

Analytik der fluoreszenz-
markierten Verbindungen

3 Analytik der fluoreszenzmarkierten Verbindungen

3.1 Allgemeines zur Fluoreszenz

Das Elektronensystem eines Moleküls wird durch die Aufnahme von elektromagnetischer Strahlung vom Grundzustand (S_0) in einen angeregten Zustand (S_1) überführt. Nach dem Jablonskii Termschema bestehen für ein angeregtes Molekül drei verschiedene Möglichkeiten, die aufgenommene Energie wieder abzugeben:

- strahlungslose Inaktivierung durch Zusammenstöße mit Nachbarmolekülen z. B. aus dem Lösungsmittel, wobei die Energie in Wärme umgewandelt wird,
- Fluoreszenzemission durch Umwandlung der Elektronenanregungsenergie in Lichtenergie,
- Phosphoreszenz durch einen strahlungslosen Übergang der Elektronen aus dem Singulett- in Triplettzustände unter Spin-Umkehr und danach Übergang in den Grundzustand unter Lichtemission.

Unter dem Oberbegriff Luminiszenz werden die durch Ausstrahlung von Licht gekennzeichneten Erscheinungen Fluoreszenz und Phosphoreszenz zusammengefasst. Fluoreszenz tritt nur während oder unmittelbar nach der Anregung des Elektronensystems auf. Aufgrund der Schnelligkeit der ohne Spin-Umkehr verlaufenden Elektronenübergänge ist sie mit der Lichteinstrahlung beendet. Da die Spin-Umkehr Singulett-Triplett-Singulett mehr Zeit beansprucht, dauert die Phosphoreszenz noch nach der Anregung an. ^[170]

Um Fluoreszenz herbeizuführen, muss das Elektronensystem eines Moleküls wie schon beschrieben zunächst durch Absorption von Licht angeregt werden. Wird die Absorption des Lichtes aufgezeichnet, erhält man ein Anregungsspektrum. Wird die Intensität des ausgestrahlten Fluoreszenzlichts gemessen, erhält man ein Emissionsspektrum. Die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts einer Substanzlösung bestimmter Konzentration bei einer bestimmten Wellenlänge (I_λ) kann durch folgende Gleichung (1) beschrieben werden:

$$I_\lambda \sim \varepsilon * I_0 * \phi * K \quad (1)$$

I_λ : Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts

ε : Molarer Absorptionskoeffizient bei der Anregungswellenlänge

I_0 : Intensität des Anregungslichtes

Φ : Fluoreszenzquantenausbeute

K: Gerätekonstante

3.1.1 Strukturelle Voraussetzungen für Fluoreszenz

Die Rückkehr angeregter Elektronen in den Grundzustand läuft auf diejenige Weise ab, bei der die Lebensdauer des angeregten Zustandes am kürzesten ist. Bei starren Molekülen trifft dies eher für die Fluoreszenz als für die strahlungslose Energieabgabe zu. Fluoreszenz wird daher häufiger bei Stoffgruppen beobachtet, die eine gewisse Starrheit im Molekülaufbau aufweisen. Zu diesen gehören aromatische Systeme, Verbindungen mit konjugierten Doppelbindungen, Carbonylverbindungen oder auch kondensierte Heterozyklen wie Chinolin, Isochinolin oder Indol.

Der für die Fluoreszenz verantwortliche Teil eines Moleküls wird als Fluorophor bezeichnet. Bei der Fluoreszenzanregung sind $\pi - \pi^*$ gegenüber $n - \pi^*$ Übergängen bevorzugt. Bei planaren Molekülen tritt häufiger Fluoreszenz auf als bei nicht planaren. Die Fluoreszenzfähigkeit kann durch die Art des Anions, Adsorption an feste Oberflächen, die Wahl des Lösungsmittels (Polarisierbarkeit), Temperatur oder Chelatbildung beeinflusst werden. ^[170]

3.2 Fluoreszenzmarkierte ER-Liganden

3.2.1 Einsatzmöglichkeiten

Fortschritte in der Entwicklung optischer Methoden für die Analyse biologischer Proben haben die Einsatzmöglichkeiten fluoreszierender Liganden des Estrogenrezeptors erweitert ^[171]. Fluoreszenzmarkierte Liganden des ER eignen sich beispielsweise

- für den Einsatz in Rezeptor-Bindungsstudien, wobei sie radioaktiv markierte Liganden ersetzen könnten;
- zur Untersuchung der Ligand-Rezeptor-Assoziation und -Dissoziation in Echtzeit mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FKS), Fluoreszenzmikroskopie oder Fluoreszenzpolarisation ^[172] in einem homogenen Assay;

- zur Untersuchung der Rezeptorverteilung in der Zelle ^[173];
- zur Bestimmung des Estrogenrezeptorstatus einzelner Zellen;
- zur Identifizierung von ER-positiven Brustkrebsarten, als Prognosefaktor für den Tumor und die optimale Therapie.

Die im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten fluoreszenzmarkierten ER-Liganden sollten für Untersuchungen der Ligand-Rezeptor-Interaktionen mittels FKS eingesetzt werden. FKS ist ein Verfahren bei dem die Geschwindigkeit der Bewegung eines fluoreszierenden Moleküls über eine bestimmte Strecke bestimmt wird. Die Geschwindigkeit der Bewegung ist dabei von der Größe des Moleküls abhängig. Der fluoreszierende Ligand allein ist ein relativ kleines Molekül, tritt er in Wechselwirkung mit dem Rezeptor, entsteht ein wesentlich größeres fluoreszierendes Molekül, dessen Durchflussgeschwindigkeit sich von der des Ausgangsmoleküls unterscheidet. ^[174]

FKS eignet sich für das direkte Studium molekularer Wechselwirkungen in Lösung, auf Zelloberflächen oder sogar innerhalb von Zellen. Sie erlaubt die Unterscheidung verschiedener physikalischer Zustände molekularer Wechselwirkungen wie gebunden und frei, gespalten und intakt, wodurch es möglich ist, die Bindungskonstanten, kinetische Konstanten und Enzymaktivitäten zu bestimmen. ^[175, 176]

Besonders vorteilhaft ist, dass die Bindungskonstanten ohne Immobilisierung bestimmt werden können, Wechselwirkungen auf der Oberfläche und in lebenden Zellen noninvasiv untersucht werden können und die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen in ihrer nativen Umgebung bestimmt werden können. ^[177] Die analytischen Vorzüge dieser Methode liegen im äußerst geringen Verbrauch der Reaktionspartner und darin, dass die absolute Konzentration unabhängig von der Quantenausbeute bestimmt werden kann. Des Weiteren sind Messungen in Echtzeit möglich und der Assay verläuft in homogener Lösung, sodass keine Waschschriffe erforderlich sind. ^[176, 177, 178]

3.2.2 Voraussetzungen

In Abhängigkeit vom geplanten Einsatzgebiet müssen fluoreszierende ER-Liganden unterschiedliche Voraussetzungen erfüllen. ^[179]

Für Rezeptorbindungsstudien mittels FKS sind vor allem eine hohe Rezeptoraffinität und eine starke Fluoreszenz (hohe Absorption) von Bedeutung. Um einen signifikanten Unterschied zwischen freien und gebundenen Liganden bestimmen zu können, muss die Masse des gebundenen Liganden um den Faktor sieben höher sein als die des freien Liganden. Der Ligand sollte sich mit Licht der Wellenlängen 488 nm oder 514 nm zur Fluoreszenz anregen lassen, da der vorhandene Argonlaser des Fluoreszenzkorrelationsspektrometers Licht in diesen Wellenlängen erzeugt. Wird der Einsatz der fluoreszierenden Liganden zur Untersuchung der Rezeptorverteilung in Zielzellen geplant, oder der Einsatz zu Rezeptorbindungsstudien in ER-haltigem Zytosol, müssen neben hoher Rezeptoraffinität und starker Fluoreszenz auch eine geringe unspezifische Bindung an zelluläre Proteine und ein Emissionsmaximum > 500 nm zur Unterscheidung von der Eigenfluoreszenz von Zellen gegeben sein. Idealerweise sollte sich die Fluoreszenz der rezeptorgebundenen Verbindung von derjenigen der nicht gebundenen Verbindung unterscheiden.

3.2.3 Fluoreszenzmarkierungsmethoden

Die Entwicklung fluoreszierender Liganden für den Estrogenrezeptor ist schon längere Zeit Gegenstand der Forschung. Dabei können fluoreszierende Eigenschaften auf unterschiedliche Weise in das Molekül eingeführt werden. Die bisher beschriebenen Liganden lassen sich folgendermaßen einteilen:

- Konjugate ^[180, 181, 182, 183], bei denen eine ER-affine Verbindung mit einem Fluoreszenzfarbstoff über einen Spacer verbunden ist,
- inhärent fluoreszierende Verbindungen ^[184, 185, 186, 187, 188], bei denen das Fluorophor in das Molekül integriert ist,
- photofluorogene Verbindungen ^[189], bei denen ein ER-affiner Ligand durch UV-Bestrahlung in eine fluoreszierende Verbindung umgewandelt wird.

3.2.3.1 Konjugate

Steroid-Farbstoff-Konjugate

E2, Ethinylestradiol oder Estron wurden an Position 6 bzw. 17 mit Fluorescein-*isothiocyanat* (FITC) bzw. Fluoresceinamin (FA) ^[190, 191] fluoreszenzmarkiert. Sie besitzen nach Markierung zu geringe Rezeptoraffinitäten und Wasserlöslichkeit, um als Reagenz zur Anfärbung ER-haltiger Zellen zu dienen. In Abbildung 3.1 sind exemplarisch die E2-Farbstoff-Konjugate 17FE und 6FE dargestellt.

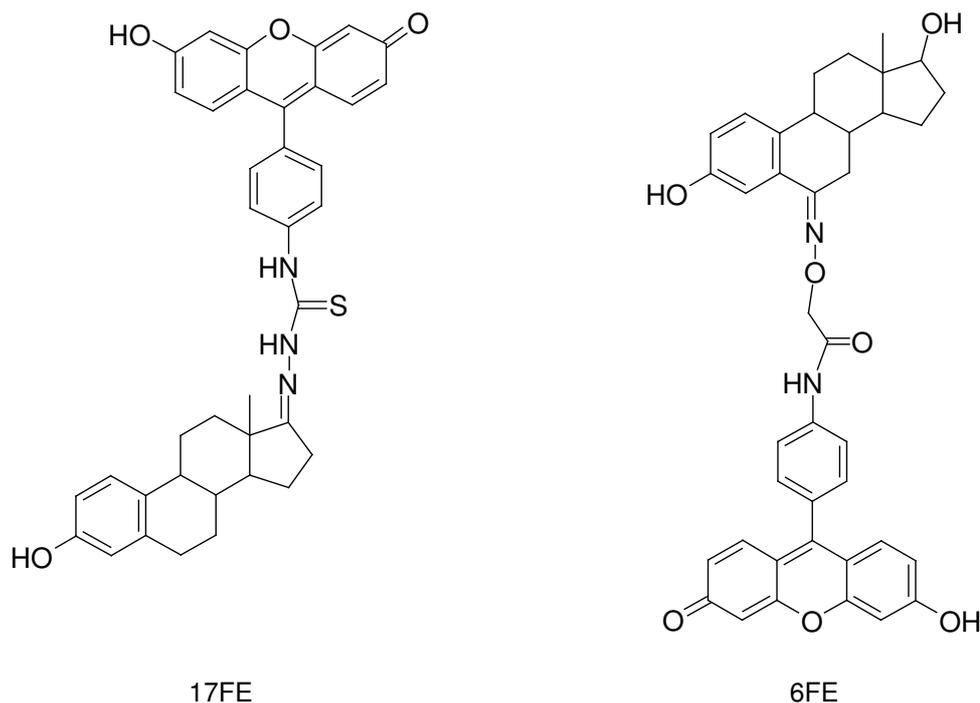


Abbildung 3.1 E2-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugate

Zur Steigerung der Löslichkeit wurde BSA (bovines Serumalbumin) als hydrophiler Carrier eingeführt, der durch Carboxamidbildung an Steroide und Fluorophore mit Lysinresten binden kann. Das resultierende 17 β -Estradiol-6-CMO-BSA-FITC (CMO: O-Carboxymethyl-Oxim, FITC: Fluoresceinisothiocyanat) färbt selektiv das Zytoplasma von menschlichen Zielzellen an ^[181].

Des Weiteren wurde auch ein fluoreszierendes E2-Porphyrin-Konjugat synthetisiert, das die phototoxischen Eigenschaften des Porphyrins mit der ER-Affinität von E2 vereinen sollte, um selektiv in ER-positiven Tumoren zu wirken ^[183, 192].

Konjugate mit nichtsteroidalen ER-Liganden

Verbindungen mit Hexestrolgrundgerüst wurden in *ortho*-Position zu einer phenolischen OH-Funktion (R1), an einer Ethylseitenkette (R2) ^[180] oder durch Veretherung einer der phenolischen Hydroxygruppen (R3) ^[172] fluoreszenzmarkiert.

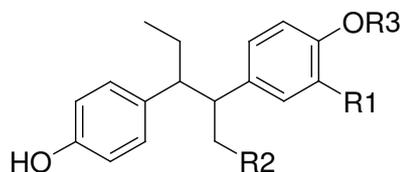


Abbildung 3.2 Fluoreszenzmarkierte Hexestrolanaloga

Als Fluoreszenzmarker dienten Nitrobenzoxadiazol (NBD), 1-(Dimethylamino)naphthalen-6-sulfonamid (Dansyl) und Aminophthalimid (AP) ^[180] bzw. Fluorescein ^[172]. Hexestrollderivate, die an R1 oder R2 mit einem Farbstoff konjugiert sind, weisen mittlere Rezeptoraffinitäten auf ^[180], Konjugation mit Fluorescein an R3 führte zu einer Verbindung, die für den Einsatz in einem homogenen Fluoreszenzpolarisations-Assay mit ER α geeignet zu sein scheint ^[172].

3.2.3.2 Inhärent fluoreszierende Liganden

Die Rigidisierung der Stilbenstruktur, die vielen synthetischen ER-Liganden zugrunde liegt, kann durch Bildung von Tetrahydrochrysenen ^[188], 10-Ethyl-9-phenylphenanthrenen ^[193], 2,3-Diaryllindenene ^[184], 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-3,4-dihydro-6-hydroxynaphthalen ^[189], Nafoxidin ^[194] oder durch Ringschluss bei Tamoxifen ^[195] zu inhärent fluoreszierenden ER-Liganden führen. Die Rigidisierung des Stilbens geht allerdings häufig mit einem Verlust der Rezeptorbindungsaffinität einher ^[184, 185, 186, 196]. Die raumgreifenden Substituenten am Stilbengerüst, die für eine hohe Rezeptorbindungsaffinität benötigt werden, verursachen eine Drehung um die Aryl-Ethen-Bindung. Dies unterbricht die Konjugation, wodurch wiederum die Absorption verringert wird und die Fluoreszenzcharakteristika beeinträchtigt werden, da eine optimale Fluoreszenz nur bei einem planaren Stilbenchromophor (vgl. 3.1.1) möglich ist. ^[197]

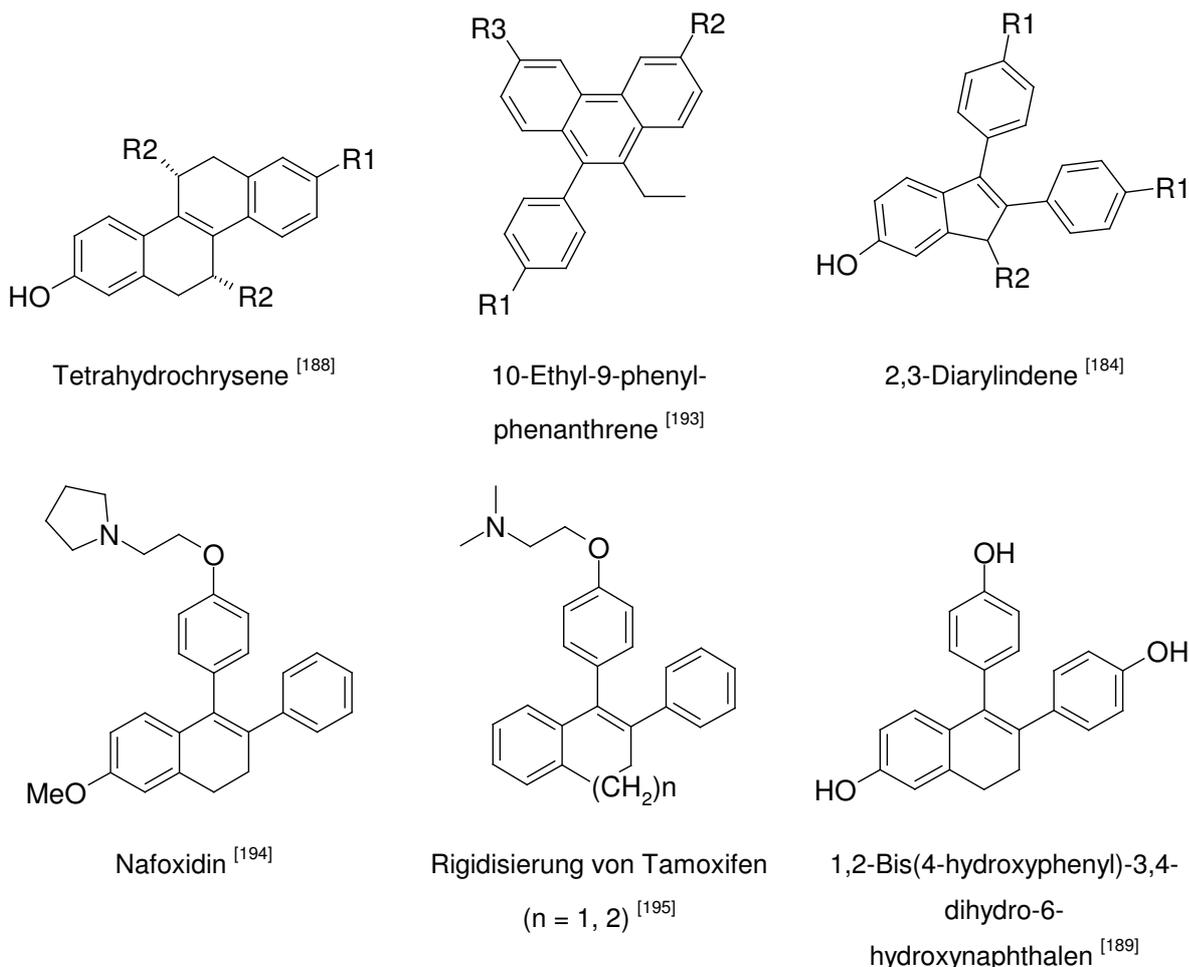


Abbildung 3.3 Strukturen mit planarem Stilbengerüst

Die Tetrahydrochryse stellen bislang die vielversprechendsten fluoreszierenden Verbindungen bezüglich der Kombination aus Rezeptoraffinität und Fluoreszenzcharakteristika dar. In letzter Zeit sind sie allerdings vor allem Gegenstand der Forschung, da gezeigt werden konnte, dass bestimmte THC-Derivate ER β -selektiv sind (vgl. auch 1.2.5, S. 16) und unterschiedliche Wirkungsprofile an den beiden ER-Subtypen aufweisen (siehe auch 6.1.3.3, S. 119).

Die photophysikalischen und photochemischen Eigenschaften der Stilbenstruktur können auch durch Einführen eines Stickstoffatoms in den Phenylring der Stilbene durch Einbeziehung des $n - \pi^*$ Zustands beeinflusst werden, was zu Styrylpyridinen führt. ^[198, 199] In verschiedene nicht-steroidale ER-Liganden, wie z. B. Deoxyhexestrolderivate ^[200], Stilbenderivate ^[200], Triarylalkene ^[200, 201] und Tetrahydrochryse ^[171] wurde Stickstoff als Heteroatom eingeführt (siehe Abbildung 3.4). Die resultierenden Stilbazole ^[200] und Deoxyhexestrolderivate ^[200] sowie die Azatetrahydrochryse ^[171] besaßen zu geringe RBA-Werte, um weiterentwickelt zu werden. Die

Rezeptorbindungsaffinität der Styrylpyridine vom Triarylalkentyp war wesentlich höher^[201], jedoch erwies sich die Fluoreszenzintensität als so gering, dass auch von einer weiteren Charakterisierung dieser Substanzklasse abgesehen wurde.^[201]

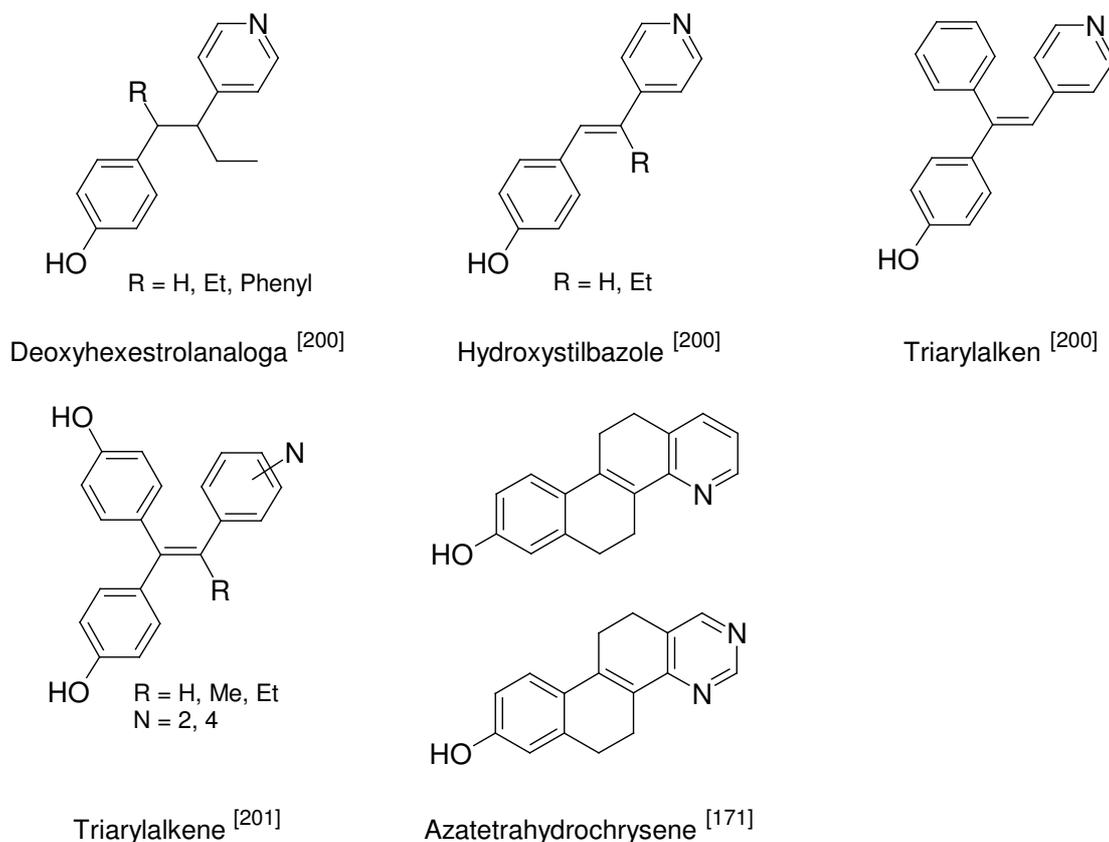


Abbildung 3.4 Inhärent fluoreszierende Styrylpyridin-Derivate

3.2.3.3 Photofluorogene Verbindungen

Stilbenstrukturen, die Elektronendonator- und Akzeptorsysteme mit Emissionsbanden bei hohen Wellenlängen aufweisen, sind in ER-Liganden wie Diethylstilbestrol oder Nafoxidin integriert worden^[189, 202]. Die resultierenden hoch rezeptoraffinen nichtfluoreszierenden Verbindungen werden photochemisch in fluoreszierende Verbindungen umgewandelt. Die Ausgangsverbindungen sind teilweise schon in Abschnitt 3.2.3.2 dargestellt.

Bei den abgebildeten Verbindungen wird die *cis*-Stilben Einheit photochemisch zu einem fluoreszierenden Phenanthroid umgewandelt^[189, 202]. Durch Bestrahlung einer Stilbenlösung mit ultraviolettem Licht macht *cis*-Stilben eine reversible Photozyklisierung durch, intermediär wird *trans*-4a,4b-Dihydrophenanthren gebildet, das dann zum Phenanthren oxidiert wird^[203].

Da durch die Photozycloisierung der Liganden eine ähnliche Rigidisierung, wie bei den inhärent fluoreszierenden Liganden erreicht wird, ist nicht weiter verwunderlich, dass die Verbesserung der Fluoreszenzcharakteristika auf Kosten der Rezeptorbindungsaffinität erreicht wird.

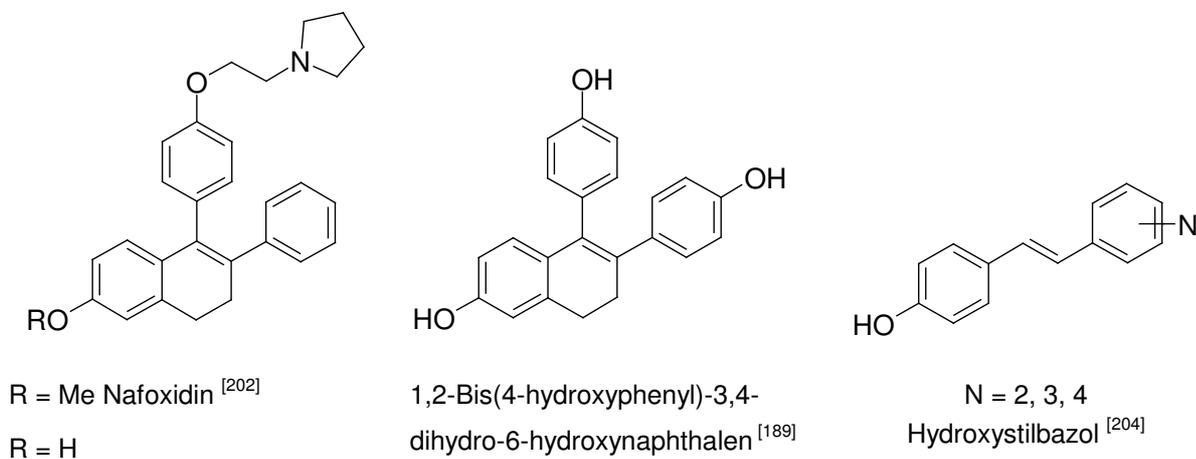


Abbildung 3.5 Photofluorogene Verbindungen

3.2.4 Auswahl einer geeigneten Fluoreszenzmarkierungsmethode

Die Umwandlung eines Triarylalkens in eine inhärent fluoreszierende Verbindung ist mit einem starken Einfluss auf die räumliche Anordnung der Phenylringe verbunden. Für die Leitstruktur 4-OHT konnte gezeigt werden, dass die Phenylringe in der LBD des ER propellerartig gegeneinander verdreht sind ^[205]. Um eine inhärent fluoreszierende Verbindung zu erhalten, müssten die Phenylringe fixiert werden, wie es für die 10-Ethyl-9-phenylphenanthrene ^[193], deren RBA-Werte allerdings sehr gering (0.01 - 0.04%) sind, beschrieben wurde. Die Einführung eines Stickstoffs in die Triarylalkenstruktur führte durch die geringe Beeinflussung der Molekülgeometrie zu Verbindungen mit hohen RBA-Werten, allerdings waren die Fluoreszenzeigenschaften nicht ausreichend ^[201]. Auch das photofluorogene 1,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-3,4-dihydro-6-hydroxynaphthalen weist nach UV-Bestrahlung nur noch einen sehr geringen RBA-Wert auf ^[189].

In der Gruppe der Liganden-Farbstoff-Konjugate wurde ebenfalls eine Abnahme der Rezeptoraffinität nach Fluoreszenzmarkierung festgestellt (vgl. Abschnitt 3.2.3.1). Jedoch sind Hexestrol-Konjugate beschrieben, die einen nicht zu geringen RBA-Wert verbunden mit einer ausreichenden Fluoreszenz aufweisen. ^[180]

Die Vorteile der Konjugation eines Fluoreszenzfarbstoffes an einen ER-Liganden liegen darin, dass die strukturellen Charakteristika einer Verbindung relativ unbeeinflusst bleiben. Gerade für die nicht planaren Triarylalkene scheint die Konjugation an Fluoreszenzmarker aus diesem Grund die plausibelste Möglichkeit zu sein, des Weiteren können die Fluoreszenzcharakteristika durch die Wahl unterschiedlicher Farbstoffe beeinflusst werden.

3.3 Fluoreszenzmarkierung der Triarylalkene

Nachdem die Konjugatbildung als günstigste Möglichkeit der Fluoreszenzmarkierung für Triarylalkene erschien, wurden analog zu den in Abschnitt 3.2.3.1 beschriebenen Hexestrolderivaten ^[172, 180] zwei Positionen der Triarylalkenstruktur (hier durch Pfeile gekennzeichnet) zur Fluoreszenzmarkierung ausgewählt. Einerseits sollte der Fluoreszenzfarbstoff mit dem Triarylalken-Grundgerüst über eine phenolische Hydroxygruppe (= R1) verbunden werden, andererseits sollte der Farbstoff an der Seitenkette an C2 des Triarylalkens (= R2) eingeführt werden.

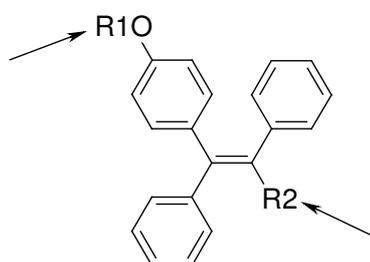


Abbildung 3.6 Positionen für die Fluoreszenzmarkierung von Triarylalkenen

Als Fluoreszenzfarbstoff wurde Rhodamin B (Rho) (siehe Abbildung 3.7) ausgewählt. Rho weist ein Absorptionsmaximum > 500 nm auf und sollte damit als Fluoreszenzmarker in der FKS einsetzbar sein.

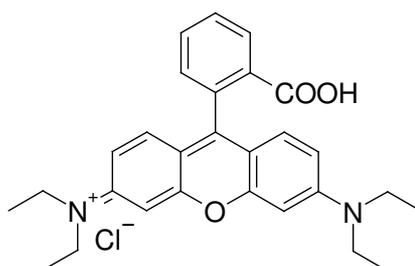


Abbildung 3.7 Fluoreszenzmarker Rhodamin B

Um den Einfluss des Fluoreszenzfarbstoffes auf die Ligand-Rezeptor-Interaktionen möglichst gering zu halten, wird ein Spacer zwischen Farbstoff und Ligand eingeführt. Der eingesetzte Spacer besteht aus sechs Kohlenstoffatomen und wird aus Aminocaprinsäure gewonnen.

Aus diesen drei Komponenten werden zwei Verbindungen mit dem in Abbildung 3.8 gezeigten Aufbau hergestellt.

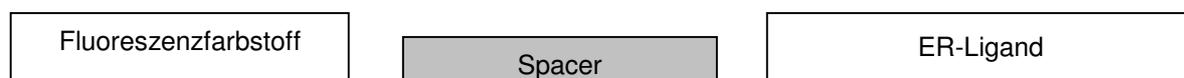


Abbildung 3.8 Schematische Darstellung der fluoreszenzmarkierten Verbindungen

Zunächst wird die Hydroxyfunktion des Triarylalken-Grundgerüsts über einen Spacer mit Rho verbunden. Die Rezeptoraffinität der resultierenden Verbindung **33Z** ist mit einem RBA von 0.02% äußerst gering, obwohl die Ausgangsverbindung **29Z** einen RBA-Wert von 1.9% besitzt (siehe 5.2.6.1, S. 100). Sicherlich ist dieser Verlust der Rezeptoraffinität dadurch zu begründen, dass das entstandene Molekül keine freie OH-Gruppe mehr besitzt, die mit der Ligandenbindungsdomäne des ER in Wechselwirkung treten kann (vgl. 6.1.1, S. 111). Es wäre also von Interesse, ähnliche Verbindungen mit zusätzlichen freien OH-Gruppen zu synthetisieren.

Aufgrund des anscheinend problematischen Schrittes der Veretherung der phenolischen OH-Gruppe, die nur mittels der Phasentransferkatalyse gelang, scheint der gewählte Syntheseweg kaum übertragbar auf bis- bzw. trishydroxylierte Verbindungen zu sein. Unter den Bedingungen der Phasentransferkatalyse wird ein äußerst hoher Überschuss an Halogenalkan eingesetzt, so dass mehrere Hydroxygruppen völlig willkürlich zu den verschiedensten Produkten reagieren könnten. Um die gezielte Veretherung nur einer Hydroxygruppe zu erreichen, sollten verschiedene Schutzgruppenkombinationen in Betracht gezogen werden, jedoch müssten diese schon zu Beginn der Synthese eingeführt werden, wodurch die Triarylalkene völlig neu aufgebaut werden müssten.

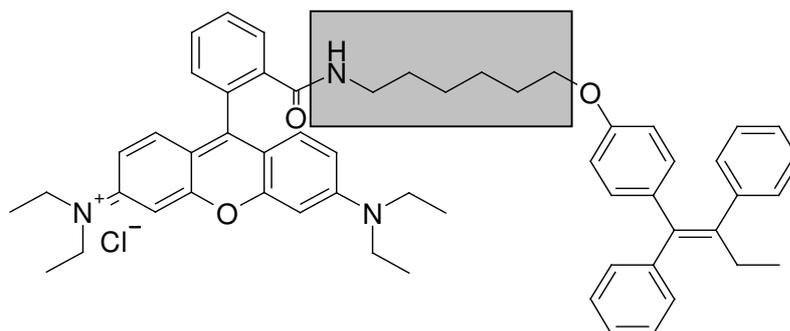


Abbildung 3.9 am Triarylalken-Grundgerüst fluoreszenzmarkierte Verbindung **33Z**

Eine weitere Position, die sich für die Fluoreszenzmarkierung eignen sollte, ist die Seitenkette an C2 des Triarylalken-Grundgerüsts (R2, Abbildung 3.6). Ein Vorteil der Fluoreszenzmarkierung an der Seitenkette ist, dass die für die Rezeptoraffinität essentiellen Hydroxygruppen von der Fluoreszenzmarkierung völlig unbeeinflusst bleiben. Eine geeignete Ausgangsverbindung für eine solche Fluoreszenzmarkierung stellt das 1,1,2-Tris(4-hydroxyphenyl)-5-aminopent-1-en **14h** dar. Über die freie Aminfunktion kann ein Rho-Spacer-Konjugat an das Molekül gebunden werden. Wie unter 2.3.1 beschrieben, wird die in Abbildung 3.10 dargestellte fluoreszenzmarkierte Verbindung **27** erhalten. Obwohl bei dieser Verbindung drei freie Hydroxygruppen für die Interaktion mit dem ER zur Verfügung stehen, ist sie nur in geringem Ausmaß in der Lage, E2 vom Rezeptor zu verdrängen (RBA = 0.04%, siehe 5.2.6.1, S. 100).

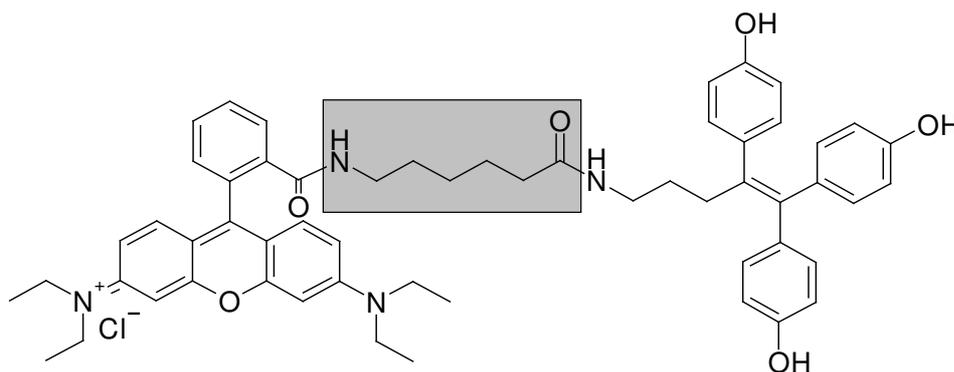


Abbildung 3.10 Fluoreszenzmarkierung an der C2-Seitenkette, **27**

3.3.1 UV-Spektren

Als Voruntersuchung für die Fluoreszenzmessungen werden zunächst mittels UV-Spektroskopie die Absorptionsmaxima der fluoreszenzmarkierten Verbindungen **27**, **33Z**, ihrer Vorstufen **14h**, **32Z** und Rho bestimmt. Die Spektren werden in ethano-

licher Lösung über einen Bereich von 250 nm bis 700 nm in Halbmikroküvetten aufgenommen. Zur Bestimmung der Empfindlichkeit einer Verbindung auf ihre Umgebung werden ferner UV-Spektren nach Zusatz von jeweils 0.1 N KOH bzw. HCl aufgenommen, wobei die Verschiebung der Absorptionsmaxima von Interesse ist. Die entsprechenden Spektren sind in der Abbildung 3.11 abgebildet, die Absorptionsmaxima und die Extinktionskoeffizienten ϵ sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Die Extinktionskoeffizienten werden nach dem Lambert-Beer-Gesetz, Gleichung (2) aus den Absorptionsmaxima bei bekannter Konzentration und Küvettendicke (1 cm) berechnet.

$$A = \epsilon * c * b \quad (2)$$

A: Absorption

ϵ : Extinktionskoeffizient

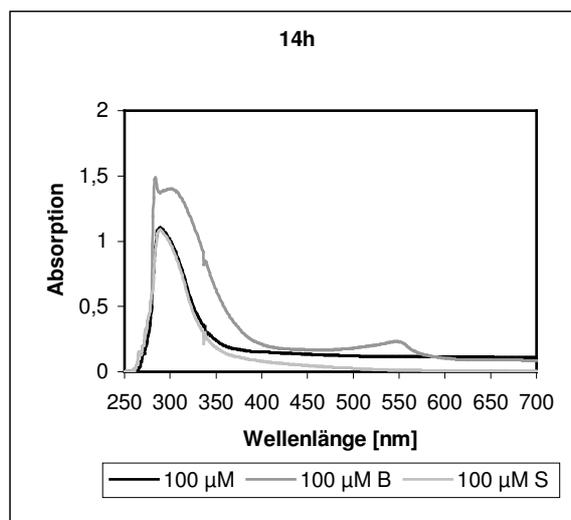
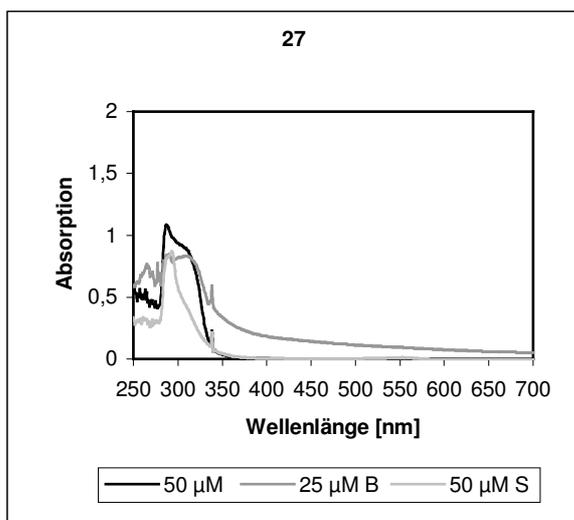
c: Konzentration [mol / L]

b: Küvettendicke [cm]

Substanz	λ_{\max} [nm]	c [mol / L]	A	ϵ
27	287	0.00005	1.084	21680
+ 0.1 N KOH	305	0.000025	0.825	33040
+ 0.1 N HCl	292	0.00005	0.867	17140
33Z	288	0.00005	0.746	14920
+ 0.1 N KOH	291	0.000025	0.486	19440
+ 0.1 N HCl	291	0.00005	0.543	10860
14h	289	0.0001	1.102	11020
+ 0.1 N KOH	301	0.0001	1.403	14027
+ 0.1 N HCl	289	0.0001	1.086	10860
32Z	289	0.0001	1.004	10040
+ 0.1 N KOH	288	0.0001	1.384	13840
+ 0.1 N HCl	288	0.0001	1.064	10640
Rho	551	0.00001	0.8958	89580
+ 0.1 N KOH	543	0.00001	0.3116	31160
+ 0.1 N HCl	554	0.00001	0.136	13600

Tabelle 3.1 Absorptionsmaxima, Absorption und Extinktionskoeffizienten

Die fluoreszenzmarkierten Verbindungen haben höhere Extinktionskoeffizienten mit 21680 für **27** und 14920 für **33Z** als die unmarkierten Verbindungen **14h** ($\epsilon = 11020$) und **32Z** ($\epsilon = 10040$). Bei **27** ist nach Basenzusatz ein hyperchromer Effekt (Intensitätserhöhung) zu beobachten ($\epsilon = 33040$), bei Säurezusatz kommt es zum Verlust der Schulter des Signals. Durch Säure- oder Basenzusatz tritt eine geringfügige bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums auf. Für die unmarkierte Ausgangsverbindung **14h** kann nur nach Basenzusatz Hyperchromie ($\epsilon = 14027$) und Rotverschiebung des Maximums (+ 12 nm) beobachtet werden. Auch beim Absorptionsmaximum von **33Z** ist eine Intensitätserhöhung ($\epsilon = 19440$) nach Zusatz von Base zu beobachten, durch Ansäuern kommt es zur Hypochromie der Lösung ($\epsilon = 10860$). Bei der unmarkierten Verbindung **32Z** verschiebt sich das Absorptionsmaximum ($\lambda = 289$ nm) nach Säure- oder Basenzusatz nicht, die Intensität steigt nur durch Zusatz von Base ($\epsilon = 13840$). Bei Rho sinkt die Intensität nach Säure- und Basenzusatz. Die Untersuchungslösung trübte sich nach Zugabe von Säure oder Base.



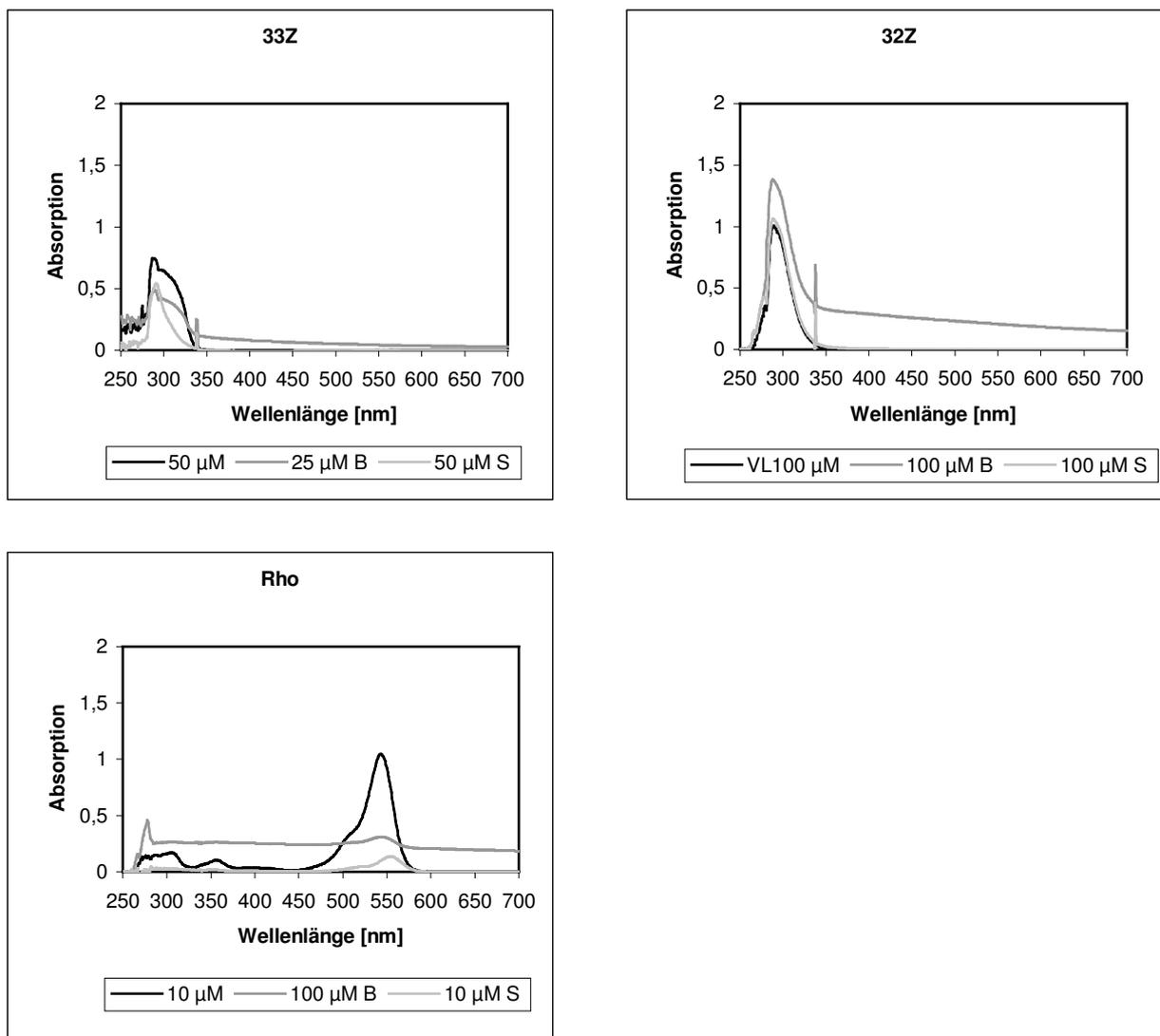
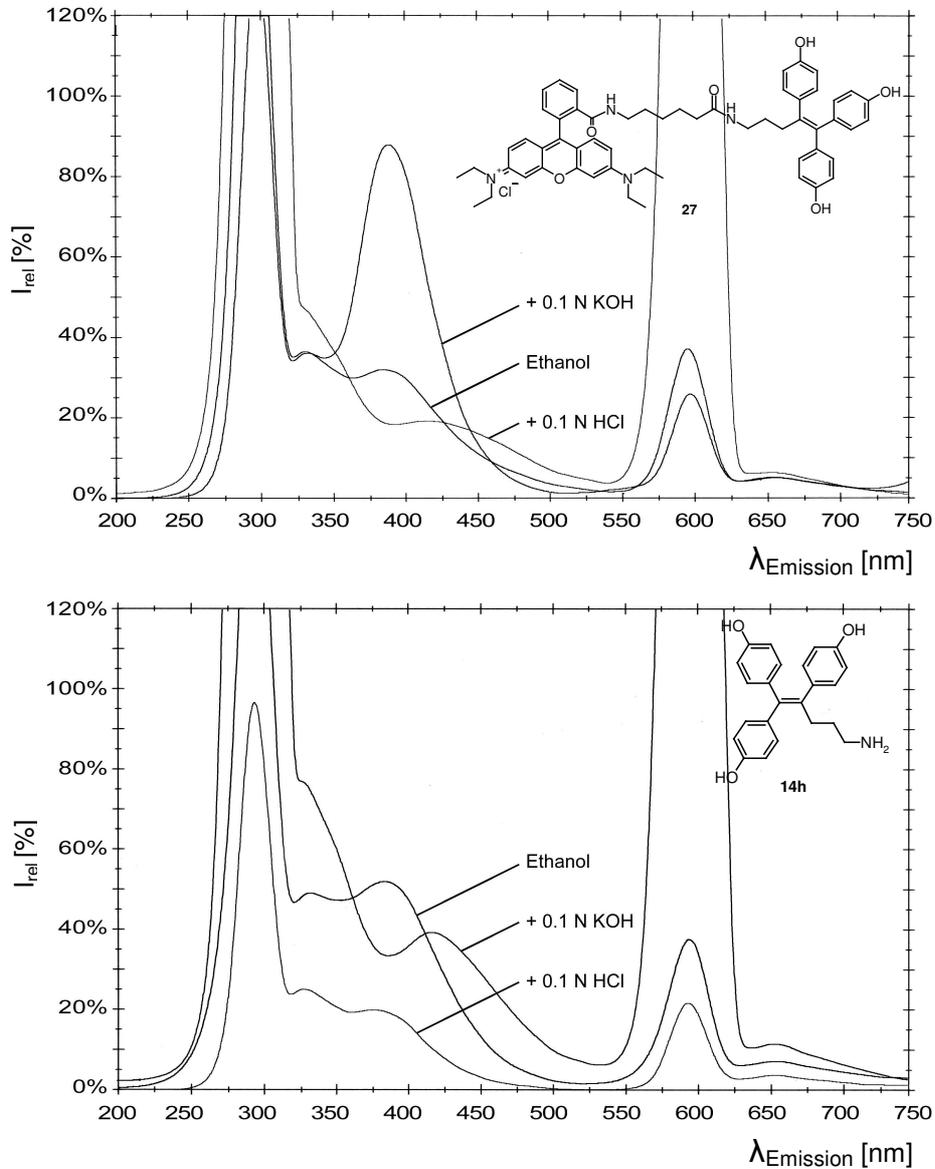


Abbildung 3.11 UV-Spektren der fluoreszenzmarkierten Verbindungen und ihrer Vorstufen
 100% schwarz: in Ethanol,
 50% schwarz: in Ethanol + 0.1 N KOH,
 25% schwarz: in Ethanol + 0.1 N HCl

3.3.2 Fluoreszenzspektren

Anhand der aus den UV-Spektren erhaltenen Absorptionsmaxima wurden für die Fluoreszenzmessung als Anregungswellenlänge 300 nm ausgewählt. Die Substanzen wurden zur Aufnahme der Fluoreszenzspektren in Ethanol gelöst. Von **27**, **33Z** und **14h** wurden jeweils analog zu den UV-Spektren bei einer Anregungswellenlänge von 300 nm zusätzlich Emissionsspektren nach Säure- bzw. Laugenzusatz aufgenommen. Bei **32Z** war dies nicht möglich, da die Lösung sich sofort nach Säure oder Laugenzugabe trübte.

Die so erhaltenen Fluoreszenzemissionspektren sind im folgenden aufgeführt (siehe Abbildung 3.12), die Fluoreszenzcharakteristika sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.^[b]



^b Die Signale bei $\lambda = 300$ nm und $\lambda = 600$ nm sind unabhängig von der jeweils vermessenen Substanz, $\lambda = 300$ nm entspricht der Anregungswellenlänge, bei $2\lambda = 600$ nm wird entsprechend ein Signal zweiter Ordnung erhalten.

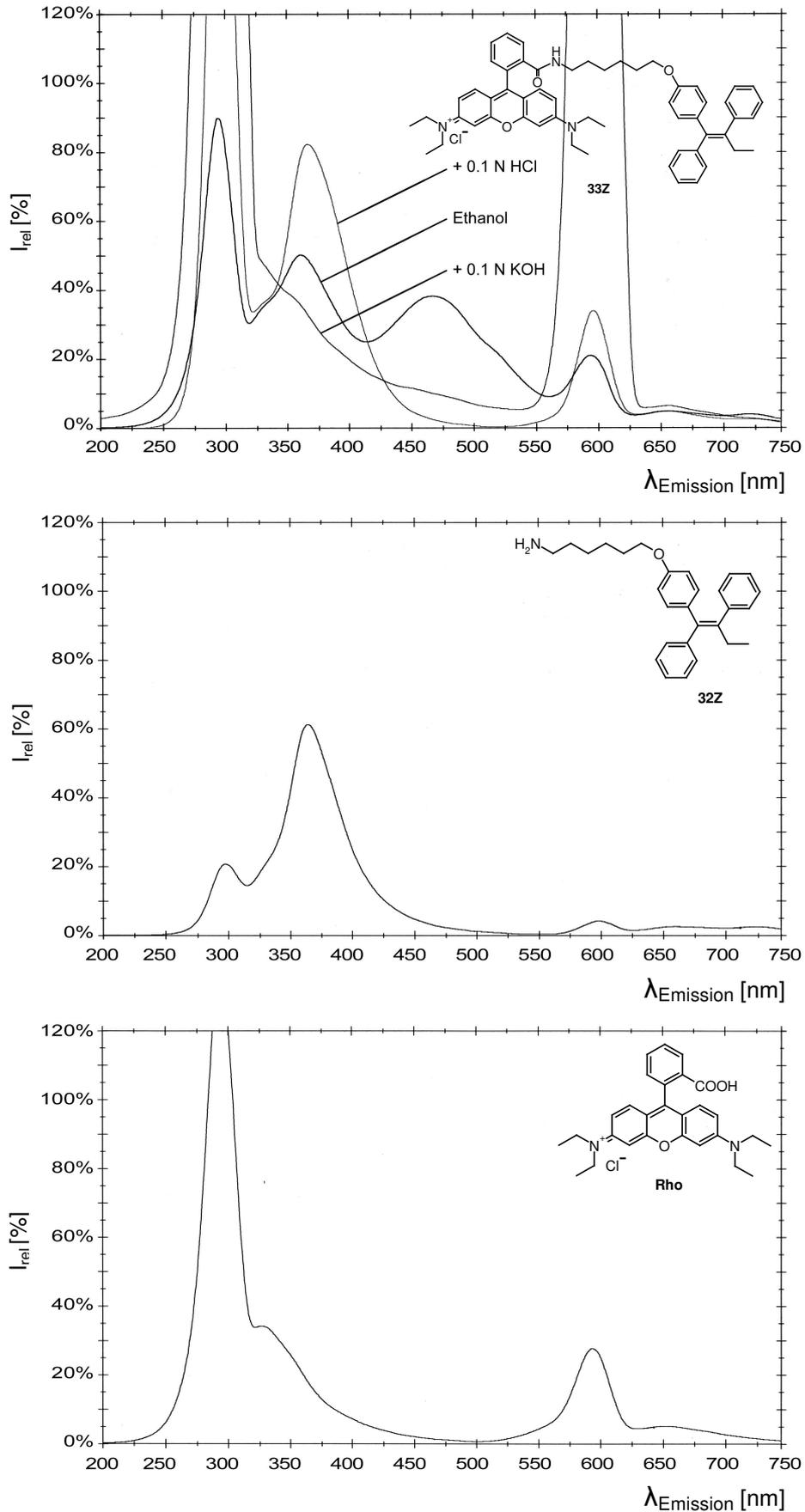


Abbildung 3.12 Fluoreszenzemissionsspektren bei einer Anregungswellenlänge von 300 nm.

27 ist relativ basenbeständig, die Lage des ersten Emissionsmaximums bei 328 nm ändert sich durch Zugabe von 0.1 N KOH nicht, nur die Intensität des zweiten Maximums wird gesteigert. Durch Zugabe von Säure wird das erste Maximum ebenfalls nicht verändert, nur Maximum 2 erfährt eine Abschwächung und Rotverschiebung um 35 nm.

14h zeigt in reinem Ethanol, ebenso wie nach Zusatz von Säure oder Base, ein Maximum bei 328 nm und ein zweites Emissionsmaximum bei 385 nm. Im Alkalischen ist dieses Maximum um 32 nm zu einer Wellenlänge von 418 nm bathochrom verschoben. Im Säuren ist das zweite Maximum schwach hypsochrom verschoben.

Bei **33Z** konnten in Ethanol ebenfalls zwei charakteristische Emissionsmaxima bestimmt werden, eines bei 360 nm und das zweite 465 nm. Nach Zusatz von Base erhält man nur noch einen breiten Peak von schwächerer Intensität. Nach Säurezusatz ist ebenfalls nur noch ein Peak zu erkennen, der jedoch schmaler ist und sein Maximum bei 365 nm erreicht.

Von der Ausgangsverbindung **32Z** wurde nur ein Spektrum in Ethanol aufgenommen, da sich die Lösung nach Säure oder Basenzusatz sofort trübt. **32Z** weist bei 360 nm ein Maximum auf.

Rho zeigt nur ein Maximum bei 350 nm.

Substanz	Ethanol	Ethanol + 0.1 N KOH	Ethanol + 0.1 N HCl
27	1 μ M 328 nm (37.5%) 385 nm (32%)	1 μ M 328 nm (37%) 385 nm (88%)	1 μ M 328 nm (37%) 420 nm (20%)
14h	1 μ M 328 nm (50%) 385 nm (52%)	1 μ M 328 nm (78%) 418 nm (40%)	0.1 μ M 328 nm (25%) 380 nm (20%)
33Z	10 μ M 360 nm (51%) 465 nm (39%)	1 μ M breiter Peak	1 μ M 365 nm (82%) s 328 nm
32Z	1 μ M 360 nm (38%)	Lösung trübte sich sofort nach Basenzusatz	Lösung trübte sich sofort nach Säurezusatz
Rho	0.1 μ M 350 nm (35%)	Siehe oben	Siehe oben.

Tabelle 3.2 Fluoreszenzcharakteristika bei einer Anregungswellenlänge von 300 nm

3.3.3 Zusammenfassung

Die beiden fluoreszenzmarkierten Verbindungen weisen unterschiedliche Fluoreszenzcharakteristika auf. **27** scheint weniger empfindlich gegen Säure oder Basenzusatz zu sein. Es wurden sowohl im Sauren als auch im Alkalischen Spektren mit zwei Maxima erhalten. Bei **33Z** ist die Sensitivität gegen Basenzusatz stark ausgeprägt, man erhält nur noch ein breites Signal. Auch Säurezusatz geht mit dem Verlust eines Emissionsmaximums einher.

In ethanolischer Lösung weist **33Z** die günstigeren Fluoreszenzeigenschaften auf. Das zweite Emissionsmaximum liegt bei 465 nm, im Vergleich zu 385 nm bei **27** in ethanolischer Lösung (420 nm im Sauren). Damit wäre **33Z** von seinen Fluoreszenzeigenschaften eher für den Einsatz in der FKS geeignet als **27**. Aufgrund der geringen RBA-Werte, können jedoch weder **27** noch **33Z** in ER-Bindungsstudien eingesetzt werden.