
Synthese von
Lanthanid-Komplex-Fluoreszenzsonden

Diplomarbeit

vorgelegt von
Frank Nils Penkert

aus
Haan

angefertigt im
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie
zu Göttingen

1997

Für Julia

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 Ziel der Arbeit	3
2.2 Lanthanidkomplexe	4
3. Physikalische Grundlagen	6
3.1 Fluoreszenz von Lanthaniden	6
3.1.1 Lumineszenzphänomene	6
3.1.2 Atomarer Aufbau und Termsymbole der Lanthanide	7
3.1.3 Fluoreszenz und Auswahlregeln	8
3.1.4 Ligand-Lanthanid-Energietransfer	11
3.1.5 Der Effekt von Wasser	12
3.1.6 Vorteile und Nachteile von Europium und Terbium	14
3.2 Förster-Energietransfer	16
3.2.1 Grundlagen des Energietransfer nach Förster	16
3.2.2 FRET-Messungen	19
3.2.3 Einsatz von Lanthanidkomplexen	19
4. Ergebnisse und Diskussion	22
4.1 Synthese der Gesamtsonde	22
4.2 Komplexbildner	23
4.2.1 Wahl der Komplexbildnerklasse	23
4.2.2 Funktionalisierung des DOTA-Gerüsts	26
4.2.3 Synthesestrategien für einfach N-funktionalisierte DOTA-Derivate	29
4.2.4 Synthese von 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan (Cyclen)	30

4.3 Sensitizer	32
4.3.1 Wahl des Sensitizers	32
4.3.2 Einfluß der Struktur von Cumarinen und Carbostrylen auf ihre Fluoreszenzeigenschaften	33
4.3.3 Synthese der Sensitizer	35
4.3.3.1 Synthese von 7-Amino-4-methyl-carbostryl (CS124)	35
4.3.3.2 Synthese von 7-Amino- und 7-Carboethoxyamino-4-methyl-cumarin	36
4.4 Seitenarm	38
4.4.1 Struktur des modifizierten Seitenarms	38
4.4.2 Synthese von 3-Benzylthio-2-chlorpropionsäure	38
4.4.3 Möglichkeiten zur Synthese von 3-Benzylthio-2-hydroxypropionsäure	40
4.4.4 Synthese von 3-Benzylthio-2-brompropionsäure	42
4.4.5 Addition der Sensitizer an den Seitenarm	43
4.4.5.1 N-(4-Methyl-carbostryl-7-yl)-3-benzylthio-2-chlor-propionsäureamid	43
4.4.5.2 N-(4-Methyl-cumarin-7-yl)-3-benzylthio-2-chlor-propionsäureamid	44
4.4.5.3 Verunreinigung von N-(4-Methyl-carbostryl-7-yl)-3-benzylthio-2-chlor-propionsäureamid	45
4.4.5.4 ¹ H-NMR und ¹³ C-NMR Spektren der Seitenarme	47
4.6 Ringaddition an Cyclen	49
4.7 Ausblick	52
5. Experimenteller Teil	53
6. Literaturverzeichnis	65
7. Danksagung	71

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist die Synthese neuer Fluoreszenzsonden, die durch Komplexbildung die positiven Fluoreszenzeigenschaften der Lanthanide - insbesondere von Europium und Terbium - nutzen.

In dieser Arbeit wird der Syntheseweg zu solchen Lanthanid-Komplex-Fluoreszenzsonden dargestellt. Die angestrebten Sonden müssen mehrere Aufgaben erfüllen:

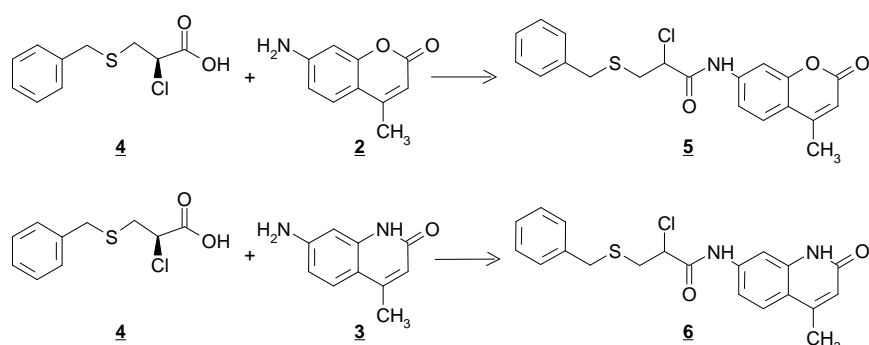
Sie müssen das Lanthanid komplexieren und vor der wäßrigen Umgebung schützen. Derivate der 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1-4-7-10-tetraessigsäure (DOTA) sind hierfür am besten geeignet. Die Synthese des Grundgerüsts 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan (Cyclen) **1** wird beschrieben.

Eine weitere Aufgabe der Sonden ist die Anregung der mit Licht nur schwer anregbaren Lanthanide mittels Energietransfers. Dafür muß die Sonde über einen sogenannten Sensitizer verfügen, der Lichtenergie absorbiert und zum Lanthanidion überträgt. Die Sensitizer 7-Amino-4-methyl-cumarin **2** und 7-Amino-4-methyl-carbostyryl **3** werden in dieser Arbeit synthetisiert.

Schließlich muß die Sonde über eine weitere Funktionalisierung verfügen, die es ermöglicht, die Sonde an Zielmoleküle zu binden. Dafür muß ein Essigsäurerest des DOTA-Gerüsts durch einen modifizierten Seitenarm ersetzt werden, der sowohl diese weitere Funktion erfüllt als auch den Sensitizer binden kann.

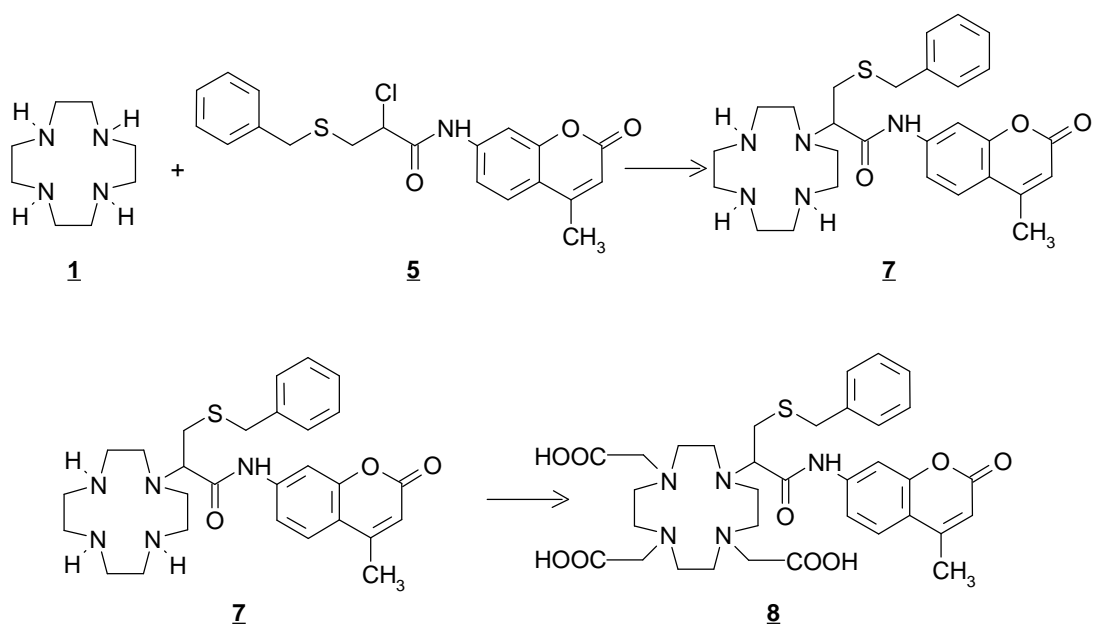
Die Synthese von verschiedenen möglichen Seitenarmen wird beschrieben, insbesondere wird 3-Benzylthio-2-chlorpropionsäure **4** - im Gegensatz zur Literatur - als reiner Feststoff erhalten.

Durch die Umsetzung des Propionsäurederivats mit den beiden Sensitizern werden N-(4-Methyl-cumarin-7-yl)-3-benzylthio-2-chlorpropionsäureamid **5** und N-(4-Methyl-carbostyryl-7-yl)-3-benzylthio-2-chlorpropionsäureamid **6** erstmals synthetisiert.



Schließlich wird die Umsetzung von N-(4-Methyl-cumarin-7-yl)-3-benzylthio-2-chlorpropionsäureamid **5** mit Cyclen **1** zum einfach substituierten Produkt, N-(4-Methyl-cumarin-7-yl)-3-benzylthio-2-(1,4,7,10-tetraazacyclododecanyl)-propionsäureamid **7**, beschrieben.

Das Produkt **7** ist die Vorstufe des Komplexbildners **8**, dessen Terbium- und Europiumkomplexe als Sonden eingesetzt werden können. Nach Abspaltung der Benzylschutzgruppe können die Sonden mit den entsprechenden Reaktionen an die Zielmoleküle gebunden werden.



2. Einleitung

2.1 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit soll eine neue Klasse von Fluoreszenzfarbstoffen erschlossen werden, die die positiven Fluoreszenzeigenschaften der Lanthanide nutzen.

Der Einsatz von Lanthanidkomplexen als fluoreszierende Sonden hat großes Interesse auf sich gezogen, insbesondere als Alternative zu Nachweismethoden, die radioaktive Antikörper bzw. Liganden verwenden, sogenannte Radioimmunoassays [1-3]. Diese Techniken sind weitverbreitet zur Detektion und Quantifizierung von wichtigen biologischen Molekülen, da sie eine sensitive Detektion ermöglichen. Fluoreszenz könnte eine genauso sensitive Detektion ermöglichen wie Radioaktivität, jedoch ohne die offensichtlichen Nachteile, die mit der Handhabung und Entsorgung von radioaktivem Material einhergehen. So wurden Nachweisgrenzen für Lanthanidfluoreszenz bei Konzentrationen von $10^{-12} \text{ mol l}^{-1}$ in wässriger Lösung und von $2 \times 10^{-15} \text{ mol l}^{-1}$ in ethanolischer Lösung berichtet [4-6]. Die Detektion von biologischen Makromolekülen kann bis in kleinere Konzentrationen erfolgen, da mehrere Chelate an ein Makromolekül gebunden werden können, ohne daß eine konzentrationsbedingte Fluoreszenzlöschung oder ein merklicher Verlust an biologischer Funktion auftritt [6-8]. Die Methode ist auch nicht nur auf Immunoassays begrenzt, sondern könnte auch der Detektion kleinerer Moleküle, wie z.B. einzelne DNA-Strängen, kleinere Peptide o.ä. dienen. Weitere Anwendungsmöglichkeiten bieten sich als Marker, um so gekennzeichnete Moleküle zu verfolgen, oder zur Entfernungsmessung im Bereich von ungefähr 5-10 nm mittels FRET-Messungen (Fluorescence Resonance Energy Transfer) [9].

In jeder Anwendung, die mit Fluoreszenz in biologischen Medien arbeitet, ergibt sich das Problem, daß die biologische Probe selbst wahrscheinlich eine große Anzahl an fluoreszierenden Komponenten enthält. So fluoreszieren z.B. die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan, sowie das reduzierte Nicotinamidadenin-dinucleotid (NADH). Durch diese Hintergrundfluoreszenz, auch Autofluoreszenz genannt, wird die Detektion erschwert und die Sensibilität erniedrigt.

Weitere Probleme ergeben sich durch Streulicht und Ramanbanden, insbesondere wenn die Stokesverschiebungen klein sind.

Der Einsatz von Lanthanidkomplexen bietet potentiell eine elegante Lösung dieser Probleme. Die Hintergrundfluoreszenz von biologischem Material ist meistens bedeutend kurzlebiger im Vergleich zu den langen Lebensdauern, die bei Verwendung von Europium (Eu^{3+}) und Terbium (Tb^{3+}) beobachtet werden. Die Zeiten bei biologischem Material bewegen sich im Nanosekunden- bis Mikrosekundenbereich, während sie bei Eu^{3+} und Tb^{3+} bis zu einigen Millisekunden betragen können. Dies erlaubt eine zeitaufgelöste Detektion, in der zwischen Anregung und Messung der Fluoreszenz eine Wartezeit liegt. Bei der Fluoreszenzmessung ist die Hintergrundfluoreszenz schon abgeklungen, und auch das Streulicht kann keinen negativen Einfluß auf die Messung nehmen.

Im Prinzip könnte jedes Molekül mit hinreichend langer Phosphoreszenz ebenfalls in dieser Art und Weise genutzt werden. In den meisten Fällen jedoch erfordert das Beobachten von langlebiger Phosphoreszenz sauerstofffreie Lösungen und vielfach niedrige Temperaturen, um konkurrierende Deaktivierungsprozesse zu reduzieren, da ansonsten die Quantenausbeute sehr klein wird, und nur wenig Licht zur Detektion zur Verfügung steht.

Der Vorteil der Lanthanide liegt nun darin, daß bei geschickter Wahl des Komplexbildners die langlebige Fluoreszenz in wäßrigen, nicht entgasten Lösungen bei Raumtemperatur beobachtet werden kann. Weiterhin zeigen die Fluoreszenzspektren von Lanthaniden sehr schmale Signale, die bemerkenswert unempfindlich gegenüber Änderungen in der Umgebung sind. Die Wellenlänge verschiebt sich selten mehr als ± 2 nm, wenn die Temperatur oder sogar die koordinierten Liganden sich ändern. Eine schmalbandige Detektion wird ermöglicht, dadurch wird das Signalrauschverhältnis der Messung verbessert.

2.2 Lanthanidkomplexe

Die frühe Geschichte der Lanthanide ist in erster Linie durch die Trennungs- und Reinigungschemie bestimmt. So wurden die wahrscheinlich ersten Lanthanidkomplexe,

Acetylacetonate, von G. Urbain [10] 1896 in einem Trennverfahren eingesetzt. Systematisch wurden die Lanthanidkomplexe jedoch erst seit Anfang der vierziger Jahre untersucht. Das Studium der Lanthanidkomplexe erweckte im Laufe der Geschichte unter wechselnden Gesichtspunkten immer wieder das Interesse. Die ersten intensiven Arbeiten wurden bei der Suche nach neuen, besseren Liganden für die Trennung und Reinigung von Lanthaniden durchgeführt. Dabei konzentrierten sich die Arbeiten hauptsächlich auf die Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten und Verteilungskoeffizienten. Die untersuchten Verbindungen waren fast ausschließlich auf solche beschränkt, die als Donoratom entweder nur Sauerstoff oder Sauerstoff in Verbindung mit Stickstoff besitzen, wie z.B. in Aminopolycarbonsäuren.

Seit Beginn der fünfziger Jahre fand die Suche nach lumineszenten und laserfähigen Komplexen das Interesse. Viele der Untersuchungen beschäftigten sich mit β -Diketonen, aber es wurde auch erkannt, daß Moleküle ohne Sauerstoff als Donoratom Komplexe bilden können. Durch das Arbeiten in wasserfreien Lösungsmitteln konnten solche Komplexe isoliert werden, z.B. mit aliphatischen Polyaminen. Weiterhin konnte durch Röntgenstrukturaufklärung gezeigt werden, daß die häufigste Koordinationszahl nicht, wie angenommen, sechs beträgt, sondern größer ist und sich je nach sterischem Anspruch zwischen acht und zehn bewegt [11].

In den siebziger Jahren standen die sogenannten NMR-Shift-Reagenzien im Mittelpunkt der Lanthanidkomplexforschung. 1969 zeigte C. C. Hinckley [12] zum ersten Mal diesen Effekt, und bis zum ersten Symposium vier Jahre später waren schon mehr als 400 Veröffentlichung erschienen.

Schließlich wurden die Komplexe von Lanthaniden in biologischen Systemen untersucht. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit in Größe und Bindungseigenschaften zu Alkali- und Erdalkalitionen können Lanthanide diese an biologischen Bindungsstellen ersetzen. Dabei können durch die Nutzung ihrer besonderen spektroskopischen und magnetischen Eigenschaften Erkenntnisse über die Bindungsstellen gewonnen werden. Neuere Techniken setzen Lanthanidkomplexe als Sonden ein. Dabei nutzt man die magnetischen Eigenschaften (Kernspintomographie), die Fluoreszenzeigenschaften (z.B. Fluorescence Resonance Energy Transfer) oder, bei Verwendung von radioaktiven Isotopen, die Radioaktivität (Radiolabelled Tumor Targeting) aus.

3. Physikalische Grundlagen

3.1 Fluoreszenz von Lanthaniden

3.1.1 Lumineszenzphänomene

Wenn eine Substanz Lichtstrahlung ausgesetzt wird, so kann sie Absorption zeigen. Es gibt zwei grundsätzliche Wege, wie die absorbierte Energie wieder abgegeben werden kann. Die erste Möglichkeit ist strahlungslos, und die Energie wird in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben. Dies geschieht durch Abgabe von Schwingungs- und Rotationsenergie während der Interaktion mit der Umgebung. Diesen Vorgang bezeichnet man als strahlungslose Relaxation.

Die zweite Möglichkeit ist die (Re-)Emission von Licht. Die Emission wird Fluoreszenz genannt, wenn der angeregte Zustand und der nach der Emission erreichte Zustand dieselbe Multiplizität aufweist. Anderenfalls wird das Phänomen Phosphoreszenz genannt. Phosphoreszenz ist streng genommen ein quantenmechanisch verbotener Vorgang, da der Wechsel der Multiplizität bei der Emission gegen die Auswahlregeln verstößt. Er wird wiederum möglich, da durch Spin-Bahn- Wechselwirkungen die Auswahlregeln zu einem gewissen Grad abgeschwächt werden. Ein ebenfalls spinverbotener Wechsel tritt bei der verzögerten Fluoreszenz auf, bei der nach der Anregung das System die Multiplizität wechselt (u.U. sogar zweimal), und dann erst die Fluoreszenz erfolgt. Den Vorgang des spinverbotenen Wechsel nennt man *intersystem crossing (ISC)*.

Licht ist gemäß der Quantentheorie gequantelt in Photonen. Die Energie eines Photons hängt mit seiner Wellenlänge zusammen. Es gilt: $E=h\nu=hc/\lambda$, wobei h die Planck'sche Wirkungskonstante, ν die Frequenz, c die Lichtgeschwindigkeit und λ die Wellenlänge ist. Die Absorption eines Photons wird möglich, wenn der Energiewert des Photons mit der Differenz zweier Energieniveaus des absorbierenden Systems übereinstimmt. Genauso ist die Wellenlänge des emittierten Photons von der Energiedifferenz der beiden involvierten Zustände abhängig. Die Gesamtenergie eines Systems ist bestimmt

durch die Summe der Rotations-, Schwingungs- und elektronischen Energien. Während die Anregung von Rotationen und Schwingungen schon durch Absorption von Mikrowellen- und Infrarotstrahlung geschieht, benötigt die Anregung in höhere elektronische Zustände Licht aus dem sichtbaren bis in den ultravioletten Bereich. Bei Raumtemperatur ist im allgemeinen nur der elektronische Grundzustand sowie der Schwingungsgrundzustand hinreichend bevölkert. Der Übergang vom elektronischen Grundzustand in höher gelegene Niveaus führt in der Regel zu einem höheren Schwingungszustand, da der elektronische Übergang viel schneller geschieht als die Kernbewegungen (Franck-Condon-Prinzip). Die physikalischen Vorgänge lassen sich anschaulich in einer Potentialkurve oder einem Jablonski-Diagramm darstellen.

3.1.2 Atomarer Aufbau und Termsymbole der Lanthanide

Bei den Lanthaniden werden bekanntermaßen die 4f-Orbitale im Laufe der Periode aufgefüllt. Da die 4f-Orbitale in einer inneren Schale liegen, geschützt von der fünften und sechsten Schale, führt das Hinzufügen eines Elektrons zu keiner Vergrößerung des Umfangs. Im Gegenteil, dadurch daß das Wachsen der Kernladungszahl aufgrund der Richtungseigenschaften der 4f-Orbitale nur unvollständig abgeschirmt wird, wird die gesamte Elektronenwolke stärker angezogen. Dies hat zur Folge, daß jedes Lanthanid gegenüber seinem Vorgänger einer leichten Kontraktion unterworfen ist, der sogenannten Lanthanidenkontraktion.

Die Elektronenkonfigurationen der freien Atome lassen sich nur schwer bestimmen, da die entsprechenden Atomspektren recht kompliziert sind, doch besteht allgemeine Übereinstimmung dahingehend, daß nahezu alle die Konfiguration $[\text{Xe}]4f^m5d^06s^2$ besitzen [13].

Die Termsymbole der Lanthanidionen lassen sich mit Hilfe des Kopplungsschemas nach Russel-Saunders ermitteln. Das Termsymbol leitet sich vom Gesamtbahndrehimpuls L ab, wobei berücksichtigt werden muß, daß bei den Lanthaniden nun noch sieben f-Orbitale hinzukommen mit den entsprechenden ganzzahligen Werten von +3 bis -3 für m_l . Für jedes Ion werden diese Werte in Form eines "Grundterms" angegeben, wobei entsprechend $L=0, 1, 2, 3, 4, 5, 6$ die Symbole S, P, D, F, G, H, I genannt werden. Die

hochgestellte Zahl gibt die Multiplizität S des Terms an und die tiefgestellte Zahl den Gesamtdrehimpuls J .

Durch das Auftreten der f -Orbitale ergibt sich allerdings ein wesentlicher Unterschied zu den Übergangsmetallen. Da die d -Elektronen in Übergangsmetall-Ionen dem direkten Einfluß benachbarter Gruppen ausgesetzt sind, ist die Auswirkung eines Ligandenfelds auf den Grundterm des freien Ions höher zu bewerten als der Einfluß der Spin-Bahn-Kopplung. Nun befinden sich aber die $4f$ -Orbitale der Lanthanidionen größtenteils im Inneren des Elektronenrumpfes und werden so von den äußeren Elektronenschalen wirksam von der chemischen Umgebung abgeschirmt. Die Spin-Bahn-Kopplung ist daher erheblich größer als das Ligandenfeld. Folglich bestimmt sich J nach dem Spin-Bahn-Kopplungsschema zu den Werten $J=L+S$, $L+S-1, \dots, |L-S|$. Es ergeben sich die folgenden Terme für den Grundzustand der einzelnen Lanthanid(III)ionen (Tab.1):

Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu
$^2F_{5/2}$	3H_4	$^4I_{9/2}$	5I_4	$^6H_{5/2}$	7F_0	$^8S_{7/2}$	7F_6	$^6H_{15/2}$	5I_8	$^4I_{15/2}$	3H_6	$^2F_{7/2}$	1S_0

Tab.1: Grundzustände der Lanthanid(III)ionen

3.1.3 Fluoreszenz und Auswahlregeln

Es wurde schon früh bemerkt, daß die Lanthanide, die bei Raumtemperatur im festen Zustand fluoreszieren, ebenfalls in Lösung fluoreszieren. Die Fluoreszenz in Lösung zeigt annähernd dieselben Energien und Intensitätenverhältnisse, jedoch kleinere absolute Intensitäten als im festen Zustand. Die maximale Fluoreszenz wurde bei den Elementen in der Mitte der Serie, Eu^{3+} , Gd^{3+} , Tb^{3+} , beobachtet, einhergehend mit einem starken Abfall der Fluoreszenz zu Sm^{3+} und Dy^{3+} hin [14-17].

Die direkte Anregung in die Zustände, aus denen die Fluoreszenz erfolgt, ist ineffizient, da elektrische Dipolübergänge innerhalb der $4f$ -Schale Paritäts-(Laporte-)verboten sind; die Elektronenwellenfunktion ändert bei diesen Übergängen nicht ihre Parität. Bei den Übergängen zwischen den 5D und 7F Niveaus von Terbium(III) und Europium(III)

ändert sich die Spinquantenzahl S von 2 nach 3, was zusätzlich spinverboten ist. Daß solche Übergänge trotzdem beobachtet werden, ist auf nicht-zentrumsymmetrische Terme im Kristallfeld-Hamiltonoperator zurückzuführen.

In Lösung wird durch Komplexbildung die Intensität der Fluoreszenz erheblich erhöht. In der Mehrzahl der Komplexe scheint der Mechanismus von G. A. Crosby [18] zur Fluoreszenz zu führen. Nach diesem Mechanismus erfolgt die Anregung des Liganden zum ersten angeregten Singulettzustand, gefolgt von einem strahlungslosen Übergang zum Triplettzustand. Die Energie wird dann ebenfalls strahlungslos in den angeregten (4f-)Zustand des Lanthanids übertragen, von dort aus kehrt das Lanthanid unter Fluoreszenzstrahlung in den Grundzustand zurück (Abb. 1). Der Energietransfer vom Liganden zum Lanthanid geschieht durch Dipol-Dipol Wechselwirkungen und wird nach der Theorie von T. Förster [19] beschrieben.

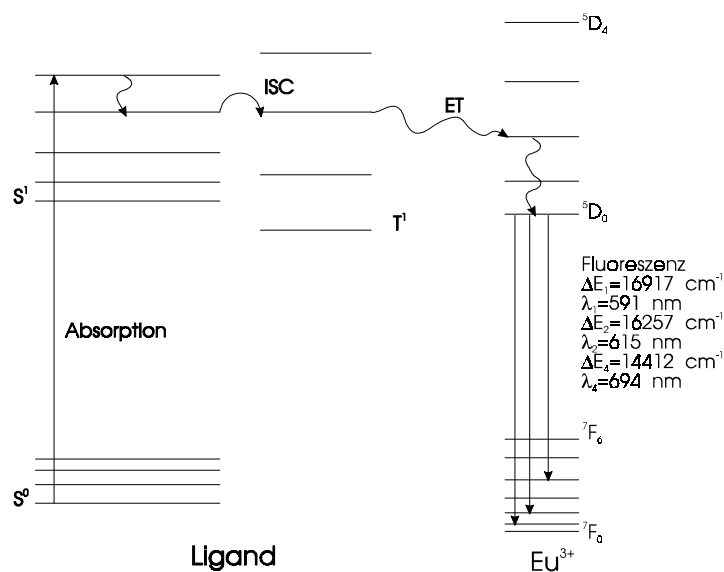


Abb.1: Jablonski-Diagramm des Energietransfermechanismus nach Crosby [18]

Die Lanthanide lassen sich hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften in drei Gruppen einteilen [13]. Während bei Sc^{3+} , Y^{3+} , La^{3+} keine 4f- \rightarrow 4f Übergänge möglich sind, ist bei Gd^{3+} die Energielücke zwischen Grundzustand und dem niedrigsten angeregten Term so groß, daß kein effizienter Energietransfer mehr stattfinden kann. Bei Sm^{3+} , Eu^{3+} , Tb^{3+} und Dy^{3+} beobachtet man starke Fluoreszenz. Dies ist eine Folge davon, daß die angeregten Niveaus der Metallionen energetisch in der Nähe der angeregten

Ligandenniveaus liegen und die Energie effektiv vom Ligand zum Lanthanid übertragen werden kann. Bei den Ionen Ce^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} und Yb^{3+} liegen die Energieniveaus sehr dicht, so daß die Wahrscheinlichkeit für strahlungslose Relaxation zunimmt und nur eine schwache Fluoreszenz beobachtet werden kann. Die intensivste Fluoreszenz zeigen also Europium und Terbium. Die Fluoreszenz von Eu^{3+} erfolgt bei den Übergängen aus den zu den Termen $^5\text{D}_0$ und $^5\text{D}_1$ gehörenden Niveaus, wobei die (wahrscheinlicheren) Übergänge von $^5\text{D}_0$ zu $^7\text{F}_1$, $^7\text{F}_2$, $^7\text{F}_4$ führen. Aus dem $^5\text{D}_4$ Zustand erfolgt die Fluoreszenz beim Tb^{3+} mit dem Übergang $^5\text{D}_4 \rightarrow ^7\text{F}_j$ mit $J=6, 5, 4, 3$.

Streng genommen darf man bei Lanthaniden nicht von Fluoreszenz sprechen, da sich die Multiplizität der Terme bei der Emission ändert. Die Bezeichnung Lumineszenz wäre treffender für Übergänge mit so hohen Multiplizitäten. Jedoch hat sich in der Literatur der Begriff der Lanthanidfluoreszenz als gewöhnliche Sprechweise eingestellt, weshalb dieser Begriff auch in dieser Arbeit verwendet wird.

$\text{Eu}^{3+} (4f^7)$		$\text{Tb}^{3+} (4f^9)$	
Niveau	Energie [cm^{-1}]	Niveau	Energie [cm^{-1}]
$^7\text{F}_0$	0	$^7\text{F}_6$	85
$^7\text{F}_1$	360	$^7\text{F}_5$	2.100
$^7\text{F}_2$	1.020	$^7\text{F}_4$	3.356
$^7\text{F}_3$	1.887	$^7\text{F}_3$	4.400
$^7\text{F}_4$	2.865	$^7\text{F}_2$	5.038
$^7\text{F}_5$	3.909	$^7\text{F}_1$	5.440
$^7\text{F}_6$	4.980	$^7\text{F}_0$	5.700
$^5\text{D}_0$	17.277	$^5\text{D}_4$	20.500
$^5\text{D}_1$	19.028	$^5\text{D}_3$	26.356
$^5\text{D}_2$	21.519	$^5\text{D}_2$	28.150
$^5\text{D}_3$	24.408	$^5\text{D}_1$	30.650
$^5\text{D}_4$	27.670	$^5\text{D}_0$	31.228

Tab.2: Energieniveaus von Eu^{3+} und Tb^{3+} [13]

3.1.4 Ligand-Lanthanid-Energietransfer

Die Fluoreszenz von Lanthanidkomplexen wird durch ihre Lebensdauer und die Quantenausbeute beschrieben. Lanthanidkomplexe zeigen gewöhnlich einfach exponentielle Lebensdauern. Die Intensität I_t zu der Zeit t nach der Anregung ist gegeben durch (Gl. 1), wobei I_0 die Intensität am Anregungsmoment $t_0=0$ ist.

$$I_t = I_0 \exp(-k_{obs}t) \quad (\text{Gl. 1})$$

Das Abklingen der Kurve ist durch k_{obs} , die beobachtete Abklingrate, charakterisiert. Sie ist die Summe der Abklingrate für strahlende Prozesse k^0 und der Abklingrate für konkurrierende strahlungslose Prozesse k^{nr} , (Gl. 2).

$$k_{obs} = k^0 + \sum k_i^{nr} \quad (\text{Gl. 2})$$

Üblicherweise wird die Lebensdauer τ der Emission selbst angegeben, die einfach die reziproke Größe von k_{obs} ist. Eine lange Lebensdauer ist offensichtlich eine Voraussetzung für zeitaufgelöste Messungen. Lebensdauermessungen bieten ein Maß für die Effizienz von Licht emittierenden Prozessen (vgl. Quantenausbeute, weiter unten). Eine lange Lebensdauer (in der Nähe von $\tau^0=1/k^0$) zeigt an, daß keine strahlungslosen Prozesse effektiv mit der Lumineszenz konkurrieren.

Die Quantenausbeute ist der Quotient aus emittierten und absorbierten Photonen und ist daher eine direktes Maß für die Effizienz des Emissionsprozesses. Die (Emissions-) Quantenausbeute φ_{em} berechnet sich nach (Gl. 3), wobei der Nenner nach (Gl. 2) gleich der beobachteten Abklingrate ist. Es wird der direkte Zusammenhang zwischen Lebensdauer und Quantenausbeute gezeigt.

$$\varphi_{em} = \frac{k^0}{k^0 + \sum k_i^{nr}} = \frac{k^0}{k_{obs}} = k^0 \tau_{obs} \quad (\text{Gl. 3})$$

Die direkte Proportionalität der beiden Größen spiegelt wieder, daß das Fehlen von strahlungslosen Relaxationswegen ein hohe Quantenausbeute begünstigt. Für *via* Ligand angeregte Lanthanidfluoreszenz ist die Gesamtquantenausbeute sowohl von der

Population des Niveaus, von dem der Energietransfer vom Liganden zum Lanthanid erfolgt, als auch der Effizienz des Energietransfers η_{et} selbst abhängig. Durch die Gleichung (Gl. 4) wird die (Emissions-)Quantenausbeute in Lanthanidkomplexen beschrieben.

$$\varphi_{em} = \varphi_D \eta_{et} k^0 \tau_{obs} \quad (\text{Gl. 4})$$

Die Quantenausbeute für den Bevölkungsprozeß des Ligandenniveaus, von dem der Energietransfer erfolgt, ist φ_D . Es ist zu erwarten, daß der Wert von k^0 sich nicht wesentlich von Komplex zu Komplex ändert, da er die Abklingrate eines lanthanid-internen Prozesses ist. So bleibt es die Aufgabe bei der Entwicklung neuer Sonden, die Größen φ_D und η_{et} durch die Wahl von geeigneten Sensitizern und τ_{obs} durch Gestaltung der Koordinationsphäre des Lanthanids zu optimieren.

3.1.5 Der Effekt von Wasser

Daß Wassermoleküle die Fluoreszenz von Lanthaniden löschen, wurde zuerst von J. L. Kropp und M. W. Windsor [20-22] in den sechziger Jahren bemerkt. Sie zeigten, daß die Lumineszenz von Eu^{3+} und Tb^{3+} in D_2O intensiver ist als in Wasser. Untersuchungen an verschiedenen Lanthaniden zeigten, daß der Quotient der Intensitäten in D_2O und H_2O umgekehrt proportional zu der Energielücke zwischen dem Emissionsniveau und dem darunter liegenden Niveau ist. Die Lebensdauern verhalten sich ähnlich. Sie schlossen daraus, daß Energietransfer vom Lanthanidion in die OH-Streckschwingungen des Wassers die Fluoreszenz löscht und daß die Abklingrate proportional zur Anzahl der OH-Oszillatoren ist. Allgemein ausgedrückt sinkt die Wahrscheinlichkeit, daß ein A-B Oszillator vom Grundschwingungsniveau ν'' in das höhere Schwingungsniveau ν' angeregt wird, mit dem Wachsen von ν' .

Der Energietransfer in OD-Schwingungen ist weniger effizient als in OH-Schwingungen, da OD-Schwingungen die kleinere Streckschwingungsfrequenz haben. Um eine gegebene Energielücke zu überbrücken, ist bei OD-Oszillatoren eine Anregung zu einem höheren Schwingungsniveau ν' notwendig als bei OH-Oszillatoren. Weiterhin

wird der Energietransfer zu OH (OD) Oszillatoren weniger wahrscheinlich, wenn die Energielücke zwischen Emissionsniveau und dem niedriger liegenden Niveau des Lanthanids größer wird. So ist dieser Effekt bei Europium(III) ($\Delta E=12300 \text{ cm}^{-1}$) stärker betont als bei Terbium(III) ($\Delta E=14700 \text{ cm}^{-1}$) (Abb.2).

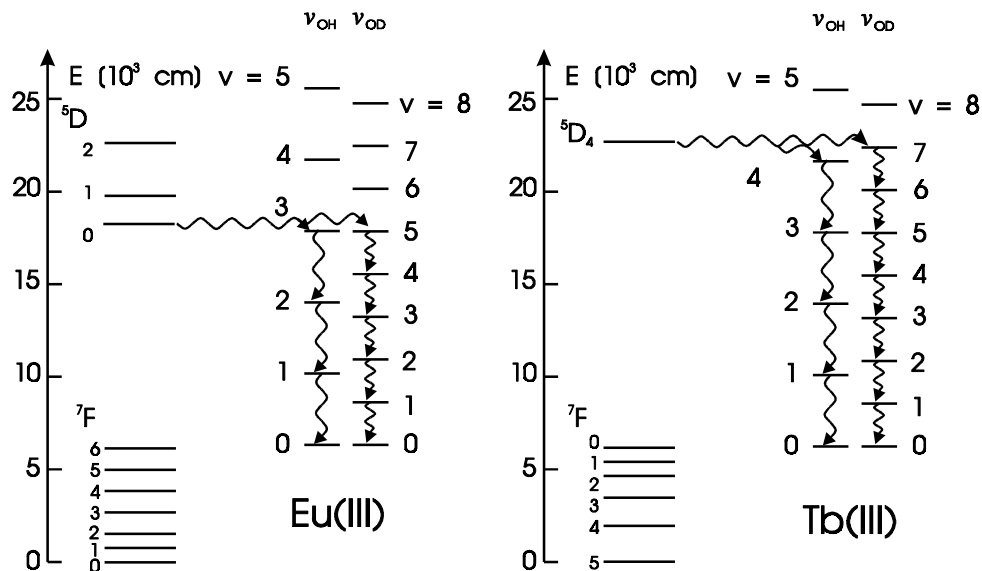


Abb.2: Fluoreszenzlöschung durch OH- und OD-Oszillatoren [23]

Weitere Arbeiten zeigten, daß der Deaktivierungsprozeß über Wassermoleküle getrennt von den anderen Deaktivierungsmöglichkeiten betrachtet werden kann. Es ergeben sich die folgenden Formeln (Gl. 5-7), in denen $k_{obs}^{H_2O}$ die in Wasser beobachtete, $k_{obs}^{D_2O}$ die in D_2O beobachtete und k_{OH} die *via* Energietransfer zu OH-Oszillatoren bedingte Abklingrate ist.

$$k_{obs}^{H_2O} = k^0 + \sum k_i^{nr} + k_{OH} \quad (\text{Gl. 5})$$

$$k_{obs}^{D_2O} = k^0 + \sum k_i^{nr} \quad (\text{Gl. 6})$$

$$\Delta k_{obs} = k_{obs}^{H_2O} - k_{obs}^{D_2O} = k_{OH} \quad (\text{Gl. 7})$$

Da die einzelnen OH-Oszillatoren unabhängig voneinander Deaktivierungswege bereitstellen, ergeben sich die folgenden Beziehungen (Gl. 8,9) zu der Anzahl q der

koordinierten Wassermoleküle, wobei die Lebensdauern τ wiederum die Kehrwerte der Abklingkonstanten k_{obs} sind.

$$\Delta k_{obs} = k_{OH} = A'q \quad (\text{Gl. 8})$$

$$q = A_{Ln}(\tau_{H_2O}^{-1} - \tau_{D_2O}^{-1}) \quad (\text{Gl. 9})$$

Die Größen A' und A_{Ln} sind Konstanten für ein gegebenes Lanthanid (unabhängig vom Komplex). Für Europium und Terbium wurden diese Konstanten von W. DeW. Horrocks, Jr. und D. R. Sudnik [24,25] empirisch ermittelt, indem sie mehrere Lanthanidkomplexe als Kristall und in Lösung untersuchten. Die Anzahl der koordinierten Wassermoleküle war aus der Röntgenstrukturanalyse bekannt. Die Auftragung von $\Delta\tau^{-1}$ gegen die bekannte Anzahl an koordinierten Wassermolekülen q ergab eine Gerade mit hohem Korrelationskoeffizienten. Die ermittelten Konstanten für die Gleichung (Gl. 9) sind $A_{Eu}=1.05$ ms und $A_{Tb}=4.2$ ms. So kann die Anzahl an koordinierten Wassermolekülen einfach durch Lebensdauermessungen in D_2O und H_2O bestimmt werden.

In neueren Untersuchungen [26] wurde die Frage erläutert, ob NH-Bindungen von Amiden und Aminen aufgrund ihrer ähnlichen Schwingungsfrequenz (3000 cm^{-1} , i.Vgl. OH: ca. 3400 cm^{-1}) ebenfalls einen Deaktivierungspfad bereitstellen. Dabei stellte sich heraus, daß dies in der Tat geschieht. Da die NH-Protonen in D_2O ausgetauscht werden, verschwand auch diese Fluoreszenzlöschung bei der Messung in D_2O und führte zu einer höheren (nicht ganzzahligen) Anzahl der koordinierten Wassermolekülen.

3.1.6 Vorteile und Nachteile von Europium und Terbium

Für Fluoreszenzmessungen sind Europium(III) und Terbium(III) aufgrund ihrer spektralen Eigenschaften die Lanthanidionen der Wahl. Jedoch besitzen beide Ionen auch negative Eigenschaften, die den optimalen Einsatz als Fluoreszenzsonden erschweren.

Um einen effizienten Energietransfer vom Sensitizer zum Lanthanid zu erreichen, müssen das Absorptionsspektrum des Lanthanids mit dem Emissionsspektrum des

Sensitizers überlappen (siehe weiter unten). Dies wird erreicht, wenn die Abstände der Energieniveaus klein sind. Vorzugsweise sollte das Energieniveau des Sensitizers energetisch etwas höher liegen, damit der Energieübertragungsprozeß exotherm verläuft. Das dabei auftretende Problem ist, daß bei einer kleinen Energiedifferenz thermisch angeregter Energietransfer vom Lanthanid zum Sensitizer zurück ermöglicht wird. Dies bietet einen zusätzlichen strahlungslosen Deaktivierungsweg für das Lanthanid. Da der Energierücktransfer temperaturabhängig ist, läßt er sich durch Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen bestimmen.

Der Sensitizer sollte sowohl über ein hinreichend hoch liegendes Niveau verfügen, von dem der Energietransfer zum Lanthanid erfolgt, als auch über ein breites Absorptionsspektrum, damit ein möglichst großes Überlappungsintegral erreicht werden kann.

Mit Terbium(III) als Lanthanidion ergibt sich das Problem, daß das Emissionsniveau (5D_4) von hoher Energie ist. Einen Sensitizer zu finden, der über ein genügend hohes Energietransferniveau verfügt, so daß der Energierücktransfer zu vernachlässigen ist, ist ein Problem, das im Abschnitt über Sensitizer diskutiert wird.

Der Energierücktransfer ist bei Messungen mit Europium(III) weniger ein Problem, da das Emissionsniveau energetisch wesentlich niedriger liegt als bei Terbium(III). Aber aufgrund des niedrigen Redoxpotentials von Europium ($E^0(\text{Eu}^{3+}-\text{Eu}^{2+})=-0.35\text{V}$) existiert eine weitere Möglichkeit, wie der Sensitizer seine Energie abgeben kann, die mit dem Energietransfer konkurriert. Der Sensitizer, insbesondere im angeregten Singulettzustand, kann durch photoinduzierten Elektronentransfer das Europiumion reduzieren [27-29].

Europium besitzt zwei Emissionsniveaus, 5D_0 und 5D_1 , und damit zwei verschiedene Lebensdauern.

Die Fluoreszenzmessung kann genutzt werden, um die Homogenität einer Probe zu prüfen, da der Übergang von 5D_0 zu 7F_0 aufgrund des Gesamtdrehimpulses von Null nicht im Ligandenfeld entartet. Für jeden Komplex existiert nur ein Signal für diesen Übergang.

Die fluoreszierenden Übergänge des Terbium(III) von 5D_4 nach 7F_6 , 7F_5 , 7F_4 und 7F_3 dagegen spalten im Ligandenfeld bis zu einer Zahl von $2J+1$ Signalen auf.

3.2 Förster-Energietransfer

3.2.1 Grundlagen des Energietransfer nach Förster

Die Theorie von T. Förster [19] beschreibt einen strahlungslosen Energietransfer zwischen zwei induzierten elektrischen Dipolen. Die Theorie wurde später von D. L. Dexter [30] erweitert. L. Stryer und R. P. Haugland [31] wandten diese Methode als erste an, um damit Entfernungen zu messen.

Der Energietransfer findet zwischen einem fluoreszenten Donor, der die Energie überträgt, und einem nicht notwendigerweise, aber häufig fluoreszenten Akzeptor, der die Energie aufnimmt, statt. Die Intensität und Lebensdauer des Donors nimmt durch den Energietransfer ab, während die Fluoreszenz des Akzeptors, falls er fluoreszent ist, zunimmt. Die Effizienz des Energietransfers E läßt sich mit den folgenden Formeln (Gl. 10,11) bestimmen, in denen I_{D_A} und τ_{D_A} die Intensität und die Lebensdauer des Donors in Anwesenheit des Akzeptors sind, und I_D und τ_D in Abwesenheit des Akzeptors. I_{A_D} und I_A sind dazu analog die Intensitäten des Akzeptors in Anwesenheit und Abwesenheit des Donors. ϵ_A und ϵ_D sind molaren Extinktionskoeffizienten des Akzeptors und des Donors. Der Energietransfer läßt sich sowohl durch Fluoreszenzmessungen des Donors (Gl. 10) als auch des Akzeptors (Gl. 11) bestimmen.

$$E = (1 - I_{D_A}/I_D) = 1 - \tau_{D_A}/\tau_D \quad (\text{Gl. 10})$$

$$E = (I_{A_D}/I_A - 1)(\epsilon_A/\epsilon_D) \quad (\text{Gl. 11})$$

In der Praxis muß in der Gleichung (Gl. 11) die Wellenlängenabhängigkeit der molaren Extinktionskoeffizienten sowie die Tatsache, daß der Akzeptor bei der verwendeten Wellenlänge auch direkt angeregt wird, berücksichtigt werden. Der Energietransfer erfüllt die in (Gl. 12) angegebene Proportionalität; ϵ_{D,λ_D} ist der molare Extinktionskoeffizient des Donors bei der (Donor-)Anregungswellenlänge, $q_{A,\lambda}$ ist das normalisierte Emissionsspektrum des Akzeptors bei gegebener Wellenlänge λ und ϕ_A ist die Fluoreszenzquantenausbeute des Akzeptors.

In der Arbeit von E. A. Jares-Erijman und T. M. Jovin [32] werden die meßtechnischen und rechnerischen Einzelheiten dieses Problems vorgestellt.

$$E \propto \varepsilon_{D,\lambda_D} q_{A,\lambda} \Phi_A \quad (\text{Gl. 12})$$

Förster bestimmte den Energietransfer in Abhängigkeit vom Abstand R zwischen Donor und Akzeptor zu:

$$E = 1/(1 + R^6/R_0^6) \quad (\text{Gl. 13})$$

Dabei ist R_0 eine für das Donor-Akzeptorpaar spezifische Konstante. Sie gibt die Distanz an, bei der 50% der Energie vom Donor zum Akzeptor übertragen werden kann. R_0 (in Nanometer) berechnet sich nach:

$$R_0 = (8.79 \times 10^{-6} J q_D n^{-4} \kappa^2)^{1/6} \quad (\text{Gl. 14})$$

mit $J = \frac{\int \varepsilon_A(\lambda) f_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int f_D(\lambda) d\lambda}$

J gibt das normalisierte Überlappungsintegral der Donoremission (f_D) und der Akzeptorabsorption (ε_A) an, die Angabe erfolgt in [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{nm}^4$]. Desweiteren gehen die Quantenausbeute der Donoremission (in Abwesenheit des Akzeptors) q_D , der Brechungsindex n und der Wert von κ^2 in R_0 ein. Der Wert κ^2 ist ein geometrischer Faktor, der die räumliche Anordnung zwischen Donor und Akzeptor berücksichtigt.

Der Energietransfer hängt umgekehrt von der sechsten Potenz des Abstandes ab, da der Energietransfer direkt proportional zum elektrischen Dipolfeld ist. Ein elektrisches Dipolfeld unterteilt sich in zwei Terme, eine "Nahfeldkomponente" und eine "Fernfeldkomponente". Die letztere ist das Strahlungsfeld des elektrischen Dipols und klingt umgekehrt proportional zum Abstand ab (mit $1/R$). Die "Nahfeldkomponente" beherrscht das Dipolfeld innerhalb der Länge einer Wellenlänge und nimmt mit $1/R^3$ ab. Innerhalb des elektrischen Nahfeldes treten keine Photonen in Erscheinung, daher ist der Energietransfer auch strahlungslos. Die übertragene Energie ist proportional zum Quadrat des elektrischen Feldes.

Für die Interaktion zwischen Donor und Akzeptor gibt es sowohl ein klassisches Modell als auch eine quantenmechanische Beschreibung.

Im klassischen Modell beginnt der Akzeptor im elektrischen Wechselfeld des Donors zu oszillieren, und der Akzeptor bildet ein induziertes Dipolmoment p_A aus. Die Größe des Dipolmoments hängt mit der elektrischen Stärke seines Erzeugerfeldes E_D zusammen. Der Zusammenhang zwischen dem Dipolmoment und dem elektrischen Feld ist durch

$p_A = \alpha_A E_D$ gegeben, wobei α_A die Polarisierbarkeit des Akzeptors ist. Die vom Akzeptor absorbierte Energie ist das Produkt aus dem induzierten Dipolmoment und dem dazugehörigen Feld, $p_A E_D = \alpha_A E_D^2$, und ist proportional zum Quadrat des Feldes, somit zu $1/R^6$. Quantenmechanisch kommt man ebenfalls auf dieses Ergebnis. Die Berechnungen wurden von C. R. Cantor und P. R. Schimmel sehr übersichtlich ausgeführt [33].

Der bestimmende Faktor im Energietransfer ist der Wert von R_0 . R_0 bietet ein Maß, wie gut der Donor Energie zum Akzeptor übertragen kann. Große Werte für R_0 zeigen an, daß auch über größere Distanzen effektiv Energie übertragen werden kann. Da das vom Donor produzierte elektrische Wechselfeld eine Frequenz haben muß, die Übergänge im Akzeptor induzieren kann, hängt R_0 vom Überlappungsintegral J (Gl. 14) ab. Die Wellenlängenabhängigkeit des Überlappungsintegrals hat zur Folge, daß bei längeren Wellenlängen ein besserer Energietransfer erfolgen kann. Physikalisch ist die Wellenlängenabhängigkeit dadurch zu erklären, daß das elektrische Feld bei längeren Wellenlängen langsamer abklingt (mit $(\lambda/R)^3$). Mathematisch ergibt sich der λ^4 Term dadurch, daß μ_A^2 proportional $\epsilon_A \lambda$ und μ_D^2 proportional $\lambda^3 q_D / \tau_D$ ist. Bemerkenswert ist, daß sich durch die umgekehrte Proportionalität von μ_D^2 zu τ_D die Donorlebensdauer aus R_0 hinaus kürzt. Dies ist einleuchtend, da eine längere Lebensdauer nur bedeutet, daß dieselbe Energie in einem längeren Zeitraum abgegeben wird. Daß die Quantenausbeute des Donors mit in den R_0 Wert eingeht, ist selbstverständlich, da nur vom Donor aufgenommene Energie auch transferiert werden kann.

Der Einfluß der räumlichen Orientierung der beiden Sonden zueinander wird durch den Faktor κ^2 berücksichtigt. κ^2 ist durch die folgende Formel gegeben, wobei θ_{DA} der Winkel zwischen den beiden Übergangsdipolmomenten ist. θ_D und θ_A sind jeweils die Winkel zwischen dem Übergangsdipolmoment und dem Vektor \mathbf{R} , der die Zentren beider Sonden miteinander verbindet.

$$\kappa^2 = (\cos \theta_{DA} - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2 \quad (\text{Gl. 15})$$

Die Werte für κ^2 können von 0 bis 4 variieren. Die Orientierung kann zu $\kappa^2=2/3$ gemittelt werden, falls sich beide Sonden schnell im Vergleich zur Lebensdauer

bewegen können. Falls dies nur eine Sonde kann, schränkt sich κ^2 auf Werte zwischen $1/3$ und $4/3$ ein.

3.2.2 FRET-Messungen

In FRET-Messungen (Fluorescence Resonance Energy Transfer) nutzt man die Entfernungsabhängigkeit des Energietransfers [9]. Man kann durch Bestimmen der Effizienz des Energietransfers Entfernungen zwischen den Sonden im Bereich von $(0.6-1.6)R_0$ ermitteln. Diese Messungen lassen sich u.a. unter physiologischen Bedingungen durchführen und finden eine breite Verwendung. Um nur einige Anwendungen zu erwähnen, seien hier exemplarisch Untersuchungen an Nukleinsäuren [34], DNA-Oligonukletiden [35-37] und der HIV-Protease [38] genannt. Aber das Messen von (festen) Entfernungen ist nur eine Anwendung von FRET. So wurden auch Diffusionsprozesse, die Bildung und der Zerfall von Komplexen und Addukten, insbesondere von biologisch relevanten Systemen, untersucht [9]. Desweiteren konnte auch die Händigkeit der Helix von DNA-Strängen mittels FRET-Messungen bestimmt werden [32].

Der Energietransfer kann prinzipiell auf verschiedene Weisen bestimmt werden. So bieten die Messung des Abfalls der Donorintensität, -lebenszeit oder -quantenausbeute, die Messung der ansteigenden Akzeptoremission und die Messung der längeren Photobleichdauer des Donors [39-44] Möglichkeiten, die Effizienz des Energietransfers zu bestimmen. Die Messung von Donorfluoreszenzeigenschaften ist eine universell anwendbare Methode, bei der jedoch berücksichtigt werden muß, daß auch andere Phänomene zu Fluoreszenzlöschung des Donors beitragen können. Die Messung von fluoreszenten Akzeptoreigenschaften ist in dieser Hinsicht weniger problematisch, da die Fluoreszenz des Akzeptors nur aus dem Energietransfer herrührt, sofern bei der Anregungswellenlänge des Donors der Akzeptor nicht absorbiert. Diese Bedingung ist aber nicht immer zu erfüllen [42-44].

3.2.3 Einsatz von Lanthanidkomplexen

Trotz der vielen erfolgreichen Anwendungen, die FRET gefunden hat, hat die Technik Einschränkungen erleiden müssen. Als erstes sind die meßbaren Entfernungen für viele biologische Anwendungen noch zu klein. Desweiteren sind die Lebensdauern der herkömmlichen Fluorophore kurz und oft multiexponentiell, was die Lebensdauer-messungen erschwert und die Genauigkeit erniedrigt. Mit einem R_0 von 4-5 nm - die größten Werte, die mit kleinen Sonden bisher erreicht werden - liegt die maximal meßbare Distanz zwischen 5.8 und 7.2 nm. Ein weiteres Problem ist das Signal-Rausch-Verhältnis, besonders bei größeren Distanzen. Wenn der Energietransfer klein wird, wird die Akzeptorfluoreszenz unmeßbar. Als letztes Problem bleibt die Unsicherheit, die mit dem Faktor κ^2 verbunden ist.

Das Donor-Akzeptorpaar mit Fluorescein als Donor und Tetramethylrhodamin als Akzeptor hat einen R_0 -Wert von ca. 4.5 nm. Einen wenig höheren Wert für R_0 ($R_0=5.0-5.4$ nm) hat Fluorescein mit Eosin als Akzeptor, jedoch überlappt die Fluoreszenz von Eosin mit der von Fluorescein derart, daß nicht einmal getrennte Maxima zu unterscheiden sind. Mit anderen Akzeptoren besitzt Fluorescein kleinere Werte, z.B. mit Tetraethylrhodamin $R_0=4.0$ nm. Fluorescein hat erschwerend eine multiexponentielle Lebensdauer im Nanosekundenbereich, und seine Fluoreszenz wird zur Hälfte in Proteinen gelöscht. Die Quantenausbeute von Fluorescein unterhalb von pH 8 ist eine Funktion des pH-Werts und sinkt zusätzlich mit wachsender Konzentration von Na^+ , Cl^- und Mg^{2+} .

Der Einsatz von Lanthanidfluoreszenzkomplexen erweist sich gegenüber herkömmlichen Sonden als überlegen. Terbium und Europium besitzen multiple Übergangsdipolmomente, so daß sie als "freibewegliche" Donoren dienen können, auch wenn sie keine Bewegungsfreiheit besitzen [9]. Dies schränkt κ^2 auf Werte zwischen 1/3 und 4/3 ein, wenn der Akzeptor ebenfalls unbeweglich gebunden ist. Diese Toleranz in κ^2 verursacht einen Fehler von ungefähr 11% in der Abstandsmessung [45].

Dadurch, daß die Sonde mit dem Biomolekül durch einen kettenförmigen, frei drehbaren Molekülteil (Linker) verbunden wird, wird die freie Beweglichkeit der Sonde erreicht und κ^2 mittelt sich auf $2/3$. Ein Linker hat jedoch den Nachteil, daß die Lage der Sonde weniger exakt zu bestimmen ist. Ein Mittelmaß, das genügend freie Beweglichkeit gewährleistet, ohne die Lage der Sonde mit zu großen Ungenauigkeiten zu belegen, ist ein sechsgliedriger Linker.

Bei gegebener Drehbarkeit der Sonde kann ein Lanthanidkomplex aufgrund seiner langen Lebensdauer während des Energietransfers mehr verschiedene Positionen einnehmen als Sonden mit kürzeren Lebensdauern. Dies führt zu einer besseren Mittelung von κ^2 . Da die Lebensdauern nicht nur lang, sondern auch einfach exponentiell sind, sind sie besonders einfach zu bestimmen. Weiterhin bieten die langen Lebensdauern die Möglichkeit der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung, mit der störende Fluoreszenzhintergrund eliminiert werden kann [46]. Dies ist besonders vorteilhaft, da die Akzeptorfluoreszenz bei großen Entfernungen sehr klein wird.

Experimente mit Europium- und Terbiumkomplexen zeigen beeindruckende Ergebnisse. G. Mathis [47] benutzte ein Europiumchelat als Donor mit einem multichromophoren Allophycocyanin als Akzeptor und berichtete einen R_0 -Wert von 9 nm.

P. R. Selvin verwendete Triethylentetraaminhexaessigsäurederivate (TTHA) als Komplexbildner für Terbium [48] und Europium [49] mit organischen Akzeptoren. Als Akzeptor für den Europiumkomplex wurde CY-5 (5,5'-Bis-(carboxymethyl)-1,1-diethyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanin) eingesetzt, und ein R_0 von 7 nm in D_2O und 5.6 nm in H_2O wurde erhalten. Der Terbiumdonor wurde mit Tetramethylrhodamin eingesetzt, und ein R_0 von 6.5 nm in D_2O und 6 nm in H_2O wurde berichtet.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Synthese der Gesamtsonde

Fluoreszente Lanthanidkomplexe können in der zeitaufgelösten Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt werden und erlauben so die Messung gegen natürliche Hintergrundfluoreszenz, somit bieten sie die Möglichkeit, Fluoreszenz gewinnbringend und vielseitig einzusetzen. Diesen Vorteilen stehen hauptsächlich zwei Probleme gegenüber, die es durch geschicktes Design des Komplexbildners zu umgehen gilt.

Ein Problem ist, daß die molaren Absorptionskoeffizienten der Lanthanide normalerweise sehr klein sind, üblicherweise kleiner als $1 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [11]. Der Grund hierfür ist, daß die angestrebten Übergänge Paritäts-(Laporte)-verboten sind. Als Folge davon läßt sich der angeregte Zustand mit herkömmlichen Lichtquellen nur wenig bevölkern. Die Anregung über einen Sensitizer bietet eine Lösung. Der Sensitizer ist ein Molekül, das leicht durch übliche Lichtquellen angeregt werden kann und anschließend die Energie zum Lanthanid überträgt. Dieses Phänomen wurde schon von S. I. Weissman im Jahre 1942 erkannt [50].

Das zweite Problem ist die Entvölkerung des angeregten Zustandes des Lanthanids durch OH-Ozillatoren. Durch den Energietransfer vom angeregten Lanthanid zu den OH-Streckschwingungen von koordinierten oder nahe am Molekül vorbeidiffundierenden Wassermolekülen werden sowohl die Lebensdauer als auch die Intensität der Emission erheblich vermindert [20-22]. Die Lebensdauern verkürzen sich von den theoretischen Werten im Millisekundenbereich zu weniger als $2.5 \mu\text{s}$. Nur für Gd^{3+} , Eu^{3+} und Tb^{3+} bleibt die Lebensdauer in wäßriger Lösung über 0.1 ms [11].

Um beim Messen in biologischen, d.h. wäßrigen Medien die Vorteile der Lanthanide zu nutzen, muß das Zentralion von seiner wäßrigen Umgebung durch den Komplexbildner abgeschirmt werden.

Weiterhin ist es wichtig, daß der Komplexbildner das Lanthanid - auch in einem genügend großen pH-Bereich - mit einer hohen Assoziationskonstante bindet, da mit dem Verlust des Lanthanids auch die Fluoreszenzeigenschaft verloren geht und eine sensitive Detektion nicht mehr möglich ist. Für *in vivo* Applikationen ist die hohe

Assoziationskonstante zwingend erforderlich, da Lanthanide meist von lebenden Organismen nicht toleriert werden.

Schließlich muß die gesamte Sonde an ein Zielmolekül - einen Antikörper, ein zu markierendes Protein oder einen DNA-Strang - gebunden werden können. Dafür benötigt die Sonde eine Bindungsstelle, einen sogenannten Linker.

4.2 Komplexbildner

4.2.1 Wahl der Komplexbildnerklasse

Der Komplexbildner sollte wie oben angeführt für die Verwendung in Lanthanid-fluoreszenzsonden eine hohe Assoziationskonstante besitzen. Unter den möglichen Komplexbildnern haben mehrzählige Liganden, sogenannte Chelate oder Kryptate, die größten Stabilitätskonstanten.

Abhängig von der Problemstellung werden verschiedene Komplexbildner eingesetzt. In Anwendungen, bei denen es auf eine schnelle, weniger stabile Komplexbildung ankommt, z. B. in einem substratspezifischen bioanalytischen Assay [3], werden Terpyridine [51-53], Komplexe mit mehreren verbrückten Pyridineinheiten, oder solche Verbindungen in Kombination mit Essigsäure-substituierten Aminogruppen [54-56] vom Typ **9** eingesetzt. Diese Komplexe haben jedoch eine niedrige Komplexbildungskonstante und verlieren mit der Zeit das Lanthanid. Ähnliche makrozyklische Ringe wurden z. B. durch Kondensation von 2,6-Diacetylpyridin und 1,2-Diaminobenzol erhalten. Die Bindungskonstanten dieser Polyazamakrozyklen [57] **10** sind etwas höher, aber da diese Verbindungen planar sind, ist das Lanthanid nicht hinreichend vor seiner wäßrigen Umgebung geschützt.

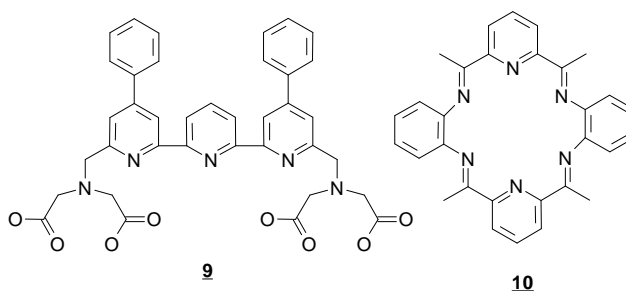


Abb.3: Komplexbildner **9** und **10**

Mitte der achtziger Jahre dienten die Bipyridylgruppen des Tris(bipyridin) Kryptatbildner **11** als Sensitizer für das eingeschlossene Europium [57]. Dieser Arbeit schlossen sich weitere an, die Bipyridine als Sensitizer verwendeten [58-62]. Die Europium- und Terbiumkomplexe zeigen eine Emission, die vom Energietransfer von den Bipyridinen herrührt aber deren Intensität durch konkurrierende photophysikalische Prozesse begrenzt ist [63]. Diese Komplexe schirmen nur mittelmäßig das Metallion vor den Wassermolekülen des Lösungsmittels ab. In Kryptatbildner **11** sind ca. 2.5 Wassermoleküle direkt am Metall koordiniert. Der Makrozyklus **12** ist in dieser Hinsicht überlegen [61].

Verschiedene Arbeitsgruppen haben die Fluoreszenzeigenschaften von Calixarenen untersucht [60]. Insbesondere die Calix[4]arene fanden viel Interesse. So ist z.B. der Europium- und Terbiumkomplex des Tetraacetamids **13** relativ stabil und wasserlöslich [62,64]. Energietransfer von den Phenylgruppen zum Metall konnte beobachtet werden. Es wurden auch Calix[4]arene synthetisiert, in denen zwei oder vier Amidgruppen gegen Bipyridingruppen ausgetauscht waren [65,66]. Obwohl bei diesen Komplexen gute Fluoreszenzeigenschaften beobachtet werden konnte, sollte erwähnt werden, daß alle berichteten Fluoreszenzmessungen in Acetonitril ausgeführt wurden. Die Fluoreszenz in wäßriger Lösung wird wahrscheinlich bedeutend niedriger liegen, da die Komplexbildner nur unvollständig gegen Wassermoleküle abschirmen. Es wurde bei den analogen Arylcalixarenen [67] gezeigt, daß zwar gute Ergebnisse in Acetonitril erzielt werden können, aber daß die Fluoreszenzintensität schon in Methanol dramatisch fällt. In Wasser ist ein weiteres Abfallen zu erwarten.

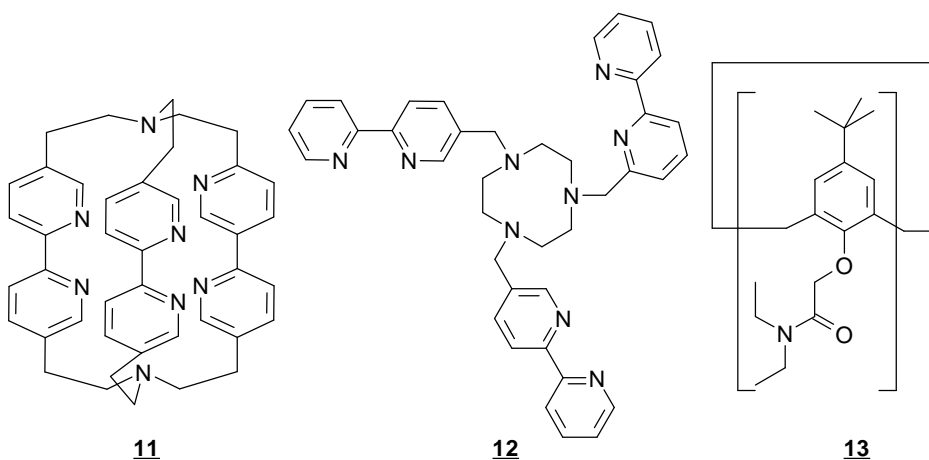


Abb.4: Komplexbildner **11**, **12** und **13**

Die Eignung der Polyaminopolycarbonsäuren und deren Derivate als Komplexbildner für Lanthanidfluoreszenzsonden war schon in verschiedenen Arbeitskreisen Gegenstand des Interesses. Die Synthese von Komplex **14** [68] war einer der ersten Versuche, die hohen Assoziationskonstanten der Polyaminopolycarbonsäuren in Lanthanidfluoreszenzsonden zu nutzen, indem man ein weiteres Molekül einbaut, das als Sensitizer dient. Seitdem wurden eine große Anzahl Untersuchungen an offenkettigen Polyaminopolycarbonsäuren durchgeführt. Unter anderem wurden DTPA-Derivate, z.B. einige DTPA-Amide [69], die N-(3-Benzoyloxy-propionsäure-2-yl)-diethylentriamin-pentacarbonsäure (BOPTA) [70] und der durch Umsetzung von DTPA mit 7-Amino-4-methyl-carbostyryl (CS124) synthetisierte Komplex **15** [48,49,71,73], untersucht. Weiteres Interesse finden längerkettige Polyaminopolycarbonsäuren, z.B. Triethyltetraaminhexacarbonsäure (TTHA) [74].

Stabilere Komplexe mit Lanthaniden als die offenkettigen Varianten bilden zyklische Polyaminocarbonsäuren und deren Derivate. Die am häufigsten verwendeten Ringe sind die neungliedrige 1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-triessigsäure (NOTA), der zwölfgliedrige Ring 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure **16** (DOTA) und die vierzehngliedrige 1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecan-1,4,8,11-tetraessigsäure (TETA). Untersuchungen an Lanthanidkomplexen anderer cyclischer Polyaminopolycarbonsäuren sind eher selten, siehe z.B. 9,17-Dicarboxy-1,4,7,10,13,16-hexaazacyclooctadecan-1,4,7-triessigsäure (Hdtpa-dien) [70,74,75].

Von den drei obengenannten Ringen ist DOTA der am besten untersuchte Komplexbildner, und auf ihn konzentriert sich der Großteil der aktuellen Forschung. Er besitzt die höchste Komplexbildungskonstante hinsichtlich der Lanthanide [76-80]. So hat die Komplexbildung von Europium (Eu^{3+}) und Terbium (Tb^{3+}) mit EDTA einen Wert von $\lg K=17.32$ bzw. 17.92 , DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure) $\lg K=22.39/22.71$ und DOTA $\lg K=28.2/28.6$ [76,77]. Auch Derivate mit variierenden Sensitizern wurden synthetisiert [72], so z.B. **17** [73]. Die Eignung der unterschiedlichen Sensitizer wird weiter unter in dieser Arbeit besprochen.

Mit besonders interessanten Derivaten beschäftigt sich die Arbeitsgruppe von D. Parker. In diesen Derivaten wurden die Essigsäurereste durch Phosphinsäurereste ersetzt [81,82]. Diese Verbindungen sind trotz ihrer kleineren Assoziationskonstanten interessant, da sie das Lanthanid völlig von Wassermolekülen abschirmen [81], z.B. **18**

[82]. Die Gadoliniumkomplexe dieser Verbindungen stellen neue Kontrastmittel für die Kernspintomographie dar, deren Lipophilie sich über den aliphatischen Rest an der Phosphinsäure einstellen läßt.

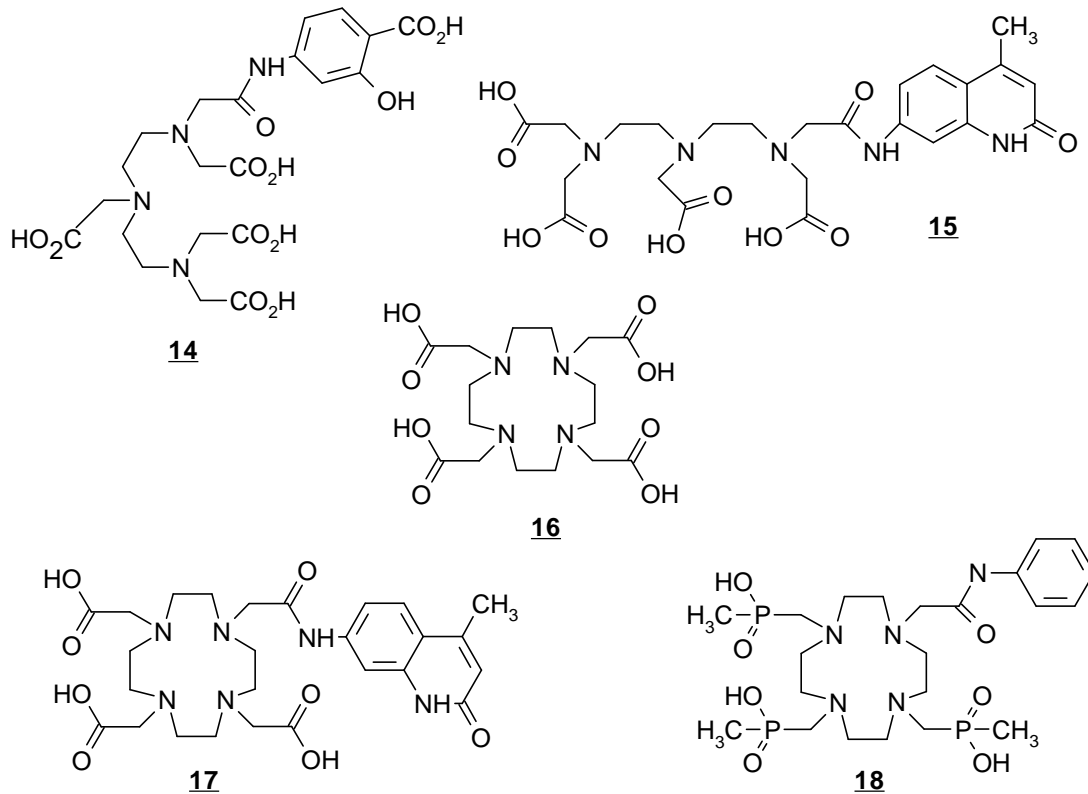


Abb.5: Komplexbildner **14-18**

4.2.2 Funktionalisierungsmöglichkeiten des DOTA-Gerüsts

Auch in dieser Arbeit soll der Komplexbildner ein DOTA-Derivat sein. DOTA wird durch die Umsetzung von 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan (Cyclen) mit Bromessigsäure synthetisiert. Für die Derivatisierung gibt es zwei grundsätzliche Funktionalisierungswege. Einmal kann man ein Cyclenderivat einsetzen, das an einem Kohlenstoffatom eine entsprechende Seitenkette besitzt, man erhält ein C-funktionalisiertes DOTA. Zum anderen kann man an die Stickstoffatome des Cyclens nacheinander verschiedenen "Seitenarme" addieren, man erhält ein N-funktionalisiertes DOTA.

Die Addition eines Sensitizers an einen auf DOTA basierenden Lanthanidkomplex ist durch eine Amidbildung zwischen einer Aminogruppe des Sensitizer und einem Essigsäurerest des DOTA erprobt. Der amidgebundene Sensitizer kann effektiv Energie zum zentralen Lanthanidion übertragen. Diese N-Funktionalisierung hat außerdem den Vorteil, daß die dreifach positive Ladung des Lanthanidions von den drei verbleibenden Carboxylatgruppen kompensiert wird. Die resultierende Ladungsneutralität ist insbesondere für Anwendungen *in vivo* interessant, da keine Wechselwirkungen mit dem vorhandenen Ionenhaushalt auftreten.

Die zweite Funktionalität, der Linker, muß am selben Seitenarm des DOTA-Moleküls implementiert sein, wenn das Problem verschiedener Isomere umgangen werden soll. Die Synthese mit einer weiteren N-Funktionalisierung für den Linker würde in der Regel zwei Isomere produzieren, wobei die beiden zusätzlich funktionalisierten Seitenarme entweder benachbart oder gegenüber im Ring stehen würden. Die Synthese über eine zusätzliche C-Funktionalisierung für den Linker würde sogar vier Isomere zur Folge haben, da die Bindung des Sensitizers i.a. an allen Stickstoffatomen gleichberechtigt ist. Die Synthesen mit zwei Funktionalitäten erfordern also aufwendige Synthesestrategien und bieten gegenüber der mit doppelter Funktionalität keine Vorteile. Deshalb wurde in dieser Arbeit entschieden, eine Sonde zu synthetisieren, in der sowohl der Sensitizer als auch der Linker an demselben modifizierten Seitenarm am DOTA-Gerüst angebracht sind. Jedoch sollen hier kurz Strategien der beiden anderen Synthesewege aufgezeigt werden. Die bisher publizierten Strategien, um regioselektiv zwei Stickstoffatome des Cyclens umzusetzen, führen über eine Hydrolyse von 1,4,7,10-Tetraazatricyclo[5.5.1.0]-tridecanen **19** zu 1-Formyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecanen **20** [83]. Über diesen Syntheseweg werden 1,7-substituierte Cyclenderivate erhalten [84] (Abb.6). Anschließend müßte noch die Umsetzung der anderen Stickstoffatome mit Bromessigsäure, die Abspaltung des Formylrestes mit konzentrierter Schwefelsäure [83] und die Reaktion des zweiten modifizierten Seitenarmes erfolgen.

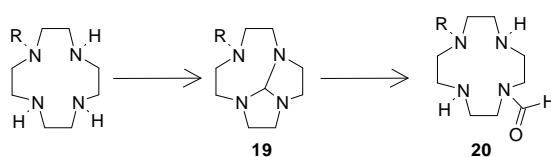


Abb.6: Synthese von 1,4-substituierten Cyclenderivaten

Für die C-Funktionalisierung hingegen wurden schon viele Synthesen beschrieben. Fast ausschließlich wurden Linker bzw. Linkervorstufen in die Komplexe integriert, um ein Lanthanid an ein anderes Molekül zu binden. Die synthetisierten Komplexe dienen, u.U. als Vorstufen, für Anwendungen in der Kernspintomographie und für den Einsatz von radioaktiven Isotopen in der Tumorbekämpfung. Aber auch hier haben sich N-funktionalisierte Derivate als überlegen gezeigt [85]. Zum einen sind sie synthetisch einfacher zugänglich, zum anderen können ladungsneutrale Komplexe in höheren Konzentrationen injiziert werden, ohne daß beim Patienten Schmerzen auftreten.

Die übliche Synthese [85-87] von C-funktionalisierten DOTA-Derivaten ist der Syntheseweg über ein Cyclenderivat. Das Cyclenderivat wird entweder nach der Vorschrift von J. E. Richman und T. J. Atkins [88,89] oder nach einer Variante von F. Chavez und A. D. Sherry [90] synthetisiert. Diese Vorschriften beschreiben die Synthese von Cyclen und werden später in dieser Arbeit nochmal behandelt.

Zwei besondere Ansätze sollen hier kurz vorgestellt werden. Eine elegante Eintopfsynthese von C-funktionalisierten Cyclenderivaten **21** wurde ebenfalls von der Arbeitsgruppe von D. Parker [91] beschrieben. Triethyltetraamin (TETA) **22** wurde mit Arylglyoxalen **23** und Eisen(III)chlorid umgesetzt, der gebildete Komplex wurde sofort durch Hinzugabe von Natriumborhydrid reduziert. Dabei reduziert Natriumborhydrid nicht nur das Diiminintermediat **24**, sondern ebenfalls das Eisen(III)ion zum Eisen(II)ion, das vom Cyclenderivat nicht mehr komplexiert werden kann. So wird der metallfreie Ring in 60%iger Gesamtausbeute erhalten (Abb.7). Die Arylglyoxale sind durch Oxidation von Arylmethylketonen mit Selen(IV)dioxid einfach zu erhalten.

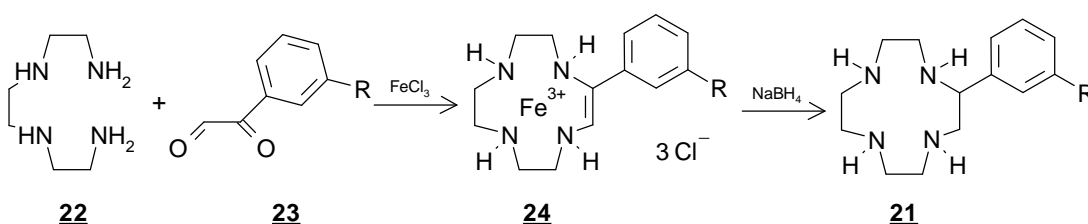


Abb.7: Synthese von C-funktionalisierten DOTA-Derivaten nach Parker [91]

Eine weitere bemerkenswerte Synthesestrategie wurde von M. K. Moi und C. F. Meares [92] verfolgt. Die Darstellung des Cyclenderivates erfolgte durch Peptidsynthese des Edukts **25**, das mit BH_3/THF reduziert wurde und nach Tosylierung in einem intramolekularen Ringschluß und anschließender Detosylierung zum gewünschten Makrozyklus **26** umgesetzt wurde (Abb.8).

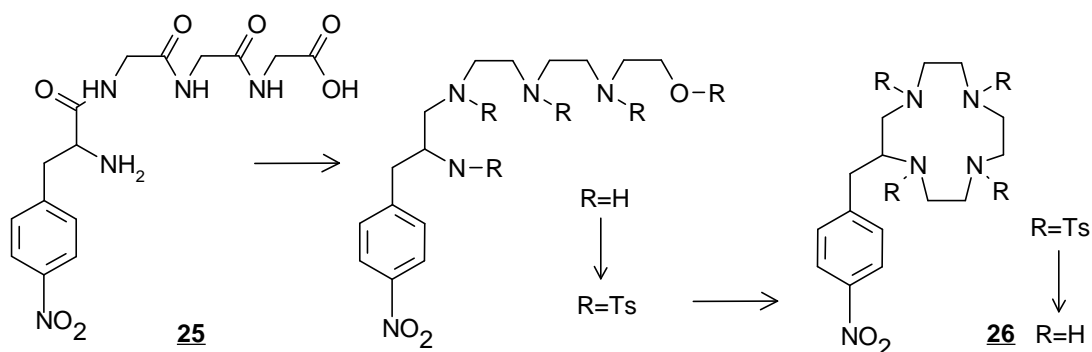


Abb.8: Synthese von C-funktionalisierten DOTA-Derivaten nach Moi und Mares [92]

4.2.3 Synthesestrategien für einfach N-funktionalisierte DOTA-Derivate

Für die Synthese von einem DOTA-Derivat mit nur einem modifizierten Seitenarm gibt es zwei grundsätzliche Wege. Zum einen kann man zuerst Cyclen mit dem modifizierten Seitenarm umsetzen, so daß man das einfach N-substituierte Produkt erhält. Zum anderen kann man zuerst das an drei Stickstoffatomen mit Bromessigsäure umgesetzte Cyclenderivat (DO3A) synthetisieren und dann das verbleibende Stickstoffatom weiter mit dem modifizierten Seitenarm umsetzen.

Verschiedene Synthesewege von DO3A wurden von M. F. Tweedle und Mitarbeitern [83] miteinander verglichen. Sie berichteten, daß die beste Synthese *via* der Umsetzung von 1-Formyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecan **20** (mit $\text{R}=\text{H}$) mit Bromessigsäure und anschließender Abspaltung des Formylrestes mit konzentrierter Schwefelsäure ist. Diese Methode wurde für die weiteren Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe eingesetzt [93]. Weiterhin wird in dieser Arbeit [83] erwähnt, daß die direkte Umsetzung von Cyclen mit drei Äquivalenten Bromessigsäure hauptsächlich zum DOTA selbst führt. Im Gegensatz dazu berichteten A. K. Mishra *et. al.* [94], daß die einfache Umsetzung von Cyclen mit 2.25 Äquivalenten Bromessigsäureethylester in Dichlormethan

DO3A-Ethylester in über 70% Ausbeute produzieren sollte. Diese Ergebnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht reproduziert werden.

Die Umsetzung von Cyclen mit dem modifizierten Seitenarm ist der weitaus häufiger gewählte Syntheseweg, der mit kürzeren Synthesen und damit höheren Gesamtausbeuten beschrieben wurde. Dieser Syntheseweg wird auch in dieser Arbeit bevorzugt.

4.2.4 Synthese von 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan (Cyclen)

Die Synthese von Cyclen und anderen Polyazamakrozyklen wurde 1974 von J. E. Richman und T. J. Atkins beschrieben [88,89]. Fast ausschließlich nach dieser Vorschrift und einer Variation von F. Chavez und A. D. Sherry [90] werden in der Literatur Cyclen und andere Polyazamakrozyklen hergestellt.

In dieser Arbeit wurde die ursprüngliche Synthesevorschrift von J. E. Richman und T. J. Atkins verwendet. Cyclen wurde ausgehend von Diethanolamin und Diethylentriamin synthetisiert.

Diethanolamin wurde mit Toluolsulfonylchlorid in Pyridin zu 3-Azapentan-1,5-di(p-toluolsulfonsäureester) **27** umgesetzt. Das Produkt wurde aus Aceton umkristallisiert. Die Durchführung der Reaktion bei höheren Temperaturen ergab dagegen nicht das gewünschte Produkt.

Die Umsetzung von Diethylentriamin mit Toluolsulfonylchlorid geschah nach ähnlicher Vorschrift jedoch bei höherer Temperatur, da bei niedrigen Temperaturen kein Umsatz erfolgte. Anschließend wurde 1,4,7-Tri(p-toluolsulfonyl)-1,4,7-triazaheptan **28** in einer methanolischen Natriummethanolatlösung zum Dinatriumsalz **29** umgesetzt.

Das Dinatriumsalz reagierte mit 3-Azapentan-1,5-di(p-toluolsulfonsäureester) unter Ringschluß.

Die Tosylatgruppen des erhaltenen Rings **30** wurden durch Rühren bei 100°C in einem Überschuß konzentrierter Schwefelsäure entfernt. Durch Zugabe von wasserfreiem Diethylether fiel Cyclensulfat aus. Durch kontinuierliche Extraktion einer alkalischen Lösung des Sulfatsalzes mit Tetrahydrofuran wurde Cyclen **1** als freie Base erhalten (Abb.9). Anschließend wurde das Produkt aus Acetonitril umkristallisiert.

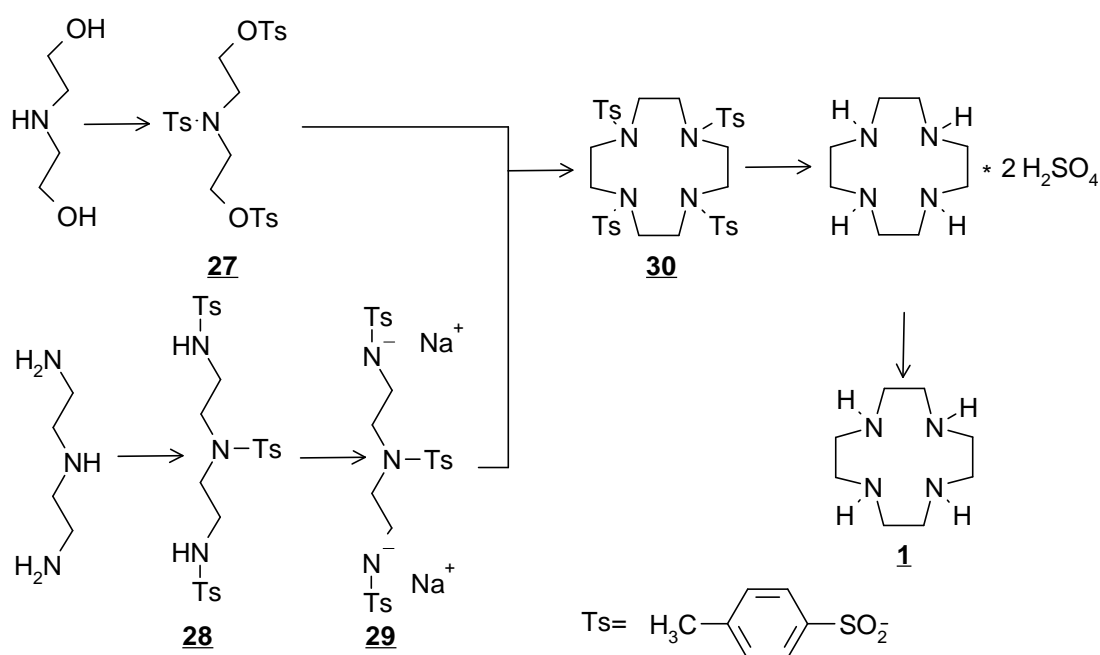


Abb.9: Synthese von Cyclen nach Atkins und Richman [88,89]

In der alternativen Vorschrift nach F. Chavez und A. D. Sherry [90] wurde N,N',N'',N'''-Tetratosyl-triethylentetraamin mit einem Überschuß 1,2-Dibromethan und Kaliumcarbonat in DMF bei 50°C für 72 Stunden gerührt, um Cyclen herzustellen.

Eine neue Synthesemöglichkeit wurde von G. R. Weisman und D. P. Reed 1996 vorgestellt [95]. Diese Synthese führt in zwei Schritten von Triethylentetraamin und Dithiooxamid **31** zu Cyclen **1**. Erst wird 2,3,5,6,8,9-Hexahydrodiimidazol-[1,2-a:2',1'-c]pyrazin **32** synthetisiert, das anschließend mit DIBALH (Dibutylaluminiumhydrid) unter (doppelter) Reduzierung und Ringerweiterung reagiert (Abb.10). Das Rohprodukt wurde durch Sublimation gereinigt.

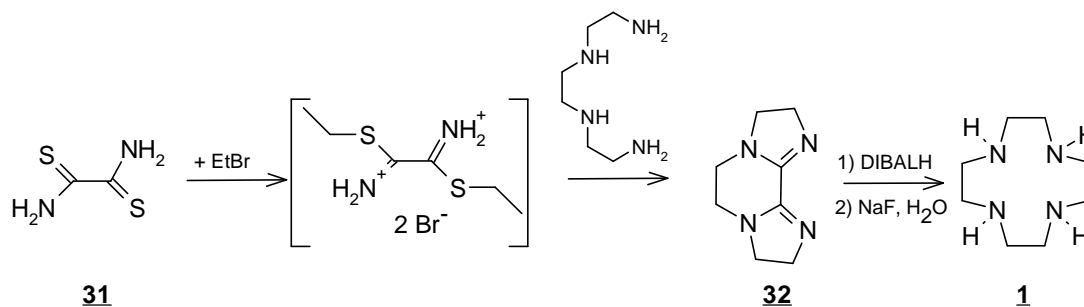


Abb.10: Synthese von Cyclen nach Weisman und Reed [95]

4.3 Sensitizer

4.3.1 Wahl des Sensitizer

Eine systematische Untersuchung über die Fähigkeit verschiedener Sensitizer, Lanthanidfluoreszenz anzuregen, existiert bisher nicht, sondern nur vereinzelte Arbeiten, in denen meist der verwendete Komplexbildner auch als Sensitizer dient. Die Synthese des vorher genannten Komplexes **14** [68] war eine der ersten Arbeiten, die die Fähigkeit eines aus einem Komplexbildner und einem Sensitizer zusammengesetzten Liganden, Lanthanidfluoreszenz anzuregen, untersuchte.

Weitere Untersuchungen, die sich mit aromatischen Ringen als Sensitizer beschäftigen, sind in letzter Zeit erschienen, wobei die Phenyl- und Benzylgruppe [81], die Naphthyl- [28,96] sowie die Anthrylgruppe [97] untersucht wurden. In diesen Untersuchungen stellte sich heraus, daß aromatische Ringsysteme keine guten Sensitizer für Lanthanide darstellen. So erfolgt die Anregung dieser Sensitizer im Bereich des CT-Bandes (Charge Transfer Band) bei 250-270 nm. Da aber biologische Proben stark unterhalb von 330 nm absorbieren, sollte der Sensitizer bei längeren Wellenlängen anregbar sein. Desweiteren tritt beim Einsatz dieser Sensitizer zusätzliche Fluoreszenzlöschung auf. Beim Einsatz von Anthrylgruppen als Sensitizer zeigen die Emissionsspektren eine starke Bande bei 308 nm, die von der Phosphoreszenz eines formal verbotenen Triplettzustands der Anthrylgruppe herrührt. Der Triplettzustand wird durch Energierücktransfer vom Lanthanid bevölkert, dabei kommt es durch das schwere Lanthanidion zu einer "Aufweichung" der Auswahlregel. Beim Einsatz von Naphthylgruppen als Sensitizer zeigt der Terbiumkomplex erheblichen Energie- rücktransfer und der Europiumkomplex Photoreduzierung. Die vom Terbium rücktransferierte Energie bevölkert einen Triplettzustand der Naphthylgruppe, der durch gelösten Sauerstoff strahlungslos entvölkert wird. Durch den Einsatz von entgasten Lösungsmitteln läßt sich die Fluoreszenz erheblich steigern. Der angeregte Singulettzustand der Naphthylgruppe hingegen transferiert Elektronen zum Europium(III)ion und reduziert dieses in seine zweiwertige Form. Auch Liganden mit mehrerer Naphthylgruppen besitzen schlechte Fluoreszenzeigenschaften.

Carbostyryle hingegen scheinen trotz ihrer kleineren molaren Extinktionskoeffizienten besser als Sensitizer geeignet zu sein. In den Untersuchungen von P. R. Selvin und Mitarbeitern [48,71,73] wurde gezeigt, daß die Lanthanidfluoreszenz mit 7-Amino-4-methyl-carbostyryl (CS124) als Sensitizer (in **17**) angeregt werden kann. Es scheint auch kein signifikanter Energierücktransfer zum Triplett des Carbostyryls zu erfolgen. Jedoch wurde bei dem Komplex **33**, an dessen Aminogruppe beide Wasserstoffatome substituiert wurden, sogar bei Raumtemperatur Energierücktransfer berichtet [27]. Die Anregung der Lanthanide erfolgte bei 330 nm (Tb^{3+}) und 345 nm (Eu^{3+}) [27] bzw. durch einen Stickstofflaser bei 337 nm [48,71,73].

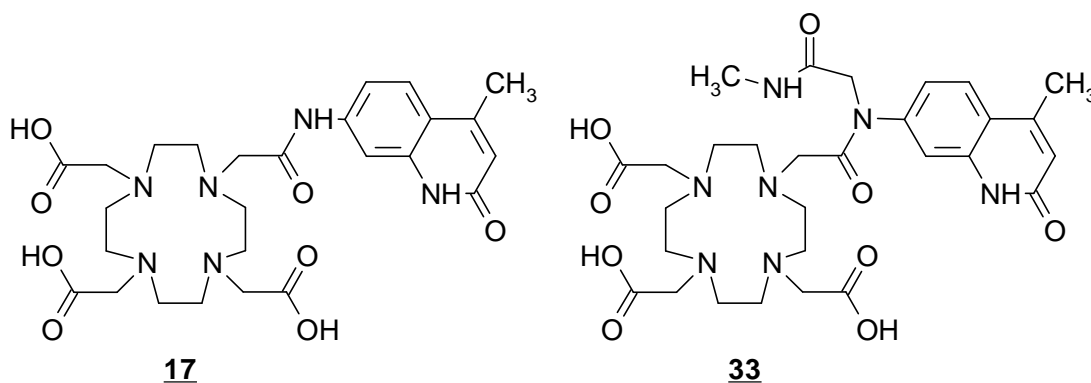


Abb.11: Komplexe **17** und **33** mit CS124 als Sensitizer

4.3.2 Einfluß der Struktur von Cumarinen und Carbostyrylen auf ihre Fluoreszenzeigenschaften

Strukturverwandt mit den Carbostyrylen sind die Cumarine. Beide Stoffklassen finden als Laserfarbstoffe Verwendung und sind gut untersucht. So kann durch unterschiedliche Substitution der Grundgerüste die Emissionswellenlänge in gewissen Grenzen verschoben werden [98]. Ein elektronegativer Substituent (z.B. CF_3 , CN, COOR, COR) in 3- oder 4-Position verursacht eine Rotverschiebung, ein elektropositiver (z.B. CH_3 , OCH_3) eine Blauverschiebung. Am anderen Ring (Positionen 5-8) verhält es sich genau umgekehrt, so daß eine Rotverschiebung erfolgt, wenn man an der Position 7 in der Aminogruppe schrittweise die Wasserstoffatome durch aliphatische Reste austauscht. Eine Substitution der Wasserstoffatome gegen

Carbethoxyreste müßte analog zu einer Blauverschiebung führen. Jedoch wird durch verschiedene Substituenten nicht nur das Emissionsmaximum verändert, sondern auch die Quantenausbeute [99] und die Photostabilität [99,100]. So zeigt sich, daß die gleichzeitige Substitution der 6- oder 8-Position neben bereits substituierter 7-Position zu schlechteren Fluoreszenzeigenschaften führt.

Die Fluoreszenz von Carbostyrylen ist grundsätzlich empfindlicher gegen gelösten Sauerstoff als die von Cumarinen. Dies zeigt, daß der Triplettzustand von Carbostyrylen effektiver durch Sauerstoff entvölkert werden kann. Carbostyryle sind auch nicht so photostabil wie Cumarine [100]. Die Photostabilität nimmt sowohl bei Carbostyrylen als auch bei Cumarinen mit höherer Substitution der 7-Aminogruppe zu. Eine Trifluormethylgruppe in 4-Position erhöht die Photostabilität, dieser Effekt ist stärker bei Carbostyrylen als bei Cumarinen zu beobachten. Die Quantenausbeute von Cumarinen (0.7-0.8) liegt ein wenig höher als bei Carbostyrylen (0.6-0.7) und verändert sich nur wenig durch unterschiedliche Substitution der Grundgerüste [99].

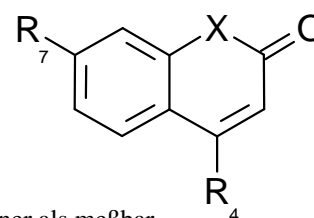
X	R ₄	R ₇	Bez.	λ_{abs} [nm]	λ_{em} [nm]	ϵ [10 ⁴ dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹]	ϕ	τ [KJ l ⁻¹]
NH	CH ₃	NH ₂	CS124	350	414	1.9	0.63	*
NH	CH ₃	NMe ₂	CS165	360	428	2.2	0.63	17
O	CH ₃	NH ₂	CM120	354	440	1.9	0.72	67
O	CH ₃	NMe ₂	CM311	366	457	2.2	0.75	113
O	CH ₃	NEt ₂	CM1	374	462	2.3	0.67	67
O	CF ₃	NH ₂	CM151	382	492	1.7	0.74	75

Tab.3: Spektroskopische Eigenschaften und Stabilität von Cumarinen und Carbostyrylen nach [99,100]

$\lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$, $\lambda_{\text{em}}^{\text{max}}$: Absorptions- und Emissionswellenlänge

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient - ϕ : Quantenausbeute

τ : Energie, die zum Zerfall von 50% der Moleküle führt - * : kleiner als meßbar



Eine neuere Untersuchung [101] erklärt die veränderten Fluoreszenzeigenschaften von N-substituierten 7-Amino-4-methyl-cumarinen durch ein Gleichgewicht zweier

ionisch-radikalischer Intermediate. Durch intramolekularen Ladungstransfer (Intramolecular Charge Transfer, ICT) kommt es bei Lichteinstrahlung zu der Bildung eines zwitterionischen Intermediates. Durch Drehung der Aminogruppe wird die Ladung stark voneinander getrennt. Dieser TICT-Zustand (Twisted Intramolecular Charge Transfer) wird stark durch polare Lösungsmittel stabilisiert. Die Drehung der Aminogruppe wird durch größere, sterisch anspruchsvollere Reste erschwert. Durch diesen Mechanismus wird sowohl die Emissionsmaximaverschiebung als auch die veränderte Photostabilität erklärt (Abb.12).

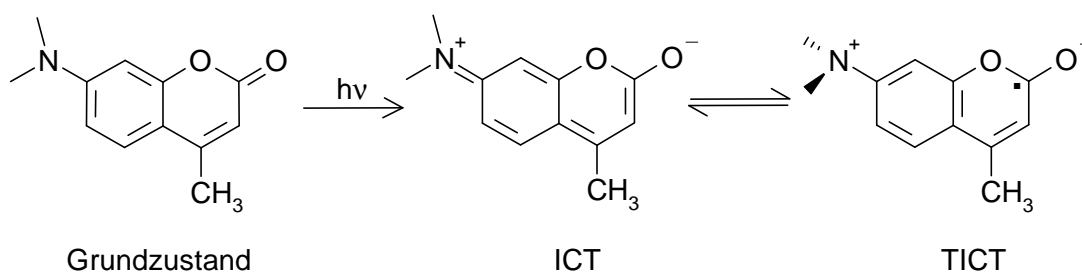


Abb.12: Anregung von Cumarinen in den ICT und TICT Zustand

4.3.3 Synthese der Sensitizer

In dieser Arbeit wurden 7-Amino-4-methyl-carbostyryl (CS124) **3** und 7-Amino-4-methyl-cumarin (CM440) **2**, sowie als Zwischenprodukt in der Synthese von **2** 7-Carboethoxyamino-4-methyl-cumarin **34** als mögliche Sensitizer synthetisiert.

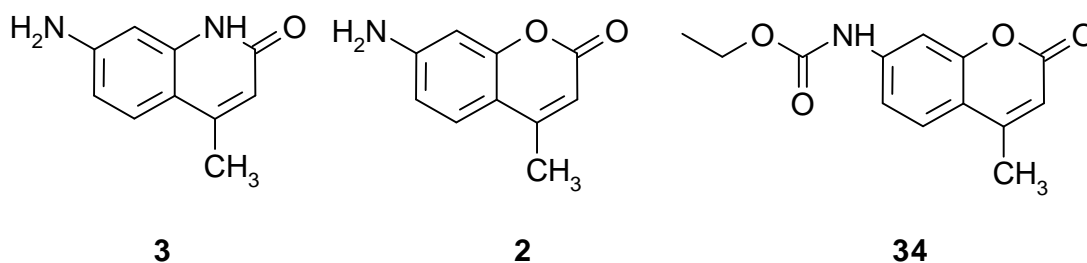


Abb.13: Die Sensitizer CS124 und CM440, sowie 7-Carboethoxyamin-4-methyl-cumarin

4.3.3.1 Synthese von 7-Amino-4-methyl-carbostyryl (CS124)

7-Amino-4-methyl-carbostyryl **3** wurde nach der Vorschrift von L. L. Woods und M. M. Fooladi [102] synthetisiert. Nach dieser Vorschrift wird m-Phenylendiamin mit einem Moläquivalent Acetessigester (Ethylacetoacetat) ohne weitere Lösungsmittel für 18 Stunden bei 150°C gerührt. Das Produkt wurde zweimal aus Morpholin durch Hinzugabe von n-Hexan auskristallisiert. Die Ausbeute dieser Reaktion ist nahezu quantitativ (Abb.14).

In dieser der Chinolinsynthese nach Skrapu verwandten Reaktion wird interessanterweise statt der üblichen Vorschrift nach Doebner und Miller der Mechanismus der Pechmann-Reaktion genutzt, der eigentlich zur Synthese von Cumarinen dient. Es zeigte sich jedoch, daß die Verwendung von Lösungsmittel in Kombination mit Aluminium(III)chlorid als Katalysator nur zu schwieriger aufzuarbeitenden Gemischen und zu niedrigeren Ausbeuten führt.

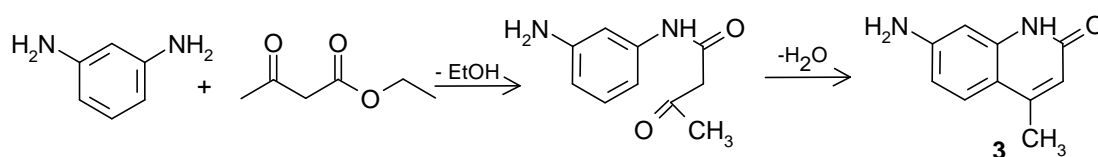


Abb.14: Synthese von 7-Amino-4-methyl-carbostyryl (CS127)

4.3.3.2 Synthese von 7-Amino- und 7-Carboethoxyamino-4-methyl-cumarin

Ebenfalls nach der Pechmann-Reaktion wurde 7-Amino-4-methyl-cumarin **2** synthetisiert. Als erstes wurde die Aminogruppe des Edukts, m-Aminophenol, mit Chlorameisensäureethylester geschützt. Die Ausbeute betrug ~50%, da die Hälfte des Eduktes als Hydrochlorid ausfiel. Als die Reaktion mit Triethylamin als Säurefänger durchgeführt wurde, war die Aufarbeitung nur aufwendiger, ohne die Ausbeute zu erhöhen. Auch der Einsatz des ungeschützten Eduktes erwies sich als nachteilig, da erwartungsgemäß bei dem anschließenden Ringschluß zwei Produkte, das gewünschte 7-Amino-4-methyl-cumarin und 7-Hydroxy-4-methyl-carbostyryl als Nebenprodukt, erhalten wurden.

Das 3-Hydroxyphenylurethan wurde mit Acetessigester in 70%iger Schwefelsäure umgesetzt. Das so erhaltene 7-Carboethoxyamino-4-methyl-cumarin **34** wurde in einer

Mischung aus je gleichen Massenanteilen von konzentrierter Schwefelsäure und Eisessig unter Rückfluß erhitzt. Nach wäßriger Aufarbeitung konnte 7-Amino-4-methyl-cumarin **2** erhalten werden (Abb.15).

Die entscheidende Ringschlußreaktion verläuft zunächst über eine Umesterung (Bildung des Phenolesters), worauf anschließend einer intramolekularen Michael-Addition folgt.

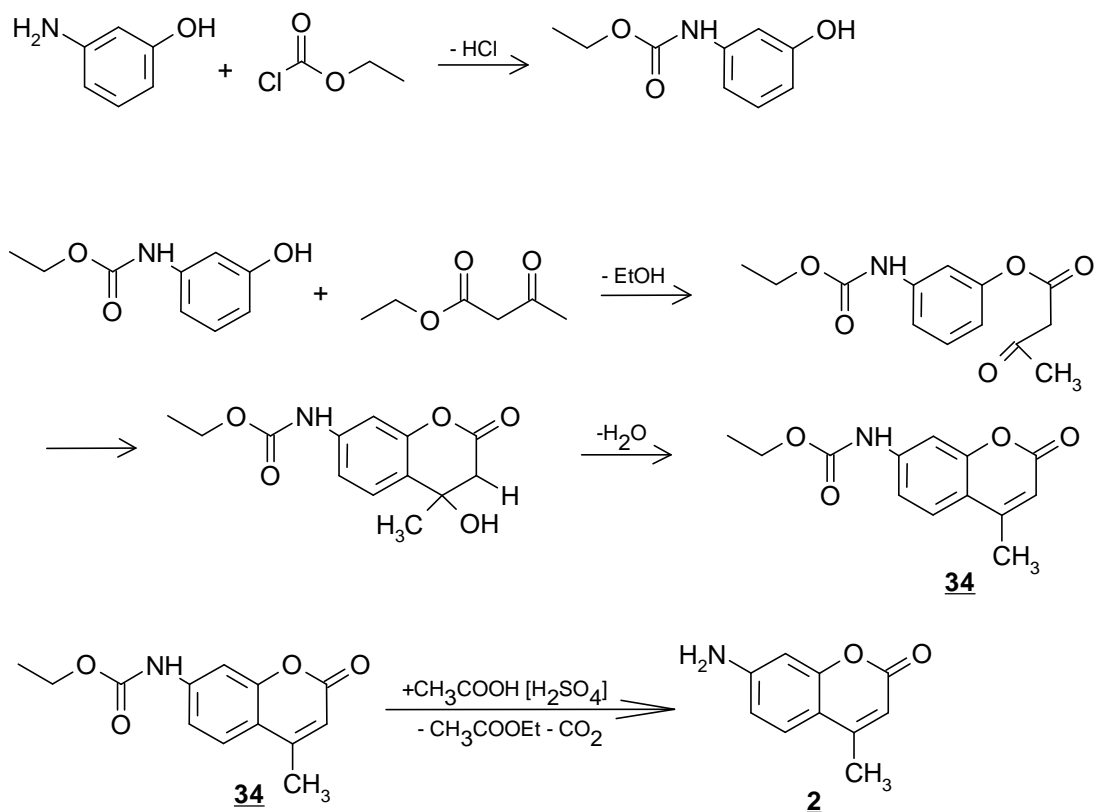


Abb.15: Synthese von 7-Amino-4-methyl-cumarin (CM440)

4.4 Seitenarm

4.4.1 Struktur des modifizierten Seitenarms

Der modifizierte Seitenarm hat die Funktion, den Sensitizer und den Linker an den Komplexbildner zu binden. Der Seitenarm benötigt ein Halogenatom in α -Stellung zu der Carboxylgruppe, um an den Ring gebunden zu werden. Der Sensitizer sollte über eine Amidbindung an die Carboxylgruppe des Seitenarms gebunden werden. Eine weitere funktionelle Gruppe muß im Molekül des Seitenarms integriert sein, die das Anbringen eines Linkers ermöglicht. Da die Wahl des Linkers je nach Anwendung ermöglicht werden soll, muß dieser im letzten Syntheseschritt angebracht werden. Die dafür vorgesehene funktionelle Gruppe muß während der restlichen Synthese geschützt werden.

Aus diesen Forderungen ergeben sich 3-substituierte 2-Halogenpropionsäuren als mögliche Seitenarme. Die Synthesen von 3-Benzylthio-2-chlorpropionsäure und 3-Benzylthio-2-brompropionsäure wurden in dieser Arbeit miteinander verglichen.

4.4.2 Synthese von 3-Benzylthio-2-chlorpropionsäure

3-Benzylthio-2-chlorpropionsäure **4** wurde ausgehend vom L-Cystein synthetisiert. Zuerst wurde die Thiolgruppe des L-Cysteins durch Umsetzung mit Benzylchlorid in einem Gemisch aus Ethanol und Natronlauge geschützt [103].

Das so erhaltene S-Benzyl-L-cystein **35** wurde in eisgekühlter, halbkonzentrierter Salzsäure portionsweise mit festen Natriumnitrit versetzt [104]. 3-Benzylthio-2-chlorpropionsäure wurde als gelbes Öl erhalten (Abb.16). Durch Umkristallisieren in n-Hexan/Cyclohexan (1:1) bei -25°C konnte das Produkt als weißer, kristalliner Feststoff erhalten werden, während in der Literatur [104,105] 3-Benzylthio-2-chlorpropionsäure bisher nur als gelbes Öl isoliert werden konnte. Das Produkt sollte in der Kälte gelagert werden, da es leicht zur 2-Benzylthio-3-chlorpropionsäure isomerisiert [105].

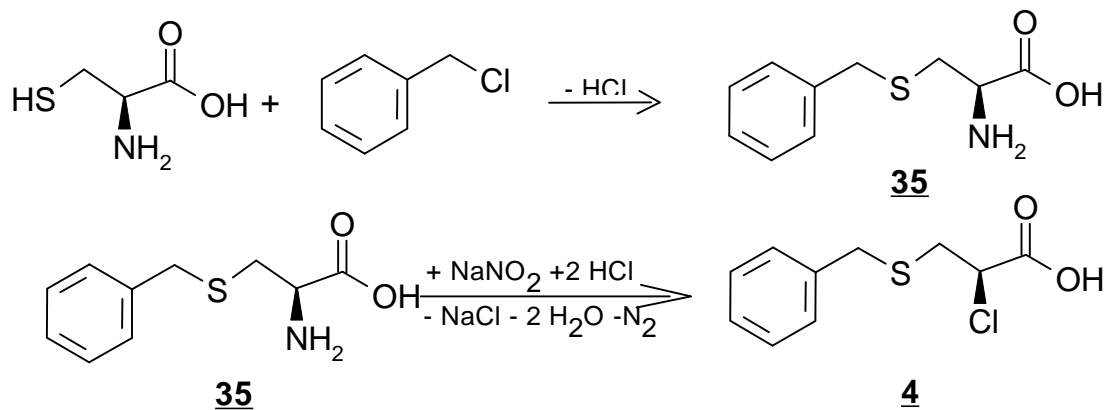
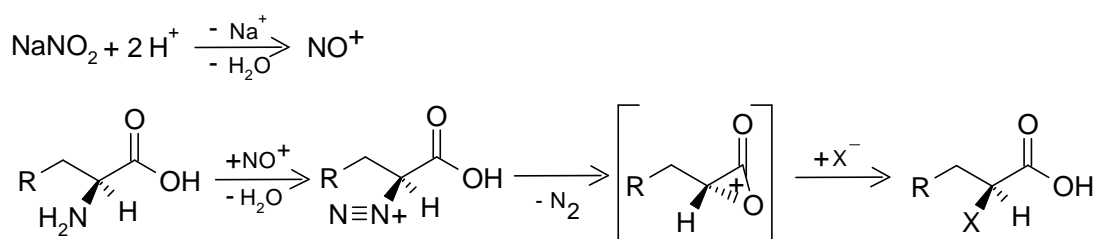


Abb.16: Synthese von 3-Benzylthio-2-chlorpropionsäure nach Owen und Rahman [104]

Analog wurde auch die Reaktion in wäßriger Bromwasserstoffsäure durchgeführt, jedoch ohne daß die gewünschte 2-Bromverbindung erhalten wurde.

Zuvor wurde die Synthese der 2-Chlorverbindung über die 2-Hydroxyprodukte durch Umsetzung von S-Benzyl-L-cystein mit Natriumnitrit in wäßriger Essigsäure [106] und mit Bariumnitrit in 1N Schwefelsäure sowie mit Bariumnitrit in 1N Salzsäure erfolglos probiert.

Die Umsetzung von α -Aminosäuren mit Nitritsalzen verläuft interessanterweise meist unter völliger Retention, wobei der sogenannte Nachbargruppeneffekt auftritt [104,106,107] (Abb.17).

Abb.17: Mechanismus der Substitution von α -Aminosäuren mit Natriumnitrit

Zwei alternative Synthesen von 3-Benzylthio-2-chlorpropionsäure stellte F. Effenberger [105] in seiner Synthese von DL-Cystein ausgehend von Acrylsäure vor. Als erstes beschrieb er die Addition von Phenylmethansulfonylchlorid an Acrylsäuremethylester (Abb.18). Diese Reaktion führte zu einem Produktgemisch von

3-Benzylthio-2-chlor-propionsäure und 2-Benzylthio-3-chlor-propionsäure. Es wurde berichtet, daß das Gemisch weder chromatographisch noch destillativ zu trennen sei.

Die zweite Synthese war die Umsetzung von Benzylthiol mit 2-Chloracrylsäuremethylester, das nach einem US-Patent [108] synthetisiert wurde (Abb.18). Das Produkt wurde isomerenfrei in guten Ausbeuten erhalten, jedoch konnte das Produkt nur als gelbes Öl isoliert werden.

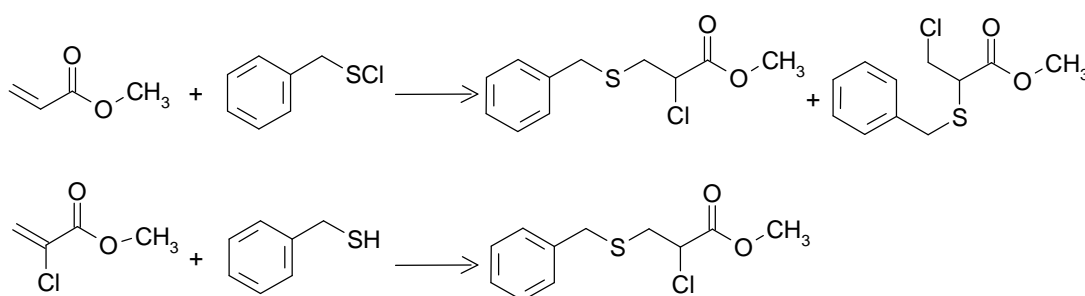


Abb.18: Synthesen von 3-Benzylthio-2-chlorpropionsäure nach Effenberger [105]

4.4.3 Möglichkeiten zur Synthese von 3-Benzylthio-2-hydroxypropionsäure

Die Synthese von 3-Benzylthio-2-hydroxypropionsäure **36** ist aus zweierlei Sicht interessant. Zum einem könnte die Hydroxygruppe gegen ein Halogen getauscht werden, was zu den gewünschten α -Halogensäuren führt. Dies war das Ziel bei den obengenannten fehlgeschlagenen Reaktionen von S-Benzyl-L-cystein mit Natriumnitrit in wäßriger Essigsäure und mit Bariumnitrit in 1N Schwefelsäure. Zum anderen können die Alkohole zu den entsprechenden Triflaten umgesetzt und diese direkt an Cyclen addiert werden [93,109].

D. B. Hope und M. Wälti [110] berichteten, daß die Umsetzungen von Cystein und S-substituierten Derivaten mit Nitritsalzen in wäßrig-sauren Lösungen nicht oder nur in geringen Ausbeuten zu den entsprechenden 2-Hydroxyverbindungen führen. Dies steht im Einklang mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten.

Als Alternative schlugen sie die Reaktion von 3-Chlormilchsäure **37** mit Benzylthiol vor. 3-Chlormilchsäure synthetisierten sie ausgehend von α -Chlorhydrin

(3-Chlorpropan-1,2-diol) **38** durch Oxidation mit Salpetersäure. Das Racemat der 3-Benzylthio-2-hydroxypropionsäure wurde als weißer Feststoff in guten Ausbeuten erhalten (Abb.19).

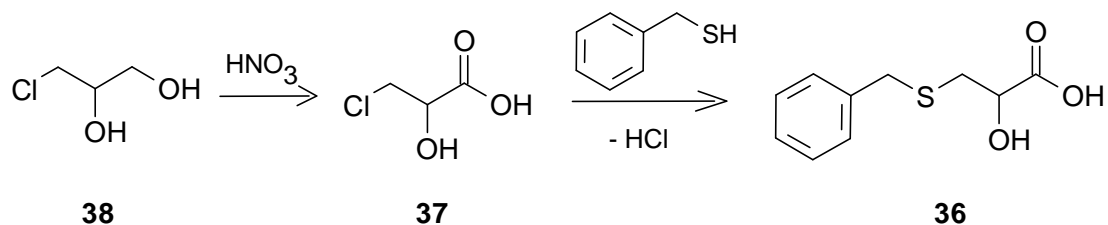


Abb.19 Synthese von 3-Benzylthio-2-Hydroxypropionsäure nach Hope und Wälti [110]

Eine weitere Synthese von 3-Benzylthio-2-hydroxypropionsäure wurde von H. Tomisawa *et. al.* beschrieben [111]. Ausgehend von 3-Fluorbrenztraubensäure **39** wurde 3-Benzylthiobrenztraubensäure **40** synthetisiert, die anschließend mit Natriumborhydrid zum gewünschten Produkt reduziert wurde (Abb.20).

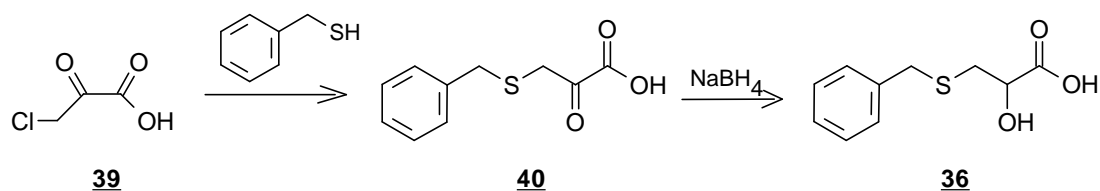


Abb.20: Synthese von 3-Benzylthio-2-chlorpropionsäure nach Tomisawa *et al.* [111]

Die Synthesen der 2-Halogenderivate über die entsprechenden Hydroxyverbindungen sind der direkten, oben beschriebenen Synthese unterlegen. Der Reaktionsweg über die Triflatverbindungen wurde nicht eingeschlagen, da die Synthese aufwendiger ist als die der 2-Chlorverbindungen und die anschließende Addition an Cyclen weniger gut untersucht ist.

4.4.4 Synthese von 3-Benzyloxy-2-brompropionsäure

3-Benzyloxy-2-brompropionsäure **41** ließ sich nicht analog dem Thioderivat herstellen, da schon die Umsetzung von L-Serin mit Benzylchlorid nicht gelang. Auch W. Grassmann *et. al.* [112] berichteten von der Unmöglichkeit der direkten O-Benzilylierung von Serin. Sie stellten eine Synthesemöglichkeit vor, die in dieser Arbeit Anwendung findet.

Acrylsäuremethylester wurde in Tetrachlorkohlenstoff mit Brom umgesetzt. 2,3-Dibrompropionsäuremethylester **42** wurde zu einer Lösung von Natriumbenzylat in Benzylalkohol getropft. Das Produkt, 3-Benzyloxy-2-brompropionsäure **41**, wurde durch Verseifung des Esters mit einer Natriumhydroxydlösung erhalten (Abb.21).

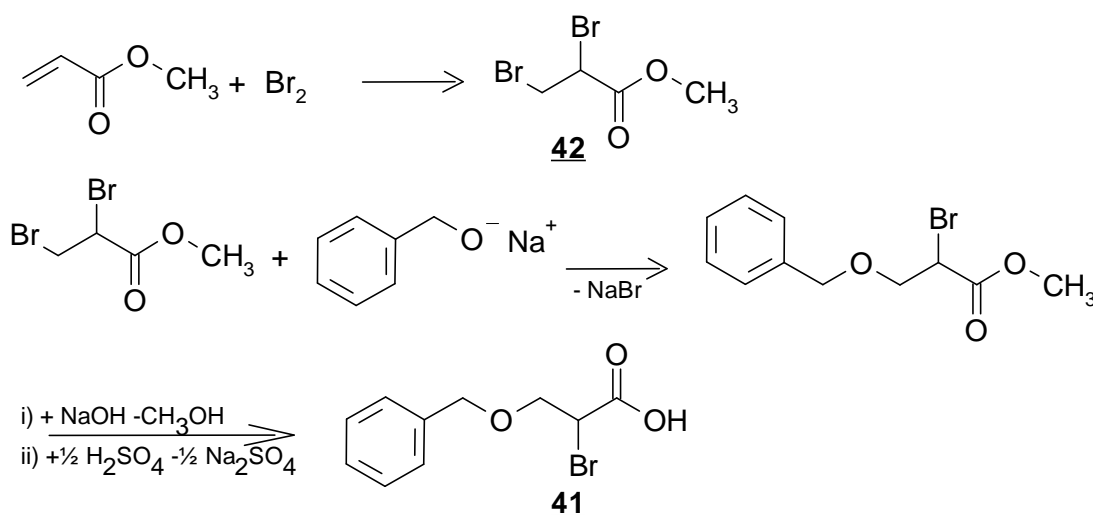


Abb.21: Synthese von 3-Benzyloxy-2-brompropionsäure nach Grassmann *et al.* [112]

Eine weitere Synthese dieser Substanz wurde nach der Vorschrift von P. L. Anelli *. al.* [113] durchgeführt. Dabei wurde zu einer Lösung von Acrylsäuremethylester, Benzylalkohol und einer katalytischen Menge Perchlorsäure in Tetrahydrofuran eine Quecksilber(II)trifluoroacetat/THF-Lösung getropft. Nach der Zugabe einer wässrigen Kaliumbromidlösung und Brom wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt. 3-Benzyloxy-2-brompropionsäuremethylester **43** wurde als Öl erhalten (Abb.22).

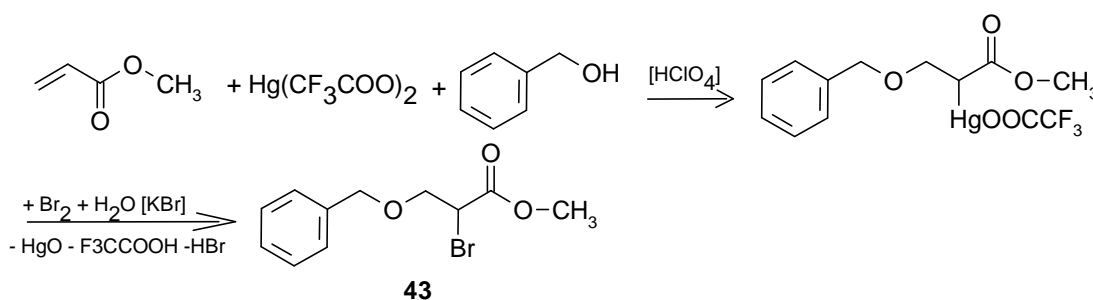


Abb.22: Synthese von 3-Benzyloxy-2-brompropionsäuremethylester nach Anelli *et al.* [113]

Obwohl das Produkt in Analogie zum Thioprodukt als Feststoff erwartet wurde, konnte weder das nach dieser Vorschrift synthetisierte noch das nach der Vorschrift von W. Grassmann hergestellte Produkt zur Kristallisation gebracht werden.

Die Synthese nach W. Grassmann ist der nach P. L. Anelli überlegen, da die hohe Giftigkeit des Quecksilber(II)trifluoroacetats (neurotoxisch) durch keine Vorteile ausgeglichen werden konnte.

Im Vergleich zwischen der Synthese nach W. Grassmann und der des Thioproduktes ist die letztgenannte überlegen. Der Umgang mit gefährlichen Stoffen ist einfacher: So sind festes Natriumnitrit und wässrige Lösungsmittel einfacher zu handhaben als elementares Natrium, flüssiges Brom und Tetrachlorkohlenstoff. Desweiteren kann das Thioprodukt als Feststoff erhalten werden, was seine Reinheit bestätigt und die Weiterverarbeitung vereinfacht. Für die Folgereaktionen wurde daher die Thioverbindung eingesetzt.

4.4.5 Addition der Sensitizer an den Seitenarm

Die Sensitizer wurden über eine Amidbindung an die Carboxylgruppe von 3-Benzylthio-2-chlorpropionsäure gebunden.

4.4.5.1 N-(4-Methyl-carbostyryl-7-yl)-3-benzylthio-2-chlor-propionsäureamid

7-Amino-4-methyl-carbostyryl, das sich schon in früheren Arbeiten [27,48,71,73] bewährte, wurde auch in dieser Arbeit als möglicher Sensitizer getestet. Die Amidbindung wurde durch Rühren von 3-Benzylthio-2-chlorpropionsäurechlorid mit

7-Amino-4-methyl-carbostyryl **3** in 1,4-Dioxan bei Raumtemperatur für 48 Stunden gebildet. Das Säurechlorid wurde zuvor durch Umsetzung von **4** mit einem Überschuß Thionylchlorid hergestellt.

Die Reaktionsmischung wurde kurz in 1,4-Dioxan erhitzt und heiß von den unlöslichen Bestandteilen abfiltriert. Das Filtrat wurde im Vakuum bis zur Trockene eingengt und in 1N Salzsäure über Nacht gerührt. Der Feststoff wurde anschließend abfiltriert und säulenchromatographisch gereinigt. Das so erhaltene Produkt, N-(4-Methyl-carbostyryl-7-yl)-3-benzylthio-2-chlor-propionsäureamid **6**, wurde aus Ethanol umkristallisiert.

In Chloroform sowie in einer Chloroform-Pyridin-Mischung konnte **6** nach derselben Vorschrift nicht erhalten werden.

In Analogie zu einer Synthese von 4-Methyl-carbostyryl-7-(N-*tert*-butyloxy-carbonyl-S-benzyl-cysteinamid) [114] wurde die Synthese der 2'-Chlorverbindung mit N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in Dimethylformamid erfolglos ausprobiert.

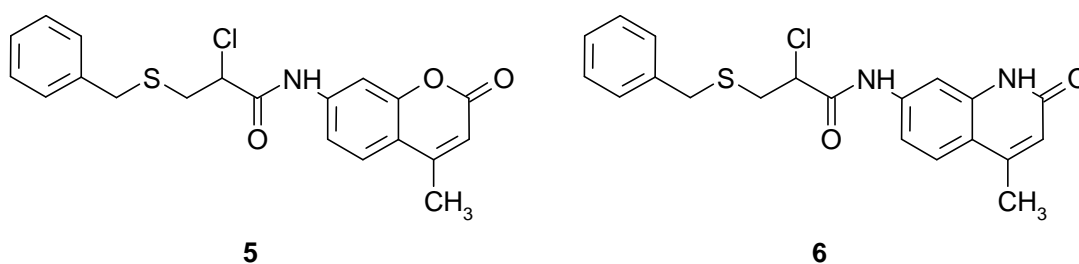


Abb.23: Verbindungen **5** und **6**

4.4.5.2 N-(4-Methyl-cumarin-7-yl)-3-benzylthio-2-chlor-propionsäureamid

Das Cumarinanalogon zu **6** wurde analog durch Umsetzung von 3-Benzylthio-2-chlorpropionsäurechlorid mit 7-Amino-4-methyl-cumarin **2** in 1,4-Dioxan bei Raumtemperatur für 48 Stunden erhalten. Das Produkt **5** entstand in guten Ausbeuten.

Die analoge Umsetzung von 7-Carboethoxyamino-4-methyl-cumarin **34** mit dem Säurechlorid gelang hingegen nicht. Das Edukt konnte quantitativ zurückgewonnen werden. Durch die Carboethoxygruppe scheint die Elektronendichte am Stickstoff der

Aminogruppe so weit gesenkt, daß keine weiteren Reaktionen an der Aminogruppe stattfinden können. Daraus kann man folgern, daß auch keine zweifach N-substituierten Produkte bei den obengenannten Umsetzungen auftreten, da der addierte Seitenarm zusätzlich auch sterisch bedeutend anspruchsvoller als der Carbohydroxyrest ist.

4.4.5.3 Verunreinigung von 4-Methyl-carbostyryl-7-(3-benzylthio-2-chlor-propionsäureamid)

Das $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des DC-reinen Carbostyrylproduktes **6** zeigt trotz der aufwendigen Reinigungsprozedur noch Verunreinigungen, insbesondere ein Satellit des Aminogruppen-Signals fällt auf. Auch im $^{13}\text{C-NMR}$ Spektrum tauchen zusätzliche Signale auf, insbesondere neben denen der Kohlenstoffatome 7 und 6. Da sich das Produkt nicht weiter reinigen ließ, wurde die Möglichkeit des Vorliegens zweier stabiler Konformere untersucht. So sind zwei Konformere möglich, wenn die freie Drehbarkeit an der Amidgruppe aus sterischen Gründen eingeschränkt wäre (Abb.23). Zur Untersuchung dieser Frage wurden $^1\text{H-NMR}$ Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen ($T_1=25^\circ\text{C}$, $T_2=50^\circ\text{C}$ und $T_3=70^\circ\text{C}$) in der Annahme durchgeführt, daß durch die höhere thermische Energie die sterische Rotationssperre überwunden werden kann. Jedoch zeigten die $^1\text{H-NMR}$ Spektren keinerlei Unterschiede, so daß verschiedene Konformere als unwahrscheinlich angesehen werden können.

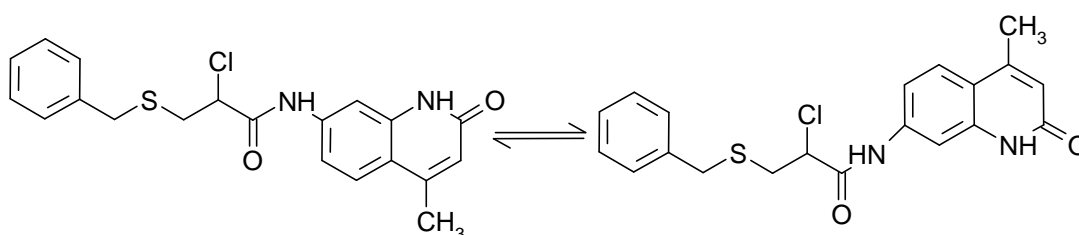


Abb.24: Konformere von **6**

Eine zweifache N-Substitution ist wie oben dargestellt ebenfalls unwahrscheinlich. Eine Isomerisierung unter Umlagerung des Chloratoms müßte auch beim Cumarinprodukt beobachtet werden können, da diese Reaktion unter denselben Bedingungen

durchgeführt wird. Dies findet man jedoch nicht, so daß dieses auch beim Carbestyrylprodukt nicht auftreten dürfte.

Das Stickstoffatom der Amidbindung ist sp^3 -hybridisiert und in der Verbindung das zweite Chiralitätszentrum. Die Methingruppe, an der das Chloratom gebunden ist, liegt - Retention bei der Substitution der Aminogruppe vorausgesetzt - in *R*-Konfiguration vor. Am Stickstoffatom der Amidbindung kann sowohl die *R*- als auch die *S*-Konfiguration vorliegen. Es sind zwei Diastereomere möglich, in denen einmal die *R, R*- und zum anderen die *R, S*-Konfiguration vorliegt (Abb.24). Jedoch müßte diese Eigenschaft auch bei dem Cumarinderivat zu beobachten sein.

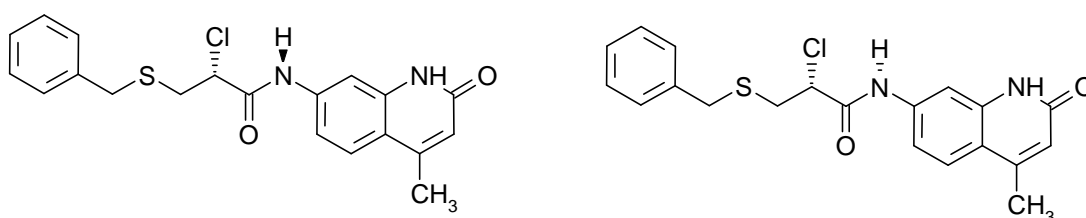


Abb.25: Diastereomere von **6**

Das Stickstoffatom des Carbestyrylringes ist - in seiner Carbonylstruktur - ebenfalls sp^3 -hybridisiert und bildet ein weiteres Chiralitätszentrum, das beim Cumarinderivat nicht auftritt. Die beiden Eantiomere können über die tautomere 2-Hydroxychinolinstruktur ineinander übergehen (Abb.25). Daß dies zu den zusätzlichen Signalen führt, ist unwahrscheinlich, da dies auch beim 7-Amino-4-methyl-carbestyryl beobachtet werden müßte.

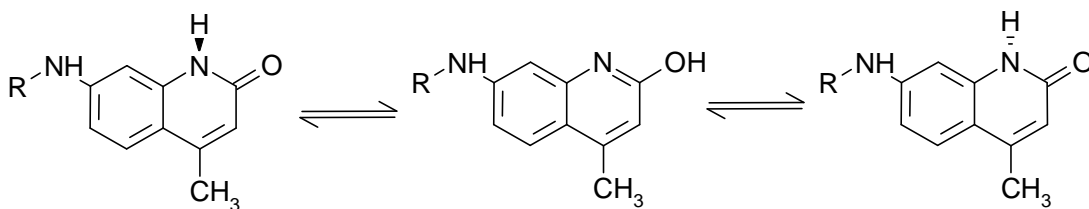


Abb.26: Tautomerengleichgewicht von **6**

Das nicht bestimmbare Nebenprodukt läßt sich aus den Verhältnissen der Aminogruppenprotonen auf ca. 25 Mol% schätzen.

Das Cumarinprodukt **5** wurde dagegen nach der obigen Vorschrift rein erhalten.

4.4.5.4 Auswertung der $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ Spektren

Die Bildung der Amidbindung läßt sich anhand der NMR-Spektren zeigen. So findet man in den $^1\text{H-NMR}$ Spektren alle Signale des Propionsäurederivats und des entsprechenden Sensitizer in den erwarteten Intensitäten wieder. Die Verschiebung der Aminogruppensignale der Sensitizer zu höheren ppm-Werten entspricht der Bildung der Amidbindung.

Mit Hilfe der $^{13}\text{C-NMR}$ Spektren kann man ausschließen, daß anstatt unter Amidbindung das α -Chloratom des Propionsäurederivats mit der Aminogruppe des Sensitizer reagiert hat. Beim resultierenden sekundären Amin würde sich das Signal des Kohlenstoffatoms 7 gegenüber dem entsprechenden Signal des Eduktes merklich zu größeren ppm-Werten verschieben. Beim Amid - dem gewünschten Produkt - verschiebt sich hingegen das Signal zu kleineren ppm-Werten, dies beobachtet man.

Desweiteren sieht man in den $^1\text{H-NMR}$ Spektren die Chiralität des Seitenarms, an dessen asymmetrischen Kohlenstoffatom das Chloratom gebunden ist. Die Chiralität hat zur Folge, daß die beiden Protonen der benachbarten Methylengruppe unterscheidbar sind und so für die drei Protonen an den α - und β -Kohlenstoffatomen des Propionsäurederivats drei Dupletts vom Duplett erhalten werden.

Verb.	Name	Lösungsm.
2	7-Amino-4-methyl-cumarin	DMSO- d_6
3	7-Amino-4-methyl-carbostyryl	DMSO- d_6
4	3-Benzylthio-2-chlorpropionsäure	CDCl_3
5	4-Methyl-cumarin-7-(3'-benzylthio-2'-chlorpropionsäureamid)	CDCl_3
6	4-Methyl-carbostyryl-7-(3'-benzylthio-2'-chlorpropionsäureamid)	DMSO- d_6

Tab.4: Namen, Nummer und Lösungsmittel der Verbindungen

Verb.	Ph	CH ₂ S	CH ₂	CHCl	3	5	6	8	CH ₃	NH _x
<u>4</u>	7.36-7 .28	3.91 dd	3.81t 3.47dd	3.53 dd	-	-	-	-	-	-
<u>2</u>	-	-	-	-	5.89s	7.39d	5.56dd	6.40 d	2.29	6.09
<u>5</u>	7.38-7 .30	3.91 s	4.02dd 3.81dd	3.64 dd	6.23s	7.54d	7.64dd	7.53 d	2.43	8.42
<u>6</u>	7.39-7 .25	4.04-3.94	4.04-3.94 3.83dd	3.71 dd	6.29s	7.67d	7.78dd	7.39- 7.25	2.39	10.61
<u>3</u>	-	-	-	-	5.94s	7.33d	6.45dd	6.35 d	2.27	5.73

Tab.5: ¹H-NMR Daten im Vergleich

Verb.	α-Ph	β-Ph	γ-Ph	δ-Ph	CH ₂ S	CH ₂	CHCl	COR
<u>4</u>	136.6	129.1	128.8	127.8	47.5	36.6	42.4	174.1
<u>5</u>	137.3	129.3	128.0	127.8	51.3	36.6	44.3	167.5
<u>6</u>	137.7	128.9	128.6	127.3	49.7	35.1	43.6	167.4

Tab.6: ¹³C-NMR Daten des Seitenarmteils im Vergleich

Verb.	2	3	4+4a	5	6	7	8	8a	CH ₃
<u>2</u>	160.7	153.8	126.1	111.2	107.6	153.1	98.7	155.5	18.0
<u>5</u>	161.2	152.6	125.3	116.0	113.5	141.3	107.8	154.2	18.5
<u>6</u>	166.1	147.6	124.4	119.4	113.7	140.3	105.0	162.0	18.4
<u>3</u>	162.4	147.9	125.5	114.8	110.5	140.9	97.0	151.1	18.4

Tab.7: ¹³C-NMR Daten der Sensitizer im Vergleich

4.6 Ringaddition an Cyclen

Für die Synthese einfach substituierter Cyclenderivate gibt es verschiedene vorgeschlagene Synthesewege. Die meisten führen zu einem Gemisch von einfach und mehrfach substituierten Produkten, das anschließend getrennt werden muß. In der Regel sind die Ausbeuten eher schlecht. Elegantere Methoden ermöglichen die Reaktion nur bis zum einfach substituierten Produkt, das in hohen Ausbeuten gewonnen werden kann. Die Reaktionen, die zu den Gemischen führen, werden bei Temperaturen von 50-70°C in Dimethylformamid durchgeführt. Dabei wurden sowohl Cyclen und die α -Chlorcarbonsäure ohne [115] und mit Caesiumcarbonat [28] als auch Cyclen mit dem Kaliumsalz der α -Chlorcarbonsäure eingesetzt [116].

In der Arbeit von S. Aime *et. al.* [116] wird die Umsetzung von 3-Benzoyloxy-2-chlorpropionsäure-Kaliumsalz mit Cyclen in Dimethylformamid beschrieben. In dieser Arbeit wurde das Kaliumsalz der 3-Benzylthio-2-chlorpropionsäure mit Cyclen umgesetzt, jedoch wurde nach der Aufarbeitung kein Produkt erhalten.

Eine Methode, das einfach substituierte Produkt selektiv zu erhalten, wurde von J. S. Prasad *et. al.* vorgestellt [117]. Dabei werden zuerst drei Stickstoffatome des Cyclen durch Umsetzung mit Chlorameisensäurebenzylester geschützt, das verbleibende Stickstoffatom umgesetzt und die Schutzgruppen wieder abgespalten. Diese Prozedur ist jedoch sehr umständlich und hat nur eine geringe Gesamtausbeute.

Eine elegante Methode wurde von W. J. Kruper, Jr. *et. al.* [118] vorgestellt. Dabei wird Cyclen mit α -Bromcarbonsäureestern in unpolaren, aprotischen Lösungsmitteln (z.B. Chloroform) in einem Molverhältnis von 1:1 bei Raumtemperatur umgesetzt. Der bei der Reaktion freigesetzte Bromwasserstoff protoniert das angegriffene Cyclen und schützt es vor weiteren Substitutionen, da die Nukleophilie des protonierten Rings weit niedriger liegt als die der freien Base.

Nach dieser Vorschrift wurde 3-Benzylthio-2-chlorpropionsäuremethylester **44** mit Cyclen **1** in Chloroform umgesetzt (Abb.26). Das Produkt **45** konnte in mäßigen Ausbeuten erhalten werden. Aufgrund der anschließenden Probleme bei der Umsetzung mit dem Sensitizer wurde der Syntheseweg so umgestellt, daß zuerst der Sensitizer an das Propionsäurederivat gebunden und anschließend dieses Amid mit Cyclen umgesetzt wurde.

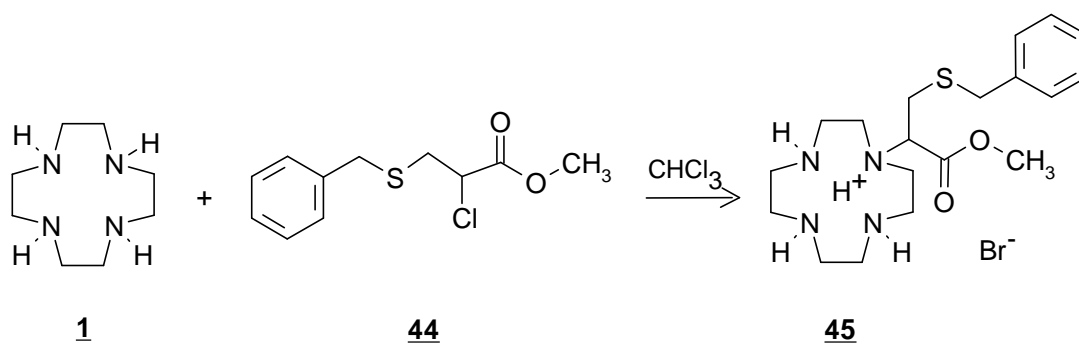


Abb.27: Umsetzung von Cyclen mit 3-Benzylthio-2-chlorpropionsäuremethylester

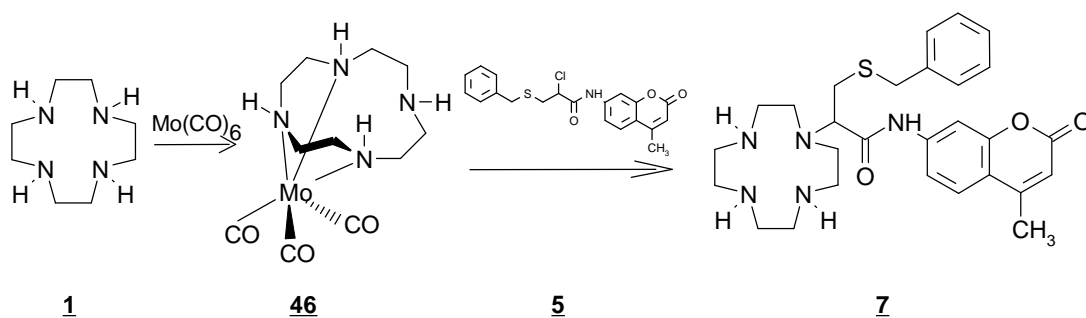
Ebenfalls nach der Vorschrift von W. J. Kruper, Jr. wurde die Umsetzung von N-(4-Methyl-carbostyryl-7-yl)-3-benzylthio-2-chlorpropionsäureamid mit Cyclen probiert, was jedoch nicht gelang, da das Amid eine zu geringe Löslichkeit in Chloroform und anderen unpolaren aprotischen Lösungsmitteln besitzt.

Eine weitere elegante Methode zur selektiven Synthese von einfach substituierten Cyclenderivaten wurde in der Arbeitsgruppe von D. Parker entwickelt [119].

Zuerst wurde durch die Umsetzung von Cyclen **1** mit Molybdänhexacarbonyl ein Komplex gebildet, in dem drei Stickstoffatome das Molybdän komplexieren. Dieser Komplex **46** wurde mit α -Chlorcarbonsäurederivaten umgesetzt, wobei jeweils nur das nicht an dem Komplex beteiligte Stickstoffatom reagierte. Nach Aufarbeitung wurde das einfach substituierte Produkt in guten Ausbeuten erhalten.

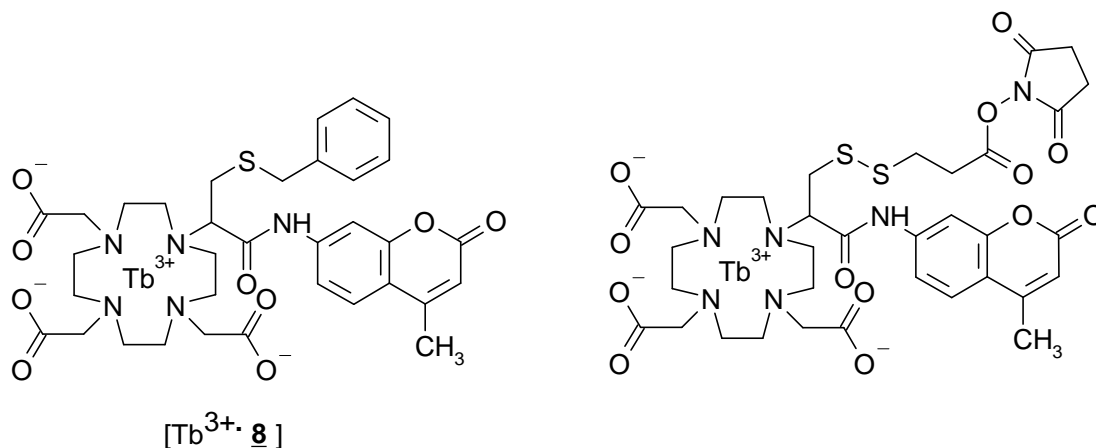
Der Molybdänkomplex **46** konnte nach dieser Vorschrift synthetisiert werden und wurde anschließend mit N-(4-Methyl-cumarin-7-yl)-3-benzylthio-2-chlorpropionsäureamid **5** umgesetzt (Abb.27). In der folgenden Aufarbeitung wurde aus der wässrigen Reaktionsmischung mit Dichlormethan nur eine kleine Menge Cyclen extrahiert.

Ein Dünnschichtchromatogramm der wässrigen Phase zeigt neben den Spots der beiden Edukte - mit den R_F -Werten von $R_F(\mathbf{1})=0$ und $R_F(\mathbf{5})=0.9$ - auch einen neuen Spot mit einem R_F -Wert von 0.15. Der neue Spot zeigt im UV-Licht starke Fluoreszenz und kann mit hoher Wahrscheinlichkeit dem erwarteten Produkt **7**, N-(4-Methyl-cumarin-7-yl)-3-benzylthio-2-(1,4,7,10-tetraazacyclododecanyl)-propionsäureamid, zugeordnet werden.

Abb.28: Umsetzung von Cyclen mit **5** via Molybdän-Cyclen-Hexacarbonylkomplex

Das Produkt **7** ist die unmittelbare Vorstufe zum gewünschten Komplexbildner **8**. Durch Umsatz von **7** mit einem Überschuß Bromessigsäure in alkalischer Lösung kann der Komplexbildner **8** erhalten werden. Die Terbium- und Europiumkomplexe von **8** können als Sonden an biologische Zielmoleküle gebunden werden.

Beispielsweise kann nach Abspaltung der Benzylschutzgruppe und anschließender Umsetzung zum Succinimid die Sonde kovalent an Aminogruppen unterschiedlicher biologischer Moleküle gebunden werden.

Abb.29: Terbium(III)komplex von **8** und entsprechender Komplex mit Succinimid-Linker

4.7 Ausblick

Das Ziel der weiteren Arbeiten muß zuerst die Vollendung der Fluoreszenzsonde nach dem in dieser Arbeit aufgezeigten Syntheseweg sein.

Die Fluoreszenzsonde bietet ein interessantes Spektrum weiterer Herausforderungen.

So sollten die entsprechenden Sonden mit Phosphinsäureresten anstatt von Essigsäureresten als unmodifizierte Seitenarme synthetisiert werden. Die beiden Verbindungsklassen müßten dann hinsichtlich ihrer Komplexbildungskonstanten und ihrer Fähigkeit, das Lanthanid vor Wassermolekülen zu schützen, miteinander verglichen werden.

In einer Versuchsreihe müßte der Sensitizer variiert und die spektralen Eigenschaften der unterschiedlichen Sonden miteinander verglichen werden. Dabei gilt es, die Quantenausbeute zu optimieren sowie die Stokesverschiebung zu erhöhen. Desweiteren ermöglichen verschiedene Sensitizer eine Auswahl an verschiedenen Anregungswellenlängen. Möglicherweise könnte durch diese Arbeit auch weitere Erkenntnisse über die Natur des Energietransfers gewonnen werden.

Die Integration verschiedener Linker und die Bindung der Sonde an unterschiedliche biologische Moleküle ist eine weitere interessante Aufgabe, wobei auf die Erfahrungen aus Anwendungen in der Kernspintomographie und der Tumorforschung zurückgegriffen werden kann [84, 120-122].

Mit dem Einsatz der Sonde in FRET-Messungen und in Anwendungen mit zeitaufgelöster Spektroskopie werden erst alle Vorteile der Lanthanide genutzt.

Das Ermitteln optimaler Donor-Akzeptor-Paare, die Bestimmung der zugehörigen R_0 -Werte und die Bestimmung und Optimierung von κ^2 -Werten sind in dabei die Aufgaben.

5. Experimenteller Teil

Allgemeines

NMR-Spektren: Bruker MSL-300, TMS als interner Standard

Schmelzpunkte (unkorrigiert): Kofler Block

Dünnschichtchromatogramme: Merck Silica 60 auf Aluminium

Säulenchromatographie: Merck Silica 60

Elementaranalyse: Mikroanalytisches Laboratorium Beller, Göttingen

Synthese von 3-Azapentan-1,5-di(p-toluolsulfonsäureester) 27

Toluolsulfonylchlorid (3 eq, 28.6 g, 150 mmol) wurde in Pyridin (75 ml) gelöst. Es wurde bei 0°C eine Lösung aus Diethanolamin (1 eq, 5.26 g, 50 mmol) in Pyridin (10 ml) hinzugegeben. Es wurde für weitere zwei Stunden bei 0°C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung für 16h bei 0-5°C gehalten und anschließend auf eine Eis(300 g)-Wasser(100 g)-Mischung geschüttet. Der Kolben wurde nochmals mit 50 ml Wasser ausgewaschen. Die vereinigten wäßrigen Lösungen wurden gerührt, bis das gesamte Eis geschmolzen war, und dann der entstandene Feststoff abfiltriert. Der Feststoff wurde mit eiskaltem Wasser gewaschen und anschließend im Vakuum getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt (quant. Ausbeute) wurde bei Raumtemperatur in Aceton (125 ml) gelöst. Das Produkt wurde bei -25°C wieder zur Kristallisation gebracht. Der Feststoff wurde abfiltriert und mit Ethanol (40 ml) gewaschen. (Ausbeute 70-80%)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ = 7.74 (d, $^3J_{2'-3'}=8.1$, 4H, 2'), 7.58 (d, $^3J_{2''-3''}=8.0$, 2H, 2''), 7.49 (d, $^3J_{3'-2'}=8.1$, 4H, 3'), 7.37 (d, $^3J_{3''-2''}=8.0$, 2H, 3''), 4.01 (t, $^3J_{1/5-2/4}=5.8$, 4H, 1+5), 2.44 (s, 9H, CH_3), 3.30 (t, $^3J_{2/4-1/5}=5.8$, 4H, 2+4)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ = 145.8 (C1'), 143.7 (C1''), 135.2 (C4'), 132.2 (C4''), 130.0 (C3'+C6'), 129.9 (C3'+C6''), 127.6 (C2'+C5'), 127.0 (C2''+C5''), 68.1 (C1+C5), 47.4 (C2+C4), 21.1 (CH_3)

Elementaranalyse($\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{NO}_8\text{S}_3$)

berechnet: C 52.89 H 5.14 N 2.47 O 22.55 S 16.95

gefunden: C 52.96 H 5.03 N 2.49 O 22.74 S 16.82

Smp. 96-98°C

Synthese von 1,4,7-Tri(p-toluolsulfonyl)-1,4,7-triazaheptan **28**

p-Toluolsulfonylchlorid (3 eq, 28.60 g, 150 mmol) wurde in Pyridin (75 ml) bei 50°C gelöst. Anschließend wurde bei 30°C eine Mischung von Diethylentriamin (1 eq, 5.16 g, 50 mmol) in Pyridin (10 ml) hinzuge tropft, so daß die Temperatur während des einstündigen Zutropfens zwischen 50-60°C verblieb. Es wurde weitere 30 min bei 50-60°C gerührt und dann abgekühlt. Unter Rühren wurde Wasser (100 ml) hinzuge tropft, noch 6h gerührt, dann der entstandene Feststoff abfiltriert und mit eiskaltem Ethanol (95%) gewaschen. Nach Trocknen im Vakuum wurde das Produkt erhalten (Ausbeute: 60-70%).

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ = 7.65 (d, ³J_{2'-3''}=8.1, 4H, 2'), 7.54 (d, ³J_{2''-3''}=8.0, 2H, 2''), 7.40 (d, ³J_{3'-2'}=8.1, 4H, 3'), 7.37 (d, ³J_{3''-2''}=8.0, 2H, 3''), 3.00 (t, ³J_{2/6-3/5}=7.0, 4H, 2+6), 2.80 (t, ³J_{3/5-2/6}=7.0, 4H, 3+5), 2.39 (s, 9H, CH₃)

¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ = 143.5 (C1'), 142.8 (C1''), 137.6 (C4'+C4''), 130.0 (C3'+5'), 129.7 (C3''+C5''), 126.8 (C2'+C6'), 126.5 (C2''+C6''), 48.3 (C3+C5), 41.6 (C2+C6), 21.0 (CH₃)

Elementaranalyse (C₂₅H₃₁N₃O₆S₃)

berechnet: C 53.08 H 5.52 N 7.43 O 16.97 S 17.00

gefunden: C 53.17 H 5.44 N 7.39 O 16.93 S 16.98

Smp. 179°C

Synthese von 1,4,7-Tri(p-toluolsulfonyl)-1,4,7-triazaheptan, Dinatriumsalz **29**

Zu einer 60°C heißen Mischung von **28** (1 eq, 10.8 g, 19 mmol) in wasserfreien Methanol (90 ml) wurde Natriummethanolat (2.1 eq, 2.3 g, 40 mmol) in Methanol (25 ml) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde noch für vier Stunden gerührt. Während die Mischung für 12 h bei 0-5°C gelagert wurde, kristallisierte das Produkt aus, anschließend wurde es abfiltriert und im Vakuum getrocknet. (Ausbeute: 70-75 %)

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ = 7.61 (d, ³J_{2'-3''}=8.2, 2H, 2'), 7.60 (d, ³J_{2''-3''}=8.0, 4H, 2''), 7.43 (d, ³J_{3'-2'}=8.2, 2H, 3'), 7.25 (d, ³J_{3''-2''}=8.0, 4H, 3''), 3.03 (t, ³J_{2/6-3/5}=8.5, 4H, 2+6), 2.79 (t, ³J_{3/5-2/6}=8.5, 4H, 3+5), 2.44 (s, 9H, CH₃)

^{13}C -NMR (DMSO- d_6) δ = 145.5 (C1'), 142.3 (C1''), 137.5 (C4'+C4''), 129.4 (C3'+5'), 128.0 (C3''+C5''), 126.6 (C2'+C6'), 126.2 (C2''+C6''), 51.1 (C3+C5), 45.2 (C2+C6), 20.9 (CH₃)

Elementaranalyse (C₂₅H₂₉N₃Na₂O₆S₃):

berechnet: C 49.26 H 4.79 N 6.89 Na 7.54 O 15.74 S 15.78

gefunden: C 48.82 H 4.89 N 6.69 Na 7.16 O 17.99 S 14.53

Smp. 300-301°C unter Zersetzung

Synthese von 1,4,7,10-Tetra(p-toluolsulfonyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan **30**

Unter Rühren wurde zu einer 100°C heißen Lösung (0.1 M) von **29** (1 eq, 6.1 g, 10 mmol) in DMF (100 ml) innerhalb von 2h eine Lösung (0.2 M) von **27** (1 eq, 5.7 g, 10 mmol) in DMF (50 ml) hinzugegeben. Danach wurde das Ölbad entfernt und die Lösung weitere 30 min gerührt. Es wurde Wasser (200 ml) schnell hinzugegeben und über weitere 16 h gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert, mit viel Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. (Ausbeute: 98%)

^1H -NMR (CDCl₃) δ = 7.69 (d, $^3J_{2,3}=8.2$, 8H, 2'), 7.33 (d, $^3J_{3,2}=8.2$, 8H, 3'), 3.43 (s, 16H, CH₂), 2.44 (s, 12H, CH₃)

^{13}C -NMR (CDCl₃) δ = 143.9 (C1'), 134.3 (C4'), 130.0 (C3'+C5'), 127.8 (C2'+C6'), 52.3 (CH₂), 21.5 (CH₃)

Synthese von 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan (Cyclen) **1**

Der Ring **30** (1 eq, 7.28 g, 9.2 mmol) wurde in einem Überschuß konzentrierter Schwefelsäure (50 ml) gelöst und für 48h unter Rühren auf 100°C erhitzt.

Die Reaktionslösung wurde anschließend auf 0°C gekühlt, und trockener Diethylether (200 ml) wurde langsam hinzugegeben. Der gebildete Niederschlag wurde abfiltriert und mit Diethylether gewaschen. Das Salz wurde in Wasser (25 ml) aufgenommen und unter Rühren bei 0°C mit 50%iger Natronlauge neutralisiert. Dann wurde Aktivkohle hinzugefügt und das Gemisch auf 80°C erhitzt, anschließend die Aktivkohle wieder abfiltriert. Das Filtrat wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und erneut durch Hinzugabe von konzentrierter Schwefelsäure bis pH=1 angesäuert. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert, mit Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das

Produkt wurde erneut in Wasser (20 ml) gelöst und mit Natronlauge (50%, 40 ml) gerührt. Die Lösung wurde kontinuierlich mit THF für vier Tage extrahiert. Das Extraktionsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Produkt aus Acetonitril umkristallisiert. (Ausbeute: 80%)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ = 2.68 (s, 16H, CH_2), 1.95 (s, 4 H, NH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ = 46.3 (CH_2)

Elementaranalyse ($\text{C}_8\text{H}_{20}\text{N}_4$):

berechnet: C 55.78 H 11.70 N 32.52

gefunden: C 55.90 H 11.84 N 32.40

Smp. 112°C

Synthese von 7-Amino-4-methyl-carbostyryl (CS-124) 3

Eine Mischung von m-Phenylendiamin (1 eq, 5.41 g, 0.05 mol) und Acetessigester (1 eq, 6.51 g, 0.05 mol) wurde unter Rühren für 15h auf 150°C erhitzt. Anschließend wurde zu der Reaktionsmischung Wasser (100 ml) hinzugeben. Die Lösung wurde bis zum Sieden erhitzt und dann auf 0°C abgekühlt. Der entstandene Feststoff wurde kalt abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde zweimal in Morpholin gelöst und durch Hinzugabe von n-Hexan zur Kristallisation gebracht. (Ausbeute:77-79%)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ = 11.12 (s, 1H, NH), 7.33 (d, $^3J_{5,6}=8.6$, 1H, 5), 6.45 (dd, $^3J_{6,5}=8.6$, $^4J_{6,8}=2.1$, 1H, 6), 6.35 (d, $^4J_{8,6}=2.1$, 1H, 8), 5.94 (s, 1H, 3), 5.73 (s, 2H, NH_2), 2.27 (s, 3H, CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6) δ = 162.4 (C2), 151.1 (C8a), 147.9 (C3), 140.9 (C7), 125.5 (C4+C4a), 114.8 (C5), 110.5 (C6), 97.0 (C8), 18.4 (CH_3)

Elementaranalyse ($\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$)

berechnet: C 68.95 H 5.79 N 16.08 O 9.18

gefunden: C 68.76 H 5.83 N 16.16 O 9.28

Smp. 281-282°C

Synthese von N-(3-Hydroxy-phenyl)-urethan 47

Zu einer Suspension von m-Aminophenol (1 eq, 5.46 g, 0.05 mol) in trockenem Diethylether (200 ml) wurde Chlorameisensäureethylester (1 eq, 5.43 g, 0.05 mol) hinzugegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Das m-Aminophenol-Hydrochlorid (3.56 g, 50%) wurde abfiltriert. Das Produkt wurde durch Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum gewonnen. (Ausbeute: 50%)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ = 7.33 (b, 1H, OH), 7.13 (dd, $^3J_{5-6}=8.0$, $J_{5-4}^3=8.1$, 1H, 5), 6.70 (s, 1H, 2), 6.64 (dd, $^3J_{6-5}=8.0$, $^4J_{6-4}=1.8$, 1H, 6), 6.57 (dd, $^3J_{4-5}=8.1$, $^4J_{4-6}=1.8$, 1H, 4), 4.23 (q, $^3J_{1'-2}=7.1$, 2H, CH_2), 1.31 (t, $^3J_{2'-1}=7.1$, 3H, CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ = 157.0 (C=O), 154.0 (C3), 139.0 (C5), 130.0 (C5), 110.8 (C4+C6), 106.3 (C2), 61.5 (CH_2), 14.4 (CH_3)

Elementaranalyse ($\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$)

berechnet: C 59.66 H 6.12 N 7.73 O 26.49

gefunden: C 59.78 H 6.14 N 7.79 O 26.44

Smp. 94-95°C

Synthese von 7-Carboethoxyamino-4-methyl-cumarin 34

Acetessigester (1 eq, 4.15 g, 23 mmol) und **47** wurden in Schwefelsäure (70%, 60 ml) suspendiert und vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die klare gelbe Lösung wurde auf eine Eis-(100 g) Wasser- (100 g) Mischung geschüttet. Der gebildete Niederschlag wurde abfiltriert und aus Ethanol umkristallisiert. (Ausbeute: 65-75%)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ = 10.13 (s, 1H, NH), 7.68 (d, $^3J_{5-6}=8.7$, 1H, 5), 7.54 (d, $^4J_{8-6}=1.8$, 1H, 8), 7.40 (dd, $^3J_{6-5}=8.7$, $^4J_{6-8}=1.8$, 1H, 6), 6.23 (s, 1H, 3), 4.17 (q, $^3J_{1'-2}=7.1$, 2H, 1'), 2.38 (s, 3H, CH_3), 1.26 (t, $^3J_{2'-1}=3\text{H}$, 2')

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6) δ = 160.0 (C2), 153.9 (C=O), 153.4 (C8a), 153.1 (C3), 142.9 (C7), 125.9 (C4+C4a), 114.4 (C5), 111.9 (C6), 104.6 (C8), 60.7 (C1'), 18.0 (CH_3), 14.4 (C2')

Elementaranalyse ($\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO}_4$)

berechnet: C 63.15 H 5.30 N 5.67 O 25.88

gefunden: C 63.25 H 5.32 N 5.61 O 25.77

Smp. 186-188°C

Synthese von 7-Amino-4-methyl-cumarin (CM 440) 2

34 (1 eq, 3.84 g, 14.6 mmol) wurde 4h unter Rückfluß in einer Mischung aus konzentrierter Schwefelsäure (15 g) und Eisessig (15 g) erhitzt. Die abgekühlte Lösung wurde in Eiswasser (60 ml) geschüttet und für 16 h stehengelassen. Zur resultierende Suspension wurde unter Eiskühlung Natronlauge (50%) bis zur leicht basischen Reaktion hinzugegeben. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit Eiswasser gewaschen. Das Produkt wurde aus Ethanol umkristallisiert. (quant. Ausbeute)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ = 7.39 (d, $^3J_{5,6}$ =8.6, 1H, 5), 6.56 (dd, $^3J_{6,5}$ =8.6, $^4J_{6,8}$ =2.0, 1H, 6), 6.40 (d, $^4J_{8,6}$ =2.0, 1H, 8), 6.09 (s, 2H, NH_2), 5.89 (s, 1H, 3), 2.29 (s, 3H, CH_3)

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) δ = 160.7 (C2), 155.5 (C8a), 153.8 (C3), 153.1 (C7), 126.1 (C4+C4a), 111.2 (C5), 107.6 (C6), 98.7 (C8), 18.0 (CH_3)

Elementaranalyse ($\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$)

berechnet: C 68.56 H 5.18 N 8.00 O 18.27

gefunden: C 67.81 H 5.18 N 7.45 O 19.17

Smp. 220-224°C

Synthese von S-Benzyl-L-cystein 35

Zu einer Lösung von L-Cystein (1 eq, 6.06 g, 50 mmol) in einem Gemisch aus Ethanol (60 ml) und Natronlauge (1 N, 1 eq, 50 ml, 50 mmol) wurde unter Rühren Benzylchlorid (1.1 eq, 6.96 g, 55 mmol) hinzugegeben. Nach wenigen Minuten startete eine exotherme Reaktion, wobei S-Benzyl-L-Cystein ausfiel. Es wurde eine weitere halbe Stunde gerührt, dann der Feststoff abfiltriert und mit Wasser, Ethanol und Diethylether gewaschen. Das Produkt wurde in reichlich Wasser unter Rückfluß umkristallisiert und anschließend im Vakuum getrocknet. (Ausbeute: 90-92 %)

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ = 7.39-7.22 (m, 5 H, Ph), 3.81 (d, J =2.2, 2 H, Benzyl- CH_2), 3.66 (dd, $^3J_{2,3}$ =3.95, $^3J_{2,3'}$ =8.35, 1 H, 2), 3.06 (dd, $^3J_{3,2}$ =3.95, $^2J_{\text{gem}}$ =14.75, 1H, 3), 2.85 (dd, $^3J_{3,2}$ =8.35, $^2J_{\text{gem}}$ =14.75, 1H, 3')

$^1\text{H-NMR}$ (Na-Salz in D_2O) $\delta = 7.41-7.30$ (m, 5H, Ph), 3.78 (s, 2H, Benzyl- CH_2), 3.38 (dd, $^3J_{2,3}=5.3$, $^3J_{2,3}=6.7$, 1H, 2), 2.78 (dd, $^3J_{3,2}=5.3$, $^2J_{\text{gem}}=13.6$, 1H, 3), 2.70 (dd, $^3J_{3,2}=6.7$, $^2J_{\text{gem}}=13.6$, 1H, 3')

$^1\text{H-NMR}$ (in 1 ml D_2O und 5 μl SOCl_2) $\delta = 7.46-7.32$ (m, 5H, Ph), 4.21 (dd, $^3J_{2,3}=4.5$, $^3J_{2,3}=7.5$, 1H, 2), 3.87 (s, 2H, Benzyl- CH_2), 3.12 (dd, $^3J_{3,2}=4.5$, $^2J_{\text{gem}}=15.1$, 1H, 3), 3.01 (dd, $^3J_{3,2}=7.5$, $^2J_{\text{gem}}=15.1$, 1H, 3')

Elementaranalyse ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{S}$)

berechnet: C 56.85 H 6.20 N 6.63 O 15.14 S 15.18

gefunden: C 56.92 H 6.11 N 6.69 O 15.14 S 15.05

Smp. 209-210°C

Synthese von 3-Benzylthio-2-chlor-propionsäure 4

Zu einer 0°C kalten Lösung von S-Benzyl-L-Cystein **35** (1 eq, 1.46 g, 7.05 mmol) in Salzsäure (6 mol l^{-1} , 100 ml, 0.6 mol) wurde über 6h Natriumnitrit (2 eq, 1 g, 14.49 mmol) portionsweise hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 12h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde sie mit Diethylether (5x20 ml) extrahiert. Nach Entfernen des Diethylethers im Vakuum wurde das Produkt als Öl erhalten. Durch Umkristallisieren in n-Hexan/Cyclohexan (1:1) bei -25°C wurde das Produkt als weißer, kristalliner Feststoff erhalten. (Ausbeute: 65-70%)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) $\delta = 7.36-7.28$ (m, 5H, Ph), 3.92 (dd, $J_1=13.4$, $J_2=16.6$, 2H, Benzyl- CH_2), 3.81 (t, $^3J_{3,2}=^2J_{\text{gem}}=10.5$, 1H, 3), 3.53 (dd, $^3J_{2,3}=4.5$, $^3J_{2,3}=10.5$, 1H, 2), 3.47 (dd, $^3J_{3,2}=4.5$, $^2J_{\text{gem}}=10.5$, 1H, 3')

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) $\delta = 174.10$ (C1), 136.64 (C2'), 129.08 (C3'+C7'), 128.82 (C4'+C6'), 127.80 (C5'), 47.49 (C1'), 42.39 (C2), 36.57 (C3)

Elementaranalyse ($\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClO}_2\text{S}$)

berechnet: C 52.06 H 4.81 Cl 15.36 O 13.87 S 13.90

gefunden: C 52.07 H 4.89 Cl 15.18 O 13.86 S 14.04

Smp. 67-70°C

Synthese von 2,3-Dibrompropionsäuremethylester 42

Unter Rühren bei 0°C wurde zu einer Lösung von Acrylsäuremethylester (1 eq, 2.88 g, 33.45 mmol) in Tetrachlorkohlenstoff (20 ml) eine Lösung von Brom (1 eq, 1.71 ml,

5.35 g, 33.45 mmol) in Tetrachlorkohlenstoff (40 ml) hinzugegeben. Anschliessend wurde noch 48 h bei Raumtemperatur gerührt, danach wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 90-95 %

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ = 4.43 (dd, $^3J_{2-3}=11.3$, $^3J_{2-3}=4.3$, 1H, 2), 3.91 (dd, $^3J_{3-2}=11.3$, $^2J_{\text{gem}}=10.0$, 1H, 3), 3.82 (s, 3H, CH_3), 3.66 (dd, $^3J_{3-2}=4.3$, $^2J_{\text{gem}}=10.0$, 1H, C3)

Synthese von 3-Benzoyloxy-2-brompropionsäure nach Grassmann *et al.* 41

Zu 2,3-Dibrompropionsäuremethylester **42** (1 eq, 6.15 g, 25 mmol) liess man bei 0°C innerhalb von zwei Stunden eine Lösung von Natrium (1 eq, 0.57 g, 25 mmol) in Benzylalkohol (5 eq, 13.52 g, 0.125 mol) hinzutropfen. Nach einer Stunde verseifte man den Ester durch vorsichtige Hinzugabe von Natriumhydroxidlösung (5N, 1.1 eq, 1.1 g in 5.5 ml H_2O , 27.5 mmol). Die Reaktionsmischung wurde noch eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt, dann mit Diethylether (15 ml) gewaschen und die wässrige Phase abgetrennt. Die etherische Phase wurde noch mit Wasser (4x10 ml) ausgeschüttelt. Die vereinten wässrigen Lösungen wurden mit Schwefelsäure (5 N) bis pH=1 angesäuert. Das ausgeschiedene Öl nahm man mit Diethylester (15 ml) auf, extrahierte die wässrige Phase nochmal mit Diethylether (2x10 ml) und trocknete die vereinigten etherischen Lösungen nach Säurefreiwaschen mit Natriumhydrogencarbonat über Calciumchlorid. Der Diethylether wurde im Vakuum entfernt.

Ausbeute: 65-69%

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ = 7.80-7.48 (m, 5 H, Ph), 4.55 (s, 2 H, Benzyl- CH_2), 4.33 (dd, $^3J_{2-3}=6.0$, $^3J_{2-3}=7.5$, 1 H, 2), 3.93 (dd, $^3J_{3-2}=7.5$, $^2J_{\text{gem}}=10.4$, 1 H, 3), 3.76 (dd, $^3J_{2-3}=6.0$, $^2J_{\text{gem}}=10.4$, 1 H, 3)

Synthese von 3-Benzoyloxy-2-brompropionsäuremethylester nach Anelli *et al.* 43

Die Reaktion wurde unter einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Zu einer Lösung von Acrylsäuremethylester (2 M, 1 eq, 1.72 g, 20 mmol), Benzylalkohol (2 M, 1 eq, 2.16 g, 20 mmol) und 72%iger Perchlorsäure (0.04 M, 0.02 eq, 0.034 ml, 0.4 mmol) in THF (20 ml) wurde unter Rühren bei 0°C eine Lösung von Quecksilber(II)-trifluoacetat (1 M, 1 eq, 8.53 g, 20 mmol) in THF (10 ml) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung

wurde anschliessend für 16h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde eine wäßrige Kaliumbromidlösung (2.5 M, 1 eq, 2.38 g, 20 mmol) hinzuge tropft, die Temperatur wurde dabei zwischen 0-5° C gehalten. Nach einstündigen Rühren bei Raumtemperatur wurde das Gemisch erneut auf 0° C gekühlt und Brom (1 eq, 1.03 ml, 3.20 g, 20 mmol) hinzuge tropft. Schliesslich wurde noch eine Stunde bei 0°C weitergerührt. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum entfernt und der Rückstand in Chloroform (20 ml) aufgenommen. Die anorganischen Salze wurden abfiltriert, die Lösung mit Wasser (3x5 ml) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und bis zur Trockene im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch gereinigt (Silca Gel, n-Hexan/Ethylacetat 15:85 (v/v)).

Ausbeute: Produkt 60-65 %

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ = 7.28-7.38 (m, 5H, Ph), 4.58 (s, 2H, Benzyl- CH_2), 4.34 (dd, $^2J_{\text{gem}}=10$, $^3J_{3-2}=7$, 1H, 3), 3.96 (dd, $^2J_{\text{gem}}=10$, $^3J_{3-2}=7$, 1H, 3), 3.78 (s, 1H, CH_3), 3.79 (t, $^3J_{2-3}=7$, 1H, C2)

Synthese von N-(4-Methyl-carbostyryl-7-yl)-3-benzylthio-2-chlorpropionsäureamid **6**

4 (1 eq, 0.35 g, 1.5 mmol) wurde in einem Überschuß Thionylchlorid (10 ml) für eine Stunde unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde das überschüssige Thionylchlorid im Vakuum entfernt. Das Säurechlorid wurde nacheinander in Chloroform (4 ml) und 1,4-Dioxan (2 ml) aufgenommen und die Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Dann wurde das Säurechlorid in 1,4-Dioxan (5 ml) bei 0°C zu einer Suspension des Carbostyryls **3** (1 eq, 0.26 g, 1.5 mmol) in Dioxan (15 ml) getropft. Die Reaktionsmischung wurde für 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde kurz erhitzt und heiß von den unlöslichen Bestandteilen abfiltriert. Das Filtrat wurde im Vakuum bis zur Trockene eingengt und in Salzsäure (25 ml, $c=1 \text{ mol l}^{-1}$) für 16 h gerührt. Der Feststoff wurde anschließend abfiltriert und säulenchromatographisch (Silica 60, LM: 1,4-Dioxan) gereinigt. Das so erhaltene Produkt wurde aus Ethanol (95%) umkristallisiert. (Ausbeute: 20%)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ = 11.61 (s, 1H, N1), 10.61 (s, 1H, N2), 7.78 (dd, $^3J_{6-5}=8.0$, $^4J_{6-8}=2.0$, 1H, C6), 7.67 (d, $^3J_{5-6}=8.0$, 1H, C5), 7.39-7.25 (m, 6H, Ph+C8), 6.29 (s, 1H,

C3), 4.04-3.94 (m, 3H, C1'', C3'), 3.83 (dd, $^2J_{\text{gem}}=10.9$, $^3J_{3'-2}=3.9$, C3'), 3.71 (dd, $^3J_{2'-3}=3.9$, $^3J_{2'-3}=9.8$, C2), 2.39 (s, 1H, CH₃)

¹³C-NMR(DMSO-d₆): 167.4 (C1'), 166.1 (C2), 162.0 (C8a), 147.6 (C3), 140.3 (C7), 137.7 (C2''), 128.9 (C3''+C7''), 128.6 (C4''+C6''), 127.3 (C5''), 125.4 (C4+C4a), 119.4 (C5), 113.7 (C6), 105.0 (C8), 49.7 (C1''), 43.6 (C2'), 35.1 (C3'), 18.4 (CH₃)

Elementaranalyse (C₂₀H₁₉N₂O₂SCl)

berechnet: C 62.09 H 4.95 N 7.24 O 8.27 S 8.29 Cl 9.16

Elementaranalyse (C₂₀H₁₉N₂O₂SCl + H₂O)

berechnet: C 59.33 H 5.23 N 6.92 O 11.85 S 7.91 Cl 8.79

gefunden: C 60.18 H 5.50 N 7.03 O 11.57 S 7.46 Cl 8.39

Synthese von N-(4-Methyl-cumarin-7-yl)-3-benzylthio-2-chlorpropionsäureamid **5**

4 (1 eq, 0.35 g, 1.5 mmol) wurde in einem Überschuß Thionylchlorid (10 ml) für eine Stunde unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde das überschüssige Thionylchlorid im Vakuum entfernt. Das Säurechlorid wurde nacheinander in Chloroform (4 ml) und 1,4-Dioxan (2 ml) aufgenommen und die Lösungsmittel erneut im Vakuum entfernt. Dann wurde das Säurechlorid in 1,4-Dioxan (5 ml) bei 0°C zu einer Suspension des Cumarins **2** (1 eq, 0.26 g, 1.5 mmol) in Dioxan (15 ml) getropft. Die Reaktionsmischung wurde für 48 h bei Raumtemperatur gerührt, erhitzt und heiß abfiltriert. Das Filtrat wurde im Vakuum bis zur Trockene eingengt.

¹H-NMR(CDCl₃) δ = 8.42 (s, 1H, NH), 7.64 (dd, $^3J_{6-5}=8.3$, $^4J_{6-8}=2.2$, 1H, C6), 7.54 (d, $^3J_{5-6}=8.3$, 1H, C5), 7.53 (d, $^4J_{8-6}=2.2$, 1H, C8), 7.38-7.30 (m, 5H, Ph), 6.23 (s, 1H, C3), 4.02 (dd, $^2J_{\text{gem}}=10.8$, $^3J_{3'-2}=7.9$, 1H, C3'), 3.91 (s, 2H, C1''), 3.81 (dd, $^2J_{\text{gem}}=10.8$, $^3J_{3'-2}=4.5$, 1H, C3'), 3.64 (dd, $^3J_{2'-3}=7.9$, $^3J_{2'-3}=4.5$, 1H, C2'), 2.43 (s, 3H, CH₃)

¹³C-NMR(CDCl₃) δ = 167.5 (C1'), 161.2 (C2), 154.2 (C9), 152.6 (C3), 141.3 (C7), 137.3 (C2''), 129.3 (C3''+C7''), 128.0 (C4''+C6''), 127.8 (C5''), 125.3 (C4+C10), 116.0 (C5), 113.5 (C6), 107.3 (C8), 51.3 (C1''), 44.3 (C2'), 36.6 (C3'), 18.5 (CH₃)

Elementaranalyse (C₂₀H₁₈NO₃SCl)

berechnet: C 61.93 H 4.68 N 3.61 O 12.37 S 8.27 Cl 9.14

gefunden: C 61.17 H 4.68 N 3.56 O 13.10 S 8.16 Cl 8.95

Synthese von 3-Benzylthio-2-chlor-propionsäure-methylester **44**

3-Benzylthio-2-chlorpropionsäure **4** (1 eq, 2.30 g, 10 mmol) wurde in einem Überschuß Thionylchlorid (10 ml) gelöst und eine halbe Stunde unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wurde das Thionylchlorid im Wasserstrahlvakuum entfernt. Zu dem erhaltenen Säurechlorid wurde Methanol (10 ml) im Überschuß hinzugegeben, und nach kurzen Rühren bei Raumtemperatur wurde die Lösung unter Rückfluß erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Das Produkt wurde in Diethylether aufgenommen (5 ml) und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung säurefrei gewaschen. Die etherische Phase wurde über NaHCO₃ getrocknet, der Ether im Vakuum entfernt. Man erhielt das Produkt in quantitativer Ausbeute als Öl.

¹H-NMR (CDCl₃) δ = 7.34-7.32 (m, 5H, Ph), 3.86 (s, 2H, Ph-CH₂), 3.81 (dd, ³J₃₋₂=9.2, ²J_{gem}=13.5, 1H, C3), 3.76 (s, 3 H, CH₃), 3.51 (dd, ³J₃₋₂=4.6, ²J_{gem}=13.5, 1 H, C3'), 3.47 (dd, ³J₂₋₃=4.6, ³J₂₋₃=9.2, 1H, C2)

¹³C-NMR (CDCl₃) δ = 174.07 (C1), 136.97 (C2'), 129.01 (C3'+C7'), 128.76 (C4'+C6'), 127.66 (C5'), 52.60 (C1''), 47.85 (C1'), 42.88 (C2), 36.34 (C3)

Synthese von N-(1'-Carbonsäuremethylester-2'-benzylthio-ethyl)

-1,4,7,10-tetraazacyclododecan **45**

Die Reaktion wurde unter einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Zu einer Lösung von Cyclen **1** (1 eq, 113 mg, 0.656 mmol) in CDCl₃ (1 ml) wurde unter Rühren langsam eine Lösung von 3-Benzylthio-2-chlor-propionsäure-methylester **44** (1 eq, 161 mg, 0.656 mmol) in CDCl₃ (1 ml) hinzuge tropft und anschließend für 48h bei Raumtemperatur gerührt. Nach wenigen Minuten bildete sich ein Niederschlag, der nach der Reaktion abfiltriert wurde. Der Niederschlag konnte als Cyclen-Hydrochlorid bestimmt werden (max. 18%). Die Reaktionsmischung wurde mit Hilfe von ¹H-NMR und ¹³C-NMR untersucht.

¹H-NMR (CDCl₃) δ = 7.45-7.35 (m, 5H, Ph), 3.94 (s, 2 H, 2'), 3.66 (d, ³J₃₋₂=7.0, 2H, 3), 3.13 (s (b), 16H, Ring), 2.91 (t, ³J₃₋₂=7.5, 1H, 2),

^{13}C -NMR (CDCl_3) δ = 137.66 (C2'), 129.07 (C3'+C7'), 128.59 (C4'+C6'), 127.31 (C5'), 57.01 (C2), 52.29 (C1''), 47.66 (C1'), 46.48, 46.22, 45.82, 45.53 (Cyclen- CH_2), 36.29 (C3)

Synthese von Molybdän Tricarbonyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecan Komplex **46**

Cyclen **1** (1 eq, 250 mg, 1.45 mmol) und Molybdän-hexacarbonyl (1 eq, 383 mg, 1.45 mmol) wurden unter einer Argonatmosphäre für 2 h bei 160°C unter Rückfluß gekocht. Der gelbe Feststoff wurde unter einer Argonatmosphäre abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde sofort weiter verwendet.

Synthese von N-(4-Methyl-cumarin-7-yl)-3-benzylthio-2-(1,4,7,10-tetraazacyclododecanyl)-propionsäureamid **7**

Der Molybdänkomplex **46** (1 eq, 292 mg, 0.83 mmol), N-(4-Methyl-cumarin-7-yl)-3-benzylthio-2-chlorpropionsäureamid **5** (1 eq, 320 mg, 0.83 mmol) und fein gemörsertes Kaliumcarbonat (1.1 eq, 125 mg, 0.90 mmol) wurden unter einer Argonatmosphäre in trockenen entgasten DMF (20 ml) für 2 h auf 80°C erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in wäßriger Salsäure (50 ml, $c = 0.1 \text{ mol l}^{-1}$) für 4 h gerührt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von festen Kaliumhydroxid auf pH=14 eingestellt. Die Suspension wurde filtriert und das Filtrat mit Dichlormethan (1x10 ml, 5 x 5 ml) extrahiert. Nach Entfernen des Dichlormethan im Vakuum erhielt man 60 mg Cyclen.

Dünnschichtchromatographisch (Silica 60, LM:10% NH_4OH -Lsg in CH_3OH) konnte (wahrscheinlich) das Produkt in der wäßrigen Phase nachgewiesen werden ($R_F=0.15$, Spot fluoresziert; Cyclen $R_F=0$, keine Fluoreszenz; **5** $R_F=0.9$, Fluoreszenz; weitere unbekannte Substanz $R_F=0.6$, keine Fluoreszenz)

6. Literaturverzeichnis

- [1] E. Lopez, C. Chypre, B. Alpha, G. Mathis, *Clin.Chem.* **1993**, 39, 196
- [2] G. Mathis, *Clin. Chem.* **1995**, 41, 1391
- [3] E. F. G. Dickson, A. Pollack, E. P. Diamandis,
J.Photochem.Photobio. B **1995**, 27, 3
- [4] A. K. Saha, K. Kross, E. D. Kloszewski, D. A. Upson, J. L. Toner, R. A. Snow,
C. D. V. Black, V. C. Desai, *J.Am.Chem.Soc.* **1993**, 115, 11032
- [5] L. Seveus, M. Vaisala, S. Syrjanen, M. Sandberg, A. Kuusisto, R. Harju, J. Salo,
I. Hemmilä, H. Kojola, E. Soini, *Cytometry* **1992**, 13, 329
- [6] R. C. Morton, E. P. Diamandis, *Anal.Chem.* **1990**, 62, 1841
- [7] A. Canfi, M. P. Bailey, B. F. Rocks, *Analyst* **1989**, 114, 1908
- [8] H. Takalo, V. M. Mukkala, H. Mikola, P. Liitti, I. Hemmilä,
Bioconjugate Chem. **1994**, 5, 278
- [9] P. R. Selvin, *Meth.Enzy.* **1995**, 246, 300
- [10] G. Urbain, *Bull.Soc.Chim.* **1896**, 15, 347
- [11] K. A. Gschneider, Jr., L. R. Eyring, Handbook on the Physics and Chemistry of
Rare Earths, North-Holland Publishing Company, Amsterdam; 1978-1996
- [12] C. C. Hinckley, *J.Am.Chem.Soc.* **1969**, 91, 5160
- [13] N. N. Greenwood, A. Earnshaw, Chemie der Elemente,
VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1990
- [14] R. Thomaschek, O. Deutschbein, *Physik.Zeitschr.* **1933**, 34, 374
- [15] O. Deutschbein, R. Thomschek, *Ann.Phys.* **1937**, 29, 311
- [16] R. Thomaschek, E. Mehnert, *Ann.Phys.* **1937**, 29, 306
- [17] H. Gobrecht, *Ann. Phys.* **1939**, 31, 181
- [18] G. A. Crosby, *Mol.Cryst.* **1966**, 1, 37-81
- [19] T. Förster, *Z.Naturforsch.A* **1949**, 4, 321
- [20] J. L. Kropp, M. W. Windsor, *J.Chem.Phys.* **1963**, 39, 2769
- [21] J. L. Kropp, M. W. Windsor, *J.Chem.Phys.* **1965**, 42, 1599
- [22] J. L. Kropp, M. W. Windsor, *J.Chem.Phys.* **1966**, 45, 761

- [23] J. C. G. Bünzli, G. R. Choppin, *Lanthanide Probes in Life, Chemical and Earth Sciences*, Elsevier, Amsterdam, 1989
- [24] W. DeW. Horrocks, Jr., D. R. Sudnik, *J.Am.Chem.Soc.* **1979**, 101, 334
- [25] W. DeW. Horrocks, Jr., D. R. Sudnik, *Acc.Chem.Res.* **1981**, 14, 384
- [26] R. S. Dickins, D. Parker, A. S. de Sousa, J. A. G. Williams, *J.Chem.Soc.Chem.Comm.* **1996**, 697
- [27] D. Parker, J. A. G. Williams, *J.Chem.Soc.Perkin Trans.2* **1996**, 1581
- [28] D. Parker, J. A. G. Williams, *J.Chem.Soc.Perkin Trans.2* **1995**, 1305
- [29] A. Abusaleh, C. F. Meares, *Photochem.Photobiol.* **1984**, 39, 763
- [30] D. L. Dexter, *J.Chem.Phys.* **1953**, 21, 836
- [31] L. Stryer, R. P. Haugland, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **1967**, 98, 719
- [32] E. A. Jares-Erijman, T. M. Jovin, *J.Mol.Biol.* **1996**, 257, 597
- [33] C. R. Cantor, P. R. Schimmel, "Biophysical Chemistry", Freeman, San Francisco, 1980
- [34] R. M. Clegg, *Meth.Enzy.* **1992**, 211, 353
- [35] J. P. Cooper, P. J. Hagerman, *Biochemistry* **1990**, 29, 9261
- [36] A. I. H. Murchie, R. M. Clegg, E. von Kitzing, D. R. Duckett, S. Diekmann, D. M. J. Lilley, *Nature* **1989**, 341, 763
- [37] R. M. Clegg, A. I. H. Murchie, A. Zechel, C. Carlberg, S. Dieckmann, D. M. J. Lilley, *Biochemistry* **1992**, 31, 4846
- [38] E. D. Matayoshi, G. T. Wang, G. A. Krafft, J. Erickson, *Scienes* **1990**, 247, 954
- [39] T. M. Jovin, D. J. Arndt-Jovin, *Annu.Rev.Biophys.Biophys.Chem.* **1989**, 18, 271
- [40] T. M. Jovin, D. J. Arndt-Jovin, in "Microspectrofluorimetry of Single Living Cells" (ed. E. Kohen, J. S. Ploem, J. G. Hirschberg), Academic Press, Orlando, 1989, S.99ff
- [41] T. M. Jovin, D. J. Arndt-Jovin, G. Marriott, R. M. Clegg, M. Robert-Nicoud, T. Schormann, in "Optical Microscopy for Biology" (ed. B. Herman, K. Jacobson), Wiley-Liss, New York, 1990, S.575ff
- [42] P. I. H. Bastiaens, J. W. Borst, T. M. Jovin, *Bioimaging* **1996**, 4, 25
- [43] P. I. H. Bastiaens, I. V. Majoul, P. J. Verveer, H. D. Söling, T. M. Jovin, *EMBO* **1996**, 15, 4246

- [44] P. I. H. Bastians, T. M. Jovin, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **1996**, 93, 8407
- [45] L. Stryer, *Annu.Rev.Biochem.* **1978**, 47, 819
- [46] G. Marririot, R. M. Clegg, D. J. Arndt-Jovin, T. M. Jovin,
Biophys.J. **1991**, 60, 1374
- [47] G. Mathis, *Clin.Chem.* **1993**, 39, 1953
- [48] P. R. Selvin, J. E. Hearst, *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* **1994**, 91, 10024
- [49] P. R. Selvin, T. M. Rana, J. E. Hearst, *J.Am.Chem.Soc.* **1994**, 116, 6029
- [50] S. I. Weissman, *J.Chem.Phys.* **1942**, 10, 214
- [51] H. Takalo, I. Hemmilä, T. Sutela, M. Latva, *Helv.Chim.Acta* **1996**, 79, 789
- [52] V. M. Mukkala, P. Liitti, I. Hemmilä, H. Takalo, C. Matachescu, J. Kankare,
Helv.Chim.Acta **1996**, 79, 295
- [53] V. M. Mukkala, P. Liitti, I. Hemmilä, H. Takalo, C. Matachescu, J. Kankare,
Helv.Chim.Acta **1993**, 76, 1361
- [54] J. Coates, P. G. Sammes, R. M. West, *J.Chem.Soc.Perkin Trans.2* **1996**, 1275
- [55] J. Coates, P. G. Sammes, R. M. West, *J.Chem.Soc.Perkin Trans.2* **1996**, 1283
- [56] H. Hoshino, T. Saitoh, T. Yotsuyanagi, *Analytical Sciences* **1995**, 11, 175
- [57] F. Benetollo, G. Bombieri, L. De Cola, A. Polo, D. L. Smailes, L. M. Vallarino,
Inorg.Chem. **1989**, 28, 3447
- [58] B. Alpha, J. M. Lehn, G. Mathis, *Angew.Chem.* **1987**, 99, 254;
Angew.Chem.Int.Ed.Engl. **1987**, 26, 266
- [59] L. Prodi, M. Maestri, R. Ziessel, V. Balzani, *Inorg.Chem.* **1991**, 30, 3798
- [60] V. Balzani, J. M. Lehn, J. van de Loosdrecht, A. Mecati, N. Sabbatini, R. Ziessel,
Angew.Chem. **1991**, 103, 186; *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.*
1991, 30, 190
- [61] N. Sabbatini, M. Guardigli, J. M. Lehn, *Coord.Chem.Rev.* **1993**, 123, 201;
- [62] N. Sabbatini, M. Guardigli, A. Mecati, V. Balzani, R. Ungaro, E. Ghidini,
A. Casnati, A. Pochini, *J.Chem.Soc.Chem.Comm.* **1990**, 878
- [63] B. Alpha, R. Ballardini, V. Balzani, J. M. Lehn, S. Perathoner, N. Sabbatini,
Photochem.Photobiol. **1990**, 52, 299
- [64] F. J. Steemers, W. Verboom, D. N. Reinhout, E. B. van der Tol,
J. W. Verhoeven, *J.Am.Chem.Soc.* **1995**, 117, 9408

- [65] N. Sabbatini, M. Guardigli, I. Manet, R. Ungaro, A. Casnati, C. Fischer, R. Ziessel, H. G. Ulrich, *New J.Chem.* **1995**, 19, 137
- [66] A. Casnati, C. Fischer, M. Guardigli, A. Isernia, I. Manet, N. Sabbatini, R. Ungaro, *J.Chem.Soc.Perkin Trans.2* **1996**, 395
- [67] N. Sato, S. Shinkai, *J.Chem.Soc.Perkin Trans.2* **1993**, 621
- [68] M. P. Bailey, B. F. Rocks, C. Riley, *Analyst (London)* **1984**, 109, 1449
- [69] C. F. G. C. Geraldes, A. M. Urbano, M. A. Hoefnagel, J. A. Peters, *Inorg.Chem.* **1993**, 32, 2426
- [70] F. Uggeri, S. Aime, P. L. Anelli, M. Botta, M. Brocchetta, C. de Haën, G. Ermondi, M. Grandi, P. Paoli, *Inorg.Chem.* **1995**, 34, 633
- [71] P. R. Selvin, J. Jancarik, M. Li, L. W. Hung, *Inorg.Chem.* **1996**, 35, 700
- [72] D. Parker, J. A. G. Williams, *J.Chem.Soc. Dalton Trans.* **1996**, 3613
- [73] M. Li, P. R. Selvin, *J.Am.Chem.Soc.* **1995**, 117, 8132
- [74] A. Mondry, S. C. J. Meskers, J. P. Riehl, *J.Luminescence* **1994**, 62, 17
- [75] S. L. Wu, S. J. Franklin, K. N. Raymond, W. DeW. Horrocks, *Inorg.Chem.* **1996**, 35, 162
- [76] K. Kumar, M. F. Tweedle, M. F. Malley, J. Z. Gougoutas, *Inorg.Chem.* **1995**, 34, 6472
- [77] M. F. Loncin, J. F. Desreux, E. Merciny, *Inorg.Chem.* **1986**, 25, 2646
- [78] C. J. Broan, K. J. Jankowski, R. Katakya, D. Parker, A. M. Randall, A. Harrison, *J.Chem.Soc.Chem.Commun.* **1990**, 1739
- [79] M. Kodama, T. Koike, A. B. Mahatma, E. Kimura, *Inorg.Chem.* **1991**, 30, 1270
- [80] J. A. Chang, *J.Chem.Soc.Dalton Trans.* **1996**, 2347
- [81] S. Aime, M. Botta, D. Parker, J. A. G. Williams, *J.Chem.Soc.Dalton Trans.* **1996**, 17
- [82] S. Aime, M. Botta, D. Parker, J. A. G. Williams, *J.Chem.Soc.Dalton Trans.* **1995**, 2259
- [83] D. D. Dischino, E. J. Delaney, J. E. Emswiler, G. T. Gaughan, J. S. Prasad, S. K. Srivaatava, M. F. Tweedle, *Inorg.Chem.* **1991**, 30, 1265
- [84] P. L. Anelli, L. Calabi, P. Dapporto, M. Murru, L. Paleari, P. Paoli, F. Uggeri, S. Verona, M. Virtuani, *J.Chem.Soc.Perkin Trans.1* **1995**, 2995

- [85] J. P. L. Cox, A. S. Craig, I. M. Helps, K. J. Jankowski, D. Parker, M. A. W. Eaton, A. T. Millican, K. Millar, N. R. A. Beeley, B. A. Boyce, *J.Chem.Soc.Perkin Trans.1* **1990**, 2567
- [86] M. H. Ansari, M. Ahmad, K. A. Dicke, *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **1993**, 3, 1067
- [87] K. Takenouchi, M. Tabe, K. Watanabe, A. Hazato, Y. Kato, M. Shionoya, T. Koike, E. Kimura, *J.Org.Chem.* **1993**, 58, 6895
- [88] J. E. Richman, T. J. Atkins, *J.Am.Chem.Soc.* **1974**, 96, 2268
- [89] T. J. Atkins, J. E. Richman, W. F. Oettle, *Org.Synth.* **1978**, 58, 86
- [90] F. Chavez, A. D. Sherry, *J.Org.Chem.* **1989**, 54, 2990
- [91] C. D. Edlin, S. Faulkner, D. Parker, M. P. Wilkinson, *J.Chem.Soc.Chem.Comm.* **1996**, 1249
- [92] M. K. Moi, C. F. Meares, *J.Am.Chem.Soc.* **1988**, 110, 6266
- [93] S. I. Kang, R. S. Ranganathan, J. E. Emswiler, K. Kumar, J. Z. Gougoutas, M. F. Malley, M. F. Tweedle, *Inorg.Chem.* **1993**, 32, 2912
- [94] A. K. Mishra, K. Draillard, A. Faivre-Chauvet, J. F. Gestin, C. Curtet, J. F. Chatal, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 7515
- [95] G. R. Weisman, D. P. Reed, *J.Org.Chem.* **1996**, 61, 5186
- [96] A. Beeby, D. Parker, J. A. G. Williams, *J.Chem.Soc.Perkin Trans.2* **1996**, 1565
- [97] M. Murru, D. Parker, J. A. G. Williams, A. Beeby, *J.Chem.Soc.Chem.Comm.* **1993**, 1116
- [98] P. R. Hammond, A. N. Flechter, R. A. Henry, R. L. Atkins, *Appl.Phys.* **1975**, 8, 311
- [99] A. N. Flechter, D. E. Bliss, *Appl.Phys.* **1978**, 16, 289
- [100] A. N. Flechter, *Appl.Phys.* **1977**, 14, 295
- [101] L. Taneja, A. K. Sharma, R. D. Singh, *J.Luminescence* **1995**, 63, 203
- [102] L. L. Woods, M. M. Folladi, *J.Chem.Eng.Data* **1968**, 13, 440
- [103] M. Frankel, D. Gertner, H. Jacobson, A. Zilka, *J.Chem.Soc.* **1960**, 1390
- [104] L. N. Owen, M. B. Rahman, *J.Chem.Soc.Perkin Trans.1* **1974**, 2413
- [105] F. Effenberger, T. Beisswanger, F. Dannenhauer, *Chem.Ber.* **1988**, 121, 2209
- [106] A. Focella, F. Bizzarro, C. Exon, *Synth.Comm.* **1991**, 21, 2165
- [107] G. W. Wheland, *Advanced Organic Chemistry*, Wiley, New York, 1960

- [108] Imperial Chemical Industries, US-Pat.2379104, vom 26.02.1949;
Chem.Abstr. **1945**, 39, 4621
- [109] M. H. Ansari, M. Ahmad, K. A. Dicke, *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **1993**, 3, 1071
- [110] D. B. Hope, M. Wälti, *J.Chem.Soc.* **1970**, 2475
- [111] H. Tomisawa, M. Hayashi, F. Uda, A. Okamoto, K. Hattori, N. Ozawa,
M. Tateishi, *Biochem.Pharm.* **1992**, 44, 703
- [112] W. Grassmann, E. Wünsch, P. Deufel, A. Zwick, *Chem.Ber.* **1958**, 91, 538
- [113] P. L. Anelli, A. Beltrami, M. Lolli, F. Uggeri, *Synth.Comm.* **1993**, 23, 2639
- [114] H. P. Maskova, G. Kokotos, C. Tzougraki, T. Barth,
Collect.Czech.Chem.Communic. **1989**, 54, 2802
- [115] S. Aime, P. L. Anelli, M. Botta, F. Fedeli, M. Grandi, P. Paoli, F. Uggeri,
Inorg.Chem. **1992**, 31, 2422
- [116] S. Aime, M. Botta, G. Ermondi, F. Fedeli, F. Uggeri,
Inorg.Chem. **1992**, 31, 1100
- [117] J. S. Prasad, F. J. Okuniewicz, E. J. Delaney, D. D. Dischino,
J.Chem.Soc.Perkin Trans.1 **1991**, 3329
- [118] W. J. Kruper, Jr., P. R. Rudolf, C. A. Langhoff, *J.Org.Chem.* **1993**, 58, 3869
- [119] K. P. Pulukkody, T. J. Norman, D. Parker, L. Royle, C. J. Broan,
J.Chem.Soc.Perkin Trans.2 **1993**, 605
- [120] C. G. Pippin, T. J. McMurry, M. W. Brechbiel, M. McDonald, R. Lambrecht,
D. Milenic, M. Roselli, D. Colcher, O. A. Gansow,
Inorg.Chim.Acta **1995**, 239, 43
- [121] T. J. Norman, D. Parker, L. Royle, A. Harrison, P. Antoniow, D. J. King,
J.Chem.Soc.Chem.Comm. **1995**, 1877
- [122] T. J. Norman, D. Parker, F. C. Smith, D. J. King, *J.Chem.Soc.Chem.Comm.* **1995**,
1879

Danksagung

Allen voran gilt mein Dank Herrn Dr. T. M. Jovin und Herrn Prof. Dr. H. Lackner.

Herrn Dr. T. M. Jovin danke ich besonders für die sehr interessante Themenstellung sowie die ständige Förderung und Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Lackner möchte ich für seine universitäre Betreuung, insbesondere für anregende Diskussionen und sein fortwährendes Interesse danken.

Desweiteren möchte ich Frau Dr. E. A. Jares-Erijman für interessante Diskussionen und ständige Hilfsbereitschaft danken.

Den Mitgliedern der Abteilung für molekulare Biologie, insbesondere Herrn C. Meyer, Herrn A. Kirsch und Herrn Dr. A. Schaper möchte ich für eine gute Arbeitsatmosphäre danken.

Dem technischen Personal möchte ich ebenfalls meinen Dank aussprechen für ihre ständige Hilfsbereitschaft, allen voran Frau G. Heim und Herrn J. Dichter.

Herrn F. Reiche möchte ich nicht nur für seine Mühe bei der Korrektur dieser Arbeit herzlich danken.

Allen anderen, die mich ebenfalls moralisch außerhalb meiner Arbeitszeit unterstützt haben, möchte ich natürlich auch danken.

Schließlich, aber nicht an letzter Stelle danke ich meinen Eltern, die durch ihre moralische und finanzielle Unterstützung mein Studium erst ermöglichten.