

**Fluoreszenzfarbstoffe
als
Proteinaffinitätssonden
und Potentialsonden
in HTS-Verfahren**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Diplom-Chemiker Cord Meyer

aus Aachen

Düsseldorf 2004

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

Referent: Professor Dr. H.-D. Martin

Koreferent: Professor Dr. M. Braun

Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.2004

Herrn Prof. Dr. H.-D. Martin danke
ich für die Möglichkeit, in seinem
Arbeitskreis diese Dissertation
anfertigen zu dürfen und für
fruchtbare Diskussionen.

Abkürzungen

AM1	Austin Modell 1
BRET	Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (s. a. FRET)
DMSO	Dimethylsulfoxid
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer = strahlungsloser Energietransfer nach Förster
GC	Gaschromatographie
GFP	Grünfluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
HTS	High Throughput Screening
$^xJ_{a,b}$	Kopplungskonstante über x Bindungen zwischen den Kernen a und b; $[J] = \text{Hz} = \text{s}^{-1}$
MM	Molmasse, Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie
NBA	3-Nitrobenzylalkohol
Rhodanin	2-Thioxothiazolidin-4-on
Thiohydantoin	2-Thioxoimidazolidin-4-on
TMS	Tetramethylsilan

1 Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	v
1 Inhaltsverzeichnis.....	vii
2 Einleitung	1
3 Grundlagen.....	3
3.1 Transmembranpotentialmessungen.....	3
3.1.1 Zellmembranaufbau	4
3.1.2 Membranpotential	5
3.1.3 Messung des Membranpotentials.....	9
3.1.4 Fast-Response- und Slow-Response-Farbstoffe	13
3.1.5 Oxonole als Potentialsonden	14
3.2 Messung von Protein-Wechselwirkungen	15
3.2.1 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET).....	15
3.2.2 Fluoreszenz Resonanz Energietransfer im High Throughput Screening	20
4 Struktursuche und Synthesen.....	22
4.1 Anforderungen an den BRET-Akzeptor in Proteinaffinitätssonden	22
4.2 Synthese des BRET-Akzeptors.....	32
4.2.1 Synthese von 6-Diethylaminbenzofuran-2-carbaldehyd als einfachster Teilchromophor.....	32
4.2.2 Synthese von Modellchromophoren.....	38
4.2.3 Einführung der Carboxylgruppe in den Chromophor	53
4.2.3.1 Einführung der Carboxylgruppe in den Benzofuran-Teilchromophor	53
4.2.3.2 Einführung der Carboxylgruppe in den auxochromen Heterocyclus des Fluorophors	56
4.2.4 Einführung von hydrophilen Gruppen zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit	61
4.2.4.1 Versuche zur direkten Sulfonierung von 6-Diethylaminbenzofuran-2-carbaldehyd 5	62
4.2.4.2 Einführung der Sulfonsäuregruppe in 6-Diethyl- aminbenzofuran-2-carbaldehyd 5 als Seitenkette.....	65

4.2.4.3 Modifikation des Benzofuran-Teilchromophors I	68
4.2.4.4 Modifikation des Benzofuran-Teilchromophors II.....	73
4.2.4.5 Einführung der Sulfonsäuregruppe mittels Propylsulton	78
4.2.5 Spektroskopische Eigenschaften der Chromophore.....	81
4.2.5.1 Absorption und Emission.....	81
4.2.5.2 Darstellung der Succinimidylester.....	86
4.2.5.3 Messung der Quantenausbeute.....	87
4.3 Derivatisierung von Thiobarbiturat-Oxonolen für den Einsatz als Transmembranpotentialsonden.....	91
4.3.1 Problemstellung und allgemeine Synthese	91
4.3.2 Darstellung von Thioharnstoffderivaten und deren spektroskopische Besonderheiten	96
4.3.2.1 Zu den Infrarotspektren der Thioharnstoffe	97
4.3.3 Darstellung von Thiobarbituratderivaten und deren spektroskopische Besonderheiten.....	107
4.3.4 Darstellung der Thiobarbituratoxonole und deren spektroskopische Besonderheiten	111
4.3.4.1 Symmetrie der Oxonole.....	113
4.3.4.2 UV-VIS-Spektren und Solvatochromie der Oxonole...	116
4.4 Ergebnisse der Farbstofftests	119
5 Zusammenfassung.....	133
6 Experimentalteil.....	139
6.1 Zur Nomenklatur von Thiobarbiturat-Derivaten.....	141
7 Literaturverzeichnis.....	309

2 Einleitung

Licht ist Voraussetzung allen Lebens auf der Erde. Die chemischen Elemente finden sich seit Anbeginn in wechselnder Zusammensetzung und Oxidationsstufe, ihre Gesamtmasse auf der Erde ändert sich aber nicht. Wird ein Rohstoff verbraucht, d.h. in andere Verbindungen überführt, so wird sein Vorrat nicht ohne weiteres wieder hergestellt.

Licht jedoch steht seit den frühen Anfängen der Entwicklung der Erde und des Lebens nahezu unbegrenzt zur Verfügung und wird es auch, in menschlichen Zeiträumen gemessen, bleiben. Darauf ist das gesamte Leben auf der Erde eingestellt.

Alle Spezies sind, von wenigen Ausnahmen abgesehen, direkt oder indirekt vom Sonnenlicht abhängig; es liefert die Energie zur Bildung energiereicher Moleküle, von denen sich der diese Verbindungen erzeugende Organismus einen Vorrat anlegt, z. B. Kohlenhydrate. Dieser dient ihm selbst und seinen Freßfeinden als Nahrung.

So nutzt der Mensch Licht eher unbewußt als Energielieferant über seine Nahrung, ist also *indirekt* vom Sonnenlicht dadurch abhängig, daß seine Nahrung Licht benötigt. Obwohl die teilweise sehr energiereiche Strahlung der Sonne auch Schäden beim Menschen hervorruft, die er auf biologische Weise durch Hautpigmentierung oder durch synthetische Sonnenschutzcremes zu verhindern sucht, ist er doch auch *direkt* auf Lichtstrahlung angewiesen, z. B. bei der photochemischen Erzeugung von Vitamin D (Calciferol) in seinem Stoffwechsel.

In neuerer Zeit macht sich der Mensch Licht auch in hochtechnisierten Prozessen zunutze, um z. B. ihre Effektivität zu steigern. Beim lithographischen Verfahren wird Licht genutzt, um sehr feine Strukturen herausarbeiten zu können. Licht dient zur Speicherung und zum Lesen großer Mengen von Daten und ist für die dauerhafte Speicherung den magnetischen Verfahren weit überlegen. Die hohe Geschwindigkeit der Übertragung von Informationen lassen Licht für neue Computergenerationen als Konkurrent zu

Stromleiterbahnen in den Vordergrund treten, zur Übertragung großer Datenmengen über lange Wege werden Lichtleiter schon heute fast standardmäßig verwendet.

Licht kann aber auch in Meßinstrumenten dienen. Nicht nur zur exakten Vermessung von Strecken wird Licht verwendet. Der große Vorteil der Automatisierungsmöglichkeit bei optischen Hochdurchsatzmessungen (*High Throughput Screening*, HTS) ist für die pharmazeutische Forschung interessant. Daß Licht geeigneter Wellenlänge keine Schäden an Zellen hervorruft, Messungen also *in vivo* erfolgen können, macht diese Methode für biologische Anwendungen nützlich. Bei diesen Messungen erfolgt der Response in Form von optischen Signalen. Auf diese Weise wird gegenüber anderen analytischen Verfahren nicht nur eine starke Miniaturisierung erzielt, es können auch viele Proben simultan in kurzer Zeit und automatisiert vermessen werden.

In solchen Systemen werden sehr häufig Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Bezogen auf den chemischen Aufbau können sie verschiedenen Farbstoffklassen zugeordnet sein. Aber sie gehören durch ihre Anwendung, die nicht rein kosmetischer Natur ist, der Klasse der *funktionellen Farbstoffe* an. Nach J. Griffiths ist "*ein funktioneller Farbstoff [...] ein Farbstoff, der bei seiner Anwendung eine Funktion erfüllt, die nicht auf einer rein ästhetischen Farbgebung beruht*"^[1]. Solche *funktionellen Farbstoffe* müssen nicht anthropogen sein, Carotinoide und Porphyrine z. B. sind hochspezialisiert und stark auf ihre Funktion im *light harvesting complex* der Photosynthese abgestimmt.

Der Meßaufbau solcher Hochdurchsatzmessungen ist so gestaltet, daß die Meßantwort aus z. B. dem Erlöschen oder Auftreten von Fluoreszenzemission bei bestimmter Wellenlänge (Ja/Nein Antwort) oder z. B. aus der Veränderung der Fluoreszenzintensität während der Messung (quantitative Messung) besteht.

In der vorliegenden Arbeit werden Fluoreszenzfarbstoffe zur Verwendung in Hochdurchsatzmessungen vorgestellt, in welchen die erstere oder die letztere dieser beiden Möglichkeiten genutzt wird.

3 Grundlagen

Auf Anregung von Dr. Bechem und Dr. Paffhausen vom Pharmaforschungszentrum der Bayer AG, Wuppertal, wurden Fluoreszenzfarbstoffe synthetisiert, die sich für eine der beiden folgenden Anwendungen eignen sollten.

Zum einen besteht ein großes Interesse daran, das Transmembranpotential von Zellen schnell und bei einer Vielzahl von Zellen zu messen, ohne diese zu beschädigen.

Die zweite Anwendung, die ebenfalls für die pharmazeutische Industrie bei der Suche nach Wirkstoffen eine große Rolle spielt, ist die schnelle Antwort, ob zwei Proteine analog Antigen/Antikörper Affinität zueinander zeigen oder nicht.

In beiden Fällen sollte die Methode automatisierbar sein und sich in geeignetem zeitlichen Rahmen durchführen lassen. Die Automatisierbarkeit ist durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen prinzipiell gegeben. Rechnergesteuerte Zugabe von Farbstofflösungen, Anregung mit Laserlicht und Auslesen der Fluoreszenzemission ist seit einiger Zeit *state of the art*.

Die Zeit pro Messung ist Abhängig von der Anwendung und muß durch das Design des verwendeten Farbstoffs möglichst gering gehalten werden. So ist es zum Beispiel erforderlich, daß alle Messungen an einer Zelllinie innerhalb von vierundzwanzig Stunden erfolgen können. Nur dann können alle Zellen als äquivalent gelten, d. h. nur dann sind alle Messungen vergleichbar.

3.1 Transmembranpotentialmessungen

Zur Messung von Transmembranpotentialen von Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen muß die Antwort möglichst schnell erfolgen und signifikant sein. Also muß der Farbstoff in kurzer Zeit in die Zellmembran oder sogar in die Zelle eindringen können, desweiteren muß bereits bei geringer Änderung des Membranpotentials eine starke Änderung der Fluoreszenz erfolgen.

3.1.1 Zellmembranaufbau

Zellen sind die morphologischen Grundeinheiten des Lebens. Die Zelle enthält verschiedene Organellen, d. h. größere abgetrennte Bereiche mit spezifischer Funktion, die z. B. ihrer Fortpflanzung und Ernährung dienen. Eine wesentliche Eigenschaft der Zelle und auch ihrer Organellen ist die, daß ihr Inneres gegen die Umgebung abgetrennt ist. Man spricht in der Cytologie von Kompartimentierung (von franz.: compartiment = Abteilung). Neben Stoff-, Energie- und Informationstransport intra- und interzellulär ist die Kompartimentierung die wesentliche Aufgabe von Membranen (Membran: lat. = dünnes Häutchen). Die Membranen sind also Trennmedien und wahrscheinlich Voraussetzung für die Entstehung des Lebens gewesen. Durch die spontane Bildung von Membranen entstanden erste „Bläschen“, die die im Inneren enthaltenen Moleküle nach außen abtrennten und damit primitive Reaktoren bildeten.

Das Grundgerüst einer Membran sind Lipide: Moleküle, die sich durch ein lipophiles und ein hydrophiles Ende auszeichnen (Amphiphile). Die wichtigsten Lipide biologischer Membranen sind Glycerophospholipide (oder Phosphoglyceride) und Sphingolipide.

Glycerophospholipide leiten sich von *sn*-Glycerin-3-phosphat ab, das an C(1) und C(2) mit Fettsäuren und an der Phosphatgruppe mit einem weiteren Rest verestert ist.

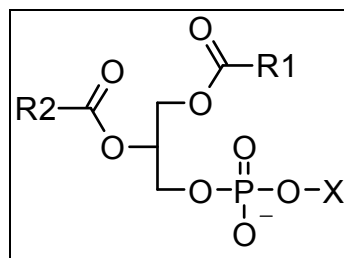


Abbildung 1: Glycerophospholipid

R1-CO₂H, R2-CO₂H: C₁₆-, C₁₈- oder C₂₀-Säure, gesättigt oder teilweise ungesättigt

X: Ethanolamin, Cholin u. a.

Sphingolipide leiten sich von Sphingosin oder Dihydrosphingosin ab. *N*-acylierte Derivate nennen sich Ceramide. Die in biologischen

Membranen häufigsten Sphingolipide sind Sphingomyeline, mit Phosphocholin oder Phosphoethanolamin veresterte Ceramide.

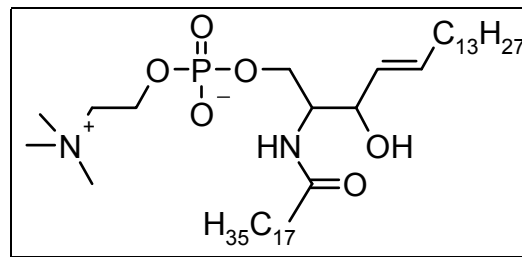


Abbildung 2: Sphingomyelin

Obwohl Phospholipide und Sphingomyeline sich chemisch deutlich unterscheiden, sind Struktur und Ladungsverteilung doch sehr ähnlich. Beide Moleküle zeichnen sich durch einen hydrophilen Kopf und zwei lange lipophile Kohlenwasserstoffketten aus, so daß die Form schematisch einem Rechteck entspricht. Dies begünstigt die Bildung von Lipiddoppelschichten (Bilayer) in wäßriger Lösung.

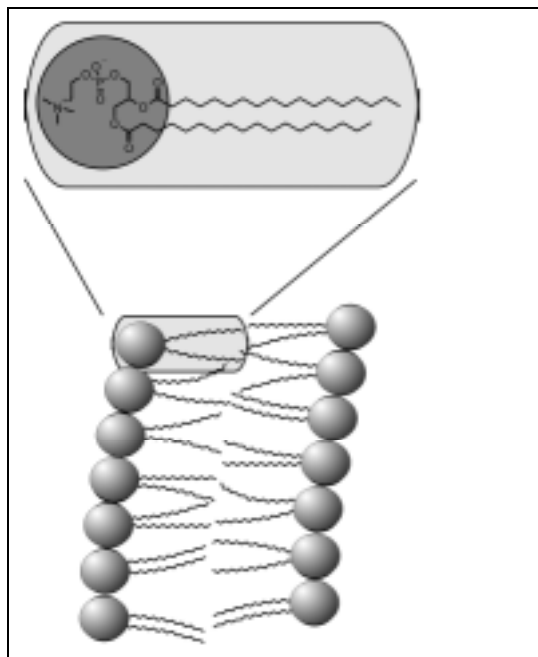


Abbildung 3: Bildung einer Lipiddoppelschicht aus Phospholipidmolekülen

3.1.2 Membranpotential

Durch eine Lipiddoppelschicht findet unter biologischen Bedingungen nicht ohne weiteres ein Stoffaustausch zwischen Zellinnerem und -äußerem statt. Die typischerweise in Zellen vorkommenden

wasserlöslichen, also polaren, Moleküle können die lipophile Zellmembran nicht überwinden. (Eine Ausnahme besteht für wasserlösliche, relativ unpolare Moleküle. So wird z. B. Valinomycin verwendet, um Ionen durch Zellmembranen oder *Vesikel-Bilayer* ohne Kanäle zu schleusen.) In der Zellmembran befinden sich jedoch Transmembranproteine, die z. B. Kanäle und aktive Transporter bilden. Über diese Kanäle können Wassermoleküle oder die für den Ionenkanal spezifischen Ionen zwischen Innen- und Außenmedium ausgetauscht werden. Für die Aufklärung solcher Kanäle wurde 2003 der Nobelpreis für Chemie an RODERICK MACKINNON^[2] und PETER AGRE^[3] vergeben. Manche Ionen werden aktiv, d. h. mit Energieaufwand gegen ihren Konzentrationsgradienten transportiert. Zum Beispiel befördert die Na-K-ATPase Kaliumionen in die Zelle, während sie gleichzeitig Natriumionen aus der Zelle transportiert (Verhältnis: 2 K⁺ gegen 3 Na⁺), wobei Adenosintriphosphat als Energielieferant wirkt. Umgekehrt kann ein bestehender Konzentrationsgradient die Energie zur Knüpfung höherenergetischer Bindungen liefern. Zum Beispiel dient der ATP-Synthase ein Protonengradient über die Membran als Energielieferant zur Bildung von Adenosintriphosphat.

Tabelle 1: Typische Verteilung ausgesuchter Ionen und deren Membranpermeabilitäten bei Säugern^[4]

Ion	Intrazelluläre Konzentration / mmol·l ⁻¹	Extrazelluläre Konzentration / mmol·l ⁻¹	Gleichgewichts potential / mV	Permeabilitäts- koeffizient P * / cm·s ⁻¹
Kalium	139	4	-91	5·10 ⁻⁷
Natrium	12	145	+64	5·10 ⁻⁹
Chlorid	4	116	-86	1·10 ⁻⁸
Prote- inische Anionen	138	9	-	0

* Membranpermeabilitätskoeffizient = Diffusionskoeffizient / Membrandicke

Üblicherweise ist bei Zellen ein deutlicher Konzentrationsunterschied von Ionen zwischen Zellinnerem und -äußerem, allerdings bei gleichzeitiger Elektroneutralität, vorherrschend. Eine typische Verteilung der Ionen gibt Tabelle 1 wieder.

Zwischen zwei Reaktionsräumen, getrennt durch eine Membran, in denen ein Stoff in neutraler Form in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegt, berechnet sich die Änderung der Freien Enthalpie beim Übergang von Lösung 1 in Lösung 2 wie folgt:

$$\Delta G = RT \cdot \ln \frac{c_2}{c_1} \quad \text{Gl. (1.)}$$

G : Freie Enthalpie

R : allg. Gaskonstante

T : absolute Temperatur

c_1, c_2 : Konzentration der Lösung 1 und 2

Kaliumionen können durch Kaliumionenkanäle in der Zellmembran dem Konzentrationsgradienten folgend nach außen treten. Da ihre Gegenionen jedoch nicht durch diesen Ionenkanal gelangen können, würde ein Anionenüberschuß in der Zelle resultieren, ein Überschuß an positiver Ladung außerhalb der Zelle. Dies führt zu einem elektrischen Potentialunterschied, dessen Kraft dem Konzentrationsgradienten entgegengerichtet ist.

Die Energie die nach Gleichung (1) durch Übertritt des Kaliumions von der Lösung hoher Konzentration in die Lösung niedriger Konzentration frei wird ($c_1 > c_2$), muß nach Gleichung (2) aufgewendet werden, um das Kaliumion gegen den Potentialgradienten zu transportieren.

$$\Delta G = z \cdot F \cdot \Delta \Psi \quad \text{Gl. (2.)}$$

z : Ionenladung

F : Faraday-Konstante

Ψ : Elektrisches Potential, $\Delta \Psi = \Psi_{\text{innen}} - \Psi_{\text{außen}}$

Per Konvention bezieht sich das Membranpotential auf die positive Ladung. Das intrazelluläre Potential wird auf das extrazelluläre bezogen, letzteres ist zu Null definiert.

Das heißt, es treten solange Ionen aus der Zelle aus, bis der Potentialgradient so groß wird, daß er den Konzentrationsgradienten aufwiegt. Das elektrische Potential ist dann gleich groß wie das chemische Potential, nur mit umgekehrtem Vorzeichen, so daß das Gesamtpotential, das elektrochemische Potential, gleich Null ist.

Tatsächlich ist es jedoch so, daß nicht ein stationärer Zustand (*steady state*) herrscht, sondern in der Ruhephase der Zelle gleichviele Kaliumionen durch die Na-K-ATPase in die Zelle transportiert werden, wie durch spannungsunabhängige Kaliumionenkanäle die Zelle verlassen. Es herrscht also ein Fließgleichgewicht, der Konzentrationsgradient ändert sich nicht.

Um die Verhältnisse mathematisch wiederzugeben, muß sowohl das elektrische, als auch das chemische Transmembranpotential berücksichtigt werden. Damit addieren sich Gleichung (1) und (2) zu:

$$\Delta G = z \cdot F \cdot \Delta \Psi - 2.3 \cdot R \cdot T \cdot \log \frac{c_2}{c_1} \quad \text{Gl. (3.)}$$

c_1 : intrazelluläre Konzentration
 c_2 : extrazelluläre Konzentration

Zur Vereinfachung wird das System als stationärer Zustand behandelt. Mit $\Delta G = 0$ und Auflösen nach der Potentialdifferenz, erhält man die Nernstsche Gleichung:

$$\Delta \Psi = \frac{2.3 \cdot R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \log \frac{c_{ex}}{c_{in}} \quad \text{Gl. (4.)}$$

ex: extrazellulär
in: intrazellulär

Für ein einwertiges Kation bei 25°C wird bei Erhöhung der extrazellulären Konzentration um den Faktor 10 das Membranpotential um 59.0 mV erhöht (positiver), im Falle eines zweiwertigen Ions um 29.5 mV.

Nun ist eine Zellmembran nicht für jede Ionensorte gleich permeabel, dies muß bei Gleichung (4) noch berücksichtigt werden. Unter Berücksichtigung der Permeabilitäten für die entsprechenden Ionen (siehe auch Tabelle 1) und unter der Annahme, daß das elektrische Feld gleichmäßig über die Membran verteilt ist, stellten A. L. HODGKIN, B. KATZ und D. E. GOLDMAN in den vierziger Jahren die *Hodgkin-Katz-Goldman-Gleichung* auf^[5]:

$$\Delta\Psi = \frac{2.3 \cdot R \cdot T}{F} \log \frac{P_K [K^+]_{ex} + P_{Na} [Na^+]_{ex} + P_{Cl} [Cl^-]_{in}}{P_K [K^+]_{in} + P_{Na} [Na^+]_{in} + P_{Cl} [Cl^-]_{ex}} \quad \text{Gl. (5.)}$$

P_X : Permeabilität für das Ion X; $P_X = D_X/d$
 D_X : Diffusionskoeffizient für das Ion X
 d : Durchmesser der Membran
 $[X]$: Konzentration von X
 ex : extrazellulär
 in : intrazellulär

Na^+ -, K^+ - und Cl^- -Ionen sind die für die meisten Zellen hauptsächlich an der Potentialentstehung beteiligten Ionen.

Die meisten Zellmembranen enthalten mehr spannungsunabhängige Kaliumkanäle als andere Ionophore, sie sind daher im Ruhezustand hauptsächlich durchlässig für Kaliumionen. Wenn also die Permeabilitäten der anderen Ionen gegenüber der von Kalium vernachlässigbar sind, vereinfacht sich Gleichung (5) zur Nernst-Gleichung (4). Das erklärt, warum bei vorhandener höherer Konzentration an Kaliumionen im Inneren der Zelle gegenüber dem Außenmedium sich ein negatives Membranpotential ($\Delta\Psi < 0$) ausbildet, daß sehr nahe am Gleichgewichtspotential für Kalium liegt. Desweiteren zeigt die Gleichung (5) auf, daß zur schnellen Veränderung des Membranpotentials nur die Permeabilitäten geändert werden müssen (Öffnen und Schließen von Membrankanälen), ohne daß sich tatsächlich die Konzentrationsverhältnisse signifikant ändern.

3.1.3 Messung des Membranpotentials

Neben der Weiterleitung von Informationen, z. B. entlang von Nervenzellen, ist das Membranpotential direkt oder indirekt beteiligt an Transportsystemen von Ionen, Zuckern, Aminosäuren, Neurotrans-

mitern und Metaboliten^[6]. Dies zeigt, daß das Membranpotential eine wichtige Eigenschaft von Zellen darstellt, die zu untersuchen von großem Interesse für Biologie, Medizin und Pharmazie ist. Es gibt verschiedene Methoden, Membranpotentiale zu messen^[7]:

- a) Einführen von Elektroden in die Zelle. Zum Beispiel haben die Riesennervenzellen des Tintenfisches bis zu 1 mm Innendurchmesser, so daß von der Schnittstelle in axialer Richtung eine Elektrode in das Axoplasma vorgeschoben werden kann. Das Membranpotential wird zwischen dieser und einer zweiten Elektrode in der Außenflüssigkeit gemessen.
- b) Einstechen von feinen Mikroelektroden (0.1 bis 0.5 µm Spitzendurchmesser), gemessen wird das Potential zwischen Innen- und Außenelektrode. Die gemessenen Potentiale können jedoch durch Auftreten von Spitzenpotentialen an der Öffnung der Mikroelektrode oder durch Lecks an der Einstichstelle verfälscht werden.
- c) Messung über Kontaktelektrolyten. Sind die Nerven- oder Muskelfasern zu dünn, um eine Elektrode einzuführen, werden zwei Faserabschnitte voneinander isoliert (Luftspalt oder Saccharoselösung). Die Faser auf der einen Seite wird abgeschnitten und mit einer Flüssigkeit gespült, die kein Kontaktpotential mit der Intrazellulärflüssigkeit ausbildet. Die Potentialdifferenz zwischen beiden Außenlösungen jenseits der Isolierung entspricht dem Membranpotential.
- d) Messung der Verteilung von gekennzeichneten Ionen^[6]. Es wurden z. B. radioaktiv markierte Ionen benutzt ([³H]Triphenylmethylphosphonium⁺, [¹⁴C]Thiocyanat⁻, ⁸⁶Rb⁺ + Valinomycin).
- e) Protonenverteilung. Kann mittels pH-Messung verfolgt werden.
- f) Verteilung von Farbstoffen, für die die Zellmembran durchlässig ist. Kann mittels Fluoreszenzemission oder -absorption beobachtet werden.

Die Verwendung von Farbstoffen zur Messung von Membranpotentialen ist eine sehr elegante Methode. Ihre Vorzüge sind z. B. die leichtere Handhabung gegenüber den elektrophysiologischen

Methoden mit Elektroden und radioaktiven Substanzen, die Automatisierbarkeit der Messung und die Verkürzung der Meßzeit. Deswegen eignen sie sich als Reagenz für das *High Throughput Screening* von vielen Zellen. Außerdem werden die Zellen nicht notwendigerweise geschädigt, sofern man Farbstoffe verwendet, die den Zellmetabolismus nicht stark irreversibel beeinflussen. Dies ermöglicht Messungen an Zellen mit intaktem Stoffwechsel. An die Farbstoffe werden ganz spezifische Bedingungen gestellt:

- Membrangängigkeit
- Spektrale Eigenschaften unbeeinflusst durch die zelluläre Umgebung
- Keine Aggregatbildung
- Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen (Wasserlöslichkeit)
- Hohe Fluoreszenzquantenausbeute
- Potentialsensitivität
- Schnelle und spezifische Reaktion auf Potentialänderung
- Ungiftigkeit für den Zellmetabolismus

Das Ziel Detektion einer Transmembranpotentialänderung mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen, zumindest qualitativ, wird bereits seit längerer Zeit verfolgt:

- 1968 benutzen I. TASAKI et al.^[8] 8-Anilinonaphtalin-1-sulfonsäure als Fluoreszenzfarbstoff, um Aktionspotentiale nach Stimulation mit Elektroden nachzuweisen.
- M. MORAD und G. SALAMA^[9] messen 1978 mit verschiedenen Merocyaninen elektrisch stimulierte Aktionspotentiale in Herzmuskelzellen von Fröschen und Säugetieren.
- C. L. BASHFORD und J. C. SMITH^[10] geben 1979 in einem Übersichtsartikel verschiedene Cyaninfarbstoffe und die entsprechenden Zellen an, mit denen bis dato Transmembranpotentiale nachgewiesen wurden.

- A. GRINVALD et al.^[11] benutzen 1981 Merocyanin- und Oxonol-Farbstoffe, um Aktionspotentiale von kultivierten Neuronen zu detektieren, die mit einer Mikroelektrode angeregt werden.
- M. E. BAYER und M. H. BAYER^[12] nutzen 1981 ein Cyanin und andere Farbstoffe, um an Bakterien Phagenbefall nachzuweisen, da dieser für eine Veränderung des Membranpotentials sorgt.
- B. LABEDAN und L. LETELLIER^[13] weisen im gleichen Jahr, ebenfalls mit einem Cyanin, partielle Depolarisation des Transmembranpotentials durch Phagenbefall nach.
- D. J. LASZLO und B. L. TAYLOR^[14] weisen 1981 Änderungen im Membranpotential in aerotaktischen Bakterien bei Änderung der Sauerstoffkonzentration im Medium mit Fluoreszenzfarbstoffen nach.
- V. DALL'ASTA et al.^[15] bestimmen 1997 Membranpotentiale mittels Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). Dazu färben sie diverse Zellen mit "Bis-Oxonol" (DiSBAC₂(3), *Molecular Probes*) und umspülen sie mit Medium hoher Gramicidin und Na⁺-Konzentration. Gramicidin ist ein Polypeptid aus 15 alternierenden hydrophoben L- und D-Aminosäureresten. Zwei Gramicidinmoleküle bilden ein helicales Dimer, das sich in die Membran einlagert und so einen Kanal von 400 pm Durchmesser bildet. Dieser Ionophor ist durchlässig für Protonen und Alkalimetallionen. Der Zugabe dieses Mediums folgt ein hoher Anstieg der Oxonolfluoreszenz. Bei Erniedrigung der Na⁺-Ionenkonzentration (Na wird durch Cholin ersetzt) nimmt die Fluoreszenzintensität spezifisch ab. Durch Auftragung der logarithmischen Fluoreszenzintensität gegen das berechnete Membranpotential wird eine Eichgerade erhalten.
- A. GHELLI et al.^[16] benutzen 1997 ebenfalls Oxonole, um das Membranpotential, hervorgerufen durch die Atmungskette, in Mitochondrien-Untereinheiten zu messen.

Eine quantitative Erfassung des Transmembranpotentials durch Fluoreszenzfarbstoffe ist das Ziel, das es zu erreichen gilt. Jedoch

sind auch schnelle qualitative Messungen für die Pharmazeutische Industrie interessant. Dies wäre eine Möglichkeit, ohne größeren Aufwand festzustellen, ob Substanzen, die auf Ionenkanäle und Transportsysteme wirken, in die Zellen eingedrungen sind.

3.1.4 Fast-Response- und Slow-Response-Farbstoffe

Prinzipiell unterscheidet man zwei Arten von Farbstoffen, die sich im Mechanismus der Detektion des Transmembranpotentials unterscheiden: slow-response- und fast-response-Farbstoffe.

Für Fast-Response-Farbstoffe ist die Membran undurchlässig, sie sind in der Membran eingelagert und verändern ihre Lage in der Membran nur wenig, daher ist der Mechanismus sehr schnell (Milli- bis Mikrosekunden). Dies ist auch der Grund, warum nur geringe Änderungen in der Fluoreszenzintensität erfolgen.

Für Slow-Response-Farbstoffe ist die Membran permeabel, sie akkumulieren aufgrund ihrer Ladung in der Zelle und sorgen damit für hohe Fluoreszenzintensität. Sie reagieren schon auf geringe Potentialänderungen innerhalb von Minuten. Eine 60 mV-Änderung des Membranpotentials sollte mit bis zu 10-facher Änderung der Konzentrationsverteilung zwischen intra- und extrazellulärem Medium erfolgen (vgl. Nernst Gleichung (4)). Weil die Verteilung auf Diffusion beruht und sowohl unbewegte Flüssigkeitsschichten direkt an der Membraninnen- und -außenseite als auch die Membran mit niedriger Dielektrizitätskonstante überwunden werden müssen, reagieren die Slow-Response-Farbstoffe langsam.

Die Einteilung eines Farbstoffes als Slow- oder Fast-Response-Farbstoff ist nicht allgemein möglich und muß von Fall zu Fall entschieden werden

Ziel ist es nun Farbstoffe zu synthetisieren, die sowohl hohe Sensitivität als auch ein schnelles Ansprechverhalten bei Potentialänderung aufweisen.

3.1.5 Oxonole als Potentialsonden

Oxonole sind Fluoreszenzfarbstoffe, die sich chemisch als Untergruppe der Cyaninfarbstoffe einteilen lassen. Sie bestehen aus einer ungeradzahligen Polymethinkette, an deren beiden Enden je ein Sauerstoffatom sitzt (s. Abbildung 4). Durch die Mesomeriestabilisierung des Anions (vinyloge Carbonsäure) liegen sie unter physiologischen Bedingungen in deprotonierter Form vor.

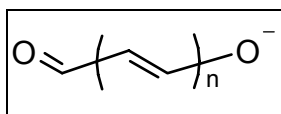


Abbildung 4: Allgemeine Struktur von Oxonolanionen

Sie sind hochsymmetrisch, was ihre geringe Solvatochromie und Stokes-Verschiebung, d. h. den Abstand zwischen Absorptions- und Emissionsmaximum, erklärt.

Geeignete Derivate sind membrangängig, sie eignen sich also zum Anfärben von Zellen. Üblicherweise ist die Polymethinkette zumindest teilweise überbrückt, d.h. Hydroxy- und Carbonylgruppe sind funktionelle Gruppen an Cyclen, eventuell Carbocyclen, meist Heterocyclen.

Ihre hohe Fluoreszenz-Hyperchromie nach Durchtritt durch die Zellmembran erklärt man sich dadurch, daß sich Oxonole an Zellorganellen anlagern. Vermutlich gewinnt dadurch der Chromophor an Rigidität, außerdem sollte die Polarität der direkten Umgebung gegenüber der wäßrigen extrazellulären Phase erniedrigt sein.

Zur Messung versetzt man eine Zellkultur mit der Farbstofflösung und läßt eine gewisse Zeit einwirken. In dieser Zeit verteilt sich der Farbstoff aufgrund seines Konzentrationsgefälles und der über die Zellmembran anliegenden Potentialdifferenz. Nach Veränderung des Membranpotentials, verteilt sich der Farbstoff bis sich erneut ein Gleichgewicht eingestellt hat. Die Änderung des Membranpotentials erfolgt zum Beispiel dadurch, daß man eine Kaliumlösung höherer Konzentration zugibt, wodurch der Quotient der Kaliumionenkonzentration ($[K_{ex}]/[K_{in}]$) größer wird und Depolarisation

der Zelle erfolgt. Es ist auch üblich durch Zugabe eines Transportermoleküls wie Valinomycin die Diffusion von Ionen durch die Membran zu ermöglichen und damit eine Änderung des Membranpotentials herbeizuführen. Eine dritte Möglichkeit ist, durch bestimmte Substrate ionenspezifische Kanäle in der Membran zu öffnen und dadurch die Permeabilität zu verändern.

Bei Depolarisation der Zelle, also Positivierung des Membranpotentials, werden sich mehr negativ geladene Oxonolmoleküle in der Zelle sammeln. Dadurch wird die detektierte Fluoreszenzintensität der Zelle erhöht.

3.2 Messung von Protein-Wechselwirkungen

Es gibt viele Problemstellungen in der Biologie und Pharmazie, bei denen es von Interesse ist, zu wissen, ob bestimmte Moleküle oder Molekülteile sich einander räumlich nähern. Auch hier bieten Fluoreszenzfarbstoffe die bereits genannten Vorteile der Automatisierbarkeit und des Screenens vieler Substanzen in kurzer Zeit.

Solche Fluoreszenzmessungen sind letztlich Abstandsmessungen zweier verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe mit zueinander passenden Absorptions- und Emissionsmaxima. Dabei macht man sich zunutze, daß die Geschwindigkeit des strahlungslosen Energietransfers nach Förster sehr stark abhängig ist vom Abstand der beiden interagierenden Farbstoffmoleküle. Nur wenn sie sich auf eine bestimmte Entfernung einander nähern können, erfolgt eine effektive Energieübertragung und damit die detektierbare Fluoreszenz des Akzeptormoleküls.

Im folgenden soll darauf eingegangen werden.

3.2.1 Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)

Die quantenmechanische Betrachtung des *Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers* erfolgte wegweisend durch TH. FÖRSTER^[17]. Daher wird diese Form der strahlungslosen Energieübertragung auch als *Förster-Resonanz-Energietransfer* oder kurz *Förster-Transfer* bezeichnet.

Der *Förster-Transfer* erfolgt vom angeregten Donorchromophor, der bei kürzeren Wellenlängen absorbiert als der Akzeptorchromophor. Die Lebensdauer des angeregten Zustands beträgt etwa 10^{-8} s, bevor der Chromophor desaktiviert und die Energie wieder abgegeben wird.

Die Abgabe der Energie kann auf verschiedenen Wegen erfolgen.

Der Chromophor geht aus dem vibronischen Grundzustand des elektronisch angeregten Zustands über in höhere Rotations- und Schwingungsmoden des elektronischen Grundzustands. Die hohe vibronische und rotatorische Energie kann durch Stöße mit anderen Molekülen (z. B. auch an das Lösungsmittel) abgegeben werden. Es handelt sich also um einen strahlungslosen Energieverlust. Ist der Chromophor sehr rigide, wird diese Möglichkeit deutlich eingeschränkt zugunsten der anderen Desaktivierungswege. Starre Farbstoffe geben ihre Anregungsenergie also zu einem großen Teil als Fluoreszenzstrahlung ab, indem sie unter Aussendung eines Photons direkt aus dem Elektronenanregungszustand übergehen in diverse schwingungsangeregte Zustände des elektronischen Grundzustands.

Ist jedoch ein geeigneter Chromophor in entsprechender Orientierung und Entfernung vorhanden, kann die Energie auf einem weiteren strahlungslosen Weg über einen Dipol-Dipol-Mechanismus an diesen abgegeben werden.

Wenn der Übergang aus $D^* \rightarrow D$ (D = Donor, $*$ = angeregter Zustand) energetisch ähnlich zu einem möglichen Übergang $A \rightarrow A^*$ (A = Akzeptor) eines benachbarten Moleküls ist, können beide Prozesse simultan verlaufen. Man erkennt, daß eine gewisse Überlappung von Donor-Emissionsspektrum und Akzeptor-Absorptionsspektrum notwendig ist (s. Abbildung 5). Ist dies der Fall, dann gibt es bei den breiten Spektren der mehratomigen Moleküle in Lösung genügend übereinstimmende Übergänge. Dies ist nicht derselbe Vorgang wie bei Reabsorption.

Modellhaft läßt sich dies wie folgt vorstellen. Die Bewegungen des Elektrons in seinem Orbital (Oszillationen) in D^* beeinflussen die Bewegungen eines Elektrons in seinem Orbital in A . Kommt es zu Resonanz, so kann Energietransfer stattfinden, wobei das Elektron in

A in oszillative Bewegung gerät (Anregung) und gleichzeitig das Elektron in D^* seine Bewegung vermindert^[18].

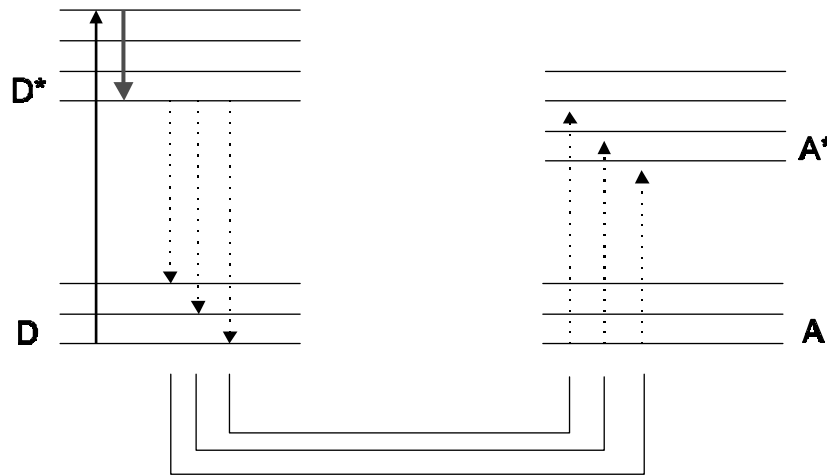


Abbildung 5: Kopplung der Energieübertragung. Nach Anregung erfolgt thermische Relaxation, im Resonanzfall können dann gekoppelte Übergänge stattfinden (markiert).

Quantenmechanisch ausgedrückt mischen zwei Zustände in zwei Molekülen durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Die Coulomb-Wechselwirkung geschieht über das elektromagnetische Feld, d.h. auf Entfernung, vergleichbar mit Sender und Empfänger. Man spricht daher von Resonanztransfer oder Transfer durch induzierte Resonanz, auch von Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET).

Da es sich um die Wechselwirkung von Dipolen handelt, ist die Wechselwirkungsenergie reziprok proportional zur dritten Potenz des Abstandes der beiden Dipole. Die Wahrscheinlichkeit des Energietransfers ist wiederum proportional zum Quadrat dieser Wechselwirkungsenergie, also reziprok proportional zur sechsten Potenz des Abstandes.

Die Wechselwirkung zwischen den Zuständen ist dann groß, wenn der Energieunterschied zwischen ihnen klein ist, also die spektrale Überlappung groß ist.

$$k_{FRET} = \frac{1}{\tau_D} \frac{R_0^6}{R^6} \quad \text{Gl. (6.)}$$

k_{FRET} : Übertragungsrate des Energietransfers

τ_D : Lebensdauer des angeregten Donors in Abwesenheit des Akzeptors

mit:

$$R_0^6 = \frac{8.79 \cdot 10^{-5} \cdot J \cdot q_D \cdot \kappa^2}{n^4} \quad (\text{in } \text{Å}) \quad \text{Gl. (7.)}$$

τ_D : Lebensdauer des angeregten Donors

q_D : Quantenausbeute der Donoremission in Abwesenheit des Akzeptors

κ : Orientierungsfaktor

n : Brechungsindex des Lösungsmittels (typischerweise 1.3–1.4)

J : Normierte spektrale Überlappung von Donoremission (f_D)

und Akzeptorabsorption (ϵ_A)

$$J = \frac{\int \epsilon_A(\lambda) \cdot f_D(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda}{\int f_D(\lambda) d\lambda} \quad \left(\text{in } \frac{\text{l} \cdot \text{nm}^4}{\text{mol} \cdot \text{cm}}\right) \quad \text{Gl. (8.)}$$

ϵ_A : molarer dekadischer Extinktionskoeffizient des Akzeptors

f : Fluoreszenzintensität des Donors

λ : Wellenlänge

So daß sich ergibt:

$$k_{FRET} = \frac{8.79 \cdot 10^{-5} \cdot q_D \cdot \kappa^2}{\tau_D \cdot n^4 \cdot R^6} \cdot \frac{\int \epsilon_A(\lambda) \cdot f_D(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda}{\int f_D(\lambda) d\lambda} \quad \text{Gl. (9.)}$$

Gleichung (6) bzw. Gleichung (9) beschreibt die quantitative Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten des Energietransfers. Hieraus wird auch ersichtlich, daß Eigentransfer (Energietransfer von einem Donormolekül auf ein anderes) erfolgen kann, wenn Absorptions- und Emissionsspektrum des Donors einen großen Überlappungsgrad haben bzw. wenn der Abstand R klein ist.

Für den Orientierungsfaktor κ gilt wiederum:

$$\kappa^2 = (\cos \Phi_{DA} - 3 \cdot \cos \Phi_D \cdot \cos \Phi_A)^2 \quad \text{Gl. (10.)}$$

Φ_{DA} : Winkel zwischen den Übergangsmomentvektoren von D und A

Φ_D , bzw. Φ_A : Winkel zwischen den Vektoren und der Achse \overline{DA}

Für die zufällige Richtungsverteilung der Molekel ist $\kappa^2 = \frac{2}{3}$.

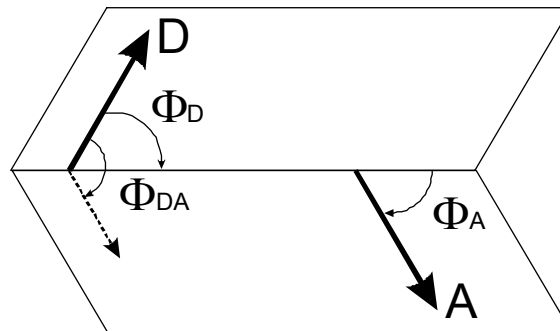


Abbildung 6: Orientierungsfaktor

Aus Gleichung (10) ergibt sich, daß κ^2 die Transferrate in Gleichung (6) mit Werten von 0 (alle Winkel senkrecht) bis 4 (alle Vektoren parallel) beeinflusst. Wenn man eine schnelle Drehung sowohl des Donormoleküls als auch des Akzeptormoleküls innerhalb der Lebensdauer des Angeregten Zustands des Donors annimmt, kann man von einer Zufälligen Anordnung der Dipolmomente ausgehen. Damit ergibt sich näherungsweise $\kappa^2 = 2/3$.

Die Effizienz des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers ergibt sich zu:

$$\Phi_{FRET} = \frac{k_{FRET}}{\sum_i k_i} \quad \text{Gl. (11.)}$$

Φ_{FRET} : FRET-Effizienz

k_{FRET} : Geschwindigkeit des Energietransfers

$\sum k_i$: Summe über alle Desaktivierungsraten

Aus Gleichung (6) bzw. Gleichung (9) und Gleichung (11) wird deutlich, daß die Effizienz des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers Φ_{FRET} einem „Alles oder nichts“-Mechanismus unterliegt. Unterschreitet der Abstand von Donor und Akzeptor R den Förster-Abstand R_0 , ist die Transferrate k_{FRET} maximal und damit der FRET der hauptsächliche Desaktivierungskanal des angeregten Donors ($\Phi_{FRET} \approx 1$). Bei größeren Abständen als R_0 geht die FRET-Transferrate sehr schnell gegen Null und wird damit vernachlässigbar gegenüber den anderen Desaktivierungsmöglichkeiten ($\Phi_{FRET} \approx 0$).

3.2.2 Fluoreszenz Resonanz Energietransfer im High Throughput Screening

Die starke Abstandsabhängigkeit des Försterenergietransfers wird bereits in vielen Anwendungen ausgenutzt. Der Energietransfer erfolgt in Abständen von 10–75 Å (abhängig von den gewählten Farbstoffen). Die Messungen sind Fluoreszenzmessungen entsprechend empfindlich und können auch unter physiologischen Bedingungen durchgeführt werden. Daher findet FRET breiten Nutzen sowohl in Polymerwissenschaften, als auch in der Biologie und Pharmazie. Einen Überblick über Grundlagen, Anwendungen und Grenzen von FRET bis dahin liefert PAUL R. SELVIN^[19] 1995 in seinem Review.

- Schon 1967 untersuchten L. STRYER und R. P. HAUGLAND^[20] die Effizienz des Energietransfers in Abhängigkeit des Abstandes von Donor (α -Naphthylrest) und Akzeptor (Dansylrest), getrennt durch eine Oligoprolinkette (1–12 Oligomere). Sie fanden Försters R^{-6} -abhängigkeit bestätigt und schlugen vor, den Energietransfer zur Entfernungsmessung zu nutzen („spectroscopic ruler“).
- R.Y. TSIEN et al.^[21] beschreiben 1993 die Beobachtung der Dissoziation der cAMP-abhängigen Proteinkinaseuntereinheiten durch FRET. Bei Bindung von cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) an die Proteinkinase dissoziieren deren katalytische und regulatorische Untereinheit. Tsien et al. versahen diese mit Fluorescein (Donor an katalytischer Untereinheit) und Tetramethylrhodamin (Akzeptor an regulatorischer Untereinheit). Bei Anwesenheit von cAMP konnte die Dissoziation der Proteinkinase durch Verringerung des Energietransfers beobachtet werden.
- P. I. H. BASTIAENS und A. SQUIRE^[22] beschreiben in ihrem Übersichtsartikel 1999 die Nutzung von FRET zur *in-situ*-Beobachtung von ligandeninduzierter Phosphorylierung der Tyrosinreste von EGF-Rezeptoren (ErbB1-Rezeptor, EGF: epidermal growth factor). Der ErbB1-Rezeptor ist mit GFP (*green fluorescent protein*, Donor) markiert, ein

phosphotyrosinspezifischer Antikörper PY-72 ist Cy-3 markiert (Akzeptor), FRET zeigt die erfolgte Phosphorylierung an.

- Im gleichen Jahr geben B. A. POLLOK und R. HEIM in ihrem Übersichtsartikel^[23] Beispiele an, wie zwei GFP-Mutanten mit unterschiedlichen Absorptions- und Emissionsmaxima in Fluoreszenzsonden genutzt werden, um die Erhöhung der Calciumkonzentration durch FRET anzuzeigen.
- C. MATSUMOTO et al.^[24] schlagen im Jahr 2000 vor, FRET zwischen Fluorescein und Tetramethylrhodamin für high throughput screenings auf der Suche nach einem HIV-Virostaticum zu benutzen. Die Bindung von transactivator protein (tat) an die *tat responsive region* von m-RNA (TAR RNA) spielt eine wichtige Rolle bei der Replikation des HIV-1-Virus. Diese Bindung und deren kompetitive Hemmung durch andere Substrate können durch Löschen der Rhodamin-Fluoreszenz (FRET) bzw. durch ihre quantitative Bestimmung beobachtet werden.

Werden in FRET-Systemen als Donor und/oder Akzeptor biolumineszierende Moleküle wie *green fluorescent protein* (GFP) verwendet, so spricht man auch von *Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer* (BRET).

4 Struktursuche und Synthesen

4.1 Anforderungen an den BRET-Akzeptor in Proteinaffinitätssonden

Im Rahmen dieser Dissertation sollte in Zusammenarbeit mit dem Pharmaforschungszentrum Wuppertal der Bayer AG ein System entwickelt werden, durch das im *High Throughput Screening* Verfahren (HTS) die Wechselwirkung eines Proteins mit anderen zu testenden Proteinen detektiert werden kann.

Durch *Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer* (FRET) Informationen über die räumliche Nähe zweier biologisch relevanter Moleküle oder Molekülteile zu erhalten ist ein bereits bekanntes Verfahren (s. Übersicht, Kapitel 3.2.2, Seite 20).

Eines der beiden Moleküle wird kovalent mit dem Donorchromophor des FRET-Systems verbunden, das andere mit dem Akzeptorchromophor. Haben die beiden Moleküle (z.B. Proteine wie Antigen/Antikörper, Substrat/Enzym etc.) eine gewisse Affinität zueinander, so kann durch die räumliche Nähe Energietransfer erfolgen. Bei Bestrahlung des Donors mit geeigneter Wellenlänge wird dessen Emission vermindert detektiert, man nimmt außerdem die Emissionsstrahlung des Akzeptors wahr.

In neuerer Zeit wird als Chromophor gerne Grünfluoreszierendes Protein (GFP) verwendet. Am besten bekannt ist das GFP aus der Qualle *Aequorea victoria* und aus der gemeinen Seefeder *Renilla reniformis*, eine Weichkoralle. Das GFP ist Teil des Biolumineszenz-Systems dieser Meeresbewohner und bezieht seine Emissionsenergie aus einer Chemilumineszenzreaktion eines zweiten Chromophors (*Aequorin* bzw. *Renilla Luciferase*), die strahlungslos übertragen wird.

Aequorin ist ein Komplex bestehend aus einem Apoprotein (Luciferase), molekularem Sauerstoff und Coelenterazin (von Coelenterate = Hohltiere, ein Imidazopyrazinon), dem Luciferin von *Aequorea victoria*, *Renilla reniformis* und vielen anderen

Meeresbewohnern. Durch Ca^{2+} -Ionen wird die Oxidation von Coelenterazin zu Coelenteramid katalysiert. Letzteres befindet sich dann im angeregten Zustand, aus dem es *in vitro* durch Emission von Licht der Wellenlänge 470 nm relaxiert. *In vivo* findet statt dieser Emission ein Resonanz-Energie-Transfer auf GFP statt.

Es wird vermutet, daß die ursprüngliche Funktion von Coelenterazin dazu diente, Sauerstoff und seine schädlichen Derivate (z.B. das Superoxidradikalanion) abzufangen. Der Wechsel von der antioxidativen zur lichtemittierenden Funktion könnte nach REES et al.^[25] dann erfolgt sein, als der Selektionsdruck aufgrund geringerer Strahlungsintensität und geringerem Sauerstoffpartialdruck nachließ, z.B. für Organismen in größerer Meerestiefe (mesopelagische Zone, 200–1000 m unter dem Wasserspiegel).

Aequorin ist nach J. F. HEAD et al.^[26] ein globuläres Protein, das aus vier E-F-Hand-Domänen besteht. Eine E-F-Hand ist das Strukturmotiv der Calmodulin-Familie Calcium-bindender Proteine. Sie besteht aus einer Helix (E), verbunden mit einer zweiten Helix (F) über eine Polypeptidkette, welche Calciumionen binden kann. Diese drei Sekundärstrukturen sind in etwa angeordnet wie abgespreizter Daumen, gebeugter Mittelfinger und gestreckter Zeigefinger der rechten Hand. Die vier E-F-Hand-Domänen bilden einen nach innen hydrophoben Hohlraum, in den einige hydrophile Aminosäurereste, wichtig sind in diesem Zusammenhang Histidin, Tyrosin und Tryptophan, hineinragen. Diese Aminosäurereste dienen einerseits der Bindung und Stabilisierung von Coelenterazin bzw. dessen Peroxidform und des Produktes Coelenteramid. Andererseits spielen sie eine wichtige Rolle beim Mechanismus der Oxidation von Coelenterazin und der folgenden Umwandlung in Coelenteramid.

Im Aequorin bildet sich zunächst das Hydroperoxid des Luciferins, der in Abbildung 7 angegebene Mechanismus wird von F. G. PRENDERGAST^[27] vorgeschlagen. Dieses Produkt ist außerhalb des Proteins sehr instabil.

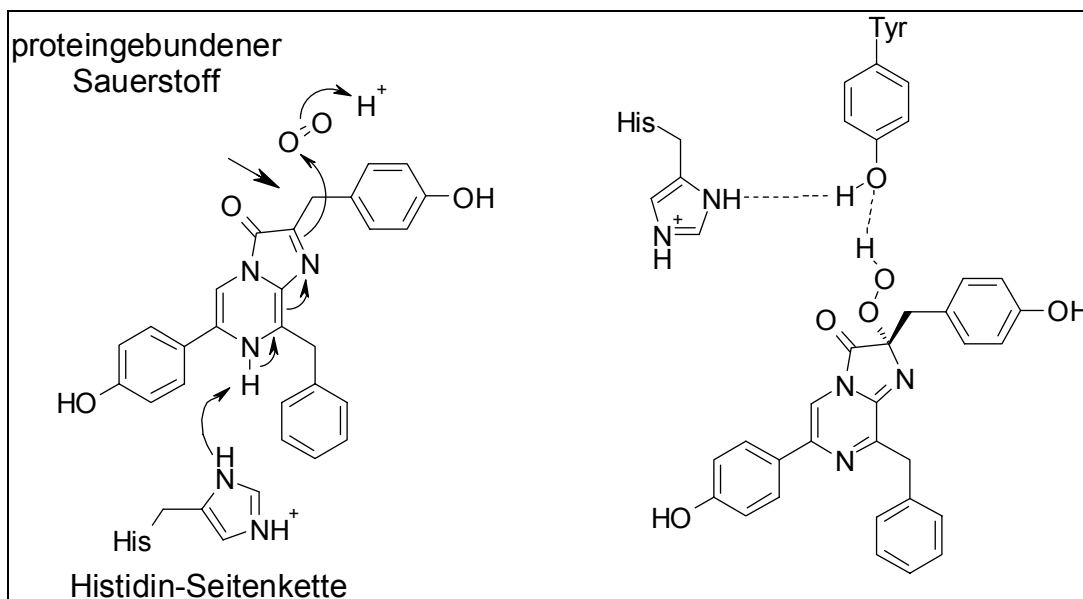


Abbildung 7: Bildung von Coelenterazinhydroperoxid und seine Stabilisierung in Aequorin

J. F. HEAD und Mitarbeiter bestimmen im Jahre 2000 die Kristallstruktur von Aequorin aus *Aequorea aequorea*. Sie vermuten, daß ähnlich wie bei Calmodulin bei Calciumbindung eine Strukturänderung erfolgt. Diese führt ihrer Meinung nach dazu, daß das Coelenterazinhydroperoxid nicht mehr ausreichend stabilisiert wird und spontan zum Coelenteramid reagiert.

L. DENG et al.^[28] untersuchen 2004 die Kristallstruktur von Obelin, ein Photoprotein aus *Obelia longissima*, vor und nach Calciumzugabe. Obelin ist dem Aequorin sehr ähnlich, ebenso wie bei diesem wird das Coelenterazin und sein Hydroperoxid durch die Seitenketten von Tyrosin und Histidin des Proteins stabilisiert. Sie stellen fest, daß die Strukturänderung des Obelins bei Calciumzugabe nicht sehr groß ist. Bemerkenswert sind jedoch die Änderungen der Aminosäurereste, die mit dem Coelenterazin wechselwirken. Der Imidazolring von Histidin bewegt sich, fast senkrecht zur ursprünglichen Position, in Richtung der Hydroxylgruppe des Tryptophans. Aufgrund dieser Beobachtungen vermuten L. DENG und Mitarbeiter den abgebildeten Mechanismus.

Durch die Strukturänderung bei Calciumbindung erfolgt Protonenübertragung vom Tyrosin- auf den Histidinrest, was wiederum zur Deprotonierung der Hydroperoxidgruppe führt (Abbildung 8). Da

die phenolische OH-Gruppe des Tyrosins und die Hydroperoxidgruppe ähnliche pK_s -Werte besitzen erscheint dies möglich.

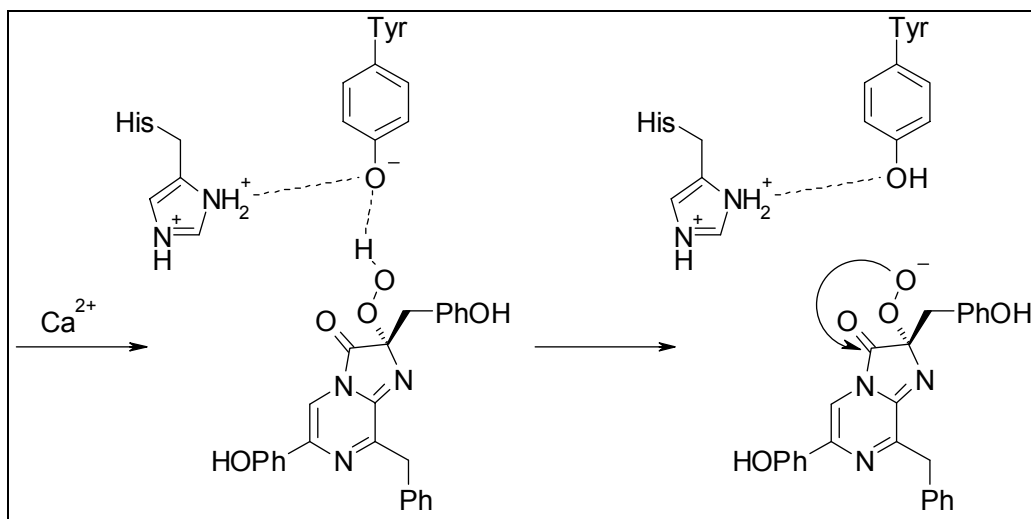


Abbildung 8: Protonenübertragung bei Calciumzugabe in Obelin

Durch die Strukturänderung und Protonenübertragung wird das Peroxid(anion) nicht mehr stabilisiert. Es erfolgt die Bildung des Oxetanon-Intermediates, welches nach Decarboxylierung das angeregte Coelenteramid anion zurückläßt (Abbildung 9).

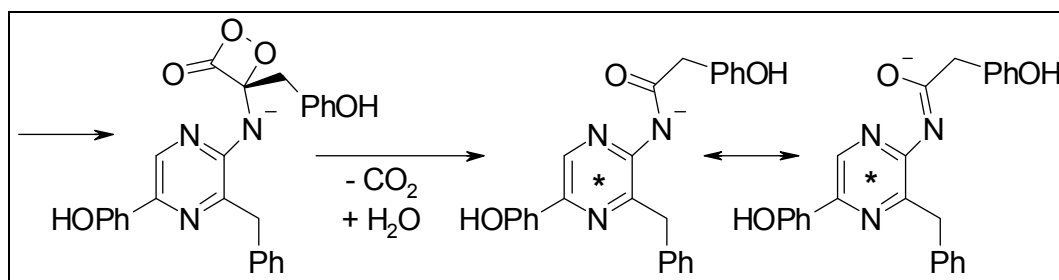


Abbildung 9: Bildung des Coelenteramid anions unter Decarboxylierung

Nach Protonen-Rückübertragung unter Mitwirkung eines Wassermoleküls liegt das angeregte Coelenteramid vor, welches unter Lichtemission bzw. Energieübertragung in den Grundzustand zurückkehrt (Abbildung 10).

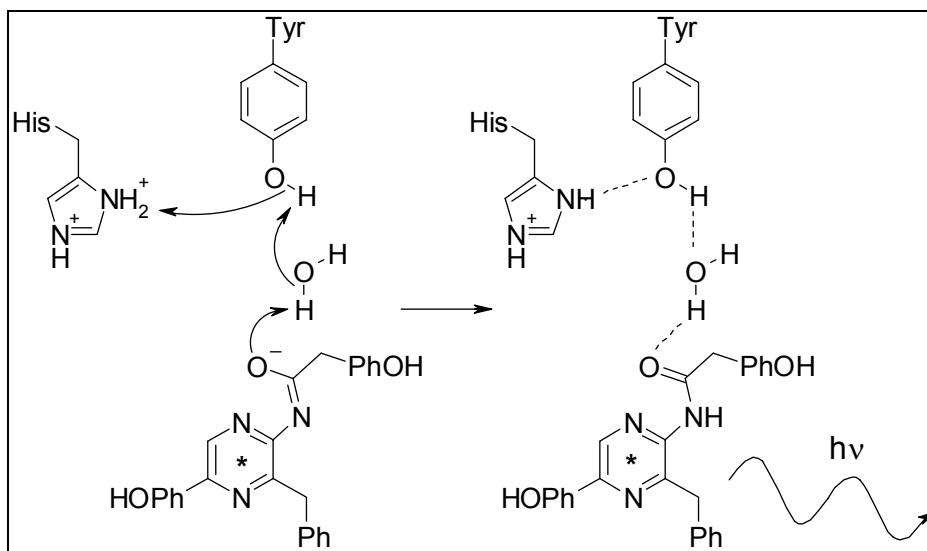


Abbildung 10: Protonenrückübertragung und Lichtemission aus dem angeregten Coelenteramid

Da sich Aequorin und Obelin strukturell sehr ähnlich sind, erscheint ein ähnlicher Mechanismus für Aequorin plausibel.

Auch bei Renilla-Luciferase ist die Biolumineszenz Calciumionen-abhängig. Jedoch erfolgt dies dadurch, daß ein Luciferin-bindendes Protein (*luciferin binding protein BP-LH₂*) existiert^[29]. Dieses erfährt durch Calciumaufnahme eine Strukturänderung und macht dadurch das Luciferin für die Renilla-Luciferase erst zugänglich. BP-LH₂, Luciferase und GFP liegen im lebenden Organismus im molaren Verhältnis 10:3:1 in membrangebundenen Vesikeln (*Lumisomen*) vor. Diese können bei Depolarisation Calciumionen aufnehmen, was zu Lumineszenz führt. Dieses Modell erklärt die Kopplung der *Renilla*-Biolumineszenz mit Nervenimpulsen.

Die Struktur des GFP-Chromophors ist bei *Aequorea* und *Renilla* am weitesten aufgeklärt. Nach A. B. CUBITT et al.^[30] besteht *Aequorea*-GFP aus 238 Aminosäureresten. Das Absorptionsmaximum liegt bei 395 nm ($\epsilon = 21000\text{--}30000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), die Emission erfolgt bei 508 nm (Quantenausbeute 0.72–0.85). *Aequorea*-GFP zeigt keine sehr großen Homologien zu anderen bekannten Proteinen, enthält aber wie *Renilla*-GFP die Aminosäuresequenz Ser-Tyr-Gly. Aus dieser Sequenz bildet sich im Organismus der Chromophor, ein *p*-Hydroxybenzylidenimidazolinon. CUBITT et al. schlagen einen

Mechanismus vor, bei dem zunächst eine Cyclisierung erfolgt, dann eine Oxidation (s. Abbildung 11).

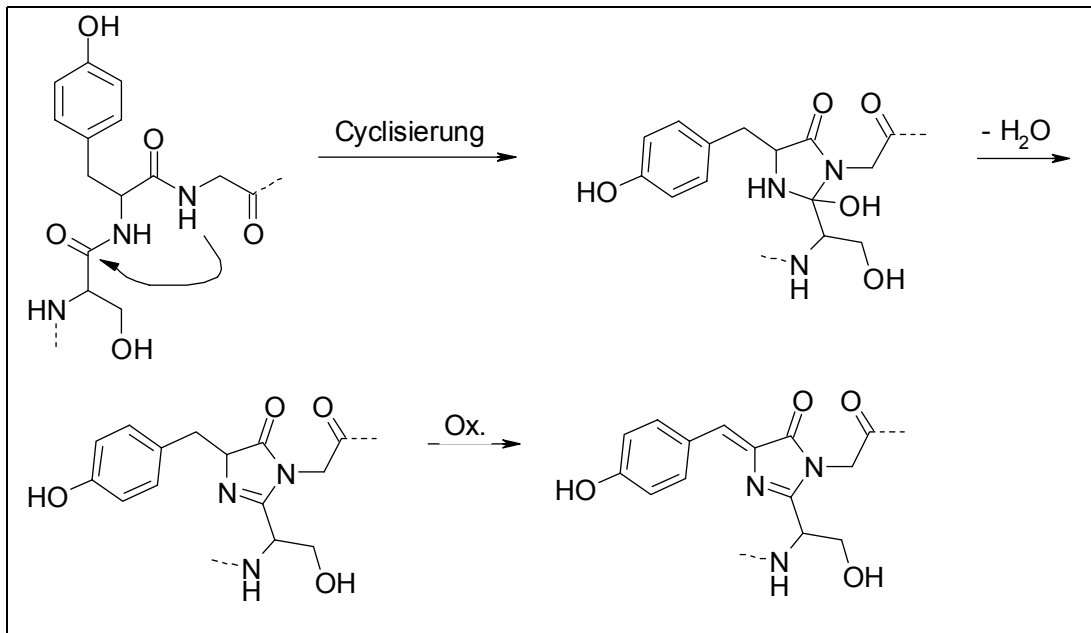


Abbildung 11: Mechanismus der Bildung des GFP-Chromophors von *Aequoria victoria* und *Renilla reniformis*.

GFP kann wie andere Proteine exprimiert werden. R. HEIM und R. Y. TSIEN^[31] konnten durch gezielte Mutation das Absorptions- und Emissionsmaximum des Wildtyp-GFP verändern. Dies erreichten sie durch Austausch von entweder einer der drei am Chromophor beteiligten Aminosäuren oder von Aminosäuren, die zwar in der Aminosäuresequenz weit entfernt von den chromophorbildenden Aminosäuren sind, im gefalteten Protein aber vermutlich nahe beim Chromophor angeordnet sind. Die hypsochrom absorbierenden Mutanten (Absorption 381 nm, Emission 445 nm, Quantenausbeute = 0.21) leuchten zwar nur schwach, die bathochrom absorbierenden Mutanten (Absorption 504 nm, Emission 514 nm, Quantenausbeute = 0.54) zeigen jedoch deutliche Leuchtkraft.

So ist es möglich, Zellorganellen verschiedenfarbig fluoreszierend markiert in vivo nebeneinander zu detektieren. Eine andere Möglichkeit ist, zwei geeignete GFP-Mutanten als FRET-System durch eine Polypeptidkette miteinander zu verbinden. Die Aktivität von Proteasen, die die Peptidkette zerschneiden, kann durch den

verringerten Energietransfer qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden.

Der große Vorteil in der Verwendung von GFP-Mutanten ist, daß hier organische Synthese durch molekularbiologische Verfahren ersetzt werden kann und dadurch die Möglichkeit besteht, Sonden durch die Zellen selbst herstellen zu lassen. Man beobachtet also *in situ* und *in vivo*.

Dennoch sind viele Vorteile der organischen Synthese nicht von der Hand zu weisen. Man kann den Chromophor sehr viel besser an die gestellten Aufgaben anpassen. Die durch organische Synthese zugänglichen Chromophoren überstreichen einen viel größeren Spektralbereich, als dies durch Proteine möglich ist. Durch Mutation ein Absorptionsmaximum gezielt zu erreichen ist kaum möglich. Eine Kombination aus beiden Verfahren ist vermutlich der Königsweg.

In den genannten Beispielen müssen die GFP-Chromophoren wie ein organischer Farbstoff durch eine Lichtquelle angeregt werden. Anstelle einer Lichtquelle und gleichzeitig als Donor des BRET-Systems des von der Bayer AG vorgeschlagenen HTS-Verfahrens dient ein Biolumineszenzsystem. Dieses kann durch mikrobiologische Verfahren unter geringem Aufwand mit jedem gewünschten Protein zusammen exprimiert werden. Der Vorteil eines biolumineszierenden Proteins liegt darin, daß kein Licht von außen zugeführt werden muß, das möglicherweise die Detektion der Fluoreszenz beeinträchtigt oder Isomerisierung oder andere Lichtschäden an den Molekülen des FRET-Systems oder der Zellen verursacht. Das Protein, das im HTS-Verfahren auf mögliche Wechselwirkung mit anderen Proteinen getestet werden soll, wird mit dem Biolumineszenz-System versehen. Da das Protein ohnehin exprimiert werden muß, führt die Ausstattung mit einem biolumineszierenden Proteinteil zu keiner wesentlichen Aufwandserhöhung. Im geeigneten Nährmedium emittiert dieses mit der ihm eigenen Wellenlänge. Alle zu untersuchenden Proteine werden mit einem synthetischen Chromophor versehen, dessen Absorptionsmaximum auf die Biolumineszenz abgestimmt ist (Akzeptor-Chromophor), so daß FRET erfolgen kann. Diese

Anordnung wird als Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET) bezeichnet (siehe Abbildung 12).

Ein Biolumineszenz-System liefert allerdings deutlich weniger Licht als z.B. ein Laser als Lichtquelle, weshalb BRET-Systeme eine längere Zeitspanne oder höhere Anzahl von Molekülen erfordern als ein FRET-System.

BRET-Systeme bieten sich also dann an, wenn die zu beobachtende Reaktion sehr langsam verläuft, mit höheren Konzentrationen gearbeitet werden kann oder wenn mit lichtempfindlichen Zellen gearbeitet werden muß^[32]. Dadurch, daß die Hintergrundstrahlung kaum vorhanden ist, können auch geringe Änderungen in der Fluoreszenz wahrgenommen werden.

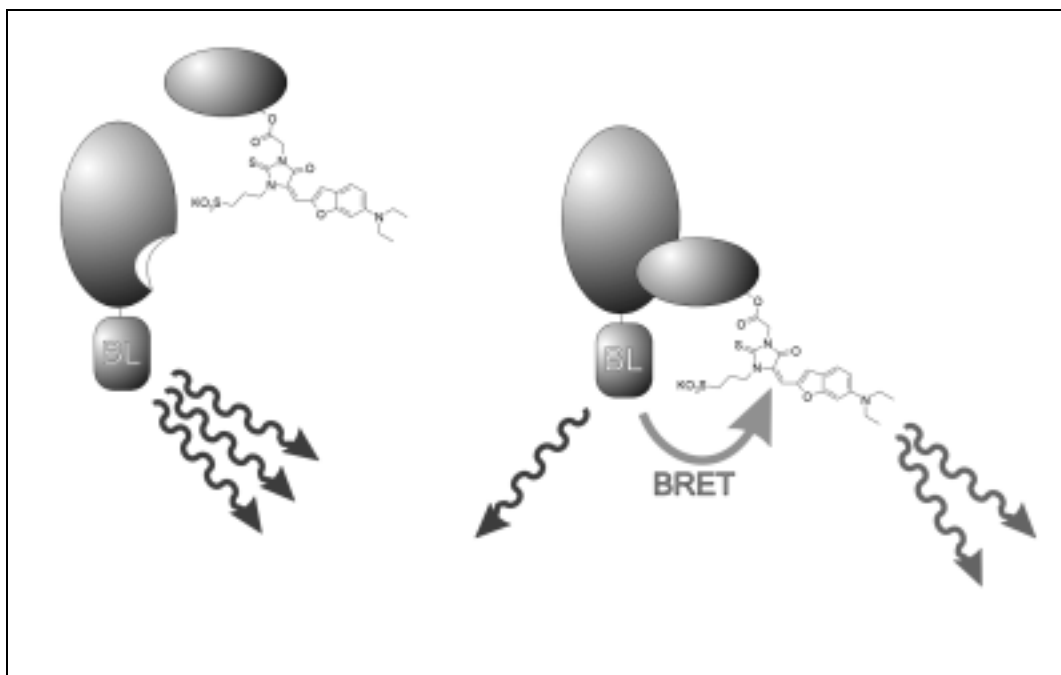


Abbildung 12: Detektion von Protein-Protein-Wechselwirkungen durch Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer (BRET). BL = Biolumineszenz-System

Das Biolumineszenz-System war von der Bayer AG vorgegeben, das Maximum der Biolumineszenz-Emission liegt bei 463 nm (siehe Abbildung 13). Ein geeigneter BRET-Akzeptor sollte also zwischen 450 und 550 nm sein Absorptionsmaximum aufweisen, um ein ausreichend großes spektrales Überlappungsintegral (siehe Gleichung 8) zu erzeugen.

Damit die Biolumineszenzemission nicht die Detektion der Akzeptorfluoreszenz erschwert, sollte das Emissionsmaximum des Akzeptors möglichst weit entfernt vom Biolumineszenzmaximum liegen. Dies erreicht man durch einen möglichst großen Stokes-Shift des Akzeptors und dadurch, daß sein Absorptionsmaximum bereits in der bathochromen Flanke der Biolumineszenz-Kurve liegt (ca. 500 bis 550 nm). Dies hat zwar ein schlechteres Überlappungsintegral J von Donor-Emission und Akzeptor-Absorption zur Folge, der FRET kann aber bei geringeren Abständen R_0 trotzdem sehr effizient sein, wie in Gleichung (9) bis (11) deutlich wird.

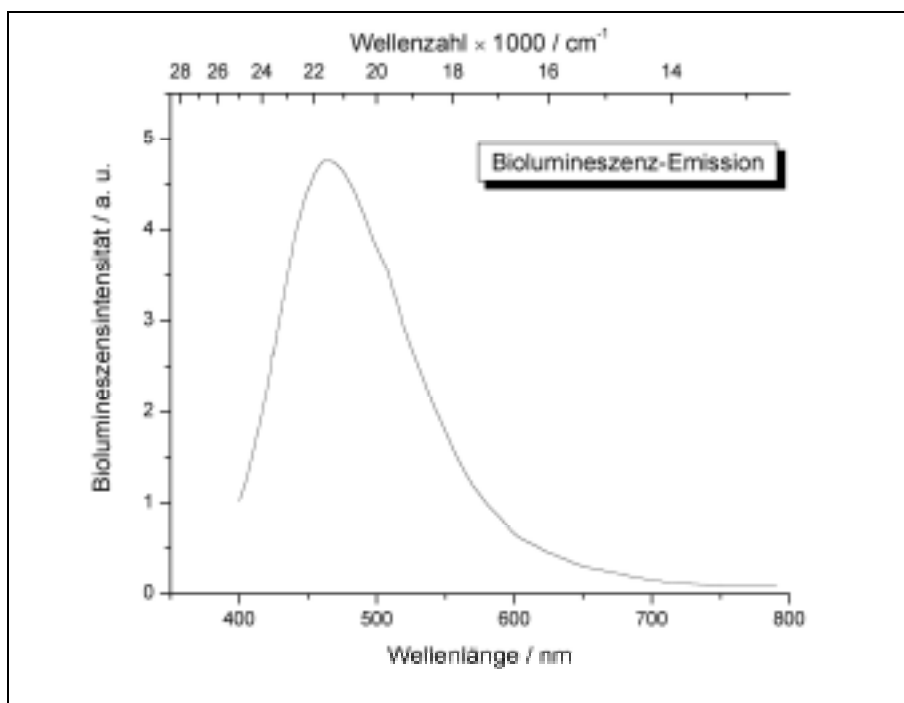


Abbildung 13: Biolumineszenz-Emission des BRET-Systems

Desweiteren muß der gesuchte Chromophor eine möglichst hohe Fluoreszenzquantenausbeute aufweisen, damit die durch FRET übertragene Energie möglichst quantitativ als Fluoreszenz-Emission abgestrahlt wird.

Um an ein Protein gebunden werden zu können, muß der Farbstoff mit einer reaktiven Gruppe ausgestattet sein.

Außerdem sollte er eine gewisse Wasserlöslichkeit aufweisen. Da die Beladung des zu testenden Proteins mit dem Farbstoff beträchtlich

sein kann, würde es andernfalls aus der wäßrigen Meßlösung gefällt. Dabei darf der Chromophor keine positive Ladung tragen, da sonst die Gefahr besteht, daß der Farbstoff an Zellorganellen akkumuliert (z. B. an Mitochondrien), wodurch es zur Verfälschung der Messung kommen kann.

Der gesuchte Chromophor hat also folgende Eigenschaften:

- Absorptionsmaximum zwischen 500 und 550nm
- möglichst hoher Extinktionskoeffizient
- großer Stokes-Shift
- hohe Fluoreszenz-Quantenausbeute
- Wasserlöslichkeit
- reaktive funktionelle Gruppe zur kovalenten Bindung an Proteine
- Lagerfähigkeit
- Elektrische Neutralität oder negative Ladung tragend

Bei der Suche nach geeigneten bekannten Chromophoren wurde außerdem darauf Wert gelegt, daß die Synthese möglichst kurz und einfach durchzuführen ist. Außerdem ist eine konvergente Synthese von Vorteil.

Der Zielchromophor dieser Arbeit, ein Merocyanin, setzt sich letztlich aus zwei Synthesebausteinen zusammen (siehe Abbildung 14). Ein Baustein ist 6-Aminobenzofuran-2-carbaldehyd, das die Donorgruppe des Merocyanins trägt und selbst ebenfalls ein Merocyanin ist. Der zweite Baustein ist ein Heterocyclus mit C-H-acider Methylengruppe, der die Akzeptorgruppe des Merocyanins trägt und die spektralen Eigenschaften der Zielsubstanz bestimmt. Um bei späteren Erwähnungen die Verwechslung mit dem FRET-Donor- und FRET-Akzeptor-Chromophor zu vermeiden wird der Merocyanin-Donor von nun an als Benzofuran bezeichnet, der Merocyanin-Akzeptor als auxochromer Cyclus oder Auxochrom, wenngleich diese Bezeichnung veraltet ist. Die Zusammensetzung des Chromophors besteht aus zwei Teilbausteinen, so daß der Chromophor relativ einfach auch an

andere Systeme angepaßt werden kann, indem ein anderer auxochromer Heterocyclus in der Synthese eingesetzt wird.

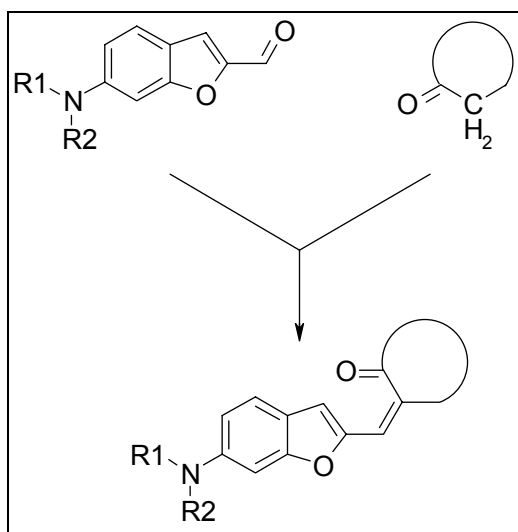


Abbildung 14: Allgemeine Synthese des Zielmoleküls

4.2 Synthese des BRET-Akzeptors

Es muß ein C-H-acider auxochromer (Hetero)cyclus gefunden werden, der im Zielmolekül die gestellten spektroskopischen Anforderungen erfüllt. Dazu soll zunächst in einer möglichst einfachen Synthese der Benzofuran-Teilchromophor dargestellt werden. Dieser kann dann mit verschiedenen Heterocyclen zu Modellsubstanzen umgesetzt werden, um das Zielmolekül zu finden.

4.2.1 Synthese von 6-Diethylaminobenzofuran-2-carbaldehyd als einfachster Teilchromophor

Das Benzofuranmolekül läßt sich im Falle des Diethylderivates (R1, R2 = Ethyl in Abbildung 14) in einer zweistufigen Synthese darstellen. Ausgehend von *N,N*-Diethylaminophenol **1** setzt man zunächst in einer Williamson-Ethersynthese mit einem als Acetal geschützten 2-Bromacetaldehyd **3** um. Die Reaktionszeit (48 h) ist relativ lang, die Ausbeute (37 %) ist nicht sehr hoch, aber die Edukte sind günstig zu beziehen.

Im zweiten Schritt wird der Ether **4** einer Vilsmeier-Formylierung unterzogen, in deren Aufarbeitung gleichzeitig der Ringschluß zum Benzofuran **5** erfolgt.

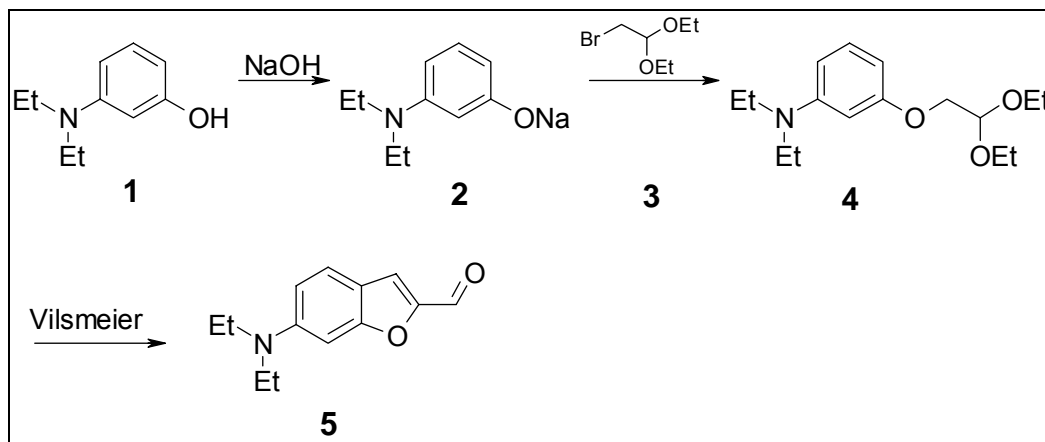
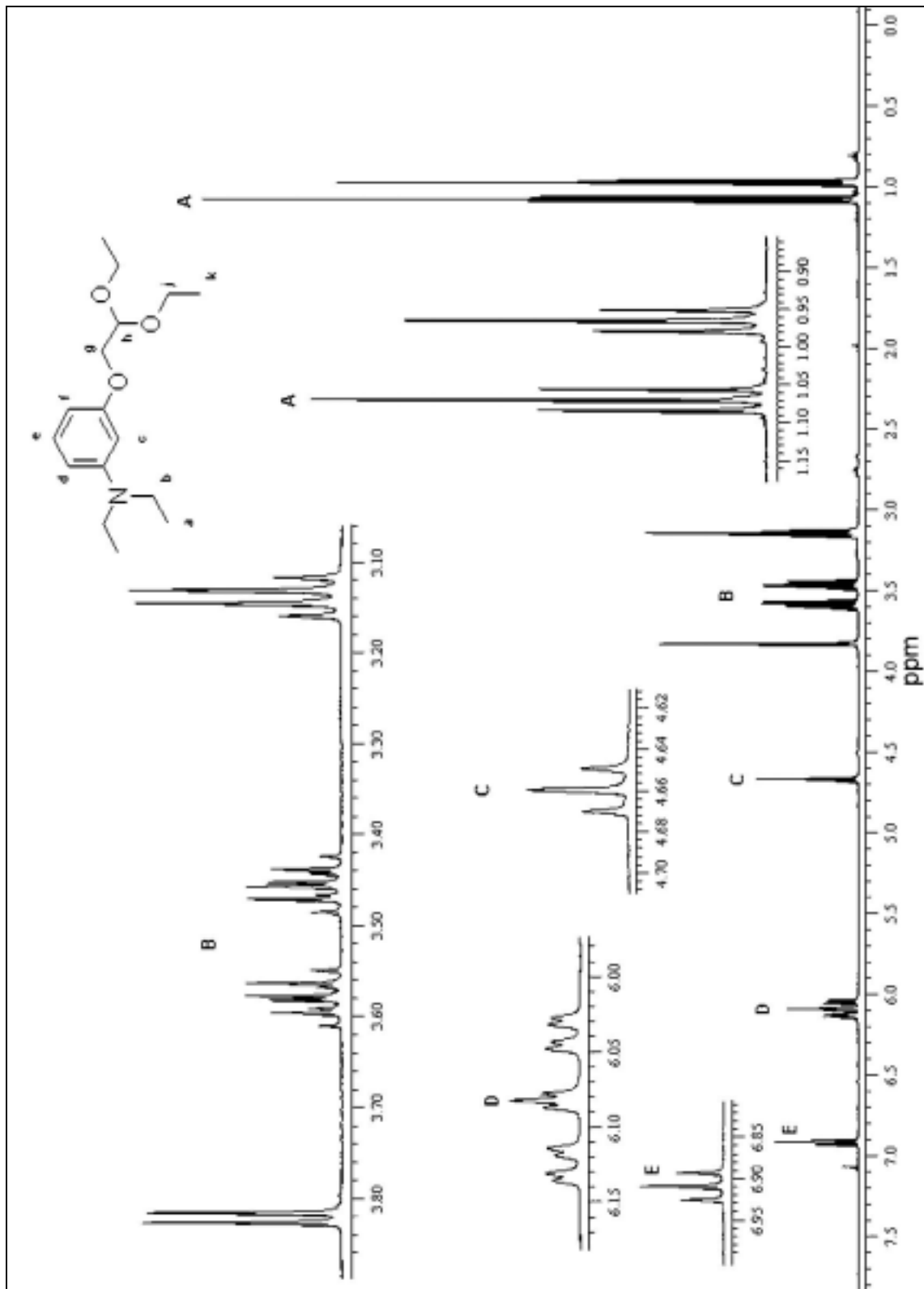
V2

Abbildung 15: Darstellung von 6-Diethylaminobenzofuran-2-carbaldehyd **5**

Der entstandene Ether **4** ist unter NMR-spektroskopischen Gesichtspunkten interessant. Das Molekül trägt eine Spiegelebene in der Ringebene, die beiden Ethoxygruppen sind also enantiotop zueinander.

Auffällig ist jedoch die Multiplizität des Signals der Methylenprotonen **j** der Ethoxygruppen, für die man ein Quartett erwarten würde (Multipllett **B** in Abbildung 16). Die beiden Methylengruppen sind zwar enantiotop zueinander, die Protonen einer Methylengruppe sind allerdings diastereotop zueinander und besitzen ein enantiotopes und ein diastereotopes Gegenstück in der anderen Methylengruppe, wodurch sich für jedes dieser Protonen **j** eine Aufspaltung zu einem Dublett vom Quartett ergibt, allerdings mit doppelter Intensität, da sich die enantiotopen Protonen im gewählten, nicht chiralen Lösungsmittel nicht unterscheiden. Die Aufspaltung der Protonen **j** wird anhand der Ausschnittsvergrößerung (siehe Abbildung 17) deutlicher.

Abbildung 16: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) von 4

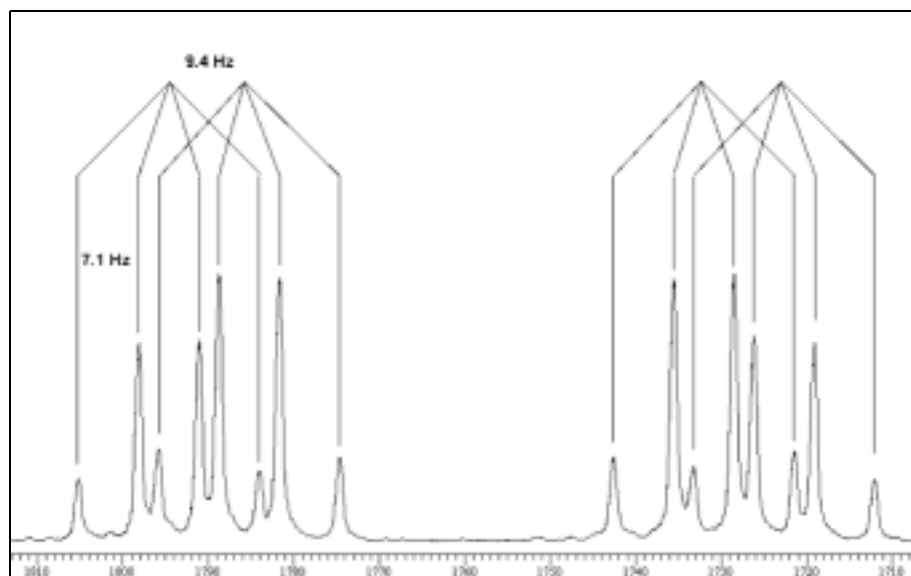


Abbildung 17: Ausschnittsvergrößerung von **B** aus Abbildung 16: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) von **4**

Tabelle 2: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) von **4**

Verschiebung δ / ppm	Multiplizität	Kopplungskonstante J / Hz	Intensität	Zuordnung
0.96	t	$^3J_{a,b} = 7.1$	6 H	a
1.07	t	$^3J_{k,j} = 7.1$	6 H	k
3.14	q	$^3J_{b,a} = 7.1$	4 H	b
3.46	dq	$^3J_{j,k} = 7.1$ $^2J_{j_1,j_2} = 9.3$	2 H	j_1 oder j_2
3.58	dq	$^3J_{j,k} = 7.1$ $^2J_{j_1,j_2} = 9.3$	2 H	j_1 oder j_2
3.82	d	$^3J_{g,h} = 5.2$	2 H	g
4.66	t	$^3J_{h,g} = 5.2$	1 H	h
6.04	ddd	$^3J_{d,e} = 8.0$ $^4J_{d,c} = ^4J_{d,f} = 2.2$	1 H	d
6.08	dd	$^4J_{c,d} = ^4J_{c,f} = 2.4$	1 H	c
6.12	ddd	$^3J_{f,e} = 8.3$ $^4J_{f,d} = ^4J_{f,c} = 2.4$	1 H	f
6.91	dd	$^3J_{e,d} = ^3J_{e,f} = 8.2$	1 H	e

Bei den aromatischen Protonen ergibt sich die Zuordnung anhand der Aufspaltung. Bei dem am weitesten tieffeldverschobenen Proton muß es sich um **e** handeln, da nur für dieses ein Dublett vom Dublett der Kopplungskonstante von 8.2 Hz (Kopplung mit orthoständigen Protonen im Aromaten) möglich ist.

Bei der Formylierung von **4** in **V2** ist auch bei sehr schonender Reaktionsführung die Bildung von polymerem Nebenprodukt nicht zu verhindern. Die Reaktion benötigt eine gewisse Wärmezufuhr, ohne die das Produkt nicht isoliert werden kann, die aber auch die Bildung des Nebenproduktes begünstigt. Es zeigte sich aber, daß letzteres nahezu vollständig zu entfernen ist, indem das Rohprodukt an Kieselgel 60 adsorbiert und dann über eine sehr kurze Chromatographiesäule mit Diethylether eluiert wird (Filtration an Kieselgel). Daran kann sich die gründliche Aufreinigung des Produktes anschließen.

Natürlich schlägt sich die Entstehung von Nebenprodukt in der Ausbeute nieder (24 %). Dabei gilt jedoch zu bedenken, daß die Formylierung nicht zu 100 % in para-Stellung zur Diethylaminogruppe stattfinden wird. Zu einem gewissen Teil wird die Carbonylgruppe sicherlich auch in para-Stellung zur phenolischen Ethergruppe eingeführt **4a**, was jedoch dann nicht zum Ringschluß führen kann.

Desweiteren ist **V2** nicht lediglich eine Formylierungsreaktion. Bei der Hydrolyse entstehen durch das Vilsmeier-Reagenz (Phosphorylchlorid) sowohl Phosphor- als auch Salzsäure. Durch das saure Milieu wird die latente zweite Carbonylgruppe des eingesetzten Acetaldehyds **3** aus ihrem Acetal befreit **4c**, **4d**. Dadurch ist bei Abstumpfen mit Natriumhydrogencarbonat überhaupt der Ringschluß über Aldolkondensation mit der neueingeführten Aldehydgruppe am Aromaten erst möglich. Gewissermaßen besteht **V2** aus drei sequentiellen Reaktionen, aus denen das Benzofuran **5** ohne Isolation der Zwischenprodukte hervorgeht. In Anbetracht des bisher genannten ist die geringe Ausbeute nicht so überraschend. Pro Reaktionsstufe ergibt sich im Durchschnitt eine Ausbeute von 62 %. Nimmt man für die erste Stufe, die Formylierung, eine Ausbeute von 50 % an, ergibt

sich für die beiden anderen Reaktionsschritte sogar eine Ausbeute von 69 %.

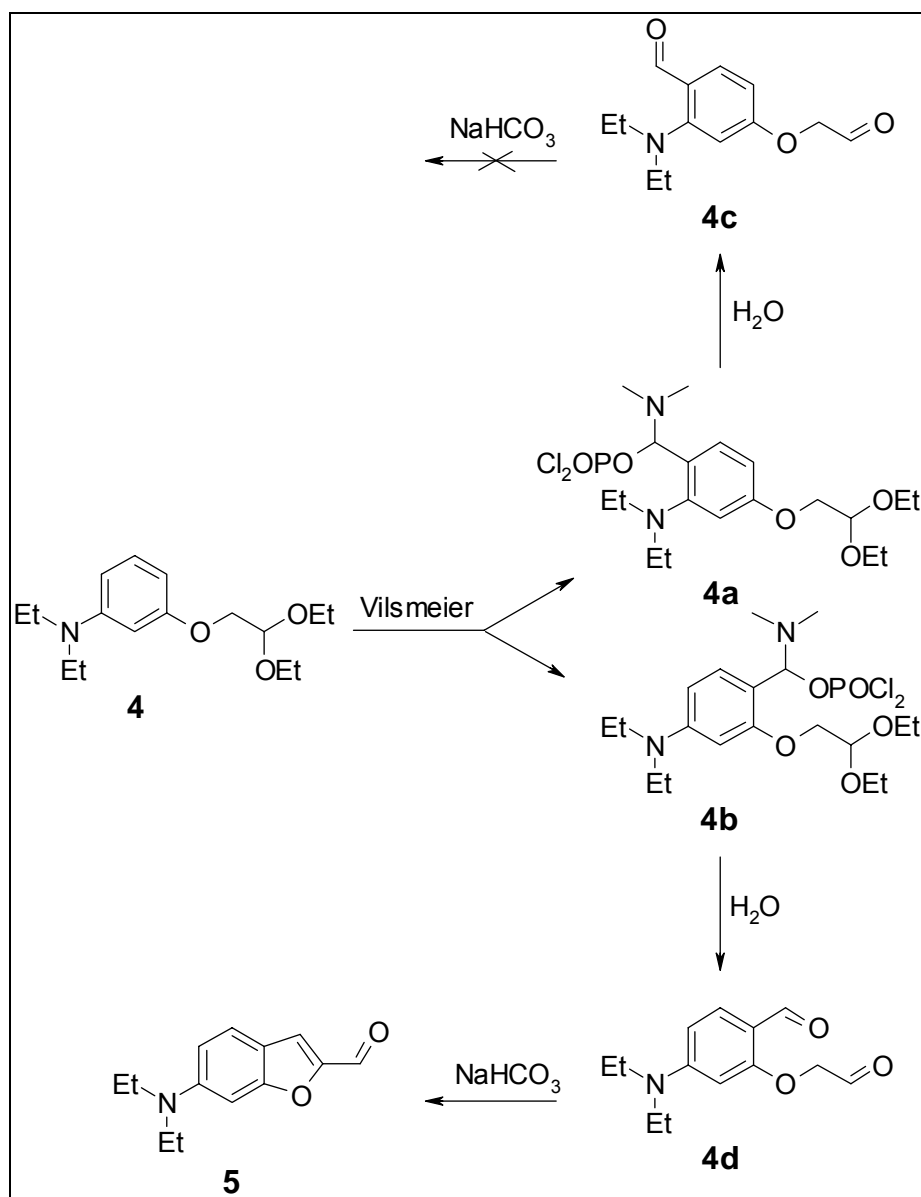


Abbildung 18: Übersicht über mögliche Neben- und Zwischenprodukte in V2

Der Benzofurancarbaldehyd **5** ist ein Merocyanin, Amino- und Carbonylgruppe sind durch eine ungerade Anzahl von Methingruppen getrennt. Das reine Produkt ist ein braunes hochviskoses Öl, in Lösung gelb mit grünlich-gelber Fluoreszenz. Das Absorptionsmaximum liegt in Diethylether bei 382 nm, in Ethanol bei 395 nm. Das Produkt zeigt also, wie für ein Merocyanin erwartet, positive Solvatochromie.

4.2.2 Synthese von Modellchromophoren

Um sich einen Überblick über die spektroskopischen Eigenschaften verschiedener Endgruppen zu machen, werden zunächst Modellverbindungen dargestellt. Bei diesen Modellverbindungen ist nur die farbgebende (auxochrome) Struktur entscheidend. Es wird kein Wert auf funktionelle Gruppen gelegt, die für Wasserlöslichkeit oder die Bindung an Proteine sorgen.

Zu diesem Zweck werden ausgewählte Heterocyclus in einer Knoevenagel-Reaktion mit Triethylamin als Base umgesetzt (siehe Abbildung 14). Für die Auswahl ist kommerzielle Verfügbarkeit oder leichte Darstellungsmöglichkeit ausschlaggebend.

Folgende Chromophore wurden dargestellt und spektroskopisch auf ihre Eignung untersucht:

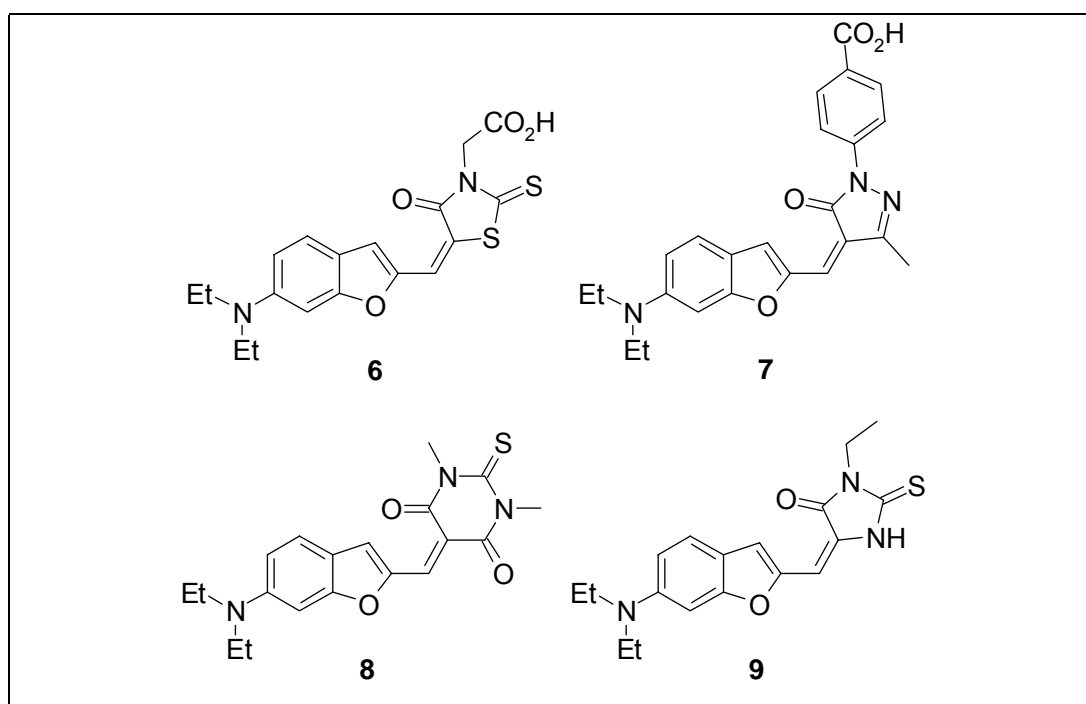


Abbildung 19: Modellchromophore zur Untersuchung auf spektroskopische Eignung

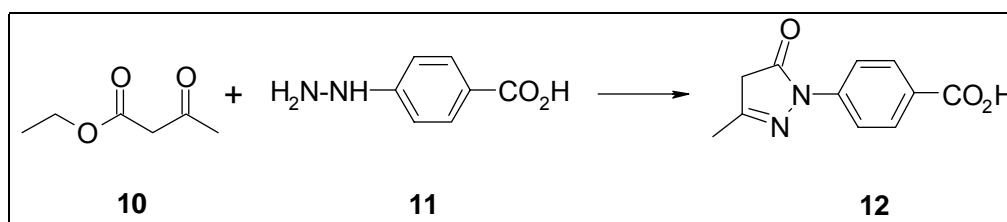
Der Rhodanin-Heterocyclus in **6** kann bei *Aldrich* bezogen werden. Die Pyrazolinon-Endgruppe der Verbindung **7** ist ebenso wie das Thiobarbiturat in **8** in Kondensationsreaktion zweier käuflich erwerbbarer Edukte zugänglich. Die Thiohydantoin-Endgruppe der Verbindung **9** kann in dreistufiger Synthese dargestellt werden.

Das Merocyanin **6** kann durch Knoevenagel-Reaktion (Base und Lösungsmittel: Pyridin) dargestellt werden. Durch die hohe Acidität und damit einhergehende ionische Struktur der Carboxylgruppe ist die Elutionszeit an Kieselgel 60 (Dichlormethan/Methanol = 8/1) sehr lang. Bei polareren Lösungsmittelgemischen ist die Trennung jedoch sehr schlecht. Wegen der hohen Affinität zur stationären Phase bleibt ein gewisser Teil des Farbstoffs am Kieselgel adsorbiert. Dies ist vermutlich der Hauptgrund für die hohen Verluste bei der Reinigung (46 % des Rohproduktes). Man erhält einen Farbstoff, der eine fluoreszierende orangefarbene Lösung liefert. Auf die spektroskopischen Eigenschaften wird noch näher eingegangen.

V3

Für Merocyanin **7** muß zunächst die Pyrazolinon-Endgruppe **12** dargestellt werden. Dies erfolgt in einer einstufigen Kondensationsreaktion aus Ethylacetoacetat **10** und 4-Hydrazinobenzoesäure **11**.

V4



Das Pyrazolinon kann nach H.-J. HOFMANN und W. SCHINDLER in drei tautomeren Formen vorkommen. Die CH-Form liegt meist in unpolaren Lösungsmitteln vor, in polaren Lösungsmitteln überwiegt meist eines der anderen beiden Tautomeren.

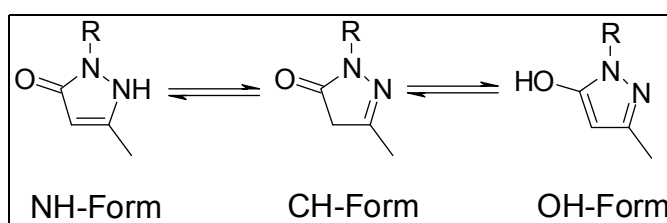


Abbildung 20: tautomere Formen von **12**

Im ¹H-NMR-Spektrum ([D₆]DMSO) von Substanz **12** ergibt die Integration des Signals der aciden Protonen an C4 des Pyrazolinons bei 5.41 ppm einen Wert von eins. Dies bedeutet, daß die CH-Form

nicht vorliegen kann. Dies war zu erwarten, DMSO (Dimethylsulfoxid) gilt als eher polares Lösungsmittel.

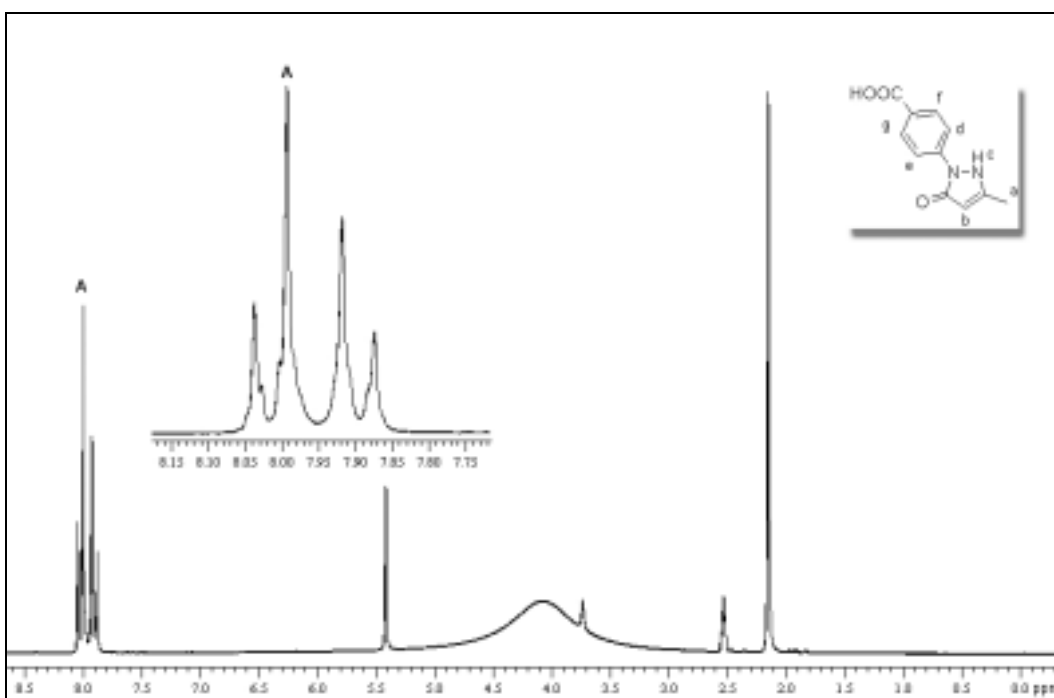


Abbildung 21: $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 200 MHz) von **12**

Tabelle 3: $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 200 MHz) von **12**

Verschiebung δ / ppm	Multiplizität	Kopplungskonstante J / Hz	Intensität	Zuordnung
2.14	s		3 H	a
5.41	s		1 H	b
7.90	B-Teil des [AB] ₂ - Systems	$J_{f,g} = 4.9$ $J_{d,e} = 1.1$ $J_{f,d} = 8.7$ $J_{e,f} = 0.3$	2 H	d,e
8.01	A-Teil des [AB] ₂ - Systems	$J_{f,d} = 8.7$ $J_{e,f} = 0.3$	2 H	f,g

Zur Berechnung der Kopplungskonstanten muß das Spektrum der Aromatenprotonen detaillierter betrachtet werden.

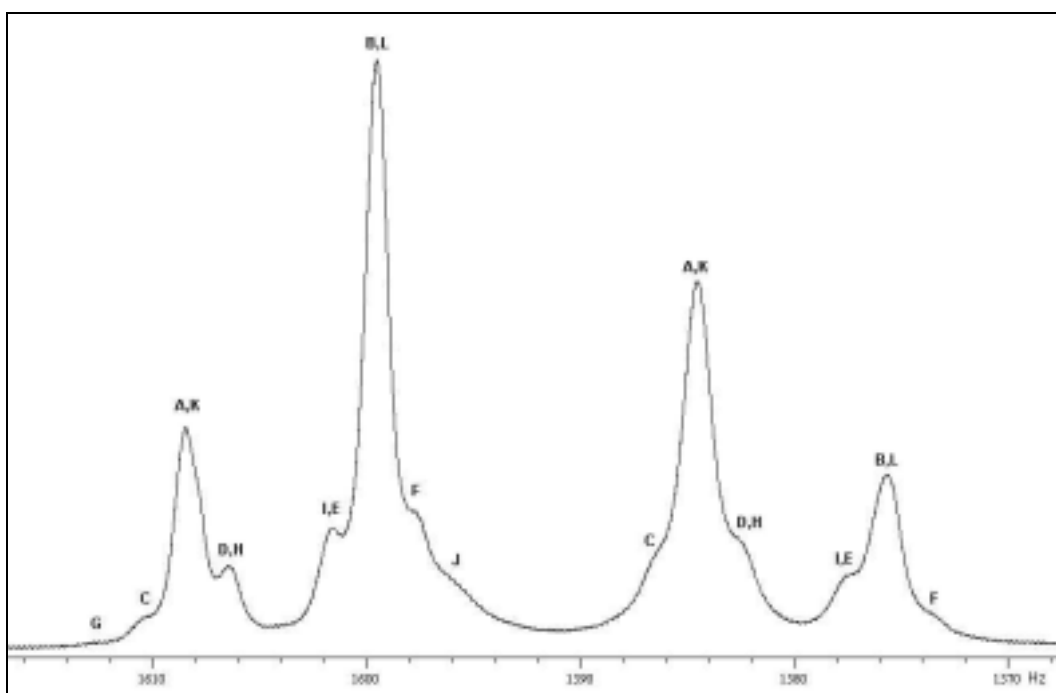


Abbildung 22: $[AB]_2$ -Spektrum von **12** (Ausschnittsvergrößerung aus Abbildung 21)

Wie man gängigen Lehrbüchern der NMR-Spektroskopie^[33] entnehmen kann, berechnen sich die Kopplungskonstanten in einem $[AB]_2$ -System wie folgt:

$$\nu_A, \text{ bzw. } \nu_B = \frac{1}{2} (A + B) = \frac{1}{2} (K + L)$$

$$J_{f,g} = \frac{1}{2} (K + M)$$

$$J_{d,e} = \frac{1}{2} (K - M)$$

$$J_{f,d} = J_{g,e} = \frac{1}{2} (N + L)$$

$$J_{e,f} = J_{g,d} = \frac{1}{2} (N - L)$$

Wobei die Terme definiert sind zu:

$$N = A - B = K - L$$

$$M = C - D = E - F$$

$$K = G - H = I - J$$

$$L = ((H - I) \cdot (G - J))^{\frac{1}{2}} = ((C - F) (D - E))^{\frac{1}{2}}$$

Da die Auflösung des Spektrums nicht sehr gut ist, sind die Peaklagen fehlerbehaftet, die Banden G und J des B-Teils sind im Spektrum nicht

auszumachen. Dadurch entfällt die Berechnung von $J_{f,g}$ und $J_{d,e}$ aus dem B-Teil.

Tabelle 4: Peaklagen und Kopplungskonstanten des $[AB]_2$ -Systems von **12**

	A-Teil	B-Teil
	Peakzuordnung / Hz	Peakzuordnung / Hz
G	1612.7	
C	1610.2	1586.5
A,K	1608.4	1584.5
D,H	1606.4	1582.6
I,E	1601.6	1577.3
B,L	1599.5	1575.6
F	1597.7	1573.6
J	1596.0	
$J_{f,g}$	4.9	
$J_{d,e}$	1.1	
$J_{f,d}$	8.7	8.6
$J_{e,f}$	0.3	0.3

Das IR-Spektrum (KBr) zeigt eine Absorptionsbande bei 3421 cm^{-1} . Dies ist einer NH-Valenzschwingung zuzuordnen, was für die NH-Form spricht. Nur die vollständige Abwesenheit dieser Bande würde für die OH-Form sprechen, denn die OH-Valenzschwingung zeigt sich im IR-Spektrum in jedem Fall, schon durch die Carboxylgruppe des Moleküls (Spektrum siehe Experimentalteil). Es ist aber nicht ausgeschlossen, daß Auxochrom **12** in DMSO eine andere tautomere Form annimmt als im Preßling.

V5

Das Merocyanin **7** wird in der üblichen Knoevenagel-Kondensation mit **2** dargestellt. Man erhält einen Farbstoff, dessen methanolische Lösung brombeerfarben aussieht und keine erkennbare Fluoreszenz zeigt.

Der Thiobarbiturat-Heterocyclus für Merocyanin **8** wird üblicherweise durch einstufige Kondensationsreaktion aus

Diethylmalonat und 1,3-Dimethylharnstoff dargestellt (siehe Kapitel 4.3.1, Seite 91). In diesem Fall kann eine aus der Synthese der Membranpotentialsonden existierende Charge verwendet werden (siehe **V72**). Man erhält das Merocyanin **8** auf üblichem Wege, es zeigt in Lösung tiefblaue Farbe und keine erkennbare Fluoreszenz. Bemerkenswert ist, daß **8** in Lösung sehr schnell zerstört wird. Schon nach 90 min hat die Konzentration auf etwa 10 % abgenommen.

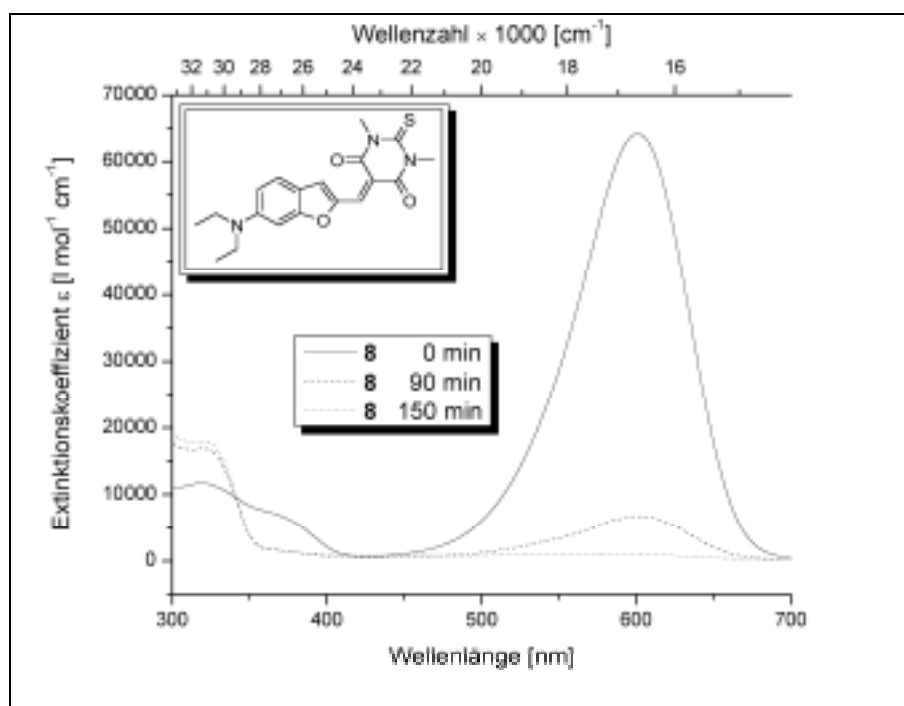
V6

Abbildung 23: Abnahme der Konzentration von **8** in DMSO

Dieses Verhalten ist von den anderen hier vorgestellten Chromophorgrundstrukturen nicht bekannt. Der Grund für diese geringe Haltbarkeit scheint also der Thiobarbiturat-Heterocyclus zu sein.

Der *N*-Ethylthiohydantoin-Heterocyclus für das Merocyanin **9** ist durch eine dreistufige Synthese zugänglich. Ausgehend von Glycin **13** wird der entsprechende Ethylester **14** dargestellt und zum Isothiocyanat **15** umgesetzt. Dieses kondensiert mit Ethylamin zum Thioharnstoff **16**, der aber nur intermediär entsteht und nicht isolierbar ist, da sofort die Cyclisierung zum Thiohydantoin **17** erfolgt.

V7**V8****V9**

V10

Das Thiohydantoin kann dann auf die bekannte Weise mit dem Benzofuran **2** zum Merocyanin **9** umgesetzt werden. Die Lösung des Farbstoffes ist orange und zeigt deutliche Fluoreszenz.

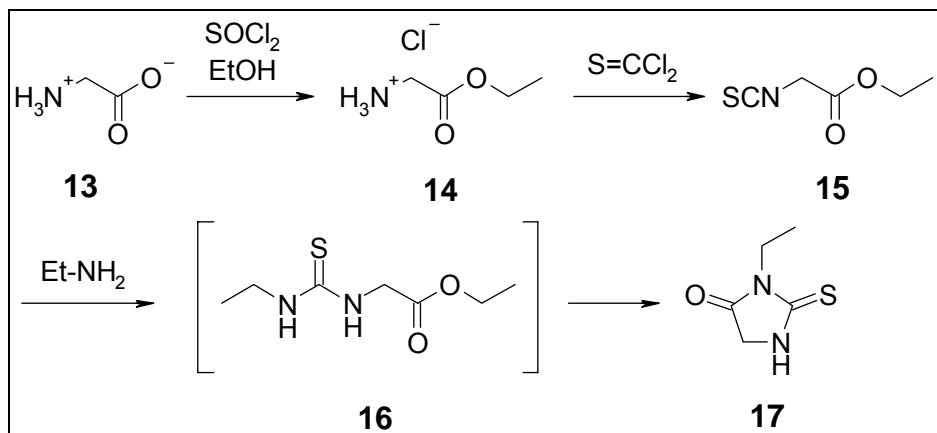


Abbildung 24: Darstellung von *N*-Ethylthiohydantoin **17**

Die Merocyanine **6** bis **9** zeigen die in Tabelle 5 aufgeführten Absorptions- und Emissionsmaxima. Für das FRET-System sollte das Absorptionsmaximum des Akzeptors zwischen 450 und 550 nm liegen.

Tabelle 5: spektroskopische Eigenschaften der Modellsubstanzen

Merocyanin	Absorptionsmaximum / nm (ϵ / l·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹) Lösungsmittel	Emissionsmaximum / nm Lösungsmittel
8	601 (64 300) DMSO*	keine
7	537 (41 000) DMSO* 542 (77 700) Methanol	keine
6	522 (23 500) DMSO* 511 (18 200) Methanol 538 (6 300) H ₂ O	628 DMSO*
9	503 (79 700) DMSO* 491 (32 340) Aceton 505 (74 800) CH ₂ Cl ₂	550 DMSO* 604 Aceton 597 CH ₂ Cl ₂
Biolumineszenz		463

*DMSO: Dimethylsulfoxid

Verbindung **8** zeigt nicht nur eine zu bathochrom gelegene Absorbanz, als daß sie sich als BRET-Akzeptor eignete, desweiteren zeigt sie keine Fluoreszenz. Verbindung **7** zeigt ebenfalls keine Fluoreszenz, aus diesem Grund scheiden beide Verbindungen als BRET-Akzeptoren aus.

Vergleicht man die Merocyanine dieser Reihe, so erkennt man die deutliche Einflußnahme des auxochromen Heterocyclus (Akzeptor) auf die spektralen Eigenschaften des Chromophors. Bei gleichbleibendem Donor des Chromophors (Diethylaminogruppe) erfolgt im gleichen Lösungsmittel bathochrome Verschiebung bei Veränderung des Akzeptors vom Thiohydantoin in **9** über Rhodanin in **6** und Pyrazolinon in **7** zum Thiobarbiturat in **8**. Dies ist auf die zunehmende Akzeptorstärke der Heterozyklen in der oben genannten Reihenfolge zurückzuführen und in absoluter Übereinstimmung mit der Aciditätsreihe von L. G. S. BROOKER et al^[34]. In Abbildung 25 ist dies graphisch dargestellt.

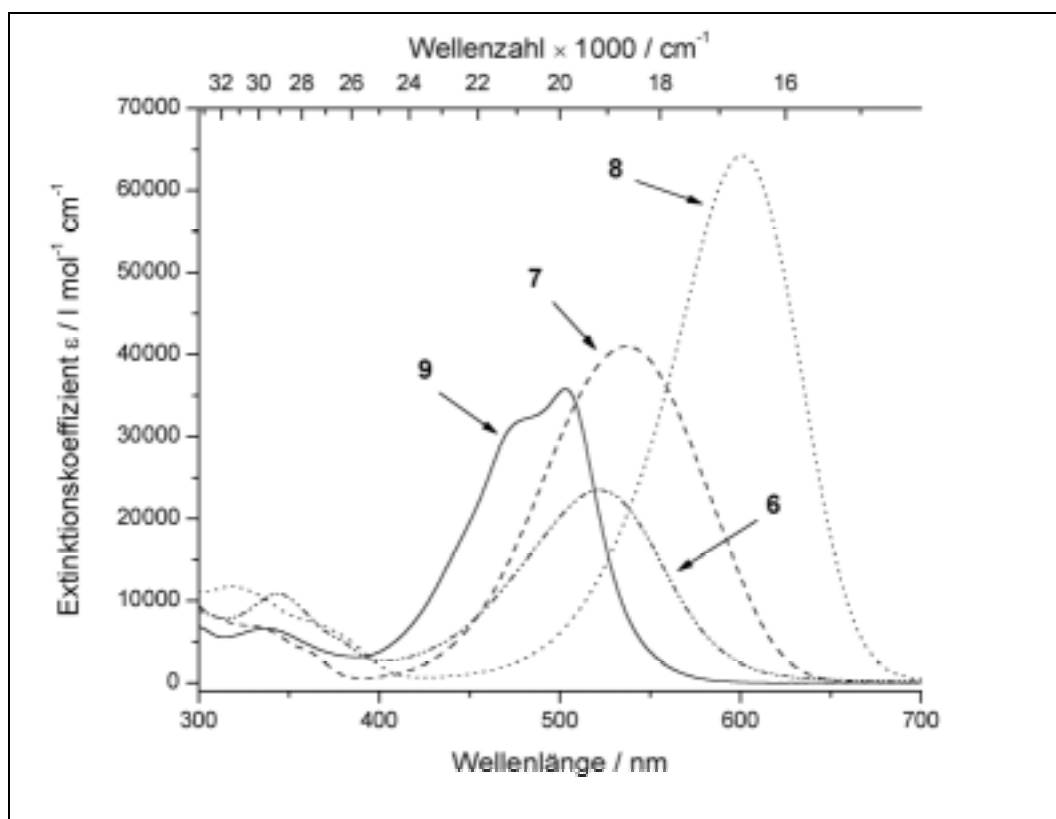


Abbildung 25: Absorptionsmaxima der Modellchromophoren in Dimethylsulfoxid

Die Deutung nach BROOKER et al. resultiert aus der Resonanztheorie. Für Jedes der obigen Merocyanine existieren zwei Resonanzstrukturen, eine ungeladene und eine dipolare. Anhand von Verbindung **9** sei dies exemplarisch dargestellt.

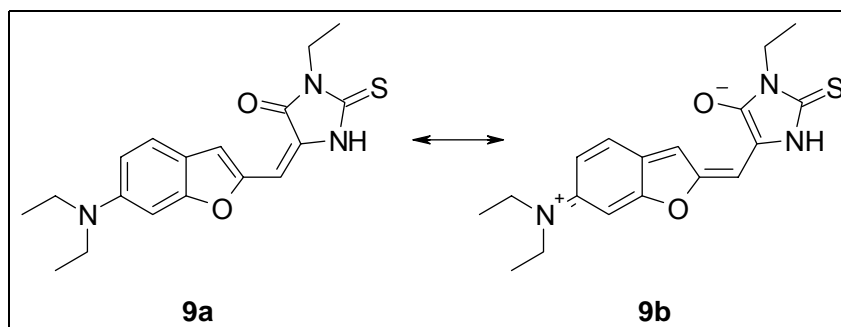


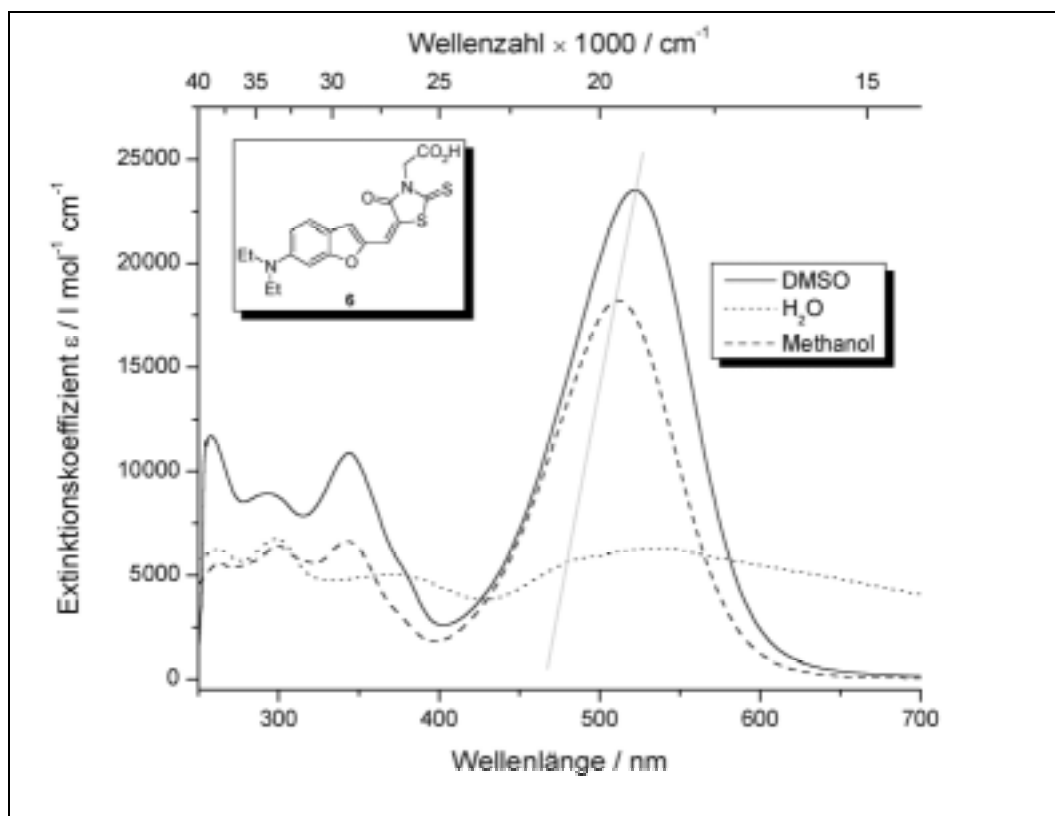
Abbildung 26: Resonanzstrukturen von **9**

9b sollte energetisch ungünstiger als **9a** sein, wegen der dipolaren Struktur und wegen der chinoiden Struktur des Aromaten. Eine Erhöhung der Brooker-Acidität (größere Elektronenakzeptorstärke) beim auxochromen Heterocyclus (Merocyanin Akzeptor) stabilisiert die Struktur **9b**. Es verringert sich also der energetische Abstand zwischen den Resonanzstrukturen **9a** und **9b** (Erhöhung der Symmetrie des Farbstoffs), was nach der Resonanztheorie einen geringeren Abstand zwischen Grund- und Anregungszustand, also Bathochromie bedingt.

Verbindung **6** zeigt einen interessanten solvatochromen Effekt. Bei zunehmender Polarität innerhalb der verwendeten polaren Lösungsmittel zeigt sich ausgehend von Dimethylsulfoxid zunächst Hypsochromie, wenn man das polarere Lösungsmittel Methanol verwendet. Dann aber erfolgt scheinbar Bathochromie, geht man zu dem sehr polaren Lösungsmittel Wasser über (siehe Tabelle 6 und Abbildung 27).

Tabelle 6: Lösungsmittleigenschaften und Solvatochromie von **6**

Lösungsmittel	E_T^N	Absorptions- maximum / nm
DMSO	0.444 ^[35]	522
Methanol	0.762 ^[36]	511
H ₂ O	1.000 ^[37]	538

Abbildung 27: Solvatochrome Eigenschaften von Modellchromophor **6**

Die hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums bei Verwendung von Methanol anstelle von Dimethylsulfoxid lässt sich anschaulich erklären. Merocyaninfarbstoffe bewegen sich im elektronischen Grundzustand nach K. D. NOLTE und S. DÄHNE^[38] je nach Lösungsmittel zwischen zwei mesomeren Grenzstrukturen. In unpolaren Lösungsmitteln wird eher eine unpolare polyenartige Struktur (**6a** in Abbildung 28) vorliegen, in sehr polaren Lösungsmitteln eine polare polyenartige (betainische) Struktur (**6c** in Abbildung 28).

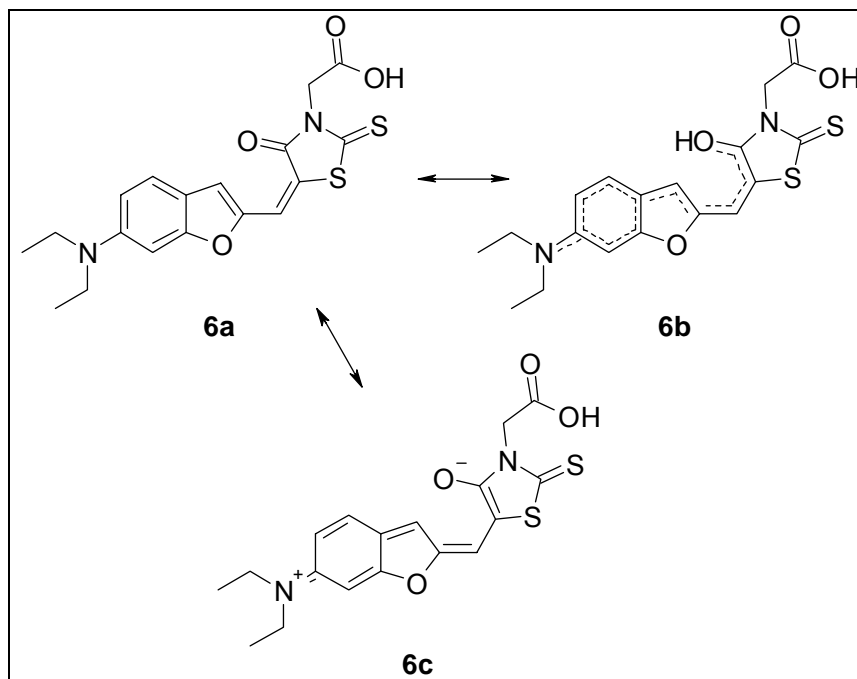


Abbildung 28: mesomere Grenzstrukturen von Merocyaninen, hier **6**

In den übrigen Lösungsmitteln nimmt ein Merocyanin eine symmetrische unpolare polymethinartige Struktur an (**6b**), die je nach Lösungsmittelpolarität eher zu **6a** oder eher zu **6c** tendiert. Von **6a** oder **6b** ausgehend ist der angeregte Zustand deutlich polarer und wird daher mit zunehmender Lösungsmittelpolarität stärker energetisch stabilisiert (abgesenkt) als der Grundzustand. Eine bathochrome Verschiebung, d. h. positive Solvatochromie ist die Folge. Bei sehr polaren Lösungsmitteln ist eher **6c** die vorherrschende polare Struktur, daher wird der Grundzustand stärker durch das Lösungsmittel stabilisiert. Durch die Vergrößerung des energetischen Abstands zeigt sich Hypsochromie (negative Solvatochromie). Dies dürfte der Fall sein für Substanz **6** bei Übergang von Dimethylsulfoxid zu Methanol. Hier kommt hinzu, daß Methanol deutlich protischer ist als Dimethylsulfoxid und polare Strukturen durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisieren kann.

Nach der Resonanztheorie, die BROOKER et al.^[34] zur Interpretation heranziehen, kann dies nur so gedeutet werden, daß die dipolare Resonanzstruktur (vgl. Abbildung 26) durch die höhere Polarität des Lösungsmittels so stark stabilisiert wird, daß sie energetisch niedriger liegt, als die unpolare Resonanzstruktur. Bei weiterer Zunahme der

Lösungsmittelpolarität erfolgt weitere Absenkung der dipolaren Resonanzstruktur, also Erhöhung des energetischen Abstandes zwischen beiden Strukturen. Dadurch Vermindert sich die Symmetrie des Farbstoffes, der energetische Abstand zwischen Grund- und Anregungszustand erhöht sich.

Geht man von Methanol zu Wasser als Lösungsmittel über, so erfolgt vermutlich nur scheinbare Bathochromie. Betrachtet man das H₂O-Spektrum in Abbildung 27 genauer, so besteht es vermutlich aus mehreren Banden. Dies erklärt auch die deutliche Verbreiterung des Peaks und die Hypochromie. Es ist anzunehmen, daß **6** in Wasser aufgrund des *Hydrophoben Effekts* Aggregate bildet, welche bathochromer absorbieren. Bei diesen muß von einem ganz anderen Grund- und Anregungszustand ausgegangen werden. Die Monomeren, deren Bande nur als Schulter im kurzwelligeren Bereich schlecht auszumachen ist, zeigen durchaus die erwartete Hypsochromie. Zur Verdeutlichung sind die Monomerenmaxima in Abbildung 27 durch eine hellgraue Linie verbunden.

Das Merocyanin **9** zeigt ebenfalls Hypsochromie, wenn man berücksichtigt, daß die Absorptionskurve in DMSO im Wesentlichen wieder aus zwei Peaks besteht. Das Maximum liegt zwar bei 503 nm (Aggregate), in der kurzwelligen Flanke des Peaks ist jedoch deutlich eine Schulter zu erkennen, deren Maximum bei etwa 476 nm liegt.

Tabelle 7: Lösungsmittleigenschaften und Solvatochromie von **9**

Lösungsmittel	E_T^N	Absorptions- maximum / nm
Dichlormethan	0.309 ^[39]	505
Aceton	0.355 ^[40]	491
DMSO	0.444 ^[35]	476, (503)

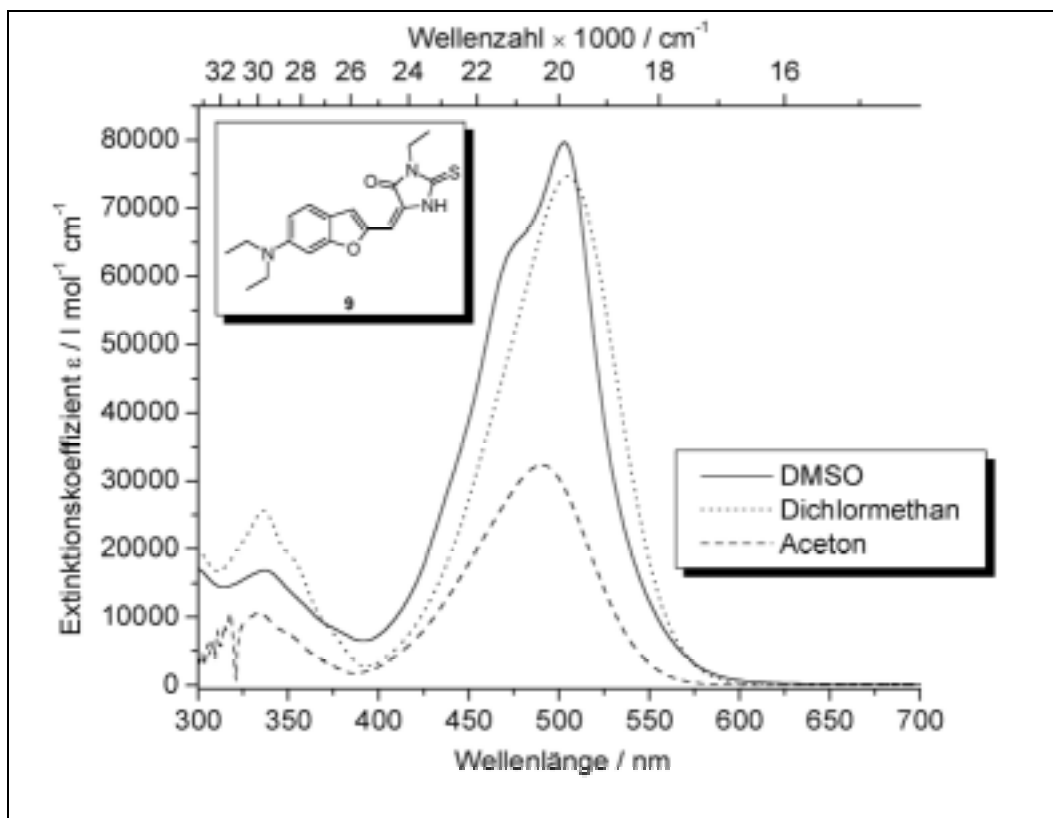
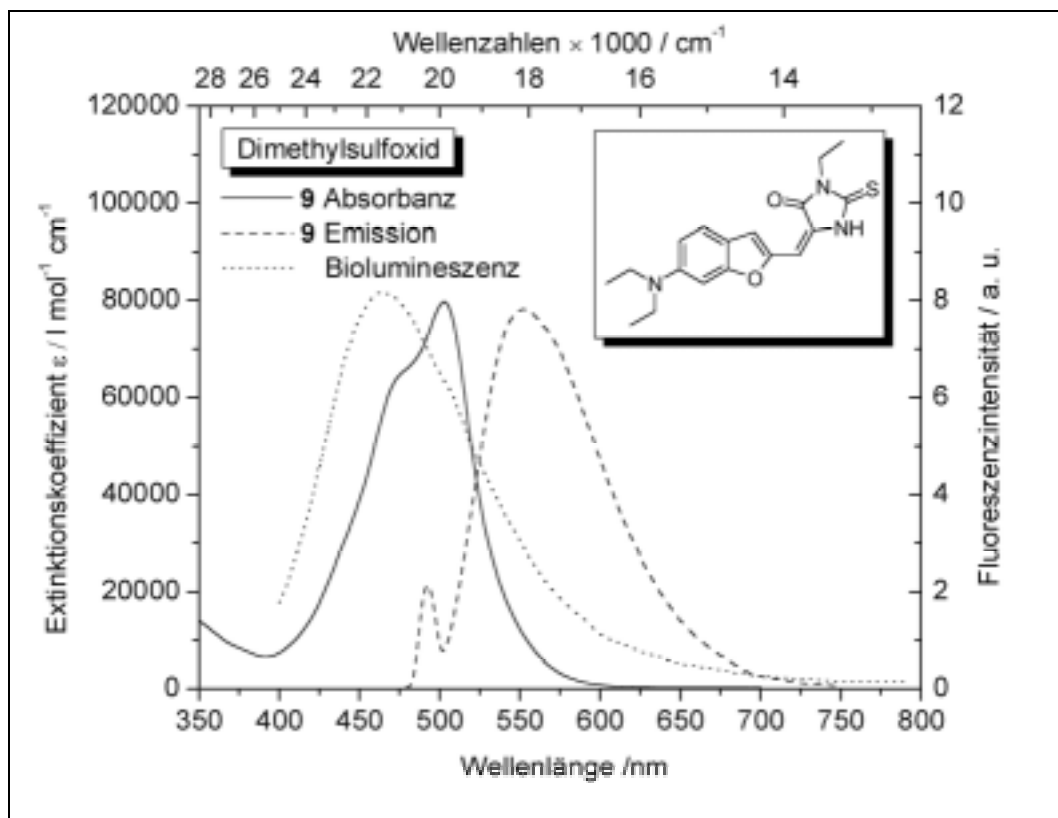
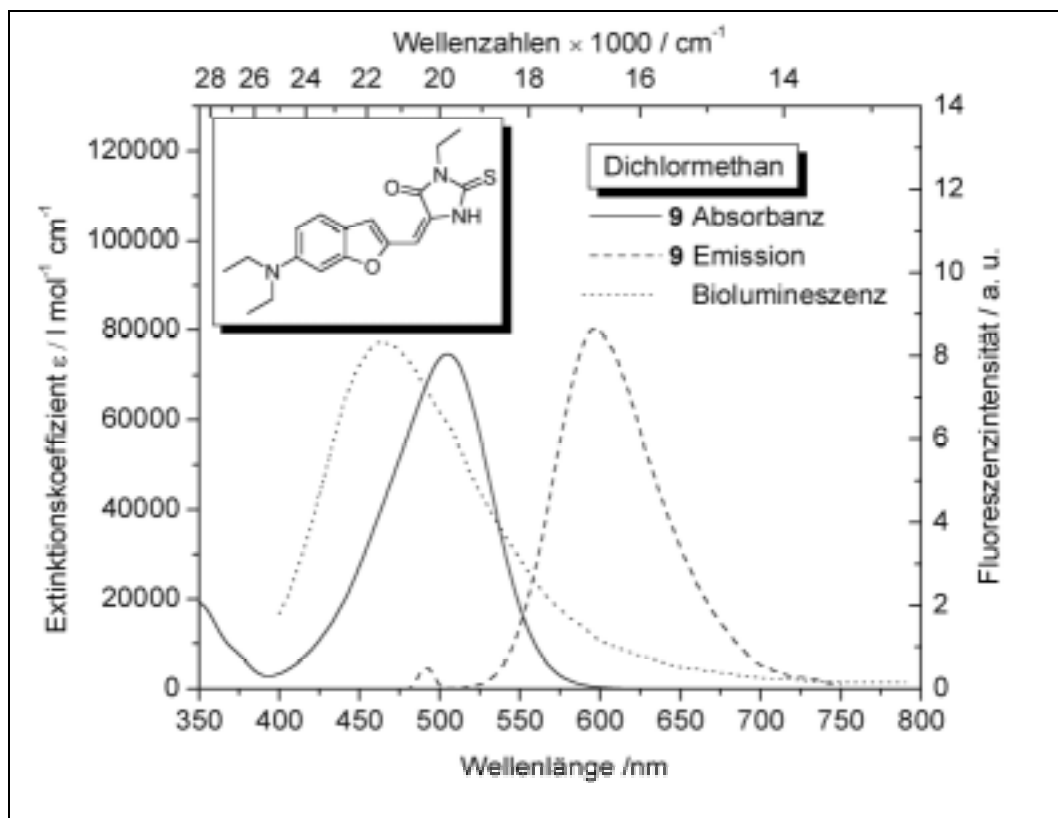


Abbildung 29: solvatochrome Eigenschaften von Modellchromophor **9**

Die Absorbanzkurve von Verbindung **9** zeigt eine sehr gute Überlappung (Überlappungsintegral J , siehe Gleichung 8, Seite 18) seiner Absorptionskurve mit der Biolumineszenzemission (siehe Abbildung 30). Demgegenüber steht die recht geringe Stokes-Verschiebung in DMSO von etwa 50 nm (1700 cm^{-1}), wenn man vom Absorptionsmaximum bei 503 nm ausgeht, bzw. von 74 nm (2830 cm^{-1}), wenn man die Monomerenbande bei 476 nm berücksichtigt (Emissionsmaximum bei 550 nm). Immerhin emittiert der BRET-Akzeptor **9**, Energietransfer vorausgesetzt, etwa 90 nm (3420 cm^{-1}) bathochromer als der BRET-Donor (Emissionsmaximum 463 nm). Möglicherweise reicht diese Differenz, um beide Emissionen voneinander zu unterscheiden.

In Dichlormethan ist die Stokes-Shift deutlich größer (94 nm, 3052 cm^{-1} , vgl. Abbildung 31), hier beträgt der Abstand der Emissionsmaxima von Biolumineszenz und Farbstoff-Emission von **9** 134 nm (4848 cm^{-1}).

Abbildung 30: Bandenlage von Absorbanz und Emission von **9** in DMSOAbbildung 31: Bandenlage von Absorbanz und Emission von **9** in Dichlormethan

Es ist schwer vorauszusagen, welches Lösungsmittel den tatsächlichen Gegebenheiten am Nächsten kommt. Befindet sich der Chromophor vollständig in wässriger Lösung, steht also rechtwinklig von der Oberfläche des Proteins ab, so versagen sowohl Dimethylsulfoxid als auch Dichlormethan als Modell der Farbstoffumgebung. In wässriger Lösung läßt sich der vorliegende Chromophor jedoch nicht vermessen. Nimmt man an, daß der Chromophor mit seinem lipophilen aromatischen Gerüst an der Oberfläche des Proteins adhäsiert ist, so geben die verwendeten Lösungsmittel die spektralen Lagen vielleicht recht gut wieder.

Die Absorbanzbande des Chromophors **6** zeigt zwar eine geringere Überlappung mit der Biolumineszenzbande (vgl. Abbildung 32), jedoch beobachtet man auch einen sehr viel größeren Stokes-Shift gegenüber **9** von 106 nm (3234 cm^{-1}) in Dimethylsulfoxid. Die Differenz der Farbstoff-Emission zum Maximum der Biolumineszenz von 165 nm (5675 cm^{-1}), ließe eine exakte Unterscheidung zwischen BRET-Donor- und -Akzeptorstrahlung zu.

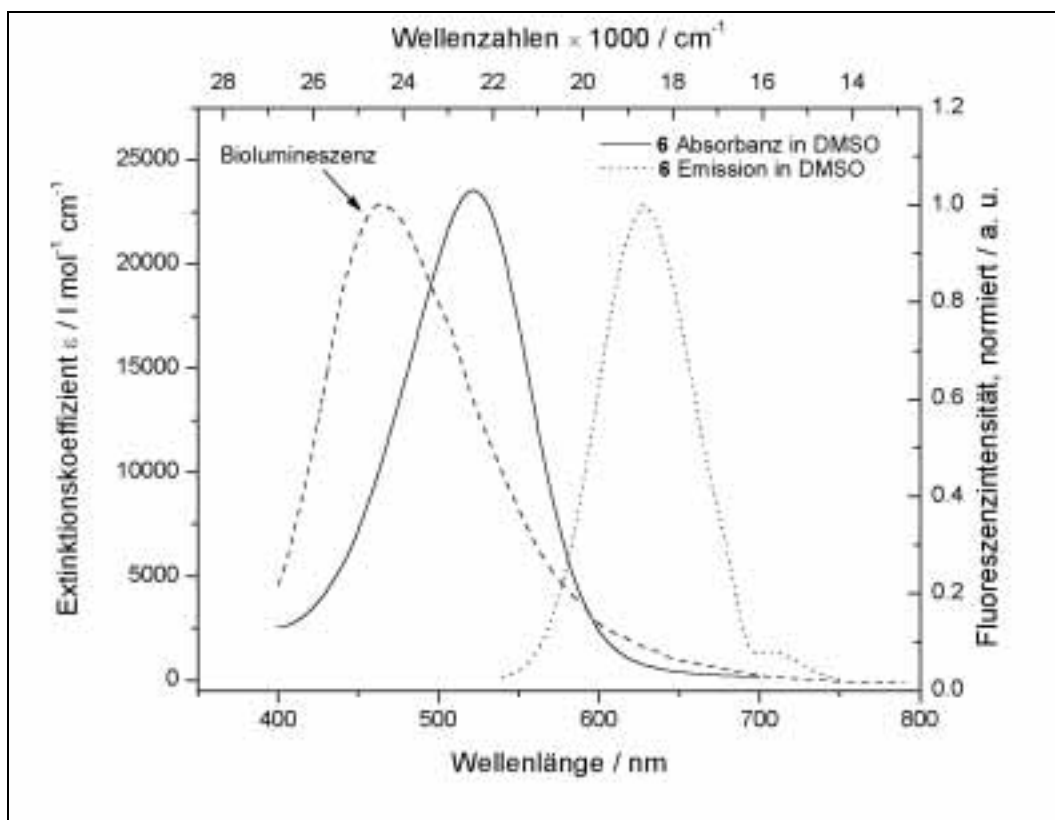


Abbildung 32: Bandenlage von Absorbanz und Emission von **6** in DMSO

Damit sind die beiden Chromophoren **6** und **9** interessante Grundstrukturen, die an die weiteren Anforderungen angepaßt werden müssen. Dies betrifft die Möglichkeit der Bindung an ein Protein, z. B. durch eine aktivierte Carboxylgruppe, die mit Aminogruppen des Proteins reagieren kann. Die geforderte Wasserlöslichkeit muß durch eine weitere funktionelle Gruppe eingeführt werden, da die Carboxylgruppe, im Bindungsfall eine Amidgruppe, nicht wesentlich zur Wasserlöslichkeit beitragen kann.

4.2.3 Einführung der Carboxylgruppe in den Chromophor

Da die Rhodaningruppe der Modellsubstanz **6** bereits eine Carboxylgruppe trägt, ist letztere nur noch in Chromophor **9** einzuführen. Dies kann entweder ebenfalls am Heterocyclus erfolgen oder als Seitenkette am Benzofuranteil anstelle der Diethylreste der Aminogruppe.

4.2.3.1 Einführung der Carboxylgruppe in den Benzofuran-Teilchromophor

Zunächst wird untersucht, ob die Einführung einer Carboxylgruppe in Form eines Restes der Aminogruppe des Benzofuranchromophors gelingt. Dies würde die Synthese des auxochromen Cyclus erleichtern oder man hätte eine deutlich größere Auswahl an kommerziell erwerbbaaren Cyclen.

Man geht dabei aus von 3-Aminophenol **18** (siehe Abbildung 33). Dieses Edukt enthält zwei funktionelle Gruppen. Die Möglichkeit der *selektiven* Substitution an der phenolischen Hydroxyfunktion durch Bromacetaldehyddiethylacetal zum Ether, ohne daß gleichzeitig die Aminogruppe substituiert wird, wird wegen der höheren Reaktivität der Aminogruppe ausgeschlossen. Die Frage ist, ob eine selektive Substitution an der Aminogruppe durch einen carboxyltragenden Rest gelingt.

Die Substitution an der Aminogruppe mittels Iodessigsäureethylester in Substanz (zwei Moläquivalente Ester) analog der Vorschrift von R. HIRAYAMA et al.^[41] gelingt zwar nicht, wohl aber in ethanolischer Lösung (äquimolarer Ansatz), wie von M. L. CROSSLEY et al.^[42] beschrieben.

Allerdings findet dabei sowohl Mono-, als auch Disubstitution statt, wie anhand eines GC-MS-Spektrums bewiesen wird.

Fraktion 1 (monosubstituiert): 195 [M⁺]; 122 [M⁺, - EtO₂C^{*}]

Fraktion 2 (disubstituiert): 281 [M⁺]; 208 [M⁺, - EtO₂C^{*}];

136 [M⁺, - 2 x EtO₂C^{*}, + H].

Das Kernresonanzspektrum zeigt allerdings die Methylenprotonen des Ethoxycarbonylmethyl-Restes bei zwei verschiedenen Lagen. Zwei Singulets bei 3.86 und 4.10 ppm lassen darauf schließen, daß die Zweitsubstitution nach der Amino- auch an der Hydroxygruppe erfolgt. Dies ist wahrscheinlich auf den relativ großen Platzbedarf des Ethoxycarbonylmethyl-Restes zurückzuführen, der eine doppelte Substitution an der Aminogruppe nicht zuläßt. Sowohl HIRAYAMA et al., als auch CROSSLEY et al. verwendeten als Alkylierungsreagenzien allerdings auch nur Alkyljodide und -bromide, keine Halogenalkylester.

In der späteren Umsetzung in einer Vilsmeier-Reaktion (siehe Abbildung 15: Darstellung von 6-Diethylaminobenzofuran-2-carbaldehyd) können nur tertiäre Amine verwendet werden. Da eine zweifache Substitution des Aminophenols durch α -Halogenessigsäureester aus sterischen Gründen nicht möglich zu sein scheint, soll zunächst zum Monomethylaminophenol umgesetzt werden. Die Zweitsubstitution durch Iodessigsäureethylester sollte dann sterisch weniger gehemmt sein.

Bei der Umsetzung von Alkylhalogeniden nach HIRAYAMA et al.^[41] kann jedoch ebenfalls nie die Reaktion nach dem ersten Substitutionsschritt gestoppt werden:

Bei der Reaktion äquimolarer Mengen 3-Aminophenol **18** mit Methyljodid in Dimethylformamid setzt sich das Rohprodukt laut GC-MS-Spektrum aus Mono- und Disubstituiertem Aminophenol (m/z =

122 und 136) zusammen. Das Produktverhältnis ist laut $^1\text{H-NMR}$ etwa 1:1. Eine Ausbeute von lediglich 50 % vor Destillation im ersten Schritt einer vielstufigen Synthese ist jedoch nicht annehmbar.

Bei der äquimolaren Umsetzung von Ethyliodid oder Ethylbromid mit Aminophenol entstehen laut GC-MS-Spektrum neben monosubstituiertem Produkt ($m/z = 137$) auch zwei disubstituierte Produkte ($m/z = 165$) und sogar etwas dreifach substituiertes Aminophenol ($m/z = 193$).

Die direkte Einführung eines Alkylrestes selektiv an der Aminogruppe scheint also nicht möglich. Es müßte also zunächst selektiv die Phenol-OH-Gruppe geschützt werden. Dabei muß die Schutzgruppe Bedingungen der Substitutionsreaktion an der Aminogruppe überstehen (Silylether und Acetale scheiden vermutlich aus). Oder es müßte zunächst selektiv die Aminogruppe geschützt werden, so daß die OH-Gruppe mit Bromacetaldehyddiethylacetal umgesetzt werden kann. Die Aminogruppe muß sich dann so entschützen lassen, daß das Acetal erhalten bleibt, andernfalls müßte nach der Substitution der Aminogruppe für den Einsatz in der Vilsmeier-Formylierung wieder zum Acetal umgesetzt werden.

Eine dritte Möglichkeit besteht darin, zunächst beide funktionelle Gruppen mit der gleichen Schutzgruppe zu versehen, dann selektiv eine der beiden zu entschützen. Dazu wird 3-Aminophenol **18** zunächst mit Acetanhydrid zum Amidester umgesetzt.

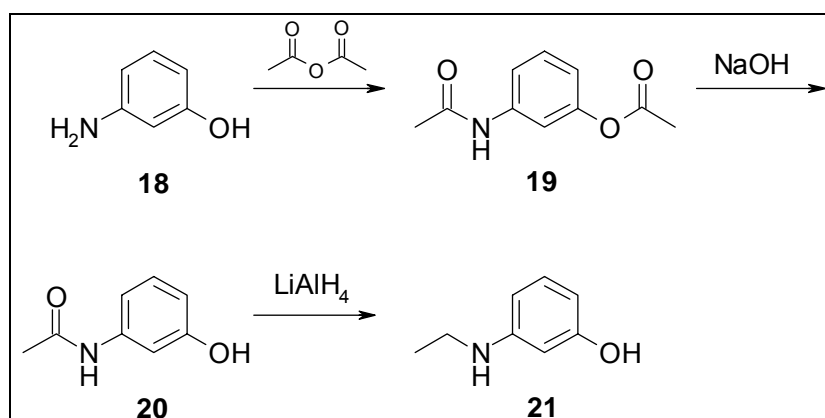


Abbildung 33: Darstellung von *N*-Ethylaminophenol

Nach Verseifung des Esters soll das Amid mit Litiumaluminiumhydrid nach V. M. MIĆOVIĆ und M. LJ. MIHAILOVIĆ^[43] zum Alkylamin reduziert werden.

Die ersten beiden Schritte verlaufen mit annehmbarer Ausbeute. Die Reduktion ist zwar prinzipiell möglich, das 3-Ethylaminophenol kann jedoch nur mit einer Ausbeute von 9 % isoliert werden. Über alle drei Schritte ergibt sich eine Ausbeute von 2 % des Monoethylaminophenols. Aus diesem Grunde wird auch diese Reaktionsführung verworfen.

V14

Letztlich gelingt die Monomethylierung der Aminogruppe zu **22** nach der Methode von J. BIEHRINGER und A. TANZEN^[44], die 3-Aminophenol **18** mit Methyljodid unter Einfluß von Natronlauge während 10 h bei 100 °C im Autoklaven umsetzen.

Die Umsetzung von 3-(Methylamino)phenol zum tertiären Amin mit Chloressigsäureethylester findet jedoch nicht in nennenswertem Umfang statt.

Es scheint also einfacher, die Carboxylgruppe am auxochromen Heterocyclus einzuführen, auch wenn dadurch dessen Synthese erschwert wird.

4.2.3.2 Einführung der Carboxylgruppe in den auxochromen Heterocyclus des Fluorophors

Man erreicht das Carboxylderivat des Thiohydantoin in einer fünfstufigen Synthese. Wie beschrieben wird Glycin in das entsprechende Isothiocyanat **15** überführt. Dieses wird umgesetzt mit dem aus seinem Hydrochlorid befreiten Ethylglycinat **23**. Es muß nach Extraktion aus dem Reaktionsansatz sofort mit dem Isothiocyanat umgesetzt werden, da es leicht zum Piperazin-2,5-dion dimerisiert.

V15**V16**

Bei der Umsetzung von **15** mit **23** entsteht der Thioharnstoff **24**, welcher isoliert werden kann, aber zweckmäßigerweise ohne Isolation in halbkonzentrierter Salzsäure erhitzt wird. Dies dient der

V17

Vervollständigung der Zyklisierung und der Verseifung des Esters zur Thiohydantoylessigsäure **25**.

Der Versuch **25** in einem oder zwei Schritten darzustellen mißlingt. Die Umsetzung des Esterhydrochlorids **14** mit Thiophosgen im molaren Verhältnis 2:1 unter Zuhilfenahme von Triethylamin als Base sollte eigentlich ebenfalls zum Thioharnstoff **24** führen. Dieser dürfte wiederum spontan zyklisieren, wobei der Ethylester des Thiohydantoin **25** entsteht. Dieser kann jedoch nicht isoliert werden. Problematisch bei der Isolation sind die großen Mengen Triethylammoniumchlorid, die bei der Reaktion anfallen. Dessen Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln und in Wasser ist offensichtlich nicht so unterschiedlich von **25**, daß die Trennung leicht erfolgt. Daher ist die oben beschriebene umständlichere mehrstufige Synthese die Methode der Wahl (siehe Abbildung 34).

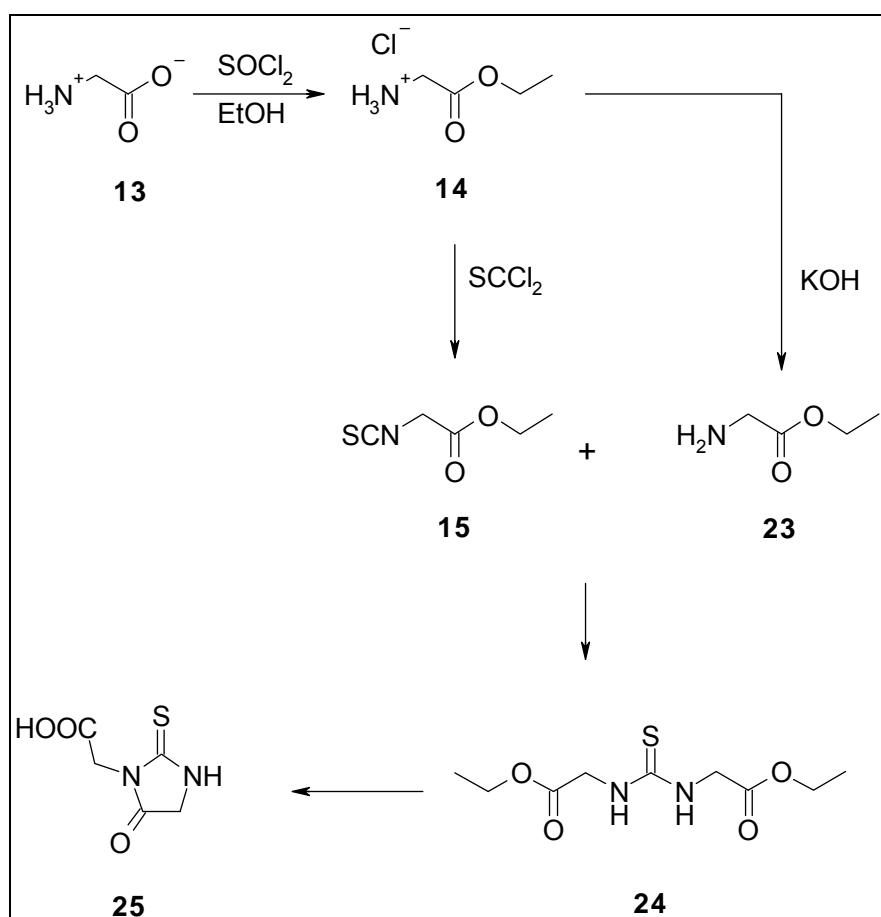


Abbildung 34: Einführung der Carboxymethylgruppe in den Thiohydantoincyclus

Grundsätzlich kann auf diese Weise eine Carboxylseitenkette beliebiger Länge eingeführt werden. Um zu untersuchen, ob die

Kettenlänge des Carboxylrestes Einfluß hat auf die Bindung an ein Protein, wird das entsprechende Buttersäurederivat hergestellt.

V18

Dabei wird γ -Aminobuttersäure **26** anstelle von Glycin verwandt und in der ersten Stufe zum Ethylester-Hydrochlorid **27** umgesetzt (siehe Abbildung 36). Dieses wird mit Ethyl-2-isothiocyanatoacetat **15** zum

V19

intermediären Thioharnstoff **28** kondensiert, welcher wie **24** zum entsprechenden Thiohydantoin **29** zyklisiert.

Den 4-Aminobuttersäureethylester aus seinem Hydrochlorid **27** zu befreien, um ihn in der Synthese einzusetzen, ist nicht möglich. Es erfolgt sofort intramolekularer Ringschluß zu seinem Lactam, dem Pyrrolidin-2-on, welches zwar nicht aufgereinigt, aber magnetresonanzspektroskopisch nachgewiesen wird.

Diese *intramolekulare* Reaktion ist eine *5-exo-trig*-Reaktion und damit nach den Baldwin-Regeln^[45] besonders günstig.

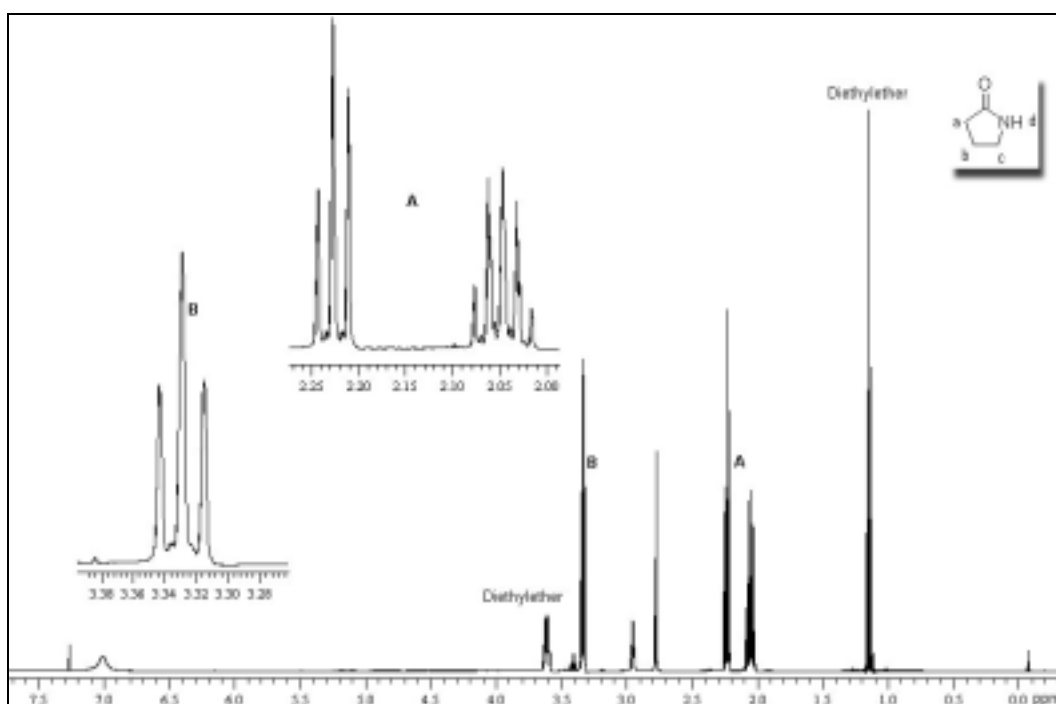
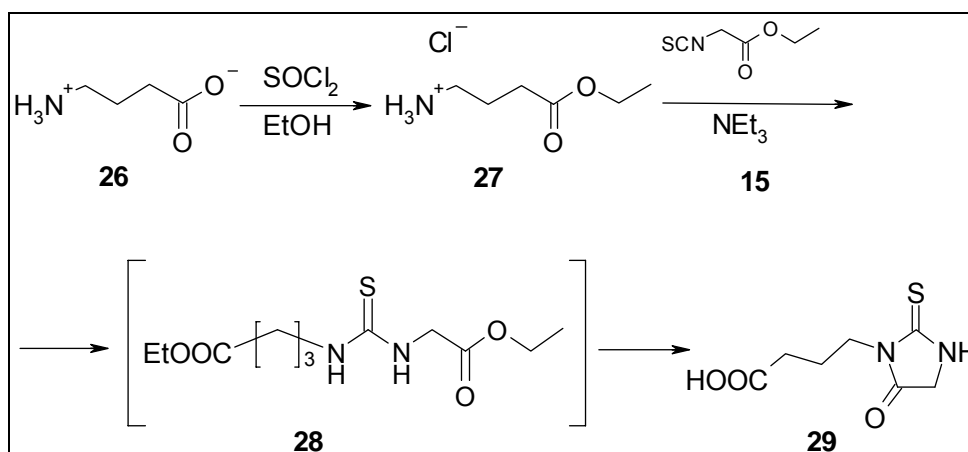


Abbildung 35: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) von Pyrrolidin-2-on, Nebenprodukt in V18

Tabelle 8: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) von Pyrrolidin-2-on

Verschiebung δ / ppm	Multiplizität	Kopplungskonstante J / Hz	Intensität	Zuordnung
2.05	tt	$^3J_{b,a} \approx ^3J_{b,c} = 7.5$	2 H	b
2.23	t	$^3J_{c,b} = 7.8$	2 H	c
3.33	t	$^3J_{a,b} = 7.0$	2 H	a
7.00	s		1 H	d

Aus diesem Grund wird **27** direkt mit **15** umgesetzt. Die Erzeugung des freien Amins erfolgt *in situ* durch Zugabe von Triethylamin als Base. Der Thioharnstoff wird nicht isoliert. Man kann den Ethylester des Thiohydantoin isolieren (s. **V16**, S. 175), er wird jedoch wie **24** in **V14** sofort im sauren Milieu verseift.

Abbildung 36: Darstellung von Thiohydantoyl-buttersäure **29**

Man kann das Isothiocyanat **15** auch direkt mit γ -Aminobuttersäure **26** umsetzen, ohne den Umweg über den Ethylester **27**. Dabei muß die Aminogruppe der γ -Aminobuttersäure **26** jedoch deprotoniert sein. Dies erreicht man durch Zugabe einer Base. Diese sollte nicht zu stark sein, da sonst Verseifung des Esters **15** erfolgt, was möglicherweise den Ringschluß zum Thiohydantoin erschwert. Desweiteren ist mit Deprotonierung am α -C der Estergruppe und damit mit Nebenreaktionen zu rechnen. Als Base wird also Natriumhydrogencarbonat

V20

gewählt, was zu Löslichkeitsproblemen führt. Als ideales Lösungsmittel ergibt sich ein Gemisch aus Wasser und Ethanol. Durch diese Syntheseführung wird zwar eine Stufe gespart, die Ausbeute ist jedoch deutlich geringer. Selbst wenn man das recht reine Rohprodukt für weitere Umsetzungen verwendet, kann man nur mit einer Ausbeute von 20 % rechnen. Möglicherweise ist **26** unter diesen Bedingungen nicht ausreichend deprotoniert. Demgegenüber steht eine Gesamtausbeute über alle Stufen nach der Reaktionsführung von **V16** von 55 %.

V21

Beide Thiohydantoin-Endgruppen werden mit 6-Diethylamino-benzofuran-2-carbaldehyd **5** zu den Fluorophoren **30** und **31** (Abbildung 37) umgesetzt.

V22

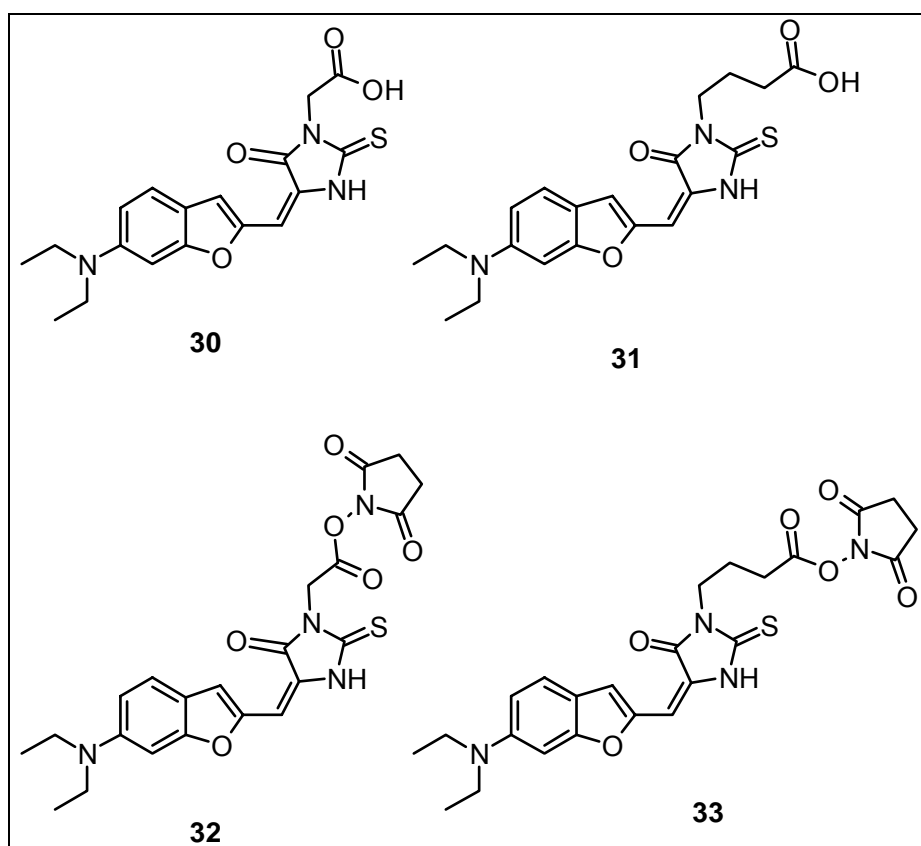


Abbildung 37: Fluorophore mit Carboxylseitenkettenvariation und ihre Succinimidylester

Die Aktivierung der Carboxylgruppen zur Bindung an Proteine erfolgt durch Umsetzung zu den Succinimidylestern **32** und **33**. In dieser Form reagiert der Fluorophor mit Hydroxy-, Mercapto- oder

Aminoresten von Proteinen zu den entsprechenden Estern, Thioestern und Amidien. Letztere sind die stabilsten Produkte.

Daß die Bindung an die Proteine erfolgt, wird durch das Pharmazieforschungszentrum der Bayer AG bestätigt. Dazu wird der Fluorophor mit Protein umgesetzt und dieses dann durch Gelelektrophorese aufgereinigt. Dabei trennt sich nicht umgesetzter Farbstoff vom Protein. Die gereinigte Proteinfraction zeigt die Fluoreszenz des Farbstoffs, dies ist nur durch kovalent gebundenen Fluorophor zu erklären. Ob durch die Verlängerung der Carboxylseitenkette Vor- oder Nachteile entstehen, ist nach praktischen Test der Bayer AG nicht bekannt.

Die Umsetzung zum Succinimidylester ist nicht trivial. Die relativ polaren Carboxyl-Farbstoffe **30** und **31** lösen sich nur in sehr polaren Lösungsmitteln. In wasserfreiem Ethanol ist die Löslichkeit nicht sehr gut. Dies führt zu geringer Ausbeute, welche außerdem darauf zurückzuführen ist, daß sich die Carbonsäure des Farbstoffs nicht vollständig gelöst hat oder daß der bereits dargestellte Succinimidylester sich mit Lösungsmittel oder Wasserspuren bei der Aufarbeitung umsetzt. Ein nicht zu vernachlässigender Ausbeuteverlust dürfte bei der Säulenchromatographie entstehen. Hier werden technische Lösungsmittel eingesetzt. Das Kieselgel selbst ist sicher nicht frei von Wasserspuren. Zudem ist Kieselgel leicht sauer, was die Verseifung des sehr labilen Esters noch beschleunigt.

V23**V24**

4.2.4 Einführung von hydrophilen Gruppen zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit

Eine weitere Syntheseherausforderung ist, die Wasserlöslichkeit herbeizuführen. Diverse elektrisch neutrale und ionische funktionelle Gruppen sind denkbar.

Positiv geladene Reste sind ungeeignet, da sie bei Messungen in biologischen Systemen Schwierigkeiten verursachen können. So ist zum Beispiel bekannt, daß sich positiv geladene Farbstoffionen an Mitochondrien akkumulieren.

Eine zweite Carboxylgruppe scheidet aus; selektiv nur eine der beiden zum Succinimidylester umzusetzen ist schwierig. Es dürfen keinesfalls beide als aktiver Ester vorliegen, da sie sonst vermutlich gleichzeitig an das Protein gebunden werden, wodurch die Wasserlöslichkeit nicht gegeben ist.

Die Natur bedient sich häufig der Glykosidierung um Metabolite wasserlöslich zu machen. Saccharide, also Polyalkohole als Reste erschweren die Synthese jedoch sehr. Darüberhinaus ist die Gefahr sehr groß, daß bei Aktivierung der Carbonsäurefunktion intermolekulare Ester entstehen.

Als Funktionelle Gruppe in wasserlöslichen organischen Farbstoffen sind Sulfonsäuren seit langem bekannt. Sie liegen unter physiologischen Bedingungen als Säureanion vor, handelsübliche Farbstoffe tragen sie oft als Kaliumsalz. Da Sulfonsäuren starke Säuren sind, sind ihre Alkalisalze neutral, das Sulfonat ist unreaktiv. So bietet sich diese funktionelle Gruppe idealerweise an, die Hydrophilie der Modellchromophoren zu erhöhen.

Die Überlegungen zur Einführung des Sulfonatrestes sind ähnlich denen der Einführung der Carboxylgruppe. Der günstigste Fall wäre des bereits wasserlöslichen Benzofuran-Teilchromophors. Da es sich hierbei um ein aromatisches System handelt, wird zunächst versucht, die Sulfonsäure in für diese Verbindungsklasse üblichen Reaktionen einzuführen.

4.2.4.1 Versuche zur direkten Sulfonierung von 6-Diethylamino-benzofuran-2-carbaldehyd 5

Eine Standardmethode zur Sulfonierung von Aromaten ist, diese mit Oleum in konzentrierter Schwefelsäure umzusetzen. Nach der Vorschrift von R. CHILD^[46], der so 2-Methoxyanilin (*o*-Anisidin) sulfoniert, kann jedoch kein Sulfonsäurederivat des Benzofurans **5** gewonnen werden. Da die Bedingungen bei dieser Vorgehensweise sehr extrem sind, ist dies nicht überraschend.

Eine zweite Möglichkeit ist die Verwendung von Chlorsulfonsäure als Sulfonierungsreagenz. Hierbei entsteht

üblicherweise zunächst das Sulfonsäurederivat, das dann im Überschuß von Chlorsulfonsäure mit dieser wiederum reagiert, wobei Schwefelsäure und Sulfochlorid entsteht (Substitution einer OH-Gruppe durch Chlorid). Sulfochloride sind im Gegensatz zu Sulfonsäuren nicht wasserlöslich. Sie hydrolysieren sehr viel langsamer in Wasser als Carbonsäurechloride, weshalb ihre Isolierung leichter fallen sollte. Die Reaktion wird nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift des *Organikum*^[47] für reaktionsfähige Aromaten durchgeführt. Die Reaktionsführung erfolgt erst bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, dann bei Raumtemperatur. Das Produkt kann aber weder als Sulfochlorid isoliert werden noch als Sulfonsäure nach Hydrolyse durch Aussalzen oder Chromatographie an Kieselgel 60.

Möglicherweise ist das aromatische System nicht reaktiv genug, daher wird in einer Durchführung des Experiments die Reaktionstemperatur von Raumtemperatur auf Siedehitze (es wird in Chloroform gearbeitet) erhöht. Jedoch führt auch dies nicht zum Erfolg.

R. J. W. CREMLYN und R. HORNBY^[48] beobachten 1969 auch bei meta-substituierten Anisolen (Methoxybenzole), daß sie bei Chlorsulfonierung bei Eiskühlung nur sehr schlechte Ausbeuten erhalten, bei höheren Temperaturen starke Zersetzung eintritt. Während hingegen ortho- und para-substituierte Anisole in wenigen Minuten bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ sehr hohe Ausbeuten ergeben. Die Umsetzung von *m*-Methoxyacetanilid **34** erfolgt sogar nur bis zur Sulfonsäure, nicht zum Sulfochlorid. Auch wenn man einen quantitativen Vergleich nicht ziehen kann, so ist die Grundstruktur doch eine sehr ähnliche bei Substanz **5**.

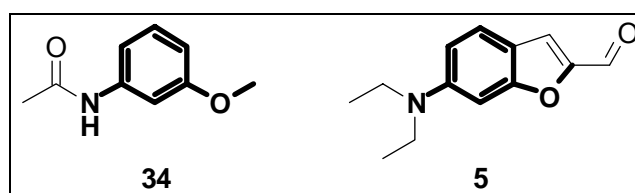


Abbildung 38: Strukturähnlichkeiten bei *m*-Methoxyacetanilid **34** und dem Benzofuran-Teilchromophor **5**

So ist durchaus bei beiden Systemen eine sterische Hinderung an der möglichen Substitutionsstelle in *para*-Position zum phenolischen Sauerstoff in **34** bzw. zum Furan-Sauerstoff in **5** offensichtlich.

A. P. TERENT'EV und L. A. KAZITSYNA^[49] stellen eine sehr schonende Methode der Sulfonierung mit Pyridin-Schwefeltrioxid vor, die bei säureempfindlichen Substanzen empfohlen wird. Da von Furan und seinen Homologen bekannt ist, daß sie bei Säureeinwirkung leicht Harze bilden, wie auch Terent'ev und Kazitsyna feststellen, ist der unbefriedigende Ausgang obiger Versuche nicht erstaunlich. Terent'ev und Kazitsyna beobachten auch, daß Acetylfuran unter Einwirkung von Schwefelsäure und Oleum in Dichlorethan Dunkelfärbung zeigt.

Dagegen erhitzen sie Benzofuran (Cumaron) mit der dreifachen molaren Menge Pyridin-Schwefeltrioxid auf 100 °C für 10 h im Autoklaven. Nach Aufarbeitung erhalten sie quantitativ das Bariumsalz des Sulfonsäurederivats. Wenngleich sie keine Angaben über die Substitutionsposition machen, so ist doch anzunehmen, daß sie an C2 erfolgt, also in Nachbarschaft zum Sauerstoff des Benzofurans. Im allgemeinen ist dies die reaktivste Stelle im Molekül. Diese Position ist im Chromophor **5** jedoch belegt durch die Aldehydgruppe.

Furfural (Furan-2-carbaldehyd) reagiert laut der Autoren überhaupt nicht mit dem Sulfonierungsreagenz^[50].

Auch Substanz **5** wird mit Pyridin-Schwefeltrioxid im Autoklaven umgesetzt. Es wird in Substanz im Autoklaven für 10 h auf 100 °C erhitzt. Das Produkt kann jedoch nicht isoliert werden. Bei Wiederholung werden die Reaktionsbedingungen variiert, es wird als Lösungsmittel Dichlorethan zugegeben. Auch hier wird das Produkt nicht isoliert. Auf die Vermutung hin, daß die Reaktionsbedingungen zu destruktiv sind, wird die Reaktion in Dichlormethan für 3 d bei Raumtemperatur durchgeführt. In diesem Fall kann zumindest das Edukt leicht verunreinigt nachgewiesen werden. Sulfoniertes Benzofuran wird jedoch auch hier nicht erhalten.

Zusammenfassend läßt sich der Schluß ziehen, daß der empfindliche Benzofuran-Chromophor **5** je nach Reaktionsbedingung

von den gewählten Reagenzien entweder nicht angegriffen oder zerstört wird. Damit wird die direkte Sulfonierung als Möglichkeit der Erhöhung der Hydrophilie ausgeschlossen.

*4.2.4.2 Einführung der Sulfonsäuregruppe in 6-Diethylamino-benzofuran-2-carbaldehyd **5** als Seitenkette*

Da die Sulfonierung des aromatischen Systems unmöglich ist, sollen im folgenden die Versuche dargestellt werden, die Sulfonsäuregruppe in den Alkylrest an der Aminogruppe des Benzofuran-Chromophors einzuführen. Die Durchführbarkeit dieser Reaktion ist ähnlich aussichtsreich wie die Einführung der Carboxylfunktion als Seitenkette (siehe Kapitel 4.2.3.1 Einführung der Carboxylgruppe in den Benzofuran-Teilchromophor, Seite 53). Die Versuche fanden aber zeitgleich mit diesen statt, so daß aus ihnen noch keine Lehre gezogen werden konnte. Sie sollen hier der Vollständigkeit halber aufgeführt werden.

Genauso wie α -Halogen-carbonsäureester mit der Aminogruppe umgesetzt werden können, sollte auch ein Natrium 2-Bromethylsulfonat reagieren können. Dazu wird 3-Aminophenol **18** mit zwei Äquivalenten von Natrium 2-Bromethylsulfonat in Wasser für 15 h zum Rückfluß erhitzt. Nach Aufarbeitung läßt sich eine wasserlösliche Substanz isolieren. Sie ist aber durch Auskochen und Umkristallisation nicht so aufzureinigen, daß anhand des Protonenresonanzspektrums entschieden werden kann, ob der Umsatz stattgefunden hat.

Die Reaktion wird analog der Vorschrift von B. RAMAMURTHY und M. V. BHATT^[51], die Naphtylalanin mit Ethyl 2-Brompropionat in Gegenwart von Natriumacetat in Wasser umsetzen, wiederholt. 3-Aminophenol **18** wird dazu mit dem 2-Bromethylsulfonsäuresalz (2 Äquivalente) in Gegenwart von Natriumacetat (3 Äquivalente) in DMF und Wasser für 2.5 h auf 90 °C erhitzt. Natriumacetat soll dabei entstehende Bromwasserstoffsäure abfangen, die die Aminogruppe protoniert und damit der Reaktion entzieht. Aufgrund der hohen Salzfracht ist die Isolation schwierig. Laut ¹H-NMR kann nicht entschieden werden, ob und in welchem Maße ein Umsatz

stattgefunden hat. Laut FAB-Massenspektrum ist das Produkt (Monosubstitution, $m/z = 369$) aber zumindest enthalten.

Die Reaktion wird mit stärkerer Base wiederholt, es werden aber nur zwei Äquivalente Natriumhydroxid und Wasser als Lösungsmittel eingesetzt. Es wird für 20 h zum Sieden erhitzt, die Reaktionskontrolle erfolgt durch Dünnschichtchromatographie (Kieselgel 60, Dichlormethan/Methanol = 8:1). Nach Neutralisation erfolgt Aufarbeitung und Reinigung durch mehrfaches Auskochen und mehrfache Umkristallisation. Laut $^1\text{H-NMR}$ ist Monosubstitution erfolgt, gleichzeitig scheint auch Eliminierung an der Bromsulfonsäure eingetreten zu sein. Natriumhydroxid ist also eine zu starke Base und ungeeignet.

Ein deutlich reaktiveres Reagenz als Sulfongruppen tragende Alkylbromide sind Sultone. Bei Reaktion von **18** mit Propylsulton (1,2-Oxathiolan-2,2-dioxid) in Butanol nach der Vorschrift von I. ZEID und I. ISMAIL^[52] wird in einem nucleophilen Angriff der Aminogruppe der Ring geöffnet, wobei die entsprechende 3-Aminopropylsulfonsäure resultiert. Auf diese Weise gelingt es, das monosubstituierte Sulfonsäurederivat von Aminophenol **36** darzustellen. Allerdings entstehen auch geringere Mengen eines Produkts, das ebenfalls an der phenolischen Hydroxygruppe substituiert wurde.

V25

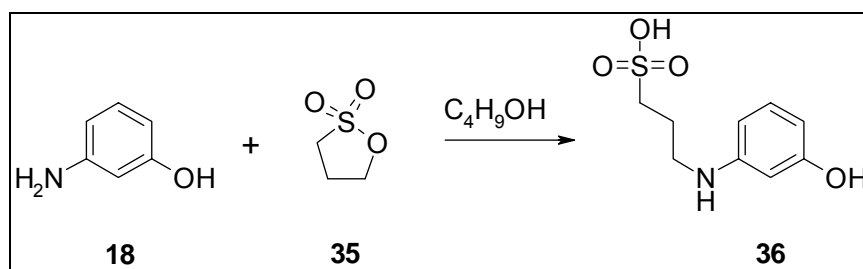


Abbildung 39: Alkylsulfonierung von 3-Aminophenol **18**

Die Aufreinigung von Sulfonsäuren ist grundsätzlich problematisch, auch wenn nur geringe Mengen Nebenprodukt entstehen, wie bei der vergleichsweise sauber verlaufenden obigen Reaktion. Da die Aminophenole sehr oxidationsempfindlich sind, besonders die an der Aminogruppe alkylierten Derivate, ist die

Aufreinigung in späteren Reaktionsschritten kaum mehr möglich. Die in jedem weiteren Schritt entstehenden Nebenprodukte (vor allem *Williamson-Veretherung*, *Vilsmeier-Reaktion*), sind sehr polar und daher von den polaren ionischen Sulfonsäuren auf herkömmlichem Wege nicht mehr zu trennen. Ein Ausweg besteht in der Verwendung von *Reverse-Phase-Kieselgel*. Diese stationäre Phase ist unpolar, die Affinität von polaren Substanzen ist also gering, als mobile Phase werden polare Lösungsmittel wie Methanol, Wasser und ähnliche und deren Gemische verwendet. Die ausgiebige Verwendung von diesem Säulenmaterial ist allerdings sehr kostenintensiv. Daher verbietet sich, eine Synthesestrategie, bei der von den ersten Syntheseschritten an auf diese Möglichkeit zurückgegriffen werden muß.

Nach der Sulfonierung des Aminophenols muß die Veretherung mit Bromacetaldehyddiethylacetal erfolgen. Da hier längere Zeit (100 h) auf 100 °C erhitzt wird, entstehen auch unter Argonatmosphäre eine relativ große Menge Nebenprodukte, vor allem Oxidationsprodukte. Über die Nebenprodukte, die bei der Vilsmeier-Formylierung entstehen, wurde bereits diskutiert (siehe Abbildung 18, Seite 37). Daher ist die Aufreinigung unmöglich oder nur mit größtem Aufwand zu erzielen, so daß der Erfolg dieser Reaktionsschritte analytisch nicht mehr überwacht werden kann.

Da auch auf den finanziellen Aspekt der Synthese geachtet werden muß, werden weitere Untersuchungen abgebrochen.

Das Fazit ist also, daß die Sulfonsäuregruppe möglichst spät in der Synthese eingeführt werden muß.

Eine Möglichkeit wäre, die Sulfonsäuregruppe wie die Carboxylgruppe in der C-H-aciden Endgruppe des Fluorophors einzubringen. Dabei darf die reaktive Methylengruppe des auxochromen Heterocyclus nicht substituiert werden, da sie ja zur Verknüpfung mit dem Benzofuranchromophor dient. Die Sulfonsäure müßte also beim Aufbau der Heterozyklen eingeführt werden. Hier bietet sich der Thiohydantoinring **9** an, der noch eine unsubstituierte NH-Gruppe trägt.

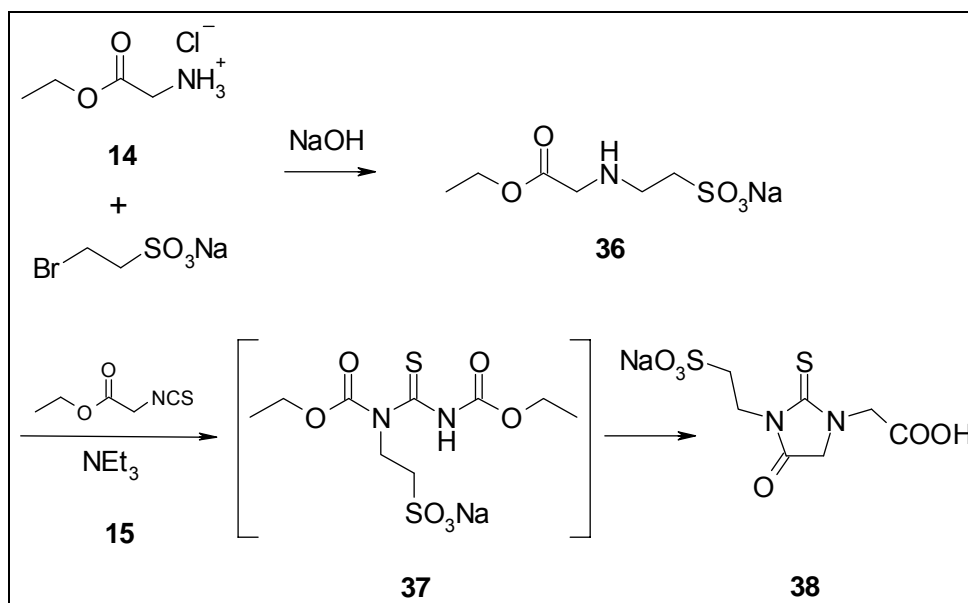


Abbildung 40: Thiohydantoin mit Sulfonatseitenkette

Eine mögliche Syntheseführung ist denkbar (Abbildung 40), aber sie erscheint aus oben genannten Gründen der aufwendigen Aufreinigung bereits nach dem ersten Syntheseschritt ebenfalls als nicht sinnvoll.

Für eine spätere Einführung der Sulfonatgruppe an der Aminogruppe des Benzofurans, müßte letztere vor dem Aufbau des Chromophors selektiv geschützt werden, so daß sie, ohne Schaden für den Chromophor wieder entfernt werden kann. Über diese Möglichkeit wurde ebenfalls bereits nachgedacht, aber als ungünstig verworfen (siehe Seite 55).

Aus diesem Grund soll untersucht werden, ob durch Modifikation des Benzofuranchromophors eventuell Bedingungen für eine spätere Nucleophile Substitution durch ein Sulton geschaffen werden können.

4.2.4.3 Modifikation des Benzofuran-Teilchromophors I

Eine funktionelle Gruppe, die ähnlich reaktiv ist wie eine Aminogruppe, aber ohne Aufwand mit Schutzgruppen versehen werden kann, die ausreichend stabil und doch einfach entfernbar sind, ist die phenolische Hydroxygruppe. Wäre also der Chromophor mit einer Hydroxygruppe anstelle der Aminogruppe am Benzofuran versehen, sollte die Einführung der Sulfonsäuregruppe als einer der letzten Schritte der Synthese durchführbar sein.

Zur Darstellung des Benzofuranchromophors begänne man mit Resorcin (3-Hydroxyphenol) statt 3-Aminophenol. Dessen Monoveresterung, z. B. mit Acetylchlorid sollte möglich sein. Ob der Ester die Reaktionsbedingungen bei der Veretherung mit Bromacetaldehyd übersteht, muß das Experiment zeigen. Nach der Vilsmeier-Reaktion kann der Ester verseift werden, sofern dies nicht schon währen der Reaktion erfolgt. Die phenolische Hydroxygruppe des 6-Hydroxybenzofuran-2-carbaldehyds sollte sich dann mit Propylsulton oder ähnlichen Reagentien zum Sulfonalkyl-Ether umsetzen lassen.

Dabei muß jedoch darauf geachtet werden, daß sich die spektroskopischen Eigenschaften nicht ungünstig verändern. Um dies zu überprüfen, wird eine kürzere Syntheseroute gewählt, bei der die neue OH-Gruppe nicht durch eine Veresterung geschützt wird, sondern als Methylether vorliegt(siehe Abbildung 41). Der Methylether **42** als Modellsubstanz sollte mit dem gewünschten Sulfonalkyl-Ether zumindest grob spektroskopisch vergleichbar sein. Ist das Ergebnis ermutigend, kann die Synthese wie oben beschrieben durchgeführt werden.

Dabei geht man ebenfalls von Resorcin **39** aus, das zunächst monomethyliert wird. Dies gelingt nach einer Vorschrift von H. ADKINS^[53] et al. Die Ausbeute (45 %) ist nicht befriedigend, aber für eine Modellsubstanz ausreichend.

V26

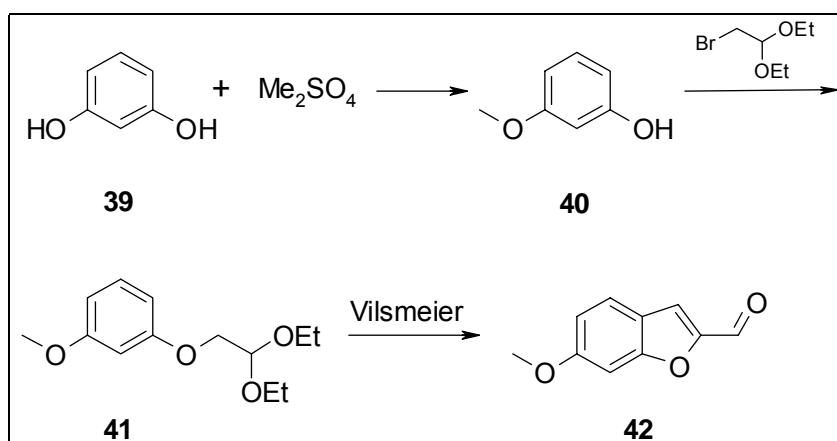


Abbildung 41: Darstellung von 6-Methoxybenzofuran-2-carbaldehyd **42**

V27 Die nächsten beiden Schritte wurden wie auch beim
V28 6-Aminobenzofuran **5** bereits von T. HIROTA et al.^[54] durchgeführt. Die Umsetzung zum zweifachen Ether **41** ist noch mit ähnlicher Ausbeute (57 %) durchführbar wie die erste Synthesestufe. Bei der Vilsmeier-Formylierung allerdings ist die isolierte Substanzmenge (25 %) noch geringer als bei der Formylierung des Aminoderivates nach einfacher Reinigung. Dies kann mit Sicherheit der geringeren Reaktivität des Aromaten zugeschrieben werden.

Der Methoxybenzofuranchromophor **42** absorbiert in Ethanol hypso- und hypochromer (325 nm, $\log \epsilon = 3.45$, Angaben nach T. HIROTA et al.^[54]) als das zuvor dargestellte Aminoderivat **5** (395 nm, $\log \epsilon = 4.37$). In Dimethylsulfoxid wird ein Absorptionsmaximum von **42** bei 328 nm ($\log \epsilon = 4.40$) gemessen. Da **42** kein Merocyanin mehr ist, ist die Solvatochromie wie erwartet geringer.

Daß das Absorptionsmaximum von **42** deutlich zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben liegt, war erwartet. Die 6-Alkoxygruppe in **42** ist ein schwächerer Donor als die 6-Dialkylaminogruppe des Benzofurans **5**. Bei einem schwächeren Merocyanin-Donor müssen andere Merocyanin-Akzeptoren (Auxochrome) zum Einsatz kommen, damit das Absorptionsmaximum im gleichen Wellenlängenbereich bleibt.

Um die spektroskopischen Eigenschaften zu überprüfen, wird **42** mit dem Rhodanin-Heterocyclus, der schon in Substanz **6** Verwendung fand umgesetzt und mit den beiden Kopfgruppen **12** und **25**. Damit ergeben sich die Chromophoren **43** bis **45**.

Die Reaktionen erfolgen im Kleinstmaßstab (0.3 mmol) equimolar in Methanol unter Zuhilfenahme von 1 bis 2 Tropfen Triethylamin als Base. Man läßt 15 h bei Raumtemperatur stehen, dann wird das Lösungsmittel entfernt. Man nimmt mehrfach in Dichlormethan auf und evakuiert, um Reste von Triethylamin zu entfernen. Die Produkte, die laut Dünnschichtchromatographie verunreinigt sind, werden an Kieselgel 60 chromatographisch aufgereinigt.

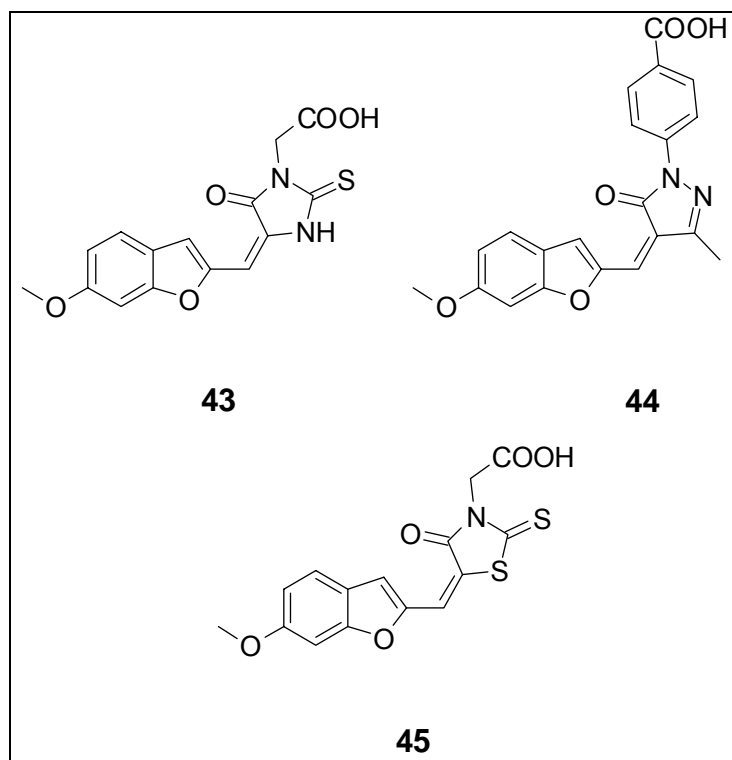


Abbildung 42: Methoxybenzofuran-Modellchromophore

Wie schon der Teilchromophor **42** zeigen auch die Chromophoren **43** bis **45** deutlich hypsochrom verschobene Absorptionsmaxima gegenüber den Chromophoren mit 6-Aminogruppe als Donor des Merocyanins. In Tabelle 9 sind die entsprechenden Chromophorenpaare mit gleichen auxochromen Heterocyclen aufgeführt. Dies ist in Übereinstimmung mit den Erwartungen, die Methoxygruppe ist ein sehr viel schlechterer Donor als die Diethylaminogruppe, die Brooker-Basizität des Merocyanin-Donors (Benzofuran) dürfte deutlich geringer sein. Damit einhergehend ist eine Destabilisierung der dipolaren Resonanzstruktur, eine geringere Symmetrie des Chromophors und Hypsochromie die Folge (siehe auch Seite 46). Dieser Hypsochromie-Effekt durch geringere Brooker-Basizität des Merocyanin-Donors ist umso stärker, je symmetrischer die Farbstoffe sind. Die Farbstoffe höherer Symmetrie einer Homologen Reihe absorbieren bathochromer, d.h. in der Reihe der Dialkylamino-Merocyaninderivate nimmt die Symmetrie und der angesprochene Hypsochromie-Effekt von **9** über **6** nach **7** zu (Verschiebung um ca. 2000, 4000 und 5000 cm^{-1}).

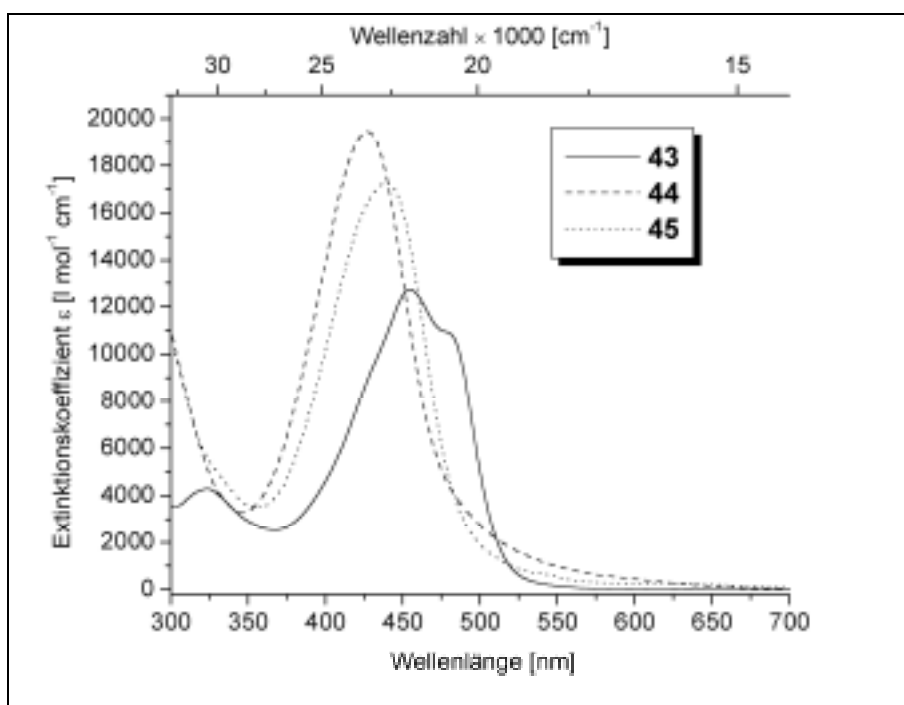


Abbildung 43: Absorbanzen der Methoxybenzofuran-Modellchromophoren (DMSO)

Tabelle 9: Absorbanzen der Methoxybenzofuran-Chromophoren im Vergleich mit denen der Diethylaminobenzofuran-Chromophoren in Dimethylsulfoxid

Substanz	Absorptionsmaximum / nm {Wellenzahlen / cm ⁻¹ }	Extinktionskoeffizient ε / l·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹	Substanz	Absorptionsmaximum / nm {Wellenzahlen / cm ⁻¹ }	Extinktionskoeffizient ε / l·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹
9	503 {19880}	79 700	43	455 {21980}	12 700
6	522 {19160}	23 500	45	439 {22780}	17 300
7	537 {18620}	41 000	44	427 {23420}	19 400

Da nach BROOKER et al.^[34] mit der Abnahme der Symmetrie auch Hypochromie verbunden ist, zeigen auch die dargestellten

Methoxyderivate **43**, **44** und **45** deutlich geringere Extinktionskoeffizienten als die Dialkylaminoderivate **6**, **7** und **9**.

Von der Lage der Absorptionsmaxima her sind die Chromophoren **43**, **44** und **45** nicht sehr gut als BRET-Akzeptoren geeignet, da sie zu stark in der kurzwelligen Flanke der Biolumineszenz-Emission liegen. Dies könnte durch Einsatz anderer Akzeptoren, z. B. des Thio-barbituratcyclus vielleicht behoben werden. Jedoch zeigen alle drei Modellsubstanzen keine Fluoreszenz, was sie für den Einsatz als BRET-Akzeptoren unbrauchbar macht.

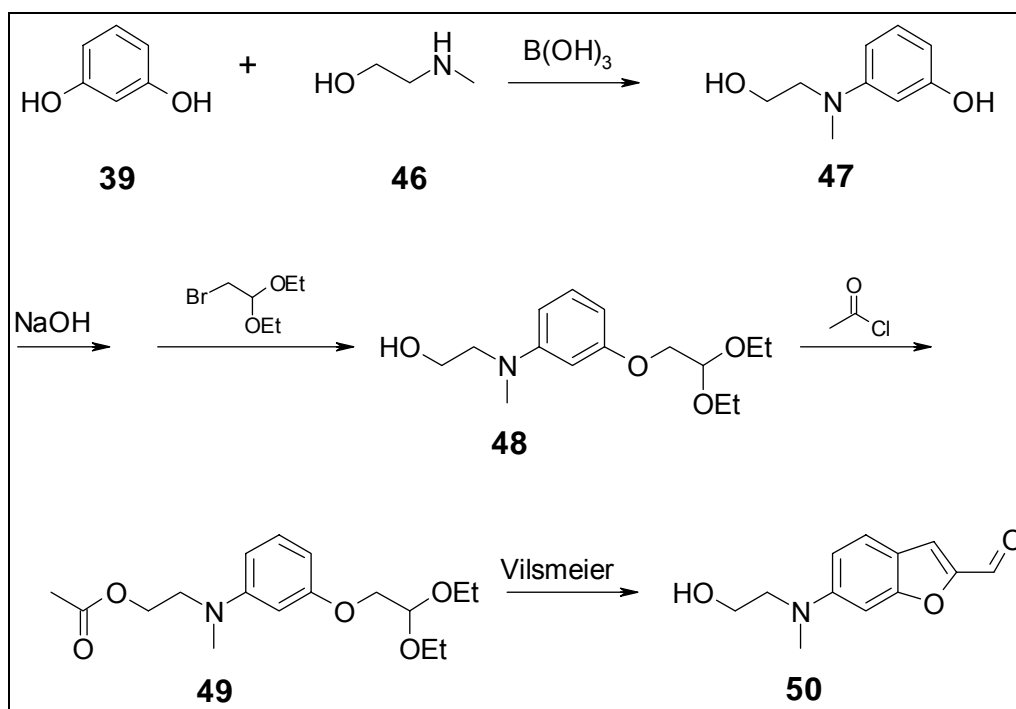
Mit der Veränderung der Donorgruppe des Merocyanins wird also zu stark in die spektroskopischen Eigenschaften der Moleküle eingegriffen. Die Dialkylaminogruppe in 6-Position des Benzofurans muß folglich erhalten bleiben.

4.2.4.4 Modifikation des Benzofuran-Teilchromophors II

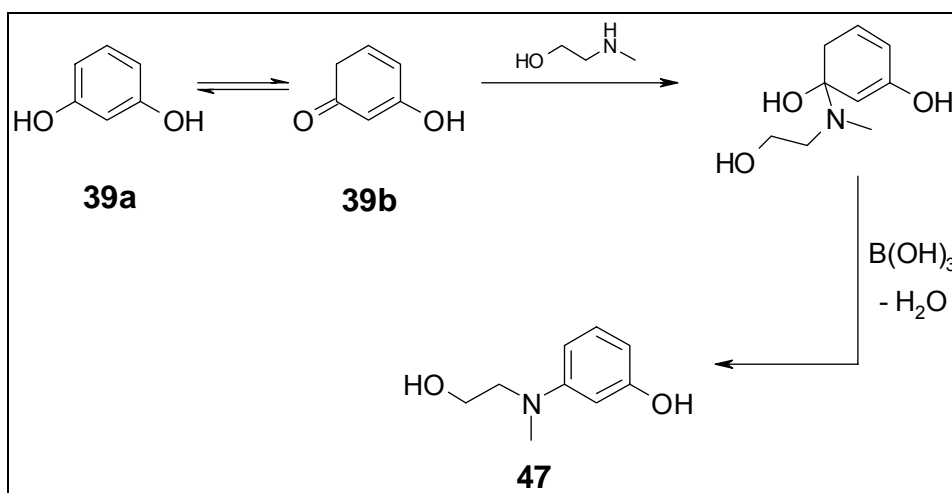
Da die 6-Aminogruppe des Benzofurans erhalten bleiben muß, kann eine Veränderung nur an den Alkylresten der Aminogruppe durchgeführt werden. Hier sollte keine Beeinflussung des farbgebenden Systems eintreten.

Wenn die Hydroxygruppe zur späteren Kopplung mit einem sulfonsäuretragenden Rest nicht als phenolische OH-Gruppe eingeführt werden kann, so möglicherweise in Form einer Alkoholgruppe. Das heißt sie sollte Bestandteil der Alkylgruppen der Dialkylaminogruppe des Chromophors sein.

Die Einführung eines Hydroxyethylrestes an der Aminogruppe des Benzofurans ist möglich. Der Teilchromophor wird dazu aufgebaut, erneut ausgehend von Resorcin **39**.

Abbildung 44: Darstellung des dialkylamino-modifizierten Benzofurans **50****V29**

Dazu wird im ersten Schritt unter Zuhilfenahme von Borsäure mit (2-Hydroxyethyl)methylamin umgesetzt. Formal scheint die Reaktion eine nucleophile Substitution am Aromaten zu sein. Dies ist aber unwahrscheinlich. Eventuell ermöglicht die Borsäure als Katalysator die Bildung des Keto-Tautomers des Resorcins. Dieses reagiert mit dem Amin zum entsprechenden Halbamin. Im nachfolgenden Schritt wird durch Borsäure-Katalyse Wasser eliminiert, wodurch **47** entsteht.

Abbildung 45: Vermuteter Mechanismus der Darstellung von **47**

Die weiteren Schritte sind die gleichen wie beim Aufbau des 6-Diethylaminobenzofuran-2-carbaldehyds **5**. Nach Deprotonierung zum Phenolat mit Natronlauge wird mit Bromacetaldehyd-diethylacetal

V30

zum phenolischen Ether **48** umgesetzt. Auch hier ergibt sich wieder, daß im Kernresonanzspektrum die Methylengruppen **I** enantiotop zueinander sind, aber die geminalen Methylenprotonen einer Ethoxygruppe sind diastereotop zueinander.

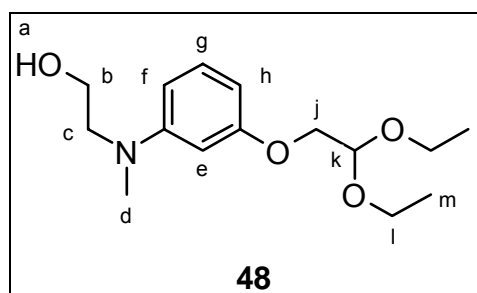


Abbildung 46: Benennung der Protonen von **48**

Allerdings ist die daraus resultierende Multipllett (16 Linien) durch die Signale des 2-Hydroxyethylrestes überlagert. Es handelt sich dabei um das Triplet der Methylenprotonen **b** in direkter Nachbarschaft zur Hydroxygruppe.

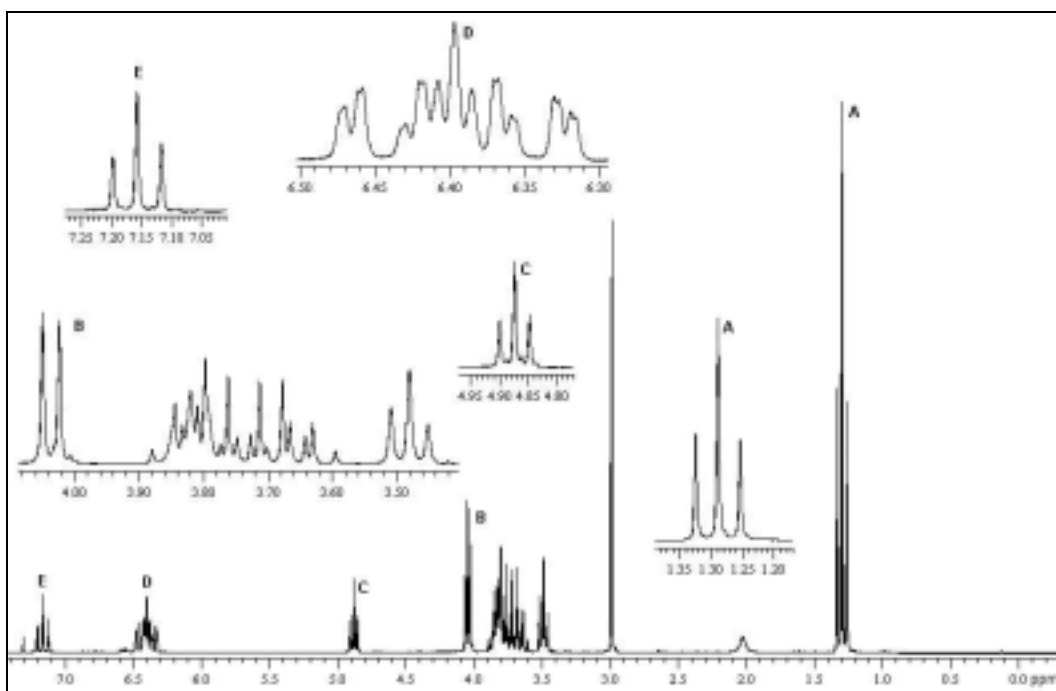


Abbildung 47: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) von **48**

Die Bestimmung der Kopplungskonstanten ist daher nicht trivial.

Bei den oben angesprochenen Signalen handelt es sich um die Signalgruppe zwischen Dublett und Triplet im Ausschnitt **B** des Protonenresonanzspektrums von Substanz **48** (siehe Abbildung 47 und Abbildung 48).

Tabelle 10: $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) von **48**

Verschiebung δ / ppm	Multiplizität	Kopplungskonstante J / Hz	Intensität	Zuordnung
1.29	t	$^3J_{m,l} = 7.1$	6 H	m
2.02	s		1 H	a
2.98	s		3 H	d
3.48	t	$^3J_{c,b} = 5.8$	2 H	c
3.67	dq	$^3J_{l,m} = 7.0$ $^2J_{l1,l2} = 9.4$	2 H	l_1 oder l_2
3.80	dq	$^3J_{l,m} = 7.1$ $^2J_{l1,l2} = 9.4$	2 H	l_1 oder l_2
3.82	t	$^3J_{b,c} = 5.8$	2 H	b
4.25	d	$^3J_{j,k} = 5.2$	2 H	j
4.87	t	$^3J_{k,j} = 5.2$	1 H	k
6.34	ddd	$^3J_{h,g} = 8.0$ $^4J_{h,f} = ^4J_{h,e} = 2.3$	1 H	h
6.40	dd	$^3J_{e,f} = ^3J_{e,h} = 2.3$	1 H	e
6.45	ddd	$^3J_{f,g} = 8.2$ $^4J_{f,e} = ^4J_{f,h} = 2.5$	1 H	f
7.16	dd	$^3J_{g,f} = ^3J_{g,h} = 8.1$	1 H	g

Für die Analyse des Multipletts ist der Bereich B aus Abbildung 47 in Abbildung 48 noch einmal vergrößert dargestellt. Teilweise sind die Signale nicht basisliniengetrennt, dadurch entstehen leichte Abweichungen in den Werten der Kopplungskonstanten.

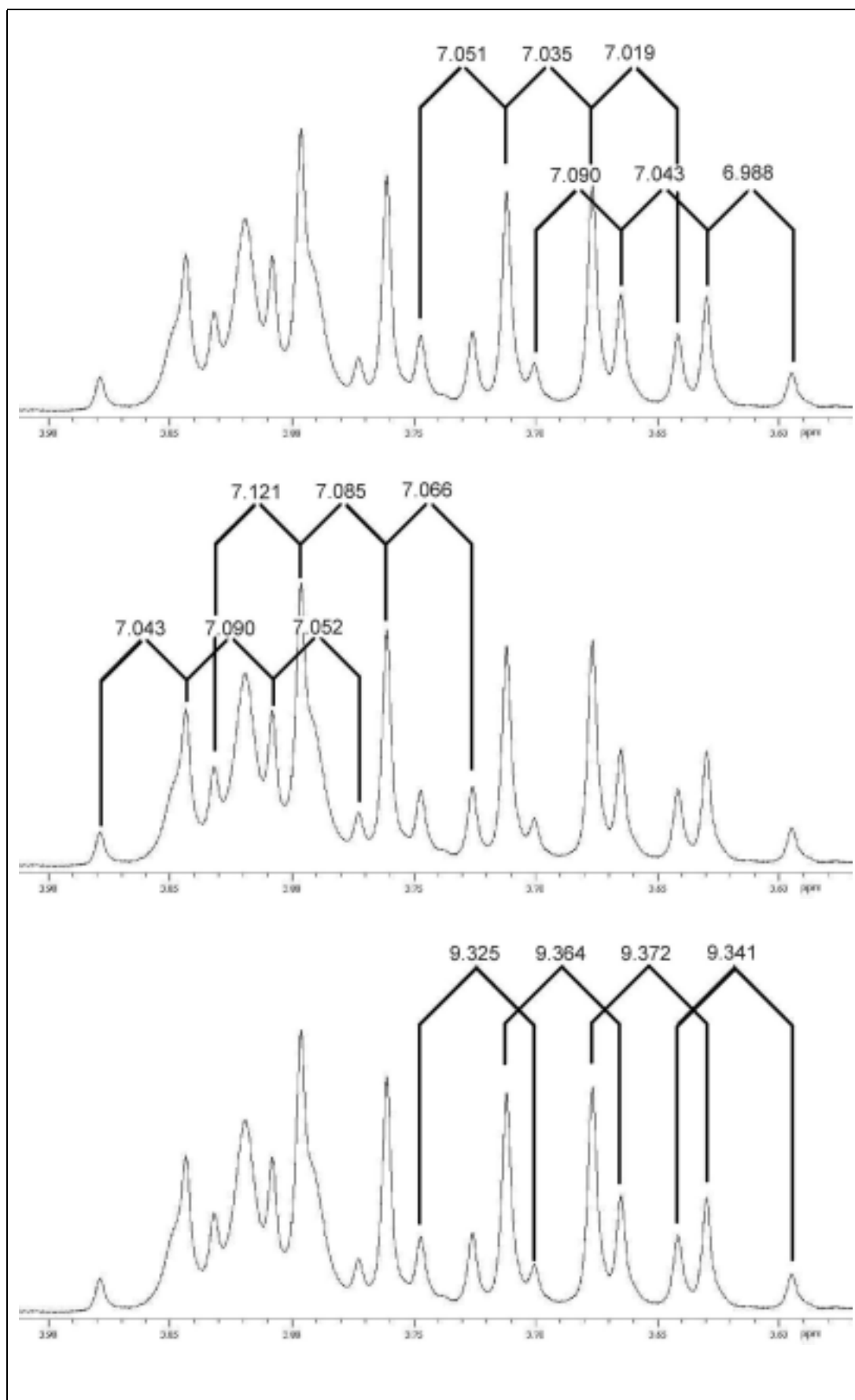


Abbildung 48: $^1\text{H-NMR}$ von **48** - Zuordnung der Signale zu I_1 bzw. zu I_2 mit Kopplungskonstanten (oben und mitte); Kopplungskonstante der geminalen diastereotopen Protonen I_1 und I_2 (unten)

- Vor der Vilsmeier-Formylierung von **48** muß die Hydroxygruppe geschützt werden, da sonst Substitution zum Chlorid eintritt. Als Schutzgruppe wird Acetylchlorid verwendet. Die Veresterung zu **49** erfolgt unter Zuhilfenahme von Triethylamin, um entstehenden Chlorwasserstoff abzufangen. Unter diesen Bedingungen bleibt das Acetal erhalten.
- V31**
- V32** In der Vilsmeier-Reaktion wird dann zum Benzofuran zyklisiert und gleichzeitig der Ester verseift. Man erhält den Teilchromophor **50**.

4.2.4.5 Einführung der Sulfonsäuregruppe mittels Propylsulton

Der Benzofuranchromophor **50** (siehe Abbildung 44) soll nun durch Reaktion mit Propylsulton zum entsprechenden Ether mit Sulfonsäurerest umgesetzt werden. Die neu eingeführte Hydroxygruppe ist jedoch nicht sehr reaktiv. Ohne Hilfsreagentien erfolgt in Butanol kein Angriff am Sultonring. Unter Zuhilfenahme von Butyllithium (Lösungsmittel THF, Aceton/Trockeneis-Kühlung) soll die Hydroxygruppe vor Zugabe des Sultons deprotoniert werden. Dabei wird aber offenbar das Benzofuran zerstört.

Die Merocyanine **6** und **9** sind deutlich stabiler als der Aminobenzofurancarbaldehyd **5**. Die Oxidationsempfindlichkeit ist viel geringer, sie sind auch wesentlich resistenter gegenüber Einwirkung von Säuren und Basen. Es soll daher untersucht werden, ob die Reaktion mit dem Sulton auf der Stufe des fertigen Chromophors gelingt.

- V33** Daher wird der Teilchromophor **50** mit dem Thiohydantoin **25** als auxochromer Kopfgruppe per Knoevenagel-Kondensation umgesetzt. Man erhält das Merocyanin **51**.

- V34** Dieses wird im folgenden Schritt mit Propylsulton umgesetzt. Dazu dient die weniger starke Base Kaliumhydroxid. Es kann der wasserlösliche Fluoreszenzfarbstoff **52** isoliert werden. Da dies der letzte Reaktionsschritt vor der Aktivierung ist, lohnt sich der finanzielle Aufwand RP-Kieselgel einzusetzen, ohne das die Reinigung nicht möglich ist.

Obwohl zwei Äquivalente Sulton und drei Äquivalente Base eingesetzt werden, trägt der Chromophor nur eine Propylsulfonsäuregruppe.

Zu Vergleichszwecken wird auch der Chromophor **30** mit Diethylaminogruppe in dieser Weise zu **53** umgesetzt.

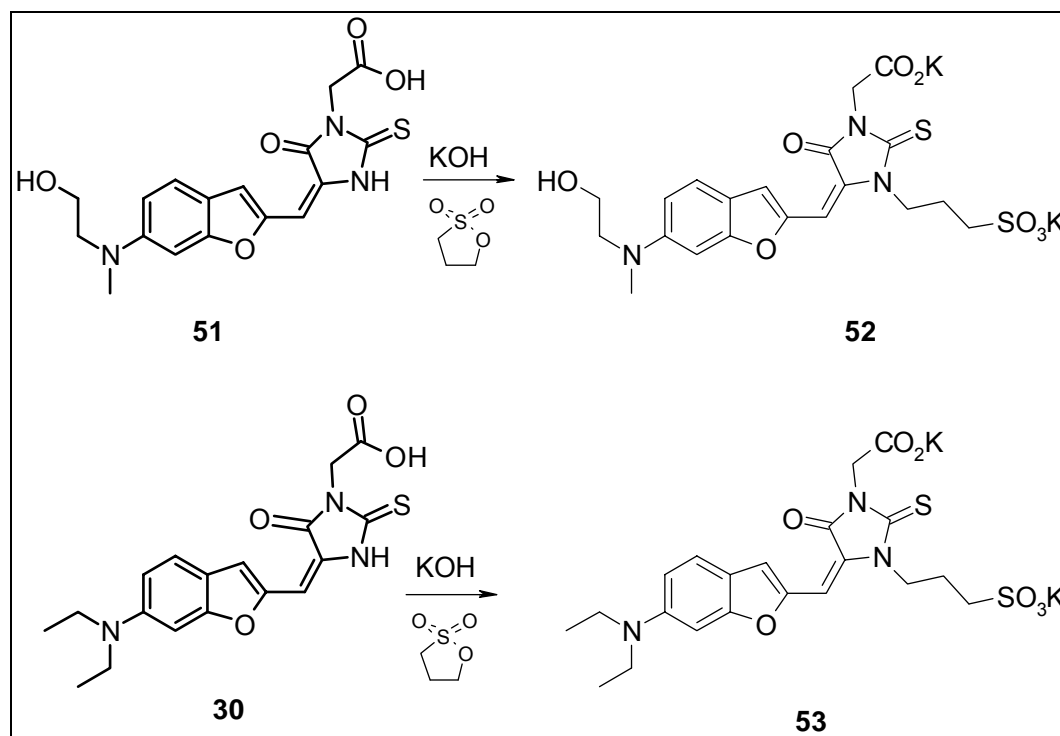
V35

Abbildung 49: Darstellung der wasserlöslichen Chromophoren **52** und **53**

Auch er trägt nach der Reaktion eine Propylsulfonsäuregruppe. Da eine Alkyl-Hydroxygruppe hier fehlt, kann die Substitution nur an der Aminogruppe des Thiohydantoinringes erfolgt sein. Also wird auch Substanz **52** an dieser Stelle und nicht an der eigens dafür eingeführten Hydroxygruppe substituiert sein. Dies wird durch Vergleich der ^1H - und ^{13}C -Magnetresonanzspektren von **52** und **53** bestätigt (siehe V34, S. 219 ff. und V35, S. 221 ff.).

Modellsubstanz **6**, der zweite erfolgsversprechende Chromophor, ist bereits mit Carboxylgruppe als Proteinlinker ausgestattet. Es fehlt jedoch auch hier noch die Sulfonatgruppe zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit. Am Rhodanin-Auxochrom kann sie nicht eingeführt werden, hier ist keine Möglichkeit zur Anbringung weiterer

Substituenten gegeben. Die einzige Möglichkeit ist die Einführung an der Hydroxygruppe des modifizierten Benzofuransystems **50**.

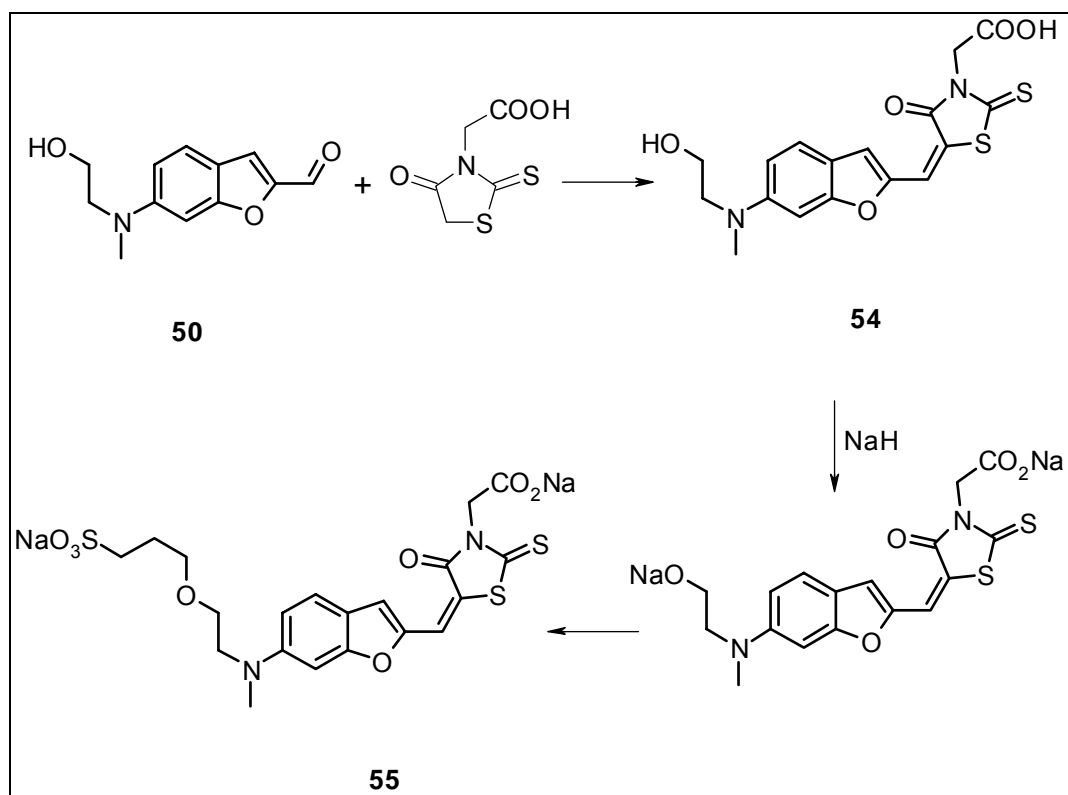


Abbildung 50: Einführung der Sulfonsäuregruppe in Modellchromophor **6**

V36 Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wird **50** mit dem Rhodanincyklus, der bereits in **6** Verwendung fand, zum Farbstoff **54** umgesetzt. Dieser soll an der Hydroxygruppe deprotoniert, dann mit Propylsulton zur Reaktion gebracht werden, um den wasserlöslichen Farbstoff **55** zu erhalten. Damit die Reaktion des Alkoholats mit dem Sulton in hoher Ausbeute verläuft, muß die Deprotonierung vollständig sein. Aus diesem Grund wird Natriumhydrid als Base in Dichlormethan eingesetzt. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur unter Feuchtigkeitsausschluß wird die zu **54** äquimolare Menge Propylsulton zugegeben und weitere 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Es zeigt sich, daß **55** leider nicht erhalten wird. Offensichtlich reagiert das Hydrid nicht oder nur in sehr geringem Maße mit der Hydroxygruppe von **54**, obwohl die doppelte Stoffmenge der Base eingesetzt wird, da ja auch die Carboxylgruppe deprotoniert werden muß. Auf **55** muß als Proteinaffinitätssonde also verzichtet werden.

4.2.5 Spektroskopische Eigenschaften der Chromophore

4.2.5.1 Absorption und Emission

Das Absorptionsmaximum von **54** in Dimethylsulfoxid liegt bei 518 nm ($\epsilon = 8\,200 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Das Emissionsmaximum in Dimethylsulfoxid liegt bei 639 nm, dies entspricht einer Stokes-Verschiebung von 3655 cm^{-1} (120 nm) und einem Abstand von der Biolumineszenz-emission von 5950 cm^{-1} (175 nm). Dies ist zur Unterscheidung von der Biolumineszenz sehr günstig. Allerdings ist der Extinktionskoeffizient ungünstigerweise sehr klein. Desweiteren kann die Wasserlöslichkeit nicht in ausreichendem Maße verstärkt werden. Daher ist **54** als Proteinaffinitätssonde nicht geeignet.

Chromophor **52** wird in verschiedenen Lösungsmitteln spektroskopisch untersucht (siehe auch Abbildung 51).

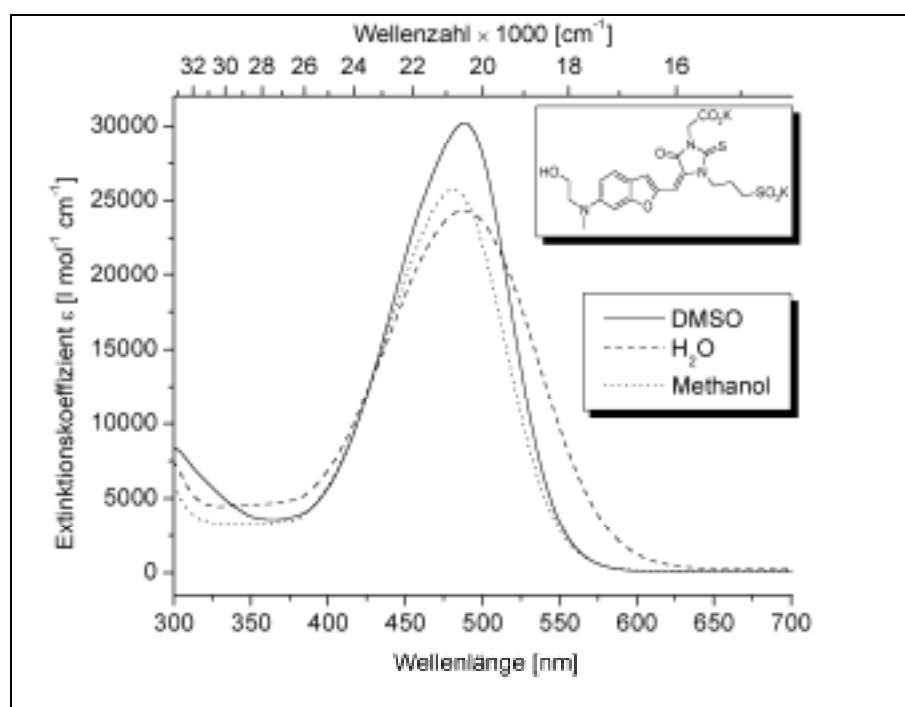


Abbildung 51: Absorbanzen von **52**

Ähnlich wie bei **9** kann für **52** eine hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums bei Erhöhung der Lösungsmittelpolarität, also negative Solvatochromie festgestellt werden. Scheinbar erfolgt beim

Wechsel von Methanol nach Wasser Bathochromie. Da aber die Bande in Wasser deutlich verbreitert ist, wenn auch nicht strukturaufgelöst, wird genau wie bei **9** das Vorliegen von Aggregaten angenommen. Die Monomeren werden in der kurzwelligen Schulter der Absorptionsbande vermutet.

Tabelle 11: Vergleich der spektroskopischen Eigenschaften von **9** und **52**

Lösungs- mittel	E_T^N kcal·mol ⁻¹	λ_{\max} von 9 / nm	λ_{\max} von 52 / nm (ϵ / l·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)
Dichlormethan	0.309 ^[39]	505	
Aceton	0.355 ^[40]	491	
DMSO	0.444 ^[35]	476, (503)	488 (30 200)
Methanol	0.762 ^[36]	-	481 (25 700)
Wasser	1.000 ^[37]	-	489 (24 300)

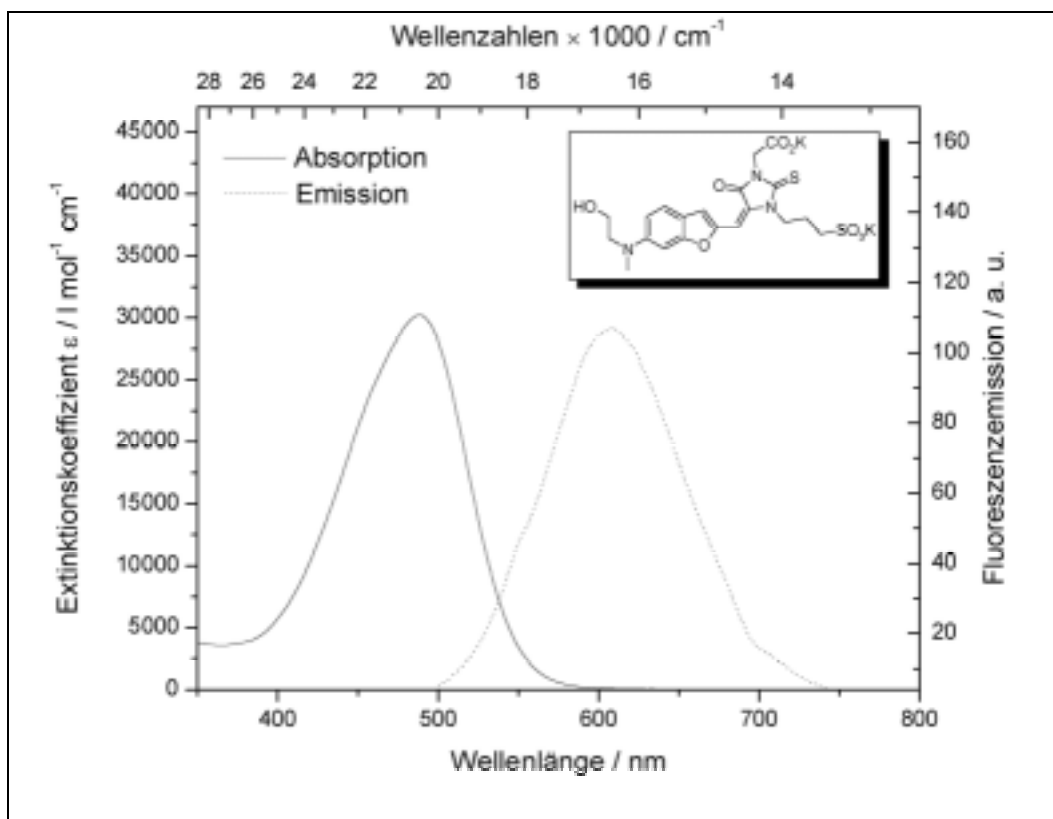


Abbildung 52: Stokes-Verschiebung von **52** in DMSO

Das Fluoreszenzmaximum von **52** liegt in DMSO bei 610 nm. Damit beträgt die Stokes-Verschiebung zwischen Absorptions- und

Fluoreszenzmaximum 122 nm (5000 cm^{-1}). Der spektrale Abstand zum Emissionsmaximum der Biolumineszenz (463 nm) beträgt damit etwa 150 nm (5205 cm^{-1}).

Tabelle 12: Vergleich der spektroskopischen Eigenschaften von **52** und **53**

Lösungs- mittel	E_T^N / $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$	λ_{max} von 52 / nm (ϵ / $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	λ_{max} von 53 / nm (ϵ / $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)
DMSO	0.444 ^[35]	488 (30 200)	494 (28 500)
Methanol	0.762 ^[36]	481 (25 700)	490 (33 200)
Wasser	1.000 ^[37]	489 (24 300)	494 (14 500)

Die Absorption von **53** unterscheidet sich nicht wesentlich von der von **52**, bei Chromophor **53** fällt jedoch sofort auf, daß offensichtlich in wäßriger Lösung mehrere Aggregate vorliegen. Da diese hypsochromer absorbieren, kann man von H-Aggregaten ausgehen. Dies führt zu einer deutlichen Hypochromie und Bandenverbreiterung.

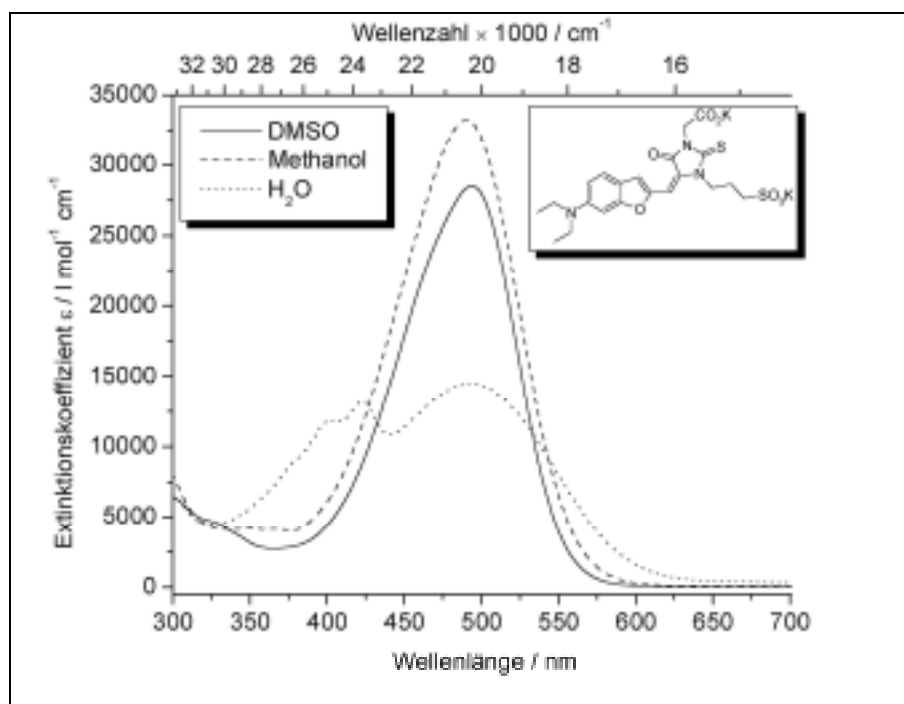


Abbildung 53: Absorbanzen von **53**

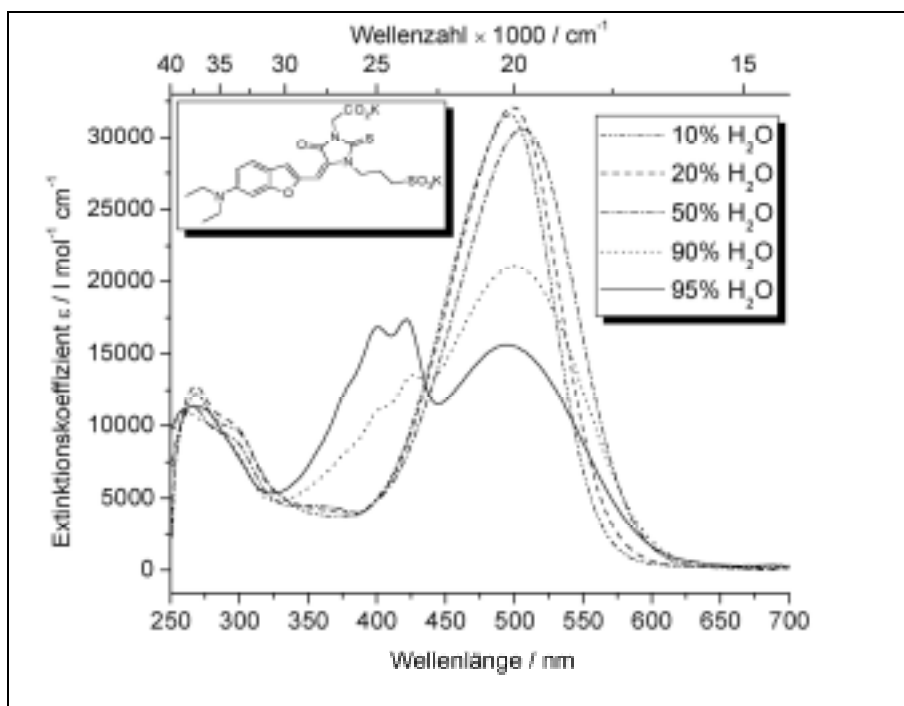


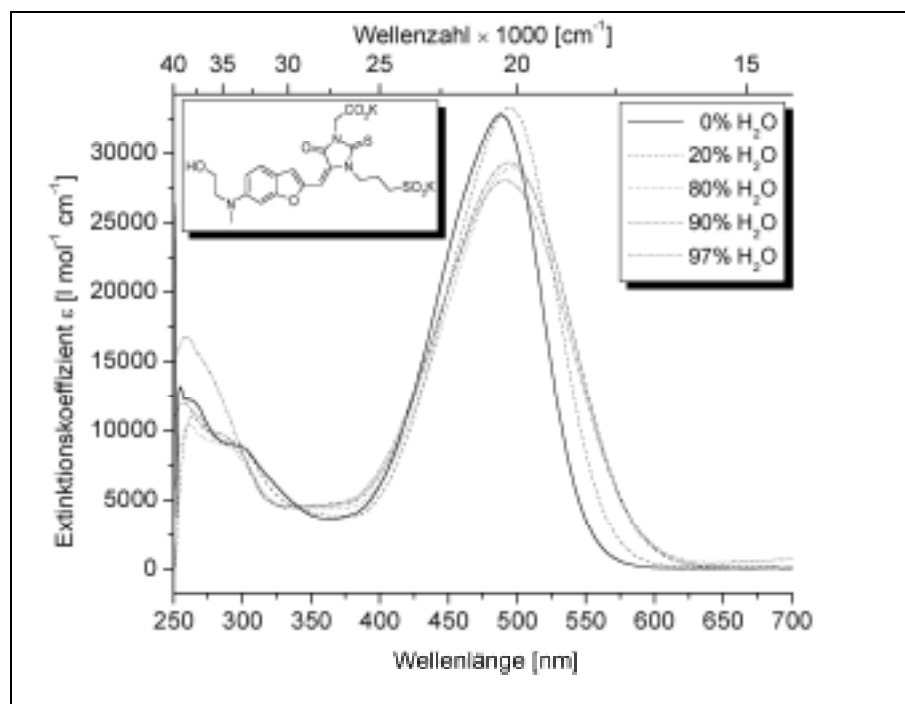
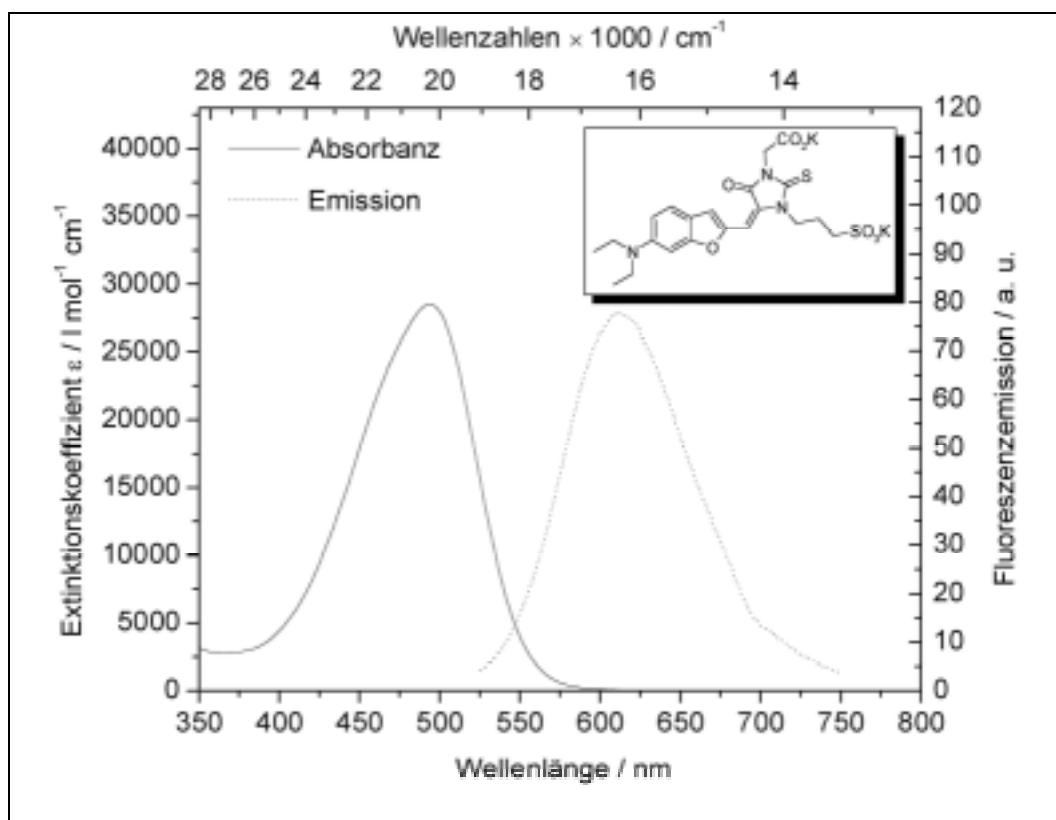
Abbildung 54: Aggregatebildung in Wasser von **53**

Eine Verdünnungsreihe aus Dimethylsulfoxid mit Wasser zeigt, daß die Aggregatebildung erst bei sehr hohem Wassergehalt stattfindet (siehe Abbildung 54).

Interessanterweise zeigt Substanz **52** dieses Verhalten nicht (siehe Abbildung 55). Es ist anzunehmen, daß dies so ist, weil der Hydroxyethylrest an der Aminogruppe von **52**, der einen deutlichen Beitrag zur Wasserlöslichkeit liefert, bei **53** fehlt. **52** trägt an beiden Enden des Moleküls polare Gruppen und hat damit die größere Fähigkeit zur Interaktion mit dem Solvens, zum Beispiel durch Wasserstoffbrückenbindung. **53** hingegen wirkt eher amphiphil. Der Farbstoff besitzt ein Ende, das deutlich hydrophiler ist als der eher lipophile aromatische Teil mit Dialkylaminogruppe.

Das Emmissionsmaximum von **53** liegt wie bei **52** bei 610 nm. Der Stokes-Shift beträgt also 116 nm (3850 cm^{-1}), der spektrale Abstand zur Biolumineszenzemission (463 nm) beträgt ebenso wie bei **52** 150 nm (5205 cm^{-1}).

Damit kann die Fluoreszenz sowohl von **52** als auch von **53** apparativ gut von der Biolumineszenzemission unterschieden werden.

Abbildung 55: Fehlende Aggregatbildung von **52**Abbildung 56: Stokes-Verschiebung von **53**

4.2.5.2 Darstellung der Succinimidylester

Zur Bindung an die Proteine muß die Carboxylgruppe der in Frage kommenden Farbstoffe als Succinimidylester aktiviert werden.

Die Reaktion ist bereits mit den nur eingeschränkt wasserlöslichen Farbstoffen **32** und **33** (siehe Seite 61) durchgeführt worden. Die Umsetzung von **52** und **53** zu den Succinimidylestern und deren Aufreinigung ist jedoch weit schwieriger durchführbar. Als Lösungsmittel eignet sich wasserfreies Dimethylformamid, was jedoch deutlich schwieriger zu entfernen ist als das zuvor verwendete Ethanol. Säulenchromatographische Aufreinigung muß wegen der polaren Sulfonsäuregruppen an RP-18-Kieselgel erfolgen. Dies ist jedoch nicht durchführbar, weil die dort verwendeten Lösungsmittel (Wasser oder Wasser-Methanol) mit dem aktivierten Ester reagieren. Zur Reinigung wird das Rohprodukt in Petrolether ausgekocht. Dieser Reinheitsgrad genügt, da die mit dem Fluoreszenzfarbstoff beladenen Proteine ohnehin gelelektrophoretisch aufgereinigt werden müssen.

Für **52** ergibt sich die Schwierigkeit, daß der Farbstoff selbst eine Hydroxylgruppe trägt, welche intermolekular mit dem Succinimidylester reagieren kann. Der Succinimidylester kann im Rohprodukt massenspektrometrisch nicht nachgewiesen werden. Damit scheidet **52** als geeigneter Farbstoff aus.

Da die Reinigung des aktivierten Esters **56** nicht möglich ist, wird er nach seiner Darstellung indirekt nachgewiesen. Dazu wird der Aktivester in trockenem Dimethylformamid mit Benzylamin zum entsprechenden Amid **57** umgesetzt.

V37

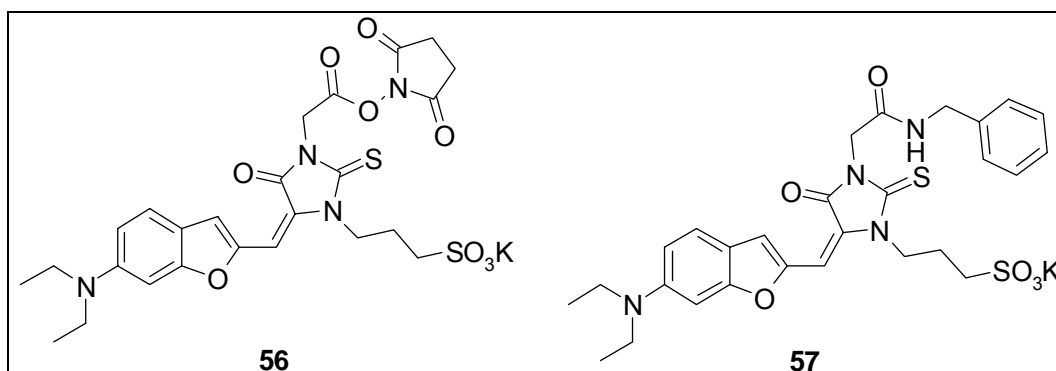


Abbildung 57: Aktivester und Amid von **53**

4.2.5.3 Messung der Quantenausbeute

Die Bestimmung der Quantenausbeute ist durch Relativmessungen möglich. Dabei mißt man gegen einen Standard bekannter Quantenausbeute. Hier wird Fluorescein verwendet. Nach J. N. DEMAS und G. A. CROSBY^[55] ist diese Methode mit optisch verdünnten Lösungen (Absorbanz ≤ 0.05) hinreichend genau.

Die Quantenausbeute für die unbekannte Substanz berechnet sich nach Gleichung 12.

$$\Phi_x = \Phi_r \frac{A_r \cdot E_x \cdot n_x^2 \cdot I(\lambda_r)}{E_r \cdot A_x \cdot n_r^2 \cdot I(\lambda_x)} \quad \text{Gl. (12.)}$$

Φ : Quantenausbeute
 A : Absorbanz bei der Meßwellenlänge
 E : Integral unter der korrigierten Fluoreszenzemissionskurve
 n : Brechungsindex des Lösungsmittels
 I : Intensität des Anregungslichts bei der Meßwellenlänge
 x : zu vermessende Substanz
 r : Referenzsubstanz

Der Quotient der Lichtintensitäten $I(\lambda)$ kürzt sich also aus der Gleichung heraus, wenn Referenzsubstanz und zu vermessende Substanz bei der gleichen Wellenlänge angeregt werden.

Gleiches gilt für den Quotienten der Brechungsindizes n , wenn im gleichen Lösungsmittel vermessen wird. Dies ist hier nicht der Fall, Fluorescein wird in Ethanol vermessen, die synthetisierten Chromophore aber in verschiedenen anderen Lösungsmitteln.

Die Brechungsindizes für die Berechnung haben folgende Werte:

$$\begin{aligned} n_D^{20} \text{ (Ethanol)} &= 1.361 \\ n_D^{20} \text{ (Dichlormethan)} &= 1.424 \\ n_D^{20} \text{ (Aceton)} &= 1.359 \\ n_D^{20} \text{ (Dimethylsulfoxid)} &= 1.478 \end{aligned}$$

Von allen Substanzen werden Lösungen hergestellt, deren Absorbanz bei der Anregungswellenlänge zur Aufnahme der Fluoreszenzspektren (hier 470 nm und 490 nm) unter 0.05 liegt. Von diesen Lösungen

werden Absorptionsspektren aufgenommen, um die Absorbanz bei Anregungswellenlänge genau zu bestimmen.

Das Fluoreszenzspektrum wird aufgenommen, korrigiert und die Fläche unter der Kurve bei Auftragung gegen Wellenzahlen durch Integration bestimmt.

Durch die Korrektur der Spektren wird berücksichtigt, daß die Lichtintensität des Anregungsstrahls eine Funktion der Wellenlänge ist. Die Korrekturkurve erhält man aus der Division des gemessenen Spektrums durch ein literaturbekanntes Spektrum dieser Substanz im gleichen Lösungsmittel. Man dividiert jedes weitere gemessene Spektrum durch diese Korrekturkurve, um das *wahre* Spektrum zu erhalten. Zur Korrektur wurde hier das Fluoreszenzspektrum von Fluorescein in Ethanol^[56] verwendet.

Die Quantenausbeute von Fluorescein in neutraler ethanolischer Lösung ist bekannt. Sie beträgt nach LINDSEY et al.^[56]
 $\Phi_{\text{Fluorescein, Ethanol}} = 0.79$.

4.2.5.3.1 Fehlerquellen

Die Bestimmung von Absolutwerten der Quantenausbeute kann mit relativ großen Fehlern behaftet sein.

Ein Problem ist die Gefahr der Reabsorption, welche umso größer ist, je größer das Überlappungsintegral von Absorptionsspektrum und Emissionsspektrum ist. Sie soll dadurch weitgehend verhindert werden, daß optisch verdünnte Lösungen vermessen werden. Aus diesem Grunde soll die Absorbanz der Chromophorlösung 0.05 nicht übersteigen.

Geringe Fehler entstehen auch bei der Bestimmung der Absorbanz, die Werte sind sehr klein, relativ dazu ist der Untergrund und das Rauschen entsprechend groß.

Während der Messungen erwärmen sich die Spektrometer, was zur Volumenausdehnung der Lösung, also zur Verringerung der Konzentration führt. Da die Verweildauer im Spektrometer und damit die Volumenausdehnung der Lösungen bei allen Messungen weder eines Lösungsmittels und noch weniger für verschiedene

Lösungsmittel exakt gleich ist, entstehen Fehler in Bezug auf die Bestimmung der Absorbanzwerte, aber auch in Bezug auf die Fluoreszenzintegrale. Im Fluoreszenzspektrometer ist eine Kühlung der Meßküvette nicht möglich. Im Falle von Aceton, besonders Dichlormethan besteht die Gefahr der Verdampfung als gegenläufigem Effekt zur Volumenausdehnung.

Nach DEMAS und CROSBY^[55] sind bei ungünstigen Bedingungen Fehler bis zu 20% möglich.

4.2.5.3.2 Diskussion der Werte

Je nachdem, wie sich die an Protein gebundenen Chromophore verhalten, entspricht deren Umgebung eher der in einer wäßrigen, also sehr polaren Lösung oder einer weniger polaren Lösung. Ersteres sollte der Fall sein, wenn der Chromophor senkrecht vom gebundenen Protein abstehend in die Lösung ragt. Abhängig von den Resten der Aminosäuren des Proteins, kann es auch zur Adhäsion des Chromophors an die Proteinoberfläche kommen, was eher unpolare Lösung entsprechen kann. Bei vorhandenen aromatischen Resten ist zum Beispiel π - π -Wechselwirkung möglich. Eine weitere Möglichkeit ist die der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen bei entsprechenden Aminosäureresten.

Aus diesen Gründen werden die Quantenausbeuten in Dimethylsulfoxid ($E_T^N = 0.444 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$), Aceton ($E_T^N = 0.355 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) und Dichlormethan ($E_T^N = 0.309 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) bestimmt (E_T^N -Werte nach Reichardt^[37]). Alle drei Lösungsmittel befinden sich in ihrer Polarität zwischen Wasser ($E_T^N = 1.000 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) und Tetramethylsilan ($E_T^N = 0.000 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$), sind also weder extrem polar, noch unpolar.

Die gemessenen Quantenausbeuten finden sich in Tabelle 13. Es zeigt sich, daß die Quantenausbeuten wie gefordert unabhängig von der Wellenlänge des eingestrahlten Anregungslichts sind, sofern der gleiche Übergang angeregt wird. Im Rahmen der Meßgenauigkeit ist die Abweichung der Werte für **9** in Aceton bei 490 nm bzw. 470 nm

sehr gering. Die Wellenlängenunabhängigkeit der Quantenausbeute ist also hier gegeben.

Die Quantenausbeuten sind für alle drei Derivate des gleichen Grundchromophors in Dimethylsulfoxid sehr klein. Der Wert ist umso geringer, je polarer die Reste am Chromophor sind. Wahrscheinlich eine Folge stärkerer Solvatisierung und damit einhergehender thermischer Desaktivierung des Anregungszustandes statt Fluoreszenzemission. Neben der Polarität trägt die Hydroxyethylgruppe aber auch zur Erhöhung der Freiheitsgrade des Moleküls bei, was ebenfalls die thermische Desaktivierung begünstigt.

Tabelle 13: Quantenausbeuten der Chromophoren

Chromophor	Lösungsmittel	Quantenausbeute (Anregungswellenlänge)
52	Dimethylsulfoxid	2% (490 nm)
52	Dimethylsulfoxid	2% (490 nm)
53	Dimethylsulfoxid	4% (490 nm)
53	Dimethylsulfoxid	4% (470 nm)
9	Dimethylsulfoxid	6% (490 nm)
9	Dimethylsulfoxid	6% (470 nm)
9	Aceton	12% (490 nm)
9	Aceton	15% (470 nm)
9	Dichlormethan	42% (490 nm)

Schon in Aceton sind die Quantenausbeuten deutlich größer, in Dichlormethan wird beinahe die Hälfte der Anregungsenergie durch Lichtemission wieder abgegeben.

Welche Zahlenwerte die Quantenausbeuten unter Meßbedingungen im HTS-Verfahren annehmen, kann nur in der Praxis geklärt werden. Möglicherweise erfolgt hier Fluoreszenzhyperchromie durch Adhäsion an das gebundene Protein und damit Rigidisierung des lichtgebenden Gerüsts, ähnlich wie bei den Potentialsonden (siehe Kapitel 4.3.1, Seite 91). Da die tatsächlichen Gegebenheiten der Umgebung bei Bindung der Chromophore an Proteine in lebenden Zellen durch

Lösungsmittel nur schlecht wiedergegeben werden können, muß die Praxis erweisen, ob die Akzeptor-Chromophore für Proteinaffinitätssonden geeignet sind.

4.3 Derivatisierung von Thiobarbiturat-Oxonolen für den Einsatz als Transmembranpotentialsonden

4.3.1 Problemstellung und allgemeine Synthese

Die wichtigsten geforderten Eigenschaften an Moleküle, die als Potentialsonden fungieren sollen, wurden bereits in der Einleitung genannt (siehe Kapitel 3.1.3). Neben den spektroskopischen Voraussetzungen ist vor allem die Wasserlöslichkeit wichtig. Da die Moleküle zur Detektion von Membranpotentialänderungen von lebenden Zellen eingesetzt werden sollen, dürfen sie aus wässriger Lösung nicht ausfallen. Eine gewisse Polarität sollte also vorhanden sein. Andererseits darf der Farbstoff aber auch lipophile Eigenschaften nicht vollständig vermissen lassen. Auf dem Weg in die Zelle muß die Zellmembran passiert werden, deren innere hydrophobe Schicht durch Fettsäurereste gebildet wird. Starke lokalisierte Ladungen an der Potentialsonde wären hier unvorteilhaft.

Sofern der Farbstoff eine Ladung trägt, darf sie - ebenso wie bei den Protein-Affinitätssonden - nicht positiv sein, da sonst Akkumulation der Farbstoffe in Mitochondrieneintreten wird. Dies kann die Ergebnisse verfälschen, da oft die Fluoreszenz der mitochondrialen Farbstoffe die der cytosolischen übertrifft^[15]. Negativ geladene Farbstoffe färben Mitochondrien nicht an und vermeiden daher diese Schwierigkeiten.

Eine weitere Eigenschaft, die für die Durchtrittsgeschwindigkeit durch die Membran sicherlich nicht unwichtig ist, ist Größe und Form des Farbstoffes. Rein qualitativ betrachtet bewegt sich ein langgestrecktes Molekül wahrscheinlich leichter durch eine Membran als ein kompaktes, z.B. Kugelförmiges. Je kleiner das Molekül ist, um so vorteilhafter dürfte dies für den Membrandurchtritt sein.

Für aussagekräftige Messungen sollte der Farbstoff eine möglichst große Änderung der Fluoreszenz zeigen beim Wechsel vom extrazellulären zum intrazellulären Medium.

Barbiturat- und Thiobarbiturat-Oxonole sind als Transmembranpotentialsonden bereits bekannt. Sie sind in physiologischem pH-Bereich deprotoniert, tragen also eine negative Ladung, die aber über den gesamten Chromophor delokalisiert ist. Die negative Ladung trägt zur Wasserlöslichkeit bei, durch ihre Delokalisation ist sie aber offensichtlich kein Hindernis beim Membrandurchtritt. Innerhalb der Zelle nimmt die Fluoreszenz der Oxonole stark zu. Oxonole binden innerhalb der Zelle an hydrophoben Zellkomponenten, finden sich also in der Zelle an Organellmembranen und Proteinen adsorbiert wieder. Wie bereits angesprochen erhöht sich dadurch die Rigidität des Chromophors, so daß strahlungslose Desaktivierung (*internal conversion* in hohe Schwingungsmoden des elektronischen Grundzustandes) langsamer wird und damit gegenüber Desaktivierung durch Emission unwahrscheinlicher.

Als ein besonders leistungsfähiger Vertreter der Barbiturat-Oxonole hat sich DiSBAC₁(3) **58**, von der Bayer AG *DyeB* genannt, gezeigt. Es ist ein Trimethinthiobarbiturat-Oxonol, bei dem alle vier Reste an den Stickstoffatomen Methylgruppen sind.

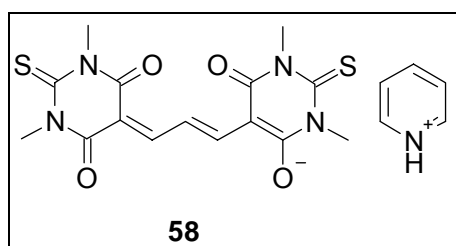


Abbildung 58: DiSBAC₁(3) **58** (*Dye B*)

Längere Polymethinketten wurden von der Bayer AG als ungünstig geschildert. Einerseits verschiebt sich das Absorptions- und Fluoreszenzmaximum, es müßten zum Beispiel andere Anregungslaser als die üblicherweise verwendeten eingesetzt werden, andererseits wandern sie langsamer durch die Zellmembran.

Möglicherweise neigen sie zur Verdrillung und müßten zur Vorbeugung überbrückt werden. Insgesamt führt die Ausdehnung des Chromophors und die eventuell nötige Verbrückung zu einer Zunahme des Volumens, des Gewichtes und der Lipophilie. Dies könnte aber die das Diffusionsverhalten der Potentialsonde durch die Membran negativ beeinflussen.

Die Substitution zweier Methylgruppen an den Stickstoffatomen durch Protonen führte ebenfalls zu schlechteren Ergebnissen. Wahrscheinlich eine Folge der dann möglichen Wasserstoffbrückenbindungen, z. B. zu den Carbonylsauerstoffatomen der Phospholipide, was den Membrandurchtritt verhindert oder stark beeinträchtigt.

Für den Einsatz in High-Throughput-Systemen ist es wichtig, daß neben der Fluoreszenzhyperchromie der Membrandurchtritt möglichst schnell und vollständig erfolgt. Die Zeit, die zwischen Membranpotentialänderung und Erreichen des dazugehörigen Fluoreszenzwertes vergeht und die benötigte Zeit zum Anfärben der Zellen mit Oxonolfarbstoff vor der Messung, ist der meßzeitlimitierende Faktor. Um kurze Meßsequenzen zu erzielen, müssen diese Zeiten möglichst kurz sein.

Daher soll getestet werden, ob durch Variation der Reste eine Verbesserung der Kinetik erfolgt. Um die Veränderung des Farbstoffs möglichst gering zu halten wird zunächst ein Methylrest am Thiobarbiturat belassen, der andere durch diverse Reste substituiert.

Die Synthese der Thiobarbiturate erfolgt ausgehend von Methylisothiocyanat, das in Chloroform mit einem Amin zum entsprechenden Thioharnstoff **TH_{1,R}** umgesetzt wird (siehe Abbildung 59). Das Methylisothiocyanat ist im Chemikalienhandel zu beziehen (hier *Aldrich*), andere Isothiocyanate können durch Reaktion von Aminen mit Thiophosgen hergestellt werden (siehe z. B. Abbildung 24, Darstellung von Thiohydantoin). Der Thioharnstoff wird dann mit einem C₃-Baustein zum Thiobarbiturat **TB_{1,R}** umgesetzt.

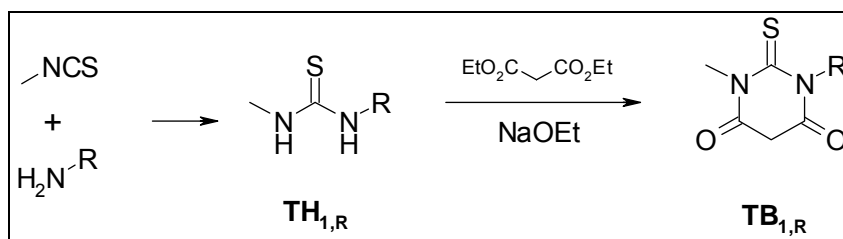


Abbildung 59: Allgemeine Darstellung von Thioharnstoffen und Thioarbituraten

Die bei der Darstellung von Oxo-Barbituraten übliche Reaktionsführung mit Malonylchlorid als C₃-Baustein, wie sie zum Beispiel A. C. COPE^[57] et al. durchführen, schlägt bei der Thioarbituratsynthese fehl. In der Literatur wird die Synthese mit Malonsäure und Acetanhydrid von H. BILTZ und H. WITTEK^[58] als allgemeingültiges Verfahren für die Darstellung von Barbituraten beschrieben. Dieser Syntheseweg führt ebenfalls nicht zum Ziel, es können nur Spuren von Thioarbiturat qualitativ nachgewiesen werden. Gleiches gilt für den von A. DHASMANA et al.^[59] beschriebenen Weg. Nach ihrer Vorschrift werden Malonsäure und Acetylchlorid zur Kondensation mit Thioharnstoff eingesetzt. Auch H. SCHULTE^[60] beschreibt Probleme bei der Darstellung von Thioarbituraten nach den in der Literatur üblichen Methoden und gibt isolierte Nebenprodukte, sowie Ausbeuten unter 10% an. Alle bisher genannten Verfahren würden allerdings eine erhebliche Zeitersparnis bedeuten, die Reaktionsdauer beträgt laut Literatur jeweils nur wenige Stunden. Da aber allen Verfahren gemein ist, daß sie keine oder nur geringste Ausbeute liefern, werden sie verworfen.

Als erfolgreiche Syntheseführung hat sich die Reaktion von Thioharnstoff mit Diethylmalonat in Ethanol mit Natriumethanolat als Base erwiesen, wie sie E. LANGHALS und H. BALLI^[61] mit sulfonierten Thioharnstoffen durchführen. Für Reste ohne funktionelle Gruppen ist dieses Verfahren unproblematisch, bei Resten, die durch Alkoholat deprotoniert werden, muß dies zu Problemen führen. Auch ist die Reaktionszeit sehr lang (100 h), was das Voranschreiten der Derivatisierung behindert.

Die Thioarbiturate reagieren dann innerhalb kurzer Zeit mit Malonaldehyd-bisphenyliminhydrochlorid (**MABPI**) als Trimethin-

baustein und Triethylamin als Base zum Oxonol **DiSBAC_{1,R}(3)**. Diese Kurzschreibweise hat sich mittlerweile für die Barbiturat- und Thiobarbituratoxonole eingebürgert. Das S steht für Schwefel um von den Oxoderivaten zu unterscheiden. Die Indizes meinen die Reste der (Thio-)Barbiturate, die Zahl in runden Klammern steht für die Länge der Polymethinkette.

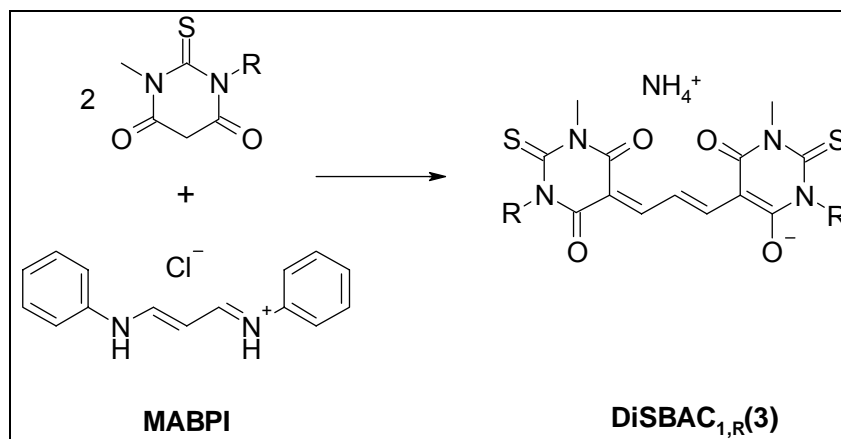


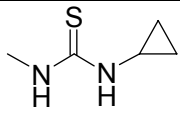
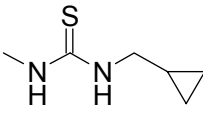
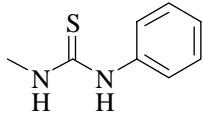
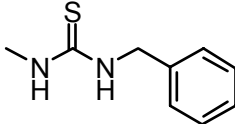
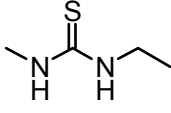
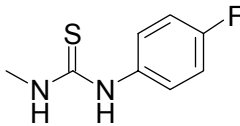
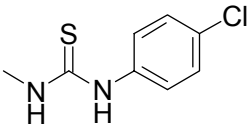
Abbildung 60: Allgemeine Darstellung der Thiobarbituratoxonole

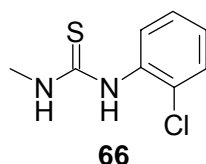
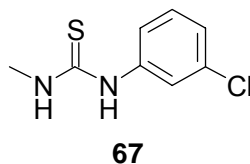
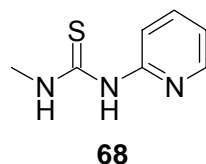
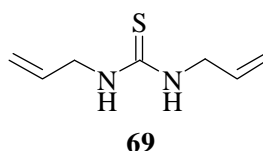
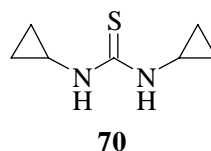
Im Allgemeinen sind die Oxonole symmetrisch, besitzen also an beiden Seiten der Polymethinkette die gleiche Endgruppe. Speziell im Fall der Thiobarbiturate ist die Synthese von unsymmetrischen Oxonolen schwierig. Zwar kann im Fall des Trimethinoxonols das Hemioxonol (Reaktion von MABPI mit nur einem Thiobarbituratcyclus) als Zwischenprodukt isoliert werden. Bei nachfolgender Reaktion mit einem zweiten unterschiedlichen Thiobarbiturat entstehen jedoch vor allem die beiden symmetrischen Produkte. Da *Dye B* jedoch hochsymmetrisch ist und die Veränderungen am Molekül zunächst gering bleiben sollen, steht die Synthese von unsymmetrischen Oxonolen im Hintergrund.

4.3.2 Darstellung von Thioharnstoffderivaten und deren spektroskopische Besonderheiten

Für die Umsetzung zu den Thiobarbitursäuren werden die in Tabelle 14 aufgeführten Thioharnstoffe dargestellt. Bis auf die symmetrischen Thioharnstoffe **69** und **70** werden die entsprechenden Amine nach obiger Vorgehensweise mit Methylisothiocyanat umgesetzt. Für symmetrischen Thioharnstoffe wird das Amin in doppelter Stoffmenge mit Thiophosgen umgesetzt.

Tabelle 14: Liste der dargestellten Thioharnstoffe

V38	 59
V39	 60
V40	 61
V41	 62
V42	 63
V43	 64
V44	 65

**V45****V46****V47****V48****V49**

4.3.2.1 Zu den Infrarotspektren der Thioharnstoffe

Die Interpretation der Infrarotspektren der Thioharnstoffe stützt sich hauptsächlich auf die Arbeit von K. A. JENSEN und P. H. NIELSEN^[62], die die Infrarotspektren von 150 Thioamiden, Selenoamiden, Thioharnstoffen und Selenoharnstoffen miteinander vergleichen. Die Autoren verwenden die Termini A-Bande, B-Bande etc. Weil im experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit darauf Bezug genommen wird, sollen diese Banden hier kurz erläutert werden.

Die A- und E-Bande rühren von einer primären NH₂-Gruppe her, die bei den in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen nicht vorkommt, weshalb sie hier nicht ausführlich behandelt werden.

B-Bande: 1400-1600 cm⁻¹, üblicherweise sehr stark und etwas breit (unterschied zu Phenylabsorption, die eher eine sehr schmale Bande zeigt). Vermutlich rührt sie her von der antisymmetrischen N-C-N-Streckschwingung (ν_{as}), wahrscheinlich gekoppelt mit C=S- und N-H-Moden, wie Selenierungs- und Deuterierungsexperimente ergeben.

C-Bande: 1200-1400 cm^{-1} mittlere bis starke Bande, auch manchmal bei etwas höheren Frequenzen (Thioharnstoff 1415 cm^{-1}). Kommt in allen Thioharnstoffen und Thioamiden vor. In Thioharnstoffen wahrscheinlich hauptsächlich durch N-C-N-Streckschwingung (reagiert nur sehr gering auf Deuterierung, nur geringe Verschiebung durch S-Methylierung bei Thioharnstoffen).

D-Bande: 1000-1200 cm^{-1} mittelstarke Banden, in den meisten Thioamiden und Thioharnstoffen, außer symmetrischen, aromatisch disubstituierten. Deuterierungsexperimente zeigen, daß diese Bande hauptsächlich der N-H-Schwingung in *sek*-Thioamiden und den meisten Thioharnstoffen entspricht.

Möglicherweise erhält die Bande auch einen großen Beitrag von der symmetrischen N-C-S Streckschwingung, die stark mit der N-H-Schwingung gekoppelt ist. Da S-Alkylierung bei manchen Verbindungen zu einer leichten Verschiebung zu niedrigeren Frequenzen führte (erniedrigter Doppelbindungscharakter der C=S-Gruppe, offensichtlich also gewisser C-S-Schwingungscharakter), bei anderen Verbindungen trat leichte Verschiebung zu höheren Frequenzen auf (also auch C-N-Schwingungscharakter vorhanden). Die S-Alkylierung beeinflusst die C-N- und die C-S-Bindung in gegensätzlichem Effekt, daher fallen die Veränderungen meist nur gering aus.

F-Bande: bei 700 cm^{-1} , typisch für Thioharnstoffe und Thioamide, N-H-Schwingung

G-Bande: unter 800 cm^{-1} , C=S-Streckschwingung.

4.3.2.2 Massenspektrum von 1-Cyclopropyl-3-methyl-thioharnstoff **59**

Das Massenspektrum des 1-Cyclopropyl-3-methyl-thioharnstoffes **59** lohnt genauer betrachtet zu werden.

Durch thermische Fragmentierung entstehen nach Shapiro et al.^[63] aus dem Thioharnstoff über einen 4-Ring-Übergangszustand (Protonenübertragung von einer NH-Gruppe auf die dazu β -ständige) ein Amin und ein Isothiocyanat. Bei verschiedenen Resten, wie im vorliegenden Fall, entstehen zwei mögliche Amine und Isothiocyanate, eventuell mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit.

Der Massepeak mit $m/z = 99$ (*cyclo*-Propylisothiocyanat⁺) wird jedoch im Spektrum vermißt. Die Vermutung liegt nahe, daß dieses Molekülion metastabil ist. Das bedeutet, daß es nach der Bildung (Ionisierung) als Molekül der Masse $m/z = 99.16$ (C_4H_5NS) beschleunigt wird, aber nicht langlebig genug ist, als solches durch das magnetische Ablenkungsfeld zu gelangen. Möglicherweise findet Ringöffnung und -schluß mit anschließender Eliminierung von S-H statt. Die Masse des Molekülions, mit der die Ablenkung im Magnetfeld erfolgt, ist dann $m/e = 66.08$ (C_4H_4N). Die Detektion erfolgt also bei $m^*/z = 44$, was sich berechnet durch^[64]:

$$\frac{m_{\text{Ablenkungsfeld}}^2}{m_{\text{Beschleunigungsfeld}}} = m^* \quad \text{Gl. (13.)}$$

m : Masse des Fragmentes, m^* : scheinbare detektierte Masse

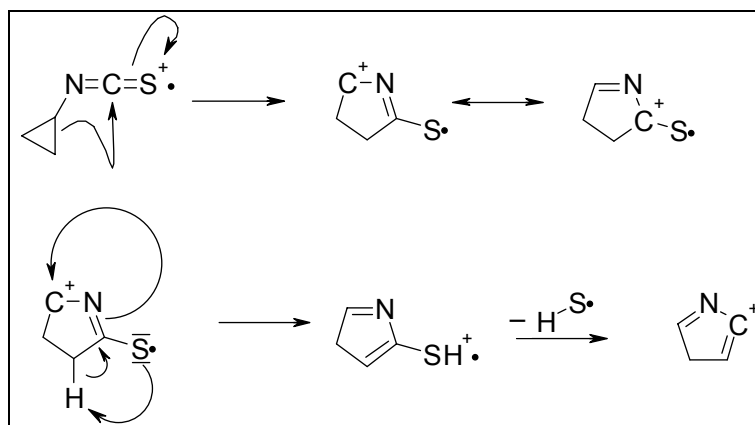


Abbildung 61: Fragmentierung des Thioharnstoffes **59**

Eine Masse von $m/z = 43$ findet sich im Spektrum mit 23% Fragmentanteil, was obige Vermutung untermauert. Die Fragmentierung ergibt sich wie folgt:

MS von **57** (EI); m/z (%): 130 (60) [M^+], 115 (16) [$M^+ - CH_3$], 74 (48) [$H_3C-NCS + H^+$], 57 (32) [*cyclo*-Prop- NH_2^+], 56 (51) [*cyclo*-Prop- $NH^{\bullet+}$], 43 (23) [metastabiles *cyclo*-Prop- $NCS^{\bullet+}$], 32 (100) [$H_3C-NH_2 + H^+$].

4.3.2.3 Massenspektrum von 1-Cyclopropylmethyl-3-methylthioharnstoff **60**

Auch beim Thioharnstoff **60** finden sich entsprechende Massenpeaks, die sich nur auf diese Weise erklären lassen.

MS von **60** (EI); m/z (%): 144 (57) [M^+], 115 (100) [$M^+ - CH_3$ (metastabil)], 74 (48) [$H_3C-NCS + H^+$], 70 (31) [Cyclopropyl- CH_2-NH^+], 57 (85) [3,4-Dihydropyridin-Kation].

$m/z = 57$: Der Thioharnstoff zerfällt unter Bildung der zwei Möglichen Amine und Isothiocyanate. Das entstandene Cyclopropylmethylisothiocyanat wird mit $m/z = 113$ im elektrischen Feld beschleunigt, ist als Radikalkation aber nicht stabil und spaltet nach Ringschluß HS^{\bullet} ab. Das entstandene 3,4-Dihydropyridin-Kation wird mit $m/z = 80$ abgelenkt, wodurch die Detektion bei $m/z = 80^2/113 = 57$ erfolgt (siehe Seite 99).

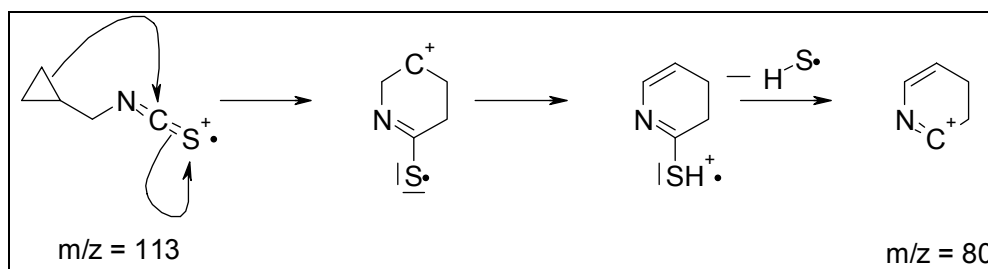


Abbildung 62: Vermutete Fragmentierung von **60**

$m/z = 115$: Das Molekülion wird beschleunigt mit $m/z = 144$, zerfällt aber unter Abspaltung der *N*-Methylgruppe und durchquert das Ablenkungsfeld mit der Masse $m/z = 129$. Die Detektion erfolgt bei $m/z = 115$.

4.3.2.4 Massenspektrum von 1-Methyl-3-phenylthioharnstoff **61**

MS von **61** (EI); m/z (%): 166 (58) [M^+], 133 (7) [$M^+ -SH$], 109 (8) [2-Thioxo-cyclohexa-3,5-dien-carbeniumion], 93 (100) [Anilin $^+$], 77 (23) [Phenylkation].

Die Fragmentierung von Substanz **61** wird in Übereinstimmung mit der Literatur folgendermaßen erklärt.

Die Elimination von SH erfolgt laut Shapiro et al.^[63] durch elektrophilen Angriff der Thiocarbonylgruppe am Aromaten:

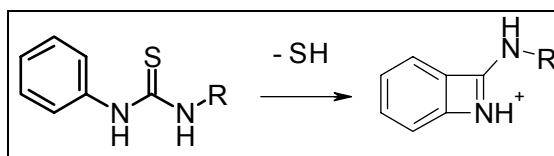


Abbildung 63: Elimination von SH aus **61**

Desweiteren erklären sie sich den Peak bei $m/z = 109$ dadurch, daß nach Ionisation des Aromaten zunächst eine Cyclisierung mit der Thiocarbonylgruppe erfolgt, dann elektrozyklische Fragmentierung unter 1,2-H-Shift:

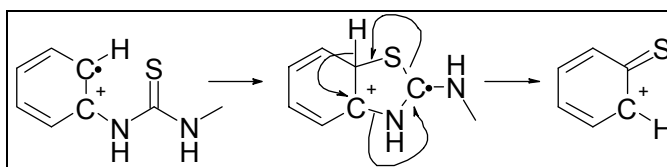


Abbildung 64: Fragmentierung von **61**

4.3.2.5 $^1\text{H-NMR}$ von 1-Methyl-3-(2-pyridyl)thioharnstoff **68**

Für den pyridylsubstituierten Harnstoff **68** ergeben sich zwei deutlich verschiedene N-H-Protonensignale im Protonenresonanzspektrum.

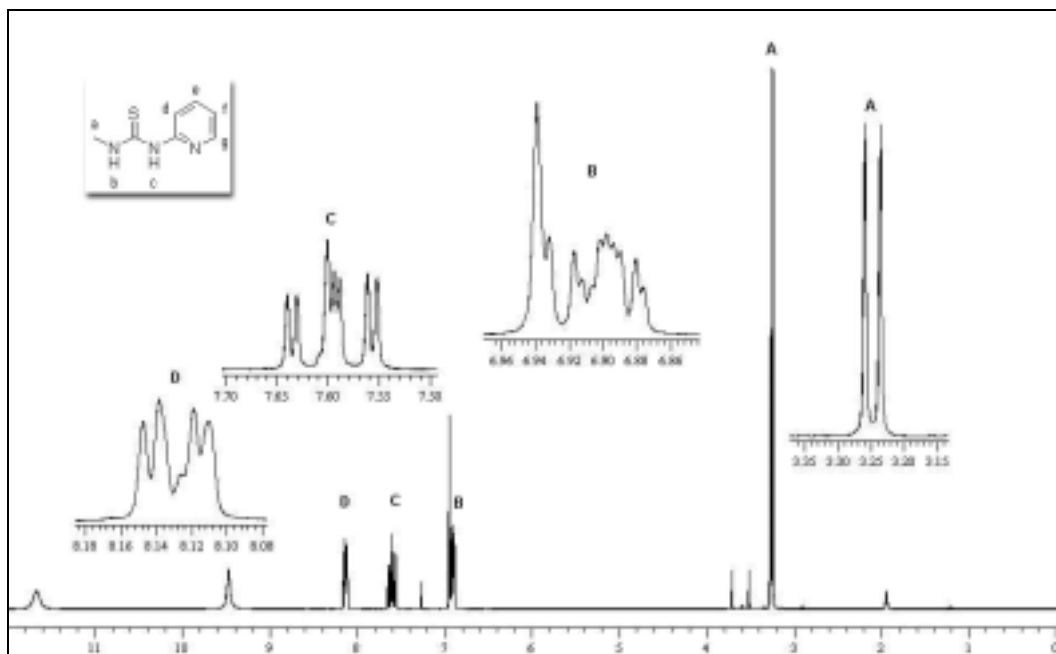
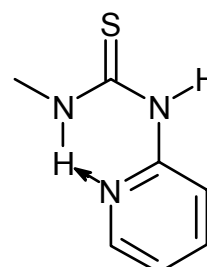


Abbildung 65: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) von **68**

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz):

δ [ppm] = 3.25 (d, 3 H, $^3J_{a,b} = 4.7$ Hz, a); 6.87–6.94 (A- und B-Teil des ABMX-Systems, 2 H, f + d); 7.54–7.64 (M-Teil des ABMX-Systems, 1 H, e); 8.10–8.16 (X-Teil des ABMX-Systems, 1 H, g); 9.47 (s, 1 H, c); 11.67 (s, 1 H, b).

Sudha und Sathyanarayana^[65] geben für diverse 1,3-substituierte Thioharnstoffe bei Raumtemperatur zwei Banden an. Je nach Stellung der Reste stehen die N-H-Protonen cis oder trans zum Schwefelatom. Die unterschiedliche Verschiebung im Spektrum resultiert nach den Autoren aus dem anisotropen entschirmenden Effekt der Thiocarbonylgruppe, wodurch das cis-Proton gegenüber dem trans-Proton tieffeldverschoben ist.



Für 1-Methyl-3-pyridyl-thioharnstoffe ergeben sich umgekehrte Verschiebungen, das trans-NH-Proton ist tieffeldverschoben, was

durch intramolekulare H-Brückenbindung zum Pyridin-N erklärt wird. Dies wird auch dadurch untermauert, daß bei verschiedenen Temperaturen sich die Verschiebung im $^1\text{H-NMR}$ gegenüber dem anderen Proton (cis-Proton intermolekulare H-Brücken, bei niedrigen Temperaturen Tieffeldverschiebung) kaum verändert.

Sudha und Sathyanarayana geben das trans-NH-Proton mit 11.67 ppm und das cis-NH-Proton mit 9.16 ppm an. Die übrigen Protonen geben sie in guter Übereinstimmung mit dieser Arbeit wie folgt an: δ [ppm] (270 MHz, CDCl_3): 3.29 (a, $^3J_{a,b} = 5.0$ Hz), 6.87 (d), 7.65 (e), 6.96 (f), 8.18 (g)

4.3.2.6 $^1\text{H-NMR}$ und Massenspektrum von 1,3-Diallylthioharnstoff **69**

Das Protonenresonanzspektrum von **69** bedarf auch eingehenderer Betrachtung (vgl. auch Mohanta et al.^[66]).

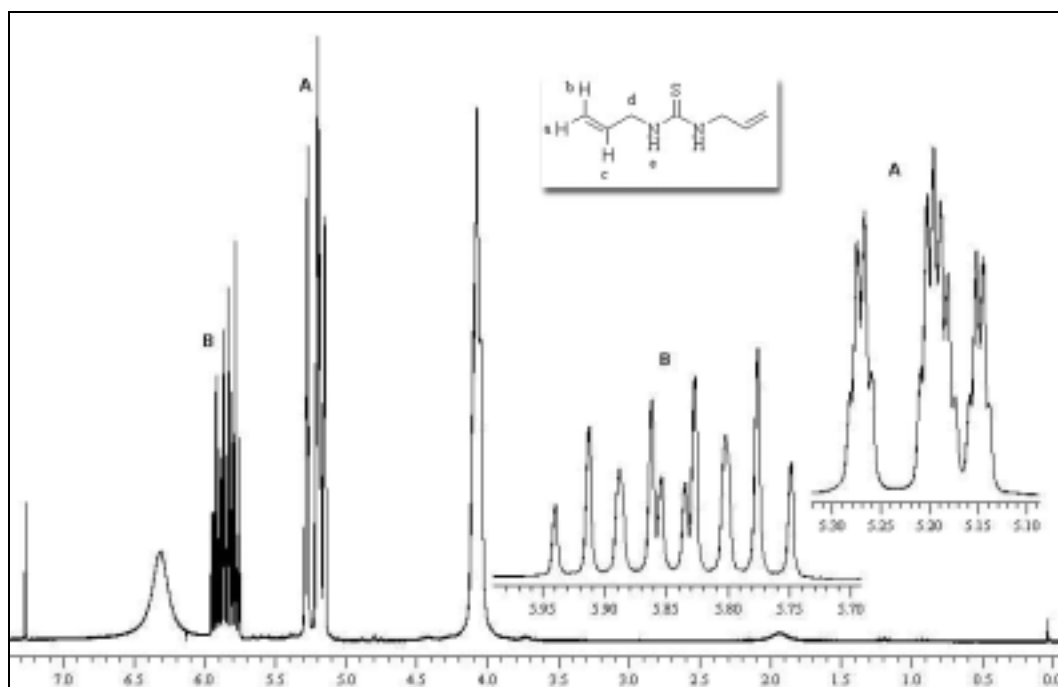


Abbildung 66: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) von **69**

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz):

δ [ppm] = 4.07 (dd, 4 H, $^3J_{d,c} = 5.2$ Hz, d); 5.18 (ddt, 2 H, $^3J_{a,c} = 10.2$ Hz, $^2J_{a,b} \approx 1.5$ Hz, $^4J_{a,d} \approx 1.3$ Hz, a); 5.23 (ddt, 2 H, $^3J_{b,c} = 17.2$ Hz, $^2J_{b,a} \approx 1.5$ Hz, $^4J_{b,d} \approx 1.5$ Hz, b); 5.84 (ddt, 2 H, $^3J_{c,d} = 5.5$ Hz, $^3J_{c,a} = 10.2$ Hz, $^3J_{c,b} = 17.2$ Hz, c); 6.31 (s, 2 H, e).

Da einige Linien zusammenfallen (siehe Abbildung 68), können die Kopplungskonstanten $^2J_{a,b}$, $^4J_{a,d}$ und $^4J_{b,d}$ nicht genau bestimmt werden.

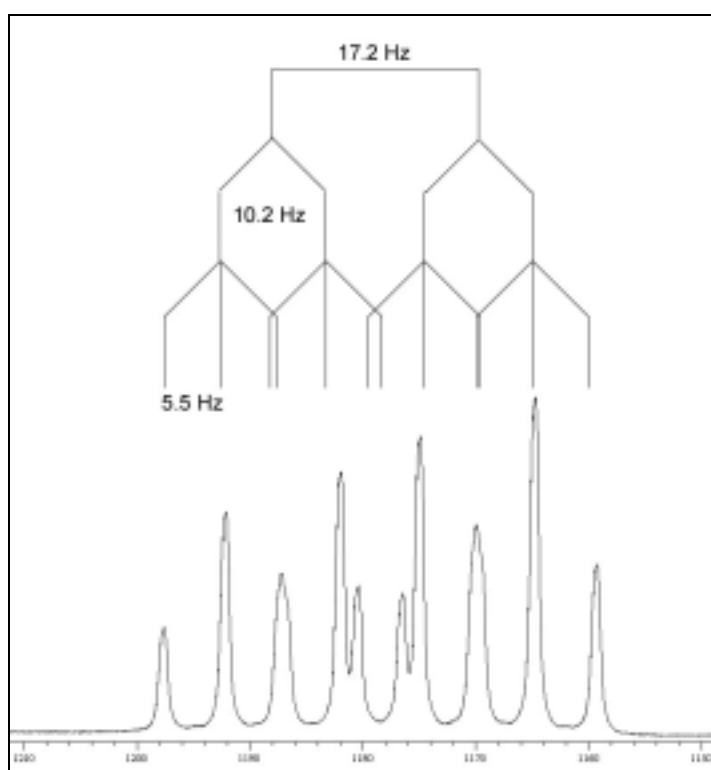


Abbildung 67: Kopplungsmuster des Protons c im $^1\text{H-NMR}$ von **69**

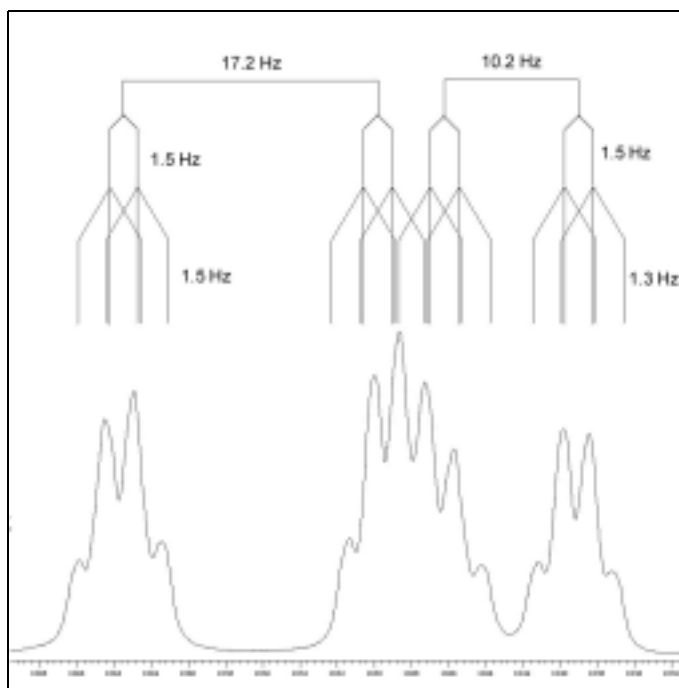


Abbildung 68: Kopplungsmuster der Protonen a und b im $^1\text{H-NMR}$ von **69**

Das Fragmentierungsmuster des Massenspektrums ergibt sich wie folgt:

MS (EI); m/z (%): 156 (68) [M^+], 141 (63) [M^+ , - NH], 100 (7) [$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{N}=\text{C}=\text{S}^+$], 56 (100) [$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{NH}^+$], 41 (90) [Propenylykation].

Auffällig ist, daß zu einem hohen Anteil von 63 % ein Fragment entsteht, daß durch Verlust der NH-Gruppe gedeutet werden kann. Vermutlich findet dies statt, da ein intramolekularer Ringschluß möglich ist, infolgedessen eine Umlagerung des Allylrestes an die Thiocarbonylgruppe erfolgen kann. Im Anschluß daran verläßt die NH-Gruppe das Molekül.

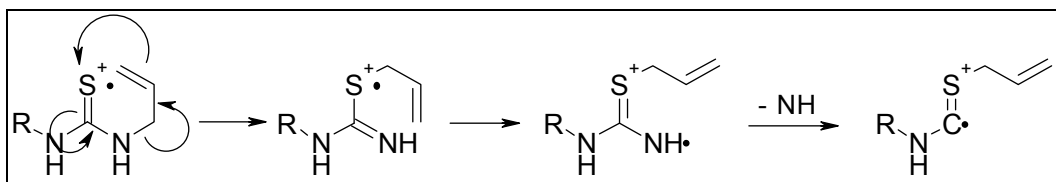


Abbildung 69: Fragmentierung von **69**

4.3.2.7 Massenspektrum von 1,3-Dicyclopropylthioharnstoff **70**

Im Massenspektrum des 1,3-Dicyclopropylthioharnstoffs **70** ist der Basispeak $m/z = 41$. Dies stimmt überein mit der Masse des Cyclopropylkations. Dieses kann zum Propenylkation umlagern, welches selbst durch zwei mesomere Formen stabilisiert ist. Dies erklärt die hohe Stabilität und die Tatsache, daß es als Basispeak detektiert wird.

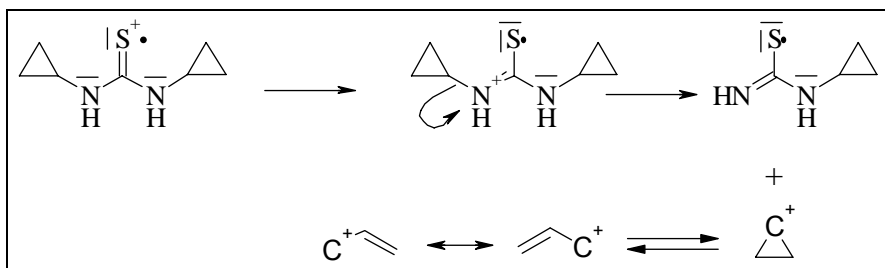
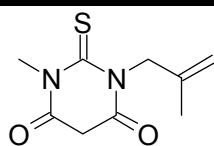


Abbildung 70: Cyclopropylkation als Basispeak im Massenspektrum von **70**

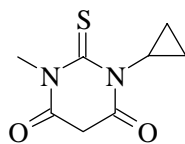
4.3.3 Darstellung von Thiobarbituratderivaten und deren spektroskopische Besonderheiten

Die oben beschriebenen Thioharnstoffe werden mit Diethylmalonat in der in Kapitel 4.3.1 beschriebenen basischen Methode zu den entsprechenden Thiobarbitursäuren umgesetzt. Tabelle 15 führt die dargestellten Thiobarbiturate auf.

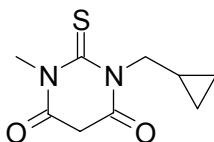
Tabelle 15: Liste der dargestellten Thiobarbitursäuren

**V50**

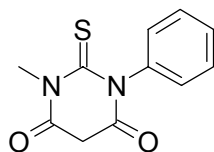
71

**V51**

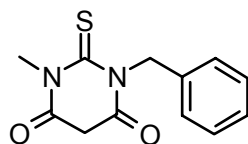
72

**V52**

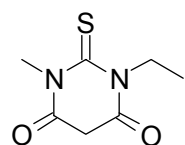
73

**V53**

74

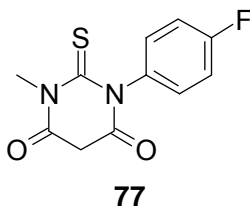
**V54**

75

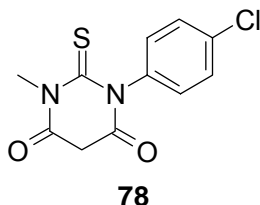
**V55**

76

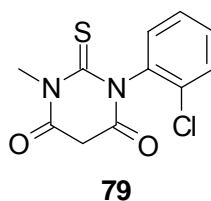
V56



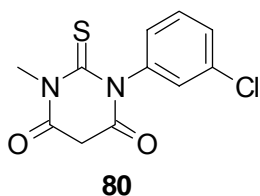
V57



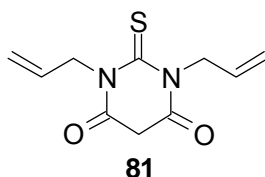
V58



V59



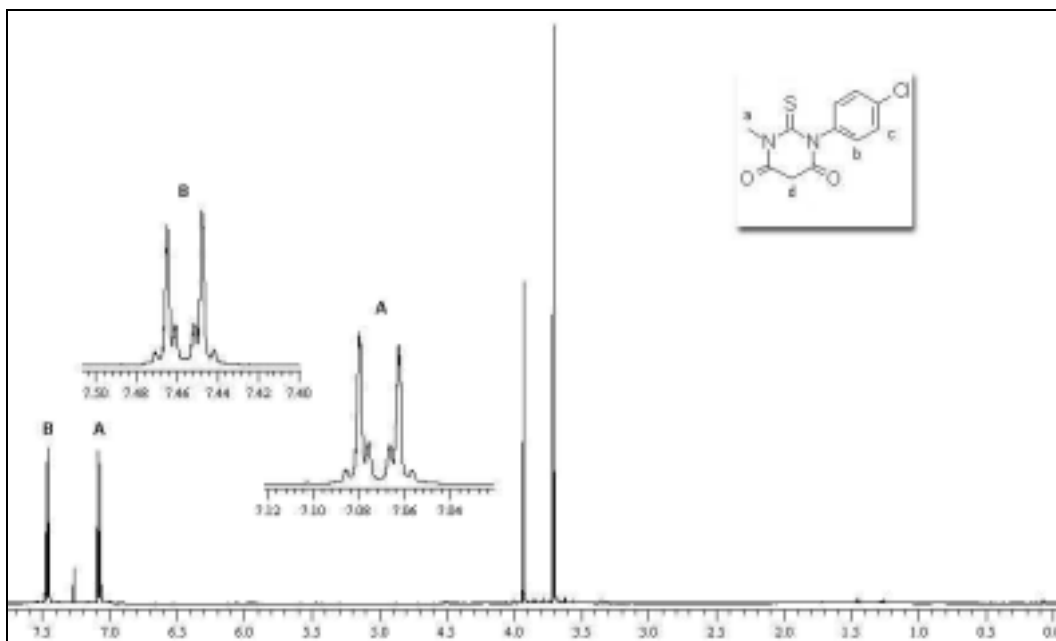
V60



4.3.3.1 $^1\text{H-NMR}$ von 1-(4-Chlorphenyl)-3-methylthiobarbitursäure **78**

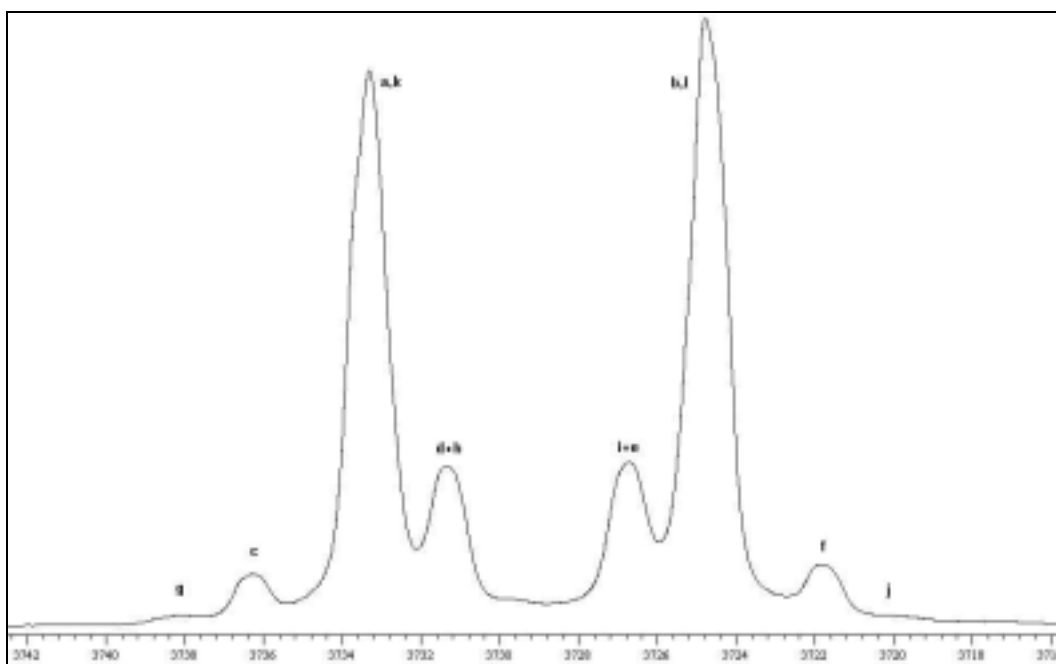
Das Protonenresonanzspektrum des 4-Chlorderivats **78** zeigt ein $[\text{AX}]_2$ -System. Die Auswertung erfolgt nach dem für dieses Spinsystem üblichen Verfahren (siehe z. B. H. GÜNTHER^[33]), wobei zu beachten ist, daß die Peaks g und j nur als Schultern der Peaks c und f auftreten und daher ihre Lage abgeschätzt wurde.

Desweiteren sind im vorliegenden Spektrum die Peaks d und h bzw. i und e nicht unterscheidbar (siehe Abbildung 72, S. 109). Aus diesen Unsicherheiten ergibt sich nur eine ungefähre Bestimmung der Kopplungskonstanten.

Abbildung 71: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) von **78**

X-Teil : δ [Hz] = 3738.19 (g); 3736.26 (c); 3733.32 (a,k); 3731.35 (d+h); 3726.70 (i+e); 3724.79 (b,l); 3721.81 (f); 3720.04 (j).

A-Teil : δ [Hz] = 3545.99 (g); 3543.73 (c); 3540.79 (a,k); 3538.80 (d+h); 3534.15 (i+e); 3532.24 (b,l); 3529.25 (f); 3527.16 (j).

Abbildung 72: X-Teil des $[\text{AX}]_2$ -Systems aus dem $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) von **78**

Nachfolgende Werte sind Mittelwerte aus den Berechnungen für den A-Teil und den X-Teil:

$$N = a-b = k-l = 8.5 \text{ Hz}$$

$$M = c-d = e-f = 4.9 \text{ Hz}$$

$$K = g-h = i-j = 6.9 \text{ Hz}$$

$$L = [(h-i) \cdot (g-j)]^{1/2} = [(c-f) \cdot (d-e)]^{1/2} = 8.7 \text{ Hz}$$

$$\nu_a = 1/2 (a+b) = 1/2 (k + l) = 3729.06 \text{ Hz} = 7.46 \text{ ppm}$$

$$\nu_x = 1/2 (a+b) = 1/2 (k + l) = 3536.52 \text{ Hz} = 7.07 \text{ ppm}$$

$${}^4J_{b,b'} = 1/2 (K + M) = 5.83 \text{ Hz} / 6.01 \text{ Hz}$$

$${}^3J_{b,c} = 1/2 (N + L) = 8.62 \text{ Hz} / 8.67 \text{ Hz}$$

$${}^4J_{c,c'} = 1/2 (K - M) = 0.93 \text{ Hz} / 1.09 \text{ Hz}$$

$${}^5J_{b,c'} = 1/2 (N - L) = 0.09 \text{ Hz} / 0.12 \text{ Hz}$$

4.3.3.2 ¹H-NMR von 1-(2-Chlorphenyl)-3-methylthiobarbitursäure **79**

Alle bisher vorgestellten Thiobarbiturate besitzen eine Spiegelebene in der Ringebene des Thiobarbiturats. Dadurch sind die beiden Methylenprotonen an C-5 des Thiobarbituratcyclus enantiotop zueinander und es resultiert in den benutzten, nicht chiralen Lösungsmitteln ein einziges Signal. Die Phenylringe der Thiobarbiturate **74**, **75** und **77** bis **80** stehen vermutlich senkrecht zur Thiobarbiturat-Ringebene. Bei dem Derivat **79** entfällt durch die Chlorsubstitution an C-2 im Phenylring die Spiegelebene, die Substanz ist axialchiral. Die Protonen f und g sind nicht mehr enantiotop, sondern diastereotop, wodurch es zur Signalaufspaltung kommt (siehe Vergrößerung A in Abbildung 73). Für **80** gilt gleiches, die Substanz wurde jedoch in [D₆]Dimethylsulfoxid vermessen, die aciden Methylenprotonen werden leicht durch Deuterierumkationen ausgetauscht und zeigen kein Signal.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz):

δ [ppm] = 3.71 (s, 3 H, a); 3.91 (d, 1 H, $^2J_{f,g} = 21.6$ Hz, f oder g); 3.97 (d, 1 H, $^2J_{f,g} = 21.6$ Hz, f oder g); 7.19–7.24 (A-Teil des ABCD-Systems, 1 H, e); 7.37–7.43 (B- und C-Teil des ABCD-Systems, 2 H, c+d); 7.50–7.54 (D-Teil des ABCD-Systems, 1 H, e).

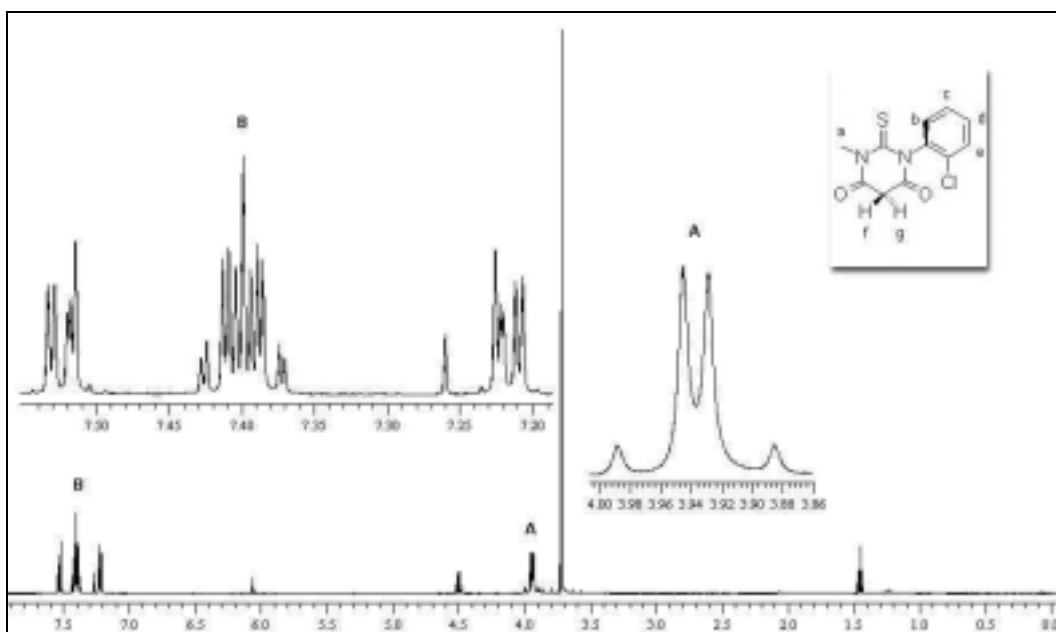
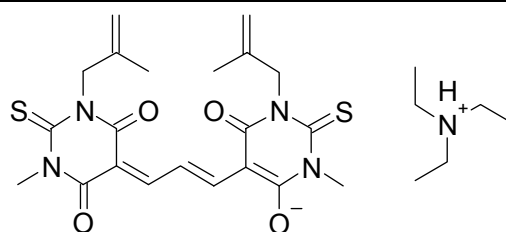


Abbildung 73: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) von **79** [ppm]

4.3.4 Darstellung der Thiobarbituratonole und deren spektroskopische Besonderheiten

Die dargestellten Thiobarbitursäuren werden mit MABPI zu den Oxonolen umgesetzt, als Base wird Triethylamin verwendet. Tabelle 16 führt die dargestellten Thiobarbiturate auf.

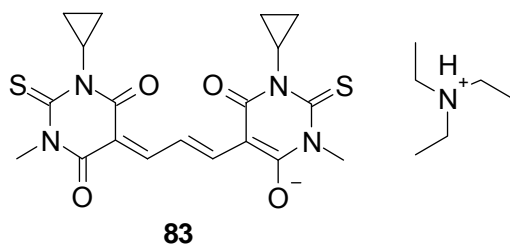
Tabelle 16: Liste der dargestellten Thiobarbituratonole



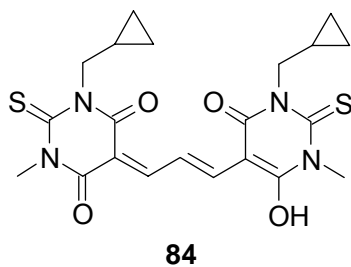
82

V61

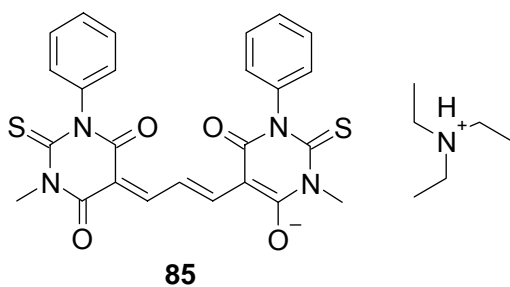
V62



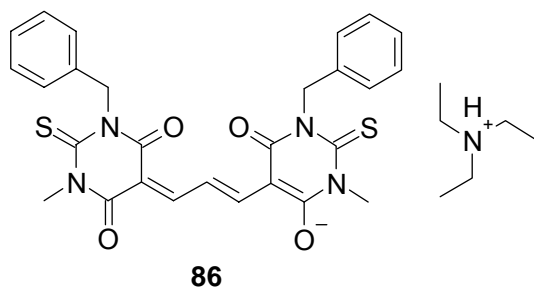
V63



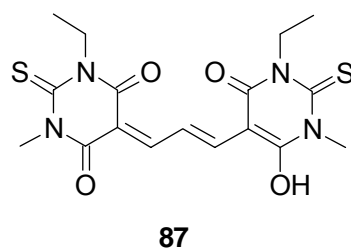
V64



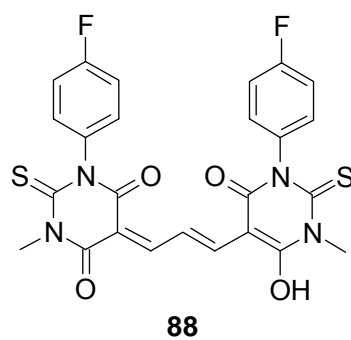
V65

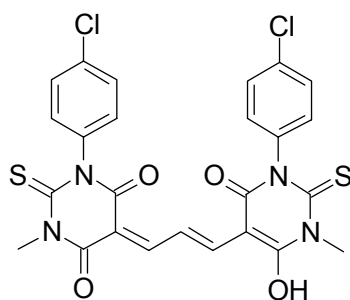


V66



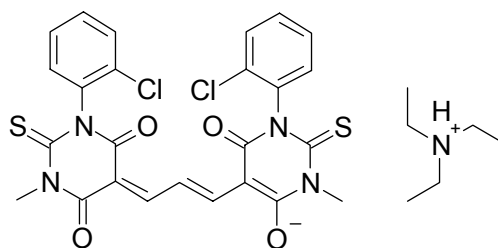
V67





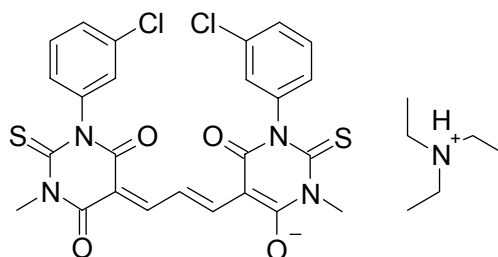
89

V68



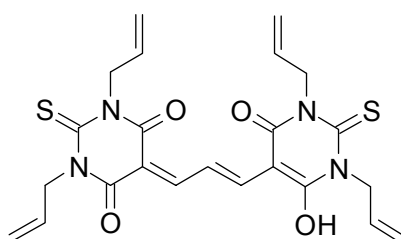
90

V69



91

V70



92

V71

Die Referenzsubstanz **58** (*Dye B*) wird aus dem entsprechenden Thiobarbiturat **93** (siehe V72) hergestellt. Der zur Darstellung des Thiobarbiturats benötigte 1,3-Dimethylharnstoff ist kommerziell erhältlich.

4.3.4.1 Symmetrie der Oxonole

Die Dargestellten Oxonole sind üblicherweise C_s -, C_2 - oder sogar C_{2v} -symmetrisch aufgebaut, das heißt, daß die gleichen Reste auf der gleichen Seite der Polymethinkette zu liegen kommen. Diese Symmetrie spiegelt sich zum Beispiel in den Protonen- und

Kohlenstoffresonanzspektren wieder und ist für die Berechnung der QSAR-Werte (siehe Kapitel 4.5, Seite 123) von Bedeutung. Zum Beispiel liefern die Protonen e der Substanz **83** im $^1\text{H-NMR}$ ein einziges Dublett. Dies kann nur der Fall sein, wenn es eine C_2 -Achse oder Spiegelebene senkrecht zur längsten Molekülachse gibt. In diesem Fall sind die zu f benachbarten Protonen e homotop bzw. enantiotop und in Chloroform magnetisch äquivalent. Befänden sich die beiden Cyclopropylgruppen auf verschiedenen Seiten der Polymethinkette, müssten die beiden Protonen neben f (sie seien hier e und e' genannt) diastereotop zueinander und daher zwei Dublett-Signale im $^1\text{H-NMR}$ sichtbar sein.

Gleiches gilt für das $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum. Ohne die angesprochenen Symmetrieelemente müssten deutlich mehr Signale im Spektrum sichtbar werden. Zum Beispiel würden sich nicht nur die Kerne e und g in Abbildung 76 unterscheiden, es müssten weitere Signale erzeugt werden durch die C-Atome, die im Fall des symmetrischen Moleküls noch homotop oder enantiotop zueinander sind.

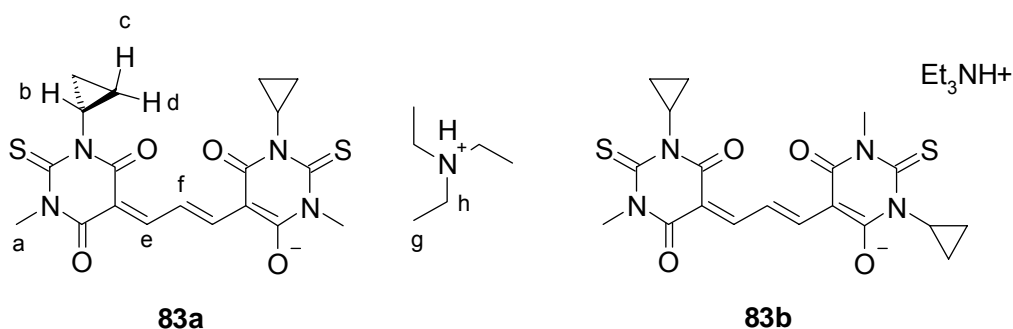
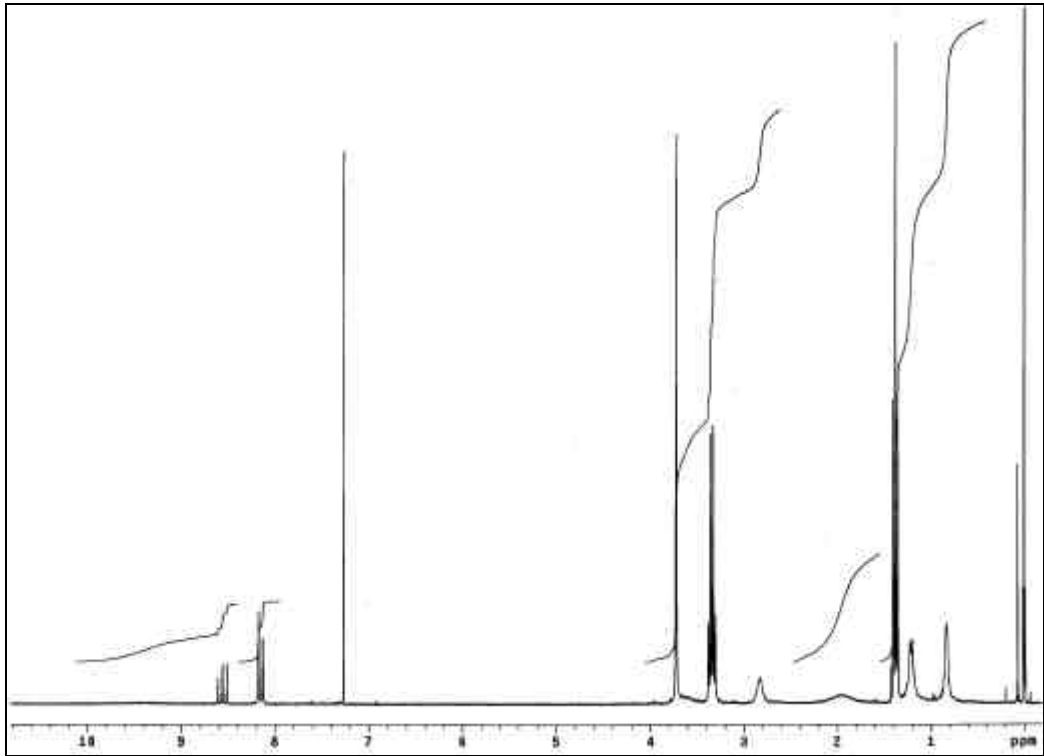
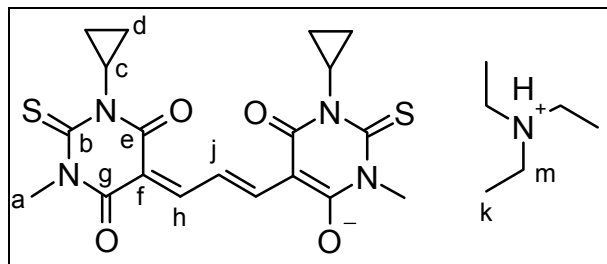


Abbildung 74: Substanz **83**, Benennung der Protonen von für das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum und mögliche Diastereotopie

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz):

δ [ppm] = 0.80–0.86 (A-Teil des $[\text{AB}]_2\text{M}$ -Systems, 2 x 2 H, c oder d); 1.16–1.28 (B-Teil des $[\text{AB}]_2\text{M}$ -Systems, 2 x 2 H, c oder d); 1.38 (t, 9 H, $^3J_{g,h} = 7.3$ Hz, g); 2.76–2.88 (M-Teil des $[\text{AB}]_2\text{M}$ -Systems, 2 x 1 H, b); 3.34 (q, 6 H, $^3J_{h,g} = 7.3$ Hz, h); 3.72 (s, 2 x 3 H, a); 8.15 (d, 2 x 1 H, $^3J_{e,f} = 13.9$ Hz, e); 8.56 (t, 1 H, $^3J_{f,e} = 13.8$ Hz, f).

Abbildung 75: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) von **83**Abbildung 76: Substanz **83**, Benennung für $^{13}\text{C-NMR}$

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz):

δ [ppm] = 8.9 (k); 12.7 (d); 31.2 (c); 34.9 (a); 46.4 (m); 103.0 (b); 118.5 (j); 160.6 (h); 162.4 (e oder g); 163.1 (e oder g); 180.7 (f).

Die Identifikation der Kerne erfolgt durch ein $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -Korrelationspektrum. Die C-Atome b, e, g und f, die nicht über das Korrelationspektrum identifiziert werden können, werden durch Vergleich mit den anderen Oxonolen zugeordnet. Da die Reste an den Stickstoffatomen nur relativ geringen Einfluß auf die Verschiebung dieser Kerne haben, sind die δ -Werte für diese C-Atome in allen Oxonolen sehr ähnlich.

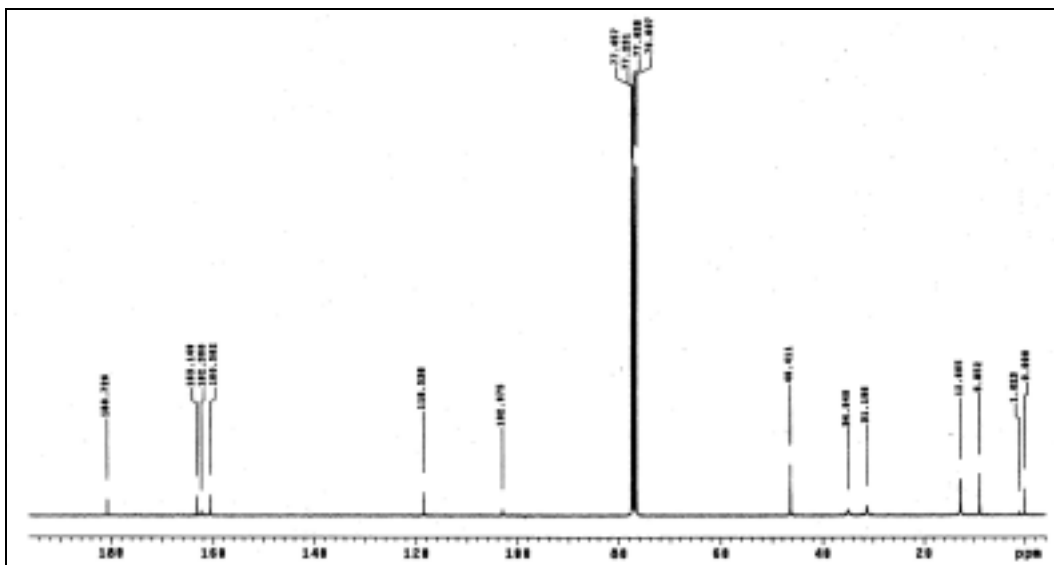


Abbildung 77: ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) von **83**

Es gibt zwei Möglichkeiten der Anordnung der Reste, so daß das Oxonol die durch die Spektren geforderte Symmetrie erhält. Für die vorliegende Substanz wären es folgende:

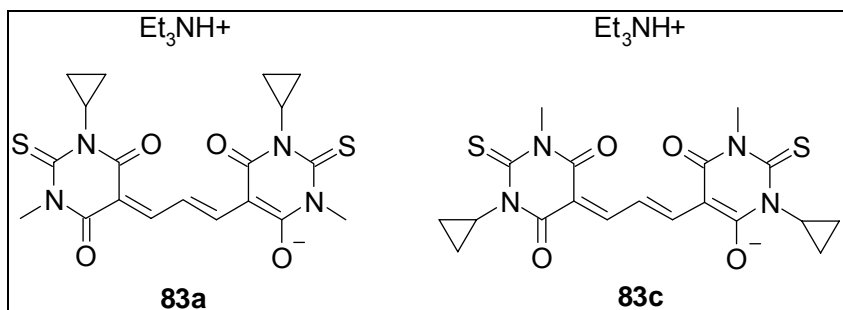


Abbildung 78: Mögliche symmetrische Diastereomere von **83**

Welcher der beiden Fälle tatsächlich vorliegt, könnte durch Kristallstrukturanalyse festgelegt werden. Wahrscheinlich ist aber, daß mit wachsendem sterischen Anspruch der Reste gegenüber den Methylgruppen eher die Form **83c** vorliegt.

4.3.4.2 UV-VIS-Spektren und Solvatochromie der Oxonole

Die Solvatochromie ist, wie für sehr symmetrische Chromophore erwartet, recht schwach ausgeprägt. Exemplarisch ist im Folgenden das Absorptionsmaximum von **58** in verschiedenen Lösungsmitteln

aufgeführt. Die Absorptionsenergie (Wellenzahlen) korreliert linear mit den E_T^N -Werten für die Lösungsmittelpolarität.

Tabelle 17: Absorptionsmaxima und Anregungsenergien von **58** in verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	Absorptions- maximum / nm	Absorptions- maximum / cm^{-1}	E_T^N -Wert
Benzol	543.2	18409	0.111 ^[37]
Chloroform	541.6	18464	0.259 ^[37]
Dichlormethan	540.8	18491	0.309 ^[39]
Dimethylsulfoxid	539.2	18546	0.444 ^[35]
Ethanol	533.6	18741	0.654 ^[67]
Wasser	536.0	18657	1.000 ^[37]

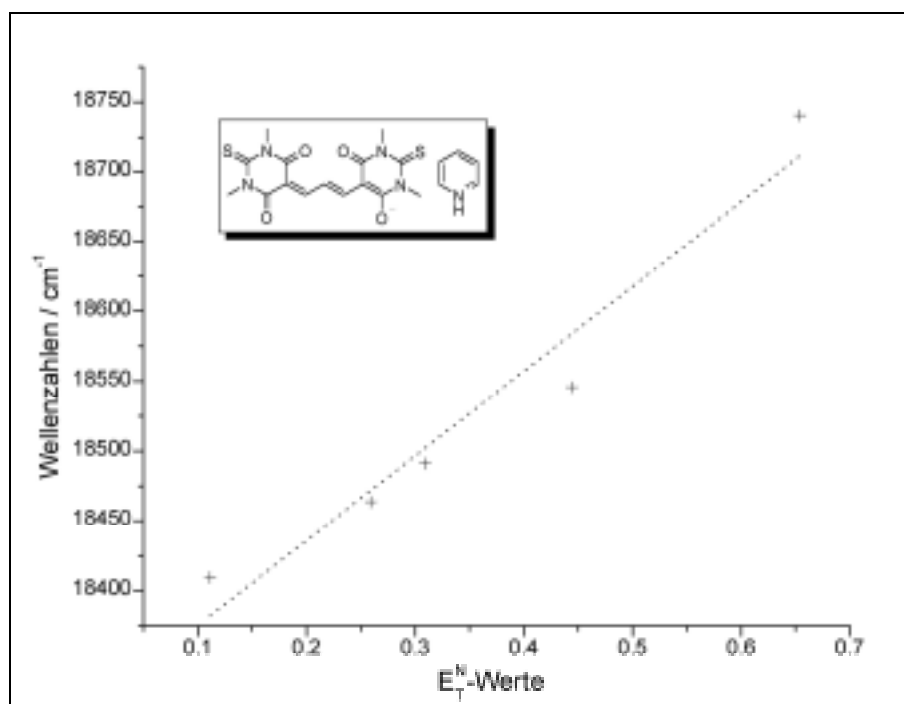


Abbildung 79: Solvatochromie von **58**, lineare Korrelation zwischen Anregungsenergie und Lösungsmittelpolarität, $R = 0.9748$

Wie man erkennt, nimmt mit steigender Lösungsmittelpolarität die Anregungsenergie zu, im UV-VIS-Spektrum zeigt sich hypsochrome Verschiebung (negative Solvatochromie). Dies bedeutet, daß der polare Grundzustand besser stabilisiert wird, je polarer das

Lösungsmittel ist. Der eher unpolare angeregte Zustand wird wenig beeinflusst. Eine Ausnahme bildet Wasser, hier erfolgt trotz zunehmender Polarität gegenüber Ethanol wieder eine Abnahme der Anregungsenergie. Aus diesem Grund wird der Wert für Wasser nicht bei der linearen Korrelation berücksichtigt. Möglicherweise ist die Bathochromie eine Folge der viel stärkeren Protizität des Wassers. Durch die ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen wird offensichtlich auch der angeregte Zustand stabilisiert.

Ein typisches Absorptionsspektrum zeigt Abbildung 80, der Extinktionskoeffizient der Oxonole ist relativ hoch er liegt bei etwa $150\,000\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

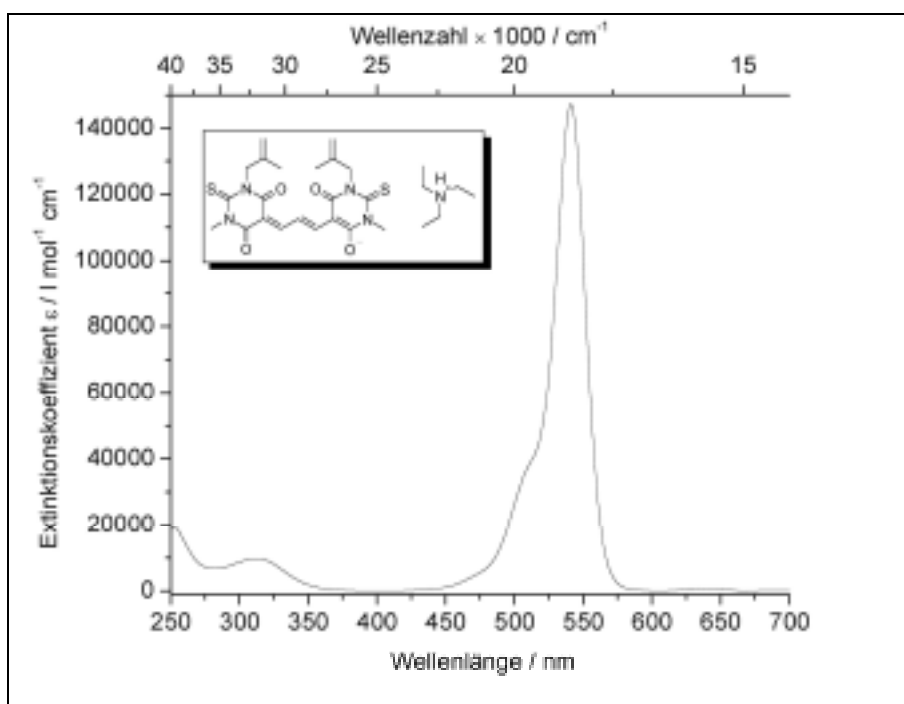


Abbildung 80: UV-VIS-Spektrum von **82** in Dimethylsulfoxid

4.4 Ergebnisse der Farbstofftests

Die dargestellten Oxonole wurden durch das Pharmaforschungszentrum der Bayer AG an Zellen auf Potentialsensitivität getestet. Zwei Testverfahren wurden dabei angewandt.

a) Kaliummessung

Von jedem Farbstoff wird eine Lösung von $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ in Salzlösung nach TYRODE¹ angesetzt. 100 μl dieser Lösung läßt man 30 min auf TWIK2-Zellen² einwirken, damit sich ein Konzentrationsgleichgewicht des Farbstoffs innerhalb und außerhalb der Zellen einstellen kann. Nach Zugabe von 10 μl Kaliumlösung ohne Farbstoff (Endkonzentration von Kalium $40 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) wird 30 min lang die Fluoreszenzzunahme beobachtet.

b) GABA-Messung

Wie vorher, jedoch bei Einsatz von Zellen mit transfizierten GABA_C-Kanälen. Diese Ionenkanäle können durch Gabe von γ -Aminobuttersäure geöffnet werden. Die Depolarisation der Zellen erfolgt hier kontrollierter als durch Zugabe von Kaliumlösung.

Wie bereits erwähnt, ist von besonderem Interesse, daß neben einer großen relativen Änderung der Fluoreszenzintensität die Fluoreszenzänderung nach Änderung des Membranpotentials durch Depolarisation der Zelle möglichst schnell erfolgt. Tabelle 18 führt die durch die Bayer AG experimentell bestimmten Daten auf. Es sind die Ergebnisse beider Meßmethoden (Kaliumkinetik und GABA-Kinetik) aufgeführt. Da nur wenige der Farbstoffe nach beiden Methoden untersucht wurden und die Werte der GABA-Kinetik stark fehlerbehaftet sind (siehe unten), ist ein Vergleich zwischen den Meßmethoden nicht möglich.

¹ 0.8 g NaCl, 0.02 g KCl, 0.02 g CaCl₂, 0.01 g MgCl₂, 0.005 g NaH₂PO₄, 0.1 g NaHCO₃ u. 0.1 g Glucose in 100 ml dest. Wasser (2.7 mmol·l⁻¹ Kalium)

² TWIK = Tandem of P domains in a Weak Inward rectifying K⁺ channel

Tabelle 18: Ergebnisse der Farbstofftests (Erklärung zu den Datenpunkten siehe Text, Strukturformeln siehe Abbildung 58, Seite 92 (Dye B) und Tabelle 16, Seite 111 und Abbildung 81, Seite 121.)

Molekül-Nr.	Kaliumkinetik / Meßpunkte		GABA-Kinetik [X+ Wert] / Meßpunkte			Fluoreszenzmaximum / a. u. (Kaliumkinetik)		
	$t_{\max, 1/2}$			Fluoreszenzintensität vor Kaliumzugabe / a. u. (Kaliumkinetik)	relative Änderung (Kaliumkinetik)	Fluoreszenzmaximum / a. u. (GABA-kinetik)	Fluoreszenzintensität vor GABA-Zugabe / a. u. (GABA-kinetik)	relative Änderung (GABA-Kinetik)
58 (Dye B)	20		12339	4271	2.89	-	-	-
82	71	8	34200	12400	2.76	54842	28222	1.94
83	56	1	20662	6397	3.23	38880	19895	1.95
84	195	32	33309	12426	2.68	59666	39658	1.50
85	120	30	42500	16696	2.55	38880	19895	1.95
86	348	37	32656	14297	2.28	44231	30881	1.43
87	93	36	20662	6397	3.23	52442	27904	1.88
88		17	-	-	-	35139	19757	1.78
89		29	-	-	-	16825	9460	1.78
90		0	-	-	-	119415	94429	1.26
91		0	-	-	-	79252	59113	1.34
92		25	-	-	-	23589	12438	1.90
MP1	175		13844	5156	2.69	-	-	-
MP2	123		32321	9286	3.48	-	-	-
MP3	295		27846	10615	2.62	-	-	-
MP4	173		44750	16875	2.65	-	-	-
MP5	163		40750	18500	2.20	-	-	-

4.4.1 Erklärung der Tabelle 18

Das Thiobarbituratoxonol **58** (Dye B) trägt an allen vier Stickstoffatomen eine Methylgruppe, die Chromophore **82** bis **92** sind in Tabelle 16, Seite 111 aufgeführt.

Die Farbstoffe MP1 bis MP5 sind Chromophore, die bei der Bayer AG bereits vorhanden waren und zu Vergleichszwecken vermessen wurden. Das Gegenion ist bei ihnen nicht bekannt, vermutlich handelt es sich um das Pyridiniumkation, da in vielen Patenten Pyridin als Base und Lösungsmittel eingesetzt wird. Sie entsprechen folgenden Chromophoren:

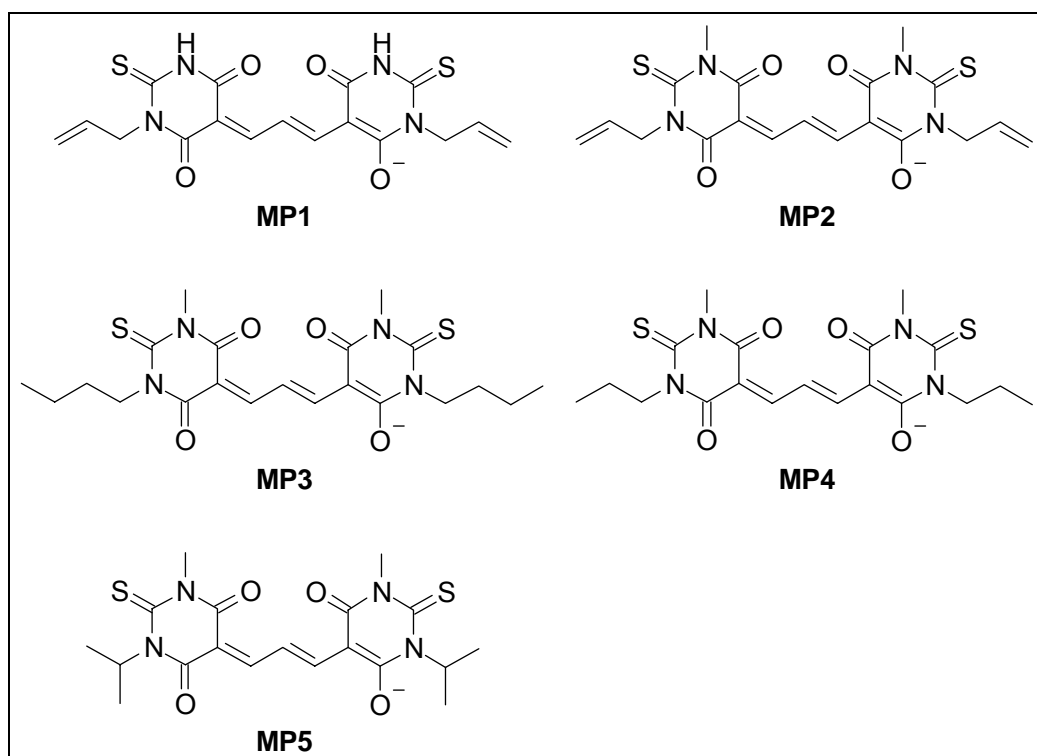


Abbildung 81: Chromophore der Bayer AG (nicht in dieser Arbeit synthetisiert)

Die relative Änderung der Fluoreszenzintensitäten errechnet sich als Quotient aus maximaler Fluoreszenzintensität nach Potentialänderung und der Fluoreszenzintensität vor der Potentialänderung. Sie soll möglichst groß sein.

$t_{\max,1/2}$ ist die Anzahl der Meßpunkte zwischen Potentialänderung (Zugabe von Kalium respektive γ -Aminobuttersäure) und der Hälfte der

maximalen Fluoreszenzintensitätsänderung. Der zeitliche Abstand der Meßpunkte entspricht bei der Kaliummessung etwa 3.6 s (30 min \approx 500 Datenpunkten), bei der GABA-Messung 9 s (30 min \approx 200 Datenpunkten). Bei der GABA-Kinetikmessung ist allerdings die kontinuierliche Messung aus apparativen Gründen nicht möglich gewesen. Die Probe mußte entnommen werden, was etwa 30 s (= X) in Anspruch nahm. Zu den in der Tabelle 18 angegebenen Werten (ebenfalls Angabe in Meßpunkten) muß dieser Wert X addiert werden. Die Werte entziehen sich also einer quantitativen Betrachtung und sind deshalb mit denen aus der Kaliummessung resultierenden nicht vergleichbar.

Die Änderung der Fluoreszenzintensität der Zellen nach Potentialänderung sollte möglichst groß sein. Einerseits wird sie von der Konzentrationsänderung des Farbstoffs in der Zelle abhängen, was wiederum abhängig von der Permeationsgeschwindigkeit (Kinetik) ist. Andererseits ist sie abhängig von der Erhöhung der Fluoreszenzquantenausbeute. Ist dies tatsächlich eine Folge der Anlagerung des Farbstoffs an Zellorganellen, so könnte eventuell die Einführung von funktionellen Gruppen helfen, welche Wasserstoffbrückenbindungen zu den Proteinen der Zelle eingehen können. Dies würde aber auch die Permeationsgeschwindigkeit durch die Zellmembran negativ beeinflussen, da auch hier Wasserstoffbrückenbindungen, zum Beispiel zu den Carbonylgruppen der Lipide in der Doppelschicht möglich sind. Hydrophobe Reste, zum Beispiel Aromaten, sollten die Aggregation an Zellorganellen ebenfalls verstärken. Die Farbstoffe, die aromatische Reste tragen (**85**, **86** und **88** bis **90**), zeigen jedoch entweder eine sehr geringe Fluoreszenzänderung oder eine so langsame Kinetik, daß sie nicht verwendbar sind.

Die geringe Fluoreszenzänderung und Kinetik ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß sie bereits vor dem Eindringen in die Zelle durch ihre Hydrophobie als Aggregate vorliegen. Speziell bei Erhöhen der Ionenstärke (Erhöhen der Polarität des Mediums) durch Kaliumzugabe muß dies in Betracht gezogen werden.

Aus Tabelle 18 sind einige Regeln sofort ablesbar. Kleine Reste an den Thiobarbituratcyclen verbessern offensichtlich die geforderten Eigenschaften der Verbindungen gegenüber großen Resten. Dies spiegelt sich im Raumbedarf wieder und ist in Übereinstimmung mit der Theorie (siehe oben). Die Farbstoffe mit der schnellsten Kinetik **58**, **82**, **83**, **87** tragen Methyl-, Ethyl-, *cyclo*-Propyl- und Methallylseitenketten (Methallyl = 2-Methyl-1-propen-3-yl).

Obwohl der Raumanspruch von **MP1** geringer sein dürfte als von **MP2**, ist die Permeationsgeschwindigkeit des ersteren langsamer. Dies ist auf die Möglichkeit der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zurückzuführen. Die Wasserstoffbrücken werden entweder direkt durch die NH-Gruppe des Thiobarbituratcyclus gebildet oder durch die OH-Gruppe des Tautomeren (Imidsäure). Dies erschwert entweder das Abstreifen der Hydrathülle beim Eintritt in die Membran oder führt zu Bindung an die Phospholipid-Estergruppen. Letzteres wird zum Beispiel von M. KORGER^[68] bei Hydroxygruppen tragenden Carotinoiden in Vesikeln diskutiert.

Die Rotationsfreiheitsgrade der Seitenketten haben ebenfalls Einfluß auf die Permeationsgeschwindigkeit. Je starrer das System ist, um so schneller der Durchtritt. Dies fällt beim Vergleich sehr ähnlicher Seitengruppen auf. **MP4** (Propyl, $t_{\max, \frac{1}{2}} = 173$) ist gegenüber **MP5** (*i*-Propyl, $t_{\max, \frac{1}{2}} = 163$) benachteiligt. **83** (*cyclo*-Propyl, $t_{\max, \frac{1}{2}} = 56$) ist in etwa einem Drittel der Zeit in die Zellen gelangt, die **84** (*cyclo*-Propyl-CH₂-, $t_{\max, \frac{1}{2}} = 195$) benötigt. Ähnliches gilt für die Oxonole **85** und **86** mit den Resten Phenyl bzw. Benzyl.

4.5 Korrelation der Permeationsgeschwindigkeit mit QSAR-Werten

Chemisch-intuitiv ist der Einfluß der Reste auf die Permeationsgeschwindigkeit also zumindest ansatzweise verstanden. Es wäre allerdings von Vorteil, wenn sich eine quantitative oder auf allgemeingültige Zahlenwerte basierende qualitative Beziehung zwischen Permeationsgeschwindigkeit und physikalischen oder chemischen Eigenschaften der Chromophoren herstellen ließe.

Quantitative Structure Activity Relationship (Quantitative Struktur-Wirkungs-Beziehung, QSAR) ist ein in der pharmazeutischen Forschung häufig angewendetes Verfahren. Von einem Pool von Substraten und dazugehörigen Meßwerten wird eine Korrelation zu Daten hergestellt, die theoretisch vorhersagbar oder leicht zugänglich sind. So können die Eigenschaften noch unbekannter Substanzen vorausgesagt werden, gezielte Synthese ist möglich.

Im vorliegenden Fall ist der Datenpool aus der Kaliummessung sehr gering und wegen fehlender Vergleichsmöglichkeiten zwischen beiden Meßmethoden, müssen einige Vertreter aus der GABA-Messung vernachlässigt werden.

Da die Farbstoffe aus wäßriger Lösung in die lipophile Zellmembran wandern, aber auch wieder aus ihr heraus ins wäßrige Zellinnere, dürfte die Lipophilie/Hydrophilie der Substanzen Einfluß auf die Permeationsgeschwindigkeit haben.

Die Permeationsgeschwindigkeit der Farbstoffe wurde bei den Messungen nicht bestimmt. Der Kehrwert von $t_{\max,1/2}$ (Kehrwert der Datenpunkte zwischen Potentialänderung und Hälfte der maximalen Fluoreszenzänderung) entspricht einer Geschwindigkeit und sollte der Permeationsgeschwindigkeit proportional sein.

Der logP-Wert ist ein Maß für die Hydrophilie einer Substanz. Er ist der Logarithmus des Verteilungskoeffizienten eines Stoffes zwischen zwei nicht mischbaren Phasen, einer hydrophilen und einer lipophilen Phase (hier Octanol und Wasser) und beschreibt mit zunehmender Größe zunehmende Lipophilie. Der logP-Wert kann nach dem Inkrement-System von A. K. GHOSE et al.^[69], das aus experimentell bestimmten Werten entwickelt wurde, errechnet werden. Die theoretischen Werte sind laut GHOSE et al. in guter Übereinstimmung mit den experimentell bestimmten. Dadurch ist er eine leicht zugängliche physikalische Größe, die die Permeationsgeschwindigkeit vermutlich beeinflusst. Die Berechnung der logP-Werte nach diesem Inkrementensystem erfolgt für die Anionen der Farbstoffe. Dies hat zwei Gründe. Die Gegenionen der die Datenbasis bildenden Oxonole sind nicht alle eindeutig bekannt, außerdem ist fraglich, ob die Gegenionen

mit den Farbstoffen durch die Membran wandern. Im Übrigen werden sie möglicherweise ohnehin wegen der hohen Kaliumkonzentration im Medium gegen diese Ionen ausgetauscht. Der logP-Wert für **85** beträgt nach dem Inkrementsystem 6.34, wenn die negative Ladung am Carbonylsauerstoff neben dem Phenylrest angenommen wird. Die mesomere Grenzstruktur, die die negative Ladung am Carbonylsauerstoff neben der Methylgruppe trägt, hat nach dem Inkrementsystem einen logP-Wert von 5.89. Dies resultiert aus verschiedenen Inkrementen für den Thiobarbiturat-Stickstoff je nachdem, ob an ihn direkt ein aromatischer oder aliphatischer Rest gebunden ist. Für die übrigen Farbstoffe entsteht diese Differenz nicht. So erhält der Stickstoff in **86**, an den die Benzylgruppe gebunden ist, das gleiche Inkrement wie der Stickstoff, der die Methylgruppe trägt, denn in beiden Fällen handelt es sich um die Bindung zwischen einem aliphatischen Kohlenstoffatom und dem Stickstoffatom. Für **85** wird mit dem Mittelwert von logP aus beiden mesomeren Strukturen gerechnet.

Tabelle 19: QSAR, logP-Werte (berechnet)

Substanz-Nr	logP	$t_{\max,1/2}$ / Datenpunkte	$\log(1/t_{\max,1/2})$
Dye B 58	2.52	20	-1.30
DiSBAC _{1,Methallyl} 82	4.31	71	-1.85
DiSBAC _{1,Cyclopropyl} 83	3.32	56	-1.75
DiSBAC _{1,Cyclopropylmethyl} 84	3.94	195	-2.29
DiSBAC _{1,Phenyl} 85	6.11	120	-2.08
DiSBAC _{1,Benzyl} 86	6.08	348	-2.54
DiSBAC _{1,2} 87	3.21	93	-1.97
DiSBAC _{0,Allyl} MP1	3.51	175	-2.24
DiSBAC _{1,Allyl} MP2	4.00	123	-2.09
DiSBAC _{1,Butyl} MP3	4.94	295	-2.47
DiSBAC _{1,Propyl} MP4	4.15	173	-2.24
DiSBAC _{1,<i>i</i>-Propyl} MP5	4.03	163	-2.21

Es läßt sich feststellen, daß ein grober Trend gegeben ist durch die Beziehung zwischen dem Logarithmus von $(t_{\max,1/2})^{-1}$ und $\log P$, wie Abbildung 82 zeigt. Die zugehörigen Werte sind Tabelle 19 zu entnehmen. Da **MP1** sich durch seine Möglichkeit H-Brückenbindungen zu bilden von den anderen Oxonolen unterscheidet, wird es bei den folgenden Korrelationen nicht berücksichtigt.

Es ist im wesentlichen erkennbar, daß die Substanzen mit kleineren $\log P$ -Werten, also geringerer Lipophilie, zu geringeren Halbwertszeiten neigen, was höheren Permeationsgeschwindigkeiten entspricht. Alle Farbstoffe sind so deutlich lipophil, daß es von Vorteil ist, Farbstoffe mit stärker ausgeprägter Hydrophilie zu synthetisieren.

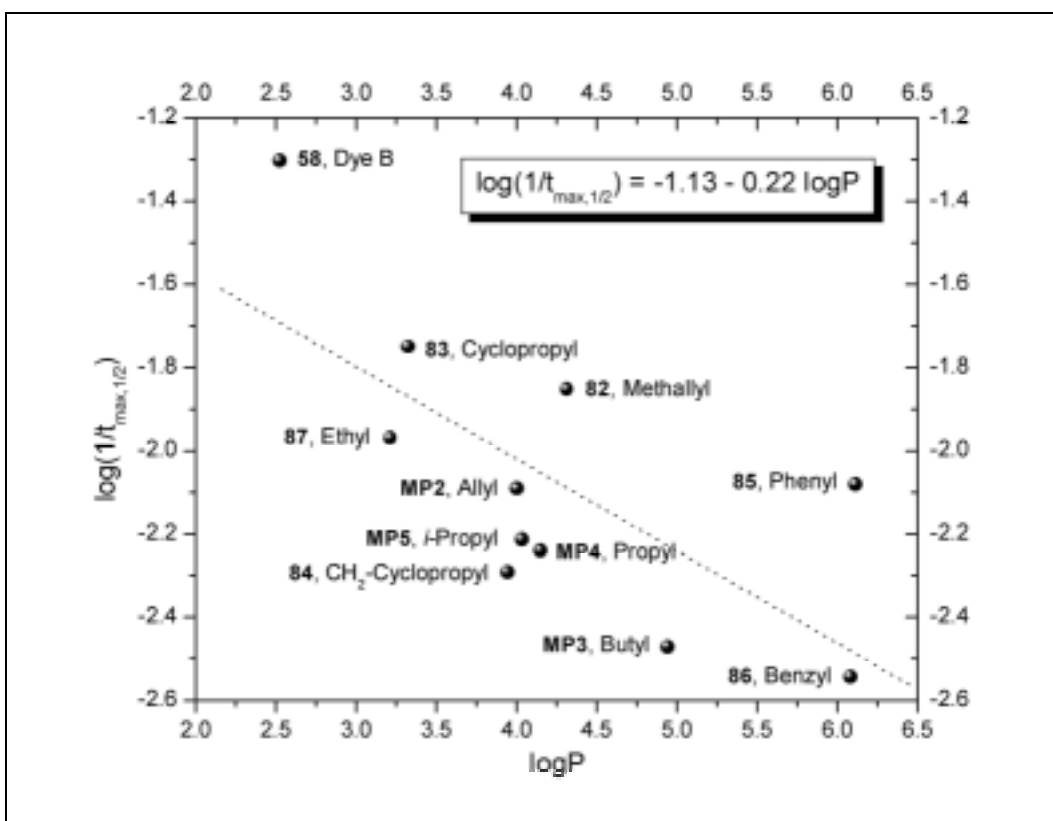


Abbildung 82: Korrelation zwischen $\log P$ und Permeationsgeschwindigkeit

Die hydrophilen oder lipophilen Eigenschaften eines Stoffes sind jedoch sicherlich nicht der einzige Parameter, der auf die Permeationsgeschwindigkeit einwirkt. Es gibt viele literaturbekannte Bemühungen, die experimentellen Werte durch Multiparameter-

Korrelation möglichst genau abzubilden. So erreichen E. J. LIEN und H. GAO mit fünf Parametern eine sehr genaue Vorhersagbarkeit der Hautdurchlässigkeit des Menschen für eine Reihe von Medikamenten^[70]. In dieser Arbeit ist ein sehr genauer *multiparameter fit* aufgrund der geringen Datenbasis ein unnötiger Aufwand. Für die Vorgabe einer Syntheserichtung soll die Korrelation möglichst einfach gehalten sein, bei einer deutlich breiteren Datenbasis kann eine Verfeinerung leicht nachgeholt werden.

Da es sich um Durchtritt durch Lipidmembranen handelt, sollte ein großer Faktor der Permeationsgeschwindigkeit die Diffusion durch lipophile Medien sein. In einem Übersichtsartikel von W. F. TEN BERGE et al.^[71] werden verschiedene Modelle zur Berechnung der Permeationsgeschwindigkeit durch die Haut beschrieben. In allen Fällen handelt es sich um Abhängigkeiten von $\log P$ oder der nichtlogarithmischen Form K_{ow} . Fast alle erwähnten Modelle beschreiben aber zusätzlich den Einfluß des Molekulargewichtes auf die Permeationsgeschwindigkeit durch Linearkombination von $\log P$ und Molekulargewicht. Ein einfaches, aber nach TEN BERGE et al. gut mit experimentellen Daten korrelierendes Modell, das nur die Permeation durch *lipophile* Bereiche der Haut beschreibt ist das von R. H. GUY und R. O. POTTS^[72]. Der Logarithmus des Permeationskoeffizienten errechnet sich hier durch eine Linearkombination aus $\log P$ und der Wurzel des Molekulargewichtes.

Der Diffusionskoeffizient für ideale Gase ist nach G. WEDLER^[73] proportional zur reziproken Wurzel der Masse, aber auch zum reziproken quadratischen Radius der Teilchen. Das Molekulargewicht sollte also eher *reziprok* in die Linearkombination eingehen. Außerdem wäre es physikalisch sinnvoll, den Radius der Moleküle ebenfalls mit in die Korrelation einzubeziehen.

Für die Berechnung der Masse und der Radien werden, wie für die Berechnung der $\log P$ -Werte, die Anionen der Oxonole zugrunde gelegt. Für die Berechnung der Radien muß zunächst eine Geometrieoptimierung durch AM1-Rechnung^[74] erfolgen. Die

Berechnung erfolgte mit der Version 6.01 (Evaluation) des Windows-Programms *Hyperchem*.

Als Start-Geometrie wurden in allen Fällen die Reste an den Thiobarbiturat-Stickstoffatomen so angeordnet, daß gleiche Reste auf der gleichen Seite des π -Systems stehen. Die größeren Reste stehen auf der Seite, auf der sie den größeren Abstand zueinander haben. Desweiteren sind die Reste so angeordnet, daß der Farbstoff eine Spiegelebene senkrecht zur längsten Molekülachse besitzt. Abbildung 83 zeigt die Verhältnisse in einer räumlichen Darstellung.

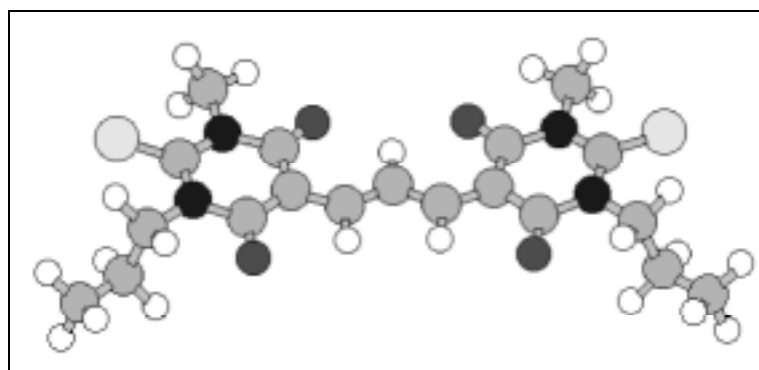


Abbildung 83: räumliche Darstellung von DiSBAC_{1,3} **MP4**

Bei der AM1-Rechnung wird keine *configuration interaction* berücksichtigt, sie erfolgt nach der *Restricted-Hartree-Fock-Methode*. Die Geometrieoptimierung erfolgt nach der Methode von *Polak-Ribiere*, als Endpunkt der Rechnung wird eine Unterschreitung des Energie-Gradienten definiert, als Grenze wird $0.1 \text{ kcal}\cdot\text{Å}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ festgesetzt. Der Energiegradient ist die erste Ableitung der Gesamtenergie bei Berücksichtigung der Bewegung jedes Atoms in x-, y- und z-Richtung. Ändert sich die Gesamtenergie des Moleküls weniger als der angegebene Wert, befindet sich das Molekül an oder nahe bei einem Energieminimum oder einem Sattelpunkt.

Nach der Geometrieoptimierung wird das *solvent accessible volume* berechnet, das Volumen das durch das Molekül von Lösemittel frei bleibt. Die Lösemittelmoleküle, hier Wasser, werden dabei als Kugeln mit dem Radius 1.4 Å angenommen. Die Berechnung erfolgt nach der Methode von N. BODOR et al.^[75] und A. GAVEZZOTTI^[76]. Dabei wird

jedes Atom des Moleküls von einem Würfel der Kantenlänge des Atomradius umgeben. Der Mittelpunkt des Kubus liegt im Mittelpunkt des Atoms. Jeder Punkt des Würfels wird darauf untersucht, ob er innerhalb des Atomradius liegt und nicht zu einem vorher berechneten Atom gehört. Der Quotient der innerhalb liegenden Punkte geteilt durch alle Würfelpunkte wird mit dem Kugelvolumen des Atoms multipliziert. Dadurch wird berücksichtigt, daß Atome im Molekül ihre Van-der-Waals-Radien unterschreiten können. Die Summe aller Kugelvolumina ist das Molekülvolumen. Je höher die Anzahl der Würfelpunkte, desto genauer ergibt sich das Volumen des Moleküls. In der vorliegenden Arbeit wird mit $20 \times 20 \times 20$ Punkten gerechnet. Auf die gleiche Art können auch Freiräume in einem Molekül berechnet werden. Dabei ist oben erwähnter Quotient die Anzahl der außerhalb liegenden Punkte geteilt durch alle Würfelpunkte.

Aus dem errechneten *solvent accessible volume* (V_{sa}) wird der Molekülradius (r) des Oxonols errechnet, wobei das Oxonol als Kugelförmig angenommen wird. Es ergibt sich also:

$$r = \sqrt[3]{\frac{3 V_{sa}}{4 \pi}} \quad \text{Gl. (14.)}$$

Tabelle 20 können die errechneten Werte für die synthetisierten und mittels Kaliummessung getesteten Oxonole entnommen werden.

Tabelle 21 enthält die aus den errechneten Werten (Tabelle 20) resultierenden Korrelationsparameter ($\log P$ und $r^{-2} \cdot m^{-1/2}$). Diese Parameter werden mit den experimentell bestimmten Werten $\log(1/t_{\max, 1/2})$ in einem Zweiparameter-Fitting korreliert. **MP1** wird aus den genannten Gründen dabei nicht berücksichtigt. Es ergibt sich folgende Beziehung:

$$\log\left(\frac{1}{t_{\max, 1/2}}\right) = -6.2644 + 0.12799 \cdot \log P + 3289.119 \cdot \frac{1}{r^2 \cdot \sqrt{m}} \quad \text{Gl. (15.)}$$

Tabelle 20: solvent accessible volume und Masse der Oxonolanionen

Substanz-Nr	Masse (Anion) / g·mol ⁻¹	solvent accessible volume / Å ³	Molekül- radius / Å
Dye B 58	379.43	965.01	6.130
DiSBAC _{1,Methallyl} 82	459.56	1210.97	6.612
DiSBAC _{1,Cyclopropyl} 83	431.50	1117.64	6.438
DiSBAC _{1,Cyclopropylmethyl} 84	459.56	1200.02	6.592
DiSBAC _{1,Phenyl} 85	503.57	1302.68	6.775
DiSBAC _{1,Benzyl} 86	531.62	1390.00	6.923
DiSBAC _{1,2} 87	407.48	1064.05	6.333
DiSBAC _{0,Allyl} MP1	403.45	1042.76	6.291
DiSBAC _{1,Allyl} MP2	431.50	1128.95	6.459
DiSBAC _{1,Butyl} MP3	463.59	1279.33	6.734
DiSBAC _{1,3} MP4	435.54	1171.31	6.539
DiSBAC _{1,i-Propyl} MP5	435.54	1155.64	6.510

Tabelle 21: Korrelationsparameter der der Oxonolanionen

Substanz-Nr	log(1/t _{max,½})	logP	r ⁻² ·m ^{-½}	log(1/t _{max,½}) theoret.
58	-1.30	2.52	1.37·10 ⁻³	-1.45
82	-1.85	4.31	1.07·10 ⁻³	-2.20
83	-1.75	3.32	1.16·10 ⁻³	-2.02
84	-2.39	3.94	1.07·10 ⁻³	-2.22
85	-2.08	6.11	9.71·10 ⁻⁴	-2.29
86	-2.54	6.08	9.05·10 ⁻⁴	-2.51
87	-1.97	3.21	1.24·10 ⁻³	-1.79
MP1	-2.24	3.51	1.26·10 ⁻³	-1.67
MP2	-2.09	4.00	1.15·10 ⁻³	-1.96
MP3	-2.47	4.94	1.02·10 ⁻³	-2.26
MP4	-2.24	4.15	1.12·10 ⁻³	-2.05
MP5	-2.21	4.03	1.13·10 ⁻³	-2.03

Mit Gleichung 15 (siehe Seite 129) lassen sich umgekehrt bei bekannten Werten für $\log P$ und $r^{-2} \cdot m^{-1/2}$ die theoretischen Werte $\log(1/t_{\max,1/2})_{\text{calc}}$ errechnen. In Abbildung 84 sind berechnete und experimentelle Werte der Substanzen gegeneinander aufgetragen.

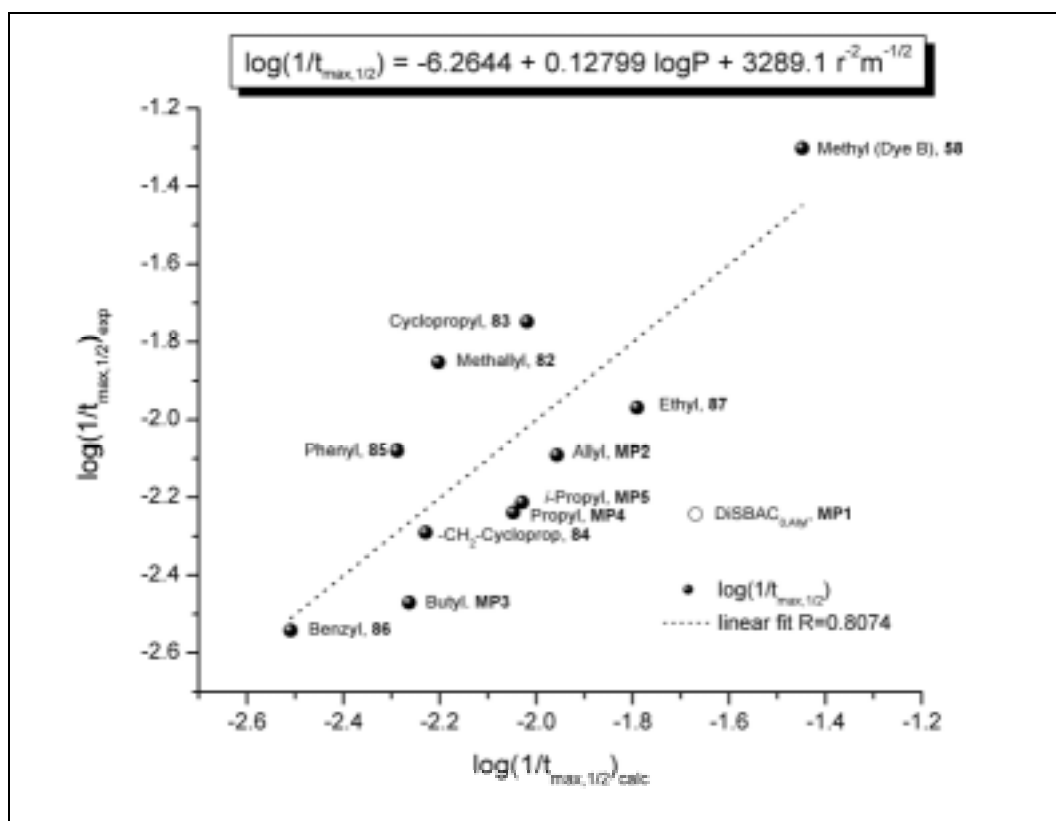


Abbildung 84: experimentelle und berechnete Werte $\log(1/t_{\max,1/2})$ nach Zweiparameter-Korrelation

MP1 ist ebenfalls aufgeführt und als Ausreißer zu erkennen. Alle übrigen Werte gruppieren sich um die Winkelhalbierende. Es scheint also durchaus eine Beziehung zwischen der Permeationsgeschwindigkeit und den herangezogenen physikalisch-chemischen Eigenschaften der Substanzen zu geben. Im Rahmen der starken Vereinfachung der tatsächlichen Zusammenhänge und bei der Berechnung der Parameter und in Anbetracht der sehr geringen Datenbasis ist eine ungefähre Einordnung der Permeationseigenschaften von noch unbekanntem Substanzen durchaus zu treffen. In Abbildung 85 ist dies noch einmal graphisch verdeutlicht.

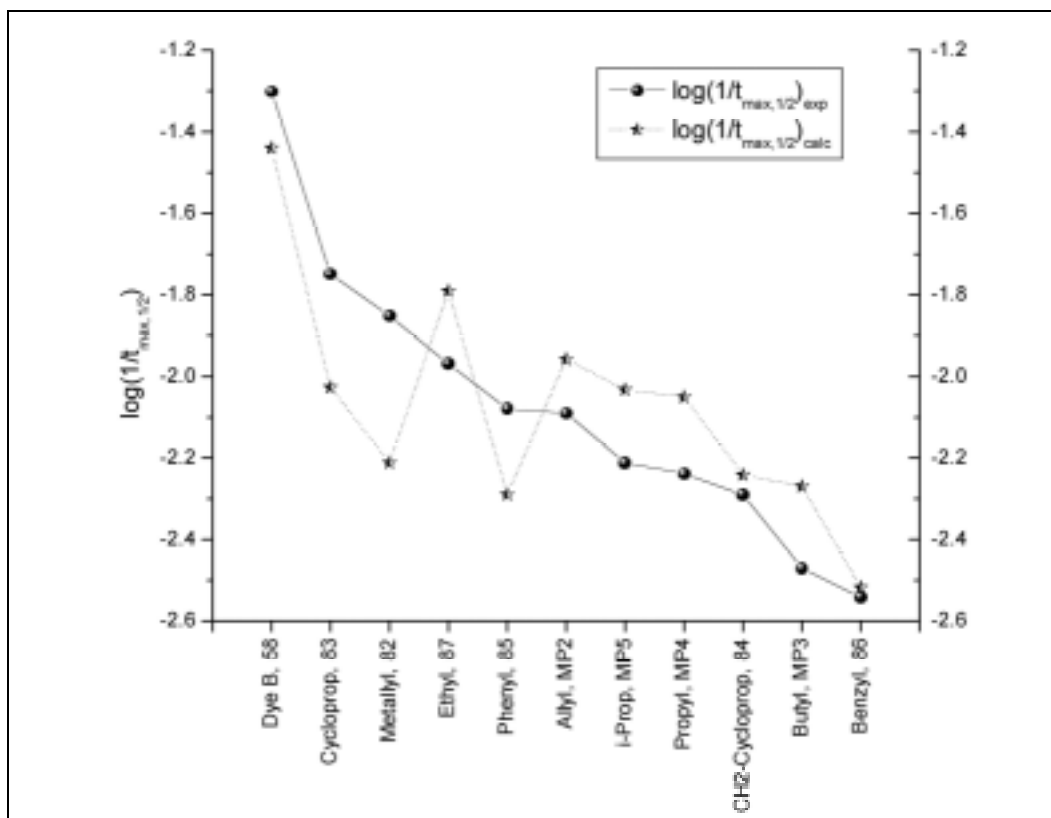


Abbildung 85: Vergleich der experimentellen und berechneten Permeationseigenschaften

Synthesevorhaben können nun viel gezielter angegangen werden. Eine theoretische Betrachtung durch M. HANDKE^[77] von langkettigeren Derivaten (Ersatz der Methylreste durch Ethylreste) und von Oxo-Derivaten (Barbituratoxonole) anhand der hier vorgestellten Korrelation zeigt, daß die Reihe der Oxo-Derivate Vertreter birgt, die möglicherweise noch höhere Permeationsgeschwindigkeiten zeigen als die Referenzsubstanz DyeB. Die Ethylderivate zeigen in der Theorie die erwartete langsamere Wanderung durch die Membran. Die Arbeit von M. HANDKE wird zeigen, ob das hier aufgestellte Modell mit einer größeren Datenbasis besser angepaßt werden kann und ob die Oxo-Derivate mit dem gleichen Modell beschrieben werden können.

5 Zusammenfassung

Für die pharmazeutische Industrie ist es notwendig in kürzestmöglicher Zeit eine hohe Anzahl Substanzen auf bestimmte Eigenschaften testen zu können. Bei der Suche nach neuen Wirkstoffen haben zwei Fragestellungen eine gewisse Schlüsselposition inne. Zum einen ist es von Interesse zu wissen, ob zwei Substanzen eine gewisse Affinität zueinander haben, zum Beispiel ob und zu welchem Zeitpunkt zwei Domänen eines Proteins zusammenfinden. Andererseits ist die automatisierte Beobachtung der Änderung des Membranpotentials von Zellen wichtig.

Um ein solches Verfahren zu automatisieren, ist es von Vorteil, wenn die Antwort auf die Fragestellung in Form von Lichtsignalen erfolgt. Auf Anregung durch das *Pharmaforschungszentrum der Bayer AG in Wuppertal* beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Synthese von Fluoreszenzfarbstoffen, die in einem solchen *High Throughput Screening* (HTS, Hochdurchsatzmessung) als Proteinaffinitäts- oder Membranpotentialsonden eingesetzt werden können.

5.1 Proteinaffinitäts-sonden

Die Messung der Affinität zweier Proteine erfolgt im dafür geeigneten Verfahren als relative Abstandsmessung. Das zu testende Protein 1 ist dabei mit einem Biolumineszenzsystem versehen. Die Bibliothek der auf Affinität zu diesem lumineszierenden Protein 1 zu untersuchenden Proteine 2 ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff versetzt, der sich kovalent an Proteine bindet. Zeigt sich bei Zugabe eines Proteins 2 zu Protein 1 die Bildung eines Proteinpaares, also eine gewisse Affinität, so ist die räumliche Nähe der beiden Proteine sehr wahrscheinlich. Damit ist auch der mittlere Abstand zwischen Biolumineszenzsystem und Fluoreszenzfarbstoff gering. Bei gegebenem Biolumineszenz-Donor und entsprechend gestaltetem Fluoreszenz-Akzeptor kann strahlungsloser Energietransfer nach Förster (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*, BRET) erfolgen. Die Proteinaffinität ist dann durch Fluoreszenzmessung verfolgbar.

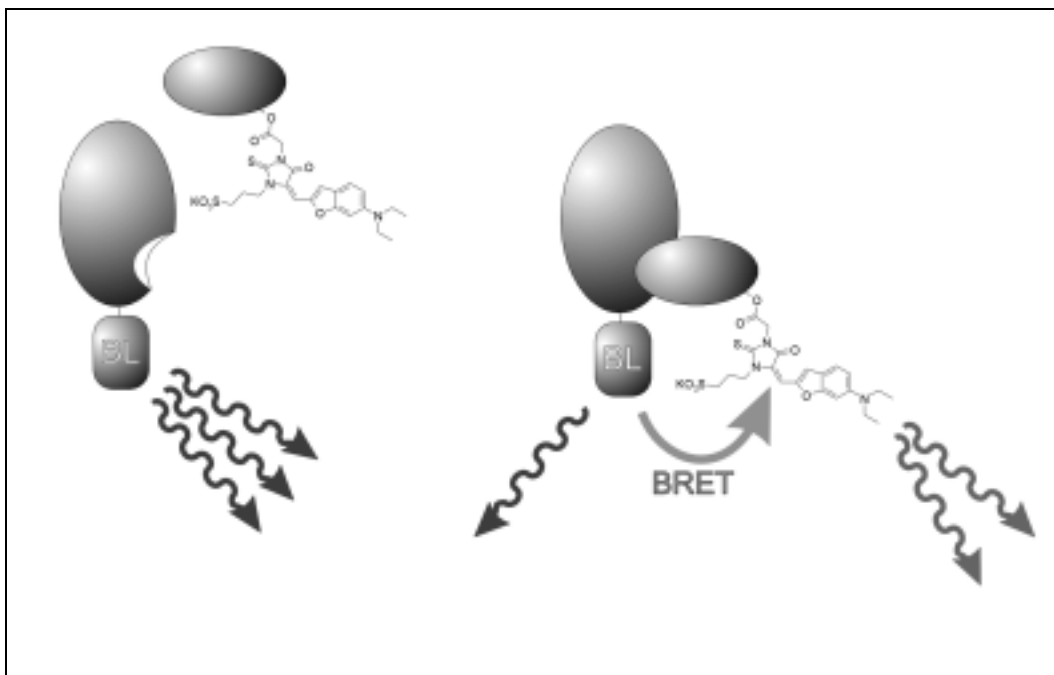


Abbildung 86: Detektion von Protein-Protein-Wechselwirkungen durch Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer (BRET). BL = Biolumineszenz-System

Dazu muß der Fluoreszenzfarbstoff mit seinem Absorptionsmaximum im Bereich des Biolumineszenzmaximums liegen und aus meßtechnischen Gründen eine möglichst große Stokes-Verschiebung und Fluoreszenzquantenausbeute aufweisen. Um die Wasserlöslichkeit des Proteins nicht negativ zu beeinflussen, muß auch der Farbstoff wasserlöslich sein. Letztlich muß zur kovalenten Bindung an das Protein der Farbstoff mit einer aktivierten Carboxylgruppe (NHS-Ester) versehen sein.

Als günstig hat sich ein Merocyaninfarbstoff erwiesen, der aus dem Benzofurancarbaldehyd **5** (siehe Abbildung 88) und einem Heterocyclus aufgebaut wird. Da der Heterocyclus als auxochrome Gruppe die spektroskopischen Eigenschaften stark beeinflusst, ist der Farbstoff theoretisch durch Variation dieses Heterocyclus an andere BRET-Donoren anzupassen, also sehr flexibel einsetzbar.

Als spektroskopisch geeignet für das von der Bayer AG vorgesehene Biolumineszenzsystem hat sich der 3-Ethylthiohydantoin-Heterocyclus als auxochrome Gruppe erwiesen. Kondensiert mit dem Benzofurancarbaldehyd **5** erhält man den Modellchromophor **9** (siehe

Abbildung 87). In Dichlormethan beträgt die Stokes-Shift von **9** 94 nm (3052 cm^{-1}), der Abstand der Emissionsmaxima von Biolumineszenz und Farbstoff-Emission von **9** beträgt 134 nm (4848 cm^{-1}). Die Fluoreszenzquantenausbeute beträgt in Aceton $\Phi_{\text{Fl}} = 0.13$ in Dichlormethan liegt sie sogar bei $\Phi_{\text{Fl}} = 0.42$. Dies sind jedoch Anhaltspunkte, in welcher Größenordnung die Fluoreszenzquantenausbeute im biologischen System liegt, kann nur das Experiment beantworten.

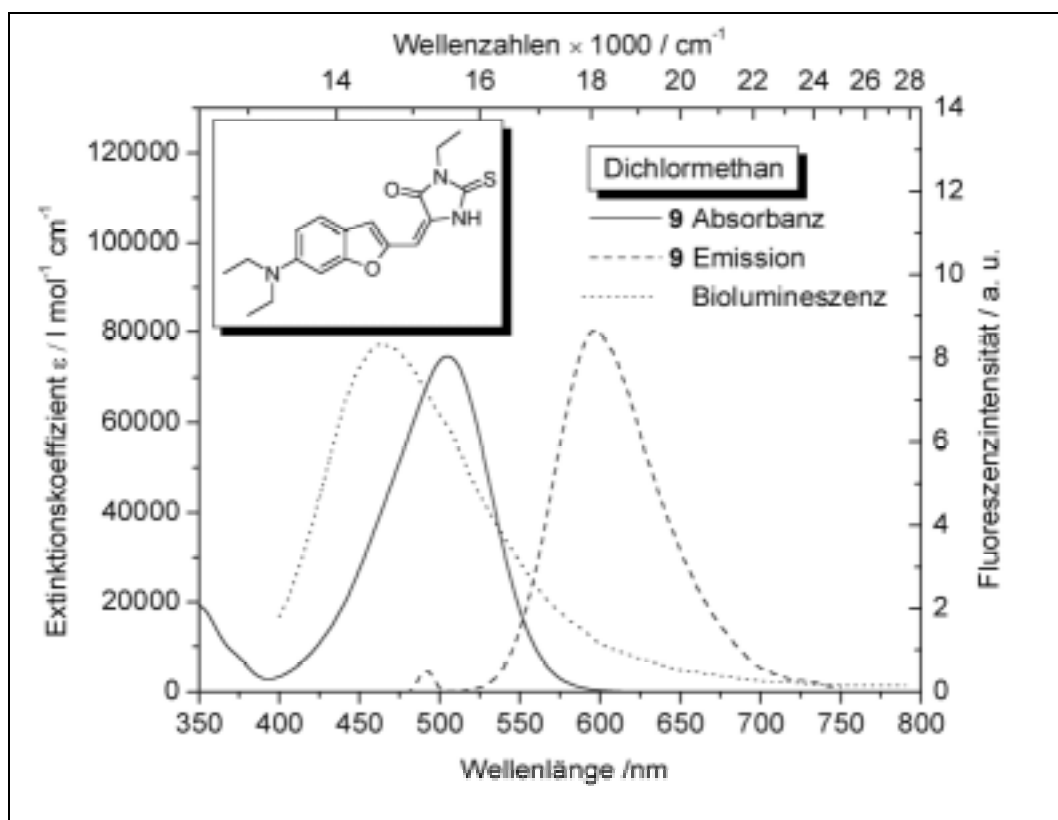


Abbildung 87: Bandenlage von Absorbanz und Emission von **9** in Dichlormethan

Damit ist der Chromophor vom spektroskopischen Gesichtspunkt als geeignet anzusehen. Bei der Auswahl der auxochromen Gruppe muß außerdem darauf geachtet werden, daß in der Synthese der resultierende Farbstoff mit einer Sulfonsäure- und einer Carboxylgruppe versehen werden kann, um die Wasserlöslichkeit zu gewährleisten und die Möglichkeit für eine kovalente Bindung zu geben. Nach der Aktivierung der Carboxylgruppe als

N-Hydroxysuccinimidylester erhält man den Zielchromophor **56** (Abbildung 88).

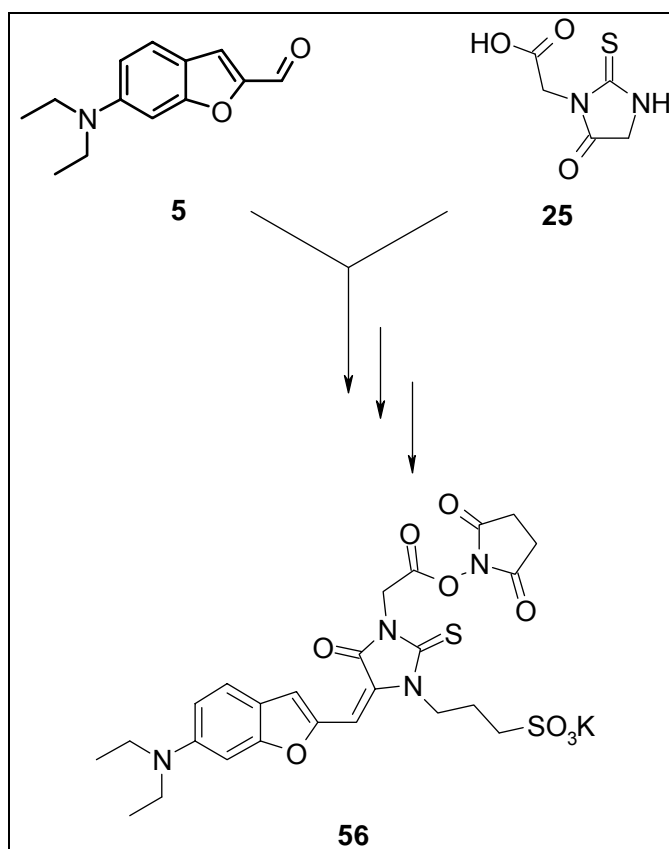


Abbildung 88: Darstellung des Zielchromophors für HTS-Proteinaffinitätssonden

5.2 Potentialsonden

Es ist bereits bekannt, daß Oxonole, speziell Thiobarbituratoxonole, mit Fluoreszenzintensitätsänderung auf Änderung des Transmembranpotentials von Zellen reagieren, sofern diese zuvor mit dem Farbstoff gefärbt wurden.

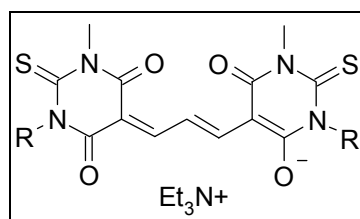


Abbildung 89: Allgemeine Struktur von Thiobarbituratoxonolen. Das Gegenion ist variabel

Dabei verteilen sich die unter physiologischen Bedingungen negativ geladenen Oxonole aufgrund des Potentialunterschieds innerhalb und außerhalb der Zelle zwischen diesen beiden Räumen. Innerhalb der Zelle adhäsieren die Farbstoffe an Zellorganellen, wodurch Fluoreszenzhyperchromie gegenüber dem wässrigen Medium erfolgt. Ändert sich das Membranpotential, so ändert sich auch der Verteilungsquotient. Bei Depolarisation strömt mehr Farbstoff in die Zelle, eine Zunahme der Fluoreszenzintensität ist die Folge. Für den Einsatz von Thiobarbituratoxonolen im *High-Throughput-Screening* ist eine möglichst schnelle Permeation durch Zellmembranen wünschenswert. Dabei erfolgt der Übergang aus wässrigem extrazellulärem Milieu durch die lipophile Zellmembran wiederum in das wässrige Zellinnere. Inwiefern die Permeationsgeschwindigkeit durch Variation der Seitenketten (R in Abbildung 89) von Thiobarbituratoxonolen beeinflussbar ist, ist Gegenstand dieser Arbeit.

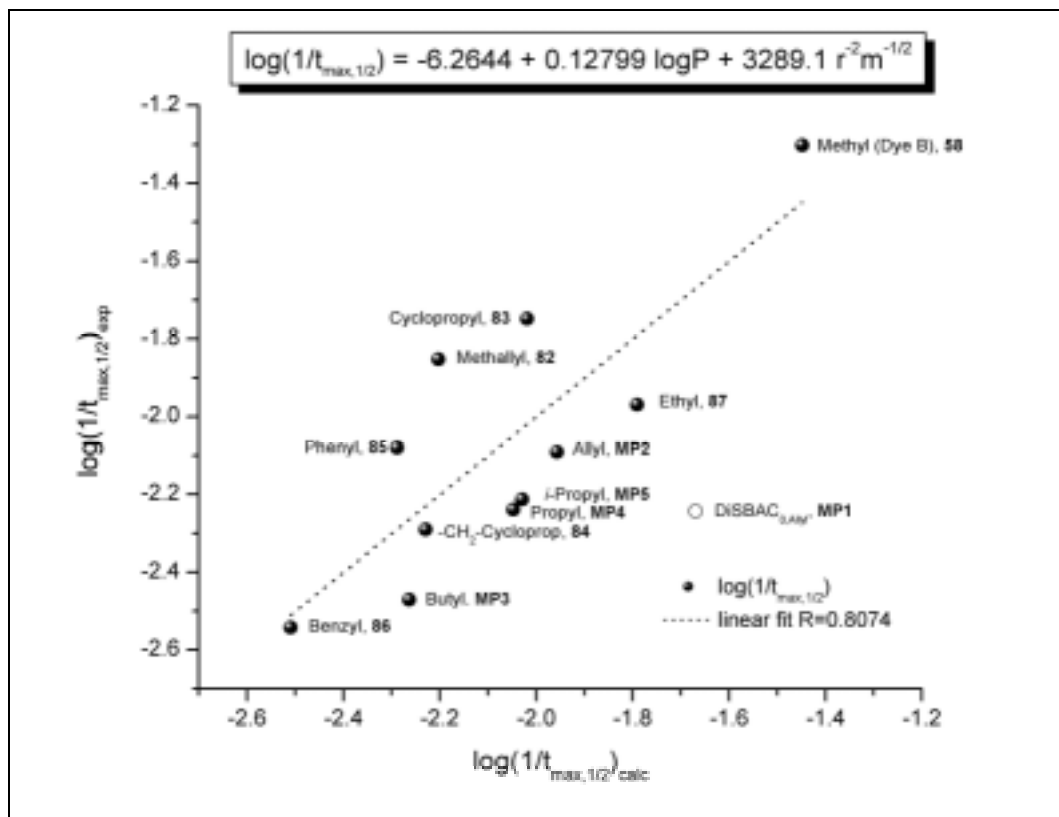


Abbildung 90: experimentelle und berechnete Werte $\log(1/t_{\max,1/2})$ nach Zweiparameter-Korrelation

Es konnte gezeigt werden, daß eine Beziehung besteht zwischen der Lipophilie ($\log P$) und der Größe (*Solvent Accessible Volume*) und Masse der Oxonolanionen einerseits und der Geschwindigkeit der Fluoreszenzantwort auf Potentialänderung, also der Permeationsgeschwindigkeit andererseits.

$\log P$ und *solvent accessible volume* sind aus Inkrementsystemen für nahezu jedes Molekül nach rechnergestützter Geometrieoptimierung (AM1) berechenbar. Mit der bekannten Masse ergibt sich für die getesteten Oxonolderivate die in Abbildung 90 angegebene Beziehung. Ob diese auch bei größerer Datenbasis bestand hat und auch für stärker modifizierte Oxonolderivate gilt, wird zur Zeit in weiteren Arbeiten ermittelt. Die Synthese von noch besser geeigneten Potentialsonden, die eine schnellere Kinetik zeigen, ist damit gezielter möglich.

6 Experimentalteil

Folgende Geräte und Chemikalien wurden für die experimentelle Arbeit benutzt:

Dünnschichtchromatographie:	Kieselgel 60, 0.2 mm Schichtdicke auf Aluminiumfolie, UV-Indikator F ₂₅₄ (Merck)
Säulenchromatographie:	Kieselgel 60 (0.040–0.063 mm, Merck) Kieselgel RP-18 (Merck)
Schmelzpunkte:	Reichardt Thermovar
Infrarotspektroskopie:	Bruker Vektor 22
Massenspektrometrie:	Varian MAT 311 A (EI) Finnigan MAT 8200 (FAB, Matrix: 3-Nitrobenzylalkohol) Bruker Ultraflex TOF (MALDI bzw. LDI)
UV/Vis-Spektroskopie:	Perkin-Elmer Lambda 19
Brechungsindex:	Carl-Zeiss-Refraktometer 90213
Fluoreszenzspektroskopie:	Jasco FP-6200 Spektrofluorometer
Kernresonanzspektroskopie:	Bruker DRX 500 Varian VXR 300 Bruker DRX 200
Elementaranalysen:	Institut für Pharmazeutische Chemie der HHU Düsseldorf

Für die Durchführung der Messungen danke ich:

Herrn Dr. S. Augner ($^1\text{H-NMR}$; Bruker DRX 500)

Frau M. Beuer ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$; Varian VXR 300)

Herrn P. Behm ($^1\text{H-NMR}$; Bruker DRX 200 + 500)

Frau I. Menzel und Frau H. Webers (UV-VIS-Spektren, IR-Spektren)

Herrn R. Bürgel (MS, GC-MS)

Herrn Dr. P. Tommes (MS, GC-MS)

Außerdem möchte ich mich bei folgenden Damen und Herren, die zur Durchführung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben, an dieser Stelle herzlich bedanken:

Herrn Priv. Doz. Dr. S. Kubik für die Bereitstellung des Fluoreszenzspektrometers und seinem Arbeitskreis für die bereitwillige Aushändigung der Schlüssel zum Spektrometerraum, wenn es mal wieder länger gedauert hat.

Herrn Priv. Doz. Dr. K. Schaper für die kritische Durchsicht dieser Arbeit, Anregungen und Belehrungen.

Herrn Schönstein für Geräte und Labormaterial.

Frau Dr. W. Groß und den Herren Dipl.-Chemikern D. Dommaschke, P. Doro und M. Korerger für gute Atmosphäre im Labor, letzterem besonders für multimediale Exzesse.

Den Kollegen, speziell den *Jungs* vom Gang 26.42.00 für Freundschaft und Kollegialität, besonders den Herren Dipl.-Chemikern P. Noack (nicht-ÖPNV – hier sei nochmal an den *Silbernen Donnervogel* erinnert, den ich in der Diplomarbeit vergaß), S. Herweg (kulinarische Exzesse, Koffein- und Nicotinlogistik).

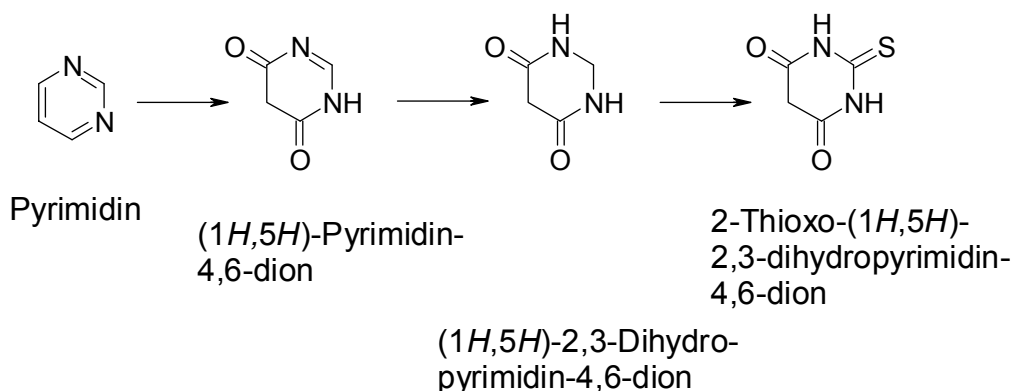
Marita, die lange Geduld bewiesen hat.

6.1 Zur Nomenklatur von Thiobarbiturat-Derivaten

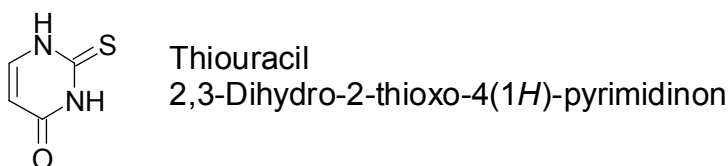
Nach der derzeit gültigen IUPAC-Nomenklatur^[78] gibt es zwei Möglichkeiten der Benennung von cyclischen Verbindungen, die Ketogruppen enthalten:

Regel C-315.1 (alternativ zu den Regeln C-314.1 und C-316.1) – Polycarbocyclische und heterocyclische Ketone können mit dem Gebrauch des Suffix „-on“ benannt werden, um darauf hinzuweisen, daß entweder eine $>CH_2$ oder eine $>CH-$ Gruppe in einem ungesättigten oder aromatischen System durch eine $>C=O$ Gruppe ersetzt wurde. War das Ringsystem aromatisch, wird nach der Einführung einer oder mehrerer $>C=O$ Gruppen die größtmögliche Anzahl nicht kumulativer Doppelbindungen hinzugefügt und jedes Wasserstoffatom, daß noch zu ergänzen ist [, damit kein Radikal entsteht (Anm. d. Übers.)] wird entsprechend aufgeführt. Als Ausnahme zu Regel C-15.11 (a) hat die Carbonylgruppe bei der Benennung gegenüber H-Lokanten die niedrigere Nummer zu erhalten.

So ergibt sich zum Beispiel für Thiobarbiturat:



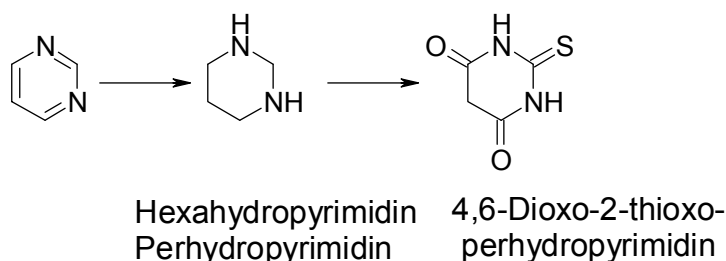
PH. FRESSENIUS und K. GÖRLITZER^[79] geben als Beispiel Thiouracil an:



Die Angabe des Hydrierungsgrades kann als eigenständiges Präfix erfolgen und wird dann alphabetisch in die Reihe der Präfixes eingeordnet wie bei Thiouracil oder wird als Teil der Stammstruktur als untrennbares Präfix verwendet wie beim Beispiel Thiobarbiturat.

Regel C-316.1 (alternativ zu Regel C-314.1 und C-315.1) – Heterocyclische und di- und polycarbocyclische Ketone können auch mit dem Präfix „oxo-“ benannt werden, wobei die hydrierten Stellen mit den entsprechenden „hydro“-Präfixes benannt werden. Bei der Benennung wird vorausgesetzt, daß die Hydrierung vor der Einführung der Ketogruppe stattgefunden hat.

Es ergibt sich somit:

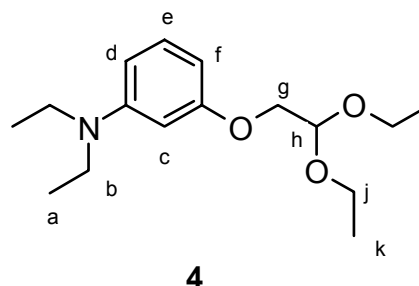


Das Präfix „oxo-“ wird vor allem dann benutzt, wenn eine andere funktionelle Gruppe höhere Priorität hat [, so daß das Suffix „-on“ nicht benutzt werden kann].

Dies ist zum Beispiel bei den Oxonol-Salzen der Fall, das Oxonol-Anion hat dort die höchste Priorität. Da man hier die Nomenklatur nach Regel C-316.1 verwendet muß, wird diese der Einheitlichkeit halber auch bei den Thiobarbiturat-Derivaten verwendet. Regel 315.1 tritt bei protonierten (ungeladenen) Oxonolen **82**, **85**, **86**, **87** und **90** in Kraft, deren funktionelle Gruppe höchster Priorität die Ketogruppe ist.

6.2 V1: [3-(2,2-Diethoxyethoxy)-phenyl]-diethylamin (4)

16.7 g 3-Diethylaminophenol **1** (101 mmol) werden in 100 ml Natronlauge ($1.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) gelöst und am Rotationsverdampfer von Wasser befreit (Wasserbad $65 \text{ }^\circ\text{C}$). Zum Rückstand gibt man 10 ml Dimethylsulfoxid



und 29.6 g (150 mmol) 2-Brom-1,1-diethoxyethan **3**. Das Gemisch wird für 48 h bei $70 \text{ }^\circ\text{C}$ unter Argonatmosphäre gerührt. Nach Abkühlen löst man in 100 ml Wasser und extrahiert mit Toluol (4 x 100 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natronlauge ($1.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 2 x 75 ml) und mit Wasser (4 x 100 ml) gewaschen, dann über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels erfolgt Destillation, wobei das im Überschuß eingesetzte 2-Brom-1,1-diethoxyethan **3** zurückgewonnen wird. Das Produkt **4** geht über als gelbliches Öl bei $133 \text{ }^\circ\text{C}$, $\leq 10^{-3} \text{ mbar}$.

Ausbeute: 10.3 g (36.6 mmol, 37 %)
gelbliches Öl
Lit.^[54]: 91 %
 $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{NO}_3$ MM = $281.40 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Siedepunkt: $133 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\leq 10^{-3} \text{ hPa}$)
Lit.: keine Angaben

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz):

δ [ppm] = 0.96 (t, 6 H, $^3J_{a,b} = 7.1 \text{ Hz}$, a); 1.07 (t, 6 H, $^3J_{k,j} = 7.1 \text{ Hz}$, k); 3.14 (q, 4 H, $^3J_{b,a} = 7.1 \text{ Hz}$, b); 3.46 (dq, 2 H, $^3J_{j,k} = 7.1 \text{ Hz}$, $^2J_{j_1,j_2} = 9.3 \text{ Hz}$, j_1); 3.58 (dq, 2 H, $^3J_{j,k} = 7.1 \text{ Hz}$, $^2J_{j_2,j_1} = 9.3 \text{ Hz}$, j_2); 3.82 (d, 2 H, $^3J_{g,h} = 5.2 \text{ Hz}$, g); 4.66 (t, 1 H, $^3J_{h,g} = 5.2 \text{ Hz}$, h); 6.04 (ddd, 1 H, $^3J_{d,e} = 8.0 \text{ Hz}$, $^4J_{d,c} = ^4J_{d,f} = 2.2 \text{ Hz}$, d); 6.08 (dd, 1 H, $^4J_{c,d} = ^4J_{c,f} =$

2.4 Hz, c); 6.12 (ddd, 1 H, $^3J_{f,e} = 8.3$ Hz, $^4J_{f,d} = ^4J_{f,c} = 2.4$ Hz, f); 6.91 (dd, 1 H, $^3J_{e,d} = ^3J_{e,f} = 8.2$ Hz, e).

(Spektrum siehe Abbildung 16, Seite 34)

GC-MS (EI); m/z (%): 281 [M^+]; 266 [$M^+ - CH_3$]; 165 [$M^+ - CH_2-CH(OEt)_2, + H^+$], 103 (100) [$M^+ - Et_2N-Ph, - 2x CH_3, \text{ dann Ringschluß}$].

IR (Film):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2973–2880 (C-H-Valenz); 1611, 1572, 1500 (C=C-Valenz des Aromaten); 1218, 1135, 1076 (C-O-Valenz in Arylethern).

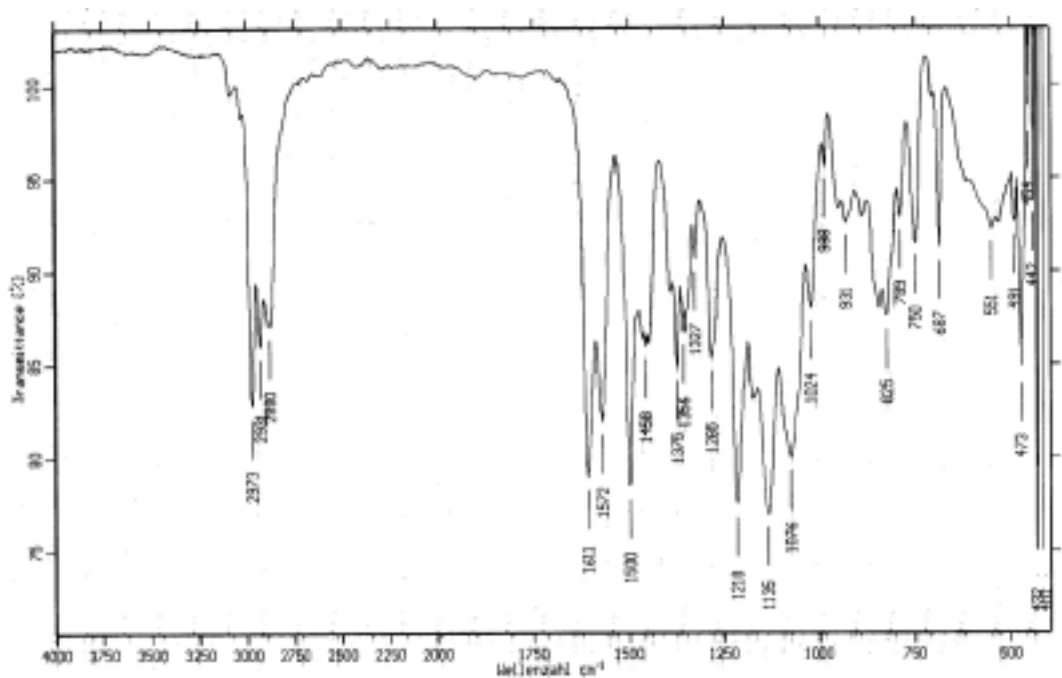
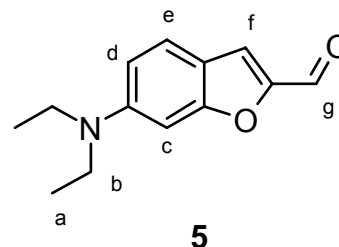


Abbildung 91: IR-Spektrum (Film) von 4

6.3 V2: 6-Diethylaminobenzofuran-2-carbaldehyd (5)

Im 100 ml Dreihalskolben mit Rückflußkühler, Innenthermometer und Tropftrichter werden 2.81 g [3-(2,2-Diethoxyethoxy)phenyl]-diethylamin **4** (10.0 mmol) und 2.19 g Dimethylformamid (30.0 mmol)



eisgekühlt vorgelegt. 1.53 g (10.0 mmol) Phosphorylchlorid werden unter Eiskühlung und Rühren langsam zugetropft. Zu Beginn muß die Tropfgeschwindigkeit sehr langsam sein, die Innentemperatur darf 20 °C nicht überschreiten.

Man rührt noch 1 h bei Raumtemperatur und erhitzt dann langsam auf 70 °C Ölbadtemperatur. Der Reaktionsfortschritt wird mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel 60 F₂₅₄, CH₂Cl₂/MeOH = 8/1) beobachtet. Ab etwa 65 °C ist ein deutlicher Umsatz zu verzeichnen, gleichzeitig bildet sich polymeres Nebenprodukt. Sobald sich signifikante Mengen des Nebenprodukts ($R_f = 0$) gebildet haben, wird die Reaktion beendet.

Nach Abkühlen gibt man den Reaktionssumpf auf 50 ml Eis, der Kolben wird mit Eiswasser ausgespült. Man rührt das saure Gemisch noch ca. 1 h und gibt dann festes Natriumhydrogencarbonat in kleinen Portionen hinzu (starkes Schäumen) bis die Lösung leicht alkalisch reagiert.

Man extrahiert mit Chloroform (4 x 100 ml). Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchloridlösung (3 x 100 ml) und Wasser gewaschen, dann über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels erfolgt zunächst eine grobe Reinigung des Rohproduktes. Dazu wird die Substanz an Kieselgel adsorbiert (Lösen in Chloroform, Zugabe von Kieselgel, Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer) und mit Diethylether extrahiert. Für die Umsetzung zu den Farbstoffen reicht diese Reinheit aus.

Zur vollständigen Reinigung wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Dichlormethan/Methanol = 8/1). Das Produkt ist in Lösung gelb und fluoresziert grünlich-gelb, nach dem Entfernen des Lösungsmittels bleibt ein braunes, sehr zähes Öl zurück.

Ausbeute: 0.530 g (2.45 mmol, 24 %)
 braunes zähes Öl
 Lit.^[54]: 33 % (einfache Reinigung)
 $C_{13}H_{15}NO_2$ MM = 217.27 g·mol⁻¹

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz):

δ [ppm] = 1.05 (t, 6 H, ³J_{a,b} = 7.1 Hz, a); 3.32 (q, 4 H, ³J_{b,a} = 7.1 Hz, b),
 6.56 (d, 1 H, ⁴J_{c,d} = 2.2 Hz, c); 6.69 (dd, 1 H, ⁴J_{d,c} = 2.2 Hz, ³J_{d,e} = 9.0 Hz, d);
 7.38 (d, 1H, ³J_{e,d} = 9.0 Hz, e); 7.46 (d, ⁵J_{f,c} = 0.9 Hz, f); 9.35 (s, 1 H, g).

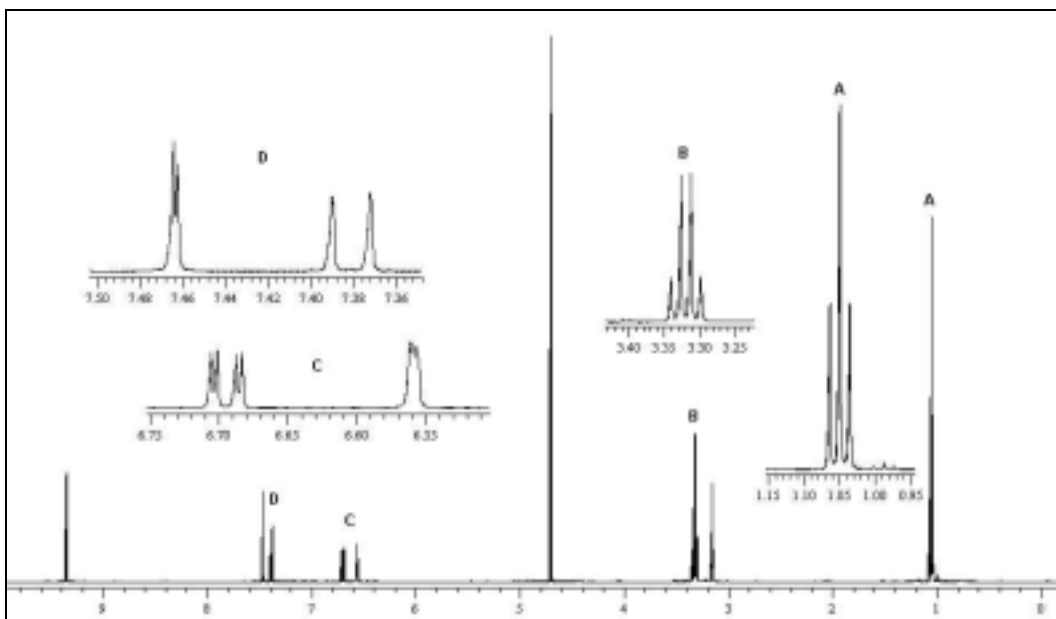


Abbildung 92: ¹H-NMR (Methanol-D₄, 500 MHz) von 5

GC-MS (EI); m/z (%): 217 [M⁺]; 202 (100) [M⁺ - CH₃]; 188 [M⁺ - CH₃CH₂]; 174 [M⁺ - CH₃, - CO], 160 [M⁺ - CH₃CH₂, - CO]; 145 [M⁺ - CH₃, -CH₃CH₂, -CO]; 131 [M⁺ - 2x CH₃CH₂, -CO].

IR (Film):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3100 (C-H-Valenz am Aromaten); 2972–2822 (C-H-Valenz);
 1666 ($\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ungesättigte Aldehyde); 1617, 1573, 1511 (C=C-Valenz
 des Aromaten).

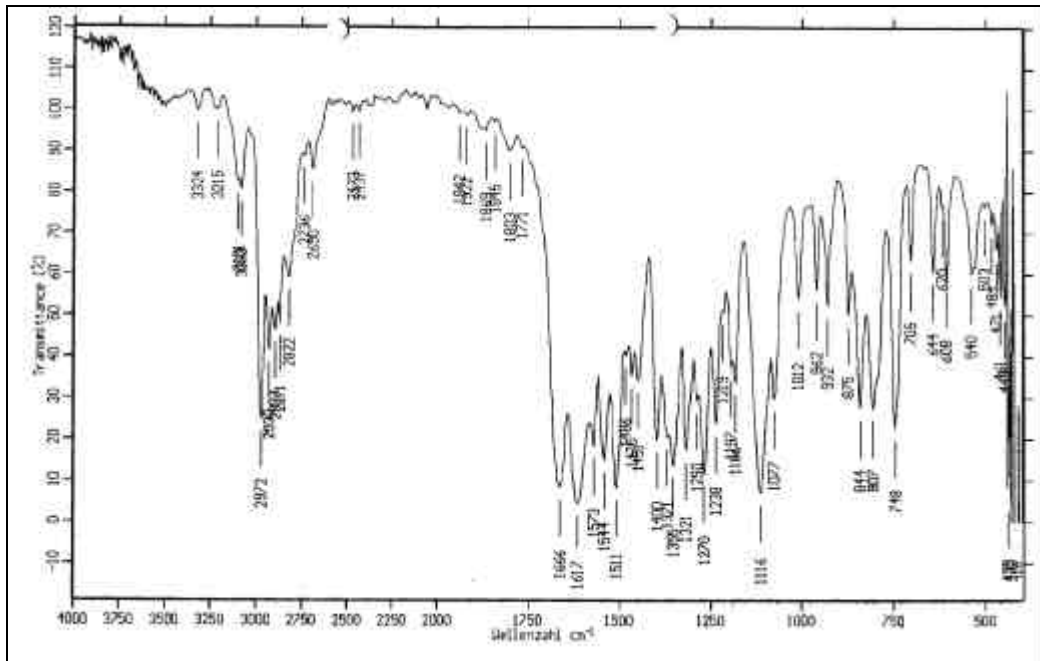


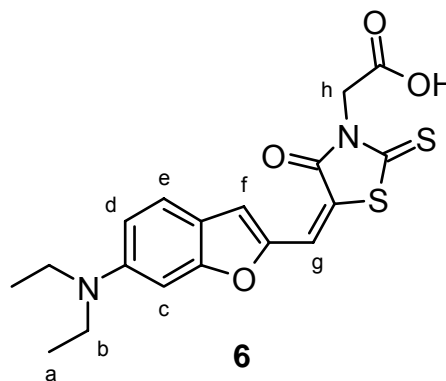
Abbildung 93: IR-Spektrum (Film) von **5**

UV-VIS:

- $\lambda_{\text{max,Diethylether}}$: 382 nm
- $\lambda_{\text{max,Ethanol}} (\epsilon)$: 395 nm (29 200 l·mol⁻¹·cm⁻¹); log ϵ = 4.47
- $\lambda_{\text{max,Dimethylsulfoxid}} (\epsilon)$: 398 nm (28 000 l·mol⁻¹·cm⁻¹); log ϵ = 4.45

6.4 V3: [5-(6-Diethylaminobenzofuran-2-ylmethyliden)-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl]essigsäure

0.543 g (2.50 mmol) 6-Diethylaminobenzofuran-2-carbaldehyd **2** und 0.478 g (2.50 mmol) 4-Oxo-2-thioxothiazolidin-3-yllessigsäure (Rhodaninessigsäure, Aldrich) werden in 3 ml Pyridin für 45 min auf 80 °C (Ölbad) erhitzt. Nach Abkühlen wird das Produkt mit Petrolether (40/60)

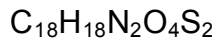


aus dem Kolben gespült und filtriert (Glasfilterfritte Pore 4). Man wäscht mit Wasser und Diethylether, dann wird über Nacht im Exsikkator getrocknet. Man erhält 0.451 g (1.16 mmol, 46 %) leicht verschmutztes Rohprodukt. Für höhere Ansprüche wird säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel 60, Dichlormethan/Methanol = 8/1), wobei die vorlaufenden Fraktionen abgetrennt werden. Man erhält das Produkt am leichtesten dadurch, daß man die Chromatographiesäule trockenlaufen läßt und die Verunreinigungen mit längerer Elutionszeit mit dem Kieselgel entnimmt. Das Produkt wird dann aus dem Kieselgel mit Methanol extrahiert. 100 mg (0.256 mmol) des Rohprodukts werden in dieser Weise behandelt, man erhält 46 mg (0.12 mmol, 46 %) des Produktes.

Ausbeute: 0.451 g (1.16 mmol, 46 %) Rohprodukt
 0.046 g (0.12 mmol, 46 %) aufgereinigt aus 0.100 g
 Ausbeute inklusive Säulenchromatographie: 21%
 Lit.: nicht bekannt
 $C_{18}H_{18}N_2O_4S_2$ MM = 390.48 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 227–229 °C (sublimiert, wird nur zähflüssig)
 Lit.: nicht bekannt

Elementaranalyse: (Doppelbestimmung)



exp. theor.

C: 51.55 / 51.09 (55.37)

H: 4.72 / 4.52 (4.65)

N: 6.60 / 6.60 (7.17)

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO, TMS, 300 MHz):

δ [ppm] = 1.15 (t, 6 H, $^3J_{a,b} = 7.0$ Hz, a); 3.46 (q, 4 H, $^3J_{b,a} = 6.9$, b); 4.49 (s, 2 H, h); 6.80 (dd, 1 H, $^3J_{d,e} = 8.8$ Hz, $^4J_{d,c} = 2.2$ Hz, d); 6.85 (s [br], 1 H, c); 7.49 (s, 1 H, f); 7.52 (d, 1 H, $^3J_{e,d} = 8.8$ Hz, e); 7.66 (s, 1 H, g).

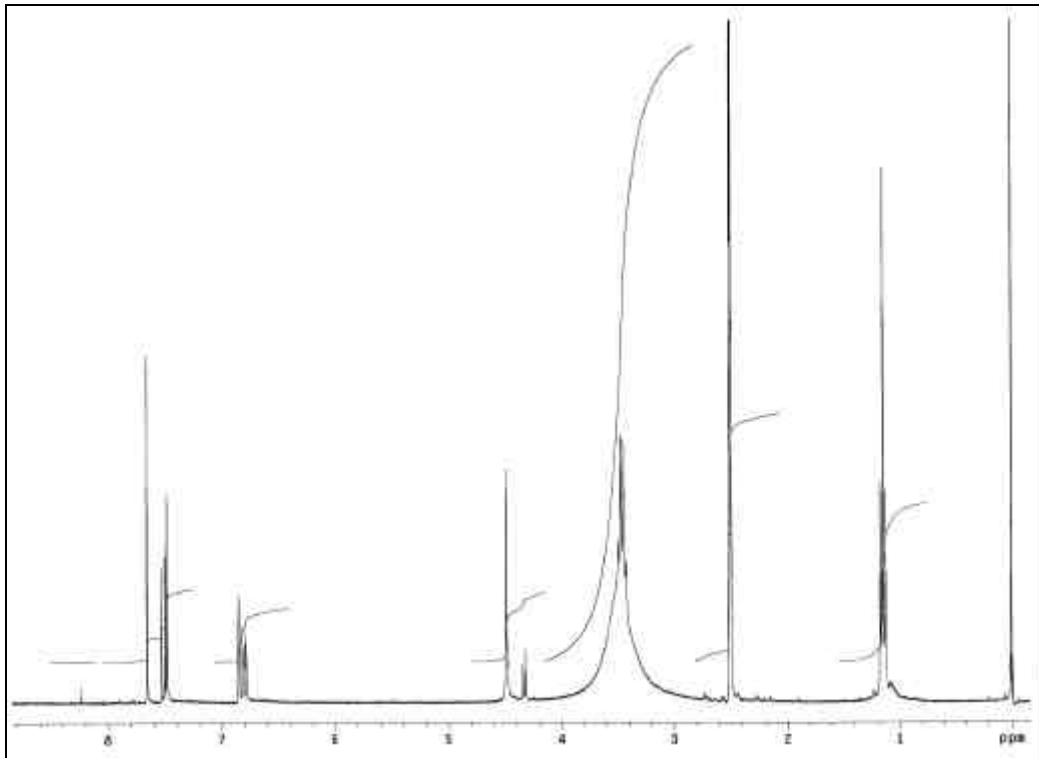
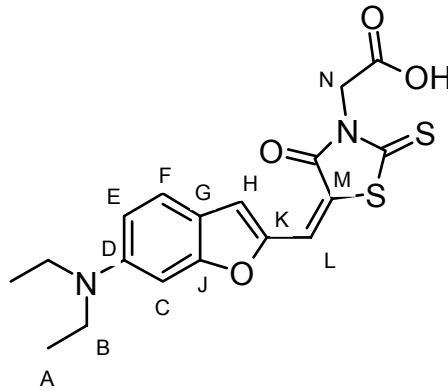


Abbildung 94: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO, TMS) von **6**

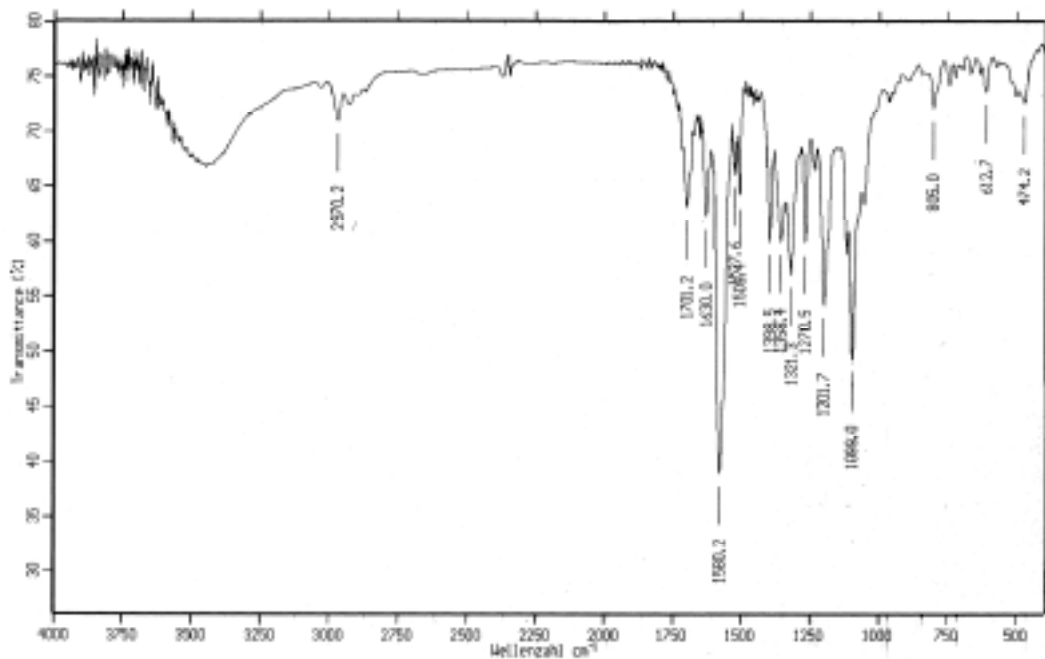
Abbildung 95: Benennung für ^{13}C -NMR von **6**

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 300 MHz):

δ [ppm] = 12.4 (A); 44.2 (B); 46.7 (N); 92.0 (C); 110.9 (E); 117.0 (G); 117.2 (M); 117.9 (H); 118.9 (L); 123.2 (F); 148.4, 148.7, 159.4 (K, D, J); 166.2, 167.1, 193.7 (C=S, C=O, COOH).

IR (Film):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3750–3250 (O-H-Valenz in COOH); 3000–2880 (C-H-Valenz); 1701 (C=O-Valenz); 1630; 1580 (C=C-Valenz des Aromaten); 1099.

Abbildung 96: IR-Spektrum (KBr) von **6**

MS (FAB, + NBA); m/z (%): 413 (8) [$M^+ + Na$]; 390 (16) [M^+].

UV-VIS (DMSO):

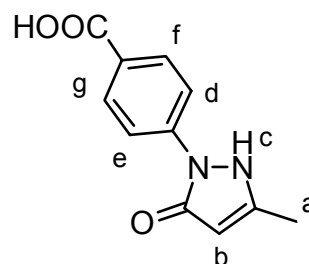
$\lambda_{\max}(\epsilon)$: 522 nm ($23\,520\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$); $\log \epsilon = 4.37$

6.5 V4: 4-(3-Methyl-5-oxo-2,5-dihydropyrazol-1-yl)benzoesäure (12)

3.80 g (25.0 mmol) 4-Hydrazinbenzoesäure werden in 27 ml Ethylacetoacetat zunächst 2 h bei 110 °C erhitzt, dann weitere 4 h bei 150 °C. Man gibt 25 ml Wasser zum heißen Ansatz, rührt weitere 30 min und filtriert die Lösung ab.

Man wäscht den Rückstand mit Wasser,

Methanol und Diethylether. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt durch Auskochen in Ethanol/Aceton = 1/1. Üblicherweise genügt die Reinheit für den Einsatz in weiteren Synthesen. Für höhere Ansprüche wird aus Ethanol umkristallisiert.



12

Ausbeute: 4.30 g (19.7 mmol, 79 %)

farblose Kristalle

Lit.^[80]: 69 %

$C_{11}H_{10}N_2O_3$ MM = 218.21 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: ab 228 °C (Zersetzung)

Lit.^[80]: 279 °C

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 200 MHz):

δ [ppm] = 2.14 (s, 3 H, a); 5.41 (s, 1 H, b); 7.90 (A-Teil des $[\text{AB}]_2$ -Systems, $J_{\text{AB}} = 8.9$ Hz, 2 H, d und e); 8.01 (B-Teil des $[\text{AB}]_2$ -Systems, $J_{\text{AB}} = 8.9$ Hz, 2 H, f und g).

(Spektrum siehe Abbildung 21, Seite 40)

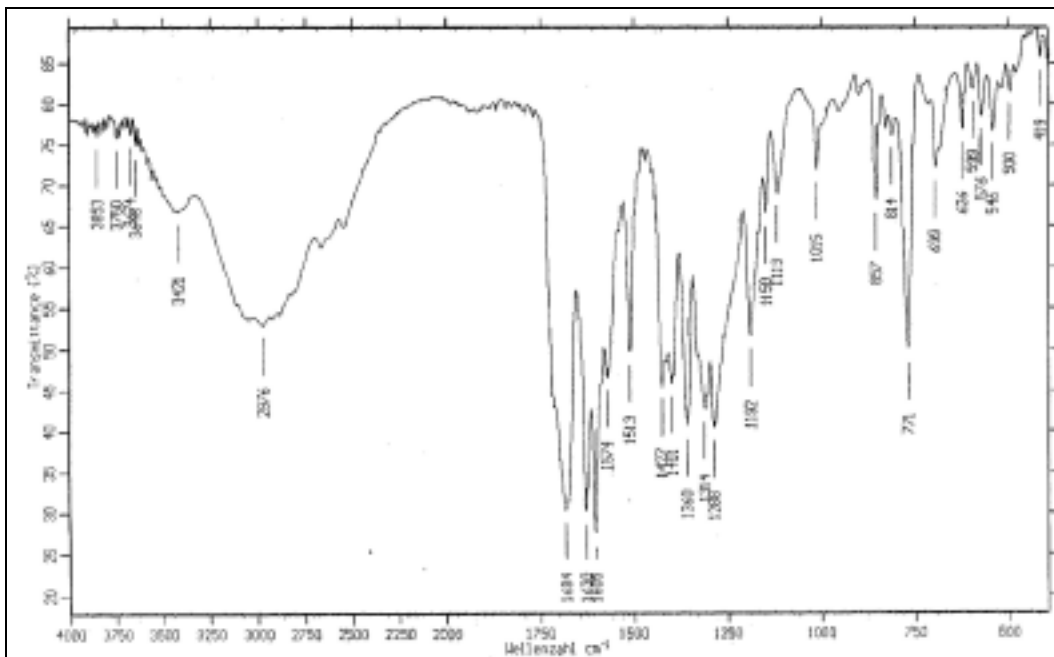


Abbildung 97: IR-Spektrum (KBr) von **12**

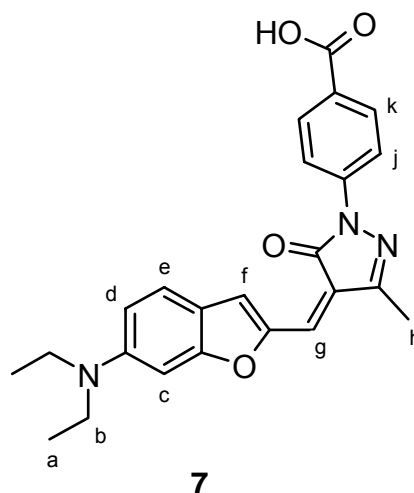
IR (Film):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3421 (N-H-Valenz); 3250–2750 (C-H-Valenz Methylrest, C-H-Valenz olefinisches Proton und Aromat); 1684 (C=O-Valenz aus Carbonsäure und Ketogruppe des Pyrazolidins); 1630; 1605, 1574, 1513 (C=C-Valenz des Aromaten).

MS (EI); m/z (%): 218 (100) [M^+]; 217 (57) [$\text{M}^+ - \text{H}$]; 173 (12) [M^+ , -COOH].

6.6 V5: 4-[4-(6-Diethylaminobenzofuran-2-yl-methyliden)-3-methyl-5-oxo-4,5-dihydropyrazol-1-yl]benzoesäure (7)

1.00 g (4.61 mmol) 6-Diethylaminobenzofuran-2-carbaldehyd **2**, 1.00 g (4.61 mmol) 4-(3-Methyl-5-oxo-4,5-dihydropyrazol-1-yl)benzoesäure **12** (V4) und 0.93 g (9.21 mmol, 2 äq) Triethylamin als Base werden in Methanol für 1 h zum Sieden erhitzt. Man gibt auf einen großen Überschuß Wasser (mindestens 2-3-faches Volumen) und säuert mit verdünnter



Salzsäure vorsichtig an, bis sich Niederschlag bildet. Man filtriert durch einen Büchner-Trichter und trocknet. Man erhält 1.18 g (2.83 mmol, 61 %) Rohprodukt. Davon werden 100 mg durch Säulenchromatographie an Kieselgel 60 (Dichlormethan/Methanol = 8/1) gereinigt, man erhält 59 mg reines Produkt.

Ausbeute 59 mg (0.14 mmol, 36 %)

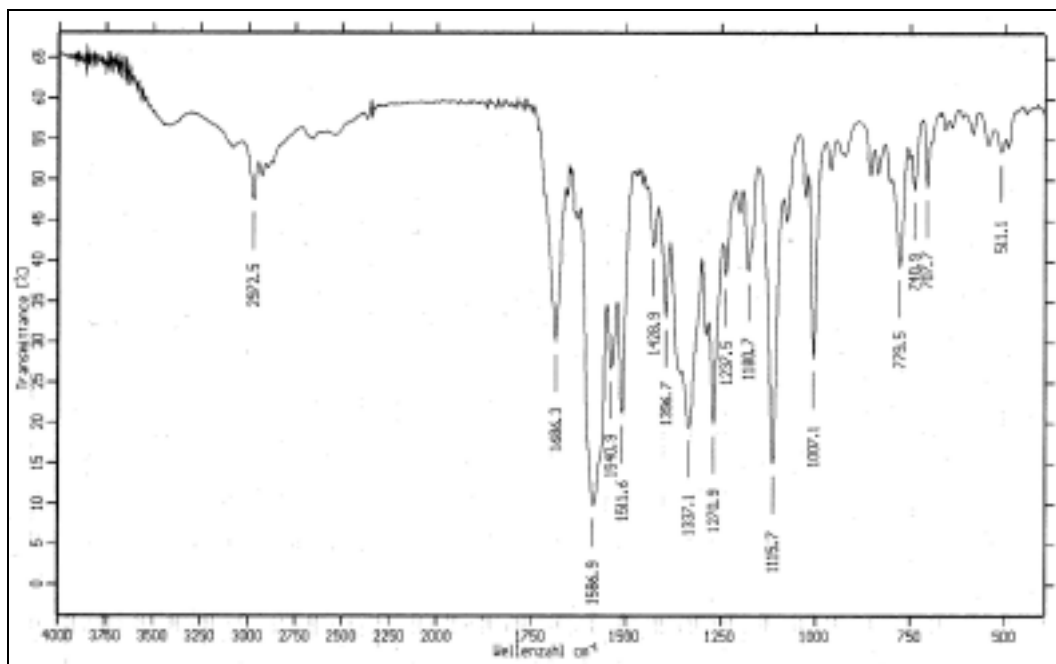
dunkelvioletter Feststoff

Lit.: nicht bekannt

$C_{24}H_{23}N_3O_4$ MM = 417.47 g·mol⁻¹

IR (Film):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2973 (C-H-Valenz); 1686 (C=O-Valenz); 1587, 1541, 1512 (C=C-Valenz des Aromaten).

Abbildung 98: IR-Spektrum (KBr) von **7**

MS (LDI aus Chloroformlösung); m/z (%): 416 (100) [M^+ , -H].

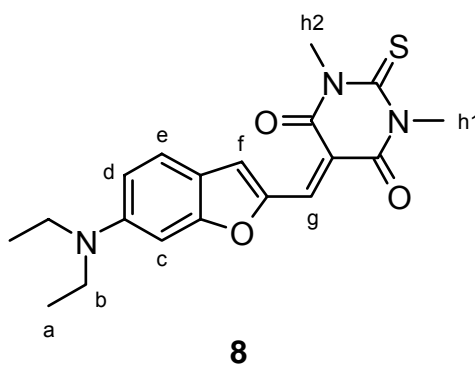
UV-VIS:

$\lambda_{\max, \text{Dimethylsulfoxid}} (\epsilon)$: 537 nm ($41\,000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) $\log \epsilon = 4.61$

$\lambda_{\max, \text{Methanol}} (\epsilon)$: 542 nm ($77\,700 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) $\log \epsilon = 4.89$

6.7 V6: 5-(6-Diethylaminobenzofuran-2-ylmethyliden)-1,3-dimethyl-4,6-dioxo-2-thioxoperhydropyrimidin (8**)**

1.00 g (4.61 mmol) 6-Diethylaminobenzofuran-2-carbaldehyd **2**, 0.790 g (4.61 mmol) 1,3-Dimethyl-4,6-dioxo-2-thioxoperhydropyrimidin und 0.470 g (4.61 mmol) Triethylamin als Base werden in Methanol zum Merocyanin **8**



umgesetzt. Dazu wird 1 h zum Sieden erhitzt und danach über Nacht

bei Raumtemperatur belassen. Durch Ansäuern wird das Rohprodukt ausgefällt und nach Filtration mit Wasser und wenig Diethylether gewaschen. Man erhält 1.25 g (3.36 mmol, 73 %) Rohprodukt.

Die Aufreinigung erfolgt durch Lösen in Chloroform und Zugabe von *n*-Hexan in der Siedehitze, bis sich Niederschlag bildet. Es werden 0.50 g auf diese Weise aufgereinigt, man erhält 0.38 g (76 % der zur Chromatographie eingesetzten Menge) reines Produkt

Alternativ kann auch an Kieselgel 60 (Ethylacetat) gereinigt werden.

Ausbeute: 0.380 g (1.02 mmol, 55 %)
dunkelblauer Feststoff, nadelförmige Kristalle
Lit.: nicht bekannt
 $C_{19}H_{21}N_3O_3S$ MM = 371.46 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 184–185 °C
Lit.: nicht bekannt

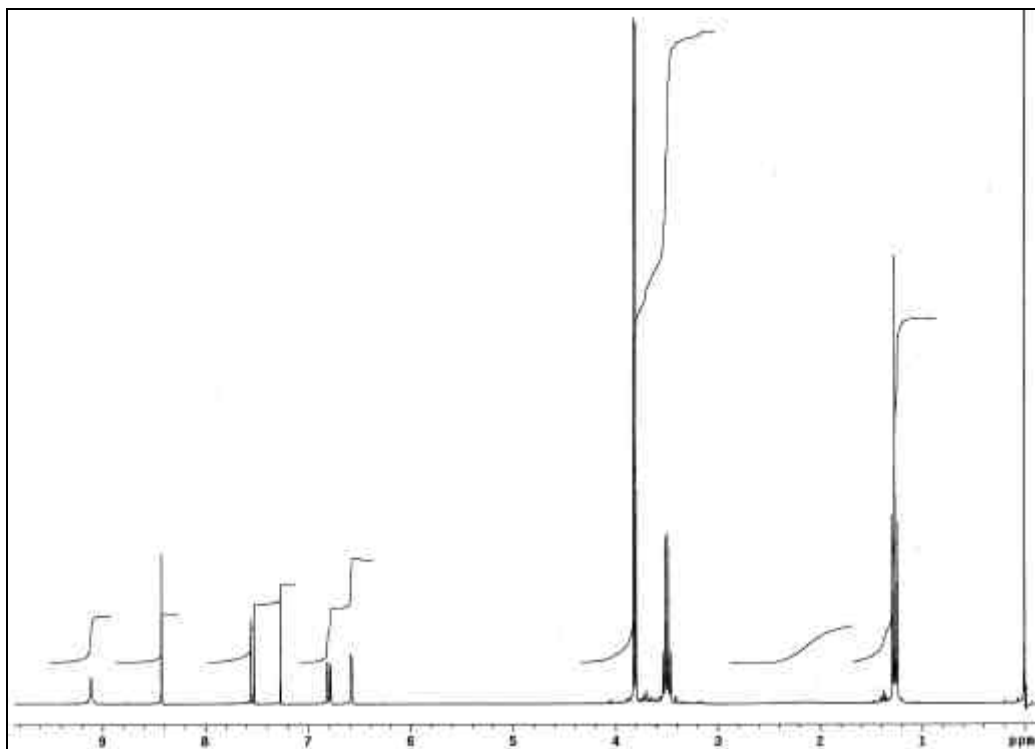
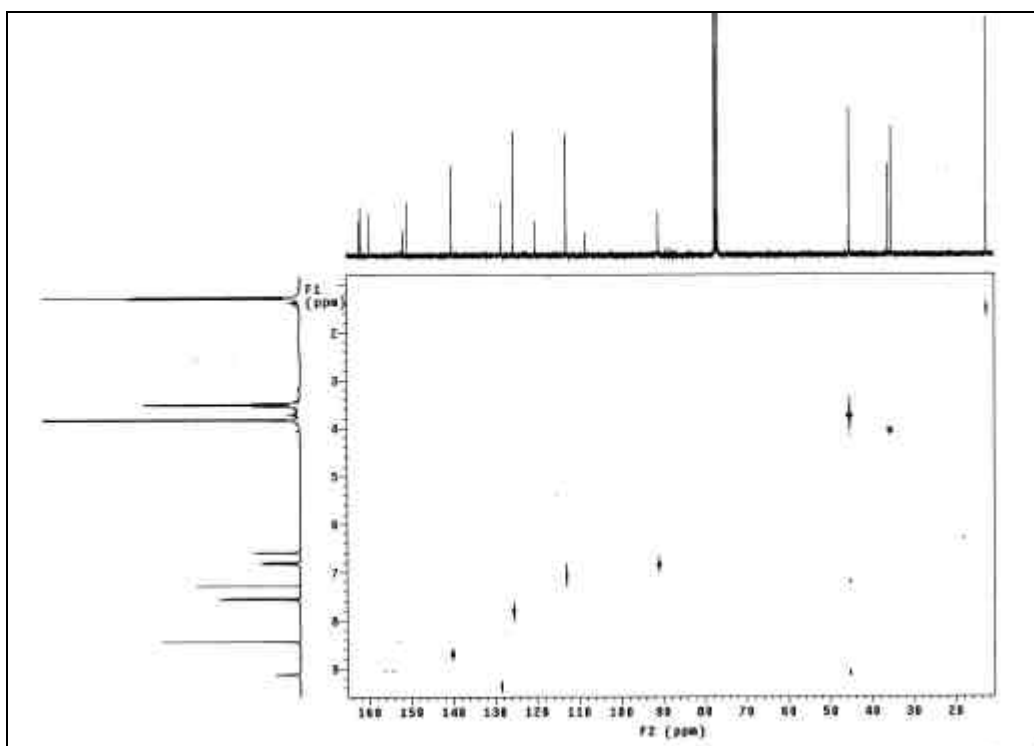
¹H-NMR (CDCl₃, TMS, 300 MHz):

δ [ppm] = 1.24 (t, 6 H, ³J_{a,b} = 7.1 Hz, a); 3.47 (q, 4 H, ³J_{b,a} = 7.1 Hz, b), 3.77 (s, 3 H, h1 oder h2); 3.79 (s, 3 H, h1 oder h2); 6.55 (s, 1H, c); 6.77 (dd, 1 H, ³J_{d,e} = 9.1 Hz, ⁴J_{d,c} = 2.1 Hz, d); 7.51 (d, 1 H, ³J_{e,d} = 9.1 Hz, e); 8.39 (s, 1 H, g oder f); 9.08 (s, 1 H, f oder g).

¹³C-NMR (CDCl₃, TMS, 300 MHz):

δ [ppm] = 12.7 (a); 35.3 (h1 oder h2); 36.1 (h1 oder h2); 45.4 (b); 91.0 (c); 108.5 (C6 oder C2 des Benzofurans); 112.9 (d); 120.1 (C6 oder C2 des Benzofurans); 125.4 (e); 128.4 (g); 140.1 (f); 150.8 (C3' oder C7' des Benzofurans); 151.7 (C3' oder C7' des Benzofurans); 159.7 (C5 des Dihydropyridins); 161.9 (C=O); 162.3 (C=O); 179.8 (C=S).

MS (EI); m/z (%): 371 (88) [M⁺]; 356 (100) [M⁺ - CH₃]; 202 (79) [Et₂N-Benzofuran-CH₂⁺]; 172 (89) [1,3-Dimethyl-4,6-dioxo-2-thioxoperhydro-pyrimidin⁺].

Abbildung 99: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , TMS, 300 MHz) von **8**Abbildung 100: $^{13}\text{C-}^1\text{H}$ -Korrelation (CDCl_3 , TMS, 300 MHz) von **8**

IR (Film):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = ca. 3750–3250 (O-H-Valenz, H_2O in KBr); 2971 (C-H-Valenz der Alkylgruppen); 1656 und 1627 (*N,N*-disubstituierte Amide); 1542.

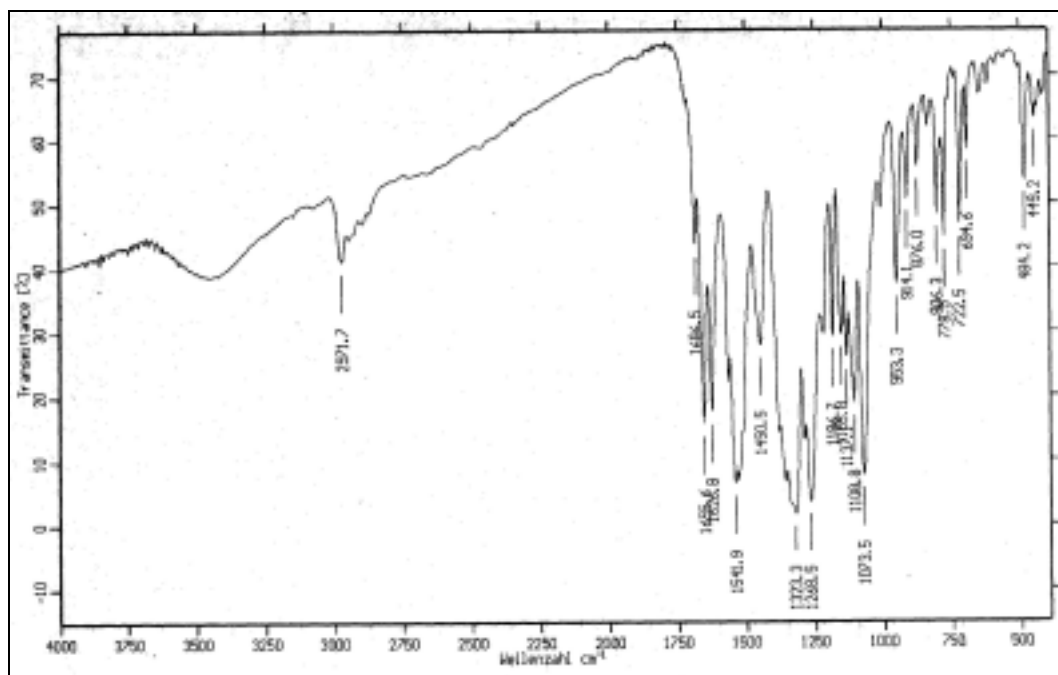
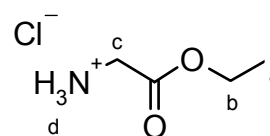


Abbildung 101: IR-Spektrum (KBr) von **8**

6.8 V7: Ethyl-2-aminoacetat-hydrochlorid (**14**)

In einem 500 ml Dreihalskolben mit Rückflußkühler und Tropftrichter wird die Suspension von 10.0 g (0.133 mol) 2-Aminoessigsäure (Glycin) in 150 ml absolutem Ethanol eisgekühlt vorgelegt. 16.4 g (0.138 mol, 10 ml)



14

Thionylchlorid werden langsam zutropft. Man läßt auf Raumtemperatur kommen und erhitzt noch 1 h zum Rückfluß, es entsteht eine farblose Lösung. Unter Eiskühlung gibt man bis zur Kristallisation des Produktes Diethylether hinzu. Nach Filtration (Glasfilterfritte Pore 3), Waschen mit Diethylether und Trocknen (80 °C, Normaldruck) erhält man das Produkt als farblose watteartige Kristalle.

Ausbeute: 15.7 g (0.113 mol, 85 %)
farblose Kristalle
Lit.^[81]: 88 % (für den Methylester)
 $C_4H_{10}NO_2Cl$ MM = 139.58 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 144 °C
Lit.^[82]: 144 °C

¹H-NMR (D₂O, 300 MHz):

δ [ppm] = 1.30 (t, 3 H, ³J_{a,b} = 7.2 Hz, a); 3.92 (s, 2 H, c); 4.39 (q, 2 H, ³J_{b,a} = 7.2 Hz, b).

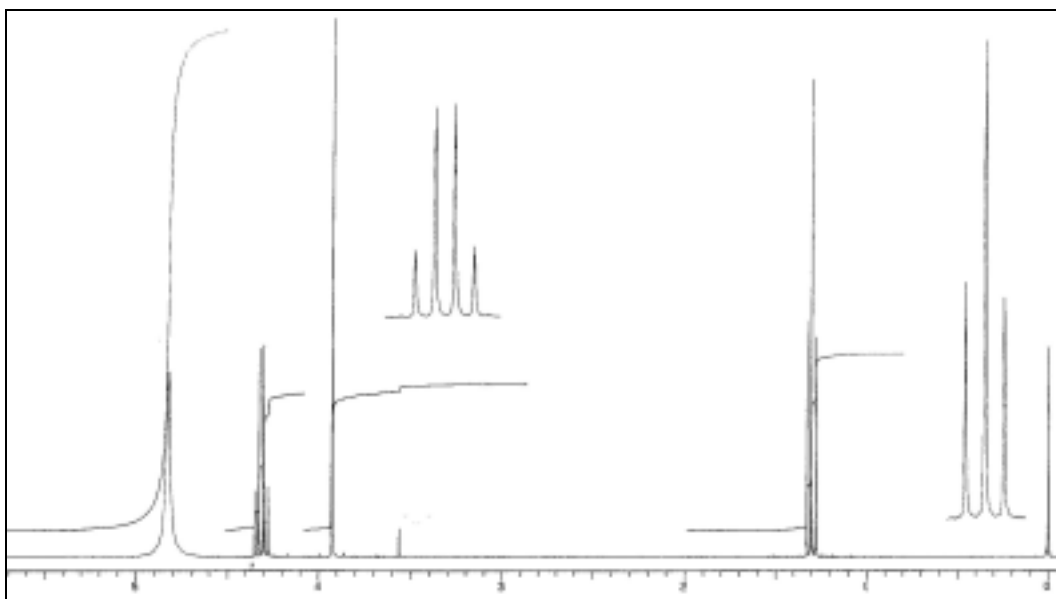


Abbildung 102: ¹H-NMR (300 MHz, D₂O) von **14**

MS (FAB, +NBA); m/z (%): 104 (100) [M⁺ - HCl]; 89 (60) [M⁺ - HCl, -NH₂], 77 (68) [H₂N-CH₂-CO₂H, + H⁺].

IR (Film):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = ca. 3500–3200 (NH-Valenz); 2978 (C-H-Valenz); 1746 (C=O-Valenz in Estern), 1249 (C-O-Valenz in Estern).

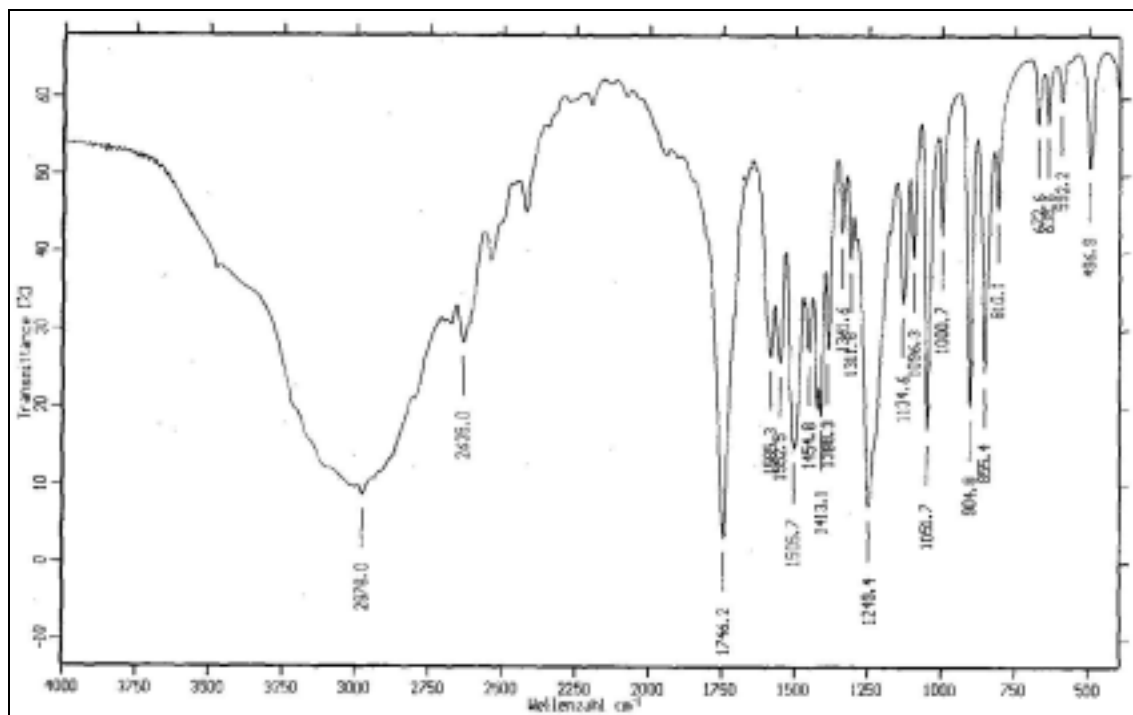
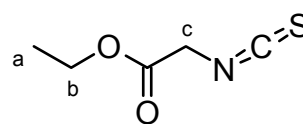


Abbildung 103: IR-Spektrum (KBr) von 14

6.9 V8: Ethyl-(2-isothiocyanato)acetat (15)

In einem 1000 ml Dreihalskolben mit Rückflußkühler, Tropftrichter und Innenthermometer werden 18.6 g (0.133 mol) Ethylglycinat-hydrochlorid **14** in 250 ml Chloroform und 13.2

**15**

(0.133 mol) Thiocarbonylchlorid (Thiophosgen) in 250 ml Chloroform eisgekühlt vorgelegt. Unter starkem Rühren werden 40.4 g (0.399 mol) Triethylamin in 100 ml Chloroform langsam zugetropft. Man läßt auf Raumtemperatur kommen und erhitzt zur Vervollständigung noch 1 h auf etwa 60 °C. Nach Abkühlen wäscht man dreimal mit 200 ml halbkonzentrierter Salzsäure und dann noch zweimal mit Wasser. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt destillativ gereinigt. Das Produkt geht bei 49 °C (0.38 hPa) als hellgelbe Flüssigkeit über.

Ausbeute: 12.0 g (82.7 mmol, 62 %)
hellgelbe Flüssigkeit
Lit.^[83]: 42 %
 $C_5H_7NO_2S$ MM = 145.18 g·mol⁻¹

Siedepunkt: 49 °C (0.38 hPa)
Lit.^[83]: 60.5 – 61.5 °C (3 hPa)

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz):

δ [ppm] = 1.33 (t, 3 H, ³J_{a,b} = 7.2 Hz, a); 4.23 (s, 2 H, c); 4.29 (q, 2 H, ³J_{b,a} = 7.2 Hz, b).

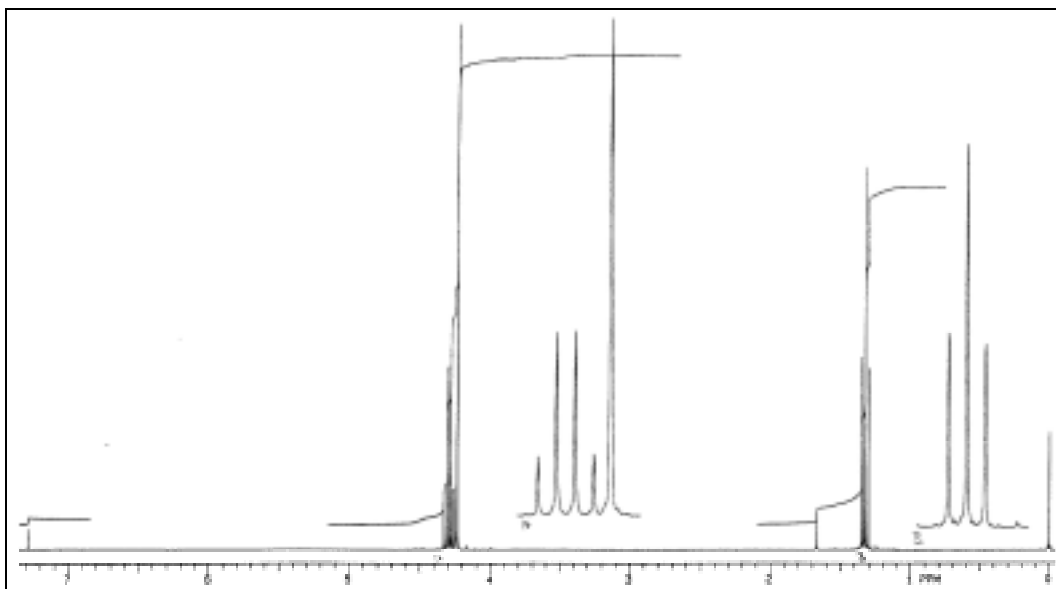
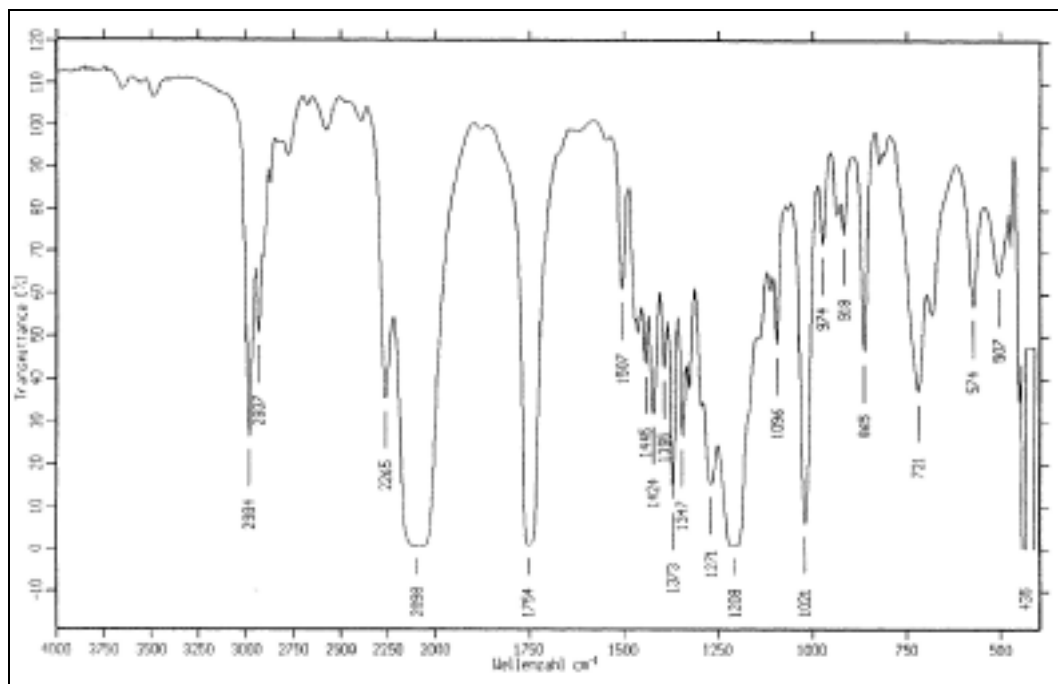


Abbildung 104: ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, TMS) von **15**

MS (GC-MS, EI); m/z (%): 145 [M⁺]; 72 (100) [-CH₂-N=C=S].

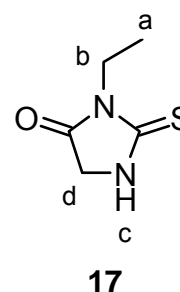
IR (Film):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2984,2937 (C-H-Valenz); 2098 (-N=C=S), 1754 (C=O-Valenz in Estern), 1208 (C-O-Valenz in Estern).

Abbildung 105: IR-Spektrum (Film) von **15**

6.10 V9: 3-Ethyl-2-thioxo-imidazolidin-4-on (**17**)

Eine Lösung von 1.54 g (10.6 mmol) Ethyl-(2-isothiocyanato)acetat **15** in 15 ml Methanol wird mit 0.68 g (10.6 mmol) Ethylamin (70%ige wäßrige Lösung) versetzt und für 1 h zum Sieden erhitzt. Nach Neutralisation mit Salzsäure wird Methanol und Wasser am Rotationsverdampfer entfernt und der



Rückstand in möglichst wenig Chloroform gelöst. Das Rohprodukt wird durch Zugabe von *n*-Hexan ausgefällt. Man erhitzt nochmals zum Sieden und läßt dann langsam auf Raumtemperatur abkühlen. Zur vollständigen Fällung wird über Nacht kalt gestellt (ca. 8 °C). Nach Filtration über Glasfilterfritte (Pore 4) wird aus 90 ml Diethylether umkristallisiert. Man erhält 0.480 g (3.33 mmol, 31 %) rötlichbraune Kristalle. Der Überstand wird eingengt, man erhält 0.640 g (4.44 mmol; 42 %) gelblichbraunen amorphen Feststoff.

Ausbeute: 1.12 g (7.77 mmol, 73 %)
rötlichbraune nadelförmige Kristalle
Lit.: $\leq 33\%$ der Theorie^[84]
83% der Theorie^[85]
 $C_5H_8N_2OS$ MM = $144.20 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Schmelzpunkt: 139–140 °C
Lit.: 140–141 °C^[84]
145–148 °C^[85]

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz):

δ [ppm] = 1.22 (t, 3 H, $^3J_{a,b} = 7.2 \text{ Hz}$, a); 3.85 (q, 4 H, $^3J_{b,a} = 7.2 \text{ Hz}$, b);
4.07 (d, 2 H, $^3J_{d,c} = 1.3 \text{ Hz}$, d); 7.95 (s, 1 H, c).

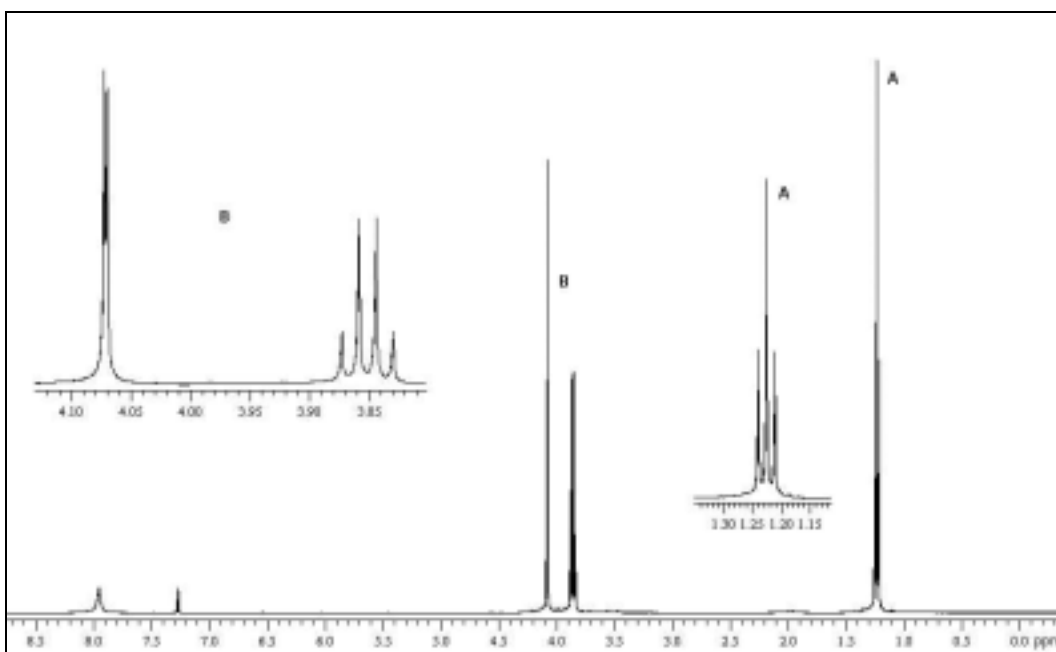
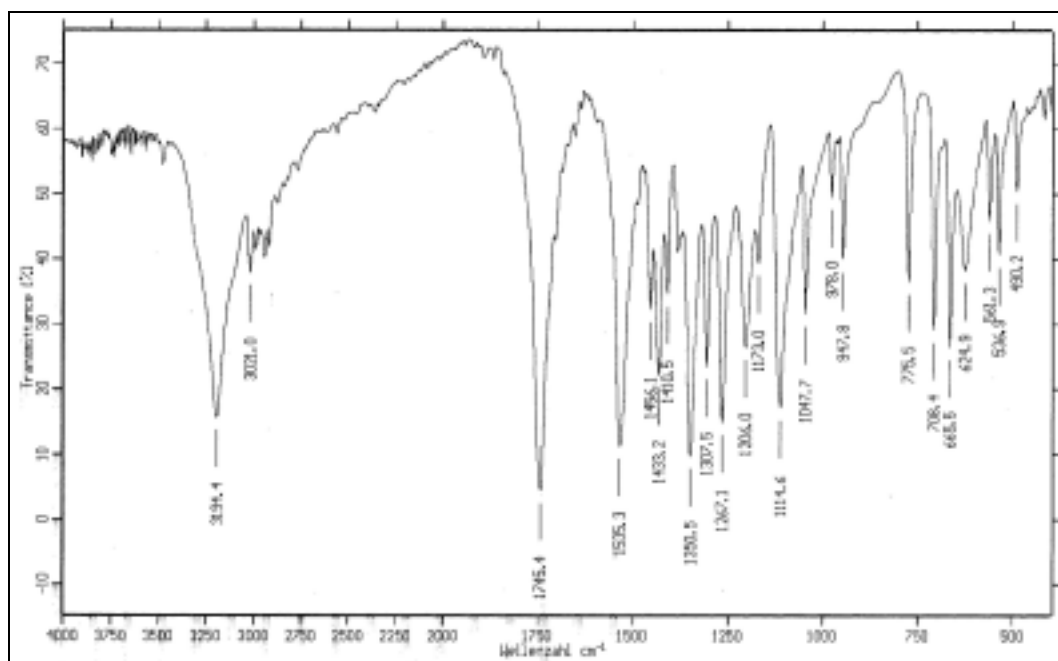


Abbildung 106: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) von **17**

IR (KBr):

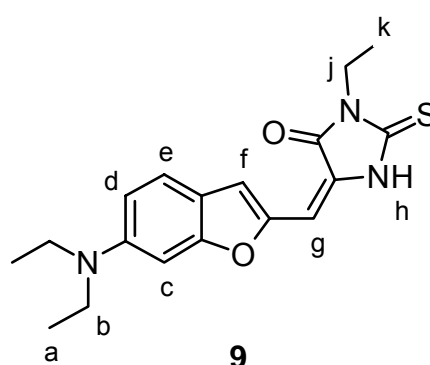
$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = ca. 3194 (N-H-Valenz in monosubstituierten Amiden); 3021 (C-H-Valenz in Alkanen); 1745 (C=O-Valenz); 1535.

Abbildung 107: IR-Spektrum (KBr) von **17**

MS (EI); m/z (%): 144 (100) [M^+]; 116 (10) [M^+ , - C=O]; 87 (5) [Et-NCS⁺]; 75 (17); 72 (9) [Et-NCO, + H⁺].

6.11 V10: 5-(6-Diethylaminobenzofuran-2-ylmethyliden)-3-ethyl-2-thioxo-imidazolidin-4-on (**9**)

0.10 g ($4.6 \cdot 10^{-4}$ mol) 6-Diethylaminobenzofuran-2-carbaldehyd **2**, 0.066 g ($4.6 \cdot 10^{-4}$ mol) 3-Ethyl-2-thioxo-imidazolidin-4-on **17** und 0.047 g ($4.6 \cdot 10^{-4}$ mol) Triethylamin als Base werden in 25 ml Methanol für 1.5 h zum Rückfluß erhitzt. Am Rotationsverdampfer wird etwas eingengt, man gibt etwa das gleiche Volumen Wasser zu und fällt dann durch Zugabe von verdünnter Salzsäure aus. Nach Filtration erhält man den violetten amorphen Feststoff.



Ausbeute: 0.12 g ($3.6 \cdot 10^{-4}$ mol, 78 %)

rote nadelförmige Kristalle

Lit.: nicht bekannt

 $C_{18}H_{21}N_3O_2S$ MM = 343.45 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 187–188 °C

Lit.: nicht bekannt

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz):

δ [ppm] = 1.25 (t, 6 H, ³J_{a,b} = 7.1 Hz, a); 1.31 (t, 3 H, ³J_{k,j} = 7.2 Hz, k);

1.58 (s,); 3.46 (q, 4 H, ³J_{b,a} = 7.1 Hz, b); 3.99 (q, 4 H, ³J_{j,k} = 7.2 Hz, j);

6.55 (s, 1 H, g); 6.71 (d, 1 H, ³J_{d,e} = 8.2 Hz, d); 6.77 (s, 1 H, c); 6.91

(s, 1 H, f); 7.38 (d, 3J_{e,d} = 8.9 Hz, e); 9.45 (s, 1 H, h).

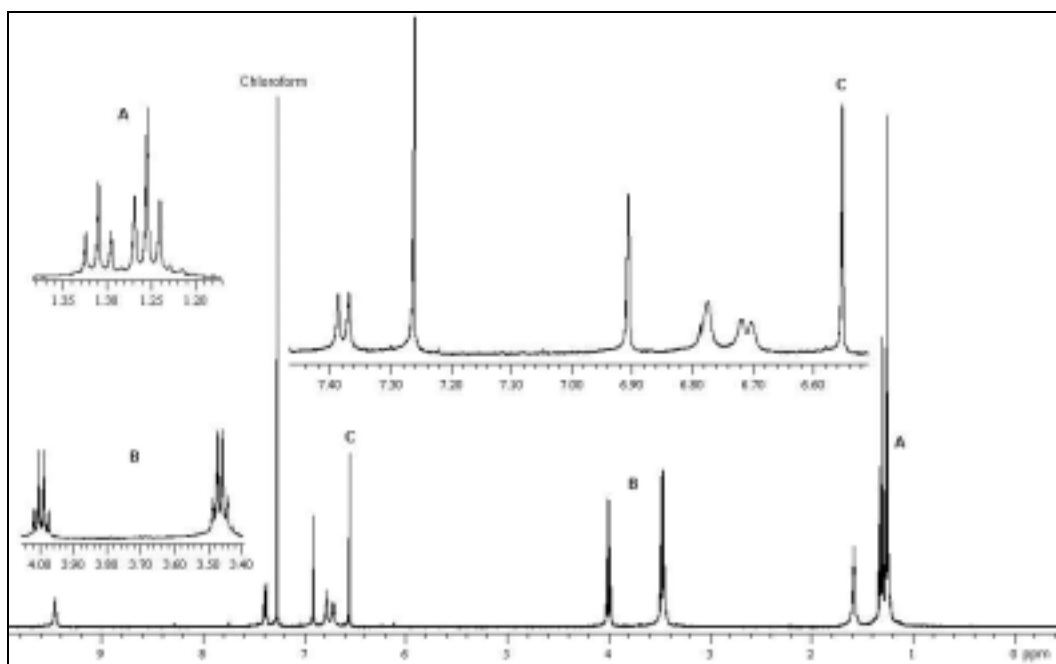
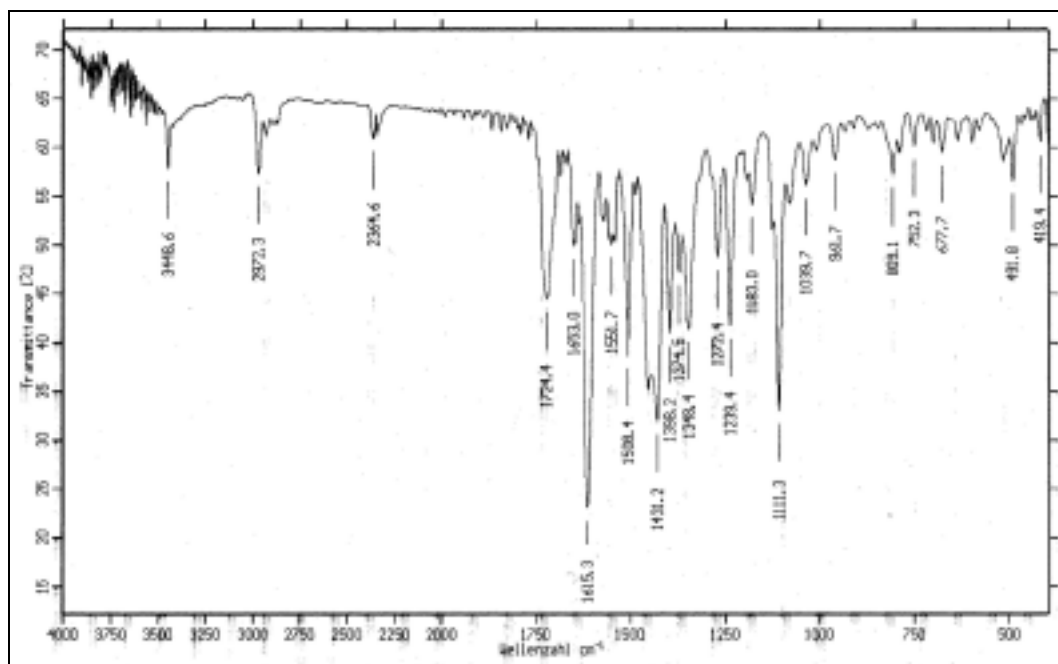


Abbildung 108: ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) von **9**

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = ca. 3449 (Oberschwingung der C=O-Valenz); ca. 2972 (C-H-Valenz in Alkanen); 1724 (C=O-Valenz); 1615, 1508 (C=C-Valenz des Aromaten).

Abbildung 109: IR-Spektrum (KBr) von **9**

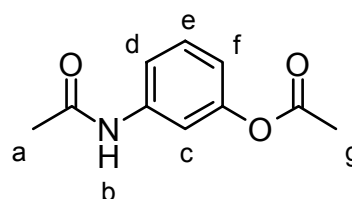
MS (EI); m/z (%): 343 (100) [M^+]; 328 (89) [M^+ , - CH_3]; 299 (20) [M^+ , - $C=S$]; 227 (29); 184 (38).

UV-Vis / Fluoreszenz:

Lösungsmittel	Absorptions- maximum / nm	Extinktions- koeffizient / l·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹	Fluoreszenz- maximum / nm
Dimethylsulfoxid	503	79 740	551
Dichlormethan	505	74 760	597
Aceton	491	32 340	604

6.12 V11: 3-Acetylaminothylacetat (19)

12.00 g (110.0 mmol) 3-Aminophenol **18** und 36 ml (39.13 g; 383.3 mmol) Essigsäureanhydrid werden für 2.5 h zum Sieden erhitzt. Man lässt auf Raumtemperatur abkühlen und gießt dann zur Hydrolyse auf

**19**

Eis. Es entsteht ein Niederschlag, der abfiltriert und mit viel Wasser

(etwa 375 ml) gewaschen wird. Der Feststoff wird bei 80 °C (Normaldruck) getrocknet.

Ausbeute: 10.06 g (52.07 mmol, 47 %)
 farblose tafelförmige Kristalle
 $C_{10}H_{11}NO_3$ MM = 193.20 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 95–96 °C
 Lit.^[86]: 98 °C

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz):

δ [ppm] = 2.06 (s, 3 H, a); 2.28 (s, 3 H, g); 6.79 (ddd, 1 H, ³J_{d,e} = 8.0 Hz, ⁴J_{d,c} ≈ ⁴J_{d,f} = 2.0 Hz, d); 7.13 (ddd, 1 H, ³J_{f,e} = 8.1 Hz, ⁴J_{f,c} ≈ ⁴J_{f,d} = 1.7 Hz, f); 7.24 (dd, 1 H, ³J_{e,d} ≈ ³J_{e,f} = 8.1 Hz, e); 7.46 (dd, ⁴J_{c,d} ≈ ⁴J_{c,f} = 2.0 Hz, c); 7.80 (s, 1 H, b).

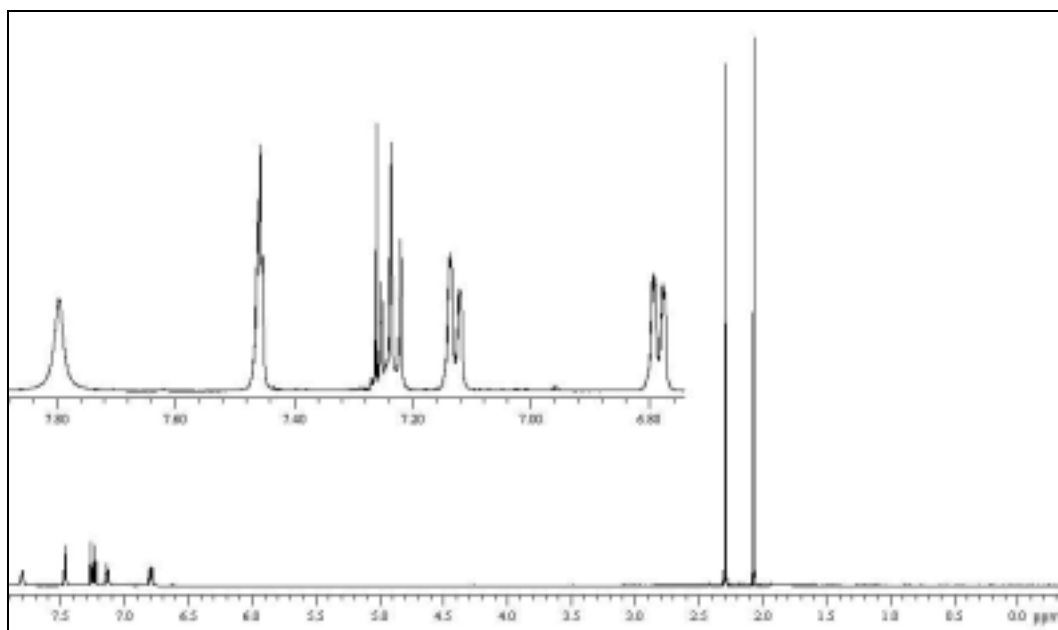


Abbildung 110: ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) von **19**

IR (Film):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = ca. 3600 (O-H-Valenz, Wasser in KBr); 3301, 3265 (N-H-Valenz in *N*-monosubstituierten Amiden); 1771 (C=O-Valenz des Esters); 1674 (C=O-Valenz des Amids, *Amid I*); 1605 (C=C-Valenz des

Aromaten); 1561 (N-H-Bending des Amids, *Amid II*) 797 (C-H-Deformation bei 1,3-disubstituierten Aromaten).

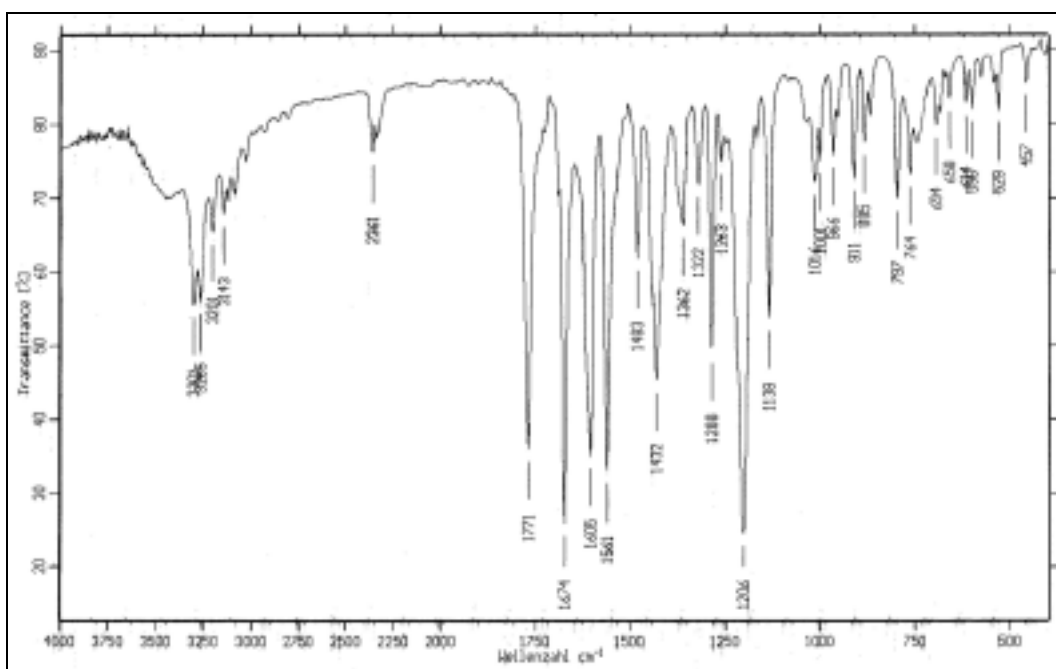
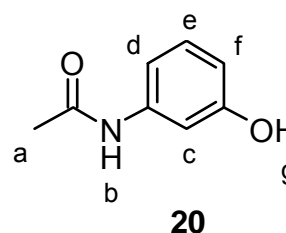


Abbildung 111: IR-Spektrum (KBr) von **19**

6.13 V12: N-(3-Hydroxyphenyl)acetamid (**20**)

4.95 g (25.6 mmol) 3-Acetylaminophenylacetat **19** und 3.10 g (77.5 mmol, 3 Äquivalente) Natriumhydroxid werden in etwa 30 ml Wasser erwärmt bis alles gelöst ist. Bei dieser Temperatur wird noch einige Zeit gerührt. Die



Lösung wird dabei etwas dunkler. Man lässt auf Raumtemperatur kommen und neutralisiert vorsichtig mit konzentrierter Salzsäure. Es fällt ein Feststoff aus, der nach Filtration mit wenig Wasser gewaschen dann getrocknet wird.

Ausbeute: 2.24 g (14.8 mmol, 58 %)
 farblose nadelförmige Kristalle
 $C_8H_9NO_2$ MM = 151.17 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 146 °C

Lit.^[87]: 146–148 °C

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 500 MHz):

δ [ppm] = 2.00 (s, 3 H, a); 6.41 (ddd, 1 H, ³J_{d,e} = 8.0 Hz, ⁴J_{d,c} ≈ ⁴J_{d,f} = 2.3 Hz, d); 6.91 (ddd, 1 H, ³J_{f,e} = 8.0 Hz, ⁴J_{f,c} ≈ ⁴J_{f,d} = 1.7 Hz, f); 7.04 (dd, 1 H, ³J_{e,d} ≈ ³J_{e,f} = 8.0 Hz, e); 7.18 (dd, ⁴J_{c,d} ≈ ⁴J_{c,f} = 2.1 Hz, c); 9.32 (s, 1 H, b); 9.77 (s, 1 H, g).

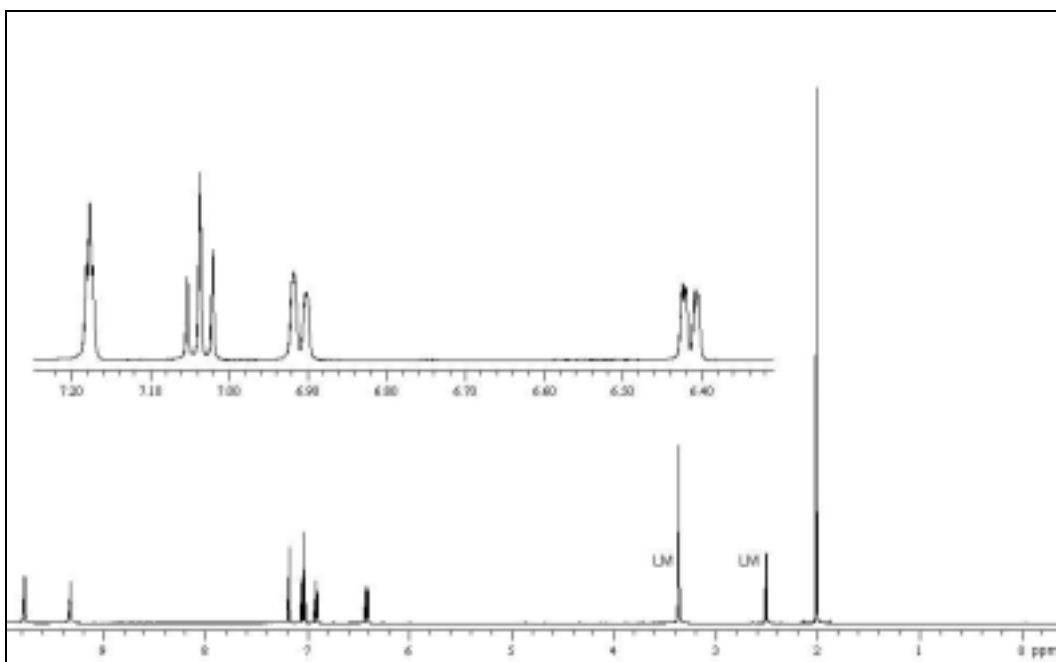
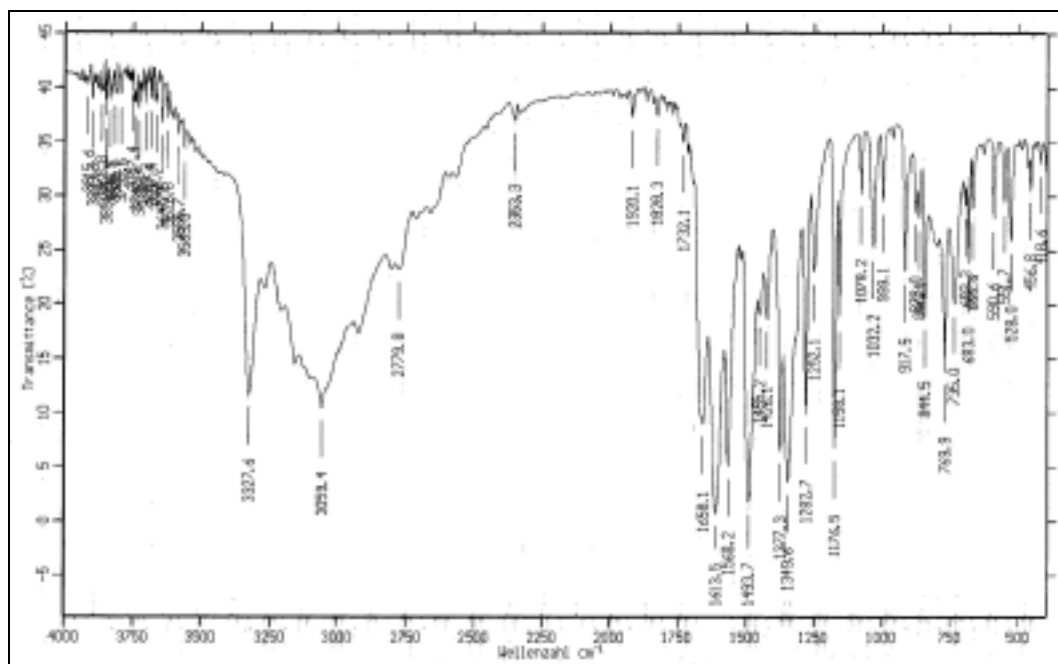


Abbildung 112: ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 500 MHz) von **20**

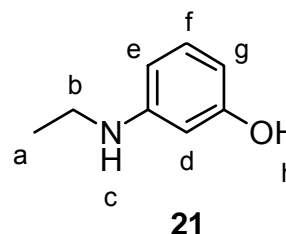
IR (Film):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3328 (N-H-Valenz in N-monosubstituierten Amiden); 3059 (C-H-Valenz im Aromaten); 1658 (C=O-Valenz des Amids, *Amid I*); 1614 (C=C-Valenz des Aromaten); 1568 (N-H-Bending des Amids, *Amid II*); 770 (C-H-Deformation bei 1,3-disubstituierten Aromaten).

Abbildung 113: IR-Spektrum (KBr) von **20**

6.14 V13: 3-(Ethylamino)phenol (**21**)

1.00 g (26.4 mmol) Lithiumaluminiumhydrid wird in 40 ml Tetrahydrofuran (p.a., über Molsieb getrocknet) gelöst. Die Lösung von 1.30 g (8.60 mmol) *N*-(3-Hydroxyphenyl)acetamid **20** in 40 ml Tetrahydrofuran wird so zutropft, daß



der Ether schwach siedet. Nach Zutropfen wird noch etwa 1 h zum Rückfluß erhitzt. Unter Eiskühlung wird hydrolysiert, indem nacheinander 1 ml Wasser, 1 ml Natronlauge (15%ig), dann wieder 3 ml Wasser zugegeben werden. Nach 20 min wird vom Salz filtriert (Faltenfilter) und mit Tetrahydrofuran nachgewaschen.

Das Lösungsmittel wird entfernt und der Rückstand in etwas Salzsäure (10%ig) aufgenommen, dabei färbt sich die Lösung violett. Man neutralisiert mit Natriumhydrogencarbonat und extrahiert mehrfach mit Diethylether. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, dann das Lösungsmittel entfernt und der Feststoff im Exsikkator getrocknet. Aminophenole sind sehr oxidationsempfindlich, daher darf beim Trocknen nicht erhitzt werden.

Ausbeute: 0.106 g ($7.73 \cdot 10^{-4}$ mol, 9 %)
 $C_8H_{11}NO$ MM = 137.18 g·mol⁻¹

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz):

δ [ppm] = 1.22 (t, 3 H, $^3J_{a,b} = 7.1$ Hz, a); 3.12 (q, 2 H, $^3J_{b,a} = 7.1$ Hz, b); 3.51 (q, Diethylether); 6.10 (dd, 1 H, $^4J_{d,e} \approx ^4J_{d,g} = 2.1$ Hz, d); 6.17 (dd, 1 H, $^4J_{e,g} \approx ^4J_{e,d} = 2.3$ Hz; $^3J_{e,f} = 7.8$ Hz, e); 6.19 (dd, $^4J_{g,d} \approx ^4J_{g,e} = 2.1$ Hz, $^3J_{g,f} = 8.0$ Hz, g); 7.01 (t, 1 H, $^3J_{f,g} \approx ^3J_{f,e} = 8.0$ Hz, f); 9.77 (s, 1 H, g).

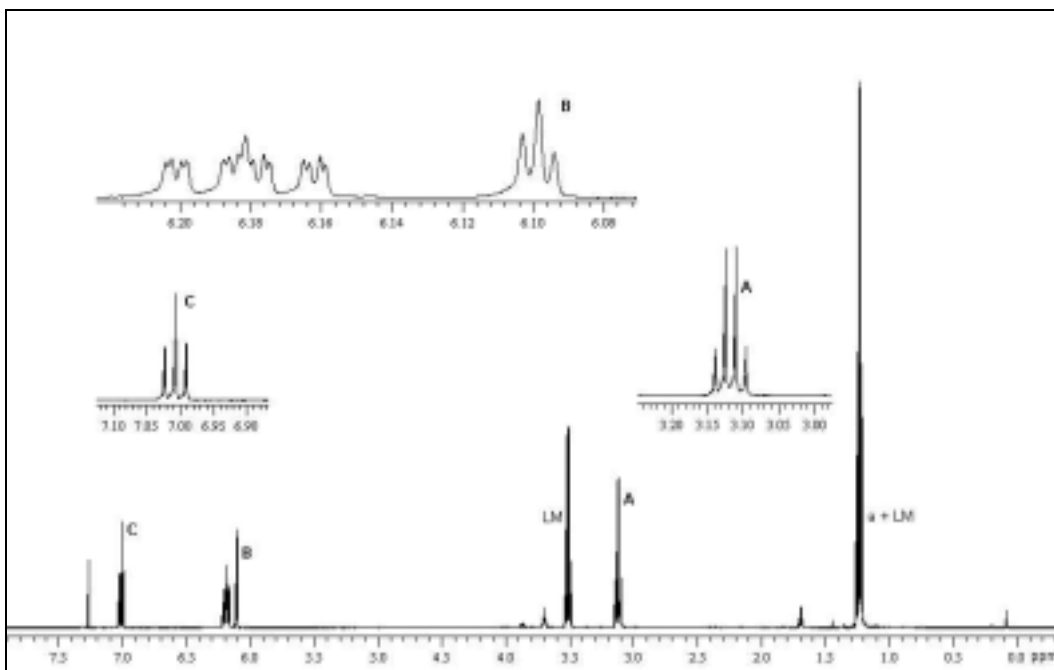
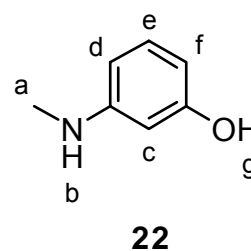


Abbildung 114: ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) von **21**

6.15 V14: 3-Methylaminophenol (**22**)

4.00 g (0.100 mol) Natriumhydroxid werden in 30 ml Wasser gelöst und zusammen mit 10.9 g (0.100 mol) 3-Aminophenol (zur Synthese) und 14.2 g (0.100 mol) Methyljodid im Autoklaven unter Rühren für 10.5 h auf 100 °C im Ölbad erhitzt. Dabei bildet sich eine weißliche Emulsion und eine schwarze



Verunreinigung, die sich am Rand und Boden des Autoklaven absetzt. Es wird in 1 M Natronlauge aufgenommen bis eine klare Lösung entsteht (etwa 50 ml). Nach Filtration durch einen Faltenfilter sättigt man mit Kohlendioxid, indem man einige Brocken Trockeneis hinzufügt. Es wird mit etwa 800 ml Diethylether extrahiert. Das Lösungsmittel wird über Magnesiumsulfat getrocknet, dann entfernt. Es bleibt ein kristalliner bräunlichweißer Feststoff zurück, welcher mit Dichlormethan gewaschen wird. Aus der Waschlösung bleibt nach Entfernen des Lösungsmittels weiterer Feststoff zurück, der gesammelt, aber bei der Ausbeuteberechnung nicht berücksichtigt wird.

Ausbeute: 3.31 g (26.9 mmol, 27 %)
weißer Feststoff
Lit.^[44]: 49 % (bei Verwendung sehr reinen Edukts)
 C_7H_9NO MM = $123.16 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

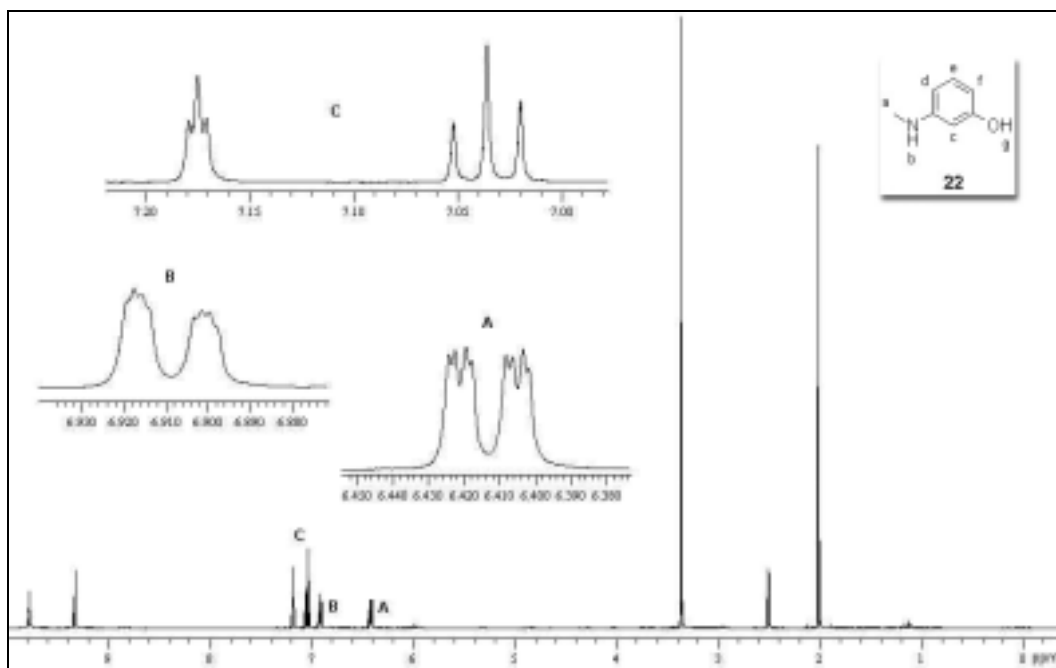
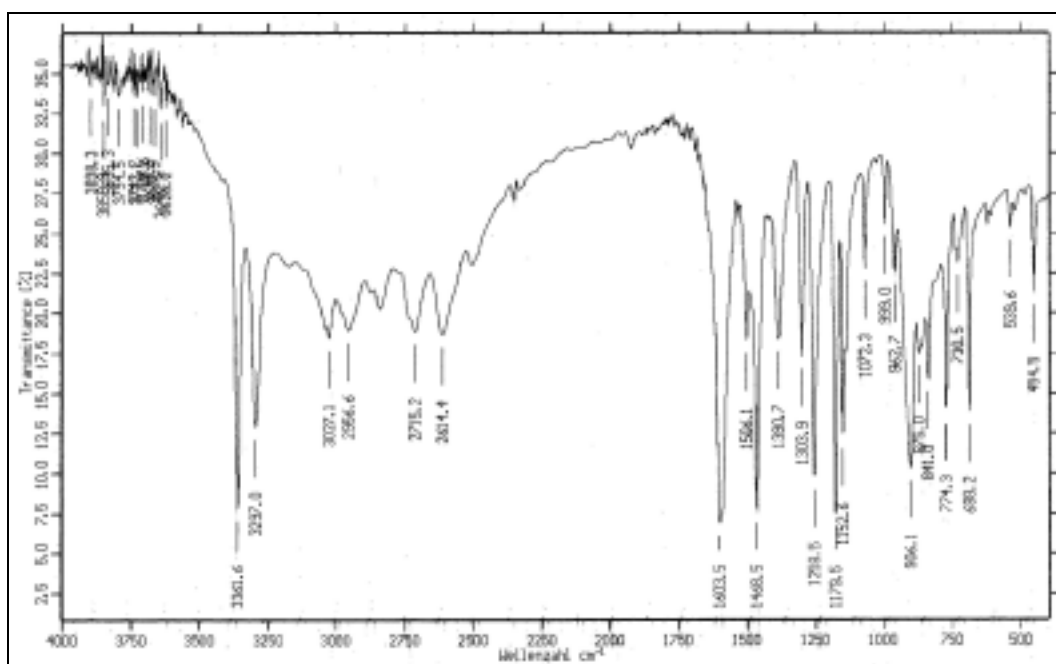
MS (EI); m/z (%): 123 (3) [M^+]; 109 (100) [$M^+ - CH_3$]; 80 (59).

$^1\text{H-NMR}$ ($[D_6]$ DMSO, 500 MHz):

δ [ppm] = 2.01 (s, 3 H, a); 6.41 (ddd, 1 H, $^3J_{d,e} = 8.0 \text{ Hz}$, $^4J_{d,f} \approx ^4J_{d,c} = 2.4 \text{ Hz}$, d); 6.91 (ddd, 1 H, $^3J_{f,e} = 8.0 \text{ Hz}$, $^4J_{f,d} \approx ^4J_{f,c} = 1.7 \text{ Hz}$, f); 7.04 (dd, 1 H, $^3J_{e,d} \approx ^3J_{e,f} = 8.1 \text{ Hz}$, e); 7.18 (dd, 1 H, $^4J_{c,d} \approx ^4J_{c,f} = 2.1 \text{ Hz}$, c); 9.32 (s, 1 H, b); 9.77 (s, 1 H, g).

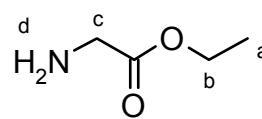
IR (Film):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3362, 3297 (N-H-Valenz); 3027 (C-H-Valenz am Aromaten); 2957 (C-H-Valenz der Methylgruppe); 2715, 2614 (N-H-Valenz in protonierten Aminen); 1604, 1506 (C=C-Valenz des Aromaten); 1469 (N-H-Deformation); 1391 (O-H-Deformation); 774 (C-H-Deformation bei 1,3-Disubstitution am Aromaten).

Abbildung 115: $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 500 MHz) von **22**Abbildung 116: IR-Spektrum (KBr) von **22**

6.16 V15: Ethyl-2-aminoacetat (23)

In einem 250 ml Einhalskolben mit Teflonstopfen werden 10.0 g (71.0 mmol) Ethyl-2-aminoacetat-hydrochlorid **14** in 7.5 ml Wasser suspendiert und mit 30 ml Diethylether überschichtet. Unter starker



23

Eiskühlung gibt man die Lösung von 4.00 g (100 mmol) Natriumhydroxid in 8 ml Wasser (Natronlauge, 33 %) langsam hinzu, das Hydrochlorid **14** löst sich.

Dieser Mischung wird soviel trockenes feinkörniges Kaliumcarbonat hinzugefügt, daß die wäßrige Phase ein Brei ist.

Nach starkem Umschütteln wird die etherische Phase dekantiert. Nach dieser Methode extrahiert man noch mehrfach mit insgesamt etwa 350 ml Diethylether. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, dann wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Zurück bleibt das Produkt als farblose Flüssigkeit mit charakteristischem Amingeruch und basischer Reaktion (pH 10-11).

Das Produkt wird üblicherweise sofort weiterverwendet, da es leicht dimerisiert.

Ausbeute: 3.90 g (37.8 mmol, 53 %)

farblose Flüssigkeit

Lit.^[88]: 52 %

C₄H₉NO₂

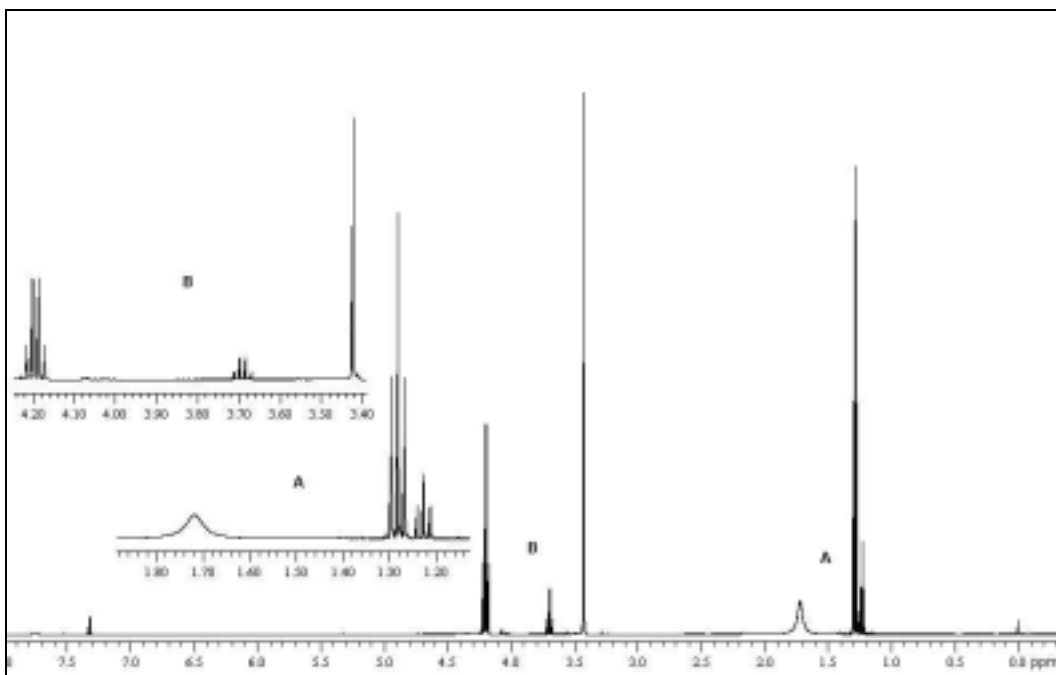
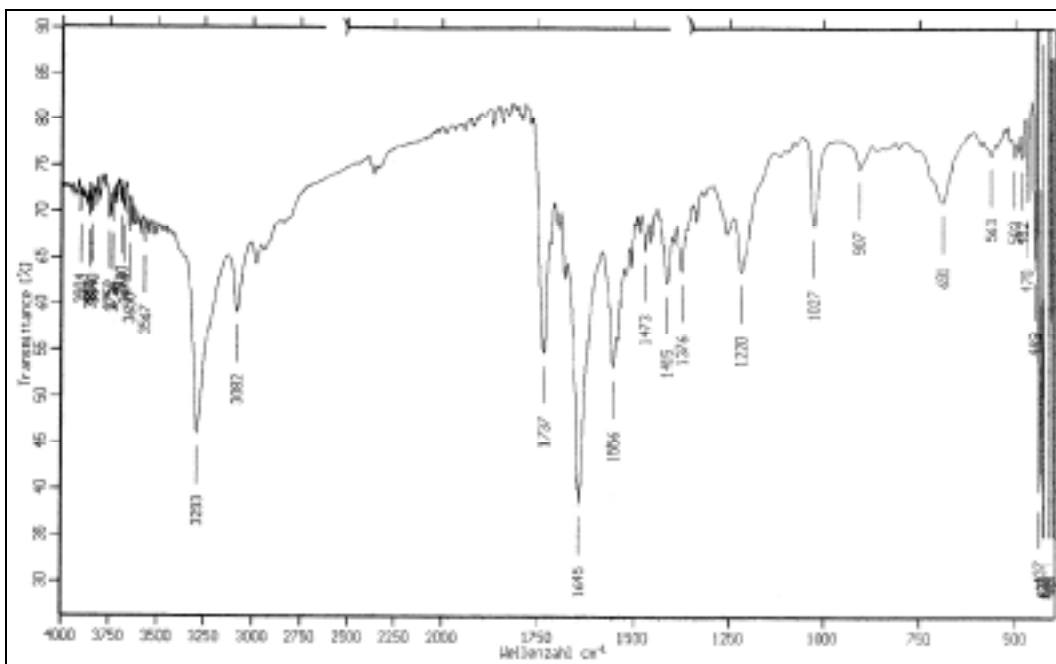
MM = 103.12 g·mol⁻¹

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz):

δ [ppm] = 1.28 (t, 3 H, ³J_{a,b} = 7.2 Hz, a); 1.72 (s, 2 H, d); 3.42 (s, 2 H, c); 4.19 (q, 2 H, ³J_{b,a} = 7.2 Hz, b).

IR (Film):

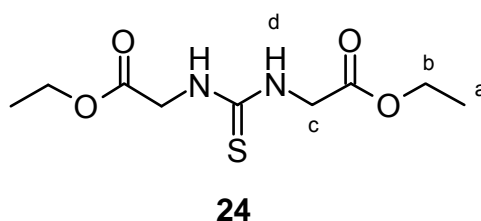
$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3293 (N-H-Valenz); 1737 (C=O-Valenz in Estern); 1645 (N-H-Deformation in Aminen).

Abbildung 117: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) von **23**Abbildung 118: IR-Spektrum (Film) von **23**

MS (EI); m/z (%): 172 (1) [1-(2-Aminoacetyl)piperazin-2,5-dion, Kondensat aus 3 x **23**]; 145 (5) [(3 x **23**)-Kondensat – NH₂]; 115 (4) [Piperazin-2,5-dion + H⁺]; 114 (11) [Piperazin-2,5-dion, (2 x **23**)-Cyclus]; 87 (3) [Piperazin-2,5-dion, – C=O, +H⁺]; 59 (4) [2-Aminoacetaldehyd = homolytische Spaltung von Piperazin-2,5-dion, + 2H⁺]; 44 (66) [CO₂]; 30 (100) [C₂H₅, +H⁺].

6.17 V16: Ethyl(3-ethoxycarbonylmethylthio-ureido)acetat (**24**)

1.25 g (12.1 mmol) Ethyl-2-aminoacetat **23** werden in 5 ml Diethylether vorgelegt. Es werden 1.51 g (10.4 mmol) Ethyl-(2-isothiocyanato)acetat **15** in zwei Portionen



zugefügt. Die Lösung erwärmt sich, bei größeren Ansätzen muß unter Eiskühlung gearbeitet werden. Man rührt noch einige Stunden bei Raumtemperatur und läßt dann über Nacht stehen.

Um den offenkettigen Harnstoff **24** zu erhalten, darf nicht erhitzt werden (Ringschluß).

Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer bei geringer Temperatur kristallisiert das Rohprodukt aus. Nach Waschen mit viel Petrolether (Siedebereich 40–60 °C) trocknet man über Nacht im Vakuum.

Ausbeute: 2.20 g (8.87 mmol, 85 %)
 farbloser Feststoff
 Lit.^[89]: 42 % (nach Umkristallisation)
 C₉H₁₆N₂O₄S MM = 248.30 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 71–77 °C
 Lit.^[89]: 72–80 °C (Rohprodukt),
 85–87 °C (nach Umkristallisation in Essigsäure)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz):

δ [ppm] = 1.29 (t, 6 H, $^3J_{a,b} = 7.2$ Hz, a); 4.24 (q, 4 H, $^3J_{b,a} = 7.2$ Hz, b);
4.38 (d, 4 H, $^3J_{c,d} = 5.1$ Hz, c); 6.95 (t, 2 H, $3J_{d,c} = 4.7$ Hz, d).

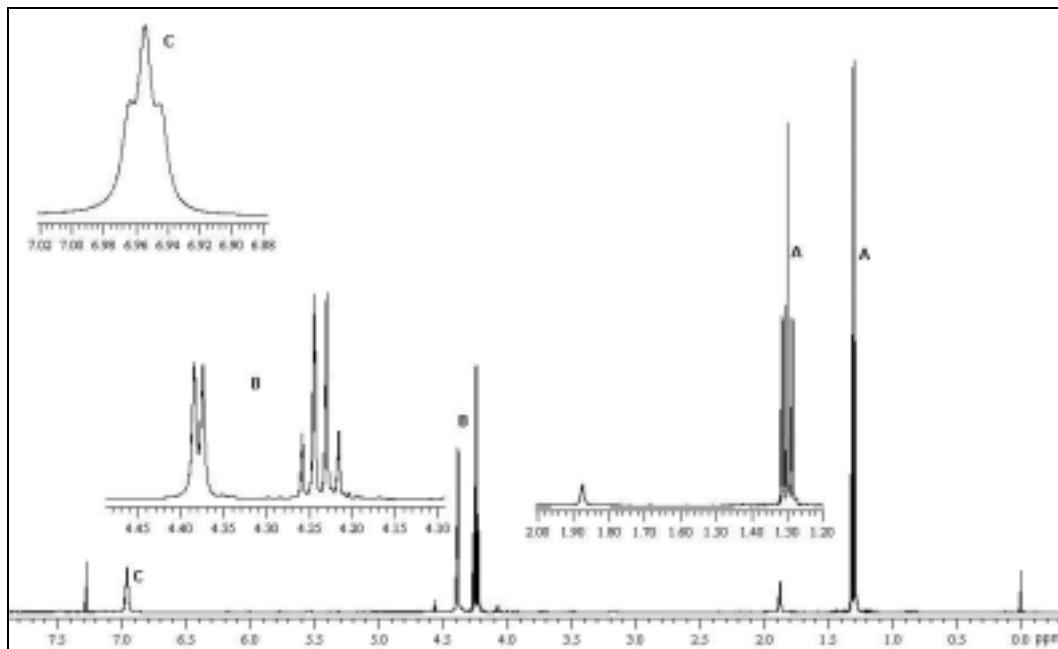


Abbildung 119: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) von **24**

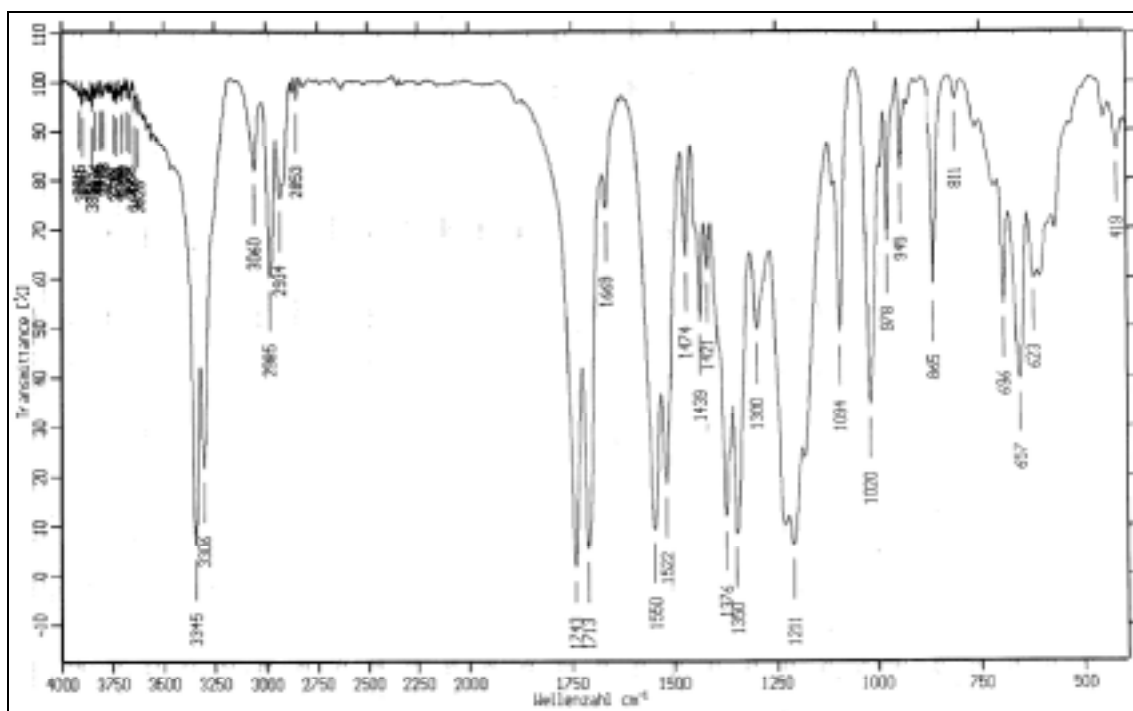


Abbildung 120: IR (KBr) von **24**

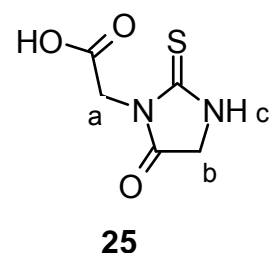
IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3345, 3306 (N-H-Valenz in Thioamiden); 2985, 2934 (C-H-Valenz); 1743 (C=O-Valenz in Estern); 1713 (C=S-Valenz Thioamiden); 1550,1522 (Amid II = N-H-Valenz in assoziierten Thioamiden); 1211 (Amid I = N-H-Valenz in freien Thioamiden).

MS (EI); m/z (%): 248 (100) [M^+]; 202 (70) [M^+ , - HOEt (Ringschluß)]; 156 (48) [M^+ , - HOEt, - HOEt (doppelter Ringschluß zum 7-Thioxo-1,4-diaza-bicyclo[2.2.1]heptan-2,5-dion)]; 145 (26) [SCN- CH_2 - CO_2Et]; 128 (39) [156 - C=O]; 102; 72 (64) [S=C=N- CH_2].

6.18 V17: (5-Oxo-2-thioxoimidazolidin-1-yl)essigsäure (25)

8.05 g (32.4 mmol) Ethyl(3-ethoxycarbonylmethylthioureido)acetat **24** werden für 2 h in halbkonzentrierter Salzsäure zum Rückfluß erhitzt. Üblicherweise wird das Rohprodukt **24** aus Ethyl-(2-isothiocyanato)acetat **15** und Ethyl-2-aminoacetat **23** verwendet.



Nach Abdestillieren des Wassers, bleibt das Rohprodukt als gelb bis orange gefärbte Kristalle zurück.

Bei Umkristallisation aus Aceton erhält man farblose Nadeln, die im Kernresonanzspektrum [$^1\text{H}_{200}$ (D_2O)] nur einen Peak ergeben und in alkalischer Lösung keine Rotfärbung zeigen. Vermutlich handelt es sich um den verseiften Harnstoff $\text{HO}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{S})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CO}_2\text{H}$.

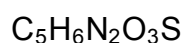
Das Filtrat wird vom Aceton befreit und der Rückstand aus Chloroform/*n*-Hexan umkristallisiert. Für höhere Reinheit erfolgt nochmalige Umkristallisation aus Methanol/Toluol/Petrolether (60-80°C) = 1/6/2.

Man erhält gelbliche Kristalle, deren Lösung im Alkalischen rot ist.

Ausbeute: 3.99 g (22.9 mmol, 71 %)
 gelbliche Kristalle
 Lit.^[89]: keine Angaben
 $C_5H_6N_2O_3S$ MM = 174.18 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 216–220 °C
 Lit.^[89].: 210–212 °C (gelbe Plättchen aus Eisessig)

Elementaranalyse: (Doppelbestimmung)



	exp.	theor.
C:	34.95 / 34.98	(34.48)
H:	3.55 / 3.54	(3.47)
N:	15.92 / 16.10	(16.08)

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 500 MHz):

δ [ppm] = 4.25 (d, 2 H, ³J_{b,c} = 1.1 Hz, b); 4.36 (s, 2H, a); 10.35 (s, 1 H, c); 13.6–12.6 (s, 1 H, -COOH).

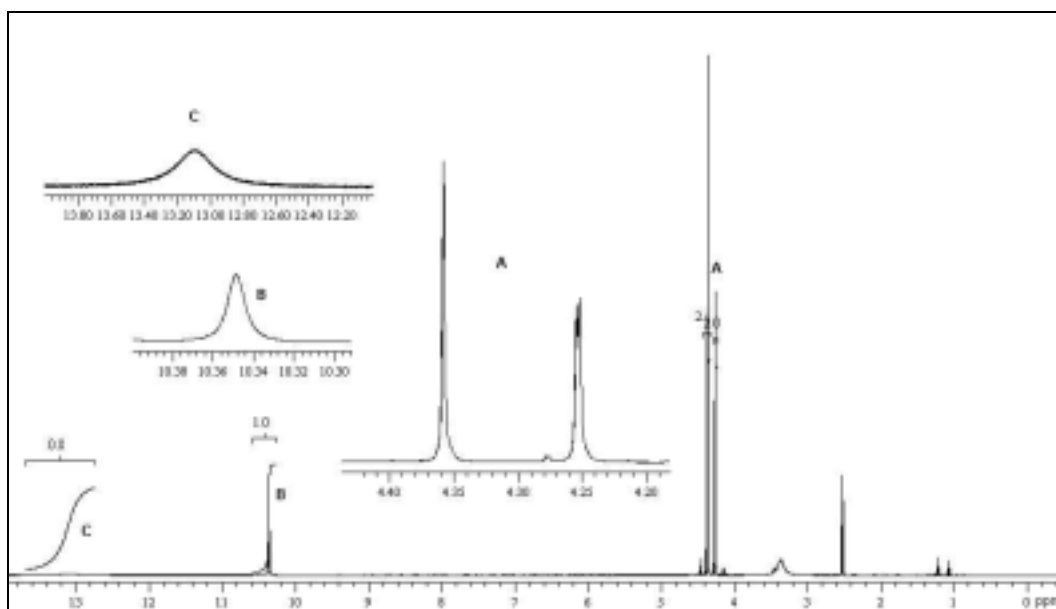


Abbildung 121: ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 500 MHz) von **25**

MS (EI); m/z (%): 174 (83) [M⁺]; 156 (17) [M⁺ - H₂O (Ringschluß -S-C(O)-)]; 128 (25) [M⁺ -H₂O, - C=O]; 99 (19); 72 (100); 45 (27); 32 (40); 30 (97).

IR (Film):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3370 (N-H-Valenz in Thioamiden); 2943 (C-H-Valenz); 1756 (C=O-Valenz in Amiden); 1729 (C=S-Valenz in Thioamiden); 1518 (Amid II = N-H-Valenz in assoziierten Thioamiden).

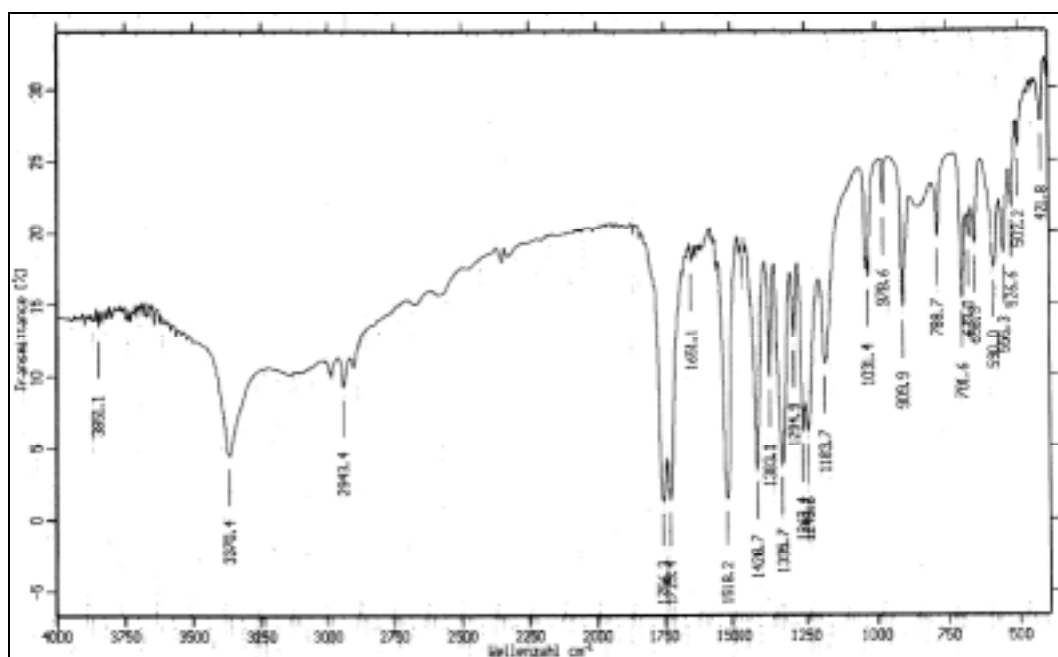
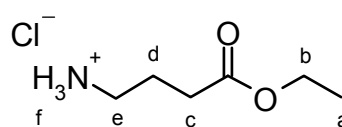


Abbildung 122: IR-Spektrum (KBr) von **25**

6.19 V18: Ethyl-4-aminobutanoat-hydrochlorid (**27**)

In einem 500 ml Dreihalskolben mit Rückflußkühler und Tropftrichter wird die Suspension von 5.00 g (48.5 mmol) 4-Aminobuttersäure in 100 ml absolutem Ethanol



27

eisgekühlt vorgelegt. 6.20 g (52.1 mmol, 4 ml) Thionylchlorid werden langsam zutropft.

Man läßt auf Raumtemperatur kommen und erhitzt dann noch 30 min zum Rückfluß.

Unter Eiskühlung gibt man Diethylether hinzu bis sich Kristalle bilden (ca. 300 ml).

Nach Filtration (Glasfilterfritte Pore 3), Waschen mit Diethylether und Trocknen (80 °C, Normaldruck), erhält man das Produkt als farblose Kristalle.

Nach Einengen fällt aus dem Filtrat bei -18 °C während 2 Tagen weiteres Produkt aus.

Ausbeute: 6.82 g (40.7 mmol, 84 %)
 farblose Kristalle
 Lit.^[81]: 88 % (für Ethyl-2-aminoacetat-hydrochlorid)
 C₆H₁₄NO₂Cl MM = 167.63 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 77 °C
 Lit.^[90]: 65-72 °C

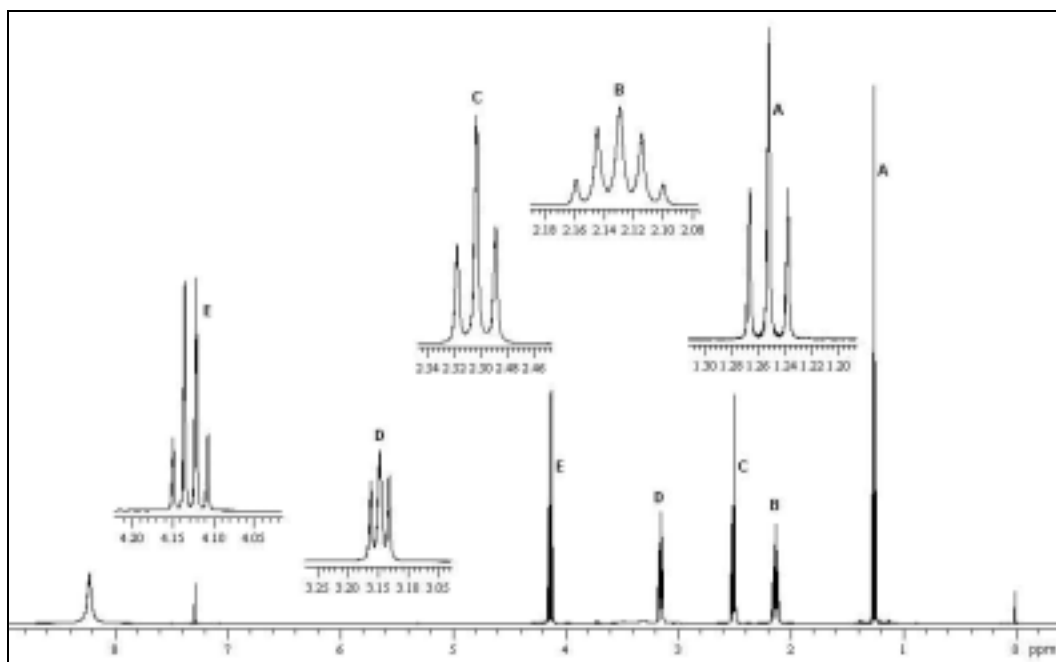


Abbildung 123: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) von **27**

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz):

δ [ppm] = 1.23 (t, 3 H, $^3J_{a,b} = 7.1$ Hz, a); 2.11 (tt, 2 H, $^3J_{d,c} = 7.3$, $^3J_{d,e} = 7.6$, d); 7.48 (t, 2 H, $^3J_{c,d} = 7.3$ Hz, c); 3.12 (t, 2 H, $^3J_{e,d} = 7.6$, e); 4.10 (q, 2 H, $^3J_{b,a} = 7.1$ Hz, b); 8.20 (s, 3 H, f).

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = ca. 3400 (N-H-Valenz); 3027 (C-H-Valenz); 1731 (C=O-Valenz in Estern), 1580 (N-H-Deformation).

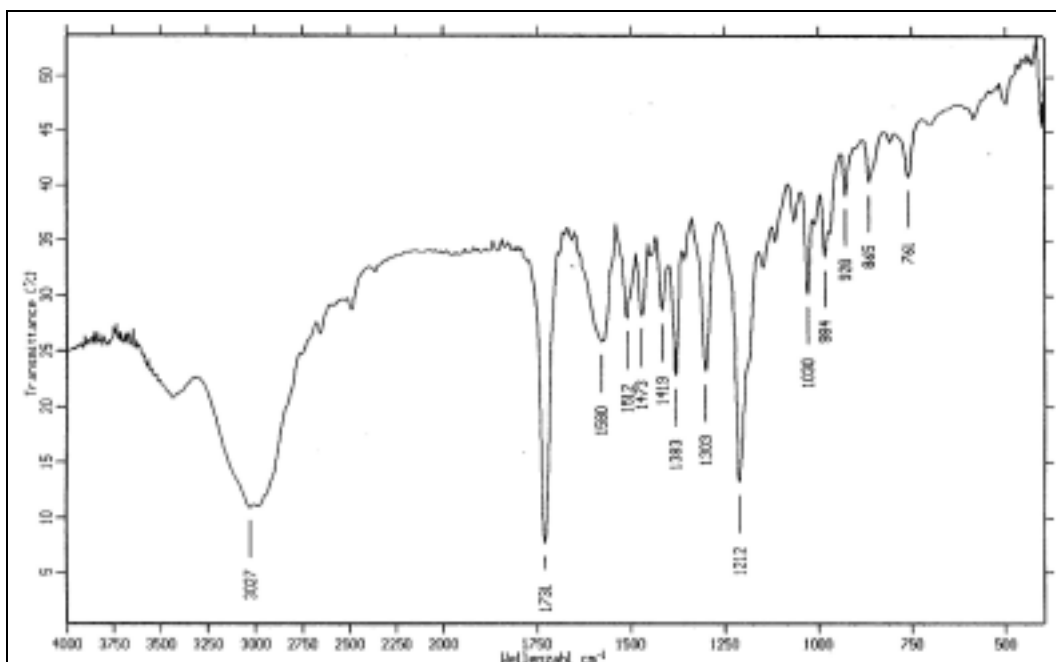
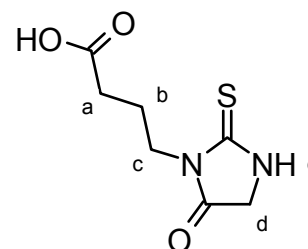


Abbildung 124: IR-Spektrum (KBr) von **27**

6.20 V19: 4-(2-Thioxoimidazolidin-5-on-1-yl)-buttersäure (**29**)

1.956 g (11.67 mmol) Ethyl-4-aminobutanoat-hydrochlorid **27** und 1.684 g (11.60 mmol) Ethyl-2-isothiocyanatoacetat **15** werden in 20 ml Chloroform vorgelegt. 1.174 g (11.60 mmol) Triethylamin werden in 20 ml Chloroform gelöst und zugetropft.



29

Über Nacht läßt man bei Raumtemperatur stehen und erhitzt dann für 4 h auf 40 °C Badtemperatur. Nach Zugabe weiterer 1.174 g (11.60 mmol) Triethylamin unverdünnt zur Reaktionslösung wird erneut 2 h bei 40 °C gerührt, die Lösung färbt sich dabei von gelb nach orange (Thiohydantoinlösung ist im alkalischen Bereich rot). Nach einer weiteren Nacht bei Raumtemperatur wird am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft und der feste Rückstand mit 1%iger Salzsäure, dann mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen wird in Dichlormethan gelöst und mit wenig n-Hexan ausgefällt.

Man erhält 2.089 g (9.070 mmol; 78 %) des Thiohydantoin als Ethylester ($C_9H_{14}N_2O_3S$, MM = 230.29 g·mol⁻¹).

MS (EI), m/z (%): 230 (11) [M⁺]; 185 (6) [M⁺ - CH₃CH₂-O]; 156 (13) [M⁺ - C(O)O-CH₂CH₃].

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): 1.27 (t, 3 H, ³J = 7.1 Hz, -CH₃); 2.02 (tt, 2 H, ³J_{b,a} = 7.4 Hz, ³J_{b,c} = 7.1 Hz, b); 2.39 (t, 2 H, ³J_{a,b} = 7.4 Hz, a); 3.88 (t, 2 H, ³J_{c,b} = 7.1, c); 4.1 (d, 2 H, ³J_{d,e} = 1.2 Hz, d); 4.14 (q, 2 H, ³J = 7.1 Hz, CH₃-CH₂-O₂C); 7.91 (s, 1H, e).

Der Ester wird in 12 ml Wasser mit 6 ml konz. Salzsäure suspendiert und für 1 h zum Sieden erhitzt. Unter Vakuum wird die Flüssigkeit abdestilliert. Der feste Rückstand wird mit Wasser gewaschen, dann getrocknet (70 °C, 18 hPa).

Ausbeute: 1.548 g (7.655 mmol, 66 %)

gelbliche Kristalle

Lit.: nicht bekannt

$C_7H_{10}N_2O_3S$ MM = 202.23 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 162–164 °C

Lit.: nicht bekannt

¹H-NMR ([D₄]Methanol, 300 MHz):

δ [ppm] = 1.95 (tt, 2 H, ³J_{b,a} = 7.0 Hz, ³J_{b,c} = 7.4 Hz, b); 2.35 (t, 2 H, ³J_{c,b} = 7.4, c); 3.84 (t, 2 H, ³J_{a,b} = 7.0 Hz, a); 4.05 (s, 2 H, d).

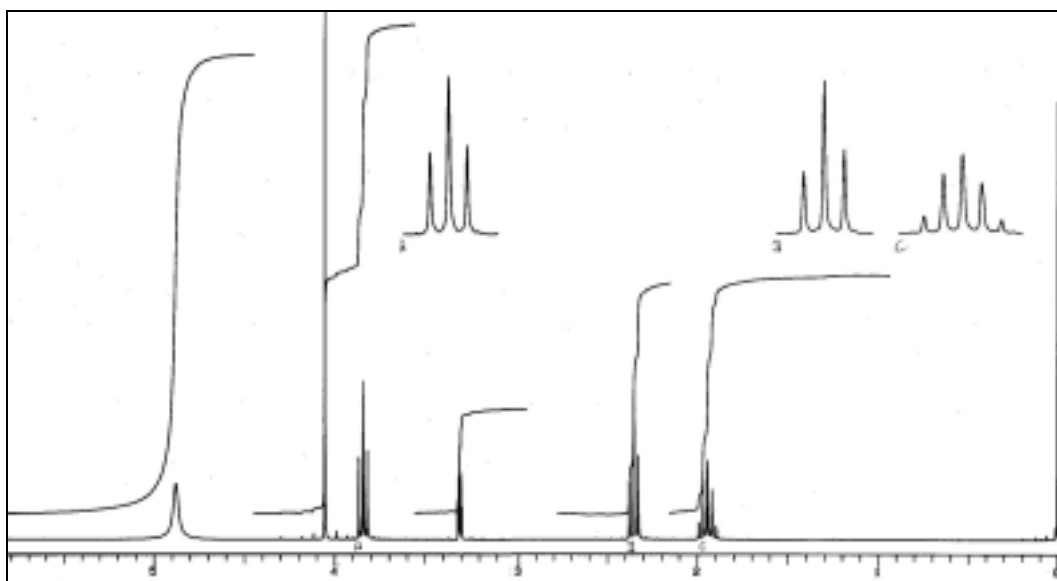


Abbildung 125: $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_4]\text{Methanol}$, 300 MHz) von **29**

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = ca. 3400 (N-H-Valenz); 3198 (C=O-Oberschwingung); 3027, 2941 (C-H-Valenz); 1750, 1723 (C=O-Valenz).

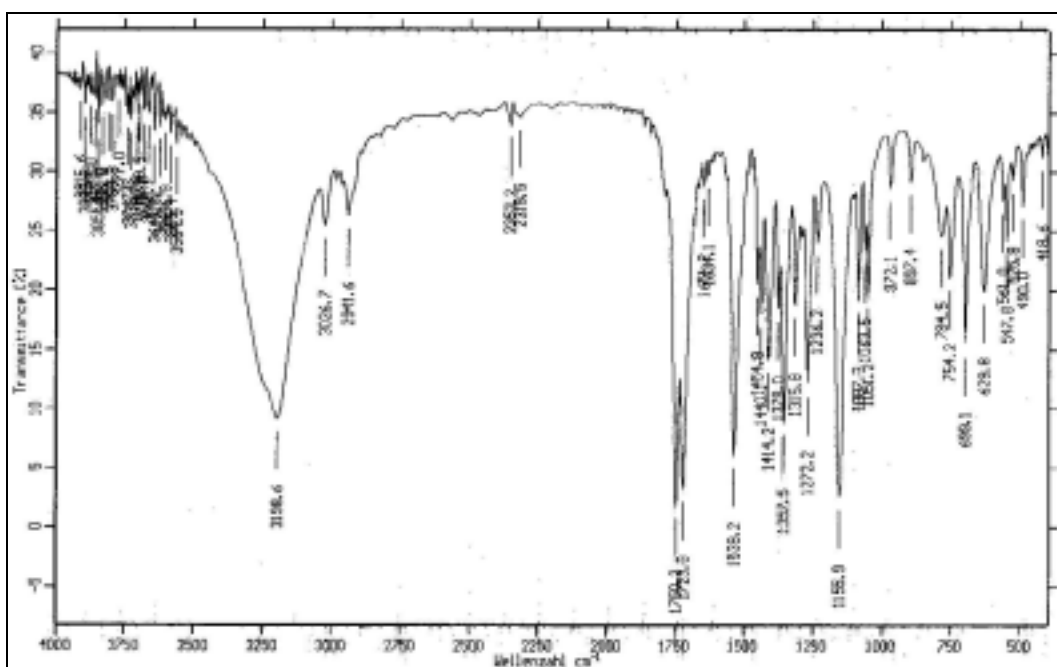


Abbildung 126: IR-Spektrum (KBr) von **29**

MS (EI), m/z (%): 202 (100) [M^+]; 156 (23) [$\text{M}^+ - 2\text{H}$, $-\text{CO}_2$]; 143 (25) [$\text{M}^+ - \text{H}$, $-\text{CO}_2$, $-\text{CH}_2$]; 130 (37) [$\text{M}^+ - \text{H}$, CO_2 , $-\text{CH}_2\text{-CH}_2$].

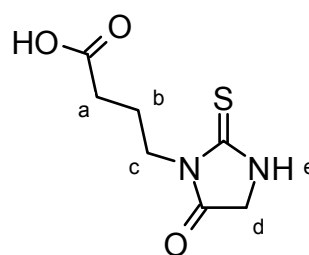
Elementaranalyse: (Doppelbestimmung)

	exp.	theor.
C:	41.67 / 42.12	(41.57)
H:	4.99 / 5.07	(4.98)
N:	13.41 / 13.72	(13.85)

6.21 V20: 4-(2-Thioxoimidazolidin-5-on-1-yl)- buttersäure (29)

(Alternative Darstellungsmethode)

0.634 g (6.15 mmol) γ -Aminobuttersäure **26** und 0.516 g (6.14 mmol) Natriumhydrogencarbonat werden in 3 ml Wasser gelöst vorgelegt. 0.893 g (6.15 mmol) Ethyl-2-isothiocyanatoacetat **15** werden in 3 ml Ethanol gelöst und zu obigem Gemisch unter Rühren bei



29

Raumtemperatur in kleinen Portionen zugegeben. Da die Substanzen nach Zugabe zum Teil wieder ausfallen, werden weitere 2 ml Wasser und 4 ml Ethanol zugegeben, so daß sowohl **15** als auch Carbonat gelöst sind. Die Reaktionskontrolle erfolgt per Dünnschichtchromatographie (Kieselgel 60, Diethylether/Methanol = 5/1). Im Laufe der Reaktion entsteht neben dem Isothiocyanat ($R_f = 0.80$) zunächst eine langsamer laufende Fraktion ($R_f = 0.73$), dann nach und nach weitere langsamer laufende und schmierende Produkte.

Nach 4.5 h scheint sich die Reaktionsgemischzusammensetzung nicht mehr zu ändern, es wird zur Vervollständigung jedoch noch weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Beim vorsichtigen Ansäuern mit verdünnter Salzsäure (ca. 2.6%ig) wird die Reaktionslösung erst trüb, dann fällt voluminöser Niederschlag.

Nach Filtration über Glasfilterfritte (Pore 3) wird das Filtrat mehrfach mit insgesamt 220 ml Diethylether extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, dann vom Lösungsmittel befreit. Das nur wenig verunreinigte Produkt bleibt als gelber Feststoff

zurück ($R_f = 0.53$; 20 %). Durch Auskochen in Chloroform erreicht man höheren Reinheitsgrad, aber deutlich verminderte Ausbeute ($R_f = 0.52$, 11 %). Der Schmelzpunkt ist gegenüber **29** nach der Methode von V19 (siehe Seite 181) weniger scharf und etwas niedriger. Dies dürfte auf leichte Verunreinigung zurückzuführen sein.

Ausbeute: 0.250 g (1.24 mmol, 20 %)
gelber Feststoff
Lit.: nicht bekannt
 $C_7H_{10}N_2O_3S$ MM = 202.23 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 154–160 °C
Lit.: nicht bekannt

¹H-NMR ([D₄]Methanol, 300 MHz):

δ [ppm] = 1.95 (tt, 2 H, ³J_{b,a} = 7.0 Hz, ³J_{b,c} = 7.4 Hz, b); 2.35 (t, 2 H, ³J_{c,b} = 7.4, c); 3.84 (t, 2 H, ³J_{a,b} = 6.9 Hz, a); 4.06 (s, 2 H, d).

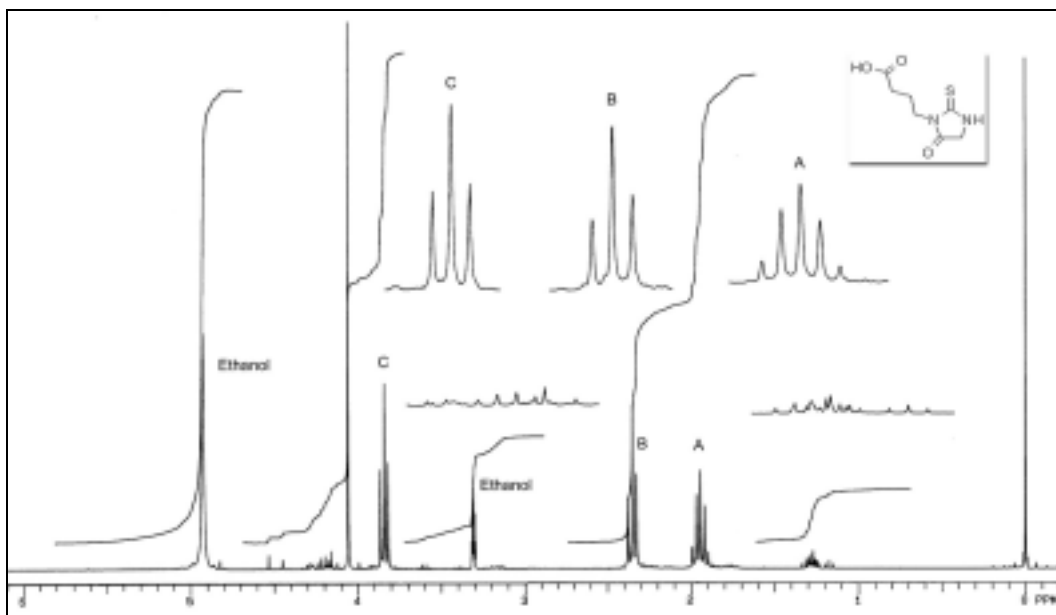
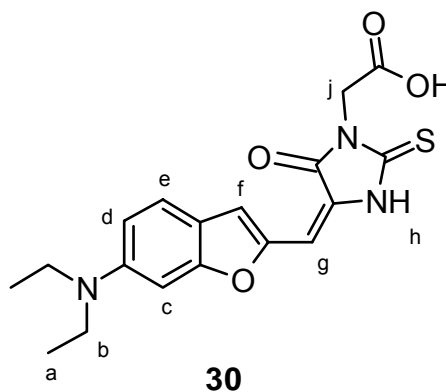


Abbildung 127: ¹H-NMR ([D₄]Methanol, 300 MHz) von **29**

MS (EI), m/z (%): 202 (9) [M⁺]; 156 (2) [M⁺ - 2H, - CO₂]; 143 (2) [M⁺, - H, - CO₂, - CH₂]; 130 (3) [M⁺ - H, CO₂, - CH₂-CH₂]; 30 (100).

6.22 V21: {4-[6-(Diethylamino)benzofuran-2-ylmethyliden]-5-oxo-2-thioxoimidazolidin-1-yl}essigsäure (30)

0.510 g (2.35 mmol) 6-(Diethylamino)benzofuran-2-carbaldehyd **5**, 0.400 g (2.30 mmol) (5-Oxo-2-thioxoimidazolidin-1-yl)essigsäure **25** und 0.280 g (7.00 mmol) fein gemörsertes Natriumhydroxid als Base werden in 10 ml Ethanol einige Zeit zum Sieden erhitzt, dann für 2 d bei Raumtemperatur stehengelassen.



Durch Zugabe von 58 ml Wasser und Ansäuern (Salzsäure, 3.7%ig) wird feiner Niederschlag gefällt, der über eine Glasfilterfritte (Pore 4) filtriert wird.

Durch Säulenchromatographie (Kieselgel 60, Dichlormethan/Methanol = 8/1) und mehrfaches Auskochen in n-Hexan oder Petrolether (60-80 °C) kann das relativ saubere Rohprodukt aufgereinigt werden.

Ausbeute: 0.595 g (1.59 mmol, 68 %)

dunkelroter Feststoff

Lit.: nicht bekannt

$C_{18}H_{19}N_3O_4S$

MM = 373.43 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: >320 °C

Lit.: nicht bekannt

Elementaranalyse: (Doppelbestimmung)

exp. theor.

C: 55.11 / 54.76 (55.23)

H: 5.49 / 5.43 (5.41)

N: 10.61 / 10.56 (10.73)

$C_{18}H_{19}N_3O_4S \cdot H_2O$

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 500 MHz):

δ [ppm] = 1.14 (t, 6 H, $^3J_{a,b} = 6.8$ Hz, a); 3.41 (q, 4 H, $^3J_{b,a} = 6.8$ Hz, b + H_2O aus DMSO), 4.12 (s, 2 H, j); 6.44 (s, 1 H, g); 6.73 (d, 1 H, $^3J_{d,e} = 8.8$ Hz, d); 6.85 (s, 1 H, c); 7.28 (s, 1 H, f); 7.41 (d, 1 H, $^3J_{e,d} = 8.5$ Hz, e).

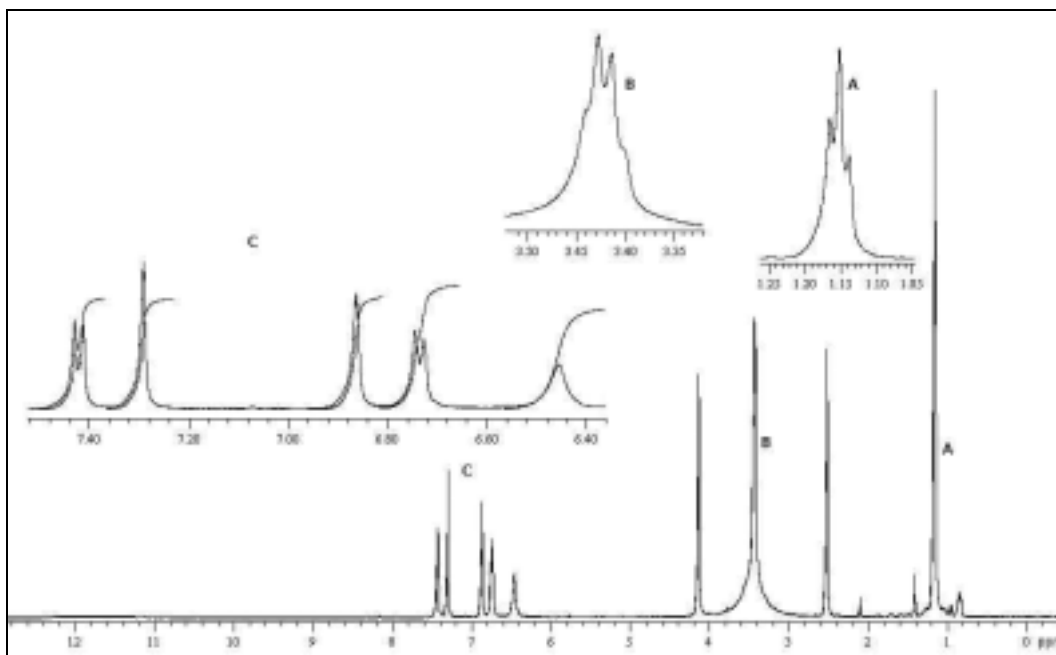


Abbildung 128: $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 500 MHz) von **30**

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 300 MHz):

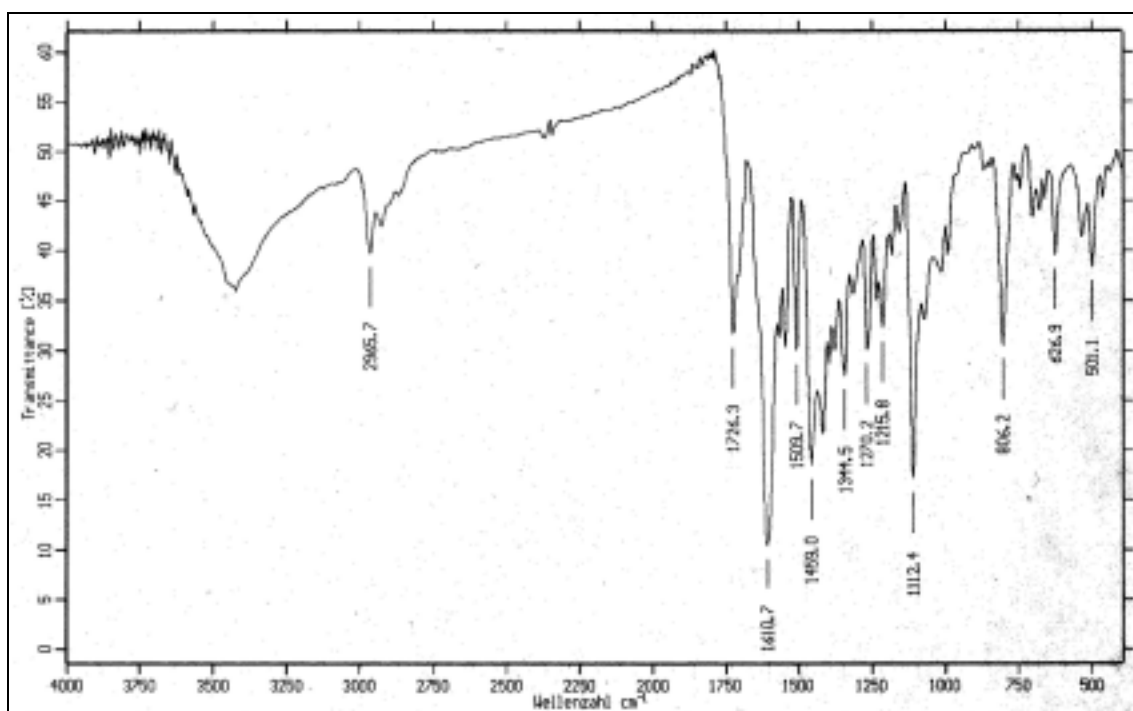
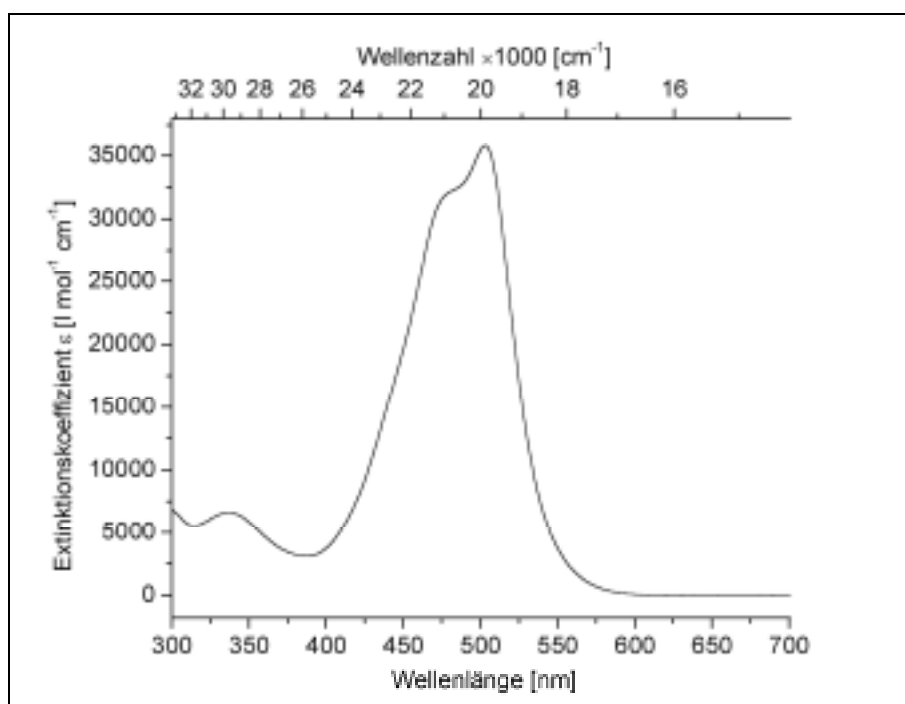
δ [ppm] = 12.3 (a); 44.2 (b); 92.9 (c); 100.5 (g); 110.3 (d); 113.0 (f); 122.1 (e).

MS (FAB, +NBA); m/z (%): 373 (21) [M^+].

MS (FAB, +NBA, +NaI); m/z (%): 418 (12) [$\text{M}^+ + 2\text{Na}, -\text{H}$]; 396 (7) [$\text{M}^+ + \text{Na}$]; 373 (4) [M^+].

IR (KBr):

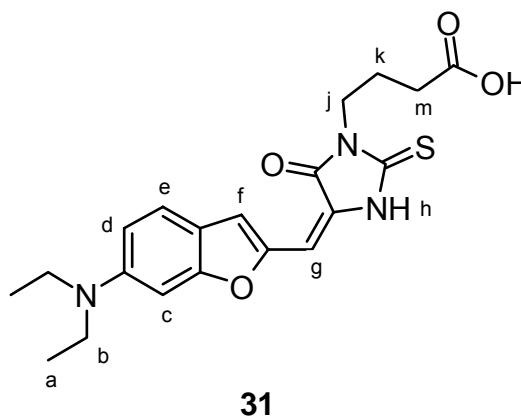
$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = ca. 3600–3250 (O-H-Valenz der Carbonsäure); ca. 3000–2700 (C-H-Valenz); 1726 (C=O-Valenz); 1610 (C=C-Valenz des Aromaten).

Abbildung 129: IR-Spektrum (KBr) von **30**Abbildung 130: UV-VIS-Spektrum (DMSO) von **30****UV-Vis (DMSO):**

$\lambda_{\max} (\epsilon)$: 503nm ($35\,810 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$); $\log \epsilon = 4.55$

6.23 V22: 4-{4-[6-(Diethylamino)benzofuran-2-ylmethyliden]-5-oxo-2-thioxoimidazolidin-1-yl}buttersäure (31)

0.500 g (2.30 mmol) 6-(Diethylamino)benzofuran-2-carbaldehyd **5**, 0.465 g (2.30 mmol) 4-(5-Oxo-2-thioxoimidazolidin-1-yl)buttersäure **29** und 0.276 g (6.90 mmol) fein gemörsertes Natriumhydroxid als Base werden in 10 ml Ethanol für 20 bis 30 min zum Sieden erhitzt.



Nach Zugabe von 20 ml Wasser wird angesäuert (Salzsäure, 3.7%ig) bis feiner Niederschlag fällt. Zur vollständigen Fällung wird über Nacht im Kühlschrank (8 °C) stehengelassen. Nach Filtration (Glasfilterfritte Pore 4) wird mit Wasser und *n*-Hexan gewaschen.

Man erhält 0.674 g (1.68 mmol; 73 %) Rohprodukt, das durch Umfällen gereinigt werden kann.

Dazu löst man in 25 ml Dichlormethan und tropft langsam *n*-Hexan hinzu bis sich Niederschlag bildet (ca. 18 ml). Man belässt über Nacht im Kühlschrank, filtriert und erhält nach Trocknen das Produkt.

Aufreinigung ist auch durch Säulenchromatographie (Kieselgel 60, Dichlormethan/Methanol = 8/1) und Auskochen in *n*-Hexan oder Petrolether (60-80 °C) möglich.

Ausbeute: 0.326 g (0.812 mmol, 35 %)

dunkelroter Feststoff

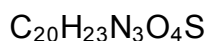
Lit.: nicht bekannt

$C_{20}H_{23}N_3O_4S$

MM = 401.49 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 191–193 °C

Lit.: nicht bekannt

Elementaranalyse: (Doppelbestimmung)

exp. theor.

C: 58.85 / 59.02 (59.83)

H: 5.58 / 5.81 (5.77)

N: 10.31 / 10.33 (10.47)

 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz):

δ [ppm] = 1.25 (t, 6 H, $^3J_{a,b} = 7.1$ Hz, a); 2.08 (tt, 2 H, $^3J_{k,j} = ^3J_{k,m} = 7.1$ Hz, k); 2.44 (t, 2 H, $^3J_{j,k} = 7.4$ Hz, j); 3.45 (q, 4 H, $^3J_{b,a} = 7.1$ Hz, b); 3.99 (t, 2 H, $^3J_{m,k} = 6.9$ Hz, m); 6.55 (s, 1 H, f oder g); 6.70 (dd, 1 H, $^3J_{d,e} = 8.9$ Hz, $^4J_{d,c} = 2.2$ Hz, d); 6.78 (d, 1 H, $^4J_{c,d} = 1.2$ Hz, c); 6.91 (s, 1 H, f oder g); 7.37 (d, 1 H, $^3J_{e,d} = 8.8$ Hz, e); 9.52 (s, 1 H, h).

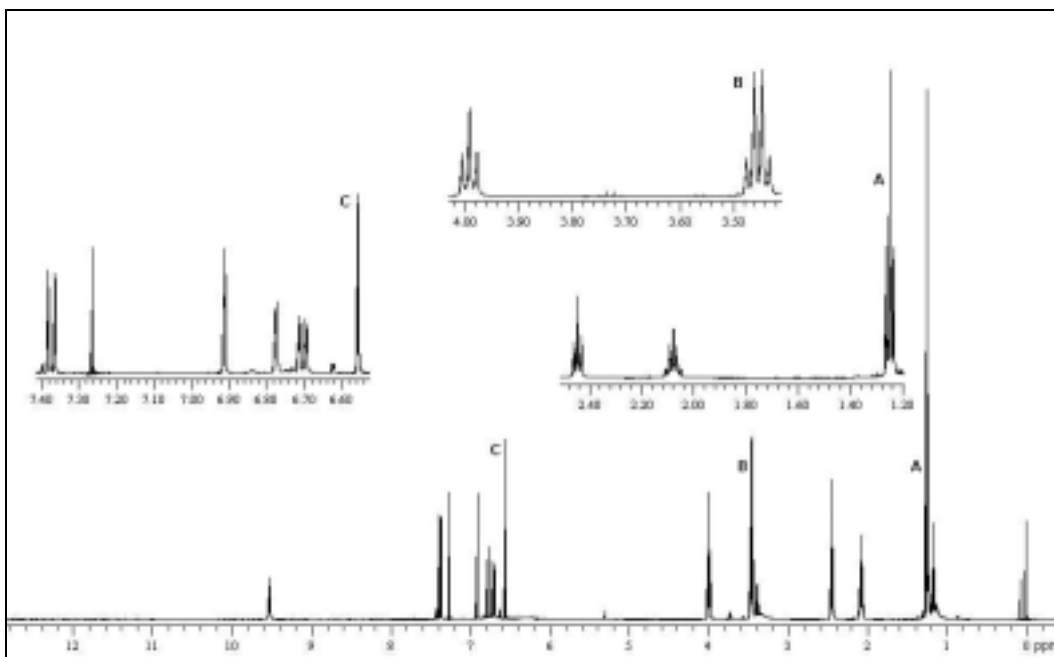
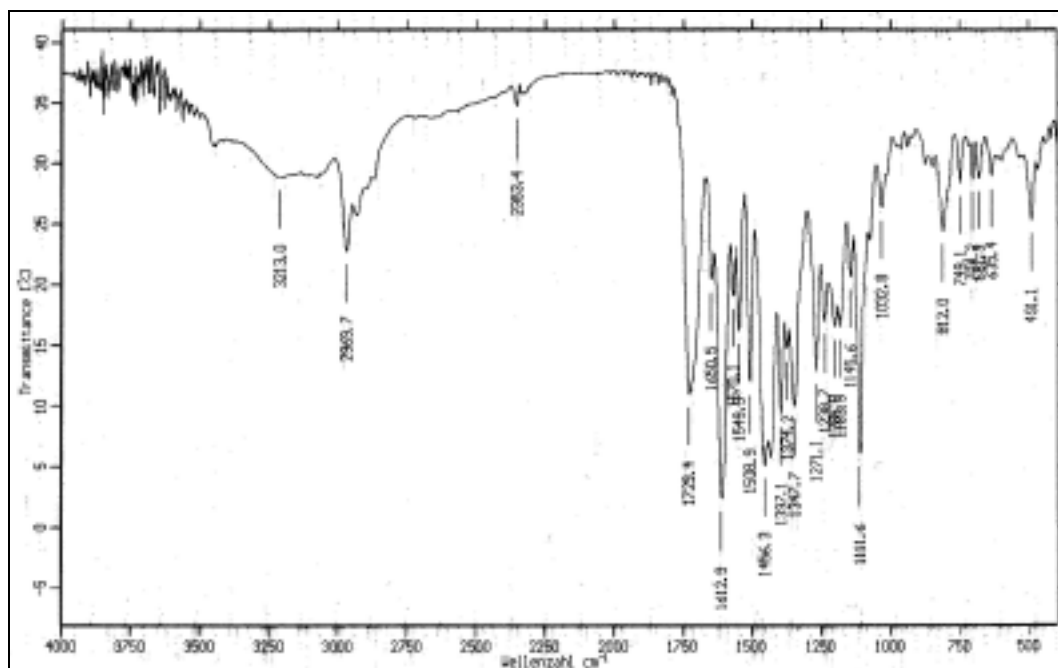


Abbildung 131: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) von **31**

IR (Film):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = ca. 3600–3100 (O-H-Valenz der COOH-Gruppe + C-H-Valenz des Aromaten); 2970 (C-H-Valenz der Alkylgruppen); 1729 (C=O-Valenz); 1613 (C=C-Valenz des Aromaten).

Abbildung 132: IR-Spektrum (KBr) von **31**

MS (FAB, +NBA); m/z (%): 401 (12) [M^+].

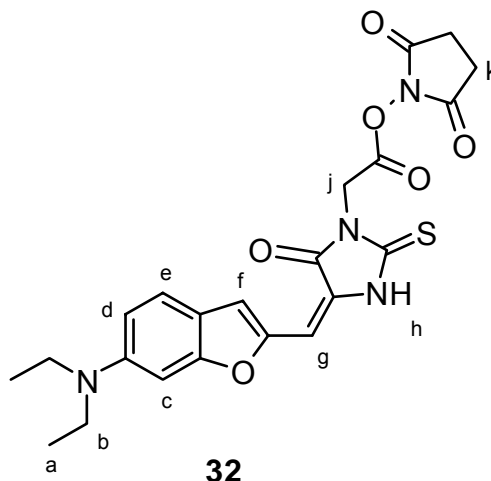
MS (EI); m/z (%): 401 (2) [M^+]; 386 (2) [$M^+ - CH_3$].

UV-VIS (DMSO):

λ_{\max} (ϵ): 504 nm ($49\,600 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$); $\log \epsilon = 4.70$

6.24 V23: (2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl){4-[6-(diethylamino)benzofuran-2-yl-methyliden]-5-oxo-2-thioxoimidazolidin-1-yl}acetat (32)

0.450 g (1.21 mmol) {4-[6-(Diethylamino)benzofuran-2-yl-methyliden]-5-oxo-2-thioxo-imidazolidin-1-yl}essigsäure **30**, 0.249 g (1.21 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid und 0.140 g (1.21 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid werden unter Argonatmosphäre in 10 ml wasserfreiem Ethanol für 27 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach



Zugabe von weiteren 10 ml wasserfreiem Ethanol wird weitere 72 h gerührt. Der Reaktionsansatz wird durch eine Glasfilterfritte (Pore 4) filtriert und der Rückstand mit wasserfreiem Diethylether gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden vom Lösungsmittel befreit und in wasserfreiem Diethylether gelöst. Es bleibt ein Rückstand (Dicyclohexylharnstoff), von dem filtriert wird. Das Filtrat wird vom Lösungsmittel befreit und mit dem Rückstand aus der ersten Filtration vereinigt. Das Rohprodukt wird einer Säulenchromatographie (Dichlormethan/Methanol = 8/1) unterworfen. Dadurch wird der Succinimidylester (schnell laufend) vom nicht umgesetzten Edukt getrennt.

Ausbeute (Rohprodukt): 0.280 mg ($5.95 \cdot 10^{-4}$ mol, 49 %)

Der Ester wird anschließend in wasserfreiem Ethanol umkristallisiert, man erhält 0.128 g reines Produkt.

Ausbeute: 0.128 g ($2.72 \cdot 10^{-4}$ mol, 23 %)

dunkelroter Feststoff

Lit.: nicht bekannt

$C_{22}H_{22}N_4O_6S$

MM = $470.51 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Schmelzpunkt: 237–240 °C

Lit.: nicht bekannt

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz):

δ [ppm] = 1.26 (t, 6 H, ³J_{a,b} = 7.1 Hz, a); 2.84 (s, 4 H, k); 3.47 (q, 4 H, ³J_{b,a} = 7.1 Hz, b); 3.79 (s, 2 H, j); 6.62 (d, 1 H, J = 7.1, f oder g); 6.71 (dd, 1 H, ³J_{d,e} = 8.8 Hz, ⁴J_{d,c} = 2.2 Hz, d); 6.76–6.78 (m, 1 H, c); 6.94 (d, 1 H, J = 5.1, g oder f); 7.38 (d, 1 H, ³J_{e,d} = 8.8 Hz, e); 9.57 (s, 1 H, h).

MS (FAB, +NBA); m/z (%): 494 [M⁺ + Na]; 471 [M⁺]; 387 (100) [M⁺ - C(O)-CH₂-CH₂-C(O)].

IR (Film):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3449 (N-H-Valenz des Thiohydantoincyclus); 2973 (C-H-Valenz von Alkanen); 1742 (C=O-Valenz in Imiden); 1612, 1509 (C=C-Valenz des Aromaten); 1459 (C-H-Deformation von Alkanen); 1111 (C-O-Valenz des Esters); 811 (zwei benachbarte H-Atome im Aromaten = 1,3,4-Trisubstitution).

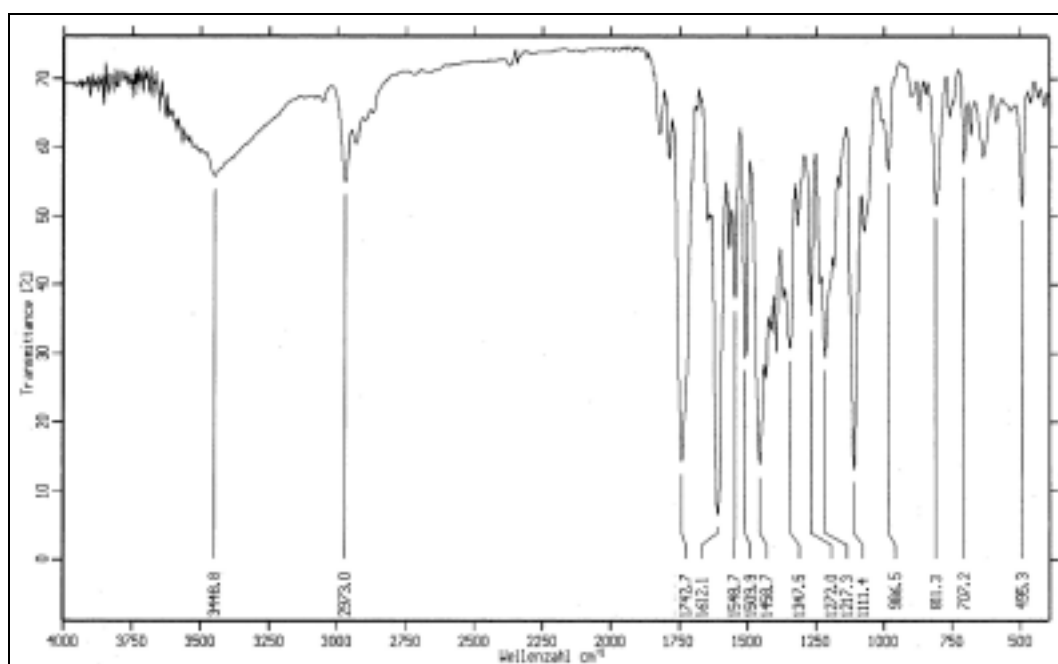
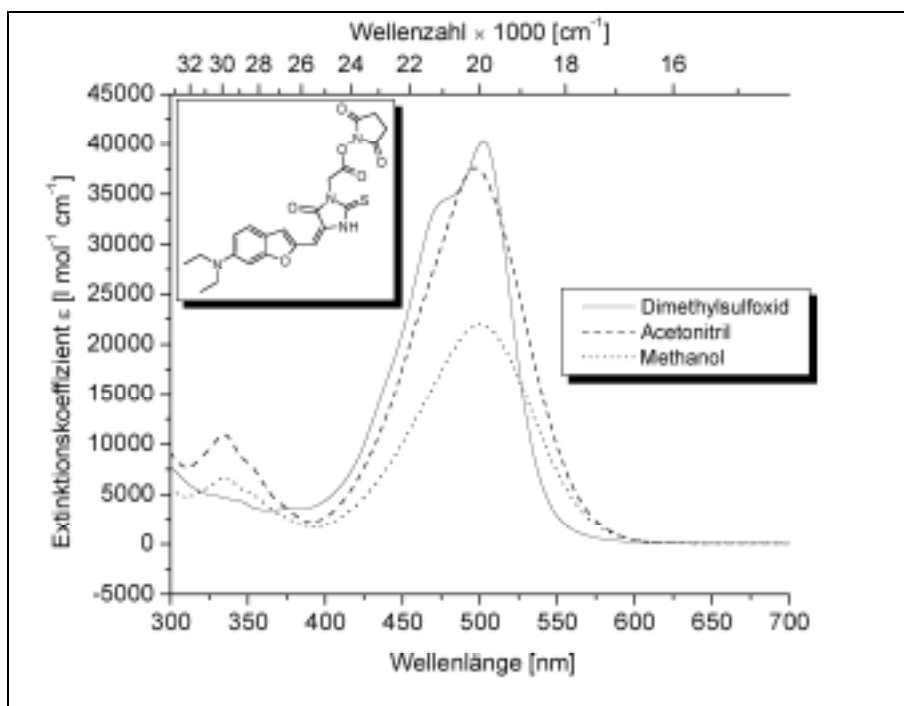


Abbildung 133: IR-Spektrum (KBr) von **32**

Abbildung 134: UV-VIS-Spektren von **32****UV-VIS:**

$\lambda_{\text{max,DMSO}} (\epsilon)$: 502 nm ($40290 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$); $\log \epsilon = 4.61$

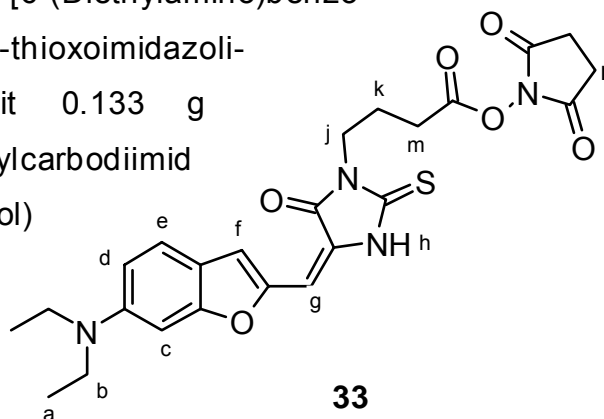
$\lambda_{\text{max,Acetonitril}} (\epsilon)$: 497 nm ($37610 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$); $\log \epsilon = 4.75$

$\lambda_{\text{max,Methanol}} (\epsilon)$: 501 nm ($21940 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$); $\log \epsilon = 4.34$

6.25 V24: (2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)(4-{4-[6-(diethylamino)benzofuran-2-ylmethyliden]-5-oxo-2-thioxoimidazolidin-1-yl}butanoat) (33)

0.226 g ($5.63 \cdot 10^{-4}$ mol) 4-{4-[6-(Diethylamino)benzofuran-2-ylmethyliden]-5-oxo-2-thioxoimidazolidin-1-yl}buttersäure **31** mit 0.133 g ($6.45 \cdot 10^{-4}$ mol) Dicyclohexylcarbodiimid und 0.140 g ($5.61 \cdot 10^{-4}$ mol)

N-Hydroxysuccinimid werden in 10 ml wasserfreiem Ethanol für 27 h bei Raumtem-



33

peratur gerührt. Nach Zugabe von 10 ml wasserfreiem Ethanol wird für weitere 72 h gerührt. Nach Filtration über Glasfilterfritte (Pore 4) wird der Rückstand (0.182 g) mit wasserfreiem Diethylether gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden vom Lösungsmittel befreit und in wasserfreiem Diethylether aufgenommen. Der Überstand wird vom Lösungsmittel befreit, es bleibt ein Feststoff (0.122 g) zurück. Dieser wird mit dem Rückstand aus erster Filtration säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel 60, Dichlormethan/Methanol = 8/1). Die erste Fraktion wird vom Lösungsmittel befreit und in *n*-Hexan suspendiert, dann mit Methanol versetzt, bis teilweise Lösung erfolgt. Es wird für einige Stunden zum Rückfluß erhitzt, dann über Glasfilterfritte (Pore 4) filtriert.

Ausbeute: 0.098 g ($2.0 \cdot 10^{-4}$ mol), 35 % der Theorie
dunkelroter Feststoff

Lit.: nicht bekannt

$C_{24}H_{26}N_4O_6S$

MM = $498.56 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Schmelzpunkt: 203–204 °C

Lit.: nicht bekannt

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz):

δ [ppm] = 1.25 (t, 6 H, $^3J_{a,b} = 7.0$ Hz, a); 2.20 (tt, 2 H, $^3J_{k,j} \approx ^3J_{k,m} = 7.4$ Hz, k); 2.75 (t, 2 H, $^3J_{j,k} = 7.6$ Hz, j); 2.82 (s, 4 H, n); 3.46 (q, 4 H, $^3J_{b,a} = 7.0$ Hz, b); 4.05 (t, 2 H, $^3J_{m,k} = 6.9$ Hz, m); 6.56 (s, 1 H, f oder g); 6.71 (dd, 1 H, $^3J_{d,e} = 8.8$ Hz, $^4J_{d,c} = 2.1$ Hz, d); 6.77 (d, 1 H, $^4J_{c,d} \approx 1.6$ Hz, c); 6.92 (s, 1 H, f oder g); 7.38 (d, 1 H, $^3J_{e,d} = 8.8$ Hz, e); 9.48 (s, 1 H, h).

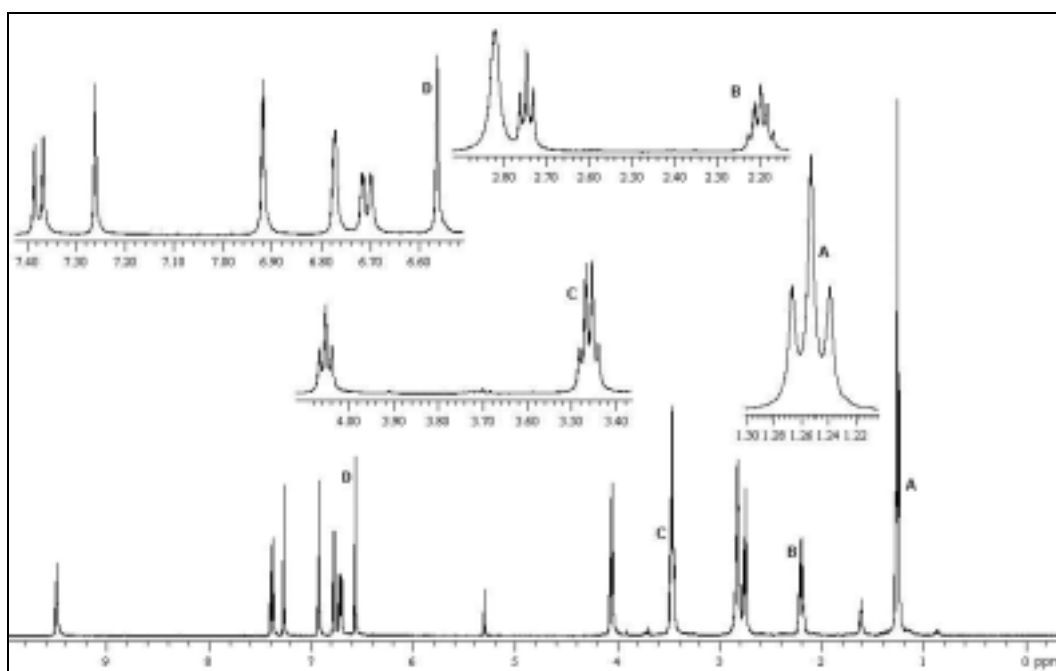


Abbildung 135: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) von **33**

MS (EI); m/z (%): 498 (2) [M^+]; 383 (6) [M^+ , - Succinimid- O^*]; 322 (12); 227 (21); 183 (15); 115 (15) [Succinimid- O^+]; 55 (100).

IR (Film):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = ca. 3451 (breit, N-H-Valenz der Thiohydantoingruppe); 2973 (C-H-Valenz der Alkylgruppen); 1734 (C=O-Valenz des Esters); 1609, 1509 (C=C-Valenz des Aromaten); 1457, 1433 (C-H-Deformation der Alkylgruppen); 1112 (C-O-Valenz des Esters); 811 (zwei benachbarte H-Atome im Aromaten = 1,3,4-Trisubstitution).

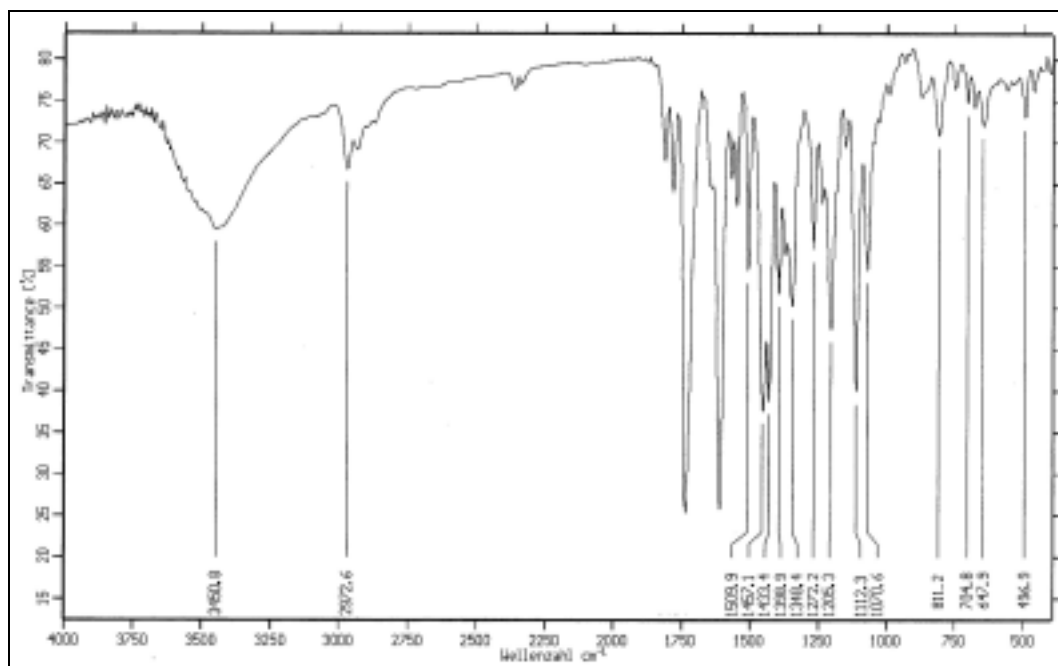


Abbildung 136: IR-Spektrum (KBr) von **33**

UV-VIS (DMSO):

λ_{\max} (ϵ): 504 nm ($38\,110 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$); $\log \epsilon = 4.58$

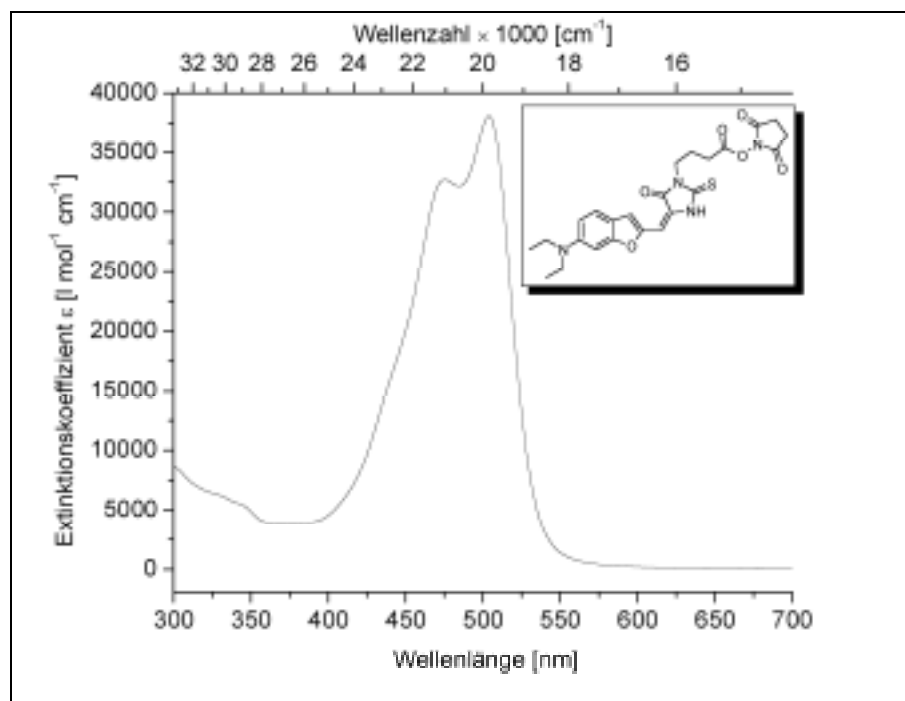
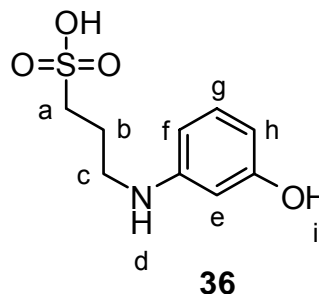


Abbildung 137: UV-VIS-Spektrum (DMSO) von **33**

6.26 V25: 3-(3-Hydroxyphenylamino)propan-1-sulfonsäure (36)

11.0 g (100 mmol) 3-Aminophenol und 10.1 g (83.0 mmol) 1,2-Oxathiolan-2,2-dioxid (Propylsulton) werden in 110 ml Butanol für 4.5 h auf 90 °C erhitzt. Die Sulfonsäure ist im Gegensatz zu den Edukten nicht löslich und fällt aus. Nach Filtration wird mit Diethylether gewaschen und über Nacht im Exsikkator getrocknet. Zur weiteren Reinigung wird in Methanol aufgekocht.



Ausbeute: 19.0 g (82.0 mmol, 99 %)
 $C_9H_{13}NO_4S$ MM = 231.27 g·mol⁻¹

IR (Film):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3205 (N-H-Valenz); 2996 (C-H-Valenz in Alkanen); 2764, 2535 (-NH₂⁺, Protonierung durch Sulfonsäure); 1619, 1503 (C=C-Valenz des Aromaten).

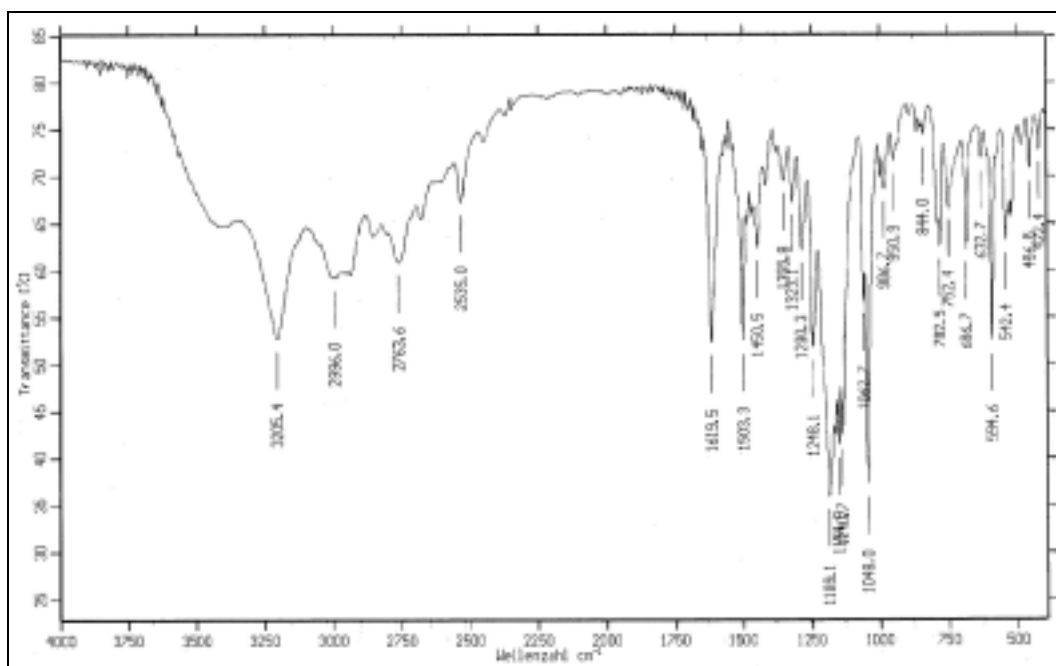


Abbildung 138: IR-Spektrum (KBr) von **36**

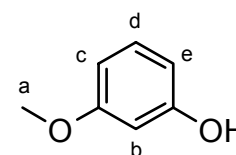
¹H-NMR (D₂O, 500 MHz):

δ [ppm] = 2.08 (tt, 2 H, $^3J_{b,a} = 7.3$, $^3J_{b,c} = 7.7$ Hz, b); 2.93 (t, 2 H, $^3J_{a,b} = 7.3$ Hz, a); 3.48 (t, 2 H, $^3J_{c,b} = 7.7$ Hz, c); 6.81–6.96 (m, 3 H, e+f+h); 7.33 (dd, $^3J_{g,f} \approx ^3J_{g,h} = 8.0$ Hz, g).

MS (FAB, + NBA); m/z (%): 254 (2) [M⁺ + Na]; 232 (7) [M⁺, + H]; 154 (100); 136 (76) [M⁺, - HO₃S-CH₂]; 107 (27) [M⁺, - HO₃S-(CH₂)₃].

6.27 V26: 3-Methoxyphenol (40)

18.0 g (321 mmol) Kaliumhydroxid werden in 110 ml Wasser gelöst, in dieser Lauge werden 20.0 g (182 mmol) Resorcin gelöst. Dazu wird unter Rühren 18 ml (23.9 g, 189 mmol) Dimethylsulfat getropft und für weitere 4 h gerührt, dann läßt man über Nacht stehen.



40

Nach Ansäuern mit halbkonzentrierter Salzsäure wird mit Benzol extrahiert. Die organische Phase wird mit Kalilauge (1.18 mol·l⁻¹, 7.3 g Kaliumhydroxid in 110 ml Wasser) extrahiert, der Extrakt wird angesäuert und mit Benzol extrahiert.

Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit.

Das Rohprodukt wird ohne Aufreinigung weiter umgesetzt.

Ausbeute: 10.1 g (81.4 mmol, 45 %)

farbloses Öl

Lit.: 48 %^[53]

60 %^[91]

C₇H₈O₂

MM = 124.14 g·mol⁻¹

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz):

δ [ppm] = 3.69 (s, 3 H, a); 6.34 (dd, 1 H, $^3J_{b,c} \approx ^3J_{b,e} = 2.1$ Hz, b); 6.36 (ddd, 1 H, $^3J_{e,d} = 7.8$ Hz, $^4J_{e,b} = ^4J_{e,c} = 2.4$ Hz, e); 6.42 (ddd, 1 H, $^3J_{c,d}$

= 8.3 Hz, $^4J_{c,e} = 2.4$ Hz, $^4J_{c,b} = 2.2$ Hz, c); 7.05 (ddd, 1 H, $^3J_{d,e} = 7.9$ Hz, $^3J_{d,c} = 8.2$ Hz, $^5J_{d,b} = 0.5$ Hz, d).

IR (Film):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3600–3100 (sehr breit, O-H-Valenz); ca. 3000 (C-H-Valenz des Aromaten); 2961–2839 (C-H-Valenz der CH_3 -Gruppe); 1600, 1493 (C=C-Valenz des Aromaten); 1286 (C-O-Valenz in Arylethern).

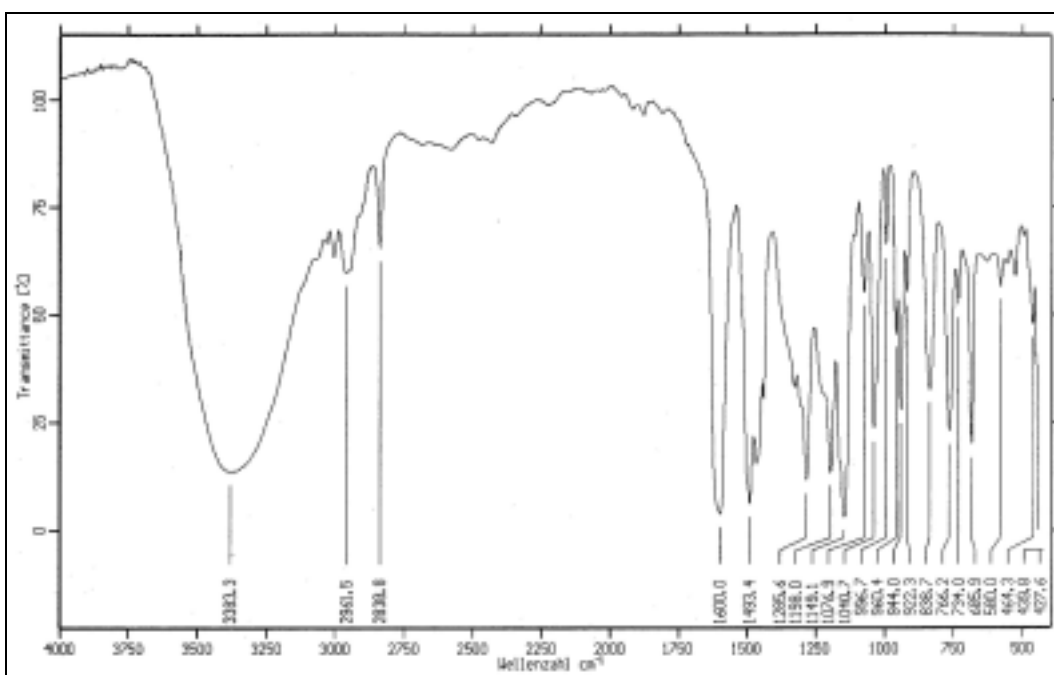
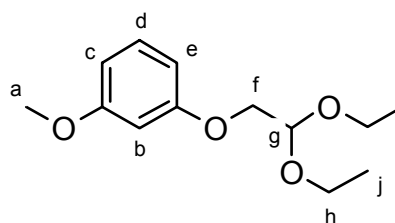


Abbildung 139: IR-Spektrum (Film) von **40**

6.28 V27: 1-(2,2-Diethoxy-ethoxy)-3-methoxybenzol (41)

10.1 g (81.4 mmol) 3-Methoxyphenol **40** werden in 81 ml Natronlauge ($1.0 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) gelöst und zur Trockne am Rotationsverdampfer eingedampft, um das Phenolat zu erhalten. Das Phenolat und 23.9 g (121 mmol, 1.50 Äquivalente) 2-Brom-1,1-diethoxyethan werden zusammen in 10 ml Dimethyl-



41

sulfoxid gelöst und unter Argonatmosphäre für 48 h auf 60–70 °C erhitzt.

Nach Versetzen mit 80 ml Wasser wird mit Benzol extrahiert und die organische Phase mit insgesamt 100 ml Natronlauge ($1.0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), danach mit Wasser gewaschen.

Nach Trocknen der organischen Phase über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt destilliert.

Ausbeute: 10.9 g (50.0 mol, 57 %)
farbloses Öl
Lit.^[54]: 74 %
 $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_4$ MM = $240.30 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
 $n_D^{23} = 1.482(5)$

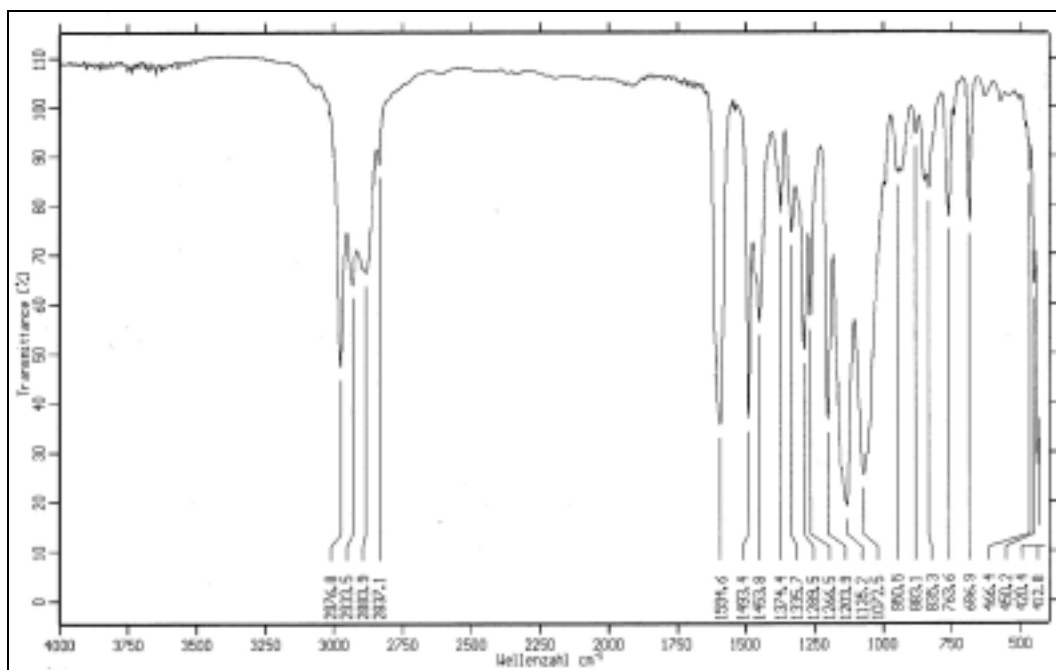
Siedepunkt: 107–111 °C ($\leq 10^{-3} \text{ hPa}$)
Lit.^[92]: 170–172 °C (15 Torr = 20 hPa)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz):

δ [ppm] = 1.25 (t, 6 H, $^3J_{j,h} = 7.1 \text{ Hz}$, j); 3.65 (dq, 2 H, $^3J_{h,j} = 7.1 \text{ Hz}$, $^2J_{h_1,h_2} = 9.4 \text{ Hz}$, h_1 oder h_2); 3.74 (dq, 2 H, $^3J_{h,j} = 7.1 \text{ Hz}$, $^2J_{h_1,h_2} = 9.4 \text{ Hz}$, h_1 oder h_2); 3.78 (s, 3 H, a); 3.99 (d, 2 H, $^3J_{f,g} = 5.2 \text{ Hz}$, f); 4.83 (t, 1 H, $^3J_{g,f} = 5.2 \text{ Hz}$, g); 6.48–6.55 (m, 3 H, b und c und e); 7.16 (dd, 1 H, $^3J_{d,c} = ^3J_{d,e} = 8.0 \text{ Hz}$, d).

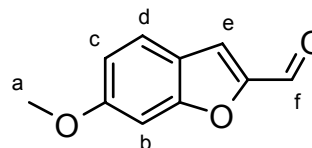
IR (Film):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2977 (C-H-Valenz des Aromaten); 2934–2837 (C-H-Valenz der CH_3 -Gruppe); 1595, 1493 (C=C-Valenz des Aromaten); 1135, 1072 (C-O-Valenz in Ethern).

Abbildung 140: IR-Spektrum (Film) von **41**

6.29 V28: 6-Methoxybenzofuran-2-carbaldehyd (**42**)

3.9 g (16 mmol) 1-(2,2-Diethoxyethoxy)-3-methoxybenzol **41** werden in ca. 15 ml Dimethylformamid eisgekühlt vorgelegt. 9.0 g (59 mmol) eisgekühltes Phosphorsäuretrichlorid werden vorsichtig unter Eiskühlung in

**42**

11 ml eisgekühltes Dimethylformamid eingetragen. Dieses Vilsmeier-Reagenz wird zunächst sehr langsam, dann zügiger zum Edukt **41** getropft. Man rührt noch weitere 10 min bei Eiskühlung und läßt dann auf Raumtemperatur kommen. Man läßt über Nacht stehen und hydrosyliert dann mit 50 ml Wasser. Durch Abstumpfen mit Natriumhydrogencarbonat (leicht basisches Mileu) erfolgt der Ringschluß.

Die wäßrige Phase wird mit Chloroform extrahiert, die organische Phase danach mit gesättigter Natriumchloridlösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel zunächst am Rotationsverdampfer entfernt,

verbleibendes Dimethylformamid wird dann bei niedrigerem Druck entfernt.

Die Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie (Kieselgel, Dichlormethan/Methanol = 19/1). Das Produkt läuft als erste gelbe Fraktion.

Für höhere Reinheit kristallisiert man aus möglichst wenig Benzol, dem man bis zur Trübung *n*-Hexan zusetzt.

Ausbeute: 0.7 g (4 mmol, 25 %)
gelblicher Feststoff, transparente Kristalle
Lit.^[54]: 27 %
 $C_{10}H_8O_3$ MM = 176.17 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 68–70 °C
Lit.: nicht bekannt

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz):

δ [ppm] = 3.88 (s, 3 H, a); 6.97 (dd, 1 H, ³J_{c,d} = 8.7 Hz, ⁴J_{c,b} = 2.3 Hz, c); 7.04 (m, 1 H, ⁴J_{b,c} = 2.3 Hz, b); 7.59 (d, 1 H, ⁵J_{e,b} = 0.9 Hz, e); 7.60 (dd, 1 H, ³J_{d,c} = 8.7 Hz, ⁵J_{d,b} = 0.4 Hz, d); 9.75 (s, 1 H, f).

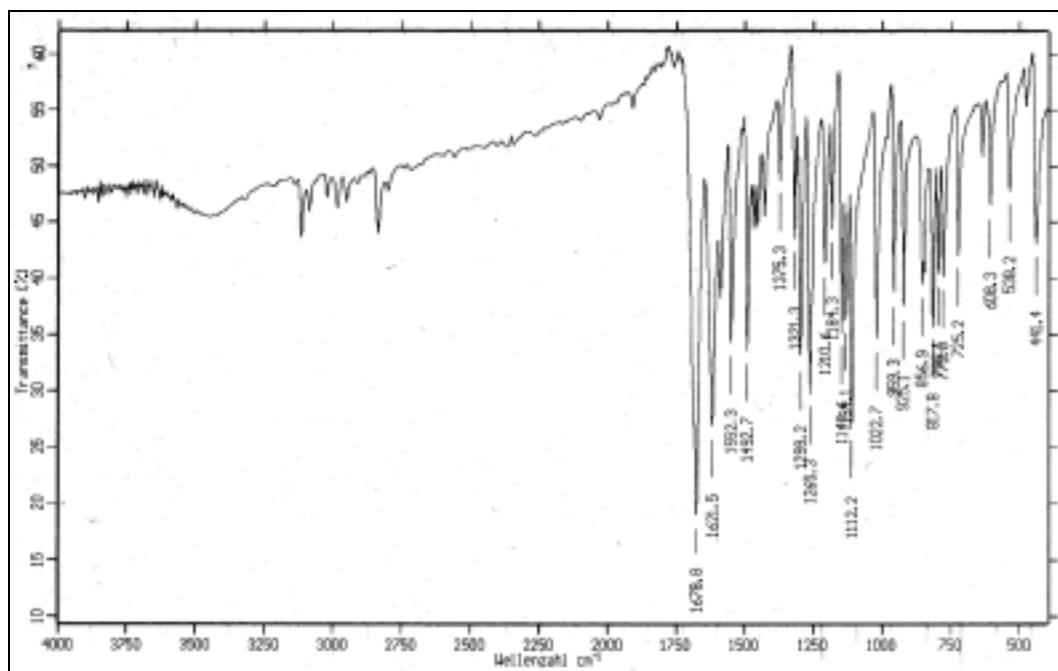


Abbildung 141: IR-Spektrum (KBr) von 42

IR (Film):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = ca. 3100 (C-H-Valenz des Aromaten); ca. 3000–2750 (C-H-Valenz der CH_3 -Gruppe); 1678 (C=O-Valenz der Aldehydgruppe in Konjugation zum Ring), 1622, 1552 (C=C-Valenz des Aromaten); 1112 (C-O-Valenz in Ethern).

MS (EI); m/z (%): 176 (100) [M^+]; 161 (61) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$]; 133 (44) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3, - \text{C}=\text{O}$].

UV-VIS (DMSO):

λ_{max} (ϵ): 328 nm ($25180 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$); $\log \epsilon = 4.40$

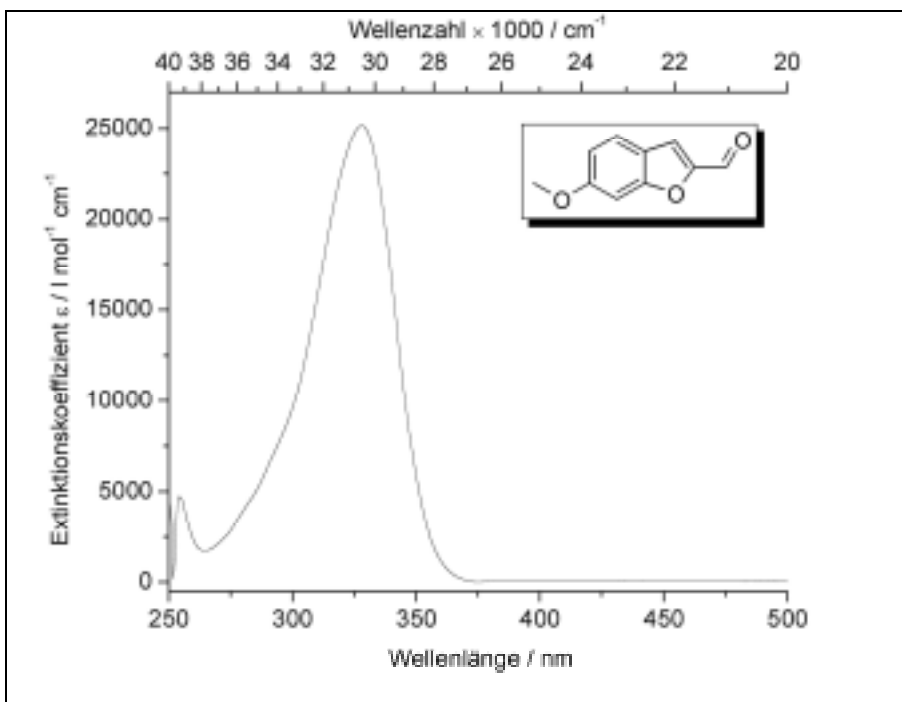
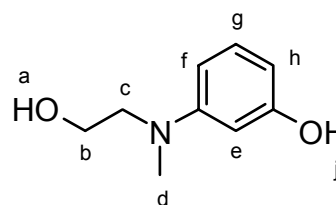


Abbildung 142: UV-VIS-Spektrum von **42** (DMSO)

6.30 V29: 3-[(2Hydroxyethyl)methylamino]phenol (46)

80.00 g (727.0 mmol) Resorcin, 5.300 g (867.0 mmol) Borsäure und 62.70 g (835.0 mmol) 2-(Methylamino)ethanol werden im 500 ml Einhalskolben mit aufgesetzter kurzer Vigreux-Kolonne und Destillationsbrücke auf 180–200 °C erhitzt und bei



46

der Reaktion entstehendes Wasser abdestilliert. Innerhalb 6.5 h gehen 16.7 ml Destillat über (theoretische Menge 19 ml), man läßt auf 60 °C abkühlen und gibt 93 ml (117.4 g, 3.665 mol) Methanol zur Reaktionslösung. Die Borsäure wird als Methylester destillativ entfernt. Man ersetzt Kolonne und Brücke durch Übergangsstück und Mikrodestille (Zinke-Apparatur mit Kühlfinger, siehe Seite 139) und erhält das Produkt als gelbliches Öl durch Destillation. Nach Erkalten kristallisiert das Produkt zu einem farblosen, sehr harten Feststoff (eventuell Animpfen erforderlich), welcher durch Oxidation an Luftsauerstoff erst rot, dann schwarz wird.

Ausbeute: 96.19 g (575.0 mmol, 79 %)

farbloser Feststoff

Lit.^[93]: 78 %

$C_9H_{13}NO_2$ MM = 167.21 g·mol⁻¹

Siedepunkt: 145–155 °C ($\leq 10^{-3}$ hPa)

Lit.^[93]: 165–175 °C (0.4 Torr, 0.5 hPa)

Schmelzpunkt: 92–94 °C

Lit.: keine Angaben

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz):

δ [ppm] = 2.88 (s, 3 H, d); 3.33 (t, 2 H, $^3J_{\text{c,b}} = 6.4$ Hz, c); 3.54 (t, 2 H, $^3J_{\text{b,c}} = 6.4$ Hz, b); 6.06 (dd, 1H, $^3J_{\text{h,g}} = 7.9$ Hz, $^4J_{\text{h,e}} = 2.1$ Hz, h); 6.1 (dd, $^4J_{\text{e,f}} = ^4J_{\text{e,h}} = 2.3$ Hz, e); 6.15 (dd, $^3J_{\text{f,g}} = 8.3$ Hz, $^4J_{\text{f,e}} = 2.4$ Hz, f); 6.93 (dd, $^3J_{\text{g,f}} = ^3J_{\text{g,h}} = 8.1$ Hz, g).

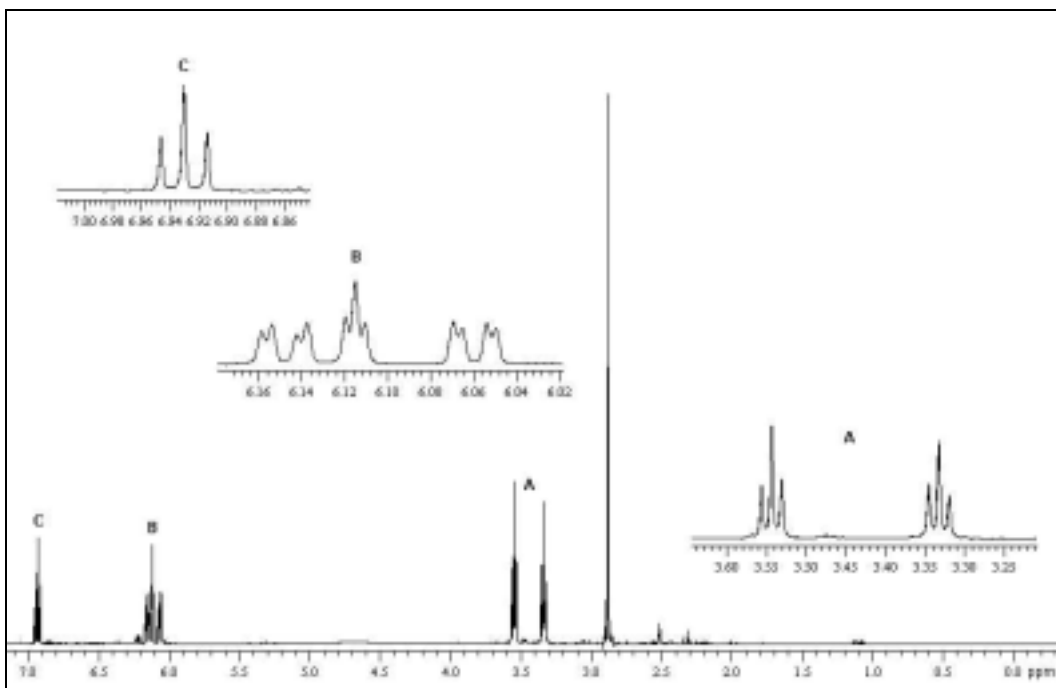
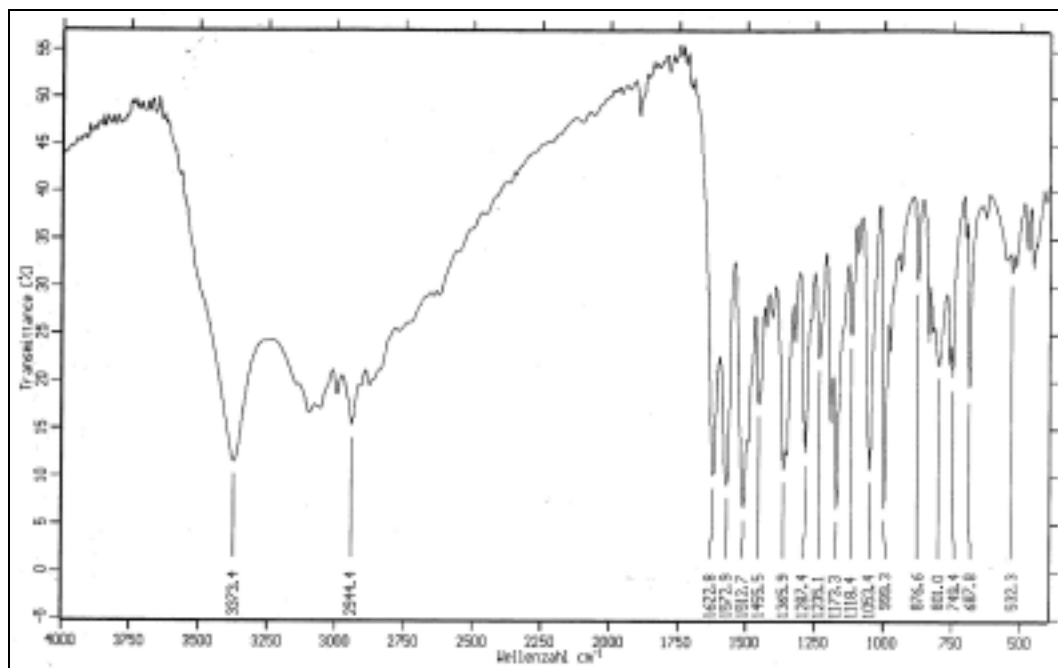


Abbildung 143: $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) von **46**

MS (EI); m/z (%): 167 (8) [M^+]; 137 (3) [$\text{M}^+ - \text{O-CH}_2$]; 136 (33) [$\text{M}^+ - \text{HO-CH}_2$], 123 (3) [$\text{M}^+ - \text{O-CH}_2\text{-CH}_2$]; 110 (62) [$\text{H}_2\text{N-Ph-OH} + \text{H}^+$]; 75 (8) [$\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N-CH}_3 + \text{H}^+$]; 44 (100) [$\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$].

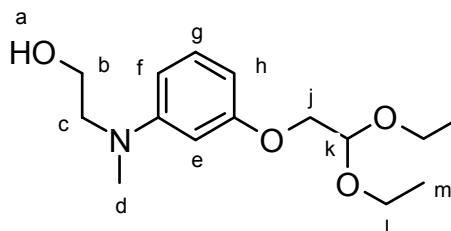
IR (Film):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3373 (N-H-Valenz, O-H-Valenz); 3100 (C-H-Valenz, Aromat) 2944–2800 (C-H-Valenz); 1622, 1573, 1512 (C=C-Valenz des Aromaten); 801, 749 (C=C-Valenz, 1,3-Disubstitution am Aromaten).

Abbildung 144: IR-Spektrum (Film) von **46**

6.31 V30: 2-[[3-(2,2-Diethoxyethoxy)phenyl]methylamino]ethanol (**48**)

24.86 g (149.0 mmol) 3-[(2Hydroxyethyl)methylamino]phenol **46** wird gelöst in 50 ml 3 M Natronlauge (5.90 g Natriumhydroxid in 50 ml Wasser). Um das Phenolat zu erhalten wird die Lösung zur

**48**

Trockne eingedampft. Der Rückstand wird mit 44.05 g (224.0 mmol, 1.500 Äquivalente) 2-Brom-1,1-diethoxyethan versetzt und 35 ml Dimethylsulfoxid zur Lösungsvermittlung zugegeben.

Das Reaktionsgemisch wird unter Argonatmosphäre für 165 h bei 60 bis 70 °C gerührt.

Nach Erkalten gibt man das Reaktionsgemisch auf einen großen Überschuss Wasser (ca. 250 ml) und extrahiert mehrfach mit Chloroform. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natronlauge und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, dann wird das Lösungsmittel entfernt. Die Aufreinigung

erfolgt durch Destillation. Man erhält das Produkt als hellbernsteinfarbenes hochviskoses Öl.

Ausbeute: 29.12 g (103.0 mmol, 69 %)
 hellbernsteinfarbenes Öl
 Lit.^[54]: 91 % (für das *N,N*-Diethylderivat)
 $C_{15}H_{25}NO_4$ MM = 283.37 g·mol⁻¹

Siedepunkt: 159–163 °C ($\leq 10^{-3}$ hPa)
 Lit.: keine Angaben

Elementaranalyse: (Doppelbestimmung)

$C_{15}H_{25}NO_4 \cdot \frac{1}{2} H_2O$		
	exp.	theor.
C:	61.80 / 61.67	(61.62)
H:	8.47 / 8.58	(8.96)
N:	7.24 / 7.28	(4.94)

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz):

δ [ppm] = 1.29 (t, 6 H, $^3J_{m,l} = 7.1$ Hz, m); 2.02 (s, 1 H, a); 2.98 (s, 3 H, d); 3.48 (t, 2 H, $^3J_{c,b} = 5.8$ Hz, c); 3.67 (dq, 2 H, $^3J_{l,m} = 7.0$ Hz, $^2J_{l_1,l_2} = 9.4$ Hz, l_1 oder l_2); 3.80 (dq, 2 H, $^3J_{l,m} = 7.1$ Hz, $^2J_{l_1,l_2} = 9.4$ Hz, l_1 oder l_2); 3.82 (t, 2H, $^3J_{b,c} = 5.8$ Hz, b); 4.25 (d, 2 H, $^3J_{j,k} = 5.2$ Hz, j); 4.87 (t, 1 H, $^3J_{k,j} = 5.2$ Hz, k); 6.34 (ddd, 1 H, $^3J_{h,g} = 8.0$ Hz, $^4J_{h,f} = ^4J_{h,e} = 2.3$ Hz, h); 6.40 (dd, 1 H, $^3J_{e,f} = ^3J_{e,h} = 2.3$ Hz, e); 6.45 (ddd, 1 H, $^3J_{f,g} = 8.2$ Hz, $^4J_{f,e} = ^4J_{f,h} = 2.5$ Hz, f); 7.16 (dd, 1 H, $^3J_{g,f} = ^3J_{g,h} = 8.1$ Hz, g).

¹³C{¹H}-NMR (CDCl₃, 300 MHz):

δ [ppm] = 15.3 (m), 38.9 (d); 55.1 (c); 59.9 (b); 62.4 (l); 68.3 (j), 99.9 (e), 100.4 (k), 102.3 (h), 106.1 (f); 129.8 (g). 151.2 (C_{Ar-NR_2}); 159.8 (C_{Ar-OR}).

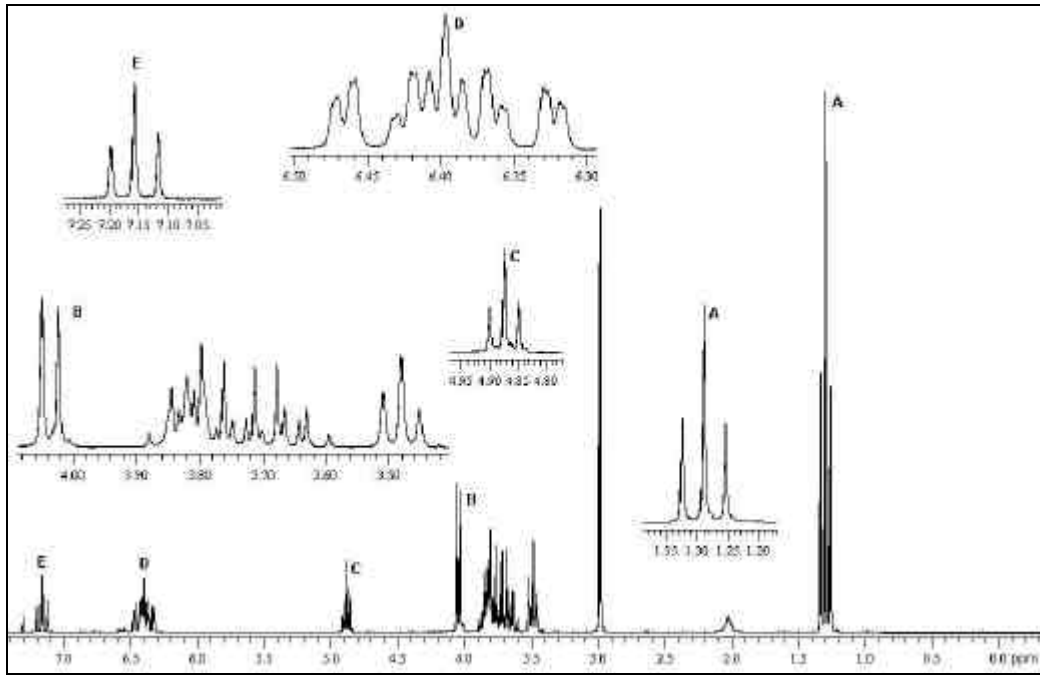


Abbildung 145: $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) von **48**

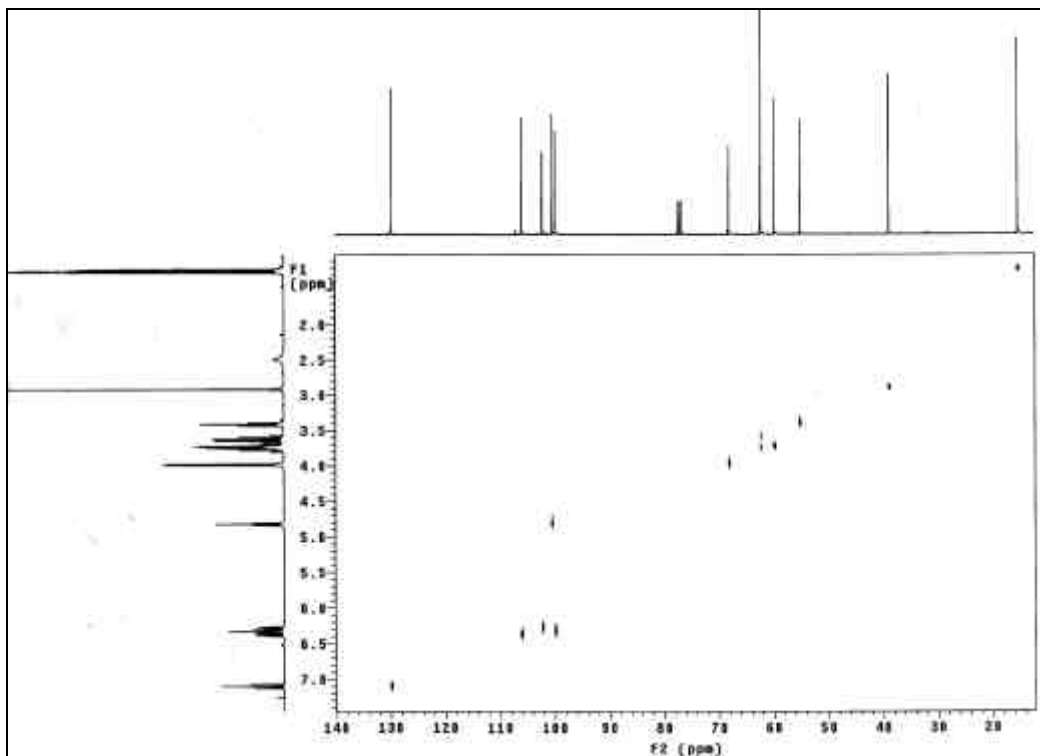


Abbildung 146: $^{13}\text{C-}^1\text{H-COSY}$ (CDCl_3 , 300 MHz) von **48**

MS (EI); m/z (%): 283 (25) [M^+]; 252 (100) [$\text{M}^+ - \text{HO-CH}_2$]; 238 (4) [$\text{M}^+ - \text{O-CH}_2\text{CH}_3$], 103 (57) [$\text{CH}(\text{OEt})_2^+$].

IR (Film):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = ca. 3500 (O-H-Valenz); 2976–2882 (C-H-Valenz); 1613, 1574, 1502 (C=C-Valenz des Aromaten); 1072 (C-O-C-Valenz, Ether); 824, 753, 688 (C=C-Valenz, 1,3-Disubstitution am Aromaten).

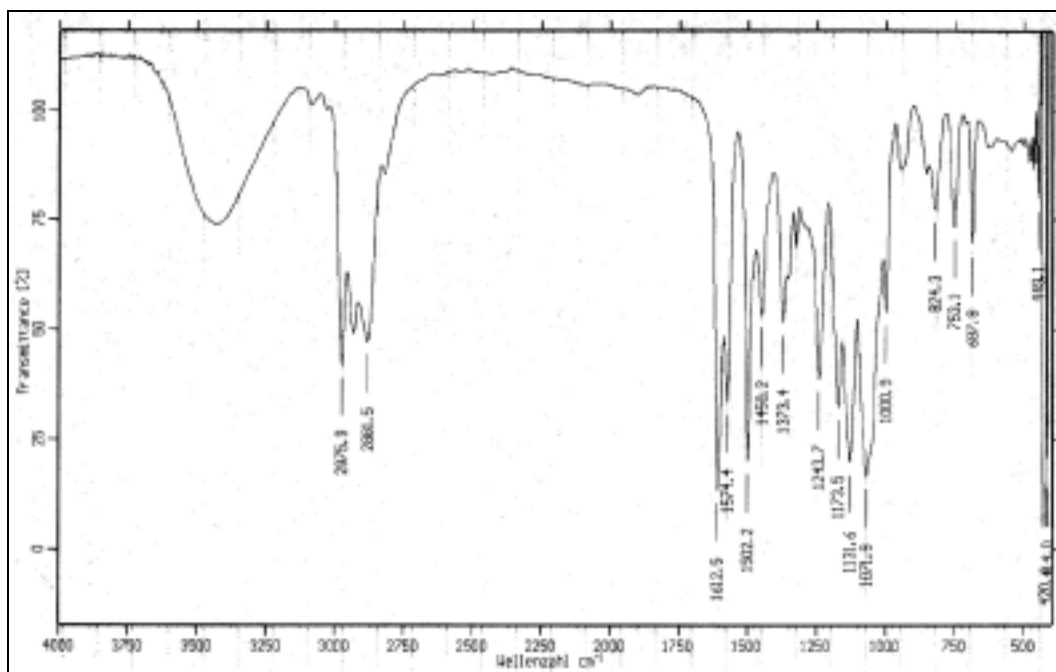
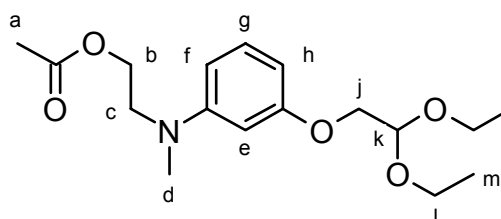


Abbildung 147: IR-Spektrum (Film) von **48**

6.32 V31: 2-[[3-(2,2-Diethoxyethoxy)phenyl]methylamino]ethylacetat (**49**)

In einem 250 ml Dreihalskolben mit Rückflußkühler und Tropftrichter werden 12.8 g (45.0 mmol) 2-[[3-(2,2-Diethoxyethoxy)phenyl]methylamino]-ethanol **48** und 4.55 g



49

(50.0 mmol) Triethylamin in 50 ml Dichlormethan bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgelegt. 3.93 g (50.0 mol) Acetylchlorid in 50 ml Dichlormethan werden langsam zutropft. Während des Zutropfens steigt die Temperatur auf $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nach Zutropfen läßt man auf Raumtemperatur kommen, rührt noch 1 h und gibt weiteres Dichlormethan (ca. 100 ml) zu, um

ausgefallenen Feststoff zu lösen. Man läßt über Nacht bei Raumtemperatur stehen.

Die organische Phase wird mehrfach mit gesättigter Kaliumcarbonatlösung, anschließend mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt destilliert.

Ausbeute: 11.6 g (35.6 mmol, 79 %)
farbloses Öl
Lit.^[94]: 62 % für *N*-Nitroso,*N*-methyl-2-aminoethanol
 $C_{17}H_{27}NO_5$ MM = 325.41 g·mol⁻¹

Siedepunkt: 150–154 °C ($\leq 10^{-3}$ hPa)
Lit.: keine Angaben

Elementaranalyse: (Doppelbestimmung)

$C_{17}H_{27}NO_5$
exp. theor.
C: 62.60 / 62.80 (62.75)
H: 8.40 / 8.51 (8.36)
N: 4.49 / 4.42 (4.30)

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz):

δ [ppm] = 1.25 (t, 6 H, ³J_{m,l} = 7.1, m); 2.01 (s, 3 H, a); 2.95 (s, 3 H, d); 3.56 (t, 2 H, ³J_{c,b} = 6.1 Hz, c); 3.63 (dq, 2 H, ³J_{l,m} = 7.0 Hz, ²J_{l₁,l₂} = 9.3 Hz, l₁ oder l₂); 3.76 (dq, 2 H, ³J_{l,m} = 7.0 Hz, ²J_{l₁,l₂} = 9.4 Hz, l₁ oder l₂); 4.00 (d, 2 H, ³J_{j,k} = 5.2 Hz, j); 4.22 (t, 2 H, ³J_{b,c} = 6.1 Hz, b); 4.84 (t, 1 H, ³J_{k,j} = 5.2 Hz, k); 6.28 (ddd, 1 H, ³J_{h,g} = 8.1 Hz, ⁴J_{h,f} = ⁴J_{h,e} = 2.2 Hz, h); 6.31 (dd, 1 H, ³J_{e,f} = ³J_{e,h} = 2.1 Hz, e); 6.35 (ddd, 1 H, ³J_{f,g} = 7.9 Hz, ⁴J_{f,e} = ⁴J_{f,h} = 2.5 Hz, f); 7.11 (dd, 1 H, ³J_{g,f} = ³J_{g,h} = 8.1 Hz, g).

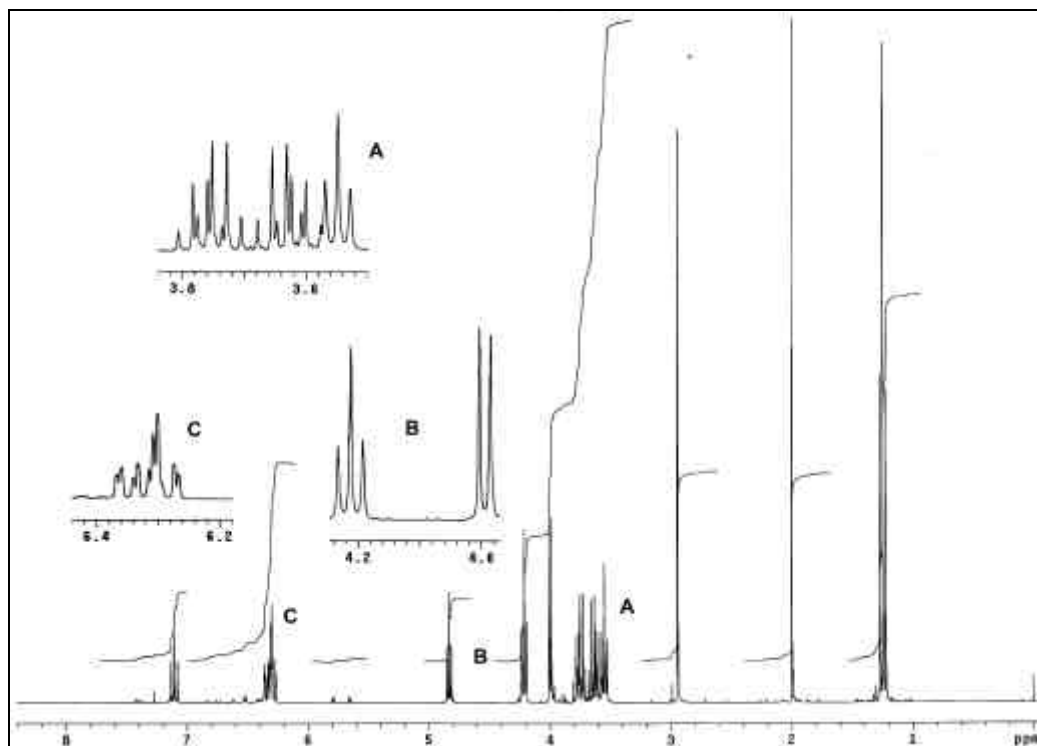


Abbildung 148: $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) von **49**

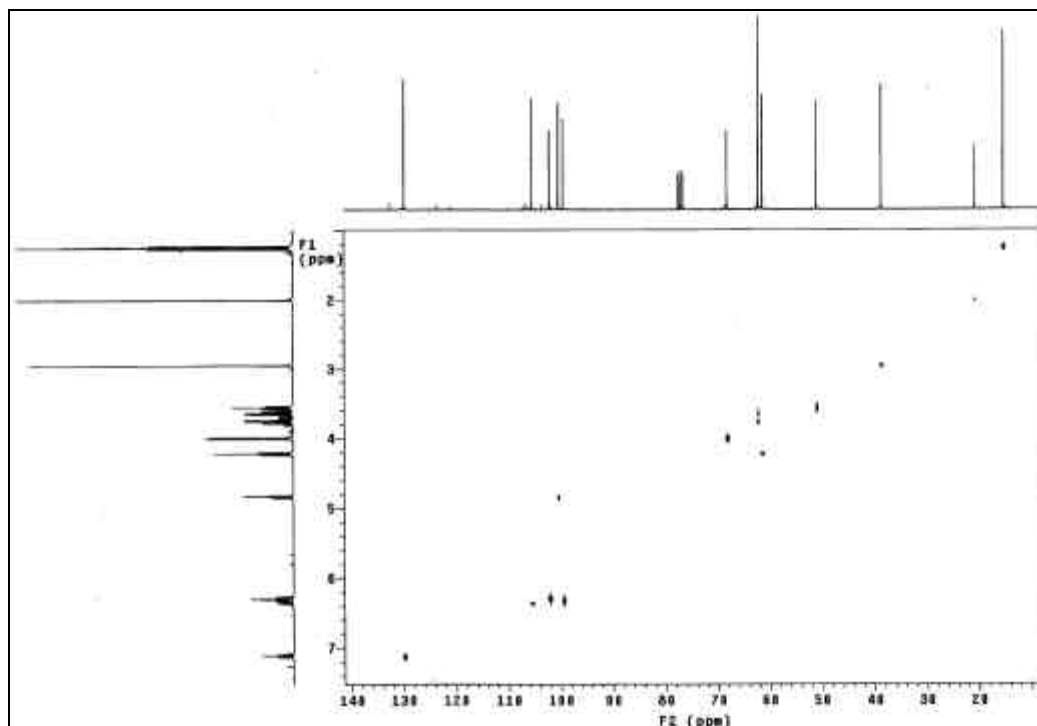


Abbildung 149: $^{13}\text{C-}^1\text{H-COSY}$ (CDCl_3 , 300 MHz) von **49**

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz):

δ [ppm] = 15.4 (m); 20.9 (a); 38.7 (d); 51.1 (c); 61.5 (b); 62.3 (l); 68.3 (j); 99.6 (e); 100.5 (k); 102.2 (h); 105.6 (f); 129.9 (g); 150.3 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-NR}_2$); 159.9 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-O-R}$); 170.9 ($\text{H}_3\text{C-C(O)O-}$).

MS (EI); m/z (%): 325 (44) [M^+]; 252 (100) [$\text{M}^+ - \text{H}_3\text{C-C(O)O-CH}_2$]; 206 (22) [$\text{M}^+ - \text{CH(OEt)}_2, - \text{CH}_3, - \text{H}$]; 136 (16) [$\text{Ph-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}^+$]; 103 (57) [CH(OEt)_2^+]; 87 (12) [$\text{H}_3\text{C-C(O)O-CH}_2\text{-CH}_2^+$]; 75 (27) [$\text{H}_3\text{C-C(O)O-CH}_2 + \text{H} + \text{H}^+$]; 43 (9) [$\text{H}_3\text{C-N-CH}_2^+$].

IR (Film):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2976–2883 (C-H-Valenz); 1741 (C=O-Valenz im Ester); 1613, 1576, 1502 (C=C-Valenz des Aromaten); 1234 (C-O-Valenz der Ester); 1074 (C-O-C-Valenz der Ether); 825, 755, 688 (C=C-Valenz, 1,3-Disubstitution am Aromaten).

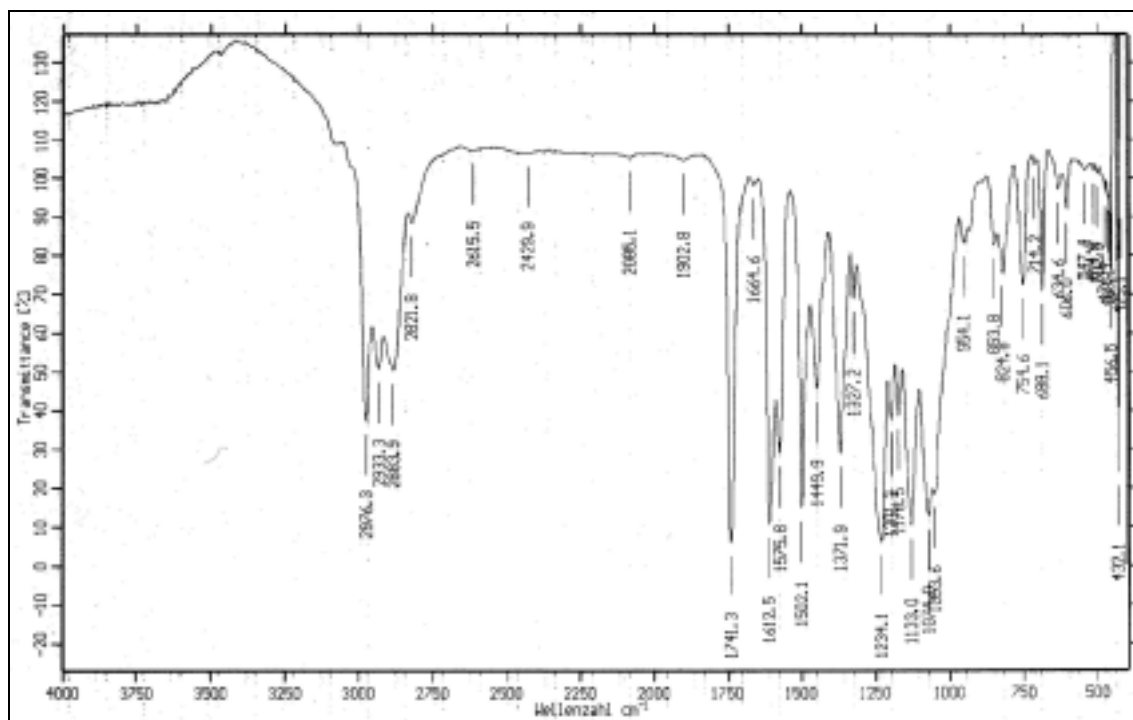
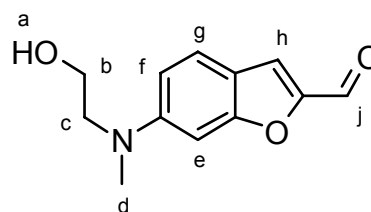


Abbildung 150: IR-Spektrum (Film) von **49**

6.33 V32: 6[(2-Hydroxyethyl)methylamino]benzofuran-2-carbaldehyd (50)

In einem 250 ml Dreihalskolben mit Rückflußkühler, Innenthermometer und Tropftrichter werden 3.25 g (10.0 mmol) 2-[[3-(2,2-Diethoxyethoxy)phenyl]methylamino]ethylacetat **49** und 2.19 g (30.0 mmol) Dimethylformamid auf $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$



50

gekühlt vorgelegt. Man tropft 1.53 g (10.0 mmol) Phosphorylchlorid so langsam zu, daß die Temperatur des Reaktionsgemisches $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaum überschreitet. Man läßt auf Raumtemperatur kommen und erhitzt dann schrittweise auf bis auf $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ Ölbadtemperatur. Der Reaktionsfortschritt kann per Dünnschichtchromatographie (Kieselgel 60, Dichlormethan/Methanol = 8/1) überprüft werden. Das gewünschte Produkt ist in hoher Verdünnung gelb und zeigt grünlich-gelbe Fluoreszenz. Da bei der Reaktion leicht polymere Nebenprodukte entstehen (schwarz-braun, $R_f \approx 0$), die die Aufreinigung deutlich erschweren, wird die Temperaturzufuhr sofort beendet, sobald sich diese in nennenswerter Konzentration zeigen.

Man läßt dann auf Raumtemperatur abkühlen und gießt zur Hydrolyse auf etwa 200 ml Eis in einem 600 ml Becherglas. Man rührt noch etwa 30 min, wobei das Acetal zerstört wird und das restliche Eis schmilzt.

Mit festem Natriumhydrogencarbonat wird das saure Gemisch auf pH 7–8 abgestumpft, hierbei erfolgt der Ringschluß zum Benzofuran, wodurch der sich bildende Schaum sehr fest wird und sich kaum noch bricht.

Man extrahiert mit Chloroform und wäscht die vereinigten organischen Phasen mit Wasser. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel entfernt.

Zur Reinigung filtriert man an Kieselgel 60 (Laufmittel Diethylether). Dazu wird das Rohprodukt in Chloroform gelöst und einige Löffel Kieselgel darin suspendiert. Man entfernt das Lösungsmittel und trägt

das an Kieselgel adsorbierte Rohprodukt auf eine kurze Säule mit Kieselgel auf. Das relativ saubere Produkt wird mit Diethylether eluiert, während v. a. die polymeren Nebenprodukte an der stationären Phase adsorbiert bleiben.

Nach Entfernen des Lösungsmittels wird im Vakuum ($\leq 10^{-3}$ hPa) getrocknet. Man erhält ein braunes hochviskoses Öl.

Zum Teil ist das Produkt bereits entschützt. Zur Vervollständigung der Verseifung löst man in Methanol, gibt äquimolare Menge Natriumhydroxyd zu und erhitzt für einige Zeit zum Rückfluß. Dabei wird per Dünnschichtchromatographie überprüft, ob das Produkt nicht zerstört wird. Nach Abkühlen wird auf das dreifache Volumen mit Wasser verdünnt und mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Ammoniumchloridlösung, dann mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt über Kieselgel 60 filtriert. Dazu wird es an Kieselgel adsorbiert (die Chloroformlösung des Produktes wird mit Kieselgel am Rotationsverdampfer evakuiert), dann mit Diethylether eluiert. Für die Umsetzung zu Chromophoren ist die Reinheit ausreichend. Für höhere Reinheit muß säulenchromatographisch (Kieselgel 60, Dichlormethan/Methanol = 8/1) aufgereinigt werden.

Ausbeute: 0.726 g (3.31 mmol, 33 %)
braunes hochviskoses Öl
Lit.: nicht bekannt
 $C_{12}H_{13}NO_3$ MM = 219.24 g·mol⁻¹

Siedepunkt: nicht destillierbar

Elementaranalyse: (Doppelbestimmung)

	exp.	theor.	
C:	64.02 / 64.41	(65.74)	
H:	6.34 / 6.34	(5.98)	$C_{12}H_{13}NO_3$
N:	5.37 / 5.37	(6.39)	

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz):

δ [ppm] = 3.00 (s, 3 H, d); 3.52 (t, 2 H, $^3J_{c,b} = 5.7$ Hz, c); 3.78 (t, 2 H, $^3J_{b,c} = 5.7$ Hz, b); 6.67 (d, 1 H, $^4J_{e,f} = 1.9$ Hz, e); 6.78 (dd, 1 H, $^4J_{f,e} = 2.3$ Hz, $^3J_{f,g} = 8.9$ Hz, f); 7.32 (s, 1 H, h); 7.41 (d, 1 H, $^3J_{g,f} = 8.8$ Hz, g); 9.51 (s, 1 H, j).

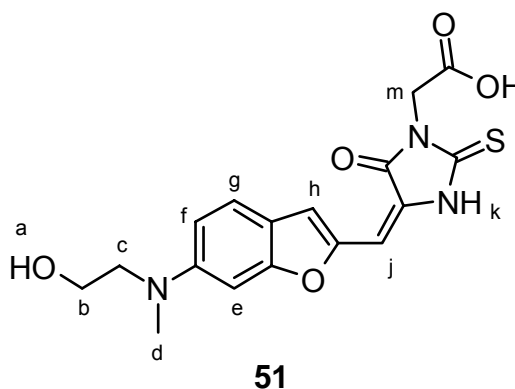
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz):

δ [ppm] = 38.4 (d); 54.1 (c); 59.0 (b); 92.4 (e); 110.8 (f); 115.6 (C3'); 119.1 (h); 122.9 (g); 150.2, 150.8, 158.283 (C2, C6, C7'), 176.9 (j).

MS (EI); m/z (%): 219 (28) [M^+]; 188 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{OH}$]; 173 (13) [$\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{OH}, - \text{CH}_3$]; 149 (32).

6.34 V33: (4-{6-[(2-Hydroxyethyl)methylamino]-benzofuran-2-ylmethyliden}-5-oxo-2-thioxoimidazolidin-1-yl)essigsäure (51)

0.27 g (1.2 mmol) 6-[(2-Hydroxyethyl)methylamino]benzofuran-2-carbaldehyd **50** und 0.22 g (1.3 mmol) (5-Oxo-2-thioxoimidazolidin-1-yl)essigsäure **25** werden in 10 ml Methanol zur Lösung gebracht. Ist die Lösung nicht vollständig, wird etwas



erwärmt. Dann gibt man 0.26 g (2.6 mmol) Triethylamin als Base gelöst in 3 ml Methanol hinzu. Man erhitzt für 3 h zum Rückfluß, läßt abkühlen und fügt etwa die gleiche Menge Wasser hinzu. Nachdem der größte Teil des Methanols entfernt wurde, wird mit verdünnter Salzsäure vorsichtig angesäuert, bis sich Niederschlag bildet. Eventuell muß mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung abgestumpft werden.

Die dickflüssige Suspension wird über eine Glasfilterfritte (Pore 4) filtriert, der Feststoff mit wenig Wasser gewaschen und getrocknet.

Die Aufreinigung erfolgt durch Säulenchromatographie (Kieselgel 60, Dichlormethan/Methanol = 8/1). Dazu wird das Rohprodukt an Kieselgel adsorbiert (die Lösung von **51** wird mit Kieselgel am Rotationsverdampfer evakuiert) aufgetragen.

Die vorlaufende gelbe Fraktion ist nicht umgesetztes Edukt **50**. Ist diese entfernt, wird das Produkt eluiert. Dazu muß sukzessive die Konzentration an Methanol erhöht werden bis zum Verhältnis 2/1. Die polaren Nebenprodukte (vermutlich durch Oxidation von **50**) verbleiben größtenteils auf der Säule. Geringe Mengen werden aber mit dem Produkt eluiert, besonders bei höherem Methanolanteil. Das saubere Produkt fällt bei Einengen des Eluats teilweise aus.

Ausbeute: 0.22 g (0.58 mmol, 47 %)
rotschwarzer Feststoff
Lit.: nicht bekannt
 $C_{17}H_{17}N_3O_5S$ MM = 375.41 g·mol⁻¹

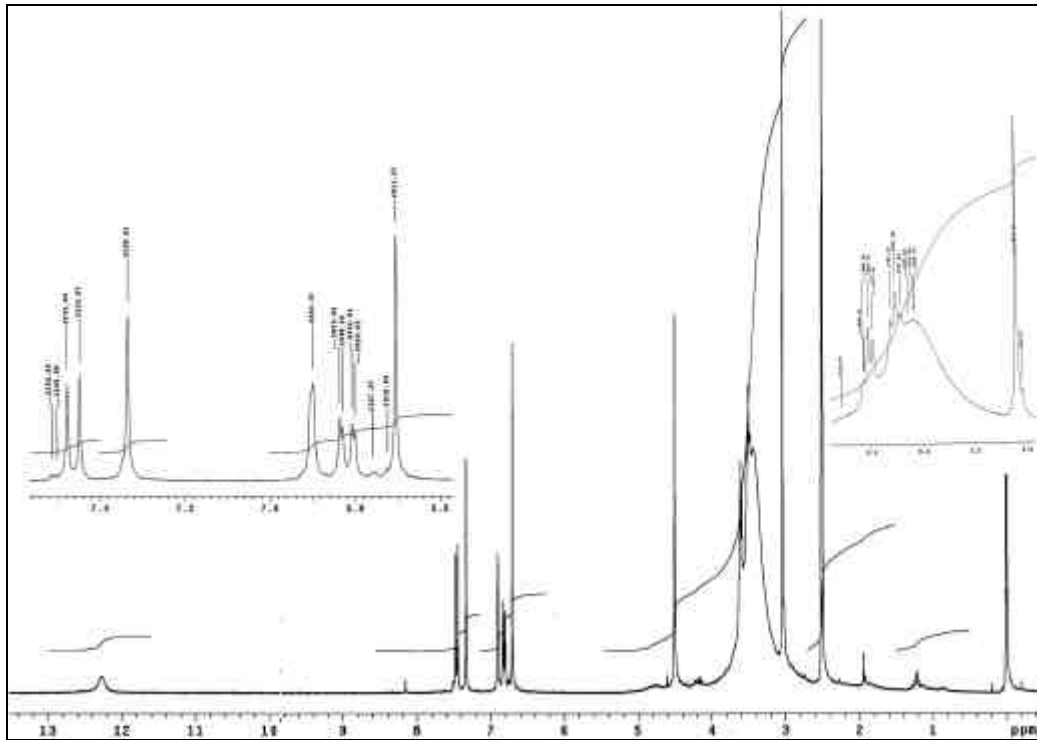
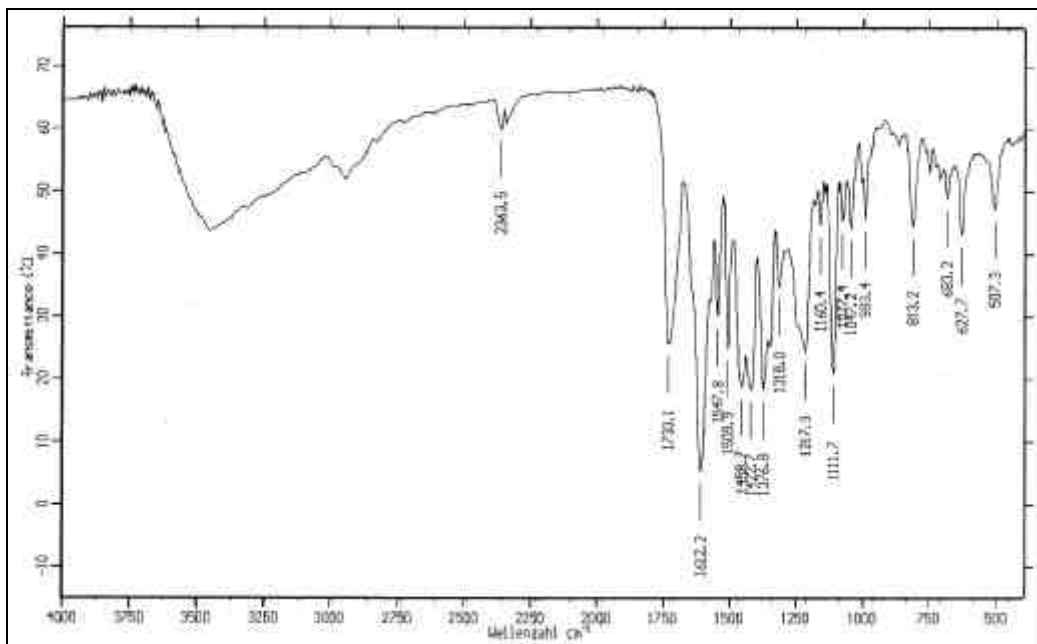
Schmelzpunkt: >300 °C
Lit.: nicht bekannt

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 300 MHz):

δ [ppm] = 3.04 (s, 3 H, d); 3.50 (t, 2 H, ³J_{c,b} = 5.8 Hz, c); 3.61 (t, 2 H, ³J_{b,c} = 5.6 Hz, b); 4.51 (s, 2 H, m); 6.70 (s, 1 H, j); 6.82 (dd, ³J_{f,g} = 8.9 Hz, ⁴J_{f,e} = 2.3 Hz, f); 6.90 (s, 1 H, e); 7.33 (s, 1 H, h); 7.46 (d, 1 H, ³J_{g,f} = 9.0 Hz, g); 12.27 (s, 1 H, COOH).

IR (Film):

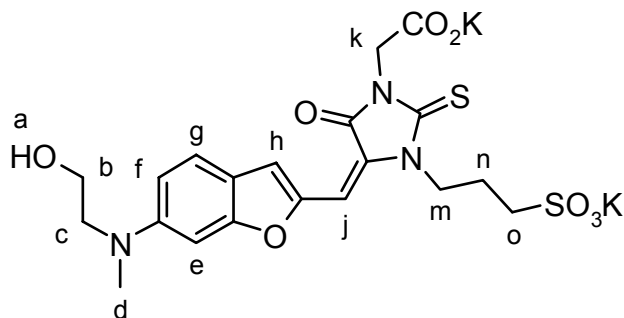
$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: etwa 3700-3300 (O-H-Valenz der Hydroxygruppe und N-H-Valenz von HNEt₃⁺ und Thiohydantoincyclus); 2938 (C-H-Valenz der Alkylreste); 1733 (C=O-Valenz); 1612, 1548, 1510 (C=C-Valenz des Aromaten); 813 (1,3,4-Trisubstitution am Aromaten).

Abbildung 151: $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 300 MHz) von **51**Abbildung 152: IR-Spektrum (KBr) von **51**

MS (FAB + NBA); m/z (%): 477 (2) [M^+ , $\text{HNet}_3\text{-Salz}$]; 398 (8) [M^+ , + Na]; 375 (10) [M^+]; 329 (51) [M^+ , - HO-CH_2^+]; 307 (100); 289 (72) [M^+ , - $\text{O=C=N-CH}_2\text{-COOH}$ aus Thiohydantoin].

6.35 V34: Dikalium-[4-{6-[(2-Hydroxyethyl)methylamino]benzofuran-2-ylmethyliden}-5-oxo-3-(3-sulfonatopropyl)-2-thioxoimidazolidin-1-yl]acetat (**52**)

0.815 g (2.17 mmol)
 (4-{6-[(2-Hydroxyethyl)-
 methylamino]benzofuran-
 2-ylmethyliden}-5-oxo-2-
 thioxoimidazolidin-1-yl)es-
 sigsäure **51** wird in 150 ml
 [1,4]-Dioxan vorgelegt.



52

Man löst 0.365 g (6.51 mmol, 3.00 Äquivalente) Kaliumhydroxid in 20 ml Wasser und gibt dies zur Lösung von **51**. Man rührt etwa 30 min und gibt dann 0.530 g (4.34 mmol, 2.00 eq) [1,2]-Oxathiolan-2,2-dioxid als Feststoff hinzu.

Das sich bildende Produkt erkennt man dünnschichtchromatographisch (Kieselgel 60, Dichlormethan/Methanol = 8/1, $R_f = 0$). Man rührt 5 h bei 35 °C, dann weitere 17 h bei Raumtemperatur.

Nach Entfernen des Lösungsmittels erfolgt grobe Reinigung durch Säulenchromatographie an Kieselgel 60. Dabei entfernt man das Edukt **51** (Dichlormethan/Methanol = 8/1). Das Rohprodukt erhält man durch sukzessive Erhöhung der Polarität des Laufmittels (Dichlormethan/Methanol = 8/1, 2/1, 1/1, reines Methanol).

Man erhält 0.425 g ($7.41 \cdot 10^{-4}$ mol, 34 %) Rohprodukt.

Eine vollständige Entfernung der Nebenprodukte und Edukte erfolgt durch Säulenchromatographie an Reverse-Phase-18-Kieselgel (Wasser). Dazu wird die Chromatographiesäule mit in Methanol aufgeschlämmtem RP-18-Kieselgel gefüllt und dann mit Wasser gespült (mehrere Säulenvolumina). Das Produkt findet sich in der ersten rot gefärbten Fraktion.

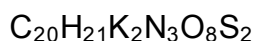
Nach Entfernung des Wassers, wird in Methanol gelöst, dann gibt man Petrolether (Siedebereich 60–80 °C) bis zur Phasentrennung hinzu.

Durch Zugabe von Chloroform mischen sich die Phasen, das sehr reine Produkt fällt als Niederschlag.

Ausbeute: 0.070 g (1.22 mmol, 6 %)
Kristalle mit metallisch grünem Glanz
Lit.: nicht bekannt
 $C_{20}H_{21}K_2N_3O_8S_2$ MM = 573.73 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 259–260 °C (wird nur zähflüssig)
Lit.: nicht bekannt

Elementaranalyse: (Doppelbestimmung)



exp. theor.

C: 40.79 / 40.74 (41.87)

H: 4.33 / 4.57 (3.69)

N: 6.54 / 6.34 (7.32)

¹H-NMR (D₂O, 300 MHz):

δ [ppm] = 2.31(tt, 2 H, ³J_{n,m} = 7.1 Hz, ³J_{n,o} = 7.7 Hz, n); 3.04 (s, 3 H, d); 3.15 (t, 2 H, ³J_{o,n} = 7.7 Hz, o); 3.42 (t, 2 H, ³J_{m,n} = 7.1 Hz, m); 3.57 (dt, 2 H, b); 3.82 (t, 2 H, ³J_{c,b} = 5.8 Hz, c); 3.93 (s, 2 H, k); 6.55 (s, 1 H, j); 6.69 (s, 1 H, e); 6.80 (d, 1 H, ³J_{f,g} = 8.5 Hz, f); 7.23 (s, 1 H, h); 7.38 (d, 1 H, ³J_{g,f} = 8.5 Hz, g).

¹³C-NMR (D₂O, 300 MHz):

δ [ppm] = 25.2 (n); 30.6 (m); 40.0 (d); 44.9 (k); 51.0 (o); 55.2 (b); 60.1 (c); 94.1 (e); 112.3 (f); 114.0 (j); 118.2 (h); 119.9; 123.9 (g); 134.8; 150.7; 151.3; 159.7; 163.3; 170.6; 174.8.

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹]: ca. 3700–3250 (O-H-Valenz Hydroxygruppe); ca. 2945, 2883 (C-H-Valenz); 1618, 1542, 1509 (C=C-Valenz des Aromaten).

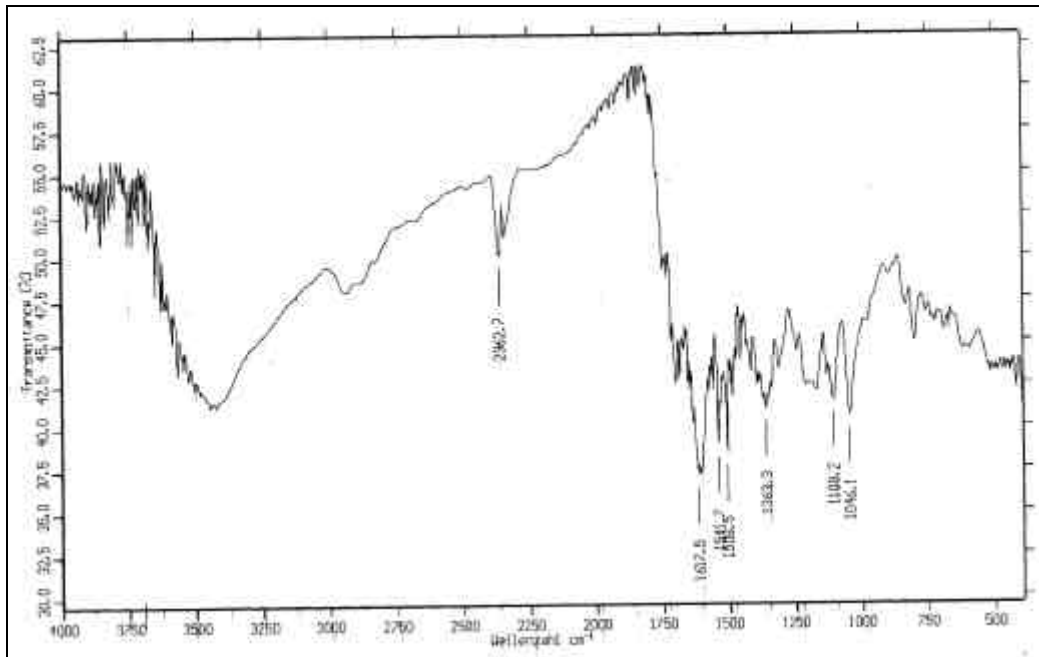


Abbildung 153: IR-Spektrum (KBr) von **52**

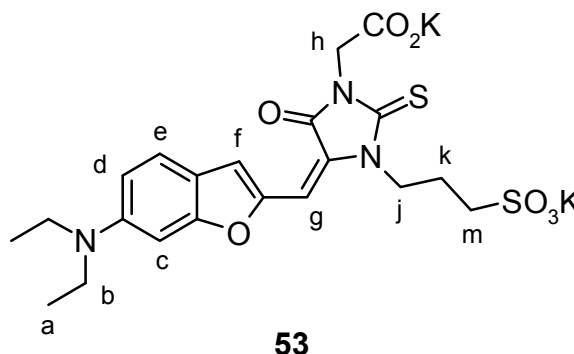
UV-VIS (DMSO):

λ_{max} (ϵ): 490 nm ($30210 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$); $\log \epsilon = 4.48$

MS (FAB, +NBA, +Na); m/z (%): 564 (3) [$M^+ - 2 \text{ K}, + 3 \text{ Na}$]; 542 (3) [$M^+, - 2 \text{ K}, + 2 \text{ Na} + \text{ H}$].

6.36 V35: Dikalium-{4-[6-(diethylamino)benzofuran-2-ylmethyliden]-3-(3-sulfonatopropyl)-5-oxo-2-thioxoimidazolidin-1-yl}acetat (53**)**

0.349 g (1.05 mmol)
 {4-[6-(Diethylamino)benzo-
 furan-2-ylmethyliden]-
 5-oxo-2-thioxoimidazolidin-
 1-yl}essigsäure **30** wird in
 33 ml [1,4]-Dioxan vorge-
 legt. Man löst 0.118 g



(2.10 mmol, 2.00 Äquivalente) Kaliumhydroxid in 5 ml Wasser und gibt

dies zur Lösung von **30**. Man rührt etwa 30 min und gibt dann 0.129 g (1.06 mmol, 1.00 Äquivalente) [1,2]-Oxathiolan-2,2-dioxid als Feststoff hinzu. Das sich bildende Produkt erkennt man dünnschichtchromatographisch (Kieselgel 60, Dichlormethan/Methanol = 8/1, $R_f = 0$).

Man rührt 4 h bei 36–38 °C, dann über Nacht bei Raumtemperatur.

Nach Entfernen des Lösungsmittels erfolgt grobe Reinigung durch Säulenchromatographie an Kieselgel 60. Dabei entfernt man das Edukt **30** (Dichlormethan/Methanol = 8/1). Das Rohprodukt erhält man durch sukzessive Erhöhung der Polarität des Laufmittels (Dichlormethan/Methanol = 8/1, 2/1, 1/1, reines Methanol).

Eine vollständige Entfernung der Nebenprodukte und Edukte erfolgt durch Säulenchromatographie an Reverse-Phase-18-Kieselgel bei sukzessiver Erniedrigung der Polarität des Laufmittels (H₂O, dann H₂O/Methanol = 1/1).

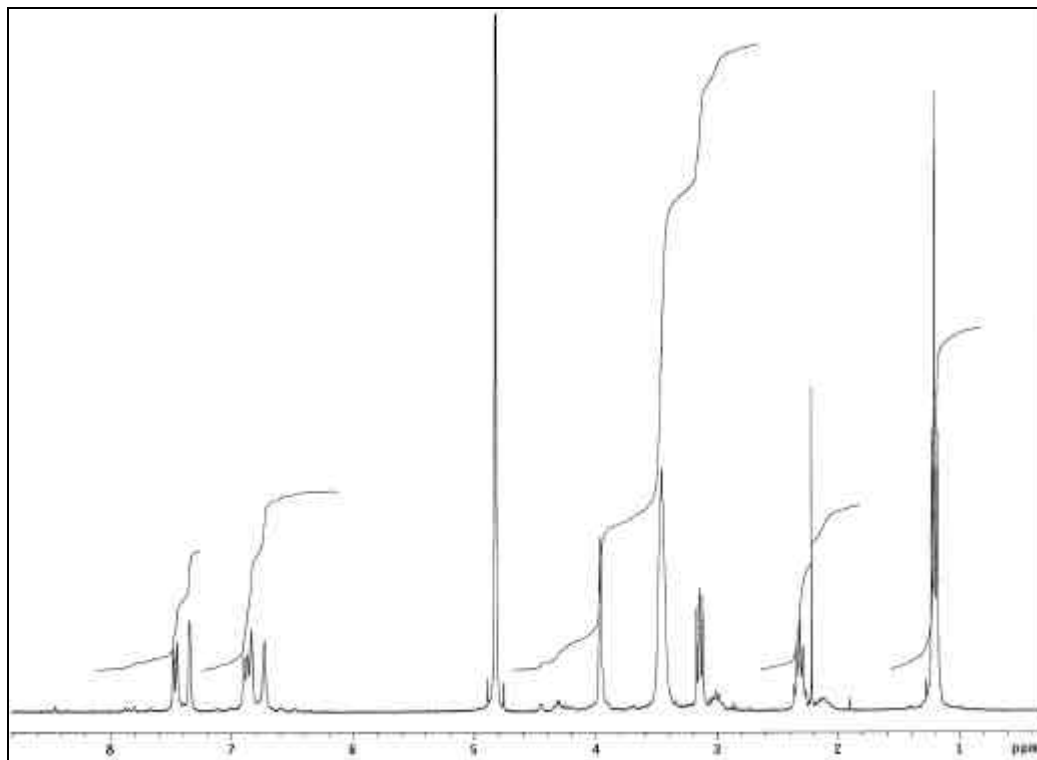
Nach Entfernung des Lösungsmittels erhält man das Produkt

Ausbeute: 0.304 g ($5.32 \cdot 10^{-4}$ mol, 50 %)
dunkelroter Feststoff,
rote transparente tafelförmige Kristalle
Lit.: nicht bekannt
 $C_{21}H_{23}K_2N_3O_7S_2$ MM = 571.76 g·mol⁻¹

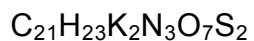
Schmelzpunkt: 295–298 °C (unter Zersetzung)
Lit.: nicht bekannt

¹H-NMR (D₂O, 300 MHz):

δ [ppm] = 1.20 (t, 6 H, $^3J_{a,b} = 7.0$ Hz, a); 2.31 (tt, 2 H, $^3J_{k,j} = 7.1$ Hz, $^3J_{k,m} = 7.5$ Hz, k); 3.14 (t, 2 H, $^3J_{m,k} = 7.5$ Hz, m); 3.38–3.54 (m, 6 H, b+j); 3.96 (s, 2 H, h); 6.73 (s, 1 H, g); 6.84 (s, 1 H, c); 6.88 (d, 1 H, $^3J_{d,e} = 8.6$ Hz, d); 7.34 (s, 1 H, f); 7.46 (d, 1 H, $^3J_{e,d} = 8.6$ Hz, e).

Abbildung 154: $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz) von **53** $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O , 300 MHz):

δ [ppm] = 12.7 (a); 25.2 (k); 30.6 (j); 45.0 (h); 47.4 (b); 51.0 (m); 113.7 (g); 117.7 (f); 124.3 (e); 135.6; 147.8; 151.3; 159.4; 164.1; 170.7.

Elementaranalyse: (Doppelbestimmung)

exp.	theor.
------	--------

C: 42.78 / 42.59	(44.11)
------------------	---------

H: 4.70 / 4.75	(4.05)
----------------	--------

N: 6.90 / 6.85	(7.35)
----------------	--------

MS (FAB, +NBA, +NaI); m/z (%): 594 (6) [$\text{KO}_2\text{C-R-SO}_3\text{Na}$, + K]; 578 (5) [$\text{KO}_2\text{C-R-SO}_3\text{Na}$, + Na]; 556 (10) [$\text{KO}_2\text{C-R-SO}_3\text{Na}$, + H].

UV-VIS (DMSO):

λ_{max} (ϵ): 494 nm (28 540 l mol $^{-1}$ cm $^{-1}$); log ϵ = 4.46

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = ca. 3600–3250 (O-H-Valenz von Wasser); ca. 2969 (C-H-Valenz); 1701 (C=O-Valenz); 1610, 1541, 1509 (C=C-Valenz des Aromaten); 802 (1,3,4-Substitution am Aromaten).

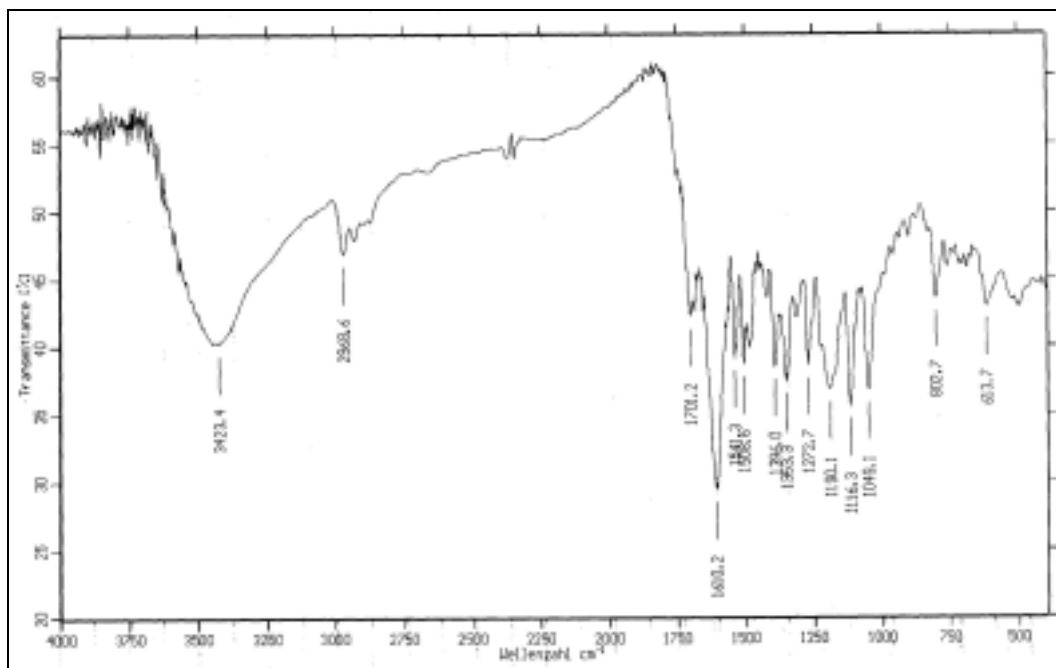


Abbildung 155: IR-Spektrum (KBr) von **53**

6.37 V36: (5-{6-[(2-Hydroxyethyl)methylamino]-benzofuran-2-ylmethyliden}-4-oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)essigsäure (**54**)

0.145 g ($6.61 \cdot 10^{-4}$ mol)

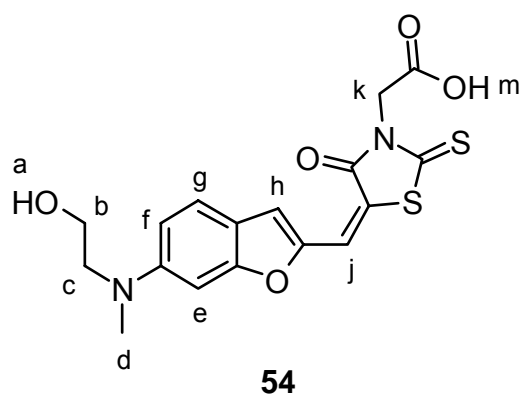
6-[(2-Hydroxyethyl)methylamino]-benzofuran-2-carbaldehyd **50**,

0.126 g ($6.61 \cdot 10^{-4}$ mol) (4-Oxo-2-thioxothiazolidin-3-yl)essigsäure

(Aldrich) und 0.134 g (1.32 mmol, 2.00 Äquivalente) Triethylamin

werden in 20 ml Methanol für 30

min auf 60–70 °C Ölbadtemperatur erwärmt, dann läßt man 24 h bei



Raumtemperatur stehen. Nach Einengen wird etwa das gleiche Volumen Wasser zugegeben, dann mit verdünnter Salzsäure ausgefällt. Nach Filtration über Glasfilterfritte (Pore 4) wird bei 60 °C und Normaldruck getrocknet.

Ausbeute: 0.250 g ($6.37 \cdot 10^{-4}$ mol, 96 %)
dunkelroter, fast schwarzer Feststoff,
Lit.: nicht bekannt
 $C_{17}H_{16}N_2O_5S_2$ MM = $392.56 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Schmelzpunkt: 212–215 °C
Lit.: nicht bekannt

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = ca. 3600–3250 (O-H-Valenz von Wasser); ca. 2936 (C-H-Valenz); 1701 (C=O-Valenz); 1629, 1582, 1509 (C=C-Valenz des Aromaten).

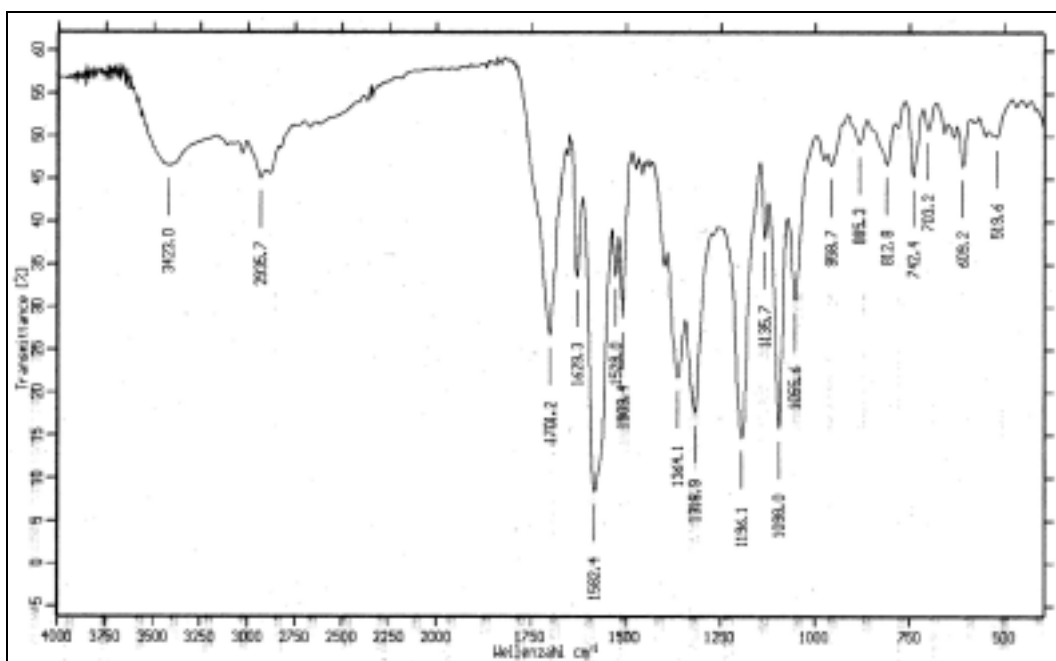


Abbildung 156: IR-Spektrum (KBr) von **54**

MS (LDI, aus CHCl_3 , negativ); m/z (%): 392 (100) [M].

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 500 MHz):

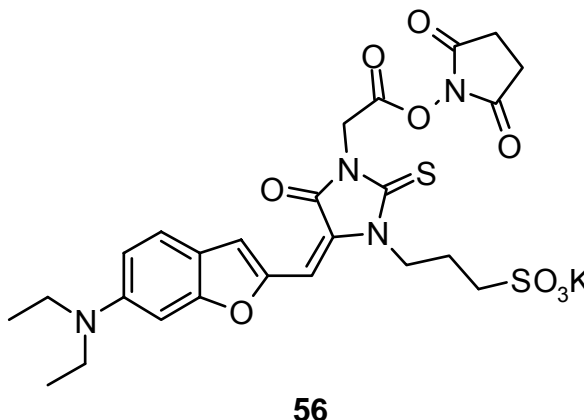
δ [ppm] = 3.04 (s, 3 H, d); 3.51 (t, 2 H, ³J_{b,c} = 5.6 Hz, b); 3.59 (t, 2 H, ³J_{c,b} = 5.6 Hz, c); 4.70 (s, 2 H, k); 6.85 (m, 2 H, f+e); 7.50 (m, 1 H, h); 7.51 (d, 1H, ³J_{g,f} = 8.8 Hz, g); 7.69 (m, 1 H, j).

UV-VIS (DMSO):

λ_{max}, (ε): 518 nm (8 200 l·mol⁻¹·cm⁻¹); log ε = 3.91

6.38 V37: Kalium-3-{5-[6-diethylamino)benzofuran-2-ylmethyliden]-3-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)oxycarbonylmethyl)-4-oxo-2-thioxoimidazolidin-1-yl}propan-1-sulfonat (56)

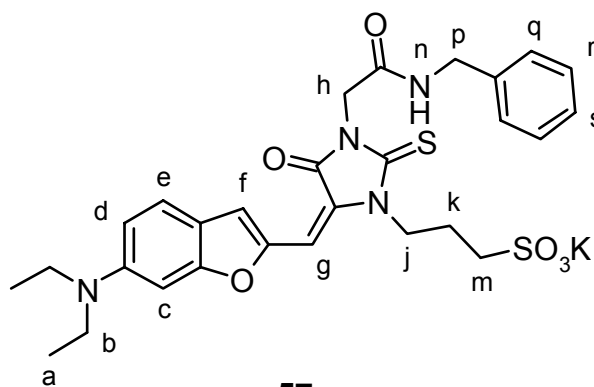
0.151 g (2.47·10⁻⁴ mol) des Farbstoffs **53** werden in 70 ml trockenem Dimethylformamid gelöst. Man gibt einen Tropfen konzentrierte Schwefelsäure hinzu, um die Carbonsäure aus ihrem Salz zu vertreiben. Nach Zufügen



von 0.244 g (1.17·10⁻³ mol, 4 Äquivalente) Dicyclohexylcarbodiimid und 0.057 g (4.9·10⁻⁴ mol, 2 Äquivalente) *N*-Hydroxysuccinimid wird für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer weitgehend entfernt (70 °C Wasserbad, 23 hPa), das Rohprodukt wird in möglichst wenig Aceton gelöst, dann mit Ethylacetat auf etwa 50 ml aufgefüllt. Man filtriert und entfernt das Lösungsmittel. Man erhält den Succinimidylester **56** als Rohprodukt, verunreinigt mit Dicyclohexylharnstoff.

Da die Reinigung aus den genannten Gründen nicht möglich ist, wird der Aktivester als Benzylamid **57** nachgewiesen. Dazu löst man

das Rohprodukt in 70 ml Dimethylformamid und gibt 0.115 g ($1.07 \cdot 10^{-3}$ mol, 4 Äquivalente) Benzylamin (destilliert, über Molsieb 3Å gelagert) hinzu. Man rührt für 120 h bei Raumtemperatur und entfernt



das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Es wird in möglichst wenig Aceton gelöst, dann mit 50 ml Ethylacetat versetzt und über Nacht im Kühlschrank verbracht. Man filtriert und entfernt das Lösungsmittel. Es wird an Kieselgel filtriert. Dazu wird das an Kieselgel adhäsierende Rohprodukt (Lösung des Rohprodukts zusammen mit Kieselgel in Dichlormethan und Entfernen des Lösungsmittels) in einer kurzen Chromatographiesäule auf Kieselgel aufgebracht. Die Verunreinigungen eluiert man mit Ethylacetat, die Elution des Produkts erfolgt mit Methanol. Anschließend erfolgt die Reinigung an RP-18-Kieselgel. Dazu wird das an Kieselgel 60 vorgereinigte Rohprodukt aus methanolischer Lösung auf die stationäre Phase aufgetragen, dann mit Wasser mit zunehmendem Methanolgehalt eluiert (Wasser/Methanol = 100 %, 4:1, 3:2, 1:1, 2:3, 1:4). Die Reinigung, d.h. die Entfernung des entstandenen Dicyclohexylharnstoffs bleibt jedoch unvollständig.

Ausbeute: 0.063 g ($1.0 \cdot 10^{-4}$ mol, 41 %)
 Dunkelroter, fast schwarzer Feststoff,
 Lit.: nicht bekannt
 $C_{28}H_{31}KN_4O_6S_2$ MM = $622.81 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_4]$ Methanol, 200 MHz):

δ [ppm] = 1.22 (t, 6 H, $^3J_{a,b} = 6.8$ Hz, a); 2.43 (tt, 2 H, $^3J_{k,j} = 7.1$ Hz, $^3J_{k,m} = 7.4$ Hz, k); 3.08 (t, 2 H, $^3J_{m,k} = 7.4$ Hz, m); 3.50 (q, 4 H, $^3J_{b,a} = 6.9$ Hz, b); 3.60 (t, 2 H, $^3J_{j,k} = 7.0$ Hz, j); 4.50 (d, 2 H, $^3J_{p,n} = 3.0$ Hz);

6.70–6.9 (m, 3 H, g+c+d); 7.26–7.46 (m, 5 H, q+r+s); 7.52 (d, 1 H, $^3J_{e,d}$ = 9.1 Hz, e); 7.74 (s, 1 H, f).

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = ca. 3600–3250 (O-H-Valenz von Wasser); ca. 2931, 2855 (C-H-Valenz); 1707 (C=O-Valenz); 1612, 1538, 1509 (C=C-Valenz des Aromaten).

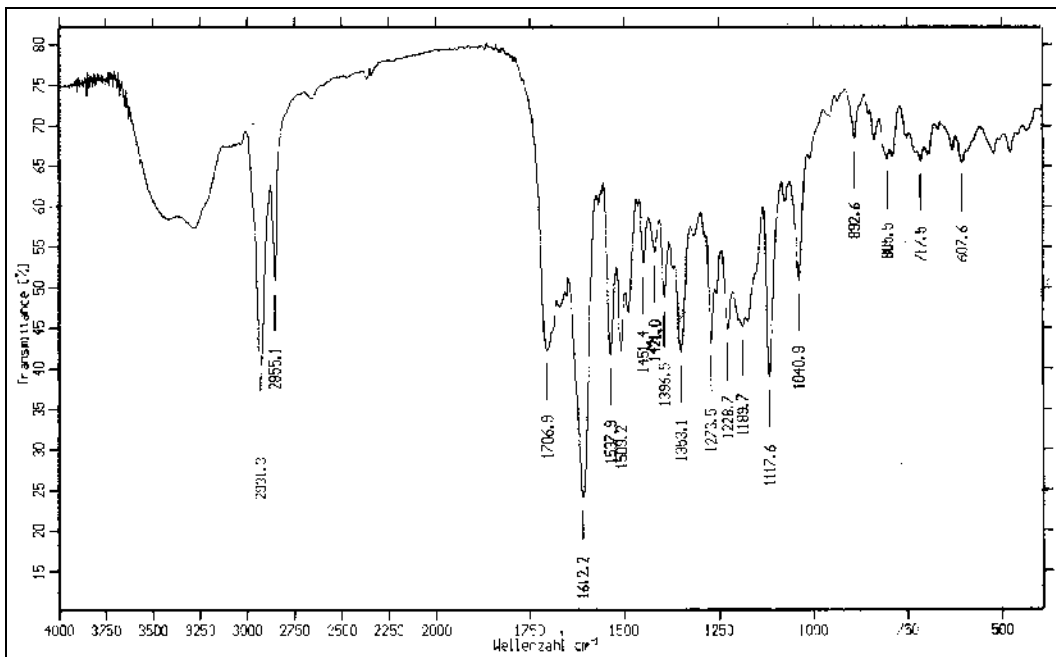


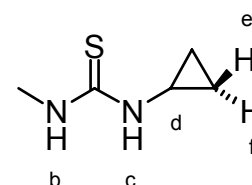
Abbildung 157: IR-Spektrum (KBr) von **57**

6.39 Allgemeine Darstellung der Thioharnstoff-derivate

Zur Darstellung der 1-Alkyl-3-methylthioharnstoffderivate wird Methylisothiocyanat in Chloroform eisgekühlt (Eis/Kochsalz) vorgelegt und die äquimolare Menge des entsprechendenamins, gelöst in Chloroform, so zugetropft, daß die Temperatur der Reaktionslösung $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ nicht übersteigt. Man läßt auf Raumtemperatur kommen, dann wird je nach Derivat unterschiedlich aufgearbeitet.

6.40 V38: 1-Cyclopropyl-3-methylthioharnstoff (59)

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.39, Seite 229 werden 10.1 g (0.150 mol) Methylisothiocyanat und 8.40 g (0.150 mol, 10 ml) Cyclopropylamin, jeweils in 50 ml Chloroform umgesetzt. Man läßt auf Raumtemperatur kommen, dann wird auf etwa $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt. Durch



59

weitere Zugabe von etwa 1 ml Amin ändert sich laut Dünnschichtchromatographie an der Edukt-Produkt-Verteilung nichts: $R_f(\text{Isothiocyanat}) = 0.96$, $R_f(\text{Harnstoff}) = 0.77$ (Kieselgel 60, Dichlormethan/Methanol = 8/1).

Es wird eingeeengt und durch Zugabe von Diethylether ausgefällt. Mit dem Filtrat verfährt man nochmals nach dieser Methode.

Ausbeute: 14.2 g (0.110 mol, 74 %)
 farblose Kristalle
 Lit.: nicht bekannt
 $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{S}$ MM = $130.21\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Schmelzpunkt: $109\text{--}110\text{ }^{\circ}\text{C}$
 Lit.: nicht bekannt

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz):

δ [ppm] = 0.57 – 0.82 (A- und B-Teil des $[\text{AB}]_2\text{M}$ -Systems, 4 H, e und f); 2.42 (M-Teil des $[\text{AB}]_2\text{M}$ -Systems, 1 H, d); 3.10 (d, 3 H, $^3J_{ab} = 4.6$ Hz, a); 6.40 (s, 1 H, c); 6.98 (s, 1 H, b).

für die Protonen e, f und d liegt ein Spinsystem höherer Ordnung vor, die Kopplungskonstanten können nicht bestimmt werden.

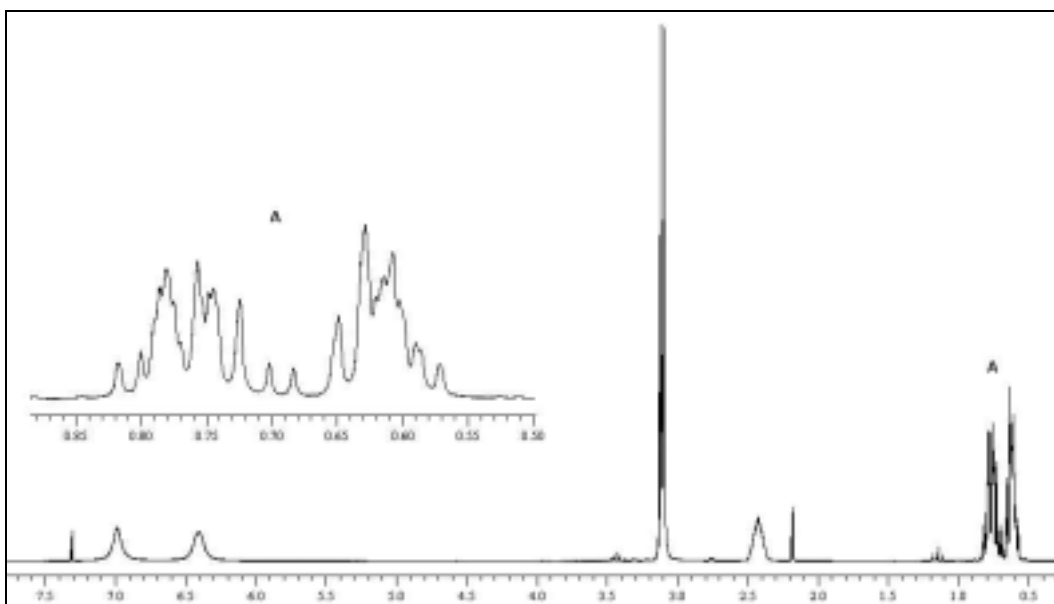


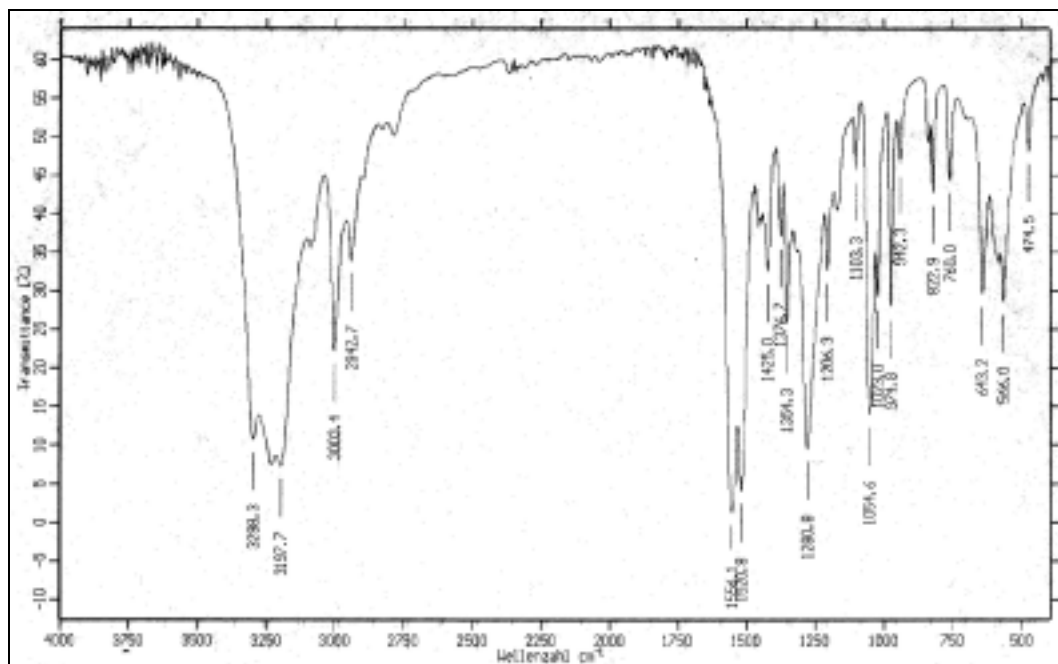
Abbildung 158: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) von **59**

MS (EI); m/z (%): 130 (60) [M^+], 115 (16) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$], 74 (48) [$\text{H}_3\text{C-NCS} + \text{H}^+$], 57 (32) [cyclo-Prop-NH_2^+], 56 (51) [cyclo-Prop-NH^+], 43 (23) [metastabiles cyclo-Prop-NCS^+], 32 (100) [$\text{H}_3\text{C-NH}_2 + \text{H}^+$].

(siehe auch Kapitel 4.3.2.2, Seite 99, Darstellung der Thioharnstoffderivate)

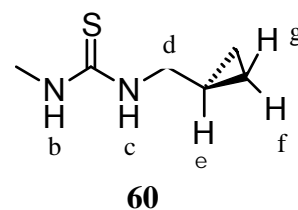
IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3298–3198 (N-H-Valenz); 2943–3003 (C-H-Valenz); 1556, 1521 (C-N-Valenz in Thioharnstoffen, B-Bande), 1281 (N-C-N-Valenz in Thioharnstoffen, C-Bande), 1055 (N-H-Deformation in Thioharnstoffen, D-Bande), 760 (N-H-Deformation in Thioharnstoffen, F-Bande), 643 (C=S-Valenz in Thioharnstoffen, G-Bande).

Abbildung 159: IR-Spektrum (KBr) von **59**

6.41 V39: 1-Cyclopropylmethyl-3-methylthioharnstoff (**60**)

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.39, Seite 229 werden 5.14 g (70.0 mmol) Methylisothiocyanat und 5.00 g (70.0 mmol) Cyclopropylmethylamin, jeweils in 50 ml Chloroform umgesetzt. Man läßt über Nacht stehen, nach



Entfernen des Lösungsmittels bleibt ein gelbes Öl zurück. Es wird mit Ethanol aufgekocht und kristallisiert aus der Lösung im Tiefkühlschrank (ca. $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nach Filtration, Waschen des Feststoffes mit Ethanol und Trocknen (Trockenpistole, 20 hPa, $45\text{ }^{\circ}\text{C}$) erhält man das Produkt.

Ausbeute: 6.95 g (50.0 mmol, 69 %)

farblose Kristalle

Lit.: nicht bekannt

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}$

MM = $144.24\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Schmelzpunkt: 79–80 °C

Lit.: nicht bekannt °C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz):

δ [ppm] = 0.07–0.29 (A-Teil des $[\text{AB}]_2\text{M}$ -Systems, 2 H, f oder g); 0.36–0.60 (B-Teil des $[\text{AB}]_2\text{M}$ -Systems, 2 H, f oder g); 0.86–1.09 (M-Teil des $[\text{AB}]_2\text{M}$ -Systems, 1 H, e); 2.94 (d, 3 H, $^3J_{ab} = 4.8$ Hz, a); 3.24 (dd, 2 H, d); 6.26 (s, 1 H, b oder c), 6.46 (s, 1 H, b oder c).

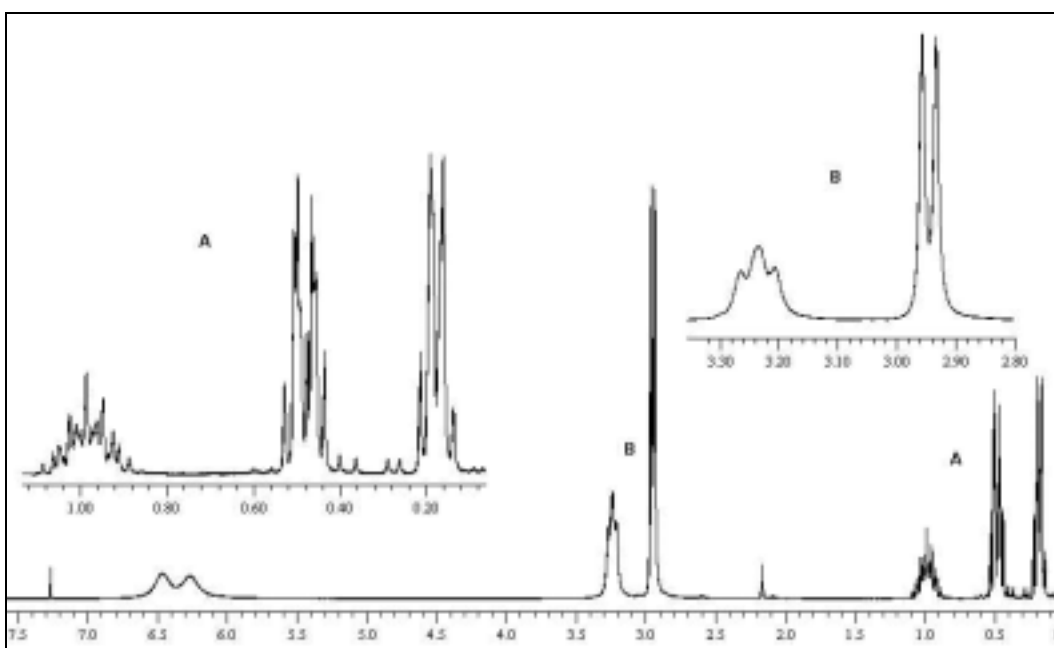


Abbildung 160: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) von **60**

MS (EI); m/e (%): 144 (57) [M^+], 115 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$ (metastabil)], 74 (48) [$\text{H}_3\text{C-NCS} + \text{H}^+$], 70 (31) [Cyclopropyl- $\text{CH}_2\text{-NH}^+$], 57 (85) [3,4-Dihydropyridin-Kation].

Zur Erklärung der Massepeaks bei $m/e = 115$ und $m/e = 57$ siehe Kapitel 4.3.2.3, Darstellung der Thioharnstoffderivate, Seite 100.

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3238 (NH-Valenz in Amiden), 3001–2870 (C-H-Valenz); 1570, 1519 (C-N-Valenz in Thioharnstoffen, B-Bande), 1255 (N-C-N-Valenz in Thioharnstoffen, C-Bande), 1086, 1049, 1029 (N-H-Valenz in

Thioharnstoffen, D-Bande), 741 (N-H-Deformation in Thioharnstoffen, F-Bande), 644 (C=S-Valenz in Thioharnstoffen, G-Bande).

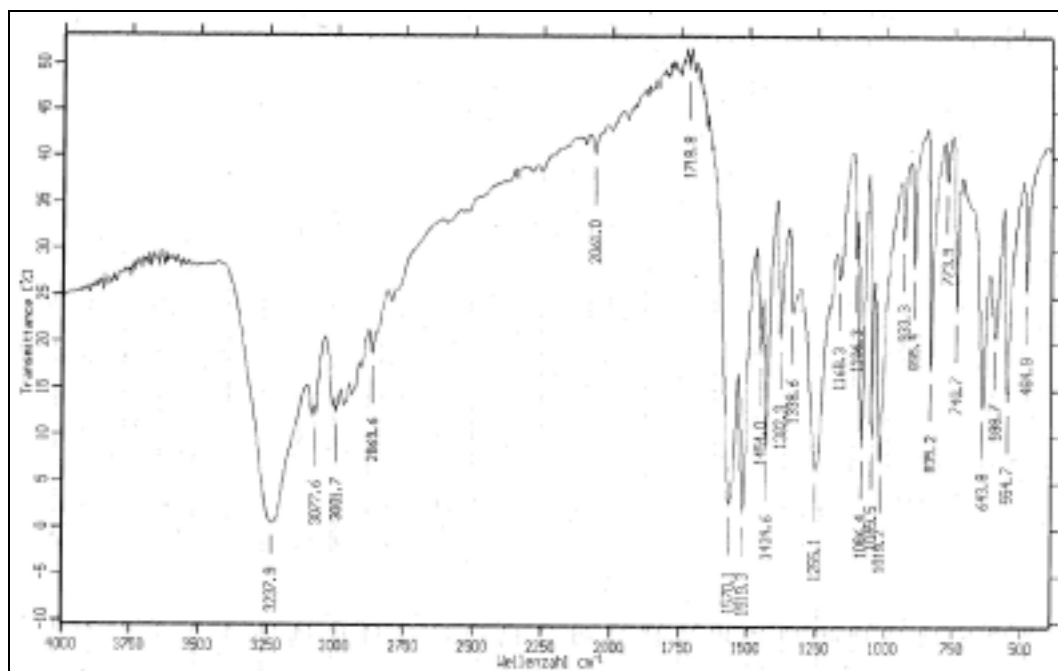
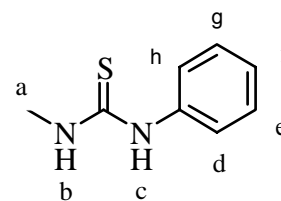


Abbildung 161: IR-Spektrum (KBr) von **60**

6.42 V40: 1-Methyl-3-phenylthioharnstoff (**61**)

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.39, Seite 229 werden 22.0 g (0.300 mol) Methylisothiocyanat und 28.0 g (0.300 mol) Anilin, jeweils in 150 ml Chloroform umgesetzt. Man rührt noch einige Zeit oder läßt über Nacht stehen. Nach



61

Entfernen des Lösungsmittels bleibt ein Öl zurück, das bei Kühlung kristallisiert. Der Feststoff wird aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 32.8 g (0.200 mol, 66 %)
farblose schuppenförmige Kristalle

Lit.: 64 %^[66]

88 %^[95]

85 %^[96]

$C_8H_{10}N_2S$

MM = 166.25 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 111–114 °C
Lit.: 113 °C^[97]
92 °C^[96]
153–154 °C^[66]

MS (EI); m/z (%): 166 (58) [M⁺], 133 (7) [M⁺ -SH], 109 (8) [2-Thiooxo-Cyclohexa-3,5-dien-carbeniumion], 93 (100) [Anilin⁺], 77 (23) [Phenylkation].

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz):

δ [ppm] = 3.07 (d, 3 H, ³J_{ab} = 4.8 Hz, a); 6.28 (s, 1 H, b); 7.18 – 7.30 (A-Teil und B-Teil des [AM]₂B-Systems, 3H, d+g+f); 7.39 (M-Teil des [AM]₂B-Systems, 2H, e, ³J_{ef} = ³J_{gf} ≈ ³J_{ed} = ³J_{eh} = 7.7 Hz, ⁴J_{eg} = 1.7 Hz, e+g); 8.84 (s, 1H, c).

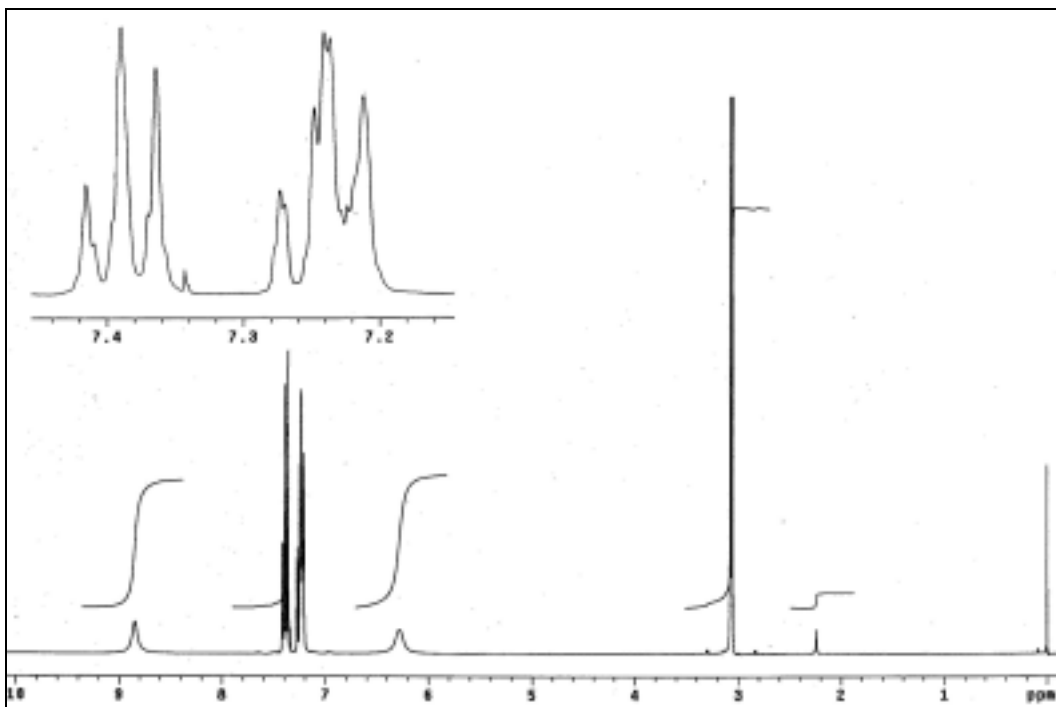


Abbildung 162: ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) von **61**

¹³C-NMR (CDCl₃, 300 MHz):

δ [ppm] = 32 (a); 125 (*o*-Ar); 127 (*p*-Ar); 130 (*m*-Ar); 136 (R-N-C(Ar)); 181(Thiocarbonyl-C).

Die Werte stimmen sehr genau überein mit denen von Wawer und Koleva^[98] bzw. von Mohanta et al.^[66] (hier auch MS, IR und ¹H-NMR) gefundenen.

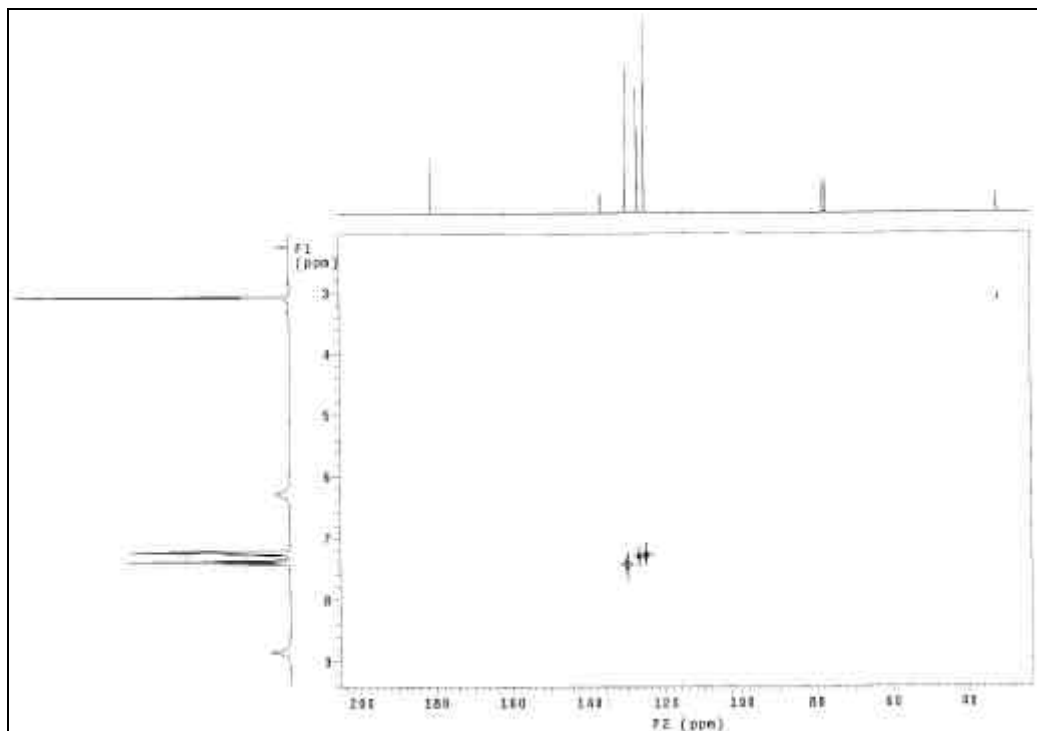


Abbildung 163: ¹³C-¹H-Korrelationspektrum (CDCl₃, 300 MHz) von **61**

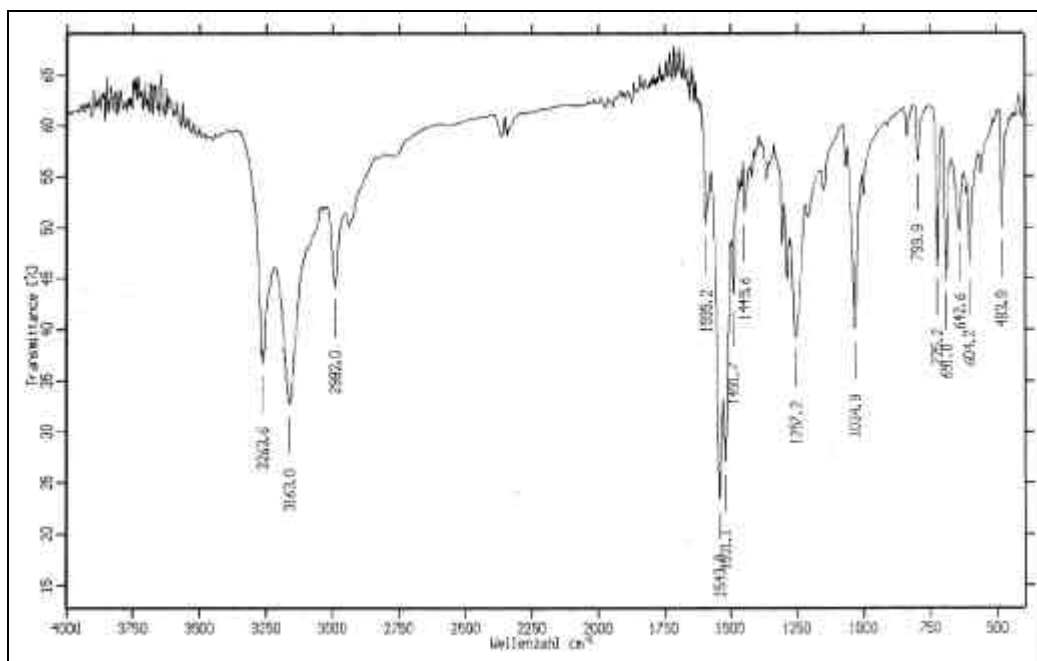


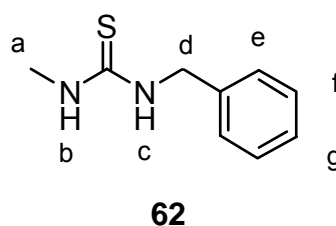
Abbildung 164: IR-Spektrum (KBr) von **61**

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3264, 3163 (N-H-Valenz im Thioharnstoff); 2992 (C-H-Valenz); 1544,1521 (B-Bande im Thioharnstoff, C-N-Schwingung), 1257 (C-Bande im Thioharnstoff, N-C-N-Valenz), 1034 (D-Bande im Thioharnstoff, N-H-Deformation).

6.43 V41: 1-Benzyl-3-methylthioharnstoff (62)

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.39, Seite 229 werden 11.0 g (0.150 mol) Methylisothiocyanat und 16.1 g (0.150 mol) Benzylamin, jeweils in 50 ml Chloroform umgesetzt. Man läßt über Nacht stehen, nach



Entfernen des Lösungsmittels wird in Ethanol in der Hitze gelöst. Das Produkt kristallisiert aus der Lösung im Tiefkühlschrank (ca. -20 °C). Nach Filtration, Waschen des Feststoffes mit Ethanol und Trocknen erhält man das Produkt.

Ausbeute: 22.4 g (0.120 mol, 83 %)

farblose Kristalle

Lit.: keine Angaben^[99]

$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{S}$ 180.27 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Schmelzpunkt: 75–77 °C

Lit.^[99]: 70–71 °C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz):

δ [ppm] = 2.79 (d, 3 H, $^3J_{a,b} = 4.8$ Hz, a); 4.53 (d, 2 H, $^3J_{d,c} = 4.9$, d); 6.44 (s, 1 H, b oder c); 6.54 (s, 1 H, b oder c); 7.10 – 7.35 ($[\text{AB}]_2\text{M}$ -System, 5 H, e + f + g).

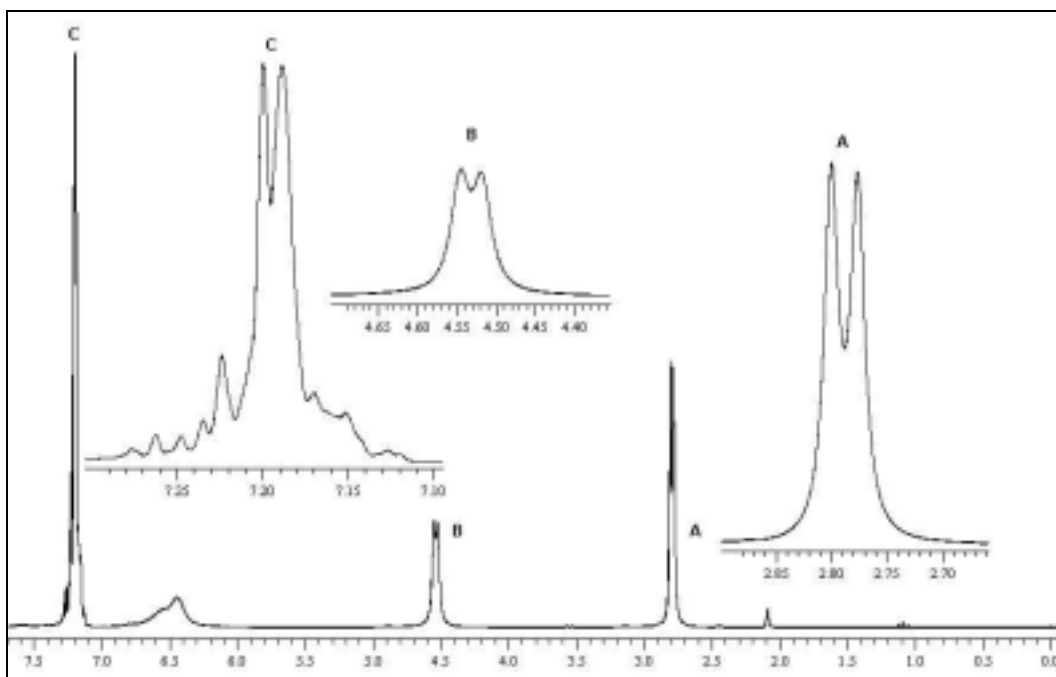


Abbildung 165: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) von **62**

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3367, 3256 (NH-Valenz); 3014 (Aryl-H-Valenz); 2938 (C-H-Valenz); 1560, 1521 (B-Bande in Thioharnstoffen (C-N-Valenz) und Aryl-H-Valenz in Aromaten); 1285 (C-Bande in Thioharnstoffen (N-C-N-Valenz)); 743, 707 (C-H-*out of plane*-Deformation in monosubstituierten Aromaten).

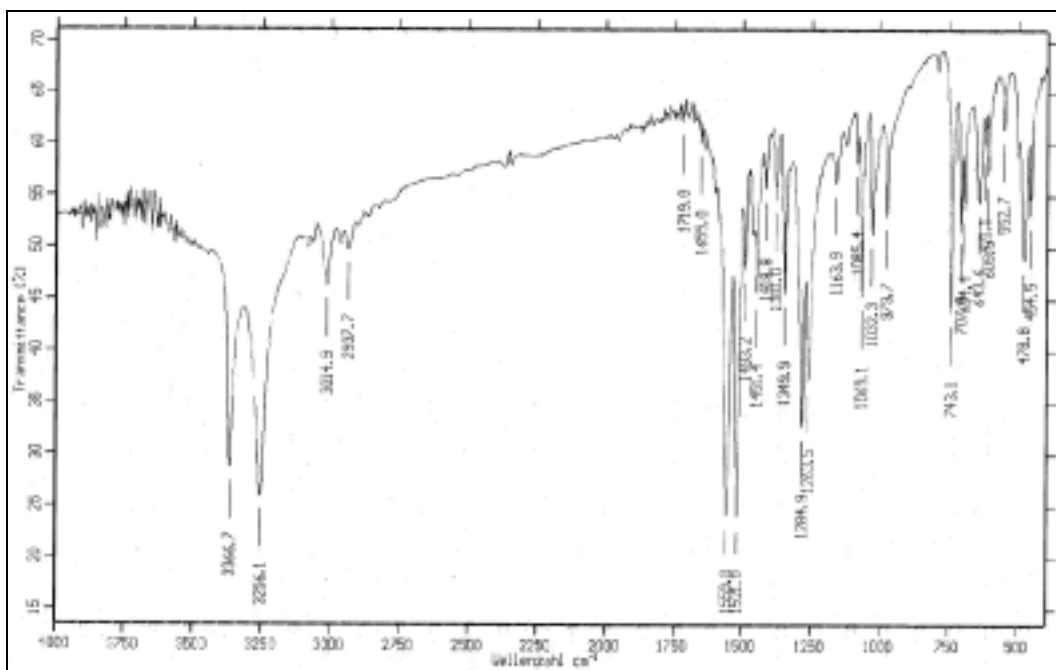
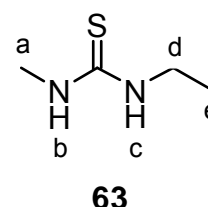


Abbildung 166: IR-Spektrum (KBr) von **62**

MS (EI); m/z (%): 180 (100) [M^+], 106 (67) [$\text{Ph-CH}_2\text{-NH}^+$], 91 (65) [$\text{H}_2\text{C-Ph}^+$].

6.44 V42: 1-Ethyl-3-methylthioharnstoff (63)

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.38, Seite 226 werden 11.0 g (0.150 mol) Methylisothiocyanat und 9.70 g (0.150 mol) Ethylamin (70%ige wässrige Lösung), jeweils in 50 ml Chloroform umge-



setzt. Da ein Zweiphasengemisch vorliegt, wird stark gerührt. Man lässt auf Raumtemperatur kommen, dann über Nacht stehen. Das Lösungsmittel wird entfernt, im Gegensatz zu den anderen Thioharnstoffen kann nicht aus Ethanol umkristallisiert werden, da **63** zu gut löslich ist. Daher wird in Petrolether 30/50 aufgekocht und filtriert.

Ausbeute: 17.2 g (0.150 mol, 97 %)
 farblose transparente Kristalle
 $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}_2\text{S}$ $\text{MM} = 180.20 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Schmelzpunkt: 50–52 °C
 Lit.^[100]: 54 °C

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz):

δ [ppm] = 1.16 (t, 3 H, $^3J_{e,d} = 7.2 \text{ Hz}$, e); 2.94 (d, 2 H, $^3J_{a,b} = 4.8$, a); 3.42 (dq, 2 H, d); 6.31 (s, 1 H, b oder c), 6.54 (s, 1 H, b oder c).

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3235 (NH-Valenz in Amiden); 2974, 2935 (C-H-Valenz); 1570, 1526 (B-Bande in Thioharnstoffen, C-N-Valenz), 1264 (C-Bande in Thioharnstoffen, N-C-N-Valenz), 1028 (D-Bande in Thioharnstoffen, N-H-Deformation), 640 (G-Bande in Thioharnstoffen, C=S-Schwingung).

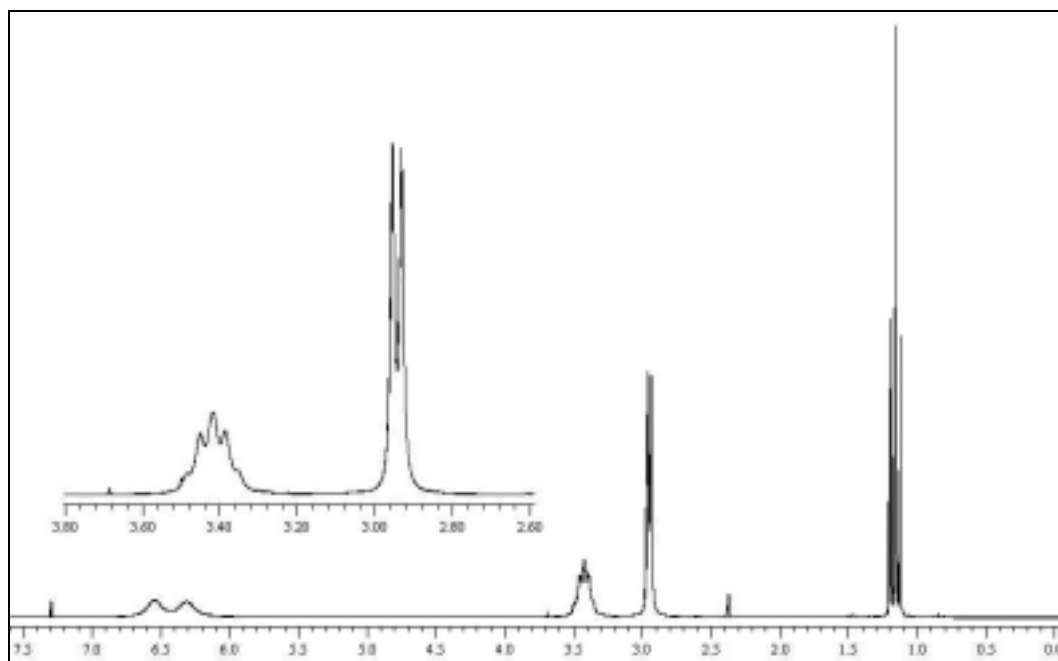


Abbildung 167: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) von **63**

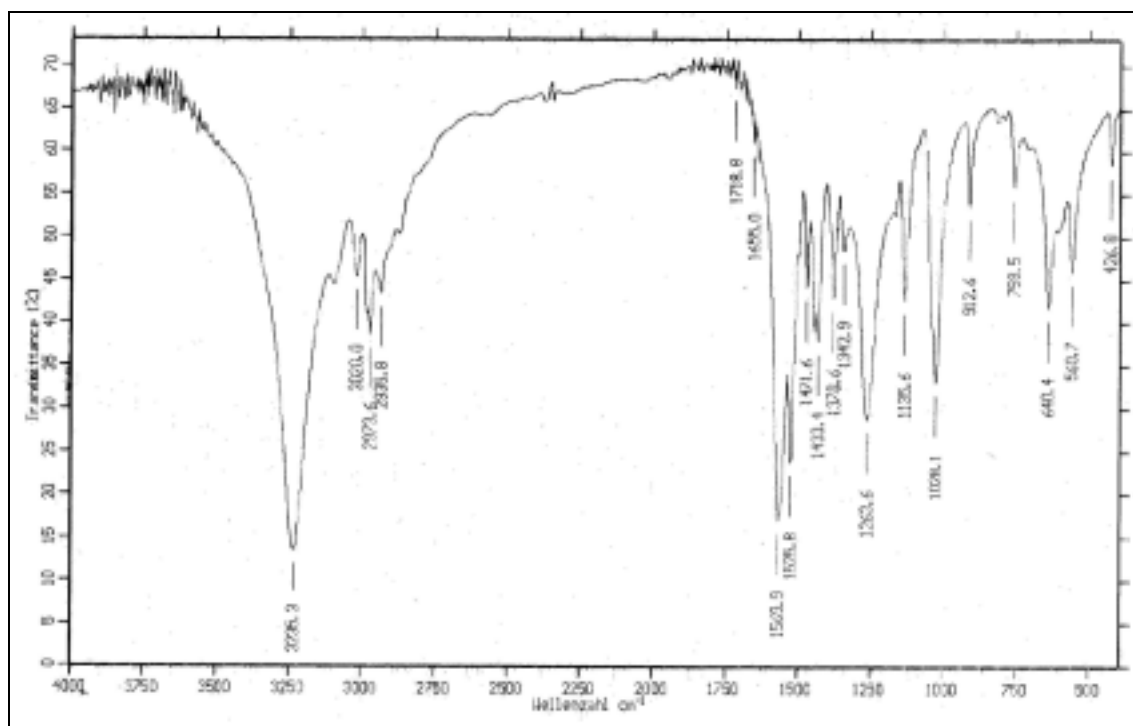
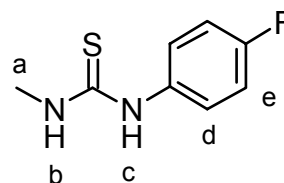


Abbildung 168: IR-Spektrum (KBr) von **63**

MS (EI); m/z (%): 118 (100) [M^+], 74 (28) [$\text{H}_3\text{C-NH-C=S}^+$], 44 (90) [$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-NH}^+$].

6.45 V43: 1(4-Fluorphenyl)-3-methylthioharnstoff (64)

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.39, Seite 229 werden 7.91 g (0.110 mol) Methylisothiocyanat in 50 ml Chloroform und 12.0 g (0.108 mol) 4-Fluoranilin¹ in 100 ml Chloroform umgesetzt. Man erhitzt für etwa 30 min zum



64

Rückfluß, nach Entfernen des Lösungsmittels wird in wenig Ethanol gelöst. Das Produkt kristallisiert bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ausbeute: 6.29 g (0.030 mol, 31 %)

farblose Kristalle

Lit.^[101]: 100 %

$\text{C}_8\text{H}_9\text{FN}_2\text{S}$

MM = $184.24\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Schmelzpunkt: $105\text{--}106\text{ }^{\circ}\text{C}$

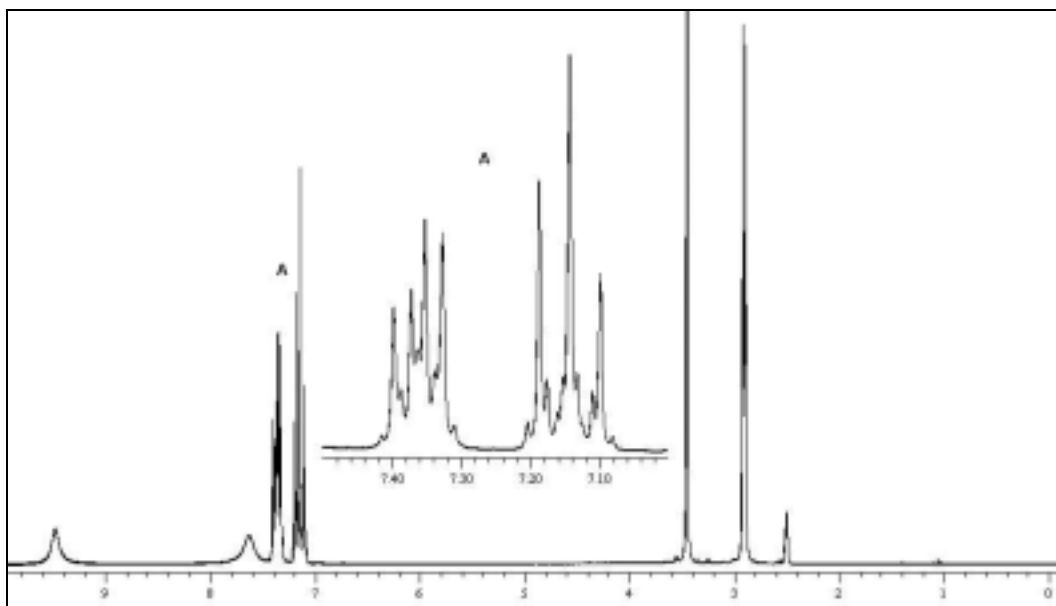
Lit.^[101]: $107\text{ }^{\circ}\text{C}$

MS (EI); m/z (%): 184 (79) [M^+], 151 (15) [M^+ , - SH], 111 (100) [F-Ph-NH_2^+], 74 (37) [$\text{H}_3\text{C-N=C=S}$, + H^+], 32 (14) [$\text{H}_3\text{C-NH}_2$, + H^+].

¹H-NMR ($[\text{D}_6]$ DMSO, 200 MHz):

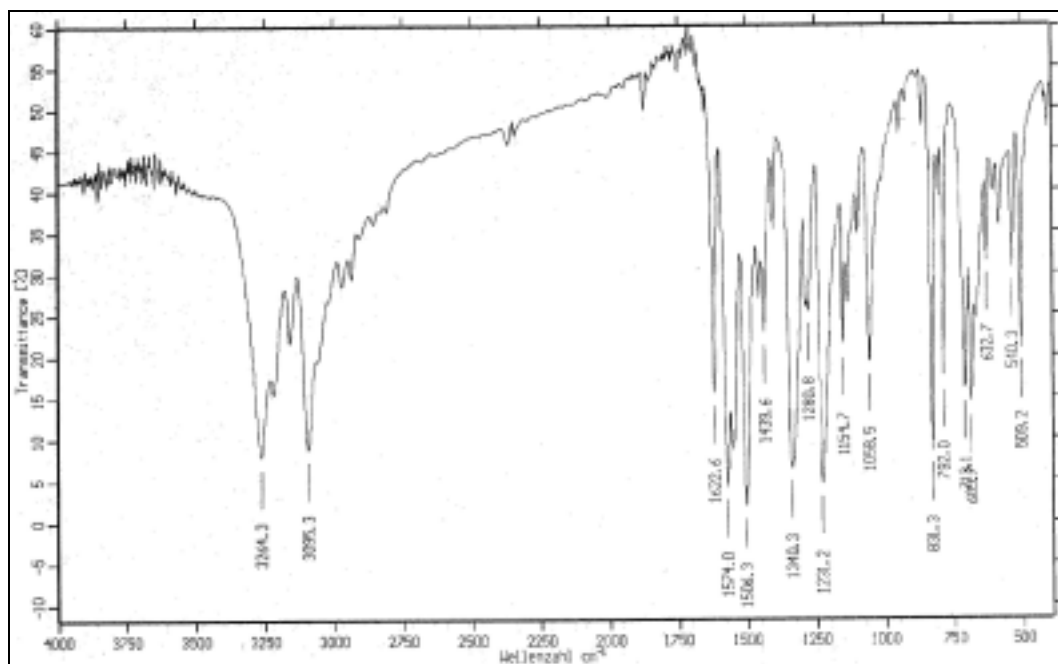
δ [ppm] = 2.90 (d, 3 H, $^3J_{a,b} = 4.5\text{ Hz}$, a); 7.07–7.22 (A-Teil des $[\text{AM}]_2\text{X}$ -Systems, 2 H, e); 7.29–7.43 (M-Teil des $[\text{AM}]_2\text{X}$ -Systems, 2 H, d); 7.63 (s, 1 H, b); 9.48 (s, 1 H, c).

¹ Es wurden Chemikalienrestbestände unbestimmten Reinheitsgrades verwendet

Abbildung 169: $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 200 MHz) von **64**

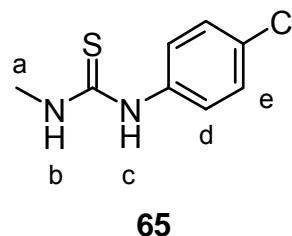
IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3264 (N-H-Valenz und Oberschwingung der C=O-Valenz);
 3095 (C-H-Valenz im Aromaten); 1623, 1574, 1506 (C=C-Valenz in
 Aromaten); ca. 1570 (B-Bande in Thioharnstoffen, C-N-Valenz); 1340,
 1231 (C-Bande in Thioharnstoffen, N-C-N-Valenz).

Abbildung 170: IR-Spektrum (KBr) von **64**

6.46 V44: 1-(4-Chlorphenyl)-3-methylthioharnstoff (65)

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.39, Seite 229 werden 7.30 g (0.100 mol) Methylisothiocyanat in 50 ml Chloroform und 12.7 g (0.100 mol) 4-Chloranilin¹ in 100 ml Chloroform umgesetzt. Man erhitzt für etwa 30 min zum



Rückfluß. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird das Rohprodukt mit wenig Ethanol versetzt und kristallisiert über Nacht bei -20 °C aus.

Ausbeute: 9.65 g (50.0 mmol, 48 %)
 farblose Kristalle
 Lit.^[102]: 100 %
 $\text{C}_8\text{H}_9\text{ClN}_2\text{S}$ $\text{MM} = 200.69\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

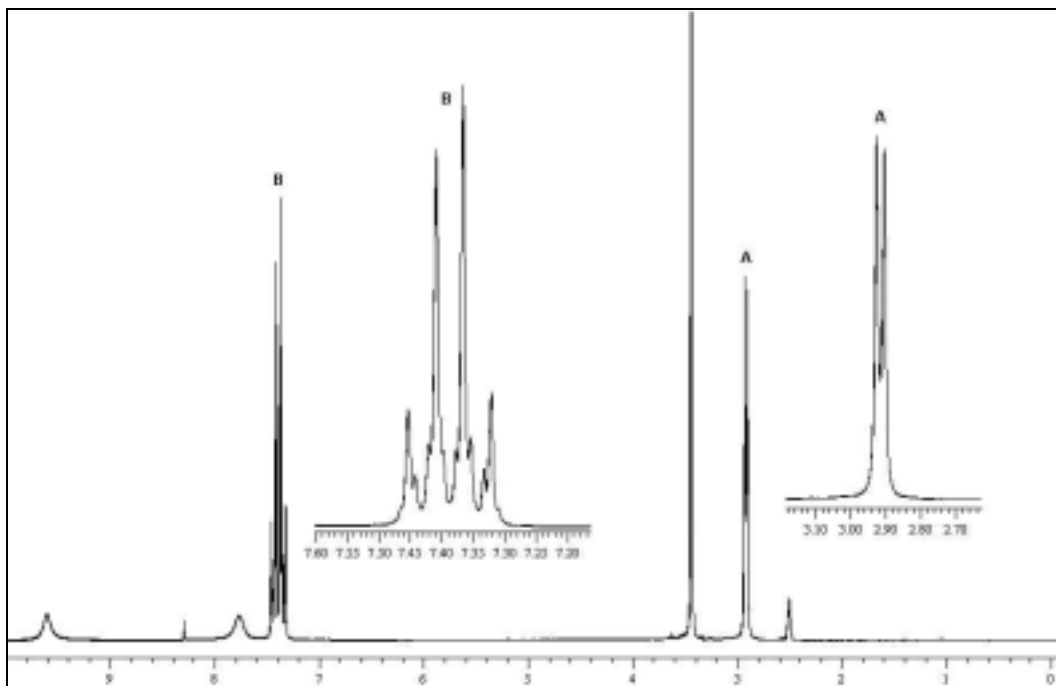
Schmelzpunkt: 142–144 °C
 Lit.: 98 °C^[96]
 149 °C^[102]
 147 °C^[103]

MS (EI); m/z (%): 200 (59) [M^+], 178 (10) [M^+ , - SH], 127 (100) [Cl-Ph-NH_2^+], 74 (55) [$\text{H}_3\text{C-N=C=S}$, + H^+], 32 (24) [$\text{H}_3\text{C-NH}_2$, + H^+].

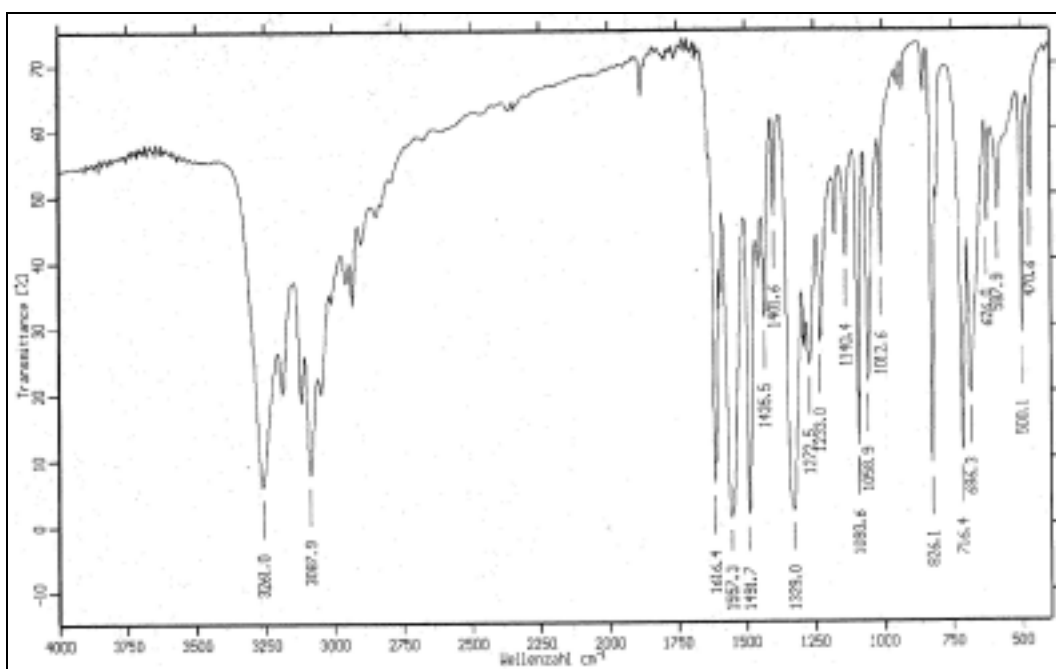
¹H-NMR ($[\text{D}_6]$ DMSO, 200 MHz):

δ [ppm] = 2.91 (d, 3 H, $^3J_{a,b} = 4.4\text{ Hz}$, a); 7.30–7.48 ($[\text{AX}]_2$ -System, 2 H, d + e); 7.76 (s, 1 H, b); 9.60 (s, 1 H, c).

¹ Es wurden Chemikalienrestbestände unbestimmten Reinheitsgrades verwendet

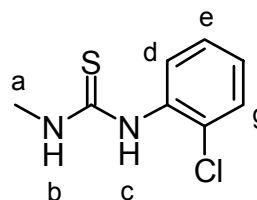
Abbildung 171: $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 200 MHz) von **65****IR (KBr):**

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3261 (N-H-Valenz und Oberschwingung der C=O-Valenz);
 3088 (C-H-Valenz im Aromaten); 1616, 1557, 1492 (C=C-Valenz in
 Aromaten); 1329 (C-Bande in Thioharnstoffen, N-C-N-Valenz); 1094
 (D-Bande in Thioharnstoffen, N-H-Deformation).

Abbildung 172: IR-Spektrum (KBr) von **65**

6.47 V45: 1-(2-Chlorphenyl)-3-methylthioharnstoff (66)

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.39, Seite 229 werden 21.6 g (295 mmol) Methylisothiocyanat in 50 ml Chloroform und 37.6 g (295 mmol) 2-Chloranilin in 100 ml Chloroform umgesetzt. Man erhitzt für 45 min zum Rückfluß.



66

Nach Entfernen des Lösungsmittels erhält man das Rohprodukt zunächst als Öl, das bei Erkalten kristallisiert. Man löst in ca. 100 ml Ethanol und läßt im Tiefkühlschrank bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ auskristallisieren.

Ausbeute: 27.7 g (138 mmol, 47 %) farblose transparente tafelförmige Kristalle
Lit.^[104]: 69 %
 $\text{C}_8\text{H}_9\text{ClN}_2\text{S}$ MM = 200.69 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 159–162 °C
Lit.^[104]: 165–167 °C

MS (EI); m/z (%): 200 (2) [M^+], 165 (100) [M^+ , - Cl], 150 (8) [M^+ , - Cl, - CH_3], 127 (20) [Cl-Ph-NH_2^+], 74 (19) [$\text{H}_3\text{C-N=C=S}$, + H^+], 32 (24) [$\text{H}_3\text{C-NH}_2$, + H^+].

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3247 (N-H-Valenz und Oberschwingung der C=O-Valenz); 3149 (C-H-Valenz im Aromaten); 2992 (C-H-Valenz der CH_3 -Gruppe); 1518, 1476 (C=C-Valenz in Aromaten); 1289, 1254 (C-Bande in Thioharnstoffen, N-C-N-Valenz); 1035 (D-Bande in Thioharnstoffen, N-H-Deformation); 747 (G-Bande in Thioharnstoffen, C=S-Valenz).

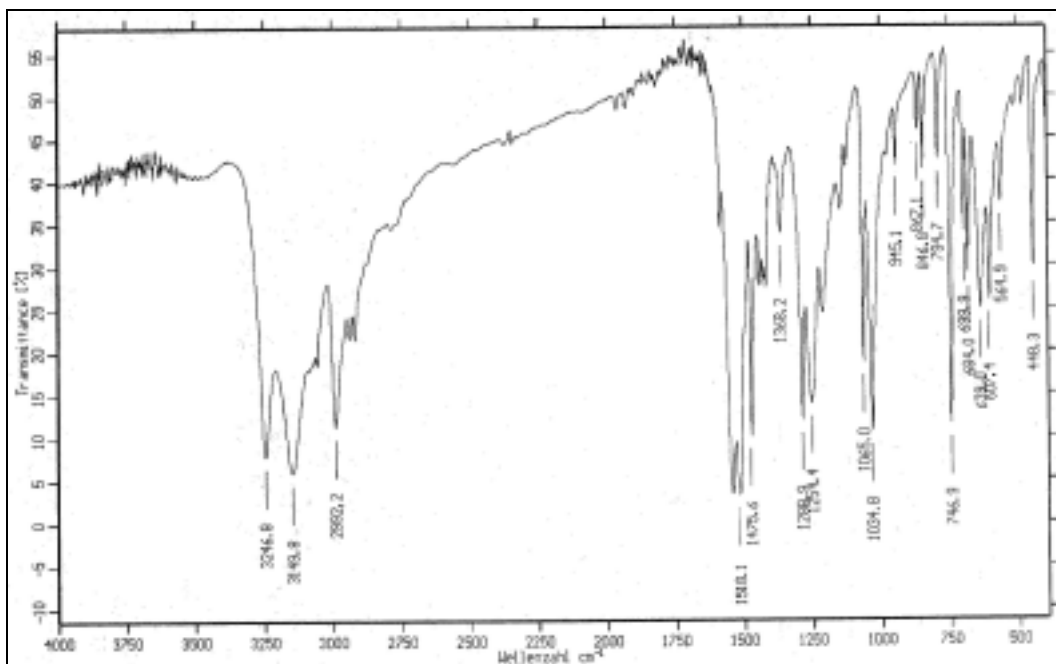


Abbildung 173: IR-Spektrum (KBr) von **66**

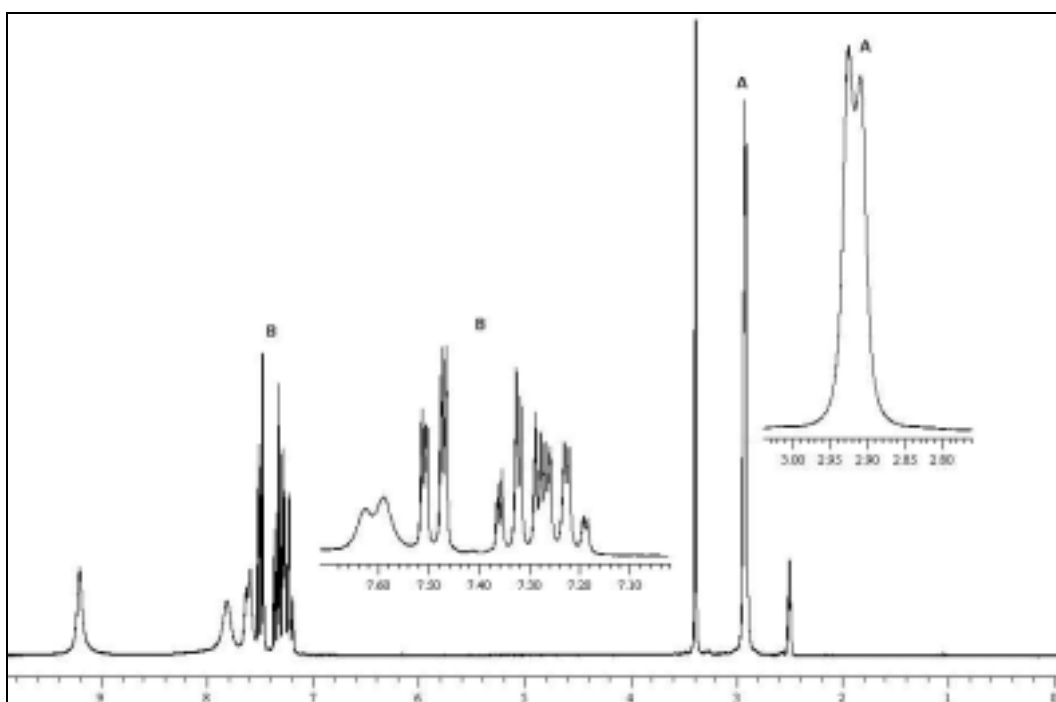


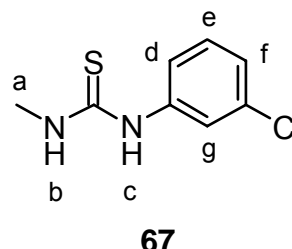
Abbildung 174: $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 200 MHz) von **66**

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 200 MHz):

δ [ppm] = 2.92 (d, 3 H, $^3J_{a,b} = 3.2$ Hz, a); 7.15–7.70 (ABCD-System, 4 H, d + e + f + g); 7.81 (s, 1 H, b); 9.20 (s, 1 H, c).

6.48 V46: 1-(3-Chlorphenyl)-3-methylthioharnstoff (67)

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.38, Seite 226 werden 10.9 g (150 mmol) Methylisothiocyanat in 50 ml Chloroform und 19.1 g (150 mmol) 3-Chloranilin in 100 ml Chloroform umgesetzt, dann wird für etwa 30 min zum



Rückfluß erhitzt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wird das Rohprodukt in Ethanol gelöst und kristallisiert aus dieser Lösung über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aus.

Ausbeute: 12.0 g (60.0 mmol, 40 %)

farblose Kristalle

Lit.^[105]: keine Angaben

$\text{C}_8\text{H}_9\text{ClN}_2\text{S}$ $\text{MM} = 200.69\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Schmelzpunkt: 86–87 $^{\circ}\text{C}$

Lit.^[105]: 92.5–93.5 $^{\circ}\text{C}$

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz):

δ [ppm] = 3.12 (d, 3 H, $^3J_{a,b} = 4.7\text{ Hz}$, a); 7.11–7.40 (ABCM-System, 4 H, d + e + f + g); 6.28 (s, 1 H, b); 8.74 (s, 1 H, c).

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3259, 3157 (N-H-Valenz); 2988 (C-H-Valenz in $-\text{CH}_3$); 1593, 1542, 1515 (C=C-Valenz in Aromaten); 1283 (C-Bande in Thioharnstoffen, N-C-N-Valenz); 1045 (D-Bande in Thioharnstoffen, N-H-Deformation).

MS (EI); m/z (%): 202 (26) [$^{37}\text{Cl-M}^+$], 200 (72) [$^{35}\text{Cl-M}^+$], 169 (7) [$^{37}\text{Cl-M}^+$, - SH], 167 (16) [$^{35}\text{Cl-M}^+$, - SH], 129 (32) [$^{37}\text{Cl-Ph-NH}_2^+$], 127 (100) [$^{35}\text{Cl-Ph-NH}_2^+$], 74 (52) [$\text{H}_3\text{C-N=C=S}$, + H^+].

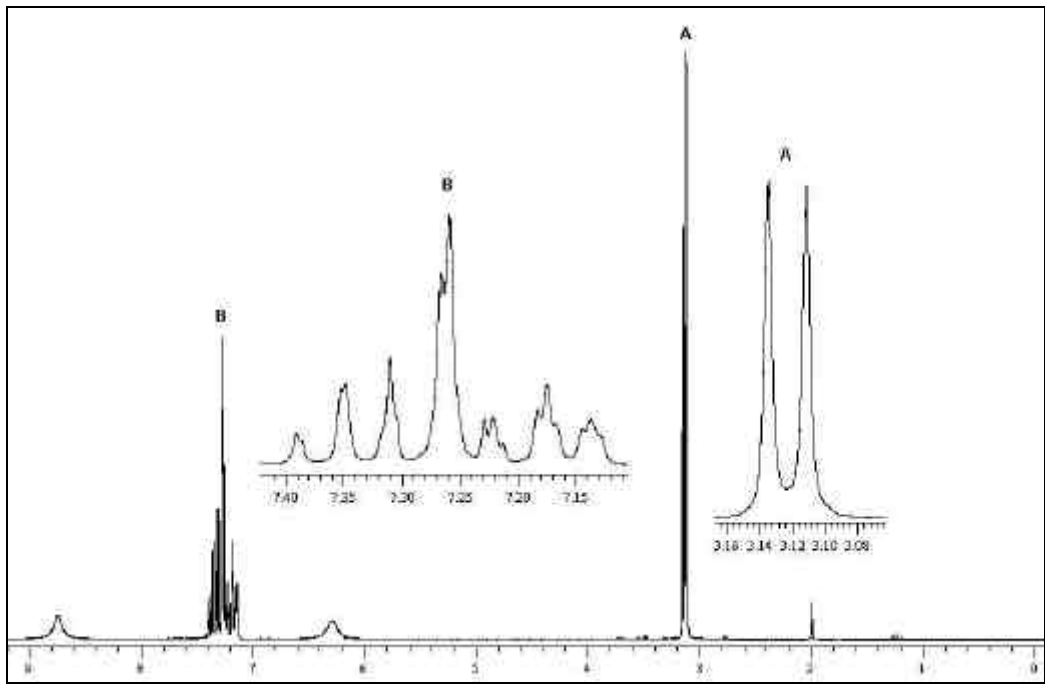


Abbildung 175: ¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) von **67**

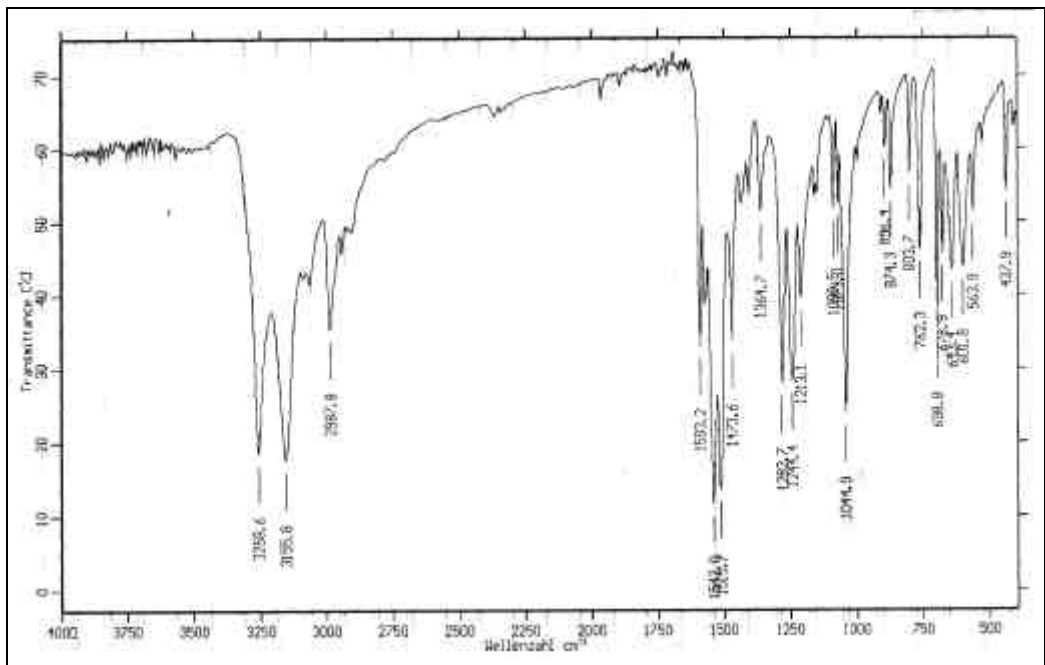
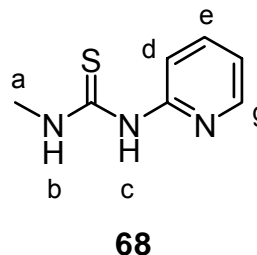


Abbildung 176: IR-Spektrum (KBr) von **67**

6.49 V47: 1-Methyl-3-pyridin-2-yl-thioharnstoff (68)

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.39, Seite 229 werden 7.30 g (0.100 mol) Methylisothiocyanat und 9.40 g (0.100 mol) 2-Aminopyridin jeweils in 50 ml Chloroform umgesetzt, dann wird für ca. 30 min zum Rückfluß erhitzt. Nach



Entfernen des Lösungsmittels wird in Ethanol gelöst, das Produkt kristallisiert bei -20°C über Nacht aus. Man erhält 3.26 g (20.0 mmol, 19 %) reines Produkt. Das Filtrat wird eingeeengt, es kristallisieren weitere 4.79 g (30.0 mmol, 29 %) geringerer Reinheit.

Ausbeute: 8.05 g (50.0 mmol, 48 %)

farblose Kristalle

Lit.^[65]: keine Angaben

$\text{C}_7\text{H}_9\text{N}_3\text{S}$ $\text{MM} = 167.24 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Schmelzpunkt: 140–143 $^{\circ}\text{C}$

Lit.: 112–114 $^{\circ}\text{C}$ ^[65]

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz):

δ [ppm] = 3.25 (d, 3 H, $^3J_{a,b} = 4.7 \text{ Hz}$, a); 6.87–6.94 (A- und B-Teil des ABMX-Systems, 2 H, f + d); 7.54–7.64 (M-Teil des ABMX-Systems, 1 H, e); 8.10–8.16 (X-Teil des ABMX-Systems, 1 H, g); 9.47 (s, 1 H, c); 11.67 (s, 1 H, b).

(Abbildung des Spektrums siehe Kapitel 4.3.2.5, Seite 102)

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = ca. 3250–3110 (N-H-Valenz, intra- und intermolekular assoziierte H-Brückenbindung); 3042 (C-H-Valenz im Aromaten); 1600 (C=C-Valenz in Aromaten); 1545 (B-Bande in Thioharnstoffen, C-N-Schwingung); 1057 (D-Bande in Thioharnstoffen, N-H-Deformation).

SUDHA und SATHYANARAYANA^[65] geben im Hochfrequenzbereich zwei Banden an: B-Bande (intermolecularly associated N-H mode via hydrogen bonding) 3180 cm^{-1} (m), C-Bande (intramolecularly associated hydrogen bond) 3200 (mb) .

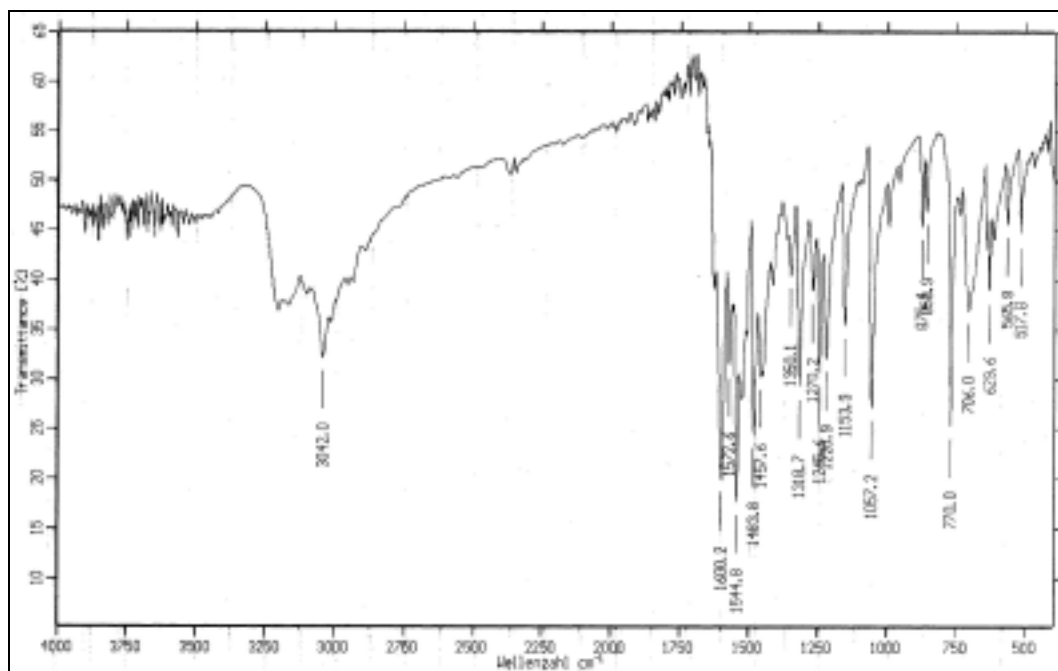
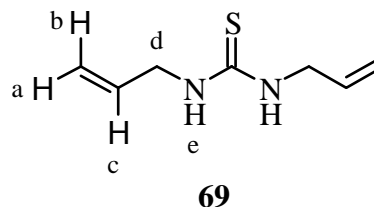


Abbildung 177: IR-Spektrum (KBr) von **68**

MS (EI); m/z (%): 167 (99) [M^+], 134 (29) [M^+ , - HS], 94 (100) [$Py-NH_2^+$], 79 (22) [$Pyridin^+$], 78 (52) [$Pyridin$, - H], 67 (61).

6.50 V48: 1,3-Diallylthioharnstoff (**69**)

11.4 g (0.200 mol) Allylamin werden mit 20.2 g (0.200) Triethylamin in 200 ml Chloroform vorgelegt. 11.5 g (0.100 mol) Thiophosgen in 100 ml Chloroform werden unter Kühlung des Reaktions-



gemisches im Wasserbad zugetropft. Man läßt über Nacht stehen und erhitzt dann 45 min zum Rückfluß. Nach Abkühlen wird mit etwa 500 ml verdünnter Salzsäure, dann zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und mit Wasser gewaschen. Nach

Trocknen der organischen Phase über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel entfernt.

Das Rohprodukt kristallisiert schlecht. Zur Umkristallisation aus Ethanol wird in Trockeneis ausgefroren und schnell filtriert. Da das Produkt gut löslich in Ethanol ist, darf nicht mit diesem Lösungsmittel nachgewaschen werden.

Beim Trocknen im Trockenschrank (80 °C) wird der Thioharnstoff flüssig und kristallisiert beim Abkühlen aus.

Ausbeute: 7.44 g (50.0 mmol, 48 %)
weiße Kristalle
Lit.^[66]: 75 %
 $C_7H_{12}N_2S$ MM = 156.25 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 45–46 °C
Lit.: 44–45 °C^[106]
48–49 °C^[66]

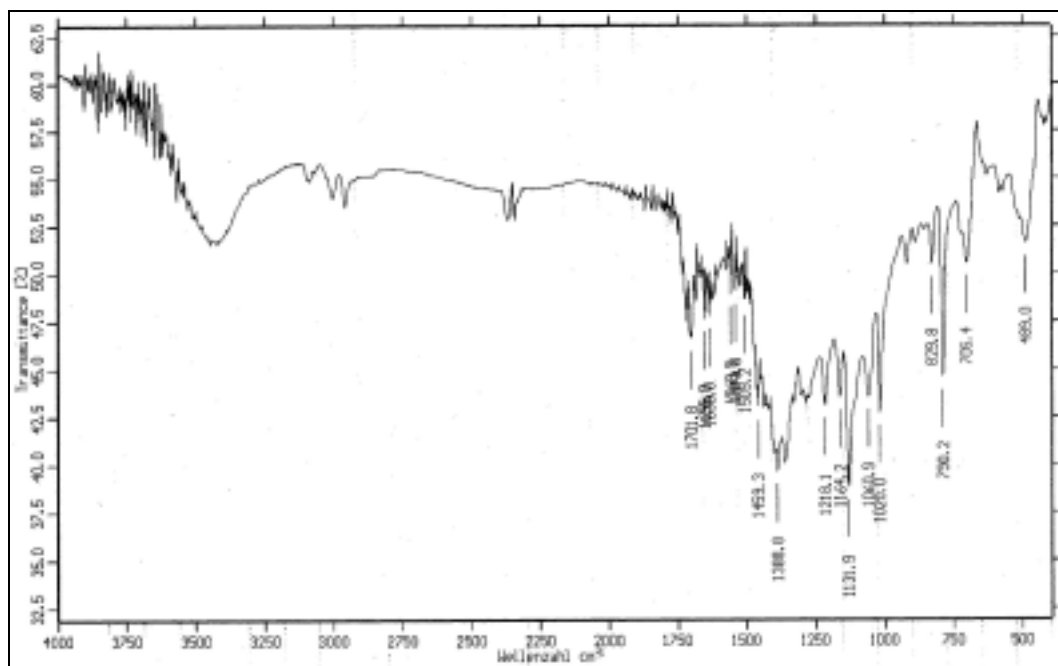
¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz):

δ [ppm] = 4.07 (dd, 4 H, ³J_{d,e} = 5.2 Hz, ³J_{d,c} = 5.5 Hz, d); 5.18 (ddt, 2 H, ³J_{a,c} = 10.2 Hz, ²J_{a,b} ≈ 1.5 Hz, ⁴J_{a,d} ≈ 1.3 Hz, a); 5.23 (ddt, 2 H, ³J_{b,c} = 17.2 Hz, ²J_{b,a} ≈ 1.5 Hz, ⁴J_{b,d} ≈ 1.5 Hz, b); 5.84 (ddt, 2 H, ³J_{c,d} = 5.5 Hz, ³J_{c,a} = 10.2 Hz, ³J_{c,b} = 17.2 Hz, c); 6.31 (s, 2 H, e).

(vgl. auch Mohanta et al.^[66], Spektrum siehe Kapitel 4.3.2.6, Seite 103).

IR (KBr):

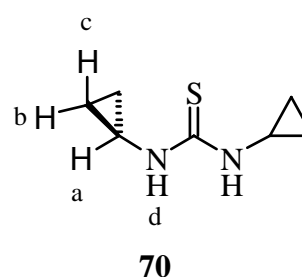
$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3215 (N-H-Valenz); 2933 (C-H-Valenz); 1568 (B-Bande in Thioharnstoffen, C-N-Valenz); 1225 (C-Bande in Thioharnstoffen, N-C-N-Valenz).

Abbildung 178: IR-Spektrum (KBr) von **69**

MS (EI); m/z (%): 156 (68) [M^+], 141 (63) [M^+ , - NH], 100 (7) [$H_2C=CH-CH_2-N=C=S^+$], 56 (100) [$CH_2=CH-CH_2-NH^+$], 41 (90) [Propenylkation].

6.51 V49: 1,3-Dicyclopropylthioharnstoff (**70**)

12.1 g (0.212 mol) Cyclopropylamin werden mit 42.9 g (0.424 mol) Triethylamin in 200 ml Chloroform vorgelegt. 10.6 g (92.0 mol) Thiophosgen in 100 ml Chloroform werden unter Kühlung des Reaktionsgemisches mit kaltem Wasser relativ rasch zugetropft. Man



läßt über Nacht stehen und erhitzt dann 45 min zum Rückfluß. Nach Abkühlen wird mit 500 ml verdünnter Salzsäure, dann zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen der organischen Phase über Magnesiumsulfat wird das Lösungsmittel entfernt.

Das Rohprodukt wird aus Ethanol umkristallisiert und der Niederschlag nach Filtration mit Ethanol gewaschen.

Ausbeute: 10.1 g (64.0 mmol, 70 %)
 weiße Kristalle
 Lit.^[66]: 82 %
 $C_7H_{12}N_2S$ MM = 156.25 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 140–142 °C (Sublimation ab ca. 125 °C)
 Lit.: 130–131 °C^[66]
 144 °C^[107]

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz):

δ [ppm] = 0.50–0.59 (A-Teil des [AB]₂M-Systems, 4 H, b oder c); 0.63–0.76 (B-Teil des [AB]₂M-Systems, 4 H, b oder c); 2.61 (M-Teil des [AB]₂M-Systems, 2 H, a); 6.73 (s, 2 H, d).

(vgl. auch Mohanta et al.^[66])

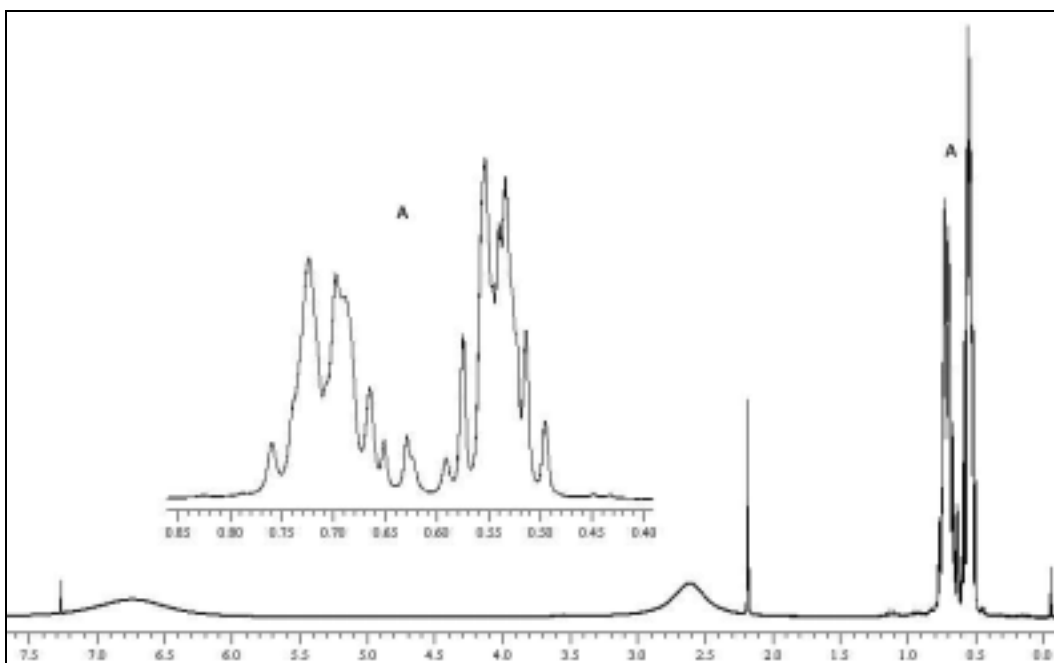


Abbildung 179: ¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) von **70**

MS (EI); m/z (%): 156 (82) [M⁺], 115 (17) [M⁺, - Cyclopropyl], 100 (14) [Cyclopropyl-N=C=S, + H⁺], 56 (85) [Cyclopropyl-NH⁺], 41 (100) [Cyclopropyl⁺, bzw Propenkation].

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3180 (NH-Valenz); 2995 (C-H-Valenz); 1558 (B-Bande in Thioharnstoffen, C-N-Valenz); 1340,1275 (C-Bande in Thioharnstoffen, N-C-N-Valenz); 1019 (D-Bande in Thioharnstoffen, N-H-Deformation).

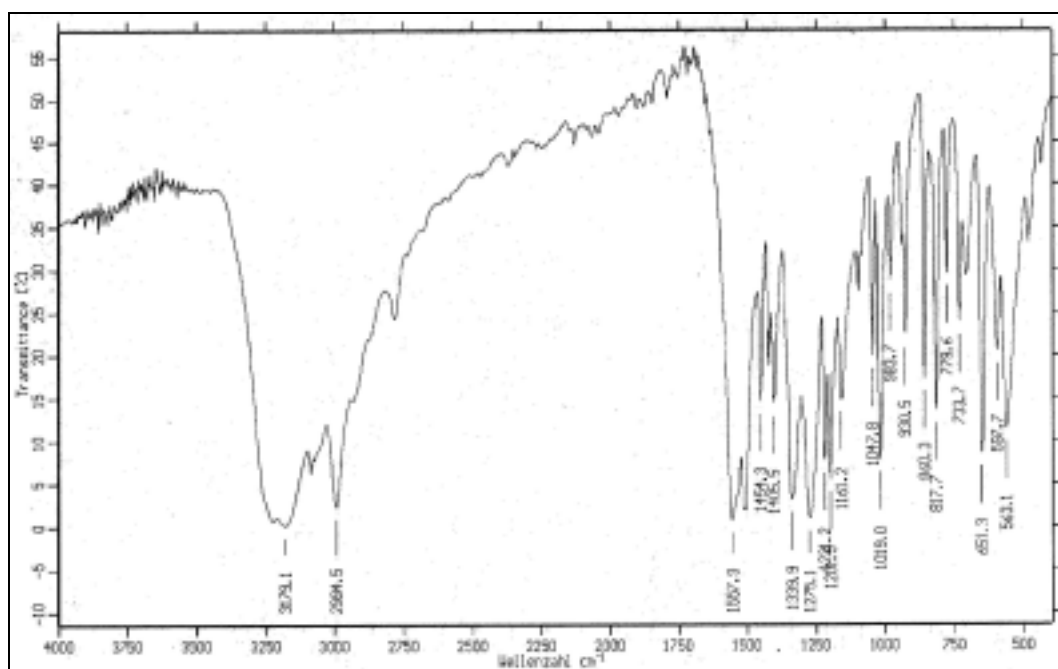


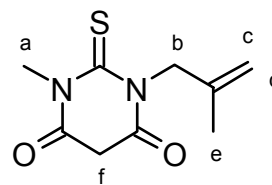
Abbildung 180: IR (KBr) von **70**

6.52 Allgemeine Darstellung der Thiobarbitur-säurederivate

Natrium wird in kleinen Stücken in absolutem Ethanol gelöst, so daß eine Lösung von $2.67 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ Natriumethanolat entsteht. Eventuell muß dazu erhitzt werden. Unter fortgesetztem Rühren wird dazu die äquimolare Menge Diethylmalonat und die halbe Stoffmenge des entsprechenden Thioharnstoffes gegeben. Man rührt mindestens 100 h in einem $100 \text{ }^\circ\text{C}$ erwärmten Ölbad unter Argonatmosphäre. Nach Lösen in einem großen Überschuß Wasser wird das Ethanol am Rotationsverdampfer entfernt. Man gibt nochmals die gleiche Menge Wasser hinzu und säuert mit konzentrierter Salzsäure an. Das Produkt fällt kristallin oder als Öl und wird aufgearbeitet.

6.53 V50: 1-Methyl-3-(2-methylallyl)-4,6-dioxo-2-thioxoperhydropyrimidin (71)

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.52, Seite 253 werden 4.60 g (0.200 mol) Natrium in 75 ml Ethanol, 32.0 g (0.200 mol) Malonsäurediethylester und 14.4 g (0.100 mol) 1-Methyl-3-(2-methylallyl)thioharnstoff während 142 h umge-



71

gesetzt. Zum Lösen und nach Entfernen des Ethanols werden jeweils 100 ml Wasser zugegeben. Das Produkt fällt als weißer Niederschlag. Im Falle, daß das Produkt als Öl anfällt, kann durch Kühlung die Kristallisation herbeigeführt werden. Der Feststoff wird abfiltriert, mit verdünnter Salzsäure gewaschen und aus Ethanol umkristallisiert.

Man erhält 14.1 g (66.4 mmol, 66 %) Produkt, das sich für weitere Umsetzungen verwenden läßt. Für höhere Reinheit werden davon 9.95 g erneut aus 50 ml 2-Propanol umkristallisiert. Man erhält nach Trocknen 6.93 g (32.6 mmol, 70 % nach Umkristallisation, 46 % Gesamtausbeute).

Ausbeute: 14.1 g (66.4 mmol, 66 %)
transparente farblose tafelförmige Kristalle
Lit.: nicht bekannt
 $C_9H_{12}N_2O_2S$ 212.27 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 86–88 °C
Lit.: nicht bekannt

MS (EI); m/z (%): 212 (42) [M⁺], 197 (100) [M⁺ - CH₃], 169 (7) [M⁺ - CH₃, - CO], 129 (28) [M⁺ - 2-Methylallyl, - CO].

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz):

δ [ppm] = 1.72 (s, 3H, e); 3.59 (s, 3H, a); 3.75 (s, 2H, f); 4.51–4.56 (m, 1 H, d); 4.76–4.81 (m, 1 H, d); 4.83 (s, 2 H, b).

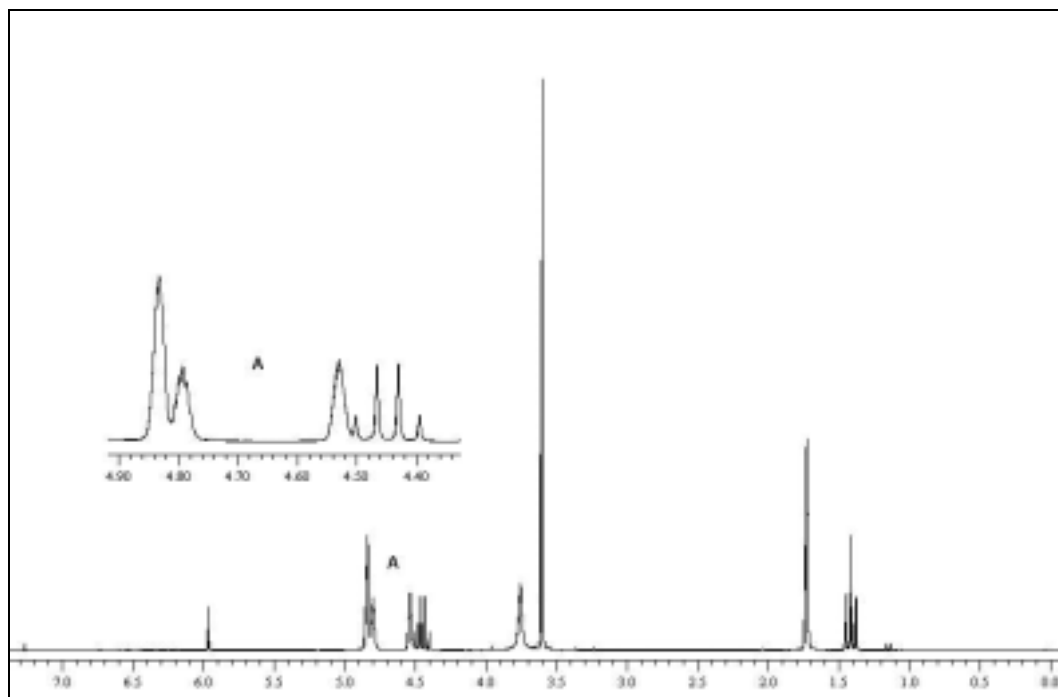


Abbildung 181: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) von **71**

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3343 (Oberschwingung der C=O-Valenz) 3098 (C-H-Valenz in Alkenen); 2988, 2944 (C-H-Valenz in Alkanen); 1664 (C=O im Imid); 1591.

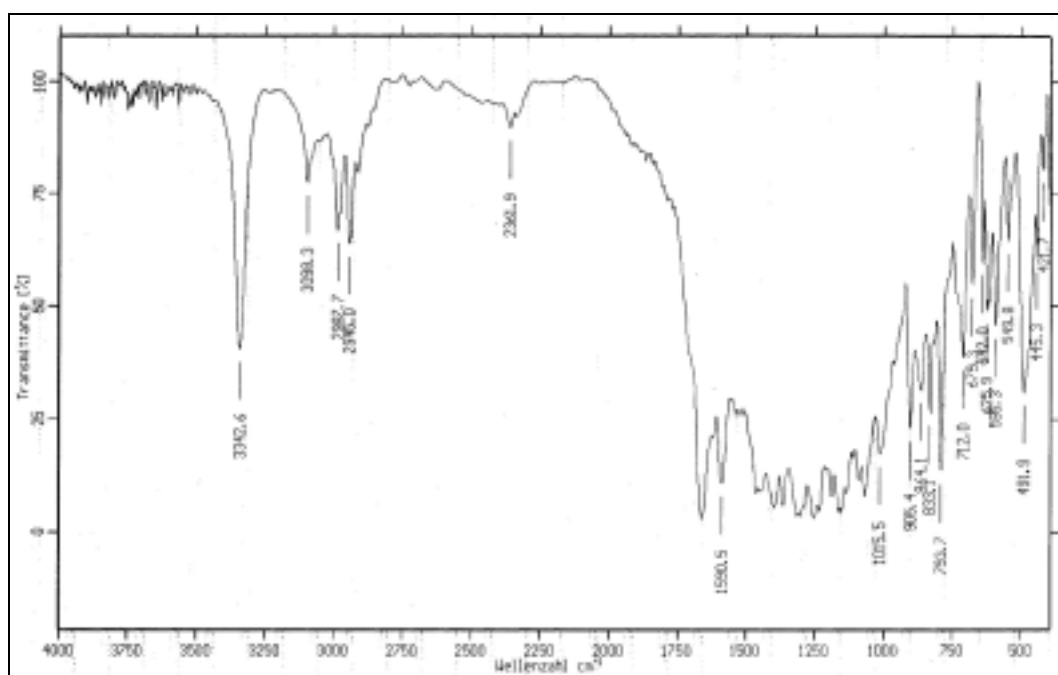
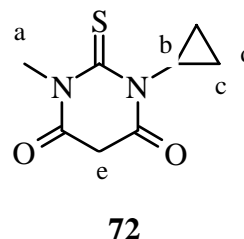


Abbildung 182: IR-Spektrum (KBr) von **71**

6.54 V51: 1-Cyclopropyl-3-methyl-4,6-dioxo-2-thioxoperhydropyrimidin (72)

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.52, Seite 253 werden 4.60 g (0.200 mol) Natrium in 75 ml Ethanol, 13.0 g (0.100 mol) 1-Cyclopropyl-3-methylthioharnstoff **59** und 32.0 g (0.200 mol) Malonsäurediethylester während 120 h umgesetzt.



Zum Lösen und nach Entfernen des Ethanols werden jeweils 100 ml Wasser zugegeben. Man erhält ein Öl, von dem die wäßrige Phase dekantiert wird. Letztere wird mit Chloroform extrahiert und das Öl in dieser organischen Phase gelöst. Nach Entfernen des Lösungsmittels erhält man einen braunen Feststoff, der aus Ethanol umkristallisiert, dann in *n*-Hexan aufgeköcht wird. Nach Trocknen in der Trockenpistole (20 hPa, 45 °C) erhält man das Produkt.

Ausbeute: 9.08 g (45.8 mmol, 46 %) beigefarbener Feststoff
Lit.: nicht bekannt
 $C_8H_{10}N_2O_2S$ MM = 198.24 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 128–130 °C
Lit.: nicht bekannt

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz):

δ [ppm] = 0.77 (A-Teil des [AB]₂M-Systems, 2 H, c oder d); 1.24 (B-Teil des [AB]₂M-Systems, 2 H, c oder d); 2.85 (M-Teil des [AB]₂M-Systems, 1 H, b); 3.64 (s, 3 H, a); 3.73 (s, 2 H, e).

MS (EI); m/z (%): 198 (69) [M⁺], 183 (100) [M⁺ - CH₃], 155 (27) [M⁺ - CH₃ - C₂H₄].

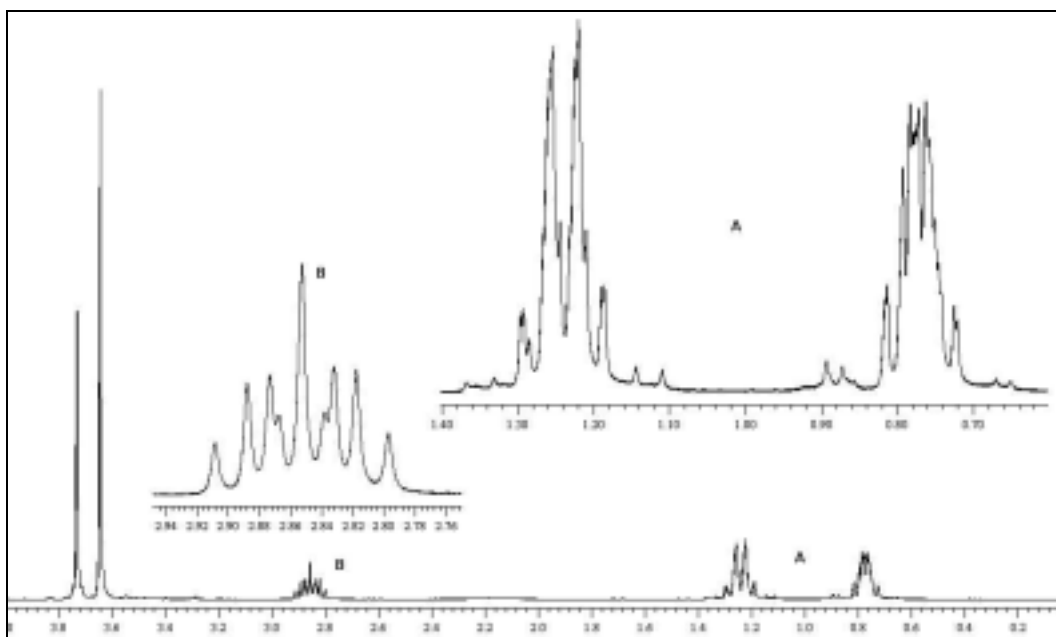


Abbildung 183: $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) von **72**

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2976 (C-H-Valenz); 2875 (C-H-Valenz am *tert*-C); 1740, 1713 (C=O –Valenz in Amiden).

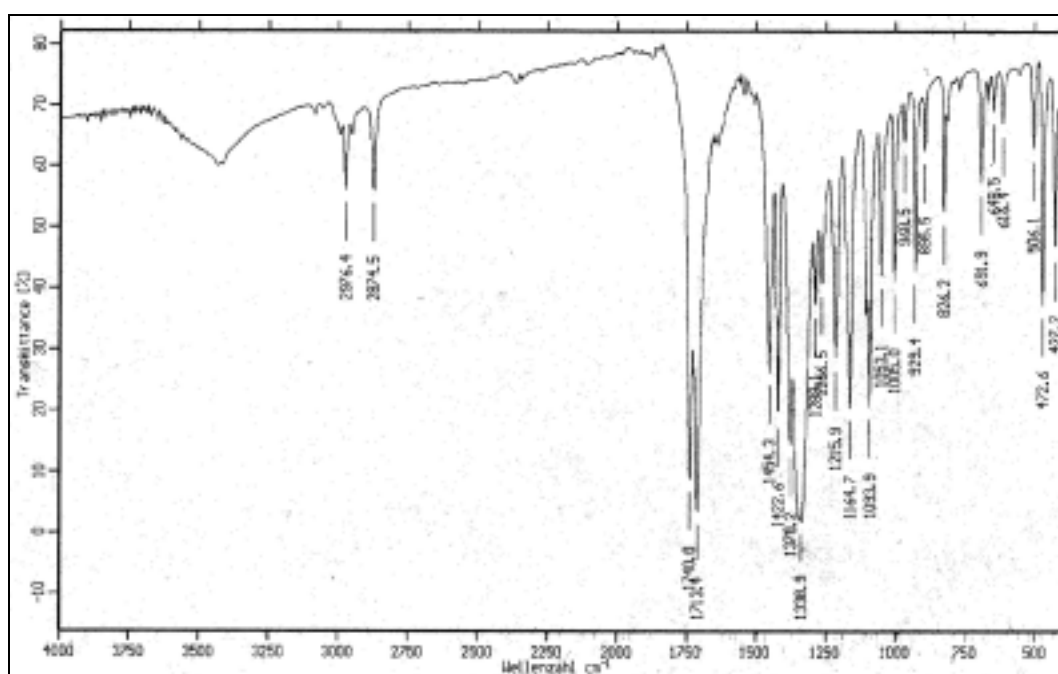
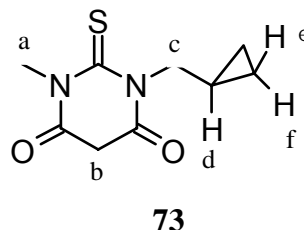


Abbildung 184: IR-Spektrum (KBr) von **72**

6.55 V52: 1-Cyclopropylmethyl-3-methyl-4,6-dioxo-2-thioxoperhydropyrimidin (73)

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.52, Seite 253 werden 2.30 g (0.100 mol) Natrium in 40 ml absolutem Ethanol, 7.20 g (0.050 mol) 1-Cyclopropylmethyl-3-methylthioharnstoff **60** und 16.0 g (0.100 mol) Diethylmalonat



während 100 h umgesetzt. Zum Lösen und nach Entfernen des Ethanols werden jeweils 100 ml Wasser zugegeben. Man erhält das Rohprodukt als zähes Öl. Die wäßrige Phase wird mit Chloroform extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden nach Trocknen vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand in 70 ml Ethanol aufgekocht, das Produkt kristallisiert bei Kühlung ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) über Nacht. Nach Filtration und Trocknen (Trockenpistole, 20 hPa, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$) erhält man das Produkt als farblosen Feststoff.

Ausbeute: 7.69 g (36.2 mmol, 72 %) farblose nadelförmige Kristalle
Lit.: nicht bekannt
 $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ MM = $212.27\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Schmelzpunkt: $104\text{--}105\text{ }^{\circ}\text{C}$
Lit.: nicht bekannt

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz):

δ [ppm] = 0.35 – 0.50 (A- und B-Teil des $[\text{AB}]_2\text{M}$ -Systems, 4 H, e und f); 1.16 – 1.46 (M-Teil des $[\text{AB}]_2\text{M}$ -Systems, 1 H, d); 3.63 (s, 3 H, a); 3.73 (s, 2 H, b); 4.26 (d, 2 H, $^3J_{c,d} = 7.2\text{ Hz}$, c).

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3750–3250 (Oberschwingung der C=O-Valenz); ca. 3000–2800 (C-H-Valenz); 1702 (C=O in *N,N*-disubstituierten Amiden).

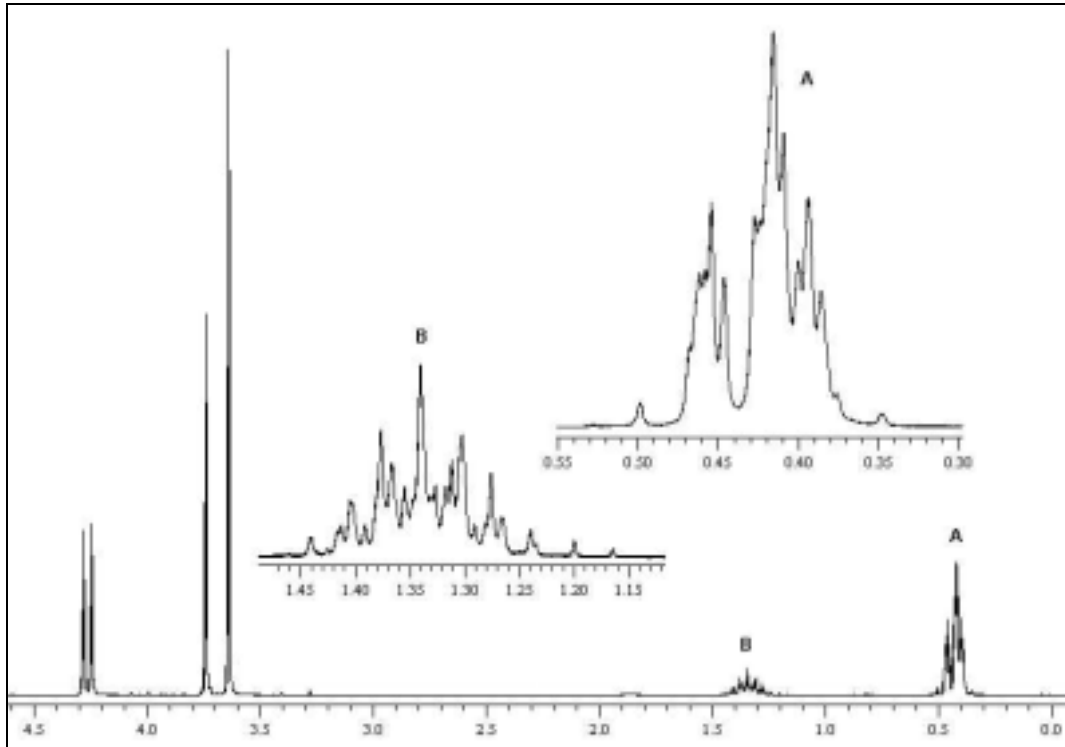


Abbildung 185: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) von **73**

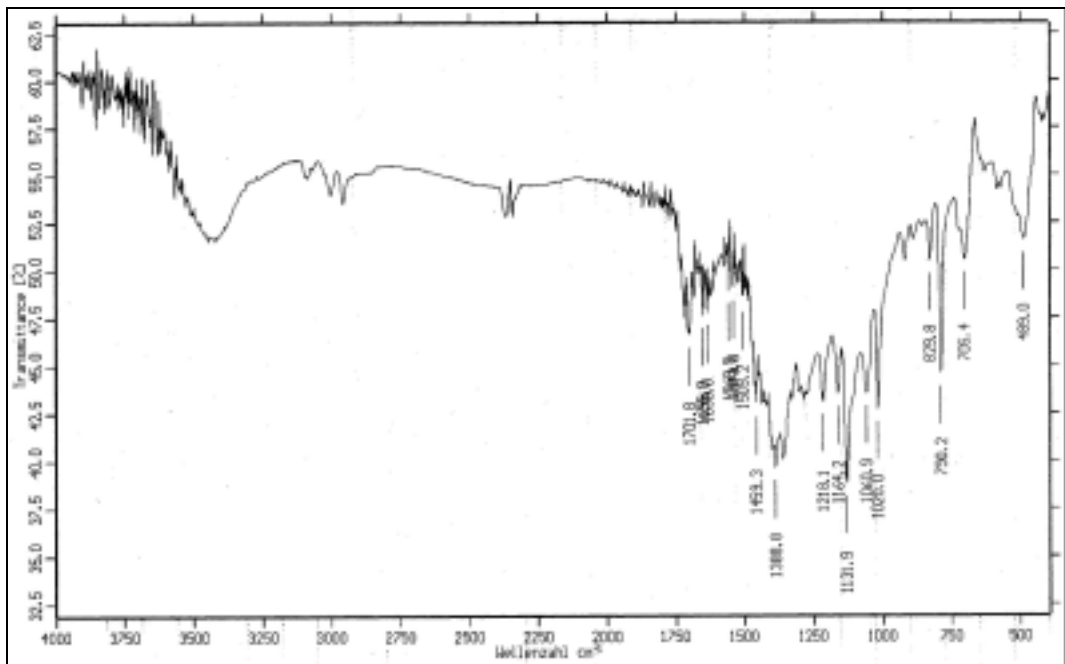


Abbildung 186: IR-Spektrum (KBr) von **73**

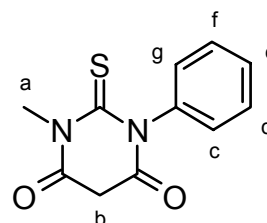
MS (EI); m/z (%): 212 (29) [M^+], 183 (100) [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$ (metastabil)].

$m/e = 183$: Das Molekülion wird beschleunigt mit $m/e = 212$, zerfällt aber unter Abspaltung der *N*-Methylgruppe und durchquert das

Ablenkungsfeld mit der Masse $m/e = 197$. Die Detektion erfolgt bei $m/e = 197^2/212 = 183$. (siehe auch Gleichung 13, Seite 99)

6.56 V53: 1-Methyl-4,6-dioxo-3-phenyl-2-thioxoperhydropyrimidin (74)

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.38, Seite 226 werden 3.50 g (0.150 mol) Natrium in 60 ml Ethanol, 12.5 g (75.0 mmol) 1-Methyl-3-phenylthioharnstoff **61** und 24.0 g (0.150 mol) Diethylmalonat während 118 h umgesetzt. Zum Lösen werden 100 ml Wasser zugegeben, nach



74

Entfernen des Ethanols wird auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt. Man säuert an und verbringt das Gemisch über Nacht in den Tiefkühlschrank (ca. $-20\text{ }^\circ\text{C}$). Das Rohprodukt wird nach Filtration aus Ethanol umkristallisiert und getrocknet.

Ausbeute: 8.72 g (37.0 mmol, 50 %) farblose, leicht gelbliche nadelförmige Kristalle
Lit.: nicht bekannt
 $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ MM = $234.28\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Schmelzpunkt: 169–171 $^\circ\text{C}$
Lit.: nicht bekannt

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz):

δ [ppm] = 3.62 (s, 3 H, a); 3.82 (s, 2 H, b); 7.12–6.99 (A-Teil des $[\text{AM}]_2\text{B}$ -Systems, 2 H, d+f); 7.48–7.32 (B- und M-Teil des $[\text{AM}]_2\text{B}$ -Systems, 3 H, c+e+g).

MS (EI); m/z (%): 234 (100) $[\text{M}^+]$, 233 (61) $[\text{M}^+ - \text{H}]$, 165 (17) $[\text{Ph-NH-C}(-\text{S}^+)=\text{N-CH}_3]$, 135 (15) $[\text{Ph-N}=\text{C}^+-\text{S}^+]$, 119 (61) $[\text{Ph-N}=\text{C}=\text{O}^+]$, 83 (86), 77 (49) [Phenylkation].

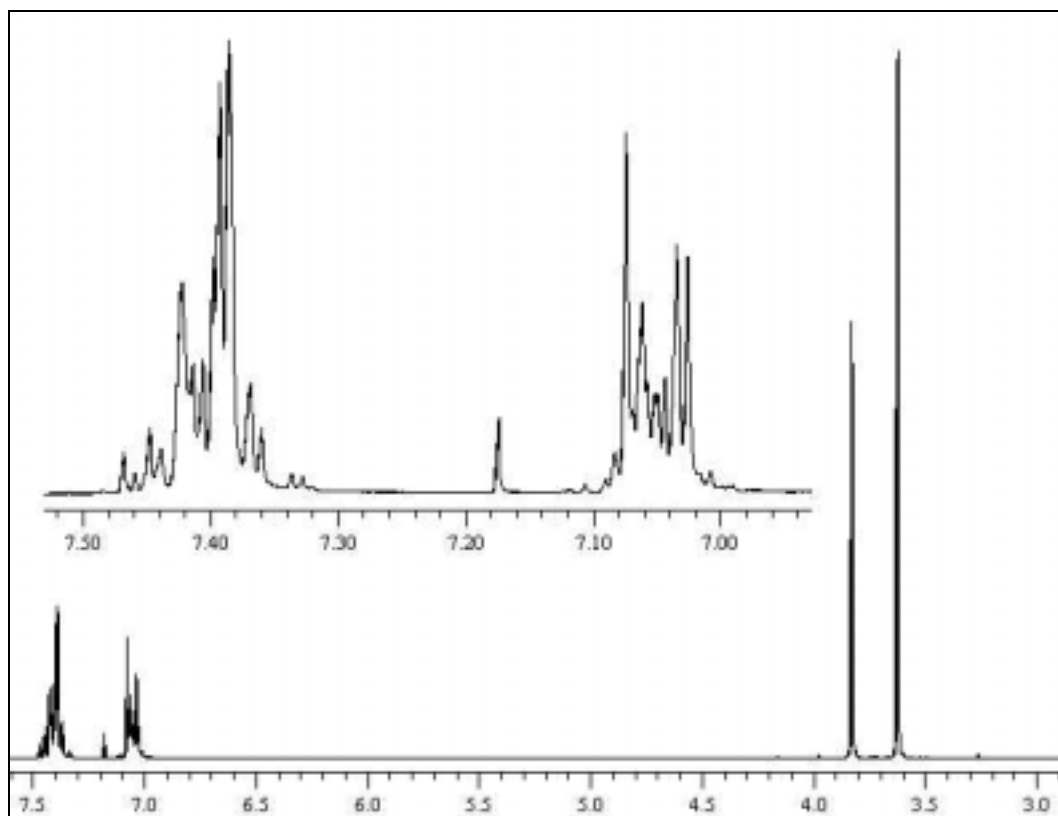


Abbildung 187: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) von **74**

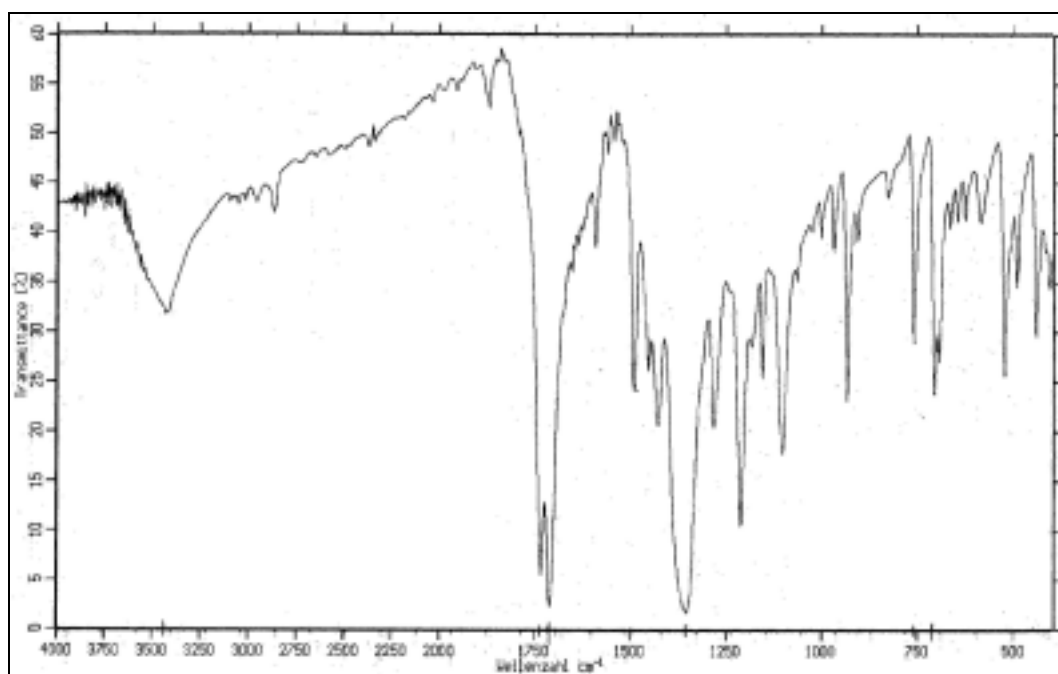


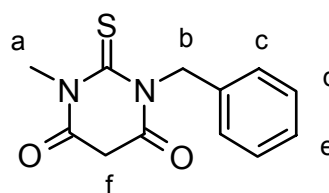
Abbildung 188: IR-Spektrum (KBr) von **74**

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3432 (Oberschwingung von 1716 cm^{-1}); 1739, 1716 (Amid I); 1500 (C=C-Valenz, Aromat); 1352; 761, 711 (C-H-Deformation, Aromat, monosubstituiert).

6.57 V54: 1-Benzyl-3-methyl-2-thioxodihydropyrimidin-4,6-dion (75)

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.52, Seite 253 werden 4.60 g (0.200 mol) Natrium in 100 ml Ethanol, 32.0 g (0.200 mol) Malonsäurediethylester und 18.0 g (0.100 mol) 1-Benzyl-3-methylthioharnstoff **62**



75

während 96 h umgesetzt. Zum Lösen und nach Entfernen des Ethanols werden jeweils 100 ml Wasser zugegeben. Das Rohprodukt fällt zunächst als Öl an, das von der wässrigen Phase getrennt wird und bei Kühlung erstarrt. Der Feststoff wird im Mörser zerkleinert, dann aus 100 ml Ethanol zweimal umkristallisiert.

Ausbeute: 11.1 g (44.7 mmol, 45 %)

farblose Kristalle

Lit.: nicht bekannt

$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$

MM = $248.31 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Schmelzpunkt: 115–116°C

Lit.: nicht bekannt

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz):

δ [ppm] = 3.68 (s, 3 H, a); 3.81 (s, 2 H, f); 5.65 (s, 2 H, b); 7.24–7.47 ([AB]₂M-System, 5 H, c + d + e).

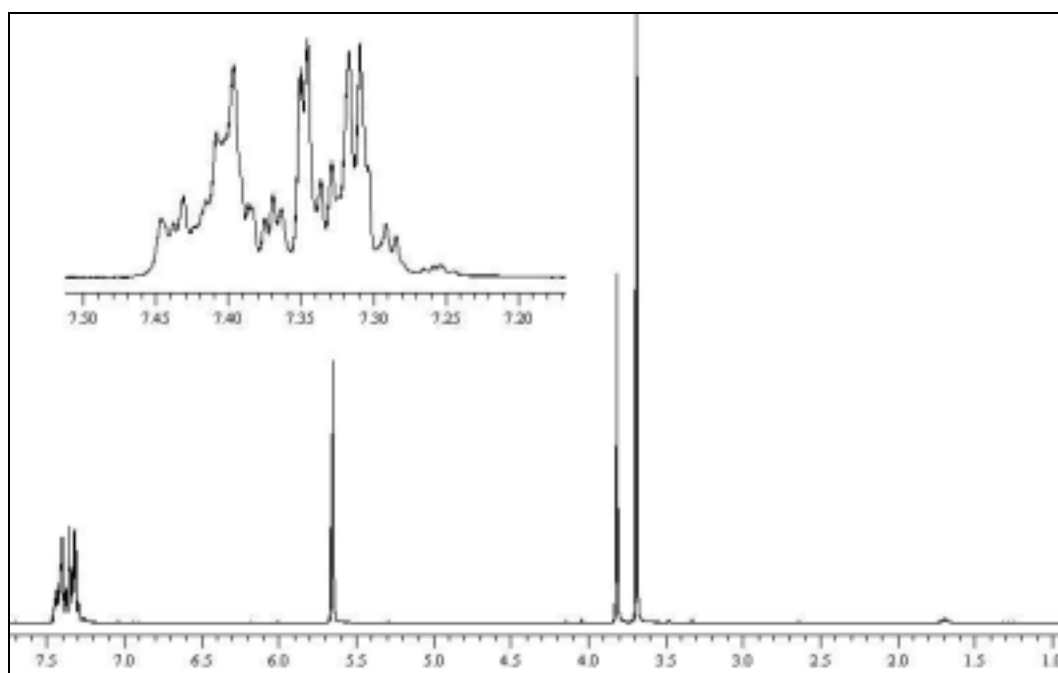


Abbildung 189: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) von **75**

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3750–3250 (Oberschwingung der C=O-Valenz); 2955 (C-H-Valenz); 1722, 1703 (C=O in *N,N*-disubstituierten Amiden).

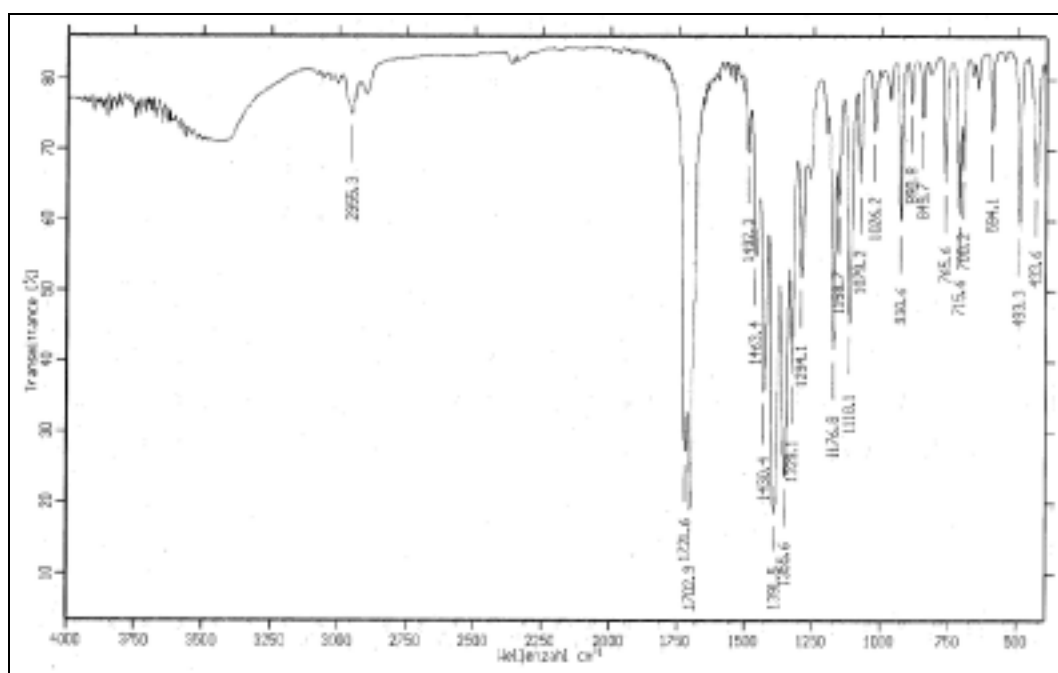
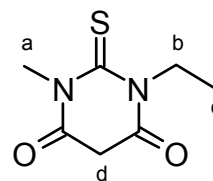


Abbildung 190: IR-Spektrum (KBr) von **75**

MS (EI); m/z (%): 248 (73) [M^+], 215 (5) [$M^+ - SH$], 178 (1) [$M^+ - O=C-CH_2-C=O$], 91 (100) [CH_2-Ph^+].

6.58 V55: 1-Ethyl-3-methyl-4,6-dioxo-2-thioxo-perhydropyrimidin (76)

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.52, Seite 253 werden 4.60 g (0.200 mol) Natrium in 100 ml Ethanol, 32.0 g (0.200 mol) Malonsäurediethylester und 11.8 g (0.100 mol) 1-Ethyl-3-methylthioharnstoff **63** während 96 h umgesetzt. Zum Lösen



76

und nach Entfernen des Ethanols werden jeweils 100 ml Wasser zugegeben. Der Niederschlag wird aus 100 ml Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 14.3 g (76.8 mmol, 77 %)

farblose Kristalle

Lit.^[108]: keine Angaben

$C_7H_{10}N_2O_2S$

MM = 186.23 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 111–112 °C

Lit.^[108]: 106–108 °C

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz):

δ [ppm] = 1.52 (t, 3 H, ³J_{c,b} = 7.0 Hz, c); 3.50 (s, 3 H, a); 4.35 (q, 2 H, ³J_{b,c} = 7.0 Hz, b); 6.48 (s, 2 H, d).

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3750–3250 (Oberschwingung der C=O-Valenz); 2981 (C-H-Valenz), 1654; 1375; 1107.

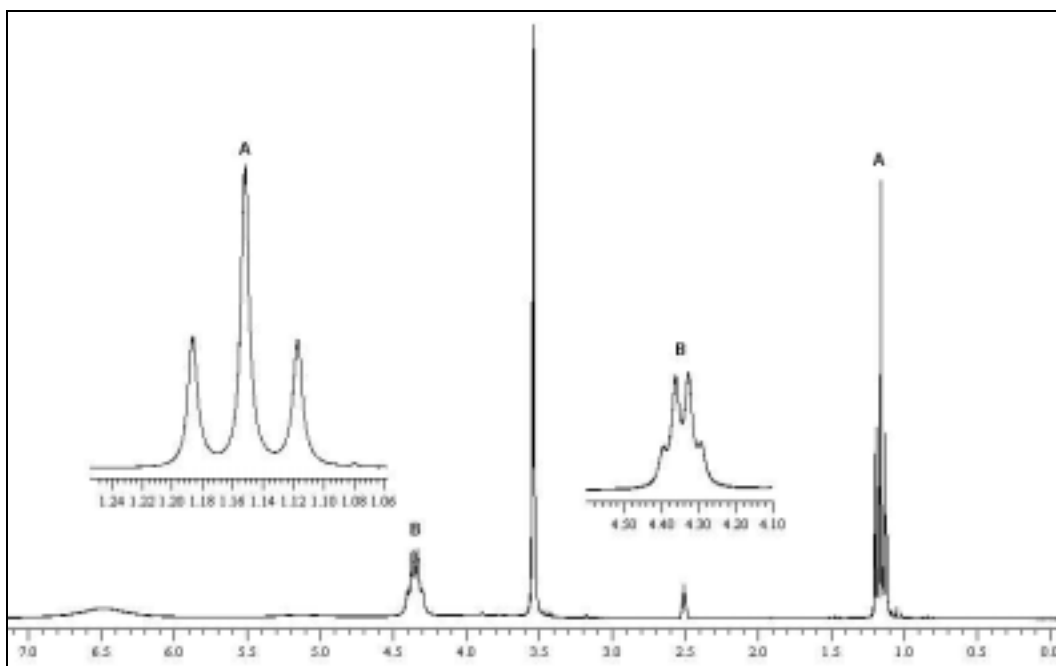


Abbildung 191: $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-D₆, 200 MHz) von **76**

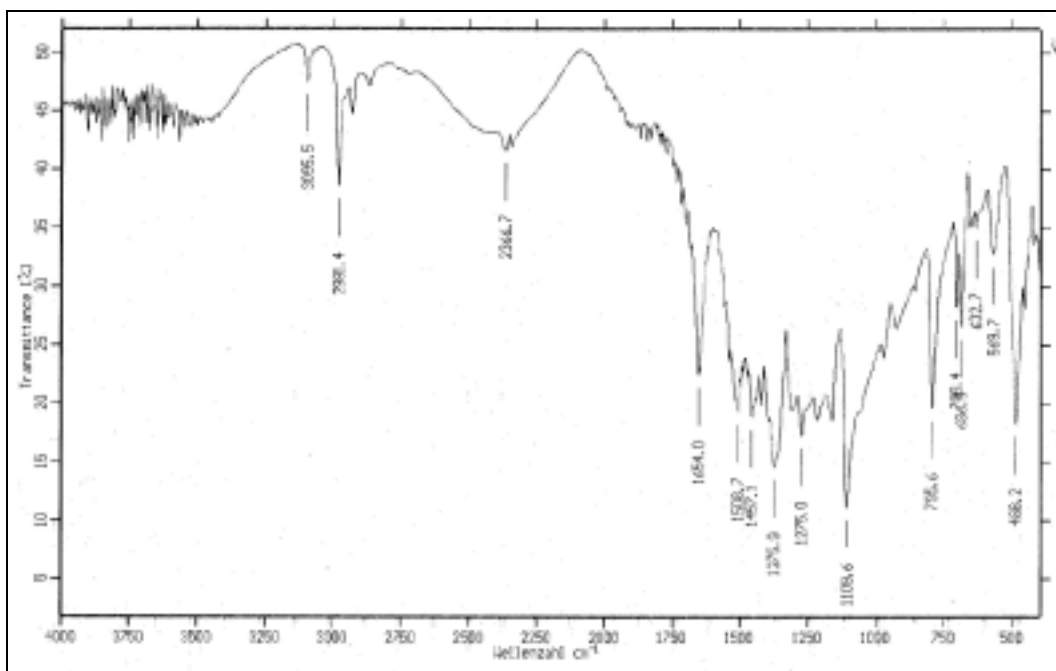
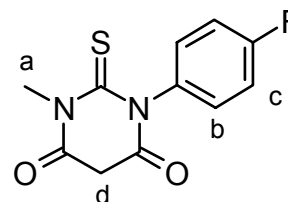


Abbildung 192: IR-Spektrum (KBr) von **76**

MS (EI); m/z (%): 186 (100) [M^+], 158 (5) [M^+ , - $\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$], 153 (8) [M^+ , - HS], 130 (14) [M^+ , - $\text{H}_3\text{C-N}=\text{C}=\text{O}$, + H], 116 (6) [M^+ , - $\text{O}=\text{C}^+\text{CH}_2-\text{C}^+=\text{O}$], 83 (38), 74 (38), 73 (10) [$\text{H}_3\text{C-N}=\text{C}=\text{S}^+$], 69 (38), 57 (14) [$\text{H}_3\text{C-N}=\text{C}=\text{O}^+$].

6.59 V56: 1-(4-Fluorphenyl)-3-methyl-4,6-dioxo-2-thioxoperhydropyrimidin (77)

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.52, Seite 253 werden 1.50 g (65.2 mmol) Natrium in 20 ml Ethanol, 6.06 g (32.7 mmol) 1-(4-Fluorphenyl)-3-methylthioharnstoff **64** und 10.5 g (65.6 mmol) Diethylmalonat während 96 h umgesetzt. Man gibt das gleiche Volumen



77

Wasser hinzu. Nach Entfernen des Ethanol wird auf 40 ml mit Wasser aufgefüllt und mit konzentrierter Salzsäure deutlich sauer gemacht. Der Niederschlag wird filtriert und aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 4.78 g (18.9 mmol, 58 %)

gelblicher Feststoff,

sehr feine nadelförmige Kristalle

Lit.: nicht bekannt

$C_{11}H_9N_2O_2S$

MM = 252.27 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 159–163 °C

Lit.: nicht bekannt

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz):

δ [ppm] = 3.69 (s, 3 H, a); 3.91 (s, 2 H, d); 7.07–7.11 (A-Teil des [AM]₂X-Systems, 2 H, b); 7.14–7.19 (M-Teil des [AM]₂X-Systems, 2 H, c).

Die Reihenfolge des A- und M-Teils im Aromatenbereich kehrt sich gegenüber dem entsprechenden Thioharnstoff **64** (S.240) um.

MS (EI); m/z (%): 252 (87) [M⁺], 153 (16) [F-Ph-NCS⁺]; 137 (72) [F-PH-NCO⁺]; 109 (20) [⁺N=Ph-F]; 83 (100).

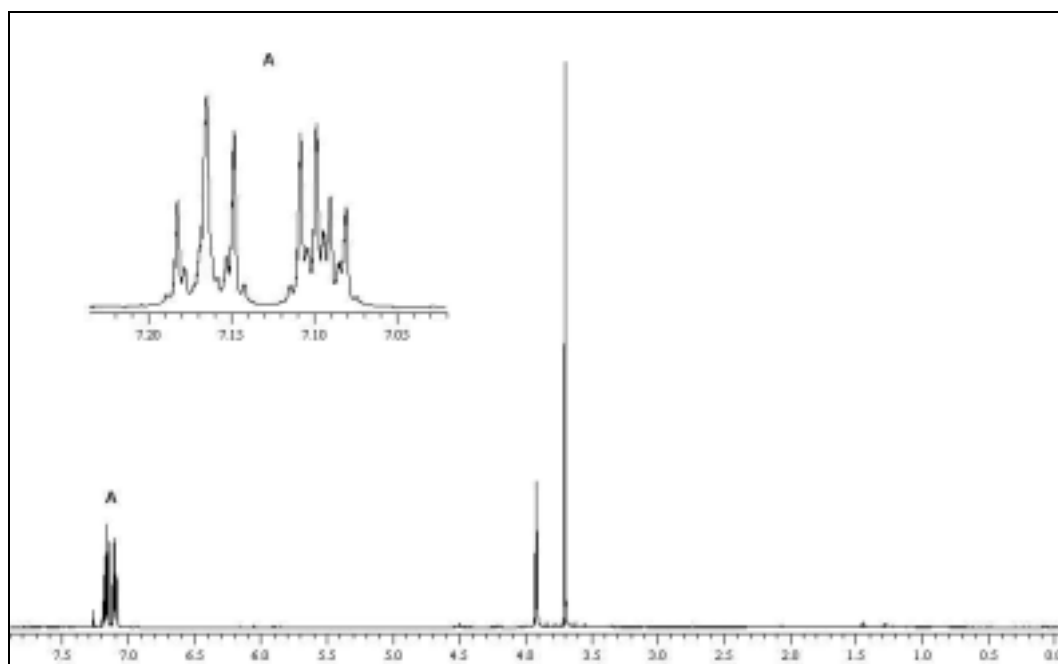


Abbildung 193: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) von **77**

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3750–3250 (Oberschwingung der C=O-Valenz); 2970 (C-H-Valenz), 1706 (C=O-Valenz im 6-Ring-Imid); 1507 (C=C-Valenz im Aromaten); 1347.

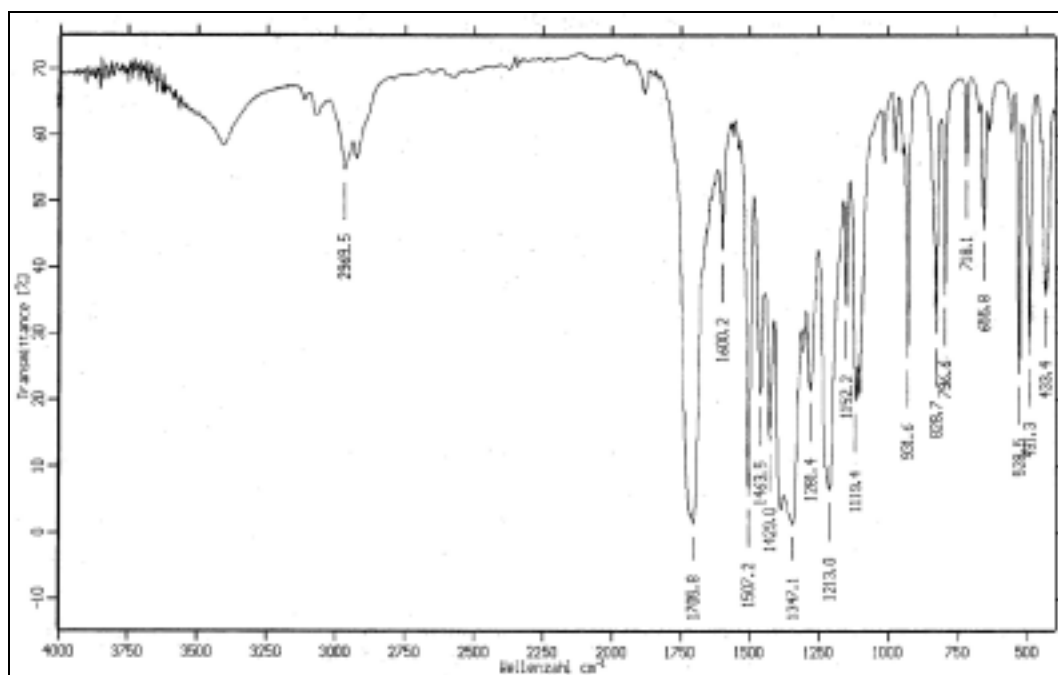
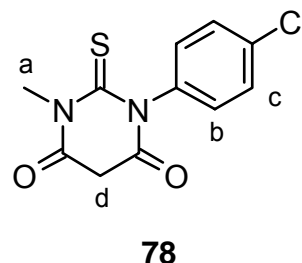


Abbildung 194: IR-Spektrum (KBr) von **77**

6.60 V57: 1-(4-Chlorphenyl)-3-methyl-4,6-dioxo- 2-thioxoperhydropyrimidin (78)

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.52, Seite 253 werden 2.10 g (91.3 mmol) Natrium in 50 ml Ethanol, 9.00 g (44.8 mmol) 1-(4-Chlorphenyl)-3-methylthioharnstoff **65** und 14.4 g (89.9 mmol) Diethylmalonat während 96 h umgesetzt. Wasserzugabe: 100 ml. Das Rohprodukt wird aus Ethanol umkristallisiert.



Ausbeute: 6.08 g (22.6 mmol, 50 %)
leicht gelblicher Feststoff,
sehr feine nadelförmige Kristalle
Lit.: nicht bekannt
 $C_{11}H_9ClN_2O_2S$ $MM = 268.72 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Schmelzpunkt: 174–175 °C (ab 148 °C Sublimation)
Lit.: nicht bekannt

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz):

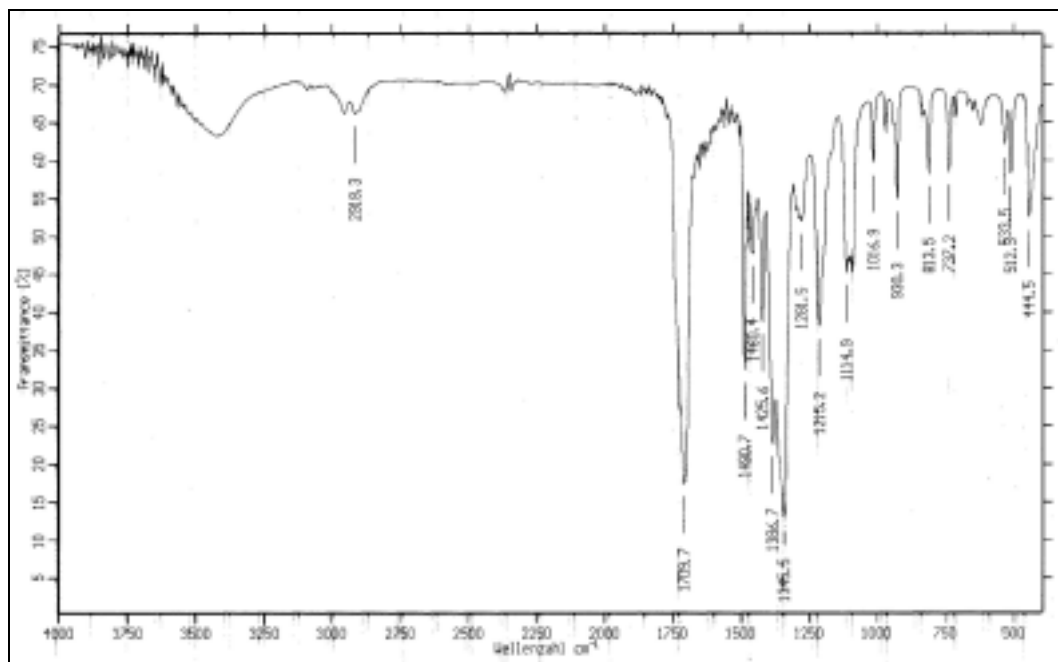
δ [ppm] = 3.70 (s, 3 H, a); 3.93 (s, 2 H, d); 7.07 (A-Teil des $[\text{AX}]_2$ -Systems, 2 H, b); 7.46 (X-Teil des $[\text{AX}]_2$ -Systems, 2 H, c).

(Abbildung des Spektrums siehe Kapitel 4.3.3.1, Seite 108)

MS (EI); m/z (%): 270 (42) $[\text{M}^+(\text{}^{37}\text{Cl})]$, 269 (30) $[\text{M}^+(\text{}^{37}\text{Cl}), -\text{H}]$, 268 (100) $[\text{M}^+(\text{}^{35}\text{Cl})]$, 267 (49) $[\text{M}^+(\text{}^{35}\text{Cl}), -\text{H}]$, 169 (13) $[\text{}^{35}\text{Cl-Ph-NCS}^+]$; 153 (82) $[\text{}^{35}\text{Cl-Ph-NCO}^+]$, 83 (84).

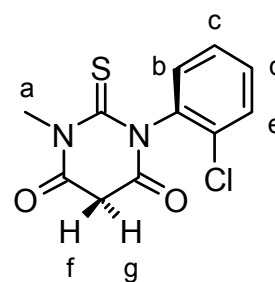
IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3750–3250 (Oberschwingung der C=O-Valenz und H_2O aus KBr); 2969, 2918 (C-H-Valenz), 1710 (C=O-Valenz im 6-Ring-Imid); 1491; 1346.

Abbildung 195: IR-Spektrum (KBr) von **78**

6.61 V58: 1-(2-Chlorphenyl)-3-methyl-4,6-dioxo-2-thioxoperhydropyrimidin (**79**)

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.52, Seite 253 werden 2.10 g (91.4 mmol) Natrium in 50 ml Ethanol, 9.00 g (44.8 mmol) 1-(2-Chlorphenyl)-3-methylthioharnstoff **66** und 14.4 g (89.9 mmol) Diethylmalonat während 96 h umgesetzt. Man gibt 100 ml Wasser hinzu, nach Entfernen des Ethanol wird auf 100 ml mit

**79**

Wasser aufgefüllt. Das Rohprodukt fällt aus ethanolischer Lösung im Tiefkühlschrank (-20 °C) aus. Eventuell muß bei geringer Ausbeute an Kristallen etwas eingeeengt werden.

Ausbeute: 7.24 g (26.9 mmol, 60 %)
gelber Feststoff, transparente tafelförmige Kristalle
Lit.: nicht bekannt
 $C_{11}H_9ClN_2O_2S$ MM = 268.72 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 168–170 °C

Lit.: nicht bekannt

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz):

δ [ppm] = 3.71 (s, 3 H, a); 3.91 (d, 1 H, $^2J_{f,g} = 21.6$ Hz, f oder g); 3.97 (d, 1 H, $^2J_{f,g} = 21.6$ Hz, f oder g); 7.19–7.24 (A-Teil des ABCD-Systems, 1 H, e); 7.37–7.43 (B- und C-Teil des ABCD-Systems, 2 H, c+d); 7.50–7.54 (D-Teil des ABCD-Systems, 1 H, e).

(Abbildung des Spektrums siehe Kapitel 4.3.3.2, Seite 110)

MS (EI); m/z (%): 270 (27) [M^+ , + H], 233 (29) [M^+ , - HCl], 224 (100), 178 (88).

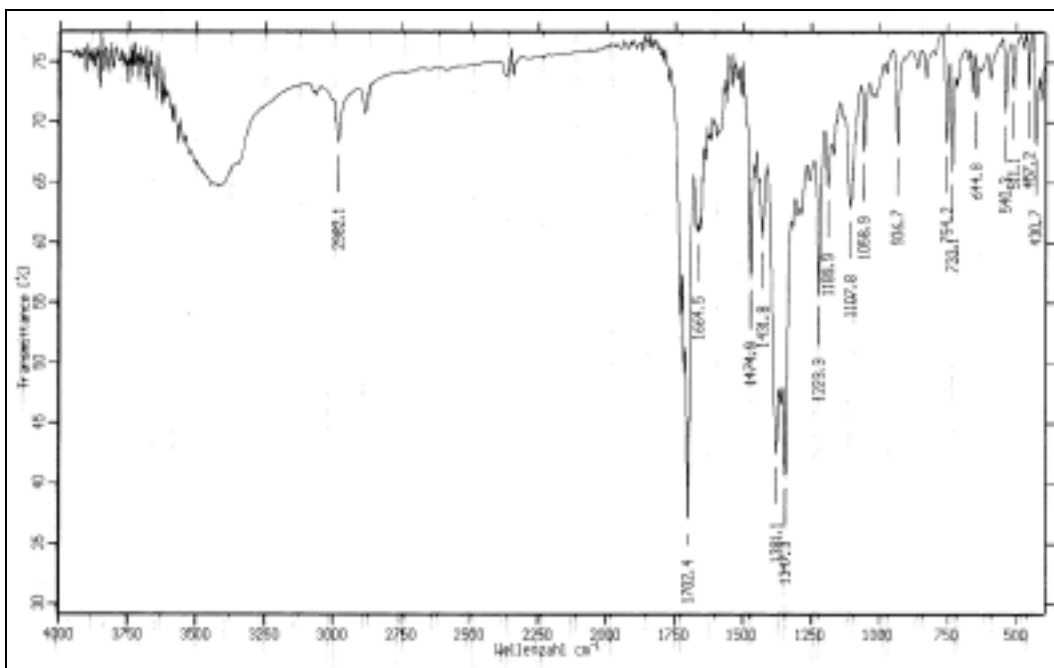


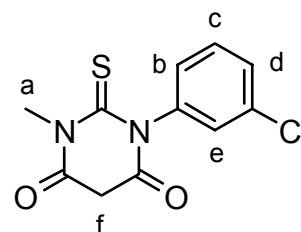
Abbildung 196: IR-Spektrum (KBr) von **79**

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3750 – 3250 (Oberschwingung der C=O-Valenz und H_2O aus KBr); 2982 (C-H-Valenz), 1702 (C=O-Valenz im 6-Ring-Imid); 1664 (C=C-Valenz im Aromaten); 1347; 754, 733 (=C-H-Deformation, 1,2-Disubstitution am Aromaten).

6.62 V59: 1-(3-Chlorphenyl)-3-methyl-4,6-dioxo-2-thioxoperhydropyrimidin (80)

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.52, Seite 253 werden 2.10 g (91.4 mmol) Natrium in 50 ml Ethanol, 9.00 g (44.8 mmol) 1-(3-Chlorphenyl)-3-methylthioharnstoff **67** und 14.4 g (89.9 mmol) Diethylmalonat während 144 h umgesetzt. Zum Lösen und nach Entfernen des

**80**

Ethanol werden jeweils 100 ml Wasser zugegeben. Das Rohprodukt wird aus Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 6.82 g (25.4 mmol, 57 %)

leicht gelblicher Feststoff,

transparente tafelförmige Kristalle

Lit.: nicht bekannt

$C_{11}H_9ClN_2O_2S$

MM = 268.72 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 215–216 °C (ab 158 °C Sublimation)

Lit.: nicht bekannt

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 500 MHz):

δ [ppm] = 3.57 (s, 3 H, a); 7.14–7.25 (A-Teil des ABCD-Systems (ddd), 1 H, $3J_{d,c} = 7.4$ Hz, $^4J_{d,b} \approx ^4J_{d,e} = 1.7$ Hz, d); 7.26–7.40 (B-Teil des ABCD-Systems, 1 H, e); 7.40–7.55 (C- und D-Teil des ABCD-Systems, 2 H, $^3J_{c,b} = ^3J_{c,d} = 8.0$ Hz, $^4J_{b,d} \approx ^4J_{b,e} = 1.7$ Hz, c+b).

Durch die Verwendung von DMSO als Lösungsmittel können die aciden Protonen f nicht mehr detektiert werden.

MS (EI); m/z (%): 270 (39) [$M^+(^{37}Cl)$], 269 (41) [$M^+(^{37}Cl), - H$], 268 (100) [$M^+(^{35}Cl)$], 267 (71) [$M^+(^{35}Cl), - H$], 169 (18) [$^{35}Cl-Ph-NCS^+$]; 153 (51) [$^{35}Cl-Ph-NCO^+$], 111 (23) [$^{35}Cl-C_6H_4^+$], 83 (97).

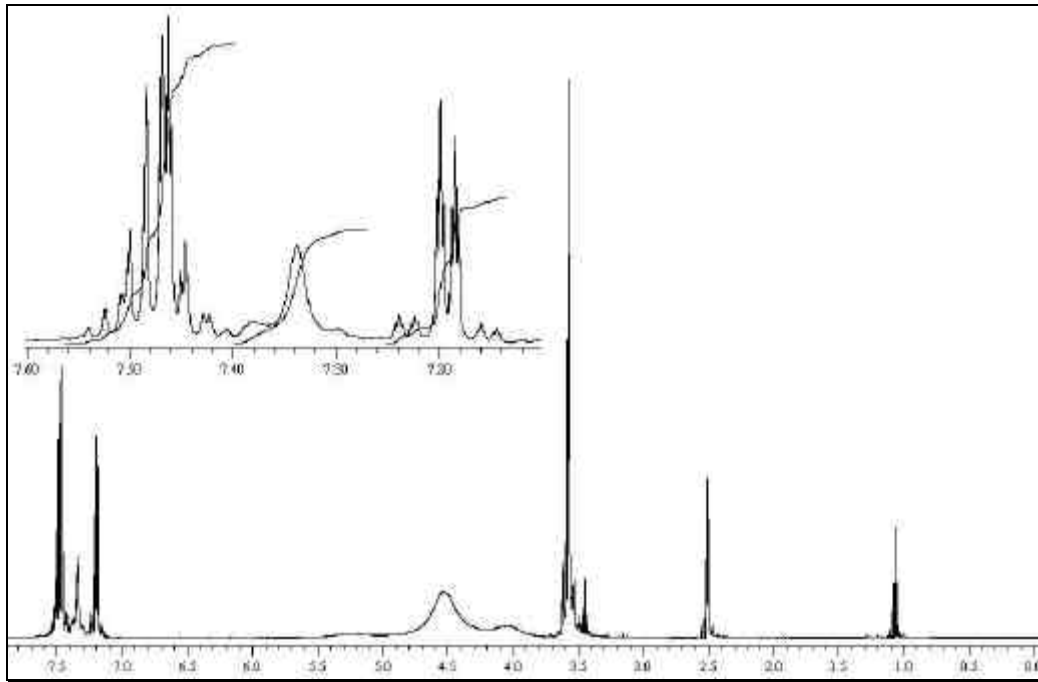


Abbildung 197: $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 500 MHz) von **80** [ppm]

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3750 – 3250 (Oberschwingung der C=O-Valenz und H_2O aus KBr); 2969, 2891 (C-H-Valenz), 1701 (C=O-Valenz im 6-Ring-Imid); 1586 (C=C-Valenz im Aromaten); 1349.

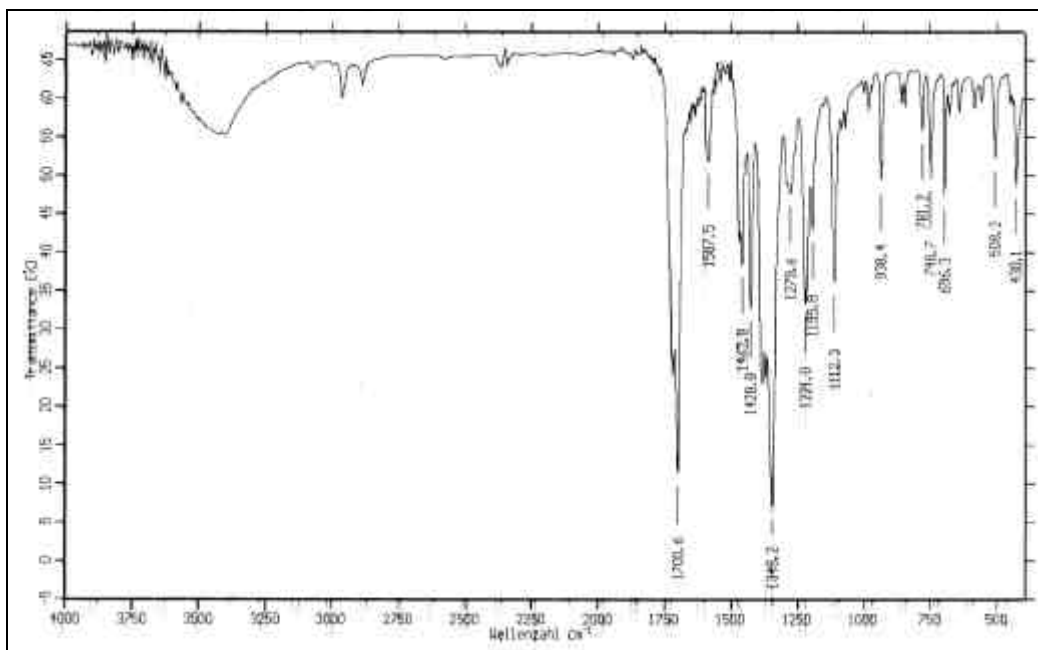
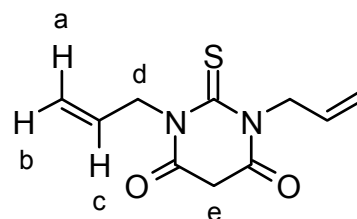


Abbildung 198: IR-Spektrum (KBr) von **80**

6.63 V60: 1,3-Diallyl-4,6-dioxo-2-thioxoperhydro-pyrimidin (81)

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.52, Seite 253 werden 2.10 g (91.4 mmol) Natrium in 45 ml Ethanol, 7.00 g (44.8 mmol) 1,3-Diallylthioharnstoff **69** und 14.4 g (89.9 mmol) Diethylmalonat während 96 h umgesetzt. Zum Lösen werden 60 ml



81

Wasser zugegeben, nach Entfernen des Ethanols werden nochmals 140 ml Wasser zugefügt. Das Rohprodukt fällt über Nacht aus. Die Umkristallisation erfolgt aus Ethanol.

Ausbeute: 2.27 g (10.1 mol, 23 %)

farblose Kristalle

Lit.: nicht bekannt

$C_{10}H_{12}N_2O_2S$

MM = 224.28 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 140-142 °C

Lit.: nicht bekannt

¹H-NMR ([CDCl₃, 200 MHz):

δ [ppm] = 3.77 (s, 2 H, e); 4.99 (ddd, 4 H, ³J_{d,c} = 5.9 Hz, ⁴J_{d,b} ≈ ⁴J_{d,a} = 1.3 Hz, d); 5.23 (ddt, 2 H, ³J_{a,c} = 10.1 Hz, ²J_{a,b} = 1.3 Hz, ⁴J_{a,d} = 1.2 Hz, a); 5.28 (ddt, 2 H, ³J_{b,c} = 17.2 Hz, ²J_{b,a} = 1.3 Hz, ⁴J_{b,d} = 1.4 Hz, b); 5.87 (ddt, 2 H, ³J_{c,b} = 17.2 Hz, ³J_{c,a} = 10.2 Hz, ³J_{c,d} = 5.8 Hz, c).

MS (EI); m/z (%): 224 (75) [M⁺], 209 (100) [M⁺, - NH, vgl. V49, Kapitel 6.51, Seite 251], 41 (92) [⁺CH₂-CH=CH₂].

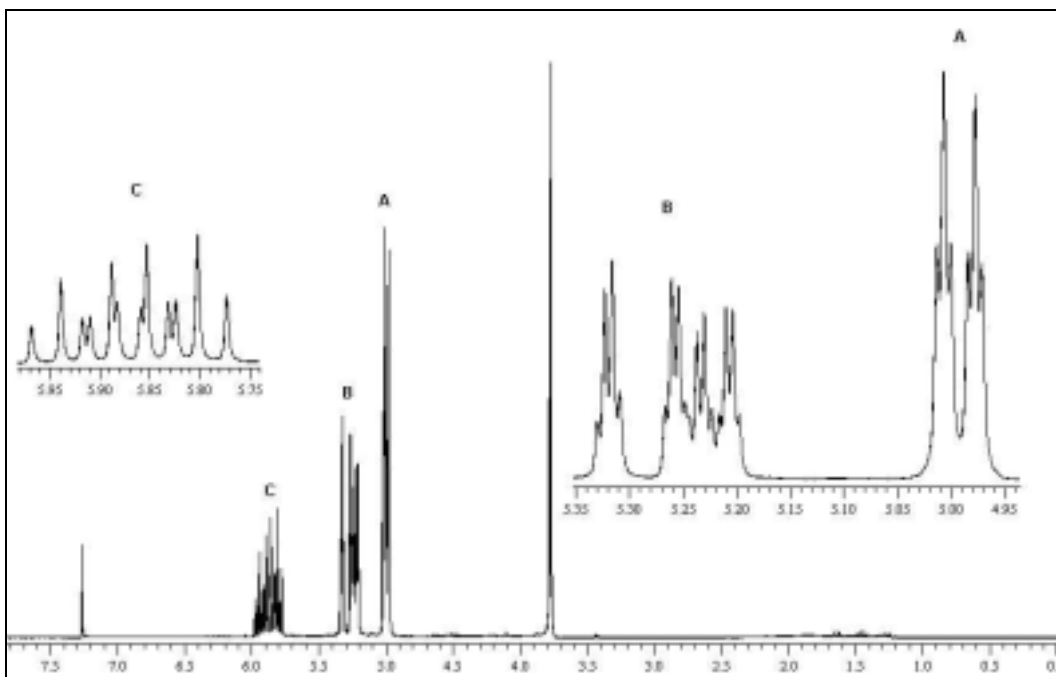


Abbildung 199: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) von **81** (Skala ppm)

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3086 (C-H-Valenz der Protonen a und b), 1705 (C=O-Valenz im 6-Ring-Imid); 1396.

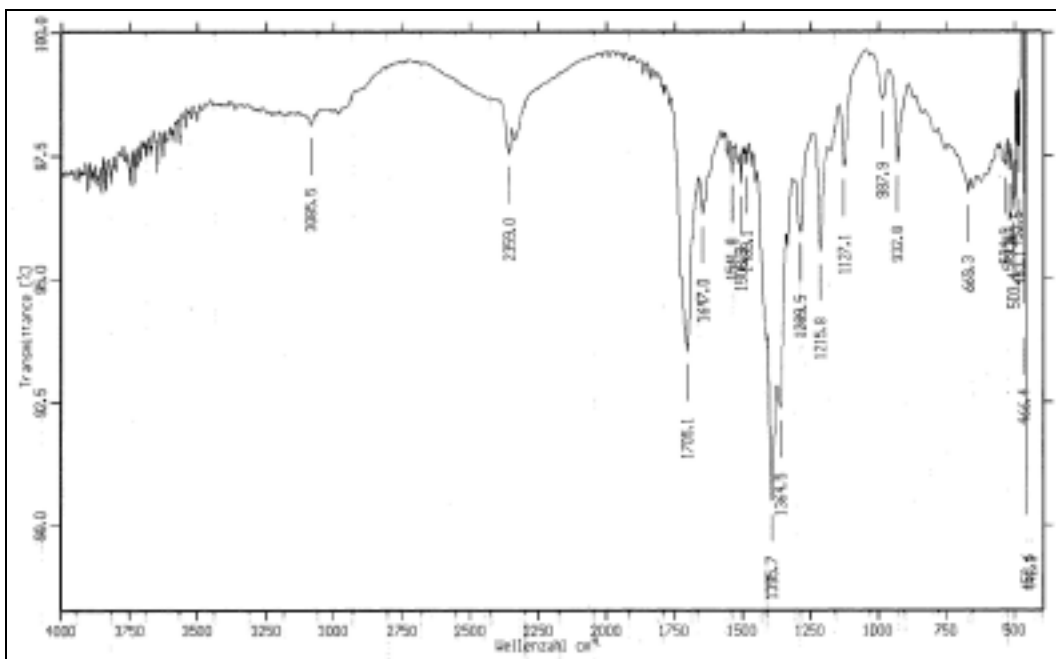


Abbildung 200: IR-Spektrum (KBr) von **81**

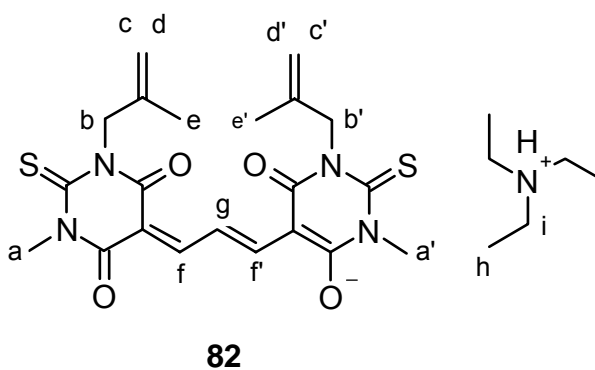
6.64 Allgemeine Darstellung der Oxonole

Thiobarbitursäure und Malonaldehyd-bisphenylimin-hydrochlorid (MABPI) werden im Stoffmengenverhältnis 2 zu 1 in der Siedehitze in Methanol gelöst. Man gibt die dreifache Stoffmenge (bezogen auf MABPI) Triethylamin hinzu und rührt noch einige Zeit unter Rückfluß. Man läßt auf Raumtemperatur kommen und gibt das gleiche Volumen Wasser hinzu. Durch Ansäuern mit Salzsäure (pH 0 bis 1) fällt das Oxonol. Nach Filtration wird mehrfach in Dichlormethan gelöst oder suspendiert und das Lösungsmittel entfernt. Dadurch wird etwaig vorhandenes Wasser herausgeschleppt und das Rohprodukt leichter verarbeitbar. Die Reinigung erfolgt durch Umkristallisation oder durch Säulenchromatographie an Kieselgel 60 (Dichlormethan/Methanol = 8:1).

6.65 V61: DiSBAC_{1,(2-Methylallyl)}(3) (82)

Darstellung von Triethylammonium-1-methyl-3-(2-methylallyl)-5-{3-[1-methyl-3-(2-methylallyl)-4,6-dioxo-2-thioxoperhydropyrimidin-5-yliden]propenyl}-6-oxo-2-thioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-olat

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.64, Seite 275 werden 2.10 g (9.89 mmol) 1-Methyl-3-(2-methylallyl)-4,6-dioxo-2-thioxoperhydropyrimidin **71**, 1.30 g (5,02 mmol)



MABPI und 1.50 g (14.8 mmol) Triethylamin in 20 ml Methanol während 60 min umgesetzt. Das Rohprodukt fällt als klebrig-zäher Feststoff. Die Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie. Das Eluat wird vom Lösemittel befreit und der Feststoff in Chloroform gelöst. In der Siedehitze gibt man solange n-Hexan hinzu, bis der Feststoff ausfällt und läßt abkühlen.

Ausbeute: 1.08 g (1.92 mmol, 39 %)
 schwarzrote Kristalle mit grüner Reflexion
 Lit.: nicht bekannt
 $C_{27}H_{39}N_5O_4S_2$ MM = 561.75 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 175-177 °C
 Lit.: nicht bekannt

MS (FAB + NBA); m/z (%): 483 (4) [M⁺, - NEt₃, + Na⁺]; 102 (60) [HNEt₃⁺].

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz):

δ [ppm] = 1.32 (t, 9 H, ³J_{h,i} = 7.3, h); 1.81 (s, 6 H, e); 3.28 (q, 6 H, ³J_{h,i} = 7.3, i); 3.76 (s, 6 H, a); 4.54 (s, 2 H, c oder d); 4.80 (s, 2 H, c oder d); 5.03 (s, 4 H, b); 8.20 (d, 2 H, ³J_{f,g} = 13.9 Hz, f); 8.62 (t, 1 H, ³J_{g,f} = 14.1 Hz, g).

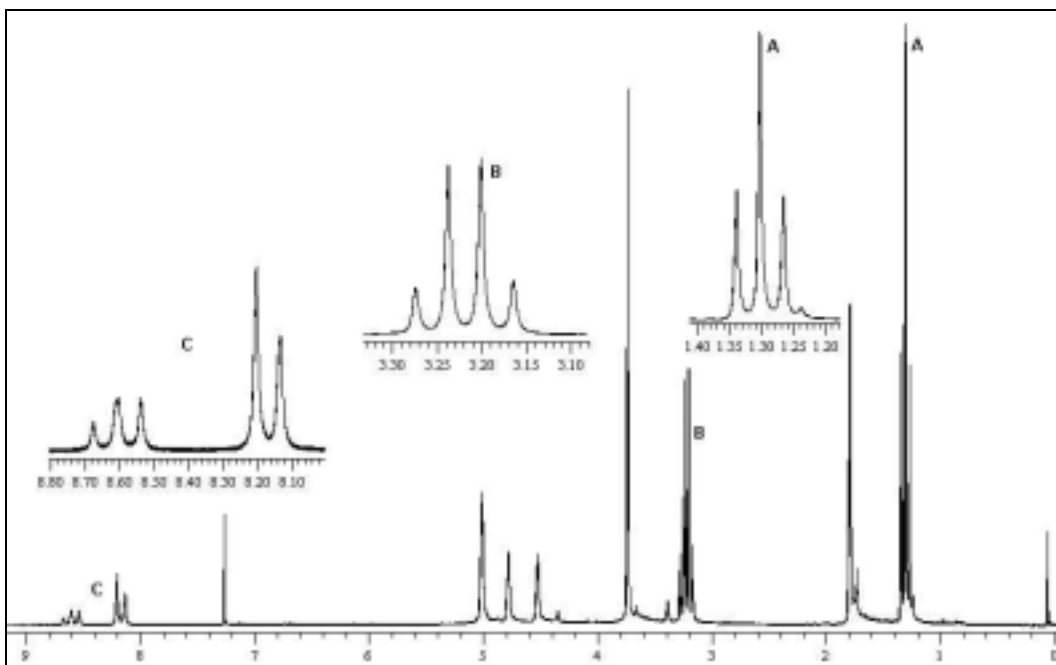
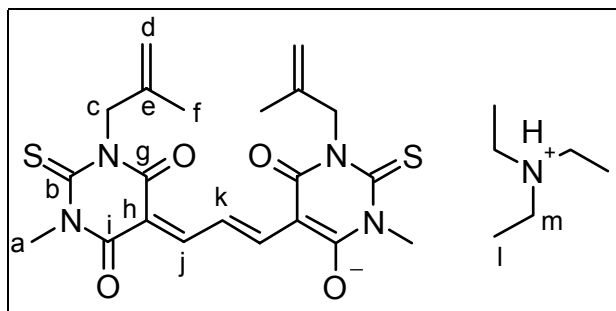


Abbildung 201: ¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz) von **82**

Abbildung 202: **82**, Benennung für ^{13}C -NMR

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , 300 MHz):

δ [ppm] = 8.8 (l); 20.8 (f); 35.6 (a); 46.3 (m); 52.0 (c); 102.4 (b); 108.4 (d); 119.1 (k), 140.0 (e); 161.2 (j); 161.7 (g oder i); 162.1 (g oder i); 179.0 (h).

Die Zuordnung der C-Atome g, i, h, e und b zu den Signalen kann zwar nicht aus dem $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -Korrelationsspektrum erfolgen, sie ergibt sich jedoch indirekt aus Vergleich mit dem Spektrum von **83** (siehe Kapitel 6.66, Seite 278); dort existieren Peaks mit sehr ähnlichen Verschiebungen wie bei Substanz **82**, die von den C-Atomen b, g, i, und h stammen müssen.

Die Zuordnung erfolgt anhand folgender Überlegung: g und i müssen sehr ähnliche Verschiebungen aufweisen, da sie eine sehr ähnliche Umgebung haben. Das C-Atom h dürfte wegen der zwei Carbonyl-Substituenten eine sehr geringe Elektronendichte aufweisen, was für eine sehr starke Tieffeldverschiebung spricht; b dagegen könnte wegen zwei Substituenten mit +M-Effekt eine etwas höhere Elektronendichte aufweisen.

Das Signal für e existiert bei **83** nicht und kann daher mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit richtig zugeordnet werden.

UV-VIS (DMSO):

λ_{max} (ϵ): 541 nm ($147\,300\ \text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$); $\log \epsilon = 5.17$

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] 3750–3250 (Oberschwingung der C=O-Valenz und H-O-Valenz); 2940 (C-H-Valenz); 1637 (C=O-Valenz, in disubstituierten Amiden); 1361 (H-O-Deformation); 1152 (S=C-Valenz, Amid I).

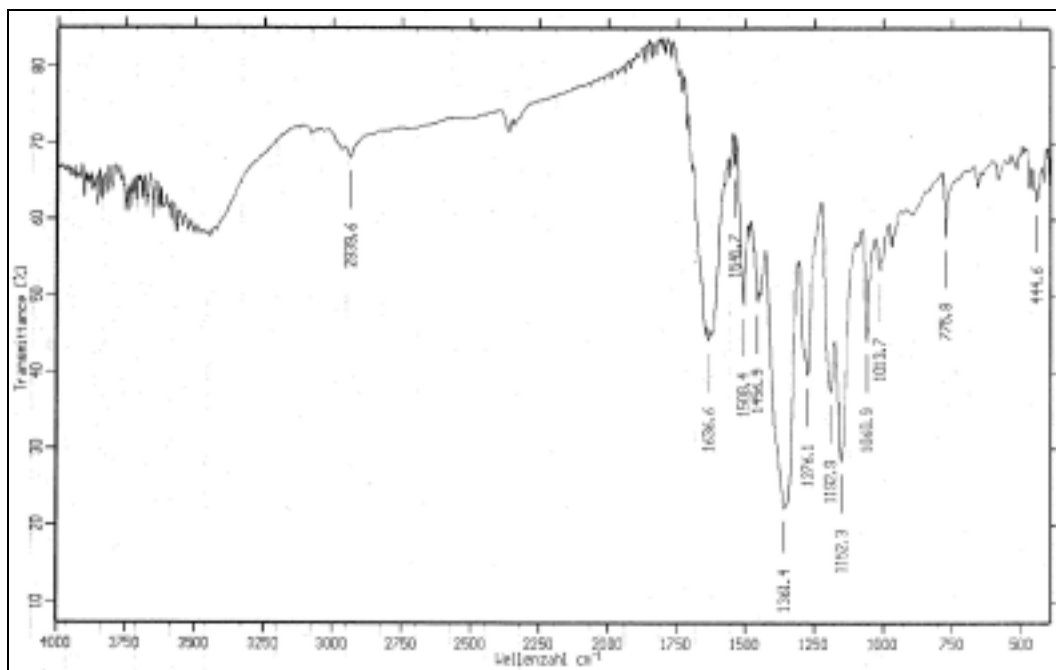
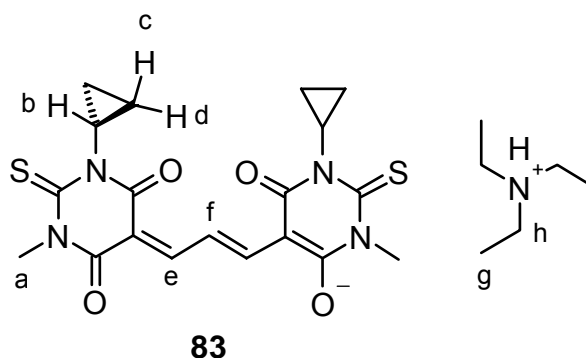


Abbildung 203: IR-Spektrum (KBr) von **82**

6.66 V62: DiSBAC_{1,Cyclopropyl}(**3**) (**83**)

Darstellung von Triethylammonium-1-cyclopropyl-5-[3-(1-cyclopropyl-3-methyl-4,6-dioxo-2-thioxoperhydropyrimidin-5-yliden)propenyl]-3-methyl-6-oxo-2-thioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-olat

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.64, Seite 275 werden 2.00 g (10.1 mmol) 1-Cyclopropyl-3-methyl-4,6-dioxo-2-thioxoperhydropyrimidin **72**, 1.30 g (5.02 mmol) MABPI und



1.50 g (14.8 mmol) Triethylamin in 40 ml Methanol während 60 min umgesetzt. Die Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie.

Ausbeute: 1.21 g (2.26 mmol, 45 %)
 schwarzrote Kristalle mit grüner Reflexion
 Lit.: nicht bekannt
 $C_{25}H_{35}N_5O_4S_2$ MM = 533.72 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: > 350 °C
 Lit.: nicht bekannt

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz):

δ [ppm] = 0.80–0.86 (A-Teil des [AB]₂M-Systems, 2 x 2 H, c oder d);
 1.16–1.28 (B-Teil des [AB]₂M-Systems, 2 x 2 H, c oder d); 1.38 (t, 9 H,
³J_{g,h} = 7.3 Hz, g); 2.76–2.88 (M-Teil des [AB]₂M-Systems, 2 x 1 H, b);
 3.34 (q, 6 H, ³J_{h,g} = 7.3 Hz, h); 3.72 (s, 2 x 3 H, a); 8.15 (d, 2 x 1 H,
³J_{e,f} = 13.9 Hz, e); 8.56 (t, 1 H, ³J_{f,e} = 13.8 Hz, f).

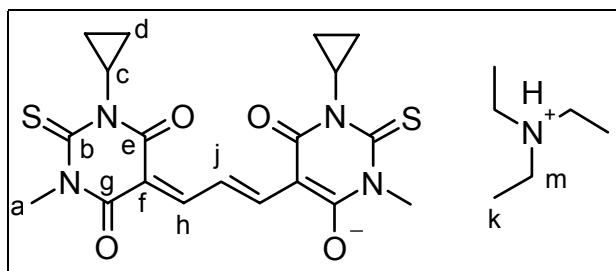


Abbildung 204: Substanz **83**, Benennung für ¹³C-NMR

¹³C{¹H}-NMR (CDCl₃, 300 MHz):

δ [ppm] = 8.9 (k); 12.7 (d); 31.2 (c); 34.9 (a); 46.4 (m); 103.0 (b); 118.5 (j); 160.6 (h); 162.4 (e oder g); 163.1 (e oder g); 180.7 (f).

Die C-Atome b, e, g und f, die nicht über das ¹H/¹³C-Korrelationspektrum identifiziert werden können, werden durch Vergleich mit den anderen Oxonolen identifiziert. Da die Reste an den Stickstoffatomen nur relativ geringen Einfluß auf die Verschiebung dieser Kerne haben, sind die δ-Werte für diese C-Atome in allen Oxonolen sehr ähnlich. Die Zuordnung erfolgt durch Vergleich mit Substanz **82** (siehe Kapitel 6.64, Seite 275).

MS (FAB, + NBA); m/z (%): 455 (M⁺, - NEt₃, + Na).

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3750–3250 (Oberschwingung der C=O-Valenz und H-O-Valenz); 2942 (C-H-Valenz); 1637 (C=O-Valenz in disubstituierten Amiden); 1374, 1327 (H-O-Deformation); 1159 (S=C-Valenz, Amid I).

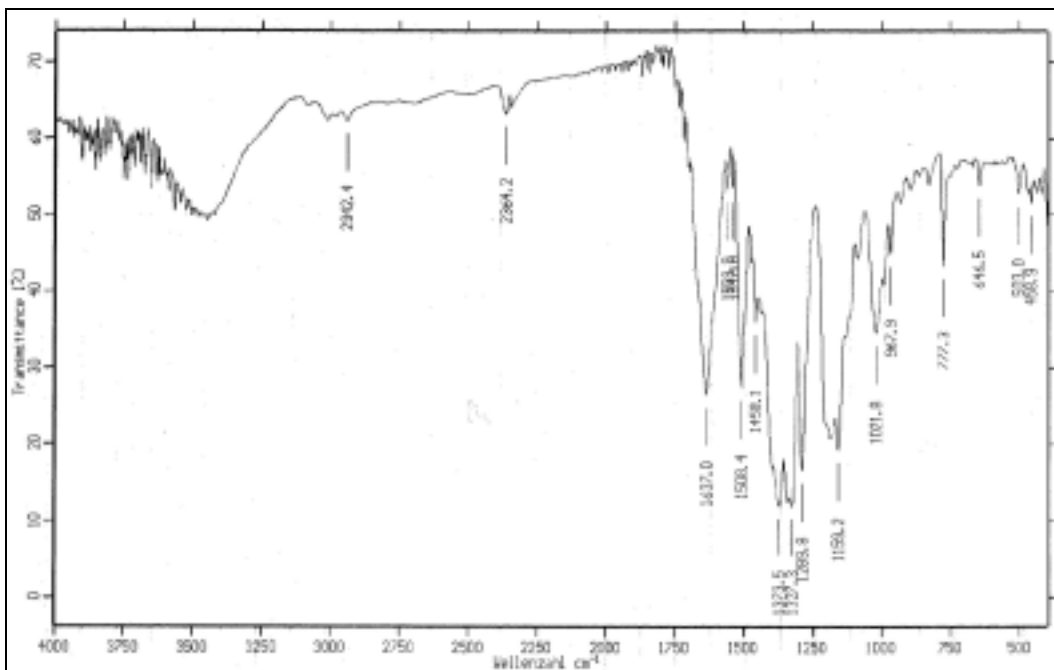


Abbildung 205: IR-Spektrum (KBr) von **83**

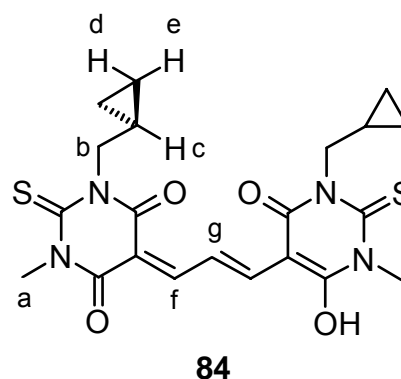
UV-VIS (DMSO):

λ_{max} (ϵ): 538 nm ($195\,700 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$); $\log \epsilon = 5.29$

6.67 V63: DiSBAC_{1,Cyclopropylmethyl}(3) (84)

Darstellung von 1-Cyclopropylmethyl-5-[3-(3-Cyclopropylmethyl-6-hydroxy-1-methyl-4-oxo-2-thio-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)-allyliden]-3-methyl-2-thio-(1*H*,5*H*)-2,3-dihydropyrimidin-4,6-dion

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.64, Seite 275 werden 2.10 g (9.89 mmol) 1-Cyclopropylmethyl-3-methyl-4,6-dioxo-2-thioxoperhydropyrimidin **73**, 1.30 g (5.02 mmol) MABPI und 1.50 g (14.8 mmol) Triethylamin in 22 ml Methanol während 60 min umgesetzt. Das Rohprodukt wird durch Umkristallisation aus Ethanol gereinigt, dann in der Trockenpistole getrocknet (20 hPa, 50 °C).



Für höhere Reinheit wird säulenchromatographisch gereinigt. Aus 100 mg erhält man nach Säulenchromatographie 57 mg sehr reines Produkt.

Ausbeute: 2.16 g (4.69 mmol, 93%)

schwarzrote Kristalle

Lit.: nicht bekannt

$C_{21}H_{24}N_4O_4S_2$

MM = 460.58 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 116 °C

Lit.: nicht bekannt

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 300 MHz):

δ [ppm] = 0.37–0.50 (m, 8 H, d+e); 1.42 (m, 2 H, c); 3.63 (s, 6 H, a); 4.33 (d, 4 H, ³J_{b,c} = 5.9 Hz, b); 7.94 (d, 2 H, ³J_{f,g} = 13.7 Hz, f); 8.80 (dd, 1 H, ³J_{g,f} = 13.6 Hz).

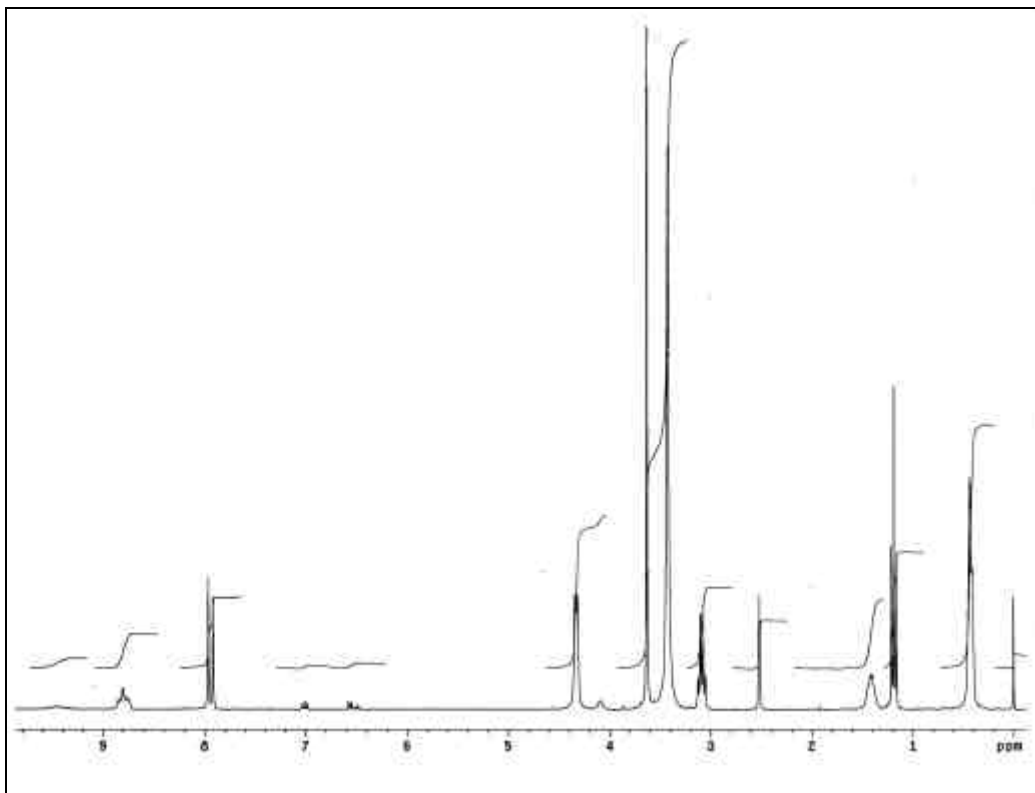


Abbildung 206: ^1H -NMR ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 300 MHz) von **84**

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 300 MHz):

δ [ppm] = 3.5 (e+f); 9.6 (d); 35.1 (a); 50.7 (c); 101.6 (b); 119.0 (k);
128.7 (g); 159.8 (j); 161.4 (i); 178.6 (h).

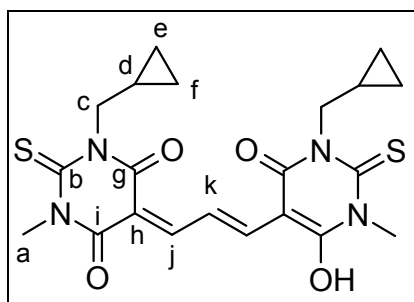


Abbildung 207: Substanz **84**, Benennung für ^{13}C -NMR

Die C-Atome b, g, i und h, die nicht über das $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -Korrelationspektrum identifiziert werden können, werden durch Vergleich mit den anderen Oxonolen identifiziert (vgl. **82**, **83**).

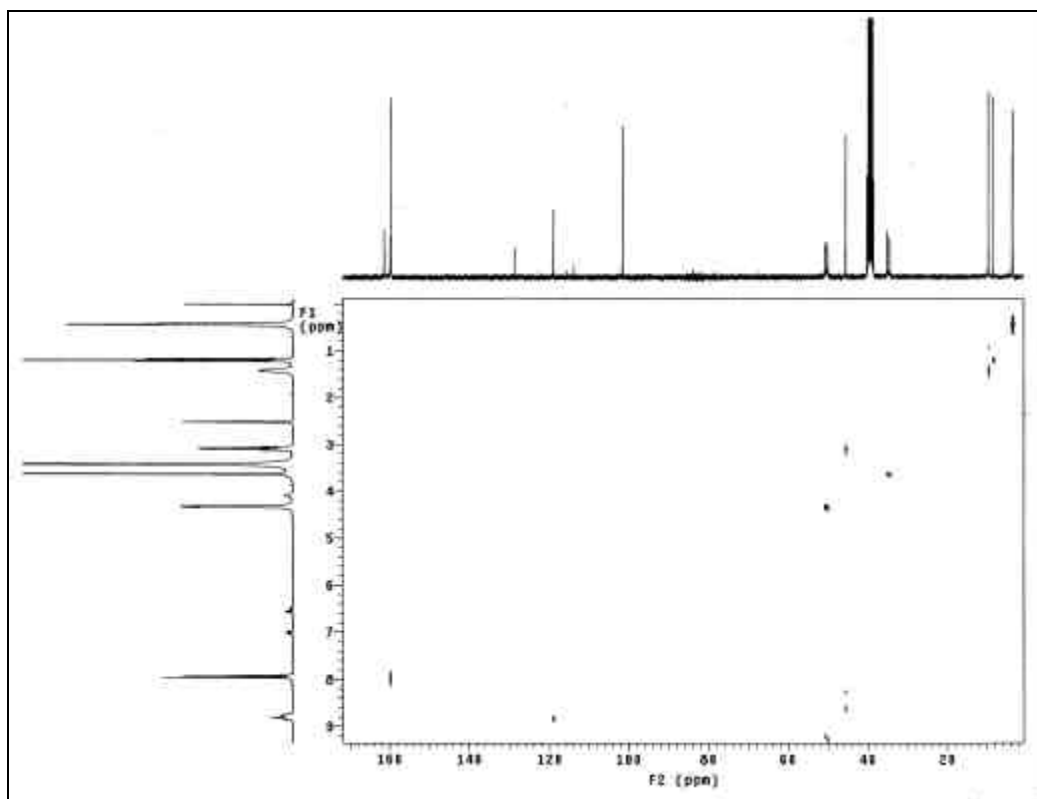


Abbildung 208: $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ -Korrelationsspektrum ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 300 MHz) von **84**

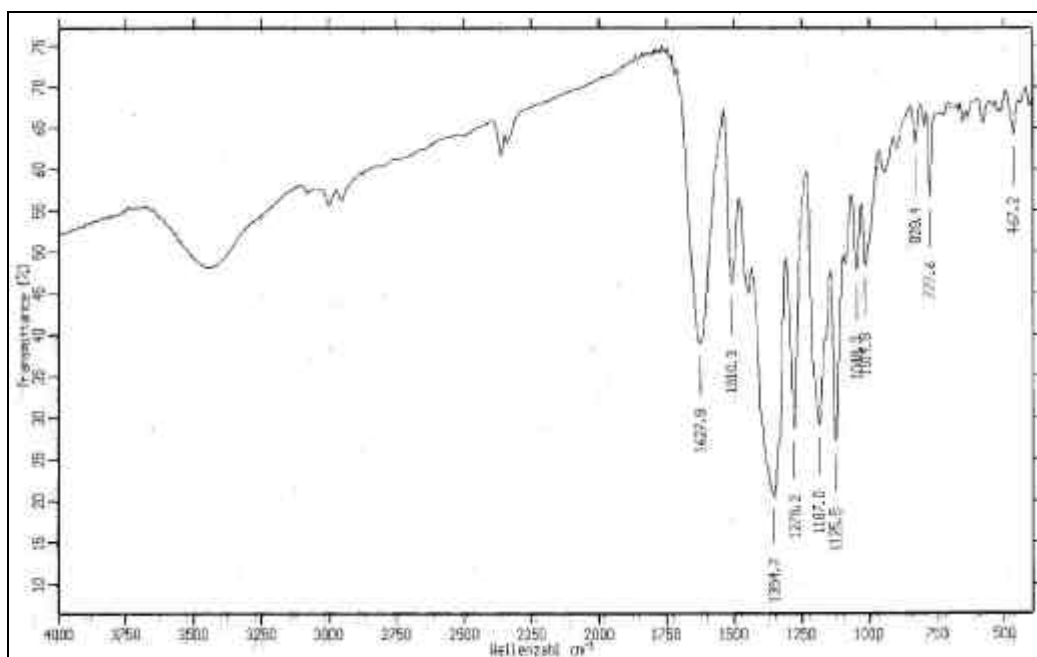


Abbildung 209: IR-Spektrum (KBr) von **84**

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = ca. 3750–3250 (H-O-Valenz); ca. 3000–2800 (C-H-Valenz, Alkylgruppen); 1628 (C=O-Valenz in disubstituierten Amiden); 1355 (H-O-Deformation); 1187 (C=S Amid I).

MS (Laserdesorptionsionisation); m/z (%): 459 (100) [Oxonolanion]

UV-VIS:

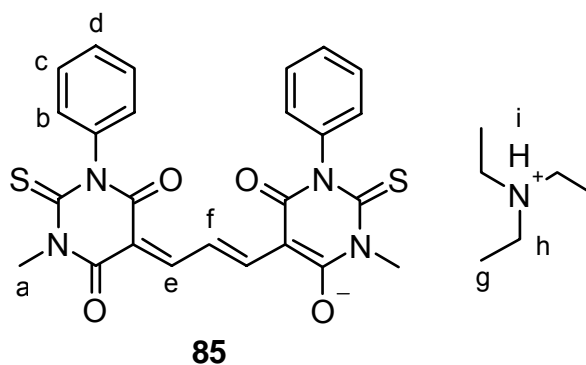
$\lambda_{\text{max, Ethanol}} (\epsilon)$: 537 nm ($169\,500 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$); $\log \epsilon = 5.23$

$\lambda_{\text{max, Dimethylsulfoxid}} (\epsilon)$: 541 nm ($147\,800 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$); $\log \epsilon = 5.17$

6.68 V64: DiSBAC_{1,Phenyl}(3) (85)

Darstellung von Triethylammonium-1-methyl-5-[3-(1-methyl-4,6-dioxo-3-phenyl-2-thioxoperhydropyrimidin-5-yliden)propenyl]-6-oxo-3-phenyl-2-thioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-olat

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.64, Seite 275 werden 2.34 g (9.99 mmol) 1-Methyl-4,6-dioxo-3-phenyl-2-thioxoperhydropyrimidin **74**, 1.30 g (5.02 mmol) MABPI und



1.50 g (14.8 mmol) Triethylamin in 40 ml Methanol während 60 min umgesetzt. Zur Reinigung wird aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 3.02 g (4.99 mmol, 99 %)

schwarzrote Kristalle mit grüner Reflexion

Lit.: nicht bekannt

$\text{C}_{31}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_2$

MM = $605.78 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Schmelzpunkt: 290 °C (bei 280 °C beginnt Sublimation)

Lit.: nicht bekannt

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO, 300 MHz):

δ [ppm] = 1.15 (t, 9 H, $^3J_{g,h} = 7.2$ Hz, g); 3.06 (dq, 6 H, $^3J_{h,g} = 7.2$ Hz, $^3J_{h,i} = 4.8$ Hz, h); 3.63 (s, 6 H, a); 7.11–7.17 (A-Teil des $[\text{AM}]_2\text{B}$ -Systems, 4 H, c); 7.31–7.43 (B- und M-Teil des $[\text{AM}]_2\text{B}$ -Systems, 6 H, b und d); 7.85–7.98 (d, 2 H, $^3J_{e,f} = 14.7$ Hz, e); 8.54–8.96 (t, 1 H, $^3J_{f,e} = 13.9$ Hz, f).

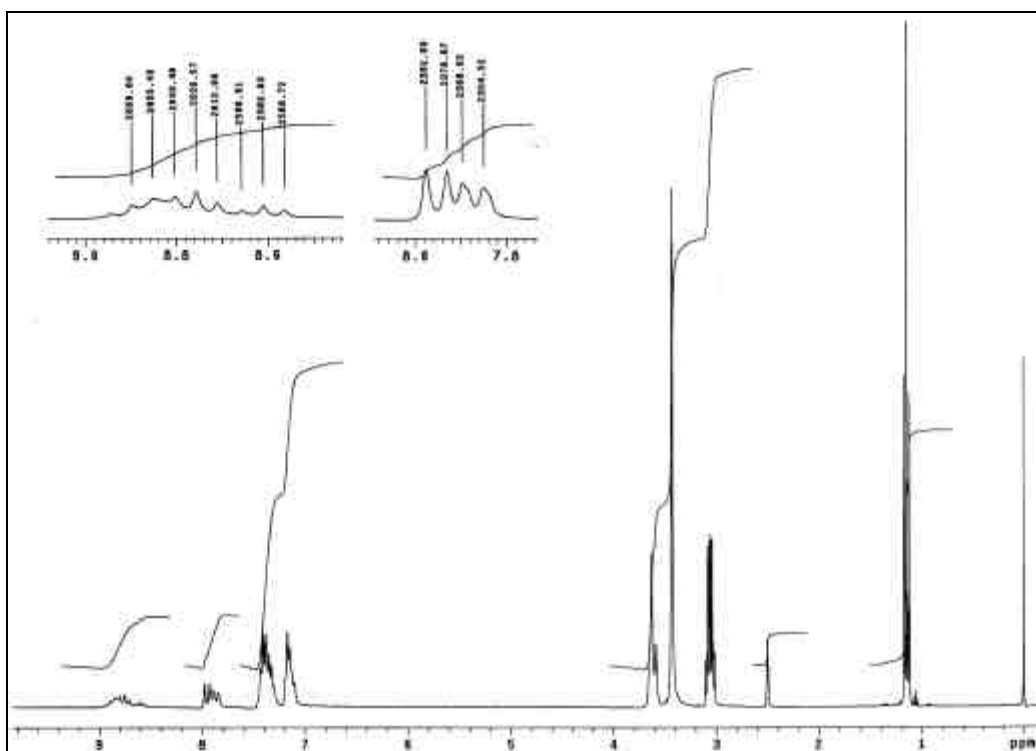


Abbildung 210: $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO, 300 MHz) von **85**

Es gibt theoretisch drei plausible verschiedene planare Stereoisomere des Oxonols **85** (siehe Abbildung 211). Zwei davon sind C_{2v} -symmetrisch, eines nur C_s -symmetrisch. In den C_{2v} -symmetrischen Oxonolen **85a** und **85b** sind die Nachbarprotonen von f (hier seien sie e und e' genannt, siehe Moleküldarstellung oben) homotop, daher zeigen sie zusammen nur ein Dublett durch Kopplung mit f, die Protonen f zeigen ein Triplett.

Im C_s -symmetrischen Oxonol **85c** sind die Nachbarprotonen von f diastereotop, somit ergibt sich ein Dublett vom Dublett für die Kopplung von f mit seinen Nachbarn e und e'. Die Protonen e und e' wiederum zeigen jeweils ein Dublett durch die Kopplung mit f. Da die Signale aber nicht stark gegeneinander verschoben sein dürften, zeigen sie sich als ein Multiplet. Die Stereoisomeren lassen sich mit den üblichen Methoden nicht trennen, dies erklärt die Vielzahl der Signale im Bereich von 7.8 bis 9.0 ppm im ^1H -NMR-Spektrum.

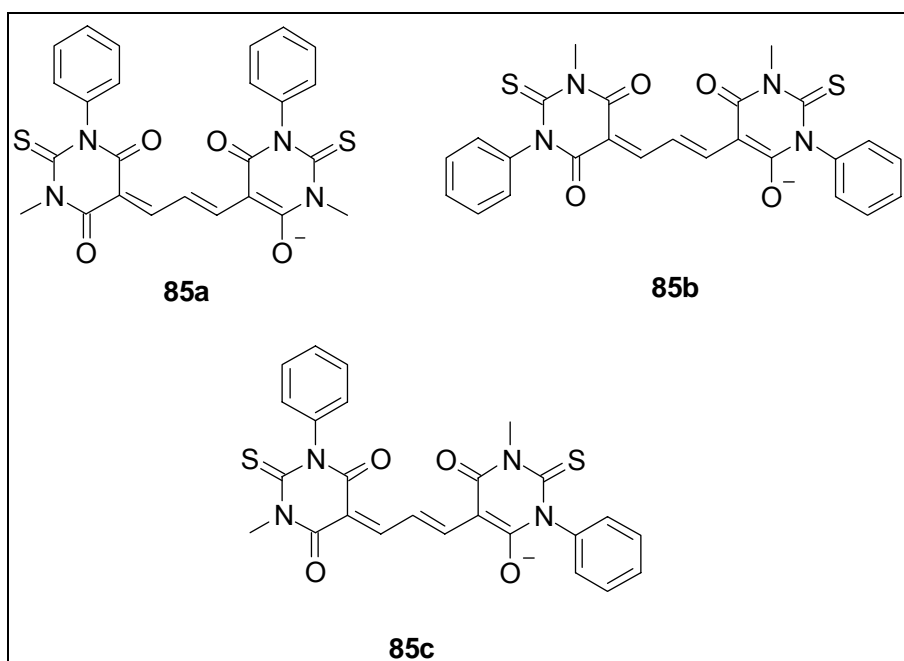
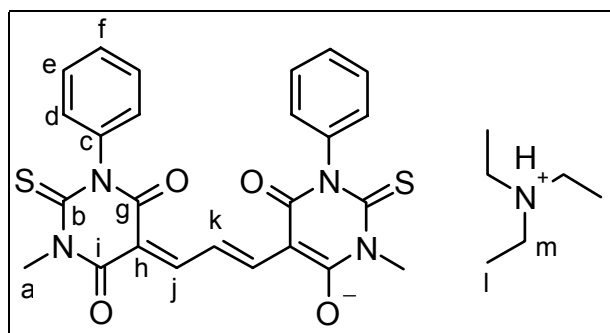


Abbildung 211: Mögliche isomere Formen von **85**

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CDCl_3 , 300 MHz):

δ [ppm] = 8.5 (l); 34.8 (a); 45.7 (m); 101.7 (b); 118.6 (k); 127.3 + 128.5 + 129.1 (c, d, e, f); 159.1–159.9 (j); 161.5 + 161.7 (g und i), 179.1 (h).

Die C-Atome b, g, i und h (siehe Abbildung 212), die nicht über das $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektrum identifiziert werden können, werden durch Vergleich mit den anderen Oxonolen identifiziert. Da die Reste an den Stickstoffatomen nur relativ geringen Einfluß auf die Verschiebung dieser Kerne haben, sind die δ -Werte für diese C-Atome in allen Oxonolen sehr ähnlich. Die Zuordnung erfolgt anhand der Überlegungen für **82**.

Abbildung 212: Benennung der C-Atome für das $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR von **85**

MS (Laserdesorptionsionisation); m/z (%): 501 (100) [Oxonolanion].

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3750–3250 (H-O-Valenz); 3039 (C-H-Valenz, Aromat); 1650 (C=O-Valenz in disubstituierten Amiden); 1509 (C=C-Valenz, Aromat); 1328 (H-O-Deformation); 1328, 1289 (O-H-Deformation); 1198, 1140 (C=S Amid I); 774 (C-H-Deformation, monosubstituierter Aromat).

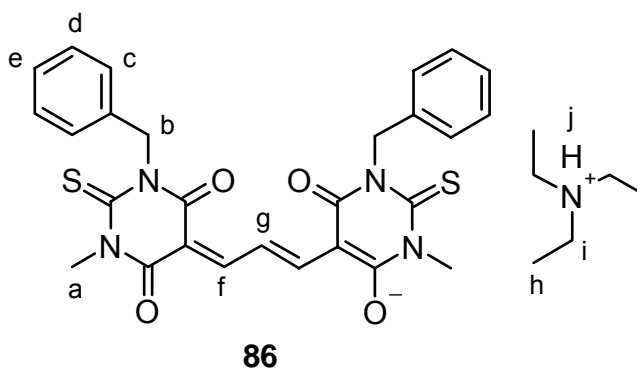
UV-VIS (DMSO):

λ_{max} (ϵ): 540 nm ($188\,700 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$); $\log \epsilon = 5.28$

6.69 V65: DiSBAC_{1,Benzyl}(3) (**86**)

Triethylammonium-1-benzyl-5-[3-(1-benzyl-3-methyl-4,6-dioxo-2-thioxoperhydropyrimidin-5-yliden)propenyl]-3-methyl-6-oxo-2-thioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-olat

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.64, Seite 275 werden 2.50 g (10.1 mmol) 1-Benzyl-3-methyl-4,6-dioxo-2-thioxoperhydropyrimidin **75**, 1.30 g



(5.02 mmol) MABPI und 1.50 g (15.0 mmol) Triethylamin in 40 ml Methanol während 60 min umgesetzt. Das Rohprodukt wird durch

Säulenchromatographie gereinigt, anschließend wird aus Methanol umkristallisiert. Die Trocknung erfolgt in der Trockenpistole (20 hPa, 50 °C).

Ausbeute: 1.18 g (1.86 mmol, 37 %)
 schwarzrote Kristalle mit grüner Reflexion
 Lit.: keine Angabe
 $C_{33}H_{39}N_5O_4S_2$ MM = 633.84 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 188–190 °C
 Lit.^[109]: 226–228 °C (als Pyridiniumsalz)

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz):

δ [ppm] = 1.01 (t, 9 H, ³J_{h,i} = 7.3 Hz, h); 2.00 (s, 4 H, b); 2.69 (q, 6 H, ³J_{i,h} = 7.3 Hz, i); 3.77 (s, 6 H, a); 5.77 (s, 4 H, b); 7.16–7.32 ([AM]₂B-System, 10 H, c, d, e); 8.22 (d, 2 H, ³J_{f,g} = 14.1 Hz, f); 8.54 (t, 1 H, ³J_{g,f} = 12.44 Hz, g).

(¹H-NMR-Spektrum siehe Abbildung 214, Seite 289)

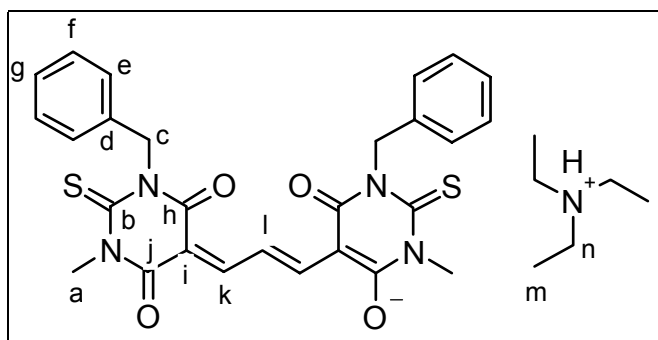


Abbildung 213: Benennung der C-Atome für das ¹³C{¹H}-NMR von **86**

¹³C{¹H}-NMR (CDCl₃, 300 MHz):

δ [ppm] = 8.5 (m); 35.8 (a); 45.6 (n); 50.7 (c); 102.5 (b); 119.1 (l); 126.2 + 126.8 + 128.4 (d, e, f, g); 161.3 (k); 162.0 + 162.1 (h und j), 179.3 (i).

$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -Korrelationspektrum identifiziert werden können, werden durch Vergleich mit den anderen Oxonolen identifiziert. Da die Reste an den Stickstoffatomen nur relativ geringen Einfluß auf die Verschiebung dieser Kerne haben, sind die δ -Werte für diese C-Atome in allen Oxonolen sehr ähnlich. Die Zuordnung erfolgt anhand der Überlegungen für **82**.

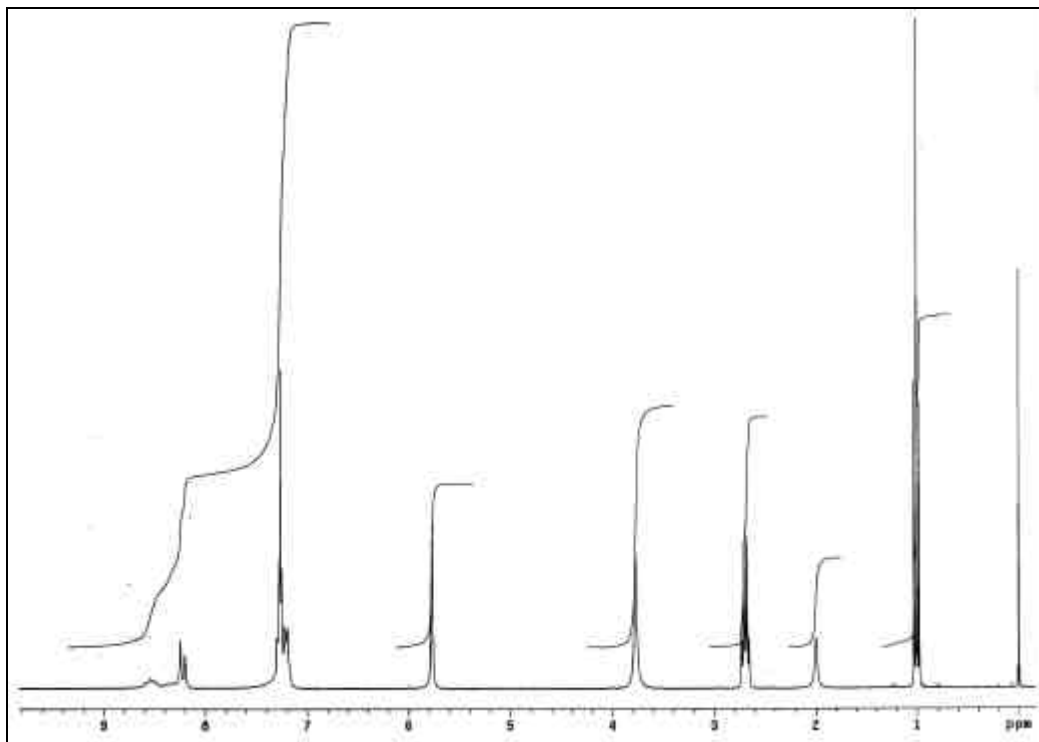


Abbildung 214: ^1H -NMR (CDCl_3 , 300 MHz) von **86**

MS (FAB, + NBA); m/z (%): 555 [M^+ , - NEt_3 , + Na]

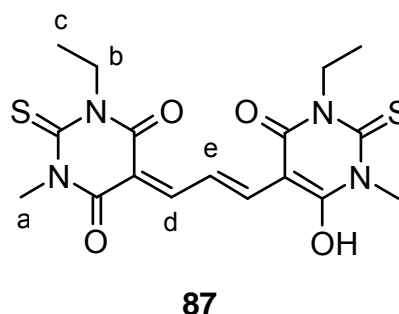
UV-VIS (DMSO):

λ_{max} (ϵ): 542 nm ($258\,000\ \text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$); $\log \epsilon = 5.41$

6.70 V66: DiSBAC_{1,2}(3) (87)

Darstellung von 1-Ethyl-5-[3-(1-ethyl-6-hydroxy-3-methyl-4-oxo-2-thio-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-5-yl)allylidene]-3-methyl-2-thio-oxo-(1*H*,5*H*)-2,3-dihydropyrimidin-4,6-dion

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.64, Seite 275 werden 2.500 g (13.42 mmol) 1-Ethyl-3-methyl-4,6-dioxo-2-thio-oxo-perhydropyrimidin **76**, 1.300 g (5.024 mmol) MABPI und 1.500 g (14.82 mmol) Triethylamin in 40 ml



Methanol während 60 min umgesetzt. Das Rohprodukt wird durch Umkristallisation aus Ethanol gereinigt, dann in der Trockenpistole getrocknet (20 hPa, 75 °C). Wird das Produkt in höherer Reinheit benötigt, so kann säulenchromatographisch gereinigt werden, was jedoch zu deutlich verminderter Ausbeute führt (ca. 50 % des Rohprodukts). Zur Trennung verwendet man Dichlormethan/Methanol (8:1) als Laufmittel, wobei das Produkt kaum transportiert wird, anschließend eluiert man mit Methanol. Die geringe Ausbeute erklärt sich durch die hohe Affinität des Produktes zur stationären Phase, weshalb sich auch keine klar abgegrenzte Fraktion zeigt. Das Produkt verteilt sich sehr stark über das Säulenmaterial.

Ausbeute: 0.962 g (1.89 mmol, 38 %)

blaue nadelförmige Kristalle

Lit.: keine Angabe

$C_{17}H_{20}N_4O_4S_2$

MM = 408.50 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 204 °C

Lit.^[109]: 134 °C (protonierte Form)

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_4]$ Methanol, 200 MHz):

δ [ppm] = 1.27 (t, 6 H, $^3J_{\text{c,b}} = 6.9$ Hz, c); 3.70 (s, 6 H, a); 4.53 (q, 4 H, $^3J_{\text{b,c}} = 6.9$ Hz, b); 4.63 (s, 1 H, OH); 7.98 (d, 2 H, $^3J_{\text{d,e}} = 13.8$ Hz, d); 8.77 (t, 1 H, $^3J_{\text{e,d}} = 13.8$ Hz, e).

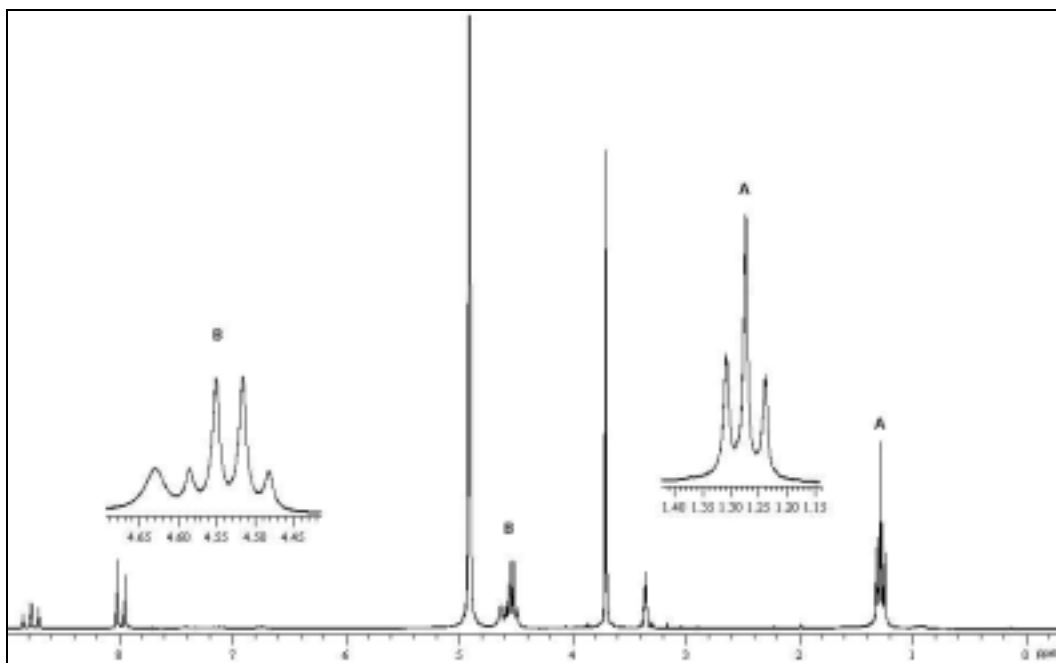


Abbildung 215: $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_4]$ Methanol, 200 MHz) von **87**

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz):

δ [ppm] = 12.3 (d); 35.4 (a); 43.4 (c); 102.9 (b); 119.1 (i); 159.6 (h); 161.9 + 162.4 (e und g), 177.9 (f).

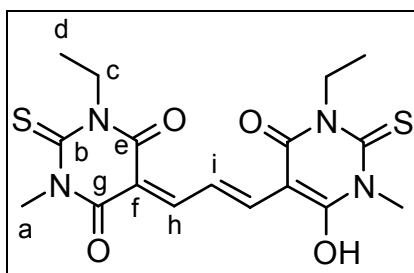


Abbildung 216: Benennung der C-Atome für das $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR von **87**

Die C-Atome b, e, g und f, die nicht über das $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -Korrelationspektrum identifiziert werden können, werden durch Vergleich mit den anderen Oxonolen identifiziert. Da die Reste an den Stickstoffatomen

nur relativ geringen Einfluß auf die Verschiebung dieser Kerne haben, sind die δ -Werte für diese C-Atome in allen Oxonolen sehr ähnlich. Die Zuordnung erfolgt anhand der Überlegungen für **82**.

MS (FAB, + NBA); m/z (%): 431 (14) [M^+ , -H, +Na]; 409 (10) [M^+]

UV-VIS (DMSO):

$\lambda_{\max}(\epsilon)$: 541 nm ($124\,800\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$); $\log \epsilon = 5.10$

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3750–3250 (H-O-Valenz); 2979 (C-H-Valenz, Alkylgruppen); 1629 (C=O-Valenz in disubstituierten Amiden); 1363 (H-O-Deformation); 1186 (C=S Amid I).

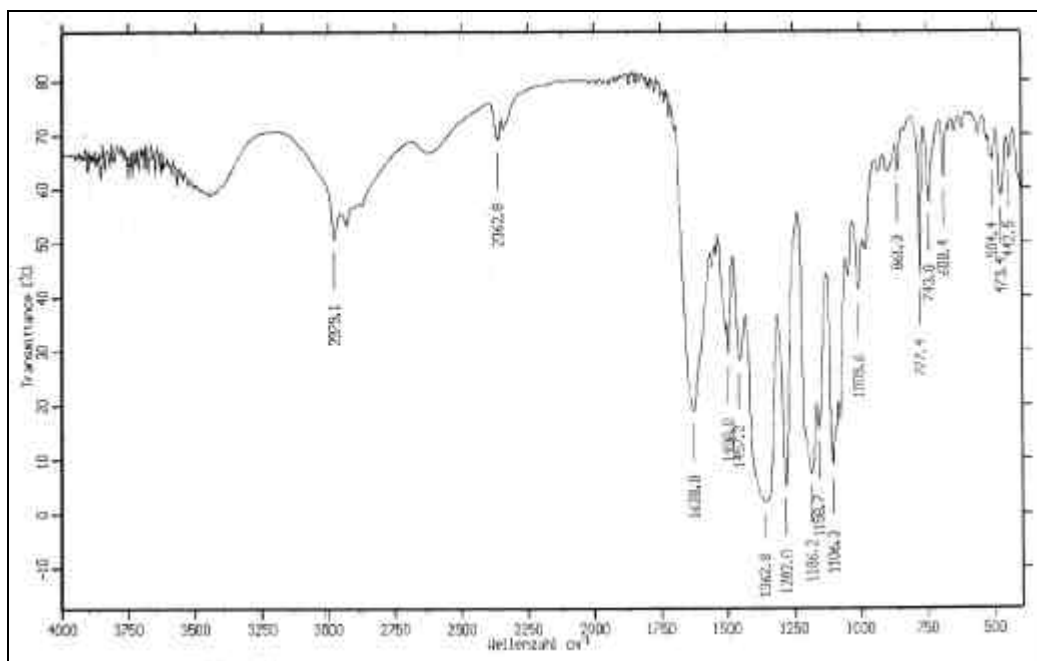
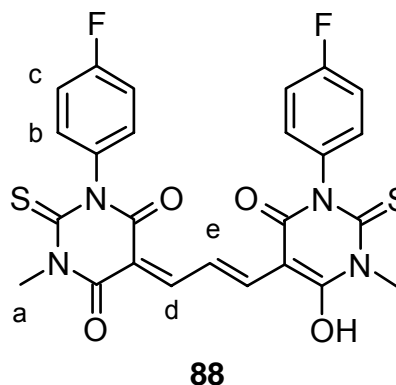


Abbildung 217: IR-Spektrum (KBr) von **87**

6.71 V67: DiSBAC_{1,4}-Fluorphenyl(3) (88)

Darstellung von 1-(4-Fluorphenyl)-5-{3-[3-(4-fluorphenyl)-6-hydroxy-1-methyl-4-oxo-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl]allyliden}-3-methyl-2-thioxo-(1*H*,5*H*)-2,3-dihydropyrimidin-4,6-dion

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.64, Seite 275 werden 1.85 g (9.99 mmol) 1-(4-Fluorphenyl)-3-methyl-4,6-dioxo-2-thioxoperhydropyrimidin **77**, 1.43 g (5.00 mmol) MABPI und 0.51 g (5.04 mmol) Triethylamin in 40 ml Methanol während 60 min umgesetzt. Das Rohprodukt wird in Aceton ausgekocht und getrocknet.



Ausbeute: 1.34 g (2.48 mmol, 50 %)

hellroter Feststoff

Lit.: nicht bekannt

$C_{25}H_{18}F_2N_4O_4S_2$

MM = 540.57 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 260–262 °C

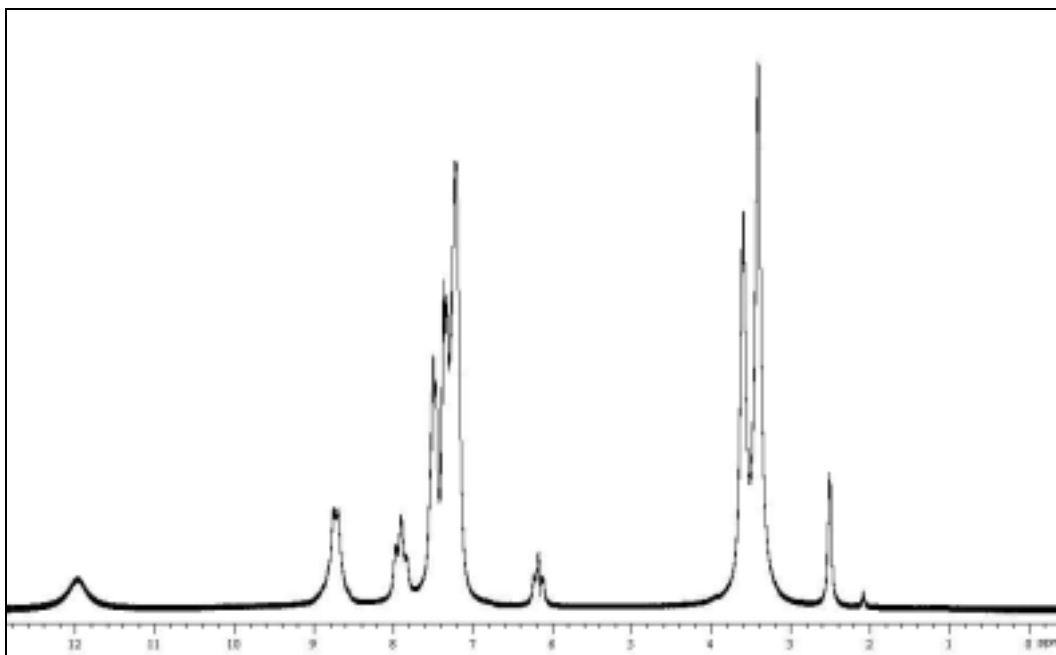
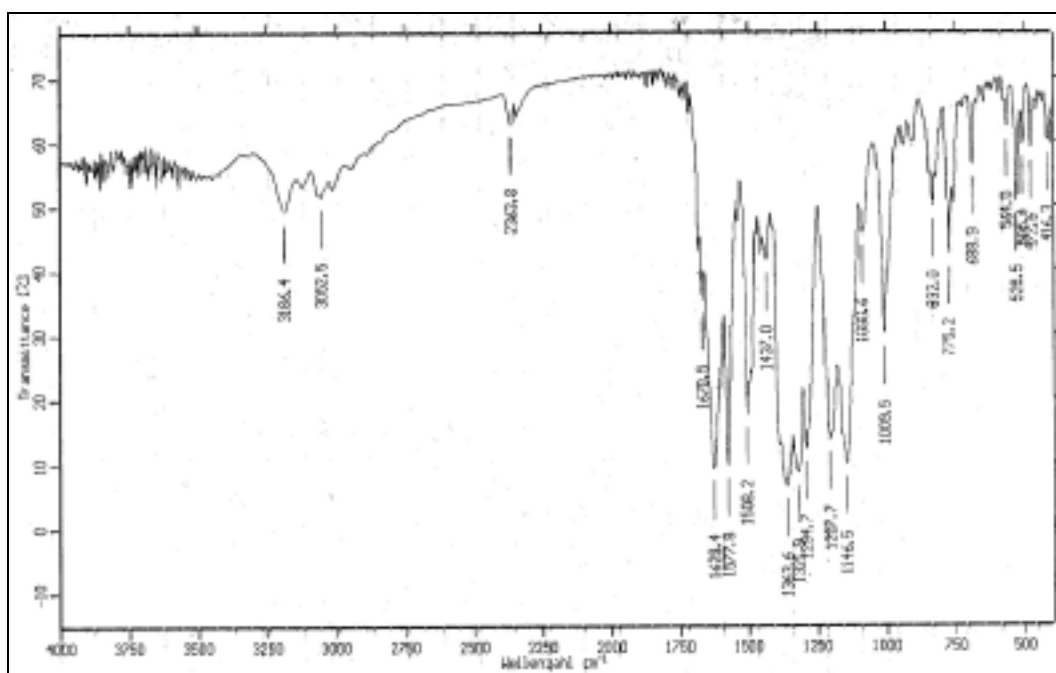
Lit.: nicht bekannt

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 200 MHz):

δ [ppm] = 3.40 (s, 6 H, a); 6.00–7.73 ([*AB*]₂]-System, 8 H, b+c); 7.90 (t, 1 H, ³J_{e,d} = 14.0 Hz, e); 8.41–9.03 (m, 2 H, d) 11.97 (s, 1 H, OH).

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3186 (C-H-Valenz im Aromaten); 3053 (C-H-Valenz, Alkylgruppen); 1629 (C=O-Valenz in disubstituierten Amiden); 1578 (C=C-Valenz im Aromaten).

Abbildung 218: $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 200 MHz) von **88**Abbildung 219: IR-Spektrum (KBr) von **88**

MS (FAB, + NBA + NaI); m/z (%): 585 (4) [M^+ , - H, + 2Na]; 563 (5) [M^+ , - H, + Na].

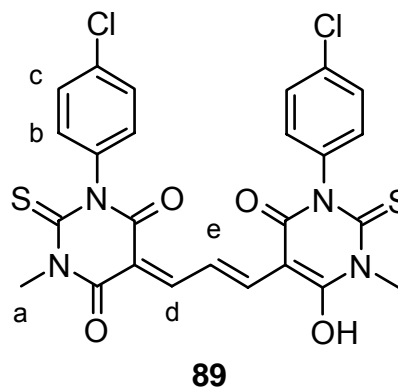
UV-VIS (DMSO):

λ_{max} (ϵ): 539 nm ($112\,400\ \text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$); $\log \epsilon = 5.05$

6.72 V68: DiSBAC_{1,4}-Chlorphenyl(3) (89)

Darstellung von 1-(4-Chlorphenyl)-5-{3-[3-(4-chlorphenyl)-6-hydroxy-1-methyl-4-oxo-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl]allyliden}-3-methyl-2-thioxo-(1*H*,5*H*)-2,3-dihydropyrimidin-4,6-dion

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.64, Seite 275 werden 2.69 g (10.0 mmol) 1-(4-Chlorphenyl)-3-methyl-4,6-dioxo-2-thioxoperhydropyrimidin-4,6-dion **78** und 1.43 g (5.00 mmol) MABPI in 40 ml Methanol in der Siedehitze gelöst. Man gibt 0.51 g (5.04 mmol) Triethylamin hinzu und rührt weitere 60 min unter Rückfluß.



Man gibt das doppelte Volumen Wasser hinzu und bringt die Lösung mit Salzsäure in deutlich saures Milieu (pH 0–1).

Das Rohprodukt wird aus Chloroform umkristallisiert und getrocknet.

Ausbeute: 1.07 g (1.87 mmol, 37 %)

hellroter Feststoff

Lit.: nicht bekannt

$C_{25}H_{18}Cl_2N_4O_4S_2$

MM = 573.48 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 208–210 °C (schmilzt langsam)

Lit.: nicht bekannt

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 200 MHz):

δ [ppm] = 3.43 (s, 6 H, a); 6.12–7.65 ([AX]₂]-System, 8 H, b+c); 7.89 (t, 1 H, ³J_{d,e} = 14.3 Hz, e); 8.47–9.00 (m, 2 H, d); 11.80–12.38 (2x s, 1 H, OH).

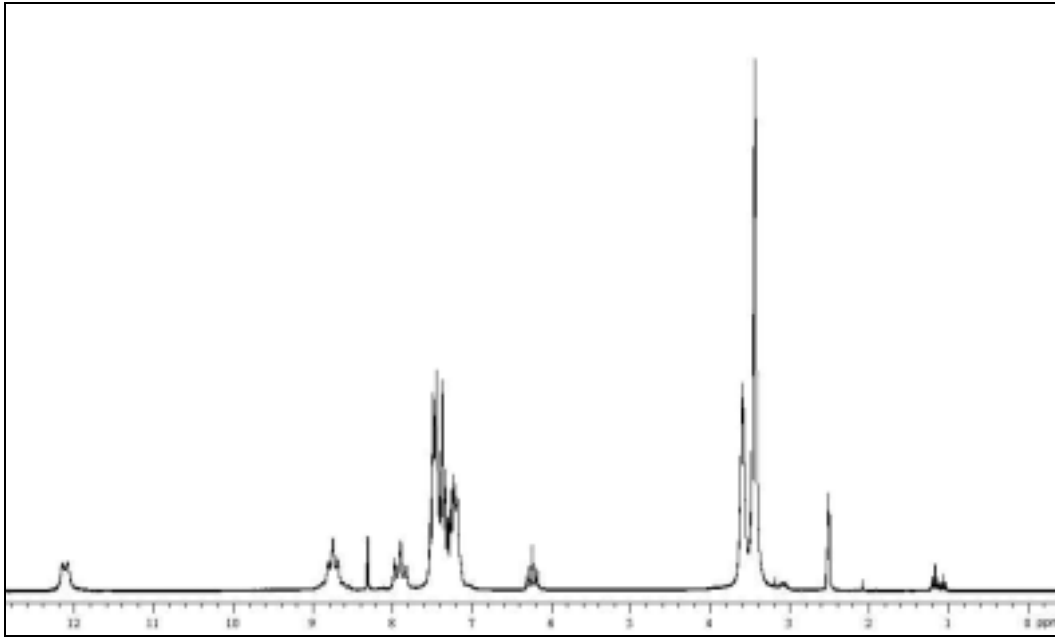


Abbildung 220: $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 200 MHz) von **89**

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3200 (C-H-Valenz im Aromaten); 3047 (C-H-Valenz, Alkylgruppen); 1635 (C=O-Valenz in disubstituierten Amiden); 1579 (C=C-Valenz im Aromaten); 1359; 1325; 1196; 1141.

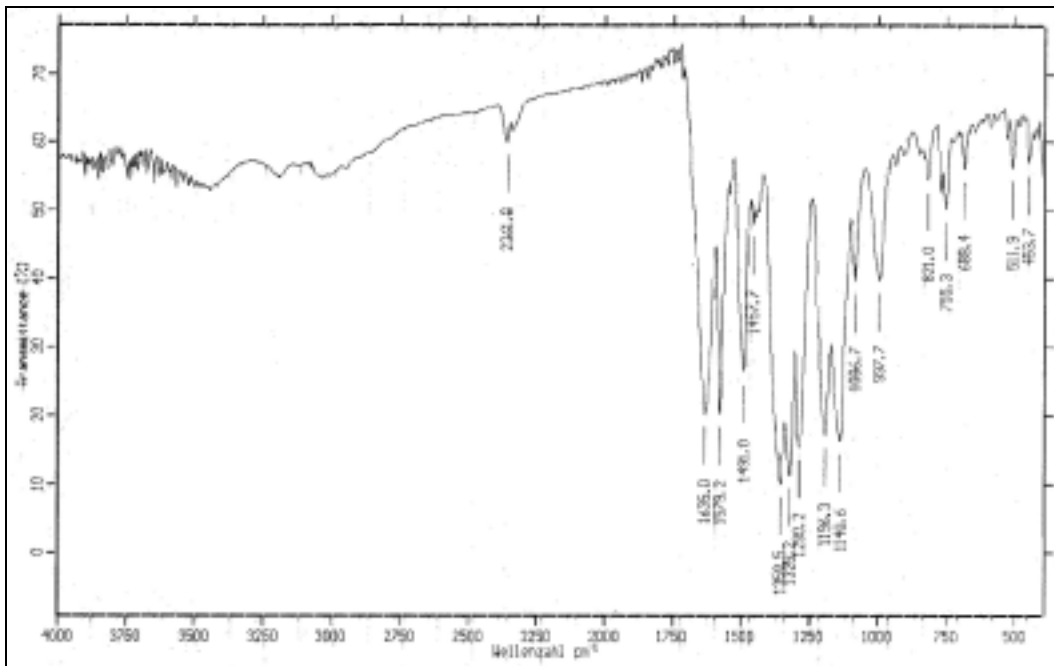


Abbildung 221: IR-Spektrum (KBr) von **89**

MS (FAB, + NBA + NaI); m/z (%): 619 (3) [M^+ , - H, + 2Na].

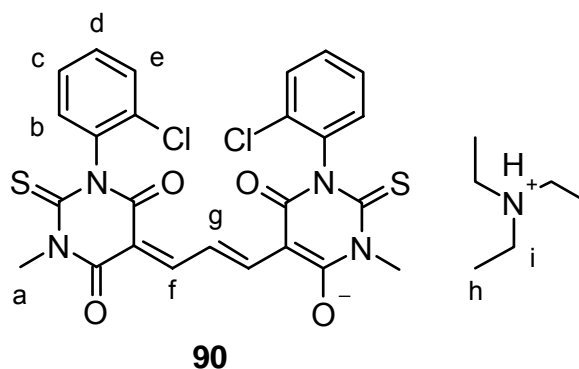
UV-VIS (DMSO):

λ_{\max} (ϵ): 540 nm ($88\,600\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$); $\log \epsilon = 4.95$

6.73 V69: DiSBAC_{1,2}-Chlorphenyl(3) (90)

Triethylammonium-1-(2-chlorphenyl)-5-{3-[1-(2-chlorphenyl)-3-methyl-4,6-dioxo-2-thioxoperhydropyrimidin-5-yliden]propenyl}-3-methyl-6-oxo-2-thioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-olat

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.64, Seite 275 werden 2.69 g (10.0 mmol) 1-(2-Chlorphenyl)-3-methyl-4,6-dioxo-2-thioxoperhydropyrimidin **79** und 1.43 g (5.00 mmol) MABPI in



50 ml Methanol in der Siedehitze gelöst. Man gibt 0.510 g (5.00 mmol) Triethylamin hinzu und rührt weitere 60 min unter Rückfluß. Man gibt das doppelte Volumen Wasser hinzu und bringt die Lösung mit Salzsäure in deutlich saures Milieu (pH 0 – 1). Das Rohprodukt wird aus Chloroform/Ethanol (1/1) umkristallisiert und getrocknet.

Ausbeute: 0.88 g (1.30 mmol, 26 %)

hellroter Feststoff

Lit.: nicht bekannt

$\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_2$

MM = $674.67\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Schmelzpunkt: 280–283°C (sublimiert)

Lit.: nicht bekannt

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 200 MHz):

δ [ppm] = 1.15 (t, 9 H, $^3J_{\text{h,i}} = 7.3$ Hz, h); 3.07 (q, 6 H, $^3J_{\text{i,h}} = 7.3$ Hz, i); 3.64 + 3.60 (2x s, 6 H, a); 7.20–7.65 ([ABCD]-System, 8 H, b+c+d+e); 7.90 + 7.99 (2x d, 2 H, $^3J_{\text{f,g}} = 14.2$ Hz, f); 8.49–9.03 (m (eigtl. t + dd, Isomerenmischung, vgl. Abbildung 211, Seite 286), 1 H, g).

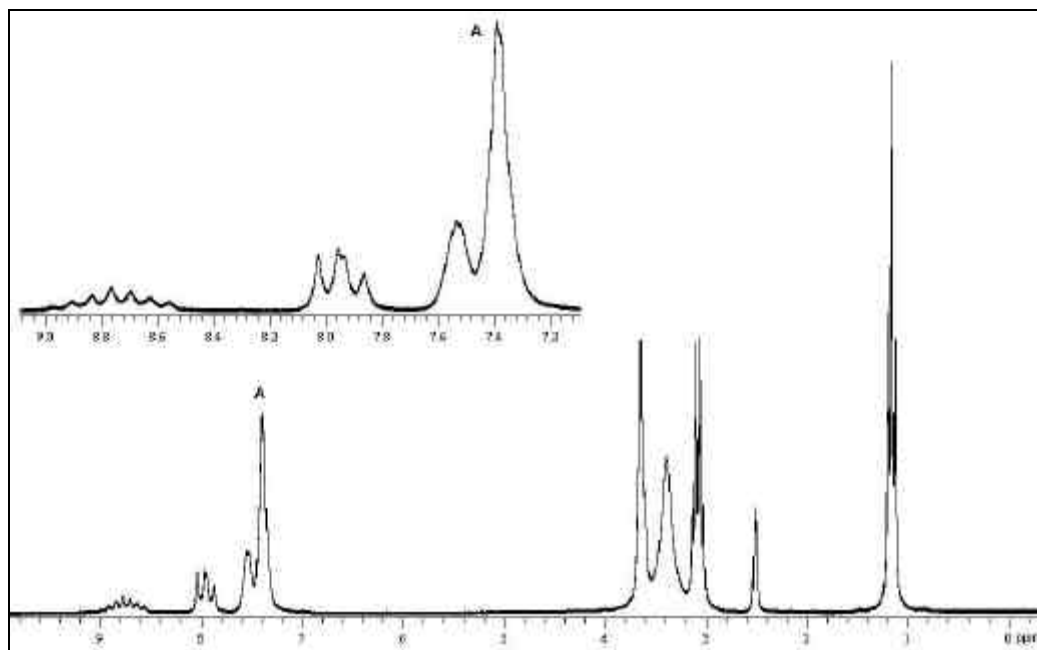


Abbildung 222: $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 200 MHz) von **90**

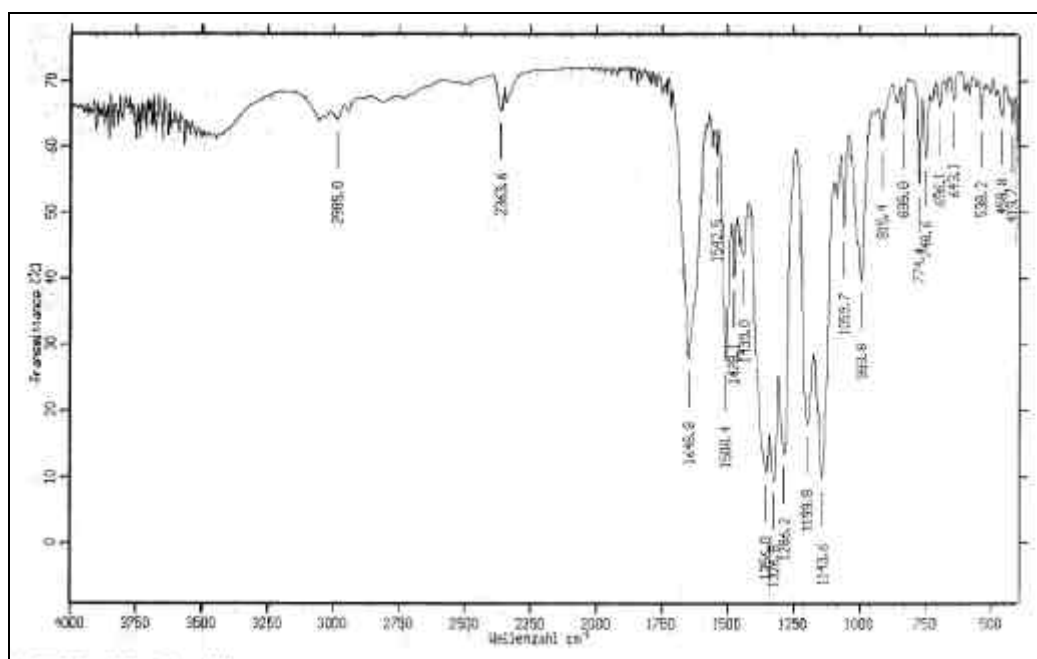


Abbildung 223: IR-Spektrum (KBr) von **90**

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3078 (C-H-Valenz im Aromaten); 2985 (C-H-Valenz, Alkylgruppen); 1649 (C=O-Valenz in disubstituierten Amiden); 1508 (C=C-Valenz im Aromaten); 1356; 1327; 1200; 1144.

UV-VIS (DMSO):

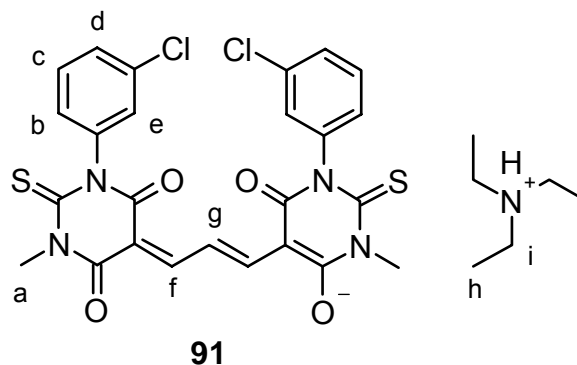
λ_{max} (ϵ): 538 nm ($184\,700 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$); $\log \epsilon = 5.27$

MS (FAB, + NBA + NaI); m/z (%): 619 (6) [M^+ , - HNEt_3 , + 2 Na].

6.74 V70: DiSBAC_{1,3}-Chlorphenyl(3) (91)

Darstellung von Triethylammonium-1-(3-chlorphenyl)-5-{3-[1-(3-chlorphenyl)-3-methyl-4,6-dioxo-2-thioxoperhydropyrimidin-5-yliden]propenyl}-3-methyl-6-oxo-2-thioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-olat

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.64, Seite 275 werden 2.69 g (10.0 mmol) 1-(3-Chlorphenyl)-3-methyl-4,6-dioxo-2-thioxoperhydropyrimidin **80** und 1.43 g (5.00 mmol)



MABPI in 75 ml Methanol in der Siedehitze gelöst. Man gibt 0.510 g (5.04 mmol) Triethylamin hinzu und rührt weitere 60 min unter Rückfluß. Man gibt das doppelte Volumen Wasser hinzu und bringt die Lösung mit Salzsäure in deutlich saures Milieu (pH 0–1). Das Rohprodukt wird aus Chloroform umkristallisiert und getrocknet.

Ausbeute: 1.45 g (2.15 mmol, 43 %)

hellroter Feststoff

Lit.: nicht bekannt

$\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_2$

MM = $674.67 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Schmelzpunkt: 294–296 °C (sublimiert)

Lit.: nicht bekannt

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO, 200 MHz):

δ [ppm] = 1.15 (t, 9 H, $^3J_{\text{h,i}} = 7.3$ Hz, h); 3.07 (2x q, 6 H, $^3J_{\text{i,h}} = 7.3$ Hz, i); 3.61 + 3.59 (2x s, 6 H, a); 7.07–7.55 ([ABCD]-System, 8 H, b+c+d+e); 7.86 und 7.94 (2x d, 1 H, $^3J_{\text{f,g}} = 15.5$ Hz, f); 8.49–9.04 (m (eigtl. t + dd, Isomerenmischung, vgl. Abbildung 211, Seite 286), 1 H, g).

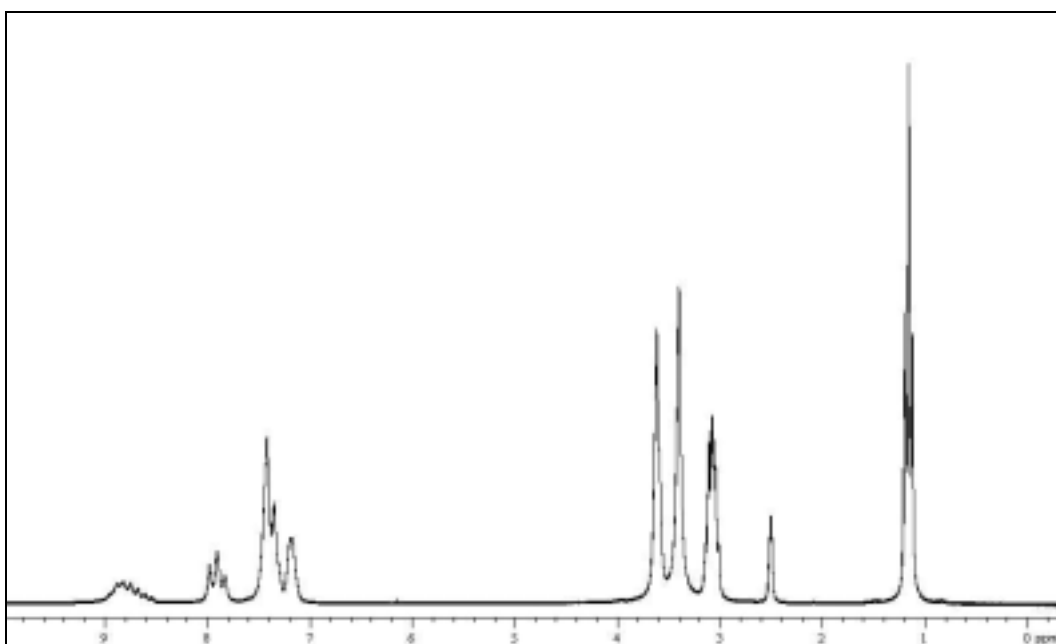
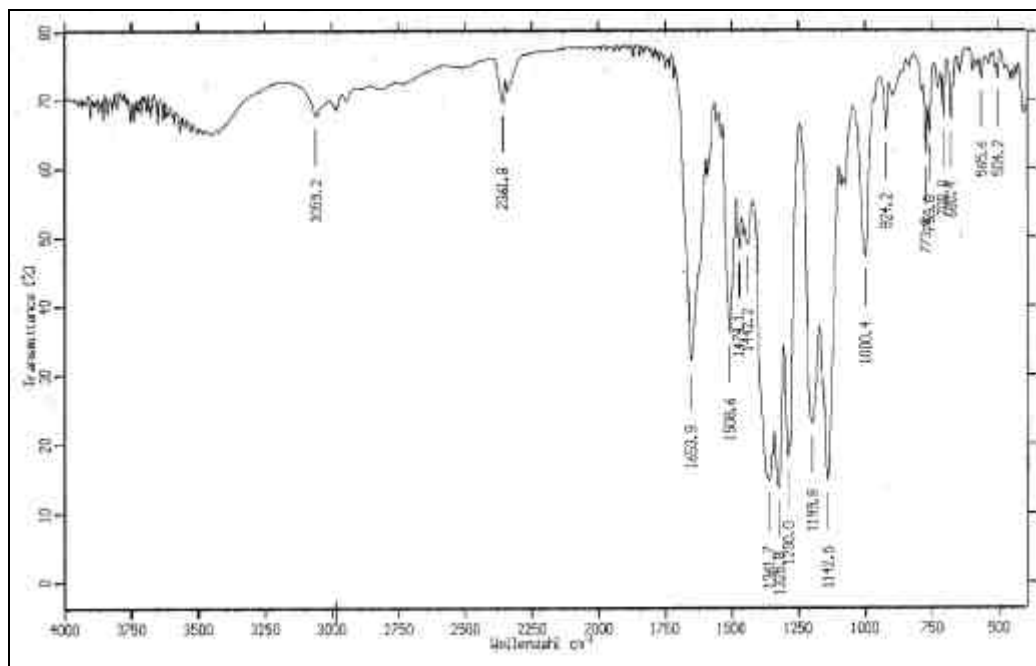


Abbildung 224: $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]$ DMSO, 200 MHz) von **91**

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3059 (C-H-Valenz im Aromaten); 2984 (C-H-Valenz, Alkylgruppen); 1654 (C=O-Valenz in disubstituierten Amiden); 1509 (C=C-Valenz im Aromaten); 1362; 1326; 1200; 1143.


 Abbildung 225: IR-Spektrum (KBr) von **91**

MS (FAB, + NBA +NaI); m/z (%): 619 (6) [M^+ , - HNEt₃, + 2 Na]; 595 (2) [M^+ , -HNEt₃, + Na].

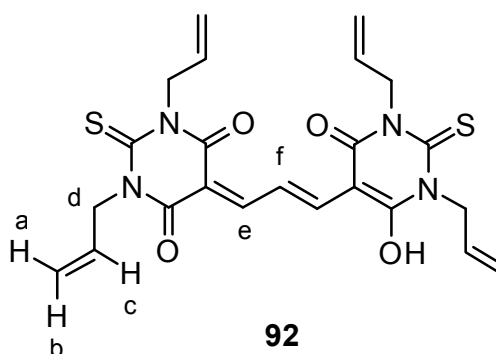
UV-VIS (DMSO):

λ_{\max} (ϵ): 540 nm (231 200 l·mol⁻¹·cm⁻¹); log ϵ = 5.36

6.75 V71: DiSBA_(Diallyl)(3) (**92**)

Darstellung von 1,3-Diallyl-5-[3-(1,3-diallyl-6-hydroxy-4-oxo-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-yl)allylidene]-2-thioxo-(1*H*,5*H*)-2,3-dihydropyrimidin-4,6-dion

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.64, Seite 275 werden 1.97 g (8.78 mmol) 1,3-Diallyl-4,6-dioxo-2-thioxoperhydropyrimidin **81** und 1.14 g (4.41 mmol) MABPI in 40 ml Methanol in der Siedehitze



gelöst. Man gibt 0.440 g (4.35 mmol) Triethylamin hinzu und rührt

weitere 60 min unter Rückfluß. Man gibt das doppelte Volumen Wasser hinzu und bringt die Lösung mit Salzsäure in deutlich saures Milieu (pH 0–1). Nach Umkristallisation aus Ethanol wird säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel 60, CH₂Cl₂/Methanol = 8/1). Die auf die Säule aufzutragende Menge Oxonol in Milligramm sollte unterhalb der Obergrenze bleiben, die sich errechnet aus dem Quadrat des Säulendurchmessers in Millimeter (vgl. dazu die Arbeiten von STILL et al.^[109] zur Flash-Chromatographie). Nach der Chromatographie wird nochmals aus Ethanol umkristallisiert.

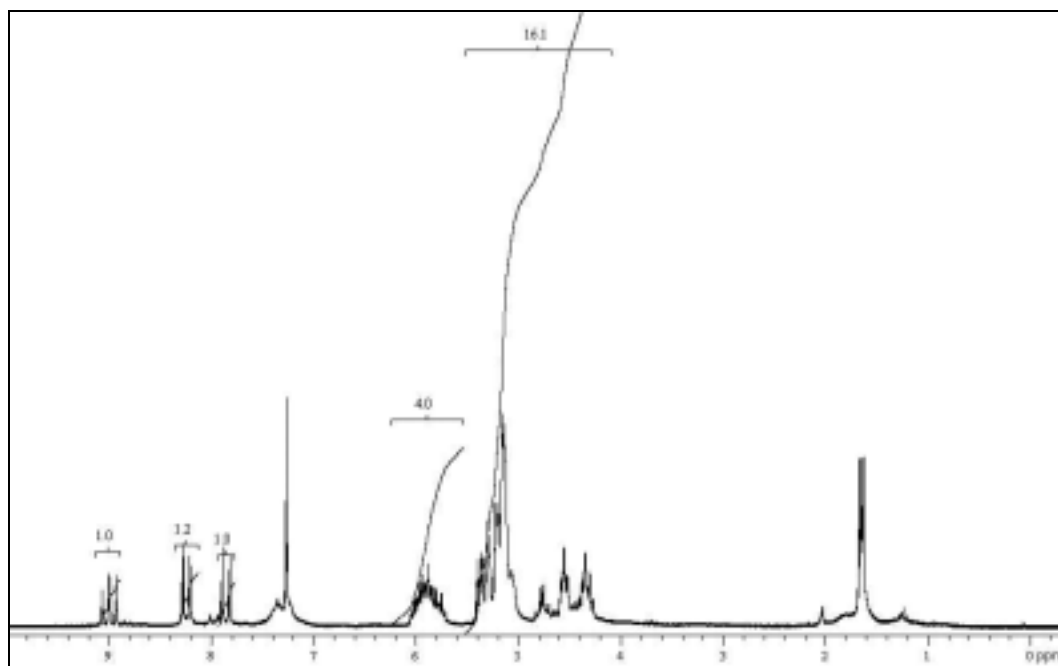
Ausbeute: 0.19 g ($3.9 \cdot 10^{-4}$, 9 %)
 schwarze Kristalle mit grüner Reflexion
 Lit.: keine Angabe
 C₂₃H₂₄N₄O₄S₂ MM = 484.60 g·mol⁻¹

Schmelzpunkt: 155–160 °C (schmilzt sehr langsam)
 Lit.: nicht bekannt

¹H-NMR (CDCl₃, 200 MHz):

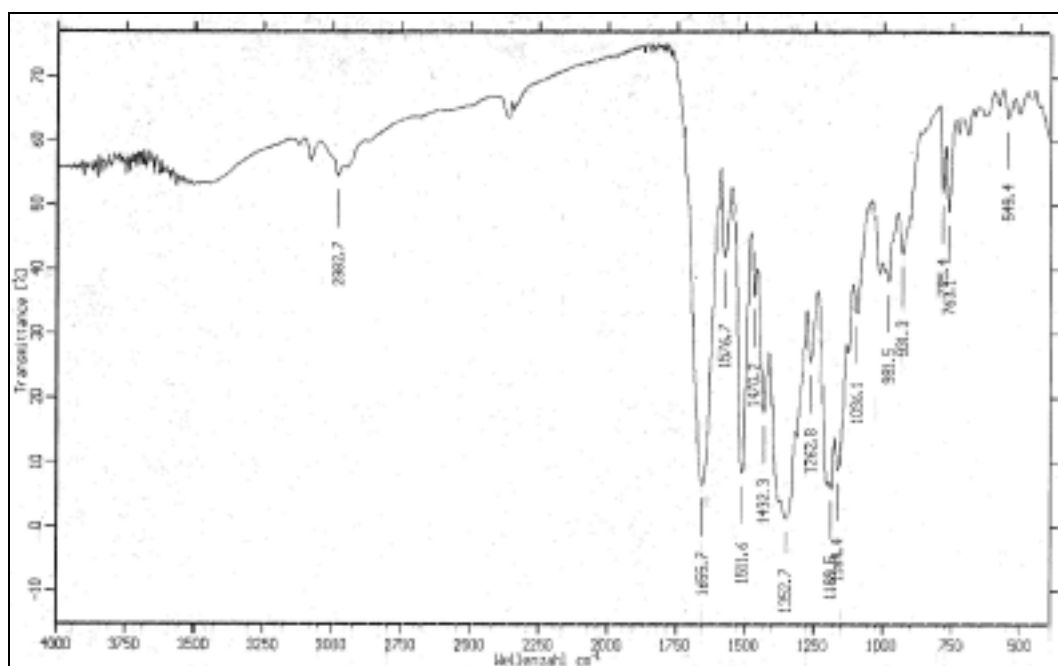
δ [ppm] = 4.22–5.42 (m, 16 H, a+b+d); 5.70–6.07 (m, 4 H, c); 7.85 (d, 1 H, ³J_{e,f} = 14.6 Hz, e oder e'); 8.24 (d, 1 H, ³J_{e',f} = 12.8 Hz, e oder e'); 8.99 (dd, 1 H, ³J_{f,e'} = 12.9 Hz, ³J_{f,e} = 14.7 Hz, f).

Die Auflösung ist sehr schlecht, daher können die Signale der Protonen a, b, c und d nur als Multipletts behandelt werden. Obwohl die Substanz hochsymmetrisch sein sollte, erhält man dennoch drei Signale für die Protonen der Trimethingruppe, statt wie erwartet zwei. Die Allylreste sind sterisch so anspruchsvoll, daß sie nicht in der Ebene des Moleküls liegen können. Dies erklärt auch die geringe Ausbeute. Die Allylgruppen sind also nach oberhalb oder unterhalb der Molekülebene gestreckt und wahrscheinlich an der Drehung gehindert. Dies könnte ein Grund für den Symmetrieverlust sein.

Abbildung 226: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) von **92**

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2983 (C-H-Valenz, Alkylgruppen); 1656 (C=O-Valenz in disubstituierten Amiden); 1512; 1353 (H-O-Deformation); 1190 (C=S Amid I).

Abbildung 227: IR-Spektrum (KBr) von **92**

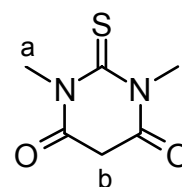
MS (FAB, + NBA +NaI); m/z (%): 507 (45) [M^+ , - $HNEt_3$, + Na]; 485 (20) [M^+ , - NEt_3].

UV-VIS (DMSO):

λ_{max} (ϵ): 542 nm ($86\,300\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$); $\log \epsilon = 4.94$

6.76 V72: 1,3-Dimethyl-4,6-dioxo-2-thioxo-perhydropyrimidin (93)

Nach der allgemeinen Darstellung Kapitel 6.52, Seite 253 werden 11.0 g (478 mmol) Natrium in kleinen Stücken in 150 ml absolutem Ethanol unter Rühren gelöst und zur vollständigen Auflösung erhitzt. Unter fortgesetztem Rühren werden 76.9 g (480 mmol)



93

Diethylmalonat und 25.0 g (240 mmol) 1,3-Dimethylthioharnstoff (*Aldrich*) zugegeben, dann wird 112 h in einem auf 100 °C erwärmten Ölbad unter Argonatmosphäre gerührt. Zur Lösung werden 100 ml Wasser zugegeben, nach Entfernung des Ethanols werden weitere 100 ml Wasser zugefügt. Der beigefarbene Niederschlag wird in 400 ml Ethanol ausgekocht.

Ausbeute: 25.1 g (146 mmol, 61 %)

farblose Kristalle

$C_6H_8N_2O_2S$

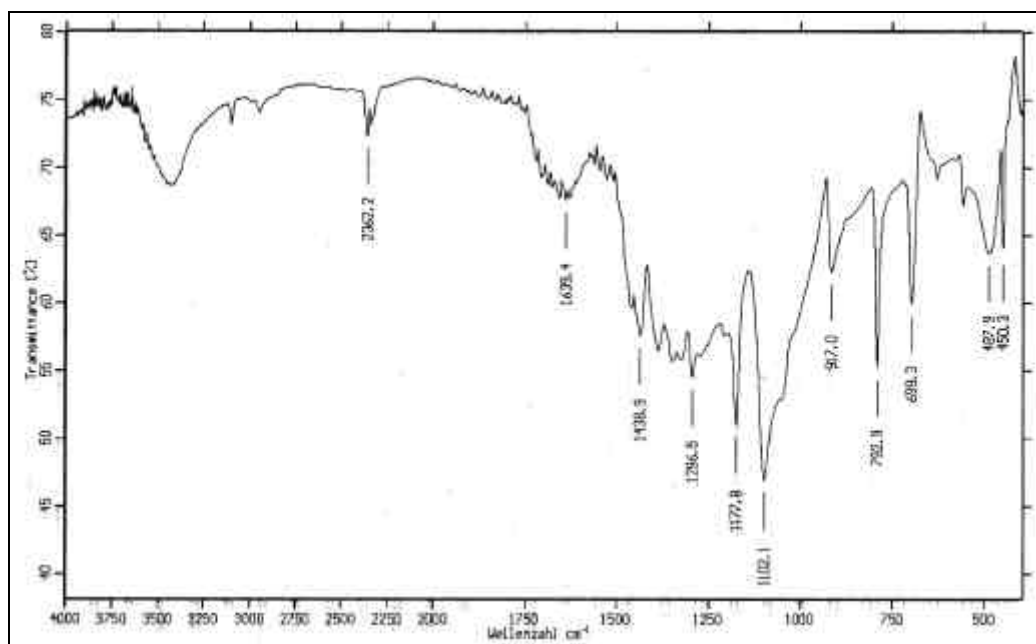
MM = $172.21\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

1H -NMR ($[D_6]DMSO$, 200 MHz):

δ [ppm] = 3.53 (s, 3 H, a); 4.12 (s, 2 H, b + H_2O aus $[D_6]DMSO$).

IR (KBr):

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3750–3250 (O-H-Valenz, Wasser aus KBr); 1639 (C=O-Valenz); 1439; 1178; 1102.

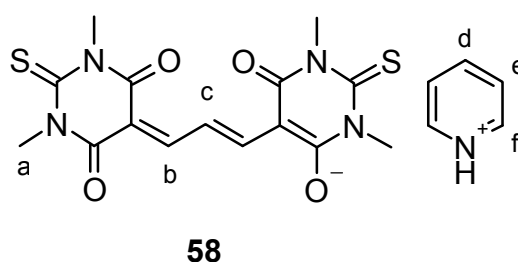

 Abbildung 228: IR-Spektrum (KBr) von **93**

MS (EI); m/z (%): 172 (100) [M^+]; 157 (1) [M^+ , - CH_3]; 144 (5) [M^+ , - $C=O$]; 127 (10).

6.77 V73: DiSBAC₁(3) (**58**)

Darstellung von Pyridinium-5-[3-(1,3-dimethyl-4,6-dioxo-2-thioxo-perhydropyrimidin-5-yliden)propenyl]-1,3-dimethyl-6-oxo-2-thioxo-1,2,3,6-tetrahydropyrimidin-4-olat

0.68 g (3.9 mmol) 1,3-Dimethyl-4,6-dioxo-2-thioxo-perhydropyrimidin **91** und 0.52 g (2.0 mmol) MABPI werden in 10 ml Pyridin vorgelegt. Nach Zugabe von etwa 0.73 g (1.0 ml, 7.2 mmol)



Triethylamin wird für 30 min auf 115 °C Ölbadtemperatur erhitzt. Dann läßt man über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Nach Zugabe des doppelten Volumens Wasser wird mit konzentrierter Salzsäure angesäuert und filtriert (Glasfilterfritte, Pore 4). Man wäscht mit viel

Wasser, dann mit etwas Methanol und Diethylether. Für höhere Reinheit schließt sich eine Umkristallisation aus Methanol an.

Ausbeute: 0.46 g (1.0 mmol, 51 %)

blauer Feststoff

Lit.^[110]: keine Angabe

$C_{20}H_{21}N_4O_4S_2$

MM = 459.55 g·mol⁻¹

¹H-NMR ([D₆]DMSO, 300 MHz):

δ [ppm] = 3.60 (s, 12 H, a); 7.91 (d, 2 H, ³J_{b,c} = 13.8 Hz, b); 8.08 (A-teil des [AX]₂M-Systems, e); 8.60 (M-Teil des [AX]₂M-Systems, ³J_{d,e} = 7.83 Hz, ⁴J_{d,f} = 1.6 Hz, d); 8.79 (t, 1 H, ³J_{c,b} = 13.8 Hz, c); 8.94 (X-Teil des [AX]₂M-Systems, f).

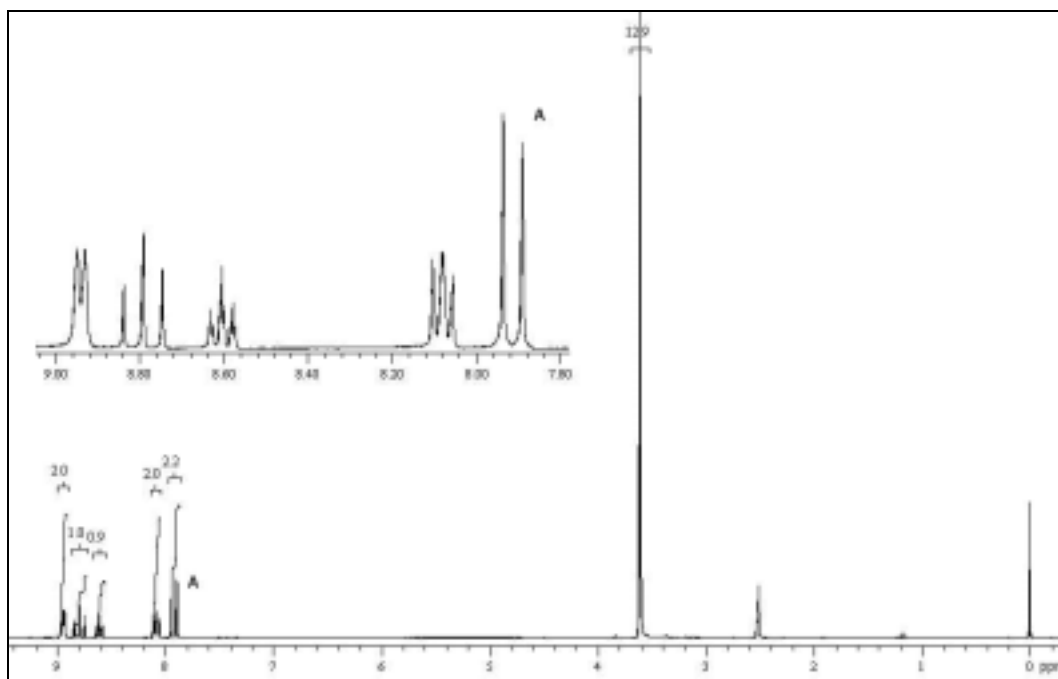
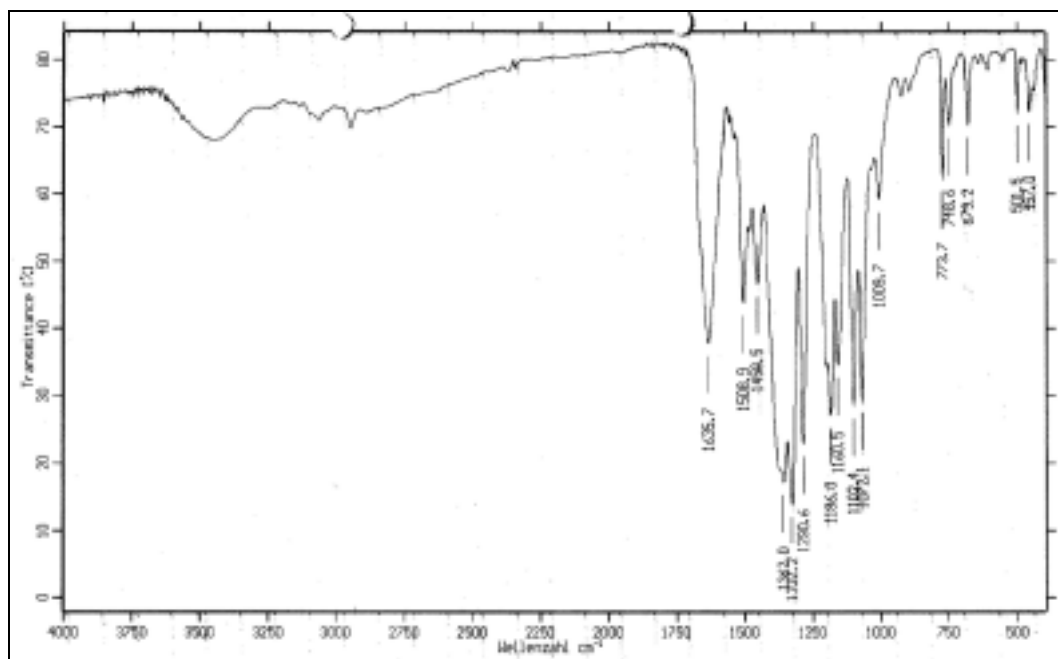


Abbildung 229: ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 300 MHz) von **58**

¹³C{¹H}-NMR ([D₆]DMSO, 300 MHz):

δ [ppm] = 101 (a); 119 (c); 127 (e); 142 (f); 146 (d); 160 (b); 161 (C=S); 179 (C=O).

Abbildung 230: IR-Spektrum (KBr) von **58****IR (KBr):**

$\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 4750–3250 (O-H-Valenz, Wasser aus KBr); 2922 (C-H-Valenz, Methylgruppen); 1636 (C=O-Valenz); 1362; 1332; 1186 (C=S Amid I).

MS (FAB, + NBA); m/z (%): 460 (3) [M^+]; 381 (7) [M^+ , - Pyridin].

UV-VIS:

Siehe Solvatochromie der Oxonole (Kapitel 4.3.4.2, Seite 116).

7 Literaturverzeichnis

- [1] J. Griffiths, *Chemie in unserer Zeit*, **1993**, 1, 21–31.
- [2] R. MacKinnon, D. Doyle, J. M. Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, *Science*, **1998**, 280, 69–77.
- [3] P. Agre, G. M. Preston, T. Carroll, W. P. Guggino, *Science*, **1992**, 256, 385.
- [4] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, VCH, Weinheim, **1994**.
- [5] F. M. Harold, in *The vital force - a study of bioenergetics*, W. H. Freeman and Co., New York, **1986**, S. 310–318.
- [6] A. S. Waggoner, in *Membranes and Transport, Vol. 1*, (Hrsg.: A. N. Martonosi), Plenum Press, New York, **1982**, S. 195–201.
- [7] B. Neumcke, in *Biophysik*, (Hrsg.: W. Hoppe, et al.), Springer-Verlag, Berlin, **1982**, S. 471.
- [8] I. Tasaki, A. Watanabe, R. Sandlin, L. Carnay, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1968**, 61, 883–888.
- [9] M. Morad, G. Salama, *J. Physiol. (London)*, **1979**, 292, 267–295.
- [10] C. L. Bashford, J. C. Smith, *Methods Enzymol.*, **1979**, 55-F, 569–586.
- [11] A. Grinvald, W. N. Ross, I. Farber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1981**, 78, 3245–3249.
- [12] M. E. Bayer, M. H. Bayer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1981**, 78, 5618–5622.
- [13] B. Labedan, L. Letellier, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1981**, 78, 215–219.
- [14] D. J. Laszlo, B. L. Taylor, *J. Bacteriol.*, **1981**, 145, 990–1001.
- [15] V. Dall'Asta, R. Gatti, G. Orlandini, P. A. Rossi, B. M. Rotoli, R. Sala, O. Bussolati, G. C. Gazzola, *Exp. Cell Res.*, **1997**, 231, 260–268.
- [16] A. Ghelli, B. Benelli, M. Degli Esposti, *J. Biochem. (Tokyo)*, **1997**, 121, 746–755.

-
- [17] T. Förster, *Ann. Phys.*, **1948**, 6, 55–75.
- [18] N. J. Turro, in *Modern Molecular Photochemistry*, University Science Books, Mill Valley (CA), **1991**, S. 296 ff.
- [19] P. R. Selvin, in *Methods in Enzymology*, Vol. 246, (Hrsg.: K. Sauer), Academic Press, London, **1995**, S. 300–334.
- [20] L. Stryer, R. P. Haugland, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1967**, 58, 719–726.
- [21] R. Y. Tsien, B. J. Bacskai, S. R. Adams, *Trends in Cell Biology*, **1993**, 3, 242–245.
- [22] P. Bastiaens, I. H., A. Squire, *Trends in Cell Biology*, **1999**, 9, 48–52.
- [23] B. A. Pollok, R. Heim, *Trends in Cell Biology*, **1999**, 9, 57–60.
- [24] C. Matsumoto, K. Hamasaki, H. Mihara, A. Ueno, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, 10, 1857–1861.
- [25] J.-F. Rees, B. d. Wergifosse, O. Noiset, M. Dubuisson, B. Janssens, E. M. Thompson, *J. Exp. Biol.*, **1998**, 201, 1211–1221.
- [26] J. F. Head, S. Inouye, K. Teranishi, O. Shimomura, *Nature (London)*, **2000**, 405, 372–376.
- [27] F. G. Prendergast, *Nature (London)*, **2000**, 405, 291–293.
- [28] L. Deng, S. V. Markova, E. S. Vysotski, Z.-J. Liu, J. Lee, J. Rose, B.-C. Wang, *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 33647–33652.
- [29] M. J. Cormier, in *Bioluminescence and Chemiluminescence*, (Hrsg.: M. DeLuca, W. D. McElroy), Academic Press, London, **1981**, S. 225–233.
- [30] A. B. Cubitt, R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross, R. Y. Tsien, *Trends Biochem. Sci.*, **1995**, 20, 448–455.
- [31] R. Heim, R. Y. Tsien, *Current Biology*, **1996**, 6, 178–182.
- [32] D. A. Zacharias, G. S. Baird, R. Y. Tsien, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **2000**, 10, 416–421.
- [33] H. Günther, *NMR-Spektroskopie*, 2. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1983**.

- [34] L. G. S. Brooker, G. H. Keyes, R. H. Sprague, R. H. VanDyke, E. VanLare, G. VanZandt, F. L. White, H. W. J. Cressman, S. G. J. Dent, *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, 73, 5332–5350.
- [35] J. F. Coetzee (Hrsg.), *Recommended Methods for Purification of Solvents and Tests for Impurities*, Pergamon Press, Oxford, **1982**.
- [36] Y. Marcus, S. Glikberg, *Pure Appl. Chem.*, **1985**, 57, 855.
- [37] C. Reichardt, *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, 2. Aufl., VCH, Weinheim, **1990**.
- [38] K. D. Nolte, S. Dähne, *Advances in Molecular Relaxation and Interaction Processes*, **1977**, 10, 299–329.
- [39] K. M. Kadish, J. E. Anderson, *Pure Appl. Chem.*, **1987**, 59, 703.
- [40] J. F. Coetzee, T. H. Chang, *Pure Appl. Chem.*, **1986**, 58, 1535.
- [41] R. Hirayama, M. Kawase, T. Kimachi, K. Tanaka, F. Yoneda, *J. Heterocycl. Chem.*, **1989**, 26, 1255–1259.
- [42] M. L. Crossley, P. F. Dreisbach, C. M. Hofmann, R. P. Parker, *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, 74.3, 573–578.
- [43] V. M. Micovic, M. L. Mihailovic, *J. Org. Chem.*, **1953**, 18, 1190–1200.
- [44] J. Biehringer, A. Tanzen, *Chemiker Zeitung*, **1912**, 389–396.
- [45] J. E. Baldwin, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1976**, 734.
- [46] R. Child, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1932**, 715–720.
- [47] H. G. O. Becker, et al., in *Organikum*, 19. Aufl., Barth, Dt. Verl. der Wiss., Leipzig, **1993**, S. 325–326.
- [48] R. J. W. Cremlyn, R. Hornby, *J. Chem. Soc.*, **1969**, 1341–1345.
- [49] P. A. Terent'ev, L. A. Kazitsyna, *J. Gen. Chem. U. R. S. S.*, **1950**, 19, 481–491.
- [50] P. A. Terent'ev, L. A. Kazitsyna, *J. Gen. Chem. U. R. S. S.*, **1950**, 20, 185–187.
- [51] B. Ramamurthy, M. V. Bhatt, *J. Med. Chem.*, **1989**, 32, 2421–2426.
- [52] I. Zeid, I. Ismail, *Liebigs Ann. Chem.*, **1974**, 667–670.
- [53] H. Adkins, R. Eloffson, M., A. G. Rossow, C. Robinson, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1949**, 71, 3622–3629.

- [54] T. Hirota, *J. Heterocycl. Chem.*, **1986**, *23*, 1715–1716.
- [55] J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.*, **1971**, *75*, 991–1024.
- [56] J. S. Lindsey, L. A. Corkan, H. Du, R.-C. A. Fuh, J. Li, *Photochem. Photobiol.*, **1998**, *68(2)*, 141–142.
- [57] A. C. Cope, D. Heyl, D. Peck, C. Eide, A. Arroyo, *J. Am. Chem. Soc.*, **1941**, *63*, 356–358.
- [58] H. Biltz, H. Wittek, *Chem. Ber.*, **1921**, *54.2*, 1035–1058.
- [59] A. Dhasmana, J. P. Barthwal, B. R. Pandey, B. Ali, K. P. Bhargava, *J. Heterocycl. Chem.*, **1981**, *18*, 635–637.
- [60] H. Schulte, *Chem. Ber.*, **1954**, *6*, 820–824.
- [61] E. Langhals, H. Balli, *Helv. Chim. Acta*, **1985**, *68*, 1782–1797.
- [62] K. A. Jensen, P. H. Nielsen, *Acta Chem. Scand.*, **1966**, *20*, 597–629.
- [63] R. H. Shapiro, J. W. Serum, A. M. Duffield, *J. Org. Chem.*, **1968**, *33(1)*, 243–250.
- [64] J. Seibl, in *Massenspektrometrie*, (Hrsg.: Prof. Dr. W. Walter), Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt am Main, **1970**, S. 36 ff.
- [65] L. V. Sudha, D. N. Sathyanarayana, *Spectrochim. Acta, Part A*, **1984**, *40A(8)*, 751–755.
- [66] P. K. Mohanta, S. Dhar, S. K. Samal, H. Ila, H. Junjappa, *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 629–637.
- [67] Y. Marcus, *Pure Appl. Chem.*, **1985**, *57*, 860.
- [68] M. Korger, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, in Vorbereitung.
- [69] A. K. Ghose, G. N. Revankar, R. K. Robins, V. N. Viswanadhan, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **1989**, *29*, 163–172.
- [70] E. J. Lien, H. Gao, *Pharm. Res.*, **1995**, *12*, 583–587.
- [71] W. F. ten Berge, T. E. McKone, P. J. Robinson, A. Wischut, *Chemosphere*, **1995**, *30*, 1275–1296.
- [72] R. H. Guy, R. O. Potts, *Am. J. Ind. Med.*, **1993**, *23*, 711–719.
- [73] G. Wedler, *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, 3. Aufl., VCH, Weinheim, **1987**.

- [74] M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Steward, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 3902–3909.
- [75] N. Bodor, Z. Gabanyi, C.-K. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 3783–3786.
- [76] A. Gavezzotti, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, *105*, 5220–5225.
- [77] M. Handke, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, in Vorbereitung.
- [78] IUPAC, *Nomenclature of Organic Chemistry, Sections A, B, C, D, E, F, and H*, Pergamon Press, Oxford, **1979**.
- [79] P. Fresenius, K. Görlitzer, *Organisch-chemische Nomenklatur: Grundlagen, Regeln, Beispiele*, 3. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **1991**.
- [80] P. Kowalski, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **1995**, 143.
- [81] K. Tilley, M. Akhtar, D. Gani, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1994**, 3079–3087.
- [82] O.-A. Neumüller, K. Eßer, K. Siekmann, *Römpps Chemie-Lexikon, Vol. 2*, 7. Aufl., Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart, **1973**.
- [83] L. Floch, S. Kovác, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1975**, *40*, 2845–2854.
- [84] D. T. Elmore, *J. Chem. Soc.*, **1958**, 3489–3492.
- [85] J. Ryczek, *Pol. J. Chem.*, **1994**, *68*, 2599–2604.
- [86] D. Peltier, A. Pichevin, A. Bonnin, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1961**, 1619–1621.
- [87] V. J. Traynelis, J. G. Dadura, *J. Org. Chem.*, **1961**, *26*, 1813–1818.
- [88] E. Fischer, *Chem. Ber.*, **1901**, *1*, 433–454.
- [89] T. Johnson, B., A. Renfrew, G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1925**, *47*, 240–245.
- [90] M. Stern, J. Tafel, *Chem. Ber.*, **1900**, *33*, 2232.
- [91] B. B. Dey, R. H. R. Rao, T. R. Seshadri, *J. Indian Chem. Soc.*, **1935**, *12*, 140–141.
- [92] R. Stoermer, *Liebigs Ann. Chem.*, **1900**, *312*, 237–336.

-
- [93] Patent, BASF AG, GB 1190274, **1970**.
- [94] S. R. Koepke, R. Kupper, C. Mechejda, J., *J. Org. Chem.*, **1979**, *44*, 2718–2722.
- [95] B. G. Shearer, L. Shuliang, J. A. Oplinger, L. W. Frick, E. P. Garvey, E. S. Furfine, *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*(12), 1901–1905.
- [96] N. B. Ambati, V. A. Hanumanthu, P. Hanumanthu, *Synth. Commun.*, **1997**, *27*(9), 1487–1493.
- [97] H. Posvic, *J. Org. Chem.*, **1974**, *39*, 2575–2580.
- [98] I. Wawer, V. Koleva, *Magn. Reson. Chem.*, **1993**, *31*, 375–379.
- [99] Okawara, *Chem. Pharm. Bull.*, **1983**, *31*, 507–512.
- [100] Hofmann, *Chem. Ber.*, **1868**, *1*, 27.
- [101] G. N. Vassilev, P. A. Jonova, *Pharmazie*, **1978**, *33*, 270–273.
- [102] G. Kaupp, J. Schmeyers, J. Boy, *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 9, 6899–6911.
- [103] R. F. Hunter, W. J. Jones, *J. Chem. Soc.*, **1930**, 2190–2193.
- [104] L. Doub, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, *80*, 2205–2210.
- [105] Patent, Ciba Ltd., GB1116793, **1968**.
- [106] T. Tarantelli, C. Furlani, *Gazz. Chim. Ital.*, **1970**, *100*(11), 1012–1025.
- [107] Patent, B. Knabe, H.-J. Lang, E. Granzer, DE2640358, **1978**.
- [108] Patent, Hoechst AG, DE 2624856, **1977**.
- [109] C. W. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*, 2923–2925
- [110] Patent, Agfa-Gevaert, GB 1231884, **1971**.