

Photochemische Wasserspaltung mit funktionalisierten Vesikeln



**Forschungsbericht
im Rahmen des Masterstudiengangs Biochemie**

vorgelegt von

N. N.

Matrikelnummer: ?

unter Betreuung von:

vom dd.mm.yyyy bis zum dd.mm.yyyy

angefertigt im

Institut für Organische Chemie

Prof. Dr. N. N.

Universität Regensburg

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	3
2. Ziel der Arbeit	6
3. Ergebnisse und Diskussion.....	7
3.1 Synthese des amphiphilen Katalysators.....	7
3.2 O ₂ -Messung am Gaschromatographen.....	10
3.2.1 Kalibrierung.....	10
3.2.2 Messung.....	13
3.3 O ₂ -Messung mit dem Fibox 3 System	14
4. Zusammenfassung und Ausblick	19
5. Experimenteller Teil.....	20
5.1 Synthese	20
5.1.1 Diethyl-4-brompyridin-2,6-dicarboxylat (1).....	20
5.1.2 Diethyl-4-(dodecyl)pyridin-2,6-dicarboxylat (2).....	20
5.1.3 Diethyl-4-dodecylpyridin-2,6-dicarboxylat (3).....	21
5.1.4 4-Dodecylpyridin-2,6-dicarboxylat (4).....	21
5.1.5 Diethyl-4-dodecylpiperidin-2,6-dicarboxylat (5).....	22
5.2 O ₂ -Messung am Gaschromatographen.....	22
5.2.1 Vesikel-Herstellung	22
5.2.2 Kalibrierung.....	23
5.2.3 Messung.....	23
5.3 O ₂ -Messung mit dem Fibox 3 System	23
5.3.1 Vesikel-Herstellung	23
5.3.2 Messung.....	24
6. Anhang	26
6.1 Literaturverzeichnis.....	26
6.2 Abkürzungsverzeichnis	27

1. Einleitung

Liposomen sind Vesikel, die hauptsächlich aus Phospholipiden bestehen. ^[1] Phospholipide sind amphiphile Moleküle, die aus einer polaren Kopfgruppe und einem unpolaren Schwanz aufgebaut sind. Sie lagern sich im wässrigen Medium zu Lipiddoppelschichten zusammen, wobei die unpolaren Gruppen aufeinander zuweisen und die Kopfgruppen zur Wasserphase hin orientiert sind (Abbildung 1). ^[2]

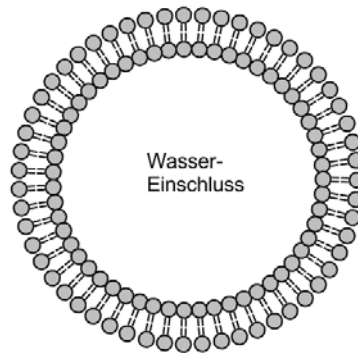


Abbildung 1: Liposom im wässrigen Medium.

Für die Herstellung der Vesikel werden z.B. die Phospholipide DMPC, DOPC und DSPC (Abbildung 2) verwendet. Diese Lipide unterscheiden sich in der Temperatur, bei der sie im flüssig-kristallinen Zustand vorliegen und schnelle laterale Diffusion innerhalb der Lipid-Doppelschicht möglich ist. Bei tieferen Temperaturen liegen Lipidmembranen nahezu kristallin vor. Mit Erhöhung der Temperatur erhöht sich auch die Fluidität der Membran und somit die laterale Diffusion. Abhängig sind die Übergangstemperaturen von der unpolaren Alkylkette. Sie werden durch lange Ketten erhöht und durch Z-Doppelbindungen und kurze Ketten gesenkt. ^[3] Die Übergangstemperatur für die Vesikel aus den genannten Phospholipiden liegt für DMPC bei 25°C, für DOPC bei -20°C und für DSPC bei 55°C. ^[4]

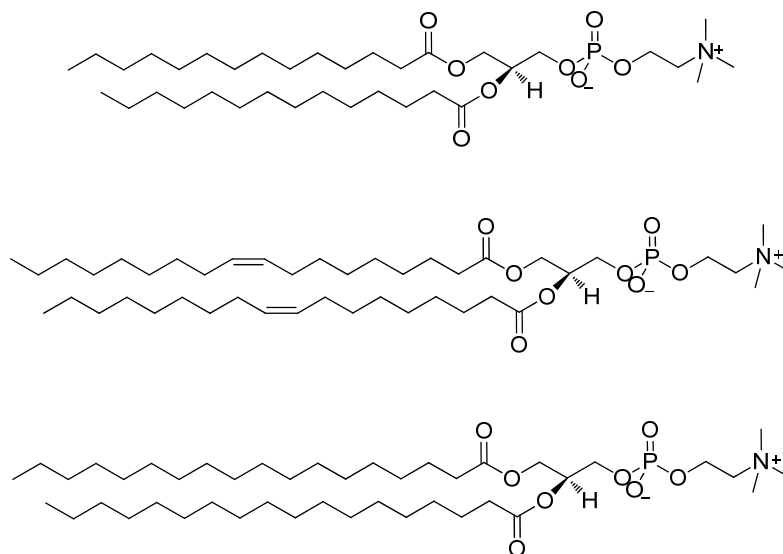


Abbildung 2: Strukturen der Phospholipide DMPC (oben), DOPC (Mitte) und DSPC (unten).

1. Einleitung

Durch den Einbau synthetischer Amphiphile in die Liposomen-Membran können funktionalisierte Vesikel hergestellt werden, die z.B. das aktive Zentrum von Metalloenzymen nachahmen oder Moleküle erkennen können. ^[5] Dadurch, dass auf der äußeren Membran-Oberfläche im Gegensatz zum umgebenden Wasser unterschiedliche physiochemische Bedingungen herrschen, kann durch Einbau von Katalysatoren oder Bindestellen deren Aktivität drastisch verändert werden. Bisher wurde die katalytische Aktivität von Vesikeln in Bezug auf verschiedene Polaritäten der Membran, ^[6] auf Katalysator-Doppelschichten oder auf in den Vesikeln eingekapselte Enzyme untersucht. ^[7,8] Durch den Einbau von Metall-Katalysatoren in die Vesikel-Membranen, kann die katalytische Aktivität optimiert werden, indem beispielsweise verschiedene Phospholipide verwendet, zusätzliche Komponenten eingebaut oder die Katalysator-Konzentrationen variiert werden.

Zur photochemischen Wasserspaltung sind ein Katalysator für die Oxidation von H_2O zu O_2 , ein Photosensitizer für die Aufnahme der Lichtenergie und ein Elektronenakzeptor-Opfersubstrat notwendig (Abbildung 3). ^[9]

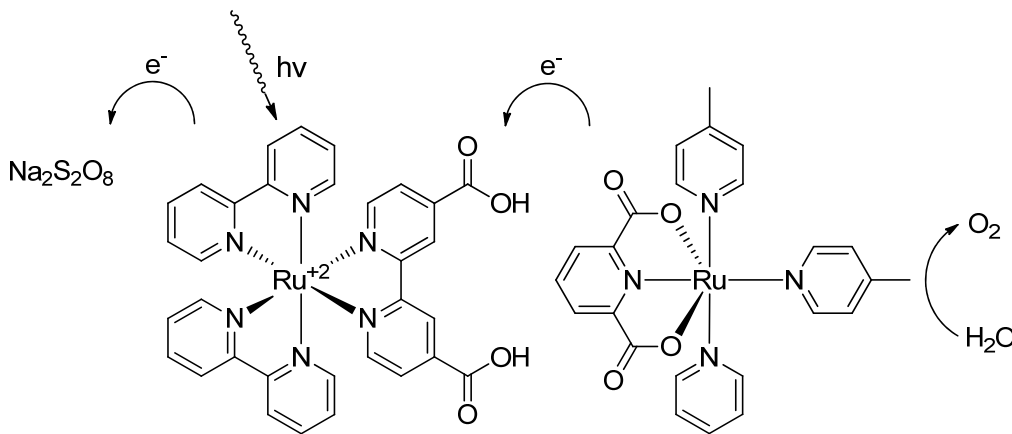


Abbildung 3: Photochemische Wasseroxidation in einem System aus Elektronenakzeptor ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$), Photosensitizer (links) und Katalysator (rechts).

Die dargestellten und andere Ruthenium-basierte Komplexe für die chemische und photochemische Wasser-Oxidation in homogenen Lösungen wurden von Sun *et al.* entwickelt und publiziert. ^[10-14]

Integriert man Katalysator und Photosensitizer in Vesikel-Membranen, kann die katalytische Aktivität stark verbessert werden. Durch die Zusammenlagerung der Phospholipide und der synthetischen Amphiphile entstehen Bereiche, in denen hohe Konzentrationen an Katalysator und Photosensitizer vorliegen und deshalb die Elektronenübertragung und somit die Wasseroxidation effizienter stattfinden kann (Abbildung 4).

1. Einleitung

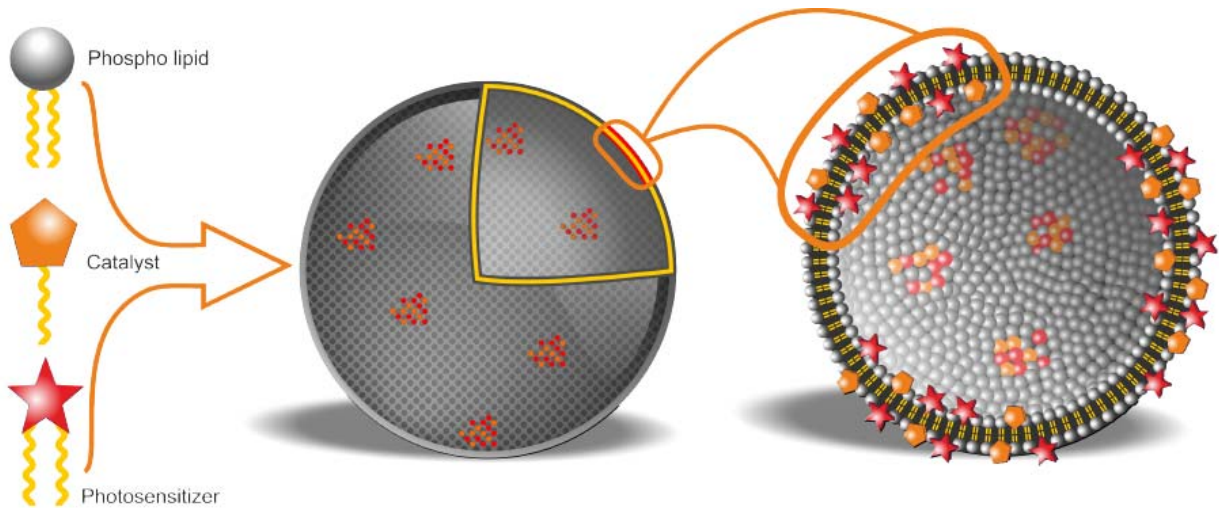


Abbildung 4: Bildung funktionalisierter Vesikel durch Selbstorganisation von Phospholipiden und synthetischen Amphiphilen. ^[15]

Durch den Einbau der Komponenten in die Vesikel-Membranen kann außerdem das Problem der Wasserlöslichkeit umgangen werden, da die eingebauten Reagenzien nicht wasserlöslich sein müssen, damit die Reaktion funktioniert.

Um aus den in Abbildung 3 dargestellten Reagenzien synthetische Amphiphile herzustellen, mussten lange Alkylketten angefügt werden. Auf diese Weise verhalten sie sich im wässrigen Milieu wie die Phospholipide, die das Grundgerüst der Vesikel bilden (Abbildung 5). ^[15]

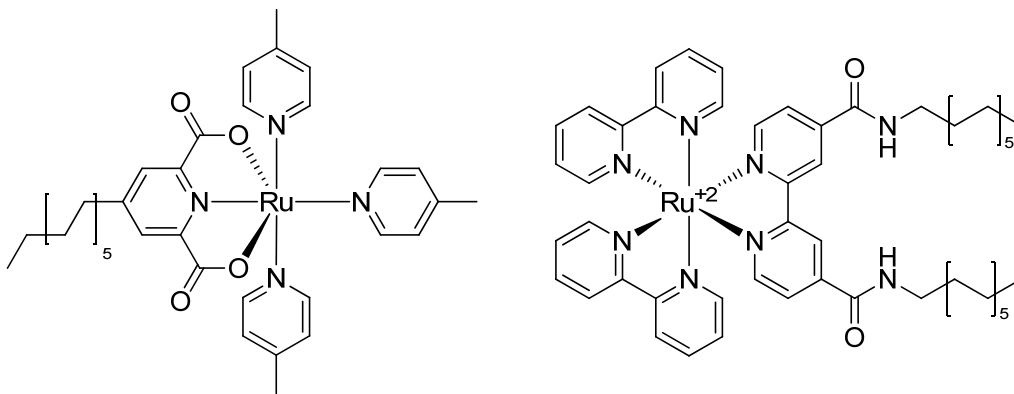


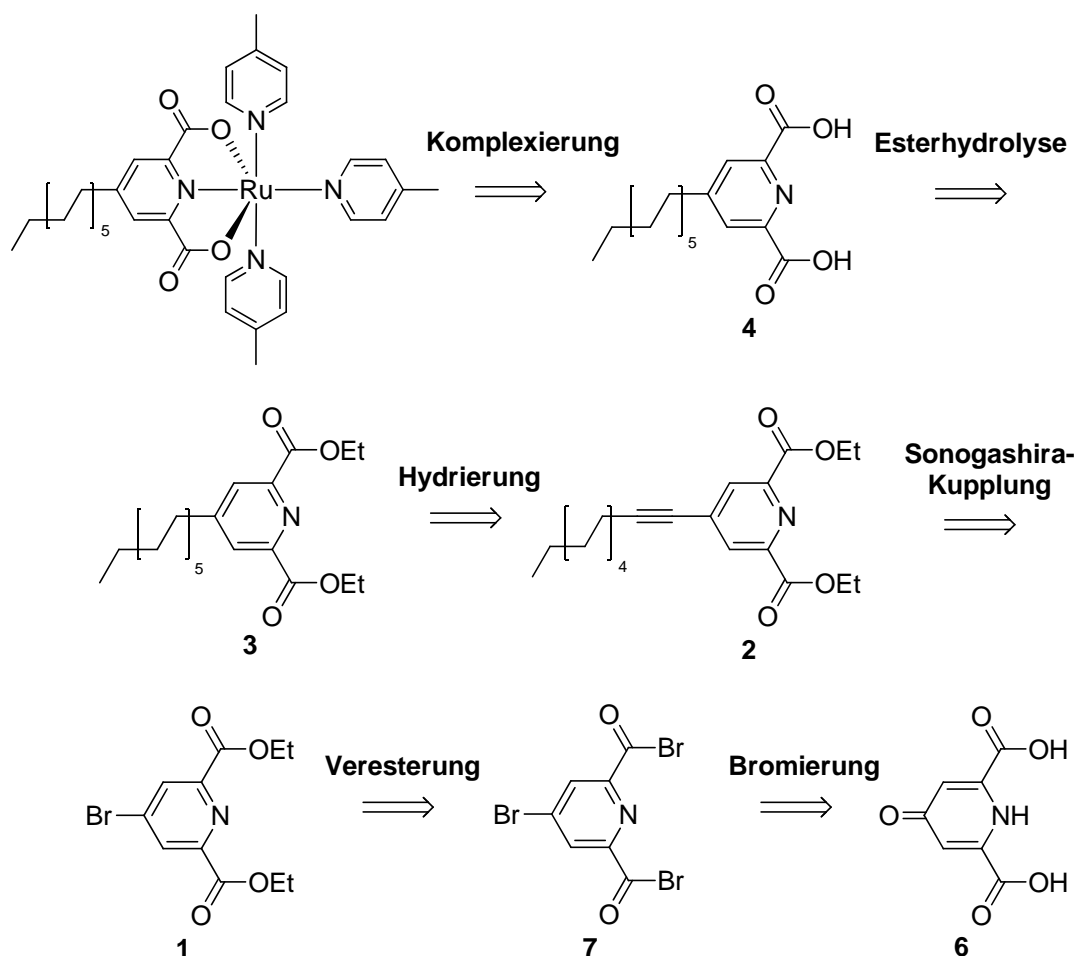
Abbildung 5: Modifizierter Katalysator (links) und Photosensitizer (rechts).

2. Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollte der in Abbildung 5 gezeigte Katalysator synthetisiert werden. Außerdem sollten mit Katalysator und Photosensitizer (Abbildung 5) funktionalisierte Vesikel mit den Phospholipiden DMPC, DOPC und DSPC (Abbildung 2) und vier verschiedenen Additiven hergestellt werden. Der mit Hilfe von eingestrahlttem Licht durch die Vesikel gebildete Sauerstoff sollte sowohl in Gasphase mit dem Gaschromatographen, als auch in Lösung über das Fibox 3 System bestimmt werden. Um die Messung in der Gasphase durchführen zu können, sollte der Gaschromatograph vor der Verwendung zudem kalibriert werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese des amphiphilen Katalysators

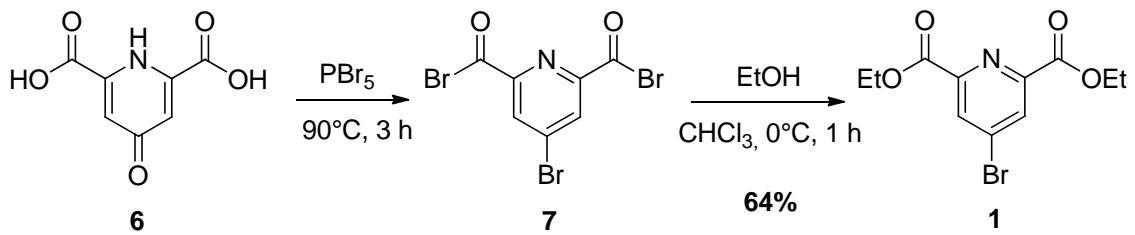


Schema 1: Retrosynthese des amphiphilen Katalysators zur Wasseroxidation.

Die Retrosynthese des amphiphilen Katalysators (Schema 1) beginnt mit der Bromierung der Chelidamsäure (**6**) an der Carbonylgruppe an Position 4 und den Carboxylgruppen mit anschließender Veresterung durch Ethanol. Über eine Sonogashira-Kupplung kann an Position 4 der gebildeten Diethyl-4-bromdipicolinsäure (**1**) Dodecin (**8**) addiert werden, so dass **2** gebildet wird. Die Dreifachbindung wird mit einem Palladium-Katalysator und Wasserstoff zu einer Einfachbindung hydriert, woraus **3** resultiert. Nach Hydrolyse der beiden Estergruppen von **3** entsteht der Ligand (**4**), welcher mit Ruthenium(II) und 4-Picolin zum gewünschten amphiphilen Katalysator komplexiert werden kann.

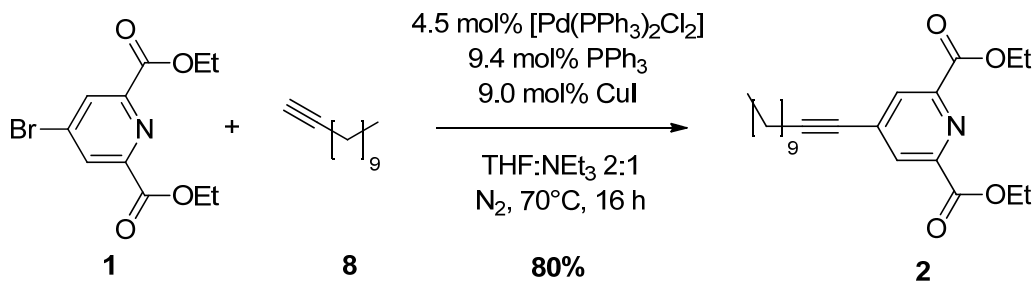
Für die Synthese des Katalysators wurde als Ausgangsmaterial Chelidamsäure (**6**) verwendet, welche mit Phosphorpentabromid bromiert wurde, wodurch **7** entstand. Die Veresterung zu **1** wurde mit Ethanol durchgeführt (Schema 2). Nach Reinigung über Säulen-Chromatographie konnte eine hohe Ausbeute von 64% erzielt werden.

3. Ergebnisse und Diskussion



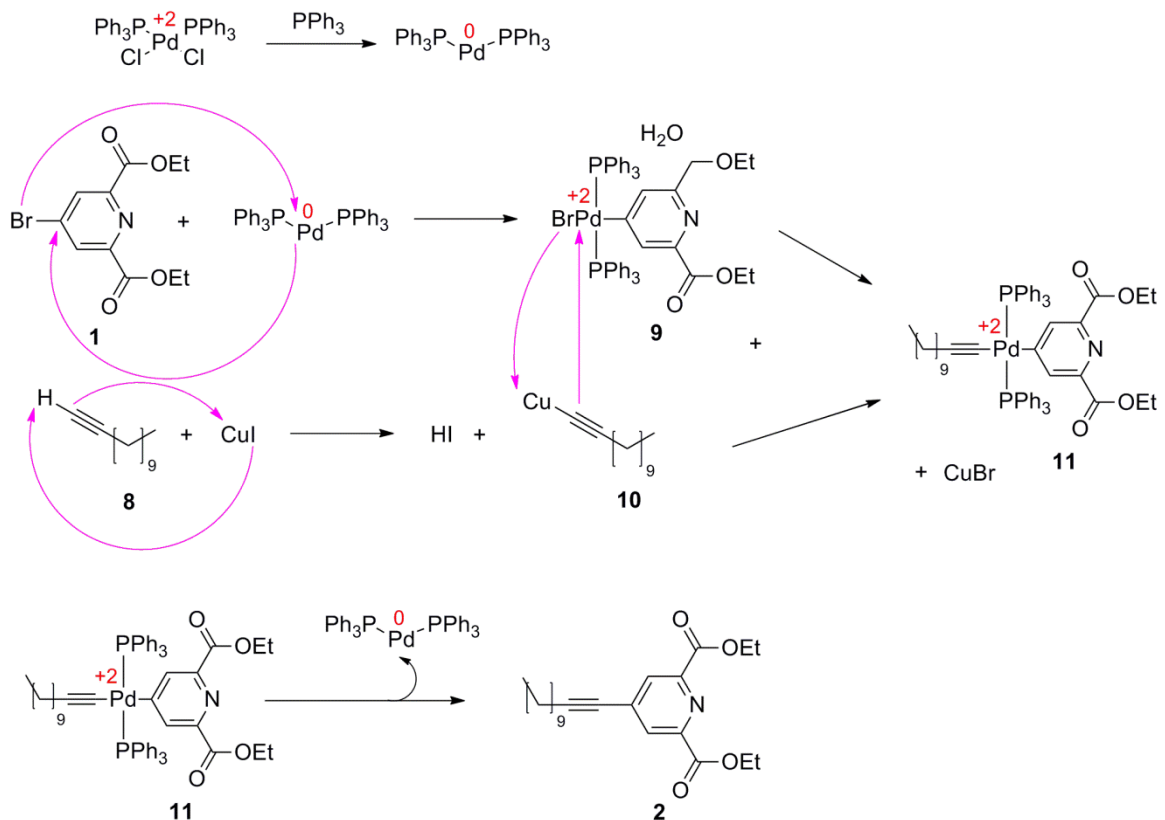
Schema 2: Bromierung der Chelidamsäure (**6**) mit PBr_5 und Veresterung von **7** mit Ethanol zu **1**.

Um **2** zu erhalten, wurde an Position 4 eine neue Kohlenstoffbindung zu Dodecin (**8**) über eine Sonogashira-Kupplung ausgebildet (Schema 3).



Schema 3: Sonogashira-Kupplung von **1** und **8** zur Bildung von **2**.

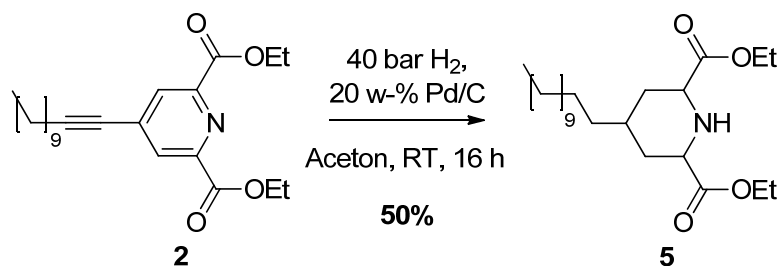
Der Mechanismus der Sonogashira-Kupplung ist in Schema 4 dargestellt.



Schema 4: Mechanismus der Sonogashira-Kupplung von **1** und **8** zur Bildung von **2**.

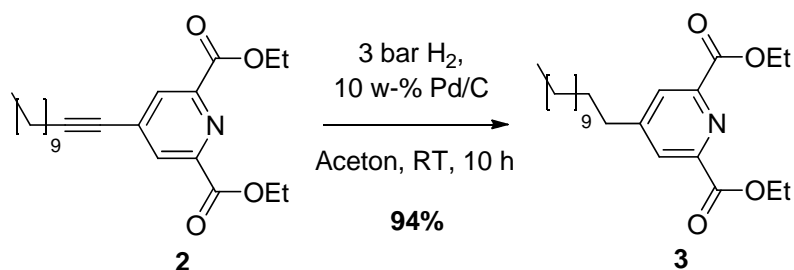
3. Ergebnisse und Diskussion

Im ersten Reaktionsschritt wird der Palladium-Katalysator durch Triphenyl-Phosphin reduziert. Anschließend wird die Pd-Spezies (**9**) erzeugt, indem **1** mit $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2]$ in einer oxidativen Addition reagiert. Parallel bildet sich aus Dodecin (**8**) und CuI ein Cuprat (**10**) und Jodwasserstoff. Zur Neutralisierung von Jodwasserstoff muss eine Amin-Base zugegeben werden, in diesem Fall NEt_3 . Die beiden entstandenen Zwischenprodukte **9** und **10** reagieren in einer Transmetallierungsreaktion, wobei ein Ligandenaustausch stattfindet, welcher sich über das HSAB-Konzept erklären lässt. Palladium als Übergangsmetall ist weich und Dodecin mit sp-hybridisierten C-Atomen ebenfalls, wohingegen Bromid als Halogen hart ist und Kupfer im Vergleich zu Palladium und Dodecin auch. Die Liganden werden also so ausgetauscht, dass aus den beiden Reagenzien, in denen harte und weiche Komponente jeweils gemischt vorliegen, eine harte Spezies (CuBr) und eine weiche Spezies (**11**) entstehen. Im letzten Schritt wird der Palladium-Katalysator durch eine reduktive Eliminierung regeneriert, wodurch das Endprodukt (**2**) mit einer Ausbeute von 80% entsteht. Um die Dreifachbindung in **2** zu reduzieren, wurde eine Hydrierung im Autoklaven durchgeführt. Es wurden dazu 20 w-% eines Palladium-Katalysators auf Aktivkohle und Wasserstoff-Gas mit einem Druck von 40 bar verwendet. Mit einer Ausbeute von 50% konnte ein farbloses Öl (**5**) erhalten werden. Nach Aufnahme eines $^1\text{H-NMR}$, eines COSY und eines HSQC hat sich ergeben, dass nicht nur die Dreifachbindung, sondern der gesamte Aromat hydriert wurde (Schema 5).



Schema 5: Hydrierung der Dreifachbindung und des Aromaten in **2** zu **5**.

Durch mildere Bedingungen ist es gelungen das gewünschte Produkt (**3**) zu synthetisieren, also lediglich die Dreifachbindung zu hydrieren (Schema 6).

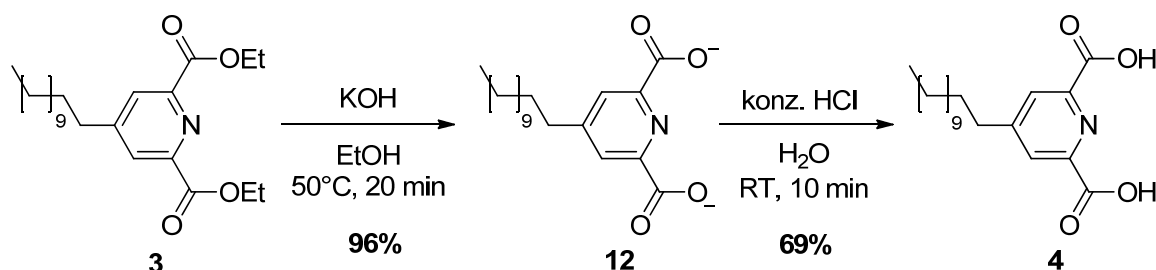


Schema 6: Hydrierung der Dreifachbindung in **2** zu **3**.

Statt 20 w-% wurden 10 w-% Palladium-Katalysator eingesetzt, statt 40 bar Wasserstoff-Druck wurden nur noch ca. 3 bar am Autoklaven eingestellt und die Reaktionszeit wurde von

16 h auf 10 h verkürzt. Mit einer sehr hohen Ausbeute von 94% konnte **3** schließlich gewonnen werden.

Der letzte Schritt zur Synthese des Liganden (**4**) war die alkalische Hydrolyse der beiden Estergruppen von **3** zu Carbonsäuren, wodurch das Di-Anion des Liganden (**12**) mit einer Ausbeute von 96% ausgefällt werden konnte. Durch Zugabe der Salzsäure wurde **12** protoniert und der Ligand (**4**) konnte mit einer Ausbeute von 69% isoliert werden (Schema 7).



Schema 7: Alkalische Hydrolyse von **3** mit KOH zu **12** und anschließende Protonierung mit HCl zu **4**.

In der Retrosynthese (Schema 1) ist gezeigt, dass der Ligand (**4**) noch mit Ruthenium(II) und 4-Picolin komplexiert werden müsste, um den gewünschten amphiphilen Katalysator zu erhalten.

3.2 O₂-Messung am Gaschromatographen

Mit dem Gaschromatographen ist es möglich, der Sauerstoff-Anteil in der Gasphase zu messen. Die zu vermessende Lösung wird dazu in Bördelrand-Gläser überführt, die mit einem Septum luftdicht verschlossen werden können. Eine Kanüle, die zum Injektor führt, wird durch das Septum gestochen und bis zur Mitte der Gasphase in das Gläschen eingeführt. Der Gaschromatograph ist mit einem PC verbunden, der verschiedene O₂-Volumina als Fläche von in Breite und Höhe variierenden Peaks auf dem Monitor anzeigt.

3.2.1 Kalibrierung

Bevor der Gaschromatograph für die Messung der Vesikel-Lösungen herangezogen werden konnte, musste eine Kalibrierung durchgeführt werden. Dazu wurden jeweils 4.5 ml Natrium-Phosphat-Puffer in Bördelrand-Gläser gefüllt, entgast und mit bestimmten O₂-Volumina versetzt.

Folgende Tabelle zeigt die Mittelwerte aus jeweils vier Ansätzen für das gleiche Sauerstoff-Volumen, wobei der Sauerstoff in die Lösung injiziert wurde.

3. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 1: Messwerte aus der GC-Kalibrierung für Injektion in die Flüssigkeit

V (O ₂) [μl]	Peak-Fläche (gemessen)	Peak-Fläche (0-Wert subtrahiert)
0	35 044	0
30	115 543	80 499
50	160 266	125 222
70	215 652	180 608
80	244 033	208 989
90	270 676	235 632
100	325 122	290 078
200	572 056	537 012
300	905 888	870 844
400	1 053 807	1 018 763
500	1 381 503	1 346 459
750	2 050 777	2 015 733

Aus den Werten von 30 bis 90 μl O₂ und von 100 bis 750 μl O₂, von welchen der 0-Wert bereits subtrahiert worden war, wurden zwei separate Kalibriergeraden angefertigt.

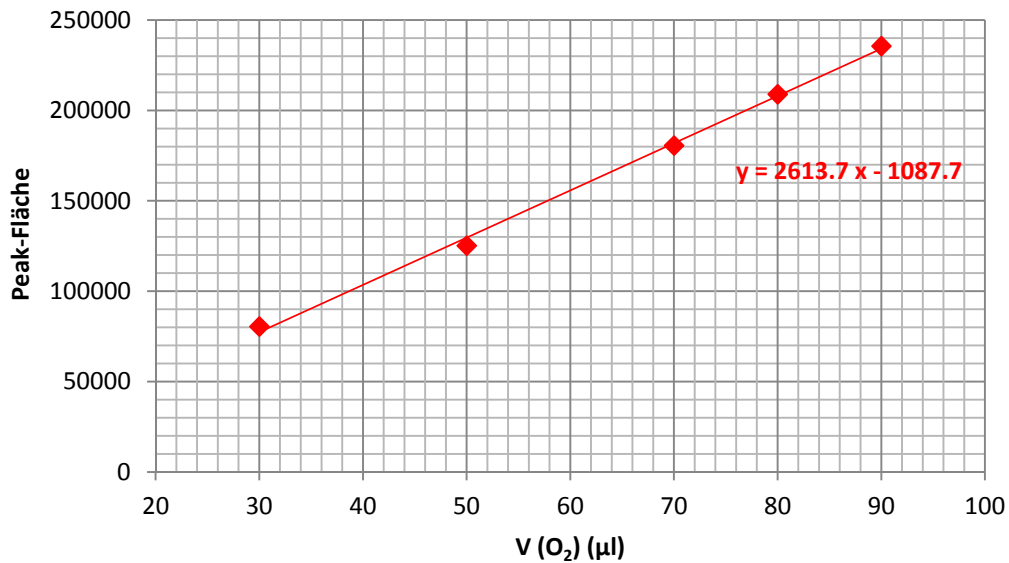


Abbildung 6: Kalibriergerade für ein O₂-Volumen von 30 bis 90 μl in den Kalibrier-Lösungen.

3. Ergebnisse und Diskussion

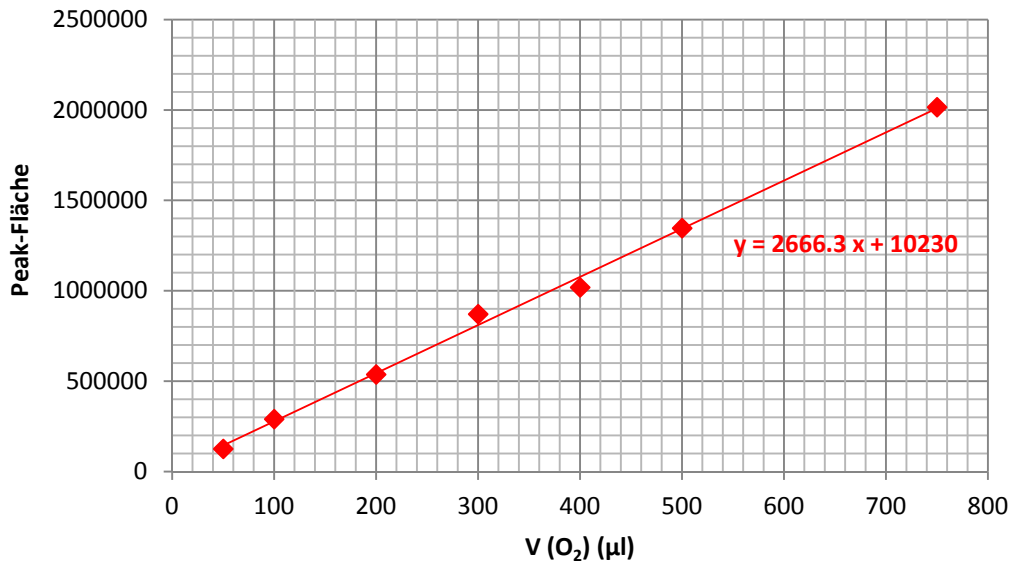


Abbildung 7: Kalibriergerade für ein O₂-Volumen von 100 bis 750 µl in den Kalibrier-Lösungen.

Abgesehen von geringfügigen Abweichungen für 300 und 400 µl verlaufen die beiden Kalibriergeraden gut durch die gemessenen Punkte.

Es wurde außerdem getestet, wie es sich auswirkt, wenn der Sauerstoff in die Gasphase und nicht in die Lösung injiziert wird. Es wurden die Volumina 50, 100, 200, 300 und 500 µl untersucht. Folgende Tabelle zeigt im Vergleich die Werte für die Injektion in die Flüssigkeit und in die Gasphase.

Tabelle 2: Messwerte aus der GC-Kalibrierung für Injektion in die Flüssigkeit bzw. in die Gasphase

V (O ₂) [µl]	Peak-Fläche (Flüssigkeit)	Peak-Fläche (Gasphase)
0	0	-
30	80 499	-
50	125 222	145 582
70	180 608	-
80	208 989	-
90	235 632	-
100	290 078	329 887
200	537 012	558 159
300	870 844	850 532
400	1 018 763	-
500	1 346 459	1 385 174
750	2 015 733	-

Die Kalibriergeraden im Vergleich sehen folgendermaßen aus:

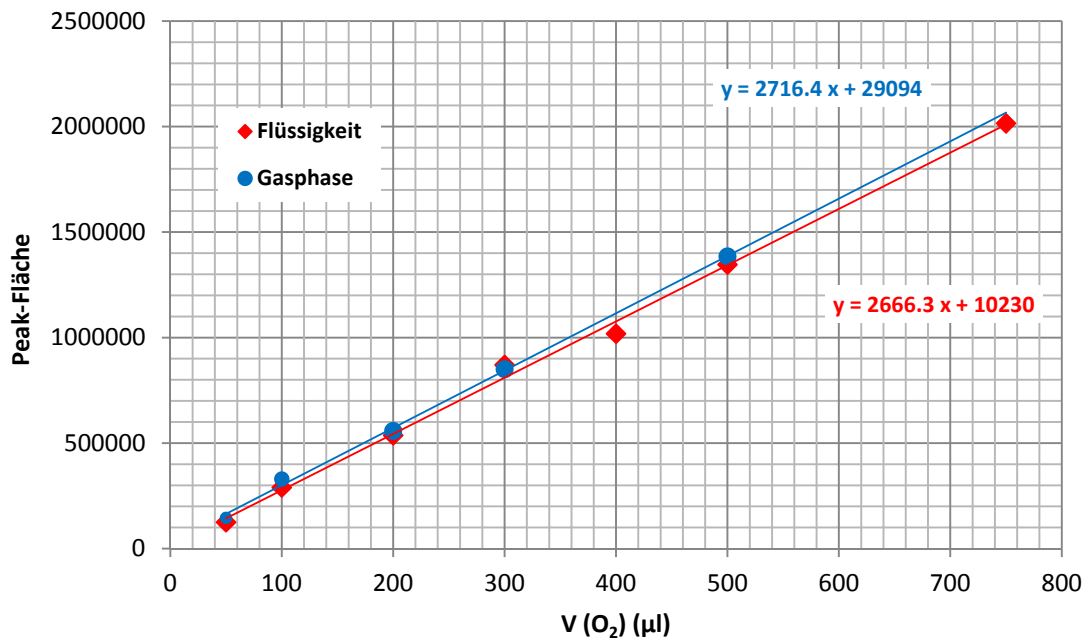


Abbildung 8: Vergleich der Kalibriergeraden für die O₂-Injektion in die Gasphase und in die Flüssigkeit.

Für die Injektion in die Gasphase ergeben sich tendenziell höhere Werte als für die Injektion in die Flüssigkeit, was daran liegen könnte, dass nach Injektion in die Gasphase die Zeitspanne zur Äquilibrierung nicht lange genug war. Dadurch dass außerdem die Abweichung des Ordinatenabschnitts in der Geradengleichung für die Gasphase höher ist und die Injektion in die Flüssigkeit die tatsächliche Sauerstoffentstehung wohl besser simuliert, wird für die Berechnung der durch die Vesikel gebildeten Sauerstoff-Volumina die rote Geradengleichung herangezogen.

3.2.2 Messung

Insgesamt wurden zwei Vesikel-Lösungen am Gaschromatographen vermessen. In der Tabelle sind die Konzentrationen angegeben, in der die einzelnen Komponenten in der Vesikel-Lösung vorlagen. Es handelte sich dabei um eine Probenzusammensetzung, die bereits im Fibox 3 System etabliert wurde und zu reproduzierbaren Ergebnissen führte. Diese Proben werden als benchmark-Proben bezeichnet.

Tabelle 3: Konzentrationen der Komponenten in den Vesikel-Lösungen für die GC-Messung

Lösung	c [µM]
Katalysator	12.5
Photosensitizer	125
DMPC	862
Natrium-Persulfat	2500

Die durch den Gaschromatographen ermittelten Peak-Flächen wurden nach Abzug der Null-Werte in eine der beiden roten Geradengleichungen aus der Kalibrierung (siehe 3.2.1) für y eingesetzt. Durch Auflösen nach x konnten die gebildeten Sauerstoff-Volumina berechnet werden und über das ideale Gasgesetz konnten daraus die Stoffmengen an Sauerstoff ermittelt werden.

$$\text{Ideales Gasgesetz: } n = \frac{p \cdot V}{R \cdot T}$$

$$p = 10^5 \frac{\text{kg}}{\text{m} \cdot \text{s}^2} \quad V [\mu\text{l}] = 1 \cdot 10^{-9} \text{ m}^3$$

$$R = 8.314 \frac{\text{kg} \cdot \text{m}^2}{\text{s}^2} \cdot \frac{1}{\text{K} \cdot \text{mol}} \quad T = 293 \text{ K}$$

Zuletzt erfolgte die Berechnung der Turn-Over-Number (TON), diese errechnet sich aus dem Verhältnis von Sauerstoff-Stoffmenge zu Katalysator-Stoffmenge ($n = 0.0625 \mu\text{mol}$). Die für die Berechnung relevanten Größen sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 4: Relevante Größen zur Berechnung der TON-Werte der vermessenen Vesikel-Lösungen

Messung	Peak-Fläche	Gleichung	V (O ₂) [μl]	n (O ₂) [μmol]	TON
1	282 397	$y = 2666.3 x + 10230$	102	4.19	67.0
2	312 732	$y = 2666.3 x + 10230$	113	4.64	74.2

3.3 O₂-Messung mit dem Fibox 3 System

Mit dem Fibox 3 System kann mit Hilfe eines optischen Sauerstoff-Sensors die O₂-Konzentration in der Lösung gemessen werden. Der Sensor ist im Inneren eines 2 ml-Vials angeklebt, in welches die zu vermessende Lösung gefüllt werden muss. Die Sensor-Antwort und die Temperatur der Lösung werden außerhalb des Vials mit einer Glas-Faser detektiert. Das Detektionssystem ist mit einem PC verknüpft, so dass am Monitor die Änderung der Sauerstoff-Konzentration und der Temperatur während der Messung verfolgt werden kann. Es wurden drei Messreihen mit dem beschriebenen System durchgeführt. Untersucht werden sollte der Einfluss vier verschiedener Additive auf die Sauerstoff-Bildung und drei verschiedener Phospholipide auf die Vesikel-Bildung. Als Kontrolle wurde jeweils eine Probe mit bereits etablierter Zusammensetzung mitgeführt, welche als benchmark-Probe bezeichnet wird (Lösung 1 in Messung 1; Lösung 1 in Messung 3).

In Messung 1 wurden als Phospholipid DMPC und als Additiv Biszinkcyclen in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt.

Tabelle 5: Konzentrationen der Komponenten in den Vesikel-Lösungen für Fibox-Messung 1

Lösung	1	2	3	4
c (Katalysator) [μM]	12.5	12.5	12.5	12.5
c (Photosensitizer) [μM]	125	125	125	125

3. Ergebnisse und Diskussion

Lösung	1	2	3	4
c (DMPC) [μM]	862	852	812	762
c (Biszyklon) [mM]	-	0.01	0.05	0.1
c (Natrium-Persulfat) [mM]	2.5	2.5	2.5	2.5

In Abbildung 9 sind die Ergebnisse von Messung 1 dargestellt.

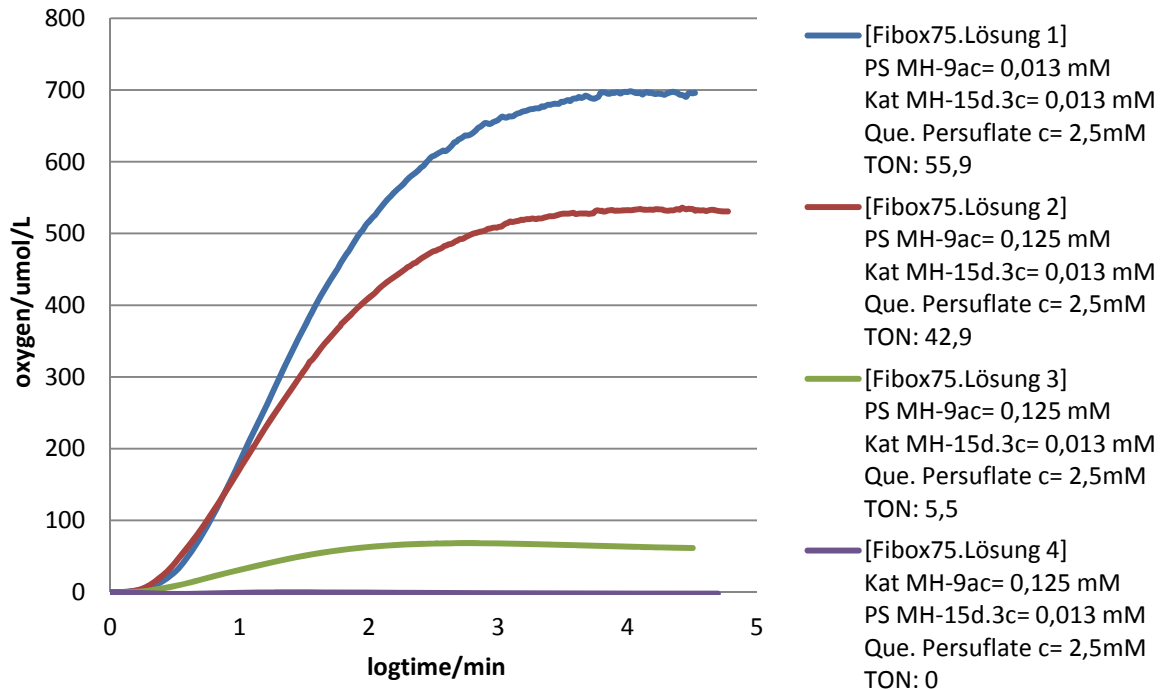


Abbildung 9: Auftragung der gebildeten Sauerstoff-Konzentrationen in DMPC-Vesikel-Lösungen bei unterschiedlichen Biszyklon-Konzentrationen gegen die Beleuchtungsdauer.

Anhand der in Abbildung 9 angegebenen TON-Werte lassen sich die Auswirkungen der steigenden Biszyklon-Konzentrationen vergleichen. Sie sollte für benchmark-Proben bei 57 ± 3 liegen.^[15] Die benchmark-Probe in Messung 1 entsprach dem erwarteten Wert, weshalb davon ausgegangen werden konnte, dass die Vesikel-Herstellung erfolgreich war und die benchmark-Probe als Kontrolle geeignet ist. Der Vergleich der TON-Werte ergab, dass sich mit zunehmender Biszyklon-Konzentration die Sauerstoff-Bildung verschlechtert und bei der höchsten Konzentration von 0.1 mM sogar zum Erliegen kommt. Erwartet wurde, dass durch Biszyklon der pH-Wert an der Vesikel-Oberfläche im Vergleich zum pH-Wert in der Lösung von 7.0 erhöht wird, wodurch das Potential für die Wasseroxidation gesenkt und somit die Effizienz des Katalysators verbessert werden sollte.

Messung 2 wurden die Phospholipide DOPC und DSPC verwendet. Als Additiv wurde erneut Biszyklon eingesetzt.

3. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 6: Konzentrationen der Komponenten in den Vesikel-Lösungen für Fibox-Messung 2

Lösung	1	2	3	4
c (Katalysator) [μM]	12.5	12.5	12.5	12.5
c (Photosensitizer) [μM]	125	125	125	125
c (DOPC) [μM]	862	842	-	-
c (DSPC) [μM]	-	-	862	842
c (Biszinkcyclen) [mM]	-	0.02	-	0.02
c (Natrium-Persulfat) [mM]	2.5	2.5	2.5	2.5

In Abbildung 10 sind die Ergebnisse von Messung 2 dargestellt.

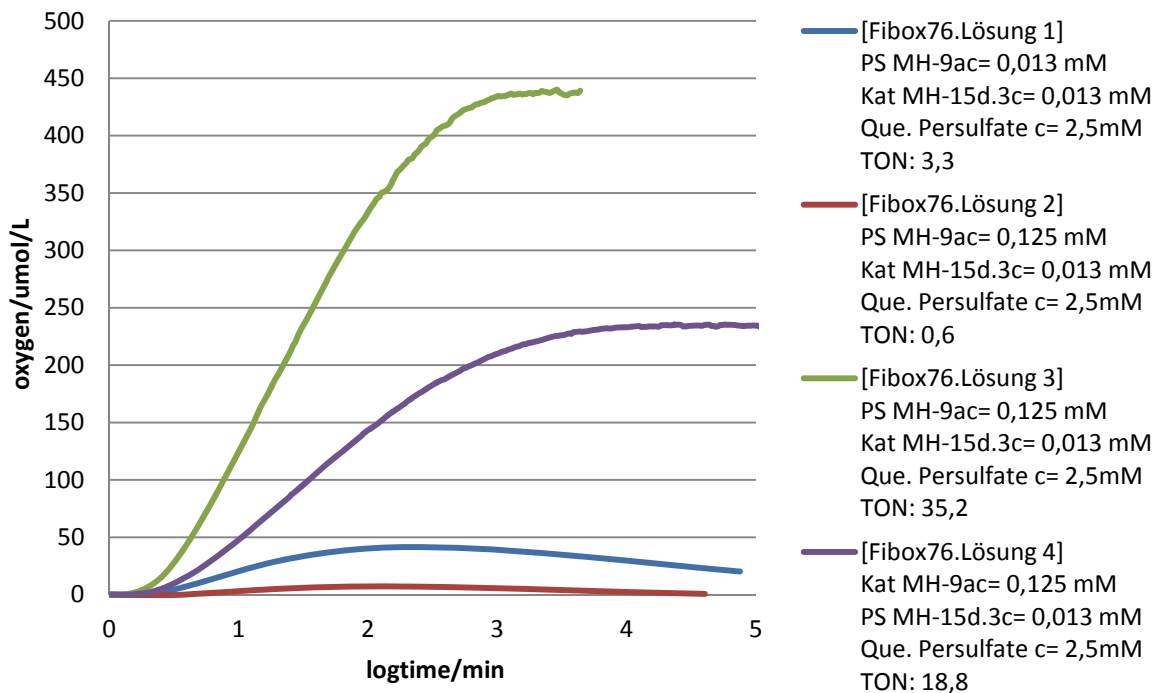


Abbildung 10: Auftragung der gebildeten Sauerstoff-Konzentrationen in DOPC- und DSPC-Vesikel-Lösungen mit und ohne Biszinkcyclen gegen die Beleuchtungsdauer.

Die Messungen wurden deshalb auch mit DOPC bzw. DSPC durchgeführt, da sich deren Übergangstemperaturen deutlich von der des DMPC unterscheiden.

Durch den Vergleich der DOPC-Lösung (Lösung 1) und der DSPC-Lösung (Lösung 3) (beide ohne Additiv) mit der benchmark-Probe in Messung 1 ergab sich, dass die Vesikel-Bildung mit DOPC einen um etwa ein Drittel schlechteren TON-Wert liefert und die Vesikel-Bildung mit DSPC überhaupt nicht funktioniert hat. Auch die Zugabe von Biszinkcyclen resultierte für DOPC in einem niedrigeren TON-Wert statt in einer Verbesserung des Resultats und auch bei DSPC verschlechterte sich der Wert.

Dieser zu den Erwartungen gegenteilige Effekt lässt sich bis dato sowohl für Messung 1 als auch für Messung 2 nicht erklären.

3. Ergebnisse und Diskussion

In Messung 3 wurde, basierend auf den Ergebnissen aus Messung 2, wieder DMPC als Phospholipid eingesetzt und drei weitere Additive getestet: C12_C1_MV-PF₆, C₁₈-Amin und C₁₈-COOH (Abbildung 11).

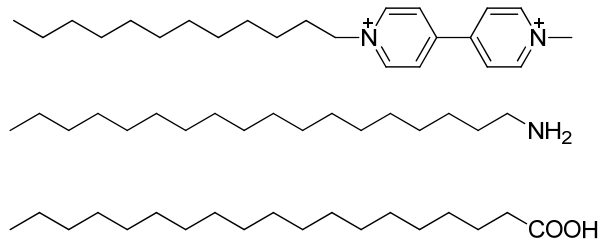


Abbildung 11: In Messung 3 eingesetzte Additive C12_C1_MV-PF₆ (oben), C₁₈-Amin (Mitte) und C₁₈-COOH (unten).

Tabelle 7: Konzentrationen der Komponenten in den Vesikel-Lösungen für Fibox-Messung 3

Lösung	1	2	3	4
c (Katalysator) [μM]	12.5	12.5	12.5	12.5
c (Photosensitizer) [μM]	125	125	125	125
c (DMPC) [μM]	862	812	812	812
c (C12_C1_MV-PF ₆) [μM]	-	50	-	-
c (C ₁₈ -Amin) [μM]	-	-	50	-
c (C ₁₈ -COOH) [μM]	-	-	-	50
c (Natrium-Persulfat) [mM]	2.5	2.5	2.5	2.5

In Abbildung 12 sind die Ergebnisse von Messung 3 dargestellt.

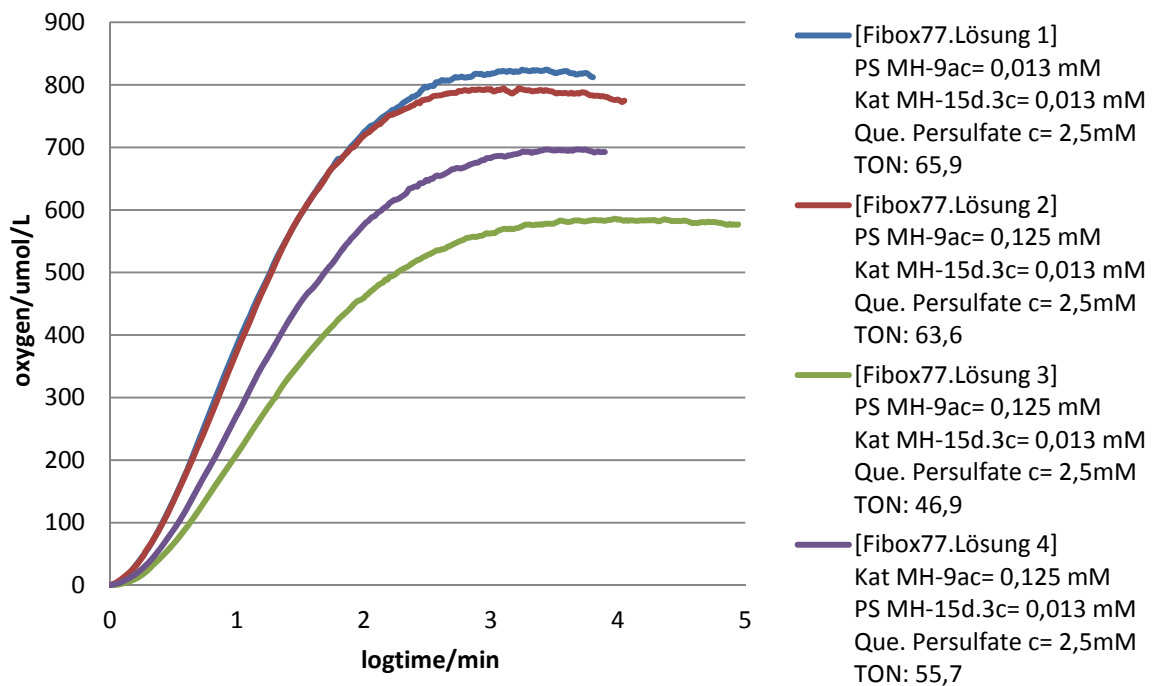


Abbildung 12: Auftragung der gebildeten Sauerstoff-Konzentrationen in DMPC-Vesikel-Lösungen bei verschiedenen Additiven gleicher Konzentration gegen die Beleuchtungsdauer.

3. Ergebnisse und Diskussion

Die benchmark-Probe hatte mit 65.9 einen verhältnismäßigen hohen TON-Wert, da eigentlich ein Wert von 57 ± 3 erwartet wurde. Der Vergleich der TON-Werte aus den Messungen mit Additiven zeigte, dass alle Additive keine Erhöhung der Sauerstoff-Produktion hervorrufen. Für C₁₈-COOH und C12_C1_MV-PF₆ entsprach das den Erwartungen, da die Carbonsäure den pH-Wert auf der Vesikel-Oberfläche erniedrigt, wodurch die Effizienz des Katalysators verschlechtert und somit weniger Sauerstoff gebildet wird. Bei C₁₈-Amin wurde dementsprechend der gegenteilige Effekt erwartet, was jedoch wie bei Biszinkcyclen in Messung 1 nicht beobachtet werden konnte. Bei C12_C1_MV-PF₆ handelt es sich um Paraquat. Die Vesikel-Lösung mit diesem Additiv sollte einen erhöhten TON-Wert aufweisen, da das oxidative Quenching des angeregten Zustands mit membrangebundenen Paraquat effektiver sein sollte und somit ein beschleunigender Effekt zu erwarten wäre. Um die Ergebnisse zu verifizieren, sollte Messung 3 nochmals durchgeführt werden, da der TON-Wert der benchmark-Probe zu hoch war.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Im ersten Teil der Arbeit konnte der Ligand (**4**) für den amphiphilen Katalysator (Abbildung 5) synthetisiert werden. Um den vollständigen Katalysator für den Einbau in die funktionalisierten Vesikel zu erhalten, müsste noch eine Komplexierung mit Ruthenium(II) und 4-Picolin durchgeführt werden. Aus zeitlichen Gründen war das im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr möglich, da mehrere Ansätze nötig waren, um die idealen Bedingungen für die Hydrierung von **2** zu **3** herauszufinden. Zudem konnte mit Hilfe der 2D-Spektroskopie die Struktur des bei den Fehlversuchen entstandenen Produkts charakterisiert werden (Schema 5).

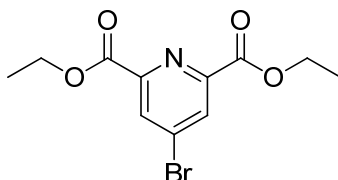
Außerdem ist es gelungen zwei Kalibriergeraden für den Gaschromatographen zu erstellen, die den Bereich von 30 bis 750 μl O_2 -Volumen umfassen (Abbildungen 6 und 7). Mit Hilfe der Kalibriergeraden kann das Sauerstoff-Volumen in der Gasphase der Vesikel-Lösungen bestimmt werden, was bereits exemplarisch für zwei benchmark-Proben durchgeführt wurde. Durch die Umrechnung des Volumens in einen TON-Wert ist der Vergleich zu früheren O_2 -Messungen mit dem Fibox 3 System in Lösung möglich, was in dieser Arbeit jedoch nicht enthalten ist.

Im dritten und letzten Teil wurde das Fibox 3 System zur Messung der O_2 -Konzentration in verschiedenen Vesikel-Lösungen verwendet. Die durch den Zusatz verschiedener Additive erwarteten Resultate konnten jedoch nur zum Teil bestätigt werden (Abbildung 12). Es sollten deshalb die im Laufe dieser Arbeit vermessenen Ansätze noch mehrmals überprüft werden, sowie Variationen in der Konzentration und Art der Additive durchgeführt werden. Außerdem könnten die mit dem Fibox 3 System gemessenen Proben auch am Gaschromatographen vermessen werden, was einen Vergleich der beiden Messmethoden und weitere Aussagen über die Wirkung der Additive ermöglichen würde.

5. Experimenteller Teil

5.1 Synthese

5.1.1 Diethyl-4-brompyridin-2,6-dicarboxylat (1)

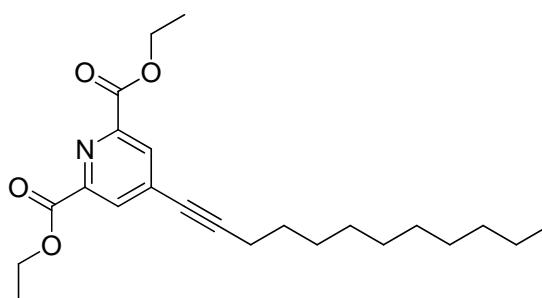


Chelidamsäure (1.14 g, 5.65 mmol) und PBr_5 (9.73 g, 22.6 mmol) wurden bei 90°C unter Stickstoff-Atmosphäre in einem Bördelrand-Glas erhitzt. Nach 3 h wurde die entstandene rote Schmelze auf Raum-Temperatur abgekühlt und in 50 ml Chloroform aufgenommen. Die Lösung wurde filtriert und 200 ml Ethanol wurden bei 0°C tropfenweise zugegeben. Chloroform und Ethanol wurden reduzierendem Druck verdampft und noch vorhandenes Edukt vom Produkt über Säulenchromatographie (SiO_2 , PE:EtOAc 4:1, $R_f = 0.3$) getrennt. Beim Verdampfen des Laufmittels kristallisierte das Produkt aus.

Ausbeute: 1.10 g (3.64 mmol, 64%)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm]: 8.35 (s, 2H, arom. H), 4.42 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H, CH_2), 1.38 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, CH_3)

5.1.2 Diethyl-4-(dodecynyl)pyridin-2,6-dicarboxylat (2)



Stoff **1** (1.0 g, 3.31 mmol), Dodecin (706 μl , 3.30 mmol), $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2]$ (23.8 mg, 4.5 mol%), PPh_3 (18.7 mg, 9.4 mol%) und CuI (13.1 mg, 9.0 mol%) wurden in einer entgasten Mischung aus THF (70 ml) und NEt_3 (35 ml) unter Stickstoff-Atmosphäre gelöst. Nach 16 h Rühren bei 70°C wurden die Lösungsmittel unter reduzierendem Druck verdampft. Der Rückstand wurde in DCM (ca. 15 ml) aufgenommen und drei Mal mit dest. Wasser (ca. 10 ml) ausgeschüttelt. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden einmal mit DCM (ca. 10 ml) ausgeschüttelt, die beiden organischen Phasen vereinigt und mit MgSO_4 getrocknet. Nach Abfiltrieren des

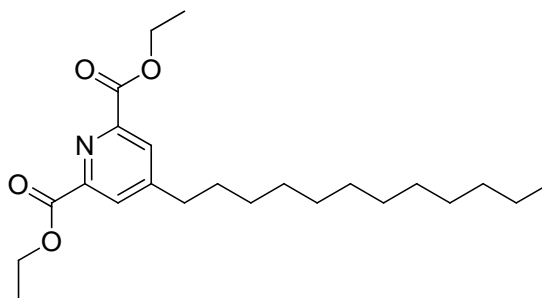
5. Experimenteller Teil

MgSO₄ wurde das DCM am Rotationsverdampfer abgezogen. Die Reinigung des Produkts erfolgte über Säulenchromatographie (SiO₂, PE:EtOAc 3:1, R_f = 0.5).

Ausbeute: 1.03 g (2.66 mmol, 80%)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm]: 8.19 (s, 2H, arom. H), 4.48 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H, O-CH₂-CH₃), 2.46 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, C≡C-CH₂), 1.64 (m, 2H, C≡C-CH₂-CH₂), 1.45 (t, *J* = 7.1 Hz, 8H, O-CH₂-CH₃, alkyl-CH₂-CH₃), 1.29 (m, 12H, alkyl-CH₂), 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, alkyl-CH₃)

5.1.3 Diethyl-4-dodecylpyridin-2,6-dicarboxylat (3)

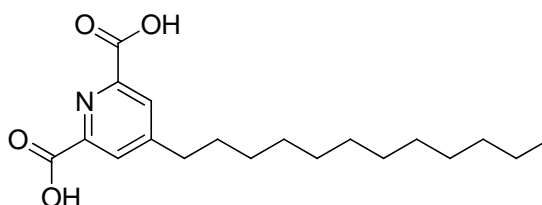


Stoff **2** (200 mg, 0.52 mmol) wurde in Aceton (ca. 5 ml) gelöst und anschließend Pd/C (20 mg) zugegeben. Die Lösung wurde für ca. 10 h in einem Autoklaven unter ca. 3 bar Wasserstoff-Druck gerührt. Der Katalysator wurde durch Zentrifugation und Filtration abgetrennt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Ein farbloses Öl blieb zurück.

Ausbeute: 192 mg (0.49 mmol, 94%)

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ [ppm]: 8.03 (s, 2H, arom. H), 4.41 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H, O-CH₂-CH₃), 2.68 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, C-CH₂-CH₂-alkyl), 1.61 (m, 2H, C-CH₂-CH₂-alkyl), 1.39 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, O-CH₂-CH₃), 1.21 (m, 18H, alkyl-CH₂), 0.80 (t, *J* = 6.7 Hz, 3H, alkyl-CH₃)

5.1.4 4-Dodecylpyridin-2,6-dicarboxylat (4)



Zu Stoff **3** (192 mg, 0.49 mmol) in einem 50 ml-Rundkolben wurde eine Lösung aus KOH (938 mg) und Ethanol (16 ml) gegeben. Sofort nach der Zugabe fiel ein weißer Feststoff aus. Die Lösung wurde für ca. 20 min bei 50°C gerührt und der Feststoff anschließend über eine Glasfritte abgesaugt. Nach Trocknung am Hochvakuum wurden 196 mg (0.47 mmol, 96%)

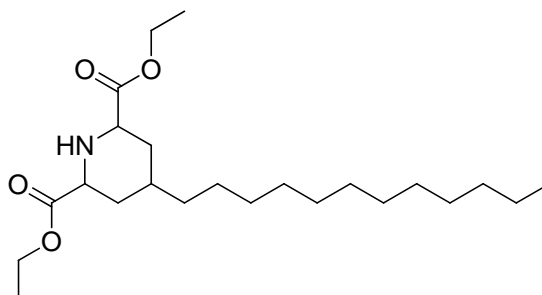
5. Experimenteller Teil

des Di-Kaliumsalzes von **4** erhalten. Der Feststoff wurde in Wasser (ca. 70 ml) gelöst und tropfenweise konz. Salzsäure zugegeben bis ein pH-Wert von 1 erreicht war. Die Lösung wurde für 10 min bei Raumtemperatur gerührt und der weiße entstandene Feststoff über eine Glasfritte abgesaugt. Nach Waschen mit Wasser (ca. 10 ml) wurde das Produkt am Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 114 mg (0.34 mmol, 69%)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]: 8.04 (s, 2H, arom. H), 2.78 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, C-CH₂-CH₂-alkyl), 1.62 (m, 2H, C-CH₂-CH₂-alkyl), 1.25 (m, 18H, alkyl-CH₂), 0.85 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, alkyl-CH₃)

5.1.5 Diethyl-4-dodecylpiperidin-2,6-dicarboxylat (5)



Stoff **2** (200 mg, 0.52 mmol) wurde in Aceton (ca. 5 ml) gelöst und anschließend Pd/C (40 mg) zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht in einem Autoklaven unter 40 bar Wasserstoff-Druck gerührt. Der Katalysator wurde durch Zentrifugation und Filtration abgetrennt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Nach Reinigung über Säulen-chromatographie (SiO₂, PE:EtOAc 3:1) wurde das Laufmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Ein farbloses Öl blieb zurück.

Ausbeute: 104 mg (0.26 mmol, 50%)

¹H-NMR (400 MHz, CHCl₃): δ [ppm]: 8.09 (s, 2H, Edukt (2): arom. H), 4.47 (q, 4H, O-CH₂-CH₃), 4.19 (q, 2H, alkyl-CH₂-CH₃), 3.36 (dd, 2H, N-CH-CO), 2.04 (m, 2H, diastereotope H), 1.50 (m, 2H, Edukt (2): C≡C-CH₂-CH₂), 1.45 (t, 7H, CH-CH₂-alkyl, O-CH₂-CH₃), 1.27 (m, 22H, alkyl-CH₂), 1.04 (m, 2H, diastereotope H), 0.87 (t, 3H, alkyl-CH₃)

5.2 O₂-Messung am Gaschromatographen

5.2.1 Vesikel-Herstellung

Für die Herstellung der funktionalisierten Vesikel zur Messung der O₂-Produktion am Gaschromatographen wurden eine 1 mM Katalysator-Lösung in CHCl₃ (Abbildung 5), eine

2mM Photosensitizer-Lösung in CHCl_3 (Abbildung 5) und eine Phospholipid-Lösung (10 mM DMPC in CHCl_3) gemischt und 5-6 Glas-Beads zugegeben. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und am Hochvakuum (ca. 20 min) wurden Puffer-Lösung (50 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7.0) und Natrium-Persulfat-Lösung (1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ in Puffer) zugegeben. Nach ca. 20 min im Ultraschallbad bei 45°C waren die Vesikel fertig präpariert.

Tabelle 8: Vesikel-Lösung für GC-Messung

Lösung	Volumen
Katalysator	62.5 μl
Photosensitizer	312.5 μl
DMPC	431 μl
Puffer	5 ml
Natrium-Persulfat	12.5 μl

5.2.2 Kalibrierung

Mit dem Gaschromatographen kann gemessen werden, wie viel O_2 sich in der Gasphase befindet.

Für jedes O_2 -Volumen wurden jeweils vier gleiche Ansätze vermessen. Dazu wurden in vier Bördelrand-Gläser mit Rührfisch je 4.5 ml Natrium-Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7.0) gefüllt und für 5 min mit N_2 entgast. Anschließend wurde mit Hilfe gasdichter Hamilton-Spritzen aus einem mit O_2 -Gas gefüllten Kolben, in dem ein leichter Überdruck herrschte, ein entsprechendes Volumen an Sauerstoff entnommen und in den Puffer gespritzt. Nach 20 min Äquilibration unter Rühren wurden die Proben nacheinander am Gaschromatographen gemessen.

Gemessen wurden die O_2 -Volumina 0, 30, 50, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 und 750 μl . In die Null-Probe wurde kein Sauerstoff injiziert, sie wurde jedoch ansonsten genauso behandelt wie die übrigen.

5.2.3 Messung

4.5 ml der Vesikel-Lösung (siehe 5.2.1) wurden in ein Bördelrand-Glas mit Rührfisch pipettiert und 5 min mit N_2 entgast. Anschließend wurde der Null-Wert gemessen. Nach 1 h Bestrahlungszeit mit einer blauen LED ($\lambda = 455 \text{ nm}$) wurde erneut gemessen. Während der gesamten Bestrahlungsdauer wurde die Vesikel-Lösung gerührt.

5.3 O_2 -Messung mit dem Fibox 3 System

5.3.1 Vesikel-Herstellung

Für das Fibox 3 System erfolgte die Herstellung der Vesikel in den Grundzügen analog wie unter 5.2.1 beschrieben. Die Unterschiede bestanden darin, dass unter Stickstoff-

5. Experimenteller Teil

Atmosphäre gearbeitet wurde, verschiedene Phospholipide (10 mM DMPC/ 10 mM DOPC/ 6 mM DSPC in CHCl_3) verwendet wurden und vor Abrotieren des Lösungsmittels verschiedene Reagenzien zugegeben wurden, wie Biszinkcyclen (1 mM in MeOH), $\text{C}_{12}\text{-C}_1\text{-MV-PF}_6$ (1 mM), $\text{C}_{18}\text{-Amin}$ (1 mM) und $\text{C}_{18}\text{-COOH}$ (2 mM). Bei Verwendung von DOPC bzw. DSPC, musste das Ultraschallbad auf Raumtemperatur bzw. auf 75°C eingestellt werden.

Insgesamt wurden drei Messreihen mit je vier Ansätzen durchgeführt, wobei sich die Proben, wie folgt beschrieben, zusammensetzten.

Tabelle 9: Vesikel-Lösungen für Fibox-Messung 1

Lösung	1	2	3	4
V (Katalysator) [μl]	31.3	31.3	31.3	31.3
V (Photosensitizer) [μl]	156	156	156	156
V (DMPC) [μl]	215.6	213.1	203.1	190.6
V (Biszinkcyclen) [μl]	-	25 (1 eq)	125 (5 eq)	250 (10 eq)
V (Puffer) [ml]	2.5	2.5	2.5	2.5
V (Natrium-Persulfat) [μl]	6.25	6.25	6.25	6.25

Tabelle 10: Vesikel-Lösungen für Fibox-Messung 2

Lösung	1	2	3	4
V (Katalysator) [μl]	31.3	31.3	31.3	31.3
V (Photosensitizer) [μl]	156	156	156	156
V (DOPC) [μl]	359.4	351	-	-
V (DSPC) [μl]	-	-	215	210.6
V (Biszinkcyclen) [μl]	-	50 (2 eq)	-	50 (2 eq)
V (Puffer) [ml]	2.5	2.5	2.5	2.5
V (Natrium-Persulfat) [μl]	6.25	6.25	6.25	6.25

Tabelle 11: Vesikel-Lösungen für Fibox-Messung 3

Lösung	1	2	3	4
V (Katalysator) [μl]	31.3	31.3	31.3	31.3
V (Photosensitizer) [μl]	156	156	156	156
V (DMPC) [μl]	216	203	203	203
V ($\text{C}_{12}\text{-C}_1\text{-MV-PF}_6$) [μl]	-	62.5 (5 eq)	-	-
V ($\text{C}_{18}\text{-Amin}$) [μl]	-	-	125 (5 eq)	-
V ($\text{C}_{18}\text{-COOH}$) [μl]	-	-	-	125 (5 eq)
V (Puffer) [ml]	2.5	2.5	2.5	2.5
V (Natrium-Persulfat) [μl]	6.25	6.25	6.25	6.25

5.3.2 Messung

Mit dem Fibox 3 System wird die O_2 -Konzentration in der Lösung gemessen.

Dazu wurde die hergestellte Vesikel-Lösung (siehe 5.3.1) unter Stickstoff-Atmosphäre in ein Glas-Vial mit Rührfisch überführt. Das Vial wurde so weit gefüllt, bis die Lösung einen

5. Experimenteller Teil

konvexen Meniskus ausbildete, wobei die gesamte Lösung möglichst frei von Luftblasen sein sollte. Auch in den Deckel wurde ein Tröpfchen pipettiert bevor er auf das Vial geschraubt wurde. Das gefüllte Vial wurde in die Apparatur eingespannt, so dass die Lösung gleichmäßig gerührt werden konnte und die Bestrahlung mit einer blauen LED ($\lambda = 455 \text{ nm}$) möglich war. Der Hintergrund wurde für maximal 1 min gemessen bevor das Licht eingeschaltet wurde und von der eigentlichen Messung subtrahiert, die mit Einschalten des Lichts gestartet wurde.

Die Sensor-Antwort wurde jede Sekunde gemessen und automatisch in die O_2 -Konzentration umgewandelt.

6. Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

- [1] D. D. Lasic, *Angewandte Chemie* **1994**, 106(17), 1765–1779.
- [2] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry: International Edition*, 7th edition. Aufl., Palgrave Macmillan, **2011**.
- [3] W. Rawicz, K. C. Olbrich, T. McIntosh, D. Needham, E. Evans, *Biophysical Journal* **2000**, 79(1), 328–339, PMID: 10866959.
- [4] J. R. Silvius, *Lipid Protein Interactions*, John Wiley & Sons Inc., New York, **1982**.
- [5] B. Gruber, S. Stadlbauer, A. Späth, S. Weiss, M. Kalinina, B. König, *Angewandte Chemie* **2010**, 122(39), 7280–7284.
- [6] J. E. Klijn, J. B. F. N. Engberts, *Langmuir* **2005**, 21(22), 9809–9817.
- [7] M. Ferreira, H. Bricout, N. Azaroual, C. Gaillard, D. Landy, S. Tilloy, E. Monflier, *Advanced Synthesis & Catalysis* **2010**, 352(7), 1193–1203.
- [8] G. Hamasaka, T. Muto, Y. Uozumi, *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, 50(21), 4876–4878.
- [9] K. Henbest, P. Douglas, M. S. Garley, A. Mills, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1994**, 80(1-3), 299–305.
- [10] Y. Xu, A. Fischer, L. Duan, L. Tong, E. Gabrielsson, B. Åkermark, L. Sun, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, 49(47), 8934–8937.
- [11] L. Duan, Y. Xu, M. Gorlov, L. Tong, S. Andersson, L. Sun, *Chemistry - A European Journal* **2010**, 16(15), 4659–4668.
- [12] L. Tong, L. Duan, Y. Xu, T. Privalov, L. Sun, *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, 50(2), 445–449.
- [13] Y. Xu, T. Åkermark, V. Gyollai, D. Zou, L. Eriksson, L. Duan, R. Zhang, B. Åkermark, L. Sun, *Inorganic Chemistry* **2009**, 48(7), 2717–2719.
- [14] L. Duan, Y. Xu, P. Zhang, M. Wang, L. Sun, *Inorganic Chemistry* **2010**, 49(1), 209–215.
- [15] M. Hansen, *Half Year Report*, **10/2012**, 1-2.
- [16] M. S. Tunuli, J. H. Fendler, *Journal of the American Chemical Society* **1981**, 103(10), 2507–513.

6.2 Abkürzungsverzeichnis

aromat.	aromatisch
C12_C1_MV-PF₆	Paraquat, Methylviologen
C₁₈-Amin	Nonadecanamin
C₁₈-COOH	Nonadecansäure
COSY	correlated spectroscopy
DCM	Dichlormethan
DMPC	Dimyristoyl-Phosphatidylcholin
DOPC	Dioleoyl-Phosphatidylcholin
DSPC	Distearoyl-Phosphatidylcholin
EtOAc	Ethylacetat, Essigsäureethylester
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
NMR	nuclear magnetic resonance
Pd/C	Palladium auf Aktivkohle
PE	Petrolether
R_f	Retentionsfaktor bei Dünnschichtchromatographie
TON	Turn-Over-Number