



**Fluoreszenzmarkierung von Arginin und argininhaltigen
kleinen Peptiden durch Umwandlung der Guanidin-Gruppe
in Amino-Diaza-Azulene**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Mark Frederik Derks

aus Kempen am Niederrhein

Düsseldorf, Juli 2014

Aus dem Institut für Organische und Makromolekulare Chemie,
Abteilung für Stereoselektive Synthesen
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. M. Braun

Koreferent: Prof. Dr. T. J. J. Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 25. September 2014

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2012 bis Juli 2014 am Institut für Organische und Makromolekulare Chemie I der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. M. Braun angefertigt.

Ich versichere, dass die vorliegende Dissertation eigenständig von mir verfasst wurde, und dass ich alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel genau angegeben habe. Alles, was ich aus anderen Arbeiten in veränderter oder unveränderter Form übernommen habe, wurde als solches kenntlich gemacht.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder ähnlichen Form noch in keiner anderen Institution eingereicht.

Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, Juli 2014

Mark Derks

für

Sarah

***... ex arte calcinati, et illuminato aeri
seu solis radiis, seu flammae
fulgoribus expositi, lucem inde sine
calore concipiunt in sese; ...***

[...richtig kalziniert und beleuchtet
entweder durch Sonnenlicht oder Flammen,
offenbaren sie Licht aus sich selbst
ohne Wärme aufzunehmen...]

Licetus, 1640 über die „Bologneser Leuchtsteine“

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem geschätzten Doktorvater Herrn Professor Dr. Manfred Braun für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und das mir entgegengebrachte Vertrauen sowie für seine stets vorhandene Diskussionsbereitschaft. Auch für die hervorragende Arbeitsatmosphäre während meiner gesamten Zeit am Institut möchte ich mich ganz herzlich in erster Linie bei meinem Doktorvater bedanken, der maßgeblich dazu beigetragen hat, dass ich mich immer willkommen gefühlt habe.

Herrn Professor Dr. Thomas J. J. Müller danke ich recht herzlich für die Übernahme des Koreferats.

Bei Herrn Professor Dr. Claus C. A. M. Seidel möchte ich mich für seine Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bedanken. Seiner Mitarbeitern Frau Deborah Sandrin, M. Sc. möchte ich ganz herzlich für die Fluoreszenzmessungen und die Bestimmung der Quantenausbeuten und Lebensdauern meiner Proben danken.

Herrn Privatdozent Dr. Klaus Schaper möchte ich an dieser Stelle nochmals für die quantenchemischen Berechnungen danken.

Herrn Dr. Bernhard Mayer möchte ich in ganz besonderem Maße meinen Dank für seine große Hilfsbereitschaft und rege Unterstützung bei diversen Problemen an den HPLC-Anlagen aussprechen.

Ein Dankeschön gilt auch Herrn Dr. Stefan Beutner für die stets angenehme Zusammenarbeit bei den Praktika und Seminaren, sowie vielen freundlichen Gesprächen.

Bei Frau Nina Mide, B. Sc. möchte ich mich für Ihren Einsatz in Ihrer Bachelorarbeit zu den Untersuchungen der *Sakaguchi*-Farbstoffe ganz herzlich bedanken.

Meinen Arbeitskreiskollegen Frau Sabine Houben, Frau Dipl.-Chem. Anke Domann, Herrn Dipl.-Chem. Robin Visse, Herrn Dipl.-Chem. Raphael Opitz und Herrn Dr. Andreas Fischer, sowie allen ehemaligen Mitarbeitern danke ich für eine ganz tolle und harmonische Arbeitsatmosphäre, viel Spaß während meiner gesamten Zeit und die immer vorhandene Hilfsbereitschaft eines jeden einzelnen. *Ich danke euch allen für eine wirklich unvergessliche Zeit!*

Bei Herrn Eric Schönstein möchte ich mich sehr herzlich für die unzähligen netten Gespräche und seine Hilfsbereitschaft bedanken.

Ebenfalls bei Frau Dagmar Koschel, Frau Heidi Webers und Frau Sonja Coors möchte ich mich für viele freundliche Gespräche bedanken.

Herrn Dr. Peter Tommes und Herrn Ralf Bürgel gilt mein Dank für die Aufnahmen der vielen Massenspektren.

Frau Maria Beuer danke ich für die Aufnahmen der Kernresonanzspektren.

Frau Gaby Zerta danke ich für die Durchführung der Elementaranalysen.

Herrn Dipl.-Chem. Robin Visse danke ich nochmals für die Hilfe bei den Messungen der Circular dichroismus-Spektren.

Ein ganz großes Dankeschön möchte ich aber auch meinen Freunden und meiner gesamten Familie für ihre Unterstützung aussprechen, insbesondere meinen lieben Eltern Margret & Ulrich, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben. *Danke, dass ihr immer für mich da wart und sein werdet!*

Mein größter Dank gilt allerdings meiner wunderbaren Frau Sarah, die mir immer viel Mut zugesprochen hat und mir mit viel Liebe, Motivation aber auch Geduld zur Seite stand. *Ich liebe dich!*

0. Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	0
2. Einleitung	3
2.1 Einführung und Stand der Forschung	4
2.2 Fluoreszenzeigenschaften von organischen Molekülen	8
2.2.1 Fluoreszenzquantenausbeute	9
2.2.2 Fluoreszenzlebensdauer	11
2.2.3 Die <i>Stokes</i> -Verschiebung	13
2.2.4 Weitere Einflüsse auf die Fluoreszenz	13
2.3 Fluoreszenzfarbstoffe in der Optischen Diagnostik	15
2.4 Amino-Diaza-Azulene	16
2.5 Eigene Vorarbeiten	18
3. Hauptteil	24
3.1 Zielsetzung	25
3.2 Trennung der Regioisomeren 8a und 8b	26
3.2.1 Trennung über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	26
3.2.1.1 Funktionsweise	26
3.2.1.2 Trennung der Regioisomeren 8a und 8b über <i>reversed-phase</i> -HPLC	28
3.2.2 Trennung über pH-Wert-abhängige Extraktion	29
3.3 Optimierung der Synthese	30
3.3.1 Einsatz von 2-Chlortropon	30
3.3.2 Zeitliche Untersuchung des Reaktionsverlaufes	31
3.3.3 Regioselektive Darstellung des Regioisomeren 8a	32
3.4 Alternative Synthesestrategien	34
3.4.1 Regioselektive Synthese ausgehend von (<i>L</i>)-N ^α -Boc-N ^ω -benzylornithin	34
3.4.2 Regiospezifische Steuerung über 3,5,7-Tribromtropolonether	35
3.4.3 Regiospezifische Steuerung über 3,5,7-Tri- <i>p</i> -tolylthiotropolonmethylether	36
3.5 Verwendete Peptide zur Arginin-Markierung	38
3.5.1 Potentielle Nebenreaktionen	39
3.5.2 Struktur der markierten Peptide	40
3.6 Ergebnisse der präparativen Trennung der Regioisomere 8a	
und 8b	43
3.6.1 Trennung über <i>reversed-phase</i> -HPLC	43
3.6.1.1 Ergebnisse der 1. Fraktion	43
3.6.1.2 Ergebnisse der 2. Fraktion	45

Inhaltsverzeichnis

3.6.2	Trennung über pH-Wert-abhängige Extraktion	47
3.7	Untersuchungen zur <i>Sakaguchi</i>-Reaktion	53
3.7.1	Allgemeines über die Struktur des <i>Sakaguchi</i> -Farbstoffes	53
3.7.2	Zielsetzung und Ergebnisse der Bachelorarbeit von <i>N. Miede</i>	56
3.7.2.1	Zielsetzung	56
3.7.2.2	Ergebnisse	57
3.8	Synthesen	58
3.8.1	Darstellung der Troponderivate	58
3.8.1.1	Synthese von 3,5,7-Tribromtropolon (17)	58
3.8.1.2	Synthese von 3,5,7-tri- <i>p</i> -Tolylthiotropolon (22)	58
3.8.1.3	Synthese von 2-Chlortropon (9)	59
3.8.1.4	Synthese von 2-Butylaminotropon (30)	59
3.8.1.5	Synthese von 2-Butylthiotropon (31)	60
3.8.2	Darstellung der Tropolonether	60
3.8.2.1	Synthese von 2-Methoxytropolon (4)	60
3.8.2.2	Synthese von 2-Ethoxytropolon (11)	61
3.8.2.3	Synthese von 3,5,7-Tribromtropolonmethylether (18)	61
3.8.2.3.1	Mechanismus der <i>Mitsunobu</i> -Reaktion	62
3.8.2.4	Synthese von 3,5,7-tri- <i>p</i> -Tolylthiotropolonmethylether (23)	63
3.8.3	Darstellung der nicht-natürlichen Aminosäuren	64
3.8.3.1	Ausgehend von 2-Chlortropon 9 (MD-37)	64
3.8.3.2	Optimierung der Reaktionsbedingungen	66
3.8.3.3	Weitere Optimierung durch den Einsatz von Natriummethanolat	68
3.8.3.3.1	Einsatz von Natriummethanolat und Tropolonmethylether 4 (MD-57)	68
3.8.3.3.2	Einsatz von Natriummethanolat und Tropolonethylether 11 (MD-64)	70
3.8.3.3.3	Vergleich der ¹ H-NMR-Spektren vor der Aufarbeitung	72
3.8.3.4	Ausgehend von 3,5,7-Tribromtropolonmethylether (18)	73
3.8.3.4.1	Umsetzung mit Guanidinhydrochlorid	74
3.8.3.5	Ausgehend von 3,5,7-tri- <i>p</i> -Tolylthiotropolonmethylether (23)	76
3.8.4	Regioselektive Darstellung der nicht-natürlichen Aminosäure 8a ausgehend von Boc-Ornithin	77
3.8.4.1	Darstellung von N ^α -tert.-butoxycarbonyl-N ⁰ -benzylornithin (S)-12	77
3.8.4.2	Darstellung von N ^α -tert.-butoxycarbonyl-N ⁰ -benzylarginin (S)-13	78
3.8.4.2.1	Unter Verwendung von Cyanamid	78
3.8.4.2.2	Unter Verwendung von 1 <i>H</i> -Pyrazol-1-carboxamidhydrochlorid (MD-25)	80
3.8.4.3	Darstellung der nicht-natürlichen Aminosäure (S)-14	81
3.8.5	Markierung ausgesuchter Peptide	84
3.8.5.1	Arginin-Markierung im Dipeptid Boc-Gly-Arg-OH (25)	84
3.8.5.2	Arginin-Markierung im Tetrapeptid H-Gly-Gly-Arg-Ala-OH (26)	86
3.8.5.3	Arginin-Markierung im Pentapeptid <i>Thymopentin</i> (27)	89

Inhaltsverzeichnis

3.8.5.3.1	Untersuchung zum Reaktionsverlauf bei der Umsetzung von _____ Tropolonmethylether in Anwesenheit der beiden Aminosäuren _____ Boc-Arg-OH (10) und Boc-Lys-OH (53) _____	90
3.8.5.3.2	Synthese des Aminotropon-Konjugates 54 _____	93
3.8.5.3.3	Untersuchung zum Reaktionsverlauf bei der Umsetzung von _____ Tropolonmethylether mit <i>Thymopentin</i> bei Raumtemperatur _____	93
3.8.5.3.4	Optimierung der Arginin-Markierung in <i>Thymopentin</i> (27) _____	94
3.8.6	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer an Peptiden mit fluoreszenzmarkiertem _____ Arginin _____	101
4.	Zusammenfassung _____	104
4.	Summary _____	112
5.	Experimentalteil _____	120
5.1	Chemikalien _____	121
5.2	Materialien und Geräte _____	122
5.3	Lösungsmittel _____	124
5.4	Allgemeine Arbeitstechniken _____	125
5.5	Darstellungen _____	126
5.5.1	3,5,7-Tribrom-2-hydroxycyclohepta-2,4,6-trien-1-on (17) _____	126
5.5.2	2-Hydroxy-3,5,7-tris(<i>p</i> -tolylthio)cyclohepta-2,4,6-trien-1-on (22) _____	126
5.5.3	2-Chlorcyclohepta-2,4,6-trien-1-on (9) _____	127
5.5.4	2-(Butylamino)cyclohepta-2,4,6-trien-1-on (30) _____	127
5.5.5	2-(Butylthio)cyclohepta-2,4,6-trien-1-on (31) _____	129
5.5.6	Darstellung der Tropolonether _____	130
5.5.6.1	2-Methoxycyclohepta-2,4,6-trien-1-on (4) _____	130
5.5.6.2	2-Ethoxycyclohepta-2,4,6-trien-1-on (11) _____	131
5.5.6.3	3,5,7-Tribrom-2-methoxycyclohepta-2,4,6-trien-1-on (18) _____	132
5.5.6.4	2-Methoxy-3,5,7-tris(<i>p</i> -tolylthio)cyclohepta-2,4,6-trien-1-on (23) _____	133
5.5.7	Darstellung der nicht-natürlichen Aminosäuren _____	133
5.5.7.1	Als Gemisch der Regioisomere 2-[(<i>tert.</i> -Butoxycarbonyl)amino]-5- _____ (cyclohepta[<i>d</i>]imidazol-2-ylamino)-pentansäure (8a) und 2-[(<i>tert.</i> - _____ Butoxycarbonyl)amino]-5-(2-iminocyclohepta[<i>d</i>]imidazol-1(<i>2H</i>)-yl)- _____ pentansäure (8b) _____	133
5.5.7.1.1	Trennung der beiden Regioisomere 8a und 8b über semi-präparative _____ <i>reversed-phase</i> -HPLC _____	137
5.5.7.1.2	Trennung der beiden Regioisomere 8a und 8b über pH-abhängige _____ Extraktion (MD-54) _____	144
5.5.7.2	Ausgehend von 2-Chlorcyclohepta-2,4,6-trien-1-on (9) (MD-37) _____	155

Inhaltsverzeichnis

5.5.7.3	Regioselektive Darstellung des Isomers 8a	157
5.5.7.3.1	Einsatz von Natriummethanolat und 2-Methoxycyclohepta-2,4,6-trien-1-on (4) (MD-57)	157
5.5.7.3.2	Einsatz von Natriumethanolat und 2-Methoxycyclohepta-2,4,6-trien-1-on (11) (MD-64)	159
5.5.8	Regioselektive Darstellung der nicht-natürlichen Aminosäure 8a ausgehend von Boc-Ornithin	160
5.5.8.1	(S)-5-(Benzylamino)-2-[(<i>tert.</i> -butoxycarbonyl)amino]-pentansäure (S)-12	160
5.5.8.2	Darstellung von N ^α - <i>tert.</i> -Butoxycarbonyl-N ^β -benzyl-L-arginin (S)-13	162
5.5.8.2.1	Unter Verwendung von Cyanamid	162
5.5.8.2.2	Unter Verwendung von 1H-Pyrazol-1-carboxamidhydrochlorid (MD-25)	163
5.5.8.3	(S)-2-[(<i>tert.</i> -Butoxycarbonyl)amino]-5-(cyclohepta-[d]-imidazol-2-ylamino-2-benzyl)-pentansäure (S)-14 (MD-23)	164
5.5.9	Markierung der Peptide	167
5.5.9.1	(S)-2-[2-[(<i>tert.</i> -Butoxycarbonyl)amino]acetamido]-5-(cyclohepta[d]imidazol-2-ylamino)-pentansäure (30)	167
5.5.9.2	{(S)-2-[2-(2-aminoacetamido)acetamido]-5-(cyclohepta[d]imidazol-2-ylamino)-pentanoyl}-L-alanin	171
5.5.9.3	(2S,5S,8S,11S,14S)-14-Amino-8-(carboxymethyl)-17-(cyclohepta[d]imidazol-2-ylamino)-2-(4-hydroxybenzyl)-5-isopropyl-4,7,10,13-tetraoxo-11-[4-[(7-oxocyclohepta-1,3,5-trien-1-yl)amino]butyl]-3,6,9,12-tetra-aza-hepta-caprinsäure	172
5.5.10	(S)-2-[(<i>tert.</i> -Butoxycarbonyl)amino]-6-[(7-oxocyclohepta-1,3,5-trien-1-yl)amino]-hexansäure	173
6.	Anhang	175
6.1	Literaturverzeichnis	176
6.2	Spektren	180
6.2.1	GC/MS-Spektrum: Tropolonmethylether (4)	180
6.2.2	GC/MS-Spektrum: Tropolonethylether (11)	181
6.3	Abbildungs- und Strukturverzeichnis	182
6.3.1	Abbildungen	182
6.3.2	Schemata	184
6.3.3	Diagramme	185
6.3.4	Tabellen	185
6.3.5	Strukturen	186

1. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolutiert
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Boc	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
bspw.	beispielsweise
Bzl	Benzoyl
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
cm ⁻¹	Wellenzahl
d	Dublett (¹ H-NMR)
dd	Dublett von Dublett (¹ H-NMR)
ddt	Dublett von Dublett von Triplet (¹ H-NMR)
DC	Dünnschichtchromatographie
dest.	destilliert
DME	Ethylenglykoldimethylether
d. Th.	der Theorie
ε	Extinktionskoeffizient
ε _M	molarer Extinktionskoeffizient
EI	Elektronische Ionisation
ESI	Elektronenspray Ionisation
eV	Elektronenvolt
GC	Gaschromatographie
Gly	Glycin
H	Wasserstoffatom
HR-MS	hochauflösende Masse (<i>High Resolution Mass Spectrum</i>)
Hz	Hertz
J	Kopplungskonstante
λ	Wellenlänge
m	Multiplett (¹ H-NMR)
Me	Methyl
min	Minuten
m/z	Masse pro Ladung

Abkürzungsverzeichnis

MHz	Megahertz
MS	Massenspektroskopie
nm	Nanometer
NMR	Kernresonanzspektroskopie (<i><u>N</u>uclear <u>M</u>agnetic <u>R</u>esonanz</i>)
Ph	Phenyl
ppm	<i>parts per million</i> (chem. Verschiebung im NMR relative zu TMS)
q	Quartett (¹ H-NMR)
reflux.	Refluxieren (zum Rückfluss erhitzen)
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (¹ H-NMR)
Ser	Serin
t	Triplett (¹ H-NMR)
<i>tert.</i>	tertiär
TMS	Tetramethylsilan (NMR-Standard)
z.B.	zum Beispiel

2. Einleitung

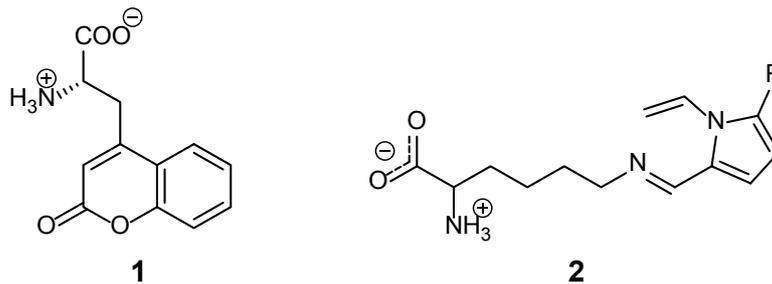
2.1 Einführung und Stand der Forschung

Für das Verständnis komplexer biochemischer Prozesse in Proteinen, um deren Struktur, Wechselwirkung und Wirkungsweise untersuchen zu können, erfordert es effiziente Methoden zur Markierung und Lokalisierung. Ein wertvolles Werkzeug stellt dabei die ortsspezifische Implementierung von Fluoreszenzfarbstoffen als chemische Reporter, wie z.B. neben nicht-natürlichen Aminosäuren mit fluorophoren Resten, vor allem autofluoreszierende Proteine, wie das aus der Qualle *Aequorea victoria* stammende „Green fluorescent protein“ (GFP), dar, um diese Ziele realisieren zu können. Letzteres ist ein 21 kDa schweres Apoprotein, das sich spontan in eine Struktur umwandelt, die grün fluoresziert. Die Emission wird dabei von einem Chromophor hervorgerufen, der sich im Inneren einer Peptidhülle befindet. Die Tatsache, dass GFP auch in viele nicht-quallenartige Zelltypen exprimiert werden kann, führte zu einer rasanten Etablierung als Fluoreszenzsonde. Nachteilig ist allerdings die geringe chemische und photochemische Stabilität des Fluorophors, die sich in einem Ausbleichen der Fluoreszenz nach relativ kurzer Zeit bemerkbar macht.^[1] Im Vergleich zu den Dimensionen von autofluoreszierenden oder photoschaltbaren Proteinen, welche Molekulargewichte größer 25 kDa besitzen, sollten kleine organische Fluorophore, nicht zuletzt wegen ihrer geringen Größe, priorisiert werden, da diese die Proteineigenschaften nachweislich weniger stark beeinflussen und so, über Bildgebungsverfahren, die auf Fluoreszenz basieren, Einsichten über sensitive, nicht invasive Messungen von zellulären Vorgängen, in die Organisation, Entwicklung und Pathologie von Zellen, erlauben.^[2] Weiterhin sind die hohen Quantenausbeuten und Photostabilitäten kleiner Fluoreszenzsonden zur zellulären Prozessvisualisierung ein wichtiger Vorteil.^[3]

Neben dem intrinsischen Vorliegen eines Fluorophors, wie z.B. im GFP gibt es im Wesentlichen zwei weitere Konzepte zur Implementierung fluorophorer Sonden in Peptide oder Proteine. Zum einen durch *in vitro*- oder *in vivo*-Einbau einer nicht-natürlichen Aminosäure, welche zuvor aus einer, zum Beispiel proteinogenen Aminosäure und einer fluorophoren Gruppe synthetisiert wurde.

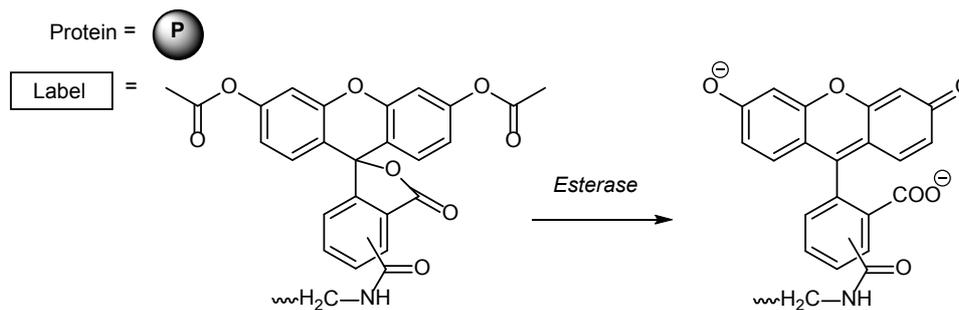
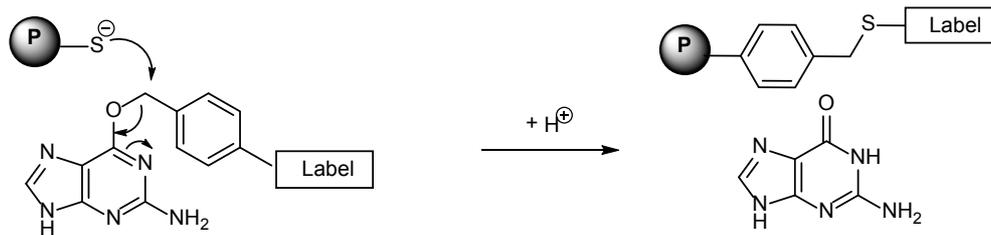
Einleitung

Dieses Konzept erlaubt die Bereitstellung maßgeschneiderter Fluorophore. Eine breite Palette derartiger Aminosäuren mit fluorophoren Resten wurde beschrieben.^[4a] Als Beispiele seien hier einerseits die nicht-natürliche Aminosäure „Cou“ (**1**) genannt, ein Glycinderivat, welches ausgehend von N-geschütztem Glutaminsäureester enantiomerenrein von *Schultz et al.*^[4b] dargestellt und in *E. coli* in Proteine inkorporiert werden konnte, und andererseits die auf *L*-Lysin basierende nicht-natürliche Aminosäure **2**, welche kürzlich von *Trofimov et al.*^[5] durch Kondensation mit 1-Vinylpyrrol-2-carb-aldehyden synthetisiert wurde.



Schema 2.1-1: Beispiele fluoreszierender nicht-natürlicher Aminosäuren

Zum anderen kann ein Einbau lichtemittierender Sonden durch Konjugatbildung einer fluorophoren Gruppe mit einem Peptid oder Protein erreicht werden. Hierbei nutzt man zur „Anbindung“ die spezifische Reaktivität funktioneller Gruppen einzelner Aminosäuren, wie zum Beispiel die der Thiolgruppe der Aminosäure Cystein zur Markierung mit dem Xanthenfarbstoff Fluoreszein.

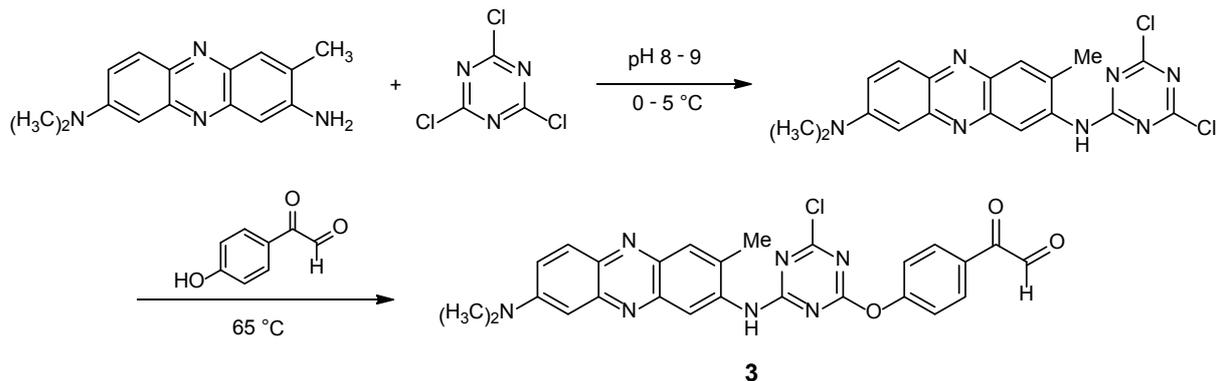


Schema 2.1-2: Beispiel für die Konjugation zwischen Cystein und Fluoreszein

Einleitung

Der in Schema 2.1-2 beschriebene Farbstoff wird als Diacetat des Fluoreszeins synthetisiert, um seine Membrandurchlässigkeit zu erhöhen. In den Zellen wird die deacetalisierte Form des Fluoreszeins über Hydrolyse durch Esterasen schließlich freigesetzt.^[6]

Ma et al.^[7a] berichteten 2008 über eine polaritätsempfindliche Fluoreszenzsonde **3** auf Basis des Phenazin-Farbstoffes Neutralrot (→Schema 2.1-3). Dabei handelt es sich um 3-(4-Chlor-p-glyoxal-phenoxy-1,3,5-triazinylamino)-7-(dimethylamino)-2-methyl-phenazin (CGTDP), welches, nach Ansicht der Autoren, zur selektiven Markierung der Aminosäure Arginin genutzt werden kann, indem die α -Diketon-Gruppe mit der Guanidiniumgruppe in der Argininseitenkette kondensiert. Da die beschriebene Sonde in einer empfindlichen Reaktion eine Verschiebung der maximalen Emissionswellenlänge der Fluoreszenz zeigte, benutze die Gruppe um *Ma* diese zur Erfassung lokaler Polaritäts- und Konformationsänderungen des aktiven Zentrums von Kaninchenmuskel-Kreatinkinase (CK), welche zuvor denaturiert wurde.



Schema 2.1-3: Synthese von CGTDP

Bereits im Jahre 1925 publizierte *Sakaguchi*^[7b] seine Beobachtungen über eine empfindliche Nachweismethode für monoalkylierte Guanidinderivate, die im Besonderen für die Aminosäure Arginin eine qualitative Nachweisreaktion darstellt. Ob der bei dieser Reaktion entstehende Chromophor fluoreszenzaktiv ist, ist bis zum jetzigen Stand nicht literaturbekannt. Da eine solche selektive Fluoreszenzmarkierung von Arginin für diese Arbeit von großem Interesse ist, wurden Untersuchungen über *Sakaguchi*-Farbstoffe im Rahmen einer Bachelorarbeit am Institut für Organische und Makromolekulare Chemie der Heinrich-Heine-Universität im Arbeitskreis von Prof. Dr. Braun angestellt, dessen Ergebnisse in Kapitel 3.7 ausführlich diskutiert werden.

Einleitung

Als kurzes Resümee der Einführung bleibt festzuhalten, dass die Synthese organischer Fluoreszenzmoleküle, gerade im Hinblick auf die rasante Entwicklung in der Fluoreszenzmikroskopie,^[2] zu einer wahren Renaissance führte. Diese sich stetig verbessernde Technologie in Kombination mit maßgeschneiderten und immer leistungsstärkeren Fluoreszenzsonden erlaubt zellbiologische und biochemische Einblicke, welche von hohem Interesse für biomedizinische Anwendungen, insbesondere im Hinblick auf optische Verfahren zur Aufklärung von Vorgängen in lebenden Zellen, sein kann.

2.2 Fluoreszenzeigenschaften von organischen Molekülen

Die Elektronenübergänge eines organischen Moleküls lassen sich anhand des in Abbildung 2.2-1 dargestellten *Jablonski-Termschema* veranschaulichen. In diesem sind die photophysikalischen Prozesse durch verschiedene Pfeile angedeutet, wobei für alle strahlungslosen Prozesse gestrichelte Linien eingezeichnet sind. Dieses Termschema ist jedoch dahingehend vereinfacht, dass die Rotationsniveaus in den einzelnen Schwingungszuständen aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht explizit angegeben sind. Es sind lediglich die einzelnen Schwingungsenergieniveaus als schmale horizontale Linien eingezeichnet. ^[8,9]

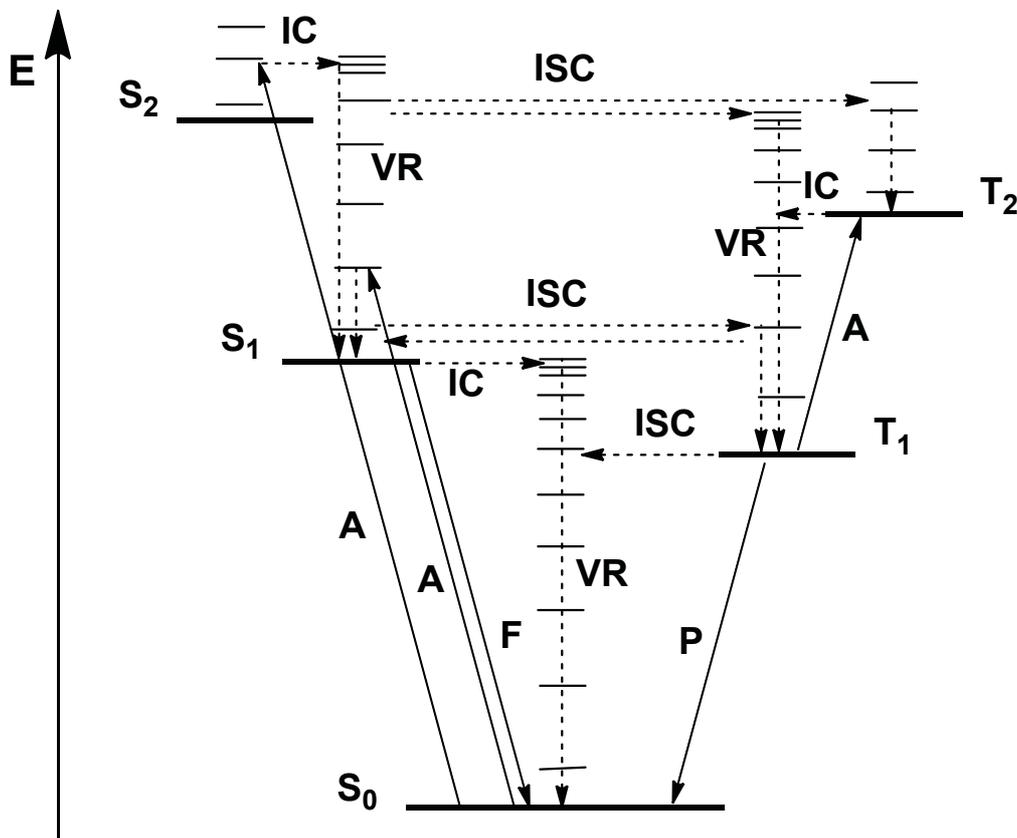


Abbildung 2.2-1: *Jablonski-Termschema*^[nach 8]

Zustände: Singulettzustand (S₀, S₁, S₂), Triplettzustand (T₁, T₂)

Prozesse: Absorption (A), Fluoreszenz (F), Phosphoreszenz (P), Schwingungsrelaxation (VR),
Innere Umwandlung (IC), Interkombinationsübergang (ISC).

Einleitung

Absorbiert das chromophore System eines Moleküls nun ein Photon der Energie $E_{ex} = h c / \lambda_{ex}$ des sichtbaren oder ultravioletten Lichtes, werden entsprechend die π - oder n-Elektronen vom Schwingungsgrundzustand S_0 in einen höheren Schwingungszustand S_1 oder S_2 angeregt. Dieser Prozess ist nach dem *Franck-Condon-Prinzip* nur möglich, weil er mit ca. 10^{-15} Sekunden so schnell abläuft, dass die trägen Atomkerne ihren Abstand in dieser Zeit nicht ändern können. Vom angeregten Schwingungszustand S_1 oder S_2 relaxiert das Molekül, gerade in gelöster Form, in den niedrigsten Schwingungszustand von S_1 (VR, engl. *vibrational relaxation*), wobei die freiwerdende Energie als Stoß- oder Wärmeenergie an das Lösungsmittel abgegeben wird. Typischerweise kann das Molekül von hier aus, durch Emission eines Photons (F, Fluoreszenz), in den Grundzustand S_0 zurückkehren. Es besteht aber auch die Möglichkeit zweier weiterer strahlungsloser Übergänge: zum einen der Interkombinationsübergang (ISC, engl. *inter system crossing*), bei dem das Molekül vom Singulett-Zustand S_1 oder S_2 unter Spin-Umkehr in die etwas energieärmeren Triplett-Zustände T_1 oder T_2 übergeht, von wo aus es unter erneuter Spin-Umkehr und Lichtemission in den Grundzustand S_0 zurückfallen kann (P, Phosphoreszenz); oder zum anderen kann unter Spin-Erhaltung durch eine innere Umwandlung eine strahlungslose Desaktivierung erfolgen, indem das Molekül von einem angeregten Zustand in einen anderen übergeht (IC, engl. *internal conversion*).^[10] In der Fluoreszenzspektroskopie sind neben den Emissionsspektren selbst, vor allem die Fluoreszenzquantenausbeute, die Fluoreszenzlebensdauer und die *Stokes-Verschiebung* von besonderem analytischen Interesse.

2.2.1 Fluoreszenzquantenausbeute^[9]

Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F stellt eine nützliche Größe zur quantitativen Beschreibung photochemischer Prozesse dar. Sie ist definiert als das Verhältnis von den bei der Fluoreszenz emittierten Photonen n_A zu den zuvor absorbierten Photonen n_Q .

$$\Phi_F = \frac{n_A}{n_Q} \tag{2.2-1}$$

Einleitung

Andererseits lässt sich die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F auch als der Quotient aus den beiden Geschwindigkeitskonstanten k_F für die Fluoreszenz und k_{nr} (nr: engl. *nonradiative*) für strahlungslose Desaktivierungen, wie die innere Umwandlung (IC) und die Interkombinationsübergänge (ISC) – alle drei Prozesse führen letztlich zu einer Entvölkerung des angeregten Zustandes – wie folgt definieren:

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{nr}} = \frac{k_F}{k_0} \quad (2.2-2)$$

Die Quantenausbeuten von fluoreszenzaktiven Proben lassen sich experimentell mit Hilfe eines fluoreszierenden Standards mit bekannter Quantenausbeute messen, der als Referenz dient. Dabei werden die integralen Fluoreszenzintensitäten, sowohl der Probe, als auch die des Standards gemessen. Die Lösungen werden dabei auf eine optische Dichte eingestellt, die unter 0.1 liegt, um Reabsorptionseffekte zu meiden. Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_x der Probensubstanz ergibt sich aus:

$$\Phi_x = \Phi_R \frac{F_x}{F_R} \frac{\alpha_R}{\alpha_x} \frac{n_x^2}{n_R^2}, \quad (2.2-3)$$

wobei Φ_R die Quantenausbeute des bekannten Referenz-Standards ist, F_R und F_x die integrierten Fluoreszenzintensitäten der Referenz und der Probe, α_R und α_x bzw. n_R und n_x sind die optischen Dichten bzw. Brechungsindizes der verwendeten Lösungsmittel des Referenz-Standards und der Probe.

2.2.2 Fluoreszenzlebensdauer

Die mittlere Zeit t , die ein Molekül benötigt, um durch Emission von Photonen aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand zurückzukehren, bezeichnet man als die Fluoreszenzlebensdauer τ . Die zeitliche Abnahme der Emission folgt dabei einem Geschwindigkeitsgesetz 1. Ordnung:

$$I(t) = I_0 e^{-k t}, \quad (2.2-4)$$

wobei I_0 die Intensität der emittierten Strahlung unmittelbar nach der Anregung (bspw. durch Laserpulse) ist, I die Intensität zu einem späteren Zeitpunkt t und k die Geschwindigkeitskonstante des Intensitätsabfalls (Abbildung 2.2-2) darstellen. ^[8]

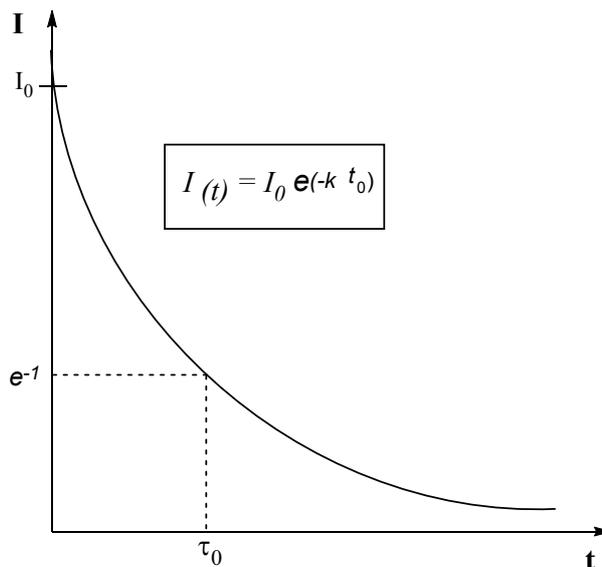


Abbildung 2.2-2: Exponentieller Abfall der Intensität I nach einem Geschwindigkeitsgesetz 1. Ordnung^[nach 8]

Die reziproke Größe der Geschwindigkeitskonstante k bezeichnet man dabei als die *mittlere natürliche Lebensdauer* τ , welche zwar temperaturunabhängig, nicht aber unabhängig von der Umgebung (z.B. Lösungsmittel) ist.^[10]

$$k = \frac{1}{\tau} \quad \text{bzw.} \quad \tau = \frac{1}{k} \quad (2.2-5)$$

Einleitung

Da sich die in den Gleichungen 2.2-4 und 2.2-5 beschriebene Geschwindigkeitskonstante k als Summe aus der Geschwindigkeitskonstante k_r für strahlende Prozesse (*Fluoreszenz*) und der unter Abschnitt 2.2-1 beschriebenen Geschwindigkeitskonstante k_{nr} (s. Abbildung 2.2-3) für strahlungslose Desaktivierungen (*IC, ISC*) wie folgt zusammensetzt:

$$k = k_r + k_{nr} \quad , \quad (2.2-6)$$

ergibt sich für die beobachtbare *tatsächliche Lebensdauer* τ_S eines Moleküls im angeregten S_1 -Zustand die folgende Gleichung 2.2-7:^[11]

$$\tau_S = \frac{1}{k_r^S + k_{nr}^S} \quad (2.2-7)$$

In Abbildung 2.2-3 sind die an den oben beschriebenen Prozessen beteiligten Geschwindigkeitskonstanten schematisch dargestellt.

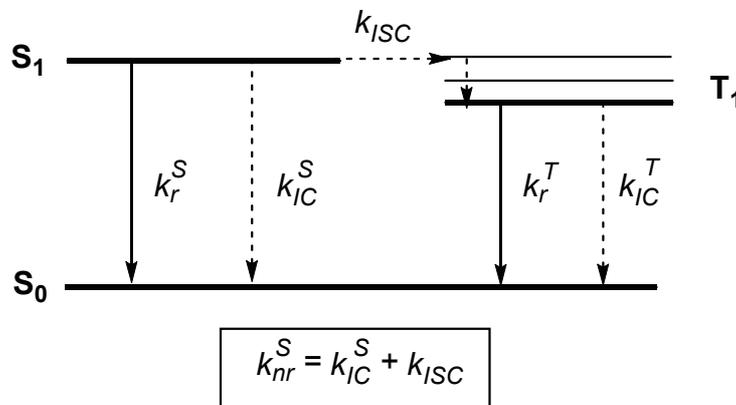


Abbildung 2.2-3: Schematische Darstellung der beteiligten Geschwindigkeitskonstanten zur Berechnung der Fluoreszenzlebensdauer ^[nach 11]

2.2.3 Die Stokes-Verschiebung

George G. Stokes entdeckte Mitte des 19. Jahrhunderts, dass das von fluoreszierenden Stoffen ausgehende Licht eine größere maximale Wellenlänge als das zuvor absorbierte besaß, somit also bathochrom in den energieärmeren Frequenzbereich verschoben wird, weswegen man dieses Phänomen heute auch als Rotverschiebung bezeichnet. Dass die emittierte Strahlung energieärmer ist, hängt damit zusammen, dass die durch Absorption eines Photons vom Molekül aufgenommene Energie sehr schnell durch strahlungslose Desaktivierung und thermische Äquilibrierung teilweise abgegeben wird, woraus eben die beobachtete Verschiebung in den längerwelligen Spektralbereich resultiert.

Aufgrund dessen, dass sowohl für die Absorptionsbande, wie auch die Emissionsbande gleichermaßen die *Franck-Condon*-Faktoren gelten, wodurch deren Form bestimmt wird, folgt, dass bei der *Stokes*-Verschiebung das Emissionsmaximum gegenüber dem Absorptionsmaximum umso größer ist, je größer der Unterschied in der Gleichgewichtsgeometrie des Grundzustandes und des angeregten Zustandes ist.^[8] Durch Bildung der Differenz der Maxima der Absorptions- und Emissionsbanden lässt sich die *Stokes*-Verschiebung sehr leicht berechnen. Sie wird stets in Wellenzahlen als Dimension angegeben.^[10]

$$\Delta\nu = \nu_a - \nu_f \quad (2.2-8)$$

2.2.4 Weitere Einflüsse auf die Fluoreszenz ^[12]

Die Fluoreszenz ist maßgeblich von der Struktur eines Moleküls abhängig. Im Allgemeinen wurde empirisch gefunden, dass Fluoreszenz im Besonderen bei Molekülen mit struktureller Starrheit auftritt. So liefern Verbindungen mit funktionalisierten aromatischen Gruppen, welche ein energiearmes $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergangsniveau besitzen, die intensivste Form der Fluoreszenz. Aliphatische oder alizyklische Carbonylverbindungen oder hochkonjugierte Doppelbindungsstrukturen können ebenfalls fluoreszieren, jedoch ist ihr Anteil im Vergleich zu den aromatischen Verbindungen sehr viel geringer.

Einleitung

Einfache Heterozyklen zeigen keine Fluoreszenz, wohingegen sie bei kondensierten Ringen normalerweise nachweisbar ist. Beispielsweise wird bei Stickstoff-Heterozyklen als energieärmster Elektronenübergang ein $n \rightarrow \pi^*$ System vermutet, welches schnell in einen Triplettzustand übergeht und so die Fluoreszenz verhindert. Neben strukturellen Einflüssen ist die Fluoreszenz auch abhängig von Temperatur- und Lösungsmittelleffekten. So nimmt der Wirkungsgrad der Fluoreszenzquantenausbeute für die meisten Moleküle bei steigender Temperatur ab, was zu einer wachsenden Zahl an Zusammenstößen führt infolge dessen die Wahrscheinlichkeit einer Deaktivierung durch externe Konversion begünstigt wird. Eine Abnahme der Lösungsmittelviskosität würde zum gleichen Resultat führen. Einen weiteren Einfluss stellt insbesondere bei aromatischen Verbindungen mit sauren oder basischen Ringsubstituenten der pH-Wert dar. Hier ist mit hoher Wahrscheinlichkeit damit zu rechnen, dass die Emissionswellenlänge und –intensität der ionisierten und nicht ionisierten Spezies unterschiedlich ist. Letztlich hat auch die Konzentration einen erheblichen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität. Weil die Stärke der Fluoreszenzstrahlung proportional zur Intensität des anregenden Strahls ist, der vom System absorbiert wird, ist stets darauf zu achten, dass mit äußerst niedrigen Konzentrationen gearbeitet wird. Wird die Konzentration zu hoch, geht bei einer Auftragung der Fluoreszenzintensität in Lösung gegen die Konzentration der emittierenden Spezies die Linearität verloren. Dies ist vor allem dann der Fall, wenn die Extinktion einen Wert größer 0.05 annimmt (mathematisch würden dadurch die Glieder höherer Ordnung einer *Maclaurinschen* Reihe an Bedeutung gewinnen). Es gibt noch zwei weitere Faktoren, die ebenfalls zu einer negativen Abweichung von der Linearität bei erhöhter Konzentration führen können: Zum einen die Selbstlöschung (*self-quenching*), eine Folge von vermehrten Zusammenstößen angeregter Moleküle, in dessen Folge strahlungslose Energieübergänge auftreten. Mit zunehmender Konzentration ist somit eine Zunahme der Selbstlöschung zu erwarten. Zum anderen die Eigenabsorption, welche auftritt, wenn die Emissionswellenlänge mit einem Absorptionssignal überlappt, was zu einer Verringerung der Fluoreszenzintensität führt.

2.3 Fluoreszenzfarbstoffe in der Optischen Diagnostik

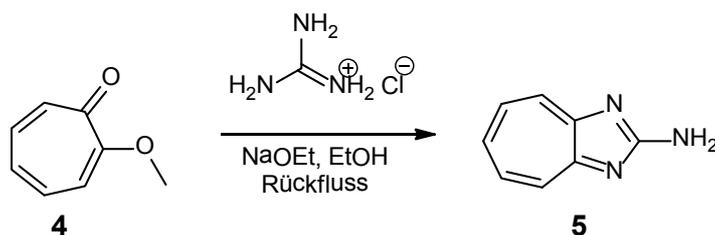
Auf dem Gebiet der Biophotonik hat sich insbesondere die Fluoreszenzdiagnostik^[13] etabliert und stellt ein geeignetes Werkzeug für die, in der Einführung bereits erwähnte, optische Visualisierung von Vorgängen in lebenden Zellen oder der medizinischen Diagnostik dar. Gerade für letztere ist ein solches bildgebendes Diagnoseverfahren von großem Wert, da es nicht auf die Gabe von Radionukleotiden angewiesen ist, sondern wegen gesundheitlich unbedenklichen fluoreszierenden Sonden einzig auf der Detektion des emittierten Lichtes beruht, welches eine berührungslose Darstellung der Vorgänge innerhalb einer lebenden Zelle misst, ohne dabei die biologischen Vorgänge selbst zu stören oder zu beeinflussen.^[14]

Solche optischen Technologien sowohl in der Diagnose als auch der Therapie anzuwenden ist beispielsweise das Ziel des Verbund-Projekts „Grundlagen peptidischer Liganden für optische Marker und Validierung für maligne Schleimhauttumore“ (PLOMS)^[15], welches durch das BMBF seit Jahren gefördert wird. Hier benötigt man spezielle kleine Peptide, die verdauungsresistent sind und an Zielmoleküle binden können. Die Intention der PLOMS-Forscher liegt darin, auf Licht basierende diagnostische *in situ*-Verfahren zur Früherkennung von Darmkrebs zu entwickeln. Der Fokus liegt dabei auf der Andersartigkeit der Darmtumorzellen. Diese besitzen, im Vergleich zu den gesunden, keine Mikrozotten mit einer dichten Schicht von zuckerhaltigen Peptiden (Glykocalyx), die den Zugang zur Zellmembran von, z.B. Verdauungsenzymen kontrollieren. Je nach Grad der Entartung besitzt die Zelle eine viel dünnere Glykocalyx auf der Schleimhaut, welche bei gesunden Zellen in der Regel bis zu 1 µm dick sein kann. Die große Herausforderung besteht sicherlich darin, ein geeignetes Peptid zu synthetisieren, welches spezifisch an das gewünschte Zielmolekül binden kann. Wünschenswert ist es daher, dass in dem Peptid der Fluoreszenzmarker schon vorliegt. Bindet ein solcher Ligand dann an die Zielmoleküle in der Zellmembran der betroffenen Tumorzellen, kann der Komplex, nach Anregung, als heller Punkt auf dem Detektor erscheinen.

Ein effizienter Weg, um Peptide mit Fluorophoren zu markieren, ist die Umwandlung einer funktionellen Gruppe einer Aminosäure in einen effizienten fluoreszierenden Marker.

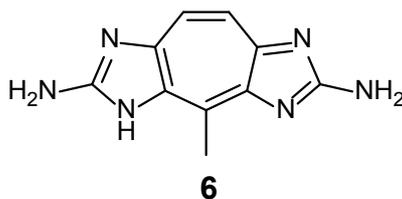
2.4 Amino-Diaza-Azulene

Bereits 1953 berichteten *Nozoe et al.*^[16] über die Kondensation von Tropolonmethylether **4** mit Guanidin-hydrochlorid zum 2-Amino-1,3-diaza-azulen **5** (Schema 2.3-1). Noch im selben Jahr protokollierten *Wada et al.*^[17] ihre Ergebnisse zur biologischen Aktivität des Amino-Diaza-Azulens **5**, indem sie dessen Effekt auf den Mitoseprozess in *Tradescantia*-Zellen untersuchten und zeigen konnten, dass die getestete Verbindung **5** eine stark hemmende Wirkung, insbesondere in der Meta- und Anaphase, entfaltet.



Schema 2.4-1: Synthese von 2-Amino-1,3-diaza-azulen durch *Nozoe et al.*^[15]

Da jedoch keiner der hier genannten Autoren oder andere bisher über die Fluoreszenz des gelben Amino-Diaza-Azulens **5** berichteten, wohl aber die Arbeitsgruppe um *Prota*^[18] in den siebziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts stark fluoreszierende marine Naturstoffe, die sogenannten „Zoanthoxanthine“, isolierten, bei denen es sich um Aza-Azulene handelt, wie das Beispiel des Parazoanthoxanthins **6** zeigt (Schema 2.3-2), lag die Vermutung nahe, dass die intensive blaue Fluoreszenz des Naturstoffes **6** durch die Amino-Diaza-Azulen-Struktur verursacht wird. Dies geht auch aus der 2001 von *Macek, Poklar*^[19] und Mitarbeitern beschriebenen absorptions- und emissionspektroskopischen Charakterisierung, sowie den hydrodynamischen Messungen des Parazoanthoxanthins **6** hervor.



Schema 2.4-2: Parazoanthoxanthin A

Einleitung

Weiterhin konnten diese Arbeiten zeigen, dass der Heterocyclus **6** ebenfalls ein breites Spektrum biologischer Aktivität aufweist, da dieser unter anderem die Fähigkeit besitzt an DNA zu binden.

2.5 Eigene Vorarbeiten

Wenn es in der Tat so ist, dass die intensive blaue Fluoreszenz des Naturstoffes **6** durch die Amino-Diaza-Azulen-Struktur verursacht wird, lag der Gedanke nahe, die Guanidin-Einheit der Aminosäure Arginin in ein Amino-Diaza-Azulen umzuwandeln, um damit fluoreszenzmarkiertes Arginin zu gewinnen. Dieses Konzept würde, anders als das der in Abschnitt 2.1 beschriebenen CGTDP-Sonde **3** von Ma^[7], dazu führen, dass der Fluorophor erst nach erfolgter Kondensation des Tropolonethers **4** mit der Guanidino-Gruppe des Arginins entsteht und diese dadurch intrinsischer Bestandteil der aufgebauten Sonde wird. Im Rahmen meiner Diplomarbeit^[20] wurde daher erstmals in Anlehnung an die von Nozoe *et al.*^[16] beschriebene Kondensation ein Amino-Diaza-Azulen als Fluorophor in der α -Aminosäure Arginin aufgebaut. Zu Beginn dieser Vorarbeiten^[20] wurde zuerst der literaturbekannte^[16] Heterocyclus **5** nachsynthetisiert und auf seine Fluoreszenzeigenschaften hin spektroskopisch untersucht. Das entsprechende Absorptions- und Emissionsspektrum ist in Diagramm 2.5-1 wiedergegeben und zeigt, dass die dargestellte Verbindung **5** in der Tat intensiv fluoresziert und ein Emissionsmaximum bei 411 nm besitzt.

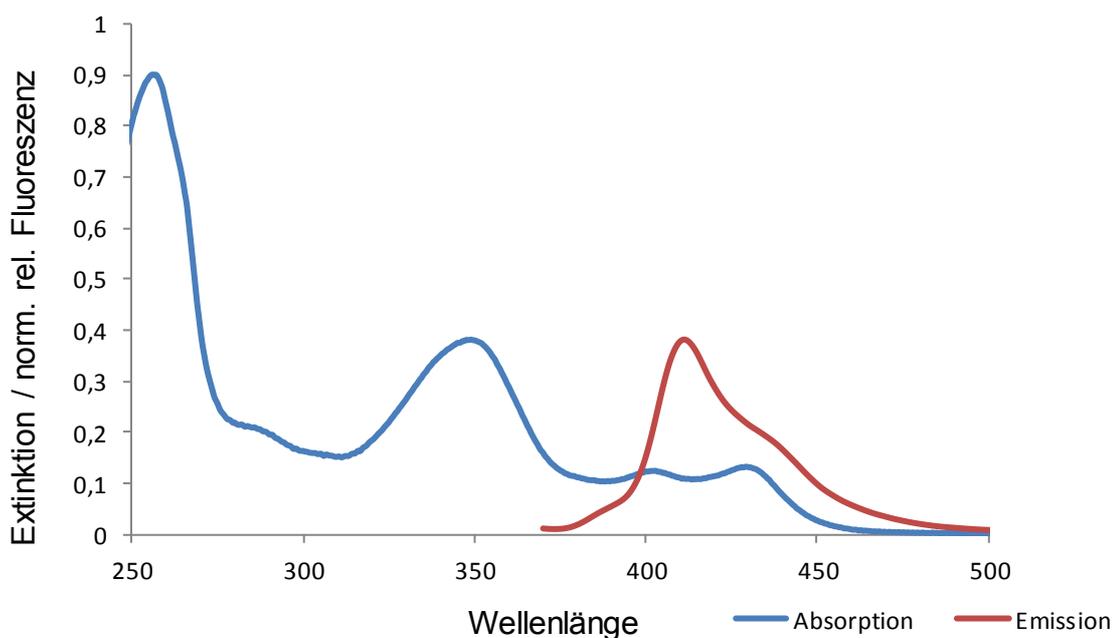


Diagramm 2.5-1: Absorption und Emission des Diaza-Azulen **5**

Fluoreszenz: angeregt bei 350 nm; $c_{(\text{Absorption})} = 3,07 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$, $c_{(\text{Emission})} = 1,53 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$,
 $d_{(\text{Küvette})} = 0,01 \text{ m}$, $\epsilon_M = 12432,34 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\Delta \tilde{\nu} = 4322 \text{ cm}^{-1}$, gemessen in MeOH

Einleitung

NMR-Untersuchungen zeigten, dass das Diaza-Azulen **5**, zumindest in Lösung, nicht als einheitliche Substanz, sondern als ein Gemisch der Tautomeren **5a** und **5b** (Schema 2.5-1) vorliegt; das höher symmetrische Tautomer **5a** war dabei leicht zu identifizieren.

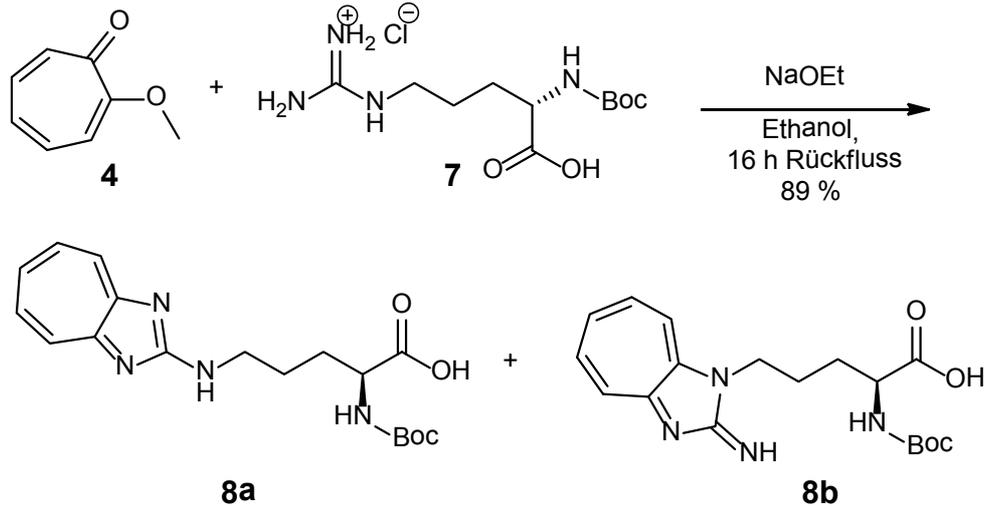


Schema 2.5-1: Tautomerie von 2-Amino-1,3-diaza-azulen

Nach diesen Voruntersuchungen ließ sich die Guanidin-Einheit von N-BOC-geschütztem Arginin **7** durch eine Einstufensynthese in eine Amino-Diaza-Azulen-Einheit überführen (Schema 2.5-2). Zur Isolierung des Produktes erwies sich das Aussalzen mit Ammoniumfluorid als gut geeignet. Aufgrund des Substitutionsmusters und des ambidenten Charakters der Guanidin-Einheit in der Aminosäure musste nun bei der Kondensation mit dem Tropolonmethylether **4** mit der Bildung von zwei regioisomeren Aza-azulen **8a** und **8b** gerechnet werden.

Dies wurde insbesondere durch pH-Wert-abhängige UV-VIS- und fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen (→ Diagramme 2.5-2 und 2.5-3), sowie durch diverse NMR-Experimente (u.a. 135 -DEPT, NOESY, COSY) bestätigt. Das lineare Regioisomer **8a** lässt sich leicht aufgrund der geringeren Anzahl der Protonensignale im Cycloheptatrienyl-Bereich erkennen. Das verzweigte Regioisomer **8b** weist dagegen fünf Signale der Cycloheptatrienyl-Protonen auf (Bestätigung durch 13 C-NMR, sowie durch NOE-Effekte (→ Abbildung 2.5-1)).

Einleitung



Schema 2.5-2: Umsetzung des Tropolonethers 4 mit Boc-Arg-OH-hydrochlorid 7

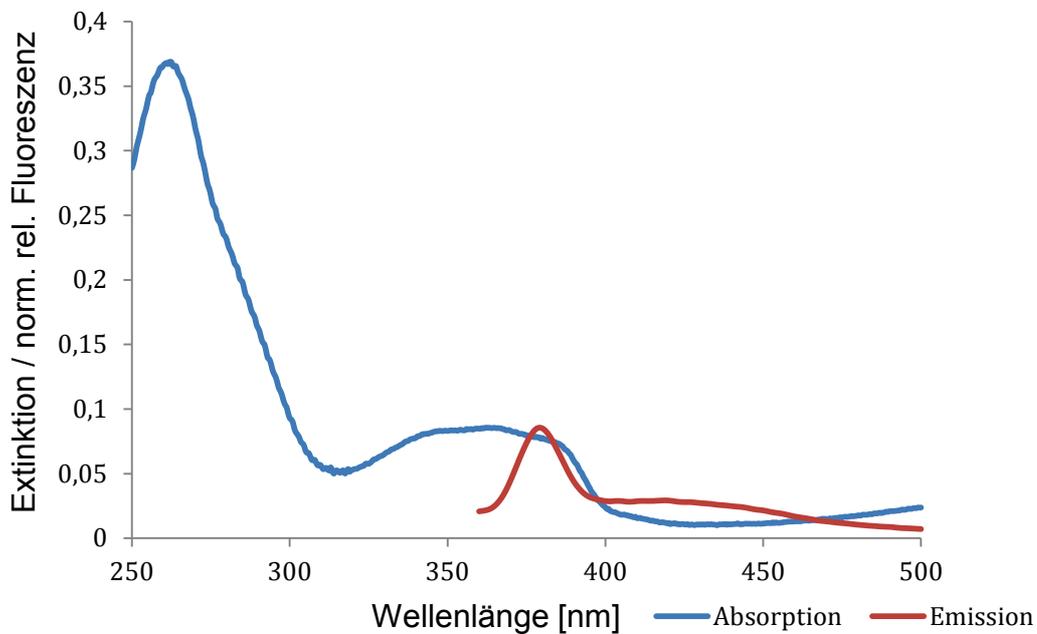


Diagramm 2.5-2: Absorption und Emission der nicht-natürlichen Aminosäure 8
 Fluoreszenz: angeregt bei 340 nm; $c_{(\text{Absorption})} = 3.07 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$, $c_{(\text{Emission})} = 1.53 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$,
 $d_{(\text{Küvette})} = 0.01 \text{ m}$, $\epsilon_M = 27863.18 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\Delta \tilde{\nu} : 1239 \text{ cm}^{-1}$, gemessen in MeOH

Einleitung

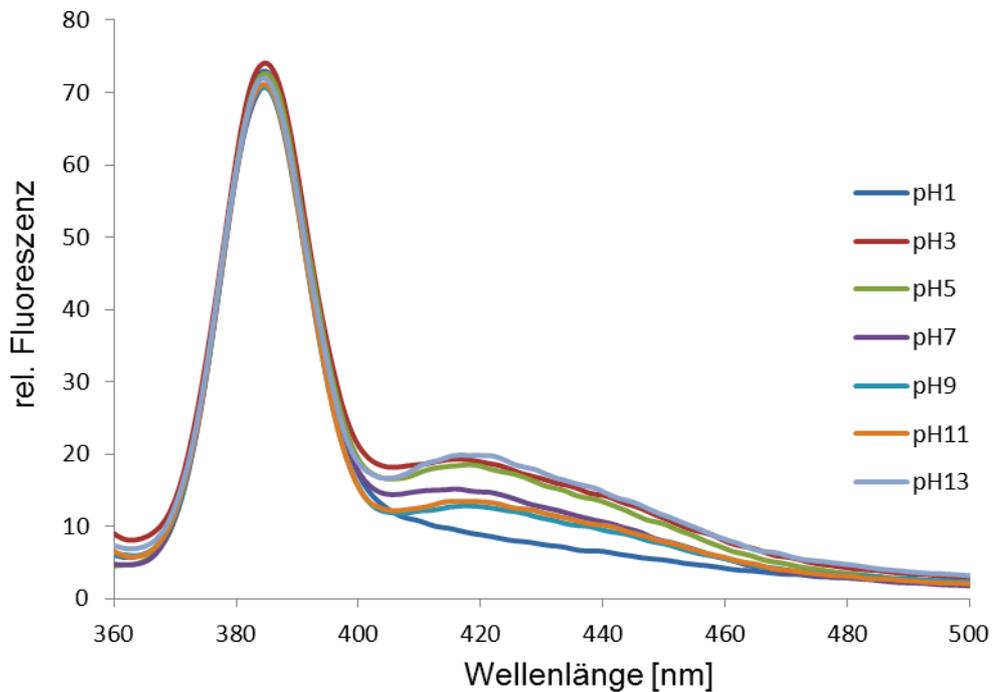


Diagramm 2.5-3: pH-abhängige Emission der nicht-natürlichen Aminosäure **8**
Fluoreszenz: angeregt bei 340 nm; $c_{\text{(Emission)}} = 1.53 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$,
 $d_{\text{(Küvette)}} = 0.01 \text{ m}$, gemessen in H_2O

Mittels eines *NOESY*-Experimentes konnte das Regioisomer **8b** über die Kopplungen der Protonen $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{COOH})\text{NH}-$ bei 4.43 ppm zu den unten dargestellten Protonen bei 1.85 ppm ($-\text{CH}_2-$), 4.03 ppm ($-\text{C}=\text{NH}$) und 8.47 ppm (Aryl-H) charakterisiert werden.

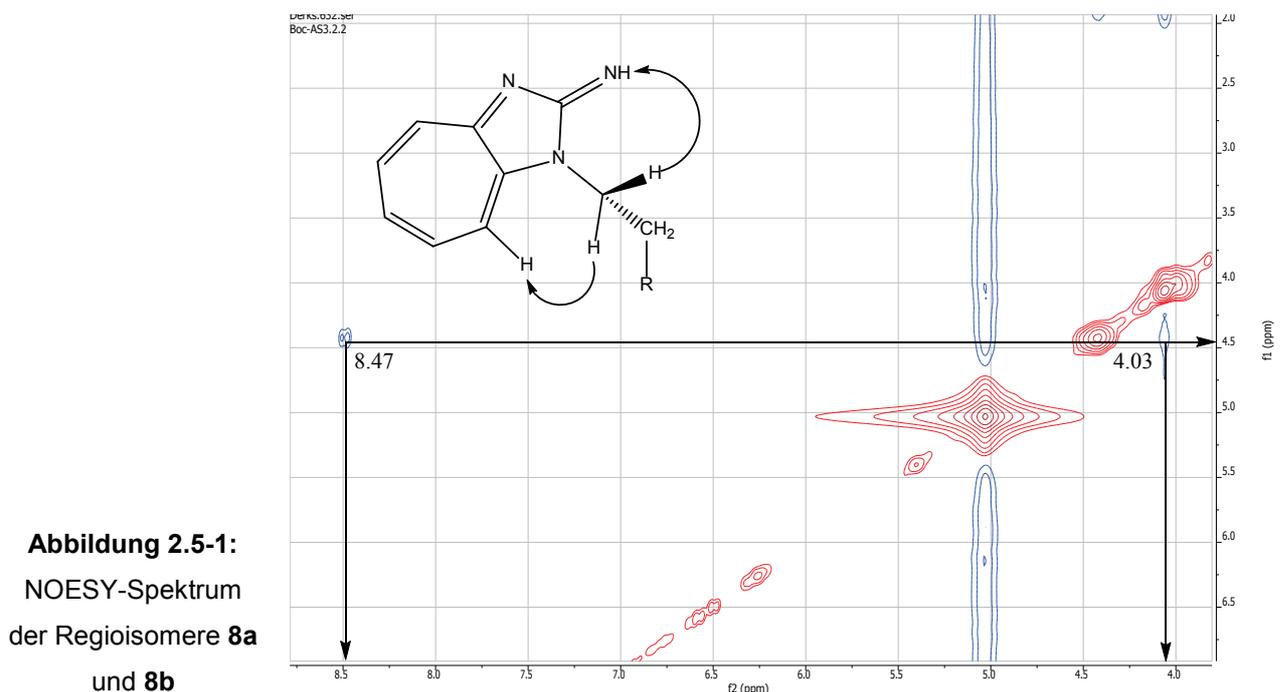


Abbildung 2.5-1:
NOESY-Spektrum
der Regioisomere **8a**
und **8b**

Einleitung

Über ein ^{13}C -DEPT-Experiment konnten anhand der Signalintegrationen und der Intensitätsunterschiede der aromatischen Kohlenstoffatome 11, 12, 13, 14 und 15 des Regioisomers **8b** zu den aromatischen Kohlenstoffatomen 11, 11', 12, 12' und 13 des Regioisomers **8a** das Isomerenverhältnis **8b:8a** zu 72:28 berechnet werden.

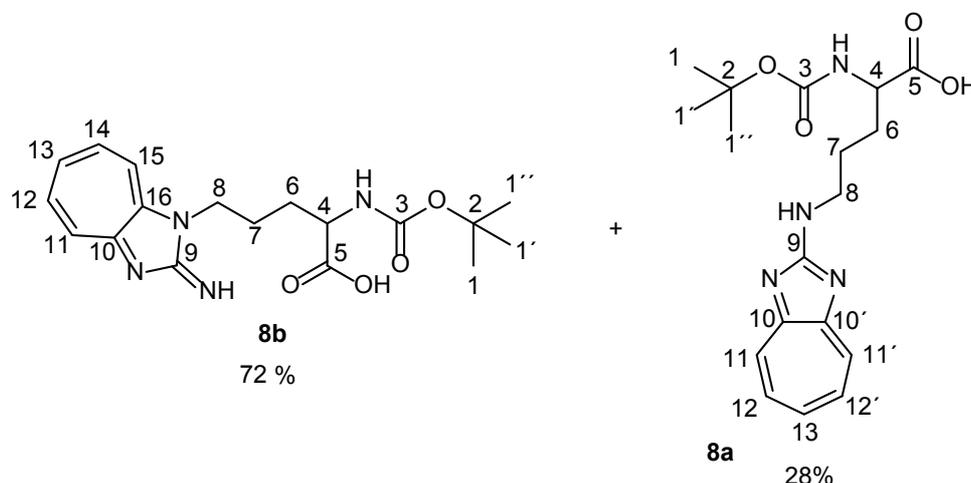


Abbildung 2.5-2: Verhältnis der Regioisomere **8a** und **8b**:
berechnet über Signalintegration via ^{13}C -DEPT-Experiment

Das ^1H -NMR-Spektrum der beiden Regioisomere **8a** und **8b** ist in der folgenden Abbildung 2.5-3 dargestellt. Dabei konnte bereits anhand anderer NMR-Experimente, bei denen die Konzentration variiert wurde, gezeigt werden, dass das lineare bzw. symmetrische Regioisomer **8a** zum einen als Dimer (SD) und zum anderen als Monomer (SM) im Bereich zwischen 7.1 und 8.1 ppm vorliegt. Das verzweigte bzw. asymmetrische Regioisomer **8b** erscheint hingegen noch weiter tieffeldverschoben zwischen 8.1 und 8.6 ppm.

Einleitung

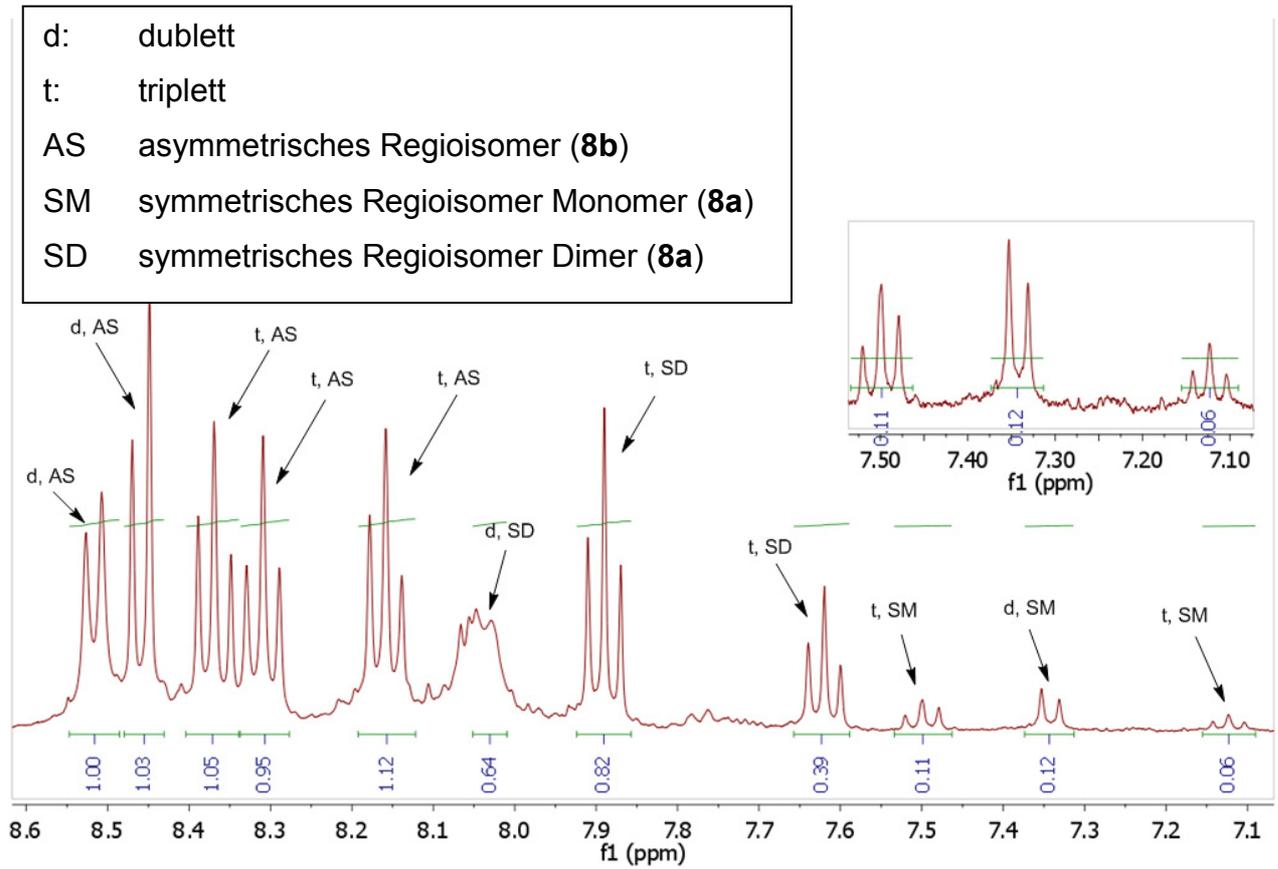


Abbildung 2.5-3: $^1\text{H-NMR}$ der beiden Regioisomere 8a und 8b

3. Hauptteil

3.1 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Einführung eines Fluorophors in Arginin enthaltenden kleinen Peptiden, indem die Guanidin-Einheit in ein Amino-Diaza-Azulen umgewandelt wird. Dass dies prinzipiell mit Hilfe eines als Fluoreszenz-Marker dienenden Tropolonderivates möglich ist, haben bereits die unter Abschnitt 2.5 beschriebenen Vorarbeiten gezeigt. Dazu sollten die dort erwähnten Regioisomere **8a** und **8b** zuerst präparativ voneinander getrennt und vollständig charakterisiert werden, insbesondere durch die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute und der Fluoreszenzlebensdauer, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. A. M. Seidel am Institut für Physikalische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gemessen wurden, um sicherstellen zu können, welches der beiden Regioisomeren die besseren Fluoreszenzeigenschaften aufweist. Davon ausgehend sollte das Problem der beschriebenen Ambidoselektivität im Kondensationsschritt zum einen durch Optimierungen der Reaktionsbedingungen und zum anderen durch die Entwicklung einer alternativen regioselektiven Synthesestrategie gelöst werden, sodass ein gezielter Zugang zu dem Isomeren eröffnet wird, welcher die vorteilhafteren fluorophoren Eigenschaften besitzt. Diese Erkenntnisse sollten dann dazu dienen, die Guanidin-Einheit der Aminosäure Arginin unter anderem in dem immunbiologisch interessanten Pentapeptid *Thymopentin* in das entsprechend potentere Amino-Diaza-Azulen-Regioisomer umzuwandeln, um auf diese Weise ein fluoreszenzmarkiertes Peptid zu gewinnen.

3.2 Trennung der Regioisomeren 8a und 8b

Die unter Abschnitt 2.5 beschriebenen Regioisomeren **8a** und **8b** konnten präparativ zum einen über Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und zum anderen extraktiv über Variation des pH-Wertes voneinander getrennt werden. Die über beide Verfahren gewonnenen Regioisomere konnten dann einzeln charakterisiert werden. Dabei erfolgten sowohl NMR-spektroskopische, als auch hochaufgelöste massenspektrometrische Untersuchungen. Vervollständigt wurde diese Charakterisierung durch umfangreiche UV-VIS- und emissions-spektroskopische Untersuchungen. Hierzu wurden insbesondere pH-Wert-abhängige Messungen durchgeführt, sowie die Fluoreszenzquantenausbeuten und Fluoreszenzlebensdauern bestimmt. Diese experimentellen Arbeiten wurden von Frau M.Sc. Deborah Sandrin am Lehrstuhl für Physikalische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. A. M. Seidel ausgeführt.

3.2.1 Trennung über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

3.2.1.1 Funktionsweise

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) kann, wie die folgende Abbildung 3.2-1 zeigt, der Polarität nach in zwei Typen eingeteilt werden: Dabei handelt es sich allgemein um ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem die zu untersuchende Substanz zusammen mit einem Laufmittel, der mobilen Phase oder Eluent, durch eine Trennsäule gepumpt wird, welche die stationäre Phase enthält. Wenn die stationäre Phase polarer als die mobile Phase ist, handelt es sich um die Normalphasen-HPLC (*normal-phase-HPLC*). Ist die stationäre Phase hingegen unpolarer als die mobile Phase, so spricht man bei diesem Verfahren von der Umkehrphasen-HPLC (*reversed-phase-HPLC*). Letztere ist in der Praxis die gängigste Methode und findet vor allem große Anwendung bei der Auftrennung von polaren Analyten, wie beispielsweise Proteinen, Peptiden oder Aminosäuren, welche ungeeignet für *normal-phase-HPLC* sind, da sie zu lange Retentionszeiten aufweisen würden.

Hauptteil

Die stationäre Phase wird aus mit langkettigen Kohlenwasserstoffen substituierten Silanen hergestellt, die mit Silicagel reagieren. Dabei wird die polare Oberfläche der Silicagel-Partikel mit einer unpolaren Schicht aus Kohlenwasserstoffen überzogen, wodurch die Verringerung der Polarität zustande kommt. In der Protein- und Peptidanalytik kommt meist eine C₁₈-Säule mit Octadecylsilan als Derivatisierungsreagenz für das Silicagel zum Einsatz. Als mobile Phase werden in der gängigen Praxis Mischungen aus Wasser oder Puffer und Acetonitril oder Methanol eingesetzt. Bei isokratischen Trennungen bleibt die Zusammensetzung der mobilen Phase während der gesamten Zeit gleich. Bei Gradiententrennungen wird die Polarität des Eluenten während der Analyse verändert. Die Detektion erfolgt zumeist mittels UV- oder Fluoreszenzdetektor. [21,22,23]

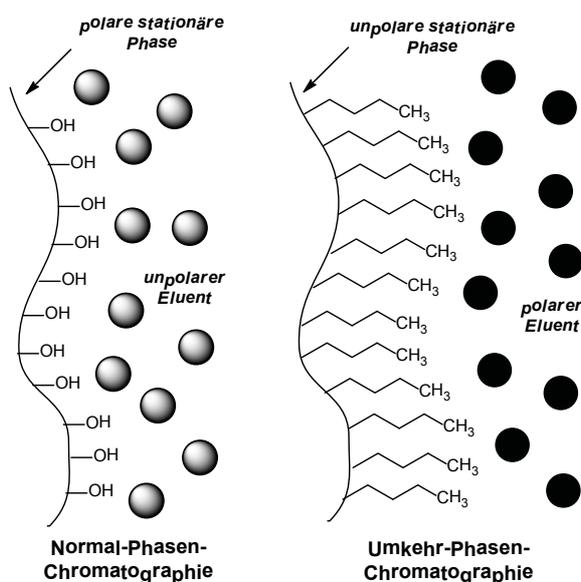


Abbildung 3.2-1: Unterschied zwischen *normal-phase*- und *reversed-phase*-HPLC

3.2.1.2 Trennung der Regioisomeren **8a** und **8b** über *reversed-phase*-HPLC

Vorversuche an einer analytischen *reversed-phase*-HPLC im Arbeitskreis von Prof. Dr. C. A. M. Seidel zeigten, dass es unter diesen Bedingungen mit einem Methanol/Wasser-Gemisch als mobile Phase im Verhältnis 80:20 möglich ist, die beiden Regioisomere **8a** und **8b** zu trennen.

Dabei offenbarte die chromatographische Trennung jedoch, nicht wie erwartet zwei, sondern drei Peaks, die über Absorptions- und Emissionserscheinungen vom Gerät direkt detektiert wurden und der Reihe nach in drei Fraktionen gesammelt wurden.

Aufgrund der gewonnenen, aber sehr geringen Substanzmengen, konnte hier mit Hilfe der Elektronensprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS), lediglich eine Aussage einzig über die Existenz, nicht aber eine eindeutige Identifizierung des einen oder anderen Regioisomeren gemacht werden. Die ESI-MS-Untersuchung zeigte nur einen Molekülpeak lediglich in den Fraktionen 1 und 3, aber gleiche Fragmentierungen bei 273, 317 und 339 m/z in allen drei Fraktionen.

Um eine aussagekräftige Strukturaufklärung durchführen zu können, bedarf es hoch aufgelöster $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren. Da die dafür benötigten Substanzmengen nicht über eine analytische HPLC getrennt werden können, wurde hierfür an einer semi-präparativen *reversed-phase*-HPLC im Arbeitskreis von Prof. Dr. T. J. J. Müller am Institut für Organische und Makromolekulare Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf weitergearbeitet. Hier stellte sich heraus, dass das im Arbeitskreis Seidel eingesetzte Laufmittelverhältnis, an die dort verbaute *reversed-phase*-Säule, angepasst werden musste. Die Trennung erfolgte schließlich unter Einsatz eines Methanol/Wasser-Gemisches im Verhältnis 95:5. Auch bei dieser chromatographischen Trennung konnten drei Peaks detektiert werden (hier allerdings nur über zwei UV/VIS-Detektoren bei 254 und 364 nm). Unter Rücksichtnahme auf die vom Hersteller angegebenen Betriebsbedingungen in Bezug auf den Druck und die Einspritzmenge, wurde das Gerät im *Batch-Modus* betrieben, wodurch die peakgebenden Substanzen jeweils getrennt in ausreichender Menge in drei Fraktionen gesammelt werden konnten. Das Lösungsmittel wurde später im Vakuum am Rotationsverdampfer entfernt, so dass die Reinsubstanzen zur oben beschriebenen Charakterisierung zugänglich waren.

3.2.2 Trennung über pH-Wert-abhängige Extraktion

Eine andere Möglichkeit, die beiden Regioisomeren **8a** und **8b** zu trennen bot eine Variation des pH-Wertes des Regioisomerengemisches in wässriger Lösung. Dabei wird das Reaktionsgemisch zunächst mit Chloroform extrahiert, um es von Resten des, in der Kondensationsreaktion eingesetzten Tropolonethers, zu befreien. Anschließend wird die wässrige Phase mit Citronensäure angesäuert, bis ein pH-Wert unter 5, aber über 2 eingestellt ist und erneut mit Chloroform extrahiert.

Das symmetrische Regioisomer **8a** geht dabei in die organische Phase über, während das asymmetrische Regioisomer **8b** in der wässrigen verbleibt. Durch die anschließende Aufarbeitung der beiden Phasen konnten die Regioisomere **8a** und **8b** getrennt von einander isoliert werden.

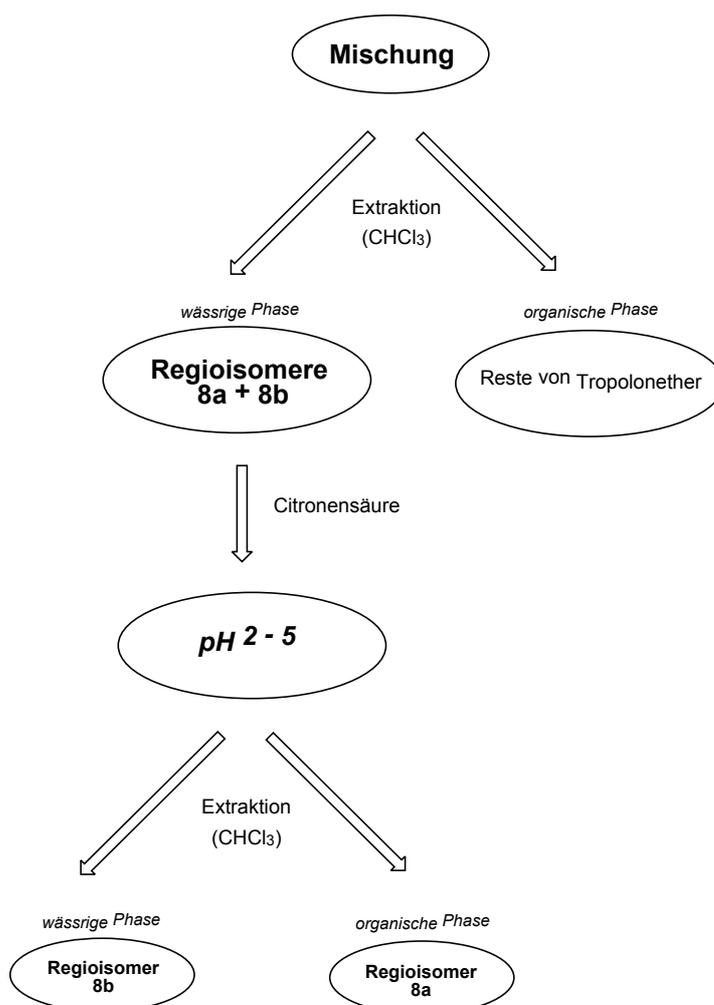


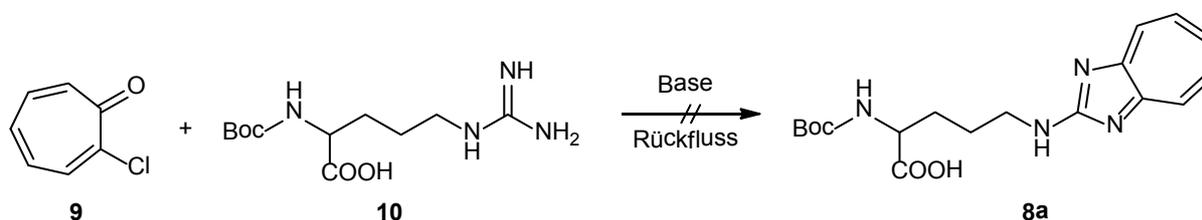
Abbildung 3.2-2: Trennungsprozess über pH-Wert-abhängige Extraktion

3.3 Optimierung der Synthese

Die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen der beiden isolierten Regioisomere **8a** und **8b**, die in den Abbildungen 5.6-8 und 5.6-12 in Abschnitt 5.6.8 gezeigt sind, zeigen, dass das symmetrische Regioisomer **8a** eine höhere Fluoreszenzaktivität im Vergleich zum asymmetrischen Regioisomer **8b** aufweist. Des Weiteren ist auch die Fluoreszenzquantenausbeute des Diaza-Azulen **8a** höher als die der Verbindung **8b** (→ Tabelle 5.6-4). Eine Optimierung der Synthesebedingungen sollte damit also das Ziel haben, regioselektiv das symmetrische Diaza-Azulen **8a** darzustellen. Dazu wurden in erster Instanz verschiedene Lösungsmittel und Lösungsmittelgemische, wie z.B. Methanol, n-Butanol, Wasser, Methanol/Wasser, Ethanol/Wasser, sowie verschiedene Basen wie beispielsweise Natrium- und Kaliumhydroxid, Kalium-*tert.*-butanolat und Tetramethylammoniumhydroxid, getestet. Hierdurch konnte jedoch keine regioselektive Route hin zum favorisierten Regioisomer **8a** eröffnet werden. Auch wenn die Boc-geschützte Aminosäure nicht als Hydrochlorid eingesetzt wird, konnte keine Verbesserung in Bezug auf die Regioselektivität beobachtet werden.

3.3.1 Einsatz von 2-Chlortropon

Da es sich bei der in Schema 2.5-2 beschriebenen Reaktion um eine Kondensation handelt, bei der die Methoxygruppe des Tropolonether **4** entscheidend beteiligt ist, sollte diese durch Chlor substituiert werden, um eine im Vergleich zum Methoxy bessere Abgangsgruppe zu generieren.



Schema 3.3-1: Einsatz von 2-Chlortropon

Das 2-Chlortropon **9** ist, wie unter Abschnitt 3.8.1.3 dargestellt sehr leicht aus Thionylchlorid und kommerziellen Tropolon zugänglich. Die analytischen Untersuchungen haben jedoch auch hier gezeigt, dass bei einem Einsatz des Chlortropon **9** wieder beide Regioisomere entstehen und die Reaktion somit nicht regioselektiv verläuft.

3.3.2 Zeitliche Untersuchung des Reaktionsverlaufes

Um zu überprüfen, ob die Bildung der beiden Regioisomere **8a** und **8b** im Verlauf der Reaktion synchron oder asynchron abläuft, wurde folgendes Experiment durchgeführt: Der Tropolonether **4** wird mit je einem Äquivalent der Aminosäure **10** und Natriumethanolat in abs. Ethanol zum Rückfluss erhitzt. Dabei werden sofort zu Beginn und dann in 30-minütigen Abständen Proben einheitlichen Volumens zur massenspektroskopischen Untersuchung entnommen. Die daraus gewonnen Intensitätsverhältnisse des Produktaminosäure und der Eduktaminosäure werden in Abhängigkeit der Zeit in einem Diagramm (Abbildung 3.3-1) dargestellt.

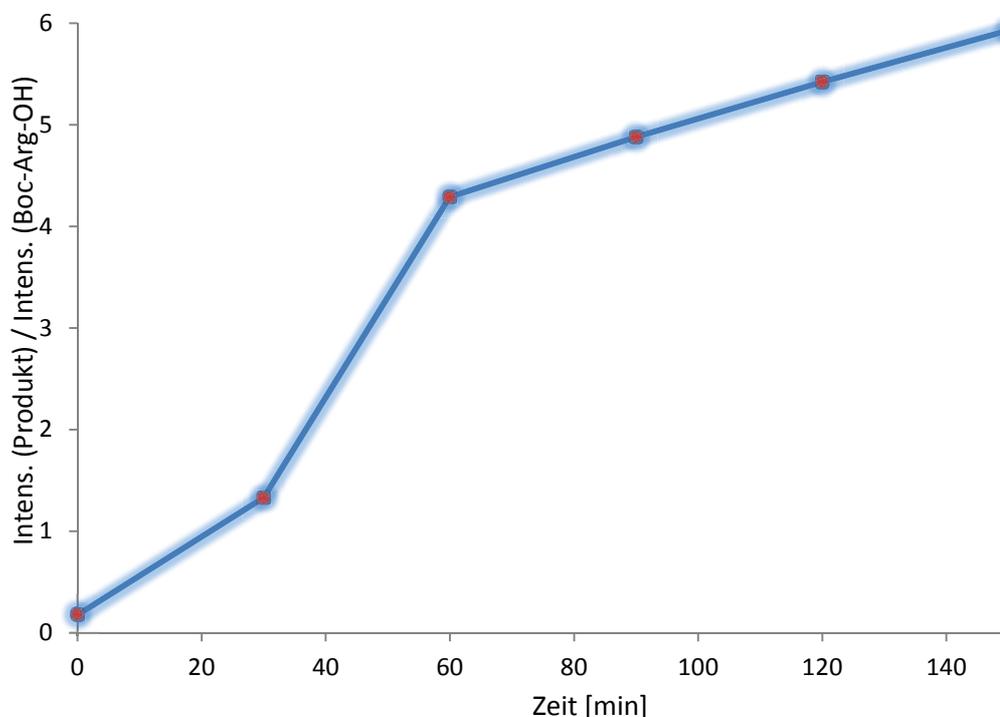


Abbildung 3.3-1: Zeitlicher Reaktionsverlauf in Abhängigkeit von Produktzu- und Eduktabnahme

Auffällig ist hier der rasante Anstieg der Intensitätskurve des Produktes in Abhängigkeit der Boc-geschützten Aminosäure zwischen 30 und 60 Minuten (blaue Kurve). NMR-spektroskopische Untersuchungen konnten belegen, dass hier in den ersten 30 Minuten offenbar nur das symmetrische Regioisomer **8a** gebildet wird, und es erst nach ca. 30 Minuten, mit einem sprunghaften Anstieg, zur Bildung des asymmetrischen Regioisomers **8b** kommt.

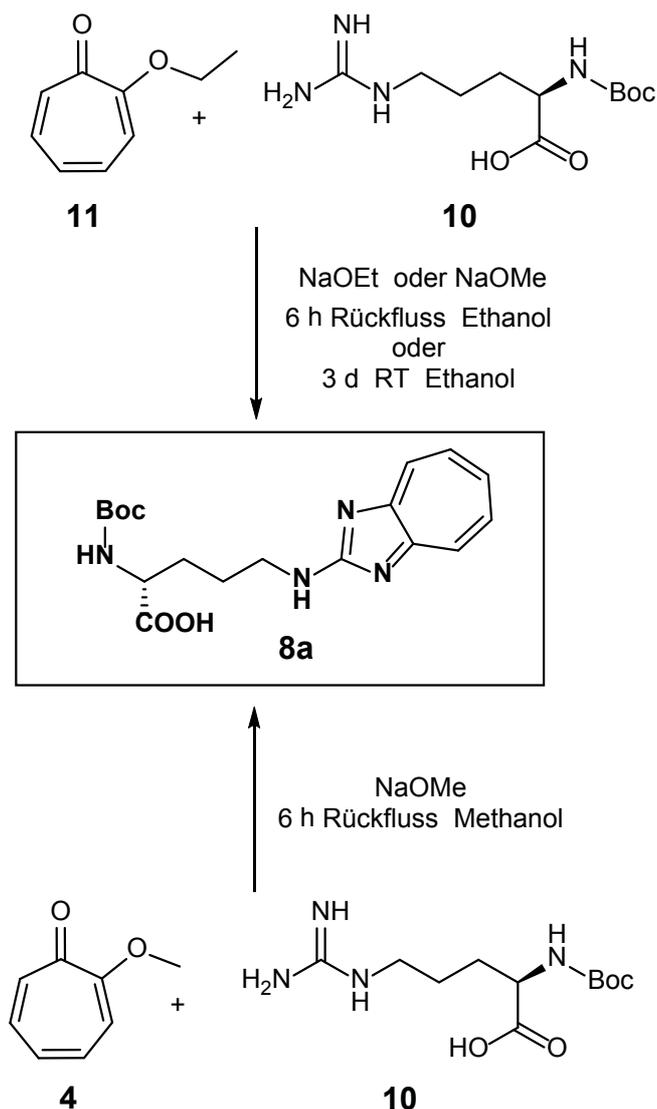
Des Weiteren zeigen alle Massenspektren keinen Peak bei $[137.1]^+$ m/z für den Tropolonmethylether + H^+ , sondern einen bei $[151.1]^+$ m/z für einen Tropolonethylether + H^+ . Diese Tatsache scheint die Vermutung zu belegen, dass der Tropolonmethylether zuerst mit dem Ethanolat-Anion zum Tropolonethylether reagiert, bevor die Kondensation zum Diaza-Azulen-Derivat stattfinden kann.

Aufgrund dieser Erkenntnisse scheint es nun naheliegen, Nukleophil und Abgangsgruppe der gleichen Spezies einzusetzen, also einen Methylether des Tropolon mit Methanolat-Anionen und den entsprechenden Ethylether mit Ethanolat-Anionen reagieren zu lassen, um die beobachteten Nebenreaktionen und Gleichgewichtseinstellungen zu vermeiden.

3.3.3 Regioselektive Darstellung des Regioisomeren **8a**

Wie im vorherigen Abschnitt 3.3.2 bereits postuliert, konnten entsprechende Versuche belegen, dass es in der Tat möglich ist, den Zugang zum symmetrischen Regioisomer **8a** regiospezifisch zu eröffnen, indem der Ether und das Anion der in der Reaktion eingesetzten Base die gleichen Alkylreste tragen.

Hauptteil



Schema 3.3-2: Übersicht der Darstellungsmöglichkeiten; gezielte Synthese des Regioisomeren **8a**

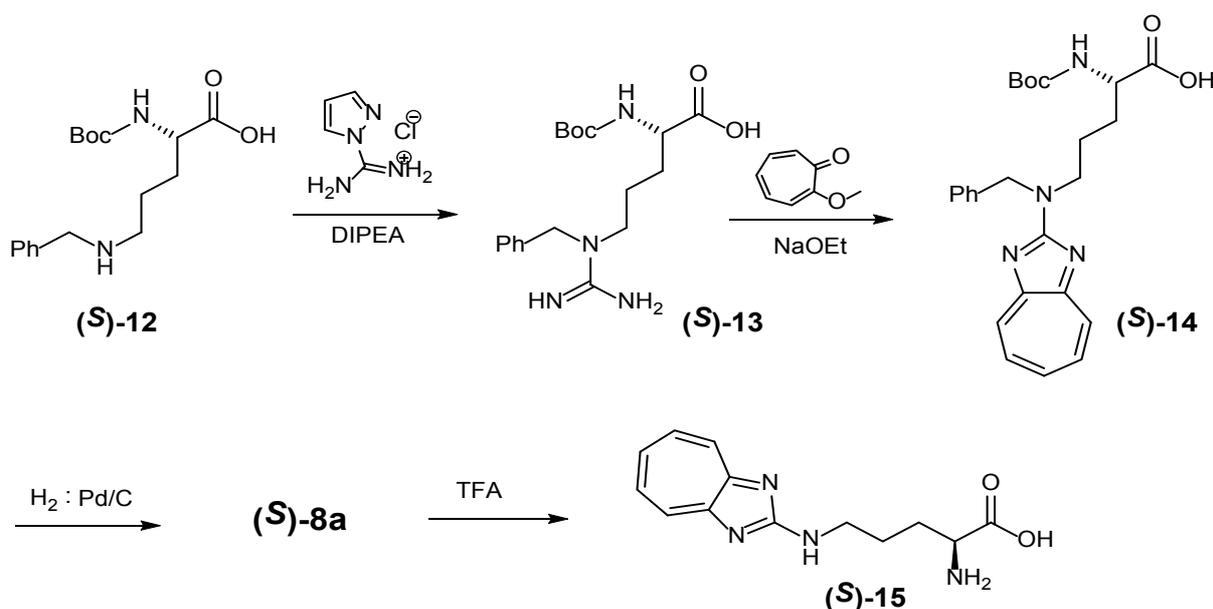
Wie in Schema 3.3-2 dargestellt, ist es ebenfalls möglich einen regioselektiven Zugang zum gewünschten Produkt **8a** zu erhalten, indem der Tropolonmethylether **4** mit Methanolat-Anionen statt mit Ethanolat-Anionen umgesetzt wird. Auch eine Umsetzung des Tropolonether **11** bei Raumtemperatur kann realisiert werden, allerdings verlängert sich die Reaktionszeit dadurch erheblich. Einzig die in den Vorarbeiten (→ Abschnitt 2.5) und bisher angewandte Umsetzung von Boc-Arg-OH-hydrochlorid **7** mit dem Tropolonether **4** und Natriumethanolat führt zu den regioisomeren Verbindungen **8a** und **8b**, da hier, wie die in Abschnitt 3.3.2 beschriebene Untersuchung zeigt, eine Umetherung des Troplonether **4** zum Troplonderivat **11** erfolgt. Dieser Vorgang scheint somit entscheidend für die Entstehung der beiden Regioisomere **8a** und **8b** verantwortlich zu sein.

3.4 Alternative Synthesestrategien

Parallel zu der in Abschnitt 3.3 beschriebenen Optimierung wurde eine von (*L*)-N^α-Boc-N^ω-benzylornithin **12** ausgehende alternative Syntheseroute hin zum symmetrischen Regioisomer **8a** entwickelt. Ein weiteres Konzept beruhte auf der Einführung sterisch anspruchsvoller Substituenten in den Tropolonring, um bei der Bildung des verzweigten Regioisomers **8b** in dem Maße für eine sterische Hinderung zu sorgen, als dass nur das lineare Isomer **8a** entstehen kann.

3.4.1 Regioselektive Synthese ausgehend von (*L*)-N^α-Boc-N^ω-benzylornithin

Das erste Konzept beruht auf einer Synthese, die gezielt zum gewünschten Regioisomer führen soll. Dazu soll (*L*)-N^α-Boc-N^ω-benzylornithin **12**^[13] mit 1*H*-Pyrazol-1-carboxamid-hydrochlorid und DIPEA zum Guanidin **13** umgesetzt werden, welches in einer anschließenden Kondensation mit dem Tropolonmethylether **4** zum benzylgeschützten Amino-Diaza-Azulen **14** führen soll. Die Abspaltung der Benzylschutzgruppe könnte hydrogenolytisch erfolgen (Aza-Azulene sind gegenüber Pd/H₂ recht inert) oder durch eine von *Braun*-Reaktion mit anschließender Hydrolyse.^[14] Somit stände die Boc-geschützte fluoreszierende Aminosäure **8a** für die chemische Peptidsynthese und die *in-vivo* Implementierung im Protein zur Verfügung, bzw. nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppe auch die freie Aminosäure **15**.



Schema 3.4-1: Syntheseroute ausgehend von N^ω-alkylierten (*S*)-Ornithin

3.4.2 Regiospezifische Steuerung über 3,5,7-Tribromtropolonether

Als ein weiteres Konzept die Ambidoselektivität im Kondensationsschritt zu erhöhen, soll die, bei der Bildung des verzweigten Isomeren **8b**, vorhersehbare sterische Hinderung mit Substituenten in der 3- und 7-Stellung des Tropolons, genutzt werden. Verknüpft wird dieses Konzept mit einem anderen geplanten Vorhaben, nämlich in der 5-Position des Tropolonether **4** einen Substituenten einzuführen, mit dem Ziel die *Stokes-Verschiebung* zu vergrößern. Im Rahmen der Diplomarbeit wurden dazu bereits Versuche mit einem Nitrosubstituenten unternommen, welche jedoch erfolglos blieben. Dass gerade die 5-Position von besonderem Interesse ist, konnten bereits in der Vergangenheit von Herrn Dr. K. Schaper vom Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführte Orbitalberechnungen mit dem quantenchemischen Simulationsprogramm *Gaussian 03* ^[24] zeigen. Diese ergaben, dass sowohl das HOMO, wie auch das LUMO des 2-Amino-1,3-diaza-azulen **5** große Orbitalkoeffizienten in der 7-Position, bzw. ausgehend vom Tropolonether in der 5-Position, aufweisen. (Abbildung 3.4-1)

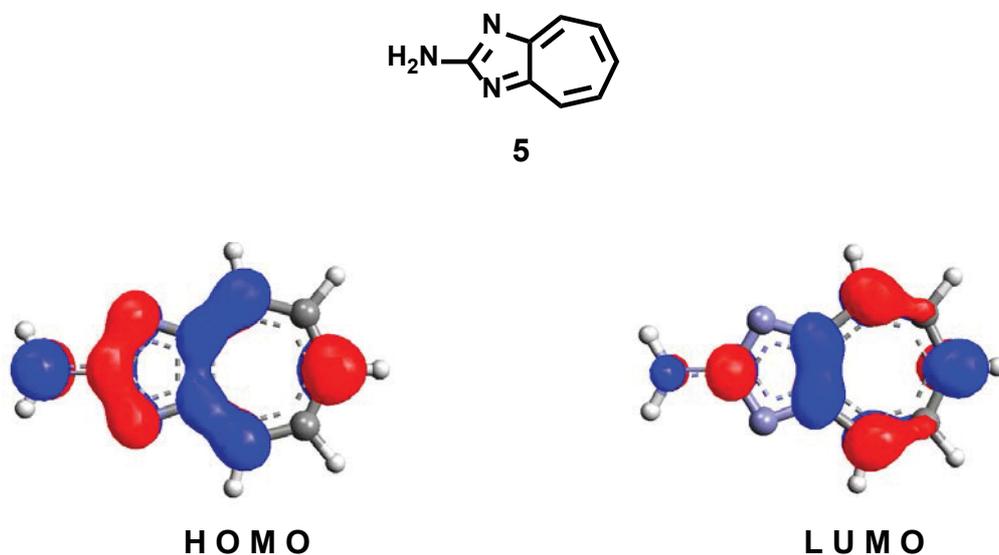
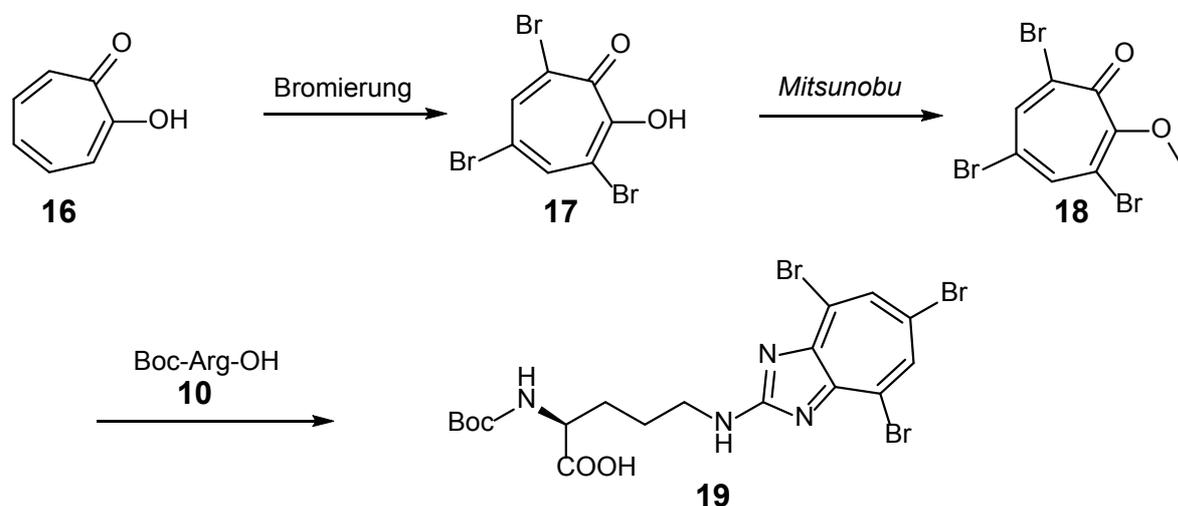


Abbildung 3.4-1: HOMO- und LUMO-Orbitale des 2-Amino-1,3-diaza-azulen (**5**)

Hauptteil

Zu diesem Zweck soll die Kondensation von Boc-Arginin mit einem 3,5,7-Tribromtropolonmethylether **17** versucht werden. Aus der in Abbildung 2.5-1 gezeigten *NOE*-Messung des verzweigten Isomeren **8b** wurde bereits die räumliche Nähe zwischen dem 3-*H* des Cycloheptariens und der Methylengruppe am Stickstoffatom deutlich. Wird an dieser Position des Cycloheptatriens ein Bromsubstituent eingeführt, so müsste sich die Entstehung des unerwünschten verzweigten Isomeren **8b** weitestgehend vermeiden lassen, so dass die fluoreszenzmarkierte Aminosäure **19** mit hoher Isomerenreinheit anfallen sollte (Schema 3.4-2). Der Vorläufer des Ethers **18**, das 3,5,7-Tribromtropolon **17** ist literaturbekannt.^[25]



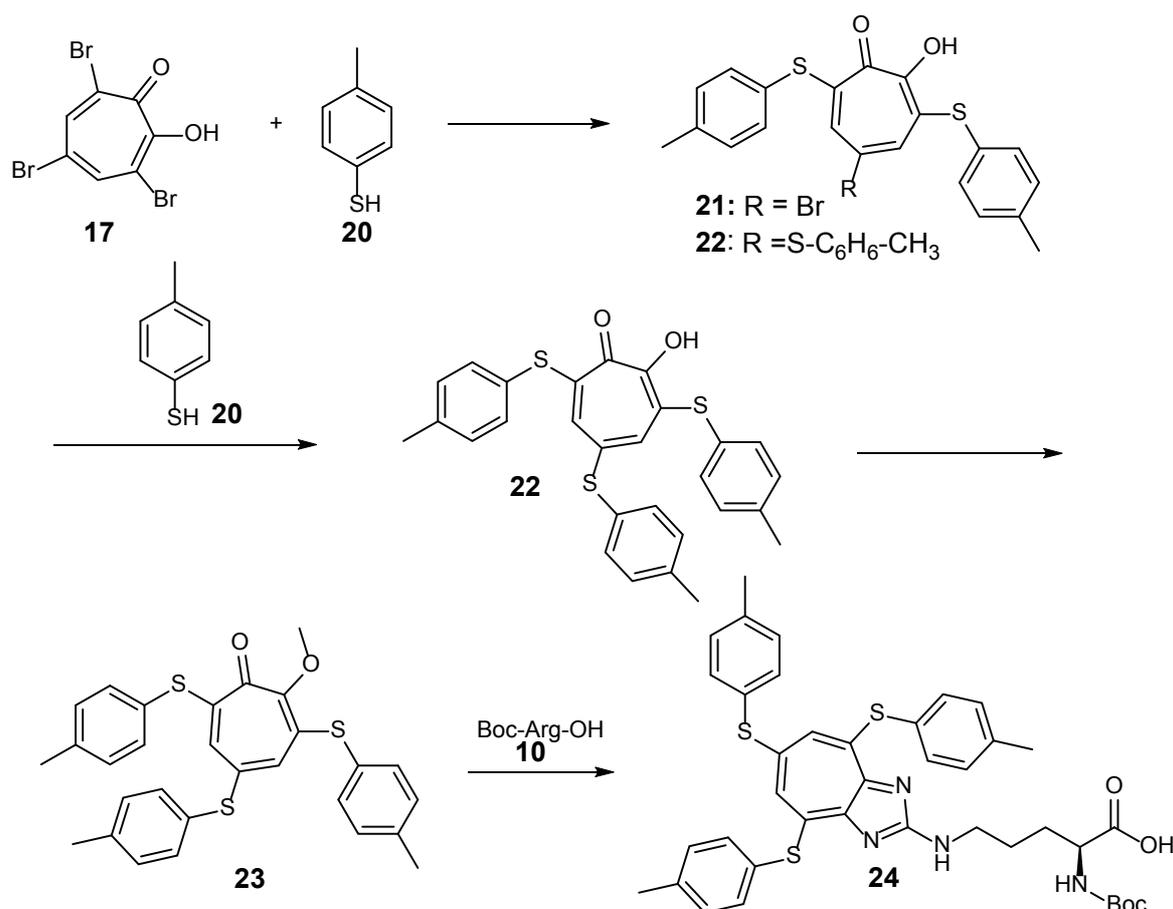
Schema 3.4-2: Synthesekonzept für den Einsatz von 3,5,7-Tribromtropolonether **18**

3.4.3 Regiospezifische Steuerung über 3,5,7-Tri-*p*-tolylthiotropolonmethylether

Ausgehend von dem in Abschnitt 3.4.2 dargestellten 3,5,7-Tribromtropolon **17**, wurde noch ein zweites Konzept zur regioselektiven Steuerung entwickelt, bei dem es vor allem auch darum geht, das konjugierte Elektronensystem durch aromatische Substituenten zu erweitern. Dazu soll die Bromverbindung **17** mit *p*-Thiokresol zum Tri-*p*-tolyltropolon **21** und diese anschließend nach der beschriebenen Methode von Khirzman et al. zum Methylether **23** umgesetzt werden.

Hauptteil

Vorversuche belegten dabei die Vermutung, dass hier mit einem Gemisch gerechnet werden muss, bei dem zum einen alle drei Bromsubstituenten durch *p*-Thiokresol ersetzt werden und zum anderen noch ein Nebenprodukt entsteht, bei dem lediglich die Bromsubstituenten vermutlich in der 3- und 7-Position gegen *p*-Thiokresol substituiert werden, der Bromsubstituent in der 5-Position hingegen erhalten bleibt. Durch Optimierungsversuche, bei denen mit einem hohen Überschuss an *p*-Thiokresol in Verbindung mit einer verlängerten Reaktionslaufzeit gearbeitet wurde, führten zum favorisierten Tropolonderivat **21** ohne dass das Nebenprodukt **22** nachgewiesen werden konnte. Durch den neu zur Verfügung stehenden Tropolonether **23** stände bei einer erfolgreichen Kondensation mit der Aminosäure **10** eine neue Amino-Diaza-Azulen-markierte Aminosäure zur Verfügung. Dies könnte vor allem im Hinblick auf Verschiebungen der Absorptions- und Emissionsmaxima oder einer Erhöhung der Fluoreszenzquantenausbeuten im Vergleich zu der unsubstituierten Spezies **8a** von Interesse sein.



Schema 3.4-3: Synthesekonzept für den Einsatz des Tropolonethers **22**

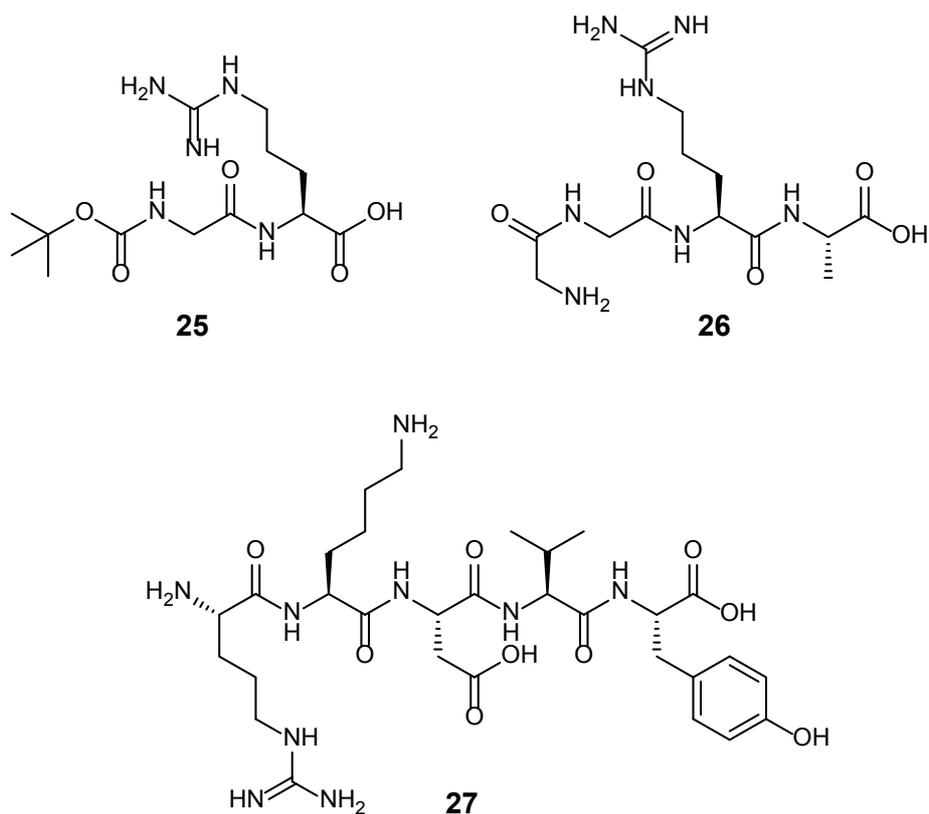
3.5 Verwendete Peptide zur Arginin-Markierung

Dass es prinzipiell möglich ist die Aminosäure Arginin in Peptiden durch den Aufbau der Amino-Diaza-Azulen-Einheit zu markieren, wurde anhand drei ausgewählter Peptide gezeigt. Zum einen an dem Dipeptid Boc-Gly-Arg-OH **25**, dem Tetrapeptid H-Gly-Gly-Arg-Ala-OH **26** und zum anderen an dem Pentapeptid *Thymopentin* **27** (H-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH), das neben der Aminosäure Arginin auch Lysin enthält.

Die in Abschnitt 3.3.3 beschriebenen optimierten Reaktionsbedingungen, die regioselektiv zum gewünschten symmetrischen Regioisomer **8a** führten, wurden bei den Markierungsversuchen mit den jeweiligen Peptiden angewandt.

Im weiteren sollte sich Thymopentin (*TP-5*) **27** als Modell besonders eignen, da dieses fünf Aminosäuren lange Peptid, welches die Positionen 32-36 des Polypeptids *Thymopoietin* (*TP*) umfasst, am umfangreichsten in klinischen Studien charakterisiert wurde. Ende der 90er Jahre des 20. Jahrhunderts wurde eine neue Familie von Kernproteinen entdeckt, bei denen der N-Terminus immer von TP dargestellt wird, weswegen diese Proteine *Thymopoietine* (*TMPOs*) genannt wurden. Weiter wurde *TP-5* therapeutisch als Immunmodulator verabreicht, da es die Fähigkeit besitzt T-Zellen zu differenzieren. Die Tatsache, dass die Wirksamkeit von *TP-5* in verschiedenen Krankheiten nachgewiesen werden konnte, deutet für Immunbiologen daraufhin, dass es in grundsätzlichen Prozessen und bei wichtigen Mechanismen eine Rolle spielen könnte, die im allgemeinen an Heilungsprozessen des Organismus beteiligt sein könnten. ^[26]

Aufgrund dieser wichtigen Eigenschaften erscheint *TP-5* ein geeigneter und repräsentativer Vertreter eines kleinen Peptids zur Arginin-Markierung zu sein.



Schema 3.5-1: Struktur der eingesetzten Peptide

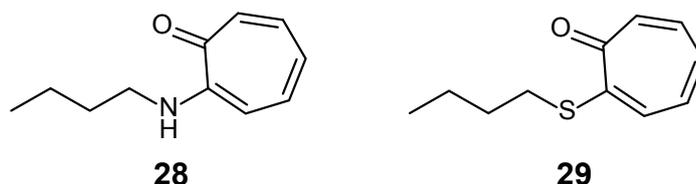
3.5.1 Potentielle Nebenreaktionen

In Bezug auf das in Abschnitt 3.5 angesprochene Vorhaben, sind besonders zwei wichtige Nebenreaktionen, die generell in Peptiden ablaufen könnten, von Bedeutung.

Sowohl mit der im Peptid befindlichen Aminogruppe der Aminosäure Lysin, als auch mit der Thiogruppe der Aminosäure Cystein, sollte es ebenfalls zu einer Kondensationsreaktion mit den verschiedenen Tropolonethern kommen. Dadurch könnte die beabsichtigte Arginin-Markierung eines Peptids oder Proteins durch *Quenching*-Effekte beeinflusst werden, vorausgesetzt diese Nebenprodukte würden eine Eigenfluoreszenz aufweisen.

Hauptteil

Um darüber eine Vorhersage treffen zu können, wurden zwei Modellverbindungen synthetisiert, die fluoreszenzspektroskopisch und UV-VIS-spektroskopisch untersucht wurden. Als Lysin-Modell diente 2-Butylaminotropon **28** und als Cystein-Modell 2-Butylthiotropon **29**, die über die Kondensation von Troponon mit Butylamin bzw. Butanthiol zugänglich gemacht wurden.



Schema 3.5-2: Modellverbindungen für spektroskopische Untersuchungen

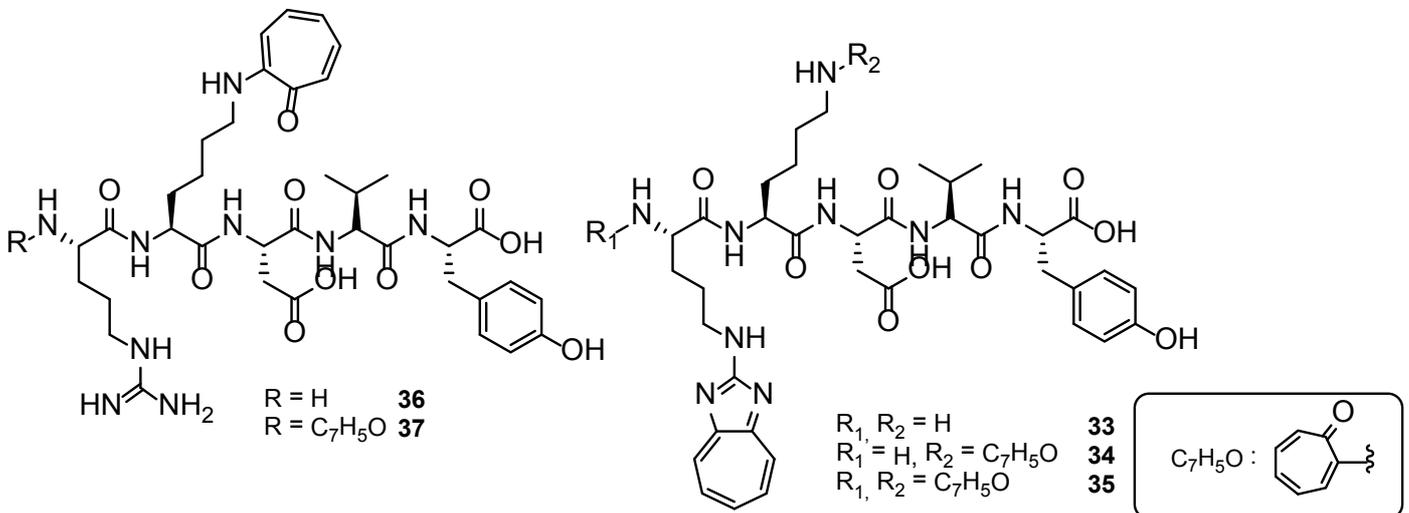
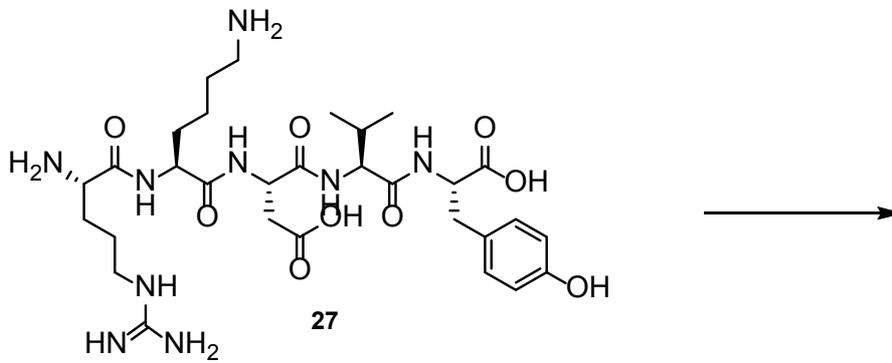
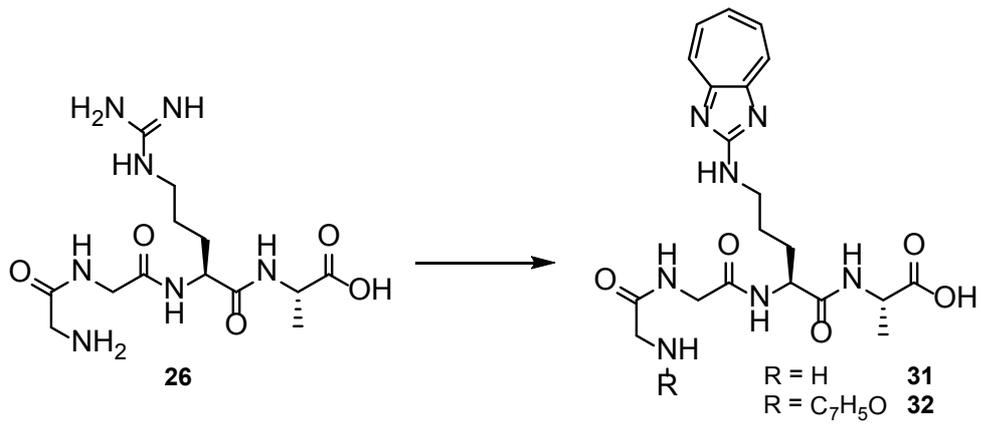
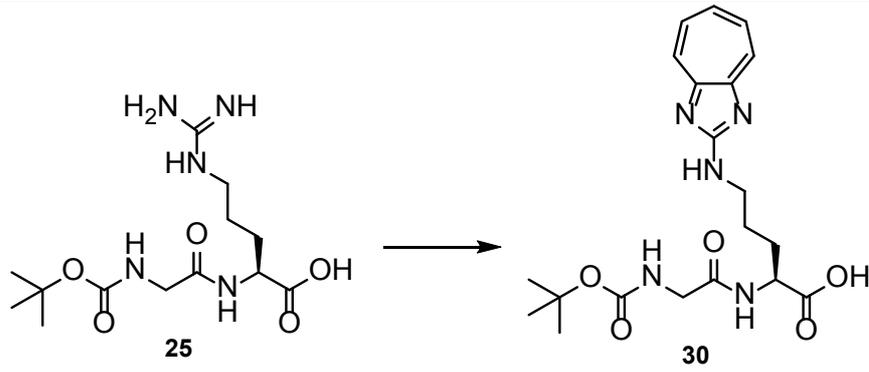
3.5.2 Struktur der markierten Peptide

Zum Aufbau der Amino-Diaza-Azulen-Struktureinheit in den Peptiden **25**, **26** und **27** sollten die in Abschnitt 3.3.3 beschriebenen Reaktionsbedingungen genutzt werden, die regioselektiv zu den entsprechenden linearen Regioisomeren **30-35** führen sollen, die demnach eine intensivere Fluoreszenz zeigen sollten, als die jeweilige verzweigte Spezies. Da nur das Dipeptid **25** N-Boc-geschützt eingesetzt wird, muss zumindest bei den Peptiden **26** und **27**, neben der gewünschten Kondensation zwischen der Guanidin-Einheit und dem eingesetzten Tropononether, auch mit einer Kondensation zwischen der terminalen Aminogruppe und dem Tropononether gerechnet werden. Da das Pentapeptid Thymopentin **27** als einziger Vertreter zudem die Aminosäure Lysin in seiner Peptidkette enthält, muss hier auch zudem, wie im vorherigen Abschnitt 3.5.1 bereits erwähnt wurde, noch mit einer Drittkondensation gerechnet werden. Diese zusätzliche Markierung der Aminosäure Lysin könnte jedoch im Hinblick auf zukünftige FRET-Experimente nicht uninteressant bleiben. Voraussetzung dafür ist, dass die Modellverbindung **28** keine Eigenfluoreszenz zeigt. Außerdem muss sich das Absorptionsspektrum des Akzeptors (markiertes Lysin) mit dem Emissionsspektrum des Donors (markiertes Arginin) überlappen, um einen Energietransfer zu gewährleisten.

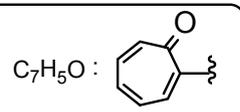
Hauptteil

Geklärt werden soll aber auch die Frage, welche der beiden Aminosäuren, Arginin oder Lysin, letztlich schneller bzw. zuerst mit dem eingesetzten Tropoloneher zum jeweiligen Kondensationsprodukt reagiert. Zumindest theoretisch sollte Lysin aufgrund der freien Aminogruppe bevorzugt mit dem Tropolonether kondensieren, so dass es daher schwierig werden dürfte, eine Arginin-Markierung in *Thymopentin* Arginin-spezifisch durchzuführen.

Hauptteil



Schema 3.5-3: Potenzielle Markierungsprodukte



3.6 Ergebnisse der präparativen Trennung der Regioisomere **8a** und **8b**

3.6.1 Trennung über *reversed-phase*-HPLC

Das noch aus der Diplomarbeit stammende Substanzgemisch (*MD-3*) der beiden Regioisomere **8a** und **8b**, dessen $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum in Abbildung 2.3-5 wiedergegeben ist, konnte erfolgreich an einer semi-präparativen-*reversed-phase*-HPLC-Anlage getrennt werden. Als Eluent wurde ein Methanol/Wasser-Gemisch im Verhältnis 95:5 verwendet. Aufgrund der geringen Fraktionsmengen, die nach jedem Durchgang erhalten wurden, wurde die Anlage im sogenannten *batch*-Modus getrieben. Das bedeutet, dass sich ein Trennvorgang, der etwas 20 Minuten dauerte und zu drei Fraktionen führte, im Intervall wiederholte, so dass immer die gleichen Fraktionen in Vorratsbehältern gesammelt werden konnten. Dadurch konnten die getrennten Regioisomere angereichert werden und standen, nach dem Entfernen des Eluenten, neben massenspektrometrischen, vor allem auch für gut aufgelöste Kernresonanzspektroskopie-Experimente zur Verfügung.

3.6.1.1 Ergebnisse der 1. Fraktion

Neben einem hochaufgelösten Massenspektrum (\rightarrow Abbildung 3.6-1), war es ebenfalls möglich ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren aufzunehmen, die zweifelsfrei den Erfolg der chromatographischen Trennung belegen können. Die beiden Kernresonanzspektren sind zusammen in der Abbildung 3.6-2 dargestellt. Hier zeigt das $^1\text{H-NMR}$ (7.4 bis 8.0 ppm), wie auch das $^{13}\text{C-NMR}$ (126 bis 138 ppm) die drei charakteristischen Signale für die fünf Wasserstoffatome bzw. Kohlenstoffatome (Signale sind hier eingekreist) des Cycloheptatrienyl-Bereiches für das symmetrische Regioisomer **8a**.

Hauptteil

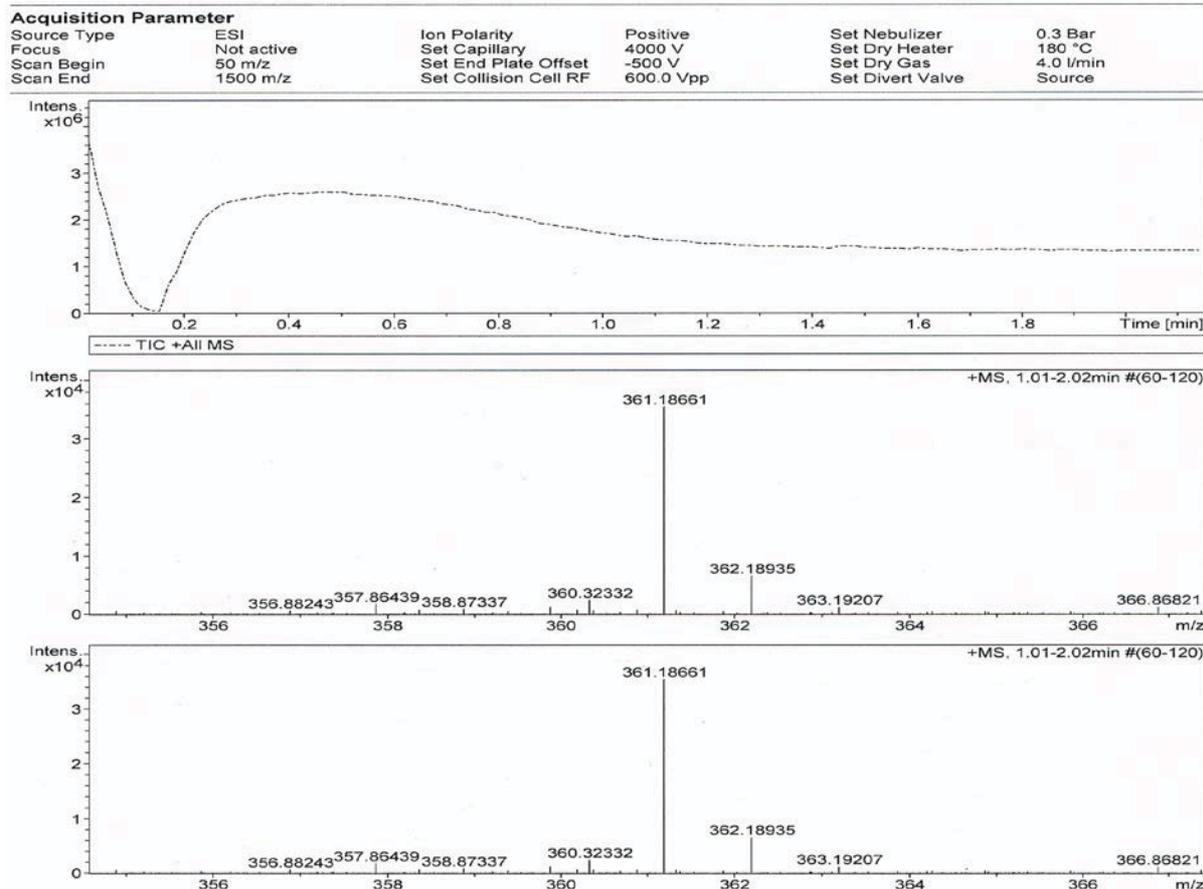


Abbildung 3.6-1: HR-MS der Fraktion 1 der Substanz MD-3

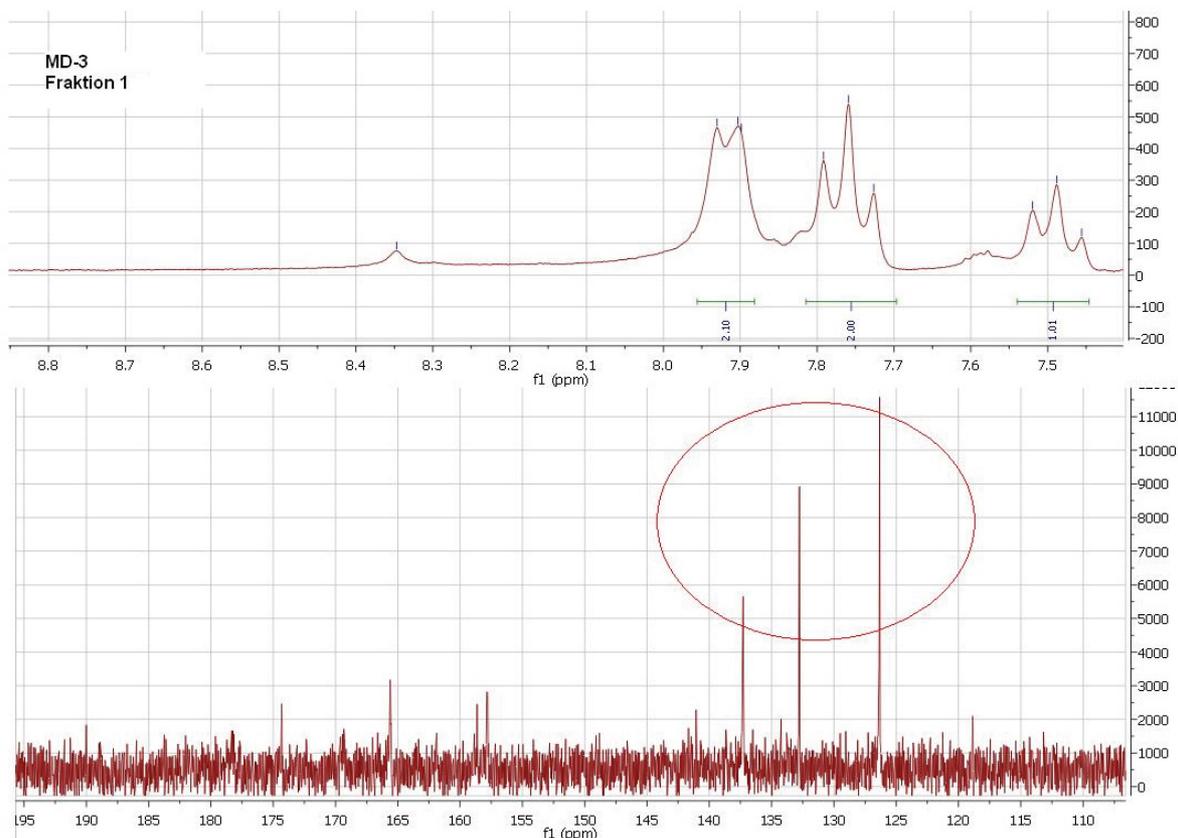


Abbildung 3.6-2: ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektrum der Fraktion 1 der Substanz MD-3

3.6.1.2 Ergebnisse der 2. Fraktion

Auch von der zweiten Fraktion wurden sowohl ein hochaufgelöstes Massenspektrum (→ Abbildung 3.7-3), als auch jeweils ein $^1\text{H-NMR}$ - und ein $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum aufgenommen, welche in der Abbildung 3.7-4 dargestellt sind. Hier konnte eindeutig der Cycloheptatrienyl-Bereich das asymmetrische Regioisomer **8b** anhand der Anzahl, Lage, Multiplizität und Signalintegration im Bereich von 8.0 bis 8.4 ppm im $^1\text{H-NMR}$, sowie den fünf Signalen zwischen 125 und 145 ppm im $^{13}\text{C-NMR}$, identifiziert werden.

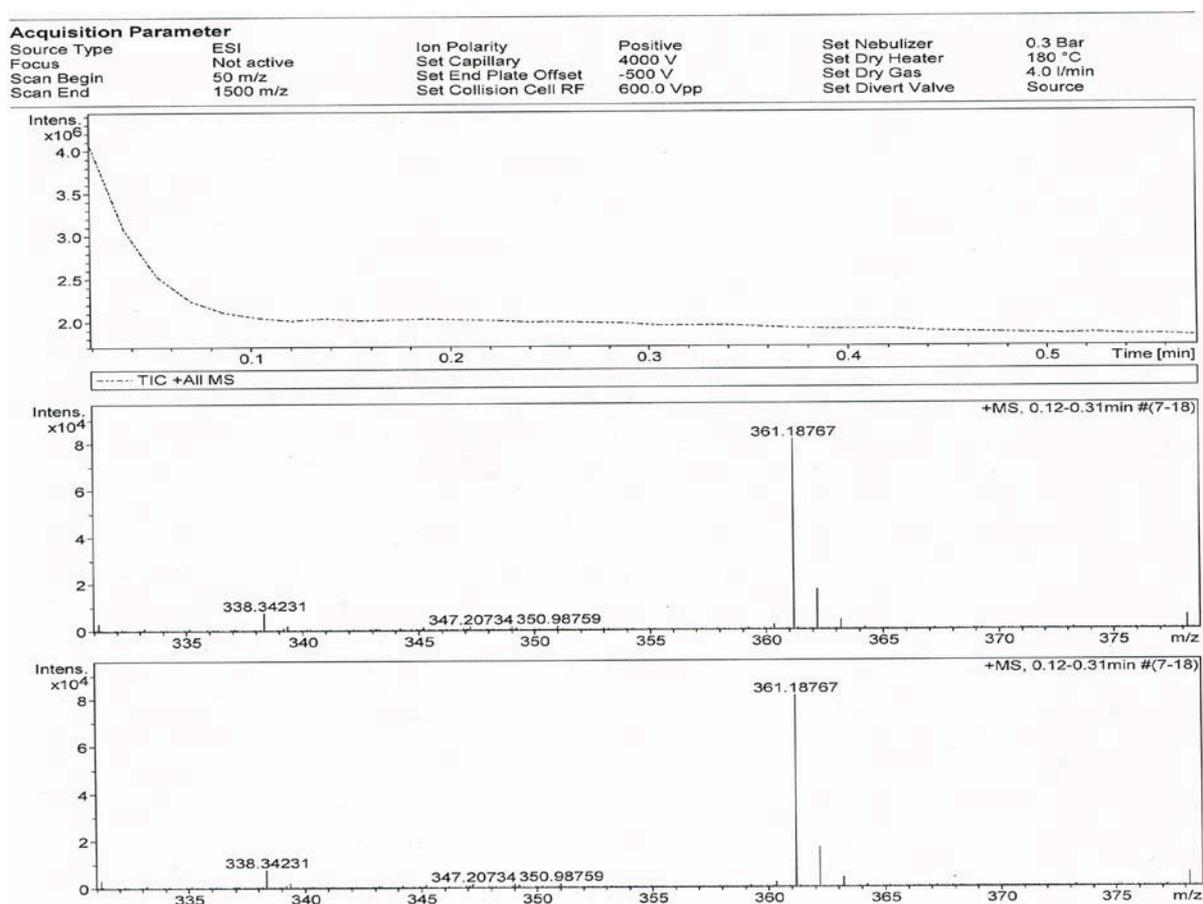


Abbildung 3.6-3: HR-MS der Fraktion 2 der Substanz MD-3

Hauptteil

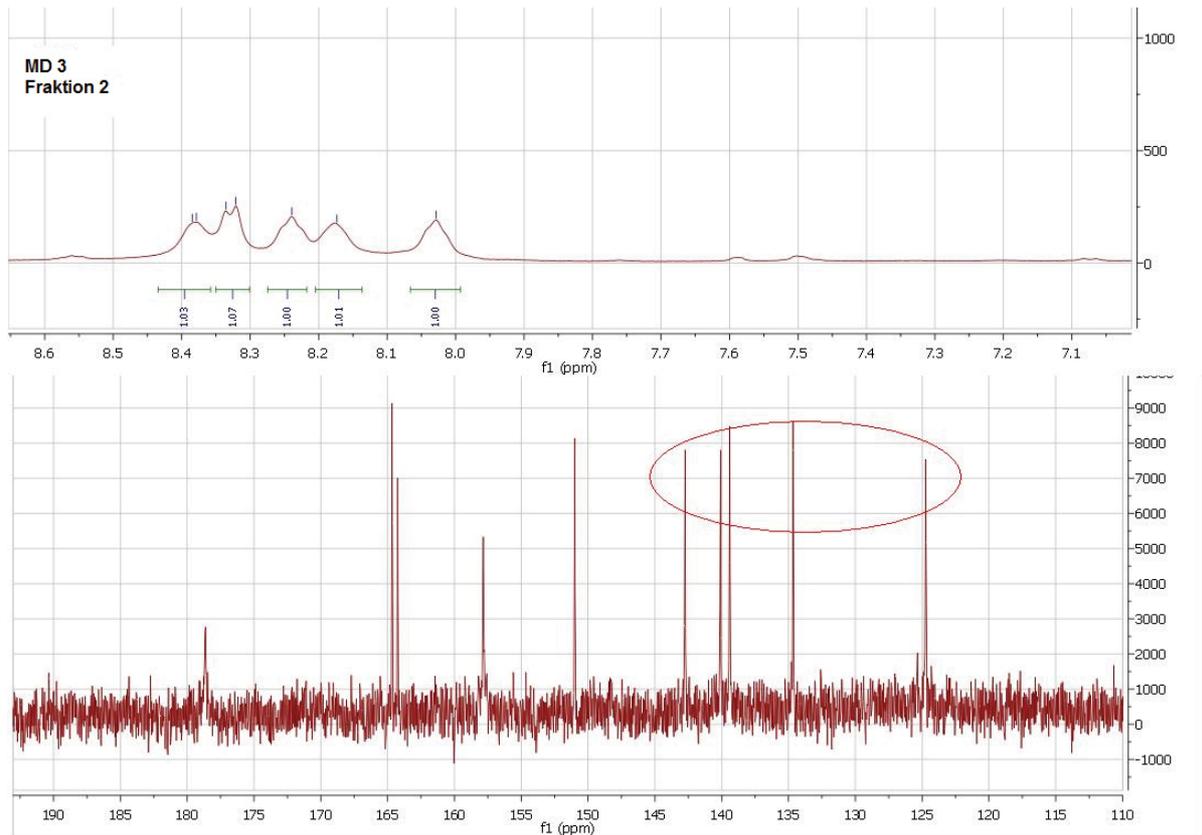


Abbildung 3.6-4: $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum der Fraktion 2 der Substanz *MD-3*

Die Absorptions- und Emissionsspektren, sowie die Fluoreszenzquantenausbeuten und die Fluoreszenzlebensdauern der hier getrennten Regioisomere **8a** und **8b** werden im experimentellen Teil dieser Arbeit gesondert diskutiert.

3.6.2 Trennung über pH-Wert-abhängige Extraktion

In dem vorherigen Kapitel 3.6.1 wurde bereits die erfolgreiche Trennung der beiden Regioisomere **8a** und **8b** über präparative *reversed-phase*-HPLC beschrieben. Da dieses Verfahren jedoch sehr aufwendig ist, wurde parallel nach einem effizienten Weg gesucht, die Regioisomere mit Hilfe von präparativen Labormethoden zu separieren. Da sich die Regioisomere **8a** und **8b** in ihrem strukturellen Aufbau des Fluorophors dahingehend unterscheiden, als das bei der Verbindung **8b** eine Imin-Struktur und bei dem Regioisomer **8a** eine Enamin-Struktur vorliegt, sollte es hier möglich sein, durch gezielte Einstellung eines sauren pH-Wertes das asymmetrische Regioisomer **8b** durch Protonierung des Imin-Stickstoffes soweit zu polarisieren, so dass es bei einer Extraktion mit organischen Lösungsmitteln in der wässrigen Phase verbleibt. Da das asymmetrische Regioisomer **8b** und sein korrespondierendes Gegenion, wie auch die zugefügte sich dissozierende Säure, in diesem Fall deutlich mehr Wassermoleküle für die Solvatisierung benötigen, müsste das symmetrische und ungeladene Regioisomer **8a** zwangsläufig in die organische Phase „ausweichen“.

Durch Anwendung dieser Strategie konnte eine Trennung auch über eine saure pH-Wert Einstellung bei der Extraktion realisiert werden. Dabei wird das basische Reaktionsgemisch zunächst mit Chloroform extrahiert, um es von Resten des Tropolonethers zu befreien. Anschließend wird die wässrige Phase mit Citronensäure angesäuert, bis ein pH-Wert unter 5 eingestellt ist und erneut mit Chloroform extrahiert. Das symmetrische Regioisomer geht dabei in die organische Phase über, während das asymmetrische in der wässrigen verbleibt. Als Substanz wurde die Probe *MD-3.2* verwendet, die im Zuge der Diplomarbeit^[20] dargestellt und analysiert wurde.

Die Ergebnisse dieser pH-Wert gesteuerten Extraktion sind in den folgenden Abbildungen illustriert. Die ersten beiden Abbildungen 3.6-5 und 3.6-6 zeigen ein ESI-Massenspektrum und ein ¹H-NMR-Spektrum, bei denen die Regioisomere **8a** und **8b** noch ungetrennt vorliegen, lediglich die Reste des verwendeten Tropolonmethylethers **4** wurden durch vorherige Extraktion mit Chloroform entfernt.

Hauptteil

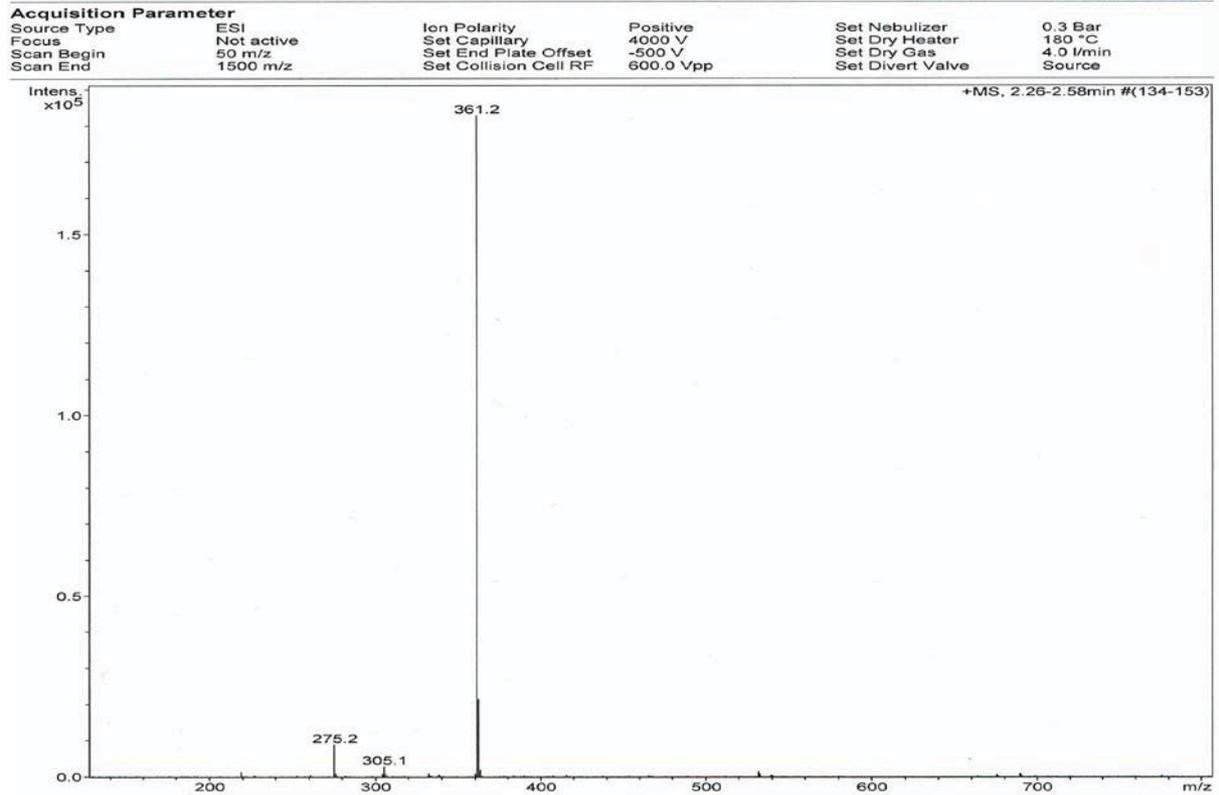


Abbildung 3.6-5: ESI-MS des Regioisomerenmisches der Substanz MD-3.2

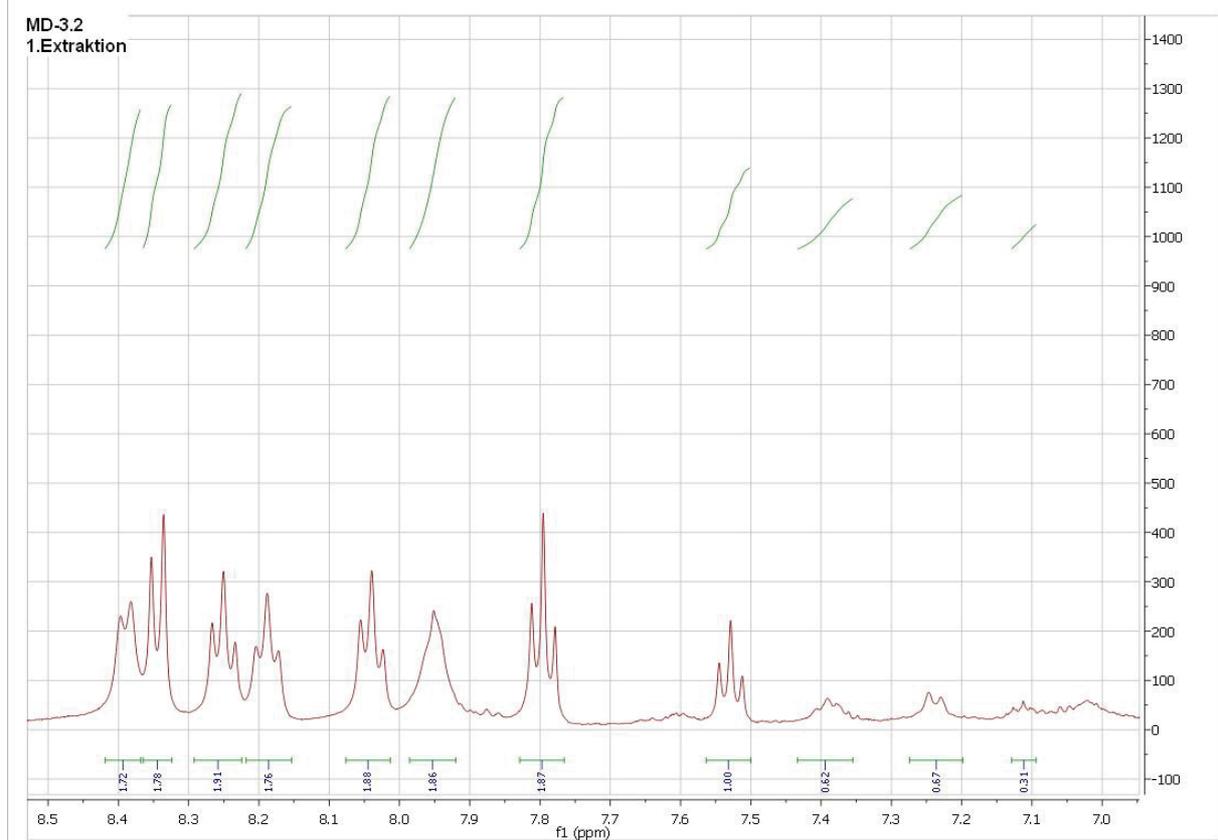


Abbildung 3.6-6: ¹H-NMR des Regioisomerenmisches der Substanz MD-3.2

Hauptteil

Nun wurde der leuchtend gelben wässrigen Phase, in der, wie das obige ESI-Massenspektrum zeigt, noch Reste der Boc-geschützten Aminosäure **10** nachgewiesen werden konnten, im Scheidetrichter etwa das halbe Volumen der wässrigen Phase an Chloroform zugefügt und mittels gesättigter Citronensäure wurde ein pH-Wert von 2 bis 1 eingestellt. Nach leichtem Schütteln konnte man direkt beobachten, dass sich die organische Phase intensiv gelb färbte, die wässrige dabei ebenfalls gelb blieb, jedoch etwas an Farbtintensität einbüßte. Die Phasen wurden nun getrennt und entsprechend den üblichen Methoden aufgearbeitet und analysiert. Die folgenden zwei Abbildungen 3.6-7 und 3.6-8 zeigen das ESI-Massenspektrum und das $^1\text{H-NMR}$ der wässrigen Phase:

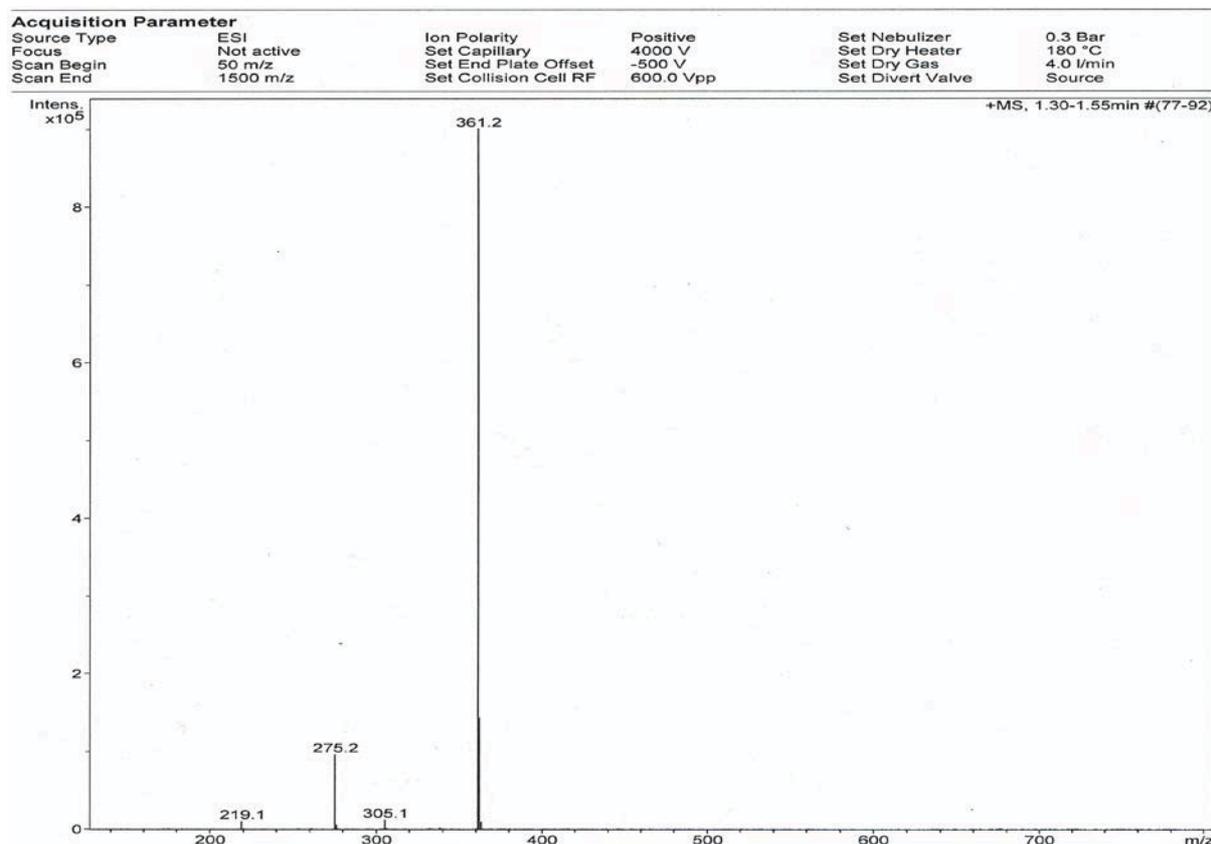


Abbildung 3.6-7: ESI-MS der wässrigen Phase

Das hier abgebildete ESI-Massenspektrum (\rightarrow Abbildung 3.6-7) zeigt, wie auch das unter Abbildung 3.6-5 gezeigte, ebenfalls noch Reste der als Edukt eingesetzten Aminosäure **10**.

Hauptteil

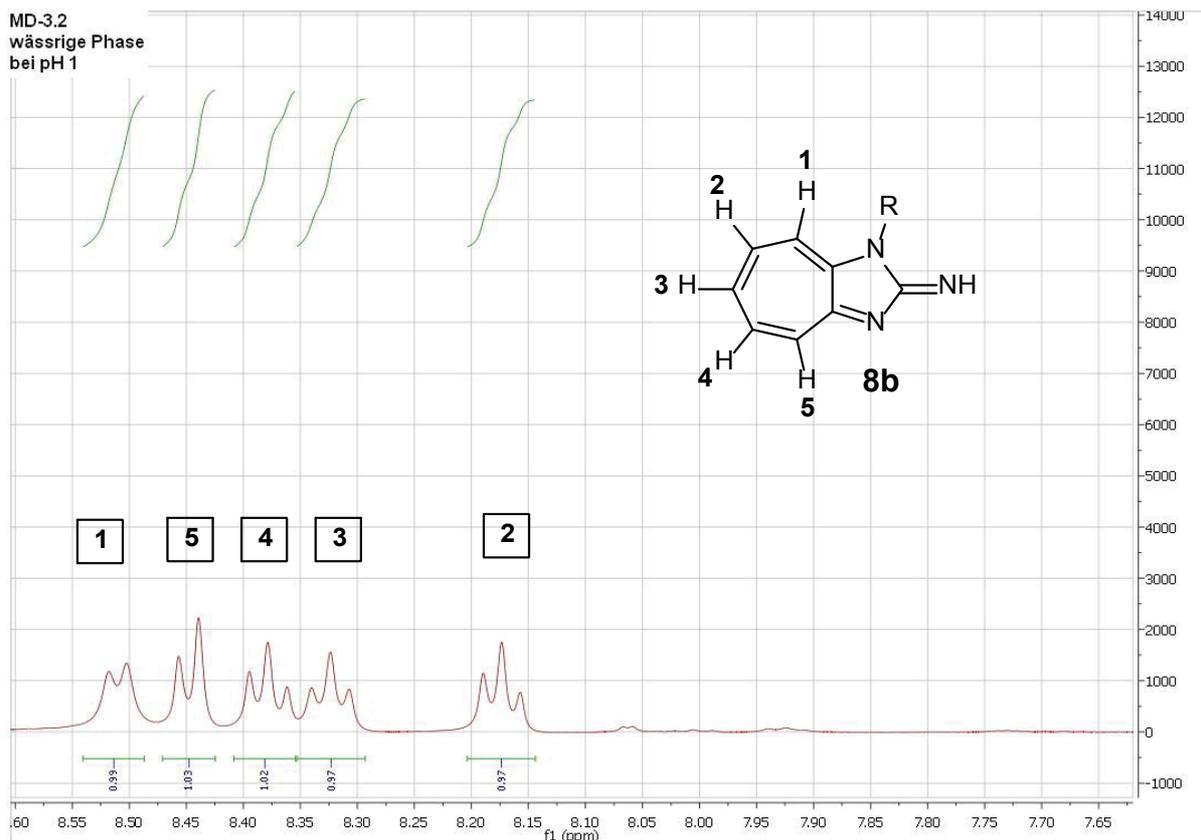


Abbildung 3.6-8: $^1\text{H-NMR}$ der wässrigen Phase

Anhand der hier in Abbildung 3.6-8 dargestellten Zuordnung der zwei Dublett- und der drei Triplet-Signale, konnte eindeutig das asymmetrische Regioisomer **8b** identifiziert werden. Es ist deutlich erkennbar, dass in dem für das symmetrische Regioisomer **8a** charakteristischen Bereich der chemischen Verschiebung von 8 bis 7 ppm, weder Signale für die monomere, noch für die dimere Spezies auftreten.

Die Abbildungen 3.6-9 und 3.6-10 zeigen entsprechend das ESI-Massenspektrum, sowie das $^1\text{H-NMR}$ der organischen Phase:

Hauptteil

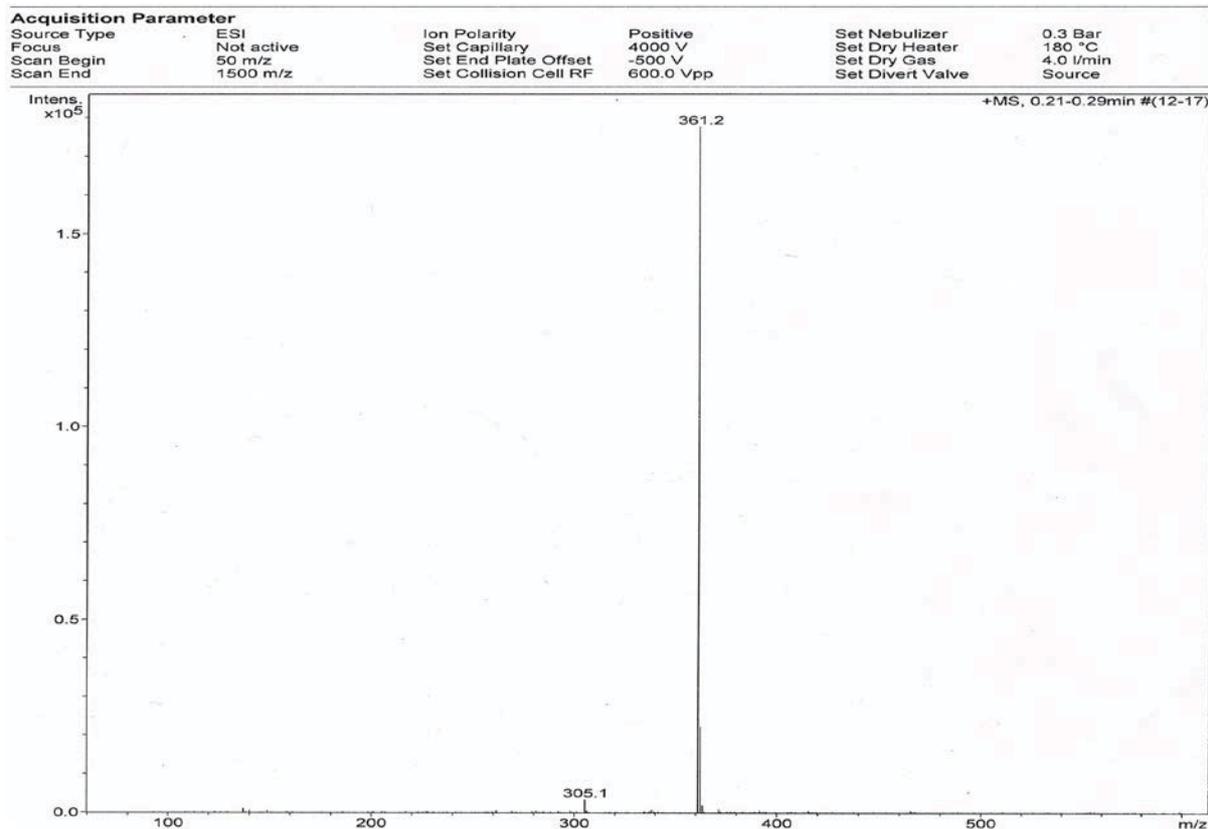


Abbildung 3.6-9: ESI-MS der organischen Phase

Auch dieses ESI-Spektrum (→ Abbildung 3.6-9) zeigt, wie auch das in Abbildung 3.6-7, einen intensiven Molekülpeak bei 361.2 m/z für die fluorophore Aminosäure **8**. Dabei sind bis auf ein Fragment bei 305.1 m/z nahezu keine weiteren Verunreinigungen und erwartungsgemäß keine Edukte mehr nachweisbar.

Durch das ¹H-NMR in der folgenden Abbildung 3.6-10 kann das symmetrische Regioisomer **8a**, anhand der drei Signale im Bereich von 7.05 bis 7.55 ppm, zugeordnet werden. Aufgrund der chemischen Verschiebung der drei Signale muss davon ausgegangen werden, dass es sich hier um die zuvor als monomere Spezies deklarierte Spezies des symmetrischen Regioisomeres **8a** handelt. Signale die für das Dimer, aber auch Signale die für die Anwesenheit für das asymmetrische Regioisomer **8b**, welche beide eine chemische Verschiebung größer als 7.5 ppm aufweisen, sind nicht zu finden.

Hauptteil

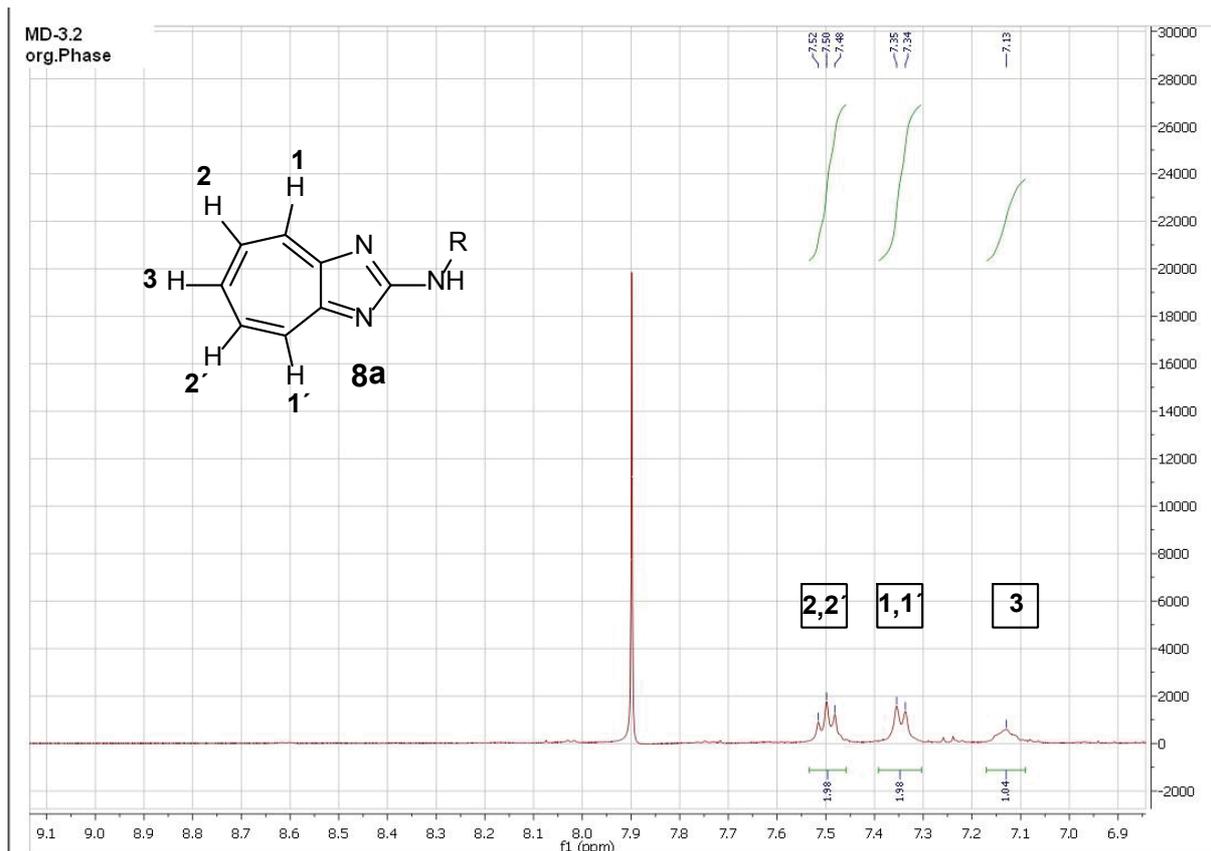


Abbildung 3.6-10: $^1\text{H-NMR}$ der organischen Phase

Wie die hier veranschaulichte analytische Auswertung zeigt, stellt die vorgestellte pH-Wert-abhängige Extraktion eine effiziente Methode dar, die beiden Regioisomere **8a** und **8b** präparativ zu separieren und so die einzelnen Verbindungen in hoher Reinheit zugänglich zu machen. Im direkten Vergleich mit den Ergebnissen, der unter Abschnitt 3.6.1 aufgeführten, Trennung über *reversed-phase*-HPLC, stellt die hier beschriebene Methode keinen Nachteil dar. Sie genau so effizient, liefert die zu trennenden Isomere in gleicher Reinheit und ist vom Arbeitsaufwand her deutlich schneller durchführbar und ökonomisch sinnvoller, da deutlich weniger Mengen organischer Lösungsmittel benötigt werden.

Die Absorptions- und Emissionsspektren, sowie die Fluoreszenzquantenausbeuten und die Fluoreszenzlebensdauern der hier getrennten Regioisomere **8a** und **8b** werden ebenfalls im experimentellen Teil dieser Arbeit diskutiert.

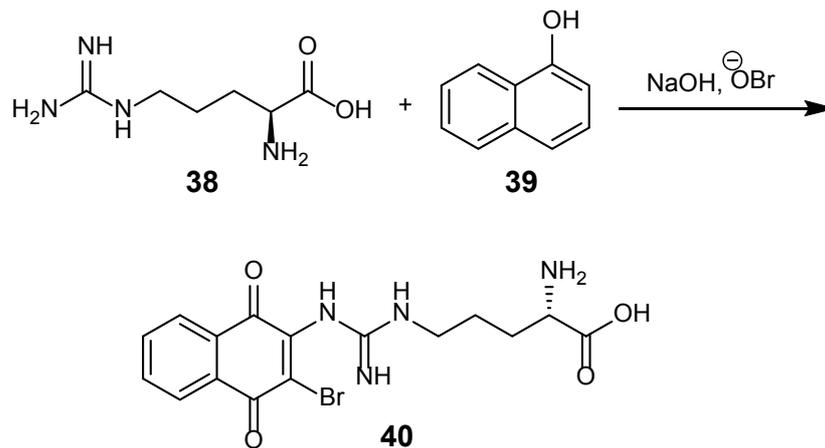
3.7 Untersuchungen zur *Sakaguchi*-Reaktion

Die Vorarbeiten aus meiner Diplomarbeit^[20] und das in dieser Arbeit beschriebene Vorhaben veranschaulichen das besondere Interesse an einer selektiven Fluoreszenz-Markierung der Aminosäure Arginin. In diesem Zusammenhang wurden im Rahmen einer Bachelorarbeit an unserem Institut Untersuchungen an *Sakaguchi*-Farbstoffen mit dem Ziel durchgeführt, herauszufinden, ob diese eine bisher unbekannte Fluoreszenz zeigen, da die *Sakaguchi*-Reaktion ebenfalls dazu geeignet erscheint Arginin selektiv zu markieren. Diese Arbeiten wurden von Frau *N. Miede*^[26] am Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. M. Braun und meiner Betreuung durchgeführt. Sie sollte in dieser Arbeit zum einen den *Sakaguchi*-Farbstoff aus der Farbreaktion isolieren und zum anderen diesen, bzw. dessen farbgebende Struktur in einer authentischen Synthese gezielt darstellen und vollständig, insbesondere im Hinblick auf Absorptions- und Emissionsspektroskopie, charakterisieren.

3.7.1 Allgemeines über die Struktur des *Sakaguchi*-Farbstoffes

Bereits im Jahre 1925 konnte *Sakaguchi*^[7b, 28] durch die später nach ihm benannte Reaktion Arginin und andere monoalkylierte Guanidine über eine Farbstoffbildung nachweisen. Dazu gab er beispielsweise Arginin als nachzuweisende Probe mit α -Naphthol und alkalischer Hypobromid- oder chlorid-Lösung zusammen und sogleich konnte er eine intensive Rotfärbung der Lösung beobachten. Warum diese Reaktion jedoch einzig monoalkylierte Guanidine oder dessen Derivate nachzuweisen vermag, konnte er nicht erklären.

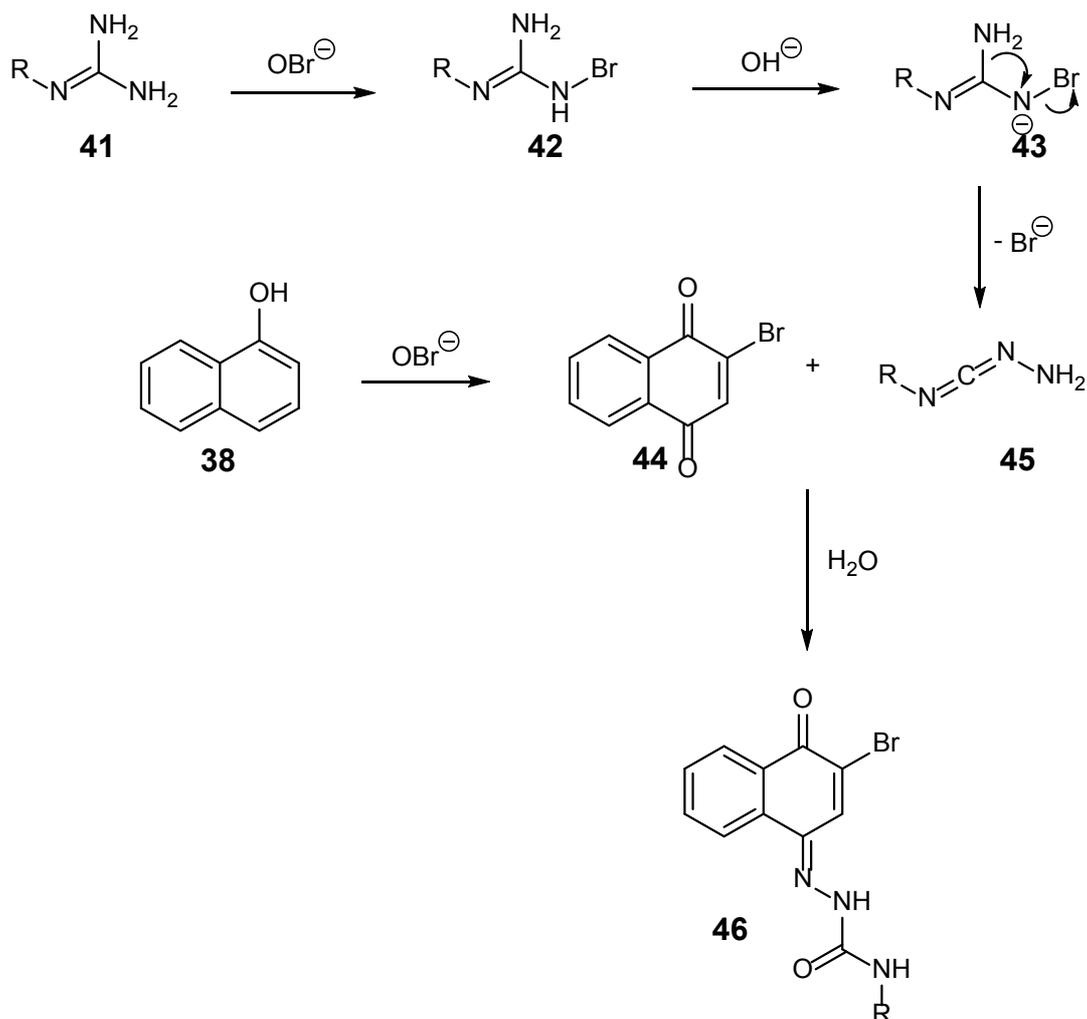
Hauptteil



Schema 3.7-1: Postulierte Struktur des Farbstoffes von *Sakaguchi*^[7b, 28]

Erst 1967 konnten *Heesing* und *Hoppe*^[29] über IR-spektroskopische Untersuchungen, sowie eine authentische Synthese die wahre Struktur der *Sakaguchi*-Farbstoffe aufzeigen. Ging man bisher davon aus, dass das Guanidinsystem in dem Farbstoff intakt vorlag, postulierten sie einen Bildungsmechanismus, indem eine Umlagerung des Guanidins in ein Semicarbazid-System vorausgeht. Durch Untersuchungen an diversen Modellsubstanzen, konnten sie den Mechanismus bestätigen.^[30]

Hauptteil



Schema 3.7-2: Bildungsmechanismus nach Hessing und Hoppe^[29]

Wie in Schema 3.7-2 veranschaulicht, reagiert das monosubstituierte Guanidin **41** mit dem Hypobromid zum N-Brom-guanidin **42**, worauf analog zum *Hofmanschen* Abbau eine α -Eliminierung von HBr erfolgt, wodurch intermediär das Anion **43** der N-Brom-Verbindung entsteht.

Dies stabilisiert sich jedoch nicht durch Wanderung eines Kohlenstoffrestes an das Stickstoffatom, sondern durch Wanderung der Aminogruppe, welche an den Stickstoff tritt, wobei gleichzeitig die Abspaltung des Bromid-Ions erfolgt und ein Aminocarbodiimid **45** resultiert, welches aufgrund seiner geringen Stabilität sofort mit dem zuvor oxidierten und bromierten Naphthol, dem 3-Brom-1,4-naphthochinon **44**, zum *Sakaguchi*-Farbstoff **46** reagiert.

Weiterhin kann die Spezifität für monoalkylierte Guanidine der *Sakaguchi*-Reaktion mit Hilfe dieser mechanistischen Betrachtung gedeutet werden. Zum einen würden freie Guanidine, sowie Arylguanidine durch Hypohalogenid-Ionen oxidativ verändert werden und zum anderen ist bei zweifach- oder höhersubstituierten Guanidinen die Umlagerung zum Aminocarbodiimid **45**, bzw. auch dessen Kondensation mit **44** unmöglich. Einzig bei monosubstituierten Guanidinen sind die oben beschriebenen Voraussetzungen zur Bildung des Semicarbazon-Farbstoffes **46** gegeben.

3.7.2 Zielsetzung und Ergebnisse der Bachelorarbeit von *N. Miede*

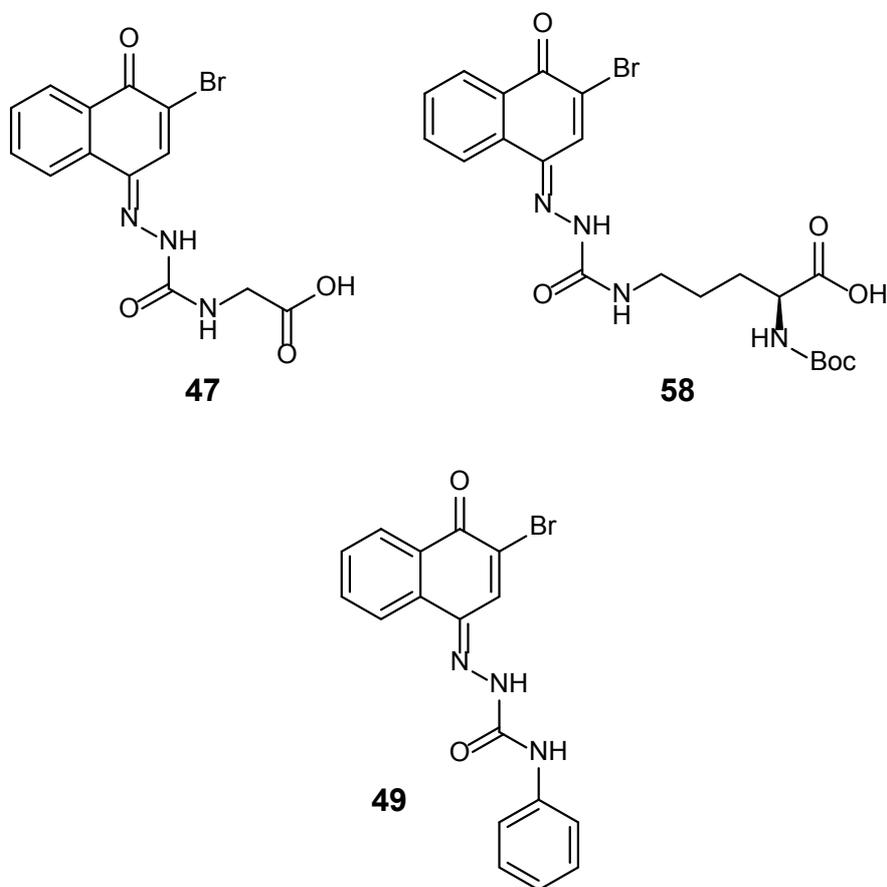
3.7.2.1 Zielsetzung

Bisher werden in der Literatur mit Ausnahme der von *Heesing*^[29] protokollierten, keine weiteren Darstellungsmethoden oder Isolierungen von *Sakaguchi*-Farbstoffen beschrieben. Die von *Heesing* durchgeführte authentische Synthese wurde leider mit keinerlei analytischen Untersuchungen belegt. Absorptions- und emissionsspektroskopische Untersuchungen konnten ebenfalls nicht gefunden werden. Ziel der Arbeit war es die *Sakaguchi*-Farbstoffe auf der Basis von Guanidinoessigsäure und Arginin aus der Reaktion zu isolieren und vollständig, insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Fluoreszenzaktivität hin, zu charakterisieren.

Weiter sollte die von *Heesing* beschriebene authentische Synthese des *Sakaguchi*-Farbstoffes auf Basis von Bromnaphthochinon und Phenylsemicarbazid reproduziert werden, um den Farbstoff in größeren Mengen zu erhalten und über NMR-spektroskopische und massenspektrometrische Untersuchungen, die von *Heesing* postulierte Struktur eines bromierten Semicarbazon-Farbstoffes, zu bestätigen.

3.7.2.2 Ergebnisse

Frau Miede konnte im Rahmen dieses Projektes die beiden *Sakaguchi*-Farbstoffe **47** und **50** durch Umsetzung von Guanidinoessigsäure bzw. Boc-geschütztem Arginin erfolgreich aus der durchgeführten *Sakaguchi*-Reaktion isolieren und vollständig charakterisieren. Die Annahme von *Hessing* und *Hoppe*, dass es sich bei den *Sakaguchi*-Farbstoffen um eine Semicarbazon-Struktur des Bromnaphthochinon handelt, konnte durch eine authentische Synthese des Semicarbazons **49** bewiesen werden, welches ebenfalls über die üblichen spektroskopischen Methoden, sowie eine Kristallstrukturanalyse eindeutig identifiziert werden konnte. Die Absorptionsspektren der hier gezeigten Farbstoffe **47**, **48** und **49** weisen alle jeweils ähnliche Absorptionsmaxima auf. Bei keinem der Farbstoffe konnte jedoch eine Fluoreszenz detektiert werden. ^[27]



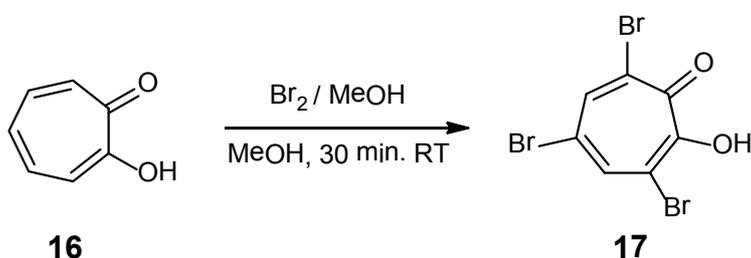
Schema 3.6-3: Charakterisierte *Sakaguchi*-Farbstoffe

3.8 Synthesen

3.8.1 Darstellung der Troponderivate

3.8.1.1 Synthese von 3,5,7-Tribromtropolon (17)

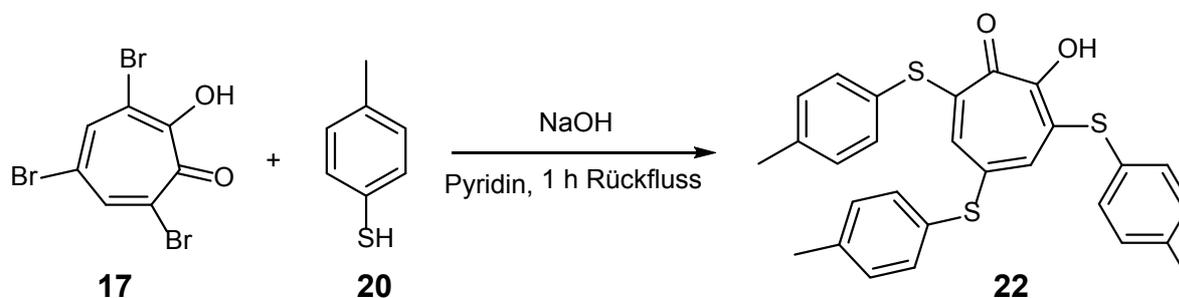
Die Bromierung von kommerziell erhältlichem Tropolon in den Positionen 3,5 und 7 erfolgte nach einer Vorschrift von *Roodt et al.*^[25], nach der Tropolon mit einem Überschuss von elementarem Brom in Methanol bei Raumtemperatur umgesetzt wurde. Das nach einiger Zeit ausfallende 3,5,7-Tribromtropolon **17** wurde abgesaugt, gewaschen und konnte allerdings nur in Ausbeuten von ca. 35 % erhalten werden.



Schema 3.8-1: Synthese von 3,5,7-Tribromtropolon nach *Roodt et al.*^[25]

3.8.1.2 Synthese von 3,5,7-tri-*p*-Tolylthiotropolon (22)

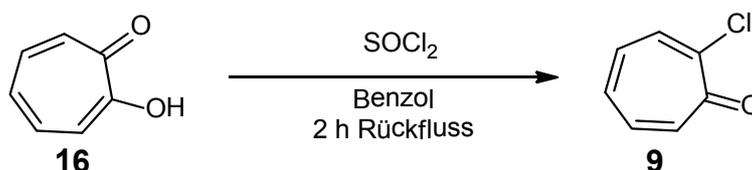
Das im vorherigen Abschnitt 3.8.1.1 dargestellte 3,5,7-Tribromtropolon wurde in Anlehnung an ein Protokoll von *Cook et al.*^[31] in Anwesenheit von Natriumhydroxid in Pyridin mit *p*-Thiokresol **20** zum Rückfluss erhitzt. Der durch saure Aufarbeitung ausgefallene Feststoff konnte mit einer Ausbeute von 88 % gewonnen werden.



Schema 3.8-2: Synthese der Troponderivate **21** und **22** in Anlehnung an *Cook et al.*^[31]

3.8.1.3 Synthese von 2-Chlortropon (9)

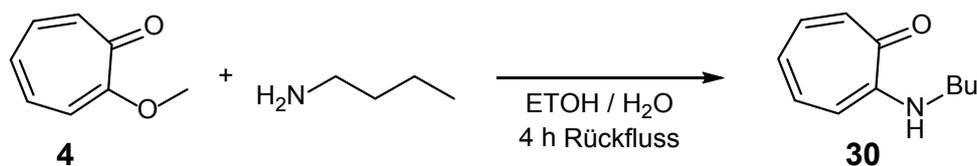
Die Umsetzung von Tropolon **16** mit Thionylchlorid erfolgte nach einer Synthesevorschrift von *Petoud* und *Zhang*^[32]. Dabei wurden die beiden Edukte in absoluten Benzol zum Rückfluss erhitzt. Die Ausbeute betrug 83 %.



Schema 3.8-3: Synthese von 2-Chlortropon nach *Petoud* und *Zhang*^[32]

3.8.1.4 Synthese von 2-Butylaminotropon (30)

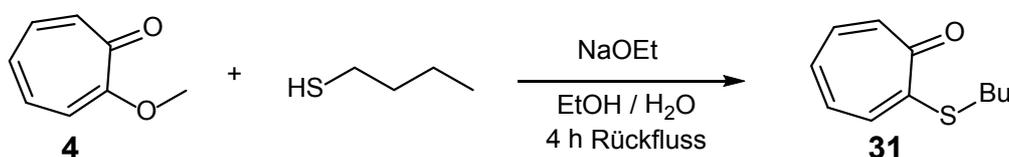
Die Darstellung des „Lysin-Modells“ 2-Butylaminotropon **30** erfolgte nach der von *Pietra et al.*^[33] beschriebenen Kondensation zwischen Tropolonmethylether **4** und Butylamin in einem Ethanol/Wasser-Gemisch, welches zum Rückfluss erhitzt wurde. Die Ausbeute betrug 90 %.



Schema 3.8-4: Synthese von 2-Butylaminotropon **30** nach *Pietra et al.*^[33]

3.8.1.5 Synthese von 2-Butylthiotropon (31)

Ähnlich wie die im vorherigen Abschnitt 3.8.1.3 beschriebene Vorschrift, führte die Kondensation von Tropolonmethylether **4** mit Butanthiol nach *Weingarten et al.*^[34] zum gewünschten 2-Butylthiotropon **31**, welches als „Cystein-Modell“ fungieren soll. Im Unterschied zu der Darstellung von 2-Butylaminotropon **30** wurde hier noch, aufgrund des reaktionsträgeren Butylthiols, ein Überschuss der Base Natriumethanolat zugesetzt und ebenfalls in einem Ethanol/Wasser-Gemisch zum Rückfluss erhitzt, was zu einer Ausbeute von 41 % führte.

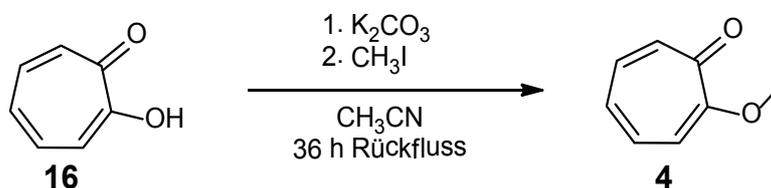


Schema 3.8-5: Synthese von 2-Butylthiotropon **31** nach *Weingarten et al.*^[34]

3.8.2 Darstellung der Tropolonether

3.8.2.1 Synthese von 2-Methoxytropolon (4)

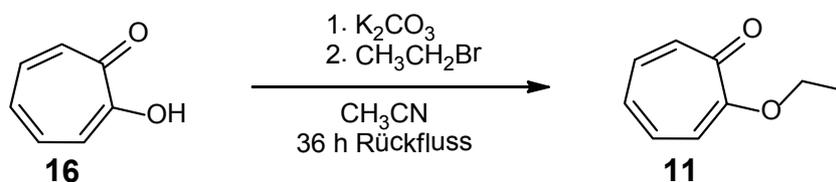
Nach einer Synthesevorschrift von *Khrizman et al.*^[35] wurde Tropolon **16** mit Kaliumcarbonat und Iodmethan in Acetonitril zum Rückfluss erhitzt. Das dabei entstehende 2-Methoxytropolon **4** wurde in 94%-iger Ausbeute erhalten.



Schema 3.8-6: Synthese von 2-Methoxytropolon **4** nach *Khrizman et al.*^[35]

3.8.2.2 Synthese von 2-Ethoxytropolon (11)

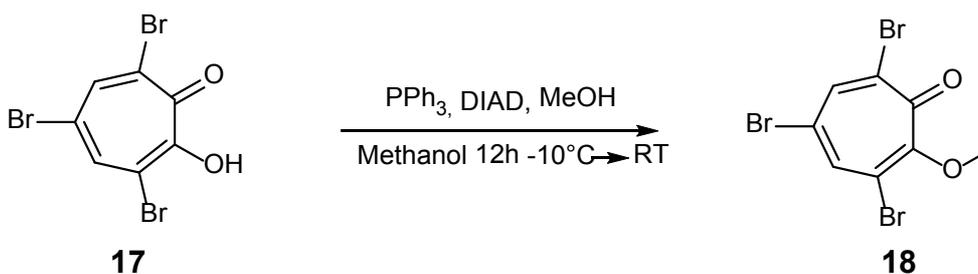
Die Alkylierung wurde analog zu der in Abschnitt 3.8.2.1 beschriebenen Vorschrift von *Khrizman et al.*^[35] mit Bromethan als Alkylierungsreagenz durchgeführt. Das dabei entstehende 2-Ethoxytropolon **11** wurde in 71 %iger Aubeute erhalten.



Schema 3.8-7: Synthese von 2-Ethoxytropolon **11** nach *Khrizman et al.*^[35]

3.8.2.3 Synthese von 3,5,7-Tribromtropolonmethylether (18)

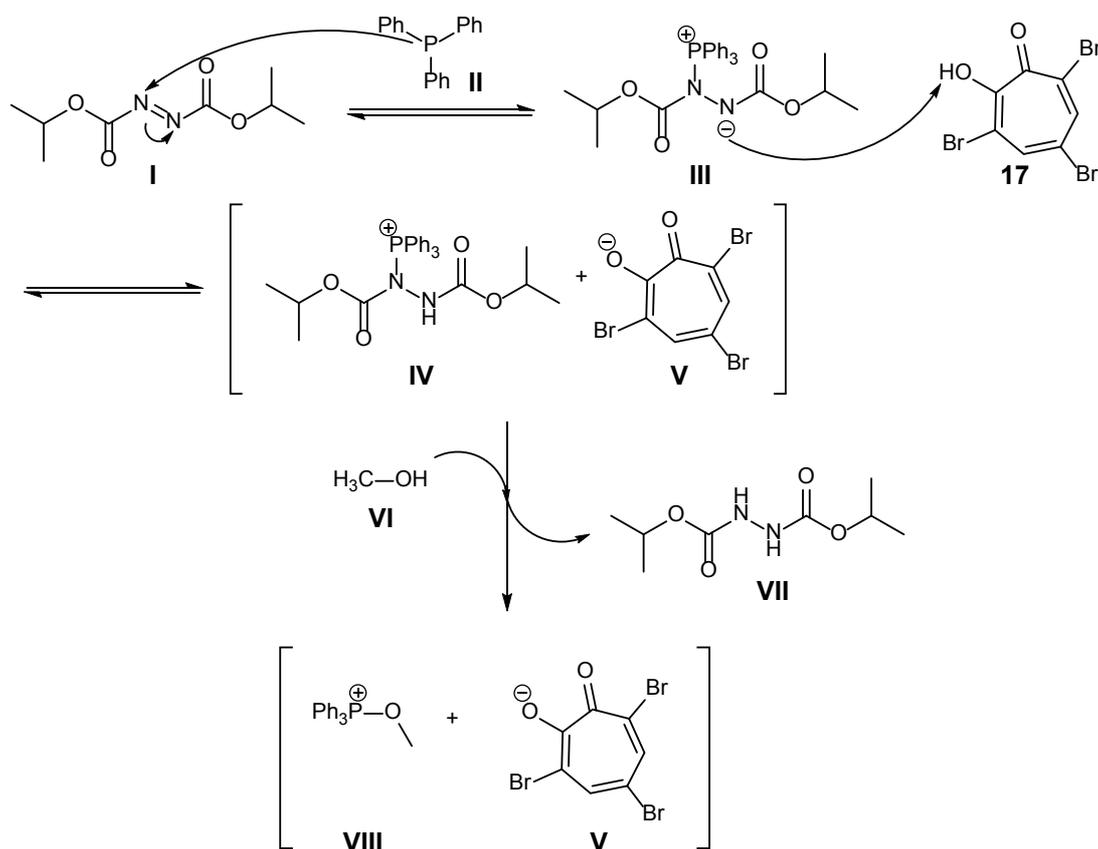
Die Darstellung des Tribrommethylethers **18** gelang nach einer Synthesevorschrift von *Biyikal*^[36] über eine *Mitsunobu*-Reaktion ausgehend von dem Tribromtropolon **17** in Diethylether. Die bei dieser Reaktion unerwünschten Nebenprodukte, wie das Triphenylphosphanoxid und das Hydrazinderivat konnten dabei zwar gut über Kieselgel entfernt werden, dennoch lag die Ausbeute nur bei 34 %.



Schema 3.8-8: Synthese von 3,5,7-Tribromtropolonmethylether **18** nach *Biyikal*^[36]

3.8.2.3.1 Mechanismus der Mitsunobu-Reaktion

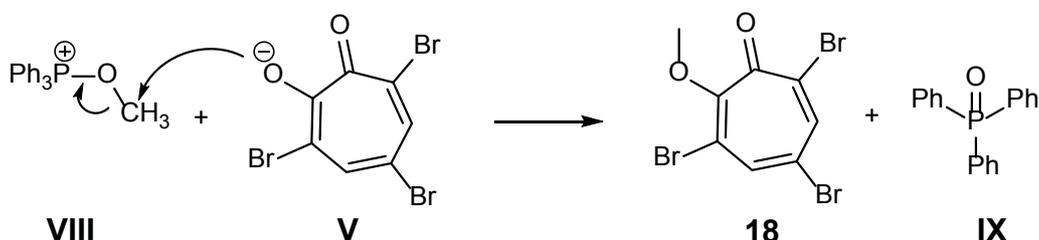
Bei der Mitsunobu-Reaktion wird formal durch das Redoxsystem Diisopropylazodicarboxylat (DIAD) **I** und Triphenylphosphan **II** *in situ* eine Alkoholfunktion in eine gute Abgangsgruppe überführt.^[37] Dabei wird Triphenylphosphan **II** zu Triphenylphosphanoxid **IX** oxidiert und DIAD zum Diisopropylhydrazinderivat **VI** reduziert. Im ersten Schritt der Reaktion reagiert das Triphenylphosphan **II** mit DIAD **I** zu dem Betain **III**, welches dem Tribromtropolon **17** aufgrund seiner Basizität das Proton der Hydroxygruppe abstrahiert, wodurch es zur Ausbildung des Ionenpaares **IV** und **V** kommt. Der Alkohol **VI** greift nun nucleophil das positiv geladene Phosphoratom an, wodurch ein Alkohol-Triphenylphosphonium-Ion **VIII** entsteht (→ Schema 3.8-9).



Schema 3.8-9: Mechanismus der Mitsunobu-Reaktion^[38]

Hauptteil

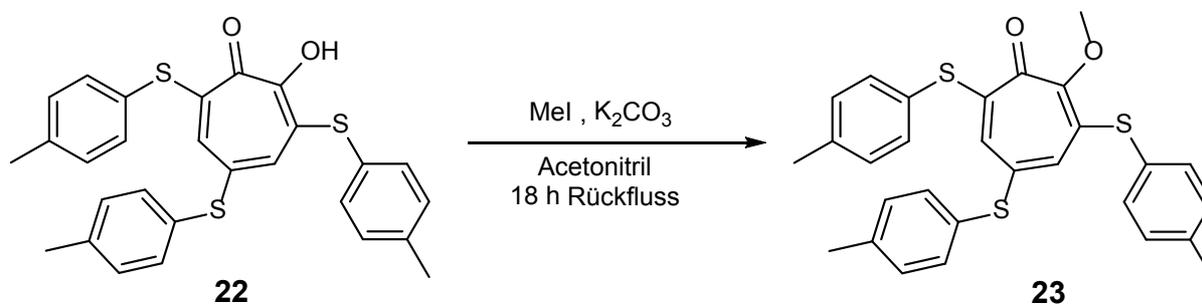
Erst jetzt findet im Zuge einer *Walden-Umkehr*^[36] die eigentliche S_N2-Reaktion statt (Schema 3.8-10). Hierbei wird das Alkohol-Triphenylphosphonium-Ion **VIII** von dem Tribromtropolon-Anion **V** angegriffen und es entsteht unter Abspaltung von Triphenylphosphanoxid **IX** der Tribromtropolonether **18**.



Schema 3.8-10: Darstellung der *Waldenschen-Umkehr*

3.8.2.4 Synthese von 3,5,7-tri-*p*-Tolylthiotropolonmethylether (**23**)

Nach der von *Khrizman et al.*^[35] beschriebenen Methode wurde auch das dreifach-substituierte Tropolon **22** umgesetzt und mit einer Ausbeute von 92 % erhalten.



Schema 3.8-11: Darstellung der Tropolonmethylether **23** und **24**

Das nachfolgende hochaufgelöste ESI-Massenspektrum (Abbildung 3.8-1) zeigt deutlich den Erfolg der Methylierung an dem eingesetzten Tropolonderivat **22**.

Hauptteil

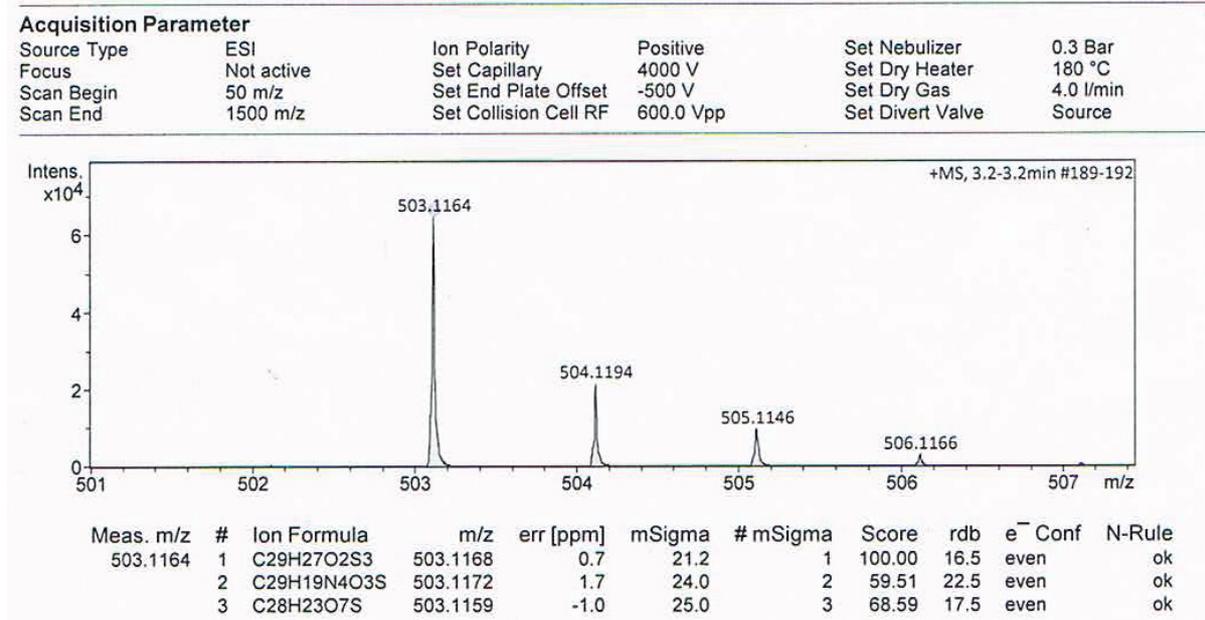


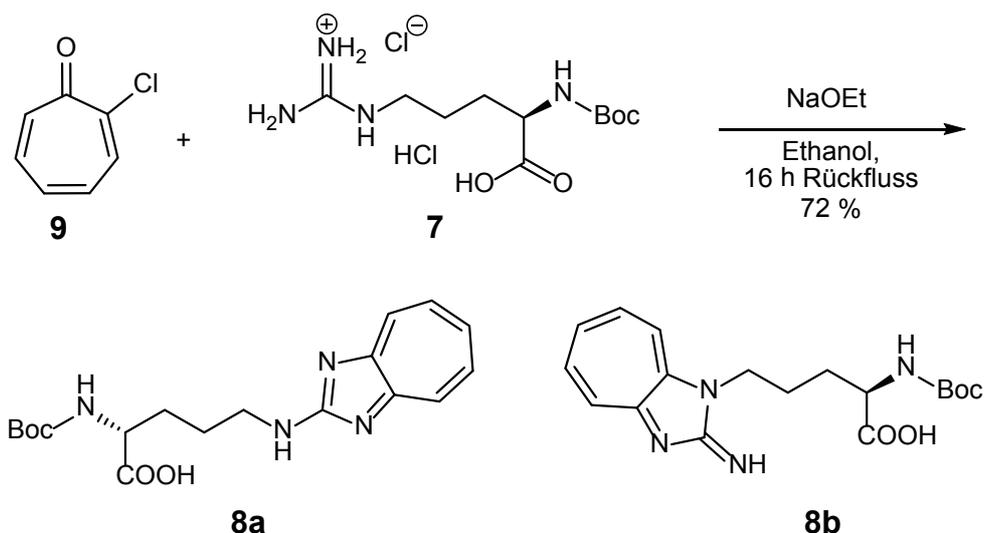
Abbildung 3.8-1: HR-MS des Tropone 23

3.8.3 Darstellung der nicht-natürlichen Aminosäuren

3.8.3.1 Ausgehend von 2-Chlortropon 9 (MD-37)

Die Synthese der nicht-natürlichen Aminosäure **8** erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von *Nozoe et al.*^[16], wobei der dort eingesetzte Tropone **4** durch das Troponderivat **9** ersetzt wurde. Dieses wurde mit der Boc-geschützten Aminosäure **7** und Natriumethanolat in absolutem Ethanol zum Rückfluss erhitzt. Das Ziel dieser Substitution sollte die regioselektive Steuerung der Reaktion hin zum favorisierten Regioisomer **8a** der nicht-natürlichen Aminosäure sein. Wie das in der Abbildung 3.8-2 abgebildete ESI-Massenspektrum zeigt, konnte die Aminosäure **8** durch Aussalzen mit Ammoniumfluorid-Lösung, relativ sauber und frei von Nebenprodukten isoliert werden. Die Ausbeute betrug 72%.

Hauptteil



Schema 3.8-12: Darstellung der Regioisomere **8a** und **8b**

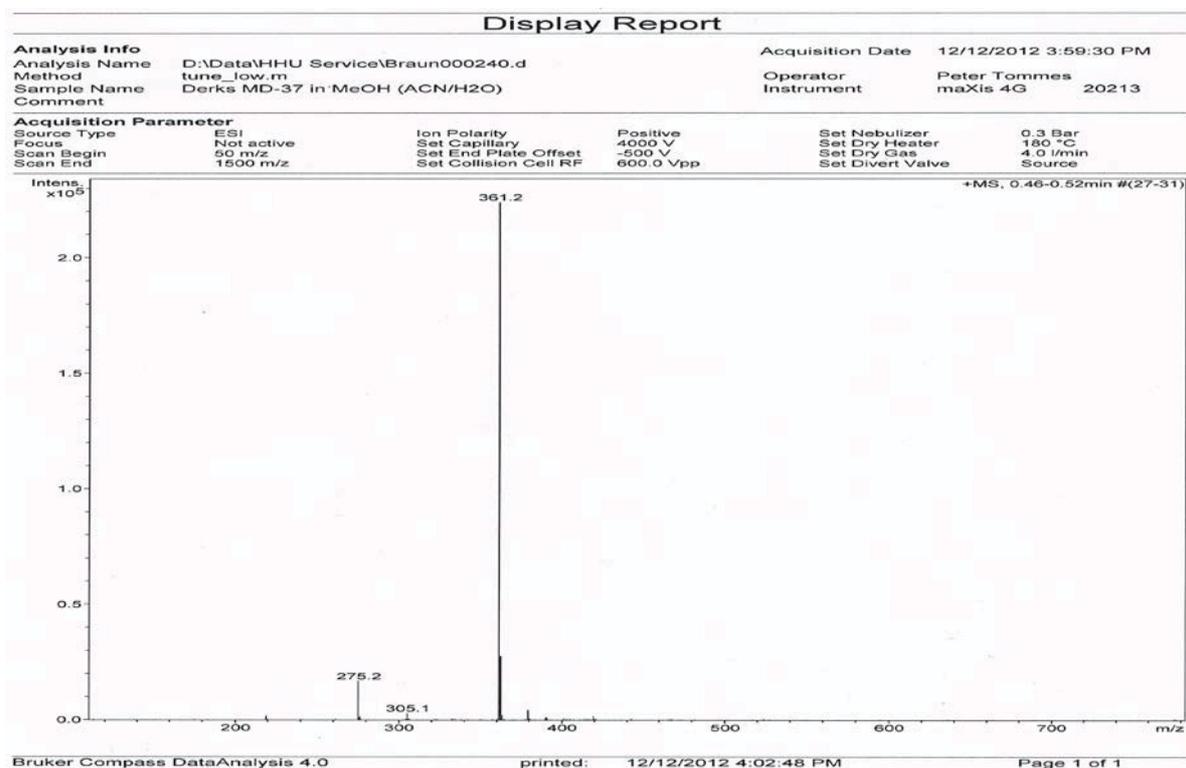


Abbildung 3.8-2: ESI-MS der beiden Regioisomere **8a** und **8b**

Das in der Abbildung 3.8-3 dargestellte NMR-Spektrum zeigt jedoch, dass keine regioselektive Synthese des linearen Isomeres **8a** gelang, sondern, wie die charakteristischen Protonensignale im Tieffeld-Bereich des Kernresonanzspektrums zeigen, wieder ein Gemisch der Verbindungen **8a** und **8b** entstanden ist.

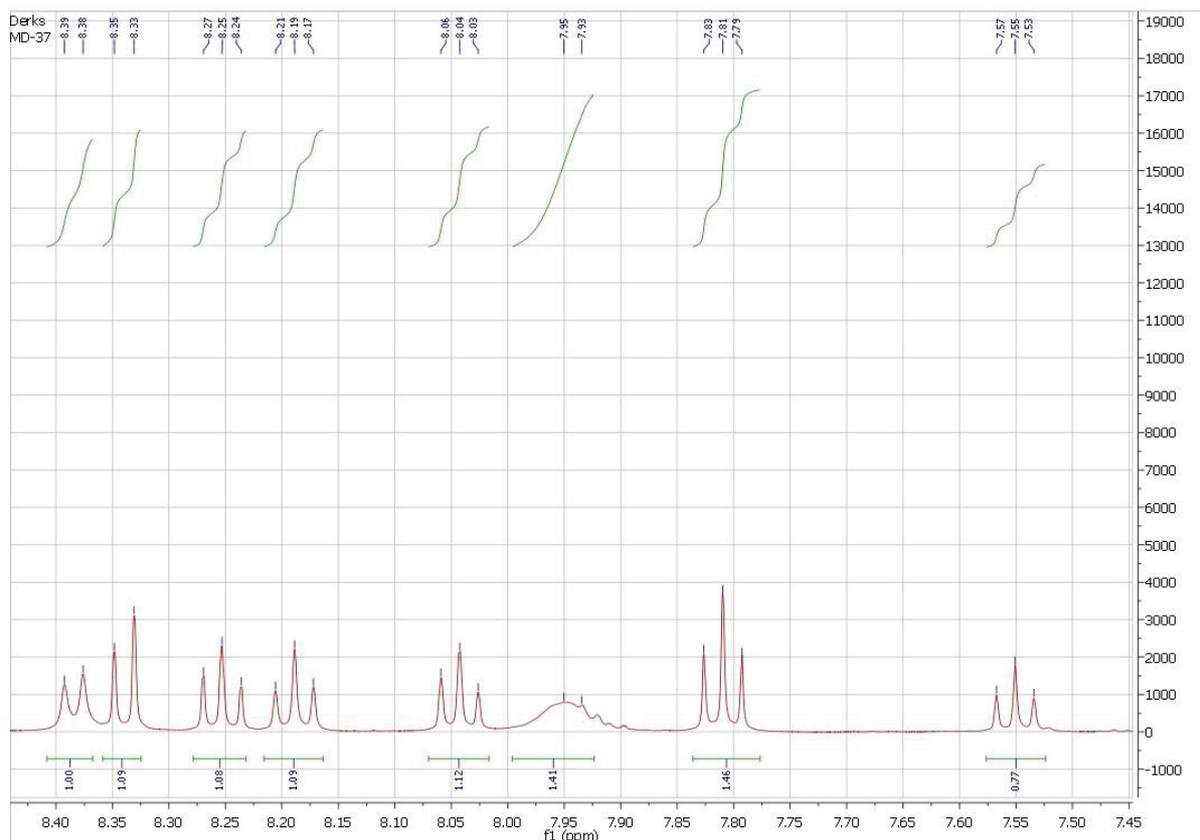


Abbildung 3.8-3: ^1H -NMR der beiden Regioisomere **8a** und **8b**

Die fünf Signale zwischen 8.0 und 8.4 ppm zeigen die Cycloheptatrienyl-Protonen des verzweigten Regioisomers **8b**, die drei Signale zwischen 7.5 und 8.0 ppm die des linearen Regioisomers **8a**. Dieses NMR-Spektrum stimmt mit dem in der Diplomarbeit^[20] abgebildeten überein.

3.8.3.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Wie unter Kapitel 3.3 bereits angesprochen wurde, sollte anhand der Variation von eingesetzter Base und dem verwendeten Lösungsmittel die unter dem Abschnitt 2.5 beschriebene Reaktion so optimiert werden, dass nach Möglichkeit ein regioselektiver Zugang zum linearen Isomer **8a** eröffnet wird. Die folgende Tabelle zeigt noch einmal die getesteten Lösungsmittel und Basen:

Hauptteil

Lösungsmittel / -gemisch
Ethanol
Methanol
n-Butanol
Wasser
Methanol/Wasser 1:1
Ethanol/Wasser 1:1
Methanol/Wasser 2:1
Ethanol/Wasser 2:1
Methanol/Wasser 1:2
Ethanol/Wasser 1:2

Base
Natriumhydroxid
Kaliumhydroxid
Kalium- <i>tert.</i> -butanolat
Tetramethylammoniumhydroxid

Tabelle 3.8-1: Getestete Lösungsmittel und Basen zur Optimierung

Bei den Optimierungsversuchen wurden nun alle möglichen Paarungen zwischen Lösungsmittel und Base getestet. Alle Reaktionslösungen wurden standardmäßig zum Rückfluss erhitzt und dabei nach einigen Stunden eine Probe zur massenspektrometrischen Untersuchung entnommen. Dabei zeichnete sich bereits ab, dass sich alle Lösungsmittelgemische mit Wasser und Wasser selbst als Lösungsmittel auf den generellen Erfolg der Reaktion nachteilig auswirkten, da die Bildung der nicht-natürlichen Aminosäure **8** nicht nachgewiesen werden konnte, unabhängig davon welche Base eingesetzt wurde. Einzig bei den getesteten Alkoholen in Kombination mit allen Basen war eine erfolgreiche Kondensation zwischen dem eingesetzten Tropolonether **4** und dem N-Boc-geschützten Arginin **10** nachweisbar. Eine regioselektive Syntheroute konnte dennoch mit keiner der hier aufgeführten Variation an Lösungsmittel oder Base realisiert werden.

Hauptteil

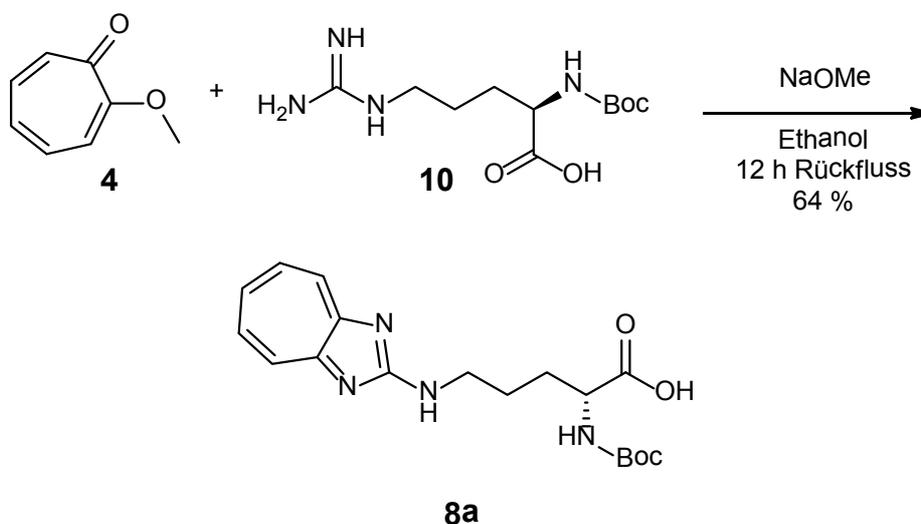
Nach der jeweiligen Aufarbeitung und NMR-spektroskopischen Untersuchung zeigen sich auch hier wieder die für ein Gemisch beider Regioisomere **8a** und **8b** charakteristischen Protonensignale, gleich denen aus Abbildung 3.8-3.

3.8.3.3 Weitere Optimierung durch den Einsatz von Natriummethanolat

Die unter Abschnitt 3.3.2 beschriebene zeitliche Untersuchung des Reaktionsverlaufes der Reaktionen zwischen dem Tropolonether **4** und der Aminosäure **10** unter Einsatz von Natriummethanolat in absoluten Ethanol zeigte, dass es vorteilhaft sein sollte, Nukleophil und Abgangsgruppe der gleichen Spezies einzusetzen. Demnach also einen Methylether des Tropolon mit Methanolat-Anionen bzw. den entsprechenden Ethylether mit Ethanolat-Anionen reagieren zu lassen, um die beobachtete Umetherung, die höchstwahrscheinlich maßgeblich für die Entstehung der beiden Regioisomere **8a** und **8b** verantwortlich ist, zu vermeiden.

3.8.3.3.1 Einsatz von Natriummethanolat und Tropolonmethylether **4** (MD-57)

Entsprechend der unter Abschnitt 3.3.2 beschriebenen Erkenntnisse, wurde die unter Kapitel 2.5 in Schema 2.5-2 beschriebene Reaktion mit Natriummethanolat statt Natriumethanolat und der nicht als Hydrochlorid vorliegenden Aminosäure **10** in absoluten Ethanol durchgeführt. Nach der erfolgten Aufarbeitung konnte das Produkt mit 64 %iger Ausbeute erhalten werden.



Schema 3.8-13: Darstellung des linearen Regioisomeren **8a**

Hauptteil

Das nachfolgende in Abbildung 3.8-4 gezeigte $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt, dass fast ausschließlich nur das Regioisomer **8a** bei der Reaktion entstanden ist. Die Abfolge und Lage der drei Signale ist nahezu identisch mit denen aus dem in Abbildung 2.5-3 gezeigten $^1\text{H-NMR}$ in diesem Bereich. In den Vorarbeiten wurden diese drei Signale als die Monomer-Spezies des linearen Isomeren **8a** diskutiert. Im weiteren Vergleich zu dem Protonenspektrum in Abbildung 2.5-3 sind in dem hier gezeigten keine weiteren auffälligen Signale, die für eine wahrnehmbare Anwesenheit einer weiteren Spezies sprechen. Somit kann der Erfolg der regioselektiven Synthese des favorisierten Regioisomeren **8a** mit diesem Vergleich der Kernresonanzspektren belegt werden.

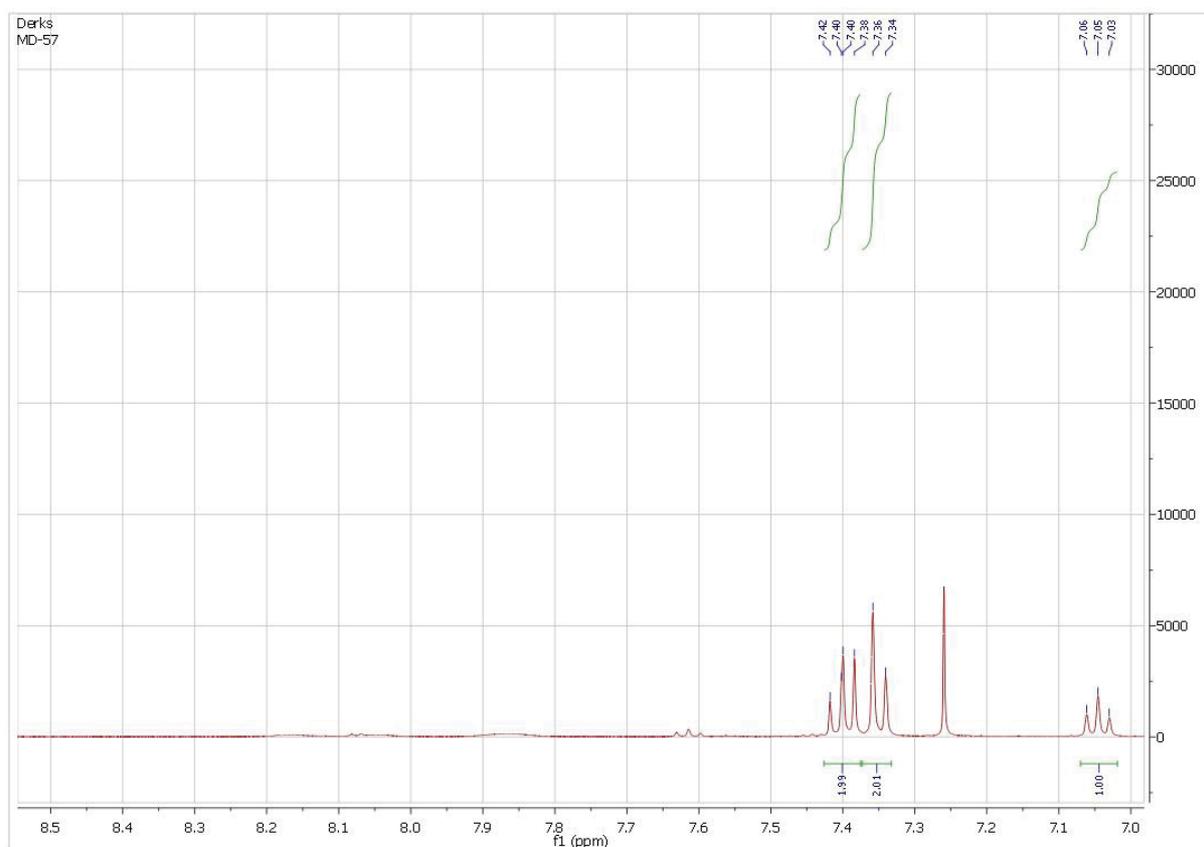


Abbildung 3.8-4: $^1\text{H-NMR}$ des linearen Regioisomeren **8a**

Des weitern zeigt das in der folgenden Abbildung 3.8-5 veranschaulichte hochaufgelöste Massenspektrum, dass die isolierte Substanz auch in hoher Reinheit gewonnen werden konnte, da das Spektrum bis auf einen Nebenpeak geringer Intensität ausschließlich einen intensiven und auch sehr gut aufgelösten Peak bei 361.18732 m/z für das, wie die Kernresonanzspektren zeigen, lineare Regioisomer **8a**.

Hauptteil

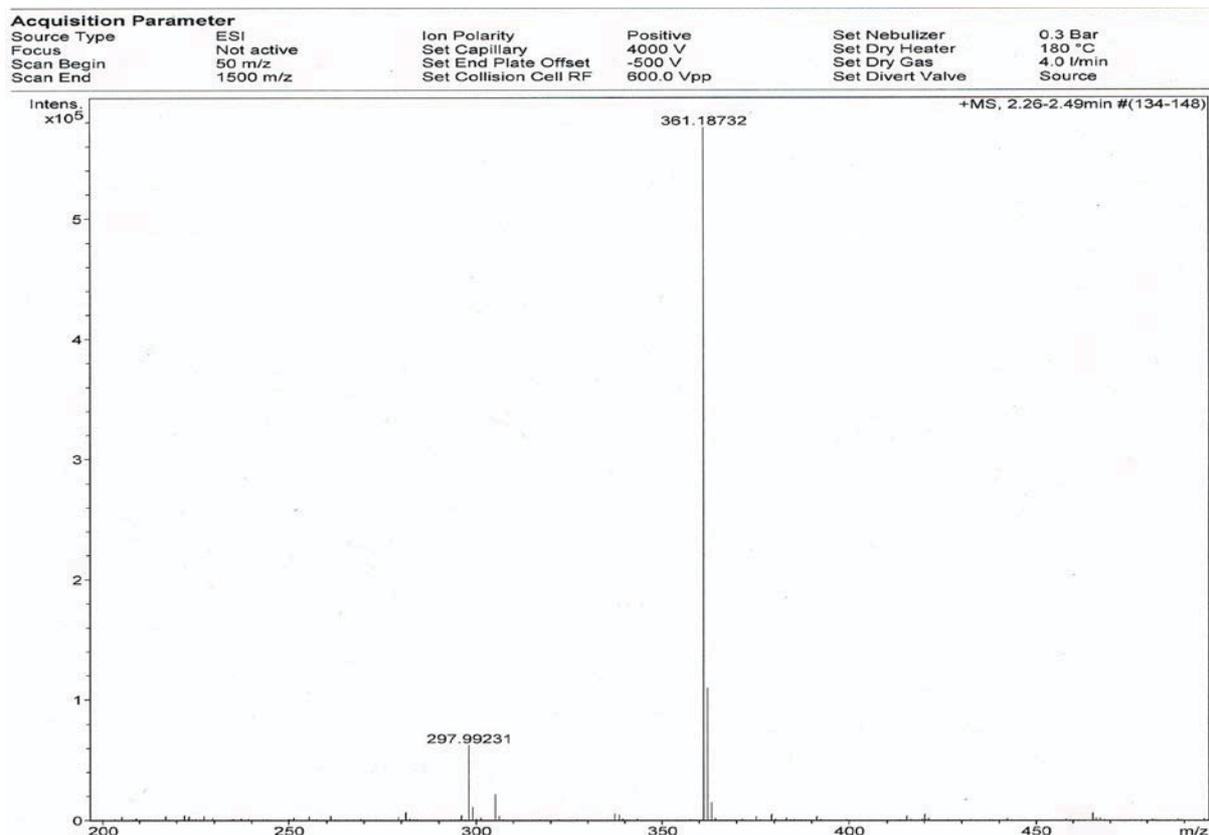
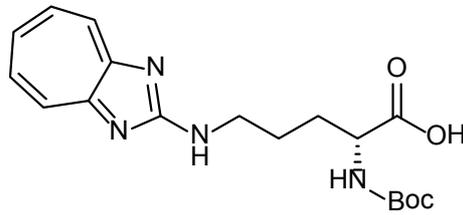
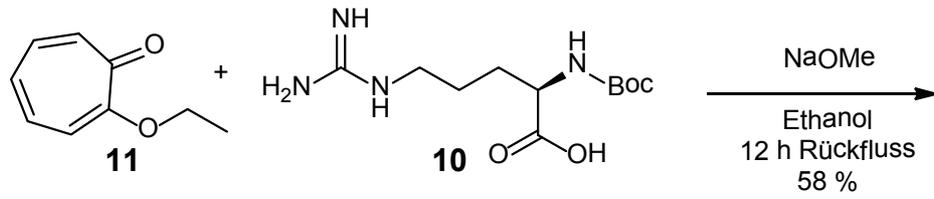


Abbildung 3.8-5: HR-MS des linearen Regioisomeren **8a**

3.8.3.3.2 Einsatz von Natriummethanolat und Tropolonethylether **11** (*MD-64*)

Analog zu der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Umsetzung führte auch eine Kondensation der Aminosäure **10** mit Tropolonethylether **11** selektiv mit einer Ausbeute von 58 % zum gewünschten Regioisomer **8a**. Auch hier zeigt das in Abbildung 3.8-6 abgebildete ¹H-NMR-Spektrum die gleichen Signale wie das in Abbildung 3.8-4 dargestellte, wenn auch die Auflösung nicht so gut ist, wie die des Spektrums im vorherigen Abschnitt.

Hauptteil



8a

Schema 3.8-14: Umsetzung von Tropolonethylether **11** mit der Aminosäure **10**

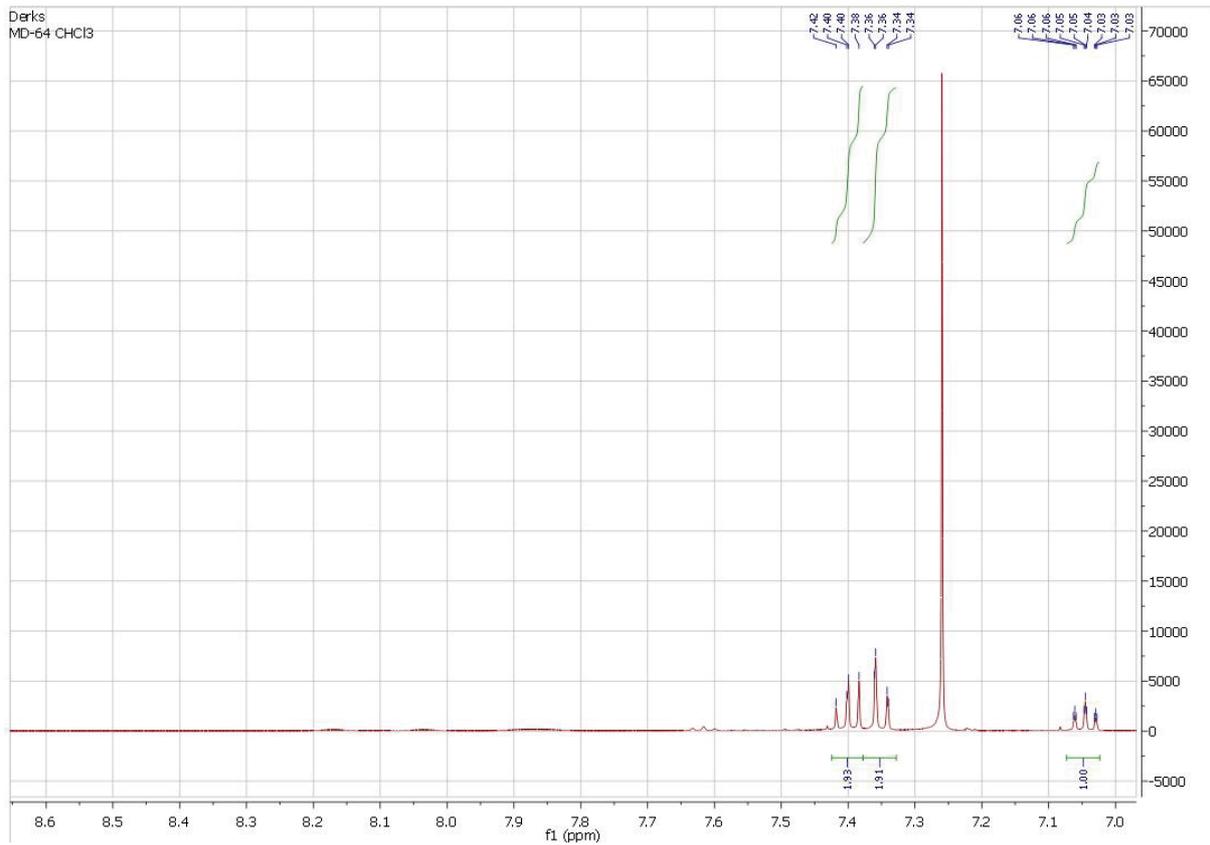


Abbildung 3.8-6: ¹H-NMR des linearen Regioisomeren **8a**

3.8.3.3 Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren vor der Aufarbeitung

Die in den vorherigen Abbildungen 3.8-4 und 3.8-6 veranschaulichten $^1\text{H-NMR}$ -Spektren wurden jeweils nach der erfolgten Aufarbeitung der entsprechenden Reaktionslösungen aufgenommen. Ein zusätzlicher Vergleich der „Roh-Spektren“, die vor der Aufarbeitung aufgenommen wurden, sollen zweifelsfrei belegen, dass es nicht zu einer Bildung des asymmetrischen Regioisomers **8b**, welches, wie die Abbildung 2.5-3 zeigt, fünf charakteristische Signale zwischen 8.1 und 8.6 ppm mit einer Integration von jeweils einem Wasserstoffatom für den Cycloheptatrienyl-Bereich aufweist, kam. Die in Abbildung 3.8-7 vom Ansatz *MD-57*, sowie das des Ansatzes *MD-64* sind sowohl von der Signalabfolge, der jeweiligen Multiplizitäten dieser, als auch deren Integrationen nahezu identisch und weisen keinerlei Signale im Bereich zwischen 8.1 und 8.6 ppm auf, die für eine Anwesenheit des asymmetrischen Isomers **8a** sprechen würden. Einzig die in Kapitel 2.5 beschriebene und ebenfalls in der Abbildung 2.5-3 ersichtliche Dimerenbildung des symmetrischen Regioisomers **8a** ist in den hier aufgeführten Spektren auch erkennbar.

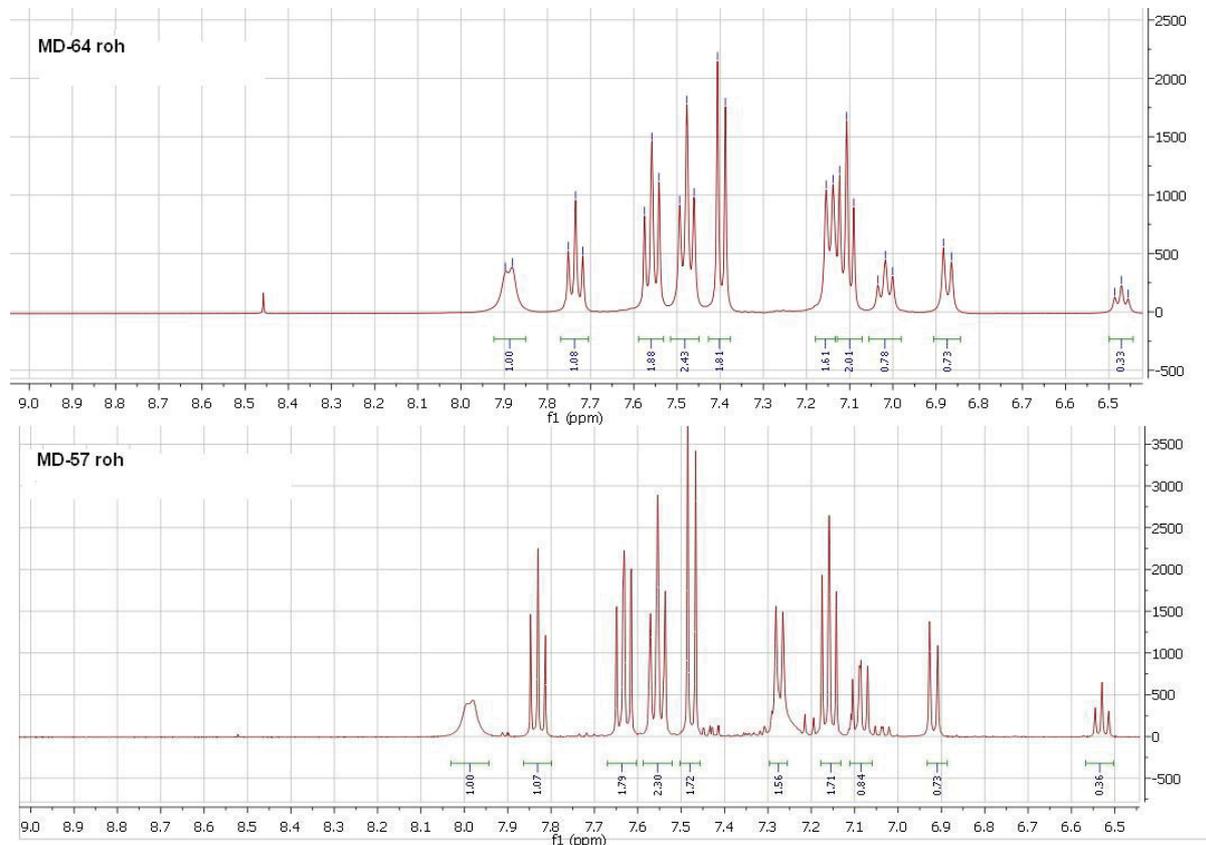
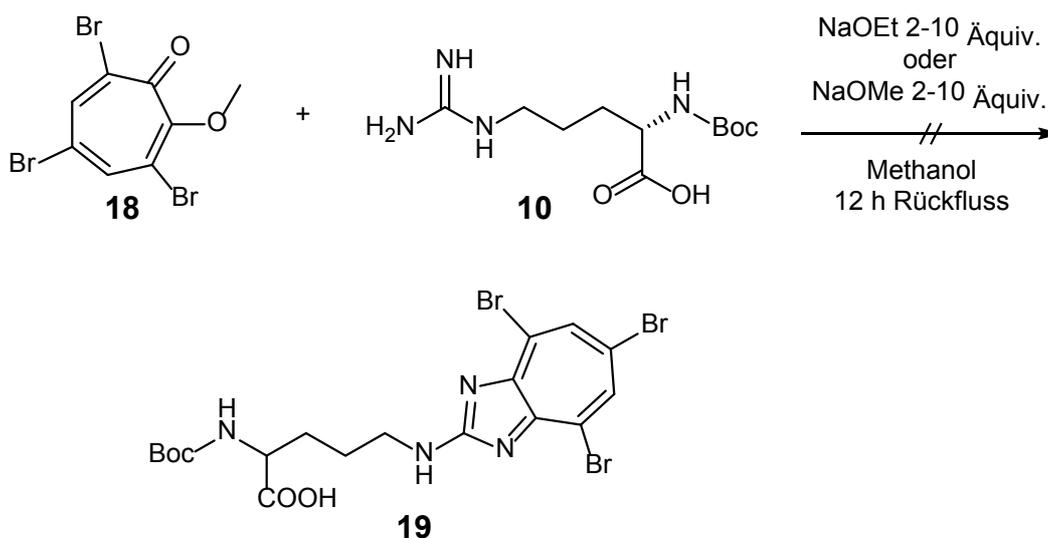


Abbildung 3.8-7: Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von *MD-57* und *MD-64*

Ebenfalls sind Signale geringerer Intensität des jeweiligen Tropolonether ersichtlich, da dieser erst bei der Aufarbeitung mit Chloroform extraktiv entfernt werden würde.

3.8.3.4 Ausgehend von 3,5,7-Tribromtropolonmethylether (**18**)

In dem Kapitel 3.4.2 wurde bereits das Synthesekonzept ausgehend von dem Tribromtropolonether **18** angesprochen. Hier wurde nun der Versuch einer direkten Kondensation des Ethers **18** mit der Boc-geschützten Aminosäure **10** unter den bekannten Bedingungen unternommen. Doch weder der Einsatz von Natriumethanolat noch Natriummethanolat zeigte einen positiven Reaktionsverlauf. Auch eine Erhöhung der Basenkonzentration auf bis zu 10 Äquivalente konnte den Zugang zu der angestrebten Aminosäure **19** nicht eröffnen.



Schema 3.8-15: Umsetzung des Tribromtropolonether **18** mit der Aminosäure **10**

Aus dem in Abbildung 3.8-8 gezeigten ESI-Spektrum wird ersichtlich, dass eine erfolgreiche Umsetzung hin zu der nicht-natürlichen Aminosäure **19** nicht erfolgte. Vielmehr lässt sich fast ausschließlich die als Edukt eingesetzte N-Boc-geschützte Aminosäure **10** nachweisen.

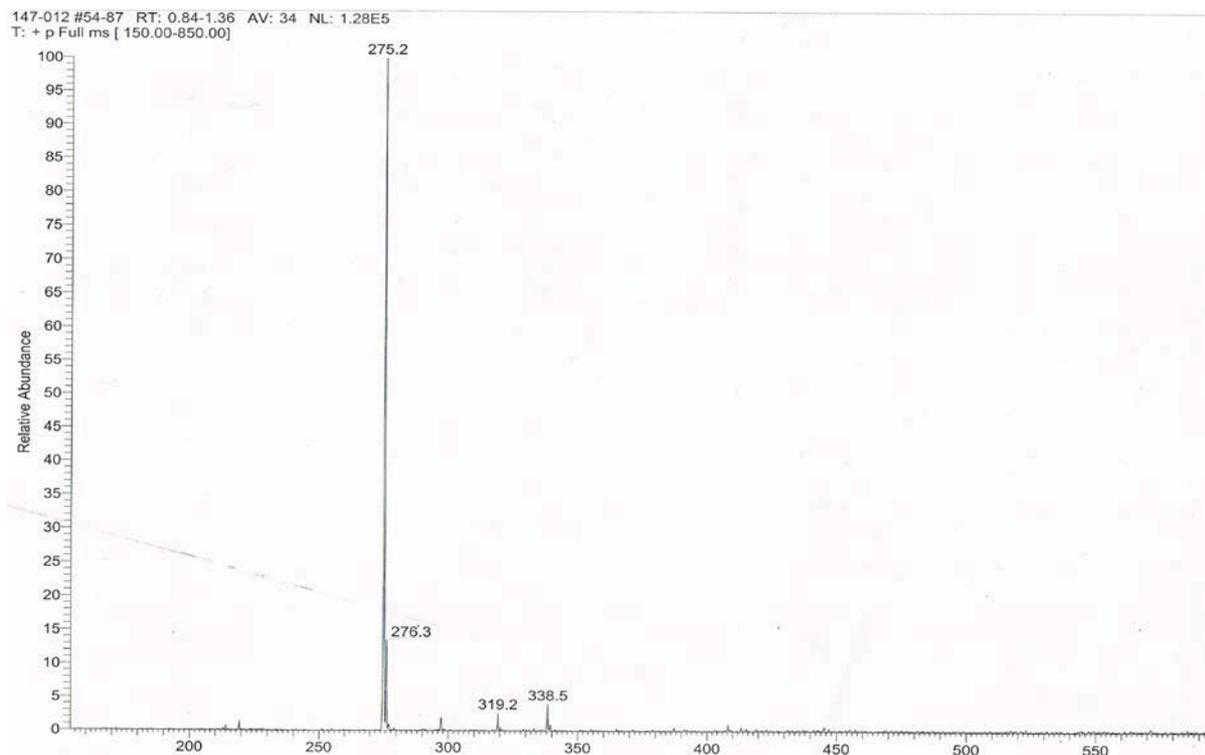
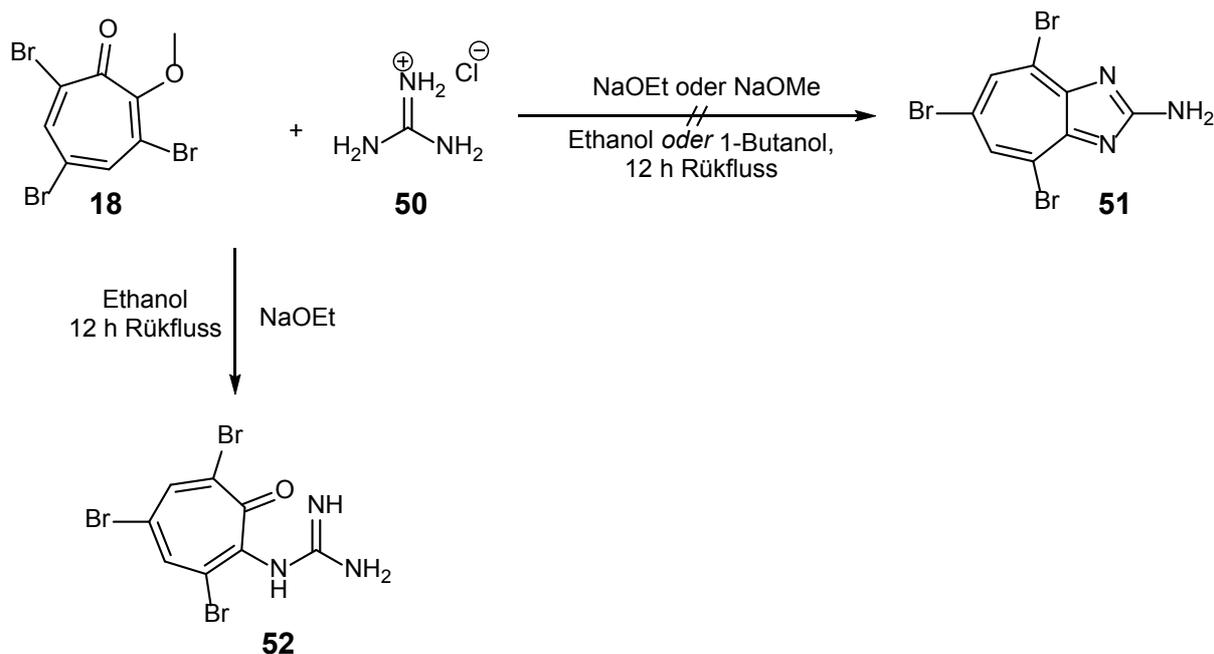


Abbildung 3.8-8: ESI-MS der Umsetzung des Tribromtropolonether **18** mit der Aminosäure **10**

3.8.3.4.1 Umsetzung mit Guanidinhydrochlorid

Da der unter Abschnitt 3.8.3.4 gezeigte Syntheseversuch nicht erfolgreich verlief, wurde der Tribromtropolonether **18** in Anlehnung an das von *Nozoe et al.* ^[16] beschriebene Amino-Diaza-Azulen **5**, mit Guanidinhydrochlorid **52** in Anwesenheit von Natriumethanolat in absolutem Ethanol umgesetzt. Hier galt es zu testen, ob eine Kondensation der beiden Edukte prinzipiell möglich ist. Aber auch dabei zeigten massenspektrometrische Untersuchungen, dass eine Kondensation zu einem Tribrom-Amino-Diaza-Azulen **51** nicht erfolgreich verlief, vielmehr konnte nur ein Tribrom-oxocycloheptatrien-guanidin **52** über ein hochaufgelöstes Massenspektrum nachgewiesen werden. Auch die Umsetzung in n-Butanol, als ein höher siedeneres Lösungsmittel und die Verwendung von Natriummethanolat als Base, brachte keinen Erfolg. Diese Tatsache lässt den Schluss zu, dass die beiden Bromsubstituenten in der 3- und 7- Position sterisch zu anspruchsvoll für die Ausbildung des 5-Ring-Heterocyclus sind, oder die drei Bromsubstituenten insgesamt eine zu hohe desaktivierende Wirkung auf das Oxocycloheptatrien-System ausüben, das eine weitere Kondensation nicht begünstigt.

Hauptteil



Schema 3.8-16: Umsetzung des Tribromtropolonether **18** mit Guanidinhydrochlorid **50**

Die folgende Abbildung 3.8-9 zeigt das hochaufgelöste Massenspektrum der Verbindung **52**. Dieses zeigt wieder das für alle Bromverbindungen charakteristische Isotopenmuster. Zum einen bei 397.81300 m/z [C₈H₇Br₃N₃O] für das Tribromoxocycloheptatrien-guanidin **52** und zum anderen bei 399.81102 für die Verbindung des entsprechenden Bromisotops.

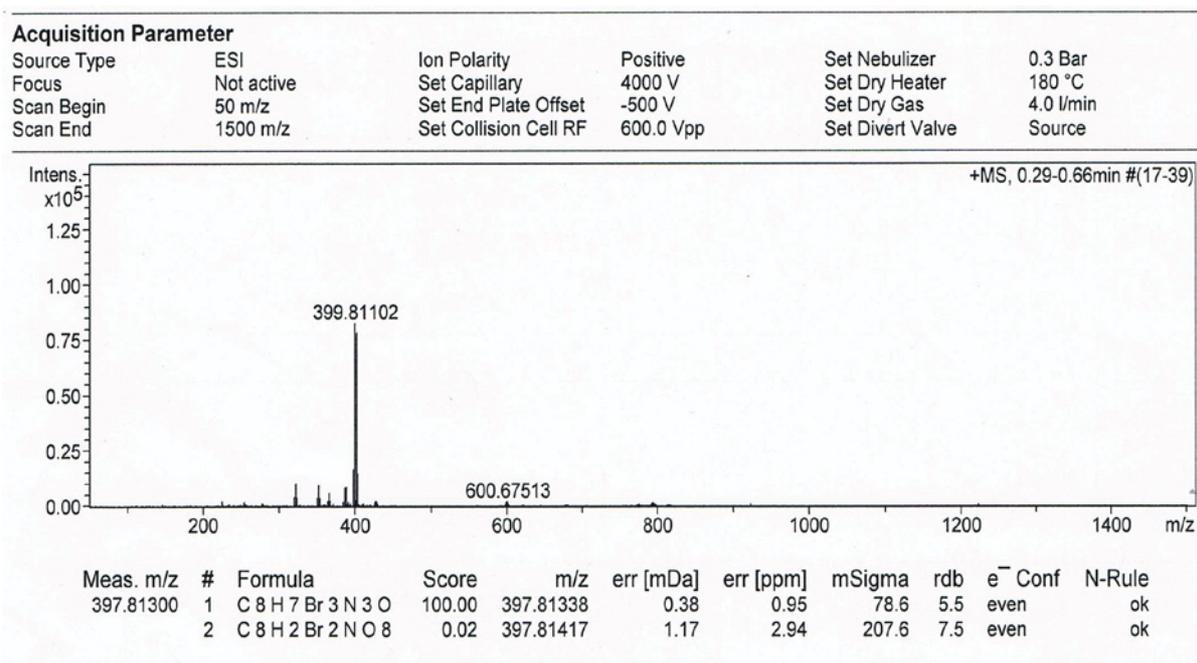
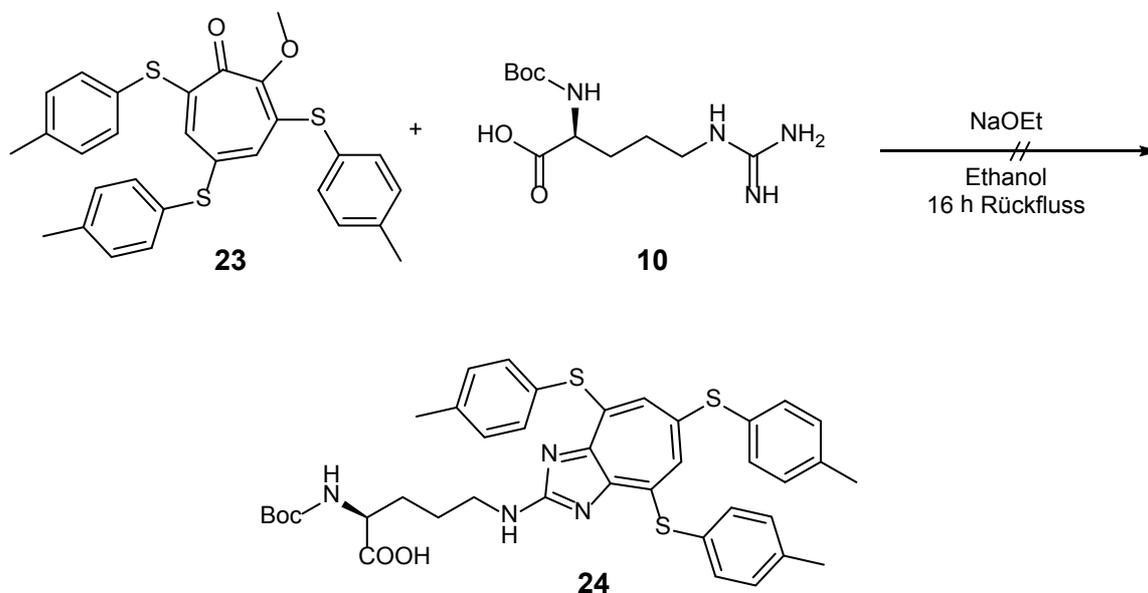


Abbildung 3.8-9: HR-MS des Guanidinderivats **52**

3.8.3.5 Ausgehend von 3,5,7-tri-*p*-Tolylthiotropolonmethylether (23)

Der unter Abschnitt 3.8.2.4 beschriebene Tropolonmethylether **23** wurde mit der Boc-geschützten Aminosäure **10** in Anwesenheit von 10 Äquivalenten Natriumethanolat zum Rückfluss erhitzt. ESI-massenspektrometrische Untersuchungen zeigten jedoch, wie auch schon bei dem Versuch des bromierten Tropolonethers **18**, dass keine erfolgreiche Kondensation zwischen dem Ether **23** und der Aminosäure **10** stattfand, da diese beiden Edukte unverändert nachgewiesen werden konnten. Eine nachträgliche Erhöhung der Basenkonzentration auf 20 Äquivalente brachte ebenso wenig einen Erfolg, wie der Einsatz der potenteren Base Natriummethanolat in einem erneuten Experiment.



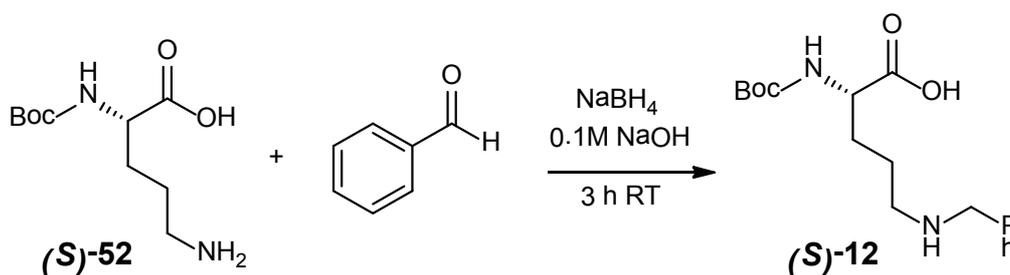
Schema 3.8-17: Umsetzung des Tropolonether **23** mit der Aminosäure **10**

Dieses Ergebnis zeigt zusammen mit dem analog in Abschnitt 3.8.3.4 beschriebenen, dass die vorgestellten Substituenten wohl vorrangig in der 3- und 7-Position des Tropolonrings eine erfolgreiche Kondensation mit der Guanidineinheit der Aminosäure **10** verhindern, da sie möglicherweise sterisch zu anspruchsvoll sind. Oder aber, dass die jeweiligen Substituenten in den Positionen 3, 5 und 7 einerseits aufgrund einer sehr hohen desaktivierenden Wirkung bei dem dreifach bromierten Ether **18** oder andererseits einem, durch die drei Schwefelatome verursachenden, zu intensiven positiven Mesomerieeffektes des oben beschriebenen Ethers **23**, eine Reaktionen nicht begünstigen.

3.8.4 Regioselektive Darstellung der nicht-natürlichen Aminosäure **8a** ausgehend von Boc-Ornithin

3.8.4.1 Darstellung von N^α-tert.-butoxycarbonyl-N^ω-benzylornithin (**S**)-**12**

Nach einer Synthesevorschrift von *Andruszkiewicz*^[39] erfolgte die Darstellung des N^ω-benzyl-geschützten Boc-Ornithin durch die Umsetzung von kommerziell erhältlichem Boc-Ornithin **52** und frisch destillierten Benzaldehyd bei Raumtemperatur unter Anwesenheit von Natriumborhydrid in wässriger Natronlauge. Nach der Aufarbeitung erhielt man das Produkt in 38%iger Ausbeute.



Schema 3.8-18: Darstellung von N^ω-benzyl-geschützten Boc-Ornithin

Die folgende Abbildung 3.8-10 zeigt das hochaufgelöste Massenspektrum der Verbindung (**S**)-**12**.

Hauptteil

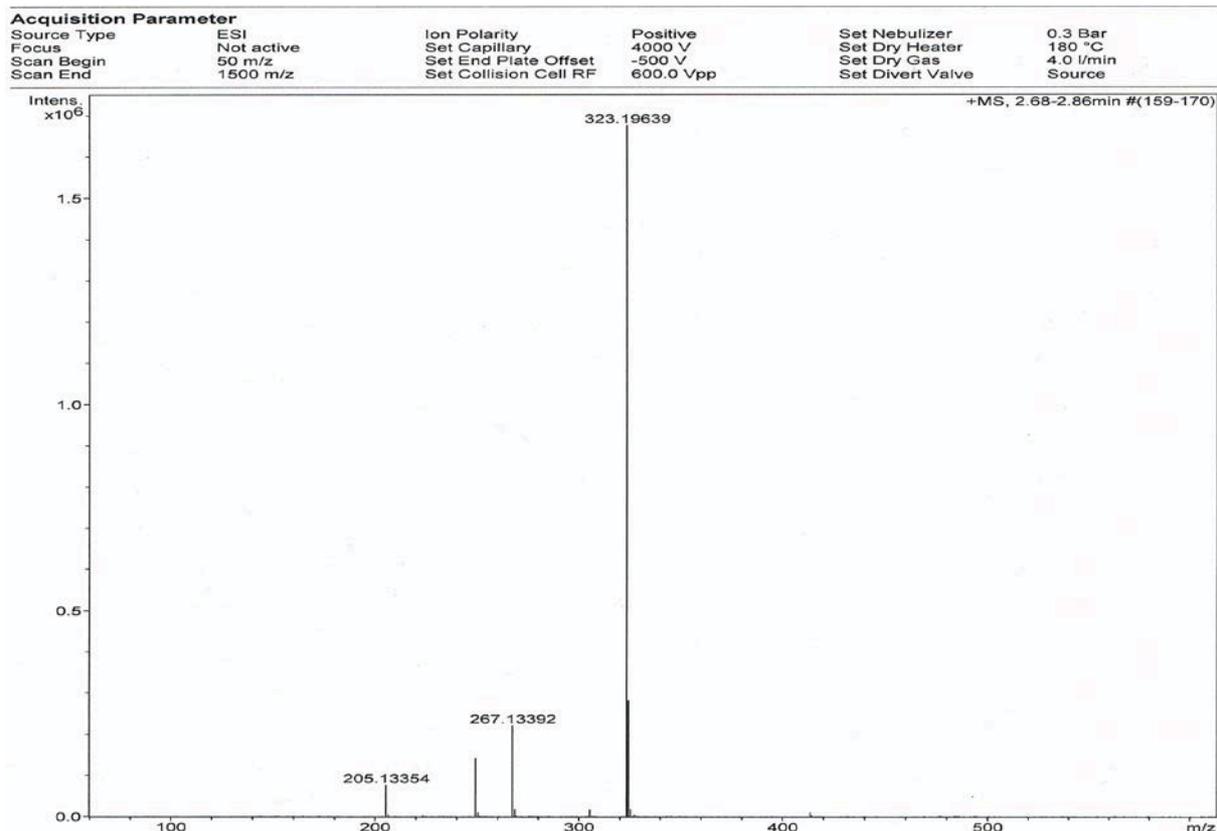


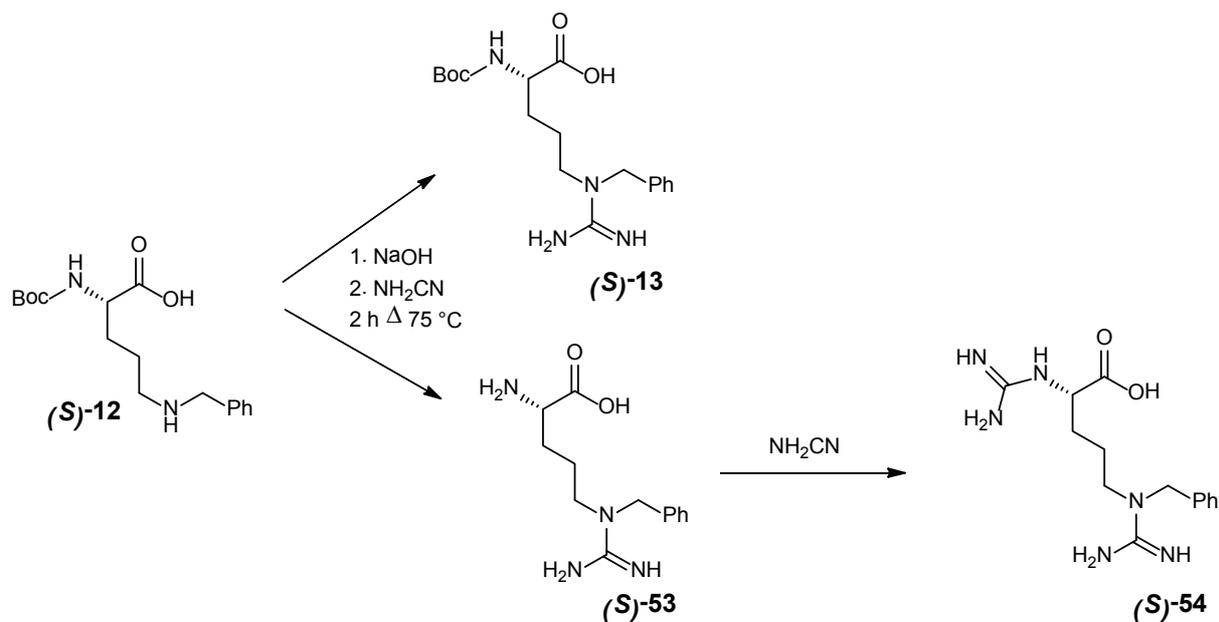
Abbildung 3.8-10: HR-MS der Aminosäure (S)-12

3.8.4.2 Darstellung von N^α-tert.-butoxycarbonyl-N⁰-benzylarginin (S)-13

3.8.4.2.1 Unter Verwendung von Cyanamid

Die Guadinisierung der Verbindung (S)-12 sollte nach einer Patentvorschrift von *Thalhammer* und *Gastner*^[40] erfolgen, wonach die handelsübliche 50 gew-%ige Cyanamid-Lösung in Methanol im Überschuss in wässriger Natronlauge zusammen mit dem Ornithinderivat (S)-12 erhitzt wurde. Massenspektrometrische Untersuchungen haben allerdings gezeigt, dass neben dem gewünschte Produkt (S)-13 [365.2 m/z]⁺ auch dessen Boc-entschützte Spezies (S)-53 [265.2 m/z]⁺ entstanden ist und es in Folge dessen auch zu einer weiteren Guadinisierung (→ (S)-54) am α-Stickstoffatom der Aminosäure (S)-53 [308.2 m/z]⁺ kam. Des Weiteren ließ sich auch noch die Edukt-Aminosäure (S)-12 [323.2 m/z]⁺ nachweisen.

Hauptteil



Schema 3.8-19: Reaktionsverlauf bei Verwendung von Cyanamid

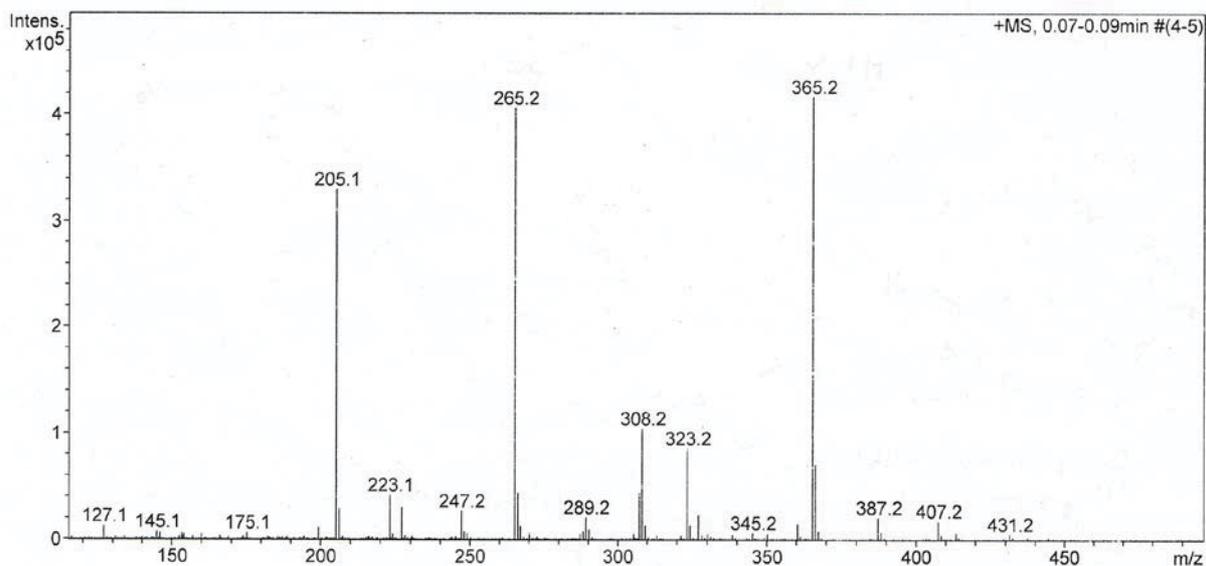


Abbildung 3.8-11: ESI-MS der Reaktionsmischung bei Verwendung von Cyanamid

Weitere Versuche, bei denen die Konzentration der eingesetzten Cyanamid-Lösung oder der Natronlauge variiert wurde, blieben ebenfalls erfolglos. Wird schließlich nur ein Äquivalent Cyanamid eingesetzt, ist keine Umsetzung zu beobachten, da nur die Edukt-Aminosäure (S)-12 nachweisbar war (→ Abbildung 3.8-12).

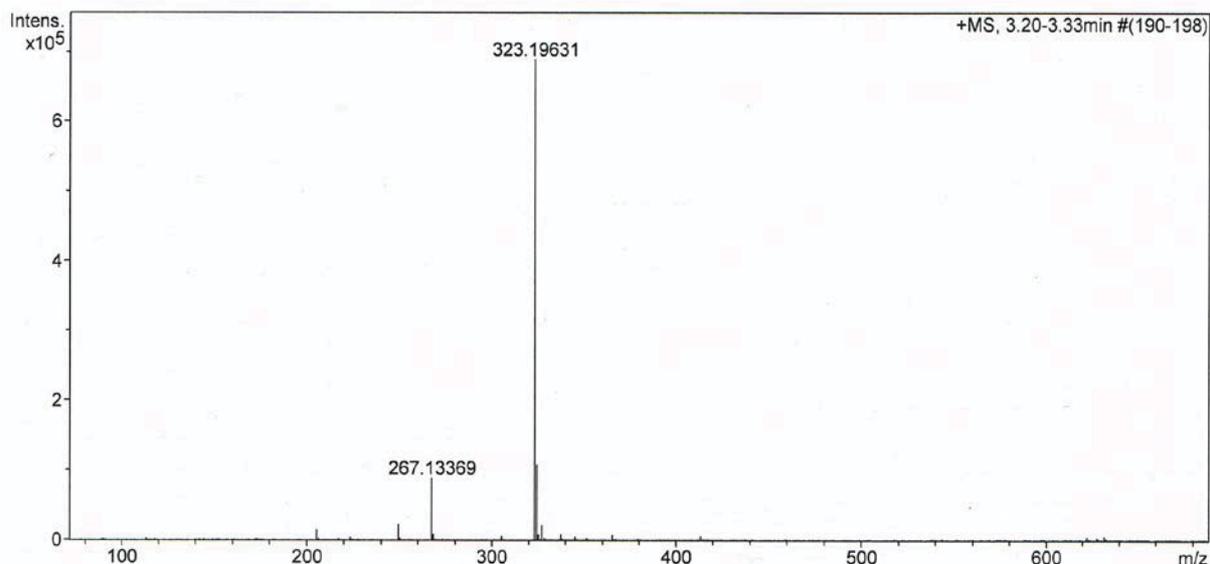
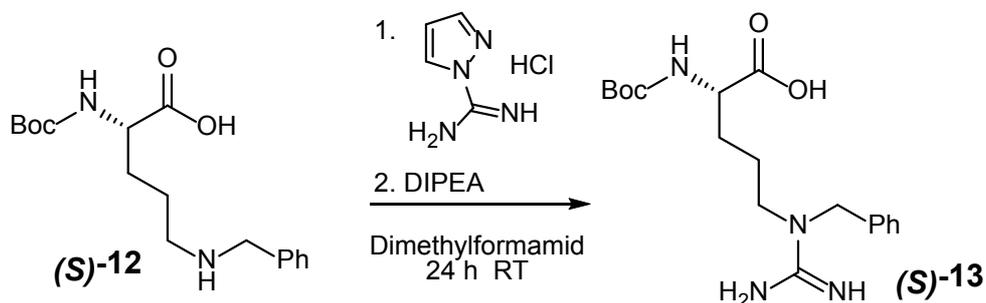


Abbildung 3.8-12: HR-MS bei Verwendung von 1 Äquiv. Cyanamid

3.8.4.2.2 Unter Verwendung von 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidhydrochlorid (MD-25)

Die Guanidin-Einheit mit Hilfe von Cyanamid-Lösung aufzubauen erschien anfangs nahe zu liegen, jedoch reagiert die als Handelsform blau eingefärbte 50%-ige wässrige Lösung von Cyanamid anscheinend zu sauer. Daher wurde nach einem Protokoll von *Orjales et al.*^[41] das Carboxamid-Reagenz unter Zusatz eines hohen Überschusses an DIPEA verwendet, um die Reaktion im stark alkalischen Milieu durchführen zu können und so die Boc-Entschützung zu vermeiden.



Schema 3.8-20: Guanidinisierung mit Pyrazol-carboxamidhydrochlorid

Hauptteil

Die folgende Abbildung 3.8-13 zeigt das ESI-Massenspektrum der erfolgreich aufgebauten Guanidin-Einheit am ω -Stickstoffatom der Aminosäure **(S)-12**. Bei dieser Umsetzung konnte eine Ausbeute von 76 % erzielt werden.

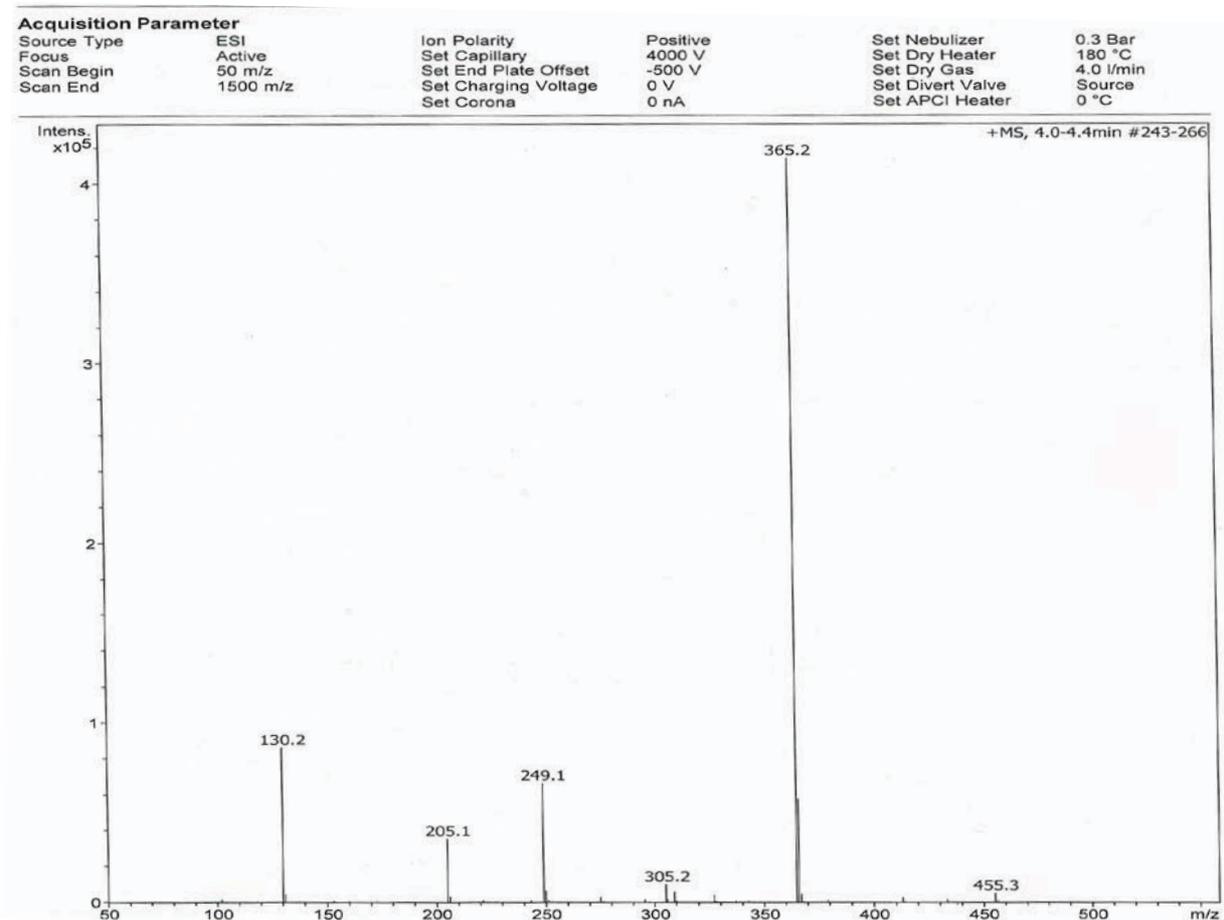
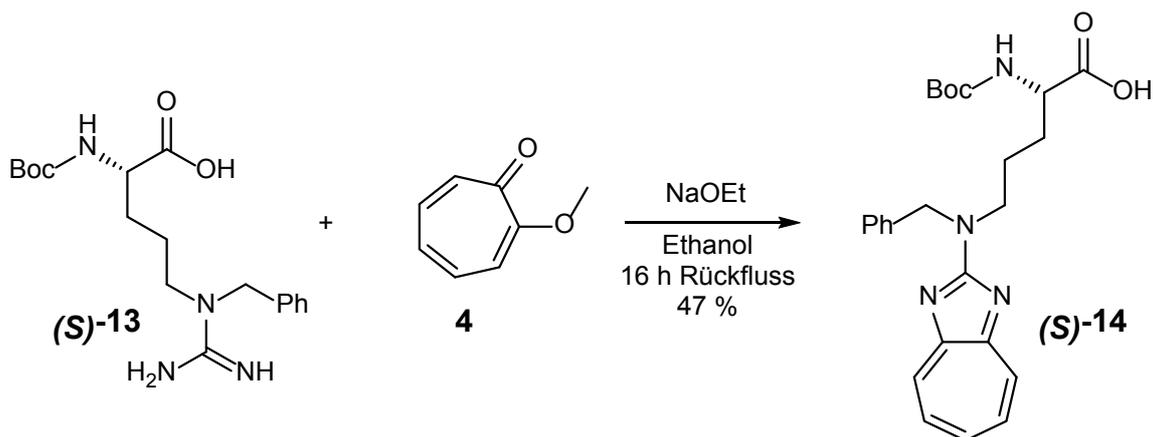


Abbildung 3.8-13: ESI-MS der Aminosäure **(S)-53**

3.8.4.3 Darstellung der nicht-natürlichen Aminosäure **(S)-14**

Ausgehend von der im vorherigen Abschnitt 3.8.4.2.2 beschriebenen Aminosäure **(S)-13**, wurde diese mit dem Tropolonether **4** und Natriumethanolat in abs. Ethanol zum Rückfluss erhitzt. Also unter den Bedingungen, die im Kapitel 2.5 beschrieben wurden und zu einem Regioisomerengemisch der Aminosäuren **8a** und **8b** führten. Die Ausbeute bei diesem Versuch betrug 47 %.

Hauptteil



Schema 3.8-21: Regioselektive Synthese der Aminosäure (S)-14

Die folgende Abbildung 3.8-14 zeigt ein hochaufgelöstes Massenspektrum der modifizierten Aminosäure (S)-14 und damit die erfolgreiche Kondensation der eingesetzten Edukte 4 und (S)-13.

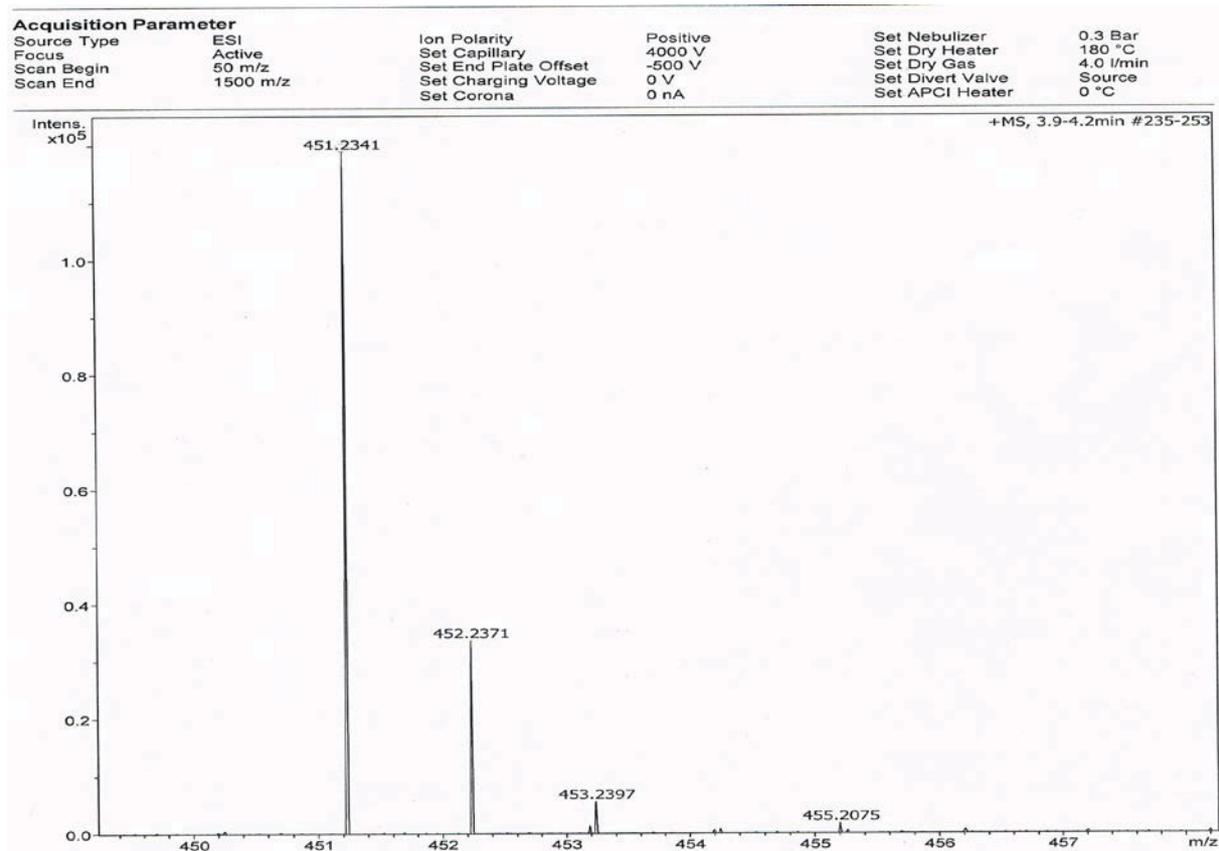


Abbildung 3.8-14: HR-MS der Aminosäure (S)-14

Hauptteil

Das in der Abbildung 3.8-15 dargestellte $^1\text{H-NMR}$ der Aminosäure (**S**)-**14** belegt aufgrund der drei charakteristischen Signale (ein Dublett und ein Triplet mit einer Integration von jeweils zwei, sowie ein Triplet mit einer Integration von eins) ausschließlich die Bildung des symmetrischen Regioisomeren (**S**)-**14** und damit den Erfolg dieser Synthesestrategie einer regioselektiven Synthese, insbesondere unter des Einsatzes von Natriummethanolat als Base.

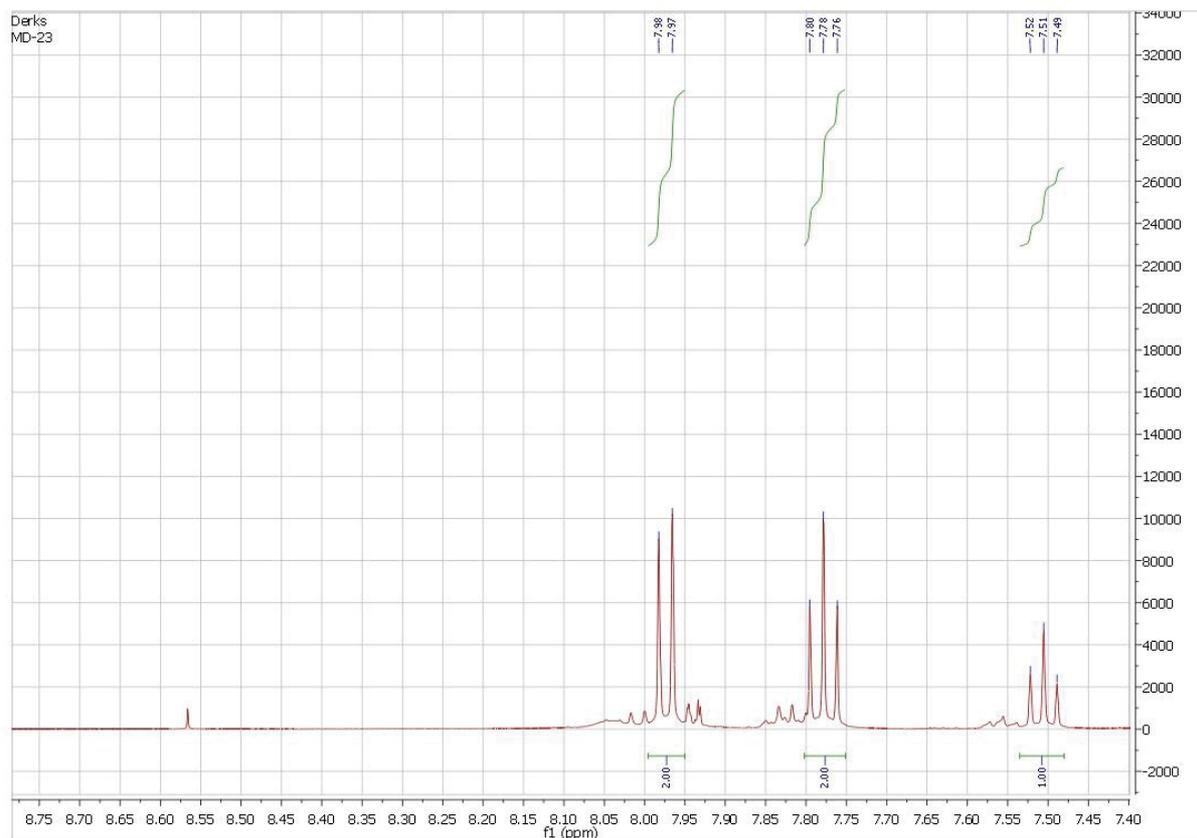
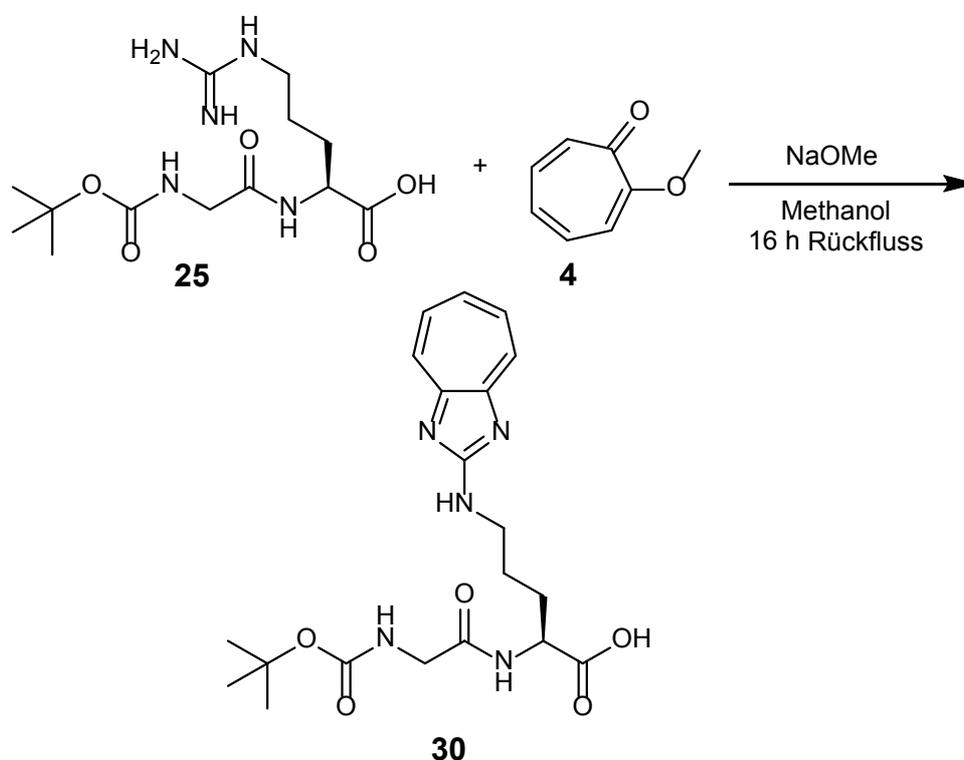


Abbildung 3.8-15: $^1\text{H-NMR}$ der Aminosäure (**S**)-**14**

3.8.5 Markierung ausgesuchter Peptide

3.8.5.1 Arginin-Markierung im Dipeptid Boc-Gly-Arg-OH (25)

Das kommerziell erhältliche Dipeptid Boc-Gly-Arg-OH **25** wurde unter den nun etablierten, zur Regioselektivität führenden Bedingungen mit dem Tropolonether **4** und einem Überschuss Natriummethanolat in abs. Methanol für 16 h zum Rückfluss erhitzt. Das Peptid **30** konnte säulenchromatographisch aufgereinigt und so in 42 %iger Ausbeute erhalten werden.



Schema 3.8-22: Regioselektive Arginin-Markierung in einem Dipeptid

Den Erfolg der Markierung zeigt das in Abbildung 3.8-16 dargestellte hochaufgelöste Massenspektrum, das allerdings auch noch einige Verunreinigungen zeigt. Dass diese teilweise über die erfolgte säulenchromatographische Reinigung entfernt werden konnten, zeigt das in Abbildung 3.8-17 aufgeführte ESI-Massenspektrum der ersten Fraktion, bei dem jedoch immer noch geringe Eduktspuren detektiert werden konnten.

Hauptteil

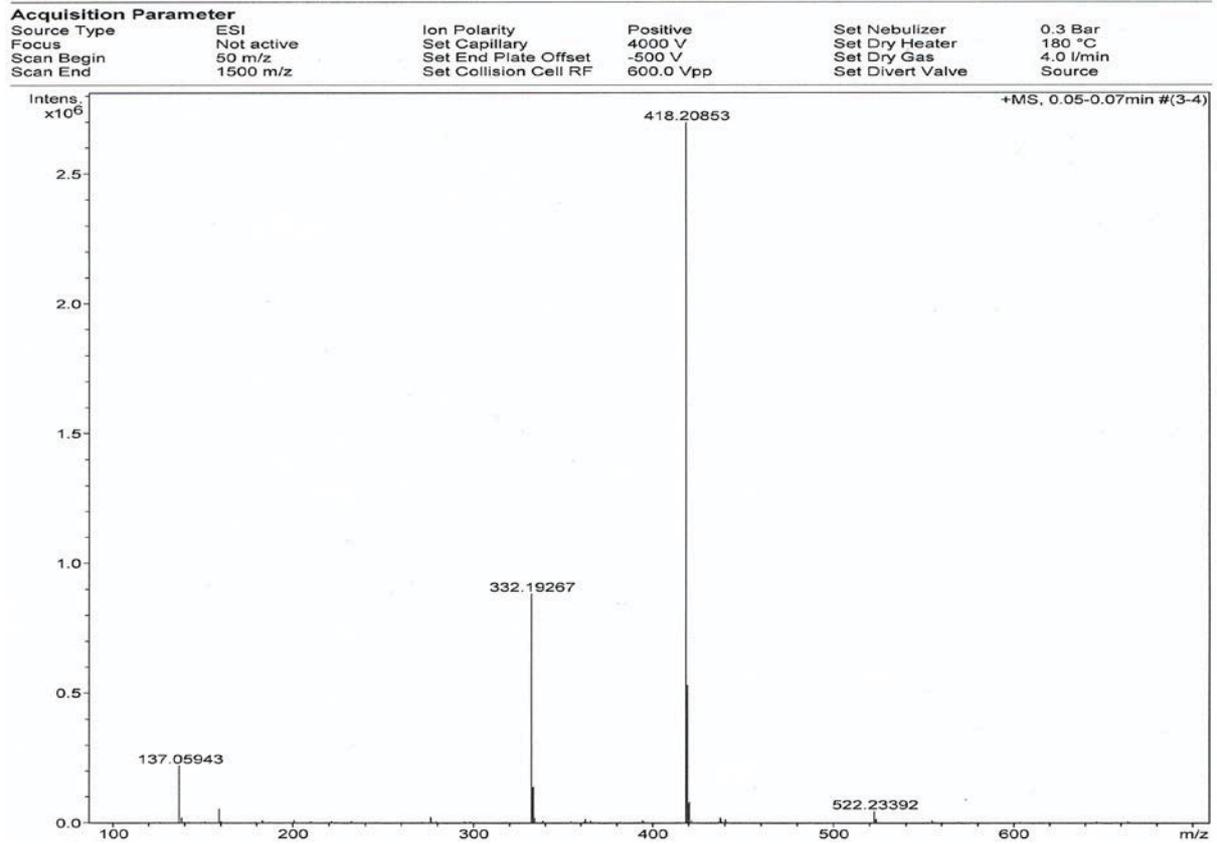


Abbildung 3.8-16: HR-MS des Dipeptids 30

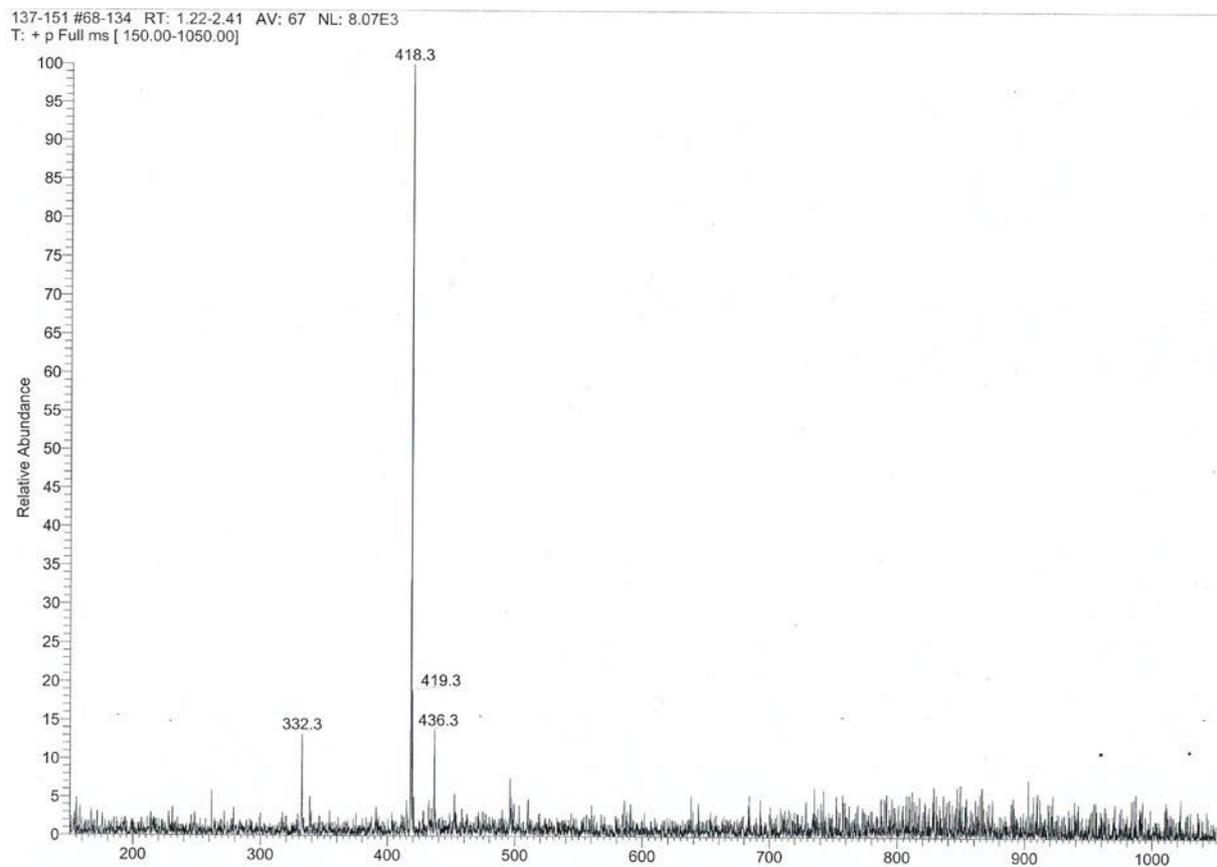


Abbildung 3.8-17: ESI-MS des Dipeptids 30 nach säulenchromatographischer Reinigung

Hauptteil

Den Nachweis für einen erfolgreichen regioselektiven Aufbau der Amino-Diaza-Azulen-Einheit in dem Dipeptid kann schließlich das in Abbildung 3.8-18 veranschaulichte $^1\text{H-NMR}$ des Dipeptids **30** erbringen, da hier wieder die, für die symmetrische Amino-Diaza-Azulen-Struktureinheit, charakteristischen Signale zu finden sind.

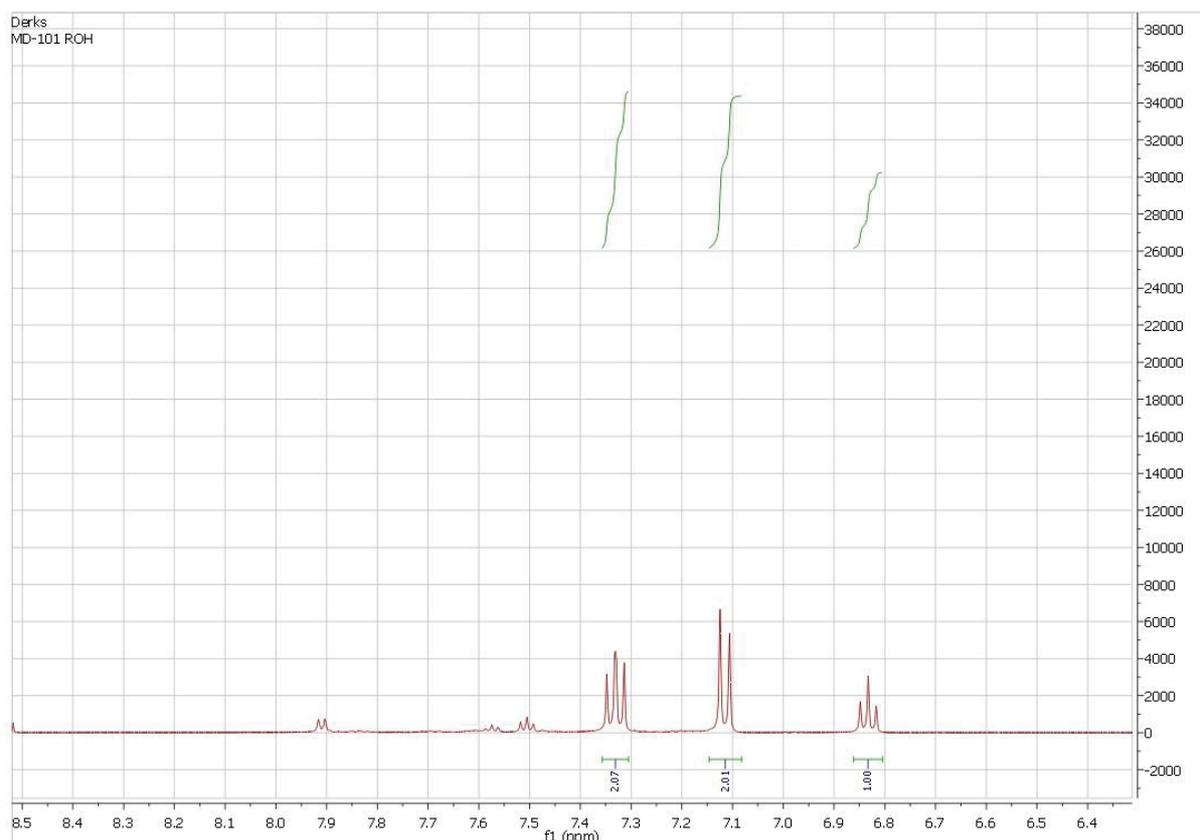
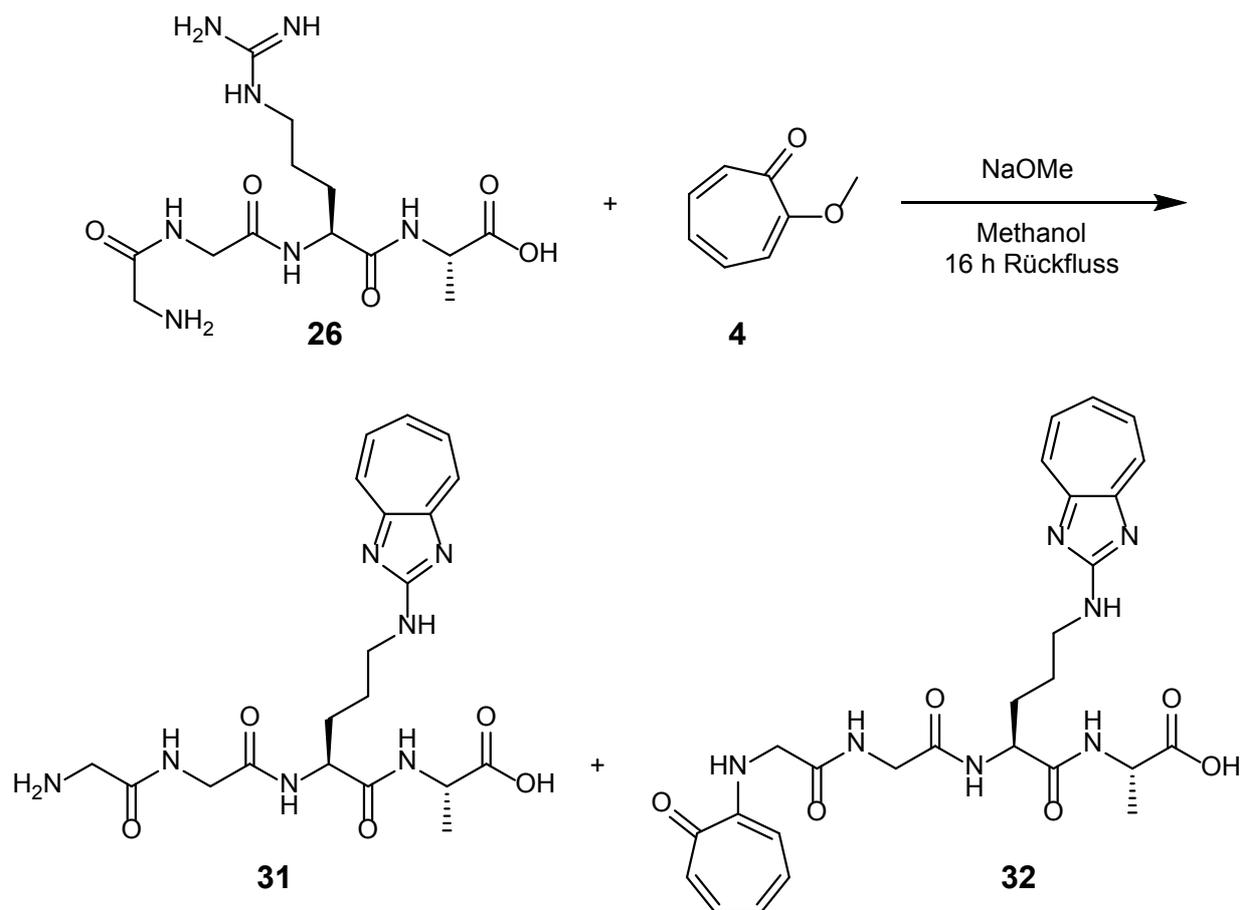


Abbildung 3.8-18: $^1\text{H-NMR}$ des Dipeptids **30**

3.8.5.2 Arginin-Markierung im Tetrapeptid H-Gly-Gly-Arg-Ala-OH (**26**)

Als zweites Peptid, das Arginin enthält, wurde das ebenfalls kommerziell erhältliche Tetrapeptid H-Gly-Gly-Arg-Ala-OH **26** eingesetzt. Dieses wird bewusst N-Boc-ungeschützt eingesetzt, um zu testen, ob eine Arginin-Markierung durch den eingesetzten Tropoloneher überhaupt möglich ist und wenn, ob diese Markierung selektiv (**31**) oder nur in Verbindung mit einer weiteren Kondensation des Ethers an der terminalen Aminogruppe des Tetrapeptids (**32**) abläuft.



Schema 3.8-23: Regioselektive Arginin-Markierung in einem Tetrapeptid

Wie in dem in Abbildung 3.8-19 gezeigten ESI-MS-Spektrum, sind in der Tat beide möglichen Markierungsprodukte **31** und **32** entstanden. Für das Tetrapeptid **31** bei $[446.5]^+$ m/z bzw. $[223.7]^{2+}$ m/z und für das Tetrapeptid **32** bei $[550.5]^+$ m/z bzw. $[275.7]^{2+}$ m/z. Des Weiteren fällt auf, dass sich noch eine hohe Menge Edukt **26**, also durch den Ether **4** unmarkiertes Peptid, in dem Ansatz befindet. Auch der Ether **4** selbst ist noch in hohen Mengen nachweisbar. Da die Reaktionszeit, sowie die eingesetzte Basenmenge ausreichend erscheint – das im weiteren Verlauf dieses Kapitels vorgestellte Pentapeptid *Thymopentin* zeigt diese Nebenreaktion nicht so ausgeprägt – liegt eine mögliche Erklärung in der Konfiguration des α -Kohlenstoffatoms des Glycin. Dieser ist im Gegensatz zu allen anderen α -Kohlenstoffatomen der übrigen proteinogenen Aminosäuren nicht stereogen und daher aufgrund der zwei Wasserstoffsubstituenten möglicherweise für eine Zweitkondensation mit dem Ether **4** wesentlich leichter zugänglich, als dies beispielsweise bei der terminalen Aminosäure Arginin im Pentapeptid *Thymopentin* der Fall ist.

Hauptteil

Hier sollte die Aminogruppe der N-terminalen Aminosäure (Arginin) sterisch stärker abgeschirmt sein, so dass eine Zweitkondensation des Ethers **4** zwar möglich ist, aber zumindest ungünstiger als es z.B. beim Glycin als N-Terminus der Fall ist. Die experimentellen Befunde, die im weiteren Verlauf vorgestellt werden, belegen diese Überlegung. Eine Kondensation am N-Terminus des Pentapeptids konnte zwar nachgewiesen werden, aber nicht in einem solchen Umfang, wie es hier bei dem Tetrapeptid **26** der Fall ist.

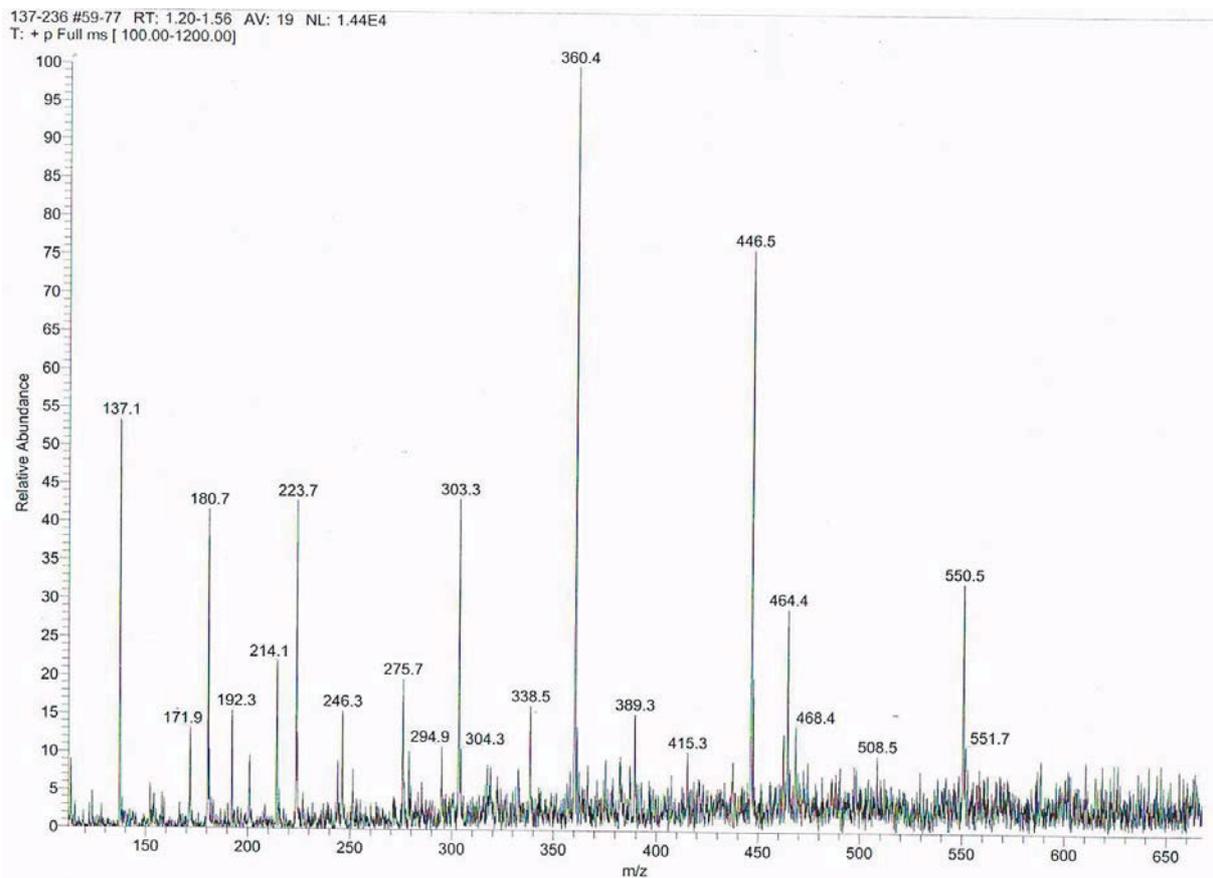
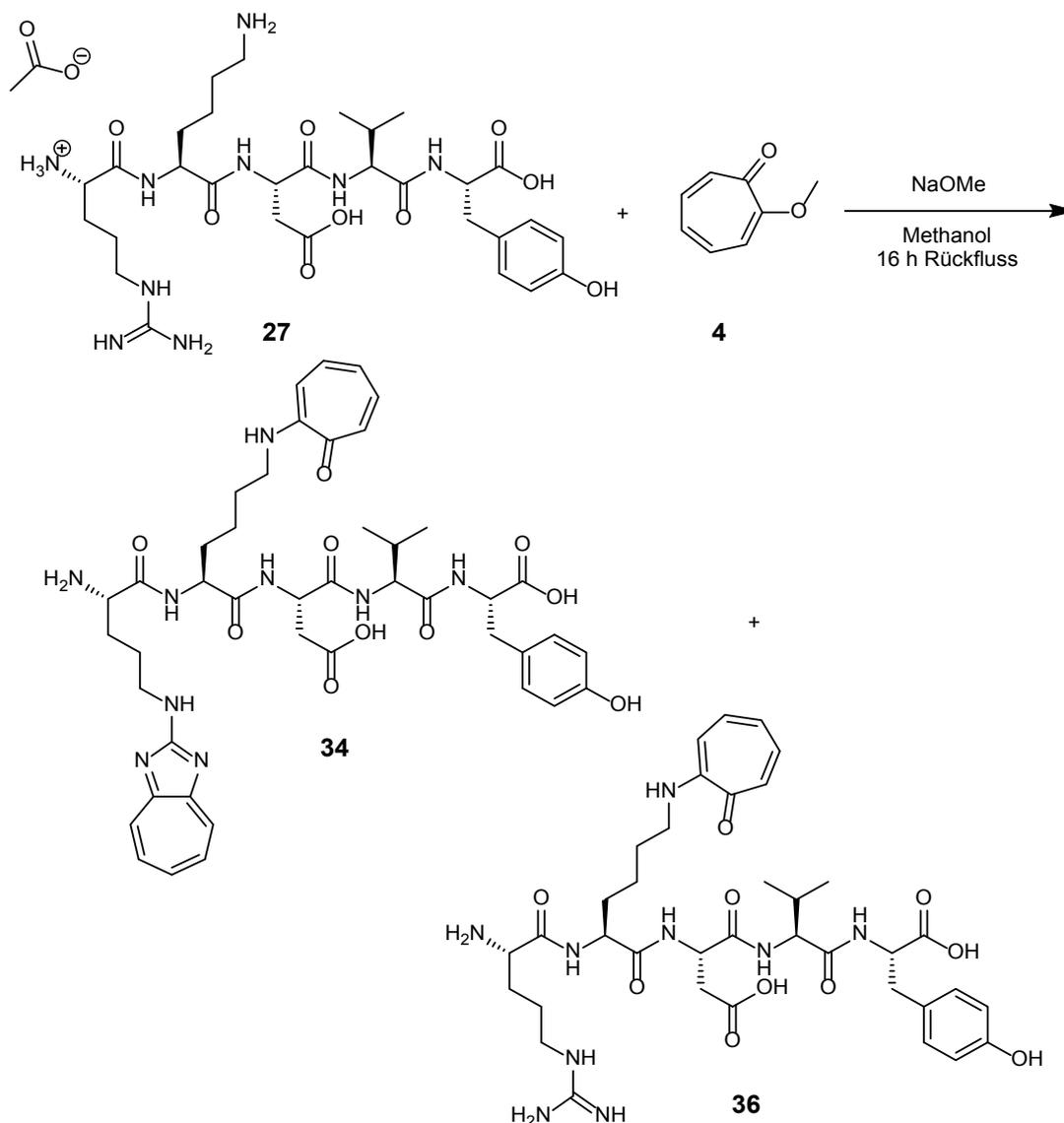


Abbildung 3.8-19: ESI-MS der Tetrapeptide **31 + 32**

3.8.5.3 Arginin-Markierung im Pentapeptid *Thymopentin* (27)

In Abschnitt 3.5 wurde bereits die biomedizinische Bedeutung des in diversen klinischen Studien untersuchten Pentapeptids *Thymopentin* (H-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH) **27** hervorgehoben. Dieses als ungeschütztes Acetat-Salz kommerziell erhältliche Peptid wurde nach den bereits im Vorfeld beschriebenen Bedingungen mit dem Tropolonether **4** in Anwesenheit eines hohen Überschusses an Base (NaOMe) einige Stunden zum Rückfluss erhitzt. Aufgrund der Anwesenheit der zweiten freien Aminogruppe der Aminosäure Lysin in direkter Nachbarschaft zum Arginin, muss unter den hier gewählten Reaktionsbedingungen mit einer weiteren Kondensation zwischen dem Ether **4** und der Aminogruppe des Lysins gerechnet werden.



Schema 3.8-24: Regioselektive Arginin- und Lysin-Markierung in *Thymopentin*

Die massenspektrometrischen Untersuchungen belegen in der Tat die Anwesenheit, sowohl des Arginin- und Lysin-markierten Peptids **34**, als auch des mono Lysin-markierten Peptids **36**. Hier wurden umfangreiche Versuche unternommen, die beiden Peptide an einer *reversed-phase*-HPLC-Anlage zu trennen. Es wurden hierbei verschiedene Laufmittelgemische wie Wasser/Acetonitril und Wasser/Methanol oder Wasser-TFA(pH3)/Acetonitril und Wasser-TFA(pH3)/Methanol als mobile Phase, sowohl über gradientelle als auch isokratische Methoden, getestet. Insgesamt wurden Trennversuche an drei verschiedenen *reversed-phase*-HPLC-Anlagen unternommen. Einer analytischen und einer semi-präparativen jeweils mit zwei verschiedenen Absorptionsdetektoren und einer weiteren analytischen Anlage, die neben zwei Absorptionsdetektoren auch einen Emissionsdetektor besaß. Auch wenn bei diesen Trennversuchen mit dem vielversprechendsten Laufmittelgemisch Wasser-TFA(pH3)/Acetonitril 90:10, in einer Fraktion eine intensive Fluoreszenz bei 410 nm detektiert werden konnte, so zeigten anschließend durchgeführte ESI-massenspektrometrische Untersuchungen, dass hier keine erfolgreiche Separierung der beiden Peptide **34** und **36** erfolgreich möglich war, da wiederum beide Substanzen in der untersuchten Probe nachweisbar waren.

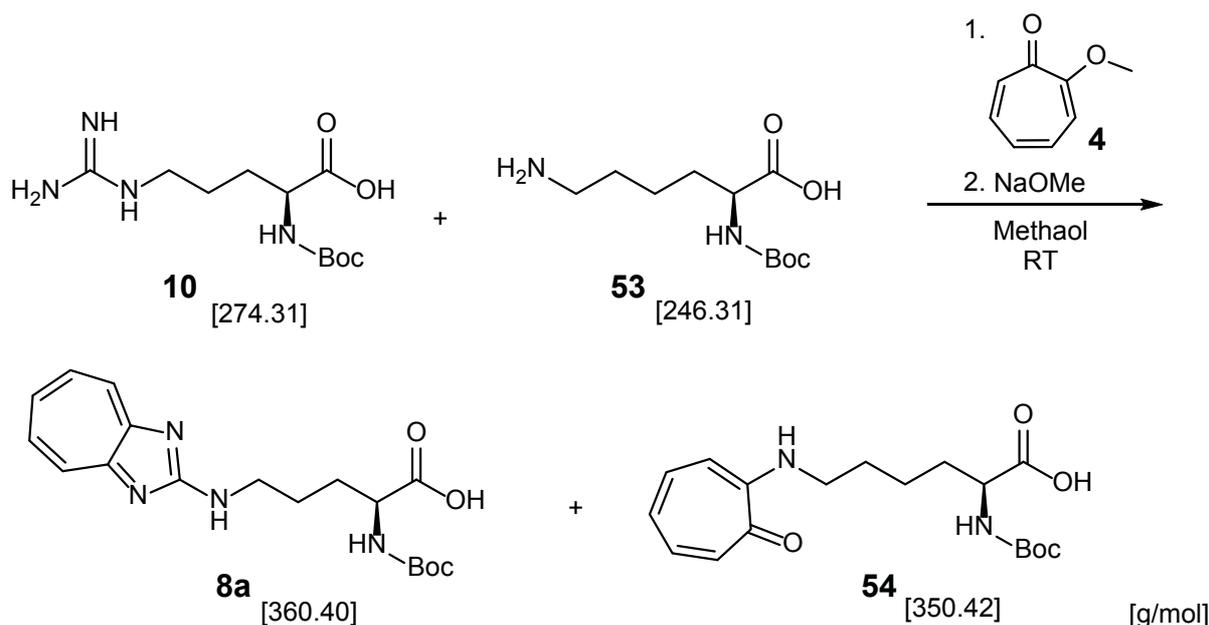
3.8.5.3.1 Untersuchung zum Reaktionsverlauf bei der Umsetzung von Tropolonmethylether in Anwesenheit der beiden Aminosäuren Boc-Arg-OH (10) und Boc-Lys-OH (53)

Wie die im vorherigen Abschnitt 3.8.5.1 beschriebene Markierung des Pentapeptids *Thymopentin* **27** gezeigt hat, wird neben der Aminosäure Arginin, dessen Guanidinogruppe in ein Amino-Diaza-Azulen-Derivat umgewandelt werden konnte, auch die ebenfalls im Peptid **27** vorhandene Aminosäure Lysin markiert. Dabei kondensiert dessen Aminogruppe in der Seitenkette mit dem eingesetzten Tropolonether zu einem Aminotropon-Derivat. Interessant ist nun die Fragestellung, welche der beiden Aminosäuren bevorzugt mit dem Tropolonether kondensiert. Um in dieser Hinsicht überhaupt ein erstes Indiz zu bekommen, wurde folgendes Experiment durchgeführt:

Der Tropolonether **4** wird nach den üblichen Bedingungen unter der Anwesenheit von einem Überschuss Natriummethanolat jetzt allerdings mit einem 1:1 Gemisch aus jeweils einem halben Äquivalent Boc-Arg-OH und Boc-Lys-OH umgesetzt.

Hauptteil

Das Gemisch wird zum Rückfluss erhitzt und es werden sofort zu Beginn und in festen temporären Abständen Proben zur massenspektrometrischen Untersuchung entnommen. Dieser Versuchsaufbau wird ebenfalls mit dem Tropolonether **11** durchgeführt. In beiden Fällen zeigen die ESI-MS-Spektren (m/z in Abhängigkeit der Relativen Häufigkeit), dass die Relative Häufigkeit von Boc-Lys-OH **53** in Bezug auf Boc-Arg-OH **10** ein wenig stärker zu Beginn ist und im weiteren Verlauf abnimmt und entsprechend die Relative Häufigkeit des Aminotropon-Derivates **54** stärker zunimmt, als die des Amino-Diaza-Azulen-Derivates **8a**. Weil hierdurch aber noch keine aussagekräftige Antwort auf die oben genannte Problemstellung gegeben werden kann, da aufgrund der zugeführten Wärme durch das Erhitzen unter Rückfluss keine genaue Differenzierung des Reaktionsverlaufes, der zu dem einen oder anderen Produkt führt, möglich ist, werden diese Versuche bei Raumtemperatur wiederholt. Dadurch sollte die Reaktionsgeschwindigkeit, die stark temperaturabhängig ist, gesenkt werden, um einen Reaktionsverlauf besser verfolgen zu können.



Schema 3.8-25: Umsetzung der beiden Aminosäuren **10** und **53** mit Tropolonmethylether **4**

Hauptteil

Bemerkenswerter Weise zeigt sich hierbei, dass Boc-Lys-OH **53** mit beiden Tropolonethern **4** und **11** bei Raumtemperatur relativ schnell reagiert, wohingegen bei Boc-Arg-OH **10** hier nur mit dem Tropolonether **11** nach mehreren Tagen überhaupt ein geringer Umsatz erkennbar ist. Dies lässt nun den Schluss zu, dass die Aminosäure Lysin, da sie schon bei Raumtemperatur relativ schnell mit beiden eingesetzten Tropolonethern kondensiert, kinetisch bevorzugt ist. Das folgende Elektronensprayionisationsspektrum zeigt die Umsetzung der beiden Aminosäuren Boc-Lys-OH **53** und Boc-Arg-OH **10** mit dem Tropolonether **11** bei Raumtemperatur nach 2 Tagen:

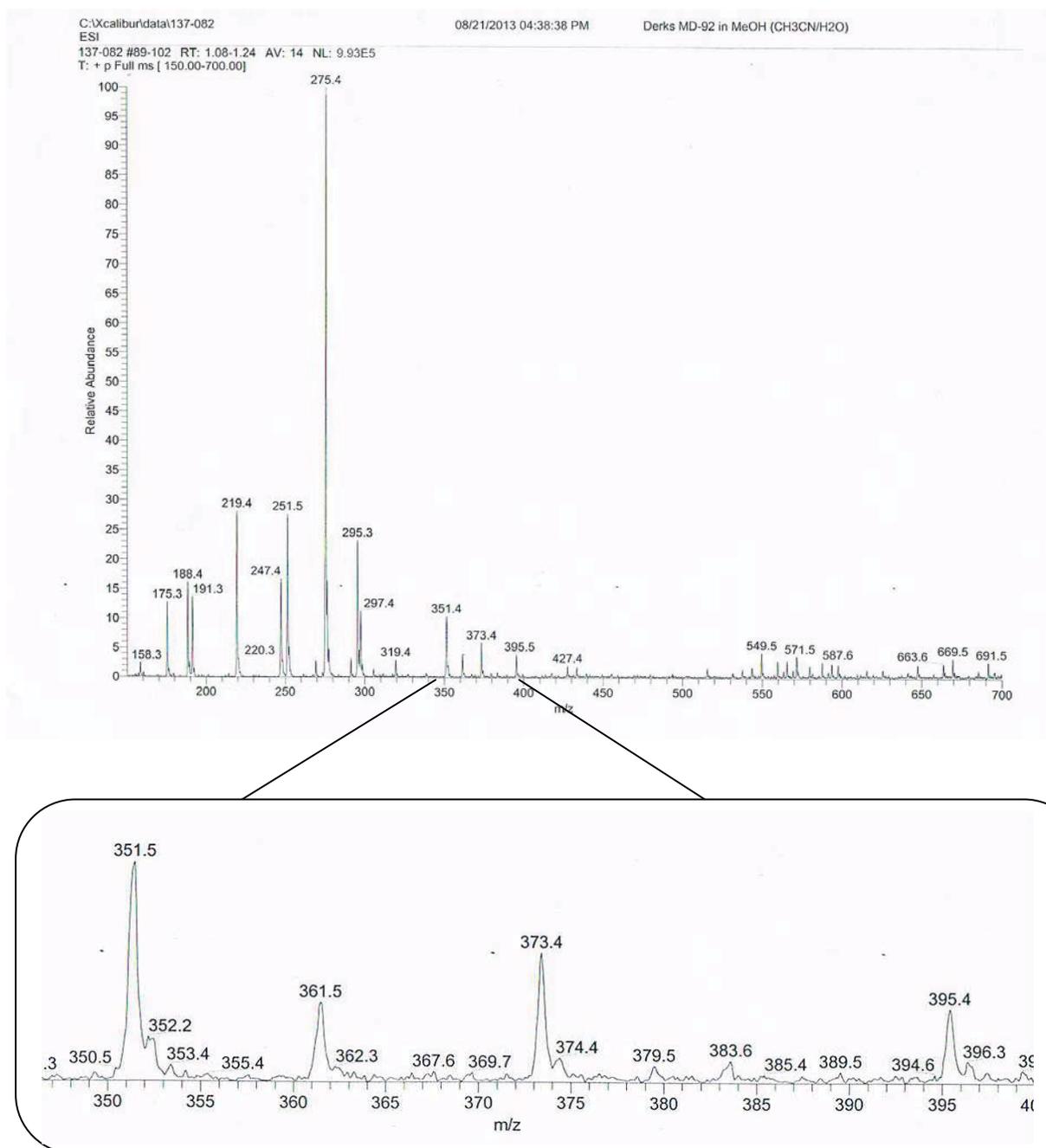
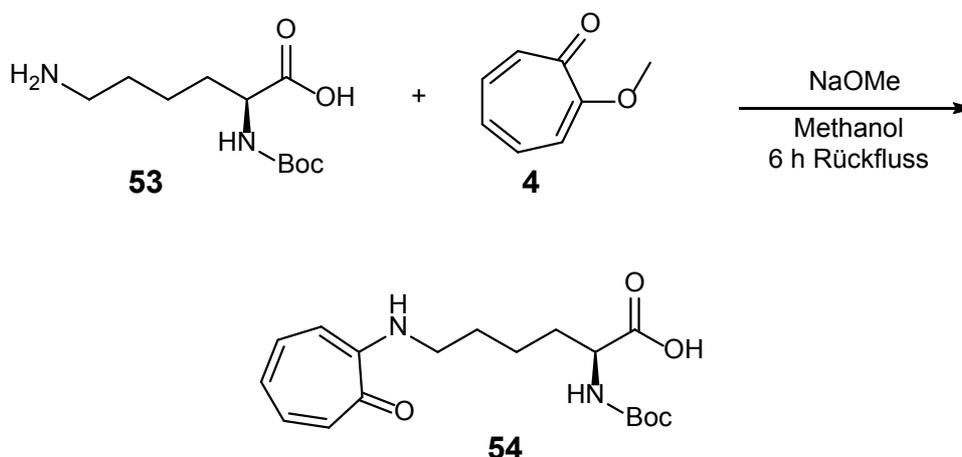


Abbildung 3.8-20: ESI-MS der Aminosäuren **8a** und **54**

3.8.5.3.2 Synthese des Aminotropon-Konjugates **54**

Der Vollständigkeit halber wird die Aminosäure **54**, bei der es sich um durch Troponmethylether markiertes Lysin handelt, zur weiteren Charakterisierung nach der etablierten Methode gezielt dargestellt. Wie bereits bei dem in Abschnitt 3.5.1 beschriebenen Lysin-Modell **28**, kann auch bei dem markierten Lysin **54** keine Fluoreszenz beobachtet werden. Die Verbindung **54** konnte hierbei mit einer Ausbeute von 81 % als zähflüssige Substanz gewonnen werden.



Schema 3.8-26: Synthese der markierten Aminosäure **54**

3.8.5.3.3 Untersuchung zum Reaktionsverlauf bei der Umsetzung von Troponmethylether mit *Thymopentin* bei Raumtemperatur

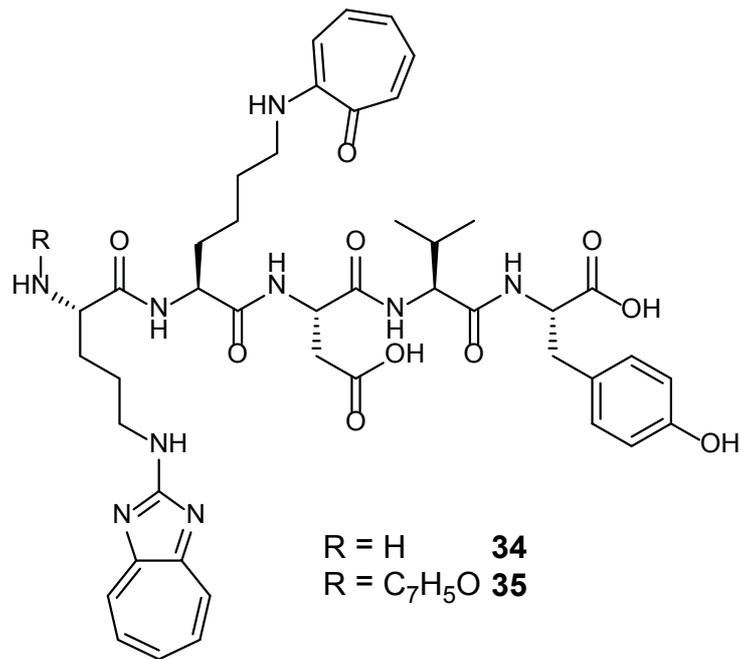
Die unter 3.8.5.1.1 gemachten Untersuchungen lassen das Postulat zu, dass die Aminogruppe am ϵ -Kohlenstoff der Aminosäure Lysin schneller mit dem eingesetzten Troponether reagieren sollte, als die Guanidino-Gruppe der Aminosäure Arginin, da die Kondensation zwischen Lysin und dem Ether bereits bei Raumtemperatur ablaufen kann. Somit sollte bei einer Umsetzung von *Thymopentin* mit dem Troponether **4** unter basischen Bedingungen zumindest bei Raumtemperatur nur die in dem Pentapeptid enthaltene Aminosäure Lysin mit dem Ether kondensieren. Und in der Tat belegen die, bei der unter bekannten Bedingungen durchgeführten Reaktion, in 20 minütigen Abständen entnommenen Proben, welche massenspektrometrisch untersucht wurden, dass nur eine Kondensation zwischen Lysin und dem Ether stattfindet.

Auch wenn prinzipiell eine einfache Kondensation zwischen der Guanidinogruppe des Arginins mit dem Ether, die zu einer identischen Masse führt, denkbar wäre, kann diesem Gedanken durch die Tatsache widersprochen werden, als dass bei den ESI-MS-Spektren, die bei dem in Abschnitt 3.8.5.1.1 geschilderten Versuchen gemessen wurden, eindeutig nachvollziehbar ist, dass im Laufe der Reaktion die relative Häufigkeit der Edukt-Aminosäure Lysin signifikant und kontinuierlich abnimmt, wohingegen die des entsprechenden Lysin-Kondensationsproduktes zunimmt. Dieser Effekt ist für die zweite Edukt-Aminosäure Arginin nicht erkennbar, so dass im Falle der *Thymopentin*-Markierung davon ausgegangen werden kann, dass zumindest bei Raumtemperatur fast ausschließlich Lysin mit dem Ether reagiert.

3.8.5.3.4 Optimierung der Arginin-Markierung in *Thymopentin* (27)

Bezugnehmend auf die Beobachtungen, die bei den zuvor in Abschnitt 3.8.5.1 beschriebenen Versuchen zum Reaktionsverlauf bei der Umsetzung von Tropolonmethylether mit *Thymopentin* gemacht wurden, wurden die dort angewandten Reaktionsbedingungen optimiert. Dabei wurde das Pentapeptid **27** zuerst, wie im gerade angesprochenen Kapitel, mit dem Tropolonether **4** umgesetzt. Nach 6 Stunden Reaktionslaufzeit wurden jedoch die äquivalenten Mengen des Ethers **4** und der eingesetzten Base erneut zugefügt und weitere 6 Stunden erhitzt. Das Ziel war es hierbei das bisher bevorzugt entstandene Aminotropon-Konjugat **36** weiter zur Verbindung **34** umzusetzen, bei der zusätzlich die vorhandene Guanidineinheit der im Pentapeptid enthaltenen Aminosäure Arginin in eine Amino-Diaza-Azulen-Einheit umgewandelt wird. Da hier mit einem hohen Überschuss, sowohl an Base, als auch an eingesetztem Tropolonether, gearbeitet wurde, musste natürlich auch mit dem in Kapitel 3.8.5 angesprochenen Konjugat **35** gerechnet werden, bei dem eine dritte Reaktionen des *Thymopentins* zwischen dessen terminalen Aminogruppe und dem Ether **4** stattfindet. Massenspektrometrische Untersuchungen konnten dies im Anschluss auch bestätigen, aber ebenfalls den Erfolg der Reaktion dahingehend, als dass das Aminotropon-Konjugat **36** nicht mehr nachgewiesen werden konnte, sondern einzig das favorisierte Amino-Diaza-Azulen **34** und das eben angesprochene Konjugat **35**.

Hauptteil



Schema 3.8-27: Struktur der Peptide **34** und **35**

Hier war es jedoch möglich über Flüssigchromatographie die beiden markierten Peptide **34** und **35** zu trennen und über hochauflösende Massenspektrometrie, wie die folgenden Abbildungen belegen, nachzuweisen.

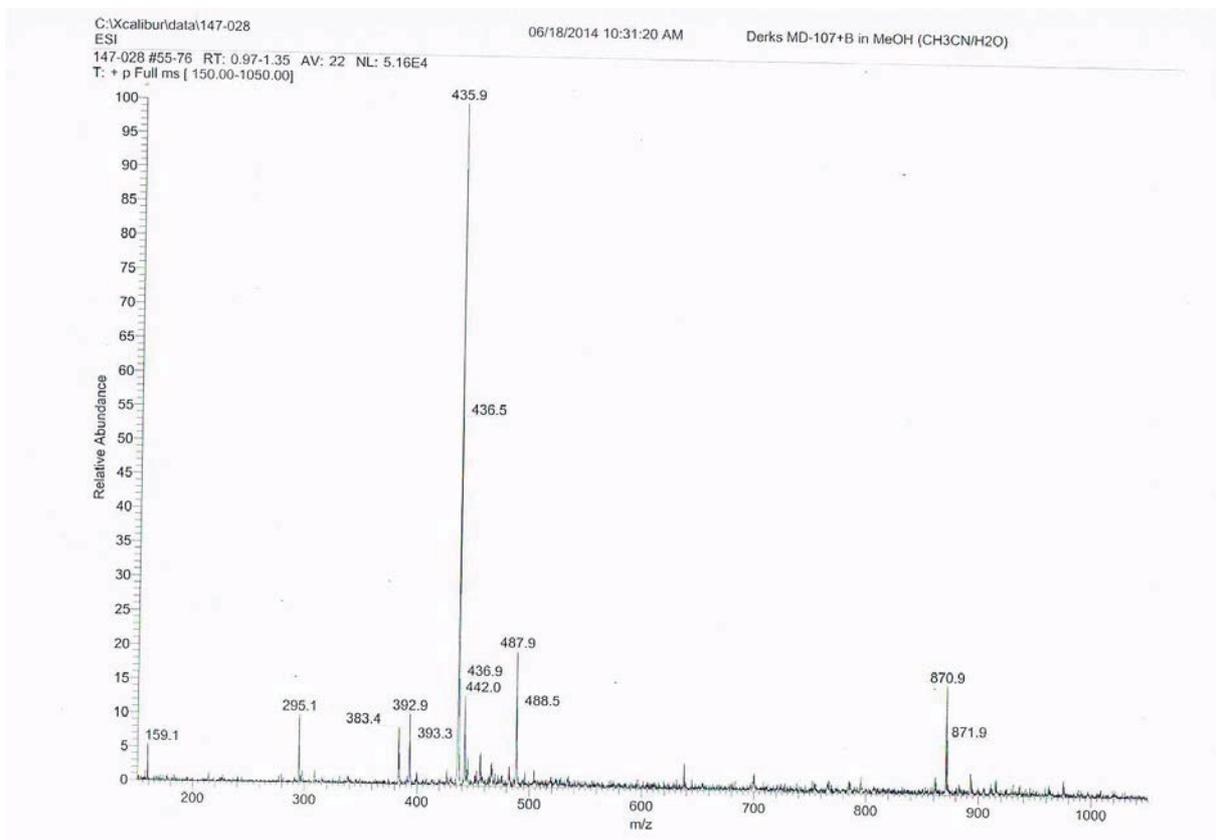


Abbildung 3.8-21: ESI-MS des optimierten Ansatzes

Hauptteil

In Abbildung 3.8-21 sind deutlich der Massenpeak bei $[870.9]^+$ m/z bzw. $[435.9]^{2+}$ m/z des Thymopentin-Derivates **34** zu erkennen, bei dem neben der Markierung der Aminosäure Lysin zum Aminotropon auch die Aminosäure Arginin durch den Troplonether zum Amino-Diaza-Azulen erfolgreich markiert werden konnte. Weiterhin zeigt der Massenpeak $[487.9]^{2+}$ m/z, dass auch das bereits angesprochene Konjugat **35** entstanden ist, bei dem eine zusätzliche Markierung an der terminalen Aminogruppe des Pentapeptids durch den Tropolonether **4** stattfand.

Die folgende Abbildung 3.8-22 zeigt den Erfolg der LC/MS-Methode, bei der die Probe durch Flüssigchromatographie aufgetrennt und im Anschluss direkt massenspektrometrisch vermessen wurde. Bei einer Retentionszeit von 1.2 Minuten erscheint das Konjugat **34** und bei 2.0 Minuten das Konjugat **35**. Beide Spektren belegen eine saubere Trennung der beiden markierten Pentapeptide voneinander.

Hauptteil

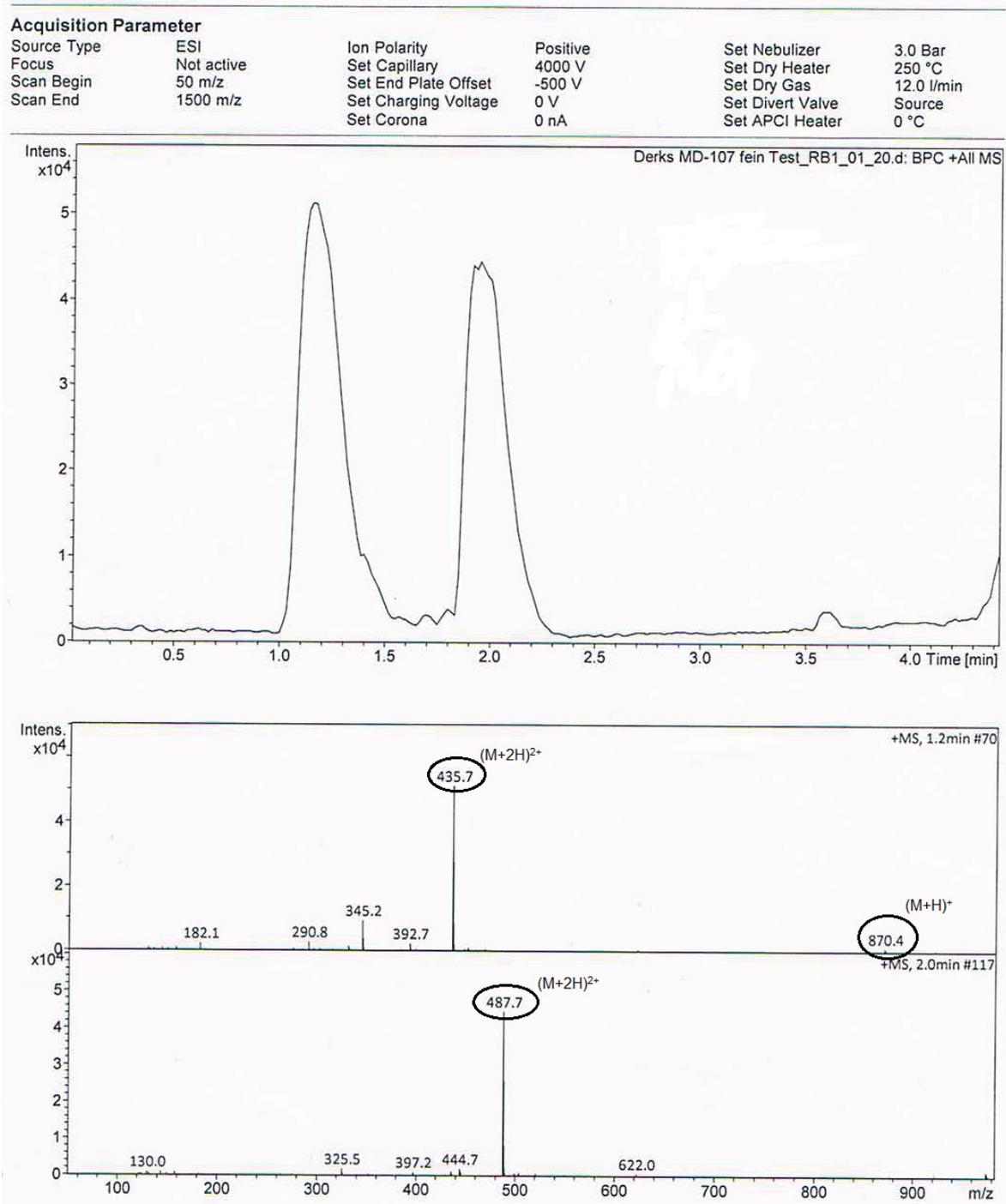


Abbildung 3.8-22: LC/MS des optimierten Ansatzes

Zur Vervollständigung sind in der folgenden Abbildung 3.8-23 und 3.8-24 die hochaufgelösten ESI-Massenspektren und die entsprechenden Berechnungen der Masse und der jeweiligen Zuordnung der Summenformel der beiden markierten Pentapeptide dargestellt:

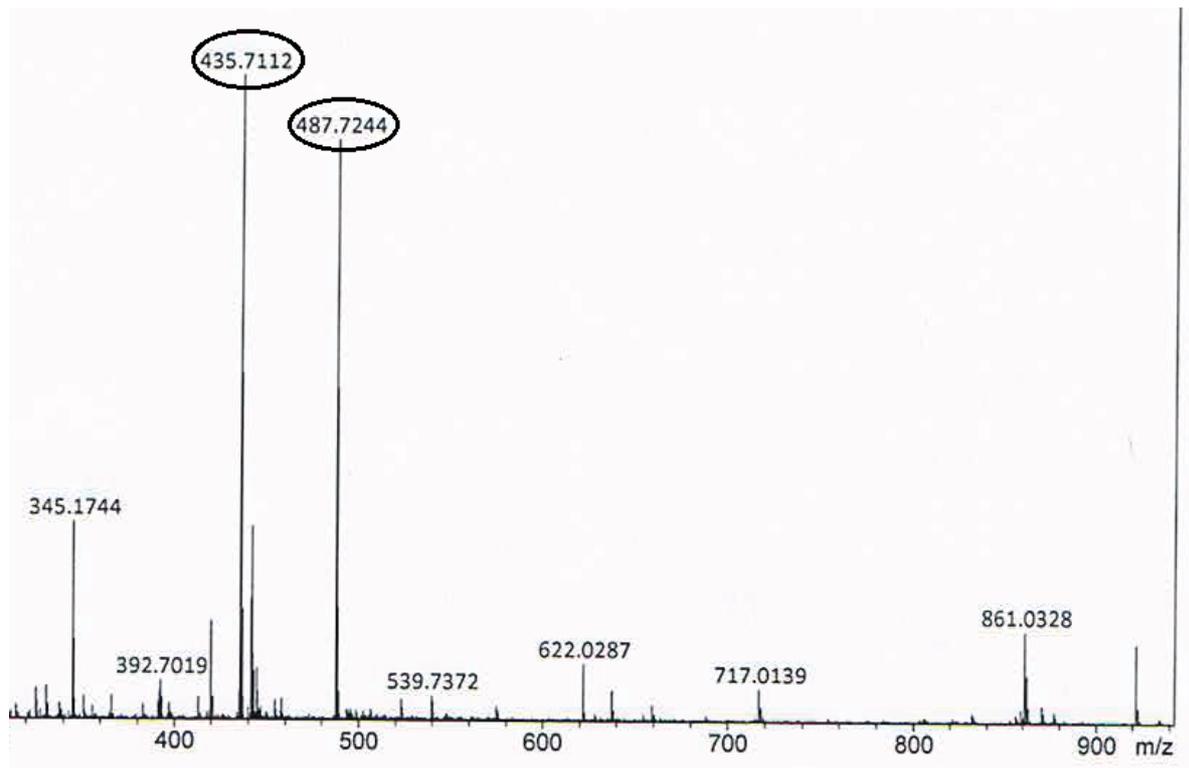


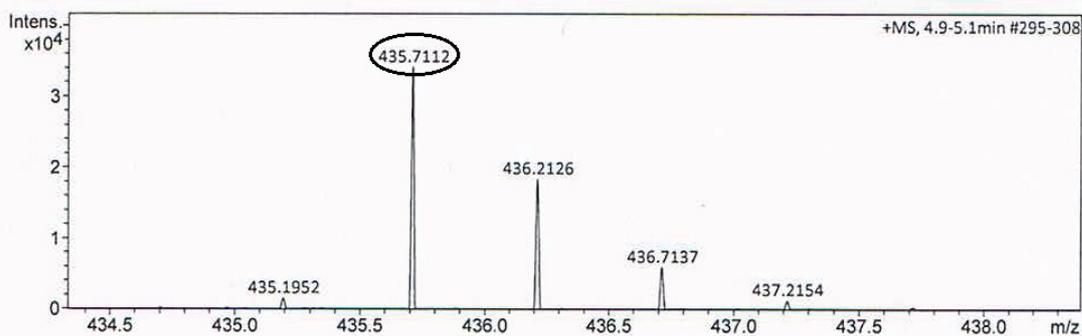
Abbildung 3.8-23: HR-MS I des optimierten Ansatzes

Das in Abbildung 3.8-22 veranschaulichte hochaufgelöste Massenspektrum zeigt jeweils die doppelt protonierten Spezies der beiden markierten Pentapeptide **34** und **35**. Entsprechend bei $[435.7112]^{2+}$ m/z für das Amino-diaza-azueln-Konjugat **34**, das wie die folgende Abbildung 3.8-23 zeigt, eine berechnete Masse von 435.7109 m/z mit der dazugehörigen Summenformel $C_{44}H_{57}N_9O_{10}$ liefert. Das zweite markierte Pentapeptid **35** wurde bei $[487.7244]^{2+}$ m/z gemessen. Hier liefert die Berechnung der exakten Masse 487.7240 m/z mit der dazugehörigen Summenformel $C_{51}H_{61}N_9O_{11}$.

Hauptteil

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4000 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set Collision Cell RF	600.0 Vpp	Set Divert Valve	Source



Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e ⁻ Conf	N-Rule
435.7112	1	C45H53N13O6	435.7115	0.8	7.9	1	100.00	26.0	even	ok
	2	C44H57N9O10	435.7109	-0.7	14.0	2	91.64	21.0	even	ok
	3	C42H45N23	435.7109	-0.7	14.5	3	90.51	32.0	even	ok
	4	C60H57NO5	435.7113	0.3	60.0	4	36.73	33.0	even	ok
	5	C30H49N25O7	435.7118	1.4	67.8	5	17.76	19.0	even	ok
	6	C61H53N5O	435.7120	1.8	70.9	6	18.19	38.0	even	ok
	7	C27H41N35O	435.7111	-0.1	71.0	7	20.31	25.0	even	ok
	8	C32H61N11O17	435.7118	1.4	75.9	8	13.04	8.0	even	ok
	9	C29H53N21O11	435.7111	-0.1	78.2	9	15.39	14.0	even	ok
	10	C26H45N31O5	435.7104	-1.7	81.0	10	10.07	20.0	even	ok
	11	C31H65N7O21	435.7111	-0.1	86.9	11	10.77	3.0	even	ok
	12	C28H57N17O15	435.7105	-1.7	88.9	12	7.23	9.0	even	ok
	13	C15H45N37O8	435.7120	2.0	129.7	13	0.84	12.0	even	ok
487.7244	1	C51H61N9O11	487.7240	-0.9	10.5	1	100.00	26.0	even	ok
	2	C52H57N13O7	487.7246	0.4	21.2	2	89.37	31.0	even	ok
	3	C55H65N3O13	487.7253	1.8	22.4	3	62.53	25.0	even	ok
	4	C49H49N23O	487.7240	-0.9	24.3	4	59.97	37.0	even	ok
	5	C53H53N17O3	487.7253	1.8	35.8	5	36.33	36.0	even	ok
	6	C37H53N25O8	487.7249	1.0	46.6	6	33.38	24.0	even	ok
	7	C34H45N35O2	487.7242	-0.4	50.7	7	33.29	30.0	even	ok
	8	C39H65N11O18	487.7249	1.0	54.0	8	26.55	13.0	even	ok
	9	C36H57N21O12	487.7242	-0.4	56.9	9	27.46	19.0	even	ok
	10	C38H69N7O22	487.7242	-0.4	58.3	10	32.84	8.0	even	ok
	11	C33H49N31O6	487.7236	-1.8	60.3	11	17.61	25.0	even	ok
	12	C35H61N17O16	487.7236	-1.8	67.5	12	13.72	14.0	even	ok
	13	C37H73N3O26	487.7236	-1.8	68.3	13	16.71	3.0	even	ok
	14	C67H61NO6	487.7244	-0.1	83.9	14	13.46	38.0	even	ok
	15	C22H49N37O9	487.7251	1.5	109.9	15	2.34	17.0	even	ok
	16	C19H41N47O3	487.7245	0.1	112.9	16	2.74	23.0	even	ok
	17	C24H61N23O19	487.7252	1.5	117.9	17	1.54	6.0	even	ok
	18	C21H53N33O13	487.7245	0.1	120.2	18	1.85	12.0	even	ok
	19	C18H45N43O7	487.7238	-1.3	122.9	19	1.23	18.0	even	ok
	20	C23H65N19O23	487.7245	0.1	128.6	20	1.15	1.0	even	ok
	21	C20H57N29O17	487.7238	-1.3	130.7	21	0.79	7.0	even	ok

Abbildung 3.8-24: HR-MS II des optimierten Ansatzes

Hauptteil

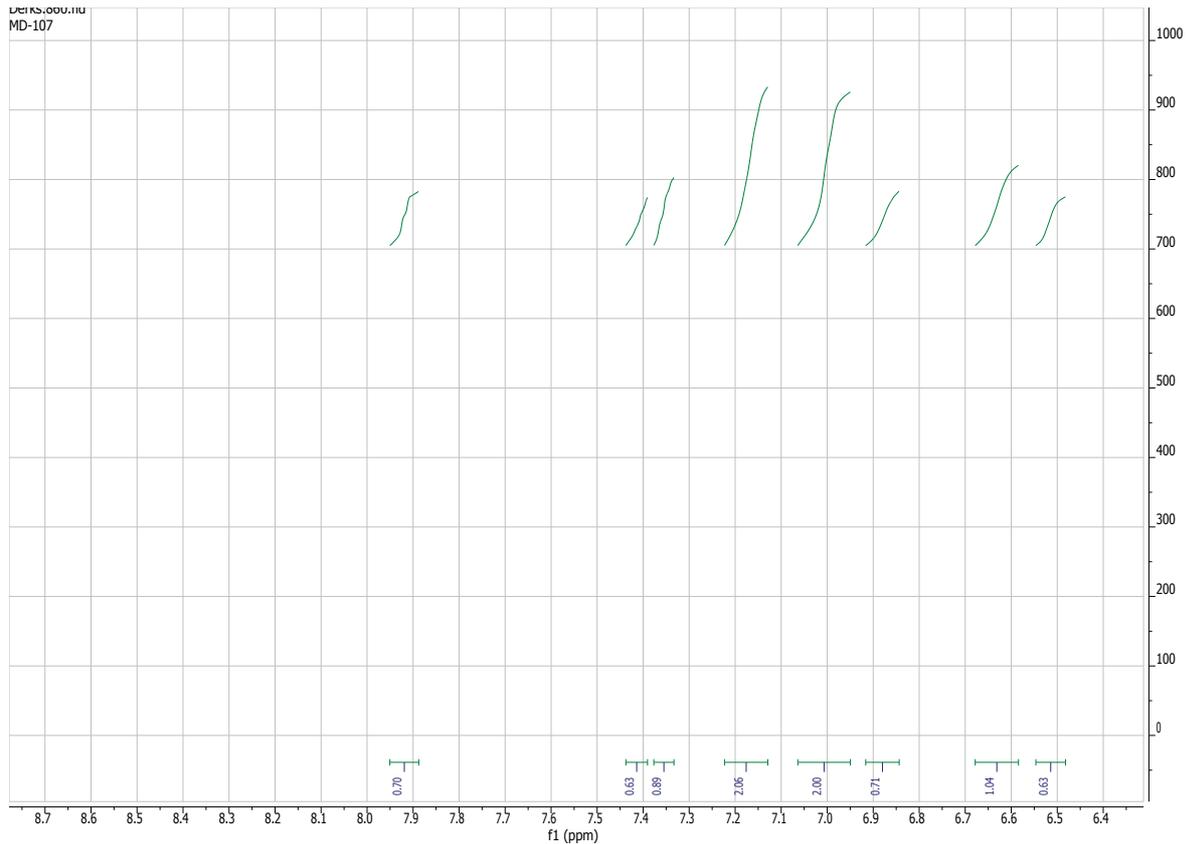


Abbildung 3.8-25: ¹H-NMR des optimierten Ansatzes

In dem oben abgebildeten ¹H-NMR-Spektrum von dem Gemisch der Peptide **34** und **35**, können zumindest, auch anhand der Integration, die für den symmetrischen Fluorophor charakteristischen drei Signale der Cycloheptatrienyl-Protonen (ein Dublett bei 7.00 ppm und zwei Tripletts bei 6.63 ppm und 7.17 ppm) ausgemacht werden. Die übrigen fünf Signale zwischen 6.3 ppm und 8.0 ppm könnten von entsprechenden Amino-tropon-Konjugat-Bildungen herrühren (vgl. Abschnitt 5.5.11).

3.8.6 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer an Peptiden mit fluoreszenzmarkiertem Arginin

Der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) hat sich als eine empfindliche Sonde in der Strukturuntersuchung von Peptiden bewährt und erlaubt es, Aussagen über den räumlichen Abstand von Struktureinheiten zu machen, deren Distanz zwischen etwa 1 und 9 nm liegt. Im FRET-Experiment, ein strahlungsfreier Prozess, wird, infolge der Kopplung der Übergangsdipolmomente, Energie von einer Donorgruppe (D) zu einer Akzeptorgruppe (A) transferiert. Voraussetzung dafür ist, dass der Akzeptor im Emissionswellenbereich des Donors Energie aufnehmen kann, d.h. die Emissionsbande des Donors muss möglichst gut mit der Absorptionsbande des Akzeptors überlappen, wobei der Akzeptor (A) im Gegensatz zum Donor (D) kein Fluorophor sein muss (→ Abbildung 3.8-25).^[42] Die Effizienz des Energietransfers ist umgekehrt proportional zur 6. Potenz des Abstands zwischen Donor und Akzeptor (→ Formel 3.8-1).

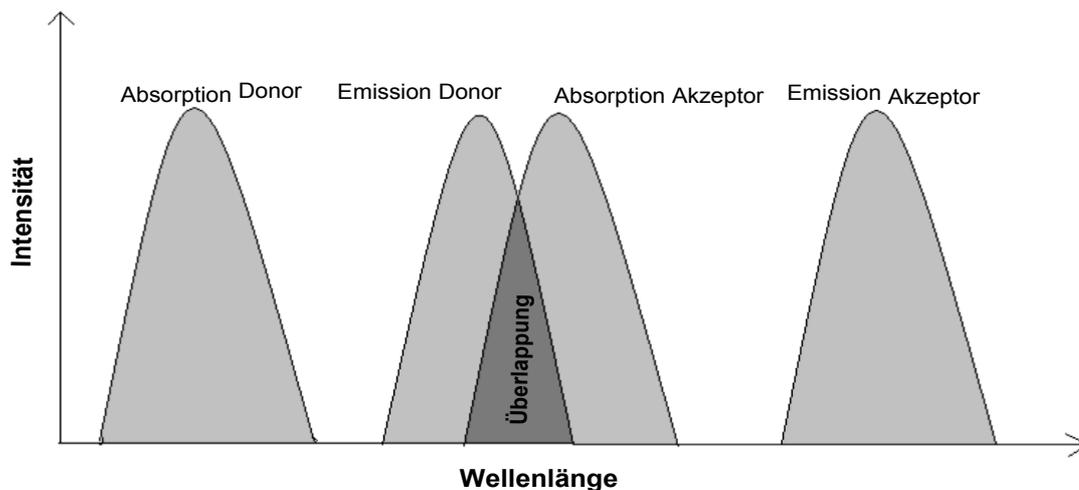


Abbildung 3.8-26: Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors

Hauptteil

Die Effizienz des Energietransfers (E_{FRET}) wird durch die Formel 3.8-3 beschrieben:

$$E_{\text{FRET}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6} \quad (3.8-3)$$

R ist der Abstand zwischen Donor und Akzeptor.

R_0 ist der sogenannte Förster-Radius. Dieser Parameter beschreibt bei welcher Distanz 50% der Fluoreszenz des Donors gelöscht ist.

Der Förster-Radius ergibt sich aus der folgenden Formel

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-23} \Phi_F k^2 h^{-4} J(l) \quad (3.8-4)$$

Φ_F ist die Fluoreszenzquantenausbeute (siehe Abschnitt 2.2.1)

k ist ein Orientierungsparameter, der die Anordnung der Übergangsdipolmomente beschreibt. Im Fall frei rotierender Fluorophore wird angenommen dass $K = 2/3$ ist. k kann Werte zwischen 0 und 4 annehmen.

h ist der

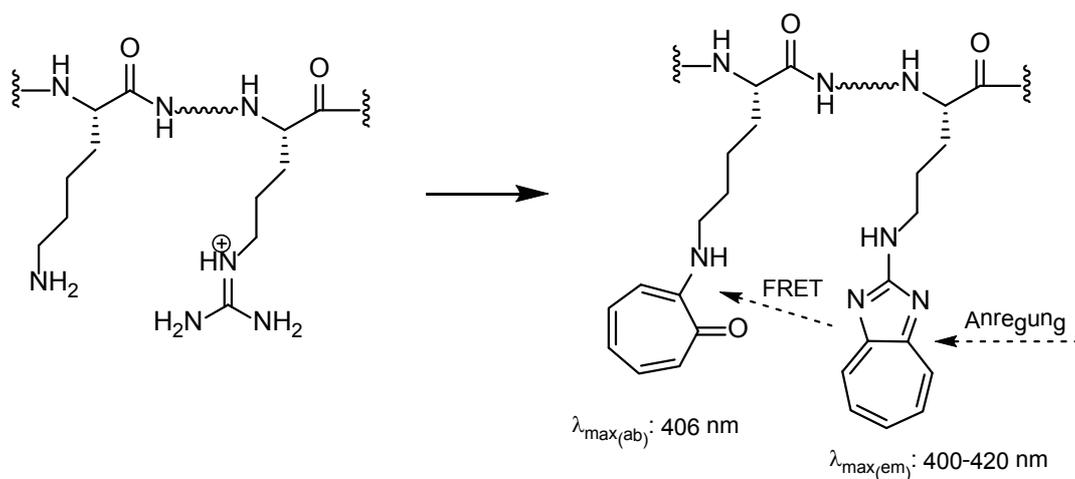
$J(l)$ beschreibt den spektralen Überlapp (Überlappintegral) zwischen der Fluoreszenz des Donors und der Absorption des Akzeptors. ^[43]

FRET eignet sich somit als besonders sensible Sonde zur Untersuchung bestimmter Proteinfaltungen. Hier soll die Abnahme der Fluoreszenz zur Bestimmung des FRET genutzt werden.^[44] Das Konzept sieht vor, durch Derivatisierung mit ein und demselben Reagens (hier der Tropolonmethylether **4**) einen Fluoreszenz-Donor und einen -Akzeptor zu erzeugen. Voraussetzung hierfür ist lediglich, dass das Peptid neben Arginin auch Lysin enthält. Während Arginin den Fluoreszenz-Donor in Form des Amino-Diaza-Azulens liefert, führt die Reaktion des Lysins mit dem Tropolenderivat **4** zu einem Chromophor, welcher als Fluoreszenz-Akzeptor dienen kann. Lysin wird mit der Aminogruppe der Seitenkette zu dem bereits diskutierten 2-Alkylaminotropon-Konjugat führen (\rightarrow Schema 3.8-27). Derartige Verbindungen absorbieren bei 337 und 406 nm.^[45] Da das aus Arginin hervorgegangene Amino-Diaza-Azulen bei 400-420 nm sein Fluoreszenzmaximum hat, kann es optimal als Fluoreszenz-Donor dienen.

Hauptteil

Die Löschung der Fluoreszenz durch FRET sollte sich dazu eignen, den Abstand zwischen Arginin und Lysin zu ermitteln.

Ein geeignetes Peptid, das diese Voraussetzungen erfüllt, wird mit dem Pentapeptid *Thymopentin 27* in dieser Arbeit vorgestellt. Auch die erfolgreichen Markierungen an den entsprechenden Aminosäuren Lysin und Arginin wurden durchgeführt und diskutiert. Einzig die Durchführung von FRET-Experimenten ist kein Bestandteil dieser Arbeit und soll anderen vorbehalten sein.

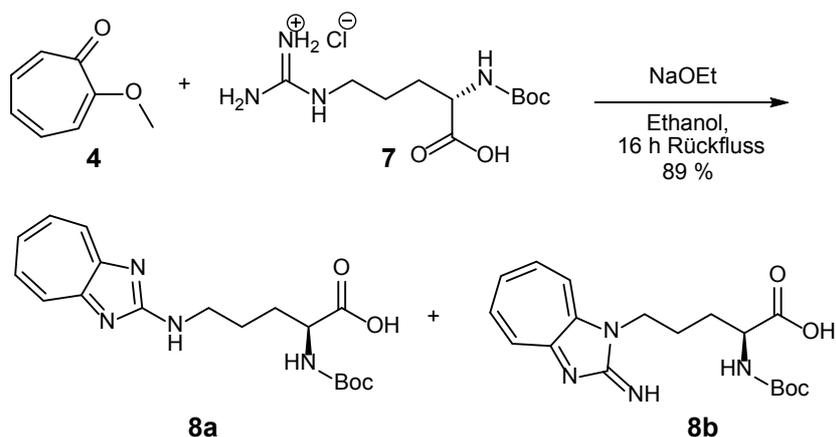


Schema 3.8-28: Idee eines FRET-Experimentes am Beispiel eines Lysin und Arginin enthaltenen Peptids

4. Zusammenfassung

Zusammenfassung

In eigenen Vorarbeiten^[20] konnte bereits unter Anwendung der literaturbekannten Kondensation eines Tropolonmethylether mit Guandinhydrochlorid^[16], die Guanidineinheit von *N*-Boc-geschütztem Arginin über eine Einstufensynthese in eine Amino-Diaza-Azulen-Einheit überführt und so ein Zugang zu fluoreszenzmarkiertem Arginin eröffnet werden. Diese Markierung führte aber letztlich zu einem Gemisch der beiden Regioisomere **8a** und **8b**:



Schema 4-1: Umsetzung des Tropolonethers **4** mit Boc-Arg-OH-hydrochlorid **7**

Das langfristige Ziel dieser Arbeit war es, die Guanidineinheit in der Seitenkette der Aminosäure Arginin in das oben beschriebene Amino-Diaza-Azulen umzuwandeln, um auf diese Weise in Arginin eine fluorophore Sonde aufzubauen und die so modifizierte Aminosäure zum biochemischen Einbau zur Verfügung zu stellen. Darüber hinaus wurde die Fluoreszenzmarkierung von Arginin in kleinen Peptiden durch Einführung des Amino-Diaza-Azulen-Fluorophors angestrebt. Hierfür wurden die beiden Regioisomere **8a** und **8b** zum einen an einer *reversed-phase*-HPLC-Säule und zum anderen im präparativen Maßstab über pH-Wert-abhängige Extraktion erfolgreich voneinander getrennt und umfassend, insbesondere im Hinblick auf ihre optischen Eigenschaften durch Absorptions- und Emissionsspektroskopie, sowie der Messung der jeweiligen Fluoreszenzquantenausbeuten und -lebenszeiten, charakterisiert. Im Zuge dieser Charakterisierung zeigte das symmetrische Regioisomer **8a** die vorteilhafteren Fluoreszenzeigenschaften. NMR-spektroskopisch lässt sich das lineare Regioisomer **8a** leicht aufgrund der geringen Anzahl der Protonen-Signale im Cycloheptatrienyl-Bereich erkennen (vgl. Abbildung 4-1 links). Das asymmetrische Regioisomer **8b** weist dagegen 5 Signale der Cycloheptatrienyl-Protonen auf (→ Abbildung 4-2 rechts).

Zusammenfassung

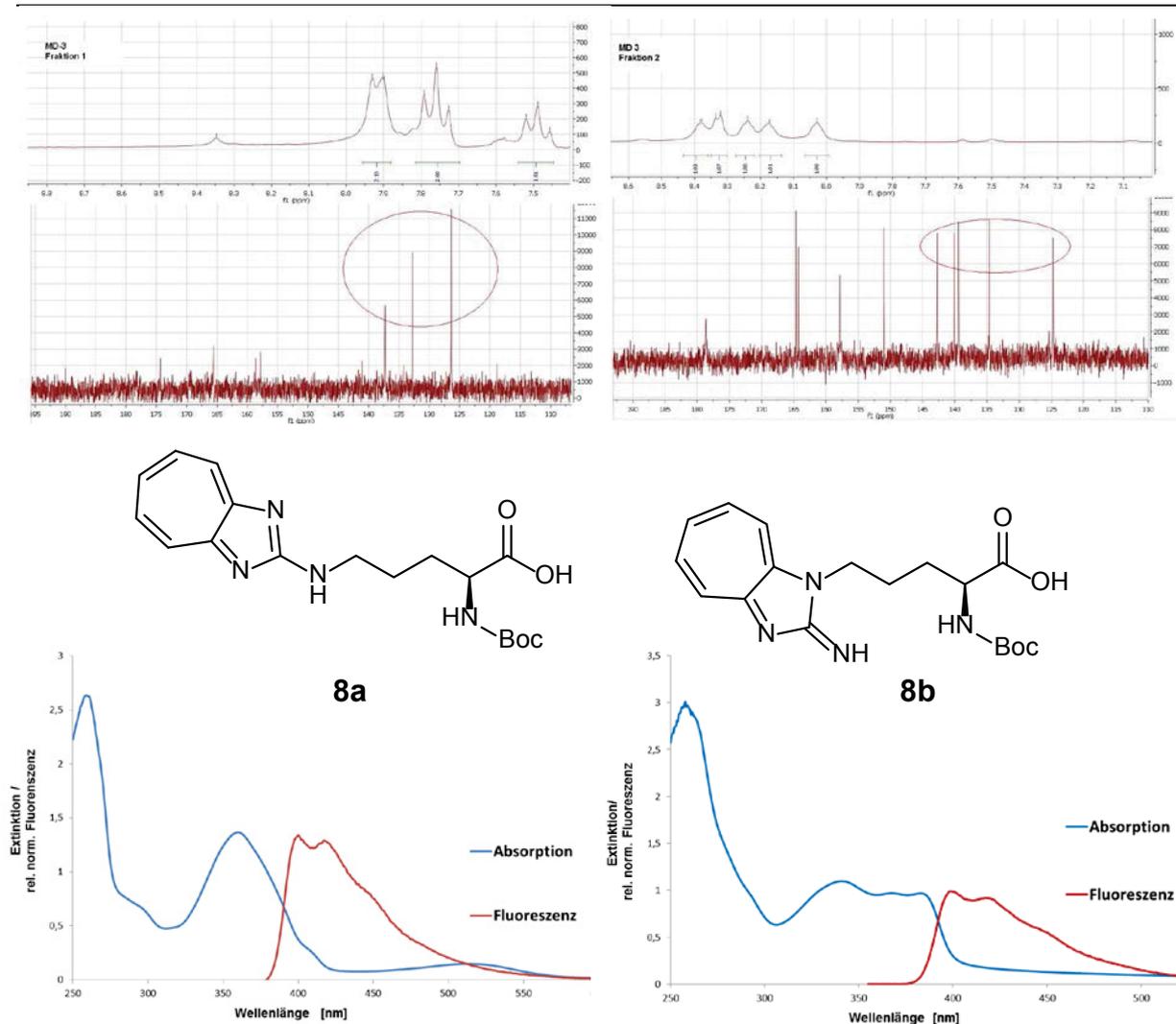
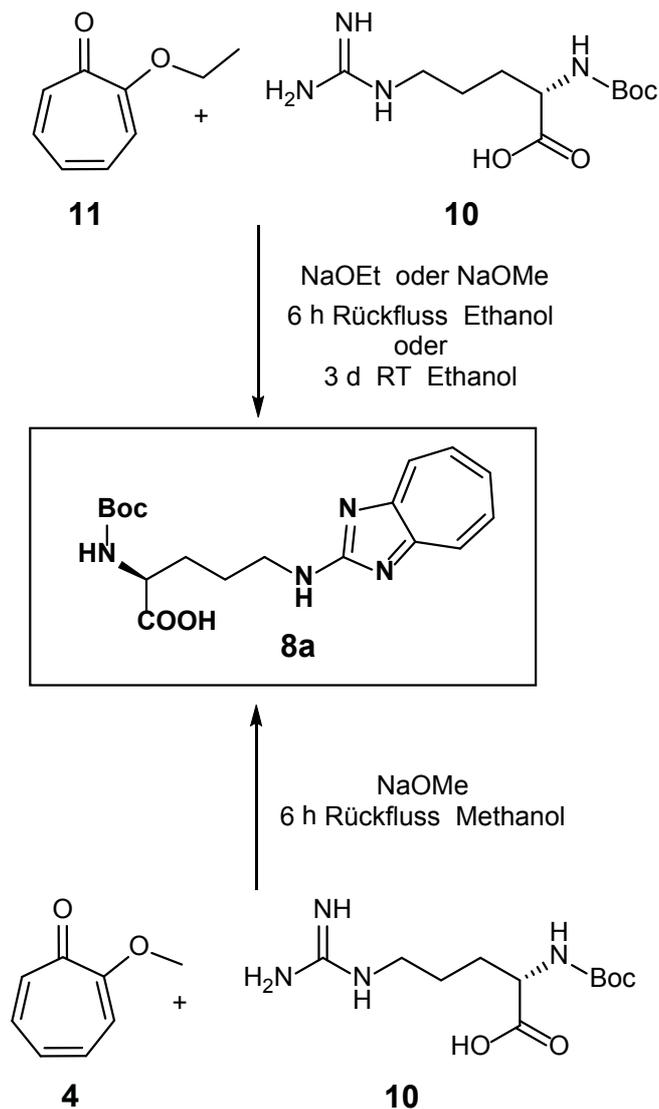


Abbildung 4-1:

^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren, sowie Absorptions- und Emissionsspektren der Regioisomere **8a** (links) und **8b** (rechts) nach dem Trennvorgang an einer *reversed-phase*-HPLC

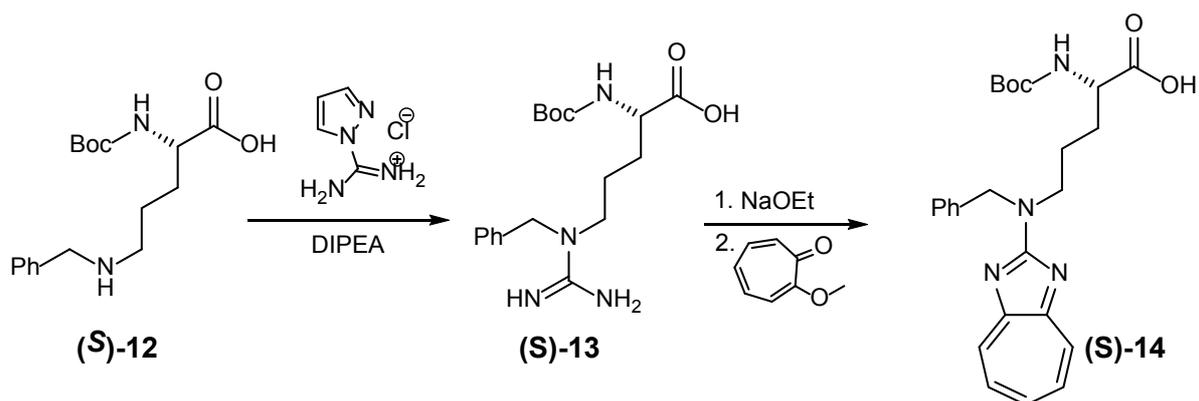
Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden Versuche unternommen, die bisherige Synthese zu optimieren und das Problem der Ambidoselektivität im Kondensationsschritt zu lösen, um einen regioselektiven Zugang zu dem favorisierten Isomer **8a** zu eröffnen. Dies gelang durch den Austausch der verwendeten Base Natriumethanolat durch Natriummethanolat. Untersuchungen konnten belegen, dass es unter der Anwesenheit von Ethanolat-Anionen zu einer Umetherung des Tropolonmethylethers kommt, die die Bildung des asymmetrischen Regioisomeren **8b** anscheinend begünstigt. Unter Anwesenheit von Methanolat-Anionen ist dieser Effekt nicht zu beobachten, so dass diese Reaktion regioselektiv das symmetrische Isomer **8a** liefert.

Zusammenfassung



Schema 4-2: Übersicht der regioselektiven Darstellungsmöglichkeiten

Parallel wurde zudem ein alternatives Synthesekonzept zur regioselektiven Steuerung realisiert. Dazu wurde (*L*)- N^α -BOC- N^ω -benzylornithin **12**^[39] mit 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidhydrochlorid zum Guanidin **13** umgesetzt, welches in der anschließenden Kondensation mit dem Tropolonmethylether **4** und unter Einsatz der Base Natriumethanolat zum benzylgeschützten Amino-Diaza-Azulen **14** führte. Insbesondere die charakteristischen Protonensignale im ¹H-NMR belegen den Erfolg dieses Konzeptes.



Schema 4-3: Synthese der markierten Aminosäure **(S)-14** ausgehend von N^ε-alkylierten (S)-Ornithin

Da der Kohlenwasserstoff Azulen für seine anomale Fluoreszenz bekannt ist, die von einem $S_0 \leftarrow S_2$ -Übergang herrührt^[16], der Fluorophor des 1,3-Diaza-Azulen, dessen längstwellige Absorptionsbande bei 450 nm liegt ($\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang), diese Anomalie dagegen nicht zeigt, weil dessen Fluoreszenz durch eine Emission aus dem niedrigsten Singulett-Zustand hervorgerufen wird^[46], wurden hierzu *Gaussian 03-BC*-Rechnungen^[24] des 2-Amino-1,3-diaza-azulens **5** durchgeführt. Diese zeigten (\rightarrow Abbildung 4-2), dass sowohl HOMO als auch LUMO in Position 6 große Orbitalkoeffizienten aufweisen. Es liegt daher nahe, durch Einführung von Substituenten unterschiedlichen elektronischen Charakters die optischen Eigenschaften des fluoreszenzmarkierten Arginins zu verändern und möglicherweise zu Derivaten zu gelangen, die einen höheren *Stokes-Shift* aufweisen; dies ist wünschenswert, damit sich Endabsorption und Emission möglichst wenig überschneiden.

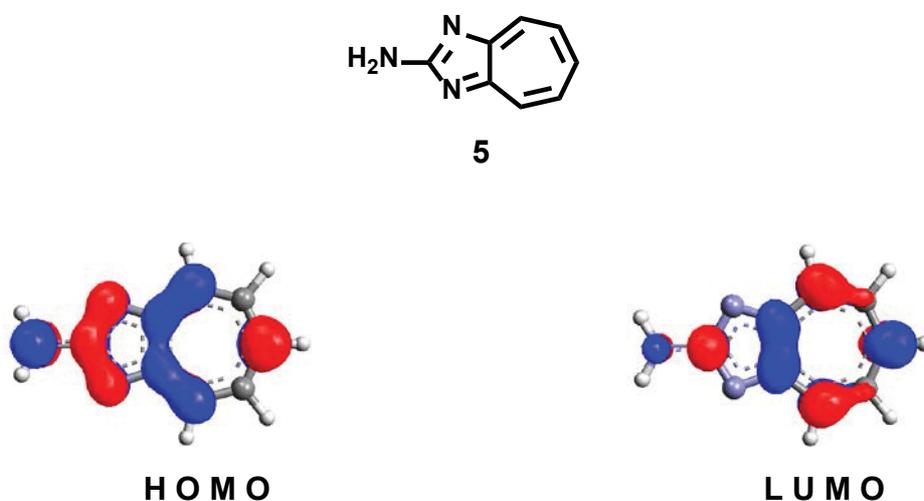
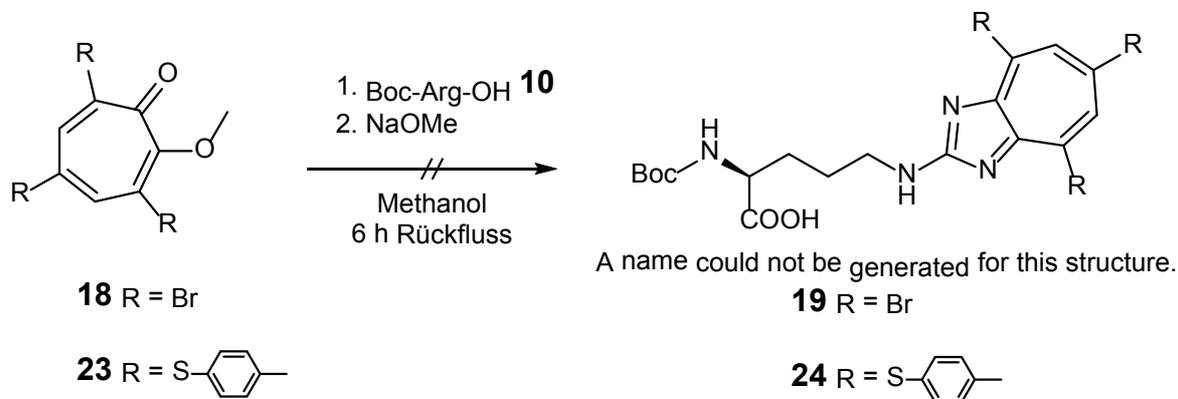


Abbildung 4-2: Berechnete HOMO- und LUMO-Orbitale des 2-Amino-1,3-diaza-azulens (**5**)

Zusammenfassung

Zu diesem Zweck wurden die Tropolonether **18** und **23** erfolgreich dargestellt. Dabei wurden in den Positionen 3, 5 und 7 des Tropolons jeweils die gleichen Substituenten eingeführt. Zum einen sollte die Einführung in der 5-Position eine Verbesserung der optischen Eigenschaften bewirken und zum anderen sollte die Substitution in der 3- und 7-Position für sterische Abschirmung sorgen, so dass auch hier ein regioselektiver Zugang zu neuen Amino-Diaza-Azulen-Derivaten ermöglicht würde.

Es gelang jedoch nicht weder den Ether **18** noch den Ether **23** erfolgreich mit der Aminosäure **10** umzusetzen. Hier üben die Substituenten entweder einen zu hohen sterischen Effekt aus oder sie wirken auf das Cycloheptatrienyl-System zu deaktivierend, so dass eine Kondensation verhindert wird. Es zeigte sich außerdem, dass große Substituenten in der 3- und 7-Positionen des Tropolonrings keinen positiven Einfluss auf eine regioselektive Steuerung der Reaktion besitzen. Eine Einführung eines einzelnen Substituenten selektiv in die 5-Position gelang nicht.



Schema 4-4: Versuche zur Darstellung der Aminosäuren **19** und **24**

Zusammenfassung

Das Hauptziel dieser Arbeit, Arginin in kleinen Peptiden durch den Aufbau einer fluorophoren Sonde zu markieren, wurde an drei kleinen Peptiden unterschiedlicher Größe erfolgreich getestet (→ Abbildung 4-6). Dabei wurden die oben beschriebenen optimierten Reaktionsbedingungen für die erfolgreiche Markierung der Peptide Boc-Gly-Arg-OH, H-Gly-Gly-Arg-Ala-OH und H-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH (*Thymopentin*) angewendet. Die Produkte **30**, **31**, **34** und **35** wurden isoliert und charakterisiert.

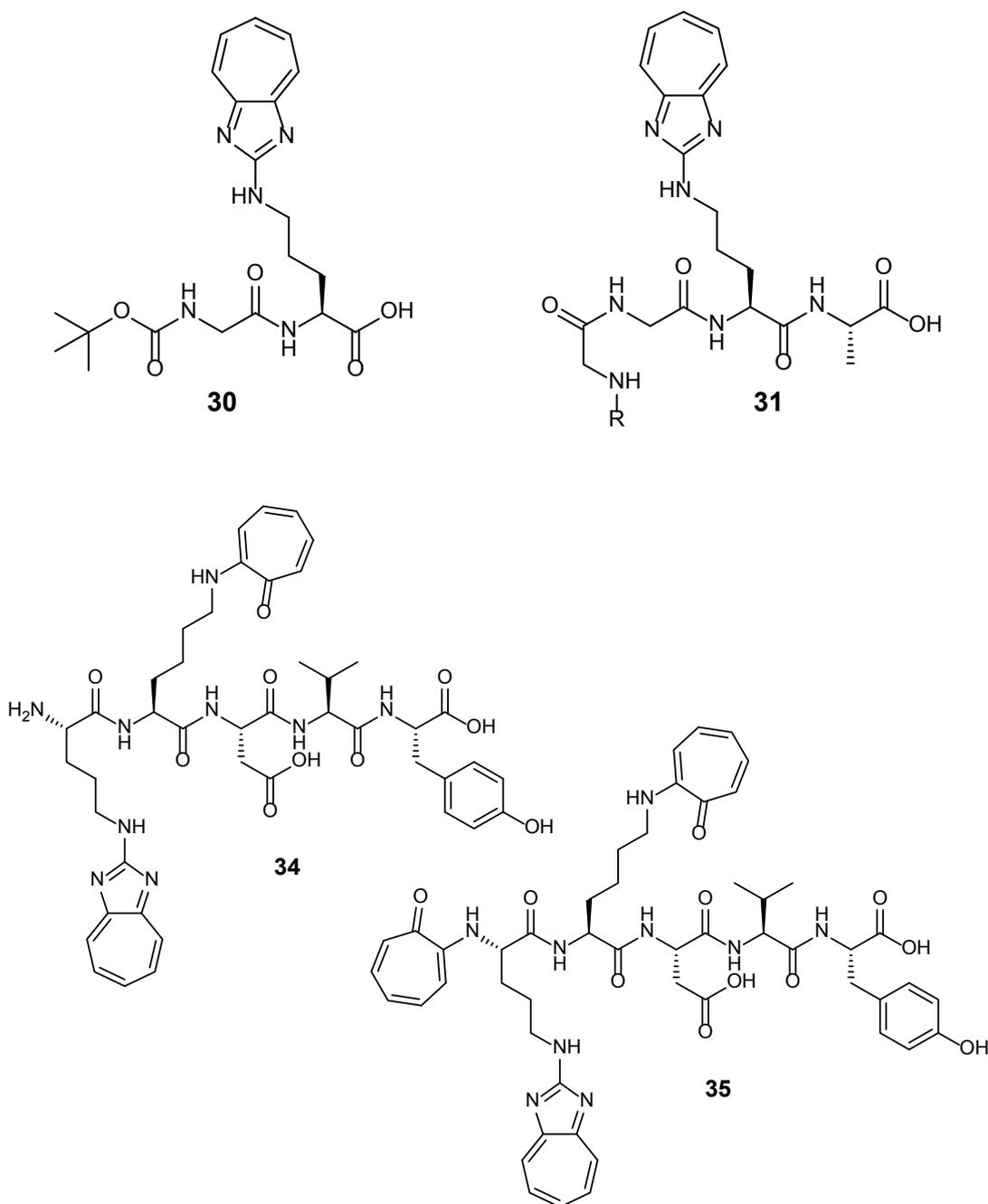
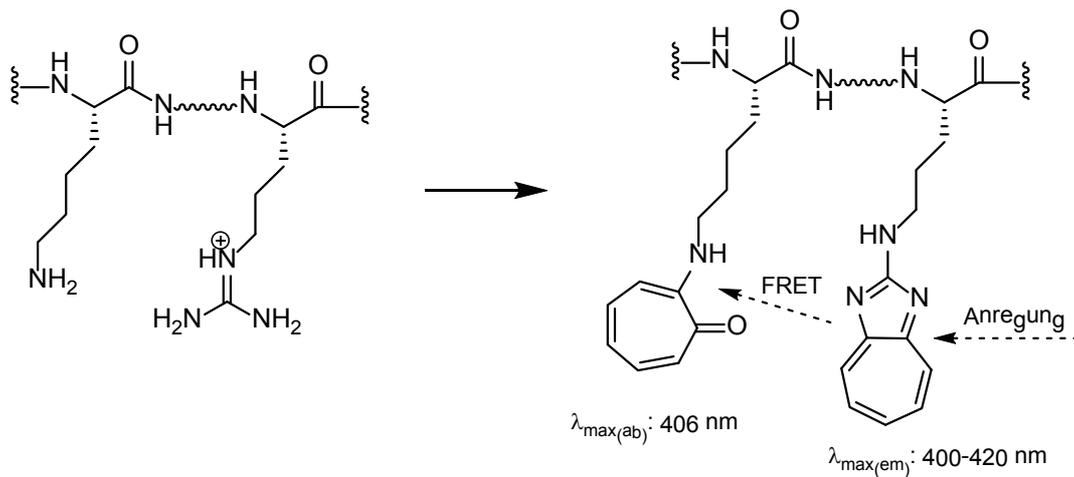


Abbildung 4-3:

Markierung der kleinen Peptide Boc-Gly-Arg-OH, H-Gly-Gly-Arg-Ala-OH und H-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH mit Amini-Diaza-Azulen-Fluorophoren

Zusammenfassung

Mit dem Pentapeptid *Thymopentin*, das neben der Aminosäure Arginin auch Lysin enthält, kondensiert neben der Guanidin-Einheit des Arginins auch die endständige Aminogruppe des Lysins mit dem Tropolonether zu einem Aminotropon-Konjugat, welches nicht fluoresziert. Das so erhaltene Peptid **35** könnte im Hinblick auf potenzielle FRET-Experimente von Interesse sein. Die beiden markierten Peptide **34** und **35** konnten erfolgreich durch Flüssigchromatographie voneinander getrennt und anschließend massenspektrometrisch charakterisiert werden.

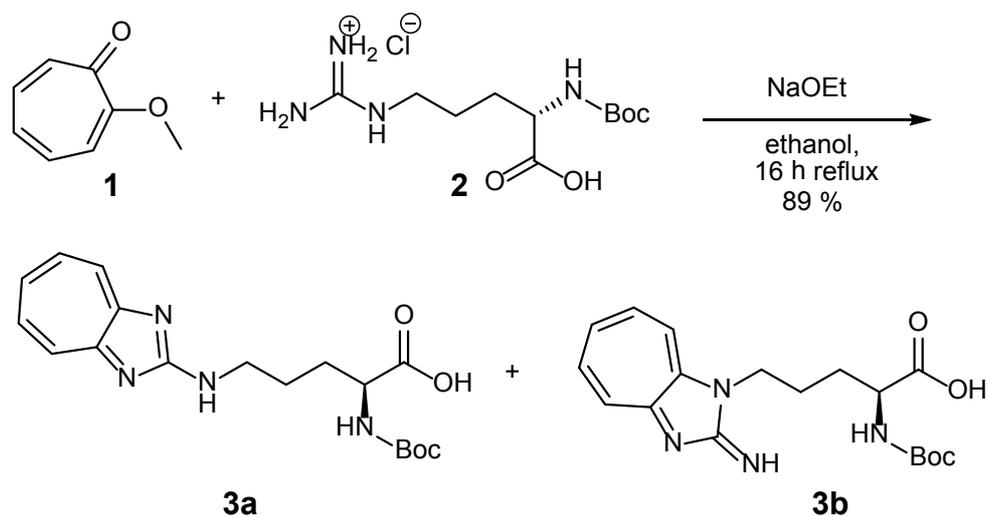


Schema 4-5: Vorschlag für ein FRET-Experiment mit markiertem *Thymopentin*

4. Summary

Summary

In own spadework ^[20] the condensation of a tropolone methyl ether with guanidine hydrochloride ^[16] known from literature was used to transform the guanidine unit of *N*-boc-protected arginine in one-step synthesis into an amino-diaza-azulen unit. Thus, an access to fluorescently labelled arginine was opened. However, this kind of labelling led to a mixture of the two regioisomers **8a** and **8b**:



Scheme 4-1: Reaction of tropolone ether **4** with boc-arg-OH-hydrochloride **7**

The long-term aim of this work was to convert the guanidine unit of the amino acid arginine into the above-described amino-diaza-azulene in order to introduce a fluorescent probe into arginine. The amino acid modified in this way could be used for biochemical implantation. Furthermore, the labelling of arginine in small peptides was attempted by introducing the amino-diaza-azulene fluorophore. For this purpose, the two regioisomers **8a** and **8b** were successfully separated by reversed phase HPLC and, in a preparative scale, by pH-dependent extraction. A thorough characterization, especially by absorption and emission spectroscopy and measurement of the fluorescence quantum yield and life time was performed. It turned out, as a result of this characterization that the symmetric regioisomer **8a** showed the more favorable fluorescence properties. The linear regioisomer **8a** can be easily identified by NMR spectroscopy due to the number of three proton signals in the cycloheptatrienyl range (\rightarrow Figure 4-1 left). Whereas the asymmetric regioisomer **8b** displays 5 signals of the cycloheptatrienyl protons (\rightarrow Figure 4-2 right).

Summary

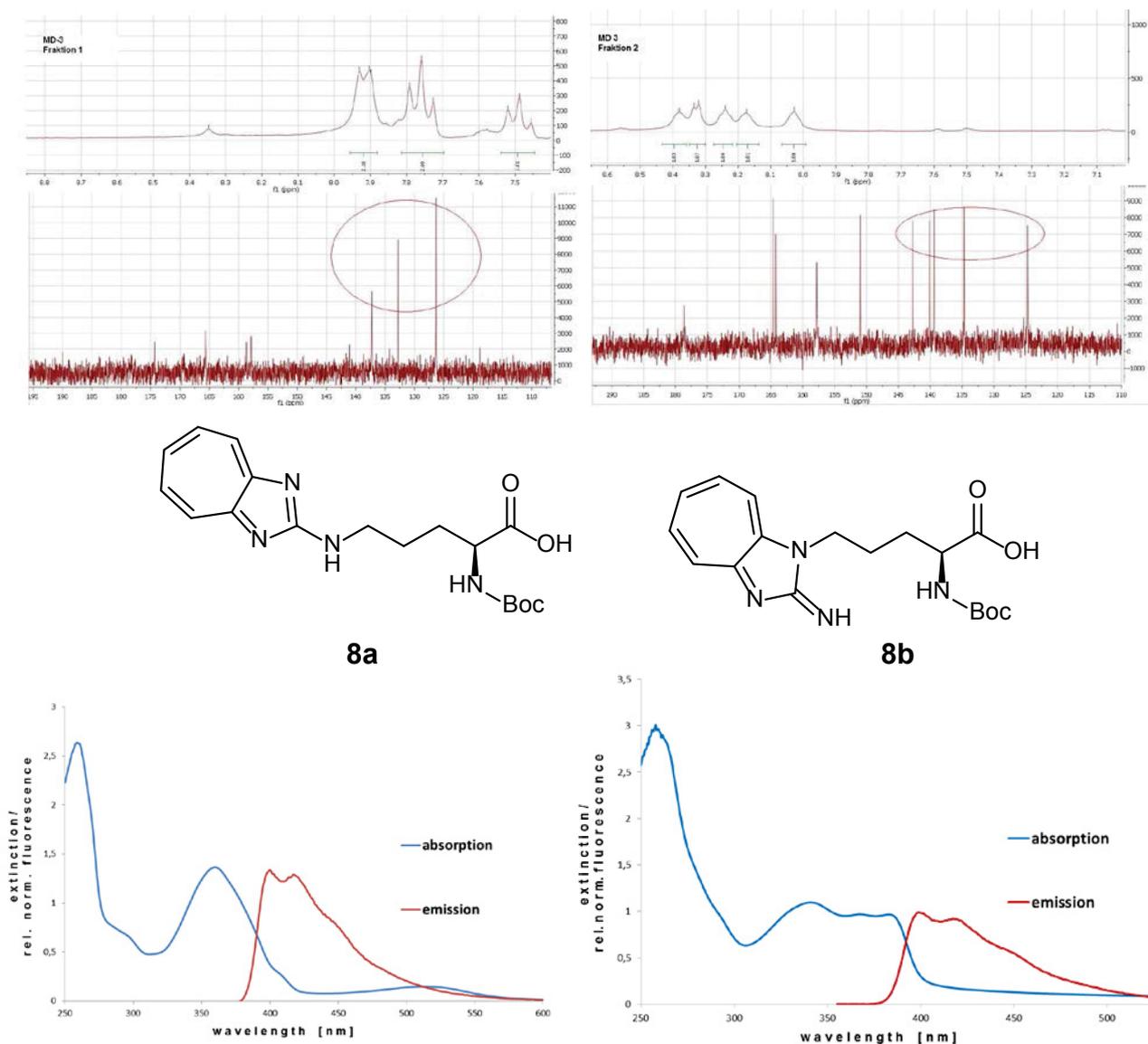
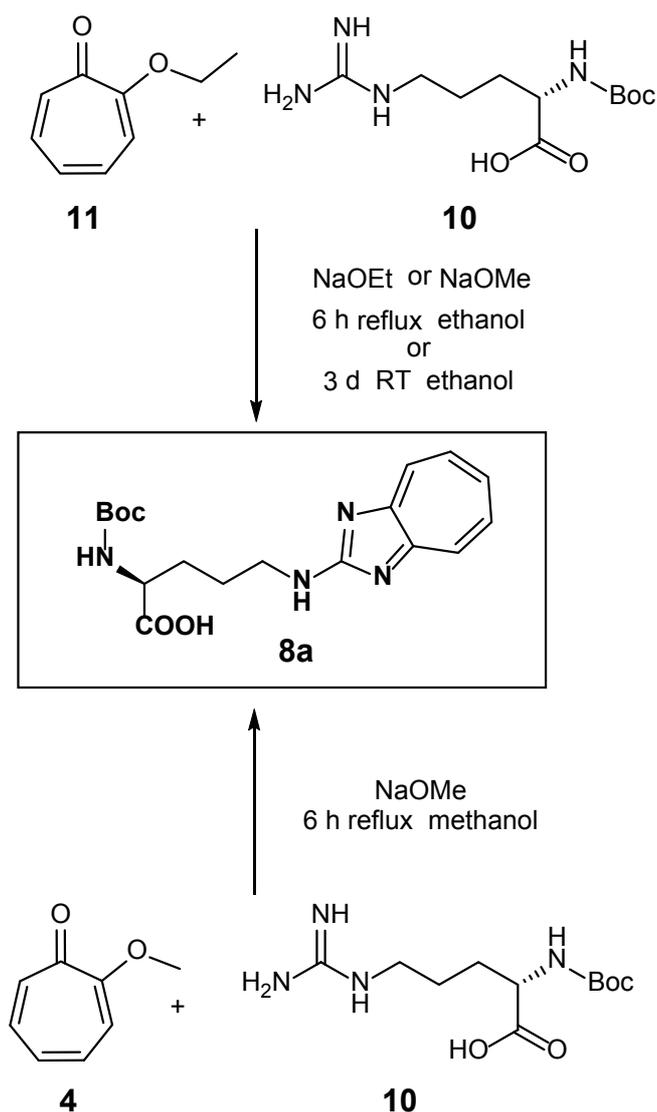


Figure 4-1:

$^1\text{H-NMR}$ - and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra, as well as the absorption and emission spectra of the regioisomers **8a** (left) and **8b** (right) after separating on reversed-phase HPLC

Based on these results, a series of experiments were performed to optimize the original synthesis and solve the problem of ambidoselectivity in the condensation step in order to open a regioselective access to the favored isomer **8a**. This was achieved by replacing the used base sodium ethoxide against sodium methoxide. It was shown that a transesterification of the tropolone methyl ether in the presence of ethoxide anions which apparently favors the non-symmetric regioisomer **8b**. In the presence of methoxide anions, this effect was not observed. Thus, reproducible conditions were elaborated that led to the symmetric isomer **8a** in a regioselective manner.

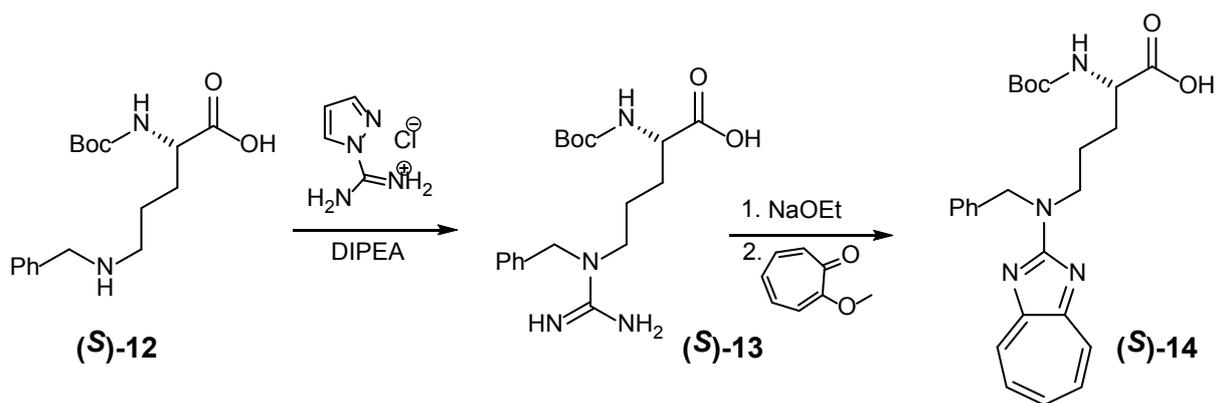
Summary



Scheme 4-2: Regioselective procedure for the preparation of **8a**

Furthermore, an alternative synthetic approach to regio control was realized. For this purpose, (*L*)- N^{α} -BOC- N^{ω} -benzylornithin **12**^[39] was converted into guanidine **13** with 1*H*-pyrazole-1-carboxamide. In the subsequent condensation with tropolone methyl ether **4**, guanidine **13** led to N^{ω} -benzyl-protected amino-diaza-azulen **14** by using sodium ethoxide as base. In particular the characteristic proton signals in the ¹H NMR spectra prove the success of this concept.

Summary



Scheme 4-3: Synthesis of labelled amino acid (**S**)-14 starting from N^o-alkylated (**S**)-ornithine

Whereas the hydrocarbon azulene is known for its anomalous fluorescence that originates from a $S_0 \leftarrow S_2$ transition^[16], the fluorophore of the 1,3-diaza-azulene - the longest wavelength absorption is located at 450 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$ transition) - does not show this anomaly, because the fluorescence is caused here by the emission from the lowest singlet state.^[46] Gaussian 03-BC calculations^[24] of the 2-amino-1,3-diaza-azulene **5** were performed. These calculations revealed (\rightarrow Figure 4-2) that both HOMO and LUMO in position 6 have large orbital coefficients. Therefrom, it seems to be plausible that changing the optical properties of fluorescently-labeled arginine should be possible by introducing substituents of different electronic character in that position. Such derivatives could have a larger Stokes shift which is desirable in order to minimize the overlap of absorption and emission.

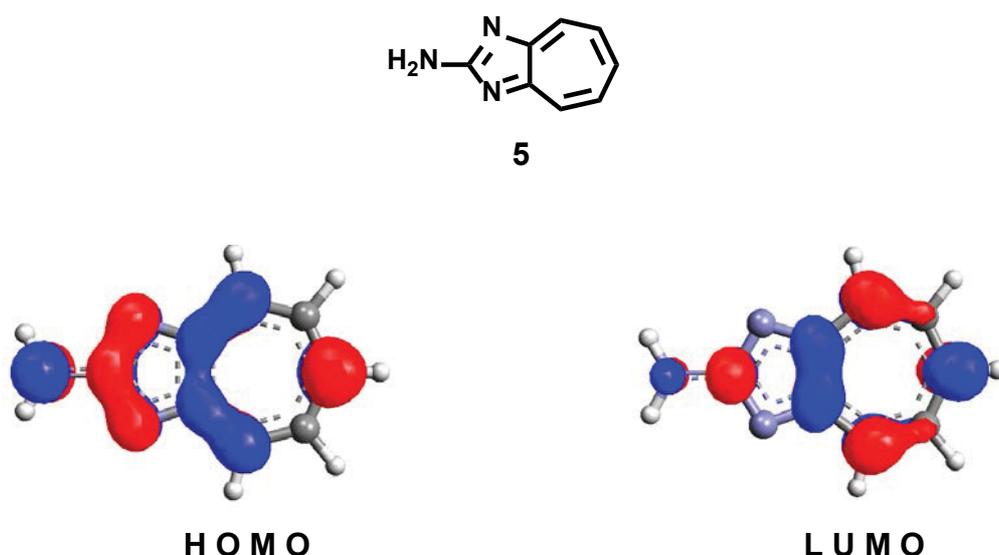
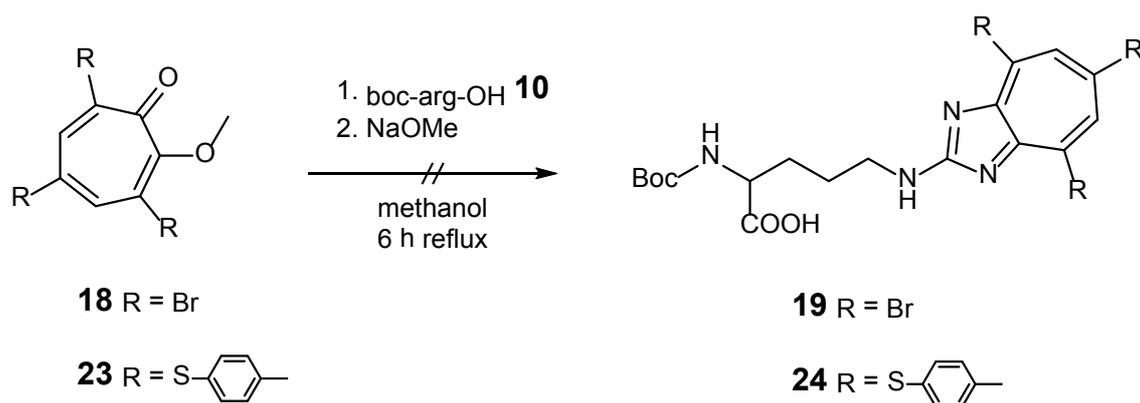


Figure 4-2: Calculated HOMO and LUMO orbitals of 2-amino-1,3-diaza-azulene (**5**)

Summary

For this purpose, the tropolone ethers **18** and **23** were synthesized. In each case identical substituents have been introduced in positions 3, 5 and 7 of tropolone. On the one hand, the introduction of substituents into the 5-position should result in an improvement of the optical properties and, on the other hand the substitution in the 3 - and 7-position should provide steric hindrance, so that a change of higher regioselectivity in favor of symmetric amino-diaza-azulene derivatives could be opened.

Unfortunately, attempted condensations of the ethers **18** or **23** with the amino acid **10** failed. Either the steric hindrance of the substituents or the deactivating electronic effects on the cycloheptatrienyl system prevent a condensation. It was also found that large substituents in the 3 - and 7-position of tropolone rings do not have a positive impact on the regio control of the reaction. A selective introduction of a single substituent in the 5-position did not succeed.



Scheme 4-4: Attempts to synthesize the amino acids **19** and **24**

Another aim of this work was the labelling of arginine in small peptides by the intrinsic implantation of the fluorophore diaza-azulene. Three small peptides of different sizes were successfully tested (→ Figure 4-6). The above-described optimized reaction conditions were used for the successful labelling of the peptides boc-gly-arg-OH (GR), H-gly-gly-arg-ala-OH (GGRA) and H-arg-lys-asp-val-tyr-OH (RKDVY) (*Thymopentin*, TP-5), and the products **30**, **31**, **34** and **35** were isolated and characterized.

Summary

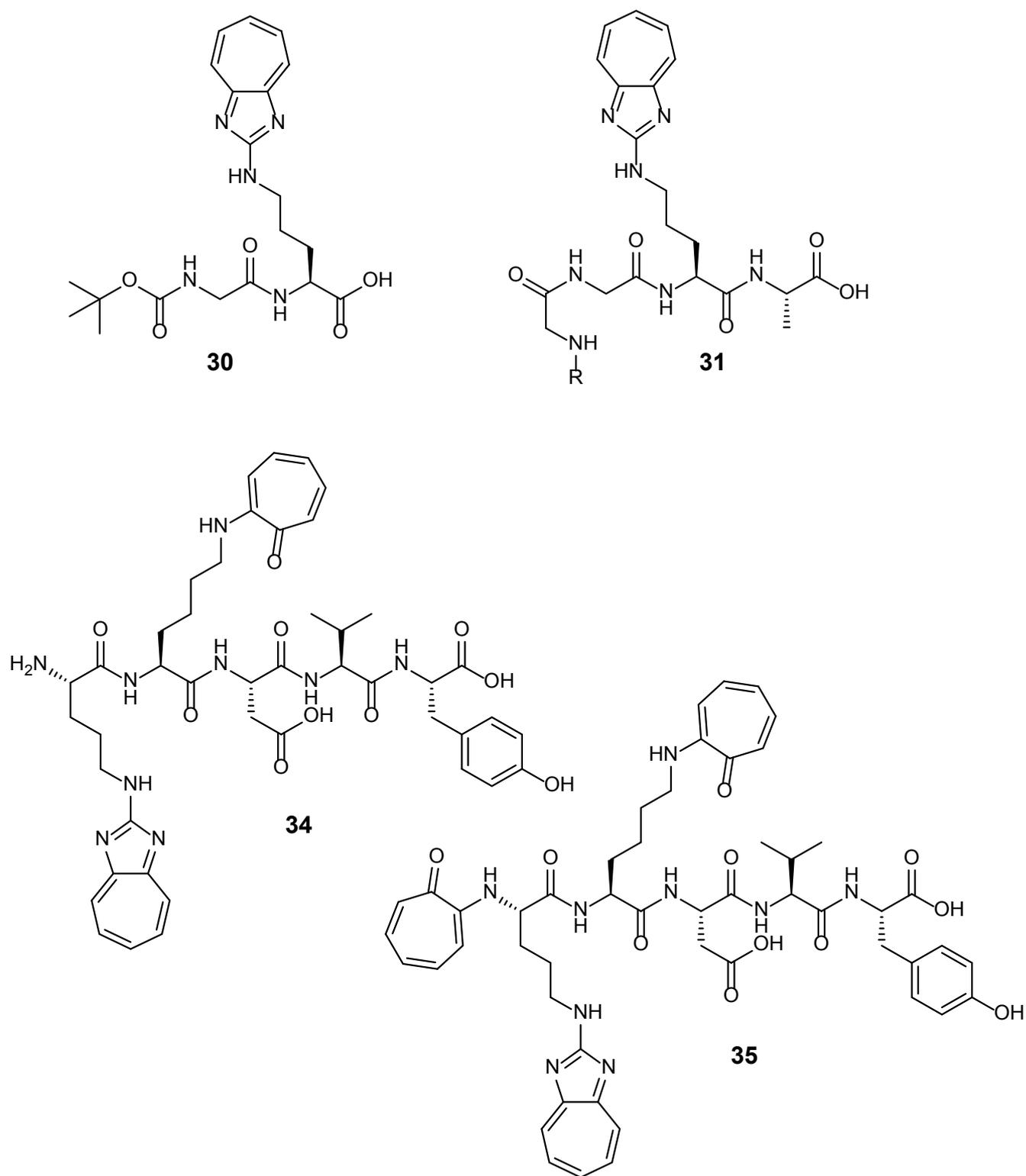
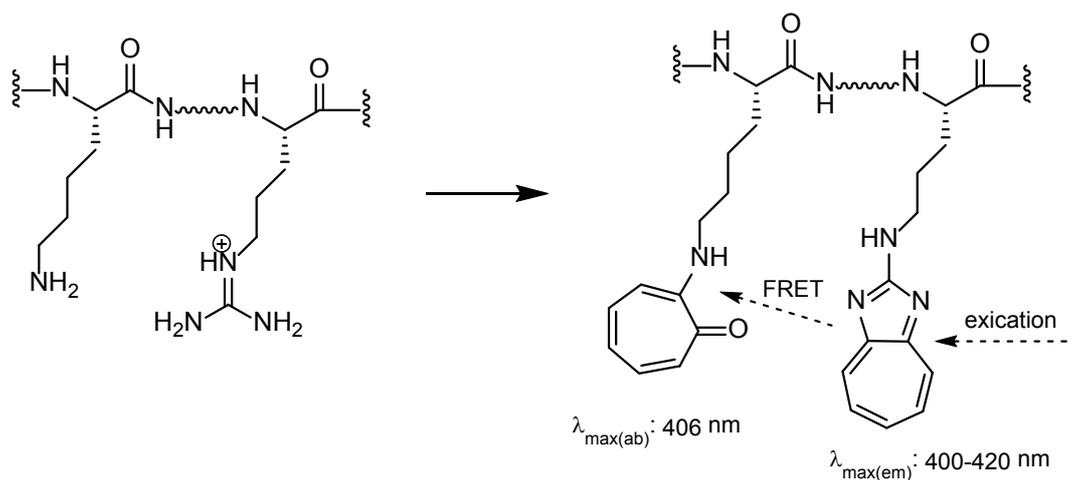


Figure 4-3:

Labelling of the small peptides Boc-gly-arg-OH (GR), $\text{H-gly-gly-arg-ala-OH}$ (GGRA) and $\text{H-arg-lys-asp-val-tyr-OH}$ (RKDVY) by the amino-diaza-azulene fluorophore

Summary

The pentapeptide *Thymopentin* which contains, in addition to arginine, the amino acid lysine, whose terminal amino group in the side chain also condenses with the tropolone ether to give product **34**. Although the presence of lysine led to an aminotropolone conjugate, the latter group does not show any fluorescence. The presence of this chromophore and the fluorophore could be used for further spectroscopic studies of labelled peptides, e.g. by FRET experiments.



Scheme 4-5: Proposed FRET-experiment with labelled *Thymopentin*

5. Experimentalteil

5.1 Chemikalien

Substanz:	Hersteller:	Produkt-Nr.:	CAS-Nr.:
Boc-Arg-OH HCl (7)	Aldrich	15063	35897-34-8
Boc-Arg-OH (10)	Bachem	A-1200	13726-76-6
L-Arginin	Aldrich	A5006	74-79-3
Boc-Lys-OH (53)	Aldrich	15456	13734-28-6
L-Lysin	Aldrich	62840	56-87-1
Boc-Orn-OH (52)	Bachem	A-2865	21887-64-9
Boc-Gly-Arg-OH (25)	Bachem	A-1745	39621-72-2
H-Gly-Gly-Arg-Ala-OH Acetat (26)	Bachem	H-3310	-
Thymopentin Acetat (27)	Bachem	H-5805	69558-55-0
Guanidin HCl $\geq 98\%$	Carl Roth	6069.2	50-01-1
Iodmethan	Merck	8060640050	74-88-4
Bromethan	Aldrich	124052	74-96-4
Natriumethanolat	Aldrich	71210	141-52-6
Natriummethanolat 25 wt% in Methanol	Aldrich	156256	124-41-4
<i>p</i> -Thiokresol, $\geq 98\%$ (20)	Alfa Aesar	B24970	106-45-6
Natriumborhydrid z. Synthese	AppliChem	A0549	16940-66-2
<i>N</i> -Ethyldiisopropylamin, $\geq 98\%$	Fluka	03440	7087-68-5
1-Amidinopyrazol HCl, $\geq 98\%$	TCI Europe	A2055	4023-02-3
Tropolon (16), $\geq 98\%$	Alfa Aesar	A11299	533-75-5
	TCI Europe	T0606	533-75-5

5.2 Materialien und Geräte

Dünnschichtchromatographie	DC-Alufolien Kieselgel 60 mit UV-Indikator F254 Fa. Merck	
Säulenchromatographie	Kieselgel 60 M Fa. Macherey-Nagel	Cellulose Fa. Carl Roth
¹ H-NMR-Spektroskopie	300 MHz: Bruker Avance III - 300 600 MHz: Bruker Avance III - 600	
¹³ C{ ¹ H}-NMR-Spektroskopie	75 MHz: Bruker Avance III - 300 150 MHz: Bruker Avance III - 600	
Massenspektrometrie	GC/MS: Thermo Finnigan Trace DSQ ESI: Ion-Trap-API-Massenspektrometer Finnigan LCQ Deca EI: Triple-Quadrupol-Massenspektrometer Finnigan TSQ 7000 MADI: Bruker Ultraflex I HR-MS: Bruker UHR-QTOF maXis 4G	
C,H,N Elementaranalyse	Serie II CHN-Analysator 2400 Perkin Elmer Messfehler: +/- 0.35 %	

Experimentaltteil

Absorptionsspektroskopie:

UV/VIS-Spektren wurden an einem Absorptionsspektrometer des Typs Varian Cary 300 in Quarzglasküvetten und bei einer Temperatur von 25 °C in spektroskopisch reinem Lösungsmittel aufgenommen.

Fluoreszenzspektroskopie:

Fluoreszenz-Spektren wurden an einem Fluorolog-3 der Firma Horiba Jobin Yuon in Fluoreszenzküvetten aus Quarzglas bei einer Temperatur von 25 °C in spektroskopisch reinem Lösungsmittel aufgenommen. Als Lichtquelle diente eine Xenon-Lampe. Um Reabsorptionseffekte zu vermeiden, wurde die Konzentration der zu messenden Proben so eingestellt, dass ein Wert von 0.01 bei der Absorption der Probe nicht überschritten wurde.

Zur Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute diente Cumarin-120 als Referenzsubstanz.

Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie:

Zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer wurden Fluoreszenzabklingkurven mittels zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung (TCSPC, engl.: *time-correlated single photon counting*) an einer Data Hub der Firma Horiba Jobin Yuon gemessen.

5.3 Lösungsmittel

n-Hexan:

Zur Reinigung wird technisches n-Hexan zum Sieden erhitzt, und über eine Füllkörper Kolonne abdestilliert.

Ethanol / Methanol:

Nach mehrtägigem Rühren über Magnesiumspäne (5 g/l) wird einige Stunden zum Sieden erhitzt, und abdestilliert. Der Alkohol wird über Molekularsieb 3 Å aufbewahrt.

Dichlormethan:

Zum Trocknen wird das Lösungsmittel für mehrere Stunden über Calciumhydrid unter Rückfluss erhitzt. Anschließend werden die benötigten Mengen frisch über eine Kolonne abdestilliert.

Chloroform:

Zur Reinigung wird technisches Chloroform zum Sieden erhitzt, und über eine Füllkörper Kolonne abdestilliert.

5.4 Allgemeine Arbeitstechniken

Die in dieser Arbeit beschriebenen Reaktionen wurden, soweit nicht anders beschrieben, unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss (inert), durchgeführt. Diese Bedingungen konnten über eine Stickstoff-/Vakuum-Linie erzeugt werden.

Dabei gelangt der Stickstoff zuerst über die universitätseigene Leitung durch ein mit Silikonöl gefüllten Blasenähler und anschließend durch einen, mit Sicapent® (Phosphorpentoxid) gefüllten Trockenturm, zum Reaktionsgefäß. Das Sicapent zeigt die absorbierte Feuchtigkeit durch einen Farbumschlag von weiß nach blau an. Der Linie ist ein Quecksilberüberdruckventil nachgeschaltet, über das der Stickstoff wieder entweichen kann. Das benötigte Vakuum wird durch eine Öldrehschieberpumpe (Vacuumbrand GmbH & Co) erzeugt. Die Pumpe konnte mittels Reduzierventil auf das benötigte Vakuum geregelt werden. Vor jeder Reaktion wurden die Kolben durch dreimaliges Evakuieren und anschließendes Begasen sekuriert. Die Zugabe der Reagenzien, nach dem Sekurieren des Kolbens, erfolgte durch Einstechen, mit Hilfe von Spritzen mit Kanülen, in ein Septum. Feststoffe wurden entweder schon zuvor im Kolben mit sekuriert, oder anschließend im Stickstoffgegenstrom zugegeben.

5.5 Darstellungen

5.5.1 3,5,7-Tribrom-2-hydroxycyclohepta-2,4,6-trien-1-on (17) ^[25]

In einem 100 ml Zweihalskolben mit Magnetrührstab und Tropftrichter werden 0.5 g (4.0 mmol) Tropolon **16** vorgelegt, dreimal sekuriert und in 10 ml abs. Methanol gelöst. Bei Raumtemperatur werden 2.0 g (0.64 ml, 13.5 mmol) Brom in 5 ml abs. Methanol über den Tropftrichter zu der Lösung getropft und 30 Minuten weitergerührt. Es bildet sich ein weiß-gelber Niederschlag, welcher im Anschluss abfiltriert und mit kaltem Methanol gewaschen wird. Zur Bestimmung der Ausbeute wird der abgezogene Feststoff über Nacht im Trockenschrank bei 80 °C getrocknet.

Ausbeute: 0.51 g (1.4 mmol, 35 % d. Th.)

Smp.: > 300 °C

El-MS m/z (rel. Ab.): 61 (20.02), 62 (34.90), 141 (25.70), 143 (25.40), 171 (4.34), 172 (11.52), 222 (14.84), 223 (19.17), 250 (13.18), 328 (34.99), 329 (100), **358 (84.16)**, 359 (12.17), 360 (81.22)

5.5.2 2-Hydroxy-3,5,7-tris(*p*-tolylthio)cyclohepta-2,4,6-trien-1-on (22) ^[31]

In einem 50 ml-Zweihalskolben mit Magnetrührstab und Abgang zur Stickstoff-Vakuum-Linie werden 0.10 g (0.28 mmol) des Tribromtropolon **17**, 0.10 g (0.81 mmol) *p*-Thiokresol und 30 mg (0.75 mmol) Natriumhydroxid vorgelegt, dreimal sekuriert und in 3 ml Pyridin gelöst. Die Lösung wird für 1 Stunden zum Rückfluss erhitzt und anschließend für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Durch die Zugabe von Essigsäure wird ein pH-Wert von ca. 4 eingestellt. Die Lösung gekühlt wird sodann gekühlt und der ausfallende Feststoff im Anschluss abfiltriert.

Ausbeute: 0.11 g (0.25 mmol, 88 % d. Th.)

Smp.: 183.5-184.4 °C

stimmt mit Literatur ^[31] überein

HR-MS: berechnet: 489.10112; gefunden: 489.10087

5.5.3 2-Chlorcyclohepta-2,4,6-trien-1-on (9) ^[32]

In einem 50 ml Zweihalskolben mit Magnetrührstab und Abgang zur Stickstoff-Vakuum-Linie werden 1.00 g (8.20 mmol) Troplon **16** vorgelegt, dreimal sekuriert und in 25 ml abs. Benzol gelöst. Nach Zugabe von 1.07 g (8.99 mmol) Thionylchlorid wird für 2 Stunden zum Rückfluss erhitzt, wobei sich die Lösung tief rot färbt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer, wird der Rückstand mit Hexane gewaschen und im Anschluss säulenchromatographisch gereinigt (Hexan/Ethylacetat 35:65). Man erhält einen blass braunen Feststoff.

Ausbeute: 0.96 g (6.83 mmol; 83% d. Th.)

GC-MS m/z (%): 50 (24), 51 (35), 77 (100), 112 (100), **140 (61)**, 142 (21)

5.5.4 2-(Butylamino)cyclohepta-2,4,6-trien-1-on (30) ^[33]

In einem 100 ml Zweihalskolben mit Magnetrührstab und Abgang zur Stickstoff-Vakuum-Linie werden 0.27 g (2.0 mmol) Tropolonmethylether **4** vorgelegt, dreimal sekuriert und in einem Gemisch aus 15 ml dest. Wasser und 15 ml abs. Ethanol gelöst. Anschließend werden 0.2 ml (2.0 mmol) Butylamin zu der Lösung gegeben und 4 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationverdampfer entfernt, der Rückstand in wenig dest. Wasser gelöst und dreimal mit 30 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde zur weiteren Aufreinigung im Anschluss aus Methanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 0.32 g (1.8 mmol, 90% d. Th.)

GC-MS m/z (rel. Ab.): 77 (27), 106 (30), 134 (100), 148 (75), **177 (84)**

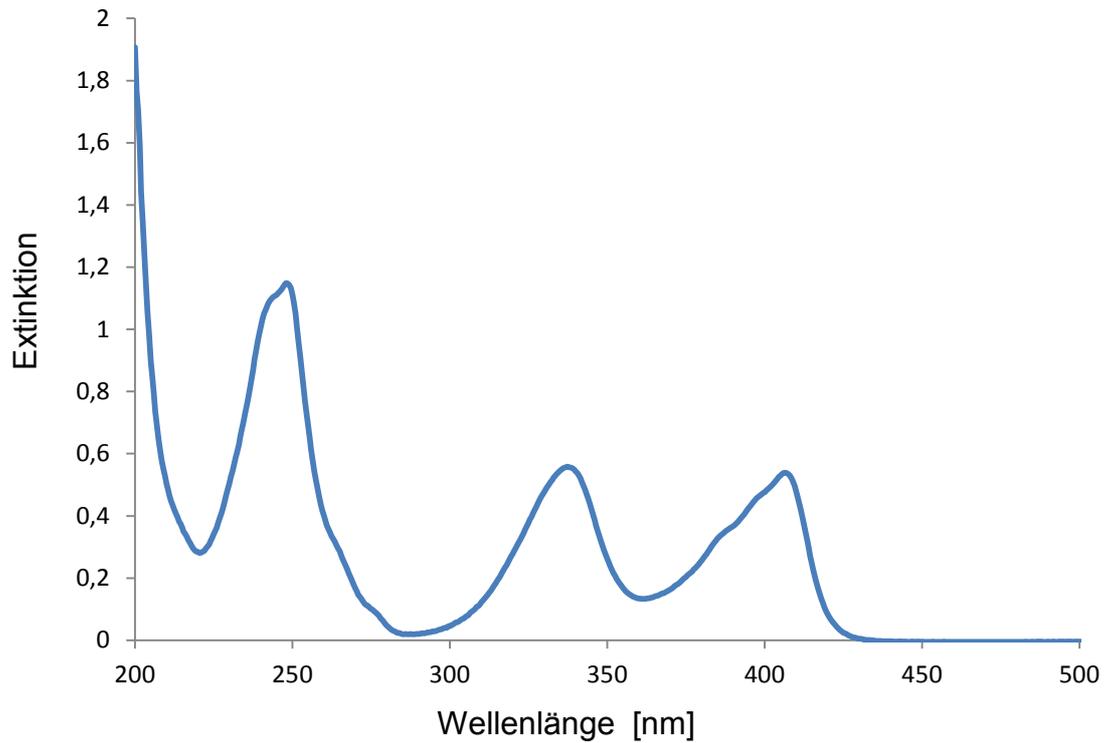


Abbildung 5.5-1: Absorptionsspektrum von 2-Butylaminotropon **30**

Art der Messung:

qualitativ

λ_{\max} [nm] gemessen: 248, 337.5, 406.5

λ_{\max} [nm] Literatur^[46]: 337, 406

Fluoreszenzspektroskopische Messungen zeigten keine Emissionserscheinung bei der Verbindung **30**

5.5.5 2-(Butylthio)cyclohepta-2,4,6-trien-1-on (31) ^[34]

In einem 100 ml Zweihalskolben mit Magnetrührstab und Abgang zur Stickstoff-Vakuum-Linie werden 0.27 g (2 mmol) Tropolonmethylether **4** vorgelegt, dreimal sekuriert und in einem Gemisch aus 15 ml dest. Wasser und 15 ml abs. Ethanol gelöst. Anschließend werden 0.27 g (4 mmol) Natriumethanolat und 0.21 ml (2 mmol) Butanthiol zu der Lösung gegeben und 4 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationverdampfer entfernt, der Rückstand in wenig dest. Wasser gelöst und dreimal mit 30 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und vom Lösungsmittel befreit. Das Rohprodukt wurde zur weiteren Aufreinigung im Anschluss aus Methanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 0.16 g (0.8 mmol, 41 % d. Th.)

GC-MS m/z (rel. Ab.): 77 (55), 105 (100), 109 (50), 110 (72), 134 (67), 151 (60), 152 (100), 160 (30), 161 (100), 165 (66), **194 (25)**

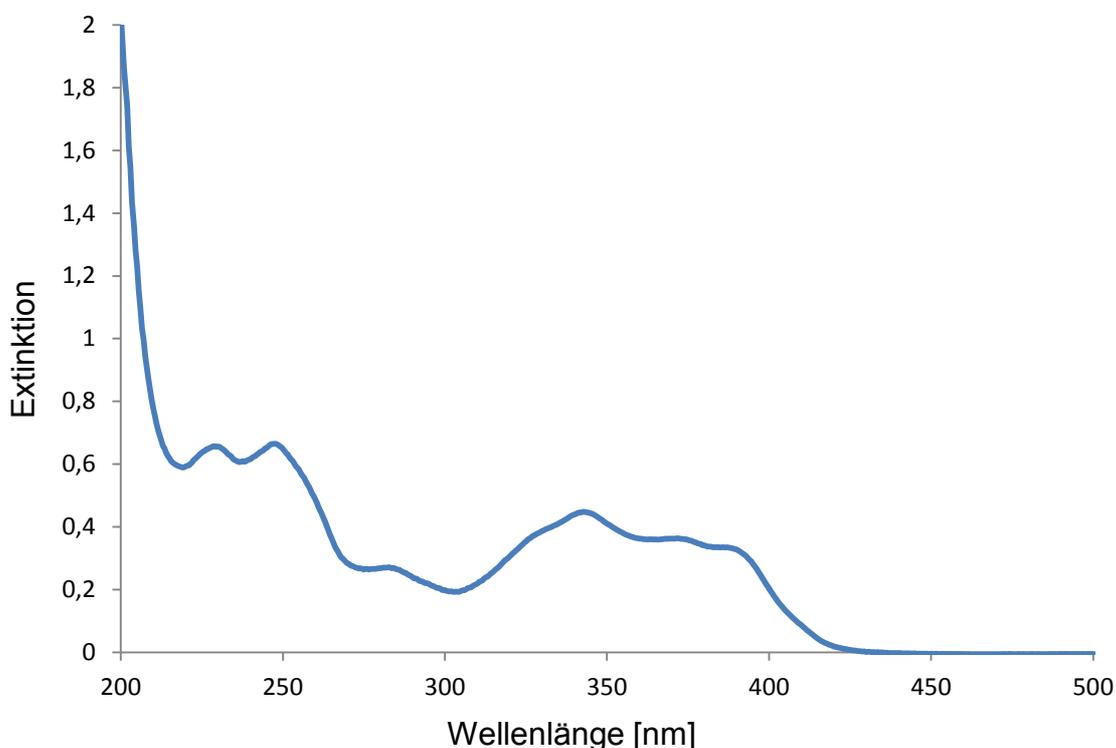


Abbildung 5.5-2: Absorptionsspektrum von 2-Butylthiotropon **31**

Experimententeil

Art der Messung: qualitativ
 λ_{\max} [nm] gemessen: 247.5, 342.5
 λ_{\max} [nm] Literatur ^[34]: 343

Fluoreszenzspektroskopische Messungen zeigten keine Emissionserscheinung bei der Verbindung **31**.

5.5.6 Darstellung der Tropolonether

5.5.6.1 2-Methoxycyclohepta-2,4,6-trien-1-on (**4**) ^[35]

In einem 100 ml Zweihalskolben mit Magnetührstab, Septum, Rückflusskühler und Abgang zur Stickstoff-Vakuum-Linie werden 1.42 g (10 mmol) Iodmethan zu einer Mischung aus 0.50 g (4.1 mmol) Tropolon **9** und 2.26 g (16.4 mmol) Kaliumcarbonat in 20 ml abs. Acetonitril gegeben. Die entstehende Suspension wird 36 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer, wird der Rückstand in 20 ml dest. Wasser resuspendiert. Die erhaltene Lösung wird dreimal mit 20 ml Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, abfiltriert und vom Lösungsmittel befreit. Es verbleibt ein bräunliches Öl.

Ausbeute: 0.53 g (3.9 mmol; 94 % d. Th.)

GC-MS m/z (rel. Ab.): 65 (50), 77 (52), 78 (64), 105 (100), 107 (56), **136 (78)**

¹H-NMR (300 MHz, MeOD):

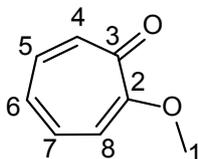
3.98 (3H, s, **CH**₃-O-), 7.01-7.07 (1H, m, C(=O)-C(OMe)=CH-**CH**=CH-CH=CH-), 7.11 (1H, d, ³J=10.0, -C(=O)-C(OMe)=**CH**-CH=CH-CH=CH-), 7.23 (1H, dt, J=12.1,0.8, -C(=O)-C(OMe)=CH-CH=CH-**CH**=CH-), 7.36-7.27 (1H, m, -C(=O)-C(OMe)=CH-CH=CH-**CH**-), 7.43 (1H, ddd, J=12.1, 8.4, 1.3, -C(=O)-C(OMe)=CH-CH=CH-**CH**=CH-) ppm.

Experimententeil

^{13}C -NMR (75 MHz, MeOD):

56.99 (1), 115.62 (8), 130.01 (6), 135.46 (7), 137.03 (5), 139.59 (4), 166.83 (2), 182.28 (3) ppm.

stimmt mit Literatur^[34] überein.



Fluoreszenzspektroskopische Messungen zeigten keine Emissionserscheinung bei der Verbindung **4**

5.5.6.2 2-Ethoxycyclohepta-2,4,6-trien-1-on (**11**) ^[35]

In einem 100 ml Zweihalskolben mit Magnetrührstab und Rückflusskühler werden 18.0 mmol (2.00 g) Bromethan zu 4.1 mmol (0.50 g) Tropolon und 16.4 mmol (2.26 g) Kaliumcarbonat in 20 ml Acetonitril gegeben. Die entstehende Suspension wird 72 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer, wird der Rückstand in 20 ml dest. Wasser resuspendiert. Die erhaltene Lösung wird dreimal mit 20 ml Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, abfiltriert und vom Lösungsmittel befreit. Das Rohrprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Hexan/Ethylacetat 3:1). Es verbleibt eine dunkelbraune bis schwarze zähflüssige Substanz.

Ausbeute: 0.44 g (2.9 mmol; 71 % d. Th.)

GC-MS m/z (rel. Ab.): 94 (67), 105 (100), 106 (62), **150 (54)**

^1H -NMR (600 MHz, MeOD):

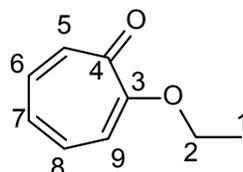
1.51 (3H, t, $^3J=7.0$, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-}$), 4.20 (2H, q, $^3J=7.0$, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-}$), 7.07 (1H, dd, $J=10.6$, 8.5, $\text{-C(=O)-C(OEt)=CH-CH=CH-CH=CH-}$), 7.13 (1H, d, $^3J=10.1$, $\text{-C(=O)-C(OEt)=CH-CH=CH-CH=CH-}$), 7.25 (1H, d, $^3J=12.1$, $\text{-C(=O)-C(OEt)=CH-CH=CH-CH=CH-}$), 7.31 (1H, td, $J=10.3$, 1.1, $\text{-C(=O)-C(OEt)=CH-CH=CH-CH=CH-}$), 7.47 (1H, ddd, $J=12.1$, 8.5, 1.2, $\text{-C(=O)-C(OEt)=CH-CH=CH-CH=CH-}$) ppm.

Experimentaltteil

^{13}C -NMR (75 MHz, MeOD):

14.61 (1), 66.44 (2), 116.23 (9), 129.23 (7), 135.54 (8), 137.10 (6), 139.41 (5),
1.66.31 (3), 182.32 (4) ppm.

stimmt mit Literatur^[34] überein.



5.5.6.3 3,5,7-Tribrom-2-methoxycyclohepta-2,4,6-trien-1-on (18) ^[36]

In einem 100 ml Zweihalskolben mit Magnetrührstab, Septum und Abgang zur Stickstoff-Vakuumlíne werden 2.0 g (5.6 mmol) Tribromtropolon und 2.2 g (8.4 mmol) Triphenylphosphin vorgelegt und dreimal sekuriert. Anschließend werden 0.36 ml (8.8 mmol) abs. Methanol und 15 ml Diethylether zugegeben. Die Lösung wird auf -10 °C gekühlt und sodann werden tropfenweise 0.4 ml (2.1 mmol) DIAD zugegeben. Nach beendeter Zugabe lässt man die Lösung auf Raumtemperatur erwärmen und rührt für 12 Stunden weiter. Nachdem das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingeengt wurde, wird der Rückstand in wenig Cyclohexan aufgenommen, über Kieselgel abfiltriert und an der Vakuumpumpe getrocknet.

Ausbeute: 0.18 g (0.47 mmol, 34 % d. Th.)

GC-MS m/z (rel. Ab.): 61 (42), 62 (75), 141 (61), 143 (60), 261 (50), 263 (100), 265 (52), 329 (45), 331 (46), 342 (48), 344 (52), **372 (36)**, 374 (34)

5.5.6.4 2-Methoxy-3,5,7-tris(*p*-tolylthio)cyclohepta-2,4,6-trien-1-on (23)

In einem 100 ml Zweihalskolben mit Magnetrührstab und Abgang zur Stickstoff-Vakuum-Linie werden 0.11 g (0.25 mmol) des *p*-Tolylthiotropolon **22** und 0.55 (4.0 mmol) Kaliumcarbonat vorgelegt und dreimal sekuriert. Anschließend werden 30 ml Acetonitril zugegeben und über ein Septum mittels einer Spritze 0.09 g (0.60 mmol) Iodmethan langsam zu der Lösung getropft, welche sodann 18 Stunden zum Rückfluss erhitzt wird. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer, wird der Rückstand in 15 ml dest. Wasser resuspendiert. Die erhaltene Lösung wird dreimal mit 20 ml Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, abfiltriert und vom Lösungsmittel befreit.

Ausbeute: 0.12 g (0.23 mmol, 92 % d. Th.)

HR-MS: berechnet: 503.1168; gefunden: 503.1164

5.5.7 Darstellung der nicht-natürlichen Aminosäuren

5.5.7.1 Als Gemisch der Regioisomere 2-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-5-(cyclohepta[*d*]imidazol-2-ylamino)-pentansäure (8a) und 2-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-5-(2-iminocyclohepta[*d*]imidazol-1(2*H*)-yl)-pentansäure (8b)

In einem 100 ml Zweihalskolben mit Magnetrührstab, Septum, Rückflusskühler und Abgang zur Stickstoff-/Vakuum-Linie werden 0.54 g (4 mmol) des Tropolonether **4** eingewogen, sekuriert und in 40 ml abs. Ethanol gelöst. Anschließend werden 1.24 g (4 mmol) Boc-Arg-OH-hydrochlorid **10** und 0.54 g (8 mmol) Natriumethanolat im Stickstoffgegenstrom zu der Lösung gegeben und 16 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer, wird der Rückstand in 40 ml dest. Wasser resuspendiert und mit einigen ml 0.1 M Salzsäure versehen, so dass ein pH-Wert von 7 nicht überschritten wird. Die erhaltene Lösung wird dreimal mit 30 ml Chloroform extrahiert.

Experimentarteil

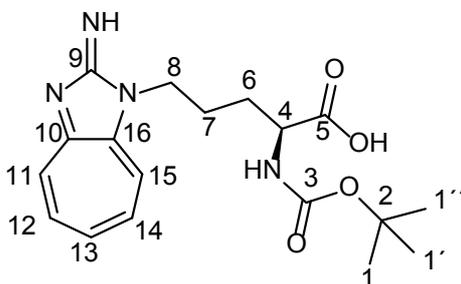
Die wässrige Phase wird am Rotationsverdampfer eingengt und der erhaltene bräunliche Feststoff wird in abs. Methanol gelöst, wobei das ausfallende Salz abfiltriert und das Filtrat vom Lösungsmittel befreit wird. Aus dem nun gewonnen bräunlich-violetten Feststoff wird eine gesättigte wässrige Lösung hergestellt zu der eine gesättigte Ammoniumfluorid-Lösung gegeben wird, wobei die Aminosäure als rot-violetter Niederschlag ausfällt. Man lässt die rot-violette Lösung so lange stehen, bis sie sich vollständig entfärbt hat. Der Niederschlag wird abgesaugt und getrocknet. Man erhält das Produkt als violett-roten Feststoff.

Ausbeute: 1.32 g (3.6 mmol; 89% d. Th.)

Smp: 114.8-115.3 °C

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD): 1.40-1.44 (9H, m, *tert.*-Butyl), 1.76-2.00 (4H, m, HO-C(=O)-CH-**CH**₂-**CH**₂-CH₂-N-C=NH), 3.91-4.17 (2H, m, HO-C(=O)-**CH**-CH₂-CH₂-CH₂-N-C=NH), 4.35-4.50 (2H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-**CH**₂-N-C=NH), 8.00-8.11 (1H, m, *tert.*-Butyl-O-C(=O)-**NH**-), 8.16 (1H, t, $^3J=9.8$, -N=C-CH=CH-**CH**=CH-CH=C-N-), 8.31 (1H, t, $^3J=10.1$, -N=C-CH=**CH**-CH=CH-CH=C-N-), 8.37 (1H, t, $^3J=10.0$, -N=C-CH=CH-**CH**-CH=C-N-), 8.46 (1H, d, $^3J=10.5$, -N=C-**CH**=CH-CH=CH-CH=C-N-), 8.52 (1H, d, $^3J=9.7$, -N=C-CH=CH-CH=CH-**CH**=C-N-) ppm.

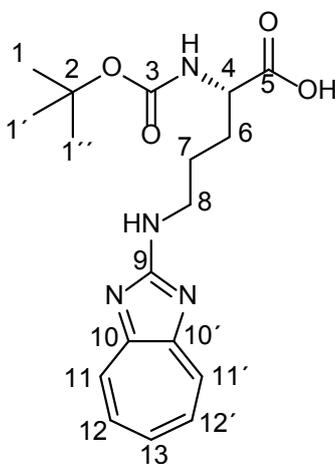
$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, MeOD): 25.46 (7), 28.80 (1,1',1''), 31.38 (6), 44.10 (8), 56.12 (4), 80.31 (2), 124.64 (15), 134.60 (11), 139.32 (12), 140.03 (13), 142.68 (14), 150.99 (16), 157.73 (10), 164.69 (9), 165.72 (3), 178.68 (5) ppm.



Experimentalteil

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD): 1.40-1.44 (9H, m, *tert.*-Butyl), 1.76-2.00 (4H, m, HO-C(=O)-CH-**CH₂**-**CH₂**-CH₂-NH-C=N-), 3.91-4.17 (2H, m, HO-C(=O)-**CH**-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C=N-), 4.35-4.50 (2H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-**CH₂**-NH-C=N-), 8.00-8.11 (1H, m, *tert.*-Butyl-O-C(=O)-**NH**-), 7.12 (1H, t, $^3J=9.7$, -N=C-CH=CH-**CH**=CH-CH=C-N-), 7.33 (2H, d, $^3J=10.9$, -N=C-**CH**=CH-CH=CH-**CH**=C-N-), 7.50 (2H, t, $^3J=10.3$, -N=C-CH=CH-CH=CH-**CH**=C-N) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, MeOD): 26.24 (7), 28.80 (1,1',1''), 31.67 (6), 43.79 (8), 56.12 (4), 80.04 (2), 126.25 (12, 12'), 132.69 (11, 11'), 137.24 (13), 157.73 (10, 10'), 164.28 (9), 165.72 (3), 178.68 (5) ppm.



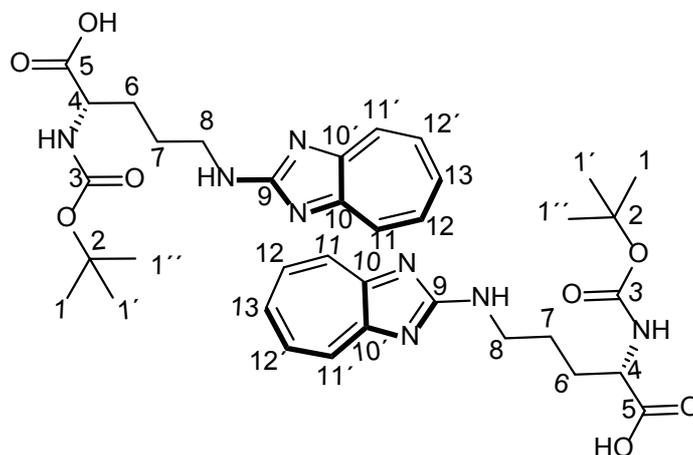
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD):

1.40-1.44 (9H, m, *tert.*-Butyl), 1.76-2.00 (4H, m, HO-C(=O)-CH-**CH₂**-**CH₂**-CH₂-NH-C=N-), 3.91-4.17 (2H, m, HO-C(=O)-**CH**-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C=N-), 4.35-4.50 (2H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-**CH₂**-NH-C=N-), 7.62 (1H, t, $^3J=9.9$, -N=C-CH=CH-**CH**=CH-CH=C-N-), 7.89 (2H, t, $^3J=10.1$, -N=C-CH=**CH**-CH=CH-**CH**=C-N), 8.00-8.11 (3H, m, *tert.*-Butyl-O-C(=O)-**NH**-, -N=C-**CH**=CH-CH=CH-**CH**=C-N-) ppm.

Experimententeil

^{13}C -NMR (75 MHz, MeOD):

26.24 (7), 28.80 (1,1',1''), 31.67 (6), 43.79 (8), 56.12 (4), 80.04 (2), 126.25 (12, 12'), 132.69 (11, 11'), 137.24 (13), 157.73 (10, 10'), 164.28 (9), 165.72 (3), 178.68 (5) ppm.



MALDI-MS m/z (a.u.): 361.0 (2550) [$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_4$], 719.3 (750) [Dimer]

HR-MS: berechnet: 361.18703 gefunden: 361.18682

Elementaranalyse: (berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_6$)*

	C	H	N
berechnet	54.53	7.12	14.13
gefunden	54.78	7.29	13.78

* $2\text{H}_2\text{O}$ eingerechnet

5.5.7.1.1 Trennung der beiden Regioisomere 8a und 8b über semi-präparative Reversed-phase-HPLC

Die Trennung erfolgte unter Einsatz eines Methanol/Wasser-Gemisches im Verhältnis 95:5. Absorptionen der Probensubstanz wurden bei 254 nm und 364 nm detektiert. Unter Einhaltung der vom Hersteller angegebenen Betriebsbedingungen in Bezug auf den Druck und die Probeneinspritzmenge, wurde das Gerät im *Batch*-Modus betrieben, wodurch die entsprechenden Fraktionen in ausreichenden Volumina gesammelt und später am Rotationsverdampfer konzentriert werden konnten, so dass die Reinsubstanz für NMR- spektroskopische, massenspektrometrische, sowie absorptions- und emissionsspektroskopische Untersuchungen zur Verfügung stand.

Ergebnisse:

Fraktion 1:

MALDI-MS m/z (a.u.): **361.2 [C₁₈H₂₄N₄O₄] (4500)**, 585.2 (900)

HR-MS: berechnet: 361.18703, gefunden: **361.18690**

¹H-NMR (600 MHz, MeOD):

1.29 (9H, s, *tert.*-Butyl), 1.53 (2H, dddd, J=25.5, 19.2, 10.1, 6.4 Hz, HO-C(=O)-CH-CH₂-**CH**₂-CH₂-NH-C=N-), 1.83 (2H, td, J=12.8, 11.0, 6.2 Hz, HO-C(=O)-CH-**CH**₂-CH₂-CH₂-NH-C=N-), 3.04-3.09 (2H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-**CH**₂-NH-C=N-), 3.89 (1H, s, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-CH₂-**NH**-C=N-), 3.97 (1H, t, ³J=7.5 Hz, HO-C(=O)-**CH**-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C=N-), 7.50 (1H, t, ³J=9.9 Hz, -N=C-CH=CH-**CH**=CH-CH=C-N-), 7.77 (2H, t, ³J=10.1 Hz, -N=C-CH=**CH**-CH=CH-**CH**=C-N), 7.91 (2H, d, ³J=8.5 Hz, -N=C-**CH**=CH-CH=CH-**CH**=C-N-), 8.35 (1H, s, *tert.*-Butyl-O-C(=O)-**NH**-) ppm.

Experimententeil

^{13}C -NMR (75 MHz, MeOD):

26.19 (7), 28.76 (1,1',1''), 31.33 (6), 43.68 (8), 56.04 (4), 80.17 (2), 126.35 (12, 12'), 132.78 (11, 11'), 137.30 (13), 157.87 (10, 10'), 158.65 (9), 165.62 (3), 174.33 (5) ppm.

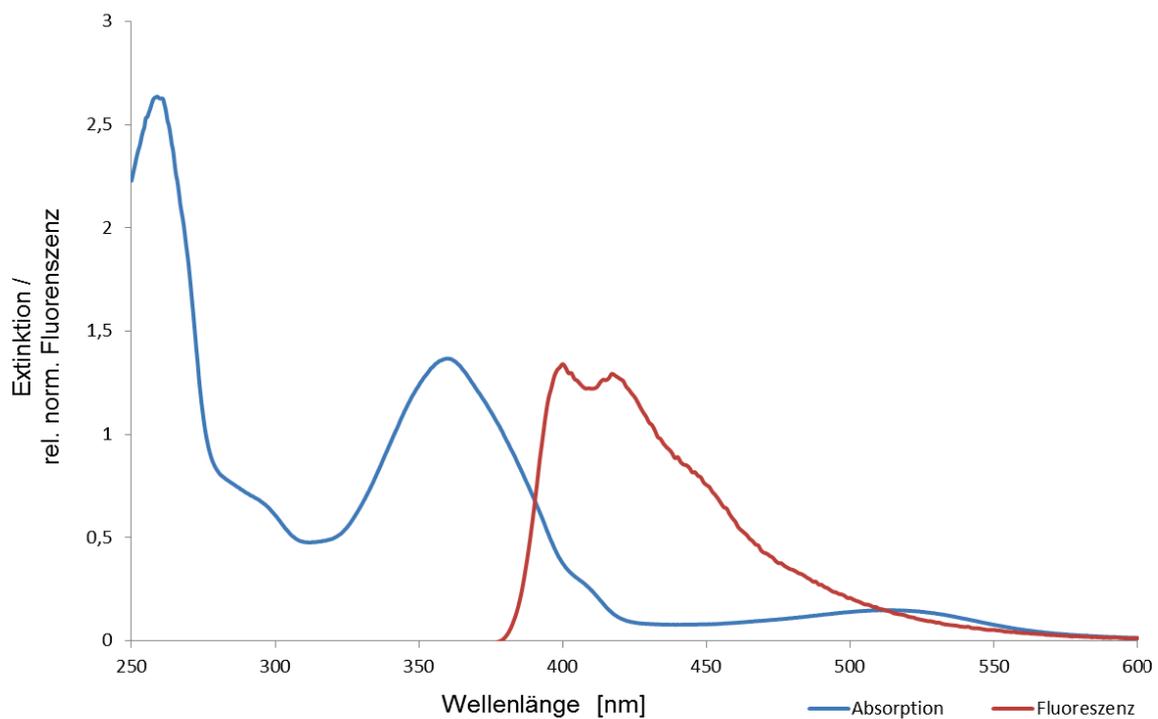
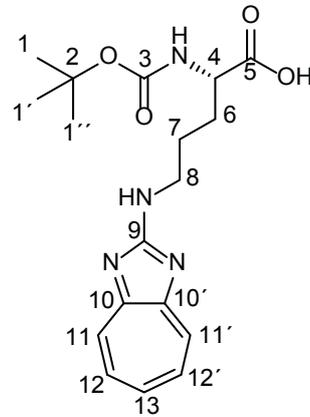


Abbildung 5.5-3: Absorption und Emission des symmetrischen Regioisomers **8a**

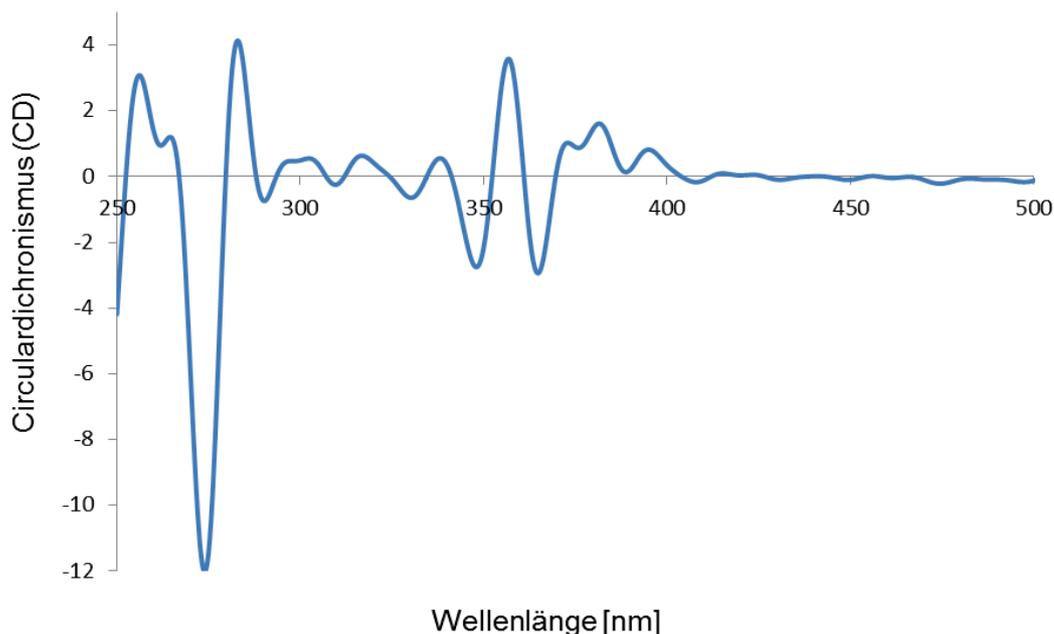


Abbildung 5.5-4: CD-Spektrum des symmetrischen Regioisomers **8a**

Fraktion 2:

MALDI-MS m/z (a.u.): **361.3 [C₁₈H₂₄N₄O₄] (2500)**, 315.3 (1500),

HR-MS: berechnet: 361.18703, gefunden: **361.18767**

¹H-NMR (600 MHz, MeOD):

1.30 (9H, m, *tert.*-Butyl), 1.63-1.92 (4H, m, HO-C(=O)-CH-**CH**₂-**CH**₂-CH₂-N-C=NH),
 3.94-4.02 (2H, m, HO-C(=O)-**CH**-CH₂-CH₂-CH₂-N-C=**NH**), 4.40-4.46 (2H, m, HO-
 C(=O)-CH-CH₂-CH₂-**CH**₂-N-C=NH), 8.17 (1H, t, ³J=9.0 Hz, -N=C-CH=CH-**CH**=CH-
 CH=C-N-), 8.31 (1H, m, -N=C-CH=**CH**-CH=CH-CH=C-N-), 8.38 (1H, t, ³J=8.8 Hz, -
 N=C-CH=CH-CH=**CH**-CH=C-N-), 8.46 (1H, d, ³J=9.8 Hz, -N=C-**CH**=CH-CH=CH-
 CH=C-N-), 8.51 (1H, m, -N=C-CH=CH-CH=CH-**CH**=C-N-), 8.70 (1H, s, *tert.*-Butyl-O-
 C(=O)-**NH**-) ppm.

Experimententeil

^{13}C -NMR (75 MHz, MeOD):

25.53 (7), 28.83 (1,1',1''), 31.33 (6), 44.15 (8), 56.07 (4), 80.33 (2), 124.73 (15), 134.66 (11), 139.41 (12), 140.10 (13), 142.75 (14), 151 (16), 157.86 (10), 164.26 (9), 164.68 (3), 178.64 (5) ppm.

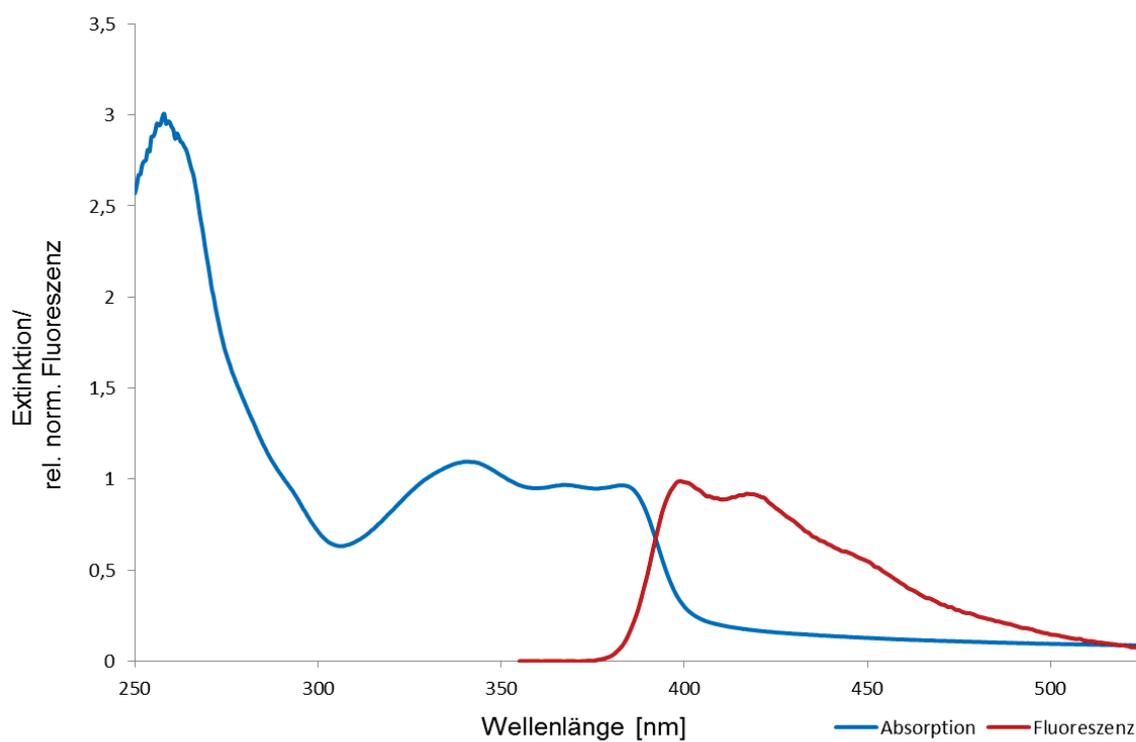
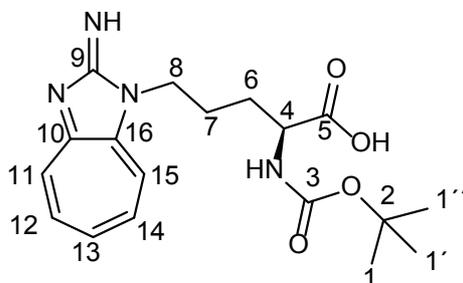


Abbildung 5.5-5: Absorption und Emission des asymmetrischen Regioisomers **8b**

Experimententeil

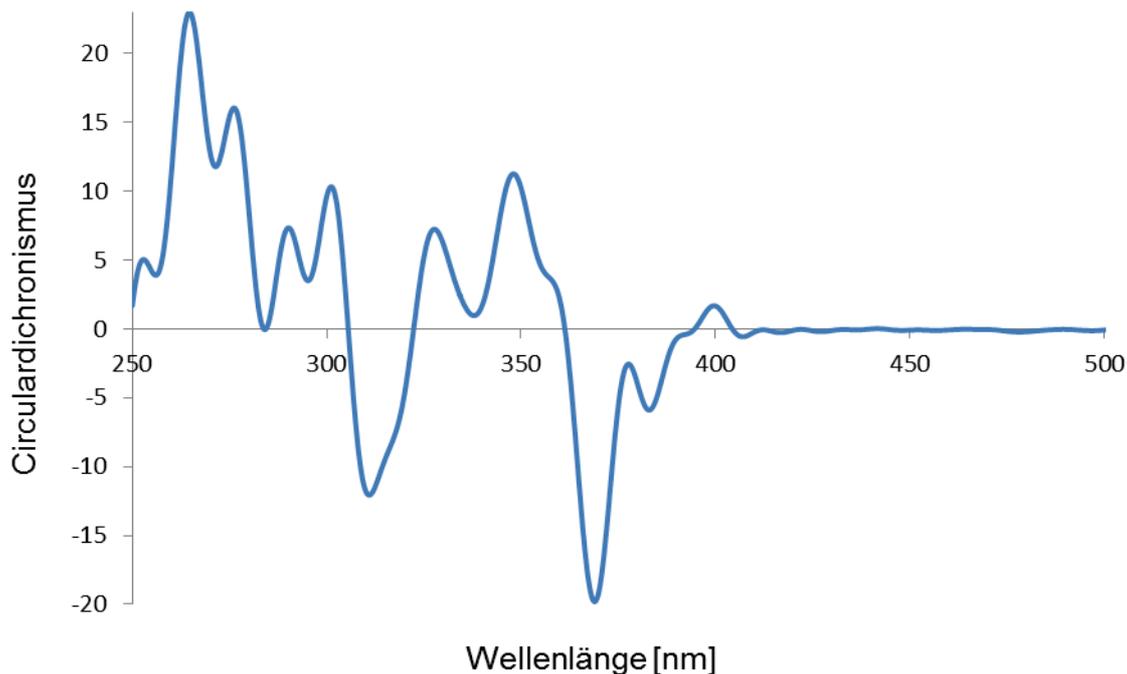


Abbildung 5.5-6: CD-Spektrum des asymmetrischen Regioisomers **8b**

Messung der Fluoreszenzquantenausbeute:

	Abs. bei 350 nm	Integral Em.	Quantenausbeute
Asymmetrisches Regioisomer 8b Puffer	0.0095	1278071	0.03
Symmetrisches Regioisomer 8a Puffer	0.011	5833353	0.10
Asymmetrisches Regioisomer 8b 3.2.2 DMF	0.011	259372	0.01
Symmetrisches Regioisomer 8a 3.2.2 DMF	0.0075	1894251	0.06
Cum 120 EtOH	0.014	37961063	

Tabelle 5.5-1: Quantenausbeute in Puffer-Lösung (pH=7) und DMF

Referenz: Quantenausbeute Cum 120 = 0.56
n ethanol= 1.36
n water = 1.33
n DMF =1.43

Tabelle 5.5-2: Werte der Referenzsubstanz Cumarin-120

Experimententeil

Range	λ Ex	Slit Ex	Slit Em	Pol Ex	Pol Em
365-600 nm	350 nm	5nm	2nm	0	54.7

Tabelle 5.5-3: Eingestellte Parameter bei den Fluoreszenzmessungen

Messung der Fluoreszenzlebensdauer:

	x _i	τ _i [ns]	Chi 2
8a	0.443	0.19	1.020
	0.153	7.60	
	0.048	2.82	
	0.356	0.41	
8b	0.495	1.29	1.101
	0.206	0.10	
	0.006	5.49	
	0.293	0.82	

Tabelle 5.5-4: Lebensdauer der getrennten Regioisomere (HPLC) **8a** und **8b** gemessen in Kaliumphosphat-Puffer (c = 20 mmol, pH 7)

Für die Ausgleichsfunktion wurde folgende Formel benutzt:

$$F(t) = \sum_i x_i e^{-\frac{t}{\tau_i}}$$

mit x_i und τ_i als Amplitude und Lebensdauer der i-ten Spezies.

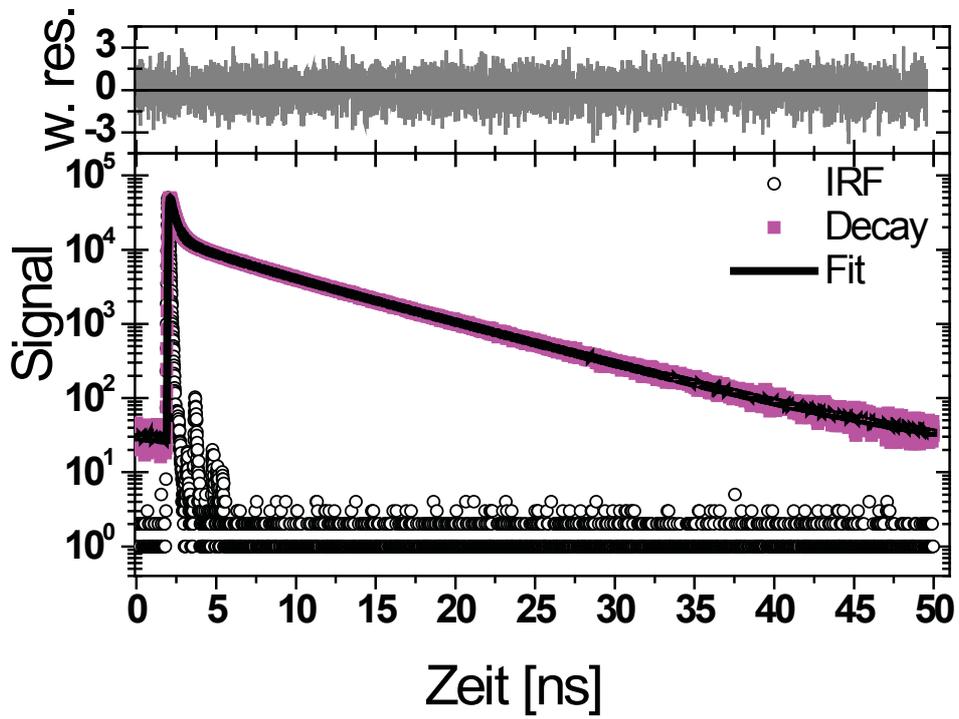


Abbildung 5.5-7: Lebensdauer des symmetrischen Regioisomers 8a

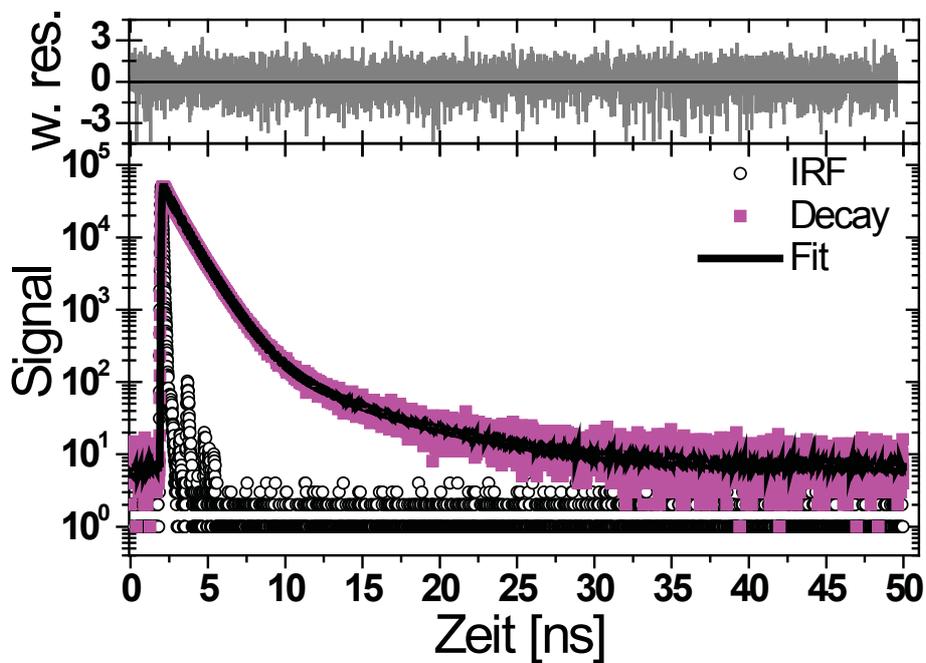


Abbildung 5.5-8: Lebensdauer des asymmetrischen Regioisomers 8b

Experimententeil

Die Ergebnisse zeigen, dass die beiden Regioisomere **8a** und **8b** erfolgreich an einer *C₁₈-reversed-phase*-Säule getrennt werden konnten. Die Absorption des asymmetrischen Regioisomers **8b** ist bathochromer als die des symmetrischen **8a**. Das symmetrische Isomer **8a** besitzt dabei jedoch eine im Vergleich zum asymmetrischen deutlich höhere Quantenausbeute und ist damit der potentere Vertreter der beiden Regioisomere **8a** und **8b**.

5.5.7.1.2 Trennung der beiden Regioisomere **8a** und **8b** über pH-abhängige

Extraktion (MD-54)

In einem 100 ml Zweihalskolben mit Septum, Magnetrührstab und Abgang zur Stickstoff-Vakuum-Linie werden 1.48 g (10.7 mmol) des Tropolonether **4** vorgelegt und dreimal sekuriert. Anschließend werden 2.94 g (10.7 mmol) und 1.46 g (21.4 mol) Natriumethanolat in 35 ml abs. Ethanol gelöst und zu dem Tropolonether geben. Die nun gelbe Reaktionsmischung wird für 6 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Die Lösung verfärbt sich mit der Zeit von hellgelb nach dunkelrot bis braun, wobei sich nach Bewegung am Kolbenrand ein extrem hell leuchtender gelber Film bildet. Das Lösungsmittel wird sodann am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in wenig dest. Wasser resuspendiert und mit Chloroform extrahiert (3 x 20 ml). Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase mit Citronensäure angesäuert bis ein pH-Wert von 3 erreicht wird. Die nun saure wässrige Phase wird dreimal mit je 20 ml mit Chloroform extrahiert. Der vereinigten organischen Phasen werden zuerst fünfmal mit ca. 20 ml Citronensäure (pH 2) ausgeschüttelt und anschließend mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel bereinigt. Im Anschluss wird auch die wässrige Phase am Rotationsverdampfer eingedunstet.

Ausbeuten:

Symmetrisches Regioisomer 8a :	0.74 g (2.10 mmol, 22% d. Th.)
Asymmetrisches Regioisomer 8b :	1.31 g (3.62 mmol, 38 % d. Th.)
Gesamt:	2.05 g (5.72 mmol, 60 % d. Th.)

Experimentalteil

Organische Phase: (symmetrisches Regioisomer **8a**)

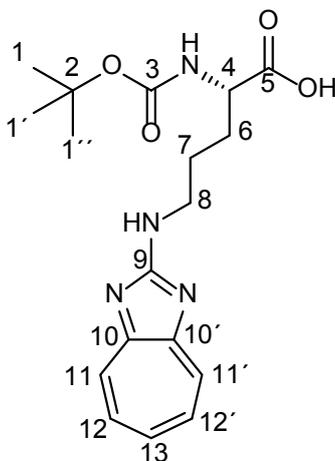
HR-MS: berechnet: 361.18703 gefunden: **361.18742**

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD):

1.42 (9H, s, *tert.*-Butyl), 1.74-1.98 (4H, m, HO-C(=O)-CH-**CH₂**-**CH₂**-CH₂-NH-C=N-), 4.13 (2H, t, J=6.8, 4.9, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-**CH₂**-NH-C=N-), 4.14 (1H, s, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-CH₂-**NH**-C=N-), 7.13 (1H, t, $^3J=9.7$, -N=C-CH=CH-**CH**=CH-CH=C-N-), 7.35 (2H, d, $^3J=10.9$, -N=C-**CH**=CH-CH=CH-**CH**=C-N-), 7.50 (2H, t, $^3J=10.3$, -N=C-CH=**CH**-CH=CH-**CH**=C-N), 8.26 (1H, s, *tert.*-Butyl-O-C(=O)-**NH**-) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, MeOD):

27.45 (7), 28.74 (1,1',1''), 30.56 (6), 43.59 (8), 55.30 (4), 80.36 (2), 126.47 (12, 12'), 132.92 (11, 11'), 139.27 (13), 158.03 (10, 10'), 165.55 (9), 173.76 (3), 174.25 (5) ppm.



Experimentaltteil

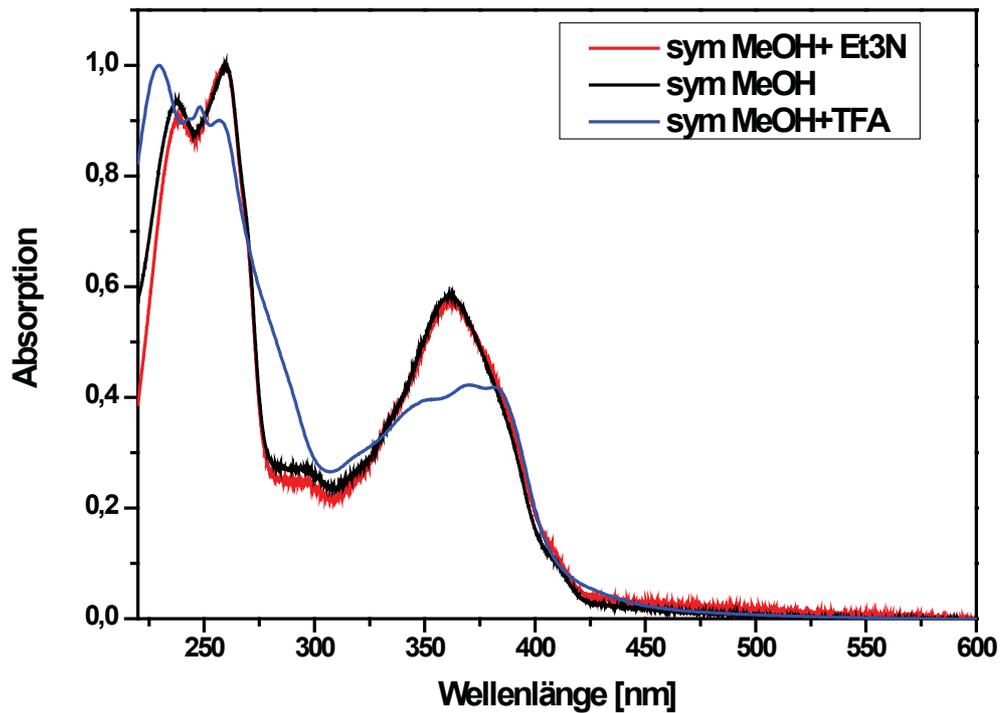


Abbildung 5.5-9: Absorptionsspektren in Methanol, Methanol + Triethylamin und Methanol + Trifluoressigsäure

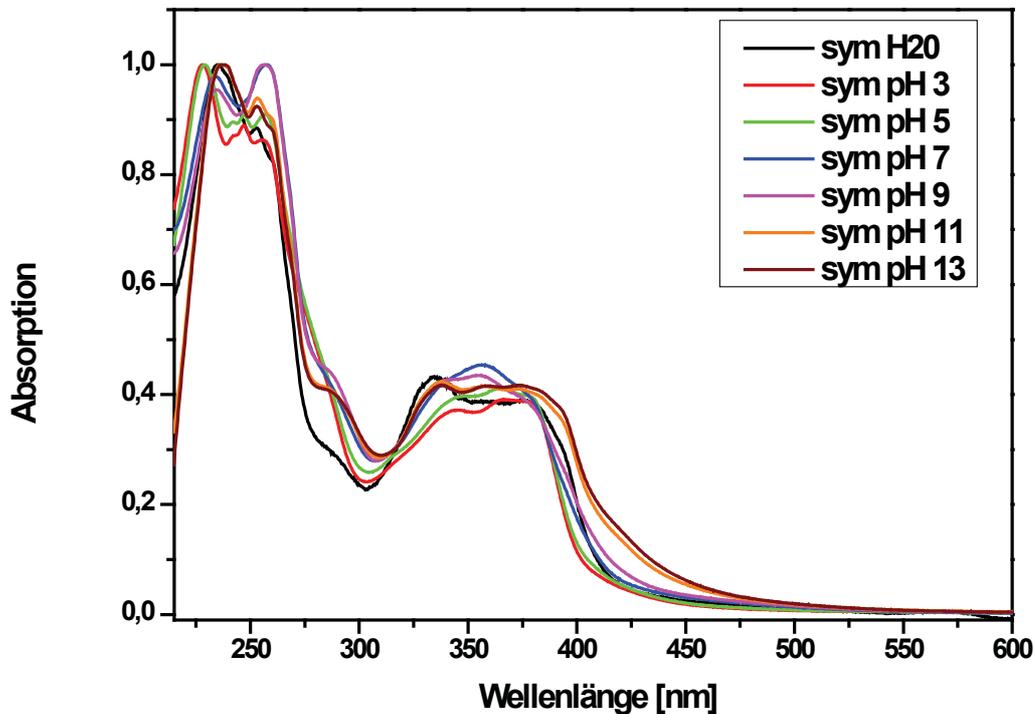


Abbildung 5.5-10: pH-abhängige Absorptionsspektren bei pH 3, pH 5, pH 7, pH 9, pH 11 und pH 13

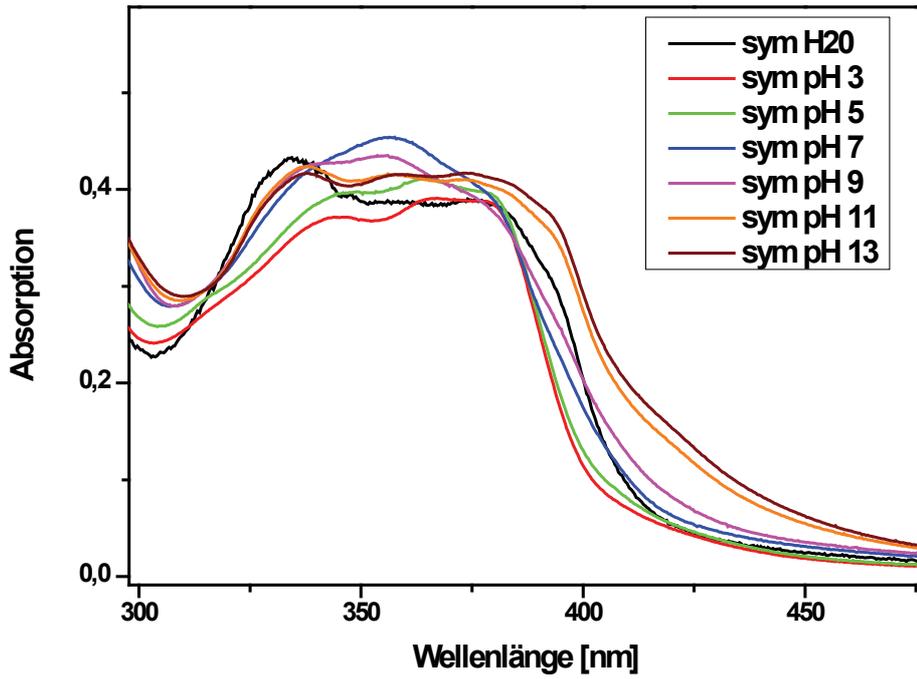


Abbildung 5.5-11: Ausschnitt 300-475 nm von Abbildung 5.6-5

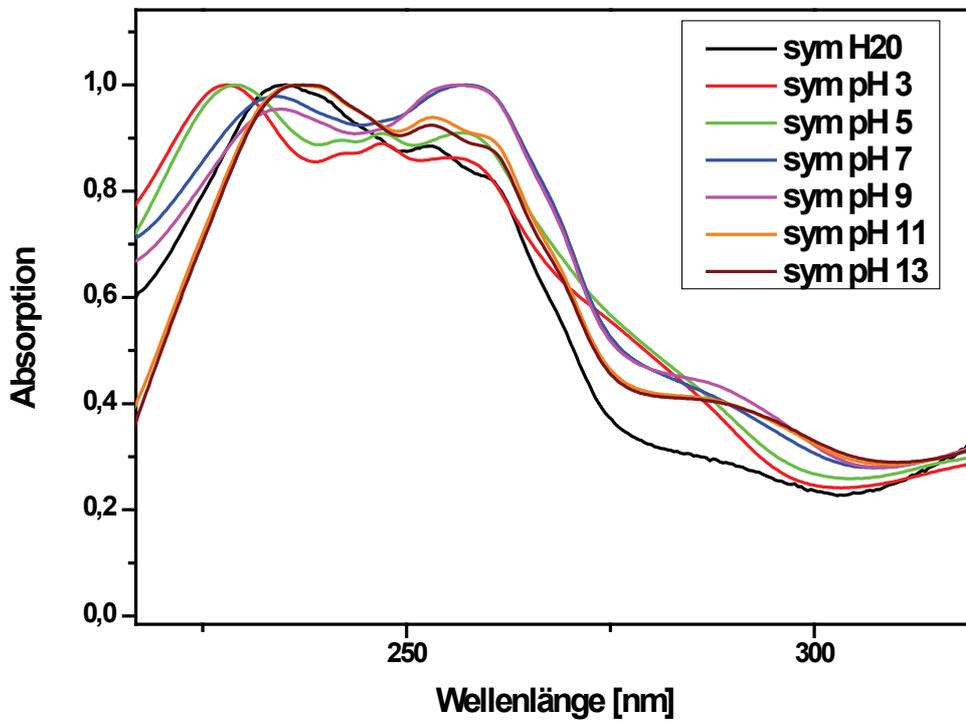


Abbildung 5.5-12: Ausschnitt 200-350 nm von Abbildung 5.6-5

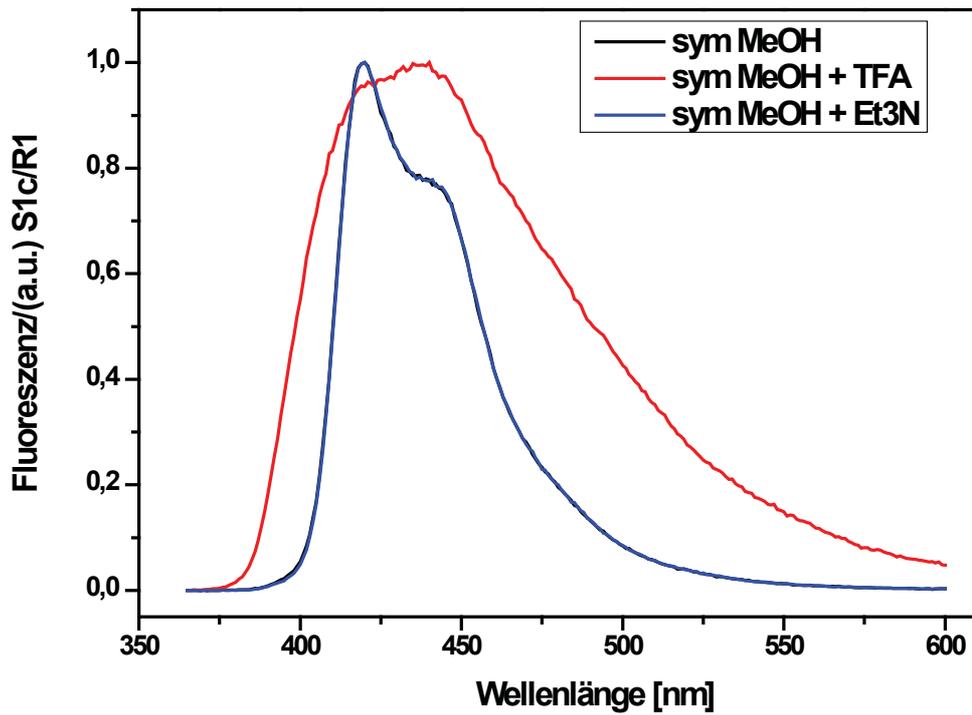


Abbildung 5.5-13: Fluoreszenzspektren in Methanol, Methanol + Triethylamin und Methanol + Trifluoressigsäure

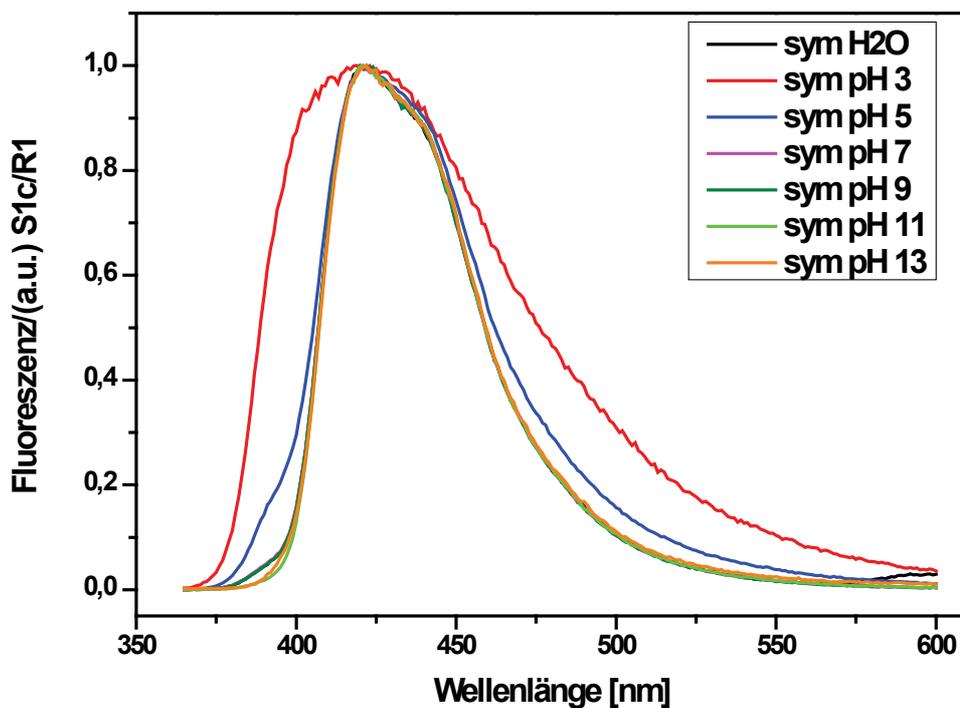


Abbildung 5.5-14: pH-abhängige Fluoreszenzspektren

Experimentaltteil

Wässrige Phase: (asymmetrisches Regioisomer **8b**)

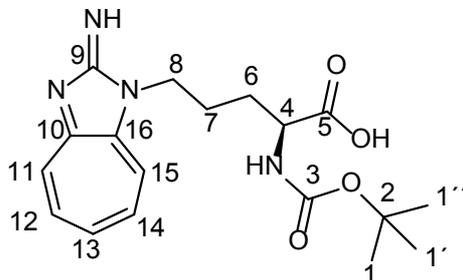
HR-MS: berechnet: 361.18703 gefunden: **361.18729**

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD):

1.38 (9H, s, *tert.*-Butyl), 1.76-2.00 (4H, m, HO-C(=O)-CH-**CH₂**-**CH₂**-CH₂-N-C=NH), 3.31 (1H, s, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-CH₂-N-C=**NH**) 4.03 (1H, t, $^3J=6.9$ HO-C(=O)-**CH**-CH₂-CH₂-CH₂-N-C=NH), 4.32-4.45 (2H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-**CH₂**-N-C=NH), 8.10 (1H, t, $^3J=9.9$, -N=C-CH=CH-**CH**=CH-CH=C-N-), 8.26 (1H, t, $^3J=10.1$, -N=C-CH=CH-CH=CH-**CH**=C-N-), 8.31 (1H, t, $^3J=10.1$, -N=C-CH=CH-CH=CH-**CH**-CH=C-N-), 8.40 (1H, d, $^3J=10.5$, -N=C-**CH**=CH-CH=CH-CH=C-N-), 8.46 (1H, d, $^3J=9.9$, -N=C-CH=CH-CH=CH-**CH**=C-N-), 10.00 (1H, m, *tert.*-Butyl-O-C(=O)-**NH**-) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, MeOD):

25.46 (7), 28.83 (1,1',1''), 31.33 (6), 44.12 (8), 56.17 (4), 80.33 (2), 124.70 (15), 134.63 (11), 139.36 (12), 140.09 (13), 142.71 (14), 164.29 (16), 164.70 (10), 175.97 (9), 178.44 (3), 180.09 (5) ppm.



Experimentaltteil

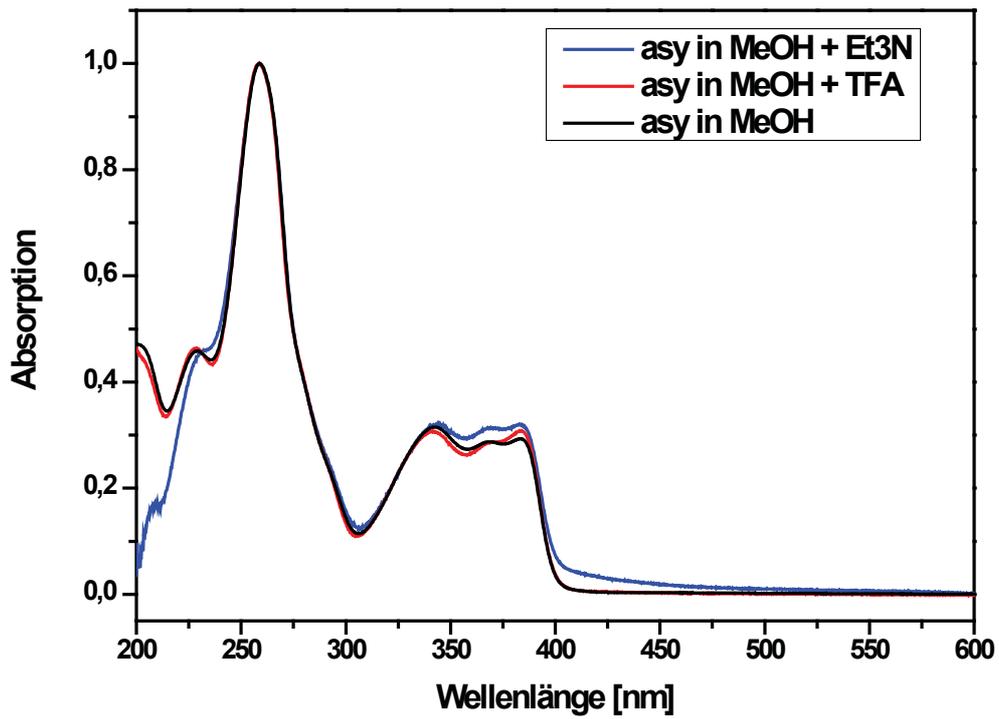


Abbildung 5.5-15: Absorptionsspektren in Methanol, Methanol + Triethylamin und Methanol + Trifluoressigsäure

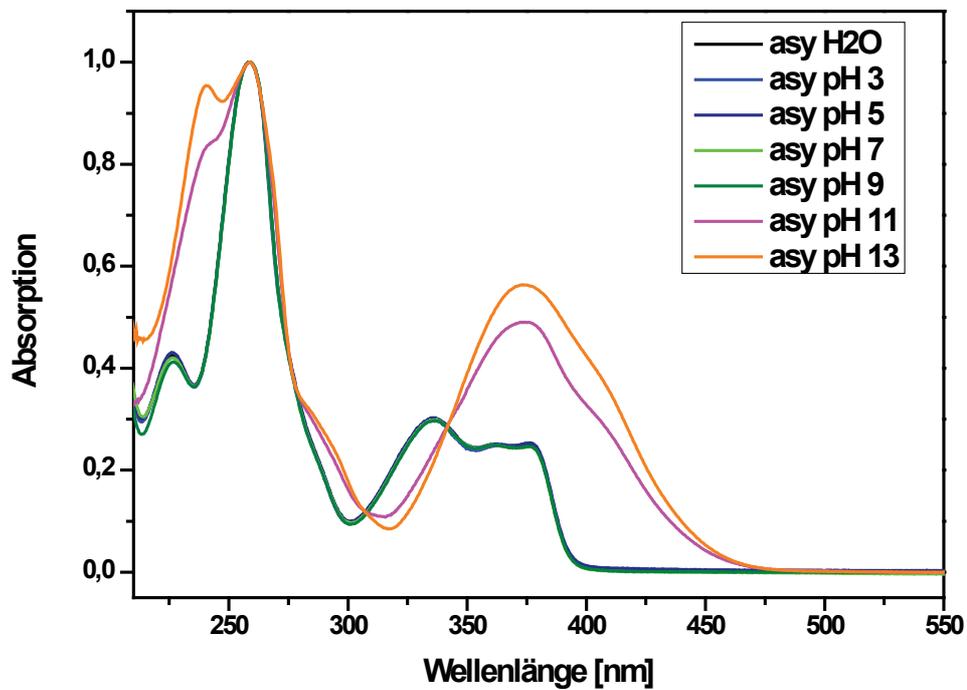


Abbildung 5.5-16: pH-abhängige Absorptionsspektren

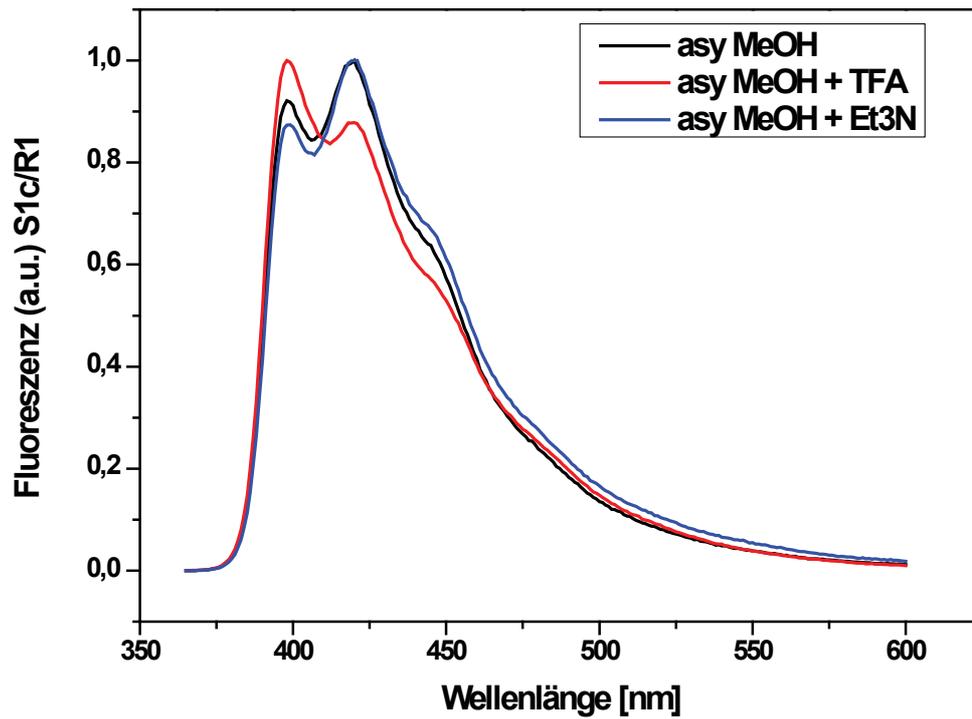


Abbildung 5.5-17: Fluoreszenzspektren in Methanol, Methanol + Triethylamin und Methanol + Trifluoressigsäure

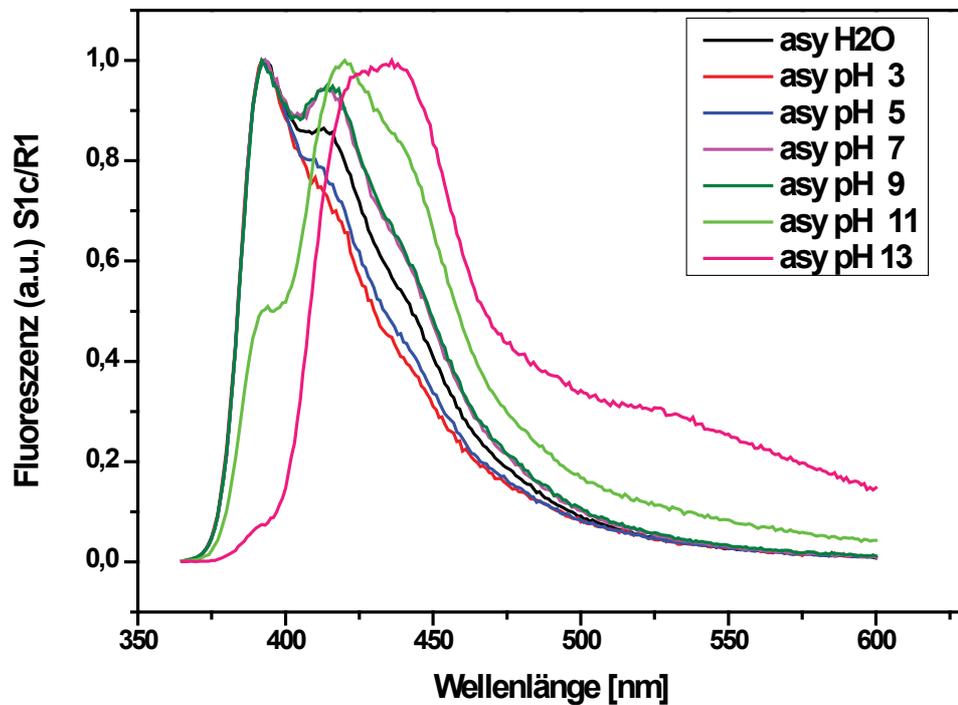


Abbildung 5.5-18: pH-abhängige Fluoreszenzspektren

Experimententeil

Messung der Fluoreszenzquantenausbeute:

	Abs. 350 nm	Integral Em	Quantenausbeute
Asymmetrisches Regioisomer 8b Puffer	0.0105	36062548	0.03
Symmetrisches Regioisomer 8a Puffer	0.0089	59666137	0.06
Asymmetrisches Regioisomer 8b DMF	0.0089	8114765	0.01
Symmetrisches Regioisomer 8a DMF	0.013	76713107	0.06
Cumarin-120 EtOH	0.0057	344299560	

Tabelle 5.5-5: Quantenausbeute in Puffer-Lösung (pH=7) und DMF

Referenz: Quantenausbeute Cumarin-120 = 0.56
n ethanol= 1.36
n water = 1.33
n DMF =1.43

Tabelle 5.5-6: Werte der Referenzsubstanz Cumarin-120

Range	λ Ex	Slit Ex	Slit Em	Pol Ex	Pol Em
365-600 nm	350 nm	5nm	2nm	0	54.7

Tabelle 5.5-7: Eingestellte Parameter bei den Fluoreszenzmessungen

Experimententeil

Messung der Fluoreszenzlebensdauer:

	x_i	τ_i (ns)	Chi 2
8a	0.332	0.54	1.013
	0.129	1.66	
	0.036	7.17	
	0.503	0.20	
8b	0.092	0.22	1.050
	0.033	7.51	
	0.875	1.12	

Tabelle 5.5-8: Lebensdauer der getrennten Regioisomere (Extraktion) **8a** und **8b** gemessen in Kaliumphosphat-Puffer (c = 20 mmol, pH 7)

Für die Ausgleichsfunktion wurde folgende Formel benutzt:

$$F(t) = \sum_i x_i e^{-\frac{t}{\tau_i}}$$

mit x_i und τ_i als Amplitude und Lebensdauer der i -ten Spezies.

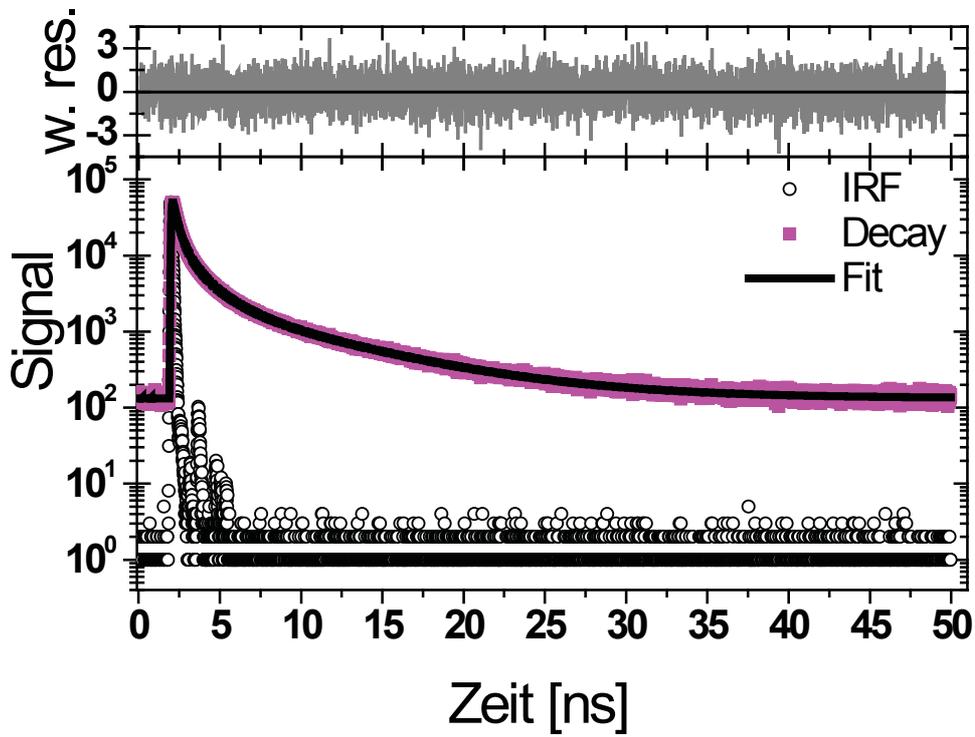


Abbildung 5.5-19: Lebensdauer des symmetrischen Regioisomers 8a

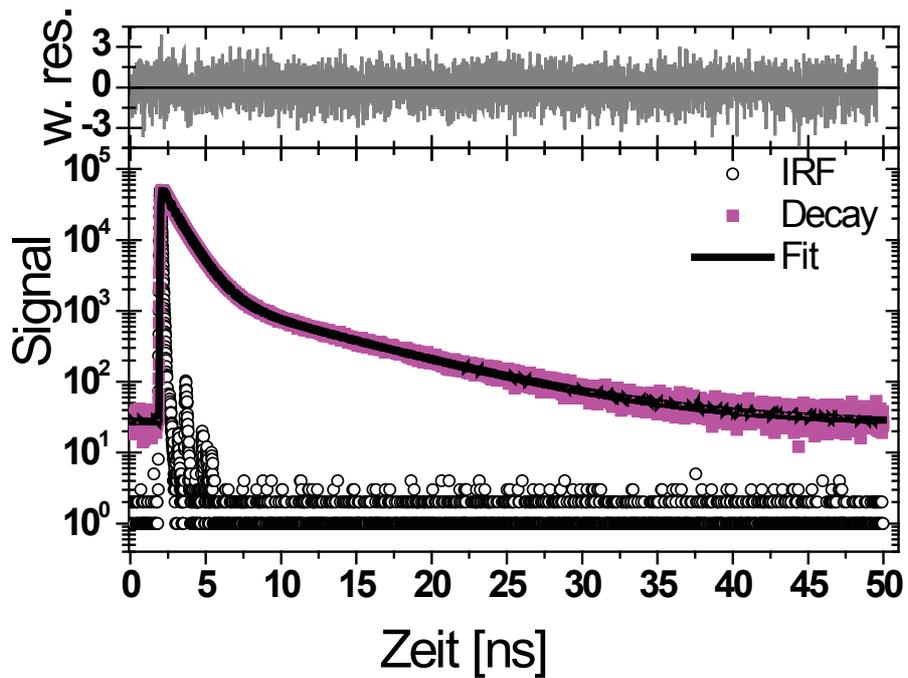


Abbildung 5.5-20: Lebensdauer des asymmetrischen Regioisomers 8b

Experimentaltteil

Beim asymmetrischen Regioisomer **8b** bewirkt eine Veränderung des pH-Wertes eine bathochrome Verschiebung des Emissionsmaximums in den Fluoreszenzspektren. Beispielsweise liegt das Emissionsmaximum bei pH 3 bei 395 nm, bei pH 11 bei 420 nm und bei pH 13 gar bei 435 nm.

Bei der symmetrischen Spezies **8a** ist dieser Effekt hingegen nicht zu beobachten. Alle Maxima liegen hier bei 420 nm. Auffällig ist hier, dass die Kurve bei pH 3 einen wesentlich größeren Integral aufweist, als die Kurven der anderen pH-Messungen.

Mit Blick auf die Quantenausbeuten zeigt sich analog zu den unter Abschnitt 5.5.8.1.1 gezeigten Ergebnissen, dass das symmetrische Regioisomer **8a** die im Vergleich zum asymmetrischen Isomer **8b** höhere Quantenausbeute besitzt.

5.5.7.2 Ausgehend von 2-Chlorocyclohepta-2,4,6-trien-1-on (**9**) (MD-37)

In einem 100 ml Zweihalskolben mit Magnetrührstab und Abgang zur Stickstoff-Vakuum-Linie werden 0.28 g (2 mmol) 2-Chlortropon **9** vorgelegt, dreimal sekuriert und in 30 ml abs. Ethanol gelöst. Anschließend werden 0.62 g (2 mmol) Boc-Arg-OH-hydrochlorid **10** und 0.41 g (6 mmol) Natriumethanolat zu der Lösung gegeben und 16 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer, wird der Rückstand in 20 ml dest. Wasser resuspendiert. Die erhaltene Lösung wird dreimal mit 15 ml Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wird am Rotationsverdampfer eingengt und der erhaltene bräunlich-gelbe Feststoff wird in abs. Methanol gelöst, wobei das ausfallende Salz abfiltriert und das Filtrat vom Lösungsmittel befreit wird. Aus dem nun gewonnen dunkel-gelben Feststoff wird eine gesättigte wässrige Lösung hergestellt zu der eine gesättigte Ammoniumfluorid-Lösung gegeben wird, wobei die Aminosäure als gelb-brauner Niederschlag ausfällt. Man lässt die Lösung so lange stehen, bis sie sich vollständig entfärbt hat. Der Niederschlag wird abgesaugt und getrocknet.

Ausbeute: 0.52 g (1.4 mmol, 72% d. Th.)

Smp.: 115.6 – 117.0 °C

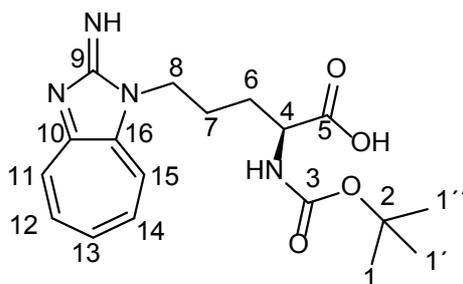
Experimentarteil

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD):

1.31 (9H, s, *tert.*-Butyl), 1.53-1.93 (4H, m, HO-C(=O)-CH-**CH₂-CH₂**-CH₂-N-C=NH), 3.52 (1H, s, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-CH₂-N-C=**NH**) 4.01 (1H, t, $^3J=4.9$ HO-C(=O)-**CH**-CH₂-CH₂-CH₂-N-C=NH), 4.25-4.36 (2H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-**CH₂**-N-C=NH), 8.02 (1H, t, $^3J=9.9$, -N=C-CH=CH-**CH**=CH-CH=C-N-), 8.17 (1H, t, $^3J=10.1$, -N=C-CH=CH-**CH**=CH-CH=C-N-), 8.23 (1H, t, $^3J=10.1$, -N=C-CH=CH-CH=**CH**-CH=C-N-), 8.32 (1H, d, $^3J=10.6$, -N=C-**CH**=CH-CH=CH-CH=C-N-), 8.36 (1H, d, $^3J=9.8$, -N=C-CH=CH-CH=CH-**CH**=C-N-) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, MeOD):

25.55 (7), 28.82 (1,1',1''), 30.72 (6), 44.06 (8), 55.52 (4), 124.61 (15), 134.65 (11), 139.36 (12), 140.02 (13), 142.71 (14), 150.98 (16), 157.96 (10), 164.70 (9), 173.51 (3), 177.77 (5) ppm.



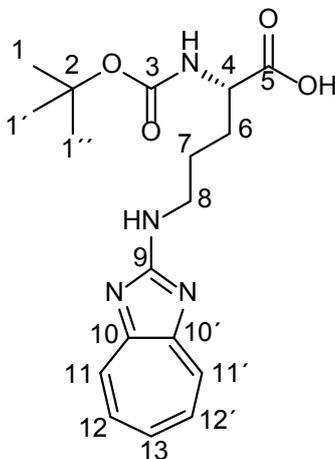
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD):

1.31 (9H, s, *tert.*-Butyl), 1.53-1.93 (4H, m, HO-C(=O)-CH-**CH₂-CH₂**-CH₂-N-C=NH), 3.52 (1H, s, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-CH₂-N-C=**NH**) 4.01 (1H, t, $^3J=4.9$ HO-C(=O)-**CH**-CH₂-CH₂-CH₂-N-C=NH), 4.25-4.36 (2H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-**CH₂**-N-C=NH), 7.35 (1H, t, $^3J=9.9$, -N=C-CH=CH-**CH**=CH-CH=C-N-), 7.79 (2H, t, $^3J=10.1$, -N=C-CH=CH-**CH**=CH-CH=C-N-), 7.91 (2H, ddd, $J=22.4, 10.5, 4.0$, -N=C-**CH**=CH-CH=CH-**CH**=C-N-) ppm.

Experimententeil

^{13}C -NMR (75 MHz, MeOD):

26.34 (7), 28.82 (1,1',1''), 30.93 (6), 43.66 (8), 55.52 (4), 126.62 (12, 12'), 133.27 (11, 11'), 137.63 (13), 158.71 (10, 10'), 164.28 (9), 173.51 (3), 177.39 (5) ppm.



Elementaranalyse: (berechnet für $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_6$)*

	C	H	N
berechnet	54.53	7.12	14.13
gefunden	55.06	7.09	13.94

* $2\text{H}_2\text{O}$ eingerechnet

5.5.7.3 Regioselektive Darstellung des Isomers 8a

5.5.7.3.1 Einsatz von Natriummethanolat und 2-Methoxycyclohepta-2,4,6-trien-1-on (4) (MD-57)

In einem 100 ml Zweihalskolben mit Septum, Magnetrührstab und Abgang zur Stickstoff-Vakuum-Linie werden 0.26 g (2 mmol) des Tropononether **4** vorgelegt und dreimal sekuriert. Anschließend werden ein Äquivalent Boc-Arg-OH **10** (0.55 g) und zwei Äquivalente Natriummethanolat 25 wt% in Methanol (0.88 g) in 20 ml abs. Methanol gelöst und zu dem Tropononether **4** geben. Die nun gelbe Reaktionsmischung wird für 6 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Die Lösung verfärbt sich mit der Zeit von hellgelb nach dunkelrot bis braun, wobei sich nach Bewegung am Kolbenrand ein extrem hell leuchtender gelber Film bildet. Das Lösungsmittel wird sodann am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in wenig dest. Wasser resuspendiert und dreimal mit je 20 ml Chloroform extrahiert.

Experimentaltteil

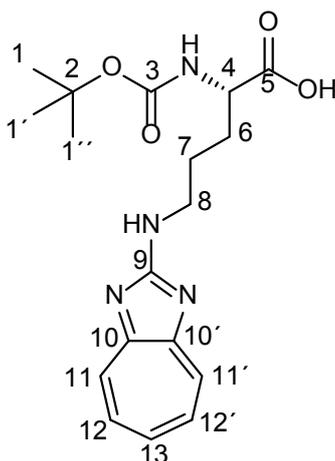
Die organischen Phasen werden abgetrennt und verworfen. Bevor die wässrige Phase mit gesättigter Citronensäure auf einen pH-Wert von 2-3 angesäuert wird, werden einige Milliliter für ein Roh-NMR entnommen. Die nun saure wässrige Phase wird fünfmal mit je 20 ml mit Chloroform extrahiert, wobei sich die organische Phase tiefrot färbt. Der vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel bereitet.

Ausbeute: 0.28 g (0.80 mmol, 40 % d. Th.)

ESI-MS m/z (rel. Ab.): 198.5 (24), 261.5 (19) [-Boc], 305.5 (23), **361.5 (100)** [$C_{22}H_{25}N_4O_3$]⁺, 419.6 (35)

¹H-NMR (600 MHz, MeOD):

1.42 (9H, s, *tert.*-Butyl), 1.74-1.78 (2H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-CH₂-N-C=NH), 1.84-1.90 (2H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-CH₂-N-C=NH), 3.60 (1H, s, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-CH₂-N-C=NH), 3.68-3.72 (2H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-CH₂-N-C=NH), 4.34 (1H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-CH₂-N-C=NH), 7.05 (1H, t, ³J=9.9, -N=C-CH=CH-CH=C-N-), 7.35 (2H, d, ³J=10.1, -N=C-CH=CH-CH=C-N-), 7.40 (2H, t, 10.9, -N=C-CH=CH-CH=C-N-) ppm.



5.5.7.3.2 Einsatz von Natriumethanolat und 2-Methoxycyclohepta-2,4,6-trien-1-on (**11**) (*MD-64*)

In einem 100 ml Zweihalskolben mit Septum, Magnetrührstab und Abgang zur Stickstoff-Vakuum-Linie werden 0.30 g (2 mmol) des Tropolonether **11** vorgelegt und dreimal sekuriert. Anschließend werden ein Äquivalent Boc-Arg-OH **10** (0.55 g) und zwei Äquivalente Natriumethanolat (0.28 g) in 20 ml abs. Ethanol gelöst und zu dem Tropolonether geben. Die nun gelbe Reaktionsmischung wird für 6 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Die Lösung verfärbt sich mit der Zeit von hellgelb nach dunkelgelb, wobei sich nach Bewegung am Kolbenrand ein extrem hell leuchtender gelber Film bildet. Das Lösungsmittel wird sodann am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in wenig dest. Wasser resuspendiert und dreimal mit je 20 ml Chloroform extrahiert. Die organischen Phasen werden abgetrennt und verworfen. Bevor die wässrige Phase mit gesättigter Citronensäure auf einen pH-Wert von 2-3 angesäuert wird, werden einige Milliliter für ein Roh-NMR entnommen. Die nun saure wässrige Phase wird fünfmal mit je 20 ml mit Chloroform extrahiert, wobei sich die organische Phase tiefrot färbt. Der vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel bereit.

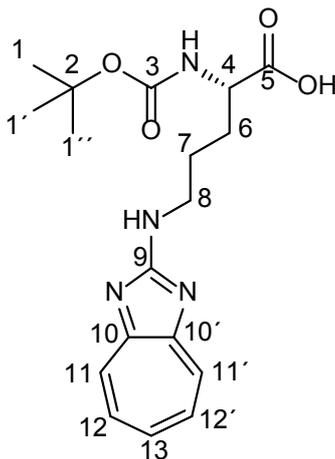
Ausbeute: 0.25 g (0.68 mmol, 34 % d. Th.)

ESI-MS m/z (rel. Ab.): 198.3 (39), 216.4 (37), 261.4 (38) [-Boc], 298.3 (48), 305.4 (51), 305.4 (23), **361.5 (100) [C₂₂H₂₅N₄O₃]⁺**, 419.4 (22), 421.4 (23)

Experimentarteil

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD):

1.42 (9H, s, *tert.*-Butyl), 1.74-1.78 (2H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-CH₂-N-C=NH), 1.84-1.90 (2H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-CH₂-N-C=NH), 3.60 (1H, s, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-CH₂-N-C=NH), 3.68-3.72 (2H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-CH₂-N-C=NH), 4.34 (1H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-CH₂-N-C=NH), 7.05 (1H, t, $^3J=9.9$, -N=C-CH=CH-CH=CH-C-N-), 7.35 (2H, d, $^3J=10.1$, -N=C-CH=CH-CH=CH-C-N-), 7.40 (2H, t, $^3J=10.9$, -N=C-CH=CH-CH=CH-C-N-) ppm.



5.5.8 Regioselektive Darstellung der nicht-natürlichen Aminosäure 8a ausgehend von Boc-Ornithin

5.5.8.1 (S)-5-(Benzylamino)-2-[(*tert.*-butoxycarbonyl)amino]-pentansäure (S)-12 [39]

In einem 100 ml Zweihalskolben mit Magnetrührstab und Abgang zur Stickstoff-Vakuum-Linie werden 1.15 g (5 mmol) Boc-Orn-OH vorgelegt, dreimal sekuriert und in 50 ml einer 0.1 M Natriumhydroxid-Lösung gelöst. Nach der Zugabe von 0.5 ml (5 mmol) Benzaldehyd wird für einige Minuten gerührt, bis sich eine homogene Lösung gebildet hat. Sodann werden 0.38 g (10 mmol) Natriumborhydrid zu der Lösung gegeben und für 3 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt. Anschließend wird die wässrige Phase mit Essigsäure vorsichtig angesäuert und dreimal mit je 30 ml Chloroform extrahiert. Die organische Phase wird mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wird aus Diethylether/Hexan umkristallisiert.

Experimentaltteil

ESI-MS (rel. Ab.): 305.2 (25), **323.3 (100)** [$C_{17}H_{27}N_2O_4$]⁺, 324.3 (21)

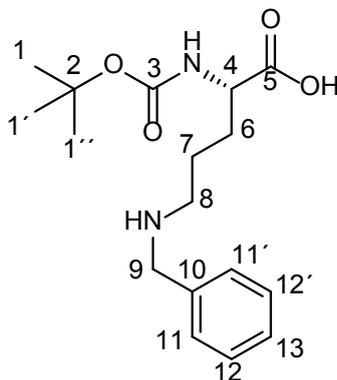
HR-MS: berechnet: 323.19653 gefunden: 323.19639

¹H-NMR (600 MHz, MeOD):

1.70 (9H, s, *tert.*-Butyl), 1.97-1.99 (2H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-**CH**₂-CH₂-N-C=NH), 2.03-2.08 (2H, m, HO-C(=O)-CH-**CH**₂-CH₂-CH₂-N-C=NH), 3.30 (2H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-**CH**₂-N-C=NH), 4.31 (1H, t, ³J=6.2, HO-C(=O)-**CH**-CH₂-CH₂-CH₂-N-C=NH), 4.43 (2H, s, -NH-**CH**₂-C(=C)-CH=CH-CH=CH-CH=C-), 6.05 (1H, s, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-CH₂-N-C=**NH**), 7.57-7.62 (2H, m, -NH-CH₂-C(=C)-**CH**=CH-CH=CH-**CH**=C-), 7.66-7.70 (1H, m, -NH-CH₂-C(=C)-CH=CH-**CH**=CH-CH=C-), 7.74-7.76 (2H, m, -NH-CH₂-C(=C)-CH=CH-**CH**-CH=CH-CH=C-) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, MeOD):

21.36 (7), 23.64 (1,1',1''), 28.94 (6), 48.13 (9), 52.23 (8), 65.30 (4), 80.51 (2), 128.13 (11, 11'), 130.27 (13), 131.10 (12, 12'), 142.68 (10), 175.88 (3), 177.76 (5) ppm.



5.5.8.2 Darstellung von N^α-*tert.*-Butoxycarbonyl-N^ω-benzyl-L-arginin (S)-13

5.5.8.2.1 Unter Verwendung von Cyanamid ^[nach 40]

In einem 50 ml Zweihalskolben mit Rückflusskühler und Septum werden 0.56 g (1.74 mmol) des Benzylornithins in 10 ml dest. Wasser gelöst. Mittels Natriumhydroxyd wird ein pH von ca. 10 (bei 20°C) eingestellt. Sodann wird die Lösung auf 75 °C erhitzt und 0.45 g einer 50 gew-%igen Cyanamid-Lösung in Methanol werden unter kräftigem Rühren über einen Zeitraum von 45 Minuten über das Septum zu der Lösung gespritzt. Anschließend lässt man noch 2 Stunden bei 75 °C weiterrühren und kühlt dann auf 5 °C runter. Da das Produkt nicht ausfiel, wurde noch für 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt und erneut auf 5 °C gekühlt. Als das Produkt erneut nicht wie gewünscht ausfiel, wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

ESI-MS m/z (Intens.): **365.2 (420000) [C₁₈H₂₉N₄O₄]⁺**, **265.2 (410000) [-Boc]**, 308.2 (110000) [C₁₄H₂₄N₆O₂]⁺⁺, 323.2 (9000) [C₁₇H₂₇N₂O₄]⁺

Die massenspektroskopische Untersuchung zeigt, dass das gewünschte Produkt zwar entstanden ist, es aber auch zu der Bildung einer Boc-entschützten Spezies [265.2] und einer daraus resultierenden doppelt guanidinisierten Spezies [308.2] kam. Des Weiteren kann die Edukt-Aminosäure [323.2] nachgewiesen werden.

5.5.8.2.2 Unter Verwendung von 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidhydrochlorid (*MD-25*)

[nach 41]

In einem 50 ml- Zweihalskolben mit Septum und Abgang zur Stickstoff-/Vakuuminie werden 0.25 g (0.85 mmol) des Benzylornithins (**S**)-**12** vorgelegt und dreimal sekuriert. Dazu werden 0.26 g (1.70 mmol) 1*H*-Pyrazol-1-carboxamidhydrochlorid in 10 ml DMF zugeben und sogleich 0.6 ml DIPEA über das Septum zu getropft. Die Lösung wird nun für 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in wenig dest. Wasser resuspendiert und dreimal mit je 30 ml Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wird Diethylether umkristallisiert.

Ausbeute: 0.24 g (0.65 mmol, 76 % d. Th.)

ESI-MS *m/z* (Intens.): 130.2 (0.9 × 10⁵), 249.1 (0.7 × 10⁵), **365.2 (4.2 × 10⁵)**

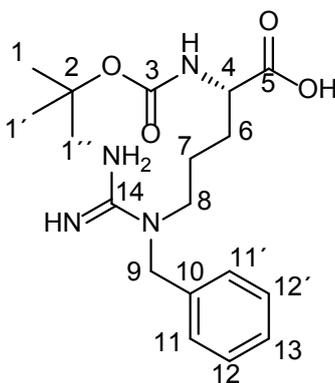
[C₁₈H₂₉N₄O₄]

HR-MS: berechnet: 365.2183 gefunden: 365.2185

Experimentarteil

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD):

1.42 (9H, s, *tert.*-Butyl), 1.63-1.199 (2H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-CH₂-N-C=NH), 1.82-1.93 (2H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-CH₂-N-C=NH), 3.38-3.49 (2H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-CH₂-N-C=NH), 4.64-4.69 (1H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-CH₂-N-C=NH), 4.62 (2H, s, -NH-CH₂-C(=C)-CH=CH-CH=CH-CH=C-), 5.36 (2H, s, -N-C(=NH)-NH₂), 7.29 (2H, ddd, ³J=8.6, 5.6, 1.8, -NH-CH₂-C(=C)-CH=CH-CH=CH-CH=C-), 7.32-7.36 (1H, m, -NH-CH₂-C(=C)-CH=CH-CH=CH-CH=C-), 7.41 (2H, t, ³J=7.5, -NH-CH₂-C(=C)-CH=CH-CH=CH-CH=C-) ppm.



5.5.8.3 (S)-2-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]-5-(cyclohepta-[d]-imidazol-2-ylamino-2-benzyl)-pentansäure (S)-14 (MD-23)

In einem 100 ml Zweihalskolben mit Magnetrührstab und Abgang zur Stickstoff-Vakuum-Linie werden 0.13 g (1 mmol) Tropolonmethylether (**4**) vorgelegt, dreimal sekuriert und in 20 ml abs. Ethanol gelöst. Anschließend werden 0.36 g (1 mmol) des Benzylarginin (**S**)-**13** und 0.13 g (2 mmol) Natriumethanolat zu der Lösung gegeben und 16 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer, wird der Rückstand in 20 ml dest. Wasser. Die erhaltene Lösung wird dreimal mit je 20 ml Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wird am Rotationsverdampfer eingengt und der erhaltene bräunliche Feststoff wird in abs. Methanol gelöst, wobei das ausfallende Salz abfiltriert und das Filtrat vom Lösungsmittel befreit wird. Aus dem nun gewonnen dunkelbraunen Feststoff wird eine gesättigte wässrige Lösung hergestellt zu der eine gesättigte Ammoniumfluorid-Lösung gegeben wird, wobei die Aminosäure als dunkelgelber Niederschlag ausfällt.

Experimententeil

Man lässt die Lösung so lange stehen, bis sie sich vollständig entfärbt hat. Der Niederschlag wird abgezogen und getrocknet.

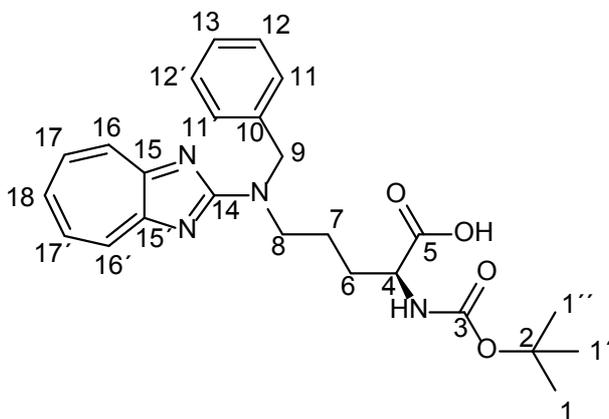
Ausbeute: 0.21 g (0.47 mmol, 47 % d. Th.)

ESI-MS m/z (Intens.): **451.2 (75000) [C₂₅H₃₁N₄O₄]⁺**, 228.1 (38000), 455.2 (35000), 153.1 (16000), 394.2 (15000)

HR-MS: berechnet: 451.23398, gefunden: 451.23361

¹H-NMR (600 MHz, MeOD):

1.30 (9H, s, *tert.*-Butyl), 1.40 (1H, t, ³J=3.3, HO-C(=O)-**CH**-CH₂-CH₂-CH₂-N-C=NH), 1.54-1.66 (4H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-**CH**₂-CH₂-N-C=NH), 1.75-1.88 (4H, m, HO-C(=O)-CH-**CH**₂-CH₂-CH₂-N-C=NH), 3.35 (s, 2H, -N-(diazazulen)-**CH**₂-C(=C)-CH=CH-CH=CH-CH=C-), 3.63-3.70 (2H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-**CH**₂-N-C=NH=, 6.95-7.39 (m, 5H, *Phenyl*), 7.51 (1H, t, ³J=9.9, -N=C-CH=CH-**CH**=CH-CH=C-N-), 7.78 (2H, d, ³J=10.2, -N=C-CH=**CH**-CH=CH-**CH**=C-N), 7.97 (2H, t, ³J=10.0, -N=C-**CH**=CH-CH=CH-**CH**=C-N-) ppm.



Experimententeil

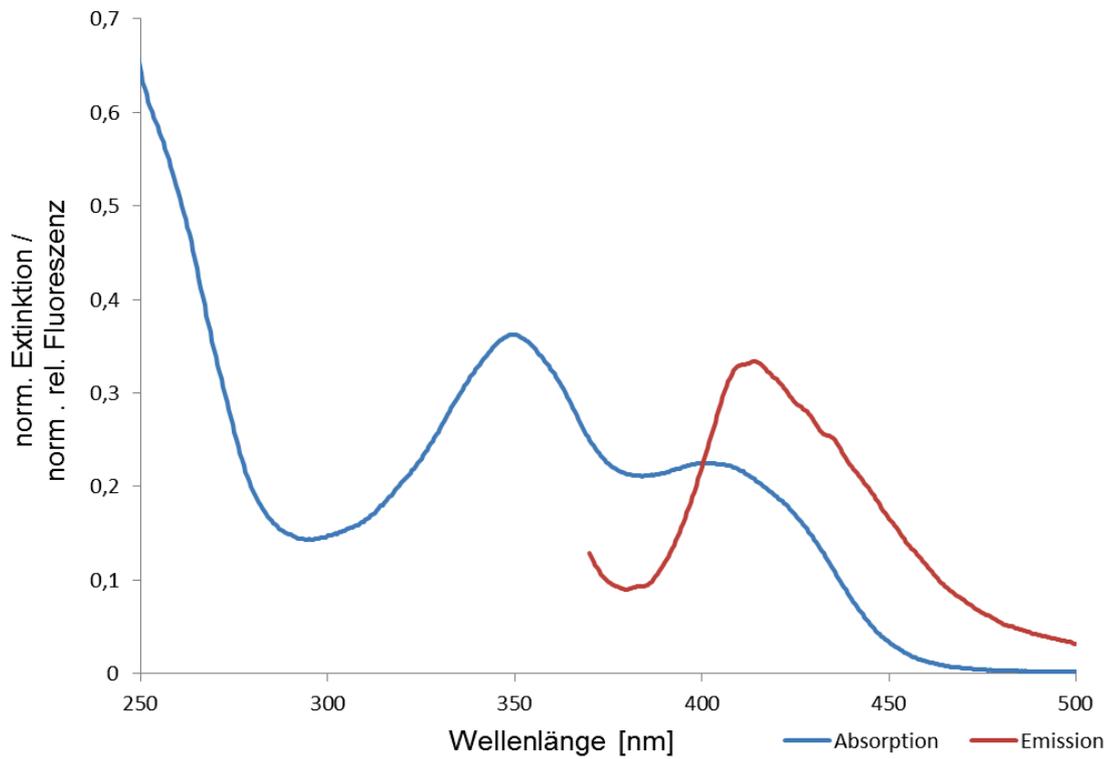


Abbildung 5.5-21: Absorption und Emission der Aminosäure (S)-14

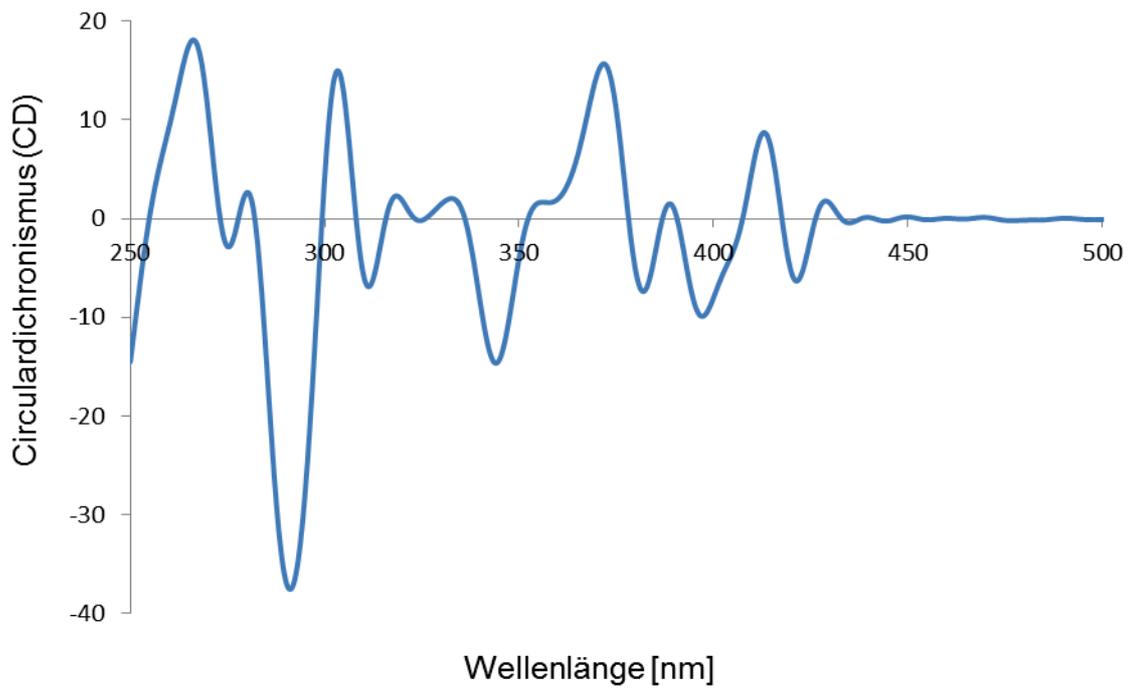


Abbildung 5.5-22: CD-Spektrum der Aminosäure (S)-14

5.5.9 Markierung der Peptide

5.5.9.1 (S)-2-{2-[(*tert.*-Butoxycarbonyl)amino]acetamido}-5-(cyclohepta[*d*]imidazol-2-ylamino)-pentansäure (30)

In einem 100 ml-Zweihalskolben mit Septum, Magnetrührstab und Abgang zur Stickstoff-Vakuum-Linie werden 0.26 g (2 mmol) Tropolonmethylether (**4**) vorgelegt und dreimal sekuriert. Anschließend werden ein Äquivalent Boc-Gly-Arg-OH (**25**) (0.66 g) und zwei Äquivalente Natriummethanolat 25 wt% in Methanol (0.88 g) in 20 ml abs. Methanol gelöst und zu dem Tropolonether geben. Die nun gelbe Reaktionsmischung wird für 6 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Die Lösung verfärbt sich mit der Zeit von hellgelb nach dunkelgelb bis rötlich, wobei sich nach Bewegung am Kolbenrand ein hell leuchtender gelber Film bildet. Das Lösungsmittel wird sodann am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in wenig dest. Wasser resuspendiert und mit Chloroform extrahiert (3 x 20 ml).

Die wässrige Phase wird am Rotationsverdampfer eingeeengt und der Rückstand wird an einer Cellulose-Säule chromatographisch mit Benzol/Cyclohexan/DMF 3:1:0.2 gereinigt. Nach dem Entfernen des Lösemittels verbleibt ein braunes Öl.

Ausbeute: 0.35 g (0.84 mmol, 42 % d. Th.)

ESI-MS (Intens.) m/z: 332.2 (920000) [(C₁₃H₂₆N₅O₅)⁺] , 418.2 (1350000) [(C₂₀H₂₈N₅O₅)⁺]

HR-MS: berechnet: 418.20850 gefunden: 418.20853

¹H-NMR (600 MHz, MeOD):

1.37 (9H, s, *tert.*-Butyl), 1.61-1.64 (2H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C=N-),
 1.89-1.92 (2H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C=N-), 3.14-3.15 (2H, m, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C=N-), 3.54-3.58 (2H, m, HO-C(=O)-CH-NH-C(=O)-CH₂-NH-C(=O)-O-*tert.*-Butyl), 3.97-4.00 (1H, t, ³J=6.2, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C=N-), 4.11 (1H, s, HO-C(=O)-CH-CH₂-CH₂-CH₂-NH-C=N-),
 7.55 (1H, t, ³J=9.8, -N=C-CH=CH-CH=CH-C-N-),
 7.82 (2H, t, ³J=10.0, -N=C-CH=CH-CH=CH-CH=C-N-),
 7.98 (2H, d, ³J=10.2, -N=C-CH=CH-CH=CH-CH=C-N)
 8.52 (2H, m, *tert.*-Butyl-O-C(=O)-NH-CH₂-C(=O)-NH-COOH-) ppm.

Experimentaltteil

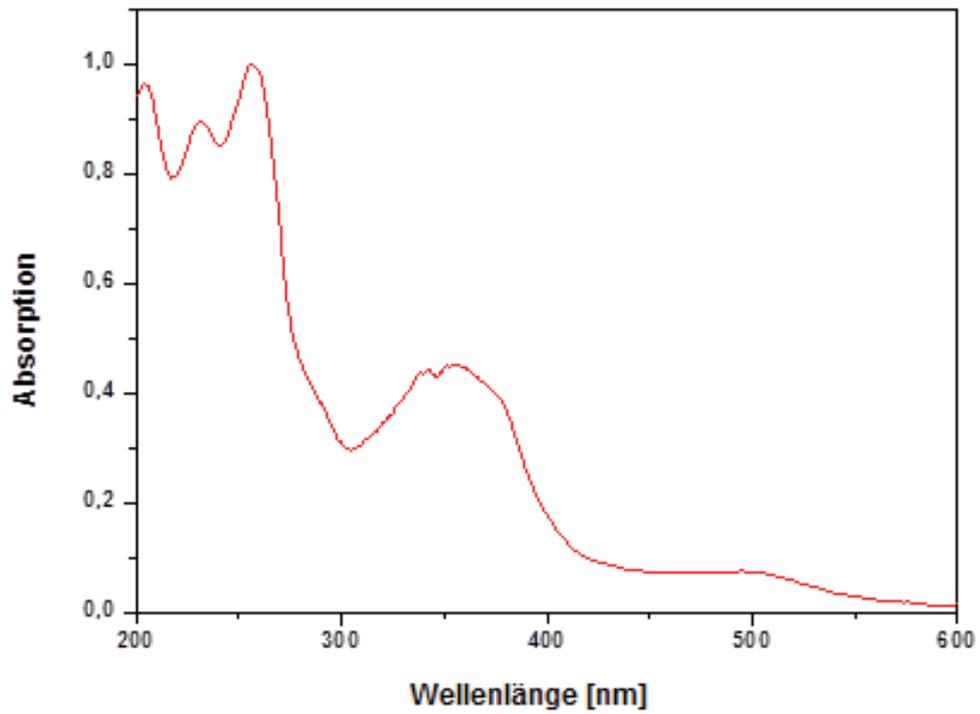
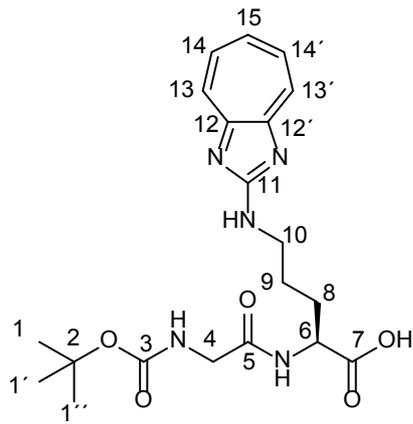


Abbildung 5.5-23: Absorption des Peptids 30

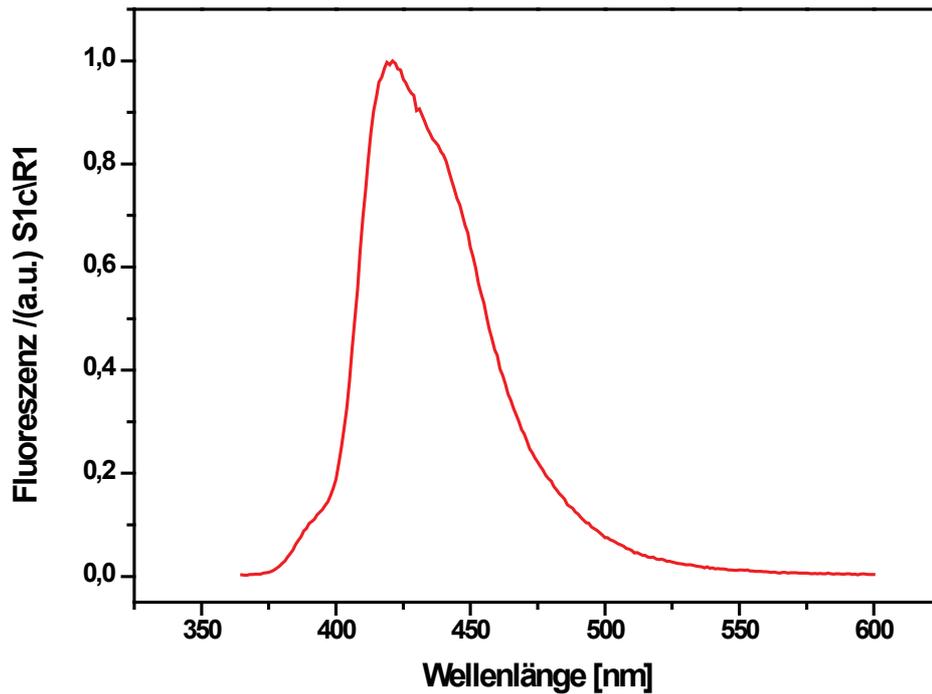


Abbildung 5.5-24: Emission des Peptids 30

Messung der Fluoreszenzquantenausbeute:

	Abs. 350 nm	Integral Em	Quantenausbeute
markiertes Dipeptid 30 Puffer	0.012	3538633	0.06
markiertes Dipeptid 30 DMF	0.011	1281931	0.03
Cumarin-120 EtOH	0.0057	344299560	

Tabelle 5.5-9: Quantenausbeute in Puffer-Lösung (pH=7) und DMF

Experimententeil

Referenz: Quantenausbeute Cumarin-120 = 0.56
n ethanol= 1.36
n water = 1.33
n DMF =1.43

Tabelle 5.5-10: Werte der Referenzsubstanz Cumarin-120

Range	λ Ex	Slit Ex	Slit Em	Pol Ex	Pol Em
365-600 nm	350 nm	5nm	2nm	0	54.7

Tabelle 5.5-11: Eingestellte Parameter bei den Fluoreszenzmessungen

Messung der Fluoreszenzlebensdauer:

	x_i	τ_i (ns)	Chi 2
30	0.255	0.22	1.045
	0.505	7.72	
	0.240	1.22	

Tabelle 5.5-12: Lebensdauer des Peptids **30** gemessen in Kaliumphosphat-Puffer
(c = 20 mmol, pH 7)

Für die Ausgleichsfunktion wurde folgende Formel benutzt:

$$F(t) = \sum_i x_i e^{-\frac{t}{\tau_i}}$$

mit x_i und τ_i als Amplitude und Lebensdauer der i -ten Spezies.

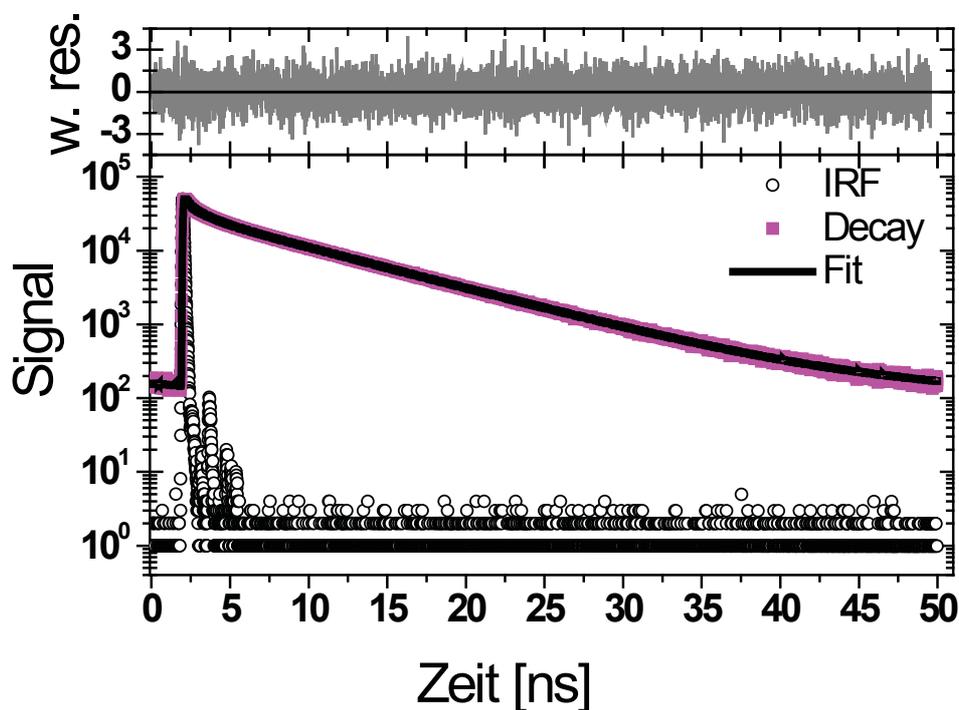


Abbildung 5.5-25: Lebensdauer des Dipeptids 30

5.5.9.2 {(S)-2-[2-(2-aminoacetamido)acetamido]-5-(cyclohepta[d]imidazol-2-yl-amino)-pentanoyl}-L-alanin

In einem 25 ml-Zweihalskolben mit Septum, Magnetrührstab und Abgang zur Stickstoff-Vakuum-Linie werden 30 mg (0.20 mmol) des Tropolonethers **4** und 80 mg (0.20 mmol) des Tetrapeptides **26** vorgelegt, dreimal sekuriert und anschließend in 5 ml. abs. Methanol gelöst. Zu der Lösung werden nun 90 mg (0.40 mmol) Natriummethanolat 25wt% in MeOH zugetropft. Die nun gelbe Reaktionsmischung wird für 6 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Anschließend werden 0.2 ml der Lösung entnommen, mit abs. Methanol verdünnt und massenspektrometrisch untersucht. Da sich hier noch sehr hohe Eduktkonzentrationen nachweisen lassen, werden zu der Reaktionsmischung 0.42 g (2.0 mmol) Natriummethanolat-Lösung gegeben und für weitere 6 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung wird nun am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit, in wenig dest. Wasser gelöst und dreimal mit je 20 ml Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wird am Rotationsverdampfer eingeeengt.

ESI-MS (rel.Ab.) m/z: 360.4 (100) [(C₁₃H₂₆N₇O₅)⁺], 446.5 (77) [(C₂₀H₂₈N₇O₅)⁺], 550.5 (38) [(C₂₇H₃₂N₇O₅)⁺], 180.7 (42) [(C₁₃H₂₇N₇O₅)²⁺], 223.7 (43) [(C₂₀H₂₉N₇O₅)²⁺], 275.7 (21) [(C₂₇H₃₃N₇O₅)²⁺]

5.5.9.3 (2S,5S,8S,11S,14S)-14-Amino-8-(carboxymethyl)-17-(cyclohepta-[*d*]imidazol-2-ylamino)-2-(4-hydroxybenzyl)-5-isopropyl-4,7,10,13-tetraoxo-11-{4-[(7-oxocyclohepta-1,3,5-trien-1-yl)amino]butyl}-3,6,9,12-tetra-aza-hepta-caprinsäure

In einem 25 ml-Zweihalskolben mit Septum, Magnetrührstab und Abgang zur Stickstoff-Vakuum-Linie werden 0.14 g (1.0 mmol) des Tropolonethers **4** und 0.10 g (0.15 mmol) *Thymopentin* vorgelegt dreimal sekuriert und anschließend in 5 ml abs. Methanol gelöst. Zu der Lösung werden nun 0.42 g (2.0 mmol) Natriummethanolat 25wt% in MeOH zugetropft. Die nun gelbe Reaktionsmischung wird für 6 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Anschließend werden 0.2 ml der Lösung entnommen, mit abs. Methanol verdünnt und massenspektrometrisch untersucht. In der Regel kann hier noch das Nebenprodukt **36** nachgewiesen werden. In dem Fall werden erneut 0.14 g (1 mmol) des Ethers **4** und 0.42 g (2 mmol) Natriummethanolat-Lösung zu der Reaktionsmischung gegeben und erneut für 6 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Hiernach sollte das Nebenprodukt **36** vollständig zu den Amino-Diaza-Azulenen **34** und **35** umgesetzt worden sein. Die Reaktionsmischung wird nun am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit, in wenig dest. Wasser gelöst und dreimal mit je 20 ml Chloroform extrahiert.

Die wässrige Phase wird am Rotationsverdampfer eingeeengt und kann im Anschluss über LC-MS (Acetonitril / Wasser) aufgetrennt werden.

ESI-MS (Intens.) m/z: 298.0 (5.6 x 10⁴), 435.7 (4.7 x 10⁴) [(C₄₄H₅₇N₉O₁₀)²⁺], 487.7 (3.4 x 10⁴) [(C₅₁H₆₁N₉O₁₁)²⁺]

Experimentaltteil

LC-MS (Intens.) m/z : 1. Fraktion bei 1.2 min.: 435.7 (5.2×10^4) [(C₄₄H₅₇N₉O₁₀)²⁺]
2. Fraktion bei 2.0 min.: 487.7 (4.6×10^4) [(C₅₁H₆₁N₉O₁₁)²⁺]

HR-MS: berechnet: 435.7109, gefunden: 435.7112 (34)

Berechnet 487.7240, gefunden: 487.7244 (35)

¹H-NMR (600 MHz, MeOD) der Mischung der Peptide **34** und **35**:

6.63 (1H, t, ³J=9.7, -N=C-CH=CH-**CH**=CH-CH=C-N-), 7.00 (2H, d, ³J=10.1, -N=C-CH=CH-**CH**-CH=CH-**CH**=C-N) 7.17 (2H, t, ³J=10.9, -N=C-**CH**=CH-CH=CH-**CH**=C-N-) ppm.

5.5.10 (S)-2-[(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-6-[(7-oxocyclohepta-1,3,5-trien-1yl)amino]-hexansäure

In einem 100 ml-Zweihalskolben mit Septum, Magnetrührstab und Abgang zur Stickstoff-Vakuum-Linie werden 0.14 g (1 mmol) Tropolonmethylether **4** und ein Äquivalent Boc-Lys-OH **52** (0.25 g) vorgelegt und dreimal sekuriert. Anschließend werden 0.42 g (2 mmol) Natriummethanolat 25 wt% in Methanol und 30 ml abs. Methanol zugegeben und die Lösung wird für 6 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand in wenig Wasser resuspendiert und mit Chloroform (3 x 20 ml) extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit.

Ausbeute: 0.27 g (0.81 mmol, 81 % d. Th.)

ESI-MS m/z (%): 295.5 (15), 351.4 (100) [(C₁₈H₂₇N₂O₅)⁺]

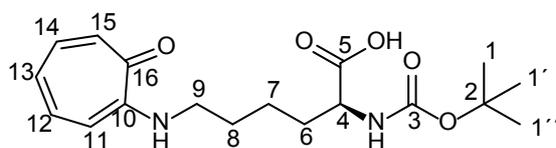
Experimentalteil

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOD):

1.43 (9H, s, *tert.*-Butyl), 1.54 (2H, ddt, $J=15.3, 9.8, 4.6$, $\text{HOOC-CH}(\text{NH-Boc})\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-}$), 1.74 (2H, m, $\text{HOOC-CH}(\text{NH-Boc})\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-}$), 1.87 (2H, m, $\text{HOOC-CH}(\text{NH-Boc})\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-}$), 3.35 (1H, s, $\text{HOOC-CH}(\text{NH-Boc})\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-}$), 3.41 (2H, t, $^3J=7.1$, $\text{HOOC-CH}(\text{NH-Boc})\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-}$), 4.10 (1H, dd, $J=9.0, 4.8$, $\text{HOOC-CH}(\text{NH-Boc})\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-}$), 6.78 (1H, t, $^3J=9.5$, $-\text{NH-C}(\text{C=O})=\text{CH-CH}=\text{CH-CH}=\text{CH-C}(\text{=O})-$), 6.83 (1H, d, $^3J=10.6$, $-\text{NH-C}(\text{C=O})=\text{CH-CH}=\text{CH-CH}=\text{CH-C}(\text{=O})-$), 7.09 (1H, d, $^3J=11.3$, $-\text{NH-C}(\text{C=O})=\text{CH-CH}=\text{CH-CH}=\text{CH-C}(\text{=O})-$), 7.35 (1H, m, $-\text{NH-C}(\text{C=O})=\text{CH-CH}=\text{CH-CH}=\text{CH-C}(\text{=O})-$), 7.39 (1H, m, $-\text{NH-C}(\text{C=O})=\text{CH-CH}=\text{CH-CH}=\text{CH-C}(\text{=O})-$), 7.89 (1H, s, $\text{HOOC-CH}(\text{NH-Boc})\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-}$)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, MeOD):

24.51 (7), 28.76 (1,1', 1''), 28.88 (6), 32.53 (8), 43.48 (9), 56.22 (4), 80.51 (2), 111.64 (11), 124.05 (12), 128.37 (13), 138.67 (14), 139.11 (15), 157.51 (3), 128.19 (10), 176.18 (5), 177.51 (16)



6. Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

- [1] a) R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 509
b) R. Y. Tsien, *Angew. Chem.* 2009, 121, 5721-5736.
- [2] K. Peneva, T. Weil, K. Müllen, *GITLaborportal* **2013**, 16. April
- [3] N. Labòria, R. Wieneke, R. Tampé, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 880-886.
- [4] a) A. Katritzky, T. Narindoshvili, *Org. Biomol. Chem.* 2009, 7, 627-643.
b) J. Wang, J. Xie, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 8738-8739.
- [5] A. V. Ivanov, I. A. Ushakov, K. B. Petrushenko, A. I. Mikhaleva, B. Trofimov, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 4554-4558.
- [6] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nature Biotechnol.* **2003**, 21, 86-89.
- [7] a) S. Wang, X. Wang, W. Shi, K. Wang, H. Ma, *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, 1784, 415-422.
b) S. Sakaguchi, *J. Biochem.* **1925**, 5, 13-24
- [8] M. Klessinger, J. Michl, *Lichtabsorption und Photochemie organischer Moleküle*; VCH: Weinheim, **1989**.
- [9] D. Pfiffi, *Dissertation* **2010**, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- [10] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3. Auflage; Springer New York, **2006**
- [11] B. Valeur, M. N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence*, 2. Auflage; Wiley-VCH: Weinheim, **2012**
- [12] D. A. Skoog, J. J. Leary, *Instrumentelle Analytik*; Springer Berlin, 4. Aufl., **1992**, S. 195 – 198,
- [13] S. Liedtke, J. Popp, *Photonik* **2007**, 58-61
- [14] J. Popp, M. Strehle, *Photonik* **2004**, 46-49

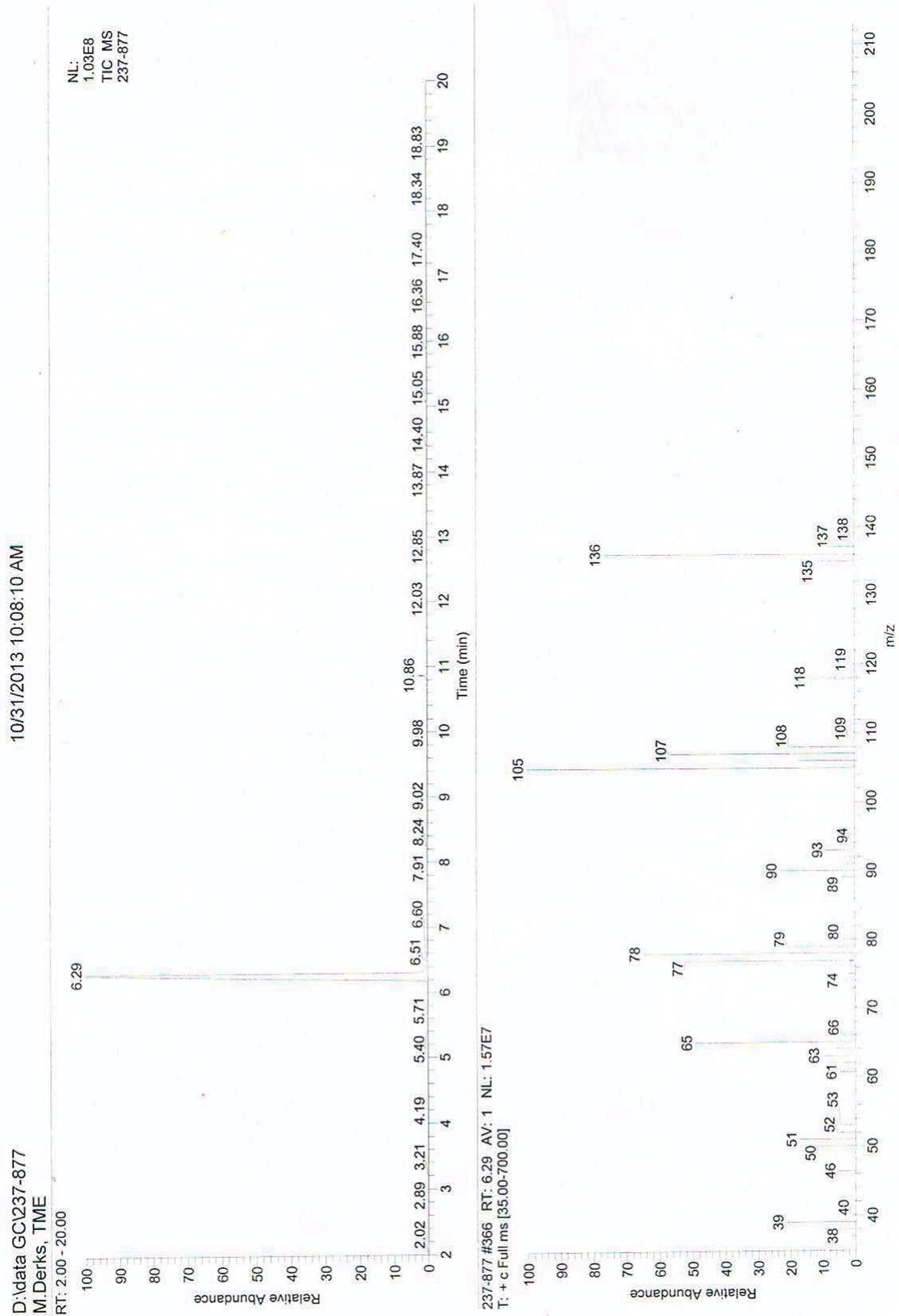
- [15] M. Strehle, J. Popp, *Photonik* **2004**, 52-55
- [16] T. Nozoe, *Proceedings of the Japan Academy* **1953**, 29, 452-456. ;
T. Nozoe, T. Mukai, I. Murata, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 3352-3353
- [17] B. Wada, *Cytologia* **1953**, 18, 266-276.
- [18] L. Cariello, S. Crescenzi, G. Prota, F. Giordano, L. Mazarella, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1973**, 99. ;
L. Cariello, S. Crescenzi, G. Prota, L. Zanetti, *Experientia* **1974**, 30, 850. ;
L. Cariello, S. Crescenzi, G. Prota, S. Capasso, F. Giordano, L. Mazarella, *Tetrahedron* **1974**, 30, 3281.
Synthese: 1.) M. Braun, G. Büchi, *JACS*. **1976**, 98, 3049-3050.
2.) M. Braun, G. Büchi, D. F. Bushey, *JACS* **1978**, 100, 4208-4213.
- [19] L. Pasic', K. Sepcic', T. Turk, P. Macek, N. Poklar, *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, 393, 132-142.
- [20] M. F. Derks, *Diplomarbeit* **2011**, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- [21] <http://de.wikipedia.org/wiki/Hochleistungsflüssigkeitschromatographie>
H. Engelhardt, *Practice of High Performance Liquid Chromatography- Applications, Equipment and Quantitative Analysis*, Springer Berlin **1986**
- [22] G. Eppert, *Flüssigchromatographie: HPLC-Theorie und Praxis*, Vieweg+Teubner Wiesbaden **1996**
- [23] S. Kromidas, *HPLC richtig optimiert Ein Handbuch für Praktiker*, Wiley-VCH Weinheim **2006**
- [24] Gaussian 03, Revision D.01,
M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria,
M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven,
K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi,

- V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega,
G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota,
R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao,
H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken,
C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann,
O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski,
P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg,
V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain,
O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari,
J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford,
J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz,
I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham,
C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill,
B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople,
Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.
- [25] R. Crous, M. Datt, D. Foster, L. Bennie, C. Steencamp, J. Huyser, L. Kirsten,
G. Steyl, A. Roodt, *Dalton Trans.* **2005**, 1108-1116
- [26] S. B. Gonser, *Dissertation 1999*, Eidgenössische Technische Hochschule
Zürich
- [27] N. Miede, *Bachelorarbeit 2014*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- [28] S. Sakaguchi, *J. Biochemistry [Tokio]* **1925**, *5*, 25-31
- [29] A. Hessing, K. Hoppe, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 3649-3654
- [30] A. Hessing, H. Schulze, *Angew. Chem.* **1967**, *79*, 688-689
- [31] J. W. Cook, J. D. Loudon, D. K. V. Steel *Jour. Chem. Soc.* **1954**,
530-533
- [32] S. Petoud, J. Zhang, *Chem. Eur. Jour.* **2008**, *14*, 1264 – 1272
- [33] G. Biggi, F. Del Cima, F. Pietra, *Jour. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*,
7101 – 7106

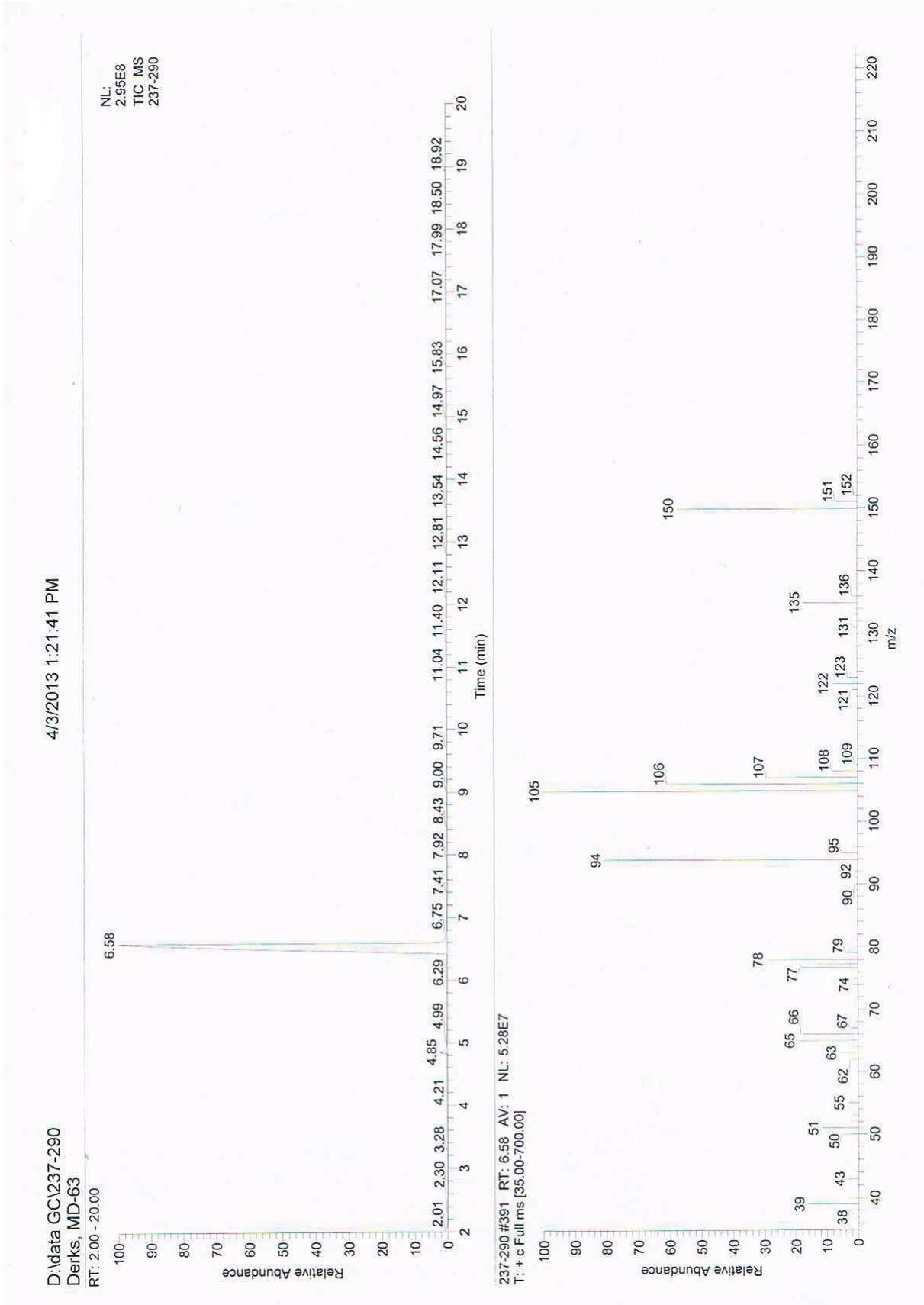
- [34] J. D. Wilson, C. F. Hobbs, H. Weingarten *Jour. Org. Chem.* **1969**, *35*, 1542 – 1545
- [35] A. Khrizman, R. D. Slack, R. C. Remsing, S. Little, V. Yardley, G. Moyana, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2007**, *340*, 569–576
- [36] M. Biyikal, *Dissertation* **2009**, Technische Universität Berlin
- [37] M. L. Edwards, D. M. Stemerick, J. R. McCarthy, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 3417-3420.
- [38] D. L. Hughes, *Org. Prep. Proced. Int.* **1996**, *28*, 127-164.
- [39] R. Andruszkiewicz, *Pol. Jour. Chem.* **1988**, *62*, 257-261
- [40] F. Thalhammer, T. Gastner, *Patent Number: 2007115799*, **18.10.2007**
- [41] P. L. Lopez-Tudanca, L. Labeaga, A. Innerarity, L. Alonso-Cires, I. Tapia, R. Mosquera, A. Orjales, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 2709-2714
- [42] A. Altevogt, *Dissertation* **2011**, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau
- [43] <http://online-media.uni-marburg.de/chemie/bioorganic/vorlesung1/kapitel3.html?/chemie/bioorganic/vorlesung1/k3-07.html>
(abgerufen am 03.06.2014)
- [44] N. Turro, V. Ramamurthy, J. C. Scaiano, *Modern Molecular Photochemistry of Organic Molecules*, University Science Books, Sausalito **2010**, S. 406-411.
- [45] T. Nozoe, K. Matsui, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1961**, *34*, 616-618
- [46] F. P. Burke, G. J. Small, J. R. Braun, T. S. Lin, *Chem. Phys. Lett.* **1973**, *19*, 574-579.

6.2 Spektren

6.2.1 GC/MS-Spektrum: Tropolonmethylether (4)



6.2.2 GC/MS-Spektrum: Tropolonethylether (11)



6.3 Abbildungs- und Strukturverzeichnis

6.3.1 Abbildungen

Abbildung 2.2-1: Jablonski-Termschema^[nach 8]

Abbildung 2.2-2: Exponentieller Abfall der Intensität *I* nach einem Geschwindigkeitsgesetz 1. Ordnung^[nach 8]

Abbildung 2.2-3: Schematische Darstellung der beteiligten Geschwindigkeitskonstanten zur Berechnung der Fluoreszenzlebensdauer^[nach 11]

Abbildung 2.5-1: NOESY-Spektrum der Regioisomere **8a** und **8b**

Abbildung 2.5-2: Verhältnis der Regioisomere **8a** und **8b**:

Abbildung 2.5-3: ¹H-NMR der beiden Regioisomere **8a** und **8b** berechnet über Signalintegration via ¹³⁵-DEPT-Experiment

Abbildung 3.2-1: Unterschied zwischen *normal-phase*- und *reversed-phase*-HPLC

Abbildung 3.2-2: Trennungsprozess über pH-Wert-abhängige Extraktion

Abbildung 3.3-1: Zeitlicher Reaktionsverlauf in Abhängigkeit von Produktzu- und Eduktabnahme

Abbildung 3.4-1: HOMO- und LUMO-Orbitale des 2-Amino-1,3-diaza-azulen (**5**)

Abbildung 3.6-1: HR-MS der Fraktion 1 der Substanz **MD-3**

Abbildung 3.6-2: ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektrum der Fraktion 1 der Substanz **MD-3**

Abbildung 3.6-3: HR-MS der Fraktion 2 der Substanz **MD-3**

Abbildung 3.6-4: ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektrum der Fraktion 2 der Substanz **MD-3**

Abbildung 3.6-5: ESI-MS des Regioisomerengemisches der Substanz **MD-3.2**

Abbildung 3.6-6: ¹H-NMR des Regioisomerengemisches der Substanz **MD-3.2**

Abbildung 3.6-7: ESI-MS der wässrigen Phase

Abbildung 3.6-8: ¹H-NMR der wässrigen Phase

Abbildung 3.6-9: ESI-MS der organischen Phase

Abbildung 3.6-10: ¹H-NMR der organischen Phase

Abbildung 3.8-1: HR-MS des Tropolonethers **23**

Abbildung 3.8-2: ESI-MS der beiden Regioisomere **8a** und **8b**

Abbildung 3.8-3: ¹H-NMR der beiden Regioisomere **8a** und **8b**

Abbildung 3.8-4: ¹H-NMR des linearen Regioisomeren **8a**

Abbildung 3.8-5: HR-MS des linearen Regioisomeren **8a**

Abbildung 3.8-6: ¹H-NMR des linearen Regioisomeren **8a**

Abbildung 3.8-7: Vergleich der ¹H-NMR-Spektren von **MD-57** und **MD-64**

Abbildung 3.8-8: ESI-MS der Umsetzung des Triobromtropolonether **18** mit der Aminosäure **10**

Abbildung 3.8-9: HR-MS des Guanidinderivats **52**

Abbildung 3.8-10: HR-MS der Aminosäure (**S**)-**12**

Abbildung 3.8-11: ESI-MS der Reaktionsmischung bei Verwendung von Cyanamid

Abbildung 3.8-12: HR-MS bei Verwendung von 1 Äquiv. Cyanamid

Abbildung 3.8-13: ESI-MS der Aminosäure (**S**)-**53**

Abbildung 3.8-14: HR-MS der Aminosäure (**S**)-**14**

Abbildung 3.8-15: ¹H-NMR der Aminosäure (**S**)-**14**

Abbildung 3.8-16: HR-MS des Dipeptids **30**

Abbildung 3.8-17: ESI-MS des Dipeptids **30** nach säulenchromatographischer Reinigung

Abbildung 3.8-18: $^1\text{H-NMR}$ des Dipeptids **30**

Abbildung 3.8-19: ESI-MS der Tetrapeptide **31 + 32**

Abbildung 3.8-20: ESI-MS der Aminosäuren **8a** und **54**

Abbildung 3.8-21: ESI-MS des optimierten Ansatzes

Abbildung 3.8-22: LC/MS des optimierten Ansatzes

Abbildung 3.8-23: HR-MS I des optimierten Ansatzes

Abbildung 3.8-24: HR-MS II des optimierten Ansatzes

Abbildung 3.8-25: $^1\text{H-NMR}$ des optimierten Ansatzes

Abbildung 3.8-26: Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors

Abbildung 4-1 $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren, sowie Absorptions- und Emissionsspektren der Regioisomere **8a** (links) und **8b** (rechts) nach dem Trennvorgang an einer Reversed phase-HPLC

Abbildung 4-2: Berechnete HOMO- und LUMO-Orbitale des 2-Amino-1,3-diaza-azulen (**5**)

Abbildung 4-3: Markierung der kleinen Peptide Boc-Gly-Arg-OH, H-Gly-Gly-Arg-Ala-OH und H-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH mit Amini-Diaza-Azulen-Fluorophoren

Abbildung 5.5-1: Absorptionsspektrum von 2-Butylaminotropon **30**

Abbildung 5.5-2: Absorptionsspektrum von 2-Butylthiootropon **31**

Abbildung 5.5-3: Absorption und Emission des symmetrischen Regioisomers **8a**

Abbildung 5.5-4: CD-Spektrum des symmetrischen Regioisomers **8a**

Abbildung 5.5-5: Absorption und Emission des asymmetrischen Regioisomers **8b**

Abbildung 5.5-6: CD-Spektrum des asymmetrischen Regioisomers **8b**

Abbildung 5.5-7: Lebensdauer des symmetrischen Regioisomers **8a**

Abbildung 5.5-8: Lebensdauer des asymmetrischen Regioisomers **8b**

Abbildung 5.5-9: Absorptionsspektren in Methanol, Methanol + Triethylamin und Methanol + Trifluoressigsäure

Abbildung 5.5-10: pH-abhängige Absorptionsspektren bei pH 3, pH 5, pH 7, pH 9, pH 11 und pH 13

Abbildung 5.5-11: Ausschnitt 300-475 nm von Abbildung 5.6-5

Abbildung 5.5-12: Ausschnitt 200-350 nm von Abbildung 5.6-5

Abbildung 5.5-13: Fluoreszenzspektren in Methanol, Methanol + Triethylamin und Methanol + Trifluoressigsäure

Abbildung 5.5-14: pH-abhängige Fluoreszenzspektren

Abbildung 5.5-15: Absorptionsspektren in Methanol, Methanol + Triethylamin und Methanol + Trifluoressigsäure

Abbildung 5.5-16: pH-abhängige Absorptionsspektren

Abbildung 5.5-17: Fluoreszenzspektren in Methanol, Methanol + Triethylamin und Methanol + Trifluoressigsäure

Abbildung 5.5-18: pH-abhängige Fluoreszenzspektren

Abbildung 5.5-19: Lebensdauer des symmetrischen Regioisomers **8a**

Abbildung 5.5-20: Lebensdauer des asymmetrischen Regioisomers **8b**

Abbildung 5.5-21: Absorption und Emission der Aminosäure (S)-14

Abbildung 5.5-22: CD-Spektrum der Aminosäure (S)-14

Abbildung 5.5-23: Absorption des Peptids 30

Abbildung 5.5-24: Emission des Peptids 30

Abbildung 5.5-25: Lebensdauer des Peptids 30

6.3.2 Schemata

Schema 2.1-1: Beispiele fluoreszierender nicht-natürlicher Aminosäuren

Schema 2.1-2: Beispiel für die Konjugation zwischen Cystein und Fluoreszein

Schema 2.1-3: Synthese von CGTDP

Schema 2.4-1: Synthese von 2-Amino-1,3-diaza-azulen durch *Nozoe et al.*^[15]

Schema 2.4-2: Parazoanthoxanthin A

Schema 2.5-1: Tautomerie von 2-Amino-1,3-diaza-azulen

Schema 2.5-2: Umsetzung des Tropolonethers 4 mit Boc-Arg-OH-hydrochlorid 7

Schema 3.3-1: Einsatz von 2-Chlortropon

Schema 3.3-2: Übersicht der Darstellungsmöglichkeiten; gezielte Synthese des Regioisomeren 8a

Schema 3.4-1: Syntheseroute ausgehend von N^o-alkylierten (S)-Ornithin

Schema 3.4-2: Synthesekonzept für den Einsatz von 3,5,7-Tribromtropolonether 18

Schema 3.4-3: Synthesekonzept für den Einsatz des Tropolonethers 22

Schema 3.5-1: Struktur der eingesetzten Peptide

Schema 3.5-2: Modellverbindungen für spektroskopische Untersuchungen

Schema 3.5-3: Potenzielle Markierungsprodukte

Schema 3.7-1: Postulierte Struktur des Farbstoffes von *Sakaguchi*^[28]

Schema 3.7-2: Bildungsmechanismus nach *Hessing* und *Hoppe*^[29]

Schema 3.6-3: Charakterisierte *Sakaguchi*-Farbstoffe

Schema 3.8-1: Synthese von 3,5,7-Tribromtropolon nach *Roodt et al.*^[25]

Schema 3.8-2: Synthese der Tropolonderivate 21 und 22 in Anlehnung an *Cook et al.*^[31]

Schema 3.8-3: Synthese von 2-Chlortropon nach *Petoud* und *Zhang*^[32]

Schema 3.8-4: Synthese von 2-Butylaminotropon 30 nach *Pietra et al.*^[33]

Schema 3.8-5: Synthese von 2-Butylthiotropon 31 nach *Weingarten et al.*^[34]

Schema 3.8-6: Synthese von 2-Methoxytropolon 4 nach *Khrizman et al.*^[35]

Schema 3.8-7: Synthese von 2-Ethoxytropolon 11 nach *Khrizman et al.*^[35]

Schema 3.8-8: Synthese von 3,5,7-Tribromtropolonmethylether 18 nach *Biyikal.*^[36]

Schema 3.8-9: Mechanismus der *Mitsunobu*-Reaktion^[38]

Schema 3.8-10: Darstellung der *Waldenschen*-Umkehr

Schema 3.8-11: Darstellung der Tropolonmethylether 23 und 24

Schema 3.8-12: Darstellung der Regioisomere 8a und 8b

Schema 3.8-13: Darstellung des linearen Regioisomeren 8a

Schema 3.8-14: Umsetzung von Tropolonethylether 11 mit der Aminosäure 10

Schema 3.8-15: Umsetzung des Triobromtropolonether 18 mit der Aminosäure 10

- Schema 3.8-16:** Umsetzung des Triobromtropolonether **18** mit Guanidinhydrochlorid **50**
- Schema 3.8-17:** Umsetzung des Tropolonether **23** mit der Aminosäure **10**
- Schema 3.8-18:** Darstellung von N^o-benzyl-geschützten Boc-Ornithin
- Schema 3.8-19:** Reaktionsverlauf bei Verwendung von Cyanamid
- Schema 3.8-20:** Guanidinisierung mit Pyrazol-carboxamidhydrochlorid
- Schema 3.8-21:** Regioselektive Synthese der Aminosäure (**S**)-**14**
- Schema 3.8-22:** Regioselektive Arginin-Markierung in einem Dipeptid
- Schema 3.8-23:** Regioselektive Arginin-Markierung in einem Tetrapeptid
- Schema 3.8-24:** Regioselektive Arginin- und Lysin-Markierung in *Thymopentin*
- Schema 3.8-25:** Umsetzung der beiden Aminosäuren **10** und **53** mit Tropolonmethylether **4**
- Schema 3.8-26:** Synthese der markierten Aminosäure **54**
- Schema 3.8-27:** Struktur der Peptide **34** und **35**
- Schema 3.8-28:** Idee eines FRET-Experimentes am Beispiel eines Lysin und Arginin enthaltenen Peptids
- Schema 4-1:** Umsetzung des Tropolonethers **4** mit Boc-Arg-OH-hydrochlorid **7**
- Schema 4-2:** Übersicht der regioselektiven Darstellungsmöglichkeiten
- Schema 4-3:** Synthese der markierten Aminosäure (**S**)-**14** ausgehend von N^o-alkylierten (*S*)-Ornithin
- Schema 4-4:** Versuche zur Darstellung der Aminosäuren **19** und **24**
- Schema 4-5:** Vorschlag für ein FRET-Experiment mit markiertem *Thymopentin*

6.3.3. Diagramme

- Diagramm 2.5-1:** Absorption und Emission des Diaza-azulen **5**
- Diagramm 2.5-2:** Absorption und Emission der nicht-natürlichen Aminosäure **8**
- Diagramm 2.5-3:** pH-abhängige Emission der nicht-natürlichen Aminosäure **8**

6.3.4. Tabellen

- Tabelle 3.8-1:** Getestete Lösungsmittel und Basen zur Optimierung
- Tabelle 5.5-1:** Quantenausbeute in Puffer-Lösung (pH=7) und DMF
- Tabelle 5.5-2:** Werte der Referenzsubstanz Cumarin-120
- Tabelle 5.5-3:** Eingestellte Parameter bei den Fluoreszenzmessungen
- Tabelle 5.5-4:** Lebensdauer der getrennten Regioisomere (HPLC) **8a** und **8b** gemessen in Kaliumphosphat-Puffer (c = 20 mmol, pH 7)
- Tabelle 5.5-5:** Quantenausbeute in Puffer-Lösung (pH=7) und DMF
- Tabelle 5.5-6:** Werte der Referenzsubstanz Cumarin-120
- Tabelle 5.5-7:** Eingestellte Parameter bei den Fluoreszenzmessungen
- Tabelle 5.5-8:** Lebensdauer der getrennten Regioisomere (Extraktion) **8a** und **8b** gemessen in Kaliumphosphat-Puffer (c = 20 mmol, pH 7)

Anhang

Tabelle 5.5-9: Quantenausbeute in Puffer-Lösung (pH=7) und DMF

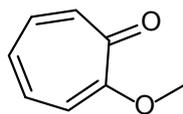
Tabelle 5.5-10: Werte der Referenzsubstanz Cumarin-120

Tabelle 5.5-11: Eingestellte Parameter bei den Fluoreszenzmessungen

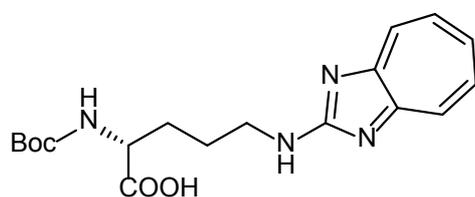
Tabelle 5.5-12: Lebensdauer des Peptids **30** gemessen in Kaliumphosphat-Puffer

(c = 20 mmol, pH 7)

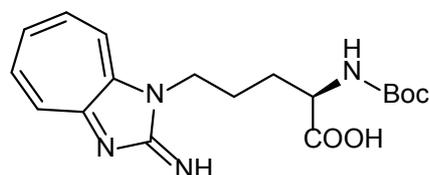
6.3.5 Strukturen



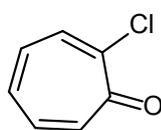
4



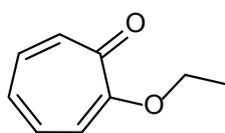
8a



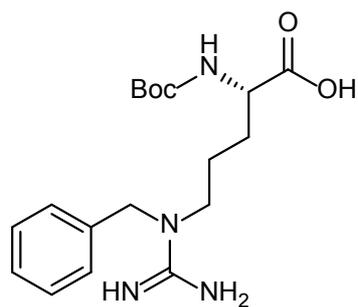
8b



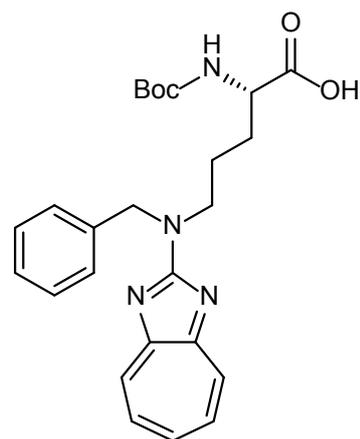
9



11

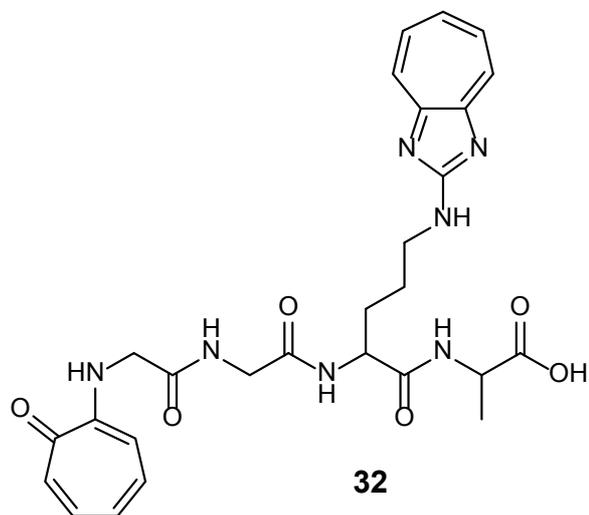
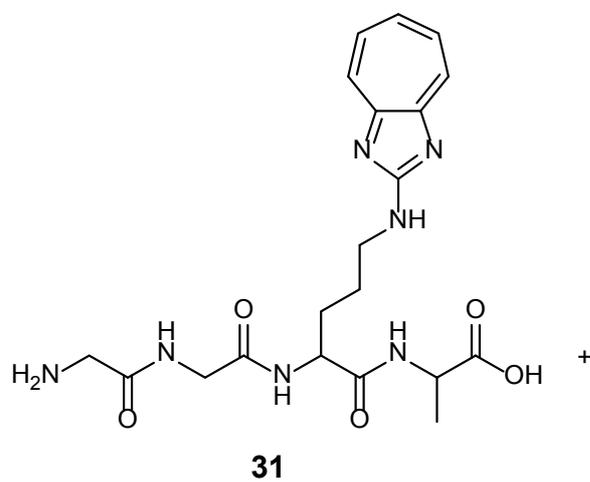
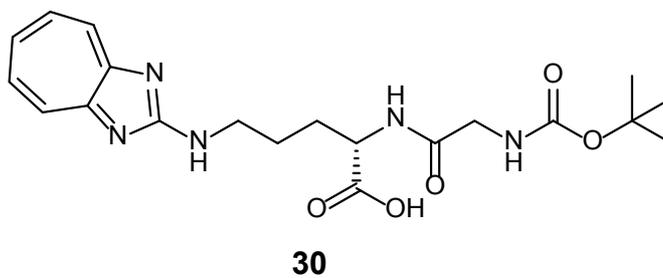
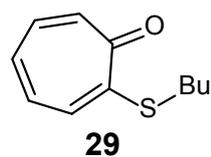
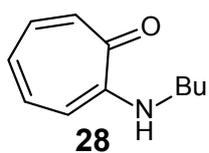
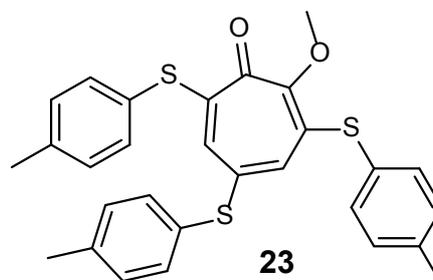
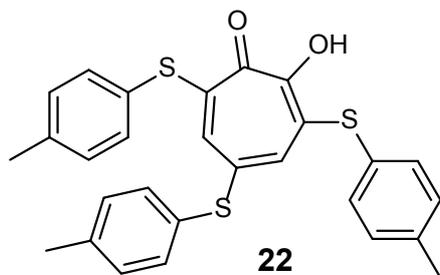
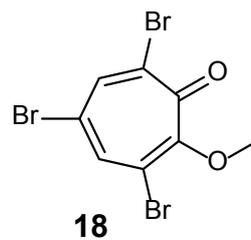
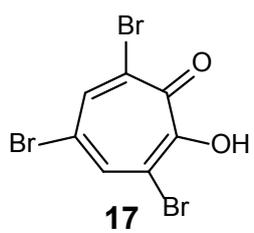


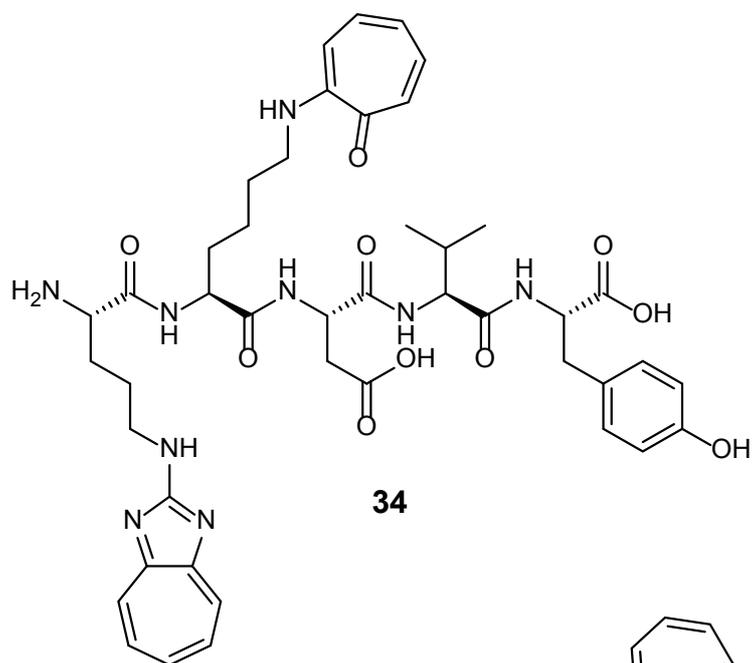
(S)-13



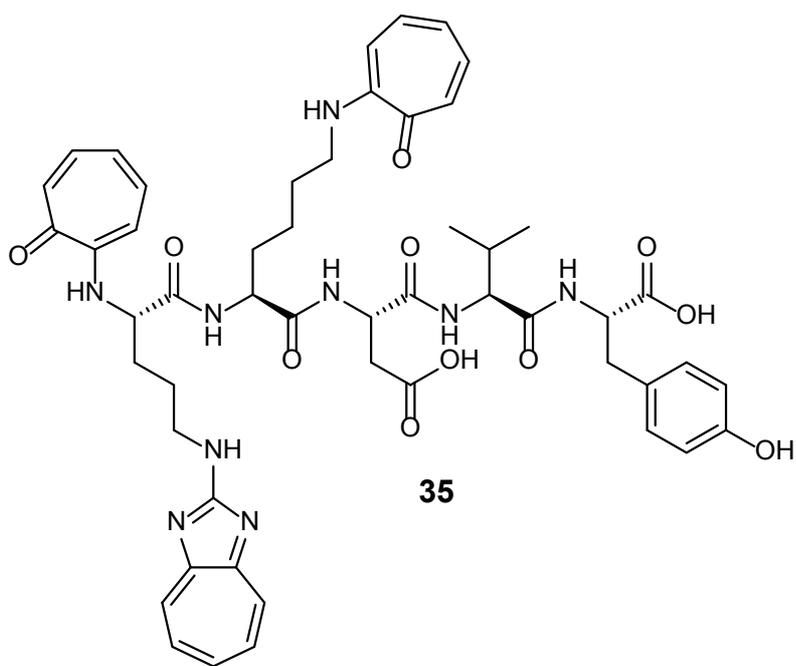
(S)-14

Anhang

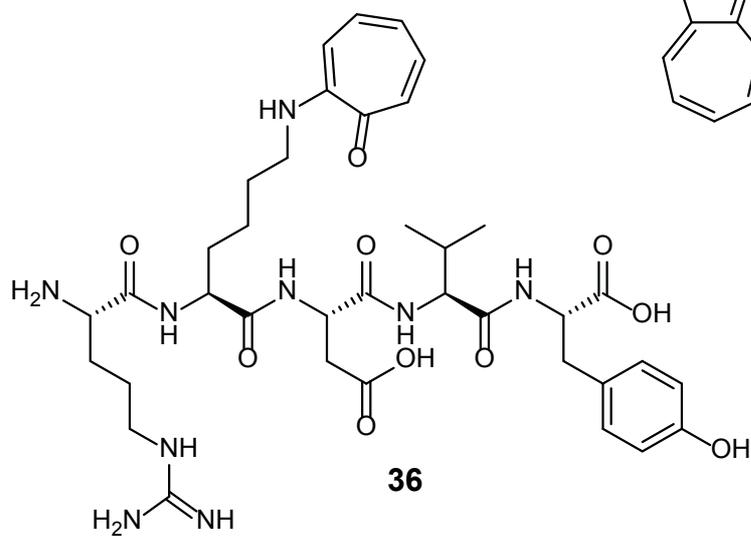




34



35



36

