

Synthese und Charakterisierung selektiver Fluoroionophore für intra- und extrazelluläre Bestimmungen von Kalium- und Natrium-Ionen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin Anorganische Chemie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Janine Riemer

Potsdam, 2019

"Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker; er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt."

Marie Curie

Published online at the
Institutional Repository of the University of Potsdam:
<https://doi.org/10.25932/publishup-44193>
<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-441932>

Kurzfassung

Im Rahmen dieser Dissertation konnten neue Kalium- und Natrium-Ionen Fluoreszenzfarbstoffe von der Klasse der Fluoroionophore synthetisiert und charakterisiert werden. Sie bestehen aus einem *N*-Phenylazakronenether als Ionophor und unterschiedlichen Fluorophoren und sind über einen π -konjugierten 1,2,3-Triazol-1,4-diyl Spacer verbunden. Dabei lag der Fokus während ihrer Entwicklung darauf, diese in ihrer Sensitivität, Selektivität und in ihren photophysikalischen Eigenschaften so zu funktionalisieren, dass sie für intra- bzw. extrazelluläre Konzentrationsbestimmungen geeignet sind.

Durch Variation der in *ortho* Position der *N*-Phenylazakronenether befindlichen Alkoxy-Gruppen und der fluorophoren Gruppe der Fluoroionophore konnte festgestellt werden, dass die Sensitivität und Selektivität für Kalium- bzw. Natrium-Ionen jeweils durch eine bestimmte Isomerie der 1,2,3-Triazol-1,4-diyl-Einheit erhöht wird. Des Weiteren wurde gezeigt, dass durch eine erhöhte Einschränkung der *N,N*-Diethylamino-Gruppe des Fluorophors eine Steigerung der Fluoreszenzquantenausbeute und eine Verschiebung des Emissionsmaximums auf über 500 nm erreicht werden konnte. Die Einführung einer Isopropoxy-Gruppe an einem *N*-Phenylaza-[18]krone-6-ethers resultierte dabei in einem hoch selektiven Kalium-Ionen Fluoroionophor und ermöglichte eine *in vitro* Überwachung von 10 – 80 mM Kalium-Ionen. Die Substitution einer Methoxy-Gruppe an einem *N*-Phenylaza-[15]krone-5-ether kombiniert mit unterschiedlich *N,N*-Diethylamino-Coumarinen lieferte hingegen zwei Natrium-Ionen Fluoroionophore, die für die Überwachung von intra- bzw. extrazellulären Natrium-Ionen Konzentrationen geeignet sind.

In einem weiteren Schritt wurden *N*-Phenylaza-[18]krone-6-ether mit einem Fluorophor, basierend auf einem [1,3]-Dioxolo[4,5-*f*][1,3]benzodioxol-(DBD)-Grundgerüst, funktionalisiert. Die im Anschluss durchgeführten spektroskopischen Untersuchungen ergaben, dass die Isopropoxy-Gruppe in *ortho* Position des *N*-Phenylaza-[18]krone-6-ether in einen für extrazelluläre Kalium-Ionen Konzentrationen selektiven Fluoroionophor resultierte, der die Konzentrationsbestimmungen über die Fluoreszenzintensität und -lebensdauer ermöglicht.

In einem abschließenden Schritt konnte unter Verwendung eines Pyrens als fluorophore Gruppe ein weiterer für extrazelluläre Kalium-Ionen Konzentrationen geeigneter Fluoroionophor entwickelt werden. Die Bestimmung der Kalium-Ionen Konzentration erfolgte hierbei anhand der Fluoreszenzintensitätsverhältnisse bei zwei Emissionswellenlängen.

Insgesamt konnten 17 verschiedene neue Fluoroionophore für die Bestimmung von Kalium- bzw. Natrium-Ionen synthetisiert und charakterisiert werden. Sechs dieser neuen Moleküle ermöglichen *in vitro* Messungen der intra- oder extrazellulären Kalium- und Natrium-Ionen Konzentrationen und könnten zukünftig für *in vivo* Konzentrationsmessungen verwendet werden.

Abstract

In this thesis, new potassium and sodium ion fluorescent probes from the class of fluoroionophores were synthesized and characterized. They consist of an *N*-phenylazacrown lariat ether and several fluorophores, connected through a π -conjugated 1,2,3-triazole-1,4-diyl spacer. The focus of their development was to optimize their sensitivity, selectivity and their photophysical properties, making them suitable for detecting intra- or extracellular ion levels. Variation of the alkoxy groups in the *ortho* position of the *N*-phenylazacrown lariat ether and the fluorophoric group of the fluoroionophores showed that the sensitivity and selectivity for potassium or sodium ions was preferred by a specific isomerism of the 1,2,3-triazole-1,4-diyl unit. Furthermore it was possible to show that an increased hindrance of the *N,N*-diethylamino group of the fluorophore led to a higher fluorescence quantum yield and a shift of the emission maximum to over 500 nm. The introduction of an isopropoxy group to an *N*-phenylaza-[18]crown-6 lariat ether resulted in a highly selective potassium ion fluoroionophore suitable for in vitro monitoring of potassium ion levels (10 – 80 mM). However, a substitution of a methoxy group on an *N*-phenylaza-[15] crown-5 lariat ether combined with different degrees of hindrance of *N,N*-diethylamino coumarins gave sodium ion fluoroionophores which are suitable for monitoring intracellular and extracellular sodium ion levels.

In a following step *N*-phenylaza-[18]crown-6 lariat ethers were functionalized with a fluorophore, which was based on a [1,3]-dioxolo[4,5-*f*] [1,3]benzodioxole (DBD) backbone. Following spectroscopic studies it was shown that an isopropoxy group in the *ortho* position of the *N*-phenylaza-[18]crown-6 lariat ether resulted in a selective fluoroionophore for extracellular potassium ion levels, which allows measurements of the fluorescence intensity and -lifetime.

In a final step an additional fluoroionophore, suitable for extracellular potassium ion levels, was developed by using a pyrene as the fluorophoric group. This fluoroionophore was used to measure potassium ion levels by analyzing the fluorescence intensity ratios at two emission wavelengths.

In this work 17 new fluoroionophores were synthesized and characterized. Six of these novel molecules allow in vitro measurements of intra- or extracellular potassium and sodium ion levels and could be used for in vivo concentration measurements in the future.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Zielstellung	18
3.	Theoretische Grundlagen	20
3.1	Fluoreszenzentstehung.....	20
3.2	Fluoreszenzquantenausbeute und Fluoreszenzlebensdauer.....	22
3.3	Fluoroionophore.....	24
3.4	Photoinduzierter Elektronentransfer.....	26
4.	Ergebnisdiskussion.....	27
4.1	Synthese der alkin- bzw. azidfunktionalisierten Ionophore	27
4.2	Synthese der alkin- bzw. azidfunktionalisierten Fluorophore	30
4.3	Synthese neuer Kalium-Ionen Fluoroionophore basierend auf Änderungen der Fluoreszenzintensität (K5 – K9).....	32
4.4	Synthese neuer Natrium-Ionen Fluoroionophore basierend auf Änderungen der Fluoreszenzintensität (Na3 – Na10)	46
4.5	Synthese neuer Kalium-Ionen Fluoroionophore basierend auf Änderungen der Fluoreszenzlebenszeiten (W1, W2).....	59
4.6	Ratiometrische Fluoroionophore für Kalium-Ionen (R1, R2).....	66
5.	Zusammenfassung.....	72
6.	Experimentelle Daten	79
6.1	Allgemeines.....	79
6.2	Synthesen.....	82
6.3	Durchführung der spektroskopischen Untersuchungen	115
7.	Anhang	117
8.	Verzeichnisse	150
8.1	Literaturverzeichnis	150
8.2	Abkürzungsverzeichnis	156
8.3	Abbildungsverzeichnis.....	159

8.4 Tabellenverzeichnis	162
9. Publikationen.....	163
10. Danksagung.....	164
11. Ehrenwörtliche Erklärung.....	165

1. Einleitung

In der Medizin ist die Überwachung von Metallionen wie Natrium-, Kalium-, Magnesium- oder Calcium-Ionen im Blut oder Urin für die Diagnostik von großer Bedeutung, da diese in lebenden Organismen bei vielen physiologischen und pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen. Schon geringe Abweichungen ihrer Konzentrationen haben einen direkten Einfluss auf körperliche und physiologische Funktionen. Kalium-Ionen sind zum Beispiel an physiologischen Prozessen wie der Muskelkontraktion, dem Herzrhythmus, der Nierenfunktion und der Signalübertragung von Nervenimpulsen beteiligt und befinden sich hauptsächlich innerhalb von Zellen. Natrium-Ionen hingegen sind größtenteils außerhalb von Zellen vorzufinden und regulieren im Wesentlichen den Bluthaushalt und -druck. Außerdem sind sie an der Muskelkontraktion sowie der Weiterleitung von Nervenimpulsen beteiligt. In tierischen Zellen sind Kalium- und Natrium-Ionen oft Antagonisten zueinander und weisen nahezu entgegengesetzte Konzentrationsgradienten auf. Im intrazellulären Raum sind Konzentrationen von 100 – 150 mM Kalium- und 5 – 30 mM Natrium-Ionen vorzufinden. Im Gegensatz dazu liegen die Konzentrationen im extrazellulären Raum bei 1 – 10 mM Kalium- und 100 – 150 mM Natrium-Ionen vor.^[1-6]

Der Unterschied zwischen den Konzentrationen der Kationen führt zu einer Differenz im elektrischen Potential zwischen der Innen- und Außenseite von Zellen, dem Membran-Ruhepotential, das im Allgemeinen negativ (ca. -70 mV) ist. Die Aufrechterhaltung dieses Ungleichgewichtes wird durch die Natrium-Kalium-ATPase (Ionenpumpe) erreicht, die mittels der freiwerdenden Energie durch Hydrolyse von ATP, drei Natrium-Ionen aus der Zelle heraus und zwei Kalium-Ionen in die Zelle hinein transportiert. Der daraus resultierende, aktiv aufgebaute, elektrochemische Natrium-Ionen Konzentrationsgradient dient als Triebkraft für weitere wichtige Funktionen im Körper, wie zum Beispiel das Entstehen und Weiterleiten von Aktionspotentialen in Muskel- und Nervenzellen. Hierbei wird durch das Öffnen von spannungsgesteuerten Natrium-Ionen Kanälen der Einstrom von Natrium-Ionen in die Zelle begünstigt, was zu einer Depolarisation der Zellmembran und zu einem positiven Anstieg des Membranpotentials führt. Durch die Inaktivierung der Natrium-Ionen Kanäle und dem Öffnen der spannungsgesteuerten Kalium-Ionen Kanäle, kommt es zu einem Ausstrom von Kalium-Ionen aus der Zelle und somit zur Repolarisation der Zellmembran und das Membranpotential kehrt zu seinem eigentlichen Ruhewert zurück.^[4,7,8]

Störungen des empfindlichen Ionen-Gleichgewichtes aufgrund von instabilen Konzentrationen können zu ernstesten Folgeerkrankungen wie Herzrhythmusstörungen, Muskelschwäche oder Diabetes führen. Eine zu niedrige Natrium-Ionen Konzentration, auch Hyponatriämie genannt, äußert sich in herabgesetztem Blutdruck, Antriebslosigkeit oder Kopfschmerzen. Ist die Kalium-Ionen Konzentration im extrazellulären Raum des Gehirns erhöht, kann dies zu einer Depolarisation der Nervenzellen

führen. Dies hat zur Folge, dass es zu unkontrollierten neuronalen Erregungen kommen kann, welche bei einer dauerhaft instabilen Kalium-Ionen Konzentration zu neuronalen Erkrankungen wie Epilepsie oder Depressionen führen kann.^[9-12]

Um die komplexen physiologischen Prozesse von Ionen (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) und Molekülen (Enzymen, DNA, Antikörpern) besser verstehen zu können, ist die Entwicklung selektiver und sensitiver Messmethoden von großer Bedeutung. Dabei hat sich in den letzten Jahrzehnten immer mehr das Forschungsgebiet der Fluoreszenzspektroskopie hervorgetan. Aufgrund der enormen Entwicklung modernerer und sensiblerer Fluoreszenztechniken hat sich diese als Methode der Wahl herausgestellt.^[13] Ein Durchbruch stellte dabei die Entwicklung der Einzelmolekülspektroskopie dar, die erstmals im Jahre 1976 von HIRSCHFELD beschrieben wurde.^[14]

Da die zu bestimmenden Analyten jedoch selbst nicht fluoreszieren, ist insbesondere in den Bereichen der Analytischen Chemie, Biochemie, medizinischer Diagnostik und in der Umweltanalytik die Nachfrage nach maßgeschneiderten Fluoreszenzfarbstoffen, die das Detektieren dieser Analyten ermöglichen, groß. Deshalb ist die Auswahl von bisher entwickelten Fluoreszenzfarbstoffen für Kationen, Anionen, Gasen oder Enzymen heutzutage auch schon breit gefächert.^[15]

Aufgrund der ähnlichen chemischen Eigenschaften (z. B. Ionenradius, Ladung und Koordinationszahl) von Natrium- und Kalium-Ionen gestaltet sich die Entwicklung von selektiven Fluoreszenzfarbstoffen für die *in vitro* und *in vivo* Bestimmung und Visualisierung der Ionenkonzentrationen im intra- und extrazellulären Raum jedoch schwierig.^[6] Da die einwertigen Ionen mit organischen Molekülen meist nur Bindungen in Form von Salzen eingehen, mussten Verbindungen erforscht werden, die in der Lage sind diese zu komplexieren. Ungeachtet dessen, dass es bereits natürliche Moleküle (Ionophore) mit Hohlraumstrukturen, wie Nonactin und Valinomycin, gibt (Abb. 1.1), die in der Lage sind Natrium- und Kalium-Ionen zu binden und in biologischen Systemen zu transportieren, geht das erstmals synthetisch hergestellte Ionophor auf PEDERSEN zurück.^[16,17]

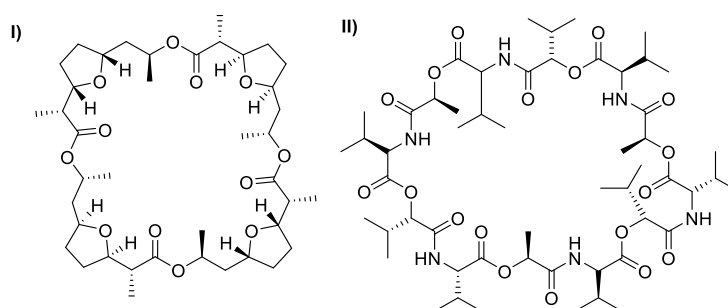


Abb. 1.1: Strukturen natürlicher Ionophore I) Nonactin und II) Valinomycin.
(Abbildung modifiziert nach VÖGTLE).^[18]

Da PEDERSEN eigentlich aus dem mono-geschützten Brenzkatechin und dem Bis(2-chloroethyl)ether das Bisphenol (III) gewinnen wollte, kann man die Entdeckung dieser neuen Substanzklasse, den

Kronenethern, wohl eher als Zufall betrachten. Denn außer dem Bisphenol (III) erhielt er auch in geringer Ausbeute das Nebenprodukt IV, da das Edukt Brenzkatechin in nicht vollständig geschützter Form eingesetzt wurde (Abb. 1.2).

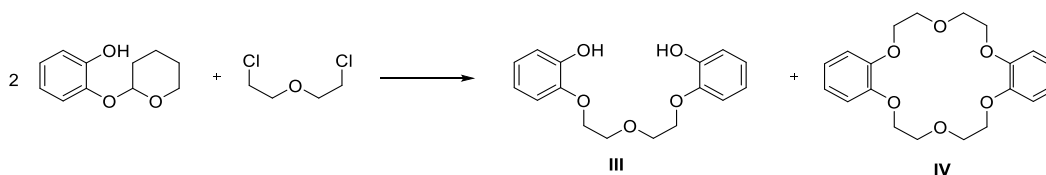


Abb. 1.2: Entdeckung der Kronenether.

Mit Hilfe dieses cyclischen Hexaethers gelang es ihm Kaliumpermanganat und andere Salze in organischen Lösungsmitteln, wie Benzen oder Chloroform, zu lösen. Für seine Entdeckung der Kronenether erhielt PEDERSEN im Jahre 1987 zusammen mit CRAM und LEHN den Chemie-Nobelpreis. Die von PEDERSEN kurze Zeit später eingeführte Nomenklatur zur Benennung der Moleküle, die nach der IUPAC-Nomenklatur sehr aufwendig wäre, ist bis heute prägend. Demnach ergibt sich für die Bezeichnung der Moleküle die Reihenfolge: Anzahl der Atome im Ring in eckigen Klammern, Substanzbezeichnung „Krone“ und Anzahl der im Ring befindlichen Donoratome. Jegliche Art von Derivatisierungen (z. B. ankondensierte Ringe) werden vorangestellt. ^[18]

Die neue Substanzklasse bot eine enorme Vielfalt an Strukturen durch Variation der Ringgrößen, Derivatisierungen oder sogar durch den Austausch von Sauerstoffatomen gegen andere Heteroatome wie Schwefel oder Stickstoff, die dann mit der Nomenklatur der Thia- bzw. Azakronenether versehen wurden. ^[19,20] Dabei konnte festgestellt werden, dass die Komplexbildungsstärke eines Ions mit einem Kronenether dem HSAB-Prinzip (*Hard and Soft Acids and Bases*) folgt. Demzufolge ergeben harte Donoratome wie Sauerstoff oder Stickstoff mit harten Alkalimetall-Ionen wie Kalium- oder Natrium-Ionen und weiche Donoratome wie Schwefel mit weichen Übergangsmetall-Ionen wie Silber-Ionen die energetisch besseren Paarungen. ^[21] Mit Hilfe der Variation der Ringgrößen konnte außerdem festgestellt werden, dass diese ebenfalls ein entscheidendes Kriterium für die Stärke der Bindung zwischen Ionen und Kronenether sind. Mit steigender Größe des Hohlräum (Cavität) des Kronenethers steigt auch die Affinität, größere Kationen zu komplexieren (Tab. 1.1).

Kation	Durchmesser Kationen [pm]	Kronenether	Durchmesser Kronenetherhohlraum [pm]
Lithium	136	[12]Krone-4	120 – 150
Natrium	190	[15]Krone-5	170 – 220
Kalium	266	[18]Krone-6	260 – 320
Cäsium	338	[21]Krone-7	340 – 430

Tab. 1.1: Vergleich der Durchmesser ausgewählter Kationen und Kronenether.

Die Annahme, dass Kronenether mit Ionen, dessen Hohlräume und Ionenradien ähnliche Werte aufweisen, die stabileren Komplexe ausbilden trifft jedoch nicht in jedem Fall zu. Auch wenn deren Durchmesser nicht übereinstimmen, kann es zum Ausbilden von Sandwichkomplexen kommen, bei denen zu große Kationen mit zwei Molekülen Kronenether oder zwei zu kleine Kationen mit einem Molekül Kronenether koordinieren.^[18]

Um ein besseres Verständnis über die Zusammenhänge von Struktur und Eigenschaften von Kronenethern zu erlangen wurden diese weiter in ihren Strukturen variiert. So wurden zum Beispiel die Ringstrukturen zu Ketten geöffnet oder der Einbau von Brücken vorgenommen, so dass sich die Neutralliganden in drei Gruppen einordnen lassen. Die Podanden, die die offenkettigen Liganden darstellen, die Coronanden, zu denen die monocyclischen Kronenether zählen und die oligocyclischen Cryptanden (Abb. 1.3).^[18] Die Entwicklung der Cryptanden geht auf den französischen Chemiker LEHN zurück, dem in den siebziger Jahren die Verbrückung der Azacoronanden gelang.^[22]

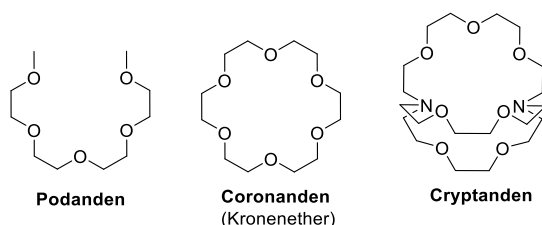


Abb. 1.3: Klassifizierung der Neutralliganden.

Das Konzept der Chromoionophore bzw. Fluoroionophore wurde unterdessen von VÖGTLE und LÖHR in den achtziger Jahren eingeführt, die eine signalgebende Einheit in Form eines Chromophors bzw. Fluorophors an einen Kronenether gebunden haben, um die Komplexbildung eines Ions zu visualisieren.^[23,24] Voraussetzung hierfür ist, dass zwischen Ionophor und Chromophor (oder Fluorophor) eine Art elektronischer Kommunikationspfad vorhanden ist. So zeigte zum Beispiel der Chromoionophor **V**, in dem ein Aza-[15]krone-5-ether über eine Methyl-Gruppe als Spacer mit dem Phenolblau verbunden ist, für Ionen mit einer hohen Ladungsdichte (Lithium-Ionen) eine starke bathochrome Verschiebung auf, welche spektroskopisch ausgewertet werden konnte.^[25] Im Fluoroionophor **VI** wurde als signalgebende Einheit das dem Naturstoff Umbelliferron ähnliche 7-Hydroxy-4-methylcoumarin eingeführt. Umbelliferron selbst weist unter UV-Licht eine blaue Fluoreszenz auf. Extraktionsexperimente mit dem Fluoroionophor **VI** zeigten eine intensive Fluoreszenz, wobei je nach Ringgröße eine hohe Selektivität für Lithium-Ionen ($n = 1$) oder Kalium-Ionen ($n = 2$) vorzufinden war (Abb. 1.4).^[26]

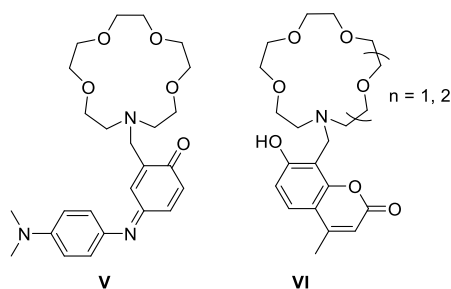


Abb. 1.4: Beispiele für Chromoionophore und Fluoroionophore.

Im weiteren Verlauf wurde das Augenmerk immer mehr auf die Entwicklung wasserlöslicher Fluoroionophore gelegt, die für die Anwendung in physiologischen Medien genutzt werden konnten. Eine der ersten Alkali-Ionen sensitiven Sensoren wurden im Jahre 1989 von MINTA und TSIEN vorgestellt. Diese bestehen aus einem Diazakronenether, an dessen zwei Stickstoffatomen jeweils eine Benzofuranisophthalat-Einheit als fluorophore Gruppe gebunden ist. Die Aromaten der Benzofuranisophthalate sind zusätzlich in *ortho* Position mit Methoxy-Gruppen substituiert (Abb. 1.5).^[27]

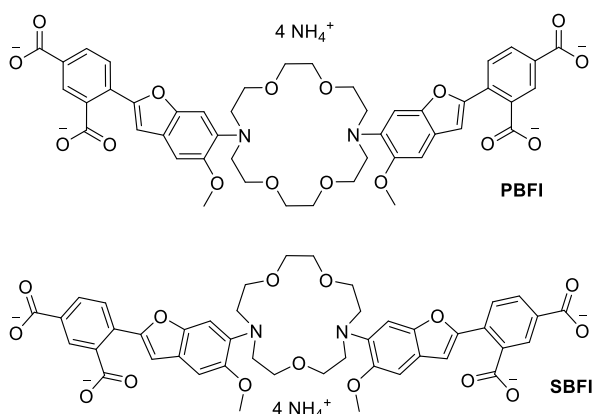


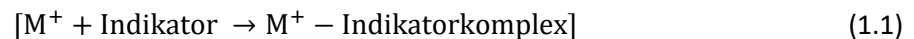
Abb. 1.5: Strukturformeln von PBFI und SBFI.

Die Fluoreszenzindikatoren **PBFI** (*potassium binding benzofuran isophthalate*) und **SBFI** (*sodium binding benzofuran isophthalate*) beruhen auf einem Elektronendonator-Elektronenakzeptor Prinzip, wobei die Komplexierung von Kalium- bzw. Natrium-Ionen zu einer Reduktion des Elektronendonor-Charakters der Stickstoffatome führt, was eine Änderung des Fluoreszenzsignals verursacht. Aufgrund ihrer Untersuchungen mit den neuen Fluoroionophoren stellten MINTA und TSIEN fest, dass ein idealer Fluoreszenzindikator einige grundlegende Eigenschaften besitzen sollte:^[27]

- Bei der Messung der Ionenkonzentrationen darf der Fluoreszenzindikator nicht mit anderen Bestandteilen der Zelle wechselwirken, da sonst Funktionen der Zelle beeinträchtigt werden können.

- Der Fluoreszenzfarbstoff sollte eine hohe Selektivität für das zu bestimmende Ion in Gegenwart konkurrierender Ionen aufweisen, da zum Beispiel die Konzentration von intrazellulären Kalium-Ionen die der Natrium-Ionen um das 10- bis 30-fache übersteigt.
- Die Dissoziationskonstante (K_d –Wert), welche ein Maß dafür ist, an welchem Punkt sich in einer Dissoziationsreaktion das Gleichgewicht einstellt, sollte in Wasser bei einem pH-Wert von 7 im physiologisch relevanten Bereich der jeweiligen Ionenkonzentration liegen.

Für die Bindung der Ionen an den Indikator gilt dabei:



Nach dem Massenwirkungsgesetz errechnet sich der K_d –Wert folgendermaßen:

$$K_d = \frac{[M^+] [\text{Indikator}]}{[M^+ - \text{Indikator-Komplex}]} \quad (1.2)$$

Um Änderungen der Ionenkonzentration detektieren zu können, muss der Indikator bei einer Zunahme der Konzentration weitere Ionen binden und bei einer Abnahme abgeben können. Der ideale Arbeitsbereich eines Indikators ist dann erreicht, wenn die Konzentration des freien Indikators gleich der des Ion-Indikator-Komplexes entspricht:

$[\text{Indikator}] = [M^+ - \text{Indikator-Komplex}]$ mit $K_d = [M^+]$. Ein zu großer K_d –Wert würde das Einstellen des Gleichgewichtes verhindern, wodurch keine (ausreichende) Änderung der Fluoreszenz wahrzunehmen wäre. Ein zu niedriger K_d –Wert führt zu einer zu schnellen Sättigung des Indikators, welche ebenfalls zu keiner (ausreichenden) Änderung des Fluoreszenzsignals führen würde.

- Das Indikatormolekül sollte genügend polare Gruppen für eine ausreichende Wasserlöslichkeit enthalten, um durch die Zellmembran hinein, aber nicht hinaus zu diffundieren
- Der Fluoreszenzfarbstoff sollte eine starke Fluoreszenz aufweisen. Als Maß hierfür wird die oft in Publikationen beschriebene *Brightness* (Helligkeit) eines Fluorophors herangezogen. Sie setzt sich aus der Fluoreszenzquantenausbeute (φ_{fl}) und dem Extinktionskoeffizienten (ϵ) zusammen und sollte größer als $10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ sein.
- Die Anregungswellenlängen (λ_{exc}) sollten $> 340 \text{ nm}$ sein, da Wellenlängen aus diesem und kleineren Bereichen von Nucleinsäuren und Aminosäuren absorbiert werden, was zu Schädigungen der Zellen führen kann.
- Die Emissionswellenlängen (λ_{em}) sollten $> 500 \text{ nm}$ sein, um so eine Überlappung mit der Autofluoreszenz von Zellbestandteilen, wie Pyridinnucleotide, zu verhindern. Ein klassischer Vertreter der Pyridinnucleotide ist das NADP (Nicotinamidadenindinucleotidphosphat),

welches an Redoxreaktionen des Stoffwechsels der Zelle beteiligt ist und ein Emissionsmaximum von 465 nm aufweist.^[28]

- Damit es zu keiner Überlappung zwischen dem Anregungs- und Emissionsspektrum kommt, sollte der Unterschied zwischen dem Emissions- und Absorptionsmaximum, der sogenannte STOKES-Shift ($\Delta\lambda$), groß genug sein. Kommt es zu einer Überlappung führt dies zu einer Re-Absorption des bereits emittierten Lichtes, was bei hohen Indikatorkonzentrationen zu einer Selbstlöschung der Fluoreszenz führen kann.

Die von MINTA und TSIEN dargestellten Fluoroionophore erfüllten jedoch nicht alle Kriterien, die einen guten Fluoreszenzindikator ausmachten. Mit Hilfe von **SBFI** war es möglich Natrium-Ionen intrazellulär unter Nutzung eines Fluoreszenzmikroskops zu messen. Trotz seiner vorhandenen Selektivität für Natrium-Ionen in Gegenwart von Kalium-Ionen erwies sich **SBFI** als ungeeignet, da für dessen Anregung eine Wellenlänge von 340 nm benötigt wurde. Untersuchungen des Fluoroionophores **PBFI** zeigten sogar, dass dieser eine nicht ausreichende Selektivität für Kalium-Ionen in Anwesenheit von Natrium-Ionen hat und für die Bestimmung von extrazellulären Kalium-Konzentrationen ungeeignet ist. Trotzdem gehören **SBFI** und **PBFI** noch heute zu den kommerziell erhältlichen Fluoreszenzindikatoren, die von der Firma Molecular Probes® vertrieben werden.^[15]

Die Entwicklung der Fluoroionophore für die Bestimmung von Kalium- und Natrium-Ionen, die innovativer und erfolgreicher einsetzbar sind, ist trotz allem auf großes Interesse gestoßen und beschäftigte in den letzten Jahrzehnten viele Wissenschaftler. So entwickelten zum Beispiel KUHN und HAUGLAND Anfang der neunziger Jahre den Fluoroionophor **Sodium Green**, der wie **SBFI** über einen Diaza-[15]krone-5-ether verfügt, an dessen Stickstoffatomen jeweils Aromaten mit in *ortho* und *para* Position befindlichen Methoxy-Gruppen gebunden sind und zwei Chlorfluorescein-Derivate als fluorophore Gruppen enthält.^[29] Gut ein Jahrzehnt später war es die Arbeitsgruppe um GEE und MARTIN, die ihre Fluoroionophore **CoroNa Red** und **CoroNa Green** vorstellten. Als Ionophore fungierten dabei im **CoroNa Red** ein Dibenzodiaz-[15]krone-5-ether und in **CoroNa Green** ein Benzoaza-[15]krone-5-ether, die jeweils mit einem Tetramethylrhodaminderivat bzw. einem Fluorfluorescein-Derivat als fluoreszierende Einheit versehen wurden.^[30,31] Etwa 20 Jahre nach **SBFI** stellte MINTA zusammen mit ESCAMILLA dann die Fluoroionophore **Asante NaTRIUM Green 1** und **2** vor, die, wie zuvor **SBFI**, als natriumbindende Einheit einen Diaza-[15]krone-5-ether besitzen und an dessen Stickstoffatome sich Aromaten mit in *ortho* Position substituierten Methoxy-Gruppen befinden. Als fluorophore Gruppen kamen diesmal Fluorescein-ähnliche Xanthen-Derivate zum Einsatz, wobei anders als beim **SBFI**, nur eine fluorophore Gruppe verwendet wurde. (Abb. 1.6).^[32]

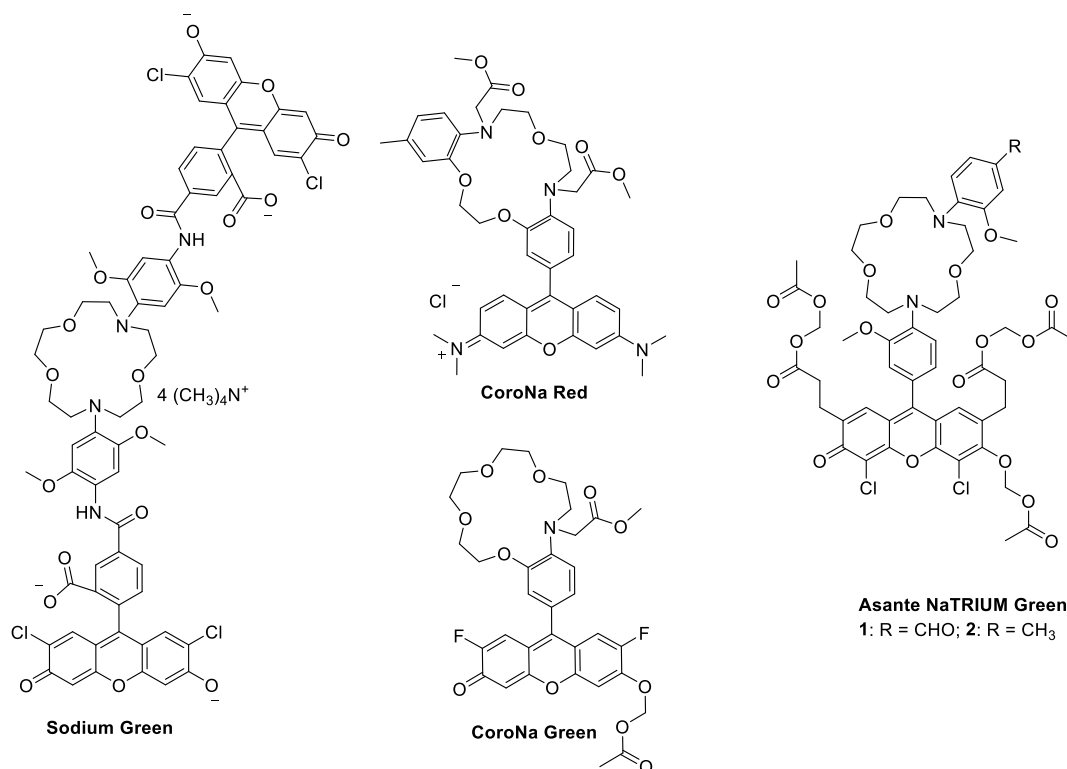


Abb. 1.6: Strukturformeln der Natrium-Fluoroionophore **Sodium Green**, **CoroNa Red**, **CoroNa Green**, **Asante NaTRIUM 1** und **2**.

Die Betrachtungen der spektroskopischen Untersuchungen zeigten, dass es mit allen vier Fluoreszenzindikatoren gelungen war, die Anregungs- und Emissionswellenlängen in ein für die zelluläre Bestimmung von Natrium-Ionen günstigeren Bereich zu verschieben, wodurch die Autofluoreszenz der Zelle vermieden werden konnte. Die Dissoziationskonstanten der Fluoreszenzindikatoren **CoroNa Red**, **CoroNa Green** und **Asante NaTRIUM 1** liegen jedoch außerhalb des für intrazelluläre Bestimmung relevanten physiologischen Bereiches. **CoroNa Red** könnte jedoch Anwendung für die extrazelluläre Bestimmung von Natrium-Ionen finden. **Sodium Green** und **Asante NaTRIUM 2** weisen zwar beide Dissoziationskonstanten auf, die für die intrazelluläre Natrium-Ionen Bestimmung günstig sind, jedoch zeigten beide eine geringe Selektivität in Gegenwart von Kalium-Ionen (Tab. 1.2).^[29-32]

	λ_{exc} [nm]	λ_{em} [nm]	$K_{\text{d}}^{\text{Na}^+}$ [mM]
Sodium Green	488	532	6
CoroNa Red	547	570	200
CoroNa Green	492	516	80
Asante NaTRIUM 1	517	540	92
Asante NaTRIUM 2	517	540	20

Tab. 1.2: Absorptions- und Emissionsmaxima sowie Dissoziationskonstanten der Natrium-Ionen Fluoroionophore.

Auch die Darstellung verbesserter Fluoroionophore für die Bestimmung von Kalium-Ionen in lebenden Zellen unterlag nach der Veröffentlichung von **PBFI** einer stetigen Entwicklung. So stellte CROSSLEY schon 1994 seinen Kalium-Ionen Fluoreszenzindikator **CD18** vor, der auf einem ähnlichen Design wie **PBFI** basierte (Abb. 1.7). Dieser setzte sich aus einer Diaza-[18]krone-6-ether als kaliumbindende Einheit und einem 6-Methoxy-3-carboxyl-coumarin-Derivat als fluorophore Gruppe zusammen. Obwohl **CD18** eine verbesserte Selektivität für Kalium-Ionen zeigte und seine Anregungs- und Emissionswellenlänge in einem passablen Bereich lagen, war er aufgrund seiner Dissoziationskonstante für die Bestimmung von extrazellulären Kalium-Ionen nicht gut geeignet. [33,34]

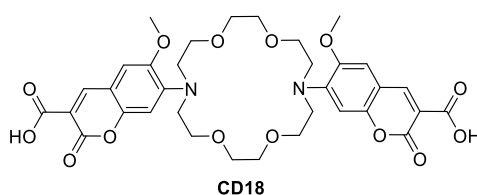


Abb. 1.7: Strukturformel von **CD18**.

Um dem Problem der mangelnden Komplexstabilität entgegenzuwirken, griff CROSSLEY die von MASILAMANI entwickelten Fluoroionophore auf, in denen er als kaliumbindende Einheit einen Cryptanden verwendete, und als Fluorophor das 4-Methyl-coumarin (Abb. 1.8). [35]

Der 6,7-(4-Methyl)coumarin[2.2.2]cryptand (**MCC**) zeigte zwar eine hohe Selektivität für Kalium-Ionen, lag aber mit seiner Anregungs- und Emissionswellenlänge in einem, für Messungen in lebenden Zellen, ungünstigen Bereich ($\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$). Des Weiteren zeigte **MCC** eine hohe Empfindlichkeit gegenüber pH-Wert Veränderungen und konnte im physiologisch relevanten pH-Wert Bereich von 6.8 – 7.4 nicht angewendet werden, da die aliphatischen Stickstoffatome protoniert wurden.

Um die Beeinträchtigung des pH-Wertes im physiologisch relevanten Bereich zu minimieren, hat CROSSLEY die aliphatischen Stickstoffatome aromatisiert, indem er dort die 4-Methylcoumarin Einheit anbrachte und erhielt dadurch den Fluoroionophor **CD222** (Abb. 1.8). [34]

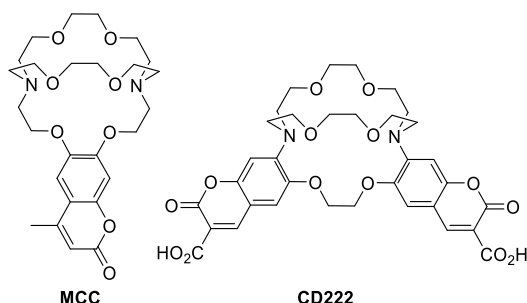


Abb. 1.8: Strukturformeln von **MCC** und **CD222**.

Obwohl es CROSSLEY mit diesem Fluoroionophor gelang, die pH-Empfindlichkeit zu verringern und die Anregungs- und Emissionswellenlänge in einen günstigeren Bereich zu verschieben ($\lambda_{\text{exc}} = 386 \text{ nm}$,

$\lambda_{em} = 476 \text{ nm}$), hatte die Aromatisierung der Stickstoffatome zur Folge, dass die Bindungsrotation zwischen Ionophor und Fluorophor behindert wurde, wodurch die kaliuminduzierte Signaländerung stark abnahm und sich die Selektivität für Kalium-Ionen gegenüber Natrium-Ionen verschlechterte.

In den darauffolgenden Jahren kam es trotz der anfänglichen Misserfolge zu einer Vielzahl neuer entwickelter Fluoroionophore, dessen Rezeptor-Einheiten aus Cryptanden bestanden. Cryptanden sind aufgrund ihrer sphärischen Struktur sehr starr und weisen daher eine hohe Selektivität für Ionen auf, die sich für die entsprechende Größe des Innenraums eignen und größere bzw. kleinere Ionen aufgrund dieser geometrischen Kontrolle diskriminieren.

Einer der wichtigsten Vertreter bis heute ist der von HE entwickelte neuartige [2.2.3]Triazacryptand (TAC) Rezeptor-Typ. HE präsentierte 2003 erstmals einen Fluoroionophor, der auf einem TAC als Ionophor basierte und über eine Ethylen-Gruppe als Spacer mit einem 4-Aminonaphthalimid als fluorophore Gruppe verbunden war (Abb. 1.9).^[36]

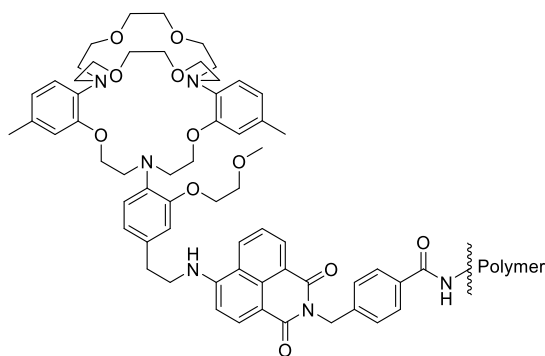


Abb. 1.9: Strukturformel des Kalium-Ionen Fluoroionophors nach HE.

Mit der Verwendung des neuen Rezeptor-Typs gelang es HE die Kalium-Ionen Selektivität in Gegenwart von Natrium-Ionen deutlich zu verbessern und die pH-Wert Empfindlichkeit zu minimieren. Die Anregung bei 470 nm zeigte schon bei niedrigen Kalium-Ionen Konzentrationen eine hohe Signaländerung der Fluoreszenz, wobei das Emissionsmaximum bei 540 nm unverändert blieb. Der Fluoroionophor von HE stellte den ersten Indikator dar, der alle Anforderungen eines idealen Indikators erfüllte. Er wurde auch als erster Kalium-Ionen Sensor in einem Blutanalysegerät (OPTI CCA) von der Firma Roche® für die Bestimmung von Kalium-Ionen im Bereich von 0.8 – 10 mM in Blut oder Serum kommerziell eingesetzt.

Der von HE entwickelte TAC-Ligand ist ein hoch selektiver Rezeptor für Kalium-Ionen, sodass in den folgenden Jahren eine große Anzahl neuer Fluoroionophore mit dieser Einheit präsentiert wurden.

Einer der bekanntesten unter ihnen ist der von VERKMAN entwickelte Sensor **TAC-Red**. Dieser Fluoroionophor besteht aus einem 3,6-Bis(dimethylamino)xanthylium Fluorophor, der direkt mit dem TAC verbunden ist und wurde für die Überwachung der neuronalen Aktivität in Verbindung mit Kalium-Ionen Konzentrationen im extrazellulären Bereich des Gehirngewebes entwickelt.^[37] Obwohl die

Fluoroionophore **TAC-Red**, und der später von VERKMAN entwickelte **TAC-Crimson**, eine sehr hohe Kalium-Ionen Selektivität aufweisen, sind sie für die Überwachung der extrazellulären Konzentration weniger gut geeignet, da sie in die Zelle diffundieren.^[38] Um dies zu umgehen, hat VERKMAN die Größe des Fluoroionophors mit **TAC-Lime** erhöht, indem er große Dextran-Gruppen an einen mit einem BODIPY (Boron-dipyroomethen) als Fluorophor modifizierten TAC einführte (Abb. 1.10).^[39]

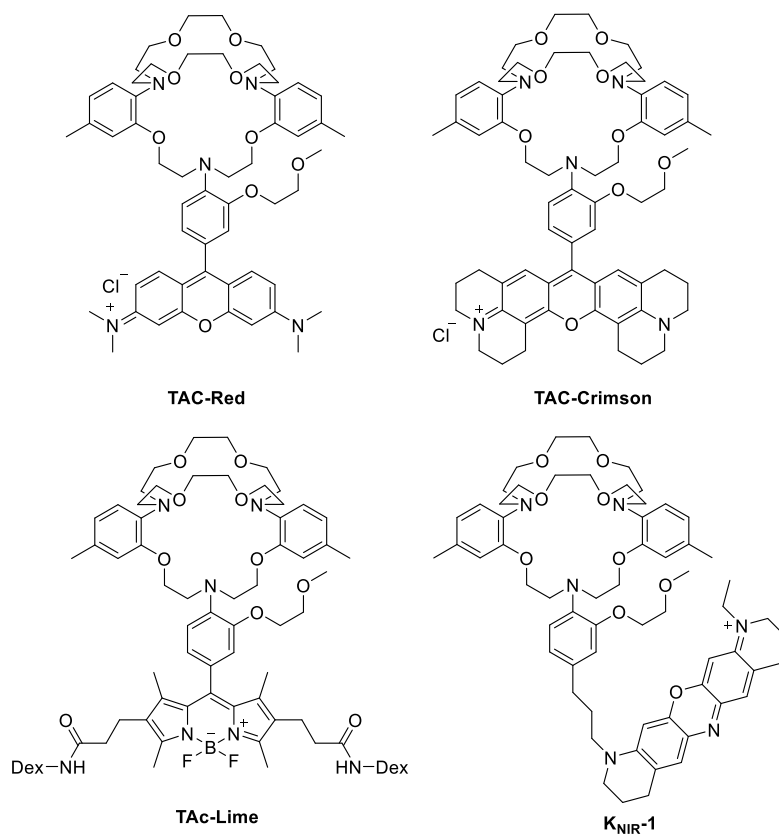


Abb. 1.10: Darstellung der Fluoroionophore **TAC-Red**, **TAC-Crimson**, **TAC-Lime** und **KNIR-1**.

Die guten selektiven Eigenschaften des TAC-Rezeptors machte sich 2017 KOBERTZ zunutze, als er seinen Fluoroionophor **KNIR-1** vorstellte, der mit einem Oxazin-Derivat als fluorophore Gruppe über eine Propylen-Gruppe als Spacer mit einem **TAC** verbunden ist (Abb. 1.10).^[40] Der Sensor zeigte eine hohe Kalium-Ionen Selektivität gegenüber anderen Ionen und liegt mit seinem Anregungs- und Emissionsmaximum im nahen IR-Bereich und ist für extrazelluläre Kalium-Ionen Bestimmungen geeignet ($\lambda_{em} = 680 \text{ nm}$, $K_d = 12 \text{ mM}$).

Trotz der großen Vielzahl der bis heute entwickelten Kalium- und Natrium-Ionen Fluoroionophore ist es überraschend, dass nur wenige tatsächlich auch kommerziell erhältlich sind. Einer der Hauptgründe hierfür könnten die wohl sehr aufwendigen Syntheserouten zu den vielversprechenden Sensoren sein. So benötigt zum Beispiel der hoch selektive TAC-Rezeptor nach HE für seinen Aufbau mehr als 10 Synthesestufen, die in einzelnen Stufen hohe Verdünnungsbedingungen erfordern und nur geringe Ausbeuten ergeben.^[36] Zwar versuchte VERKMAN die Synthese des TAC mithilfe von Pd-katalysierten

Kreuzkupplungen aus ökonomischer Sicht zu optimieren, jedoch ist auch die Kupplung zwischen Ionophor und Fluorophor häufig durch die Instabilität bestimmter Fluorophore oder der Kupplungsreaktion selbst, begrenzt.^[41]

Deshalb besteht bis heute ein großes Interesse daran die Entwicklung von neuen, leichter zugänglichen Fluoroionophoren für *in vitro* und *in vivo* Bestimmungen von Kalium- bzw. Natrium-Ionen weiter voran zu bringen.

Auch der Arbeitskreis HOLDT hat sich vor einigen Jahren der Thematik der Kalium- und Natrium-Ionen Bestimmung angenommen und sich dabei auf die Entwicklung von Fluoroionophoren konzentriert, bei denen Ionophor und Fluorophor mit Hilfe einer Cu(I)-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) über eine 1,2,3-Triazol-1,4-diyl-Einheit miteinander verbunden sind.

Die Bildung eines 1,2,3-Triazols aus einem Azid und einem Alkin in Form einer 1,3-dipolaren Cycloaddition wurde erstmals von HUSIGEN in den 1960er Jahren beschrieben.^[42] Für diese Additionsreaktion ohne Katalysator wurden jedoch hohe Temperaturen und oft lange Reaktionszeiten benötigt und führten zu einer Mischung aus 1,4- und 1,5-disubstituierten 1,2,3-Triazolen. Durch die von SHARPLESS und MELDAL, unabhängig voneinander, vorgestellten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von Cu(I)-Salzen als Katalysator die Regioselektivität gegenüber dem 1,4-disubstituierten Isomer beschleunigt.^[43,44] Aufgrund der hervorragenden Biokompatibilität, der breiten Anwendbarkeit und der Durchführung unter milderen Reaktionsbedingungen zählt die CuAAC heute zu einer der wichtigsten Kupplungsreaktionen in der Chemie und wird unter den von SHARPLESS eingeführten Begriff der Click-Reaktionen eingeordnet.^[45]

Während die CuAAC jedoch überwiegend für die Kopplung von zwei Komponenten genutzt wurde, bei denen die Triazol-Diyl-Einheit einen strukturellen Spacer darstellte, war es das Bestreben des Arbeitskreises HOLDT, diese Einheit als eine Signaltransduktions-Einheit zu verwenden, da bis zu diesem Zeitpunkt noch keine 1,2,3-Triazol-basierten Fluoroionophore für die Bestimmung von Kalium- bzw. Natrium-Ionen existierten. Obwohl DIEDERICH und JAROWSKI schon 2008 mit ihren Untersuchungen zeigen konnten, dass 1,2,3-Triazol-1,4-diyl-Einheiten die Fähigkeiten als aktive π -Linker in Charge-Transfer-Chromophore besitzen, wenn diese mit einem starken Elektronendonator (D) und einem starken Elektronenakzeptor (A) gekoppelt sind und das die Topologie der Substitution am Triazol einen großen Einfluss auf die Charge-Transfer Effizienz hat (Abb. 1.11).^[46]

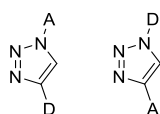


Abb. 1.11: 1,4-Regioisomere Strukturen des Donor-Akzeptors (D-A) substituierten 1,2,3-Triazol.

Die Chromophore, wie sie auch BUNZ beschrieben hat, sind selbst nur schwach bis gar nicht fluoreszierend und erst die Zugabe von Metall-Ionen führte zu einem Einschalten (*turn-on*) der Fluoreszenz.^[47] Für die Darstellung der neuen Fluoroionophore konzentrierte man sich im Arbeitskreis HOLDT wieder auf die Azakronenether als Ionophore, da diese eine weniger aufwendige Synthese als die TAC versprachen. Sie sollten anschließend mit geeigneten Fluorophoren, wie den Coumarinen, kombiniert werden. Coumarin, das erstmals im achtzehnten Jahrhundert aus einer bestimmten Bohnensorte isoliert werden konnte, fluoresziert selbst nicht (Abb. 1.12).^[48]

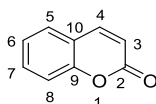


Abb. 1.12: Strukturformel und Atomnummerierung von Coumarin.

Durch Substitutionen von Elektronendonator-Gruppen an der 7. Position und Elektronenakzeptor-Gruppen an der 3. Position können die Fluoreszenzeigenschaften von Coumarin-Derivaten jedoch verbessert werden und Emissionswellenlängen von bis zu 600 nm erreicht werden. Fluoreszierende Coumarin-Derivate werden aufgrund ihrer guten Fluoreszenzeigenschaften und hohen Fluoreszenzquantenausbeuten zum Beispiel als Laserfarbstoffe, in pH-Sensoren, in der Zellbiologie oder als Metallsensoren verwendet.^[49,50]

Mithilfe der ersten CuAAC erzeugten Fluoroionophore **K1** und **K2** (Ab. 1.13) konnte S. AST herausfinden, dass die elektronische Konjugation zwischen dem Ionophor *N*-Phenylaza-[18]krone-6-ether und dem Fluorophor 7-Diethylaminocoumarin durch einen π -konjugierten 1,2,3-Triazol-1,4-diyli-Linker zu einer perfekten Signaltransduktionskette führt, die für die Bestimmung von Kalium- bzw. Natrium-Ionen unter simulierten physiologischen Bedingungen geeignet ist.^[51,52]

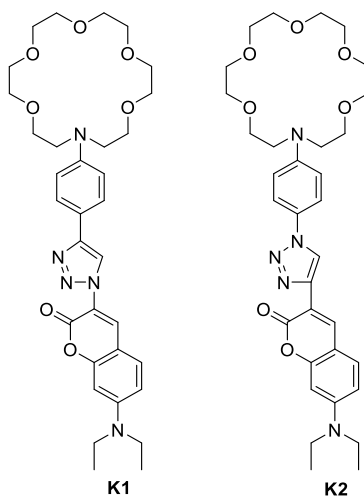


Abb. 1.13: Strukturformeln der Fluoroionophore **K1** und **K2**.

Dabei fungiert die Anilin-Einheit des *N*-Phenylaza-[18]krone-6-ethers als Elektronendonator und die Coumarin-Einheit als Elektronenakzeptor. Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass diese Donor-Akzeptor-Anordnung im Fluoroionophor in Abwesenheit von Alkalimetall-Ionen in Form eines Photoinduzierten Elektronentransfer (PET) vom Ionophor zum Fluorophor zu einer Löschung der Fluoreszenz führt.^[53] Untersuchungen der beiden Regioisomere **K1** und **K2** zeigten, dass es einen Zusammenhang zwischen den Substitutionen an der 1,2,3-Triazol-1,4-diyl-Einheit und den photophysikalischen Eigenschaften des Fluoroionophores gibt. Die Regioisomere **K1** und **K2** wiesen Unterschiede in der Stärke des auftretenden PET, in ihren Emissionsmaxima und ihren ermittelten Dissoziationskonstanten der gebildeten Komplexe auf. Die Messungen im physiologisch relevanten Bereich von 1 – 160 mM ergaben, dass beide Isomere selektiver für Kalium- als für Natrium-Ionen sind (Tab. 1.3).

	λ_{abs} [nm]	λ_{em} [nm]	ϕ_{fl}	FEF	$K_{\text{d}}^{\text{K}^+}$ [mM]	$K_{\text{d}}^{\text{K}^+/\text{Na}^+}$ [mM]
K1	422	500	0.015	-	-	-
K1 + K⁺	422	500	0.038	2.5	260	> 300
K2	420	493	0.061	-	-	-
K2 + K⁺	420	493	0.155	2.4	> 300	> 300

Tab. 1.3: Photophysikalische Eigenschaften von **K1** und **K2**.

Eine genauere Betrachtung der ermittelten Untersuchungsergebnisse für beide Isomere zeigte, dass die Anordnung in **K2** zu einer höheren Intensität der für Coumarine charakteristischen Charge-Transfer (CT) Absorptionsbande im längerwelligen Bereich führt. Dies spricht für eine effizientere Konjugation zwischen der 1,2,3-Triazol-1,4-diyl- und der Coumarin-Einheit über das sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffatom (C4) des Triazols anstatt über des Stickstoffatoms (N1) wie in **K1**.^[54] In Gegenwart von Kalium- und Natrium-Ionen bleibt diese Absorptionsbande nahezu unverändert in ihrer Intensität und Lage. Bei der zweiten Absorptionsbande im kurzwelligen Bereich führte die Anwesenheit von Kalium- oder Natrium-Ionen jedoch zu einer Abnahme der Intensität und zu einer leichten Blauverschiebung. Die Koordination von Kalium- oder Natrium-Ionen hat zur Folge, dass es zu einer Reduzierung des Elektronendonator-Charakters der Anilintriazol-Einheit kommt, wodurch kein PET mehr stattfindet und die Fluoreszenz ansteigt. Dieses Verhalten wurde bereits von DE SILVA in seinen Arbeiten über PET-Sensoren in den neunziger Jahren beschrieben.^[55,56] Berechnungen der optimierten Geometrien ergaben, dass die Anilin-Einheit in **K1** gegen den Triazolring um 6° verdreht ist und diese deshalb nahezu planar zueinander sind, während sie in **K2** eine Verdrehung um 24° aufweisen. Diese voneinander abweichenden Geometrien resultieren in unterschiedlichen Oxidationspotentialen. In **K1** ist das Oxidationspotential niedriger als in **K2**, sodass die Anilin-Einheit in **K1** einen stärkeren Elektronendonator-Charakter als **K2** besitzt und eine effizientere Fluoreszenzlöschung im unkomplexierten Zustand zeigte.

Um ein besseres Verständnis über den Einfluss der Isomerie der Fluoroionophore zu erhalten und Dissoziationskonstanten im physiologisch relevanten Bereich zu erreichen wurden im nächsten Schritt von S. AST die Isomere **K3** und **K4** synthetisiert (Abb. 1.14).^[57]

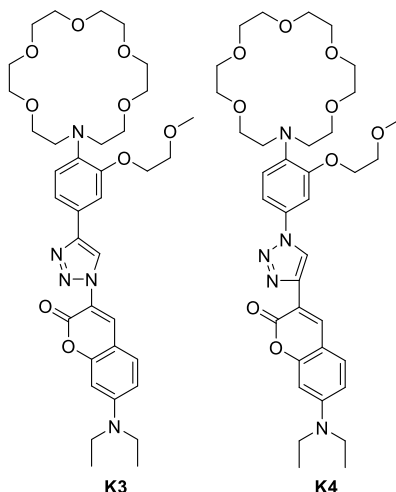


Abb. 1.14: Strukturformeln der Fluoroionophore **K3** und **K4**.

Hierbei wurde sich zu Nutze gemacht, dass das Anbringen einer Alkoxy-Gruppe, die Stabilität von Komplexen von Monoazakronenether mit Alkalimetall-Ionen erhöht und dabei nur geringe Einschränkungen in der Flexibilität der Ionophore auftreten.^[58] Frühere Arbeiten von GOKEL zeigten, dass eine starke Koordination von Kalium-Ionen erreicht werden kann, wenn der Ionophor aus 7 Sauerstoff-Donoratomen besteht.^[59] Demnach sollte, die Einführung einer 2-Methoxyethoxy-Ethergruppe in *ortho* Position des *N*-Phenylaza-[18]krone-6-ethers bei **K3** und **K4** zu einer Abnahme der Dissoziationskonstante führen.^[58] Untersuchungen unter simulierten physiologischen Bedingungen zeigten, dass das Einführen der 2-Methoxyethoxy-Ethergruppe zu einer deutlichen Abnahme der Dissoziationskonstante führte und sich stabilere Komplexe bei der Koordination von Kalium-Ionen ausbildeten. Die Berechnungen der optimierten Geometrien von **K3** und **K4** waren ähnlich zu denen der lariatfreien Analoga **K1** und **K2**, weshalb angenommen wird, dass der signalgebende Mechanismus ebenfalls auf einem PET basiert, der einen virtuellen Spacer zwischen Akzeptor und Donor beinhaltet. Ein Vergleich der Fluoreszenzeigenschaften der Fluoroionophore **K1** – **K4** im unkomplexierten Zustand zeigte, dass die Löschung der Fluoreszenz und damit die Stärke des PET durch die Einführung einer Alkoxy-Gruppe an der Anilin-Triazol-Einheit nur geringfügig beeinflusst wurde (Tab. 1.4).

	λ_{abs} [nm]	λ_{em} [nm]	φ_{fi}	FEF	$K_d^{\text{K}^+}$ [mM]	$K_d^{\text{K}^+/\text{Na}^+}$ [mM]
K3	422	500	0.016	-	-	-
K3 + K⁺	422	500	0.068	3.7	19	29
K4	420	493	0.062	-	-	-
K4 + K⁺	420	493	0.184	2.5	26	29

Tab. 1.4: Photophysikalische Eigenschaften von **K3** und **K4**.

Weiterhin konnte aus den Ergebnissen unter simuliert physiologischen Bedingungen eine erste Prognose über den Einfluss der Isomerie gewonnen werden. Fluoroionophor **K4**, bei dem die 1,2,3-Triazol-1,4-diyl- und die Coumarin-Einheit über das sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffatom (C4) des Triazols verbunden sind, zeigt zwar weniger gute Fluoreszenzeigenschaften als Fluoroionophor **K3**, bei dem die Verbindung über das Stickstoffatom (N1) des Triazol vorliegt, verfügt jedoch über die bessere Selektivität für Kalium-Ionen in Gegenwart von Natrium-Ionen.

Für die Entwicklung der selektiven Natrium-Ionen Fluoroionophore **Na1** und **Na2** wurden anstelle des *N*-Phenylaza-[18]krone-6-ethers, der schon durch HE, GUNNLAUGSSON und KIM publizierte *N*-(*o*-Methoxyphenyl)aza-[15]krone-5-ether als Ionophor und das 7-Diethylaminocoumarin als Fluorophor verwendet, um die Signaltransduktionskette über den π -konjugierten 1,2,3-Triazol-1,4-diyl-Spacer aufzubauen (Abb. 1.15).^[60-63]

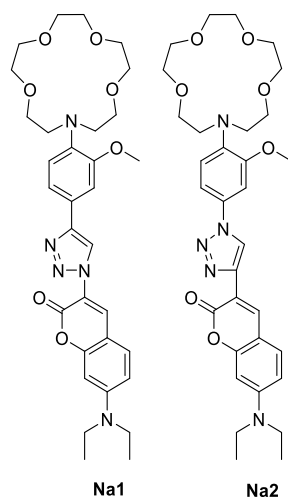


Abb. 1.15: Strukturformeln der Fluoroionophore **Na1** und **Na2**.

Untersuchungen der Isomere **Na1** und **Na2** unter simuliert physiologischen Bedingungen zeigten, dass der *N*-(*o*-Methoxyphenyl)aza-[15]krone-5-ether als Ionophor selektiver für Natrium-Ionen ist und dass die Isomerie auch hier einen Einfluss auf die Fluoreszenzeigenschaften des Fluoroionophores hat (Tab. 1.5).^[64] Bei genauerer Betrachtung konnte für **Na1** und **Na2** ebenfalls festgestellt werden, dass

die längerwellige Coumarin CT-Absorptionsbande in Gegenwart von Natrium- und Kalium-Ionen unverändert in Lage und Intensität bleibt. Bei der kurzwelligen CT-Absorptionsbande der Anilinriazol-Einheit, führte die Anwesenheit von Natrium-Ionen zu einer Abnahme der Intensität, da der Elektronendonator-Charakter des Ionophors durch die Komplexbildung der Ionen reduziert wird, weshalb auch hier angenommen wird, dass der signalgebende Mechanismus auf einen PET basiert.

	λ_{abs} [nm]	λ_{em} [nm]	φ_{fl}	FEF	K_{d} [mM]
Na1	422	500	0.009	-	-
Na1 + Na⁺	422	500	0.048	5.0	120
Na1 + K⁺	422	500	0.017	1.5	276
Na2	419	493	0.051	-	-
Na2 + Na⁺	422	493	0.110	2.5	260
Na2 + K⁺	419	493	0.076	1.5	1060

Tab. 1.5: Photophysikalische Eigenschaften von **Na1** und **Na2**.

2. Zielstellung

Da mit Hilfe der in Kapitel 1 dargestellten Kalium- bzw. Natrium-Ionen Fluoroionophore der Arbeitsgruppe HOLDT bereits gezeigt werden konnte, dass die Anordnung von Ionophor und Fluorophor über einen 1,2,3-Triazol-1,4-diyl-Spacer zu einer gut funktionierenden Signaltransduktionskette führte, die die Bestimmung dieser Kationen unter simuliert physiologischen Bedingungen ermöglichte, sollte es Ziel dieser Arbeit sein, das Verhalten von Fluoroionophoren gleicher Anordnungen, jedoch mit strukturellen Veränderungen zu untersuchen. Einhergehend mit den Veränderungen der Strukturen, sollte die Erarbeitung neuer Synthesestrategien zur Darstellung der Ionophore erfolgen, da diese bei der Entwicklung der Kalium- bzw. Natrium-Ionen sensitiven Fluoroionophoren nach bisherigen Schemata schon allein 6–7 Synthesestufen benötigten. Die strukturellen Veränderungen der Fluoroionophore sollten im Wesentlichen darauf basieren, die Ionophore in *ortho* Position des Azakronenethers mit neuen Alkoxy-Substituenten zu modifizieren und Fluorophore mit geeigneten photophysikalischen Eigenschaften zu verwenden.

In einem ersten Arbeitsschritt sollte sich dabei darauf konzentriert werden, Kalium- bzw. Natrium-Ionen Fluoroionophore zu entwickeln, bei denen Änderungen der Ionenkonzentrationen mit Hilfe der Fluoreszenzintensitäten ermittelt werden können. Hierbei sollte zum einen überprüft werden, inwieweit die Regioisomerie der 1,2,3-Triazol-1,4-diyl-Einheit die photophysikalischen Eigenschaften und Selektivitäten beeinflusst und zum anderen, wie diese durch die Variation der Ionophore und Fluorophore dahin gehend optimiert werden können, um intra- bzw. extrazelluläre Konzentrationen dieser Kationen unter simuliert physiologischen Bedingungen bestimmen zu können.

Neben der Suche nach neuen Fluoreszenzintensitäts-basierenden Fluoroionophoren, sollten die daraus gewonnen Erkenntnisse dazu genutzt werden, Kalium-Ionen sensitive Fluoroionophore zu entwickeln, deren Fluoreszenzlebenszeiten als photophysikalische Eigenschaft dazu genutzt werden können, um Ionenkonzentrationen unter simuliert physiologischen Bedingungen zu bestimmen. Für biologisch wichtige Kationen, wie zum Beispiel Natrium-, Magnesium- oder Calcium-Ionen, konnten bereits schon Fluoroionophore entwickelt werden, die Fluoreszenzlebensdauer sensitiv sind und mit denen Ionenkonzentrationen *in vivo* bestimmbar sind.^[65-68] Für Fluoreszenzlebenszeit-basierte Kalium-Ionen Bestimmungen sind bisher nur **PBFI** und **CD222** von LAKOWICZ genutzt worden.^[69,70] Allerdings machte LAKOWICZ deutlich, dass **PBFI** aufgrund mangelnder Selektivität und **CD222** aufgrund zu geringer Fluoreszenzlebensdauern bzw. -änderungen nicht vorteilhaft für Fluoreszenzlebenszeit-basierte Kalium-Ionen Bestimmungen seien. Daher sollten in einem weiteren Arbeitsschritt Kalium-Ionen Fluoroionophore entwickelt werden, die zum einen eine ausreichende Selektivität aufweisen

und zum anderen, aufgrund einer geeigneten Fluoreszenzlebensdauer und signifikanter Änderung dieser, eine Bestimmung biologisch relevanter Kalium-Ionen Konzentrationen ermöglichte.

Die meisten bisher bekannten Fluoreszenzfarbstoffe für *in vivo* und *in vitro* Bestimmungen von Kalium-Ionen Konzentrationen basieren auf Änderungen der Fluoreszenzintensitäten bei nur einer Emissionswellenlänge. Da diese Bestimmungsmethode der Kalium-Ionen Konzentrationen sehr empfindlich auf Änderungen der zellulären Farbstoffkonzentration reagiert, sollten in einem abschließenden Arbeitsschritt Fluoroionophore entwickelt werden, die ein duales Emissionsverhalten zeigen. Ein Vorteil bei der Bestimmung von Ionenkonzentrationen anhand von zwei Emissionswellenlängen ist, dass hervorgerufene Verfälschungen durch zum Beispiel Photobleichen oder Änderungen der Indikatorkonzentration, reduziert werden können. Im Allgemeinen sind nur wenige Fluoreszenzfarbstoffe bekannt, die eine Kalium-Ionen induzierte Änderung bei zwei Emissionswellenlängen zeigen.^[71-73] Nach bisherigem Kenntnissstand gibt es jedoch keine, die im wässrigen Milieu angewendet werden können. Daher sollten die zuvor gewonnenen Erkenntnisse dazu genutzt werden, im letzten Teil dieser Arbeit Kalium-Ionen Fluoroionophore zu entwickeln, die ein duales Emissionsverhalten aufzeigen und unter simuliert physiologischen Bedingungen eine Bestimmung der Kalium-Ionen Konzentration im physiologisch relevanten Bereich ermöglichen.

3. Theoretische Grundlagen

3.1 Fluoreszenzentstehung

Der Begriff Fluoreszenz, wie er in der heutigen Zeit genutzt wird, wurde erstmals von dem Physiker und Professor für Mathematik G. G. STOKES eingeführt und ist zusammen mit der Phosphoreszenz unter dem Begriff der Photolumineszenz einzuordnen.^[74,75] Diese beschreibt den Vorgang bei der eine, meist organische Verbindung, mit elektromagnetischer Strahlung wechselwirkt (Absorption) und die dabei aufgenommene Energie zum Teil in Form von Emission wieder abgibt. Die verschiedenen Prozesse, die bei der Anregung und Emission von Photonen auftreten, lassen sich im JABLONSKI-Diagramm anschaulich darstellen (Abb. 3.1).^[76,77]

Führt die Anregung einer Verbindung mit elektromagnetischer Strahlung mit der von BOHR aufgestellten Resonanzbedingung:

$$\Delta E = E(S_n) - E(S_0) = h\nu \quad (3.1)$$

zu einer Absorption eines Photons, so wird diese aus dem elektronischen Grundzustand S_0 in einen energetisch höher liegenden angeregten Zustand S_n angehoben ($\approx 10^{-15}$ s).

Strahlungslose Desaktivierungsprozesse, wie die Innere Konversion (*internal conversion*, IC) und die Innere Relaxation (*internal relaxation*, IR) führen dazu, dass das Molekül seine überschüssige Energie abgeben kann und in den Schwingungsgrundzustand v_0 des ersten angeregten Zustandes S_1 relaxiert. Dabei gelangt das angeregte Molekül aufgrund von Molekülschwingungen in einen energetisch tiefer liegenden angeregten Zustand (z.B. $S_2 \rightarrow S_1$) der gleichen Spinmultiplizität und die darauf folgenden Stoßprozesse sorgen dafür, dass es dann in den niedrigsten Schwingungszustand v_0 des elektronisch angeregten Zustandes (S_1) relaxiert. Die Rückkehr aus den ersten angeregten Zustand in den elektronischen Grundzustand S_0 kann entweder durch strahlungslose Desaktivierungsprozesse wie IC/IR oder Spinumkehr (*intersystem crossing*, ISC)/IR oder durch strahlende Desaktivierungsprozesse, wie Fluoreszenz oder Phosphoreszenz, aufgrund von Emission eines Photons erfolgen. Strahlende Desaktivierungsprozesse erfolgen laut der Regel von KASHA immer aus dem niedrigsten angeregten Zustand einer gegebenen Multiplizität.^[78] Findet der strahlende Übergang in den elektronischen Grundzustand S_0 aus dem ersten angeregten Zustand S_1 statt, wird dies auch Fluoreszenz genannt. Kommt es im angeregten Zustand zu einer Umkehr der Spinmultiplizität (ISC), erfolgt ein strahlungsloser Übergang in den angeregten Triplettzustand (z.B. T_1). Da der Triplettzustand energetisch tiefer liegt als der Singulettzustand, ist dieser Übergang zwar thermodynamisch erlaubt, aber dennoch spinverboten. Innere Relaxation führt dazu, dass das angeregte Molekül strahlungslos in den Schwingungsgrundzustand v_0 des angeregten Triplettzustandes T_1 übergeht. Der Übergang von

T_1 in den elektronischen Grundzustand S_0 erfordert eine erneute Spinumkehr, weshalb das Molekül länger in diesen Zustand verweilt ($10^{-8} \text{ s} - 10^2 \text{ s}$) als beim Übergang vom angeregten Singulettzustand S_1 ($10^{-7} \text{ s} - 10^{-10} \text{ s}$) in den Grundzustand S_0 . Das Molekül kann aus den angeregten Triplettzustand T_1 entweder strahlungslos über ISC oder IR oder strahlend unter Emission eines Photons durch Phosphoreszenz in S_0 übergehen.

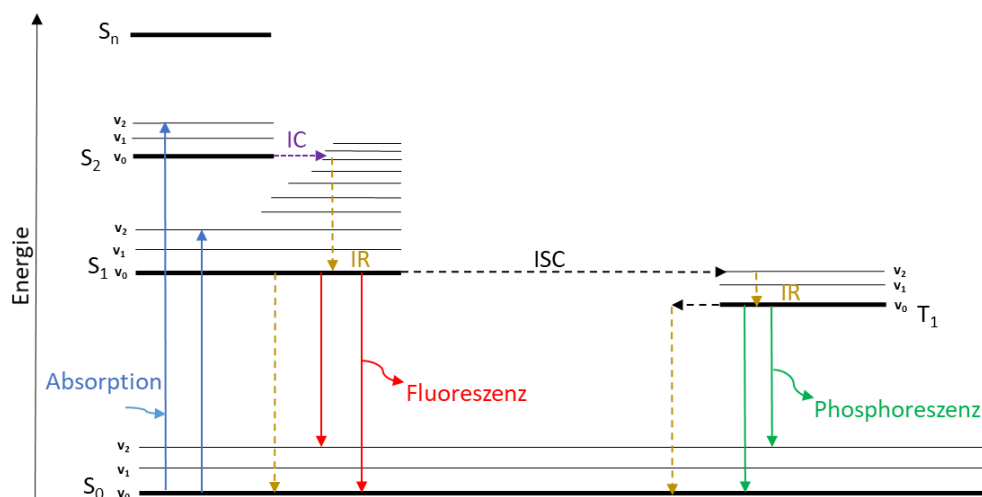


Abb. 3.1: Vereinfachtes Schema eines Jablonski-Diagrammes.

Aufgrund der strahlungslosen Desaktivierungsprozesse beim Übergang von höher liegenden angeregten Zuständen in den ersten angeregten Singulett- bzw. Triplettzustand kommt es zu einer Erniedrigung der Energie des Moleküls, weshalb bei der auftretenden Fluoreszenz bzw. Phosphoreszenz, im Vergleich zu der Absorption, stets eine bathochrome, also zu höheren Wellenlängen, Verschiebung stattfindet. Die dabei entstehende Differenz zwischen dem langwelligsten Absorptionsmaximum (λ_{abs}) zum kurzwelligsten Emissionsmaximum (λ_{em}) wird als Stokes-Shift ($\Delta\lambda$) bezeichnet und ist für jede Verbindung charakteristisch (Abb. 3.2).

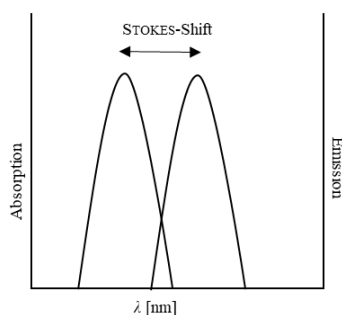


Abb. 3.2: Darstellung des Stokes-Shift.

Fluoreszenzfähige Moleküle, auch als Fluorophore bezeichnet, sind typischerweise aromatische Verbindungen mit starren konjugierten Doppelbindungen. Die Fähigkeit der Emission ist bei ihnen

stark erhöht, da die Möglichkeit Anregungsenergie in Schwingungsenergie umzuwandeln aufgrund ihrer Struktur sehr eingeschränkt ist. Infolge ihrer aromatischen Struktur kommt es zu einer Verringerung der Energiedifferenz zwischen dem höchsten besetzten Molekülorbital (*highest occupied molecular orbital*, HOMO) und dem niedrigsten unbesetzten Molekülorbital (*lowest unoccupied molecular orbital*, LUMO), wodurch es zu einer Fluoreszenz im sichtbarem Bereich ($\approx 400 - 700 \text{ nm}$) kommen kann.^[79]

3.2 Fluoreszenzquantenausbeute und Fluoreszenzlebensdauer

Neben der Lage und der Intensität der Absorptions- und Emissionsmaxima, zählen die Fluoreszenzquantenausbeute (φ_{fl}) und die Fluoreszenzlebensdauer (τ_{fl}) zu den wichtigsten Kenngrößen für die Charakterisierung von Fluoreszenzfarbstoffen.

Die Fluoreszenzquantenausbeute selbst stellt ein Maß für die Helligkeit eines Fluoreszenzfarbstoffes dar und ist definiert als das Verhältnis von der Anzahl der emittierten Photonen (N_{em}) zu den zuvor vom Molekül absorbierten Photonen (N_{abs}).

$$\varphi_{\text{fl}} = \frac{N_{\text{em}}}{N_{\text{abs}}} \quad (3.2)$$

Die Fluoreszenzquantenausbeute kann von verschiedenen Faktoren wie Molekülstruktur, Lösungsmittel, Temperatur oder pH-Wert abhängig sein, jedoch nicht von der Anregungswellenlänge (Energie), da die Fluoreszenz vom ersten angeregten Zustand S_1 ausgeht. Sie kann auch mit Hilfe der Geschwindigkeitskonstanten der Übergänge die den S_1 Zustand desaktivieren, beschrieben werden:

$$\varphi_{\text{fl}} = \frac{k_{\text{fl}}}{k_{\text{fl}} + k_{\text{nr}}} = k_{\text{fl}} \cdot \tau_{\text{fl}} \quad (3.3)$$

Dabei beschreibt k_{fl} die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz und k_{nr} die der strahlungslosen Desaktivierung, die sich aus den Desaktivierungsprozessen wie IC/IR oder ISC/IR zusammensetzt.^[77] Aufgrund des Energieverlustes der strahlungslosen Übergänge gilt in den meisten Fällen, dass $k_{\text{nr}} \neq 0$ ist. Erfolgt die Desaktivierung hauptsächlich über die Fluoreszenz, kann die φ_{fl} Werte nahezu 1 annehmen, da $k_{\text{nr}} \ll k_{\text{fl}}$ ist. Solch hohe φ_{fl} sind vor allem bei Fluoreszenzfarbstoffen für biologische Anwendungen gewünscht, da so ein möglichst intensives Fluoreszenzsignal bei gleichzeitig geringem Energieeintrag in das zu untersuchende Medium erreicht werden kann. Zu hohe (kurzwellige) Energieeinträge könnten sonst zu Schädigungen der Zellen bzw. des Gewebes führen, das untersucht werden soll. Strahlungslose Desaktivierungsprozesse werden durch Änderungen der Geometrie im angeregten Zustand, die durch Schwingungen und Rotations- bzw. Torsionsbewegungen von Molekülgruppen

entstehen, begünstigt. Daher ist es für eine hohe φ_{fl} förderlich, möglichst ‚starre‘ Verbindungen mit wenig Beweglichkeit innerhalb des Moleküls zu verwenden.

Neben dem so genannten Relativwertverfahren^[80,81] kann die Fluoreszenzquantenausbeute auch thermisch über die *Thermal-Lens-Methode*^[82] oder durch Verwendung einer ULBRICHT-Kugel, welche in dieser Arbeit genutzt wurde, bestimmt werden. Diese hat den Vorteil, dass für die Bestimmung kein Fluoreszenzstandard benötigt wird, da die zu bestimmende Verbindung mit dem jeweiligen verwendeten Lösungsmittel ins Verhältnis gesetzt wird.

Die Fluoreszenzlebensdauer τ_{fl} beschreibt die mittlere Zeit, die ein Molekül im angeregten Zustand S_1 verbleibt, bevor es anschließend in den elektronischen Grundzustand S_0 zurückkehrt und liegt typischerweise im Nanosekundenbereich. Da die Desaktivierung entweder unter Emission eines Photons oder strahlungslos erfolgen kann, ist τ_{fl} wie folgt definiert:

$$\tau_{fl} = \frac{1}{k_{fl} + k_{nr}} \quad (3.4)$$

Die Fluoreszenzlebensdauer hängt von den strahlenden Geschwindigkeitskonstanten k_{fl} und den strahlungslosen Geschwindigkeitskonstanten k_{nr} ab. Findet keine strahlungslose Desaktivierung statt, spricht man auch von der natürlichen (intrinsic) Fluoreszenzlebensdauer τ_{fl}^n ,

$$\tau_{fl}^n = \frac{1}{k_{fl}} \quad (3.5)$$

welche auch mit Hilfe der bestimmten Fluoreszenzlebensdauer τ_{fl} und -quantenausbeute φ_{fl} dargestellt werden kann:

$$\tau_{fl}^n = \frac{\tau_{fl}}{\varphi_{fl}} \quad (3.6)$$

Bei einer unimolekularen Desaktivierung, in der nur eine fluoreszierende Spezies vorliegt, folgt die Fluoreszenzintensität I_{fl} nach der Anregung mit einem kurzen Laserpuls einem monoexponentiellen Zerfallsgesetz:

$$I_{fl} = I_{fl,0} \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) = I_{fl,0} \cdot \exp(-k_i t) \quad (3.7)$$

mit der Fluoreszenzintensität $I_{fl,0}$ unmittelbar nach der Anregung zum Zeitpunkt $t = 0$ min, der Zeit t , der Fluoreszenzlebensdauer τ_{fl} , des angeregten Zustandes S_1 und den Geschwindigkeitskonstanten k_i ($k_i = k_{fl} + k_{nr}$) für den Übergang in den elektronischen Grundzustand S_0 . Liegen mehrere fluoreszierende Spezies oder Zustände gleichzeitig vor, so folgt die Fluoreszenzintensität einem mehrexponentiellen Zerfallsgesetz:

$$I_{fl} = I_{fl,0} \cdot \sum_n A_n \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_n}\right) \quad (3.8)$$

wobei A_n und τ_n den Amplituden bzw. Fluoreszenzlebensdauern der n-ten Komponente im angeregten Zustand entsprechen.

Zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern wurde in dieser Arbeit auf die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (*time correlated single photon counting, TCSPC*) zurückgegriffen. Bei diesem Verfahren wird das Molekül mit sehr kurzen periodischen Lichtpulsen ($10^5 - 10^7$ Zyklen) angeregt und die Zeit von Anregungspuls bis zur Emission eines Photons gemessen. Die gemessenen Zeiten werden in einem Histogramm als Counts aufsummiert (Abb. 3.3). Um sogenannte „pile-up“-Effekte zu vermeiden, ist es wichtig, dass pro Zyklus jeweils nur ein Photon detektiert wird, weshalb im Durchschnitt nur etwa bei jedem 50. Zyklus ein Photon gemessen wird. Ist die Messung beendet, erhält man ein Abklingenspektrum (*decay*) mit einem exponentiellen Abfall der Fluoreszenzintensität nach der Anregung.^[76]

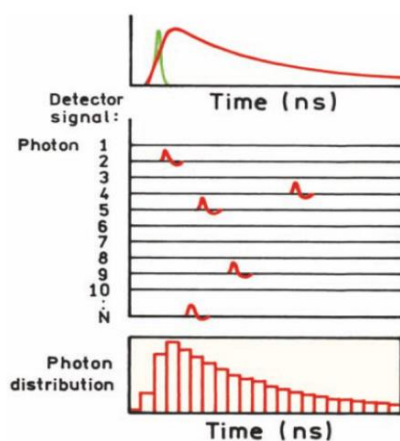


Abb. 3.3: Prinzip der TCSPC-Methode mit Anregungspuls (grün) und Counts (rot).
Abbildung aus der Literatur [76] entnommen.

3.3 Fluoroionophore

Fluorophore sind in molekularen Fluoreszenzfarbstoffen die signalgebende Einheit. Sie fungieren dort als Übermittler eines Signals, welches die Information, wie zum Beispiel die Anwesenheit eines Analyten, in ein optisches Signal umwandelt, das dann als Änderung der photophysikalischen Eigenschaften des Fluorophors wahrgenommen wird. Molekulare Fluoreszenzfarbstoffe lassen sich im Allgemeinen in folgende drei Typen unterscheiden:

1. Fluorophore, bei denen die Fluoreszenz durch die Kollision mit einem Analyten gelöscht wird.
2. Fluorophore, die einen Analyten reversibel binden können, wobei die Fluoreszenz entweder verstärkt oder gelöscht werden kann.
3. Fluorophore, die entweder über einen Spacer (Abstandshalter) an einen Rezeptor oder direkt an diesen gebunden sind (Abb.3.4).

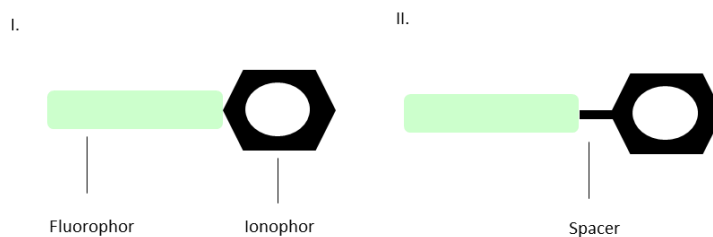


Abb. 3.4: Darstellung eines Ionenindikators bzw. Fluoroionophors.

Die Fluoreszenzfarbstoffe des Typs 3, die auf der Erkennung von Molekülen oder Ionen basieren, erfordern in ihrem Design ein hohes Maß an Sensitivität und Selektivität für die entsprechenden Analyten. Handelt es sich bei den zu bestimmenden Analyten um Ionen, wird der Rezeptor auch als Ionophor und der gesamte molekulare Fluoreszenzfarbstoff als Fluoroionophor bezeichnet. Eine Änderung der Umgebung des Fluoroionophors, wie zum Beispiel das Komplexieren von Ionen, führt zu einer Änderung seiner photophysikalischen Eigenschaften. Am besten zugänglich sind diese Änderungen über die Fluoreszenzintensität (I_{fl}), wenn das Komplexieren zum Beispiel zu einer Verstärkung oder zum Löschen der Fluoreszenz führt. Da die Fluoreszenzintensität jedoch von der Konzentration des Farbstoffes abhängig ist, kann die Detektion in komplexeren Systemen aufgrund von Photobleichen oder Farbstoff-Extrusion gehindert werden.^[83] Um solchen Problemen vorzubeugen, kann die Bestimmung auch über die nahezu konzentrationsunabhängige Fluoreszenzabklingzeit erfolgen oder auf die Verwendung von ratiometrischen Fluorophoren zurückgegriffen werden, bei denen sich durch das Komplexieren nicht nur die Fluoreszenzintensität ändert, sondern auch eine Verschiebung der Anregungs- oder Emissionswellenlänge stattfindet. Die komplexierungsinduzierten Änderungen der photophysikalischen Eigenschaften eines Fluoroionophores können durch unterschiedliche photophysikalische Prozesse, wie Elektronen- oder Ladungstransfer, Energietransfer oder Excimer- bzw. Exciplexbildung, hervorgerufen werden.^[77] Bei denen im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Fluoroionophore wird angenommen, dass diese überwiegend auf dem Prinzip des Photoinduzierten Elektronentransfers (PET) beruhen.^[77,84]

3.4 Photoinduzierter Elektronentransfer

Bei den meisten Fluoroionophoren, deren Signalübertragung auf einem PET basiert, ist der Fluorophor über einen Spacer mit der im Ionophor enthaltenen Donorgruppe verbunden. Der PET verursacht ausgehend von der Donorgruppe eine Fluoreszenzlöschung des Fluorophors, welche durch Komplexierung des Ionophors mit einem Analyten gehindert wird, so dass ein Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten ist.

In Abb. 3.5 ist der dem PET zugrunde liegende Mechanismus anhand von Molekülorbitalen schematisch dargestellt. Durch die Anregung des Fluoroionophors kommt es zu einer Übertragung eines Elektrons aus dem höchsten besetzten Molekülorbital (*highest occupied molecular orbital*, HOMO) des Fluorophors in dessen niedrigsten unbesetzten Molekülorbital (*lowest unoccupied molecular orbital*, LUMO). Da das HOMO des Donors im freien Ionophor energetisch höher liegt als das des Fluorophors, findet ein Übergang eines Elektrons vom HOMO des Donors auf das einfach besetzte HOMO des angeregten Fluorophors statt. Da das zuvor angeregte Elektron des Fluorophors nicht mehr vom angeregten Zustand in den Grundzustand relaxieren und seine aufgenommene Energie in Form von Fluoreszenz abgeben kann, führt dies zur Löschung der Fluoreszenz. Wird ein Ion im Ionophor komplexiert, wird das Redoxpotential des Donors erhöht, sodass dessen HOMO energetisch herabgesenkt wird und nun tiefer liegt als das des Fluorophors. Eine Übertragung des Elektrons zum Fluorophor ist nicht mehr möglich. Das angeregte Elektron des Fluorophors kann aus dessen LUMO in das HOMO übertragen werden und die aufgenommene Energie in Form von Emission eines Photons abgeben. Mit steigender Konzentration des Ions verstärken sich die Änderungen der photophysikalischen Eigenschaften (I_{fl} , φ_{fl} , τ_{fl}).^[77,84,85]

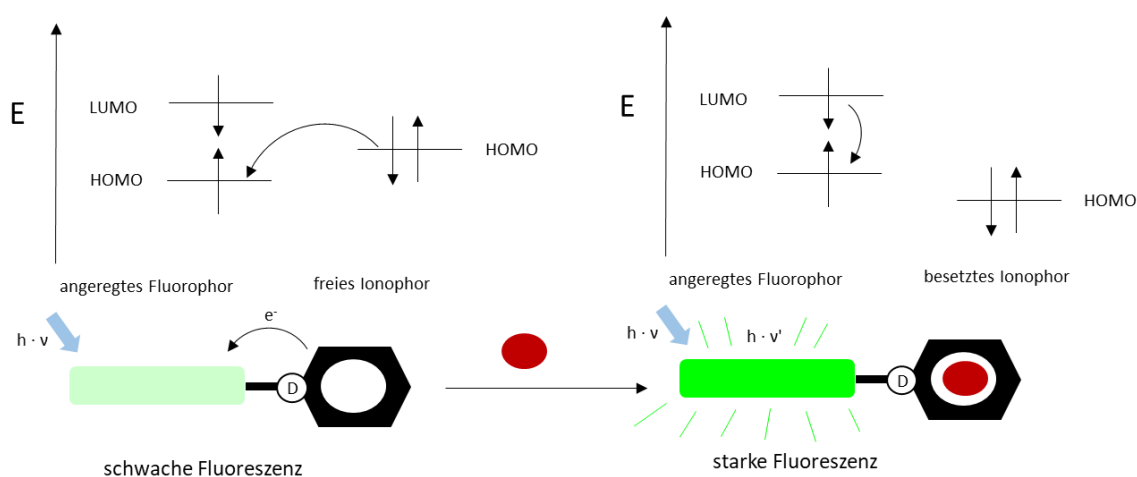


Abb. 3.5: Schematische Darstellung des Photoinduzierten Elektronentransfers (PET). links: in Abwesenheit von Kationen, rechts: in Anwesenheit von Kationen.

4. Ergebnisdiskussion

Im ersten Teil dieser Arbeit werden die Synthesen neuer Kalium- und Natrium-Ionen Fluoroionophore dargestellt, die auf einer Änderung der Fluoreszenzintensität basieren. Durch das Variieren der Ionophore und Fluorophore soll der Einfluss dieser auf die photophysikalischen Eigenschaften untersucht werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit werden die Synthesen von Kalium-Ionen Fluoroionophore vorgestellt, dessen Prinzipien auf ratiometrischen und Lebenszeit-basierten Messungen beruhen. Im Anschluss der jeweiligen Synthesen werden die Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchungen und die Anwendungsmöglichkeiten der einzelnen Fluoroionophore diskutiert.

4.1 Synthese der alkin- bzw. azidfunktionalisierten Ionophore

Zur Darstellung der Kalium- und Natrium-Ionen sensitiven Fluoroionophore wurden die benötigten azid- bzw. alkin-funktionalisierten Ionophore bislang nach folgendem Syntheschema aufgebaut (Abb. 4.1).^[57]

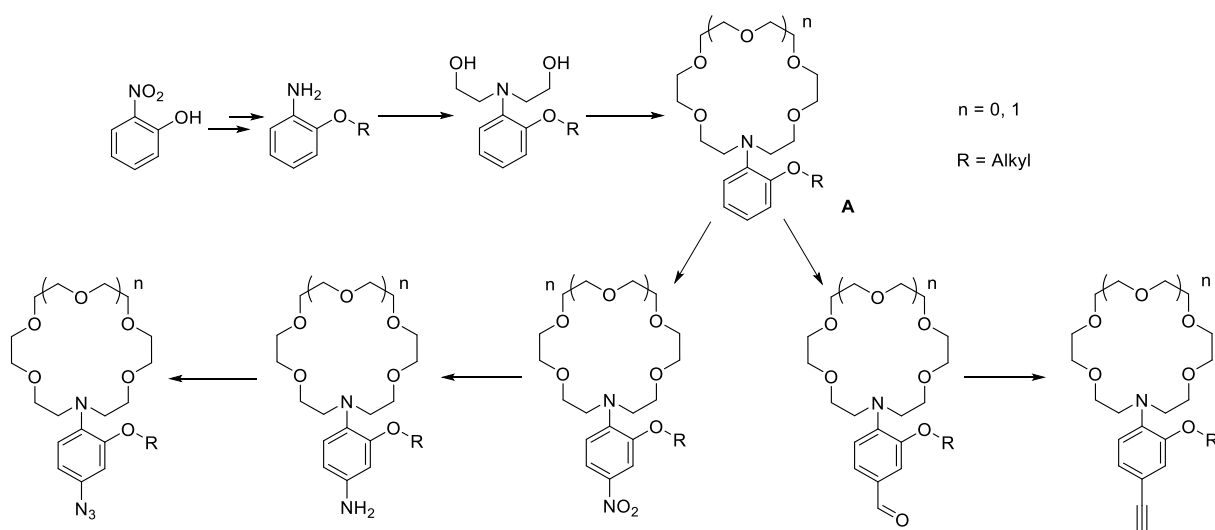


Abb. 4.1: Bisheriges Syntheschema zur Darstellung der alkin- bzw. azidfunktionalisierten Ionophore.

Ausgehend vom 2-Nitrophenol wurde mittels einer nucleophilen Substitution (S_N2) und einer anschließenden katalytischen Hydrierung das gewünschte 2-Alkoxyanilin synthetisiert. Dieses wurde im nächsten Schritt in Form einer Konversion mit 2-Chlorethanol zu einem Dialkohol-Anilin-Derivat umgesetzt. In einer anschließenden Makrozyklisierung erhielt man dann den gewünschten N-(2-Alkoxyphenyl)azakronenether **A**. Dieser konnte entweder mit Hilfe einer Vilsmeier Reaktion zum entsprechenden Aldehyd dargestellt werden, welcher dann mit Hilfe des Bestmann-Ohira-Reagenz

(BOR) in Form einer BESTMANN-Modifizierung zum alkinfunktionalisierten Ionophor umgesetzt wurde. Oder, um den azidfunktionalisierten Ionophor zu erhalten, wurde **A** zunächst unter milden Bedingungen nitriert, mittels einer katalytischen Hydrierung zum Amin und abschließend in Form einer Diazotierung in das gewünschte Azid umgesetzt. [57,60,86,87]

Zu Beginn meiner Arbeit habe ich mich darauf konzentriert die bisherige Syntheseroute zur Darstellung der gewünschten Ionophore zu optimieren, da die einzelnen Synthesestufen zum Teil sehr geringe Ausbeuten aufwiesen. Verbunden mit dieser Optimierung wurde ebenfalls angestrebt die benötigte Zeit zur Fertigstellung der Ionophore zu verkürzen.

Bei der Erarbeitung des neuen Syntheseweges habe ich mir das Prinzip zu Nutze gemacht, dass Fluoraromaten mit sekundären Aminen, zu denen auch die Azakronenether gezählt werden, umgesetzt werden können. [88,89] Ausgehend von den kommerziell erhältlichen 2-Fluor-5-nitrophenol, Aza-[18]krone-6-ether und Aza-[15]krone-5-ether wurde für die azidfunktionalisierten Ionophore folgendes Schema entwickelt (Abb. 4.2.)

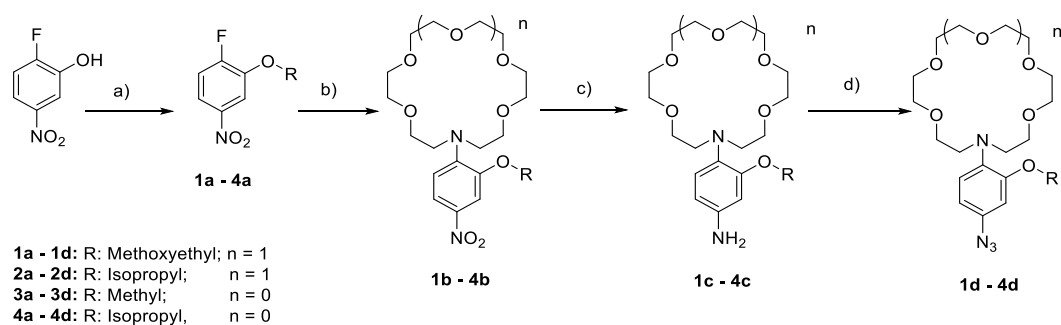


Abb. 4.2: Optimiertes Syntheseschema zur Darstellung azidfunktionalisierter Ionophore **1d – 4d**.

a) 2-Fluor-5-nitrophenol, Iodalkan, K_2CO_3 , DMF, 60 °C zu RT; b) Cs_2CO_3 , Azakrone, DMF, 100 °C; c) $SnCl_2 \cdot 2 H_2O$, EE, HCl, H_2O , NaOH 40 °C; d) $NaNO_2$, NaN_3 , HCl, H_2O , 0 °C zu RT.

Sofern das gewünschte 1-Fluor-2-alkoxy-4-nitrobenzol nicht kommerziell erhältlich war, wurde dies in Form einer Williamson-Ethersynthese aus dem 2-Fluor-5-nitrophenol dargestellt. Hierbei wurde das Phenol mit Hilfe einer Base in ein Phenolat überführt und durch eine anschließende nucleophile Substitution (SN_1) mit den entsprechenden Iodalkanen zu den Verbindungen **1a – 4a** umgesetzt. [90,91] Diese konnten im nächsten Syntheseschritt mittels einer nucleophilen aromatischen Substitution mit den gewünschten Azakronenether zu den *N*-(4-Nitro-2-alkoxyphenyl)azakronenether **1b – 4b** überführt werden. [92] Die anschließende Reduktion der Nitrogruppe wurde anfänglich nach dem bisherigen Syntheseweg mit Hilfe einer katalytischen Hydrierung durch Palladium auf Aktivkohle (Pd/C) unter Wasserstoffatmosphäre (50 bar) durchgeführt. Da dies aber mit steigender Ringgröße des Azakronenethers bis zu 7 Tage dauerte, wurde trotz einer geringeren Ausbeute auf eine andere Form der Reduktion zurückgegriffen. Hierfür wurde als Reduktionsmittel $SnCl_2 \cdot 2 H_2O$ verwendet, wobei die Amine zunächst als Hydrochloride ausgefallen sind und anschließend mit Natriumhydroxid zu den

entsprechenden *N*-(4-Amin-2-alkoxyphenyl)azakronenether **1c**–**4c** umgewandelt wurden.^[93] Der abschließende Syntheseschritt beinhaltete eine Diazotierung, bei der die *N*-(4-Amin-2-alkoxyphenyl)azakronenether **1c**–**4c** unter sauren Bedingungen zum Hydrochlorid, mit Natriumnitrit zu einem Aryldiazoniumsalz und schließlich mit Natriumazid zu den gewünschten *N*-(4-Azido-2-alkoxyphenyl)azakronenether **1d**–**4d** umgesetzt wurden.^[51]

Mit der dargestellten optimierten Syntheseroute der azidfunktionalisierten Ionophore konnten die einzelnen Syntheseschritte von 7 auf 4 reduziert werden. Weiterhin konnten die von geringer Ausbeute gekennzeichneten Schritte der Makrozyklisierung und der anschließenden Nitrierung umgangen werden, indem bereits nitrierte Edukte verwendet wurden. Die Verwendung von 2-Fluor-5-nitrophenol als Edukt machte es außerdem möglich, auf einem einfachen Weg die gewünschten Alkoxy-Gruppen einzuführen.

Für die Synthese der alkinfunktionalisierten Ionophore wurde ausgehend von den kommerziell erhältlichen Edukten 4-Fluor-3-hydroxybenzaldehyd, Aza-[18]krone-6-ether und Aza-[15]krone-5-ether, ein analoges Syntheschema entwickelt (Abb. 4.3).

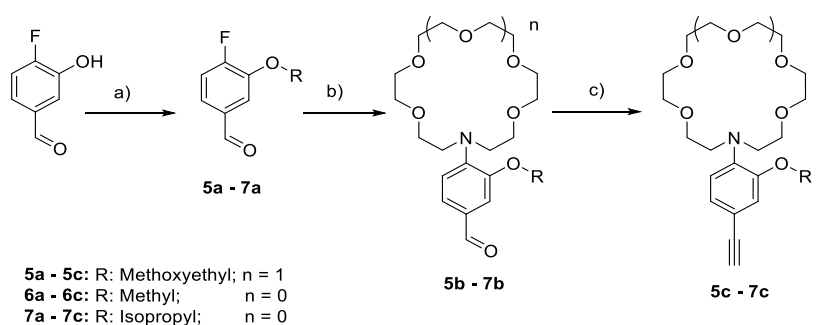


Abb. 4.3: Optimiertes Syntheschema zur Darstellung alkinfunktionalisierter Ionophore **5c**–**7c**.

a) 4-Fluoro-3-hydroxybenzaldehyd, Iodalkan, K_2CO_3 , DMF, 60 °C zu RT; b) K_2CO_3 , Azakrone, DMF, 130 °C; c) K_2CO_3 , BOR, MeOH, RT.

Die Darstellung der 4-Fluoro-3-alkoxybenzaldehyde **5a**–**7a** konnte im ersten Syntheseschritt in Form einer nucleophilen Substitution (SN_1) realisiert werden. Hierbei wurde das Phenol zunächst mit einer Base in ein Phenolat überführt und anschließend mit den entsprechenden Iodalkanen zu den gewünschten Verbindungen **5a**–**7a** umgesetzt.^[90] Die kommerziell erhältlichen Azakronenether wurden im nachfolgendem Schritt mit Hilfe einer Base deprotoniert und in Form einer nucleophilen aromatischen Substitution mit den Aldehyden **5a**–**7a** zu den *N*-(4-Formyl-2-alkoxyphenyl)-azakronenether **5b**–**7b** umgesetzt.^[92,94] Im abschließenden Syntheseschritt wurden die Aldehyde **5b**–**7b** mit Dimethyl-1-diazo-2-oxopropylphosphonat (BOR) in Form einer BESTMANN-Modifizierung umgesetzt. Dabei wird das BOR zunächst deprotoniert, sodass das entstandene Carbanion den Aldehyd in einer Additionsreaktion und unter Ringschluss zum Oxaphosphetan nucleophil angreift und sich durch eine anschließende zyklische Eliminierung und Abspaltung von Stickstoff die gewünschten

N-(4-Etynyl-alkoxyphenyl)azakronenether **5c** – **7c** bildeten.^[57,86] Der für die alkinfunktionalisierten Ionophore dargestellte optimierte Syntheseweg machte es möglich die einzelnen Syntheseschritte von 6 auf 3 zu minimieren. Der mit einer geringen Ausbeute einhergehende Schritt der Makrozyklisierung konnte umgangen werden. Weiterhin machte es der Einsatz des 4-Fluoro-3-hydroxybenzaldehyd als Edukt möglich, die gewünschten Alkoxy-Gruppen leicht einzuführen. Der 4-Fluoro-3-methoxybenzaldehyd **6a** war kommerziell erhältlich und ersparte den Reaktionsschritt der Einführung der Alkoxy-Gruppe.

4.2 Synthese der alkin- bzw. azidfunktionalisierten Fluorophore

Bei der Wahl der zu verwendenden azid- bzw. alkinfunktionalisierten Fluorophore als signalgebende Einheit der Fluoroionophore habe ich mich an das bereits von S. AST verwendete 7-Diethylaminocoumarin **9** orientiert.^[51,52,57] Zusätzlich zu diesem Coumarin-Derivat wurden in Anlehnung an frühere Arbeiten von JONES außerdem die 7-Aminocoumarine **14** und **19** funktionalisiert. JONES Arbeiten, in denen er bereits 4-Trifluoromethyl substituierte 7-Aminocoumarine (Abb. 4.4) hinsichtlich ihrer photophysikalischen Eigenschaften untersuchte, zeigten, dass mit steigender Polarität des Lösungsmittels eine Rotverschiebung der Emission und eine Reduzierung der Fluoreszenzquantenausbeute zu verzeichnen war. Weiterhin konnte er feststellen, dass mit zunehmender Starrheit der 7-Aminocoumarine ebenso eine Rotverschiebung der Emission und ein Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute stattfand.^[95-97]

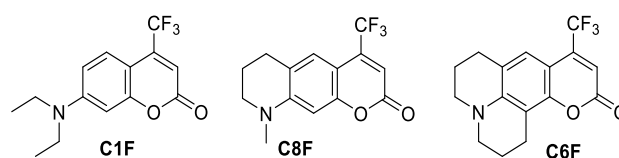


Abb. 4.4: Darstellung der 7-Aminocoumarine **C1F** (Coumarin 35), **C6F** (Coumarin 153) und **C8F** (Coumarin 522) nach JONES.

Für die Darstellung der alkin- bzw. azidfunktionalisierten Fluorophore **12**, **22**, **25** und **31** wurden die kommerziell erhältlichen Aldehyde **8** und **18** als Edukte verwendet. Der für die Darstellung der bis dahin noch unbekanntenen alkin- bzw. azidfunktionalisierten Fluorophore **17** und **28** benötigte Aldehyd **13** wurde aus dem kommerziell erhältlichen 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-7-ol **13a** synthetisiert. Die weiteren Synthesestufen für die alkin- bzw. azidfunktionalisierten Fluorophore sind, wenn auch in leicht abgeänderter Form, analog durchgeführt worden.

Die für die Darstellung der neuen Fluoroionophore benötigten alkinfunktionalisierten Fluorophore wurden folgendermaßen synthetisiert (Abb. 4.5).

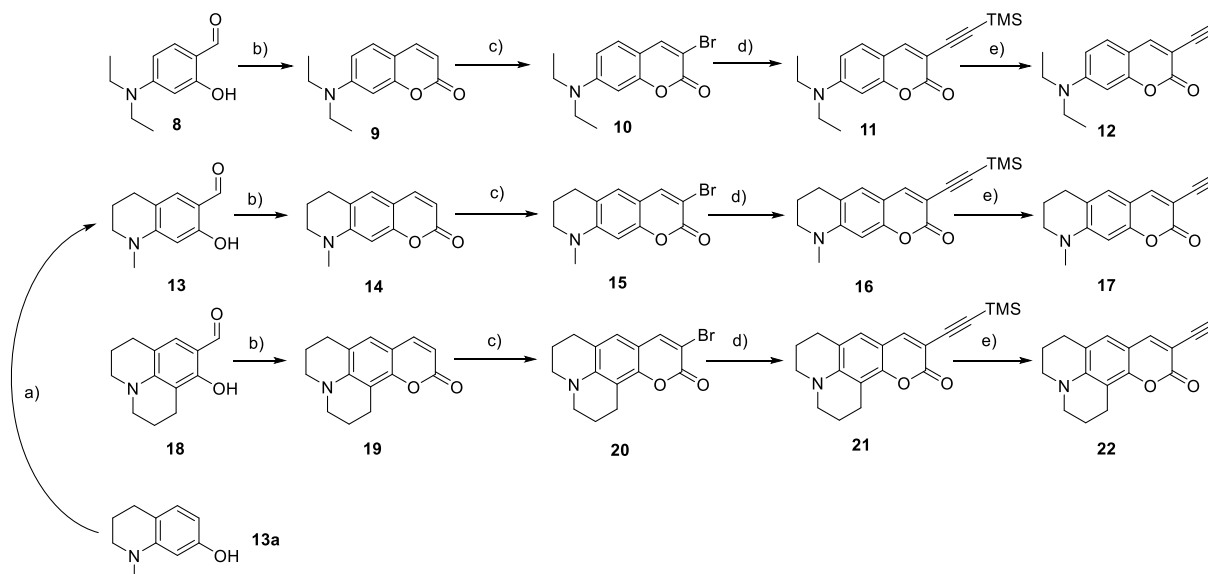


Abb. 4.5: Syntheschema zur Darstellung der alkynefunktionalisierten Fluorophore **12**, **17** und **22**.

a) POCl_3 , DMF, RT; b) Diethylmalonat, Piperidin, EtOH, 80 °C; HCl, HAc, 80 °C; c) Br_2 , HAc, 0 °C; d) TMSA, $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, DIPA, 60 °C; e) TBAF, DCM, RT.

Für die Darstellung des benötigten Aldehyds **13** wurde das Edukt **13a** in Form einer Vilsmeier Reaktion umgesetzt. Dabei wurde zuerst das reaktive Formylierungsreagenz Chloriminium-Ion aus Phosphoroxidtrichlorid und DMF generiert, welches anschließend mit dem Aromaten in einer elektrophilen aromatischen Substitution reagierte. Das dabei entstandene Produkt wurde durch wässrige Aufarbeitung zum Aldehyd hydrolysiert.^[98] Via Knoevenagel-Kondensation wurden die Aldehyde **8**, **13** und **18** mit Diethylmalonat unter Ringschluss zu Coumarin-3-carbonsäureethylester-Derivaten umgesetzt, die dann durch eine anschließende saure Aufarbeitung und unter Abspaltung des Carbonsäureethylester die Verbindungen **9**, **14**, und **19** lieferten.^[99] Durch die darauffolgende säurekatalysierte Halogenierung in Form einer elektrophilen Substitution mit Brom, wurden diese dann zu den Verbindungen **10**, **15** und **20** umgesetzt.^[100] Die bromierten Coumarin-Derivate wurden anschließend mittels einer Sonogashira-Kupplung zu den Trimethylsilyl-geschützten Verbindungen **11**, **16** und **21** umgesetzt.^[100,101] Diese palladiumkatalysierte Reaktion ermöglicht die Kupplung von endständigen Alkinen mit Aryl- oder Vinylhalogeniden. Dabei bildete sich im ersten Schritt in Form einer oxidativen Addition ein π -Komplex aus dem Arylhalogenid und dem katalytisch wirksamen Pd^0 -Komplex. Anschließend kommt es zwischen dem mit einer Base hergestellten Trimethylsilylacetylen-Anion und dem reaktiven Pd^{II} -Komplex zu einer Liganden-Austausch-Reaktion am Pd. Es entsteht ein Alkynyl-Pd-Komplex, welcher durch eine reduktive Eliminierung wieder den Pd^0 -Komplex regeneriert und die Kupplungsverbindungen **11**, **16** und **21** freisetzt. Im abschließenden Syntheseschritt wurden mit Hilfe von Tetrabutylammoniumfluorid die Trimethylsilyl-Gruppen basisch abgespalten, so dass die alkynefunktionalisierten Fluorophore **12**, **17** und **22** freigesetzt wurden.^[102]

Für die Darstellung der azidfunktionalisierten Fluorophore **25**, **28** und **31** konnte ebenfalls ein allgemeines Syntheschema aufgestellt werden (Abb. 4.6).

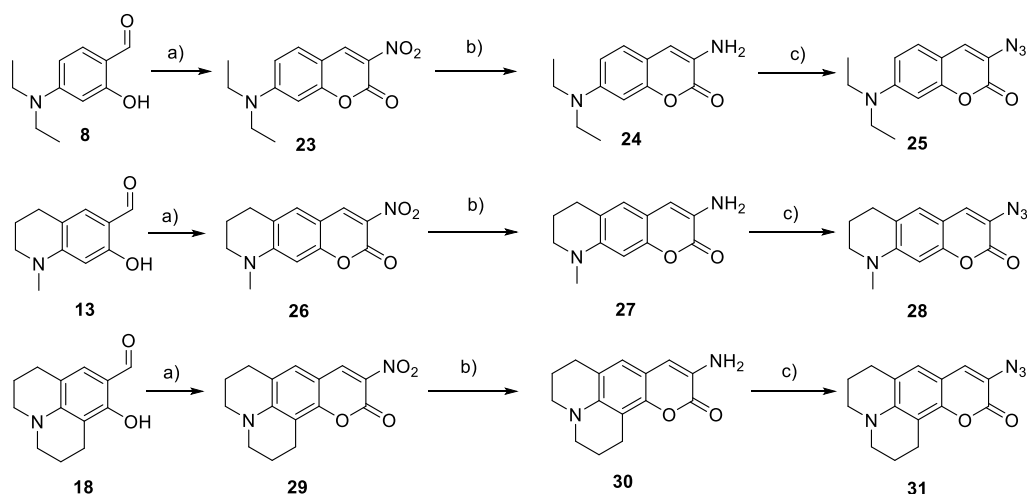


Abb. 4.6: Syntheschema zur Darstellung der azidfunktionalisierten Fluorophore **25**, **28** und **31**.

a) Ethylnitroacetat, Piperidin, HAC, *n*-BuOH, 120 °C; b) HCl, SnCl₂ · 2 H₂O, RT; c) NaNO₂, NaN₃, HCl, H₂O, 0 °C zu RT.

Als Edukte wurden auch hier die Aldehyde **8**, **13** und **18** verwendet, die mit Ethylnitroacetat in Form einer Knoevenagel-Kondensation unter Ringschluss zu den nitrierten Coumarin-Derivaten **23**, **26** und **29** reagierten. Durch die darauffolgende Reduktion der Nitrogruppe mittels SnCl₂ · 2 H₂O sind die Amin-Derivate zunächst als Hydrochloride ausgefallen. Diese wurden im Anschluss mit Hilfe von Natriumhydroxid zu den Verbindungen **24**, **27** und **30** freigesetzt. Im abschließenden Syntheseschritt wurden die Amine in Form einer Diazotierung zu den entsprechenden Aziden umgesetzt. Dabei wurden die primären Amine **24**, **27** und **30** zunächst unter sauren Bedingungen zum Hydrochlorid und anschließend mit Natriumnitrit zu einem Aryldiazoniumsalz umgesetzt. Unter Verwendung von Natriumazid und der Abgabe von Stickstoff wurden aus den Aryldiazoniumsalzen die azidfunktionalisierten Fluorophore **25**, **28** und **31** freigesetzt.^[103]

4.3 Synthese neuer Kalium-Ionen Fluoroionophore basierend auf Änderungen der Fluoreszenzintensität (K5 – K9)

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse der vorangegangenen Arbeiten wurde mit Hilfe des bisher verwendeten *N*-(*o*-Methoxyethoxyphenyl)aza-[18]krone-6-ether Ionophor weiter untersucht, inwieweit die Eigenschaften der Regioisomere durch das Einführen einer neuen fluorophoren Gruppe beeinflusst werden und wie sich dies auf die photophysikalischen Eigenschaften auswirkt. Hierfür wurde zunächst das Coumarin-Derivat **19** (Coumarin 6H, $\varphi_{fl} = 0.59$) gewählt, welches im Vergleich zu

dem bisher verwendeten Coumarin-Derivat **9** ($\varphi_{fl} = 0.03$) eine deutliche höhere Fluoreszenzquantenausbeute in einer 10 mM Tris-Puffer Lösung (pH = 7.2) zeigte. In der Literatur sind schon einige Beispiele für substituierte Coumarin 6H-Derivate bekannt mit denen ebenfalls eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute und eine längerwellige Emission erreicht werden konnte.^[104-106] Im Zuge der durchgeführten Synthesen konnte Coumarin 6H erfolgreich in die alkin- bzw. azidfunktionalisierten Derivate **22** bzw. **31** überführt werden.

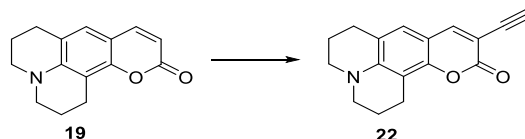


Abb. 4.7: Darstellung der Coumarine **19** und **22**.

Spektroskopische Untersuchungen des alkinfunktionalisierten Coumarin-Derivat **22** in einer 10 mM Tris-Puffer Lösung (pH = 7.2) wiesen ein Absorptionsmaximum bei 445 nm, ein Emissionsmaximum bei 505 nm und eine Fluoreszenzquantenausbeute von $\varphi_{fl} = 0.68$ auf. Sowohl die Absorptions- wie auch die Emissionsmaxima blieben in Gegenwart von 1000 mM Kalium- bzw. Natrium-Ionen nahezu unverändert (Abb. 4.8).

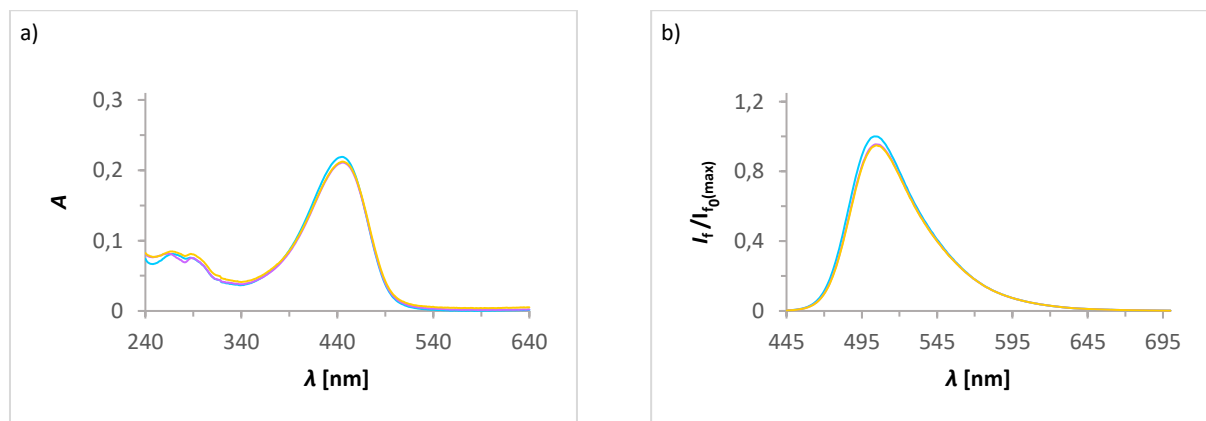


Abb. 4.8: Absorptions- und Fluoreszenzspektren von **22**

a) UV-VIS Spektren und b) Fluoreszenzemissionsspektren von **22** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $H_2O/DMSO$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2) in 10 mM Tris-Puffer (türkis) und in Gegenwart von 1000 mM KCl (lila) und 1000 mM NaCl (gelb) mit $\lambda_{abs} = 445$ nm, $\lambda_{exc} = 435$ nm und $\lambda_{fl} = 505$ nm.

Ein Vergleich mit dem von JONES untersuchten 4-trifluoromethyl-substituierten 7-Aminocoumarin **C6F** zeigte, dass Coumarin-Derivat **22** ähnlich gute photophysikalische Eigenschaften besaß, um als fluorophore Gruppe verwendet zu werden.^[97]

Die Darstellung der isomeren Fluoroionophore **K5** und **K6** erfolgte mithilfe einer Cu(I)-katalysierten 1,3-dipolaren Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) zwischen den alkin- bzw. azidfunktionalisierten Fluorophoren **22** und **31** und den Ionophoren **1d** und **5c** (Abb. 4.9).

Bei einer CuAAC bildet sich im ersten Schritt ein Kupfer-Komplex aus, wobei das zugefügte Natriumascorbat als Reduktionsmittel fungiert. Das zugesetzte Alkin wird durch Deprotonierung einer Base zu einem Kupfer-Acetyl-Komplex. Wird die Reaktion in Wasser durchgeführt, kann auf den Einsatz einer Base verzichtet werden, da die Koordination von Kupfer die C-H-Acidität des Alkins erniedrigt. Im nächsten Schritt erfolgt durch ein weiteres Kupferatom die Aktivierung des Azids, wodurch sich ein Kupfer-Acetyl-Azid-Komplex ausbildet. Durch einen nucleophilen Angriff des Azids an das Acetylen bildet sich ein Metallozyklus, der in ein Triazol-Kupfer-Derivat übergeht und durch anschließende Protonierung und Regeneration des Kupferkatalysators in die 1,2,3-Triazol basierten Fluoroionophore überführt werden kann. [43,44,107,108]

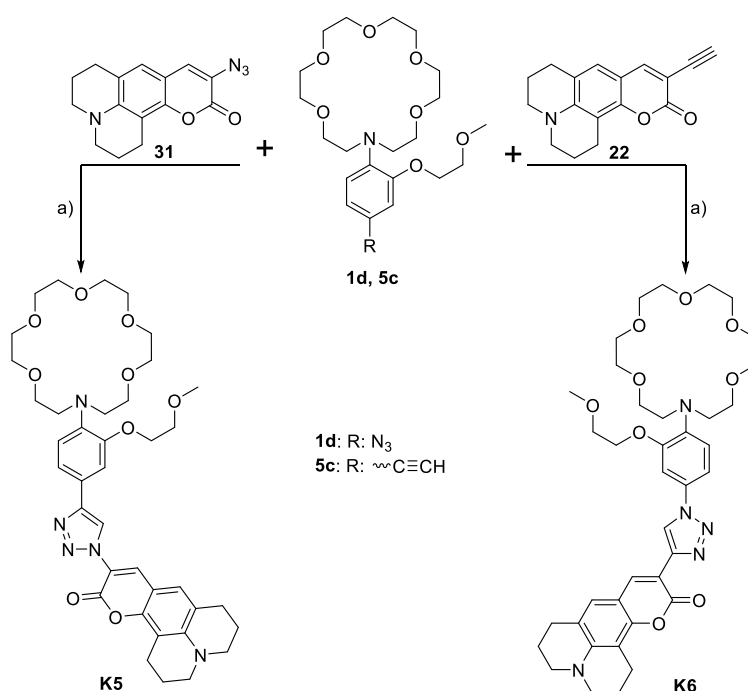


Abb. 4.9: Darstellung der Fluoroionophore **K5** und **K6** mittels CuAAC.

a) CuSO₄ · 5 H₂O, Na-asc., THF/ H₂O (2:1, v/v), 60 °C.

Für die Bestimmung der photophysikalischen Eigenschaften der Kalium-Ionen Fluoroionophore wurden Untersuchungen unter simuliert physiologischen Bedingungen durchgeführt. Hierfür wurden Stammlösungen der Fluoroionophore mit einer Konzentration von 10⁻³ mol/l in DMSO hergestellt, welche zur Vorbereitung der jeweiligen Messungen mit einer 10 mM Tris-Puffer Lösung (pH = 7.2) auf 10⁻⁵ mol/l verdünnt wurden (H₂O/DMSO, 99:1, v/v). Für die Ermittlung der Emissionsmaxima und der Dissoziationskonstanten, sowie die Veranschaulichung von Kalium-/Natrium-Selektivitäten wurden Fluoreszenztitrationen mit Hilfe von Kalium- bzw. Natrium-Ionen Lösungen im physiologisch relevanten Bereich von 0 – 160 mM durchgeführt. Dabei wurde die Ionenstärke während der Titrationen mittels einer Cholinchlorid Lösung (10 mM, pH = 7.2) konstant gehalten. Wurden Messungen in kombinierten Lösungen durchgeführt, wurde im Bereich von 0 – 160 mM Kalium-Ionen

titriert und die Ionenstärke mit Natrium-Ionen konstant bei 160 mM gehalten. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten der gebildeten Komplexe erfolgte mit Hilfe einer linearen Regression der Emissionsmaxima zu den entsprechenden Kalium-Ionen Konzentrationen.^[83]

Um feststellen zu können, inwieweit die Veränderung der fluorophoren Gruppe zu einer Verschiebung der Absorptionsmaxima führte, wurden als erstes UV/VIS-Spektren der Fluoroionophore **K5** und **K6** aufgenommen und diese mit dem zuvor ermittelten Absorptionsmaxima von **22** verglichen (Abb. 4.10). Die zu erkennende längerwellige Absorptionsbande bei 444 nm (**K5**) und 434 nm (**K6**) ist ähnlich zu der des Coumarin-Derivates **22** (445 nm) und demnach auf einen Charge Transfer (CT) des Coumarins zurückzuführen. Die Isomerie der 1,2,3-Triazol-1,4-diyl-Einheit hat, wie auch schon bei den Fluoroionophoren **K1** – **K4**, nur einen geringen Einfluss auf die Lage der Absorptionsmaxima. Die Intensitäten der längerwelligen Absorptionen dieser CT-Bande sind für beide Isomere annähernd gleich und unterliegen nur einer geringen Änderung in Gegenwart von 160 mM Kalium- bzw. Natrium-Ionen (Tab. 4.1). Die zweite, kurzwellige CT-Absorptionsbande lag mit 270 – 300 nm im gleichen Bereich wie für **K3** und **K4** und ist charakteristisch für π -konjugierte 1,2,3-Triazol-1,4-diyl-Fluoroionophore.^[52] In Gegenwart von 160 mM Kalium- bzw. Natrium-Ionen kam es bei beiden Isomeren zu einer unterschiedlichen Intensitätsabnahme dieser CT-Bande. Die Komplexierung der Ionen führte zu einem Herabsetzen des Elektronendonator-Charakters der Anilintriazol-Einheit.^[55,56] Daher kann davon ausgegangen werden, dass der signalgebende Mechanismus in **K5** und **K6** einen PET beinhaltet. Für **K5** war eine Abnahme der Intensität sowohl für Kalium- als auch Natrium-Ionen zu verzeichnen, wobei sie für Kalium-Ionen etwas stärker ausfiel. Es bindet somit beide Ionen, wenn auch unterschiedlich stark, was auf eine schlechtere Selektivität hindeutete. Für **K6** hingegen führte lediglich die Zugabe von Kalium-Ionen zu einer Abnahme der Intensität, was eine bessere Kalium-/Natrium-Selektivität vermuten ließ.

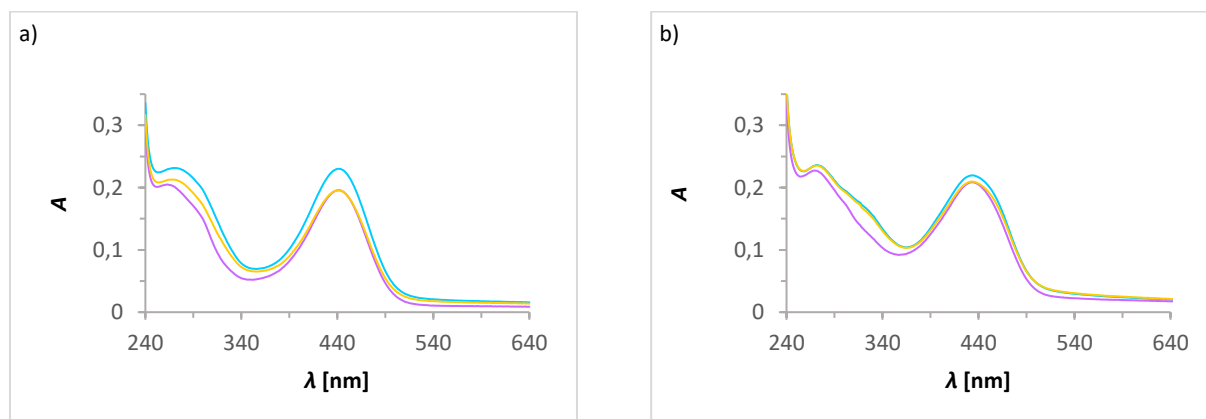


Abb. 4.10: Absorptionsspektren der Fluoroionophore **K5** und **K6**.

UV/VIS-Spektren ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2) in Gegenwart von 160 mM ChCl (türkis), 160 mM KCl (lila) und 160 mM NaCl (gelb) mit $\lambda_{\text{abs}} = 444$ nm und 434 nm für a) **K5** und b) **K6**.

Für die Fluoreszenztitrationsmessungen wurden anhand der Absorptionsmaxima die Anregungswellenlängen $\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$ (**K5**) und 430 nm (**K6**) gewählt. Die Fluoreszenzspektren von **K5** und **K6** zeigten im Vergleich zu **K3** und **K4** eine deutliche Rotverschiebung der Emissionsmaxima zu 517 nm (**K5**) und 511 nm (**K6**), jedoch waren die Werte der Fluoreszenzquantenausbeuten im unkomplexierten Zustand höher. Dies deutete auf einen schlechteren PET als in **K3** und **K4** hin (Tab. 4.1). Zu der schlechteren Fluoreszenzlöschung kommt es aufgrund der Einschränkung der Drehbarkeit der *N,N*-Diethylamino-Gruppe des Coumarins, da dies zu einem schwächeren intramolekularen Ladungstransfer innerhalb des Coumarins führt.^[24] Es konnten weiterhin leichte Unterschiede in der Fluoreszenzlöschung für die Isomere ausgemacht werden. In **K5** kam es zu einer etwas effizienteren Fluoreszenzlöschung als in **K6**, weshalb angenommen wird, dass die Anilin-Einheit von **K5**, wie bei **K1** und **K3**, eher planar zum Triazolring ist und in **K6** verdreht, wie es bei **K2** und **K4** der Fall ist.^[52,57] Während der Fluoreszenztitrationsmessungen der Konzentrationen von 0 – 160 mM Kalium-Ionen waren Steigungen der Fluoreszenzintensitäten von 1.6 (**K5**) und 2.9 (**K6**) zu beobachten, wobei für beide Isomere der maximale Anstieg der Intensität bei 140 mM Kalium-Ionen zu verzeichnen war (s. Anhang S6, S11). Die ermittelten Fluoreszenzquantenausbeuten bei 160 mM Kalium-Ionen lagen für **K5** bei $\varphi_{\text{fl}} = 0.10$ und **K6** bei $\varphi_{\text{fl}} = 0.36$. Titrationsmessungen im Bereich von 0 – 160 mM Natrium-Ionen führten bei beiden Isomeren nur zu einer geringen Steigerung der Fluoreszenzintensität. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten zeigte, dass es aufgrund der Änderung der fluorophoren Gruppe und bei gleichbleibenden *N*-(*o*-Methoxyethoxyphenyl)aza-[18]kronen-6-ether als Ionophor zu einem leichten Anstieg des K_d -Wertes kam. Dies lässt darauf schließen, dass die Komplexstabilität nicht nur durch die Isomerie des Fluoroionophores beeinflusst wird, sondern auch das verwendete Fluorophor als signalgebende Einheit einen Einfluss darauf haben muss (Abb. 4.11, Tab. 4.1).

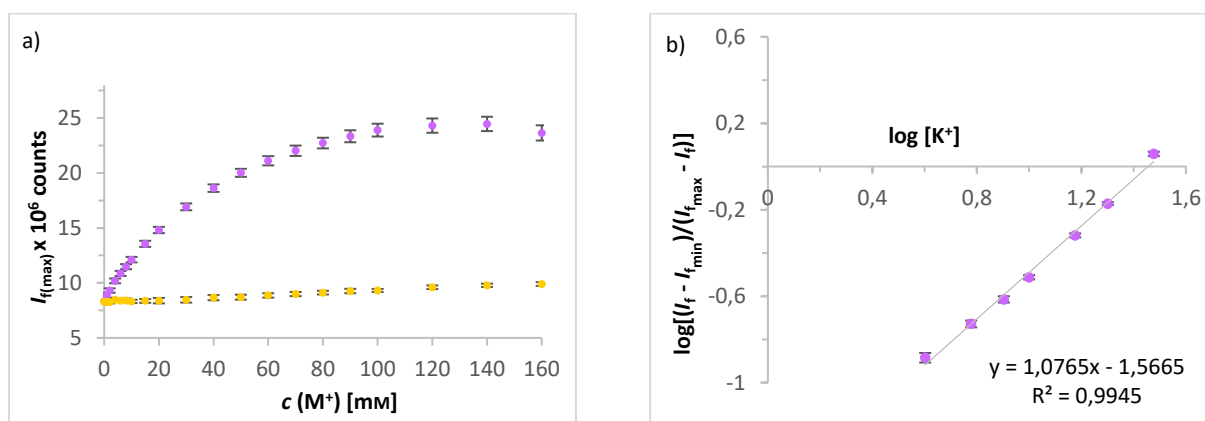


Abb. 4.11: Änderung der Fluoreszenzintensitäten von **K6** und Bestimmung der Dissoziationskonstante.

a) Fluoreszenztitrationsmessungen von **K6** ($c = 10^{-5} \text{ mol/l}$, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v , 10 mM Tris-Puffer, $\text{pH} = 7.2$, $\lambda_{\text{exc}} = 430 \text{ nm}$) bei 511 nm in Gegenwart von 160 mM KCl (lila) und 160 mM NaCl (gelb) b) Plot von $\log\left[\frac{I_f - I_{f(\text{min})}}{I_{f(\text{max})} - I_f}\right]$ **K6** + K^+ gegen $\log[\text{K}^+]$ zur Bestimmung von K_d .

Die Fluoreszenztitrationmessungen der Isomere in kombinierten Lösungen zeigten, dass die Steigerung der Fluoreszenzintensitäten und die Dissoziationskonstante bei Anwesenheit von Natrium-Ionen leicht beeinflusst werden. So konnte für **K5** eine Steigerung von 1.7 und für **K6** von 2.4 und für beide Isomere eine Dissoziationskonstante von 38 mM ermittelt werden (Abb. 4.12, s. Anhang S8).

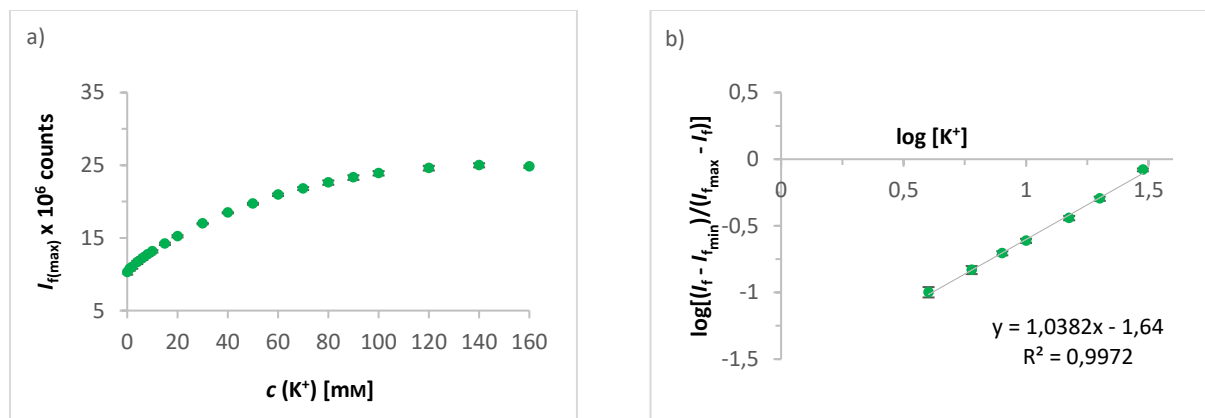


Abb. 4.12: Änderung der Fluoreszenzintensitäten von **K6** in kombinierten Lösungen und Bestimmung der Dissoziationskonstante.

a) Änderung der Fluoreszenzintensität von **K6** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $H_2O/DMSO$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{exc} = 430$ nm) bei 511 nm in Gegenwart von kombinierten K^+/Na^+ -Konzentrationen gleich 160 mM b) Plot von $\log\left(\frac{I_f - I_{f(\min)}}{I_{f(\max)} - I_f}\right)$ **K6** + K^+/Na^+ gegen $\log[K^+]$ zur Bestimmung von K_d .

Bei der Bestimmung der photophysikalischen Eigenschaften der Isomere **K5** und **K6** konnte festgestellt werden, dass die Isomerie im gleichen Maß Einfluss auf diese ausübt, wie es zuvor schon für **K3** und **K4** dokumentiert wurde. Die Anordnung über das Kohlenstoffatom (C4) des Triazols in **K6** führte zwar zu einer schlechteren Fluoreszenzlöschung im unkomplexierten Zustand, dennoch zeigte diese Anordnung eine stärkere Signaländerung bei der Komplexbildung der Kalium-Ionen, als das Isomer **K5** mit der Verknüpfung über das Stickstoffatom (N1) des Triazols. Die niedrigere Dissoziationskonstante für das Isomer **K6** deutete außerdem auf eine höhere Komplexstabilität hin, als es bei **K5** der Fall war. Weiterhin konnte mit der Einführung der neuen fluorophoren Gruppe im Gegensatz zum 7-Diethylaminocoumarin **9** eine Verschiebung der Emissionsmaxima um 18 nm und somit über 500 nm erreicht werden. Damit kann bei Messungen in Zellen eine Autofluoreszenz minimiert werden. Der größte Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute bei der Komplexbildung von Kalium-Ionen konnte mit Fluoroionophor **K6** erreicht werden. Sie konnte im Vergleich zu **K4** sogar verdoppelt werden (Tab. 4.1). Da anhand der photophysikalischen Eigenschaften der Fluoroionophore **K3** – **K6** angenommen werden konnte, dass die Anbindung der fluorophoren Gruppe über das Kohlenstoffatom (C4) des Triazols die effizientere ist, weil diese Regioisomere eine bessere Selektivität und größere Steigerungen der Fluoreszenzintensität bei der Komplexbildung zeigten, wurde im weiteren Verlauf bei der Entwicklung neuer Kalium-Ionen Fluoroionophore der Schwerpunkt auf diese Isomere gelegt.

	λ_{abs} [nm]	λ_{em} [nm]	$\varphi_{\text{fl}}^{[a]}$	FEF	$K_d^{K^+}$ [mM] ^[c]	$K_d^{K^+/Na^+}$ [mM] ^[d]	ϵ [$M^{-1} \text{cm}^{-1}$]	$\epsilon \cdot \varphi_{\text{fl}}$ [$M^{-1} \text{cm}^{-1}$]
K3	422	500	0.016	-	-	-	-	-
K3 + K⁺	422	500	0.068	3.7	19	29	-	-
K4	420	493	0.062	-	-	-	-	-
K4 + K⁺	420	493	0.184	2.5	26	29	-	-
K5	440	517	0.086	-	-	-	22952	1974
K5 + K⁺	440	517	0.096	1.6	34	38 (FEF 1.7)	19507	1873
K6	434	511	0.124	-	-	-	21961	2723
K6 + K⁺	434	511	0.355	2.8	29	38 (FEF 2.4)	20855	7404

Tab. 4.1: Photophysikalische Eigenschaften der Fluoroionophore **K3** - **K6**.

Photophysikalische Eigenschaften von **K3** – **K6**: untersucht in gepufferten H₂O/DMSO Gemischen (99:1, v/v, 10 mM Tris, pH = 7.2) in Ab- und Anwesenheit von K⁺- oder Na⁺-Ionen (160 mM). Die Ionenstärke wurde konstant bei 160 mM mit Cholinchlorid gehalten. [a] Fluoreszenzquantenausbeute \pm 15%, [b] Fluoreszenzsteigerungsfaktoren, FEF = I/I_0 [c] K_d für K⁺ Komplexe in Abwesenheit von Na⁺ ([K⁺] + [ChCl] = 160 mM) und [d] in Anwesenheit von Na⁺ ([K⁺] + [Na⁺] = 160 mM).^[57,101]

Die Schwankungen der Dissoziationskonstanten bei den mit Kalium-Ionen und mit kombinierten Kalium-/Natrium-Ionen Lösungen durchgeführten Titrations von bis zu 10 mM deuteten auf eine abnehmende Komplexstabilität in Gegenwart beider Ionen hin. Um diese zu erhöhen wurde ein neuer Ionophor mit einer Isopropoxy-Gruppe in *ortho* Position des *N*-Phenylaza-[18]krone-6-ethers synthetisiert. Es sollte festgestellt werden, inwieweit die Reduzierung von 7 auf 6 Sauerstoff-Donoratome die Koordination der Kalium-Ionen beeinflusst. Dieser wurde mit den zuvor verwendeten Fluorophoren von **K4** und **K6** via CuAAC zu den Fluoroionophoren **K7** und **K8** umgesetzt (Abb. 4.13). Zusätzlich wurde ein bis dahin noch unbekannter Fluorophor in alkin- und azidfunktionalisierter Form (**17** und **28**) synthetisiert, um diesen mit dem azidfunktionalisierten Ionophor **2d** umzusetzen. Grundlage hierfür war das bereits von Jones synthetisierte 4-trifluoromethyl-substituierte 7-Aminocoumarin **C8F** (Abb. 4.4), welches ebenfalls gute photophysikalische Eigenschaften aufwies.^[97]

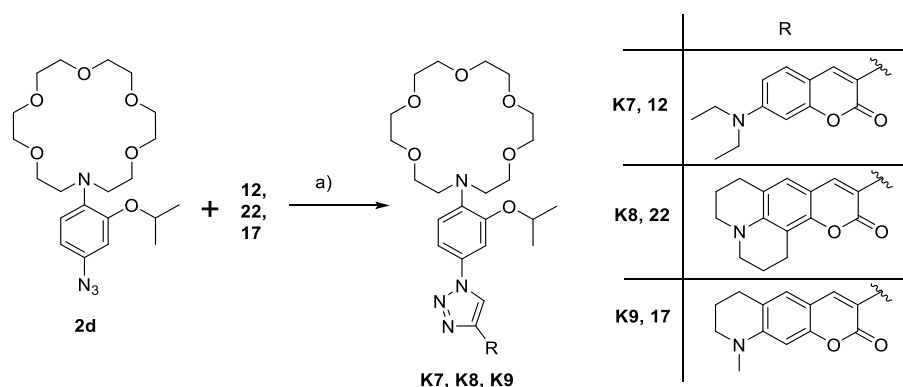


Abb. 4.13: Darstellung der Fluoroionophore **K7**, **K8** und **K9** mittels CuAAC.

a) CuSO₄ · 5 H₂O, Na-asc., THF/ H₂O (2:1, v/v), 60 °C.

Betrachtet man die Starrheit der *N,N*-Dialkylamino-Gruppe, so ordnet sich Verbindung **14** zwischen den Derivaten **9** und **19** ein. Die Beweglichkeit der am Stickstoffatom befindlichen Alkyl-Gruppen des Fluorophors nehmen in der Reihe von **K7** über **K9** zu **K8** ab. Somit können die Coumarin-Derivate **17** und **22** zusätzliche Erkenntnisse darüber liefern, inwieweit die Struktur des Fluorophors die photophysikalischen Eigenschaften des Fluoroionophores beeinflussen kann.

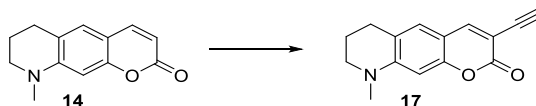
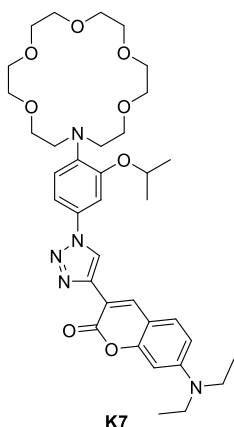


Abb. 4.14: Darstellung der Coumarine **14** und **17**.

Des Weiteren wurde sich für den Einsatz der alkin- bzw. azidfunktionalisierten Fluorophore des Coumarin-Derivates **14** entschieden, da dessen Stickstoffatom die Möglichkeit bieten kann, an dieser Position beliebige Substituenten wie Ester oder Carbonsäuren einzuführen, um den Fluoroionophor somit an biologische Strukturen koppeln zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte Coumarin-Derivat **14** erstmals in alkin- bzw. azidfunktionalisierter Form dargestellt werden. Die Bestimmung der photophysikalischen Eigenschaften des Fluorophors **17** in einer 10 mM Tris-Puffer Lösung (pH = 7.2) ergaben ein Absorptionsmaximum von 430 nm, ein Emissionsmaximum von 492 nm und eine Fluoreszenzquantenausbeute von $\varphi_{fl} = 0.76$ (s. Anhang S4). Die synthetisierten Fluoroionophore **K7**, **K8** und **K9** wurden im Anschluss hinsichtlich ihrer photophysikalischen Eigenschaften untersucht und mit den zuvor hergestellten Fluoroionophoren verglichen.



Die aufgenommenen UV/VIS-Spektren von Fluoroionophor **K7** zeigten die zwei charakteristischen CT-Absorptionsbanden (s. Anhang S14). Die längerwellige CT-Absorptionsbande konnte, wie schon bereits für **K2** und **K4**, bei rund 420 nm festgestellt werden und ist dem 7-Diethylaminocoumarin zuzuordnen. In Gegenwart von Kalium- bzw. Natrium-Ionen blieb diese Bande in ihrer Lage und Intensität unverändert. Dies ist charakteristisch für fluoreszierende PET-Systeme. Die für 1,2,3-Triazol-1,4-diyl Fluoroionophore charakteristische kurzwellige CT-Absorptionsbande konnte im Bereich von 270 – 300 nm ermittelt und zeigte nur in Gegenwart von Kalium-Ionen eine Abnahme in ihrer

Intensität. Dies lässt darauf schließen, dass vorrangig die Komplexbildung von Kalium-Ionen stattfindet und diese für eine Reduzierung der Elektronendonorfähigkeit verantwortlich ist. Es war auch ein Hinweis darauf, dass hier eine sehr gute Kalium-/Natrium-Selektivität vorliegen könnte. Um dies genauer zu untersuchen wurden im Anschluss Fluoreszenztitrationen durchgeführt.

Aufgrund des ermittelten Absorptionsmaximums wurden diese bei einer Anregungswellenlänge von 420 nm durchgeführt, wobei für das Fluoroionophor **K7** im unkomplexierten Zustand ein Emissionsmaximum von 494 nm und eine Fluoreszenzquantenausbeute von $\varphi_{fi} = 0.060$ bestimmt werden konnte (s. Anhang S15). Beide Werte stimmten mit den bisher veröffentlichten Werten von **K2** und **K4** überein und sind somit charakteristisch für das 7-Diethylaminocoumarin Fluorophor im wässrigen Medium. Dies lässt darauf schließen, dass die Donorfähigkeit des Stickstoffatoms in der Anilin-Einheit im Wesentlichen vom Elektronenzug der 1,2,3-Triazol-Einheit in *para* Position beeinflusst wird und weniger von der Anzahl der Sauerstoff-Donoratome. Der niedrige Wert der Fluoreszenzquantenausbeute deutet insgesamt auf einen gut funktionierenden PET entlang des virtuellen Spacer hin. Fluoreszenztitrationmessungen in Gegenwart von Kalium-Ionen zeigten einen maximalen Anstieg der Fluoreszenzintensität bei einer Konzentration von 160 mM um das 2.3-fache. In Gegenwart von 160 mM Kalium-Ionen konnte eine Erhöhung der Fluoreszenzquantenausbeute auf $\varphi_{fi} = 0.140$ festgestellt werden. Diese Änderungen liegen in etwa im selben Bereich wie die der Fluoroionophore **K2** und **K4** und sind auf das 7-Diethylaminocoumarin zurückzuführen. Während der Titrationsmessungen in Gegenwart von Natrium-Ionen im Bereich von 0–160 mM konnte kein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität festgestellt werden und auch die Fluoreszenzquantenausbeute blieb nahezu unverändert. Dies war ein weiterer Hinweis auf eine sehr gute Kalium-/Natrium-Selektivität (Abb. 4.15, Tab. 4.2).

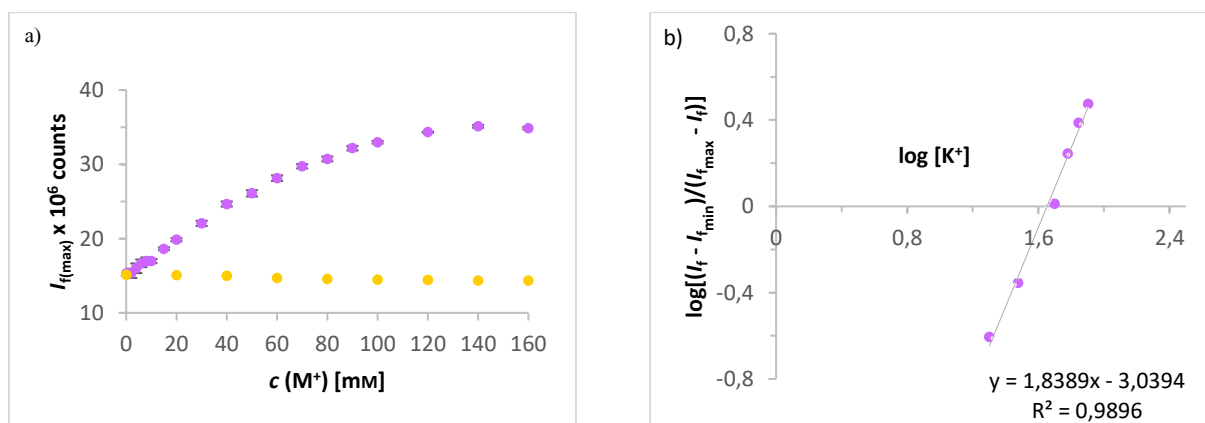


Abb. 4.15: Änderung der Fluoreszenzintensitäten von **K7** und Bestimmung der Dissoziationskonstante.

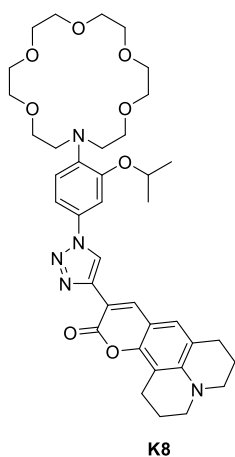
K7 ($c = 10^{-5}$ mol/l, $H_2O/DMSO$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2) a) Fluoreszenztitrationmessungen bei 494 nm in Gegenwart von 160 mM KCl (lila) und 160 mM NaCl (gelb) $\lambda_{exc} = 420$ nm b) Plot von $\log\left[\frac{I_f - I_{f(\min)}}{I_{f(\max)} - I_f}\right]$ **K7** + K^+ gegen $\log[K^+]$ zur Bestimmung von K_d .^[36]

Die darauffolgenden Fluoreszenztitrationen in Gegenwart beider Ionen ergaben, wie bei den Natrium-Ionen freien Messungen, ebenfalls einen Anstieg der Fluoreszenzintensität um das 2.3-fache. Dies spricht dafür, dass bei Fluoroionophor **K7** eine ausgezeichnete Kalium-/Natrium-Selektivität vorliegt. Im Anschluss daran wurden die Dissoziationskonstanten der Kalium-Ionen Titrations und der der kombinierten Lösungen beim Emissionsmaximum von 494 nm bestimmt, um genaueres über die

Komplexstabilitäten zu erfahren. Es stellte sich heraus, dass die gleichzeitige Anwesenheit von Natrium-Ionen keinen Einfluss auf die Komplexstabilität der gebildeten Kalium-Ionen Komplexe hatte, da für beide Titrationsen eine Dissoziationskonstante von 45 mM ermittelt werden konnte. Im Vergleich zu den mit einer Methoxyethoxy-Gruppe in *ortho* Position des *N*-Phenylaza-[18]krone-6 substituierten Fluoroionophor **K4** war die Dissoziationskonstante aber gestiegen. Dies lässt die Annahme zu, dass mit einem Anstieg der sterischen Hinderung des in *ortho* Position befindlichen Substituenten die Komplexstabilität abnimmt. Dennoch behindert der sperrige Isopropoxy-Substituent offensichtlich überwiegend die Komplexierung der Natrium-Ionen, wodurch diese ausgezeichnete Kalium-/Natrium-Selektivität zustande kommt.

K7 ist mit einer Dissoziationskonstante von 45 mM zwar weniger empfindlich für Messungen des extrazellulären Kalium-Ionen Spiegels, kann aber aufgrund seiner hervorragenden Selektivität gegenüber Natrium-Ionen für eine *in vitro* Überwachung von Kalium-Ionen Konzentrationen im Bereich von 10 – 80 mM angewendet werden.

Um den Einfluss des neu eingeführten *N*-(*o*-Isopropoxyphenyl)aza-[18]krone-6-ether Ionophors auf Eigenschaften wie Selektivität oder Komplexstabilität noch besser verstehen zu können, wurde im Anschluss der azidfunktionalisierte Ionophor **2d** mit dem alkinfunktionalisierten Fluorophor **22** in Form einer CuAAC zum Fluoroionophor **K8** umgesetzt und auf seine photophysikalischen Eigenschaften hin untersucht (Abb. 4.13).



Den aufgenommenen UV/VIS-Spektren von **K8** konnten die zwei typischen Absorptionsbanden entnommen werden, die bisher auch bei den anderen Fluoroionophoren zu finden waren (s. Anhang S19). Dabei war die längerwellige Absorptionsbande bei 434 nm identisch mit der bei **K6** und ist auf den Fluorophor zurückzuführen. Bei Zugabe von Kalium- bzw. Natrium-Ionen blieb diese nahezu unverändert in ihrer Lage und Intensität. Die zweite CT-Absorptionsbande im kurzwelligen Bereich von 270 – 300 nm ist die, für die 1,2,3-Triazol-1,4-diyl-Einheit, charakteristische CT-Bande. In Gegenwart von Kalium- bzw. Natrium-Ionen nahm diese in ihrer Intensität ab, wobei für Kalium-

Ionen eine intensivere Abnahme zu beobachten war. Dies deutete auf eine stärkere Komplexierung der Kalium-Ionen hin. Um Aussagen über die Selektivität und Komplexstabilität treffen zu können, wurden im Anschluss Fluoreszenztitrationsmessungen durchgeführt und die Fluoreszenzquantenausbeuten bestimmt. Wie zuvor für **K6** wurden hierfür Anregungswellenlängen von 430 nm gewählt. Während der Titrationsmessungen konnte, wie auch schon bei **K6**, ein Emissionsmaximum von 511 nm festgestellt werden (s. Anhang S20). Für den unkomplexierten Zustand konnte für **K8** eine Fluoreszenz-quantenausbeute von $\varphi_{fl} = 0.13$ ermittelt werden, die

vergleichbar ist mit der von **K6**. Dies deutet auf einen weniger gut funktionierenden PET-Mechanismus bei der Verwendung des Coumarin-Derivates **19** als fluorophore Gruppe hin (Tab. 4.2). Grund hierfür ist die Einschränkung der Drehbarkeit der *N,N*-Diethylamino-Gruppe und folglich ein schwächerer intramolekularer Ladungstransfer im Coumarin.^[106] Die Titrationsmessungen der Kalium-Ionen zeigten eine maximale Steigerung der Fluoreszenzintensität bei 140 mM um das 4.1-fache (Abb. 4.16). Diese fiel zwar deutlich höher aus als bei **K6** und **K7**, die bestimmte Fluoreszenzquantenausbeute bei 160 mM Kalium-Ionen war jedoch nur auf $\varphi_{fl} = 0.35$ gestiegen, was annähernd den Anstieg von **K6** entsprach. Während der Titrationsmessungen der Natrium-Ionen kam es im gewählten Bereich bis 160 mM zu einer Steigerung der Fluoreszenzintensität um 1.6-fache mit einer Fluoreszenzquantenausbeute von $\varphi_{fl} = 0.16$ (Abb. 4.16). Dies deutete darauf hin, dass sich die herausragende Kalium-/Natrium-Selektivität von Fluoroionophor **K7** durch die Einführung des Fluorophors **19** verschlechterte.

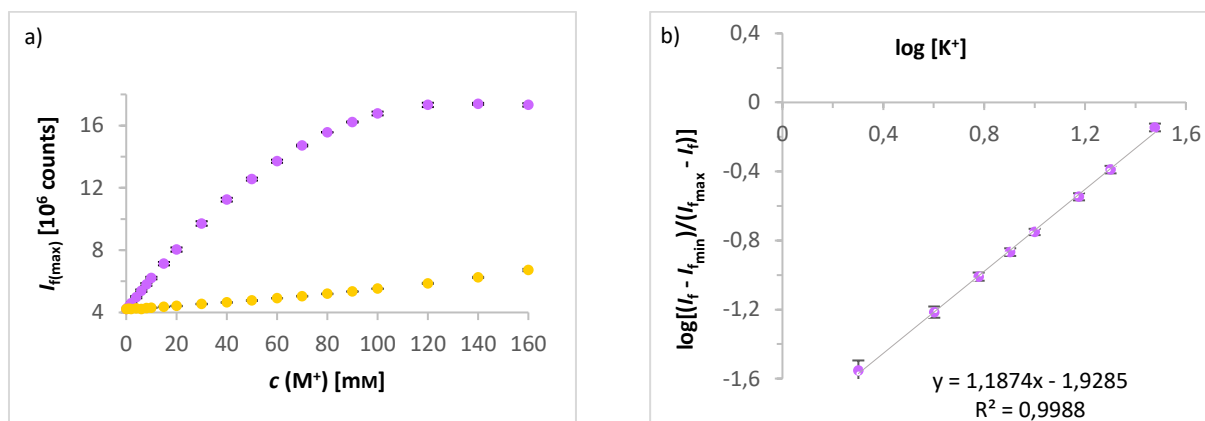


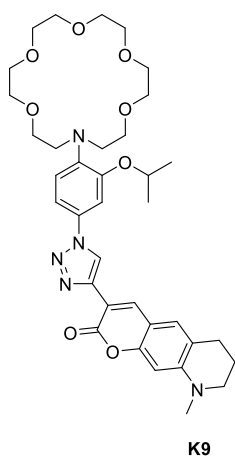
Abb. 4.16: Änderung der Fluoreszenzintensitäten von **K8** und Bestimmung der Dissoziationskonstante.

K8 ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2) a) Fluoreszenztitrationsmessungen bei 511 nm in Gegenwart von 160 mM KCl (lila) und 160 mM NaCl (gelb) mit $\lambda_{exc} = 430$ nm b) Plot von $\log\left[\frac{I_f - I_{f(min)}}{I_{f(max)} - I_f}\right]$ **K8** + K⁺ gegen $\log [K^+]$ zur Bestimmung von K_d .

Um feststellen zu können, inwieweit die gleichzeitige Anwesenheit von Natrium-Ionen die Komplexierung der Kalium-Ionen beeinflusst, wurden anschließend Fluoreszenztitrationsmessungen in kombinierten Kalium-/Natrium-Ionen Lösungen durchgeführt. Hierbei konnte eine maximale, durch Kalium-Ionen induzierte, Steigerung der Fluoreszenzintensität bei 140 mM um das 3.2-fache bestimmt werden (s. Anhang S23). Diese ist etwas geringer als in den Natrium-Ionen freien Messungen und spricht dafür, dass **K8** zu einem gewissen, wenn auch kleinen, Maß Natrium-Ionen komplexiert und eine etwas schlechtere Selektivität als in **K7** vorliegt. Um abschließend feststellen zu können, inwieweit die gleichzeitige Anwesenheit von Natrium-Ionen die Stabilität des Kalium-Ionen Komplexes beeinflusst, wurden die Dissoziationskonstanten beim Emissionsmaximum von 511 nm beider Titrationsmessungen bestimmt. Daraus ergab sich für die Kalium-Ionen Titrationsmessungen einen K_d -Wert von 42 mM und für Kalium-/Natrium-Ionen Titrationsmessungen einen K_d -Wert von 45 mM. Dies lässt darauf schließen, dass Messungen der Kalium-Ionen in Gegenwart von Natrium-Ionen von diesen nur leicht beeinflusst

werden. Ungeachtet dessen kann Fluoroionophor **K8** trotz seiner etwas geringeren Selektivität als **K7** für *in vitro* Überwachungen von Kalium-Ionen Konzentrationen im Bereich von 2 – 30 mM genutzt werden, da in diesem Bereich bereits schon eine Steigerung der Fluoreszenzintensität um das 2.3-fache stattfindet und für Natrium-Ionen lediglich um das 1.07-fache. Für *in vivo* Messungen des extrazellulären Kalium-Ionen Spiegels ist **K8** aufgrund seiner geringeren Kalium-/Natrium-Selektivität jedoch weniger gut geeignet.

Um weitere Erkenntnisse über das Verhalten der photophysikalischen Eigenschaften des Ionophors *N*-(*o*-Isopropoxyphenyl)aza-[18]krone-6ether sammeln zu können, wurde der azidfunktionalisierte Ionophor **2d** abschließend mit dem alkinfunktionalisierten Fluorophor **17** zum Fluoroionophor **K9** in Form einer CuAAC umgesetzt (Abb. 4.13).



Anhand der aufgenommenen UV/VIS-Spektren konnten für **K9** ebenfalls die zwei charakteristischen CT-Absorptionsbanden festgestellt werden. Dabei ist die längerwellige CT-Absorptionsbande mit einem Maximum von 425 nm dem Fluorophor zuzuordnen, welches gut mit dem zuvor bestimmten Maximum von 430 nm des alkinfunktionalisierten Fluorophor **17** übereinstimmte (s. Anhang S4). In Gegenwart von Kalium- bzw. Natrium-Ionen unterlag diese Absorptionsbande keiner merklichen Änderung in Lage und Intensität. Die zweite kurzwellige CT-Absorptionsbande im Bereich von 250 – 280 nm ist charakteristisch für die 1,2,3-Triazol-1,4-diy-Einheit. In Gegenwart von Kalium-

bzw. Natrium-Ionen verringerte sich dessen Intensität. Dabei führte die Komplexierung der Kalium-Ionen zu einer deutlich stärkeren und die Komplexierung von Natrium-Ionen nur zu einer sehr geringen Abnahme der Intensität (Abb. 4.17).

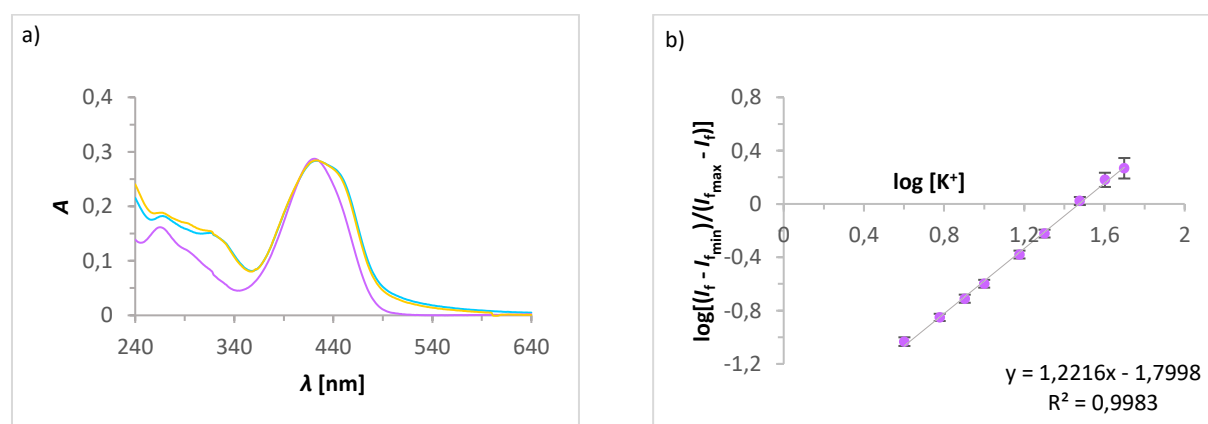


Abb. 4.17: Absorptionsspektren von **K9** und Bestimmung der Dissoziationskonstante.

K9 ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2) a) UV/VIS-Spektren in Gegenwart von 160 mM ChCl (türkis), 160 mM KCl (lila) und 160 mM NaCl (gelb) mit $\lambda_{\text{abs}} = 425$ nm b) Plot von $\log[(I_t - I_{\text{min}})/(I_{\text{max}} - I_t)]$ **K9** + K⁺ gegen $\log[K^+]$ zur Bestimmung von K_d .

Anhand des ermittelten Absorptionsmaximums bei 425 nm wurden für die folgenden Fluoreszenztitrationmessungen Anregungswellenlängen von 420 nm gewählt. Es konnte für **K9** ein Emissionsmaximum von 498 nm bestimmt werden (s. Anhang S24). Die Fluoreszenzquantenausbeute im unkomplexierten Zustand lag bei $\varphi_{fl} = 0.120$, was in etwa der von **K8** entsprach, da die eingeschränkte Drehbarkeit der *N,N*-Diethylamino-Gruppe einen schwächeren intramolekularen Ladungstransfer hervorruft, was sich in einer weniger guten Fluoreszenzlöschung äußert.^[106]

Die anschließenden Fluoreszenztitrationmessungen in Gegenwart von Kalium-Ionen im Bereich von 0 – 160 mM zeigten einen veränderten Verlauf zu den bisherigen bestimmten von **K5** – **K8**. Hierbei kam es bei den Konzentrationen von 0 – 40 mM zu dem gewohnten, nahezu linearen, Anstieg der Fluoreszenzintensität, jedoch zeigten die Konzentrationen von 60 – 80 mM die Ausbildung eines Plateaus, welches ab 90 mM wieder in einen Anstieg überging (s. Anhang S26). Mögliche Ursache für dieses Verhalten im Anstieg der Fluoreszenz könnte sein, dass es während der Ausbildung der Komplexe nicht nur wie gewohnt zu einer eins zu eins Komplexbildung kommt, sondern auch die Ausbildung von Sandwichkomplexen mit entweder zwei Kationen oder zwei Farbstoffmolekülen stattfindet. Die ermittelte maximale Steigerung der Fluoreszenzintensität um das 4.7-fache konnte bei 140 mM Kalium-Ionen festgestellt werden. Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute bei einer Konzentration von 160 mM Kalium-Ionen lag bei $\varphi_{fl} = 0.450$. Aufgrund der Ausbildung eines Plateaus wurden zur genaueren Betrachtung nur die Konzentrationen von 0 – 60 mM verwendet. Für diesen Bereich konnte eine Fluoreszenzquantenausbeute von $\varphi_{fl} = 0.38$ und ein Anstieg der Fluoreszenzintensität um das 3.5-fache bestimmt werden. Im Vergleich dazu führte die Titration von 0 – 160 mM Natrium-Ionen zu einem konstanten Anstieg der Fluoreszenzintensität um 1.6-fache (s. Anhang S26). Des Weiteren wurde in Gegenwart von 160 mM Natrium-Ionen eine Fluoreszenzquantenausbeute von $\varphi_{fl} = 0.160$ festgestellt, was auf eine geringere Selektivität als für **K7** hindeutete. Die Betrachtung der Fluoreszenzintensitäten im Bereich von 0 – 60 mM Natrium-Ionen ergab sogar nur eine Steigerung um das 1.2-fache mit einer Fluoreszenzquantenausbeute von $\varphi_{fl} = 0.140$. Titrationmessungen in den kombinierten Kalium-/Natrium-Ionen Lösungen zeigten einen ähnlichen Verlauf, wie die der Natrium-Ionen freien Lösungen. Hier kam es in dem Konzentrationsbereich von 0 – 40 mM Kalium-Ionen zu einem linearen Anstieg der Fluoreszenzintensität. Im Konzentrationsbereich von 50 – 70 mM Kalium-Ionen (110 – 90 mM Natrium-Ionen) kam es zu einer leichten Abnahme der Fluoreszenzintensität, die ab 80 – 160 mM Kalium-Ionen wieder anstieg. Eine maximale Änderung der Fluoreszenzintensität konnte bei 140 mM um das 2.7-fache bestimmt werden (Anhang S28). Eine Auswertung bzw. die Berechnung der Dissoziationskonstante, um Aussagen über die Komplexstabilität von **K9** treffen zu können, konnte an dieser Stelle nur unter Vorbehalt durchgeführt werden. Dabei konnte für die Kalium-Ionen Titrationen im Bereich von 0 – 60 mM ein K_d -Wert von 30 mM bestimmt werden und für die Titrationmessungen

in den kombinierten Kalium-/Natrium-Ionen Lösungen im Bereich von 0 – 40 mM Kalium-Ionen ebenfalls ein K_d –Wert von 30 mM. Es besteht also die Annahme, dass Fluoroionophor **K9** im Bereich von 0 – 40 mM einen selektiven Nachweis von Kalium-Ionen bei *in vitro* Bestimmungen liefern könnte.

Abschließend kann für die Darstellung dieser neuen Kalium-Fluoroionophore, die auf einer Änderung der Fluoreszenzintensität beruhen angenommen werden, dass die Einführung der unterschiedlichen Alkoxy-Gruppen in *ortho* Position zum Anilindonor keinen signifikanten Einfluss auf die Fluoreszenzlöschung hat, da sowohl in den unsubstituierten **K2**, als auch in den substituierten Fluoroionophoren **K4** und **K7** eine gleich starke Löschung der Fluoreszenz festgestellt wurde. Die Fluoreszenzlöschung wurde einzig durch das Variieren der fluorophoren Gruppe beeinflusst und verschlechterte sich mit zunehmender Starrheit der *N,N*-Diethylamino-Gruppe wie in den Fluoroionophoren **K8** und **K9**. Die Donorfähigkeit des Stickstoffatoms in der Anilin-Einheit wird also im Wesentlichen vom Elektronenzug der 1,2,3-Triazol-Einheit in *para* Position beeinflusst. Durch die Variation der fluorophoren Gruppe in **K6** und **K8** konnte eine Rotverschiebung des Emissionsmaximums um 18 nm über 500 nm und eine Steigerung der Fluoreszenzintensität und Fluoreszenzquantenausbeute erreicht werden. Die größte Verbesserung der Kalium-/Natrium-Selektivität konnte mit **K7** realisiert werden.

	λ_{abs} [nm]	λ_{em} [nm]	$\varphi_{\text{fl}}^{[a]}$	FEF ^[b]	$K_d^{K^+}$ [mM] ^{[c],[d]}	ϵ [$M^{-1} \text{cm}^{-1}$]	$\epsilon \cdot \varphi_{\text{fl}}$ [$M^{-1} \text{cm}^{-1}$]
K7	419	494	0.060	-	-	28550	1713
K7 + K^+	419	494	0.140	2.3	45	27892	3905
K7 + Na^+	419	494	0.061	1.0	-	28111	1715
K7 + K^+/Na^+	419	494	-	2.3	45	-	-
K8	434	511	0.133	-	-	24239	3224
K8 + K^+	434	511	0.346	4.1	42	23374	8087
K8 + Na^+	434	511	0.159	1.6	130	24338	3870
K8 + K^+/Na^+	434	511	-	3.1	45	-	-
K9	425	498	0.128	-	-	28343	3628
K9 + $K^{+[e]}$	425	498	0.382	3.5	30	28436	10863
K9 + $Na^{+[e]}$	425	498	0.142	1.2	149	28392	4032
K9 + $K^+/Na^{+[f]}$	425	498	-	1.9	31	-	-

Tab. 4.2: Photophysikalische Eigenschaften der Fluoroionophore **K7**, **K8** und **K9**.

Photophysikalische Eigenschaften von **K7** – **K9**: untersucht in gepufferten $H_2O/DMSO$ Gemischen (99:1, v/v, 10 mM Tris, pH = 7.2) in Ab- und Anwesenheit von K^+ - oder Na^+ -Ionen (160 mM). Die Ionenstärke wurde konstant bei 160 mM mit Cholinchlorid gehalten. [a] Fluoreszenzquantenausbeute: $\pm 15\%$ [b] Fluoreszenzsteigerungsfaktoren, $FEF = I/I_0$ [c] K_d für K^+ Komplexe in Abwesenheit von Na^+ ($[K^+] + [ChCl] = 160 \text{ mM}$), [d] in Anwesenheit von Na^+ ($[K^+] + [Na^+] = 160 \text{ mM}$) und [e] Auswertung erfolgte nur für den Bereich von 0 – 60 mM K^+ -Ionen und [f] 0 – 40 mM K^+ -Ionen.

4.4 Synthese neuer Natrium-Ionen Fluoroionophore basierend auf Änderungen der Fluoreszenzintensität (Na3 – Na10)

Da die von S. AST synthetisierten und spektroskopisch untersuchten Fluoroionophore **Na1** und **Na2** bereits Hinweise darauf lieferten, dass die Regioisomerie auch hier einen Einfluss auf die photophysikalischen Eigenschaften haben muss, wurde der bereits verwendete Ionophor, *N*-(*o*-Methoxyphenyl)aza-[15]krone-5-ether, zu Beginn mit den alkin- und azidfunktionalisierten Coumarinen-Derivaten von **22** und **31** mit Hilfe einer CuAAC modifiziert und die resultierenden Fluoroionophore **Na3** und **Na4** auf ihre photophysikalischen Eigenschaften hin untersucht (Abb. 4.18, Tab. 4.3).

Für die Erfassung der photophysikalischen Eigenschaften der Natrium-Ionen Fluoroionophore wurden ebenfalls Untersuchungen unter simuliert physiologischen Bedingungen durchgeführt. Hierfür wurden Stammlösungen der Fluoroionophore mit einer Konzentration von 10^{-3} mol/l in DMSO hergestellt, welche zur Vorbereitung der jeweiligen Messungen mit einer 10 mM Tris-Puffer Lösung (pH = 7.2) auf 10^{-5} mol/l verdünnt wurden (H₂O/DMSO, 99:1, v/v). Für die Ermittlung der Emissionsmaxima und der Dissoziationskonstanten, sowie der Veranschaulichung von Selektivitäten wurden Fluoreszenztitrationsmessungen mit Hilfe von Kalium- bzw. Natrium-Ionen Lösungen im Bereich von 0 – 1000 mM durchgeführt. Wurden Messungen in kombinierten Natrium-/Kalium-Ionen Lösungen durchgeführt, wurde im Bereich von 0 – 1000 mM Natrium-Ionen bei konstanter Anwesenheit von 10 mM bzw. 135 mM Kalium-Ionen titriert. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten der gebildeten Komplexe erfolgte mit Hilfe einer linearen Regression der Emissionsmaxima zu den entsprechenden Natrium-Ionen Konzentrationen.^[83]

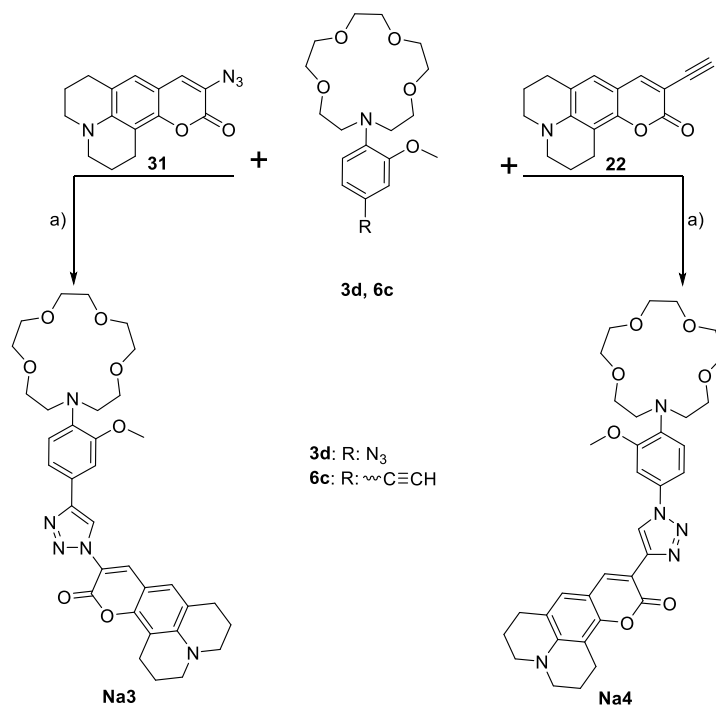


Abb. 4.18: Darstellung der Fluoroionophore **Na3** und **Na4** mittels CuAAC.

a) $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, Na-asc., THF/ H_2O (2:1, v/v), 60 °C.

Mithilfe der aufgenommenen UV/VIS-Spektren der Fluoroionophore **Na3** und **Na4** wurden die zwei charakteristischen CT-Absorptionsbanden, wie schon zuvor für die Kalium-Fluoroionophore, identifiziert. Die längerwelligen CT-Banden, bei 440 bzw. 435 nm, sind dem Fluorophor zuzuordnen und blieben in Gegenwart von 1000 mM Natrium- bzw. Kalium-Ionen in ihrer Lage und Intensität unverändert. Die im Bereich von 270 – 300 nm liegenden kurzwelligen CT-Banden wurden durch die Zugabe von Natrium- bzw. Kalium-Ionen in ihrer Intensität herabgesenkt und sind den 1,2,3-Triazol-1,4-diy-Einheiten zuzuordnen. Diese weisen auf einen abnehmenden Elektronendonator-Charakter bei der Komplexierung der Ionen hin. Dabei ist die Intensitätsabnahme für **Na3** bei Natrium-Ionen stark und für Kalium-Ionen nur gering ausgeprägt (Abb. 4.19). Isomer **Na4** weist dagegen für beide Ionen eine Abnahme der Intensität auf (s. Anhang S34). Aufgrund der Reduktion der Elektronendonorstärke durch die Komplexierung der Ionen wird angenommen, dass in beiden Isomeren als signalgebender Mechanismus ein PET vorliegt, bei dem die Löschung der Fluoreszenz durch die Komplexierung der Ionen verhindert wird. Die Bestimmungen der Fluoreszenzquantenausbeuten von **Na3** und **Na4** zeigten, dass es zu einer effizienteren Löschung der Fluoreszenz im Isomer **Na3** kam. In diesem sind die 1,2,3-Triazol-1,4-diy-Einheit und der Fluorophor über das Stickstoffatom (N1) miteinander verbunden. In Gegenwart von 1000 mM Natrium- bzw. Kalium-Ionen konnte mit Hilfe von Fluoreszenzquantenausbeuten festgestellt werden, dass es für **Na3** zu einer größeren Signaländerung kommt und dass für **Na3** eine bessere Selektivität als für **Na4** vorliegen könnte (Tab. 4.3). Zur genaueren Betrachtung wurden von **Na3** und **Na4** Fluoreszenztitrationsmessungen von 0 – 1000 mM Natrium- bzw. Kalium-Ionen bei den Anregungswellenlängen von 440 bzw. 435 nm durchgeführt. Die

daraus resultierenden Emissionsmaxima bei 517 nm bzw. 509 nm waren im Vergleich zu den bisher dargestellten Isomeren **Na1** und **Na2** (Tab. 1.5) deutlich bathochrom verschoben. In Gegenwart von Natrium-Ionen kam es zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität, welcher für **Na3** doppelt so groß war als für **Na4** (s. Anhang S29, S35). Im Gegensatz dazu kam es bei den Titrationsmessungen in Gegenwart von Kalium-Ionen bei beiden Isomeren zu einem vergleichbaren Anstieg der Fluoreszenzintensitäten. Dies lässt darauf schließen, dass beide Isomere bis zu einem gewissen Grad auch Kalium-Ionen komplexieren können (Abb. 4.19, s. Anhang S34).

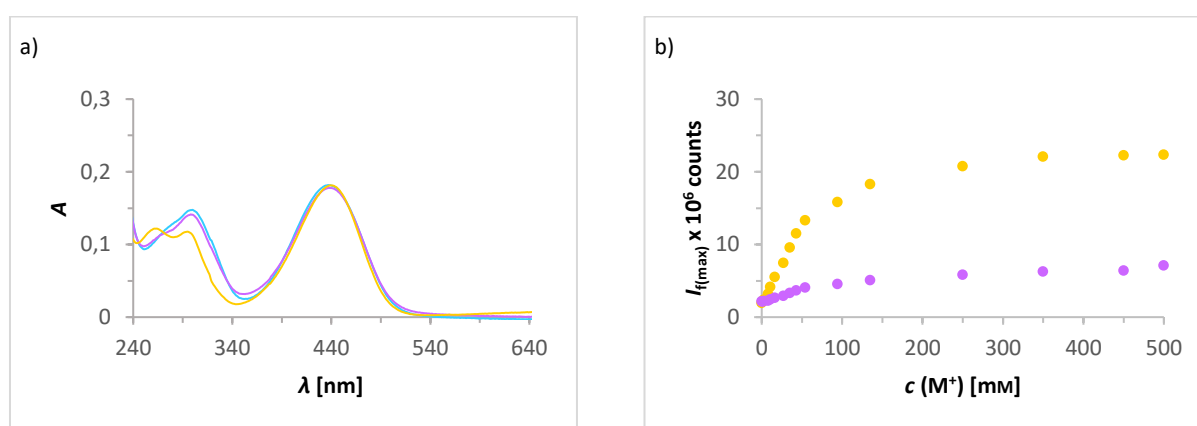


Abb. 4.19: Absorptionsspektren und Änderung der Fluoreszenzintensitäten von **Na3**.

Na3 ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2) a) UV/VIS-Spektren in Gegenwart von 10 mM Tris-Puffer (türkis), 1000 mM KCl (lila) und 1000 mM NaCl (gelb) mit $\lambda_{\text{abs}} = 440$ nm b) Änderung der Fluoreszenzintensität bei 517 nm in Gegenwart von 500 mM KCl (lila) und 500 mM NaCl (gelb).

Mit Hilfe der bestimmten Dissoziationskonstanten wurden die einzelnen Komplexstabilitäten genauer untersucht. Es konnten im Vergleich zu **Na1** und **Na2** durch die Variation der fluorophoren Gruppe bei **Na3** und **Na4** jeweils bessere Komplexstabilitäten erreicht werden. Mit einem K_d -Wert von 48 mM war diese in **Na3** besser ausgeprägt als in **Na4** mit einem K_d -Wert von 152 mM. Dies bestätigt die Annahme, dass die Komplexstabilität auch im Zusammenhang mit der Regioisomerie am Triazolring steht (s. Anhang S31, S37). Da die Steigerung der Fluoreszenzintensität für **Na4** in Gegenwart von 1000 mM Kalium-Ionen waren in etwa halb so groß wie für Natrium-Ionen. Daraus kann geschlossen werden, dass durch die Anordnung, bei der der Anilin-Elektronendonator über das Stickstoffatom (N1) und der Fluorophor über das Kohlenstoffatom (C4) des Triazols miteinander verbunden sind, eine weniger gute Selektivität mit sich bringt. Anders als in **Na3**, bei dem die Steigerung der Intensität bei Natrium-Ionen viermal höher ist als bei Kalium-Ionen, liegt hier eine bessere Selektivität vor. In Bezug auf den K_d -Wert von 48 mM für **Na3** wurden im Anschluss Titrationsmessungen unterschiedlicher Natrium-Ionen Konzentrationen in Anwesenheit von 135 mM Kalium-Ionen, welche der intrazellulären Konzentration entspricht, durchgeführt. Diese führten zu einer Steigerung der Fluoreszenzintensität um das 5.5-fache und zu einer Dissoziationskonstante von 42 mM (s. Anhang S33). Die gleichzeitige Anwesenheit von Kalium-Ionen hatte demzufolge einen minimalen Einfluss auf die Komplexstabilität

von **Na3**. Dennoch ist Fluoroionophor **Na3** dafür geeignet, selektiv intrazelluläre Natrium-Ionen Konzentrationen in Gegenwart von intrazellulären Kalium-Ionen Konzentrationen zu kontrollieren. **Na4** hingegen ermöglicht es, extrazelluläre Natrium-Ionen Konzentrationen zu bestimmen, jedoch nur in Abwesenheit von Kalium-Ionen.

	λ_{abs} [nm]	λ_{em} [nm]	$\phi_{\text{fl}}^{[\text{a}]}$	FEF ^[b]	K_{d} [mM] ^[c]	ϵ [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]	$\epsilon \cdot \phi_{\text{fl}}$ [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]
Na3	440	517	0.025	-	-	18115	453
Na3 + Na⁺	440	517	0.275	10.9	48	17760	4884
Na3 + K⁺	440	517	0.067	2.7	68	18109	1213
Na3 + Na⁺/K⁺ ^[d]	440	517	-	5.5	42	-	-
Na4	435	509	0.096	-	-	18697	1795
Na4 + Na⁺	435	509	0.346	4.6	152	19373	6703
Na4 + K⁺	435	509	0.227	2.5	327	19308	4383

Tab. 4.3: Photophysikalische Eigenschaften der Fluoroionophore **Na3** und **Na4**

Photophysikalische Eigenschaften von **Na3** und **Na4**: vermessen in gepufferten H₂O/DMSO Gemischen (99:1, v/v, 10 mM Tris, pH = 7.2) in Ab- und Anwesenheit von 1000 mM NaCl oder 1000 mM KCl. [a] $\phi_{\text{fl}} \pm 15\%$. [b] Fluoreszenzsteigerungsfaktoren, FEF = I/I_0 [c] K_{d} für Na⁺- oder K⁺- Komplexe [d] in Anwesenheit von 1000 mM NaCl und 135 mM KCl.

Um noch ein genaueres Verständnis über das Verhalten der photophysikalischen Eigenschaften in Bezug auf die Isomerie der Fluoroionophore zu erlangen, wurden die *N*-(*o*-Methoxyphenyl)aza-[15]krone-5-ether Ionophore **3d** und **6c** mit den alkin- und azidfunktionalisierten Fluorophoren **17** und **28** in Form einer CuAAC zu den Fluoroionophoren **Na5** und **Na6** umgesetzt (Abb. 4.20).

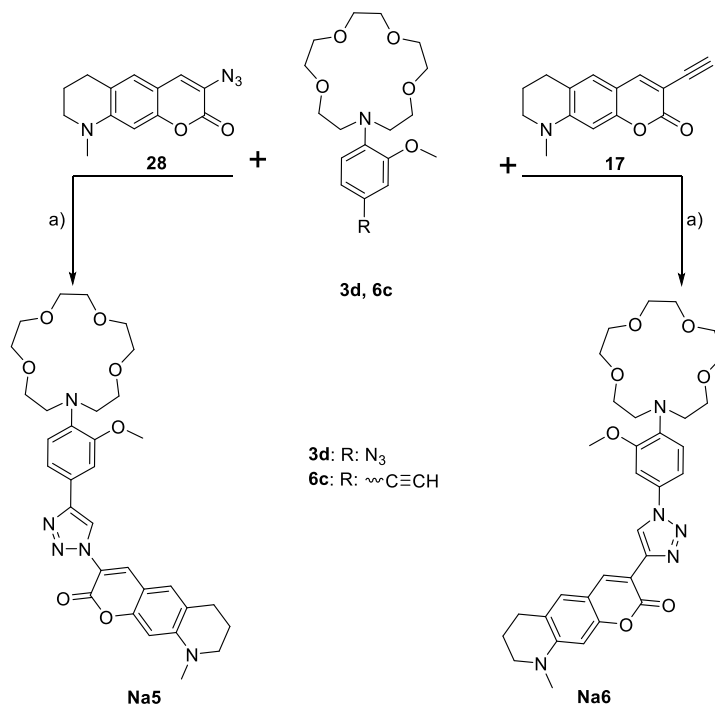


Abb. 4.20: Darstellung der Fluoroionophore **Na5** und **Na6** mittels CuAAC.

a) CuSO₄ · 5 H₂O, Na-asc., THF/ H₂O (2:1, v/v), 60 °C.

Ein Vergleich der aufgenommenen UV/VIS-Spektren der Isomere **Na5** und **Na6** zeigte, dass die für den Fluorophor typischen längerwelligen CT-Absorptionsbanden mit 425 bzw. 423 nm annähernd gleich waren und sich diese lediglich in ihrer Intensität unterscheiden (Tab. 4.4). In Gegenwart von 1000 mM Natrium- bzw. Kalium-Ionen wurde diese Absorptionsbande nur geringfügig beeinflusst. Die zweiten, kurzwelligen CT-Absorptionsbanden der 1,2,3-Triazol-1,4-diy-Einheit im Bereich von 240 – 300 nm zeigten in Gegenwart von Natrium- bzw. Kalium-Ionen für beide Isomere eine Abnahme der Intensität. Dabei konnte für **Na5** eine sichtbar stärkere Abnahme in der Intensität für Natrium-Ionen als für Kalium-Ionen festgestellt werden, wohingegen für das Isomer **Na6** sowohl Natrium- wie auch Kalium-Ionen zu einer deutlichen Abnahme der Intensität führten (s. Anhang S38). Dies lässt vermuten, dass die Anordnung im Isomer **Na5** zu einer besseren Natrium-/Kalium-Selektivität führte. Die in beiden Isomeren festgestellte Abnahme der Intensitäten bei der Komplexierung der Ionen führte zu einer Reduktion des Elektronendonator-Charakters der 1,2,3-Triazol-1,4-diy-Einheit. Es wird für beide Isomere angenommen, dass der signalgebende Mechanismus über einen PET verläuft. Die bestimmten Fluoreszenzquantenausbeuten im unkomplexierten Zustand von $\varphi_{fl} = 0.038$ für **Na5** und $\varphi_{fl} = 0.098$ für **Na6** zeigten, dass die Anordnung der 1,2,3-Triazol-1,4-diy-Einheit mit dem Fluorophor über das Stickstoffatom (N1) im Isomer **Na5** zu der effizienteren Löschung der Fluoreszenz führte. Dies konnte zuvor auch bei den Isomeren **Na3** und **Na4** festgestellt werden und zeigte, dass die Stärke des auftretenden PET der dargestellten Fluoroionophore von deren Regioisomerie abhängt. Ein größerer Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute in Gegenwart von 1000 mM Natrium-Ionen konnte zwar für **Na6** mit $\varphi_{fl} = 0.495$ festgestellt werden, jedoch führte bei diesem auch die Anwesenheit von 1000 mM Kalium-Ionen zu einem starken Anstieg auf $\varphi_{fl} = 0.356$. Für **Na5** konnte nur eine Steigerung auf $\varphi_{fl} = 0.297$ für 1000 mM Natrium-Ionen bestimmt werden, allerdings führte die Bestimmung von 1000 mM Kalium-Ionen nur zu einer sehr geringen Steigerung auf $\varphi_{fl} = 0.073$, was die Annahme der besseren Selektivität für **Na5** bestärkt. Um dies genauer darstellen zu können, wurden im Anschluss die Fluoreszenztitrationmessungen durchgeführt. Die durch Anregung der Fluoroionophore festgestellten Emissionsmaxima bei 502 nm für **Na5** und 498 nm für **Na6** blieben während der Titrationen mit den verschiedenen Ionen-Konzentrationen in ihrer Lage unverändert, zeigten jedoch Unterschiede in den Änderungen ihrer Intensitäten (Abb. 4.21, s. Anhang S39-42).

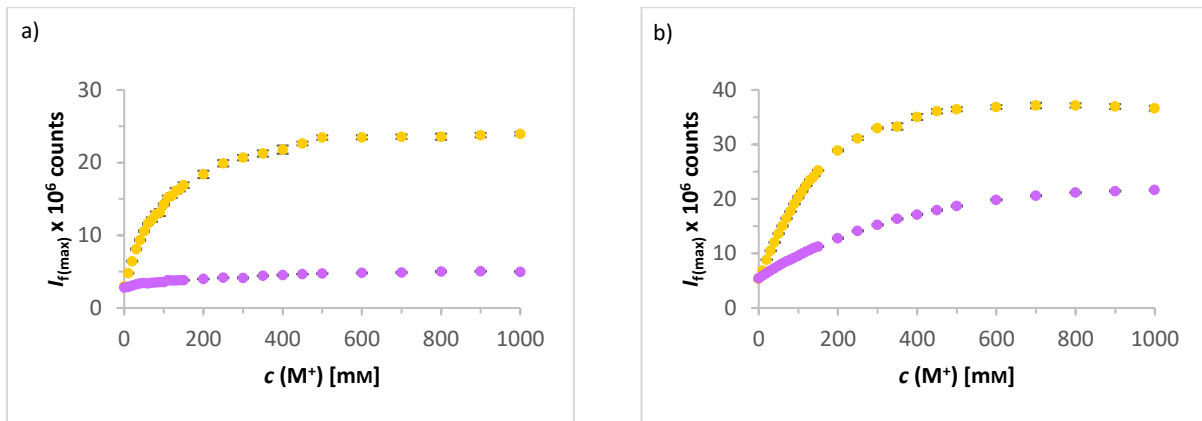


Abb. 4.21: Änderung der Fluoreszenzintensitäten für **Na5** und **Na6**.

Änderung der Fluoreszenzintensitäten ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2) in Gegenwart von 1000 mM KCl (lila) und 1000 mM NaCl (gelb) a) von **Na5** bei 502 nm b) von **Na6** bei 498 nm.

Während der Titrationsmessungen mit 1000 mM Natrium-Ionen konnte für **Na5** eine Steigerung der Fluoreszenzintensität um das 8.1-fache und für **Na6** um das 6.8-fache bestimmt werden. Beide Isomere zeigten in den Bereichen von 0 – 200 mM eine Steigerung von ungefähr 4 % pro 10 mM Natrium-Ionen. Titrationsmessungen bis zu einer Konzentration von 1000 mM Kalium-Ionen zeigten, dass diese einen geringen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität von **Na5** hatten, da hier nur eine Steigerung um das 1.8-fache bestimmt werden konnte. Anders als für **Na6**, hier führte die Titration mit 1000 mM Kalium-Ionen zu einer Steigerung der Fluoreszenzintensität um das 4.0-fache. Fluoroionophor **Na6** bindet sowohl Natrium- wie auch Kalium-Ionen und weist von beiden Isomeren die deutlich schlechtere Natrium-/Kalium-Selektivität auf. Für die Darstellung der Komplexstabilitäten wurden im Anschluss die Dissoziationskonstanten der Isomere für die Natrium- und Kalium-Ionen Titrationsen ermittelt. Dabei konnte festgestellt werden, dass Fluoroionophor **Na5** mit Natrium-Ionen den stabileren Komplex bildete und mit einem K_d -Wert von 87 mM im physiologischen relevanten Bereich der extrazellulären Natrium-Ionen Konzentration einzuordnen ist. Auch wenn **Na6** mit einem K_d -Wert von 109 mM ebenfalls in diesem Bereich liegt, ist es aufgrund seiner mangelnden Selektivität für Messungen in Anwesenheit beider Ionen ungeeignet. Um feststellen zu können, inwieweit die Natrium-Ionen Bestimmung mit **Na5** in Gegenwart von Kalium-Ionen beeinflusst wird, wurden Titrationsmessungen in kombinierten Lösungen verschiedener Natrium-Ionen Konzentrationen und 10 mM Kalium-Ionen durchgeführt. Die daraus resultierende Steigerung der Fluoreszenzintensität für Natrium-Ionen von 8.0 zeigte, dass die Anwesenheit von Kalium-Ionen nur einen geringen Einfluss ausübte. Und auch der bestimmte K_d -Wert von 92 mM machte deutlich, dass die Komplexstabilität nur geringfügig beeinflusst wurde und das **Na5** geeignet ist, extrazelluläre Natrium-Ionen Spiegel in Anwesenheit von Kalium-Ionen *in vitro* zu bestimmen.

	λ_{abs} [nm]	λ_{em} [nm]	$\phi_{\text{fl}}^{[\text{a}]}$	FEF ^[b]	K_{d} [mM] ^[c]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	$\epsilon \cdot \phi_{\text{fl}}$ [M ⁻¹ cm ⁻¹]
Na5	425	502	0.038	-	-	18495	702
Na5 + Na⁺	425	502	0.297	8.1	87	19825	5392
Na5 + K⁺	425	502	0.073	1.8	190	19281	1408
Na5 + Na⁺/K⁺[d]	425	502	-	8.0	92	-	-
Na6	423	498	0.098	-	-	22659	2221
Na6 + Na⁺	423	498	0.495	6.8	109	23997	11879
Na6 + K⁺	423	498	0.356	4.0	255	22981	8181

Tab. 4.4: Photophysikalische Eigenschaften der Fluoroionophore **Na5** und **Na6**.

Photophysikalische Eigenschaften von **Na5** und **Na6**: untersucht in gepufferten H₂O/DMSO Gemischen (99:1, v/v, 10 mM Tris, pH = 7.2) in Ab- und Anwesenheit von 1000 mM NaCl oder 1000 mM KCl. [a] $\phi_{\text{fl}} \pm 15\%$. [b] Fluoreszenzsteigerungsfaktoren, FEF = I/I_0 [c] K_{d} für Na⁺- oder K⁺- Komplexe [d] in Anwesenheit von 1000 mM NaCl und 10 mM KCl.

Mit der Synthese der Fluoroionophore **Na3** und **Na5** ist es gelungen, Fluoroionophore zu präsentieren, die es ermöglichen Natrium-Ionen Spiegel im intra- bzw. extrazellulären Bereich in Gegenwart von Kalium-Ionen *in vitro* zu bestimmen und zu kontrollieren. Weiterhin konnte mit der Synthese und anschließenden Bestimmung der photophysikalischen Eigenschaften von **Na3** – **Na6** festgestellt werden, dass die Anordnung des Isomers eine entscheidende Rolle bei der Selektivität und der Komplexstabilität spielt.

Um eine Verbesserung der Natrium-/Kalium-Selektivität zu erreichen und um feststellen zu können, ob sich der Trend des Isomerie-Einflusses auch hier fortsetzt, wurden im nächsten Schritt zunächst die alkin- und azidfunktionalisierten 7-Diethylaminocoumarine **12** und **25** mit den neu entwickelten azid- und alkinfunktionalisierten Ionophoren des *N*-(*o*-Isopropoxyphenyl)aza-[15]krone-5-ethers, **4d** und **7c**, mittels CuAAC zu den Fluoroionophoren **Na7** und **Na8** umgesetzt (Abb. 4.22). Grundlage hierfür waren die zuvor bestimmten physiologischen Eigenschaften des Kalium-Ionen Fluoroionophors **K7** und dessen ausgezeichnete Kalium-/Natrium-Selektivität.

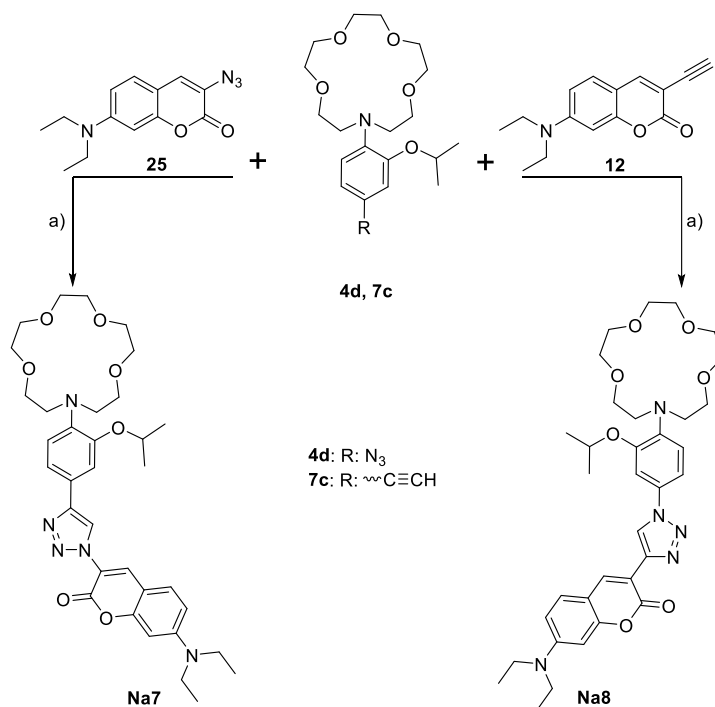


Abb. 4.22: Darstellung der Fluoroionophore **Na7** und **Na8** mittels CuAAC.

a) CuSO₄ · 5 H₂O, Na-asc., THF/ H₂O (2:1, v/v), 60 °C.

In einem zweiten Syntheseschritt wurde anschließend der azidfunktionalisierte *N*-(*o*-Isopropoxyphenyl)aza-[15]krone-5-ether Ionophor **7c** mit den alkinfunktionalisierten Coumarin-Derivaten **28** und **31** mittels CuAAC zu den Fluoroionophoren **Na9** und **Na10** umgesetzt. Diese diente, um feststellen zu können, inwieweit eine Verbesserung der photophysikalischen Eigenschaften (wie z. B. φ_{fl} , λ_{em} , FEF), wie sie zuvor schon bei den Kalium-Ionen Fluoroionophoren zu beobachten war, auf diese übertragbar sind (Abb. 4.23).

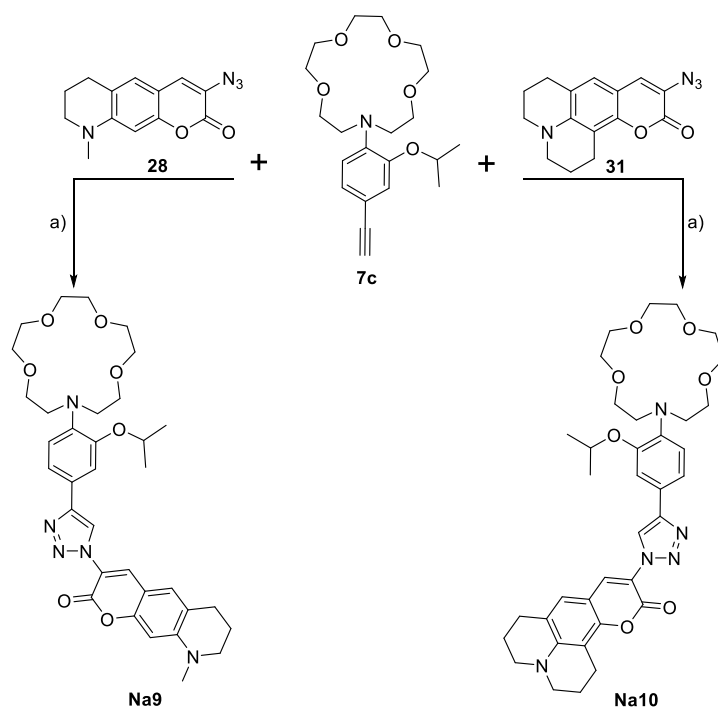


Abb. 4.23: Darstellung der Fluoroionophore **Na9** und **Na10** mittels CuAAC.

a) $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, Na-asc., THF/ H_2O (2:1, v/v), 60 °C.

Die aufgenommenen UV/VIS-Spektren der Isomere **Na7** und **Na8** zeigten beide die für das 7-Diethylaminocoumarin charakteristische längerwellige CT-Absorptionsbande bei 427 bzw. 425 nm. Die Zugabe von 1000 mM Natrium- bzw. Kalium-Ionen verursachte nahezu keine Veränderung in der Lage und Höhe dieser Absorptionsmaxima. Die für die 1,2,3-Triazol-1,4-diyl-Einheit charakteristische CT-Absorptionsbande im kurzwelligen Bereich von 270 – 330 nm unterlag in Anwesenheit von 1000 mM Natrium- bzw. Kalium-Ionen bei beiden Isomeren einer Intensitätsabnahme. Führten beim Fluoroionophor **Na8** noch beide Ionen in etwa zu einer gleich starken Abnahme, konnte für **Na7** festgestellt werden, dass diese in Anwesenheit der Natrium-Ionen stärker ausgeprägt war als für Kalium-Ionen (s. Anhang S47). Die Abnahmen der Intensitäten sind auf die Komplexierung der Ionen mit dem *N*-(*o*-Isopropoxyphenyl)aza-[15]krone-5-ether zurückzuführen, wodurch dessen Elektronendonator-Charakter geschwächt wird. Die Bestimmungen der Fluoreszenzquantenausbeuten zeigte, dass die Effizienz der Löschung der Fluoreszenz auf 1 % durch den PET-Mechanismus in beiden Isomeren nahezu gleich stark ausgeprägt war, was für eine effektive Natrium-Ionen Bestimmung von großer Bedeutung ist. In Anwesenheit von 1000 mM Natrium-Ionen konnte ebenfalls ein gleicher Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute auf 2,4 % bzw. 2.6 % für die Isomere beobachtet werden. Der in diesem Fall sehr geringe Anstieg der Fluoreszenz durch die Komplexierung der Natrium-Ionen lässt annehmen, dass die Fluoreszenzlöschung innerhalb der 7-Diethylaminocoumarin substituierten Fluoroionophore nicht nur von der Ionophor-Einheit und damit vom PET-Mechanismus beeinflusst wird, sondern auch von dessen Umgebung. Die für die Bestimmung der photophysikalischen Eigenschaften verwendeten

Stammlösungen der Fluoroionophore bestehen aus einem 99:1, (v/v) Verhältnis von H₂O zu DMSO. H₂O selbst kann zu einer Löschung der Fluoreszenz des Fluorophors 7-Diethylaminocoumarin führen, wie es auch schon für andere 7-Diethylaminocoumarin-Derivate beobachtet werden konnte. Dabei wird angenommen, dass es vermehrt zu einer strahlungslosen Desaktivierung aufgrund eines verdrehten intramolekularen Ladungstransfers (*twisted intramolecular charge transfer*, TICT) kommt. Der TICT von 7-Aminocoumarinen ist gekennzeichnet durch einen Elektronentransfer von der Aminogruppe zum Coumarinring, gefolgt von einer gedrehten Rotation zwischen diesen. Aufgrund einer hohen Elektronendonorkapazität der Aminogruppe, welche durch den induzierten Effekt (+I) der Ethylen-Gruppen gegeben ist, und aufgrund einer hohen Lösungsmittel-polarität wird das Auftreten dieses CT verstärkt. Der TICT-Zustand ist durch eine Erhöhung der Ladungstrennung gekennzeichnet, die durch die Polarität des Lösungsmittels stabilisiert werden kann.^[110]

Da sich die Isomere weder in ihren UV/VIS-Spektren, noch in den ermittelten Fluoreszenzquantenausbeuten markant unterschieden, wurden im Anschluss Fluoreszenztitrationen durchgeführt, um Selektivität und Komplexstabilität genauer zu charakterisieren. Während der Titrationsmessungen unterschiedlicher Natrium- bzw. Kalium-Ionen Konzentrationen des Fluoroionophores **Na8** kam es zu einem Absetzen des Farbstoffes am Rand der Glasküvette, was auf eine nicht ausreichende Löslichkeit in H₂O hindeutete, die für Messungen unter simuliert physiologischen Bedingungen aber zwingend notwendig ist. Daher wurde Fluoroionophor **Na8** im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter spektroskopisch untersucht. Die Anregung von **Na7** bei einer Wellenlänge von 422 nm resultierte in einem Emissionsmaximum von 500 nm (s. Anhang S48). Während der Titrationsmessungen mit 1000 mM Natrium- bzw. Kalium-Ionen blieb dieses Maximum in seiner Lage unverändert, was typisch ist für Fluoroionophore dessen signalgebender Prozess durch einen PET-Mechanismus gesteuert wird. Lediglich in der Intensität des Emissionsmaximums konnte eine Veränderung festgestellt werden (Abb. 4.24).

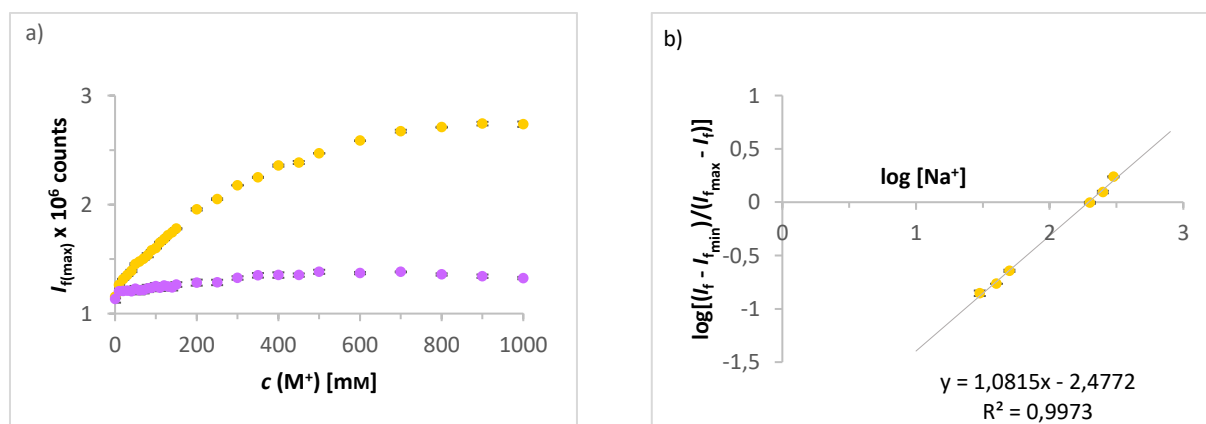


Abb. 4.24: Änderung der Fluoreszenzintensitäten und Bestimmung der Dissoziationskonstante für **Na7**.

a) Änderung der Fluoreszenzintensitäten ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2) in Gegenwart von 1000 mM KCl (lila) und 1000 mM NaCl (gelb) von **Na7** bei 500 nm, b) Plot von $\log[(I_f - I_{f(\min)}) / (I_{f(\max)} - I_f)]$ **Na7** + Na⁺ gegen $\log[\text{Na}^+]$ zur Bestimmung von K_d .

Während der Titrations mit Natrium-Ionen kam es zu einer Steigerung der Fluoreszenzintensität um das 2.4-fache. Im relevanten Konzentrationsbereich 0 – 200 mM konnte außerdem eine Steigerung von 2 % pro 10 mM bestimmt werden. In Gegenwart von 1000 mM Kalium-Ionen kam es hingegen nur zu einer 1.2-fachen Steigerung der Fluoreszenzintensität. Aus den Fluoreszenzintensitäten beim Emissionsmaximum von 500 nm wurde im Anschluss die Dissoziationskonstante für Natrium-Ionen bestimmt. Der von **Na7** ermittelte K_d -Wert von 195 mM war im Vergleich zu dem bereits zuvor dargestellten Fluoroionophor **Na1** (120 mM) deutlich gestiegen und weist somit eine schlechtere Stabilität des gebildeten Natrium-Ionen-Komplexes auf (Abb. 4.24). Dies lässt vermuten, dass die, durch die Substitution der am *N*-Phenylaza-[15]krone-5-ether befindlichen Alkoxy-Gruppe von Methoxy zu Isopropoxy, auftretende sterische Hinderung des Rezeptors, die Komplexstabilität des Fluoroionophores beeinflusst. Eine Bestimmung der Dissoziationskonstante für den gebildeten Komplex während der Kalium-Ionen Titrations konnte nicht erfolgen, da die Änderung der Fluoreszenzintensitäten zu gering war. Titrationsmessungen bei unterschiedlichen Natrium-Ionen Konzentrationen in Gegenwart von 10 mM Kalium-Ionen lies leider keine eindeutige Bestimmung eines K_d -Wertes zu, da es im physiologisch relevanten Bereich von 0 – 200 mM zu großen Schwankungen der Messergebnisse kam (s. Anhang S50). Es wird vermutet, dass auch Fluoroionophor **Na7** eine nicht auszureichende Löslichkeit in H₂O aufweist. Die Steigerung der Fluoreszenzintensität bei 900 mM Natrium-Ionen auf das 2.2-fache kann daher nur unter Vorbehalt betrachtet werden. Die Ergebnisse der photophysikalischen Eigenschaften für die Isomere **Na7** und **Na8** sind in Tab. 4.5 zusammengefasst.

	λ_{abs} [nm]	λ_{em} [nm]	$\phi_{\text{fl}}^{[\text{a}]}$	FEF ^[b]	K_d [mM] ^[c]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	$\epsilon \cdot \phi_{\text{fl}}$ [M ⁻¹ cm ⁻¹]
Na7	427	500	0.012	-	-	26308	316
Na7 + Na ⁺	427	500	0.026	2.4	195	26014	676
Na7 + K ⁺	427	500	0.015	1.2	n. b.	25836	388
Na7 + Na ⁺ /K ⁺ ^[d]	427	500	-	2.2	n. b.	-	-
Na8	425	n. b.	0.010	-	-	23296	233
Na8 + Na ⁺	425	n. b.	0.024	2.4	n. b.	22496	540
Na8 + K ⁺	425	n. b.	0.014	1.4	n. b.	22712	318

Tab. 4.5: Photophysikalische Eigenschaften der Fluoroionophore **Na7** und **Na8**.

Photophysikalische Eigenschaften von **Na7** und **Na8**: untersucht in gepufferten H₂O/DMSO Gemischen (99:1, v/v, 10 mM Tris, pH = 7.2) in Ab- und Anwesenheit von 1000 mM NaCl oder 1000 mM KCl. [a] $\phi_{\text{fl}} \pm 15\%$. [b] Fluoreszenzsteigerungsfaktoren, FEF = I/I_0 [c] K_d für Na⁺- oder K⁺- Komplexe [d] in Anwesenheit von 1000 mM NaCl und 10 mM KCl.

Für die genauere Untersuchung des Einflusses des Ionophors *N*-(*o*-Isopropoxyphenyl)aza-[15]krone-5-ether **7c** auf die photophysikalischen Eigenschaften, wurden im Anschluss die Natrium-Ionen Fluoroionophore **Na9** und **Na10** spektroskopisch untersucht.

Die aufgenommenen UV/VIS-Spektren zeigten für beide Fluoroionophore die zwei typischen CT-Absorptionsbanden. Dabei befand sich die längerwellige, dem Fluorophor zugehörige CT-Bande von

Na9, das analog zu **Na5** mit dem Fluorophor **28** modifiziert wurde, mit 430 nm im gleichen Bereich, wie die zuvor ermittelte CT-Absorptionsbande des Coumarin-Derivates **14** (s. Anhang S4). Die längerwellige CT-Absorptionsbande von **Na10** konnte wie zuvor bei den Fluoroionophoren, die mit dem azidfunktionalisierten Fluorophor **31** modifiziert waren, bei 435 nm bestimmt werden. In beiden Fluoroionophoren wurde diese CT-Bande durch die Zugabe von 1000 mM Natrium- bzw. Kalium-Ionen in ihrer Lage und Intensität nicht merklich beeinflusst (s. Anhang S51). Für die 1,2,3-Triazol-1,4-diy-Einheit charakteristische CT-Absorptionsbande im kurzwelligen Bereich von 270 – 310 nm, wurde bei beiden Fluoroionophoren in Anwesenheit von 1000 mM Natrium- bzw. Kalium-Ionen eine Abnahme der Intensität beobachtet. Durch Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten konnte festgestellt werden, dass in beiden Fluoroionophoren eine ausreichend gute Löschung der Fluoreszenz im unkomplexierten Zustand stattfindet (Tab. 4.6). In Anwesenheit von 1000 mM Natrium-Ionen erfolgte nur eine mäßige Steigerung der Fluoreszenz. Für **Na9** konnte eine Steigerung um das 3-fache auf 10 % und für **Na10** um das 2.5-fache auf 7 % bestimmt werden. Für beide Isomere konnte außerdem eine schwache Steigerung der Fluoreszenz in Gegenwart von 1000 mM Kalium-Ionen auf 3.7 % bzw. 3.5 % ermittelt werden. Da mit Hilfe der aufgenommenen UV/VIS-Spektren und bestimmten Fluoreszenzquantenausbeuten keine eindeutigen Aussagen zu den Selektivitäten getroffen werden konnten, wurden die Fluoroionophore mittels Fluoreszenzspektroskopie genauer untersucht. Hierfür erfolgte eine Anregung bei 425 nm für **Na9** und bei 435 nm für **Na10**. Die dadurch entstandenen Emissionsmaxima bei 502 nm für **Na9** und 520 nm für **Na10** waren vergleichbar mit denen, der zuvor dargestellten Fluoroionophoren **Na3** und **Na5** und blieben während der Titrationsmessungen mit 1000 mM Natrium- bzw. Kalium-Ionen in ihrer Lage unverändert (s. Anhang S52-55). In Gegenwart von 1000 mM Natrium-Ionen konnte für beide Fluoroionophore mit 2.9 (**Na9**) und 3.1 (**Na10**) in etwa die gleiche Steigerung der Fluoreszenzintensität festgestellt werden, die pro 10 mM Natrium-Ionen jeweils einer Steigerung von 2.3 % entsprach (Abb. 4.25).

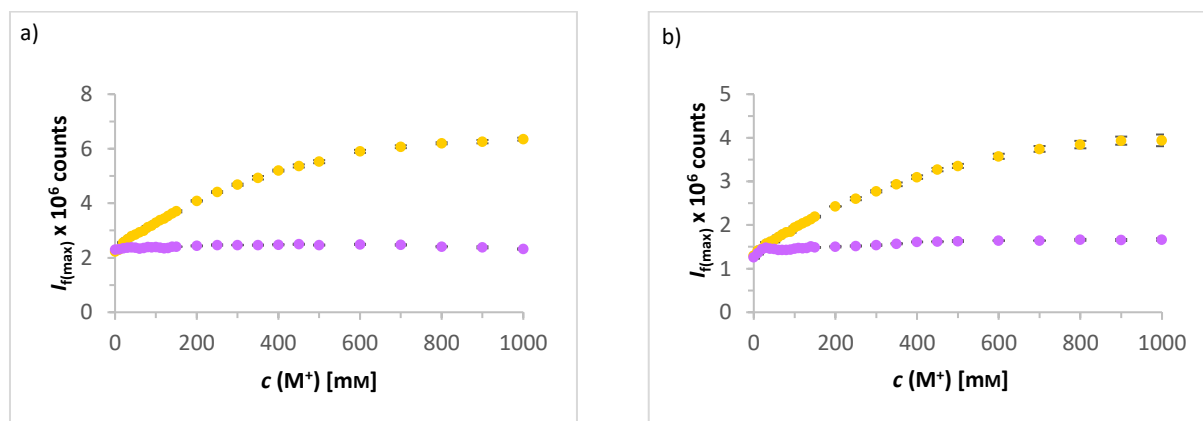


Abb. 4.25: Änderungen der Fluoreszenzintensitäten für **Na9** und **Na10**.

Änderung der Fluoreszenzintensitäten ($c = 10^{-5}$ mol/l, $H_2O/DMSO$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2) in Gegenwart von 1000 mM KCl (lila) und 1000 mM NaCl (gelb) a) von **Na9** bei 502 nm b) von **Na10** bei 520 nm.

Die Fluoreszenztitrationsmessungen in Gegenwart von 1000 mM Kalium-Ionen zeigten für **Na9** bzw. **Na10** nur eine leichte Steigerung der Fluoreszenz um das 1.1-fache bzw. 1.3-fache. Dies lässt vermuten, dass eine ausreichend gute Natrium-/Kalium-Selektivität vorliegt und stellt eine Verbesserung im Vergleich zu den *N*-(*o*-Methoxyphenyl)aza-[15]krone-5-ether modifizierten Fluoroionophoren **Na3** und **Na5** dar. Die ermittelten Dissoziationskonstanten von 241 mM bzw. 264 mM der Natrium-Ionen Titrationsmessungen zeigten jedoch, dass die Einführung der sterisch anspruchsvolleren Alkoxy-Gruppe in *ortho* Position des *N*-Phenylaza-[15]krone-5-ethers mit einer Verschlechterung der Komplexstabilität einherging. Die Isopropoxy-Gruppe verursacht eine größere sterische Hinderung als die Methoxy-Gruppe, weshalb angenommen wird, dass sich dieser sperrige Substituent mit seiner freien Drehbarkeit vor den Hohlraum der Azakrone schieben kann und somit eine Komplexierung beider Ionen behindert. Obwohl der, mit Hilfe von Titrationsmessungen unterschiedlicher Natrium-Ionen Konzentrationen in Anwesenheit von 10 mM Kalium-Ionen, ermittelte K_d -Wert von 242 mM von **Na9** deutlich macht, dass dieser Fluoroionophore selektiv ist, sind beide, **Na9** und **Na10**, nicht dafür geeignet Messungen im physiologisch relevanten Bereich durchzuführen. Die ermittelten photophysikalischen Eigenschaften für **Na9** und **Na10** sind in Tab. 4.6 zusammengefasst.

	λ_{abs} [nm]	λ_{em} [nm]	$\phi_{\text{fl}}^{\text{[a]}}$	FEF ^[b]	K_d [mM] ^[c]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	$\epsilon \cdot \phi_{\text{fl}}$ [M ⁻¹ cm ⁻¹]
Na9	430	502	0.030	-	-	20103	603
Na9 + Na ⁺	430	502	0.100	2.9	241	19979	1998
Na9 + K ⁺	430	502	0.037	1.1	n. b.	20041	742
Na9 + Na ⁺ /K ⁺ ^[d]	430	502	-	2.6	242	-	-
Na10	435	520	0.025	-	-	22132	553
Na10 + Na ⁺	435	520	0.070	3.1	264	22621	1584
Na10 + K ⁺	435	520	0.035	1.3	n. b.	21834	764
Na10 + Na ⁺ /K ⁺ ^[d]	435	520	-	3.0	328	-	-

Tab. 4.6: Photophysikalische Eigenschaften der Fluoroionophore **Na9** und **Na10**.

Photophysikalische Eigenschaften von **Na9** und **Na10**: vermessen in gepufferten H₂O/DMSO Gemischen (99:1, v/v, 10 mM Tris, pH = 7.2) in Ab- und Anwesenheit von 1000 mM NaCl oder 1000 mM KCl. [a] $\phi_{\text{fl}} \pm 15\%$. [b] Fluoreszenzsteigerungsfaktoren, FEF = I/I_0 [c] K_d für Na⁺- oder K⁺- Komplexe [d] in Anwesenheit von 1000 mM NaCl und 10 mM KCl.

Mit der Darstellung der Fluoroionophore **Na7** – **Na10** konnte gezeigt werden, dass durch die Einführung der Isopropoxy-Gruppe in *ortho* Position des *N*-Phenylaza-[15]krone-5-ethers im Vergleich zu den *N*-(*o*-Methoxyphenyl)aza-[15]krone-5-ether Analoga, eine Verbesserung der Selektivität gegenüber Natrium-Ionen erreicht werden konnte. Als Nachteil bringt dieser große, sperrige Rest aber eine Verschlechterung der Komplexstabilitäten mit sich, was zum einen anhand der Dissoziationskonstanten von ≥ 200 mM und zum anderen an den wesentlich geringeren Fluoreszenzintensitätssteigerungen bzw. Fluoreszenzquantenausbeuten im komplexierten Zustand deutlich wurde.

4.5 Synthese neuer Kalium-Ionen Fluoroionophore basierend auf Änderungen der Fluoreszenzlebenszeiten (W1, W2)

Neben denen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten grundlegenden Studien über das photophysikalische Verhalten der Kalium-Ionen selektiven Fluoroionophore für die extra- oder intrazelluläre Bestimmung von Kalium-Ionen, die auf einer Steigerung der Fluoreszenzintensität beruhen, sollten in einem nächsten Schritt die zuvor gewonnen Erkenntnisse genutzt werden, Fluoroionophore zu entwickeln, die Fluoreszenzlebenszeit-basierte Messungen für die Bestimmung der Kalium-Ionen Konzentrationen ermöglichen.

Für die Darstellung der neuen Lebenszeit-basierten Fluoroionophore war es wichtig hochselektive Ionophore für Kalium-Ionen mit geeigneten Fluorophoren, deren photophysikalische Eigenschaften (ϕ_{fl} , τ_{fl} , $\Delta\lambda$) herausragend sind, zu verknüpfen. Dabei fiel die Wahl der passenden Ionophore zum einen auf den *N*-Phenylaza-[18]krone-6-ether, mit dessen Hilfe ein Fluoroionophor für Bestimmungen der intrazellulären Kalium-Ionen Konzentration dargestellt werden sollte.^[52] Zum anderen wurde für Bestimmungen der extrazellulären Kalium-Ionen Konzentration, der in dieser Arbeit synthetisierte Ionophor *N*-(*o*-Isopropoxyphenyl)aza-[18]krone-6-ether **2d** gewählt, da dieser bereits bei **K7** zu einer guten Komplexstabilität und ausgezeichneten Selektivität führte. Auf der Suche nach einem geeigneten Fluorophor ist die vom Arbeitskreis WESSIG neu entwickelte Fluoreszenzfarbstoffklasse der **DBD**-Farbstoffe, aufgrund ihrer ausgezeichneten photophysikalischen Eigenschaften in Wasser, in den Vordergrund gerückt. Die **DBD**-Farbstoffe, deren Strukturen auf einem [1,3]-Dioxolo[4,5-*f*][1,3]-benzodioxol Grundgerüst beruhen, zeichnen sich vor allem durch die grundlegenden Eigenschaften einer langen Fluoreszenzlebensdauer ($\tau_{fl} > 20$ ns) und einer große STOKES-Verschiebung, gepaart mit einer guten Photostabilität, aus. Dabei fluoresziert das reine **DBD**-Gerüst selbst nicht. Erst durch die Substitution von elektronenziehenden Gruppen an der 4. und 7. Position am Aromaten, erhalten die **DBD**-Farbstoffe schlussendlich ihre herausragenden Fluoreszenzeigenschaften (Abb. 4.26).^[111,112]

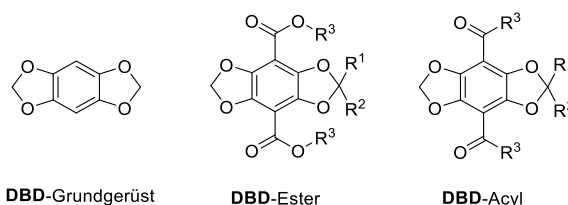


Abb. 4.26: Struktur des **DBD**-Grundgerüsts und der **DBD**-Bausteine.

Durch die Variation der Substituenten wuchs die Zahl an **DBD**-Farbstoffen und es gelang bereits Fluoreszenzsonden für diverse bioanalytische Anwendungen darzustellen.^[112-115] So konnte zum Beispiel bereits ein **DBD**-Ester Fluorophor erfolgreich in Fluoreszenzlebenssonden für die Bestimmung von Konformationsänderungen in Proteinen integriert werden und ein **DBD**-Acyl Fluorophor als Teil eines Bindungsassays für Histon-Deacetylasen der Klasse IIa verwendet werden.^[115,116] Für die Darstellung der Lebenszeit-basierten Fluoroionophore wurde der, vom Arbeitskreis Wessig zur Verfügung gestellte, alkinfunktionalisierte **DBD**-Ester **32** verwendet, da dessen Vorstufe **B** mit einer Fluoreszenzquantenausbeute von $\varphi_{fl} = 0.63$ und einer Fluoreszenzlebensdauer von $\tau_{fl} = 20.5$ ns in Wasser bereits über ausgezeichnete Fluoreszenzeigenschaften verfügte (Abb. 4.27).^[112]

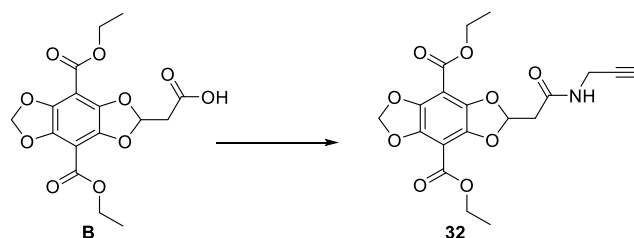


Abb. 4.27: Darstellung der **DBD**-Ester Fluorophore.

Mit Hilfe einer CuAAC wurde der alkinfunktionalisierte **DBD**-Ester **32** mit den azidfunktionalisierten Ionophoren *N*-Phenylaza-[18]krone-6-ether **C** bzw. *N*-(*o*-Isopropoxyphenyl)aza-[18]krone-6-ether **2d** zu den Fluoroionophoren **W1** und **W2** umgesetzt (Abb. 4.28).

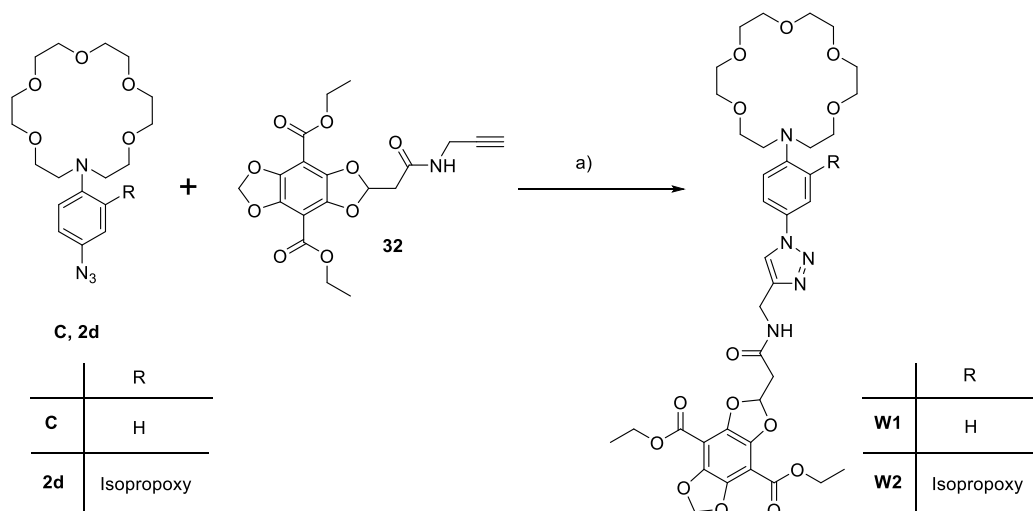


Abb. 4.28: Darstellung der Fluoroionophore **W1** und **W2** mittels CuAAC.

a) $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, Na-asc., DMF/ H_2O (2:1, v/v), 60 °C

Die anschließenden Untersuchungen der photophysikalischen Eigenschaften der beiden Fluoroionophore erfolgten unter simuliert physiologischen Bedingungen. Die hierfür verwendeten Stammlösungen wurden mit einer Konzentration von 10^{-3} mol/l in DMSO hergestellt und zur Vorbereitung der spektroskopischen Messungen mit einer 10 mM Tris-Puffer Lösung (pH = 7.2) auf 10^{-5} mol/l ($\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v) verdünnt.

In den aufgenommenen UV/VIS-Spektren von **W1** und **W2** konnten Absorptionsbanden festgestellt werden, die denen des **DBD**-Fluorophors und der Triazol-substituierten *N*-Phenylaza-[18]krone-6-Ionophore entsprachen (Abb. 4.29). Dabei gehörten die längerwelligen Absorptionsbanden bei 415 nm zu einer $n-\pi^*$ -Absorption des **DBD**-Fluorophors, die mit der bereits bekannten Absorption des **DBD**-Esters **B** von 414 nm in H_2O nahezu identisch war.^[112] Die Absorptionsbanden blieben nach der Zugabe von Kalium- bzw. Natrium-Ionen in ihrer Lage und Intensität nahezu unverändert. Die kurzwelligen Absorptionsbanden konnten um etwa 300 nm festgestellt werden und liegen dem Ladungstransfer des freien Elektronenpaares des Stickstoffs der Anilin-Einheit mit dem 1,2,3-Triazol-Elektronenakzeptor zugrunde.^[52,109] Dabei konnte beobachtet werden, dass es in **W1** zu einer effizienteren Konjugation des freien Elektronenpaares des Stickstoffs und dem aromatischen Ring der Anilin-Einheit kommt, da die CT-Absorptionsbande bei 304 nm für **W1** intensiver war als die für **W2** bei 301 nm (Tab. 4.7). Es wird angenommen, dass die sterische Hinderung der Isopropoxy-Gruppe in *ortho* Position der Anilin-Einheit in **W2** zu einer Verdrehung der Kohlenstoff-Stickstoff-Bindung zwischen der Aza-[18]krone-6-Einheit und dem aromatischen Ring führt, wodurch die Konjugation behindert wird. Anhand der abnehmenden Intensität der CT-Absorptionsbanden um 300 nm kann weiterhin die Komplexbildung von Kalium-Ionen innerhalb der *N*-Phenylaza-[18]krone-6-ether von **W1** und **W2** angenommen werden, da dies zu einer Reduktion der Elektronendonorfähigkeit der Anilin-Einheiten in **W1** und **W2** führt. In Gegenwart von unterschiedlichen Natrium-Ionen Konzentrationen wurden die kurzwelligen CT-Absorptionsbanden von **W1** und **W2** nur geringfügig verringert, was für eine gute Kalium-/Natrium-Selektivität spricht.

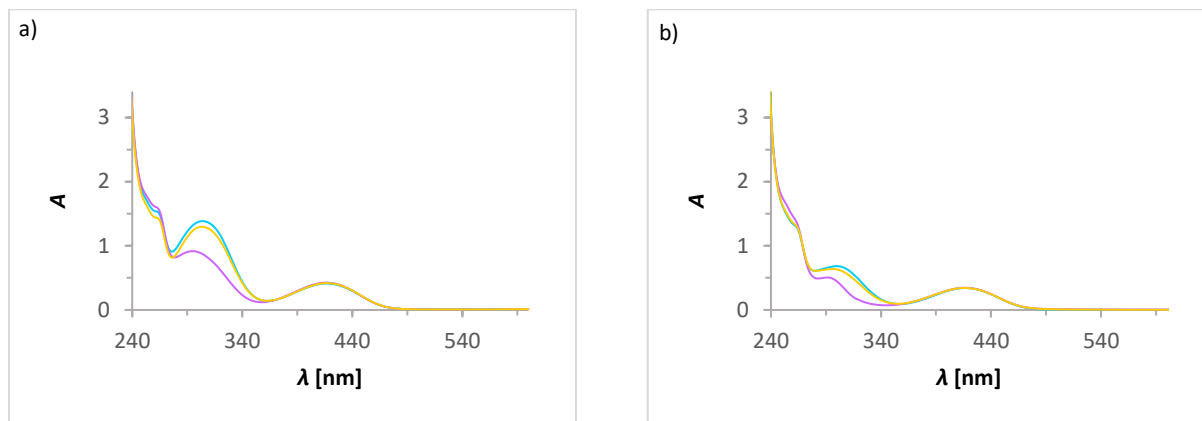


Abb. 4.29: Absorptionsspektren der Fluoroionophore **W1** und **W2**

UV/VIS-Spektren ($c = 10^{-4}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2) in Gegenwart von a) **W1** (türkis), 2000 mM KCl (lila), 2000 mM NaCl (gelb) und b) **W2** (türkis), 160 mM KCl (lila), 160 mM NaCl (gelb).

Die geringeren Fluoreszenzquantenausbeuten von **W1** ($\varphi_{\text{fl}} = 0.040$) und von **W2** ($\varphi_{\text{fl}} = 0.110$) als die des reinen **DBD**-Fluorophors ($\varphi_{\text{fl}} = 0.63$) werden durch einen reduktiven PET vom Anilin-Elektronendonator zum **DBD**-Elektronenakzeptor verursacht. Mit $\varphi_{\text{fl}} = 0.040$ kommt es im Fluoroionophor **W1** zu einer effektiveren Löschung der Fluoreszenz, weshalb vermutet wird, dass der *N*-Phenylaza-[18]krone-6-ether eine bessere Elektronendonator-Einheit mit einem niedrigeren Oxidationspotential als die Isopropoxy substituierte *N*-Phenylaza-[18]krone-6-Einheit in **W2** darstellt. Des Weiteren wird angenommen, dass der PET-Prozess in **W1** und **W2** durch eine durch den Raum elektronisch entkoppelte Struktur funktioniert. Mit Hilfe eines Modellmoleküls, in dem der Azakronenether durch eine Dimethylamino-Gruppe ersetzt wurde, konnte eine systematische Konformationsanalyse unter Verwendung des Kraftfeldes MMFF94x und der „low mode MD“ (Programm: MOE 2010.10) durchgeführt.^[117] Die Struktur des globalen Minimums zeigt die Möglichkeit, eines durch den Raum agierenden PET-Prozesses von der Anilin-Elektronendonator-Einheit hin zum **DBD**-Fluorophor (Abb. 4.30).

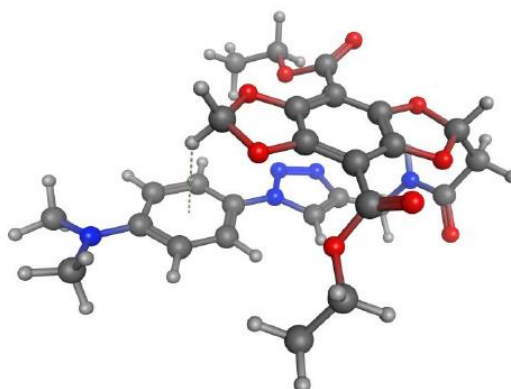


Abb. 4.30: Modellmolekül zur Veranschaulichung der Konformationsanalyse.

Mit Hilfe der aufgenommenen Fluoreszenzspektren von **W1** und **W2** konnten für diese nahezu identische Emissionsmaxima bei 518 nm bzw. 515 nm bestimmt werden, die dem des **DBD-Esters B** mit einem Emissionsmaximum bei 514 nm in H₂O ähnlich waren (s. Anhang S61, S64).^[112] Die im Anschluss durchgeführten Titrationsexperimente von **W1** und **W2** mit Kalium-Ionen zeigten eine Steigerung der Fluoreszenzintensität mit zunehmender Kalium-Ionen Konzentrationen. Dabei wurde für **W2** eine maximale Fluoreszenzsteigerung um das 3.8-fache bei 140 mM Kalium-Ionen erreicht, wohingegen **W1** eine Zunahme der Fluoreszenzintensität bis 2000 mM Kalium-Ionen zeigte, was einer Steigerung um das 2.3-fache entspricht. Die bestimmten Steigerungen der Fluoreszenzquantenausbeuten für **W1** bei 2000 mM Kalium-Ionen auf $\varphi_{fi} = 0.093$ und für **W2** bei 160 mM Kalium-Ionen auf $\varphi_{fi} = 0.435$ stimmten mit den ermittelten Fluoreszenzsteigerungsfaktoren nahezu überein. Titrationsmessungen von **W1** und **W2** mit den konkurrierenden Natrium-Ionen zeigten, dass die Fluoreszenzintensitäten von diesen nur leicht beeinflusst wurden (Abb. 4.31). In Gegenwart von 2000 mM Natrium-Ionen konnte für **W1** lediglich eine Steigerung der Fluoreszenzintensität um das 1.1-fache und für **W2** in Gegenwart von 160 mM Natrium-Ionen um das 1.4-fache bestimmt werden.

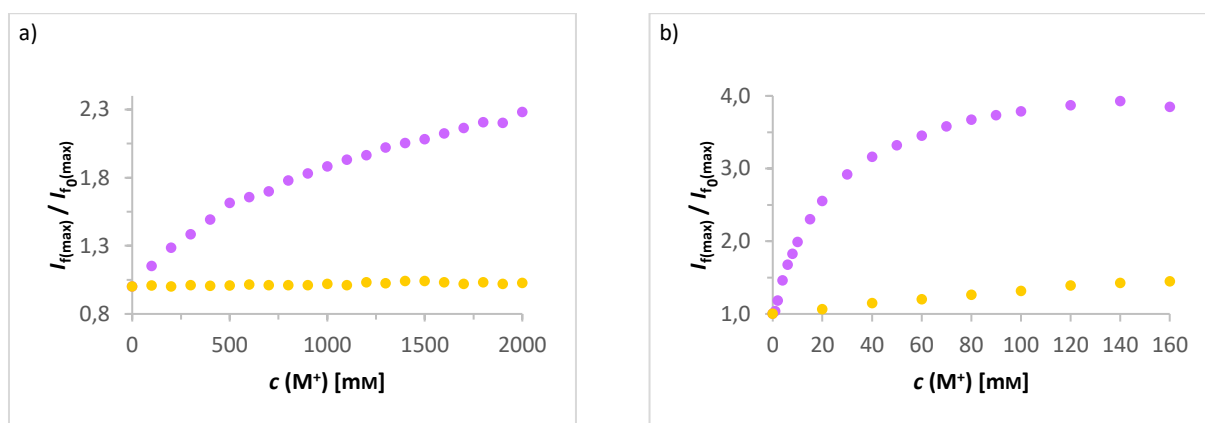


Abb. 4.31: Änderungen der Fluoreszenzintensitäten von **W1** und **W2**

Änderung der Fluoreszenzintensitäten ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2) a) **W1** in Gegenwart von 2000 mM KCl (lila) und 2000 mM NaCl bei 518 nm und b) **W2** in Gegenwart von 160 mM KCl (lila) und 160 mM NaCl bei 515 nm.

Um die bis dahin beobachteten guten Kalium-/Natrium-Selektivitäten von **W1** und **W2** weiter zu bekräftigen, wurden im nächsten Schritt Titrationsmessungen in kombinierten Lösungen durchgeführt, die sowohl Natrium- wie auch Kalium-Ionen mit Gesamtkonzentrationen von 2000 mM für **W1** und 160 mM für **W2** enthielten. Diese ergaben eine Steigerung der Fluoreszenzintensität um das 2.2-fache für **W1** und um das 2.5-fache für **W2** (s. Anhang S65, S66).

Nachdem der Einfluss von Kalium- und Natrium-Ionen auf die Fluoreszenzintensität untersucht wurde, sollte im Anschluss deren Einfluss auf die Fluoreszenzlebensdauer von **W1** und **W2** bestimmt werden. Aufgrund des zugrundeliegenden PET-Prozesses in **W1** und **W2** wurden komplexe Fluoreszenzkinetiken beobachtet. Die Fluoreszenzabklingkurven bei $\lambda_{em} = 447$ nm ($\lambda_{ex} = 415$ nm) für

W1 und **W2** konnten unter Verwendung einer biexponentiellen Abklingkinetik gut angepasst werden. In Gegenwart von 2000 mM Kalium-Ionen konnte für **W1** eine biexponentielle Abklingzeit mit ähnlichen Lebensdauern, jedoch mit unterschiedlichen Anteilen wie in dessen Abwesenheit festgestellt werden. Dies ergab Zerfallszeiten von 3.8 ns (71 %) und 22.8 ns (21 %) (Tab. 4.7). Während der Komplexbildung der Kalium-Ionen nahm der Anteil der kurzen Fluoreszenzabklingzeitkomponente zu und der der langen ab, sodass die gemittelte Fluoreszenzabklingzeit ($\tau_{\text{fl(av)}}$) von 12.4 auf 9.3 ns abnahm (s. Anhang S68). Für **W2** konnten bei 160 mM Kalium-Ionen Zerfallszeiten von 2.8 ns (8 %) und 23.5 ns (92 %) bestimmt werden. Die gemittelte Fluoreszenzabklingzeit von 17.8 ns stieg auf 21.6 ns an (s. Anhang S69). Die Bestimmungen der Fluoreszenzabklingzeiten in kombinierten Lösungen, die sowohl Natrium- wie auch Kalium-Ionen mit Gesamtkonzentrationen von 2000 mM für **W1** und 160 mM für **W2** enthielten waren nahezu identisch zu denen, die zuvor ohne Natrium-Ionen bestimmt wurden. Dies spricht für eine gute Kalium-/Natrium-Selektivität der Fluoroionophore **W1** und **W2** (Abb. 4.32).

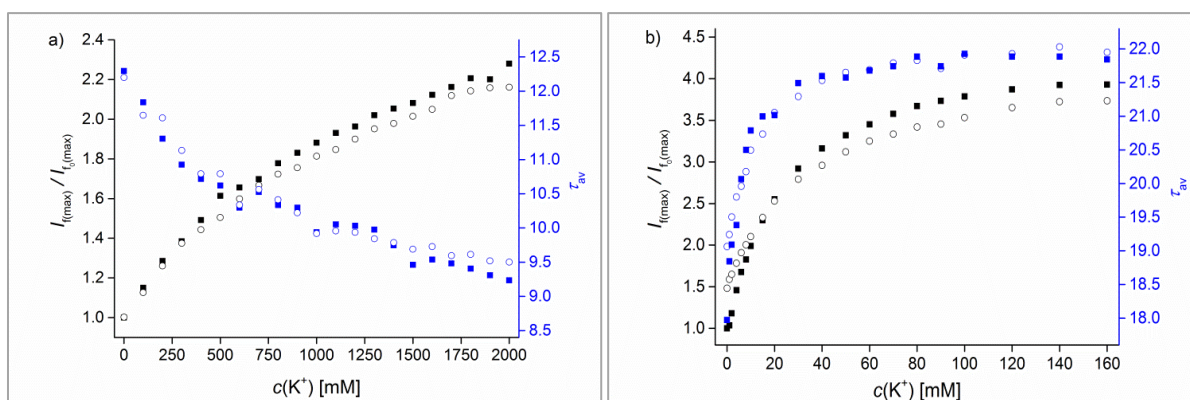


Abb. 4.32: Fluoreszenzsteigerungen (schwarz) und Änderungen der Fluoreszenzabklingzeiten (blau) von **W1** und **W2**.

a) **W1** ($c = 10^{-5}$) und b) **W2** ($c = 10^{-5}$) in Gegenwart von verschiedenen Kalium-Ionen Konzentrationen (gefüllte Quadrate) und in kombinierten Kalium-/Natrium-Ionen Lösungen (Kreise) mit einer konstanten Ionenstärke $[K^+] + [Na^+] = 2000$ mM für **W1** und 160 mM für **W2**.

Die Bestimmungen der Dissoziationskonstanten erfolgten im Anschluss mit Hilfe einer linearen Regression der Fluoreszenzintensitäten bzw. der Fluoreszenzabklingzeiten von **W1** und **W2** gegen die entsprechenden Kalium-Ionen Konzentrationen. Eine genaue Bestimmung der K_d -Werte für **W1** der Natrium-Ionen freien und kombinierten Lösungen basierend auf den Fluoreszenzintensitäten oder den Fluoreszenzabklingzeiten war nicht möglich, da es zu einer anhaltenden Signaländerung in Gegenwart der Kalium-Ionen kam. So ergaben vorläufige Analysen der Natrium-Ionen freien und kombinierten Lösungen für **W1** K_d -Werte > 300 mM. Basierend auf Änderungen der Fluoreszenzintensität in Gegenwart von Kalium-Ionen beträgt der K_d -Wert von **W2** 18 mM und der auf der gemittelten Fluoreszenzabklingzeit basierende 6 mM. Diese stimmten gut mit der Kalium-Ionen Konzentration im extrazellulären Raum überein. Der Trend, dass die Änderungen der Fluoreszenzabklingzeit einen niedrigeren K_d -Wert ergeben, wurde auch schon für andere Ionen-sensitive Fluoreszenzlebenszeitsensoren beobachtet. [65,66,68]

Die für **W2** bestimmten K_d -Werte der kombinierten Kalium-/Natrium-Ionen Lösungen waren mit 22 mM bzw. 10 mM nur minimal gestiegen. Die doch recht ähnlichen K_d -Werte für **W2** der kombinierten Kalium-/Natrium-Ionen und Natrium-Ionen freien Lösungen spiegeln dessen gute Kalium-/Natrium-Selektivität wider.

Die Synthesen der Fluoroionophore **W1** und **W2** durch die Kupplung von azidfunktionalisierten *N*-Phenylaza-[18]krone-6-ether Derivaten mit einem alkinfunktionalisierten **DBD**-Ester Fluorophor unter Verwendung einer CuAAC ermöglichten es, die Konzentration von Kalium-Ionen in Gegenwart von Natrium-Ionen durch eine Steigerung der Fluoreszenzintensität zu bestimmen. Die Messungen der Fluoreszenzlebensdauern in Ab- und Anwesenheit von Kalium-Ionen ergaben biexponentielle Zerfallskinetiken mit ähnlichen Lebensdauern, jedoch unterschiedlichen Anteilen. Durch Variation des Substituenten in *ortho* Position der Anilin-Einheit des *N*-Phenylaza-[18]krone-6-ethers konnte der K_d -Wert für Kalium-Ionen Konzentrationen in Anwesenheit von Natrium-Ionen von > 300 mM auf bis zu 10 mM verringert werden. Fluoroionophor **W2** ist demnach ein geeigneter selektiver Fluoroionophor, um im physiologisch relevanten Bereich extrazelluläre Kalium-Ionen Konzentrationen durch Messungen der Fluoreszenzintensitäten oder Fluoreszenzlebensdauer zu bestimmen.

	λ_{abs} [nm]	λ_{em} [nm]	$\phi_{\text{fl}}^{\text{[a]}}$	FEF ^[b]	τ_{fl} [ns] ^[c] (%)	K_d [mM] ^[d]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	$\epsilon \cdot \phi_{\text{fl}}$ [M ⁻¹ cm ⁻¹]
W1	415	518	0.040	-	3.8 (55) 22.8 (45)	-	4109	164
W1 + K⁺	415	518	0.093	2.3	3.8 (71) 22.8 (29)	> 300 (I_{fl}) > 300 (τ_{fl})	4257	396
W1 + Na⁺	415	518	0.041	1.1	3.8 (56) 22.8 (44)	-	4173	171
W2	413	515	0.110	-	2.8 (27) 23.5 (73)	-	3394	373
W2 + K⁺	413	515	0.435	3.8	2.8 (8) 23.5 (92)	18 (I_{fl}) 6 (τ_{fl})	3439	1496
W2 + Na⁺	413	515	0.160	1.4	2.8 (22) 23.5 (78)	-	3405	545

Tab. 4.7: Photophysikalische Eigenschaften von **W1** und **W2**.

Photophysikalische Eigenschaften von **W1** und **W2**: untersucht in gepufferten H₂O/DMSO Gemischen (99:1, v/v, 10 mM Tris, pH = 7.2) in Ab- und Anwesenheit von K⁺- oder Na⁺-Ionen. [a] Fluoreszenzquantenausbeute (\pm 15)%. [b] Fluoreszenzsteigerungsfaktoren, FEF = I/I_0 [c] Fluoreszenzlebenszeit, (\pm 15)%. [d] K_d für Kalium-Ionen Komplexe basierend auf Kalium-Ionen induzierte Änderungen der Fluoreszenzintensität und -lebenszeit. ^[118]

Erste Experimente, durchgeführt am Institut für Biologie/ Molekulare Biophysik an der Humboldt Universität zu Berlin mit Fluoroionophor **W2** zeigten, dass dessen Anwendung in biologischen Systemen möglich ist. Hierfür wurde der Kalium-Ionen Ausstrom aus menschlichen roten Blutkörperchen (RBC) gemessen. Da die Membranen der RBC Kalium-Ionen Kanäle (Gardos-Kanal) enthalten, die durch intrazelluläre Calcium-Ionen aktiviert werden, bewirkt ein Anstieg der

intrazellulären Calcium-Ionen-Konzentration ein Ausströmen von Kalium-Ionen. Um diesen Ausstrom messen zu können, wurden die RBC in einem Calcium-Ionen-haltigen Puffer inkubiert und die zelluläre Aufnahme der Calcium-Ionen durch die Zugabe des Calcium-Ionen Ionophors Ionomycin ausgelöst. Um die Löschung der Fluoreszenz von **W2** zu minimieren, wurden die Messungen bei niedrigen RBC-Konzentrationen durchgeführt, da Hämoglobin Absorptionsbanden im Bereich der Fluoreszenz-emission von **W2** aufweist. Nach der Zugabe von Ionomycin stieg die Fluoreszenz von **W2** innerhalb von 10 min leicht an und nach 120 min signifikant.^[118]

4.6 Ratiometrische Fluoroionophore für Kalium-Ionen

Mit Hilfe der bisher dargestellten Fluoroionophore für Kalium-Ionen in Kapitel 4.3 ist es bereits gelungen darzulegen, dass das Fluoreszenzsignal abhängig vom Design des Fluoroionophores ist und dass dies durch Änderungen in der Struktur beeinflusst werden kann. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Fluoroionophore durch einen Spacer zwischen Elektronendonator- und Akzeptor-Einheit elektronisch entkoppelt sind und sie daher für das Kalium-Ionen induzierte Ausschalten des PET-Prozesses verwendet werden können, was einen Anstieg der Fluoreszenzintensität, normalerweise bei nur einer Emissionswellenlänge, verursacht.^[119-122] Diese Bestimmungsmethoden reagieren empfindlich auf Änderungen der zellulären Farbstoffkonzentration. Daher lag im letzten Teil dieser Arbeit der Fokus darauf, ratiometrische Kalium-Ionen Fluoroionophore zu entwickeln, die eine Kalium-Ionen induzierte Änderung bei zwei Wellenlängen aufweisen, da diese für Messungen in H₂O bisher noch nicht beschrieben wurden.

In früheren Arbeiten gelang es S. AST bereits mit dem Fluoroionophor **D**, einen Kalium-Ionen sensitiven Fluoroionophor zu präsentieren, der aus einem *N*-Phenylaza-[18]krone-6-ether Ionophor und einer Anthracen-Einheit als lokal angeregten (LE) Fluorophor, verbunden durch eine 1,2,3-Triazol-Einheit bestand (Abb. 4.33). Dieser zeigte in Acetonitril einen schwach emittierenden CT-Zustand (S_1) bei 539 nm und einen LE-Zustand (S_2) bei 415 nm.^[53] In Gegenwart von Kalium-Ionen wurde der CT-Zustand verringert und somit energetisch nach oben verschoben und der LE-Zustand wurde zum dominierenden fluoreszierenden Zustand (S_1). Fluoroionophor **D** ist ein „light-up“ Farbstoff für Kalium-Ionen mit einem Kalium induzierten Zustandswechsel in H₂O. Bei der Komplexbildung der Kalium-Ionen kam es zu einer 12-fachen Steigerung der Fluoreszenzintensität, der ermittelte K_d -Wert lag jedoch weit über 300 mM und war somit deutlich zu hoch, um eine Bestimmung von Kalium-Ionen im physiologisch relevanten Bereich durchführen zu können.

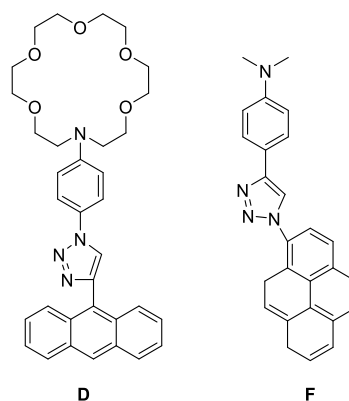


Abb. 4.33: Strukturen der Referenzverbindungen **D** und **F**.

Für die Darstellung neuer ratiometrischer Fluoroionophore war es also wichtig Kalium-Ionen sensitive Ionophore mit einem geeigneten Fluorophor zu verknüpfen. Dabei fiel die Wahl des Ionophors auf die zuvor schon in **K3** – **K6** verwendete *N*-(*o*-Methoxyethoxyphenyl)aza-[18]krone-6-Einheit, da diese schon als Kalium-Ionen selektiver Baustein für die Bestimmung physiologisch relevanter Kalium-Ionen Konzentrationen verwendet wurde und auch aktuell Bestandteil einiger hoch selektiver Kalium-Ionen Indikatoren ist.^[57,123-125] Als fluorophore Einheit wurde auf die typischen LE-Fluorophore Anthracen und Pyren zurückgegriffen. LE-Fluorophore, die mit einer elektronenreichen Dimethylanilin-Einheit substituiert sind und somit in einer vollständig π -konjugierten Anordnung vorliegen, sind dafür bekannt, in polaren Lösungsmitteln zu fluoreszierenden CT-Zuständen zu neigen. So wurde zum Beispiel von STAERK für das Pyren-*N,N*-dimethylanilin ein intensiv fluoreszierender CT-Zustand mit einer Fluoreszenzquantenausbeute von 95 % bei einem Emissionsmaximum von 532 nm und für das analoge Anthracen-Anilin eine Quantenausbeute von 47 % bei einem Maximum von sogar 582 nm in Acetonitril beschrieben.^[126] Ein duales Emissionsverhalten für das 1,2,3-Triazol-Pyren-Derivat **F** konnte zuvor auch schon von BAG und KUNDU in Dioxan/Wasser-Gemischen beschrieben werden (Abb. 4.33).^[127-129]

Die Fluoroionophore **R1** und **R2** konnten mit Hilfe einer CuAAC des azidfunktionalisierten Ionophor *N*-(*o*-Methoxyethoxyphenyl)aza-[18]krone-6-ether **1d** mit dem 9-Ethynylanthracen **35**^[130,131] bzw. dem kommerziell erhältlichen 1-Ethynalpyren **36** dargestellt werden (Abb. 4.34).^[127-129] Dabei wurde die Anordnung der 1,2,3-Triazol-1,4-diyl-Einheit mit dem Fluorophor über das sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffatom (C4) gewählt, da diese im vorangegangenen Teil dieser Arbeit die bessere Selektivität für Kalium-Ionen in Gegenwart von Natrium-Ionen aufwies.

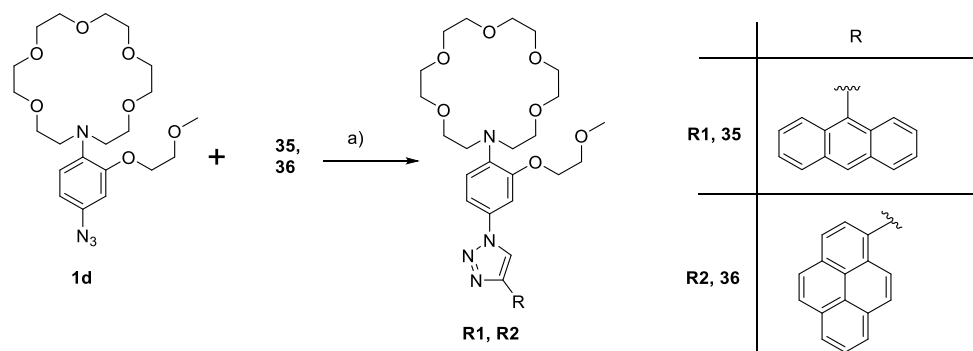


Abb. 4.34: Darstellung der Fluoroionophore **R1** und **R2** mittels CuAAC.

a) $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, Na-asc., DMF/ H_2O (2:1, v/v), 60°C .

Für die anschließenden Untersuchungen der photophysikalischen Eigenschaften unter simuliert physiologischen Bedingungen wurden Stammlösungen der Fluoroionophore **R1** und **R2** mit einer Konzentration von 10^{-3} mol/l in DMSO hergestellt. Zur Vorbereitung der spektroskopischen Messungen wurden diese mit einer 10 mM Tris-Puffer Lösung (pH = 7.2) auf 10^{-5} mol/l ($\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v) verdünnt.

Die aufgenommenen UV/VIS-Spektren von **R1** und **R2** zeigen Überlagerungen von CT-Banden und typische polyzyklische aromatische Absorptionsbanden. Dabei konnten für beide jeweils zwei CT-Absorptionsbanden beobachtet werden, die für **R1** bei rund 300 und 330 nm und für **R2** bei rund 285 und 370 nm lagen. Die CT-Absorptionsbanden für **R1** bei 330 nm und für **R2** bei 370 nm wurden hauptsächlich durch die typischen Anthryl- oder Pyrenyl-Absorptionsbanden überlagert (Abb. 4.35).^[126]

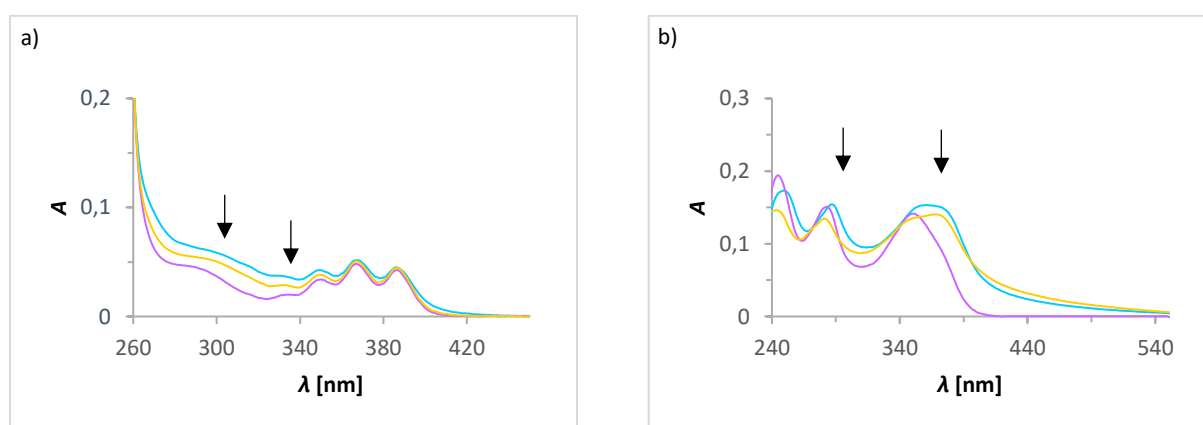


Abb. 4.35: Absorptionsspektren der Fluoroionophore **R1** und **R2**.

UV/VIS-Spektren ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2) in 10 mM Tris-Puffer (türkis), in Gegenwart von 160 mM KCl (lila) und 160 mM NaCl (gelb) a) **R1** und b) **R2**.

Die kurzwelligen Absorptionsbanden um 300 nm und 285 nm entsprechen einem CT vom freien Elektronenpaar des Stickstoffs der Anilin-Einheit zu dem 1,2,3-Triazol-Elektronenakzeptor, wie bereits

für die π -konjugierten Anilino-1,2,3-triazol-1,4-diyl-Fluoroionophore **K5** – **K9** dargestellt. Des Weiteren gehören die CT-Absorptionsbanden für **R1** bei 330 nm bzw. für **R2** bei 370 nm zu einem CT von der Anilino-triazol-Donor-Einheit zu der Anthryl-Akzeptor-Einheit bzw. der Pyrenyl-Akzeptor-Einheit, wie es bereits auch für den Fluoroionophor **D** gezeigt werden konnte.^[53] Diese CT-Bande trat für **R1** im Vergleich zu **D** (423 nm) blauverschoben und weniger intensiv auf, da im Vergleich zu **D** die in *ortho* Position der Anilin-Donor-Einheit substituierte Methoxyethoxy-Gruppe zu einer schwächeren Elektronendonator-Einheit in **R1** führte.

Die aufgenommenen Fluoreszenzspektren zeigten für **R1** die typischen Anthracen-Emissionspeaks und für **R2** konnte im Bereich von 370 – 440 nm die typische Pyren-Emission vom LE-Zustand und der breite Emissionspeak bei 505 nm für den fluoreszierenden CT-Zustand, wie er schon für Verbindung **F** beobachtet wurde, festgestellt werden (s. Anhang S70, S72).^[53,127-129] Für **R1** konnte kein fluoreszierender CT-Zustand im Bereich von 450 -650 nm in H₂O festgestellt werden. Außerdem konnte für **R1** mit $\varphi_{fl} = 0.024$ eine niedrigere Fluoreszenzquantenausbeute bestimmt werden als für **R2** mit $\varphi_{fl} = 0.092$.

Im Anschluss daran wurde der Einfluss von Kalium- bzw. Natrium-Ionen im physiologisch relevanten Bereich von 1 – 160 mM auf die Fluoroionophore **R1** und **R2** untersucht. Dabei konnte für **R1** in Gegenwart von 160 mM Kalium-Ionen eine Steigerung der Fluoreszenzintensität um das 7.7-fache beobachtet werden, wohingegen 160 mM Natrium-Ionen nur einen leichten Anstieg um das 1.7-fache bewirkten. Die maximale Signaländerung konnte für **R1** bei einer Konzentration von 140 mM bestimmt werden, mit einer Fluoreszenzquantenausbeute von $\varphi_{fl} = 0.193$. Für **R2** konnten in Gegenwart von Kalium-Ionen dagegen Änderungen der Fluoreszenzintensität bei zwei Wellenlängen (405 nm und 505 nm) beobachtet werden. Die Fluoreszenzintensität des CT-Zustandes bei 505 nm wurde in Gegenwart von 50 mM Kalium-Ionen um das 4.8-fache reduziert und die Fluoreszenzintensität des LE-Zustandes wurde bei 405 nm um das 4.6-fache erhöht (Abb. 4.36). Fluoroionophor **R2** besitzt also in Gegenwart von Kalium-Ionen ein duales Emissionsverhalten. Bei der Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeuten für **R2** konnte in Gegenwart von 160 mM Kalium-Ionen eine Reduktion auf $\varphi_{fl} = 0.023$ und für Natrium-Ionen nur ein geringer Einfluss ($\varphi_{fl} = 0.081$) festgestellt werden.

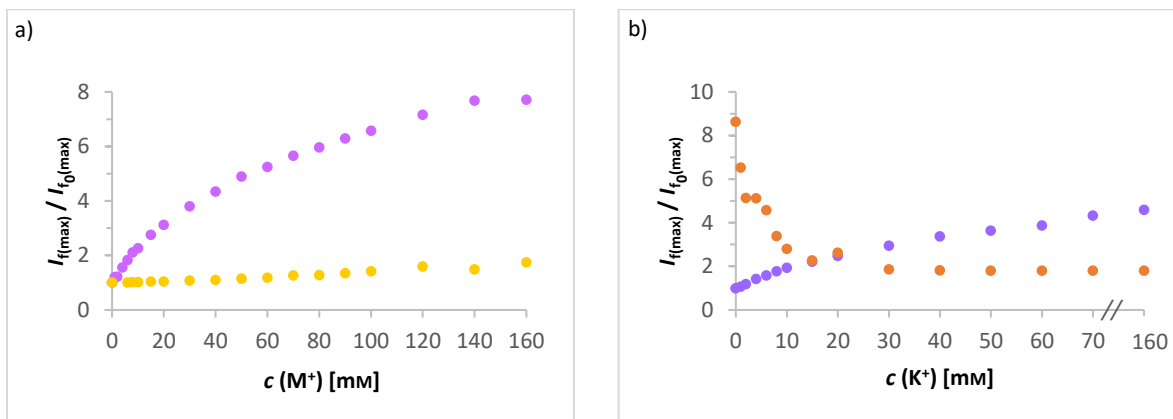


Abb. 4.36: Änderungen der Fluoreszenzintensitäten für **R1** und **R2** in Gegenwart von 160 mM KCl.

a) Fluoreszenzintensitätsänderungen von **R1** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 365$ nm) in Gegenwart von 160 mM KCl (lila) und 160 mM NaCl (gelb) bei 424 nm und b) Fluoreszenzintensitätsänderungen von **R2** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 345$ nm) bei 405 nm (lila) und 505 nm (orange) in Gegenwart von 160 mM KCl.

Im nächsten Schritt wurden Fluoreszenztitrationen von verschiedenen Kalium-Ionen Konzentrationen in Gegenwart von Natrium-Ionen durchgeführt, um die Kalium-/Natrium-Selektivität von **R1** und **R2** genauer zu untersuchen. Hierbei konnte für **R1** bei der Titration von bis zu 160 mM Kalium-Ionen eine Steigerung der Fluoreszenzintensität um das 4.5-fache beobachtet werden, die wesentlich geringer war als die der Natrium-Ionen freien Titration. Die Steigerungen der Fluoreszenzintensitäten für **R2** bei den Wellenlängen 405 und 505 nm waren zwar etwas geringer als die der Natrium-freien Titrationen, lagen aber mit einer Senkung um das 3.1-fache in einem ähnlichen Bereich (Abb. 4.37).

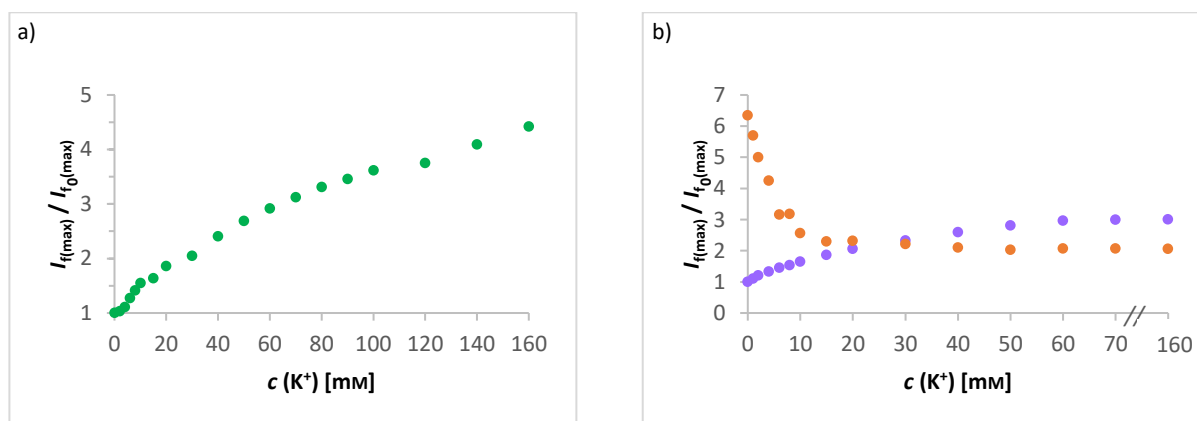


Abb. 4.37: Änderungen der Fluoreszenzintensitäten für **R1** und **R2** in kombinierten Lösungen

a) Fluoreszenzintensitätsänderungen von **R1** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 365$ nm) in Gegenwart von 160 mM KCl (lila) und 160 mM NaCl (gelb) bei 424 nm und b) Fluoreszenzintensitätsänderungen von **R2** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 345$ nm) bei 405 nm (lila) und 505 nm (orange) für 160 mM KCl in Gegenwart von NaCl. Die Ionenstärke wurde konstant gehalten ($[\text{K}^+] + [\text{Na}^+] = 160$ mM).

Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurde mit Hilfe einer linearen Regression der Fluoreszenzintensitäten von **R1** und **R2** gegen die entsprechenden Kalium-Ionen Konzentrationen durchgeführt (s. Anhang S74-76). Dabei konnte festgestellt werden, dass die gleichzeitige Anwesenheit

der konkurrierenden Natrium-Ionen unter simuliert physiologischen Bedingungen die Kalium-Ionen Komplexstabilität von **R1** und **R2** nur geringfügig beeinflusst. Der K_d –Wert von **R1** in Natrium-Ionen freien Lösungen von 38 mM steigt unter Verwendung der kombinierten Lösungen lediglich auf 41 mM an. Und auch für **R2**, mit einem K_d –Wert von 8 mM der Natrium-Ionen freien Lösungen, konnte in den kombinierten Lösungen lediglich ein Anstieg des K_d –Wertes auf 9 mM bestimmt werden.

Die mit Hilfe der CuAAC dargestellten Fluoroionophore **R1** und **R2**, welche sich lediglich in ihren Fluorophoren unterscheiden, weisen in Gegenwart von Kalium-Ionen beide eine ausreichende Änderung der Fluoreszenzintensität unter simuliert physiologischen Bedingungen auf. Für **R1** konnte die größte Steigerung der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Mit einem K_d –Wert um rund 40 mM ist es mit **R1** möglich extrazelluläre Kalium-Ionen Konzentrationen *in vitro* zu überwachen.

Mit Fluoroionophore **R2** ist es gelungen, einen Fluoroionophor zu präsentieren, der die Messung extrazellulärer Kalium-Ionen Konzentrationen durch die Bestimmung des Intensitätsverhältnisses bei zwei Emissionswellenlängen *in vitro* ermöglicht. Er weist eine ausgezeichnete Kalium-Ionen Selektivität in Anwesenheit von Natrium-Ionen auf. Das ratiometrische Verhalten von **R2** in Gegenwart von Kalium-Ionen liegt einer durch Kalium-Ionen induzierten Zustandsumkehr zugrunde. Die durch spektroskopische Untersuchungen bestimmten photophysikalischen Eigenschaften sind in Tab. 4.8 zusammengefasst.

	λ_{abs} [nm]	λ_{em} [nm]	ϕ_{fl} ^[a]	FEF ^[b]	$K_d^{\text{K}^+}$ [mM] ^[c]	$K_d^{\text{K}^+/\text{Na}^+}$ [mM] ^[d]
R1	386, 367, 349, 330, \approx 300	423, 405	0.024	-	-	-
R1 + K⁺	386, 367, 349, 333, \approx 300	423, 405	0.193	7.7	38	41
R1 + Na⁺	386, 367, 349, 330, \approx 300	423, 405	0.040	1.7	-	-
R2	370, 285	505, 405, 385	0.092	-	-	-
R2 + K⁺	370, 285	495, 405, 385	0.023	4.6 (405 nm) 4.8 (505 nm)	8	9
R2 + Na⁺	370, 285	505, 405, 385	0.081	-	-	-

Tab. 4.8: Photophysikalische Eigenschaften von **R1** und **R2**.

Photophysikalische Eigenschaften von **R1** und **R2**: untersucht in gepufferten H₂O/DMSO Gemischen (99:1, v/v, 10 mM Tris, pH = 7.2) in Ab- und Anwesenheit von K⁺ - oder Na⁺ Ionen. [a] Fluoreszenzquantenausbeute (\pm 15)%. [b] Fluoreszenzsteigerungsfaktoren, FEF = I/I_0 , [c] K_d für K⁺ Komplexe in Abwesenheit von Na⁺ und [d] in Anwesenheit von Na⁺ ($[\text{K}^+] + [\text{Na}^+] = 160$ mM).^[132]

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, Fluoreszenzfarbstoffe von der Klasse der Fluoroionophore, basierend auf einen *N*-Phenylazakronenether als Ionophor mit entsprechenden Fluorophoren über einen π -konjugierten 1,2,3-Triazol-1,4-diyl-Spacer so zu funktionalisieren, dass diese es ermöglichten intra- bzw. extrazelluläre Kalium- bzw. Natrium-Ionen Konzentrationen zu bestimmen. Dabei dienten die zuvor im Arbeitskreis HOLDT dargestellten Kalium- bzw. Natrium-Ionen Fluoroionophore als Ausgangspunkt maßgeschneiderte Fluoroionophore zu entwickeln, die aufgrund ihrer photophysikalischen Eigenschaften wie der Fluoreszenzsteigerung oder der Fluoreszenzquantenausbeute und ihrer Selektivität gegenüber des zu bestimmenden Kations dafür geeignet sind, *in vitro* Bestimmungen unter simuliert physiologischen Bedingungen durchzuführen. Da die elektronische Konjugation zwischen Ionophor (Elektronendonator) und Fluorophor (Elektronenakzeptor) durch eine 1,2,3-Triazol-1,4-diyl-Einheit zu einer gut funktionierenden Signaltransduktionskette führte, in der der signalgebende Mechanismus auf einen Photoinduzierten Elektronentransfer (PET) beruht, wurde diese Anordnung der Fluoroionophore beibehalten.

Ein grundlegender Schritt dieser Arbeit stellte die Entwicklung neuer Synthesestrategien dar, die es ermöglichten, die Gestaltung der Ionophore effizienter durchführen zu können. Ausgehend von den bisherigen Synthesewegen der alkin- bzw. azidfunktionalisierten Ionophore, konnten diese unter Verwendung entsprechender Fluoraromaten und Azakronenether in weniger Syntheseschritten und somit auch in kürzerer Reaktionszeit dargestellt werden.

Ein erstes Ziel bei der Entwicklung der neuen Kalium- und Natrium-Ionen sensitiven Fluoroionophore die auf Änderungen der Fluoreszenzintensität basieren, war es, durch Variationen der in *ortho* Position der *N*-Phenylazakronenether befindlichen Alkoxy-Gruppen eine höhere Komplexstabilität zu erzielen und dabei die Selektivität gegenüber des konkurrierenden Kations zu steigern. Weiterhin sollte unter Verwendung von geeigneten Fluorophoren mit höheren Fluoreszenzquantenausbeuten und Emissionswellenlängen erreicht werden, dass die Komplexierung der Kationen mit den Fluoroionophoren zu einer höheren Fluoreszenzintensitätssteigerung als bisher führte und dass die Emissionswellenlänge auf über 500 nm verschoben wird und eine Autofluoreszenz der Zelle bei Messungen minimiert werden kann. Dabei wurden in einem ersten Schritt die schon bekannten Kalium-Ionen sensitiven Ionophore des alkin- bzw. azidfunktionalisierten *N*-(*o*-Methoxyethoxyphenyl)aza-[18]krone-6-ether mit dem Coumarin 6H Fluorophor in Form eine Cu(I)-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) modifiziert. Mit Hilfe der spektroskopischen Untersuchungen der erhaltenen Isomere **K5** und **K6** (Abb. 5.1) konnte gezeigt werden, dass die Anordnung, bei der der Anilin-Elektronendonator über das Stickstoffatom (N1) und der Fluorophor über

das Kohlenstoffatom (C4) der 1,2,3-Triazol-1,4-diyl-Einheit miteinander verbunden sind, zu einer besseren Stabilität der gebildeten Kalium-Ionen-Komplexe führte und eine höhere Signaländerung erreicht werden konnte. Des Weiteren war es durch die Einführung des neuen Fluorophors gelungen eine Rotverschiebung des Emissionsmaximums auf über 500 nm zu erreichen, was eine Verbesserung zu den bisher verwendeten 7-Diethylaminocoumarin Fluoroionophoren um 18 nm bedeutete. Da die Komplexstabilität aber noch immer von den konkurrierenden Natrium-Ionen beeinflusst wurde, erfolgte in einem zweiten Schritt die Substitution einer Isopropoxy-Gruppe in *ortho* Position des *N*-Phenylaza-[18]krone-6-ethers, welche zunächst mit dem 7-Diethylaminocoumarin und dem Coumarin 6H modifiziert und spektroskopisch untersucht wurde. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Einführung der sperrigen Isopropoxy-Gruppe zwar zu einer etwas geringeren Komplexstabilität, aber dennoch zu einer Verbesserung der Kalium-Ionen Selektivität führte. Mit K_d -Werten von bis zu 45 mM sind die neuen Fluoroionophore zwar weniger gut für die Bestimmung von extrazellulären Kalium-Ionen Konzentrationen geeignet, dennoch konnte für den 7-Diethylaminocoumarin-Fluoroionophor **K7** (Abb. 5.1) festgestellt werden, dass die Komplexbildung der Kalium-Ionen in Anwesenheit von Natrium-Ionen nicht beeinflusst wurde. Diese ausgezeichnete Selektivität ermöglicht es **K7** für *in vitro* Überwachungen von Kalium-Ionen Konzentrationen im Bereich von 10–80 mM in Gegenwart von Natrium-Ionen zu verwenden. Mit dem Coumarin 6H-Fluoroionophore **K8** (Abb. 5.1) gelang es zwar das Emissionsmaximum auf 511 nm zu verschieben und eine Steigerung der Fluoreszenzintensität um das 4-fache zu erreichen, jedoch zeigte dieser eine weniger gute Selektivität und auch die Löschung der Fluoreszenz im unkomplexierten Zustand verschlechterte sich.

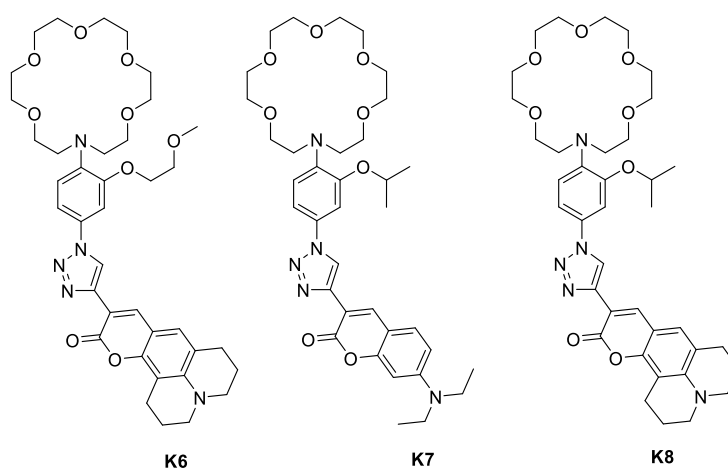


Abb. 5.1: Darstellung der Fluoroionophore **K6**, **K7** und **K8**.

Um feststellen zu können, inwieweit die Starrheit der *N,N*-Diethylamino-Gruppe dies beeinflusst, wurde als Ergänzung zu den Fluorophoren 7-Diethylaminocoumarin und Coumarin 6H, der bis dahin

noch unbekannte Coumarin-basierte Fluorophor **14** synthetisiert. Die Beweglichkeit des Stickstoffatoms ist bei diesem weniger eingeschränkt als bei Coumarin 6H. Leider konnte der somit dargestellte Fluoroionophor **K9** an dieser Stelle nicht eindeutig ausgewertet werden, da mit Hilfe der Titrationsmessungen keine eindeutigen Bestimmungen der Fluoreszenzintensitätssteigerungen und der K_d -Werte durchgeführt werden konnten. Es wird angenommen, dass es während der Komplexierung der Kationen zur Ausbildung von Sandwichkomplexen mit entweder zwei Kationen oder zwei Farbstoffmolekülen kam.

Die Entwicklung neuer Natrium-Ionen Fluoroionophore stützte sich in erster Linie auf den aus der Literatur bekannten Ionophor *N*-(*o*-Methoxyphenyl)aza-[15]krone-5-ether, der dazu diente, den Einfluss der 1,2,3-Triazol-1,4-diyl Isomerie auf die photophysikalischen Eigenschaften genauer zu untersuchen. Dazu wurden in einem ersten Schritt die Isomere der Coumarin 6H-Fluoroionophore **Na3** und **Na4** und der Coumarin-**14**-Fluoroionophore **Na5** und **Na6** dargestellt und spektroskopisch untersucht (Abb. 5.2).

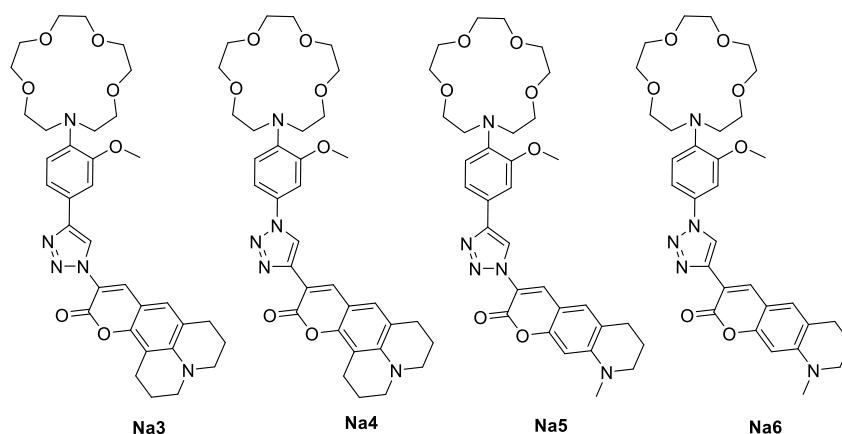


Abb. 5.2: Darstellung der Fluoroionophore **Na3**, **Na4**, **Na5** und **Na6**.

Dabei konnte bei allen vier Fluoroionophoren eine Verschiebung der Emissionsmaxima auf ≥ 500 nm realisiert werden. Unterschiede in der Selektivität und Komplexstabilität der Isomere machten auch hier deutlich, dass die Anordnung der Ionophore und Fluorophore über die 1,2,3-Triazol-1,4-diyl-Einheit einen Einfluss auf diese hat. Die Anordnung des Anilin-Elektronendonors über das Kohlenstoffatom (C4) und dem Fluorophor über das Stickstoffatom (N1) der 1,2,3-Triazol-1,4-diyl-Einheit führte zu den besseren Natrium-Ionen Selektivitäten und Komplexstabilitäten. Somit konnte mit einem K_d -Wert von 48 mM mit **Na3** ein Fluoroionophor entwickelt werden, der für die Überwachung von intrazellulären Natrium-Ionen Konzentrationen genutzt werden kann, da dieser nur geringfügig in Anwesenheit von Kalium-Ionen beeinflusst wurde. Mit einem K_d -Wert von 87 mM

ermöglicht es **Na5** hingegen extrazelluläre Natrium-Ionen Konzentrationen zu überwachen, da auch dieser nur geringfügig in Gegenwart von Kalium-Ionen beeinflusst wurde.

In einem weiteren Schritt erfolgte die Einführung der Isopropoxy-Gruppe in *ortho* Position des *N*-Phenylaza-[15]krone-5-ether Ionophors. Hiermit sollte untersucht werden, inwieweit sich die ausgezeichnete Selektivität von **K7** auf die Natrium-Ionen Fluoroionophore übertragen lässt. Unter Verwendung des im Rahmen dieser Arbeit erstmals synthetisierten *N*-(*o*-Isopropoxyphenyl)aza-[15]krone-5-ethers wurden die drei neuen Fluoroionophore **Na7**, **Na9** und **Na10** mit den Fluorophoren 7-Diethylaminocoumarin, Coumarin **14** und Coumarin 6H dargestellt. Untersuchungen der photophysikalischen Eigenschaften zeigten, dass die Einführung der Isopropoxy-Gruppe zwar zu einer leichten Verbesserung der Natrium-Ionen Selektivitäten führte, sich jedoch die Komplexstabilitäten der gebildeten Natrium-Ionen-Komplexe mit K_d -Werten ≥ 200 mM verschlechterten. Daher sind Messungen mit diesen Fluoroionophoren im physiologisch relevanten Bereich von 5 – 150 mM Natrium-Ionen nicht möglich.

Neben dem Ziel, neue Fluoreszenzintensitäts-basierte Kalium- und Natrium-Ionen sensitive Fluoroionophore für die Anwendung unter simuliert physiologischen Bedingungen darzustellen, konnten mit der von WESSIG etablierten Farbstoffklasse der **DBD**-Ester Fluoroionophore präsentiert werden, die die Bestimmung von Kalium-Ionen Konzentrationen durch Fluoreszenzlebenszeit-basierten Messungen ermöglichten. Basierend auf einem [1,3]-Dioxolo[4,5-*f*][1,3]benzodioxol-(**DBD**)-Grundgerüst, konnte ein alkinsubstituierter **DBD**-Ester Fluorophor in Form einer CuAAC mit azidfunktionalisierten *N*-Phenylaza-[18]krone-6-ether Derivaten erfolgreich zu den zwei neuen Fluoroionophoren **W1** und **W2** umgesetzt werden (Abb. 5.3).

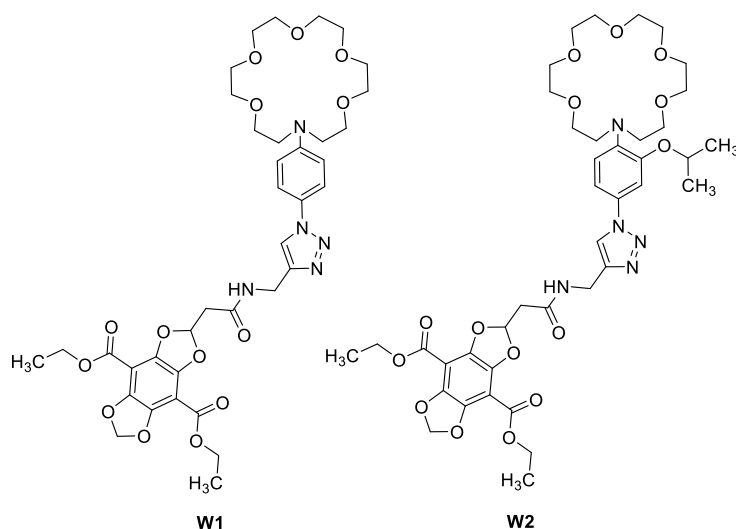


Abb. 5.3: Darstellung der Fluoroionophore **W1** und **W2**.

Anschließende spektroskopische Untersuchungen zeigten, dass es durch eine Steigerung der der Fluoreszenzintensität bei **W1** und **W2** möglich ist, im wässrigem Medium Kalium-Ionen in Gegenwart von Natrium-Ionen zu bestimmen. Fluoreszenzlebensdauermessungen von **W1** und **W2** ergaben biexponentielle Zerfallskinetiken mit ähnlichen Lebensdauern in Ab- und Anwesenheit von Kalium-Ionen, die sich lediglich in ihren jeweiligen Anteilen unterschieden. Die Variation des Substituenten in *ortho* Position der Anilin-Einheit des *N*-Phenylaza-[18]krone-6-ethers von einem Wasserstoffatom zur Isopropoxy-Gruppe zeigte, dass dies zu einem Einstellen des K_d -Wertes auf einen für extrazelluläre Kalium-Ionen Konzentrationen empfindlichen Bereich von > 300 mM auf 10 mM führte. Erste Experimente mit den Phenylaza-[18]krone-6-DBD Fluoroionophoren zeigten, dass dessen Anwendungen in biologischen Systemen möglich sind. So konnte mit **W2** der Kaliumausstrom aus menschlichen roten Blutkörperchen (RBC) untersucht werden. Nach Zugabe des Calcium-Ionen Ionophors Ionomycin zu einer RBC-Suspension in einem Calcium-Ionen-haltigen Puffer stieg die Fluoreszenz von **W2** innerhalb von 10 min leicht und nach 120 min signifikant an.

Der dritte Schwerpunkt bei der Entwicklung neuer Kalium-Ionen sensitiver Fluoroionophore lag dem Prinzip einer ratiometrischen Messung zu Grunde. Diese sollte es ermöglichen, Kalium-Ionen Konzentrationen bei zwei Emissionswellenlängen zu bestimmen. Als Ergebnis konnten zwei neue Fluoroionophore präsentiert werden, die aus einem *N*-(*o*-Methoxyethoxyphenyl)aza-[18]krone-6-ether bestehen und über einer 1,2,3-Triazol-1,4-diy-Einheit mit einem Anthracen bzw. Pyren funktionalisiert sind (Abb. 5.4).

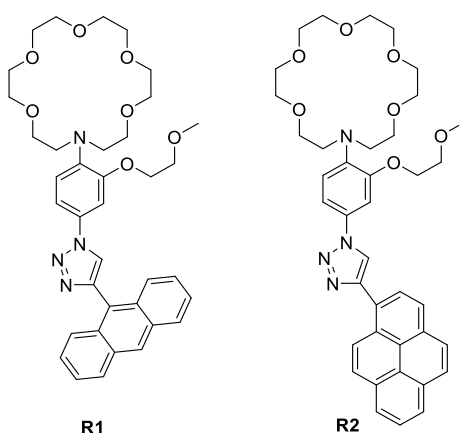


Abb. 5.4: Darstellung der Fluoroionophore **R1** und **R2**.

In Gegenwart von Kalium-Ionen zeigten beide Fluoroionophore eine Kalium-Ionen induzierte Änderung der Fluoreszenzintensität. Spektroskopische Untersuchungen im wässrigem Medium ergaben dabei für den Anthracen modifizierten Fluoroionophor **R1** eine Steigerung der Fluoreszenzintensität um das 7.7-fache und für den Pyren modifizierten Fluoroionophor **R2** ein duales

Emissionsverhalten bei 405 nm und 505 nm. In Gegenwart von Kalium-Ionen war zu beobachten, dass die CT-Bande bei 505 nm reduziert wurde und die LE-Emission bei 405 nm anstieg. Die Analyse der Intensitätsverhältnisse der zwei Emissionswellenlängen in Gegenwart von Kalium-Ionen ergab für **R2** einen K_d -Wert von 8 mM. **R2** ist demnach gut dafür geeignet, extrazelluläre Kalium-Ionen Konzentrationen *in vitro* zu bestimmen. Um **R2** auch für *in vivo* Bestimmungen von extrazellulären Kalium-Ionen Konzentrationen verwenden zu können, könnte dieser mit Alkylketten versehen werden, um sich in Membranen einzulagern.

Die erfolgreiche Kombination der *N*-Phenylaza-[18]krone-6-ether Ionophore mit den **DBD**-Ester Fluorophoren eröffnet eine weitere Möglichkeit für die Entwicklung neuer Natrium-Ionen Fluoroionophore. So konnten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe WESSIG bereits unter Verwendung von *N*-Phenylaza-[15]krone-5-ether Ionophore und dem **DBD**-Ester Fluorophor **32** die Fluoroionophore **W4** und **W5** erfolgreich in Form einer CuAAC dargestellt werden (Abb. 5.5). Dessen photophysikalischen Eigenschaften ändern sich in Abhängigkeit der Natrium-Ionen Konzentrationen.

Ein weiterer möglicher Ansatz bei der Entwicklung von Natrium-Ionen sensitiven Fluoroionophoren ergab sich aus den bereits für Kalium-Ionen sensitiven Fluoroionophor **R2**, in dem Literatur bekannte Ionophor, *N*-(*o*-Methoxyphenyl)aza-[15]krone-5-ether, über eine 1,2,3-Triazol-1,4-diyl-Einheit mit einem Pyren als Fluorophor versehen wurde. Erste Fluoreszenztitrationmessungen des Fluoroionophors **Na11** zeigten bereits eine Änderung der Fluoreszenzeigenschaften in Abhängigkeit der Natrium-Ionen Konzentration, ähnlich wie Fluoroionophor **R2**. Ein duales Emissionsverhalten von **Na11** könnte es ermöglichen, Natrium-Ionen Konzentrationen *in vitro* unter simuliert physiologischen Bedingungen zu bestimmen.

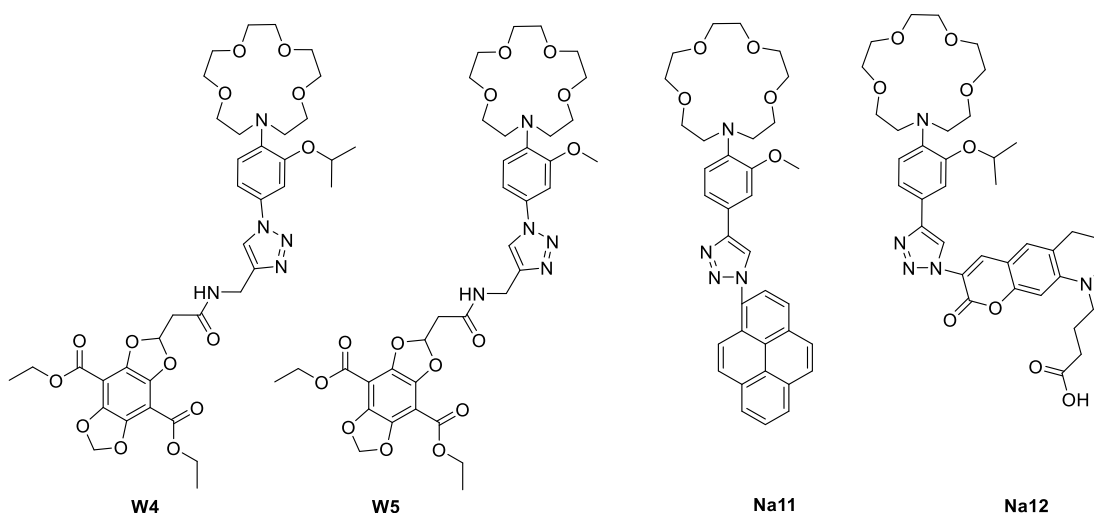


Abb. 5.5: Strukturvorschläge für weitere Natrium-Ionen sensitive Fluoroionophore.

Aufgrund der Bildung schwacher Komplexe mit Natrium-Ionen der Fluoroionophore **Na7**, **Na9** und **Na10**, könnte in einem weiteren Schritt untersucht werden, ob sich der *N*-(*o*-Isopropoxyphenyl)aza-[15]krone-5-ether Ionophor dazu eignet, Fluoroionophore für Lokalisationsmikroskopie-Techniken wie zum Beispiel dSTORM oder STED zu entwickeln. Einen Ansatz dafür könnte der im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte Fluorophor **14** liefern, da dessen Stickstoffatom die Möglichkeit bietet, diesen mit kopplungsfähigen Gruppen wie Carboxyl-Gruppen zu versehen. Mit Fluoroionophor **Na12** bestünde somit die Möglichkeit, einen Fluoreszenzfarbstoff zu präsentieren, der an biologische Strukturen koppeln wäre (Abb. 5.5).

In Rahmen dieser Arbeit konnten 17 neue Kalium- bzw. Natrium-Ionen Fluoroionophore dargestellt werden. Mit Hilfe der bestimmten photophysikalischen Eigenschaften, Komplexstabilitäten und Selektivitäten konnten 7 Fluoroionophore hervorhoben werden, die dazu geeignet sind, *in vitro* Bestimmungen von Natrium- bzw. Kalium-Ionen Konzentrationen unter simuliert physiologischen Bedingungen durchzuführen. Für zukünftige *in vivo* Untersuchungen der Kalium- bzw. Natrium-Ionen Konzentrationen könnten die Fluorophore mit einem Acetoxymethylester bzw. einem Lipidanker versehen werden, um intra- bzw. extrazelluläre Messungen zu ermöglichen.

6. Experimentelle Daten

6.1 Allgemeines

Chemikalien und Lösungsmittel

Alle, im Zuge dieser Arbeit verwendeten Feinchemikalien und Lösungsmittel wurden von den Firmen abcr, MERCK, Sigma-Aldrich, TCI und VWR bezogen. Reaktionen mit luft- oder feuchtigkeitsempfindlichen Substanzen wurden mit Lösungsmittel, die vorher einem geeigneten Trocknungsverfahren unterzogen wurden, in ausgeheizten Glasapparaturen und unter Schutzgas (Stickstoff bzw. Argon) durchgeführt. Die synthetisierten Verbindungen wurden mit Hilfe von NMR- und IR-Spektroskopie, Massenspektrometrie und über die Messung des Schmelzpunktes charakterisiert.

Dünnschicht- und Säulenchromatographie

Die bei Synthesen erforderlichen Analysen der Reaktionsverläufe erfolgten unter Anwendung von Kieselgel-Aluminiumfolien mit Fluoreszenz-Indikator (60 F₂₅₄) der Firma Merck. Als Laufmittel bzw. Laufmittelgemische wurden EE, EE/HEX, DCM, CHCl₃, CHCl₃/ MeOH verwendet. Die Reinigung erfolgte mittels präparativer Säulenchromatographie in Normalglassäulen mit Kieselgel 60 (40 – 63 µm) der Firma VWR mit den Eluenten EE, EE/HEX, DCM, CHCl₃, CHCl₃/ MeOH.

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren wurden mit einem BRUKER AVANCE 300 bzw. 500 MHz Spektrometer in den Lösungsmitteln CDCl₃, DMSO-*d*₆, Aceton-*d*₆ oder Acetonitril-*d*₃ aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm (*parts per million*) und die Kopplungskonstanten in Hz (Hertz) angegeben. Die Feinstrukturen der Signale sind mit s (Singulett), br s (breites Singulett), d (Dublett), t (Triplet), dd (Dublett vom Dublett), dt (Dublett vom Triplet), q (Quadrublett) und m (Multiplet) angegeben. Das jeweilige Lösungsmittelsignal diene als interner Standard mit den charakteristischen Verschiebungen: CDCl₃ bei $\delta_H = 7.26$ (¹H-NMR) und $\delta_C = 77.16$ (¹³C-NMR), DMSO-*d*₆ bei $\delta_H = 2.50$ (¹H-NMR) und $\delta_C = 39.52$ (¹³C-NMR), Aceton-*d*₆ bei $\delta_H = 2.05$ (¹H-NMR) und $\delta_C = 29.84$ (¹³C-NMR) und Acetonitril-*d*₃ bei $\delta_H = 1.94$ (¹H-NMR) und $\delta_C = 1.32$ (¹³C-NMR).^[133] Die Auswertung erfolgte mithilfe der MestReNova Software.

Infrarotspektroskopie (IR)

Für die Aufnahme der IR-Spektren wurde ein NEXUS FT-IR Spektrometer mit einem SmartOrbit ATR Aufsatz der Firma Thermo Nicolet verwendet. Die für die charakteristischen Banden angegebenen Schwingungsfrequenzen (ν) erfolgten ohne weitere Zuordnung in cm^{-1} und wurden mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} und 64 Scans aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Thermo Nicolet OMNIC® Software.

Massenspektrometrie (MS)

Die Aufnahme der hochaufgelösten Massenspektren (HRMS) zur Bestimmung der Massen erfolgte mittels Elektronenstoß-Ionisation (EI) mit einem HEWLETT-PACKARD GCMS 5995-A-Spektrometer (70 eV, Temperaturbereich 293 bis 593 K) oder Elektronenspray-Ionisation (ESI) mit einem Thermo Finnegan LTQ-FT-Massenspektrometer. Die Auftragung der einzelnen Signale erfolgte nach der Molmasse geteilt durch die Ladung (m/z) der detektierten Ionen. Die Auswertung der Spektren erfolgte anhand der $[M^+]$ (EI) und $[M+H]^+$ (ESI) Peaks.

Schmelzpunkte

Die angegebenen Schmelzpunkte der dargestellten Verbindungen wurden mit einer Schmelzpunktapparatur der Firma Mel-Temp® in einer offenen Glaskapillare (unkorrigiert) gemessen.

UV-VIS-Spektroskopie

Die Aufnahmen der UV-VIS Spektren erfolgte mit einem Lambda 750 UV/VIS Spektrometer der Firma PERKIN ELMER. Als Probengefäße wurden 10 mm Quarzglas-Küvetten der Firma HELIMA verwendet. Die Auswertung erfolgte mithilfe der installierten Software UV WinLab.

Fluoreszenzspektroskopie

Die Aufnahmen der Fluoreszenzspektren erfolgten mit einem Fluoromax 3 der Firma HORIBA JOBIN YVON. Die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauern erfolgte über TCSPC mit einem HORIBA JOBIN YVON Single Photon Counting Controller Fluorohub in Verbindung mit einem Fluoromax 4 der Firma HORIBA JOBIN YVON.

Die Fluoreszenzquantenausbeuten wurden mit einem MULTI-CHANNEL ANALYZER PMA-12 der Firma HAMAMATSU PHOTONIC in Verbindung mit einer ULBRICHT-Kugel bestimmt. Als Lichtquelle diente eine Xenon/Mercury-Xenon Lampe. Als Probengefäße der Fluoreszenzmessungen wurden 10 mm

Quarzglas-Küvetten verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels der installierten Software der Firma HORIBA JOBIN YVON und HAMAMATSU.

Bestimmung der Dissoziationskonstanten

Die Dissoziationskonstanten der Kalium- bzw. Natrium-Ionen-Komplexe, basierend auf Änderungen der Fluoreszenzintensitäten oder Fluoreszenzabklingzeiten, wurden mit Hilfe der Fluoreszenzintensitäten bzw. Fluoreszenzabklingzeiten der jeweiligen Emissionsmaxima in einer linearen Regression kalkuliert. Hierfür wurden nach der von Grynkiewicz beschriebenen Methode $\log[(I_f - I_{fmin})/(I_{fmax} - I_f)]$ bzw. $\log[(\tau_f - \tau_{fmin})/(\tau_{fmax} - \tau_f)]$ gegen $\log[K^+]$ bzw. $\log[Na^+]$ in Diagrammen aufgetragen. Diese doppelt logarithmischen Diagramme geben einen x-Achsenabschnitt wieder, der dem Logarithmus des K_d -Wertes entspricht.^[83]

I_f : Fluoreszenzintensität

I_{fmax} : Maximum der Fluoreszenzintensität bei gesättigter $[K^+]$

I_{fmin} : Minimum der Fluoreszenzintensität bei $[K^+] = 0$

τ_f : Fluoreszenzlebensdauer

τ_{fmax} : Maximum der Fluoreszenzlebensdauer bei gesättigter $[K^+]$

τ_{fmin} : Minimum der Fluoreszenzlebensdauer bei $[K^+]$

Die Dissoziationskonstanten für die Kalium-Ionen-Komplexe der ratiometrischen Fluoroionophore bei zwei Emissionswellenlängen, wurde mit Hilfe der Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Emissionsmaxima in einer linearen Regression kalkuliert. Hierfür wurde nach der von Grynkiewicz beschriebenen Methode $\log\{(R - R_{min})/(R_{max} - R)\} \times (F_{505max} - F_{505min})$ gegen $\log[K^+]$ in Diagrammen aufgetragen. Die doppelt logarithmischen Diagramme geben eine n x-Achsenabschnitt wieder, der dem Logarithmus des K_d -Wertes entspricht.^[83]

R : Rate der Emissionsintensität bei 505 nm zu der Emissionsintensität bei 405nm

R_{min} : Rate der Emissionsintensität bei 505 nm zu der Emissionsintensität bei 405nm bei $[K^+] = 0$

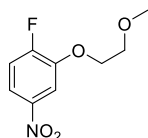
R_{max} : Rate der Emissionsintensität bei 505 nm zu der Emissionsintensität bei 405nm bei gesättigter $[K^+]$

F_{505max} : Fluoreszenzintensität bei $[K^+] = 0$

F_{505min} : Fluoreszenzintensität bei gesättigter $[K^+]$

6.2 Synthesen

1-Fluoro-2-(2-methoxyethoxy)-4-nitrobenzol (**1a**)



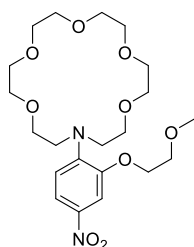
2.5 g (15.912 mmol) 2-Fluor-5-nitrophenol und 6.59 g (47.736 mmol) K_2CO_3 wurden in 50 ml getrocknetem DMF vorgelegt und mit 2.59 g (2.62 ml, 23.868 mmol) 2-Chloroethylmethylether und 2.86 g (19.094 mmol) NaI versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 24 h bei 60°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde die Reaktionslösung mit 50 ml H_2O verdünnt und mit DCM (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden erst mit gesättigter $Na_2S_2O_3$ -Lösung und dann mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, sodass 1.85 g der Verbindung **1a** als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 54 % erhalten wurden.

1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 7.94 – 7.85 (m, 2H), 7.28 – 7.18 (m, 1H), 4.29 (t, J = 4.6 Hz, 2H), 3.83 (t, J = 4.5 Hz, 2H), 3.47 ppm (s, 3H)

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 75 MHz): δ = 156.95, 148.17, 144.67, 117.83, 116.57, 110.65, 70.96, 69.74, 59.72 ppm

HR-MS (EI): m/z = 216.12 [M^+], berechnet: 216.07 $C_9H_{10}O_4F$

N-(4-Nitro-2-methoxyethoxyphenyl)aza-[18]krone-6-ether (**1b**)

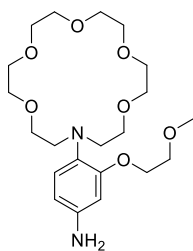


0.45 g (1.720 mmol) Aza-[18]krone-6 und 1.85 g (8.602 mmol) 1-Fluoro-2-(2-methoxyethoxy)-4-nitrobenzol wurden in getrocknetem DMF (6 ml) gelöst, mit 0.56 g (1.720 mmol) CS_2CO_3 versetzt und für 16 h bei 100°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde der Rückstand abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Öl wurde mittels Säulenchromatographie ($CHCl_3/MeOH$, 9:1 v/v) gereinigt, sodass 0.64 g der Verbindung **1b** als gelbes Öl mit einer Ausbeute von 81 % erhalten wurden.

1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 7.80 (dd, J = 9.1, 2.5 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 4.15 – 4.12 (m, 2H), 3.75 – 3.58 (m, 26H), 3.40 ppm (s, 3H)

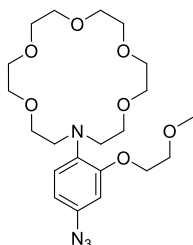
^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 75 MHz): δ = 148.39, 146.33, 139.08, 118.57, 115.65, 108.21, 70.77, 70.68, 70.64, 70.56, 70.52, 69.93, 67.92, 58.82, 52.83 ppm

***N*-(4-Amin-2-methoxyethoxyphenyl)aza-[18]krone-6-ether (**1c**)**



1.29 g (2.815 mmol) der Verbindung **1b** wurden in 30 ml getrocknetem MeOH gelöst und mit 173 mg Pd/C (0.282 mmol, 10 mol%) versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 4 Tage im Autoklaven unter Wasserstoff-Atmosphäre (50 bar) bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung über eine mit Celite®500 befüllte und mit MeOH angefeuchtete Fritte abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Es wurden 1.01 g der Verbindung **1c** als hellbraunes Öl mit einer Ausbeute von 84 % erhalten. Da sich das entstandene Amin **1c** als nicht stabil erwies, wurde es ohne weitere Analytik zum Azid **1d** umgesetzt.

***N*-(4-Azido-2-methoxyethoxyphenyl)aza-[18]krone-6-ether (**1d**)**

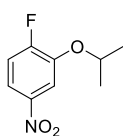


1.00 g (2.335 mmol) des Amins **1c** wurden in 20 ml 4 M HCl gelöst und auf 0°C abgekühlt. Dann wurde eine Lösung von 161 mg (2.335 mmol) NaNO₂ gelöst in 8 ml H₂O langsam zugetropft. Die entstandene hellbraune Lösung wurde für 30 min bei 0°C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung von 227 mg (3.500 mmol) NaN₃ gelöst in 8 ml H₂O zugetropft und für weitere 30 min bei 0°C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde langsam auf RT erwärmt und für 14 h gerührt. Durch die Zugabe von LiCO₃ wurde der pH-Wert der Lösung auf 7 eingestellt. Nach der Extraktion mit CHCl₃ (3x) wurden die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Öl wurde säulenchromatographisch (CHCl₃/MeOH, 95:5 → 9:1, v/v) gereinigt. Es wurden 0.43 g der Verbindung **1d** als braunes Öl mit einer Ausbeute von 41 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 6.89 – 6.59 (m, 3H), 4.13 – 4.10 (m, 2H), 3.77 – 3.56 (m, 26H), 3.40 ppm (s, 3H)

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 146.06, 138.63, 121.84, 116.44, 111.74, 110.21, 72.49, 71.07, 70.53, 70.31, 70.25, 69.75, 68.06, 61.64, 59.05 ppm

1-Fluoro-2-isopropoxy-4-nitrobenzol (2a**)**



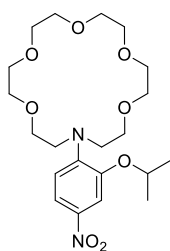
2.5 g (15.912 mmol) 2-Fluor-5-nitrophenol und 6.59 g (47.736 mmol) K₂CO₃ wurden in 40 ml getrocknetem DMF vorgelegt und mit 4.06 g (2.39 ml, 23.868 mmol) 2-Iodpropan versetzt. Die Reaktionslösung wurde zuerst für 5.5 h bei 60°C und dann für 16 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit 40 ml H₂O verdünnt und mit DCM (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden erst mit gesättigter Na₂S₂O₃-Lösung und dann mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am

Rotationsverdampfer entfernt, sodass 2.71 g der Verbindung **2a** als gelbes Öl mit einer Ausbeute von 86 % erhalten wurden.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.83 (m, 2H), 7.18 (dd, *J* = 14.3, 4.9 Hz, 1H), 4.67 (dt, *J* = 12.1, 6.1 Hz, 1H), 1.42 ppm (d, *J* = 6.1 Hz, 6H)

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 159.11, 155.70, 146.57, 117.08, 116.97, 111.85, 73.12, 21.91 ppm

N-(4-Nitro-2-isopropoxyphenyl)aza-[18]krone-6-ether (2b)



2.00 g (7.595 mmol) Aza-[18]krone-6 und 7.56 g (37.975 mmol) 1-Fluoro-2-isopropoxy-4-nitrobenzol wurden in getrocknetem DMF (20 ml) gelöst, mit 2.48 g (7.595 mmol) Cs₂CO₃ versetzt und für 16 h bei 100°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde der Rückstand abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene gelbe Öl wurde mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH, 95:5, v/v) gereinigt, sodass 3.02 g der Verbindung **2b** als gelbes Öl mit einer Ausbeute von 98 % erhalten wurden.

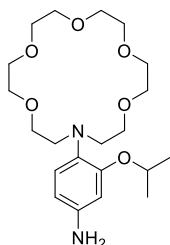
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.77 (dd, *J* = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 4.73 – 4.52 (m, 1H), 3.80 – 3.45 (m, 24H), 1.36 ppm (d, *J* = 6.0 Hz, 6H)

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 147.51, 146.95, 139.54, 117.94, 116.36, 109.42, 70.94, 70.80, 70.71, 70.55, 70.22, 69.96, 52.72, 21.82 ppm

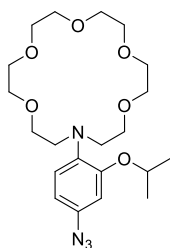
IR (ATR): ν = 2870, 1679, 1591, 1559, 1506, 1321, 1286, 1240, 1109, 980, 866, 799, 747, 465 cm⁻¹

HR-MS (EI): *m/z* = 442.2298 [M⁺], berechnet: 442.2315 C₂₁H₃₄N₂O₈

N-(4-Amino-2-isopropoxyphenyl)aza-[18]krone-6-ether (2c)



1.39 g (3.134 mmol) der Verbindung **2b** und 0.87 g (3.855 mmol) SnCl₂ · 2 H₂O wurden mit 5 ml Ethylacetat und 1.03 ml konzentrierter HCl versetzt und für 2 h bei 40°C gerührt. Anschließend wurden dem Reaktionsgemisch 7 ml H₂O zugesetzt und es wurde für weitere 24 h bei 40°C gerührt. Mit Hilfe einer 40%igen NaOH-Lösung wurde der pH-Wert des Reaktionsgemisches auf 8 eingestellt, abfiltriert und das Filtrat mit DCM (3x) extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Der erhaltene Rückstand wurde dann mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH, 9:1, v/v) gereinigt. Es wurden 1.05 g der Verbindung **2c** als hellbraunes Öl mit einer Ausbeute von 81 % erhalten. Da sich das entstandene Amin **2c** als nicht stabil erwies, wurde es ohne weitere Analytik zum Azid **2d** umgesetzt.

N-(4-Azido-2-isopropoxyphenyl)aza-[18]krone-6-ether (2d)

1.05 g (2.536 mmol) des Amins **2c** wurden in 20 ml 4 M HCl gelöst und auf 0°C abgekühlt. Dann wurde eine Lösung von 175 mg (2.536 mmol) NaNO₂ gelöst in 8 ml H₂O langsam zugetropft. Die entstandene hellbraune Lösung wurde für 30 min bei 0°C gerührt. Anschließend wurde eine Lösung von 247 mg (3.801 mmol) NaN₃ gelöst in 8 ml H₂O zugetropft und für weitere 30 min bei 0°C gerührt. Das Reaktionsgemisch

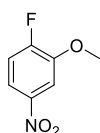
wurde langsam auf RT erwärmt und für 14 h gerührt. Durch die Zugabe von LiCO₃ wurde der pH-Wert der Lösung auf 7 eingestellt. Nach der Extraktion mit CHCl₃ (3x) wurden die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Öl wurde säulenchromatographisch (CHCl₃/MeOH, 95:5 → 9:1, v/v) gereinigt. Es wurden 0.35 g der Verbindung **2d** als braunes Öl mit einer Ausbeute von 33 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.10 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.58 (dd, *J* = 8.4, 2.4 Hz, 1H), 6.47 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 4.60 – 4.47 (m, 1H), 3.83 – 3.27 (m, 24H), 1.33 ppm (d, *J* = 6.1 Hz, 6H)

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 152.74, 124.98, 123.95, 116.22, 110.86, 106.36, 70.74, 70.63, 70.52, 70.31, 69.85, 69.79, 53.11, 22.05 ppm

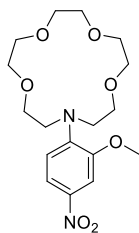
IR (ATR): ν = 2858, 2102, 1722, 1598, 1578, 1541, 1502, 1350, 1300, 1227, 1109, 1077, 986, 943, 838, 809, 634, 604 cm⁻¹

HR-MS (EI): *m/z* = 438.2460 [M⁺], berechnet: 438.2478 C₂₁H₃₄N₄O₆

1-Fluoro-2-methoxy-4-nitrobenzol (3a)

5.00 g (31.827 mmol) 2-Fluor-5-nitrophenol und 6.60 g (47.753 mmol) K₂CO₃ wurden in 150 ml ACN vorgelegt und mit 5.42 g (2.39 ml, 37.918 mmol) Iodmethan versetzt und für 2 h bei 90°C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung in 300 ml Eiswasser gegossen und mit EE (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden erst mit gesättigter Na₂S₂O₃-Lösung und dann mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, sodass 5.34 g der Verbindung **3a** als gelbbrauner Feststoff mit einer Ausbeute von 98 % erhalten wurden.

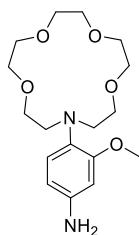
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.86 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 7.31 (m, 1H), 7.20 (m, 1H), 3.99 ppm (s, 3H)

N-(4-Nitro-2-methoxyphenyl)aza-[15]krone-5-ether (3b)

3.902 g (22.802 mmol) 1-Fluoro-2-methoxy-4-nitrobenzol und 1.00 g (4.56 mmol) Aza-[15]krone-5 wurden in 10 ml getrockneten DMF gelöst und mit 1.49 g (4.56 mmol) Cs₂CO₃ versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 16 h bei 100°C gerührt. Der Rückstand wurde nach Abkühlen auf RT abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene gelbe Öl wurde mittels Säulenchromatographie (CHCl₃) gereinigt, sodass 1.67 g der Verbindung **3b** als gelbes Öl in einer Ausbeute von 96 % erhalten wurde.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.87 (dd, *J* = 9.0, 2.0 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 6.90 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.78 – 3.56 ppm (m, 20H)

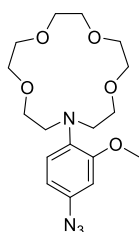
¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 149.36, 145.96, 139.25, 118.24, 115.37, 107.21, 70.97, 70.30, 70.17, 69.72, 55.72, 53.64 ppm

N-(4-Amin-2-methoxyphenyl)aza-[15]krone-5-ether (3c)

1.15 g (2.99 mmol) von Verbindung **3b** und 0.83 g (3.68 mmol) SnCl₂ · 2 H₂O wurden mit 3 ml Ethylacetat und 1 ml konzentrierter HCl versetzt und für 2 h bei 40°C gerührt. Zum gelben Reaktionsgemisch wurden 7 ml H₂O zugegeben und für weitere 24 h bei 40°C gerührt. Durch Zugabe einer 40%igen NaOH-Lösung wurde der pH-Wert des Gemisches auf 8 eingestellt. Der Rückstand wurde abfiltriert und das Filtrat mit DCM (3x) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Die anschließende Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH, 9:1, v/v), sodass 0.80 g der Verbindung **3c** als hellbraunes Öl mit einer Ausbeute von 75 % erhalten werden konnte.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.00 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 6.30 (s, 1H), 6.22 (d, *J* = 8.28 Hz, 1H), 5.64 (br s, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.70 – 3.36 ppm (m, 20H)

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 173.35, 154.78, 145.96, 125.05, 106.85, 98.65, 68.88, 68.83, 68.80, 67.01, 54.95, 54.89 ppm

N-(4-Azido-2-methoxyphenyl)aza-[15]krone-5-ether (3d)

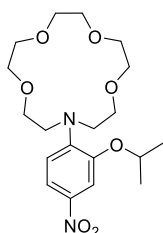
Zu 0.97 g (2.725 mmol) des Amins **3c** gelöst in 20 ml 4 M HCl, wurde bei 0°C eine Lösung von 188 mg (2.725 mmol) NaNO₂ in 10 ml H₂O langsam zugetropft und für 30 min bei 0°C gerührt. Anschließend wurden 266 mg (4.088 mmol) NaN₃, gelöst in 10 ml H₂O, langsam zugetropft und für weitere 30 min bei 0°C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf RT

erwärmt und für weitere 14 h bei RT gerührt. Der pH-Wert der Lösung wurde durch Zugabe von K_2CO_3 auf 7 eingestellt und anschließend mit $CHCl_3$ (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Öl wurde zum Abschluss säulenchromatographisch ($CHCl_3/MeOH$, 95:5, v/v) gereinigt, sodass 0.78 g der Verbindung **3d** als braunes Öl mit einer Ausbeute von 78 % gewonnen wurde.

1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 7.11 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.60 (dd, J = 8.4, 2.5 Hz, 1H), 6.47 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.75 – 3.43 ppm (m, 20H)

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 75 MHz): δ = 153.89, 137.25, 133.87, 122.16, 110.61, 103.25, 70.93, 70.48, 70.37, 70.08, 55.47, 53.13 ppm

***N*-(4-Nitro-2-isopropoxyphenyl)aza-[15]krone-5-ether (4b)**



0.84 g (3.816 mmol) Aza-[15]krone-5 und 3.80 g (19.078 mmol) 1-Fluoro-2-isopropoxy-4-nitrobenzol **2a** wurden in 8.5 ml getrocknetem DMF gelöst und mit 1.24 g (3.816 mmol) Cs_2CO_3 versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 16 h bei 100°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde der Rückstand abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene gelbe Öl wurde mittels Säulenchromatographie ($CHCl_3/MeOH$, 95:5, v/v) gereinigt. Es wurden 1.40 g der Verbindung **4b** als gelbes Öl in einer Ausbeute von 92 % erhalten.

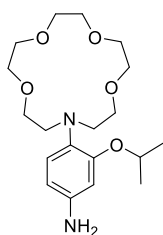
1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 7.77 (dd, J = 9.0, 2.5 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 4.67 – 4.59 (m, 1H), 3.73 – 3.61 (m, 20H), 1.37 ppm (d, J = 6.0 Hz, 6H)

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 75 MHz): δ = 147.41, 146.59, 139.55, 118.11, 115.99, 109.38, 71.20, 71.05, 70.52, 70.42, 70.00, 53.86, 21.91 ppm

IR (ATR): ν = 2863, 1580, 1501, 1315, 1273, 1235, 1179, 1108, 1088, 976, 939, 867, 799, 746, 641 cm^{-1}

HR-MS (EI): m/z = 398.2054 [M^+], berechnet: 398.2053 $C_{19}H_{30}N_2O_7$

***N*-(4-Amin-2-isopropoxyphenyl)aza-[15]krone-5-ether (4c)**



1.93 g (4.844 mmol) der Verbindung **4b** und 1.34 g (5.958 mmol) $SnCl_2 \cdot 2 H_2O$ wurden mit 10 ml Ethylacetat und 3 ml konzentrierter HCl versetzt und für 2 h bei 40°C gerührt. Anschließend wurden zu der Lösung 10 ml H_2O zugegeben und für weitere 24 h bei 40°C gerührt. Durch Zugabe einer 40%igen NaOH-Lösung wurde der pH-Wert des Gemisches auf 8 eingestellt. Der entstandene Rückstand wurde abfiltriert und das Filtrat mit DCM (3x) extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und über $MgSO_4$ getrocknet.

Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Die anschließende Aufreinigung erfolgte

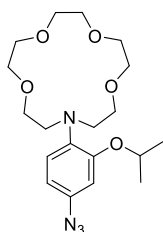
mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH, 9:1, v/v), sodass 1.07 g der Verbindung **4c** als hellbraunes Öl mit einer Ausbeute von 60 % erhalten wurde. Da sich das entstandene Amin **4c** sich nur als mäßig stabil erwies, wurde es ohne Durchführung einer IR-Analytik zum Azid **4d** umgesetzt.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 6.95 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.24 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.18 (dd, *J* = 8.2, 2.3 Hz, 1H), 4.54 – 4.46 (m, 1H), 3.71 – 3.54 (m, 16H), 3.30 (t, *J* = 5.2 Hz, 4H), 1.31 ppm (d, *J* = 6.0 Hz, 6H)

¹³C-NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ = 162.65, 153.50, 112.06, 107.67, 107.08, 102.92, 70.77, 70.49, 70.20, 69.91, 54.50, 22.31 ppm

HR-MS (EI): *m/z* = 368.2302 [M⁺], berechnet: 368.2311 C₁₉H₃₂N₂O₅

N-(4-Azido-2-isopropoxyphenyl)aza-[15]krone-5-ether (**4d**)



1.07 g (2.904 mmol) des Amins **4c** wurden in 20 ml 4 M HCl gelöst und auf 0°C gekühlt. Eine Lösung von 200 mg (2.904 mmol) NaNO₂ in 10 ml H₂O, wurde langsam zu dem Reaktionsgemisch zugetropft und für 30 min bei 0°C gerührt. Dann wurde eine Lösung von 283 mg (4.356 mmol) NaN₃ in 10 ml H₂O zugetropft und für 30 min bei 0°C gerührt. Nach dem langsamen Erwärmen auf RT wurde die Lösung für weitere 14 h bei RT

gerührt. Durch die Zugabe von K₂CO₃ wurde der pH-Wert der Lösung auf 7 eingestellt und im Anschluss mit CHCl₃ (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH, 9:1, v/v) gereinigt, sodass 0.92 g von der Verbindung **4d** als braunes Öl mit einer Ausbeute von 80 % gewonnen wurde.

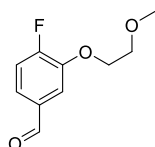
¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 7.05 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.55 (dd, *J* = 8.5, 2.5 Hz, 1H), 6.45 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 4.55 – 4.49 (m, 1H), 3.69 – 3.61 (m, 16H), 3.39 (t, *J* = 6.0 Hz, 4H), 1.32 ppm (d, *J* = 6.0 Hz, 6H)

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 152.22, 138.73, 133.73, 122.79, 110.86, 106.42, 71.13, 70.66, 70.53, 70.47, 53.52, 22.20 ppm

IR (ATR): ν = 2855, 2105, 1682, 1596, 1577, 1501, 1348, 1296, 1230, 1109, 981, 938, 853 cm⁻¹

HR-MS (EI): *m/z* = 394.2222 [M⁺], berechnet: 394.2216 C₁₉H₃₀N₄O₅

4-Fluoro-3-methoxyethoxybenzaldehyd (**5a**)



2.5 g (17.843 mmol) 4-Fluoro-3-hydroxybenzaldehyd und 7.40 g (53.539 mmol) K₂CO₃ wurden in 50 ml getrocknetem DMF vorgelegt und mit 2.53 g (2.45 ml, 26.765 mmol) 2-Chloro-ethylmethylether und 3.21 g (21.412 mmol) NaI versetzt. und für 5.5 h bei 60°C gerührt. Anschließend wurde das Gemisch auf RT abgekühlt und für weitere 12 h bei RT gerührt.

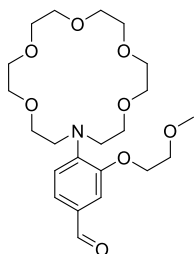
Die hellgelbe Reaktionslösung wurde mit 20 ml H₂O verdünnt und mit DCM (3x) extrahiert. Die

vereinigten organischen Phasen wurden mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde zum Abschluss säulenchromatographisch (DCM) gereinigt. Es wurden 2.83 g von der Verbindung **5a** als hellgelbes Öl mit einer Ausbeute von 80 % erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 9.61 (s, 1H), 7.48 – 7.46 (m, 2H), 7.28 – 7.15 (m, 1H), 4.14 (t, J = 4.6 Hz, 2H), 3.76 (t, J = 4.5 Hz, 2H), 3.35 ppm (s, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 190.67, 159.03, 149.50, 134.86, 126.61, 114.93, 114.42, 70.48, 68.64, 57.81 ppm

***N*-(4-Formyl-2-methoxyethoxyphenyl)aza-[18]krone-6-ether (5b)**



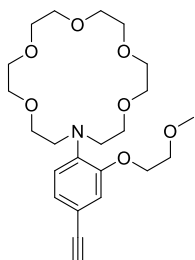
1.00 g (3.799 mmol) Aza-[18]krone-6 und 3.76 g (22.802 mmol) 4-Fluoro-3-methoxyethoxybenzaldehyd **5a** wurden in 10 ml getrocknetem DMF vorgelegt und mit 0.53 g (3.799 mmol) K_2CO_3 versetzt. Nach 16 h rühren bei 130°C wurde das Reaktionsgemisch auf RT abgekühlt und mit 100 ml Ethylacetat verdünnt. Die Lösung wurde dann mit H_2O (3x) gewaschen und die abgetrennte organische Phase

über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der erhaltene Rückstand mittels Säulenchromatographie ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 100:0 \rightarrow 95:5, v/v) gereinigt. Es wurden 1.45 g der Verbindung **5b** als gelbbraunes Öl mit einer Ausbeute von 87 % erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ = 9.69 (s, 1H), 7.30 (dd, J = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 4.11 – 4.08 (m, 2H), 3.71 – 3.55 (m, 26H), 3.36 ppm (s, 3H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz): δ = 190.14, 149.69, 146.08, 128.22, 126.73, 116.46, 111.01, 70.70, 70.61, 70.55, 70.48, 70.42, 69.95, 67.46, 58.65, 52.61 ppm

***N*-(4-Ethynyl-2-methoxyethoxyphenyl)aza-[18]krone-6-ether (5c)**



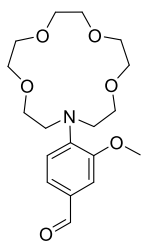
1.00 g (2.266 mmol) der Verbindung **5b** und 0.63 g (4.532 mmol) K_2CO_3 wurden in 20 ml getrocknetem MeOH vorgelegt und mit 0.52 g (2.651 mmol) BOR versetzt. Nach 10 h rühren bei RT wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit 60 ml H_2O und 60 ml CHCl_3 aufgenommen. Nach der Phasentrennung wurde die organische Phase mit H_2O (3x) gewaschen und über

MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der erhaltene ölige Rückstand mittels Säulenchromatographie ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 100:0 \rightarrow 95:5, v/v) gereinigt. Es wurden 0.60 g der Verbindung **5c** als hellbraunes Öl mit einer Ausbeute von 61 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.02 (dd, J = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 6.92 – 6.89 (m, 2H), 4.07 – 4.04 (m, 2H), 3.72 – 3.47 (m, 26H), 3.38 (s, 3H), 2.98 ppm (s, 1H)

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 150.57, 141.23, 125.66, 119.37, 116.92, 113.83, 84.09, 75.57, 70.84, 70.75, 70.63, 70.59, 70.36, 69.97, 67.61, 58.78, 52.45 ppm

***N*-(4-Formyl-2-methoxyphenyl)aza-[15]krone-5-ether (6b)**

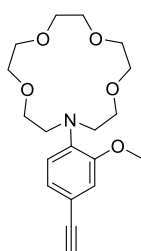


1.00 g (4.560 mmol) Aza-[15]krone-5 und 3.50 g (22.802 mmol) 4-Fluoro-3-methoxybenzaldehyd **6a** wurden in 10 ml getrocknetem DMF vorgelegt und mit 0.63 g (4.560 mmol) K₂CO₃ versetzt. Nach 16 h rühren bei 130°C wurde das Reaktionsgemisch auf RT abgekühlt und mit 100 ml Ethylacetat verdünnt. Die Lösung wurde dann mit H₂O (3x) gewaschen und die abgetrennte organische Phase über MgSO₄ getrocknet. Das

Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der erhaltene Rückstand mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH, 100:0 → 95:5, v/v) gereinigt. Es wurden 0.70 g der Verbindung **6b** als hellgelbes Öl mit einer Ausbeute von 44 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 9.76 (s, 1H), 7.35 (d, J = 12.2 Hz, 2H), 7.01 (s, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.76 – 3.72 (m, 4H), 3.67 – 3.61 ppm (m, 16H)

***N*-(4-Ethynyl-methoxyphenyl)aza-[15]krone-5-ether (6c)**

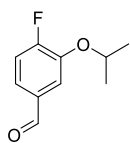


1.14 g (3.229 mmol) der Verbindung **6b** und 0.89 g (6.458 mmol) K₂CO₃ wurden in 28 ml getrocknetem MeOH vorgelegt und mit 0.73 g (3.791 mmol) BOR versetzt. Nach 10 h rühren bei RT wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit 75 ml H₂O und 75 ml CHCl₃ aufgenommen. Nach der Phasentrennung wurde die organische Phase mit H₂O (3x) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das

Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der erhaltene ölige Rückstand mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH, 100:0 → 95:5, v/v) gereinigt. Es wurden 0.70 g der Verbindung **6c** als hellbraunes Öl mit einer Ausbeute von 63 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.04 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 6.99 – 6.89 (m, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.68 – 3.59 (m, 16H), 3.52 – 3.48 (m, 4H), 3.00 ppm (s, 1H)

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 151.32, 140.93, 125.21, 119.06, 115.13, 113.94, 84.15, 75.57, 70.85, 70.34, 70.25, 69.94, 55.37, 52.85 ppm

4-Fluoro-3-isopropoxybenzaldehyd (7a)

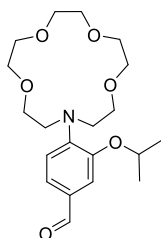
2.50 g (17.843 mmol) 4-Fluoro-3-hydroxybenzaldehyd und 2.67 ml (26.765 mmol) 2-Iodpropan wurden in 40 ml getrocknetem DMF gelöst und mit 7.40 g (53.529 mmol) K_2CO_3 versetzt und für 5.5 h bei 60°C gerührt. Anschließend wurde das Gemisch auf RT abgekühlt und für weitere 12 h bei RT gerührt. Die hellgelbe Reaktionslösung wurde mit 20 ml H_2O verdünnt und mit DCM (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit $Na_2S_2O_3$ -Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde zum Abschluss säulenchromatographisch (DCM) gereinigt. Es wurden 2.71 g von der Verbindung **7a** als farbloses Öl mit einer Ausbeute von 83 % erhalten.

1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 9.89 (s, 1H), 7.50 (dd, J = 8.1, 1.9 Hz, 1H), 7.42 (ddd, J = 8.2, 4.5, 1.9 Hz, 1H), 7.21 (dd, J = 10.5, 8.2 Hz, 1H), 4.65 (dt, J = 12.1, 6.1 Hz, 1H), 1.39 ppm (d, J = 6.1 Hz, 6H)

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 75 MHz): δ = 190.84, 157.63, 147.04, 133.30, 125.12, 116.94, 115.46, 72.33, 22.01 ppm

IR (ATR): ν = 2981, 1679, 1607, 1510, 1439, 1298, 1262, 1207, 1114, 942, 881, 791, 762, 632, 577 cm^{-1}

HR-MS (EI): m/z = 182.0742 [M^+], berechnet: 182.0743 $C_{10}H_{11}FO_2$

N-(4-Formyl-2-isopropoxyphenyl)aza-[15]krone-5-ether (7b)

1.25 g (5.700 mmol) Aza-[15]krone-5 und 5.19 g (28.502 mmol) des Aldehyds **7a** wurden in 12.5 ml getrocknetem DMF gelöst, mit 0.87 g (6.270 mmol) K_2CO_3 versetzt und für 16 h bei 130°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Reaktionsgemisch mit 100 ml Ethylacetat verdünnt und mit H_2O (3x) gewaschen. Die organische Phase wurde dann über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde dann mittels Säulenchromatographie ($CHCl_3/MeOH$, 100:0 \rightarrow 95:5, v/v) gereinigt. Es wurden 0.69 g der Verbindung **7b** als hellgelbes Öl mit einer Ausbeute von 32 % erhalten.

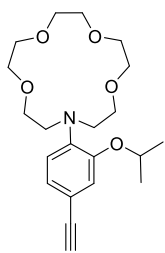
1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 9.71 (s, 1H), 7.34 – 7.28 (m, 2H), 7.25 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 4.62 (dt, J = 12.1, 6.0 Hz, 1H), 3.72 (t, J = 5.7 Hz, 4H), 3.65 – 3.60 (m, 16H), 1.33 ppm (d, J = 6.0 Hz, 6H)

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 75 MHz): δ = 190.32, 148.93, 147.04, 128.81, 126.27, 117.09, 112.98, 71.31, 70.64, 70.57, 70.51, 70.39, 53.58, 22.08 ppm

IR (ATR): ν = 2864, 2703, 1673, 1588, 1560, 1510, 1432, 1374, 1346, 1245, 1178, 1107, 988, 924, 872, 812, 735, 628, 587 cm^{-1}

HR-MS (EI): m/z = 381.2150 [M^+], berechnet: 381.2151 $C_{20}H_{31}NO_6$

***N*-(4-Ethynyl-isopropoxyphenyl)aza-[15]krone-5-ether (7c)**



0.69 g (1.814 mmol) der Verbindung **7b** und 0.50 g (3.628 mmol) K_2CO_3 wurden in 16 ml getrocknetem MeOH vorgelegt und mit 0.41 g (2.123 mmol) BOR versetzt. Nach 10 h rühren bei RT wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit 20 ml H_2O und 20 ml $CHCl_3$ aufgenommen. Nach der Phasentrennung wurde die organische Phase mit H_2O (3x) gewaschen und mit $MgSO_4$ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der erhaltene ölige Rückstand mittels Säulenchromatographie ($CHCl_3/MeOH$, 100:0 \rightarrow 95:5, v/v) gereinigt. Es wurden 0.67 g der Verbindung **7c** als hellbraunes Öl mit einer Ausbeute von 98 % erhalten.

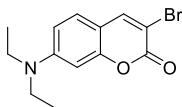
1H -NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 7.01 (dd, J = 8.2, 1.9 Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.90 (s, 1H), 4.53 (dt; J = 12.1, 6.1 Hz, 1H), 3.71 – 3.60 (m, 16H), 3.49 (t, J = 6.1 Hz, 4H), 2.98 (s, 1H), 1.32 ppm (d, J = 6.1 Hz, 6H)

^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 75 MHz): δ = 149.95, 142.83, 125.67, 120.10, 119.18, 114.23, 84.66, 75.45, 71.39, 70.88, 70.72, 70.66, 53.37, 22.31 ppm

IR: ν = 2880, 2103, 1681, 1589, 1563, 1482, 1450, 1372, 1333, 1256, 1211, 1118, 1088, 987, 865, 825, 782, 671, 622, 570 cm^{-1}

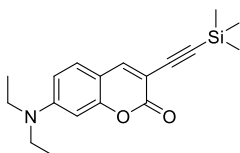
HR-MS (ESI): m/z = 378.2244 [$M+H^+$], berechnet: 378.2280 $C_{21}H_{31}NO_6$

3-Bromo-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-on (10)



Da von der Verbindung **10** aus vorangegangenen Arbeiten noch ausreichend vorhanden war, konnte damit an dieser Stelle weitergearbeitet werden.

7-(Diethylamino)-3-((trimethylsilyl)ethynyl)-2H-chromen-2-on (11)

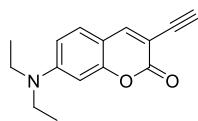


1.48 g (5.000 mmol) der Verbindung **10** wurden in 50 ml getrocknetem DMF vorgelegt und mit 183 mg (0.260 mmol) $PdCl_2(PPh_3)_2$, 980 mg (1.4 ml, 10.000 mmol) TMSA, 1.11 g (1.5 ml, 11.000 mmol) TEA und 49.6 mg

(0.260 mmol) CuI versetzt und für 16 h bei 60°C gerührt. Dann wurde die Reaktionslösung auf RT abgekühlt, mit 200 ml H_2O verdünnt und mit DCM (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (EE/HEX, 1:4, v/v) gereinigt, sodass 0.53 g der Verbindung **11** als orangener Feststoff mit einer Ausbeute von 34 % erhalten wurde.

1H -NMR (Aceton- d_6 , 300 MHz): δ = 7.93 (s, 1H), 7.44 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 6.78 (dd, J = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 6.51 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 3.58 (q, J = 7.0 Hz, 4H), 1.26 (t, J = 7.0 Hz, 6H), 0.24 ppm (s, 9H)

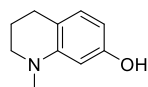
7-(Diethylamino)-3-ethynyl-2H-chromen-2-on (**12**)



0.53 g (1.699 mmol) der Verbindung **11** wurden in 10 ml MeOH und 40 ml getrocknetem THF gelöst. 0.67 g (0.74 ml, 2.549 mmol, 1M in THF) TBAF wurden zugegeben und für 8 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (EE/HEX, 1:4, v/v) gereinigt. Es wurden 0.33 g der Verbindung **12** als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 81 % erhalten.

¹H-NMR (Aceton-*d*₆, 300 MHz): δ = 7.96 (s, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 6.78 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 6.52 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 3.72 (s, 1H), 3.58 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H), 1.30 ppm (t, *J* = 7.0 Hz, 6H)

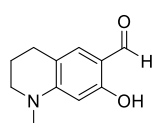
1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-7-ol (**13a**)



2.58 g (17.279 mmol) 1,2,3,4-Tetrahydroquinolin-7-ol und 2.39 g (17.279 mmol K₂CO₃) wurden in 20 ml getrocknetem DMF vorgelegt. Die Lösung wurde dann mit 2.45 g (1.08 ml, 17.279 mmol) Iodmethan versetzt und für 2 h bei 100°C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf RT abgekühlt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der entstandene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (EE/HEX, 1:2, v/v) gereinigt, sodass 2.42 g der Verbindung **13a** als weißer Feststoff mit einer Ausbeute von 86 % erhalten wurde.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 6.79 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 6.13 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.09 (dd, *J* = 7.9, 2.3 Hz, 1H), 3.23 – 3.17 (m, 2H), 2.85 (s, 3H), 2.68 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.00 – 1.90 ppm (m, 2H)

7-Hydroxy-1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-carbaldehyd (**13**)



2.51 g (1.5 ml, 16.370 mmol) POCl₃ wurden mit 3 ml getrocknetem DMF versetzt und für 2 h bei RT gerührt. Der Lösung wurden 2.43 g (14.882 mmol) der Verbindung **13a**, gelöst in 10 ml getrocknetem DMF, zugegeben und für 10 h bei RT gerührt. Dann wurde das Reaktionsgemisch langsam auf 50 ml Eiswasser gegossen und mit CHCl₃ (5x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (EE/HEX, 1:3, v/v) gereinigt. Es wurden 2.28 g der Verbindung **13** als braunes Öl mit einer Ausbeute von 80 % gewonnen.

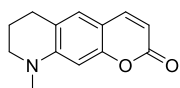
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 9.42 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 5.97 (s, 1H), 3.39 – 3.33 (m, 2H), 2.97 (s, 3H), 2.70 – 2.63 (m, 2H) 1.93 ppm (dt, *J* = 12.1, 6.1 Hz, 2H)

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 191.83, 163.54, 153.11, 132.69, 115.04, 111.18, 95.99, 51.24, 39.12, 27.00, 21.97 ppm

IR (ATR): ν = 2885, 2844, 1642, 1572, 1529, 1349, 1244, 1223, 904, 822, 782, 768, 702, 542 cm⁻¹

HR-MS (EI): m/z = 191.0939 [M⁺], berechnet: 191.0946 C₁₁H₁₃NO₂

9-Methyl-6,7,8,9-tetrahydro-2H-pyrano[3,2-g]quinolin-2-on (14)



2.26 g (11.923 mmol) des Aldehyds **13** und 5.13 g (3.62 ml, 23.846 mmol)

Diethylmalonat wurden in 130 ml getrocknetem EtOH vorgelegt. Nach dem Zufügen

von 21 Tropfen Piperidin wurde die Reaktionslösung für 24 h bei 80°C gerührt. Anschließend wurde die Lösung auf RT abgekühlt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mit 42 ml konzentrierter HCl und 42 ml Eisessig versetzt. Nach 12 h Rühren bei 80°C wurde die Reaktionslösung auf RT abgekühlt und auf 200 ml Eiswasser gegossen. Ein pH-Wert von 7 wurde durch Zugabe von 1 M NaOH-Lösung eingestellt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und im Exsikkator getrocknet. Der Feststoff wurde mit 5 ml CHCl₃ aufgenommen und per Säulenchromatographie (EE/HEX, 1:1, v/v) gereinigt. Es wurden 2.26 g der Verbindung **14** als hellbrauner Feststoff mit einer Ausbeute von 88 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.47 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.36 (s, 1H), 6.00 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 3.38 – 3.31 (m, 2H), 2.95 (s, 3H), 2.73 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 1.95 ppm (dt, J = 11.7, 6.2 Hz, 2H)

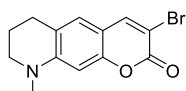
¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 162.44, 155.56, 149.51, 143.68, 126.86, 119.97, 109.31, 108.56, 96.81, 50.97, 39.09, 27.38, 21.87 ppm

IR (ATR): ν = 2942, 2847, 1689, 1612, 1524, 1409, 1356, 1310, 1255, 1210, 1192, 1164, 1101, 908, 829, 808, 609, 566, 450 cm⁻¹

HR-MS (EI): m/z = 215.0940 [M⁺], berechnet: 215.0946 C₁₃H₁₃NO₂

Mp: Zers. ab 126°C

3-Bromo-9-methyl-6,7,8,9-tetrahydr-2H-pyrano[3,2-g]quinolin-2-on (15)



2.78 g (12.919 mmol) des Quinolins **14** wurden in 94 ml Eisessig vorgelegt und auf

15°C abgekühlt. 2.07 g (0.66 ml, 12.919 mmol) Br₂ wurden langsam dazu getropft.

Nach 30 min rühren bei RT wurde der entstandene hellbraune Rückstand abfiltriert und mit Essigsäure gewaschen und getrocknet. Der Rückstand wurde aus ACN bei 80°C umkristallisiert. Nach dem Absaugen und Trocknen wurden 3.31 g der Verbindung **15** als beiger Feststoff mit einer Ausbeute von 87 % erhalten.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ = 8.26 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 3.40 – 3.30 (m, 2H), 2.95 (s, 3H), 2.70 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 1.97 ppm (dt, *J* = 11.8, 6.0 Hz, 2H)

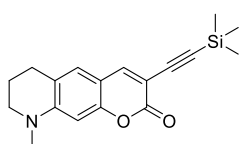
¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ = 157.29, 154.39, 149.67, 145.38, 126.32, 120.08, 108.15, 100.87, 95.41, 50.13, 38.62, 26.56, 20.96 ppm

IR (ATR): ν = 3020, 2385, 1967, 1764, 1607, 1460, 1342, 1176, 1122, 1095, 1045, 1012, 949, 862, 847, 745, 593 cm⁻¹

HR-MS (EI): *m/z* = 293.0058 [M⁺], berechnet: 293.0051 C₁₃H₁₂BrNO₂

Mp: 194°C

9-Methyl-3-((trimethylsilyl)ethynyl)-6,7,8,9-tetrahydro-2H-pyrano[3,2-*g*]quinolin-2-on (16)



2.65 g (9.002 mmol) des Bromids **15** wurden in 60 ml Diisopropylamin vorgelegt und mit 189 mg (0.270 mmol) PdCl₂(PPh₃)₂ und 1.77 g (2.5 ml, 18.004 mmol) TMSA versetzt und 3 Tage bei 60°C gerührt. Dabei wurden nach je 24 h erneut

0.88 g (1.25 ml, 9.002 mmol) TMSA und eine Spatelspitze PdCl₂(PPh₃)₂ zugegeben. Die Reaktionslösung wurde auf RT abgekühlt, mit 200 ml H₂O verdünnt und mit DCM (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (EE/HEX, 1:2, v/v) gereinigt, sodass 1.1 g der Verbindung **16** als orangener Feststoff mit einer Ausbeute von 39 % erhalten wurde.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.68 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.34 (s, 1H), 3.42 – 3.33 (m, 2H), 2.97 (s, 3H), 2.74 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 1.96 (dt, *J* = 12.3, 6.1 Hz, 2H), 0.25 ppm (s, 9H)

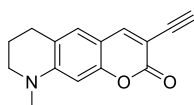
¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 161.12, 155.34, 150.20, 146.64, 126.76, 120.45, 108.37, 104.44, 100.01, 98.61, 96.39, 51.06, 39.10, 27.38, 21.75, 0.13 ppm

IR (ATR): ν = 2952, 2142, 1725, 1705, 1620, 1591, 1523, 1406, 1355, 1308, 1277, 1248, 1224, 1189, 1166, 1119, 1040, 958, 930, 838, 762, 692, 631, 568, 438 cm⁻¹

HR-MS (EI): *m/z* = 311.1346 [M⁺], berechnet: 311.1342 C₁₈H₂₁NO₂Si

Mp: Zers. ab 144°C

3-Ethynyl-9-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-2H-pyrano[3,2-*g*]quinolin-2-on (17)



1.10 g (3.516 mmol) der Verbindung **16** wurden in 75 ml DCM gelöst. 1.84 g (2.04 ml, 7.032 mmol, 1 M in THF) TBAF wurden zugegeben und für 5 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der

Rückstand mittels Säulenchromatographie (EE/HEX, 1:2, v/v) gereinigt. Es wurden 0.64 g der Verbindung **17** als kupferbrauner Feststoff mit einer Ausbeute von 76 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.69 (s, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.32 (s, 1H), 3.43 – 3.35 (m, 2H), 3.34 (s, 1H), 2.98 (s, 3H), 2.74 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 1.96 ppm (dt, J = 15.0, 6.1 Hz, 2H)

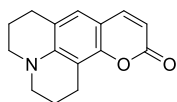
¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 161.40, 155.45, 150.40, 147.00, 126.86, 120.57, 108.14, 103.25, 96.33, 81.09, 78.93, 51.07, 39.11, 27.37, 21.71 ppm

IR (ATR): ν = 3320, 2938, 2842, 2144, 1691, 1619, 1589, 1524, 1407, 1364, 1306, 1275, 1223, 1096, 949, 809, 765, 711, 669, 568, 470 cm⁻¹

HR-MS (EI): m/z = 239.0940 [M⁺], berechnet: 239.0946 C₁₅H₁₃NO₂

Mp: Zers. ab 190°C

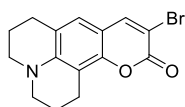
2,3,6,7-Tetrahydro-1H,5H,11H-pyrano[2,3-f]pyrido[3,2,1-ij]quinolin-11-on (19)



5.0 g (23.013 mmol) 9-Formyl-8-hydroxyjulolidin wurden in 250 ml getrocknetem EtOH vorgelegt und mit 7.37 g (6.99 ml, 46.026 mmol) Diethylmalonat versetzt. Nach der Zugabe von 40 Tropfen Piperidin wurde die Reaktionslösung für 24 h bei 80°C gerührt. Die Lösung wurde auf RT abgekühlt wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde mit 80 ml konzentrierter HCl und 80 ml Eisessig versetzt und für weitere 12 h bei 80°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde die Reaktionslösung in 400 ml Eiswasser gegeben und ein pH-Wert von 7 durch Zugabe von 1 M NaOH-Lösung eingestellt. Der entstandene Niederschlag wurde für 30 min gerührt, abfiltriert, mit H₂O gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Der Feststoff wurde mit 6 ml CHCl₃ aufgenommen und mittels Säulenchromatographie (EE/HEX, 1:1, v/v) gereinigt. Es wurden 1.90 g der Verbindung **19** als orange-gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 34 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.45 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 6.84 (s, 1H), 5.99 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 3.28 – 3.23 (m, 4H), 2.88 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.76 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 2.02 – 1.92 ppm (m, 4H)

10-Bromo-2,3,6,7-Tetrahydro-1H,5H,11H-pyrano[2,3-f]pyrido[3,2,1-ij]quinolin-11-on (20)

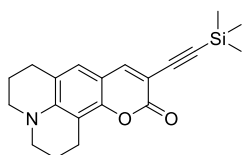


1.90 g (7.866 mmol) der Verbindung **19** wurden in 60 ml Eisessig gelöst und auf 15°C abgekühlt. Unter Rühren wurden langsam 1.28 g (0.41 ml, 8.259 mmol) Br₂ zugetropft. Nach 30 min rühren bei RT wurde der entstandene Rückstand abfiltriert und mit kaltem Eisessig gewaschen und getrocknet. Der Rückstand wurde aus ACN bei 80°C umkristallisiert und anschließend abgesaugt und getrocknet. Es wurden 1.05 g der Verbindung **20** als beiger Feststoff mit einer Ausbeute von 42 % erhalten.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ = 8.21 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 3.28 – 3.24 (m, 4H), 2.73 – 2.67 (m, 4H), 1.92 – 1.81 ppm (m, 4H)

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ = 157.33, 153.65, 145.98, 145.54, 124.57, 118.59, 108.00, 105.16, 100.08, 49.21, 48.69, 26.72, 20.65, 19.73, 19.58 ppm

10-((Trimethylsilyl)ethynyl)-2,3,6,7-Tetrahydro-1*H*,5*H*,11*H*-pyrano[2,3-*f*]pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-11-on (21)



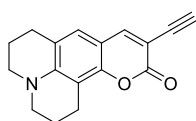
1.05 g (3.286 mmol) der Verbindung **20** wurden in 30 ml Diisopropylamin gelöst und mit 69 mg (10 mol%) PdCl₂(PPh₃)₂ und 650 mg (0.91 ml, 6.572 mmol) TMSA versetzt und für 3 Tage bei 60°C gerührt. Nach je 24 h wurden erneut 0.33 g (0.46 ml, 3.286 mmol) TMSA und ein Spatelspitze PdCl₂(PPh₃)₂ zugegeben. Die

Reaktionslösung wurde auf RT abgekühlt und mit 100 ml H₂O verdünnt. Nach dem Extrahieren mit DCM (3x) wurden die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (EE/HEX, 1:2, v/v) gereinigt. Es wurden 0.61 g der Verbindung **21** als dunkelgelber Feststoff mit einer Ausbeute von 55 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.63 (s, 1H), 6.77 (s, 1H), 3.27 (dd, *J* = 11.2, 5.3 Hz), 2.84 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.73 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.00 – 1.90 (m, 4H), 0.24 ppm (s, 9H)

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 161.12, 151.33, 146.92, 146.69, 124.96, 118.72, 108.09, 106.37, 103.38, 100.19, 98.09, 50.08, 49.69, 27.44, 21.31, 20.37, 20.19, 0.02 ppm

10-Ethynyl-2,3,6,7-Tetrahydro-1*H*,5*H*,11*H*-pyrano[2,3-*f*]pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-11-on (22)



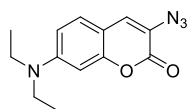
0.61 g (1.805 mmol) der Verbindung **21** wurden in 40 ml DCM gelöst und mit 0.94 g (1.1 ml, 3.610 mmol, 1 M in THF) TBAF versetzt und für 5 min bei RT gerührt.

Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der erhaltene Rückstand mittels Säulenchromatographie (EE/HEX, 1:2, v/v) gereinigt. Es wurden 0.36 g der Verbindung **22** als orangebrauner Feststoff mit einer Ausbeute von 76 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.67 (s, 1H), 6.81 (s, 1H), 3.29 (dd, *J* = 11.1, 5.2 Hz, 4H), 3.24 (s, 1H), 2.86 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.74 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.01 – 1.89 ppm (m, 4H)

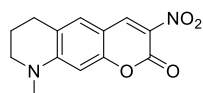
¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 161.50, 151.47, 147.21, 146.85, 125.09, 118.89, 107.89, 106.43, 102.24, 80.73, 79.05, 50.09, 49.71, 27.44, 21.28, 20.35, 20.16 ppm

3-Azido-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-on (25)



Da von der Verbindung **25** aus vorangegangenen Arbeiten noch ausreichend vorhanden war, konnte damit an dieser Stelle weitergearbeitet werden.

9-Methyl-3-nitro-6,7,8,9-tetrahydr-2H-pyrano[3,2-g]quinolin-2-on (26)



2.54 g (13.277 mmol) des Aldehyds **13** und 1.77 g (1.47 ml, 13.277 mmol) Ethylnitroacetat wurden in 36 ml getrocknetem *n*-BuOH vorgelegt. Dann wurden 0.36 ml Eisessig und 0.18 ml Piperidin unter Rühren zugegeben. Nach 24 h Rühren bei 120°C wurde die Reaktionslösung auf RT abgekühlt und der entstandene Feststoff bei 80°C in DMF gelöst. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch langsam auf 100 ml Eiswasser gegossen und mit CHCl₃ (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde dann mittels Säulenchromatographie (EE/HEX, 2:1, v/v) gereinigt, sodass 2.54 g der Verbindung **26** als roter Feststoff mit einer Ausbeute von 73 % gewonnen wurde.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 8.64 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.36 (s, 1H), 3.50 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.09 (s, 3H), 2.83 – 2.75 (m, 2H), 2.06 – 1.95 ppm (m, 2H)

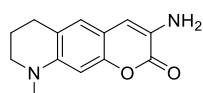
¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): Aufgrund der geringen Löslichkeit in den verfügbaren deuterierten Lösungsmitteln (CDCl₃, C₆D₆, DMSO-*d*₆, Aceton-*d*₆) konnte keine ¹³C-NMR-Analytik dieser Verbindung durchgeführt werden.

IR (ATR): ν = 2858, 1727, 1625, 1580, 1558, 1529, 1492, 1446, 1409, 1364, 1294, 1256, 1216, 960, 821, 766, 729, 694, 613 cm⁻¹

HR-MS (EI): *m/z* = 260.0787 [M⁺], berechnet: 260.0797 C₁₃H₁₂N₂O₄

Mp: Zers. ab 244°C

3-Amino-9-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-2H-pyrano[3,2-g]quinolin-2-on (27)



4.83 g (21.413 mmol) SnCl₂ · 2 H₂O wurden in 15 ml konzentrierte HCl vorgelegt. Dann wurden 0.74 g (2.855 mmol) der Verbindung **26** portionsweise unter Rühren zugegeben. Nach 4 h Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch langsam auf 100 ml Eiswasser gegossen. Durch die Zugabe von 5 M NaOH bei 15°C wurde der pH-Wert der Reaktionslösung auf 8 eingestellt und mit Diethylether (5x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit H₂O gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt.

Der Rückstand wurde in 3 ml CHCl₃ aufgenommen und mit 30 ml Hexan in der Kälte ausgefällt. Es wurden 0.48 g der Verbindung **27** als hellbrauner Feststoff mit einer Ausbeute von 73 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 6.83 (s, 1H), 6.66 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 3.38 – 3.20 (m, 2H), 2.93 (s, 3H), 2.75 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H) 1.96 ppm (dt, *J* = 12.1, 6.1 Hz, 2H)

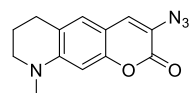
¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 160.45, 150.23, 146.19, 127.70, 124.62, 120.59, 114.71, 110.17, 97.41, 50.98, 39.25, 27.47, 22.18 ppm

IR (ATR): ν = 3349, 2830, 1681, 1591, 1558, 1514, 1492, 1308, 1181, 1151, 905, 881, 815, 765, 563 cm⁻¹

HR-MS (EI): *m/z* = 230.1056 [M⁺], berechnet: 230.1055 C₁₃H₁₄N₂O₂

Mp: 141°C

3-Azido-9-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-2H-pyrano[3,2-g]quinolin-2-on (**28**)



0.46 g (2.011 mmol) des Amins **27** wurden in 19 ml 17%iger HCl vorgelegt und auf 0°C abgekühlt. Es wurde eine Lösung von 139 mg (2.011 mmol) NaNO₂, gelöst in 10 ml H₂O, langsam zugetropft und für 1 h bei 0 bis 5°C gerührt. Durch die Zugabe einer NaOAc-Lösung wurde der pH-Wert der Reaktionslösung auf 4 eingestellt. Anschließend wurden 139 mg (4.123 mmol) NaN₃ bei 0 bis 5°C portionsweise zugegeben und 5 h gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert und mit Eiswasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Es wurden 0.31 g der Verbindung **28** als grünbrauner Feststoff mit einer Ausbeute von 60 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.03 (s, 1H), 6.88 (s, 1H), 6.37 (s, 1H), 3.38 – 3.32 (m, 2H), 2.95 (s, 3H), 2.78 – 2.70 (m, 2H) 1.96 ppm (dt, *J* = 12.0, 6.1 Hz, 2H)

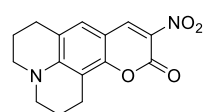
¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 18.59, 152.98, 148.75, 127.73, 126.23, 120.76, 119.54, 108.18, 96.45, 50.94, 39.07, 27.43, 21.84 ppm

IR (ATR): ν = 2934, 2844, 2099, 1703, 1620, 1559, 1523, 1449, 1404, 1318, 1248, 1223, 1185, 1162, 1095, 932, 809, 751, 706, 586 cm⁻¹

HR-MS (EI): *m/z* = 256.0965 [M⁺], berechnet: 256.0960 C₁₃H₁₂N₄O₂

Mp: Zers. ab 176°C

10-Nitro-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H,11H-pyrano[2,3-f]pyrido[3,2,1-ij]quinolin-11-on (**29**)

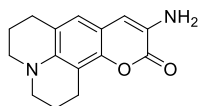


2.5 g (11.512 mmol) 9-Formyl-8-hydroxyjulolidin und 1.53 g (1.3 ml, 11.512 mmol) Ethylnitroacetat wurden unter Rühren in 60 ml *n*-BuOH vorgelegt. Nacheinander wurden dem Gemisch 0.32 ml Eisessig und 0.16 ml Piperidin zugegeben und für 12 h bei 120°C gerührt. Dann wurde die Reaktionslösung auf RT abgekühlt und der entstandene Feststoff bei 80°C in DMF gelöst und auf 200 ml Eiswasser gegossen. Der dadurch entstandene Rückstand wurde

abfiltriert und mittels Säulenchromatographie (EE/HEX, 2:1, v/v) gereinigt. Es wurden 2.73 g der Verbindung **29** als lila Feststoff mit einer Ausbeute von 83 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 8.53 (s, 1H), 6.97 (s, 1H), 3.41 (dd, *J* = 10.9, 4.1 Hz, 4H), 2.86 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.76 (tr, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.05 – 1.93 ppm (m, 4H)

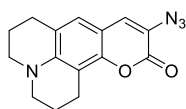
10-Amino-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*,11*H*-pyrano[2,3-*f*]pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-11-on (**30**)



16.14 g (71.52 mmol) SnCl₂ · 2 H₂O wurden mit 50 ml konzentrierter HCl versetzt. Dem Gemisch wurden dann 2.73 g (9.536 mmol) der Verbindung **29** portionsweise zugegeben und für 4 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch langsam auf 200 ml Eiswasser gegossen und durch Zugabe von 5 M NaOH bei 15 °C ein pH-Wert von 8 eingestellt. Die Reaktionslösung wurde mit Diethylether (5x) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit H₂O gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand wurde in 5 ml CHCl₃ aufgenommen und mit 40 ml Hexan in der Kälte ausgefällt. Es wurden 1.94 g der Verbindung **30** als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 79 % erhalten.

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ = 6.78 (s, 1H), 6.61 (s, 1H), 4.97 (s, 2H), 3.18 – 3.05 (m, 4H), 2.77 – 2.63 (m, 4H), 1.97 – 1.78 ppm (m, 4H)

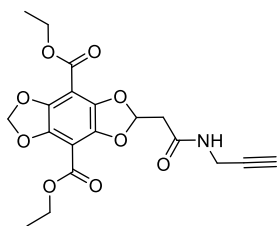
10-Azido-2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*,11*H*-pyrano[2,3-*f*]pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-11-on (**31**)



1.94 g (7.565 mmol) des Amins **30** wurden in 20 ml 17%iger HCl gelöst und auf 0 bis 5°C abgekühlt. Eine Lösung von 0.63 g (9.078 mmol) NaNO₂, gelöst in 10 ml H₂O, wurde langsam zugetropft und für 1 h bei 0 bis 5°C gerührt. Dann wurde die Reaktionslösung mit 250 ml Eiswasser versetzt und für weitere 30 min bei 0 bis 5°C gerührt. Bei selbiger Temperatur wurden dann 0.56 g (8.548 mmol) NaN₃ portionsweise zugegeben und für weitere 15 min gerührt. Durch die Zugabe einer gesättigten KOAc-Lösung wurde der pH-Wert der Reaktionslösung auf 4 eingestellt und für weitere 5 h gerührt. Der entstandene Feststoff wurde abfiltriert, mit Eiswasser gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es wurden 1.33 g der Verbindung **31** als grünbrauner Feststoff mit einer Ausbeute von 63 % erhalten.

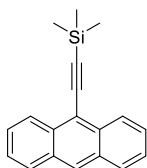
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.02 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 3.28 – 3.21 (m, 4H), 2.87 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.74 (t, *J* = 6.3 Hz), 2.02 – 1.91 ppm (m, 4H)

Diethyl-2-(2-oxo-2-(prop-2-yn-1-ylamino)ethy)benzo[1,2-*d*:4,5-*d'*]bis[1,3]dioxole-4,8-dicarboxylat (32)



Der alkinfunktionalisierte **DBD**-Ester wurde zur weiteren Synthese von der Arbeitsgruppe Wessig zur Verfügung gestellt.

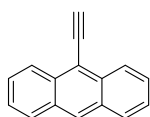
(Anthracen-9-ylethynyl)trimethylsilan (34)



1.00 g (3.906 mmol) der Verbindung **33**, 281 mg (0.400 mmol) PdCl₂(PPh₃)₂, 1.04 g (1.46 ml, 10.546 mmol) TMSA und 87.6 mg (0.460 mmol) CuI versetzt und in 3 ml Piperidin und 30 ml TEA gelöst und für 16 h bei 110°C gerührt. Dann wurde die Reaktionslösung auf RT abgekühlt und mit 50 ml gesättigter NH₄Cl-Lösung versetzt. Die wässrige Phase wurde mit HEX (2x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (EE/HEX, 1:4, v/v) gereinigt, sodass 0.92 g der Verbindung **34** als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 86 % erhalten wurde.

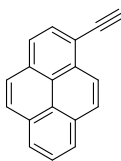
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 8.56 (dq, *J* = 8.8, 1.1 Hz, 2H), 8.42 (s, 1H), 8.04 – 7.96 (m, 2H), 7.59 (ddd, *J* = 8.0, 6.6, 1.3 Hz, 2H), 7.50 (ddd, *J* = 8.0, 6.6, 1.2 Hz, 2H), 0.43 ppm (s, 9H)

9-Ethynylanthracen (35)

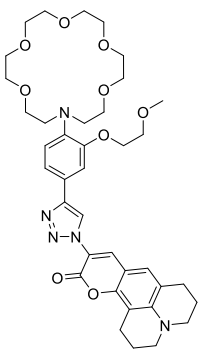


0.90 g (3.283 mmol) der Verbindung **34** wurden in 40 ml MeOH und 40 ml getrocknetem THF gelöst. 3.17 g (22.982 mmol) K₂CO₃ wurden zugegeben und für 12 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch mit 90 ml H₂O versetzt und mit Diethylether (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (EE/HEX, 1:4, v/v) gereinigt. Es wurden 0.49 g der Verbindung **35** als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 75 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 8.59 (dq, *J* = 8.8, 1.0 Hz, 2H), 8.46 (s, 1H), 8.02 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.60 (ddd, *J* = 8.7, 6.6, 1.3 Hz, 2H), 7.51 (ddd, *J* = 8.0, 6.6, 1.3 Hz, 2H), 3.99 ppm (s, 1H)

1-Ethynylpyren (36)

Das 1-Ethynylpyren wurde beim Anfertigen dieser Arbeit nicht selber synthetisiert, sondern in kommerziell erhältlicher Form von der Firma abcr verwendet.

10-(4-(4-(1,4,7,10,13-Pentaoxa-16-azacyclooctadecan-16-yl)-3-(2-methoxyethoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H,11H-pyrano[2,3-f]pyrido[3,2,1-ij]quinolin-11-on (K5)

377.00 mg (0.862 mmol) des Alkins **5c** und 243.20 mg (0.862 mmol) des Azids **31** wurden in 9 ml eines THF/H₂O-Gemisches (2:1, v/v) vorgelegt. 10.76 mg (0.043 mmol, 5 mol%) CuSO₄ · 5 H₂O und 17.10 mg (0.086 mmol, 10 mol%) Natriumascorbat wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 48 h bei 60°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Gemisch mit 6 ml H₂O versetzt und mit CHCl₃ (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der

erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH, 9:1, v/v) gereinigt. Es wurden 121 mg der Verbindung **K5** als brauner Feststoff mit einer Ausbeute von 21 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 8.70 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.38 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.12 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.97 (s, 1H), 4.28 – 4.18 (m, 2H), 3.86 – 3.75 (m, 2H), 3.75 – 3.37 (m, 27H), 3.36 – 3.32 (m, 4H), 2.90 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.76 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.02 – 1.91 ppm (m, 4H)

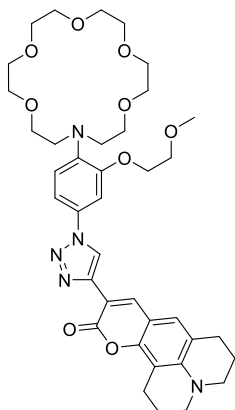
¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 157.33, 150.96, 147.15, 140.08, 139.39, 134.96, 126.11, 119.97, 119.05, 116.05, 111.07, 111.00, 107.09, 106.33, 102.67, 71.01, 70.67, 70.51, 70.30, 70.07, 67.72, 59.05, 53.07, 50.22, 49.80, 27.65, 21.29, 20.39, 20.36 ppm

IR (ATR): ν = 2854, 2173, 3129, 2075, 2056, 2044, 2030, 2017, 1988, 1944, 1703, 1597, 1520, 1500, 1434, 1395, 1348, 1309, 1286, 1243, 1216, 1101, 1026, 986, 933, 863, 804, 751, 609 cm⁻¹

HR-MS (ESI): *m/z* = 720.3613 [M+H⁺], berechnet: 720.3603 C₃₈H₅₀N₅O₉

Mp: Zers. ab 109°C

10-(1-(4-(1,4,7,10,13-Pentaoxa-16-azacyclooctadecan-16-yl)-3-(2-methoxyethoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H,11H-pyrano[2,3-f]pyrido[3,2,1-ij]quinolin-11-on (K6)



188.60 mg (0.415 mmol) des Azids **1d** und 110.00 mg (0.415 mmol) des Alkins **22** wurden in 9 ml eines THF/H₂O-Gemisches (2:1, v/v) vorgelegt. 5.18 mg (0.021 mmol, 5 mol%) CuSO₄ · 5 H₂O und 8.22 mg (0.042 mmol, 10 mol%) Natriumascorbat wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 48 h bei 60°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Gemisch mit 6 ml H₂O versetzt und mit CHCl₃ (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH, 9:1, v/v) gereinigt. Es wurden 70 mg der Verbindung **K6** als orange-brauner Feststoff mit einer Ausbeute von 24 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ = 8.64 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 7.36 – 7.33 (m, 1H), 7.27 – 7.25 (m, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 4.25 – 4.17 (m, 2H), 3.78 – 3.76 (m, 2H), 3.75 – 3.49 (m, 24H), 3.43 (s, 3H), 3.29 (dd, *J* = 5.3, 11.2 Hz, 4H), 2.93 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.79 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.01 – 1.95 ppm (m, 4H)

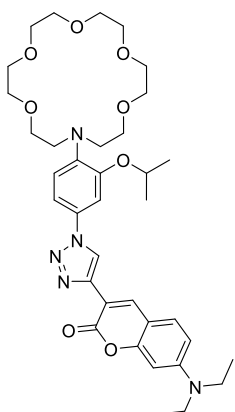
¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 160.96, 151.14, 147.90, 146.21, 142.53, 138.94, 136.17, 125.63, 121.29, 120.34, 119.01, 113.02, 109.59, 108.50, 106.43, 106.29, 102.63, 70.85, 70.74, 70.62, 70.57, 70.29, 69.79, 68.02, 58.96, 52.87, 50.09, 49.70, 27.53, 21.44, 20.53, 20.31 ppm

IR (ATR): ν = 2886, 2222, 2175, 2139, 2124, 2077, 2043, 2006, 1972, 1949, 1710, 1602, 1518, 1462, 1365, 1187, 1107, 1028, 931, 823, 773, 609, 445 cm⁻¹

HR-MS (ESI): *m/z* = 720.3620 [M+H⁺], berechnet: 7203609 C₃₈H₅₀N₅O₉

Mp: Zers. ab 79°C

3-(1-(4-(1,4,7,10,13-Pentaoxa-16-azacyclooctadecan-16-yl)-3-isopropoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-on (K7)



182.00 mg (0.415 mmol) des Azids **2d** und 100.14 mg (0.415 mmol) des Alkins **12** wurden in 9 ml eines THF/H₂O-Gemisches (2:1, v/v) vorgelegt. 5.30 mg (0.021 mmol, 5 mol%) CuSO₄ · 5 H₂O und 8.22 mg (0.042 mmol, 10 mol%) Natriumascorbat wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 48 h bei 60°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Gemisch mit 6 ml H₂O versetzt und mit CHCl₃ (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH, 9:1, v/v) gereinigt. Es wurden 93 mg der Verbindung **K7** als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 33 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 8.65 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 7.41 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.23 – 7.14 (m, 2H), 6.68 – 6.58 (m, 1H), 6.54 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 4.76 – 4.52 (m, 1H), 3.81 – 3.25 (m, 28H), 1.37 (d, *J* = 5.9 Hz, 6H), 1.22 ppm (t, *J* = 2.5 Hz, 6H)

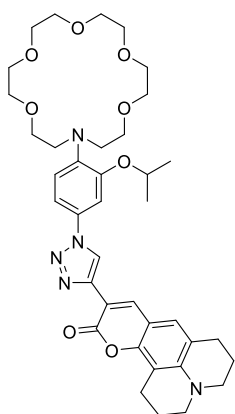
¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 160.64, 156.03, 151.34, 150.80, 142.14, 141.23, 138.49, 131.24, 129.47, 121.49, 120.45, 112.59, 110.67, 109.34, 108.71, 107.84, 97.08, 70.83, 70.69, 70.43, 70.01, 69.90, 52.71, 44.85, 22.08, 12.44 ppm

IR (ATR): ν = 2868, 2045, 2030, 2007, 1988, 1969, 1692, 1594, 1540, 1510, 1458, 1417, 1375, 1355, 1277, 1228, 1185, 1127, 1107, 1079, 1033, 1011, 955, 924, 849, 820, 798, 770, 696, 633 cm⁻¹

HR-MS (ESI): *m/z* = 680.5640 [M+H⁺], berechnet: 680.3659 C₃₆H₅₀N₅O₈

Mp: Zers. ab 35°C

10-(1-(4-(1,4,7,10,13-Pentaoxa-16-azacyclooctadecan-16-yl)-3-isopropoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H,11H-pyrano[2,3-*f*]pyrido[3,2-*ij*]quinolin-11-on (K8)



84.00 mg (0.192 mmol) des Azids **2d** und 50.82 mg (0.192 mmol) des Alkins **22** wurden in 9 ml eines THF/H₂O-Gemisches (2:1, v/v) vorgelegt. 2.40 mg (0.010 mmol, 5 mol%) CuSO₄ · 5 H₂O und 3.81 mg (0.019 mmol, 10 mol%) Natriumascorbat wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 48 h bei 60°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Gemisch mit 6 ml H₂O versetzt und mit CHCl₃ (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH, 95:5, v/v) gereinigt. Es wurden 40 mg der Verbindung **K8** als oranger Feststoff mit einer Ausbeute von 29 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 8.64 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.24 (s, 2H), 7.00 (s, 1H), 4.75 – 4.62 (m, 1H), 3.74 – 3.54 (m, 24H), 3.29 (s, 4H), 2.93 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.78 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 1.98 (d, *J* = 5.0 Hz, 4H), 1.38 ppm (d, *J* = 5.6 Hz, 6H)

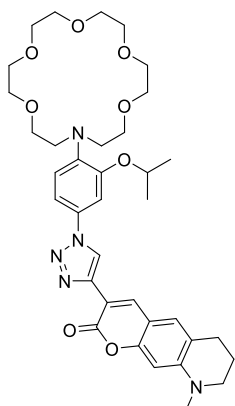
¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 161.07, 151.65, 151.29, 146.35, 142.66, 139.04, 125.77, 122.15, 120.54, 119.15, 112.80, 109.82, 108.78, 108.00, 106.41, 71.07, 70.98, 70.87, 70.84, 70.55, 69.92, 53.13, 50.24, 49.85, 27.68, 22.23, 21.60, 20.69, 20.46 ppm

IR (ATR): ν = 2871, 2138, 2057, 2030, 2008, 1967, 1942, 1918, 1869, 1844, 1792, 1722, 1691, 1679, 1602, 1529, 1442, 1337, 1246, 1207, 1170, 1103, 1032, 1010, 950, 806, 774, 611 cm⁻¹

HR-MS (ESI): *m/z* = 704.3638 [M+H⁺], berechnet: 704.3659 C₃₈H₅₀N₅O₈

Mp: Zers. ab 150°C

3-(1-(4-(1,4,7,10,13-Pentaoxa-16-azacyclooctadecan-16-yl)-3-isopropoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-9-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-2H-pyrano[3,2-g]quinolin-2-on (K9)



153.00 mg (0.349 mmol) des Azids **2d** und 83.48 mg (0.349 mmol) des Alkins **17** wurden in 9 ml eines THF/H₂O-Gemisches (2:1, v/v) vorgelegt. 4.35 mg (0.0175 mmol, 5 mol%) CuSO₄ · 5 H₂O und 6.91 mg (0.035 mmol, 10 mol%) Natriumascorbat wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 48 h bei 60°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Gemisch mit 6 ml H₂O versetzt und mit CHCl₃ (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH, 9:1, v/v) gereinigt. Es wurden 209 mg der Verbindung **K9** als gelbbrauner Feststoff mit einer Ausbeute von 89 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 8.64 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 7.32 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.22 (dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 4.67 (dt, *J* = 12.0, 6.0 Hz, 1H), 3.76 – 3.58 (m, 20H), 3.52 (d, *J* = 5.2 Hz, 4H), 3.42 – 3.36 (m, 2H), 2.99 (s, 3H), 2.80 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.03 – 1.94 (m, 2H), 1.38 ppm (d, *J* = 6.0 Hz, 6H)

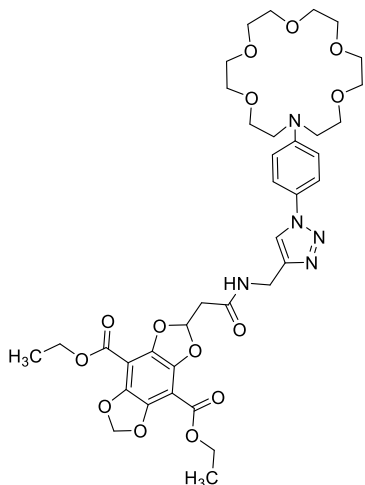
¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 160.83, 155.15, 151.87, 149.94, 142.51, 141.72, 138.53, 131.76, 127.48, 122.19, 120.70, 113.01, 111.13, 109.18, 96.48, 71.25, 71.18, 71.08, 71.06, 70.82, 70.42, 53.22, 51.17, 39.11, 27.55, 22.33, 22.05 ppm

IR (ATR): ν = 2857, 2047, 2030, 1973, 1844, 1710, 1605, 1559, 1513, 1448, 1409, 1362, 1329, 1239, 1212, 1178, 1110, 1040, 1013, 978, 937, 883, 847, 816, 772, 739, 703, 646, 607, 552 cm⁻¹

HR-MS (ESI): *m/z* = 678.3490 [M+H⁺], berechnet: 678.3503 C₃₆H₄₈N₅O₈

Mp: 132°C

Diethyl 2-(2-(((1-(4-(1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyclooctadecan-16-yl)phenyl)-1 H-1,2,3-triazol-4-yl)-methyl)amino)-2-oxoethyl)benzo[1,2-d:4,5-d']bis([1,3]dioxole)-4,8-dicarboxylat (W1)



38.00 mg (0.100 mmol) des *N*-(4-Azidophenyl)aza-[18]krone-6-ether und 40.54 mg (0.100 mmol) des Alkins **32** wurden in 4 ml eines DMF/H₂O-Gemisches (3:1, v/v) vorgelegt. 1.25 mg (0.005 mmol, 5 mol%) CuSO₄ · 5 H₂O und 1.98 mg (0.010 mmol, 10 mol%) Natriumascorbat wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 48 h bei 50°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Gemisch mit 5 ml H₂O versetzt und mit CHCl₃ (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH, 95:5, v/v)

gereinigt. Es wurden 15 mg der Verbindung **W1** als hellgelbes Öl mit einer Ausbeute von 19 % erhalten.

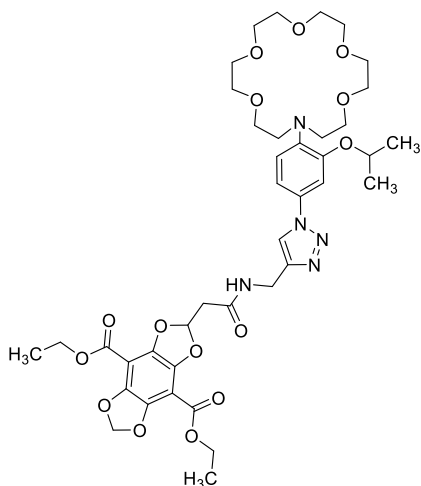
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 8.00 (s, 1H), 7.55 – 7.46 (m, 2H), 6.81 – 6.70 (m, 2H), 6.67 – 6.59 (m, 1H), 6.12 – 6.06 (m, 2H), 4.65 (s, 2H), 4.34 (q, *J* = 6.7 Hz, 4H), 3.82 – 3.45 (m, 24H), 2.97 (s, 2H), 1.33 ppm (t, *J* = 6.9 Hz, 6H)

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 166.6, 161.7, 145.0, 142.0, 141.0, 134.1, 129.1, 126.7, 122.2, 111.8, 110.5, 103.2, 102.9, 70.9, 70.8, 68.6, 68.5, 67.1, 61.7, 42.0, 28.8, 14.2 ppm

IR (ATR): Aufgrund der geringen Ausbeute wurde an dieser Stelle noch keine IR-Analytik durchgeführt.

HR-MS (ESI): *m/z* = 786.3178 [M+H⁺], berechnet: 786.3198 C₃₇H₄₇N₅O₁₄

Diethyl 2-(2-(((1-(4-(1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyclooctadecan-16-yl)-3-isopropoxyphenyl)-1 H-1,2,3-triazol-4-yl)-methyl)amino)-2-oxoethyl)benzo[1,2-d:4,5-d']bis([1,3]dioxole)-4,8dicarboxylat (W2)



43.85 mg (0.100 mmol) des Azids **2d** und 40.54 mg (0.100 mmol) des Alkins **32** wurden in 4 ml eines DMF/H₂O-Gemisches (3:1, v/v) vorgelegt. 1.25 mg (0.005 mmol, 5 mol%) CuSO₄ · 5 H₂O und 1.98 mg (0.010 mmol, 10 mol%) Natriumascorbat wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 48 h bei 50°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Gemisch mit 5 ml H₂O versetzt und mit CHCl₃ (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH,

95:5, v/v) gereinigt. Weiterhin fand eine Aufreinigung mittels RP-HPLC (ACN/H₂O TFA (0.1 %), Gradient 50 % zu 90 %) statt. Es wurden 33 mg der Verbindung **W2** als hellgelbes Öl mit einer Ausbeute von 39 % erhalten.

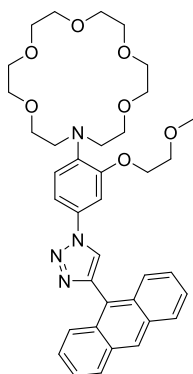
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 8.00 (s, 1H), 7.18 – 7.02 (m, 3H), 6.66 – 6.58 (m, 1H), 6.11 – 6.03 (m, 2H), 4.71 – 4.55 (m, 3H), 4.32 (q, *J* = 6.9 Hz, 4H), 3.81 – 3.33 (m, 24H), 2.99 (s, 2H), 1.43 – 1.13 ppm (m, 12H)

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 166.7, 161.6, 144.9, 141.9, 141.1, 133.2, 129.4, 127.5, 123.8, 120.7, 112.5, 110.6, 107.8, 103.1, 102.9, 70.7, 70.6, 70.3, 69.9, 69.7, 61.6, 52.7, 41.9, 34.5, 22.0, 14.2 ppm

IR (ATR): Aufgrund der geringen Ausbeute wurde an dieser Stelle noch keine IR-Analytik durchgeführt.

HR-MS (ESI): *m/z* = 844.3579 [M+H⁺], berechnet: 844.3616 C₄₀H₅₃N₅O₁₅

16-(4-(4-(Anthracen-9-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2-(2-methoxyethoxy)phenyl)-1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyclooctadecan (R1)



189.00 mg (0.415 mmol) des Azids **1d** und 83.86 mg (0.415 mmol) des Alkins **35** wurden in 9 ml eines THF/H₂O-Gemisches (2:1, v/v) vorgelegt. 5.18 mg (0.021 mmol, 5 mol%) CuSO₄ · 5 H₂O und 8.22 mg (0.042 mmol, 10 mol%) Natriumascorbat wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 48 h bei 60°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Gemisch mit 5 ml H₂O versetzt und mit CHCl₃ (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH, 9:1, v/v) gereinigt. Es wurden 55 mg der Verbindung **R1** als hellgelbes Öl mit einer Ausbeute von 20 % erhalten.

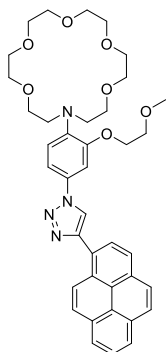
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ = 9.22 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.37 (s, 2H), 8.24 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.91 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.65 – 7.54 (m, 5H), 4.33 – 4.26 (m, 2H), 3.82 – 3.75 (m, 2H), 3.76 – 3.18 ppm (m, 27H)

¹³C-NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ = 144.49, 131.42, 131.30, 128.68, 128.46, 128.41, 127.09, 126.16, 125.96, 125.55, 125.22, 125.02, 112.84, 112.72, 108.73, 106.71, 70.87, 70.73, 70.59, 70.50, 70.31, 69.42, 68.27, 58.97, 53.12 ppm

IR (ATR): Aufgrund der geringen Ausbeute wurde an dieser Stelle noch keine IR-Analytik durchgeführt.

HR-MS (ESI): *m/z* = 657.3237 [M+H⁺], berechnet: 657.3288 C₃₇H₄₄N₄O₇

16-(2-(2-Methoxyethoxy)-4-(4-(pyren-2-yl))-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenyl)-1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyclooctadecan (R2)



189.00 mg (0.415 mmol) des Azids **1d** und 93.82 mg (0.415 mmol) des Alkins **36** wurden in 9 ml eines THF/H₂O-Gemisches (2:1, v/v) vorgelegt. 5.18 mg (0.021 mmol, 5 mol%) CuSO₄ · 5 H₂O und 8.22 mg (0.042 mmol, 10 mol%) Natriumascorbat wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 48 h bei 60°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Gemisch mit 5 ml H₂O versetzt und mit CHCl₃ (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH, 9:1, v/v) gereinigt. Es wurden 99 mg der Verbindung **R2** als hellgelbes Öl mit einer Ausbeute von 35 % erhalten.

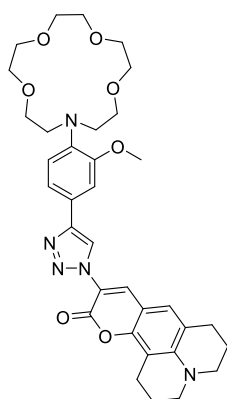
¹H-NMR (ACN-*d*₃, 300 MHz): δ = 8.85 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.37 – 8.01 (m, 7H), 7.59 (s, 1H), 7.48 – 7.37 (m, 2H), 7.19 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 4.22 – 4.17 (m, 2H), 3.75 – 3.71 (m, 2H), 3.61 – 3.40 (m, 24H), 3.37 ppm (s, 3H)

¹³C-NMR (ACN-*d*₃, 126 MHz): δ = 153.32, 132.36, 132.15, 121.84, 129.20, 129.03, 128.81, 128.33, 128.16, 127.40, 126.88, 126.51, 126.29, 126.20, 126.02, 126.00, 125.76, 125.36, 123.02, 113.72, 106.86, 79.15, 71.59, 71.12, 71.02, 70.35, 68.88, 59.06, 53.48 ppm

IR (ATR): Aufgrund der geringen Ausbeute wurde an dieser Stelle noch keine IR-Analytik durchgeführt.

HR-MS (ESI): *m/z* = 681.3315 [M+H⁺], berechnet: 681.3288 C₃₉H₄₄N₄O₇

10-(4-(4-(1,4,7,10-Tetraoxa-13-azacyclopentadecan-13-yl)-3-methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H,11H-pyrano[2,3-*f*]pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-11-on (Na3)



145.00 mg (0.415 mmol) des Alkins **6c** und 117.16 mg (0.415 mmol) des Azides **31** wurden in 9 ml eines THF/H₂O-Gemisches (2:1, v/v) vorgelegt. 5.30 mg (0.021 mmol, 5 mol%) CuSO₄ · 5 H₂O und 8.22 mg (0.042 mmol, 10 mol%) Natriumascorbat wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 48 h bei 60°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Gemisch mit 6 ml H₂O versetzt und mit CHCl₃ (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH, 95:5, v/v) gereinigt. Es wurden 52 mg der Verbindung **Na3** als oranger Feststoff mit einer Ausbeute von 20 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 8.72 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.38 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.99 (s, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.80 – 3.33 (m, 20H), 3.32 – 3.28 (m, 4H), 2.90 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.77 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.02 – 1.92 ppm (m, 4H)

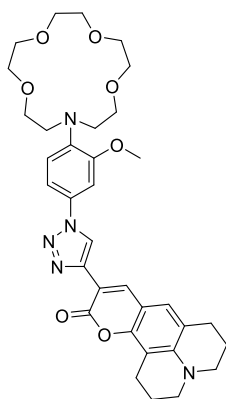
¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 157.04, 150.69, 147.19, 146.88, 134.65, 130.80, 125.84, 119.83, 119.72, 118.48, 118.40, 115.80, 115.39, 109.20, 109.10, 106.83, 106.06, 70.39, 70.18, 69.95, 69.88, 69.75, 55.65, 49.95, 49.53, 27.34, 21.02, 20.12, 20.08 ppm

IR (ATR): ν = 2872, 2173, 2136, 2057, 2029, 2005, 1989, 1967, 1710, 1600, 1525, 1455, 1396, 1350, 1309, 1284, 1247, 1217, 1169, 1113, 1080, 1034, 983, 940, 865, 809, 755, 709, 613, 550 cm⁻¹

HR-MS (ESI): *m/z* = 632.3058 [M+H⁺], berechnet: 632.3084 C₃₄H₄₂N₅O₇

Mp: Zers. ab 126°C

10-(1-(4-(1,4,7,10-Tetraoxa-13-azacyclopentadecan-13-yl)-3-methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H,11H-pyrano[2,3-f]pyrido[3,2,1-ij]quinolin-11-on (Na4)



140.00 mg (0.382 mmol) des Azids **3d** und 101.37 mg (0.382 mmol) des Alkins **22** wurden in 9 ml eines THF/H₂O-Gemisches (2:1, v/v) vorgelegt. 4.80 mg (0.019 mmol, 5 mol%) CuSO₄ · 5 H₂O und 7.60 mg (0.038 mmol, 10 mol%) Natriumascorbat wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 48 h bei 60°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Gemisch mit 6 ml H₂O versetzt und mit CHCl₃ (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH, 95:5, v/v) gereinigt. Es wurden 199 mg der Verbindung **Na4** als oranger Feststoff mit einer Ausbeute von 83 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 8.65 (s, 1H), 8.55 (s, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.26 (s, 2H), 6.99 (s, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.81 – 3.45 (m, 20H), 3.31 – 3.24 (m, 4H), 2.92 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.78 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.03 – 1.93 ppm (m, 4H)

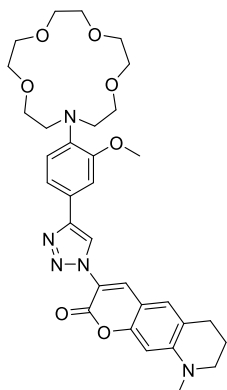
¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 160.92, 153.56, 146.43, 142.82, 139.00, 125.80, 121.97, 120.52, 119.23, 112.98, 110.15, 109.00, 108.04, 107.67, 106.64, 105.67, 71.14, 70.87, 70.74, 69.88, 69.85, 56.27, 50.34, 49.98, 27.73, 21.77, 20.86, 20.54 ppm

IR (ATR): ν = 2848, 2061, 2031, 2001, 1968, 1693, 1619, 1599, 1569, 1539, 1513, 1453, 1364, 1336, 1308, 1242, 1211, 1198, 1173, 1121, 1077, 1034, 1016, 985, 956, 923, 847, 821, 773, 744, 698, 648, 324, 571, 503 cm⁻¹

HR-MS (ESI): *m/z* = 632.3097 [M+H⁺], berechnet: 632.3079 C₃₄H₄₂N₅O₇

Mp: Zers. ab 131°C

3-(4-(4-(1,4,7,10-Tetraoxa-13-azacyclopentadecan-13-yl)-3-methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-9-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-2H-pyrano[3,2-g]quinolin-2-on (Na5)



204.00 mg (0.583 mmol) des Alkins **6c** und 149.60 mg (0.583 mmol) des Azides **28** wurden in 9 ml eines THF/H₂O-Gemisches (2:1, v/v) vorgelegt. 7.30 mg (0.029 mmol, 5 mol%) CuSO₄ · 5 H₂O und 11.60 mg (0.058 mmol, 10 mol%) Natriumascorbat wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 48 h bei 60°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Gemisch mit 6 ml H₂O versetzt und mit CHCl₃ (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH, 95:5, v/v) gereinigt. Es wurden 133 mg der Verbindung **Na5** als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 38 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 8.74 (s, 1H), 8.37 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.38 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 6.44 (s, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.68 (m, 20H), 3.44 – 3.39 (m, 2H), 3.02 (s, 3H), 2.82 – 2.76 (m, 2H), 2.02 – 1.94 ppm (m, 2H)

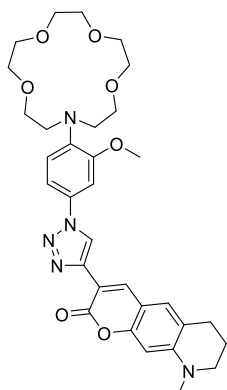
¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 157.17, 154.79, 152.78, 150.55, 134.50, 129.09, 127.70, 121.44, 119.90, 118.54, 116.93, 109.42, 107.31, 98.63, 96.07, 71.06, 70.98, 70.57, 70.31, 70.20, 55.85, 53.12, 51.10, 39.18, 27.43, 21.63 ppm

IR (ATR): ν = 2854, 2175, 2139, 2056, 2047, 2030, 1989, 1967, 1942, 1868, 1844, 1710, 1621, 1606, 1557, 1529, 1503, 1461, 1358, 1323, 1305, 1274, 1244, 1221, 1201, 1181, 1160, 1120, 1036, 985, 959, 936, 862, 814, 757, 706, 609, 557 cm⁻¹

HR-MS (ESI): *m/z* = 606.2922 [M+H⁺], berechnet: 606.2928 C₃₂H₄₀N₅O₇

Mp: Zers. ab 76°C

3-(1-(4-(1,4,7,10-Tetraoxa-13-azacyclopentadecan-13-yl)-3-methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-9-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-2H-pyrano[3,2-g]quinolin-2-on (Na6)



153.0 mg (0.418 mmol) des Azids **3d** und 99.91 mg (0.418 mmol) des Alkins **17** wurden in 9 ml eines THF/H₂O-Gemisches (2:1, v/v) vorgelegt. 5.20 mg (0.021 mmol, 5 mol%) CuSO₄ · 5 H₂O und 8.30 mg (0.042 mmol, 10 mol%) Natriumascorbat wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 48 h bei 60°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Gemisch mit 6 ml H₂O versetzt und mit CHCl₃ (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie

(CHCl₃/MeOH, 95:5, v/v) gereinigt. Es wurden 187 mg der Verbindung **Na6** als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 74 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 8.67 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.23 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 5.29 (s, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.69 – 3.65 (m, 16H), 3.53 (m, 4H), 3.39 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.79 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.02 – 1.94 ppm (m, 2H)

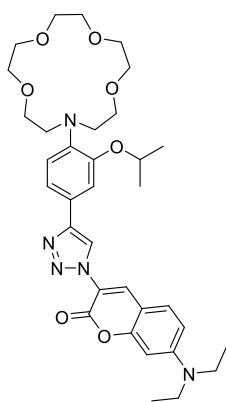
¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 160.91, 155.00, 153.01, 149.83, 142.46, 140.36, 138.67, 131.36, 127.42, 120.61, 120.54, 112.61, 110.57, 108.88, 104.86, 103.66, 96.19, 71.11, 70.61, 70.19, 55.97, 53.56, 53.19, 51.06, 39.13, 27.46, 21.85 ppm

IR (ATR): ν = 2873, 2220, 2194, 2165, 2044, 2025, 2006, 1973, 1703, 1621, 1604, 1559, 1539, 1514, 1457, 1412, 1322, 1243, 1215, 1199, 1159, 1112, 1076, 1041, 1022, 985, 967, 951, 924, 850, 818, 775, 754, 704, 663, 651, 620, 560, 493 cm⁻¹

HR-MS (ESI): *m/z* = 606.2904 [M+H⁺], berechnet: 606.2922 C₃₂H₄₀N₅O₇

Mp: Zers. ab 133°C

3-(4-(4-(1,4,7,10-Tetraoxa-13-azacyclopentadecan-13-yl)-3-isopropoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-on (**Na7**)



120.00 mg (0.318 mmol) des Alkins **7c** und 82.11 mg (0.318 mmol) des Azides **25** wurden in 9 ml eines THF/H₂O-Gemisches (2:1, v/v) vorgelegt. 3.90 mg (0.016 mmol, 5 mol%) CuSO₄ · 5 H₂O und 6.30 mg (0.032 mmol, 10 mol%) Natriumascorbat wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 48 h bei 60°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Gemisch mit 6 ml H₂O versetzt und mit CHCl₃ (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie

(CHCl₃/MeOH, 9:1, v/v) gereinigt. Es wurden 110 mg der Verbindung **Na7** als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 55 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 8.70 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 7.49 – 7.38 (m, 2H), 7.37 – 7.31 (m, 1H), 7.10 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.68 (dd, *J* = 8.9, 2.2 Hz, 1H), 6.56 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 4.72 (dt, *J* = 11.9, 5.9 Hz, 1H), 3.80 – 3.60 (m, 16H), 3.52 – 3.42 (m, 8H), 1.37 (d, *J* = 6.0 Hz, 6H), 1.24 ppm (t, *J* = 7.0 Hz, 6H)

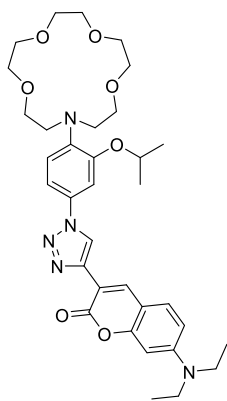
¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 157.04, 156.04, 151.85, 148.06, 134.27, 130.08, 121.55, 121.23, 119.79, 118.88, 117.65, 113.37, 110.34, 107.60, 97.54, 71.32, 70.90, 70.74, 70.64, 70.53, 53.66, 45.15, 22.46, 12.64 ppm

IR (ATR): $\nu = 2867, 2138, 2047, 2030, 1989, 1967, 1709, 1620, 1594, 1520, 1494, 1473, 1422, 1381, 1356, 1257, 1234, 1186, 1130, 1105, 1069, 1033, 999, 950, 929, 847, 831, 809, 791, 769, 756, 700, 634, 606, 538 \text{ cm}^{-1}$

HR-MS (ESI): $m/z = 636.3382 [M+H^+]$, berechnet: 636.3397 $C_{34}H_{46}N_5O_7$

Mp: Zers. ab 123°C

3-(1-(4-(1,4,7,10-Tetraoxa-13-azacyclopentadecan-13-yl)-3-isopropoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-7-(diethylamino)-2H-chromen-2-on (Na8)



100.00 mg (0.254 mmol) des Azids **4d** und 61.17 mg (0.254 mmol) des Alkins **12** wurden in 9 ml eines THF/H₂O-Gemisches (2:1, v/v) vorgelegt. 3.17 mg (0.013 mmol, 5 mol%) CuSO₄ · 5 H₂O und 5.02 mg (0.026 mmol, 10 mol%) Natriumascorbat wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 48 h bei 60°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Gemisch mit 6 ml H₂O versetzt und mit CHCl₃ (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie

(CHCl₃/MeOH, 9:1, v/v) gereinigt. Es wurden 103 mg der Verbindung **Na8** als gelber Feststoff mit einer Ausbeute von 64 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): $\delta = 8.66$ (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 7.42 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.21 (dd, $J = 8.6, 2.3$ Hz, 1H), 7.14 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.64 (dd, $J = 8.9, 2.4$ Hz, 1H), 6.55 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 4.71 – 4.64 (m, 1H), 3.74 – 3.63 (m, 16H), 3.52 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 3.44 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H), 1.38 (d, $J = 6.0$ Hz, 6H), 1.23 ppm (t, $J = 7.1$ Hz, 6H)

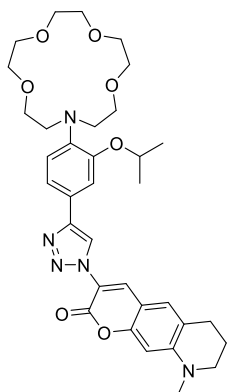
¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): $\delta = 160.70, 156.35, 152.80, 151.20, 142.35, 139.30, 138.49, 134.22, 129.58, 123.73, 120.73, 113.03, 111.26, 109.68, 108.47, 107.06, 97.06, 71.36, 70.90, 70.82, 70.69, 70.63, 53.84, 45.02, 22.28, 12.67$ ppm

IR (ATR): $\nu = 2865, 2174, 2047, 2029, 2009, 1975, 1694, 1598, 1559, 1540, 1512, 1449, 1417, 1386, 1371, 1358, 1282, 1242, 1230, 1186, 1126, 1111, 1088, 1075, 1035, 1017, 987, 956, 925, 849, 822, 805, 772, 750, 700, 663, 642, 615, 578, 540 \text{ cm}^{-1}$

HR-MS (ESI): $m/z = 636.3384 [M+H^+]$, berechnet: 636.3397 $C_{34}H_{46}N_5O_7$

Mp: Zers. bei 141°C

3-(4-(4-(1,4,7,10-Tetraoxa-13-azacyclopentadecan-13-yl)-3-isopropoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-9-methyl-6,7,8,9-tetrahydro-2H-pyrano[3,2-g]quinolin-2-on (Na9)



124.00 mg (0.329 mmol) des Alkins **7c** und 84.18 mg (0.329 mmol) des Azides **28** wurden in 9 ml eines THF/H₂O-Gemisches (2:1, v/v) vorgelegt. 4.10 mg (0.016 mmol, 5 mol%) CuSO₄ · 5 H₂O und 6.51 mg (0.032 mmol, 10 mol%) Natriumascorbat wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 48 h bei 60°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Gemisch mit 6 ml H₂O versetzt und mit CHCl₃ (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH, 9:1, v/v) gereinigt. Es wurden 41 mg der Verbindung **Na9** als braunes Öl mit einer Ausbeute von 20 % erhalten.

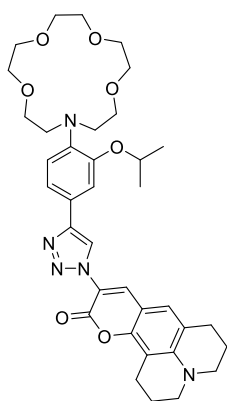
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 8.71 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.34 (dd, *J* = 8.2, 1.4 Hz, 1H), 7.11 (s, 2H), 6.44 (s, 1H), 4.72 (dt, *J* = 11.8, 5.8 Hz, 1H), 3.75 – 3.59 (m, 16H), 3.51 (s, 4H), 3.44 – 3.38 (m, 2H), 3.01 (s, 3H), 2.79 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.04 – 1.93 (m, 2H), 1.38 ppm (d, *J* = 6.0 Hz, 6H)

¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 157.13, 154.78, 150.53, 147.77, 134.40, 128.91, 127.68, 121.42, 119.81, 118.57, 117.02, 112.66, 107.34, 96.10, 71.14, 71.00, 70.70, 70.62, 70.47, 53.53, 51.09, 39.19, 27.42, 22.36, 21.64 ppm

IR (ATR): ν = 2920, 2851, 2057, 1844, 1710, 1605, 1558, 1528, 1491, 1397, 1357, 1322, 1304, 1219, 1109, 1029, 996, 939, 858, 813, 755, 705, 608, 556 cm⁻¹

HR-MS (ESI): *m/z* = 634.3225 [M+H⁺], berechnet: 634.3241 C₃₄H₄₄N₅O₇

10-(4-(4-(1,4,7,10-Tetraoxa-13-azacyclopentadecan-13-yl)-3-isopropoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H,11H-pyrano[2,3-f]pyrido[3,2,1-ij]quinolin-11-on (Na10)



120.00 mg (0.318 mmol) des Alkins **7c** und 89.74 mg (0.318 mmol) des Azides **31** wurden in 9 ml eines THF/H₂O-Gemisches (2:1, v/v) vorgelegt. 3.90 mg (0.016 mmol, 5 mol%) CuSO₄ · 5 H₂O und 6.30 mg (0.032 mmol, 10 mol%) Natriumascorbat wurden zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 48 h bei 60°C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Gemisch mit 6 ml H₂O versetzt und mit CHCl₃ (3x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (CHCl₃/MeOH, 9:1, v/v) gereinigt. Es wurden 121 mg der Verbindung **Na10** als orangebrauner Feststoff mit einer Ausbeute von 58 % erhalten.

¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ = 8.69 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.46 (s, 1H), 7.34 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.09 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 4.76 – 4.68 (m, 1H), 3.70 – 3.65 (m, 16H), 3.51 (s, 4H), 3.33 – 3.31 (m, 4H), 2.93 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.79 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 1.99 (dt, J = 18.7, 6.2 Hz, 4H), 1.37 ppm (d, J = 6.0 Hz, 6H)

¹³C-NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ = 157.28, 150.92, 150.71, 147.86, 146.99, 141.33, 134.86, 126.03, 123.82, 120.72, 119.86, 119.64, 118.49, 116.24, 112.57, 107.21, 106.34, 71.05, 70.65, 70.55, 70.42, 70.30, 53.43, 50.18, 49.76, 27.60, 22.29, 21.70, 20.33 ppm

IR (ATR): ν = 2841, 2194, 2167, 2030, 2015, 1988, 1967, 1943, 1703, 1614, 1596, 1566, 1520, 1499, 1463, 1435, 1393, 1364, 1344, 1309, 1285, 1241, 1208, 1186, 1113, 1073, 1028, 996, 977, 955, 937, 901, 863, 825, 805, 750, 709, 643, 612, 565, 549, 474 cm⁻¹

HR-MS (ESI): m/z = 660.3380 [M+H⁺], berechnet: 660.3397 C₃₆H₄₆N₅O₇

Mp: Zers. ab 165°C

6.3 Durchführung der spektroskopischen Untersuchungen

Die UV-VIS Absorptions- und Fluoreszenzmessungen der Fluoroionophore wurden in gepufferten H₂O/DMSO-Mischungen (99/1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2) durchgeführt. Hierfür wurden zuvor Stammlösungen ($c = 10^{-3}$ M) der einzelnen Fluoroionophore in DMSO hergestellt. Diese wurden für die jeweiligen Messungen mit einer 10 mM Tris-Puffer-Lösung (pH = 7.2) auf $c = 10^{-5}$ M verdünnt und mit Kaliumchlorid- bzw. Natriumchlorid-Lösungen (10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2) in unterschiedlichen Konzentrationen (160 mM, 1000 mM) vermessen.

Die Fluoreszenztitrationmessungen wurden in festgelegten Messreihen durchgeführt (Tab. 6.1, 6.2). Für die Konzentrationsreihen von 160 mM wurde die Ionenstärke mittels Cholinchlorid konstant gehalten. Die Konzentrationsreihen von 1000 mM wurden ohne Verwendung von Cholinchlorid durchgeführt.

Messung	K ⁺ / mM	ChCl/ mM
0	0	160
1	1	159
2	2	158
3	4	156
4	6	154
5	8	152
6	10	150
7	15	145
8	20	140
9	30	130
10	40	120
11	50	110
12	60	100
13	70	90
14	80	80
15	90	70
16	100	60
17	120	40
18	140	20
19	160	0

Messung	Na ⁺ / mM	ChCl/ mM
0	0	160
1	1	159
2	2	158
3	4	156
4	6	154
5	8	152
6	10	150
7	15	145
8	20	140
9	30	130
10	40	120
11	50	110
12	60	100
13	70	90
14	80	80
15	90	70
16	100	60
17	120	40
18	140	20
19	160	0

Messung	K ⁺ / mM	Na ⁺ / mM
0	0	160
1	1	159
2	2	158
3	4	156
4	6	154
5	8	152
6	10	150
7	15	145
8	20	140
9	30	130
10	40	120
11	50	110
12	60	100
13	70	90
14	80	80
15	90	70
16	100	60
17	120	40
18	140	20
19	160	0

Tab. 6.1: Titrationsreihen der Kalium-Ionen Fluoreszenzmessungen

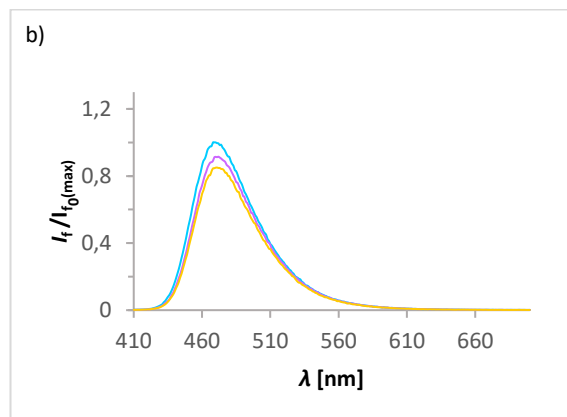
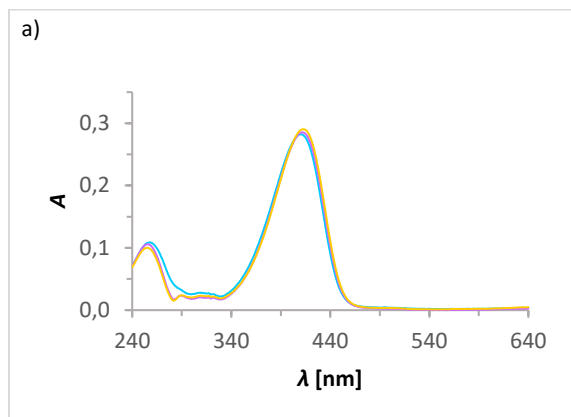
Messung	Na ⁺ / mM
0	0
1	10
2	20
3	30
4	40
5	50
6	60
7	70
8	80
9	90
10	100
11	110
12	120
13	130
14	140
15	150
16	200
17	250
18	300
19	350
20	400
21	450
22	500
23	600
24	700
25	800
26	900
27	1000

Messung	K ⁺ / mM
0	0
1	10
2	20
3	30
4	40
5	50
6	60
7	70
8	80
9	90
10	100
11	110
12	120
13	130
14	140
15	150
16	200
17	250
18	300
19	350
20	400
21	450
22	500
23	600
24	700
25	800
26	900
27	1000

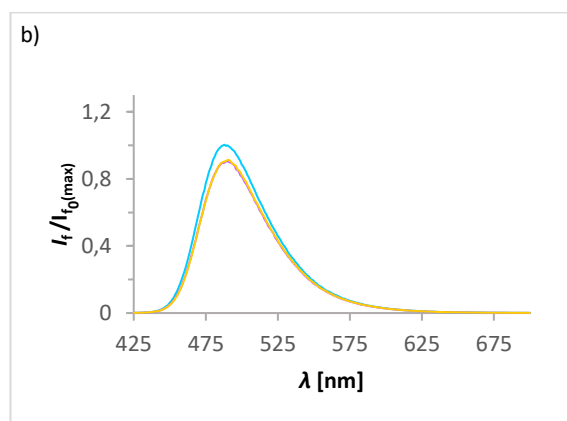
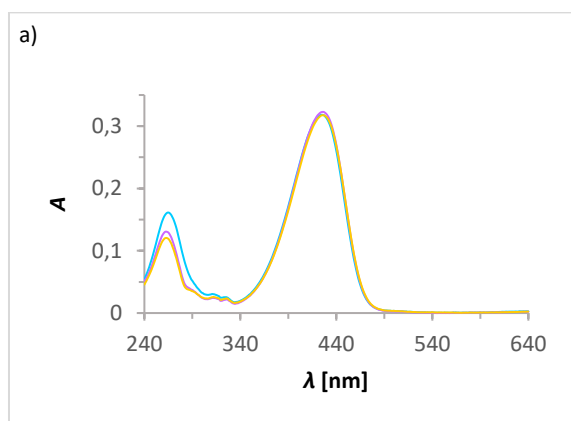
Messung	Na ⁺ / mM	K ⁺ / mM
0	0	10
1	10	10
2	20	10
3	30	10
4	40	10
5	50	10
6	60	10
7	70	10
8	80	10
9	90	10
10	100	10
11	110	10
12	120	10
13	130	10
14	140	10
15	150	10
16	200	10
17	250	10
18	300	10
19	350	10
20	400	10
21	450	10
22	500	10
23	600	10
24	700	10
25	800	10
26	900	10
27	1000	10

Tab. 6.2: Titrationsreihen der Natrium-Ionen Fluoreszenzmessungen

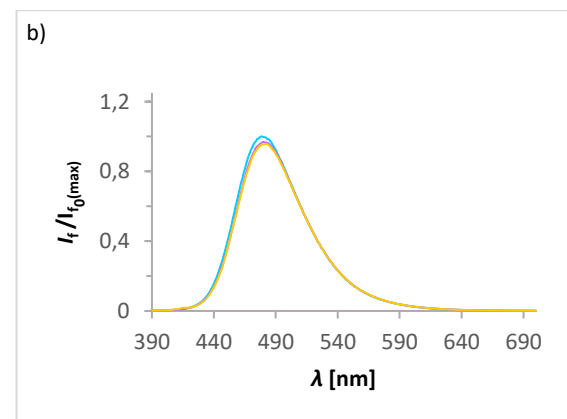
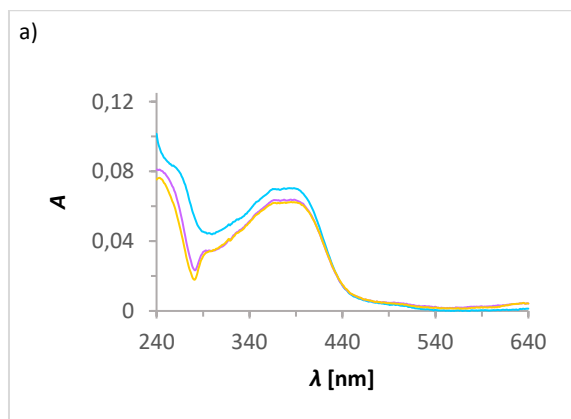
7. Anhang



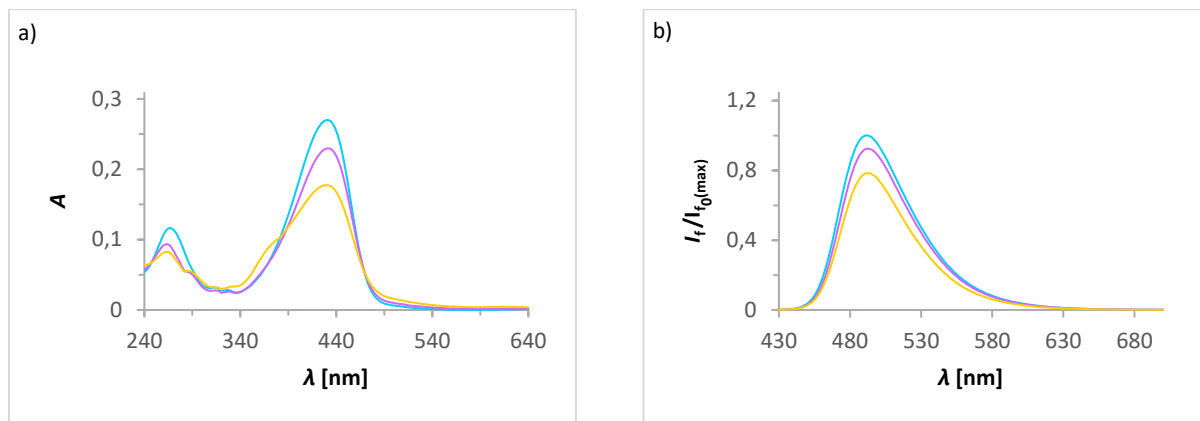
S1: a) UV-VIS Spektren und b) Fluoreszenzemissionsspektren von **9** ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2) in 10 mM Tris-Puffer (türkis) und in Gegenwart von 1000 mM KCl (lila) und 1000 mM NaCl (gelb) mit $\lambda_{\text{abs}} = 410$ nm, $\lambda_{\text{exc}} = 400$ nm und $\lambda_{\text{fl}} = 470$ nm.



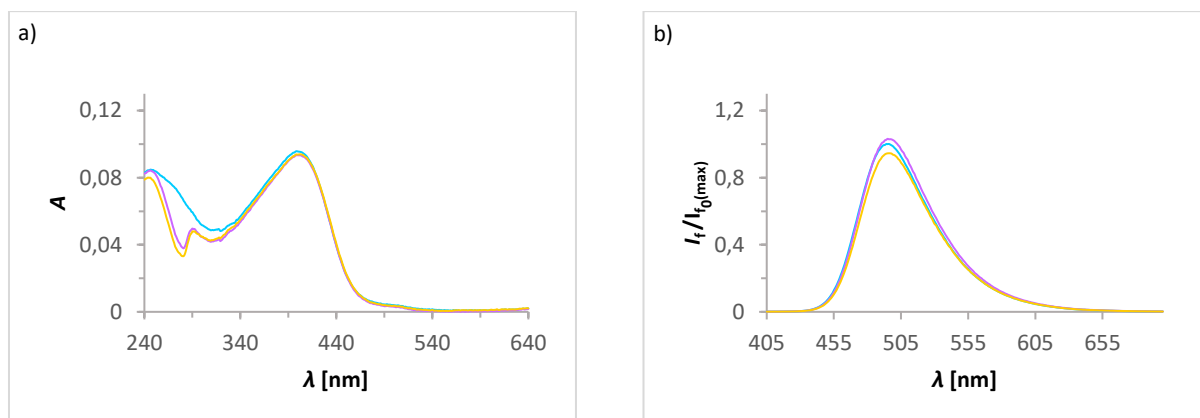
S2: a) UV-VIS Spektren und b) Fluoreszenzemissionsspektren von **12** ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2) in 10 mM Tris-Puffer (türkis) und in Gegenwart von 1000 mM KCl (lila) und 1000 mM NaCl (gelb) mit $\lambda_{\text{abs}} = 425$ nm, $\lambda_{\text{exc}} = 415$ nm und $\lambda_{\text{fl}} = 490$ nm.



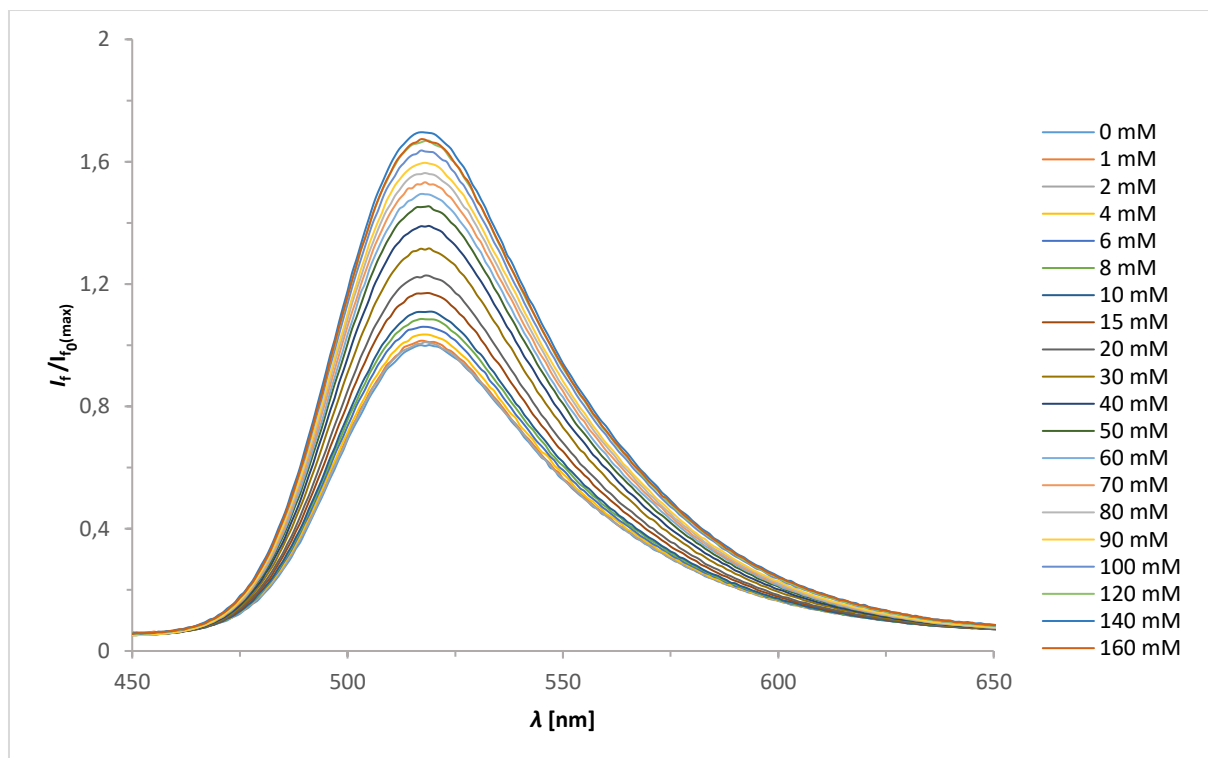
S3: a) UV-VIS Spektren und b) Fluoreszenzemissionsspektren von **14** ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2) in 10 mM Tris-Puffer (türkis) und in Gegenwart von 1000 mM KCl (lila) und 1000 mM NaCl (gelb) mit $\lambda_{\text{abs}} = 410$ nm, $\lambda_{\text{exc}} = 400$ nm und $\lambda_{\text{fl}} = 470$ nm.



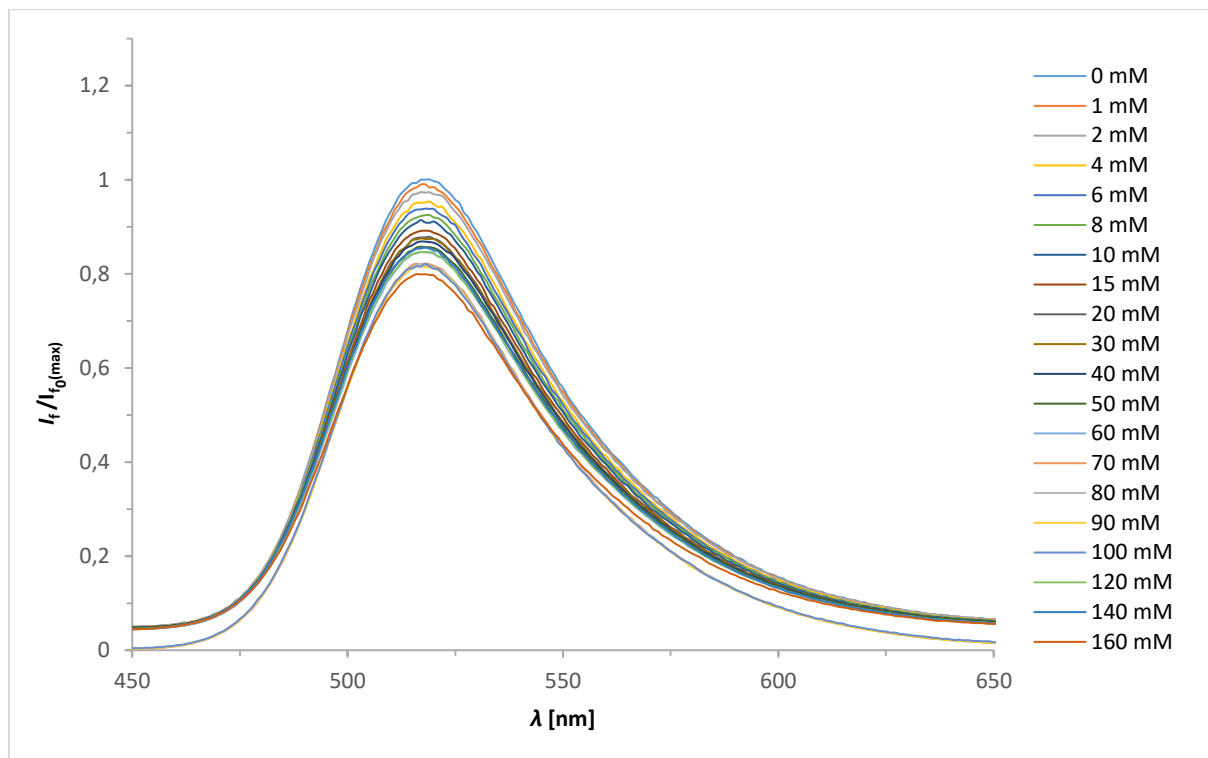
S4: a) UV-VIS Spektren und b) Fluoreszenzemissionsspektren von **17** ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2) in 10 mM Tris-Puffer (türkis) und in Gegenwart von 1000 mM KCl (lila) und 1000 mM NaCl (gelb) mit $\lambda_{\text{abs}} = 410$ nm, $\lambda_{\text{exc}} = 400$ nm und $\lambda_{\text{fl}} = 470$ nm.



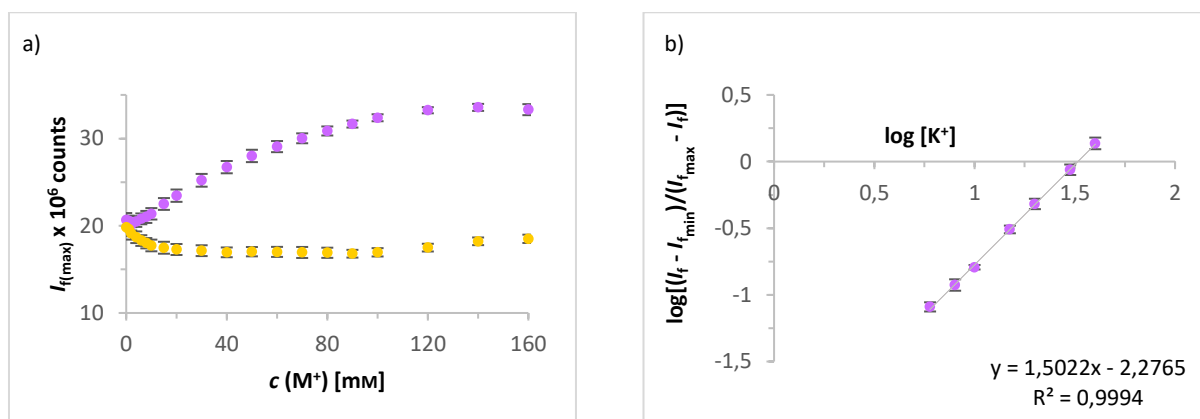
S5: a) UV-VIS Spektren und b) Fluoreszenzemissionsspektren von **19** ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2) in 10 mM Tris-Puffer (türkis) und in Gegenwart von 1000 mM KCl (lila) und 1000 mM NaCl (gelb) mit $\lambda_{\text{abs}} = 405$ nm, $\lambda_{\text{exc}} = 395$ nm und $\lambda_{\text{fl}} = 495$ nm.



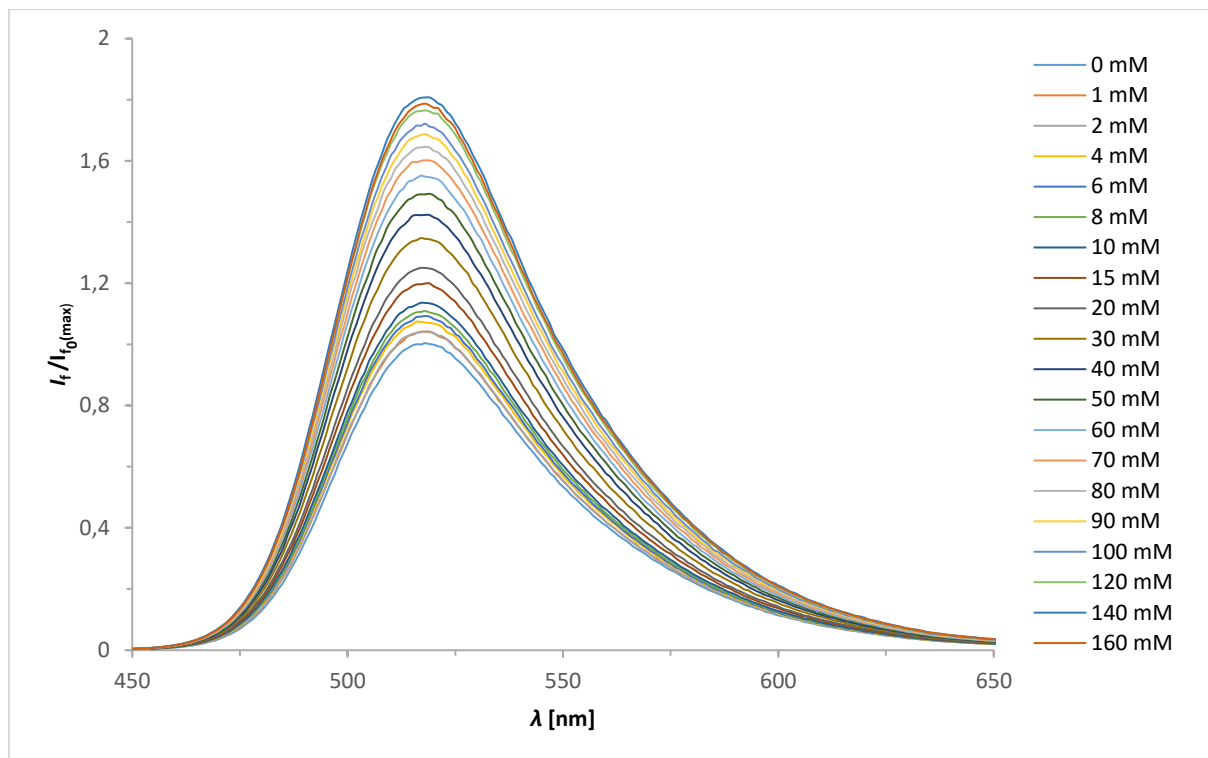
S6: Fluoreszenzemissionsspektren von **K5** ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 440$ nm) für K^+ 160 mM. Die Ionenstärke wurde konstant gehalten ($[K^+] + [ChCl] = 160$ mM).



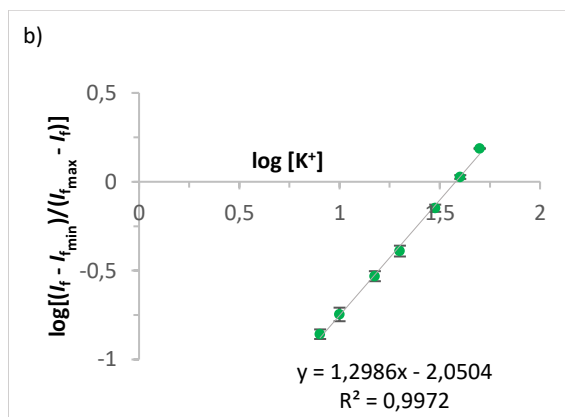
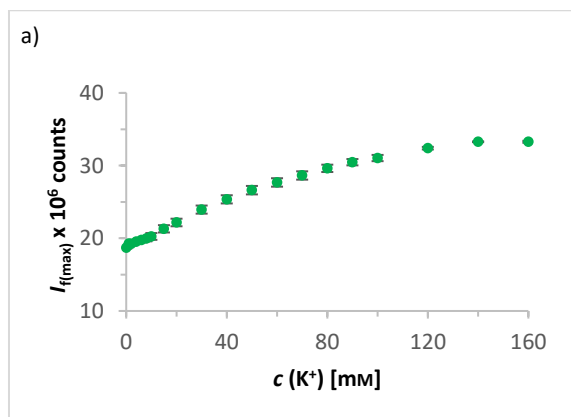
S7: Fluoreszenzemissionsspektren von **K5** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 440$ nm) für Na^+ 160 mM. Die Ionenstärke wurde konstant gehalten ($[\text{Na}^+] + [\text{ChCl}] = 160$ mM).



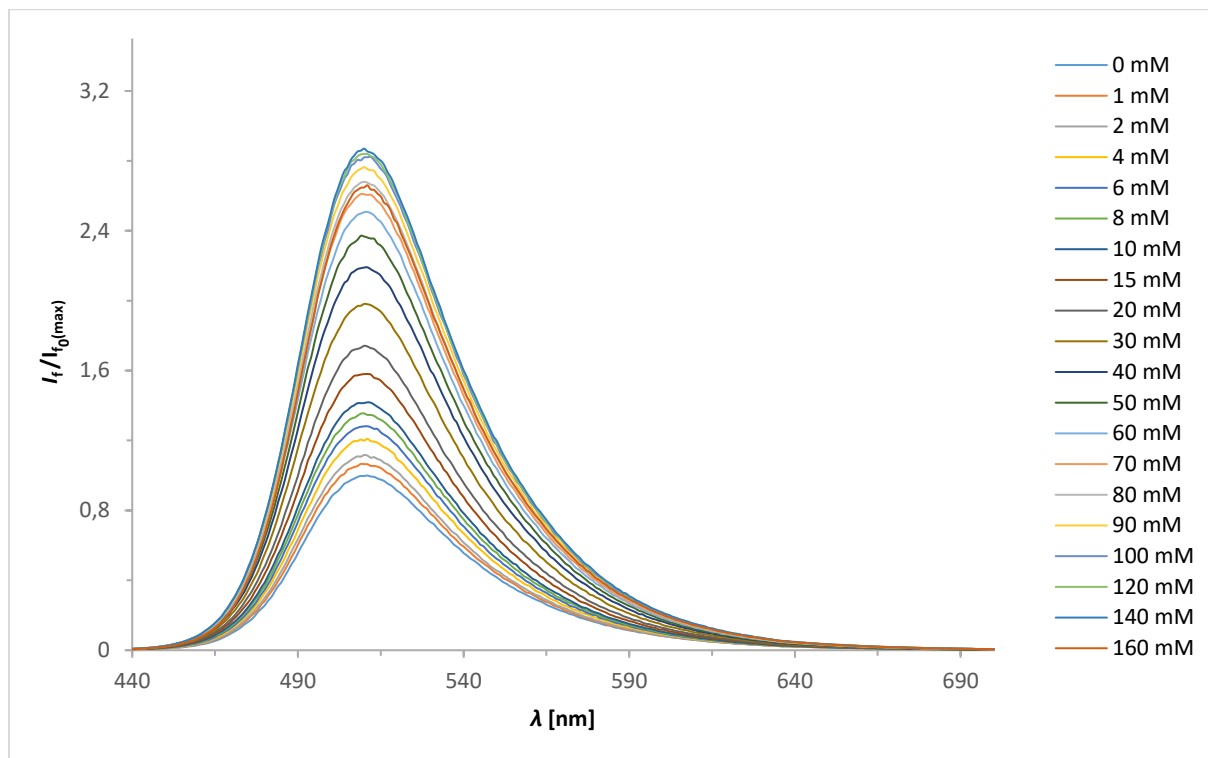
S8: a) Änderung der Fluoreszenzintensität von **K5** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 440$ nm) bei 517 nm in Gegenwart von 160 mM KCl (lila) und 160 mM NaCl (gelb) b) Plot von $\log[(I_f - I_{f(\min)}) / (I_{f(\max)} - I_f)]$ **K5** + K^+ gegen $\log[\text{K}^+]$ zur Bestimmung von K_d .



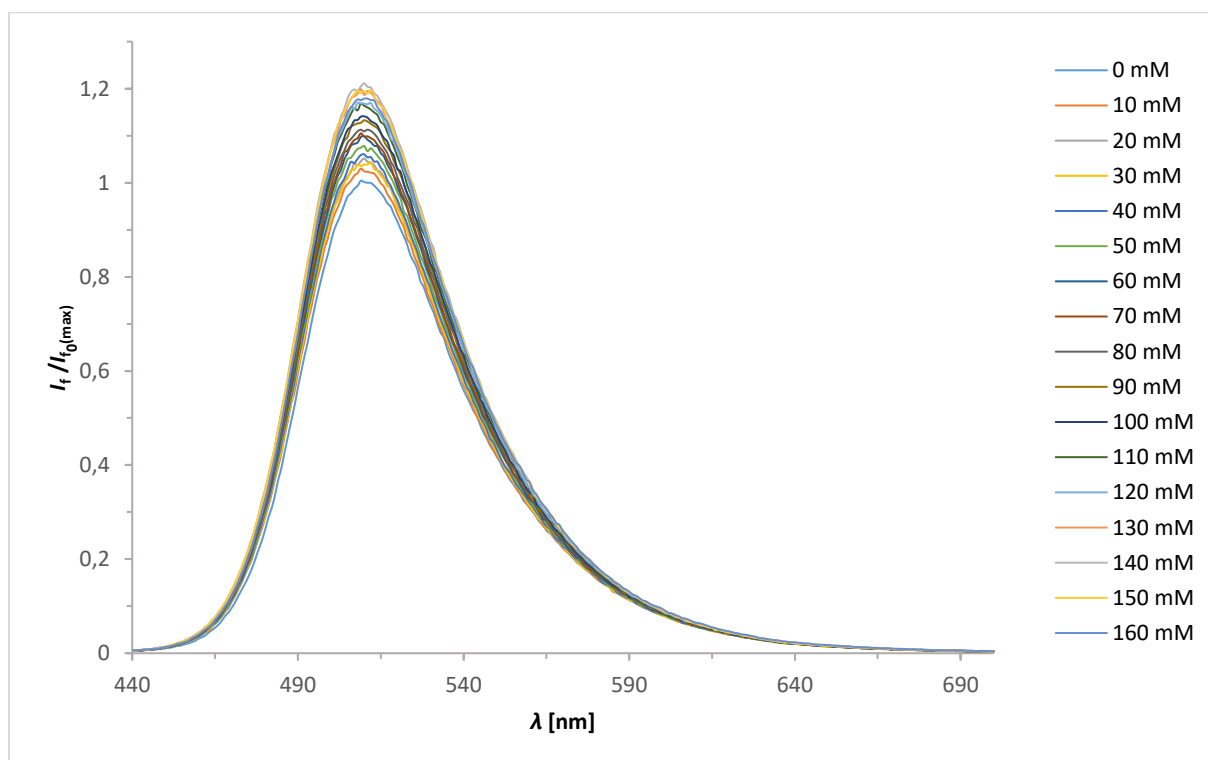
S9: Fluoreszenzemissionsspektren von **K5** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $H_2O/DMSO$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{exc} = 440$ nm) für K^+ 160 mM in Gegenwart von Na^+ -Ionen. Die Ionenstärke wurde konstant gehalten ($[K^+] + [Na^+] = 160$ mM).



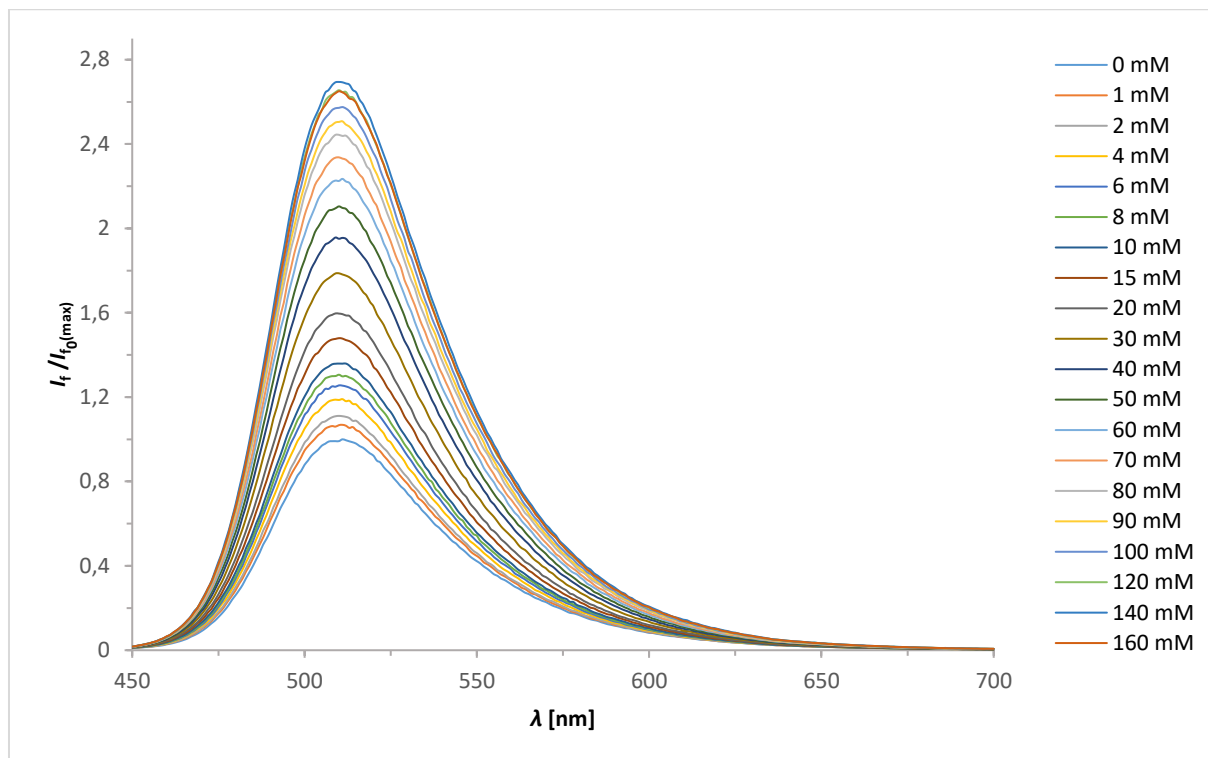
S10: a) Änderung der Fluoreszenzintensität von **K5** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $H_2O/DMSO$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{exc} = 440$ nm) bei 511 nm in Gegenwart von kombinierten K^+/Na^+ -Konzentrationen gleich 160 mM b) Plot von $\log[(I_i - I_{i\min}) / (I_{i\max} - I_i)]$ **K5** + K^+/Na^+ gegen $\log[K^+]$ zur Bestimmung von K_d .



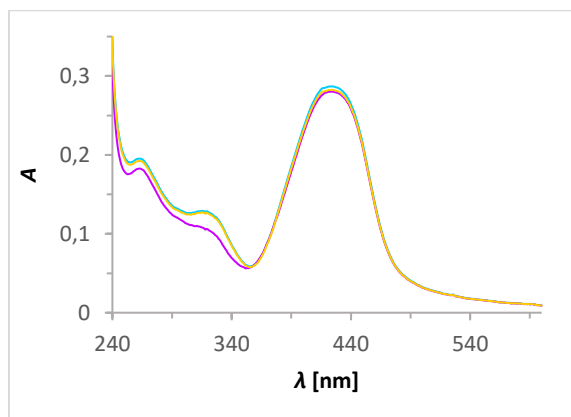
S11: Fluoreszenzemissionsspektren von **K6** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 430$ nm) für K^+ 160 mM. Die Ionenstärke wurde konstant gehalten ($[\text{K}^+] + [\text{ChCl}] = 160$ mM).



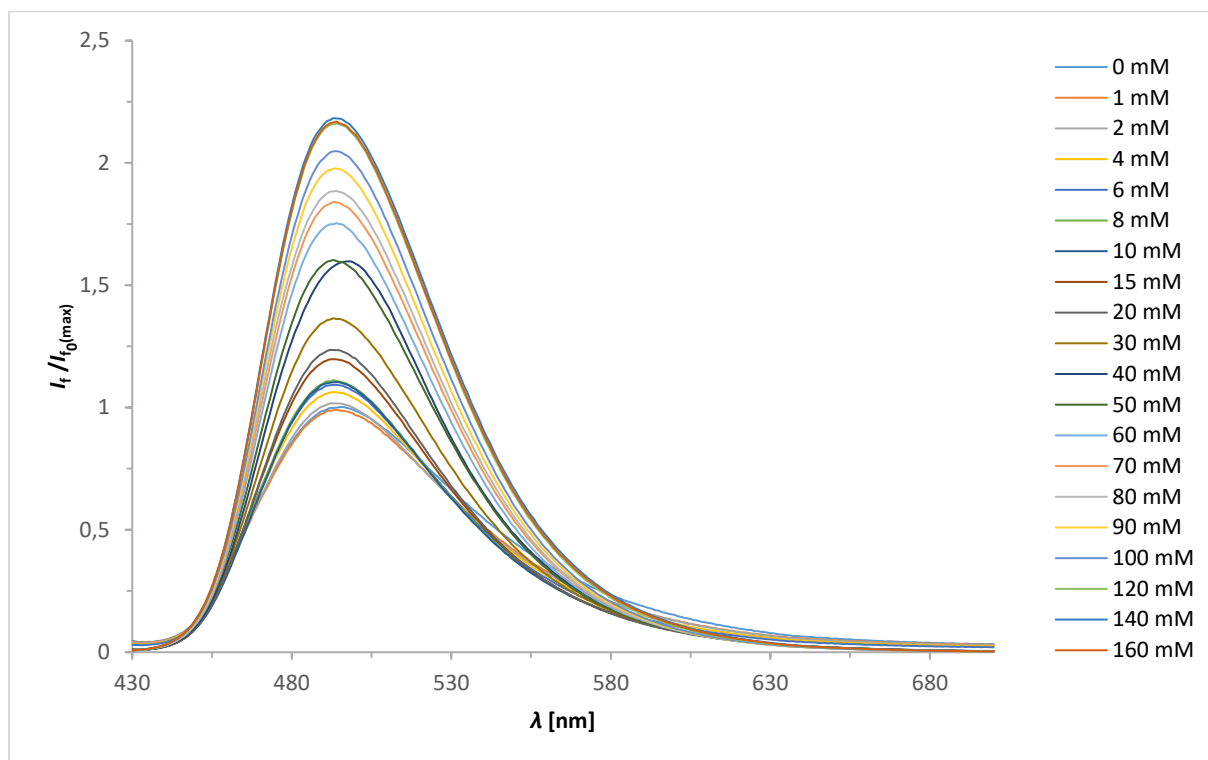
S12: Fluoreszenzemissionsspektren von **K6** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 430$ nm) für Na^+ 160 mM. Die Ionenstärke wurde konstant gehalten ($[\text{Na}^+] + [\text{ChCl}] = 160$ mM).



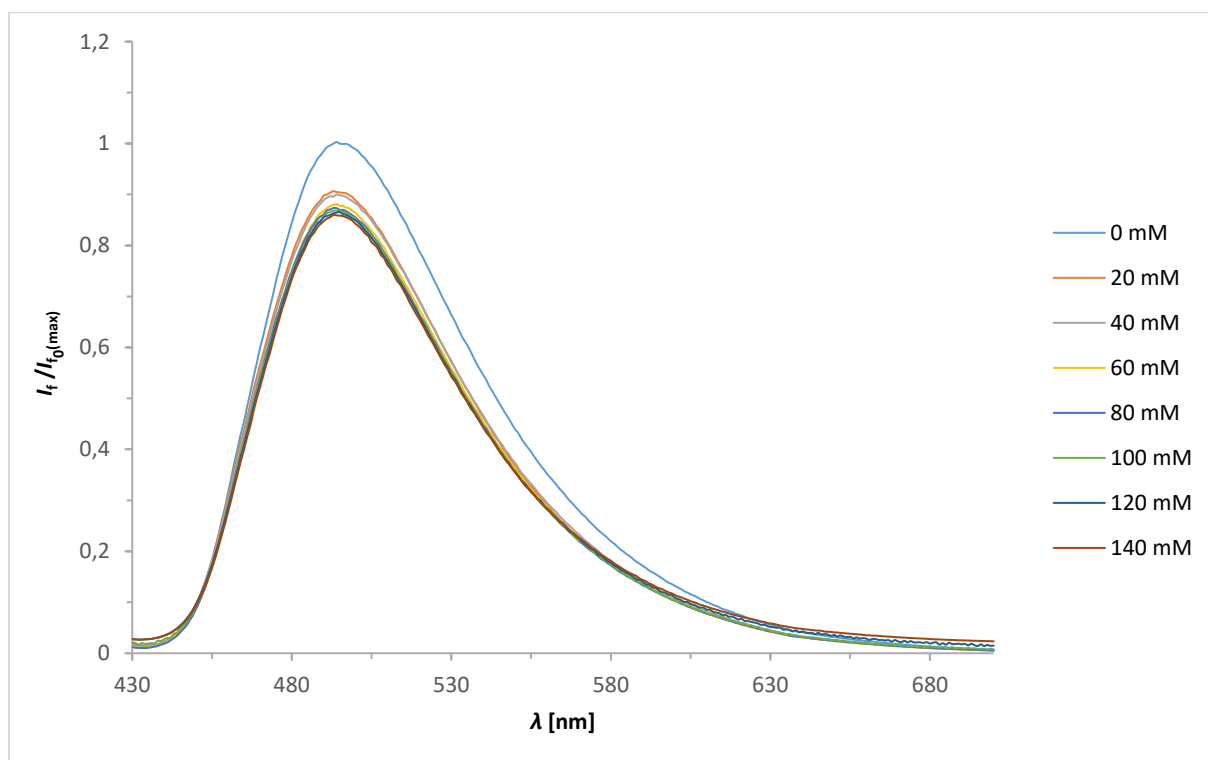
S13: Fluoreszenzemissionsspektren von **K6** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 430$ nm) für K^+ 160 mM in Gegenwart von Na^+ -Ionen. Die Ionenstärke wurde konstant gehalten ($[\text{K}^+] + [\text{Na}^+] = 160$ mM).



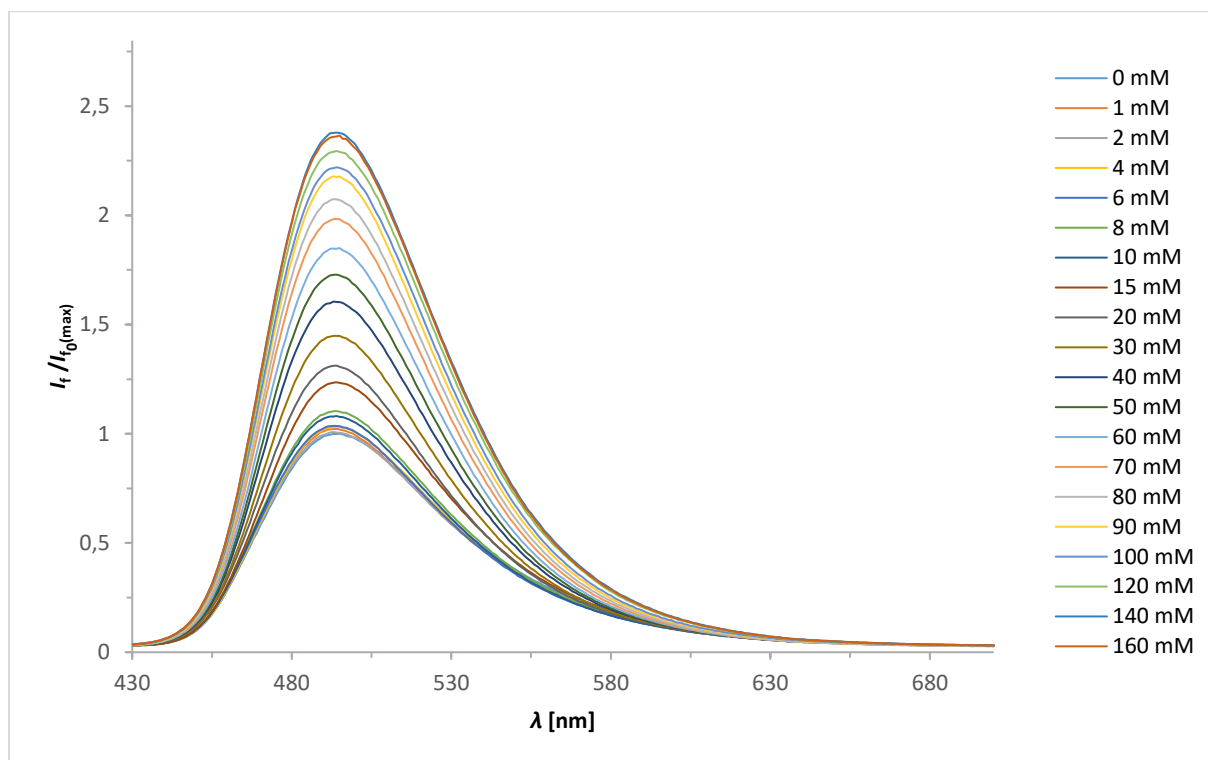
S14: UV-VIS Spektren von **K7** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2) in 10 mM Tris-Puffer (türkis), in Gegenwart von 160 mM KCl (lila) und 160 mM NaCl (gelb) mit $\lambda_{\text{abs}} = 419$ nm.



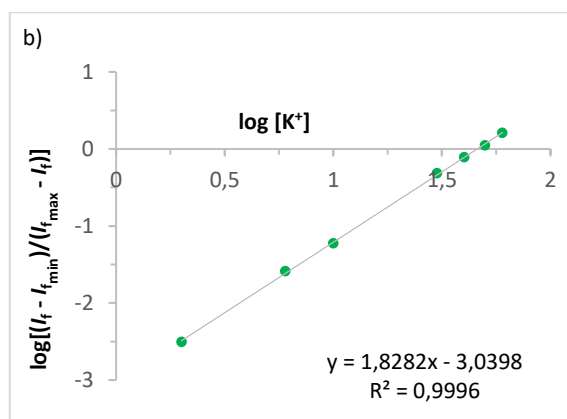
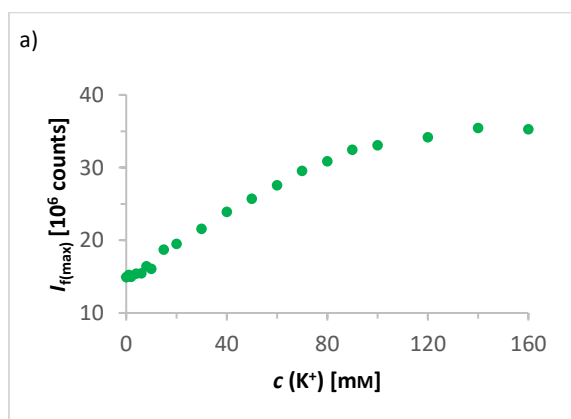
S15: Fluoreszenzemissionsspektren von **K7** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $H_2O/DMSO$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{exc} = 420$ nm) für K^+ 160 mM. Die Ionenstärke wurde konstant gehalten ($[K^+] + [ChCl] = 160$ mM).



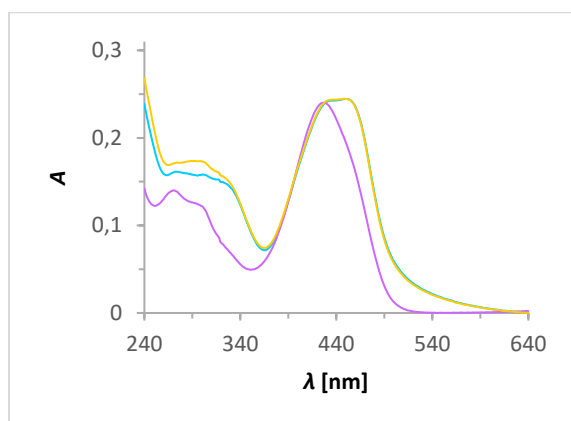
S16: Fluoreszenzemissionsspektren von **K7** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $H_2O/DMSO$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{exc} = 420$ nm) für Na^+ 160 mM. Die Ionenstärke wurde konstant gehalten ($[Na^+] + [ChCl] = 160$ mM).



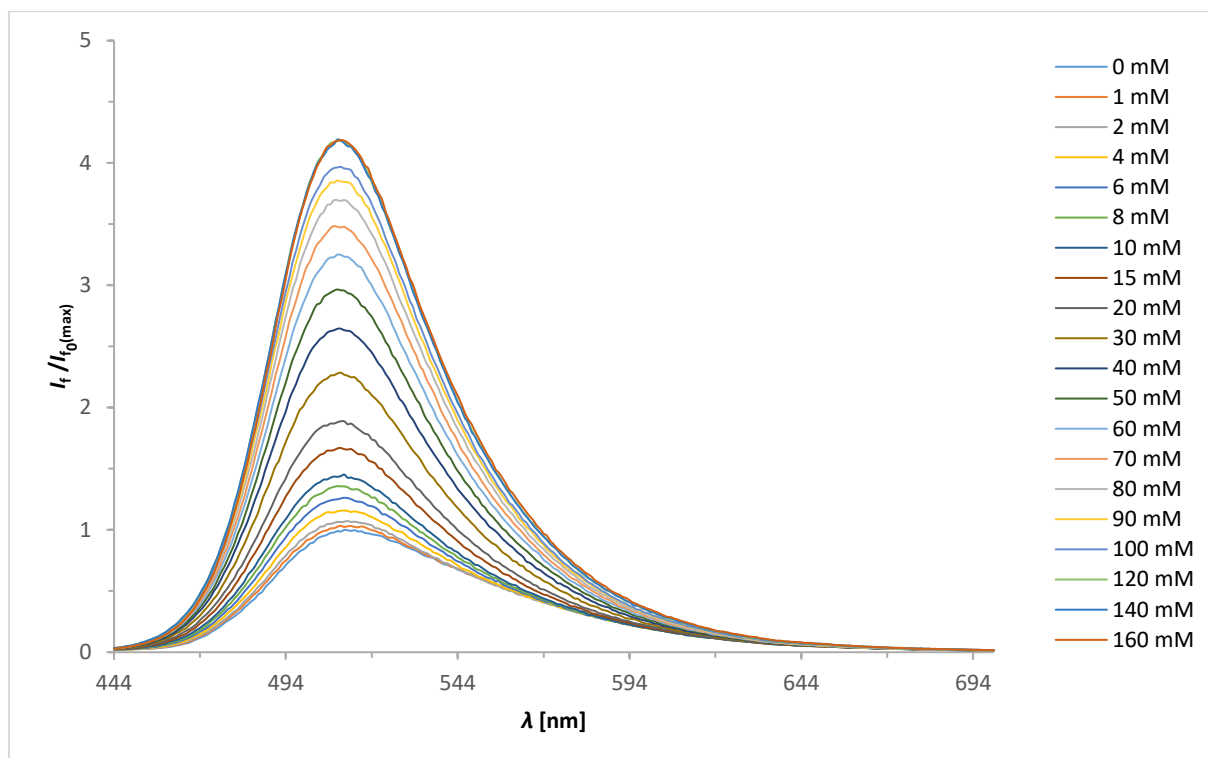
S17: Fluoreszenzemissionsspektren von **K7** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 420$ nm) für K^+ 160 mM in Gegenwart von Na^+ -Ionen. Die Ionenstärke wurde konstant gehalten ($[\text{K}^+] + [\text{Na}^+] = 160$ mM).



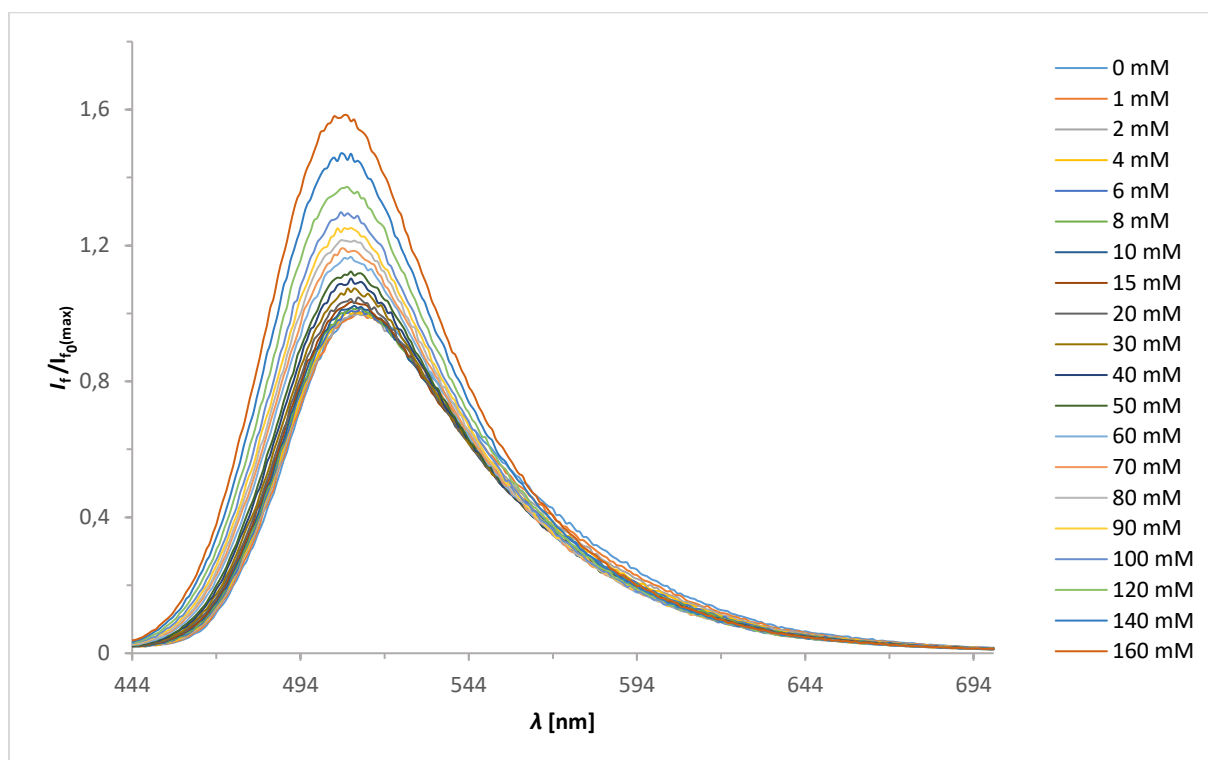
S18: a) Änderung der Fluoreszenzintensität von **K7** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 419$ nm) bei 494 nm in Gegenwart von kombinierten K^+/Na^+ -Konzentrationen gleich 160 mM b) Plot von $\log[(I_f - I_{f(\min)}) / (I_{f(\max)} - I_f)]$ **K7** + K^+/Na^+ gegen $\log[\text{K}^+]$ zur Bestimmung von K_d .



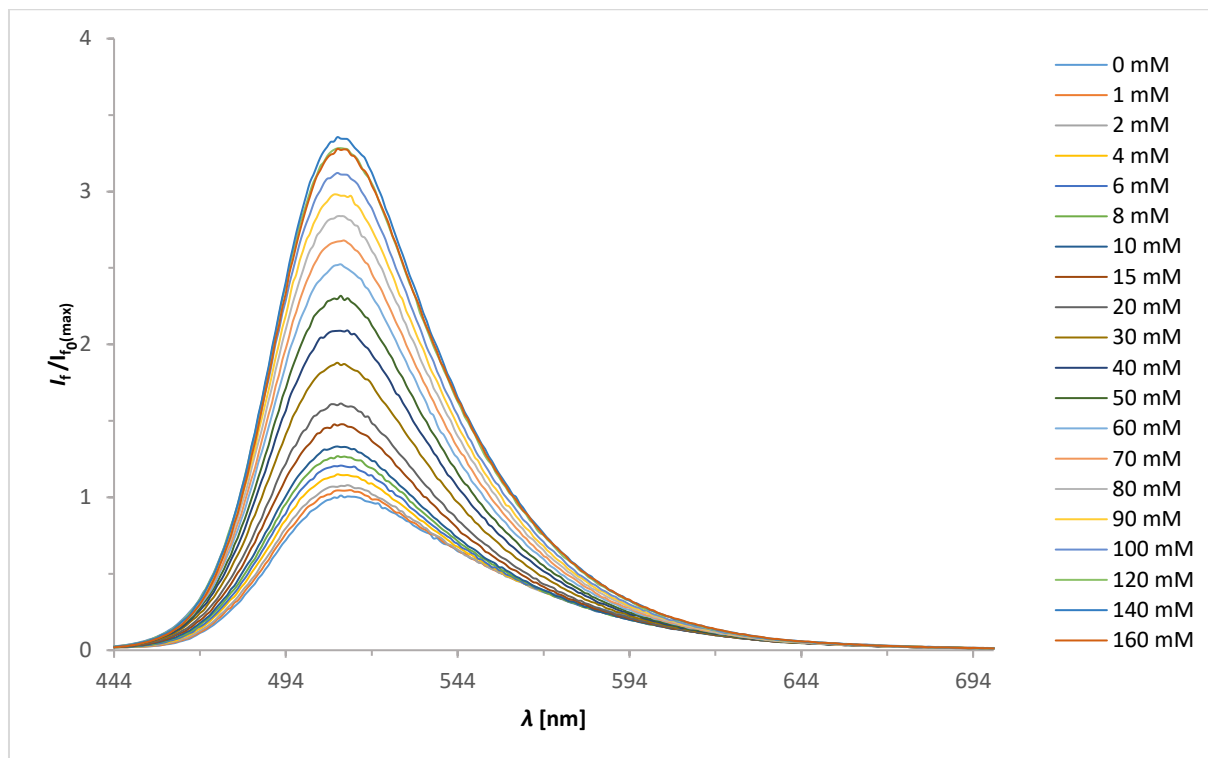
S19: UV-VIS Spektren von **K8** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2 in 10 mM Tris-Puffer (türkis), in Gegenwart von 160 mM KCl (lila) und 160 mM NaCl (gelb) mit $\lambda_{\text{abs}} = 434$ nm.



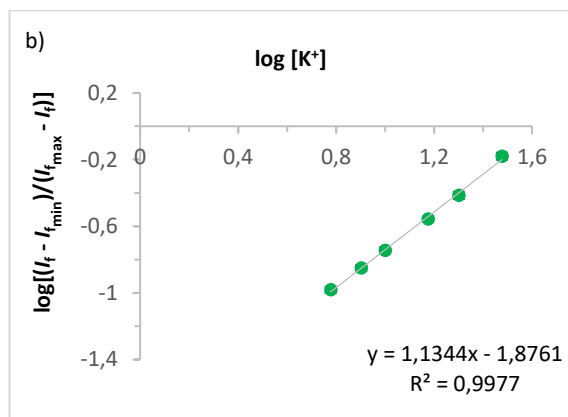
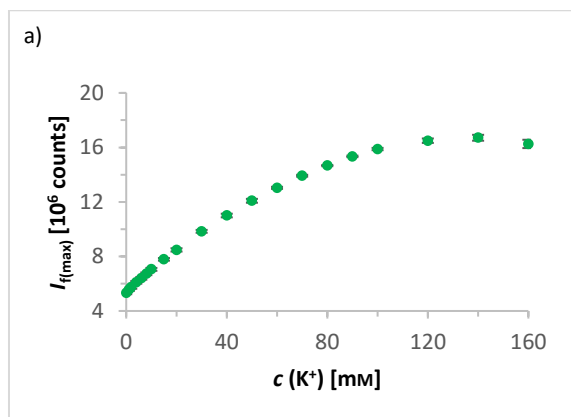
S20: Fluoreszenzemissionsspektren von **K8** ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 430$ nm) für K⁺ 160 mM. Die Ionenstärke wurde konstant gehalten ($[K^+] + [ChCl] = 160$ mM).



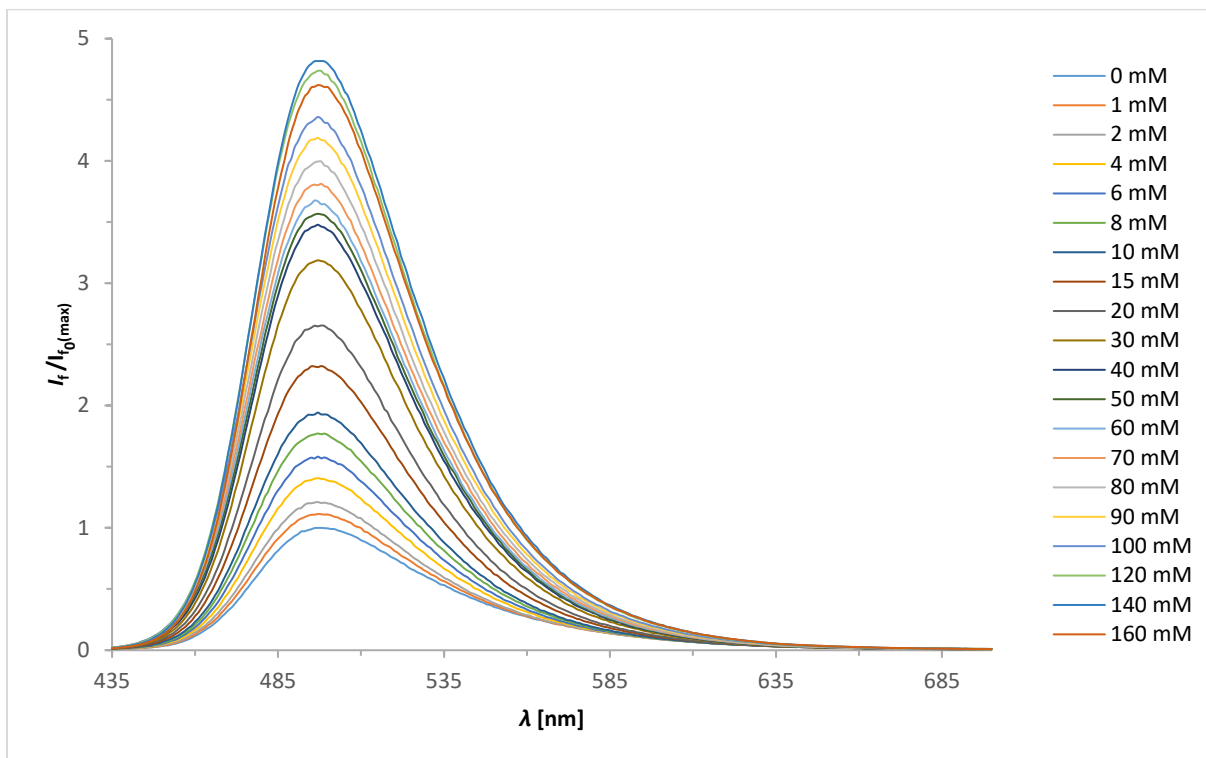
S21: Fluoreszenzemissionsspektren von **K8** ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 430$ nm) für Na⁺ 160 mM. Die Ionenstärke wurde konstant gehalten ($[Na^+] + [ChCl] = 160$ mM).



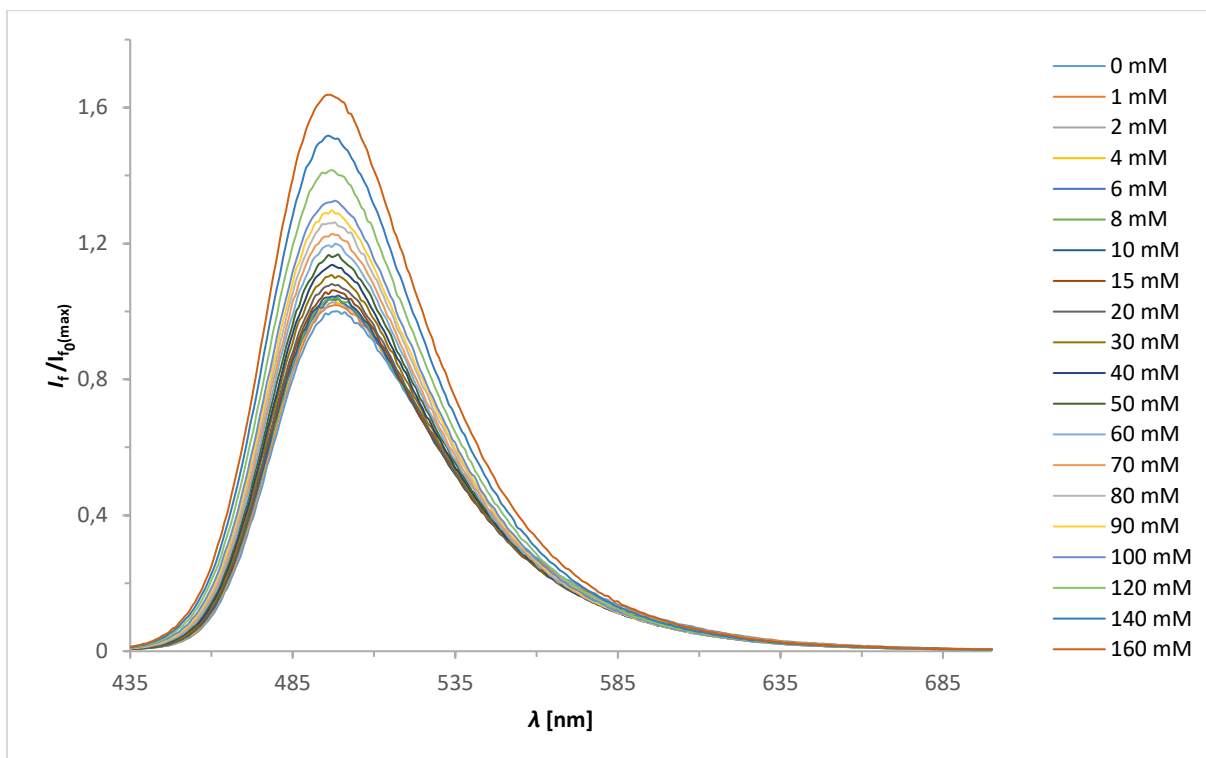
S22: Fluoreszenzemissionsspektren von **K8** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 430$ nm) für K^+ 160 mM in Gegenwart von Na^+ -Ionen. Die Ionenstärke wurde konstant gehalten ($[\text{K}^+] + [\text{Na}^+] = 160$ mM).



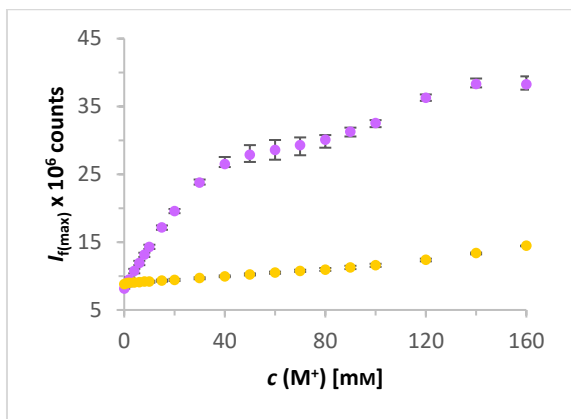
S23: a) Änderung der Fluoreszenzintensität von **K8** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 434$ nm) bei 511 nm in Gegenwart von kombinierten K^+/Na^+ -Konzentrationen gleich 160 mM Plot von $\log[(I_f - I_{f(\min)}) / (I_{f(\max)} - I_f)]$ **K8** + K^+/Na^+ gegen $\log[\text{K}^+]$ zur Bestimmung von K_d .



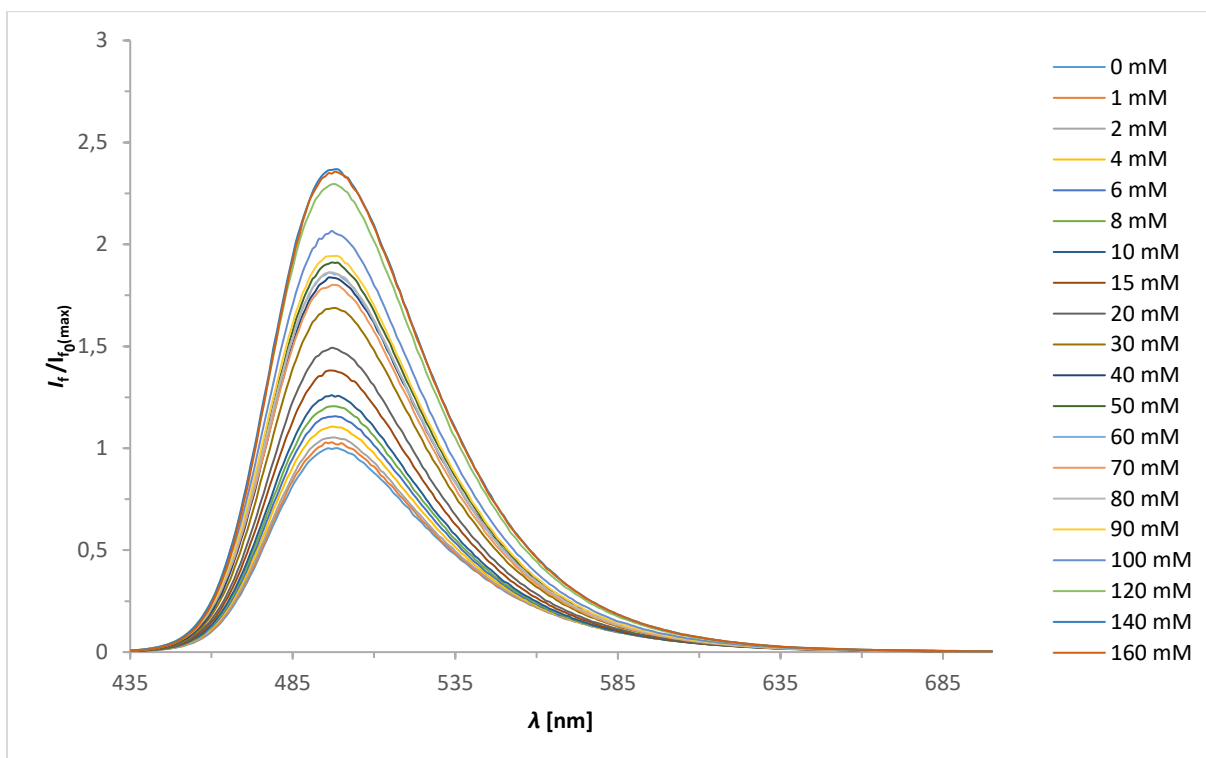
S24: Fluoreszenzemissionsspektren von **K9** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $H_2O/DMSO$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{exc} = 420$ nm) für K^+ 160 mM. Die Ionenstärke wurde konstant gehalten ($[K^+] + [ChCl] = 160$ mM).



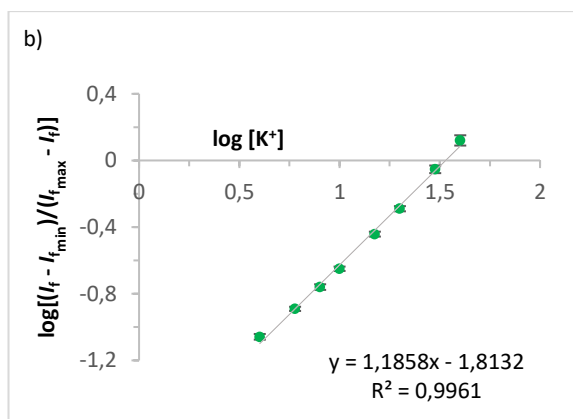
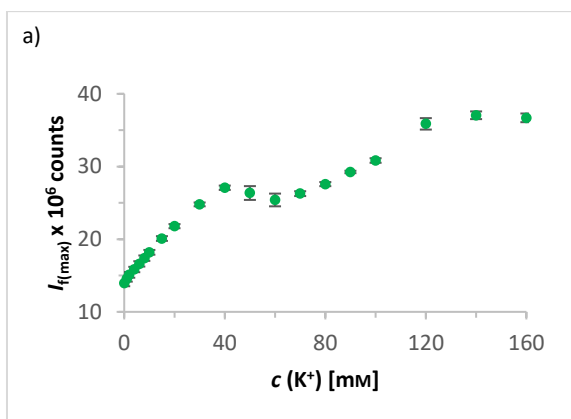
S25: Fluoreszenzemissionsspektren von **K9** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $H_2O/DMSO$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{exc} = 420$ nm) für Na^+ 160 mM. Die Ionenstärke wurde konstant gehalten ($[Na^+] + [ChCl] = 160$ mM).



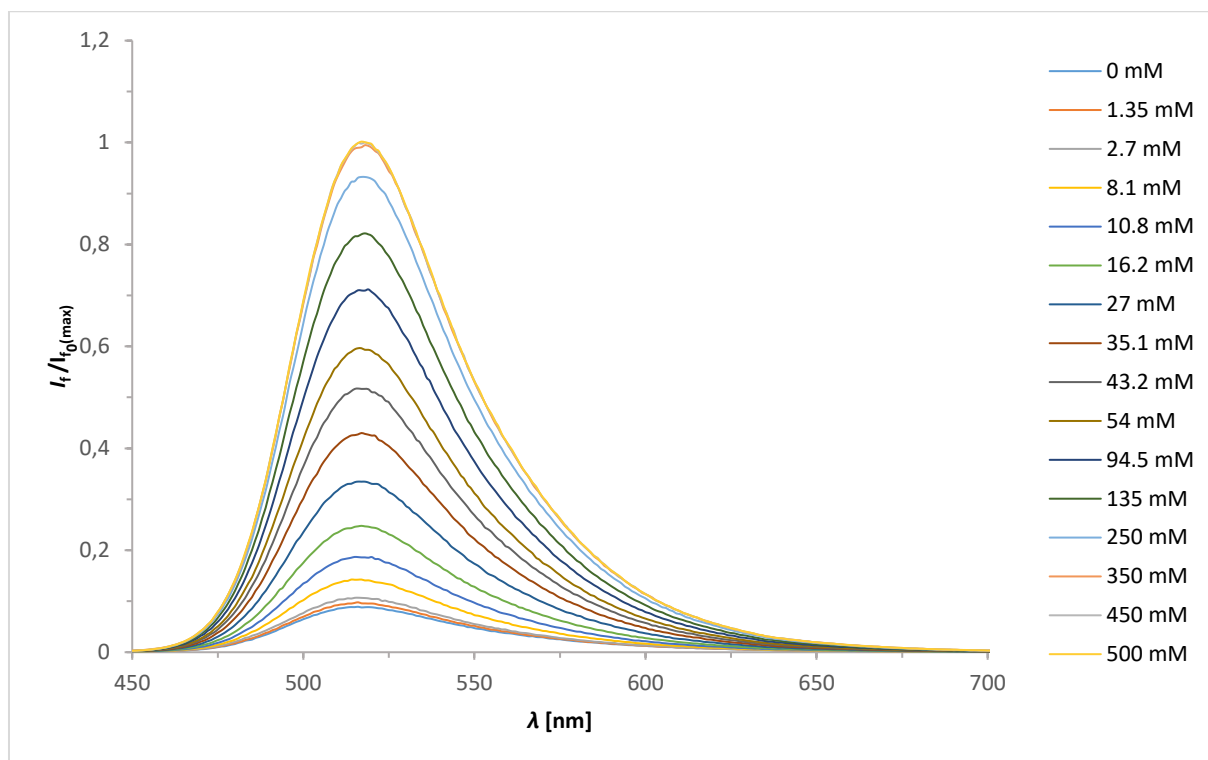
S26: Änderung der Fluoreszenzintensität von **K9** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 420$ nm) bei 498 nm in Gegenwart von 160 mM KCl (lila) und 160 mM NaCl (gelb).



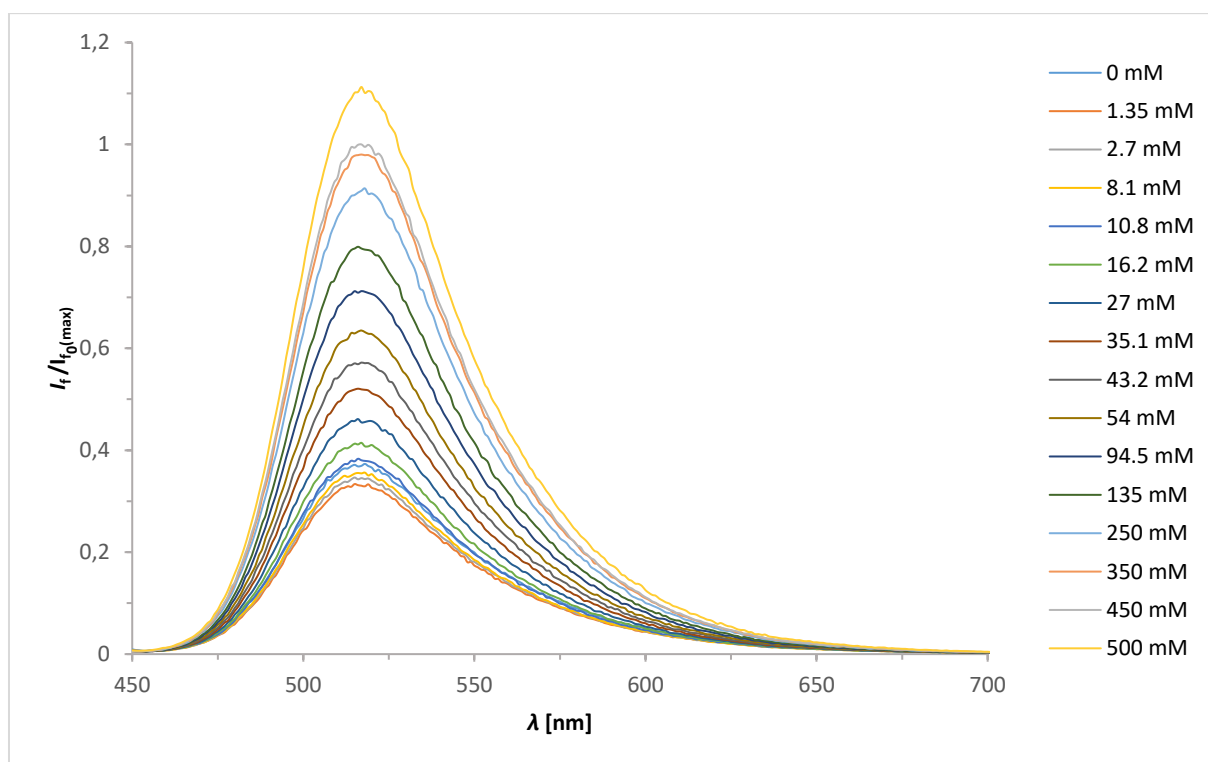
S27: Fluoreszenzemissionsspektren von **K9** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 420$ nm) für K^+ 160 mM in Gegenwart von Na^+ -Ionen. Die Ionenstärke wurde konstant gehalten ($[\text{K}^+] + [\text{Na}^+] = 160$ mM).



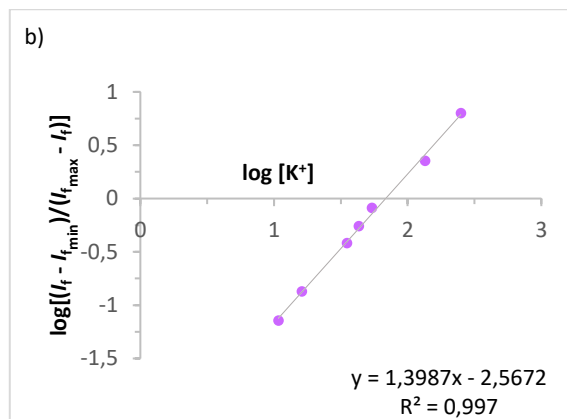
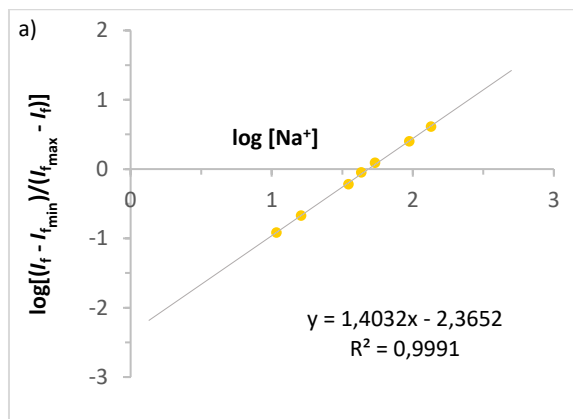
S28: a) Änderung der Fluoreszenzintensität von **K9** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 420$ nm) bei 498 nm in Gegenwart von kombinierten K^+/Na^+ -Konzentrationen gleich 160 mM b) Plot von $\log[(I_f - I_{f(\text{min})})/(I_{f(\text{max})} - I_f)]$ **K9** + K^+/Na^+ gegen $\log[\text{K}^+]$ zur Bestimmung von K_d .



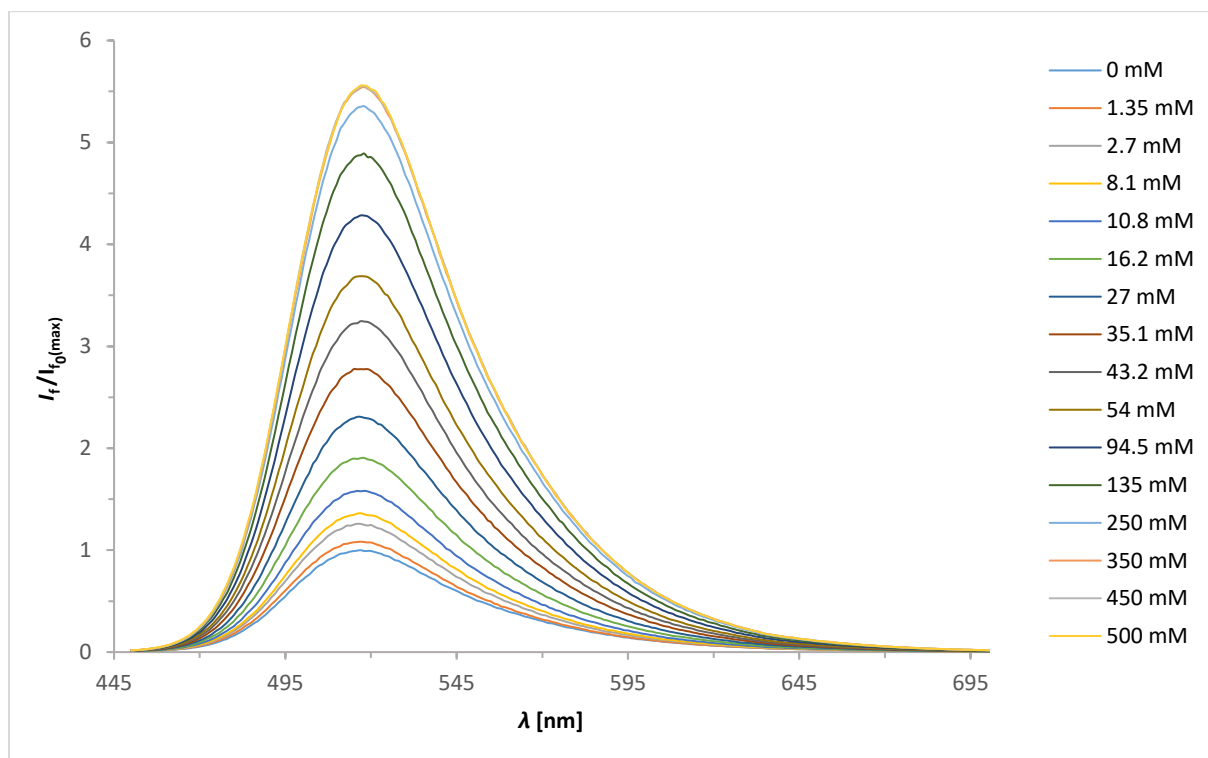
S29: Fluoreszenzemissionsspektren von Na3 ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 440$ nm) für Na⁺ 500 mM.



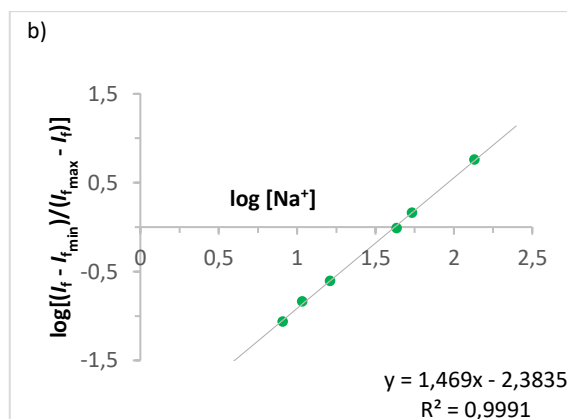
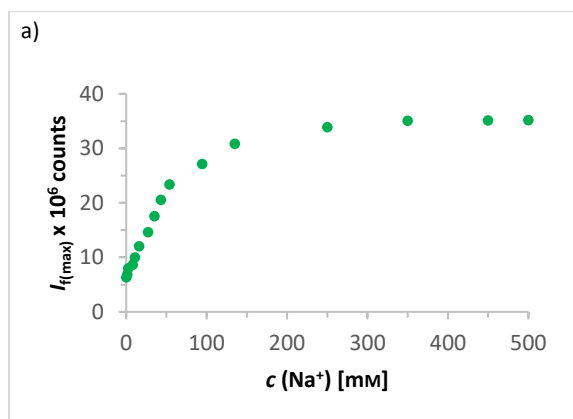
S30: Fluoreszenzemissionsspektren von Na3 ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 440$ nm) für K⁺ 500 mM.



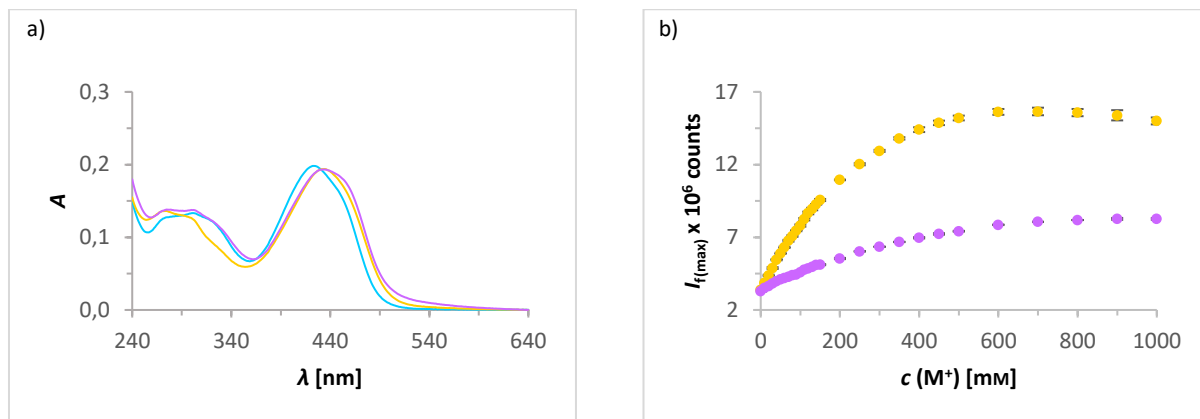
S31: a) Plot von $\log\left[\frac{I_f - I_{fmin}}{I_{fmax} - I_f}\right]$ **Na3** + Na^+ gegen $\log[\text{Na}^+]$ zur Bestimmung von K_d b) Plot von $\log\left[\frac{I_f - I_{fmin}}{I_{fmax} - I_f}\right]$ **Na3** + K^+ gegen $\log[\text{K}^+]$ zur Bestimmung von K_d .



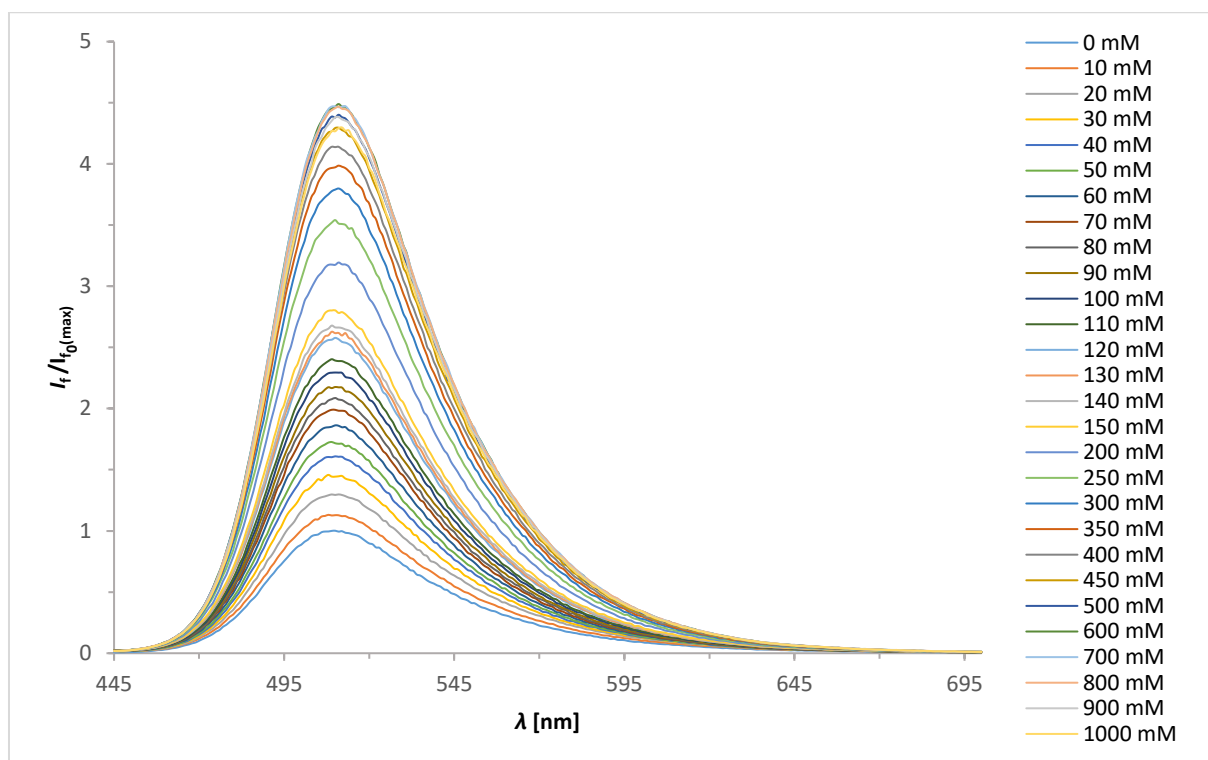
S32: Fluoreszenzmissionsspektren von **Na3** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{exc} = 440$ nm) für Na^+ 500 mM in Gegenwart von 135 mM KCl.



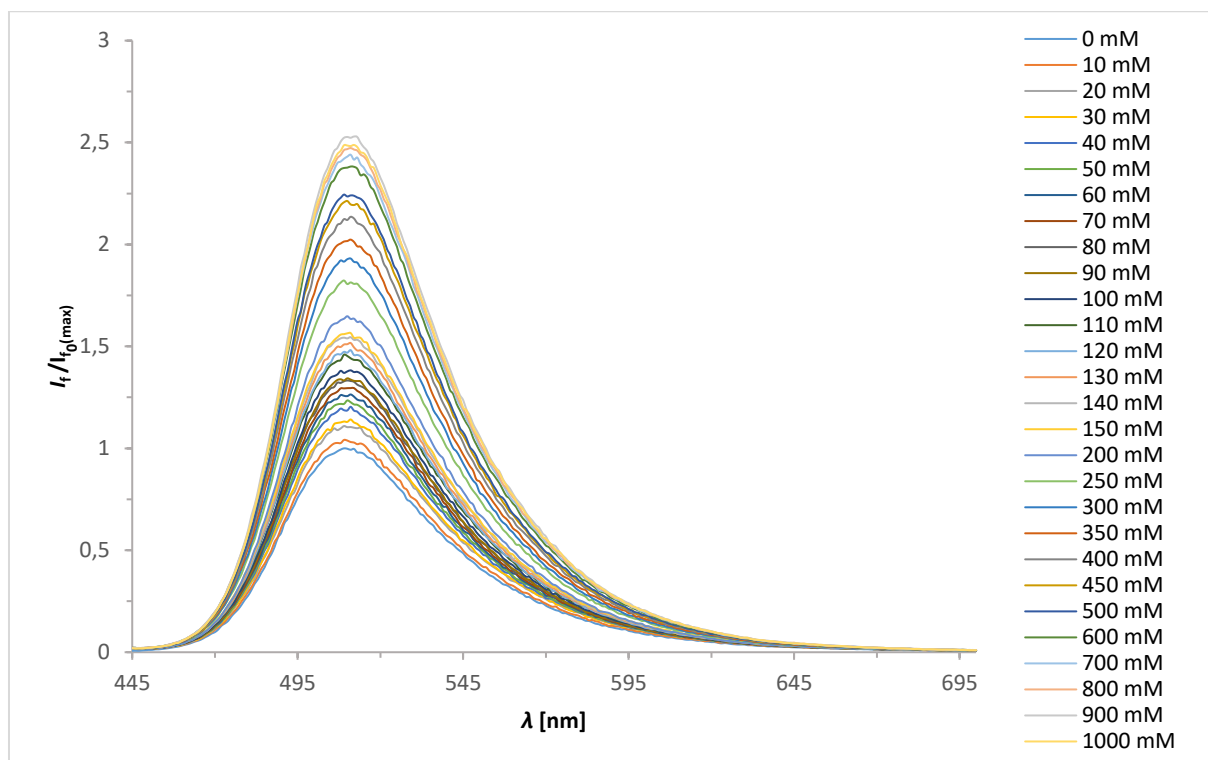
S33: a) Änderung der Fluoreszenzintensität von **Na3** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{exc} = 440$ nm) bei 509 nm in Gegenwart von kombinierten K^+/Na^+ -Konzentrationen mit 135 mM KCl b) Plot von $\log\left[\frac{I_f - I_{fmin}}{I_{fmax} - I_f}\right]$ **Na3** + K^+/Na^+ gegen $\log[\text{Na}^+]$ zur Bestimmung von K_d .



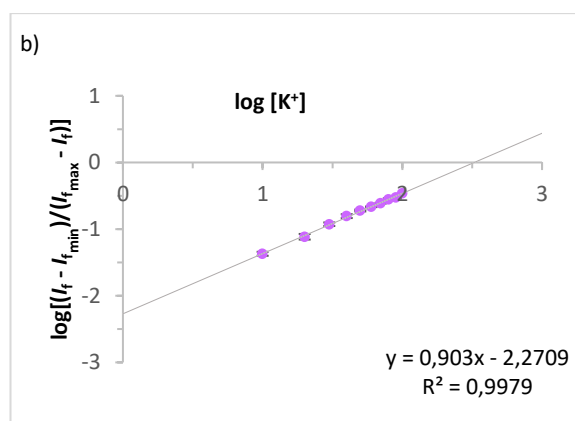
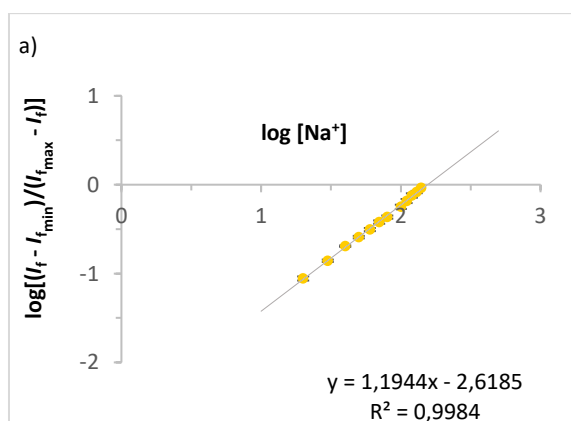
S34: Na4 ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2) a) UV-VIS Spektren in 10 mM Tris-Puffer (türkis), in Gegenwart von 1000 mM KCl (lila) und 1000 mM NaCl (gelb) mit $\lambda_{\text{abs}} = 435$ nm b) Änderung der Fluoreszenzintensität von **Na4** bei 509 nm in Gegenwart von 1000 mM KCl (lila) und 1000 mM NaCl (gelb).



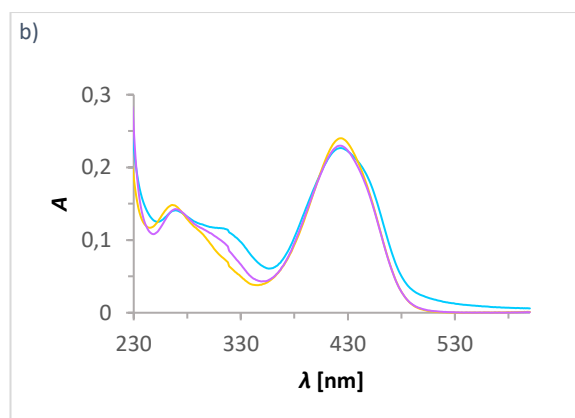
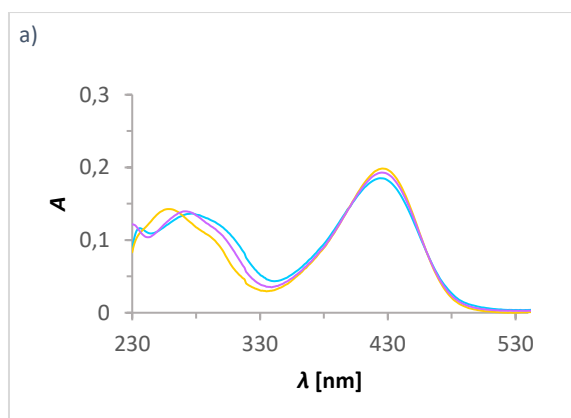
S35: Fluoreszenzemissionsspektren von Na4 ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 435$ nm) für Na⁺ 1000 mM.



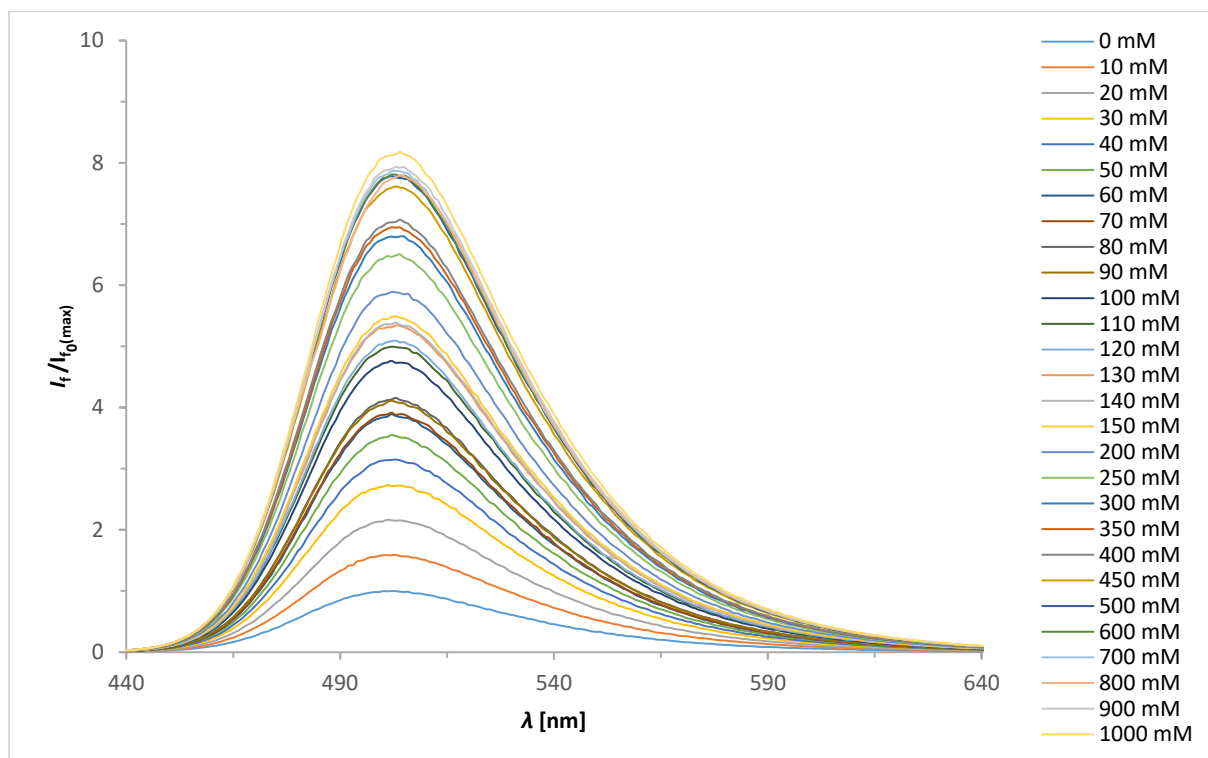
S36: Fluoreszenzemissionsspektren von **Na4** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $H_2O/DMSO$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{exc} = 435$ nm) für K^+ 1000 mM.



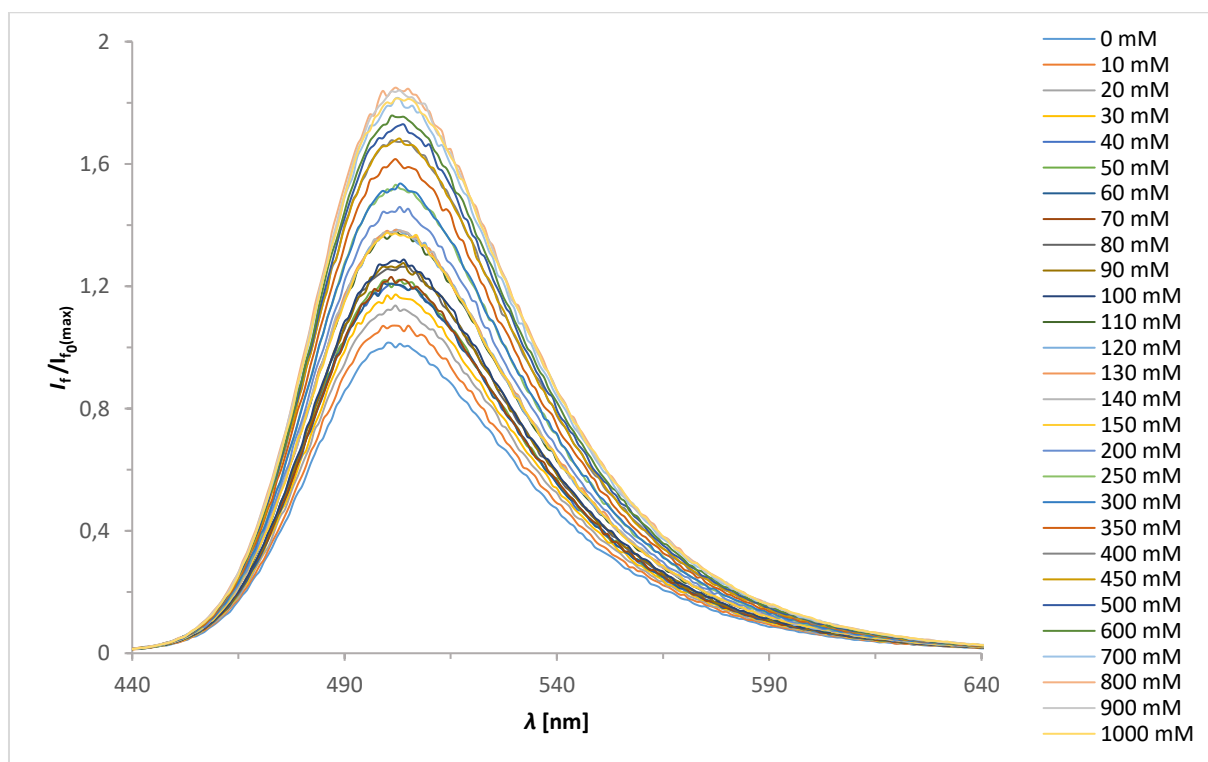
S37: a) Plot von $\log\left[\frac{I_f - I_{f_{min}}}{I_{f_{max}} - I_f}\right]$ **Na4** + Na^+ gegen $\log[Na^+]$ zur Bestimmung von K_d b) Plot von $\log\left[\frac{I_f - I_{f_{min}}}{I_{f_{max}} - I_f}\right]$ **Na4** + K^+ gegen $\log[K^+]$ zur Bestimmung von K_d .



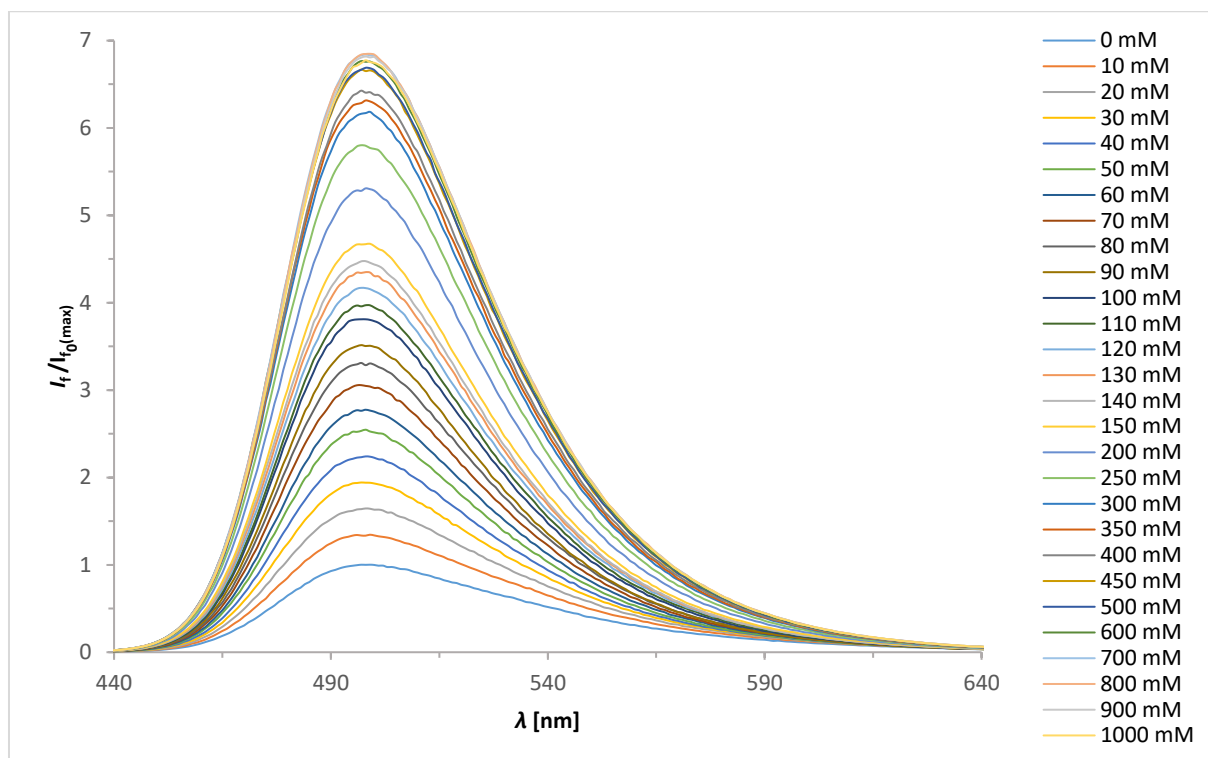
S38: UV/VIS-Spektren ($c = 10^{-5}$ mol/l, $H_2O/DMSO$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2) in 10 mM Tris-Puffer (türkis), in Gegenwart von 1000 mM KCl (lila) und 1000 mM NaCl (gelb) a) **Na5** mit $\lambda_{abs} = 425$ nm und b) **Na6** mit $\lambda_{abs} = 423$ nm.



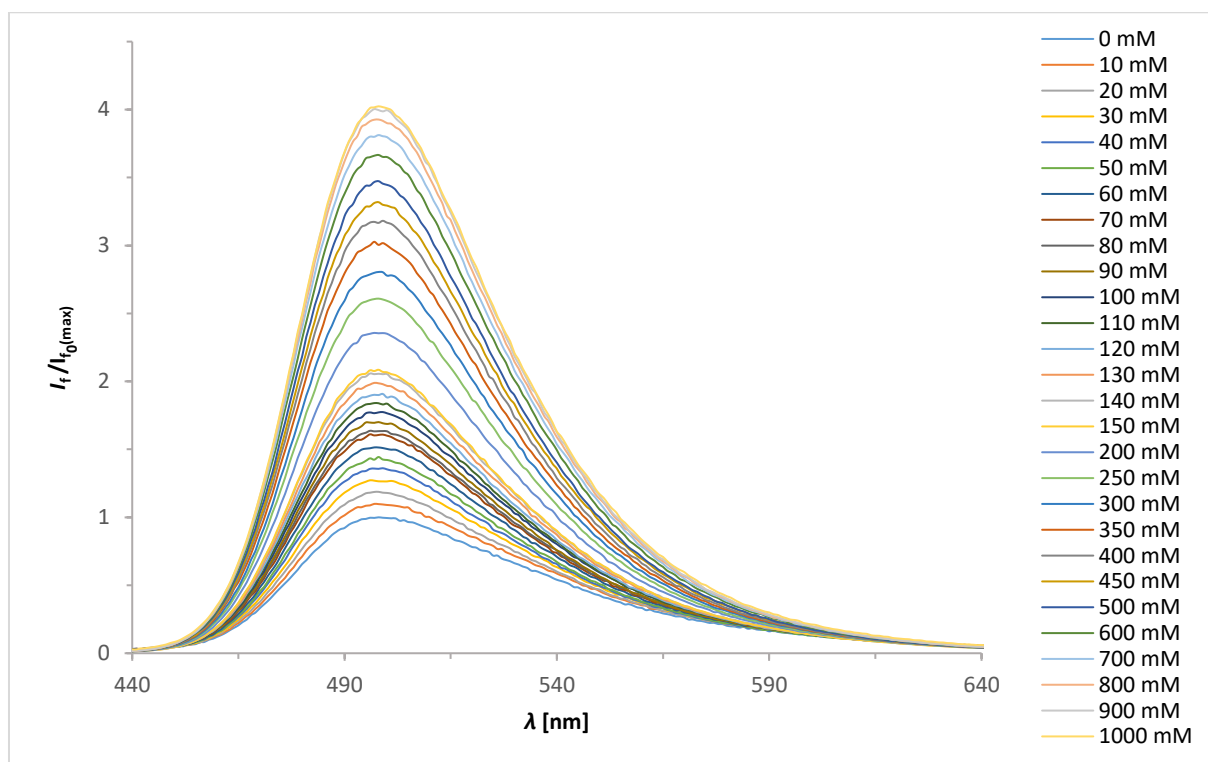
S39: Fluoreszenzemissionsspektren von Na5 ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 425$ nm) für Na⁺ 1000 mM.



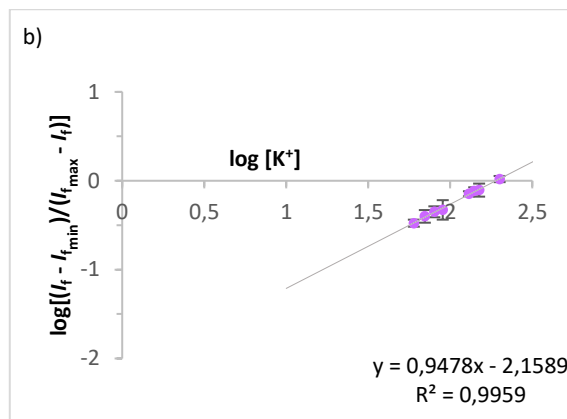
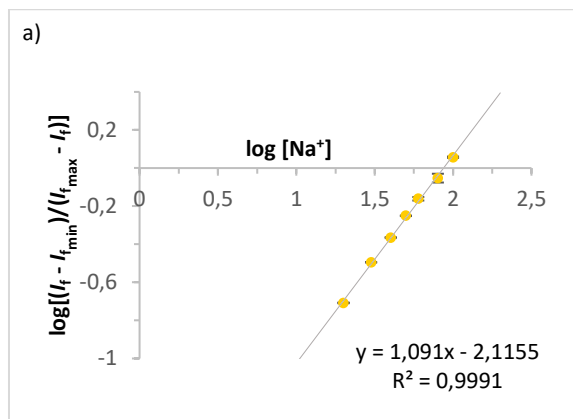
S40: Fluoreszenzemissionsspektren von Na5 ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 425$ nm) für K⁺ 1000 mM.



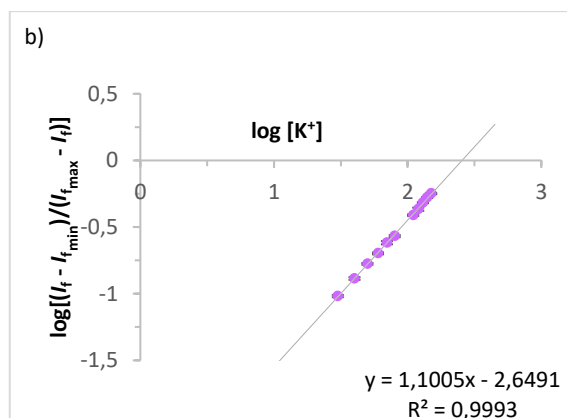
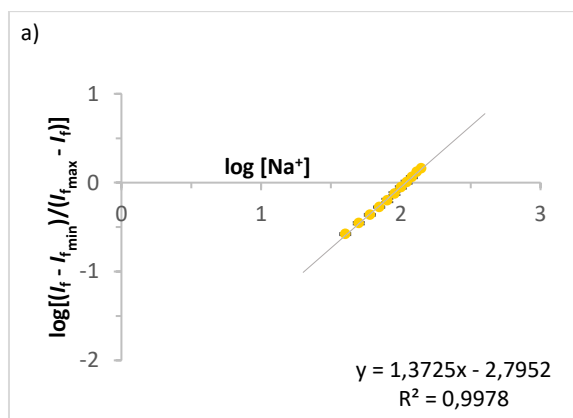
S41: Fluoreszenzemissionsspektren von Na6 ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 423$ nm) für Na⁺ 1000 mM.



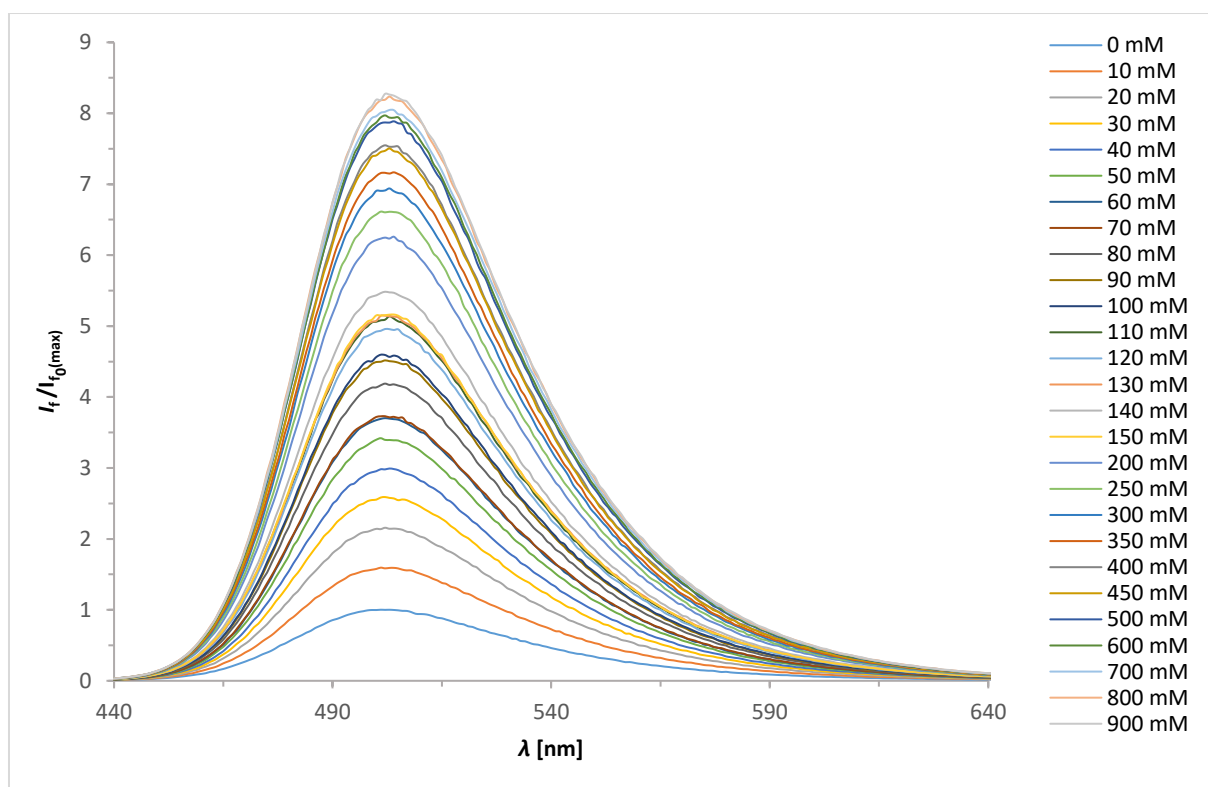
S42: Fluoreszenzemissionsspektren von Na6 ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 423$ nm) für K⁺ 1000 mM.



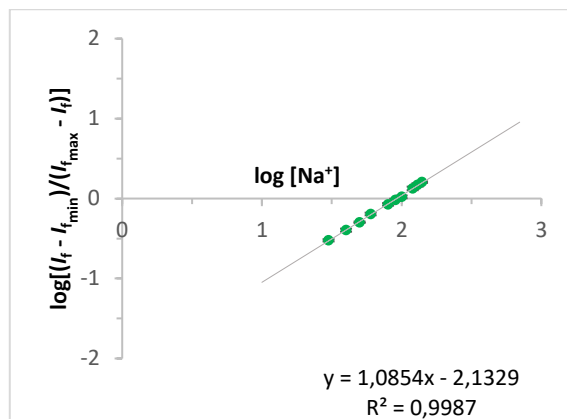
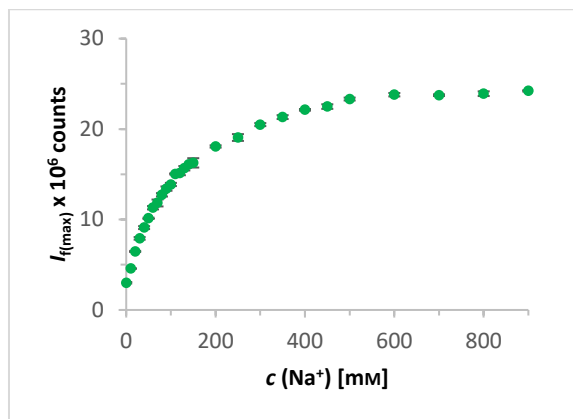
S43: a) Plot von $\log\left[\frac{I_t - I_{\min}}{I_{\max} - I_t}\right]$ $\text{Na5} + \text{Na}^+$ gegen $\log[\text{Na}^+]$ zur Bestimmung von K_d b) Plot von $\log\left[\frac{I_t - I_{\min}}{I_{\max} - I_t}\right]$ $\text{Na5} + \text{K}^+$ gegen $\log[\text{K}^+]$ zur Bestimmung von K_d .



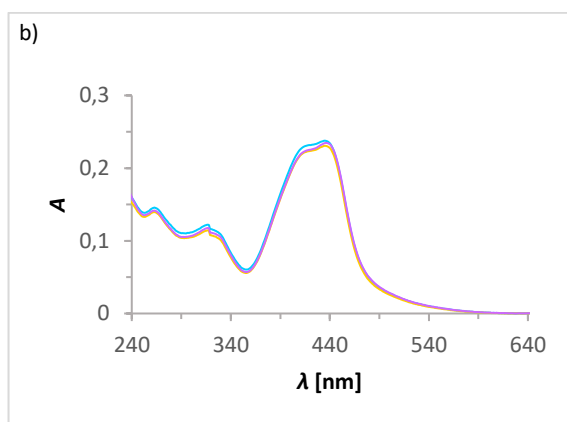
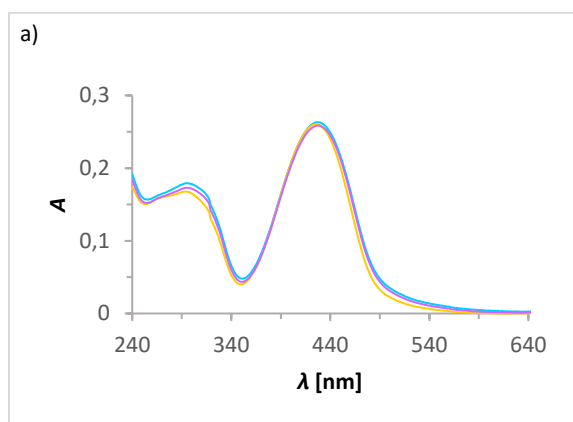
S44: a) Plot von $\log\left[\frac{I_t - I_{\min}}{I_{\max} - I_t}\right]$ $\text{Na6} + \text{Na}^+$ gegen $\log[\text{Na}^+]$ zur Bestimmung von K_d b) Plot von $\log\left[\frac{I_t - I_{\min}}{I_{\max} - I_t}\right]$ $\text{Na6} + \text{K}^+$ gegen $\log[\text{K}^+]$ zur Bestimmung von K_d .



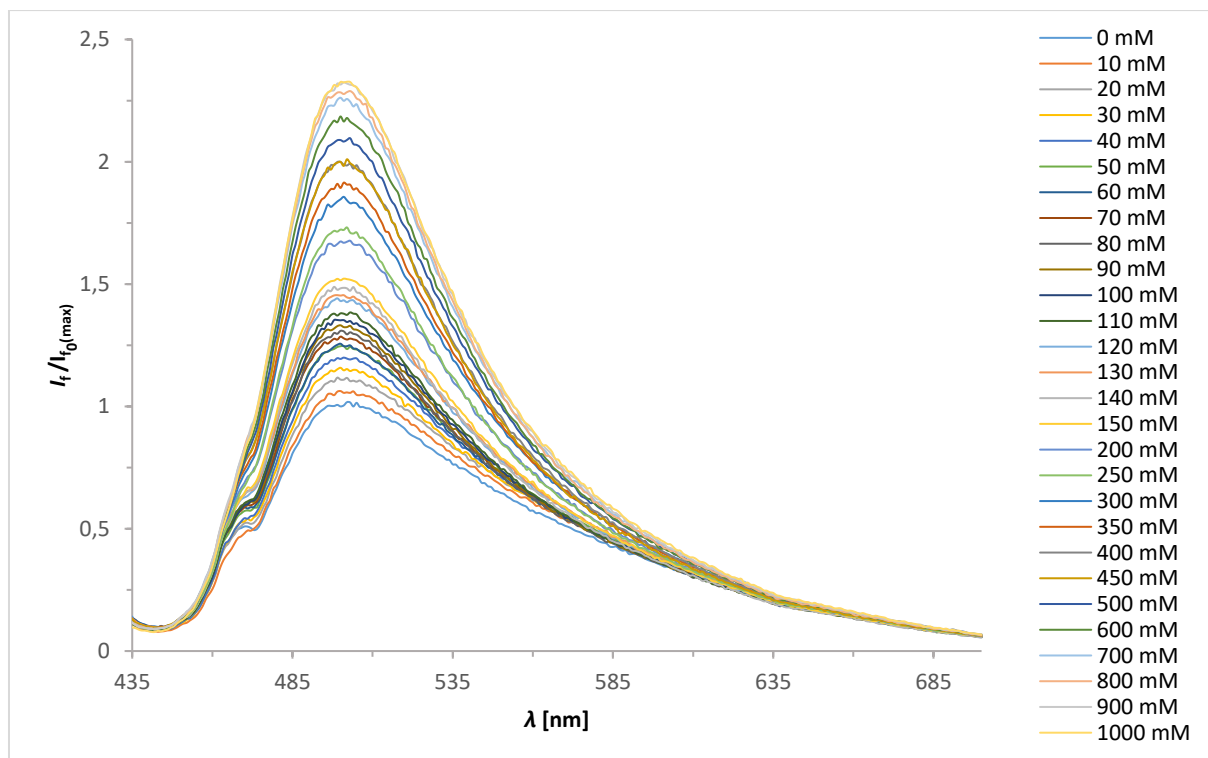
S45: Fluoreszenzemissionsspektren von Na5 ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 425$ nm) für Na^+ 900 mM in Gegenwart von 10 mM KCl.



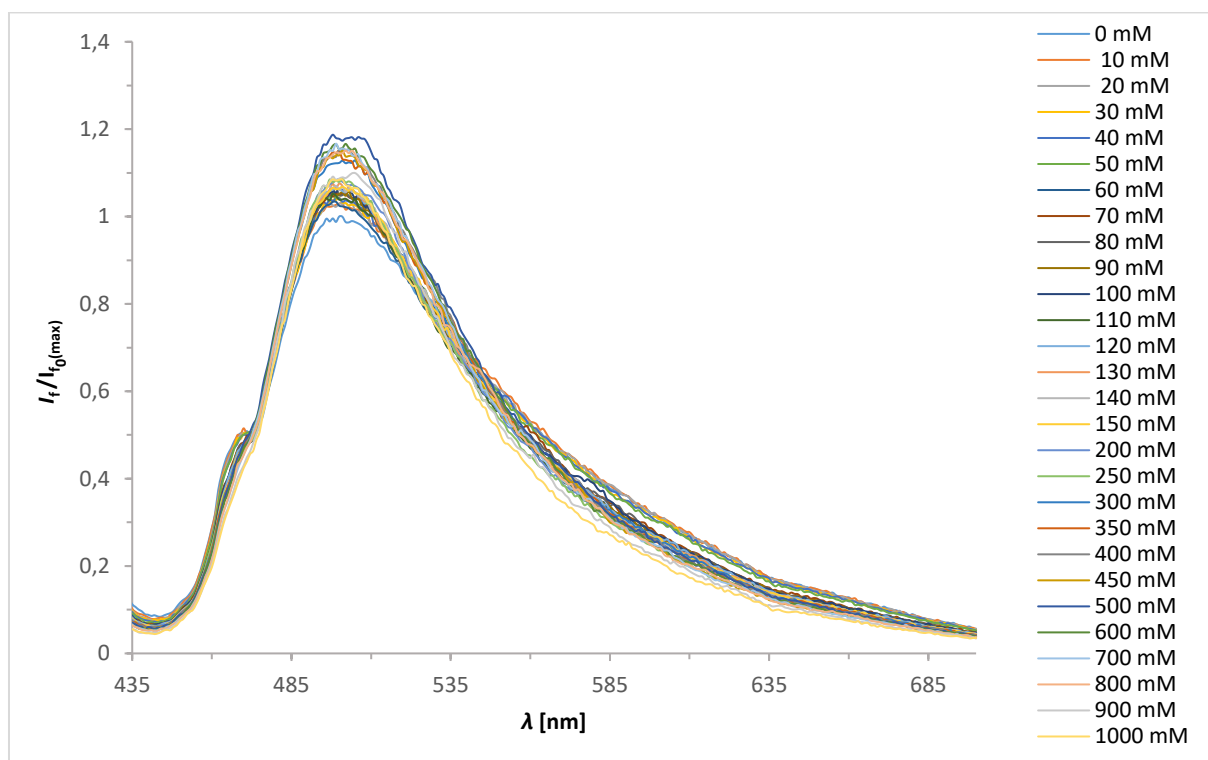
S46: a) Änderung der Fluoreszenzintensität von **Na5** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 425$ nm) bei 502 nm in Gegenwart von kombinierten K^+/Na^+ -Konzentrationen mit 10 mM KCl b) Plot von $\log[(I_f - I_{f(\text{min})})/(I_{f(\text{max})} - I_f)]$ **Na5** + K^+/Na^+ gegen $\log[\text{Na}^+]$ zur Bestimmung von K_d .



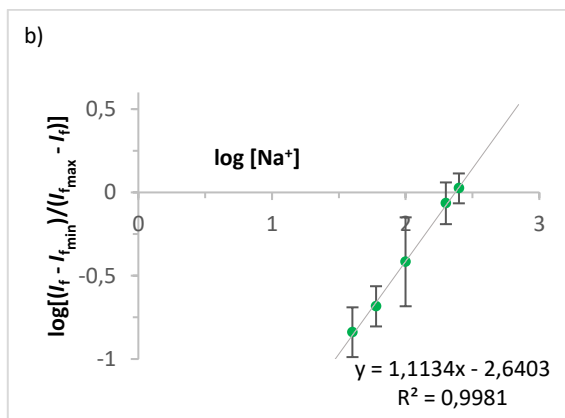
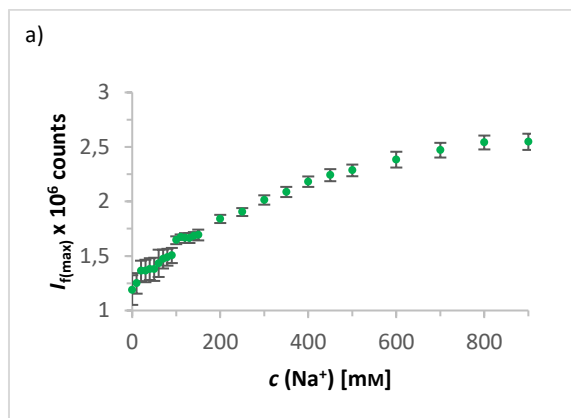
S47: UV/VIS-Spektren ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2) in 10 mM Tris-Puffer (türkis), in Gegenwart von 1000 mM KCl (lila) und 1000 mM NaCl (gelb) a) **Na7** mit $\lambda_{\text{abs}} = 427$ nm und b) **Na8** mit $\lambda_{\text{abs}} = 425$ nm.



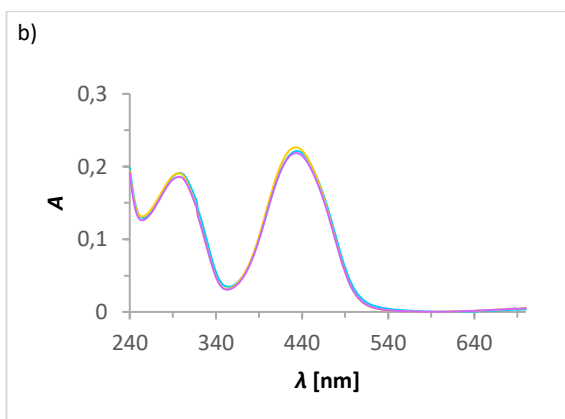
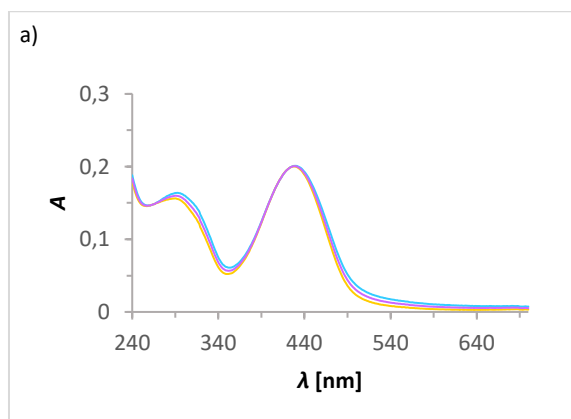
S48: Fluoreszenzemissionsspektren von **Na7** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 422$ nm) für Na^+ 1000 mM.



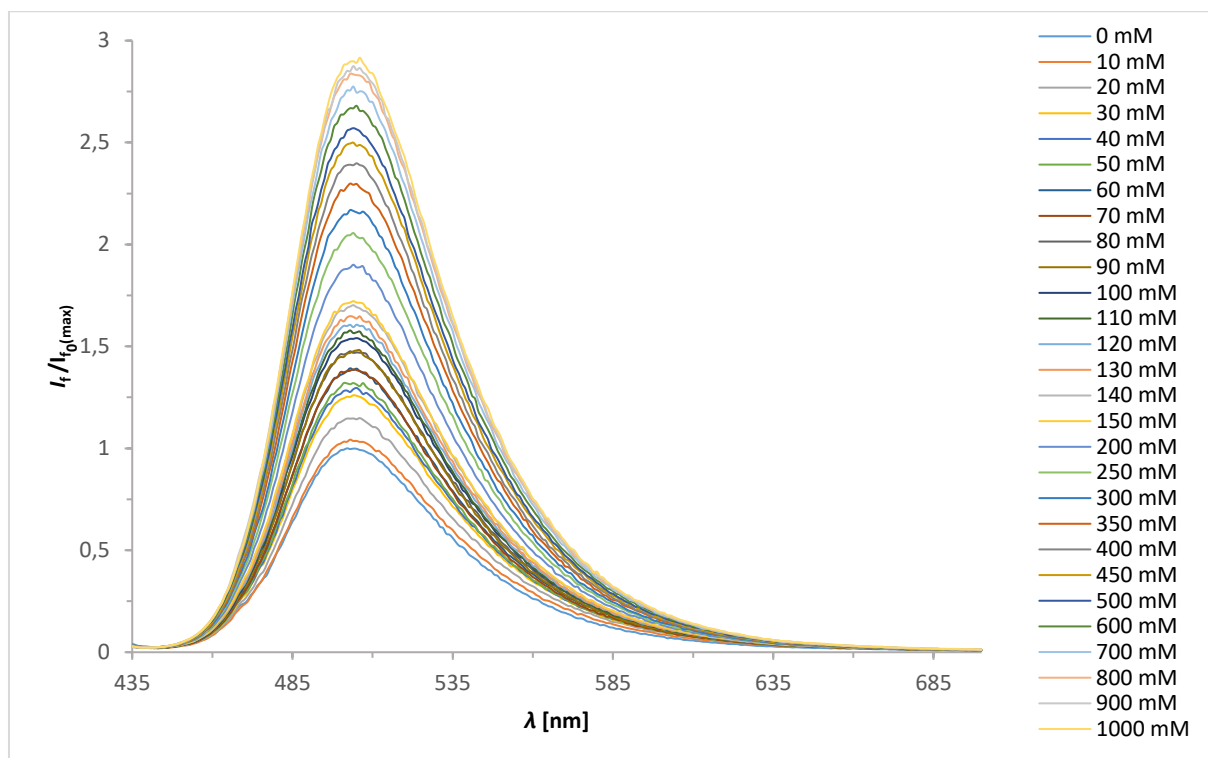
S49: Fluoreszenzemissionsspektren von **Na7** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $H_2O/DMSO$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{exc} = 422$ nm) für K^+ 1000 mM.



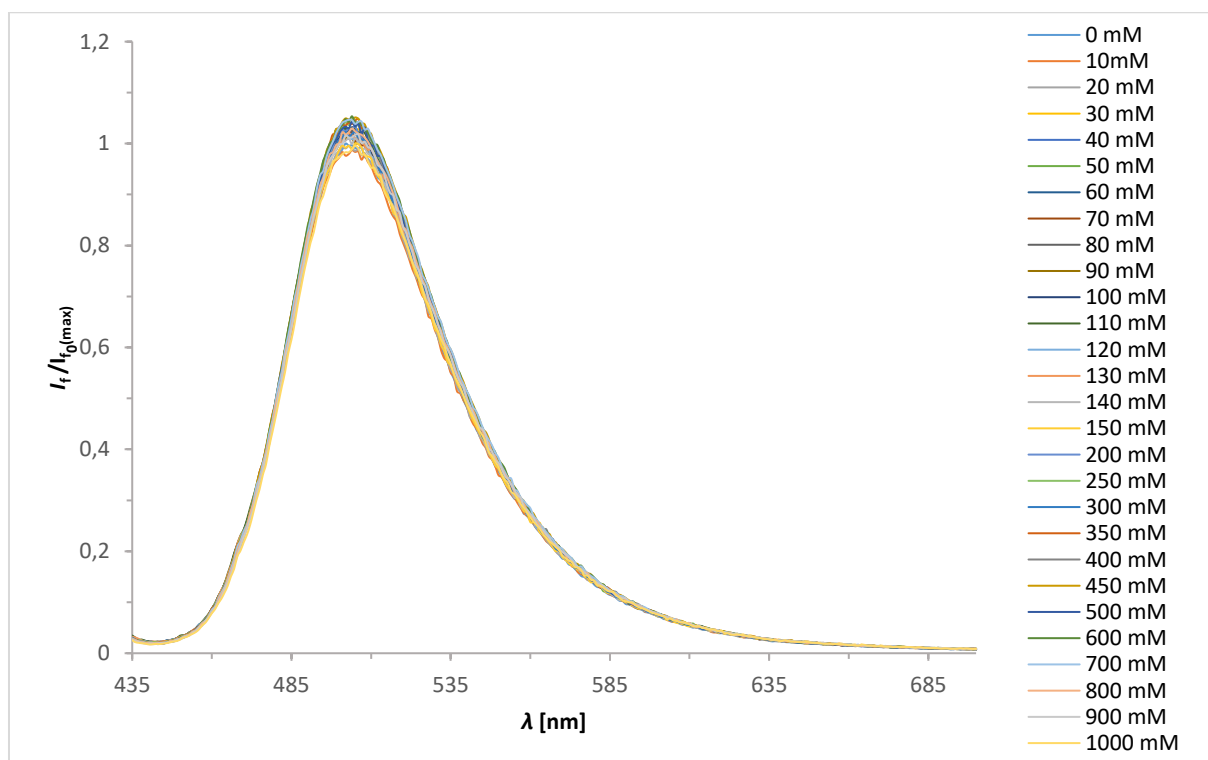
S50: a) Änderung der Fluoreszenzintensität von **Na7** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $H_2O/DMSO$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{exc} = 422$ nm) bei 500 nm in Gegenwart von kombinierten K^+/Na^+ -Konzentrationen mit 10 mM KCl b) Plot von $\log[(I_f - I_{f(\min)}) / (I_{f(\max)} - I_f)]$ **Na7** + K^+/Na^+ gegen $\log[Na^+]$ zur Bestimmung von K_d .



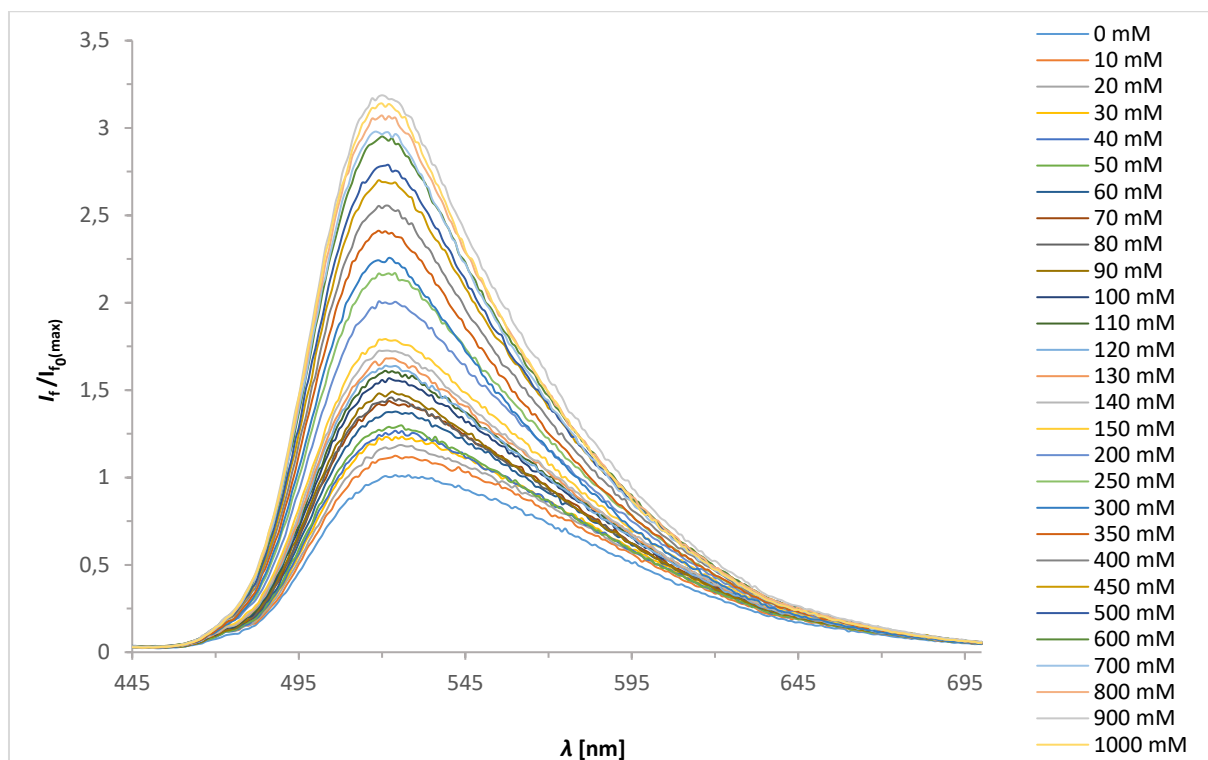
S51: UV/VIS-Spektren ($c = 10^{-5}$ mol/l, $H_2O/DMSO$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2) in 10 mM Tris-Puffer (türkis), in Gegenwart von 1000 mM KCl (lila) und 1000 mM NaCl (gelb) a) **Na9** mit $\lambda_{abs} = 430$ nm und b) **Na10** mit $\lambda_{abs} = 435$ nm.



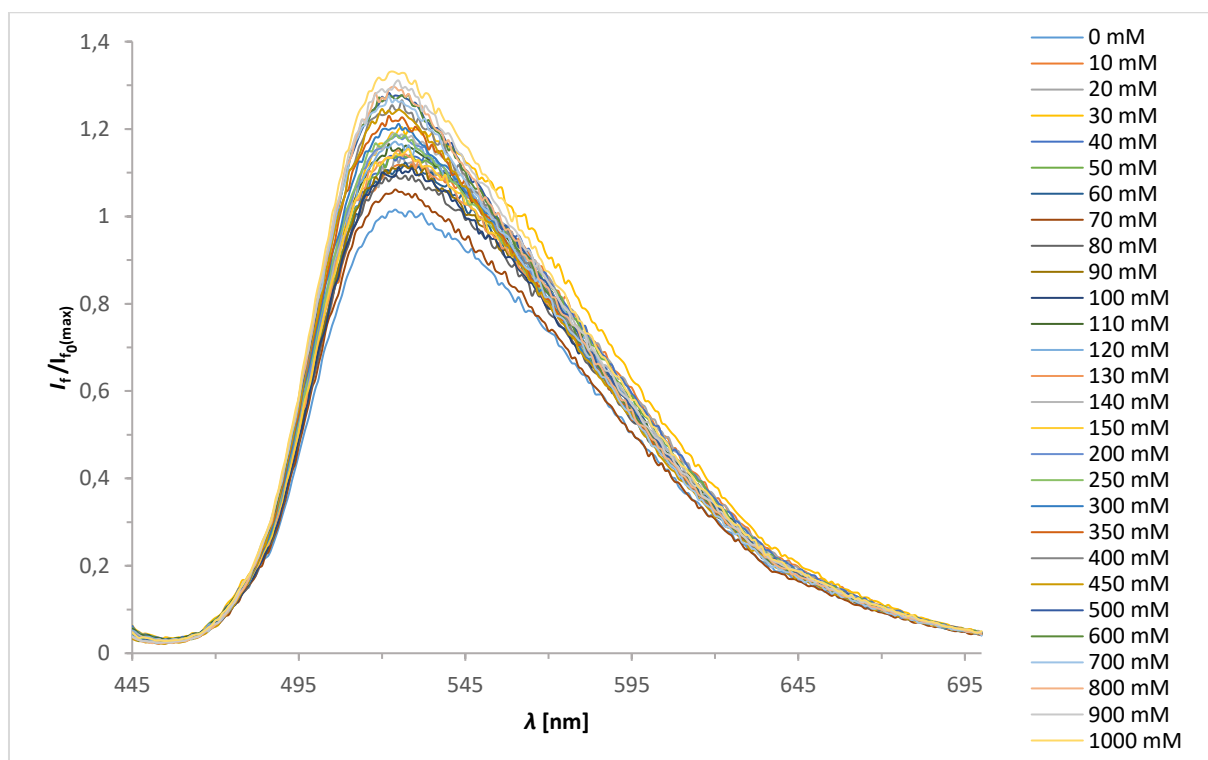
S52: Fluoreszenzemissionsspektren von Na9 ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{exc} = 425$ nm) für Na⁺ 1000 mM.



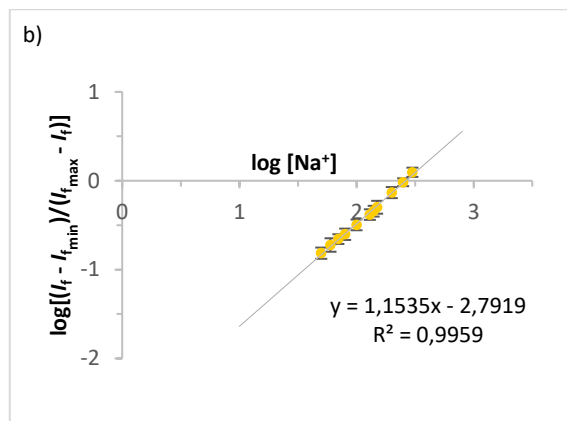
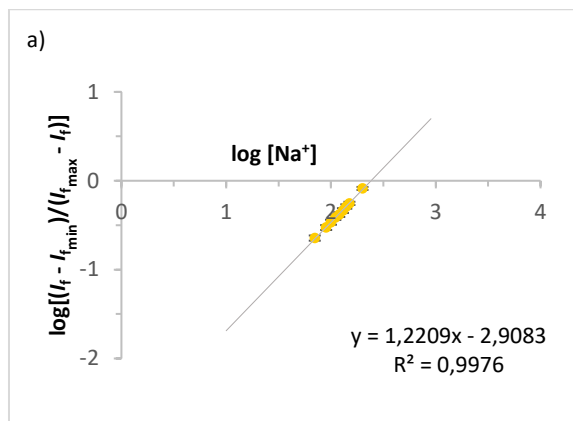
S53: Fluoreszenzemissionsspektren von Na9 ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{exc} = 425$ nm) für K⁺ 1000 mM.



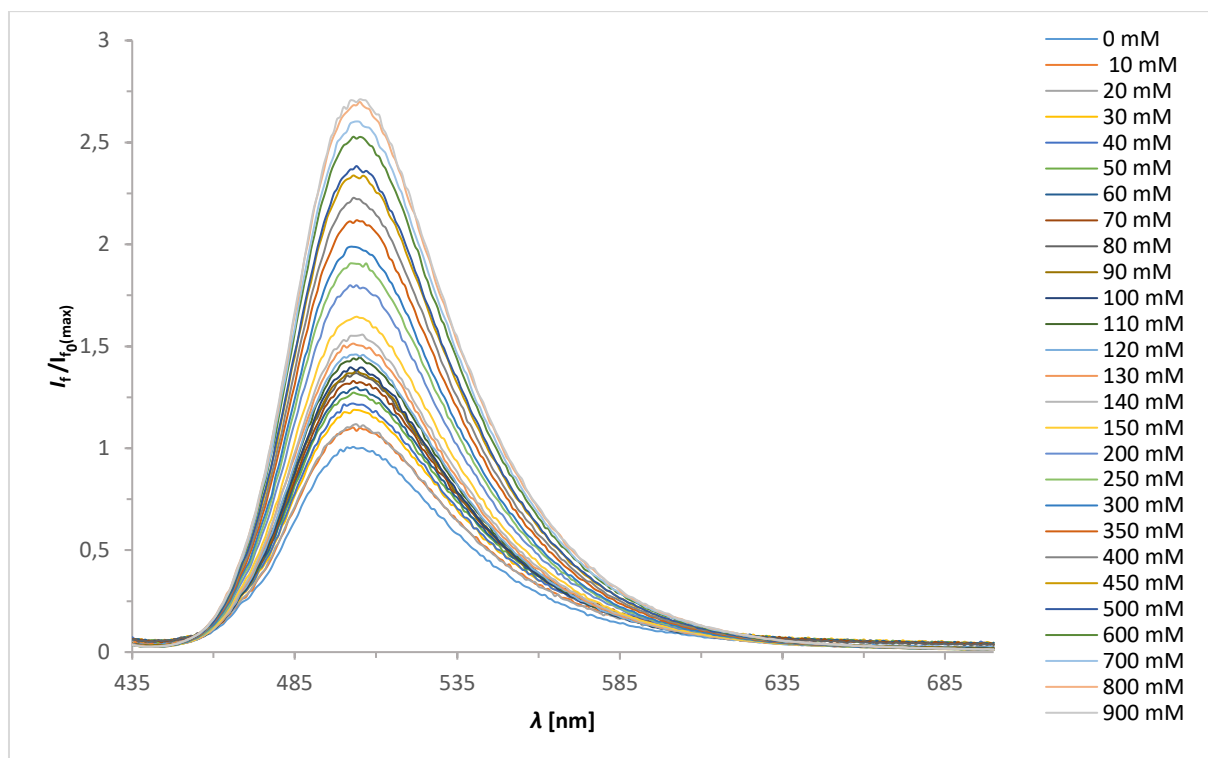
S54: Fluoreszenzemissionsspektren von Na10 (c = 10⁻⁵ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, λ_{exc} = 435 nm) für Na⁺ 1000 mM.



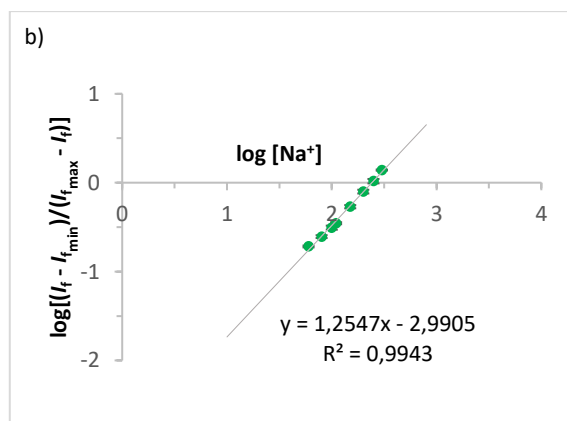
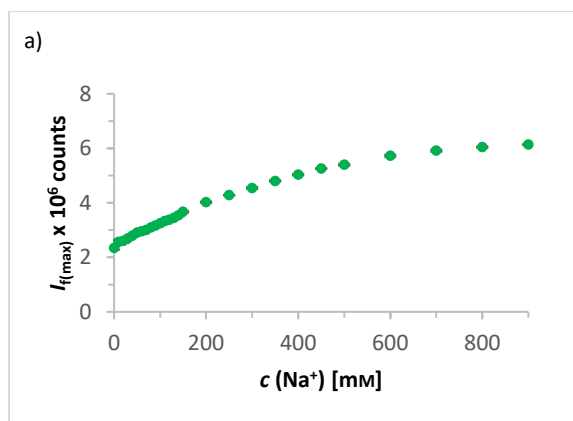
S55: Fluoreszenzemissionsspektren von Na10 (c = 10⁻⁵ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, λ_{exc} = 435 nm) für K⁺ 1000 mM.



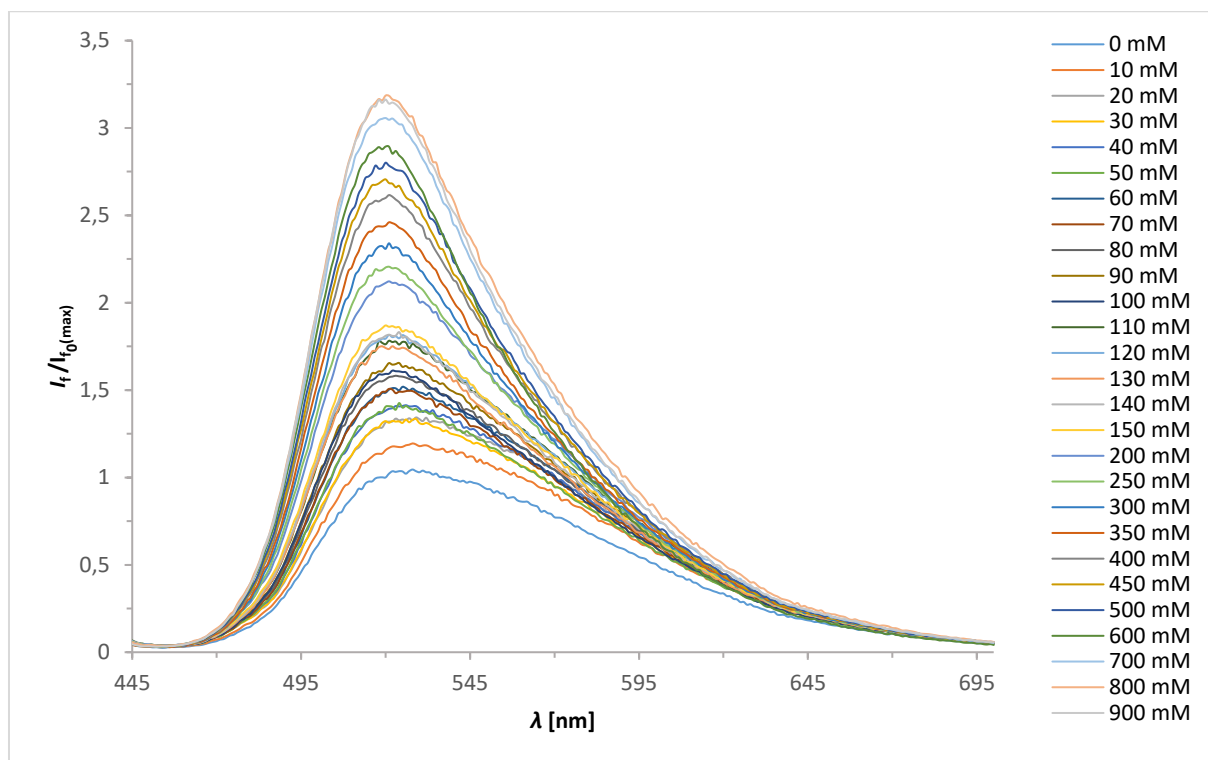
S56: a) Plot von $\log\left[\frac{I_t - I_{tmin}}{I_{tmax} - I_t}\right]$ **Na9** + Na^+ gegen $\log[\text{Na}^+]$ zur Bestimmung von K_d b) Plot von $\log\left[\frac{I_t - I_{tmin}}{I_{tmax} - I_t}\right]$ **Na10** + Na^+ gegen $\log[\text{Na}^+]$ zur Bestimmung von K_d .



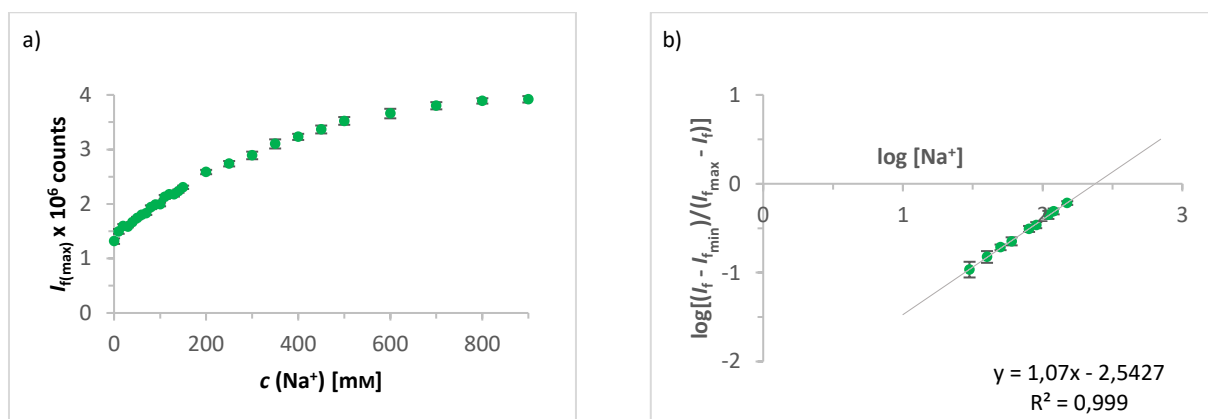
S57: Fluoreszenzemissionsspektren von **Na9** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{exc} = 425$ nm) für Na^+ 900 mM in Gegenwart von 10 mM KCl.



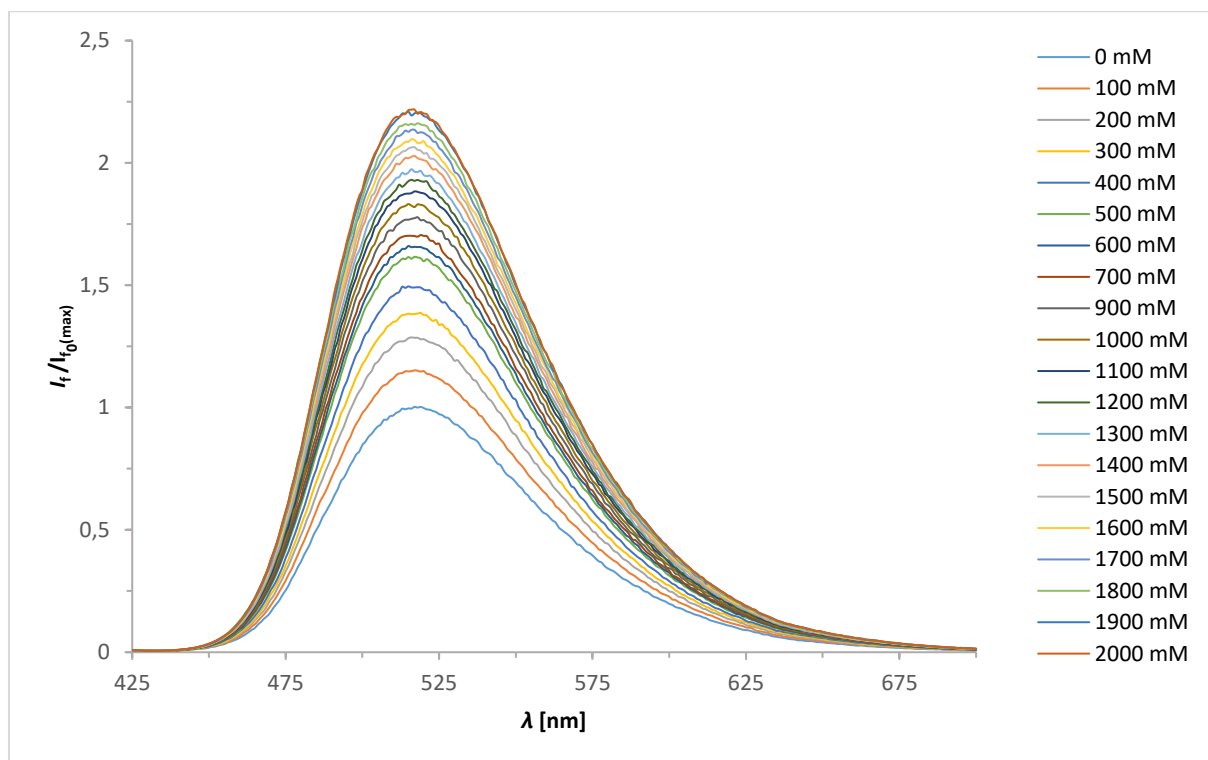
S58: a) Änderung der Fluoreszenzintensität von **Na9** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{exc} = 425$ nm) bei 502 nm in Gegenwart von kombinierten K^+/Na^+ -Konzentrationen mit 10 mM KCl b) Plot von $\log\left[\frac{I_t - I_{tmin}}{I_{tmax} - I_t}\right]$ **Na9** + K^+/Na^+ gegen $\log[\text{Na}^+]$ zur Bestimmung von K_d .



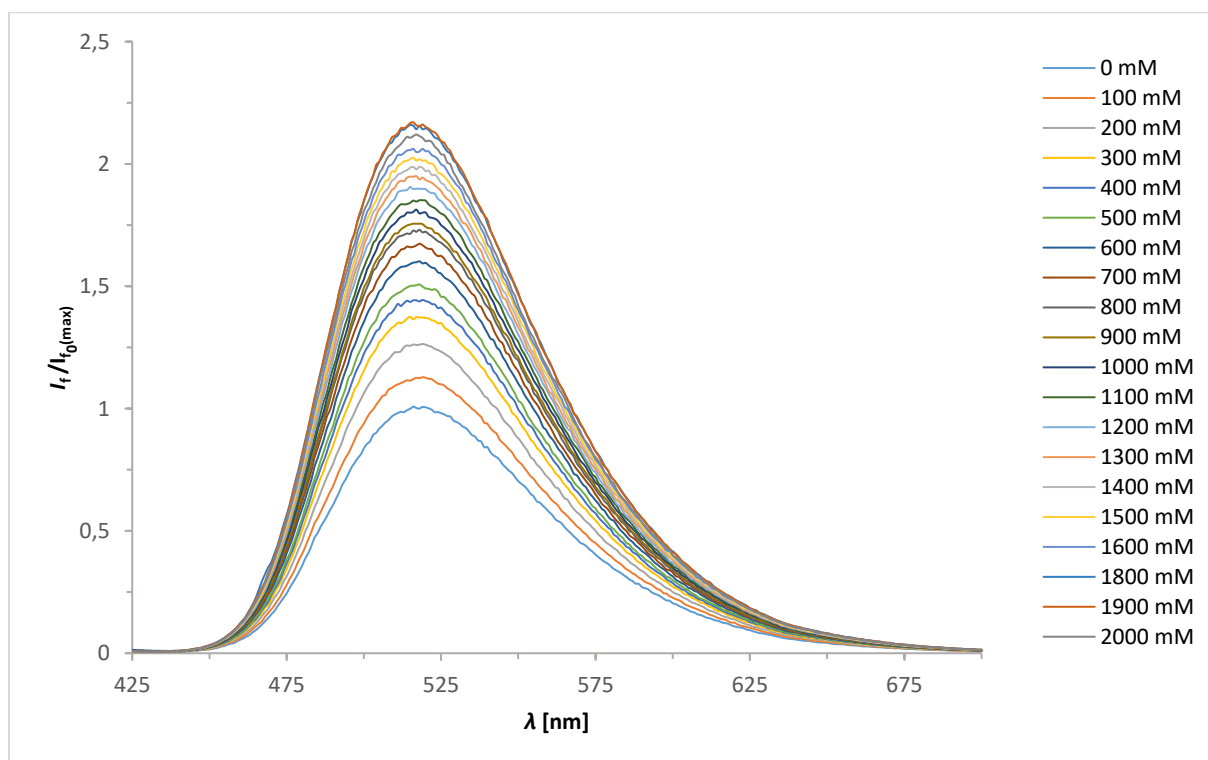
S59: Fluoreszenzemissionsspektren von **Na10** ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 435$ nm) für Na⁺ 900 mM in Gegenwart von 10 mM KCl.



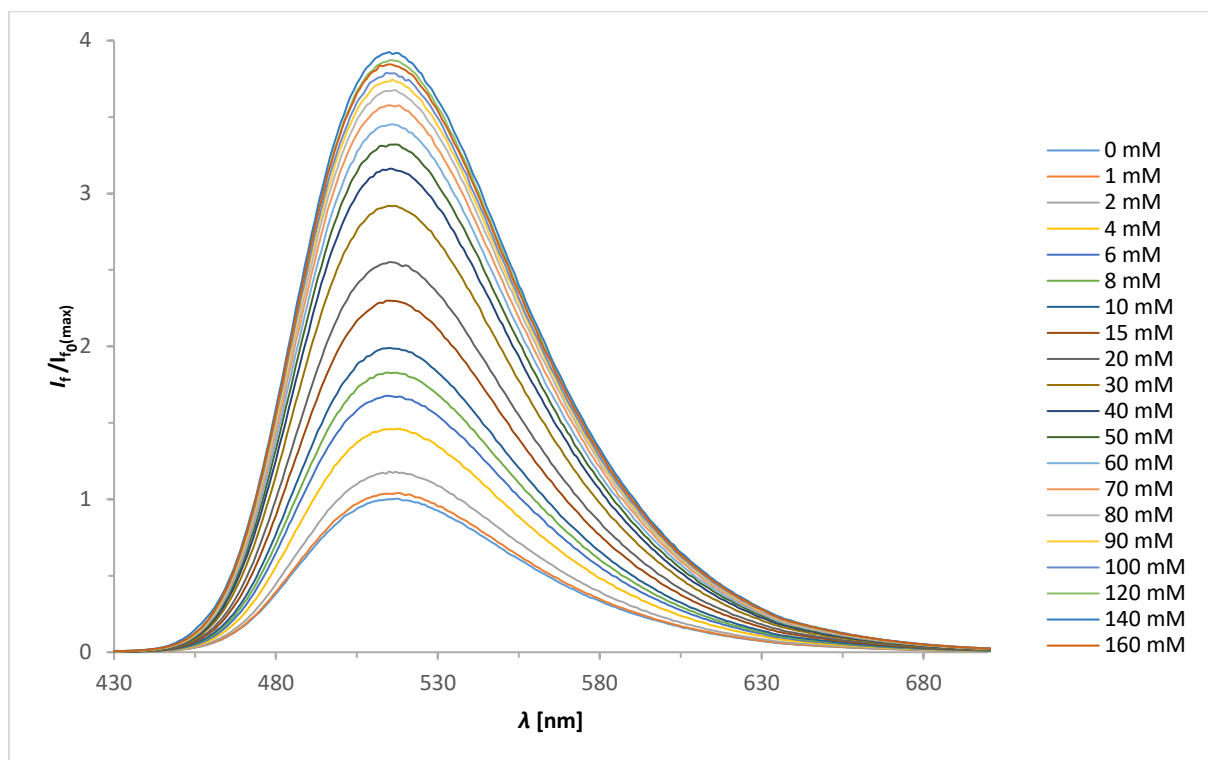
S60: a) Änderung der Fluoreszenzintensität von **Na10** ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 435$ nm) bei 520 nm in Gegenwart von kombinierten K⁺/Na⁺-Konzentrationen mit 10 mM KCl b) Plot von $\log[(I_f - I_{f(\min)}) / (I_{f(\max)} - I_f)]$ **Na10** + K⁺/Na⁺ gegen $\log[\text{Na}^+]$ zur Bestimmung von K_d .



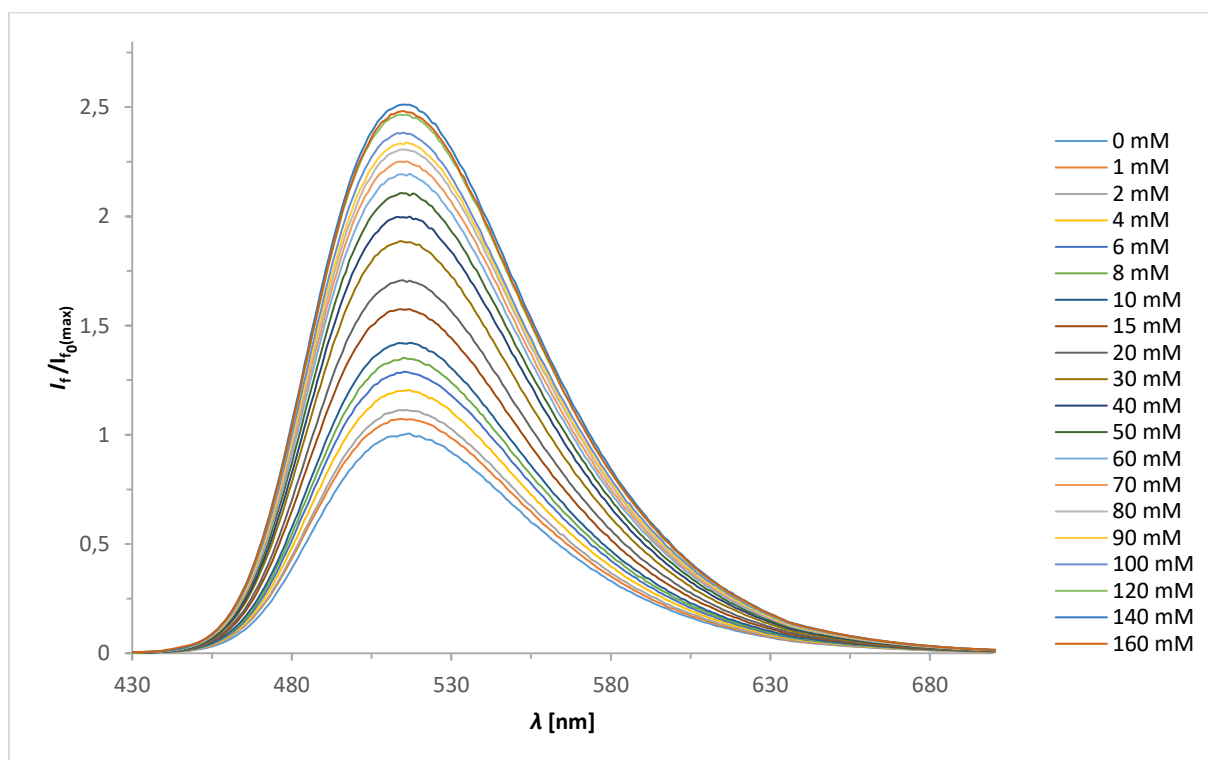
S61: Fluoreszenzemissionsspektren von **W1** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 415$ nm) für K^+ 2000 mM.



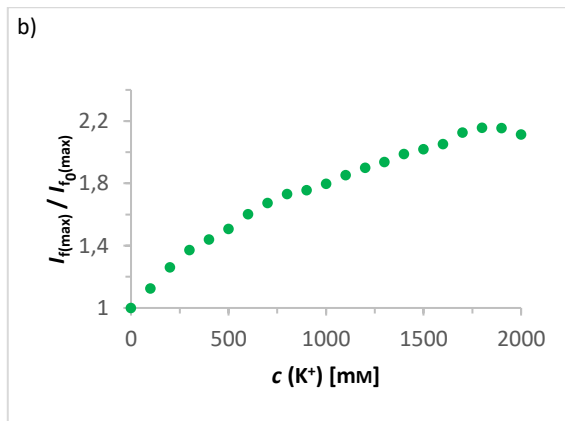
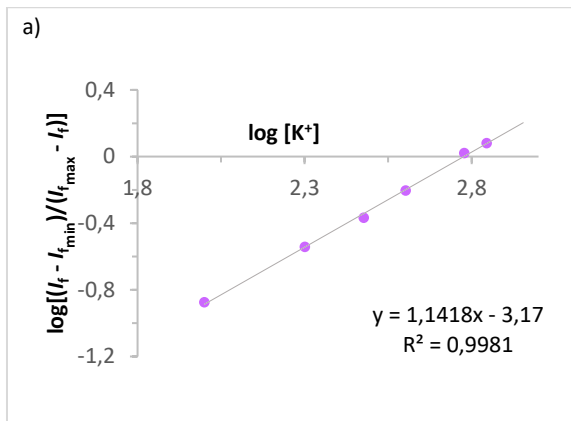
S62: Fluoreszenzemissionsspektren von **W1** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 415$ nm) für K^+ 2000 mM in Gegenwart von Na^+ -Ionen. Die Ionenstärke wurde konstant gehalten ($[\text{K}^+] + [\text{Na}^+] = 2000$ mM).



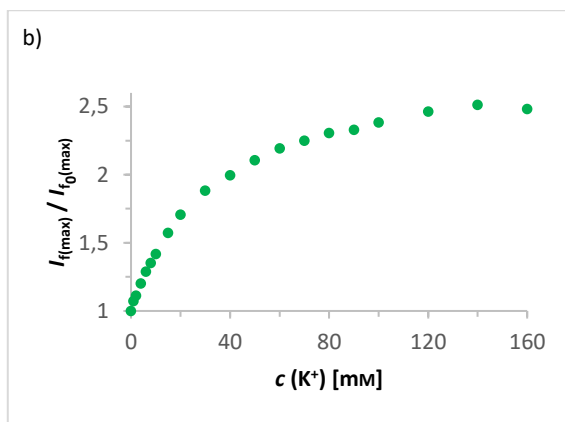
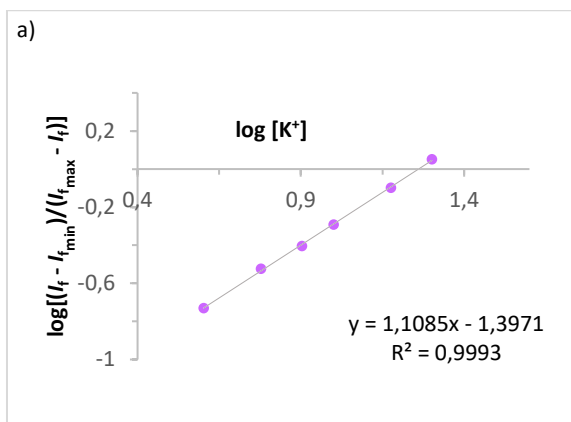
S63: Fluoreszenzemissionsspektren von **W2** ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 413$ nm) für K⁺ 160 mM.



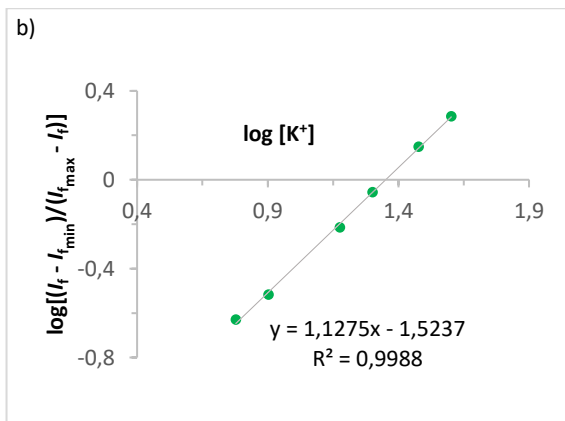
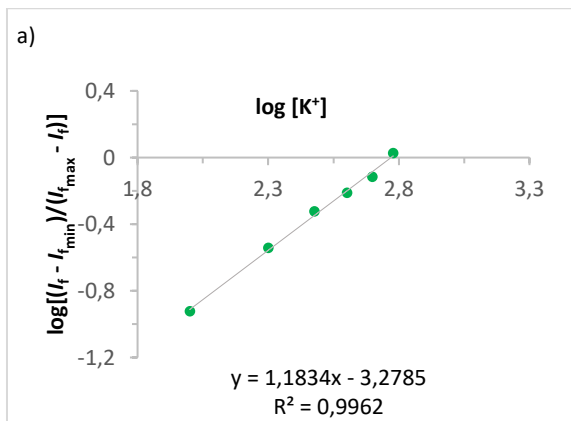
S64: Fluoreszenzemissionsspektren von **W2** ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 41$ nm) für K⁺ 160 mM in Gegenwart von Na⁺-Ionen. Die Ionenstärke wurde konstant gehalten ($[K^+] + [Na^+] = 160$ mM).



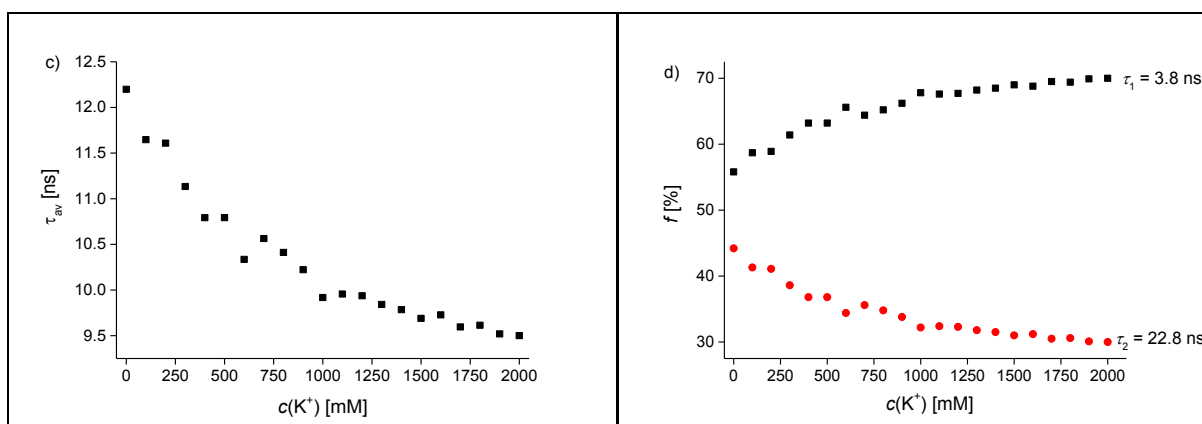
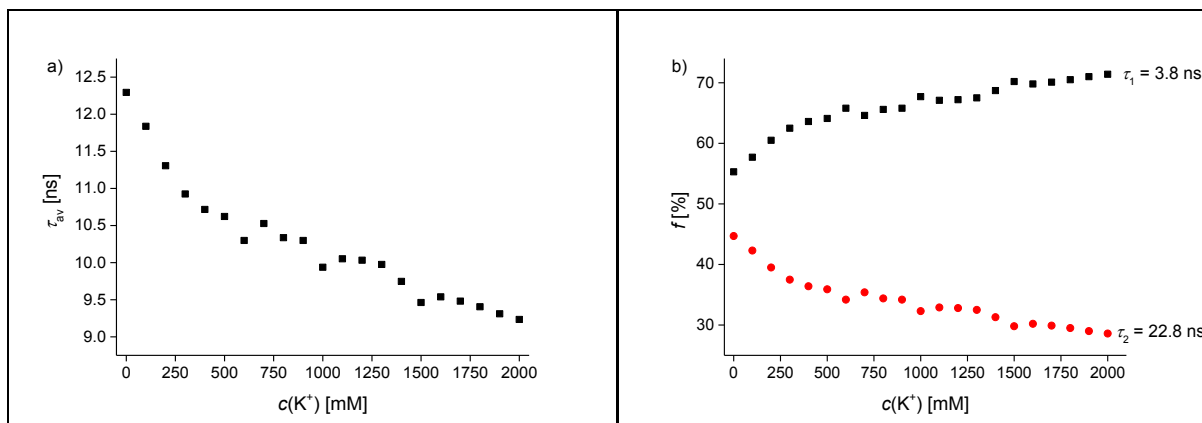
S65: a) Plot von $\log[(I_t - I_{\min})/(I_{\max} - I_t)]$ **W1** + K^+ gegen $\log[K^+]$ zur Bestimmung von K_d und b) Änderung der Fluoreszenzintensität von **W1** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $H_2O/DMSO, 99:1, v/v, 10$ mM Tris-Puffer, $pH = 7.2, \lambda_{exc} = 415$ nm) bei 518 nm in Gegenwart von kombinierten K^+/Na^+ -Konzentrationen ($[K^+] + [Na^+] = 2000$ mM).



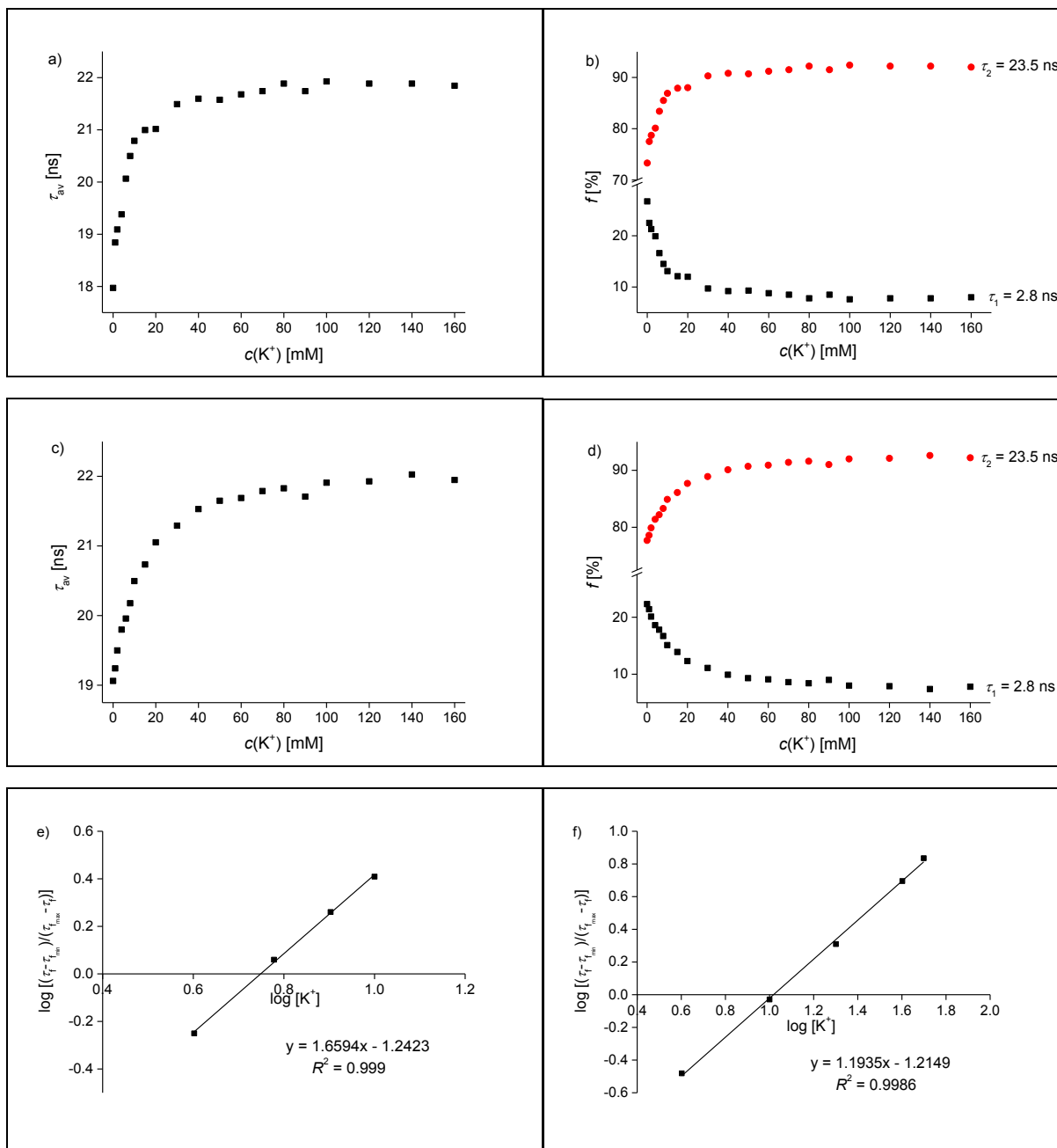
S66: a) Plot von $\log[(I_t - I_{\min})/(I_{\max} - I_t)]$ **W2** + K^+ gegen $\log[K^+]$ zur Bestimmung von K_d und b) Änderung der Fluoreszenzintensität von **W2** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $H_2O/DMSO, 99:1, v/v, 10$ mM Tris-Puffer, $pH = 7.2, \lambda_{exc} = 415$ nm) bei 515 nm in Gegenwart von kombinierten K^+/Na^+ -Konzentrationen ($[K^+] + [Na^+] = 160$ mM).



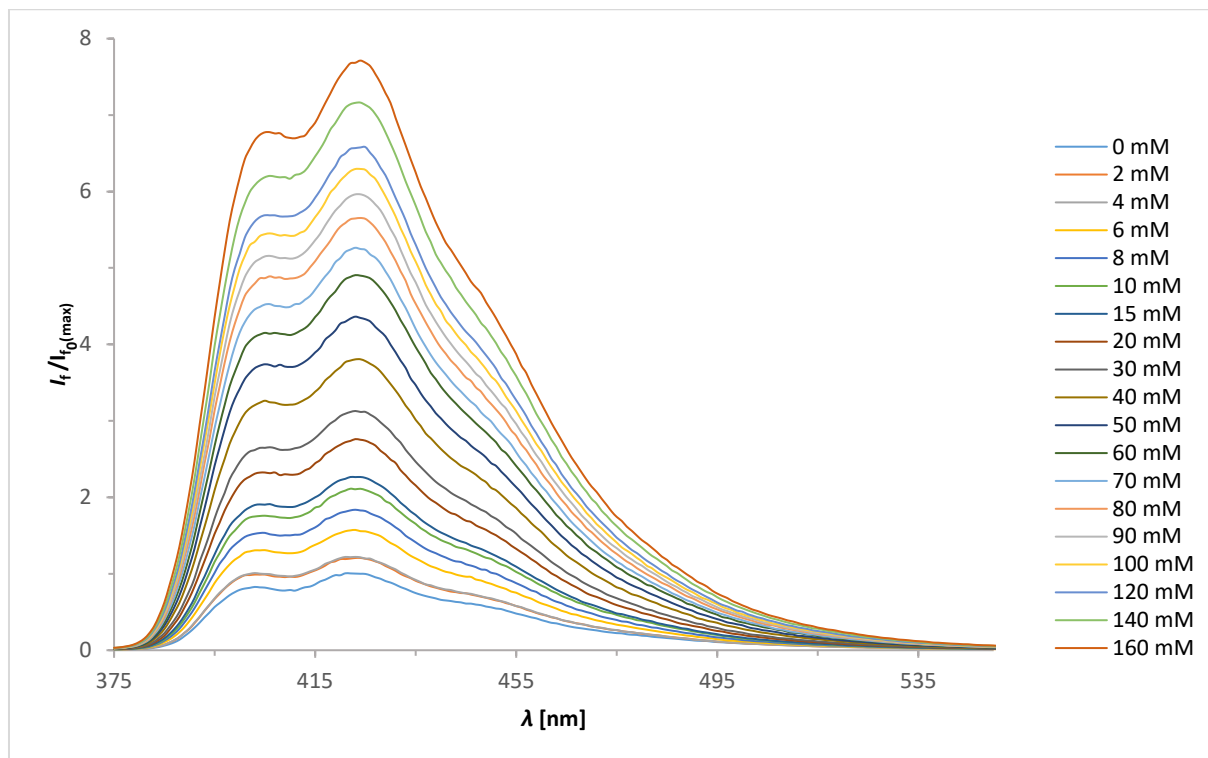
S67: a) Plot von $\log[(I_t - I_{\min})/(I_{\max} - I_t)]$ **W1** + K^+/Na^+ gegen $\log[K^+]$ zur Bestimmung von K_d und b) Plot von $\log[(I_t - I_{\min})/(I_{\max} - I_t)]$ **W2** + K^+/Na^+ gegen $\log[K^+]$ zur Bestimmung von K_d .



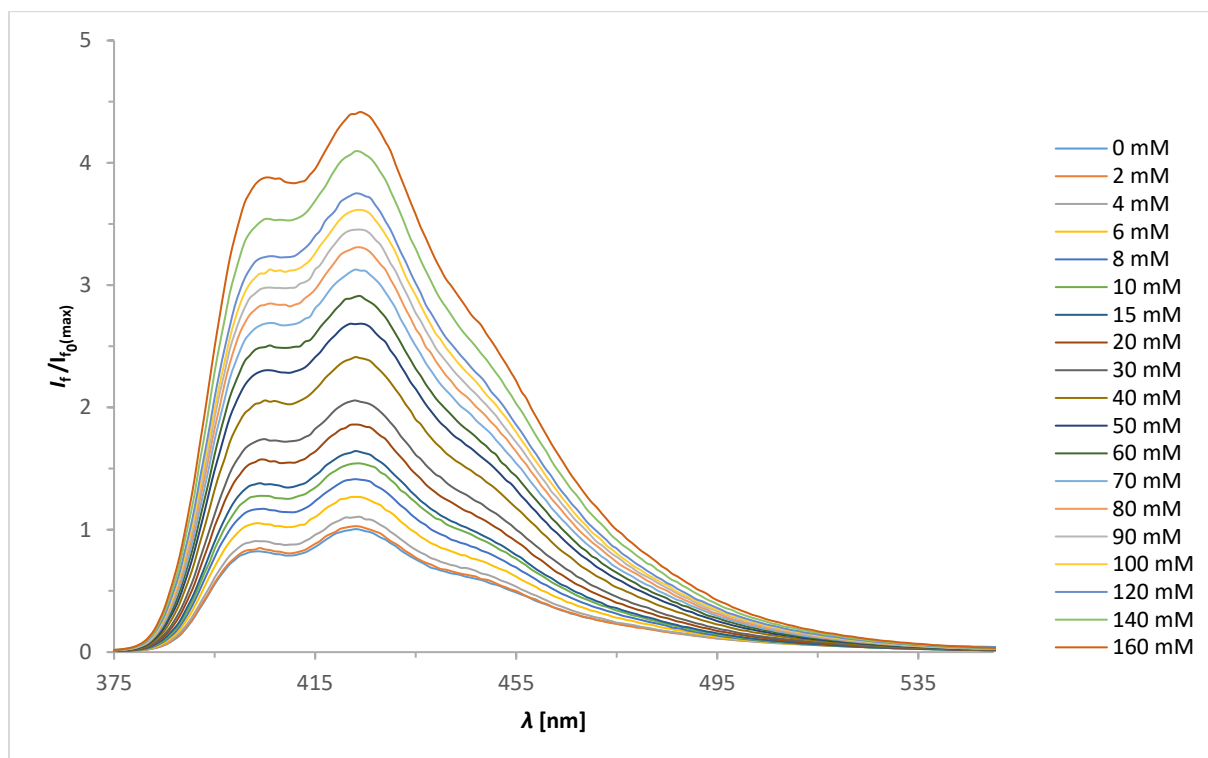
S68: W1 ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{ex} = 447$ nm) a) Änderungen der gemittelten Fluoreszenzabklingzeit in Anwesenheit von Kalium-Ionen und b) Änderungen der einzelnen Fluoreszenzabklingzeiten (22.8 ns und 3.8 ns) in Gegenwart von Kalium-Ionen. c) Änderungen der gemittelten Fluoreszenzabklingzeit in Gegenwart von kombinierten Kalium-/Natrium-Ionen Lösungen ($[K^+] + [Na^+] = 2000$ mM) und d) Änderungen der einzelnen Fluoreszenzabklingzeiten (22.8 ns und 3.8 ns) in Gegenwart von Kalium-/Natrium-Ionen Lösungen ($[K^+] + [Na^+] = 2000$ mM).



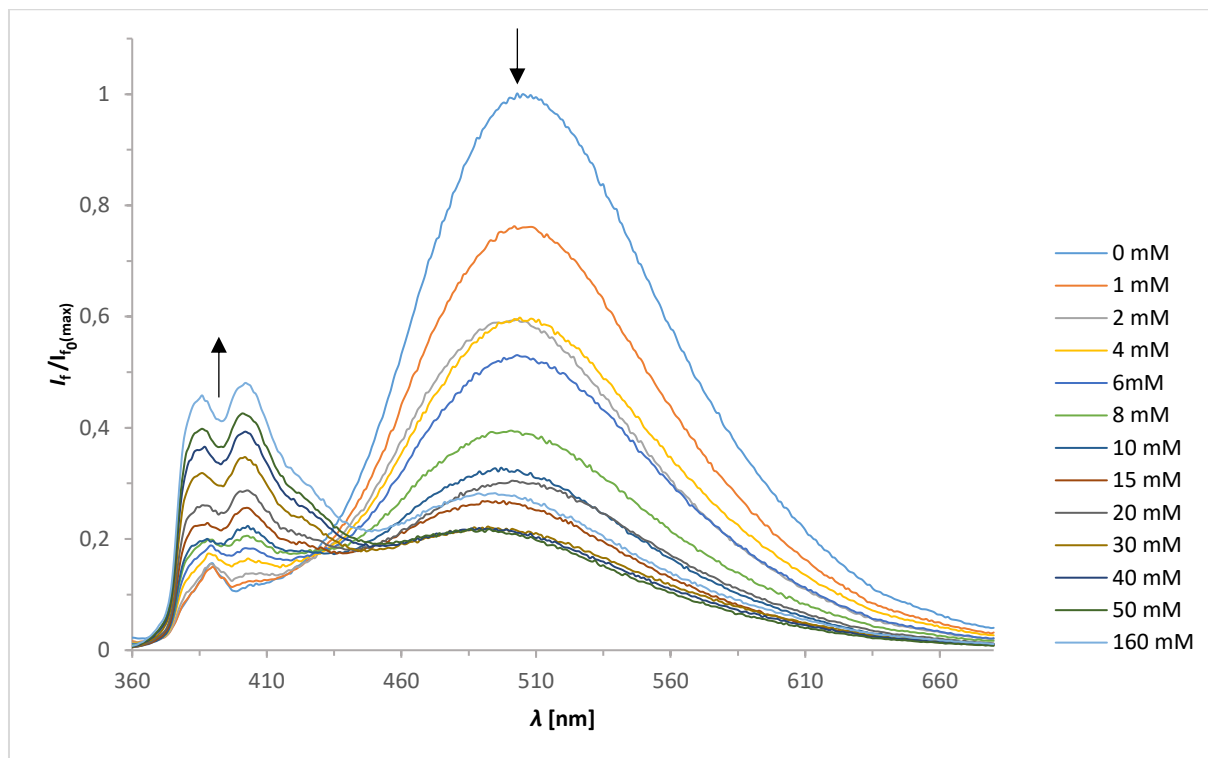
S69: W2 ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{ex} = 447$ nm) a) Änderungen der gemittelten Fluoreszenzabklingzeit in Anwesenheit von Kalium-Ionen und b) Änderungen der einzelnen Fluoreszenzabklingzeiten (23.5 ns und 2.8 ns) in Gegenwart von Kalium-Ionen. c) Änderungen der gemittelten Fluoreszenzabklingzeit in Gegenwart von kombinierten Kalium-/Natrium-Ionen Lösungen ($[K^+] + [Na^+] = 160$ mM) und d) Änderungen der einzelnen Fluoreszenzabklingzeiten (23.5 ns und 2.8 ns) in Gegenwart von Kalium-/Natrium-Ionen Lösungen ($[K^+] + [Na^+] = 160$ mM). Plot von $\log[(\tau_i - \tau_{min}) / (\tau_{max} - \tau_i)]$ gegen $\log[K^+]$ zur Bestimmung von K_d für e) für **W2** + K⁺ und f) **W2** + K⁺ in kombinierten Kalium-/Natrium-Ionen Lösungen.



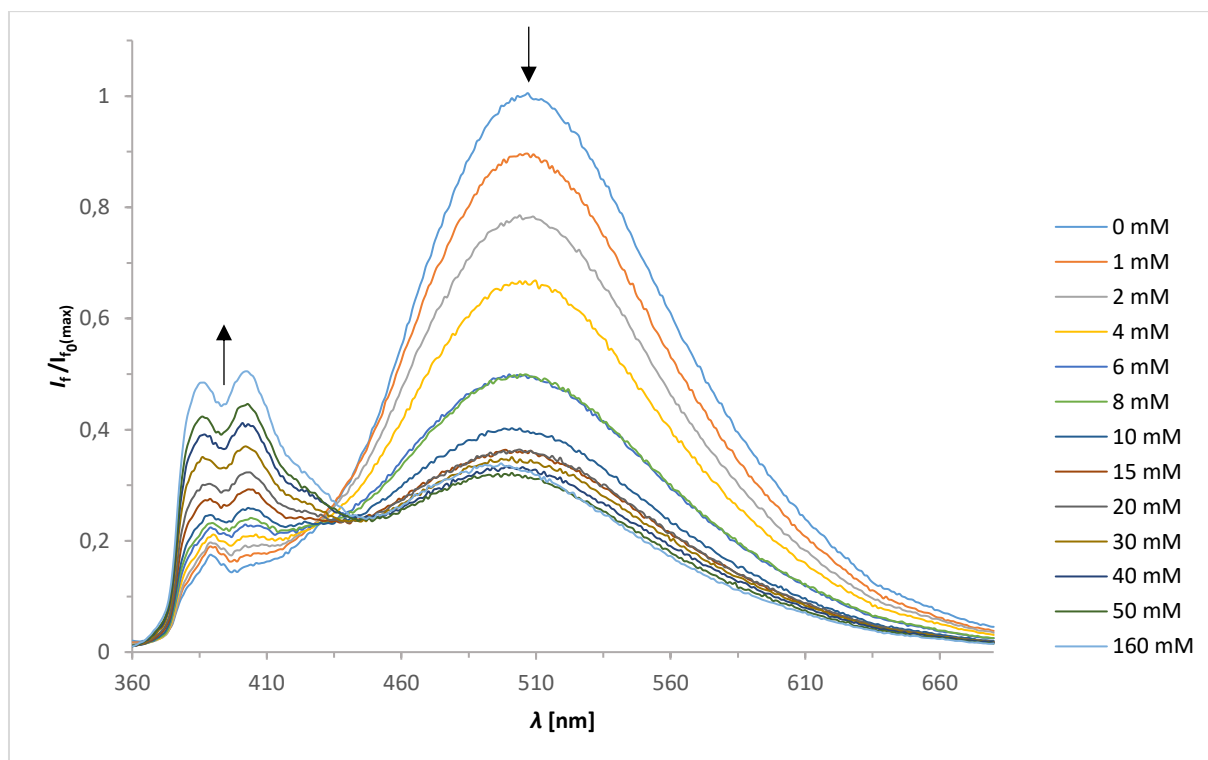
S70: Fluoreszenzemissionsspektren von **R1** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 365$ nm) für K^+ 160 mM.



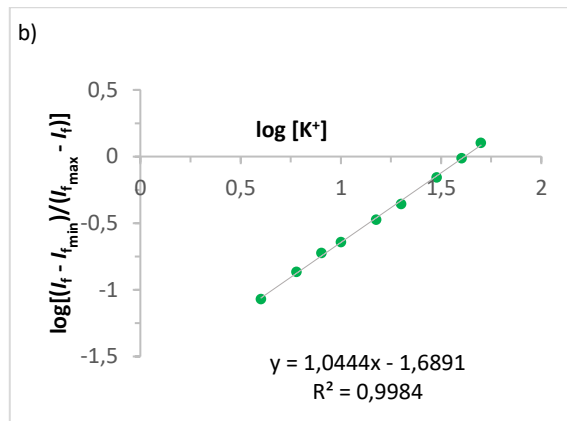
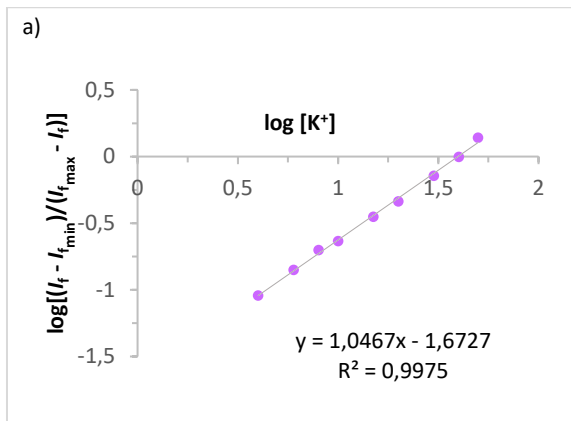
S71: Fluoreszenzemissionsspektren von **R1** ($c = 10^{-5}$ mol/l, $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 365$ nm) für K^+ 160 mM in Gegenwart von Na^+ -Ionen. Die Ionenstärke wurde konstant gehalten ($[\text{K}^+] + [\text{Na}^+] = 160$ mM).



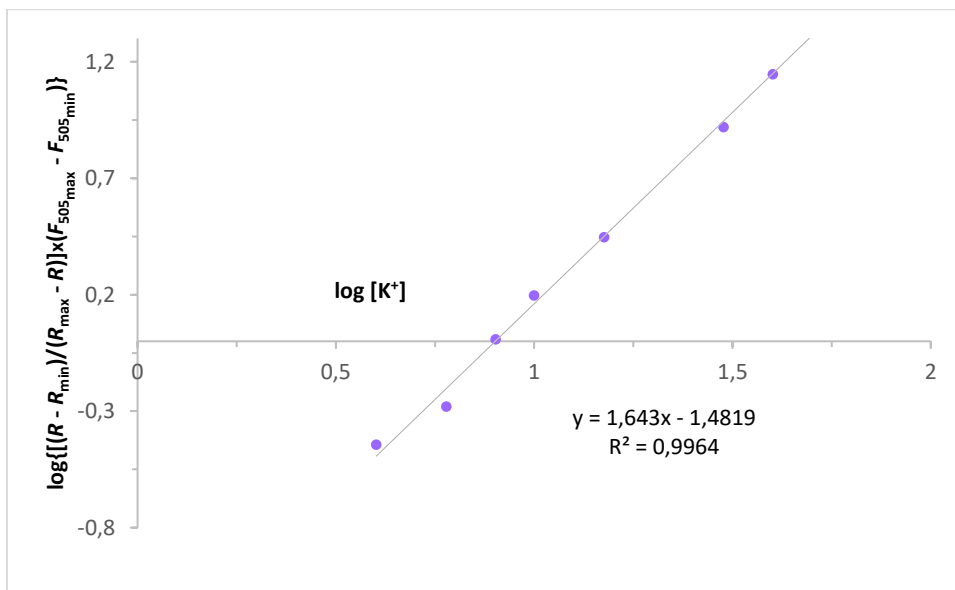
S72: Fluoreszenzemissionsspektren von **R2** ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 345$ nm) für K⁺ 160 mM.



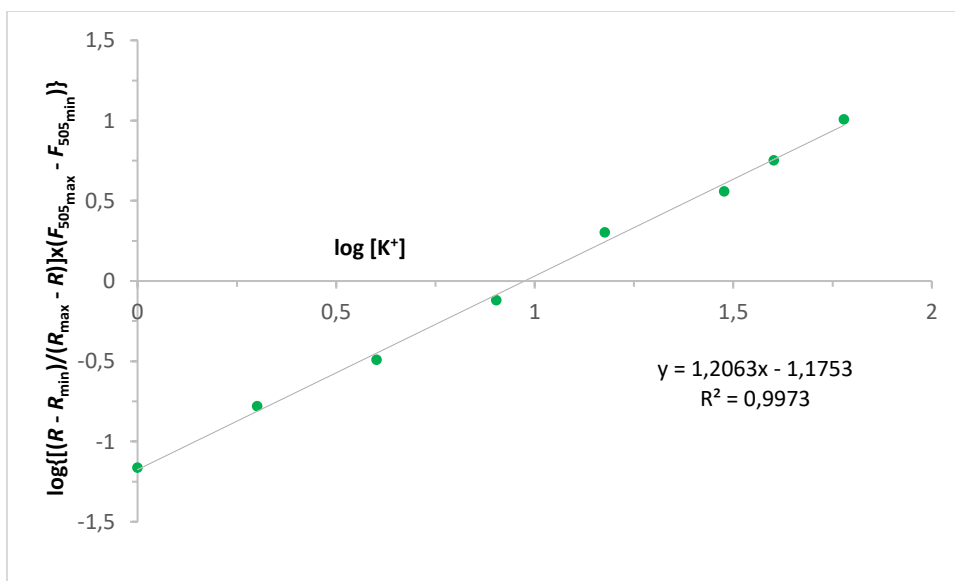
S73: Fluoreszenzemissionsspektren von **R2** ($c = 10^{-5}$ mol/l, H₂O/DMSO, 99:1, v/v, 10 mM Tris-Puffer, pH = 7.2, $\lambda_{\text{exc}} = 345$ nm) für K⁺ 160 mM in Gegenwart von Na⁺-Ionen. Die Ionenstärke wurde konstant gehalten ($[K^+] + [Na^+] = 160$ mM).



S 74: a) Plot von $\log\left[\frac{I_t - I_{tmin}}{I_{tmax} - I_t}\right] R1 + K^+$ gegen $\log[K^+]$ zur Bestimmung von K_d und b) Plot von $\log\left[\frac{I_t - I_{tmin}}{I_{tmax} - I_t}\right] R1 + K^+/Na^+$ gegen $\log[K^+]$ zur Bestimmung von K_d .



S 75: Plot von $\log\left\{\left[\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R}\right] \times (F_{505max} - F_{505min})\right\} R2 + K^+$ gegen $\log[K^+]$ zur Bestimmung von K_d .



S 76: Plot von $\log\left\{\left[\frac{R - R_{min}}{R_{max} - R}\right] \times (F_{505max} - F_{505min})\right\} R2 + K^+/Na^+$ gegen $\log[K^+]$ zur Bestimmung von K_d .

8. Verzeichnisse

8.1 Literaturverzeichnis

- [1] X. Zhou, F. Su, Y. Tian, C. Youngbull, R. H. Johnson, D. R. Meldrum, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 18530 – 18533
- [2] E. Murphy, D. A. Eisner, *Circ. Res.*, **2009**, *104*, 292 – 303
- [3] D. M. Bers, W.-H. Barry, S. Despa, *Cardiovasc. Res.*, **2003**, *57*, 897 – 912
- [4] J. Yin, Y. Hu, J. Yoon, *Chem Soc. Rev.*, **2015**, *44*, 4619 – 4644
- [5] A. Minta, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 19449 – 19457
- [6] G. Gao, Y. Cao, W. Liu, D. Li, W. Zhou, J. Liu, *Anal. Methods*, **2017**, *9*, 5570 – 5579
- [7] N. A. Campbell, J. B. Reece, *Biologie*, 8. Auflage, Pearson Verlag, **2009**
- [8] C. Hick, A. Hick, *Physiologie*, 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag Stuttgart, **1997**
- [9] T. Clausen, *Physiol. Rev.*, **2003**, *83*, 1269 – 1324
- [10] H.-R. Yu, X.-J. Ju, R. Xie, W. Wang, B. Zhang, L.-Y. Chu, *Anal. Chem.*, **2013**, *85*, 6477 – 6484
- [11] K. C. Chen, C. Nicholson, *Biophys. J.*, **2000**, *78*, 2776 – 2797
- [12] P. Padmawar, X. Yao, O. Bloch, G. T. Manley, A. S. Verkman, *Nature Methods*, **2005**, *2*, 825 – 827
- [13] B. R. Masters, *The Development of Fluorescence Microscopy*, John Wiley & Sons, Ltd., eLS, **2010**
- [14] T. Hirschfeld, *Appl. Optics*, **1976**, *15*, 2965 – 2966
- [15] *The Molecular Probes Handbook—A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 11th edn., Thermo Fischer Scientific, **2010**
- [16] B. C. Pressman, H. J. Harris, W.S. Jagger, J. H. Johnson, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **1967**, *58*, 1949 – 1956
- [17] C. J. Pederson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, *89*, 7017 – 7036
- [18] F. Vögtle, *Supramolekulare Chemie*, 2. Auflage, B. G. Teubner Stuttgart, **1992**
- [19] J. S. Bradshaw, J. Y. Hui, Y. Chan, B. L. Haymore, R. M. Izatt, J. J. Christen, *J. Heterocyclic Chem.*, **1974**, *11*, 45 – 49
- [20] R. A. Schultz, B. D. White, D. M. Dishong, K. A. Arnold, G. W. Gokel, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 6659 – 6668
- [21] R. M. Izatt, K. Pawlak, J. S. Bradshaw, R. L. Bruening, *Chem. Rev.*, **1991**, *91*, 1721 – 2085
- [22] B. Dietrich, J. M. Lehn, J. P. Sauvage, J. Blanzat, *Tetrahedron*, **1973**, *29*, 1629 – 1645
- [23] F. Vögtle, *Pure and Appl. Chem.*, **1980**, *52*, 2405 - 2416
- [24] H. G. Löhr, F. Vögtle, *Acc. Chem. Res.*, **1985**, *18*, 65 – 72

- [25] J. P. Dix, F. Vögtle, *Chem. Ber.*, **1981**, *114*, 638 – 651
- [26] H. Nishida, Y. Katayama, H. Katsuki, H. Nakamura, M. Takagi, K. Ueno, *Chem. Lett.*, **1982**, *11*, 1853 – 1854
- [27] A. Minta, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 19449 – 19457
- [28] N. Ramanujam, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R. A. Meyers ed. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, **2000**
- [29] M. A. Kuhn, R. P. Haugland, **1995**, US005405975A
- [30] V. V. Martin, A. Rothe, Z. Diwu, K. R. Gee, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2004**, *14*, 5313 – 5316
- [31] V. V. Martin, A. Rothe, K. R. Gee, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 1851 – 1855
- [32] A. Minta, P. R. Escamilla, **2012**, PCT/US2011/052353
- [33] R. Crossley, Z. Goolamali, J. J. Gosper, P. G. Sammes, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1994**, 513 – 520
- [34] R. Crossley, Z. Goolamali, P.G. Sammes, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1994**, 1615 – 1623
- [35] K. Golchini, M. Mackovi-Basic, S. A. Gharib, D. Masilamani, M. E. Lucas, I. Kurtz, *Am. J. Physiol.*, **1990**, *258*, F438 – F443
- [36] H. He, M. A. Mortellaro, M. J. P. Leiner, R. J. Fraatz, J. K. Tusa, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 1468 – 1469
- [37] P. Padmawar, X. Yao, O. Bloch, G. T. Manley, A. S. Verkman, *Nat. Methods*, **2005**, *2*, 825 – 827
- [38] M. Magzoub, P. Padmawar, J. A. Dix, A. S. Verkman, *J. Phys. Chem. B*, **2006**, *110*, 21216 – 21221
- [39] W. Namkung, P. Padmawar, A. D. Mills, A. S. Verkman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 7794 – 7795
- [40] H. M. D. Bandara, Z. Hua, M. Zhang, S. M. Pauff, S. C. Miller, E. A. C. Davie, W. R. Kobertz, *J. Org. Chem.*, **2017**, *82*, 8199 – 8205
- [41] R. D. Carpenter, A. S. Verkman, *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, 1242 – 1248
- [42] R. Husigen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1963**, *2*, 565 – 598
- [43] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 2596 – 2599
- [44] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 3057 – 3064
- [45] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.*, **2001**, *113*, 2056 – 2075
- [46] P. D. Jarowski, Y.-L. Wu, B. Schweizer, F. Diederich, *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 3347 – 3350
- [47] D. Schweinfurth, K. I. Hardcastle, U. H. F. Bunz, *Chem. Commun.*, **2008**, 2203 – 2205
- [48] B. D. Wagner, *Molecules*, **2009**, *14*, 210 – 237
- [49] X. Liu, Z. Xu, J. M. Cole, *J. Phys. Chem. C*, **2013**, *117*, 16584 – 16595
- [50] S. B. Chemate, N. Sekar, *J. Fluoresc.*, **2015**, *25*, 1615 – 1628

- [51] S. Ast, H.-J. Holdt, **2012**, PCT/EP2012/054181
- [52] S. Ast, H. Müller, R. Flehr, T. Klamroth, B. Walz, H.-J. Holdt, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 4685 – 4687
- [53] S. Ast, T. Fischer, H. Müller, W. Mickler, M. Schwichtenberg, K. Rurack, H.-J. Holdt, *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 2990 – 3005
- [54] S. Senthilkumar, S. Nath, H. Pal, *Photochemistry and Photobiology*, **2004**, *80*, 104 – 111
- [55] A. P. de Silva, H. Q. Gunaratne, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1990**, 186 – 188
- [56] A. P. de Silva, H. Q. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, M. Nieuwenhuizen, *Chem. Commun.*, **1996**, 1967 – 1968
- [57] S. Ast, T. Schwarze, H. Müller, A. Sukhanov, S. Michaelis, J. Wegener, O. S. Wolfbeis, T. Körzdörfer, A. Dürkop, H.-J. Holdt, *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 14911 – 14917
- [58] R. A. Schultz, B. D. White, D. M. Dishong, K. A. Arnold, G. W. Gokel, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 6659 – 6668
- [59] K. A. Arnold, J. C. Hernandez, C. Li, J. V. Mallen, A. Nakano, O. F. Schall, J. E. Trafton, M. Tsesarskaja, B. D. White, G. W. Gokel, *Supramolecular Chemistry*, **1995**, *5*, 45 – 60
- [60] H. He, M. A. Mortellaro, M. J. P. Leiner, S. T. Young, R. J. Fraatz, J. K. Tusa, *Anal. Chem.*, **2003**, *75*, 549 – 555
- [61] M. K. Kim, C. S. Lim, J. T. Hong, J. H. Han, H.-Y. Jang, H. M. Kim, B. R. Cho, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 364 – 367
- [62] A. R. Sarkar, C. H. Heo, M. Y. Park, H. W. Lee, H. M. Kim, *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 1309 – 1312
- [63] T. Gunnlaugsson, M. Nieuwenhuizen, L. Richard, V. Thoss, *Tetrahedron Letters*, **2001**, *42*, 4725 – 4728
- [64] T. Schwarze, H. Müller, S. Ast, D. Steinbrück, S. Eidner, F. Geißler, M. U. Kumke, H.-J. Holdt, *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 14167 – 14170
- [65] P. Roder, C. Hille, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2014**, *13*, 1699 – 1710
- [66] H. Szmecinski, J. R. Lakowicz, *J. Fluoresc.*, **1996**, *6*, 83 – 95
- [67] M. Colot, C. Loukou, A. V. Yakovlev, C. D. Wilms, D. Li, A. Evrard, A. Zamaleeva, L. Bourdieu, J.-F. Léger, N. Ropert, J. Eilers, M. Oheim, A. Feltz, J.-M. Mallet, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 14923 – 14931
- [68] K. Jahn, C. Hille, *PLOS ONE*, **2014**, *9*, e105334
- [69] J. R. Lakowicz, H. Szmecinski, *Sens. Actuators B*, **1993**, *11*, 133 – 143
- [70] J. R. Lakowicz, H. Szmecinski, **2002**, US6472221 B1
- [71] M. Baruah, W. Qin, R. A. L. Vallée, D. Beljonne, T. Rohand, W. Dehaen, N. Boens, *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 4377 – 4380

- [72] S. Nishizawa, M. Watanabe, T. Uchida, N. Teramae, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1999**, 141 – 143
- [73] T. T. Ruckh, C. G. Skipwith, W. Chang, A. W. Senko, V. Bulovic, P. O. Anikeeva, H. A. Clark, *ACS Nano*, **2016**, *10*, 4020 – 4030
- [74] G. G. Stokes, *Phil. Trans. Roy. Soc. London B*, **1852**, *142*, 463 – 562
- [75] G. G. Stokes, *Phil. Trans. Roy. Soc. London*, **1853**, *143*, 385 – 396
- [76] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd Ed., Springer New York, **2006**
- [77] B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 2nd Ed., Wiley-VCH Weinheim, **2012**
- [78] M. Kasha, *Discussion of the Faraday Society*, **1950**, *9*, 14 – 19
- [79] K. P. Vollhardt, *Organische Chemie*, 5. Aufl., Wiley-VCH Weinheim, **2011**
- [80] C. A. Parker, W. T. Rees, *Analyst*, **1960**, *85*, 587 – 600
- [81] J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.*, **1971**, *75*, 991 – 1024
- [82] M. Franco, C. D. Tran, *Rev. Sci. Instrum.*, **1996**, *67*, 1 – 18
- [83] G. Grynkiewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.*, **1985**, *260*, 3440 – 3450
- [84] B. Valeur, I. Leray, *Coord. Chem. Rev.*, **2000**, *205*, 3 – 40
- [85] A. P. de Silva, T. S. Moody, G. D. Wright, *Analyst*, **2009**, *134*, 2385 – 2393
- [86] S. Müller, B. Liepold, G. J. Roth, H. J. Bestmann, *Synlett*, **1996**, 521 – 522
- [87] H. He, M. A. Mortellaro, M. J. P. Leiner, R. J. Fraatz, J. K. Tusa, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 1468 – 1469
- [88] W. V. Ruyle, L. H. Sarett, A. R. Matzuk, **1977**, US4,044,049
- [89] J. W. Silbert, P. B. Forshee, *Inorg. Chem.*, **2002**, *41*, 5928 – 5930
- [90] T. Glinka, O. Rodny, K. A. Bostian, D. M. Wallace, R. I. Higuchi, C. Chow, C. C. Mak, G. Hirst, B. Eastman, **2010**, US2010/0152098A1
- [91] F. Lori, G. Kéri, **2014**, PCT/WO2014/031937
- [92] J. W. Silbert, P. B. Forshee, G. R. Hundt, A. L. Sargent, S. G. Bott, V. Lynch, *Inorg. Chem.*, **2007**, *46*, 10913 – 10925
- [93] W. Zeng, Y. Du, H. Li, X. Lu, S. Qin, *OPPI BRIEFS*, **2003**, *35*, 228 – 231
- [94] D. R. Anderson, M. W. Mahoney, D. P. Phillion, T. E. Rogers, M. J. Meyers, G. Poda, S. G. Hegde, M. Singh, D. B. Reitz, K. K. Wu, I. P. Buchler, J. Xie, W. F. Vernier, **2004**, PCT/WO2004/058762
- [95] G. Jones, W. R. Jackson, *Chem. Phys. Letters*, **1980**, *72*, 391 – 395
- [96] G. Jones, W. R. Jackson, S. Kanoktanaporn, *Optics Commun.*, **1980**, *33*, 315 – 320
- [97] G. Jones, W. R. Jackson, C. Choi, W. R. Bergmark, *J. Phys. Chem.*, **1985**, *89*, 294 – 300
- [98] C.-S. Tsai, P.-Y. Liu, H.-Y. Yen, T.-L. Hsu, C.-H. Wong, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 5575 – 5577

- [99] L. Yuan, W. Lin, J. Song, Y. Yang, *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 12691 – 12693
- [100] H. Sun, H. Guo, W. Wu, X. Liu, J. Zhao, *Dalton Trans.*, **2011**, 40, 7834 – 7841
- [101] T. Schwarze, J. Riemer, S. Eidner, H.-J. Holdt, *Chem. Eur. J.*, **2015**, 21, 11306 – 11310
- [102] J. Han, J. Jose, E. Mei, K. Burgess, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46, 1684 – 1687
- [103] K. Sivakumar, F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, Q. Wang, *Org. Lett.*, **2004**, 6, 4603 – 4606
- [104] X. Liu, Z. Xu, J. M. Cole, *J. Phys. Chem. C*, **2013**, 117, 16584 – 16595
- [105] S. B. Chemate, N. Sekar, *J. Fluoresc.*, **2015**, 25, 1615 – 1628
- [106] Q. Sun, S.-H. Yang, L. Wu, W.-C. Yang, G.-F. Yang, *Anal. Chem.*, **2016**, 88, 2266 – 2272
- [107] V. O. Rodionov, V. V. Fokin, M. G. Finn, *Angew. Chem.*, **2005**, 117, 2250 – 2255
- [108] R. Berg, B. F. Straub, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2013**, 9, 2715 – 2750
- [109] T. Schwarze, R. Schneider, J. Riemer, H.-J. Holdt, *Chem. Asian J.*, **2016**, 11, 241 – 247
- [110] T. L. Arbeloa, F. L. Arbeloa, M. J. Tapia, I. L. Arbeloa, *J. Phys. Chem.*, **1993**, 97, 4704 – 4707
- [111] P. Wessig, R. Wawrzinek, K. Möllnitz, E. Feldbusch, U. Schilde, *Tetrahedron Lett.*, **2011**, 52, 6192 – 6195
- [112] R. Wawrzinek, J. Ziolkowska, J. Heuveling, M. Mertens, A. Herrmann, E. Schneider, P. Wessig, *Chem. Eur. J.*, **2013**, 19, 17349 – 17357
- [113] D. Bader, D. T. Klier, C. Hettrich, F. F. Bier, P. Wessig, *Anal. Methods*, **2016**, 8, 1235 – 1238
- [114] R. Wawrzinek, P. Wessig, K. Möllnitz, J. Nikolaus, R. Schwarzer, P. Müller, A. Herrmann, *Bioorg. & Medic. Chem. Lett.*, **2012**, 22, 5367 – 5371
- [115] C. Meyners, M. Mertens, P. Wessig, F.-J. Meyer-Almes, *Chem. Eur. J.*, **2017**, 23, 3107 – 3116
- [116] J. Heuveling, V. Frochoux, J. Zimkowska, R. Wawrzinek, P. Wessig, A. Herrmann, E. Schneider, *Biochem. Biophys. Acta (BBA) Biomembranes*, **2014**, 1838, 106 – 116
- [117] T. Halgren, *J. Comp. Chem.*, **1996**, 17, 490 – 519
- [118] T. Schwarze, M. Mertens, P. Müller, J. Riemer, P. Wessig, H.-J. Holdt, *Chem. Eur. J.*, **2017**, 23, 17186 – 17190
- [119] J. F. Callan, A. P. de Silva, D. C. Magri, *Tetrahedron*, **2005**, 61, 8551 – 8588
- [120] B. Daly, J. Ling, A. P. de Silva, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, 44, 4203 – 4211
- [121] A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem. Soc. Rev.*, **1997**, 97, 1515 – 1566
- [122] J. Li, D. Yim, W.-D. Jang, J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.*, **2017**, 46, 2437 – 2458
- [123] B. J. Müller, S. M. Borisov, I. Klimant, *Adv. Funct. Mater.*, **2016**, 26, 7697 – 7707
- [124] G. Song, R. Sun, J. Du, M. Chen, Y. Tian, *Chem. Commun.*, **2017**, 53, 5602 – 5605
- [125] J. García-Calvo, S. Ibeas, E.-C. Antón-García, T. Torroba, G. González-Aguilar, W. Antunes, E. González-Lavado, M. L. Fanarraga, *ChemistryOpen*, **2017**, 6, 562 – 570

- [126] A. Wiessner, G. Hüttmann, W. Kühnle, H. Staerk, *J. Phys. Chem.*, **1995**, *99*, 14923 – 14930
- [127] S. S. Bag, R. Kundu, *J. Org. Chem.*, **2011**, *76*, 3348 – 3356
- [128] S. S. Bag, R. Kundu, S. Talukdar, *Tetrahedron Lett.*, **2012**, *53*, 5875 – 5879
- [129] S. S. Bag, R. Kundu, *J. Fluoresc.*, **2013**, *23*, 929 – 938
- [130] T. K. Claus, S. Telitel, A. Welle, M. Bastmeyer, A. P. Vogt, G. Delaittre, C. Barner-Kowollik, *Chem. Commun.*, **2017**, *53*, 1599 – 1602
- [131] T. Zdobinsky, P. S. Maiti, R. Klajn, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*, 2711 – 2714
- [132] T. Schwarze, J. Riemer, H.-J. Holdt, *Chem. Eur. J.*, **2018**, *24*, 10116 – 10121
- [133] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics*, **2010**, *29*, 2176 – 2179

8.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	grad Celsius
ACN	Acetonitril
BOR	Bestmann Ohira Reagenz
Br ₂	Brom
ChCl	Cholinchlorid
CHCl ₃	Chloroform
CuAAC	Cu(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
CuI	Kupferiodid
CuSO ₄ · 5H ₂ O	Kupfersulfat Pentahydrat
DCM	Dichlormethan
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EE	Essigsäureethylester
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Elektronenspray-Ionisation
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
FLIM	Fluoreszenzlebenszeitmikroskopie, <i>fluorescence lifetime imaging microscopy</i>
FSF/ FEF	Fluoreszenzsteigerungsfaktor
HAc	Essigsäure
HCl	Salzsäure
HEX	Hexan
HOMO	höchste besetzte Molekülorbital, <i>highest occupied molecular orbital</i>
IC	innere Konversion, <i>internal conversion</i>
IR	Innere Relaxation, <i>internal relaxation</i>
IR	Infrarot
ISC	Interkombination, <i>inter system crossing</i>
KOAc	Kaliumacetat
LiCO ₃	Lithiumcarbonat
LUMO	niedrigste unbesetzte Molekülorbital, <i>lowest unoccupied molecular orbital</i>
MeOH	Methanol
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minuten

MS	Massenspektrometrie
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	Natriumthiosulfat
Na_2SO_4	Natriumsulfat
Na-asc.	Natriumascorbat
NaCl	Natriumchlorid
NaI	Natriumiodid
NaN_3	Natriumazid
NaNO_2	Natriumnitrit
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
NH_4Cl	Ammoniumchlorid
nm	Nanometer
NMR	magnetische Kernresonanz, <i>nuclear magnetic resonance</i>
PBFI	<i>Potassium binding benzofuran isophthalate</i>
$\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$	Bis(triphenylphosphine)palladium(II)dichlorid
PET	Photoinduzierter Elektronentransfer
POCl_3	Phosphorylchlorid
ppm	<i>parts per million</i> (chemische Verschiebung)
RBC	rote Blutkörperchen, <i>Red Blood Cells</i>
RT	Raumtemperatur
SBFI	<i>Sodium binding benzofuran isophthalate</i>
$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Zinnchlorid Dihydrat
TAC	Triazacryptand
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TCSPC	zeitaufgelöste Einzelphotonenzählung, <i>time-correlated single photon counting</i>
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
TMSA	Trimethylsilylacetylen
UV	Ultraviolett
VIS	sichtbar, <i>visible</i>
ϵ	Extinktionskoeffizient
$\epsilon \cdot \varphi_{\text{fl}}$	Helligkeit, <i>brightness</i>
λ_{abs}	Absorptionswellenlänge
λ_{em}	Emissionswellenlänge

λ_{exc}	Anregungswellenlänge
φ_{fl}	Fluoreszenzquantenausbeute
τ_{fl}	Fluoreszenzlebensdauer

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Strukturen natürlicher Ionophore I) Nonactin und II) Valinomycin	2
Abb. 1.2: Entdeckung der Kronenether	3
Abb. 1.3: Klassifizierung der Neutralliganden	4
Abb. 1.4: Beispiele für Chromoionophore und Fluoroionophore	5
Abb. 1.5: Strukturformeln von PBFI und SBFI	5
Abb. 1.6: Strukturformeln der Natrium-Fluoroionophore Sodium Green , CoroNa Red , CoraNa Green , Asante NaTRIUM 1 und 2	8
Abb. 1.7: Strukturformel von CD18	9
Abb. 1.8: Strukturformeln von MCC und CD222	9
Abb. 1.9: Strukturformel des Kalium-Ionen Fluoroionophors nach HE	10
Abb. 1.10: Darstellung der Fluoroionophore TAC-Red , TAC-Crimson , TAC-Lime und K_{NIR-1}	11
Abb. 1.11: 1,4-Regioisomere Strukturen des Donor-Akzeptors (D-A) substituierten 1,2,3-Triazol....	12
Abb. 1.12: Strukturformel und Atomnummerierung von Coumarin	13
Abb. 1.13: Strukturformeln der Fluoroionophore K1 und K2	13
Abb. 1.14: Strukturformeln der Fluoroionophore K3 und K4	15
Abb. 1.15: Strukturformeln der Fluoroionophore Na1 und Na2	16
Abb. 3.1: Vereinfachtes Schema eines JABLONSKI-Diagrammes.....	21
Abb. 3.2: Darstellung des STOKES-Shift.....	21
Abb. 3.3: Prinzip der TCSPC-Methode mit Anregungspuls (grün) und Counts (rot)	24
Abb. 3.4: Darstellung einen Ionenindikators bzw. Fluoroionophors.....	25
Abb. 3.5: Schematische Darstellung des Photoinduzierten Elektronentransfer (PET).....	26
Abb. 4.1: Bisheriges Syntheschema zur Darstellung der alkin- bzw. azidfunktionalisierten Ionophore	27
Abb. 4.2: Optimiertes Syntheschema zur Darstellung azidfunktionalisierter Ionophore 1d – 4d	28
Abb. 4.3: Optimiertes Syntheschema zur Darstellung alkinfunktionalisierter Ionophore 5c – 7c ...	29
Abb. 4.4: Darstellung der 7-Aminocoumarine C1F (Coumarin 35), C6F (Coumarin 153) und C8F (Coumarin 522) nach JONES.....	30
Abb. 4.5: Syntheschema zur Darstellung der alkinfunktionalisierten Fluorophore 12 , 17 und 22 ...	31

Abb. 4.6: Syntheschema zur Darstellung der azidfunktionalisierten Fluorophore 25 , 28 und 31	32
Abb. 4.7: Darstellung der Coumarine 19 und 22	33
Abb. 4.8: Absorptions- und Fluoreszenzspektren von 22	33
Abb. 4.9: Darstellung der Fluoroionophore K5 und K6 mittels CuAAC.....	34
Abb. 4.10: Absorptionsspektren der Fluoroionophore K5 und K6	35
Abb. 4.11: Änderung der Fluoreszenzintensitäten von K6 und Bestimmung der Dissoziationskonstante.	36
Abb. 4.12: Änderung der Fluoreszenzintensitäten von K6 in kombinierten Lösungen und Bestimmung der Dissoziationskonstante.	37
Abb. 4.13: Darstellung der Fluoroionophore K7 , K8 und K9 mittels CuAAC.....	38
Abb. 4.14: Darstellung der Coumarine 14 und 17	39
Abb. 4.15: Änderung der Fluoreszenzintensitäten von K7 und Bestimmung der Dissoziationskonstante.	40
Abb. 4.16: Änderung der Fluoreszenzintensitäten von K8 und Bestimmung der Dissoziationskonstante.	42
Abb. 4.17: Absorptionsspektren von K9 und Bestimmung der Dissoziationskonstante.	43
Abb. 4.18: Darstellung der Fluoroionophore Na3 und Na4 mittels CuAAC.	47
Abb. 4.19: Absorptionsspektren und Änderung der Fluoreszenzintensitäten von Na3	48
Abb. 4.20: Darstellung der Fluoroionophore Na5 und Na6 mittels CuAAC.	49
Abb. 4.21: Änderung der Fluoreszenzintensitäten für Na5 und Na6	51
Abb. 4.22: Darstellung der Fluoroionophore Na7 und Na8 mittels CuAAC.	53
Abb. 4.23: Darstellung der Fluoroionophore Na9 und Na10 mittels CuAAC.	54
Abb. 4.24: Änderung der Fluoreszenzintensitäten und Bestimmung der Dissoziationskonstante für Na7	55
Abb. 4.25: Änderungen der Fluoreszenzintensitäten für Na9 und Na10	57
Abb. 4.26: Struktur des DBD -Grundgerüsts und der DBD -Bausteine.	59
Abb. 4.27: Darstellung der DBD -Ester Fluorophore.....	60
Abb. 4.28: Darstellung der Fluoroionophore W1 und W2 mittels CuAAC.....	60
Abb. 4.29: Absorptionsspektren der Fluoroionophore W1 und W2	62
Abb. 4.30: Modellmolekül zur Veranschaulichung der Konformationsanalyse.....	62

Abb. 4.31: Änderungen Der Fluoreszenzintensitäten von W1 und W2	63
Abb. 4.32: Fluoreszenzsteigerungen (schwarz) und Änderungen der Fluoreszenzabklingzeiten (blau) von W1 und W2	64
Abb. 4.33: Strukturen der Referenzverbindungen D und F	67
Abb. 4.34: Darstellung der Fluoroionophore R1 und R2 mittels CuAAC.	68
Abb. 4.35: Absorptionsspektren der Fluoroionophore R1 und R2	68
Abb. 4.36: Änderungen der Fluoreszenzintensitäten für R1 und R2 in Gegenwart von 160 mM KCl.70	
Abb. 4.37: Änderungen der Fluoreszenzintensitäten für R1 und R2 in kombinierten Lösungen	70
Abb. 5.1: Darstellung der Fluoroionophore K6 , K7 und K8	73
Abb. 5.2: Darstellung der Fluoroionophore Na3 , Na4 , Na5 und Na6	74
Abb. 5.3: Darstellung der Fluoroionophore W1 und W2	75
Abb. 5.4: Darstellung der Fluoroionophore R1 und R2	76
Abb. 5.5: Strukturvorschläge für weitere Natrium-Ionen sensitive Fluoroionophore.	77

8.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Vergleich der Durchmesser ausgewählter Kationen und Kronenether.	3
Tab. 1.2: Absorptions- und Emissionsmaxima sowie Dissoziationskonstanten der Natrium-Ionen Fluoroionophore.	8
Tab. 1.3: Photophysikalische Eigenschaften von K1 und K2	14
Tab. 1.4: Photophysikalische Eigenschaften von K3 und K4	16
Tab. 1.5: Photophysikalische Eigenschaften von Na1 und Na2	17
Tab. 4.1: Photophysikalische Eigenschaften der Fluoroionophore K3 - K6	38
Tab. 4.2: Photophysikalische Eigenschaften der Fluoroionophore K7, K8 und K9	45
Tab. 4.3: Photophysikalische Eigenschaften der Fluoroionophore Na3 und Na4	49
Tab. 4.4: Photophysikalische Eigenschaften der Fluoroionophore Na5 und Na6	52
Tab. 4.5: Photophysikalische Eigenschaften der Fluoroionophore Na7 und Na8	56
Tab. 4.6: Photophysikalische Eigenschaften der Fluoroionophore Na9 und Na10	58
Tab. 4.7: Photophysikalische Eigenschaften von W1 und W2	65
Tab. 4.8: Photophysikalische Eigenschaften von R1 und R2	71
Tab. 6.1: Titrationsreihen der Kalium-Ionen Fluoreszenzmessungen.	115
Tab. 6.2: Titrationsreihen der Natrium-Ionen Fluoreszenzmessungen.	116

9. Publikationen

- T. Schwarze, **J. Riemer**, H. Müller, L. John, H.-J. Holdt, P. Wessig, „Na⁺ Selective Fluorescent Tools Based on Fluorescence Intensity Enhancements, Lifetime Changes, and on a Ratiometric Response“, *Chem. Eur. J.*, **2019**, *25*, 12412 – 12422
- T. Schwarze, **J. Riemer**, H.-J. Holdt, „A Ratiometric Fluorescent Probe for K⁺ in Water based on a Phenylaza-18-crown-6 Lariat Ether“, *Chem. Eur. J.*, **2018**, *24*, 10116 – 10121
- T. Schwarze, M. Mertens, P. Müller, **J. Riemer**, P. Wessig, H.-J. Holdt, „Highly K⁺-selective Fluorescent Probes for Lifetime Sensing of K⁺ in Living Cells“, *Chem. Eur. J.*, **2017**, *23*, 17186 – 17190
- T. Schwarze, H. Müller, D. Schmidt, **J. Riemer**, H.-J. Holdt, „Design of Na⁺-Selective Fluorescent Probes – A Systematic Study of the Na⁺-Complex Stability and the Na⁺/K⁺ Selectivity in Acetonitrile and Water“, *Chem. Eur. J.*, **2017**, *23*, 7255 – 7263
- T. Schwarze, R. Schneider, **J. Riemer**, H.-J. Holdt, „A Highly K⁺-Selective Fluorescent Probe – Tuning the K⁺-Complex Stability and the K⁺/Na⁺ Selectivity by Varying the Lariat-Alkoxy Unit of a Phenylaza[18]crown-6 Ionophore“, *Chem. Asian J.*, **2016**, *11*, 241 – 247
- T. Schwarze, **J. Riemer**, S. Eidner, H.-J. Holdt, „A highly K⁺-selective Two-Photon Fluorescent Probe“, *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 11306 – 11310

10. Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Hans-Jürgen Holdt, der mir die Möglichkeit eröffnete, in seinem Arbeitskreis das interessante Forschungsgebiet der Fluoroionophore unter seiner Anleitung zu untersuchen. Ich danke ihm ebenfalls für seine stete Hilfestellung und wissenschaftliche Unterstützung.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises der Anorganischen Chemie für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre und den zahlreichen anregenden Diskussionen und Ratschlägen. Vor allem danke ich an dieser Stelle Dr. Thomas Schwarze für seine stetige Unterstützung und der gemeinsamen Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt ebenfalls Prof. Dr. Pablo Wessig und der ehemaligen Mitarbeiterin Dr. Monique Mertens des Arbeitskreises Bioorganische Chemie der Universität Potsdam, für die erfolgreiche Zusammenarbeit.

Für die Durchführung der Messungen in RBC bedanke ich mich bei Dr. Peter Müller des Arbeitskreises Molekulare Biophysik der Humboldt Universität zu Berlin.

Den Mitarbeitern des Arbeitskreises der Analytischen Chemie, Angela Krtitschka, Dr. Ines Starke und Sylvia Fürstenberg danke ich für die Messung der zahlreichen NMR- und Massenspektren.

Weiterhin bedanke ich mich bei apl. Prof. Dr. Michael U. Kumke und Prof. Dr. Klaus Müller-Buschbaum für die Übernahme der Gutachten.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie, meinen Freunden und insbesondere meiner Freundin Friederike, die mich während meiner Promotion stets unterstützt haben und mir die Kraft gaben durchzuhalten.

11. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit im Zeitraum von August 2015 bis Mai 2019 am Institut für Chemie - Arbeitskreis für Anorganische Chemie - der Universität Potsdam selbstständig und einzig unter der Zuhilfenahme, der in der Arbeit angegebenen Hilfsmittel und Personen durchgeführt und verfasst habe. Ich versichere weiter, dass diese Arbeit an keiner anderen Hochschule als der Universität Potsdam eingereicht wurde.

Potsdam, den 20.05.2019