^2 , ergibt sich pro Farbstoffmolekül eine Fläche von 10000 nm^2 , was einen durchschnittlichen Abstand von 120 nm zum nächsten Molekül ergibt. Damit ist ein intermolekularer Energietransfer auch innerhalb des Vesikels ausgeschlossen, was auch zusätzlich durch die Linearität der konzentrationsabhängigen Messungen der Fluoreszenz in Kapitel 5.2 (Abbildung 71) bestätigt wird.

Im Folgenden wird zunächst das Einlagerungsverhalten der Farbstoffe in die Membran untersucht. Im anschließenden Kapitel dann wird die Reaktion auf Änderungen des Membranpotentials dargestellt.

5.3.1 Einlagerungsverhalten in Vesikel

Gibt man die Lösung eines amphiphilen Farbstoffs zu einer Vesikelsuspension, so beginnt sich dieser in die Membran einzulagern. Da gegenüber dem wässrigen Milieu die Möglichkeiten der Desaktivierung in der Membran geringer sind, zeigen die eingelagerten Farbstoffmoleküle eine gesteigerte Fluoreszenzintensität. Wird die Einlagerungsgeschwindigkeit gleich der Geschwindigkeit des Austritts aus der Membran, so ist das Einlagerungsgleichgewicht erreicht. Die Fluoreszenz strebt gegen einen Grenzwert.

Ein großes Problem bei den in der Vergangenheit dargestellten Bichromophoren, ist die lange Zeit, die benötigt wird, bis sich das Einlagerungsgleichgewicht einstellt. In den Arbeiten von Birnes, Witzak, Reiffers und Schneider waren im Allgemeinen zwischen 40 und 120 Minuten nötig um ein konstantes Meßsignal zu erhalten. In einzelnen Fällen war dies aber auch nach 24 Stunden nicht festzustellen [73,75,76,77]. Dies stellt einen erheblichen Nachteil für eine Anwendung dar, da Sensitivitätsmessungen erst sinnvoll

durchgeführt werden können, wenn das Fluoreszenzsignal konstant ist.

Um das Einlagerungsverhalten für alle in dieser Arbeit untersuchten Farbstoffe zu bestimmen, wurden nach Zugabe des Farbstoffs zu den Vesikeln (Volumina und Konzentrationen siehe Seite 89) in der Pufferlösung zeitabhängige Fluoreszenzspektren bei fester Anregungs- und Emissionswellenlänge aufgenommen. Für die Untersuchung der Aminophenylpyridiniumfarbstoffe (Abbildung 76) wird bei 400 nm eingestrahlt und die Emission bei 500 nm beobachtet. Man sieht sehr schön, wie die Fluoreszenz mit beginnender Einlagerung ansteigt und nach etwa 10 Minuten gegen einen Grenzwert strebt. Dieses Verhalten deckt sich mit den in der Literatur beschriebenen Befunden.

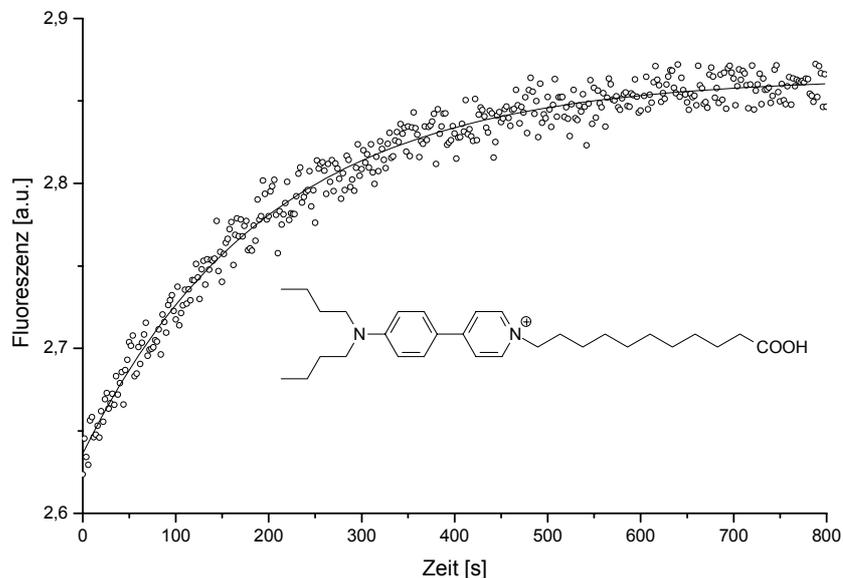


Abbildung 76: Aufziehkinetik von Di-4-APP-C₁₀COOH; $\lambda_{\text{Ex}} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 500 \text{ nm}$

Ein praktisch gleiches Verhalten zeigen die Aminostyrylpyridiniumfarbstoffe bei Einlagerung in Vesikelmembranen (Abbildung 77). Angeregt wird der Farbstoff bei 500 nm und die Fluoreszenz bei 600 nm beobachtet. Bereits nach etwa 7 Minuten bleibt das Fluoreszenz im Rahmen der Signalschwankungen konstant und zeigt das Erreichen des Einlagerungsgleichgewichtes an.

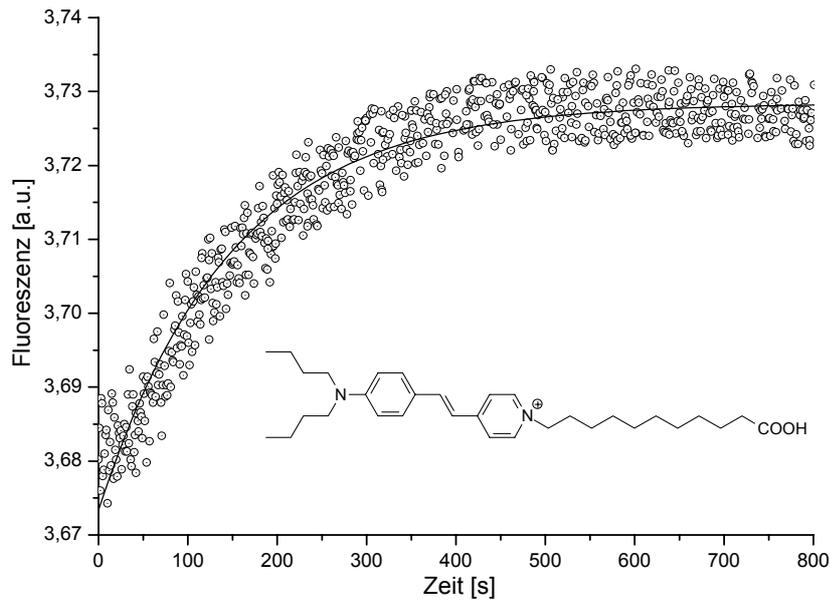


Abbildung 77: Aufziehkinetik von Di-4-ASP-C₁₀COOH; $\lambda_{\text{Ex}} = 500 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 600 \text{ nm}$

Gibt man die Lösung eines Bichromophors in Vesikelsuspension, so können sich prinzipiell entweder der APP-Teil oder der ASP-Teil oder beide Teilchromophore gleichzeitig in die Membran des Vesikels einlagern. Je nachdem sollte ein unterschiedliches Fluoreszenzverhalten nach Anregung bei 400 oder 500 nm, sowie bei Beobachtung der Emission bei 500 oder 600 nm zu erwarten sein.

Lagert sich der APP-Teil als Absorber alleine in die Membran ein, so kann man auch hier zwei Fälle unterscheiden. Regt man den eingelagerten Chromophor an und findet FRET statt, sollte die Fluoreszenz der in der wässrigen Phase verbleibende Emitter gequencht werden und keine oder höchstens sehr kleine Signale bei 600 nm zu beobachten sein. Findet kein FRET statt, wird der angeregte APP-Teilchromophor in der Membran in hohem Maße durch Fluoreszenz relaxieren und es treten entsprechend starke Signale bei 500 nm auf.

Ist umgekehrt nur der ASP-Teilchromophor in die Membran eingelagert, ist in keinem Fall die Fluoreszenz des APP-Teilchromophors zu erwarten. Da auch kein FRET von dem in der Wasserphase verbliebenen Absorber aus stattfinden kann, kann die Fluoreszenz des Emitters nur direkt angeregt werden.

Lagern sich beide Teilchromophore in die Membran ein, so sind auch beide prinzipiell zu Fluoreszenz befähigt. Regt man bei 400 nm den Absorber des Bichromophors an, so

wird bei stattfindendem FRET die Fluoreszenz des Absorbers ganz oder teilweise gequencht und die Fluoreszenz des Emitters ist bei 600 nm zu beobachten. Ist dagegen kein FRET möglich, so tritt allein die Fluoreszenz des Absorbers im Bereich von 500 nm auf.

Abbildung 78 stellt das Einlagerungsverhalten des Bichromophors 1/10/10/1 in Vesikel dar. Dabei wird der Bichromophor sowohl im Bereich des Emitters (420 nm), als auch im Bereich des Absorbers (500 nm) angeregt. Das Fluoreszenzsignal bei 600 nm wird beobachtet und gegen die Zeit aufgetragen.

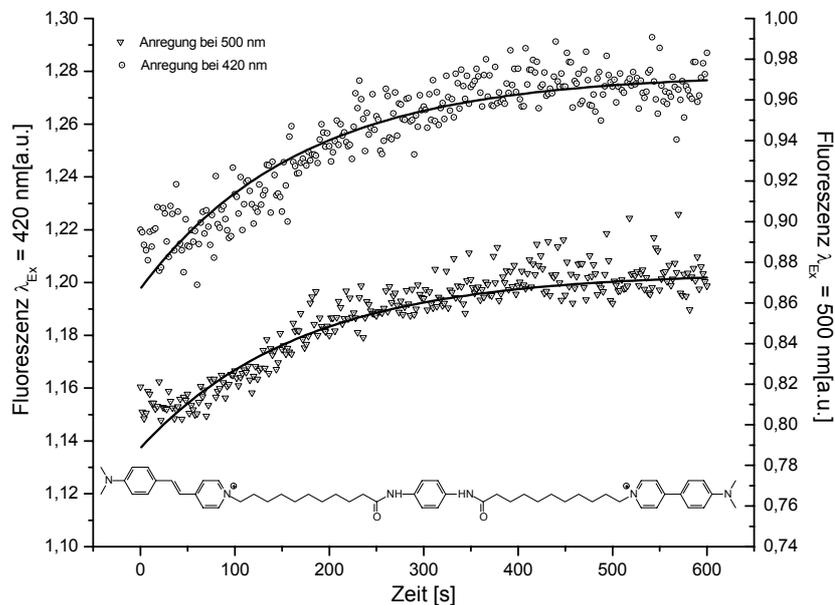


Abbildung 78: Zeitabhängige Fluoreszenzspektren von Bichromophor 1/10/10/1 in Na-Vesikel

Es zeigt sich das prinzipiell gleiche Verhalten, wie bei den Einzelchromophoren. Sowohl bei direkter, wie auch bei indirekter Anregung steigt die Intensität der Emission bei 600 nm an und strebt nach etwa 10 Minuten gegen einen Grenzwert. Somit muß der ASP-Teilchromophor in die Membran eingelagert sein und es findet effektiver FRET statt. Auch der APP-Teilchromophor muß eingelagert sein, da gemäß der Förster-Gleichung (Gleichung 4) aus der Wasserphase kein FRET stattfinden kann.

Untersucht man Bichromophore mit kürzeren Spacerkettenlängen, so zeigt sich eine interessante Veränderung gegenüber dem bislang beobachteten Einlagerungsverhalten. Beispielhaft ist dies für den Bichromophor 4/4/4/4 in Abbildung 79 dargestellt.

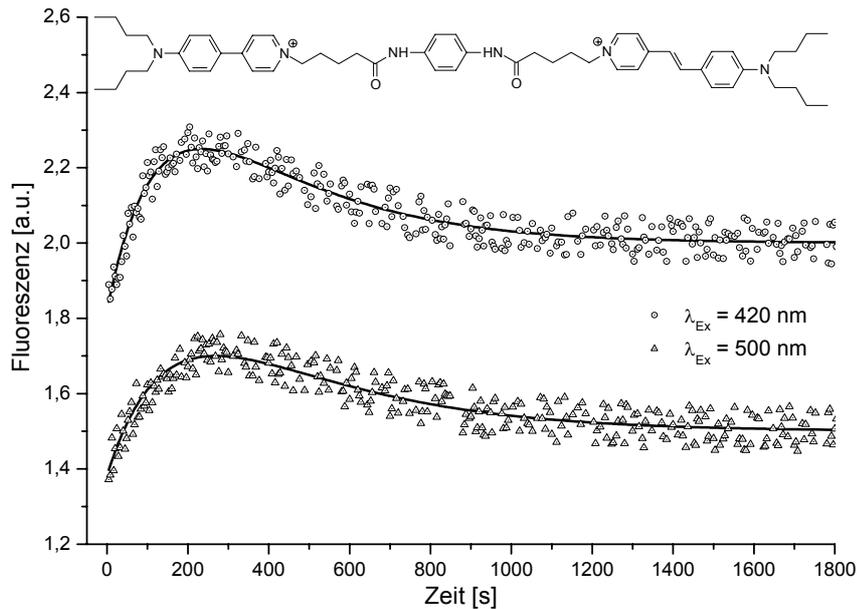


Abbildung 79: Einlagerungsverhalten von Bichromophor 4/4/4/4 in Vesikel

Zunächst registriert man nach Zugabe der Farbstofflösung eine Zunahme der Emission, die aber nach etwa 5 Minuten ein Maximum durchläuft und dann nach weiteren 15 Minuten einem Grenzwert entgegenstrebt. Dieses Verhalten ist sowohl bei direkter, wie auch bei indirekter Anregung zu beobachten.

Der Anstieg der Fluoreszenz bei 600 nm spricht für eine Einlagerung des ASP-Teilchromophors in die Membran. Die anschließende Abnahme wiederum für eine Verlagerung des Teilchromophors in einen für Emission ungünstigeren Bereich in der Membran bzw. des Grenzbereichs Membran/wässrigem Phase. Dies kann mit der folgenden Einlagerung des zweiten Teilchromophors erklärt werden, der eine vergleichbar große Membranaffinität aufweist. Der Bichromophor nimmt somit eine hufeisenförmige Anordnung ein, bei der beide Teilchromophore in die Membran einlagern. Im Falle von kurzen Spacerketten ist jedoch eine optimale Einlagerung für beide Teilchromophore nicht gleichzeitig möglich, was in einer geringeren Fluoreszenzintensität resultiert. Dieses Verhalten ist in Abbildung 81 veranschaulicht. Erst ab einer ausreichenden Spacerkettenlänge ist die vollständige Einlagerung beider Teilchromophore in die Membran mit optimaler Fluoreszenzquantenausbeute möglich. Besonders deutlich wird das bei der Untersuchung der Bichromophore mit den kürzesten Spacerkettenlängen. In Abbildung 80 ist das Einlagerungsverhalten von Bichromophor 2/2/2/2 in Vesikel dargestellt. Wiederum ist der anfängliche Anstieg der Fluoreszenzintensität aufgrund

der Einlagerung des ASP-Teilchromophors zu erkennen, die nach etwa 3 Minuten ein schwach ausgeprägtes Maximum durchläuft und dann beginnt stark abzufallen. Nach etwa 30 Minuten nähert sich die Fluoreszenzintensität einem Grenzwert. Dieser liegt weit unterhalb des zu Beginn der Messung registrierten Wertes.

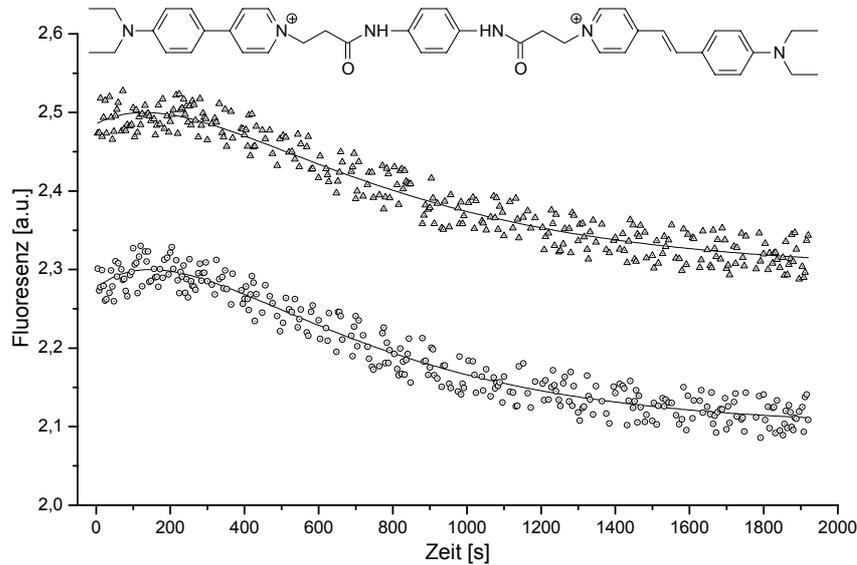


Abbildung 80: Einlagerungsverhalten des Bichromophor 2/2/2/2 in Vesikel

Vergleichende Messungen aller Bichromophore zeigen, daß eine große Gesamtlänge des Spacers allein nicht reicht, sondern es muß eine ausreichende Alkylkettenlänge jeweils auf beiden Seiten des 1,4-Phenylendiamins im Bichromophor gegeben sein, um eine für beide Teilchromophore günstige Einlagerung zu ermöglichen.

Aufgrund dieser und der schon zuvor bei der Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute (Kapitel 5.2) gemachten Befunde kann davon ausgegangen werden, daß beide Teilchromophore in die Membran eintauchen und daß der vergleichsweise starre Bereich des 1,4-Phenylendiamins auf der Membranoberfläche zu liegen kommt (Abbildung 81).

Eine vollständige Einlagerung des Bichromophors in die Membran in gestreckter Weise ist auszuschließen oder zumindest von untergeordneter Bedeutung, da in diesem Fall auch bei Bichromophoren mit kurzen Spacern eine Abnahme der Fluoreszenz in der gefundenen Weise nicht zu erwarten ist.

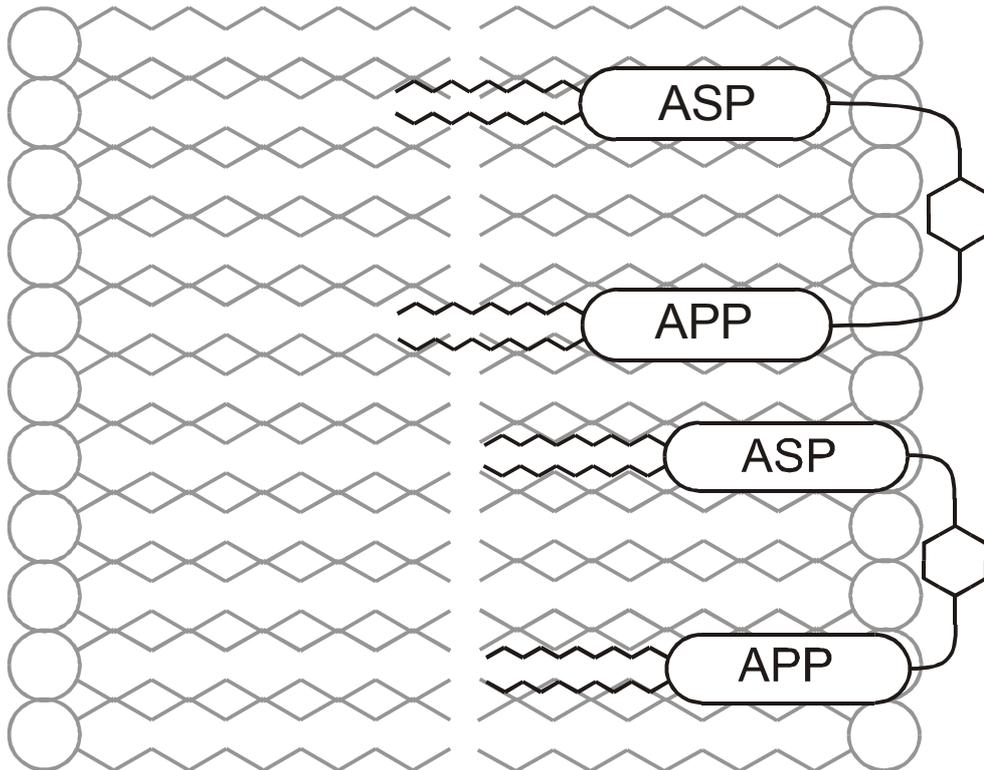


Abbildung 81: Schematische Darstellung der Einlagerung in die Membran von Bichromophoren mit unterschiedlichen Spacerkettenlängen.

5.3.2 Untersuchung der potentialsensitiven Eigenschaften.

Die Grundlagen für potentialsensitive Eigenschaften von Fluoreszenzfarbstoffen wurden in Kapitel 2.2 beschrieben. Neben der Änderung der chemischen Umgebung in Abhängigkeit vom Potential, sind bei den eingesetzten Aminostyryl- und Aminophenylpyridinium-Farbstoffen auch elektrochrome Eigenschaften möglich. Die zu erwartende Änderung der Fluoreszenz bei Änderung des Membranpotentials sind in der schematischen Darstellung von Absorptions- und Fluoreszenzspektrum in Abbildung 82 veranschaulicht.

Im Falle der Verwendung von K-Vesikeln, wird nach Zugabe von Valinomycin das Vesikelinnere an K-Ionen verarmen und sich gegenüber der Vesikelumgebung negativ aufladen. Die Verschiebung der positiven Ladung der Pyridinium-Chromophore bei Anregung erfolgt somit in Richtung des Potentialgefälles, was eine bathochrome Verschiebung im Sinne eines Stark-Effektes (siehe Seite 22) von Absorptions- und Emissionsspektrum zur Folge hat.

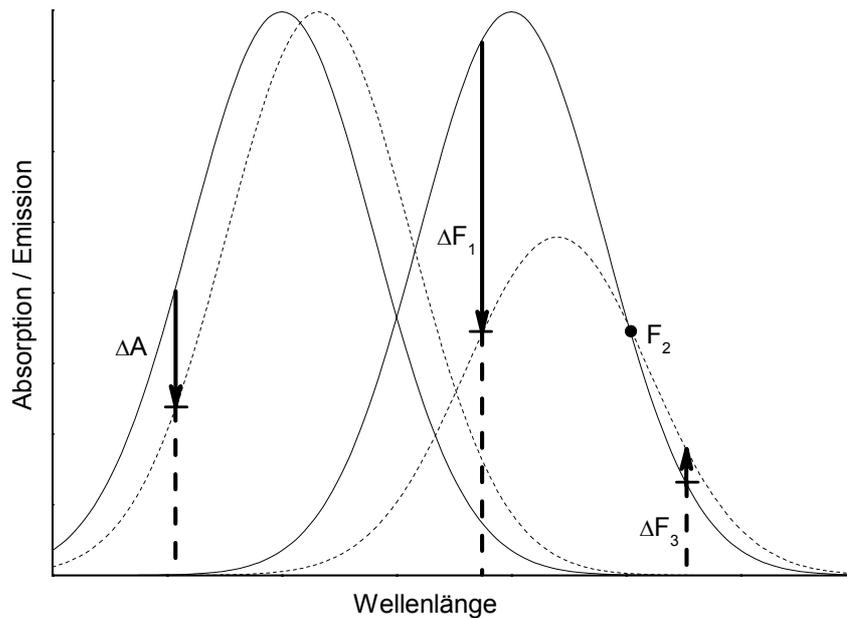


Abbildung 82: Schematische Darstellung zur Erklärung der Potentialsensitivität; durchgezogene Linien: Spektren ohne Membranpotential, gestrichelte Linien: Spektren mit Membranpotential.

Wird in der kurzwelligen Flanke des Absorptionsspektrums angeregt, so bewirkt eine bathochrome Verschiebung eine Verringerung der Absorption ΔA bei dieser Wellenlänge. In dem Schema in Abbildung 82 hat eine geringe Verschiebung der Bande schon einen gut 40 %igen Abfall der Absorption zu Folge. Dies hat wiederum eine entsprechend geringere integrale Fluoreszenz zur Folge. Wird die Emission in der blauen Flanke des Spektrums detektiert, so registriert man bei Potentialänderung eine Abnahme der Fluoreszenzintensität ΔF_1 , die zusätzlich noch durch die bathochrome Verschiebung der Fluoreszenzbande verstärkt wird. In dem gewählten Beispiel macht dies einen Fluoreszenzabfall von über 50 % aus. Daß dies nicht zwangsläufig über den gesamten Bereich des Emissionsspektrums der Fall sein muß, wird ebenfalls aus Abbildung 82 deutlich. Verbunden mit einer bathochromen Verschiebung von Absorption und Fluoreszenz ist es möglich, daß, trotz Abnahme der integralen Fluoreszenz, bei Detektion der Emission in der roten Flanke des Spektrums bei F_2 keine Änderung der Fluoreszenz und im weiter langwelligen Bereich sogar eine Steigerung der Intensität ΔF_3 zu beobachten ist. Die Wahl von Anregungs- und Beobachtungswellenlänge bei der Ermittlung der Potentialsensitivität hat offensichtlich einen erheblichen Einfluß auf die Richtung und Stärke der Änderung des Fluoreszenzsignals. So hat – bei gleicher

Änderung des Membranpotentials – eine Anregung in der roten Flanke des Absorptionsspektrums eine Zunahme der integralen Fluoreszenz zur Folge. Wellenlängen im Bereich des Maximums erfahren eine geringere Änderung der Absorption, im Schnittpunkt der Spektren mit und ohne Membranpotential gar keine. Regt man den Fluorophor in diesem Bereich an, hat man demzufolge nur mit einer geringen bis gar keinen Änderung des Fluoreszenzsignals zu rechnen.

Neben dem elektrochromen Verhalten ist natürlich auch eine Verlagerung des Farbstoffs innerhalb der Membran möglich. Im Falle der negativen Aufladung des Vesikelinneren bei der Verwendung von K-Vesikeln besteht die Tendenz des Farbstoffs aus dem Bereich der polaren Kopfgruppe in Richtung Vesikelinneres gezogen zu werden. Die apolare Umgebung in der Membran wird eine Steigerung der Fluoreszenzintensität zur Folge haben. Zudem kann auch, im Gegensatz zum gegebenen Beispiel in Abbildung 82, das Emissionsspektrum hypsochrom verschoben werden. In welchem Maße diese Verschiebung erfolgt und wie groß die Auswirkung auf Lage und Intensität der Fluoreszenz ist, kann, auch im Anbetracht der teilweise gegenläufigen Effekte, schwer abgeschätzt werden.

Weitet man diese Betrachtungen nun auf bichromophore Systeme aus, so bleiben die Überlegungen für Anregung und Emission dieselben, es muß jedoch zusätzlich die Änderung des FRET mit einbezogen werden. Wie aus Gleichung 2 auf Seite 22 ersichtlich, gehen in den FRET unter anderem ein Orientierungsfaktor, der Abstand von Absorber und Emitter, sowie die Überlappung der Emissionsbande des Absorbers mit der Fluoreszenzbande des Emitters ein. Aus der Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten der Farbstoffe in der Membran in Kapitel 5.2 kann gefolgert werden, daß beide Teilchromophore in vergleichbarer Weise wie auch die Einzelchromophore in der Membran einlagern. Das Ansprechen der Teilchromophore auf Potentialänderungen wird also in guter Näherung aus dem der Einzelchromophore abzuleiten sein. Beim Emissionsspektrum des Aminophenylpyridiniumchromophors, wie auch beim Absorptionsspektrum des Aminostyrylpyridiniumchromophors ist eine gleichsinnige Verschiebung zu erwarten. Die Lage der beiden Banden relativ zueinander verändert sich also nicht oder nur in geringem Maße. Eine Änderung des FRET aufgrund der Änderung der spektralen Überlappung wird demzufolge zu einem großen Teil durch den Abfall der integralen

Fluoreszenz des Absorbers bestimmt. Welchen Beitrag eine Änderung des Orientierungsfaktors hat, ist schwer abzuschätzen. In Anbetracht der Einlagerung der Teilchromophore in die verhältnismäßig rigide Umgebung der Membran, ist jedoch keine große Änderung zu erwarten. Von einer Änderung des Abstands der Chromophore zueinander sind gemäß Gleichung 2 hohe Änderungen der Fluoreszenz zu erwarten. In welchem Maße eine solche Abstandsänderung in der Membran erfolgt und wie groß der daraus resultierende Beitrag zur Änderung des Fluoreszenzsignals ist, kann aber ebenfalls nur schwer vorhergesagt werden.

Bei der Verwendung von Na-Vesikeln ergibt sich sowohl für die Einzel-, wie auch für die Bichromophore ein genau umgekehrtes Verhalten.

Nach der eingangs in Kapitel 5.3 beschriebenen Methode werden die Farbstoffe sowohl in K-, als auch in Na-Vesikel eingelagert und durch Zugabe von Valinomycin ein Potential eingestellt. Die Fluoreszenzspektren werden vor und nach Zugabe von Valinomycin aufgenommen und die absolute Änderung der Fluoreszenzintensität über den Wellenlängenbereich berechnet.

In Abbildung 83 ist dies für Di-4-ASP-C₁₀COOH in K-Vesikeln aufgetragen. Deutlich ist die Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen, die bei 600 nm -30 % beträgt und in der Richtung den Erwartungen entspricht. Auffällig ist jedoch, daß die Fluoreszenz nach Zugabe des Valinomycins praktisch nicht verschoben ist. Einem rein elektrochromen Mechanismus folgend sollte Bathochromie zu erwarten sein.

Wie zuvor ausgeführt, können verschiedene Vorgänge bei Potentialänderungen teilweise gegenläufige Änderungen des Fluoreszenzverhaltens bewirken. Im folgenden werden die zu erwartenden Änderungen und ihre Auswirkung auf die spektralen Eigenschaften des Chromophors tabellarisch zusammengefaßt:

Verschiebung der Ladung im Molekül bei Anregung in Richtung des Potentialgefälles (Stark-Effekt)	Bathochromie ⇨
Abnahme der Absorption durch Anregung in der blauen Flanke und bathochromer Verschiebung der Bande	Hypochromie ⇩
Verlagerung des Chromophors in Richtung des Potentialgefälles in das apolare Vesikelinnere	Hyperchromie ⇧ Hypsochromie ⇐

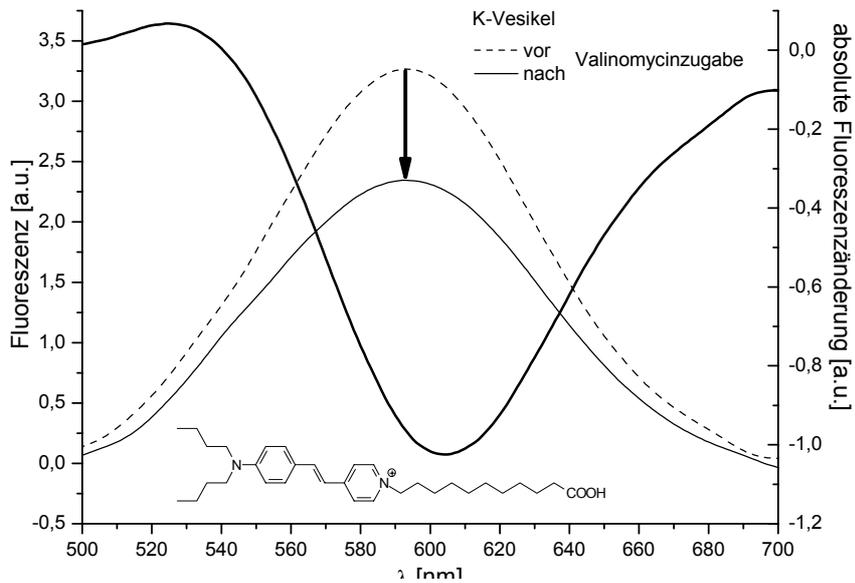


Abbildung 83: Änderung der Fluoreszenzspektren von Di-4-ASP-C₁₀COOH in K-Vesikeln bei Zugabe von Valinomycin. Gestrichelte Linie: vor Valinomycin-Zugabe, durchgezogene Linie: nach Valinomycin-Zugabe. $\lambda_{\text{Ex}} = 490 \text{ nm}$

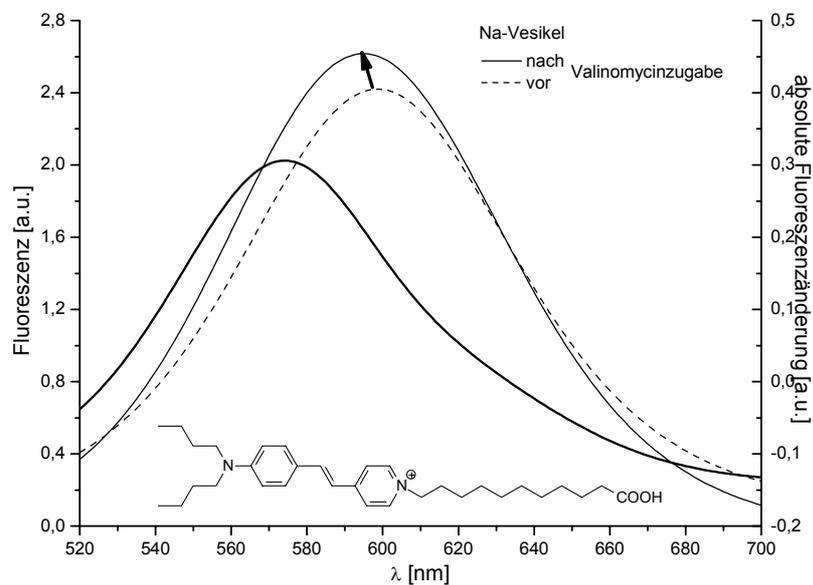


Abbildung 84: Änderung der Fluoreszenzspektren von Di-4-ASP-C₁₀COOH in Na-Vesikeln bei Zugabe von Valinomycin. Gestrichelte Linie: vor Valinomycin-Zugabe, durchgezogene Linie: nach Valinomycin-Zugabe. $\lambda_{\text{Ex}} = 490 \text{ nm}$

Da offensichtlich eine deutliche Abnahme und keine Verschiebung der Fluoreszenz zu beobachten ist, dominiert die Hypochromie und heben sich bathochrome und hypsochrome Verschiebung auf.

Erfolgt das gleiche Experiment mit Na-Vesikeln, so beobachtet man einen Anstieg der Fluoreszenzintensität nach der Erzeugung eines Membranpotentials (Abbildung 84). Die Reaktion auf die Potentialänderung erfolgt also in entgegengesetzter Weise zu den K-Vesikeln und entspricht damit den zu Beginn des Kapitels gemachten Überlegungen. Die Effekte und ihre Auswirkungen auf das spektrale Verhalten des Chromophors lassen sich hier wie folgt zusammenfassen:

Verschiebung der Ladung im Molekül bei Anregung entgegen der Richtung des Potentialgefälles (Stark-Effekt)	Hypsochromie ⇐
Zunahme der Absorption durch Anregung in der blauen Flanke und hypsochromer Verschiebung der Bande	Hyperchromie ↑
Verlagerung des Chromophors in Richtung des Potentialgefälles in den polaren Kopfbereich des Vesikels	Hypochromie ↓ Bathochromie ⇒

Erwartungsgemäß gehen die Effekte in die entgegengesetzte Richtung im Vergleich zum Experiment in K-Vesikeln. In der Summe ergibt sich eine Zunahme der Fluoreszenzintensität, die hyperchromen Effekte dominieren also. Die relative Zunahme ist mit +10 % bei 600 nm vom Betrag her aber wesentlich geringer als die Änderung in K-Vesikeln. Eine Wanderung des Chromophors dem Potentialgefälle folgend, würde eine Einlagerung in den polaren Kopfbereich des Lipids bewirken, zusammen mit einer bathochromen Verschiebung des Spektrums und einem Abfall der Fluoreszenzintensität. Der Beitrag aus der Verschiebung in der Membran zum spektralen Verhalten des Chromophors, kann nur – wie aus Abbildung 84 hervorgeht – minimal sein. Dies ist plausibel, wenn man betrachtet, daß der Farbstoff bereits im Bereich der polaren Kopfgruppe eingelagert ist und wenig Spielraum für eine weitere Verlagerung hat. Aus der Membran wird der Farbstoff nicht herausgezogen, da dies einen starken Abfall der Fluoreszenzintensität zur Folge haben sollte.

Auch die Effekte, die eine Verschiebung der Bande bewirken, heben sich nahezu auf. Das Emissionsspektrum ist nach der Einstellung des Potentials nur leicht hypsochrom verschoben.

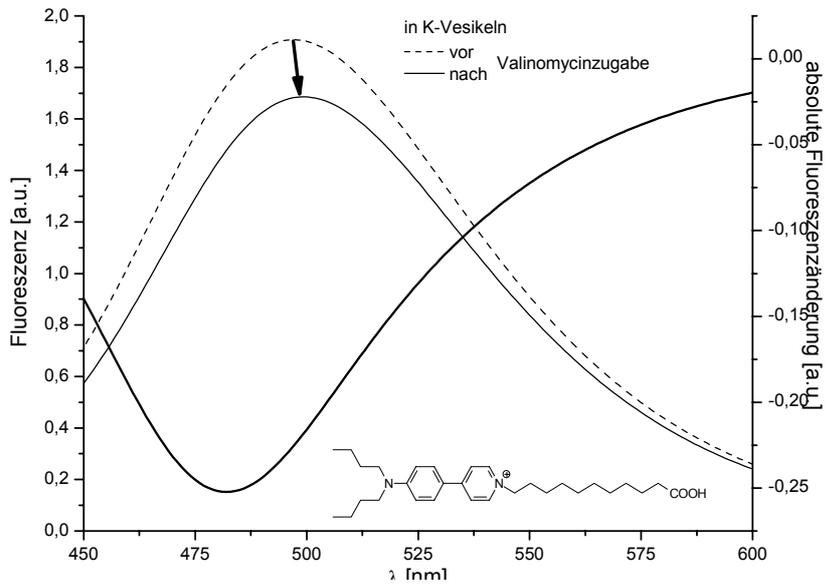


Abbildung 85: Änderung der Fluoreszenzspektren von Di-4-APP-C₁₀COOH in K-Vesikeln bei Zugabe von Valinomycin. Gestrichelte Linie: vor Valinomycin-Zugabe, durchgezogene Linie: nach Valinomycin-Zugabe. $\lambda_{\text{Ex}} = 420 \text{ nm}$

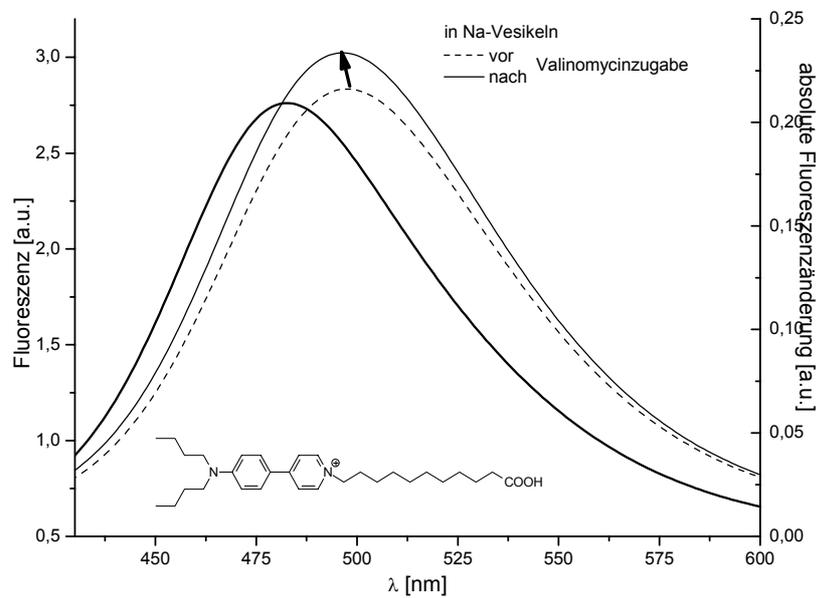


Abbildung 86: Änderung der Fluoreszenzspektren von Di-4-APP-C₁₀COOH in Na-Vesikeln bei Zugabe von Valinomycin. Gestrichelte Linie: vor Valinomycin-Zugabe, durchgezogene Linie: nach Valinomycin-Zugabe. $\lambda_{\text{Ex}} = 420 \text{ nm}$

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Potentialsensitivität der APP-Farbstoffe sind beispielhaft für Di-4-APP-C₁₀COOH in Abbildung 85 (in K-Vesikeln) und in Abbildung 86 (in Na-Vesikeln) dargestellt. Es können analoge Betrachtungen angewendet werden und erwartungsgemäß zeigen diese Chromophore ein ähnliches Verhalten wie die ASP-Farbstoffe. In K-Vesikeln nimmt die Fluoreszenzintensität nach Zugabe von Valinomycin ab. Bei 500 nm beträgt die Abnahme -11 %. Auch ist eine leicht bathochrome Verschiebung des Emissionsspektrums um 3 nm festzustellen. In Na-Vesikeln nimmt umgekehrt die Fluoreszenzintensität zu. Bei 500 nm beträgt die Zunahme +9 % und die Fluoreszenzbande ist um 3 nm hypsochrom verschoben.

Generell muß bezüglich der Bewertbarkeit der Angaben zur Lage von Fluoreszenzspektren betont werden, daß diese mit einem Fehler von $\pm 5\%$ in der Wellenlänge behaftet sind [29]. Daher liegen Verschiebungen der Lage des Spektrums von bis zu 5 nm in der Fehlerbreite und können somit nicht zuverlässig als Batho- oder Hypsochromie identifiziert werden.

Abbildung 87 und Abbildung 88 zeigen das Verhalten des Bichromophors 4/4/4/4 in K-Vesikeln bzw. Na-Vesikeln bei Änderung des Membranpotentials. Die Fluoreszenz wird erzeugt durch Anregung im APP-Teilchromophor bei 420 nm. Wie in Kapitel 5.1 ausführlich beschrieben, findet FRET statt und es ist eine Fluoreszenzbande mit einem Maximum bei etwa 600 nm zu beobachten, die sich hauptsächlich aus der Emission des ASP-Teilchromophors und zu einem kleinen Anteil aus der Emission des APP-Teilchromophors zusammensetzt. Zudem kann, neben der Anregung des Emitters über den FRET, auch eine direkte Anregung des ASP-Chromophors in geringem Maße nicht ausgeschlossen werden.

Es fällt auf, daß bei Einlagerung in K-Vesikel die Fluoreszenzintensität bei Zugabe von Valinomycin zunimmt. Dies entspricht dem entgegengesetztem Verhalten der reinen ASP-Farbstoffe. Bei 600 nm entspricht die relative Änderung +18 %. Im Rahmen der Meßgenauigkeit ist keine Verschiebung der Banden zu registrieren.

Auch in Na-Vesikeln wird eine Zunahme der Fluoreszenz und eine leicht hypsochrome Verschiebung um 7 nm beobachtet. Bei 600 nm beträgt die relative Änderung +3 %. Dies entspricht wiederum im Trend dem Verhalten der ASP-Chromophore.

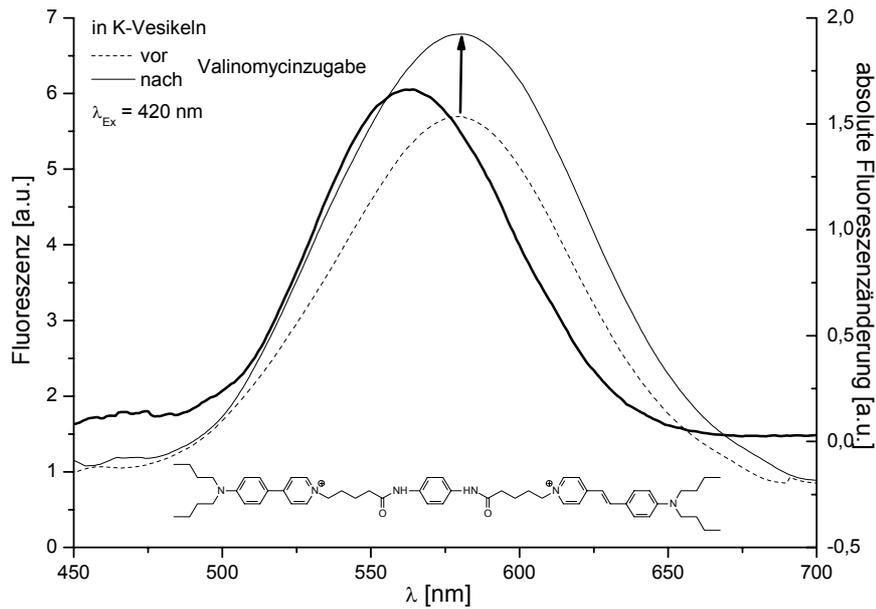


Abbildung 87: Änderung der Fluoreszenzspektren von Bichromophor 4/4/4/4 in K-Vesikeln bei Zugabe von Valinomycin. Gestrichelte Linie: vor Valinomycin-Zugabe, durchgezogene Linie: nach Valinomycin-Zugabe. $\lambda_{\text{Ex}} = 420$ nm

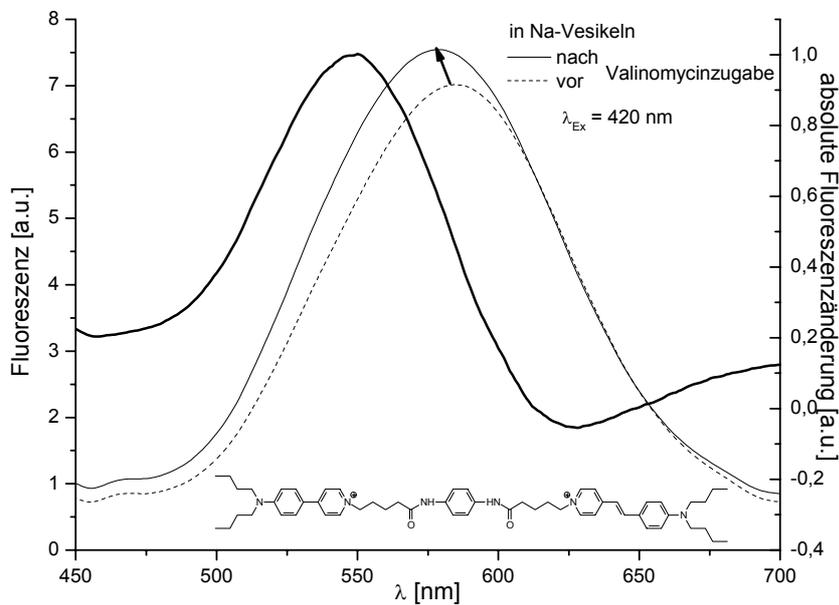


Abbildung 88: Änderung der Fluoreszenzspektren von Bichromophor 4/4/4/4 in Na-Vesikeln bei Zugabe von Valinomycin. Gestrichelte Linie: vor Valinomycin-Zugabe, durchgezogene Linie: nach Valinomycin-Zugabe. $\lambda_{\text{Ex}} = 420$ nm

Will man das potentialsensitive Verhalten der Bichromophore – auch vor dem Hintergrund des Verhaltens der einzelnen Farbstoffe – erklären, so muß dies im wesentlichen über die Betrachtung der Lokalisation der Teilchromophore und deren Verschiebung in der Membran, sowie der Art der Anregung erfolgen. Wiederum werden im Folgenden alle Effekte mit ihren Auswirkungen auf das spektrale Verhalten des Bichromophors in K-Vesikeln tabellarisch zusammengefaßt:

Verschiebung der Ladung beider Teilchromophore bei Anregung in Richtung des Potentialgefälles (Stark-Effekt)	Bathochromie ⇨
Abnahme der Absorption durch Anregung in der blauen Flanke des Absorbers und bathochromer Verschiebung der Bande	Hypochromie ⇩
Abnahme des FRET durch kleines Überlappungsintegral, aufgrund geringer Emission des Absorbers	Hypochromie ⇩
Änderung des FRET aufgrund Verschiebung von Emissions- und Absorptionsspektrum von Absorber und Emmitter zueinander (Änderung der Größe des Überlappungsintegrals)	?
Änderung des FRET aufgrund Abstands- und Lageänderung der Teilchromophore zueinander	?
Verlagerung beider Teilchromophore in Richtung des Potentialgefälles in den apolaren Bereich des Vesikelinneren	Hyperchromie ↑ Hypsochromie ⇐

Die Anregung des ASP-Teilchromophors erfolgt indirekt über den FRET vom APP-Teilchromophor. Dieser wird maßgeblich bestimmt durch die Überlappung der Fluoreszenzbande des Absorbers mit der Absorptionsbande des Emitters (siehe Gleichung 4 auf Seite 26). Im Gegensatz zur direkten Anregung bei einer definierten Wellenlänge mit einem Anregungsspalt von nur 5 nm, erfolgt die Anregung beim FRET also über den gesamten Überlappungsbereich der Fluoreszenzbande mit der Absorptionsbande. Das Maximum der Fluoreszenz des Absorbers liegt dabei im Wellenlängenbereich größer 500 nm, also in der roten Flanke des Emitters. Entsprechend der anhand von Abbildung 82 zu Beginn des Kapitels gemachten Überlegungen, würde das eine Zunahme der Fluoreszenz bei Potentialänderung bewirken. Wie sich die Beiträge des Überlappungsintegrals, des Orientierungsfaktors und der Abstand der Chromophore tatsächlich ändern, kann nicht bestimmt werden.

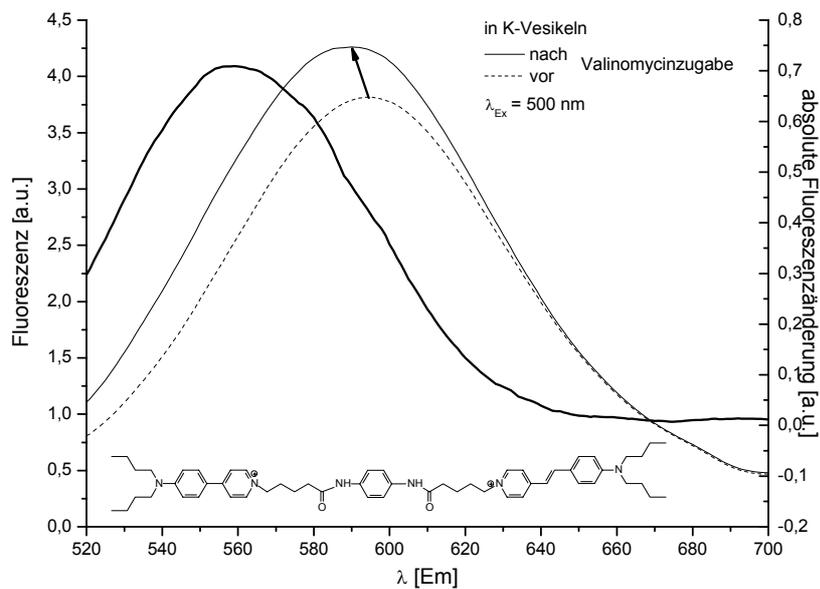


Abbildung 89: Änderung der Fluoreszenzspektren von Bichromophor 4/4/4/4 in K-Vesikeln bei Zugabe von Valinomycin. Gestrichelte Linie: vor Valinomycin-Zugabe, durchgezogene Linie: nach Valinomycin-Zugabe. $\lambda_{\text{Ex}} = 500 \text{ nm}$

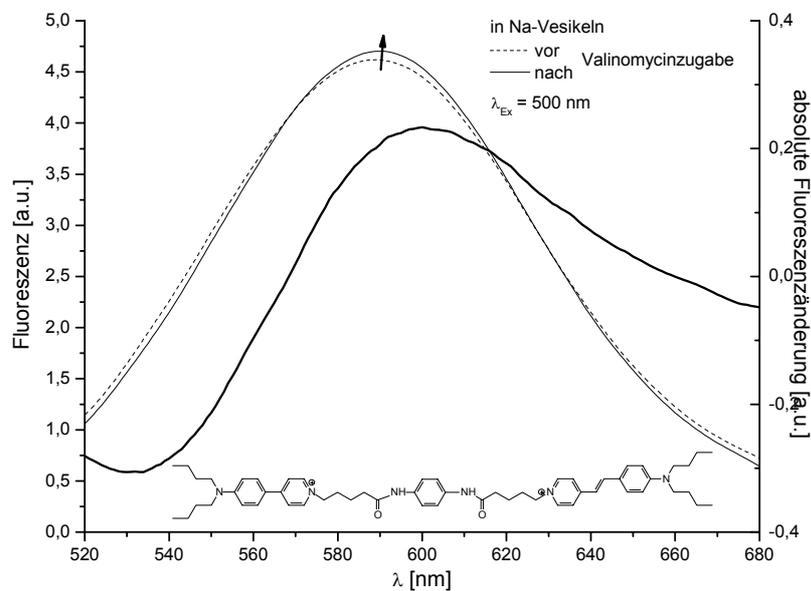


Abbildung 90: Änderung der Fluoreszenzspektren von Bichromophor 4/4/4/4 in Na-Vesikeln bei Zugabe von Valinomycin. Gestrichelte Linie: vor Valinomycin-Zugabe, durchgezogene Linie: nach Valinomycin-Zugabe. $\lambda_{\text{Ex}} = 500 \text{ nm}$

Eine – dem Potentialgefälle folgende – Verlagerung des Teilchromophors in den weniger polaren Bereich der Membran hätte ebenfalls eine Fluoreszenzsteigerung zur Folge. Insgesamt summieren sich die Effekte zu einer Zunahme des Fluoreszenzsignals. Eine eventuelle Abnahme der Fluoreszenzintensität des APP-Teilchromophors analog der Beobachtung aus der Messung des Einzelchromophors, wird also insgesamt überkompensiert.

Wenn der Bichromophor direkt im Absorptionsbereich des ASP-Teilchromophor angeregt wird, ist ein FRET ausgeschlossen. In Abbildung 89 und Abbildung 90 sind die Ergebnisse der Untersuchungen zur Potentialsensitivität der Bichromophore bei direkter Anregung beispielhaft für Bichromophor 4/4/4/4 dargestellt. Die Anregung erfolgt bei 500 nm, also in der Nähe des Maximums in der langwelligen Flanke. Die zu erwartenden Effekte bei Potentialänderung in K-Vesikeln sind wie auch zuvor in einer Tabelle zusammengefaßt:

Verschiebung der Ladung im Molekül bei Anregung in Richtung des Potentialgefälles (Stark-Effekt)	Bathochromie ⇨
Zunahme der Absorption durch Anregung in der roten Flanke und bathochromer Verschiebung der Bande	Hyperchromie ↑
Verlagerung des Chromophors in Richtung des Potentialgefälles in das apolare Vesikelinnere	Hyperchromie ↑ Hypsochromie ⇐

Abbildung 89 zeigt das Verhalten von Bichromophor 4/4/4/4 in K-Vesikeln. Nach Zugabe von Valinomycin ist ein Anstieg der Fluoreszenzintensität zu verzeichnen. Bei 600 nm beträgt die relative Änderung + 9 %. Die Bande ist nach Aufbau des Membranpotentials um 5 nm leicht hypsochrom verschoben. Die hyperchromen Effekte überwiegen also in diesem Fall, was mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Anregung in der roten Flanke zurückzuführen ist.

Vergleicht man die absoluten Beträge der Änderung der Fluoreszenzintensität von direkter und indirekter Anregung so stellt man fest, daß durch indirekte Anregung größere absolute Änderungen bewirkt werden. Wie schon zuvor, können auch hier die Besonderheiten der Anregung des Emitters durch den FRET als Erklärung herangezogen

gen werden. Die direkte Anregung erfolgt im Bereich des Maximums und eine Verschiebung der Bande ergibt zwar ebenso eine Zunahme der Fluoreszenz, aber nur eine vergleichsweise geringe Änderungen in der Absorption. Die indirekte Anregung über den APP-Teilchromophor erfolgt dagegen, über den gesamten Überlappungsbereich von Absorptionsbande des ASP- mit der Fluoreszenzbande des APP-Teilchromophors, mit dem Gewicht in der langwelligen Flanke des Emitters. Eine Änderung des Potentials hat somit einen empfindlicheren Effekt auf die Änderung der Fluoreszenzintensität des Emitters. Ganz deutlich wird dies bei der Untersuchung des potentialsensitiven Verhaltens bei direkter Anregung in Na-Vesikeln. Die bereits bei indirekter Anregung schon schwach ausgeprägte Sensitivität, ist nun noch weiter abgesunken. In der kurzwelligen Flanke ist ein geringer Abfall der Intensität zu beobachten, von 570 bis 660 nm eine Zunahme und im längerwelligen Bereich wieder eine Abnahme. Bei 600 nm steigt die Intensität der Fluoreszenz um + 2 %.

Wie in Kapitel 5.3.1 ausgeführt, haben die Länge der N-Alkylketten und Spacerketten erheblichen Einfluß auf das Einlagerungsverhalten der Bichromophore. Um hohe Membranaffinität zu erzielen und eine vollständige Einlagerung in die Membran zu gewährleisten, sind ausreichend lange N-Alkylketten an den Teilchromophoren und Spacerketten auf beiden Seiten des 1,4-Phenylendiamins notwendig. Dies schlägt sich auch auf das Verhalten der Bichromophore bei Potentialänderung nieder. So sind bei den Bichromophoren des Typs $x/2/2/x$ praktisch keine reproduzierbaren Ergebnisse zu erhalten. Auch nachdem sich das Einlagerungsgleichgewicht eingestellt hat, schwankt das Signal so stark, daß sämtliche Änderungen bei Zugabe von Valinomycin überlagert werden. Ab einer C_5 -Kette ist eine zuverlässige Messung der Potentialsensitivität möglich. Wie bei den Untersuchungen zum Einlagerungsverhalten festgestellt, besitzen die Bichromophore mit gleicher Spacerkettenlänge der Teilchromophore die günstigsten Eigenschaften, so daß die Ausführungen im Folgenden auf diese „symmetrischen“ Bichromophore beschränkt werden. Von diesen wird in jeweils 5 Messungen die relative Änderung des Fluoreszenzsignals bei 600 nm ermittelt. In Tabelle 16 sind die Ergebnisse für Bichromophore des Typs $4/x/x/4$ bei indirekter Anregung (420 nm) und in Tabelle 17 für die direkte Anregung (500 nm) zusammengefaßt.

Spacer-Kettenlänge	Messung Nr.					Ø	Abw.
	1.	2.	3.	4.	5.		
4	18.2	16.1	15.2	17.4	19.5	17.3	1.5
6	19.1	20.1	17.1	18.4	19.2	18.8	1.0
10	18.8	20.9	20.5	16.1	19.7	19.2	1.7

Tabelle 16: relative Änderung des Fluoreszenzsignals bei 600 nm in % bei Potentialänderung in K-Vesikeln; $\lambda_{\text{EX}} = 420 \text{ nm}$

Spacer-Kettenlänge	Messung Nr.					Ø	Abw.
	1.	2.	3.	4.	5.		
4	3.1	5.8	5.1	4.5	3.1	4.3	1.1
6	3.1	3.7	2.5	5.7	4.1	3.8	1.1
10	4.2	5.2	6.1	3.1	4.5	4.6	1.0

Tabelle 17: relative Änderung des Fluoreszenzsignals bei 600 nm in % bei Potentialänderung in K-Vesikeln; $\lambda_{\text{EX}} = 500 \text{ nm}$

Spacer-Kettenlänge	Messung Nr.					Ø	Abw.
	1.	2.	3.	4.	5.		
4	3.1	4.3	5.2	2.7	4.5	4.0	0.9
6	3.1	3.5	2.3	3.9	5.2	3.6	1.0
10	4.5	5.9	3.5	5.3	3	4.4	1.1

Tabelle 18: relative Änderung des Fluoreszenzsignals bei 600 nm in % bei Potentialänderung in Na-Vesikeln; $\lambda_{\text{EX}} = 420 \text{ nm}$

Spacer-Kettenlänge	Messung Nr.					Ø	Abw.
	1.	2.	3.	4.	5.		
5	2.1	1.8	1.2	3.1	2.3	2.1	0.6
6	3.2	3.4	1.2	2.6	3.5	2.8	0.8
10	4.1	5.3	2.1	3.2	1.2	3.2	1.4

Tabelle 19: relative Änderung des Fluoreszenzsignals bei 600 nm in % bei Potentialänderung in Na-Vesikeln; $\lambda_{\text{EX}} = 500 \text{ nm}$

Die Daten bestätigen das zuvor für Bichromophor 4/4/4/4 gefundene Verhalten für alle vermessenen Bichromophore, bei direkter, wie indirekter Anregung, in K- und Na-Vesikeln. Sie zeigen aber auch, daß die Spacerkettenlänge keinen signifikanten Einfluß auf das potentialsensitive Verhalten hat, solange die Teilchromophore nur einen Mindestabstand voneinander haben, der für beide eine Einlagerung in die Membran ermöglicht. Ist diese Bedingung erfüllt, so erfolgt im Bereich der in dieser Arbeit dargestellten Farbstoffe eine Reaktion auf eine Potentialänderung praktisch unabhängig von der Spacerkettenlänge.

Auf gleiche Weise wurde auch der Einfluß der Länge der N-Alkylketten auf die Sensitivität der Bichromophore untersucht. In den unten aufgeführten Tabellen sind die Ergebnisse der Untersuchungen der Sensitivität der Bichromophore des Typs x/4/4/x zusammengefaßt. Auch hier wurden nur die „symmetrischen“ Bichromophore gemessen, bei denen beide Teilchromophore die gleiche N-Alkylkettenlänge besitzen.

N-Alkylkettenlänge	Messung Nr.					Ø	Abw.
	1.	2.	3.	4.	5.		
1	18.1	16.2	19.2	17.3	17.5	17.7	1.0
2	16.8	19.5	17.6	18.4	15.9	17.6	1.2
3	19.4	15.4	16.8	17.8	15.6	17.0	1.5
4	18,2	16,1	15,2	17,4	19,5	17,3	1,5

Tabelle 20: relative Änderung des Fluoreszenzsignals bei 600 nm in % bei Potentialänderung in K-Vesikeln; $\lambda_{\text{Ex}} = 420 \text{ nm}$

N-Alkylkettenlänge	Messung Nr.					Ø	Abw.
	1.	2.	3.	4.	5.		
1	5.1	4.1	4.5	3.1	6.1	4.6	1.0
2	3.5	6.5	4.2	4.1	5.1	4.7	1.0
3	2.8	3.5	6.1	2.9	4.0	3.9	1.2
4	3,1	5,8	5,1	4,5	3,1	4,3	1,1

Tabelle 21: relative Änderung des Fluoreszenzsignals bei 600 nm in % bei Potentialänderung in K-Vesikeln; $\lambda_{\text{Ex}} = 500 \text{ nm}$

N-Alkylkettenlänge	Messung Nr.					Ø	Abw.
	1.	2.	3.	4.	5.		
1	5.1	5.8	3.5	3.4	4.6	4.5	0.9
2	3.8	4.5	4.8	6.1	2.9	4.4	1.1
3	4.8	2.8	3.7	4.1	4.1	3.9	0.7
4	3,1	4,3	5,2	2,7	4,5	4,0	0,9

Tabelle 22: relative Änderung des Fluoreszenzsignals bei 600 nm in % bei Potentialänderung in Na-Vesikeln; $\lambda_{\text{Ex}} = 420 \text{ nm}$

N-Alkylkettenlänge	Messung Nr.					Ø	Abw.
	1.	2.	3.	4.	5.		
1	1.9	2.2	1.8	3.1	2.5	2.3	0.5
2	1.5	2.1	2.5	3.0	3.1	2.4	0.6
3	2.9	1.9	2.3	3.2	2.7	2.6	0.5
4	2,1	1,8	1,2	3,1	2,3	2,1	0,6

Tabelle 23: relative Änderung des Fluoreszenzsignals bei 600 nm in % bei Potentialänderung in Na-Vesikeln; $\lambda_{\text{Ex}} = 500 \text{ nm}$

Wie auch bei der Spacerkettenlänge zeigt sich, daß eine Änderung der N-Alkylkettenlänge keinen nachweisbaren Effekt auf die Sensitivität der Bichromophore bewirkt.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß durch ausreichend große Abstände der Teilchromophore und lange N-Alkylketten die Voraussetzungen für ein gutes Einlagerungsverhalten gegeben werden. Eine vollständige und anhaltende Einlagerung in die Membran ist Bedingung für eine reproduzierbare Messung der Potentialsensitivität. Diese ist ab einer Spacerkettenlänge von mindestens C₄-Ketten gegeben. Eine Variation der Kettenlänge oberhalb dieses Minimums hat auf das Ergebnis der Messung jedoch keinen Einfluß.

Bei indirekter Anregung nehmen – im Gegensatz zur direkten Anregung – das Verhalten beider Teilchromophore und der FRET Einfluß auf die Sensitivität des Bichromophors. Dies wirkt sich in der Summe so aus, daß die Bichromophore bei indirekter Anregung eine größere Sensitivität zeigen, als bei direkter.

6 Zusammenfassung

Bichromophore Fluoreszenzfarbstoffe, die einen Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) zeigen, können als Sonden für Potentialänderungen interessante Eigenschaften bieten. Eine Änderung des transmembranen Potentials beeinflusst die Einlagerung in die Membran, die Konformation oder die elektronischen Zustände im Molekül. Dies kann empfindlichen Einfluß auf die Fluoreszenz der Einzelchromophore haben, was wiederum verstärkt Änderungen der „bichromophoren“ Eigenschaften bewirken könnte. Daraus ergibt sich somit eine Möglichkeit der empfindlichen Detektion von Potentialänderungen.

Um solche Farbstoffsysteme für eine Verwendung als Potentialsonden bereitzustellen, wurden im Rahmen dieser Arbeit *N,N*-Dialkylaminophenylpyridiniumchromophore und *N,N*-Dialkylaminostyrylpyridiniumchromophore zu neuartigen Bichromophoren verknüpft und die Eigenschaften dieser Verbindungen untersucht.

Bichromophor m/x/y/n

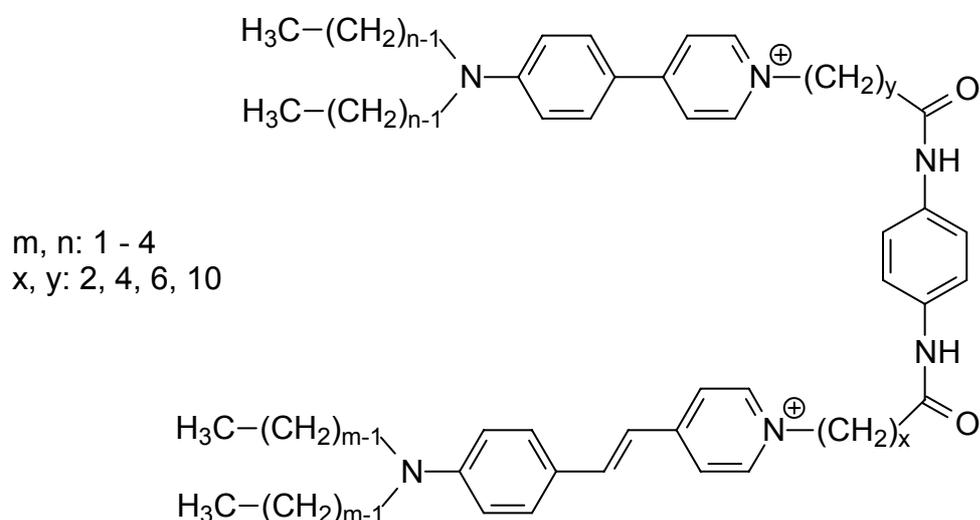


Abbildung 91: Allgemeine Struktur der synthetisierten Bichromophore und Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten systematischen Bezeichnung „Bichromophor m/x/y/n“. Durch Variation der Parameter m, n, x und y wurden insgesamt 64 dieser neuartigen Bichromophore dargestellt.

N,N-Dialkylaminophenylpyridiniumchromophore und *N,N*-Dialkylaminostyrylpyridiniumchromophore wurden als Bausteine für das angestrebte bichromophore System gewählt, da diese ein eindeutiges und schon umfassend untersuchtes Einlagerungsverhalten in Biomembranen zeigen und die spektralen Eigenschaften der Farbstoffe einen effektiven FRET erwarten lassen.

Generell ist die Absicht, bichromophore Systeme mit amphiphilen Eigenschaften und hoher Membranaffinität darstellen zu wollen, in der Synthese jedoch mit zahlreichen Problemen behaftet, da solche Verbindungen zumeist wachsartig anfallen und ein indifferentes Lösungsverhalten aufweisen. Dies hat erhebliche Probleme bei der Isolierung und Reinigung der Verbindungen zur Folge. Mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Syntheseroute ist jedoch ein effizienter Zugang zu den gewünschten Verbindungen gefunden worden und es wurden 64 neuartige Bichromophore dargestellt.

Die Synthese der Bichromophore gelang über eine konvergente Synthese, bei der zuerst die *N,N*-Dialkylaminostyrylpyridiniumfarbstoffe und *N,N*-Dialkylaminophenylpyridiniumfarbstoffe mit Carboxylendgruppen dargestellt wurden. In zwei weiteren Schritten wurden diese Farbstoffe dann über 1,4-Phenylendiamin unter Bildung von Amidbindungen zum Bichromophor gekoppelt. Diese Kopplungen wurden mit Hilfe der, aus der Peptidchemie bekannten, Kopplungsreagenzien PyCloP oder TBTU durchgeführt. Die *N,N*-Dialkylaminostyrylpyridiniumfarbstoffe waren gut über die Umsetzung von, mit ω -Bromalkancarbonsäuren quarterniertem, γ -Picolin mit 4-(*N,N*-Dialkylamino)-benzaldehyd im Sinne einer Knoevenagel-Reaktion zugänglich. Zur Darstellung der *N,N*-Dialkylaminophenylpyridiniumfarbstoffe wurden zwei Synthesewege besprochen. Für die kurzkettigen Verbindungen wurden *N,N*-Dialkylaniline und Pyridin mit Cyanurchlorid umgesetzt. Diese Reaktion führt in einem Schritt zum gewünschten Ziel. Bei den längerkettigen Verbindungen, wird die Aufarbeitung dagegen nahezu unmöglich, so daß auf eine Palladium-katalysierte Kreuzkupplung von 4-Diethylboranyl-pyridin mit *N,N*-Dialkyl-p-bromanilin zurückgegriffen wird. Diese ist wesentlich aufwendiger und empfindlicher, liefert aber auch die langkettigen Verbindung in zufriedenstellenden Ausbeuten.

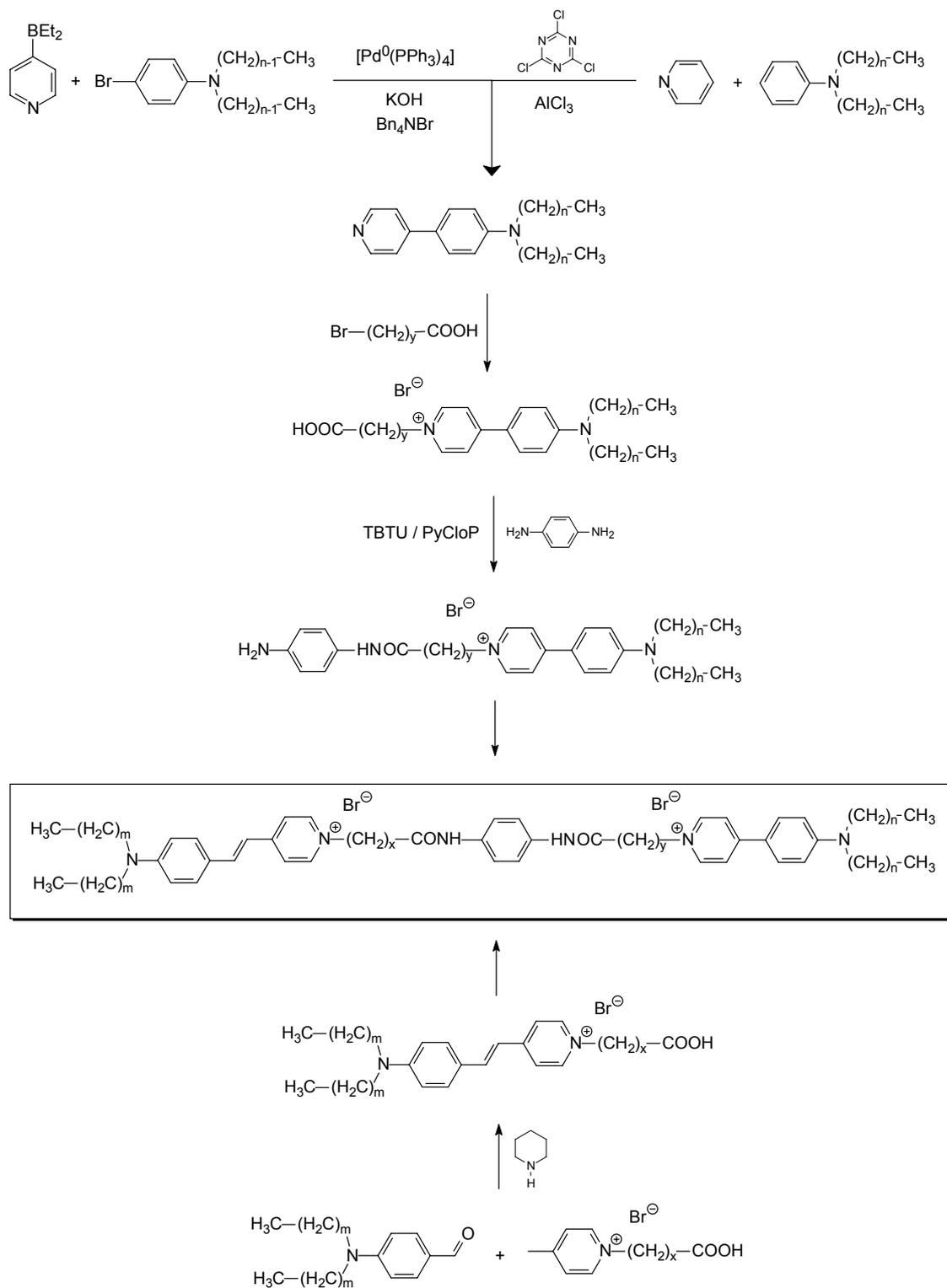


Abbildung 92: Gesamtschema der Synthese der Bichromophore.

Bei der Untersuchung der spektralen Eigenschaften zeigen die Bichromophore einen effektiven FRET, da bei indirekter Anregung der Bichromophore in der Absorptionsbande des Phenylpyridiniumchromophors eine starke Emission im Bereich der Styrylpyridiniumfluoreszenz beobachtet wird. Durch Bandenanalyse und Vergleich der Spektren von direkter und indirekter Anregung wurde gezeigt, daß aber auch die Emission des Phenylpyridinium-Absorbers und direkt angeregte Fluoreszenz des Styrylpyridinium-Emitters einen geringen, aber nicht zu vernachlässigenden Anteil an dieser Emission besitzen.

Bei einer Untersuchung des Einlagerungsverhaltens der Bichromophore in Biomembranen zeigt sich eine für Moleküle dieser Größenordnung überraschend gute und schnelle Einlagerung. Hierbei ist davon auszugehen, daß sich die Bichromophore hufeisenförmig in die Membran einlagern, wobei beide Teilchromophore bestrebt sind, mit ihrem positiven N-Atom in den polaren Kopfbereich der Membran einzulagern. Es kann gezeigt werden, daß eine schnelle und vollständige Einlagerung beider Teilchromophore nur möglich ist, wenn die N-Alkyl- und Spacerketten mindesten Butylkettenlänge besitzen (D.h. $m, n, x, y = 4$). Während dieser Einfluß der Kettenlänge auf die Einlagerung in Membranen für die N-Alkylketten schon von den Monochromophoren her bekannt war, konnten für den Einfluß der Spacerkettenlänge auf das Einlagerungsverhalten neue Erkenntnisse gewonnen werden. Zu kurze Spacerkettenlängen bedingen offensichtlich eine ungünstige Einlagerung oder verhindern sie sogar ganz, so daß der Bichromophor nicht so tief in die Membran oder nur im Bereich der Grenzflächen einlagern kann. Dies hat Auswirkungen auf das potentialsensitive Verhalten der Bichromophore. Bei der Untersuchung der Potentialsensitivitäten konnte nämlich gezeigt werden, daß die Länge der Spacer- und N-Alkylketten keinen Einfluß auf die potentialsensitiven Eigenschaften der Bichromophoren haben, solange die oben genannte Mindestanforderung für eine vollständige Einlagerung gegeben ist.

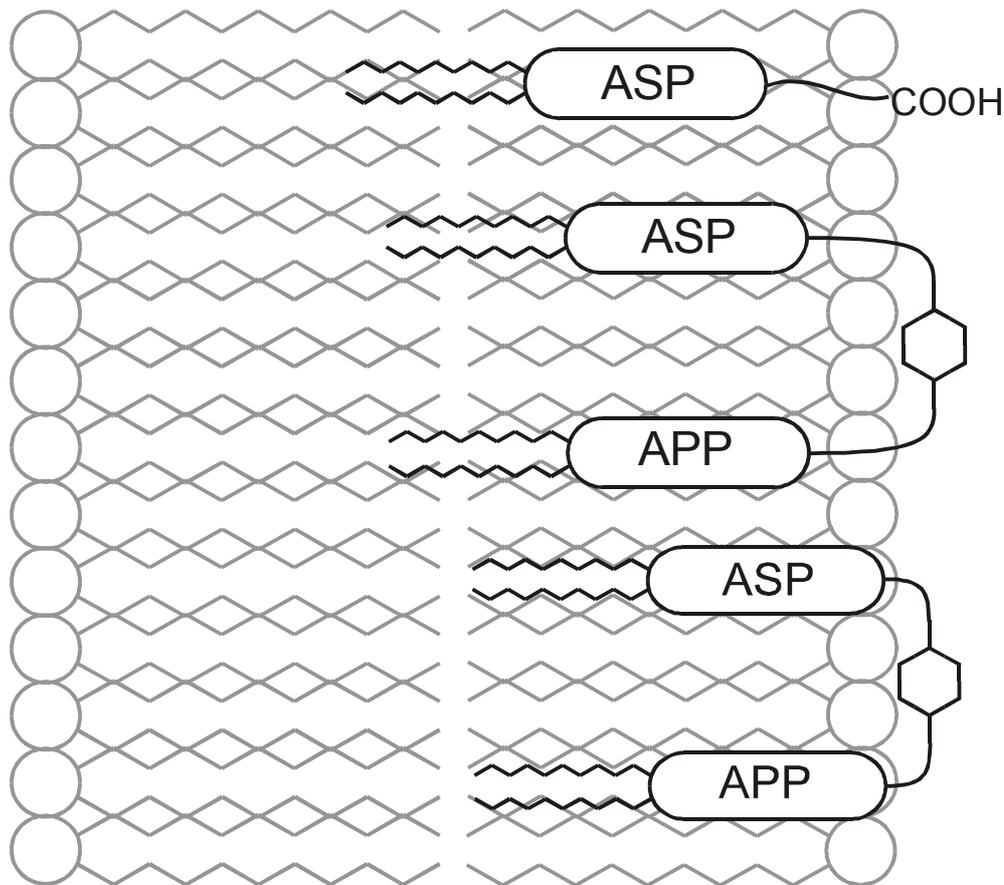


Abbildung 93: Schematische Darstellung des Einlagerungsverhaltens von Monochromophoren und Bichromophoren mit unterschiedlichen Spacerkettenlängen.

Die Potentialsensitivität der Bichromophore wurde dabei sowohl bei direkter Anregung des Emitters, als auch bei indirekter Anregung unter Ausnutzung des FRET untersucht. Dabei zeigte sich, daß bei indirekter Anregung größere Änderungen des Fluoreszenzsignals gemessen werden. Die Summe der Effekte aus FRET, sowie direkter Anregung des Emitters bzw. Absorbers verstärken sich offensichtlich und bewirken somit eine Steigerung der Potentialsensitivität in diesem System.

Des weiteren wurden die Bichromophore in Na- und K-Vesikel eingelagert, mit denen in geeigneten Puffern durch Zugabe von Valinomycin ein jeweils gegensinniges Membranpotential eingestellt werden kann. Die Fluoreszenzänderung der Bichromophore auf eine Änderung des Potentials erfolgt dabei überraschender Weise unabhängig von der Orientierung des Potentialgefälles stets in die gleiche Richtung. Es wurde lediglich festgestellt, daß bei Verwendung von K-Vesikeln – gleichbedeutend mit einer negativen Aufladung des Vesikelinneren bei Zugabe von Valinomycin – generell stärkere

Änderungen des Fluoreszenzsignals als bei Na-Vesikeln – positive Aufladung des Vesikellinneren – zu registrieren sind.

Auch wenn die Ausnutzung des FRET gegenüber der direkten Anregung insgesamt eine Steigerung der Potentialsensitivität des Bichromophors ergibt, so geht sie aber nicht über die Sensitivität der *N,N*-Dialkylaminostyrylpyridiniummonochromophore hinaus.

Auf Basis der hier durchgeführten umfassenden Untersuchungen zur Einlagerung und Reaktion der Bichromophore auf Potentialänderungen und den beschriebenen Beobachtungen, wurde ein Modell für den Mechanismus der Potentialsensitivität entwickelt. Wenn man darin die Summe der Effekte von Elektrochromie, Verschiebung der Chromophoren in der Membran, Änderung der chemischen Umgebung, Anregungswellenlänge und Änderung des Überlappungsintegrals mit in Betracht zieht, gibt dieses Modell eine zufriedenstellende Erklärung für das gefundene Verhalten der Bichromophore. Es wird jedoch auch deutlich, daß die Ergebnisse sehr stark von den verwendeten Parametern, wie Vesikelpräparation, Anregungs- und Beobachtungswellenlänge, sowie Temperatur abhängen und somit auch einen Vergleich mit anderen Systemen erschweren.

7 Experimentaltteil

7.1 Allgemeines

Für die Isolierung und Charakterisierung der dargestellten Verbindungen wurden die folgenden Geräte und Materialien eingesetzt:

Dünnschichtchromatographie:	Merck DC-Alufolien Kieselgel 60, UV-Indikator F ₂₅₄
Säulenchromatographie:	Kieselgel 60, 230 – 400 mesh, Fa. Merck
Schmelzpunkt:	SMD 20, Fa. Büchi, Flavil/Schweiz (unkorrigiert)
Brechungsindices:	Carl Zeiss Refraktometer 90213
Infrarotspektroskopie:	Bruker Vector 22
Massenspektroskopie:	Varian MAT 311 (70 eV) Finnigan MAT 8200
¹ H-NMR-Spektroskopie ₃₀₀ :	Varian VXR 300
¹ H-NMR-Spektroskopie ₅₀₀ :	Bruker AM 500
UV/Vis-Spektroskopie:	Perkin Elmer λ-19
Fluoreszenzspektroskopie:	Jasco FP-6200
Elementaranalysen:	durchgeführt am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

7.2 Vesikelpräparation

Material für die Vesikelpräparation:

- 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (Sigma)
- Ethylendiamintetraacetat (EDTA), p.a. (Merck)
- Histidin, p.a. (Merck)
- Magnesiumsulfat, p. a. (Merck)
- Kaliumsulfat, p.a. (Merck)
- Natriumsulfat, p.a. (Merck)
- Polycarbonat Membranfilter, Porengröße 100 nm (Liposo Fast, Avestin Inc.)
- Extruder (Hamilton)

Zur Vesikeldarstellung wurde zweifach deionisiertes Wasser verwendet. Sämtliche organische Lösemittel waren von spektroskopischer Reinheit (Merck, Uvasol).

Vesikelpräparation:

In einem 50 ml Rundkolben werden 30 mg DOPC eingewogen und in 3 bis 4 ml Chloroform gelöst. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt, so daß ein dünner Lipidfilm an der Kolbenwand zurückbleibt. Dieser wird in 3 ml Pufferlösung aufgenommen, und die Suspension wird im Wasserbad auf 40°C erwärmt, wodurch sich der Lipidfilm vollständig von der Kolbenwand löst. Der Kolben wird nun verschlossen und für 30 Minuten in einem Ultraschallbad belassen. Dabei bilden sich die bereits vorhandenen Membranfragmente zu Vesikeln aus, die jedoch multilamellar und nicht einheitlich in ihrer Größe sind.

Zur Herstellung gleich großer unilamellarer Vesikel muß die vorliegende Suspension mittels Extrusion weiterbehandelt werden.

Dazu werden je 500 µl Spritzenvolumen 15-mal extrudiert, das heißt durch eine Membran mit 100 nm großen Poren, die sich im Extruder zwischen zwei Spritzen befindet, gedrückt. Die vorher uneinheitlichen großen und multilamellaren Vesikel werden aufgrund der Poren in der Membran der Größe von 100 nm angepaßt und unilamellar. Die extrudierte Suspension wird portioniert und kann im Kühlschrank bei 4°C einige Wochen gelagert werden. Mit Hilfe eines Farbttest kann die Lipid-Konzentration der so hergestellten Vesikelsuspension auf $10,59 \pm 1,06$ mmol / L bestimmt werden [119].

Zusammensetzung des Puffers:

- 25 mmol/L Histidin,
- 0,5 mmol/L EDTA,
- 5 mmol/L Magnesiumsulfat und
- 75 mmol/L Kaliumsulfat bzw. Natriumsulfat (für K- bzw. Na-Vesikel und K- bzw. Na-Puffer)

Danksagung

Während meiner Zeit im Institut und an der Uni bin ich zahlreichen Menschen begegnet, mit denen ich viele schöne Erfahrungen teile und an die ich mit Freude denke. All diesen gilt mein Dank. An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Damen und Herren besonders bedanken, die im Entstehen dieser Arbeit eine ebenso besondere Rolle gespielt haben.

Vielen Dank an alle meine lieben Kollegen im Institut. Vor allem an Dipl.-Chem. Filiz Bley, Dipl.-Chem. Oszkar Keray, Dipl.-Chem. Nicole Kiesendahl, Dipl.-Chem. Pavlos Kolszouzidis, Dr. Christine Fuchs, Dr. Dorett Quadros, Dr. Sayed Abdollah Madani Mobarakeh, Dr. Inés Hernandez Blanco und Dr. Mikael Smushkin für die nette Arbeitsatmosphäre, konstruktiven Diskussionen und lustigen Gespräche.

Dr. Susanne Frixel, Dipl.-Chem. Sonja Köhn, Dr. Klaus Schaper, Dipl.-Chem. Roger Scherrers und Dr. Jens Jablonski danke ich insbesondere für die schönen gemeinsamen Stunden in der deutschen Oper am Rhein.

Herrn Eric Schönstein danke ich für stets gewährtes Asyl in seiner „Zuflucht im Keller“ und die vielen netten Gespräche bei einer guten Tasse Kaffee. Dabei bedanke ich mich auch bei den lieben Kollegen aus dem AK Braun für die freundliche Aufnahme im Keller...

Herrn Behm, Frau Beuer, Herrn Dr. Tommes und Herrn Bürgel danke ich für die Besorgung der Analytik, ohne die diese Arbeit natürlich nicht möglich gewesen wäre.

Bei Frau Reinartz, Frau Foremny, Frau Webers und Frau Koschel möchte ich mich sehr für ihre Hilfe in Institutsangelegenheiten und alles im allerweitesten Sinne drumherum bedanken.

Herrn Dr. Stefan Beutner schulde ich Dank für zahlreiche Dinge: seine aufopferungsvolle und überaus hilfreiche Tätigkeit als wissenschaftlicher „Supervisor“, gutes Teamplay als Praktikumsleiter, ausgiebige Nachhilfe in Sachen Basketball, aber vor allem für meine Ausbildung zum Hilfsbauarbeiter.

Frau Dr. Britta Reiffers vermisse ich sehr und frage mich, wann wir endlich das mit dem 3. Mittwoch im Monat anfangen...

Frau Dr. Yasemin Kara danke ich einfach von Herzen für all die schönen Zeiten die wir gemeinsam verbringen konnten.

Frau Irmgard Menzel hat zwar auch immer fleißig UV- und IR-Spektren gemessen, jedoch danke ich ihr vor allem dafür, daß sie mit ihrer Art und Wärme so manchen Tag zu etwas ganz besonderem hat werden lassen.

Ein sehr herzliches Dankeschön und einen festen Drücker gebührt Dr. Johannes „No Goal“ Schmitz, für die gute Labornachbarschaft, seine Freundschaft in allen Lebenslagen, sowie die vielen schönen Erlebnisse auf dem Platz und daneben! „Always Sticks up“ und lang lebe die 89!

Mit Herrn Dr. Oliver Schröder verbindet mich eigentlich nur die Leidenschaft zu Schnitzelbrötchen. Über die Zeiten beim gemeinsamen Verzehr ist aber eine Freundschaft gewachsen, die nur wenig Worte braucht...

Zum Glück hat Herr Dr. Björn Dingwerth in Prüfungsphasen den gleichen Schlaf- und Wachrhythmus wie ich, so daß man auch noch um 3:18 Uhr bedenkenlos zum Telefon greifen konnte.

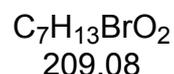
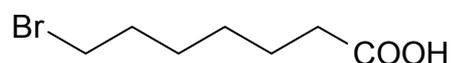
Frau Dr. Vera Buchholz möchte ich hiermit noch mal für die Nachhilfe in NMR im 3. Semester bedanken! Darüber hinaus aber auch für die großherzige Art, mit der sie immer wieder über mein schreibfaules Wesen hinweg gesehen hat.

Herr Dirk Börnert und Herr Christof Schössler begleiten meinen Weg schon eine wesentlich längere Zeit, als das Entstehen dieser Arbeit benötigte. Zum Glück haben die Beiden fast gar keinen Bezug zur Chemie. Aber nicht nur aus diesem Grund ist mir ihre Freundschaft so wichtig und wird mir auch hoffentlich noch lange erhalten bleiben.

Als Basis von Allem aber danke ich meinen Freunden, meiner Familie und meiner Frau Jenny für die Liebe, das Vertrauen und die Kraft, die sie mir geben.

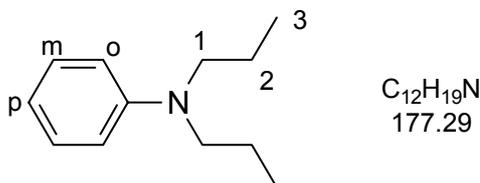
Versuchsbeschreibungen

Versuch 1 7-Bromheptansäure [120]



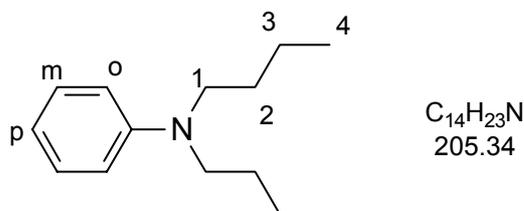
6.50 g (0.28 mol) Natrium werden in 80 ml absoluten Ethanol gelöst und mit 70.0 g (0.4 mol) Diethylmalonat versetzt. Die Lösung wird 1 h bei 60°C erhitzt und nach Zugabe von 73.5 g (0.3 mol) 1,5-Dibrompentan 24 h bei Raumtemperatur gerührt und weitere 48 h bei 0°C gelagert. Das ausgefallene Natriumbromid wird durch Zugabe von 200 ml Wasser gelöst und die Lösung zweimal mit je 200 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und nach Entfernen des Lösungsmittels erhält man einen gelben, öligen Rückstand. Dieser wird mit 75 ml konz. Essigsäure und 15 ml konz. Schwefelsäure versetzt und erhitzt, wobei das bei der Reaktion freigesetzte Ethylacetat kontinuierlich abdestilliert wird. Der Rückstand wird mit 300 ml Wasser versetzt und zweimal mit je 200 ml Diethylether ausgeschüttelt, Die etherischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und nach Entfernen des Lösungsmittels im Ölpumpenvakuum fraktioniert destilliert. Das erhaltene farblose Öl kristallisiert im Kühlschrank zu einem weißen Feststoff.

- Ausbeute:** 16.9 g weißer Feststoff (23%) (Lit.: 53% [120])
- Siedepunkt:** 125°C / 0.01 mbar (Lit.: 105°C / 0.08 mbar [121])
- Schmelzpunkt:** 30°C (Lit.: 28-29°C [122])
- IR (Film):** $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3200-3500 (OH), 2937, 2860 (aliph. C-H), 1709 (CO), 645, 561 (C-Br)
- ¹H-NMR₃₀₀:** (DMSO-d₆/TMS) δ [ppm] = 1.14-1.42 (m, 4H, 4-, 5-H), 1.44-1.54 (m, 2H, 3-H), 1.74-1.83 (m, 2H, 6-H), 2.19 (t, J = 7.4 Hz, 2-H), 3.52 (t, J = 6.7 Hz, 7-H), 12.00 (s (breit), 1 H, COOH)

Versuch 2 *N,N*-Di-*n*-propylanilin [123]


23.90 g (0.25 mol) Anilin, 87.50 g (0.51 mmol) 1-Iodpropan und 34.50 g (0.25 mmol) Kaliumcarbonat werden in 20 ml absolutem Dimethylformamid 48 h bei einer Badtemperatur von 130°C unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Abkühlen werden die ausgefallenen Salze durch Wasserzugabe gelöst. Anschließend wird zweimal mit je 300 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird der Rückstand im Wasserstrahlvakuum fraktioniert destilliert.

Ausbeute:	23.50 g (53%) hellgelbes Öl	
Siedepunkt:	117 – 122°C / 25 mbar	(240 – 243°C [123])
Brechungsindex:	n_D^{20} : 1.5291	(n_D^{20} : 1.5287 [123])
IR (Film):	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3029 – 3093 (C-H arom.), 2873 – 2960 (C-H aliph.), 1598 (C=C), 1505 (C-N), 745,692 (monosubst. Aromat)	
¹H-NMR₃₀₀:	(CDCl ₃ /TMS): δ [ppm] = 0.92 (t, J = 7.5 Hz, 6H, 3-H, 1.50 – 1.70 (m, 4H, 2-H) 3.22 (t, J = 7.5 Hz, 4H, 1-H), 6.59 – 6.68 (, 3H, <i>o</i> -, <i>p</i> -H), 7.15 – 7.25 (, 2H, <i>m</i> -H)	

Versuch 3 *N,N*-Di-*n*-butylanilin [124]


Analog Versuch 1 werden 26.60 g (0.29 mol) Anilin, 72.50 g (0.57 mol) 1-Iodbutan und 39.50 g (0.29 mol) Kaliumcarbonat in 30 ml absolutem Dimethylformamid 48 h bei

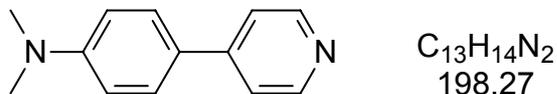
einer Badtemperatur von 130°C unter Rückfluß erhitzt. Nach der Aufarbeitung erhält man ein farbloses Öl.

Ausbeute:	41.02 g (70%) farbloses Öl	(78% [124])
Siedepunkt:	141 – 149°C / 21 mbar	(85°C / 0.01 mbar [124])
Brechungsindex:	n_D^{20} : 1.5160	(n_D^{20} : 1.5160 [124])
IR (Film):	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3024 (C-H arom.), 2957, 2932, 2872 (C-H aliph.), 1599 (C=C), 1505 (C-N), 744, 692 (monosubst. Aromat)	
¹H-NMR₃₀₀:	(CDCl ₃ /TMS): δ [ppm] = 0.95 (t, J = 7.4 Hz, 6H, 4-H), 1.31 – 1.38 (m, 4H, 3-H), 1.53 – 1.59 (m, 4H, 2-H), 3.25 (t, J = 7.7 Hz, 4H, 1-H), 6.59 – 6.64 (m, 3H, <i>o</i> -, <i>p</i> -H), 7.17 – 7.21 (m, 2H, <i>m</i> -H)	

Versuch 4 Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der [*N,N*-Dialkylaminophenyl]pyridine mit Hilfe von Cyanurchlorid [125]

Eine Mischung von 9.22 g (0.05 mol) Cyanurchlorid und 40 ml Pyridin wird für 15 Minuten bei 70°C gerührt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Es werden 0.15 mol *N,N*-Dialkylanilin zugegeben. Unter kräftigem Rühren wird portionsweise 20.0 g (0,15 mol) Aluminiumchlorid zugegeben, so dass die Reaktionstemperatur 30°C nicht übersteigt. Alsdann wird das Reaktionsgemisch 1,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluß im Verlauf von 1 Stunde auf 100 °C gebracht. Bei 100°C wird 2 Stunden gerührt. Man lässt im Anschluß auf Raumtemperatur abkühlen. Das zähflüssige Reaktionsgemisch wird mit 120 ml 10%iger Salzsäure gelöst, mit gekörnter Aktivkohle gekocht, abfiltriert und das Filtrat mit 15%iger Natronlauge neutralisiert. Das orangefarbene Produkt wird abgesaugt, mit Wasser gewaschen, getrocknet und über eine kurze Filtersäule mit Aceton gesäult.

Die Charakterisierung der *N,N*-Dialkylaminophenylphenylpyridine durch IR- und NMR-Spektroskopie ist zusammenfassend in Kapitel 4.2.5 dargestellt. Auf eine tabellarische Zusammenfassung dieser Daten am Ende der Synthesvorschriften wird daher verzichtet.

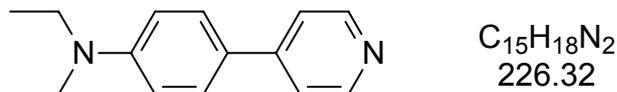
Versuch 4.1 [N,N-Dimethylamino]pyridin


Analog der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 4 werden 18.18 g (0.15 mol) *N,N*-Dimethylanilin mit 9.30 g (0.05 mol) Cyanurchlorid und 40 ml Pyridin umgesetzt. Nach der Aufarbeitung erhält man einen hellbeigen Feststoff.

Ausbeute: 12.49 g (42 %) beiges Pulver (97 % [94])

Schmelzpunkt: 230 °C (233 – 234°C [94])

Elementaranalyse: berechnet: C 78.75% H 7.12% N 14.13%
 gefunden: C 78.41% H 7.08% N 14.01%

Versuch 4.2 [N,N-Diethylamino]pyridin


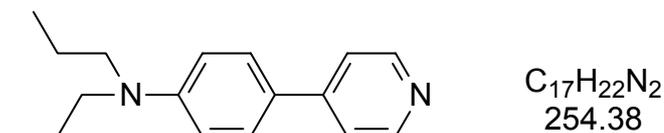
Analog der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 4 werden 22.39 g (0.15 mol) *N,N*-Diethylanilin mit 9.30 g (0.05 mol) Cyanurchlorid und 40 ml Pyridin umgesetzt. Nach der Aufarbeitung erhält man einen hellbeigen Feststoff.

Ausbeute: 13.58 g (40 %) beiges Pulver (86 % [94])

Schmelzpunkt: 158°C (157°C [94])

Elementaranalyse: berechnet: C 79.61% H 8.02% N 12.38%
 gefunden: C 79.50% H 7.98% N 12.26%

Versuch 4.3 [N,N-Dipropylamino]pyridin



Analog der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 4 werden 29.59 g (0.15 mol) *N,N*-Dipropylanilin mit 9,30 g (0,05 mol) Cyanurchlorid und 40 ml Pyridin umgesetzt. Nach der Aufarbeitung erhält man einen hellbeigen Feststoff.

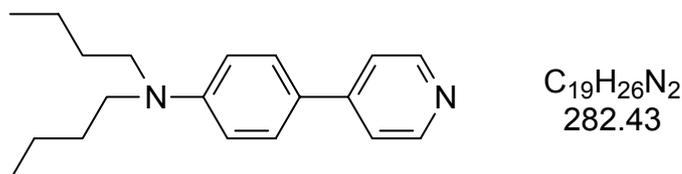
Ausbeute: 19.84 g (52 %) beiges Pulver (81 % [94])

Schmelzpunkt: 105°C (108°C [94])

Elementaranalyse: berechnet: C 80.27% H 8.72% N 11.01%

gefunden: C 79.99% H 8.43% N 10.89%

Versuch 4.4 [N,N-Dibutylamino]pyridin



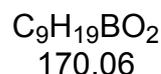
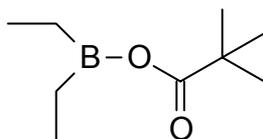
Analog der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 4 werden 30.80 g (0.15 mol) *N,N*-Dibutylanilin mit 9.30 g (0.05 mol) Cyanurchlorid und 40 ml Pyridin umgesetzt. Nach der Aufarbeitung erhält man einen hellbeigen Feststoff.

Ausbeute: 19.84 g (39 %) beiges Pulver (64 % [94])

Schmelzpunkt: 151°C (156 - 157°C [94])

Elementaranalyse: berechnet: C 80.80% H 9.28% N 9.92%

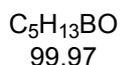
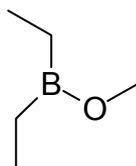
gefunden: C 79.78% H 8.98% N 9.38%

Versuch 5 Diethylborylpivalat [126]


Zu 4.97 g (0.05 mol) Triethylboran wird bei 0 °C eine Lösung von 4.14 g (0.41 mol) Pivalinsäure in 3 ml absolutem Pentan getropft (Ethanentwicklung). Nach Abziehen von Pentan und Triethylboran erfolgt fraktionierte Destillation. Aufgrund der hohen Hydrolyseempfindlichkeit wird das Destillat sofort umgesetzt.

Ausbeute: 3.57 g (52 %) (Lit.: 84%)

Siedepunkt: 57 – 60°C / 20 Torr (Lit.: 53°C / 8 Torr)

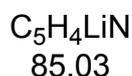
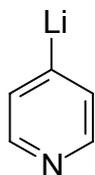
Versuch 6 Diethyl-methoxy-boran [105]


Aus einem Tropftrichter wird 34.7 g (1.1 mol) Methanol zu 98.0 g (1.0 mol) Triethylboran mit 1.5 ml Diethylborylpivalat (Versuch 5) zugetropft. Die Zugabe erfolgt so rasch, daß die Temperatur 80°C nicht übersteigt. Es folgt Destillation im Vakuum, nachdem überschüssiges Triethylboran im Vorlauf abgetrennt worden ist. Aufgrund der hohen Hydrolyseempfindlichkeit wird das Destillat sofort umgesetzt.

Ausbeute: 45.7 g (45 %) (Lit.: 86%)

Siedepunkt: 90 °C / 760 Torr (Lit.: 90°C / 760 Torr)

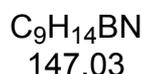
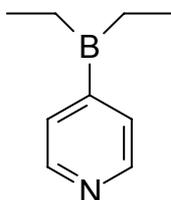
Versuch 7 4-Pyridyllithium [127]



3.9 g (20.0 mmol) 4-Brompyridinhydrochlorid werden in 100 ml einer 10%igen Na_2CO_3 -Lösung gelöst und das freigesetzte 4-Brompyridin mit einer Spritze aufgenommen und in 40 ml trockenen THF gelöst. Die etherische Lösung wird mit Magnesiumsulfat getrocknet.

Die etherische Lösung von 4-Brompyridin wird auf $-70^\circ C$ gekühlt. 12.5 ml einer 1.6 molaren Lösung von Butyllithium in n-Hexan (20 mmol) wird unter Stickstoffatmosphäre zugegeben und im Anschluß für 2 Stunden gerührt. Die etherische Lösung 4-Pyridyllithium wird so weiter eingesetzt.

Versuch 8 Diethyl-(4-pyridyl)-boran [128]



Die etherische Lösung von 4-Pyridyllithium aus Versuch 7 wird auf $-70^\circ C$ gekühlt und 2.0 g (20.0 mmol) Diethylmethoxyboran (Versuch 6) zugetropft. Die Mischung wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Der Ansatz wird mit 100 ml Ethylacetat verdünnt, mit gesättigter NaCl-Lösung (70 ml) gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach abziehen des Lösungsmittel wird säulenchromatographisch gereinigt (Silicagel / Toluol).

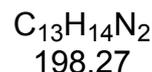
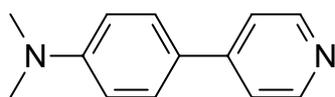
Ausbeute: 1.4 g (48 %) (Lit.: 71 %)

Schmelzpunkt: $> 250^\circ C$ (Lit.: $> 300^\circ C$)

1H -NMR₅₀₀: (CDCl₃): δ [ppm] = 0.40 – 1.05 (m, 10H), 6.96 (d, 2H, J = 6 Hz),
7.68 (d, 2H, J = 6 Hz)

Versuch 9 Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der [N,N-Dialkylaminophenyl]pyridine über Diethyl-(4-pyridyl)-boran [128]

Eine Mischung aus 294 mg (2 mmol) Diethyl-(4-Pyridyl-)boran und 3 mmol *N,N*-Dialkyl-*p*-bromanilin, 636 mg (6 mmol) gepulvertem KOH, 322 mg (1 mmol) Bu₄NBr und 115 mg (0.1 mmol) Pd(Ph₃P)₄ in 10 ml absolutem THF wird unter Stickstoff 12 Stunden refluxiert. Die Mischung wird verdünnt, mit 50 ml Ethylacetat und 40 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nachdem das Lösungsmittel abgezogen wurde, wird der Rückstand säulenchromatographisch mit Hexan / Ethylacetat (2:1) gereinigt.

Versuch 9.1 [N,N-Dimethylamino]pyridin

Analog der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 9 werden 294 mg (2 mmol) Diethyl-(4-Pyridyl-)boran und 600 mg (3 mmol) *N,N*-Dimethyl-*p*-bromanilin, 636 mg (6 mmol) gepulvertem KOH, 322 mg (1 mmol) Bu₄NBr und 115 mg (0.1 mmol) Pd(Ph₃P)₄ in 10 ml absolutem THF umgesetzt. Nach der Aufarbeitung erhält man einen hellbeigen Feststoff.

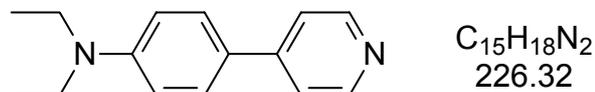
Ausbeute: 246 mg (62 %) beiges Pulver

Schmelzpunkt: 232 °C (233 – 234°C [94])

Elementaranalyse: berechnet: C 78.75% H 7.12% N 14.13%

gefunden: C 78.53% H 7.11% N 13.81%

Versuch 9.2 [N,N-Diethylamino]pyridin



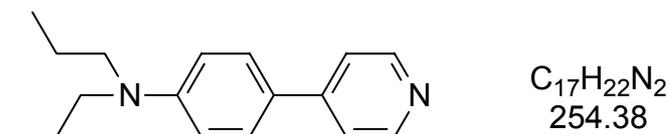
Analog der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 9 werden 294 mg (2 mmol) Diethyl-(4-Pyridyl-)boran und 680 mg (3 mmol) *N,N*-Diethyl-*p*-bromanilin, 636 mg (6 mmol) gepulvertem KOH, 322 mg (1 mmol) Bu₄NBr und 115 mg (0.1 mmol) Pd(Ph₃P)₄ in 10 ml absolutem THF umgesetzt. Nach der Aufarbeitung erhält man einen hellbeigen Feststoff.

Ausbeute: 272 mg (60 %) beiges Pulver

Schmelzpunkt: 156°C (157°C [94])

Elementaranalyse: berechnet: C 79.61% H 8.02% N 12.38%
gefunden: C 79.41% H 7.77% N 12.30%

Versuch 9.3 [N,N-Dipropylamino]pyridin

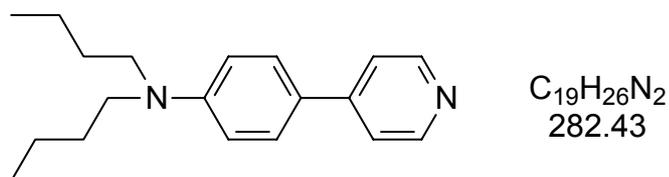


Analog der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 9 werden 294 mg (2 mmol) Diethyl-(4-Pyridyl-)boran und 770 mg (3 mmol) *N,N*-Dipropyl-*p*-Bromanilin, 636 mg (6 mmol) gepulvertem KOH, 322 mg (1 mmol) Bu₄NBr und 115 mg (0.1 mmol) Pd(Ph₃P)₄ in 10 ml absolutem THF umgesetzt. Nach der Aufarbeitung erhält man einen hellbeigen Feststoff.

Ausbeute: 300 mg (59 %) beiges Pulver

Schmelzpunkt: 108°C (108°C [94])

Elementaranalyse: berechnet: C 80.27% H 8.72% N 11.01%
gefunden: C 79.87% H 8.55% N 10.91%

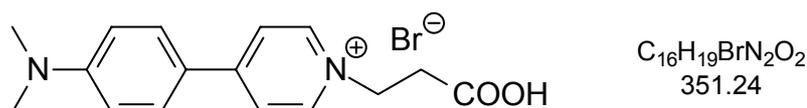
Versuch 9.4 [N,N-Dibutylamino]pyridin


Analog der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 9 werden 294 mg (2 mmol) Diethyl-(4-Pyridyl)-boran und 3 mmol (0,85g) *N,N*-Dibutyl-*p*-bromanilin, 636 mg (6 mmol) gepulvertem KOH, 322 mg (1 mmol) Bu₄NBr und 115 mg (0.1 mmol) Pd(Ph₃P)₄ in 10 ml absolutem THF umgesetzt. Nach der Aufarbeitung erhält man einen hellbeigen Feststoff.

Ausbeute: 322 mg (57 %) beiges Pulver

Schmelzpunkt: 154°C (156 - 157°C [94])

Elementaranalyse: berechnet: C 80.80% H 9.28% N 9.92%
 gefunden: C 80.70% H 9.01% N 9.30%

Versuch 9.5 1-(4-Carboxy-ethyl)-4-(4-dimethylamino-phenyl)-pyridiniumbromide (Di-1-APP-C₂COOH)


1.98 g (0.01 mol) Di-1-APPy und 1.53 g (0.01 mol) Di-1-APPy werden in absolutem Aceton gelöst und 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das Produkt scheidet sich in ausreichender Reinheit als gelber Feststoff ab, wird abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

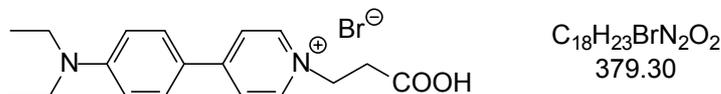
Ausbeute: 2.14 g (61 %) gelbes Pulver

Schmelzpunkt: > 300°C

Elementaranalyse: berechnet: C 54.71% H 5.45% N 7.98%
 gefunden: C 54.21% H 5.40% N 7.22%

UV/VIS (EtOH): λ_(max) (ε) = 436 nm (31900)

Versuch 9.6 **1-(4-Carboxy-ethyl)-4-(4-diethylamino-phenyl)-pyridiniumbromide (Di-2-APP-C₂COOH)**



2.26 g (0.01 mol) Di-2-APPy und 1.53 g (0.01 mol) Di-1-APPy werden in absolutem Aceton gelöst und 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das Produkt scheidet sich in ausreichender Reinheit als gelber Feststoff ab, wird abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

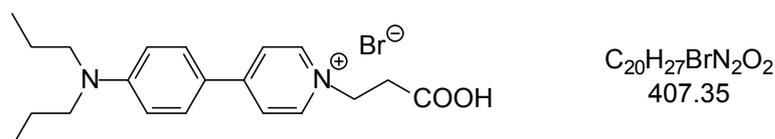
Ausbeute: 2.26 g (60 %) gelbes Pulver

Schmelzpunkt: > 300°C

Elementaranalyse: berechnet: C 57.00% H 6.11% N 7.39%
 gefunden: C 56.81% H 6.01% N 6.87%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 435 nm (32100)

Versuch 9.7 **1-(4-Carboxy-ethyl)-4-(4-dipropylamino-phenyl)-pyridiniumbromide (Di-3-APP-C₂COOH)**



2.54 g (0.01 mol) Di-3-APPy und 1.53 g (0.01 mol) Di-1-APPy werden in absolutem Aceton gelöst und 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das Produkt scheidet sich in ausreichender Reinheit als gelber Feststoff ab, wird abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

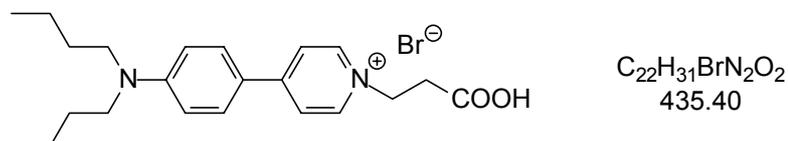
Ausbeute: 2.20 g (54 %) gelbes Pulver

Schmelzpunkt: 267°C

Elementaranalyse: berechnet: C 58.97% H 6.68% N 6.88%
 gefunden: C 58.80% H 6.41% N 6.25%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 432 nm (32500)

Versuch 9.8 **1-(4-Carboxy-ethyl)-4-(4-dibutylamino-phenyl)-pyridiniumbromide (Di-4-APP-C₂COOH)**



2.82 g (0.01 mol) Di-4-APPy und 1.53 g (0.01 mol) Di-1-APPy werden in absolutem Aceton gelöst und 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das Produkt scheidet sich in ausreichender Reinheit als gelber Feststoff ab, wird abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

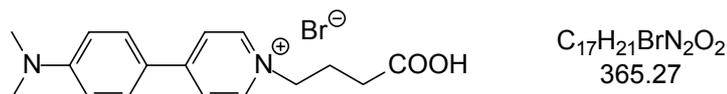
Ausbeute: 2.13 g (49 %) gelbes Pulver

Schmelzpunkt: 262°C

Elementaranalyse: berechnet: C 60.69% H 7.18% N 6.43%
 gefunden: C 60.15% H 7.11% N 6.15%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 430 nm (32500)

Versuch 9.9 **1-(4-Carboxy-propyl)-4-(4-dimethylamino-phenyl)-pyridiniumbromide (Di-1-APP-C₃COOH)**



1.98 g (0.01 mol) Di-1-APPy und 1.81 g (0.01 mol) 4-Brombuttersäure werden in absolutem Aceton gelöst und 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das Produkt scheidet sich in ausreichender Reinheit als gelber Feststoff ab, wird abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

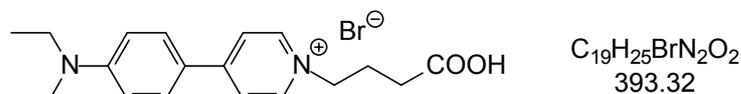
Ausbeute: 1.97 g (54 %) gelbes Pulver

Schmelzpunkt: >300°C

Elementaranalyse: berechnet: C 55.90% H 5.79% N 7.67%
 gefunden: C 55.29% H 5.44% N 7.55%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 437 nm (32800)

Versuch 9.10 **1-(4-Carboxy-propyl)-4-(4-diethylamino-phenyl)-pyridiniumbromide (Di-2-APP-C₃COOH)**



2.26 g (0.01 mol) Di-2-APPy und 1.81 g (0.01 mol) 4-Brombuttersäure werden in absolutem Aceton gelöst und 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das Produkt scheidet sich in ausreichender Reinheit als gelber Feststoff ab, wird abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 2.01 g (51 %) gelbes Pulver

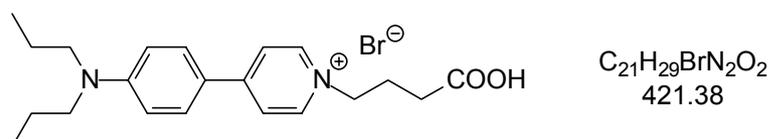
Schmelzpunkt: >300°C

Elementaranalyse: berechnet: C 58.02% H 6.41% N 7.12%

 gefunden: C 57.89% H 6.34% N 6.95%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\text{max})}$ (ϵ) = 434 nm (32800)

Versuch 9.11 **1-(4-Carboxy-propyl)-4-(4-dipropylamino-phenyl)-pyridiniumbromide (Di-3-APP-C₃COOH)**



2.54 g (0.01 mol) Di-3-APPy und 1.81 g (0.01 mol) 4-Brombuttersäure werden in absolutem Aceton gelöst und 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das Produkt scheidet sich in ausreichender Reinheit als gelber Feststoff ab, wird abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 2.19 g (52 %) gelbes Pulver

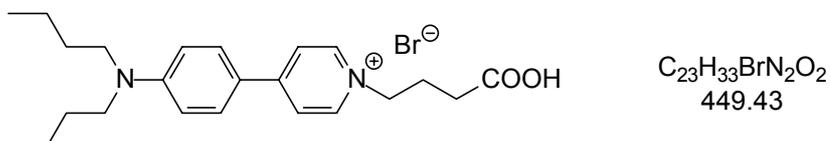
Schmelzpunkt: 266°C

Elementaranalyse: berechnet: C 59.86% H 6.94% N 6.65%

 gefunden: C 59.11% H 6.45% N 6.44%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\text{max})}$ (ϵ) = 431 nm (32900)

Versuch 9.12 1-(4-Carboxy-propyl)-4-(4-dibutylamino-phenyl)-pyridiniumbromide (Di-4-APP-C₃COOH)



2.82 g (0.01 mol) Di-4-APPy und 1.81 g (0.01 mol) 4-Brombuttersäure werden in absolutem Aceton gelöst und 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das Produkt scheidet sich in ausreichender Reinheit als gelber Feststoff ab, wird abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

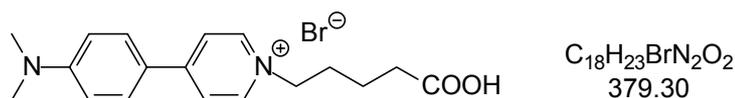
Ausbeute: 2.16 g (48 %) gelbes Pulver

Schmelzpunkt: 260°C

Elementaranalyse: berechnet: C 61.47% H 7.40% N 6.23%
 gefunden: C 60.98% H 7.33% N 6.01%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 429 nm (33300)

Versuch 9.13 1-(4-Carboxy-butyl)-4-(4-dimethylamino-phenyl)-pyridiniumbromide (Di-1-APP-C₄COOH)



1.98 g (0.01 mol) Di-1-APPy und 1.81 g (0.01 mol) 5-Bromvaleriansäure werden in absolutem Aceton gelöst und 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das Produkt scheidet sich in ausreichender Reinheit als gelber Feststoff ab, wird abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

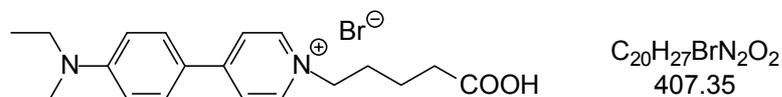
Ausbeute: 1.86 g (49 %) gelbes Pulver

Schmelzpunkt: >300°C

Elementaranalyse: berechnet: C 57.00% H 6.11% N 7.39%
 gefunden: C 56.87% H 6.00% N 7.11%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 435 nm (33000)

Versuch 9.14 **1-(4-Carboxy-butyl)-4-(4-diethylamino-phenyl)-pyridiniumbromide (Di-2-APP-C₄COOH)**



2.26 g (0.01 mol) Di-2-APPy und 1.81 g (0.01 mol) 5-Bromvaleriansäure werden in absolutem Aceton gelöst und 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das Produkt scheidet sich in ausreichender Reinheit als gelber Feststoff ab, wird abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 1.83 g (45 %) gelbes Pulver

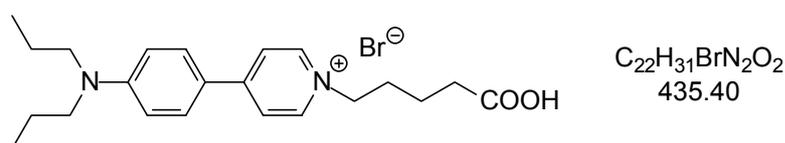
Schmelzpunkt: 278°C

Elementaranalyse: berechnet: C 58.97% H 6.68% N 6.88%

gefunden: C 58.25% H 6.24% N 6.26%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 431 nm (32800)

Versuch 9.15 **1-(4-Carboxy-butyl)-4-(4-dipropylamino-phenyl)-pyridiniumbromide (Di-3-APP-C₄COOH)**



2.54 g (0.01 mol) Di-3-APPy und 1.81 g (0.01 mol) 5-Bromvaleriansäure werden in absolutem Aceton gelöst und 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das Produkt scheidet sich in ausreichender Reinheit als gelber Feststoff ab, wird abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 2.35 g (54 %) gelbes Pulver

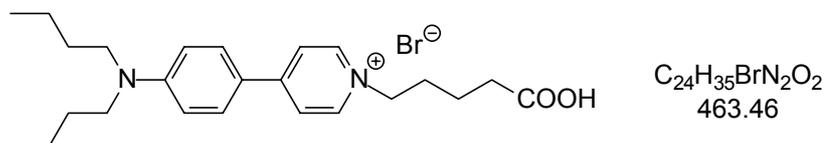
Schmelzpunkt: 270°C

Elementaranalyse: berechnet: C 60.69% H 7.18% N 6.43%

gefunden: C 60.34% H 7.04% N 6.11%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 430 nm (33100)

Versuch 9.16 **1-(4-Carboxy-butyl)-4-(4-dibutylamino-phenyl)-pyridiniumbromide**
(Di-4-APP-C₄COOH)



2.82 g (0.01 mol) Di-4-APPy und 1.81 g (0.01 mol) 5-Bromvaleriansäure werden in absolutem Aceton gelöst und 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das Produkt scheidet sich in ausreichender Reinheit als gelber Feststoff ab, wird abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

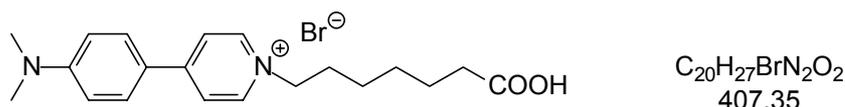
Ausbeute: 2.27 g (49 %) gelbes Pulver

Schmelzpunkt: 268°C

Elementaranalyse: berechnet: C 62.20% H 7.61% N 6.04%
 gefunden: C 62.00% H 7.18% N 5.87%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(max)} (\epsilon) = 435 \text{ nm} (33500)$

Versuch 9.17 **1-(4-Carboxy-hexyl)-4-(4-dimethylamino-phenyl)-pyridiniumbromide**
(Di-1-APP-C₆COOH)



1.98 g (0.01 mol) Di-1-APPy und 2.09 g (0.01 mol) 6-Bromheptansäure werden in absolutem Aceton gelöst und 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das Produkt scheidet sich in ausreichender Reinheit als gelber Feststoff ab, wird abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

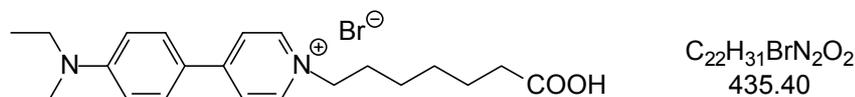
Ausbeute: 2.27 g (51 %) gelbes Pulver

Schmelzpunkt: 265°C

Elementaranalyse: berechnet: C 58.97% H 6.68% N 6.88%
 gefunden: C 58.41% H 6.18% N 6.45%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(max)} (\epsilon) = 435 \text{ nm} (32900)$

Versuch 9.18 **1-(4-Carboxy-hexyl)-4-(4-diethylamino-phenyl)-pyridiniumbromide (Di-2-APP-C₆COOH)**



2.26 g (0.01 mol) Di-2-APPy und 2.09 g (0.01 mol) 6-Bromheptansäure werden in absolutem Aceton gelöst und 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das Produkt scheidet sich in ausreichender Reinheit als gelber Feststoff ab, wird abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 2.05 g (47 %) gelbes Pulver

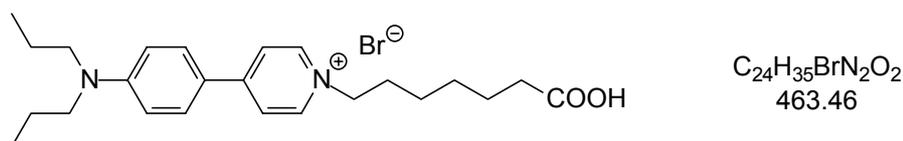
Schmelzpunkt: 264°C

Elementaranalyse: berechnet: C 60.69% H 7.18% N 6.43%

gefunden: C 60.14% H 6.94% N 6.11%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 434 nm (33200)

Versuch 9.19 **1-(4-Carboxy-hexyl)-4-(4-dipropylamino-phenyl)-pyridiniumbromide (Di-3-APP-C₆COOH)**



2.54 g (0.01 mol) Di-3-APPy und 2.09 g (0.01 mol) 6-Bromheptansäure werden in absolutem Aceton gelöst und 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das Produkt scheidet sich in ausreichender Reinheit als gelber Feststoff ab, wird abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 1.95 g (42 %) gelbes Pulver

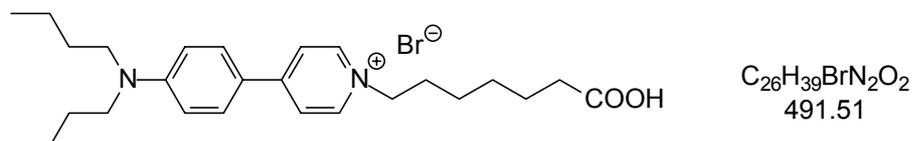
Schmelzpunkt: 261°C

Elementaranalyse: berechnet: C 62.20% H 7.61% N 6.04%

gefunden: C 61.89% H 7.55% N 5.89%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 430 nm (33800)

Versuch 9.20 **1-(4-Carboxy-hexyl)-4-(4-dibutylamino-phenyl)-pyridiniumbromide**
(Di-4-APP-C₆COOH)



2.82 g (0.01 mol) Di-4-APPy und 2.09 g (0.01 mol) 6-Bromheptansäure werden in absolutem Aceton gelöst und 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das Produkt scheidet sich in ausreichender Reinheit als gelber Feststoff ab, wird abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

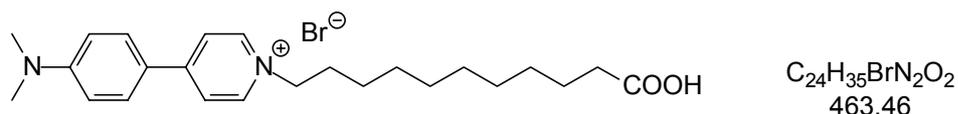
Ausbeute: 2.11 g (43 %) gelbes Pulver

Schmelzpunkt: 258°C

Elementaranalyse: berechnet: C 63.54% H 8.00% N 5.70%
 gefunden: C 63.14% H 7.85% N 5.54%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(max)} (\epsilon) = 428 \text{ nm} (33100)$

Versuch 9.21 **1-(4-Carboxy-decyl)-4-(4-dimethylamino-phenyl)-pyridiniumbromide**
(Di-1-APP-C₁₀COOH)



1.98 g (0.01 mol) Di-1-APPy und 2.65 g (0.01 mol) 11-Bromundecansäure werden in absolutem Aceton gelöst und 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das Produkt scheidet sich in ausreichender Reinheit als gelber Feststoff ab, wird abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

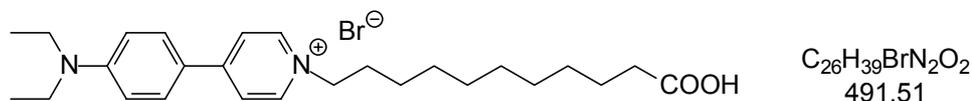
Ausbeute: 2.13 g (46 %) gelbes Pulver

Schmelzpunkt: 260°C

Elementaranalyse: berechnet: C 62.20% H 7.61% N 6.04%
 gefunden: C 61.98% H 7.21% N 5.64%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(max)} (\epsilon) = 437 \text{ nm} (33800)$

Versuch 9.22 **1-(4-Carboxy-decyl)-4-(4-diethylamino-phenyl)-pyridiniumbromide**
(Di-2-APP-C₁₀COOH)



2.26 g (0.01 mol) Di-2-APPy und 2.65 g (0.01 mol) 11-Bromundecansäure werden in absolutem Aceton gelöst und 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das Produkt scheidet sich in ausreichender Reinheit als gelber Feststoff ab, wird abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 2.16 g (44 %) gelbes Pulver

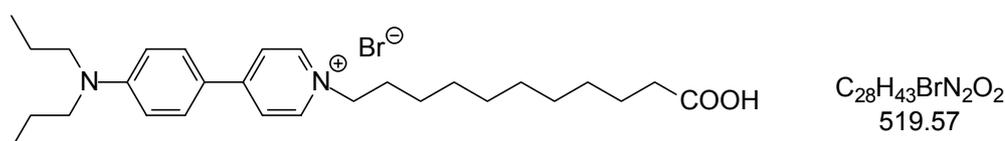
Schmelzpunkt: 256°C

Elementaranalyse: berechnet: C 63.54% H 8.00% N 5.70%

 gefunden: C 63.07% H 7.14% N 5.31%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)} (\epsilon) = 435 \text{ nm} (33400)$

Versuch 9.23 **1-(4-Carboxy-decyl)-4-(4-dipropylamino-phenyl)-pyridiniumbromide**
(Di-3-APP-C₁₀COOH)



2.54 g (0.01 mol) Di-3-APPy und 2.65 g (0.01 mol) 11-Bromundecansäure werden in absolutem Aceton gelöst und 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das Produkt scheidet sich in ausreichender Reinheit als gelber Feststoff ab, wird abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 2.34 g (45 %) gelbes Pulver

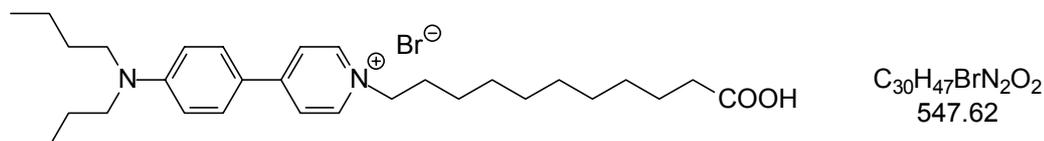
Schmelzpunkt: 255°C

Elementaranalyse: berechnet: C 64.73% H 8.34% N 5.39%

 gefunden: C 64.21% H 8.11% N 5.21%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)} (\epsilon) = 430 \text{ nm} (33500)$

Versuch 9.24 **1-(4-Carboxy-decyl)-4-(4-dibutylamino-phenyl)-pyridiniumbromide (Di-4-APP-C₁₀COOH)**



2.82 g (0.01 mol) Di-4-APPy und 2.65 g (0.01 mol) 11-Bromundecansäure werden in absolutem Aceton gelöst und 6 Stunden unter Rückfluß gekocht. Das Produkt scheidet sich in ausreichender Reinheit als gelber Feststoff ab, wird abgesaugt und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 2.25 g (41 %) gelbes Pulver

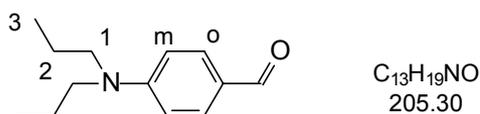
Schmelzpunkt: 248°C

Elementaranalyse: berechnet: C 65.80% H 8.65% N 5.12%

 gefunden: C 65.71% H 8.08% N 4.87%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 428 nm (32900)

Versuch 10 **p-N,N-Di-n-propylaminobenzaldehyd [82]**

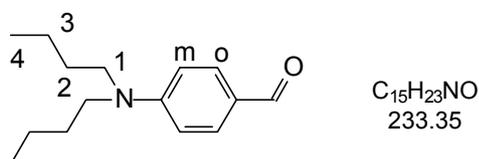


Zu einer Mischung von 17.20 g (97 mmol) *N,N*-Di-*n*-propylanilin und 25 ml abs. DMF werden bei einer Temperatur unter 20°C 14.88 g (97 mmol) Phosphorylchlorid langsam zutropft. Nach beendeter Zugabe wird noch 1 Stunde bei 20°C gerührt, dann für 3 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt. Die Mischung wird unter Eiskühlung auf 100 g Eis gegossen und mit 20%iger Natronlauge auf pH 6 gebracht. Es wird dreimal mit je 200 ml Ether ausgeschüttelt, die Etherphase mit 100 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Ethers wird im Vakuum fraktioniert destilliert.

Ausbeute: 11.93 g (60 %) blaßgelbes Öl (76 % [82])

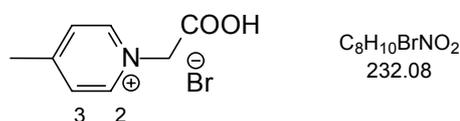
Siedepunkt:	144 – 145°C	(180 – 182°C / 4mbar [82])
Brechungsindex:	n_D^{20} : 1.5681	(n_D^{20} : 1.5685 [82])
IR (Film):	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 2874 – 2962 (C-H aliph.), 2729, 2806 (C-H aldehyd.), 1667 (C=O aromat. Aldehyde), 1595 (C=C), 815 (1,4-disubst. Aromaten)	
¹H-NMR₃₀₀:	(CDCl ₃ /TMS): δ [ppm] = 0.95 (t, J = 7.4 Hz, 6H, 3-H), 1.60 – 1.70 (m, 4H, 2-H), 3.32 (t, J = 7.7 Hz, 4H, 1-H), 6.65 (d, J = 9.0 Hz, 2H, <i>m</i> -H), 7.70 (d, J = 9.1 Hz, 2H, <i>o</i> -H), 9.70 (s, 1H, CHO)	

Versuch 11 **p-N,N-Di-n-butylaminobenzaldehyd [82]**



Zu einer Mischung von 20.00 g (97 mmol) *N,N*-Di-*n*-butylanilin und 25 ml abs. DMF werden bei einer Temperatur unter 20°C 14.88 g (97 mmol) Phosphorylchlorid langsam zugegeben. Nach beendeter Zugabe wird noch 1 Stunde bei 20°C gerührt, dann für 3 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt. Die Mischung wird unter Eiskühlung auf 100 g Eis gegossen und mit 20%iger Natronlauge auf pH 6 gebracht. Es wird dreimal mit je 200 ml Ether ausgeschüttelt, die Etherphase mit 100 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Ethers wird im Vakuum fraktioniert destilliert.

Ausbeute:	13.96 g (62 %) blaßgelbes Öl	(70 % [82])
Siedepunkt:	125 – 129°C / 0.02 mbar	(198 – 200°C / 3mbar [82])
Brechungsindex:	n_D^{20} : 1.5854	(n_D^{20} : 1.5852 [82])
IR (Film):	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 2872 – 2957 (C-H aliph.), 2728, 2806 (C-H aldehyd.), 1667 (C=O aromat. Aldehyde), 1595 (C=C), 814 (1,4-disubst. Aromaten)	
¹H-NMR₃₀₀:	(CDCl ₃ /TMS): δ [ppm] = 0.97 (t, J = 7.4 Hz, 6H, 4-H), 1.38 – 1.45 (m, 4H, 3-H), 1.57 – 1.63 (m, 4H, 2-H), 3.34 (t, J = 7.7 Hz, 4H, 1-H), 6.64 (d, J = 9.0 Hz, 2H, <i>m</i> -H), 7.69 (d, J = 9.1 Hz, 2H, <i>o</i> -H), 9.69 (s, 1H, CHO)	

Versuch 12 Synthese der Picoliniumsalze
Versuch 12.1 1-(1-Carboxymethyl)-4-picoliniumbromid


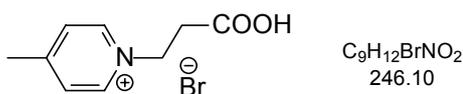
10.0 g (0.07 mol) 2-Bromessigsäure und 6.70 g (0.07 mol) 4-Picolin werden in 40 ml absolutem Aceton 3 h unter Rückfluß erhitzt. Der ausgefallene Feststoff wird abgesaugt, mehrmals mit Aceton gewaschen und 5 h im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 12.5 g (76 %) weißes Pulver

Schmelzpunkt: 185 – 188°C

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

$^1\text{H-NMR}_{300}$: (CDCl_3/TMS): δ [ppm] = 8.79 (d, J = 7 Hz, 2H, 2-H), 7.87 (d, J = 7 Hz, 2H, 3-H), 5.21 (s, 2H, Methylen), 2.62 (s, 3H, Methyl)

Versuch 12.2 1-(2-Carboxyethyl)-4-picoliniumbromid


10.9 g (0.07 mol) 3-Brompropionsäure und 6.70 g (0.07 mol) 4-Picolin werden in 40 ml absolutem Aceton 3 h unter Rückfluß erhitzt. Der ausgefallene Feststoff wird abgesaugt, mehrmals mit Aceton gewaschen und 5 h im Ölpumpenvakuum getrocknet.

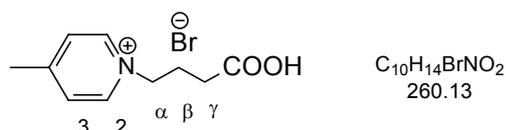
Ausbeute: 12.2 g (70 %) weißes Pulver

Schmelzpunkt: 161°C

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

¹H-NMR₃₀₀: (CDCl₃/TMS): δ [ppm] = 8.72 (d, J 7 Hz, 2H, 2,2'-H), 7.76 (d, J = 7Hz, 2H, 3,3'-H), 4.50 (t, J = 7 Hz, 2H, 1''-H), 2.84 (t, J = 7Hz, 2H, 2''-H), 2.38 (s, 3H, Methyl)

Versuch 12.3 1-(4-Carboxypropyl)-4-picoliniumbromid



11.9 g (0.07 mol) 3-Brombutansäure und 6.70 g (0.07 mol) 4-Picolin werden in 40 ml absolutem Aceton 3 h unter Rückfluß erhitzt. Der ausgefallene Feststoff wird abgesaugt, mehrmals mit Aceton gewaschen und 5 h im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 12.2 g weißer Feststoff (70%)

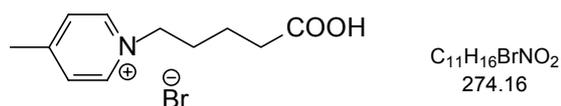
Ausbeute: 12.2 g (70 %) weißes Pulver

Schmelzpunkt: 161°C

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

¹H-NMR₃₀₀: (CDCl₃/TMS): δ [ppm] = 8.92 (d, J = 7 Hz, 2H, 2-H), 7.99 (d, J = 7 Hz, 2H, 3-H), 4.56 (t, J = 7 Hz, 2H, α-H), 2.61 (s, 3H, Methyl), 2.33 (t, J = 7 Hz, 2H, γ-H), 2.13 (m, 2H, β-H)

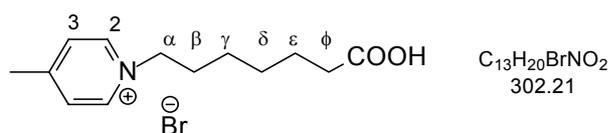
Versuch 12.4 1-(4-Carboxybutyl)-4-picoliniumbromid



12.9 g (0.07 mol) 5-Bromvaleriansäure und 6.70 g (0.07 mol) 4-Picolin werden in 40 ml absolutem Aceton 3 h unter Rückfluß erhitzt. Der ausgefallene Feststoff wird abgesaugt, mehrmals mit Aceton gewaschen und 5 h im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute:	13.6 g (70 %) weißes Pulver
Schmelzpunkt:	112°C
IR (Film):	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3356 (O-H Carboxyl), 3046 (C-H aromat.), 2890 – 2934 (C-H aliph.), 1723 (C=O Carboxyl), 1640 (C=C Pyridin), 827 (C=C 1,4 disubst. Aromat)
¹H-NMR₃₀₀:	(CDCl ₃ /TMS): δ [ppm] = 8.66 (d, J = 7 Hz, 2H, 2-H), 7.88 (d, J = 7 Hz, 2H, 3-H), 4.56 (t, J = 7Hz, 2H, α -H), 2.65 (s, 3H, Methyl), 2.43 (t, J = 7 Hz, 2H, δ -H), 2.04 (m, J = 7Hz, 2H, β -H), 1.64 (m, J = 7 Hz, 2H, γ -H)

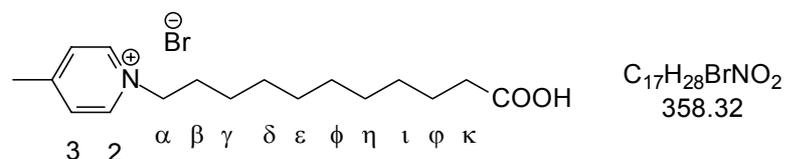
Versuch 12.5 1-(5-Carboxyhexyl)-4-picoliniumbromid



14.8 g (0.07 mol) 7-Bromheptansäure und 6.70 g (0.07 mmol) 4-Picolin werden in 40 ml absolutem Aceton 3 h unter Rückfluß erhitzt. Der ausgefallene Feststoff wird abgesaugt, mehrmals mit Aceton gewaschen und 5 h im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute:	13.9 g (65 %) weißes Pulver
Schmelzpunkt:	125°C
IR (Film):	$\tilde{\nu}$ [cm ⁻¹] = 3431 (O-H Carboxyl), 3040 (C-H aromat.), 2850 – 2921 (C-H aliph.), 1704 (CO Carboxyl), 1638 (C=C Pyridin), 1467 (C-H – Def.), 829 (C=C 1,4-disubst. Aromat)
¹H-NMR₅₀₀:	(CDCl ₃ /TMS): δ [ppm] = 11.83 (s, 1H, Carboxyl-H), 8.73 (d, J = 7 Hz, 2H, 2-H), 7.78 (d, J = 7 Hz, 2H, 3-H), 4.31 (t, J = 7 Hz, 2H, α -H), 2.40 (s, 3H, Methyl), 1.98 (t, J = 7Hz, 2H, ϕ -H), 1.67 (t, J = 7Hz, 2H, β -H), 1.27 (m, 2H, ϵ -H), 1.11 (m, 4H, γ, δ -H)

Versuch 12.6 1-(10-Carboxydecyl)-4-picoliniumbromid



18.8 g (0.07 mol) 11-Bromundecansäure und 6.70 g (0.07 mol) 4-Picolin werden in 40 ml absolutem Aceton 3 h unter Rückfluß erhitzt. Der ausgefallene Feststoff wird abgesaugt, mehrmals mit Aceton gewaschen und 5 h im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 15.3 g (60 %) weißes Pulver

Schmelzpunkt: 156°C

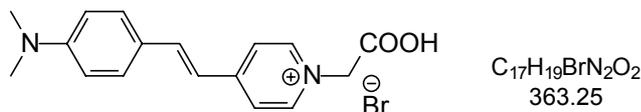
IR (Film): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3449 (O-H Carboxyl), 3044 (C-H aromat.), 2847 – 2919 (C-H aliph.), 1704 (C=O Carboxyl), 1638 (C=C Pyridin), 1467 (C-H – Def.), 829 (C=C 1,4 disubst. Aromat)

1H -NMR₅₀₀: (CDCl₃/TMS): δ [ppm] = 11.78 (s, 1H, Carboxyl-H), 8.73 (d, J = 7 Hz, 2H, 2-H), 7.78 (d, J = 7 Hz, 2H, 3-H), 4.32 (t, J = 7 Hz, 2H, α -H), 2.40 (s, 3H, Methyl), 1.98 (t, J = 7 Hz, 2H, κ -H), 1.68 (t, J = 7 Hz, 2H, β -H), 1.27 (m, J = 7 Hz, 2H, ι -H), 1.27 (m, 8H, γ - η -H)

Versuch 13 Allgemeine Vorschrift zur Synthese der Styrylfarbstoffe

Das Picoliniumsalz wird mit dem 4-(*N,N*-Di-*n*-Alkylamino)-benzaldehyds in equimolaren Mengen in absolutem Methanol gelöst und mit der 2,5fachen Menge Piperidin versetzt. Das ganze wird für 24h bei RT gerührt und im Anschluß etwa die Hälfte des Methanols abdestilliert. Die Lösung wird unter Eiskühlung tropfenweise mit Bromwasserstoffsäure (48%) versetzt, bis ein dicker Niederschlag entsteht und die Suspension schwach sauer (pH 6 bis 5) ist. Eventuell muß mit Wasser verdünnt werden. Bei Zugabe von zuviel Säure, muß die Lösung mit K_2CO_3 -Lösung versetzt werden, bis sich der Niederschlag zurückbildet. Das abgesaugte Rohprodukt wird aus Ethanol / Ether bzw. bei zunehmender Alkyl-Kettenlänge aus Ethanol / *n*-Hexan umkristallisiert.

Versuch 13.1 1-(1-Carboxymethyl)-4-(*p*-(*N,N*-dimethylamino)-phenyl)-pyridinium-bromid (Di-1-ASP-C₁COOH)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 2.32 g (0.01 mol) 1-(1-Carboxymethyl)-4-picoliniumbromid (Versuch 12.1), 1.49 g (0.01 mol) *p*-(*N,N*-Dimethylamino)-benzaldehyd und 2.01 g / 2.42 ml (0.03 mol) Piperidin in abs. Methanol umgesetzt.

Ausbeute: 2.25 g (62 %) rotes Pulver

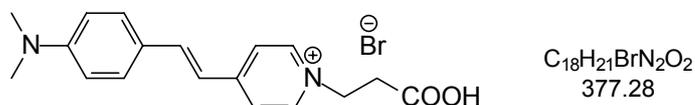
Schmelzpunkt: 160°C

Elementaranalyse: berechnet: C 56.21% H 5.27% N 7.71%

 gefunden: C 56.14% H 5.14% N 7.55%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 472 nm (56100)

Versuch 13.2 **1-(2-Carboxyethyl)-4-(p-(*N,N*-dimethylamino)-phenyl)-pyridinium-bromid (Di-1-ASP-C₂COOH)**



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 2.46 g (0.01 mmol) 1-(2-Carboxyethyl)-4-picoliniumbromid (Versuch 12.2), 1.49 g (0.01 mmol) p-(*N,N*-Dimethylamino)-benzaldehyd und 2.01 g / 2.42 ml (0.03 mmol) Piperidin in abs. Methanol umgesetzt.

Ausbeute: 2.57 g (68 %) rotes Pulver

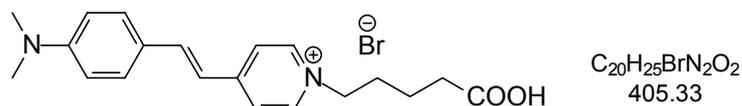
Schmelzpunkt: 171°C

Elementaranalyse: berechnet: C 57.30% H 5.61% N 7.43%

gefunden: C 57.07% H 5.42% N 7.24%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 482 nm (51300)

Versuch 13.3 **1-(4-Carboxybutyl)-4-(p-(*N,N*-dimethylamino)-phenyl)-pyridinium-bromid (Di-1-ASP-C₄COOH)**



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 1.73 g (0.01 mol) 1-(4-Carboxybutyl)-4-picoliniumbromid (Versuch 12.4), 1.49 g (0.01 mol) p-(*N,N*-Dimethylamino)-benzaldehyd und 2.01 g / 2.42 ml (0.03 mol) Piperidin in abs. Methanol umgesetzt.

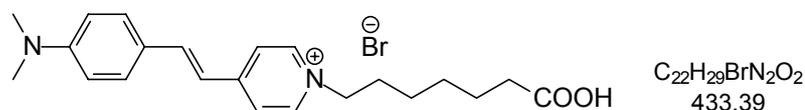
Ausbeute: 2.59 g (64 %) rotes Pulver

Schmelzpunkt: 172°C

Elementaranalyse: berechnet: C 59.26% H 6.22% N 6.91%

gefunden: C 58.87% H 6.10% N 6.87%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 485 nm (49800)

Versuch 13.4 1-(5-Carboxyhexyl)-4-(p-(N,N-dimethylamino)-phenyl)-pyridinium-bromid (Di-1-ASP-C₆COOH)


Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 3.02 g (0.01 mol) 1-(5-Carboxyhexyl)-4-picoliniumbromid (Versuch 12.5), 1.49 g (0.01 mol) p-(N,N-Dimethylamino)-benzaldehyd und 2.01 g / 2.42 ml (0.03 mmol) Piperidin in abs. Methanol umgesetzt.

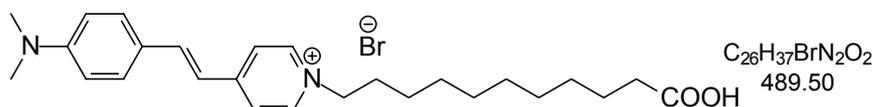
Ausbeute: 3.03 g (70 %) rotes Pulver

Schmelzpunkt: 188°C

Elementaranalyse: berechnet: C 60.97% H 6.74% N 6.46%

gefunden: C 60.75% H 6.44% N 6.24%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 480 nm (45800)

Versuch 13.5 1-(10-Carboxydecyl)-4-(p-(N,N-dimethylamino)-phenyl)-pyridinium-bromid (Di-1-ASP-C₁₀COOH)


Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 3.58 g (0.01 mol) 1-(10-Carboxydecyl)-4-picoliniumbromid (Versuch 12.6), 1.49 g (0.01 mol) p-(N,N-Dimethylamino)-benzaldehyd und 2.01 g / 2.42 ml (0.03 mmol) Piperidin in abs. Methanol umgesetzt.

Ausbeute: 2.84 g (58 %) rotes Pulver

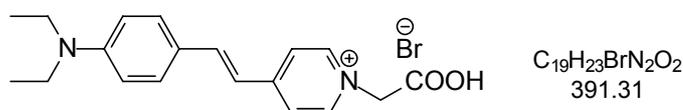
Schmelzpunkt: 171°C

Elementaranalyse: berechnet: C 63.80% H 7.62% Br 16.32% N 5.72%

gefunden: C 63.41% H 7.14% N 5.34%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 481 nm (42900)

Versuch 13.6 **1-(1-Carboxymethyl)-4-(p-(N,N-diethylamino)-phenyl)-pyridinium-bromid (Di-2-ASP-C₁COOH)**



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 2.32 g (0.01 mmol) 1-(1-Carboxymethyl)-4-picoliniumbromid (Versuch 12.1), 1.77 g (0.01 mol) p-(N,N-Diethylamino)-benzaldehyd und 2.01 g / 2.42 ml (0.03 mmol) Piperidin in abs. Methanol umgesetzt.

Ausbeute: 2.31 g (59 %) rotes Pulver

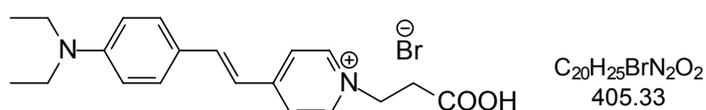
Schmelzpunkt: 189°C

Elementaranalyse: berechnet: C 58.32% H 5.92% N 7.16%

 gefunden: C 58.14% H 5.57% N 7.02%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(max)} (\epsilon) = 506 \text{ nm} (48700)$

Versuch 13.7 **1-(2-Carboxyethyl)-4-(p-(N,N-diethylamino)-phenyl)-pyridinium-bromid (Di-2-ASP-C₂COOH)**



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 2.60 g (0.01 mol) 1-(2-Carboxyethyl)-4-picoliniumbromid (Versuch 12.2), 1.77 g (0.01 mol) p-(N,N-Diethylamino)-benzaldehyd und 2.01 g / 2.42 ml (0.03 mol) Piperidin in abs. Methanol umgesetzt.

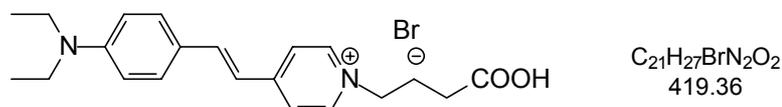
Ausbeute: 2.27 g (56 %) rotes Pulver

Schmelzpunkt: 185°C

Elementaranalyse: berechnet: C 59.26% H 6.22% N 6.91%

 gefunden: C 58.99% H 5.98% N 6.57%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(max)} (\epsilon) = 599 \text{ nm} (52700)$

Versuch 13.8 1-(4-Carboxypropyl)-4-(p-(N,N-diethylamino)-phenyl)-pyridinium-bromid (Di-2-ASP-C₃COOH)


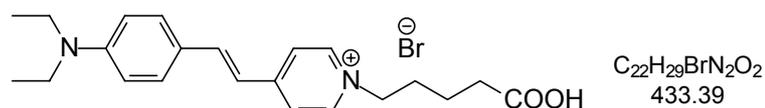
Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 1.80 g (0.01 mol) 1-(4-Carboxybutyl)-4-(p-(N,N-dimethylamino)-phenyl)-pyridinium-bromid (Di-1-ASP-C₄COOH) (Versuch 12.3), 1.77 g (0.01 mol) p-(N,N-Diethylamino)-benzaldehyd und 2.01 g / 2.42 ml (0.03 mol) Piperidin in abs. Methanol umgesetzt.

Ausbeute: 2.27 g (56 %) rotes Pulver

Schmelzpunkt: 176°C

Elementaranalyse: berechnet: C 60.15% H 6.49% N 6.68%
 gefunden: C 59.86% H 6.21% N 6.21%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 496 nm (50200)

Versuch 13.9 1-(4-Carboxybutyl)-4-(p-(N,N-diethylamino)-phenyl)-pyridinium-bromid (Di-2-ASP-C₄COOH)


Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 2.74 g (0.01 mol) 1-(4-Carboxybutyl)-4-picoliniumbromid (Versuch 12.4), 1.77 g (0.01 mol) p-(N,N-Diethylamino)-benzaldehyd und 2.01 g / 2.42 ml (0.03 mol) Piperidin in abs. Methanol umgesetzt.

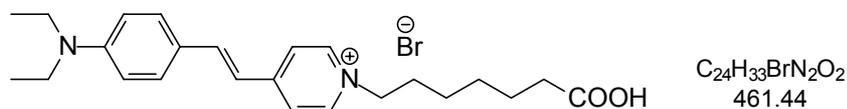
Ausbeute: 2.51 g (58 %) rotes Pulver

Schmelzpunkt: 171°C

Elementaranalyse: berechnet: C 60.97% H 6.74% Br N 6.46%
 gefunden: C 60.25% H 6.42% N 6.11%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 494 nm (49800)

Versuch 13.10 1-(5-Carboxyhexyl)-4-(p-(N,N-diethylamino)-phenyl)-pyridinium-bromid (Di-1-ASP-C₆COOH)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 3.02 g (0.01 mol) 1-(5-Carboxyhexyl)-4-picoliniumbromid (Versuch 12.5), 1.77 g (0.01 mol) p-(N,N-Diethylamino)-benzaldehyd und 2.01 g / 2.42 ml (0.03 mol) Piperidin in abs. Methanol umgesetzt.

Ausbeute: 2.35 g (51 %) rotes Pulver

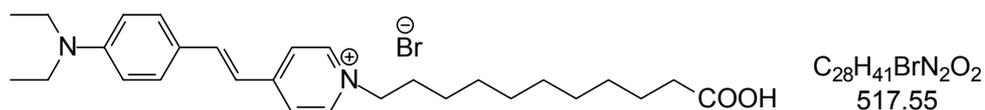
Schmelzpunkt: 178°C

Elementaranalyse: berechnet: C 62.47% H 7.21% N 6.07%

gefunden: C 62.17% H 6.98% N 5.79%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 493 nm (46700)

Versuch 13.11 1-(10-Carboxydecyl)-4-(p-(N,N-diethylamino)-phenyl)-pyridinium-bromid (Di-2-ASP-C₁₀COOH)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 3.58 g (0.01 mol) 1-(10-Carboxydecyl)-4-picoliniumbromid (Versuch 12.6), 1.77 g (0.01 mol) p-(N,N-Diethylamino)-benzaldehyd und 2.01 g / 2.42 ml (0.03 mol) Piperidin in abs. Methanol umgesetzt.

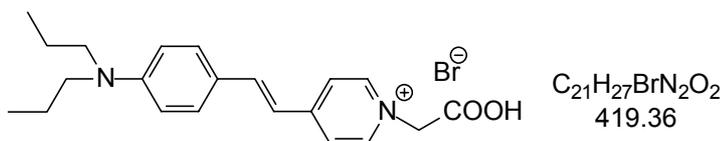
Ausbeute: 2.48 g (48 %) rotes Pulver

Schmelzpunkt: 171°C

Elementaranalyse: berechnet: C 64.98% H 7.98% N 5.41%

gefunden: C 64.73% H 7.64% N 5.38%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 491 nm (47300)

Versuch 13.12 1-(1-Carboxymethyl)-4-(p-(N,N-dipropylamino)-phenyl)-pyridinium-bromid (Di-3-ASP-C₁COOH)


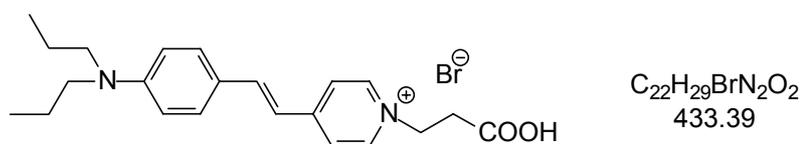
Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 2.32 g (0.01 mol) 1-(1-Carboxymethyl)-4-picoliniumbromid (Versuch 12.1), 2.05 g (0.01 mol) p-N,N-Di-n-propylaminobenzaldehyd (Versuch 10) und 2.01 g / 2.42 ml (0.03 mol) Piperidin in abs. Methanol umgesetzt.

Ausbeute: 2.52 g (60 %) rotes Pulver

Schmelzpunkt: 187°C

Elementaranalyse: berechnet: C 60.15% H 6.49% N 6.68%
 gefunden: C 59.82% H 6.19% N 6.58%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 489 nm (38800)

Versuch 13.13 1-(2-Carboxyethyl)-4-(p-(N,N-dipropylamino)-phenyl)-pyridinium-bromid (Di-3-ASP-C₂COOH)


Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 2.46 g (0.01 mol) 1-(2-Carboxyethyl)-4-picoliniumbromid (Versuch 12.2), 2.05 g (0.01 mol) p-N,N-Di-n-propylaminobenzaldehyd (Versuch 10) und 2.01 g / 2.42 ml (0.03 mol) Piperidin in abs. Methanol umgesetzt.

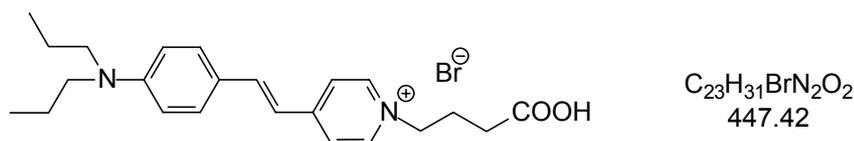
Ausbeute: 2.90 g (67 %) rotes Pulver

Schmelzpunkt: 181°C

Elementaranalyse: berechnet: C 60.97% H 6.74% N 6.46%
 gefunden: C 60.57% H 6.70% N 6.38%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 498 nm (50100)

Versuch 13.14 1-(4-Carboxypropyl)-4-(p-(*N,N*-dipropylamino)-phenyl)-pyridinium-bromid (Di-3-ASP-C₃COOH)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 2.74 g (0.01 mol) 1-(4-Carboxypropyl)-4-picoliniumbromid (Versuch 12.3), 2.05 g (0.01 mol) *p-N,N*-Dipropylaminobenzaldehyd (Versuch 10) und 2.01 g / 2.42 ml (0.03 mol) Piperidin in abs. Methanol umgesetzt.

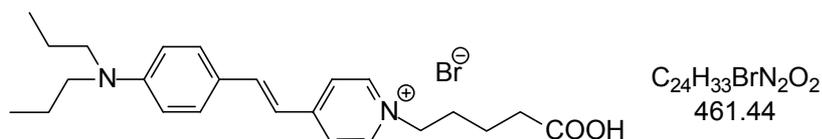
Ausbeute: 2.46 g (55 %) rotes Pulver

Schmelzpunkt: 175°C

Elementaranalyse: berechnet: C 61.74% H 6.98% N 6.26%
gefunden: C 61.28% H 6.37% N 6.06%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 496 nm (49600)

Versuch 13.15 1-(4-Carboxybutyl)-4-(p-(*N,N*-dipropylamino)-phenyl)-pyridinium-bromid (Di-3-ASP-C₄COOH)



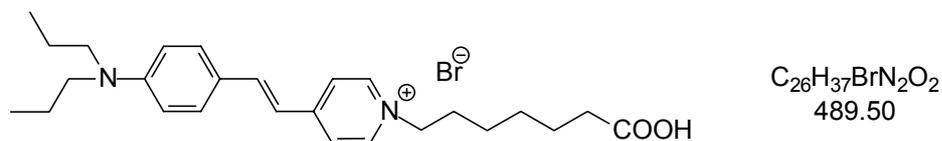
Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 2.74 g (0.01 mol) 1-(4-Carboxybutyl)-4-picoliniumbromid (Versuch 12.4), 2.05 g (0.01 mol) *p-N,N*-Dipropylaminobenzaldehyd (Versuch 10) und 2.01 g / 2.42 ml (0.03 mol) Piperidin in abs. Methanol umgesetzt.

Ausbeute: 2.40 g (52 %) rotes Pulver

Schmelzpunkt: 167°C

Elementaranalyse: berechnet: C 62.47% H 7.21% N 6.07%
gefunden: C 62.12% H 7.05% N 5.89%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 494 nm (49400)

Versuch 13.16 1-(5-Carboxyhexyl)-4-(p-(N,N-dipropylamino)-phenyl)-pyridinium-bromid (Di-3-ASP-C₆COOH)


Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 3.02 g (0.01 mol) 1-(5-Carboxyhexyl)-4-picoliniumbromid (Versuch 12.5), 2.05 g (0.01 mol) p-N,N-Di-n-propylaminobenzaldehyd (Versuch 10) und 2.01 g / 2.42 ml (0.03 mol) Piperidin in abs. Methanol umgesetzt.

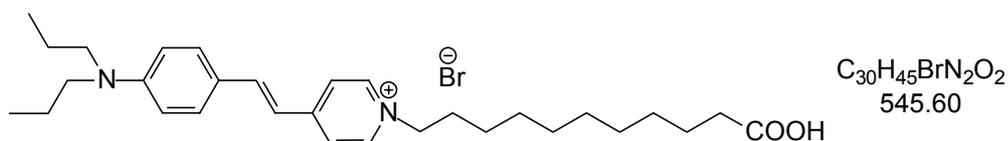
Ausbeute: 2.15 g (44 %) rotes Pulver

Schmelzpunkt: 159°C

Elementaranalyse: berechnet: C 63.80% H 7.62% N 5.72%

gefunden: C 63.28% H 7.27% N 5.24%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 492 nm (42400)

Versuch 13.17 1-(10-Carboxydecyl)-4-(p-(N,N-dipropylamino)-phenyl)-pyridinium-bromid (Di-3-ASP-C₁₀COOH)


Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 3.58 g (0.01 mol) 1-(10-Carboxydecyl)-4-picoliniumbromid (Versuch 12.6), 2.05 g (0.01 mol) p-N,N-Di-n-propylaminobenzaldehyd (Versuch 10) und 2.01 g / 2.42 ml (0.03 mol) Piperidin in abs. Methanol umgesetzt.

Ausbeute: 2.29 g (42 %) rotes Pulver

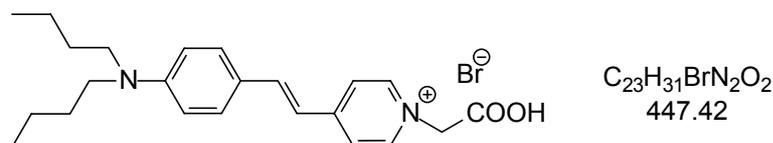
Schmelzpunkt: 152°C

Elementaranalyse: berechnet: C 66.04% H 8.31% N 5.13%

gefunden: C 65.83% H 8.06% N 7.92%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 491 nm (41600)

Versuch 13.18 1-(1-Carboxymethyl)-4-(p-(*N,N*-dibutylamino)-phenyl)-pyridinium-bromid (Di-4-ASP-C₁COOH)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 2.32 g (0.01 mol) 1-(1-Carboxymethyl)-4-picoliniumbromid (Versuch 12.1), 2.33 g (0.01 mol) *p-N,N*-Di-n-butylaminobenzaldehyd (Versuch 11) und 2.01 g / 2.42 ml (0.03 mol) Piperidin in abs. Methanol umgesetzt.

Ausbeute: 2.86 g (64 %) rotes Pulver

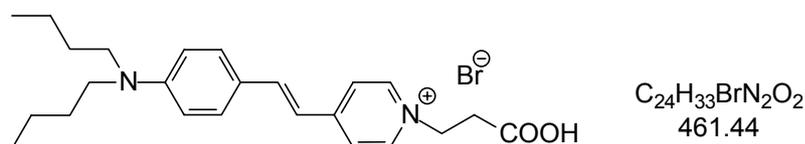
Schmelzpunkt: 179°C

Elementaranalyse: berechnet: C 61.74% H 6.98% N 6.26%

gefunden: C 61.61% H 6.82% N 6.12%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 489 nm (48600)

Versuch 13.19 1-(2-Carboxyethyl)-4-(p-(*N,N*-dibutylamino)-phenyl)-pyridinium-bromid (Di-4-ASP-C₂COOH)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 2.46 g (0.01 mol) 1-(2-Carboxyethyl)-4-picoliniumbromid (Versuch 12.2), 2.33 g (0.01 mol) *p-N,N*-Di-n-butylaminobenzaldehyd (Versuch 11) und 2.01 g / 2.42 ml (0.03 mol) Piperidin in abs. Methanol umgesetzt.

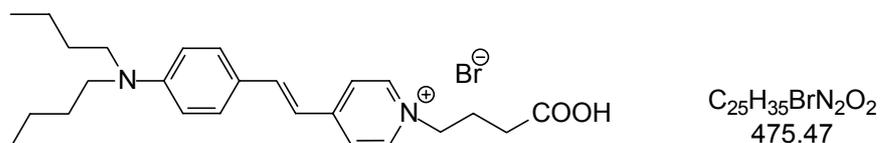
Ausbeute: 2.81 g (61 %) rotes Pulver

Schmelzpunkt: 178°C

Elementaranalyse: berechnet: C 62.47% H 7.21% N 6.07%

gefunden: C 62.19% H 7.08% N 5.87%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 500 nm (54100)

Versuch 13.20 1-(2-Carboxyethyl)-4-(p-(N,N-dibutylamino)-phenyl)-pyridinium-bromid (Di-4-ASP-C₃COOH)


Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 1.80 g (0.01 mol) 1-(4-Carboxypropyl)-4-picoliniumbromid (Versuch 12.3), 2.33 g (0.01 mol) p-N,N-Di-n-butylaminobenzaldehyd (Versuch 11) und 2.01 g / 2.42 ml (0.03 mmol) Piperidin in abs. Methanol umgesetzt.

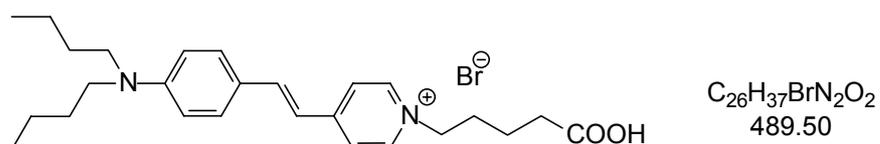
Ausbeute: 2.57 g (54 %) rotes Pulver

Schmelzpunkt: 175°C

Elementaranalyse: berechnet: C 63.15% H 7.42% N 5.89%

gefunden: C 62.86% H 7.14% N 5.67%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\text{max})}$ (ϵ) = 494 nm (56200)

Versuch 13.21 1-(4-Carboxybutyl)-4-(p-(N,N-dibutylamino)-phenyl)-pyridinium-bromid (Di-4-ASP-C₄COOH)


Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 2.74 g (0.01 mol) 1-(4-Carboxybutyl)-4-picoliniumbromid (Versuch 12.4), 2.33 g (0.01 mol) p-N,N-Di-n-butylaminobenzaldehyd (Versuch 11) und 2.01 g / 2.42 ml (0.03 mol) Piperidin in abs. Methanol umgesetzt.

Ausbeute: 2.84 g (58 %) rotes Pulver

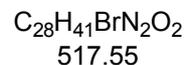
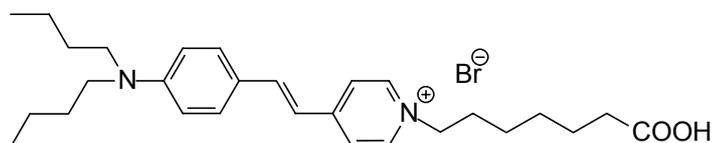
Schmelzpunkt: 171°C

Elementaranalyse: berechnet: C 63.80% H 7.62% N 5.72%

gefunden: C 63.80% H 7.59% N 5.65%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\text{max})}$ (ϵ) = 495 nm (54300)

Versuch 13.22 1-(5-Carboxyhexyl)-4-(p-(N,N-dibutylamino)-phenyl)-pyridinium-bromid (Di-4-ASP-C₆COOH)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 3.02 g (0.01 mol) 1-(5-Carboxyhexyl)-4-picoliniumbromid (Versuch 12.5), 2.33 g (0.01 mol) p-N,N-Di-n-butylaminobenzaldehyd (Versuch 11) und 2.01 g / 2.42 ml (0.03 mol) Piperidin in abs. Methanol umgesetzt.

Ausbeute: 2.79 g (54 %) rotes Pulver

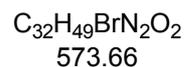
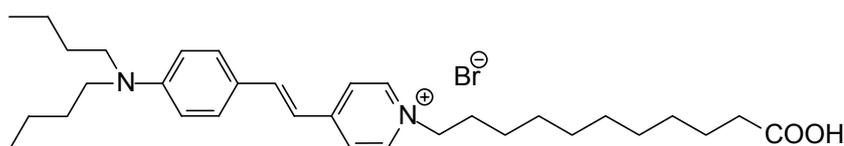
Schmelzpunkt: 171°C

Elementaranalyse: berechnet: C 64.98% H 7.98% N 5.41%

gefunden: C 64.81% H 7.74% N 5.33%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 494 nm (53400)

Versuch 13.23 1-(10-Carboxydecyl)-4-(p-(N,N-dibutylamino)-phenyl)-pyridinium-bromid (Di-4-ASP-C₁₀COOH)



Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift werden 3.58 g (0.01 mol) 1-(10-Carboxydecyl)-4-picoliniumbromid (Versuch 12.6), 2.33 g (0.01 mol) p-N,N-Di-n-butylaminobenzaldehyd (Versuch 11) und 2.01 g / 2.42 ml (0.03 mol) Piperidin in abs. Methanol umgesetzt.

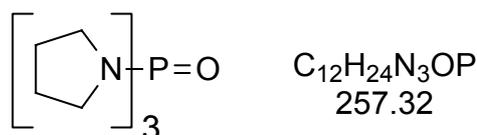
Ausbeute: 2.81 g (49 %) rotes Pulver

Schmelzpunkt: 174°C

Elementaranalyse: berechnet: C 67.00% H 8.61% N 4.88%

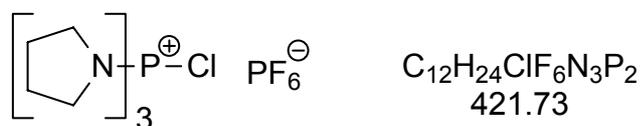
gefunden: C 66.89% H 8.43% N 4.39%

UV/VIS (EtOH): $\lambda_{(\max)}$ (ϵ) = 492 nm (52800)

Versuch 14 Tripyrrolidinophosphanoxid [129]


Eine Lösung von 42.6 g Pyrrolidin (0.6 mol) und 60.6 g Triethylamin (0.6 mol) in 200 ml trockenem Toluol wird in einem Eis-Kochsalzbad auf ca. 0°C abgekühlt. Unter kräftigem Rühren mit einem KPG-Rührer wird eine Lösung von 30.7 g Phosphorylchlorid (0.2 mol) in 200 ml trockenem Toluol so zugetropft, daß die Temperatur der Reaktionsmischung 5°C nicht übersteigt. Man rührt noch 2 h in der Kälte und erhitzt anschließend 5 h zum Sieden. Nach Abkühlen der Reaktionsmischung wird das ausgefallene Triethylammoniumchlorid in einen Büchnertrichter durch eine 10 cm dicke Schicht Kieselgel abfiltriert. Das Salz wird mit ca. 400 ml Essigester gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden am Rotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand im Ölpumpenvakuum über eine kurze Vigreuxkolonne destilliert.

Ausbeute:	24.4 g (55 %)	
Siedepunkt:	114 – 118°C (0.03 Torr)	(Lit. 143°C / 0.5 Torr [129])
Brechungsindex:	n_D^{25} : 1.5110	(Lit. 1.5115 [128])

Versuch 15 Chlortripyrrolidinophosphonium Hexafluorophosphat (PyCloP) [130]


Zu einer Lösung von 4.60 ml frisch destilliertem Phosphorylchlorid (0.05 mol) in 7 ml Dichlormethan wird bei Raumtemperatur tropfenweise eine Lösung von 12.9 g Tripyrrolidinophosphanoxid (0.05 mol) in 7 ml Dichlormethan innerhalb von 20 Min. gegeben. Man läßt noch 30 Min. bei Raumtemperatur rühren. Danach wird die Reaktionsmischung unter kräftigem Rühren in eine Lösung von 9.20 g Kaliumhexafluorophosphat (0.05 mol) in 70 ml Wasser eingegossen. Die organische Phase wird abgetrennt und die wäßrigem noch dreimal mit je 50 ml Dichlormethan extrahiert. Die

vereinigten organischen Phasen werden zweimal mit Wasser gewaschen, getrocknet und am Rotationsverdampfer im Vakuum zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird aus Essigester umkristallisiert (unter leichtem Erwärmen lösen, gegebenenfalls filtrieren, animpfen und im Kühlschrank auskristallisieren).

NMR-Daten siehe Kapitel 4.3.1.

Ausbeute:	16.4 g (78 %)	(Lit.: 86%)
Schmelzpunkt:	146 – 148 °C	(Lit. 140 – 151 °C)

Versuch 16 Kopplung der ASP-Farbstoffe mit 1,4-Phenylendiamin

Um die bichromophoren Farbstoffen darzustellen, wurden zunächst die ASP-Farbstoffe mit p-Phenylendiamin gekoppelt und im Anschluß das erhaltene Amid mit dem APP-Farbstoff zum Bichromophor gekoppelt.

Je nach Löslichkeit wurden die Kopplungen in Acetonitril oder DMF durchgeführt und demzufolge PyCloP oder TBTU als Kopplungsreagenz gewählt.

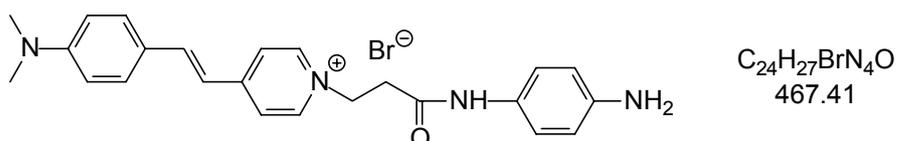
Bei den gekoppelten Verbindungen wird es, vor allem mit zunehmender Molekülgröße, schwieriger reproduzierbare Elementaranalysen zu erhalten. Die Ergebnisse schwanken bei identischen Proben sehr stark und sind durchweg – trotz guter NMR-Spektren – zu niedrig. Dies läßt sich vor allem mit einer unvollständigen Verbrennung erklären. Es wird daher im Folgenden auf Elementaranalysen verzichtet.

Ein Nachweis der gelungenen Kopplung wird, neben dem NMR-Spektrum, durch die Massenspektroskopie erbracht, bei der das Vorhandensein des Molekülpeaks hinreichender Beleg ist. Da die bei den vorliegenden Salzen zur Ionisation auf die FAB-Methode, mit Einbettung der Probe in Nitrobenzylalkohol, zurückgegriffen werden muß, ist aus dem Massenspektrum nur der Molekülpeak sinnvoll auszuwerten. Daher wird auf eine weitere Auswertung und eine Angabe der Daten der Massenspektren verzichtet.

Versuch 16.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Kopplungsreaktion mit Hilfe der Kopplungsreagenzien PyCloP und TBTU

Die Carbonsäure wird mit der dreifachen Menge p-Phenylendiamin, der 1.2fachen Menge PyCloP in absolutem Acetonitril bzw. TBTU in absolutem DMF gelöst und mit der 4.2fachen Menge DIEA unter Rühren versetzt. Die Mischung wird für 24h bei Raumtemperatur gerührt. Während dieser Zeit fällt unter Umständen schon Produkt aus. Im Anschluß wird die Mischung in das 5fache Volumen Diethylether getropft. Das Produkt wird abgesaugt und entweder aus Ethanol/Diethylether umkristallisiert oder an Kieselgel 60 mit Dichlormethan/Methanol (5:1) säulenchromatographisch gereinigt.

Versuch 16.2 1-[2-(4-Amino-phenylcarbamoyl)-ethyl]-4-[2-(4-dimethylamino-phenyl)-vinyl]-pyridinium



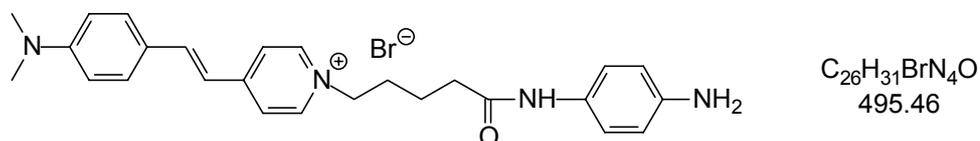
Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 3.77 g (0.01 mol) Di-1-ASP- C_2COOH (Versuch 13.2) mit 3.24 g (0.03 mol) p-Phenylendiamin, 5.06 g (0.01 mol) PyCloP und 4.84 g (0.04 mol) DIEA in absolutem Acetonitril umgesetzt.

Ausbeute: 2.01 g (43 %)

Schmelzpunkt: 199 °C

MS (FAB +NBA): 387 m/z ($M^+ - Br$)

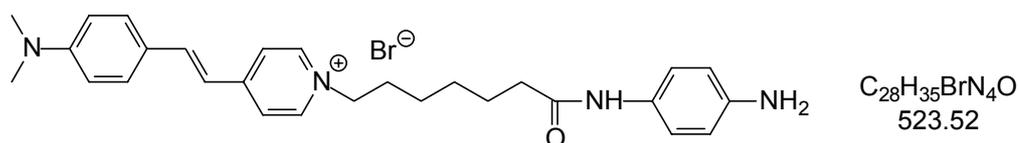
Versuch 16.3 1-[3-(4-Amino-phenylcarbamoyl)-butyl]-4-[2-(4-dimethylamino-phenyl)-vinyl]-pyridiniumbromid



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 4.19 g (0.01 mol) Di-1-ASP- C_4COOH (Versuch 13.3) mit 3.24 g (0.03 mol) p-Phenylendiamin, 5.06 g (0.01 mmol) PyCloP und 4.84 g (0.04 mol) DIEA in absolutem Acetonitril umgesetzt.

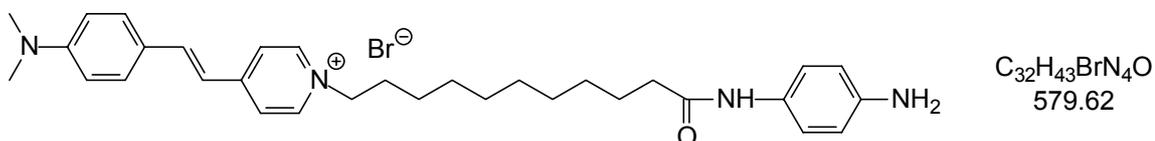
Ausbeute: 2.38 g (48 %)
Schmelzpunkt: 204 °C
MS (FAB +NBA): 415 m/z (M^+-Br)

Versuch 16.4 1-[3-(4-Amino-phenylcarbamoyl)-hexyl]-4-[2-(4-dimethylamino-phenyl)-vinyl]-pyridiniumbromid



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 4.33 g (0.01 mol) Di-1-ASP- C_6COOH (Versuch 13.4) mit 3.24 g (0.03 mmol) p-Phenylendiamin, 5.06 g (0.01 mol) PyCloP und 4.84 g (0.04 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

Ausbeute: 2.20 g (42 %)
Schmelzpunkt: 191 °C
MS (FAB +NBA): 444 m/z (M^+-Br)

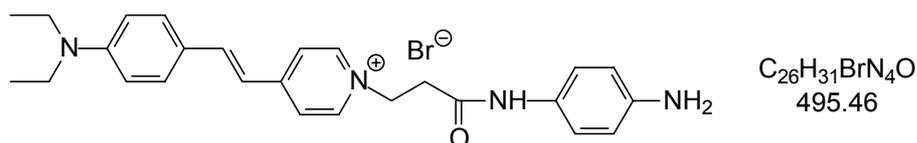
Versuch 16.5 1-[3-(4-Amino-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-[2-(4-dimethylamino-phenyl)-vinyl]-pyridiniumbromid


Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 4.90 g (0.01 mol) Di-1-ASP- $C_{10}COOH$ (Versuch 13.5) mit 3.24 g (0.03 mol) p-Phenylendiamin, 5.06 g (0.01 mol) PyCloP und 4.84 g (0.04 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

Ausbeute: 2.26 g (39 %)

Schmelzpunkt: 186 °C

MS (FAB +NBA): 500 m/z ($M^+ - Br$)

Versuch 16.6 1-[3-(4-Amino-phenylcarbamoyl)-ethyl]-4-[2-(4-diethylamino-phenyl)-vinyl]-pyridiniumbromid


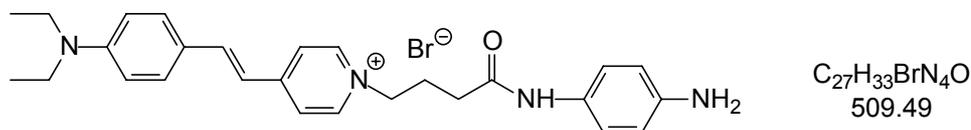
Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 4.05 g (0.01 mol) Di-2-ASP- C_2COOH (Versuch 13.7) mit 3.24 g (0.03 mol) p-Phenylendiamin, 5.06 g (0.01 mmol) PyCloP und 4.84 g (0.04 mmol) DIEA in absolutem Acetonitril umgesetzt.

Ausbeute: 2.48 g (50 %)

Schmelzpunkt: 209 °C

MS (FAB +NBA): 416 m/z ($M^+ - Br$)

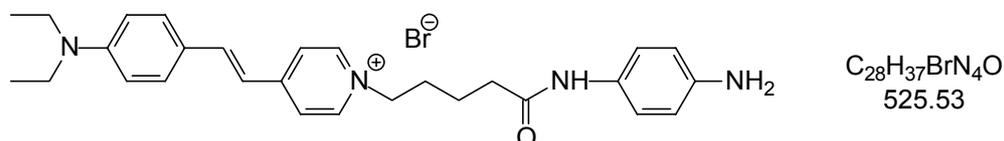
Versuch 16.7 **1-[3-(4-Amino-phenylcarbamoyl)-propyl]-4-[2-(4-diethylamino-phenyl)-vinyl]-pyridiniumbromid**



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 4.19 g (0.01 mol) Di-2-ASP-C₃COOH (Versuch 13.8) mit 3.24 g (0.03 mol) p-Phenylendiamin, 5.06 g (0.01 mol) PyCloP und 4.84 g (0.04 mmol) DIEA in absolutem Acetonitril umgesetzt.

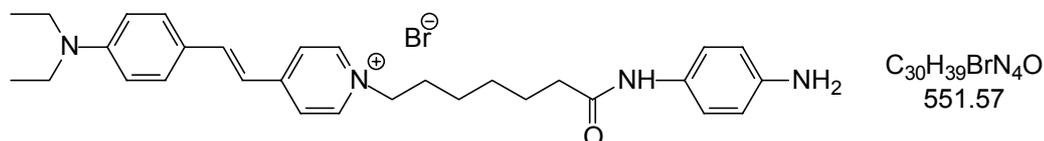
Ausbeute: 2.34 g (46 %)
Schmelzpunkt: 221 °C
MS (FAB +NBA): 430 m/z (M⁺-Br)

Versuch 16.8 **1-[3-(4-Amino-phenylcarbamoyl)-butyl]-4-[2-(4-diethylamino-phenyl)-vinyl]-pyridiniumbromid**



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 4.33 g (0.01 mol) Di-2-ASP-C₄COOH (Versuch 13.9) mit 3.24 g (0.03 mol) p-Phenylendiamin, 5.06 g (0.01 mol) PyCloP und 4.84 g (0.04 mol) DIEA in absolutem Acetonitril umgesetzt.

Ausbeute: 3.05 g (58 %)
Schmelzpunkt: 212 °C
MS (FAB +NBA): 446 m/z (M⁺-Br)

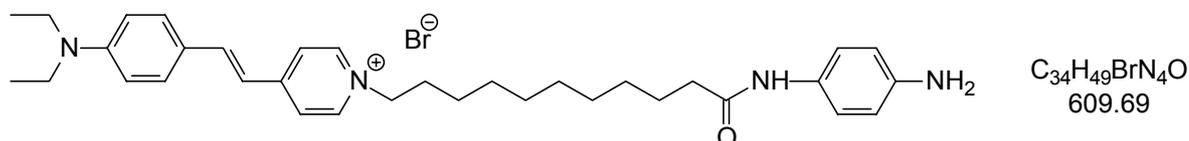
Versuch 16.9 1-[3-(4-Amino-phenylcarbamoyl)-hexyl]-4-[2-(4-diethylamino-phenyl)-vinyl]-pyridiniumbromid


Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 4.33 g (0.01 mol) Di-2-ASP- C_6COOH (Versuch 13.9) mit 3.24 g (0.03 mol) p-Phenylendiamin, 5.06 g (0.01 mol) PyCloP und 4.84 g (0.04 mol) DIEA in absolutem Acetonitril umgesetzt.

Ausbeute: 2.43 g (44 %)

Schmelzpunkt: 197 °C

MS (FAB +NBA): 472 m/z ($M^+ - Br$)

Versuch 16.10 1-[3-(4-Amino-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-[2-(4-diethylamino-phenyl)-vinyl]-pyridiniumbromid


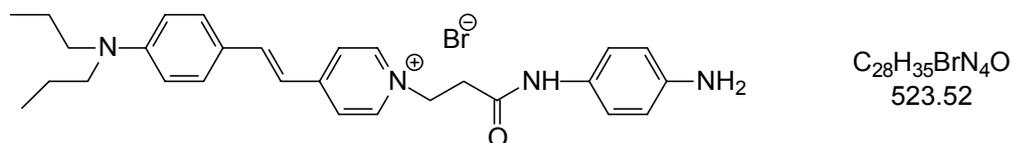
Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 5.18 g (0.01 mol) Di-2-ASP- $C_{10}COOH$ (Versuch 13.11) mit 3.24 g (0.03 mol) p-Phenylendiamin, 5.06 g (0.01 mol) PyCloP und 4.84 g (0.04 mol) DIEA in absolutem Acetonitril umgesetzt.

Ausbeute: 2.44 g (40 %)

Schmelzpunkt: 187 °C

MS (FAB +NBA): 530 m/z ($M^+ - Br$)

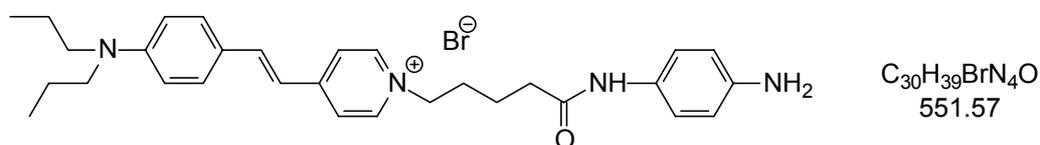
Versuch 16.11 1-[3-(4-Amino-phenylcarbamoyl)-ethyl]-4-[2-(4-dipropylamino-phenyl)-vinyl]-pyridiniumbromid



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 4.33 g (0.01 mol) Di-3-ASP-C₂COOH (Versuch 13.13) mit 3.24 g (30 mol) p-Phenylendiamin, 5.06 g (12 mol) PyCloP und 4.84 g (42 mol) DIEA in absolutem Acetonitril umgesetzt.

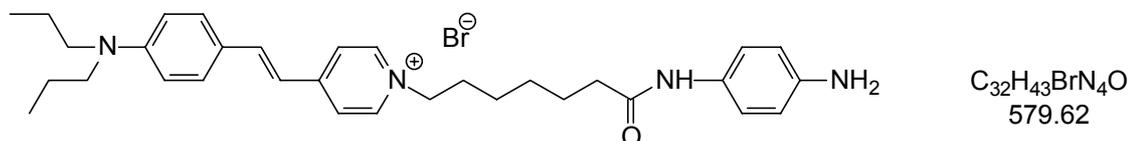
Ausbeute: 2.82 g (51 %)
Schmelzpunkt: 211 °C
MS (FAB +NBA): 444 m/z (M⁺-Br)

Versuch 16.12 1-[3-(4-Amino-phenylcarbamoyl)-butyl]-4-[2-(4-dipropylamino-phenyl)-vinyl]-pyridiniumbromid



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 4.61 g (0.01 mol) Di-3-ASP-C₄COOH (Versuch 13.15) mit 3.24 g (0.03 mol) p-Phenylendiamin, 5.06 g (0.01 mol) PyCloP und 4.84 g (0.04 mol) DIEA in absolutem Acetonitril umgesetzt.

Ausbeute: 2.70 g (49 %)
Schmelzpunkt: 203 °C
MS (FAB +NBA): 472 m/z (M⁺-Br)

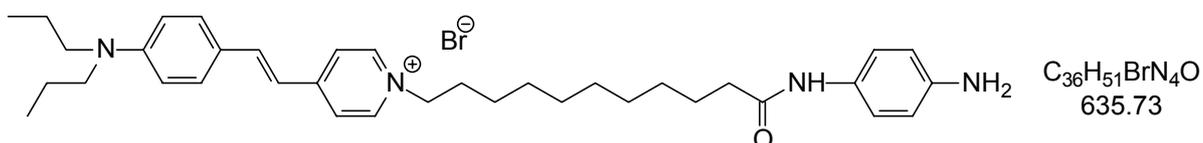
Versuch 16.13 1-[3-(4-Amino-phenylcarbamoyl)-hexyl]-4-[2-(4-dipropylamino-phenyl)-vinyl]-pyridiniumbromid


Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 4.90 g (0.01 mol) Di-3-ASP-C₆COOH (Versuch 13.16) mit 3.24 g (30 mol) p-Phenylendiamin, 5.06 g (12 mol) PyCloP und 4.84 g (42 mol) DIEA in absolutem Acetonitril umgesetzt.

Ausbeute: 2.61 g (45 %)

Schmelzpunkt: 191 °C

MS (FAB +NBA): 500 m/z (M⁺-Br)

Versuch 16.14 1-[3-(4-Amino-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-[2-(4-dipropylamino-phenyl)-vinyl]-pyridiniumbromid


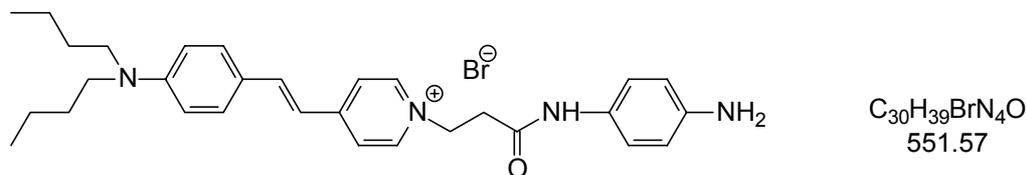
Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 5.46 g (0.01 mol) Di-3-ASP-C₁₀COOH (Versuch 13.17) mit 3.24 g (0.03 mol) p-Phenylendiamin, 5.06 g (0.01 mol) PyCloP und 4.84 g (0.04 mol) DIEA in absolutem Acetonitril umgesetzt.

Ausbeute: 2.42 g (38 %)

Schmelzpunkt: 182 °C

MS (FAB +NBA): 556 m/z (M⁺-Br)

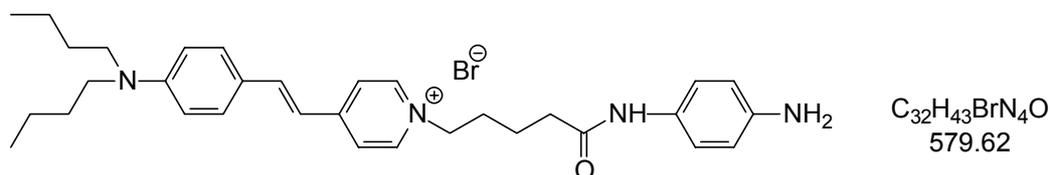
Versuch 16.15 1-[3-(4-Amino-phenylcarbamoyl)-ethyl]-4-[2-(4-dibutylamino-phenyl)-vinyl]-pyridiniumbromid



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 4.61 g (10 mol) Di-4-ASP-C₂COOH (Versuch 13.19) mit 3.24 g (0.03 mol) p-Phenylendiamin, 5.06 g (0.01 mol) PyCloP und 4.84 g (0.04 mol) DIEA in absolutem Acetonitril umgesetzt.

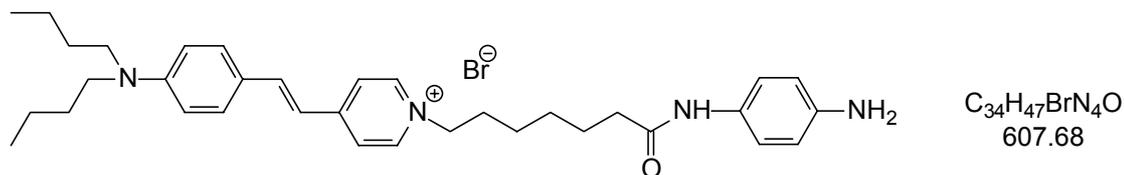
Ausbeute: 2.98 g (54 %)
Schmelzpunkt: 200 °C
MS (FAB +NBA): 472 m/z (M⁺-Br)

Versuch 16.16 1-[3-(4-Amino-phenylcarbamoyl)-butyl]-4-[2-(4-dibutylamino-phenyl)-vinyl]-pyridiniumbromid



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 4.90 g (0.01 mol) Di-4-ASP-C₄COOH (Versuch 13.21) mit 3.24 g (0.03 mol) p-Phenylendiamin, 5.06 g (0.01 mol) PyCloP und 4.84 g (0.04 mol) DIEA in absolutem Acetonitril umgesetzt.

Ausbeute: 2.96 g (51 %)
Schmelzpunkt: 194 °C
MS (FAB +NBA): 500 m/z (M⁺-Br)

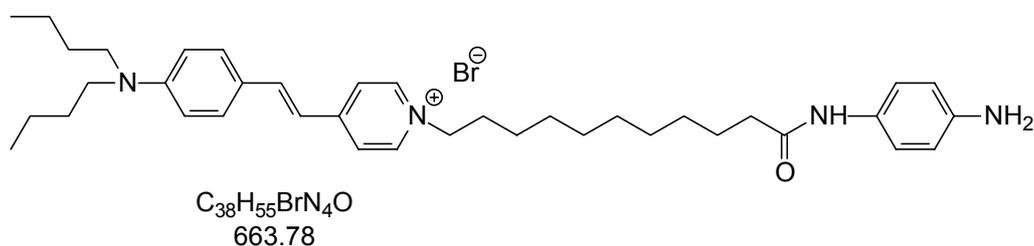
Versuch 16.17 1-[3-(4-Amino-phenylcarbamoyl)-hexyl]-4-[2-(4-dibutylamino-phenyl)-vinyl]-pyridiniumbromid


Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 4.75 g (0.01 mol) Di-4-ASP- C_6COOH (Versuch 13.22) mit 3.24 g (0.03 mol) p-Phenylendiamin, 5.06 g (0.01 mol) PyCloP und 4.84 g (0.04 mol) DIEA in absolutem Acetonitril umgesetzt.

Ausbeute: 2.80 g (46 %)

Schmelzpunkt: 190 °C

MS (FAB +NBA): 528 m/z (M^+-Br)

Versuch 16.18 1-[3-(4-Amino-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-[2-(4-dibutylamino-phenyl)-vinyl]-pyridiniumbromid


Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 5.74 g (0.01 mol) Di-4-ASP- $C_{10}COOH$ (Versuch 13.23) mit 3.24 g (0.03 mol) p-Phenylendiamin, 5.06 g (0.01 mol) PyCloP und 4.84 g (0.04 mol) DIEA in absolutem Acetonitril umgesetzt.

Ausbeute: 2.59 g (39 %)

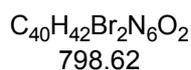
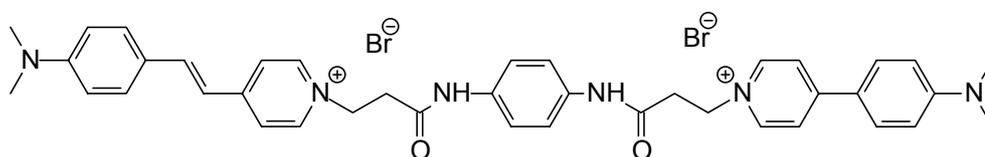
Schmelzpunkt: 184 °C

MS (FAB +NBA): 584 m/z (M^+-Br)

Versuch 17 **Synthese der Bichromophore**

Im folgenden werden die Synthesevorschriften für die bichromophoren Farbstoffe aufgelistet. Die Synthese erfolgt analog der zuvor aufgeführten Umsetzungen der ASP-Farbstoffe mit 1,4-Phenylendiamin und der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1.

Versuch 17.1 **1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dimethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-ethylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-ethyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dimethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 1/2/2/1)**



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 470 mg (1 mmol) Di-1-ASP-C₂COOH-Phen (Versuch 16.2) mit 350 mg (1 mmol) Di-1-APP-C₂COOH (Versuch 9.5), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

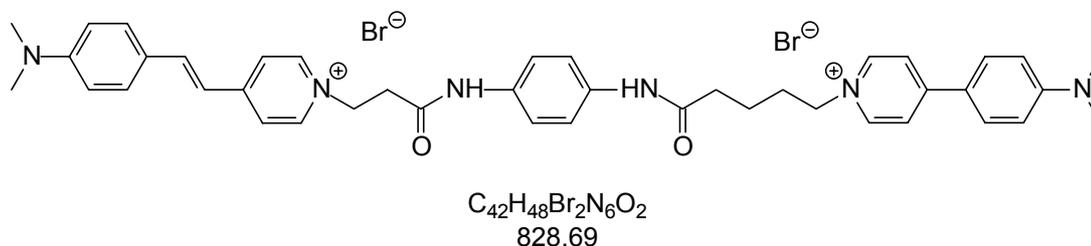
Ausbeute: 311 mg (39 %)

Schmelzpunkt: 184 °C

MS (FAB +NBA): 639 m/z (M⁺-2 Br)

UV/Vis (EtOH): λ_{max} (ε) = 436 nm (32500), λ_{max} (ε) = 483 (50600)

Versuch 17.2 **1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dimethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-hexylcarbamoyl]-phenylcarbamoyl)-ethyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dimethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 1/2/4/1)**



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 470 g (1 mmol) Di-1-ASP-C₂COOH-Phen (Versuch 16.2) mit 380 mg (1 mmol) Di-1-APP-C₄COOH (Versuch 9.13), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

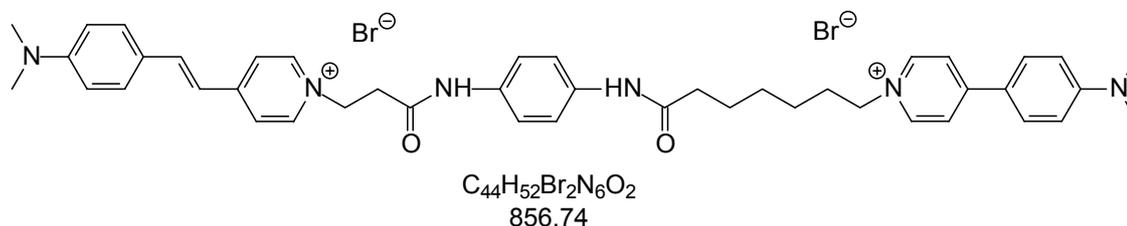
Ausbeute: 340 mg (41 %)

Schmelzpunkt: 194 °C

MS (FAB +NBA): 669 m/z (M⁺ - 2 Br)

UV/Vis (EtOH): λ_{max} (ε) = 435 nm (32500), λ_{max} (ε) = 482 (51000)

Versuch 17.3 **1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dimethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-hexylcarbamoyl]-phenylcarbamoyl)-ethyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dimethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 1/2/6/1)**



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 470 mg (1 mmol) Di-1-ASP-C₂COOH-Phen (Versuch 16.2) mit 410 mg (1 mmol) Di-1-APP-C₆COOH (Versuch 9.17), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in

absolutem DMF umgesetzt.

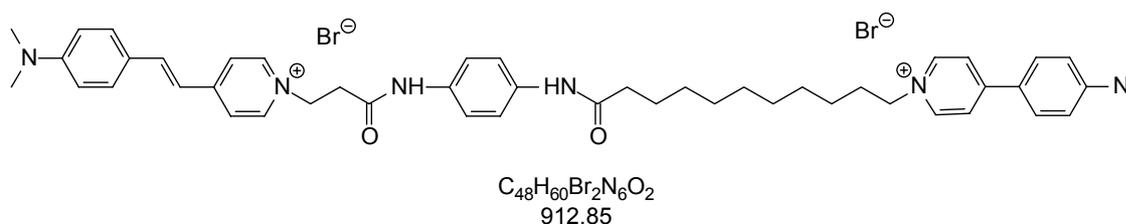
Ausbeute: 317 mg (37 %)

Schmelzpunkt: 207 °C

MS (FAB +NBA): 697 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 431 \text{ nm} (32100)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 481 (51200)$

Versuch 17.4 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dimethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-decylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-ethyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dimethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 1/2/10/1)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 470 mg (1 mmol) Di-1-ASP-C₂COOH-Phen (Versuch 16.2) mit 410 mg (1 mmol) Di-1-APP-C₁₀COOH (Versuch 9.21), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

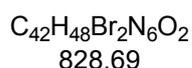
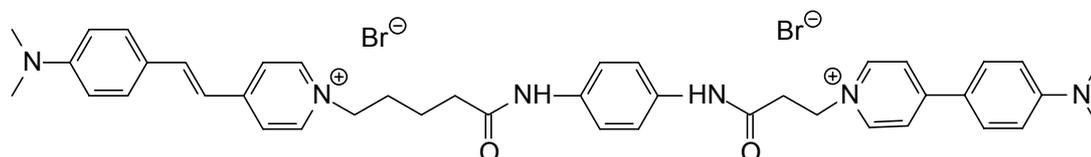
Ausbeute: 317 mg (37 %)

Schmelzpunkt: 207 °C

MS (FAB +NBA): 753 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 431 \text{ nm} (32100)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 481 (51200)$

Versuch 17.5 **1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dimethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-ethylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-butyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dimethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 1/4/2/1)**



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 495 mg (1 mmol) Di-1-ASP-C₄COOH-Phen (Versuch 16.3) mit 421 mg (1 mmol) Di-1-APP-C₃COOH (Versuch 9.11), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

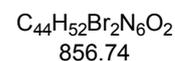
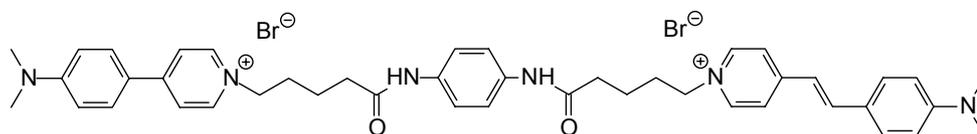
Ausbeute: 331 mg (40 %)

Schmelzpunkt: 201 °C

MS (FAB +NBA): 669 m/z (M⁺ - 2 Br)

UV/Vis (EtOH): λ_{max} (ε) = 430 nm (32200), λ_{max} (ε) = 485 nm (50100)

Versuch 17.6 **1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dimethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-butylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-butyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dimethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 1/4/4/1)**



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 15.1 werden 495 mg (1 mmol) Di-1-ASP-C₄COOH-Phen (Versuch 16.3) mit 365 mg (1 mmol) Di-1-APP-C₄COOH (Versuch 9.9), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 g (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

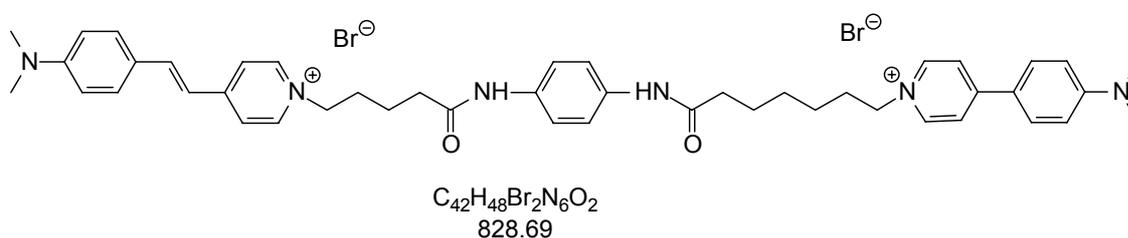
Ausbeute: 317 mg (37 %)

Schmelzpunkt: 201 °C

MS (FAB +NBA): 697 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 430 \text{ nm} (32100)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 481 \text{ nm} (51200)$

Versuch 17.7 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dimethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-hexylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-butyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dimethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 1/4/6/1)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 495 mg (1 mmol) Di-1-ASP-C₄COOH-Phen (Versuch 16.12) mit 407 mg (1 mmol) Di-1-APP-C₆COOH (Versuch 9.17), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

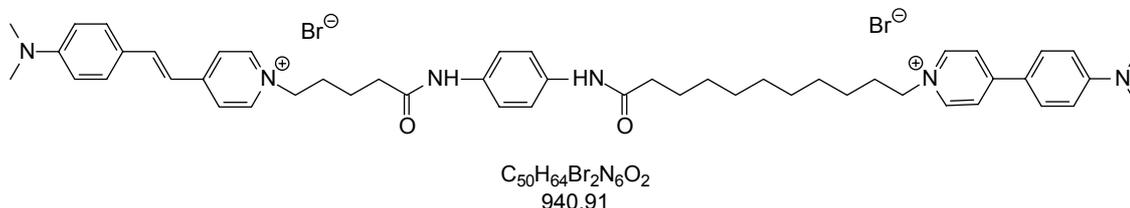
Ausbeute: 348 mg (42 %)

Schmelzpunkt: 199 °C

MS (FAB +NBA): 669 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 429 \text{ nm} (32000)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 480 \text{ nm} (51600)$

Versuch 17.8 **1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dimethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-decylcarbamoyl]-phenylcarbamoyl)-butyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dimethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 1/4/10/1)**



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 495 mg (1 mmol) Di-1-ASP- C_4 COOH-Phen (Versuch 16.12) mit 463 mg (1 mmol) Di-1-APP- C_{10} COOH (Versuch 9.21), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

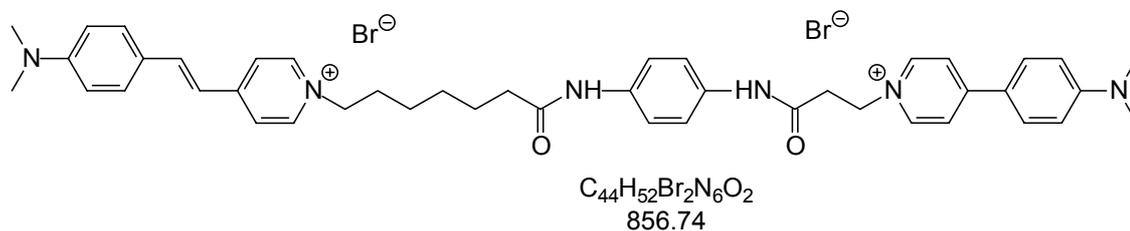
Ausbeute: 292 mg (31 %)

Zersetzungspunkt: > 200 °C

MS (FAB +NBA): 781 m/z ($M^+ - 2 Br$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{max} (\epsilon) = 434 \text{ nm} (31900)$, $\lambda_{max} (\epsilon) = 481 (48200)$

Versuch 17.9 **1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dimethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-ethylcarbamoyl]-phenylcarbamoyl)-hexyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dimethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 1/7/3/1)**



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 523 mg (1 mmol) Di-1-ASP- C_6 COOH-Phen (Versuch 16.4) mit 379 mg (1 mmol) Di-1-APPQC (Versuch 9.5), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

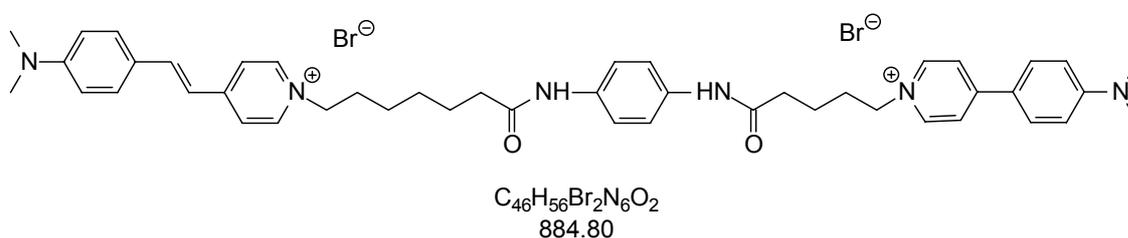
Ausbeute: 257 mg (30 %)

Schmelzpunkt: 214 °C

MS (FAB +NBA): 697 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 435 \text{ nm} (31800)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 482 (48300)$

Versuch 17.10 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dimethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-hexylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-butyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dimethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 1/6/4/1)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 495 mg (1 mmol) Di-1-ASP- C_6COOH -Phen (Versuch 16.4) mit 407 mg (1 mmol) Di-1-APP- C_6COOH (Versuch 9.17), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

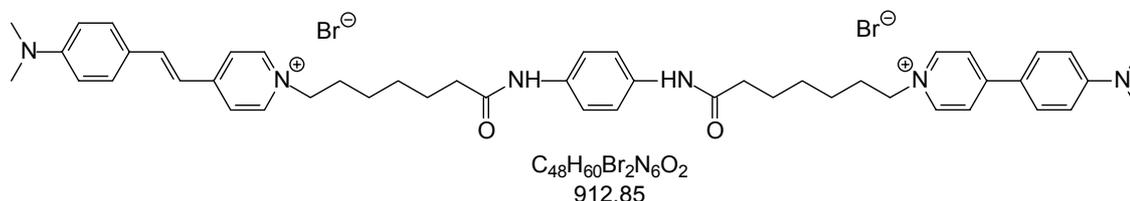
Ausbeute: 327 mg (37 %)

Schmelzpunkt: 219 °C

MS (FAB +NBA): 725 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 432 \text{ nm} (33000)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 486 \text{ nm} (49100)$

Versuch 17.11 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dimethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-hexylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-hexyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dimethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 1/6/6/1)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 523 mg (1 mmol) Di-1-ASP- C_6 COOH-Phen (Versuch 16.4) mit 379 mg (1 mmol) Di-1-APP- C_6 COOH (Versuch 9.17), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

Ausbeute: 246 mg (27 %)

Schmelzpunkt: 224 °C

MS (FAB +NBA): 753 m/z ($M^+ - 2 Br$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{max} (\epsilon) = 436 \text{ nm} (32100)$, $\lambda_{max} (\epsilon) = 480 (47600)$

Versuch 17.12 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dimethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-hexylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dimethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 1/6/10/1)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 523 mg (1 mmol) Di-1-ASP- C_6 COOH-Phen (Versuch 16.4) mit 463 mg (1 mmol) Di-1-APP- C_{10} COOH (Versuch 9.21), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

Ausbeute: 271 mg (28 %)

Zersetzungspunkt: > 200 °C

MS (FAB +NBA): 809 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 433 \text{ nm} (33200)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 480 (44400)$

Versuch 17.13 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dimethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-decylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-ethyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dimethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 1/10/2/1)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 580 mg (1 mmol) Di-1-ASP- C_{10}COOH -Phen (Versuch 16.5) mit 351 mg (1 mmol) Di-1-APP- C_6COOH (Versuch 9.5), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

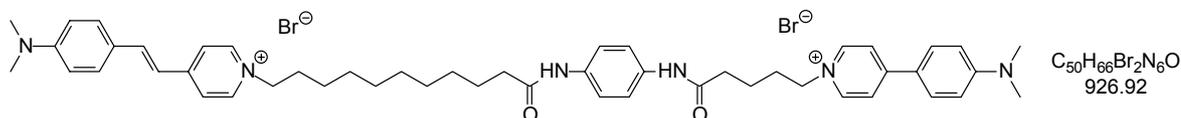
Ausbeute: 228 mg (25 %)

Zersetzungspunkt: > 210 °C

MS (FAB +NBA): 753 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 433 \text{ nm} (33100)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 481 \text{ nm} (44100)$

Versuch 17.14 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Diethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-butylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dimethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 1/10/4/1)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 580 mg (1 mmol) Di-1-ASP-C₁₀-Phen (Versuch 16.5) mit 379 mg (1 mmol) Di-1-APP-C₄COOH (Versuch 9.13), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

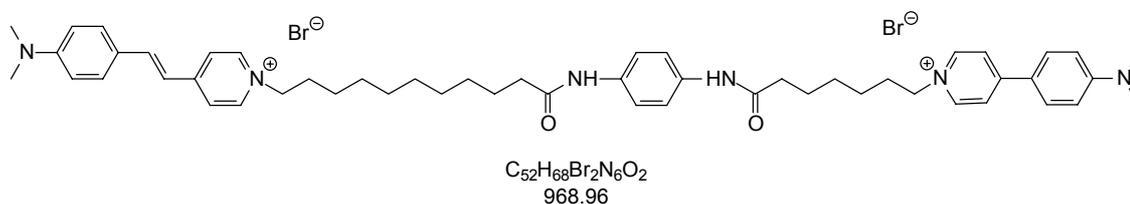
Ausbeute: 269 mg (29 %)

Schmelzpunkt: 231 °C

MS (FAB +NBA): 767 m/z (M⁺ - 2 Br)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\max} (\epsilon) = 434 \text{ nm} (33200)$, $\lambda_{\max} (\epsilon) = 482 (43900)$

Versuch 17.15 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dimethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-decylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-hexyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dimethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 1/10/6/1)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 580 mg (1 mmol) Di-1-ASP-C₁₀COOH-Phen (Versuch 16.5) mit 379 mg (1 mmol) Di-1-APP-C₆COOH (Versuch 9.17), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

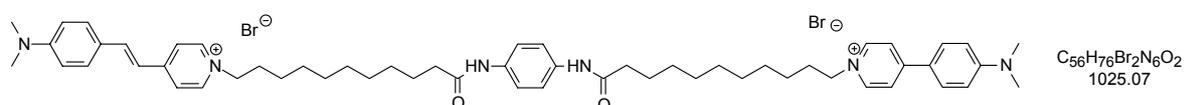
Ausbeute: 271 mg (28 %)

Zersetzungspunkt: > 210 °C

MS (FAB +NBA): 809 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 430 \text{ nm} (31100)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 480 \text{ nm} (44100)$

Versuch 17.16 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dimethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-decylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dimethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 1/10/10/1)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 580 mg (1 mmol) Di-1-ASP-C₁₀-Phen (Versuch 16.5) mit 460 mg (1 mmol) Di-1-APP-C₁₀COOH (Versuch 9.21), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

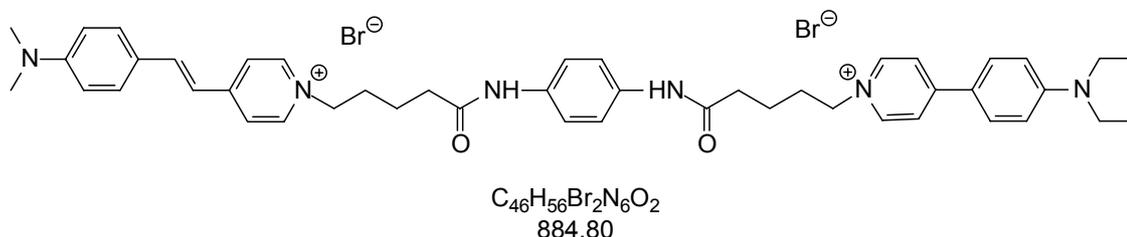
Ausbeute: 215 mg (21 %)

Zersetzungspunkt: > 210 °C

MS (FAB +NBA): 865 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 436 \text{ nm} (32900)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 483 (41800)$

Versuch 17.17 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dimethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-butylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-butyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Diethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 1/4/4/2)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 495 mg (1 mmol) Di-1-ASP-C₄-Phen (Versuch 16.3) mit 407 mg (1 mmol) Di-2-APP-C₄COOH (Versuch 9.14), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

Ausbeute: 292 mg (33 %)
Schmelzpunkt: 199 °C
MS (FAB +NBA): 725 m/z (M⁺ - 2 Br)
UV/Vis (EtOH): λ_{max} (ε) = 435 nm (33400), λ_{max} (ε) = 480 (45000)

Versuch 17.18 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Diethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-decylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Diethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 1/10/10/2)



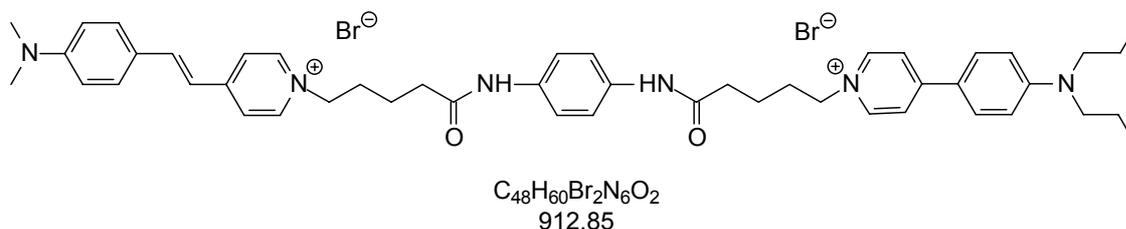
Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 580 mg (1 mmol) Di-1-ASP-C₁₀-Phen (Versuch 16.5) mit 460 mg (1 mmol) Di-2-APP-C₁₀COOH (Versuch 9.21), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

Ausbeute: 2121 mg (21 %)
Zersetzungspunkt: > 210 °C

MS (FAB +NBA): 893 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 436 \text{ nm} (33900)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 480 (44900)$

Versuch 17.19 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dipropylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-butylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-butyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dimethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 1/4/4/3)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 495 mg (1 mmol) Di-1-ASP-C₄-Phen (Versuch 16.3) mit 435 mg (1 mmol) Di-3-APP-C₄COOH (Versuch 9.15), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

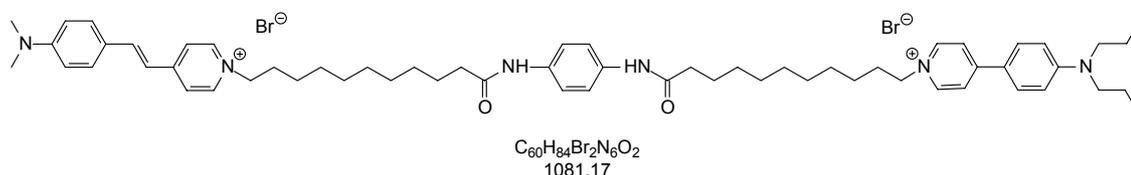
Ausbeute: 365 mg (40 %)

Zersetzungspunkt: 195 °C

MS (FAB +NBA): 753 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 438 \text{ nm} (32900)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 480 (45000)$

Versuch 17.20 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dipropylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-decylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dimethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 1/10/10/3)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 580 mg (1 mmol) Di-1-ASP-C₁₀-Phen (Versuch 16.5) mit 520 mg (1 mmol) Di-3-APP-C₁₀COOH (Versuch 9.23), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

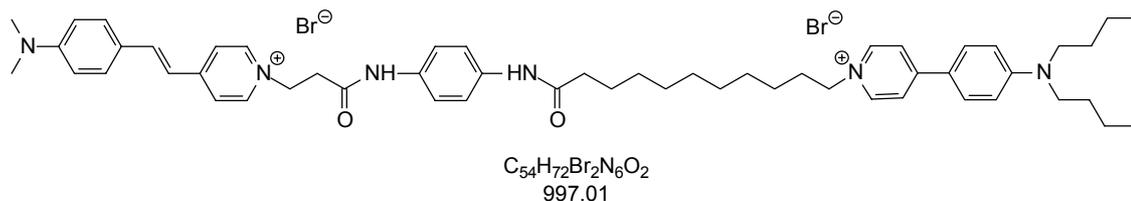
Ausbeute: 195 mg (18 %)

Zersetzungspunkt: > 210 °C

MS (FAB +NBA): 921 m/z (M⁺ - 2 Br)

UV/Vis (EtOH): λ_{max} (ε) = 437 nm (32100), λ_{max} (ε) = 482 (44800)

Versuch 17.21 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dibutylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-decylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-ethyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dimethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 1/2/10/4)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 467 mg (1 mmol) Di-1-ASP-C₂-Phen (Versuch 16.2) mit 548 mg (1 mmol) Di-4-APP-C₁₀COOH (Versuch 9.24), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

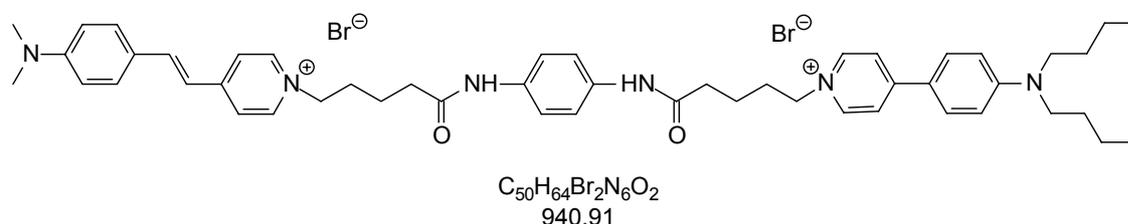
Ausbeute: 229 mg (23 %)

Zersetzungspunkt: > 210 °C

MS (FAB +NBA): 837 m/z (M⁺ - 2 Br)

UV/Vis (EtOH): λ_{max} (ε) = 432 nm (33000), λ_{max} (ε) = 481 (45200)

Versuch 17.22 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dibutylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-butylcarbonyl}-phenylcarbonyl)-butyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dimethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 1/4/4/4)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 509 mg (1 mmol) Di-1-ASP-C₄-Phen (Versuch 16.7) mit 463 mg (1 mmol) Di-4-APP-C₄COOH (Versuch 9.16), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

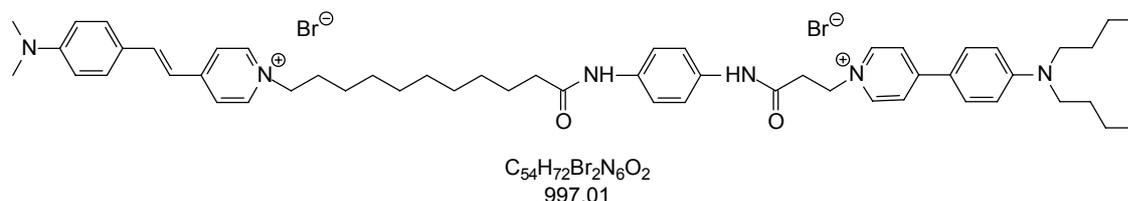
Ausbeute: 198 mg (21 %)

Zersetzungspunkt: > 200 °C

MS (FAB +NBA): 781 m/z (M⁺ - 2 Br)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{max} (\epsilon) = 436 \text{ nm} (33200)$, $\lambda_{max} (\epsilon) = 482 (44800)$

Versuch 17.23 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dibutylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-ethylcarbonyl}-phenylcarbonyl)-decyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dimethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 1/10/2/4)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 580 mg (1 mmol) Di-1-ASP-C₁₀-Phen (Versuch 16.5) mit 435 mg (1 mmol) Di-4-APP-C₂COOH (Versuch 9.8), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

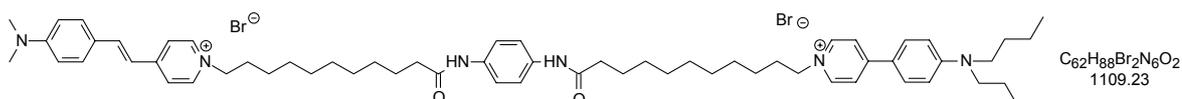
Ausbeute: 239 mg (24 %)

Zersetzungspunkt: > 200 °C

MS (FAB +NBA): 837 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 436 \text{ nm} (33200)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 482 (44800)$

Versuch 17.24 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dibutylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-decylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dimethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 1/10/10/4)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 15.1 werden 0.58 g (1 mmol) Di-1-ASP-C₁₀-Phen (Versuch 16.5), mit 0.55 g (1 mmol) Di-4-APP-C₁₀COOH (Versuch 9.24), 0.39 g (1.2 mmol) TBTU und 0.49 g (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

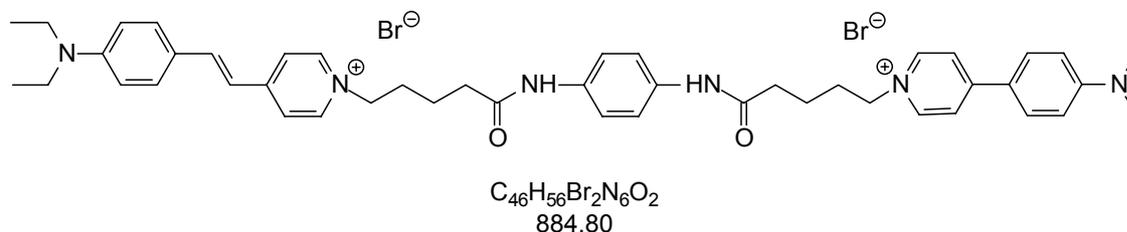
Ausbeute: 244 mg (22 %)

Zersetzungspunkt: > 205 °C

MS (FAB +NBA): 949 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 430 \text{ nm} (31400)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 483 (40700)$

Versuch 17.25 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dimethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-butylcarbomoyl}-phenylcarbomoyl)-butyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Diethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 2/4/4/1)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 15.1 werden 526 mg (1 mmol) Di-2-ASP-C₄-Phen (Versuch 16.8), 379 mg (1 mmol) Di-1-APP-C₄COOH (Versuch 9.13), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

Ausbeute: 277 mg (25 %)

Zersetzungspunkt: > 210 °C

MS (FAB +NBA): 725 m/z (M⁺ - 2 Br)

UV/Vis (EtOH): λ_{max} (ε) = 430 nm (31400), λ_{max} (ε) = 483 (40700)

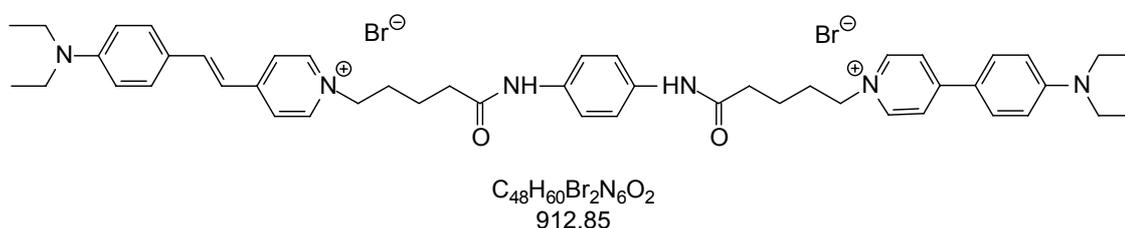
Versuch 17.26 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dimethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-decylcarbomoyl}-phenylcarbomoyl)-decyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Diethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 2/10/10/1)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 610 mg (1 mmol) Di-2-ASP-C₁₀-Phen (Versuch 16.10) mit 463 mg (1 mmol) Di-1-APP-C₁₀COOH (Versuch 9.21), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

Ausbeute:	232 mg (22 %)
Zersetzungspunkt:	> 210 °C
MS (FAB +NBA):	893 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)
UV/Vis (EtOH):	$\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 431 \text{ nm} (31600)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 483 \text{ nm} (41000)$

Versuch 17.27 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Diethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-butylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-butyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Diethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 2/4/4/2)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 580 mg (1 mmol) Di-2-ASP-C₄-Phen (Versuch 16.5) mit 435 mg (1 mmol) Di-2-APP-C₄COOH (Versuch 9.8), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

Ausbeute:	365 mg (39 %)
Schmelzpunkt:	195 °C
MS (FAB +NBA):	753 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)
UV/Vis (EtOH):	$\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 433 \text{ nm} (32000)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 481 \text{ nm} (42000)$

Versuch 17.28 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Diethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-decylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Diethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 2/10/10/2)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 610 mg (1 mmol) Di-2-ASP-C₁₀-Phen (Versuch 16.10) mit 492 mg (1 mmol) Di-2-APP-C₁₀COOH (Versuch 9.22), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

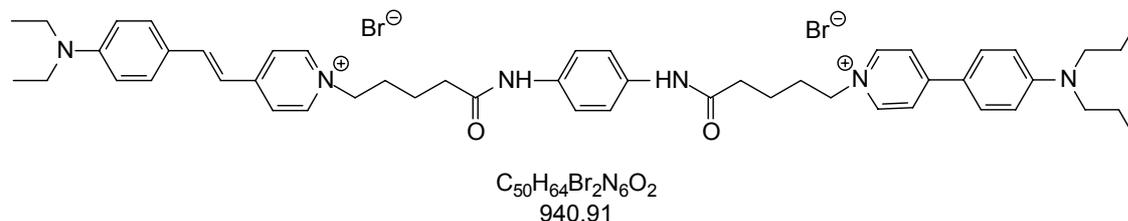
Ausbeute: 249 mg (23 %)

Zersetzungspunkt: > 210 °C

MS (FAB +NBA): 921 m/z (M⁺ - 2 Br)

UV/Vis (EtOH): λ_{max} (ε) = 433 nm (31800), λ_{max} (ε) = 484 nm (42100)

Versuch 17.29 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dipropylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-butylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-butyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Diethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 2/4/4/3)

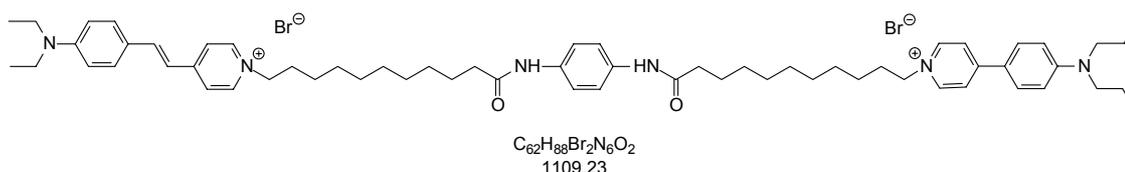


Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 526 mg (1 mmol) Di-2-ASP-C₄-Phen (Versuch 16.8) mit 435 mg (1 mmol) Di-3-APP-C₄COOH (Versuch 9.15), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

Ausbeute: 358 mg (38 %)

Schmelzpunkt: 200 °C
MS (FAB +NBA): 781 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)
UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 434 \text{ nm} (31700)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 485 \text{ nm} (42200)$

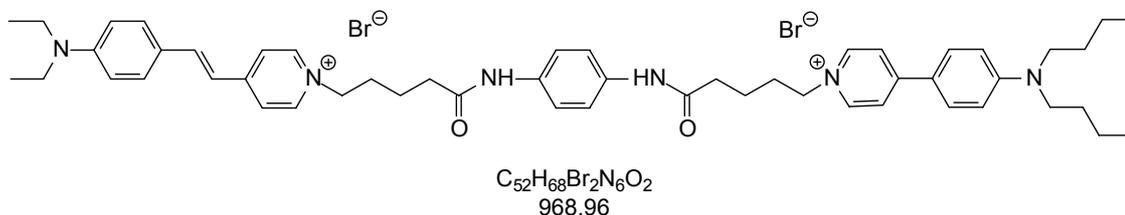
Versuch 17.30 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dipropylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-decylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Diethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid
(Bichromophor 2/10/10/3)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 610 mg (1 mmol) Di-2-ASP-C₁₀-Phen (Versuch 16.10) mit 520 mg (1 mmol) Di-3-APP-C₁₀COOH (Versuch 9.23), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

Ausbeute: 244 mg (22 %)
Zersetzungspunkt: > 210 °C
MS (FAB +NBA): 949 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)
UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 435 \text{ nm} (32100)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 484 \text{ nm} (42100)$

Versuch 17.31 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Diethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-butylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-butyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Diethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid
(Bichromophor 2/4/4/4)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 526 mg (1 mmol) Di-2-ASP-C₄-Phen (Versuch 16.8) mit 407 mg (1 mmol) Di-4-APP-C₄COOH (Versuch 9.14), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem

DMF umgesetzt.

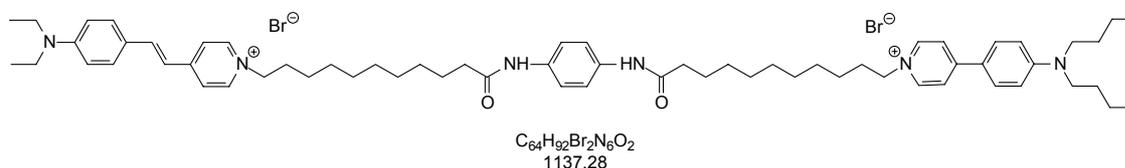
Ausbeute: 378 mg (39 %)

Schmelzpunkt: 195 °C

MS (FAB +NBA): 809 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 438 \text{ nm} (32800)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 482 \text{ nm} (42200)$

Versuch 17.32 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dibutylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-decylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Diethylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 2/10/10/4)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 610 mg (1 mmol) Di-2-ASP- C_{10} -Phen (Versuch 16.10) mit 548 mg (1 mmol) Di-4-APP- C_{10} COOH (Versuch 9.24), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

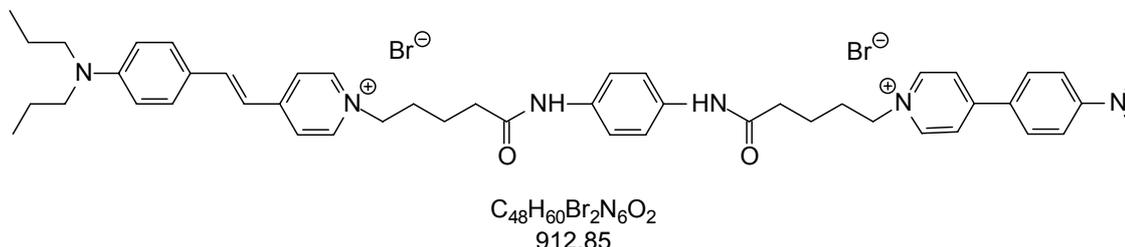
Ausbeute: 250 mg (22 %)

Zersetzungspunkt: > 210 °C

MS (FAB +NBA): 949 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 437 \text{ nm} (32700)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 482 \text{ nm} (42800)$

Versuch 17.33 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Diethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-butylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-butyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dipropylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 3/4/4/1)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 552 mg (1 mmol) Di-3-ASP-C₄-Phen (Versuch 16.12) mit 379 mg (1 mmol) Di-1-APP-C₄COOH (Versuch 9.13), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

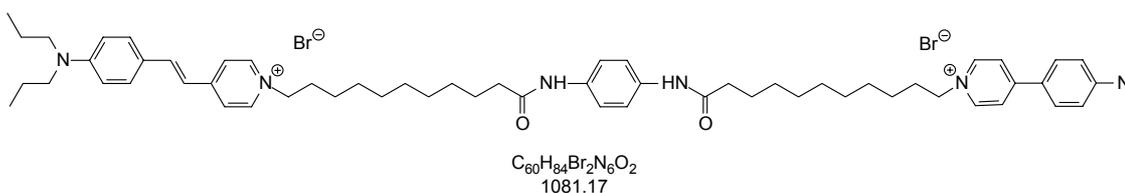
Ausbeute: 365 mg (39 %)

Schmelzpunkt: 190 °C

MS (FAB +NBA): 753 m/z (M⁺ - 2 Br)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\max} (\epsilon) = 438 \text{ nm} (32800)$, $\lambda_{\max} (\epsilon) = 485 \text{ nm} (42100)$

Versuch 17.34 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Diethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-decylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dipropylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 3/10/10/1)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 636 mg (1 mmol) Di-3-ASP-C₁₀-Phen (Versuch 16.16) mit 463 mg (1 mmol) Di-1-APP-C₁₀COOH (Versuch 9.21), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

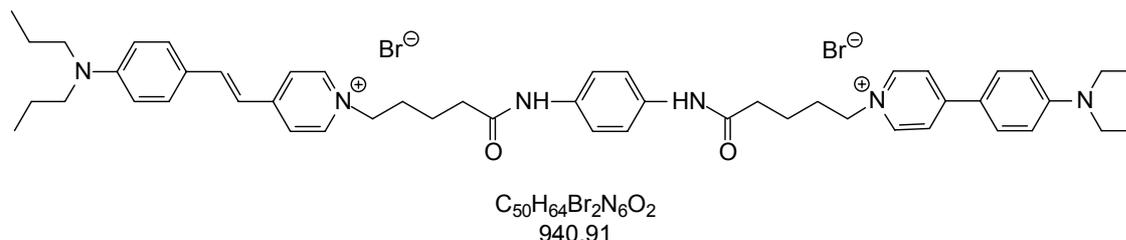
Ausbeute: 227 mg (21 %)

Zersetzungspunkt: > 210 °C

MS (FAB +NBA): 921 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 430 \text{ nm} (31200)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 484 (42000)$

Versuch 17.35 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Diethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-butylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-butyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dipropylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 3/4/4/2)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 552 mg (1 mmol) Di-3-ASP-C₄-Phen (Versuch 16.12) mit 407 mg (1 mmol) Di-2-APP-C₄COOH (Versuch 9.14), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

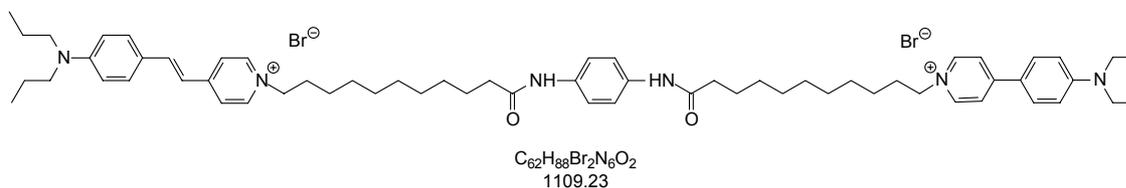
Ausbeute: 367 mg (39 %)

Schmelzpunkt: 198 °C

MS (FAB +NBA): 781 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 433 \text{ nm} (31800)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 486 \text{ nm} (42700)$

Versuch 17.36 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Diethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-decylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dipropylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 3/10/10/2)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 636 mg (1 mmol) Di-3-ASP-C₁₀-Phen (Versuch 16.14) mit 492 mg (1 mmol) Di-2-APP-C₁₀COOH (Versuch 9.22), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

Versuch 17.38 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dipropylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-decylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dipropylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 3/10/10/3)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 636 mg (1 mmol) Di-3-ASP-C₁₀-Phen (Versuch 16.14) mit 520 mg (1 mmol) Di-3-APP-C₁₀COOH (Versuch 9.23), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

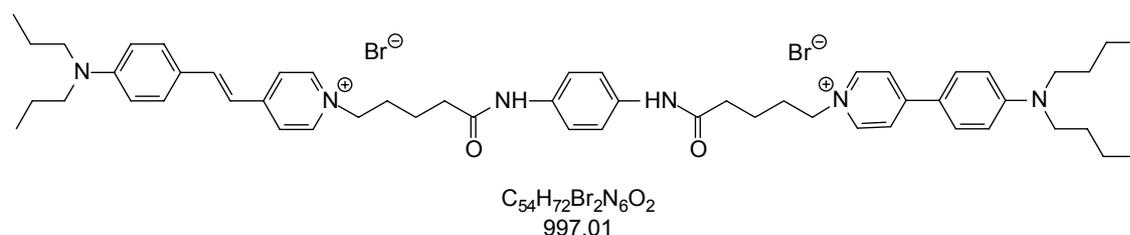
Ausbeute: 273 mg (24 %)

Zersetzungspunkt: > 210 °C

MS (FAB +NBA): 949 m/z (M⁺ - 2 Br)

UV/Vis (EtOH): λ_{max} (ε) = 434 nm (32800), λ_{max} (ε) = 485 nm (42000)

Versuch 17.39 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dibutylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-butylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-butyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dipropylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 3/4/4/4)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 552 mg (1 mmol) Di-3-ASP-C₄-Phen (Versuch 16.12) mit 463 mg (1 mmol) Di-4-APP-C₄COOH (Versuch 9.16), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

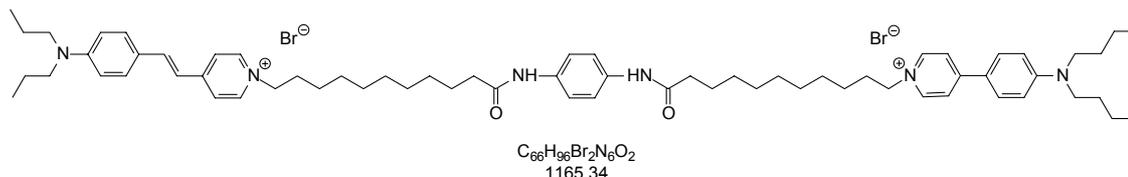
Ausbeute: 319 mg (32 %)

Schmelzpunkt: 200 °C

MS (FAB +NBA): 837 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 439 \text{ nm} (33100)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 486 \text{ nm} (42100)$

Versuch 17.40 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dibutylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-decylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dipropylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 3/10/10/4)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 636 mg (1 mmol) Di-3-ASP-C₁₀-Phen (Versuch 16.14) mit 407 mg (1 mmol) Di-2-APP-C₄COOH (Versuch 9.14), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

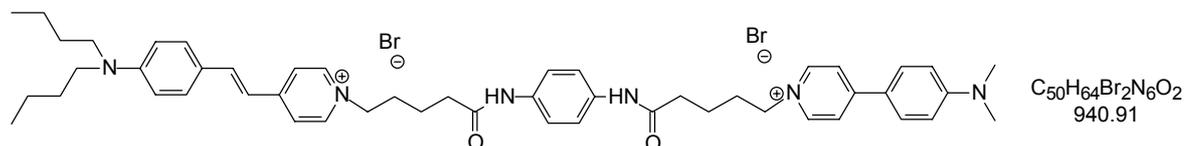
Ausbeute: 210 mg (18 %)

Zersetzungspunkt: > 210 °C

MS (FAB +NBA): 1006 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 438 \text{ nm} (33200)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 485 \text{ nm} (42100)$

Versuch 17.41 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dimethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-butylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-butyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dibutylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 4/4/4/1)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 15.1 werden 0.58 g (1 mmol) Di-4-ASP-C₄-Phen (Versuch 16.16) mit 0.38 g (1 mmol) Di-1-APP-C₄COOH (Versuch 9.13), 0.39 g (1.2 mmol) TBTU und 0.49 g (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

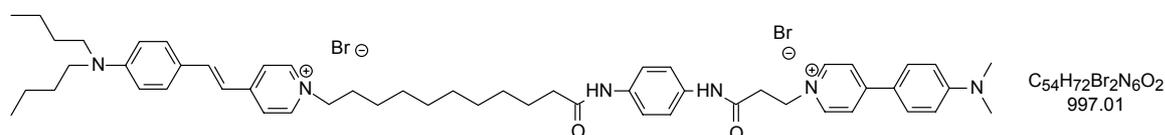
Ausbeute: 259 mg (24 %)

Schmelzpunkt: 219 °C

MS (FAB +NBA): 781 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 433 \text{ nm} (32900)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 495 (52600)$

Versuch 17.42 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dimethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-ethylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dibutylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 4/10/2/1)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 15.1 werden 0.66 g (1 mmol) Di-4-ASP- C_{10} -Phen (Versuch 16.18) mit 0.35 g (1 mmol) Di-1-APP- C_2COOH (Versuch 9.5), 0.39 g (1.2 mmol) TBTU und 0.49 g (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

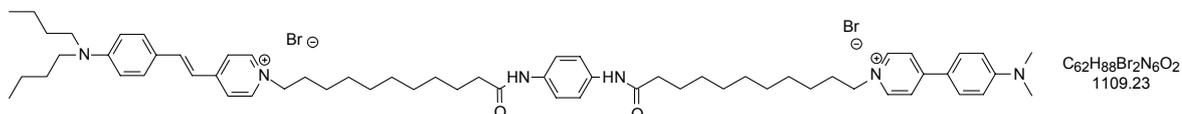
Ausbeute: 269 mg (27 %)

Zersetzungspunkt: > 210 °C

MS (FAB +NBA): 837 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 431 \text{ nm} (32800)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 493 (53900)$

Versuch 17.43 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dimethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-decylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dibutylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid
(Bichromophor 4/10/10/1)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 15.1 werden 0.66 g (1 mmol) Di-4-ASP-C₁₀-Phen (Versuch 16.18) mit 0.46 g (1 mmol) Di-1-APP-C₁₀COOH (Versuch 9.21), 0.39 g (1.2 mmol) TBTU und 0.49 g (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

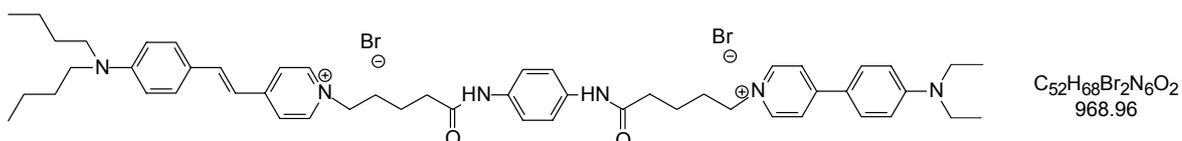
Ausbeute: 222 mg (20 %)

Zersetzungspunkt: > 210 °C

MS (FAB +NBA): 949 m/z (M⁺ - 2 Br)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\max} (\epsilon) = 435 \text{ nm} (32800)$, $\lambda_{\max} (\epsilon) = 495 (52400)$

Versuch 17.44 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Diethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-butylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-butyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dibutylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid
(Bichromophor 4/4/4/2)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 15.1 werden 0.58 g (1 mmol) Di-4-ASP-C₄-Phen (Versuch 16.16) mit 0.41 g (1 mmol) Di-2-APP-C₄COOH (Versuch 9.14), 0.39 g (1.2 mmol) TBTU und 0.49 g (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

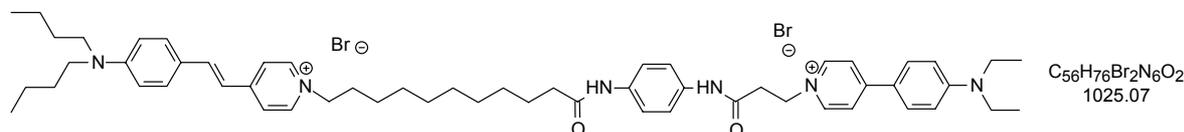
Ausbeute: 329 mg (34 %)

Schmelzpunkt: 227 °C

MS (FAB +NBA): 809 m/z (M⁺ - 2 Br)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\max} (\epsilon) = 431 \text{ nm} (32800)$, $\lambda_{\max} (\epsilon) = 493 (53900)$

Versuch 17.45 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Diethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-ethylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dibutylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 4/10/2/2)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 15.1 werden 0.66 g (1 mmol) Di-4-ASP-C₁₁-Phen (Versuch 16.18) mit 0.35 g (1 mmol) Di-1-APP-C₂COOH (Versuch 9.5), 0.39 g (1.2 mmol) TBTU und 0.49 g (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

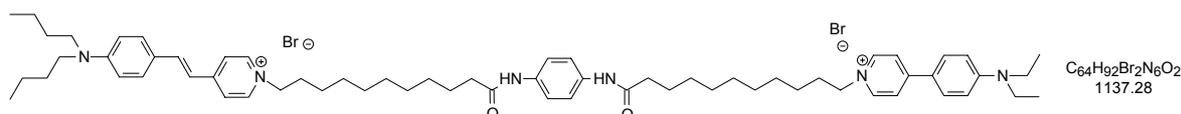
Ausbeute: 297 mg (29 %)

Zersetzungspunkt: > 210 °C

MS (FAB +NBA): 865 m/z ($M^+ - 2 Br$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{max} (\epsilon) = 433 \text{ nm} (32300)$, $\lambda_{max} (\epsilon) = 492 (53200)$

Versuch 17.46 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Diethylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-decylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dibutylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 4/10/10/2)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 15.1 werden 0.66 g (1 mmol) Di-4-ASP-C₁₀-Phen (Versuch 16.18) mit 0.49 g (1 mmol) Di-2-APP-C₁₀COOH (Versuch 13.11), 0.39 g (1.2 mmol) TBTU und 0.49 g (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

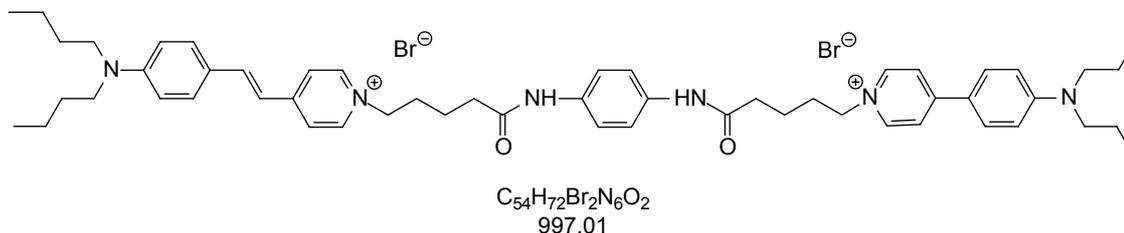
Ausbeute: 205 mg (18 %)

Zersetzungspunkt: > 200 °C

MS (FAB +NBA): 977 m/z ($M^+ - 2 Br$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{max} (\epsilon) = 436 \text{ nm} (33100)$, $\lambda_{max} (\epsilon) = 493 (52100)$

Versuch 17.47 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dipropylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-butylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-butyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dibutylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid
(Bichromophor 4/4/4/3)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 15.1 werden 580 mg (1 mmol) Di-4-ASP-C₄COOH-Phen (Versuch 16.6) mit 449 mg (1 mmol) Di-3-APP-C₄COOH (Versuch 9.12), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

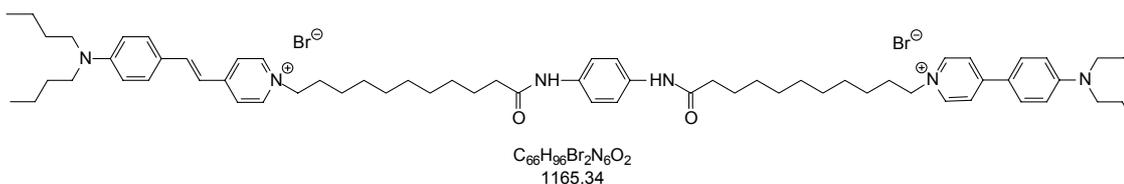
Ausbeute: 309 mg (31 %)

Schmelzpunkt: 202 °C

MS (FAB +NBA): 837 m/z (M⁺ - 2 Br)

UV/Vis (EtOH): λ_{max} (ε) = 430 nm (31400), λ_{max} (ε) = 497 (52400)

Versuch 17.48 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dipropylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-decylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dibutylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid
(Bichromophor 4/10/10/3)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 15.1 werden 664 mg (1 mmol) Di-4-ASP-C₁₀COOH-Phen (Versuch 16.18) mit 520 mg (1 mmol) Di-3-APP-C₁₀COOH (Versuch 9.23), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

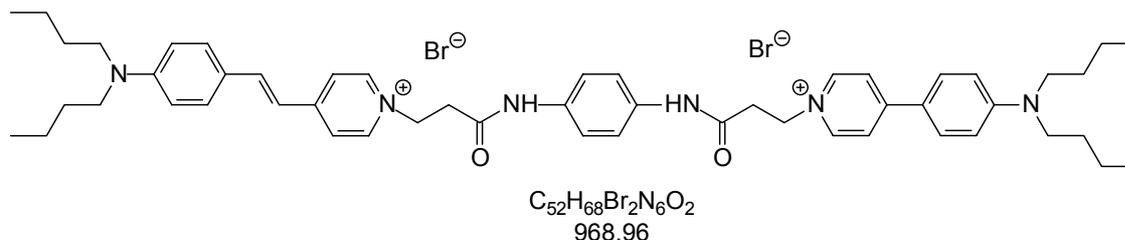
Ausbeute: 233 mg (20 %)

Zersetzungspunkt: > 210 °C

MS (FAB +NBA): 1006 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 429 \text{ nm} (31100)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 500 (53100)$

Versuch 17.49 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dibutylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-ethylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-ethyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dibutylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid
(Bichromophor 4/2/2/4)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 15.1 werden 0.55 g (1 mmol) Di-4-ASP- C_2COOH -Phen (Versuch 16.15) mit 0.44 g (1 mmol) Di-4-APP- C_2COOH (Versuch 9.8), 0.39 g (1.2 mmol) TBTU und 0.49 g (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

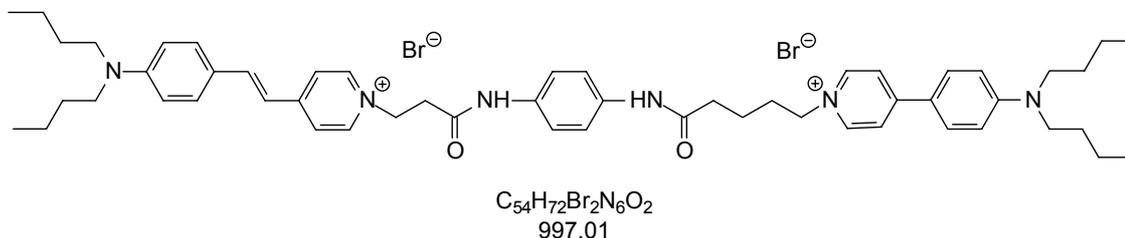
Ausbeute: 277 mg (25 %)

Zersetzungspunkt: > 210 °C

MS (FAB +NBA): 809 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 429 \text{ nm} (31200)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 499 (53400)$

Versuch 17.50 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dibutylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-butylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-ethyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dibutylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 4/2/4/4)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 552 mg (1 mmol) Di-4-ASP-C₂-Phen (Versuch 16.15) mit 463 mg (1 mmol) Di-4-APP-C₄COOH (Versuch 9.16), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

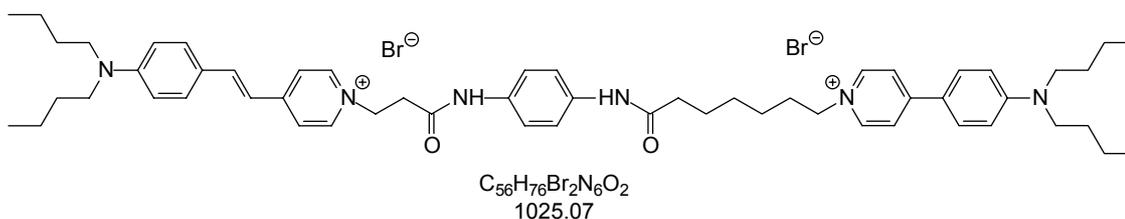
Ausbeute: 219 mg (22 %)

Zersetzungspunkt: > 210 °C

MS (FAB +NBA): 837 m/z (M⁺ - 2 Br)

UV/Vis (EtOH): λ_{max} (ε) = 430 nm (32200), λ_{max} (ε) = 495 nm (52100)

Versuch 17.51 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dibutylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-hexylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-ethyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dibutylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 4/2/6/4)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 15.1 werden 0.55 g (1 mmol) Di-4-ASP-C₂COOH-Phen (Versuch 16.15) mit 0.49 g (1 mmol) Di-4-APP-C₆COOH (Versuch 9.20), 0.39 g (1.2 mmol) TBTU und 0.49 g (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

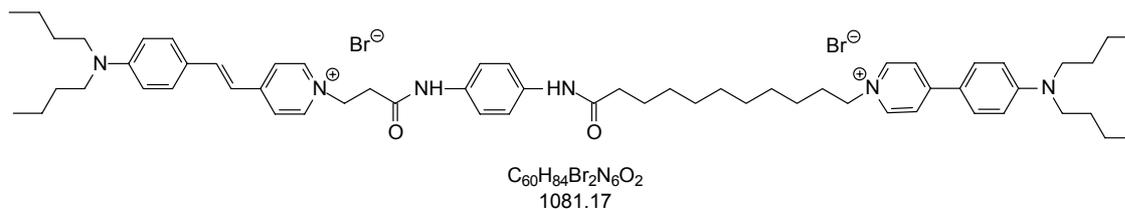
Ausbeute: 287 mg (28 %)

Schmelzpunkt: 222 °C

MS (FAB +NBA): 865 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 430 \text{ nm} (32100)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 501 (53900)$

Versuch 17.52 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dibutylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-decylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-ethyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dibutylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 4/2/10/4)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 552 mg (1 mmol) Di-2-ASP-C₄-Phen (Versuch 16.5) mit 435 mg (1 mmol) Di-2-APP-C₄COOH (Versuch 9.8), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

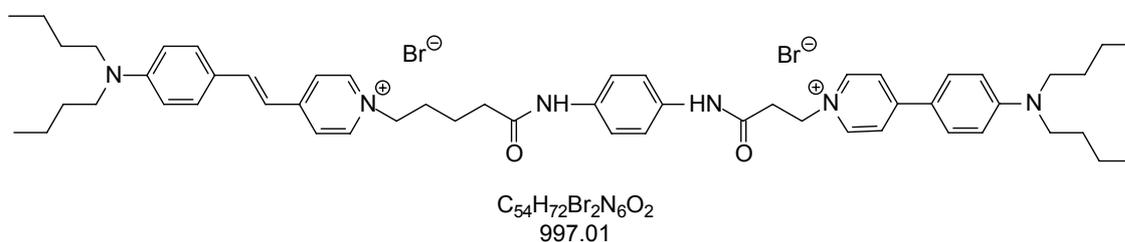
Ausbeute: 249 mg (23 %)

Zersetzungspunkt: > 200 °C

MS (FAB +NBA): 921 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 432 \text{ nm} (32100)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 500 (50000)$

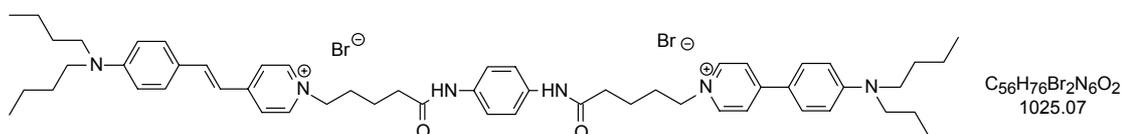
Versuch 17.53 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dibutylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-ethylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-butyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dibutylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 4/4/2/4)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 580 mg (1 mmol) Di-4-ASP-C₄-Phen (Versuch 16.16) mit 435 mg (1 mmol) Di-4-APP-C₂COOH (Versuch 9.8), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

Ausbeute: 319 mg (32 %)
Schmelzpunkt: 190 °C
MS (FAB +NBA): 837 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)
UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 434 \text{ nm} (33000)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 499 \text{ nm} (51000)$

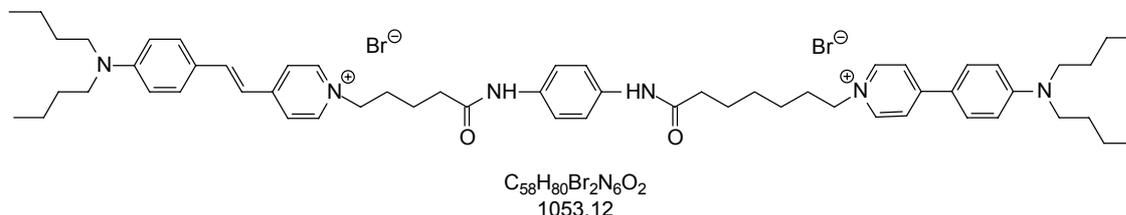
Versuch 17.54 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dibutylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-butylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-butyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dibutylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid
(Bichromophor 4/4/4/4)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 15.1 werden 0.58 g (1 mmol) Di-4-ASP-C₄-Phen (Versuch 16.16) mit 0.46 g (1 mmol) Di-4-APP-C₄COOH (Versuch 9.16), 0.39 g (1.2 mmol) TBTU und 0.49 g (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

Ausbeute: 318 mg (31 %)
Schmelzpunkt: 208 °C
MS (FAB +NBA): 865 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)
UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 427 \text{ nm} (33000)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 498 (52200)$

Versuch 17.55 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dibutylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-hexylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-butyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dibutylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 4/4/6/4)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 580 mg (1 mmol) Di-4-ASP-C₄-Phen (Versuch 9.16) mit 492 mg (1 mmol) Di-4-APP-C₆COOH (Versuch 9.20), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

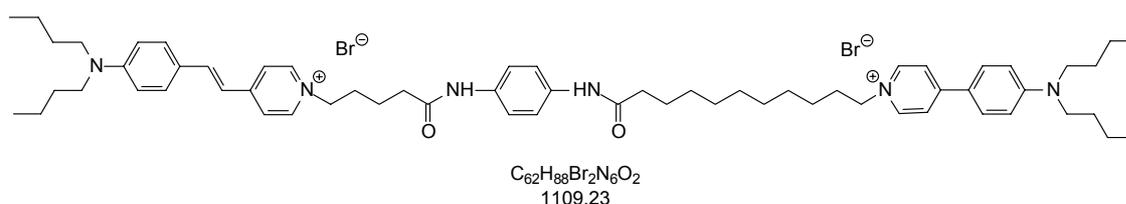
Ausbeute: 305 mg (29 %)

Schmelzpunkt: 205 °C

MS (FAB +NBA): 893 m/z (M⁺ - 2 Br)

UV/Vis (EtOH): λ_{max} (ε) = 430 nm (32900), λ_{max} (ε) = 495 nm (49900)

Versuch 17.56 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dibutylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-decylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-butyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dibutylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 4/4/10/4)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 664 mg (1 mmol) Di-4-ASP-C₁₀-Phen (Versuch 16.18) mit 548 mg (1 mmol) Di-4-APP-C₁₀COOH (Versuch 9.24), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

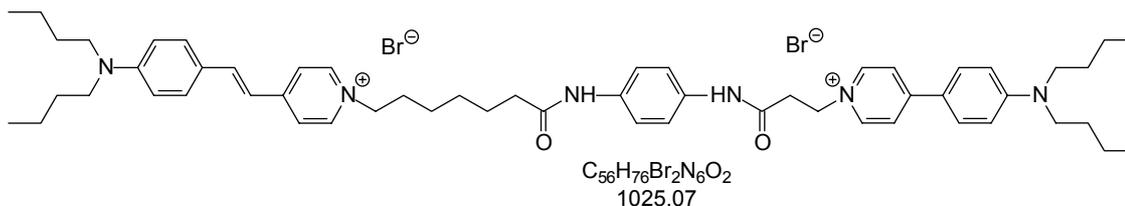
Ausbeute: 255 mg (23 %)

Zersetzungspunkt: > 200 °C

MS (FAB +NBA): 949 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 435 \text{ nm} (33100)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 499 \text{ nm} (51000)$

Versuch 17.57 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dibutylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-hexylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-hexyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dibutylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 4/6/2/4)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 15.1 werden 0.61 g (1 mmol) Di-4-ASP-C₆COOH-Phen (Versuch 16.17) mit 0.44 g (1 mmol) Di-4-APP-C₂COOH (Versuch 9.8), 0.39 g (1.2 mmol) TBTU und 0.49 g (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

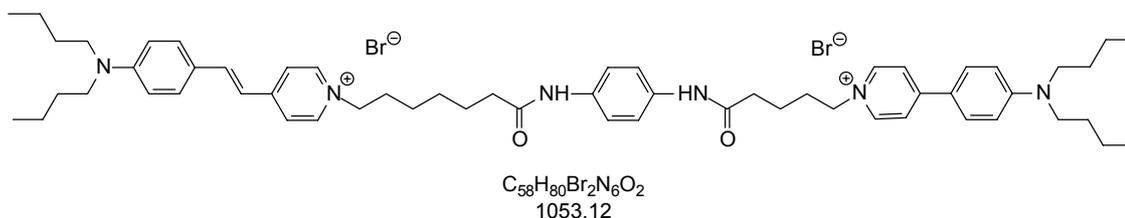
Ausbeute: 308 mg (30 %)

Schmelzpunkt: 218 °C

MS (FAB +NBA): 865 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 431 \text{ nm} (32100)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 495 (51800)$

Versuch 17.58 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dibutylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-butylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-hexyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dibutylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 4/6/4/4)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 608 mg (1 mmol) Di-4-ASP-C₆-Phen (Versuch 16.17) mit 463 mg (1 mmol) Di-4-APP-C₄COOH (Versuch 9.16), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in

absolutem DMF umgesetzt.

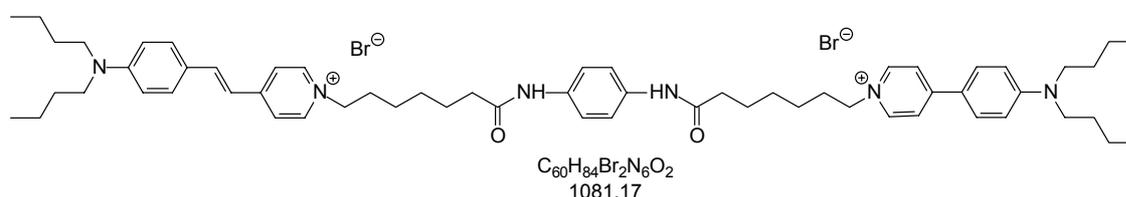
Ausbeute: 358 mg (34 %)

Zersetzungspunkt: 205 °C

MS (FAB +NBA): 893 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 432 \text{ nm} (32200)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 495 \text{ nm} (50100)$

Versuch 17.59 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dibutylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-hexylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-hexyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dibutylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 4/6/6/4)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 15.1 werden 0.61 g (1 mmol) Di-4-ASP- C_6COOH -Phen (Versuch 16.17) mit 0.49 g (1 mmol) Di-4-APP- C_6COOH (Versuch 9.20), 0.39 g (1.2 mmol) TBTU und 0.49 g (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

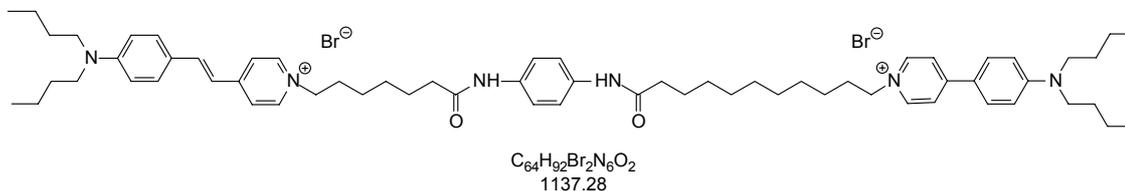
Ausbeute: 259 mg (24 %)

Zersetzungspunkt: > 210 °C

MS (FAB +NBA): 921 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 427 \text{ nm} (33400)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 493 (53800)$

Versuch 17.60 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dibutylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-decylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-hexyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dibutylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 4/6/10/4)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 608 mg (1 mmol) Di-4-ASP-C₆-Phen (Versuch 16.17) mit 548 mg (1 mmol) Di-4-APP-C₁₀COOH (Versuch 9.24), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

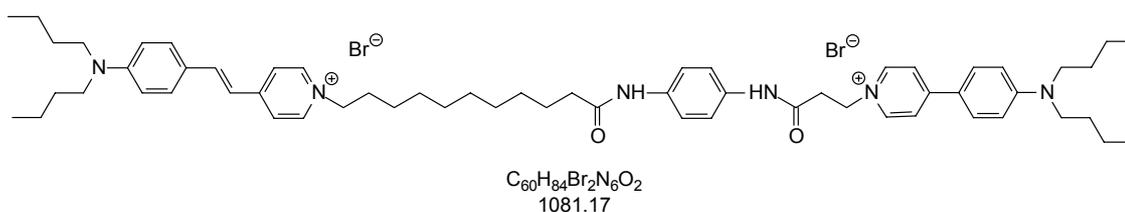
Ausbeute: 284 mg (25 %)

Zersetzungspunkt: > 200 °C

MS (FAB +NBA): 977 m/z (M⁺ - 2 Br)

UV/Vis (EtOH): λ_{max} (ε) = 433 nm (33100), λ_{max} (ε) = 498 nm (51200)

Versuch 17.61 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dibutylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-ethylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dibutylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 4/10/2/4)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 664 mg (1 mmol) Di-4-ASP-C₁₀-Phen (Versuch 16.18) mit 435 mg (1 mmol) Di-4-APP-C₂COOH (Versuch 9.8), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

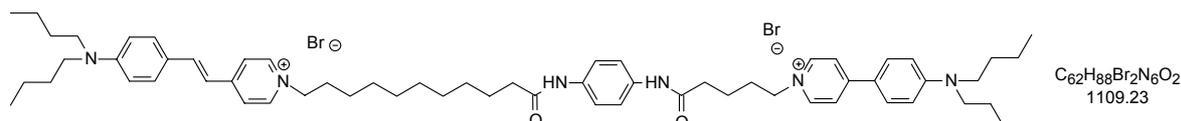
Ausbeute: 259 mg (24 %)

Zersetzungspunkt: > 200 °C

MS (FAB +NBA): 921 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 436 \text{ nm} (33400)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 500 \text{ nm} (48000)$

Versuch 17.62 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dibutylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-butylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dibutylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 4/10/4/4)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 15.1 0.66 g (1 mmol) Di-4-ASP-C₁₀-Phen (Versuch 16.18) mit 0.55 g (1 mmol) Di-4-APP-C₄COOH (Versuch 9.16), 0.39 g (1.2 mmol) TBTU und 0.49 g (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

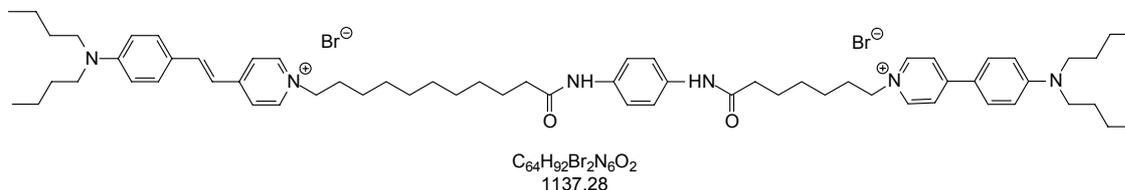
Ausbeute: 266 mg (24 %)

Zersetzungspunkt: > 210 °C

MS (FAB +NBA): 949 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 427 \text{ nm} (33100)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 492 (53900)$

Versuch 17.63 1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dibutylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-hexylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dibutylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 4/10/6/4)



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 16.1 werden 664 mg (1 mmol) Di-4-ASP-C₁₀-Phen (Versuch 16.18) mit 492 mg (1 mmol) Di-4-APP-C₆COOH (Versuch 9.20), 390 mg (1.2 mmol) TBTU und 490 mg (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

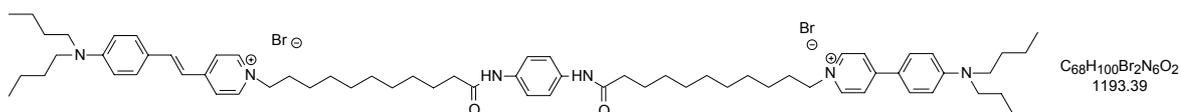
Ausbeute: 318 mg (28 %)

Zersetzungspunkt: > 200 °C

MS (FAB +NBA): 977 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 437 \text{ nm} (33000)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 505 \text{ nm} (48900)$

Versuch 17.64 **1-[4-(4-{2-[4-(4-*N,N*-Dibutylamino-phenyl)-pyridinium-1-yl]-decylcarbamoyl}-phenylcarbamoyl)-decyl]-4-{2-[4-(*N,N*-Dibutylamino)phenyl]ethenyl}pyridiniumdibromid (Bichromophor 4/10/10/4)**



Entsprechend der allgemeinen Arbeitsvorschrift in Versuch 15.1 werden 0.66 g (1 mmol) Di-4-ASP-C₁₀-Phen (Versuch 16.18) mit 0.55 g (1 mmol) Di-4-APP-C₁₀COOH (Versuch 13.23), 0.39 g (1.2 mmol) TBTU und 0.49 g (4.2 mmol) DIEA in absolutem DMF umgesetzt.

Ausbeute: 227 mg (19 %)

Zersetzungspunkt: > 200 °C

MS (FAB +NBA): 1034 m/z ($M^+ - 2 \text{ Br}$)

UV/Vis (EtOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 439 \text{ nm} (32200)$, $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 495 (51100)$

8 Literaturverzeichnis

- [1] W. Kratzert, R. Peichert, *Farbstoffe*, Quelle und Meyer, Heidelberg **1981**.
- [2] L.A. Polette, N. Ugarte, R.R. Chianelli, M.J. Yacamán, *Scientific American Discovering Archaeology*, **2000**, 46-53.
- [3] G. Wittke, *Farbstoffchemie*, Diesterweg, Frankfurt **1979**.
- [4] W.H. Perkin, *J. Chem. Soc.* **1879**, 35, 717.
- [5] J. Griffith, *Chemie in unserer Zeit*, **1993**, 27, 21 – 31.
- [6] E. Bishop, *Indicators*, Pergamon Press, Oxford **1972**.
- [7] F.P. Schäfer, *Dye Lasers*, Springer Verlag, Berlin **1977**.
- [8] M. Maeda, *Laser Dyes*, Academic Press, Tokyo **1984**.
- [9] M. Matsuoka, *Infrared Absorbing Dyes*, Plenum Press, New York **1989**.
- [10] F. Jones, *Rev. Prog. Color Relat. Top.* **1989**, 19, 20.
- [11] S.H. Kim, M. Matsuoka, Y. Kubp, T. Yodoshi, T. Kitao, *Dyes and Pigments* **1986**, 7, 93.
- [12] K. Takagi, M. Kawabe, M. Matsuoka, T. Kitao, *Dyes and Pigments* **1985**, 6, 177
- [13] D. Wöhrle, D. Meissner, *Adv. Mater.*, **1991**, 3, 129 – 138.
- [14] B. Blödorn, Dissertation **2003**, Universität Düsseldorf.
- [15] M.R. Detty, P.B. Merkel, S.K. Powers, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 5920 – 5922.
- [16] M.R. Detty, P.B. Merkel, S.K. Powers, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 3845 – 3855.
- [17] L.A. Meijer, F.A.M. Leermakers, J. Lyklema, *J. Phys. Chem.*, **1995**, 99, 17282 – 17293.
- [18] S.J. Singer, G.L. Nicolson, *Science*, **1972**, 175, 720 – 731.
- [19] D.M. Small, *Handbook of Lipid Research*, Plenum Press, New York, **1974**, 4.
- [20] R.R.C. New, *Liposomes: A Practical Approach*, IRL Oxford University Press **1990**.
- [21] R.C. MacDonald, R.I. MacDonald, B.Ph. Menco, K. Takeshita, N.K. Subbarao, L. Hu, *Biochimica at Biophysica Acta* **1991**, 1061, 297 – 303.

- [22] S. Batzri, E.D. Korn, *Biochimica et Biophysica Acta* **1973**, 298, 1015.
- [23] F. Ishii, S. Noro, *J. Pharm. Pharmacol.*, **1986**, 38, 296 – 297.
- [24] D. Deamer, A.D. Bangham, *Biochimica et Biophysica Acta* **1976**, 443, 629 – 634.
- [25] A. Berkaloﬀ, J. Bourguet, P. Farvard, J.-C. Lacroix, *die Zelle – Biologie und Physiologie*, 1. Aufl., Vieweg, Braunschweig **1990**.
- [26] P. Karlson, D. Doenecke, J. Koolman, *Kurzes Lehrbuch für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 14. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York **1994**.
- [27] D. Parks, L. Herzenberg, *Methods Enzymol.* **1984**, 108, 197 – 249.
- [28] M. Steinhausen, *Medizinische Physiologie*, 2. Aufl., Verlag für Medizin, Heidelberg **1991**.
- [29] W. Schmidt, “*Optische Spektroskopie*”, 2. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim **2000**.
- [30] I. Tasaki, L. Karnay, B. Sandlin, A. Watanabe, *Science*, **1969**, 163, 683 – 685.
- [31] L.B. Cohen, *J. Membr. Biol.*, **1974**, 19, 1 – 35.
- [32] W.N. Ross, *Biophys. J.*, **1974**, 14, 983 – 986.
- [33] F. Conti, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **1975**, 4, 287 – 310.
- [34] A.S. Waggoner, *The Enzymes of Biological Membranes*, Plenum Press, **1985**.
- [35] M. Reers, *Biochemistry*, **1991**, 30, 4480 – 4486.
- [36] E.B. George, *J. Membr. Biol.*, **1988**, 103, 245 – 253.
- [37] P.R. Pratap, *Biophys. J.*, **1990**, 57, 835 – 849.
- [38] A. Azzi, P. Gherardine, M. Santato, *J. Membr. Biol.*, **1971**, 246, 2035 – 2042.
- [39] J. Slavik, *Biochim. Biophys. Acta*, **1982**, 694, 1 – 25.
- [40] V. Mikes, *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **1979**, 44, 508 – 518.
- [41] B. Ehrenberg, V. Montana, M.-D. Wei, J.P. Wuskel, L.M. Loew, *Biophys. J.*, **1988**, 53, 785 – 794.
- [42] L.M. Loew, *Pure & Appl. Chem.*, **1996**, 68, 1405 – 1409.
- [43] E. Fluhler, V.G. Burnham, L.M. Loew, *Biochemistry*, **1985**, 24, 5749 – 5755.
- [44] H. Ephard, P. Fromherz, *J. Phys. Chem.*, **1991**, 95, 6792 – 6797.
- [45] H. Ephard, P. Fromherz, *J. Phys. Chem.*, **1989**, 93, 7717 – 7725.

- [46] H. Ephard, P. Fromherz, *J. Phys. Chem.*, **1993**, *97*, 4540 – 4547.
- [47] P. Fromherz, C. Röcker, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **1994**, *98*, 128 – 131.
- [48] P. Fromherz, C.O. Müller, *Biochim. Biophys. Acta*, **1993**, *1150*, 111 – 122.
- [49] P. Fromherz, O. Schenk, *Biochim. Biophys. Acta*, **1994**, *1191*, 299 – 308.
- [50] P. Fromherz, C. Röcker, A. Heilmann, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **1991**, *95*, 1333 – 1345.
- [51] A. Grinvald, A. Fine, I.C. Faber, R. Hildesheimer, *Biophys. J.*, **1983**, *42*, 195 – 198.
- [52] A. Zouni, R.J. Clarke, A.J.W.G. Visser, N.V. Visser, J.F. Holzwarth, *Biochim. Biophys. Acta*, **1993**, *1115*, 203 – 212.
- [53] R.J. Clarke, P. Schimpf, M. Schöneich, *Biochim. Biophys. Acta*, **1992**, *1112*, 142 – 152.
- [54] P. Fromherz, A. Lambacher, *Biochim. Biophys. Acta*, **1991**, *1068*, 149 – 156.
- [55] A. Zouni, R.J. Clarke, J.F. Holzwarth, *J. Phys. Chem.*, **1994**, *98*, 1732 – 1738.
- [56] W.N. Ross, B.M. Salzberg, L.B. Cohen, A. Grinvald, H.V. Davilla, A.S. Waggoner, C.H. Wang, *J. Membr. Biol.*, **1977**, *33*, 141 – 183.
- [57] A.S. Waggoner, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **1979**, *8*, 47 – 68.
- [58] L.M. Loew, G.W. Bonneville, J. Surow, *Biochem.*, **1978**, *17*, 4065 – 4071.
- [59] J.E. Gonzalez, R.Y. Tsien, *Biophys. J.*, **1995**, *69*, 1272 – 1280.
- [60] J.E. Gonzalez, R.Y. Tsien, *Chemistry & Biology*, **1997**, *4*, 269 – 277.
- [61] T.W. Cacciatore, *Neuron*, **1999**, *23*, 449 – 459.
- [62] T. Förster, *Discuss. Faraday Soc.* **1959**, *27*, 7 – 17.
- [63] L. Stryer, *Ann. Rev. Biochem.*, **1978**, *47*, 819 – 846.
- [64] Y. Luo, J.L. Wu, J. Gergely, T. Tao, *Biophys. J.*, **1998**, *74*, 3111 – 3119.
- [65] P. Mellet, C. Boudier, Y. Mely, J.G. Bieth, *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 9119 – 9123.
- [66] B.S. Watson, T.L. Hazlett, J.F. Eccleston, C. Davis, D.M. Jameson, A.E. Johnson, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 7904 – 7912.
- [67] A.B. Cubitt, *Trans. Immun. Biol. Sci.*, **1995**, *20*, 448 – 456.
- [68] K. Toth, V. Sauermann, J. Langowski, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 8173 – 8179.

- [69] C. Gutierrez-Merino, I.C. Bonini de Romanelli, L.I. Pietrasanta, F.J. Barrantes, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 4846 – 4855.
- [70] E.I. Pecheur, I. Martin, J.M. Ruyschaert, A. Bienvenue, D. Hoeckstra, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 2361 – 2371.
- [71] P. Wu, L. Brand, *Biochemistry* **1992**, *31*, 7939 – 7947.
- [72] P. Wu, L. Brand, *Analytical Biochemistry* **1994**, *218*, 1 – 13.
- [73] M. Birmes, Dissertation **1996**, Universität Düsseldorf.
- [74] U. Meyer-Beeck, Dissertation **2000**, Universität Düsseldorf.
- [75] D. Witzak, Dissertation **2000**, Universität Düsseldorf.
- [76] B. Reiffers, Dissertation **2001**, Universität Düsseldorf.
- [77] L. Schneider, Dissertation **2001**, Universität Düsseldorf.
- [78] J. Hallmann, Diplomarbeit **1997**, Universität Düsseldorf.
- [79] A. Hassner, D. Birnbaum, L.M. Loew, *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 2546 – 2550.
- [80] R.F. Heck, *Palladium Reagents in Org. Synthesis*, Acad. Press London **1987**.
- [81] Ch. Elschenbroich, A. Salzer, *Organometallic Chemistry*, Teubner Verlag **1990**, 488.
- [82] G.O. Becker et. al., *Organikum*, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin **1990**.
- [83] F. Salmon-Legagneur, C. Neveu, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1956**, *204*, 1345 – 1350.
- [84] R.G. Micetich, „The Chemistry of Heterocyclic Compounds“, *14*, Suppl. Part 2, ed. R.A. Abramovitch, John Wiley & Sons Inc., New York, **1974**, 263.
- [85] K. Akiba, Y. Iseki, M. Wada, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 429.
- [86] D.L. Comins, A.H. Abdulla, *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 4315.
- [87] D.L. Comins, E.D. Stround, J.J. Herrick, *Heterocycles* **1984**, *22*, 151.
- [88] D.L. Comins, E.D. Stround, *Heterocycles* **1984**, *22*, 339.
- [89] L.N. Pridgen, *J. Heterocycl. Chem.*, **1975**, *12*, 443.
- [90] A. Minato, K. Tamao, T. Hayashi, K. Suzuki, M. Kumada, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 5319.
- [91] K. Tamao, S. Kodama, I. Nakajima, M. Kumada, A. Minato, K. Suzuki, *Tetrahedron* **1982**, *38*, 3347.
- [92] E. Negishi, F.-T. Luo, R. Frisbee, H. Matsushita, *Heterocycles* **1982**, *18*, 117.

- [93] M. Ishikura, T. Ohta, M. Terashima, *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, 33, 4755 – 4763.
- [94] G.I. Migachev, B.I. Stepanov, *J. Gen. Chem. USSR* **1968**, 38, 1320 – 1321.
- [95] R.C. Fuson, J.J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 3477 – 3481.
- [96] M. Ishikura, T. Mano, I. Oda, M. Terashima, *Heterocycles* **1984**, 22, 2475 – 2478.
- [97] M. Ishikura, T. Mano, I. Oda, M. Terashima, *Heterocycles* **1984**, 22, 2471 – 2474.
- [98] R. Köster, W. Fenzl, G. Seidel, *Liebigs Ann. Chem.* **1975**, 352 – 372.
- [99] B.M. Mikhailov, V.A. Vaver, Y.N. Bubnov, *Dokl. Chem* **1959**, 126, 369.
- [100] L. Rosenblum, *J. Amer. Chem. Soc.* **1955**, 77, 5016.
- [101] R. Köster, *Liebigs Ann. Chem.* **1958**, 618, 31.
- [102] R. Köster, *Angew. Chem.* **1961**, 73, 66.
- [103] R. Köster, G. Bruno, *Liebigs. Ann. Chem.* **1960**, 629, 89 – 95.
- [104] G. Schomburg, R. Köster, D. Henneberg, *Mitteilungsblatt Chem. Ges. DDR, Sonderheft Anal. Chem.* **1960**.
- [105] R. Köster, W. Fenzl, G. Seidel, *Liebigs Ann. Chem.* **1975**, 352 – 372.
- [106] A. Suzuki, N. Miyaura, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1979**, 866 – 867.
- [107] A. Suzuki, N. Miyaura, *Chem. Rev.* **1995**, 2457 – 2483.
- [108] A.R. Martin, Y. Yang, *Acta Chem. Scand.* **1993**, 43, 221 – 230.
- [109] G.I. Migachev, B.I. Stepanov, *J. Gen. Chem. USSR*, **1968**, 38, 1320 – 1321.
- [110] L. Schneider, Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **1996**.
- [111] S. Delarue, C. Sergheraert, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 5487 – 5490.
- [112] R. Knorr, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1927 – 1930.
- [113] V.A. Kuzmin, A.P. Darmanyany, *Chem. Phys. Letters* **1978**, 13, 3315 – 3330.
- [114] J.N. Demas, G.A. Crosby, *J. Phys. Chem.*, **1971**, 75, 991 – 1024.
- [115] O. Litterscheid, Staatsarbeit, Universität Düsseldorf, **2000**.
- [116] J. Schmitz, Diplomarbeit, Universität Düsseldorf **1997**.
- [117] P. Läger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1985**, 97, 939 – 959.
- [118] C. Huang, *Biochemistry* **1969**, 8, 344 – 351.
- [119] J. Hallmann, Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **1997**.

- [120] F. Salmon-Legagneur, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1956**, No. 194, 1263 – 1269.
- [121] W.E. Parham, D.C. Egberg, S.S. Salgar, *J. Org. Chem.* **1972**, 37 (21), 3240 – 3248.
- [122] D.E. Ames, R.E. Bowman, R.G. Mason, *J. Chem. Soc.* **1950**, 174.
- [123] R.F. Heck, H.A. Dick, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 1133 – 1136.
- [124] J.H. Billmann, A. Radike, B.W. Mundy, *J. Am. Chem.* **1942**, 64, 2977 – 2978.
- [125] G.I. Migachev, B.I. Stepanov, *J. Gen. Chem. USSR*, **1968**, 38, 1320 – 1321.
- [126] R. Köster, H. Bellut, W. Fenzl, *Liebigs Ann. Chem.* **1974**, 54 – 68.
- [127] P.L. Desbène, N. Jehanno, *J. Heterocyclic Chem.* **1984**, 21, 1321 – 1327.
- [128] M. Ishikura, T. Ohta, M. Terashima, *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, 33 (11), 4755 – 4763.
- [129] T. Yvernault, G. Yvernault, J.C. Bollinger, *C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. C* **1978**, 287, 519 – 521.
- [130] J.Coste, E. Frérot, P. Jouin, *J. Org. Chem.* **1994**, 12, 2436 – 2446.