

Curcumin und synthetische Derivate als umgebungssensitive Fluoreszenzsonden



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Jens Kruse

Kiel 2003

Referent/in:.....Prof. Dr. W. Hänsel

Korreferent/in:.....Prof. Dr. D. Heber

Tag der mündlichen Prüfung:.....10., 12. und 18. Februar 2003

Zum Druck genehmigt:.....19. Februar 2003

Prof. Dr. W. Depmeier
(Dekan)

1	Einleitung	1
1.1	Curcumin	1
1.1.1	Vorkommen und Gewinnung	1
1.1.2	Pharmakodynamik und Pharmakokinetik	2
1.1.3	Photochemische und photophysikalische Eigenschaften	7
1.2	Fluoreszenzsonden	10
1.2.1	Allgemeines	10
1.2.2	Solvatochromie	11
1.2.3	Umgebungssensitive Fluoreszenzsonden	13
1.3	Fluoreszenzpolarisation	17
2	Problemstellung	20
3	Synthesen	22
3.1	Darstellungsmöglichkeiten	22
3.2	Syntheseweg	23
4	Material und Methoden	25
4.1	Material	25
4.1.1	UV/VIS-Spektroskopie	25
4.1.2	Fluoreszenz-Spektroskopie	25
4.1.3	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	25
4.1.4	Sonstige Geräte	25
4.1.5	Chemikalien	25

4.2	Stabilitätsuntersuchungen	27
4.2.1	Stabilität von Curcuminoiden in Phosphatpuffer pH 7,4	27
4.2.2	Stabilität von Curcuminoiden in Phospholipid-Liposomensuspensionen	28
4.2.3	Stabilität von Curcuminoiden in SPP pH 7,4 mit Rinderserumalbumin	29
4.3	Solvatochromie der untersuchten Verbindungen :	
	Absorptionsspektren	29
4.3.1	Aufnahme der Absorptionsspektren	30
4.4	Solvatochromie der untersuchten Verbindungen :	
	Emissionsspektren	30
4.4.1	Aufnahme der Emissionsspektren	30
4.5	Berechnung der Differenz der Dipolmomente im Grund- und ersten angeregten Zustand	31
4.6	Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute	33
4.6.1	Durchführung der Messungen	34
4.7	Fluoreszenzverhalten in Liposomenlösung	35
4.7.1	Aufnahme der Fluoreszenzspektren in Liposomensuspension	35
4.8	Fluoreszenzverhalten in Rinderserumalbuminlösung	36
4.8.1	Aufnahme der Fluoreszenzspektren in Rinderserumalbuminlösung	37
4.9	Fluoreszenzpolarisation	38
4.9.1	Bestimmung der Anisotropie in Liposomensuspensionen	39
4.9.2	Bestimmung der Anisotropie in Ethanol und Aceton	40
4.10	Bestimmung von Bindungskonstanten einzelner Verbindungen mit Rinderserumalbumin	40
4.10.1	Durchführung des Continuos-Variations-Plot	42

4.11	Lipophiliebestimmung	44
4.11.1	Durchführung der Lipophiliebestimmung mittels RP-HPLC	45
5	Ergebnisse	46
5.1	Stabilitätsuntersuchungen	46
	1,7-Diphenyl-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (1)	47
	5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (4)	
	Bisdesmethoxycurcumin	47
	5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (6)	
	Curcumin	48
	1,7-Bis(4-diethylaminophenyl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (10)	48
5.2	Solvatochromie der untersuchten Verbindungen:	
	Absorptionsspektren	49
	1,7-Diphenyl-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (1)	50
	5-Hydroxy-1,7-bis(<i>p</i> -tolyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (2)	51
	1,7-Bis(4- <i>tert</i> -butylphenyl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (3)	52
	5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (4)	
	Bisdesmethoxycurcumin	53
	5-Hydroxy-1,7-bis(4-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (5)	54
	5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (6)	
	Curcumin	55
	5-Hydroxy-1,7-bis(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (7)	56
	1,7-Bis(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (8)	57
	1,7-Bis(4-dimethylaminophenyl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (9)	58
	1,7-Bis(4-diethylaminophenyl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (10)	59
	5-Hydroxy-1,7-bis(9-julolidinyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (11)	60
	5-Hydroxy-1,7-di-2-naphthyl-1,4,6-heptatrien-3-on (12)	61
5.3	Solvatochromie der untersuchten Verbindungen:	
	Emissionsspektren	62
	5-Hydroxy-1,7-bis(<i>p</i> -tolyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (2)	63

1,7-Bis(4- <i>tert</i> -butylphenyl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (3)	64
5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (4)	
Bisdesmethoxycurcumin	65
5-Hydroxy-1,7-bis(4-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (5)	66
5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (6)	
Curcumin	67
5-Hydroxy-1,7-bis(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (7)	68
1,7-Bis(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (8)	69
1,7-Bis(4-dimethylaminophenyl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (9)	70
1,7-Bis(4-diethylaminophenyl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (10)	71
5-Hydroxy-1,7-bis(9-julolidinyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (11)	72
5-Hydroxy-1,7-di-2-naphthyl-1,4,6-heptatrien-3-on (12)	73
5.4 Berechnung der Differenz der Dipolmomente im Grund- und ersten angeregten Zustand	74
5.5 Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute	76
Bestimmung der relativen Fluoreszenzquantenausbeute in Ethanol, Oktanol und <i>n</i> -Hexan	77
5.6 Fluoreszenzverhalten in Liposomensuspension	77
5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (4)	
Bisdesmethoxycurcumin	78
5-Hydroxy-1,7-bis(9-julolidinyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (11)	79
5-Hydroxy-1,7-di-2-naphthyl-1,4,6-heptatrien-3-on (12)	79
5.7 Fluoreszenzverhalten in Rinderserumalbuminlösung	80
5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (6)	
Curcumin	81
1,7-Bis(4-dimethylaminophenyl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (9)	81

5.8	Fluoreszenzpolarisation	82
5.8.1	Bestimmung der Anisotropie in Liposomensuspension	82
5.8.2	Bestimmung der Anisotropie in Ethanol und Aceton	84
5.9	Bestimmung von Bindungskonstanten einzelner Verbindungen mit Rinderserumalbumin	85
	5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (6)	
	Curcumin	86
	5-Hydroxy-1,7-bis(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (7)	87
5.10	Lipophiliebestimmung	88
5.10.1	Lipophiliebestimmung mittels RP-HPLC	88
6	Diskussion	91
6.1	Stabilitätsuntersuchungen der Curcuminoide	91
6.2	Solvatochromieeffekte der untersuchten Verbindungen	93
6.3	Fluoreszenzquantenausbeuten der Verbindungen	100
6.4	Fluoreszenzverhalten in Liposomensuspension und in Rinderserumalbuminlösung	101
6.4.1	Fluoreszenzverhalten in Liposomensuspension	101
6.4.2	Fluoreszenzverhalten in RSA-Lösung	102
6.5	Bestimmung der Bindungskonstanten einzelner Curcuminoide mit Rinderserumalbumin	103
6.6	Fluoreszenzpolarisation	104
6.7	Lipophiliebestimmung	108

7 Zusammenfassung 109

8 Experimenteller Teil 112

8.1 Allgemeine Hinweise 112

8.2 Allgemeine Synthesevorschriften 113

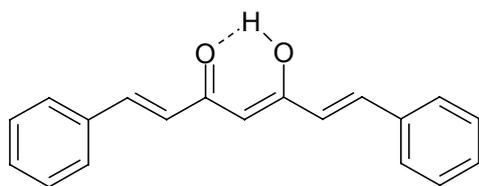
8.3 Verbindungen 114

9 Literaturverzeichnis 123

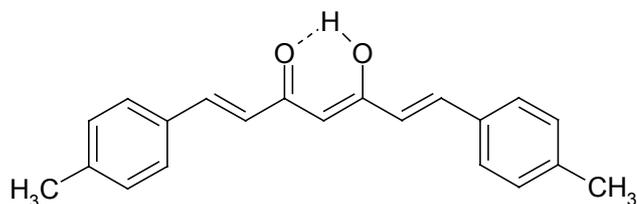
Abkürzungsverzeichnis

Danksagung

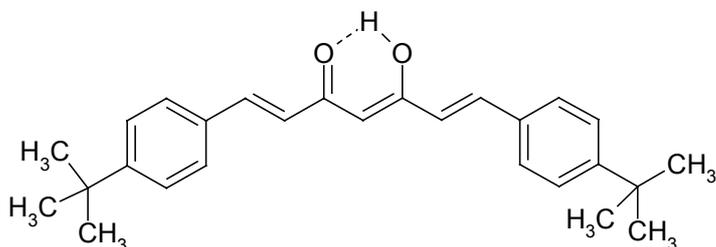
Lebenslauf



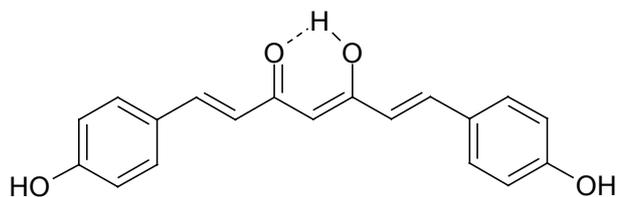
1,7-Diphenyl-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (1)



5-Hydroxy-1,7-bis(*p*-tolyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (2)

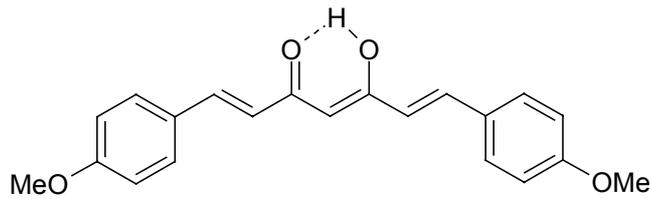


1,7-Bis(4-*tert*-butylphenyl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (3)

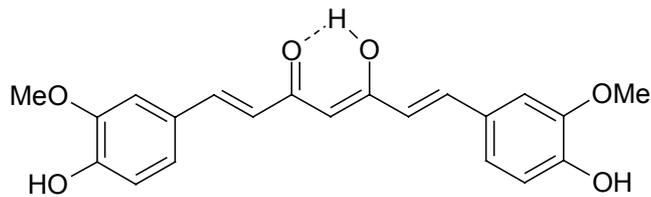


5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (4)

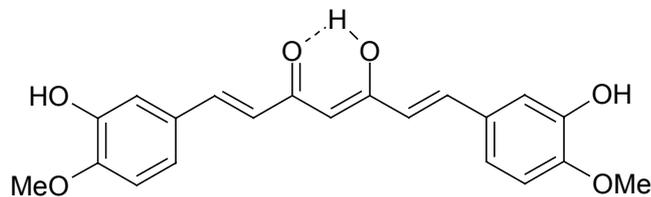
Bisdesmethoxycurcumin



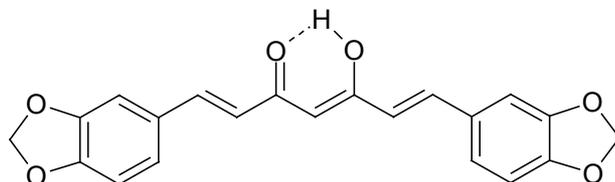
5-Hydroxy-1,7-bis(4-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (5)



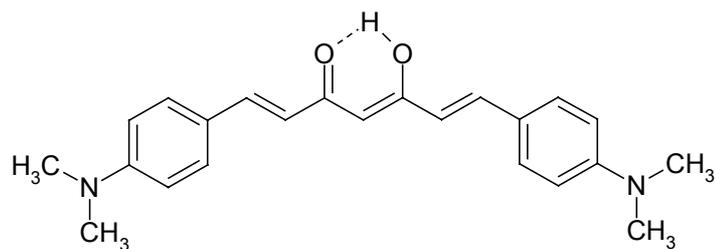
5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (6)
Curcumin



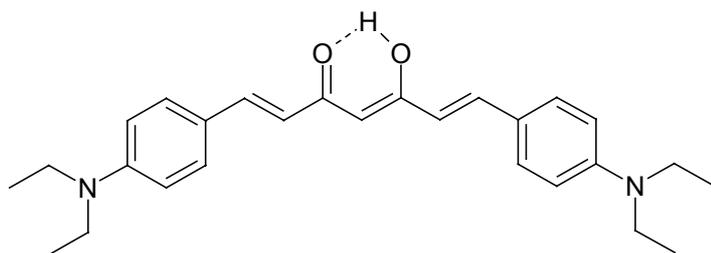
5-Hydroxy-1,7-bis(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (7)



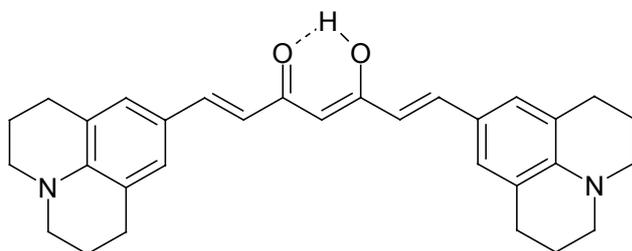
1,7-Bis(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (8)



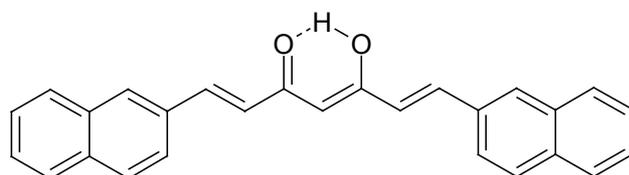
1,7-Bis(4-dimethylaminophenyl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (9)



1,7-Bis(4-diethylaminophenyl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (10)



5-Hydroxy-1,7-bis(9-julolidinyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (11)



5-Hydroxy-1,7-di-2-naphthyl-1,4,6-heptatrien-3-on (12)

1 Einleitung

1.1 Curcumin

1.1.1 Vorkommen und Gewinnung

Curcumin und natürlich vorkommende Curcuminoide sind die wohl auffälligsten, arzneilich wie auch industriell bedeutendsten und daher auch namengebenden Inhaltsstoffe der Gelbwurzel, *Curcuma domestica* Val. (*Curcuma longa* L.) bzw. der Javanischen Gelbwurzel, *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. Beide Pflanzen gehören systematisch zu den Ingwergewächsen (Fam. Zingiberaceae).

Sowohl *C. domestica* wie auch *C. xanthorrhiza* gelten in ihrer Heimat als Kulturpflanze und werden in industriellem Maßstab gezüchtet. Während *C. domestica* überwiegend in Indien angebaut wird, wird *C. xanthorrhiza* bei ähnlicher Kultivierung in Indonesien angebaut, mit Schwerpunkt Java. Bei uns ist, von *Curcuma*-Hybriden abgesehen, die mittlerweile im Gartenfachhandel zu erwerben sind, nur die pflanzliche Droge bekannt. Sie besteht aus dem getrockneten, zerkleinerten Rhizom, welches nach dem Welken der Blätter geerntet und zumeist an Ort und Stelle gebrüht oder kurz abgekocht wird. Die gepulverte Droge, die in ihrer Heimat *Turmeric* genannt wird, findet traditionell nicht nur als Heilmittel, sondern vor allem auch für die Zubereitung von Speisen und bei religiösen Zeremonien Verwendung.

Neben den Curcuminoiden enthalten beide *Curcuma*-Arten ein überwiegend aus Sesquiterpenen bestehendes ätherisches Öl, wobei sich Gehalt und Zusammensetzung deutlich unterscheiden. Während *C. xanthorrhiza* 3-12 % ätherisches Öl enthält, sind es bei *C. domestica* 2-7 % (Wichtl, 2002). Der höhere Gehalt an ätherischem Öl steht möglicherweise in Zusammenhang mit der zeitweise erhöhten arzneilichen Bedeutung von *C. xanthorrhiza*. Das in der letzteren Pflanze im Gegensatz zu *C. domestica* vorkommende Xanthorrhizol ist außerdem ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal für die Analytik beider Pflanzen.

Der Begriff Curcumin steht in der Literatur sowohl für die Reinsubstanz **6** als auch für das in der Pflanze vorkommende Gemisch aus Curcumin **6**, Desmethoxycurcumin und Bisdesmethoxycurcumin **4** (Abb 1.1). Im folgenden ist mit dem Begriff Curcumin immer die Reinsubstanz **6** gemeint. Bezüglich des Gehalts an Curcuminoiden unterscheiden sich wiederum beide Arten. *C. domestica* enthält mit 3-5 % deutlich mehr von diesen typischen Farbstoffen als *C. xanthorrhiza* mit 0,8-2 % (Wichtl, 2002).

Hieraus läßt sich ableiten, daß *C. domestica* überwiegend zur Zubereitung von Gewürzmischungen (Currypulver) und zur industriellen Farbstoffgewinnung dient. Neben den bereits erwähnten Curcuminoiden konnten zahlreiche weitere, ähnlich aufgebaute Verbindungen aus *Curcuma*-Arten oder anderen Zingiberaceen isoliert werden, von denen einige in Abb 1.1 abgebildet sind.

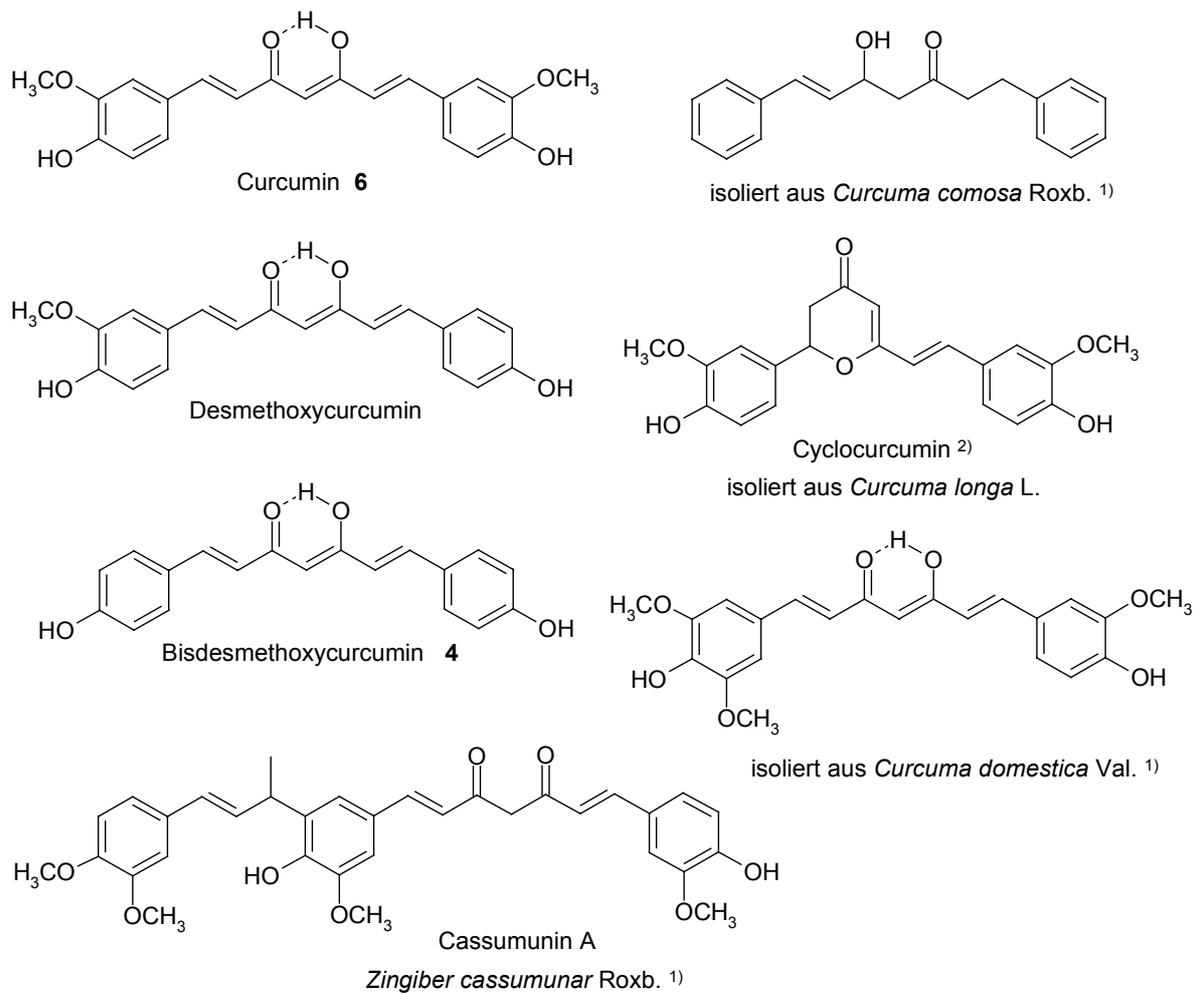


Abb. 1.1: Hauptcurcumine aus *Curcuma domestica* und *C. xanthorrhiza* sowie weitere Inhaltsstoffe aus *Curcuma*-Arten und Zingiberaceen (¹⁾ Hänsel, 1997; ²⁾ Kiuchi et al., 1993)

1.1.2 Pharmakodynamik und Pharmakokinetik

Die Ursprünge der Anwendung von Curcuma, insbesondere von *C. xanthorrhiza*, als Heilmittel liegen tausende von Jahren zurück (Wichtl, 1991). Im Rahmen der sog. Signaturenlehre, bei der Heilpflanzen nach Form, Farbe, Geruch und Geschmack bestimmten Organen zugeordnet und aus Übereinstimmungen gezielte Heilkräfte

abgeleitet werden, wurde Curcuma, wohl aufgrund der gelben Farbe der Droge, bereits mit Galleleiden in Beziehung gesetzt (Hänsel, 1997).

Zur Resorption und Biotransformation von Curcumin **6** liegen mehrere Veröffentlichungen vor. Nach peroraler Verabreichung an Ratten wird ein Großteil unverändert mit dem Fäces ausgeschieden (40-75 %), ein geringer Teil (0-6 %) erscheint im Urin. Im Blut ist Curcumin nicht nachzuweisen. Nach intraperitonealer Gabe finden sich 73 % der verabreichten Dosis im Fäces, 11 % findet man in der Galle. Eine Erklärung für die unvollständige Wiederfindung der verabreichten Curcuminmenge könnte darin liegen, daß Curcumin nach Absorption im Darm bereits in der Darmwand biotransformiert wird (Ammon und Wahl, 1991).

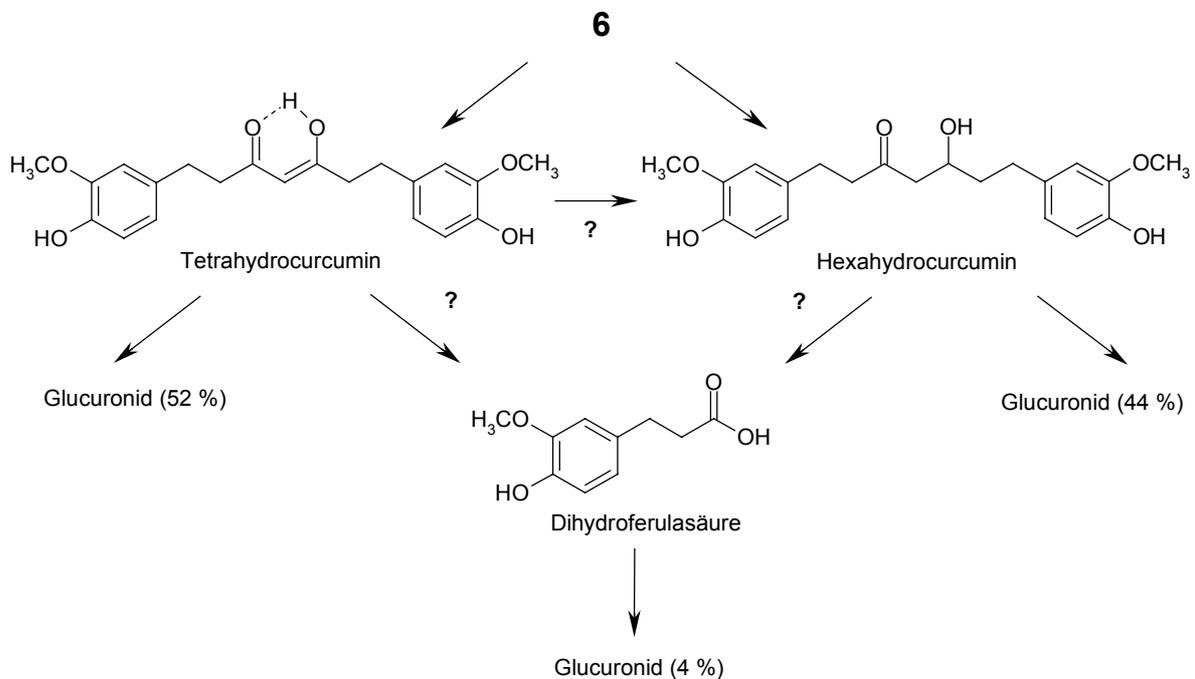


Abb. 1.2: Biotransformation des Curcumins 6 nach i.v.-Applikation (Hänsel, 1997)

Eine Untersuchung der biliär ausgeschiedenen Metabolite in Ratten nach intravenöser Gabe zeigt, daß 95 % der Metabolite glucuronidiert sind. Eine genauere Identifizierung ergibt, daß es sich bei 52 % um Konjugate von Tetra- und bei 44 % um Konjugate von Hexahydrocurcumin handelt. Außerdem konnte Dihydroferulasäure als Metabolit identifiziert werden (Holder et al., 1978). Die qualitative Analyse der nach intraperitonealer Gabe in Mäusen auftretenden Metabolite ergibt Curcumin-, Dihydrocurcumin- und Tetrahydrocurcuminglucuronide sowie nicht-

konjugiertes Tetrahydrocurcumin als Hauptbestandteile (Pan et al., 1999; Lin et al., 2000).

Arzneilich sind sowohl die beiden Arzneipflanzen als auch Einzelkomponenten, hier in der Hauptsache das ätherische Öl und die Curcuminoide, in umfassender Weise beschrieben worden (Ammon und Wahl, 1991; Maiwald und Schwantes, 1991). Hier soll insbesondere auf gezielte Erkenntnisse zur Pharmakodynamik und Pharmakokinetik von Curcumin **6** und Curcuminoiden eingegangen werden. Es sei bereits angemerkt, daß in der Literatur häufig nach wie vor der Begriff Curcumin im Sinne des natürlichen Substanzgemisches aus Curcumin **6**, Desmethoxycurcumin und Bisdesmethoxycurcumin **4** verwendet wird oder aber von käuflich erworbenem Curcumin die Rede ist. Auch bei letzterem handelt es sich nicht zwangsläufig um die Reinsubstanz **6**, wie vorangegangene Untersuchungen bereits belegen konnten (König, 1993; Mamero, 1997).

Curcuma wird seit langem eine cholagoge Wirkung zugeschrieben. Dabei sind sowohl choloretische (die Gallensekretion steigernde) als auch cholekinetische (die Gallenblasenentleerung fördernde) Eigenschaften gut belegt. Zudem werden nach wie vor dem in *C. domestica* enthaltenen Bisdesmethoxycurcumin **4** Choleresehemmende Eigenschaften zugeschrieben. Dies ist jedoch auf eine einzige Quelle zurückzuführen, in der an jeweils drei Versuchstieren die galletreibende Wirkung von Curcumin **6**, Bisdesmethoxycurcumin **4** und einer Mischung (1:1) beider Verbindungen untersucht wurde (Jentzsch et al., 1959). Neuere Studien, in denen die Experimente verifiziert werden sollten, kommen zu einem anderen Ergebnis, wonach alle drei natürlich vorkommenden Hauptcurcumine in etwa derselben Weise choloretisch wirksam sind (Siegers et al., 1997; Deters et al., 1999). Im Zusammenhang mit der cholagogen Wirkung wurde auch der Einfluß von Curcumin **6** auf Cyclosporin-induzierte Veränderungen der Gallentätigkeit untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß 30 min nach Cyclosporin-Gabe intravenös verabreichtes Curcumin **6** den durch Cyclosporin verursachten reduzierten Gallenfluß und die reduzierte Ausscheidung von Bilirubin und Cholesterol wieder erhöhen kann, und daß präventiv verabreichtes Curcumin **6** die hemmende Wirkung von Cyclosporin auf den Gallenfluß und die Bilirubinausscheidung unterdrücken kann. Der Effekt von Cyclosporin auf die Cholesterol-Ausscheidung wird dabei nicht unterdrückt (Deters et al., 2000).

Die antiinflammatorische Wirkung von Curcumin ist vielfach untersucht worden. Eine detaillierte Untersuchung einer indischen Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß Curcumin **6** nach peroraler Gabe bei dem Carrageenin-induzierten Ödem-Test als Modell für einen akuten Entzündungsprozeß in Mäusen und Ratten einen antiinflammatorischen Effekt besitzt (Srimal und Dhawan, 1973). Mit demselben Modell wurde auch die Wirkung von lokal injiziertem Curcumin untersucht. Auch hierbei zeigt Curcumin **6** einen antiinflammatorischen Effekt (Mukhopadhyay et al., 1982). Beide Arbeitsgruppen untersuchten auch den antiinflammatorischen Effekt von Curcumin **6** in Modellen für ein chronisches Entzündungsgeschehen („granuloma pouch“- und „cotton pellet“-Modell). Demnach erweist sich die Substanz als etwa halb so wirksam wie Phenylbutazon (Srimal und Dhawan, 1973). Als Wirkmechanismus wird ein Zusammenwirken mit endogenen kortikoidalen Steroiden postuliert, da gezeigt werden konnte, daß Curcumin **6** in adrenaletomisierten Ratten einen geringeren Effekt besitzt. Neuere Untersuchungen bringen die antiinflammatorische Wirkung von Curcumin **6** in Zusammenhang mit dem Arachidonsäurestoffwechsel. Sowohl eine Hemmung der COX-2-Transkription in mit Gallensäuren und Phorbolestern behandelten humanen gastrointestinalen Epithelzellen (Zhang et al., 1999) als auch eine Hemmung der enzymkatalysierten Oxidation von Mizell-gebundenen Lipiden durch LOX-1 (Began et al., 1998) ist beschrieben. Als weiterer antiinflammatorischer Effekt wurde die blockierende Wirkung von Curcumin **6** auf die Cytokin-vermittelte NF- κ B Aktivierung und die Expression von proinflammatorischen Genen untersucht (Jobin et al., 1999).

Zahlreiche aktuelle Studien befassen sich mit den antikanzerogenen Eigenschaften von Curcumin **6**. In menschlichen leukämischen Zellen (HL-60 Zellen) induziert die Substanz eine Apoptose, vermutlich im Zusammenhang mit reaktiven Sauerstoffspezies und der Beeinflussung von antiapoptotischen Proteinen (Kuo et al., 1996). Über eine Hemmung der Cyclooxygenase-2 (COX-2), die in Krebszellen häufig verstärkt exprimiert wird, kann Curcumin **6** als chemopräventives Agens bei Dickdarmkrebs fungieren (Goel et al., 2001). Ein großer Vorteil von Curcumin **6** für diese Indikation könnte in seiner niedrigen Resorptionsrate und dem damit verbundenen erhöhten Auftreten von nicht metabolisiertem Curcumin im Dickdarm liegen (Ireson et al., 2001). Curcumin-Analoga (z.B. 5-Hydroxy-1,7-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on) (Abb. 1.3) zeigen erstaunlich große

antagonistische Effekte am Androgenrezeptor von Prostatakrebs-Zelllinien und sind somit potentielle Agentien gegen Prostatakrebs (Ohtsu et al., 2002).

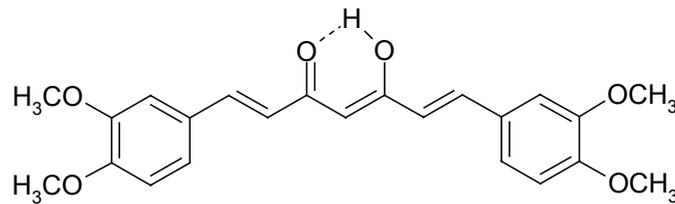


Abb. 1.3: Strukturformel des Curcumin-Analogon 5-Hydroxy-1,7-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (s. Text)

Ein weiteres sehr aktuelles Forschungsgebiet ist die Untersuchung von Curcumin **6** im Zusammenhang mit Morbus Alzheimer. Dabei konnte gezeigt werden, daß Curcumin **6** oxidative Schäden in Alzheimer-transgenen Mäusen reduziert und Zellen vor β -Amyloid-Ablagerungen schützen kann (Lim et al., 2001; Park und Kim, 2002).

Sowohl für die Effekte im Zusammenhang mit der Alzheimer-Krankheit als auch für die antiinflammatorischen und antikanzerogenen Eigenschaften von Curcumin **6** scheinen bei der Mehrzahl der Untersuchungen die antioxidativen Eigenschaften dieser Verbindung verantwortlich zu sein. Auf eine detaillierte Erörterung der antioxidativen Prozesse soll im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen werden, es sollen aber die aktuellen Erkenntnisse kurz zusammengefaßt werden.

Durch eine Untersuchung zur Hemmung der Lipidperoxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch Ascorbinsäure/ Fe^{2+} konnte gezeigt werden, daß Curcumin **6** in einer Konzentration von 25 μM die Lipidperoxidation zu 50 % hemmt und damit ähnlich potent ist wie bekannte chemische Antioxidantien, z.B. *t*-Butylhydroxytoluol (BHT) und *t*-Butylhydroxyanisol (BHA). Als möglicher Mechanismus dieser Hemmung wird eine Chelatisierung von Fe^{2+} durch die Diketo-Gruppe und einer damit verbundenen Hemmung einer Hydroxylradikal-Bildung, analog der antioxidativen Wirkung der Kaffeesäure, vermutet (Pulla Reddy und Lokesh, 1992). Rajakumar und Rao, die ebenfalls die Hemmung der durch Ascorbinsäure/ Fe^{2+} vermittelten Lipidperoxidation untersuchten, widersprechen dieser Theorie und machen die Phenolstruktur des Curcumins für den antioxidativen Effekt verantwortlich. Die phenolische Hydroxylgruppe reagiert dabei mit freien Radikalen unter Bildung eines Phenoxyradikals, was durch den elektronenliefernden Methoxysubstituenten im Ring und die Möglichkeit der Konjugation mit den

Doppelbindungen der Alkylkette noch verstärkt wird (Rajakumar und Rao, 1994). Über eine Reaktion mit dem Methylradikal konnte gezeigt werden, daß Curcumin **6** aus der Diketo-Form heraus als bemerkenswert starker H-Atom-Lieferant reagieren und somit antioxidativ wirken kann, wobei die zentrale Methylengruppe des Moleküls als reaktiver Bereich fungiert (Jovanovicz et al., 1999). Über einen Vergleich der Hemmung der Lipidperoxidation und der Radikalfängereigenschaften von Curcumin **6** und einer Reihe von am Ringsystem substituierten Derivaten konnten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für die antioxidativen Effekte dieser Verbindungen aufgestellt werden. Dabei erwiesen sich die phenolischen Analoga als wesentlich aktiver als die nicht-phenolischen, von denen einige keine Aktivität zeigten. Die höchste antioxidative Aktivität wurde durch die Einführung einer zweiten Methoxygruppe in *ortho*-Position beider Ringe des Curcumins erreicht, die über der von Standard-Antioxidantien wie α -Tocopherol lag (Venkatesan und Rao, 2000). Diese und weitere Erkenntnisse legen den Verdacht nahe, daß in den antioxidativen Eigenschaften von Curcumin **6** eine Reihe von pharmakologischen Effekten begründet sind.

Toxikologische Untersuchungen an Ratten konnten bei peroraler Gabe von bis zu 5g/kg Curcumin keine akute Toxizität der Substanz nachweisen (Wahlstrom und Blennow, 1978). Die Gabe der 1,25- bis 125-fachen Dosis der normalerweise von Menschen konsumierten Menge Curcumin **6** an Ratten zeigte keine Effekte bezüglich Wachstum, Erythrozyten- und Leukozytenzahl oder der Spiegel von Blutbestandteilen wie Hämoglobin, Albumin, Globulin, Serumaminotransferase oder alkalischer Phosphatase (Sambaiah et al., 1982). Dagegen zeigen sich ausgeprägte phototoxische Effekte von Curcumin gegen verschiedene Bakterienarten, aber auch gegenüber Säugetierzellen (Dahl et al., 1994).

Trotz der Vielzahl der Studien über Curcumin steht eine Zunahme der Bedeutung dieser Substanz als Phytotherapeutikum weiter aus. In der Roten Liste 2002 sind 5 Mono- und 14 Kombinationspräparate, zumeist mit Schöllkraut, Pfefferminzblättern oder Artischocke für die Indikationsgebiete Choloagoga und Gallenwegstherapeutika aufgeführt. Im DAC 2001 ist eine Monographie für Curcumawurzelstock, im Europäischen Arzneibuch 2002 eine Monographie für Javanische Gelbwurz aufgeführt.

1.1.3 Photochemische und photophysikalische Eigenschaften

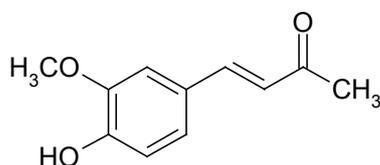
Ebenso wie die Verwendung von Curcuma als Arzneidroge hat auch die Verwendung als Farbstoff eine sehr lange Tradition. So wurde bereits von Marco Polo die

Curcuma-Droge als wichtiger Ersatz für den wesentlich teureren Safran erkannt (Hänsel, 1991). Während Curcuminoide in der Textilfärbung aufgrund ihrer Lichtempfindlichkeit weitestgehend von synthetischen Farbstoffen verdrängt wurden, werden sie zur Färbung von Lebensmitteln nach wie vor eingesetzt. In der für die Bundesrepublik Deutschland geltenden Zusatzstoff-Zulassungsverordnung vom 29.01.1998 sowie in der für die Europäische Gemeinschaft geltenden Richtlinie 94/36/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 30.06.1994 über Farbstoffe, die in Lebensmitteln verwendet werden dürfen, ist „Kurkumin“ unter der EWG-Nummer E 100 als Lebensmittel-Farbstoff zugelassen. Dabei wird auf Angaben bezüglich Verunreinigungen oder Nebenbestandteilen verzichtet. Offen bleibt auch, ob es sich bei E 100 um Curcumin im Sinne der Reinsubstanz **6** oder um das bei der Extraktion aus der Droge erhaltene Gemisch von Curcumin **6**, Desmethoxycurcumin und Bidesmethoxycurcumin **4** handelt.

Die auffällige Abhängigkeit der spektralen und photochemischen Eigenschaften von der unmittelbaren Umgebung (Lösungsmittel, Makromoleküle u.a.) von Curcumin **6** ist vielfach untersucht worden. Werden z.B. Zellen aus dem Blut von Hühnern mit einer wässrigen, nicht fluoreszierenden Curcumin-Lösung behandelt, so ist eine anschließende grünliche Fluoreszenz des in den Zellkernen enthaltenen Chromatins wahrnehmbar, wobei eine Bindung von Curcumin **6** an die DNA des Chromatins angenommen wird (Stockert et al., 1989). Curcumin in Gegenwart von Phosphatidylcholin(PC)-Mizellen zeigt ein charakteristisches Fluoreszenzmaximum bei 490 nm (Began et al., 1998). Weitergehende Untersuchungen mit PC-Mizellen konnten zeigen, daß Absorption und Fluoreszenzintensität einer konstanten Curcuminmenge mit steigender PC-Konzentration bis zu einem Sättigungswert zunehmen. Aufgrund der relativ starken Blauverschiebung des Emissionsmaximums in Gegenwart von PC-Mizellen wird eine Bindung in den hydrophoben Bereichen der Mizellen angenommen (Began et al., 1999). In einer Untersuchung zur Wechselwirkung von Curcumin **6** mit humanem Serumalbumin konnte gezeigt werden, daß die Fluoreszenz des Proteins von Curcumin **6** konzentrationsabhängig gelöscht wird (Pulla Reddy et al., 1999). Wird Curcumin **6** mit steigenden Mengen von β -Cyclodextrin (β -CD) versetzt, so steigt die Absorption von Curcumin **6** konzentrationsabhängig an, wobei das Absorptionsmaximum von 426 nm ohne β -CD nach 431 nm mit β -CD leicht rotverschoben wird. Als Grund für die Verschiebung

wird eine partielle Abschirmung der anregbaren Elektronen bzw. des gesamten Chromophors im Curcumin- β -CD-Komplex angenommen (Tang et al., 2002).

Die Abhängigkeit der Emissionsspektren des Curcumins **6** von Lösungsmiteleeigenschaften wie Dielektrizitätskonstante ϵ_r und Fähigkeit zur Ausbildung von H-Brückenbindungen ist erstmals von Diaz und Peinado beschrieben, aber nicht weiter erörtert worden. Die Autoren stellen fest, daß das Emissionsmaximum beim Wechsel von relativ unpolaren Lösungsmitteln wie Dioxan ($\epsilon_r = 2,21$ bei 25 °C) zu polaren Lösungsmitteln wie *n*-Butanol ($\epsilon_r = 17,1$ bei 25 °C) rotverschoben wird, können aber weder eine allgemeine Korrelation zwischen Lösungsmittelpolarität und Emissionsmaximum noch zwischen Lösungsmittelpolarität und Fluoreszenzintensität erkennen (Diaz und Peinado, 1992). Die Bedeutung der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung in der Keto-Enol-Form des Curcumins **6** für das spektrale Verhalten der Verbindung konnte durch einen Vergleich mit sog. halben Curcumin (4-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-buten-2-on; hC) (Abb. 1.4) unterstrichen werden. Die Fluoreszenzquantenausbeuten und die Verschiebung der Emissionsspektren in Anhängigkeit von der Lösungsmittelpolarität für hC sind um ein bis zwei Größenordnungen kleiner als bei Curcumin **6** (Chignell et al., 1994).



4-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-buten-2-on

Abb. 1.4: „Halbes Curcumin“ (hC)

Es konnte auch gezeigt werden, daß das photochemische Verhalten in bezug auf die Bildung von Singulett-Sauerstoff und anderen reaktiven Sauerstoffspezies von den polaren und protischen Eigenschaften des Lösungsmittels bzw. der unmittelbaren Umgebung (z.B. Zellmembranen) abhängt (Dahl et al., 1994). Genauere Informationen über das intra- und intermolekulare Wasserstoffbindungsvermögen von natürlich vorkommenden und einigen synthetischen Derivaten lieferten Tønnesen et al. durch Untersuchungen der spektroskopischen Eigenschaften in einer Vielzahl von organischen Lösungsmitteln. Demnach nimmt die Keto-Enol-Struktur nicht oder nur schwach an der Bildung von intermolekularen

Wasserstoffbindungen teil, allerdings begünstigt eine starke intramolekulare Wasserstoffbindung in der Keto-Enol-Struktur die Fluoreszenz. Die Untersuchungen ergaben außerdem, daß die phenolischen Gruppen im Curcumin **6** Akzeptor-Eigenschaften der Wasserstoffbindungen zeigen, die des Bisdesmethoxycurcumins **4** hingegen als Donor für Wasserstoffbindungen auftreten (Tønnesen et al., 1995). Die Solvatochromiedaten für Curcumin **6** wurden auch verwendet, um die Differenz der Dipolmomente zwischen Grund- und erstem angeregten Zustand $\Delta\mu$ zu berechnen (Khopde et al., 2000). Für Curcumin wurde eine Differenz $\Delta\mu$ von 6,1 Debye gefunden, was auf eine starke intramolekulare Ladungsübertragung im angeregten Zustand hindeutet. Mit Hilfe von zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen gelang es der gleichen Arbeitsgruppe, Fluoreszenzlebensdauern sowohl für die Keto-Enol-Form (50-350 ps) als auch für die Diketo-Form (500-1180 ps) zu bestimmen.

1.2 Fluoreszenzsonden

1.2.1 Allgemeines

Die Fluoreszenztechnik ist seit langem als empfindliche und vielfältig einsetzbare Untersuchungsmethode für das Verständnis von biologisch-chemischen Vorgängen bekannt, da innerhalb der Lebensdauer des angeregten Zustandes eine Vielzahl von chemischen und physikalischen Wechselwirkungen stattfinden können, ehe es zur Emission von Fluoreszenzlicht kommt. Diese sind z.B. Molekülrotationen, Lösungsmittelumorientierung, Komplexbildung, Protonen-Transfer oder Transfer der Energie des angeregten Zustandes auf einen anderen Chromophor.

Zahlreiche Verfahren wurden entwickelt, die die Eigenfluoreszenz von Proteinen analytisch ausnutzen, welche durch die fluoreszierenden aromatischen Aminosäuren zustande kommt, so z.B. die Verfolgung der bathochromen Verschiebung der Tryptophan-Fluoreszenz als Folge der Assoziation eines Proteins mit Membranen oder die Bestimmung der Rotationskorrelationszeiten von Proteinen durch Messung der zeitabhängigen Fluoreszenz-Depolarisation der Tryptophan-Reste (Galla, 1988). Als Nachteil dieser Untersuchungsmethoden merkt Stryer an, daß die Natur nicht immer den richtigen Chromophor an der richtigen Stelle eines Proteins vorgesehen hat (Stryer, 1968). Daher war die Entwicklung neuer Methoden erforderlich, die auf einer nachträglichen kovalenten Bindung von Reagenzien an Makromoleküle und somit einer gezielten Fluoreszenzmarkierung beruhen (Kanaoka, 1977). Darüber

hinaus spielten auch Fluorophore, die sich durch eine nicht-kovalente Bindung an Makromoleküle auszeichnen, eine immer größere Rolle. Für diese Moleküle wurde der Begriff der Fluoreszenzsonden geprägt. Definitionsgemäß sind Fluoreszenzsonden Verbindungen, die als Ergebnis einer nicht-kovalenten Wechselwirkung mit einem Protein oder einem anderen Makromolekül einer Veränderung in einer oder mehreren Fluoreszenzeigenschaften unterliegen (Edelmann und McClure, 1968).

Einige spektroskopische Charakteristika solcher Sonden, wie z.B. die Fluoreszenzquantenausbeute oder Form, Intensität und Lage des Emissionsmaximums, sind stark abhängig von den Lösungsmittelbedingungen oder der lokalen Umgebung von Makromolekülen, an die die Sonden binden. Auf solche umgebungssensitiven Fluoreszenzsonden (Polaritätssonden) soll im folgenden eingegangen werden. Da es sich bei diesen Verbindungen in der Regel um Donor-Akzeptor-Farbstoffe handelt, die sich dadurch auszeichnen, daß als Folge der Lichtanregung des chromophoren Systems ein Elektronenübergang vom Donor zum Akzeptor stattfindet, sollen zunächst Solvatochromieeffekte als spezielle Eigenschaft dieser Verbindungen näher erläutert werden. Anschließend werden einige konkrete Anwendungsbeispiele anhand bekannter Fluoreszenzsonden vorgestellt.

1.2.2 Solvatochromie

Werden Absorptionsspektren von Farbstoffen in Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität aufgenommen, so kann in Abhängigkeit von der Lösungsmittelpolarität eine Veränderung der Lage, Intensität und/oder Gestalt der Absorptionsbande beobachtet werden. Bei diesem als Solvatochromie bezeichneten Effekt unterscheidet man zwischen positiver und negativer Solvatochromie.

Bei der positiven Solvatochromie wird die Absorptionsbande mit steigender Lösungsmittelpolarität bathochrom, d.h. zu größeren Wellenlängen, bei der negativen Solvatochromie hypsochrom, d.h. zu kleineren Wellenlängen verschoben. Die Erhöhung der Lösungsmittelpolarität wirkt sich auf $\pi \rightarrow \pi^*$ - und auf $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge verschieden aus (Abb. 1.5). Über die Polarisierbarkeit des Lösungsmittels wird der Zustand mit dem größten Dipolmoment stabilisiert. Das

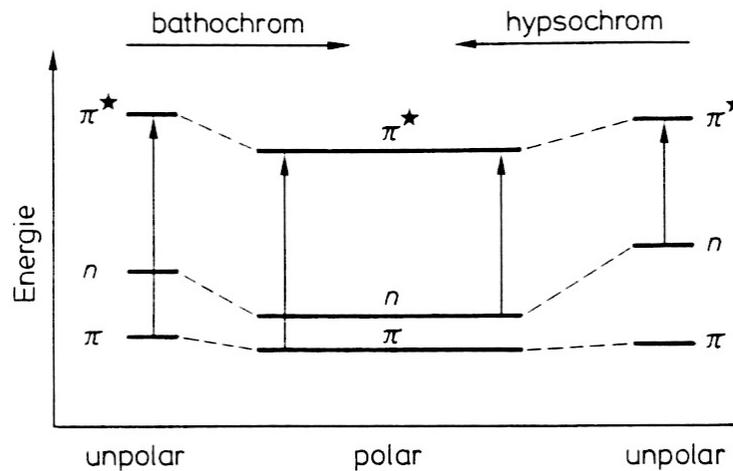


Abb. 1.5: Unterschiedlicher Einfluß der Lösungsmittelpolarität auf $\pi \rightarrow \pi^*$ - und auf $n \rightarrow \pi^*$ -Übergänge und auf die energetische Lage der Molekülorbitale

bedeutet, daß der π^* -Zustand im polaren Medium energetisch stärker abgesenkt wird als der π -Zustand und der $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang durch einen geringeren Energieunterschied gekennzeichnet ist (bathochrome Verschiebung).

Die Lösungsmittelmoleküle besitzen aber auch ein permanentes Dipolmoment, so daß die Elektronen aus den nichtbindenden Orbitalen des gelösten Moleküls eine starke Wechselwirkung mit einem polaren Lösungsmittelmolekül eingehen. In diesem Fall ist die energetische Absenkung des n -Zustandes stärker als die des π^* -Zustandes, so daß der Energieunterschied zwischen n und π^* im polaren Medium größer wird (hypsochrome Verschiebung).

Bei der Fluoreszenzemission ist häufig zu beobachten, daß der Zustand, von dem ein Photon emittiert wird, von dem Franck-Condon-Zustand S_1 energetisch abweicht. Dies ist neben dem Effekt der Schwingungsrelaxation im wesentlichen auf die sog. Lösungsmittelrelaxation zurückzuführen (Abb. 1.6).

Nach dem Franck-Condon-Prinzip erfolgt die Absorption eines Photons wesentlich schneller ($\sim 10^{-15}$ s) als die Bewegung eines Kerns ($\sim 10^{-10}$ s). Durch die Umorientierung von Elektronen aufgrund der Lichtabsorption kommt es zu einer spontanen Änderung des Dipolmomentes. Die meisten umgebungssensitiven Fluoreszenzsonden unterliegen einer intramolekularen Ladungsübertragung, so daß in diesem Fall das Dipolmoment des angeregten Zustandes μ_e größer ist als das Dipolmoment des Grundzustandes μ_g . Als Folge der Änderung des Dipolmomentes durch die Anregung kommt es neben der sog. Schwingungsrelaxation zu einer

Reorganisation der Solvathülle („Lösungsmittelrelaxation“) ($\sim 10^{-10}$ s) und zu einem Zustand geringerer Energie (S_1').

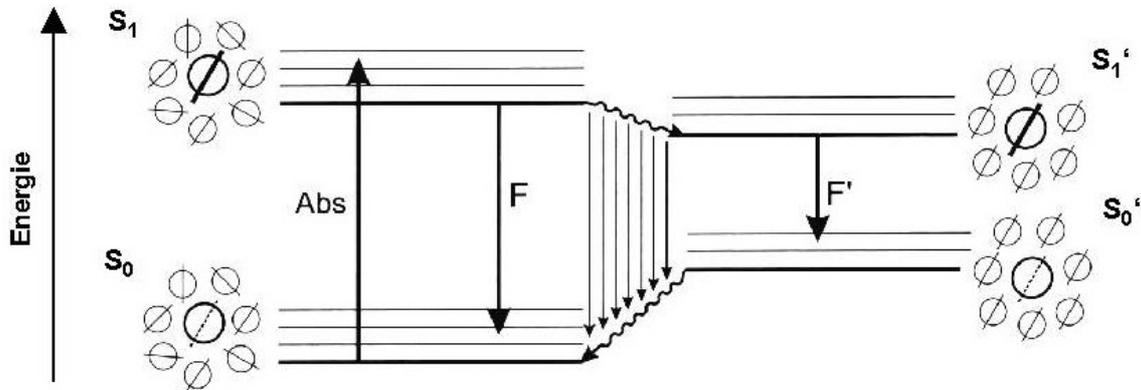


Abb. 1.6: Darstellung des Effektes der Lösungsmittelrelaxation auf ΔV_{Stokes} . S_0 ist der Grundzustand, S_1 ist der angeregte Franck-Condon-Zustand, S_1' ist der angeregte Zustand nach Umorientierung des Lösungsmittels, S_0' der Grundzustand in der umorientierten Solvathülle. F ist die Fluoreszenz ohne Lösungsmittelrelaxation, F' die Fluoreszenz nach Lösungsmittelrelaxation.

Geht nun das Molekül unter Emission eines Photons in den Grundzustand S_0' über ($\sim 10^8$ s), so entspricht die Orientierung der Solvathülle noch der zuvor induzierten. Schließlich gelangt das Molekül durch Schwingungsrelaxation und erneuter Umorientierung der Lösungsmittelmoleküle in den ursprünglichen Grundzustand S_0 .

Die geschilderten Solvationseffekte nehmen mit größer werdender Polarität des Lösungsmittels zu, so daß die Differenz zwischen Absorptions- und Emissionsmaximum wächst. Dieses Phänomen wurde erstmals 1852 von G.G. Stokes beobachtet und beschrieben und wird daher als Stokes-Shift bezeichnet (nach Lakowicz, 1983).

1.2.3 Umgebungssensitive Fluoreszenzsonden

„Newton (...) nahm an, daß alle lumineszierenden Moleküle zwei Pole besitzen wie die eines Magneten (...). Somit besitzen gemäß diesem berühmten Menschen alle lumineszierenden Moleküle eine Polarität, und es ist diese Hypothese, die die Bedeutung von Polarisationserscheinungen bei optischen Phänomenen beschreibt.“ (Monge, Cassini, Bertholon et al., 1822, *Encyclopédie Méthodique. Physique*).

Diese schon sehr früh erkannte Eigenschaft von fluoreszierenden Molekülen trifft insbesondere für sog. umgebungssensitive Fluoreszenzsonden oder auch

Polaritätssonden zu. Solche Verbindungen enthalten zwei funktionelle Gruppen, von denen eine als Elektronen-Donator und die andere als Elektronen-Akzeptor fungiert. Beide Gruppen sind über ein aromatisches System miteinander verbunden und erzeugen einen maximalen Effekt, wenn sie so weit wie möglich voneinander entfernt sind (Weber und Farris, 1979).

Eine der bekanntesten und am besten untersuchten Polaritätssonden ist 1,8-ANS (1-Anilino-8-naphthalinsulfonat (Abb. 1.7) (Weber und Laurence, 1954). Es ist in wäßrigen Lösungen nicht fluoreszierend und fluoresziert stark in Lösungsmitteln geringer Polarität. 1,8-ANS und sein Isomer 2,6-TNS (*N*-(*p*-Tolyl)-2-aminonaphthalin-6-sulfonat) (Abb. 1.6) sind umfassend eingesetzt worden, um Proteine, biologische Membranen und mizellare Systeme zu untersuchen. So konnte gezeigt werden, daß 1,8-ANS stöchiometrisch an einen spezifischen, apolaren Bereich im Apomyoglobin bindet (Stryer, 1965). Verschiedene *N*-Arylamionaphthalinsulfonate wurden eingesetzt, um die Polarität von Proteinbindungsbereichen quantitativ abschätzen zu können (Turner und Brand, 1968; Macgregor und Weber, 1986). Temperaturabhängige und zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen mit 1,8-ANS wurden eingesetzt, um Informationen über die Reorientierung von Lösungsmittelmolekülen und deren Einfluß auf die Absorptions- und Emissionsspektren von Fluorophoren zu erhalten (Chakrabarti und Ware, 1971). Wechselwirkungen mit Phospholipidvesikeln und die Zusammensetzung von Membranen wurden mit Hilfe von 1,8-ANS untersucht (DeThoma et al., 1975; Slavik, 1982).

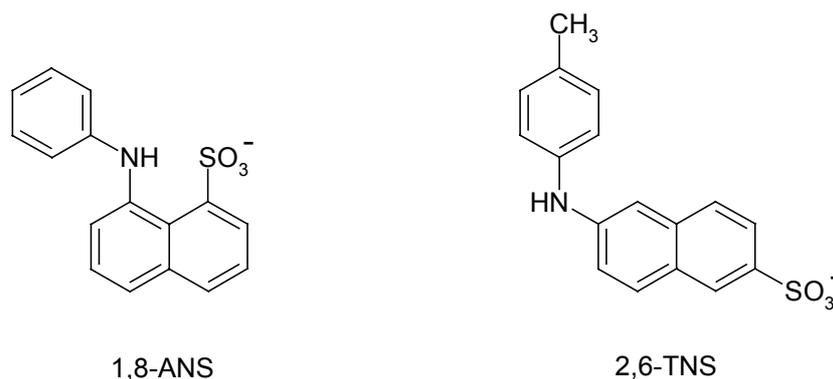


Abb. 1.7: 1,8-Anilidonaphthalinsulfonat (1,8-ANS) und *N*-(*p*-Tolyl)-2-aminonaphthalin-6-sulfonat (2,6-TNS)

Eine herausragende Umgebungssensitivität weist PRODAN (6-Propionyl-2-dimethylaminonaphthalin) auf, welches von Weber und Farris entwickelt wurde und ein

Paradebeispiel für einen Donor-Akzeptor-Farbstoff darstellt (Abb. 1.8) (Weber und Farris, 1979). Der Anstieg des Stokes-Shifts ist extrem groß: von 4300 cm^{-1} in Cyclohexan bis 8640 cm^{-1} in Wasser. Dementsprechend umfangreich ist das Einsatzgebiet dieser Verbindung für die Untersuchung der Polarität chemischer und biologischer Systeme. PRODAN bildet einen Einschlußkomplex mit β -Cyclodextrin, wobei sich das spektrale Verhalten von PRODAN konzentrationsabhängig, aber auch druckabhängig verändert (Crane et al., 2002). In einer Suspension von Phospholipidvesikeln bindet PRODAN an die hydrophoben Bereiche der Doppelschicht und zeigt empfindliche Veränderungen des Fluoreszenzverhaltens bei gleichzeitiger Anwesenheit von Alkoholen (Rottenberg, 1992) oder Cholesterol (Bondar und Rowe, 1999) in der Phospholipiddoppelschicht. Mit Hilfe von PRODAN gelang es, die Oberflächenhydrophobizität von Proteinen zu bestimmen (Alizadeh-Pasdar und Li-Chan, 2000 und 2001), und es konnte die Polarität der Warfarin-Bindungsstelle in humanem Serumalbumin charakterisiert werden (Moreno et al., 1999).

Der Grund für die extreme Empfindlichkeit der Emissionsspektren gegenüber der Umgebungspolarität wird bisweilen kontrovers diskutiert. In dem Originalartikel von Weber und Farris wurde die Differenz zwischen dem Dipolmoment im Grundzustand und dem im angeregten Zustand ($\Delta\mu$) über die Lippert-Beziehung (vgl. Kapitel 4, Gl. 4.1) ermittelt, mit $\sim 20\text{ D}$ angegeben und als der Hauptgrund für die Umgebungssensitivität angeführt. Neuberechnungen von $\Delta\mu$ mehrerer voneinander unabhängiger Arbeitsgruppen führten zu einem wesentlich geringeren Wert von $5 - 7\text{ D}$ (Catalan et al., 1991; Samanta und Fessenden, 2000). Dieser eher moderate Anstieg des Dipolmomentes im Zuge der Anregung kann nicht alleiniger Grund für die extreme Umgebungssensitivität von PRODAN sein, so daß z.B. spezifischen Lösungsmittelleffekten wie Wasserstoffbrückenbindungen eine größere Bedeutung zugeschrieben werden muß (Valeur, 2002).

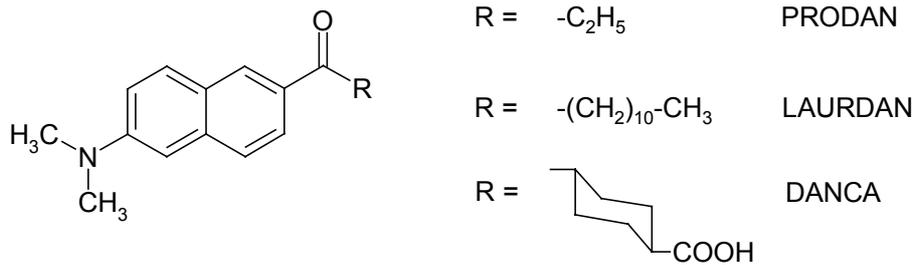


Abb 1.8: 6-Propionyl-2-dimethylaminonaphthalin (PRODAN) und die chemischen Varianten 6-Lauroyl-2-dimethylaminonaphthalin (LAURDAN) und 4-(2-Dimethylamino-6-naphthoyl)-cyclohexancarbonsäure (DANCA)

Neben PRODAN sind auch einige chemische Varianten dieser Verbindung als Polaritätssonden eingesetzt worden. DANCA (4-(2-Dimethylamino-6-naphthoyl)-cyclohexancarbonsäure) (Abb. 1.8) besitzt eine relativ hohe Affinität zu Apomyoglobin. Mit dieser Verbindung konnte die Polarität der Häm-Bindungstasche des Apomyoglobins bestimmt werden (Macgregor und Weber, 1986). LAURDAN (6-Lauroyl-2-dimethylaminonaphthalin) (Abb. 1.8) besitzt eine im Vergleich zu PRODAN um neun Methylengruppen verlängerte Seitenkette und wurde daher insbesondere für Untersuchungen von Phospholipidvesikeln eingesetzt. Dabei konnte gezeigt werden, daß die spektralen Eigenschaften nicht von der Polarität oder Ladung der Kopfgruppen von Phospholipid-Bilayern, sondern von dem Phasenzustand dieser Doppelschichten abhängen. Mit steigender Temperatur wird die Membran fluider und es können geringfügig mehr Wassermoleküle in den hydrophoben Bereich der Membran eindringen. Dieser geringfügige Anstieg der Wasserkonzentration sorgt jedoch für eine deutliche Rotverschiebung des Emissionsmaximums von LAURDAN, so daß das Phasenübergangsverhalten im Sinne einer veränderten Membranfluidität mit Hilfe dieser Fluoreszenzsonde verfolgt werden kann (Zeng und Chong, 1995; Parasassi und Gratton, 1995; Krasnowska et al., 1998).

Es bleibt anzumerken, daß die Polarität eines Lösungsmittels oder eines bestimmten Bereiches eines Makromoleküls nicht anhand eines einzelnen Parameters abzuschätzen ist. Alle Arten von allgemeinen wie speziellen Lösungsmittelleffekten auf das gelöste Molekül müssen in die Überlegungen mit einfließen. Es muß auch und vor allem sichergestellt sein, daß die Lösungsmittelrelaxation vollständig

stattgefunden hat, ehe der angeregte Fluorophor durch Emission eines Photons in den Grundzustand übergeht.

1.3 Fluoreszenzpolarisation

Bei Anregung mit linear polarisiertem Licht ist auch das von einem Fluorophor emittierte Licht polarisiert. Diese Polarisation ist ein Ergebnis der PhotoSelektion von Fluorophoren bezüglich ihrer Orientierung im Vergleich zur Polarisationssebene des Anregungslichtes. Durch eine Vielzahl von Ereignissen kommt es zu einer mehr oder minder starken Depolarisierung des emittierten Lichtes. Die Rotationsdiffusion eines Fluorophors ist ein Hauptgrund dieser Depolarisation. Die Polarisations- oder auch Anisotropiemessungen geben Aufschluß über die durchschnittliche Winkelverschiebung zwischen den elektronischen Feldstärkevektoren von Anregungs- und Emissionsübergangsdipolmoment, die während der Absorption und der nachfolgenden Emission eines Photons auftritt. Diese Winkelverschiebung hängt ab von der Geschwindigkeit und dem Ausmaß der Rotationsdiffusion während der Lebensdauer des angeregten Zustandes. Daraus folgt, daß diese drehenden Bewegungen z.B. von der Viskosität des Lösungsmittels und der Größe und Gestalt des sich drehenden Objektes abhängen (Lakowicz, 1983).

Die Grundlagen der Fluoreszenzpolarisation wurden bereits 1926 von Perrin erarbeitet und von Weber 1952 sowohl theoretisch als auch praktisch entscheidend weiterentwickelt. Die Begriffe Polarisation und Anisotropie werden in der Literatur gleichermaßen verwendet und umschreiben dasselbe Phänomen. Die physikalisch sinnvollere Größe stellt allerdings die Anisotropie dar, da sie die Beiträge aller Polarisationsrichtungen der emittierten Strahlung berücksichtigt (Schmidt, 2000).

Die Anisotropie r kann über die Perrin-Gleichung ausgedrückt werden:

$$r = \frac{r_0}{1 + (\tau_F / \tau_R)} \quad \text{Gl. 1.1}$$

Dabei stellt r_0 die intrinsische Anisotropie in Abwesenheit von Molekülrotation dar, τ_F steht für die Fluoreszenzlebensdauer und τ_R beschreibt die Rotationskorrelationszeit.

Aufgrund der Abhängigkeit der Anisotropie r von der Rotationskorrelationszeit ergibt sich eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten der Fluoreszenzpolarisationsmessungen.

Die Fluoreszenzanisotropie wird mit einem herkömmlichen Fluoreszenzspektrometer gemessen, in dessen Anregungs- und Emissionsstrahlengänge Polarisationsfilter eingebracht werden können (Abb. 1.9). Dabei wird die Meßlösung mit monochromatischer, vertikal polarisierter Strahlung einer definierten Wellenlänge bestrahlt. Die von dem Fluoreszenzmarker emittierte Strahlung wird in vertikaler und in horizontaler Polarisationsrichtung detektiert.

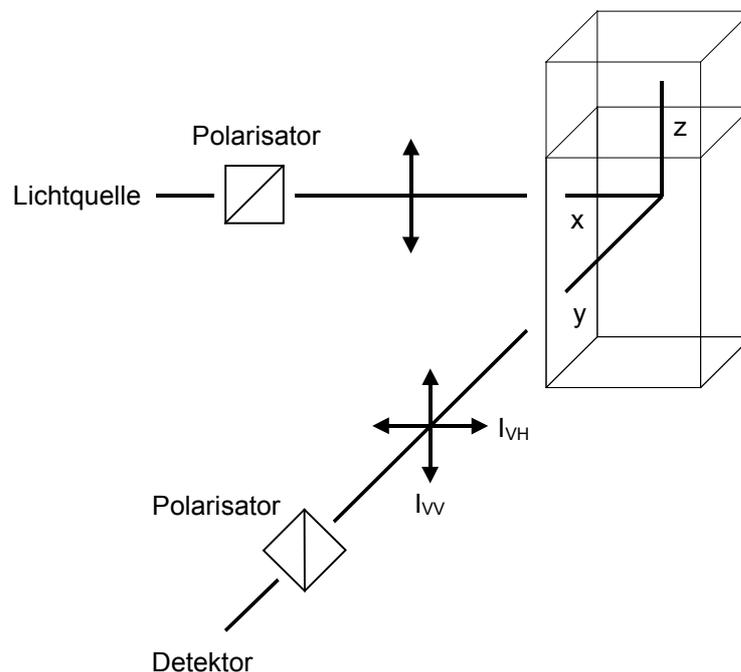


Abb. 1.9: Darstellung der Meßanordnung für Fluoreszenzanisotropiemessungen

Der Anisotropiewert r wird nach Einsetzen der Intensitäten I_{VV} und I_{VH} in Gl. 1.2 unter Einbeziehung des Gerätefaktors G (s. Gl. 1.3) ermittelt:

$$r = \frac{I_{VV} - I_{VH} \cdot G}{2 \cdot I_{VV} + I_{VH} \cdot G} \quad \text{Gl. 1.2}$$

Der sogenannte G -Wert stellt das Empfindlichkeitsverhältnis des Detektorsystems für vertikal und horizontal polarisierte Strahlung dar. Jedes System verfügt über einen spezifischen, konstanten Wert, der vor Beginn der Messung bestimmt werden muß:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

Gl. 1.3

Für das Verständnis der komplexen Theorie der Fluoreszenzpolarisationsmessungen sei an dieser Stelle auf die umfangreiche Literatur verwiesen (Lakowicz, 1983; Schmidt, 2000).

2 Problemstellung

Ausgehend von den Erkenntnissen über die spektralen und photochemischen Eigenschaften des natürlich vorkommenden Curcumins **6**, insbesondere der Empfindlichkeit der Emissionsspektren gegenüber seiner Umgebung, sollten im Substitutionsmuster des Phenylrings variierende Curcuminoide dargestellt und fluorimetrisch charakterisiert werden.

Aufgrund der bekannten Instabilität von Curcumin **6** gegenüber neutralen und alkalischen wässrigen Lösungen sollte auch die Stabilität der dargestellten Curcuminoide in neutraler wässriger Lösung mit und ohne stabilisierende Zusätze wie Proteinen oder Phospholipiden untersucht werden.

Über einen Vergleich mit der bekannten Fluoreszenzsonde 1,6-Diphenylhexatrien (DPH) (Abb 2.1), welches strukturelle Ähnlichkeiten zum Curcumin **6** aufweist, sollte mit Hilfe der Fluoreszenzpolarisationstechnik untersucht werden, inwieweit sich Curcuminoide für Polarisationsmessungen im Hinblick auf die Bestimmung von Mikroviskositäten und Membranfluiditäten eignen.

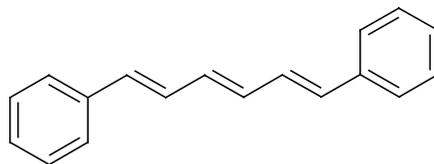


Abb. 2.1: Strukturformel der Fluoreszenzsonde 1,6-Diphenylhexatrien (DPH)

Die bekannte Empfindlichkeit der Emissionsspektren von Curcumin **6** gegenüber seiner Umgebung sollte Ausgangspunkt sein für Untersuchungen der Umgebungs-sensitivität der dargestellten Curcuminoide. Dazu sollten Solvatochromieeffekte in Lösungsmitteln stark unterschiedlicher Polarität und Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen untersucht und auf Basis der gewonnenen Ergebnisse allgemeine sowie spezifische Lösungsmittelleffekte auf das spektrale Verhalten von Curcuminoiden diskutiert werden. Ein Vergleich mit bekannten Polaritätssonden wie PRODAN (Abb. 1.7) und 1,8-ANS (Abb. 1.6) sollte für die Interpretation und Beurteilung der Ergebnisse herangezogen werden.

Mit dem Ziel, eine neue umgebungssensitive Fluoreszenzsonde aus der Verbindungsklasse der Naturstoffe zu entwickeln, sollten die spektralen Verän-

derungen von Curcuminoiden aufgrund der Wechselwirkung mit Makromolekülen und Membranmodellen untersucht werden.

Die Bestimmung der bislang nicht beschriebenen Lipophiliewerte der Curcuminoide sollte die Diskussion im Hinblick auf die Einlagerung dieser Verbindungen in hydrophobe Bereiche von Membranen sowie auf spezifische Wechselwirkungen mit der unmittelbaren Umgebung, wie z.B. hydrophobe Interaktionen, erleichtern.

3 Synthesen

3.1 Darstellungsmöglichkeiten

Die Darstellung von Curcumin **6** gelang erstmals Lampe 1918 in einer fünfstufigen Reaktionsfolge ausgehend von Carbomethoxyferuloylchlorid **I** (3-(3-Methoxy-4-methoxycarbonyloxyphenyl)-2-propensäurechlorid) (Abb 3.1).

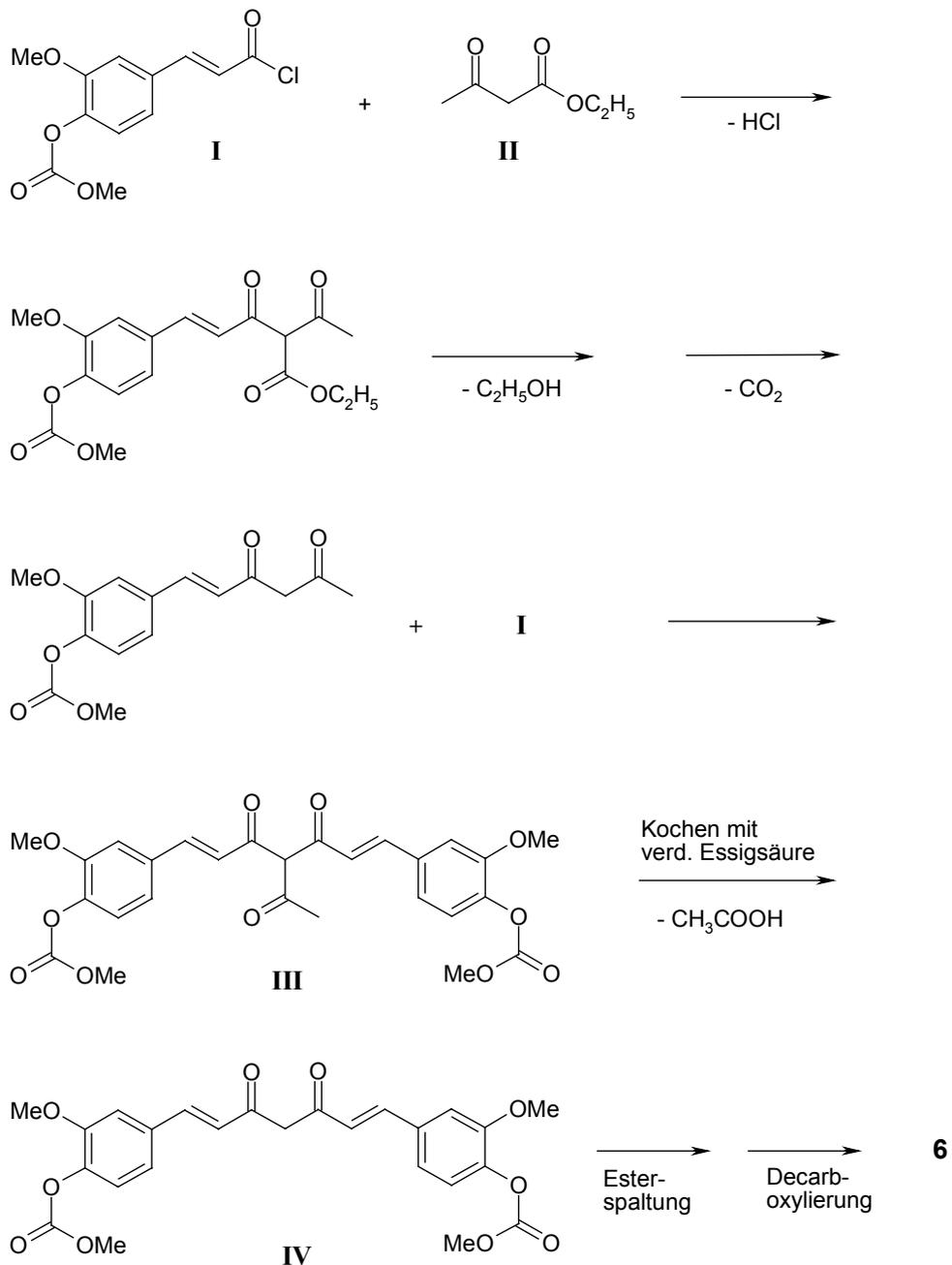


Abb. 3.1: Formelschema zur Darstellung von Curcumin **6** (nach Lampe, 1918)

Nach der Kondensation mit Acetessigester **II** sowie anschließender Verseifung und Decarboxylierung wird erneut mit Carbomethoxyferuloylchlorid **I** umgesetzt. Das Kondensationsprodukt **III**, ein triacyliertes Methan, wird durch Kochen mit verdünnter Essigsäure zu Dicarbomethoxydiferuloylmethan **IV** gespalten. Nach abschließender Esterspaltung und Decarboxylierung erhält man nach Ansäuern Curcumin **6** (Lampe, 1918).

Pavolini beschreibt 1950 als Syntheseweg eine Bisaldolkondensation von 2 mol Vanillin (4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd) mit 1 mol Acetylaceton unter Zusatz von Bortrioxid in der Schmelze (Pavolini, 1950). Dieses Verfahren wurde 1964 von Pabon weiterentwickelt, indem die Umsetzung zur Vermeidung einer Vielzahl von Nebenprodukten in Lösung bei 40 °C unter Basenkatalyse durchgeführt wurde (Pabon, 1964).

Mit einem an die Methode von Pabon angelehnten Verfahren konnte Bauer 1996 eine breite Palette an symmetrischen, in *p*-Position substituierten Curcuminoiden darstellen (Bauer, 1996).

3.2 Syntheseweg

Die Darstellung der Curcuminoide in der vorliegenden Arbeit erfolgte in Anlehnung an das von Pabon entwickelte und von Bauer verbesserte Verfahren, wodurch die Darstellung von symmetrischen Curcuminoiden in einem Reaktionsschritt und in guten Ausbeuten möglich war.

Bortrioxid wird zunächst mit Acetylaceton zu einem Bisacetylacetonato-Bor-Komplex umgesetzt, um eine Knoevenagel-Reaktion an der acideren 3-Position des Acetylacetons zu vermeiden. Durch die Zugabe von überschüssigem Tributylborat kann eine Dissoziation des Komplexes wesentlich verringert werden. In dem gebildeten Komplex sind nur noch die der enolisierten, komplexierenden β -Diketon-Struktur benachbarten Methylgruppen ausreichend CH-acide und in der Lage, mit einer Carbonylkomponente in Form eines aromatischen Aldehyds in einer Tetraaldolkondensation zu einem Biscurcuminoidato-Bor-Komplex zu reagieren. Aufgrund der Alkaliinstabilität einiger Curcuminoide wird der Komplex im wässrig-sauren Medium zur gewünschten Zielverbindung hydrolysiert (Abb. 3.2).

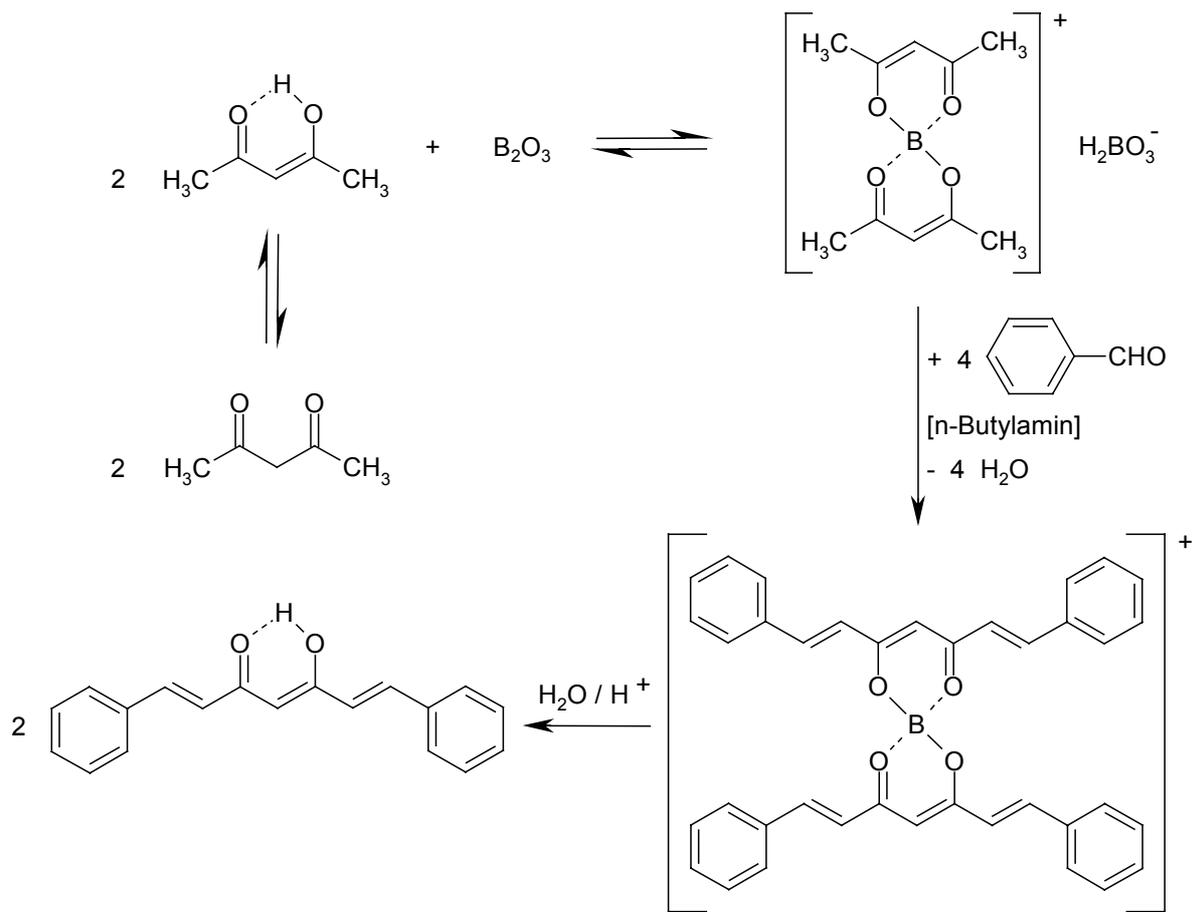


Abb. 3.2: Allgemeiner Syntheseweg der Curcuminoide (nach Pabon, 1964)

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 UV/VIS-Spektroskopie

Photodiodenarray-Spektrometer HP 8452A, Hewlett-Packard
Computersystem HP 9000 (Series 300), Hewlett-Packard
Umwälz-Thermostat F20-C, Julabo

4.1.2 Fluoreszenz-Spektroskopie

LS-50 B Luminescence Spektrometer Perkin Elmer
Epson EL 3s Plus Computer mit Fluorescence Data Manager
Umwälz-Thermostat F20-C, Julabo

4.1.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

WATERS 1525 Binary HPLC Pump
Peltier-Kolonnenthermostat für HPLC und GPC *jetstream*
Säule: Kromasil 100 RP-18 5 μm (60 x 4,6 mm), VDS-Optilab Chromatogra-
phie Technik GmbH
WATERS 486 Tunable Absorbance Detector
WATERS 2475 Multi λ Fluorescence Detector
WATERS BREEZE Auswertesystem

4.1.4 Sonstige Geräte

pH-Meter Metrohm 605
Ultraschallbad Sonorex RK 514, Bandelin

4.1.5 Chemikalien

Aceton	Merck 1.00020.2500
Acetonitril, HPLC Gradient Grade	Roth 8825.1
Butanol	Merck 1988.1000
Butylbenzol	Merck 8.20239.0100
Chloroform	Merck 1.02447.0500

Decylbenzol	Aldrich 03224 DS
DMSO	Merck 1.02931.0500
Dodecylbenzol	Fluka 44180
DPPC	SIGMA P-0763
Ethanol	Merck 1.00980.0500
Ethylbenzol	Merck 8.01372.0100
Heptylbenzol	Lancaster 8237
<i>n</i> -Hexan	Merck 4367
Hexylbenzol	Fluka 52299
Methanol	Merck 1.06018.2500
<i>p</i> -Methylbenzaldehyd	Merck 8.06179.0005
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck 6580.1000
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Fluka 71504
Nonylbenzol	ACROS 151000250
Octylbenzol	Aldrich 17510KU-030
Oktanol	Merck 1.00991.1000
Pentylbenzol	Merck 820965
Propylbenzol	Merck 8.07521.0005
RSA	SIGMA A-6003
Tetrahydrofuran (THF)	Fluka 87368
Toluol	Merck 1.08331.1000
Undecylbenzol	Lancaster 2086

4.2 Stabilitätsuntersuchungen

Die Instabilität von Curcumin **6** in wäßrigen Medien mit $\text{pH} > 7$ ist bekannt und wird in der Literatur verschiedenartig diskutiert. Tønnesen und Karlsen sowie Price schlagen einen einfachen Hydrolysemechanismus für die Zersetzung des Curcumins vor und finden unterschiedliche Reaktionsordnungen sowie unterschiedliche pH-Profile für die Zerfallsreaktion (Tønnesen und Karlsen, 1985a,b; Price 1992). König stellt in ihrer Arbeit den einfachen Hydrolysemechanismus in Frage und führt die Instabilität auf ein zersetzendes Agens zurück (König, 1993). Mamero greift diese Idee in ihrer Arbeit auf, identifiziert Eisenionen als auslösendes Agens der Curcuminzerersetzung und postuliert einen radikalischen Verlauf der Zerfallsreaktion. Die Wahrscheinlichkeit einer radikalischen Zerfallsreaktion wird dadurch unterstrichen, daß durch Strukturvariationen am aromatischen System und der damit verbundenen unterschiedlichen Radikalfängereigenschaften der Curcuminoide die Stabilität deutlich verbessert werden kann (Mamero, 1997).

Die Stabilitätsmessungen in der vorliegenden Arbeit wurden durchgeführt, um die Stabilität der synthetisierten Verbindungen zu charakterisieren und den Einfluß von Zusätzen wie Phospholipiden oder Rinderserumalbumin auf die Stabilität der Verbindungen zu untersuchen. Dadurch sollten Probleme, die durch ungenügende Stabilität der Curcuminoide in den verwendeten wäßrigen Medien hätten auftreten können, von vornherein vermieden werden.

4.2.1 Stabilität von Curcuminoiden in Phosphatpuffer pH 7,4

Die Prüfung auf Stabilität der einzelnen Verbindungen wurde mit Hilfe UV/VIS-spektroskopischer Kinetikmessungen mit einem Dioden-Array-Photometer über einen Zeitraum von 60 min bei 20 °C durchgeführt. Der Absorptionswert der Meßlösung wurde alle 90 s gemessen.

Tabelle 4.1: Zusammensetzung Sörensen-Phosphat-Puffer (SPP) pH 7,4

Puffersalz	g/l	mmol/l
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	9,635	54,2
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,673	12,1

Die Puffersalze werden in Aqua bidest. gelöst und mit 0,1 N HCl oder NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

Zur Herstellung der Probenstammlösungen wurden die Verbindungen in DMSO zur Spektroskopie gelöst und über Verdünnungsschritte auf eine Konzentration von 0,75 mmol/l eingestellt. Von dieser Stammlösung wurden 50 µl zu 2450 µl SPP pH 7,4 pipettiert. Die Meßkonzentration betrug 15 µmol/l. Der DMSO-Anteil in der Meßküvette betrug 2 %.

Der Blindwert wurde mit SPP pH 7,4 mit 2 % DMSO bestimmt. Die Messung wurde unmittelbar nach Zugabe der Probenlösung gestartet, da der Zersetzungsprozeß z.T. sehr schnell einsetzte. Die Angaben zu den Meßwellenlängen bei den einzelnen Verbindungen sind im Ergebnisteil aufgeführt.

4.2.2 Stabilität von Curcuminoiden in Phospholipid-Liposomensuspensionen

Die Prüfung auf Stabilität der einzelnen Verbindungen wurde mit Hilfe UV/VIS-spektroskopischer Kinetikmessungen mit einem Dioden-Array-Photometer über einen Zeitraum von 60 min bei 20 °C durchgeführt. Der Absorptionswert der Meßlösung wurde alle 90 s gemessen.

Die Liposomen wurden nach der sog. Filmmethode hergestellt (Rubas und Schreier, 1991; Junginger et al., 1991): 2,0 ml einer 1 mmol Dipalmitoylphosphatidylcholin(DPPC)-Stammlösung in Chloroform wurden in einen Rundkolben gegeben. Das Lösungsmittel wurde mit Stickstoff abgedampft. Der an der Kolbenwand haftende Phospholipidfilm wurde in 10,0 ml SPP pH 7,4 aufgenommen und 30 min im Ultraschallbad suspendiert. Die DPPC-Konzentration dieser Suspension betrug 200 µmol/l.

Zur Herstellung der Probenstammlösungen wurden die Verbindungen in DMSO zur Spektroskopie gelöst und über Verdünnungsschritte auf eine Konzentration von 0,75 mmol/l eingestellt. Von dieser Stammlösung wurden 50 µl zu 2450 µl Liposomensuspension pipettiert. Die Meßkonzentration betrug 15 µmol/l. Der DMSO-Anteil in der Meßküvette betrug 2 %.

Für die Messung des Blindwertes wurde die Liposomensuspension mit 2 % DMSO versetzt. Die Messungen wurden ohne Vorinkubation unmittelbar nach Probenzugabe gestartet. Die Angaben zu den Meßwellenlängen bei den einzelnen Verbindungen sind im Ergebnisteil aufgeführt.

4.2.3 Stabilität von Curcuminoiden in SPP pH 7,4 mit Rinderserumalbumin

Die Prüfung auf Stabilität der einzelnen Verbindungen wurde mit Hilfe UV/VIS-spektroskopischer Kinetikmessungen mit einem Dioden-Array-Photometer über einen Zeitraum von 60 min bei 20 °C durchgeführt. Der Absorptionswert der Meßlösung wurde alle 90 s gemessen.

Zur Herstellung der Rinderserumalbumin(RSA)-Stammlösung wurden 67 mg RSA in 1,0 ml SPP pH 7,4 gelöst und mit SPP pH 7,4 auf eine Konzentration von 0,75 mmol/l eingestellt. Zur Herstellung der Probenstammlösungen wurden die Verbindungen in DMSO zur Spektroskopie gelöst und über Verdünnungsschritte auf eine Konzentration von 0,75 mmol/l eingestellt.

Zu 2400 µl SPP pH 7,4 wurden 50 µl RSA-Stammlösung und 50 µl Probenstammlösung pipettiert. Die RSA-Konzentration betrug 15 µmol/l, die Meßkonzentration der Substanz betrug ebenfalls 15 µmol/l. Der DMSO-Anteil in der Meßküvette betrug 2 %.

Für die Messung des Blindwertes wurden zu 2400 µl SPP pH 7,4 50 µl RSA-Stammlösung und 50 µl DMSO pipettiert. Die Messungen wurden ohne Vorinkubation unmittelbar nach Probenzugabe gestartet. Die Angaben zu den Meßwellenlängen bei den einzelnen Verbindungen sind im Ergebnisteil aufgeführt.

4.3 Solvatochromie der untersuchten Verbindungen : Absorptionsspektren

Unter dem Begriff Solvatochromie wird die Verschiebung von Absorptionsspektren eines gelösten Moleküls in Abhängigkeit von der Polarität des Lösungsmittels verstanden (vgl. 1.2.2).

Zur Beschreibung der Polarität von Lösungsmitteln gibt es keine universelle physikalische Größe. Die zwei wichtigsten Größen sind dabei das Dipolmoment μ und die Dielektrizitätskonstante ϵ_r (DK). Als Parameter für die Lösungsmittelpolarität diente in der vorliegenden Arbeit die Dielektrizitätskonstante ϵ_r . Sie ist eine stoffspezifische Konstante, die angibt, um wieviel sich die Kapazität eines Kondensators gegenüber dem Vakuum erhöht, wenn zwischen seine Platten ein Nichtleiter (Dielektrikum) eingebracht wird.

Darüber hinaus müßten theoretisch jedoch auch alle molekularen Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel und gelöster Verbindung berücksichtigt werden (u.a. Was-

serstoffbrückenbindungen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Dipol-induzierter Dipol-Wechselwirkungen). Die DK ist also nur eine ungefähre Größe, da sie in unmittelbarer Umgebung des gelösten Moleküls kleiner ist als im isotropen Lösungsmittel. Der Grund dafür liegt darin, daß die Dipole der Lösungsmittelmoleküle in der Solvathülle weniger frei in ihrer Orientierung sind als zwischen zwei Kondensatorplatten (Beinhoff, 2002).

4.3.1 Aufnahme der Absorptionsspektren

Die Absorptionsspektren der Verbindungen **1-12** wurden mit Hilfe UV/VIS-spektroskopischer Messungen mit einem Dioden-Array-Photometer aufgenommen. Alle Messungen wurden bei 20 °C durchgeführt.

Als Lösungsmittel wurden Methanol, Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan gewählt. Die Dielektrizitätskonstanten als Parameter für die Lösungsmittelpolaritäten sind im Ergebnisteil aufgeführt.

Für die Herstellung der Probenstammlösungen wurden die Verbindungen in THF gelöst und über Verdünnungsschritte auf eine Konzentration von 0,5 mmol/l eingestellt. THF ist im Gegensatz zu DMSO mit allen Lösungsmitteln, in denen Absorptionsspektren der Verbindungen aufgenommen werden sollten, mischbar. Zu 2450 µl des jeweiligen Lösungsmittels wurden 50 µl der Probenstammlösung gegeben. Die Meßkonzentration betrug 10 µmol/l, der THF-Anteil in der Meßküvette betrug 2 %.

Für die Messung des Blindwertes wurde das jeweilige Lösungsmittel mit 50 µl THF versetzt. Die Angaben zu den Meßwellenlängen bei den einzelnen Verbindungen sind im Ergebnisteil aufgeführt.

4.4 Solvatochromie der untersuchten Verbindungen : Emissionsspektren

4.4.1 Aufnahme der Emissionsspektren

Die Aufnahme der Emissionsspektren erfolgte mit Hilfe fluoreszenzspektroskopischer Messungen mit einem Lumineszenzspektrometer der Firma Perkin-Elmer. Alle Fluoreszenzmessungen wurden bei 20 °C durchgeführt. Die Spektren wurden nicht korrigiert.

Die Fluoreszenzspektren der Verbindungen wurden in den gleichen Lösungsmitteln wie bei der Aufnahme der Absorptionsspektren (4.3.1) gemessen. Es wurde

zunächst ein Emissionsspektrum der einzelnen Verbindungen in den verschiedenen Lösungsmitteln aufgenommen. Als Wellenlänge des Anregungsmonochromators wurde das Maximum des jeweiligen Absorptionsspektrums der einzelnen Verbindungen in den verschiedenen Lösungsmitteln gewählt. Anschließend wurde ein Anregungsspektrum aufgenommen. Die Wellenlänge des Emissionsmonochromators ergab sich aus dem Maximum des zuvor aufgenommenen Emissionsspektrums. Für die Herstellung der Probenstammlösungen wurden die Verbindungen in THF gelöst und anschließend weiter verdünnt. Die Meßkonzentrationen mußten in Abhängigkeit sowohl von der Verbindung als auch vom jeweiligen Lösungsmittel unterschiedlich gewählt werden, da es zu sehr großen Unterschieden hinsichtlich der Fluoreszenzintensitäten kam. Die Angaben zu den Meßwellenlängen bei den einzelnen Verbindungen sind im Ergebnisteil aufgeführt.

4.5 Berechnung der Differenz der Dipolmomente im Grund- und ersten angeregten Zustand

Anhand der Lösungsmittelabhängigkeit des Stokes-Shifts $\Delta\nu_{\text{Stoke}}$ kann die Differenz der Dipolmomente im Grund- und ersten angeregten Zustand $\Delta\mu$ berechnet werden. Die von Lippert aufgestellte Beziehung Gl. 4.1 wurde nach dem Onsager-Modell in ihrer einfachsten Form ermittelt (Lippert, 1957; Onsager, 1936):

$$\Delta\nu = \frac{2 \cdot \Delta f}{h \cdot c \cdot a^3} \Delta\mu^2 + k \quad \text{Gl. 4.1}$$

In Gl. 4.1 ist $\Delta\nu$ die Differenz zwischen Absorptions- und Emissionsmaximum, h die Planck-Konstante, c die Lichtgeschwindigkeit und a der Onsager-Radius. Die Konstante k berücksichtigt die Empfindlichkeit des gelösten Moleküls gegenüber der Lösungsmittelpolarität. Der Lösungsmittelparameter Δf berücksichtigt sowohl die Dielektrizitätskonstante ϵ_r als auch den Brechungsindex n des Lösungsmittels und kann bei Kenntnis der beiden Größen berechnet werden nach:

$$\Delta f = \frac{\epsilon_r - 1}{2\epsilon_r + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad \text{Gl. 4.2}$$

Diese Überlegungen basieren auf dem Onsager-Modell, nach welchem sich das Molekül in einem isotropen und homogenen Dielektrikum befindet. Der Hohlraum wird dabei zunächst als eine Kugel mit dem Radius a betrachtet, in deren Mittelpunkt ein punktförmiges Dipolmoment angenommen wird. Diese Näherung ist sicherlich im allgemeinen nur schlecht erfüllt. Als Modell sollte vielmehr ein Ellipsoid mit getrennten Ladungen betrachtet werden, das die tatsächliche Form und Ladungsverteilung besser widerspiegelt. Von Liptay wurde ein solches Modell diskutiert, worauf an dieser Stelle jedoch nur verwiesen sei (Liptay, 1965). Die Praxis zeigt, dass mitunter Berechnungen der Länge, Höhe und Breite des Chromophors mittels AM1-Rechnungen die Realität recht gut wiedergeben (Görlitz, 1997). Dabei wird wir angenommen, daß das Volumen des π -Systems und die zugehörige Solvathülle das gesuchte Wechselwirkungsvolumen darstellen (Lippert, 1956). Die Kugelradien, die sich aus den berechneten Volumina ergeben, können dann für die Berechnung von $\Delta\mu$ verwendet werden.

Die praktische Bestimmung von $\Delta\mu$ erfolgt mit Hilfe der Lippert-Auftragung. Dazu werden die Differenzen von Absorptions- und Emissionsmaximum gegen den Lösungsmittelparameter Δf für unterschiedlich polare Lösungsmittel aufgetragen. Die Steigung b der Geraden entspricht dem Ausdruck $(\Delta\nu/\Delta f - k)$. Einsetzen von b in Gl. 4.1 und umstellen der Gleichung ergibt (vgl. Lakowicz, 1983):

$$\Delta\mu^2 = \frac{b}{2} \cdot h \cdot c \cdot a^3 \quad \text{Gl. 4.3}$$

Somit läßt sich $\Delta\mu$ berechnen nach:

$$\Delta\mu = \sqrt{\frac{b}{2} \cdot h \cdot c \cdot a^3} \quad \text{Gl. 4.4}$$

Nicht immer ergibt die Auftragung von $\Delta\nu$ gegen Δf einen linearen Zusammenhang. Spezifische Lösungsmittelleffekte wie etwa die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Sonde und Lösungsmittelmolekül bewirken häufig eine nichtlineare Lippert-Auftragung. Die Ermittlung der Geradensteigung b sollte dann anhand der Solvatochromiedaten für Lösungsmittel erfolgen, bei denen solche

spezifischen Effekte wesentlich geringer sind oder ausgeschlossen werden können (Lakowicz, 1983).

4.6 Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute

Wird ein Molekül durch die Absorption elektromagnetischer Strahlung in den angeregten Zustand überführt, so kann die anschließende Desaktivierung in Abhängigkeit der Übergangsraten strahlend oder strahlungslos erfolgen. Der Anteil der Fluoreszenz an den verschiedenen Desaktivierungsprozessen des angeregten Zustandes wird durch die Fluoreszenzquantenausbeute Q_F ausgedrückt (Galla, 1988)

Obwohl es in der Literatur zahlreiche hervorragende Bücher und Übersichtsartikel über die praktischen Aspekte von Fluoreszenzmessungen gibt, findet man vergleichsweise wenig Literatur, die sich explizit mit der Vorgehensweise bei der Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute beschäftigt. Darüber hinaus findet man für identische Experimente von Autor zu Autor unterschiedliche Angaben zur Fluoreszenzquantenausbeute bestimmter Substanzen. Fery-Forgues und Lavabre weisen darauf hin, daß die in der Literatur zitierten Fluoreszenzquantenausbeuten mit einem relativen Fehler von mindestens 10 % behaftet sind (Fery-Forgues und Lavabre, 1999).

Für die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute einer Substanz in Lösung ist die Bestimmung der relativen Quantenausbeute die Methode der Wahl (Parker und Rees, 1960). Dabei wird die Quantenausbeute einer zu untersuchenden Verbindung (x) mit der einer Standardverbindung (s) über folgende Gleichung in Beziehung gesetzt:

$$Q_{F(x)} = \left(\frac{A_s \cdot F_x \cdot n_x^2}{A_x \cdot F_s \cdot n_s^2} \right) Q_{F(s)} \quad \text{Gl. 4.5}$$

Dabei ist Q_F die Fluoreszenzquantenausbeute, A die Absorption bei der Anregungswellenlänge, F die Fläche unter der korrigierten Emissionskurve und n der Brechungsindex der verwendeten Lösungsmittel.

Ein Emissionsspektrum erhält man gewöhnlich durch Bestrahlung einer Probenlösung bei konstanter Anregungswellenlänge und Registrierung der Emissionsintensität in Abhängigkeit von der Emissionswellenlänge. Aus diesem

„scheinbaren“ wird ein „wahres“ Emissionsspektrum, wenn der Empfindlichkeitsfaktor der Kombination aus Monochromator und Photomultiplier berücksichtigt und das Spektrum entsprechend korrigiert wird (Parker und Rees, 1960).

In den Empfindlichkeitsfaktor $S(\lambda)$ gehen die wellenlängenabhängigen Empfindlichkeitsschwankungen des Photomultipliers (d.h. des Detektors) $P(\lambda)$ sowie die Veränderungen der Bandbreite $B(\lambda)$ und Transmission des Monochromators $L(\lambda)$ mit der Emissionswellenlänge ein (Lakowicz, 1983):

$$S(\lambda) = P(\lambda) B(\lambda) L(\lambda) \qquad \text{Gl. 4.6}$$

Der Empfindlichkeitsfaktor ist proportional zur Intensität des Detektorsignals, wenn die Intensität der Strahlungsquelle ebenfalls konstant ist. Da die Form eines Emissionsspektrums unabhängig von der Anregungswellenlänge ist, kann bei Verwendung der gleichen Anregungswellenlänge für Probe und Standard eine konstante Strahlungsintensität erzeugt werden. Teilt man nun wellenlängenabhängig die Fluoreszenzintensitäten durch das Detektorsignal, so erhält man das korrigierte Emissionsspektrum.

Zur Bestimmung des Detektorsignals bringt man eine Streuplatte und einen Strahlenabschwächer (Attenuator 3,5 %) in den Probenraum des Fluorimeters und fährt den Anregungs- und Emissionsmonochromator synchron über den Bereich von 250 bis 400 nm. Anschließend wird ein Emissionsspektrum von Chininsulfat in 0,1 M Perchlorsäure und ein Emissionsspektrum von 0,1 M Perchlorsäure jeweils über den Bereich von 400 bis 630 nm aufgenommen. Die Gerätesoftware ermittelt ein Emissionskorrektur-Spektrum, mit dessen Hilfe alle nachfolgend aufgenommenen Emissionsspektren korrigiert werden können (Perkin Elmer LS 50B User's Manual).

4.6.1 Durchführung der Messungen

Als Standardsubstanz diente Chininsulfat mit einer bekannten Fluoreszenzquantenausbeute von 0,54 in 0,5 M H_2SO_4 . Zur Herstellung einer Stammlösung wurde Chininsulfat in 0,5 M H_2SO_4 gelöst und über Verdünnungsschritte auf eine Konzentration von 1,0 mmol/l gebracht. Zur Herstellung der Probenstammlösungen wurden die Verbindungen in THF gelöst und über Verdünnungsschritte auf eine Konzentration von 1,0 mmol/l gebracht.

Die Absorption von Chininsulfat in 0,5 M H₂SO₄ mit einer Meßkonzentration von 50 µM wurde bei den Wellenlängen 300 und 360 nm bestimmt. Die Absorptionen der Verbindungen wurde bei denselben Wellenlängen in den Lösungsmitteln Ethanol, Oktanol und *n*-Hexan bestimmt. Die Meßkonzentrationen bei den einzelnen Verbindungen waren aufgrund stark unterschiedlicher Intensitäten variabel. Für die Aufnahme der Emissionsspektren wurden die Meßlösungen der Absorptionsmessungen 1:10 verdünnt und bei 300 oder 360 nm vermessen. Mit Hilfe der Gerätesoftware wurden die Spektren korrigiert und die Fläche unter der korrigierten Emissionskurve bestimmt. Über Gl. 4.5 wurden die Quantenausbeuten der Verbindungen in den verschiedenen Lösungsmitteln berechnet.

4.7 Fluoreszenzverhalten in Liposomenlösung

Ein Fluoreszenzmarker sollte sich dadurch auszeichnen, daß die Verbindung an der zu markierenden Phase (z.B. Biomembran) kovalent oder nichtkovalent bindet und daß sich das Fluoreszenzsignal in der zu markierenden Phase deutlich von dem Fluoreszenzsignal in der umgebenden Phase (z.B. Puffermedium) sowohl hinsichtlich der Fluoreszenzintensität als auch hinsichtlich der Lage des Emissionsmaximums unterscheidet. Unter diesen Umständen sollten nur die gebundenen Markermoleküle zum detektierten Fluoreszenzsignal beitragen (Azzi, 1975).

Liposomen dienen seit langem als Modelle zum Studium von biologischen Membranen. Je nach Anzahl der Lamellen (Bilayer) und Durchmesser der Vesikeln werden Liposomen als kleine unilamellare (small unilamellar vesicles = SUV; 20-100 nm Durchmesser), große unilamellare (large unilamellar vesicles = LUV; > 100 nm) und multilamellare (multilamellar vesicles = MLV; 100 nm bis mehrere µm) Liposomen bezeichnet (Rubas und Schreier, 1991).

4.7.1 Aufnahme der Fluoreszenzspektren in Liposomensuspension

Die Aufnahme der Anregungs- und Emissionsspektren erfolgte mit Hilfe fluoreszenzspektroskopischer Messungen mit einem Lumineszenzspektrometer der Firma Perkin-Elmer. Alle Fluoreszenzmessungen wurden bei 20 °C durchgeführt. Die Spektren wurden nicht korrigiert.

Die Liposomensuspension wurde wie unter Punkt 4.2.2. beschrieben hergestellt. Als Phospholipid diente ebenfalls DPPC, die Konzentration dieser Liposomensuspension betrug 200 $\mu\text{mol/l}$.

Zur Herstellung der Probenstammlösungen wurden die Verbindungen in DMSO zur Spektroskopie gelöst und über Verdünnungsschritte auf eine Konzentration von 0,1 mmol/l eingestellt.

Es wurden die Anregungs- und Emissionsspektren der Verbindungen in SPP pH 7,4 mit steigenden Liposomenkonzentrationen aufgenommen. Die Liposomenkonzentration wird ausgedrückt durch die Konzentration an DPPC in mol/l und ist für die einzelnen Lösungen in der Tabelle 4.2. angegeben. Die Meßkonzentration der jeweiligen Verbindung betrug bei jeder Messung 2 $\mu\text{mol/l}$, der DMSO-Anteil in der Meßküvette betrug 2 %. Die Meßlösungen wurden wie in Tabelle 4.2. angegeben pipettiert. Die Angaben zu den Meßwellenlängen bei den einzelnen Verbindungen sind im Ergebnisteil aufgeführt.

Tabelle 4.2: Pipettierschema für die Aufnahme der Fluoreszenzspektren in einer Liposomensuspension

Lösung	Probenstammlösung (100 $\mu\text{mol/l}$) μl	Probenkonzentration ($\mu\text{mol/l}$)	Liposomensuspension (200 $\mu\text{mol/l}$) μl	DPPC-konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	SPP pH 7,4 μl
1	50	2	62,5	5	2388
2	50	2	122,5	10	2328
3	50	2	306	25	2144
4	50	2	613	50	1838
5	50	2	1225	100	1226
6	50	2	2450	200	0

4.8 Fluoreszenzverhalten in Rinderserumalbuminlösung

Durch die Aufnahme von Anregungs- und Emissionsspektren der Verbindungen in RSA-Lösungen unterschiedlichen Gehalts sollte das Fluoreszenzverhalten hinsichtlich einer Veränderung der Fluoreszenzintensität und/oder der Lage des Emissionsmaximums untersucht werden. Ähnlich wie bei der Untersuchung des Fluoreszenz-

verhaltens der Verbindungen in einer Liposomensuspension sollte auch hier der Unterschied den Fluoreszenzintensitäten und der Lage der Emissionsmaxima zwischen freier und an RSA gebundener Probe bestimmt werden.

4.8.1 Aufnahme der Fluoreszenzspektren in Rinderserumalbuminlösung

Die Aufnahme der Anregungs- und Emissionsspektren erfolgte mit Hilfe fluoreszenzspektroskopischer Messungen mit einem Lumineszenzspektrometer der Firma Perkin-Elmer. Alle Fluoreszenzmessungen wurden bei 20 °C durchgeführt. Die Spektren wurden nicht korrigiert.

Zur Herstellung einer etwa 1 mMol Rinderserumalbumin(RSA)-Stammlösung wurden 67 mg RSA in 1,0 ml SPP pH 7,4 gelöst. Zur Herstellung der Probenstammlösungen wurden die Verbindungen in DMSO zur Spektroskopie gelöst und über Verdünnungsschritte auf eine Konzentration von 0,1 mmol/l eingestellt.

Anschließend wurden Anregungs- und Emissionsspektren der Verbindungen in SPP pH 7,4 mit steigenden RSA-Konzentrationen aufgenommen (s. Tabelle 4.3.). Die Meßkonzentration der jeweiligen Verbindung betrug bei jeder Messung 5 µmol/l, der DMSO-Anteil in der Meßküvette betrug 5 %. Die Meßlösungen wurden wie in Tabelle 4.3 angegeben pipettiert. Die Angaben zu den Meßwellenlängen bei den einzelnen Verbindungen sind im Ergebnisteil aufgeführt.

Tabelle 4.3: Pipettierschema für die Aufnahme der Fluoreszenzspektren in RSA-Lösung

Lösung	Probenstammlösung (100 µmol/l) µl	Proben- konzentration (µmol/l)	RSA-Lösung (1 mmol/l) µl	RSA- konzentration (µmol/l)	SPP pH 7,4 µl
1	125	5	0	0	2375
2	125	5	12,5	5	2362
3	125	5	25	10	2350
4	125	5	62,5	25	2312
5	125	5	125	50	2250
6	125	5	250	100	2125
7	125	5	500	200	1875
8	125	5	750	300	1625

4.9 Fluoreszenzpolarisation

Die theoretischen Grundlagen der Fluoreszenzpolarisationstechnik und der prinzipielle Geräteaufbau sind in der Einleitung unter Punkt 1.3 beschrieben worden. Da sich alle Phänomene, die die Beweglichkeit eines Fluorophors beeinflussen, auch auf den Polarisationsgrad des von ihm emittierten Lichtes auswirken, ergibt sich eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten.

Eine umfassend beschriebene Anwendungsmethode der Fluoreszenzpolarisationstechnik ist die Untersuchung der Mikroviskosität und der Zusammensetzung von Zellmembranen oder Membranmodellen. Das Prinzip dieser Anwendungsmethode besteht in der Abhängigkeit der Rotationsbeweglichkeit eines Fluorophors in Membranen von der in diesen Membranen vorherrschenden Mikroviskosität. Diese wird z.B. von der Art der Membranzusammensetzung (Phospholipidmuster, Anteil von Cholesterol) oder von der Temperatur beeinflusst. Das Ausmaß der Rotationsbeweglichkeit wird durch den Wert der apparenten Anisotropie ausgedrückt, anhand der über die Perrin-Gleichung (Gl. 1.1 bzw. 4.7) auf die vorliegende Mikroviskosität rückgeschlossen werden kann.

Die Anfänge dieser Anwendungsmethode gehen auf Arbeiten von Shinitzky, Badley und Cogan zurück, die zahlreiche Verbindungen auf ihre Eignung als Sonde für die Membranfluidität hin untersuchten (Shinitzky et al., 1971 und 1974a; Badley et al., 1973; Cogan et al., 1973). 1974 wurde erstmals 1,6-Diphenylhexatrien (DPH) (Abb. 4.1) als Membransonde eingesetzt, welches heute eine der am häufigsten eingesetzten Fluoreszenzsonden für die Untersuchung von Zellmembranen ist (Shinitzky und Barenholz, 1974b). Das Einsatzgebiet dieser und anderer Fluoreszenzsonden liegt vor allem in klinischen Untersuchungen von Krankheitsbildern, bei denen die Lipidzusammensetzung von Zellmembranen verändert ist (Shinitzky und Barenholz, 1978; Okano et al., 1979; Nairn und Rolland, 1980).

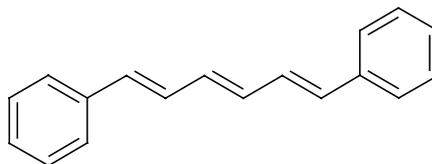


Abb. 4.1: Strukturformel der Fluoreszenzsonde 1,6-Diphenylhexatrien (DPH)

Dabei wird die Membran mit einem geeigneten Fluorophor markiert und die Anisotropie r bestimmt. Über eine alternative Form der Perrin-Gleichung ist die allgemeine Beziehung zwischen der Fluoreszenzanisotropie r und den hydrodynamischen Gegebenheiten seiner Umgebung darstellbar:

$$\left(\frac{r_0}{r} - 1\right)^{-1} = \frac{\eta}{C \cdot T \cdot \tau_F} \quad \text{Gl. 4.7}$$

In der Gl. 4.7 ist η die Mikroviskosität in Poise, C eine stoffspezifische Konstante, die von der Form und dem Molekülvolumen des Fluorophoren abhängig ist, und T die absolute Temperatur in K. Da die Konstante C und die Fluoreszenzlebensdauer τ_F nur schwer zugänglich sind, wird in der Praxis der Faktor $C \cdot T \cdot \tau_F$ experimentell ermittelt, indem in einem System bekannter Viskosität (z.B. dünnflüssiges Paraffin) und bei Kenntnis von r_0 der Term $[(r_0 / r) - 1]^{-1}$ für verschiedene Temperaturen bestimmt und gegen die Viskosität bei der jeweiligen Temperatur aufgetragen wird. Die Steigung der ermittelten Geraden stellt den Faktor $C \cdot T \cdot \tau_F$ dar (Shinitzky und Barenholz, 1978).

4.9.1 Bestimmung der Anisotropie in Liposomensuspensionen

Die Bestimmung der Anisotropie der Verbindungen erfolgte mit Hilfe fluoreszenzspektroskopischer Messungen mit einem Lumineszenzspektrometer der Firma Perkin-Elmer mit Polarisationsfilter. Die Temperatur in der Meßküvette wurde mit Hilfe eines beheizbaren Küvettenhalters und eines Umwälzbades der Firma Julabo reguliert. Die Kontrolle der Temperatur erfolgte über ein Digitalthermometer, dessen Meßfühler in eine Referenzküvette im Probenraum eintauchte.

Es wurden die Anisotropiewerte der Verbindungen in einer Liposomensuspension über einen Temperaturbereich von 15 bis 50 °C bestimmt. Als Vergleich wurden die Anisotropiewerte des bekannten Fluoreszenzmarkers Diphenylhexatrien (DPH) (Abb. 4.1) über den gleichen Temperaturbereich bestimmt.

Die Liposomensuspension wurde wie unter Punkt 4.2.2. beschrieben hergestellt. Als Phospholipid diente ebenfalls DPPC, die Konzentration dieser Liposomensuspension betrug 200 µmol/l. Zur Herstellung der Probenstammlösungen wurden die Verbindungen in DMSO zur Spektroskopie gelöst und über Verdünnungsschritte auf eine Konzentration von 0,1 mmol/l eingestellt. DPH wurde in THF gelöst und über Ver-

dünnungsschritte auf eine Konzentration von 0,1 mmol/l eingestellt. Zu 2,45 ml der Liposomensuspension wurden 50 µl der Probenstammlösung bzw. 50 µl der DPH-Stammlösung pipettiert. Die Meßkonzentration der Verbindungen betrug jeweils 2 µmol/l, die Meßkonzentration von DPH betrug ebenfalls 2 µmol/l. Der DMSO- bzw. der THF-Anteil in der Meßküvette betrug jeweils 2 %. Die Angaben zu den Meßwellenlängen bei den einzelnen Verbindungen sind im Ergebnisteil aufgeführt.

4.9.2 Bestimmung der Anisotropie in Ethanol und Aceton

Die Bestimmung der Anisotropie der Verbindungen erfolgte mit Hilfe fluoreszenzspektroskopischer Messungen mit einem Lumineszenzspektrometer der Firma Perkin-Elmer mit Polarisationsfilter. Alle Messungen wurden bei 20 °C durchgeführt. Es wurden die Anisotropiewerte der Verbindungen in Ethanol und Aceton bei 20 °C bestimmt.

Zur Herstellung der Probenstammlösungen wurden die Verbindungen in THF gelöst. Über Verdünnungsschritte mit Aceton bzw. Ethanol wurden zwei Probenstammlösungen mit einer Konzentration von jeweils 0,1 mmol/l hergestellt. Durch die Verwendung von Aceton bzw. Ethanol wurde der THF-Anteil in der Meßküvette vernachlässigbar klein.

Zu 2,475 ml Aceton bzw. Ethanol wurden 25 µl der entsprechenden Probenstammlösungen pipettiert, die Meßkonzentration der Verbindungen betrug somit 1 µmol/l. Die Angaben zu den Meßwellenlängen bei den einzelnen Verbindungen sind im Ergebnisteil aufgeführt.

4.10 Bestimmung von Bindungskonstanten einzelner Verbindungen mit Rinderserumalbumin

Um Proteine gezielt mit Fluorophoren zu markieren, ist eine kovalente oder nicht-kovalente Bindung zwischen Fluorophor und Protein erforderlich. Für Curcumin **6** sind zwei Bindungskonstanten mit Humanserumalbumin (HSA) für zwei verschiedene Bindungsbereiche des Proteins bekannt. Mit Hilfe von fluoreszenzspektroskopischen Messungen, bei denen die Fluoreszenzlöschung des in dem Protein enthaltenen Tryptophans durch Curcumin **6** verfolgt wurde, konnte eine Bindungskonstante K_B von $2,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ bestimmt werden. Durch Circular-

dichroismus-Messungen konnte die gleiche Arbeitsgruppe eine zweite K_B für Curcumin **6** mit $2,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ bestimmen (Pulla Reddy et al., 1999).

Die Bindungskonstanten für ausgewählte synthetische Derivate des Curcumins sollten mit einer fluoreszenzspektroskopischen Methode bestimmt werden. Als Meßprinzip wurde die sog. Methode der kontinuierlichen Veränderung („continuos variation“) eingesetzt, die ursprünglich von P. Job 1928 als Auswertungsverfahren für die Bestimmung der Stöchiometrie eines Komplexes entwickelt wurde. Für 1:1-Komplexe kann die Bindungskonstante K_B ebenfalls berechnet werden (Bruneau et al., 1992; Williams et al. 2002):

$$K_B = \frac{[LM]}{[L] \cdot [M]} \quad \text{Gl. 4.8}$$

Die Gesamtkonzentration von Ligand [L] und Makromolekül [M] bzw. zweier komplexbildender Komponenten wird konstant gehalten, wobei der Konzentrationsanteil des Liganden (X) von 0 bis 1 (0 % bis 100 %) variiert wird. Dieser Konzentrationsanteil wird gegen einen Parameter der Komplexbildung (z.B. Fluoreszenzintensität) aufgetragen (Jobs-Plot oder „Continuos-Variations-Plot“, Abb. 4.2). Die an die ermittelten Datenpunkte angepaßte Kurve hat ein Maximum bei dem stöchiometrischen Konzentrationsanteil (X_M).

Da die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Konzentration des gebildeten Komplexes LM ist, kann Gl. 4.8 ausgedrückt werden durch:

$$K_B = \frac{\frac{I}{I_0}[LM]_0}{\left([L]_T - \frac{I}{I_0}[LM]_0\right)\left([M]_T - \frac{I}{I_0}[LM]_0\right)} \quad \text{Gl. 4.9}$$

In Gl. 4.9 ist $[LM]_0$ die Konzentration von LM für die vollständige Komplexbildung und I_0 ist die dazu korrespondierende Fluoreszenzintensität, die sich aus dem Schnittpunkt der beiden an die Kurve angelegten Tangenten und anschließender Übertragung auf die y-Achse ergibt (Abb. 4.2).

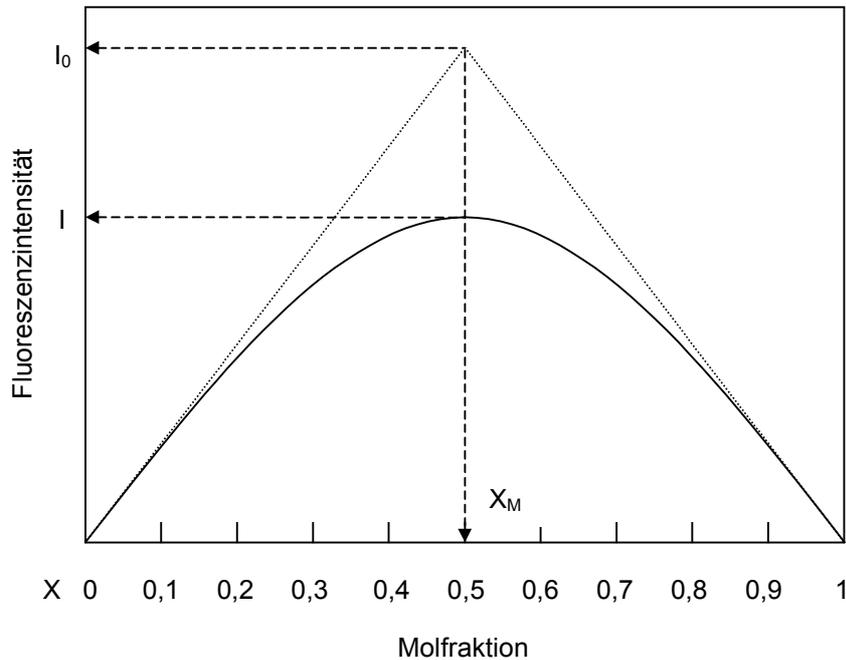


Abb. 4.2: Continuos-Variations-Plot: Auftragung der Molfraktion X zweier Komplexbildner L und M gegen die Fluoreszenzintensität des Komplexes LM (Erklärung siehe Text)

Für $X \leq X_M$ ist L das limitierende Reagenz und $[LM]_0$ ist gleich der totalen Konzentration von L ($[L]_T$). Daher wird Gl. 4.9 zu:

$$K_B = \frac{I \cdot I_0}{(I_0 - I)(I_0[M]_T - I[L]_T)} \quad \text{Gl. 4.10}$$

In Gl. 4.10 sind $[M]_T$ die totale Konzentration des Makromoleküls M und $[L]_T$ die totale Konzentration des Liganden L im Maximum der ermittelten Kurve. I ist die Fluoreszenzintensität für das Maximum der ermittelten Kurve und I_0 die theoretische Fluoreszenzintensität des Komplexes LM , die sich aus dem Schnittpunkt der beiden an die Kurve angelegten Tangenten und anschließender Übertragung auf die y -Achse ergibt (Abb. 4.2). Die Bestimmung von I und I_0 sollte rechnerisch anhand der mathematischen Funktionen für die Tangenten bzw. für die Kurve erfolgen.

4.10.1 Durchführung des Continuos-Variations-Plot

Die Aufnahme der Anregungs- und Emissionsspektren erfolgte mit Hilfe fluoreszenzspektroskopischer Messungen mit einem Lumineszenzspektrometer der Firma

Perkin-Elmer. Alle Fluoreszenzmessungen wurden bei 20 °C durchgeführt. Die Spektren wurden nicht korrigiert.

Zur Herstellung der RSA-Stammlösung wurden zunächst 67 mg RSA in 1,0 ml SPP pH 7,4 gelöst. Durch Verdünnung mit SPP pH 7,4 wurde die Lösung auf eine Konzentration von 0,25 mmol/l eingestellt. Die untersuchten Verbindungen wurden zunächst in DMSO gelöst und anschließend durch Verdünnungsschritte mit Ethanol auf eine Konzentration von 0,25 mmol/l eingestellt. Die Meßlösungen wurden wie in Tabelle 4.4 pipettiert. Dabei war die Gesamtkonzentration von Curcuminoid und RSA immer 10 µmol/l. Der Konzentrationsanteil von Curcuminoid und RSA wurde wie unter 4.10 beschrieben variiert. Um die Lösungsmittelzusammensetzung der Meßlösungen identisch zu halten, wurden in Abhängigkeit von der Menge der pipettierten ethanolischen Probenstammlösung unterschiedliche Mengen Ethanol in die Küvette pipettiert, sodaß die Ethanol-Konzentration in der Meßküvette für jede Lösung 4 % betrug (s. Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4: Pipettierschema für die Bestimmung der Bindungskonstanten über den Continuos-Variations-Plot

Lösung	Probenstammlösung (250 µmol/l)	Probe [µmol/l]	RSA-Lösung (250 µmol/l)	RSA [µmol/l]	Ethanol µl	SPP pH 7,4 µl
1	10	1	90	9	90	2310
2	20	2	80	8	80	2320
3	30	3	70	7	70	2330
4	40	4	60	6	60	2340
5	50	5	50	5	50	2350
6	60	6	40	4	40	2360
7	70	7	30	3	30	2370
8	80	8	20	2	20	2380
9	90	9	10	1	10	2390

Die Emissionsspektren der Lösungen 1-9 wurden immer bei derselben, für den Komplex zwischen Curcuminoid und RSA spezifischen Anregungswellenlänge aufgenommen. Die Auswertung und Bestimmung der Bindungskonstanten erfolgte wie

unter 4.10 beschrieben. Die Angaben zu den Meßwellenlängen bei den einzelnen Verbindungen sind im Ergebnisteil aufgeführt.

4.11 Lipophiliebestimmung

Azzi beschreibt das Prinzip von Fluoreszenzsonden dadurch, daß kleine fluoreszierende organische Moleküle mit umgebungssensitiven Fluoreszenzeigenschaften in Membranen hinein diffundieren (oder kovalent an diese binden). Die Diffusion in die Membran hängt dabei von dem Verteilungskoeffizienten der Sonde ab und wird umso stärker, je größer der Verteilungskoeffizient der Sonde in der Membran im Vergleich zum umgebenden Medium ist (Azzi, 1975).

Die Lipophilie einer Verbindung wird häufig mit deren biologischer Aktivität korreliert, ist aber in erster Linie ein wichtiger Parameter für die Verteilung dieser Verbindung in ihrer Umgebung (Krass et al., 1997). Daher ist für die Entwicklung eines umgebungssensitiven Fluoreszenzmarkers die Kenntnis der Lipophilie der Verbindung von besonderer Bedeutung.

Unter einer Vielzahl von experimentellen Verfahren zur Bestimmung der Lipophilie hat sich die Bestimmung des Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten (log P-Wert) als Standardbezugssystem durchgesetzt. Die Nachteile dieser Methode sind jedoch der relativ große Arbeits- und Zeitaufwand, die potentiellen Gefahren beim Umgang mit toxischen Substanzen und Lösungsmitteln sowie nicht zuletzt die Schwierigkeiten bei der Bestimmung der log P-Werte von Substanzen, die sich nur sehr schlecht in einer der beiden Phasen lösen.

Die Bestimmung der log P-Werte der Verbindungen sollte daher mit einer alternativen Methode erfolgen, die auf dem Prinzip der Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) beruht. Dabei stellt das RP-Material in der Säule die lipophile und das Fließmittel die hydrophile Phase dar.

Für die Ermittlung der unbekanntenen log P-Werte der Verbindungen werden zunächst Standardverbindungen mit bekannten log P-Werten mit dem ausgewählten System untersucht und die aus den Retentionszeiten berechneten k' -Werte mit den bekannten log P-Werten korreliert. Mit Hilfe der sich aus dieser Korrelationsanalyse ergebenden Geradengleichung und dem experimentell bestimmten k' -Wert der Verbindungen ist es möglich, den log P-Wert zu berechnen.

4.11.1 Durchführung der Lipophiliebestimmung mittels RP-HPLC

Es wurde eine Gradienten-Methode gewählt, wie sie z.B. von Krass et al. für die Bestimmung der Lipophilie beschrieben ist (Krass et al., 1997). Die Chromatographie wurde mit dem unter 4.1.3. beschriebenen HPLC-System durchgeführt. Als Eluent A wurde Acetonitril (HPLC Gradient Grade der Firma Roth), als Eluent B SPP pH 7,4 bzw. 5,0 verwendet. Es wurde ein linearer Gradient mit einer Fließmittelzusammensetzung von 30:70 bis 95:5 (jeweils Eluent A:Eluent B) über einen Zeitraum von 95 min und einer Flußrate von 1,0 ml/min gefahren. Als Standards mit steigenden log P-Werten wurden *p*-Methylbenzaldehyd und *n*-Alkylbenzole mit C₁ - C₁₂ (Toluol – Dodecylbenzol) verwendet. Es wurde jeweils eine Mischung aller Standards und der zu untersuchenden Verbindung eingespritzt. Die Detektion der Standards erfolgte mit Hilfe der UV-Detektion bei 210 nm, die Detektion der Verbindungen erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzdetektion bei individuell verschiedenen Anregungs- und Emissionswellenlängen.

Die Auswertung der Chromatogramme und die Berechnung der k'-Werte erfolgte mit der Herstellersoftware WATERS BREEZE Auswertesystem. Die Ermittlung der log P-Werte der Verbindungen erfolgte wie unter 4.11 beschrieben.

5 Ergebnisse

5.1 Stabilitätsuntersuchungen

Die Stabilität der Verbindungen **1** – **12** wurde in drei Ansätzen bestimmt:

1. in Sörensen-Phosphatpuffer pH 7,4
2. in SPP pH 7,4 mit 15 $\mu\text{mol/l}$ Rinderserumalbumin
3. in einer DPPC-Liposomensuspension 200 $\mu\text{mol/l}$

Die Messungen erfolgten mit einem Photodioden-Array Spektrometer über einen Zeitraum von 60 min. Alle 90 s wurde ein Absorptionsspektrum der jeweiligen Verbindung aufgenommen. Die Meßkonzentration der Verbindungen **1** – **12** betrug bei allen Messungen 15 $\mu\text{mol/l}$.

Um die Stabilitäten der Verbindungen untereinander und in den verschiedenen Medien optimal vergleichen zu können, wurde der Absorptionswert bei der Wellenlänge des Absorptionsmaximums der jeweils ersten Messung ermittelt und als 100 %-Wert betrachtet. Die Absorptionswerte der folgenden Messungen wurden bei der gleichen Wellenlänge ermittelt und in Prozent in bezug auf den Anfangswert umgerechnet. In den Abbildungen ist die Veränderung der Absorption in bezug auf den Anfangswert in % über den Untersuchungszeitraum von 60 min dargestellt.

Beispielhaft für alle Verbindungen sind im folgenden die ermittelten Stabilitätsdaten für die Verbindungen **1**, **4**, **6** und **10** graphisch dargestellt (Abb. 5.1 – 5.4). Die Ergebnisse für alle Verbindungen sind in der Tabelle 5.1 zusammengefaßt. Darin sind die Meßwellenlängen der einzelnen Verbindungen in den verschiedenen Medien sowie die Absorptionswerte in bezug auf den Anfangswert in % nach 60 min angegeben.

5.1.1 1,7-Diphenyl-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (1)

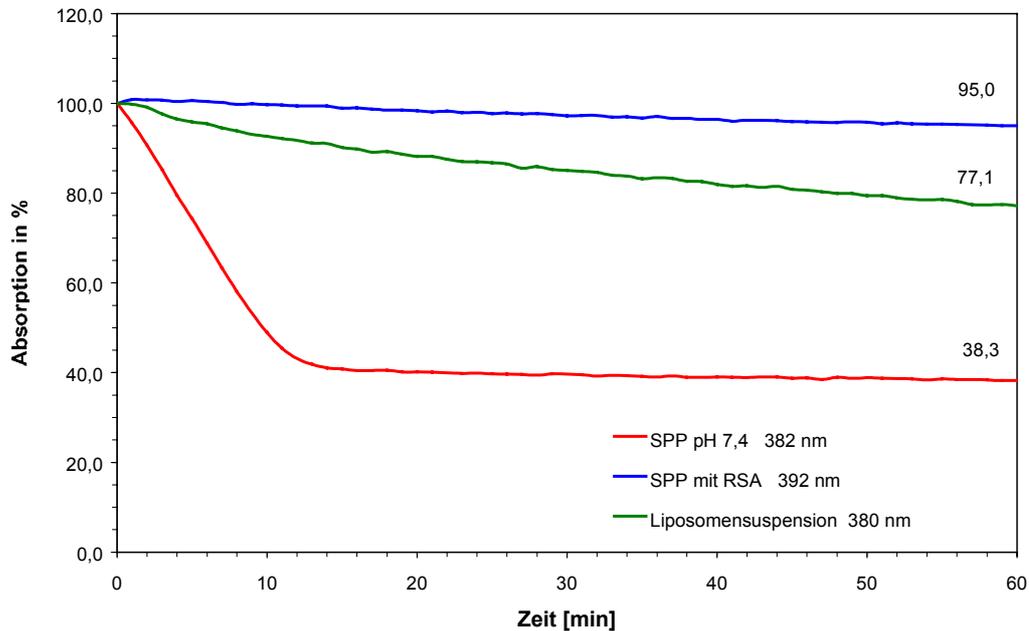


Abb. 5.1: Veränderung der Absorption in % der Verbindung 1 (15 μM) in SPP pH 7,4, SPP pH 7,4 mit 15 μM RSA und in Liposomensuspension (200 μM) über 60 min

5.1.2 5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (4) Bisdemethoxycurcumin

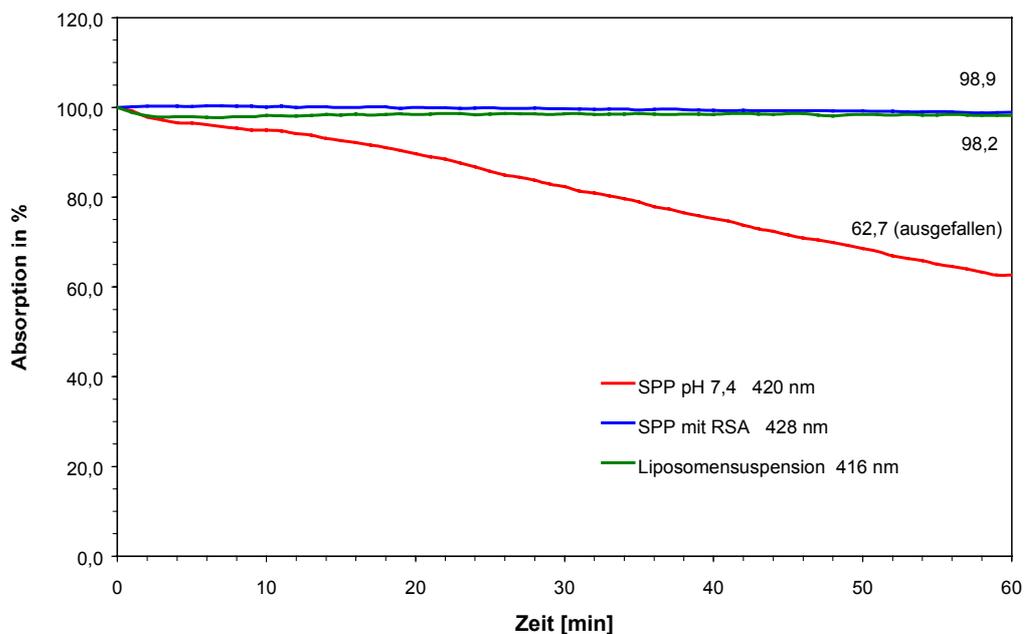


Abb. 5.2: Veränderung der Absorption in % der Verbindung 4 (15 μM) in SPP pH 7,4, SPP pH 7,4 mit 15 μM RSA und in Liposomensuspension (200 μM) über 60 min

5.1.3 5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (6) Curcumin

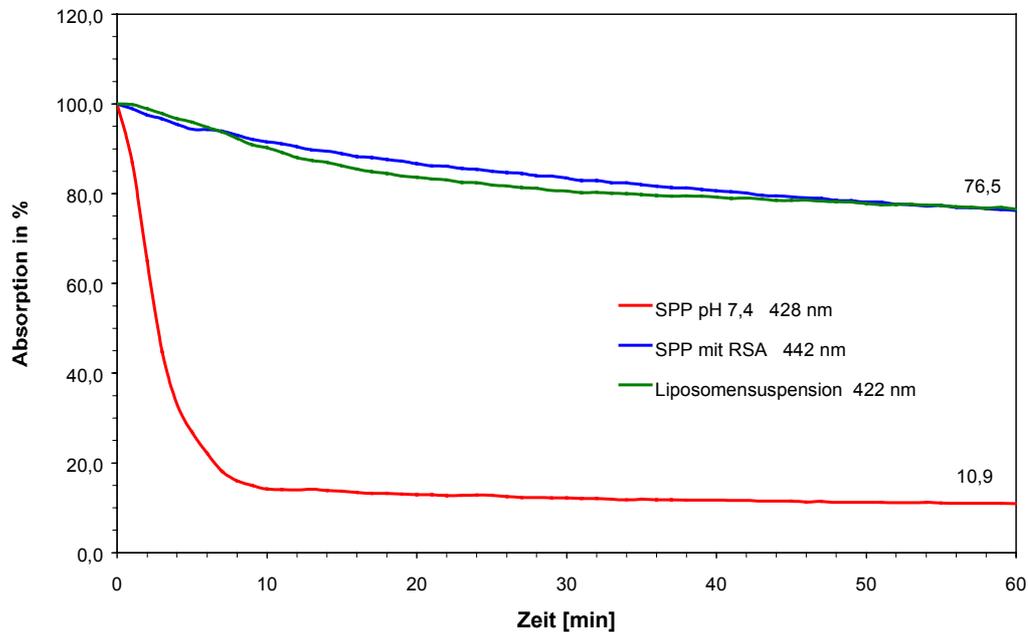


Abb. 5.3: Veränderung der Absorption in % der Verbindung 6 (15 μM) in SPP pH 7,4, SPP pH 7,4 mit 15 μM RSA und in Liposomensuspension (200 μM) über 60 min

5.1.4 1,7-Bis(4-diethylaminophenyl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (10)

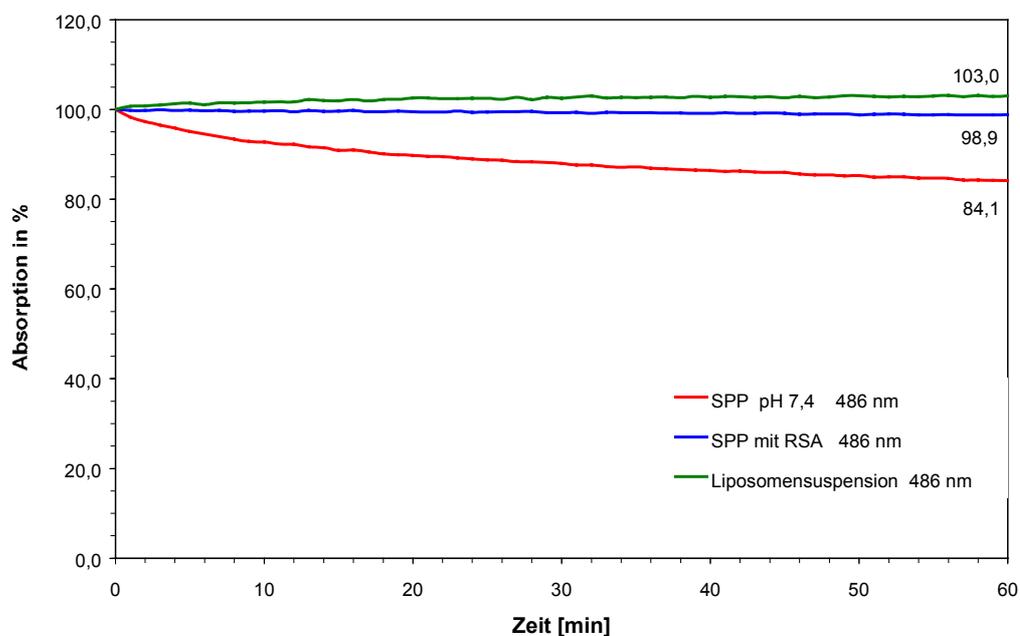


Abb. 5.4: Veränderung der Absorption in % der Verbindung 10 (15 μM) in SPP pH 7,4, SPP pH 7,4 mit 15 μM RSA und in Liposomensuspension (200 μM) über 60 min

Tabelle 5.1: Stabilitätsdaten der Verbindungen 1 - 12 (15 μM) in SPP pH 7,4, SPP pH 7,4 mit 15 μM RSA und in Liposomensuspension (200 μM) (λ_{Abs} : Meßwellenlänge in dem jeweiligen Medium; $\text{Abs}_{60 \text{ min}}$ (%): Absorption nach 60 min in % der Anfangsabsorption)

Verbindung	SPP pH 7,4		SPP pH 7,4 mit RSA		Liposomensuspension	
	λ_{Abs}	$\text{Abs}_{60 \text{ min}}$ (%)	λ_{Abs}	$\text{Abs}_{60 \text{ min}}$ (%)	λ_{Abs}	$\text{Abs}_{60 \text{ min}}$ (%)
1	382	38	392	95	380	77
2	370	81	366	97	368	105
3	386	79	382	87	386	94
4	420	63 ¹⁾	428	99	416	98
5	422	57	410	108	414	114
6	428	11	442	77	422	77
7	414	69 ¹⁾	422	98	420	98
8	380	97	412	112	416	73
9	396	93	388	96	412	114
10	486	84	486	99	486	103
11	506	79	506	87	504	94
12	330	85	330	98	326	109

¹⁾ Substanz fällt aus

5.2 Solvatochromie der untersuchten Verbindungen: Absorptionsspektren

Die Aufnahme der Absorptionsspektren erfolgte in den Lösungsmitteln Methanol, Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan mit Hilfe UV/VIS-spektroskopischer Messungen mit einem Photodioden-Array Spektrometer. Die Meßkonzentration der Verbindungen **1 - 12** betrug bei allen Messungen 10 $\mu\text{mol/l}$.

Dargestellt sind die Absorptionsspektren der Verbindungen in den verschiedenen Lösungsmitteln. In den Tabellen sind die Absorptionsmaxima (λ_{max}), die Breite der Absorptionsbanden bei 50 % des Absorptionsmaximums ($\Delta\nu_{1/2}$) und die Extinktionskoeffizienten (ϵ) für die unterschiedlichen Lösungsmittel angegeben. Außerdem ist in den Tabellen die Dielektrizitätskonstante ϵ_r als Parameter der Lösungsmittelpolarität angegeben.

5.2.1 1,7-Diphenyl-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (1)

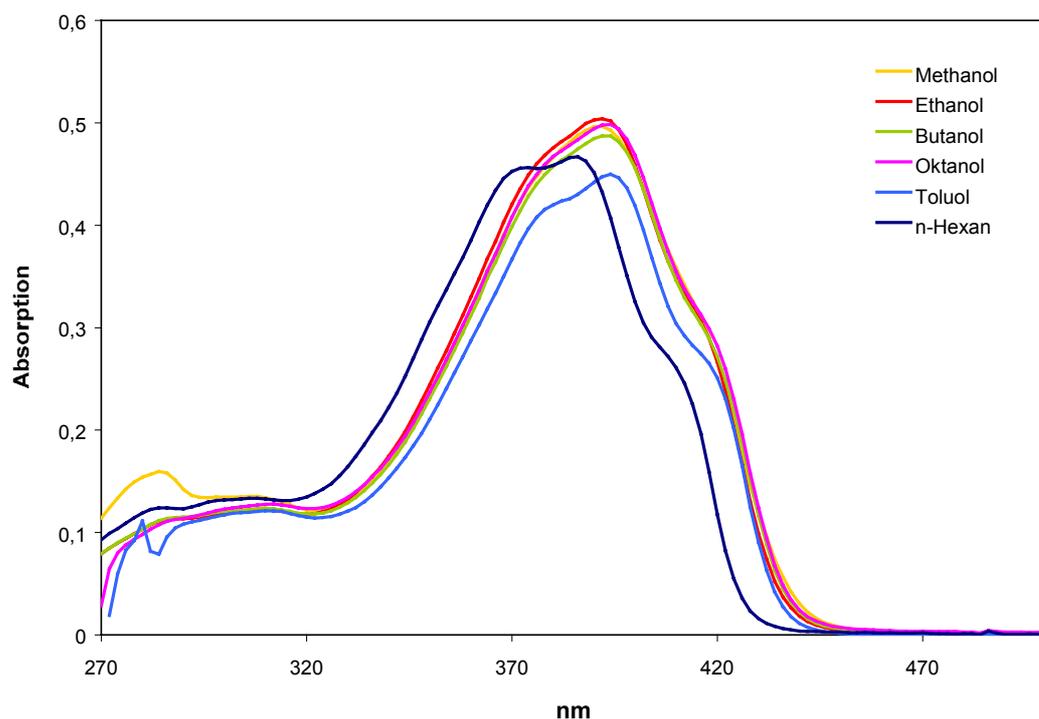


Abb. 5.5: Absorptionsspektren der Verbindung 1 (10 $\mu\text{mol/l}$) in Methanol, Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan

Tabelle 5.2: UV/VIS-spektroskopische Daten der Verbindung 1 in verschiedenen Lösungsmitteln (ϵ_r : relative Dielektrizitätskonstante; λ_{max} : Absorptionsmaximum; $\Delta\nu_{1/2}$: Breite der Absorptionsbande bei 50 % des Absorptionsmaximums; ϵ : Absorptionskoeffizient)

Lösungsmittel	Dielektrizitätskonstante ϵ_r ¹⁾	λ_{max} [nm]	$\Delta\nu_{1/2}$ [cm ⁻¹]	ϵ [mol ⁻¹ cm ⁻¹]
Methanol	32,6	392	4660	49600
Ethanol	24,3	392	4740	50400
Butanol	17,8	392	4710	48700
Oktanol	10,3	394	4850	49800
Toluol	2,38	394	4710	45000
<i>n</i> -Hexan	1,89	386	5030	46700

¹⁾ aus: *Handbook of Chemistry and Physics, 58th Edition 1977-78*

5.2.2 5-Hydroxy-1,7-bis(*p*-tolyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (2)

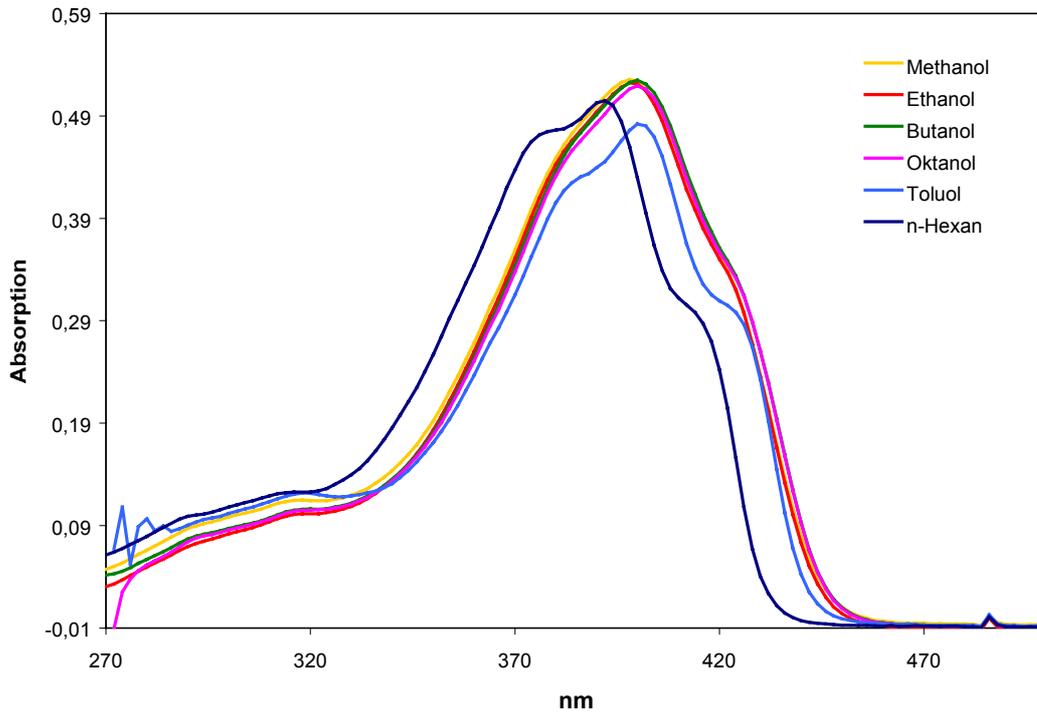


Abb. 5.6: Absorptionsspektren der Verbindung 2 (10 $\mu\text{mol/l}$) in Methanol, Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan

Tabelle 5.3: UV/VIS-spektroskopische Daten der Verbindung 2 in verschiedenen Lösungsmitteln (ϵ_r : relative Dielektrizitätskonstante; λ_{max} : Absorptionsmaximum; $\Delta\nu_{1/2}$: Breite der Absorptionsbande bei 50 % des Absorptionsmaximums; ϵ : Absorptionskoeffizient)

Lösungsmittel	Dielektrizitätskonstante ϵ_r ¹⁾	λ_{max} [nm]	$\Delta\nu_{1/2}$ [cm ⁻¹]	ϵ [mol ⁻¹ cm ⁻¹]
Methanol	32,6	398	4490	52600
Ethanol	24,3	398	4410	52200
Butanol	17,8	400	4450	52500
Oktanol	10,3	400	4450	51900
Toluol	2,38	400	4390	48200
<i>n</i> -Hexan	1,89	392	4710	50500

¹⁾ aus: *Handbook of Chemistry and Physics*, 58th Edition 1977-78

5.2.3 1,7-Bis(4-*tert*-butylphenyl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (3)

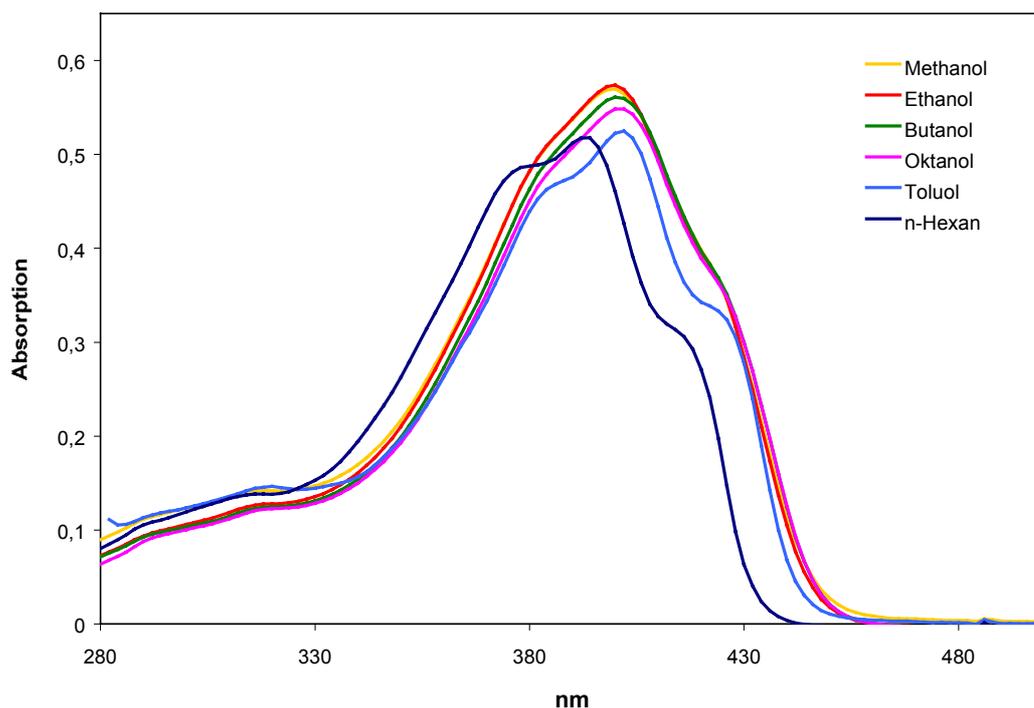


Abb. 5.7: Absorptionsspektren der Verbindung 3 (10 $\mu\text{mol/l}$) in Methanol, Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan

Tabelle 5.4: UV/VIS-spektroskopische Daten der Verbindung 3 in verschiedenen Lösungsmitteln (ϵ_r : relative Dielektrizitätskonstante; λ_{max} : Absorptionsmaximum; $\Delta\nu_{1/2}$: Breite der Absorptionsbande bei 50 % des Absorptionsmaximums; ϵ : Absorptionskoeffizient)

Lösungsmittel	Dielektrizitätskonstante ϵ_r ¹⁾	λ_{max} [nm]	$\Delta\nu_{1/2}$ [cm ⁻¹]	ϵ [mol ⁻¹ cm ⁻¹]
Methanol	32,6	400	4600	57000
Ethanol	24,3	400	4520	57400
Butanol	17,8	400	4500	56100
Oktanol	10,3	402	4550	54800
Toluol	2,38	402	4580	52500
<i>n</i> -Hexan	1,89	394	4900	51800

¹⁾ aus: *Handbook of Chemistry and Physics, 58th Edition 1977-78*

5.2.4 5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (4) Bisdesmethoxycurcumin

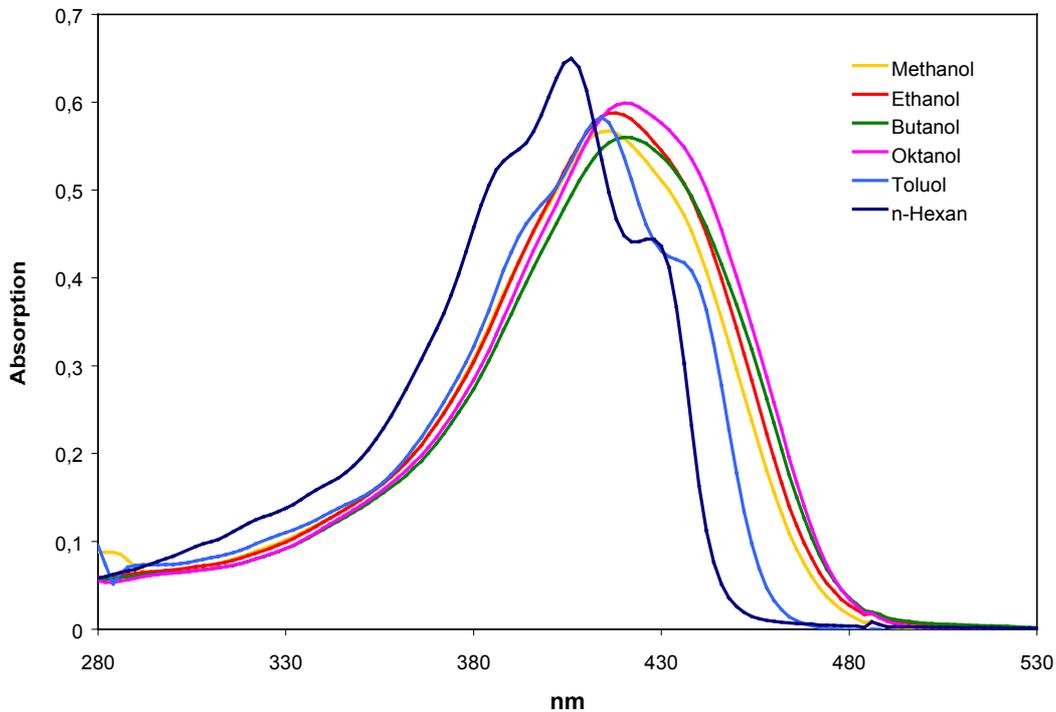


Abb. 5.8: Absorptionsspektren der Verbindung 4 (10 $\mu\text{mol/l}$) in Methanol, Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan

Tabelle 5.5: UV/VIS-spektroskopische Daten der Verbindung 4 in verschiedenen Lösungsmitteln (ϵ_r : relative Dielektrizitätskonstante; λ_{max} : Absorptionsmaximum; $\Delta\nu_{1/2}$: Breite der Absorptionsbande bei 50 % des Absorptionsmaximums; ϵ : Absorptionskoeffizient)

Lösungsmittel	Dielektrizitätskonstante ϵ_r ¹⁾	λ_{max} [nm]	$\Delta\nu_{1/2}$ [cm ⁻¹]	ϵ [mol ⁻¹ cm ⁻¹]
Methanol	32,6	416	4350	56700
Ethanol	24,3	418	4310	58800
Butanol	17,8	420	4410	56000
Oktanol	10,3	420	4300	59900
Toluol	2,38	414	4120	58300
<i>n</i> -Hexan	1,89	406	4190	65000

¹⁾ aus: Handbook of Chemistry and Physics, 58th Edition 1977-78

5.2.5 5-Hydroxy-1,7-bis(4-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (5)

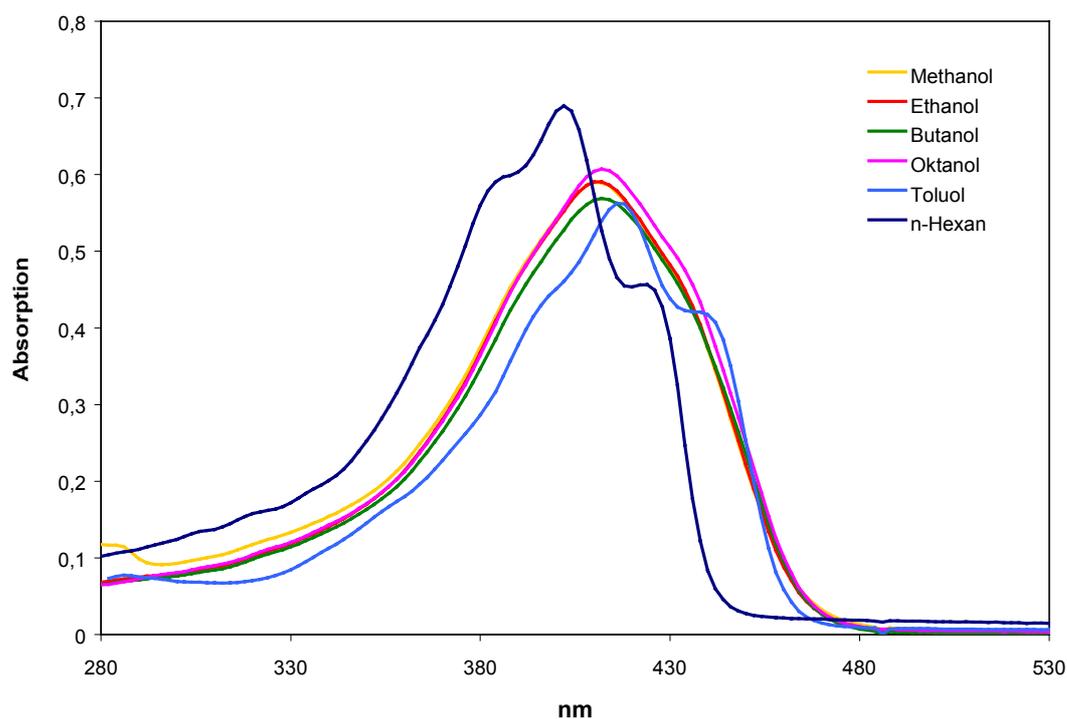


Abb. 5.9: Absorptionsspektren der Verbindung 5 (10 $\mu\text{mol/l}$) in Methanol, Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan

Tabelle 5.6: UV/VIS-spektroskopische Daten der Verbindung 5 in verschiedenen Lösungsmitteln (ϵ_r : relative Dielektrizitätskonstante; λ_{max} : Absorptionsmaximum; $\Delta\nu_{1/2}$: Breite der Absorptionsbande bei 50 % des Absorptionsmaximums; ϵ : Absorptionskoeffizient)

Lösungsmittel	Dielektrizitätskonstante ϵ_r ¹⁾	λ_{max} [nm]	$\Delta\nu_{1/2}$ [cm ⁻¹]	ϵ [mol ⁻¹ cm ⁻¹]
Methanol	32,6	410	4480	59000
Ethanol	24,3	410	4410	59100
Butanol	17,8	412	4390	56900
Oktanol	10,3	412	4370	60700
Toluol	2,38	416	4110	56200
<i>n</i> -Hexan	1,89	402	4500	69000

¹⁾ aus: *Handbook of Chemistry and Physics, 58th Edition 1977-78*

5.2.6 5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (6) Curcumin

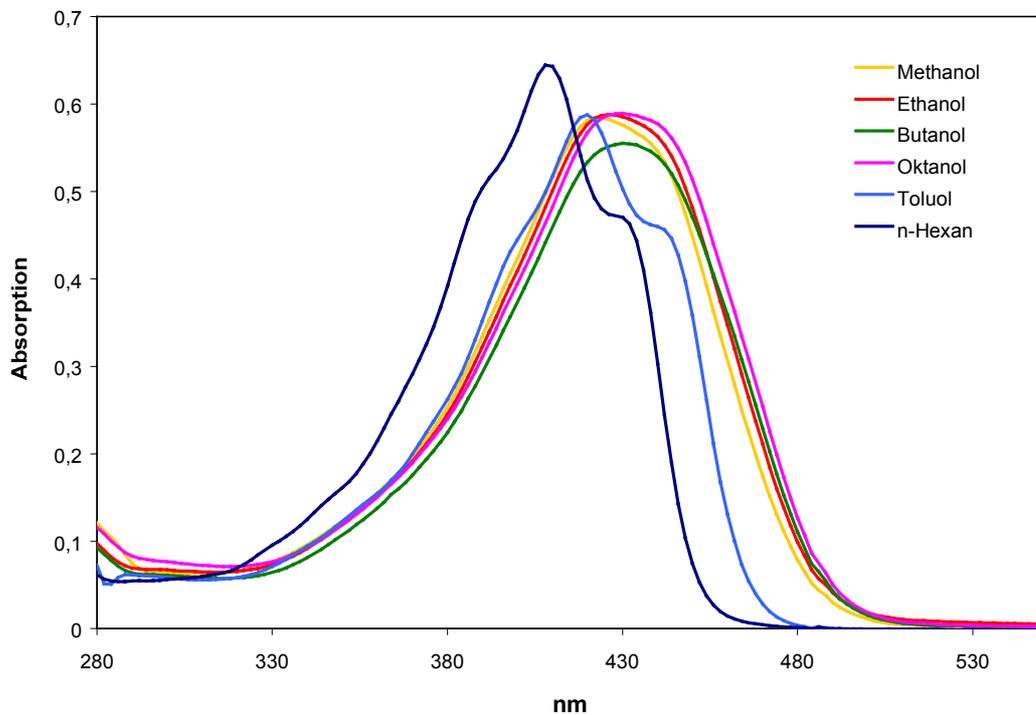


Abb. 5.10: Absorptionsspektren der Verbindung 6 (10 µmol/l) in Methanol, Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan

Tabelle 5.7: UV/VIS-spektroskopische Daten der Verbindung 6 in verschiedenen Lösungsmitteln (ϵ_r : relative Dielektrizitätskonstante; λ_{\max} : Absorptionsmaximum; $\Delta\nu_{1/2}$: Breite der Absorptionsbande bei 50 % des Absorptionsmaximums; ϵ : Absorptionskoeffizient)

Lösungsmittel	Dielektrizitätskonstante ϵ_r ¹⁾	λ_{\max} [nm]	$\Delta\nu_{1/2}$ [cm ⁻¹]	ϵ [mol ⁻¹ cm ⁻¹]
Methanol	32,6	424	4280	58500
Ethanol	24,3	426	4330	58800
Butanol	17,8	430	4310	55500
Oktanol	10,3	430	4360	59000
Toluol	2,38	420	3970	58800
<i>n</i> -Hexan	1,89	408	3960	64500

¹⁾ aus: Handbook of Chemistry and Physics, 58th Edition 1977-78

5.2.7 5-Hydroxy-1,7-bis(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (7)

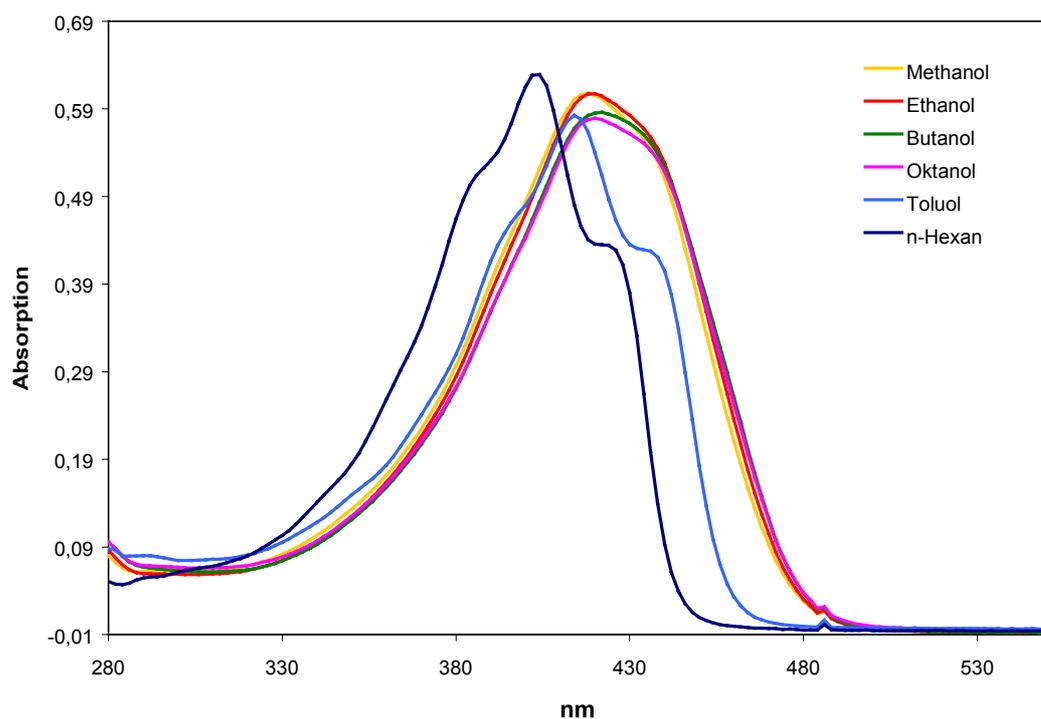


Abb. 5.11: Absorptionsspektren der Verbindung 7 (10 $\mu\text{mol/l}$) in Methanol, Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan

Tabelle 5.8: UV/VIS-spektroskopische Daten der Verbindung 7 in verschiedenen Lösungsmitteln (ϵ_r : relative Dielektrizitätskonstante; λ_{max} : Absorptionsmaximum; $\Delta\nu_{1/2}$: Breite der Absorptionsbande bei 50 % des Absorptionsmaximums; ϵ : Absorptionskoeffizient)

Lösungsmittel	Dielektrizitätskonstante ϵ_r ¹⁾	λ_{max} [nm]	$\Delta\nu_{1/2}$ [cm ⁻¹]	ϵ [mol ⁻¹ cm ⁻¹]
Methanol	32,6	418	4220	60800
Ethanol	24,3	420	4250	60700
Butanol	17,8	422	4280	58600
Oktanol	10,3	420	4300	57900
Toluol	2,38	414	4030	58200
<i>n</i> -Hexan	1,89	404	4100	63000

¹⁾ aus: *Handbook of Chemistry and Physics, 58th Edition 1977-78*

5.2.8 1,7-Bis(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (8)

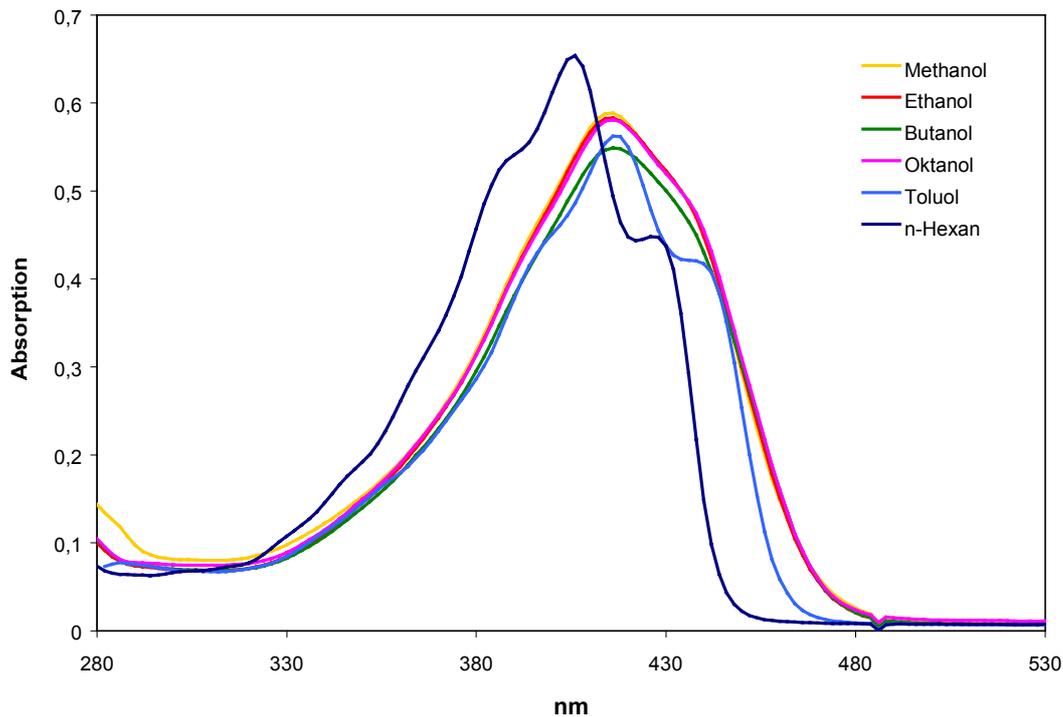


Abb 5.12: Absorptionsspektren der Verbindung 8 (10 $\mu\text{mol/l}$) in Methanol, Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan

Tabelle 5.9: UV/VIS-spektroskopische Daten der Verbindung 8 in verschiedenen Lösungsmitteln (ϵ_r : relative Dielektrizitätskonstante; λ_{max} : Absorptionsmaximum; $\Delta\nu_{1/2}$: Breite der Absorptionsbande bei 50 % des Absorptionsmaximums; ϵ : Absorptionskoeffizient)

Lösungsmittel	Dielektrizitätskonstante ϵ_r ¹⁾	λ_{max} [nm]	$\Delta\nu_{1/2}$ [cm ⁻¹]	ϵ [mol ⁻¹ cm ⁻¹]
Methanol	32,6	416	4300	58800
Ethanol	24,3	416	4300	58300
Butanol	17,8	416	4400	54900
Oktanol	10,3	416	4350	58100
Toluol	2,38	416	4040	56200
<i>n</i> -Hexan	1,89	406	4190	65400

¹⁾ aus: *Handbook of Chemistry and Physics, 58th Edition 1977-78*

5.2.9 1,7-Bis(4-dimethylaminophenyl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (9)

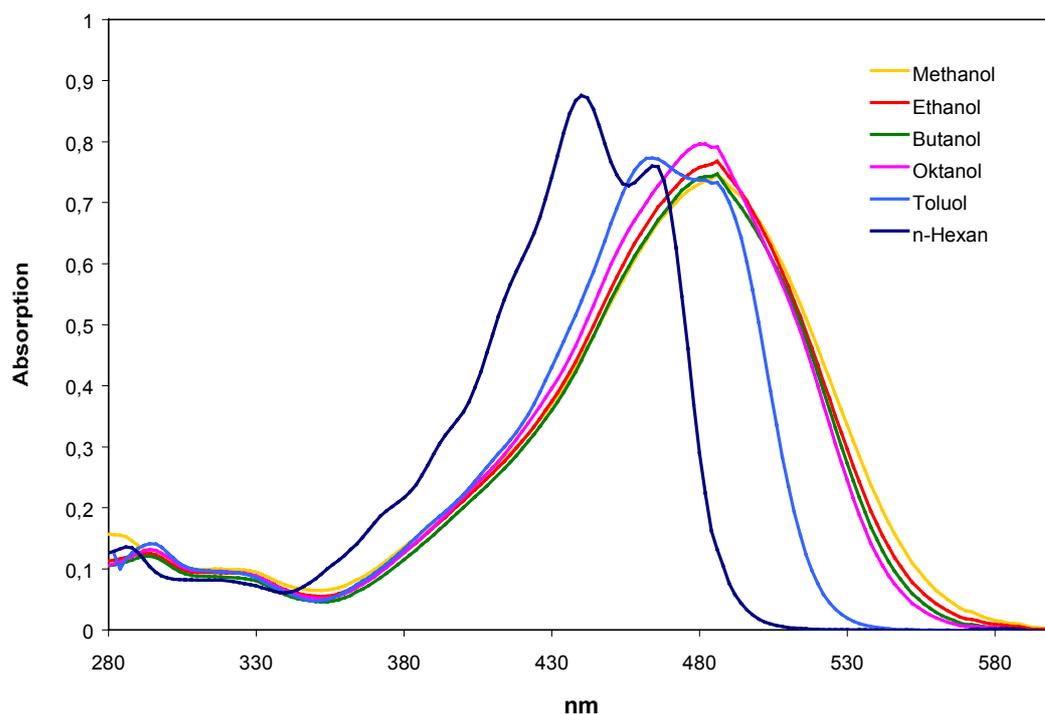


Abb. 5.13: Absorptionsspektren der Verbindung 9 (10 $\mu\text{mol/l}$) in Methanol, Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan

Tabelle 5.10: UV/VIS-spektroskopische Daten der Verbindung 9 in verschiedenen Lösungsmitteln (ϵ_r : relative Dielektrizitätskonstante; λ_{max} : Absorptionsmaximum; $\Delta\nu_{1/2}$: Breite der Absorptionsbande bei 50 % des Absorptionsmaximums; ϵ : Absorptionskoeffizient)

Lösungsmittel	Dielektrizitätskonstante ϵ_r ¹⁾	λ_{max} [nm]	$\Delta\nu_{1/2}$ [cm ⁻¹]	ϵ [mol ⁻¹ cm ⁻¹]
Methanol	32,6	486	4280	74600
Ethanol	24,3	486	4120	76800
Butanol	17,8	486	4030	74700
Oktanol	10,3	482	4060	79600
Toluol	2,38	464	3630	77300
<i>n</i> -Hexan	1,89	440	3610	87600

¹⁾ aus: *Handbook of Chemistry and Physics, 58th Edition 1977-78*

5.2.10 1,7-Bis(4-diethylaminophenyl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (10)

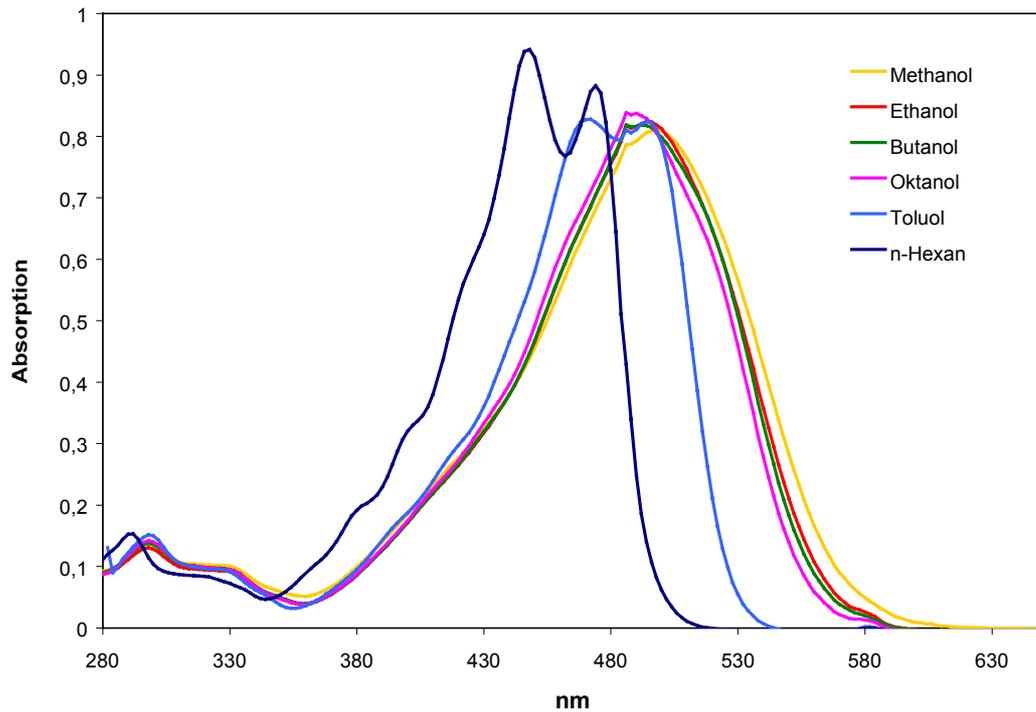


Abb. 5.14: Absorptionsspektren der Verbindung 10 (10 $\mu\text{mol/l}$) in Methanol, Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan

Tabelle 5.11: UV/VIS-spektroskopische Daten der Verbindung 10 in verschiedenen Lösungsmitteln (ϵ_r : relative Dielektrizitätskonstante; λ_{max} : Absorptionsmaximum; $\Delta\nu_{1/2}$: Breite der Absorptionsbande bei 50 % des Absorptionsmaximums; ϵ : Absorptionskoeffizient)

Lösungsmittel	Dielektrizitätskonstante ϵ_r ¹⁾	λ_{max} [nm]	$\Delta\nu_{1/2}$ [cm ⁻¹]	ϵ [mol ⁻¹ cm ⁻¹]
Methanol	32,6	498	4072	81000
Ethanol	24,3	494	3901	82400
Butanol	17,8	486	3866	81900
Oktanol	10,3	490	3776	83700
Toluol	2,38	472	3495	82800
<i>n</i> -Hexan	1,89	448	3420	94200

¹⁾ aus: *Handbook of Chemistry and Physics*, 58th Edition 1977-78

5.2.11 5-Hydroxy-1,7-bis(9-julolidinyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (11)

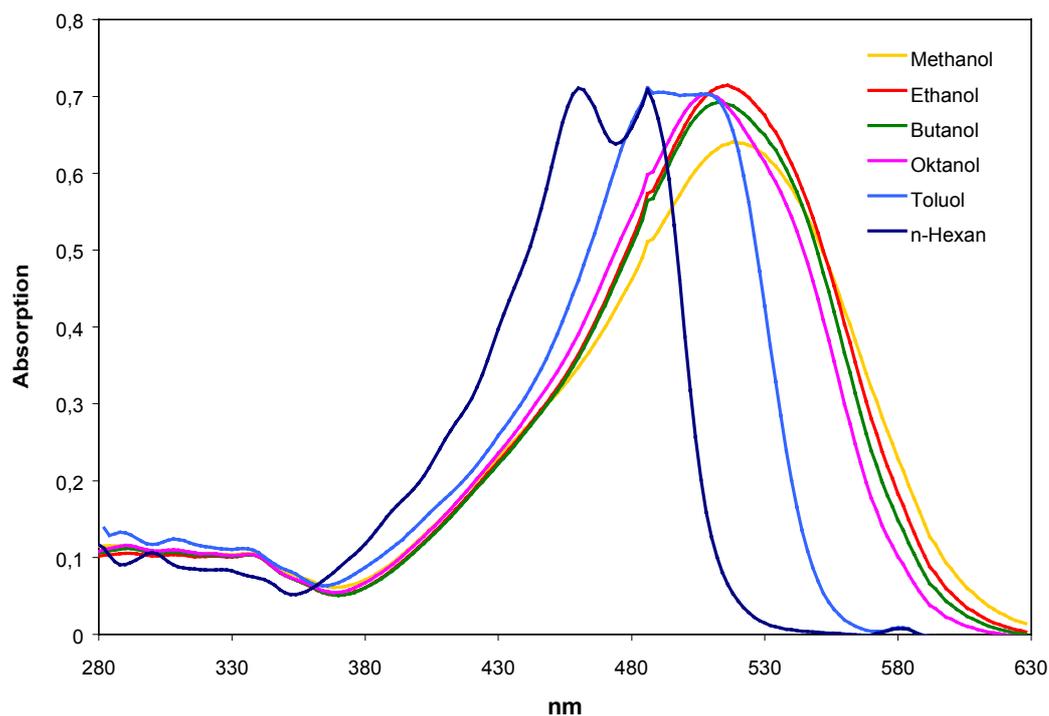


Abb. 5.15: Absorptionsspektren der Verbindung 11 (10 $\mu\text{mol/l}$) in Methanol, Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan

Tabelle 5.12: UV/VIS-spektroskopische Daten der Verbindung 11 in verschiedenen Lösungsmitteln (ϵ_r : relative Dielektrizitätskonstante; λ_{max} : Absorptionsmaximum; $\Delta\nu_{1/2}$: Breite der Absorptionsbande bei 50 % des Absorptionsmaximums; ϵ : Absorptionskoeffizient)

Lösungsmittel	Dielektrizitätskonstante ϵ_r ¹⁾	λ_{max} [nm]	$\Delta\nu_{1/2}$ [cm ⁻¹]	ϵ [mol ⁻¹ cm ⁻¹]
Methanol	32,6	518	4480	64100
Ethanol	24,3	516	4060	71400
Butanol	17,8	514	4040	69200
Oktanol	10,3	508	4040	70300
Toluol	2,38	486	3560	71100
<i>n</i> -Hexan	1,89	460	3510	71100

¹⁾ aus: *Handbook of Chemistry and Physics*, 58th Edition 1977-78

5.2.12 5-Hydroxy-1,7-di-2-naphthyl-1,4,6-heptatrien-3-on (12)

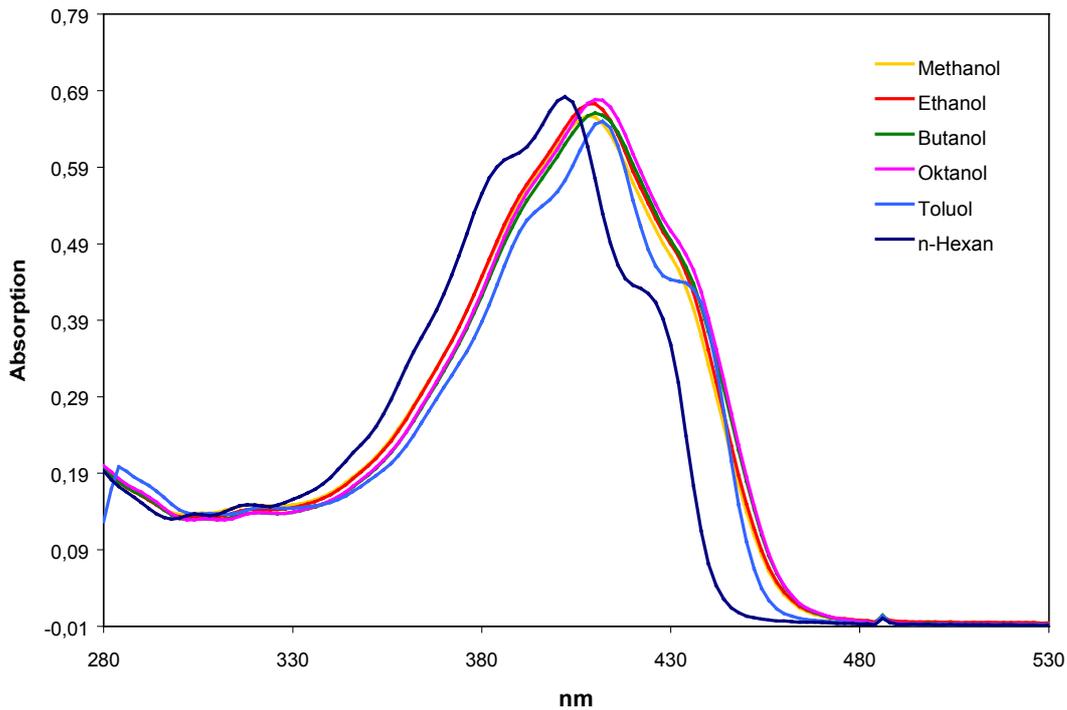


Abb. 5.16: Absorptionsspektren der Verbindung 12 (10 $\mu\text{mol/l}$) in Methanol, Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan

Tabelle 5.13: UV/VIS-spektroskopische Daten der Verbindung 12 in verschiedenen Lösungsmitteln (ϵ_r : relative Dielektrizitätskonstante; λ_{max} : Absorptionsmaximum; $\Delta\nu_{1/2}$: Breite der Absorptionsbande bei 50 % des Absorptionsmaximums; ϵ : Absorptionskoeffizient)

Lösungsmittel	Dielektrizitätskonstante ϵ_r ¹⁾	λ_{max} [nm]	$\Delta\nu_{1/2}$ [cm ⁻¹]	ϵ [mol ⁻¹ cm ⁻¹]
Methanol	32,6	408	4450	65700
Ethanol	24,3	410	4430	67300
Butanol	17,8	410	4330	66100
Oktanol	10,3	410	4380	67800
Toluol	2,38	412	4190	65000
<i>n</i> -Hexan	1,89	402	4500	68200

¹⁾ aus: *Handbook of Chemistry and Physics*, 58th Edition 1977-78

5.3 Solvatochromie der untersuchten Verbindungen: Emissionsspektren

Die Emissionsspektren wurden in den Lösungsmitteln Methanol, Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan aufgenommen. Da die Fluoreszenzintensitäten sowohl der einzelnen Verbindungen in einem Lösungsmittel als auch einer Verbindung in verschiedenen Lösungsmitteln sehr unterschiedlich waren, konnten zumeist keine einheitlichen Meßkonzentrationen bzw. Spaltbreiten von Anregungs- und Emissionsmonochromatoren für die verschiedenen Verbindungen gewählt werden. Um die Solvatochromieeffekte der untersuchten Verbindungen anhand der Emissionsspektren dennoch gut vergleichen zu können, erfolgte die Darstellung der Emissionsspektren einer Verbindung in verschiedenen Lösungsmitteln mit normalisierten Fluoreszenzintensitäten.

Für Verbindung **1** konnten keine reproduzierbaren Anregungs- und Emissionsspektren aufgenommen werden, da die Fluoreszenzintensitäten in allen verwendeten Lösungsmitteln sehr gering waren.

In den Tabellen 5.14 – 5.24 sind einige spektroskopische Daten der Verbindungen zusammengefaßt. Aufgeführt sind die Absorptions- und Emissionsmaxima (λ_{Abs} und λ_{Em}), die Halbwertsbreiten der Emissionsmaxima ($\Delta\nu_{1/2}$) und die Stokes-Verschiebung ($\Delta\nu_{\text{Stokes}}$) in den verwendeten Lösungsmitteln.

Der Einfluß von Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität auf die Emissionsspektren der Verbindungen **2** – **12** wird in Kapitel 6 ausführlich diskutiert.

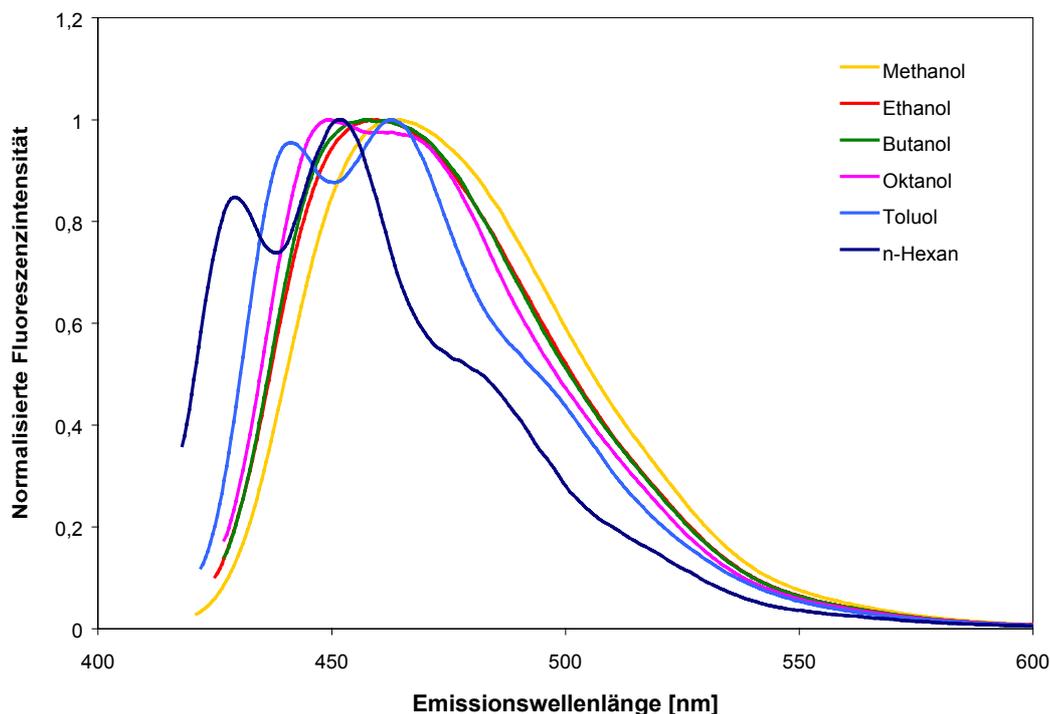
5.3.1 5-Hydroxy-1,7-bis(*p*-tolyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (2)

Abb. 5.17: Normalisierte Fluoreszenzemissionsspektren der Verbindung 2 in Methanol, Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan

Tabelle 5.14: Absorptions- und Emissionsmaximum (λ_{Abs} und λ_{Em}), Breite der Emissionsbande bei 50 % des Emissionsmaximums ($\Delta\nu_{1/2}$) und Stokes-Shift ($\Delta\nu_{\text{Stokes}}$) der Verbindung 2 in verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	λ_{Abs} nm	λ_{Em} nm	$\Delta\nu_{1/2}$ cm^{-1}	$\Delta\nu_{\text{Stokes}}$ cm^{-1}
Methanol	400	463	2960	3400
Ethanol	398	461	2950	3430
Butanol	400	459	2950	3210
Oktanol	400	449	2910	2730
Toluol	400	463	2990	3400
<i>n</i> -Hexan	392	451	3030	3340

5.3.2 1,7-Bis(4-*tert*-butylphenyl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (3)

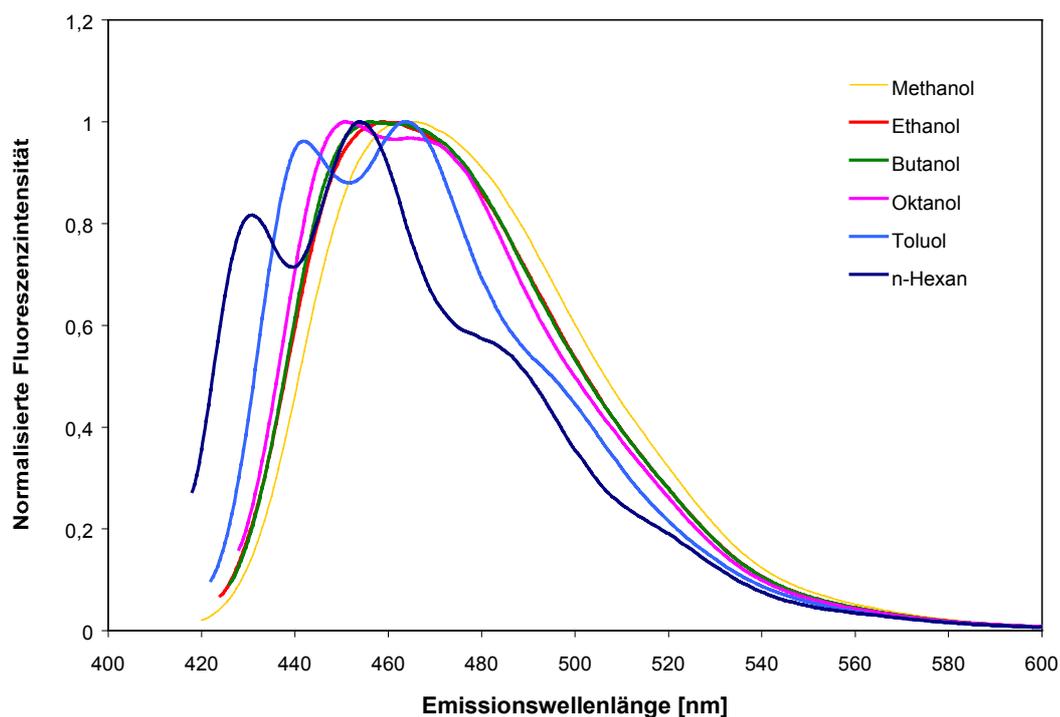


Abb. 5.18: Normalisierte Fluoreszenzemissionsspektren der Verbindung 3 in Methanol, Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan

Tabelle 5.15: Absorptions- und Emissionsmaximum (λ_{Abs} und λ_{Em}), Breite der Emissionsbande bei 50 % des Emissionsmaximums ($\Delta\nu_{1/2}$) und Stokes-Shift ($\Delta\nu_{\text{Stokes}}$) der Verbindung 3 in verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	λ_{Abs} nm	λ_{Em} nm	$\Delta\nu_{1/2}$ cm ⁻¹	$\Delta\nu_{\text{Stokes}}$ cm ⁻¹
Methanol	400	465	2910	3500
Ethanol	400	460	2910	3260
Butanol	400	459	2910	3210
Oktanol	402	449	2940	2600
Toluol	402	464	2960	3320
<i>n</i> -Hexan	394	453	3260	3310

5.3.3 5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (4) Bisdesmethoxycurcumin

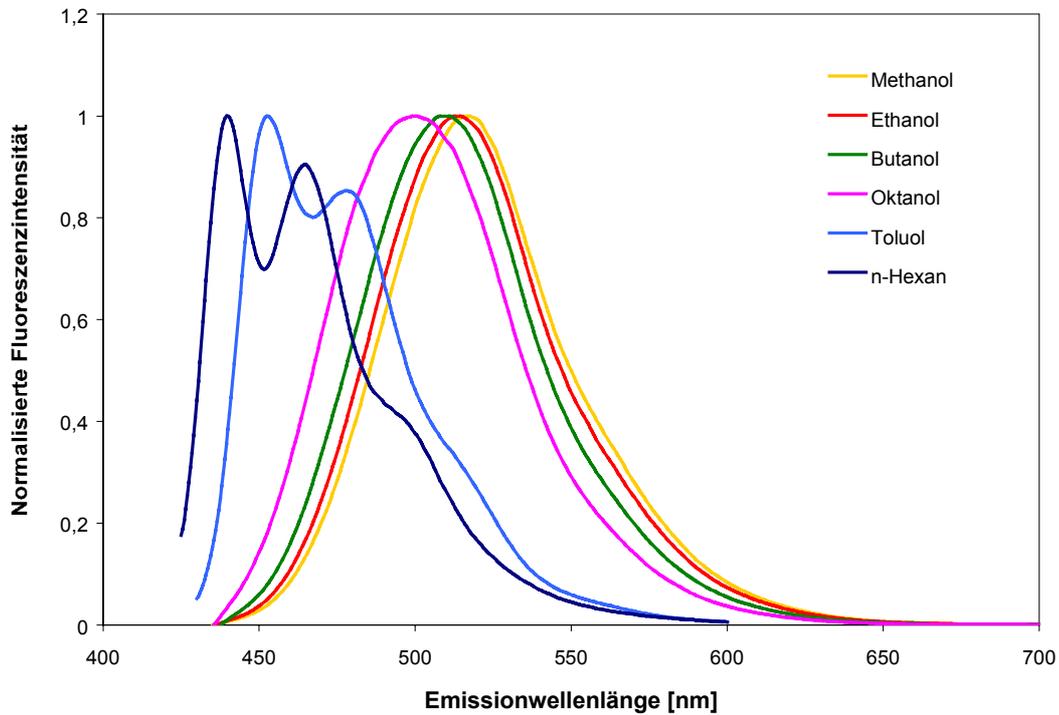


Abb. 5.19: Normalisierte Fluoreszenzemissionsspektren der Verbindung 4 in Methanol, Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan

Tabelle 5.16: Absorptions- und Emissionsmaximum (λ_{Abs} und λ_{Em}), Breite der Emissionsbande bei 50 % des Emissionsmaximums ($\Delta\nu_{1/2}$) und Stokes-Shift ($\Delta\nu_{\text{Stokes}}$) der Verbindung 4 in verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	λ_{Abs} nm	λ_{Em} nm	$\Delta\nu_{1/2}$ cm ⁻¹	$\Delta\nu_{\text{Stokes}}$ cm ⁻¹
Methanol	416	518	2440	4730
Ethanol	418	514	2470	4470
Butanol	420	510	2490	4200
Oktanol	420	501	2740	3850
Toluol	414	453	2540	2080
<i>n</i> -Hexan	405	440	2500	1960

5.3.4 5-Hydroxy-1,7-bis(4-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (5)

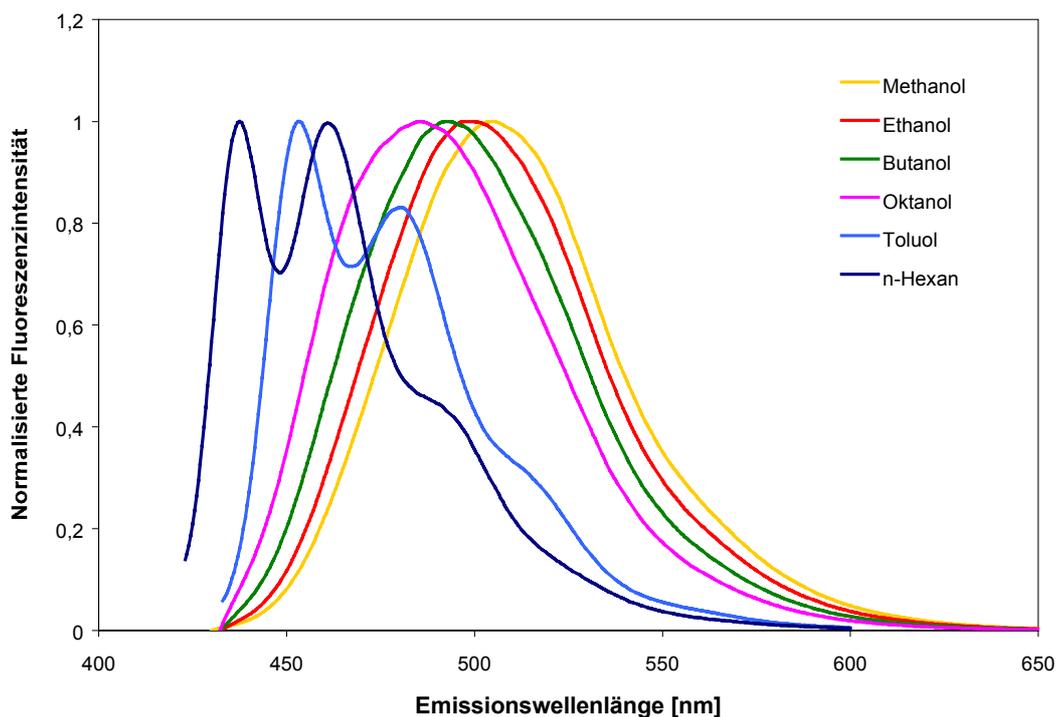


Abb. 5.20: Normalisierte Fluoreszenzemissionsspektren der Verbindung 5 in Methanol, Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan

Tabelle 5.17: Absorptions- und Emissionsmaximum (λ_{Abs} und λ_{Em}), Breite der Emissionsbande bei 50 % des Emissionsmaximums ($\Delta\nu_{1/2}$) und Stokes-Shift ($\Delta\nu_{\text{Stokes}}$) der Verbindung 5 in verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	λ_{Abs} nm	λ_{Em} nm	$\Delta\nu_{1/2}$ cm ⁻¹	$\Delta\nu_{\text{Stokes}}$ cm ⁻¹
Methanol	410	505	2620	4590
Ethanol	410	500	2690	4390
Butanol	412	494	2800	4030
Oktanol	412	486	2920	3700
Toluol	416	453	2430	1960
<i>n</i> -Hexan	402	438	2520	2050

5.3.5 5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (6) Curcumin

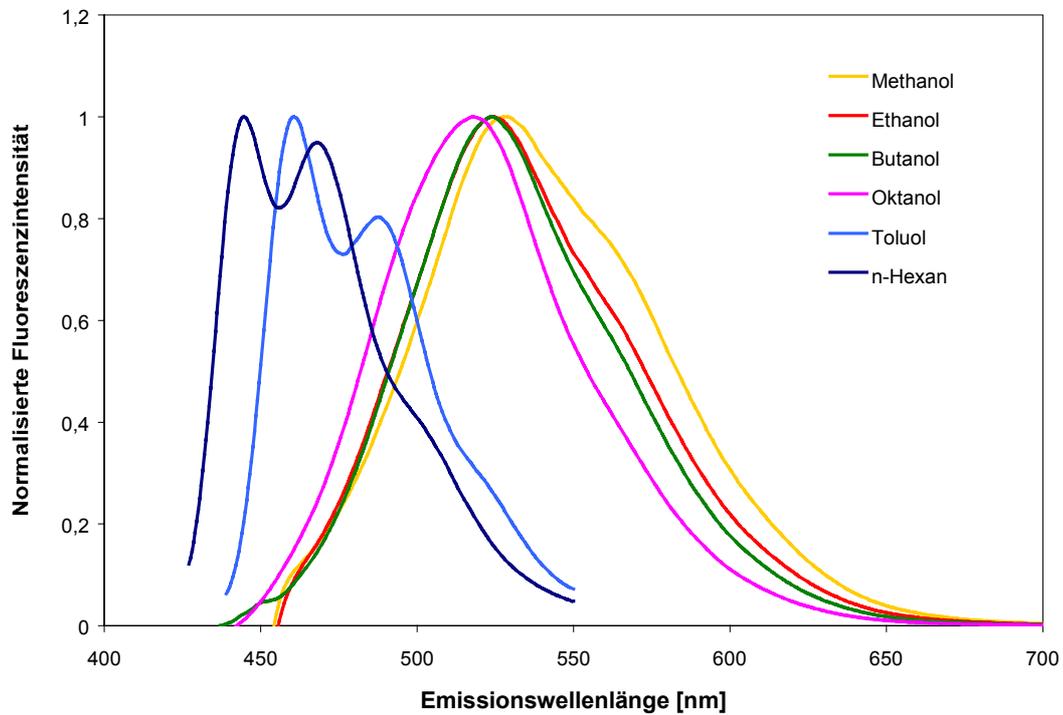


Abb. 5.21: Normalisierte Fluoreszenzemissionsspektren der Verbindung 6 in Methanol, Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan

Tabelle 5.18: Absorptions- und Emissionsmaximum (λ_{Abs} und λ_{Em}), Breite der Emissionsbande bei 50 % des Emissionsmaximums ($\Delta\nu_{1/2}$) und Stokes-Shift ($\Delta\nu_{\text{Stokes}}$) der Verbindung 6 in verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	λ_{Abs} nm	λ_{Em} nm	$\Delta\nu_{1/2}$ cm^{-1}	$\Delta\nu_{\text{Stokes}}$ cm^{-1}
Methanol	424	529	3050	4680
Ethanol	426	525	2940	4430
Butanol	430	524	2760	4170
Oktanol	430	519	2700	3990
Toluol	419	461	2380	2170
<i>n</i> -Hexan	407	444	2610	2050

5.3.6 5-Hydroxy-1,7-bis(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (7)

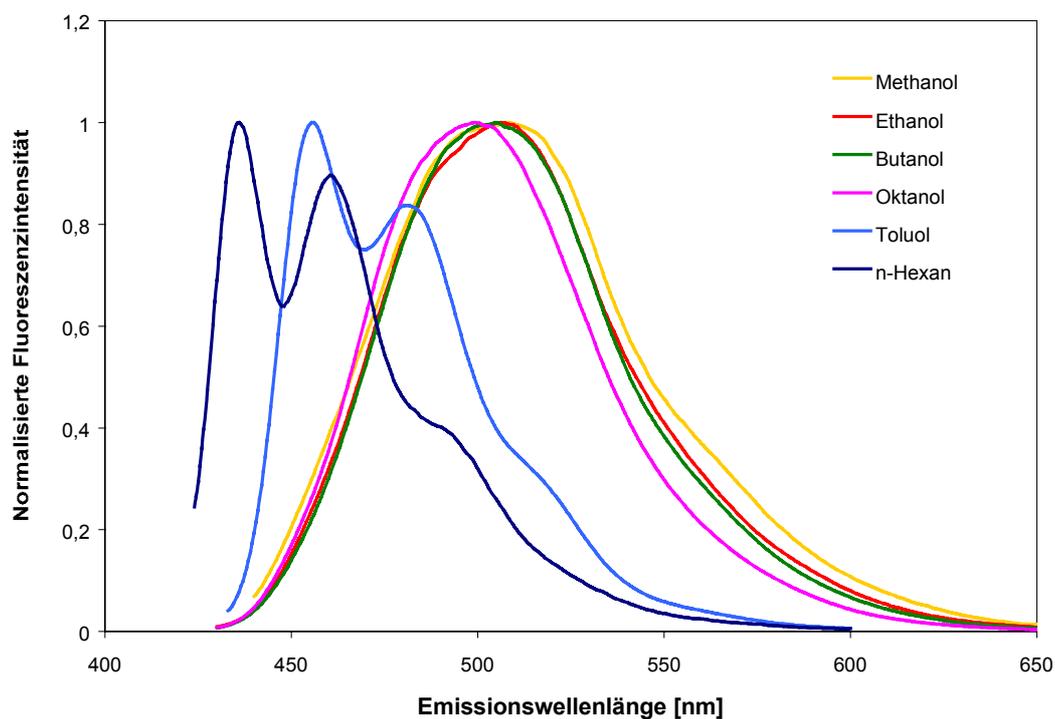


Abb. 5.22: Normalisierte Fluoreszenzemissionsspektren der Verbindung 7 in Methanol, Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan

Tabelle 5.19: Absorptions- und Emissionsmaximum (λ_{Abs} und λ_{Em}), Breite der Emissionsbande bei 50 % des Emissionsmaximums ($\Delta\nu_{1/2}$) und Stokes-Shift ($\Delta\nu_{\text{Stokes}}$) der Verbindung 7 in verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	λ_{Abs} nm	λ_{Em} nm	$\Delta\nu_{1/2}$ cm ⁻¹	$\Delta\nu_{\text{Stokes}}$ cm ⁻¹
Methanol	418	508	2620	4240
Ethanol	420	506	2690	4050
Butanol	422	505	2800	3900
Oktanol	420	499	2920	3770
Toluol	413	456	2430	2280
<i>n</i> -Hexan	404	437	2520	1870

5.3.7 1,7-Bis(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (8)

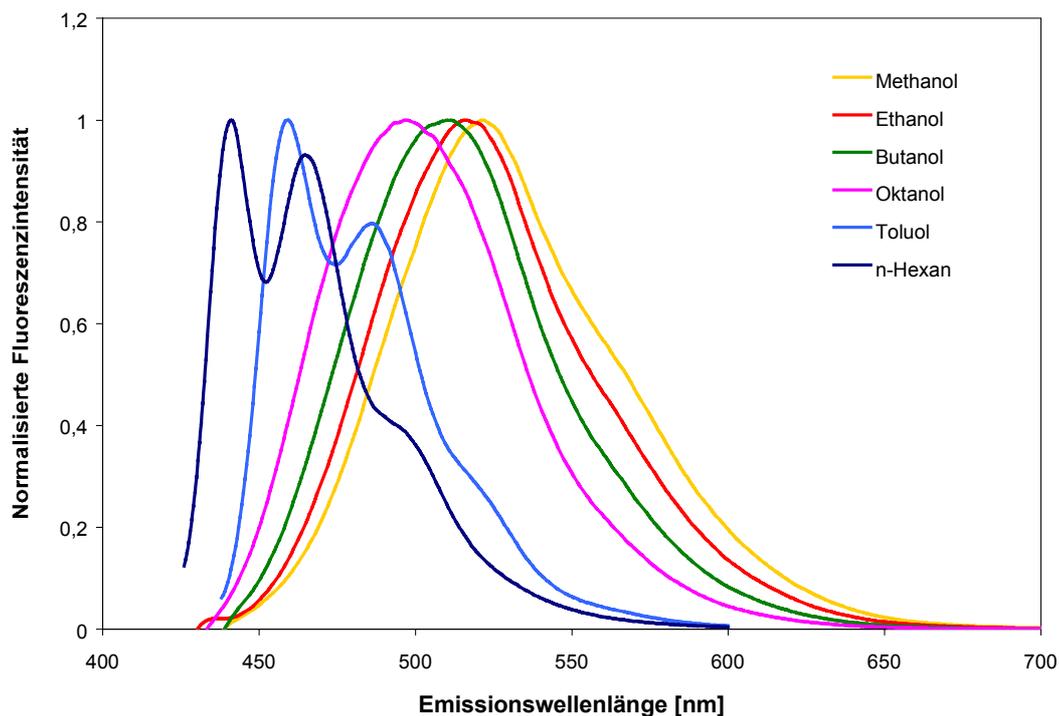


Abb. 5.23: Normalisierte Fluoreszenzemissionsspektren der Verbindung 8 in Methanol, Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan

Tabelle 5.20: Absorptions- und Emissionsmaximum (λ_{Abs} und λ_{Em}), Breite der Emissionsbande bei 50 % des Emissionsmaximums ($\Delta\nu_{1/2}$) und Stokes-Shift ($\Delta\nu_{\text{Stokes}}$) der Verbindung 8 in verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	λ_{Abs} nm	λ_{Em} nm	$\Delta\nu_{1/2}$ cm^{-1}	$\Delta\nu_{\text{Stokes}}$ cm^{-1}
Methanol	416	522	2920	4880
Ethanol	417	517	2800	4640
Butanol	416	511	2830	4470
Oktanol	419	498	2940	3790
Toluol	416	459	2380	2250
<i>n</i> -Hexan	406	441	2400	1960

5.3.8 1,7-Bis(4-dimethylaminophenyl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (9)

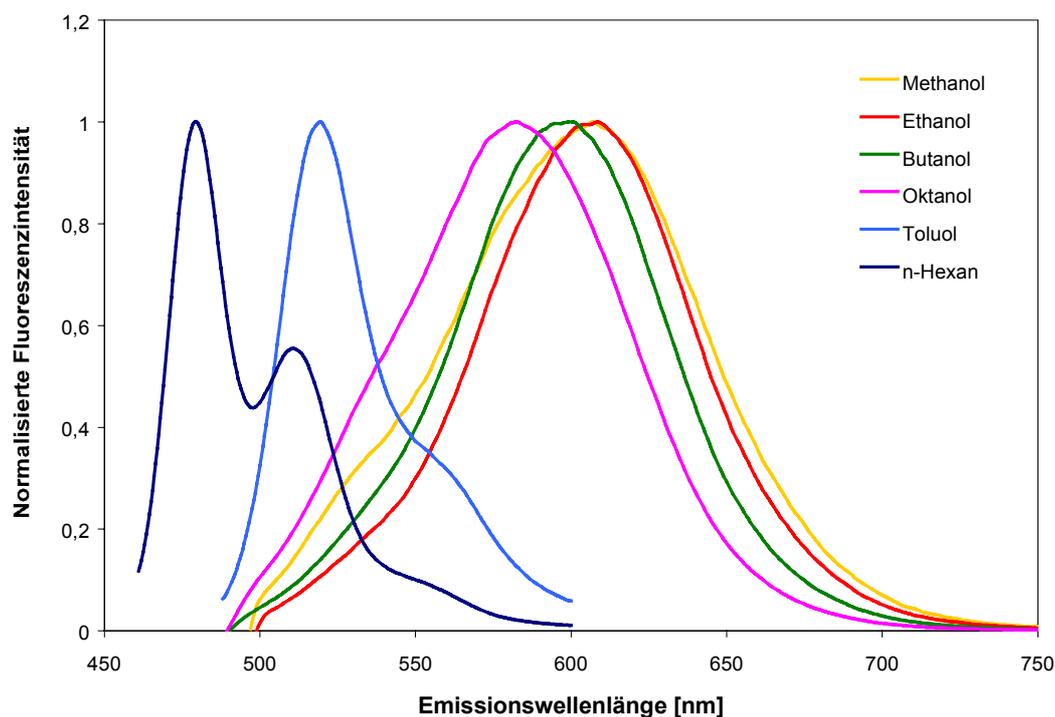


Abb. 5.24: Normalisierte Fluoreszenzemissionsspektren der Verbindung 9 in Methanol, Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan

Tabelle 5.21: Absorptions- und Emissionsmaximum (λ_{Abs} und λ_{Em}), Breite der Emissionsbande bei 50 % des Emissionsmaximums ($\Delta\nu_{1/2}$) und Stokes-Shift ($\Delta\nu_{\text{Stokes}}$) der Verbindung 9 in verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	λ_{Abs} nm	λ_{Em} nm	$\Delta\nu_{1/2}$ cm ⁻¹	$\Delta\nu_{\text{Stokes}}$ cm ⁻¹
Methanol	486	607	2640	4100
Ethanol	486	608	2200	4130
Butanol	486	598	2230	3850
Oktanol	482	582	2660	3570
Toluol	464	519	1290	2280
<i>n</i> -Hexan	441	480	1980	1840

5.3.9 1,7-Bis(4-diethylaminophenyl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (10)

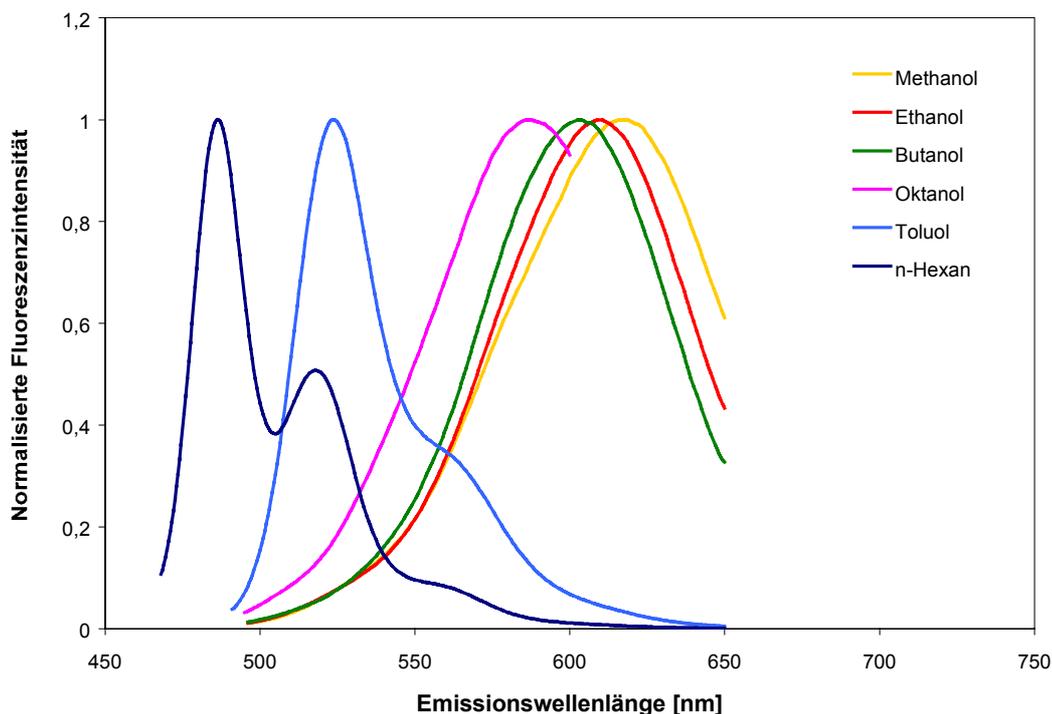


Abb. 5.25: Normalisierte Fluoreszenzemissionsspektren der Verbindung 10 in Methanol, Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan

Tabelle 5.22: Absorptions- und Emissionsmaximum (λ_{Abs} und λ_{Em}), Breite der Emissionsbande bei 50 % des Emissionsmaximums ($\Delta\nu_{1/2}$) und Stokes-Shift ($\Delta\nu_{\text{Stokes}}$) der Verbindung 10 in verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	λ_{Abs} nm	λ_{Em} nm	$\Delta\nu_{1/2}$ cm^{-1}	$\Delta\nu_{\text{Stokes}}$ cm^{-1}
Methanol	498	617	¹⁾	3870
Ethanol	494	609	2060	3820
Butanol	486	601	2010	3940
Oktanol	490	586	¹⁾	3340
Toluol	472	523	1230	2070
<i>n</i> -Hexan	448	487	906	1790

¹⁾ $\Delta\nu_{1/2}$ ist aus den aufgenommenen Emissionsspektren nicht bestimmbar (s. Abb. 5.25)

5.3.10 5-Hydroxy-1,7-bis(9-julolidinyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (11)

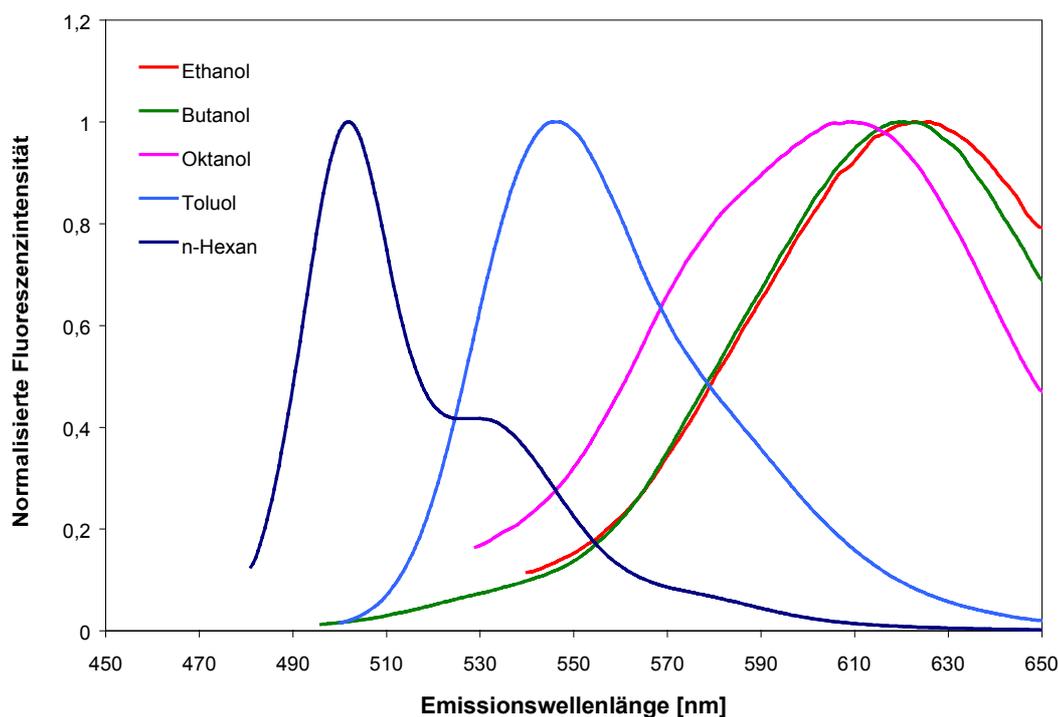


Abb. 5.26: Normalisierte Fluoreszenzemissionsspektren der Verbindung 11 in Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan

Tabelle 5.23: Absorptions- und Emissionsmaximum (λ_{Abs} und λ_{Em}), Breite der Emissionsbande bei 50 % des Emissionsmaximums ($\Delta\nu_{1/2}$) und Stokes-Shift ($\Delta\nu_{\text{Stokes}}$) der Verbindung 11 in verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	λ_{Abs} nm	λ_{Em} nm	$\Delta\nu_{1/2}$ cm^{-1}	$\Delta\nu_{\text{Stokes}}$ cm^{-1}
Ethanol	516	626	¹⁾	3410
Butanol	514	621	¹⁾	3350
Oktanol	509	608	2380	3200
Toluol	486	546	1670	2260
<i>n</i> -Hexan	461	502	1050	1770

¹⁾ $\Delta\nu_{1/2}$ ist aus den aufgenommenen Emissionsspektren nicht bestimmbar (s. Abb. 5.26)

5.3.11 5-Hydroxy-1,7-di-2-naphthyl-1,4,6-heptatrien-3-on (12)

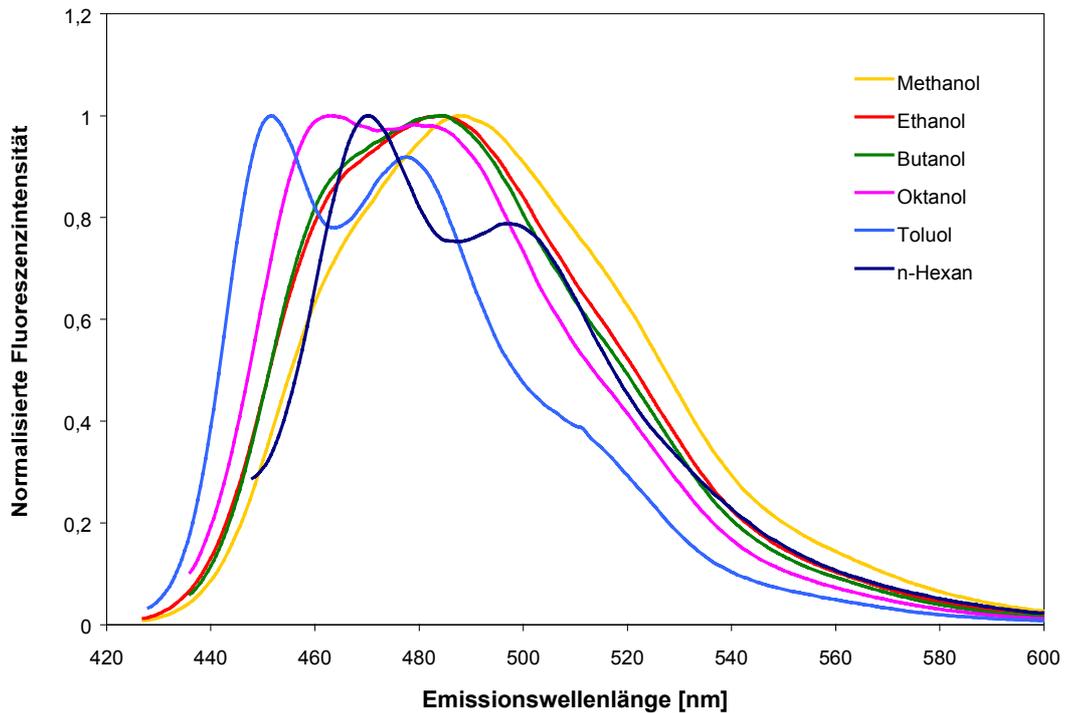


Abb. 5.27: Normalisierte Fluoreszenzemissionsspektren der Verbindung 12 in Methanol, Ethanol, Butanol, Oktanol, Toluol und *n*-Hexan

Tabelle 5.24: Absorptions- und Emissionsmaximum (λ_{Abs} und λ_{Em}), Breite der Emissionsbande bei 50 % des Emissionsmaximums ($\Delta\nu_{1/2}$) und Stokes-Shift ($\Delta\nu_{\text{Stokes}}$) der Verbindung 12 in verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	λ_{Abs} nm	λ_{Em} nm	$\Delta\nu_{1/2}$ cm^{-1}	$\Delta\nu_{\text{Stokes}}$ cm^{-1}
Methanol	408	488	2980	4020
Ethanol	410	483	2960	3690
Butanol	410	484	2920	3730
Oktanol	410	463	2890	2790
Toluol	412	451	2570	2100
<i>n</i> -Hexan	402	466	2560	3420

5.4 Berechnung der Differenz der Dipolmomente im Grund- und ersten angeregten Zustand

Die Berechnung des Onsager-Radius für die Verbindungen erfolgte in Anlehnung an die von Liptay vorgeschlagene Methode für Fluorophore, deren tatsächliche Molekülform von der dem Onsager-Modell zugrunde liegenden Kugelform abweicht und deren Dipolmoment nicht punktförmig in der Mitte einer Kugel liegt (Liptay, 1965). Das Wechselwirkungsvolumen, welches sich aus dem Volumen des π -Systems und der zugehörigen Solvathülle zusammensetzt (Lippert, 1956), wurde unter der Annahme berechnet, daß es sich bei der tatsächlichen Form der Verbindungen um ein Rotationsellipsoid handelt, und daß das Dipolmoment parallel zur langen Achse angeordnet ist.

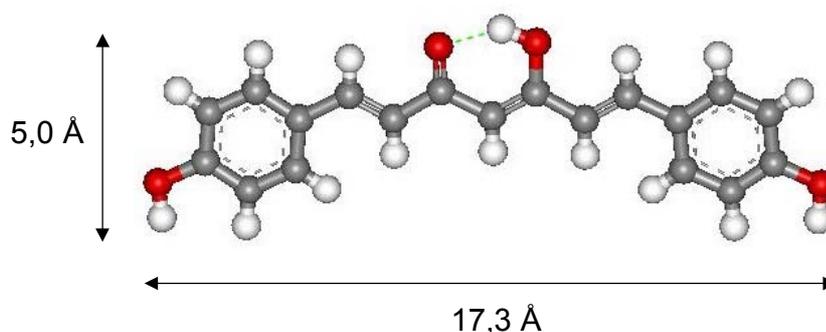


Abb. 5.28: Geometrieoptimierte Darstellung der Verbindung 4

Die Länge und die Höhe des Moleküls wurden mit Hilfe von AM1-Rechnungen ermittelt (Abb. 5.28). Zusätzlich zu den errechneten Maßen wurde eine Solvathülle von 0,7 Å in jede Dimension veranschlagt (Rohde, 2002). Da davon auszugehen ist, daß das π -System der unterschiedlichen Verbindungen in etwa gleich groß ist, wurde der Onsager-Radius beispielhaft für alle Verbindungen anhand der Verbindung 4 berechnet. Es wurde zunächst das Volumen eines Ellipsoids berechnet ($V_E = 4/3\pi abc$), wobei a die halbe Strecke der Gesamtlänge des Moleküls und b und c jeweils die halbe Strecke der Gesamthöhe des Moleküls sind. Anschließend wurde der Radius einer Kugel mit dem Kugelvolumen $V_K = V_E$ ermittelt und als Onsager-Radius in die Gl. 4.4 eingesetzt.

Das Ergebnis der Lippert-Auftragung zur Ermittlung der Geradensteigung b ist in Abb. 5.29 am Beispiel der Verbindungen **4** und **9** dargestellt.

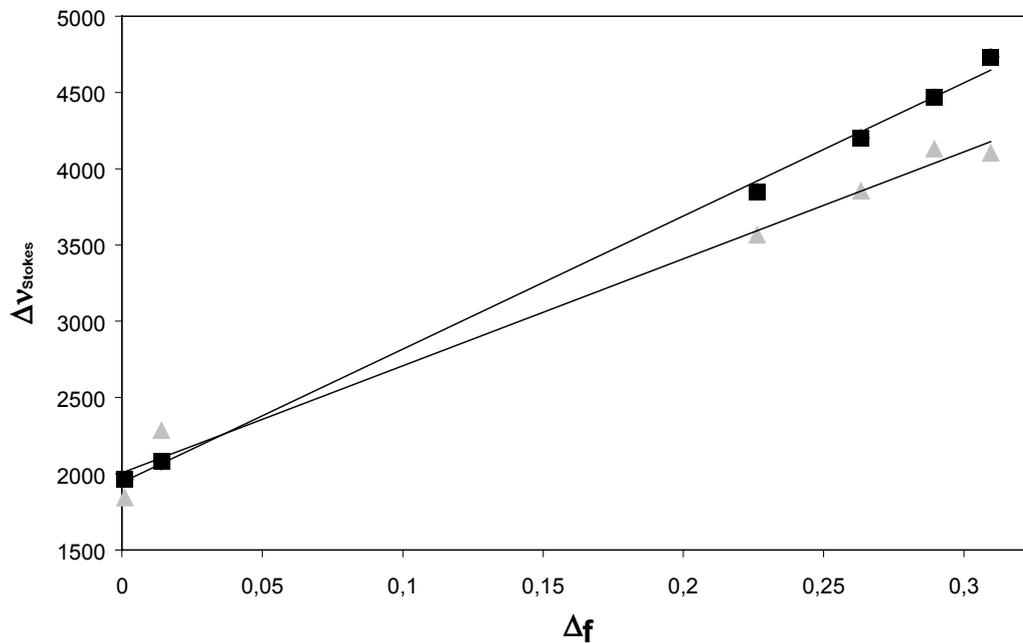


Abb. 5.29: Lippert-Auftragung für die Verb. **4** (■) und **9** (▲). Lösungsmittel (Δf): Methanol (0,309), Ethanol (0,289), Butanol (0,263), Oktanol (0,226), Toluol (0,014) und *n*-Hexan (0,001), $\Delta f = (\epsilon - 1)/(2\epsilon + 1) - (n^2 - 1)/(2n^2 + 1)$

Die Lippert-Auftragung ergab für die Verbindungen **2**, **3** und **12** keinen linearen Zusammenhang zwischen ΔV_{Stokes} und Δf . Daher wurde $\Delta\mu$ für diese Verbindungen nicht bestimmt.

In Tabelle 5.25 sind die Ergebnisse der Bestimmung der Differenz der Dipolmomente von Grund- und erstem angeregten Zustand für die Verbindungen **4** – **11** aufgeführt.

Tabelle 5.25: Ergebnisse der Bestimmung der Differenz von Dipolmomenten im Grund- und ersten angeregten Zustand ($\Delta\mu$) für die Verbindungen 4 - 11

Verbindung	Onsagerradius [Å]	Geradensteigung b	Bestimmtheitsmaß r^2	$\Delta\mu$ [D]
4	4,33	8733	0,9980	8,4
5	4,33	8305	0,9927	8,2
6	4,33	8334	0,9982	8,2
7	4,33	7175	0,9864	7,6
8	4,33	9016	0,9874	8,5
9	4,33	7014	0,9843	7,5
10	4,33	6842	0,9770	7,4
11	4,33	5153	0,9557	6,4

5.5 Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute

Die Bestimmung der relativen Fluoreszenzquantenausbeute erfolgte über den Vergleich mit Chininsulfat in 0,5 M H₂SO₄ (Parker und Rees, 1960). Es wurde zunächst ein Absorptionsspektrum der Standardsubstanz in 0,5 M H₂SO₄ und der Verbindungen **1 – 12** in Ethanol, Oktanol und *n*-Hexan aufgenommen und der Absorptionswert bei 360 nm bestimmt. Anschließend wurde ein Emissionsspektrum der Standardsubstanz in 0,5 M H₂SO₄ und der Verbindungen in Ethanol, Oktanol und *n*-Hexan mit der Anregungswellenlänge von 360 nm aufgenommen, wobei die Probenlösungen der Absorptionmessungen 1:10 verdünnt wurden. Die Emissionsspektren wurden wie unter 4.6 beschrieben korrigiert und die Flächen unter den korrigierten Spektren wurden mit Hilfe der Geräte-Software ermittelt.

Die Berechnung der relativen Fluoreszenzquantenausbeute erfolgte über die Gl. 4.5. Die Ergebnisse der Bestimmung der relativen Fluoreszenzquantenausbeute sind in Abb. 5.30 dargestellt.

5.5.1 Bestimmung der relativen Fluoreszenzquantenausbeute in Ethanol, Oktanol und *n*-Hexan

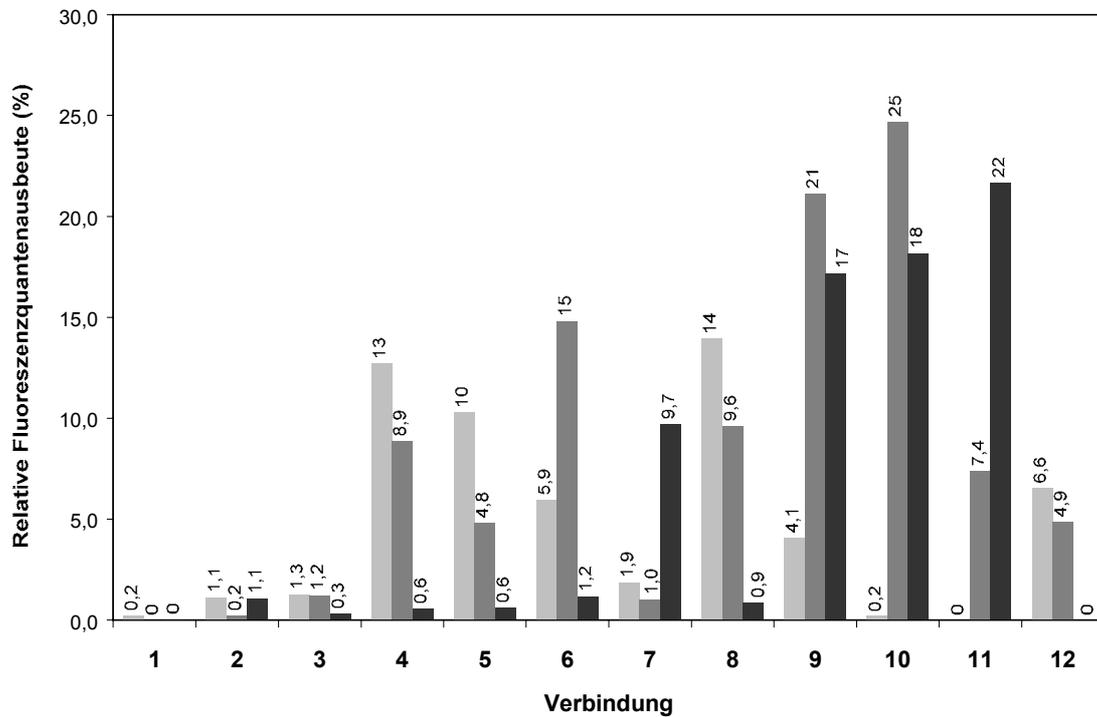


Abb. 5.30: Relative Fluoreszenzquantenausbeuten der Verbindungen 1 - 12 in Ethanol (hellgrau), Oktanol (dunkelgrau) und *n*-Hexan (schwarz)

5.6 Fluoreszenzverhalten in Liposomensuspension

Zur Bestimmung des Fluoreszenzverhaltens der Verbindungen **2** - **12** in einer DPPC-Liposomensuspension wurden die Verbindungen in einer Konzentration von 2 μM in SPP pH 7,4 und in SPP pH 7,4 mit steigenden Konzentrationen von DPPC (10, 25, 50, 100 und 200 μM) fluorimetrisch untersucht.

Die Verbindungen **2**, **3**, **6**, **7** und **9** – **12** zeigten ohne DPPC-Zusatz keine Fluoreszenz. In den Abbildungen 5.31 und 5.32 ist beispielhaft für die Messungen das Fluoreszenzverhalten der Verbindungen **4** bzw. **11** bei steigenden DPPC-Konzentrationen dargestellt. Da die Verbindungen in SPP pH 7,4 keine Fluoreszenz zeigten, ist als Vergleich für das Fluoreszenzverhalten in einer polaren Umgebung des Emissionsspektrum der beiden Verbindungen in Ethanol abgebildet. Die Verbindungen **2** und **12** zeigen bei 50 μM bzw. 200 μM DPPC eine deutliche Strukturierung, weshalb in der Tabelle 5.26 bei diesen Konzentrationen zwei Maxima angegeben sind. Für die Verbindung **12** sind die Emissionsspektren bei

verschiedenen DPPC-Konzentrationen in Abb. 5.33 dargestellt. Das Fluoreszenzverhalten dieser Verbindungen wird in Kapitel 6 diskutiert.

In Tabelle 5.26 sind die Ergebnisse der Untersuchung des Fluoreszenzverhaltens in einer Liposomensuspension zusammengefaßt.

5.6.1 5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (4) Bisdesmethoxycurcumin

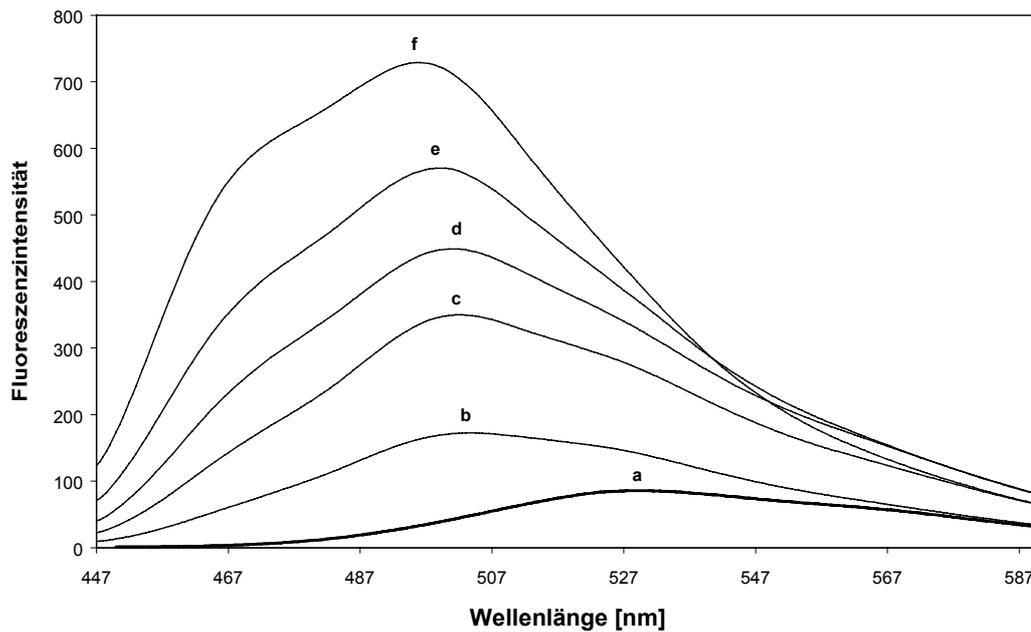


Abb. 5.31: Fluoreszenzemissionsspektren der Verbindung 4 in SPP pH 7,4 (a) und in Liposomensuspension [(b) 10 µM, (c) 25 µM, (d) 50 µM, (e) 100 µM, (f) 200 µM DPPC]

5.6.2 5-Hydroxy-1,7-bis(9-julolidinyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (11)

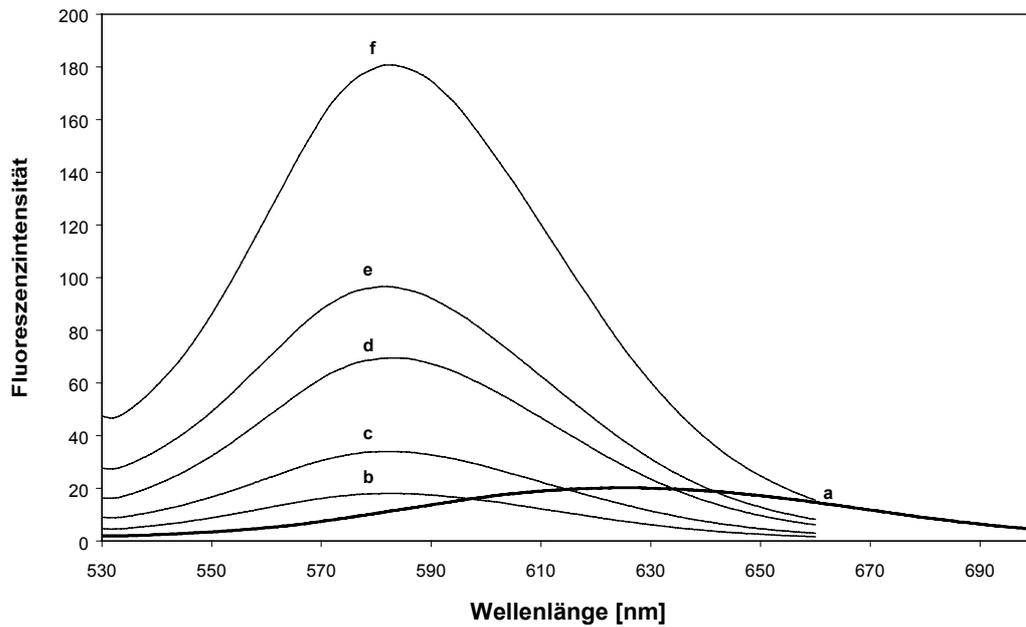


Abb. 5.32: Fluoreszenzemissionsspektren der Verbindung 11 in Ethanol (a) und in Liposomensuspension [(b) 10 μM, (c) 25 μM, (d) 50 μM, (e) 100 μM, (f) 200 μM DPPC]

5.6.3 5-Hydroxy-1,7-di-2-naphthyl-1,4,6-heptatrien-3-on (12)

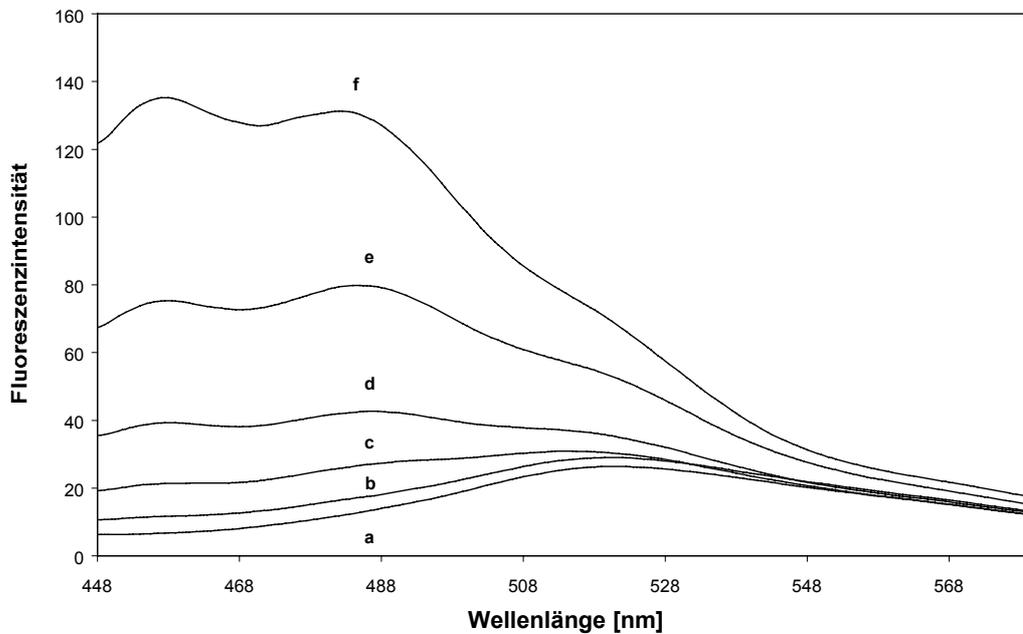


Abb. 5.33: Fluoreszenzemissionsspektren der Verbindung 12 in Liposomensuspension [(b) 10 μM, (c) 25 μM, (d) 50 μM, (e) 100 μM, (f) 200 μM DPPC]

Tabelle 5.26: Zusammenfassung der Fluoreszenzmessungen der Verbindungen 4 – 11 in Liposomensuspension (λ_{Em} : Emissionsmaximum der Verbindung; RFI: Relative Fluoreszenzintensität)

Verb.	0 μ M DPPC λ_{Em} (RFI)	10 μ M DPPC λ_{Em} (RFI)	25 μ M DPPC λ_{Em} (RFI)	50 μ M DPPC λ_{Em} (RFI)	100 μ M DPPC λ_{Em} (RFI)	200 μ M DPPC λ_{Em} (RFI)
2	-	500 (92)	499 (91)	$\begin{matrix} 471 (104) \\ 495 (102) \end{matrix}$	468 (141)	466 (219)
3	-	496 (76)	490 (66)	491 (85)	486 (76)	485 (95)
4	528 (87)	504 (172)	502 (350)	501 (449)	499 (570)	496 (729)
5	523 (214)	494 (357)	492 (485)	491 (565)	489 (570)	485 (607)
6	-	494 (357)	492 (485)	491 (565)	489 (570)	485 (607)
7	-	498 (18)	501 (67)	501 (134)	502 (134)	501 (494)
8	527 (21)	500 (102)	497 (284)	495 (513)	494 (941)	488 (848)
9	-	556 (61)	556 (129)	556 (230)	553 (293)	552 (490)
10	-	555 (59)	550 (97)	550 (196)	548 (249)	546 (477)
11	-	584 (17)	584 (35)	585 (72)	584 (115)	584 (214)
12	-	520 (29)	514 (31)	487 (43)	484 (80)	$\begin{matrix} 457 (135) \\ 482 (131) \end{matrix}$

5.7 Fluoreszenzverhalten in Rinderserumalbuminlösung

Zur Bestimmung des Fluoreszenzverhaltens der Verbindungen **4 - 11** in einer RSA-Lösung wurden die Verbindungen in einer Konzentration von 5 μ M in SPP pH 7,4 und in SPP pH 7,4 mit steigenden Konzentrationen von RSA (5, 10, 25, 50, 100 und 300 μ M) fluorimetrisch untersucht.

Die Verbindungen **6, 7, 9, 10** und **11** zeigten in SPP pH 7,4 ohne RSA-Zusatz keine Fluoreszenz. In den Abbildungen 5.34 und 5.35 ist beispielhaft für die Messungen das Fluoreszenzverhalten der Verbindungen **6** bzw. **9** bei steigenden RSA-Konzentrationen dargestellt. Da die Verbindungen in SPP pH 7,4 keine Fluoreszenz zeigten, ist als Vergleich für das Fluoreszenzverhalten in einer polaren Umgebung des Emissionsspektrum der beiden Verbindungen in Methanol abgebildet.

In Tabelle 5.27 sind die Ergebnisse der Untersuchung des Fluoreszenzverhaltens in RSA-Lösung zusammengefaßt.

5.7.1 5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (6) Curcumin

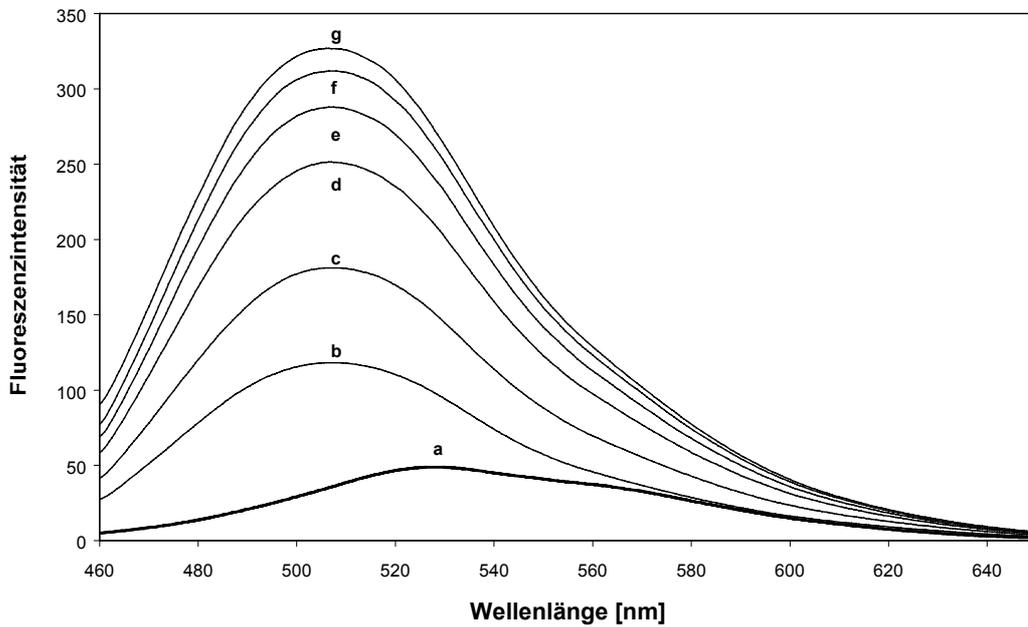


Abb. 5.34: Emissionsspektren der Verbindung 6 in Methanol (a) und in SPP pH 7,4 mit Rinderserumalbumin [(b) 5 µM, (c) 10 µM, (d) 25 µM, (e) 50 µM, (f) 100 µM, (g) 300 µM RSA]

5.7.2 1,7-Bis(4-dimethylaminophenyl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (9)

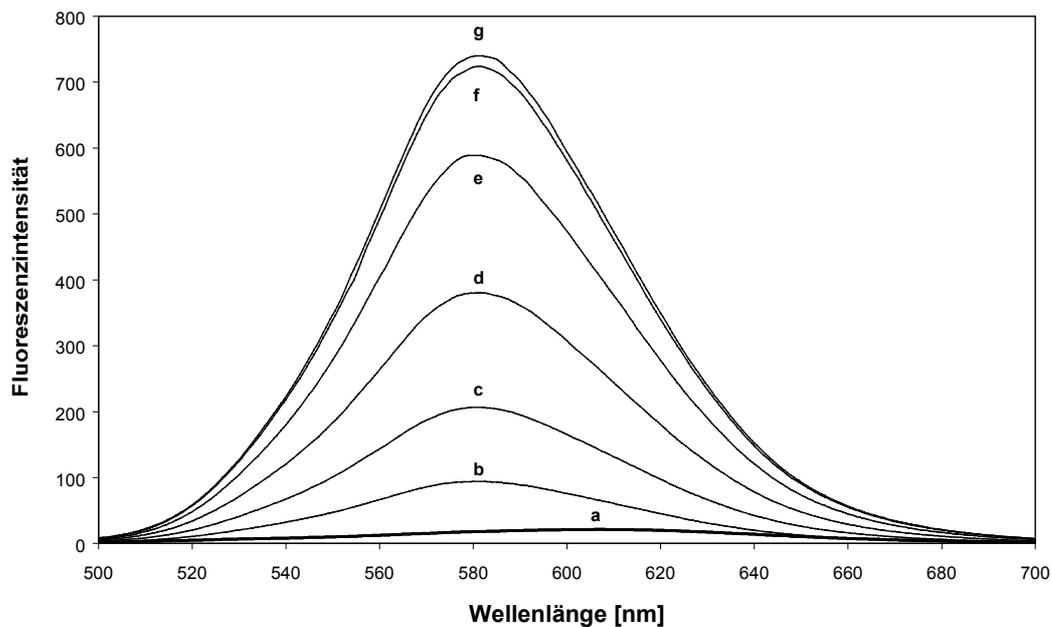


Abb. 5.35: Emissionsspektren der Verbindung 9 in Methanol (a) und in SPP pH 7,4 mit Rinderserumalbumin [(b) 5 µM, (c) 10 µM, (d) 25 µM, (e) 50 µM, (f) 100 µM, (g) 300 µM RSA]

Tabelle 5.27: Zusammenfassung der Fluoreszenzmessungen der Verbindungen 4 – 11 in SPP pH 7,4 mit Rinderserumalbumin (λ_{Em} : Emissionsmaximum der Verbindung; RFI: Relative Fluoreszenzintensität)

Verb.	0 μ M RSA λ_{Em} (RFI)	5 μ M RSA λ_{Em} (RFI)	10 μ M RSA λ_{Em} (RFI)	25 μ M RSA λ_{Em} (RFI)	50 μ M RSA λ_{Em} (RFI)	100 μ M RSA λ_{Em} (RFI)	300 μ M RSA λ_{Em} (RFI)
4	528 (87)	497 (348)	496 (441)	495 (496)	495 (527)	495 (534)	494 (544)
5	523 (214)	510 (471)	492 (291)	489 (233)	490 (223)	489 (232)	488 (259)
6	-	507 (118)	508 (181)	507 (251)	507 (288)	506 (312)	506 (327)
7	-	504 (233)	504 (359)	505 (463)	504 (498)	504 (521)	503 (529)
8	527 (21)	499 (220)	495 (215)	494 (220)	493 (224)	493 (229)	492 (254)
9	-	581 (94)	581 (206)	581 (380)	581 (588)	581 (724)	581 (740)
10	-	605 (36)	602 (48)	599 (96)	597 (137)	596 (196)	596 (289)
11	-	550 (23)	552 (36)	554 (61)	556 (84)	561 (120)	566 (164)

5.8 Fluoreszenzpolarisation

5.8.1 Bestimmung der Anisotropie in Liposomensuspension

Die Bestimmung der Anisotropie in einer DPPC-Liposomensuspension erfolgte mit Hilfe fluoreszenzspektroskopischer Messungen mit einem herkömmlichen Fluorimeter, in dessen Anregungs- und Emissionsstrahlengänge Polarisationsfilter eingebracht werden können.

Über einen Vergleich mit den Anisotropiewerten der bekannten Membransonde 1,6-DPH sollte untersucht werden, in wieweit zum einen der temperaturabhängige Übergang der Phospholipid-Doppelmembran von der Gel- in die Flüssig-kristalline Phase mit Hilfe der Curcuminoide zu verfolgen und anhand der erhaltenen Daten eine Phasenübergangstemperatur für die Liposomen zu bestimmen ist. Zum anderen sollte untersucht werden, ob aus den erhaltenen Daten Rückschlüsse auf die in der Lipidmembran vorherrschende Mikroviskosität zu ziehen sind.

Dazu wurden die Verbindungen **6** und **9** eingehender untersucht. Parallel dazu wurden die Anisotropiewerte von 1,6-DPH ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.36 dargestellt.

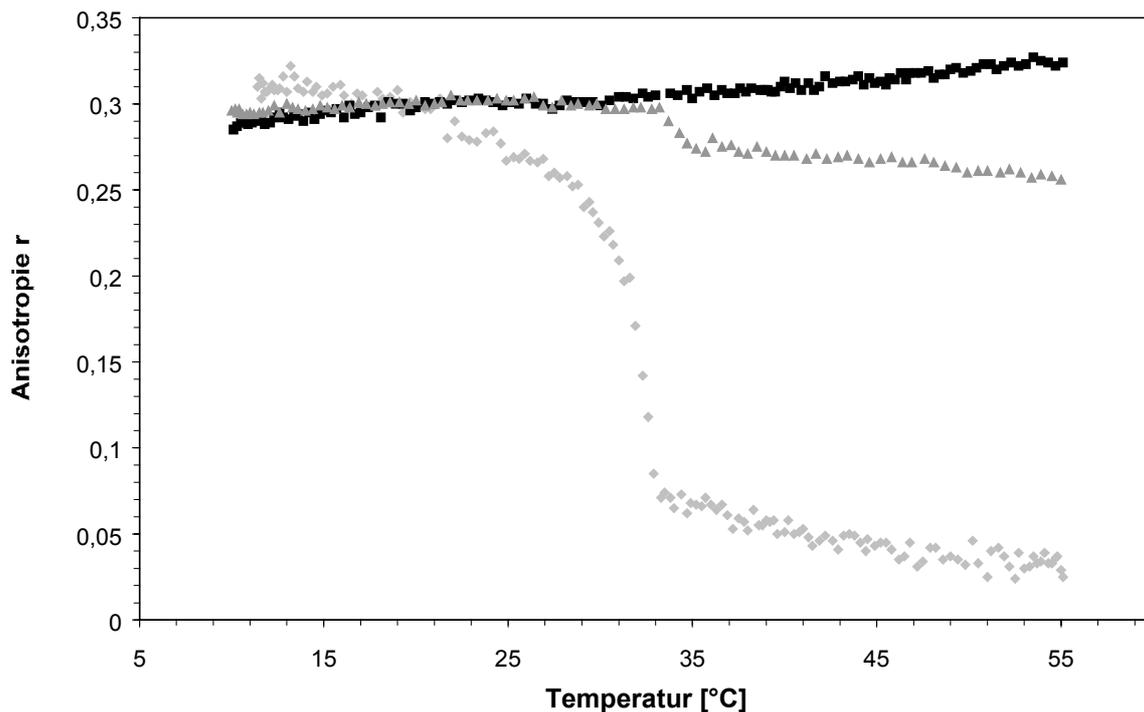


Abb. 5.36: Anisotropiewerte der Verbindungen **6** (■), **9** (▲) sowie DPH (◆) aufgetragen gegen die Temperatur (10 – 55 °C).

Aus den Anisotropiewerten von 1,6-DPH ist der sprunghafte Übergang der Liposomen von der Gel- in die Flüssig-kristalline Phase gut zu erkennen. Aus einer Kurvenanpassung an die sich ergebende sigmoidale Kurve nach Gl. 5.1 kann die Phasenübergangstemperatur ermittelt werden.

$$r = r_0 + \frac{a}{1 + e^{\frac{-(T-T_m)}{b}}} \quad \text{Gl. 5.1}$$

Dabei ist r die jeweilige Anisotropie, r_0 der Anfangswert der Anisotropie, T die jeweilige Temperatur und T_m die Phasenübergangstemperatur. Es ergibt sich eine mit 1,6-DPH bestimmte Phasenübergangstemperatur von 31,4 °C.

Die Anisotropiewerte der Verbindung **9** zeigen keine derart empfindliche Änderung wie bei 1,6-DPH, jedoch ist auch hier der sprunghafte Phasenübergang gut zu erkennen. Eine Kurvenanpassung ergibt hier eine Phasenübergangstemperatur von 35,4 °C. Aus den Anisotropiewerten der Verbindung **6** ist ein Phasenübergang nicht erkennbar. Die Werte zeigen über den gesamten Temperaturbereich einen kontinuierlichen Anstieg. T_m ist hier nicht bestimmbar.

Aus den Anisotropiewerten von 1,6-DPH lässt sich die Mikroviskosität über die Perrin-Gleichung (Gl. 4.7) ermitteln. Für DPPC-Liposomen ist eine Mikroviskosität von etwa $1,0 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ in der rigideren Gelphase und etwa $0,03 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ in der fluideren flüssig-kristallinen Phase beschrieben (Elschner, 1998).

Aus den Anisotropiewerten sowohl der Verbindung **6** als auch der Verbindung **9** ist eine derartig ausgeprägte Veränderung der Mikroviskosität als Zeichen einer „Fluidisierung“ der Lipidmembran nicht ermittelbar.

Die dargestellten Vergleichsmessungen werden in Kapitel 6 diskutiert.

5.8.2 Bestimmung der Anisotropie in Ethanol und Aceton

Die Bestimmung der Anisotropie in Ethanol und Aceton erfolgte mit Hilfe fluoreszenzspektroskopischer Messungen mit einem Fluorimeter, in dessen Anregungs- und Emissionsstrahlengänge Polarisationsfilter eingebracht werden können.

Für die Verbindung **1** konnte aufgrund der sehr geringen Fluoreszenzintensitäten in den Lösungsmitteln kein Anisotropiewert ermittelt werden. Die Ergebnisse für die übrigen Verbindungen und als Vergleich für DPH sind in Tabelle 5.28 aufgeführt und werden in Kapitel 6 diskutiert. Für die Verbindungen **6** und **9** sind zusätzlich die Emissionsspektren in Aceton und Ethanol dargestellt (Abb. 5.37).

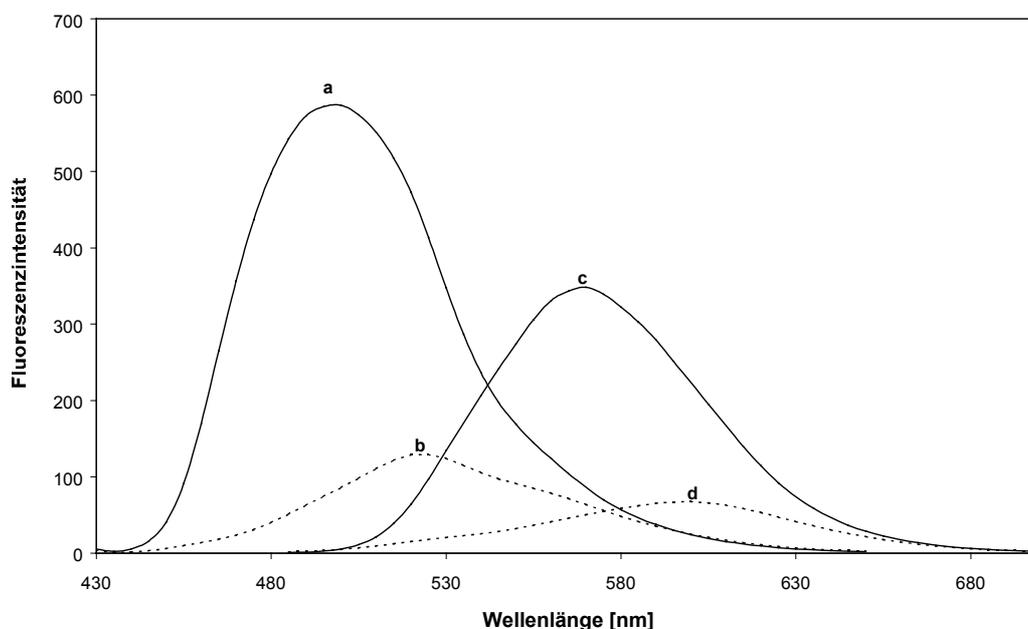


Abb. 5.37: Emissionsspektren der Verbindung **6** in Aceton (a) und Ethanol (b) sowie der Verbindung **9** in Aceton (c) und Ethanol (d).

Tabelle 5.28: Anisotropiewerte der Verbindungen 1 – 12 sowie von DPH in Ethanol und Aceton (n.b.: nicht bestimmbar)

Verbindung	Ethanol			Aceton		
	λ_{Ex} (nm)	λ_{Em} (nm)	Anisotropie (r)	λ_{Ex} (nm)	λ_{Em} (nm)	Anisotropie (r)
1	-	-	n.b.	-	-	n.b.
2	397	472	0,258	390	470	0,264
3	404	460	0,279	399	462	0,280
4	418	511	0,147	409	476	0,106
5	411	498	0,121	400	478	0,095
6	437	525	0,229	423	497	0,059
7	415	493	0,316	415	494	0,062
8	418	511	0,147	409	476	0,106
9	465	575	0,106	474	572	0,028
10	475	600	0,108	476	571	0,027
11	511	625	0,242	514	603	0,060
12	407	483	0,164	407	455	0,173
DPH	366	428	0,002	366	428	0,002

5.9 Bestimmung von Bindungskonstanten einzelner Verbindungen mit Rinderserumalbumin

Die Bestimmung der Bindungskonstanten sollte mit Hilfe der Methode der kontinuierlichen Veränderung nach Jobs erfolgen (Continuos-Variations-Plot; Jobs-Plot). Da sich die Bestimmung der Bindungskonstanten nach dieser Methode für einige der Verbindungen als ungeeignet erwies (siehe Diskussion der Ergebnisse), sind im folgenden nur die Ergebnisse für die Verbindungen **6** und **7** dargestellt (Abb. 5.38 und 5.39). Die Versuchsdurchführung erfolgte wie unter 4.9.1 beschrieben. Vor der Aufnahme der Emissionsspektren wurden die Proben jeweils 15 min vorinkubiert, um auszuschließen, daß sich während der Messungen das Ausmaß der Proteinbindung der Verbindungen verändert. Jede Probenkonzentration wurde drei mal vermessen, die Standardabweichungen der Messungen sind in Form von Fehlerbalken in den Abbildungen angegeben.

5.9.1 5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (6) Curcumin

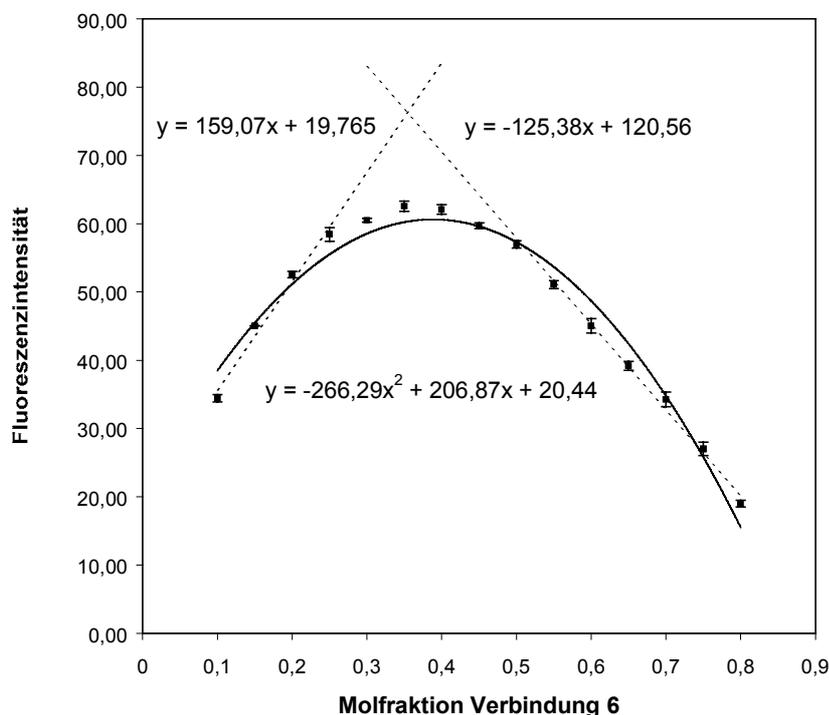


Abb. 5.38: Continuos-Variations-Plot für die Verbindung **6** mit Rinderserumalbumin. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen der gemessenen Intensitäten an.

Durch Gleichsetzen der Geradengleichungen der beiden Tangenten erhält man den Konzentrationsanteil X_M der Verbindung **6** für die maximale Komplexbildung (ergibt umgerechnet in mol/l den Wert L_T). Setzt man diesen Wert als x-Wert in eine der Geradengleichung bzw. in die ermittelte Kurvenfunktion ein, so erhält man I_0 bzw. I . Zieht man von 1 den Konzentrationsanteil der Verbindung **6** ab, erhält man den Konzentrationsanteil des Proteins für die maximale Komplexbildung (ergibt umgerechnet in mol/l den Wert M_T). Durch Einsetzen der Werte in Gl. 4.9. erhält man den Wert für die Bindungskonstante K_B in M^{-1} :

$$I_0 = 76,13$$

$$I = 60,31$$

$$L_T = 3,54 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

$$M_T = 6,46 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

Einsetzen in Gl. 4.9. ergibt die Bindungskonstante K_B der Verbindung **6** mit RSA:

$$\underline{K_B = 1,0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}}$$

5.9.2 5-Hydroxy-1,7-bis(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (7)

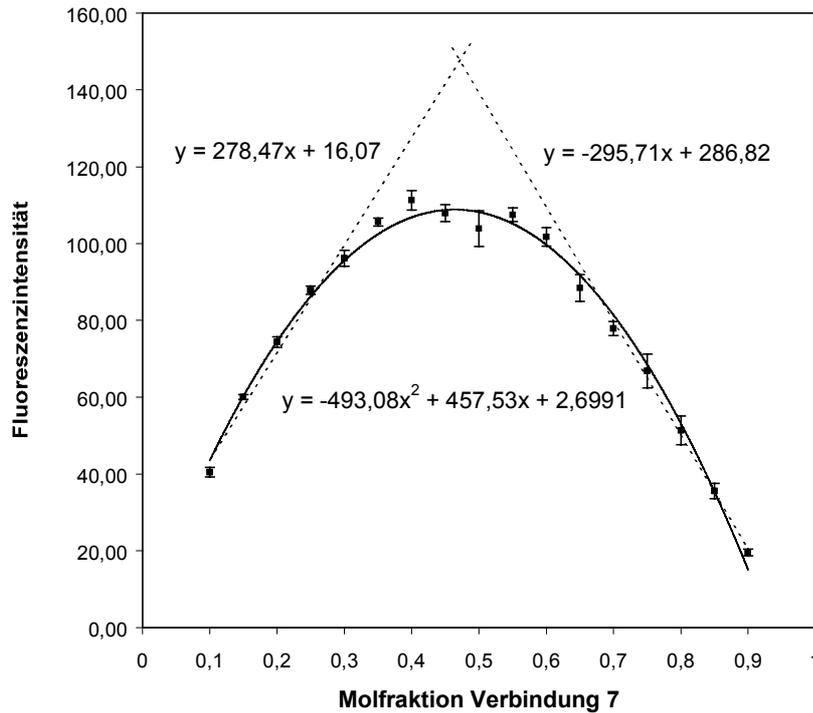


Abb. 5.39: Continuos-Variations-Plot für die Verbindung 7 mit Rinderserumalbumin. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen der gemessenen Intensitäten an.

Die Auswertung erfolgte wie unter 5.9.2 für die Verbindung 6 beschrieben. Zieht man von 1 den Konzentrationsanteil der Verbindung 7 ab, erhält man den Konzentrationsanteil des Proteins für die maximale Komplexbildung (ergibt umgerechnet in mol/l den Wert M_T). Durch Einsetzen der Werte in Gl. 4.9. erhält man den Wert für die Bindungskonstante K_B in M^{-1} :

$$I_0 = 147,38$$

$$I = 108,81$$

$$L_T = 4,72 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

$$M_T = 5,28 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

Einsetzen in Gl. 4.9. ergibt die Bindungskonstante K_B der Verbindung 7 mit RSA:

$$\underline{K_B = 1,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}}$$

5.10 Lipophiliebestimmung

5.10.1 Lipophiliebestimmung mittels RP-HPLC

Die Ermittlung der log P-Werte erfolgte wie unter 4.10 beschrieben. In Abb. 5.40 ist das Ergebnis einer Korrelationsanalyse für die Standardmischung dargestellt.

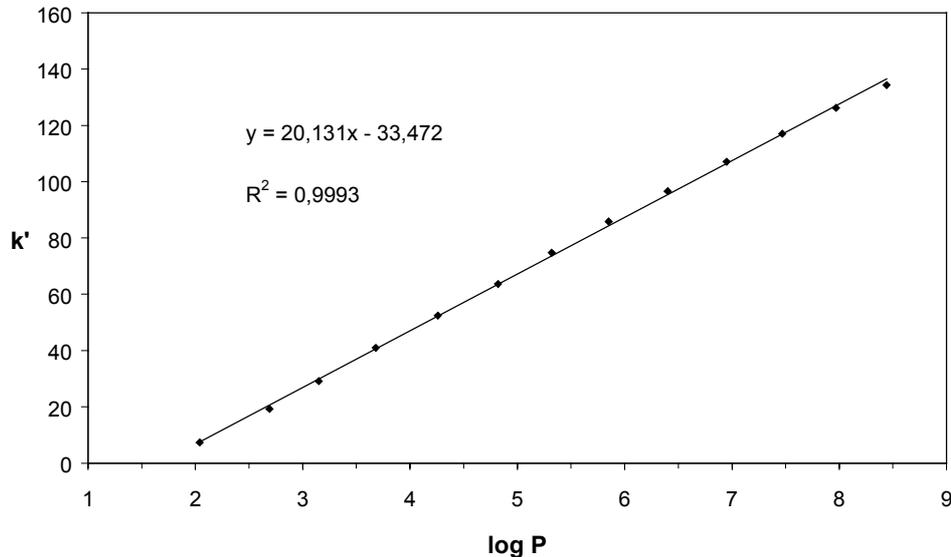


Abb. 5.40: Ergebnis einer Korrelationsanalyse: Dargestellt ist die Korrelation der bekannten log P-Werte der Standards mit den ermittelten k' -Werten (Eluent A: Acetonitril, Eluent B: Sörensen-Phosphatpuffer pH 7,4)

Da es sich bei den ermittelten log P-Werten der Verbindungen um empirische Daten handelt, sollten die gewonnenen Ergebnisse einer statistischen Beurteilung unterworfen werden. Folgende Parameter wurden dabei geprüft:

1. Standardabweichung der Geradensteigung
 2. Standardabweichung des Achsenabschnittes
 3. Vertrauensbereich der Geradensteigung
 4. Vertrauensbereich des Achsenabschnittes
- zur Beurteilung der ermittelten Regressionsgeraden, sowie
5. Standardabweichung der log P-Werte der Verbindungen
 6. Vertrauensbereich der log P-Werte der Verbindungen
- zur Beurteilung der mit der Methode ermittelten log P-Werte.

Für jede Verbindung wurden jeweils zwei Parallelbestimmungen durchgeführt ($n = 2$), bei jeder Messung wurden alle dreizehn Standards eingespritzt (Anzahl der Referenzwerte $m = 13$). Die Ermittlung der Regressionsgeraden erfolgte nach einem linearen Regressionsmodell. Die Vertrauensintervalle sind jeweils mit einer Wahr-

scheinlichkeit von $P = 95\%$ angegeben. Die Ergebnisse der statistischen Beurteilung sind in Tabelle 5.29 dargestellt.

Tabelle 5.29: Ergebnisse der Regressionsanalyse für die log P-Bestimmung der Verbindungen 1 - 12 (Eluent A: Acetonitril; Eluent B: SPP pH 7,4)

Verbindung	Geradengleichung	r^2	log P
1	$k' = (20,26 \pm 0,37) \log P - (33,39 \pm 2,03)$	0,999 ($n = 2$)	$4,91 \pm 0,09$
2	$k' = (19,08 \pm 0,32) \log P - (31,43 \pm 1,80)$	0,999 ($n = 2$)	$5,82 \pm 0,09$
3	$k' = (20,28 \pm 0,36) \log P - (33,39 \pm 1,98)$	0,999 ($n = 2$)	$7,59 \pm 0,10$
4	$k' = (20,40 \pm 0,34) \log P - (33,74 \pm 1,94)$	0,999 ($n = 2$)	$2,66 \pm 0,10$
5	$k' = (19,08 \pm 0,33) \log P - (31,49 \pm 1,87)$	0,999 ($n = 2$)	$4,79 \pm 0,09$
6	$k' = (20,27 \pm 0,33) \log P - (33,69 \pm 1,88)$	0,999 ($n = 2$)	$2,78 \pm 0,10$
7	$k' = (20,30 \pm 0,33) \log P - (33,58 \pm 1,87)$	0,999 ($n = 2$)	$2,85 \pm 0,10$
8	$k' = (19,14 \pm 0,31) \log P - (31,62 \pm 1,79)$	0,999 ($n = 2$)	$4,53 \pm 0,09$
9	$k' = (19,91 \pm 0,33) \log P - (32,81 \pm 1,90)$	0,999 ($n = 2$)	$5,36 \pm 0,09$
10	$k' = (19,73 \pm 0,32) \log P - (32,46 \pm 1,83)$	0,999 ($n = 2$)	$6,62 \pm 0,09$
11	$k' = (20,36 \pm 0,34) \log P - (33,69 \pm 1,95)$	0,999 ($n = 2$)	$7,15 \pm 0,10$
12	$k' = (20,28 \pm 0,33) \log P - (33,63 \pm 1,87)$	0,999 ($n = 2$)	$6,65 \pm 0,09$

Um auszuschließen, daß die ermittelten log P-Werte durch Dissoziation der phenolischen oder enolischen Hydroxylfunktion beeinflusst werden, wurden alle Verbindungen mit Sörensen-Phosphatpuffer pH 5,0 als Eluent B vermessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.30 unter Angabe der Vertrauensbereiche für die Geradensteigung, des Achsenabschnitts und der ermittelten log P-Werte sowie des Bestimmtheitsmaßes der Regressionsgeraden dargestellt.

Tabelle 5.30: Ergebnisse der Regressionsanalyse für die log P-Bestimmung der Verbindungen 1 - 12 (Eluent A: Acetonitril; Eluent B: SPP pH 5,0)

Verbindung	Geradengleichung	r^2	log P
1	$k' = (20,37 \pm 0,39) \log P - (33,34 \pm 2,19)$	0,999 ($n = 2$)	$4,93 \pm 0,10$
2	$k' = (20,34 \pm 0,38) \log P - (33,28 \pm 2,17)$	0,999 ($n = 2$)	$5,83 \pm 0,10$
3	$k' = (20,37 \pm 0,37) \log P - (33,43 \pm 2,09)$	0,999 ($n = 2$)	$7,59 \pm 0,11$
4	$k' = (20,34 \pm 0,37) \log P - (33,21 \pm 2,08)$	0,999 ($n = 2$)	$2,69 \pm 0,11$
5	$k' = (20,39 \pm 0,41) \log P - (33,35 \pm 2,33)$	0,999 ($n = 2$)	$4,79 \pm 0,11$
6	$k' = (20,30 \pm 0,39) \log P - (33,17 \pm 2,22)$	0,999 ($n = 2$)	$2,81 \pm 0,12$
7	$k' = (20,32 \pm 0,37) \log P - (33,30 \pm 2,09)$	0,999 ($n = 2$)	$2,85 \pm 0,11$
8	$k' = (20,33 \pm 0,38) \log P - (33,23 \pm 2,14)$	0,999 ($n = 2$)	$4,53 \pm 0,10$
9	$k' = (20,28 \pm 0,36) \log P - (33,13 \pm 2,06)$	0,999 ($n = 2$)	$5,36 \pm 0,10$
10	$k' = (20,26 \pm 0,37) \log P - (33,20 \pm 2,12)$	0,999 ($n = 2$)	$6,59 \pm 0,10$
11	$k' = (20,37 \pm 0,38) \log P - (33,37 \pm 2,16)$	0,999 ($n = 2$)	$7,14 \pm 0,11$
12	$k' = (20,38 \pm 0,36) \log P - (33,48 \pm 2,05)$	0,999 ($n = 2$)	$6,65 \pm 0,10$

Die Ergebnisse zeigen, daß keine signifikanten Unterschiede in den log P-Werten in Abhängigkeit vom pH-Wert des verwendeten Puffers gefunden wurden.

6 Diskussion

6.1 Stabilitätsuntersuchungen der Curcuminoide

Die Problematik der Stabilität von Curcumin **6** in wäßrigen alkalischen Lösungen wurde in der Vergangenheit ausführlich untersucht und diskutiert. Dabei wurden sowohl ein einfacher Hydrolysemechanismus als auch ein radikalisch induzierter Mechanismus als Grund für die Instabilität postuliert (Tönnesen, 1985a,b; König, 1993; Mamero, 1997). Untersuchungen zum Abbaumechanismus waren jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Es wurde die Stabilität der Verbindungen **1** – **12** bei einem physiologischen pH-Wert verfolgt und der stabilisierende Effekt von RSA und DPPC-Liposomen untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, daß alle Verbindungen mit Ausnahme der Verbindungen **8** und **9** einem mehr oder weniger starken Abbau in SPP pH 7,4 unterliegen. Die Verbindungen **4** und **7** konnten zunächst in der eingesetzten Meßkonzentration in Lösung gebracht werden, fallen jedoch innerhalb des Untersuchungszeitraumes aus. Die Verbindungen **1**, **2**, **4**, **5** und **7** wurden bereits von Mamero auf ihre Stabilität in wäßriger alkalischer Lösung hin untersucht. Dabei konnten sie in Lösung gehalten werden und erwiesen sich in dem Experiment als stabil (Mamero, 1997). Allerdings wurde dort der wäßrigen Pufferlösung eine größere Menge Methanol (50 %) zugesetzt, um ein Ausfallen der Verbindungen zu verhindern. Da ein höherer Methanolanteil die Zersetzung verlangsamt, wurde zur Kompensation ein Phosphatpuffer pH 8,0 verwendet.

Die gezeigten Ergebnisse ergeben sich also aus anderen Bedingungen als bei vorherigen Arbeiten. Der von Mamero vorgeschlagene radikalische Zersetzungsprozeß der Curcuminoide, wonach das Ausmaß der Zersetzung mit den Radikalfängereigenschaften der Verbindungen korreliert, kann durch die vorliegenden Ergebnisse zum Teil nicht bestätigt werden. Nach Mamero besitzen die Verbindungen **1** und **2** praktisch keine Radikalfängereigenschaften. Dennoch zersetzen sie sich unter den physiologischen Bedingungen (Verbindung **1** auf 38 %, Verbindung **2** auf 81 % der Anfangsabsorption).

Eine andere Erklärung der Abnahme der Absorption im Wellenlängenbereich der langwelligen Absorptionsbande könnte in dem tautomeren Gleichgewicht zwischen der Diketo- und der Enolform, in denen die Curcuminoide vorliegen können, liegen.

Solche tautomeren Gleichgewichte sind auch für andere β -Diketone bekannt und sind unter anderem abhängig von der Polarität des Solvens bzw. der unmittelbaren Umgebung des Moleküls. Für Benzoylacetone (1-Phenyl-1,3-butadion) ist solch eine lösungsmittelabhängige Tautomerie beschrieben (Abb. 6.1).

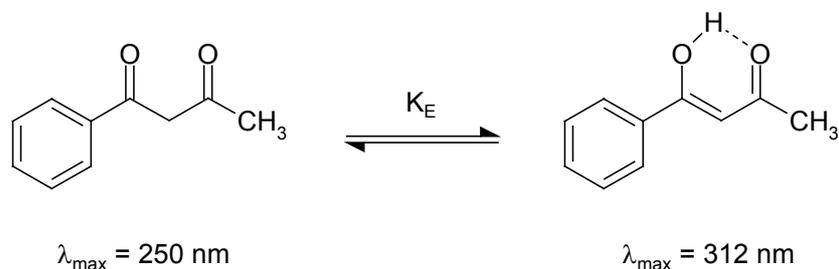


Abb. 6.1: Tautomeriegleichgewicht von 1-Phenyl-1,3-butadion und Absorptionsmaxima der beiden tautomeren Formen

Die Verbindung liegt in unpolaren Lösungsmitteln wie z.B. Cyclohexan überwiegend in der Enolform unter Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbindung vor. In Lösungsmitteln, die wesentlich polarer sind oder als Wasserstoffbindungs-Donor fungieren, nimmt der Anteil der Enolform zugunsten der Diketoform ab. In Wasser liegt ein Gemisch der beiden Formen mit einem Anteil der Enolform von 37 % vor (Iglesias, 1996). Dieser Effekt kann analytisch ausgenutzt werden, da die Diketoform und die Enolform unterschiedliche Absorptionsmaxima besitzen (Abb. 6.1).

Die Abnahme der Absorptionswerte einiger Verbindungen im Bereich der langwelligeren Absorptionsbande in wässrigem Medium könnte also mit einer Verschiebung des Tautomeriegleichgewichtes zugunsten der Diketoform und einer damit verbundenen Zunahme der Absorption im kurzwelligen Bereich zusammenhängen. Untersuchungen zur Keto-Enol-Tautomerie von Curcumin **6** konnten zeigen, daß mit zunehmender Lösungsmittelpolarität der Enolisierungsgrad der Verbindung linear abnimmt (Bauer, 1996).

Bei allen Verbindungen ist eine Zunahme der Stabilität aufgrund der Anwesenheit sowohl von Rinderserumalbumin als auch von DPPC-Liposomen im Vergleich zum reinen Phosphatpuffer festzustellen. Die Zunahme der Absorption bei den Verbindungen **5**, **8**, **9** und **12** in Anwesenheit von RSA oder DPPC-Liposomen ist auf einen größer werdenden Extinktionskoeffizienten der Verbindungen in apolarer Umgebung zurückzuführen. Dies ist anhand der Bestimmung der Extinktionskoeffizienten in eher polaren Lösungsmitteln wie Methanol bzw. in unpolaren Lösungsmitteln wie *n*-Hexan in Kapitel 5.2 erkennbar. Eine Zunahme der Absorption

in Anwesenheit von RSA oder DPPC-Liposomen trotz kleiner werdendem Extinktionskoeffizienten in unpolarer Umgebung, wie es bei der Verbindung **2** der Fall ist, ließe sich mit einem veränderten Tautomeriegleichgewicht der Verbindung in unpolarer Umgebung erklären (s.o.). Der größere Anteil an Enolform in Anwesenheit von RSA oder DPPC-Liposomen im Vergleich zum reinen Phosphatpuffer würde eine Absorptionzunahme im Bereich der langwelligen Absorptionsbande bedingen.

Es kann davon ausgegangen werden, daß die Curcuminoide mit einem hydrophoben Bereich des RSA bzw. dem hydrophoben Bereich der Phospholipidmembran wechselwirken und dadurch einem geringeren Abbau unterliegen (Pulla Reddy et al., 1999; Began et al., 1999). Diese Annahme wird zum einen durch das Fluoreszenzverhalten der Verbindungen **1 – 12** in RSA-Lösung (Kapitel 5.7) und in Liposomsuspension (Kapitel 5.6) bestätigt. Die Lage des Emissionsmaximums wird durch die Zugabe von RSA bzw. DPPC zu kürzeren Wellenlängen verschoben, woraus über einen Vergleich mit den Solvatochromiedaten der Emissionsspektren (Kapitel 5.3) auf eine eher unpolare Umgebung der Verbindungen **1 – 12** zu schließen ist. Zum anderen sprechen die ermittelten log P-Werte (Kapitel 5.10) für eine zum Teil sehr hohe Lipophilie der Verbindungen, so daß eine Verteilung der Verbindungen zwischen hydrophiler Phase (Phosphatpuffer) und lipophiler Phase (hydrophobe Bereiche von RSA bzw. der Liposomen) zugunsten der lipophilen Phase ausfallen sollte.

6.2 Solvatochromieeffekte der untersuchten Verbindungen

In den Abschnitten 5.2 und 5.3 ist gezeigt worden, daß insbesondere die Verbindungen **4 – 11** eine ausgeprägte positive Solvatochromie ihrer Emissionsspektren zeigen, und daß zusätzlich die Verbindungen **9 – 11** eine auffallende Solvatochromie ihrer Absorptionsspektren zeigen. Bei den genannten Verbindungen handelt es sich um Strukturen, die in 3- und/oder 4-Position des Phenylringes Substituenten tragen, die über einen Mesomerieeffekt als Elektronendonator wirken können. Auf die Solvatochromie dieser Verbindungen soll im folgenden ausführlicher eingegangen werden, wobei die Ergebnisse für die Verbindungen **1, 2, 3** und **12** in die Diskussion einbezogen werden sollen.

Definitionsgemäß können die Verbindungen **4 – 11** zu den Polymethinfarbstoffen gezählt werden. Dabei handelt es sich nach der Definition von König (1926) um

ionoid aufgebaute Verbindungen, die zwischen zwei Heteroatomen eine ungerade Anzahl von Methingruppen (-CH=) enthalten. In Abb. 6.2 sind die allgemeine Form eines Polymethins und die denkbaren Polymethin-Teilstrukturen der Curcuminoide am Beispiel der Verbindung **9** dargestellt.

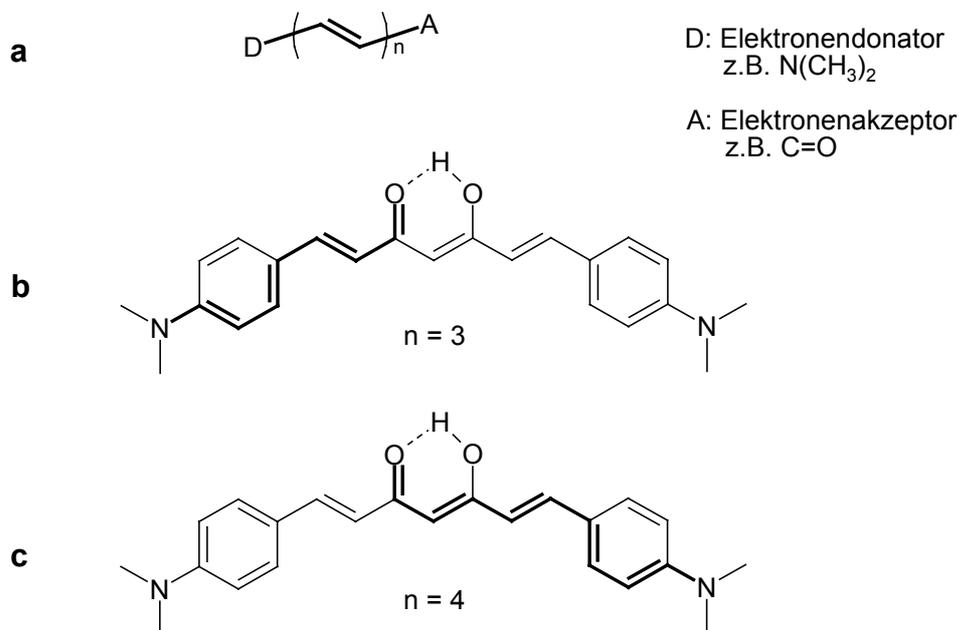


Abb. 6.2: Allgemeine Form eines Polymethins (a) und die denkbaren Polymethin-Teilstrukturen (b und c) der Curcuminoide am Beispiel der Verbindung **9**

Da die Verbindung **9** zwei verschiedene Heteroatome besitzt, kann diese Struktur als Merocyanin-artig bezeichnet werden. Solche Strukturen besitzen eine Elektronen-Donatorgruppe (D) und eine Elektronen-Akzeptorgruppe (A). Beide sind über ein konjugiertes System verbunden und sind durch eine ausgeprägte Solvatochromie gekennzeichnet (Liptay, 1965). Die Verknüpfung einer elektronenliefernden und einer elektronenziehenden Gruppe über ein aromatisches System resultiert in einem niedrigsten angeregten Zustand, in dem eine ausgeprägte Ladungsübertragung von D zu A stattfindet. Dabei sind Amino- oder Alkylaminogruppen die besten Elektronenlieferanten, S=O und C=O die besten Elektronenakzeptoren (Weber und Farris, 1979). Die Ladungsübertragung zwischen D und A ist außerdem häufig mit einer wesentlichen Veränderung des Dipolmoments (μ_g : Dipolmoment des Grundzustandes; μ_e : Dipolmoment des ersten angeregten Zustandes) gekoppelt (Liptay, 1965). Für wenig polare Verbindungen gilt in der Regel $\mu_e > \mu_g$, für stark polare Verbindungen kann $\mu_e < \mu_g$ werden.

Der Einfluß der Veränderung des Dipolmoments auf die Solvatochromie einer Verbindung ist unter 1.2.2 erörtert worden. Anhand der positiven Solvatochromie der Emissionsspektren der Verbindungen **4** – **11**, also der Verschiebung des Emissionsmaximums zu längeren Wellenlängen beim Wechsel vom unpolaren zum polaren Lösungsmittel, ist zu erkennen, daß der angeregte Zustand der Curcuminoide ein größeres Dipolmoment aufweisen muß als der Grundzustand. Dies steht im Einklang mit früheren Untersuchungen der Lösungsmittelabhängigkeit insbesondere der Emissionsspektren von Curcumin **6**, wonach die Differenz von μ_g und μ_e 6,1 D beträgt (Khopde et al., 2000). Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit weichen jedoch insofern von der Arbeit von Khopde et al. ab, als in der vorliegenden Arbeit zum einen eine geringere Anzahl von Lösungsmitteln und zum anderen qualitativ unterschiedliche Lösungsmittel verwendet wurden. In der zitierten Arbeit wurden neben eher unpolaren Lösungsmitteln wie Benzol und Dioxan sowie den eher polaren Alkoholen auch Acetonitril, DMF und DMSO verwendet. Aus der Korrelation der Stokes-Verschiebung $\Delta\nu_{\text{Stokes}}$ mit dem Polaritätsparameter Δf ergibt sich in der vorliegenden Arbeit für die Verbindung **6** ein Korrelationskoeffizient $r = 0,999$ und ein $\Delta\mu$ von 8,2 D (Tabelle 5.25). Khopde et al. finden einen Korrelationskoeffizienten $r = 0,684$ und schließen daraus auf wesentliche spezifische Lösungsmittelleffekte wie Wasserstoffbrückenbindungen als Grund für die Solvatochromie der Emissionsspektren.

Ein Beispiel für den genau umgekehrten Fall einer Abnahme des Dipolmoments als Folge der Lichtabsorption und einer daraus resultierenden negativen Solvatochromie ist in umfangreicher Weise für Pyridinium-*N*-phenolat-betaine beschrieben (Dimroth et al., 1963; Reichardt und Müller, 1976) (Abb. 6.3).

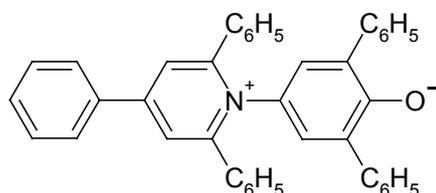


Abb. 6.3: Struktur eines Pyridinium-*N*-phenolat-betains als Beispiel für ein Molekül mit ausgeprägter negativer Solvatochromie (es gilt: $\mu_e < \mu_g$)

Daß die solvatochromen Eigenschaften der Curcuminoide auf einer Ladungsübertragung im angeregten Zustand von einer elektronenliefernden auf eine

elektronenziehende Gruppe beruhen, wird dadurch bestätigt, daß zum einen die Solvatochromie der Emissionsspektren wesentlich stärker ausgeprägt ist als die der Absorptionsspektren, und daß zum anderen die Verbindungen **1**, **2**, **3** und **12** keine Solvatochromie ihrer Emissionsspektren zeigen. Diesen Verbindungen ist gemeinsam, daß sie keine auxochromen Ringsubstituenten mit der Möglichkeit zur Ladungsübertragung besitzen.

Die Annahme, daß für die Verbindungen **4** – **11** $\mu_e > \mu_g$ gilt, wird durch die Bestimmung der Differenz zwischen den Dipolmomenten im Grund- und ersten angeregten Zustand $\Delta\mu$ über die Lippert-Gleichung eindeutig bestätigt (Punkt 5.4). Für Curcumin **6** ist $\Delta\mu$ mit 6,1 D beschrieben (Khopde et al., 2000). Die Bestimmung des kritischen Parameters a (Onsager-Radius) wird von den Autoren jedoch nicht angegeben. Daraus und aus der Tatsache, daß die Bestimmung in anderen Lösungsmitteln vorgenommen wurde, könnte sich der Unterschied des in der vorliegenden Arbeit ermittelten $\Delta\mu$ der Verbindung **6** von 8,2 D erklären.

In der Einleitung wurde die Verbindung PRODAN als Beispiel für eine umgebungssensitive Fluoreszenzsonde vorgestellt. Auch bei dieser Verbindung handelt es sich definitionsgemäß um einen Poymethinfarbstoff, genauer um ein Merocyanin (Abb. 6.4). Elektronendonator bzw. –akzeptorgruppen sind hier die Dimethylamino- bzw. die Propionylgruppe.

In Tabelle 6.1 sind die Emissionsmaxima für PRODAN und für die Verbindung **9** aufgeführt. Dieses Curcuminoid zeigt die größte Strukturähnlichkeit zum PRODAN. Die Solvatochromieeffekte dieser Verbindung sollen beispielhaft für die untersuchten Verbindungen im Vergleich mit PRODAN diskutiert werden.

Sowohl die Verbindung **9** als auch PRODAN zeigen eine ausgeprägte positive Solvatochromie in ihren Emissionsspektren in Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität. Rechnet man die Verschiebung des Emissionsmaximums beim Wechsel von Ethanol nach *n*-Hexan bzw. Cyclohexan für die beiden Verbindungen in Wellenzahlen um, ergibt sich für PRODAN ein $\Delta\nu$ von 4780 cm^{-1} und für die Verbindung **9** ein $\Delta\nu$ von 4390 cm^{-1} . Das bedeutet, daß PRODAN im Vergleich zu Verbindung **9** geringfügig empfindlicher auf eine Veränderung der Lösungsmittelpolarität reagiert. Die Differenz zwischen den Dipolmomenten im Grund- und im ersten angeregten Zustand $\Delta\mu$ wird in der Literatur mit 5 – 7 D angegeben (Catalan et al., 1991; Samanta und Fessenden, 2000). Auch hier zeigt

der Vergleich mit $\Delta\mu$ der Verbindung **9** (7,5 D (Tabelle 5.25)), daß dieser Parameter für beide Verbindungen ähnlich groß ist.

Tabelle 6.1: Absorptions- und Emissionsmaxima von PRODAN und der Verbindung 9 in verschiedenen Lösungsmitteln

Lösungsmittel	DK	PRODAN		Verbindung 9	
	ϵ_r	λ_{Abs}	λ_{Em}	λ_{Abs}	λ_{Em}
<i>n</i> -Hexan (Cyclohexan) ²⁾	2,02 (1,89)	342	401	440	480
Toluol (Benzol) ²⁾	2,28 (2,38)	355	421	464	519
Aceton	20,7	350	452	474	570
Ethanol	24,3	360	496	486	608

¹⁾ (Weber und Farris, 1979)

²⁾ (da für PRODAN keine Literaturwerte der Emissionsmaxima in *n*-Hexan und Toluol beschrieben sind, sind die Emissionsmaxima der Verbindung in Cyclohexan bzw. Benzol angegeben)

Auffallend bei dem in Tabelle 6.1 aufgeführten Vergleich der Emissionsmaxima ist außerdem, daß sowohl die Absorptions- als auch die Emissionsmaxima der Verbindung **9** in Lösungsmitteln gleicher Polarität im Vergleich zu PRODAN um 80 – 110 nm bathochrom verschoben sind.

Die in etwa gleiche Empfindlichkeit der Emissionsspektren hinsichtlich der Lösungsmittelpolarität, die Kongruenz von $\Delta\mu$ sowie der Unterschied der Lage der Absorptions- und Emissionsmaxima in gleichen Lösungsmitteln für die beiden Verbindungen können anhand eines Vergleichs der chromophoren Systeme von PRODAN und Verbindung **9** erklärt werden (Abb. 6.4).

In beiden Verbindungen fungiert die Dimethylaminogruppe als Elektronendonator und eine Ketogruppe als Elektronenakzeptor. Die in Abb. 6.4 schematisch dargestellte, durch Anregungslicht induzierte intramolekulare Ladungsübertragung ist für PRODAN beschrieben und kann in ähnlicher Weise für die Verbindung **9** angenommen werden (Crane et al., 2002). Daraus ist eine deutliche Veränderung des Dipolmoments im angeregten Zustand abzuleiten. Als Folge des veränderten Dipolmoments des Fluorophors kommt es zu einer Umorientierung der Lösungsmittelmoleküle (sog. Lösungsmittelrelexation, vgl. 1.2.2) und somit zu einem relaxierten Zustand des Fluorophors mit einem minimalen Energiegehalt. Mit zunehmender Lösungsmittelpolarität sinkt der Energiegehalt des relaxierten

Zustandes, und die bathochrome Verschiebung der Emissionsspektren wird größer (Valeur, 2002).

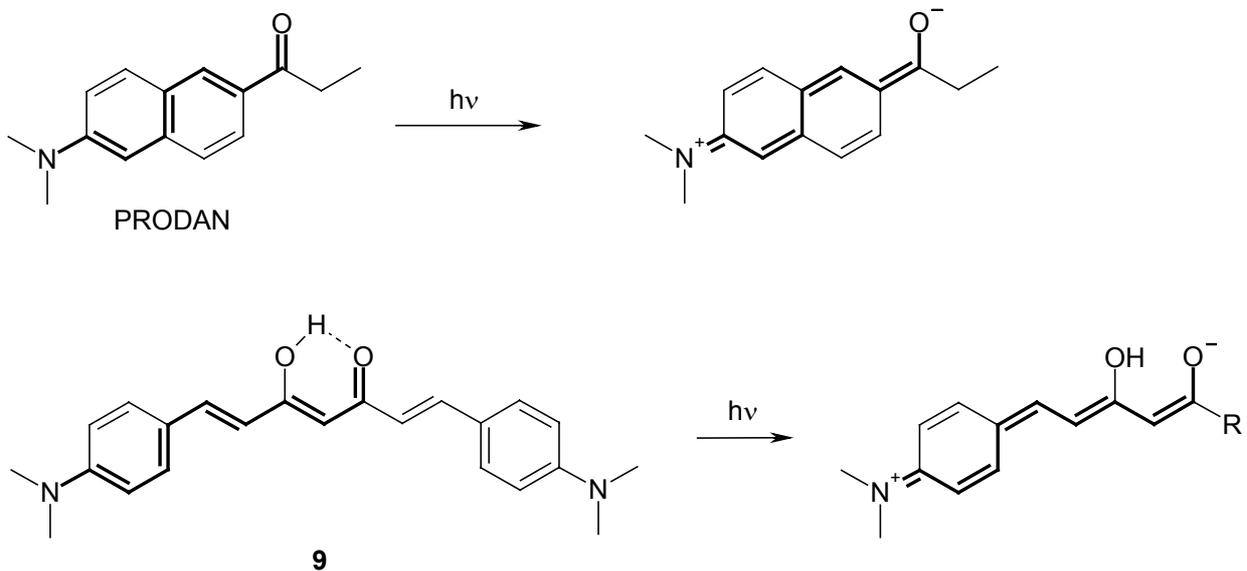


Abb. 6.4: Chromophores System von PRODAN und (denkbares) chromophores System der Verbindung **9** sowie Darstellung der lichtinduzierten intramolekularen Ladungsübertragung von der Elektronendonator- zur Elektronenakzeptorgruppe

Die längerwelligen Absorptions- und Emissionsspektren der Verbindung **9** im Vergleich zu PRODAN lassen sich anhand der chromophoren Systeme der beiden Verbindungen erklären. Polymethinfarbstoffe zeichnen sich hinsichtlich ihres Absorptionsverhaltens vor allem dadurch aus, daß durch die Einführung zusätzlicher Vinylengruppen die Absorptionsmaxima um sehr viel größere Beträge – etwa 100 nm pro Doppelbindung – nach längeren Wellen verschoben werden als bei der entsprechenden Vergrößerung irgendeines anderen Konjugationssystems (Staab, 1964). Durch die Konjugation über eine weitere Doppelbindung wird das Energieniveau des höchsten besetzten π -Orbitals (HOMO) angehoben und das des niedrigsten unbesetzten π^* -Orbitals (LUMO) erniedrigt, so daß die Energiedifferenz zwischen dem höchsten bindenden und dem niedrigsten antibindenden π -Orbital geringer wird. In der Folge reicht eine immer längerwellige Strahlung für die Anregung eines Elektrons im Sinne eines $\pi \rightarrow \pi^*$ -Überganges aus. In Abb. 6.4 erkennt man, daß das denkbare chromophore System der Verbindung **9** im Vergleich zu PRODAN um eine Doppelbindung erweitert ist. Die Verschiebung der Absorptions- und Emissionsmaxima der Verbindung **9** im Vergleich zu PRODAN

deckt sich gut mit der für Polymethinfarbstoffe typischen Verschiebung um ca. 100 nm durch Einführung einer zusätzlichen Doppelbindung.

Die Ergebnisse der Verbindungen **1**, **2**, **3** und **12** unterstützen die Theorie des chromophoren Systems der Curcuminoide als polymethin- bzw. merocyaninartig, da sowohl die Absorptions- als auch die Emissionsspektren dieser Verbindungen, denen eine elektronenliefernde Gruppe im Phenylring fehlt, so gut wie keine Solvatochromieeffekte zeigen. Das Absorptions- und Fluoreszenzverhalten wird durch die Polarität der unmittelbaren Umgebung wesentlich geringer beeinflusst, als es für die übrigen Verbindungen der Fall ist.

Um die Umgebungssensitivität der untersuchten Verbindungen zu quantifizieren, können die Ergebnisse der Lippert-Auftragung (Tabelle 5.25) herangezogen werden. Dabei wurde die Stokes-Verschiebung $\Delta\nu_{\text{Stokes}}$ gegen Δf als Parameter für die Lösungsmittelpolarität aufgetragen. Die Steigung der Geraden kann, ebenso wie der Parameter $\Delta\mu$, als Maß für die Solvenzempfindlichkeit angesehen werden (Rohde, 2002). Anhand dieser Parameter kann die Verbindung **8** als die Verbindung mit der größten Umgebungssensitivität in bezug auf die Polarität angesehen werden.

Bei der Betrachtung der Absorptions- und Emissionsspektren der Verbindungen **1** – **12** fällt neben der Lage der Absorptions- bzw. Emissionsmaxima die Abhängigkeit der Form der Spektren vom jeweiligen Lösungsmittel auf. Im Gegensatz zu den Spektren in den Alkoholen weisen die Spektren in Toluol und *n*-Hexan eine gewisse Feinstruktur auf. Bei den Emissionsspektren der Verbindungen **4** – **11** nimmt zusätzlich die Halbwertsbreite $\Delta\nu_{1/2}$ in Toluol und *n*-Hexan im Vergleich zu den Alkoholen ab.

Beide Effekte lassen sich anhand von spezifischen Lösungsmittelleffekten, in erster Linie anhand von intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Fluorophor und Solvensmolekül, erklären. Dabei sind insbesondere die Bereiche des Chromophors betroffen, die über freie Elektronenpaare verfügen, d.h. die Elektronendonator- bzw. Akzeptorgruppen, woraus sich eine stärkere Beeinflussung auf die Spektren der Verbindungen **4** – **11** ableiten lässt. Durch die elektronischen Wechselwirkungen des Fluorophors in den protischen Lösungsmitteln Methanol, Ethanol, Butanol und Oktanol kommt es zu einer Beeinflussung der Schwingungsniveaus des angeregten Zustandes im Sinne einer Verminderung der Energiedifferenzen zwischen diesen Schwingungsniveaus und somit zu einem Verwischen der Schwingungsteilbanden der Spektren. In den aprotischen

Lösungsmitteln findet diese Beeinflussung nicht statt, so daß die Feinstruktur der Schwingungsteilbanden erhalten bleibt.

Über einen Vergleich der spektroskopischen Eigenschaften der Verbindung **9** mit PRODAN können einige spektroskopische Phänomene der Curcuminoide erklärt werden. Das chromophore System der untersuchten Curcuminoide muß allerdings insgesamt komplexer sein, als in Abb. 6.2 und 6.4 schematisch dargestellt. Dies erklärt sich aus Untersuchungen von Teilstrukturen des Curcumins **6** wie sog. halbes Curcumin oder Feruloylacetone (Abb. 6.5), deren Absorptionsmaxima kürzerwellig sind als die des Curcumins **6** (Roth und Miller, 1964).

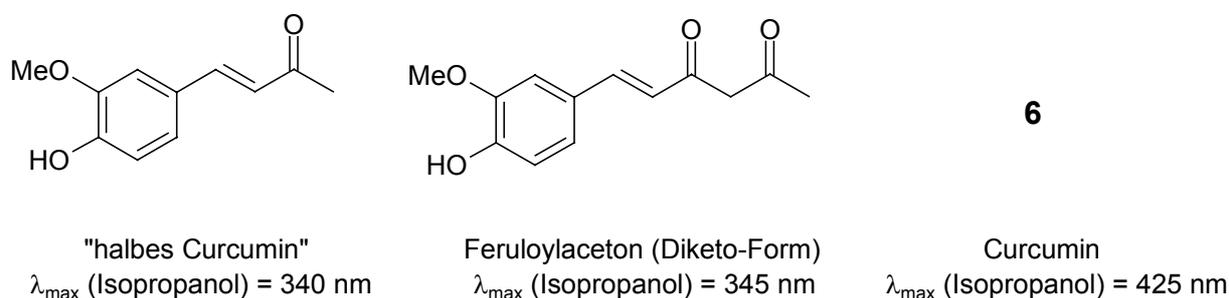


Abb. 6.5: Teilstrukturen des Curcumins **6** und Vergleich der Absorptionsmaxima der Teilstrukturen mit Curcumin **6** in Isopropanol (Roth und Miller, 1964)

Die genaue Klärung des chromophoren Systems der Curcuminoide bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

6.3 Fluoreszenzquantenausbeuten der Verbindungen

Wie stark der Einfluß eines elektronenliefernden Substituenten auf die Fluoreszenzeigenschaften der Curcuminoide ist, zeigt sich neben den bereits erwähnten Solvatochromieeffekten auch an den Quantenausbeuten der Verbindungen. Die Verbindungen **1** – **3** können mit Quantenausbeuten $\leq 1\%$ als nicht fluoreszent in den verwendeten Lösungsmitteln bezeichnet werden. Die etwas höheren Werte der Verbindung **12** in Ethanol und Oktanol sind auf den Naphtalinrest als aromatisches System zurückzuführen.

Wie erwartet zeigen die Verbindungen **9** – **11** aufgrund ihrer Aminoalkylsubstituenten als stark auxochrome Gruppen die größten Quantenausbeuten. Auffallend ist hier wie auch bei den Verbindungen **4** – **8** die Abhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeuten von dem jeweiligen Lösungsmittel. Es sei an dieser Stelle auf die

im folgenden Abschnitt erwähnten Zusammenhänge zwischen Fluoreszenzquantenausbeute und Lebensdauer des angeregten Zustandes und die Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer des Curcumins **6** vom Lösungsmittel hingewiesen (Khopde et al., 2000).

6.4 Fluoreszenzverhalten in Liposomensuspension und in Rinderserumalbuminlösung

Die Untersuchung des Fluoreszenzverhaltens der Verbindungen **2 – 12** in Gegenwart von DPPC-Liposomen (Konzentration der Verbindungen: 2 μM) und der Verbindungen **4 – 11** in RSA-Lösung (Konzentration der Verbindungen: 5 μM) sollte zeigen, inwieweit sich die Solvatochromieeffekte der Verbindungen in Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität auf die Markierung einer Modellmembran (DPPC-Liposomen) bzw. eines Makromoleküls (RSA) übertragen lassen. Als Meßparameter sollten in beiden Fällen die Fluoreszenzintensität und die Lage des Emissionsmaximums bestimmt werden. Es soll zunächst auf die Ergebnisse in der Liposomensuspension und anschließend auf die Ergebnisse in Gegenwart von RSA eingegangen werden.

6.4.1 Fluoreszenzverhalten in Liposomensuspension

Die Ergebnisse für die Verbindungen **2, 3** und **12** weichen von denen der übrigen Verbindungen dadurch ab, daß durch allmähliche Erhöhung der DPPC-Konzentration zwar die Fluoreszenzintensität ansteigt, aber das Emissionsmaximum bis zur höchsten DPPC-Konzentration längerwellig ist als in Methanol. Aufgrund der sehr hohen log P-Werte dieser Verbindungen (vgl. Kapitel 5.10) würde man erwarten, daß sie mit einem eher hydrophoben Bereich der Phospholipide wechselwirken und ein kürzerwelliges Fluoreszenzsignal zeigen. Bei genauerer Betrachtung der Emissionsspektren der Verbindung **12** (Abb. 5.33) fällt auf, daß das ursprüngliche Maximum bei der geringsten DPPC-Konzentration auch noch bei höheren Konzentrationen als Schulter zu erkennen ist. Der Grund für die unerwartet große Änderung der Lage des Emissionsmaximums und die leicht strukturierte Form des Spektrums ist hier wahrscheinlich die überproportionale Zunahme von Elektronenübergängen bei kleineren Wellenlängen. Die Elektronenübergänge bei größeren Wellenlängen sind als Schulter nach wie vor erkennbar. Die Verschiebung

des Emissionsmaximums beruht bei den Verbindungen **2**, **3** und **12** also auf der lösungsmittelabhängigen Änderung der relativen Intensitäten verschiedener Elektronenübergänge und nicht auf der lösungsmittelabhängigen Verschiebung eines einzelnen Elektronenübergangs.

Bei den übrigen Verbindungen wird bereits durch die Zugabe von 10 μM DPPC die Lage des Emissionsmaximums in einen Bereich verschoben, der eine eher unpolare Umgebung anzeigt. Die Verschiebung des Maximums durch DPPC-Zugabe kann an der Verbindung **4** gut verfolgt werden (Abb. 5.31). Im Vergleich zum Maximum im SPP pH 7,4 bewirkt die Zugabe von 200 μM DPPC eine hypsochrome Verschiebung des Fluoreszenzsignals um 30 nm. Noch stärker macht sich die Verschiebung des Maximums bei der Verbindung **11** bemerkbar (Abb. 5.32). Hier findet bereits durch die Zugabe von 10 μM DPPC eine hypsochrome Verschiebung um etwa 40 nm statt. Hinsichtlich der Fluoreszenzintensität ist bei allen Verbindungen eine deutliche Zunahme durch DPPC-Zugabe festzustellen, was auf eine Zunahme des Absorptionskoeffizienten im Vergleich zum reinen Puffer zurückzuführen ist.

6.4.2 Fluoreszenzverhalten in RSA-Lösung

Hinsichtlich der Fluoreszenzintensität zeigen mit Ausnahme der Verbindung **5** eine kontinuierliche Zunahme mit steigender RSA-Konzentration, wobei bei den höchsten RSA-Konzentrationen ein Sättigungseffekt eintritt (gut zu erkennen in den Abb. 5.34 und 5.35). Bei Verbindung **5** ist die Intensität des Fluoreszenzsignals bei 5 μM RSA maximal, um bei weiterer RSA-Zugabe wieder abzufallen und sich auf einen relativ konstanten Wert einzupendeln. Eventuell ist das Fluoreszenzsignal bereits bei Zugabe von 10 μM RSA nicht mehr in einem linearen Bereich, so daß es im folgenden durch Konzentrationseffekte zur Fluorezenzlöschung kommt.

Die Lage der Emissionsmaxima wird bei allen Verbindungen durch Zugabe von RSA hypsochrom verschoben, was auf eine Wechselwirkung mit einem eher hydrophoben Bereich des Proteins hindeutet. Diese Vermutung findet durch Untersuchungen zur Wechselwirkung von Curcumin **6** mit Humanserumalbumin (HSA) Bestätigung, wonach diese Verbindung mit zwei verschiedenen jeweils hydrophoben Bereichen des Proteins interagiert (Pulla Reddy et al., 1999).

Bei der Verbindung **11** fällt auf, daß bei Zugabe der geringsten RSA-Konzentration von 5 μM das Emissionsmaximum am stärksten hypsochrom verschoben wird, um bei höheren RSA-Konzentrationen wieder zu etwas höheren Wellenlängen

verschoben zu werden. Hierfür konnte allerdings keine plausible Erklärung gefunden werden.

Der bei hohen RSA-Konzentrationen zu beobachtende Sättigungseffekt der Verbindungen deutet auf ein Gleichgewicht im Bindungsverhalten zwischen den Curcuminoiden und dem RSA hin, was durch die Bestimmung der Bindungskonstanten K_B für die Verbindungen **6** und **7** (vgl. Kapitel 5.9 und 6.5) bestätigt werden kann.

6.5 Bestimmung der Bindungskonstanten einzelner Curcuminoide mit Rinderserumalbumin

Für Curcumin **6** sind zwei Bindungskonstanten mit HSA für zwei verschiedene Bindungsbereiche des Proteins bekannt. Mit Hilfe von fluoreszenzspektroskopischen Messungen, bei denen die Fluoreszenzlöschung des in dem Protein enthaltenen Tryptophans durch Curcumin **6** verfolgt wurde, konnte eine Bindungskonstante K_B von $2,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ bestimmt werden. Durch Circular dichroismus-Messungen konnte die gleiche Arbeitsgruppe eine zweite K_B für Curcumin **6** mit $2,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ bestimmen (Pulla Reddy et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Bindungskonstante K_B für Curcuminoide über das Fluoreszenzsignal des RSA-gebundenen Curcuminoids nach der Jobs-Methode (vgl. 4.10) bestimmt werden. Aus drei Gründen konnten nur für die Verbindungen **6** und **7** die Bindungskonstanten bestimmt werden. Zum einen zeigen die Verbindungen **1**, **2**, **3** und **12** in Gegenwart von RSA keine ausreichende Fluoreszenz. Zum anderen zeigen die Verbindungen **4**, **5** und **8** auch ohne RSA eine gewisse Fluoreszenz im Puffer. Für die Bestimmung von K_B nach der Jobs-Methode muß jedoch die zu messende Größe (hier die Fluoreszenzintensität) allein durch die Komplexbildung zwischen Ligand und Makromolekül zustande kommen (vgl. 4.10). Schließlich war die Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten der Verbindungen **9** – **11** in Gegenwart von RSA ab einem bestimmten Konzentrationsverhältnis sehr großen, nicht nachvollziehbaren Schwankungen unterworfen, so daß keine reproduzierbaren Ergebnisse erhalten werden konnten.

Die Messungen für die Verbindungen **6** und **7** ergeben Bindungskonstanten von $1,0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ für Verbindung **6** und $1,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ für Verbindung **7**. Eine vergleichende Diskussion ist aufgrund fehlender Daten in der Literatur schwierig. Die für

Verbindung **6** bestimmte K_B von $1,0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ liegt etwa um den Faktor 5 über der für Curcumin **6** bekannten K_B $2,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ für den einen Bindungsbereich im HSA. Die Besetzung einer zweiten Bindungsstelle im RSA wie sie für die Bindung mit HSA bei großen Curcumin-Konzentrationen beschrieben ist (Pulla Reddy et al., 1999), wurde für die Verbindungen nicht überprüft. Der Unterschied zwischen der bekannten K_B mit HSA und der hier bestimmten K_B mit RSA ist sicherlich zum Teil auf die unterschiedlichen Proteine zurückzuführen. Die Bestimmung der K_B für die strukturell sehr ähnliche Verbindung **7** mit $1,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ läßt jedoch vermuten, daß die gewählte Methode der Bestimmung der Bindungskonstanten über das Fluoreszenzsignal des RSA-gebundenen Curcuminoids prinzipiell geeignet ist.

6.6 Fluoreszenzpolarisation

Mit Hilfe der Fluoreszenzpolarisationstechnik sollte über einen Vergleich mit der bekannten Fluoreszenzsonde 1,6-DPH untersucht werden, inwieweit sich Curcuminoiden für Polarisationsmessungen im Hinblick auf die Bestimmung von Mikroviskositäten und Membranfluiditäten eignen. Die unter 5.8.1 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die Anisotropiewerte der Verbindung **9** eine Verfolgung des Phasenübergangs von der Gel- in die flüssigkristalline Phase zwar ermöglichen, daß aus diesen Werten jedoch nicht auf die tatsächliche Mikroviskosität zu schließen ist. Um die konstant hohen Anisotropiewerte der Verbindung **6** und die auch nach dem Phasenübergang noch vergleichsweise hohen Anisotropiewerte der Verbindung **9** zu begründen, wurden verschiedene Lösungsansätze verfolgt.

Es wurde zunächst postuliert, daß die untersuchten Verbindungen membranverändernde Eigenschaften besitzen und über eine Einlagerung in den hydrophoben Bereich der Phospholipidmembran einen rigidisierenden Effekt auf die Membran ausüben. Diese Hypothese wurde durch zwei Punkte unterstützt. Zum einen wurde über membranverändernde Effekte von Curcumin **6** im Zusammenhang mit den Apoptoseeigenschaften dieser Verbindung berichtet (Jaruga et al., 1998a,b). Zum anderen konnten Untersuchungen im eigenen Arbeitskreis zeigen, daß Curcumin **6** und synthetische Derivate spannungsabhängige Kalium- und Natriumkanäle in immunkompetenten Zellen zum Teil dosisabhängig aber unselektiv blockieren. In diesem Zusammenhang werden die Verbindungen **4** - **9** eingehend auf

ihre membranverändernden Eigenschaften hin untersucht und die Ergebnisse an anderer Stelle publiziert (Wernekschnieder, Dissertation in Vorbereitung).

Die zweite Hypothese zur Erklärung der hohen Anisotropiewerte in Liposomen steht in Zusammenhang mit der Fluoreszenzlebensdauer τ_F der Verbindungen. Ausgehend von der Perrin-Gleichung (Gl. 6.1) läßt sich die beobachtbare Fluoreszenzanisotropie für verschiedene Werte von Fluoreszenzlebensdauer τ_F und Rotationskorrelationszeit τ_R diskutieren.

$$r = \frac{r_0}{1 + (\tau_F / \tau_R)} \quad \text{Gl. 6.1}$$

Ist τ_R groß gegenüber τ_F der angeregten Moleküle, so erfolgt keine Bewegung des Moleküls innerhalb von τ_F . Für die gemessene Anisotropie r gilt $r = r_0$. Ist τ_R wesentlich kleiner als τ_F , so werden die angeregten Fluorophore innerhalb von τ_F einer statistischen Verteilung unterliegen und für die gemessene Anisotropie r gilt $r = 0$. Nur wenn die Lebensdauer des angeregten Zustandes τ_F und die Rotationskorrelationszeit τ_R etwa in einer Größenordnung liegen, wird sich die Orientierung der Moleküle innerhalb von τ_F ändern, unter Beibehaltung einer anisotropen Verteilung der Moleküle. In diesem Fall nimmt r Werte zwischen 0 und r_0 an. Aus dieser Betrachtung wird sofort deutlich, daß eine Messung der Fluoreszenzanisotropie zur Untersuchung molekularer Beweglichkeit nur sinnvoll ist, wenn τ_F und τ_R in einer Größenordnung liegen. D.h. mit einem bestimmten Fluorophor kann man nur einen begrenzten Zeitbereich der Rotationsbewegungen von Molekülen bzw. der Rotation des Fluorophors selbst erfassen.

Die bekannte Fluoreszenzsonde 1,6-DPH hat eine Fluoreszenzlebensdauer von 10,5 ns in dickflüssigem Paraffin und eignet sich daher für die Untersuchungen von membrandynamischen Prozessen (Shinitzky und Barenholz, 1974). Die Fluoreszenzlebensdauer von Curcumin **6** in dem unpolaren Lösungsmittel Cyclohexan liegt bei etwa 50 ps (Khopde et al., 2000). Geht man davon aus, daß Curcumin **6** in einer Liposomensuspension membrangebunden, also in der Rotationsbeweglichkeit eingeschränkt vorliegt, könnten die hohen Anisotropiewerte der Verbindungen **6** und **9** in DPPC-Liposomen daher auf die sehr kurze Fluoreszenzlebensdauer τ_F der Verbindungen bei vergleichsweise großer

Rotationskorrelationszeit τ_R zurückzuführen sein. Dementsprechend liegen die gemessenen Anisotropiewerte r im Bereich der intrinsischen Anisotropie r_0 der Verbindungen.

Khopde et al. berichten über verschieden hohe Fluoreszenzlebensdauern von Curcumin **6** in Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel. Es lag daher nahe, die Anisotropie der Verbindungen **6** und **9** in verschiedenen Lösungsmitteln zu bestimmen. In Abb. 5.37 ist gezeigt worden, daß die Fluoreszenzintensitäten der Verbindungen **6** und **9** in Ethanol und Aceton sehr verschieden sind. Aus dieser Tatsache und den in Tabelle 5.28 aufgeführten Anisotropiewerten der Verbindungen **6** und **9** ist ein Zusammenhang zwischen der Fluoreszenzintensität und der Anisotropie r erkennbar. Dieser Zusammenhang soll anhand der Glg. 6.2 – 6.6 (nach Schmidt, 2000) kurz dargestellt werden.

Die Fluoreszenzintensität I_F kann vereinfacht ausgedrückt werden durch das Produkt aus Fluoreszenzquantenausbeute Q_F und dem Ausmaß der Absorption I_A .

$$I_F = Q_F \cdot I_A \quad \text{Glg. 6.2}$$

Die Fluoreszenzquantenausbeute Q_F ist der Quotient aus dem Anteil der strahlenden Desaktivierungsprozesse und der Gesamtheit aller Desaktivierungsprozesse, ausgedrückt durch die Übergangsraten k_F (Fluoreszenz), k_{IC} (internal conversion), k_{ISC} (intersystem crossing) und k_{ET} (electron transfer), wobei die Gesamtheit aller Desaktivierungsprozesse auch durch den reziproken Wert der Fluoreszenzlebensdauer τ_F dargestellt werden kann.

$$Q_F = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC} + k_{ET}} = k_F \cdot \tau_F \quad \text{Glg. 6.3}$$

Setzt man Gl. 6.3 in Gl. 6.2 ein, erhält man:

$$I_F = k_F \cdot \tau_F \cdot I_A \quad \text{Glg. 6.4}$$

bzw.

$$\tau_F = \frac{I_F}{k_F \cdot I_A} \quad \text{Gl. 6.5}$$

Durch Einsetzen der Gl. 6.5 in Gl. 6.1 ergibt sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Fluoreszenzintensität I_F und der Anisotropie r :

$$r = \frac{r_0}{1 + \left(\frac{I_F}{k_F \cdot I_A} / \tau_R \right)} \quad \text{Gl. 6.6}$$

Die Vergleichsmessungen der Anisotropiewerte von 1,6-DPH (Tabelle 5.28) zeigen, daß sich für Aceton und Ethanol gleichgroße r -Werte ergeben müßten. Die Differenz der r -Werte in Aceton und Ethanol der Verbindungen **6** und **9** und einiger anderer Verbindungen läßt sich folgendermaßen erklären: Die Fluoreszenzlebensdauern der Verbindungen **6** und **9** seien unterschiedlich in Aceton und Ethanol, wobei aufgrund der wesentlich größeren Fluoreszenzintensitäten der Verbindungen **6** und **9** in Aceton in diesem Lösungsmittel die größere Fluoreszenzlebensdauer τ_F anzunehmen sei. Bei etwa gleicher Rotationskorrelationszeit τ_R der Verbindungen **6** und **9** in Aceton und Ethanol ergäbe sich ein unterschiedliches Verhältnis von τ_F zu τ_R für die beiden Lösungsmittel und über die Gl. 6.1 eine deutliche Differenz in den gemessenen Anisotropiewerten (Verbindung **6**: 0,229 in Ethanol und 0,059 in Aceton; Verbindung **9**: 0,106 in Ethanol und 0,028 in Aceton).

Zusammenfassend lassen sich also die hohen Anisotropiewerte der Verbindungen **6** und **9** im Vergleich zu 1,6-DPH mit einer kleinen Fluoreszenzlebensdauer τ_F im Vergleich zur Rotationskorrelationszeit τ_R erklären.

Die Tatsache, daß anhand der Anisotropiewerte der Verbindung **9** im Gegensatz zur Verbindung **6** der temperaturabhängige Phasenübergang der DPPC-Liposomen verfolgt werden kann, läßt sich wie folgt erklären: In dem unpolaren Lösungsmittel *n*-Hexan hat die Verbindung **9** eine wesentlich höhere Fluoreszenzquantenausbeute ($Q_F = 17\%$) als die Verbindung **6** ($Q_F = 1\%$) (vgl. 5.5.1). Beachtet man den in Gl. 6.3 dargestellten Zusammenhang zwischen Q_F und Fluoreszenzlebensdauer τ_F , so kann eine im Vergleich zu Verbindung **6** größere Fluoreszenzlebensdauer von Verbindung

9 angenommen werden. Dadurch ergibt sich ein günstigeres zeitliches Verhältnis von τ_F zu τ_R und somit ein gemessener Wert r , der von der intrinsischen Anisotropie r_0 abweicht.

6.7 Lipophiliebestimmung

Die erhaltenen log P-Werte (Tabelle 5.29 bzw. 5.30) zeigen, daß es sich bei den Curcuminoiden um zum Teil sehr lipophile Verbindungen handelt. Die Untersuchung in zwei Puffersystemen unterschiedlichen pH-Wertes konnte zeigen, daß die Lipophiliebestimmung bei physiologischem pH-Wert nicht durch Dissoziationseffekte beeinflusst wird.

Ein Vergleich aller log P-Werte im Sinne einer Struktur-Eigenschafts-Beziehung ist aufgrund der sehr unterschiedlichen Ringsubstituenten schwierig. Vergleicht man jedoch die Verbindungen mit strukturell ähnlichen Substituenten, erhält man eine zu erwartende Reihenfolge.

Unter den Verbindungen mit Alkylsubstituenten bzw. ohne Substituent nimmt die Lipophilie mit größer werdendem Alkylrest zu (**1** < **2** < **3**).

Die Verbindung **4** mit der OH-Gruppe in 4-Position ist wie erwartet die am wenigsten lipophile. Die Lipophilie nimmt durch Einführung einer Methoxygruppe in 3-Position geringfügig zu (**6** und **7**). Verbindung **8** ist mit zwei an den Phenylring gebundenen O-Atomen etwas hydrophiler als Verbindung **5** mit einer Methoxygruppe in 4-Position.

In der Gruppe der Amino-alkylierten Verbindungen nimmt die Lipophilie mit größer werdendem Alkylrest zu (**9** < **10** < **11**).

7 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei bislang nicht beschriebene Curcuminoide (Verbindung **3**, **10** und **12**) synthetisiert. Dazu wurden weitere bereits bekannte Curcuminoide dargestellt. Alle Verbindungen wurden auf ihre Stabilität in wäßrigen, neutralen Lösungen untersucht und im Rahmen der gegebenen Möglichkeiten photometrisch und insbesondere fluorimetrisch charakterisiert.

Es konnte gezeigt werden, daß die bekannte Instabilität zahlreicher Curcuminoide durch den Zusatz von Phospholipid-Liposomen oder äquimolarer Mengen RSA deutlich verbessert werden kann. Für die potentielle Markierung von Proteinen oder Biomembranen durch Curcuminoide auch in wäßrigen Lösungen tritt die Instabilität der Verbindungen daher in den Hintergrund.

Aufgrund der hohen Lipophilie der Curcuminoide, die durch die Bestimmung der log P-Werte quantifiziert werden konnte, kann in Anwesenheit von Makromolekülen wie z.B. Proteinen oder von Zellmembranen eine hohe Verteilung in den hydrophoben Bereichen dieser Matrices angenommen werden.

Mit Hilfe der Fluoreszenzpolarisationstechnik konnte gezeigt werden, daß die untersuchten Curcuminoide insbesondere für die Untersuchung membran-dynamischer Prozesse wie etwa Bestimmungen von Membranfluiditäten eher nicht geeignet sind. Mit Hilfe der Verbindung **9**, die in unpolaren Lösungsmitteln eine vergleichsweise große Fluoreszenzquantenausbeute besitzt, konnte jedoch der temperaturabhängige Phasenübergang einer Phospholipidmembran über eine signifikante Änderung der Anisotropie verfolgt werden. Als mögliche Anwendung leitet sich hieraus die Markierung hydrophober Matrices wie etwa Proteinen oder Lipidvesikeln ab, deren Beweglichkeit z.B. durch Assoziationsreaktionen starken Veränderungen unterworfen ist.

Es konnte außerdem gezeigt werden, daß die gemessene Anisotropie starken Schwankungen in Abhängigkeit des verwendeten Lösungsmittels unterliegt. Dies wurde in Zusammenhang mit den ebenfalls vom Lösungsmittel abhängigen und insgesamt eher kurzen Fluoreszenzlebensdauern der Curcuminoide gebracht. Dieser Sachverhalt wurde am Beispiel des Curcumins **6** diskutiert, für das

Fluoreszenzlebensdauern in unterschiedlichen Lösungsmitteln bekannt sind (Khopde et al., 2000).

Die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute Q_F ergibt zwei wichtige Erkenntnisse. Zum einen zeigt sich, daß die untersuchten Curcuminoide insgesamt eher schwach fluoreszieren, wobei die Verbindung **10** mit einer Fluoreszenzquantenausbeute von 25 % in Oktanol den höchsten Wert besitzt. Zum anderen ist eine starke Abhängigkeit der Q_F vom Lösungsmittel festzustellen. Hier könnte ein analytischer Vorteil solcher Verbindungen wie etwa der Verbindung **11** liegen, die in polarer Umgebung (z.B. Puffer) keine Fluoreszenz zeigt, in unpolarer Umgebung wie in *n*-Hexan jedoch eine Quantenausbeute von 22 % besitzt.

Als besondere spektroskopische Eigenschaft der untersuchten Curcuminoide konnte eine außergewöhnlich hohe positive Solvatochromie für diejenigen Strukturen ermittelt werden, die in beiden Phenylringen auxochrome Substituenten tragen. Solche Gruppen, durch die die Verbindungen zu Donor-Akzeptor-Farbstoffen werden, sind für die Solvatochromie der untersuchten Curcuminoide essentiell. Dies konnte über den Vergleich mit den Verbindungen **1 – 3** und **12** gezeigt werden, denen solche Ringsubstituenten fehlen.

Für die hohe Solvatochromie kann die Änderung des Dipolmomentes zwischen Grund- und erstem angeregten Zustand verantwortlich gemacht werden. Anhand der Solvatochromiedaten der Verbindungen konnte die Differenz $\Delta\mu$ zwischen den beiden Zuständen berechnet werden. Das Ausmaß der Änderung des Dipolmomentes deutet auf eine Anregungslicht-induzierte Ladungsübertragung von der Elektronendonator- auf die Elektronenakzeptorgruppe hin.

Über einen Vergleich mit der bekannten und vielfach eingesetzten Polaritätssonde PRODAN wurde das chromophore System der Curcuminoide diskutiert. Die Verbindungen **4 – 8** lassen sich in die Gruppe der gekreuzten Polymethin- und die Verbindungen **9 – 11** in die Gruppe der gekreuzten Merocyanin-Farbstoffe einordnen. Die spektroskopischen Eigenschaften wurden anhand von Teilstrukturen des mesomeren Systems der Curcuminoide modellhaft erklärt. Das tatsächliche chromophore System der untersuchten Verbindungen muß jedoch als wesentlich komplexer angesehen werden, da es sich formal aus jeweils zwei Elektronendonator-

bzw. Elektronenakzeptorgruppen zusammensetzt. Die Bezeichnung „doppeltes Polymethin bzw. Merocyanin“ umschreibt bildlich den genannten Sachverhalt.

Die hohe Solvatochromie der Verbindungen erlaubt eine Anwendung als Fluoreszenzsonden z.B. zur Ermittlung von Umgebungspolaritäten in Proteinen oder Biomembranen. Die Untersuchung des Fluoreszenzverhaltens in Gegenwart von Liposomen oder RSA zeigt, daß sich die Lage der Emissionsmaxima einiger Verbindungen bereits bei niedrigen Konzentrationen deutlich ändern. Hierin liegen potentielle analytische Anwendungen der in dieser Arbeit untersuchten Curcuminoide.

8 Experimenteller Teil

8.1 Allgemeine Hinweise

Die im folgenden beschriebenen Verbindungen wurden mit den üblichen Methoden charakterisiert. Bislang nicht beschriebene Verbindungen sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Elementaranalysen: Institut für anorganische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (CHN-Autoanalyser der Firma Hewlett-Packard).

Fluoreszenz-Spektroskopie: Perkin-Elmer LS 50 B Luminescence Spektrometer

Infrarot-Spektroskopie: Perkin-Elmer 16 PC FTIR

Zur Charakterisierung wurden folgende Abkürzungen verwendet:

ν = Valenzschwingungen

NMR-Spektroskopie: ^1H -NMR: Bruker ARX 300 (Meßfrequenz 300,13 MHz)

Es wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, dd = doppeltes Dublett, t = Triplett, q = Quartett, q = Quintett, m = Multiplett, J = Kopplungskonstante in Hz

Als innerer Standard wurde Tetramethylsilan (TMS) verwendet. Alle Angaben der chemischen Verschiebung δ erfolgen in ppm.

Schmelzpunkte : Schmelzpunktapparatur Büchi 510 und Mikroheiztisch Thermovar (Reichert). Die Schmelzpunkte wurden nicht korrigiert. (Z.): Unter Zersetzung

UV/VIS-Spektroskopie: HP 8452A Dioden-Array-Spektrophotometer der Firma Hewlett-Packard

8.2 Allgemeine Synthesevorschriften

Methode A: 1000 mg getrocknetes Bortrioxid werden bei 60 °C 30 Minuten in 15 ml Ethylacetat unter Rühren suspendiert. Nach Zugabe von 0,02 mol Acetylaceton wird 60 Minuten bei 60 °C gerührt. Zu der entstandenen milchig-trüben Suspension wird eine erwärmte Lösung von 0,04 mol aromatischem Aldehyd in 18,4 g Tributylborat und 20 ml Ethylacetat hinzugefügt. Nach weiteren 30 Minuten bei 40 °C wird innerhalb von 30 Minuten eine Mischung von **2,0 g *n*-Butylamin** in 15 ml Ethylacetat unter Rühren zugetropft. Der Ansatz wird 18 Stunden bei 40 °C gerührt.

Nach Zugabe von 4 ml konz. Salzsäure und 46 ml Wasser wird 60 Minuten bei 60 °C hydrolysiert. Der nach Erkalten des Ansatzes auftretende Niederschlag wird abgenutscht, mit reichlich Wasser neutral gewaschen und getrocknet.

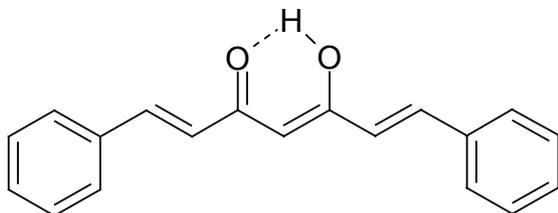
Die organische Phase wird einmal mit Natriumhydrogencarbonat-Lösung und dreimal mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und anschließend bis zur Trockene einrotiert. Die vereinigten Rohprodukte werden umkristallisiert.

Methode B: wie Methode A; es wird jedoch eine Mischung von **0,2 g *n*-Butylamin** in 15 ml Ethylacetat verwendet.

Methode C: wie Methode A; der nach der Hydrolyse auftretende Niederschlag wird abgenutscht, mit reichlich Wasser neutral gewaschen, getrocknet und aus einem geeigneten Lösungsmittel umkristallisiert.

8.3 Verbindungen

1,7-Diphenyl-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (1)



Darstellung nach Methode A

Aromatischer Aldehyd: Benzaldehyd (4,24 g)

Umkristallisieren aus Ethanol ergibt gelbe Nadeln

Ausbeute: 0,4 g (7 % d. Th.)

Smp.: 140 °C (140 °C, Bauer 1996)

IR (KBr [cm⁻¹]): 3052 (ν), 1624 (ν_{C=O}), 1576, 1501, 754

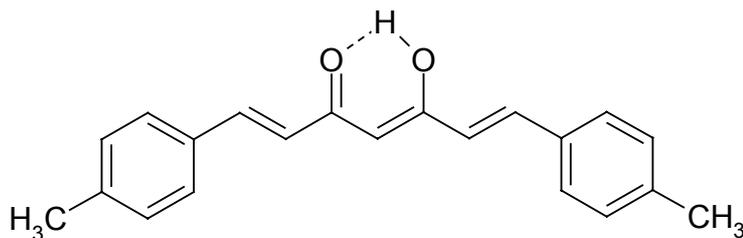
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 5,86 (s, 1H, H-4), 6,64 (d, ³J = 15,9 Hz, 2H, H-2,6), 7,40 (m, 6H, H-3',4',5'), 7,57 (m, 4H, H-2',6'), 7,67 (d, ³J = 16,1 Hz, 2H, H-1,7), 15,90 (s, 1H, enol-H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 101,8 (C-4), 124,0 (C-2,6), 128,1 (C-2',6'), 128,9 (C-3',5'), 130,1 (C-4'), 135,0 (C-1'), 140,6 (C-1,7), 183,3 (C-3,5)

UV (Ethanol): λ_{max} = 392 nm, lgε = 4,68

C₁₉H₁₆O₂ (276,34)

5-Hydroxy-1,7-bis(p-tolyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (2)



Darstellung nach Methode A

Aromatischer Aldehyd: 4-Methylbenzaldehyd (4,81 g)

Umkristallisieren aus Aceton ergibt gelbe Nadeln

Ausbeute: 2,6 g (43 % d. Th.)

Smp.: 206 °C (203 °C, Bauer 1996)

IR (KBr [cm⁻¹]): 2912 (v), 1622 (ν_{C=O}), 1604, 1570, 1516, 1440

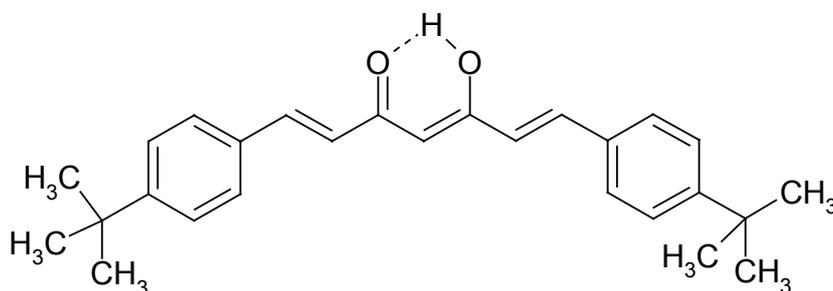
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 2,38 (s, 6H, 4'-CH₃), 5,82 (s, 1H, H-4), 6,59 (d, ³J = 15,8 Hz, 2H, H-2,6), 7,20 (d, ³J = 8,0 Hz, 4H, H-3',5'), 7,46 (d, ³J = 8,0 Hz, 4H, H-2',6'), 7,64 (d, ³J = 15,8 Hz, 2H, H-1,7), 15,98 (s, 1H, enol-H)

UV (Ethanol): λ_{max} = 400 nm, lgε = 4,71

Fluoreszenz: λ_{Emission} = 461 nm (Ethanol)

C₂₁H₂₀O₂ (304,39)

1,7-Bis(4-*tert*-butylphenyl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (3)*



Darstellung nach Methode A

Aromatischer Aldehyd: 4-*tert*-Butylbenzaldehyd (6,49 g)

Umkristallisieren aus Aceton ergibt gelbe Nadeln

Ausbeute: 0,43 g (5,5 %)

Smp.: 175 – 179 °C

IR (KBr [cm⁻¹]): 2962 (v), 1628 (ν_{C=O}), 1514 (br), 1412, 1363, 1267, 827

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1,34 (s, 18H, 4'-C(CH₃)₃), 5,91 (s, 1H, H-4), 6,67 (d, ³J = 16,0 Hz, 2H, H-2,6), 7,50 (d, ³J = 8,6 Hz, 4H, H-3',5'), 7,59 (d, ³J = 8,6 Hz, 4H, H-2',6'), 7,73 (d, ³J = 16,0 Hz, 2H, H-1,7), 15,94 (s, 1H, enol-H)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 31,18$ ($-\text{CH}_3$), $34,91$ ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), $101,56$ (C-4), $123,35$ (C-2,6), $125,92$ (C-3',5'), $127,98$ (C-2',6'), $132,32$ (C-1'), $140,44$ (C-1,7), $153,69$ (C-4'), $183,42$ (C-3,5)

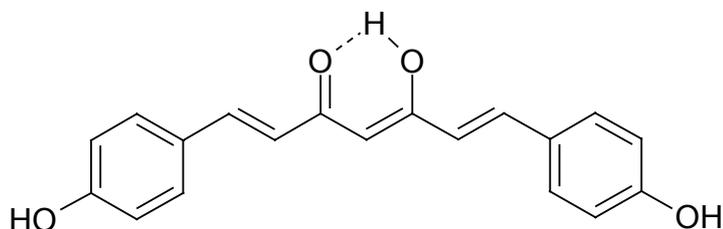
UV (Ethanol): $\lambda_{\text{max}} = 400$ nm, $\lg \epsilon = 4,76$

Fluoreszenz: $\lambda_{\text{Emission}} = 460$ nm (Ethanol)

$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_2$ (388,55) ber. C 83,46 H 8,30
 gef. C 83,58 H 8,41

5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (4)

Bisdesmethoxycurcumin



Darstellung nach Methode B

Aromatischer Aldehyd: *p*-Hydroxybenzaldehyd

Umkristallisieren aus Ethanol ergibt orange Nadeln

Ausbeute: 3,4 g (55 % d. Th.)

Smp.: 224 – 226°C (224 °C, Bauer 1996)

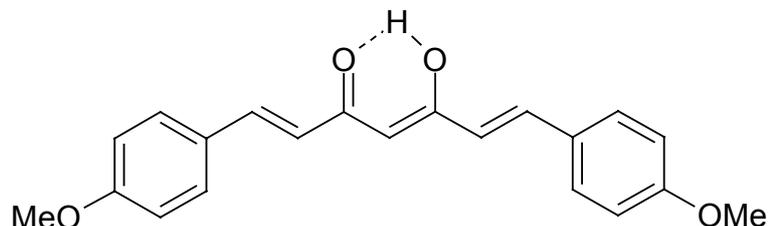
IR (KBr [cm^{-1}]): 3422 (ν), 1622 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1600, 1580, 1514 1252

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): $\delta = 6,04$ (s, 1H, H-4), $6,69$ (d, $^3J = 15,9$ Hz, 2H, H-2,6), $6,82$ (d, $^3J = 8,7$ Hz, 4H, H-3',5'), $7,55$ (d, $^3J = 16,0$ Hz, 2H, H-1,7), $7,56$ (d, $^3J = 8,7$ Hz, 4H, H-2',6'), $16,34$ (s, 1H, enol-H)

UV (Ethanol): $\lambda_{\text{max}} = 418$ nm, $\lg \epsilon = 4,77$

Fluoreszenz: $\lambda_{\text{Emission}} = 514$ nm (Ethanol)

$\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_4$ (308,34)

5-Hydroxy-1,7-bis(4-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (5)

Darstellung nach Methode A

Aromatischer Aldehyd: 4-Methoxybenzaldehyd (5,45 g)

Umkristallisieren aus Ethanol ergibt orange Nadeln

Ausbeute: 3,0 g (44 % d. Th.)

Smp.: 164°C (163 °C, Bauer 1996)

IR (KBr [cm⁻¹]): 2833 (ν), 1626 (ν_{C=O}), 1602, 1574, 1512, 1422, 1250, 1140

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 3,85 (s, 6H, 4'-OCH₃), 5,78 (s, 1H, H-4), 6,50 (d, ³J = 15,8 Hz, 2H, H-2,6), 6,92 (d, ³J = 8,7 Hz, 4H, H-3',5'), 7,51 (d, ³J = 8,7 Hz, 4H, H-2',6'), 7,62 (d, ³J = 15,8 Hz, 2H, H-1,7), 16,01 (s, 1H, enol-H)

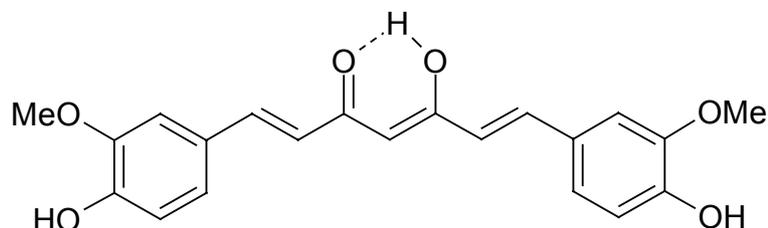
UV (Ethanol): λ_{max} = 410 nm, lgε = 4,77

Fluoreszenz: λ_{Emission} = 500 nm (Ethanol)

C₂₁H₂₀O₄ (336,39)

5-Hydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (6)

Curcumin



Darstellung nach Methode B

Aromatischer Aldehyd: 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (6,09 g)

Umkristallisieren aus Ethanol ergibt orange Nadeln

Ausbeute: 3,4 g (46 % d. Th.)

Smp.: 183°C (184 °C, Bauer 1996)

IR (KBr [cm⁻¹]): 3417 (ν), 2844 (ν), 1628 (ν_{C=O}), 1603, 1560, 1510, 1233

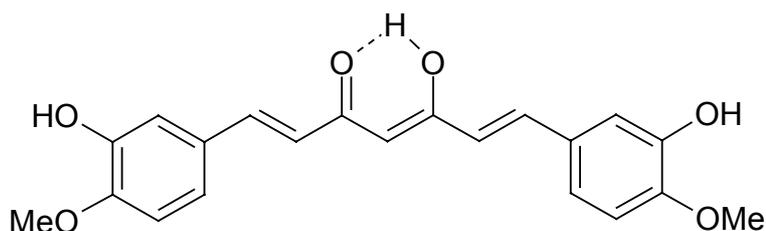
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 3,84 (s, 6H, 3'-OCH₃), 6,06 (s, 1H, H-4), 6,75 (d, ³J = 15,8 Hz, 2H, H-2,6), 6,82 (d, ³J = 8,1 Hz, 2H, H-5'), 7,15 (dd, ³J = 8,1 Hz, ⁴J = 1,7 Hz, 2H, H-6'), 7,32 (d, ⁴J = 1,7 Hz, 2H, H-2'), 7,54 (d, ³J = 15,8 Hz, 2H, H-1,7), 9,63 (s, 2H, 4'-OH), 16,38 (s, 1H, enol-H)

UV (Ethanol): λ_{max} = 426 nm, lgε = 4,77

Fluoreszenz: λ_{Emission} = 525 nm (Ethanol)

C₂₁H₂₀O₆ (368,39)

5-Hydroxy-1,7-bis(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (7)



Darstellung nach Methode A

Aromatischer Aldehyd: 3-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd (6,1 g)

Umkristallisieren aus Ethanol ergibt orange Kristalle

Ausbeute: 3,6 g (49 % d. Th.)

Smp.: 190°C (192-193 °C, König 1993)

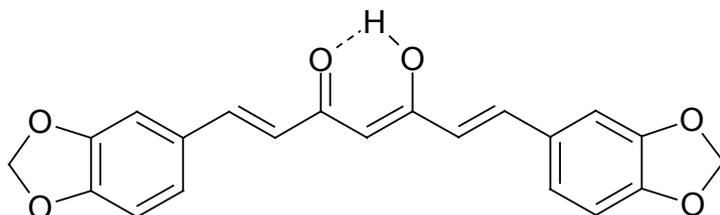
IR (KBr [cm⁻¹]): 3404 (ν), 3208 (br), 1622 (ν_{C=O}), 1639, 1589, 1461, 1126

¹H NMR (300 MHz, Aceton-d₆): δ = 3,90 (s, 6H, 4'-OCH₃), 6,02 (s, 1H, H-4), 6,68 (d, ³J = 15,8 Hz, 2H, H-2,6), 7,01 (d, ³J = 8,3 Hz, 2H, H-5'), 7,15 (dd, ³J = 8,3 Hz, ⁴J = 2,1 Hz, 2H, H-6'), 7,21 (d, ⁴J = 2,0 Hz, 2H, H-2'), 7,57 (d, ³J = 15,8 Hz, 2H, H-1,7), 7,78 (s, 2H, 3'-OH), 16,36 (s, 1H, enol-H)

UV (Ethanol): λ_{max} = 420 nm, lgε = 4,78

Fluoreszenz: λ_{Emission} = 506 nm (Ethanol)

C₂₁H₂₀O₆ (368,39)

1,7-Bis(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (8)

Darstellung nach Methode A

Aromatischer Aldehyd: 1,3-Benzodioxol-5-carbaldehyd (6,0 g)

Umkristallisieren aus Aceton ergibt orange Kristalle

Ausbeute: 2,4 g (33 % d. Th.)

Smp.: 202°C (198-199 °C, Pabon 1964)

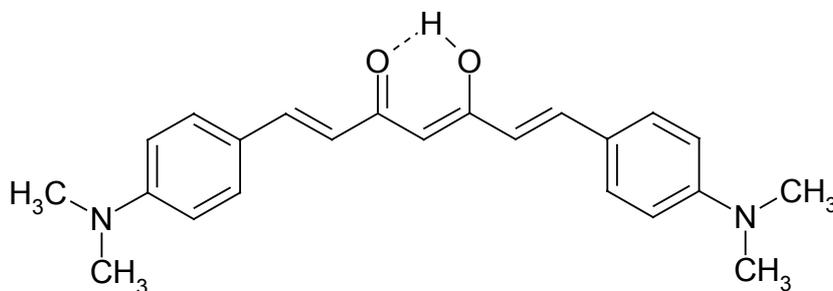
IR (KBr [cm⁻¹]): 2904 (ν), 1629 (ν_{C=O}), 1611, 1499, 1360, 1171, 1037, 811

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 6,04 (s, 1H, H-4), 6,09 (s, 4H, -OCH₂O-), 6,81 (d, ³J = 15,8 Hz, 2H, H-2,6), 6,98 (d, ³J = 8,0 Hz, 2H, H-5'), 7,21 (dd, ³J = 8,1 Hz, ⁴J = 1,5 Hz, 2H, H-6'), 7,41 (d, ⁴J = 1,5 Hz, 2H, H-2'), 7,55 (d, ³J = 15,8 Hz, 2H, H-1,7), 16,21 (s, 1H, enol-H)

UV (Ethanol): λ_{max} = 416 nm, lgε = 4,77

Fluoreszenz: λ_{Emission} = 517 nm (Ethanol)

C₂₁H₁₆O₆ (364,36)

1,7-Bis(4-dimethylaminophenyl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (9)

Darstellung nach Methode C

Aromatischer Aldehyd: 4-Dimethylaminobenzaldehyd (5,97 g)

Umkristallisieren aus DMF ergibt violette Kristalle

Ausbeute: 2,4 g (33 % d. Th.)

Smp.: 209 °C (206-207 °C, Pabon 1964)

IR (KBr [cm⁻¹]): 3024 (ν), 2912 (ν), 1621 (ν_{C=O}), 1516, 1142, 977, 819

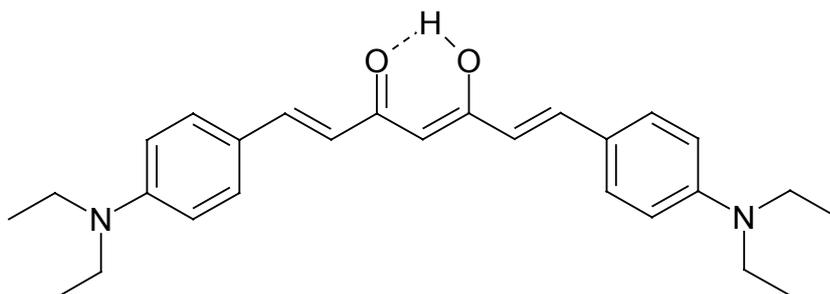
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 2,95 (s, 12H, -N(CH₃)₂), 5,73 (s, 1H, H-4), 6,42 (d, ³J = 15,8 Hz, 2H, H-2,6), 6,68 (d, ³J = 8,6 Hz, 4H, H-3',5'), 7,45 (d, ³J = 8,6 Hz, 4H, H-2',6'), 7,59 (d, ³J = 15,8 Hz, 2H, H-1,7), 16,31 (s, 1H, enol-H)

UV (Ethanol): λ_{max} = 486 nm, lgε = 4,89

Fluoreszenz: λ_{Emission} = 608 nm (Ethanol)

C₂₃H₂₆N₂O₂ (362,47)

1,7-Bis(4-diethylaminophenyl)-5-hydroxy-1,4,6-heptatrien-3-on (10)*



Darstellung nach Methode C

Aromatischer Aldehyd: 4-Diethylaminobenzaldehyd (7,09 g)

Umkristallisieren aus DMF ergibt violette Kristalle

Ausbeute: 2,0 g (24 % d. Th.)

Smp.: 186 – 188 °C

IR (KBr [cm⁻¹]): 2970 (ν), 2893 (ν), 1549 (ν_{C=O}), 1432, 1401, 1353, 1265, 964, 816

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1,19 (t, ³J = 7,1 Hz, 12H, -CH₃), 3,40 (q, ³J = 7,1 Hz, 8H, -CH₂-), 5,72 (s, 1H, H-4), 6,39 (d, ³J = 15,66 Hz, 2H, H-2',6'), 6,64 (d, ³J = 9,0 Hz, 4H, H-3',5'), 7,43 (d, ³J = 9,0 Hz, 4H, H-2',6'), 7,58 (d, ³J = 15,68 Hz, 2H, H-1,7), 16,36 (s, 1H, enol-H)

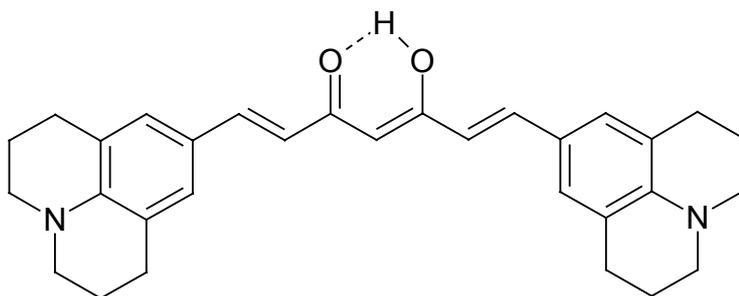
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 12,64 (-CH₃), 44,50 (-CH₂-), 100,73 (C-4), 111,38 (C-3',5'), 118,63 (C-2,6), 122,31 (C-1'), 130,13 (C-2',6'), 140,56 (C-1,7), 149,19 (C-4') 183,33 (C-3,5)

UV (Ethanol): $\lambda_{\max} = 494 \text{ nm}$, $\lg \epsilon = 4,92$

Fluoreszenz: $\lambda_{\text{Emission}} = 609 \text{ nm}$ (Ethanol)

$\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_2$ (418,58) ber. C 77,48 H 8,19 N 6,69
 gef. C 77,29 H 8,33 N 6,43

5-Hydroxy-1,7-bis(9-julolidinyl)-1,4,6-heptatrien-3-on (11)



Darstellung nach Methode A

Edukte: 0,01 mol Acetylaceton (1,0 g), 0,02 mol 9-Formyljulolidin (4,03 g)

Umkristallisieren aus DMF ergibt violette Nadeln

Ausbeute: 1,1 g (24 % d.Th.)

Smp.: 179°C (179 °C, Bauer 1996)

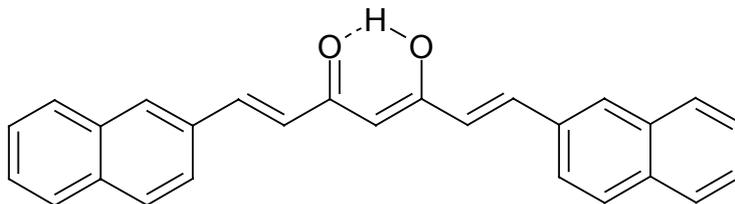
IR (KBr [cm^{-1}]): 2920 (ν), 2838 (ν), 1588 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1566, 1518, 1286

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,96$ (quint, $^3\text{J} = 5,7 \text{ Hz}$ und $6,2 \text{ Hz}$, 8H, H-2',6'), 2,74 (t, $^3\text{J} = 6,2 \text{ Hz}$, 8H, H-3',5'), 3,22 (t, $^3\text{J} = 5,7 \text{ Hz}$, 8H, H-1',7'), 6,65 (s, 1H, H-4), 6,33 (d, $^3\text{J} = 15,6 \text{ Hz}$, 2H, H-2,6), 7,00 (s, 4H, H-8',10'), 7,48 (d, $^3\text{J} = 15,6 \text{ Hz}$, 2H, H-1,7), 16,40 (s, 1H, enol-H)

UV (Ethanol): $\lambda_{\max} = 516 \text{ nm}$, $\lg \epsilon = 4,85$

Fluoreszenz: $\lambda_{\text{Emission}} = 626 \text{ nm}$ (Ethanol)

$\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_2$ (466,63)

5-Hydroxy-1,7-di-2-naphthyl-1,4,6-heptatrien-3-on (12)*

Darstellung nach Methode C

Aromatischer Aldehyd: 2-Naphtaldehyd (6,24 g)

Umkristallisieren aus Toluol ergibt gelbe Plättchen

Ausbeute: 3,7 g (49 % d. Th.)

Smp.: 245 – 247 °C

IR (KBr [cm⁻¹]): 3050 (ν), 1634 (ν_{C=O}), 1362, 1141, 970, 823

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 5,94 (s, 1H, H-4), 6,77 (d, ³J = 15,8 Hz, 2H, H-2,6), 7,51 – 7,54 (m, 4H, H-4',5'), 7,73 (d, 2H, ³J = 8,5 Hz, 2H, H-8'), 7,83 – 7,89 (m, 8H, H-1,7,3',6',7'), 7,98 (s, 2H, H-2'), 15,97 (s, 1H, enol-H)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 101,99 (C-4), 123,63 (C-2,6), 124,35 (C-8'), 126,75 (C-4'), 127,23 (C-5'), 127,81 (C-2'), 128,61 und 128,72 (C-3' und C-6'), 129,99 (C-7'), 132,58 (C-6'a), 133,46 (C-2'a), 134,21 (C-1'), 140,73 (C-1,7), 183,31 (C-3,5)

UV (Ethanol): λ_{max} = 410 nm, lgε = 4,83

Fluoreszenz: λ_{Emission} = 483 nm (Ethanol)

C ₂₇ H ₂₀ O ₂ (376,46)	ber. C 86,15 H 5,36
	gef. C 85,98 H 5,41

9 Literaturverzeichnis

Alizadeh-Pasdar, N.; Li-Chan, E. C. Y. Comparison of protein surface hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent probes. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 328-334

Alizadeh-Pasdar, N.; Li-Chan, E. C. Y. Application of prodan fluorescent probe to measure surface hydrophobicity of proteins interacting with κ -carrageenan. *Food Hydrocolloids* **2001**, 15, 285-294

Ammon, H. P. T.; Wahl, M. A. Pharmacology of curcuma longa. *Planta Med.* **1991**, 57, 1-7

Azzi, A. The application of fluorescent probes in membrane studies. *Q. Rev. Biophys.* **1975**, 8, 237-316

Badley, R. A.; Martin, W. G.; Schneider, H. Dynamic behavior of fluorescent probes in lipid bilayer model membranes. *Biochemistry* **1973**, 12, 268-275

Bauer, J. Curcuminoiden als potentielle biliäre Schwermetallausscheider – Synthese, Keto-Enol-Tautomerie und Redoxverhalten. *Dissertation Universität Kiel* **1996**

Began, G.; Sudharshan, E.; Appu Rao, A. G. Inhibition of lipoxygenase-1 by phosphatidylcholine micelles-bound curcumin. *Lipids* **1998**, 33, 1223-1228

Began, G.; Sudharshan, E.; Udaya Sankar, K.; Appu Rao, A. G. Interaction of curcumin with phosphatidylcholine: a spectrofluorometric study. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 4992-4997

Beinhoff, M. Grundlegende Arbeiten zu sphärischen Phenyl-Äthylen-Dendrimern mit generationsspezifisch eingebauten, fluoreszierenden Solvatationssonden auf Pyrenbasis. *Dissertation FU Berlin* **2002**

Bondar, O. P.; Rowe, E. S. Preferential interactions of fluorescent probe prodan with cholesterol. *Biophys. J.* **1999**, 76, 956-962

Bruneau, E.; Lavabre, D.; Levy, G.; Micheau, J. C. Quantitative analysis of continuous-variation plots with a comparison of several methods. Spectrophotometric study of organic and inorganic 1:1 stoichiometry complexes. *J. Chem. Educ.* **1992**, 69, 833-837

Catalan, J.; Perez, P.; Laynez, J.; Blanco, F. Analysis of the solvent effect on the photophysical properties of 6-Propionyl-2-(dimethylamino)naphtalene (PRODAN) *J. Fluoresc.* **1991**, 1, 215-224

Chakrabarti, S. K.; Ware, W. R. Nanosecond time-resolved emission spectroscopy of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate. *J. Chem. Phys.* **1971**, 55, 5494-5498

Chignell, C. F.; Bilski, P.; Reszka, K. J.; Motten, A. G.; Sik, R. H.; Dahl, T. A. Spectral and photochemical properties of curcumin. *Photochem. Photobiol.* **1994**, 59, 295-302

Cogan, U.; Shinitzky, M.; Weber, G.; Nishida, T. Microviscosity and order in the hydrocarbon region of phospholipid – cholesterol dispersions determined with fluorescent probes. *Biochemistry* **1973**, 12, 521-528

Crane, N. J.; Mayrhofer, R. C.; Betts, T. A.; Baker, G. A. Cyclodextrin inclusion complexes with a solvatochromic fluorescent probe. *J. Chem. Educ.* **2002**, 79, 1261-1263

Dahl, T. A.; Bilski, P.; Reszka, K. J.; Chignell, C. F. Photocytotoxicity of curcumin. *Photochem. Photobiol.* **1994**, 59, 290-294

Deters, M.; Siegers, C.; Muhl, P.; Hänsel, W. Choleric effects of an acute cyclosporin-induced cholestasis in the rat. *Planta Med.* **1999**, 65, 610-613

Deters, M.; Siegers, C.; Hänsel, W.; Schneider, K.-P.; Hennighausen, G. Influence of curcumin on cyclosporin-induced reduction of biliary bilirubin and cholesterol excretion and on biliary excretion of cyclosporin and its metabolites. *Planta Med.* **2000**, 66, 429-434

DeToma, R. P.; Easter, J. H.; Brand, L. Dynamic interactions of fluorescence probes with the solvent environment. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 5001-5007

Díaz, A. N.; Ramos Peinado, M. C. Fluorometric determination of curcumin in yogurt and mustard. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 56-59

Dimroth, K.; Reichardt, C.; Siepmann, T.; Bohlmann, F. Über Pyridinium-*N*-phenol-betaine und ihre Verwendung zur Charakterisierung der Polarität von Lösungsmitteln. *Liebigs Ann. Chem.* **1963**, 661, 1-37

Eaton, D. F. Reference materials for fluorescence measurement. *J. Photochem. Photobiol.* **1988**, 2, 523-531

Edelmann, G. M.; McClure, W. O. Fluorescent probes and the Conformation of Proteins. *Acc. Chem. Res.* **1968**, 1, 65-70

Elschner, K. *In vitro*-Untersuchungen zu Phospholipidinteraktionen und Änderungen der Membranfluiditäten von Neuroblastomzellen durch kaliumkanalblockierende Psoralene. *Dissertation Universität Kiel* **1998**

Fery-Forgues, S.; Lavabre, D. Are fluorescence quantum yields so tricky to measure? A demonstration using familiar stationary products. *J. Chem. Educ.* **1999**, *76*, 1260-1264

Galla, H. J. *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*. G. Thieme Verlag Stuttgart **1988**

Görlitz, G. *Dissertation MLU Halle-Wittenberg* **1997**

Goel, A.; Boland, R.; Chauhan, D. P. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by dietary curcumin in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Lett.* **2001**, *172*, 111-118

Hänsel, W. Die Gelbwurzel – *Curcuma domestica* Val., *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. Portrait zweier Arzneipflanzen. *Z. Phytother.* **1997**, *18*, 297-306

Holder, G. M.; Plummer, J. L.; Ryan, A. J. The metabolism and excretion of curcumin (1,7-Bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) in the rat. *Xenobiotica* **1978**, *8*, 761-768

Iglesias, E. Enolization of benzoylacetone in aqueous surfactant solutions: a novel method for determining enolization constants. *J. Phys. Chem. A.* **1996**, *100*, 12592-12599

Ireson, C.; Orr, S.; Jones, D. J. L.; Verschoyle, R.; Lim, C.-K.; Luo, J.-L.; Howells, L.; Plummer, S.; Jukes, R.; Williams, M.; Steward, W. P.; Gescher, A. Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E₂ production. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 1058-1064

Jaruga, E.; Salvioli, S.; Dobrucki, J.; Chrul, S.; Bandorowicz-Pikula, J.; Sikora, E.; Franceschi, C.; Cossarizza, A.; Bartosz, G. Apoptosis-like, reversible changes in plasma membrane asymmetry and permeability, and transient modifications in mitochondrial membrane potential induced by curcumin in rat thymocytes. *FEBS Letters* **1998** (a), *433*, 287-293

Jaruga, E.; Sokal, A.; Chrul, S.; Bartosz, G. Apoptosis-independent alterations in membrane dynamics induced by curcumin. *Exp. Cell Res.* **1998** (b), *245*, 303-312

Jentsch, K.; Gonda, T.; Holler, H. Papierchromatographische und pharmakologische Untersuchungen von *Curcuma*-Farbstoffen. *Pharm. Acta Helv.* **1959**, *34*, 181-188

Jobin, C.; Bradham, C. A.; Russo, M. P.; Juma, B.; Narula, A. S.; Brenner, D. A.; Sartor, R. B. Curcumin blocks cytokine-mediated NF- κ B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I- κ B kinase activity. *J. Immunol.* **1999**, 163, 3474-3483

Jovanovic, S. V.; Steenken, S.; Boone, C. W.; Simic, M. G. H-atom transfer is a preferred antioxidant mechanism of curcumin. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9677-9681

Junginger, H.-E.; Hofland, H. E. J.; Bouwstra, J. A. Liposomen und Niosomen – Herstellung und Prüfung. *Pharm. Ztg.* **1991**, 25, 1631-1641

Kanaoka, Y. Organische Fluoreszenzreagentien für die Untersuchung von Enzymen und Proteinen. *Angew. Chem.* **1977**, 89, 142-152

Khopde, S. M.; Priyadarsini, K. I.; Palit, D. K.; Mukherjee, T. Effect of solvent on the excited-state photophysical properties of curcumin. *Photochem. Photobiol.* **2000**, 72, 625-631

Kiuchi, F.; Goto, Y.; Sugimoto, N.; Akao, N.; Kondo, K.; Tsuda, Y. Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoids. *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, 41, 1640-1643

König, W. *J. prakt. Chem.* **1926**, 112, 1 in: Staab, H. A. *Einführung in die theoretische organische Chemie*. Verlag Chemie, Weinheim, 1964, 4. Auflage

König, B. Analytische Untersuchungen zur Stabilität von Curcuminoiden sowie zu ihrer Eignung als hepatobiliäre Schwermetallausscheider. *Dissertation Universität Kiel* **1993**

Kosower, E. M. The effect of solvent on spectra I. A new empirical measure of solvent polarity: Z-values. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, 80, 3253-3260

Krass, J. D.; Janstorff, B.; Genieser, H.-G. Determination of lipophilicity by gradient elution high-performance liquid chromatography. *Analyt. Chem.* **1997**, 69, 2575-2581

Krasnowska, E. K.; Gratton, E.; Parasassi, T. Prodan as a membrane surface fluorescence probe: partitioning between water and phospholipid phases. *Biophys. J.* **1998**, 74, 1984-1993

Kuo, M.-L.; Huang, T.-S.; Lin, J.-K. Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, 1317, 95-100

Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, New York. **1983**

- Lampe, V.** Synthese von Curcumin. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1918**, 51, 1347-1355
- Lippert, E.; Vogel, W.** *Z. phys. Chem. N.F.* **1956**, 9, 133
- Lippert, E.** *Z. Elektrochem.* **1957**, 61, 962-975
- Liptay, W.** Die Lösungsmittelabhängigkeit der Wellenzahlen von Elektronenbanden und die chemisch-physikalischen Grundlagen. *Z. Naturforsch.* **1965**, 20 a, 1441-1471
- Lim, G. P.; Chu, T.; Yang, F.; Beech, W.; Frautschy, S. A.; Cole, G. M.** The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an alzheimer transgenic mouse. *J. Neurosci.* **2001**, 21, 8370-8377
- Lin, J.-K.; Pan, M.-H.; Lin-Shiau, S.-Y.** Recent studies on the biofunctions and biotransformations of curcumin. *BioFactors* **2000**, 13, 153-158
- Macgregor, R. B.; Weber, G.** Estimation of the polarity of the protein interior by optical spectroscopy. *Nature* **1986**, 319, 70-73
- Maiwald, L.; Schwantes, P. A.** *Curcuma xathorrhiza* Roxb. *Z. Phytother.* **1991**, 12, 35-45
- Mamero, B.** Curcumin als Antioxidans: Schwermetallionenvermittelte radikalische Oxidation von Curcuminoiden. *Dissertation Universität Kiel* **1997**
- Moreno, F.; Cortijo, M.; González-Liménez, J.** The fluorescent probe prodan characterizes the warfarin binding site on human serum albumin. *Photochem. Photobiol.* **1999**, 69, 8-15
- Mukhopadhyay, A.; Basu, N.; Ghatak, N.; Gujral, P. K.** Anti-inflammatory and irritant activities of curcumin analogues in rats. *Agents Actions* **1982**, 12, 508
- Nairn, R. C.; Rolland, J. M.** Fluorescent probes to detect lymphocyte activation. *Clin. Exp. Immunol.* **1980**, 39, 1-13
- Ohtsu, H.; Xiao, Z.; Ishida, J.; Nagai, M.; Wang, H.-K.; Itokawa, C.-Y. S.; Shih, C.; Chiang, T.; Chang, E.; Lee, Y.; Tsai, M.-Y.; Chang, C.; Lee, K.-H.** Antitumor Agents. 217. Curcumin analogues as novel androgen receptor antagonists with potential as anti-prostate cancer agents. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 5037-5042
- Okano, Y.; Iida, H.; Yamauchi, T.; Sekiya, T.; Kuwabara, H.; Goto, M.; Nozawa, Y.** Abnormalities of erythrocyte membranes in biliary atresia: ultrastructure and lipid composition. *Clin. Chim. Acta* **1979**, 94, 317-325
- Onsager, L.** *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, 58, 1486

Pabon, H. J. J. A synthesis of curcumin and related compounds. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1964**, 83, 379-386

Pan M.-H.; Huang, T.-M.; Lin, J.-K. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab. Dispos.* **1999**, 27, 486-494

Parasassi, T.; Gratton, E. Membrane lipid domains and dynamics as detected by Laurdan fluorescence. *J. Fluoresc.* **1995**, 5, 59-69

Park, S.-Y.; Kim, D. S. H. L. Discovery of Natural Products from *Curcuma longa* that Protect Cells from Beta-Amyloid Insult: A Drug Discovery Effort against Alzheimer's Disease. *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 1227-1231

Parker, C. A.; Rees, W. T. Correction of fluorescence spectra and measurement of fluorescence quantum efficiency. *Analyst* **1960**, 85, 587-600

Pavolini, T.; Gambarin, F. Grinzato, A. M. Curcumina e curcuminoidi. *Ann. Chim. Rome* **1950**, 40, 280-291

Price, L. C. Kinetics and mechanisms of decomposition of curcumin and the curcuminoids by alkali and light. *Dissertation University of Arkansas, Arkansas/USA* **1992**

Pulla Reddy, A. C.; Lokesh, B. R. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Mol. Cell. Biochem.* **1992**, 111, 117-124

Pulla Reddy, A. C.; Sudharshan, E.; Appu Rao, A. G.; Lokesh, B. R. Interaction of curcumin with human serum albumin – a spectroscopic study. *Lipids* **1999**, 34, 1025-1029

Rajakumar, D. V.; Rao, M. N. A. Antioxidant properties of dehydrozingerone and curcumin in rat brain homogenates. *Mol. Cell. Biochem.* **1994**, 140, 73-79

Reichardt, C.; Müller, R. Der Substituenteneinfluß auf das Elektronenanregungsspektrum der Pyridinium-N-phenolat-betaïne. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1976**, 11, 1937-1963

Rohde, D. Darstellung und Eigenschaftsuntersuchungen an 1,3,2-Dioxaborinen mit variablen Coliganden am Boratom. *Dissertation MLU Halle-Wittenberg* **2002**

Roth, H. J.; Miller, B. Zur Kenntnis der Farbreaktion zwischen Borsäure und Curcumin. *Arch. Pharm. Weinheim, Germany* **1964**, 297, 660-673

Rottenberg, H. Probing the interactions of alcohols with biological membranes with the fluorescent probe prodan. *Biochemistry* **1992**, 31, 9473-9481

Rubas, W.; Schreier, H. Liposomen: Fortschritte in Herstellungs-Technologie und Therapie. *Pharm. Unserer Zeit* **1991**, 6, 255-270

Samanta, A.; Fessenden, R. W. Excited State Dipole Moment of PRODAN as Determined from Transient Dielectric Loss Measurements. *J. Phys. Chem. A* **2000**, 104, 8972

Sambaiah, K.; Ratankumar, S.; Kamanna, V. S.; Satyanarayana, M. N.; Rao, M. V. L. *J. Food Sci. Technol.* **1982**, 19, 187-190

Schmidt, W. *Optische Spektroskopie*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2000**, 2. Auflage

Shinitzky, M.; Dianoux, A.-C.; Gitler, C.; Weber, G. Microviscosity and order in the hydrocarbon region of micelles and membranes determined with fluorescent probes. I. Synthetic micelles. *Biochemistry* **1971**, 10, 2106-2113

Shinitzky, M.; Inbar, M. Difference in microviscosity induced by different cholesterol levels in the surface membrane lipid layer of normal lymphocytes and malignant lymphoma cells. *J. Mol. Biol.* **1974** (a), 85, 603-615

Shinitzky, M.; Barenholz, Y. Dynamics of the hydrocarbon layer in liposomes of lecithin and sphingomyelin containing dicetylphosphate. *J. Biol. Chem.* **1974** (b), 249, 2652-2657

Shinitzky, M.; Barenholz, Y. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, 515, 367-394

Siegers, C.; Deters, M.; Strubelt, O.; Hänsel, W. Choleric properties of different curcuminoids in the rat bile-fistula model. *Pharm. Pharmacol. Lett.* **1997**, 7, 87-89

Slavik, J. Anilino-naphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, 694, 1-25

Srimal, R. C.; Dhawan, B.N. Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent. *J. Pharm. Pharmacol.* **1973**, 25, 447-452

Staab, H. A. *Einführung in die theoretische organische Chemie*. Verlag Chemie, Weinheim, **1964**, 4. Auflage

Stockert, J. C.; Del Castillo, P.; Gómez, A.; Llorente, A. R. Fluorescence reaction of chromatin by curcumin. *Z. Naturforsch.* **1989**, 44c, 327-329

Stryer, L. The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin. A fluorescent probe of non-polar binding sites. *J. Mol. Biol.* **1965**, 13, 482-495

Stryer, L. *Science* **1968**, 162, 526

Tang, B.; Ma, L.; Wang, H.-Y.; Zhang, G.-Y. Study on the supramolecular interaction of curcumin and β -cyclodextrin by spectrophotometry and its analytical application. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 1355-1361

Tønnesen, H. H.; Karlsen, J. Studies on curcumin and curcuminoids V. Alkaline degradation of curcumin. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1985** (a), 180, 132-134

Tønnesen, H. H.; Karlsen, J. Studies on curcumin and curcuminoids VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1985** (b), 180, 402-404

Tønnesen, H. H.; Arrieta, A. F.; Lerner, D. Studies on curcumin and curcuminoids XXIV: Characterization of the spectroscopic properties of the naturally occurring curcuminoids and selected derivatives. *Pharmazie* **1995**, 50, 689-693

Turner, D. C.; Brand, L. Quantitative estimation of protein binding site polarity. Fluorescence of N-arylamino-naphthalenesulfonates. *Biochemistry* **1968**, 7, 3381-3390

Valeur, B. *Molecular Fluorescence – Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim **2002**

Venkatesan, P.; Rao, N. A. Structure – activity relationships for the inhibition of lipid peroxidation and the scavenging of free radicals by synthetic symmetrical curcumin analogues. *J. Pharm. Pharmacol.* **2000**, 52, 1123-1128

Wahlström, B.; Blennow, G. A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **1978**, 43, 86-92

Weber, G.; Laurence, D. J. R. *Proc. Biochem. J.* **1954**, 56: XXXI

Weber, G.; Farris, F. J. Synthesis and spectral properties of a hydrophobic fluorescent probe: 6-Propionyl-2-(dimethylamino)naphthalene. *Biochemistry* **1979**, 18, 3075-3078

Wichtl, M. *Curcuma xanthorrhiza – Moderne Forschung bestätigt die Signaturenlehre*. *Therapeutikon – Sonderheft Curcuma xanthorrhiza* **1991**, 10, 17-20

Wichtl, M. (Hrsg.) *Teedrogen und Phytopharmaka*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart. **2002**, 4. Auflage

Williams, K. R.; Adhyaru, B.; Pierce, R. Schulman, S. G. The binding constant for complexation of bilirubin to bovine serum albumin. An experiment for the biophysical chemistry laboratory. *J. Chem. Educ.* **2002**, 79, 115-116

Zeng, J.; Chong, P. L.-G. Effect of ethanol-induced lipid interdigitation on the membrane solubility of prodan, acdan, and laurdan. *Biophys. J.* **1995**, 68, 567-573

Zhang, F.; Altorki, N. K.; Mestre, J. R.; Subbaramaiah, K.; Dannenberg, A. J. Curcumin inhibits cyclooxygenase-2 transcription in bile acid- and phorbol ester-treated human gastrointestinal epithelial cells. *Carcinogenesis* **1999**, 20, 445-451

Abkürzungsverzeichnis

D	Debye
DK	Dielektrizitätskonstante
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPH	Diphenylhexatrien
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
ε	Extinktionskoeffizient
ε_r	relative Dielektrizitätskonstante
hC	„halbes Curcumin“
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HSA	Humanserumalbumin
K_B	Bindungskonstante
log P	(Oktanol/Wasser)-Verteilungskoeffizient
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
μ_e	Dipolmoment des angeregten Zustandes
μ_g	Dipolmoment des Grundzustandes
$\Delta\mu$	Differenz von μ_e und μ_g
Q_F	Fluoreszenzquantenausbeute
r	Anisotropie
r_0	intrinsische Anisotropie
RSA	Rinderserumalbumin
SPP	Sörensen-Phosphat-Puffer
THF	Tetrahydrofuran
τ_F	Fluoreszenzlebensdauer
τ_R	Rotationskorrelationszeit

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Hänsel.

Herrn Prof. Dr. W. Hänsel möchte ich danken für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, für die Überlassung des interessanten Themas und für seine stete Diskussionsbereitschaft und wissenschaftliche Hilfestellung.

Herrn Dr. P. Körner danke ich für die Einweisung in die Fluoreszenzpolarisationstechnik und für die Hilfestellung vor allem zu Beginn dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. U. Girreser, der jederzeit ein kompetenter Ansprechpartner war und mich mit seinen kritischen und kreativen Anmerkungen immer motivieren konnte. Ihm danke ich auch ganz besonders für das sorgfältige Korrekturlesen und die vielen wertvollen Hinweise, mit denen er sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Frau Dr. M. Rostaie-Gerylow danke ich für die Einweisung und Unterstützung bei den durchgeführten Hyperchem AM1-Rechnungen.

Frau A. Wernekenschnieder danke ich für die gute Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Curcuminoide und für die zur Verfügung gestellten Fluoreszenzanisotropiedaten der Verbindungen in Liposomensuspension.

Ganz herzlich danken möchte ich Frau S. Häuer für die vorbildliche Unterstützung und ihr großes persönliches Engagement bei der Erstellung der Lipophiliedaten und der Aufnahme von NMR- und Fluoreszenzspektren. Der gleiche Dank gilt Herrn B. Henke für seinen unermüdlichen Einsatz bei der Erstellung der Stabilitätsdaten sowie den photometrischen Untersuchungen. Ihm gilt auch mein persönlicher Dank für das freundschaftliche Verhältnis, daß sich in unserer gemeinsamen Zeit am Institut entwickelt hat.

Allen studentischen Hilfskräften, insbesondere Frau A. Windelberg und Herrn S. Döker, gilt mein Dank für die große Einsatzbereitschaft und tatkräftige Unterstützung bei den Fluoreszenzmessungen und bei der Synthese.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für die tolle Zusammenarbeit am Pharmazeutischen Institut.

Meinen Eltern und meiner Familie danke ich für ihr Interesse an meinem Studium und für die großartige Unterstützung, durch die schließlich auch das Gelingen dieser Arbeit möglich war.

Nicht genug danken kann ich meiner lieben Yvonne und unseren beiden „Kleinen“, Ada und Hendrik. Ihr habt mir durch eure Wärme nicht nur die Energie für das Erstellen dieser Arbeit gegeben.

Lebenslauf

Name:	Kruse
Vorname:	Jens
Geburtsdatum:	12.07.1972
Geburtsort:	Kiel
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulbildung

1979 – 1983	Grundschule am Heidenberger Teich, Kiel
1983 – 1992	Gymnasium im Bildungszentrum Mettenhof, Kiel Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Grundwehrdienst

1992 – 1993	Grundwehrdienst bei der Marine
-------------	--------------------------------

Hochschulstudium und Pharmaziepraktikum

1993 – 1997	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
September 1995	Erster Prüfungsabschnitt
November 1997	Zweiter Prüfungsabschnitt
Januar – Juni 1998	Pharmaziepraktikum in der Apotheke des Städtischen Krankenhauses Kiel
Juli – Dezember 1998	Pharmaziepraktikum in der Apotheke Dr. Sievert, Kiel
Januar 1999	Dritter Prüfungsabschnitt und Approbation zum Apotheker

Seit dem 01. April 1999 bin ich als wissenschaftlicher Angestellter am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel tätig. Gleichzeitig begann ich die vorliegende Arbeit unter der Leitung von Prof. Dr. W. Hänsel.