

leicht herstellen. Ligandenbibliotheken, die über diesen Weg zugänglich sind, könnten dazu verwendet werden, die bisher erreichten Regio- und Enantioselektivitäten noch weiter zu verbessern.

Unsere Ergebnisse zeigen, wie die Regioselektivität allylischer Alkylierungen durch systematische Veränderung der sterischen und elektronischen Eigenschaften des am Palladiumkatalysator gebundenen Liganden beeinflußt werden kann. Mit einer neuen Klasse chiraler P,N-Liganden gelang es, die Reaktion von 1- und 3-Aryl-2-propenylacetaten mit brauchbaren Enantio- und Regioselektivitäten durchzuführen.^[8] Die Auswahl an Substraten, die befriedigende Selektivitäten ergeben, ist zur Zeit auf Aryl-substituierte Derivate beschränkt, doch die Konzepte, die uns zu den Liganden **9** geführt haben, sollten sich auch zur Entwicklung neuer Katalysatoren für andere Substratklassen eignen. Darüber hinaus zeichnen sich bereits weitere Anwendungsmöglichkeiten dieser Liganden in der asymmetrischen Katalyse ab.^[9]

Experimentelles

9a: Alle Reaktionen wurden in entgasten Lösungsmitteln unter Argon durchgeführt. Eine Lösung von **10**^[10] (1.1 g, 3.2 mmol) in 10 mL Toluol wurde zu einer Lösung von Et₃N (2.6 g, 25.7 mmol) in 20 mL Toluol bei -78°C getropft. Nach 5 min Röhren bei -78°C wurde eine Lösung von **11**^[11] (0.6 g, 3.2 mmol) in 5 mL Toluol rasch zugegeben. Man ließ die Lösung langsam auf Raumtemperatur kommen und anschließend 12 h röhren. Dann wurde vom entstandenen weißen Niederschlag abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt und das erhaltene gelbe Öl durch Säulenchromatographie gereinigt (Kieselgel, 3.0 × 20 cm; n-Hexan:EtOAc 4:1, *R*_f = 0.4). Ausbeute: 890 mg (56%) (*S,S*)-**9a** als amorpher Feststoff. [α]₅₈₉ = +269 (CHCl₃, *c* = 3.1, 23 °C); ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 0.96 (s, 9 H; tBu), 1.65 (s, 3 H; Me), 1.75 (s, 3 H; Me), 3.95–4.00 (m, 1 H; HCN), 4.20–4.35 (m, 2 H; CH₂O), 7.22–7.52 (m, 8 H; arom. CH), 7.89–7.96 (m, 4 H; arom. CH); ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 25.8 (tBu), 28.1 (d, *J* = 7.9 Hz; Me), 28.2 (d, *J* = 5.7 Hz; Me), 33.9 (tBu), 69.7 (CH₂O), 75.7 (CHN), 77.2 (C), 121.9/122.4 (arom. CH), 123.2 (arom. C), 124.5 (d, *J* = 3.1 Hz; arom. C), 124.6/124.8/125.8/126.0/126.9/127.0/128.1/128.2/129.3/130.0 (arom. CH), 131.1/131.4/132.7/132.8 (arom. C), 147.9 (d, *J* = 2.3 Hz; arom. C), 148.0 (d, *J* = 3.7 Hz; arom. C), 168.3 (C≡N); ³¹P-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 151.5. Die katalytischen Reaktionen (Tabellen 1 and 2) wurden nach bekannter Vorschrift durchgeführt.^[12] Die Reinigung und die analytischen Daten der Produkte sind an anderer Stelle beschrieben.^[3b, 4]

Eingegangen am 28. Juli 1997 [Z10745]

Stichwörter: Allylische Alkylierungen • Asymmetrische Katalyse • Dihydrooxazole • Palladium • P,N-Liganden

- [1] a) B. M. Trost, D. L. Van Vranken, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 395–422; b) T. Hayashi in *Catalytic Asymmetric Synthesis*, (Hrsg.: I. Ojima), VCH, New York, **1993**, S. 325–365.
- [2] a) Eine Diskussion der Regioselektivitätsbestimmenden Faktoren findet man in: B. M. Trost, M.-H. Hung, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 6837–6839; b) zum Einfluß des Liganden auf die Regioselektivität siehe: B. Åkermark, K. Zetterberg, S. Hansson, B. Kränkerberger, A. Vitagliano, *J. Organomet. Chem.* **1987**, *335*, 133–142; M. P. T. Sjögren, S. Hansson, B. Åkermark, A. Vitagliano, *Organometallics* **1994**, *13*, 1963–1971.
- [3] a) W. B. M. Trost, M.-H. Hung, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 7757–7759; b) vgl. auch: G. C. Lloyd-Jones, J. Lehmann, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 8863–8874; c) Ir: R. Takeuchi, M. Kashio, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 268–270; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 263–265; d) Mo: B. M. Trost, M. Lautens, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 4817–4840; e) Ru: T. Kondo, H. Ono, N. Satake, T. Mitsudo, Y. Watanabe, *Organometallics*

- 1995**, *14*, 1945–1953; S.-W. Zhang, T. Mitsudo, T. Kondo, Y. Watanabe, *J. Organomet. Chem.* **1993**, *450*, 197–207.
- [4] G. C. Lloyd-Jones, A. Pfaltz, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 534–536; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 462–464.
- [5] a) P. von Matt, A. Pfaltz, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 614–615; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 566–568; A. Pfaltz, *Acta Chem. Scand. B* **1996**, *50*, 189–194; b) J. Sprinz, G. Helmchen, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1769–1772; G. Helmchen, S. Kudis, P. Sennhenn, H. Steinhagen, *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69*, 513–518; c) G. J. Dawson, C. G. Frost, J. M. J. Williams, S. J. Coote, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3149–3150; J. M. J. Williams, *Synlett* **1996**, 705–710.
- [6] J. Sprinz, M. Kiefer, G. Helmchen, M. Reggelin, G. Huttner, O. Walter, L. Zsolnai, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 1523–1526; J. M. Brown, D. J. Hulmes, P. J. Guiry, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 4493–4506; A. Togni, U. Burckhardt, V. Gramlich, P. S. Pregosin, R. Salzmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1031–1037; P. E. Blöchl, A. Togni, *Organometallics* **1996**, *15*, 4125–4132; T. R. Ward, *ibid.* **1996**, *15*, 2836–2838.
- [7] Synthese von **7**: O. Loiseleur, Dissertation, Universität Basel, **1996**.
- [8] Nach Abschluß dieser Arbeit wurde über analoge regioselektive Reaktionen von 3-Aryl-2-propenylacetaten **1** mit Methylmalonsäuredimethylester und einem chiralen Monophosphan-Pd-Komplex berichtet (4:5 4:1, 68–86 % ee; R = Ph): T. Hayashi, M. Kawatsura, Y. Uozumi, *Chem. Commun.* **1997**, 561–562.
- [9] Cu-katalysierte 1,4-Addition von Organozink-Reagentien an Enone: A. Knobel, I. Escher, A. Pfaltz, *Synlett* **1997**, 1429–1431.
- [10] N. Green, T. P. Kee, *Synth. Commun.* **1993**, *23*, 1651–1657.
- [11] J. V. Allen, J. M. J. Williams, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 277–282; L. N. Pridgen, G. Miller, *J. Heterocycl. Chem.* **1983**, *20*, 1223–1230.
- [12] P. von Matt, G. C. Lloyd-Jones, A. B. E. Minidis, A. Pfaltz, L. Macko, M. Neuburger, M. Zehnder, H. Rüegger, P. S. Pregosin, *Helv. Chim. Acta* **1995**, *78*, 265–284.

Synthese einer neuen Klasse lösungsmittelabhängiger Fluoreszenzmarker

James J. La Clair*

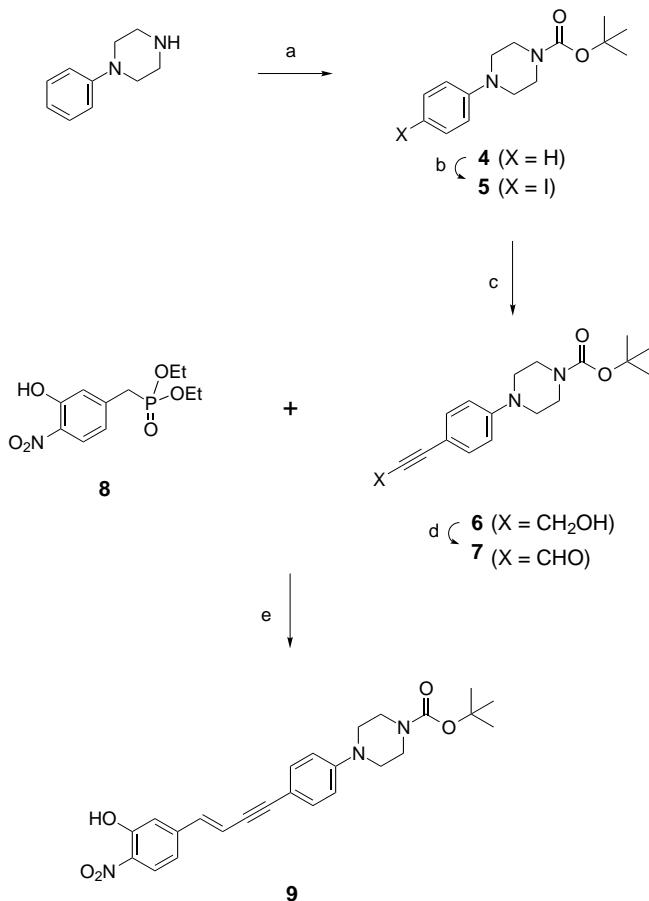
Charge-Transfer(CT)-Marker wie 5-(Dimethylamino)-naphthalin-1-sulfonyl(Dansyl)-chlorid wurden in großem Ausmaß beim Nachweis sowie bei der Charakterisierung und Lokalisierung von Kohlenhydraten, Phospholipiden, Proteinen, Oligonucleotiden sowie zahlreichen anderen synthetischen und natürlich vorkommenden Verbindungen eingesetzt.^[1] Die UV/Vis-Absorptions- und/oder Fluoreszenzbanden dieser Verbindungen werden in typischer Weise je nach Art der Lösungsmittelhülle verschoben.^[2] Dieser Effekt sowie ferner die Beeinflussung der Fluoreszenzlebensdauer, des Ausmaßes an Intersystem-Crossing und der Fluoreszenzquantenausbeute förderten die Verwendung dieser Verbindungen in der Praxis als Sonden zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen biologisch wichtigen Makromolekülen.^[3] Bedingt durch den Grad der Aromatizität absorbiert die Dansylgruppe Licht mit einer Wellenlänge zwischen λ = 190 und 400 nm, d.h., die Anregung ist primär auf UV-Licht eingeschränkt.^[4] Im folgenden beschreiben wir die Synthese einer neuen Klasse von Markierungssubstanzen, bei denen eine intramolekulare Ladungsübertragung stattfinden kann.

[*] Prof. J. J. La Clair
Department of Molecular Biology
The Scripps Research Institute
10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)
Telefax: Int. + 619/784-2584
E-mail: laclair@scripps.edu

Diese Verbindungen absorbieren sichtbares und UV-Licht, wobei die Absorption sehr stark vom verwendeten Lösungsmittel abhängt, und lassen sich in Konzentrationen von einzelnen Molekülen nachweisen.

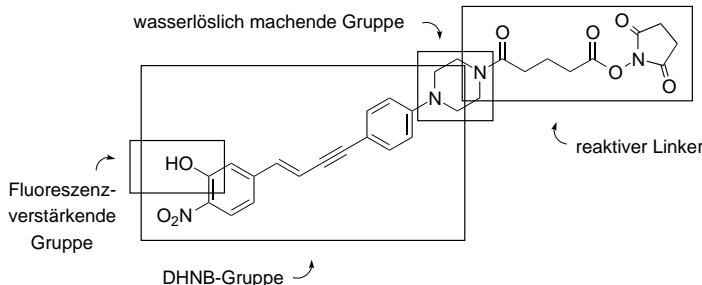
Jüngste Untersuchungen ergaben, daß die Fluoreszenz von 1-[4-(*N,N*-Dimethylamino)phenyl]-4-(3-hydroxy-4-nitrophenyl)-3-(*E*)-buten-1-in (DHNB) stark, die UV/Vis-Absorption dagegen nur wenig durch die Art der Lösungsmittelhülle beeinflußt wird.^[5] Beispielsweise absorbiert in Methanol gelöstes DHNB Licht mit einem Maximum bei 421 nm ($\varepsilon = 50\,800 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) und fluoresziert bei 528 nm mit einer Quantenausbeute von 0.000017. In einem unpolaren aprotischen Lösungsmittel wie *n*-Heptan ist das Absorptionsmaximum bathochrom nach 435 nm ($\varepsilon = 47\,400 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) verschoben und die Quantenausbeute der Fluoreszenz bei 593 und 570 nm um das etwa 1000fache auf 0.0188 bzw. 0.0205 erhöht. Als neues System zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen einzelnen Molekülen haben wir DHNB eingesetzt, um einzelne Aggregate aus einem Kohlenhydrat und einem Protein selektiv nachzuweisen.^[5] Wir beschreiben hier die Synthese von DHNB-Derivaten, die zur Markierung einer großen Vielzahl biologisch signifikanter Moleküle verwendet werden können.

Schema 1 zeigt den derzeitigen Stand des Designs modifizierter DHNB-Verbindungen. Die Hydroxygruppe in Nachbarschaft zur Nitrogruppe dient dazu, die Fluoreszenzquantenausbeute zu steigern. Über diese Gruppe können darüber



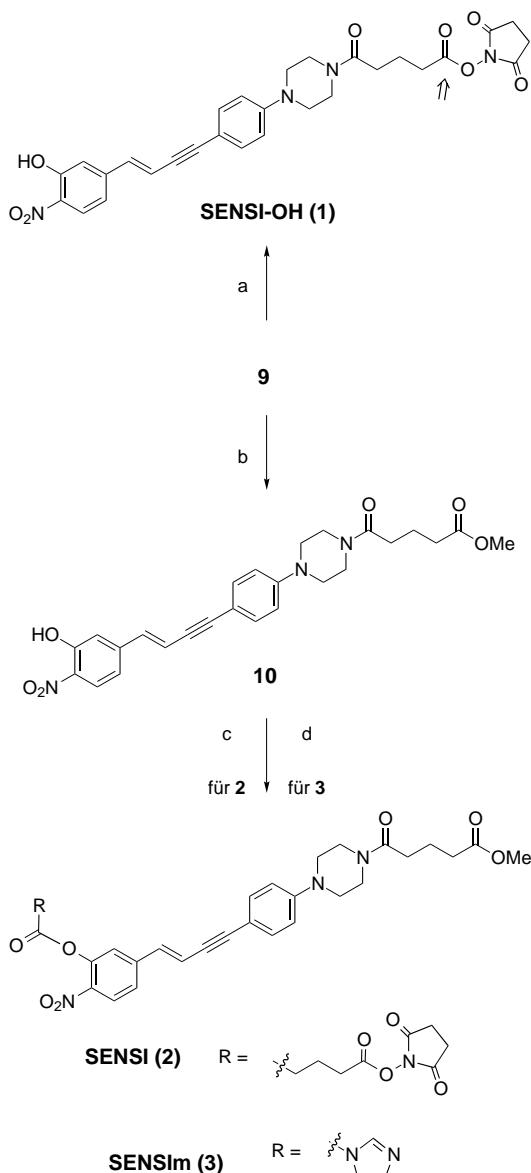
Schema 2. a) Di-*tert*-butyldicarbonat, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂, 0°C → Raumtemperatur (RT), 94%; b) 1. Iod, NaHCO₃, CH₂Cl₂, H₂O, 12–15°C, 10 min; 2. RT, 30 min, 90%; c) Propargylalkohol, [PdCl₂(PPh₃)₂], CuI, Et₃N, THF, RT, 18 h, 85%; d) MnO₂, CH₂Cl₂, RT, 6 h, 98%; e) 1. Zugabe von NaHMDS in THF zu **8** in DMF, 0°C → RT, 1 h; 2. Zugabe von **7** in THF, –20°C → RT, 8 h, 62%.

schen 41 und 45 %. Nach Entfernung der Schutzgruppe von **9** mit Schwefelsäure in wasserhaltigem Tetrahydrofuran kann eine große Zahl reaktiver Linker angebunden werden. So wurde die für die Anbindung an Amine geeignete Markierungssubstanz SENS1-OH **1** hergestellt, indem das entschützte Piperazin mit Glutarsäureanhydrid und anschließend die endständige Carbonsäuregruppe mit *N*-Hydroxysuccinimid in Gegenwart von *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC) umgesetzt wurde (Schema 3). Zur Anknüpfung des Linkers kann auch – wie in SENS1 **2** – die Phenolfunktion verwendet werden. Die Anbindung über diese Gruppe hat den Vorteil, daß diese Bindung durch Hydrolyse gelöst werden kann. Durch Abspaltung der *tert*-Butoxycarbonyl(*t*Boc)-Gruppe von **9** wurde **10**^[8] (Tabelle 1) erhalten, das zur Bildung von **2** mit 4-Chlorcarbonylbuttersäure-*N*-hydroxysuccinimidylester umgesetzt wurde. Die mit einer anderen reaktiven Gruppe versehene Verbindung SENS1m **3** wurde analog hergestellt. Alle drei Derivate reagierten unter Standardbedingungen mit Rinderserumalbumin (BSA). Mit vier Äquivalenten SENS1-OH **1** pro Äquivalent BSA wurden Konjugate mit durchschnittlich 2.1 Farbstoffmolekülen pro BSA-Molekül erhalten. Die Effizienz der beiden an der Phenolgruppe modifizierten Derivate **2** und



Schema 1. Design eines neuen Fluoreszenzmarkers.

hinaus weitere reaktive Funktionalitäten angeknüpft werden.^[6] Die Dimethylaminogruppe von DHNB wurde durch eine Piperazineeinheit ersetzt, wodurch nicht nur die Wasserlöslichkeit dieses Farbstoffs gesteigert, sondern auch eine Funktionalität zur weiteren Verknüpfung bereitgestellt wurde. Als Ausgangsverbindung für die Synthese dieser Modellverbindung wählten wir *N*-Phenylpiperazin, da es im Handel erhältlich und preisgünstig (ca. 1 DM pro Gramm) ist. Das aus diesem hergestellte geschützte Piperazin **4**^[7] wurde mit Iod in einem Zweiphasensystem aus wäßriger Natriumbicarbonatlösung und Dichlormethan halogeniert (Schema 2). Nach einmaligem Umkristallisieren wurde das Iodid **5** erhalten, das übergangsmetallkatalysiert an den C-Terminus von Propargylalkohol gekuppelt wurde. Der entstandene Alkohol **6** wurde mit Mangandioxid zum Aldehyd **7** (Tabelle 1) oxidiert, der mit dem Dianion des Phosphats **8**^[6] unter Bildung von **9** (Tabelle 1) kondensiert wurde. Die Gesamt-ausbeute dieses Verfahrens lag im 1-Gramm-Maßstab zwi-



Schema 3. a) 1. H_2SO_4 , H_2O , THF, RT; 2. Glutarsäureanhydrid, THF, RT, 2 h; 3. *N*-Hydroxysuccinimid, EDC, THF, RT, 12 h, 81%; b) 1. H_2SO_4 , H_2O , THF, RT; 2. Glutarsäureanhydrid, THF, RT, 2 h; 3. EDC, MeOH, THF, RT, 4 h, 77%; c) 4-Chlorocarbonylbuttersäure-*N*-hydroxysuccinimidylester, DMAP, THF, RT, 12 h, 64%; d) *N,N*-Carbonyldimidazol (2.5 Äquiv.), DMAP (0.05 Äquiv.), THF, RT, 14 h, 72%.

3 war deutlich geringer als die von **1** (durchschnittlich 1.2 bzw. 0.8 Fluoreszenzmoleküle pro BSA-Molekül), wahrscheinlich weil die Phenolesterbindung im Verlauf der Kupplung hydrolytisch gespalten wird. Die Konjugate von **2** und **3** waren bei einem pH-Wert zwischen 5.9 und 8.1 stabil, unter diesen Bedingungen wurde nur eine geringe Menge des Farbstoffs während der Dialyse freigesetzt.^[9] Außerhalb dieses Bereichs findet jedoch in beträchtlichem Maß Hydrolyse statt, wobei die Markierungssubstanz oft nur in sehr geringer Menge übrig blieb.

Die spektroskopischen Eigenschaften dieser Verbindungen ähneln denen von DHNB. So wurde das UV/Vis-Absorptionsmaximum der Verbindung **10** beim Wechsel von *n*-Heptan zu Methanol um 33 nm rotverschoben (Tabelle 2).

Tabelle 1. Ausgewählte physikalische Daten von **1–3, 5–7, 9** und **10**.

1 ($C_{29}H_{28}N_4O_8$, 560.56): $R_f = 0.41$ (Ethylacetat/Toluol/Methanol, 10/1/1); Schmp. 223.1–225.6 °C; 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 10.6$ (s, 1 H), 8.04 (d, $J = 8.8$ Hz, 1 H), 7.38 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H), 7.09 (d, $J = 1.6$ Hz, 1 H), 7.01 (dd, $J = 1.6, 8.8$ Hz, 1 H), 6.87 (d, $J = 16.1$ Hz, 1 H), 6.83 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H), 6.54 (d, $J = 16.1$ Hz, 1 H), 3.73 (dd, $J = 4.8, 4.9$ Hz, 2 H), 3.63 (dd, $J = 4.8, 4.9$ Hz, 2 H), 3.24 (m, 4 H), 2.83 (s, 4 H), 2.74 (t, $J = 6.7$ Hz, 2 H), 2.52 (t, $J = 7.2$ Hz, 2 H), 2.10 (ddd, $J = 6.7, 6.7, 7.2, 7.2$ Hz, 2 H); ^{13}C -NMR (63 MHz, $CDCl_3/[D_6]DMSO$, 2/1): $\delta = 18.9, 24.4, 29.0, 29.8, 43.5, 46.5, 46.8, 113.1, 113.9, 115.5, 116.3, 124.4, 131.6, 135.9, 149.2, 168.3$
2 ($C_{35}H_{36}N_4O_{11}$, 688.69): $R_f = 0.62$ (Ethylacetat/Toluol/Methanol, 10/1/1); Schmp. 161.1–162.9 °C; 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 8.08$ (d, $J = 8.5$ Hz, 1 H), 7.37 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H), 7.35 (dd, $J = 1.1, 8.5$ Hz, 1 H), 7.20 (d, $J = 1.1$ Hz, 1 H), 6.90 (d, $J = 16.1$ Hz, 1 H), 6.83 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H), 6.51 (d, $J = 16.1$ Hz, 2 H), 3.75 (t, $J = 4.9$ Hz, 2 H), 3.65 (s, 3 H), 3.63 (t, $J = 4.9$ Hz, 2 H), 3.23 (m, 4 H), 2.83 (s, 4 H), 2.80 (t, $J = 7.1$ Hz, 2 H), 2.42 (t, $J = 7.1$ Hz, 4 H), 2.20 (quint., $J = 7.1$ Hz, 2 H), 1.96 (quint., $J = 7.1$ Hz, 2 H), 1.23 (t, $J = 7.1$ Hz, 2 H); ^{13}C -NMR (53 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 19.4, 20.3, 25.6, 29.8, 32.1, 32.4, 33.0, 41.1, 45.0, 48.0, 48.4, 51.6, 87.1, 113.1, 114.4, 115.3, 122.0, 123.8, 126.5, 133.0, 136.3, 140.1, 143.7, 144.5, 168.0, 169.0, 170.3, 173.7$
3 ($C_{30}H_{29}N_5O_5$, 571.59): $R_f = 0.12$ (Ethylacetat/ <i>n</i> -Hexan, 1/1); Schmp. 192.5–193.1 °C; 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 8.04$ (d, $J = 8.8$ Hz, 1 H), 7.67 (s, 1 H), 7.38 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H), 7.10 (s, 2 H), 7.01 (d, $J = 8.8$ Hz, 1 H), 6.88 (d, $J = 16.0$ Hz, 1 H), 6.84 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H), 6.54 (t, $J = 16.0$ Hz, 1 H), 3.74 (m, 2 H), 3.66 (s, 3 H), 3.63 (m, 2 H), 3.24 (m, 4 H), 2.42 (t, $J = 7.1$ Hz, 2 H), 1.97 (quint., $J = 7.1$ Hz, 2 H), 0.85 (t, $J = 7.1$ Hz, 2 H)
5 ($C_{15}H_{22}IN_2O_2$, 388.25): $R_f = 0.85$ (Ethylacetat/ <i>n</i> -Hexan, 1/1); Schmp. 153.1–153.8 °C; 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.50$ (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H), 6.65 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H), 3.54 (dd, $J = 5.2, 5.2$ Hz, 2 H), 3.07 (dd, $J = 5.2, 5.2$ Hz, 2 H), 1.45 (s, 9 H); ^{13}C -NMR (63 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 28.4, 48.9, 118.5, 137.8, 150.8, 154.6$
6 ($C_{18}H_{24}N_2O_3$, 316.40): $R_f = 0.52$ (Ethylacetat/Hexan, 1/1); Schmp. 158.2–159.1 °C; 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7.30$ (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 6.77 (d, $J = 8.9$ Hz, 2 H), 4.44 (s, 2 H), 3.53 (dd, $J = 5.2, 5.2$ Hz, 4 H); 3.13 (dd, $J = 5.2, 5.2$ Hz, 4 H), 1.45 (s, 9 H); ^{13}C -NMR (63 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 28.4, 48.4, 51.6, 80.0, 85.9, 113.1, 115.5, 132.8, 150.8$
7 ($C_{18}H_{22}N_2O_3$, 314.38): $R_f = 0.74$ (Ethylacetat/ <i>n</i> -Hexan, 1/1); Schmp. 103.5–104.7 °C; 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 9.34$ (s, 1 H), 7.48 (d, $J = 8.9$ Hz, 2 H), 6.81 (d, $J = 8.9$ Hz, 2 H), 3.55 (dd, $J = 5.5, 5.5$ Hz, 4 H); 3.13 (dd, $J = 5.5, 5.5$ Hz, 4 H), 1.46 (s, 9 H); ^{13}C -NMR (63 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 28.4, 47.2, 80.2, 89.2, 89.4, 98.1, 108.2, 114.5, 135.3, 152.5, 154.6, 176.6$
9 ($C_{25}H_{27}N_3O_5$, 449.20): $R_f = 0.83$ (Ethylacetat/ <i>n</i> -Hexan, 1/1); Schmp. 214.3–216.0 °C; 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 10.7$ (s, 1 H), 8.03 (d, $J = 8.8$ Hz, 1 H), 7.37 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 7.07 (d, $J = 1.5$ Hz, 1 H), 7.00 (dd, $J = 1.5, 8.8$ Hz, 1 H), 6.87 (d, $J = 16.0$ Hz, 1 H), 6.83 (d, $J = 8.9$ Hz, 2 H), 6.53 (d, $J = 16.0$ Hz, 2 H), 3.55 (dd, $J = 5.2, 5.2$ Hz, 4 H); 3.20 (dd, $J = 5.2, 5.2$ Hz, 4 H), 1.46 (s, 9 H); ^{13}C -NMR (63 MHz, $[D_6]DMSO$): $\delta = 28.4, 48.1, 87.2, 114.8, 115.3, 116.6, 117.7, 125.6, 133.0, 136.9, 145.9, 151.1, 154.2$
10 ($C_{30}H_{29}N_5O_7$, 571.59): $R_f = 0.13$ (Ethylacetat/ <i>n</i> -Hexan, 1/1); Schmp. 166.3–168.0 °C; 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 10.6$ (s, 1 H), 8.02 (d, $J = 8.8$ Hz, 1 H), 7.36 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H), 7.07 (d, $J = 1.5$ Hz, 1 H), 6.89 (dd, $J = 1.5, 8.8$ Hz, 1 H), 6.86 (d, $J = 16.0$ Hz, 1 H), 6.81 (d, $J = 8.9$ Hz, 2 H), 6.51 (d, $J = 16.0$ Hz, 2 H), 3.74 (t, $J = 1.4$ Hz, 2 H), 3.65 (s, 3 H), 3.62 (t, $J = 1.4$ Hz, 2 H), 3.22 (m, 4 H), 2.40 (dt, $J = 1.4, 6.6$ Hz, 2 H), 1.95 (quint., $J = 7.2$ Hz, 2 H), 1.22 (t, $J = 7.2$ Hz, 2 H)

Der Extinktionskoeffizient war in aromatischen Lösungsmitteln wie Benzol und Toluol am größten und nahm mit zunehmender Polarität ab. Die B-Bande war in den meisten Lösungsmitteln mit Ausnahme von DMF zwischen 14 und 63 % intensiver als die K-Bande.^[10] Die Fluoreszenzbande von **10** wurde beim Wechsel von Methanol zu *n*-Heptan um 111 nm verschoben, die Intensität dieser Bande nahm dabei um das 120fache zu. Die Verstärkung der Fluoreszenzintensität war damit achtmal geringer als bei der Stammverbindung.

Tabelle 2. UV/Vis-Absorptionsmaxima ($\lambda_{A,\text{max}}$), -bereich, Extinktionskoeffizienten (ε), Fluoreszenzmaxima ($\lambda_{F,\text{max}}$), -bereich und -quantenausbeute (Φ_F) von **10** in wasserfreien Lösungsmitteln.^[a]

Lösungsmittel	$E_T^{[b]}$	$\lambda_{A,\text{max}}^{[c]}$ [nm]	ε [cm ⁻¹ M ⁻¹]	λ_A -Bereich ^[d] [nm]	$\lambda_{F,\text{max}}$ [nm]	$\Phi_F^{[e]}$	λ_F -Bereich ^[d] [nm]
<i>n</i> -Heptan	30.9	425	72 500	190–505	595	0.082	575–740
		305	61 800		579	0.079	
Toluol	33.9	422	71 700	190–495	601	0.041	510–730
		314	62 800				
Benzol	34.5	420	119 300	190–495	606	0.057	520–730
		318	93 700				
THF	37.4	412	65 200	190–510	596	0.0067	450–760
		306	47 500				
Ethylacetat	38.1	410	85 100	190–495	624	0.0086	440–725
		310	60 500				
CHCl ₃	39.1	422	59 200	190–505	666	0.0061	460–780
		316	46 900				
CH ₂ Cl ₂	41.4	422	69 400	190–505	657	0.0051	450–670
		316	47 200				
Aceton	42.2	410	67 400	190–495	468	0.0053	430–565
DMF	43.8	468	32 900	190–515	473	0.0039	405–510
		364	73 200				
DMSO	45.0	390	44 900	190–510	480	0.0021	425–545
		310	34 700				
Acetonitril	46.0	398	45 300	190–495	473	0.0014	430–585
		316	34 100				
<i>n</i> -Butanol	50.2	406	45 700	190–490	586	0.0019	432–705
		316	28 200				
Ethanol	51.9	394	63 900	190–490	482	0.0016	425–690
		318	40 800				
Methanol	55.5	392	46 700	190–485	490	0.00068	425–545
		318	28 500				

[a] Die angegebenen Daten sind über mehrere Iterationen gemittelt mit Abweichungen von weniger als 5%. Unvermeidliche Feuchtigkeitsspuren verringerten zweifellos die Intensität dieser Werte. Es wurde darauf geachtet, den Kontakt mit Feuchtigkeit möglichst gering zu halten. Alle Lösungsmittel wurden entweder wasserfrei gekauft oder destilliert. [b] E_T =Solveng polarität. Siehe Lit.^[2a]. [c] Die K-Bande ist als die Bande mit der niedrigeren, die B-Bande als die mit der höheren Wellenlänge definiert. [d] An den Bereichsgrenzen beträgt die Signalintensität 5% der maximalen Absorption bzw. Fluoreszenz. [e] Die Quantenausbeuten wurden gegen den Wert von 0.70 für Rhodamin B in Ethanol standardisiert.

DHNB. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, daß der Piperazinring stärker zur Konjugation mit dem Aryl- π -Elektronensystem neigt als die Dimethylaminogruppe und dadurch dessen Rotationsfreiheitsgrade zur Bildung weiterer fluoreszierender Zustände eingeschränkt sind.^[11] Wie in Tabelle 3 angegeben, waren einzelne Moleküle dieser Farbstoffe in polaren Lösungsmitteln wie THF, Chloroform, Aceton, Acetonitril, DMF, Ethanol, Methanol und Wasser unter Verwendung eines konfokalen Fluoreszenzkorrelationsspek-

trometers in submikromolaren Konzentrationen nachweisbar.^[12] In unpolaren Lösungsmitteln wie *n*-Heptan ließen sich einzelne Moleküle sogar bei weitaus geringeren Konzentrationen nachweisen, so daß sich eine Signalverstärkung von etwa 40 000 für den selektiven Nachweis einzelner Moleküle ergibt. Derzeit wird untersucht, ob diese Marker als Sonde für Wechselwirkungen zwischen Molekülen und lipophilen Oberflächen verwendet werden können.

Experimentelles

5: Di-*tert*-butyldicarbonat (4.5 g, 20.6 mmol) wurde in kleinen Portionen in 15 min zu einem Gemisch aus *N*-Phenylpiperazin (3.0 mL, 19.6 mmol), Triethylamin (8.2 mL, 58.9 mmol) und 4-Dimethylaminopyridin (DMAP; 86 mg) in 100 mL wasserfreiem CH₂Cl₂ bei 0 °C gegeben. 10 min nach Beendigung der Zugabe wurde das Gemisch auf Raumtemperatur erwärmt. Nach 1.5 h wurde es mit 200 mL CH₂Cl₂ und 100 mL Wasser verdünnt und extrahiert. Die wäßrige Phase wurde mit je 100 mL CH₂Cl₂ zweimal extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Kochsalzlösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeengt, wobei 4.87 g (94 %) **4** erhalten wurden. Innerhalb von 45 min wurde ein Gemisch aus **4** (5.46 g, 20.8 mmol) und NaHCO₃ (2.62 g, 31.2 mmol) in 80 mL CH₂Cl₂ und 60 mL Wasser bei 12–15 °C mit Iod (5.0 g, 19.7 mmol) versetzt. Nach Beendigung der Zugabe wurde das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur erwärmt und 30 min bei dieser Temperatur belassen. Es wurde anschließend mit 500 mL CH₂Cl₂ und 100 mL Wasser verdünnt. Die organische Phase wurde abgetrennt, mit 50 mL Wasser, 100 mL Natriumthiosulfatlösung, 100 mL Wasser (2 ×) sowie 100 mL gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeengt. Das Rohprodukt

Tabelle 3. Nachweis einzelner Moleküle von **10**.^[a]

Lösungsmittel	Nachweisgrenze [nM] ^[b]	Grad der Zersetzung nach 5 min [%]
<i>n</i> -Heptan	0.015	1
THF	12	4
CHCl ₃	0.95	3
Aceton	14	4
DMF	17	3
Acetonitril	89	2
Ethanol	128	2
Methanol	205	5
Wasser	625	4

[a] Anregung mit einem Argonionenlaser bei 457 nm (0.5 mW). Die Fluoreszenz wurde durch ein Filter mit einem Cut-off bei 545 nm beobachtet. [b] Die Nachweisgrenze ist die Konzentration, bei der die Signale der Übergänge einzelner Moleküle von der Grundlinie nicht mehr aufgelöst werden konnten.

dukt wurde aus *n*-Hexan/THF (10/1) umkristallisiert, wobei 6.95 g (90%) **5** erhalten wurden.

9: Ein Gemisch aus **5** (1.17 g, 3.02 mmol), $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ (21.2 mg, 0.032 mmol) sowie CuI (5.7 mg, 0.032 mmol) in 2 mL THF und 5 mL Triethylamin wurde durch rasches Durchperlenlassen von wasserfreiem Argon in 15 min entgast. Danach wurde das kräftig gerührte Gemisch mit 2-Propin-1-ol (0.193 mL, 3.32 mmol) versetzt. Nach 3 h wurden nochmals $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ und CuI zugesetzt. Nach 18 h war die Reaktion vollständig abgelaufen. Die strikte Einhaltung sauerstoff- und wasserfreier Bedingungen durch Aufrechterhaltung einer Argonatmosphäre war für eine hohe Ausbeute in diesem Reaktionsschritt entscheidend. Das Reaktionsgemisch wurde mit Methanol/Ethylacetat (5/95) durch 30 g Silicagel filtriert und das Filtrat anschließend eingeengt. Aus dem Rückstand wurde reines **6** (815.2 mg, 85%) durch Flash-Chromatographie (SiO_2 , Ethylacetat/Hexan, 1/3) isoliert. Dann wurde **6** (615.0 mg, 1.94 mmol) in 18 mL CH_2Cl_2 bei Raumtemperatur mit aktiviertem MnO_2 (9.507 g, 5.83 mmol) versetzt. Nach 6 h wurde das Reaktionsgemisch direkt durch Flash-Chromatographie gereinigt (SiO_2 , Ethylacetat/Hexan, 1/3) gereinigt, wobei 602.1 mg (98%) **7** erhalten wurden. Eine Lösung des Phosphonats **8** (621 mg, 2.15 mmol) in 6.0 mL DMF wurde bei 0 °C mit Natriumbis(trimethylsilyl)amid (4.79 mL, 1.0 M in THF, 4.79 mmol) versetzt. Die Lösung wurde nach 30 min bei 0 °C auf Raumtemperatur erwärmt, 20 min bei dieser Temperatur gerührt und danach wieder auf –20 °C abgekühlt. Eine Lösung des Aldehyds **7** (376.5 mg, 1.19 mmol) in 10 mL THF wurde zugespritzt, und nach 8 h Röhren bei Raumtemperatur wurden 5 mL Wasser zugegeben. Der pH-Wert wurde mit 5proz. wäßriger HCl auf 7 eingestellt und das Gemisch mit 10 mL Kochsalzlösung verdünnt. Das Rohprodukt wurde dreimal mit je 40 mL THF/ CH_2Cl_2 (1/9) extrahiert. Die Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Nach Flash-Chromatographie (SiO_2 , CHCl_3 /Hexan, 1/2) und Umkristallisieren aus *n*-Heptan/THF (10/1) wurden 331.4 mg (62%) **9** erhalten.

1: Konzentrierte Schwefelsäure (130 μL) wurde zu **9** (82.1 mg, 0.178 mmol) in 9 mL THF/ H_2O (1/9) bei 0 °C gegeben. Nach 20 min wurden gesättigte wäßrige Natriumbicarbonatlösung bis zum pH-Wert von 6.5 und anschließend 15 mL gesättigte Kochsalzlösung zugesetzt. Das Rohprodukt wurde mit THF/ CH_2Cl_2 (1/9; 3 \times 60 mL) extrahiert, die Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Der Rückstand wurde mit Glutarsäureanhydrid (26.4 mg, 0.231 mmol) und DMAP (ca. 3 mg) in 8 mL wasserfreiem THF umgesetzt. Nach 2 h bei Raumtemperatur wurden *N*-Hydroxysuccinimid (40.9 mg, 0.356 mmol) und anschließend EDC (119.4 mg, 0.623 mmol) zugesetzt. 12 h später wurden 10 mL Wasser zugegeben. Der pH-Wert wurde mit verdünnter HCl auf 6.5 eingestellt und das Reaktionsgemisch mit THF/ CH_2Cl_2 (1/9; 3 \times 80 mL) extrahiert. Die Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Nach Ummkristallisieren aus *n*-Heptan/THF (2.5/1) wurden 80.7 mg (81%) reines **1** erhalten.

2: Konzentrierte Schwefelsäure (80 μL) wurde zu **9** (49.5 mg, 0.107 mmol) in 5 mL THF/ H_2O (1/9) bei 0 °C gegeben. Nach 20 min wurden gesättigte wäßrige Natriumbicarbonatlösung bis zum pH-Wert von 7 und anschließend 10 mL gesättigte Kochsalzlösung zugesetzt. Das Rohprodukt wurde mit THF/ CH_2Cl_2 (1/9; 3 \times 40 mL) extrahiert, die Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Der Rückstand wurde sofort in wasserfreiem THF (5 mL) gelöst und mit Glutarsäureanhydrid (14.6 mg, 0.128 mmol) und DMAP (ca. 2 mg) umgesetzt. Nach 2 h bei Raumtemperatur wurden wasserfrees Methanol (0.2 mL) und anschließend EDC (61.7 mg, 0.321 mmol) zugesetzt. Die Veresterung war nach 4 h vollständig (DC-Kontrolle). Dann wurden 10 mL Wasser zugesetzt, der pH-Wert wurde mit verdünnter HCl auf 6.5 eingestellt und das Reaktionsgemisch mit THF/ CH_2Cl_2 (1/9; 3 \times 40 mL) extrahiert. Die Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Nach Ummkristallisieren aus *n*-Heptan/THF (3/1) wurden 39.2 mg (77%) reines **10** erhalten. Dann wurde 4-Chlorcarbonylbuttersäure-*N*-hydroxysuccinimidylester (81.1 mg, 0.327 mmol) zu **10** (41.9 mg, 0.0953 mmol) und DMAP (ca. 1 mg) in 5 mL wasserfreiem THF gegeben. Nach 12 h bei Raumtemperatur wurden 10 mL Wasser zugesetzt. Der pH-Wert wurde mit verdünnter HCl auf 6.5 eingestellt und das Reaktionsgemisch mit THF/ CH_2Cl_2 (1/9; 2 \times 30 mL) extrahiert. Die Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Nach Ummkristallisieren aus *n*-Heptan/THF (3/1) wurden 40.9 mg (64%) reines **2** erhalten.

Kopplung mit BSA: Das bei diesen Untersuchungen verwendete Rinderserumalbumin (BSA) wurde von Sigma, Produkt A 7030, bezogen. Eine

Lösung von **1** (1.2 mg, 2.14 μmol) in 50 μL DMF wurde in fünf Portionen zu einer Lösung von BSA (35.9 mg, 0.54 μmol) in 5 mL Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung (PBS; 0.15 M NaCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM NaH_2PO_4) gegeben. Nach 8 h bei Raumtemperatur war die Reaktion beendet, und das Gemisch wurde mit 5 mL Wasser verdünnt, ausgiebig gegen Wasser dialysiert (Spectra/por MWCO 12 000–14 000) und gefriergetrocknet. Das Absorptionsspektrum wurde von 2–3 mg dieser Probe, die in 500 μL PBS gelöst wurden, aufgenommen. Die ungefähre Zahl von Fluorophoren pro Proteinmolekül wurde auf der Basis der bekannten Absorption von **1** in PBS und der Konzentration des markierten BSA berechnet.

Eingegangen am 14. Juli 1997 [Z 10681]

Stichwörter: Farbstoffe • Fluoreszenzmarkierung • Solvatochromie

- [1] N. Seiler, *Meth. Biochem. Anal.* **1970**, *18*, 259.
- [2] a) C. Reichardt, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319; b) E. M. Kosower, M. Mohammad, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2713; c) M. J. Kamlet, J.-L. M. Abboud, R. W. Taft, *ibid.* **1977**, *99*, 8325.
- [3] a) G. Weber, D. H. R. Laurence, *J. Biochem.* **1954**, *56*, xxxi; b) J. Stryer, *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 482; c) J. A. Gally, G. M. Edelman, *Biochim. Biophys. Acta* **1965**, *94*, 175; d) R. P. Cory, R. R. Becker, R. Rosenbluth, I. Isenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 1643; e) R. F. Chen, *Arch. Biochem.* **1967**, *120*, 609; f) C. R. Guest, R. A. Hochstrasser, C. G. Dupuy, D. J. Allen, S. J. Benkovic, D. P. Millar, *Biochemistry* **1991**, *30*, 8759.
- [4] Dies lässt sich durch Zwei- oder Mehrphotonenanregung umgehen: C. Xu, W. W. Webb, *J. Opt. Soc. Am. B* **1996**, *13*, 481.
- [5] J. J. La Clair, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7676.
- [6] J. J. La Clair, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 1623. Für Untersuchungen mit ähnlichen Verbindungen siehe: a) D. M. Shin, D. G. Whitten, *J. Phys. Chem.* **1988**, *92*, 2945; b) S. Akiyama, K. Tajima, S. Nakatsuji, K. Nakashima, K. Abiru, M. Watanabe, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1995**, *68*, 2043.
- [7] Das Piperazin **4** wurde durch Umsetzung von *N*-Phenylpiperazin mit Di-*tert*-butyldicarbonat, Triethylamin und DMAP in Dichlormethan hergestellt. Für ein alternatives Verfahren siehe: M. Perez, P. Potier, S. Halazy, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8487.
- [8] Zur Steigerung der Ausbeute bei weiteren Umsetzungen wurde **9** zu **10** umgesetzt.
- [9] Das Ausmaß der Hydrolyse wurde anhand der Abnahme der Extinktion bei 400 nm nach 5 h Dialyse beim angegebenen pH-Wert bestimmt.
- [10] Zur Zuordnung der K- und B-Bande siehe A. Burawoy, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1930**, *63*, 3155. Die Verstärkung der B-Bande war in protischen Medien deutlich größer (54–63 %) als in aprotischen (14–47 %).
- [11] Eine mögliche Erklärung hierfür besteht im Fehlen zusätzlicher Twisted-Intramolecular-Charge-Transfer(TICT)-Zustände infolge einer Einschränkung der Rotation um die Aryl-Piperidin-Bindung. Zu TICT-Zuständen siehe: a) Z. Grabowski, K. Rotkiewicz, A. Siemiarzuk, D. J. Cowley, W. Baumann, *Nouv. J. Chim.* **1979**, *3*, 443; b) W. Rettig, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 969; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 971; c) C. Rulliere, Z. R. Grabowski, J. Dobkowski, *Chem. Phys. Lett.* **1987**, *137*, 408; d) M. Vogel, W. Rettig, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1985**, *137*, 408.
- [12] Die Einzelmolekülausführungen wurden mit einem konfokalen Eigen-Rigler-Fluoreszenzkorrelationsspektrometer durchgeführt. Alle Proben wurden mit einem Argonionenlaser (Lexel, Waldbronn, Deutschland) bei 457 nm (0.5 W) angeregt. Der Laserstrahl wurde durch ein wasserstables Objektiv (Zeiss Plan Neofluar 40×0.9) geführt und auf einen Substanztropfchen gelenkt, das mit einem Wassertropfen und einem hängenden Deckglas (Fisher 12-5454-101) fixiert war. Die Proben befanden sich in einem Goldbehälter von 20 μL und waren unmittelbar vor Gebrauch durch ein Glasfritte filtriert worden. Die Fluoreszenz wurde durch das gleiche Objektiv und durch ein Filter mit einem Cut-off bei 545 nm gemessen. a) M. Eigen, R. Rigler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 5740; b) R. Rigler, *J. Biotech.* **1995**, *41*, 177.