

Chirale und achirale Liganden für die Fluoreszenzspektroskopie

**Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades**

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

genehmigte

Dissertation

von

Dipl.-Chem. Dennis K. Ehlert

geboren am 19.03.1967 in Bremerhaven

Hannover 1999

Referent: Prof. H. M. R. Hoffmann, PhD, DSc

Korreferent. Prof. Dr. H. Duddeck

Tag der Promotion: 1. Juli 1999

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden in der Zeit von Juli 1995 bis Dezember 1998 am Lehrstuhl für Organische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von

Herrn Prof. H. M. R. Hoffmann, PhD, DSc

und

Herrn Priv. Doz. Dr. B. Schmidt

durchgeführt.

Danken möchte ich an dieser Stelle

Herrn Prof. H. M. R. Hoffmann für die vielen auch fachübergreifenden Diskussionen,

Herrn Priv. Doz. Dr. B. Schmidt für die Anregung zu dieser Arbeit, sein Interesse an deren Fortgang und seine hilfreiche Unterstützung,

Herrn Prof. Dr. H. Duddeck für die Übernahme des Korreferats,

dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. H. Duddeck für die freundliche Aufnahme in ihr internationales Team während der gemeinsamen Zusammenarbeit,

dem Arbeitskreis von Prof. H. M. R. Hoffmann und

Frau Mettig für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Mein persönlicher Dank gilt Herrn Dr. Christian Kühn und Frau Dipl. Chem. Vera Neitemeier, die es nicht immer leicht mit mir hatten und Herrn cand. chem Jan Jiricek für die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Dipl. Chem. Mahmoud Zohri danke ich für sein Vertrauen in vielen Gesprächen.

Ich danke meiner Frau Anja.

Hiermit versichere ich an Eides Statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben habe.

Hannover, im Mai 1999

Für Anja, Sylvia, Karin und Rolf

*vos bonae senibus viris
cognitae bene feminae,
collocate has chimias!*

Abstract

Dennis K. Ehlert

Chiral and nonchiral ligands for fluorescence spectroscopy

Subject of the present work were synthesis of chiral and nonchiral ligands for fluorescence spectroscopy and *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography* (IMAC). Target molecules were 2,4,6-trisubstituted pyridine derivatives with nucleophilic functional groups at position 2 and 6 and a tether at position 4 of the pyridine core. The tether offers a terminal or internal incorporation to a peptide (labelling).

The preparation was achieved by conversion of 4-hydroxy-2,6-pyridinedicarboxylic acid (chelidamic acid) to 4-bromo-2,6-pyridinedicarboxylic bromide with phosphorus pentabromide. Treatment with absolute ethanol or dry amines generated the corresponding esters or amides. Palladium mediated coupling process with these 4-bromo-pyridine derivatives gave chiral pyridylalanines and nonchiral pyridylpropionates.

The pyridylalanines were synthesized via cross-coupling reaction between 4-bromopyridines and zinc metallated Methyl-2(*R*)-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-3-iodopropionate (Boc-L-Ala(I)-OMe) in good yields. For this building block Jackson's zinc reagents were used, which are synthesised from Boc protected iodo-serine esters followed by treatment with activated zinc.

The pyridylpropionates were generated by Heck olefination of acrylates in good to excellent yields under simple, non inert reaction conditions. Hydrogenation and deprotection by TFA gave the crystalline acid in quantitative yield.

The target molecules coupled readily to L-phenyl-alanine methyl ester to give the pseudo dipeptides which results in complex when treated with europium(III). These complexes were used to establish the complexation site by titration with 0.1 to 2.3 eq of Eu(III) monitored by ¹H-NMR.

The selectivity of complexation could be shown.

The absorbance of the ligands were monitored by UV-spectroscopy.

Stability constants of the ligands were established in cooperation with C. Piguet, University of Geneva.

Keywords: ligands, fluorometry, lanthanide complex

Abstract

Dennis K. Ehlert

Chirale und achirale Liganden für die Fluoreszenzspektroskopie

In der vorliegenden Arbeit wurden chirale und achirale Liganden für die Fluoreszenzspektroskopie und die *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography* (IMAC) synthetisiert. Zielmoleküle waren 2,4,6-trisubstituierte Pyridinderivate mit nucleophilen funktionellen Gruppen an der Position 2 und 6 und einem tether an Position 4 des Pyridinkerns. Der tether ermöglicht die terminale bzw. interne Inkorporierung in ein Peptid (labelling).

Die Darstellung erfolgte ausgehend von 4-Hydroxy-2,6-dicarbonsäure (Chelidamsäure) zunächst durch Synthese des 4-Brom-2,6-dicarbonsäurebromids mit Phosphorpentabromid und anschließender Veresterung bzw. Amidbildung. Durch Kupplungsreaktionen mit den 4-Brompyridinderivaten wurden chirale Pyridylalanine und achirale Pyridylpropionate erhalten.

Die Pyridylalanine wurden in guten Ausbeuten durch Palladium katalysiertes cross-coupling mit dem Zinkorganyl des Methyl-2(*R*)-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-3-iodopropionats (Boc-L-Ala(I)-OMe) dargestellt. Hierzu wurde aktiviertes Zink nach Jackson in Boc-L-Ala(I)-OMe inseriert.

Die Pyridylpropionate wurden in guten bis sehr guten Ausbeuten durch eine Palladium katalysierte Heckkupplung mit *tert*-Butylacrylat und anschließender Hydrierung und Entschützung mit TFA synthetisiert.

Um die Affinität der Liganden gegenüber Lanthaniden zu untersuchen, wurden die Liganden mit L-phenylalaninmethylester gekuppelt und mit EuCl_3 Europiumkomplexe hergestellt.

Die Selektivität der Komplexierung konnte mit $^1\text{H-NMR}$ -shift-Experimenten gezeigt werden.

Der UV-Absorptionsbereich der Liganden wurde durch UV-Absorptionsspektroskopie ermittelt.

Die Bindungskonstanten der Liganden wurden in Zusammenarbeit mit C. Piguet, Universität Genf, ermittelt.

Schlagwörter: Liganden, Fluoreszenzspektroskopie, Lanthanidkomplexe

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Akronyme

abs.	absolut
Bn	Benzyl
BOC	tertiär-Butyloxycarbonyl
DCM	Dichlormethan
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EA	Elementaranalyse
EE	Essigsäureethylester
eq	Äquivalente
Et	Ethyl
Ether	Diethylether
h	Stunde
HBTU	O-Benzotriazolyl-N,N,N-tetramethyluronium-Hexafluorophosphat
Hz	Hertz
IR	Infrarot
Me	Methyl
MS	Massenspektroskopie
NBS	N-Bromsuccinimid
NMR	Kernmagnetische Resonanz
PE	Petrolether
Ph	Phenyl
ppm	parts per million
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
Smp	Schmelzpunkt
tBu	tertiär-Butyl
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Trimethylsilyl
UV	Ultraviolett

1 Einführung	1
2 Theoretischer Hintergrund	3
2.1 Lumineszenz	3
3 Vorarbeiten	6
3.1 Pybox-Liganden	6
3.1.1 Asymmetrische Katalyse mit Pybox-Liganden	7
3.1.2 Elektronisches Tuning der Katalyse durch Substituenten	8
3.2 Anwendungsgebiete von Pybox- und auf Pyridin basierende Liganden	9
3.2.1 Pybox-Kupfer(II)-Komplexe	10
3.3 Lumineszente Lanthanidkomplexe	13
3.3.1 Lumineszenz und Energietransfer zwischen Lanthanid-Chelaten	15
3.3.2 DELFIA™-System von Wallac	16
3.4 Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC)	18
4 Experimentelle Durchführung	19
4.1 Aufgabenstellung	19
4.2 Synthese der Py-box Komponenten	19
4.3 Das Lutidin-System	20
4.4 Chelidamsäure	21
4.4.1 Synthese der Chelidamsäure	24
4.5 Synthese eines chiralen <i>tethers</i>	25
4.6 Synthese der Liganden	28
4.6.1 Heckkupplung	28
4.7 Hydrierung der Heckprodukte	31
4.8 Freisetzung der Carbonsäure (TFA-Spaltung)	32
4.9 Cross-Coupling und Zinkinsertion	33
4.9.1 Das <i>Jackson-Zinkreagens</i>	35
4.9.2 Zinkaktivierung	38
4.10 Verseifung der chiralen Liganden	38
5 Experimente zur Charakterisierung der Liganden	40
5.1 ¹ H-NMR-Experimente: Bestimmung der <i>complexation site</i>	40

5.1.1 Tabellarische Ausführung der ^1H -NMR- <i>shift</i> -Experimente.....	45
5.2 UV-Absorptionsspektren.....	47
5.3 Messung der Bindungskonstanten.....	49
6 Experimenteller Teil	51
7 Lebenslauf.....	77
8 Literatur.....	78

1 Einführung

Totalsynthese satt! Dieser Titel wurde einem Artikel der *Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium* vorangestellt, der die Vortragsreihe „Chemical Synthesis of Naturally Occuring Substances“ von K. C. Nicolaou, die im Rahmen des Merck-Schuchardt Lectureships 1998 organisiert wurde, zusammenfaßt.¹ Hierin wird ein Feuerwerk der Synthesekunst beschrieben, wie die Synthese des *Brevetoxin A*, ein Stoffwechselprodukt der die „Rote Flut“ verursachenden Algenform *Gymnodinium breve*, oder des cytotoxischen, in der Wirkungsform dem Taxol sehr ähnlichen Eleutherobins. Diese Verbindungen, die beispielhaft für die Schaffenskraft moderner chemischer Synthesemethoden stehen, zeichnen sich durch eine Vielzahl an funktionellen Gruppen und, was viel schwerer wiegt, durch eine Vielzahl chiraler Zentren aus, deren Etablierung in einem Molekülgerüst die eigentliche Kunst eines organischen Chemikers ausmacht. Möglich ist dies geworden durch neue Techniken in der (Naturstoff-)Synthese, homogener und heterogener Katalyse, bioorganischer und supramolekularer Chemie² aber auch durch neue Analysemethoden, die eine rasche und damit das Voranschreiten der Synthese determinierende Verifikation bzw. Falsifikation einzelner Syntheseschritte und der Zielsubstanz ermöglichen. Zuvorderst ist hierfür die *Kernmagnetische Resonanzspektroskopie* (NMR) zu nennen, die heute als die am weitesten verbreitete Meßmethode in der analytischen Chemie gilt.³ Deren Väter Felix Bloch und Edward Purcell wurde für ihre Arbeiten 1952 der Physik-Nobelpreis verliehen. In den beiden Jahren zwischen Juli 1963 und Juni 1965 dürften nach amerikanischer Schätzung insgesamt etwa 6000 Arbeiten mit NMR-Daten erschienen sein. Heute wäre es wahrscheinlich leichter, die Arbeiten zu zählen, die keinen Hinweis auf ein NMR-Experiment enthalten.⁴ Deutlich wird der Aufschwung, der durch NMR-Experiment und Röntgenstrukturanalyse bereitet wurde, führt man sich die Arbeiten von Robert Robinson und Herman Leuchs zur Aufklärung der Struktur des Strychnins in Erinnerung, die nach 40jähriger Arbeit mit klassischer Nachweismethodik 1946 ein erfolgreiches Ende fand.⁵ Was moderne organische Chemie heute, 53 Jahre später, leistet, zeigt der Übersichtsartikel „Chemie und Biologie der Epothilone“ von K.C. Nicolaou (1998),⁶ der die weltweite Erfolgsgeschichte der Epothilon-Totalsynthese in der Zeit zwischen der Strukturaufklärung 1996 bis 1998 auf 33 Seiten zusammenfaßt.⁷

Alles ist machbar? fragt der Autor eines Artikels der *Nachrichten aus Chemie, Technik und Laboratorium*, der den 12. *International Conference on Organic Synthesis*, eine alle zwei Jahre veranstaltete Konferenz unter der Schirmherrschaft der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), zusammenfaßt.⁸ Unter der Rubrik „Neue Synthesemethoden“ stellt er Reinhoudts Fortschritte in der Supramolekularen Chemie vor⁹ und stellt fest: „Der Analytik der Zielverbindung fiel auch in diesem Fall eine zentrale Rolle zu; den Beweis für die Form der Reinhoudtschen Aggregate lieferten die Tieftemperatur-NMR-Spektroskopie, die MALDI-TOF-Massenspektroskopie und nicht zuletzt auch Kristallstrukturanalysen.“

Die instrumentelle Analytik eilt mit Riesenschritten voran und trennt sich den neuen Ansprüchen gemäß auf. Die *Kombinatorische Chemie* ermöglicht die parallele Synthese einer Vielzahl an Substanzen in kürzester Zeit, deren strukturelle Charakterisierung nicht im Vordergrund steht, sondern deren biologische Wirksamkeit¹⁰. Diese „digitale“ Qualifizierung¹¹, die eine neue Form der Analytik erfordert und mit dem Sammelbegriff *Essay* bezeichnet wird, läßt sich nicht besser als mit dem Motto der *Pittcon 97*, einer jährlichen Tagung analytischer Chemiker, charakterisieren: „*Catch the Star*“.¹²

Die Festphasen- und Peptidsynthese dagegen stellt im nanomolaren Bereich gezielt Peptide mit 50 bis 100 Aminosäuren her, die gereinigt und charakterisiert werden müssen.¹⁰ So zeigte Nicolaou die Synthese eines stereochemisch homogenen Dodecasaccharids auf der Festphase, deren Methode für die Herstellung umfangreicher und vielfältiger Oligosaccharid-Bibliotheken allgemein anwendbar sei.¹³ *Porcine adenylate kinase* (AK 1), beispielhaft für das Potential moderner Peptidsynthese, ist ein kleines monomeres Protein, das den Transfer einer Phosphatgruppe von ATP nach AMP katalysiert.¹⁴ Es besteht aus 195 Aminosäuren und wurde aus 14 Peptiden mit jeweils 15 Aminosäuren nach der Fmoc-Festphasenstrategie hergestellt. Die Charakterisierung erfolgte mit Elektrospray-Massenspektroskopie und die Konformationsanalyse mit der Circular-Dichroismus-Spektroskopie.¹⁵ Die Empfindlichkeit optischer und auch NMR-spektroskopischer Methoden erlaubt inzwischen den Nachweis einzelner Moleküle; auch Prozesse, die in einzelnen Zellen ablaufen, sind beobachtbar. Diese sog. „Nanospektroskopie“ und andere hochauflösende Techniken wie Rastersondenmikroskopie oder Time-of-Flight-Massenspektroskopie erleben zur Zeit eine stürmische Entwicklung.¹⁶

Die Biotechnologie etabliert sukzessive den Einsatz der Fluoreszenz-Spektroskopie, speziell in der Nucleinsäurehybridisierung oder bei immunologischen Tests.¹⁷ Hierbei arbeitet man mit autofluoreszierenden oder farbstoffmarkierten Reagenzien, die, und hierin liegt der wesentliche Vorteil, radioaktive Marker ersetzen. Sie bieten Vorteile im Hinblick auf Sicherheit, Schnelligkeit, Stabilität und (Verwaltungs-)Kosten. Neben den konventionellen Fluorophoren¹⁸ wie dem bekannten Luminol, das in alkalischer Lösung auf Zugabe von Wasserstoffperoxid und eines Elektronendonors eine tiefblaue Chemilumineszenz zeigt, oder dem Luciferin, dem Leuchtstoff des Glühwürmchens, wurden aromatische Lanthanid-Chelate entwickelt, deren Eu(III)-, Tb(III)- und Sm(III)-Komplexe ausgezeichnete Photolumineszenzeigenschaften zeigen.¹⁹

Diese Arbeit präsentiert neue aromatische Liganden für den Einsatz als autofluoreszierende *Marker* in der Fluoreszenz-Spektroskopie und als N-terminales *Affinitätslabel* für die Reinigung großer Peptide in der *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography* (IMAC).²⁰

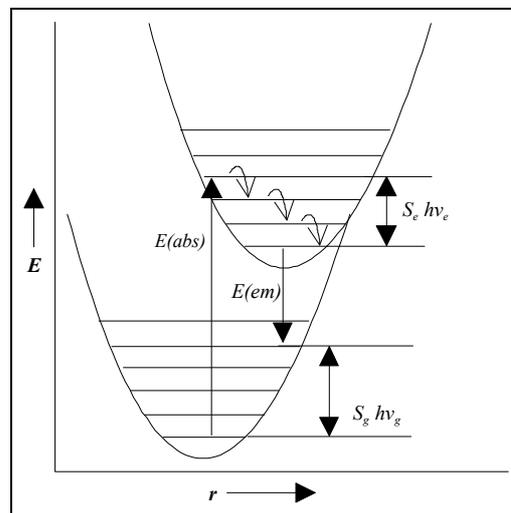
2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Lumineszenz

Fluoreszenz, Phosphoreszenz, Chemilumineszenz, Biolumineszenz und Lumineszenz sind häufig uneindeutig gebrauchte Begriffe. *Lumineszenz* ist der Oberbegriff und bezeichnet die Lichtemission, die durch den Übergang eines Moleküls aus einem angeregten Energiezustand in den Grundzustand hervorgeht.²¹ Eine Variante, Lumineszenzphänomene zu differenzieren, bietet die Einteilung nach dem Stimulus der elektronischen Anregung. Danach umfaßt Photolumineszenz alle Prozesse, deren Initialisierung ein Photon erzeugt. Hierbei läßt sich wiederum zwischen *Fluoreszenz*, *zeitlich aufgelöster Fluoreszenz* (*time resolved fluorescence*) und *Phosphoreszenz* unterscheiden. Chemilumineszenz wird durch einen chemischen Stimulus hervorgerufen (vgl. Luminolreaktion), wobei die Biolumineszenz Chemilumineszenzphänomene in lebenden Organismen (Glühwürmchen) beschreibt.

Neben den photoinduzierten Lumineszenzerscheinungen gibt es die besonders technisch relevante elektroneninduzierte Kathodolumineszenz (Fernsehgeräte, Monitore), die durch elektrische Felder induzierte Elektrolumineszenz (LEDs, EL-Displays) und die durch mechanische Energie hervorgerufene Tribolumineszenz.²²

Nach dem *Gesetz von Stokes* besitzt die emittierte Strahlung bei der Fluoreszenz eine kleinere Frequenz (größere Wellenlänge) als die absorbierte Strahlung.²³ Diese Energiedifferenz bezeichnet man als *Stokes shift*. Ursächlich dafür ist die sehr schnelle Relaxation (10^{-23} sec) des zunächst hoch angeregten Zustandes der Moleküle, die durch strahlungslose Prozesse in den niedrigsten elektronisch angeregten Zustand übergehen. Hieraus kehren sie durch Abgabe eines Lichtquants in den Grundzustand zurück (Dissipation durch Strahlung).²⁴ *Schema 1* zeigt ein Konfigurationskoordinatendiagramm zur Illustration des elektronischen Übergangs vom Grundzustand in den angeregten Zustand. Dabei sind die absorbierte Energie ($E(abs)$) und die emittierte Energie ($E(em)$) symbolisch mit Pfeilen dargestellt. Der Stokes-Shift ergibt sich aus den Beiträgen $S_g hv_g$ und $S_e hv_e$.²² Die Wellenlänge der Fluoreszenzstrahlung liegt bei Molekülen im UV/VIS-Bereich: etwa zwischen 200 und 1000 nm.

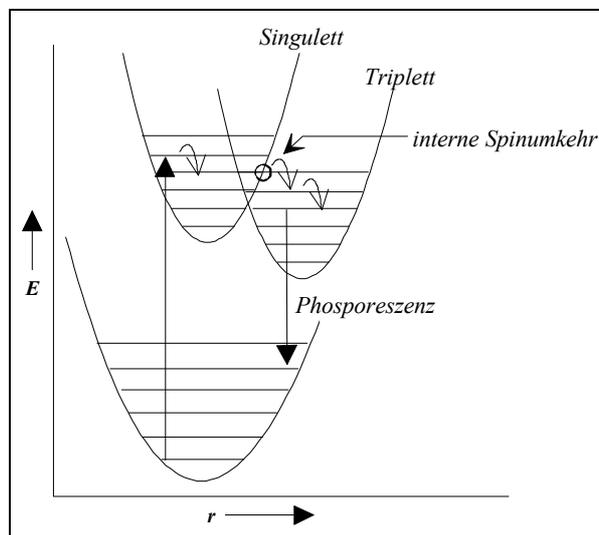


Schema 1

Phosphoreszenz und Fluoreszenz lassen sich rein empirisch unterscheiden: Während diese zeitlich parallel und konsistent mit dem äußeren Stimulus (Photon) einhergeht (Leuchten nur während der Erregung), ist bei der Phosphoreszenz nach dem Abschalten der äußeren Anregungsquelle ein allmähliches Abklingen des Leuchtens zu beobachten.²³

Physikalisch ergibt sich für die Fluoreszenz ein quantenmechanisch erlaubter Elektronenübergang vom Grundzustand in den Singulettzustand. Da die Elektronen in beiden Zuständen dieselbe Spinrichtung einnehmen, erfolgt die Emission sehr schnell (10^{-10} bis 10^{-7} sec).²⁵ Wenn aber während der ersten strahlungslosen Energieabgabe eine Spinumkehr der elektronischen Anregung eintritt, ist die Rückkehr in den Grundzustand unter Abgabe von Strahlung quantenmechanisch verboten und verzögert sich deutlich (10^{-3} s bis einige Sekunden). Schema 2 zeigt die Dissipation von Energie durch Phosphoreszenz. Das angeregte Molekül kehrt ausgehend vom Singulettzustand durch Spinumkehr in den hierzu relativ energieärmeren Triplettzustand (*Inter-System-Crossing*) unter Emission von Licht in den Grundzustand zurück.

Da das Molekül zeitlich relativ lange im angeregten Triplettzustand verweilt (bis einige Sekunden), kann dessen Potentielle Energie bei einem Zusammenstoß mit anderen Molekülen zu Bindungstrennung und damit zum Auslösen einer chemischen Reaktion führen. Daher wirken solche Substanzen, deren Übergang vom Singulett in den Triplettzustand energetisch begünstigt ist, als *Sensibilisatoren* photochemischer Prozesse.²⁵



Schema 2

Lumineszenz ist kein alltägliches Phänomen, und bei einer Mehrzahl von Verbindungen ist keinerlei meßbare Fluoreszenz und noch seltener Phosphoreszenz nachzuweisen. Moleküle können neben der Abgabe eines Lichtquants ihre Potentielle Energie leichter durch strahlungslose Vorgänge dissipieren. Dazu zählt die Umwandlung in kinetische Energie (Rotation, Oszillation) aber auch die Energieübertragung durch intermolekulare Zusammenstöße. Der wahrscheinlich wichtigste dieser Vorgänge ist die sog. Prädissoziation: Die elektronische Anregungsenergie innerhalb des Moleküls wird in eine sehr hohe Schwingungsenergieanregung einer Bindung im Molekül umgewandelt.²⁴ Diese Schwingungsenergie kann durch Dissoziation des Moleküls oder sukzessive durch intermolekulare Zusammenstöße abgebaut werden. Damit ein Molekül also signifikante Photolumineszenz zeigt, muß es einerseits leicht elektronisch anregbar sein, andererseits ein stabiles chemisches Bindungssystem aufweisen. Diese Voraussetzungen erfüllen sich im aromatischen π -System und optimal bei polykondensierten Aromaten. Die Intensität der Fluoreszenz ist dann von der Wellenlänge und Intensität des absorbierten Photons, der Konzentration und des Milieus (z. B. Solvens) abhängig.

Neben den konventionellen Fluorophoren haben sich gerade im technischen und analytischen Bereich Lanthanidchelate bewährt, die seit geraumer Zeit Gegenstand der Forschung sind.²⁶ Sie zeigen *time resolved fluoreszenz* und kennzeichnen sich durch einen großen Stokes-shift, der eine Unterscheidung vom Hintergrundrauschen ermöglicht, sowie ein zeitlich verlängertes Lichtsignal, das die Hintergrundfluoreszenz überdauert.²¹ Jedes Lanthanid hat seine charakteristische Emissionswellenlänge und Abklingzeit, so daß in einer Probe bis zu drei verschiedene Lanthanid-Labels bei unterschiedlicher Wellenlänge und differentem Zeitfenster vermessen werden können.

Diese Faktoren erhöhen die Sensitivität der Lanthanidchelate gegenüber konventionellen Fluorophoren erheblich.

Bei der Photolumineszenz wird hierbei UV-Licht durch den Liganden absorbiert, der damit als *Sensibilisator* für das schlecht absorbierende Lanthanid-Ion fungiert. Die Absorption des Lichtquants überführt den Liganden in den Singulettzustand, worauf durch die Nähe des Lanthanid-Ions ein *Inter-System-Crossing* zwischen Ligand und Ion stattfindet. Hierbei wird der Triplettzustand des Liganden besetzt. Von dort wird die Energie effektiv auf die f-Niveaus des Lanthanid-Ions übertragen.

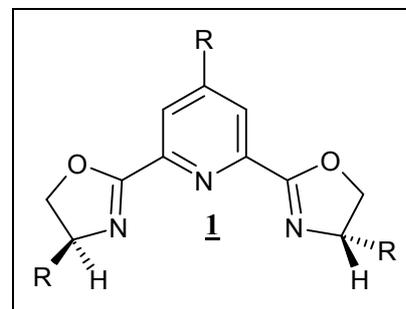
Der Lumineszenzprozeß kann damit in die Teilschritte Energieabsorption, Energietransfer und Emission eingeteilt werden. Interessant dabei ist, daß Energieabsorption und Energieemission nicht am selben Ort geschehen, so daß der eigentliche Lumineszenzprozeß weitgehend unabhängig von der chemischen Umgebung stattfindet.²² Mittels sog. Fluoreszenz-Löscher lassen sich selektiv die Lichtemissionen bestimmter Moleküle mit sehr hoher Empfindlichkeit unterdrücken. Temperatur- und Konzentrationsabhängigkeiten dieser Terminierung erlauben Aussagen über die Moleküldynamik.²⁴ Konventionelle Fluorophore mit großem Stokes-Shift weisen für gewöhnlich eine niedrige Löschtemperatur der Lumineszenz auf, was für viele Anwendungen von Nachteil ist. Arbeiten mit anorganischen, lanthaniddotierten Materialien haben gezeigt, daß durch das Prinzip der Ortstrennung von Energieabsorption und Energieemission dieses Problem umgangen wird.²²

3 Vorarbeiten

3.1 Pybox-Liganden

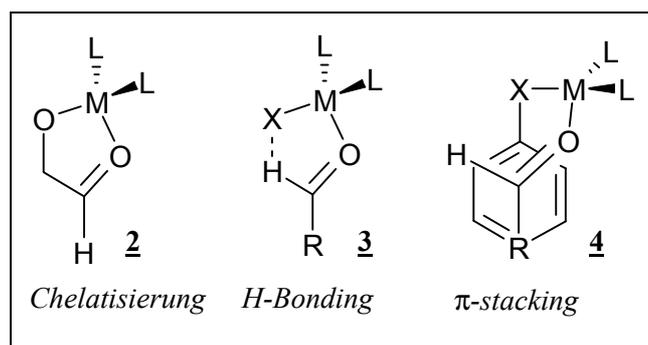
Die Abkürzung Pybox (Pyridin-Box) wird i.a. für die optisch aktiven Bis(oxazolanyl)pyridine (**1**) verwendet²⁷ und spiegelt deren umschließende bzw. einschließende Eigenschaft als tridentater Chelator wieder. Sie werden für die chirale Erkennung und zur katalytischen asymmetrischen Induktion verwendet.

Bei der asymmetrischen Induktion nutzt man sterische Effekte bzw. stabile intermolekulare Interaktionen aus, um symmetrische Verbindungen enantioselektiv bzw. diastereoselektiv zu transformieren (z. B. zu reduzieren).



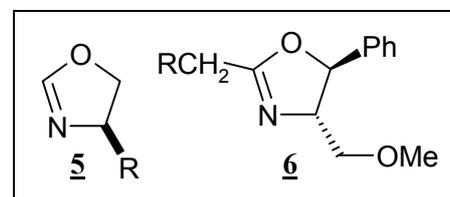
Schema 3

Schema 4 zeigt die diskutierten Interaktionen am Beispiel eines Aldehyd-Komplexes: Es kann eine faciale Fixierung des Aldehyds erfolgen durch Chelatisierung (**2**), Wasserstoffbrückenbindung²⁸ (**3**) oder π -Orbital-Überlappung (**4**)²⁹. Durch diese räumliche Festlegung des Aldehyds wird z. B. bei einer Reduktion das Reduktionsmittel aus sterischen Gründen nur eine Seite angreifen und somit den Aldehyd enantioselektiv reduzieren.



Schema 4

Die Oxazoline (**5**) der Pybox-Liganden (**1**) sind erprobte und wohlfeile chirale Auxiliare, die aus einem reduzierten Derivat des Valins, dem Valinol, hergestellt werden. Das besonders vielseitige Oxazolin (**6**) von Meyers kann z. B. mit prochiralen Alkenen in einer asymmetrischen Michael-Addition mit ausgezeichneter diastereofacialer Selektivität eingesetzt werden.³⁰ Ferner sind hiermit α -alkylierte Carbonsäuren durch Deprotonierung der acidifizierten Methylengruppe mit LDA und anschließender Alkylierung oder Cyclohexenone mit quartärem stereogenen Zentrum an der Position 4 zugänglich.³¹



Schema 5

Die Strategien in der asymmetrischen Synthese können in Generationen eingeteilt werden.³² Diese von Aitken und Kilenyi eingeführte Klassifizierung stellt allerdings keine historische, sondern nur eine methodische Einordnung dar. Hierbei wird der rasante Fortschritt in dieser Disziplin und der Wandel der Methodik deutlich. Ausgehend von der Inkorporierung eines chiralen Zentrums in ein Zielmolekül z. B. durch den Abbau von Monosacchariden (Ruff, Wohl) und anschließender Implementierung des chiralen Fragments in das Zielmolekül, konnte eine asymmetrische Induktion erzielt werden, wobei ein chirales Auxiliar eine faciale Reaktionslenkung ermöglicht.

Die erste Generation umfaßt Synthesen mit Substanzen aus dem chiralen Pool (Isoprenoide, Aminosäuren; Synthese des cytotoxischen *Avenaciolids* von Fraser-Reid aus Glucose³³), die zweite Generation die Nutzung chiraler Auxiliare (Enders' SAMP und RAMP³⁴, Evans' Oxazolidinon³⁵, Oppholzers Campher-Sultam³⁶ oder Schöllkopfs 2,5-Diketopiperazin-Methode zur Synthese α -methylierter Aminosäuren³⁷).

In der dritten Generation der asymmetrischen Synthese wurden Metallkomplexe entwickelt, die in stöchiometrischen Mengen eingesetzt werden: Die asymmetrische Hydroborierung mit Campheylboranen (Ipc_2BH)³⁸, Sharpless Epoxidierung³⁹ und Dihydroxylierung^{40,41} (noch ohne N-Methylmorpholin-N-oxid als Reoxidant)⁴² oder die enantioselektive nucleophile Addition an Carbonylverbindungen mit Noyoris Dialkylzink-Reagentien⁴³.

Die vierte Generation ergibt sich zwanglos aus diesen Vorarbeiten. Hier werden die Erfahrungen zusammengefaßt und optimiert in der Stöchiometrie, der Selektivität der Liganden und der Metalle.

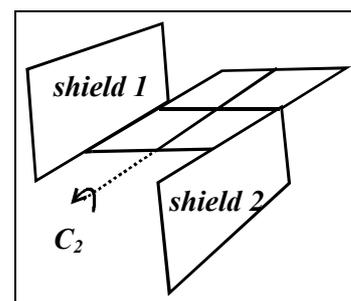
3.1.1 Asymmetrische Katalyse mit Pybox-Liganden

Die Erfolge in der asymmetrischen Katalyse sind so umfangreich (z. B. katalytische Sharpless Dihydroxylierung,⁴¹ katalytische Hydrierung mit chiralen Übergangsmetallkomplexen,⁴⁴ insbesondere Noyoris BINAP Ruthenium-Komplexe⁴⁵), daß hier nur auf neue Arbeiten in der asymmetrischen Katalyse mit Pybox-Liganden eingegangen wird.

Bis(oxazolinyl)pyridine sind C_2 symmetrisch. Für die enantiofaciale Differenzierung ist es nicht erforderlich, daß ein Auxiliar unsymmetrische geometrische Eigenschaften zeigt, sondern lediglich dissymmetrisch ist.⁴⁶ Es sollte also weder eine Spiegelebene noch Inversionssymmetrie zeigen.

Es hat sich gezeigt, daß eine C_2 -Achse innerhalb eines chiralen Auxiliars die Anzahl möglicher diastereomerer Übergangszustände deutlich vermindern kann⁴⁷, weshalb in den letzten Jahren eine breite Palette solcher Auxiliare nach diesem Konzept entwickelt wurden.⁴⁸

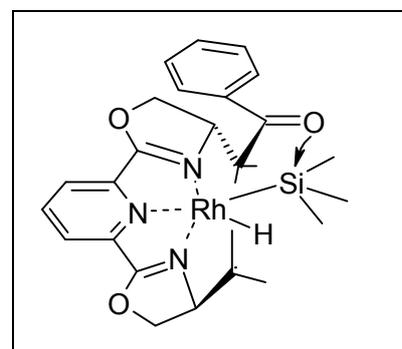
Im Pybox-System bilden der Pyridinstickstoff und die Imidstickstoffe mit ihren n-Elektronen ein planares Reaktionszentrum. Die Alkylgruppen des Oxazolins bilden chirale Schilde, die in Schema 6 als *shield 1* und *shield 2* bezeichnet werden. Das Reaktionszentrum, ein Tridentat, komplexiert ein Metall, das über eine freie Koordinationsstelle ein weiteres Molekül binden kann. Dieses Molekül erfährt nun eine sterische Ausrichtung, wobei die in Schema 4 diskutierten Interaktion ebenfalls einwirken können.



Schema 6

Nishiyama zeigt am Beispiel der asymmetrischen Hydrosilylierung die Effektivität dieser Liganden.⁴⁹ Er erzeugt mit Rhodiumtrichlorid und Isopropyl-Pybox (*ip-pybox*, vgl. Schema 3, mit Isopropylresten für R) einen Rhodiumkomplex, der mit Diphenylsilan Acetophenon mit einer optischen Ausbeute von 94 % hydrosilyliert.

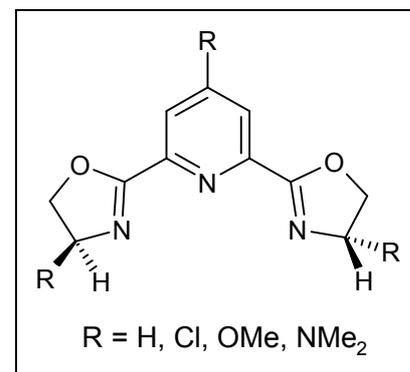
Da Versuche mit anderen Ketonen die Abhängigkeit der optischen Ausbeute vom sterischen Anspruch des Ketons (*bulk*) zeigen, schlägt er das in Schema 7 dargestellte reaktionsbedingende Intermediat vor. Der Benzylrest orientiert sich sterisch günstig in die geometrische Tasche des Komplexes. Die Hydrierung kann nur noch von einer Seite erfolgen.



Schema 7

3.1.2 Elektronisches Tuning der Katalyse durch Substituenten

Nishiyama untersuchte in weiterführenden Arbeiten zur asymmetrischen Hydrosilylierung von Ketonen den Einfluß von Donor- und Akzeptorsubstituenten an der Position 4 des Pyridinrings.⁵⁰ Die Arbeiten zeigen, daß die Substituenten Einfluß auf die kritische Reaktionstemperatur, d. h. die minimale Temperatur, ab der der Rhodiumkatalysator und das Diphenylsilan das Keton reduzieren, und auf die *turn-over-number* (die Anzahl der Katalysezyklen, die der Katalysator durchläuft, bis er ineffektiv wird) des Katalysators und den Enantiomeren-Überschuß nehmen. Donorsubstituenten (Methoxy-, Amingruppe) erhöhen die kritische Reaktionstemperatur, die optische Ausbeute steigt aber relativ zu dem nichtsubstituierten Katalysator (R = H) deutlich an. Akzeptorsubstituenten (R = Cl) reduzieren die kritische Reaktionstemperatur aber auch den ee-Wert.



Schema 8

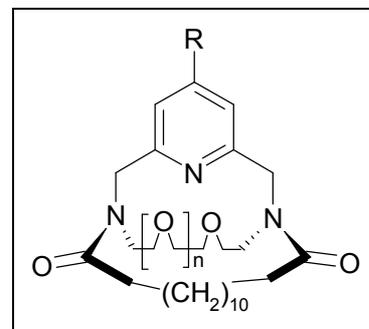
Der Einfluß auf die *turn-over-number* zeigt dagegen einen umgekehrten Effekt. Akzeptorsubstituenten erhöhen die Umsatzzahl ($ton > 150$), während Donorsubstituenten diese erniedrigen ($ton = 40-90$). Nishiyama erklärt den Einfluß der Substituenten mittels *extended Hückel*-Orbital Berechnungen. Danach wirken die Substituenten auf die Elektronendichte des Pyridinstickstoffs und damit indirekt auf die Elektronendichte des Rhodium(III)-Atoms ein. Auf den Imidstickstoff der Oxazolinringe haben sie keinen Einfluß.

Elektronische Kontrolle durch Substituenten an der Position 4 des Pyridinrings beobachtet auch Jacobsen, der mit Mangan(III)-Komplexen Olefine asymmetrisch epoxidiert.⁵¹ Er bestätigt, daß Donorsubstituenten die Enantioselektivität erhöhen und legt produktnahe Übergangszustände zugrunde, die die stereochemische Interaktion (*stereochemical communication*) zwischen chiralem Katalysator und Substrat erhöhen.

3.2 Anwendungsgebiete von Pybox- und auf Pyridin basierende Liganden

Neben der oben erwähnten asymmetrischen Hydrosilylierung und Epoxidierung haben tridentate Pyridinliganden Einzug in viele Forschungsgebiete genommen. Dabei wurden neben den von Nishiyama beschriebenen Bis(oxazolinyl)pyridinen viele Pyridinsysteme geprüft, die alle das tridentate Reaktionszentrum gemeinsam haben. In dieser Arbeit werden daher tridentate Pyridinliganden allgemein als Pybox-Liganden bezeichnet.

Pybox-Liganden können nicht nur für die enantioselective Synthese, sondern auch für die regioselective Erkennung eingesetzt werden. Lünning verwendet konkave Pyridinsysteme (Schema 9), um Polyalkohole regioselectiv mit Diphenylketen zu acylieren.⁵² Prinzipiell sind zwei Mechanismen bei der Pyridin katalysierten Acylierung von Alkoholen möglich: Das Keten greift den basischen Pyridinstickstoff an und bildet ein Betain,⁵³ oder es bildet sich eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Pyridinstickstoff und dem Alkohol, wodurch dieser aktiviert wird.

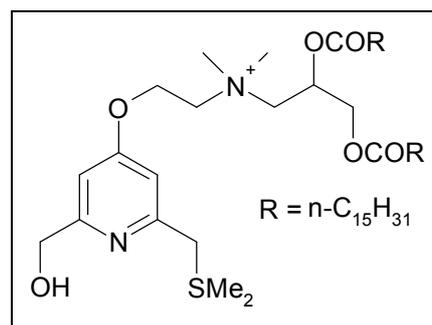


Schema 9

Lünings Kazerant schließt den ersten Mechanismus aus. Das sperrige Biphenylketen kann nicht zum Pyridinstickstoff vordringen, weshalb sich nur die Wasserstoffbrückenbindung zum Alkohol ausbilden kann. Das Substitutionsmuster des Pyridins dirigiert dann Selektivität und Reaktivität bezüglich primärer und sekundärer Alkohole.

Scrimin und Tonellato entwickeln aus Pybox-Derivaten synthetische Liposomen, die Vesikel (kugelförmige Aggregate) und Mycellen (in hydrophilen Lösungsmitteln Aggregate mit polarer Oberfläche und unpolarem Kern, vgl. Seife) ausbilden können.⁵⁴

Schema 10 zeigt ein solches Mimetikum, in dem der Ammoniumstickstoff mit dem Pyboxsystem die hydrophile Oberfläche und die Palmitinsäureester den lipophilen Kern bilden. Die Autoren benutzen diese Liganden um die hydrolytische Spaltung der aktivierten Ester von Aminosäuren mit Cu(II) zu katalysieren.



Schema 10

Diese Systeme sind vergleichbar mit biochemischen Metalloenzymen (z. B. Phosphatasen), die vorwiegend als Zn(II)-Komplexe Hydrolysevorgänge katalysieren.

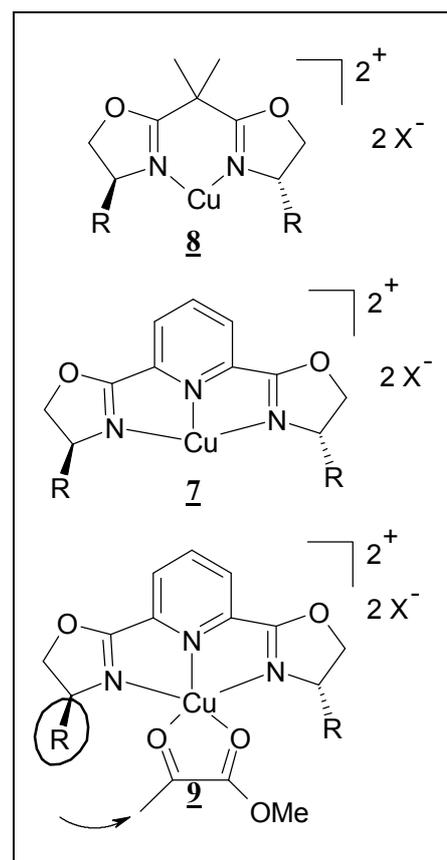
3.2.1 Pybox-Kupfer(II)-Komplexe

Die von Evans synthetisierten Kupfer(II)-Komplexe **8** und **7** werden als chirale Lewisäuren bei der Diels-Alder-Reaktion⁵⁵ und der enantioselektiven Aldoladdition^{56,57} als Katalysatoren eingesetzt. Hierbei findet eine starke Substratkoordination an den planaren Kupferkatalysator statt, wodurch für das angreifende Reagenz eine π -faciale Diskriminierung erzeugt wird.

Evans setzt für die enantioselektive Aldoladdition Pyruvatester (1,2-Dicarbonyl-Verbindung) und Benzyloxyacetaldehyd (1,2-Funktionsgruppenabstand) ein, die mit einem Enolsilan in guten bis sehr guten optischen Ausbeuten diastereoselektiv reagieren.

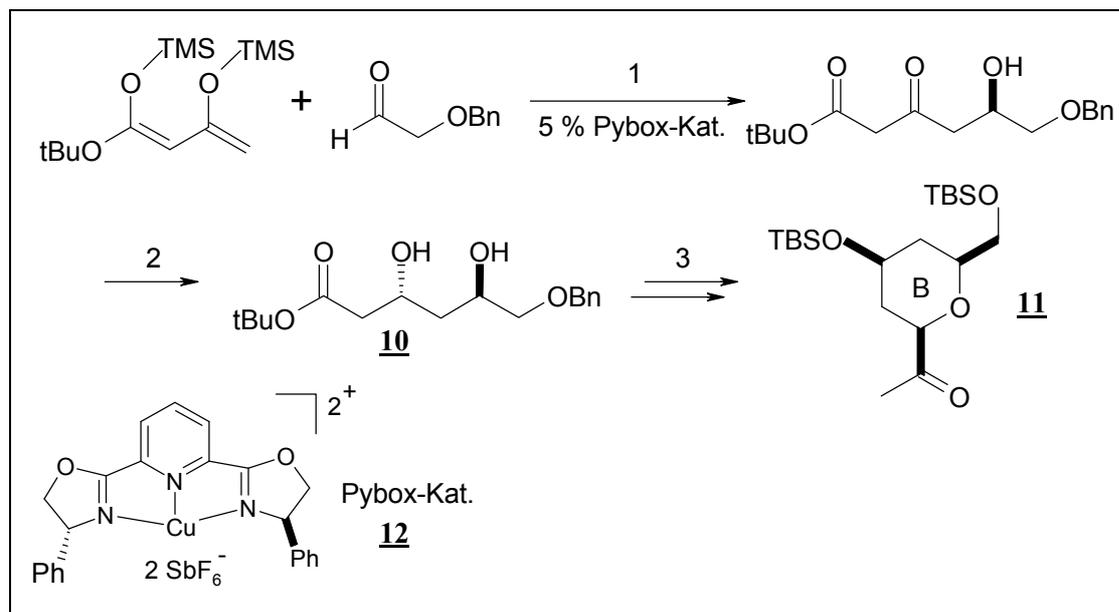
9 zeigt einen koordinierten Substrat-Ligand Komplex am Beispiel eines Pyruvatesters. Die Lewisäure aktiviert dabei die Carbonylgruppen zum Enol und der Substituent R des Oxazolins schirmt die Oberseite ab, so daß der Angriff des Enolsilans nur von der Unterseite erfolgen kann.

Diese Reaktion stellt somit eine Variante der enantioselektiven Mukaiyama-Aldol-Reaktion⁵⁸ dar.



Schema 11

Der Katalysator **7** mit Phenylresten als abschirmende Substituenten R (**12**) diente Evans bei der Totalsynthese des Bryostatins **2** zum Aufbau der *anti*-1,3-Dioleinheit im B-Ring **11** durch eine Aldolreaktion.⁵⁹



Schema 12

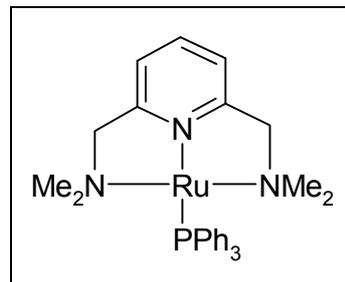
Schema 12 zeigt im ersten Reaktionsschritt die enantioselektive Aldol-Addition des Silylenolethers an α -Benzyloxyacetaldehyd, wobei durch den Einsatz des Katalysators **12** ein Enantiomerentüberschuß von 99 % erzielt wird. Im zweiten Reaktionsschritt erfolgt die Synthese des *anti*-1,3-Diols **10** durch eine Boranatreduktion, die durch die Hydroxygruppe dirigiert wird. Der B-Ring des Bryostatins **2** **11** kann von dieser Stufe aus in drei weiteren Stufen erreicht werden.

Durch Austausch des Cu(II) durch Sn(II) kann unter Verwendung der Pyboxliganden das syn-1,3-Diol erhalten werden.⁶⁰

Ferner konnte gezeigt werden, dass Kupferkomplexe mit Bipyridin- (Bipy) oder Trispyridinliganden selektiv die RNA spalten.⁶¹

Van Koten benutzt einen Pybox-Ruthenium Katalysator (Schema 13), um sekundäre und primäre Amine zu synthetisieren. Hierbei werden primäre oder sekundäre Alkohole als Alkylierungsreagenz benutzt. Die katalytische Alkylierung von Aminen ist auch eine großtechnisch interessante Methode (Synthese von Heterocyclen: Piperazine, Piperidine), da hierbei keine Salze, sondern nur Wasser als Nebenprodukt anfallen. Nachteilig ist nur der hohe Energieaufwand, da bisher für die Reaktion eine Reaktionstemperatur von 150-200°C erforderlich ist.

Van Koten konnte zeigen, daß der Pybox-Ruthenium-Katalysator mit guten Ausbeuten bei 82°C Reaktionstemperatur für die Alkylierung von Aminen einsetzbar ist.⁶²



Schema 13

3.3 Lumineszente Lanthanidkomplexe

Nichtradioaktive Labelling-Techniken ersetzen immer mehr den Einsatz von Radionucleotiden, da sie, wie Eingangs festgestellt, beträchtliche Vorteile im Umgang, in der Haltbarkeit und den Kosten mit sich bringen. Hierbei haben sich für die zeitaufgelöste Fluoreszenzanalytik besonders Tb(III)- und Eu(III)-Chelate bewährt.⁶³

Zeitaufgelöste Fluoreszenz basiert im Wesentlichen auf zwei Effekten: Das Lanthanid bleibt nach der photoinduzierten elektronischen Anregung für Millisekunden im angeregten Zustand und fällt dann unter Lichtemission in den Grundzustand zurück. Die Verweilzeit im angeregten Zustand ist länger als die der Umgebung, deren Lumineszenzperiode maximal 10 ns andauert, so daß das Fluoreszenzphänomen der Lanthanide eintausend mal länger anhält. Mißt man daher nach der Photoanregung zeitlich verzögert die Fluoreszenz, so wird das Hintergrundrauschen herausgefiltert. Diese Methode der zeitlich verzögerten Lumineszenzmessung wird als *time-gated measurement* bezeichnet.

Ein modernes zeitaufgelöstes Fluorometer gibt eintausend Lichtimpulse pro Sekunde mit einer Wellenlänge von 340 nm auf eine Probe. In der kurzen Periode zwischen den Lichtimpulsen, mißt das Gerät nach einer Verzögerungszeit von 400 ns die Fluoreszenzemission.

Auf diese faszinierende Weise wird die Achilles-Ferse der Fluorezenzspektroskopie, nämlich die Lumineszenz der Umgebung (Solvens, Partikel, Hilfsreagentien) und damit ein starkes Hintergrundrauschen, elegant umgangen.

Ein weiterer Effekt, der die zeitaufgelöste Fluoreszenz charakterisiert, ist ein großer Stokes-Shift, der das Emissionssignal des Lanthanids von vielen Hintergrundsignalen zu unterscheiden hilft. Er beträgt etwa 300 nm. Dazu ist der Signal-Peak sehr scharf, so daß das Meßfenster des Detektors sehr fein eingestellt werden kann.²¹

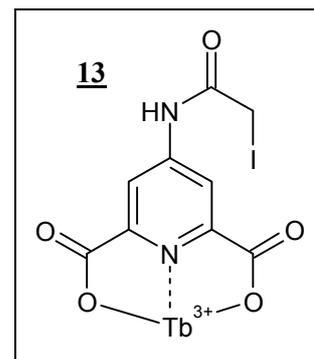
Lanthanide benötigen für die photochemische Anregung einen Sensibilisator, d.h. ein π -System, das das ultraviolette Licht absorbiert und die Energie auf das Metallatom überträgt. Die Intensität der Lumineszenz, also die Lichtquantenausbeute, ist unmittelbar mit der Absorptivität des Liganden verbunden. Hierzu gehört die Effizienz des Energietransfers und die Koordination vom Liganden zum Metall. Da diese Eigenschaften primär durch die Struktur des Liganden bestimmt werden, erfolgte eine große Anstrengung bei der Synthese einer Vielzahl von Liganden.⁶⁴

Dabei haben sich bidentate Liganden als zu schwache Sensibilisatoren für die photochemische Anregung von Tb(III) und Eu(III) erwiesen.⁶⁵

Im Gegensatz hierzu ist Dipicolinsäure (Pyridin-2,6-dicarbonsäure) ein sehr effizienter Sensibilisator für die Lanthanidlumineszenz.⁶⁶

Wenzel führte daher Messungen des Absorptionsmaximums und der Emissionsdauer des Komplexes **13** durch, und erhielt typische Ergebnisse: Die Emission erfolgte innerhalb einer Periode von ca. 5 ms bei einem Absorptionsmaximum von 280 nm.¹⁹

Im weiteren führte er ein Protein-Labeling durch, indem er die Iodo-Gruppe des Liganden durch ein Immunoglobulin substituierte. Das an dem Liganden gebundene Immunoglobulin wurde daraufhin auf Nitrocelluloseplatten immobilisiert und in eine TbCl₃-Lösung zur Komplexbildung getaucht.



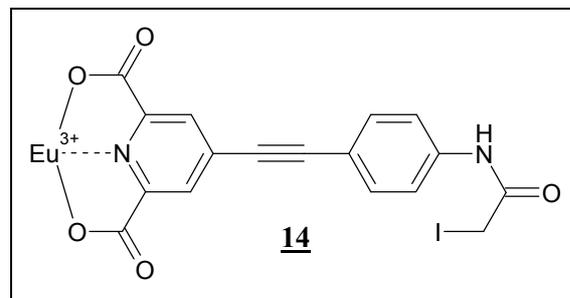
Schema 14

Nach einer Elektrophorese in einem denaturierenden Polyacrylamidgel konnten fluoreszenzspektrometrisch unterschiedlich große Fragmente des Proteins nachgewiesen werden. Um die Grenzen der Stabilität des Terbium-Komplexes zu testen, wurde das Gel über einige Tage regelmäßig in EDTA getaucht. Danach zeigte der Immunoglobulin-Komplex noch immer die charakteristischen Fluoreszenzspektren.

Wenzel hat damit gezeigt, daß tridentate Pyridinkomplexe als Protein-Konjugate genutzt werden können, die stabile Tb(III)-Komplexe bilden. Deren Emissionsperiode und Stokes-Shift sind für *time-gated* Lumineszenz-Immunoassays optimal.

Hogan stellt einen auf dem Wenzelschen Komplex aufbauenden Dipicolinsäure-Liganden vor, der um ein Phenylacetylen erweitert ist (**14**).⁶⁷ Das Absorptionsmaximum liegt bei 320 nm und das der Emission bei 617 nm, so daß der Stokes-shift ca. 300 nm beträgt.

Wie bei der Dipicolinsäure festgestellt,⁶⁸ liegt auch hier bei einem Ligand - Lanthanid Verhältnis von 3:1 das Fluoreszenzmaximum vor. Die Photonenintensität ist dabei um den Faktor 10 größer als bei einem Ligand - Lanthanid Verhältnis von 1:1.



Schema 15

Hogan konnte bei der Lichtquantenausbeute sogar einen Substituenteneffekt feststellen. Wird **14** an einen polymeren Harz gebunden, so verdoppelt sich die Lichtintensität gegenüber dem Komplex mit dem freien Liganden.

3.3.1 Lumineszenz und Energietransfer zwischen Lanthanid-Chelaten

Neue Methoden wurden entwickelt, um die Lumineszenz der Lanthanidionen zu erhöhen. Hemmilä beobachtete eine Quantenverstärkung von Eu(III) und Tb(III) bei der Zugabe von Gd(III) oder Y(III) in eine Lösung aus β -Diketon, Triton X-100 und Phenanthrolin.⁶⁹ Dieses Phänomen in der Mycellen bildenden Lösung nannte er Co-Lumineszenz.

Danach basiert die durch Co-Lumineszenz bewirkte Lumineszenzverstärkung auf einem intermolekularen Energietransfer nach Förster⁷⁰. Dieser Energietransfer erfolgt durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung von dem Chelat des verstärkenden Ions (Gd(III) oder Y(III)) auf das Chelat des emittierenden Ions (Eu(III), Tb(III) oder Sm(III)). Die Co-Lumineszenz kann nur in einer Mycellen bildenden Umgebung, nicht aber in microhomogener Lösung beobachtet werden. So kann z. B. in Benzol dieser Effekt nicht festgestellt werden, da die Chelate in separaten Molekülen vorliegen und die große intermolekulare Distanz einen Energietransfer unmöglich macht.

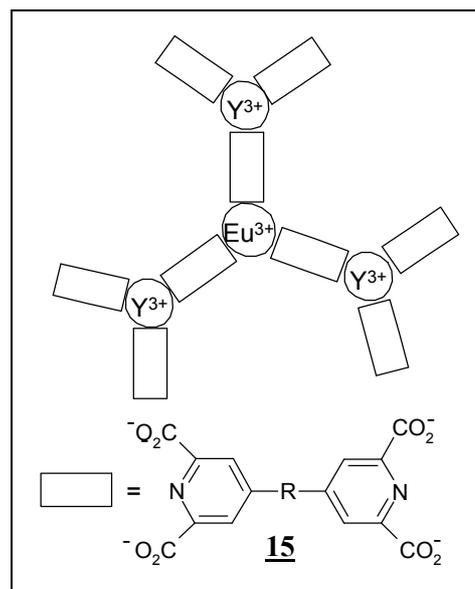
Takalo entwickelte ein polymeres Netzwerk, um Signalverstärkung durch Co-Lumineszenz auch in wässriger Lösung zu erreichen⁷¹.

Schema 16 zeigt symbolisch dieses Netzwerk, in dem das emittierende Europium in wässriger Lösung von drei Ytterbiumchelaten umgeben ist ohne Additive und Mycellenbildung. Die dabei eingesetzten Liganden **15** sind symmetrisch und vermögen durch die terminalen Carboxylgruppen und den basischen Pyridinstickstoff zwei Lanthanid-Ionen zu komplexieren. Das Verhältnis Metall zu Ligand beträgt dabei 3:2.

In einem polymeren Netzwerk liegen der Lumineszenzverstärkung der Eu(III)-Ionen zwei Faktoren zugrunde. Einmal besteht ein großer Sensibilisatorüberschuß (Ligand) relativ zu den Energieacceptoren (Ionen), wodurch maximale Absorption erfolgen kann. Der Überschuß an Ytterbiumionen verknüpft die

Liganden zu einem Netzwerk und verstärkt das *Inter-System-Crossing* in den externen Liganden. Die Energie, die die *externen* Chelate absorbieren, wird dann über Triplett-Zustände zum Europium transferiert.

Somit kann ein Eu(III)-Ion sowohl durch direkt koordinierte Liganden, als auch durch externen Liganden angeregt werden. Praktisch bedeutet dies, daß Energie, die während des Transfers strahlungslos dissipiert, jederzeit ersetzt werden kann und ein Maximum der Fluoreszenz erhalten bleibt.



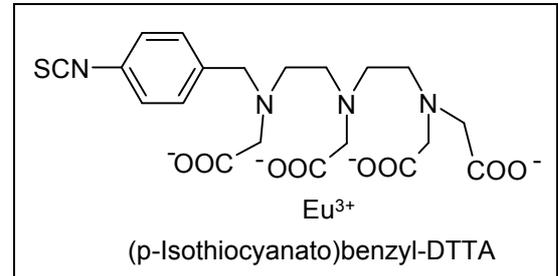
Schema 16

3.3.2 DELFIA™-System von Wallac

Das DELFIA™-System von Wallac ist die praktische und kommerzielle Umsetzung eines auf Lanthanid-Chelaten basierenden Labels für die Fluoreszenzspektroskopie.⁷² Es gilt als das am häufigsten eingesetzte *time-resolved* Fluoreszenzsystem überhaupt und gehört im Vergleich mit anderen Detektionsmethoden, wie radioisotopische (z. B. ¹²⁵I) Markierung, zu den sensitivsten nicht enzymatischen Detektionsverfahren für Microtiter-Platten Essays.⁷³

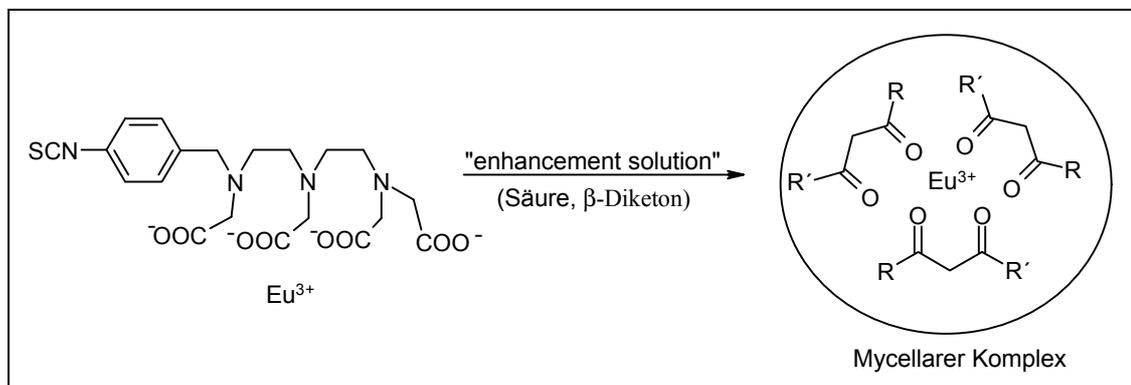
Das System basiert auf dem Liganden (*p*-Isothiocyanatobenzyl)-diethylentriamin-*N*¹,*N*²,*N*³,*N*³-tetraessigsäure

(Schema 17) und wirkt untypisch, da der Ligand weder über ein konjugiertes π -System noch über σ , π -Orbitalüberlappung Elektronendichte an das Europium weitergeben kann. Er ist daher kein Sensibilisator für die Lanthanid-Fluoreszenz.



Schema 17

Das DELFIA™-System gehört zu den sog. dissoziativen Methoden. (*p*-Isothiocyanatobenzyl)-DTTA ist ein indirektes Label, da es über die Isothiocyanatgruppe an das zu untersuchende Substrat gebunden wird, aber mit Europium einen wenig fluoreszierenden Komplex bildet. Das Europium muß am Ende des Essays mit einem Dissoziationsreagenz (*enhancement solution*), das sich aus Säure, einem β -Diketon, Liganden und einem Detergenz zusammensetzt, aus dem Komplex herausgewaschen werden.

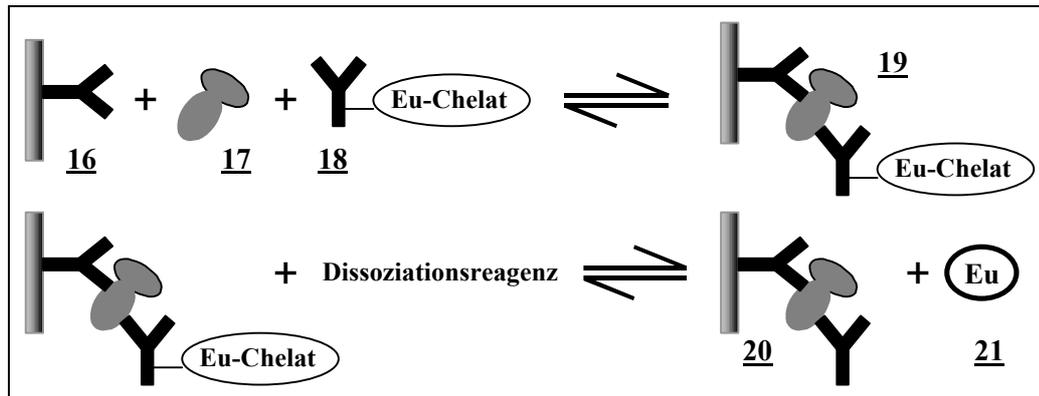


Schema 18

Das Dissoziationsreagenz wirkt als Fluoreszenzverstärker und bildet mit dem Metall einen neuen Multi-Komponenten-Komplex, der eine mycellare Struktur einnimmt (Schema 18).

Das DELFIA™-System wird bei Immuno-, Zytotoxizitäts- oder DNA-Hybridisierungs-Essays eingesetzt.

Schema 19 zeigt die wesentlichen Schritte, die bei einem Immunoessay (sog. *Blot-Technik*) durchlaufen werden.

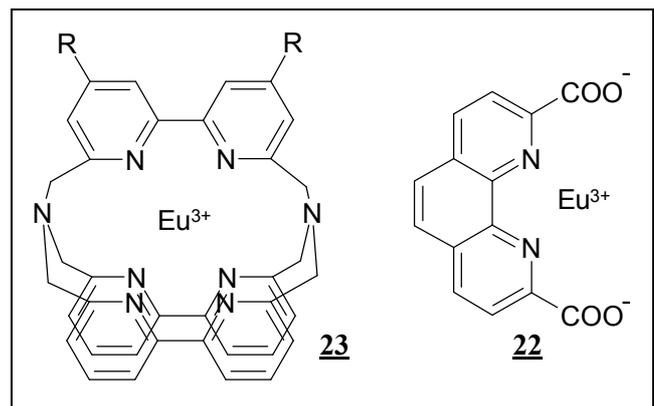


Schema 19

Auf einer mit immobilisierten Antikörpern **16** versehenen Microtiterplatte werden Antigene **17** und an den DELFIA™-Liganden gebundene Antikörper **18** gegeben. Die Microtiterplatte wird in Europium-Salzlösung getaucht und es bildet sich nach positiver Antigen-Antikörper Reaktion das auf der Microtiterplatte fixierte Addukt **19**. Dieses wird mit destilliertem Wasser gewaschen, um unkomplexiertes Europium zu entfernen. Nun wird das Dissoziationsreagenz hinzugegeben, um das fluoreszierende Chelat **21** zu bilden. Auf diese Weise können abhängig von der Größe der Microtiterplatte 50 - 100 Tests gleichzeitig vermessen werden.

Andere erprobte Europium-Chelat-Label sind das Cryptat **23** und der Phenanthrolin-2,6-dicarbonsäurekomplex (*Cyberfluor*) **22**. Cyberfluor wurde ursprünglich für immunochemische Anwendungen konzipiert,⁷⁴ ist aber indessen für die DNA-Erkennung weiterentwickelt worden.⁷⁵

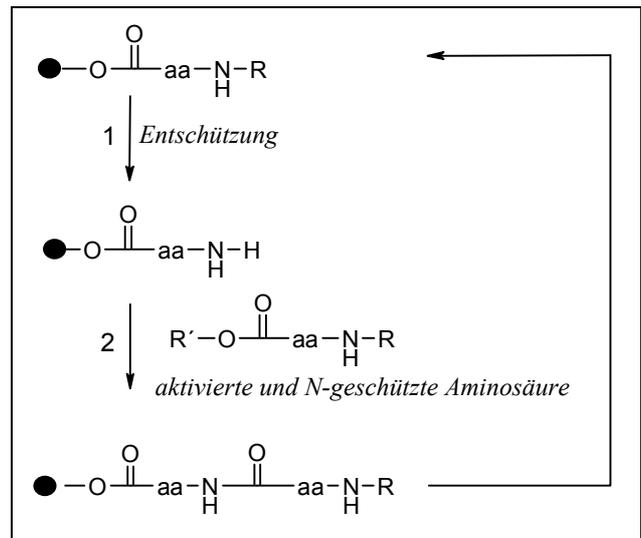
Das von J. M. Lehn beschriebene Cryptat **23**⁷⁶ wurde ebenfalls für immunodiagnostische Anwendungen,⁷⁷ DNA-Erkennung⁷⁸ und für Proteininteraktionsstudien erfolgreich eingesetzt.⁷⁹



Schema 20

3.4 Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC)

Die moderne automatisierte Festphasensynthese ermöglicht es in relativ kurzer Zeit große Peptide aufzubauen. Dabei wird eine N-terminal geschützte Aminosäure (aa in Schema 21) über ihren C-Terminus an einen Harz (*resin*) gebunden (Ester- oder Amid-Bindung) und der N-Terminus im ersten Reaktionsschritt entschützt. Im zweiten Reaktionsschritt wird eine N-terminal geschützte Aminosäure zusammen mit einem die Carboxylgruppe aktivierenden Reagenz (z. B. HBTU) zugegeben und der sich bildende Aktivester greift die vorher freigelegte Aminogruppe elektrophil an. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis das Zielpeptid erreicht ist.



Schema 21

Ein Nachteil der Festphasensynthese ist, daß Nebenprodukte, die durch unvollständige Kupplungsreaktionen auftreten, während der Synthese nicht abgetrennt werden können. Daher liegen nach der Synthese neben dem Zielpeptid andere Peptide unterschiedlicher Länge als Verunreinigung vor, die abgetrennt werden müssen. Um die Reinigung zu erleichtern, wird während der Synthese in regelmäßigen Abständen ein sog. *N-capping*-Schritt mit Essigsäureanhydrid durchgeführt. Dabei wird ausgenutzt, daß nach dem Kupplungsschritt alle harzgebundenen Peptide, die mit ihrem Reaktionspartner reagiert haben, N-terminal geschützt (vgl. Schritt 2 in Schema 21), alle Peptide aber, die nicht mit ihrem Reaktionspartner reagiert haben, N-terminal ungeschützt vorliegen (vgl. Schritt 1 in

Schema 21). Das Essigsäureanhydrid acetyliert diese Peptide, so daß sie im weiteren nicht mehr reagieren können. Wird das polare Zielpeptid vom Harz getrennt, kann es so leichter durch *reversed phase* HPLC von den weniger polaren acetylierten Nebenprodukten getrennt werden.

Die *reversed phase* Chromatographie ist aber nur für Peptide sinnvoll, die weniger als 30 Aminosäuren enthalten, da bei größeren Peptiden die physikalischen Eigenschaften wie Ladung, Lipophilie und Molekülgröße bei Zielpeptid und Nebenprodukten ähnlich sind.

Eine Methode große Peptide zu reinigen ist die *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography* (IMAC).²⁰ Sie wird bei Peptiden angewendet, die N-terminal Aminosäuren mit Donor Gruppen tragen wie Cystein, Tryptophan oder Histidin. Dazu wird als stationäre Phase Superose® verwendet, die vor der chromatographischen Trennung mit Cu(II) beladen wird. Die Trennung erfolgt durch Komplexbildung mit dem an der Superose® immobilisierten Metall. N-terminal acetylierte Peptide können keine Cu(II)-Komplexe bilden und werden daher schneller eluiert als das Zielpeptid.

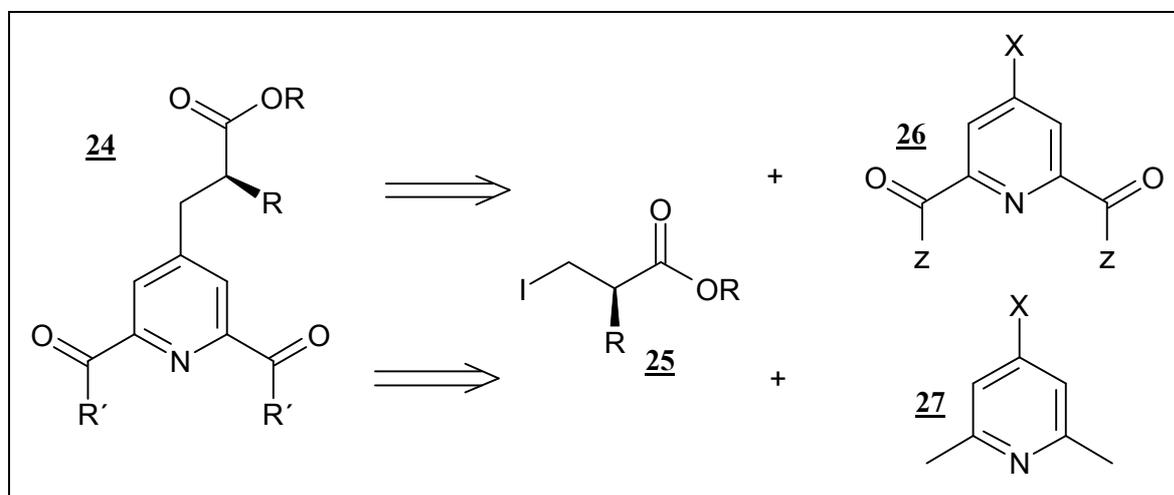
4 Experimentelle Durchführung

4.1 Aufgabenstellung

Ziel der Arbeit war die Synthese chiralen und achiraler Pybox-Systeme, deren Anwendbarkeit für die Fluoreszenzanalytik überprüft werden sollte.

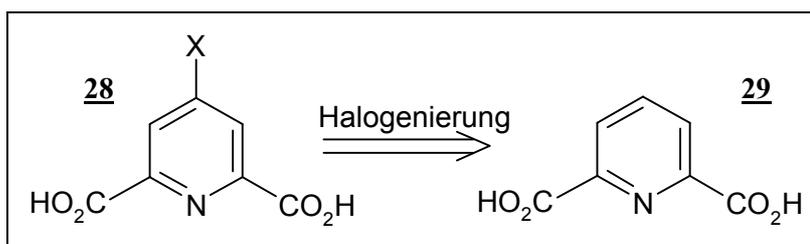
4.2 Synthese der Py-box Komponenten

Die Synthese der Liganden soll aus Gründen der Effizienz nicht linear, sondern konvergent erfolgen. Diese Strategie kann durch ein Palladium katalysiertes Cross-Coupling bzw. Heckkupplung an Position 4 des Heteroaromaten mit einem Zinkorganyl bzw. Acrylester durchgeführt werden. Der retrosynthetische Ansatz eröffnet dabei zwei Strategien bezüglich der Tridentat-Komponente:



Schema 22

Hierbei kann einmal von einem Derivat (27) (z. B. Diester oder Bisamid) oder von 4-Halogen-Lutidin (26) ausgegangen werden. Das Lutidin kann vor der Kupplung oder wenn möglich nach der Kupplung oxidiert werden, um ein homologes Diol oder ein Chelidamsäuresalz zu erhalten. Demgegenüber kann die 4-Halogen-Chelidamsäure reduziert werden, was wiederum eine Vielzahl an variierten Liganden eröffnet (Alkohole, N-substituierte Amine, N-substituierte Amide). Die Synthese von 4-Halogen-Chelidamsäure kann auch über Halogenierung der 4-Position von Pyridin-2,6-dicarbonsäure erfolgen:



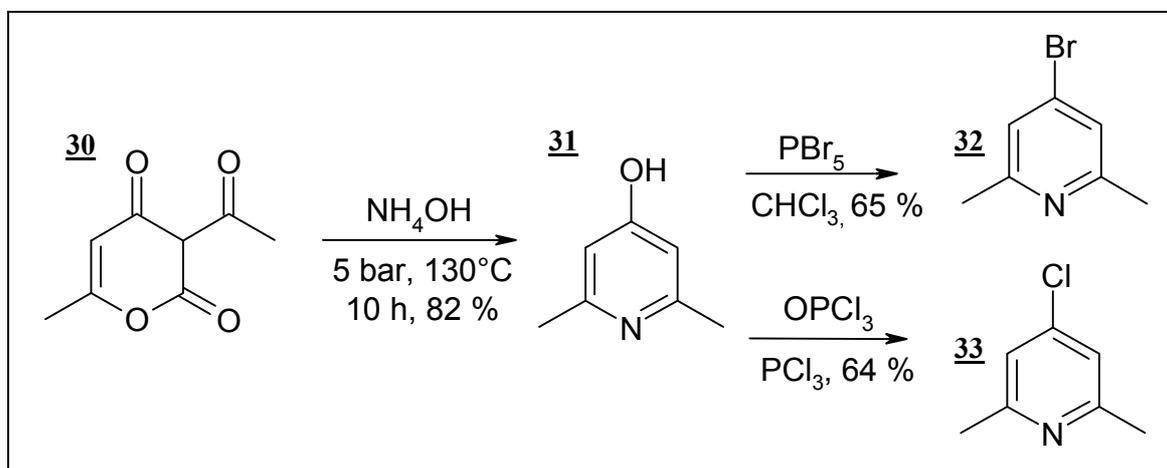
Schema 23

4.3 Das Lutidin-System

4-Halogenpyridine lassen sich über Pyridin-N-Oxide erzeugen, dabei wird von ihren 4-Amino-,⁸⁰ 4-Nitramino-^{81,82,83,84} oder 4-Nitro-Derivaten^{85,86,87} ausgegangen. Diese Methodik erweist sich aber nur für die 4-Chlorpyridine als sinnvoll, da die Ausbeuten der Brom-Homologen mit 10 - 20 % für Ausgangsmaterialien zu gering sind.⁸⁰⁻⁸⁷

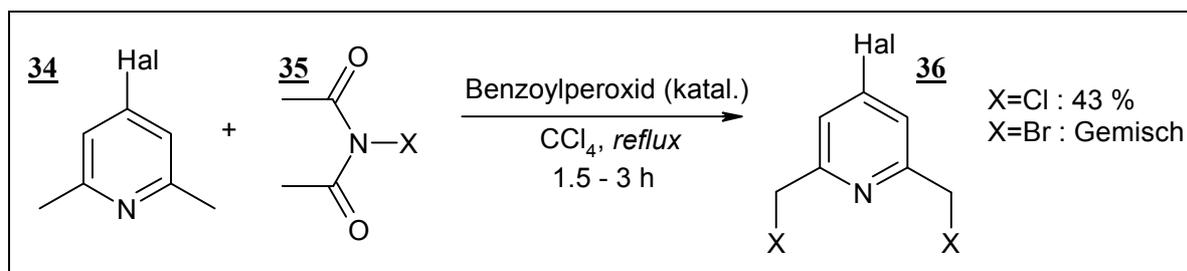
Takalo⁸⁸ schlägt daher vor, 4-Hydroxypyridine mit Phosphorylchlorid bzw. mit Phosphorpentabromid umzusetzen, wobei mechanistisch der Phosphonester durch das Halogenid ipso-substituiert wird. Das 4-Hydroxylutidin (**31**) wird aus der preisgünstigen Dehydroacetessigsäure (**30**) gewonnen, mit großem Überschuß an konzentriertem Ammoniak bei 130°C und 5 bar in einem Autoklaven umgesetzt wird.

Die Aufarbeitung wird durch die Ammoniakdämpfe erschwert, doch die Ausbeute ist nach dem Umkristallisieren aus Methanol mit 82 % sehr gut.



Schema 24

Um ein Tridentat zu erhalten, ist eine Funktionalisierung der benzylicchen Methylgruppen erforderlich. Die Standardmethode^{89,90,91} für die Halogenierung von Kohlenstoffen mit benzylicchen Protonen ist die Umsetzung mit N-Bromsuccinimid bzw. N-Chlorsuccinimid in Tetrachlorkohlenstoff, wobei unter ionischen Bedingungen ein Halogenkation nach der Deprotonierung bzw. unter radikalischen Bedingungen ein Halogenatom auf den nukleophilen Kohlenstoff übertragen wird.



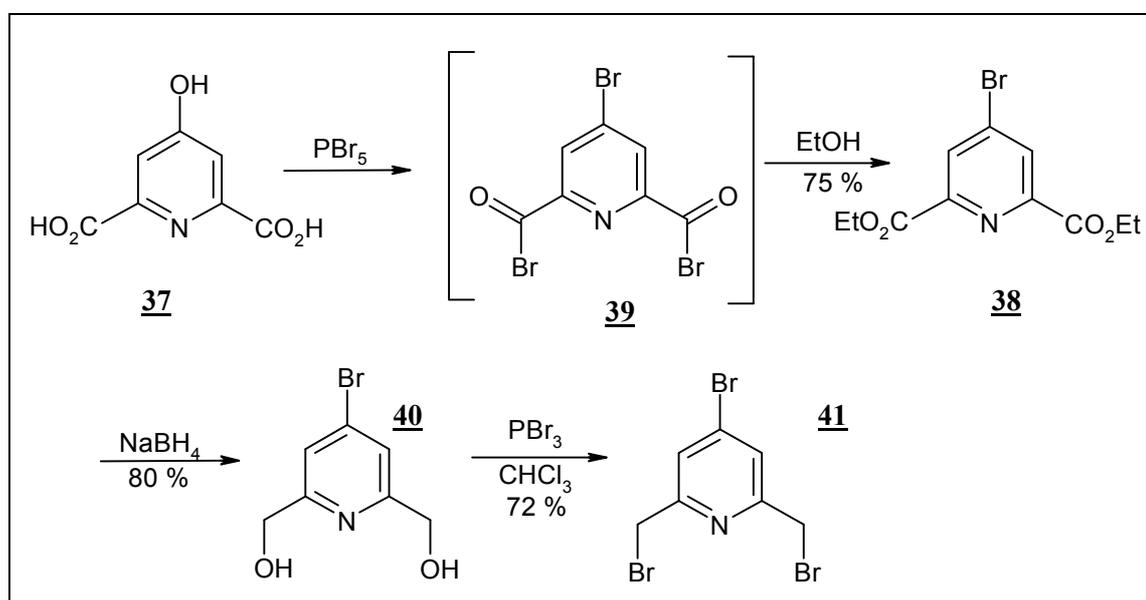
Schema 25

Wie schon vorher von Newkome⁹² und Vögtle⁹³ gezeigt, ist die Umsetzung von **(34)** mit N-Bromsuccinimid unter radikalischen Bedingungen nicht erfolgreich, da ein komplexes Reaktionsgemisch erhalten wird. Auch Variation des Solvens (Dichlormethan, Chloroform, Toluol, Benzol) verbessert die Ausbeute nicht. Allerdings konnte die Ausbeute von **(36)** (X=Cl) durch den Einsatz einer UV-Wolfram-Lampe auf 43 % gesteigert werden, während Takalo keine Reaktionsabhängigkeit von UV-Anregung feststellen konnte.

Da die Synthese des erwünschten Lutidin-Derivats **(36)** (X=Br) auf diese Weise nicht dargestellt werden konnte, mußte diese Route verlassen werden, selbst wenn die Derivatisierung der Chlormethylgruppen erfolgreich verlaufen wären. Im Hinblick auf das Cross-Coupling mit einem Zinkorganyl wäre die Elektrophilie bzw. die Polarisierung des 4-Pyridylkohlenstoffs bezüglich des Chloratoms von 4-Chlorlutidin zu gering, um gute Reaktionsausbeuten zu erzielen. Es hätte daher einen Austausch des Chlors durch Brom mit PBr₃ erfolgen müssen.

4.4 Chelidamsäure

Die logische Alternative zur Lutidin-Strategie stellt der Einsatz der Chelidamsäure als Ausgangsverbindung dar. Nach einer ipso-Substitution der 4-Hydroxygruppe mit Phosphorpentabromid und Reduktion beider Carboxylgruppen kann man leicht zu **(41)** (X=Br) gelangen.^{88,94}



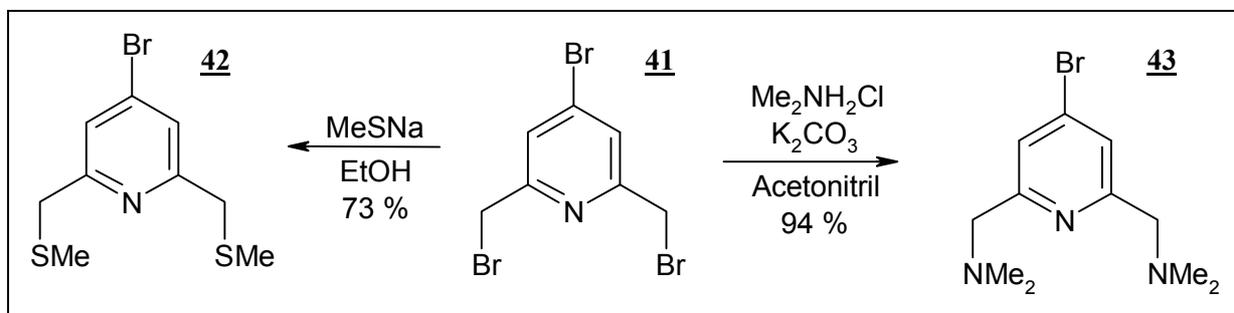
Schema 26

Der Diester **(38)** ist leicht herzustellen. Die Aufarbeitung beschränkt sich auf ein Ausfällen des Rohproduktes aus kaltem Wasser mit anschließendem Umkristallisieren aus Ethanol, das Diol **(40)** wird nach der Reduktion 2 Tage mittels einer Soxhlet-Apparatur mit DCM extrahiert und kann daraufhin sofort eingesetzt werden.

Ein weiteres Problem der Lutidin-Variante, das hier umgangen werden kann, liegt in der Monohydroxylierung der Methylgruppen. Diese selektive Oxidation ist schwer zu kontrollieren, leicht dagegen ist die Oxidation des 4-Hydroxylutidins zur Chelidamsäure mit KMnO_4 durchzuführen.⁹⁵

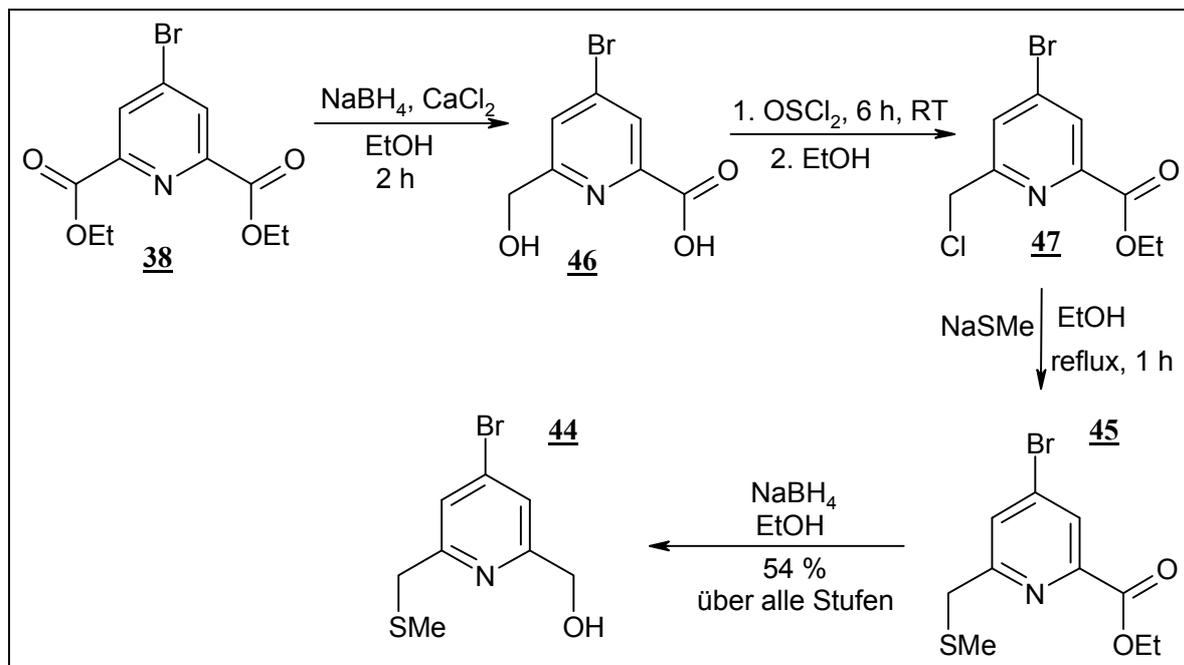
Das Tribromid (**41**) ist eine Schlüsselverbindung für eine Vielzahl symmetrischer und unsymmetrischer Liganden. Die benzylicen Bromide werden zunächst selektiv über einen Substitutionsmechanismus ausgetauscht, das aromatische Bromid darauf über ein Cross-Coupling.

Mit sehr guten Ausbeuten erhält man das Diamin **43**, das nach der Aufarbeitung als gelbes Öl gewonnen und durch fraktionierte Kristallisation aus Ethanol gereinigt wird.⁹⁶ Die Produktreinigung des Disulfids **42** erfolgt durch säulenchromatographische Trennung leichter als bei **43**, da die Sulfidgruppen weitaus weniger basisch sind und daher ein geringerer Chelatisierungseffekt auftritt (*tailing* bei der Säulenchromatographie).



Schema 27

Wird in **38** nur eine Estergruppe reduziert, gelangt man leicht zu asymmetrischen Verbindungen. Hierbei ist

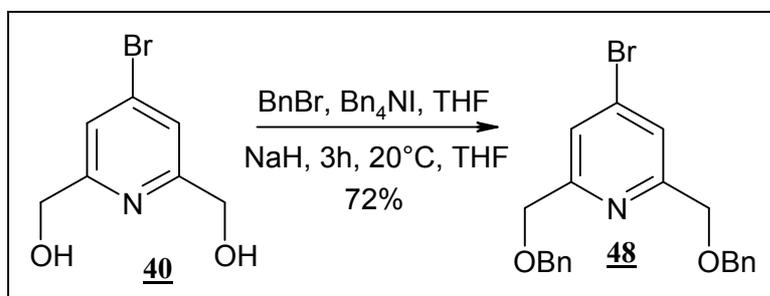


Schema 28

es nicht erforderlich die sehr wasserlösliche Verbindung **46** aufzuarbeiten. Überschüssiges NaBH_4 wird nach der Reduktion mit Wasser hydrolysiert, der Rückstand wird getrocknet und kann darauf mit Thionylchlorid umgesetzt werden.

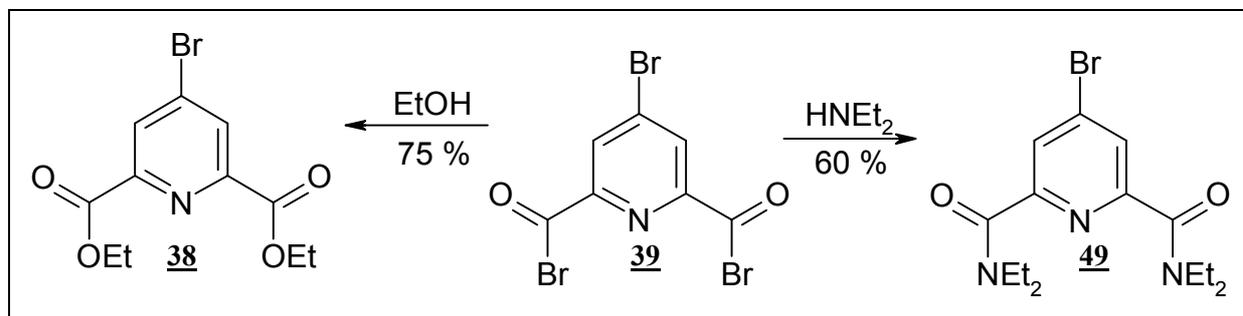
Das Produkt **47** dagegen ist sehr lipophil und kann leicht säulenchromatographisch getrennt werden. Nucleophile Substitution mit Natriumthiomethanolat in Ethanol ergibt Produkt **45**, das nach Reduktion mit NaBH_4 mit insgesamt guter Ausbeute zum gewünschten asymmetrischen Liganden **44** führt.

Eine interessante Verbindung stellt **48** dar, denn sie ermöglicht die Synthese eines Bishydroxy-Tridentats über die Cross-Coupling Methode. Nach dem Coupling werden die Benzylschutzgruppen hydrogenolytisch abgespalten und das Produkt säulenchromatographisch mit Alox B von Katalysator und Aktivkohle getrennt. Die Synthese von **48** folgt der Benzylierungsmethode von Provelenghiou,⁹⁷ der Tetrabenzylammoniumiodid in katalytischen Mengen als Aktivierungsreagenz einsetzt.



Schema 29

Während das Tribromid **41** die Schlüsselverbindung für Liganden mit Funktionalitätsnummer 1 am Methylenkohlenstoff darstellt, erfüllt das Säurebromid **39** diese Aufgabe bei Liganden mit der Funktionalitätsnummer 3. Es wird nach der Bromierung mit PBr_5 als Chloroformextrakt vom Phosphorsäuresumpf in einen trockenen Kolben abfiltriert und unter guter Kühlung mit einem Nucleophil gequenchet.



Schema 30

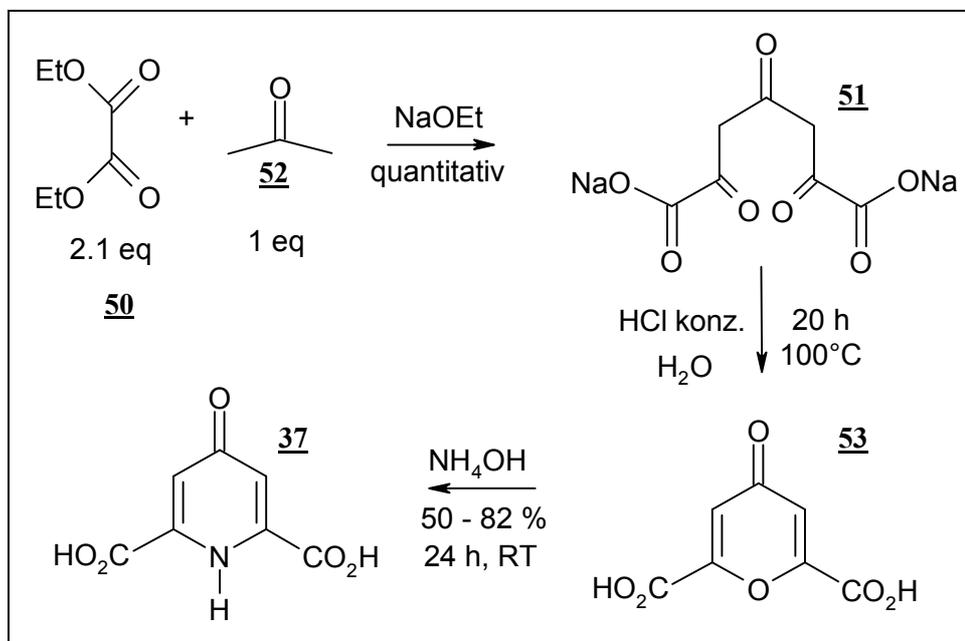
Piguets Arbeiten zu helikalen *Lanthanide Building Blocks*⁹⁸ zeigen, daß das Diamid **49** aufgrund der höheren Elektronendichte am Stickstoff relativ zum Diester **38** einen ausgezeichneten Komplexierungssensor und guten Komplexbildner in Acetonitril darstellt. Daher wurde dieser Ligand für Komplexierungsversuche ausgewählt, die im weiteren besprochen werden.

4.4.1 Synthese der Chelidamsäure

Die Synthese der Chelidamsäure wurde zuerst 1943 von Zwiilmeyer in *Organic Synthesis* beschrieben⁹⁹. Dabei wird zunächst Chelidonsäure (**53**) über eine gekreuzte Aldolreaktion von Oxalsäurediethylester mit Aceton (**52**) aus dem Vorläufer (**51**) gebildet, das darauf mit konzentriertem Ammoniak zu Chelidamsäure (**37**) umgesetzt wird.

Der Vorläufer (**51**) liegt als hochviskoses, orangefarbenes Salz vor, das bis zur Trockene eingengt und dann vorsichtig in konzentrierter Salzsäure gelöst und auf 100°C erhitzt wird. Das Produkt (**53**) liegt als gelbes Pulver vor, und es konnte gezeigt werden, daß Qualitätsverbesserungen durch ein Aufkochen mit Aktivkohle in Wasser zu erzielen sind. Nachdem man die Aktivkohle abfiltriert hat, fällt die Chelidamsäure aus.

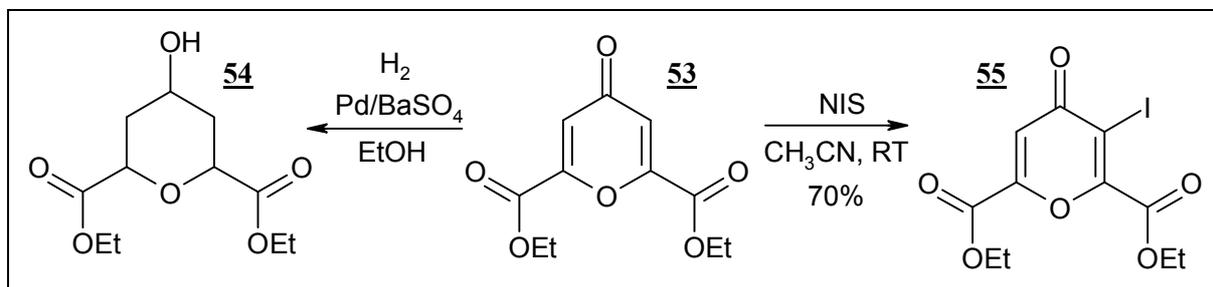
Durch fraktionierte Kristallisation erhöht man die Ausbeute. Quantitativ führt der Einsatz von Aktivkohle jedoch zu einem Ausbeuteverlust, was auf Adsorption an die Aktivkohle zurückgeführt werden kann. Die Reaktion ist nicht konsistent, d. h. die Ausbeuten schwanken zwischen 45 und 70 %.



Schema 31

Chelidon- und Chelidamsäure lassen sich leicht mit HCl gesättigtem Ethanol verestern bzw. mit konzentriertem Ammoniak zum korrespondierenden Diamid umsetzen.¹⁰⁰

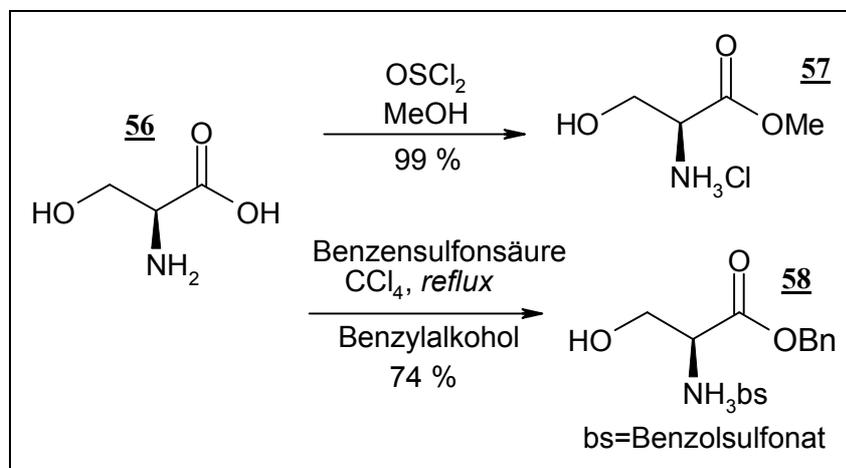
Schema 32 zeigt, wie Chelidonsäurediethylester mit Palladium auf Bariumsulfat zu dem interessanten *meso*-Tetrahydropyranderivat¹⁰¹ (**54**) bzw. mit N-Iodsuccinimid nach einer Methode von Ruano¹⁰² für α , β -ungesättigte Ketone α -halogeniert werden kann (**55**).



Schema 32

4.5 Synthese eines chiralen tethers

Die Synthese der N-Boc-3-iod-L-alaninester (**64**) (vgl. Schema 35) kann auf mehreren Wegen erfolgen. Allgemein wird von N-Boc-L-serinmethyl- oder N-Boc-L-serinbenzylester (**62**) ausgegangen, das in einer 2-Stufen-Reaktion aus L-Serin (**56**) über L-Serin-methylester-Hydrochlorid¹⁰³ (**57**) bzw. L-Serinbenzylester-benzolsulfonat¹⁰⁴ (**58**) hergestellt wird.



Schema 33

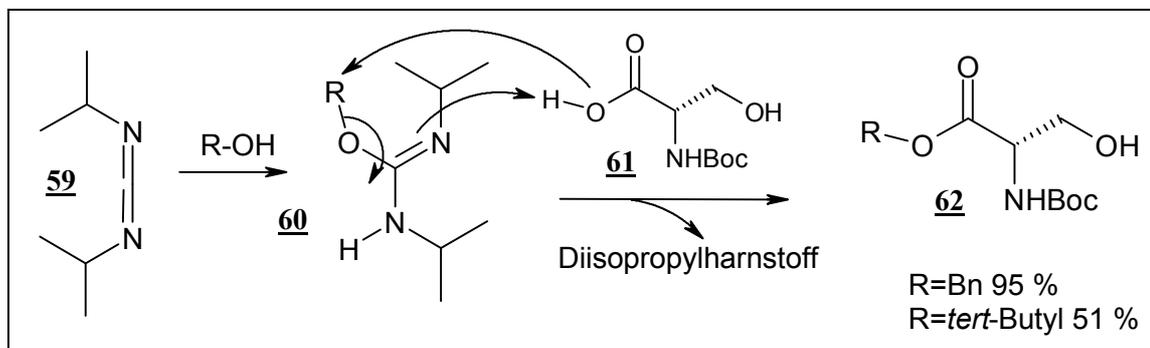
Das Amin wird darauf nach Bodansky aus dem Hydrochlorid (**57**) freigelegt und mit Boc-Anhydrid geschützt.¹⁰⁵

Eine interessante alternative Route, die sich besonders für die Synthese der *tert*-Butylester eignet,¹⁰⁶ leitet sich von der Methode zur Bildung von Aktivestern mit Dicylocarbodiimid ab (DCC).¹⁰⁷ Hierbei setzt man Diisopropylharnstoff (**59**) mit einem Alkohol zum Alkoxy-isoharnstoff (**60**) um, der im nächsten Schritt die Boc-geschützte Aminosäure (**61**) verestert. Die Veresterung verläuft über einen S_N2-Mechanismus im Falle primärer Alkoxy-isoharnstoffe oder über einen S_N1-Mechanismus im Fall des *tert*-Butyloxy-isoharnstoffs.

Diese Reaktionsführung bietet gegenüber der konventionellen Bildung von Aktivestern mit Dicylocarbodiimid mit anschließender Zugabe des Nucleophils mehrere Vorteile:

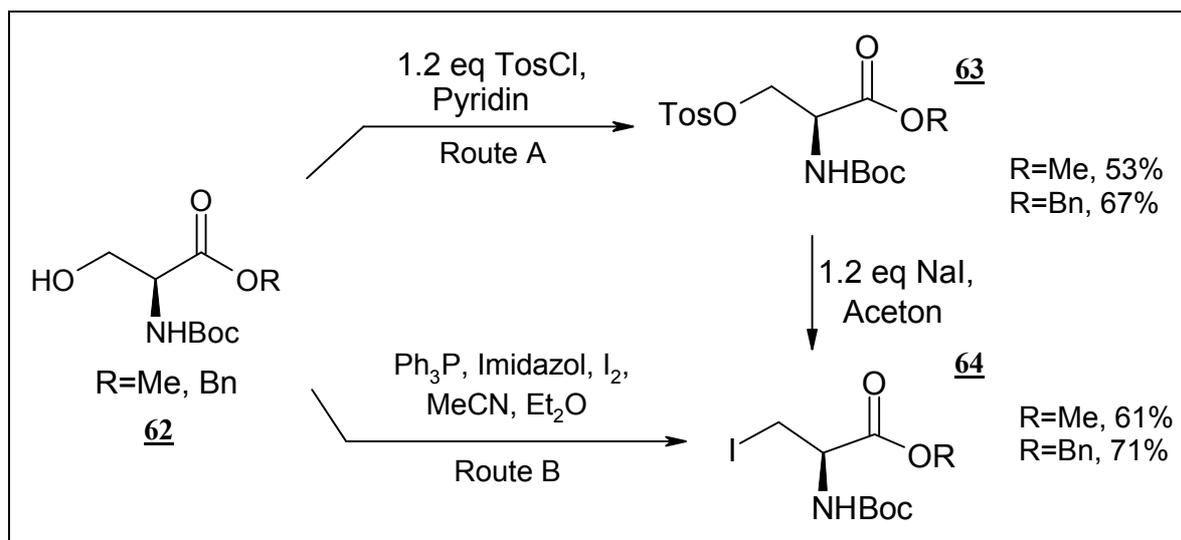
- Bei der Standard DCC-Methode liegt der thermisch instabile O-Acylisoharnstoff als Zwischenprodukt vor.¹⁰⁸ Dieser lagert sich zum N-Acylisoharnstoff um, was zu einer Verminderung der Ausbeute führt.
- Der N-Acylisoharnstoff liegt als stabiles Nebenprodukt und mit einer dem Hauptprodukt vergleichbaren Polarität vor, so daß es nicht leicht vom Hauptprodukt abzutrennen ist.
- Wasser ist unbedingt bei der DCC-Methode auszuschließen, um die Hydrolyse des Aktivesters zu verhindern.

Bei der Isoharnstoffmethode wird jeder Reaktionsschritt separat ausgeführt. Der Alkoxy-isoharnstoff (**60**) liegt gereinigt vor, was i. a. über Vakuumdestillation erfolgt, und kann gelagert werden. Für hohe Ausbeuten sind absolute Lösungsmittel nicht erforderlich.¹⁰⁹



Schema 34

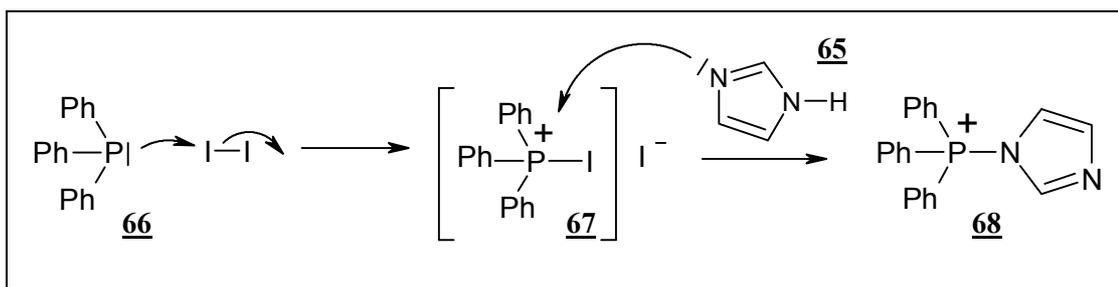
Zur Synthese der N-Boc-iodoalaninester **64** kann im weiteren nach der klassische Variante das N-Boc-geschützte Serin in Pyridin mit Tosylchlorid zu **63** sulfoniert werden. Die Aufarbeitung erfolgt durch Zugabe einer Lösungsmittel-äquivalenten Menge Eis. Die Suspension muß bis zu 2 h unter weiterer Eiszugabe gerührt werden. Dies führt zur Bildung eines weißen Produktniederschlags, der darauf abfiltriert, getrocknet und umkristallisiert wird. Nach der Tosylierung wird unter einfachen S_N2-Bedingungen **63** mit Natriumiodid in Aceton zu (**64**) iodiert.



Schema 35

Ein Nachteil dieser Route A liegt in der großen Menge Pyridins, das als Lösungsmittel und Nucleophiltransferreagenz eingesetzt wird, und insbesondere bei der Aufarbeitung zu einer bedeutenden Geruchsbelästigung führt. Daher bietet Route B einen alternativen Reaktionsweg zu N-Boc-geschützten Iodoalaninestern.

Bei dieser direkten, Mitsunobu-Reaktion¹¹⁰ ähnlichen Iodierung von Alkoholen^{111,112} mit Triphenylphosphin (**66**) (vgl. Schema 36), Iod und Imidazol (**65**) wird zunächst ein in Toluol oder Acetonitril wenig lösliches Addukt **67** gebildet,¹¹³ das bei der Zugabe von Imidazol (**65**) in das löslichere und elektrophilere Salz **68** übergeht. Dieses Phosphoniumsalz ist hoch oxophil, weshalb es im nächsten Schritt schnell mit der freien Hydroxygruppe reagiert und eine gute Fluchtgruppe bildet. Die Iodierung erfolgt unter Inversion durch Angriff des gebildeten Iodids am aktivierten Kohlenstoff unter Bildung von N-Boc-iodoalaninester (**64**) und Triphenylphosphinoxid.



Schema 36

Jackson verwendet bei Umwandlung von Boc-geschützten Serin-*tert*-butylestern in die korrespondierenden Iodoalanin-*tert*-butylester Methyltriphenoxyphosphiniumiodid (Me(PhO)₃PI) in DMF mit sehr guten Ausbeuten.¹¹⁴

4.6 Synthese der Liganden

4.6.1 Heckkupplung

Über die Palladium katalysierte Arylierung von Olefinen wurde erstmals 1968 von Heck^{115, 116} und drei Jahre später von Mizoroki¹¹⁷ publiziert. Heck führte mechanistische Detailstudien durch^{118, 119}, die heute Grundlagen des mechanistischen Verständnisses dieser Reaktion darstellen.

Hiernach erfolgt innerhalb eines Katalysezyklus zunächst die oxidative Addition des Arylhalogenids an das Palladium(0), dann eine Insertion des Olefins in die Palladium-Arylbindung (cis Palladierung). Im nächsten Schritt wird Palladium(II)hydrid unter Bildung des Produktes eliminiert (β -Hydrid-Eliminierung) und Palladium(0) durch Reaktion des Palladiumhydrids mit der Base regeneriert. Palladium(0) kann nun den Cyclus erneut starten.

Das Spektrum der Heck-Reaktion hat sich bis heute enorm geweitet, von chemo- und regioselektiven Einfachkupplungen hochfunktionalisierter Substrate mit unsymmetrisch¹²⁰ mehrfach substituierten Reaktionspartnern (z. B. Rawal Heck-Cyclisierung bei der Synthese von (\pm)-Dehydrotubifolin¹²¹) über Kaskadenreaktionen mit C-C-Bindungsknüpfungen von drei bis acht Bindungen (Oppenholzers Tandem-Tricylisierungs-Heckprozeß in der Synthese eines Tetracyclus¹²²).

Einen ausführlichen Überblick über die Bandbreite dieser Reaktion liefert ein 1994 publizierter Review von de Meijere und Meyer in der Angewandten Chemie.¹²³

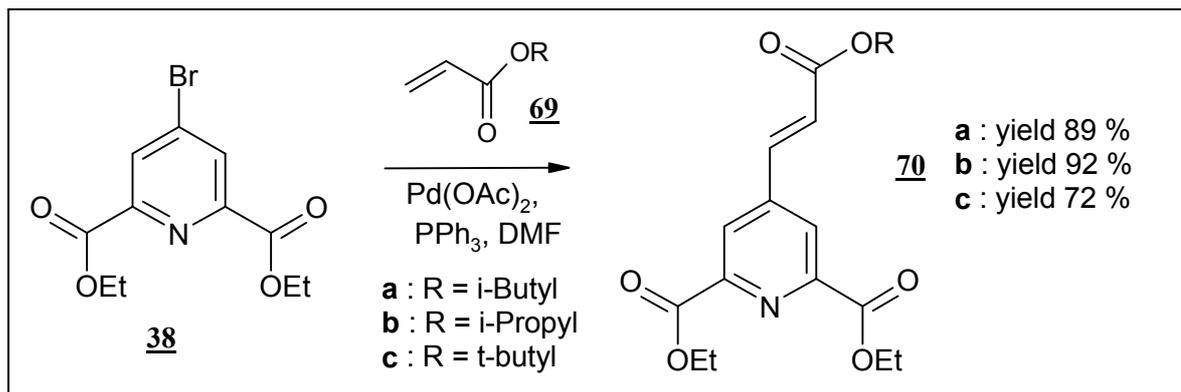
Die wesentlichen Vorzüge der Heck-Reaktion liegen darin, daß sie sowohl mit elektronenreichen (z. B. 1,3-Cyclohexadien) als auch mit elektronenarmen Olefinen (Acrylnitril) erfolgreich und mit guten Ausbeuten durchgeführt werden kann.

Ferner, wie die Reaktionen mit hochfunktionalisierten Substraten zeigen (s. o.), toleriert sie eine Vielzahl von funktionellen Gruppen und erfordert weder den Ausschluß von Wasser, noch von Sauerstoff.¹¹⁹ Eine Vielzahl von Publikationen zeigt sogar den effizienten Einsatz von Wasser bei der katalysierten Arylierung von Olefinen.¹²⁴

Obwohl sich die Heckreaktion zum Aufbau polycyclischer Verbindungen und quartärer stereogener Zentren eignet (vgl. Overmans intramolekulare Heck-Strategie in der Synthese von (-)-Morphin)¹²⁵, konnte sie sich aus Kostengründen in der industriellen Chemie bisher nur wenig durchsetzen.

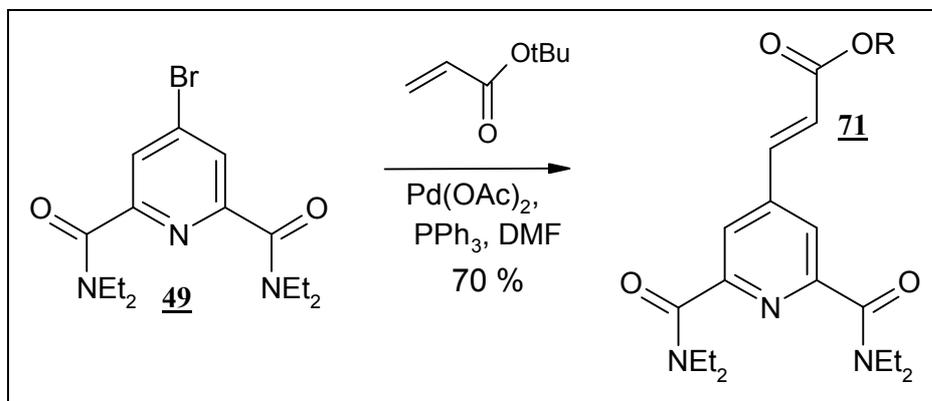
Spencers konnte zeigen, daß die Heckkupplung in DMF mit Natriumacetat als Base in hohen Ausbeuten und Turnovers zu erzielen ist.¹²⁶ Dabei werden für die Synthese der Acrylate (**70 a,b,c**) 2 mol% Palladiumdiacetat, 1.1 eq Natriumacetat als Base und 8 mol% Triphenylphosphin als Koligand in DMF eingesetzt. Die Reaktion ist nach 2 h abgeschlossen, wobei die von Spencer vorgeschlagene Zugabe von Diethylenglycoldi-n-butylether in diesem Fall zu keiner Verbesserung der Ausbeute führt.

Die Acrylate (**70 a,b,c**) sind Feststoffe und lassen sich säulenchromatographisch leicht isolieren.



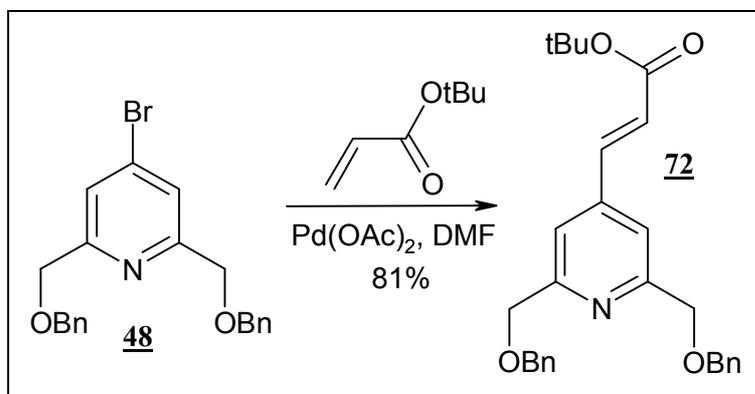
Schema 37

Die 1,6-Pyridin-bisamide (**71**) können unter den gleichen Bedingungen synthetisiert werden. Obwohl die Amidgruppe im Sinne des Pearson-Konzepts weicher und damit bessere Komplexierungseigenschaften zeigt, ist eine größere Menge des Katalysators nicht erforderlich.



Schema 38

Neben den den Palladiumkatalysator schwach komplexierenden Liganden **70** und **71** können mit geschützten Tridentaten (z. B. **48**) auch Vorläufer (**72**) synthetisiert werden, die nach der Hydrierung einen tridentaten 2,6-Diol-Liganden zugänglich machen.

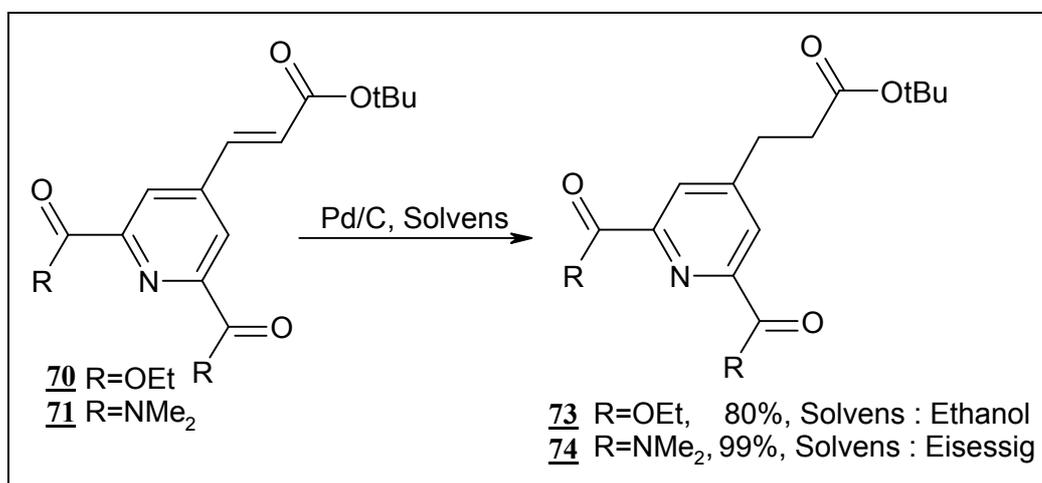


Schema 39

4.7 Hydrierung der Heckprodukte

Die Hydrierung der weißen Feststoffe **70** und **71** wird im Falle des 2,6-Pyridindiethylesters (**70**) in Ethanol und im Falle des Bisamids (**71**) in Eisessig durchgeführt. Um die Konzentration möglichst hoch zu halten, wird empfohlen den Lösungsvorgang des Feststoffes im Solvens mit Ultraschall zu unterstützen, was deutlich die Lösungsgeschwindigkeit erhöht.

Die Reaktion benötigt je nach eingesetzter Menge 24 - 48 h, was am Verbrauch des Wasserstoffs kontrollierbar ist. Die Hydrierung von **70** erfolgt deutlich schneller, da die Nucleophilie der Doppelbindung von **71** durch das stark protische Solvens herabgesetzt wird. Nach der Hydrierung wird das Lösungsmittel evaporiert, die Aktivkohle durch eine Säulenfiltration abgetrennt und die Hydrierungsprodukt (**73**, **74**) säulenchromatographisch gereinigt.

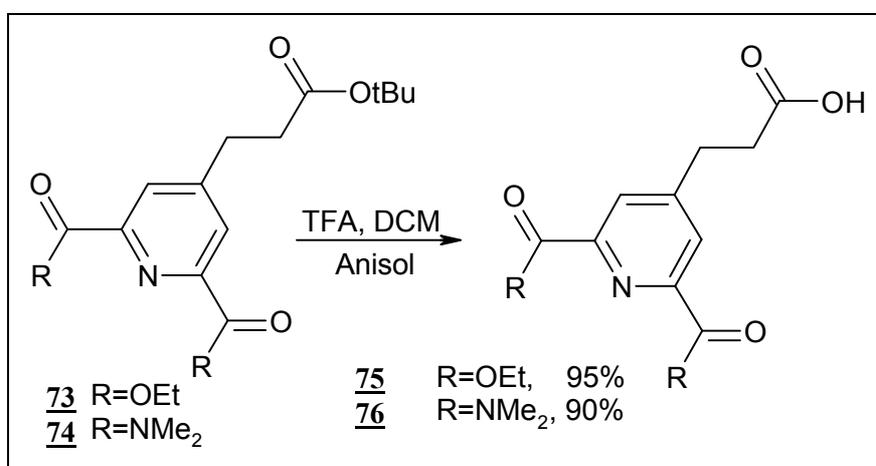


Schema 40

4.8 Freisetzung der Carbonsäure (TFA-Spaltung)

Die Acetolyse der *tert*-Butylester **73** und **74** erfolgt unter Standardbedingungen mit einem Überschuß an TFA (50 eq sind hierfür ausreichend) in Dichlormethan.¹²⁷ Die Reaktion ist nach maximal 1 h abgeschlossen und kann Dünnschichtchromatographisch anhand des Eduktabbaus (UV) und der Produktbildung (Anfärben mit Bromkresolgrün) verfolgt werden.

Wichtig ist hierbei ferner der Einsatz von Anisol, das als *Scavenger*, also als Fänger von freigesetzten alkylierenden Elektrophilen (z. B. *tert*-Butylkationen), dient. Für die Aufarbeitung besteht die besondere Aufgabe, das Produkt frei von TFA-Spuren zu bekommen, da es im weiteren Reaktionsverlauf die Peptidkupplung behindert.



Schema 41

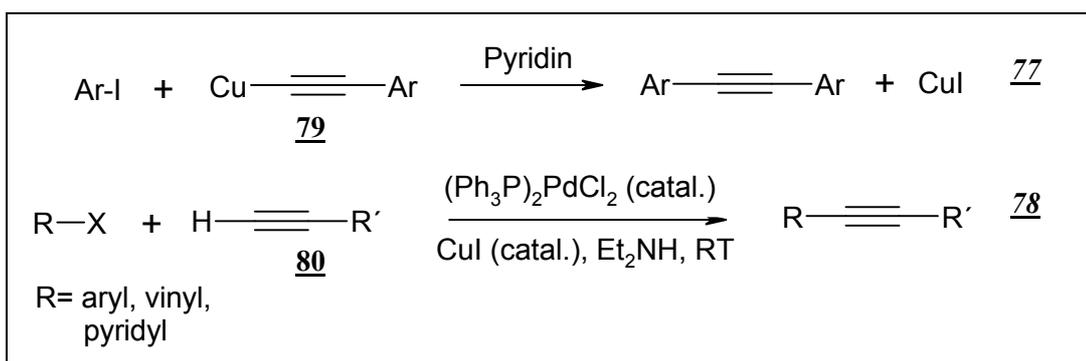
Dabei werden zunächst das Solvens und überschüssiges TFA evaporisiert, dann aus basischer Lösung das Anisol mit DCM und das Reaktionsprodukt mit Essigsäureethylester extrahiert. Das über Natriumsulfat getrocknete und eingedampfte Produkt **75** wird aus Petrolether zweimal umkristallisiert und als weißer Feststoff gewonnen. Dagegen empfiehlt sich bei **76** nach der Extraktion des Reaktionsproduktes aus Essigsäureethylester eine säulenchromatographische Reinigung über Silicagel durchzuführen, die restliche Spuren der Trifluoressigsäure entfernt.

Die Synthese der terminalen Liganden **75** und **76** ist ausgehend von Chelidamsäure **37** über vier Stufen zu erreichen und zeichnet sich durch hohe Flexibilität und gute Ausbeuten aus. Als Schlüsselverbindungen eröffnen das intermediär gebildete 4-Brom-Pyridin-2,6-dicarbonyl-dibromid (**39**) ebenso wie der 4-Brom-Pyridin-2,6-dicarbonsäure-diethylester (**38**) Zugang zu einer Vielzahl von unterschiedlichen Pyboxsystemen, deren gemeinsamer *Henkel* (Brom an der Position 4 des Pyridins) die selektive Kupplung mit Olefinen oder Alkanen ermöglicht.

4.9 Cross-Coupling und Zinkinsertion

Während die Heckreaktion ein Beispiel für symmetrische Kupplungsreaktionen darstellt, d. h. Nucleophil und Elektrophil mit gleicher Funktionalitätsnummer bilden eine C-C-Verknüpfung, bezeichnet der Oberbegriff *Cross-Coupling* unsymmetrische Kupplungsreaktionen.¹²⁸

Beispielhaft hierfür sind die Stephans-Castro-Reaktion¹²⁹ (77), die häufig als Nebenreaktion stattfindet und dann als Homokupplung bezeichnet wird, und die Sonogashira-Kupplung (78).¹³⁰

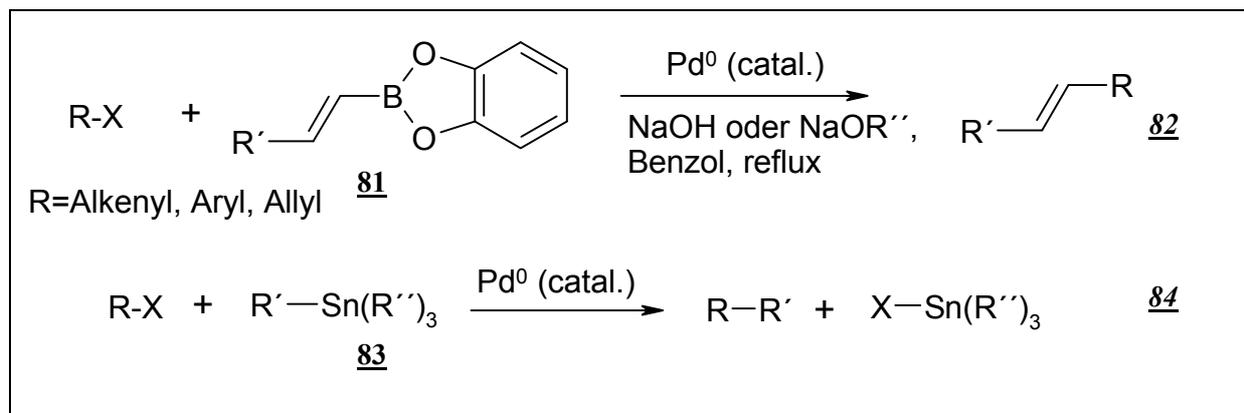


Schema 42

Die Stephans-Castro-Reaktion setzt dabei die Synthese eines Metallacetylids voraus, worin wiederum ihre Beschränkung liegt, da Übergangsmetallacetylde i.a. sehr instabil sind.¹³¹ Eine Ausnahme ist das Kupferacetylid (79), das als gelber Feststoff vorliegt und im Kühlschrank lange und stabil gelagert werden kann.

Diese Einschränkung überwand Sonogashira et. al. durch den katalytischen Einsatz von Palladium, das in einem katalytischen Prozeß unter milden Bedingungen nach der oxidativen Addition des Halogenids die nucleophile Insertion des Acetylens (80) ermöglicht.

Wichtige Beispiele, neben der Heckkupplung, für symmetrische Kupplungen sind die Suzuki¹³²- (**82**) und die Stille-Kupplung¹³³ (**84**).



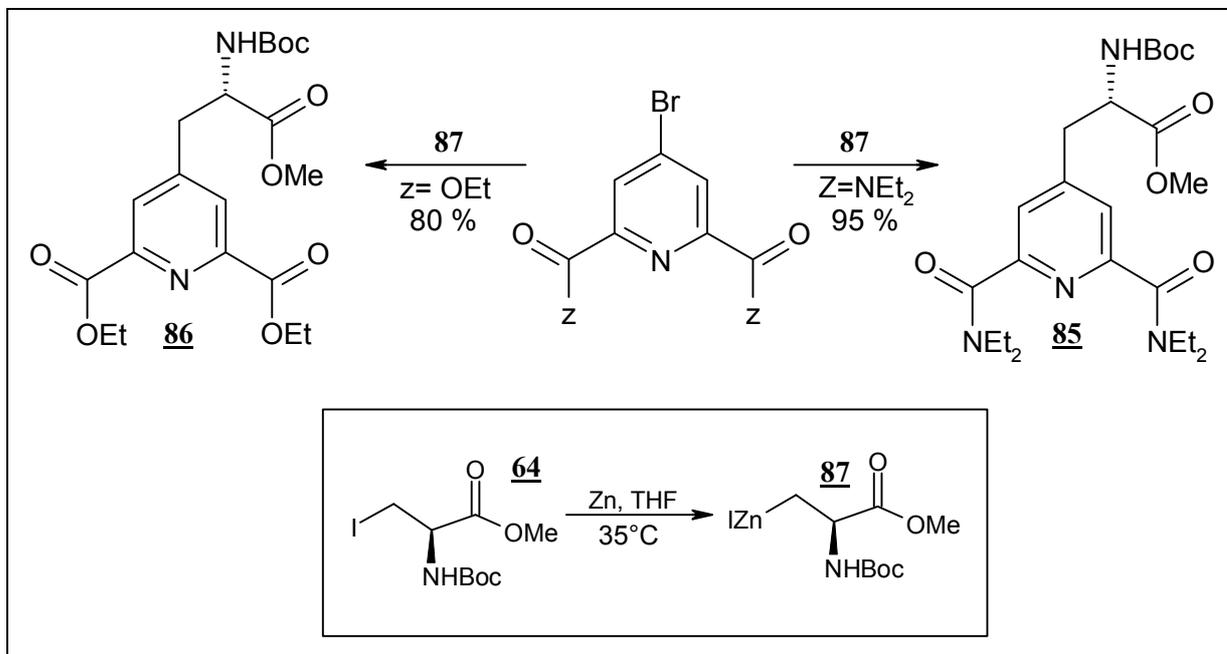
Schema 43

Die Suzuki-Kupplung hat sich als nützliche Methode in der Synthese konjugierter Diene mit hoher stereoisomerer Reinheit erwiesen. Hierbei wird ein Alkin regio­spezifisch über eine *syn*-Addition zu einem (*E*)-vinylboran (**81**) hydroboriert, das nach der oxidativen Addition des Palladiums in die Kohlenstoff-Heteroatombindung mit dem Alkenyl- oder Arylhalogenid unter Ausbildung einer neuen C-C-Verknüpfung reagiert.

Bei der Stille-Kupplung werden Vinylstannane (**83**) unter milden Bedingungen mit sehr guter Ausbeute palladiumkatalysiert unter Ausbildung einer neuen C-C-Verknüpfung umgesetzt. Funktionelle Gruppen wie Ester, Alkohole, Nitrile aber auch Aldehyde werden dabei toleriert. Interessant ist ferner die partielle Unempfindlichkeit der Vinylstannane gegenüber sterischen Effekten¹³⁴ und die Möglichkeit, Vinyltriflate (Enoltriflate) als Elektrophile bei einem Palladium katalysierten Cross-Coupling mit Organostannanen einzusetzen.^{134,135}

4.9.1 Das Jackson-Zinkreagens

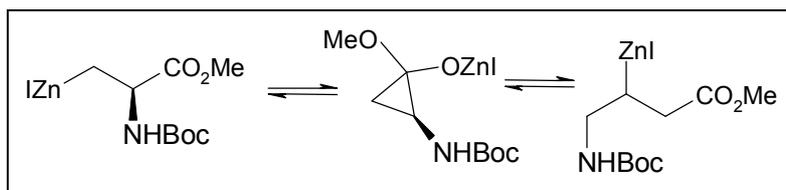
Für die Synthese der chiralen Liganden **85** und **86** wurde eine erstmals 1992 von Jackson publizierte Strategie eingesetzt¹⁰⁴, die bis heute in zahlreichen Synthesen evaluiert wurde.^{136a-m}



Schema 44

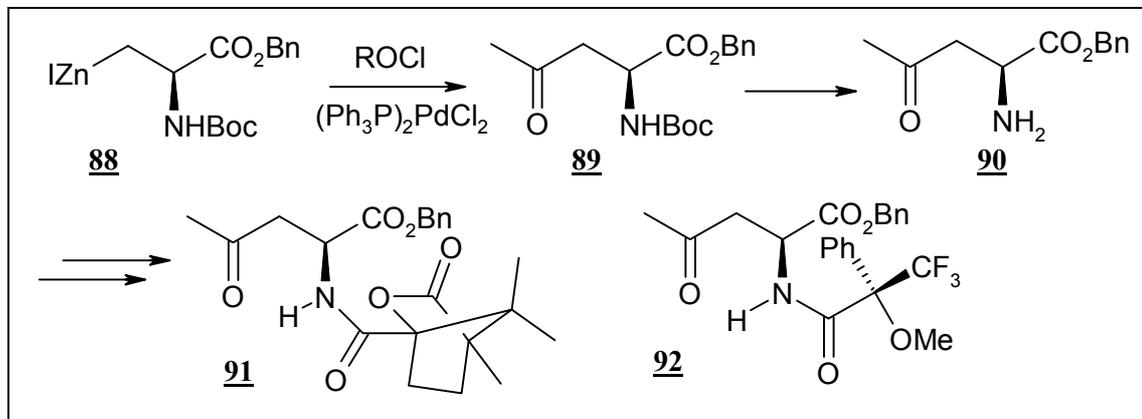
Dabei wird nach Knochels¹³⁷ Methode zur Bildung von *1,n*-Heterobimetallischen Zink-Kupfer-Organylen aus *1,n*-Diiodiden in aprotisch, unpolaren (Benzol) bis schwach polaren Lösungsmitteln (THF) das Zinkorganyl **87** aus Methyl-2(*R*)-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-3-iodopropionat (Boc-L-Ala(I)-OMe) **64** und Zinkstaub gebildet. Die Zinkinsertion α -halogener Ester ist als Reformatsky-Reaktion bekannt¹³⁸ und dient zur Umpolung des α -Kohlenstoffs. Hierbei ist eine Homokupplung aufgrund der herabgesetzten Nucleophilie des α -zinkierten Kohlenstoffs im Gegensatz zu einem Grignard-Reagenz nicht möglich. Wichtig bei der Bildung von **87** ist durch regelmäßige DC-Kontrolle den Verlauf der Reaktion und die Bildung des β -Eliminierungsproduktes zu beobachten. Da nach etwa 30 min das Eliminierungsprodukt nachweisbar ist, sollte die Reaktionszeit nicht länger als 2.5 h betragen.

Ein weiteres Problem wäre die Isomerisierung des Boc-L-Ala(I)-OMe **64**. Dies kann als intermolekulare Terminierung durch das acidifizierte α - bzw. Carbamat-Proton oder durch die prinzipiell mögliche reversible Cyclopropanolatbildung erfolgen (Schema 45).



Schema 45

Nakamura konnten zeigen, daß die Cyclopropanolatbildung nicht erfolgt und somit die konfigurale Stabilität des Boc-*L*-Ala(I)-OMe **64** bei der Zinkinsertion gewährleistet ist.¹³⁹ Jackson wiederum setzte die Zinkorganyl (**88**) mit Säurechloriden um, und aus den so gebildeten 4-Oxo-aminosäureestern (**89**) synthetisierte er nach Freilegung der Aminofunktion (**90**) Camphan- (**91**) und Mosher-Amide (**92**).¹⁰⁴



Schema 46

¹H-NMR- und für das Moshersäureamid ¹⁹F-NMR-*shift* Messungen ergaben keinerlei Kontamination durch Epimere, so daß die Enantiomerenreinheit sowohl für die Zinkinsertion als auch nach der Cross-Coupling-Reaktion als gesichert gilt.

Kennzeichnend für die oben erwähnte Evaluation dieser Cross-Coupling-Reaktion ist, daß abhängig von dem eingesetzten Kupplungspartner des Zinkorganyls **87** ein individuelles Reaktionsfenster gefunden werden muß, das Lösungsmittel, Reaktionstemperatur, -zeit und Katalysator umfaßt. So stellte Jung bei der Totalsynthese des Isodityrosins^{136,1} fest, daß für die Kupplung des Jackson-Reagenzes mit einem 1-Iod-4-benzoxy-3-phenylether der Zusatz von Dimethylacetamid (DMAC) notwendig ist, um eine erfolgreiche Kupplung durchzuführen. Dabei setzt er ein 1:1 Gemisch THF/DMAC als Lösungsmittel und Pd₂(dba)₃ als Katalysator ein (64 % Ausbeute). Eine solche Abhängigkeit konnte für **85** und **86** nicht gefunden werden.

Für die Zinkinsertion und die Kupplung wird in den frühen Arbeiten von Jackson, aber auch in neueren Arbeiten^{136,1} anderer Autoren, der Einsatz von Ultraschall vorgeschlagen. Die Ultraschallaktivierung gilt als etablierte Methode zur Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit für eine Vielzahl an Reaktionen.¹⁴⁰

Diese Methode kann für die Synthese von **85** und **86** nicht empfohlen werden, da sich für die Zinkinsertion gezeigt hat, daß thermische Aktivierung schnellere und reproduzierbarere Ergebnisse liefert. Gerade die Reaktionsgeschwindigkeit ist, wie oben beschrieben, für die Zinkinsertion ein entscheidendes Kriterium.

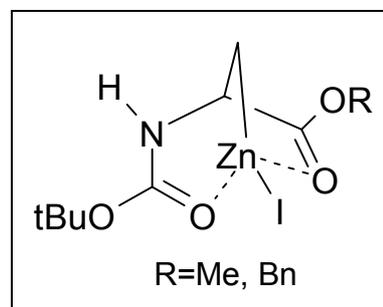
Die Ultraschallaktivierung während des Cross-Couplings kann für **85** und **86** überhaupt nicht empfohlen werden, da die hierbei freigesetzte Energie sehr schnell zum β -Eliminierungsprodukt führen.

Wichtig ist, daß Zinkinsertion und Cross-Coupling separat, d. h. nicht *in situ* und mit völligem Sauerstoffausschluß^{136, i} erfolgen. Für die Zinkinsertion empfiehlt sich Zinkfitter statt Zinkstaub, da jene entscheidende Vorteile bringen:

- Zinkfitter sind wie Zinkstaub aktivierbar (s. u.) und damit nicht weniger reaktiv.
- Nach der Zinkinsertion ist das Zinkorganyl leicht von nicht umgesetztem Zinkmetall abzutrennen.
- Erfolgt die Abtrennung des Zinkorganyls durch eine Spritze, kann im Gegensatz zu Zinkstaub kein Zinkmetall in die Spritze gelangen. Dieses deaktiviert den Palladiumkatalysator in der anschließenden Cross-Coupling-Reaktion merklich, so daß mehr Katalysator hinzugefügt werden muß oder die Reaktion nicht stattfinden kann.

Als nachteilig kann eine erniedrigte Reaktionsgeschwindigkeit angeführt werden, da die Oberfläche der Zinkfitter geringer ist. Diese konnte aber nach entsprechender Aktivierung des Metalls nicht festgestellt werden, da die Zinkinsertionszeit auch bei Zinkfittern den Literaturwerten entspricht.

Um die Lösungsmittelabhängigkeit der Kupplungskomponente bei einer Cross-Coupling-Reaktion mit dem Zinkorganyl (**88**) zu erklären, führte Jackson ¹H-NMR-Studien über die Zinkinsertion und die Cross-Coupling Reaktion mit dem wenig polaren THF und dem polaren DMF durch.^{136, m} Die ¹H-NMR-Daten der Experimente in THF weisen auf einen internen Komplex hin, wobei das Zink durch die Carbonylgruppen chelatisiert wird (Schema 47). Dieser Komplex erklärt ferner die konfigurale Stabilität des Zinkorganyls.



Schema 47

Die ¹H-NMR-Daten der Experimente in DMF weisen ebenfalls auf einen internen Komplex hin, doch koordiniert nur die Estergruppe, es liegt also kein Chelat vor. Die Koordination der Carbamat-Carbonylgruppe mit Zink wird durch das DMF unterdrückt. Die Cross-Coupling-Experimente in beiden Lösungsmitteln führten zu folgendem Ergebnis: Phenyljodid und monosubstituierte Aryljodide geben höhere Ausbeuten in DMF. Die Ausbeute in THF kann durch Erhöhung der Reaktionstemperatur verbessert werden. *Ortho*-substituierte Aryljodide zeigen in DMF signifikant bessere Ausbeuten in der Reaktion mit dem Zinkorganyl als in THF. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Jungs oben angeführten Erfahrungen über die 1-Iod-4-benzyloxy-3-phenylether.

Eine vergleichende Studie mit den sterisch anspruchsvolleren 2,4,6-substituierten Pyridinen, die in THF sehr gute Kupplungsergebnisse erzielen, kann ein interessantes Projekt darstellen.

4.9.2 Zinkaktivierung

Speziell für den Einsatz von Zinkflittern ist eine Voraktivierung empfehlenswert, um die Zinkinsertion zu beschleunigen. Durch Oxidation bildet sich eine passivierende Schicht an der Oberfläche, die möglichst zu entfernen ist. Bewährt hat sich dreitägiges Erhitzen des Metalls auf 250°C in einem Röhrenofen. Das Gefäß wird darauf mit Argon gespült und das Zink stets unter Argon gelagert.

Vor der Zinkinsertion wird das Zink nach der Knochel-Methode,¹⁴¹ ähnlich dem Einsatz von Sublimat oder Iod bei der Grignard-Reaktion, mit 1,2-Dibromethan und Chlortrimethylsilan voraktiviert, 30 min in THF gerührt und dann erst das Boc-*L*-Ala(I)-OMe **64** hinzugegeben. Es hat sich bei **86** gezeigt, daß hier der Einsatz von Chlortrimethylsilan die Ausbeute merklich herabsetzt.

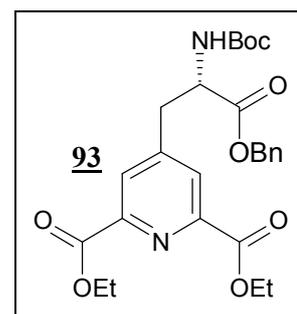
Andere Autoren^{136, k} empfehlen den Einsatz von Rieke™-Zink, eine hochaktivierte Form, die durch Reduktion mit Natrium gewonnen wird. Es ist käuflich¹⁴² und kann beinahe stöchiometrisch eingesetzt werden

(~ 1.0-1.5 eq). Dennoch zeigen die damit erzielten Ausbeuten keine entscheidende Verbesserung und es besteht bei der Eigensynthese die Gefahr, daß bei zu klein gewähltem Ansatz das Natrium nicht quantitativ umgesetzt wird, so daß Natriumrückstände im Zink verbleiben. Diese vergiften den Palladiumkatalysator sofort.

4.10 Verseifung der chiralen Liganden

Um das Syntheseziel zu erreichen, müssen die chiralen Liganden **85** und **86** verseift werden, um die Carboxygruppe freizulegen. Dabei zeigte sich, daß eine selektive Verseifung des orthogonal geschützten Triesters **86** mit Standardmethoden (NaOH/Dioxan/Wasser, LiI/Pyridin¹⁴³, NaI/TMSCl¹⁴⁴, 0.05 M NaOH¹⁴⁵) nicht zu erzielen ist.

Daher sollte mit dem Benzyl-2(*R*)-[(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-3-iodopropionat (Boc-*L*-Ala(I)-OBn) **64** der chirale Ligand **93** synthetisiert werden, dessen Benzylgruppe sich hydrogenolytisch abspalten läßt. Diese Reaktion schlug fehl, da nur die Edukte und Didehydroalaninbenzylester zurückgewonnen werden konnte. Autoren, die mit Arylhalogeniden arbeiten, beschreiben keine Probleme mit der Kupplung des (Boc-*L*-Ala(I)-OBn) **64**.



Schema 48

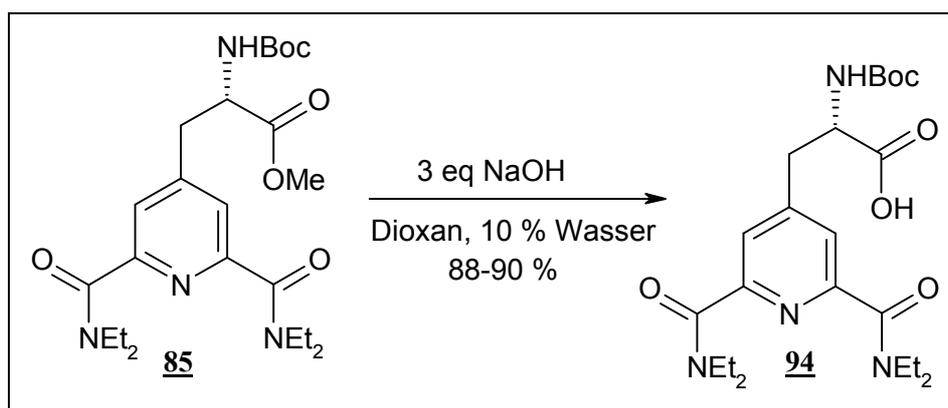
Walker dagegen, der 2-, 3- und 4-Brompyridin mit (Boc-L-Ala(I)-OBn) umsetzt, erhält entsprechende Ergebnisse.^{136, k}

Er postuliert eine Zink-Chelatkontrolle durch die Carbonylgruppe des Iodoalaninbenzyl- bzw. -methyl-esters, die zu einer Herabsetzung der Reaktionsgeschwindigkeit bei der Umsetzung des Zinkorganyls des Iodoalaninbenzylesters mit dem Elektrophil führt. Daher werde ausschließlich Didehydroalaninbenzylester gebildet.

Jacksons ¹H-NMR-Studien zeigen aber eine analoge Chelatisierung des Zinks für den Iodoalaninbenzyl- und den Iodoalaninmethylester

Schema 47), so daß Chelatkontrolle allein durch den Iodoalaninester nicht maßgebend sein kann. Es ist daher zu untersuchen, in wieweit das Pyridin, das wie DMF ein guter Kolligand ist, Einfluß auf die Chelatisierung des Zinks nimmt und welchen Einfluß dem Benzylester dabei zukommt.

Die Verseifung von **85** erfolgt mit 88 - 90 %iger Ausbeute in einer 1 M Lösung Dioxan und 10 % Wasser mit 3 eq Natriumhydroxid (Schema 49).



Schema 49

Nach der Hydrolyse wird das Rohprodukt **94** Amberlyst-Harz (*strongly acid*) hinzugegeben und für etwa 10 s neutralisiert. Das Amberlyst-Harz wird abfiltriert und das Filtrat mit Essigester extrahiert. Auf diese Weise kann das Produkt sehr einfach und sehr rein gewonnen werden.

5 Experimente zur Charakterisierung der Liganden

Um die Qualität der Liganden, d.h. ihre Affinität gegenüber Lanthaniden, die Bindungsstärke zum Metall und die Fluoreszenz des Metall-Ligand-Komplexes festzustellen, wurden spektroskopische Untersuchungen und Messungen zur Bestimmung der Komplexkonstanten mit Lanthanidtriflaten durchgeführt.

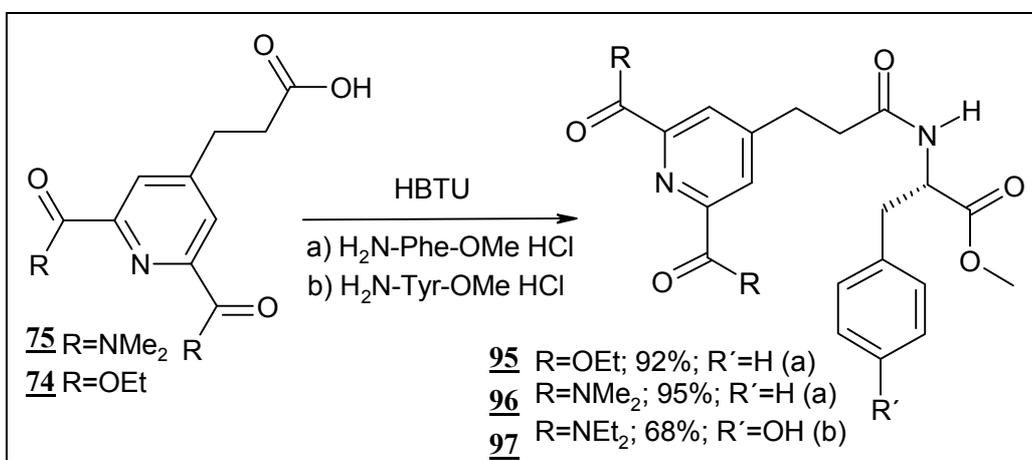
5.1 $^1\text{H-NMR}$ -Experimente: Bestimmung der *complexation site*

Es ist bei polyfunktionellen Verbindungen wichtig festzustellen, wo der Ort der Komplexierung stattfindet, d.h. die *complexation side* bestimmen. So können kleine und dadurch sterisch weniger fixierte Moleküle mit funktionellen π -Donor Gruppen (z. B. Amino-, Hydroxygruppen) diese dem Metall intramolekular oder intermolekular als Liganden zur Verfügung stellen und sich damit an dem Pyridinchelate-Komplex beteiligen oder im Extremfall das Metall aus dem Pyridinchelate-Komplex extrahieren. Der Pyridinligand wäre dann bezüglich des Metalls ein schlechter Chelator und für die Anwendung ungeeignet.

Der Ort der Komplexierung (*complexation site*) läßt sich durch sogenannte $^1\text{H-NMR-shift}$ -Experimente bestimmen. Hierbei wird ein Molekül $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopisch untersucht und dabei die Protonenverschiebung auf der Zeit- bzw. nach der Fourier-Transformation auf der Orts-Skala (ppm-Skala) vermessen. Wird ein Metallsalz (i.a. EuFOD_3) hinzugegeben, so findet eine Verschiebung der Protonen in Abhängigkeit vom Ort der Metallkomplexierung statt, d.h. je näher sich das Proton an dem Metall befindet, desto stärker wird es auf der ppm-Skala verschoben.

Ursächlich dafür ist eine verminderte Abschirmung des Protons durch das paramagnetische Lanthanid-Ion. Durch die Komplexbindungs- bzw. Kontaktwechselwirkung wird im Komplex Spindichte des ungepaarten Elektrons auf den Liganden übertragen.

Für diese Experimente wurden drei Pseudopeptide (**95**, **96**, **97**) mit HBTU in Acetonitril synthetisiert

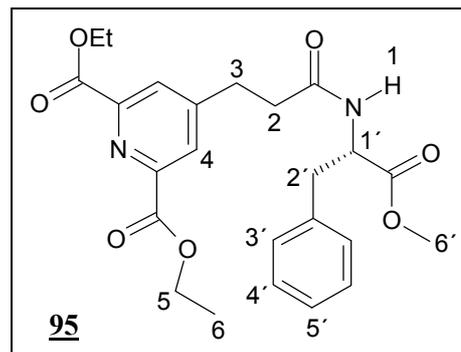


Schema 50

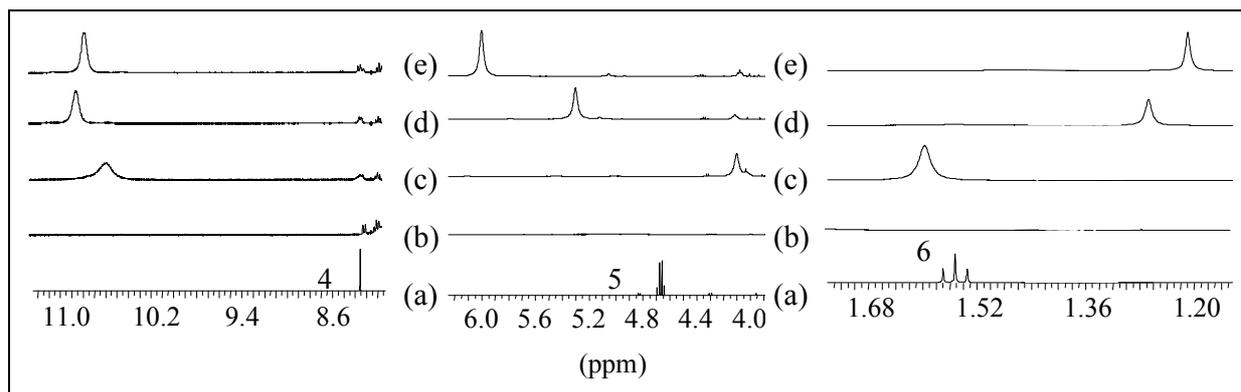
(Schema 50). Aus den drei Pseudopeptiden (**95**, **96**, **97**) und der Vergleichssubstanz **71** wurden jeweils vier Proben erstellt, wobei die erste als Referenz 0 eq, die zweite 0.1 eq, die dritte 1 eq und die letzte 2 eq Europiumnitrat enthielt. Die Proben wurden in deuteriertem Acetonitril gelöst (35-45 μmol Ligand) und das $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ vorher dreimal in Deuterium gelöst und eingeengt, um das Kristallwasser auszutauschen.

Ergebnisse für **95**

Schema 51 zeigt Ausschnitte aus den ^1H -NMR-Spektren des Pseudopeptids **95**. Dargestellt sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nur der Signal-shift der Pyridinprotonen (4), der Ethylen- (5) und der der Estergruppen. Die Spektren sind übereinander mit steigender Konzentration des Europiumsalzes angeordnet.



Die Spektren zeigen mit steigender Europiumkonzentration eine zunehmende Verbreiterung der Signale. Die Pyridin- (4) und die Ethylenprotonen (5) werden weniger abgeschirmt und damit in Richtung höherer ppm-Werte verschoben, während die Methylprotonen (6) in Richtung niedriger ppm-Werte shiften. Dabei deutet sich bei den Pyridinprotonen (4) das Erreichen eines Maximums an. Da sich die übrigen Signale bis 1.6 eq kaum verändern (vgl. Tabelle 1) wird das Europium in diesem Bereich bevorzugt durch das Pybox-System chelatisiert. Ab 2.3 eq wird das Amid-Proton deutlich Tieffeld verschoben, da keine freien Liganden mehr für die Chelatisierung zur Verfügung stehen.

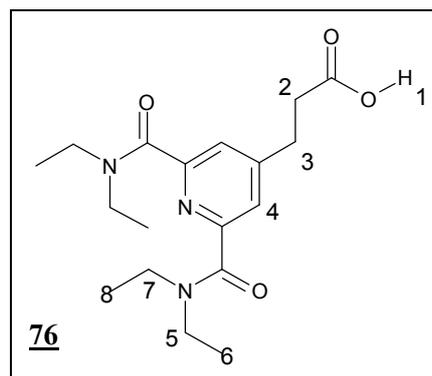


Schema 51

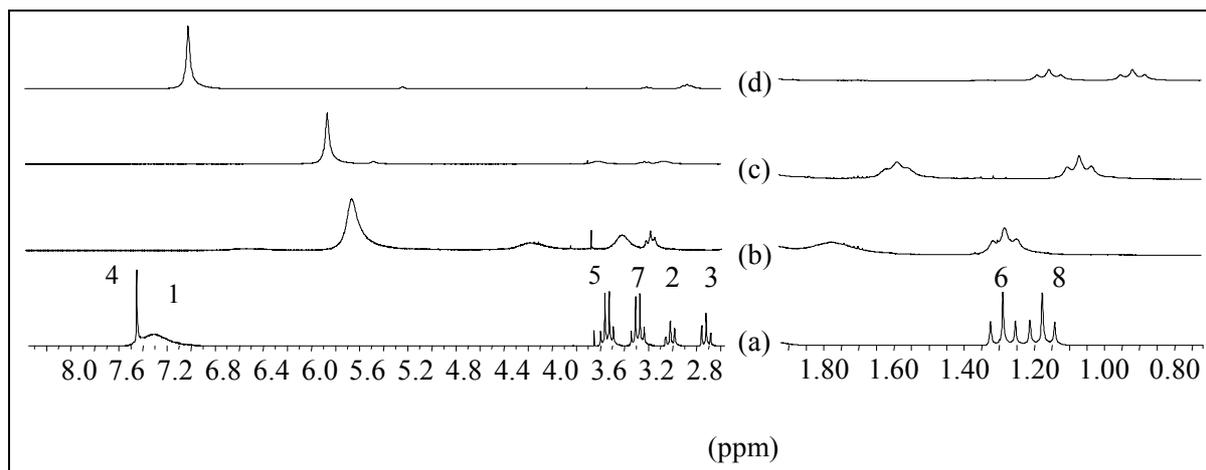
Alle Proben in MeCN-D_3 , 200 MHz (a) **95**, (b) + 0.12 eq $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$, (c) + 1.2 eq $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$, (d) + 1.6 eq $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$, (e) + 2.3 eq $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$.

Ergebnisse für **76**

Schema 52 zeigt das vollständige Spektrum des Liganden **76**; ausgeschnitten wurde lediglich der Bereich des Lösemittelsignals. Auffällig ist hier, daß die Pyridinprotonen (4) im Gegensatz zum Experiment mit **95** nicht mehr sichtbar sind. Die größte Verschiebung erfahren die Ethylen- (5) und Methylprotonen (6) der Amidgruppen des Pyridins, die Protonen (2) und (3) *shiften* kaum. Wie zu erwarten war, wird das Säureproton durch das Metall verdrängt, weshalb es in den Spektren (b) - (d) nicht mehr sichtbar ist.



Die Spektren zeigen, daß auch dieser Ligand das Europium chelatisiert.

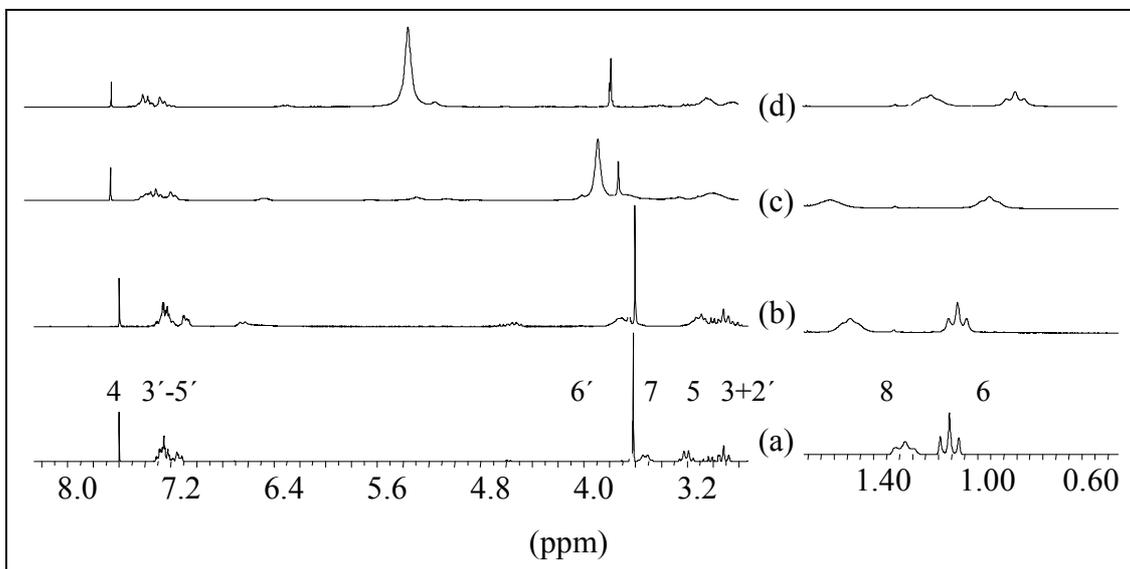
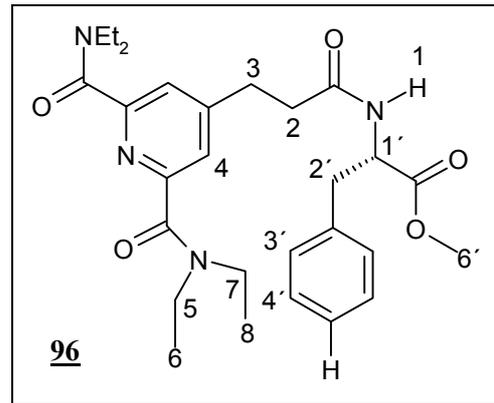


Schema 52

Alle Proben in MeCN-D₃, 200 MHz (a) **76**, (b) + 0.12 eq Eu(NO₃)₃, (c) + 1.2 eq Eu(NO₃)₃, (d) + 2.3 eq Eu(NO₃)₃.

Ergebnisse für **96**

Auch an diesem Beispiel zeigt sich die Chelatisierung durch das Pybox-System. Die Ethylenprotonen (5, 7) werden Tieffeld verschoben, die Methylprotonen (6, 8) wandern in Richtung kleinerer ppm-Werte. Die Pyridinprotonen (4) verschieben sich dagegen nicht.

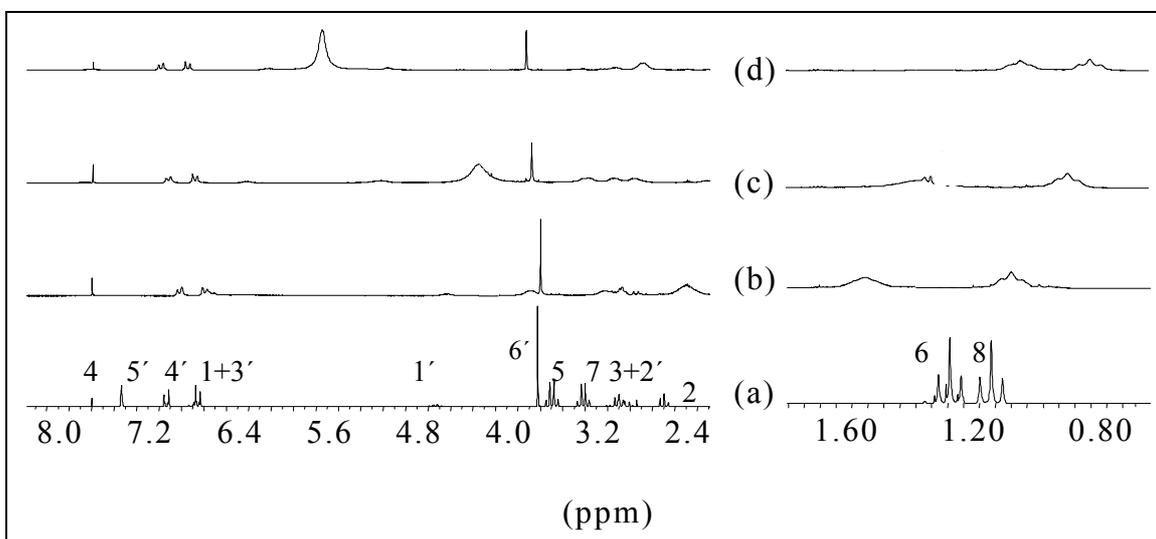
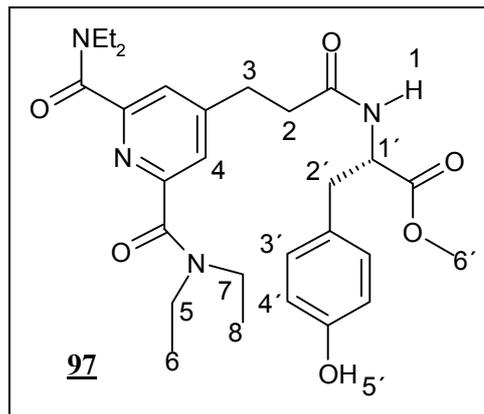


Schema 53

Alle Proben in MeCN-D₃, 200 MHz (a) **96** (b) + 0.12 eq Eu(NO₃)₃, (c) + 1.2 eq Eu(NO₃)₃, (d) + 2.3 eq Eu(NO₃)₃.

Ergebnisse für **97**

Die Ergebnisse der $^1\text{H-NMR}$ -*shift*-Experimente entsprechen den Ergebnissen von **96**. Die Ethylenprotonen (5, 7) werden deutlich Tieffeld verschoben, während die Methylgruppen (6, 8) in Richtung Hochfeld wandern. Die Signale der Protonen des 4-Hydroxy-L-Phenylalaninmethylesterrestes werden deutlich unschärfer, doch kaum verschoben. Ebenso die Pyridinprotonen (4), die im Gegensatz zum Experiment mit **76** sichtbar bleiben.



Schema 54

Alle Proben in MeCN-D_3 , 200 MHz (a) **97**, (b) + 0.1 eq $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$, (c) + 1.1 eq $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$, (d) + 2.2 eq $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$.

5.1.1 Tabellarische Ausführung der $^1\text{H-NMR-shift}$ -Experimente

Negative Werte beschreiben eine Hochfeldverschiebung, positive Werte eine Tieffeldverschiebung der Protonen. *ns* bedeutet, daß die entsprechenden Protonen im $^1\text{H-NMR-shift}$ -Spektrum nicht sichtbar sind.

	(0.12 eq Eu)	(1.2 eq Eu)	(1.6 eq Eu)	(2.3 eq Eu)
<i>H</i> (1)	-0.13	-0.80	-1.14	-1.24
<i>H</i> (2)	0	0	0	0
<i>H</i> (3), <i>H</i> (2')	0	0	0	0
<i>H</i> (4)	0	1.70	1.93	1.85
<i>H</i> (5)	0	0.25	0.54	1.20
<i>H</i> (6)	0	0.1	-0.35	0.45
<i>H</i> (1')	0	0.18	0.52	1.17
<i>H</i> (3')- <i>H</i> (5')	-0.15	-0.20	-0.25	-0.30
<i>H</i> (6')	0	0	0	0

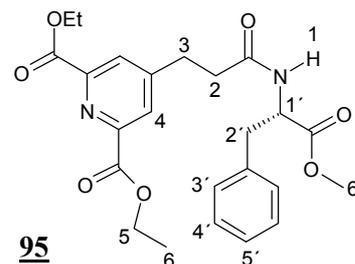


Tabelle 1

	(0.12 eq Eu)	(1.2 eq Eu)	(2.3 eq Eu)
<i>H</i> (1)	ns	ns	ns
<i>H</i> (2)	0.40	0.50	0.10
<i>H</i> (3)	0.35	0.25	0
<i>H</i> (4)	ns	ns	ns
<i>H</i> (5)	0.50	0.25	0
<i>H</i> (6)	0.10	-0.10	-0.20
<i>H</i> (7)	2.05	2.20	3.20
<i>H</i> (8)	0.90	2.10	2.05

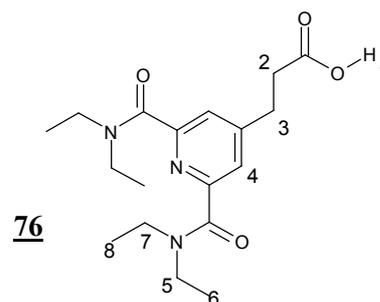


Tabelle 2

	(0.01 eq Eu)	(1.1 eq Eu)	(2.1 eq Eu)
<i>H</i> (1)	0	-0.30	-0.40
<i>H</i> (2)	0	-0.40	-0.40
<i>H</i> (3), <i>H</i> (2')	0	0	0
<i>H</i> (4)	0	0	0
<i>H</i> (5)	0.20	0.30	2.00
<i>H</i> (6)	0.20	0.30	0.15
<i>H</i> (7)	0	-0.10	-0.10
<i>H</i> (8)	0	-0.10	-0.20
<i>H</i> (1')	0	0.50	0.50
<i>H</i> (3')- <i>H</i> (5')	0	0	0
<i>H</i> (6')	0	0.1	0.1

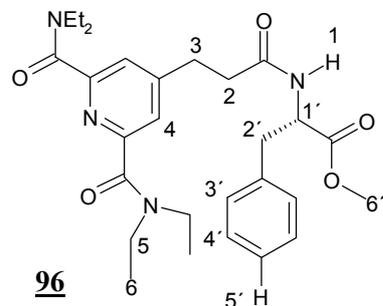


Tabelle 3

	(0.2 eq Eu)	(1.1 eq Eu)	(2.2 eq Eu)
<i>H</i> (1)	-0.20	-0.55	-0.60
<i>H</i> (2)	-0.20	-0.30	-0.70
<i>H</i> (3)	0	0	0
<i>H</i> (4)	0	0	0
<i>H</i> (5)	0.20	0.75	2.00
<i>H</i> (6)	0.25	0.10	-0.30
<i>H</i> (1')	0.10	0.50	0.50
<i>H</i> (2')	0	0	0
<i>H</i> (3')	-0.50	0	0
<i>H</i> (4')	-0.50	0	0
<i>H</i> (5')	ns	ns	ns
<i>H</i> (6')	-0.10	0	0

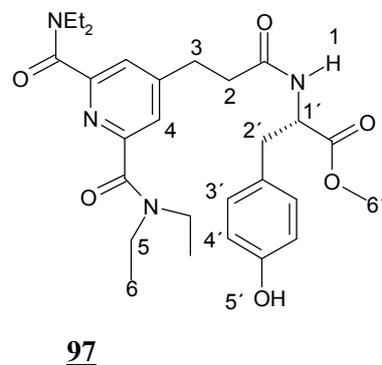
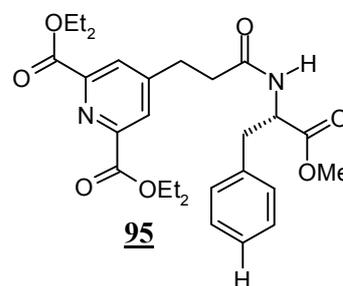
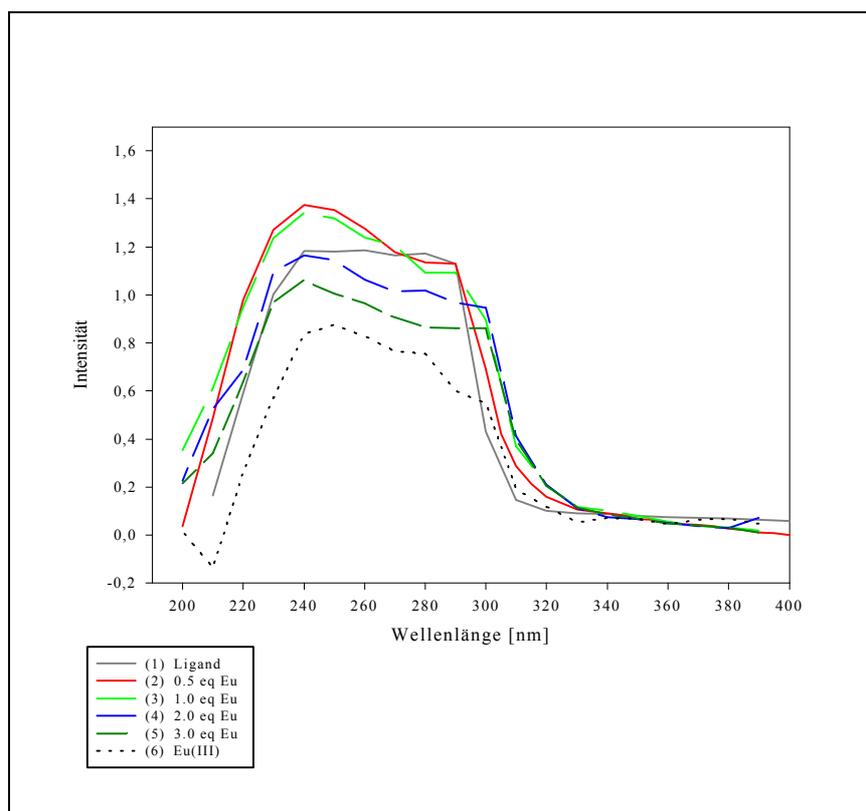


Tabelle 4

5.2 UV-Absorptionsspektren

Um den UV-Absorptionsbereich der Liganden zu bestimmen, wurden UV-spektrometrische Untersuchungen mit den Liganden **95** und **71** durchgeführt. Aus technischen Gründen konnten die übrigen Liganden nicht vermessen werden. Es wurden jeweils sechs 0.01 M Lösungen in Acetonitril angesetzt mit a) dem Liganden, b) $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, c) Ligand mit 0.5eq $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, d) Ligand mit 1eq $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, e) Ligand mit 2eq $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ und f) Ligand mit 3eq $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$.

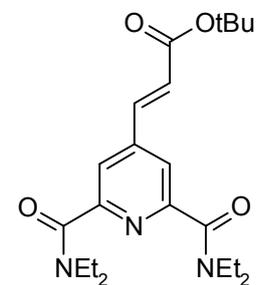
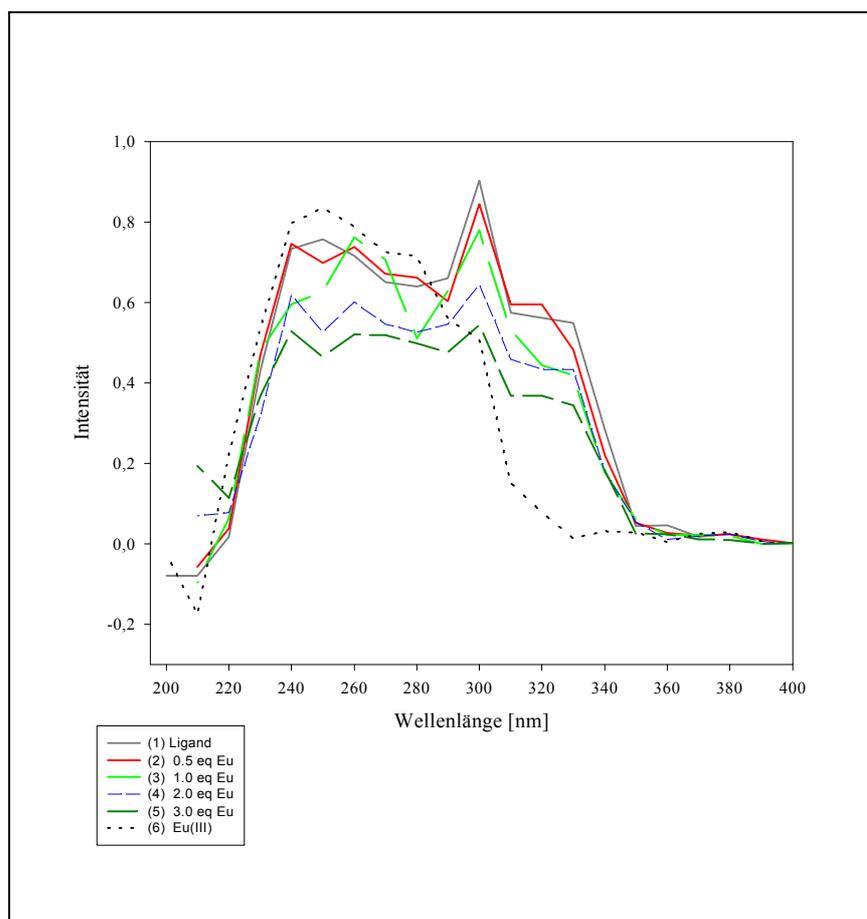
UV-Spektren von **95**



Schema 55

Das Absorptionsspektrum von **95** (Schema 55) zeigt im Bereich von 220 - 260 nm eine Zunahme der Extinktion, die auf eine Komplexierung des Europiums durch den Liganden zurückzuführen ist. Ab zwei Äquivalenten Europium ändert sich die Stöchiometrie des Komplexes und es ist eine signifikante Änderung der UV-Absorption mit einem Absorptionsmaximum bei 240 nm erkennbar.

UV-Spektren von **71**



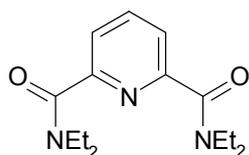
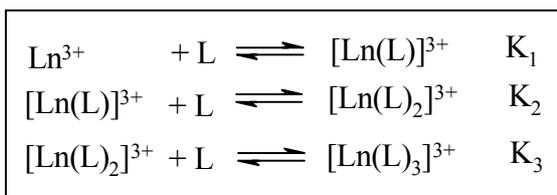
71

Schema 56

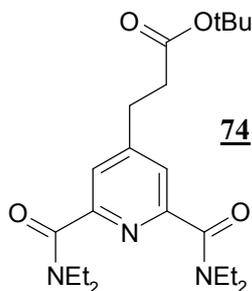
Die Europiumkomplexe absorbieren im charakteristischen Bereich des freien Liganden und die Intensität nimmt kontinuierlich ab. Der Ligand **71** ist damit im Vergleich zu **95** der bessere Ligand für Eu(III).

5.3 Messung der Bindungskonstanten

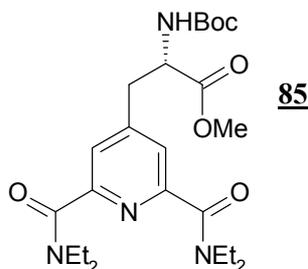
In einer Kooperation mit Prof. Dr. C. Piguet, Institut für Anorganische, Analytische und Angewandte Chemie der Universität Genf, wurden die Bindungskonstanten der Liganden **74**, **85** und **98** gegenüber den Lanthaniden La, Eu und Lu mit der spektroskopischen Titrationsmethode gemessen. Hierbei werden parallel zur Titration UV-Spektren aufgenommen, wobei die Änderung des Absorptionsbereiches die Bildung einer neuen Komplexspezies anzeigt. Die Messungen wurden bei 298 K mit einem inerten Elektrolyten (Et_4NClO_4) in einer 0.1 M Acetonitrillösung durchgeführt.



Metall	Gegenanion	log K_1	log K_2	log K_3
La(III)	CF_3SO_3^-	7.4	7.4	6.2
Eu(III)	CF_3SO_3^-	8.3	7.0	7.0
Lu(III)	CF_3SO_3^-	8.1	7.1	7.7



Metall	Gegenanion	log K_1	log K_2	log K_3
La(III)	CF_3SO_3^-	7.4	6.0	5.0
Eu(III)	CF_3SO_3^-	8.2	6.3	5.3
Lu(III)	CF_3SO_3^-	8.7	6.6	5.0



Metall	Gegenanion	log K_1	log K_2	log K_3
La(III)	CF_3SO_3^-	7.4	6.5	5.1
Eu(III)	CF_3SO_3^-	8.2	6.4	5.1
Lu(III)	CF_3SO_3^-	8.7	6.5	5.3

Fazit

Die ^1H -NMR-*shift*-Experimente und die UV-spektroskopischen Untersuchungen zeigen, daß die in dieser Arbeit vorgestellten Pyridin-bis-2,6-(diethyl)-amide mit Europium gute Komplexbildner sind. Die Absorptionsspektren zeigen das typische Absorptionsintervall der fluoreszierenden Lanthanid-Pybox-Chelate. Der Ligand **85** wird von Piguet und Bünzli im Rahmen des Projektes „Helikale Lanthanidkomplexe“ untersucht.¹⁴⁶

Ausblick

Das vorgestellte Synthesekonzept erlaubt die Darstellung einer Vielzahl an symmetrischen und unsymmetrischen Pybox-Systemen, die terminal oder intern mit z. B. Peptiden oder Proteinen verknüpft werden können. Eine neue Applikation stellt die heterogene Katalyse dar, wobei die Liganden an die Festphase gebunden werden und nach der Reaktion durch Filtration leicht abtrennbar sind.

6 Experimenteller Teil

Allgemeine Bemerkungen

¹H-NMR-Spektren wurden mit den Spektrometern WP 80, WP 200 SY und AM 400 der Firma Bruker erstellt. Als interner Standard diente bei den Messungen Tetramethylsilan, das Lösungsmittel wird jeweils angegeben. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm, Kopplungskonstanten J in Hertz angegeben. Für Signalmultiplizitäten werden folgende Abkürzungen verwendet : s = Singulett, d = Doublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, b = breites Signal und Kombinationen der Bezeichnungen.

Zur besseren Zuordnung der Signale folgt die Bezifferung der Moleküle nicht immer der IUPAC-Nomenklatur.

¹³C-NMR-Spektren wurden mit dem Spektrometer WP 200 SY (50.3 MHz) und AM 400 (100 MHz) der Firma Bruker im APT-Meßverfahren gemessen. Das jeweilige Lösungsmittel wird angegeben. Als interner Standard diente Trimethylsilan. Die Singulettmultiplizitäten werden mit "+" für Doublett oder Quartett oder "-" für Singulett oder Triplett beschrieben (APT-Spektrum, im Falle des WP 200 SY).

Zur besseren Zuordnung der Signale folgt die Bezifferung der Moleküle auch hier nicht immer der IUPAC-Nomenklatur.

Infrarot-Spektren wurden mit dem FT-IR-Spektrometer 1710 der Firma Perkin-Elmer gemessen. Die Aufnahmetechnik wird jeweils benannt, die Wellenzahlen charakteristischer Banden werden in cm⁻¹ angegeben. Es gelten folgende Abkürzungen : s = stark, m = mittel, w = schwach, b = breit.

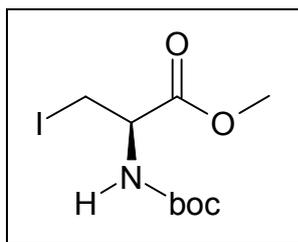
Massenspektren wurden mit dem Spektrometer MAT 312 der Firma Finnigan mit einem Ionisierungspotential von 70 eV aufgenommen. Neben den Meßtemperaturen werden die Massenpeaks mit der jeweils auf den Basispeak bezogenen Intensität angegeben.

Schmelzpunkte sind mittels einer Büchi-Apparatur bestimmt worden und nicht korrigiert.

Präparative Säulenchromatographie wurde mit Kieselgel der Firma Baker (0.04 - 0.06 mm Korndurchmesser) und Aluminiumoxid für die Chromatographie der Firma Fluka (5016 blank A blank basisch) unter leichtem Überdruck durchgeführt.

Analytische Dünnschichtchromatographie wurde mit Fertigfolien 60F-254 der Firma Merck (Schichtdicke 0.25 mm) durchgeführt. Die Indikation erfolgte mit UV-Licht, Kaliumpermanganat-, Vanillin-, Cer- und Ninhydrin-Tauchreagentien.

Lösungsmittel wurden destilliert und gegebenenfalls absolutiert.

Methyl-2(R)-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]-3-iodopropionat (Boc-L-Ala(I)-OMe)

2.3 g (10.5 mmol) Methyl-2(R)-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]-3-hydroxypropionat (Boc-L-Ser-OMe), 3.60 g (13.7 mmol) Triphenylphosphin und 0.97g (14.1 mmol) Imidazol werden bei 0°C in 10.3 ml Acetonitril und 17.1 ml Diethylether vorgelegt. Hierzu gibt man langsam 3.81 g (15.02 mmol) Iod und läßt über Nacht unter Rühren auf RT kommen. Die Lösung wird mit 200 ml Diethylether verdünnt, mit Eis versetzt und jeweils 3x mit gesättigter Na₂SO₃ und gesättigter CuSO₄·4H₂O (Kupfervitriol) ausgeschüttelt. Ist alles Iod reduziert, wird die organische Phase von der wäßrigen abgetrennt, mit gesättigter NaCl-Lösung vorgeetrocknet und über NaSO₄ getrocknet. Der Diethylether wird langsam evaporiert, wobei das Triphenylphosphin ausfällt. Dieses wird abfiltriert, der Rückstand mit wenig kaltem Diethylether gewaschen. Durch fortgesetztes Evaporieren und Abfiltrieren kann das Triphenylphosphin nahezu quantitativ abgetrennt werden (Dünnschichtchromatographische Kontrolle mit Kaliumpermanganat). Nachdem der Diethylether vollständig abgetrennt wurde, wird durch schärferes Evaporieren das Acetonitril abgetrennt, bis ein gelbes Öl zurückbleibt. Dieses wird säulenchromatographisch (EE:PE 1:5) gereinigt. Das Produkt ist ein weißer, wachsartiger Feststoff.

Ausbeute: 63 %

Summenformel: C₉H₁₆INO₄

Molekulargewicht: 329.1366

Schmelzpunkt: 59°C

$[\alpha]_D^{21} = -4^\circ$ (Methanol)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

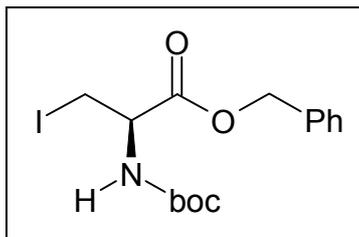
1.50 (s, 9H), 3.58 (m, 2H), 3.80 (s, 3H), 4.55 (dd, 3.9 Hz, 1H), 5.36 (bd, 6.8Hz, 1H)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

8.0 (+, ICH₂), 28.2 (-, CH₃)₃, 31.0 (-, CN), 53.0 (-, CH₃O), 80.0 (+, C-(Me)₃), 155 (+, Urethan), 170 (+, COO)

IR: 3432, 2982, 2930, 1744, 1704, 1496

MS: M⁺ 329 (3.69%), 146 (100%)

Benzyl 2(R)-[(tert-Butoxycarbonyl)amino]-3-iodopropionat (Boc-L-Ala(I)-OBn)

2 g (11.9 mmol) N-Boc-L-Serin werden in 14 ml DCM gelöst. Hierzu gibt man 3 g (12.95 mmol) OBn-N,N'-Diisopropylisoharnstoff und läßt 12 h unter Rückfluß erhitzen. Dann werden erneut 3 g (12.95 mmol) O-bn-N,N'-Diisopropylisoharnstoff hinzugegeben und für weitere 24 h rückflusiert. Nach dem Abkühlen wird der ausgefallene Diisopropylharnstoff abfiltriert und das Filtrat eingengt. Säulenchromatographische Reinigung mit PE:EE (20:1) ergibt 2.62 g (96 %) Benzyl-2(R)-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-3-hydroxypropionat (Boc-L-Ser-OBn). Dieses wird wie oben beschrieben iodiert.

Ausbeute: 65 % (2 Stufen)

Summenformel: C₁₅H₂₀INO₄

Molekulargewicht: 405.2354

Schmelzpunkt: 79°C

Elementaranalyse:

berechnet : C = 44.5 % H = 5.0 % N = 3.4 %

gemessen : C= 44.59 % H = 4.89 % N = 3.42 %

$[\alpha]_D^{21} = -18^\circ$ (CHCl₃)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

1.45 (s, 9H), 3.58 (m, 2H), 4.55 (dd, 4.0 Hz, 1H), 5.24 (m, 2H), 5.38 (bd, 7.3 Hz, 1H),

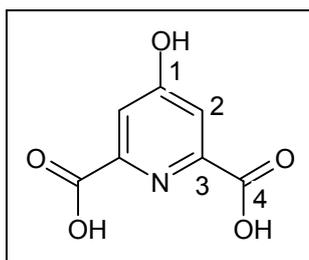
7.35 (m, 5H)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

7.79 (+, ICH₂), 28.26 (-, CH₃)₃, 53.6 (-, C-N), 68.01 (+, CH₂-Bn), 80.43 (+, C-(Me)₃), 128.60 (-, C-H aromatisch), 134.81 (+, Cq aromatisch), 154.80 (+, Urethan), 169.43 (+, COO)

IR: 3432, 3000, 2980, 2932, 1744, 1708, 1496, 1456, 1368, 1340, 1160

MS: M⁺ 405 (2.21%), 91 (100%)

Chelidamsäure

0.79 g (34.2 mmol) Natrium werden in 10 ml absolutem Ethanol gelöst. Die Lösung wird auf 60°C erwärmt und 50% der Lösung in einen weiteren Kolben mit KPG-Rührer überführt. Hierzu werden 1.2 ml (0.95 g, 16.3 mmol) Aceton und 2.3 ml (2.5 g, 17.1 mmol) Oxalsäurediethylester gegeben. Sobald die Lösung trüb wird, werden die restliche, angewärmte Natriumethanolat-Lösung und weitere 2.3 ml (2.5 g, 17.1 mmol) Oxalsäurediethylester hinzugegeben. Die Lösung nimmt nun eine hell gelbe Farbe an und ist hochviskos. Man läßt 40 min rühren und evaporiert das Gemisch bis zur Trockene ein. Es resultiert ein staubiger, brauner Feststoff, der in ein Becherglas umgefüllt und zuerst mit Eis, dann mit 5 ml konzentrierter Salzsäure versetzt wird. Das Gemisch wird gerührt, bis sich eine homogene gelbe Masse bildet, und filtriert sie mit einem Büchner-Trichter ab. Der so erhaltene gelbe Feststoff wird 20 h mit 5 ml konzentrierter Salzsäure rückflusiert. Die auf diese Weise als Rohprodukt vorliegende Chelidonsäure wird abgenutscht und mit kaltem Wasser gewaschen, bis ein homogenes grau-braunes Pulver vorliegt. Diese wird 24 h mit 10 ml konzentriertem Ammoniak rückflusiert (Ballontechnik). Der überschüssige Ammoniak wird vorsichtig mit halbkonzentrierter Salzsäure neutralisiert und der Rückstand abgenutscht. Dieser wird aus heißem Wasser umkristallisiert. Das Produkt liegt als gelbliches Pulver vor.

Ausbeute: 58-70 %

Summenformel: C₇H₅NO₅

Molekulargewicht: 183.1216

Schmelzpunkt: 265-267°C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):

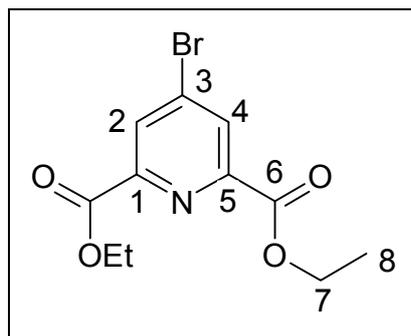
5.5-10.0 (bs), 7.55 (s)

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆):

116.50 (-, C2), 150.88 (+, C1), 166.99 (+, C3), 168.30 (+, C4)

IR: 3606, 3446, 3293, 3119, 2876, 2708, 2541, 1731, 1615, 1472, 1131

MS: M⁺ 183 (1.71%)

4-Bromo-pyridin-2,6-dicarboxylsäurediethylester

In einem 100 ml 2-Halskolben mit Rückflußkühler werden 3.7 ml (72.36 mmol) Brom in 24 ml PE vorgelegt. Hierzu gibt man langsam unter Eiskühlung 3.62 ml (87.02 mmol) Phosphortribromid und läßt bei RT rühren, bis eine gelbe Suspension entsteht (ca. 5 min). Das PE wird über dem Rückflußkühler abgezogen, bis ein gelber Feststoff zurückbleibt. Hierzu werden 4.4 g (24.04 mmol) Chelidamsäure gegeben und für 2.5 h unter Rühren auf 75 °C erhitzt. Man läßt auf RT kommen und filtriert das entstandene Tribromid vorsichtig mit 60 ml trockenem Chloroform in einen 250 ml Kolben ab. Unter ausreichender Eiskühlung werden 100 ml (1.7 mol) Ethanol hinzu getropft (stark exotherme Reaktion!). Nach der Ethanolzugabe läßt man über Nacht bei RT rühren. Die Chloroformphase wird auf $\frac{1}{4}$ des Ausgangsvolumens evaporiert und mit eisgekühltem Wasser versetzt, bis sich ein weißer Niederschlag bildet. Dieser wird abgenutscht, das Filtrat mit EE extrahiert. Die EE-Phase wird über NaSO_4 getrocknet und eingeeignet, der Produktniederschlag im Exicator getrocknet. Abschließend wird beides vereinigt und aus Ethanol auskristallisiert.

Ausbeute: 70 %

Summenformel: $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{BrNO}_4$

Molekulargewicht: 302.1266

Schmelzpunkt: 94-96°C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

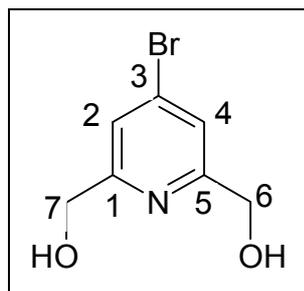
1.46 (dt, 0,7 Hz, 7,2 Hz, 6H), 4.50 (dq, 0,7 Hz, 7,2 Hz, 4H), 8.27 (s, 1H), 8.43 (s, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

14.20 (-, C-8), 62.73 (+, C-7), 128.10 (-, C-2), 131.10 (-, C-4), 146.60 (+, C-3), 149.52 (+, C-1),
149.85 (+, C-5), 163.54 (+, C-6)

IR: 3020, 1720, 1460, 1335

MS: M+ 302 (3.8 %)

4-Bromo-2,6-bis-(hydroxymethylen)-pyridin

248 mg (0.821 mmol) 4-Bromo-pyridin-2,6-dicarboxylsäurediethylester werden 10.3 ml absolutem Ethanol vorgelegt. Hierzu gibt man in kleinen Portionen innerhalb von 0.5 h 139.7 mg (3.70 mmol) NaBH₄ und läßt 2 h bei RT rühren. Darauf wird 24 h unter Rückfluß erhitzt. Das Gemisch läßt man auf RT abkühlen und evaporiert das Ethanol. Der weiße Rückstand wird mit 1.3 ml gesättigter Na₂CO₃-Lösung versetzt und für 2 min aufgekocht. Dann werden 2 ml Wasser hinzugegeben, woraus das Rohprodukt über Nacht bei 0°C kristallisiert. Der Niederschlag wird abfiltriert und das Filtrat mit DCM extrahiert. Der so gewonnene weiße Feststoff wird 24 h mit Aceton mittels einer Soxhlet-Apparatur extrahiert. Das Produkt kristallisiert während der Extraktion aus und kann abfiltriert werden.

Ausbeute: 50-65 %

Summenformel: C₇H₈BrNO₂

Molekulargewicht: 218.0513

Schmelzpunkt: 162-164°C

¹H-NMR (400, DMSO):

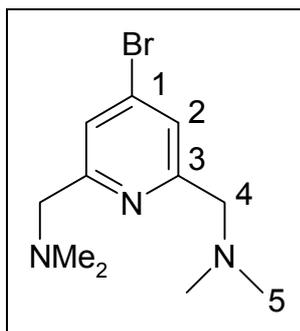
4.53 (d, 5.5 Hz, 4H), 5.55 (t, 5.5 Hz, 3H), 7.5 (s, 2H)

¹³C-NMR (100, DMSO):

66.5 (-, C-6, C-7), 124.8 (+, C-2, C-4), 136.5 (+, C-3), 166.5 (+, C-1, C-5)

IR: 3604, 3512, 3392, 3068, 2924, 2856, 1692, 1604, 1572

MS: 218 (96.98 %), 216 (100 %)

4-Bromo-2,6-bis-(N,N-dimethylaminomethylen)-pyridin

80 mg (0.37 mmol) 4-Bromo-2,6-bis-(hydroxymethylen)-pyridin werden in 2.3 ml trockenem Chloroform vorgelegt. Hierzu gibt man 0.052 ml (149.05 mg, 0.55 mmol) Phosphortribromid in 1.3 ml Chloroform und erhitzt 8 h unter Rückfluß. Hierauf läßt man auf RT abkühlen, gibt 10 ml Chloroform hinzu und neutralisiert das Gemisch mit gesättigter NaHCO_3 -Lösung. Die organische Phase wird abgetrennt und die wäßrige Phase sechsmal mit 5 ml CHCl_3 extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen und über NaSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird evaporiert und das 4-Brom-2,6-bis-bromethyl-pyridin aus DCM/Hexan umkristallisiert (Ausbeute: 75-88 %).

Eine Lösung aus 173.8 mg (1.26 mmol) K_2CO_3 , 2 ml Acetonitril und 0.2 ml CHCl_3 werden auf 0°C gekühlt und 156.5 (1.74 mmol) N,N-Dimethyl-ammoniumchlorid hinzugegeben. Ist alles gelöst, gibt man 98 mg (0.286 mmol) 4-Brom-2,6-bis-bromethyl-pyridin hinzu und läßt über Nacht auf RT kommen. Die Lösung wird filtriert und das Filtrat mit Chloroform extrahiert. Nachdem das Lösungsmittel evaporiert wurde, kristallisiert man das Produkt aus Ethanol aus (etwa 3 Tage).

Ausbeute: 80-94 %

Summenformel: $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{BrN}_3$

Molekulargewicht: 272.1902

Schmelzpunkt: 40-45 $^\circ\text{C}$

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD):

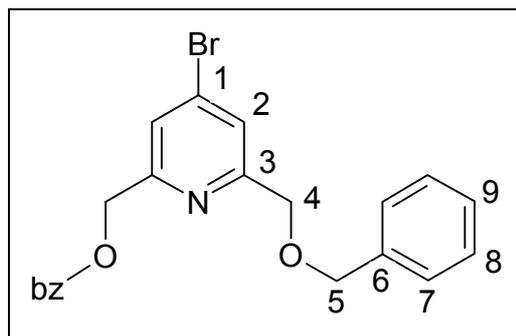
2.3 (s, 12H), 3.6 (s, 4H), 7.52 (s, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD):

35.95 (-, C-5), 62.89 (+, C-4), 128.27 (+C-2), 132.65 (+, C-1), 136.83 (+C-3)

IR: 2924, 2856, 2780, 1564, 1456

MS: M^+ 228/230 (23%, M^+ - NMe_2)

2,6-Bis-(benzyloxy-methyl)-4-bromo-pyridin

500 mg (2.3 mmol) 4-Bromo-2,6-bis-(hydroxymethylen)-pyridin werden in 4 ml THF vorgelegt und 112.3 mg (4.67 mmol) Natriumhydrid hinzugegeben. Hierauf tritt eine heftige Reaktion mit Wärmeentwicklung ein. Ist diese abgeschlossen, wird 8.5 mg (0.0023 mmol) Bn_4NI und 0.55 ml (4.64 mmol) Benzylbromid hinzugegeben. Die Lösung erhitzt man 4 h unter Rückfluß. Hierauf läßt man die Temperatur auf RT kommen, evaporiert das Solvens und gibt 5 ml 0.5 N NaOH Lösung hinzu. Das Rohprodukt wird mit DCM extrahiert und säulenchromatographisch gereinigt (PE:EE 10:1)

Ausbeute: 72 %

Summenformel: $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrNO}_2$

Molekulargewicht: 398.3031

Schmelzpunkt: 110-115°C

$^1\text{H-NMR}$ (200, CDCl_3):

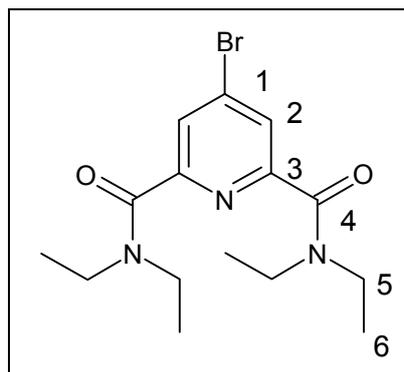
4.67 (s, 4H), 4.70 (s, 4H), 7.39 (m, 10H), 7.63 (s, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (50, CDCl_3):

75.55 (+, C-4), 76.2 (+, C-5), 122.4 (+, C-1), 127.8 (-, C-9), 128.3 (-, C-7), 129.4 (-, C-8), 130.6 (-, C-2), 138.4 (+, C-6), 140.2 (+, C-3)

IR: 3088, 3064, 3008, 2960, 2924, 2860, 1568, 1112, 908

MS: 398 (M^+ , 2.79 %)

Bromo-pyridin-2,6-dicarboxylsäure-bis-diethylamid

In einem 25 ml 2-Halskolben mit Rückflußkühler werden 0.131 ml (2.57 mmol) Brom in 1 ml PE vorgelegt. Hierzu gibt man langsam unter Eiskühlung 0.29 ml (3.09 mmol) Phosphortribromid und läßt bei RT rühren, bis eine gelbe Suspension entsteht (ca. 5 min). Das PE wird über dem Rückflußkühler abgezogen, bis ein gelber Feststoff zurückbleibt. Hierzu werden 156 mg (0.852 mmol) Chelidamsäure gegeben und für 2.5 h unter Rühren auf 75 °C erhitzt. Man läßt auf RT kommen und filtriert das entstandene Tribromid vorsichtig mit 15 ml trockenem Chloroform in einen 100 ml Kolben ab. Unter ausreichender Eiskühlung werden 4 ml (39.25 mmol) Diethylamin hinzu getropft (stark exotherme Reaktion!). Das sich dabei bildende und die Reaktionskontrolle erschwerende Ammoniumbromid läßt sich mit Luft ableiten. Ist alles Diethylamin hinzu getropft, läßt man 1 h rühren und dabei auf RT kommen. Die Chloroformphase wird evaporiert, dabei ausfallendes Ammoniumbromid wird abfiltriert. Die resultierende Flüssigkeit wird mit EE aufgenommen, mit NaHCO₃ neutralisiert und die wäßrige Phase mit EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über NaSO₄ getrocknet. Beim Evaporieren des EE fällt das Produkt aus, das abfiltriert und mit Diethylether gewaschen wird. Restliches Produktgemisch kann säulenchromatographisch getrennt werden (EE:PE 1:2 → EE:PE 1:1). R_f : 0.2 (EE:PE 1:1)

Ausbeute: 59 %

Summenformel: C₁₅H₂₂BrN₃O₂

Molekulargewicht: 356.2655

Schmelzpunkt: 92-94°C

Elementaranalyse:

berechnet : C = 50.57 % H = 6.22 % N = 11.70 % (C₁₅H₂₂N₃O₂ × 1/3 H₂O)

gemessen : C = 50.287 % H = 6.1562 % N = 11.626 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

1.17 (t, 7.2 Hz, 6H), 1.27 (t, 7.2 Hz, 6H), 3.34 (q, 7.2 Hz, 4H), 3.56 (q, 7.2 Hz, 4H)
7.81 (2H, s)

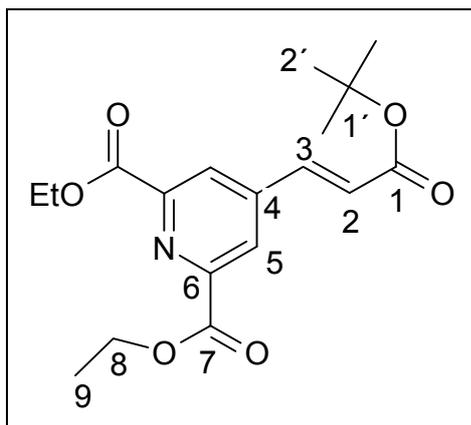
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

12.72 (-, C6a), 14.24 (-, C6b), 40.27 (+, C5a), 43.27 (+, C5b),
127.10 (-, C2), 134.53 (+, C3), 154.50 (+, C1), 166.70 (+, C4)

IR: 2996 (s), 2936 (m), 2876 (w), 1628 (s), 1564 (s), 1480 (m), 1460 (m), 1444 (m),

MS: 356 (M⁺, 6.59 %)

4-(2-tert-Butoxycarbonyl-vinyl)-pyridin-2,6-dicarboxylsäurediethylester



Allgemeine Vorschrift für die Heckkupplung:

42.1 mg (0.222 mmol) Triphenylphosphin und 12.2 mg (0.0574 mmol) Palladiumacetat werden in 3.2 ml N,N-Dimethylformamid vorgelegt und bei RT gerührt bis sich eine homogene Lösung bildet. 8 ml N,N-Dimethylformamid, 0.457 ml (3.15 mmol) tert-Butylacrylat, 258.6 mg (3.15 mmol) trockenes Natriumacetat und 883 mg (2.87 mmol) 4-Brom-pyridin-2,6-dicarboxylsäurediethylester werden hinzugegeben und 2 h bei 80°C gerührt (DC-Kontrolle).

Das DMF wird evaporiert und das resultierende Öl in 20 ml Wasser aufgenommen, mit DCM extrahiert und dieses abschließend mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Der DCM-Extrakt wird über NaSO₄ getrocknet, das DCM evaporiert und das resultierende Öl säulenchromatographisch getrennt (EE/PE 1:5).

R_f: 0.2 (EE/PE 1:5)

Ausbeute: 68 %

Summenformel: C₁₈H₂₃NO₆

Molekulargewicht: 349.3871

Schmelzpunkt: 85-90°C

Elementaranalyse:

berechnet : C = 61.09 % H = 6.69 % N = 3.96 (C₁₈H₂₃NO₆ × 1/4 H₂O)

gemessen : C = 61.061 % H = 6.601 % N = 3.8243 %

¹H-NMR (400, CDCl₃):

1.49 (t, 7 Hz, 6H), 1.57 (s, 9H), 4.51 (q, 7 Hz, 4H), 6.72 (d, 16 Hz, 1H), 7.61 (d, 16 Hz, 1H),
8.35 (s, 2H)

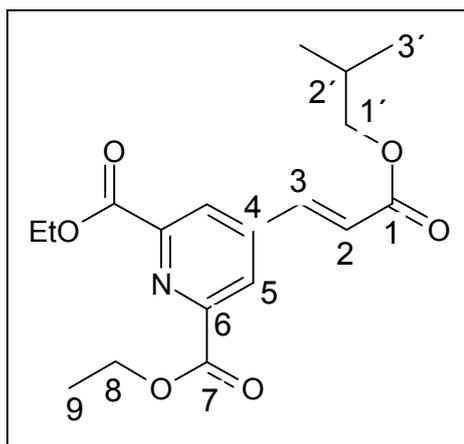
¹³C-NMR (100, CDCl₃):

14.31 (-, C-9), 28.20 (-, C-2'), 62.59 (+, C-8), 81.76 (+, C-1'), 125.74 (-, C-2), 127.13 (-, C-5),
138.83 (-, C-3), 144.91 (+, C-4), 149.62 (+, C-6), 164.44 (+, C-1), 164.76 (+, C-7)

IR: 2984 (m), 2936 (m), 1716 (s), 1368 (s), 1300 (m), 1248 (s)

MS: 349 (M⁺, 1.01%), 277 (100%)

4-(2-iso-Propoxycarbonyl-vinyl)-pyridin-2,6-dicarboxylsäurediethylester



Ausbeute: 92 %

Summenformel: C₁₈H₂₃NO₆

Molekulargewicht: 349.3871

Schmelzpunkt: 90-95°C

Elementaranalyse:

berechnet : C = 60.83 % H = 6.71 % N = 3.94 % (C₁₈H₂₃NO₆ × 1/3 H₂O)

gemessen : C = 60.600 % H = 6.5273 % N = 3.9847

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

1.0 (d, 6 Hz, 6H), 1.5 (t, 7.6 Hz, 6H), 2.1 (m, 1H), 4.1 (d, 6Hz, 2H), 4.5 (q, 7.6 Hz, 4H), 6.8 (d, 16 Hz, 1H), 7.7 (d, 16 Hz, 1H), 8.36 (s, 2H)

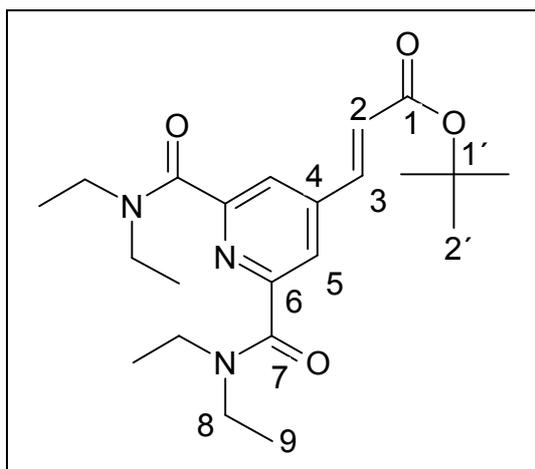
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

14.24 (-, C-9), 19.28 (-, C-3'), 27.79 (-, C-2'), 62.56 (+, C-8), 70.11 (+, C-1'), 125.12 (-, C-2), 125.72 (-, C-5), 139.78 (-, C-3), 144.58 (+, C-4), 149.63 (+, C-6), 164.36 (+, C-1), 165.56 (+, C-7)

IR: 3000, 2876, 1720, 1252, 1184

MS: 349 (M⁺, 2.7 %), 277 (100 %)

3-[2,6-Bis-(diethyl-carbamoyl)-pyridin-4-yl]-acrylsäure-tert-butylester



R_f : 0.3 (EE/PE 2:1)

Ausbeute: 70 %

Summenformel: C₂₂H₃₃N₃O₄

Molekulargewicht: 403.5260

Schmelzpunkt: 112-125°C

Elementaranalyse:

berechnet : C = 65.48 % H = 8.24 % N = 10.41 %

gemessen : C= 65.273% H= 8.22 % N = 10.362 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) :

1.18 (t, 7.2 Hz, 6H), 1.31 (t, 7.2 Hz, 6H), 1.58 (s, 9H), 3.37 (q, 7.2 Hz, 4H),
3.59 (q, 7.2 Hz, 4H), 6.62 (d, 16 Hz, 1H), 7.52 (d, 16 Hz, 1H), 7.71 (s, 2H)

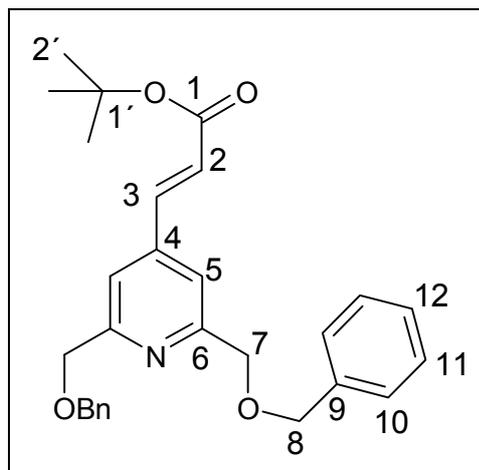
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

12.73 (-, C9a), 14.23 (-, C9b), 28.15 (-, C2'), 40.20 (+, C8a), 43.24 (+, C8b), 81.38 (+, C1'),
121.72 (-, C-2), 126.06 (-, C-5), 139.43 (-, C-3), 144.24 (+, C4), 154.44 (+, C6), 164.90 (+, C1),
167.62 (+, C7)

IR: 2980 (s), 2936 (m), 2876 (w), 1708 (s), 1628 (s), 1596 (m), 1484 (m), 1460 (m)

MS: 403.9 (M⁺, 21.87%), 333 (85.51%) -71 (C₄H₉N)

3-[2,6-Bis-(benzyloxy-methy)-pyridin-4-yl]-acrylsäure-ter-butyl ester



R_f : 0.55 (EE/PE 1:1)

Ausbeute: 81 %

Summenformel: C₂₈H₃₁NO₄

Molekulargewicht: 445.5636

Schmelzpunkt: 112-115 °C

Elementaranalyse:

berechnet : C = 74.28 % H = 7.08 % N = 3.09 % (C₂₈H₃₁NO₄ × 2/7 H₂O)

gemessen : C = 74.252 % H = 6.9172 % N = 2.924 %

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

1.53 (s, 9 H), 4.66 (s, 8 H), 6.55 (d, 16 Hz, 1 H), 7.34 (m, 10 H), 7.46 (s, 2 H),
7.52 (d, 16 Hz, 1 H)

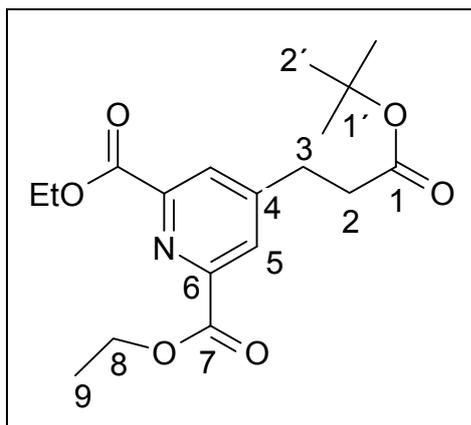
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

28.13 (-, C2'), 72.75 (+, C8), 73.11 (+, C7), 81.12 (+, C1'), 118.05 (-, C5), 124.83 (-,
C2), 127.82 (-, C10), 127.87 (-, C12), 128.58 (-, C11), 137.80 (+, C9), 141.05 (-, C3),
143.34 (+, C4), 158.92 (+, C6), 165.40 (+, C1)

IR: 3064, 2980, 2932, 2864, 1704, 908

MS: 446 (M⁺, 5.3%)

4-(2-tert-Butoxycarbonyl-ethyl)-pyridin-2,6-dicarboxylsäurediethylester



250 mg (0.716 mmol) 4-(2-tert-Butoxycarbonyl-vinyl)-pyridin-2,6-dicarboxylsäurediethylester werden in 5 ml Ethanol gelöst (Ultraschall) und 25.0 mg (10 %) Palladium auf Aktivkohle hinzugegeben. Nach 24 h Hydrierung wird das Ethanol evaporiert, das resultierende Öl mit CHCl_3 versetzt und von der Aktivkohle abgetrennt. Das so erhaltene Rohprodukt wird mit Kieselgel vermengt und anschließend säulenchromatographisch gereinigt (Ether/Petrolether 1:1). R_f : 0.25 (Ether/Petrolether 1:1)

Ausbeute: 80 %

Summenformel: $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}_6$

Molekulargewicht: 351.4031

Schmelzpunkt: 83-85°C

Elementaranalyse:

berechnet : C = 59.99 % H = 7.27 % N = 3.89 % ($\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}_6 \times 1/\text{H}_2\text{O}$)

gemessen : C = 61.008 % H = 7.263 % N = 3.8884 %

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):

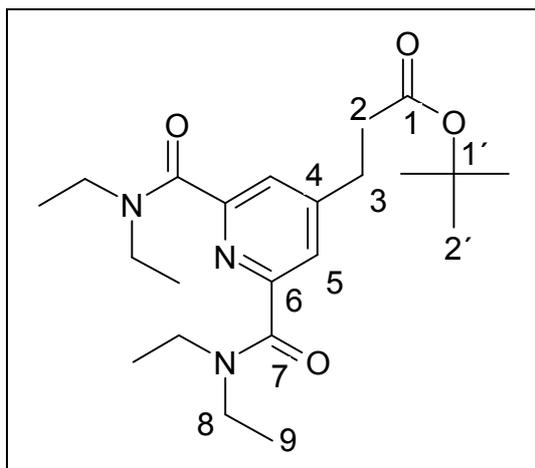
1.45 (s, 9H), 1.50 (t, 7 Hz, 6H), 2.69 (t, 7.5 Hz, 2H), 3.11(t, 7.5, 2H), 4.55(q, 7 Hz, 4H)
8.18(s, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):

14.19 (-, C9), 28.10 (-, C2'), 30.26 (+, C3), 35.46 (+, C2), 62.28 (+, C8), 81.20 (+, C1'), 127.83 (-, C5), 148.70 (+, C6), 152.76 (+, C4), 164.71 (+, C7), 170.96 (+, C1)

IR: 2984 (m), 2936 (w), 1720 (s), 1368 (s), 1336 (m), 1248 (s)

MS: 352 (M+ 1.1%), 223 (100%)

3-[2,6-Bis-(diethyl-carbamoyl)-pyridin-4-yl]-propionsäure-tert-butylester

108 mg (0.248 mmol) 3-[2,6-Bis-(diethyl-carbamoyl)-pyridin-4-yl]-acrylsäure-tert-butylester werden in 2.0 ml Eisessig gelöst (Ultraschall) und 10.8 mg (10 %) Palladium auf Aktivkohle hinzugegeben. Nach 24 h Hydrierung wird der Eisessig evaporiert, das resultierende Öl mit CHCl_3 versetzt und von der Aktivkohle abgetrennt. Das so erhaltene Rohprodukt wird mit Eis gekühlt und mit 10 ml 2 N Natriumhydroxid basisch gemacht, mit CHCl_3 extrahiert, mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen und abschließend über NaSO_4 getrocknet. Das Chloroform wird evaporiert und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt (EE/PE 1:1). R_f : 0.20 (EE/PE 1:1)

Ausbeute: 99 %

Summenformel: $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_4$

Molekulargewicht: 405.5420

Schmelzpunkt: 68-70°C

Elementaranalyse:

berechnet : C = 65.16 % H = 8.70 % N = 10.36 %

gemessen : C= 65.458 % H= 8.6125 % N = 10.3403 %

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) :

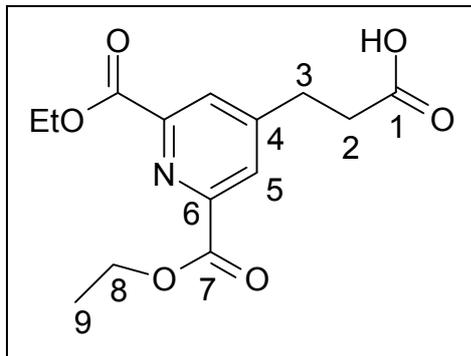
7.45 (s, 2H), 3.53 (q, 7.15 Hz, 4H), 3.30 (q, 7.15 Hz, 4H), 2.95 (t, 7.5 Hz, 2H), 2.58 (t, 7.5 Hz, 2H), 1.41 (s, 9H), 1.23 (t, 7.15 Hz, 6H), 1.12 (t, 7.15 Hz, 6H)

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃):

12.78 (-, C9), 14.05 (-, C9'), 28.16 (+, C2'), 30.75 (+, C3), 35.20 (+, C2), 40.13 (+, C8),
43.23 (+, C8'), 80.95 (+, C1'), 123.59 (-, C5), 152.13 (+, C6), 153.71 (+, C4), 168.17 (+,
C7), 171.27 (+, C1)

IR: 2980 (s), 2936 (m), 2876 (w), 1720 (s), 1624 (s), 1484 (m), 1460 (m), 1444 (m)

MS: 406 (M⁺ 20.82 %), 335 (100 %)

4-(2-Carboxy-ethyl)-pyridin-2,6-dicarboxylsäurediethylester

442 mg (1.26 mmol) 4-(2-tert-Butoxycarbonyl-ethyl)-pyridin-2,6-dicarboxylsäurediethylester und 1.37 ml (12.6 mmol) Anisol werden in 22.4 ml DCM gelöst und 4.8 ml (63 mmol) TFA bei RT hinzugegeben. Man läßt 1 h rühren (DC-Kontrolle) und evaporiert zunächst das DCM, dann das TFA. Die resultierende Flüssigkeit wird mit DCM aufgenommen und mit NaHCO_3 unter Eiskühlung basisch gemacht. Nun wird 6x mit DCM das Anisol, dann 6x mit EE das Produkt extrahiert (DC-Kontrolle). Die vereinigten Essigsäureethylesterphasen werden mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen und über NaSO_4 getrocknet. Nachdem der EE evaporiert wurde, wird das Produkt aus PE umkristallisiert. R_f : 0.0-0.1 (EE:PE1:1)

Ausbeute: 95 %

Summenformel: $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_6$

Molekulargewicht: 295.2947

Schmelzpunkt: 87-90°C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMF):

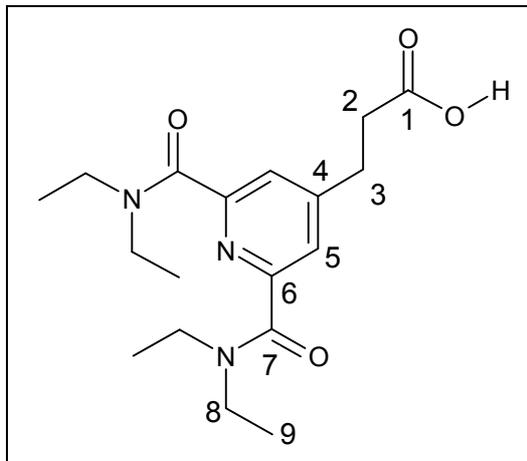
1.38 (t, 7 Hz, 6H), 2.83 (t, 7.3 Hz, 2H), 3.14 (t, 7.3 Hz, 2H), 4.43 (q, 7 Hz, 4H),
8.26 (s, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMF):

15.8 (-, C9), 31.8 (+, C3), 35.6 (+, C2), 63.6 (+, C8), 129.9 (-, C5), 151.1 (+, C6),
156.2 (+, C4), 167.1 (+, C7), 175.8 (+, C1)

IR: 3036 (w), 3000 (w), 2984 (w), 2940 (w), 2901 (w), 2872 (w), 1732 (s), 1700 (s),
1376 (s), 1312 (s)

MS: 296 (M+1, 0.47 %), 223 (100%) (-73)

3-[2,6-Bis-(diethyl-carbamoyl)-pyridin-4-yl]-propionsäure

350 mg (0.86 mmol) 3-[2,6-Bis-(diethyl-carbamoyl)-pyridin-4-yl]-propionsäure-tert-butylester und 0.94 ml (8.64 mmol) Anisol werden in 15.4 ml DCM gelöst und 3.3 ml (43.18 mmol) TFA bei RT hinzugegeben. Man läßt 1 h rühren (DC-Kontrolle) und evaporiert zunächst das DCM, dann das TFA. Die resultierende Flüssigkeit wird mit DCM aufgenommen und mit NaHCO₃ unter Eiskühlung basisch gemacht. Nun wird 6x mit DCM das Anisol, dann 6x mit EE das Produkt extrahiert (DC-Kontrolle). Die vereinigten Essigsäureethylesterphasen werden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über NaSO₄ getrocknet. Nachdem der EE evaporiert wurde, wird das Produkt säulenchromatographisch mit EE gereinigt. R_f : 0.0-0.1 (EE:PE 3:1)

Ausbeute: 90 %

Summenformel: C₁₈H₂₇N₃O₄

Molekulargewicht: 349.4336

Schmelzpunkt: 73°C

¹H-NMR (200 MHz, CD₃CN):

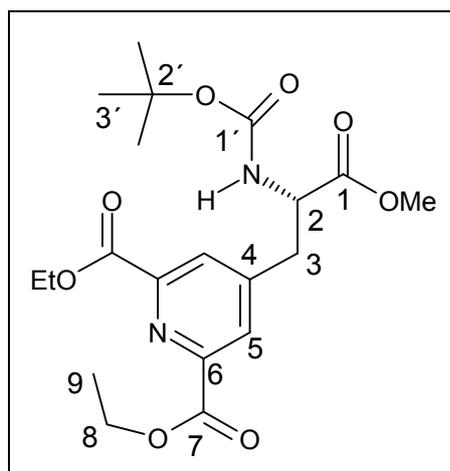
8.94 (s, 1H), 7.47 (s, 2H), 3.52 (q, 7.15 Hz, 4H), 3.34 (q, 7.15 Hz, 4H), 2.97 (t, 7.4 Hz, 2H),
2.66 (t, 7.4 Hz, 2H), 1.20 (t, 7.15 Hz, 6H), 1.10 (t, 7.15 Hz, 6H)

¹³C-NMR (50 MHz, CD₃CN):

13.34 (-, C9a), 13.53 (-, C9b), 29.66 (+, C3), 33.04 (+, C-2), 40.41 (+, C8a), 43.26 (+, 8b),
60.02 (C6), 123.06 (-, C5), 153.16 (+, C4), 153.54 (+, C6), 168.18 (+, 7a), 170.79 (+, 7b),
172.90 (+, C1)

IR: 2984 (m), 2940 (m), 2876 (w), 2584 (m), 2456 (w), 1716 (s), 1624(s)

MS: 349 (M+ 15.10%), 279 (100%)

3-(2,3-bis-ethoxymethyl-pyridin-4-yl)-N-boc-alanine methylester

Zu 216.6 mg (3.31 mmol) voraktiviertem Zink werden in einem ausgeheizten 10 ml 2-Hals-Kolben unter Schutzgas 16 μ l (23 mol %) Dibromoethan hinzugegeben und 3 min bei 60°C erwärmt. Dann kühlt man auf 30°C ab, gibt 3 ml THF hinzu und läßt 30 min rühren. 326.8 mg, (0,993 mmol) Boc-Ala(I)-OMe werden hinzugefügt und bei 60°C bis zur vollständigen Zink-Insertion (DC-Kontrolle) gerührt.

In einem zweiten ausgeheizten 10 ml 2-Halskolben werden unter Schutzgas 250 mg (0.828 mmol) 4-Bromo-2,6-bis-ethoxymethyl-pyridin und 30.7 mg (5.3 mol %) $(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{PdCl}_2$ gegeben. Hierzu gibt man mittels einer trockenen Spritze das Zinkorganyl und spült mit 2 ml THF bis alles gelöst ist. Abschließend wird auf 50°C erwärmt und 3 h gerührt (DC-Kontrolle). Das THF wird evaporiert und das resultierende braune Öl säulenchromatographisch getrennt (SiO_2 , EE/PE 2 : 1). R_f : 0.25 (EE:PE 2:1)

Ausbeute: (80%)

Summenformel: $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_8$

Molekulargewicht: 424.4548

Schmelzpunkt: 45-48°C

$^1\text{H-NMR}$ (400, CDCl_3):

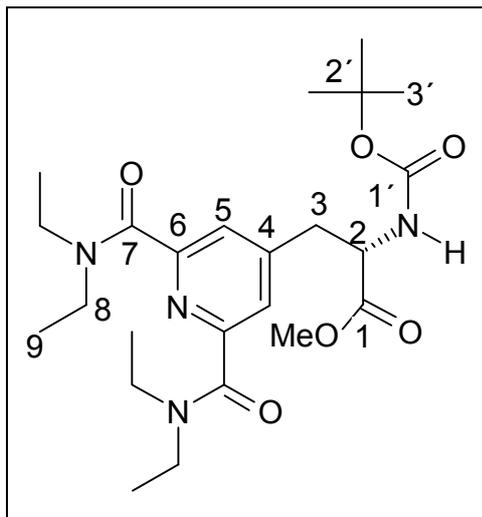
1.44 (s, 9H), 1.48 (t, 7 Hz, 6H), 3.20 (dd, 6 Hz, 13 Hz, 1H), 3.38 (dd, 5.5 Hz, 13 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 4.50 (bm, 7 Hz, 1H), 5.18 (bd, 7 Hz, 1H), 8.11 (s, H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 Hz, CDCl_3):

14.19 (-, C9), 28.26 (-, C3'), 38.29 (+, C3), 53.20 (-, OMe), 60.44 (-, 8), 66.39 (+, 2'), 78.02 (+, C2), 129.10 (-, C5), 130.28 (+, 6), 143.56 (+, 4), 164.34 (+, 1'), 170.46 (7), 171.28 (+, 1)

IR: 3432 (m), 2984 (s), 1736 (s), 1716 (s), 1248 (s), 1160 (s)

MS: 424 (M^+ , 9.4 %),

3-[2,6-Bis-(diethyl-carbamoyl)-pyridin-4-yl]-N-boc-alaninmethylester

Zu 210.6 mg (3.22 mmol) voraktiviertem Zink werden in einem ausgeheizten 10 ml 2-Hals-Kolben unter Schutzgas 16 μ l (23 mol %) Dibromoethan hinzugegeben und 3 min bei 60°C erwärmt. Dann kühlt man auf 30°C ab, gibt 3 ml THF hinzu und läßt 30 min rühren. 326.8 mg, (0,994 mmol) Boc-Ala(I)-OMe werden hinzugefügt und bei 60°C bis zur vollständigen Zink-Insertion (DC-Kontrolle) gerührt. In einem zweiten ausgeheizten 10 ml 2-Halskolben werden unter Schutzgas 293.9 mg (0.828 mmol) Bromo-pyridin-2,6-dicarboxylsäure-bis-diethylamid und 30.7 mg (5.3 mol %) $(\text{Ph}_3\text{P})_2\text{PdCl}_2$ gegeben. Hierzu gibt man mittels einer trockenen Spritze das Zinkorganyl und spült mit THF bis alles gelöst ist (3 ml). Abschließend wird auf 70°C erwärmt und 3 h gerührt (DC-Kontrolle). Das THF wird evaporiert und das resultierende braune Öl säulenchromatographisch getrennt (SiO_2 , EE/PE 5 : 1). R_f :0.5 (CHCl_3 :MeOH 50:1)

Ausbeute: 95 %

Summenformel: $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_6$

Molekulargewicht: 478.5937

Schmelzpunkt 87-90°C; $[\alpha]_D^{21} = 27^\circ$ (CHCl_3)

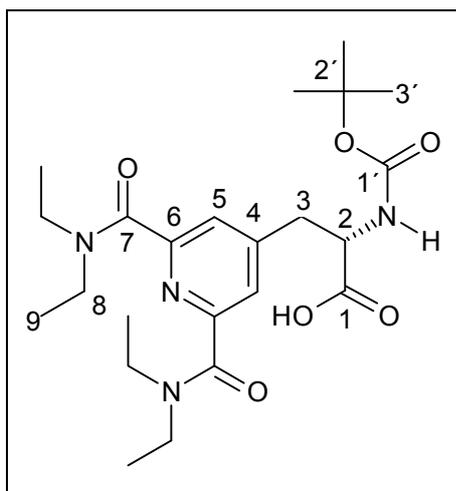
$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CD_3CN):

7.41 (s, 2H), 5.79 (d, 8.3 Hz, 1H), 4.50 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.53 (q, 7.15 Hz, 4H), 3.27 (m, 5H), 3.04 (m, 1H), 1.38 (s, 9H), 1.23 (t, 7.15 Hz, 6H), 1.12 (t, 7.15 Hz, 6H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CD_3CN):

12.19 (-, C9a), 13.65 (-, C9b), 27.49 (-, C3'), 36.50 (+, C3), 39.51 (+, C8a), 42.87 (+, C8b), 52.00 (-, OMe), 55.64 (-, C2), 79.20 (+, C2'), 121.36 (-, C5), 141.45 (C6a), 141.98 (C6b), 149.08 (+, C4), 154.34 (+, C1'), 167.78 (+, C7), 171.83 (+, C1)

IR: 3432 (m), 2936 (s), 2876 (m), 1744 (s), 1712 (s), 1628 (s) **MS:** 478 (M^+ , 15.60%), 351 (100%)

3-[2,6-Bis-(diethyl-carbamoyl)-pyridin-4-yl]-N-boc-alanin

150 mg (0.314 mmol) 3-[2,6-Bis-(diethyl-carbamoyl)-pyridin-4-yl]-N-boc-alaninmethylester werden in 0.32 ml Dioxan und 0.032 ml Wasser gelöst und 37.66 (0.94 mmol) Natriumhydroxid hinzugegeben. Nach 2.5 h gibt man Amberlyst (strongly acid) hinzu und läßt 10 sec reagieren. Das Gemisch wird abfiltriert und mit Chloroform extrahiert. Zur Chloroformphase werden 10 ml gesättigte Na_2HCO_3 -Lösung gegeben und die wäßrige Phase 2x mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen und über NaSO_4 getrocknet. Abschließend wird das Chloroform evaporiert und das Produkt aus Acetonitril umkristallisiert. R_f : 0.0-0.2 (CHCl_3 :MeOH)

Ausbeute: 88 %

Summenformel: $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_6$

Molekulargewicht: 464.5666

Schmelzpunkt: 45-47°C

Elementaranalyse:

berechnet : C = 56.27 % H = 7.74 % N = 10.50 %

gemessen : C = 56.38 % H = 7.78 % N = 10.71 %

¹H-NMR (400 MHz, CD₃CN):

7.42 (s, 2H), 5.71 (d, 8.5 Hz, 1H), 4.41 (m, 1H), 3.51 (q, 7.15 Hz, 4 H), 3.26 (m, 5H), 3.00 (m, 1H), 1.33 (s, 9H), 1.20 (t, 7.15 Hz, 6H), 1.10 (t, 7.15 Hz, 6H)

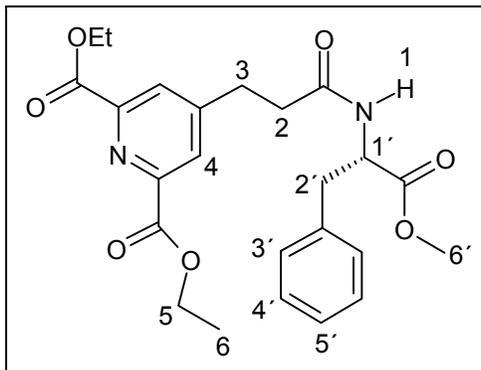
¹³C-NMR (100 MHz, CD₃CN):

13.13 (-, C9a), 14.60 (-, C9b), 28.53 (-, C3'), 37.42 (+, C3), 40.89 (+, C8a), 44.11 (+, C8b), 54.54 (-, C2), 67.69 (+, C2'), 124.75 (-, C5), 149.29 (+, C6), 153.19 (+, C4), 155.11 (+, C1'), 167.59(+, C7), 171.52 (+, C1)

IR: 3428 (m), 2986 (s), 2980 (s), 2876 (w), 2560 (m), 1708 (s), 1624 (s), 1600 (s)

MS: 465 (M+ 7.4%), 294 (100%)

***N*-[2,6-Bis(ethyl-carboxyl)-pyridin-4yl]-propionyl-L-phenylalaninmethylester (95)**



Allgemeine Vorschrift für die Synthese der Pseudopeptide:

176 mg (0.6 mmol) Säure werden zusammen mit 133.7 mg (0.62 mmol) L-Phenylalaninmethylester und 0.166 ml (1.2 mmol) TEA in 4.8 ml Acetonitril vorgelegt. Dann wird 453 mg (1.2 mmol) HBTU zugegeben und 30 min bei RT gerührt. Die Reaktion wird mit 17 ml Brine gequenchet, dann 3x mit 12 ml EE extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden 2x mit 1N HCl aq, 2x mit 1.2 ml Wasser, 2x 1.2 ml NaHCO₃, 2x mit 1.2 ml Wasser gewaschen. Es folgt Trocknen über NaSO₄. Das resultierende Rohprodukt wird mit EE/PE 2:1. Säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 252 mg (92%) eines viskosen Öls.

¹H-NMR (200, CDCl₃):

1.48 (t, 7.2 Hz, 6H; *H*6), 2.65 (dt, 3.5 Hz, 7.2 Hz, 2H; *H*2), 3.0-3.2 (m, 4H; *H*3, *H*2'),
 3.75 (s, 3H; *H*6'), 4.5 (q, 7.2 Hz, 4H; *H*5), 4.9 (m, 1H; *H*1'), 6.84 (bd, 1H, 8.0 Hz; *H*1),
 7.22 (dd, 1H, 8.0 Hz, 2 Hz; *H*5'), 7.30-7.4 (m, 4H; *H*3', *H*4'), 8.2 (s, 2H; *H*4)

***N*-[2,6-Bis(diethyl-carbamoyl)-pyridin-4yl]-propionyl-L-phenylalaninmethylester (96)**

¹H-NMR (200, CDCl₃):

1.06 (t, 7.0 Hz, 6H; *H*6), 1.23 (t, 7.0 Hz, 6H; *H*8), 2.48 (bt, 7.5 Hz, 2H; *H*2), 2.80-3.10 (m, 4H;
*H*3, *H*2'), 3.20 (q, 4H, 7.0 Hz; *H*5), 3.54 (q, 4H, 7.0 Hz; *H*7), 3.61 (s, 3H; *H*6'), 4.59 (m, 1H;
*H*1'), 6.72 (d, 1H, 7.8 Hz; *H*1), 7.10-7.40 (m, 4H, *H*3'-*H*5'), 7.60 (s, 2H; *H*4)

N-[2,6-Bis(diethyl-carbamoyl)-pyridin-4yl]-propionyl-*L*-(4-hydroxy-phenyl)-alaninmethyl-ester (**97**)

¹H-NMR (200, CDCl₃) :

1.06 (t, 6.0 Hz, 6H; *H*6), 1.19 (t, 6.0 Hz, 6H; *H*8), 2.50 (t, 8.0 Hz, 2H; *H*2), 2.70-3.00 (m, 4H; *H*3, *H*2'), 3.22 (q, 4H, 6 Hz; *H*5), 3.50 (q, 4H, 6 Hz; *H*7), 3.62 (s, 3H; *H*6'), 4.54 (m, 1H; *H*1'), 6.60-6.70 (m, 3H; *H*1, *H*4'), 6.73 (bs, 1H; *H*5'), 6.95 (d, 2H, 8.5 Hz; *H*5'), 7.33 (s, 2H; *H*4)

7 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Dennis K. Ehlert
Geburtstag: 19.03.67 in Bremerhaven
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet mit Anja Backhaus-Ehlert seit 08.08.97

Schulische Ausbildung:

August 1973 - Juni 1975 Grund- und Hauptschule Neuenwalde / Lk Cuxhaven
August 1975 - Juli 1978 Grund- und Hauptschule Drispstedt / Hildesheim
August 1978 - Mai 1980 Gymnasium Himmelsthür / Hildesheim
Juni 1980 - Juli 1984 Lessingschule Bremerhaven
August 1984 - Juni 1987 Schulzentrum Geschwister Scholl Bremerhaven, Abitur

Wehrdienst:

Januar 1988 - März 1989 Panzergrenadierbataillon 22, Braunschweig

Akademische Ausbildung:

Oktober 1989 - Juni 1995 Studium an der Universität Hannover Studiengang Chemie-Diplom
April 1992 Diplomvorprüfung
Juni 1995 Diplomprüfung
Juni 1995 - Juli 1999 Promotion an der Universität Hannover
bei Prof. H.M.R. Hoffmann, PhD, DSc und Priv. Doz. Dr. B. Schmidt
22.01.1996-21.03.1996 Studienaufenthalt am Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Uppsala, Schweden

Veröffentlichungen

B. Schmidt, D. K. Ehlert, *Tetradron Lett.*, **1998**, 39, 3999
B. Schmidt, Vera Neitemeier, Dennis K. Ehlert, *Electronic Conference on Heterocyclic Chemistry*, Echet 98 (<http://www.ch.ic.ac.uk/ectoc/echet98/pub/008/index.htm>)
Poster, Hannover Messe Industrie 1998
Poster, 37. IUPAC Kongress, Berlin 1999

8 Literatur

- ¹ Schreiner, P.R., *Nachr. Chem. Tech. Lab.*, **1998**, *46*, 1044
- ² Woggon, Wolf-D, *Nachr. Chem. Tech. Lab.*, **1997**, *45*, 882
- ³ Günther, H., *NMR-Spectroscopy; Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry*, 2nd Ed., Wiley, Chichester, **1994**
- ⁴ Schröder, b., Rudolph, J., *Physikalische Methoden in der Chemie*, VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim, **1985**, S. 37
- ⁵ Briggs, L.H., Openshaw, H.T., Robinson, R. *J. Chem. Soc.* **1946**, 903
Robinson, R. *Experientia* **1946**, *2*, 28
Smith, G.F. *Alkaloids (Academic Press)* **1965**, *8*, 591
- ⁶ Nicolaou, K.C., Roschangar, F., Vourloumis, D., *Angew. Chem.*, **1998**, *110*, 2120-2153
- ⁷ Höfle, G., Bedorf, N., Steinmetz, H., Schomburg, D., Gerth, K., Reichenbach, H., *Angew. Chem.* 1996, *108*, 1671
- ⁸ Pietruszka, J., *Nachr. Chem. Tech. Lab.*, **1998**, *46*, 970
- ⁹ Joliffe, K.A., Calama, M.C., Fokkens, R., Nibbering, N. M. M. Timmermann, P., Reinhoudt, D.N., *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1294
- ¹⁰ Vetter, S., *Nachr. Chem. Tech. Lab.*, **1997**, *45*, 1195
- ¹¹ Barnes, M.D., Whitten, W.B., Ramsey, J.M., *Analytical Chemistry*, **1995**, 418
- ¹² Karst, U., *Nachr. Chem. Tech. Lab.*, **1997**, *45*, 614
- ¹³ Nicolaou, K.C., Watanabe, N., Li, J., Pastor, J., Winssinger, N., *Angew. Chem.*, **1998**, *110*, 1636
- ¹⁴ Diederichs, K., Schulz, G.E., *Biochemistry*, **1990**, *29*, 8138
- ¹⁵ Beck-Sickinger, A.G., Kiess, M., Kern, P., Folkers, G. in Maia, H.L.S., *Peptides 1994: Proceedings of the Twenty-Third European Peptide Symposium*, Escom: Leiden 1995, S.543
- ¹⁶ Kreuzholz, R., *Nachr. Chem. Tech. Lab.*, **1998**, *46*, 633
- ¹⁷ Kricka, L.J., *Nonisotopic DNA Probe Techniques*, Academic Press: New York, **1992**, S.3
- ¹⁸ Hirschfeld, T., *Appl. Opt.*, **1976** *15*, 3135
- ¹⁹ Lamture, J.B., Wensel, T.G., *Tetrahedron Lett.*, **1993**, *34*, 4141 (weitere Referenzen werden hier zitiert)
- ²⁰ Lindeberg, G., Bennich, H., Engström, A., *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1991**, *38*, 253
- ²¹ Garman, A.J., *Non-radioactive Labelling*, Academic Press: New York, **1995**
- ²² Jüstel, T., Nikol, H., Ronda, C., *Angew. Chem.*, **1998**, *110*, 3250
- ²³ Hollemann, A.F., Wiberg, N., *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, de Gruyter: Berlin **1985**, S. 107

- ²⁴ Meine, D., *Nachr. Chem. Tech. Lab.*, **1998**, *46*, M 63
- ²⁵ Christen, H.R., *Grundlagen der Allgemeinen und Anorganischen Chemie*, Salle & Sauerländer: Frankfurt a.M. **1988**, S 155
- ²⁶ a) J. Kido, W. Ikeda, M. Kimura, K. Nai, *Jpn. J. Appl. Phys.* **1996**, *35*, L394
b) J. Kido, H. Hayase, K. Hongawa, K. Nai, K. Okuyama, *Appl. Phys. Lett.* **1994**, *65*, 2124
c) J. Kido, K. Nai, Y. Okamoto, T. Skotheim, *Chem. Lett.* **1991**, 1267
d) J. Kido, K. Nagai, Y. Ohashi, *Chem. Lett.* **1990**, 657
e) H. Boemer, U. Kynast, W. Busselt, M. Haase (Philips N. V.). DE-B 4428450.0, 1994
f) H. Boemer, W. Busselt, T. Jüstel, H. Nikol (Philips N.V.), DE-B 19726472.7, 1997.
- ²⁷ Nishiyama, Hisao, Tajima, T., Takayama, M., Ithoh, K., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, *4*, 1461
- ²⁸ (a) Corey. E. J., Barnes-Seeman, D., Lee, T. W., *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 1699
(b) Corey. E. J., Rohde. J. J., *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 37
- ²⁹ (a) Carreira, E. M., Singer, R. A., Lee, W., *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *117*, 8837
(b) Keck, G. E., Krishnamurthy, D., *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2363
(c) Mikami, K., Matsukawa, S. J., *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4077
(d) Kobayashi, S., Uchiro, H.: Shiina, I., Mukaiyama, T., *Tetrahedron* **1993**, *49*, 1761
(e) Corey E. J., Cwvin, C. L., Roper. T. D., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 6907
(f) Parmee, E. R., Hong, Y., Tempkin, O., Masamune, S., *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1729
(g) Kiyooka. S., Kaneko, Y., Kume, K., *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4927
(h) Furuta. K., Maruyama, T., Yamamoto, H., *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1041
(i) Parmee, E. R., Tempkin, O.: Masamune, S. Abiko, A., *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9365
(j) Yanagisawa, A., Matsumoto, Y., Nakashima, H., Asakawa, K., Yamamoto, H, *J Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 9319.
- ³⁰ Lutomski, K.A., Meyers, A.I., *Asymmetric Synthesis*, Morrison J.D (ed), Academic Press: Orlando **1984**, *3*, Chapter 3
- ³¹ Meyers, A.I., Lefker, B.A., Aitken, R.A., *J. Org. Chem.*, **1986**, *51*, 1936
Romo, D., Meyers, A.I., *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 9503 (review)
- ³² Aitken, R.A., Kilényi, *Asymmetric Synthesis*, Blackie Academic & Professional: London **1992**
- ³³ Anderson, R.C., Fraser-Reid, B., *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 4781
- ³⁴ Enders, D., *Asymmetric Synthesis*, Morrison J.D (ed), Academic Press: Orlando **1984**, *3*, Chapter 4
- ³⁵ (a) Evans, D.A., Ennis, M.D., Mathre, D.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, 1737
(b) Evans, D.A., Morrissey, M.M., Dorow, R.L., *J. Am. Chem. Soc.* , **1985**, *107*, 4346
(c) Evans, D.A., Britton, T.C.. Dorow, R.L, Dellaria, J.F., *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 6395
- ³⁶ Oppolzer, W., Chapuis, C., Bernardinelli, G., *Helv. Chim. Acta*, **1984**, *67*, 1397

- ³⁷ Schöllkopf, U., Tiller, T., Bardenhagen, J., *Tetrahedron*, **1988**, *44*, 5293
- ³⁸ Brown, H.C., Jadhav, P.K., *Asymmetric Synthesis*, Morrison J.D (ed), Academic Press: Orlando **1983**, *2*, Chapter 1
- ³⁹ Mechanismus: Finn, M.G., Sharpless, K.B., *Asymmetric Synthesis*, Morrison J.D (ed), Academic Press: Orlando **1985**, *5*, Chapter 8
- Anwendungen: Rossiter, B.E., *Asymmetric Synthesis*, Morrison J.D (ed), Academic Press: Orlando **1985**, *5*, Chapter 7
- ⁴⁰ Sharpless, K.B., Hentges, S.G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *103*, 4263
- ⁴¹ Kolb, H.C., VanNieuwenhze, M.S., Sharpless, K.B., *Chem. Rev.*, **1994**, *94*, 2483
- ⁴² Jacobsen, E.N., Markó, I., Mungall, W.S., Schröder, G., Sharpless, K.B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 1968
- ⁴³ Noyori, R., Kitamura, M., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1991**, *30*, 49
- ⁴⁴ Kagan, H.B., *Asymmetric Synthesis*, Morrison J.D (ed), Academic Press: Orlando **1985**, *5*, Chapter 1
- ⁴⁵ Noyori, R., Takaya, T., *Acc. Chem. Res.*, **1990**, *23*, 345
- ⁴⁶ Hargittai, I., Hargittai, M., *Symmetry through the Eyes of a Chemist*, VCH Publishers: New York **1987**
- ⁴⁷ Nakazaki, M., *Topics in Stereochemistry*; Eliel, E.L., Wilen, S., Allinger, N.L. (ed), Wiley, New York: **1984**, *15*, 199
- ⁴⁸ Whitesell, J.K., *Chem. Rev.*, **1989**, *89*, 1581
- ⁴⁹ Nishiyama, H., Sakaguchi, H., Nakamura, T., Horihata, M., Kondo, M., Itoh, K., *Organometallics* **1989**, *8*, 846
- ⁵⁰ (a) Nishiyama, H., Yamaguchi, S., Kondo, M., Itoh, K., *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 4306
(b) Nishiyama, H., Kondo, M., Nakamura, T., Itoh, K., *Organometallics* **1991**, *10*, 500
- ⁵¹ Jacobsen, E.N., Zhang, W., Güler, M.L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 6703
- ⁵² Lüning, U., Petersen, S., Schyja, W., Hacker, W., Marquardt, T., Wagner, K., Bolte, M., *Eur. J. Org. Chem.*, **1998**, 1077
- ⁵³ Jähme, J., Rüchardt, C., *Angew. Chem.*, **1981**, *93*, 919
- ⁵⁴ (a) Scimin, P., Tecilla, P., Tonellato, U., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 5086
(b) Scimin, P., Tecilla, P., Tonellato, *Eur. J. Org. Chem.*, **1998**, 1143
- ⁵⁵ Evans, D.A., Johnson, J.S., *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 786
- ⁵⁶ Evans, D.A., Kozlowski, M.C., Murry, J.A., Burgey, C.S., Campos, K.R., Connell, B.T., Staples, R.J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 669
- ⁵⁷ Evans, D.A., Burgey, C.S., Kozlowski, M.C., Tregay, S.W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 686
- ⁵⁸ Kabayashi, S., Uchiro, H., Shiina, I., Mukaiyama, T., *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 1761
- ⁵⁹ Evans, D.A., Carter, P.H., Carreira, E.M., Charette, A.B., Prunet, J.A., Lautens, M., *Angew. Chem.*, **1998**, *110*, 2526
- ⁶⁰ Evans, D.A., MacMillan, D.W.C., Campos, K.R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 10859
- ⁶¹ Liu, S., Hamilton, D., *Chem. Commun.*, **1999**, 587

- ⁶² Abbenhuis, R.A.T.M., Boersma, J., van Koten, G., *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4282
- ⁶³ Meares, C.F., Wensel, T. G., *Accts. Chem. Res.* **1984**, *17*, 202
- ⁶⁴ (a) J.-M. Lehn, M. Pietraszkiewicz J. Karpiuk, *Helv. Chim. Acta*, **1990**, *73*, 106
(b) J. Kankare, M. Latva, H. Takalo, *Eur. J. Solid State Inorg. Chem.*, **1991**, *28*, 183
(c) V. Balzani, E. Berghmans. J.-M. Lehn, N. Sabbatini. R. Terörde, R. Ziessel, *Helv. Chim. Acta*, **1990**, *73*, 2083
(d) H. Takalo, E. Hänninen, J. Kankare, *Helv. Chim. Acta*, **1993**, *76*, 877
(e) V.-M. Mikkala. M. Helenius, I. Hemmilä, J. Kankare, H. Takalo, *Helv. Chim. Acta*, **1993**, *76*, 1361
- ⁶⁵ Abusaleh, A., Meares, C. F., *Photochem. Photobiol.* **1984**, *39*, 763
- ⁶⁶ Barela, T. D., Sherry, A. D., *Anal. Biochem.*, **1976**, *76*, 351
- ⁶⁷ Lamture, J.B., Iverson, B., Hogan, M.E., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 6483
- ⁶⁸ Miller, T.L., Senkfor, S.I., *Anal. Chem.*, **1992**, *54*, 2022
- ⁶⁹ Xu, Y.-Y., Hemmilä, I., Lövgren, T., *Analyst*, **1992**, *117*, 1061
- ⁷⁰ Förster, T., *Ann. Phys.*, **1948**, *2*, 55
- ⁷¹ Latva, M., Takalo, H., Simberg, K., Kankare, J., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1995**, 995
- ⁷² Hemmilä, I., *Scan. J. Clin. Lab. Invest.*, **1988**, *48*, 389
- ⁷³ Madersbacher, M., Shu-Chen, T., Schwarz, S., Dirnhofner, S., Wick, G., Berger, P., *Clin. Chem.*, **1993**, *39*, 1435
- ⁷⁴ Diamandis, E.P., *J. Immunol. Meth.*, **1992**, *147*, 251
- ⁷⁵ Christopoulos, T.K., Diamandis, E.P., *Anal. Chem.*, **1992**, *64*, 342
- ⁷⁶ Alpha, B., Lehn, J.M., Mathis, G., *Angew. Chem.*, **1987**, *26*, 266
- ⁷⁷ Lopez, E., Chypre, C., Alpha, B., Mathis, G., *Clin. Chem.*, **1993**, *39*, 196
- ⁷⁸ Mathis, G., *Clin. Chem.*, **1993**, *39*, 1953
- ⁷⁹ Mathis, G., *Clin. Chem.*, **1995**, *41*, 1391
- ⁸⁰ Evans, R.F., Brown, H.C., *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 1329
- ⁸¹ Talik, T., Talik, Z., *Rocz. Chem.* **1968**, 2061
- ⁸² *Chem. Abstr.*, **1969**, 114970s
- ⁸³ Suszko, J., Szafran, M., *Rocz. Chem.*, **1965**, *39*, 1045
- ⁸⁴ *Chem. Abstr.*, **1966**, 12637f
- ⁸⁵ Van der Does, L., and den Hertog, H.J., *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1972**, *91*, 1403
- ⁸⁶ Bips, U., Elias, H., Hauröder, M., Kleinhans, G., Pfeifer, S., Wannowius, K.J., *Innorg. Chem.*, **1983**, *22*, 3862
- ⁸⁷ den Hertog, H.J., Combe', W.P., *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1951**, *70*, 581

- ⁸⁸ Takalo, Harri, Pasanen, P., Kankare, J., *Acta Chemica Scandinavica B*, **1988**, 42, 373
- ⁸⁹ Newkome, G.R., Puckett, W.E., Kiefer, G.E., Gupta, V.K., Xia, Y., Coreil, M., Hackney, M.A., *J. Org. Chem.*, **1982**, 47, 4116
- ⁹⁰ Newkome, G.R., Kiefer, G.E., Puckett, W.E., Vreeland, T.J., *J. Org. Chem.*, **1983**, 48, 5112
- ⁹¹ Newkome, G.R., Kiefer, G.E., Xia, Y., Gupta, V.K., *Synthesis*, **1984**, 676
- ⁹² Newkome, G.R., Marston, C.R., *Tetrahedron*, **1983**, 39, 2001
- ⁹³ Offermann, W., Vögtle, F., *Synthesis*, **1977**, 272
- ⁹⁴ Takalo, Harri, Kankare, J., *Acta Chemica Scandinavica B*, **1987**, 41, 219
- ⁹⁵ Ochiai, *Pharma. Bull.* **1954**, 2, 131
- ⁹⁶ B. Schmidt, D. K. Ehlert, *Tetradron Lett.*, **1998**, 39, 3999
- ⁹⁷ Czernecki, S., Georgoulis, C., Provelenghiou, * C., *Tetrahedron Lett.*, **1976**, 39, 3535
- ⁹⁸ Renaud, F., Piguet, C., Bernardinelli, G., Bünzli, J-C G., Hopfgartner, G., *Chem. Eur. J.*, **1997**, 3, 1660
- ⁹⁹ Riegel, Zwiilmeyer, *Organic Synthesis*, **1943**, Vol II, 126
- ¹⁰⁰ Gordon, A., Katritzky, * A.R., Roy, S.K., *J. Chem.Soc. (B)*, **1968**, 556
- ¹⁰¹ Promotionsarbeit K. Kühn, Universität Hannover, 1998
- ¹⁰² Ruano, *Tetradron Lett.*, **1996**, 37, 4081
- ¹⁰³ Guttman, S., Boissonnas, R.A., *Helv.*, **1958**, 44, 1852
- ¹⁰⁴ Jackson, R.F.W., *J. Org. Chem*, **1992**, 57 (12), 3397
- ¹⁰⁵ Bodansky & Bodansky, *The Practice of Peptide Synthesis*, Springer 1994
- ¹⁰⁶ Moore, J.W., Szelke, M., *Tetrahedron Lett.*, **1970**, 4423
- ¹⁰⁷ König, Geiger, *Chem. Ber.*, **1970**, 70, 797
- ¹⁰⁸ Kurzer, F., Douraghi-Zadeh, K., *Chem. Rev.*, **1967**, 67, 107
- ¹⁰⁹ Mathias, L.J., *Synthesis*, **1979**, 561
- ¹¹⁰ Mitsunobu, O., *Synthesis*, **1981**, 1
- ¹¹¹ Marshall, J.A., Cleary, D.G., *J. Org. Chem*, **1986**, 51 (6), 858
- ¹¹² Corey, E.J., Pyne, S.G., Su, Wei-guo, *Tetrahedron Lett.*, **1983**, 24, 4883
- ¹¹³ Garegg, P.J., Samuelsson, B., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1980**, 2866
- ¹¹⁴ Gair, S., Jackson, R.F.W., Brown, P.A., *Tetrahedron Letters*, **1997**, 38 (17), 3059
- ¹¹⁵ Heck, R.F., *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, 90, 5518
- ¹¹⁶ Heck, R.F., Nolley, J.P., *J. Org. Chem.*, **1972**, 37, 2320

- ¹¹⁷ Mizoroki, T., Mori, K., Ozaki, A., *Bull. Chem. Soc. Japan*, **1971**, *44*, 581
- ¹¹⁸ Heck, R.F., *Pure and Appl. Chem.*, **1978**, *50*, 691
- ¹¹⁹ Heck, R.F., *Acc. Chem. Res.*, **1979**, *12*, 46
- ¹²⁰ Shibasaki, M., Boden, C.D.J., Kojima, A., *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 7371
- ¹²¹ Rawal, V.H., Michoud, C., Monestel, R.F., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 3030
- ¹²² Oppolzer, W., De Vita, R.J., *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 6256
- ¹²³ de Meijere, A., Meyer, F.E., *Angew. Chem.*, **1994**, *106*, 2473
- ¹²⁴ Bumagin, N. A., More, P. G., Beletskaya, I.P. J., *Organomet. Chem.*, **1989**, *37J*, 397
- Casalnuovo, A. L., Calabrese, J.C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *772*, 4324
- Genet, J.P., Blart, E., Savignac, M., *Synlett*, **1992**, 715
- Jeffery, T., *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 3051
- ¹²⁵ Hong, C.Y., Kado, N., Overman, L.E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 11028
- ¹²⁶ Spencer, A., *J. Organometallic Chem.*, **1983**, *258*, 101
- ¹²⁷ Huffman, W. F., Holden, K. G., Buckley, T. F., Gleason, J. G., Wu, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2353.
- ¹²⁸ March, J., *Advanced Organic Chemistry*, Wiley & Sons: New York, **1992**, 449
- ¹²⁹ Stephans, R.D., Castro, C.E, *J. Org. Chem.*, **1963**, *28*, 3313
- ¹³⁰ (a) Sonogashira, K., Tohda, Y., Hagihara, N., *Tetrahedron Lett.* **1975**, 4467
- (b) Sonogashira, K. *In Comprehensive Organic Synthesis*, Trost, B. M.; Fleming, I., Eds., Pergamon Press: New York, **1991**, *Vol. 3*, 521
- ¹³¹ Greenwood, N.N., Earnshaw, A., *Chemistry of the Elements*, Pergamon Press: New York, **1990**, 318
- ¹³² (a) Suzuki, A., *Acc. Chem. Res.* **1982**, *15*, 178
- (b) Suzuki, A., *Pure & Appl. Chem.* **1985**, *57*, 1749
- (c) Suzuki, A., *ibid.* **1986**, *58*, 629
- (d) Suzuki, A. *ibid.* **1991**, *63*, 419
- (e) Suzuki, A., *Organic Synthesis in Japan, Past, Present, and Future*, Tokyo Kagaku Dozin: Tokyo, **1992**, S. 441
- (f) Miyaura, N., Yamada, K., Suginome, H.; Suzuki, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 972;
- (g) Miyaura, N., Ishiyama, T.; Sasaki, H., Ishikawa, M., Satoh, M., Suzuki, A. *ibid.* **1989**, *111*, 314.
- ¹³³ (a) Stille, J.K., *Pure & Appl. Chem.* **1985**, *57*, 1771
- (b) Stille, J.K., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 508
- (c) Mitchell, T. N., *Synthesis* **1992**, 803

- ¹³⁴ Scott, W.J., Cnsp, G.T., Stille, J.K. J., *Am.Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4630
- ¹³⁵ Ritter, K., *Synthesis*, **1993**, 735
- ¹³⁶ (a) Dunn, M.J., Jackson, R.F.W.; Pietruszaka, J., Wishart, N.; Ellis, D., Wythes, M.J., *Synlett*, **1993**, 499
- (b) Fraser, J.L., Jackson, R.F.W., Porter, B., *Synlett*, **1994**, 379
- (c) Dow, R.L., Bechele, B.M., *Synlett*, **1994**, 293
- (d) Ye, B., Burke, Jr. R., *J. Org. Chem*, **1995**, *60*, 2640
- (e) Dunn, M.J., Jackson, R.F.W., Pietruszaka, J., Turner, D., *J. Org. Chem*, **1995**, *60*, 2210
- (f) Jackson, R.F.W., Turner, D., Block, M.H., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 2207
- (g) Ye, B., Otaka, A., Burke, Jr. R., *Synlett*, **1996**, 459
- (h) Morin, C., Malan, C., *Synlett*, **1996**, 167
- (i) Jackson, R.F.W., Turner, D., Block, M.H., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, 865
- (j) Gair, Susan, Jackson, Richard F.W., Brown, Paul A., *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 3059
- (k) Walker, M.A., Kaplita, K.P., Chen, T., King, H.D., *Synlett*, **1997**, 169
- (l) Jung, Michael E., Starkey, Laurie S., *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 8815
- (m) Jackson, Richard F. W., Moore, Rebecca J., Dexter, Charles S., *J. Org. Chem*, **1998**, *63*, 7875
- (n) R. F. W. Jackson, Joanne L. Fraser, Neil Wishar; Barry Porter, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1998**, 1903
- ¹³⁷ AchyuthaRao, S., Knochel, P., *J. Org. Chem.*, **1991**, *56*, 4591
- ¹³⁸ March, J., *Advanced Organic Chemistry*, Wiley & Sons: New York, **1992**, 929
- ¹³⁹ Nakamura, E., Sekiya, K., Kuwajima, I., *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *29*, 337
- ¹⁴⁰ Lindley, J., Mason, T. J., *Chem. Soc. Rev.*, **1987**, *16*, 275-311.
- Abdulla, R. F., *Aldrichim. Acta*, **1988**, *21*, 31-42
- Einhorn, C., Einhorn, J., Luche, J.-L., *Synthesis*, **1989**, 787-813.
- ¹⁴¹ Knochel, P., Yeh, M. C. P., Berk, S. C., Talbert, *J. J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2390
- Knoess, H. P., Furlong, M. T., Rozema, M. J., Knochel, P., *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5974
- ¹⁴² Rieke Metals, Inc., Lincoln Nebraska
- ¹⁴³ Webes, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 143
- ¹⁴⁴ Olah, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 1247
- ¹⁴⁵ Hogan, M.E., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 6483
- ¹⁴⁶ Reanaud, F., Piguet, C., Bernadinelli, G., Bünzli, J-C.G., Hopfgartner, G., *Chem. Eur. J.*, **1997**, *10*, 1646