

Anwendungen von Rezeptoren auf Triphenylenketal-Basis

Von Chemosensoren und enantiofacialer Erkennung

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
Am Fachbereich 09 „Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften“
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Carsten Siering

Geboren in Münster (Westf.)

Mainz, 2011

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2012

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Topologien und allgemeine Struktur	2
1.2	Monoatomar verknüpfte Rückgrate	3
1.3	Benzen als zentrale Einheit.....	6
1.3.1	Chemosensoren und molekulare Erkennung.....	6
1.3.2	Chirale Erkennung mittels C_3 -symmetrischer Rezeptoren: Konzeptionelle Debatten...10	
1.3.3	Enantioselektive Katalyse.....	11
1.3.4	Neuartige Gerüstsynthesen.....	13
1.4	Cyclopeptide als Rückgrat	14
1.5	Triphenylenketal-basierte Rezeptoren.....	15
2	Aufgabenstellung.....	17
3	Ergebnisse	18
3.1	Enantiofaciale Differenzierung durch Supramolekulare Rezeptoren	18
3.2	Spektroskopische Verfahren zur Bestimmung von Affinitäten und zur Entwicklung einer schnellen Koffein-Analytik.....	27
3.2.1	Bindungsstudien im UV-Vis-Bereich	27
3.2.2	Direkte Koffein-Analytik durch Fluoreszenz.....	34
3.2.3	Indirekter Koffein-Nachweis.....	40
4	Zusammenfassung	54
5	Literatur.....	55
6	Eigene Veröffentlichungen.....	57
7	Anhang	59

1 Einleitung

Im Bereich der Supramolekularen Chemie steht die Wechselwirkung zwischen Molekülen im Vordergrund. Für die Ausbildung stabiler Aggregate ist Komplementarität notwendig – zum einen hinsichtlich der Baugruppen, welche die bedeutendsten Wechselwirkungen beitragen. Zum anderen hinsichtlich der Symmetrie. Wenn diese bei Wirt und Gast gut aufeinander abgestimmt ist, lassen sich besonders effiziente und stabile Systeme erzielen. Moleküle mit höheren Symmetrien haben zudem noch den Vorteil, dass sich aus gleichen Fragmenten zusammensetzen und lassen sich in ihren Wechselwirkungen mit anderen Molekülen oft einfacher beschreiben als nicht-symmetrische Vertreter. Folgt die Symmetrie des Liganden der des zu bindenden Gastes, lassen sich extrem effiziente Systeme erhalten. Im Folgenden werden die C_3 -symmetrischen Systeme in diesem Feld näher beleuchtet.

Ein natürlicher Vertreter dieser Klasse ist Enterobactin (Abbildung 1), welches von Bakterien wie *E. coli* genutzt wird, um lebenswichtiges Eisen aus der Umgebung zu binden und dem Organismus zur Verfügung zu stellen. Selbst in einem kompetitiven Umfeld (im menschlichen Serum ist die Konzentration an freiem Fe^{3+} durch verschiedene Regelmechanismen auf 10^{-24} M limitiert) versorgt dieses Molekül das Bakterium erfolgreich mit dem lebenswichtigen Element.^[1] Die Bindungskonstante für Eisen(III) liegt mit über 10^{52} M^{-1} signifikant höher als die „klassischer“ künstlicher Liganden wie EDTA ($K_{ass} = 10^{25}$ M^{-1}).^[2] Neben besonders günstigen Protonierungsgleichgewichten unter physiologischen Bedingungen trägt auch die strukturelle Komplementarität des Systems zu der hohen Bindungskonstante bei. Das C_3 -symmetrische Enterobactin kann mit seinen drei zweizähligen Catecholateinheiten die oktaedrische Koordinationsgeometrie des Eisens besonders gut bedienen.

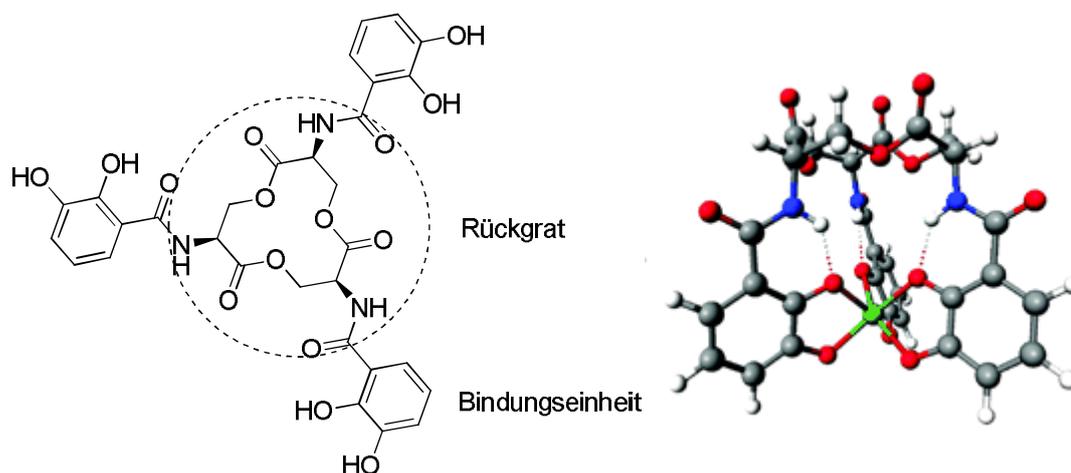


Abbildung 1: Enterobactin, ein C_3 -symmetrischer, natürlicher Ligand zur hocheffizienten Bindung von Fe^{3+} . Links: Molekulare Struktur und Einteilung in Rückgrat und Bindungseinheiten; rechts: Festkörperstruktur des Fe(III)-Komplexes.^[1]

Es wurden mehrere Übersichten für Moleküle erstellt, die primär nur über ihre C_3 -Symmetrie verwandt sind.^[3-5] Insbesondere der Artikel von *Moberg* aus dem Jahr 1998 über die Bedeutung und Anwendbarkeit von C_3 -Symmetrie beim Aufbau neuer Strukturen ist hier bahnbrechend gewesen und wurde bis 2011 über 160 mal zitiert.

1.1 Topologien und allgemeine Struktur

Bei der Beschreibung von C_3 -symmetrischen Liganden hat in vielen Fällen sich die Einteilung in Rückgrat und Bindungseinheit bewährt, wie sie am Beispiel des Enterobactins (Abbildung 1) dargestellt ist.^A

Das Rückgrat hat vor allem eine mechanische Funktion und ist selten direkt in das Bindungsgeschehen verwickelt. Im Zentrum des Rückgrats verläuft die Drehachse, außerdem laufen hier die verschiedenen funktionalen „Stränge“ zusammen. Das Rückgrat ist meist so gebaut, dass die Positionierung der funktionalen Gruppen im Abstand von 120° bevorzugt ist. Außerdem orientiert es oft die Bindungseinheiten auf einer Seite des Rückgrats (*all-syn*-Anordnung). Des Weiteren limitiert das Rückgrat schon aufgrund mechanischer Gründe die Größe des zu bindenden Gasts. Weitere Selektivität wird durch die funktionellen Gruppen der Bindungseinheiten erzielt, welche für die primären Wechselwirkungen mit dem Gast zuständig sind. Hierbei handelt es sich meist um ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken, gerade bei den anorganisch orientierten Systemen auch um koordinative Wechselwirkungen. *Van der Waals*-Wechselwirkungen und andere tragen zwar zur Stabilität der gebildeten Komplexe bei, fallen gerade bei der molekularen Erkennung wegen ihres geringen Energiebeitrags und ihres ungerichteten Charakters in den Hintergrund.

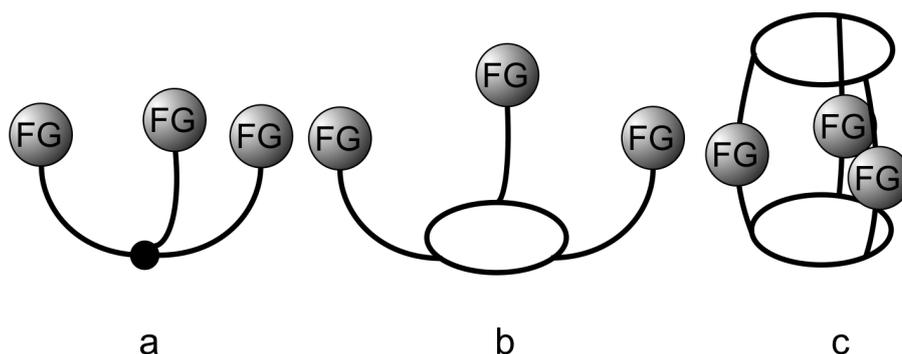


Abbildung 2: Topologien der diskutierten C_3 -symmetrischen Moleküle; FG = Funktionelle Gruppe, welche die Bindung bewirkt.

Von den zahlreichen für C_3 -symmetrische Liganden in Frage kommenden Topologien^[4] werden hier ausschließlich die einseitig geöffneten und sowie eine Auswahl beidseits geschlossener Systeme diskutiert.

Der im Folgenden dargestellte Überblick zeigt die wichtigsten Architekturen und neuesten Entwicklungen in diesem Bereich. Dabei wird die Gruppierung zunächst nach der Größe und Struktur des Rückgrats vorgenommen. Als verknüpfende Einheit werden einzelne Atome (Abbildung 2, a), sowie (poly)cyclische Einheiten wie Benzenringe, Cyclopeptide und Triphenylene vorgestellt. Innerhalb der Einheiten wird noch einmal hinsichtlich möglicher Anwendungsfelder gruppiert.

^A Dies gilt nicht für makrocyclische Systeme wie Kronenether, bei denen die Bindungseinheit direkt im Gerüst enthalten ist.

1.2 Monoatomar verknüpfte Rückgrate

Der einfachste Vertreter eines Rückgrates ist ein einzelnes, dreifach substituiertes Atom. Daran können gegebenenfalls die funktionellen Gruppen direkt angehängt sein, wie zum Beispiel bei den Tris(pyrazolyl)hydroboraten (Abbildung 3).

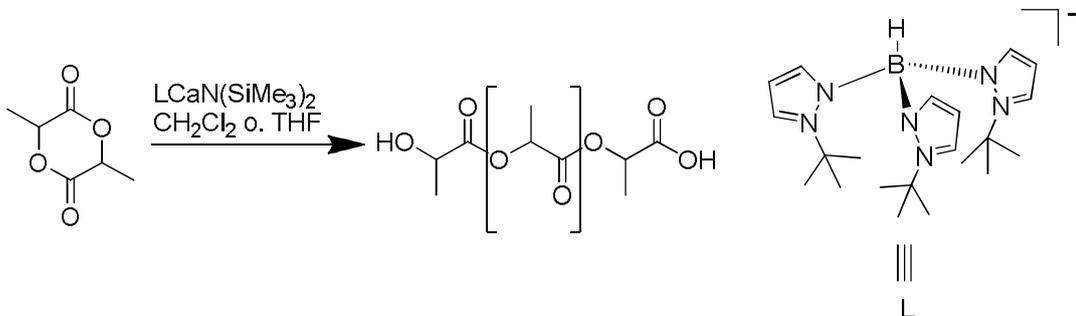


Abbildung 3: Tris(pyrazolyl)hydroborat-Ligand nach *Chisholm* (rechts); Lactidpolymerisation (links).^[6]

Diese Substanzen werden zum Beispiel in der kationischen ringöffnenden Polymerisation von Lactid eingesetzt. Polylactid ist ein neuartiger Kunststoff, der wegen seiner potentiellen Abbaubarkeit und der Herstellung aus nachwachsenden Rohstoffen von Interesse ist. Als aktive Zentren dienen meist Zink, Magnesium oder Kalzium. Der Kalziumkomplex lieferte in der Polymerisation von *rac*-Lactid bei 0.05 mol% schon nach einer Minute einen 90%igen Umsatz und einer Stereoselektivität von über 90% zugunsten des heterotaktischen Polylactids.^[6]

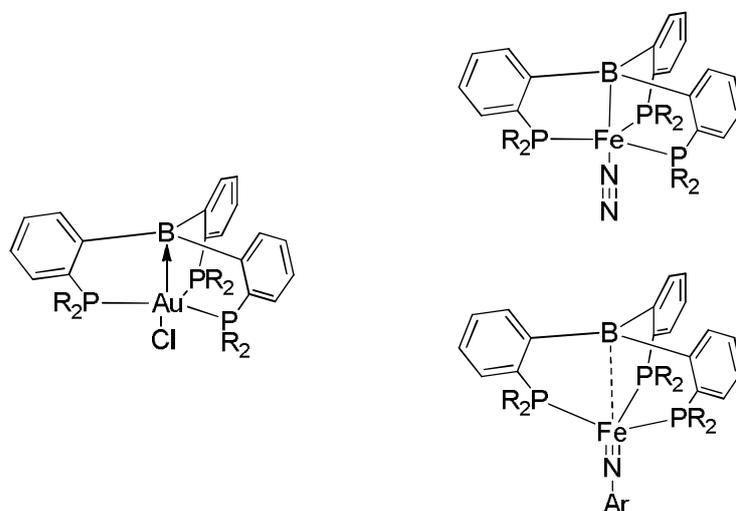


Abbildung 4: Metallaborane nach *Bourissou* (links), unterschiedliche Bindungsgeometrien an Eisenboratran-Stickstoffverbindungen (rechts).^[7,8]

Vor kurzem wurde von *Bourissou* ein Metallaboratran vorgestellt, in welchem das Bor-Atom einen Partner in einer dativen Bindung mit dem Metall darstellt (Abbildung 4).^[7] Die Bindung wird primär über drei Phosphingruppen hergestellt. In einem aktuellen Bericht wird dieser Ligand genutzt, um ein Eisenzentrum in verschiedenen valenten Stickstoff- bzw. Imido-Komplexen zu stabilisieren. Die dafür notwendigen Geometrieänderungen werden durch eine flexible Länge

der Bor-Eisen-Bindung möglich.^[8] Diese Systeme sollen als molekulare Studienobjekte zur natürlichen Stickstoff-Fixierung dienen.

Oxazolin-Einheiten sind spätestens seit der Einführung der Bisoxazolin-Liganden durch Pfaltz (box) gängige Baugruppen in der Übergangsmetall-Katalyse. Tris(oxazolin)-Liganden des in Abbildung 5 dargestellten Typs wurden vor allem in der Gruppe von Gade intensiv untersucht.^[9-12]

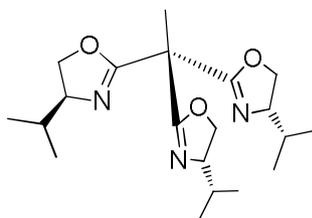


Abbildung 5: Tris(oxazolin)-Liganden nach Gade.^[9]

Nicht immer sind alle drei Affinitätsgruppen für die Bindung zuständig. So ist im Fall der enantioselektiven *Mannich*-Reaktion unter Kupferkatalyse (Abbildung 6, a) das Kupfer(II) an zwei der drei Oxazolingruppen gebunden.^[10] Trotzdem ist essentiell, dass der Ligand die C_3 -Symmetrie aufweist, da ansonsten Ausbeute und Enantioselektivität der Reaktion deutlich einbrechen. In der beschriebenen Reaktion sind sie den BOX-Liganden in Enantioselektivität (90%) wie auch in der Ausbeute (84% bei 10 mol% Katalysatorbeladung) überlegen. Im Gegensatz zu den BOX-Liganden sind diese Werte auch bei Reduktion der Beladung stabil.

Auch bei der asymmetrischen allylischen Alkylierung konnten mit den Tris(oxazolin)-Liganden die Ergebnisse von BOX-Systemen übertroffen werden (Abbildung 6, b). Neben der Enantioselektivität steigen auch die Ausbeute sowie die Reaktionsgeschwindigkeit.^[11]

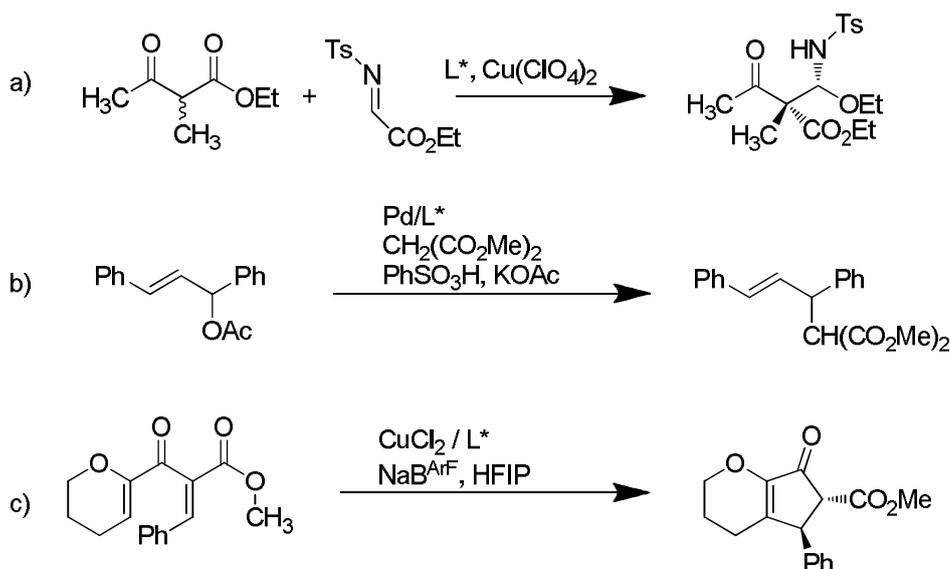


Abbildung 6: Anwendungen von Tris(oxazolin)-Liganden in der kupferkatalysierten Mannich-Reaktion (a), der allylischen Alkylierung (b), sowie der asymmetrischen *Nazarov*-Cyclisierung (c).

Vor kurzem wurde von einer asymmetrischen *Nazarov*-Cyclisierung berichtet, die ebenfalls durch Verwendung eines Tris(oxazolin)-Liganden verbessert werden konnte (Abbildung 6, c). Mit einem modifizierten Tris(oxazolin)-Liganden wurden gute Ausbeuten und sehr gute Enantiomerenüberschüsse (bis 98%, Referenz: pybox nur 30%) erzielt.^[13]

Eine modifizierte Fassung des Rückgrats besteht aus kurzen Kohlenstoffketten, welche die zentrale Verknüpfungsstelle mit den funktionellen Einheiten verbinden. Besonders prominent ist hier das Tris(2-aminoethyl)amin (TREN) zu nennen. Dieses Rückgrat wird wegen der enthaltenen Donor-Atome besonders in der anorganischen Chemie intensiv zur Darstellung von Metall-Liganden genutzt. Beispielhaft ist ein Gadolinium-Komplex dargestellt, der als neuartiges Kontrastmittel für MRT-Untersuchungen getestet wurde.^[14]

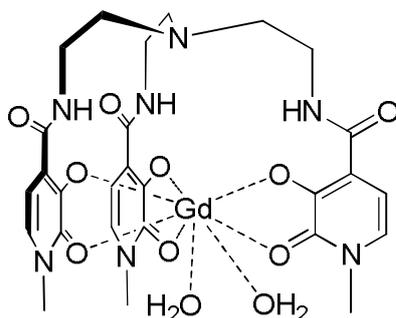


Abbildung 7: Gadolinium-Komplex mit Tris(2-aminoethyl)amin-Grundgerüst.^[14]

Es sind aber auch einige Anwendungen in der molekularen Erkennung beschrieben.^[15] Ein Beispiel hat die Gruppe um *Anslyn* mit der Entwicklung eines Phosphatrezeptors gezeigt.^[16] Dabei wird der eigentlich sehr flexible TREN-Ligand über die Bindung an ein Kupfer(II)-Kation stark in seiner Flexibilität eingeschränkt und die funktionellen Gruppen – in diesem Fall Benzylammoniumeinheiten – in eine geeignete Position gebracht. Zugleich liefert das Kupfer auch den größten Beitrag bei der Bindung des Phosphat-Anions. Durch das apikale Kation wird zugleich auch die tetraedrische Symmetrie des Phosphats strukturell besser erfasst.

Parallel dazu wurde auch ein verwandter Tris(2-pyridyl)methylamin-basierter Rezeptor mit Guanidiniumgruppen entwickelt (Abbildung 8). Obwohl sich sowohl die Flexibilität des Rückgrats als auch die Affinitätsgruppen unterscheiden, liegen die Bindungskonstanten für Phosphat für beide Systeme im Bereich von $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Dies wurde auf sich kompensierende Unterschiede bei der Solvataion der H-Brücken-Donoren zurückgeführt.^[17] Beiden Systemen gemein ist die hohe Selektivität zugunsten von Phosphat gegenüber allen anderen bei pH 7.4 vorliegenden, in biologischem Kontext relevanten Anionen. Daher ist die Nutzung als Chemosensor für Phosphat in biologischen Proben möglich. Mittels eines Indikator-Verdrängungs-Assay unter Verwendung von Fluoresceincarbonsäure ist ein kolorimetrischer Nachweis von Phosphat in Serum und Speichel leicht und schnell durchführbar.^[18]

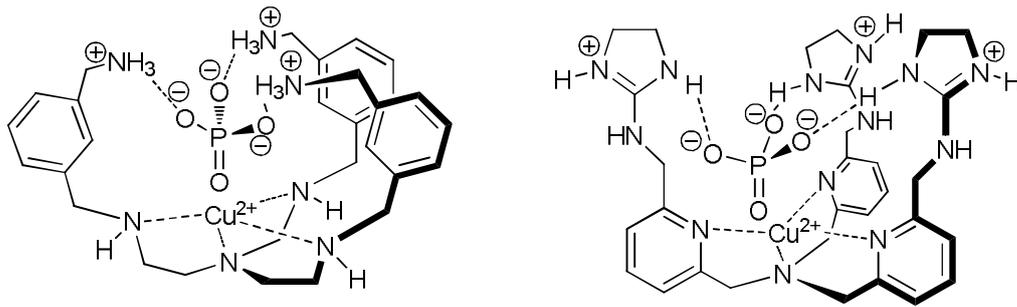


Abbildung 8: Phosphatrezeptoren mit zwei verschiedenen Trialkylamin-Rückgraten nach *Anslyn*.^[17]

1.3 Benzen als zentrale Einheit

Die mit Abstand größte Gruppe an C_3 -symmetrischen Systemen nutzt den Benzolring als Grundbaustein. Dieser ermöglicht die Bindung kleiner organischer Moleküle und seine entsprechenden Derivate lassen sich gut herstellen.

Der Ursprung dieser Chemie geht auf Arbeiten von *MacNicol* und *Vögtle* zurück.^[19] Beide haben erstmals die supramolekularen Eigenschaften (allerdings identisch) hexasubstituierter Benzene diskutiert. Erst die Beschreibung der Struktur von Hexaethylbenzen von *Mislow* eröffnete das volle Potential dieser Baugruppe.^[20] Die sterische „Verzahnung“ der nebeneinander liegenden Ethylsubstituenten bedingt, dass immer abwechselnd eine terminale Methylgruppe über bzw. unter die Ringebene weist. Mit der Entwicklung einer Synthese, die ein 1,3,5-Tribrommethyl-2,4,6-triethylbenzen in guter Ausbeute liefert,^[21] wurde die Entwicklung einer Vielzahl von Systemen möglich.^[22]

1.3.1 Chemosensoren und molekulare Erkennung

Einer der bekanntesten Vertreter aus dieser Reihe ist der Citrat-Rezeptor (Abbildung 9), welcher in wässriger Lösung bei pH 7.4 Citrat mit einer Bindungskonstante von $7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ bindet.^[21] Nachfolgend wurde auch ein optischer Nachweis von Citrat in Erfrischungsgetränken vorgestellt.^[23] Hier wurde wieder Carboxyfluorescein als zu verdrängender Indikator eingesetzt. Da dieses unter den gewählten Bedingungen eine deutlich kleinere Bindungskonstante hat als Citrat, konnte dessen Konzentration direkt kolorimetrisch und fluorimetrisch nachgewiesen werden.

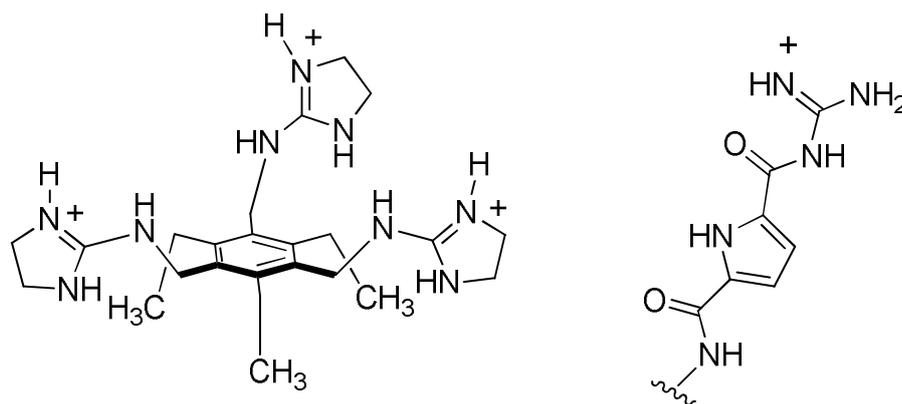


Abbildung 9: Citrat-Rezeptoren nach *Anslyn*^[21] (links) und *Schmuck* (rechts; vereinfachte Darstellung. Es ist nur eine der drei identischen, an den Benzylpositionen angehängten Bindungseinheiten gezeigt.)^[24]

Schmuck präsentierte 2005 eine weiter optimierte Version des Rezeptors, die sich durch die Insertion einer 2,5-Dicarbonylpyrrolyl-Einheit auszeichnet (Abbildung 9).^[24] Da diese Einheit für sich schon ein Chromophor ist, kann auf die Zugabe eines kompetitiven farbgebenden Gasts verzichtet werden. Fluoreszenz und UV können für eine direkte Analyse des Bindungsgeschehens genutzt werden.^B In reinem Wasser wird die Bindungskonstante um zwei Größenordnungen verbessert, und selbst in Puffer in Gegenwart eines 100fachen Überschusses an Chlorid liegt die Bindungskonstante noch immer bei $8.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Die Autoren schreiben diesen Effekt stärkeren elektrostatischen Wechselwirkungen durch die hydrophobere Tasche zu.

Ein weiterer aktueller Chemosensor auf Benzen-Basis ist das Benzimidazolsystem zum Nachweis von Iodid (Abbildung 10).^[26] Auch hier ist eine direkte optische Auswertung via UV und Fluoreszenz möglich. Die Bindungskonstante bedarf mit $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ noch Verbesserungen, ist aber für erste Untersuchungen geeignet. Zur Selektivität des Systems gibt es nur begrenzte Informationen, andere Halogenide, Cyanide und Acetate scheinen aber die Messung nicht zu stören.

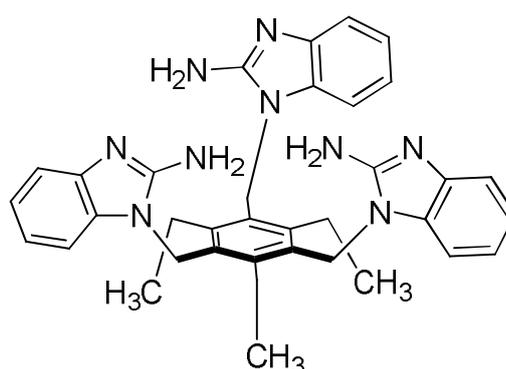


Abbildung 10: Iodid-Rezeptor mit Aminobenzimidazolen als Bindungsgruppe.

2002 publizierte *Ahn* seine Arbeiten zur Bindung von α -chiralen primären Ammoniumionen durch chiral modifizierte Tris(oxazolin)-Systemen am Benzen-Rückgrat (Abbildung 11).^[27] Die Affinitäten wurden durch Verteilungsexperimente zwischen Wasser und Chloroform bestimmt.

^B Trotzdem wurde auch ein colorimetrischer Ansatz analog dem *Anslyn*-Ansatz beschrieben.^[25]

Es zeigte sich, dass vor allem α -Arylammoniumsalze mit hoher Effizienz (bis 90%) und moderater Enantioselektivität ($(R):(S) \approx 70:30$ für α -Phenethylamin) extrahiert werden. Dies gelang allerdings nur, wenn am stereogenen Zentrum des Oxazolins eine Phenylgruppe fixiert war. Dies wurde als Indiz für eine attraktive Wechselwirkung zwischen den aromatischen Substituenten gesehen.^c

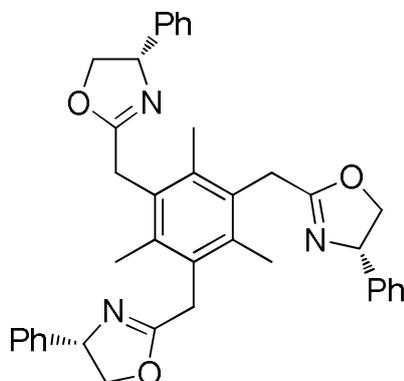


Abbildung 11: Chiraler Tris(oxazolin)-Rezeptor nach *Ahn*^[27] zur chiralen Erkennung von Ammoniumsalzen.

Auch β -chirale Ammoniumionen lassen sich mittels der Tris(oxazolin)-Systeme unterscheiden, allerdings nur, wenn die Bindungen zwischen Ammonium und chiraler Einheit durch eine Wasserstoffbrücke konformativ eingeschränkt ist.^[28]

Durch Erweiterung des Systems zu einer geschlossenen Kapsel war eine weitere Verbesserung der Diskriminierung erwartet worden, da ein festeres Gerüst vorliegt (Abbildung 12). Trotz Abkühlung auf unter -10 °C gelang es aber nicht einmal, die Ergebnisse des „offenen Systems“ zu erreichen. Die Enantiomerenverhältnisse der extrahierten Ammonium-Salze lagen durchweg bei ca. 60:40.^[29] Durch die geschlossene Struktur wird der Innenraum etwas enger und die Phenyl-Gruppen können offenbar weniger gut mit dem Gast interagieren.

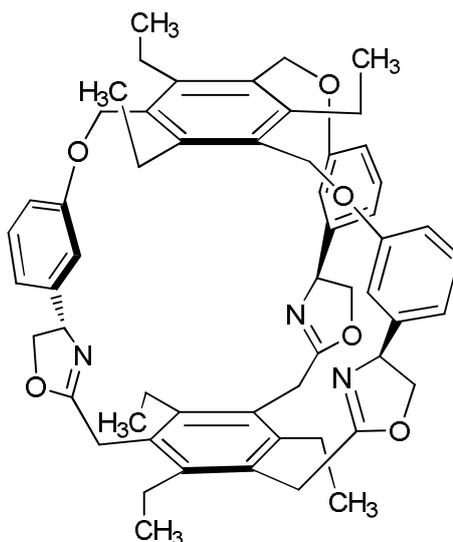


Abbildung 12: Käfigverbindung auf der Basis eines Tris(oxazolin)-Rezeptors nach *Ahn*.^[29]

^c Dies wird weiter untermauert durch die nicht nachweisbare Selektivität an Alaninmethylester.

Die Gruppe um *Roelens* veröffentlichte 2006 ebenfalls eine Käfigverbindung mit Benzen-Kern, welche sich in einem *self assembly*-Ansatz bildete (Abbildung 13).^[30] Nach Reduktion der Imine wurde ein Rezeptor erhalten, welcher mit hoher Affinität β -Glucopyranoside ($K_{\text{Ass}} = 4.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ für das β -Octyl-Derivat in CDCl_3) bindet. Ein Grund für die hohe Bindungskonstante ist sicher in der schlechten Löslichkeit der des Glucosids in den gewählten Lösungsmitteln zu suchen. Weder die entsprechenden α -Anomere noch Galaktose oder Mannose-Stereoisomere werden vom System gebunden. Daher müssen neben der lipophoben Wechselwirkung auch geometrische und elektronische Faktoren von Bedeutung sein.

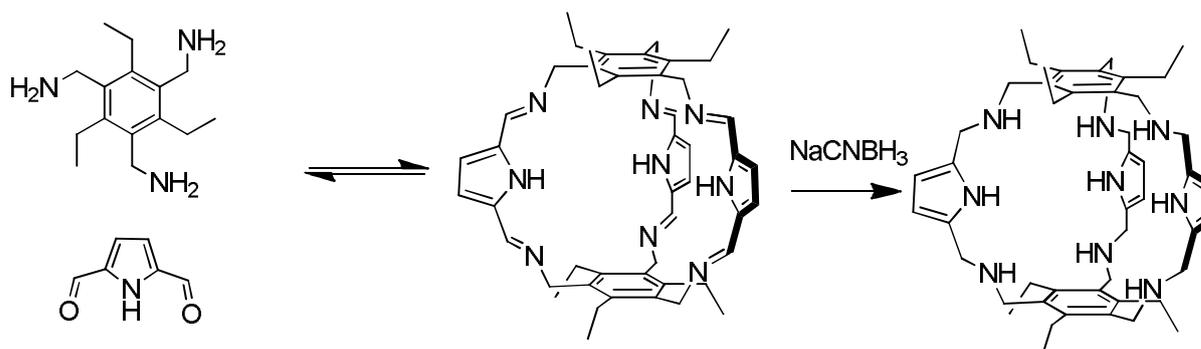


Abbildung 13: Der Vorläufer einer Kapsel nach *Roelens* bildet sich durch *self-assembly*. Nach Reduktion der Imin-Gruppen bindet die Kapsel Glucopyranoside.^[30]

Im Zuge weiterer Entwicklungen an diesen Systemen wurde gefunden, dass die um eine 1,2-Diaminocyclohexaneinheit erweiterte, aber offene Struktur hervorragend geeignet ist für die enantioselektive Erkennung von Octylmannosiden.^[31]

Ein erfolgreiches Beispiel für die Erkennung von Polyglykosiden ist der Heparin-Sensor von *Anslyn* (Abbildung 14). Nachdem gezeigt wurde, dass die Größe des Benzen-Rückgrats nicht ausreichte,^[32] wurde eine Erweiterung mittels Alkynyl-Gruppen vorgenommen.^[33] Durch Änderung des Aufstellwinkels der Seitenarme kann nun ein größerer Bereich des Heparins umfasst werden. Auch die Phenylboronsäuren, welche den Zucker über Acetalbildung reversibel binden, können nun besser mit dem Substrat interagieren. Die Bindungskonstante liegt bei $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ in einer Pufferlösung. Auch in Serum ist mit diesem System ein direkter Heparin-Nachweis möglich.

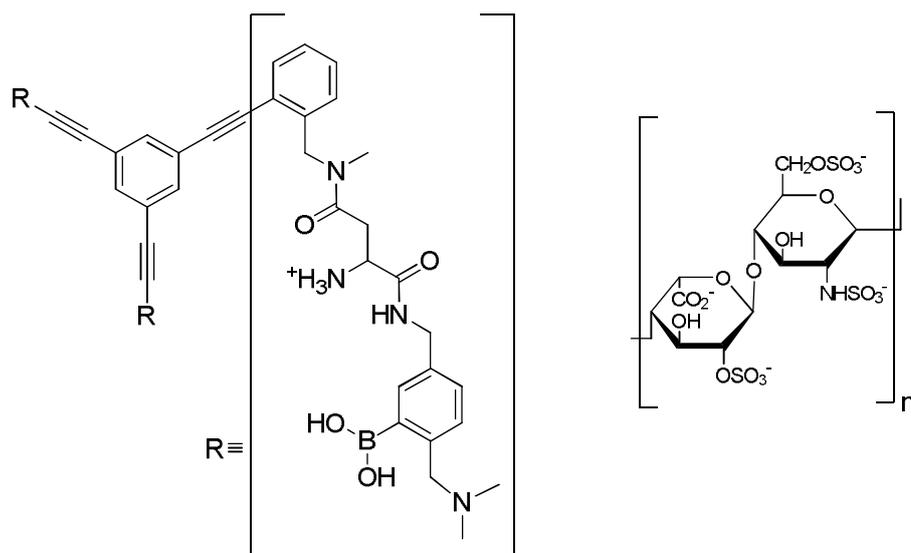


Abbildung 14: Heparin-Rezeptor nach *Anslын* (links) und Ausschnitt aus dem Heparingerüst (rechts).

1.3.2 Chirale Erkennung mittels C_3 -symmetrischer Rezeptoren: Konzeptionelle Debatten

Eine größere Kontroverse im Kreise der Entwickler von Systemen mit einer dreizähligen Drehachse hat sich an einer Publikation von *Vögtle* aus dem Jahr 1985 entzündet. Nachdem bis zu diesem Zeitpunkt die chiral erweiterten Kronenether mit D_3 -Symmetrie keine erfolgreiche Diskriminierung von enantiomeren Gästen gezeigt hatten, mutmaßten die Autoren, dass dies wohl der Symmetrie der Moleküle geschuldet war.^[34] Dies wurde in einem Review von *Izatt* und *Bradshaw* wiederholt. Danach seien makrocyclische Rezeptoren mit D_3 -Symmetrie im Allgemeinen schlechter für chirale Erkennung geeignet.^{[35],D}

Die Argumentation lässt sich an Abbildung 15 erläutern. Darin ist der Wirt mit drei homochiralen Substituten R versehen, der Gast liegt darin/darauf und hat die Substituenten S/M/L mit unterschiedlicher Größe. Der verbleibende Substituent steht senkrecht und kann hier ignoriert werden. *Vögtle* kam zu dem Schluss, dass das Vertauschen zweier Gast-Substituenten, z.B. S und L, zu einer energetisch identischen Situation führen müsse, da es auch in der neuen Situation einen gleichwertigen L-R sowie S-R-Kontakt gebe. Daher sei eine chirale Erkennung schon konzeptionell durch D_3 -symmetrische Moleküle nicht möglich. (Es wurde nicht auf C_3 -Systeme eingegangen, wenn die Argumentation richtig wäre, beträfe sie diese aber genauso.)

^D Allerdings wird die Einschränkung gemacht, dass Makrocyclen mit C_3 -Symmetrie hierzu durchaus in der Lage wären, wohl auch vor dem Hintergrund der Publikation von *Still* aus dem Jahr 1993 über die enantioselektive Erkennung von Peptiden durch einen makrotricyclischen Rezeptor.^[36]

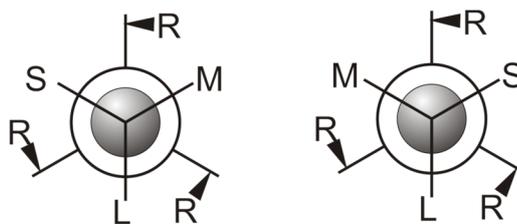


Abbildung 15: Schematische Darstellung zur chiralen Erkennung mittels C_3 -symmetrischer Rezeptoren.

Obwohl sich die Autoren beider Veröffentlichungen sehr vorsichtig geäußert haben, ist insbesondere aus den Publikationen von *Moberg* und *Ahn* zu erkennen, dass bei *Vögtle* eine verallgemeinerte negative Aussage über die Leistungsfähigkeit von dreizähligen Liganden gesehen wurde.^[5,27]

Ahn fordert nun, die Wechselwirkung von drei Gruppen zu berücksichtigen und so den Rest R im Umfeld der Substituenten M und L zu betrachten. Wenn man dem Schema im Uhrzeigersinn folgt, muss somit die Sequenz M-R-L ungünstiger sein als L-R-M, da es hier zu stärkeren Abstoßungen des großen Substituenten kommt. Daher kann nicht schon konzeptionell davon ausgegangen werden, dass die Erkennung mittels dreizähliger Systeme nicht möglich ist.

1.3.3 Enantioselektive Katalyse

Ursprünglich hatte sich die Gruppe von *Ahn* nicht mit der chiralen Erkennung beschäftigt, sondern mit der enantioselektiven Organokatalyse. Unter Verwendung des Tris(oxazolin)-Systems mit tert-Butylgruppen an den chiralen Zentren wurde bei einer *Michael*-Addition an Acrylsäuremethylester ein Enantiomerenüberschuss von bis zu 82% erzielt (Abbildung 16). Hier wurden 10 mol% des Katalysators benötigt. Die Autoren vermuten, dass das Kalium-Ion im Rezeptor gebunden ist und somit auch das Enolat in die chirale Umgebung bringt.^[37]

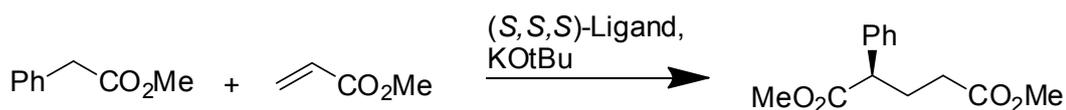


Abbildung 16: Von *Ahn* untersuchte *Michael*-Addition in Anwesenheit des chiralen Tris(oxazolin)-Rezeptors.

Ein verwandtes System, welches auf chiralen 2-Aminomethylpyrrolidinen basiert, liefert bei der *Michael*-Addition an Nitroalkenen durchweg gute Enantiomerenüberschüsse von 80-98% bei ansprechenden Ausbeuten (Abbildung 17).^[38] Der Katalysator bindet die Keton-Komponente als Enamin und aktiviert diese zugleich, dies ist also ein klassischer Vertreter moderner Organokatalyse auf Basis von Prolin und seinen Derivaten. Weiterhin gehen die Autoren von der Bindung der Nitrogruppe über Wasserstoffbrücken ausgehend von den proximalen Amin-Protonen aus. Mit dieser Methode konnten cyclische und acyclische Ketone sowie β -Diketone umgesetzt werden. Es sei angemerkt, dass die entsprechenden Prolinderivate hinsichtlich der Enantioselektivität völlig versagten. Offenbar ist eine gewisse Flexibilität des Systems hier entscheidend für die Katalyse.

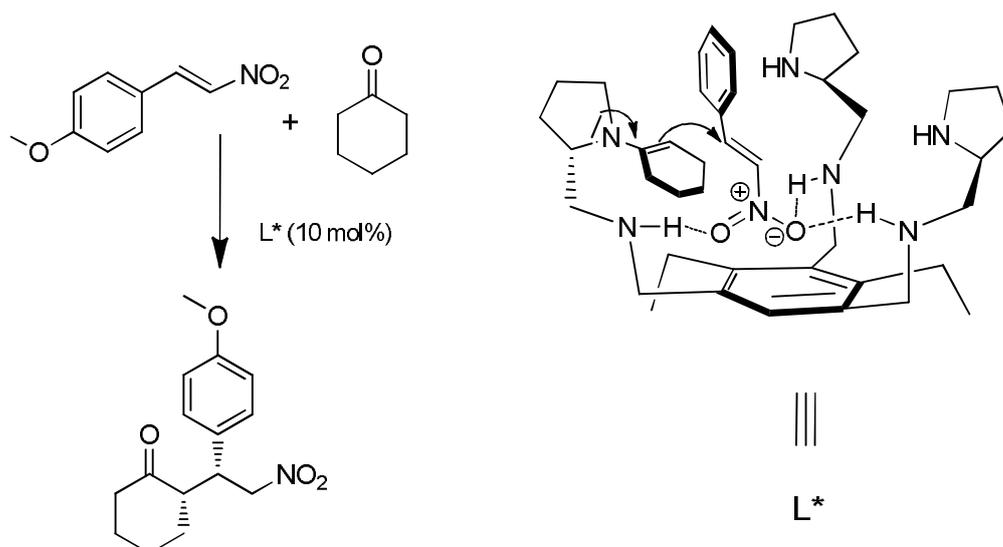


Abbildung 17: Enantioselective, organokatalytische *Nitro-Michael-Addition*.^[38]

Fujioka beschrieb nahezu gleichzeitig einen weiteren Organokatalysator für diese Reaktion. Als funktionalen Gruppen dienen C_2 -symmetrische, chirale Imidazolin-Einheiten, die in 1,3,5-Position am Benzolring angebracht sind (Abbildung 18). Es gelingt die Umsetzung mit cyclischen β -Ketoestern mit ca. 95% *ee* und Ausbeuten >90% sowie sehr guten Diastereoselektivitäten.^[39] Zwei benachbarte Imidazoline sind jeweils an der Reaktion beteiligt, in dem eines als Brønsted-Base die Enolisierung des β -Ketoesters bewirkt, das zweite als Protonendonator eine Wasserstoffbrücke zur Nitrogruppe des *Michael*-Akzeptors aufbaut. Fehlt schon eine der drei Imidazolin-Gruppen oder wird durch Methylierung der Protonenübertrag verhindert, kommt es zu einem signifikanten Einbruch der Selektivität.^[40]

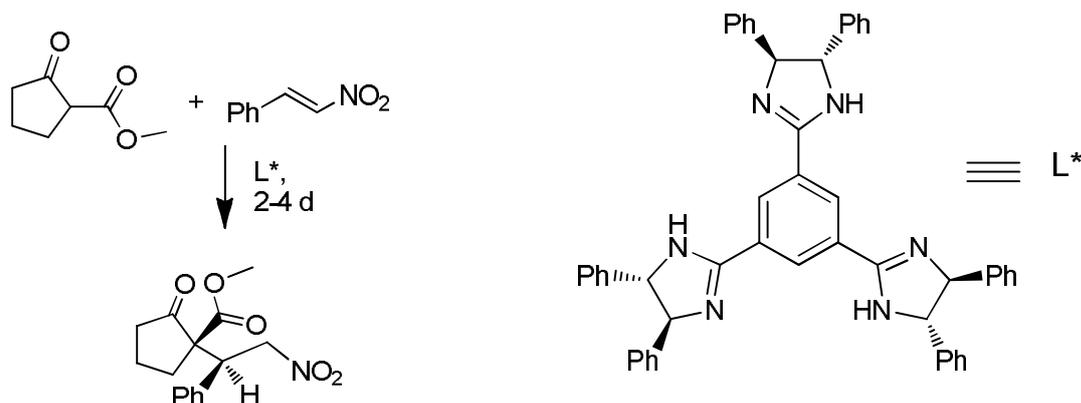


Abbildung 18: Tris(imidazolyl)benzen-System nach *Fujioka*, welches für eine Variante der *Michael-Addition* getestet wurde.^[39]

Bringmann hat durch seine Methode zur enantioselectiven Öffnung von Biaryllactonen einen Zugang zu axial chiralen, enantiomerenangereicherten Biarylen eröffnet. Diese wurden über einen Benzen-Kern zu einem C_3 -symmetrischen Triol kombiniert, welches in der Lage ist, *in situ* Titan(IV) zu inkorporieren (Abbildung 19). Dieser Komplex zeigte sich als geeignet für die enantioselective Alkylierung aromatischer Aldehyde mittels Diethylzink. Es wurden Ausbeuten und Enantiomerenüberschüsse oberhalb von 90% erzielt.^[41] Angesichts der Größe des

Katalysators und dessen eingesetzter Menge (20 mol%) ist dieser Ansatz wohl eher von akademischem Interesse.

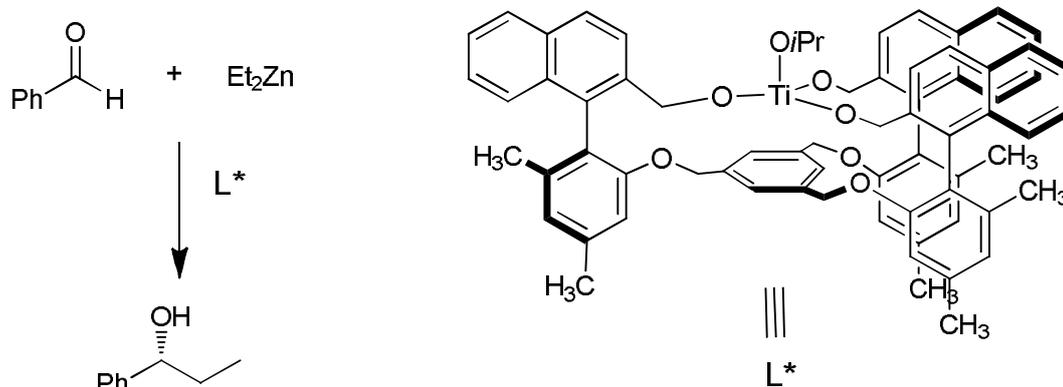


Abbildung 19: Chiraler Titankomplex nach *Bringmann* zur enantioselektiven Alkylierung von Aldehyden.^[41]

1.3.4 Neuartige Gerüstsynthesen

In den bislang vorgestellten chiralen Systemen wird die chirale Information „nachträglich“ mit der funktionellen Gruppe eingeführt. Hier sollen noch zwei aktuelle Zugänge zu chiralen Rückgraten vorgestellt werden.

Die Synthese eines *syn*-Benzotriborneols basiert auf einer dreifachen Kupplung von stannylierten Brom-borneolen (Abbildung 20).^[42] Als Katalysator dient ein Kupfer(I)-thiophencarboxylat. Der Methyl-geschützte Vorläufer liefert 100% *syn*-Produkt, die anderen Schutzgruppen führen zu *syn:anti*-Gemischen im Verhältnis von $\approx 85:15$. Da derartig gute Verhältnisse nur erhalten werden, wenn Heteroatome in den Substraten enthalten sind, liegt nahe, eine Wechselwirkung zwischen dem Kupfer und den geschützten Ethern als Ursache für die Selektivität der Reaktion zu sehen.^E In ersten Untersuchungen binden die *syn*-Triole (1-Phenylethyl)ammoniumchlorid mit geringer Enantioselektivität.

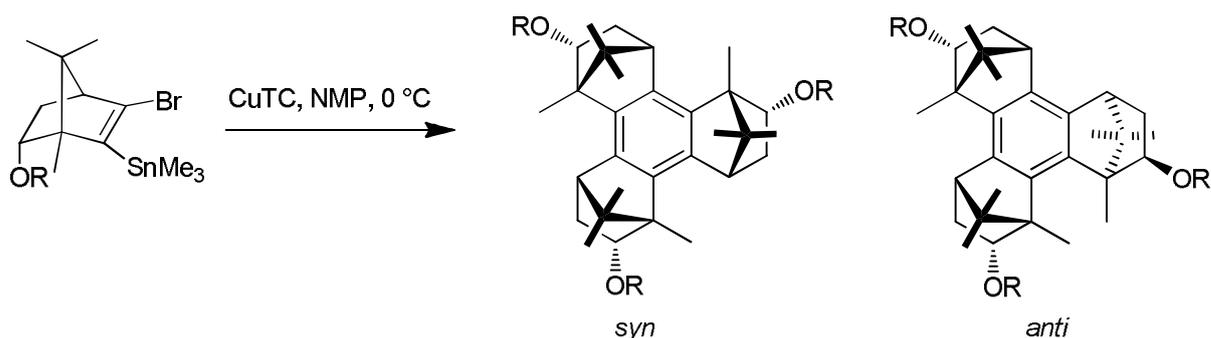


Abbildung 20: Die Synthese von *syn*-Benzotriborneol durch Trimerisierung eines stannylierten Vorläufers führt in Abhängigkeit vom Rest R zu *syn/anti*-Gemischen oder zu reinem *syn*-Produkt.^[42]

^E Würde die Regiochemie zuverlässig über die Abgangsgruppen gesteuert, sollte in jedem Fall exklusiv das *syn*-Produkt erhalten werden.

In einem Verfahren von *Gibson* wird ein 1,3,5-Tri(methoxymethyl)benzen in die entsprechende Chromtricarbonylverbindung überführt (Abbildung 21). Diese wird enantioselektiv mit einem chiralen Diamin und *n*-Butyllithium deprotoniert. Abfangen mit Alkylhalogeniden oder Propylenoxid liefert dann das dreifach modifizierte Produkt in >70% Ausbeute und mit einem *ee* >90%. Oxidative Ablösung des Chrom-Fragments mittels Cer(IV)ammoniumnitrat liefert das freie Gerüst.^[43] Unter Verwendung leichter abzuspaltender Schutzgruppen am Sauerstoff (z.B. MOM) gelingt die enantioselektive Funktionalisierung.^[44]

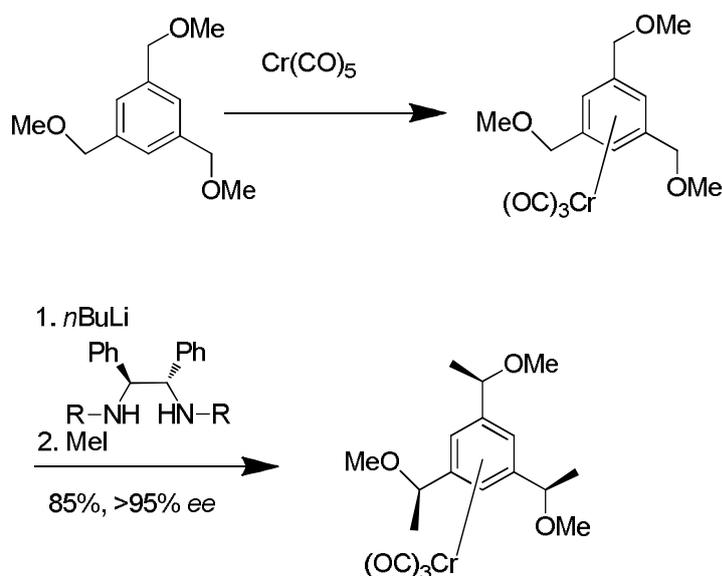


Abbildung 21: Darstellung chiral modifizierter Rezeptorplattformen auf Benzen-Basis.

1.4 Cyclopeptide als Rückgrat

Zu den größten C_3 -symmetrischen Gerüsten gehören die Cyclopeptide. Aufgrund ihrer Bausteine sind diese Gerüste inhärent chiral.

Kubik stellte ein aus *L*-Prolin und einer 2-Aminobenzoesäure ein alternierend aufgebautes Hexapeptid für die Erkennung von Glykosiden her (Abbildung 22). Die Ringkonformation bedingt eine aufrechte Position der Reste R oberhalb einer Ringseite. Die Bindungskonstanten liegen mit ca. 500 M^{-1} in Acetonitril/Methanol-Gemischen im unteren Bereich. Vor allem konnte keine signifikante Präferenz für bestimmte Monoglycoside ermittelt werden.^[45]

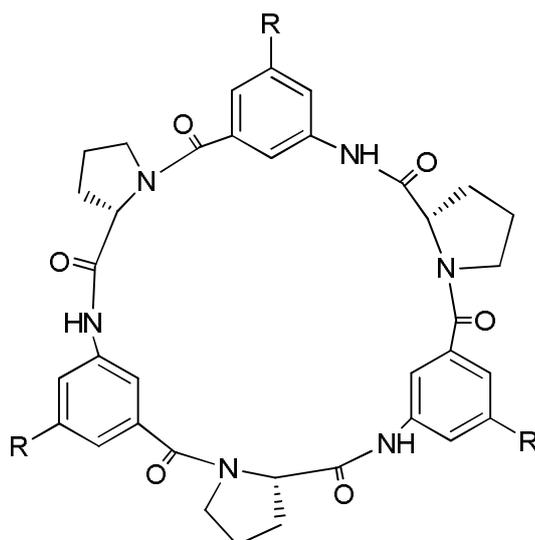


Abbildung 22: Cyclopeptid-Rückgrat nach *Kubik*.^[45]

Inspiziert von marinen macrocyclischen Naturstoffen hat *Rebek, jr.* eine weitere Klasse von kleineren Peptiden als Baugruppe für supramolekulare Gerüste vorgeschlagen. Auch diese lassen die funktionellen Gruppen für spätere Bindungseinheiten nur über einer Seite der Ringebene aufragen.^[46] Sie zeichnen sich durch Azole aus, die in den Ring eingebaut sind. Während die synthetischen Ansätze zu dieser Chemie anfänglich noch sehr komplex und ineffizient waren, erzielt *Haberhauer* inzwischen eine günstige konvergente Synthese, die in einer Trimerisierung direkt den gewünschten Ring in 60% Ausbeute liefert (Abbildung 23). Diese Synthese lässt sich im Gramm-Maßstab durchführen.^[47] Die weitere Funktionalisierung erfolgt an den sekundären Stickstoffatomen der Imidazolringe. Die Ausrichtung der funktionellen Gruppen erfolgt analog den Benzen-Systemen wieder über sterische Verzahnung mit den benachbarten Isopropylgruppen. Vor kurzem wurde eine weitere Synthese vorgestellt, in welcher der Alkylsubstituent im Imidazol modifiziert werden kann.^[48]

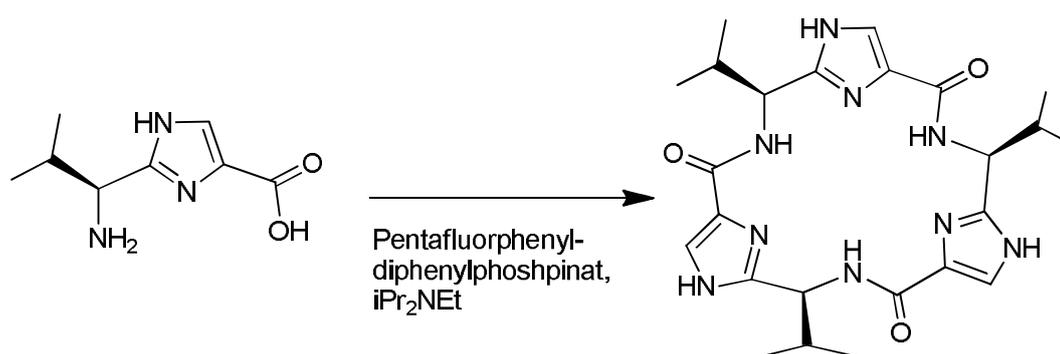


Abbildung 23: Cyclisches Tripeptid nach *Haberhauer*.^[47]

1.5 Triphenylenketal-basierte Rezeptoren

Zu den großen Rückgraten gehört auch die Triphenylenketal-Plattform, welche von *Waldvogel* und *Rebek jr.* vorgeschlagen wurde (Abbildung 24).^[49] Diese zeichnet sich durch einen stark fixierten Abstand der Bindungseinheiten aus. Des Weiteren bietet die elektronenreiche Fläche

des Hexaalkoxytriphenylens eine zusätzliche Wechselwirkung mit Gästen an. Diese konnte bei der Entwicklung des ersten künstlichen Koffeinrezeptors (**1**) erfolgreich genutzt werden.

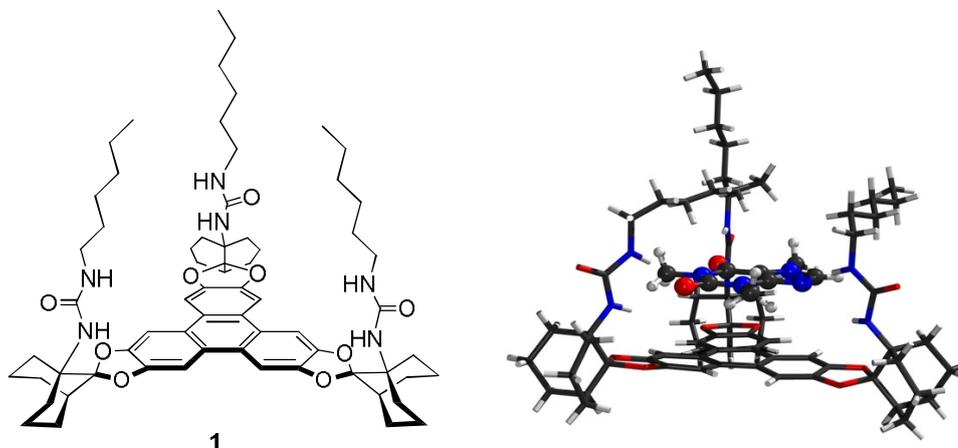


Abbildung 24: Künstlicher Koffeinrezeptor nach *Waldvogel*; links: Strukturformel, rechts: Molekülstruktur des Koffeinkomplexes aus der Röntgenstrukturuntersuchung eines Einkristalls.^[50]

Aufgrund der schlechten Löslichkeit des freien Hexahydroxytriphenylens hat sich eine Dehydrotrimerisierung der ketalisierten Brenzcatechin-Einheiten als günstigster Zugang erwiesen. Diese kann sowohl übergangsmetallvermittelt wie auch elektrochemisch erfolgen.^[51,52]

Die elektrochemische Umsetzung ist nur für ausgewählte Derivate durchführbar. Es ist notwendig, dass das gebildete Produkt zügig aus der Lösung ausfällt, da es ansonsten zu dessen Überoxidation kommt. Neben dem *all-syn*- wird das statistisch bevorzugte *anti,anti,syn*-Trimer erhalten, welches nach der Reaktion getrennt und dann durch repetitive Isomerisierung in das gewünschte Stereoisomer überführt wird.

Bei der Umsetzung mittels Molybdänpentachlorid wird hingegen bei einer größeren Zahl von Substraten unter geeigneten Bedingungen (Struktur des Ketals, Heteroatome in der Bindungseinheit, ggf. Additive) ein Produktgemisch erhalten, welches sich weitab des statistisch erwartbaren befindet.^[52,53] In diesem Fall kommt es offenbar zu einer Templatwirkung des Metallfragments, welche die Bildung des *all-syn*-Produktes bevorzugt.

Für die Entwicklung des Koffeinrezeptors erwies sich die extrem starre Bicyclononan-Einheit zur Positionierung der Bindungsgruppen als günstig. Die Vororientierung durch *tert*-Butylgruppen war hier nicht stark genug.^[49] Da Koffein in einer *pseudo*- C_3 -symmetrischen Anordnung Wasserstoffbrücken-Akzeptoren aufweist, wird mit drei Harnstoffeinheiten ein strukturkomplementäres Bindungsmotiv aufgebaut. Diese werden als *n*-Hexylisocyanat eingeführt. Mittels NMR wurde eine Bindungskonstante in $CDCl_3$ von 36500 M^{-1} ermittelt.^[50] Dieser Wert ist für den Komplex von zwei Neutalmolekülen beachtlich. Aus Löslichkeitsgründen liegen keine weiteren Daten zur Selektivität gegenüber anderen Oxopurinen vor.

2 Aufgabenstellung

Die Leistungsfähigkeit von Rezeptoren auf Triphenylenketalbasis wurde erfolgreich am Beispiel von Koffein konzeptionell demonstriert. Unter Laborbedingungen konnte die Bindung *via* NMR nachgewiesen und hinsichtlich ihrer Stabilität untersucht werden. Offen blieb aber die Frage, inwiefern sich Systeme dieses Typs dann auch wirklich für Anwendungen eignen. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Beantwortung dieser Frage.

Die Entwicklung eines Chemosensors ist der naheliegendste Ansatz. Als Vorbild dienen die Chemosensoren nach Anslyn, die vor allem wegen ihrer leichten Handhabbarkeit sowie dem einfachen Auslesen durch photometrische Methoden überzeugen.

Im Zug dieser Arbeiten sollte zugleich auch das Bindungsverhalten der Rezeptoren zu zahlreichen anderen Gästen bestimmt werden.

Der Schwerpunkt der Arbeit sollte aber in der enantiofacialen Differenzierung liegen. Nachdem schon die chirale Erkennung mittels C_3 -symmetrischer Systeme nachweislich mehrere Jahre in Frage gestellt wurde, war die Seitendifferenzierung an einem ganzen prochiralen Substrat eine besondere Herausforderung.

Als Testsystem sollte zunächst Koffein untersucht werden. Bei erfolgreicher Übertragung auf andere Substrate sollte es möglich sein, eine Seite des Gastes reversibel zu schützen und dann auf der anderen z.B. Hydrierungen durchzuführen. Eine Beispielanwendung wäre die Reduktion der Pteridin-Einheit von Folsäure, um zur Tetrahydrofolsäure zu gelangen (Abbildung 25). Diese Reaktion wird bislang nicht enantioselektiv durchgeführt.^[54]

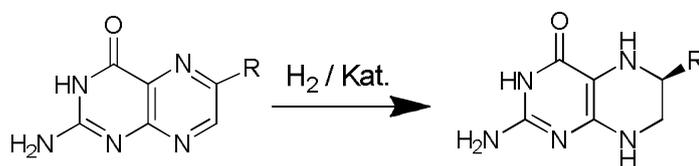


Abbildung 25: Reduktion der Pteridineinheit der Folsäure zur Tetrahydrofolsäure.

In dieser Arbeit sollten daher die Methoden zur Untersuchung und Quantifizierung der enantiofacialen Diskriminierung entwickelt und zahlreiche Wirt-Gast-Systeme hinsichtlich dieses Effektes untersucht werden.

3 Ergebnisse

3.1 Enantiofaciale Differenzierung durch Supramolekulare Rezeptoren

Dieses Kapitel fasst die Ergebnisse aus zwei Publikationen zusammen, welche im Anhang als Original beigelegt sind.

M.C. Schopohl, C. Siering, O. Kataeva, S.R. Waldvogel, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2724–2727.

C. Siering, S. Grimme, S.R. Waldvogel, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1877–1888.

Die bislang vorgestellten Konzepte zur enantiofacialen Differenzierung durch supramolekulare Systeme sind auf meist exponierte und kleine Baugruppen fokussiert. Gänzlich planare und prochirale Moleküle wie Koffein müssen dagegen als Ganzes abgetastet werden. Die Unterscheidung der beiden Seiten der Moleküle kann somit auch lediglich in der Molekülebene geschehen.

Das Konzept lässt sich mit einer Mulde in Form einer Hand erklären (Abbildung 26). Liegt der Daumen in der Mulde links, lässt sich die rechte Hand mit der Fläche hineinlegen. In die spiegelverkehrte Form passt die rechte Hand nur mit Handrücken voraus. Die Unterscheidung gelingt also durch die rein mechanische Analyse der Abfolge der Finger. Dies gilt natürlich nur, sofern zumindest bekannt ist, welche Hand genutzt wird. Für die linke Hand ist die Zuordnung umgekehrt.

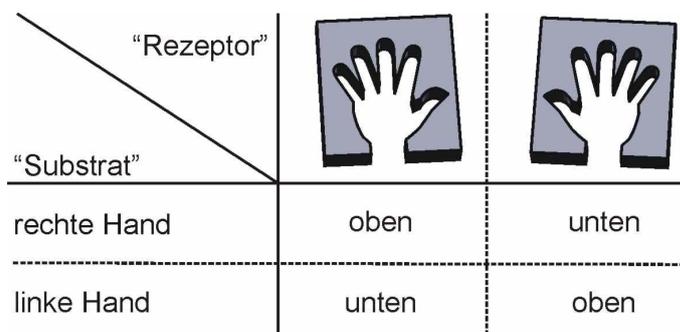


Abbildung 26: Schematisches Konzept zur enantiofacialen Differenzierung mittels eines einseitig offenen Rezeptors.

Die supramolekulare enantiofaciale Differenzierung soll an Koffein und verwandten Verbindungen aus der Gruppe der Oxopurine untersucht werden. Diese lagern sich wie schon gezeigt im Koffeinrezeptor coplanar zur Triphenylen-Ebene ein und werden an drei Positionen *via* Wasserstoffbrücken fixiert. Um eine passende „Mulde“ für diese Substrate zu bilden, soll der sterische Anspruch in direkter Umgebung der Bindungsstellen asymmetrisch werden.

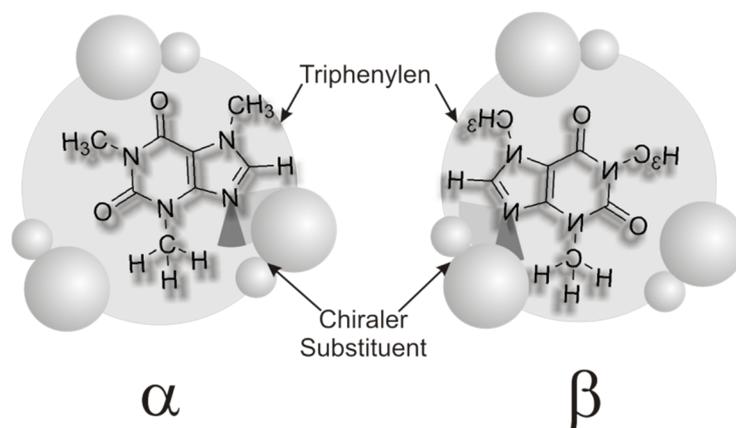


Abbildung 27: Konzept zur enantiofacialen Differenzierung an Oxopurinen mittels C₃-symmetrischen Rezeptoren. Die Kugeln repräsentieren den Raumanpruch der Substituenten.

Insbesondere die Methylsubstituenten der Oxopurine dürften mit diesen raumgreifenden Gruppen eine repulsive Wechselwirkung erfahren. Ziel ist, diese so zu gestalten, dass eine der beiden Formen deutlich bevorzugt wird.

Zur Benennung der diastereomeren Komplexe wird die Nomenklatur von *Rose* aufgegriffen.^[55] Hierzu werden zunächst die Oxopurine systematisch nach IUPAC nummeriert. Folgen die aufsteigenden Indizes im Pyrimidin-Teil dem Uhrzeigersinn schaut man auf die α -Seite. Die diastereomeren Komplexe werden mit jeweils der Seite des Gastes bezeichnet, der zum Triphenylen weist. (Abbildung 27)

Die Einführung der chiralen Information mit sterischem Anspruch erfolgte mittels einfacher α -chiraler Isocyanate und lieferte **4** und **5** (Abbildung 28). (Die Synthese der in dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren wurde von *Dr. Matthias Schopohl* durchgeführt.)

Der hochdynamische Austausch im Komplex konnte erst in Tieftemperatur-NMR-Experimenten so verlangsamt werden, dass die Detektion von zwei Spezies möglich ist. Für die Analyse der Bindungssituation lassen sich gut die distalen Harnstoff-Protonen nutzen, da diese im Bereich von 5.5-6.5 ppm gut isoliert liegen und direkt in die Bindung involviert sind. Für Rezeptor **5** wurden bei 183 K zwei Sätze à drei Signalen gefunden. Diese werden den zwei diastereomeren Komplexen und den drei verschiedenen Bindungsstellen am Koffein zugeordnet. Eine bevorzugte Spezies bildet sich nicht. Es liegt nahe, dass die Phenylgruppe sich aus dem Innenraum „wegdreht“. Für **4** wurde hingegen ein Verhältnis von 3:1 bei 183 K ermittelt.

Die absolute Konfiguration der Einlagerung sollte mittels CD-Spektroskopie untersucht werden. Die Positionierung des Gastes auf dem Triphenylen mit einer „Vorzugsseite“ sollte den Triphenylenchromophor so stören, dass es zur Ausbildung eines Cotton-Effektes kommt.

5 hat wegen der drei Phenylsubstituenten schon einen intrinsischen CD und zeigt erhebliche Signalverschiebungen nach Zugabe von Koffein. Allerdings ist die Trennung von intrinsischem und induziertem Signal ohne weitere Informationen von Vergleichsverbindungen nicht möglich. **4** lieferte extrem schwache Signale, die ebenfalls nur für erste Annahmen geeignet waren.

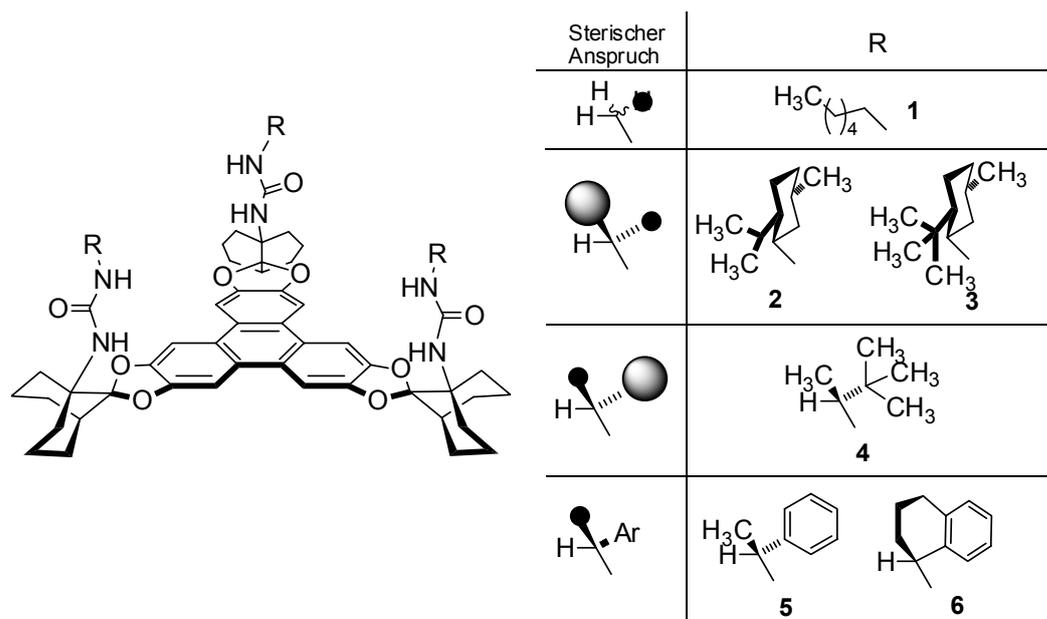


Abbildung 28: Untersuchte Rezeptoren auf Triphenylenketal-Basis

Um den Einfluss der Struktur der Gäste auf die enantiofaciale Differenzierung zu untersuchen, wurde eine kleine Bibliothek zusammengestellt (Abbildung 29). Diese lassen sich anhand des Platzbedarf in der Nähe der H-Brückenakzeptoren zu klassifizieren. Wenn dieser Platzbedarf nicht symmetrisch ist, wird dieser als Gradient zum größeren Freiraum hin dargestellt. Dieser Drehsinn ist bei einigen Gästen identisch mit dem der Nummerierung, bei anderen entgegengesetzt. In der Analogie zur Hand: Die vom Drehsinn der Nummerierung abgeleitete α/β -Nomenklatur wäre das Äquivalent zur Bezeichnung Handrücken/Handfläche. Der vorgeschlagene sterische Gradient entspräche dann dem Drehsinn beim Gang vom Daumen zu den anderen Fingern.

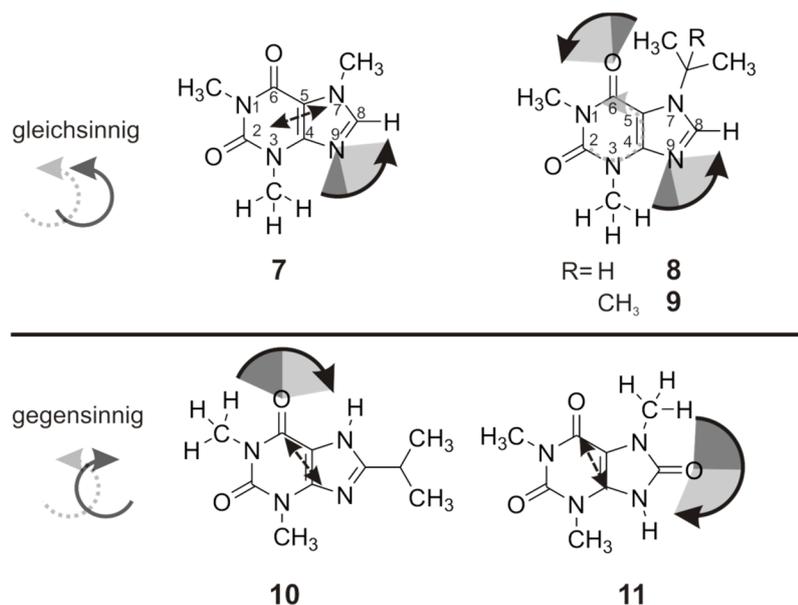


Abbildung 29: Untersuchte Gäste. Die Bindungsstellen mit unsymmetrischer Umgebung wurden mit einem Pfeil versehen, welcher in Richtung des größeren Platzbedarfs weist.

Im Rahmen der Dissertation wurde die Bibliothek um die Rezeptoren **2** und **3** ergänzt (Abbildung 28). Auch die Rezeptoren lassen sich in vier Kategorien hinsichtlich des Platzbedarfs der Kopfgruppen in ihrer Vorzugskonformation am Rezeptor einteilen. Während der größte Substituent in der gewählten Darstellung bei den Menthyl-Derivaten aus der Papierebene herausragt, liegt er bei Rezeptor **4** hinter der Ebene. Diese Inversion im Platzbedarf sollte auch hinsichtlich der Vorzugsorientierung des Gastes nachweisbar sein.

Bei den neu hinzugefügten Menthyl-Derivaten sollte die enantiofaciale Differenzierung noch einmal deutlich zunehmen, da der Cyclohexylrest auch die Bewegung der angehängten Substituenten einschränkt. Insbesondere der Isopropylrest sollte nach Modelling-Studien den Innenraum des Rezeptors besonders gut erreichen.

Die Ermittlung der Diastereomeren-Verhältnisse in Lösung erfolgte wieder mittels NMR. Dies war jedoch anhand der der Amid-Protonen nicht mehr möglich, da hier zu viele Prozesse zu einer Linienverbreiterung führten und somit die Analyse verhinderten. Auch die Signale der Methylgruppen entzogen sich wegen Signalüberlagerungen der Analyse. Somit blieb das Imidazol-Proton des Koffeins als „Sonde“.

Da es auch hier bei tiefer Temperatur zur Überlagerung mit Signalen aus dem Triphenylen kam, musste die Zuordnung „über Umwege“ durchgeführt werden. Durch Reduktion von 8-Bromkoffein mit NaBD₄ wurde [8D]-Koffein hergestellt. Durch den Vergleich der Spektren der natürlichen und der deuterierten Verbindung im Komplex ließen sich im Fall des Rezeptors **2** die zugehörigen Signale identifizieren und das Diastereomerenverhältnis bestimmen (Abbildung 30). Dabei zeigte sich, dass die Differenzierung nur unmerklich besser ist als für **4** (ca. 3:1 bei 190 K). In Kristallstrukturen, die *Schopohl* erhielt, findet sich ein α : β -Verhältnis von ca. 60:40. In dieser Struktur drehen sich die Isopropylgruppen des Menthylsubstituenten so, dass das Proton in das Rezeptorinnere weist.

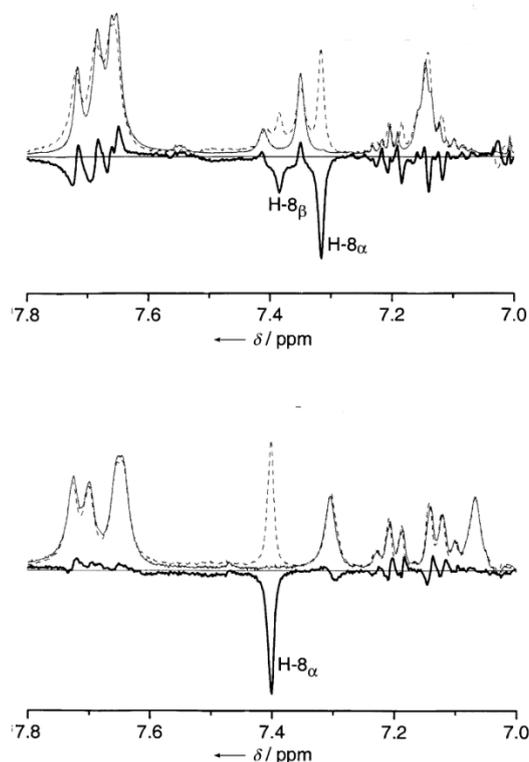


Abbildung 30: Tieftemperatur-NMR-Spektren der menthyl-abgeleiteten Rezeptoren mit Koffein (gestrichelt) und [8D]-Koffein (durchgezogen, dünn) sowie Differenz der Spektren (fett). (oben **2**, unten **3**) mit Koffein und [8D]-Koffein und deren Differenz. Die stereochemische Zuordnung erfolgte zunächst anhand von Analogieschlüssen aus Kristallstrukturen

Diese Möglichkeit besteht bei **3** nicht mehr. Folgerichtig verbessert sich die enantiofaciale Differenzierung: Per NMR ist lediglich eine Spezies nachweisbar. Angesichts der Auflösung der Methode kann das Verhältnis mit $>9:1$ angegeben werden. Konsistent wurden auch in der Kristallstruktur lediglich ein Diastereomer gefunden.

Tabelle 1: Mittels Tieftemperatur- ^1H -Spektroskopie ($-90\text{ }^\circ\text{C}$) erhaltene Werte für die enantiofaciale Differenzierung an Koffein in Lösung. Die stereochemische Zuordnung erfolgte anhand von Analogieschlüssen zur Kristallstrukturen.

Rezeptor	$\alpha:\beta$
5	1:1
4	1:3
2	3:1
3	$>9:1$

Die stereochemische Zuordnung der Komplexe anhand von Kristallstrukturen ist zwar plausibel, aber zur Beschreibung der Situation in Lösung nicht belastbar. Daher wurden die Komplexe *via* CD-Spektroskopie untersucht.

Alle aliphatisch substituierten Rezeptoren zeigen keinen Cotton-Effekt im unbelegten Zustand. Dies ist auf die räumliche Distanz von chiraler Information und Chromophor zurückzuführen. Bei Zugabe der Gäste werden wieder extrem schwache CD-Effekte gemessen ($\Delta A < 10^{-5}$), welche sich nur durch extrem lange Messzeiten überhaupt vom Hintergrundrauschen trennen lassen.

Die Koffeinkomplexe der aliphatisch substituierten Systeme weisen Vorzeichenwechsel bei 260 und 295 nm auf (Abbildung 31). Der Vorzeichenverlauf des Rezeptors **4** ist genau umgekehrt wie bei den Menthyl-abgeleiteten Systemen. Außerdem ist das Signal bei letztgenannten größer.

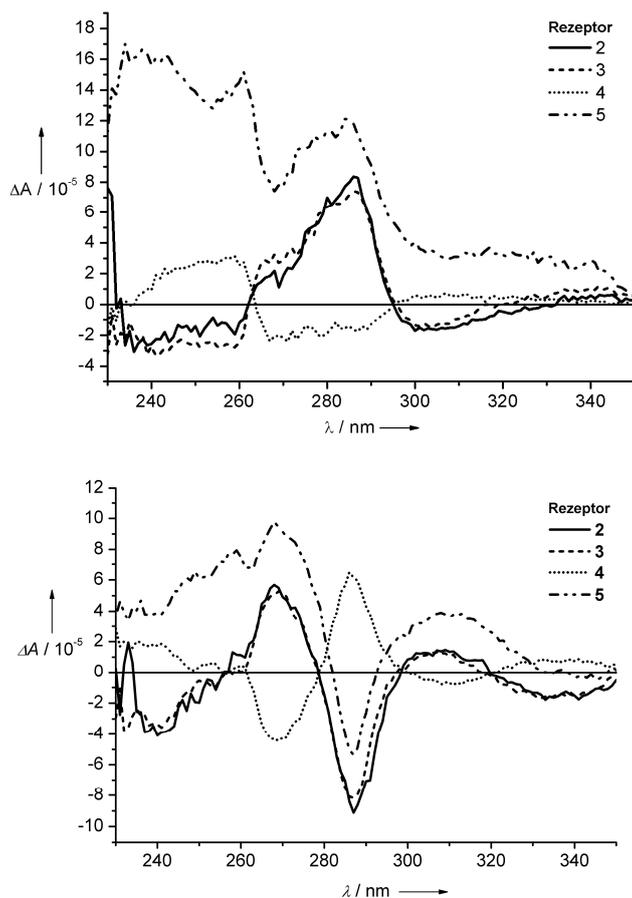


Abbildung 31: CD-Spektren der Rezeptoren mit Koffein (**7**)(oben) sowie mit 1,3,7-Trimethylharnsäure (**11**) (unten).

Um auszuschließen, dass die abweichende Signalintensität auf eine schwächere Affinität zurückzuführen ist, wurden mittels Titrations die Bindungskonstanten für alle Rezeptoren ermittelt. Diese liegen durchweg im Bereich von $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Das schwächere Signal von Rezeptor **4** ist somit einer schlechten α : β -Selektivität zuzuschreiben, da hierdurch der größte Teil des Signals kompensiert wird.

Eine besondere Rolle kommt 1,3,7-Trimethylharnsäure (**11**) zu. Diese Substanz ist in Dichlormethan nahezu unlöslich, geht aber in Anwesenheit von Rezeptoren sofort in Lösung. Der Komplex zeigt eine andere Signalform im CD, der auch den geänderten elektronischen Verhältnissen geschuldet sein könnte. Trotz der größeren Verdünnung kann auch hier noch keine Bindungskonstante zuverlässig bestimmt werden. Sie wird auf $>10^7 \text{ M}^{-1}$ abgeschätzt.

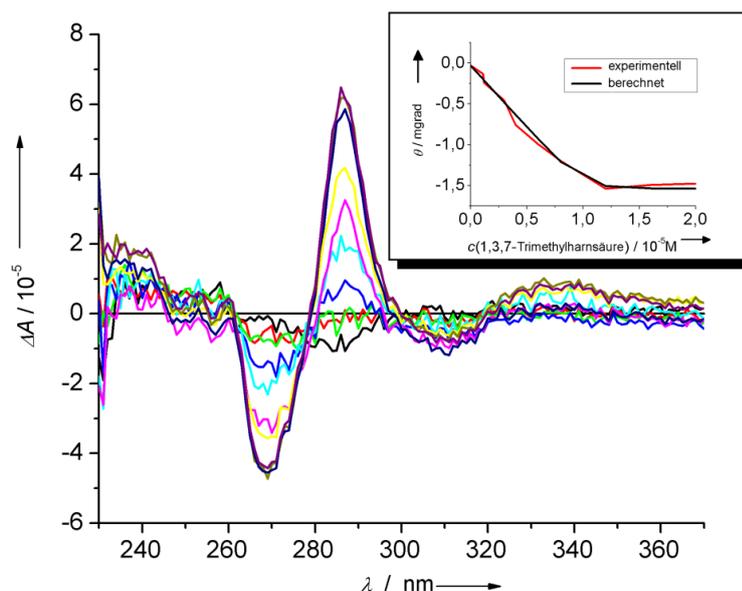


Abbildung 32: Titration von Rezeptor 4 mit 1,3,7-Trimethylharnsäure

Als diagnostisch signifikant wird das CD-Vorzeichen bei 283 nm erkannt. Wie in Abbildung 33 gezeigt, führt Umkehr des sterischen Anspruchs am Rezeptor wie auch Wechsel der Gästeklasse nach o.g. Kriterien zu einem Vorzeichenwechsel.

		Rezeptor			
					
Gast		4	2 3		
gleichsinnig		7	–	+	+
		8	–	+	
		9	+	+	
gegensinnig		10	+	–	
		11	+	–	–

Abbildung 33: Vorzeichen des CD bei 283 nm bei verschiedenen Wirt-Gast-Kombinationen

Obwohl mittels der CD-Spektroskopie somit eine gute Klassifikation der Wirt-Gast-Wechselwirkung möglich ist, besteht keine Möglichkeit, ohne Verwendung weiterer Informationen die absolute Konfiguration des Komplexes zu bestimmen. Die für kovalent-chirale Verbindungen übliche Zuordnung über den Vergleich mit strukturell verwandten, konfigurationsbekannten Substanzen war nicht möglich. Daher wurde auf die Simulation von Spektren zurückgegriffen.

Die Größe des Systems machte Strukturoptimierungen mittels quantenmechanischer Methoden sehr zeitaufwändig. Es zeigte sich, dass die Minima sehr flach und die günstigste Struktur nicht gut definiert ist. Außerdem wurde gefunden, dass die Lage des Koffeins über dem Triphenylen

einen direkten Einfluss auf den berechneten CD bei 290 nm hat: Bei Drehung in der Ebene oberhalb des Rückgrats liefert der α -Komplex nur in drei Bereichen von je 80° einen positiven Wert. Festkörperstrukturen legen nahe, dass der Winkel im Komplex nahe an den Enden diese Bereiche liegt. Die Spektrenbetrachtung anhand eines einzelnen, falsch gefundenes Minimums hätte somit deutliche Folgen für die Interpretation.

Daher wurde auf eine molekulardynamische Simulation mittels Kraftfeldmethoden zurückgegriffen. Hierfür musste zunächst das Kraftfeld hinsichtlich der Beschreibung des Triphenylens optimiert werden, da diese Baugruppe anhand der verfügbaren Parameter nicht korrekt beschrieben wurde. Danach wurde die eigentliche Simulation mittels eines *Monte Carlo/Stochastic Dynamics* Algorithmus durchgeführt. Diese Methode hat den Vorteil, dass ein größerer Konformationsraum im Rahmen der Simulation untersucht werden kann, da verhindert wird, dass sich der Komplex in einer Potentialmulde „verfängt“. Der jeweilige Komplex wurde in der α - bzw. β -Konfiguration vorgegeben und für die thermische Equilibrierung (für alle Simulationen wurde $T=298$ K vorgegeben) durch Fixierung der Wasserstoffbrücken vorbereitet. Nach Abschluss der Equilibrierung wurden dann die Abstandsvorgaben entfernt und die eigentliche Simulation durchgeführt. Nachdem sichergestellt war, dass die Simulation plausible und konvergierende Ergebnisse lieferte, wurden Trajektorien jeweils mehr als 200 Strukturen extrahiert. Für jede der Strukturen wurde mittels des semi-empirischen TD-PPP-Verfahrens das UV- und CD-Spektrum berechnet. Da dieses Verfahren Linienspektren liefert, wurden die Einzelspektren einer Linienverbreiterung mittels Gauß-Kurven unterzogen und danach gemittelt.

Die erhaltenen Spektren (sowohl UV wie auch CD) sind in guter Übereinstimmung mit den gemessenen Werten. Bei allen Spektren findet sich ein Nulldurchgang bei ca. 265 nm, sowie ein Bereich mit einem klar definierten Vorzeichen von dort bis ca. 320 nm. (Abbildung 34)

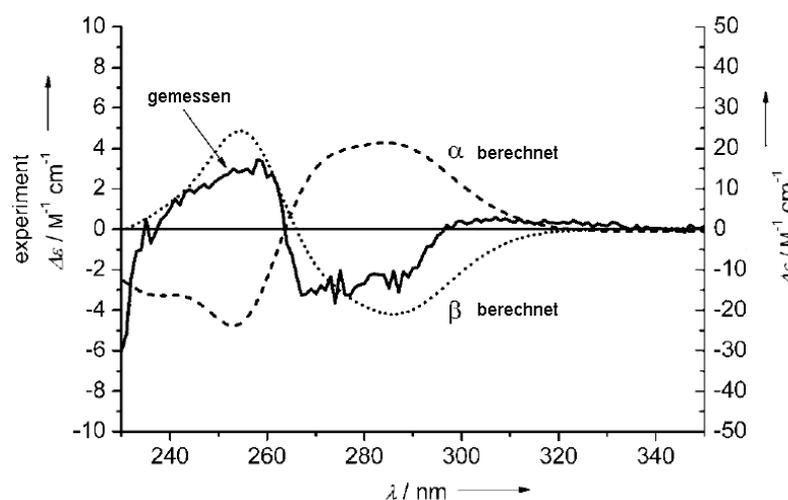


Abbildung 34: Berechnetes und erhaltenes Spektrum für Rezeptor **4** mit Koffein.

Die zur x-Achse spiegelsymmetrischen Spektren für die diastereomeren α/β -Komplexe erwecken den Anschein, dass ein Enantiomerenpaar vorliegt. Betrachtet man lediglich die Gast-

Triphenylen-Anordnung und ignoriert somit die chiralen Substituenten, trifft dies in den Simulationen auch weitgehend zu.

Bei **5** gilt dies nicht mehr, da auch die Phenylsubstituenten zum CD beitragen. Die Simulation erfasst diesen Umstand korrekt und liefert Spektren ohne Symmetrie zur x-Achse. Da im NMR keine Diskriminierung gefunden wurde, wurde eine 50:50-Mischung der simulierten Spektren berechnet. Diese liefert in guter Übereinstimmung mit dem Experiment durchweg positive CD-Signale im Bereich von 240 – 290 nm.

Nach quantitativer Abschätzung der systematischen Fehler in der Berechnung der Intensitäten konnte sogar gezeigt werden, dass gemessenen CD-Signalintensitäten mit der per NMR bestimmten enantiofacialen Diskriminierung korrelieren.

Für das System Oxopurin-Triphenylen konnte somit ein konsistentes Verfahren für die Bestimmung der absoluten Stereochemie in Lösung erhalten werden. Daneben wurde erstmals ein optisches Verfahren für die Bestimmung der Bindungskonstanten zu verschiedenen Gästen genutzt.

Durch Kombination von NMR-Methoden, CD-Spektroskopie und theoretischen Methoden konnte somit ein schlüssiges Bild zur enantiofacialen Differenzierung von Heteroaromaten entwickelt werden, welches auch in gutem Einklang mit röntgenkristallographischen Daten ist.

Insbesondere die CD-Spektroskopie lieferte hinsichtlich der Verwendung von Rezeptoren auf Triphenylenketalbasis als enantiofacial differenzierende, reversible „Schutzgruppen“ hilfreiche Informationen, da sie in Lösung und bei Raumtemperatur durchführbar ist.

Da die Entwicklung neuartiger chiral modifizierter Systeme auf Triphenylenketalbasis weiter voranschreitet, wird diese Methode für die Bewertung und Untersuchung zukünftiger Rezeptoren von großer Bedeutung sein.

3.2 Spektroskopische Verfahren zur Bestimmung von Affinitäten und zur Entwicklung einer schnellen Koffein-Analytik

Ein Nebenergebnis der Untersuchung chiraler Rezeptoren *via* CD-Spektroskopie ist die bislang erste Bestimmung von Bindungskonstanten durch eine optische Methode. Dies hat im Vergleich zu den bislang verwendeten NMR-Messungen erhebliche Einsparungen an benötigter Substanz zur Folge, da NMR wegen der schlechteren Sensitivität deutlich höhere Gesamtkonzentrationen an Rezeptor benötigt.^F Dies hat bei hochaffinen Systemen den weiteren Vorteil, dass im Lauf der Titration auch die ungebundenen Spezies vermehrt vorliegen. Beides begünstigt die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten.

Trotzdem birgt diese Technik Nachteile: Zum einen ist sie auf den Einsatz chiraler Rezeptoren und prochiraler Gäste beschränkt, zum anderen ist die Aufnahme eines CD-Spektrums zeitintensiv und bedingt durch die Anschaffungskosten des komplexen Spektrophotometers teuer.

Im Folgenden werden daher nun zwei Ansätze vorgestellt, die mittels Transmission bzw. Fluoreszenz im UV/Vis-Bereich die Bindung detektierbar machen. Im ersten Schritt ist zunächst die Untersuchung der Bindungskonstanten für die Diskussion der chemischen Grundlagen von Bedeutung. In einem zweiten Schritt sollen die Verfahren auch auf ihre Eignung zur Bestimmung von Koffein in natürlichen Proben untersucht werden.

3.2.1 Bindungsstudien im UV-Vis-Bereich

Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse wurden bislang nicht veröffentlicht, sind aber für die weiteren Schritte von Belang. Weiterhin wurde auf Basis dieser Arbeiten ein TNT-Sensor entwickelt.^[56]

Die Bindung von Koffein führt zur Ausbildung einer schwach gelben Färbung und einer Absorptionsbande im Bereich von 560 nm. Hierbei handelt es sich um eine *charge transfer*-Bande, bei der die Anregung zur Übertragung eines Elektrons vom elektronenreichen Triphenylen zum elektronenarmen Koffein führt.

Dieser Effekt ist für eine analytische Verwendung zu schwach. Analog zu dem von *Anslyn* mehrfach beschriebenen Indikator-Verdrängungs-Assay^[18,23] sollte nun ein kompetitiver Gast eingesetzt werden, der selbst einen stärker gefärbten *charge transfer*-Komplex liefert.

^F Typischerweise wurden 20 mg Rezeptor für NMR-Messungen eingesetzt. Eine CD-Titration, obwohl als *Batch*-Titration durchgeführt, verbraucht weniger als 0.5 mg Rezeptor.



Abbildung 35: Konzept zum kompetitiven Nachweis von Koffein im sichtbaren Bereich. Der Komplex mit Koffeinderivaten ist transparent, dagegen absorbiert der Komplex mit dem Konkurrenzgast.

Da das Triphenylen sehr elektronenreich ist, wurde als Konkurrenzgast ein möglichst elektronenarmer π -Akzeptor gewählt. Zu bevorzugen sind Substanzen, die auch strukturelle Eigenschaften des Koffeins, insbesondere Planarität, Wasserstoffbrücken-Akzeptoren und ggf. sogar *pseudo*- C_3 -Symmetrie aufweisen. Besonders gut werden diese Anforderungen von 1,3,5-Trinitrotoluen (**13**) erfüllt, doch auch mehrere andere Substanzen scheinen geeignet für die beschriebene Anwendung (s. Abbildung 36).

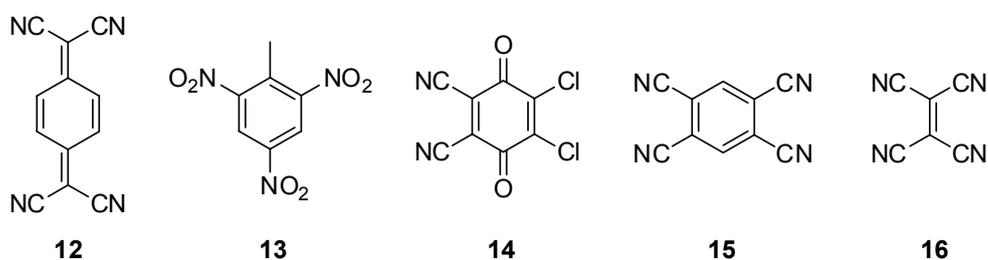


Abbildung 36: Elektronenarme Gäste, die zur Ausbildung von *charge transfer*-Komplexen eingesetzt wurden.

Ein Kristallisationsansatz mit TNT (**13**) lieferte dunkelrote, nahezu schwarze Kristalle. Die starke Färbung spricht für eine sehr ausgeprägte Charge-Transfer-Wechselwirkung. Bei Auflösung der Kristalle in Dichlormethan kommt es zur Entfärbung. Selbst bei einer Konzentration von jeweils 0.5 mM Rezeptor **1** und TNT (**13**) wurde keine ausgeprägte Färbung ermittelt. Dies deutete eine vergleichsweise schwache Bindungskonstante für TNT an. Aus diesem Grund wurde TNT im Rahmen dieser Arbeit als chromogener kompetitiver Gast nicht weiter behandelt.

Auch das Chinodimethan **12** schied schon im Vorversuch aus, da die Substanz eine intensive Eigenfärbung aufweist, die sich bei Zugabe des Rezeptors nicht ändert. Daher wurde das Augenmerk auf die beiden Gäste **15** und **16** gerichtet. Das letztgenannte führt zu einer signifikanten Absorption bei 505 nm und einer extrem breiten Bande oberhalb von 650 nm. Die *charge transfer*-Bande des Komplexes von **15** liegt bei 550 nm. Diese Absorptionen führen zu deutlich sichtbar gefärbten Lösungen.

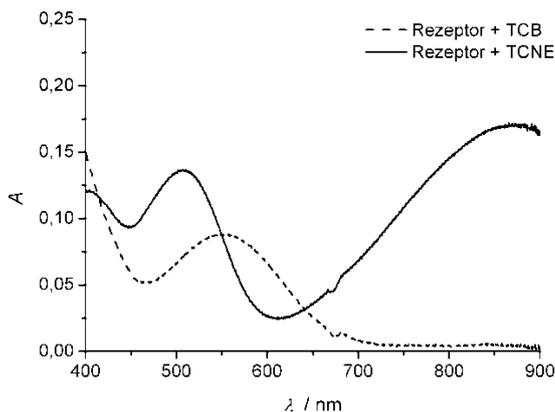


Abbildung 37: UV-Spektren von äquimolaren Gemischen von Rezeptor **1** und TCB (**15**, —) bzw. TCNE (**16**, - -). $c(\text{Rezeptor}) = c(\text{Gast}) = 0.5 \text{ mM}$.

Wenngleich mit dem Auge schon gut zu erkennen, könnte die Färbung noch deutlich intensiver sein. Aus diesem Grund sollten für die Titrations zur Bestimmung der Bindungskonstanten nochmals deutlich konzentriertere ($> 10 \text{ mM}$) Lösungen eingesetzt werden. Diese können aufgrund schlechter Löslichkeit von **15** in Dichlormethan nicht hergestellt werden, so dass auch **15** für die weiteren Untersuchungen ausschied.

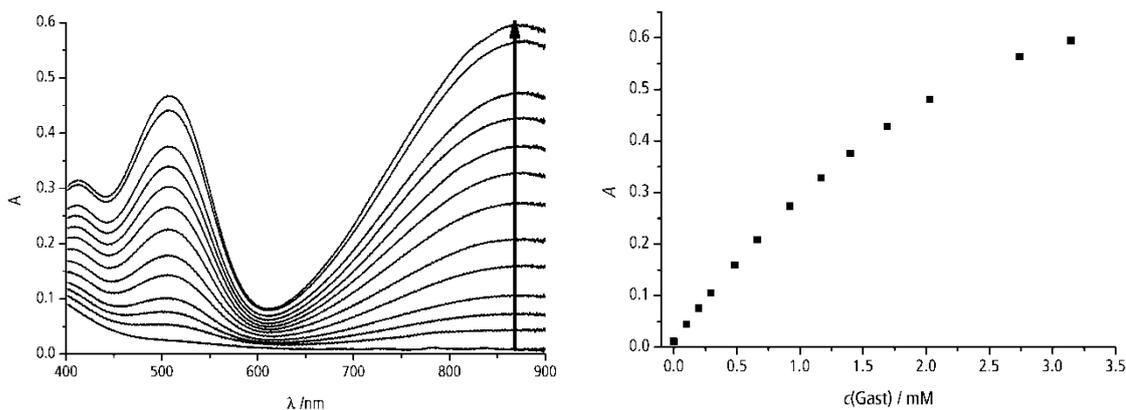


Abbildung 38: Titration von Rezeptor **1** mit **16**. $c(\text{Rezeptor}) = 1.01 \text{ mM}$, $c_{\text{Titer}}(\text{Gast}) = 10 \text{ mM}$.

Abbildung 38 zeigt den Signalzuwachs bei 500 bzw. 850 nm in einer Titration von Rezeptor **1** mit Tetracyanoethylen (**16**). Solche Lösungen zeichnen sich durch eine deutliche Rotfärbung aus.

Die Eigenvektoranalyse dieser Titration zeigt die Existenz von zwei linear unabhängigen Komponenten im System. Dabei handelt es sich wohl um den unbesetzten Rezeptor und den Komplex.⁶ Unter diesen Annahmen ergibt sich eine Bindungskonstante von $K_{\text{Ass}} = 100 \text{ M}^{-1}$. Dieser Wert ist im Vergleich zu Koffein ($K_{\text{Ass}} = 36500 \text{ M}^{-1}$) extrem klein. Die Ursache dürfte in der geringen lateralen Ausdehnung des Gastes liegen. **16** ist nicht mehr in der Lage, alle drei Arme des Gastes gleichzeitig zu erreichen. Außerdem sind Cyano-Gruppen als Wasserstoffbrückenakzeptoren deutlich schlechter geeignet als amidische Carbonyleinheiten.^[57]

⁶ **16** ist in dem hier untersuchten Wellenlängenbereich völlig transparent, wie durch eine Untersuchung einer 10 mM Lösung von **16** bestätigt wurde (o. Abb.).

Der Komplexstabilität zuträglich dürfte der ausgeprägtere *charge transfer*-Charakter der Wechselwirkung sein. Allerdings wird diesen Wechselwirkungen in der Literatur nur eine untergeordnete Rolle beigemessen.^[58]

Um die Eignung für einen kompetitiven Nachweis zu prüfen, wurde der Rezeptor mit 20 Äquivalenten **16** versetzt und dann mit einer Koffeinelösung titriert (Abbildung 39).

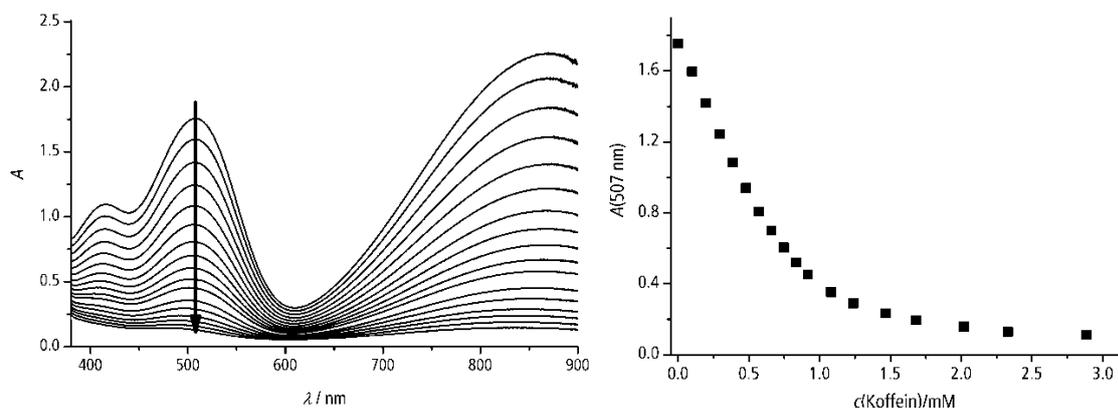


Abbildung 39: Kompetitive Titration von Rezeptor **1** und **16** mit Koffein; $c(\text{Rezeptor})=1.01 \text{ mM}$, $c(\mathbf{16})=20.0 \text{ mM}$, $c(\text{Koffein})=0.01 \text{ M}$.

Es zeigt sich ein deutlicher Rückgang in allen Signalbereichen. Der „Knick“ in der Kurve bei einer Konzentration von ca. 1 mM weist auf den Äquivalenzpunkt hin. Angesichts der schon mittels anderer Methoden bestimmten Bindungskonstanten und der hier angesetzten hohen Konzentrationen ist davon auszugehen, dass der vorliegende Rezeptor nahezu vollständig in den Koffeinkomplex überführt wird. Legt man die zuvor bestimmte Assoziationskonstante für **16** zugrunde, so wird diese Interpretation auch von der Eigenvektor-Analyse der Titrationsergebnisse bestätigt. Bei den beschriebenen Bedingungen liegt zu Beginn der Titration der Rezeptor zu fast 70% als TCNE-Komplex und ca. 30% in der freien Form vor. Nach Zugabe von 1 Äquivalent des Gastes sind diese beiden Spezies nur noch mit 11 bzw. 6% präsent, während nun der Koffein-Komplex mit über 80% dominiert. Anhand der gleichen Analyse lässt sich auch eine Assoziationskonstante für Koffein von $40\,000 \pm 5000 \text{ M}^{-1}$ ermitteln.^H Dieser Wert stimmt gut mit den aus den NMR-Titrations erhaltenen Werten überein und liefert somit ein stimmiges Ergebnis.

Auch mit bloßem Auge lässt sich die Entfärbung des *charge transfer*-Komplexes gut verfolgen (Abbildung 40). Von der roten Farbe des **16**-Komplexes kommt man bei Zugabe von Koffein zur leicht gelblichen Eigenfärbung von Rezeptor und **16**.

^H Diese Titration wurde jeweils mit 0.01 bzw. 0.1 M Lösungen von Koffein durchgeführt.

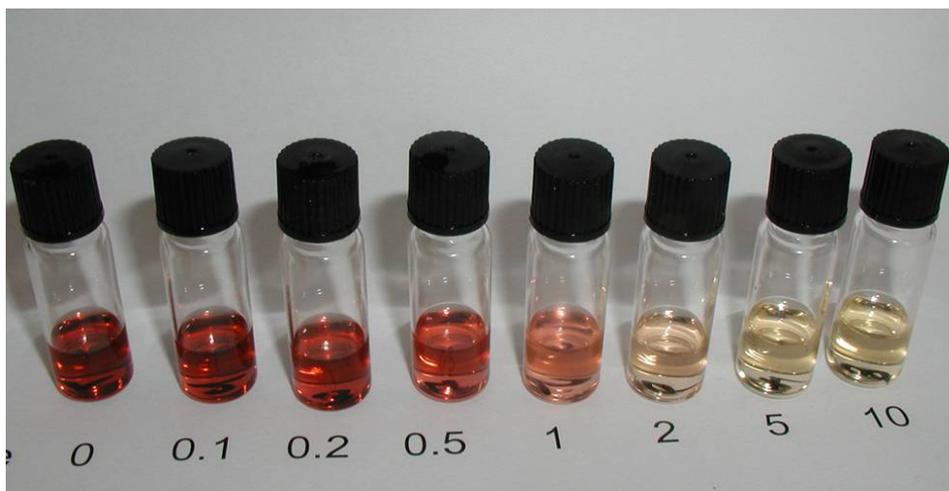
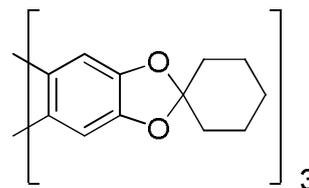


Abbildung 40: Batch-Titration einer Lösung von Rezeptor **1** ($c=11$ mM) und **16** ($c=22$ mM) mit Koffein. Die angegebenen Werte entsprechen den zugesetzten Äquivalenten an Koffein (bezogen auf den Rezeptor).

Die Natur der Wechselwirkung zwischen Rezeptor und TCNE bedurfte noch einer Klärung. Sollte die *charge transfer*-Wechselwirkung maßgeblichen Anteil an der Bindung des Gastes haben, dürfte die Entfernung der Harnstoffeinheiten keinerlei negativen Effekt auf die Farbwirkung haben. Aus diesem Grund wurde in einem Kontrollversuch das nicht-funktionalisierte System (s. rechts) mit Koffein versetzt. Obwohl sowohl Triphenylen als auch der Gast in hohen Konzentrationen von 11 bzw. 22 mM eingesetzt wurden, konnte keine Farbänderung beobachtet werden. Auch die Zugabe von einem Äquivalent Koffein führt zu keinen sichtbaren Effekten. Insofern liegt nahe, dass für die Wechselwirkung von TCNE und Rezeptor durchaus die Harnstoffeinheiten von Bedeutung sind.



Da das Nachweisprinzip auch die Anwendung als Chemosensor nahelegt, wurden daraufhin Kreuzempfindlichkeiten mit typischen Bestandteilen von Kaffeegetränken untersucht. Einige der in Frage kommenden Analyten sind nur in Anwesenheit von Methanol löslich, daher wurde zunächst dessen Einfluss auf den Komplex überprüft.

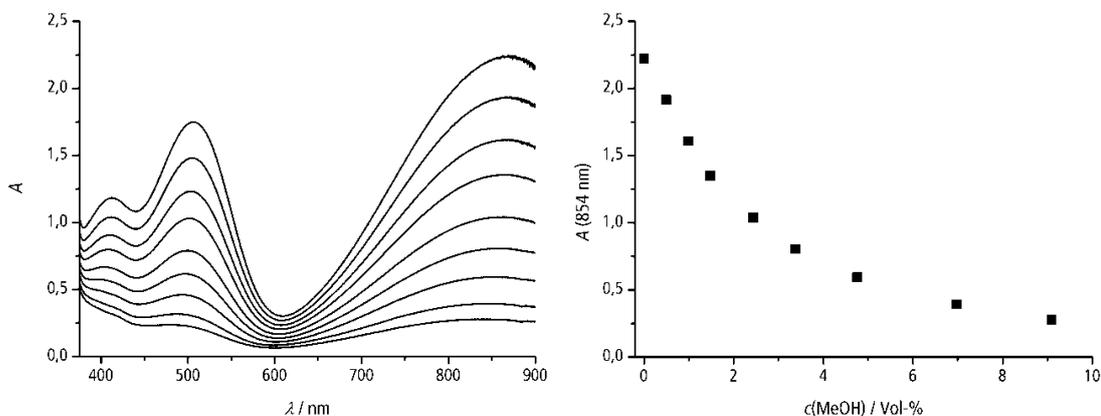


Abbildung 41: Untersuchung von **16•1** auf Empfindlichkeit gegenüber Methanol; $c(\mathbf{16})=20$ mM, $c(\mathbf{1})=1.0$ mM.

Die Zugabe von Methanol führt zu einer deutlichen Signalabnahme (Abbildung 41). Diese ist zum einen auf die Störung der Wasserstoff-Brücken zurückzuführen. Auch eine Aggregation der Rezeptoren und damit verbundene Zerstörung der Komplexe ist denkbar. (s. Kapitel 3.2.3.6) Beim Einsatz von Analyt-Lösungen mit einem gewissen Methanol-Anteil muss also dieser Effekt berücksichtigt werden.

In einem ersten Versuch wurde Chinasäure (s. rechts) als kompetitiver Gast zugesetzt. Diese ist Bestandteil der Chlorogensäuren im Kaffee und wird im Aufbrühvorgang freigesetzt. Chinasäure ist in Dichlormethan oder Dichlormethan/Methanol-Gemischen nicht löslich. Daher wurde sie in MeOH eingesetzt. Wie aus Abbildung 42 ersichtlich, unterscheidet sich der Titrationsverlauf nur unmerklich von den mit reinem Methanol erhaltenen Werten. Der zunächst etwas steilere Signalabfall könnte in der Wirkung der Chinasäure begründet sein, für eine schlüssige Aussage reichen diese Befunde allerdings nicht aus.

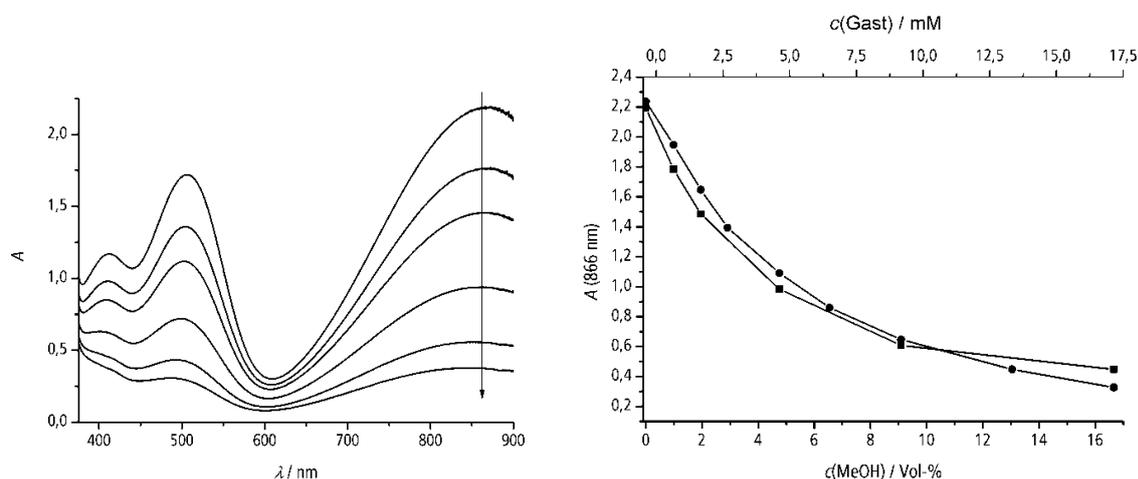
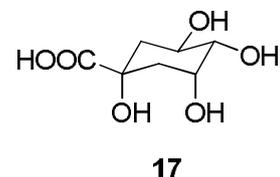
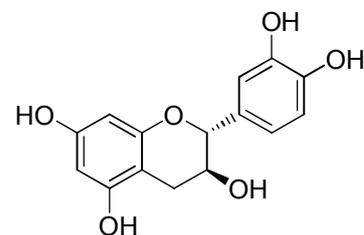


Abbildung 42: Titration von Rezeptor **1** mit Chinasäure (**17**, zugesetzt als methanolische Lösung), als Referenzwert sind die Daten für die Zugabe von reinem Methanol angegeben (■); $c(\mathbf{17}) = 100 \text{ mM}$, $c(\mathbf{1}) = 1 \text{ mM}$, $c(\mathbf{16}) = 20 \text{ m}$.

Catechin (s. rechts) löst sich in einem Gemisch aus Dichlormethan und Methanol (4:1). Diese sehr elektronenreiche Substanz erweist sich allerdings als instabil gegenüber TCNE, was sofort nach der Catechinzugabe zu einer Trübung des TCNE–Rezeptorgemisches führt.



Dieser Versuch zeigt zugleich das Kernproblem des Farbnachweises auf der Basis von *charge transfer*-Komplexen: Zum einen sollten die kompetitiven Gäste möglichst elektronenarm sein, um einen stabilen und intensiv gefärbten Komplex zu bilden, zum anderen dürfen sie nicht mit Substrat oder dem Rezeptor reagieren.

So führten Versuche mit DDQ (**14**) zu einer spontanen Grünfärbung die Lösung, welche auf die Oxidation des Triphenylens zum Radikalkation zurückgeführt wird. Diese ist auch aus der Elektrosynthese der Triphenylene bekannt. Auch Koffein reagiert direkt mit DDQ.

Trotz der vielversprechenden erste Ansätze zum kolorimetrischen Nachweis von Koffein mittels Rezeptoren auf Triphenylenketal-Basis wurden die Arbeiten an dieser Stelle eingestellt. Insbesondere die schlechte Bindungskonstanten für die kompetitiven Gäste, vor allem aber deren chemische Reaktivität machten diesen Ansatz für weitere Anwendungen uninteressant.

3.2.2 Direkte Koffein-Analytik durch Fluoreszenz

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden veröffentlicht unter C. Siering, B. Beermann, S. R. Waldvogel, *Supramol. Chem.* **2006**, *18*, 23–27.

Das Triphenylen ist ein guter Fluorophor und liefert eine bläuliche Fluoreszenz. Absorptions- und Emissions-Spektrum sind in Abbildung 43 dargestellt.

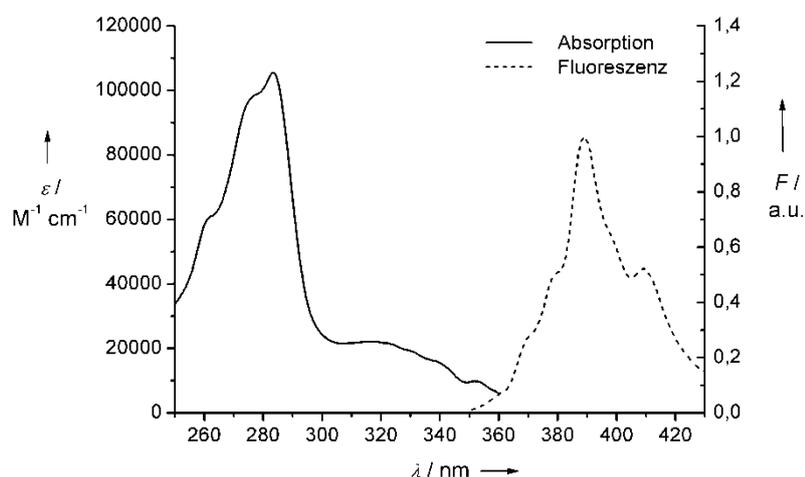


Abbildung 43: Absorptions- und Fluoreszenzspektrum des Rezeptors 1.

Die sehr schwache Absorptionsbande bei 352 nm wird dem symmetrieverbotenen Übergang $S_0 \rightarrow S_1$ zugeordnet.^[59,60] Das S_1 -Niveau ist für die Fluoreszenz von zentraler Bedeutung. Die stabile Lage des Emissionsmaximums (389 nm) bei Veränderungen der Anregungswellenlänge belegt, dass die Fluoreszenz ausschließlich aus diesem Niveau erfolgt.

In natürlichen Proben (z.B. Kaffee) kommen oft Zimtsäurederivate vor, welche bis 315 nm stark absorbieren.^[61] Um diesen Störungen von vornherein aus dem Weg zu gehen, wird das Triphenylen im langwelligsten Übergang, bei 352 nm angeregt.¹

Die schwache Absorption in diesem Bereich birgt zudem noch den Vorteil, dass bei vergleichbaren Konzentrationen (1–50 μM) wie in den vorangegangenen Kapiteln gearbeitet werden kann. Anregung im Absorptionsmaximum würde eine deutliche Verdünnung zwingend erfordern, da ansonsten der *inner filter effect* die Ergebnisse stark verfälscht. Einen Eindruck von diesem Effekt vermittelt eine Konzentrationsreihe im Bereich von 30–50 μM (Abbildung 44). Diese wird durch Verdünnung einer entsprechenden Rezeptorlösung erhalten. Bei einem Verhalten nach *Lambert-Beer* sollte die „molare“ Fluoreszenz F/c (analog $E/c = \epsilon d$) konstant sein. Die Zunahme dieser Größe bei fortschreitender Verdünnung deutet jedoch an, dass trotz Anregung bei 352 nm der *inner filter effect* noch immer zu berücksichtigen ist. Bei einer Verdünnung von 50 μM um 30% gewinnt F/c immerhin 10%. Um diesen Effekt bei den Messungen möglichst gering zu halten, werden bei Titrationsen möglichst kleine Volumina (<10% Vol.) zur Rezeptorlösung zugesetzt und/oder Rezeptorkonzentrationen $\ll 50 \mu\text{M}$ eingesetzt.

¹ In technischen Studien wie der Bestimmung von Bindungskonstanten erfolgte die Anregung in manchen Experimenten bei 330 nm. Dies sollte keinen Einfluss auf die ermittelten Konstanten haben.

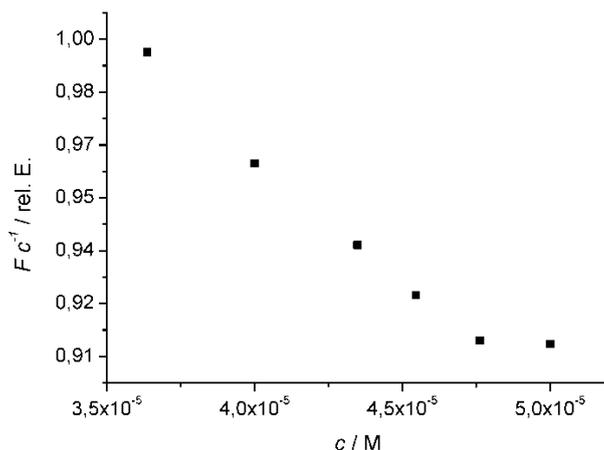


Abbildung 44: Abhängigkeit der „molaren“ Fluoreszenz ($\lambda = 389 \text{ nm}$) von der Konzentration des Rezeptors **1**.

Die Zugabe von Koffein oder 7-Octyltheophyllin (**18**, s. rechts) zu einer Lösung des Rezeptors **1** führt zu signifikanten Veränderungen der Rezeptor-Fluoreszenz (Abbildung 45; links). Zum einen kommt es zu einer leichten Signalzunahme (fast im gesamten Emissionsbereich), zum anderen zu einer bathochromen Verschiebung um ca. 2 nm. Da diese auch im Absorptionsspektrum auftritt, kann als Ursache eine Veränderung des S_1 -Niveaus ermittelt werden. (Abbildung 45; rechts).^J

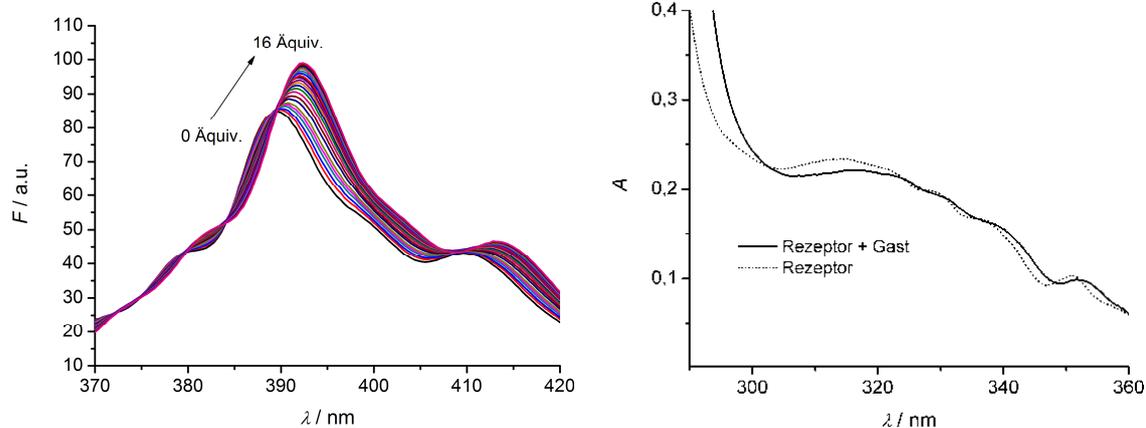
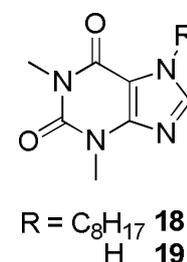


Abbildung 45: links: Signalzuwachs bei der Zugabe von **18** zu Rezeptor **2**. $c_0(\mathbf{2}) = 12.5 \mu\text{M}$, $V_0(\mathbf{2}) = 2.00 \text{ mL}$, $c(\text{Koffein}) = 5.29 \text{ mM}$; rechts: Einfluss der Zugabe von **18** auf das Absorptionsspektrum des Rezeptors am roten Ende des Spektrums. $c(\mathbf{1})=10.0 \mu\text{M}$, $c(\mathbf{18})=75 \mu\text{M}$.

Wegen der Breite der Bande und der höheren Auflösung bei der Intensitätsbestimmung wird für die weiteren Untersuchungen nicht die bathochrome Verschiebung sondern die Fluoreszenzintensität bei 392 nm genutzt.

^J Vergleichbare Effekte wurden schon an 2,3,6,7,10,11-Hexaalkoxytriphenylenen beim Übergang von der Lösung in die kolumnare Mesophase gefunden.^[59,60]

Im verwendeten Versuchsaufbau mit Magnetrührer in der Küvette wurde spätestens 10 s nach Zugabe des Gast-Aliquots Signalstabilität erreicht. Dies entspricht den Ergebnissen aus NMR-spektroskopischen Untersuchungen, die dem System eine hohe Dynamik bescheinigt haben.^[50]

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der Titrations, welche eine gute Übereinstimmung mit den für Koffein verfügbaren Werten aus den anderen Messmethoden (NMR, CD, UV) aufweisen. Bemerkenswert an diesem Ergebnis ist die vergleichbare Affinität für Koffein (**7**) und 7-Octyltheophyllin (**18**). CD-spektroskopisch wurde schon gezeigt, dass verzweigte Substituenten in Position 7 des Oxopurins die Bindungskonstante negativ beeinflussen. Hier wurde nun gezeigt, dass dies nicht für eine lineare Erweiterung des Substituenten an dieser Stelle gilt.

Im Gegensatz zu Theobromin kann von Theophyllin (**19**) zumindest eine geeignete Stammlösung zur Titration (2.6 mM) erhalten werden. Die ermittelte Konstante ist vergleichbar zum Wert für Koffein. Allerdings muss davon ausgegangen werden, dass Theophyllin in Lösung nicht völlig frei, sondern zum Teil noch als Dimer vorliegt. Dies würde zu einer negativen Verfälschung der Bindungskonstante führen.^K

Tabelle 2: Bindungskonstanten ($\log K_{\text{Ass}}$) für verschiedene Rezeptor/Gast-Kombinationen

Gast	Rezeptor	
	1	2
7	4.45 ± 0.05	4.48 ± 0.02
18	4.49 ± 0.02	4.4 ± 0.1
19^a	4.66 ± 0.05	4.44 ± 0.03

Titrationbedingungen: $c(\text{Rezeptor}) = 10 \mu\text{M}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.
^a unter Vernachlässigung von Theophyllin-Aggregaten

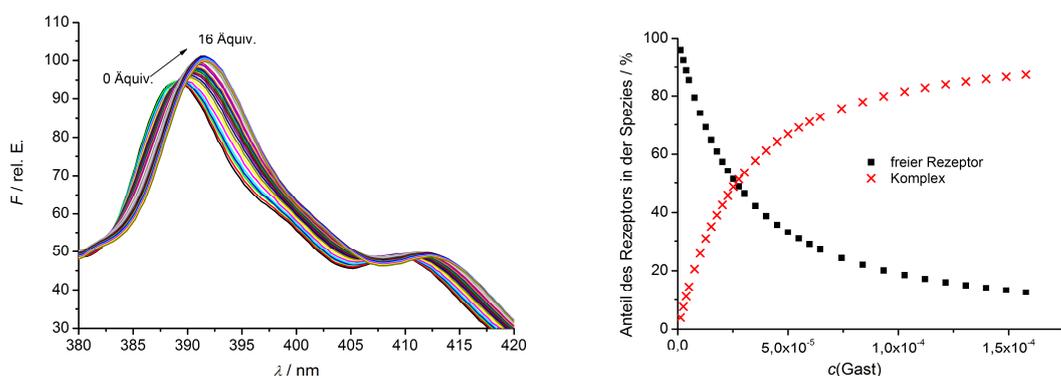


Abbildung 46: Fluoreszenzspektren (links) und Verteilungsdiagramm (rechts) einer Titration von Rezeptor **1** mit Theophyllin (**19**); $c_0(\mathbf{1}) = 10.0 \mu\text{M}$, $c(\mathbf{19}) = 2.55 \text{ mM}$.

Dr. M. Bomkamp zeigte in einem radiometrischen Verteilungsexperiment in Toluol für Koffein eine logarithmische Bindungskonstanten von 5.0 – 5.6. Dieser unerwartet hohe Wert wurde

^K Die Dimerisierung lässt sich fluoreszenzspektroskopisch nicht quantifizieren, da es keine auswertbare Größe gibt. Auch ein NMR-spektroskopischer Ansatz ist wegen der geringen Löslichkeit in Dichlormethan nicht durchführbar.

daher in wasserfreiem Toluol auch fluorimetrisch bestimmt. Für die Rezeptoren **1** und die analoge Verbindung mit Octylketten am Harnstoff wurden Werte von 5.9 erhalten. Der große Unterschied zu den Messungen aus Dichlormethan sind vornehmlich auf solvophobe Effekte zurückzuführen.

Wegen ihrer extrem schlechten Löslichkeit ist zuvor auch schon 1,3,7-Trimethylharnsäure (**11**) aufgefallen. Hinreichend konzentrierte und handhabbare Lösungen lassen sich nur in einem Gemisch von Dichlormethan und Methanol (20% Vol.) erhalten. Die Zugabe einer solchen Lösung zu Rezeptor **1** (im gleichen Lösungsmittelgemisch) führt ebenso wie die anderen Oxopurine zu einer bathochromen Verschiebung des Emissionsmaximums um 2 nm.^L Dabei ergibt sich auch die zuvor beschriebene Signalzunahme um mehr als 30% bezogen auf die Fluoreszenz des unbelegten Rezeptors.^M

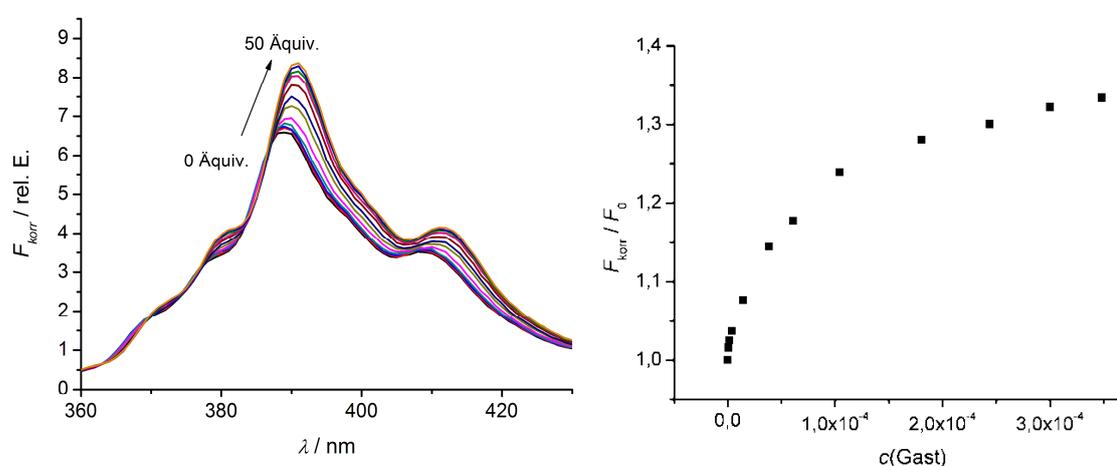


Abbildung 47: Fluoreszenz von Rezeptor **1** bei Zugabe von 1,3,7-Trimethylharnsäure; $c_0(\mathbf{1}) = 10 \mu\text{M}$, $c(\mathbf{1}) = 0.105 \text{ mM}$ bzw. 1.05 mM . In dieser Messung wurden große Volumina der Gastlösung zugesetzt. Daher wird hier in F_{korr} die Verdünnung des Rezeptors um bis zu 30% berücksichtigt.

Wegen der Verwendung eines Lösungsmittelgemisches wurde von der Bestimmung einer Bindungskonstante abgesehen. Trotzdem ist die Bindung des Gastes in Gegenwart von Methanol höchst beachtlich, denn am System **1•7** zeigt Methanol einen starken Effekt: Je höher dessen Anteil in der Lösung, desto geringer sind die Intensität und die bathochrome Verschiebung (Abbildung 48). Bei einem Methanolgehalt von 20% Vol. ergibt sich eine Signalabnahme in F_{korr}/F_0 von 1.30 auf ca. 1.05. Bei vergleichbaren Konzentrationsverhältnissen wird für 1,3,7-Trimethylharnsäure ein Wert von ≈ 1.15 gefunden.

Das Verdrängungsexperiment mit Methanol belegt den Zusammenhang zwischen Komplexbildung und Fluoreszenz. Sofern andere triviale Aspekte (z.B. Streulicht, Anregung des

^L Wegen der geringeren Konzentration des Gastes in der Stammlösung müssen größere Volumina zugesetzt werden. Daher wird hier als Kenngröße $F_{\text{korr}} = FV/V_0$ (V_0 ist die Ausgangsvolumen, V das Volumen bei der Messung) verwendet, welche die Verdünnung des Rezeptors berücksichtigt.

^M Der hier bestimmte Effekt ist deutlich größer als die zuvor beschriebene Erhöhung der molaren Fluoreszenz. Dort wurde bei Verdünnung um 30% lediglich ein Zuwachs um 9% ermittelt.

Koffeins, fluoreszente Verunreinigungen) für den Signalzuwachs verantwortlich wären, dürfte dieser Effekt nicht durch die Zugabe von Methanol zurückführbar sein.

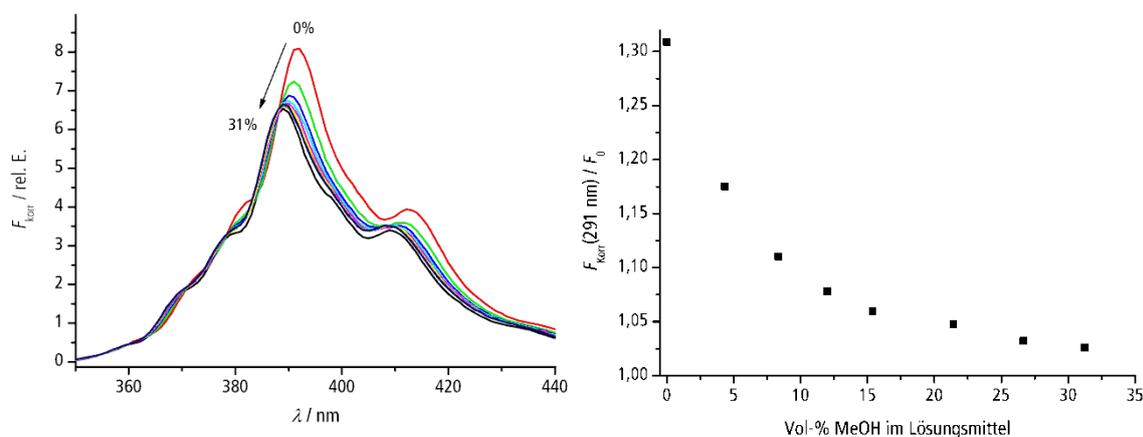


Abbildung 48: Einfluss von Methanol auf die Fluoreszenz von Komplex **1•7**; links: Emissionsspektren, gestrichelt ist das Spektrum des unbesetzten Rezeptors; Rechts: Verdünnungskorrigierte Fluoreszenzintensität bezogen auf die Intensität des unbesetzten Rezeptors (F_0). $c_0(\mathbf{1}) = 9.1 \mu\text{M}$; $c_0(\mathbf{7}) = 91 \mu\text{M}$, $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$.

Im Rahmen der Untersuchungen mit Methanol im Lösungsmittel wird beobachtet, dass sich die Fluoreszenz über eine Zeitspanne von 20–30 min nach der Zugabe des Methanols leicht erhöht. Der Intensitätszuwachs ist bei weitem nicht so ausgeprägt wie bei der Bindung von Oxopurin-Gästen, dennoch ist er gut messbar. Die Experimente werden unter verschiedenen Bedingungen mit den Rezeptoren **1** und **2** durchgeführt. Auch wird untersucht, ob die Anwesenheit von Gästen den Effekt verzögert oder sogar verhindern kann.

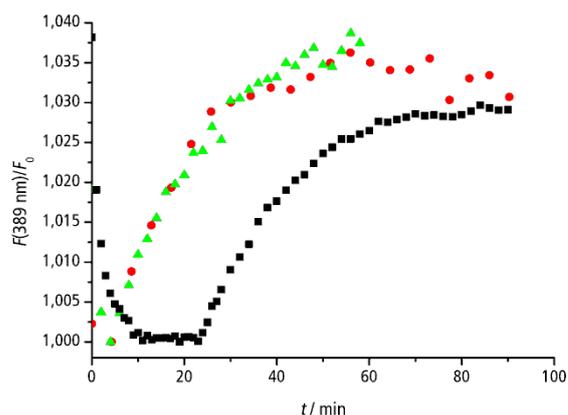


Abbildung 49: Ausgewählte Experimente zum Langzeitverhalten nach Methanolzugabe. **1**(●), **2** ($20 \mu\text{M}$) +15 Äquiv. Koffein (▲), **1** ($23 \mu\text{M}$) + 14 Äquiv. Koffein (■). Die Zugabe des Methanols (0.5 mL) erfolgte zum Zeitpunkt $t = 0 \text{ min}$. Alle Experimente wurden unter Temperaturkontrolle ($25.00 \pm 0.05 \text{ }^\circ\text{C}$) durchgeführt. Vor jedem Experiment wurde die Signalstabilität über einen Zeitraum von mehr als 10 Minuten überprüft. $\lambda_{\text{ex}} = 352 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 389 \text{ nm}$.

Das Ergebnis ist nicht einheitlich. Die in Abbildung 49 dargestellten „Kinetiken“ sind eine Auswahl aus einer Vielzahl von Messungen. Unabhängig von der Anwesenheit von Gästen ist allen Systemen ein Signalzuwachs um 3–4% bezogen auf den tiefsten gemessenen Wert (kurz nach Zugabe des Methanols) gemein. Temperaturschwankungen oder andere äußere Einflüsse sind auszuschließen, da alle Proben vor der Methanol-Zugabe mindestens 10 Minuten auf Signalstabilität überprüft wurden.

Es wurde eine Aggregation der Rezeptoren in Lösung vermutet, daher wurden in Zusammenarbeit mit *Dr. Bernd Beermann*^N dynamische Lichtstreuungsexperimente durchgeführt.

Tabelle 3: Dynamische Lichtstreuung an den Rezeptoren **1** und **2** vor und nach Zugabe von Methanol. Alle angegebenen Werte beziehen sich auf die kleinste Spezies, welche nicht als Lösungsmittel identifiziert wurde. D_t ist der translationale Diffusionskoeffizient, R_h stellt den hydrodynamischen Radius dar.

Rezeptor	Lösungsmittel	$D_t/\text{cm}^2\text{s}^{-1}$	R_h/nm	M/kDa
1	CH ₂ Cl ₂	3.78×10^{-6}	0.48	0.64
1	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 4:1	2.85×10^{-6}	0.64	1.18
2	CH ₂ Cl ₂	2.66×10^{-6}	0.7	1.46
2	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 9:1	4.8×10^{-1}	29	9110

Für Rezeptor **1** wird in Abwesenheit von Methanol ein Molgewicht von 640 g/mol ermittelt. Die Abweichung zum wirklichen Molekulargewicht ist in den zahlreichen Annahmen zur Bestimmung dieses Wertes bedingt. Nach Zugabe von Methanol und einer ausreichenden Inkubationszeit (>1 h) ist in Lösung diese Spezies nicht mehr nachweisbar. Das kleinste nachweisbare Teilchen weist in etwa die doppelte Masse (1180 g/mol) auf. Während der Messung werden auch höhere Aggregate gefunden, deren Größe aber nicht mit ausreichender Genauigkeit bestimmt werden kann. Im Fall des Menthyl-Rezeptors kann auch das Dimer nicht gefunden werden. Hier wird als kleinstes Aggregat eine Partikelgröße von 9100 g/mol ermittelt. Auch bei Rezeptor **2** ist nach Zugabe von Methanol also keine „monomere“ Spezies nachweisbar.

Die direkte fluorimetrische Beobachtung der Bindung von Oxopurinen an die Rezeptoren auf Triphenylenketalbasis konnte somit als eine schnelle und einfache Bestimmung von Bindungskonstanten etabliert werden. Für die Anwendung als Chemosensor ist sie aber nur mäßig geeignet. Als Hauptgründe sind vor allem der mäßige maximale Intensitätszuwachs um nur 30% anzuführen.

^N Institut für Physikalische Chemie, Westf. Wilhelms-Universität Münster

3.2.3 Indirekter Koffein-Nachweis

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden veröffentlicht unter C. Siering, H. Kerschbaumer, M. Nieger, S. R. Waldvogel, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1471–1474.

Da die direkte Umsetzung von Koffein mit den Koffeinrezeptoren keinen ausreichenden Signalzuwachs liefert, wurde analog zu Kapitel 3.2.1 die Verwendung eines kompetitiven Nachweises entwickelt.

3.2.3.1 Konzeptionelle Überlegungen

Es soll ein modularer Ansatz zur Anwendung kommen, welcher die einfache Variation der kompetitiven Gäste ermöglichen sollte. Gewählt wird eine Struktur aus einer Bindungseinheit, einem Verbindungsstück und einer Signaleinheit.

Als Bindungseinheit werden 1,3,7-Trialkylxanthine verwendet. Als Linker wird an N7 ein Alkylrest eingesetzt, da aus dem vorausgegangenen Kapitel bekannt ist, dass Alkylketten an dieser Stelle die Bindung nicht erheblich stören. Unterstützt wird dies durch Analyse der röntgenographisch erhaltenen Molekülstrukturen, in denen der Methylsubstituent an dieser Position genau in den Bereich zwischen den Bindungsstellen weist.

Zu Beginn der Arbeiten standen verschiedene fluoreszenzbasierte Signalwege zur Auswahl, die in Abbildung 50 dargestellt sind. Kerngedanke war die Einführung einer weiteren fluoreszenten Gruppe, die möglichst im sichtbaren Bereich emittiert. Dies sollte unter Umständen zur Entwicklung eines geräteunabhängigen („naked-eye“) Schnelltests führen. So könnte beispielsweise eine Wellenlängenverschiebung beim Übergang vom ungebundenen Konkurrenzgast **IV** zum Komplex **III** auftreten. Auch über die Entwicklung eines „on-off“-Mechanismus wurde nachgedacht, bei dem im freien Konkurrenzgast die Fluoreszenz des Markers gelöscht wird (**VI**) und erst bei Bindung an den Rezeptor in Erscheinung tritt (**V**).

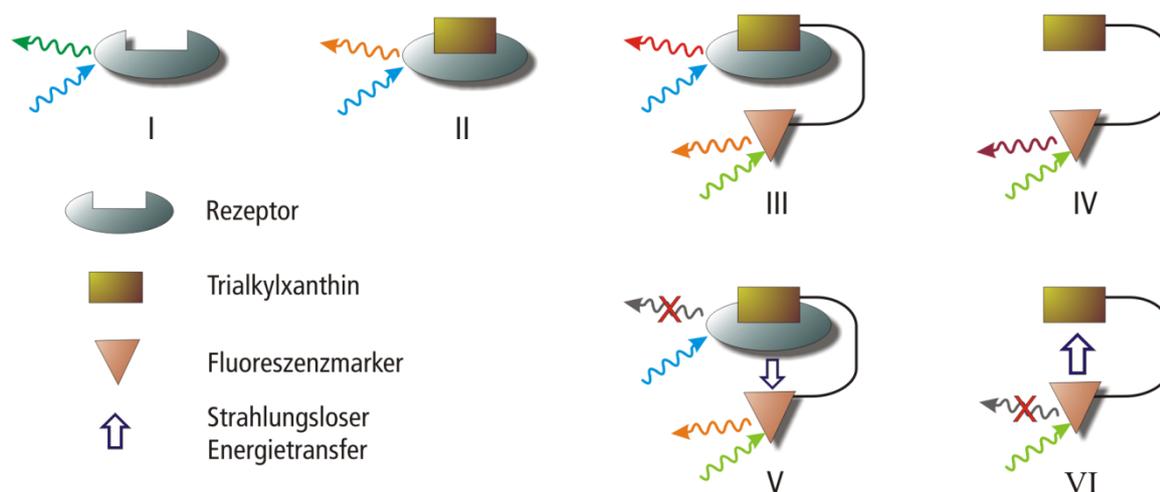


Abbildung 50: Fluoreszenzbasierte Nachweiskonzepte für Trialkylxanthine mit triphenylenbasierten Rezeptoren. Die dargestellten Farben symbolisieren die Wellenlänge des emittierten und absorbierten Lichts.

Weitere Anforderung an den eingesetzten Fluorophor war eine möglichst einfach durchzuführende ω -Kupplung am Abstandshalter. Da von einem Halogenid ausgegangen wird,

lässt sich dieser leicht mit einer Amino- oder Hydroxyfunktion versehen. Diese Funktionen sind hervorragend geeignet zur Anbindung von kommerziell erhältlichen Marker-Vorläufern, welche oft in der Biochemie oder medizinischen Chemie zur Markierung von Proteinen genutzt werden und somit schon geeignete Ankergruppen anbieten. In dieser Arbeit wurden zur Fluoreszenzmarkierung 4-Chlor-7-nitrobenzofurazan (**22**), Anthracen-9-carbaldehyd (**23**), Fluoresceinisothiocyanat (**20**) sowie Dansylchlorid (**21**) getestet. Diese sollten sich über einfache Kondensations- oder Substitutionsreaktionen mit einem Amino-funktionalisierten Vorläufer verbinden lassen.

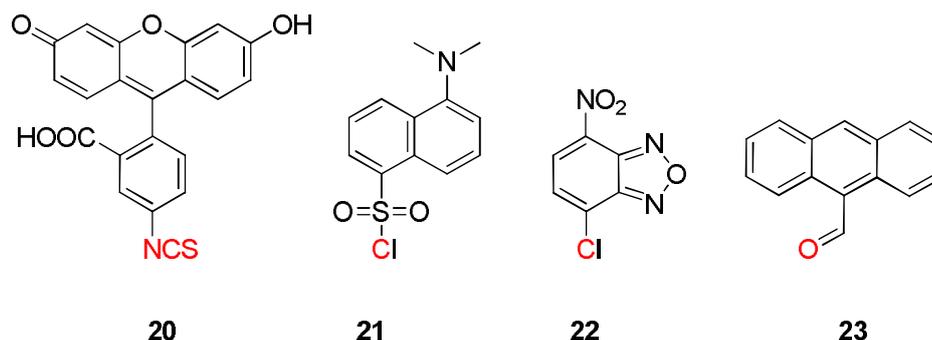


Abbildung 51: Vorläufer zur Einbringung eines Fluoreszenzmarkers für die Darstellung des kompetitiven Gastes.

3.2.3.2 Darstellung fluoreszenzmarkierter Gäste

Deprotonierung des Theophyllins mit Natriumhydrid und anschließende Alkylierung mit einem Überschuss an α,ω -Dibromhexan bzw. -butan führt zu den gewünschten Produkten. Die Massenspektrometrie zeigt in beiden Fällen das charakteristische Isotopenmuster einer monobromierten Verbindung, im $^1\text{H-NMR}$ findet man das charakteristische Triplet der *N*-7-Methylengruppe. Bei der anschließenden Umsetzung mit Natriumazid kann das intermediär gebildete Alkylazid massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Auf eine Isolierung wird wegen der geringen Stabilität der Substanz verzichtet. Stattdessen erfolgt direkt die heterogene Hydrierung an Palladium/Kohle, welche die entsprechenden Amine in ordentlichen Ausbeuten lieferte. Neben den massenspektrometrischen Untersuchungen belegt im $^{13}\text{C-NMR}$ die Lage der terminalen Aminomethylgruppe bei 42 bzw. 41 ppm die erfolgreiche Umsetzung.

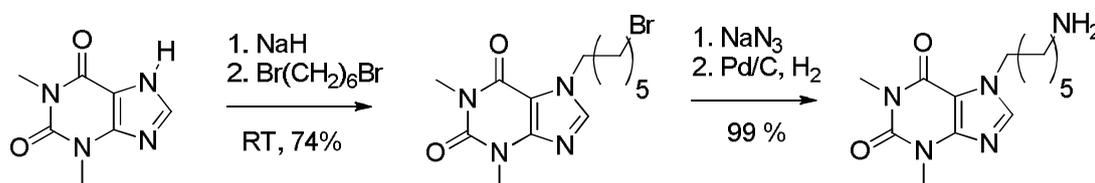


Abbildung 52: Synthese des Theophyllin-Bausteins, welcher als Vorläufer für die markierten Konkurrenzgäste dient.

Die Umsetzung des Vorläufers mit Anthracen-9-carbaldehyd (**23**) erweist sich überraschenderweise als problematisch. Anwesenheit von Molekularsieb und Erwärmung auf 60 °C kann die Umsetzung zum Imin nicht fördern. Stattdessen werden lediglich die

Ausgangsmaterialien reisoliert. Die Umsetzung unter gleichen Bedingungen in Methanol ergibt einen zusätzlichen Fleck auf der DC-Platte, jedoch kann eine entsprechende Fraktion säulenchromatographisch trotz zügiger Arbeit nicht isoliert werden, obwohl die Substanz laut Massenspektrometrie im Reaktionsgemisch nachgewiesen wird.

Bei der Darstellung des Fluorescein-modifizierten Gastes liegen die Schwierigkeiten vornehmlich in der Aufreinigung. Das gewünschte Produkt enthält eine freie Carboxy-Funktion sowie einen Thioharnstoff. Die Aufreinigung dieser hoch polaren Substanz an konventionellem Kieselgel ist nicht möglich. Nur der Einsatz von Umkehrphasen zeigt hier einen nennenswerten Effekt. In einem Wasser/Methanol-Gemisch können zwei Fraktionen abgetrennt werden, von denen eine auch das gewünschte Produkt (MS) enthält, allerdings nur in sehr kleinen Ausbeuten. Die gute Wasserlöslichkeit der Substanz stellt eine weitere Schwierigkeit für die geplante Anwendung dar, da diese im deutlich weniger polaren Dichlormethan erfolgt.

Die Umsetzung mit Dansylchlorid zum entsprechenden Sulfonamid gelingt ohne Komplikationen. In Gegenwart von Triethylamin wird der entsprechende Gast in 67% Ausbeute erhalten, welcher massenspektrometrisch als $[M+Na]^+$ und $[2M+Na]^+$ nachgewiesen wird. Auch die NMR-spektroskopischen Untersuchungen belegen die erfolgreiche Umsetzung.

Die 7-Nitrobenzofurazyl-Gruppe ist ein äußerst beliebter Fluorophor. Über eine S_NAr -Reaktion lassen sich leicht Amine am entsprechenden Arylring verankern. Fängt man die entstehende Salzsäure durch Zugabe adäquater Mengen Triethylamin ab, so lässt sich nach 8 h bei milden Bedingungen das gewünschte Produkt **24** gewinnen. Bei der säulenchromatographischen Aufreinigung lassen sich Verunreinigungen nicht vollständig oder unter erheblichen Produktverlusten entfernen. Umkristallisation aus Toluol liefert aber das Produkt als analysenreines Cokristallstat mit dem Lösungsmittel. Das Ergebnis der röntgenographischen Untersuchung dieser Einkristalle ist in Abbildung 53 dargestellt.

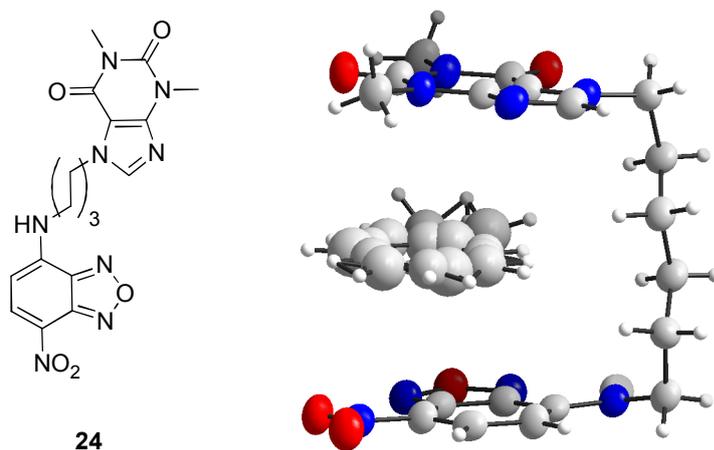


Abbildung 53: Molekülstruktur von **24** mit eingelagertem Toluol (fehlgeordnet).

Es zeigt sich eine coplanare Anordnung der Purin- und Benzofurazyleinheiten, der Abstand zwischen den Heterocyclen beträgt ca. 7 Å. Der Zwischenraum wird durch ein interkaliertes Toluol-Molekül ausgefüllt. Durch diese Anordnung ergibt sich ein Abstand von ca. 3.5 Å, welcher typisch ist für gestapelte π -Systeme. Die Bindung dieses Gastes an den Rezeptor dürfte zu einer

ähnlichen Situation führen: Während die Xanthin-Einheit im Inneren des Rezeptors verweilt, kann die Benzofurazylgruppe mit der „Außenseite“ des Triphenylens Dispersionwechselwirkungen aufbauen und eine zusätzliche Stabilisierung des Komplexes ergeben. Außerdem dürfte dieser Kontakt einen deutlichen Einfluss auf die Fluoreszenz der Benzofurazylgruppe haben.

3.2.3.3 Spektroskopische Untersuchung am Benzofurazyl-System

Die Untersuchung der spektroskopischen Eigenschaften wurde zunächst an **24** durchgeführt. Wie in Abbildung 54 ersichtlich, absorbiert der modifizierte Gast deutlich weniger als der Rezeptor. Die Absorption im Bereich von 250–300 nm ist auf die Xanthinyleinheit zurückzuführen. Die Bande mit dem Maximum bei 325 nm wird einem $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang zugeordnet, welcher entlang der Hauptachse des Chromophors polarisiert ist.^[62] Bei 450 nm liegt die Bande, welche aus einem intramolekularen Ladungstransfer (*intramolecular charge transfer*, *ICT*) vom elektronenreichen Amin in 4-Position zur Nitrogruppe an Position 7 resultiert. Durch die gleichzeitige Darstellung mit den Spektren des Rezeptors zeigt sich ein günstiger Bereich von 350–400 nm, in dem die Absorption durch den Fluoreszenzgast gering ist. In diesen Bereich fallen zugleich die letzten Ausläufer des Absorptionsspektrums der Rezeptoren (insbesondere der oben erwähnte Übergang bei 352 nm) sowie das Emissionsmaximum. Wie gewünscht emittiert der markierte Gast im sichtbaren Bereich, die breite Bande liegt bei 510 nm.

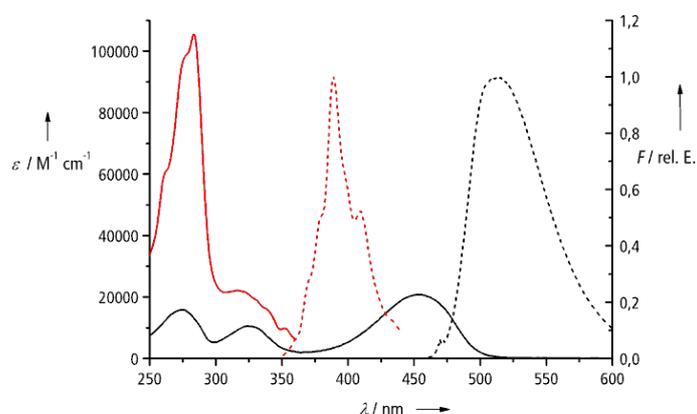


Abbildung 54: UV-Spektren (durchgezogen) und Fluoreszenzspektren (gestrichelt) von **24** (schwarz) und Rezeptor **1** (rot). Die Intensitäten der zwei Fluoreszenzspektren sind untereinander nicht direkt vergleichbar, da keine Quantenausbeuten bestimmt wurden.

Wie in Abbildung 55 ersichtlich, sinkt bei Zugabe von 10 Äquivalenten des Rezeptors **1** zu einer Lösung von **24** dessen Fluoreszenz um mehr als 30%. Außerdem sinkt die Fluoreszenz im Bereich um 510 nm stärker als bei 520 nm. Verdünnung kann als Ursache für diesen Effekt ausgeschlossen werden, da zum einen nur geringe Volumina zugesetzt wurden ($\Sigma V_{\text{add}} < 5\% \text{ Vol.}$), zum anderen eine extrem verdünnte Lösung ($2.5 \mu\text{M}$) des ohnehin schwach absorbierenden **24** eingesetzt wurde. Da somit ein *inner filter*-Effekt ausgeschlossen ist, wird zu einer Mischung von Rezeptor und markiertem Gast nach und nach Koffein zugesetzt (Abbildung 55, rechts). Der

leichte Anstieg der Fluoreszenz ist wiederum im Bereich um 510 nm ausgeprägter als bei 520 nm.

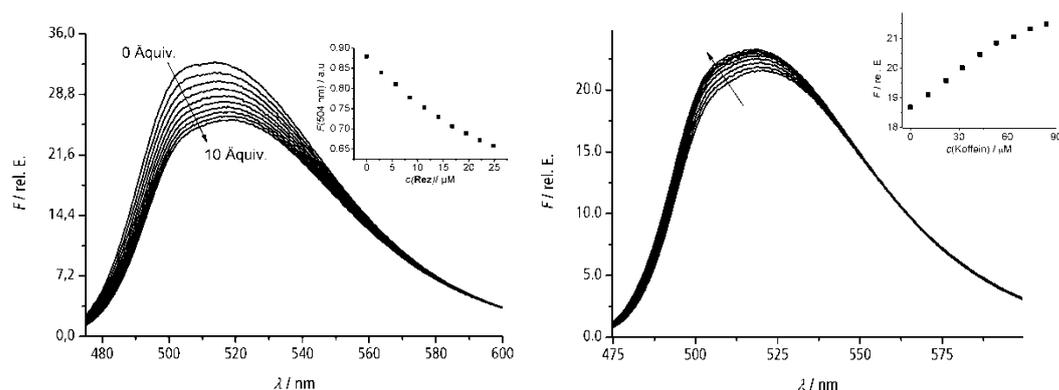


Abbildung 55: links: Titration von **24** (2.5 µM) mit **1** (580 µM). Rechts: Einfluss von Koffein auf das Spektrum des markierten Gastes, wenn dieser aus dem Komplex verdrängt wird. ($c(\mathbf{24}) = 2.2 \mu\text{M}$, $c(\mathbf{1}) = 7.3 \mu\text{M}$)

Im Rahmen dieses Experimentes ist es allerdings nicht möglich, in Intensität oder Profil das ursprüngliche Signal des Gastes wiederherzustellen, obwohl das Koffein in mehr als 40fachem (bzw. 10fachem) Überschuss bezogen auf **24** (bzw. **1**) vorliegt.

Die geringe Signalveränderung bei Zugabe des Koffeins macht die Betrachtung der Emission des fluoreszenzmarkierten Gastes für eine analytische Anwendung ungeeignet. Trotzdem sollen anhand dieses Effektes noch Untersuchungen zur molekularen Wechselwirkung mit dem Gast beschrieben werden.

In Anlehnung an Abbildung 50 **VI** könnte die Unterbrechung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen dem Xanthinyl-Substituenten und dem sekundären Amin Ursache für den beobachteten Effekt sein. Dies wird durch Vergleich der UV-Spektren von **24** und **25** (Abbildung 56) ausgeschlossen.^O Wie in Abbildung 56 ersichtlich, liegen die Absorptionsmaxima der Benzofurazyleinheit in beiden Spektren an der gleichen Stelle. In Anwesenheit der Xanthinyl-Gruppe kommt es also nicht zur Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung, welche das Spektrum des Gastes maßgeblich verschiebt.^P

^O Zum Nachweis von Wasserstoffbrücken ist IR-Spektroskopie eigentlich die geeignetere Methode. In diesem Experiment ging es primär um deren Einfluss auf die elektronischen Eigenschaften von **24**.

^P Intermolekulare Wasserstoffbrücken zu anderen **25**-Molekülen sind bei den hier verwendeten Konzentrationen (50 µM) nicht nachweisbar, da die Wechselwirkungsenergie und somit die Bindungskonstante viel zu gering ausfällt.

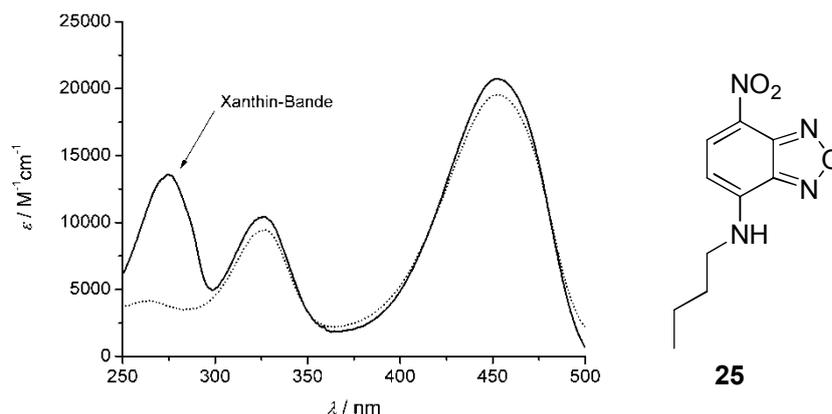


Abbildung 56: UV-Spektren der Verbindungen **24** (durchgezogen) und **25** (gestrichelt). In beiden Spektren liegen Banden bei 450 und 330 nm. Die Bande bei 270 nm im Spektrum von **24** ist dem Xanthinylsubstituenten zuzuordnen.

Für die Verschiebung des Spektrums kommt somit nur die direkte Wechselwirkung mit dem Rezeptor in Frage. Hier kommt vor allem der Aufbau einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Harnstoff-Carbonylgruppen des Rezeptors und dem sekundären Amin des Gastes in Frage. So hängt die Lage des Absorptionsmaximums direkt von der Stärke des elektronenschiebenden (-NHR) bzw. -akzeptierenden (-NO₂) Charakters der Substituenten ab.^[63] Außerdem wurde durch *Kamlet-Taft*-Analyse von solvatochromen Effekten an 4-Methylamino-7-nitrobenzofurazan gezeigt, dass Wasserstoffbrücken-Akzeptoren im Lösungsmittel einen größeren Effekt auf das Spektrum zeigen als Donoren.^[64]

Die Untersuchung der spektroskopischen Eigenschaften von **24** und seinen Komplexen mit dem Rezeptor konnte somit zeigen, dass der Gast **24** vom Rezeptor reversibel gebunden wird. Auch finden sich Hinweise auf eine spezifische Wechselwirkung zwischen der Aminobenzofurazyl-Einheit und einem Wasserstoffbrücken-Akzeptor, augenscheinlich der Harnstoff-Carbonylgruppe. Diese dürfte neben den beschriebenen Veränderungen im Spektrum auch die Affinität des Gastes zum Rezeptor erhöhen. Nutzbar für eine quantitative Koffeinanalytik ist dieser Spektralbereich jedoch kaum, da die beobachteten Veränderungen zu gering sind.

3.2.3.4 Fluoreszenzlöschung am Rezeptor

Dergleichen gilt jedoch nicht für die Fluoreszenz des Rezeptors. Die Zugabe des markierten Gastes zu einer Rezeptorlösung führt zu drastischen Intensitätseinbußen im gesamten Emissionsbereich (>80% bei Zugabe von nur 7 Äquivalenten). Die Lage des Emissionsmaximums verschiebt sich nicht. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Erkenntnissen aus der direkten Titration: Hier führte die Bindung eines Xanthin-Gastes generell zu einer leichten bathochromen Verschiebung des Maximums.

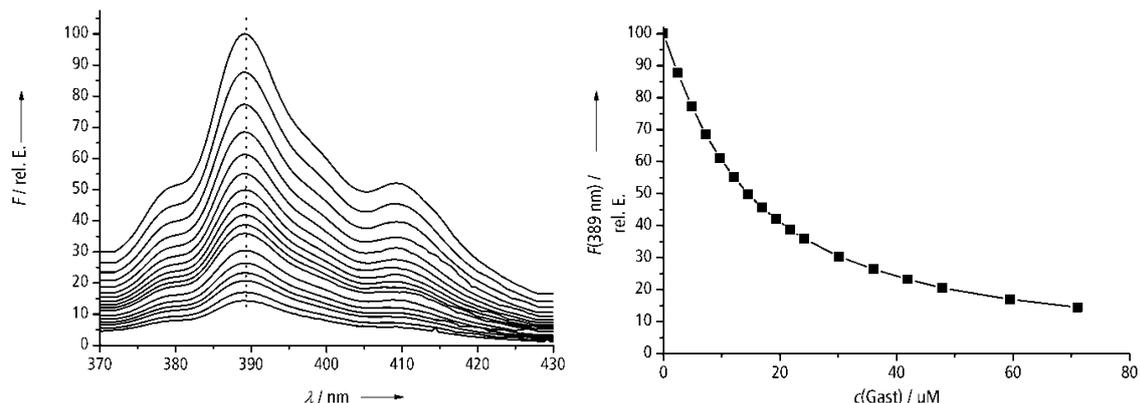


Abbildung 57: Spektren und Verlaufsdiagramm einer Titration von **1** mit **24**; $c_0(\mathbf{1}) = 10 \mu\text{M}$.

Darum muss zunächst sichergestellt werden, dass der markierte Gast überhaupt mit der Xanthineinheit an den Rezeptor bindet. Analog zu den in Kapitel 3.1 vorgestellten Experimenten wird im $^1\text{H-NMR}$ die chemische Verschiebung der Harnstoffprotonen bei Zugabe von **24** zum Rezeptor beobachtet (Abbildung 58). Dabei zeigt sich das typische Muster: Die Signale der distalen Protonen sind am Ende um mehr als 1 ppm tieffeldverschoben, die der proximalen um mehr als 0.5 ppm. Bemerkenswert ist allerdings das Auftreten der schwachen und breiten Bande bei 6.2 ppm. Diese findet man zwar auch unter Verwendung von Koffein als Gast, allerdings erst nach Abkühlung auf unter 213 K. Nach bisherigen Erkenntnissen ist sie dem distalen N-H zuzuordnen, welches an den Imidazolring des Gastes gebunden ist. Offensichtlich wird der schnelle Austausch bzw. die Rotation des Gastes im Rezeptor durch den zusätzlich angebrachten linearen Alkylrest effektiv verhindert. Die NMR-Daten geben somit ein schlüssiges Bild von der bindenden Wechselwirkung der Xanthingruppe mit dem Rezeptor.

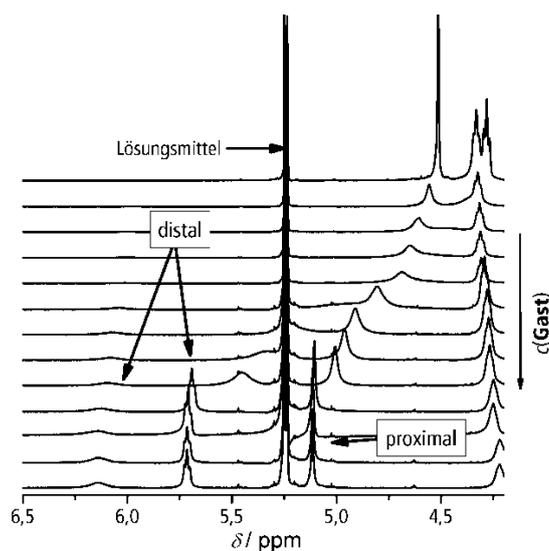


Abbildung 58: $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Harnstoff-Protonen bei Titration von Rezeptor **1** mit **24**. Die distalen N-H werden von 4.25 ppm extrem tieffeldverschoben. Sie spalten in ein scharf aufgelöstes sowie ein schwaches und breites Signal auf. Lösungsmittel CD_2Cl_2 $c(\mathbf{1}) \approx 1\text{mM}$. Eine quantitative Auswertung war nicht möglich, da sich von **24** keine Stammlösung hinreichend großer Konzentration erzielen ließ. Am Ende des Experimentes lag **24** in ca. 20fachem Überschuss vor.

Da **24** also an den Rezeptor bindet, kommt nur Fluoreszenzlöschung als Erklärung für die Signalabnahme in Frage. **24** die Emission des gebundenen Rezeptors verhindert, würde das bathochrom verschobene Spektrum emittiert und die Verschiebung nicht messbar.

Die grafische Auswertung nach *Stern* und *Volmer* liefert einen ausgeprägte linearen Zusammenhang und zeigt somit das für Fluoreszenzlöschung typische Ergebnis (Abbildung 59, links). Wie aus den drei dargestellten Messreihen ersichtlich, ist im Einklang mit der Theorie die Konzentration des Rezeptors für die Steigung der *Stern-Volmer*-Gerade nicht von Belang. Es fällt allerdings eine geringfügige Krümmung bei Verwendung höherer Konzentrationen (10 μM) auf.

Im Fall des Rezeptors **2** findet man eine etwas ausgeprägtere Krümmung in den *Stern-Volmer* Graphen (Abbildung 59, rechts, zu vergleichen sind die Punkte für $T = 20^\circ\text{C}$). Aber auch hier zeigt sich, dass bei reduzierter Konzentration des Rezeptors eine höhere Linearität erzielt wird.

Eine nach oben gekrümmte Kurve ist oft das Indiz für die Präsenz zusätzlicher, die Fluoreszenz reduzierender Mechanismen. Hier kommt insbesondere die einfache Absorption von emittiertem oder anregendem Licht in Betracht: Das Absorptionsspektrum des Gastes überlappt leicht mit dem Emissionsspektrum des Rezeptors. Allerdings widersprechen hier die Befunde mit **1** dieser Theorie. Hier wurde nur eine äußerst geringe Krümmung gefunden, obwohl bei vergleichbaren Konzentrationen gearbeitet wurde.

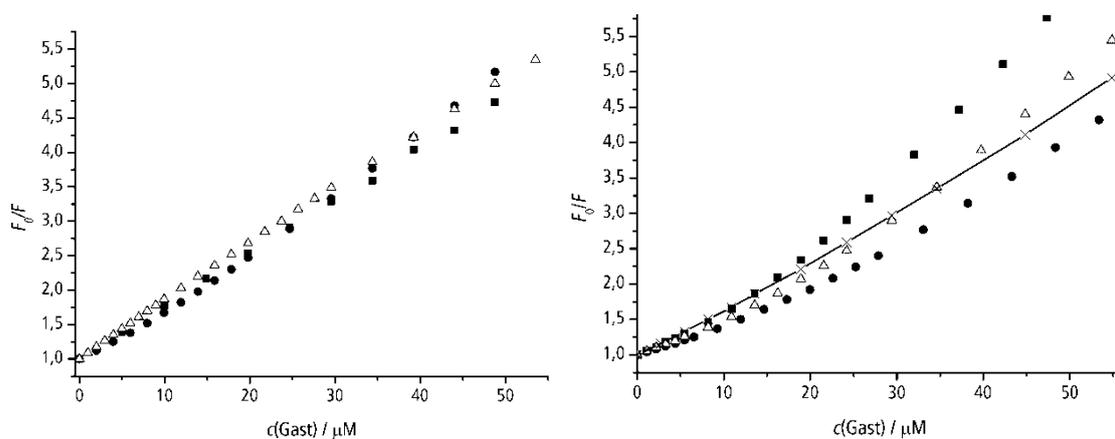


Abbildung 59: *Stern-Volmer*-Diagramme; links: Titrationen von Rezeptor **1** mit **24** bei $c(1) = 1 \mu\text{M}$ (▲, ■) und $10 \mu\text{M}$ (●); rechts: Titration von **2** ($c = 12.5 \mu\text{M}$) mit **24** bei 15°C (●), 20°C (▲) und 25°C (■) sowie bei $c = 2.5 \mu\text{M}$ und 20°C (durchgezogene Linie).

Titration von **1** mit **25** (Abbildung 60) belegt, dass eine statische Fluoreszenzlöschung vorliegt. Im Gegensatz zur Titration mit **24** nimmt die Fluoreszenzintensität des Rezeptors nur langsam und vor allem nahezu linear mit fortschreitender Zugabe von **25** ab. Da diese Substanz nicht über die Xanthineinheit verfügt, kann sie sich auch nicht an den Rezeptor binden. Läge ein dynamischer Prozess vor, dürfte die Entfernung der Xanthineinheit keinen negativen Einfluss auf die Fluoreszenzlöschung haben.

Die leichte Abnahme der Fluoreszenzintensität ist auf einen *inner filter effect* zurückzuführen. Wie aus Abbildung 56 ersichtlich, ist **25** bei der Anregungs- und Emissionswellenlänge des

Rezeptors (352 bzw. 391 nm) nicht völlig transparent. Da die spektroskopischen Eigenschaften von **24** und **25** im Bereich oberhalb 300 nm vergleichbar sind, kann anhand dieses Experiments auch der absorptionsbedingte Anteil der Fluoreszenzabnahme bei Zugabe von **24** ermittelt werden.

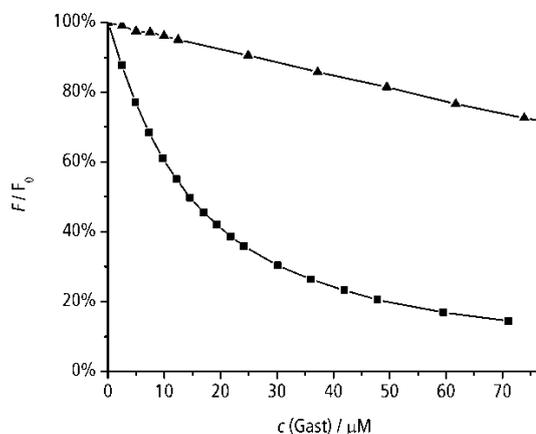


Abbildung 60: Titration von Rezeptor **1** mit **24** (▲) bzw. **25** (■). $c(1)=10 \mu\text{M}$.

Unter der Voraussetzung, dass lediglich ein statischer Mechanismus vorliegt, entspricht K_{SV} zugleich der Komplexbildungskonstante. Die linearen *Stern-Volmer*-Plots mit Rezeptor **1** ($c = 1 \mu\text{M}$) liefern Werte von $79000 \pm 3000 \text{ M}^{-1}$. Die gekrümmten Kurven ergeben Werte von $60000 - 87000 \text{ M}^{-1}$. Diese Bindungskonstante fügt sich nahtlos in die bisherigen Erkenntnisse zum Bindungsverhalten von **24** ein: Die im NMR nachgewiesenen Wasserstoffbrückenbindungen lassen eine zumindest gleichwertige Affinität von **24** und Koffein zu den Rezeptoren erwarten. Dass die Bindungskonstante noch leicht höher liegt als bei Koffein, könnte auf eine zusätzliche stabilisierende Wechselwirkung zurückzuführen sein, allerdings kommen daneben weitere Effekte in Betracht wie z.B. unterschiedlicher Solvataion der Gäste in der Lösung.

3.2.3.5 Kompetitive Experimente mit Koffein

Zugabe von Koffein zur einer Lösung von **24** und Rezeptor **1** liefert eine drastische Signalzunahme sowie eine bathochrome Verschiebung des Emissionsmaximums (Abbildung 61, links). Damit ergibt sich folgendes Konzept (Abbildung 62): Zunächst liegt der Rezeptor ungebunden vor (**I**), die Zugabe von **24** führt zur Fluoreszenzlöschung (**II**). Eine Verschiebung wird nicht festgestellt, da gebundene Rezeptoren nicht emittieren und somit nicht erfasst werden. Gibt man nun Koffein zu, wird der Komplex **II** zugunsten von **III** zerstört. Dieser Komplex ist aber wieder fluoreszent, die Intensität steigt wieder und die bathochrome Verschiebung wird nun festgestellt. Dieses Ergebnis stellt eine erhebliche Verbesserung im Vergleich zur direkten Titration dar, wie aus Abbildung 61 (rechts) leicht ersichtlich ist. Während im direkten Verfahren nur ein Zuwachs um 30% erzielt wurde und schon bei $50 \mu\text{M}$ eine ausgeprägte Sättigung beobachtet wird, steigt bei den kompetitiven Methoden das Signal um ein Vielfaches an. Dabei lässt sich über die Menge an zugesetztem **24** die Krümmung der Kurve beeinflussen. In Anwesenheit von $100 \mu\text{M}$ **24** ist die Kurve deutlich flacher als bei $50 \mu\text{M}$, zugleich ein weiterer Beleg für den kompetitiven Charakter dieser Nachweismethode. Somit kann mit der gleichen

Menge an Rezeptor nun eine größere Koffeinkonzentration mit zugleich größerem Signalzuwachs bestimmt werden.

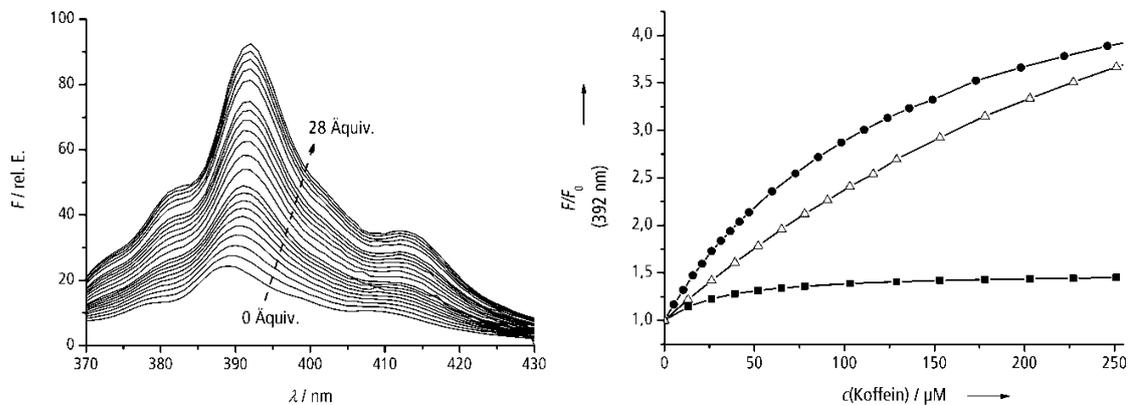


Abbildung 61: links: Titration von **1•24** mit Koffein; $c(\mathbf{1})=10 \mu\text{M}$, $c(\mathbf{24})=50 \mu\text{M}$, $c_0(\text{Koffein}) = 5.3\text{mM}$; rechts: Intensitätsverlauf bei der Zugabe von Koffein zu **1** (■) oder einem Gemisch von Rezeptor und **24** ($50 \mu\text{M}$ (●); $100 \mu\text{M}$ (▲)). F_0 bezieht sich auf die Fluoreszenz von **1•24**.

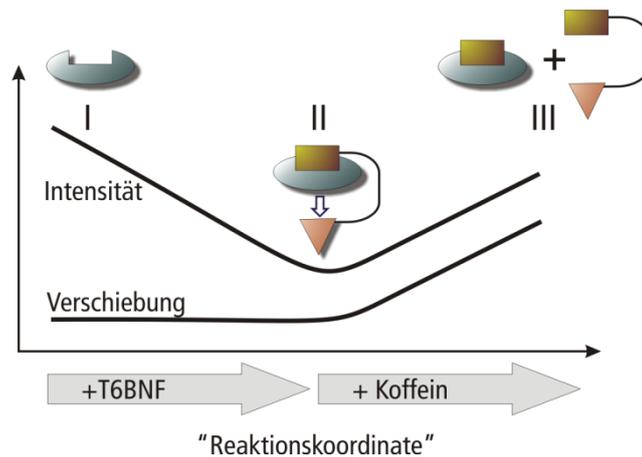


Abbildung 62: Vereinfachte schematische Darstellung des kompetitiven Koffeinnachweises unter Verwendung von **24** als konkurrierendem Gast.

3.2.3.6 Störsubstanzen

DMF und Alkohole stören den Komplex von **1** mit **24**, wie an der Zunahme der Fluoreszenz erkennbar ist (Abbildung 63).

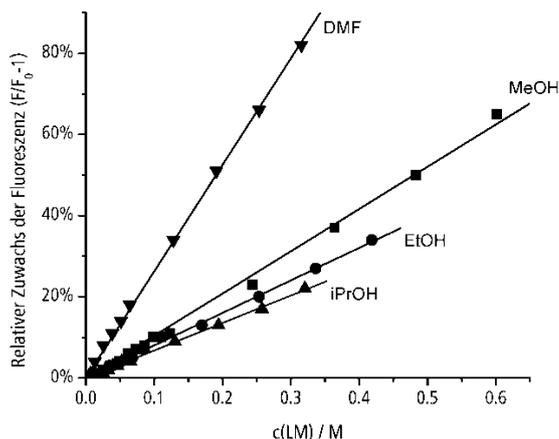


Abbildung 63: Lösungsmittelleffekte auf eine Lösung von **24** ($50 \mu\text{M}$) und **1** ($1 \mu\text{M}$); $\lambda_{\text{em}}=391 \text{ nm}$.

Die Quantifizierung der Lösungsmittelleffekte ist auch notwendig für die Untersuchung der Querempfindlichkeiten des Systems für strukturell ähnliche Verbindungen. Wegen der schlechten Löslichkeit der Barbitursäure (**27**), des 6-Azauracils (**29**) und des Phloroglucins (**31**) in reinem Dichlormethan erweist sich die Bereitung geeigneter Stammlösungen als Problem. Daher müssen diese Lösungen in einem Gemisch von Dichlormethan/Methanol (93:7) angesetzt werden.^Q Dieses wird dann dem Gemisch von **24** und **1** in reinem Dichlormethan zugesetzt. Bei der Messung liegt der Methanolgehalt im Bereich von 0.4%. Anhand der vorgenannten Messreihe ergibt sich für diesen Gehalt ein methanolinduzierter Zuwachs um weniger als 1%, ist also weitgehend zu vernachlässigen.

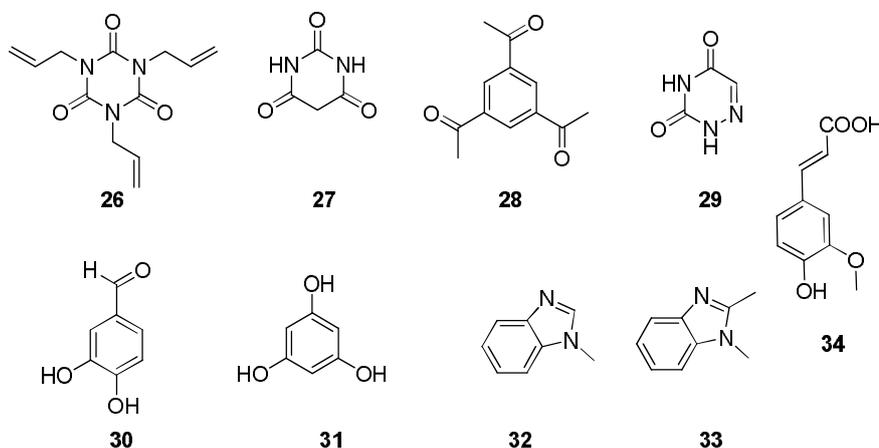


Abbildung 64: Alternative Gäste, die zur Untersuchung auf Querempfindlichkeiten getestet wurden.

In der Testreihe sind Substanzen aufgenommen, die eine dem Koffein vergleichbare Anordnung der Wasserstoffbrückenakzeptoren aufweisen (Abbildung 64). Hier sind insbesondere das Cyanursäurederivat **26**, die Barbitursäure (**27**) und das Phloroglucin (**31**) zu nennen. Das Triacetylbenzol **28** verfügt über ebenfalls C_3 -symmetrisch angeordnete, aber weiter entfernte

^Q Zudem müssen die Lösungen bis zur vollständigen Homogenisierung über Nacht stehen. Der Auflösungsprozess ist extrem langsam.

Wasserstoffbrückenakzeptoren. Die Benzimidazole werden wegen struktureller Ähnlichkeit zum Purin-Kern ausgewählt. Da Phenole oft in Kaffeeprodukten vorkommen, werden **30** und **34** untersucht.^R

Alle Substanzen wurden hinsichtlich der Fluoreszenzzunahme bei Zugabe zu einem Gemisch von **1** und **24** untersucht. Die Referenz bei den in Abbildung 65 vorgestellten Experimenten stellt die Zugabe von Koffein dar. (Unter den hier verwendeten Bedingungen wird ein Signalzuwachs um 80% erzielt.) Dieser ist erheblich größer als bei den meisten der anderen untersuchten Substanzen. Lediglich die Ferulasäure zeigt eine erhebliche Fluoreszenz. Diese ist aber nicht auf eine direkte Interaktion mit dem Rezeptor zurückzuführen, vielmehr überlagert die Fluoreszenz der Ferulasäure die des Rezeptors. Dieser Effekt lässt sich apparativ nicht umgehen, da die Anregungs- und Emissionswellenlängen schon durch den Rezeptor und **24** festgelegt sind. Ein Ziel der Probenvorbereitung aus natürlichen Proben wird somit die Entfernung der Zimtsäurederivate sein.

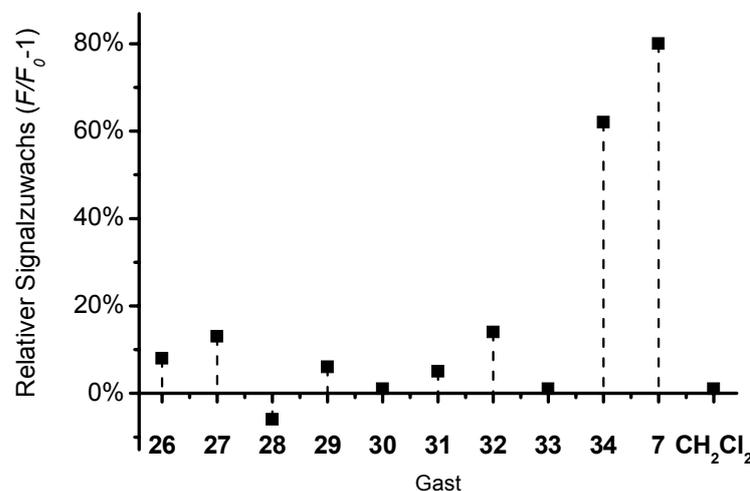


Abbildung 65: Querempfindlichkeiten des Systems **1•24** gegenüber verschiedenen Wasserstoffbrücken-aktiven Substanzen; c(**24**)= 50 µM, c(**24**)=1 µM, c(Konkurrenzgast)= 50 µM.

3.2.3.7 Anwendung in realen Proben

Die Anwendung dieser Methode soll an handelsüblichen koffeinhaltigen Getränken demonstriert werden. Hierzu gehören zum einen koffeinierte Erfrischungsgetränke wie z.B. *Coca-Cola* oder *Red Bull*, zum anderen klassische Kaffeegetränke. Die Kernanforderung bei der Probenvorbereitung ist der Wechsel des Lösungsmittels, da in wässriger Lösung nicht gemessen werden kann. Eine besondere Herausforderung stellen die Kaffeegetränke wegen der großen Vielfalt an enthaltenen Stoffen dar.

Die Probenvorbereitung gelingt mittels einer Festphasenextraktion an Polyamidgel. Diese polare Umkehrphase trennt effektiv die Zimtsäurederivate und alle gefärbten Substanzen ab. Auch die

^R Auf die Untersuchung von Theophyllin wird verzichtet, da schon in früheren Experimenten gezeigt wurde, dass die Affinitäten des Rezeptors zu Theophyllin und Koffein weitgehend vergleichbar sind.

Kaffeeöle werden abgetrennt, denn es wird ein klarer und farbloser wässriger Auszug erhalten. Nach Flüssig-flüssig-Extraktion mit Dichlormethan werden die organischen Phasen auf ein definiertes Volumen gebracht und dann zur Analyse überführt.⁵

Die Liste der Inhaltsstoffe ist bei Erfrischungsgetränken deutlich übersichtlicher, die Matrix weniger komplex. Ein bloßes Eindampfen ist aber auch hier nicht sinnvoll, da die sirupösen Rückstände sich nicht mehr auflösen lassen. Darum erfolgt hier die Aufreinigung an einer „klassischen“ Umkehrphase, bei der zunächst mit der wässrigen Phase alle polaren Substanzen eluiert werden. Nach Trocknen der Säule im Luftstrom wird dann direkt mit Dichlormethan das Koffein eluiert und die Analysenlösung erhalten.

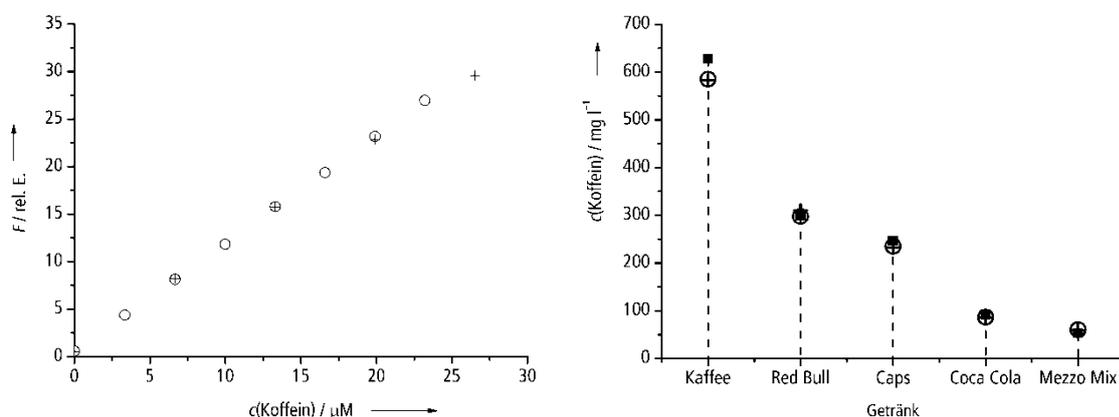


Abbildung 66: links: Beispiel für eine lineare Kalibration, $c(1)=50 \mu\text{M}$, $c(24)=100 \mu\text{M}$, $c_0(\text{Koffein})=1\text{mM}$. rechts: Vergleich von gefundenen (○,+) und Referenzwerten (■) für verschiedene Lebensmittelproben.

Für die Gehaltsbestimmungen werden zunächst Kalibrationsgeraden ermittelt (Abbildung 66). Hierfür werden bis zu drei Messreihen aufgenommen. Die Streuung der Datenpunkte ist dabei sehr gering. Da keine weiteren Interferenzen auftreten, wird auf das Standardzusatzverfahren verzichtet. Die erhaltenen Werte für den Koffeingehalt geben für alle Proben eine vernünftige Übereinstimmung mit den Werten, die mittels HPLC bestimmt^T oder vom Hersteller angegeben wurden. Dabei wird ein Konzentrationsbereich von 50–600 mg abgedeckt.^U Die Wiederfindungsraten liegen in einem Bereich von 91–114%. Damit ist die generelle Anwendbarkeit dieser Methode für die Koffeinanalytik bestätigt

^S Für die Analyse größerer Stückzahlen ist die Flüssig-Flüssig-Extraktion wenig hilfreich, da diese nur schwer parallelisierbar ist. Abhilfe schafft z.B. eine zweite, kurze Festphasenextraktion an einer konventionellen Umkehrphase, die einen schnellen Wechsel vom wässrigen zum organischen Medium erlaubt. (s. Softdrinks)

^T Herrn Bernd Schwarz vom Institut für Lebensmittelchemie der Westf. Wilhelms-Universität Münster sei herzlich für die Durchführung der HPLC-Untersuchungen und die hilfreiche Beratung in Fragen der Probenaufbereitung gedankt.

^U Zwar unterscheidet sich die Probenaufbereitung zwischen Erfrischungsgetränken und dem Kaffeegetränk. Die eingesetzten Volumina (2 mL Probe, Verdünnung der aufgereinigten Probe auf 5 mL) sind jedoch einheitlich.

Ein entscheidender Vorteil dieser Methode mit gängigen HPLC-Techniken liegt in der kurzen Messdauer. Schnelle HPLC-Techniken erlauben Analysezeiten von 3-7 Minuten, die Messung per Fluoreszenz ist nach 30 Sekunden abgeschlossen. Die Anwendung von vorgepackten Einweg-Umkehrphasen erlaubt außerdem eine erhebliche Parallelisierung, ggf. sogar Automatisierung der Probenvorbereitung. Gerade wenn es um die Koffeinbestimmung bei einer großen Zahl von Proben geht, ist diese Technik der HPLC zumindest ebenbürtig.

3.2.3.8 Fazit und Ausblick

Die kompetitive Fluoreszenzspektroskopie stellt die mit Abstand beste Methode zur quantitativen Analyse von Koffein unter Anwendung von triphenylenbasierten Rezeptoren dar. Es werden erheblich geringere Mengen an Rezeptor benötigt, auch ist der Einsatz von teils giftigen und hochreaktiven Substanzen wie bei der UV-spektroskopischen Methode nicht erforderlich. Der Konkurrenzgast ist leicht aus kommerziell erhältlichen Vorstufen herzustellen. Gerade in Bezug auf die Geschwindigkeit ist sie den gängigen HPLC-Methoden deutlich überlegen, da die Vorbereitung stark parallelisiert werden kann und die eigentlichen Messzeiten sehr kurz sind.

Für eine bessere Handhabbarkeit ist wünschenswert, dass die zu quantifizierende Emission im sichtbaren Bereich erfolgt. Vielversprechend ist die Verwendung eines Marker-Fluorophors, dessen Lumineszenz durch das Triphenylen gelöscht wird. Wie *Audebert* zeigte, bieten sich hierfür insbesondere Tetrazine an, da deren Fluoreszenz leicht von elektronenreichen aromatischen Verbindungen (u.a. Triphenylamin und Phenol) gelöscht wird.^[65] An der in Abbildung 67 gezeigten Substanz existiert eine negative Korrelation zwischen dem Logarithmus der *Stern-Volmer*-Konstante und dem Standardelektrodenpotential des Löschers. Die stärkste Löschung erfolgte somit durch Triphenylamin ($E^\circ = +0.85$ V gegen Standardkalomelektrode). Dieser Wert wird durch die erste Oxidation von Hexamethoxytriphenylen deutlich unterboten ($E^\circ = +0.5$ V).^[66] Wenn nun eine Tetrazineinheit gegen eine Xanthinylgruppe ausgetauscht würde und dieses bindet am Rezeptor, ist somit auch eine Löschung durch das Triphenylen zu erwarten

Auch die spektroskopischen Eigenschaften dieser Gruppe sprechen für deren Verwendung: Die Anregung kann bei 495 nm erfolgen, während die Emission bei 550–620 nm geschieht. Somit sind auch beide Bereiche deutlich im sichtbaren Bereich angeordnet, was den apparativen Aufwand (dies betrifft insbesondere die Lichtquelle) deutlich vereinfacht.

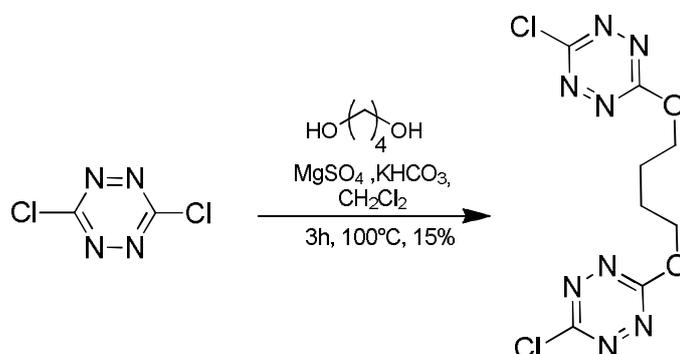


Abbildung 67: Synthese eines Ditetrazins mit Alkylbrücke nach *Audebert*.^[65]

4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bindung von Koffein und verwandten Oxopurinen in C_3 -symmetrischen Rezeptoren auf der Basis von Triphenylenketalen untersucht. Dabei stand vor allem die Evaluierung für eine spätere Anwendung im Vordergrund.

Für die Anwendung als Chemosensor wurden mehrere optische Verfahren getestet. Die Verwendung von UV/Vis-Spektroskopie gelingt nur unter Einsatz eines elektronenarmen Konkurrenzgastes, welcher durch das stärker bindende Koffein unter Entfärbung verdrängt wird. Obwohl dieser Effekt sogar mit bloßem Auge zu erkennen ist und somit eine einfache Untersuchung ermöglichen würde, machen die besondere Reaktivität des Konkurrenzgastes und dessen geringe Affinität zum Rezeptor eine weitere Anwendung als Chemosensor für Koffein unwahrscheinlich.

Den entscheidenden Durchbruch lieferte der Wechsel auf Fluoreszenzspektroskopie. Die Bindung von Gästen lässt sich mit dieser Methode direkt beobachten und für quantitative Studien nutzen. Die Signalzunahme bei Zugabe von Koffein liegt bei maximal 30%. Durch Verwendung eines vom Koffein abgeleiteten Konkurrenzgastes können weitere Verbesserungen erzielt werden. So konnte eine maximale Signaldynamik von fast 400% erzielt werden.

Durch die Entwicklung eines geeigneten Probenvorbereitungsprotokolls war es möglich, mit dem fluoreszenzbasierten System einen Nachweis von Koffein an kommerziell verfügbaren Getränkeproben durchzuführen. Die Ergebnisse waren in guter Übereinstimmung mit HPLC-Kontrollexperimenten.

Die Eignung von Rezeptoren auf Triphenylenketalbasis für die enantiofaciale Differenzierung an Heteroaromaten wurde durch Untersuchung verschiedener Wirt-Gast-Komplexe mittels CD-Spektroskopie und Tieftemperatur-NMR systematisch demonstriert. Rezeptoren mit Menthyl-Substituenten liefern laut NMR die stärkste Seitendifferenzierung. Anhand des CD wird ein vollständiges und schlüssiges Bild über den Zusammenhang zwischen dem Raumbedarf am Gast, der Ausrichtung der chiralen Gruppen am Wirt und dem erhaltenen CD hergestellt. Durch umfangreiche molekulardynamische Simulationen und nachfolgende semiempirische Berechnungen wurden Referenzspektren berechnet, welche die Zuordnung der Stereochemie anhand des CD eindeutig belegen. Die Ergebnisse sind zudem in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus röntgenkristallographischen Untersuchungen. (Diese Methode ließ sich erfolgreich auf die helicale Faltung von Alkanen in Kapseln von Rebek, jr. umsetzen.) Obwohl die Energieunterschiede zwischen den diastereomeren Komplexen klein sind, konnte anhand der CD-Spektroskopie somit erstmalig die enantiofaciale Differenzierung an einem heterocyclischen System bei Raumtemperatur beobachtet werden.

Die beste enantiofaciale Differenzierung erzielen die Menthyl-abgeleiteten Rezeptoren. Diese sind hinsichtlich einer möglichen Anwendung als chirales „Auxiliar“ ungeeignet, da sie mit den sperrigen Cyclohexylgruppen auch den Raum oberhalb des gebundenen Gastes blockieren. Daher wird für die weitere Entwicklung auf die praktische Einführung chiraler Information in Form des Isocyanats verzichtet werden müssen. Stattdessen zielen aktuelle Bemühungen auf den Aufbau chiraler Rückgrate, welche den Raum in der unteren Peripherie des Gastes beeinflussen.

5 Literatur

- [1] K. N. Raymond, E. A. Dertz, S. S. Kim, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 3584–3588.
- [2] C. J. Carrano, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 5401–5404.
- [3] S. E. Gibson, M. P. Castaldi, *Chem. Commun.* **2006**, 3045–3062.
- [4] C. Moberg, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 248–268.
- [5] C. Moberg, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4721–4723.
- [6] M. H. Chisholm, J. C. Gallucci, K. Phomphrai, *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 6717–6725.
- [7] S. Bontemps, G. Bouhadir, W. Gu, M. Mercy, C.-H. Chen, B. M. Foxman, L. Maron, O. V. Ozerov, D. Bourissou, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1481–1484.
- [8] M.-E. Moret, J. C. Peters, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2063–2067.
- [9] C. Dro, S. Bellemin-Laponnaz, R. Welter, L. H. Gade, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4479–4482.
- [10] C. Foltz, B. Stecker, G. Marconi, S. Bellemin-Laponnaz, H. Wadepohl, L. H. Gade, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 9912–9923.
- [11] L. H. Gade, S. Bellemin-Laponnaz, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 4142–4152.
- [12] L. H. Gade, G. Marconi, C. Dro, B. D. Ward, M. Poyatos, S. Bellemin-Laponnaz, H. Wadepohl, L. Sorace, G. Poneti, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 3058–3075.
- [13] P. Cao, C. Deng, Y.-Y. Zhou, X.-L. Sun, J.-C. Zheng, Z. Xie, Y. Tang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4463–4466.
- [14] D. M. J. Doble, M. Melchior, B. O'Sullivan, C. Siering, J. Xu, V. C. Pierre, K. N. Raymond, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 4930–4937.
- [15] M. Kruppa, B. König, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3520–3560.
- [16] S. L. Tobey, B. D. Jones, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4026–4027.
- [17] S. L. Tobey, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14807–14815.
- [18] S. L. Tobey, E. V. Anslyn, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2029–2031.
- [19] a) D. D. MacNicol, A. D. U. Hardy, D. R. Wilson, *Nature* **1977**, *266*, 611–612. b) F. Vögtle, E. Weber, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1974**, *13*, 814–816.
- [20] D. J. Iverson, G. Hunter, J. F. Blount, J. R. Damewood, K. Mislow, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6073–6083.
- [21] A. Metzger, V. M. Lynch, E. V. Anslyn, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 862–865.
- [22] G. Hennrich, E. V. Anslyn, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 2219–2224.
- [23] A. Metzger, E. V. Anslyn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 649–652.
- [24] C. Schmuck, M. Schwegmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3373–3379.
- [25] C. Schmuck, M. Schwegmann, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 836–838.
- [26] D. Y. Lee, N. Singh, M. J. Kim, D. O. Jang, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3024–3027.
- [27] S.-G. Kim, K. H. Kim, J. Jung, S. K. Shin, K. H. Ahn, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 591–596.
- [28] S.-G. Kim, K.-H. Kim, Y. K. Kim, S. K. Shin, K. H. Ahn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13819–13824.
- [29] S. Sambasivan, S.-G. Kim, S. M. Choi, Y. M. Rhee, K. H. Ahn, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4228–4231.
- [30] O. Francesconi, A. Ienco, G. Moneti, C. Nativi, S. Roelens, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6693–6696.
- [31] a) A. Ardá, C. Venturi, C. Nativi, O. Francesconi, G. Gabrielli, J. Canada, J. Jiménez-Barbero, S. Roelens, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 414–418. b) C. Nativi, O. Francesconi, G. Gabrielli, A. Vacca, S. Roelens, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 4814–4820.
- [32] A. T. Wright, Z. L. Zhong, E. V. Anslyn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5679–5682.
- [33] G. Hennrich, V. M. Lynch, E. V. Anslyn, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 2274–2278.
- [34] H. G. Löhr, F. Vögtle, *Acc. Chem. Res.* **1985**, *18*, 65–72.
- [35] X. X. Zhang, J. S. Bradshaw, R. M. Izatt, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 3313–3361.
- [36] R. P. Liu, W. C. Still, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2573–2576.
- [37] S.-G. Kim, K. H. Ahn, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4175–4177.

- [38] J. Kim, D. Ryu, Y. Sei, K. Yamaguchi, K. H. Ahn, *Chem. Commun.* **2006**, 1136–1138.
- [39] K. Murai, S. Fukushima, S. Hayashi, Y. Takahara, H. Fujioka, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 964–966.
- [40] K. Murai, S. Fukushima, A. Nakamura, M. Shimura, H. Fujioka, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 4862–4868.
- [41] G. Bringmann, R.-M. Pfeifer, C. Rummey, K. Hartner, M. Breuning, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6859–6863.
- [42] F. Fabris, L. Pellizzaro, C. Zonta, O. de Lucchi, *Eur. J. Org. Chem* **2007**, 283–291.
- [43] M. P. Castaldi, S. E. Gibson, M. Rudd, A. J. P. White, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 138–148.
- [44] K. Abecassis, S. E. Gibson, M. Martin-Fontecha, *Eur. J. Org. Chem* **2009**, 1606–1611.
- [45] J. Bitta, S. Kubik, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2637–2640.
- [46] D. Mink, S. Mecozzi, J. Rebek, Jr., *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5709–5712.
- [47] G. Haberhauer, T. Oeser, F. Rominger, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 6718–6726.
- [48] A. Pinter, G. Haberhauer, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2217–2225.
- [49] S. R. Waldvogel, A. R. Wartini, P. H. Rasmussen, J. Rebek, Jr., *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 3515–3518.
- [50] S. R. Waldvogel, R. Fröhlich, C. A. Schalley, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2472–2475.
- [51] a) M. C. Schopohl, A. Faust, D. Mirk, R. Fröhlich, O. Kataeva, S. R. Waldvogel, *Eur. J. Org. Chem* **2005**, 2987–2999. b) S. R. Waldvogel, D. Mirk, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 4769–4772.
- [52] N. M. Boshta, M. Bomkamp, G. Schnakenburg, S. R. Waldvogel, *Eur. J. Org. Chem* **2011**, 1985–1992.
- [53] N. M. Boshta, M. Bomkamp, G. Schnakenburg, S. R. Waldvogel, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 3459–3466.
- [54] T. Groehn, R. Moser, *Pteridines* **1999**, *10*, 95–100.
- [55] I. A. Rose, K. R. Hanson, K. D. Wilkinson, M. J. Wimmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, *77*, 2439–2441.
- [56] S. Boerner, R. Orghici, S. R. Waldvogel, U. Willer, W. Schade, *Appl. Opt.* **2009**, *48*, B183–B189.
- [57] M. H. Abraham, *Chem. Soc. Rev.* **1993**, *22*, 73–83.
- [58] H.-J. Schneider, A. K. Yatsimirsky, *Principles and Methods in Supramolecular Chemistry*, John Wiley & Sons, Chichester, **1999**.
- [59] S. Marguet, D. Markovitsi, P. Millic, H. Sigal, S. Kumar, *J. Phys. Chem.* **1998**, *102*, 4697–4710.
- [60] D. Markovitsi, A. Germain, P. Millic, P. Lécuyer, L. K. Gallos, P. Argyrakakis, H. Bengs, H. Ringsdorf, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 1005–1017.
- [61] J. P. Ryckaert, *Molecular Physics* **1985**, *55*, 549–556.
- [62] a) S. Lin, W. S. Struve, *Photochem. Photobiol.* **1991**, *54*, 361–365. b) H. Heberer, H. Matschiner, *J. Prakt. Chem. (Leipzig)* **1986**, *328*, 261–274.
- [63] S. Uchiyama, K. Takehira, S. Kohtani, K. Imai, R. Nakagaki, S. Tobita, T. Santa, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 1067–1072.
- [64] A. W. Czarnik in *Advances in Supramolecular Chemistry* (Ed.: G. W. Gokel), JAI Press, Greenwich, Connecticut, **1993**.
- [65] P. Audebert, F. Miomandre, G. Clavier, M.-C. Vernières, S. Badré, R. Méallet-Renault, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 5667–5673.
- [66] K. Bechgaar, V. D. Parker, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 4749–4750.

6 Eigene Veröffentlichungen

Folgende Publikationen wurden im Lauf dieser Arbeit erstellt und sind daher im Anhang beigefügt.

- [1] M. C. Schopohl, C. Siering, O. Kataeva, S. R. Waldvogel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2620–2623; *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2724–2727. (VIP Paper, sämtliche Untersuchungen zur Affinität in Lösung, CD-Spektroskopie)
- [2] C. Siering, S. Grimme, S. R. Waldvogel, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1877–1888.
- [3] C. Siering, B. Beermann, S. R. Waldvogel, *Supramol. Chem.* **2006**, *18*, 23–27.
- [4] C. Siering, H. Kerschbaumer, M. Nieger, S. R. Waldvogel, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1471–1474.
- [5] M. Bomkamp, C. Siering, K. Landrock, H. Stephan, R. Fröhlich, S. R. Waldvogel, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 3724–3732. (Fluoreszenzmessungen in Toluol, thermodynamische Überlegungen)
- [6] C. Siering, J. Toräng, H. Kruse, S. Grimme, S. R. Waldvogel, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1625–1627. (Hot Paper)

Nicht im (direkten) Zusammenhang mit der Dissertation sind entstanden:

- [7] N. Meier, F. E. Hahn, T. Pape, C. Siering, S. R. Waldvogel, *Molecular recognition utilizing complexes with NH,NR-stabilized carbene ligands*, *Eur. J. Inorg. Chem* **2007**, 1210–1214. (Bindungsstudien via NMR zwischen N-Heterocyclischen Carbenen mit Wasserstoffbrücken-Akzeptoren und DMPU)
- [8] D. Lubczyk, C. Siering, J. Loergen, Z. B. Shifrina, M. Muellen, S. R. Waldvogel *Simple and sensitive online detection of triacetone triperoxide explosive*, *Sens. Act. B* **2010**, *143*, 561–566.
- [9] D. M. Doble, M. Melchior, B. O’Sullivan, C. Siering, J. D. Xu, V. C. Pierre, K. N. Raymond *Toward optimized high-relaxivity MRI agents: The effect of ligand basicity on the thermodynamic stability of hexadentate hydroxypyridonate/catecholate gadolinium(III) complexes*, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 4930–4937.
- [10] B. O’Sullivan, D. M. Doble, M. K. Thompson, C. Siering, J. D. Xu, M. Botta, S. Aime, K. N. Raymond *The effect of ligand scaffold size on the stability of tripodal hydroxypyridonate gadolinium complexes*, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 2577–2583.
- [11] C. Almeida, E. Eguereva, S. Kehraus, C. Siering, G. M. König *Hydroxylated Sclerosporin Derivatives from the Marine-Derived Fungus Cadophora malorum*, *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 476–478.
- [12] A. F. Yassin, W.-M. Chen, H. Hupfer, C. Siering, R. M. Kroppenstedt, A. B. Arun, W.-A. Lai, F.-T. Shen, R. D. Rekha, C. C. Young *Lysobacter defluvii sp nov., isolated from municipal solid waste*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2007**, *57*, 1131–1136.
- [13] A. F. Yassin, C. Siering *Corynebacterium sputi sp nov., isolated from the sputum of a patient with pneumonia*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2008**, *58*, 2876–2879.
- [14] C. C. Young, H. Hupfer, C. Siering, M.-J. Ho, A. B. Arun, W.-A. Lai, P. D. Rekha, F.-T. Shen, M.-H. Hung, W.-M. Chen et al. *Azospirillum rugosum sp nov., isolated from oil-contaminated soil*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2008**, *58*, 959–963.
- [15] S.-Y. Lin, C. C. Young, H. Hupfer, C. Siering, A. B. Arun, W.-M. Chen, W.-A. Lai, F.-T. Shen, P. D. Rekha, A. F. Yassin *Azospirillum picis sp nov., isolated from discarded tar*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2009**, *59*, 761–765.
- [16] A. F. Yassin, H. Hupfer, H.-P. Klenk, C. Siering *Desmospora activa gen. nov., sp nov., a thermoactinomycete isolated from sputum of a patient with suspected pulmonary tuberculosis, and emended description of the family Thermoactinomycetacea Matsuo et al. 2006*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2009**, *59*, 454–459.

- [17] A. F. Yassin, C. Spröer, H. Hupfer, C. Siering, H.-P. Klenk *Nocardiopsis potens* sp nov., isolated from household waste, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2009**, *59*, 2729–2733.
- [18] A. F. Yassin, H. Hupfer, C. Siering, H.-J. Busse *Chryseobacterium treverense* sp. nov., isolated from a human clinical source, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2010**, *60*, 1993–1998.
- [19] A. F. Yassin, C. Spröer, C. Siering, H.-P. Klenk *Actinomadura sputi* sp nov., isolated from the sputum of a patient with pulmonary infection, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2010**, *60*, 149–153.
- [20] A. F. Yassin, C. Spröer, C. Siering, H.-P. Klenk *Actinomadura sputi* sp. nov., isolated from the sputum of a patient with pulmonary infection (vol, 60, pg 149, 2010), *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2010**, *60*, 1008.
- [21] A. F. Yassin, H. Hupfer, C. Siering, H.-P. Klenk, P. Schumann *Auritidibacter ignavus* gen. nov., sp. nov., of the family Micrococcaceae isolated from an ear swab of a man with otitis externa, transfer of the members of the family Yaniellaceae Li et al. 2008 to the family Micrococcaceae and emended description of the suborder Micrococccineae, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2011**, *61*, 223–230.
- [22] A. F. Yassin, H. Hupfer, C. Siering, P. Schumann *Comparative chemotaxonomic and phylogenetic studies on the genus Arcanobacterium Collins et al. 1982 emend. Lehnen et al. 2006: proposal for Trueperella gen. nov and emended description of the genus Arcanobacterium*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2011**, *61*, 1265–1274.
- [23] A. F. Yassin, C. Spröer, C. Siering, H. Hupfer, P. Schumann *Arthrobacter equi* sp nova, isolated from veterinary clinical material, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2011**, *61*, 2089–2094.

7 Anhang

Aus Copyright-Gründen wird auf die entsprechenden Publikationen bei den Verlagen verwiesen.

M. C. Schopohl, C. Siering, O. Kataeva, S. R. Waldvogel,
Angew. Chem. Int. Ed. **2003**, *42*, 2620–2623 (DOI: [10.1002/anie.200351102](https://doi.org/10.1002/anie.200351102));
Angew. Chem. **2003**, *115*, 2724–2727 (DOI: [10.1002/ange.200351102](https://doi.org/10.1002/ange.200351102)).

C. Siering, S. Grimme, S. R. Waldvogel, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1877–1888
(DOI: [10.1002/chem.200401002](https://doi.org/10.1002/chem.200401002))

C. Siering, B. Beermann, S. R. Waldvogel, *Supramol. Chem.* **2006**, *18*, 23–27.
(DOI: [10.1080/10610270500310479](https://doi.org/10.1080/10610270500310479))

C. Siering, H. Kerschbaumer, M. Nieger, S. R. Waldvogel, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1471–1474.
(DOI: [10.1021/ol0603110](https://doi.org/10.1021/ol0603110))

M. Bomkamp, C. Siering, K. Landrock, H. Stephan, R. Fröhlich, S. R. Waldvogel,
Chem. Eur. J. **2007**, *13*, 3724–3732.
(Fluoreszenzmessungen in Toluol, thermodynamische Überlegungen)
(DOI: [10.1002/chem.200601231](https://doi.org/10.1002/chem.200601231))

C. Siering, J. Toräng, H. Kruse, S. Grimme, S. R. Waldvogel,
Chem. Commun. **2010**, *46*, 1625–1627. (Hot Paper)
(DOI: [10.1039/b925334c](https://doi.org/10.1039/b925334c))