

**Entwicklung einer neuartigen Methode
zur fluorimetrischen Detektion von Stickstoffmonoxid (NO[•])
in biologischer Umgebung
durch Einsatz radikalischer Meßsonden**

In a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sylvia Pesch

aus Duisburg

Düsseldorf 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. H. Weber

Koreferent: Prof. Dr. U. Kuckländer

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Juli 2004

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung

und unter der Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Horst Weber

am Institut für Pharmazeutische Chemie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Für die Unterstützung und Förderung sowie die stete
Diskussionsbereitschaft bei der Erstellung dieser Arbeit
danke ich Herrn Prof. Dr. H. Weber sehr herzlich.

Herrn Prof. Dr. Uwe Kuckländer danke ich ebenfalls sehr herzlich für
die freundliche Übernahme des Korreferats.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Bedeutung von Stickstoffmonoxid (NO [•]) in Biochemie und Physiologie	2
1.2	Biosynthese von NO [•]	5
1.3	Isoformen der NO [•] -Synthase (NOS)	6
1.4	Bedeutung von NO [•] in der Arzneimitteltherapie	8
1.5	Nachweisverfahren für Stickstoffmonoxid (NO [•]).....	9
1.5.1	Biologische Verfahren.....	10
1.5.2	Physikochemische Verfahren	10
1.5.2.1	Mikroelektrode	10
1.5.2.2	Chemilumineszenz	11
1.5.2.3	UV/VIS-Spektroskopischer Nachweis	12
1.5.2.4	ESR-Spektroskopischer Nachweis	14
1.5.2.5	Fluoreszenz-Spektroskopischer Nachweis.....	18
2	ZIEL DER ARBEIT	25
3	CHEMISCH-ALLGEMEINER TEIL	29
3.1	Synthesestrategie	30
3.1.1	Synthese und Identifizierung von Aminofluoreszeinderivaten	33
3.1.2	Synthese und Charakterisierung von Dansylhydrazinderivaten.....	40
3.1.3	Synthese und Charakterisierung von Cumarinestern	43
3.1.4	Erprobung der CDMT-Methode zur Darstellung von Amiden	46
3.1.5	Acylierung von 7-Amino-4-trifluormethylcumarin 15 mittels CDMT-Methode.....	48
3.2	Synthese und Charakterisierung von Derivaten der „Butterflyaminocumarine“ (BAC).....	52
3.2.1	Auswahl und Darstellung geeigneter BAC-Derivate	53
3.2.1.1	Synthese und Charakterisierung von Amido-BAC-Derivaten (20)	54
3.2.1.2	Charakterisierung der Amido-BAC-Derivate.....	55
3.2.2	Synthese und Charakterisierung der Amidophenyl-BAC-Derivate (23)	61
3.2.2.1	Charakterisierung der Amide 23 am Beispiel von 23e.....	64
3.2.3	Diskussion verschiedener Quenchingmechanismen am Beispiel von 23e und 23g.....	68
3.2.4	ESR-Spektroskopie	73
3.3	Untersuchungen zur NO [•] -Detektion in Lösung mit 23g	76
3.3.1	Überprüfung des Funktionsprinzips	78

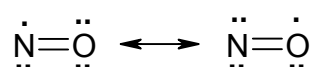
3.3.2	Reaktion von 23g mit verschiedenen NO [•] -Donatoren	80
3.3.2.1	Umsetzung von 23g mit BSH/Hexacyanoferrat (III).....	81
3.3.2.2	Umsetzung von 23g mit den NONOaten NOC-15 und NOC-18 unter anaeroben Bedingungen	84
3.3.2.3	Diskussion der Ergebnisse	85
3.3.2.4	Struktur des Nebenproduktes 30	87
3.4	Untersuchung des NO [•] -Detektors 23g in Kulturen humaner Endothelzellen.....	92
3.4.1	Materialien und Methoden	92
3.4.2	Überprüfung der Zytotoxizität von 23g mittels MTT-Test.....	93
3.4.3	Ermittlung der optimalen Substratkonzentration von 23g für den intrazellulären Nachweis von NO [•]	95
3.4.4	Langzeitinkubation mit einem Proteinkinase C-Stimulator (PMA).....	96
3.4.5	Darstellung der stimulierten EA-hy926 Zellen im Fluoreszenzmikroskop	96
3.4.6	Qualitativer Nachweis der Reaktionsprodukte der Reaktion von 23g mit NO [•] im Medium über den EA-hy926 Zellen und im Zelllysat	99
4	ZUSAMMENFASSUNG	103
5	EXPERIMENTELLER TEIL.....	109
5.1	Verwendete Geräte.....	110
5.2	Abkürzungen	111
5.3	Chemikalien.....	113
5.4	Allgemeine Arbeitsvorschriften.....	115
5.5	Verwendete Fließmittelsysteme	116
5.6	Substanzdaten.....	116
5.7	HPLC-Untersuchungen.....	168
5.8	Überprüfung des Funktionsprinzips	170
5.9	Umsetzung von 23 g mit verschiedenen NO [•] -Donatoren.....	171
5.9.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften zur Umsetzung mit NO [•] -Donatoren (AAV)	171
5.9.2	Umsetzung von 23g mit BSH.....	172
5.9.3	Umsetzung von 23g mit NOC-15	173
5.9.4	Umsetzung von 22 mit NOC-15	173
5.9.5	Umsetzung von 23g mit NOC-18	173
5.9.6	Methoden zur Identifizierung der Struktur 30	174
5.10	Zellversuche mit 23g an EA-hy926 Zellen.....	175

5.10.1	Verwendete Materialien	175
6	LITERATURVERZEICHNIS	179

1 EINLEITUNG

1.1 Bedeutung von Stickstoffmonoxid (NO[•]) in Biochemie und Physiologie

Stickstoffmonoxid (NO[•]) ist ein farbloses, paramagnetisches, giftiges Gas¹. Es siedet bei –151.77°C und erstarrt bei –163.65°C. NO[•] kann durch die unten angegebene Elektronenformel wiedergegeben werden, der NO-Abstand von 1.14 Å entspricht einem Zwischenzustand zwischen Doppel- und Dreifachbindung.



Schema 1: Elektronenformel von Stickstoffmonoxid

NO[•] reagiert diffusionskontrolliert mit Sauerstoff zu braunem Stickstoffdioxid NO₂. Abhängig von der Sauerstoff-Konzentration in physiologischer Umgebung weist NO[•] eine relativ kurze biologische Halbwertszeit von 5 - 30 Sekunden auf. Aber nicht nur diese Reaktion ist von Bedeutung, sondern u.a. auch die schnell ablaufende bimolekulare Reaktion mit Superoxid (O₂^{•-})². Dabei entsteht Peroxynitrit (ONOO⁻) als äußerst reaktives Molekül. Die Chemie der verschiedenen Oxide des Stickstoffs ist sehr komplex und soll hier nur in soweit angedeutet werden wie sie für das Verständnis der Analytik von NO[•] im biologischen Geschehen wichtig ist (s. Abb. 1). So gibt NO[•] leicht ein Elektron ab und geht dabei in Nitrit über, während die Aufnahme eines Elektrons zum Nitroxylat-Ion führt, das über HNO in Distickstoffoxid (Lachgas) zerfällt.

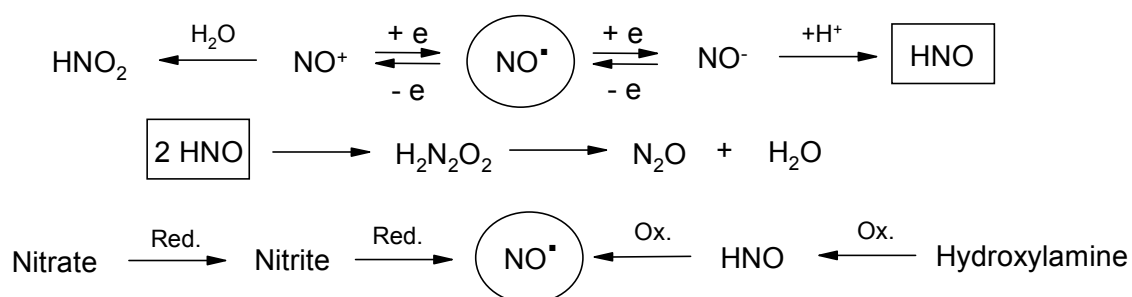


Abb. 1: Reaktionen von NO[•]

¹ Holleman, Wieberg, *Lehrbuch der anorganischen Chemie* **1985**, 91.-100. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, S. 580 - 583

² S. Pfeiffer, B. Mayer, B. Hemmens, *Angew. Chem.* **1999**, 111, S.1824 - 1844

Wurde NO[•] früher nur im Zusammenhang mit Atemgiften oder Abgasen genannt, ist es nach heutigem Kenntnisstand der kleinste Wirkstoff der Welt³. Die Zeitschrift *Science* kürte NO[•] zum „Molekül der Jahres 1992“. Für ihre Arbeiten zur Identifizierung von NO[•] als „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) erhielten Robert F. Furchgott⁴, Louis J. Ignarro⁵ und Ferid Murad⁶ den Nobelpreis für Medizin im Jahre 1998.

Schon in der Mitte des 18. Jahrhunderts wurde Glyceroltrinitrat (GTN) in der Behandlung der Angina Pectoris angewendet und selbst Alfred Nobel der Erfinder des Dynamits, war auf die vasodilatierende Wirkung seines Strengstoffs angewiesen⁷. Der molekulare Mechanismus der sogenannten „Nitrate“ war lange Zeit unklar. Es war mehr ein Zufall, dass die Gruppe von Furchgott den Umkehrereffekt von Acetylcholin an Blutgefäßen entdeckte, die nicht mehr dilatieren, wenn man vorher die innen liegende Schicht der Endothelzellen entfernt hatte. Es musste also einen „endothelium derived relaxing factor“ (EDRF) geben, der vom Endothel produziert und in die umgebenden glatten Gefäßmuskelzellen wandert, um dort die Dilatation auszulösen⁴. Murads⁶ Forschungen beschäftigen sich vornehmlich mit der Rolle des cyclischen Guanosinmonophosphats (cGMP). Ihn interessierte u.a. die Beeinflussung der Guanylat-Cyclase durch verschiedene Substanzen und Hormone. Dabei wurde eine Aktivierung der Guanylat-Cyclase nach Zugabe von Azid, Hydroxylamin und Nitrit sichtbar, was eine genauere Untersuchung zur Folge hatte. Dies ließ bald die Schlussfolgerung auf die biologische Wirkung von Stickstoffmonoxid oder eines seiner Oxidations- oder Reduktionsprodukte zu. Ignarro⁵ beschäftigte sich mit der Freisetzung von NO[•] aus Nitroverbindungen wie Nitroglycerin und Nitroprussid, die eine Inhibition der Blutplättchenaggregation verursacht. Die Zusammenführung all dieser Erkenntnisse ergab die Entdeckung des NO[•]-Radikals als ein bis dahin unbekanntes Prinzip der biologischen Regulation.

Mittlerweile ist bekannt, dass NO[•] an einer Vielzahl weiterer biochemischer Reaktionen beteiligt ist. Es spielt nicht nur eine wichtige Rolle als Vasodilatator im kardiovaskulären

³ R. Henning, *Nachr. Chem. Techn. Lab.* **1993**, 4, S. 412 - 418

⁴ R. F. Furchgott, *Angew. Chem.*, **1999**, 111, S. 1990 – 2000

⁵ L. J. Ignarro, *Angew. Chem.*, **1999**, 111, S. 2002 – 2013

⁶ F. Murad, *Angew. Chem.* **1999**, 111, S. 1970 – 1989

⁷ J. Lehmann, *Pharmazie in unserer Zeit* **1998**, 2, S. 52-57

System⁸, sondern auch als Neuromodulator im zentralen Nervensystem^{9,10} und als Effektor im Immun-System¹¹. Die Wirkungen von NO^{*} sind an die Signalkaskade des cGMP geknüpft. NO^{*} und NO^{*}-freisetzende Substanzen sind Stimulatoren der NO^{*}-sensitiven Guanylat-Cyklase, welche cGMP synthetisiert¹². Daraus resultiert eine erhöhte cGMP-Konzentration, die über Effektorproteine wie die cGMP-abhängige Proteinkinase (cGMP-Kinase) und cGMP-regulierende Ionenkanäle vermittelt wird. Der Abbau von cGMP wird durch Phosphodiesterasen (PDE's) katalysiert, deren Aktivität überraschenderweise -cGMP vermittelt- durch Phosphorylierung erhöht wird (s. Abb. 2).

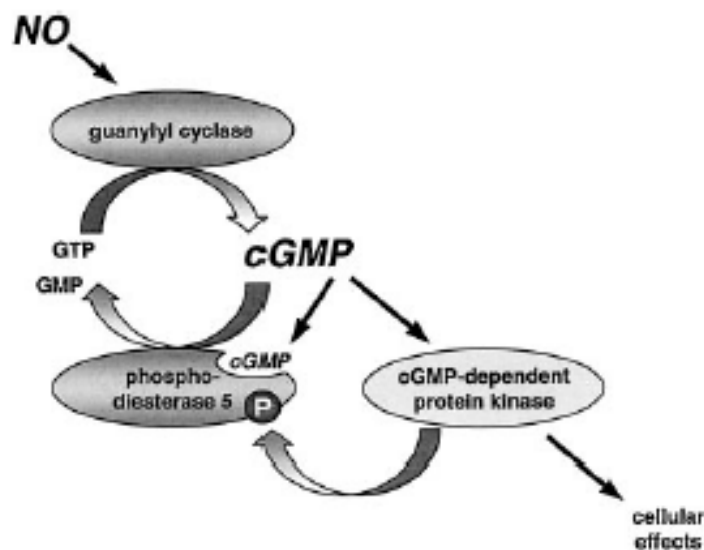


Abb. 2: NO^{*}/cGMP-vermittelte Signaltransduktion nach Lit.¹²

Pathophysiologie von NO^{*}

Durch seine Fähigkeit zur Reaktion mit aktiven Sauerstoffspezies und weiteren Substraten spielt NO^{*} auch pathophysiologisch eine Rolle. Peroxynitrit² (ONOO⁻) weist ein enormes zytotoxisches Potential auf: Proteine, Lipide, Kohlenhydrate und DNA, sowie subzelluläre Organellen und andere Zellsysteme werden chemisch verändert oder denaturiert. Außer Peroxynitrit spielen auch noch andere NO^{*}-Folgeprodukte wie NO₂, N₂O₃ sowie Nitrosamine,

⁸ L. J. Ignarro, G. M. Buga, K.S. Wood, R. E. Byrns, G. Chaudhuri, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, S.9265 - 9269

⁹ D. S. Bredt, P. H. Hwang, S. H. Snyder, *Nature* **1991**, 351, S. 714 - 718

¹⁰ J. Garthwaite, S. L. Charles, R. Chess-Williams, *Nature* **1988**, 336, S. 385 - 388

¹¹ J. R. Lancaster, J. B. Hibbs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, S. 1223 - 1328

¹² F. Müllershausen, D. Koesling, A. Friebe, *BIOspektrum* **2003**, 9, S. 687 - 690

Nitrosothiole und aromatische Nitroverbindungen wie z.B. Nitrotyrosin² bei der Pathophysiologie von NO[•] eine Rolle.

1.2 Biosynthese von NO[•]

In Säugertierzellen wird NO[•] aus einem terminalen Guanidinostickstoffatom (N^ω) der Aminosäure L-Arginin über N^ω-hydroxy-L-arginin und molekularem Sauerstoff gebildet¹³. Das Enzym, welches die Biosynthese von NO[•] katalysiert ist die NO[•]-Synthase (NOS). Bei der Umsetzung von L-Arginin durch die NOS sind einige Kofaktoren und Kosubstrate notwendig. Zu diesen gehören (6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH₄), FAD, FMN, Fe-Häm, NADPH und molekularer Sauerstoff (s. Abb. 3)¹⁴.

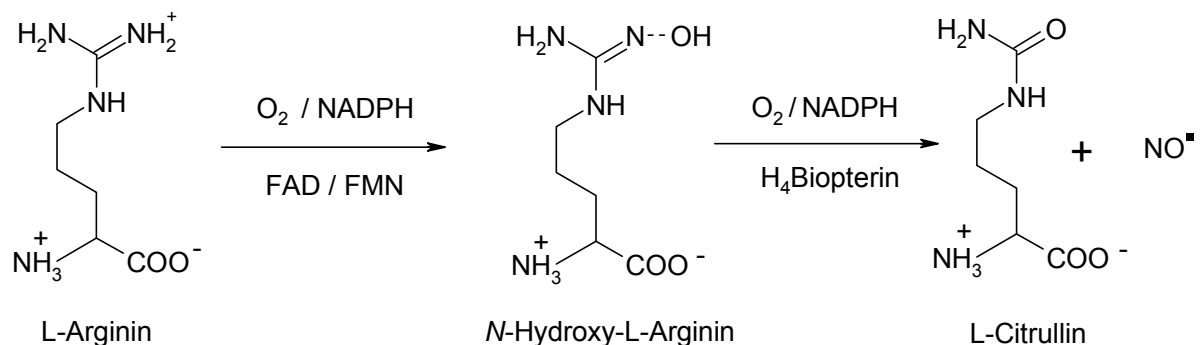


Abb. 3: Biosynthese von NO[•]

Für die 5-Elektronenoxidation des L-Arginin werden 1.5 mol NADPH als Lieferant für 3 Elektronen und 2 Elektronen aus molekularem Sauerstoff benötigt. Das intermediär gebildete N^ω-Hydroxy-L-arginin wird in einem zweiten Oxidationsschritt zu Citrullin und NO[•] umgesetzt. Damit stellt die NO[•]-Bildung aus Arginin eine Abkürzung des Harnstoffzyklus dar (vgl. Abb. 4).

¹³ W. K. Alderton, C. E. Cooper, R. G. Knowles, *Biochem. J.* **2001**, 357, S. 593 - 615

¹⁴ H. H. H. W. Schmidt, *Med. Mo. Pharm.* **1994**, 17, S. 168 - 185

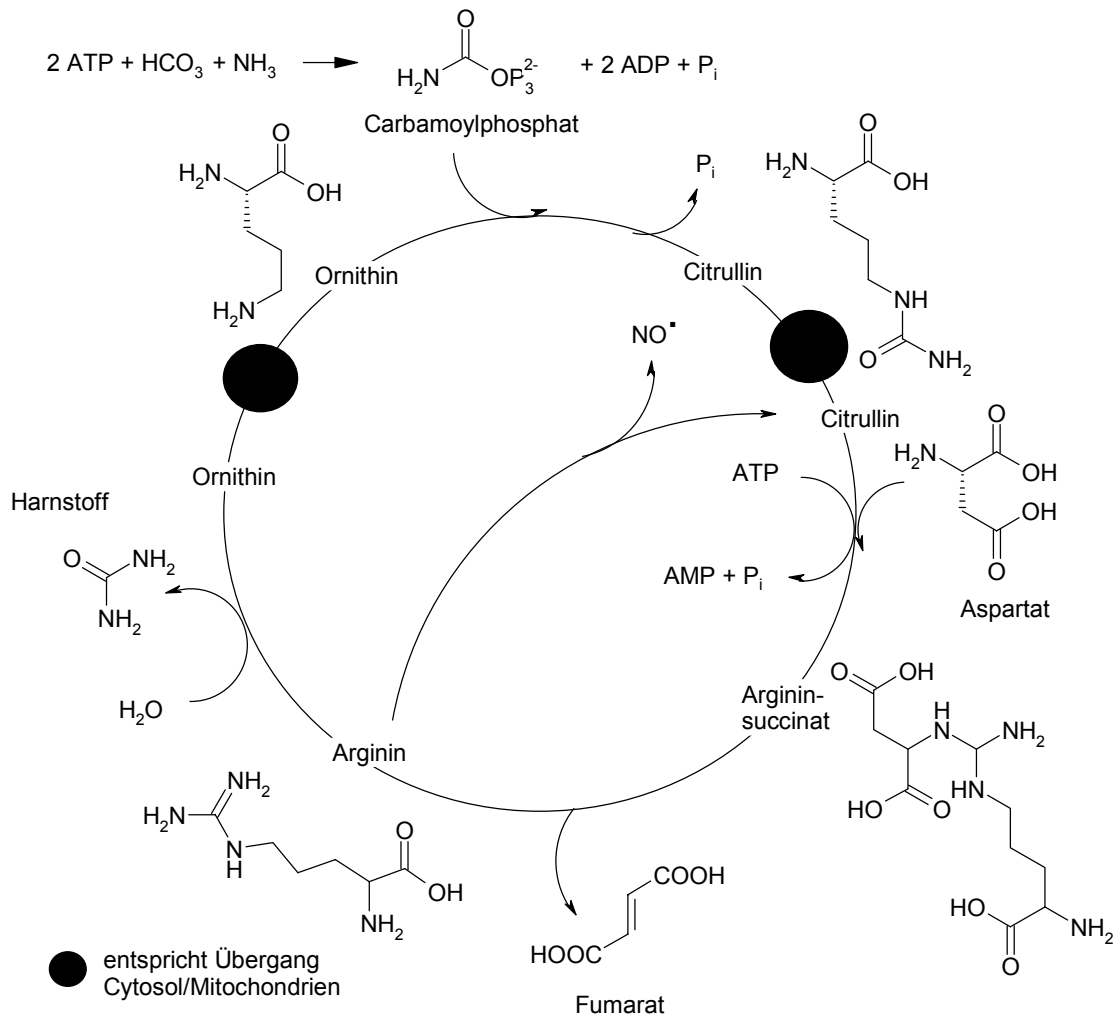


Abb. 4: Bildung von NO[•] als Abkürzung des Harnstoffzyklus

1.3 Isoformen der NO[•]-Synthase (NOS)

Das für die Biosynthese von NO[•] relevante Enzym ist die NO[•]-Synthase (NOS), eine Oxidoreduktase (EC. 1.14.13.39)¹³, von der 3 Isoformen existieren. Allen gemein ist die Homodimerstruktur mit jeweils 130-160 kDa je Monomer. Die bidominale-Struktur der NOS (s. Abb. 5) besteht aus einer N-terminalen Oxygenase Domäne, welche eine Bindungsstelle für Häm, BH₄ und L-Arginin aufweist, verbunden durch eine „Calmodulin-recognition-side“ zur C-terminalen Reduktase Domäne, wo die Bindungsstellen für FAD, FMN und NADPH lokalisiert sind¹⁵. Dabei wird die Abhängigkeit von 2 Einheiten Calmodulin diskutiert, so dass zum Teil auch von einem Tetramer gesprochen wird¹⁵.

¹⁵

C. Nathan, Q. W. Xie, *Cell*. **1994**, 78, S. 915 - 918

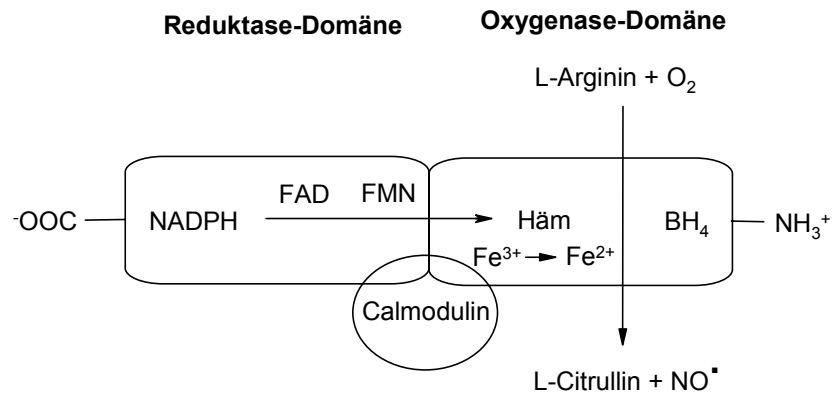


Abb. 5: Schematische Darstellung der NO⁺-Synthase-Domänen

Die drei Isoformen der NOS differieren in ihrer Aktivitätsregulation und der Expression. Zudem ist die Präsenz der einzelnen Isoenzyme zell-, gewebe- und artspezifisch. Man unterteilt in konstitutive, Calcium-abhängige und induzierbare, Calcium-unabhängige Formen. Zu den erst genannten gehören die endotheliale NOS (e-NOS, Typ 3 oder NOS-3) und die neuronale NOS (n-NOS, Typ 1 oder NOS-1). Die endotheliale NOS wird in Endothelzellen gebildet, das dort freigesetzte NO⁺ diffundiert in die angrenzende Gefäßmuskulatur und bewirkt als EDRF eine cGMP vermittelte Relaxation (s. Abb. 6).

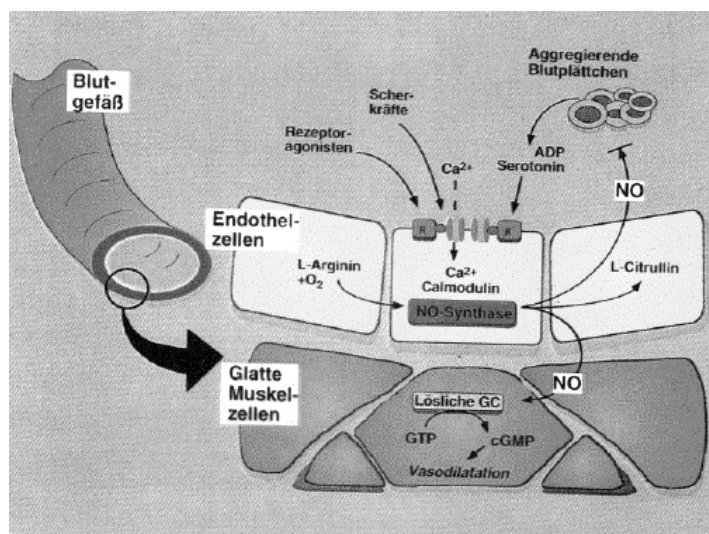


Abb. 6: NO⁺-Signalkaskade im Endothel

Hingegen wird die neuronale NO⁺-Synthase an postsynaptischen Endigungen zentraler Neurone exprimiert. Stickstoffmonoxid bewirkt hier einen Calcium-Einstrom, was zur Erhöhung der Glutamatkonzentration führt. Dieser Vorgang ist für Gedächtnis- und Lernprozesse wichtig (s. Abb. 7).

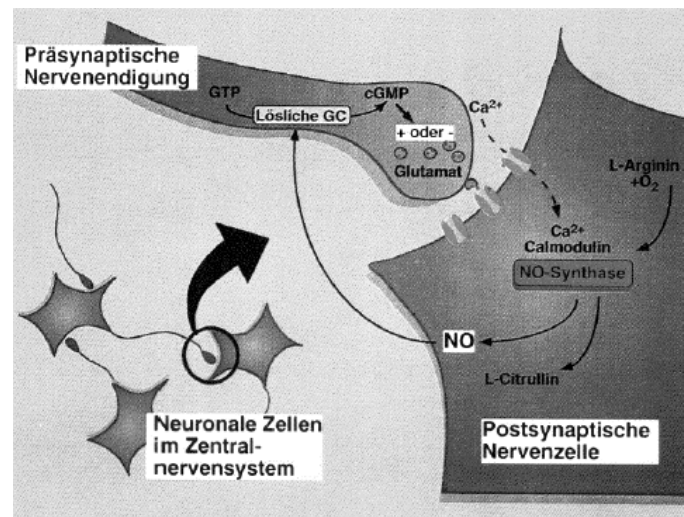


Abb. 7: *NO-Signalkaskade an zentralen Neuronen*

Die induzierbare, Calcium-unabhängige Form (iNOS) findet man in Makrophagen, dort wird sie durch inflammatorische Zytokine aktiviert, wobei NO^{*} hier das Pathogen inaktiviert und somit eine entsprechende Rolle in der Immunabwehr spielt.

Ein zusätzliches Unterscheidungskriterien ist die synthetisierte Menge an NO^{*}, die induzierbare NOS produziert NO^{*} im µM Bereich, wohingegen die anderen beiden Isoformen NO^{*} nur im nM Bereich synthetisieren¹⁴.

1.4 Bedeutung von NO^{*} in der Arzneimitteltherapie

Die Beteiligung von NO^{*} an einer Vielzahl von biochemischen Prozessen in verschiedenen Zelltypen, wie dem zentralen und peripheren Nervensystem, der Lunge, der Leber, dem Gastrointestinaltrakt, den Blutgefäßen, dem Immunsystem und der Haut spiegeln die große Bedeutung von Stickstoffmonoxid wieder. Daraus ergeben sich verschiedene Möglichkeiten für den Einsatz von NO^{*}-relevanten Wirkstoffen in der Arzneimitteltherapie¹⁶:

- NO^{*}-freisetzende Substanzen (NO^{*}-Donatoren)⁷
- NOS-Inhibitoren/ Inhibition der iNOS-Expression
- PDE-Inhibitoren

¹⁶

E. Mutschler, *Arzneimittelwirkungen*, 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlags GmbH, Stuttgart, 1996, S. 467 - 470

NO[•]-Donatoren

Stickstoffmonoxid-freisetzende Substanzen NO[•]-Donatoren³ werden seit mehr als hundert Jahren in der Arzneimitteltherapie eingesetzt, vor allem als Koronartherapeutika (Antianginosa). NO[•] fungiert hier als Vasodilatator, verhindert die Thrombozytenadhäsion und –aggregation und wirkt antiproliferativ und antioxidativ. Zum Einsatz kommen stets Prodrugs, z.B. die sogenannten organischen Nitrate³, wie Glyceroltrinitrat, Isosorbidmono- und –dinitrat und Substanzen vom Molsidomin-Typ¹⁶. Die Freisetzung von NO[•] erfolgt aus den Nitraten reduktiv, aus Substanzen wie Molsidomin jedoch oxidativ. Die Relaxation der Gefäßmuskulatur erfolgt wie zuvor beschrieben durch Stimulation der NO[•]-sensitiven Guanylat-Cyklase¹².

NOS-Inhibitoren

Als derartige Hemmstoffe werden Substanzen eingesetzt, die große strukturelle Ähnlichkeiten mit dem natürlichen Substrat L-Arginin aufweisen, wie z.B. N^ω–Nitro-L-Arginin. Zur Inhibition der Expression der iNOS können auch Glucocorticoide eingesetzt werden¹⁶.

PDE-Inhibitoren

Durch die Hemmung von Phosphodiesterasen, welche für den Abbau von cGMP verantwortlich sind, kommt es zum Anstieg von cGMP, so dass die Wirkung von NO[•] verlängert bzw. verstärkt wird. In der Arzneimitteltherapie werden spezifische Hemmstoffe der PDE5 zur Behandlung der erektilen Dysfunktion eingesetzt (wie z.B. Sildenafil)¹².

1.5 Nachweisverfahren für Stickstoffmonoxid (NO[•])

Aufgrund der großen und weiter steigenden Zahl von biologischen Prozessen, an denen Stickstoffmonoxid beteiligt ist und der daraus resultierenden Möglichkeiten in der Arzneimitteltherapie besteht ein großer Bedarf an empfindlichen und robusten Nachweismethoden für NO[•]. Im Folgenden sollen die bekanntesten Verfahren vorgestellt und hinsichtlich Spezifität, Empfindlichkeit, Robustheit und Praktikabilität bewertet werden.

1.5.1 Biologische Verfahren

Eine häufig angewandte Methode ist die $\text{NO}^\bullet$ -vermittelte Aktivierung der Guanylat-Cyclase¹⁷. Eine Auswahl weiterer biologischer Methoden sind die Hemmung der Thrombozyten-Aggregation¹⁸, die Dilatationsmessung an isolierten Rattenaorten¹⁹ und die Koronarfluss-Messung an nach Langendorff präparierten Meerschweinchen- und Kaninchenherzen²⁰. Biologische Verfahren weisen eine hohe Empfindlichkeit auf, sind jedoch durch die Verwendung des Tiermodells sehr aufwändig und kostspielig. Außerdem ist die Frage der Spezifität für den Nachweis von $\text{NO}^\bullet$ nicht eindeutig geklärt, da auch andere Stickstoffspezies wie z.B. NO^- die Guanylat-Cyclase aktivieren können (vgl. Abb. 8).

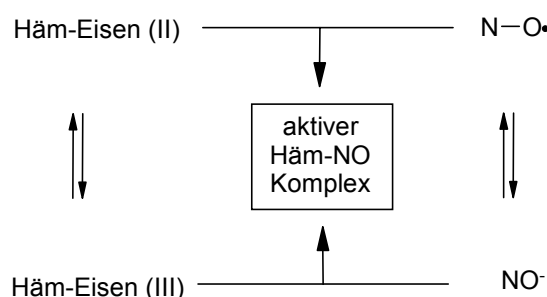


Abb. 8: Bildung bioaktiver Häm- $\text{NO}^\bullet$ -Komplexe

1.5.2 Physikochemische Verfahren

1.5.2.1 Mikroelektrode

Stickstoffmonoxid kann quantitativ mittels einer $\text{NO}^\bullet$ selektiven Mikroelektrode²¹ bestimmt werden. Hierbei wird die Oxidation von $\text{NO}^\bullet$ amperometrisch²² oder voltametrisch²³ bestimmt. Die Oxidation von $\text{NO}^\bullet$ wird in zwei Schritte unterteilt²⁴. Der erste ist eine

¹⁷ J. D. Arzt, B. Schmidt, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 21, S.18253 - 18256

¹⁸ B. Furlong, A. M. Henderson, M. J. Lewis, J. A. Smith, *Br. J. Pharmacol.* **1987**, 90, S. 687 - 692

¹⁹ J. V. d. Voorde, M. Claeys, I. Leusen, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1989**, 14 (Suppl. 11) S. 55 - 61

²⁰ K. Schrör, S. Förster, I. Woditsch, H. Schröder, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1989**, 14 (Suppl. 11) S. 29 - 34

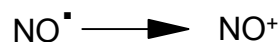
²¹ Y. Kitamura, T. Uzawa, *Anal. Chem.* **2000**, 72, S. 2957 - 2962

²² V. Brovkovich, E. Stolarczyk, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, 19, S. 135 - 143

²³ M. Pontie', C. Gobin, *Anal. Chim. Acta* **2000**, 411, S. 175 - 185

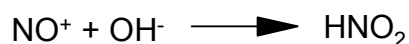
²⁴ Y. Xian, W. Zhang, *Anal. Chim. Acta* **2000**, 415, S.127 - 133

elektrochemische Reaktion²⁵, bei der ein Ein-Elektronen-Transfer von NO[•] auf die Elektrode erfolgt und ein Nitrosylkation entsteht.



Gl. 1

In einem zweiten Schritt konvertiert NO⁺ als Lewis Säure in der Anwesenheit von OH⁻ zum Nitrit.



Gl. 2

Die chemische Reaktionsrate steigt mit dem pH-Wert. Die Spezifität der Messelektrode hängt entscheidend von der Selektivität des Elektrodenüberzuges ab, der nur für NO[•] permeabel sein darf.

1.5.2.2 Chemilumineszenz

NO[•] kann durch Ozon zu NO₂^{*} angeregt werden (vgl. Gl. 3), welches Chemilumineszenz zeigt.



Gl. 3

Hierbei geht das durch Ozon angeregte NO₂^{*} unter Freisetzung von Energie wieder in den Grundzustand über (vgl. Gl. 4). Die dabei emittierte Strahlung liegt im Bereich des Infrarotlichtes (~640-3000 nm) mit einer hohen Intensität bei 1100 nm²⁶.



Gl. 4

Allerdings beschränkt sich diese Nachweismethode in der Praxis auf gasförmige Systeme, da bei der Luminol-vermittelten Detektion in Lösungen Probleme auftreten. Die Chemilumineszenzdetektion findet Anwendung zum Beispiel bei der NO[•]-Bestimmung in der

²⁵ M. Pallini, A. Curulli, *Electroanal.* **1998**, 15, S.1010 - 1016

²⁶ M. Feelisch, J. S. Stamler (Hrsg.) in: „*Methods in Nitric Oxide Research*“, J. Wiley & Sons, **1996**, Part VI

Atemluft²⁷, oder der Freisetzung von NO[•] aus NO[•]-Donatoren durch Ausgasen mittels Inertgas.

1.5.2.3 UV/VIS-Spektroskopischer Nachweis

Griess-Reagenz

Mittels der Griess-Reaktion werden die oxidativen Hauptmetaboliten von Stickstoffmonoxid, Nitrit und Nitrat, mit Hilfe einer Azokupplung nachgewiesen²⁸. Hierbei wird vorhandenes Nitrat mittels NADH-abhängiger Nitratreduktase zu Nitrit reduziert. Diese photometrische Bestimmung (s. Abb. 9) von Nitrit bzw. Nitrat ist zwar einfach, genau und empfindlich, doch ist die Spezifität für NO[•] gering, da nicht ohne weiteres sicher ist, aus welcher Quelle das Nitrit bzw. Nitrat stammt.

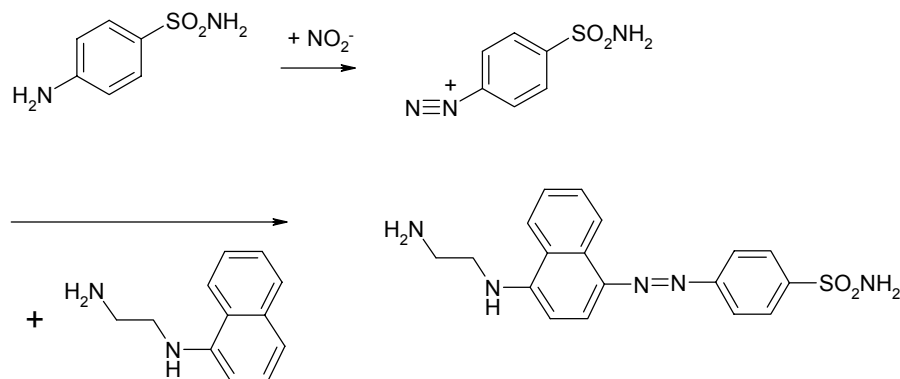


Abb. 9: NO[•]-Nachweis mittels Griess-Reagenz

Methämoglobinmethode

Ein häufig praktiziertes Verfahren zur Detektion von NO[•] ist der Nachweis mit Hämoglobin (Hb)²⁶. Diese Methode basiert auf der quantitativen Umwandlung von Oxyhämoglobin (HbO₂) zu Methämoglobin (MetHb) in wässriger Lösung durch NO[•].



Gl. 5: NO[•]-Nachweis mittels Hämoglobin

Die Transformation des zentralen Eisens im Hämoglobin wird durch eine Verschiebung im Absorptionsspektrum sichtbar. Bei pH 7.4 zeigt das Spektrum des Methämoglobins ein

²⁷ L. Ney, G. Kemming, *Res Exp. Med* **1999**, 199, S. 121 - 128

²⁸ M. Wada, T. Ikehata, Y. Yoshida, N. Kuroda, K. Nakashima, *Anal. Scienc.* **1998**, 14, S. 1177-1179

Absorptionsmaximum bei 405 nm. Eine Mischung aus Hb und MetHb dagegen weist einen isosbestischen Punkt bei 411 nm auf. Durch Bestimmung des Quotienten der Absorption bei 405 und 411 nm kann man eine lineare Kalibrierung von unterschiedlichen NO[•]-Konzentrationen erstellen und diese zur quantitativen Bestimmung von NO[•] heranziehen.

Nitroxid-Radikale

Obwohl einfache Nitroxid-Radikale normalerweise nicht mit NO[•] reagieren, konnten Weber und Grzesiok^{29,30} durch systematische Abwandlung von 1,2-Dihydro-chinolinyl-1-oxyl ein Reagenz entwickeln, das zum Nachweis von NO[•] geeignet ist. 6-*tert*-Butyl-4-carboxyl-2,2-diphenyl-1,2-dihydrochinolinyl-1-oxyl (NOXYL) stellt ein in Substanz stabiles und in wässrig-organischer Lösung bei neutralem pH-Wert lange Zeit haltbares, freies Radikal dar, das beim Kontakt mit NO[•] zu einem Hydroxylaminsalpetrigester reagiert. Dieser zerfällt spontan zum Aminylradikal, das abhängig von den Reaktionsbedingungen ein charakteristisches Produktspektrum liefert. Die stabilen Endprodukte der NO[•]-Reaktion von NOXYL lassen sich mittels HPLC und UV/Vis-Detektion quantitativ bestimmen. H. Höbler³¹ untersuchte die Reaktion im Hinblick auf Spezifität und Reproduzierbarkeit. Dabei stellte sich heraus, dass bei hohen NO[•]-Konzentrationen bevorzugt das Nitroderivat gebildet wird, während mit abnehmendem NO[•]-Angebot das nicht nitrierte 1,2-Dihydrochinolin und das 2,3-Diphenylchinolin als Hauptprodukte auftreten (s. Abb. 10).

²⁹ A. Grzesiok, Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **1994**

³⁰ H. Weber, A. Grzesiok, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1994**, 327, S. 789 - 792

³¹ H. Höbler, Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **1998**

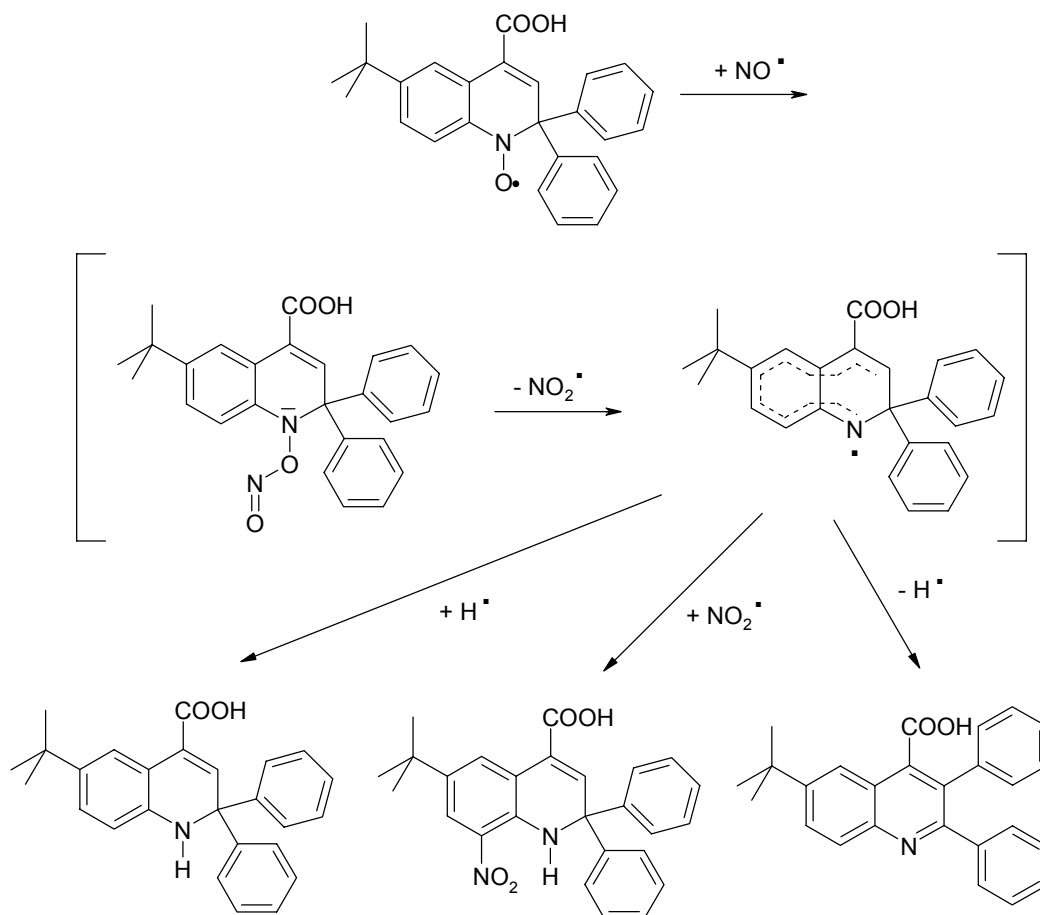


Abb. 10: Reaktion von NOXYL mit $\text{NO}^\bullet$

1.5.2.4 ESR-Spektroskopischer Nachweis

Nitrosylkomplexe

Eine Vielzahl von Übergangsmetall-Nitrosylkomplexen³², insbesondere solche des Eisens, zeigen in Abhängigkeit ihrer Struktur ein charakteristisches Elektronen-Spin-Resonanz-Spektrum (ESR-Spektrum), welches zur Identifizierung und Quantifizierung³³ von $\text{NO}^\bullet$ herangezogen werden kann. Die ersten Komplexe zum Nachweis von $\text{NO}^\bullet$ waren Chelate vom Typ der Dithiocarbamat-Eisen(II)-Komplexe (DTC-Fe) (s. Abb. 11).

³² G. B. Richter-Addo, P. Legzdins in: „Metal Nitrosyls“, Oxford University Press, Oxford, **1992** und dort zitierte Literatur

³³ S. S. Greenberg, D. E. Wilcox, G. M. Rubanyi, *Circ. Res.* **1990**, 67, S.1446 - 1452

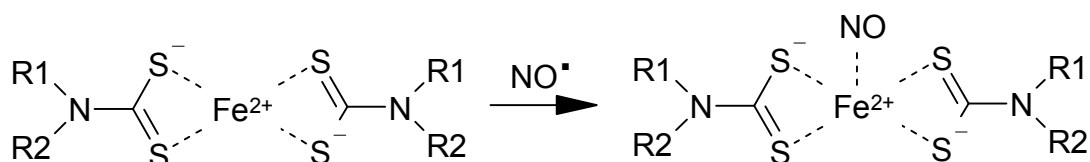


Abb. 11: *NO[•]-Nachweis mit Dithiocarbamat-Fe(II)-Komplexen*

Das Reaktionsprodukt mit NO[•] ist ein Nitrosyl-Eisen(II)-Komplex. Der Nachweis kann auch *in vivo* angewandt werden, wobei hier häufig der Diethyldithiocarbamat-Fe(II)-Komplex (DETC-Fe) verwendet wird^{34,35,36}. Dabei macht man sich die hydrophoben Eigenschaften des DETC-Fe Komplexes für eine erhöhte Vaso-Permeabilität zum Beispiel bei cerebralen Untersuchungen³⁷ zu Nutze. Weiterhin wird der N-Methylglucamindithiocarbamat-Fe(II)-Komplex (MGD-Fe) verwendet, welcher eine verbesserte Wasserlöslichkeit zeigt³⁷. Insbesondere bei biologischen Experimenten wird der Sarcosindithiocarbamat-Fe(II)-Komplex³⁸ und der Prolindithiocarbamat-Fe(II)-Komplex³⁹ (PDTC-Fe) zum Nachweis von NO[•] angewendet. Nachteilig ist, dass alle Eisen-Komplexe keine ausreichende Empfindlichkeit aufweisen, da nur unphysiologische (pathologische) NO[•]-Konzentrationen nachgewiesen werden können.

Die Simulation des „switching“-Mechanismus bei der Aktivierung der Guanylat-Cyklase⁴⁰ durch NO[•] konnte als Grundlage für eine weitere Nachweismethode für NO[•] verwendet werden. Abb. 12 zeigt auf der linken Seite schematisch die Aktivierung der Guanylat-Cyklase.

³⁴ A. F. Vanin, P.I. Mordvintcev, A. L. Kleschchev, *Stud. Biophys.* **1984**, 102, S. 135 - 140

³⁵ A. F. Vanin, *Methods Enzymol.* **1999**, 301, S.269 - 279

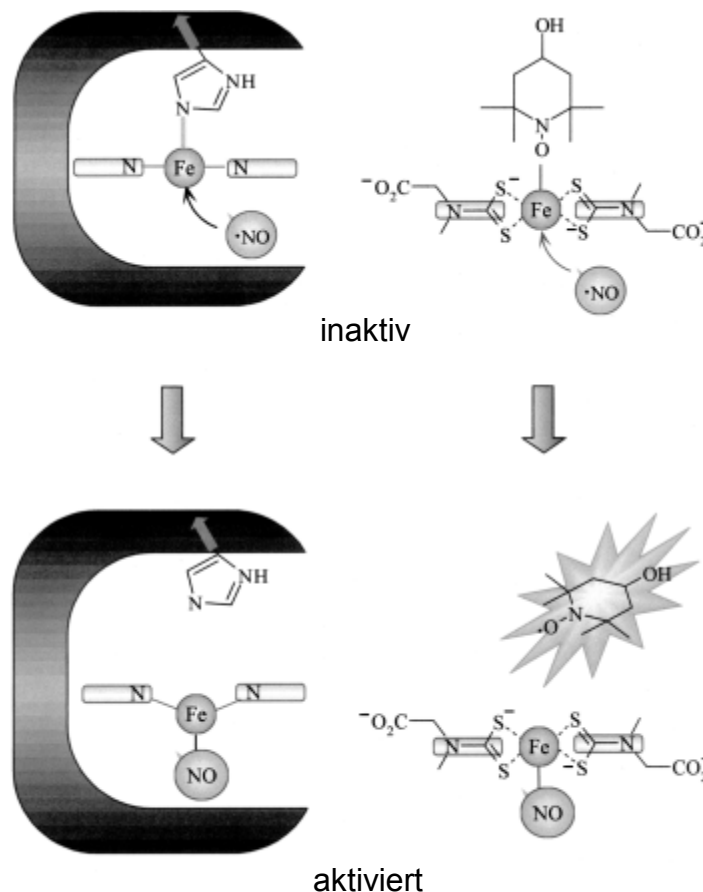
³⁶ V. Quaresima, H. Takehara, K. Tsushima, M. Ferrari, H. Utsumi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 221, S.729 - 734

³⁷ G. Wie, V. L. Dawson, J. L. Zweier, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1455, S.23 - 34

³⁸ T. Yoshimura, H. Yokoyama, S. Fujii, F. Takayama, K. Oikawa, H. Kamada, *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, S. 992 - 994

³⁹ S. V. Paschenko, V. V. Khramtsov, M. P. Skatchkov, V. F. Pljusnin, E. Bassenge, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 14, S. 992 - 994

⁴⁰ C. S. Lai, A. M. Komarov, *FEBS Lett.* **1994**, 345, S. 120 - 124



Aktivierung Guanylat-Cyclase Spin-Austausch Molekül-System

Abb. 12: Vergleich des „switching“-Mechanismus lt. Lit.⁴¹

Daran beteiligt ist die Häm-Gruppe und der Imidazolring des Histidins mit einer koordinativen Bindungsstelle für Eisen. Stickstoffmonoxid zeigt eine starke Bindungsaffinität zum Eisen der Häm-Einheit. Sowohl die NO-Bindung als auch die Verdrängung von Histidin bewirken eine Konformationsänderung des Proteins und damit die Aktivierung des Enzyms.

Dieser Mechanismus kann für analytische Zwecke nachgeahmt werden, indem Dithiocarbamate den Fe-Häm-Komplex simulieren. Dieser Komplex wird durch Anlagerung von TEMPO zu einem ESR-inaktiven Adukt umgewandelt. Erst beim Kontakt mit NO wird durch dessen höhere Bindungsaffinität zum Dithiocarbamat-Fe(II)-Komplex radikalisiertes TEMPO freigesetzt. Letzteres besitzt eine wesentlich höhere und stabilere Signalintensität im ESR-Spektrum als NO selbst, so dass die Empfindlichkeit der Nachweisreaktion deutlich gesteigert wird.

⁴¹ Y. Katayama, N. Soh, M. Maeda, *Chemphyschem.* **2001**, 2, S. 655 - 661

NO[•]-Cheletropic-Traps

Zu den **NO[•]-Cheletropic-Traps** (NOCT) gehören die *o*-Chinodimethane (s. Abb. 13), die in Anwesenheit von NO[•] zu stabilen, cyclischen Nitroxidradikalen reagieren^{42,43}. Auch NO₂-Radikale können zu stabilen Radikalen abgefangen werden. Beide Reaktionsprodukte zeigen unterschiedliche, charakteristische ESR-Signale.

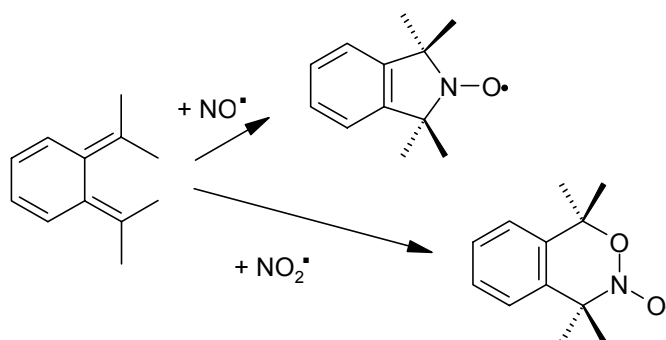


Abb. 13: Nachweis von NO[•] mittels NOCT

Sauerstoffradikale stören den Nachweis nicht, da sie nicht mit NOCT reagieren. Die anfänglich ungünstigen physikalischen Eigenschaften der Chinodimethan-Reagenzien (Instabilität, Löslichkeit) konnten durch die Synthese vieler stabiler Derivate mit hydrophilen und lipophilen Eigenschaften wesentlich verbessert werden^{44,45}.

Diaminoyl-Radikale (Bis-Aminoxyl-Radikale)

Eine neuere Nachweismethode für NO[•], die ebenfalls auf dem ESR-spektroskopischen Nachweis von Radikalen beruht, ist die Reaktion eines diradikalischen Moleküls mit NO[•]. Dabei entsteht ein Monoradikal, dessen ESR-Spektrum sich signifikant von der Ausgangssubstanz unterscheidet⁴⁶. Das Diradikal besteht aus einer Kombination eines nicht mit NO[•] reaktiven radikalischen Molekülteils und einen radikalischen Reaktionszentrum. In Abb. 14 ist die Reaktion dargestellt.

⁴² H. G. Korth, K. U. Ingold, R. Sustmann, H. de Groot, H. Sies, *Angew. Chem.* **1992**, 104, S. 915 - 917

⁴³ H. G. Korth, H. Weber, in „*Methods in Nitric Oxide Research*“ (M. Feelisch, J.S. Stamler, Eds.) **1996**, S. 383

⁴⁴ H. G. Korth, R. Sustmann, P. Lommès, T. Paul, A. Ernst, H. de Groot, L. Hughes, K. U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, S. 2767 - 2777

⁴⁵ T. Paul, M. A. Hassan, H. G. Korth, R. Sustmann, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, S. 6835 - 6848

⁴⁶ L. Marx, A. Rassat, *Angew. Chemie* **2000**, 112, S. 4668 - 4670

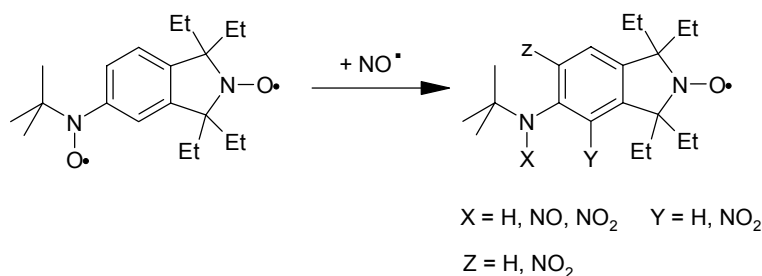


Abb. 14: $\text{NO}^\bullet$ -Reaktion der diradikalischen Substanz

Allerdings weist diese Art von Spin-trap bei der *in vivo* Detektion von $\text{NO}^\bullet$ Probleme auf, da die Anwesenheit von reduzierenden Reagenzien wie z.B. Ascorbinsäure oder intrazellulären Redoxsystemen wie GSH die Methode stören. Der große apparative Aufwand für die Aufnahme der ESR-Spektren ist ebenfalls von Nachteil.

1.5.2.5 Fluoreszenz-Spektroskopischer Nachweis

Benzotriazole als $\text{NO}^\bullet$ -Produkte von 1,2-Phenylendiamine

In der Arbeitsgruppe von H. Kojima wird die Reaktion von 1,2-Phenylendiaminen mit $\text{NO}^\bullet$ seit einigen Jahren intensiv untersucht. Das Prinzip dieser Nachweisreaktion besteht in der Cyclisierung aromatischer Diamine zu fluoreszierenden Triazolderivaten unter Einbau von $\text{NO}^\bullet$. Dabei reagiert nicht das $\text{NO}^\bullet$ -Radikal selbst, sondern die bei der aeroben Reaktion entstehenden NO^+ -Äquivalente über entsprechende Nitrosamine.

Diaminonaphthalin (DAN)

Zunächst wurden einfache 2,3-Diaminonaphthaline verwendet, die eine zusätzliche Esterfunktion aufwiesen. Dadurch wurde einerseits die Zellpermeabilität gewährleistet und andererseits eine Anreicherung im Zytoplasma erreicht, da intrazelluläre Esterasen eine Spaltung in die freie Carbonsäuren bewirken, welche nach aerober $\text{NO}^\bullet$ -Reaktion die fluoreszierenden Triazole liefern^{47,48}.

⁴⁷ M. Wade, T. Ikehata, *Anal. Sci.* **1998**, 14, S. 1177 - 1179

⁴⁸ H. Kojima, K. Sakurai, *Biol. Pharm. Bull.* **1997**, 20, S. 1229 - 1232

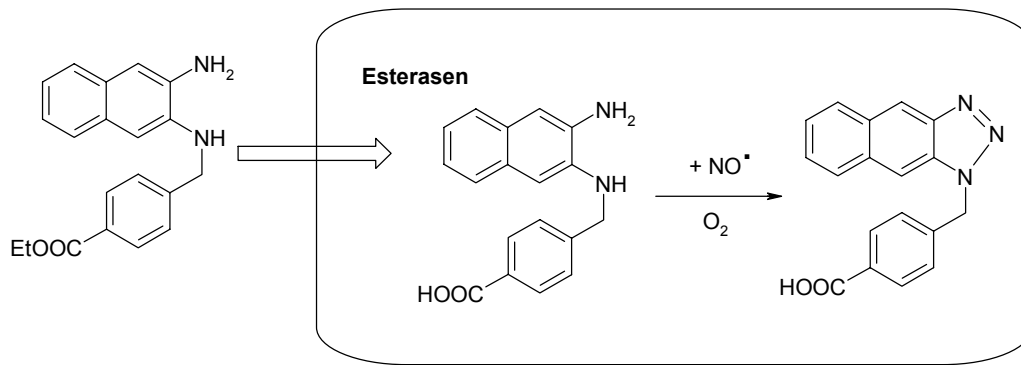


Abb. 15: NO•-Nachweis mittels DAN

Diaminofluoreszeine (DAF's)

Eine verbesserte Weiterentwicklung dieses analytischen Prinzips stellen die Diaminofluoreszeine (DAF's) dar^{49,50} (s. Abb. 16). Auch hier werden die membrangängigen Ester eingesetzt⁵¹, die nach Hydrolyse und Triazolbildung im Cytosol die fluoreszierenden Produkte (DAFT) ergeben^{52,53}. Diese zeigen eine um den Faktor 180 erhöhte Quantenausbeute gegenüber den eingesetzten Diaminofluoreszeinen. Der Einsatz von DAF's hat sich inzwischen für den NO•-Nachweis in verschiedenen Endothelzellen⁵² sowie in Hippocampuszellen von Ratten⁵⁴ bewährt.

⁴⁹ H. Kojima, Y. Urano, *Angew. Chem.* **1999**, 111, Nr. 21, S. 3419 - 3422

⁵⁰ M. O. Lopez-Figueroa, C. Caamano, *Biochem. Biophysic. Research Comm.* **2000**, 272, S. 129 - 133

⁵¹ H. Kojima, N. Nakatsubo, *Anal. Chem.* **1998**, 70, S. 2446 - 2453

⁵² K. Sugimoto, S. Fujii, *Histochem. Cell Biol.* **2000**, 113, S. 341 - 347

⁵³ H. Kojima, N. Nakatsubo, *NeuroReport* **1998**, 9, S. 3345 - 3348

⁵⁴ H. Kojima, M. Hirotsu, *Anal. Chem.* **2001**, 73, S. 1967 - 1973

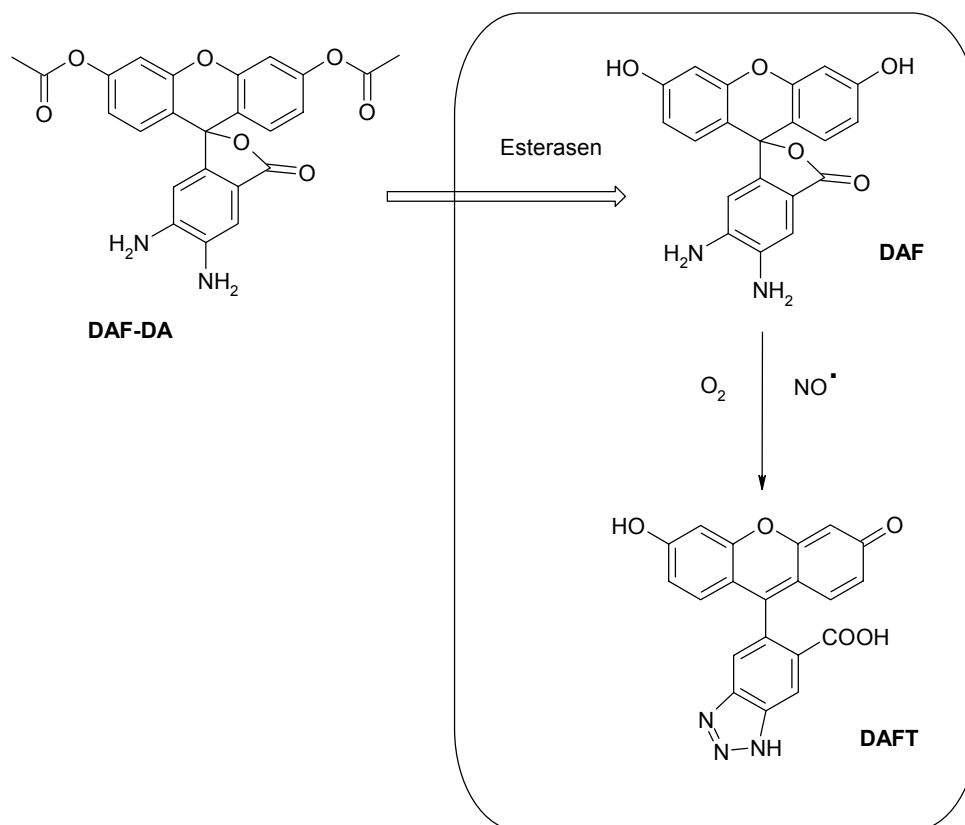


Abb. 16: Zelleinschleusung von DAF-DA und intrazelluläre Reaktion mit $NO^\bullet$

Rhodamine

Die bisher besten Ergebnisse auf diesem Gebiet konnten mit den Rhodaminen erzielt werden (s. Abb. 17). Der Vorteil liegt hier in der größeren Photostabilität vor allem bei pH-Werten von > 4 und in einer bathochromen Emission der Produkte, so dass eine Überlagerung mit der Eigenfluoreszenz der Zellen weitgehend vermieden werden kann. Deshalb konnten diese Reagenzien erfolgreich bei Untersuchungen zum Einfluss von $NO^\bullet$ auf die Neurotoxizität nach cerebraler Ischämie eingesetzt werden⁵⁵.

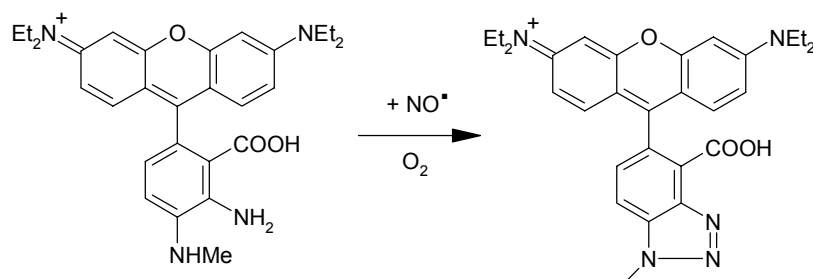


Abb. 17: $NO^\bullet$ -Nachweis mit Diaminomethylrhodamin

Fluoreszierende Nitrosylkomplexe

Zur Verbesserung der Empfindlichkeit für $\text{NO}^{\bullet}$ wurde der TEMPOL-Dithiocarbamat-Fe(II)-Komplex (vgl. Seite 16) über eine Amidbindung mit einem Acridin-Fluorophor verknüpft (s. Abb. 18).

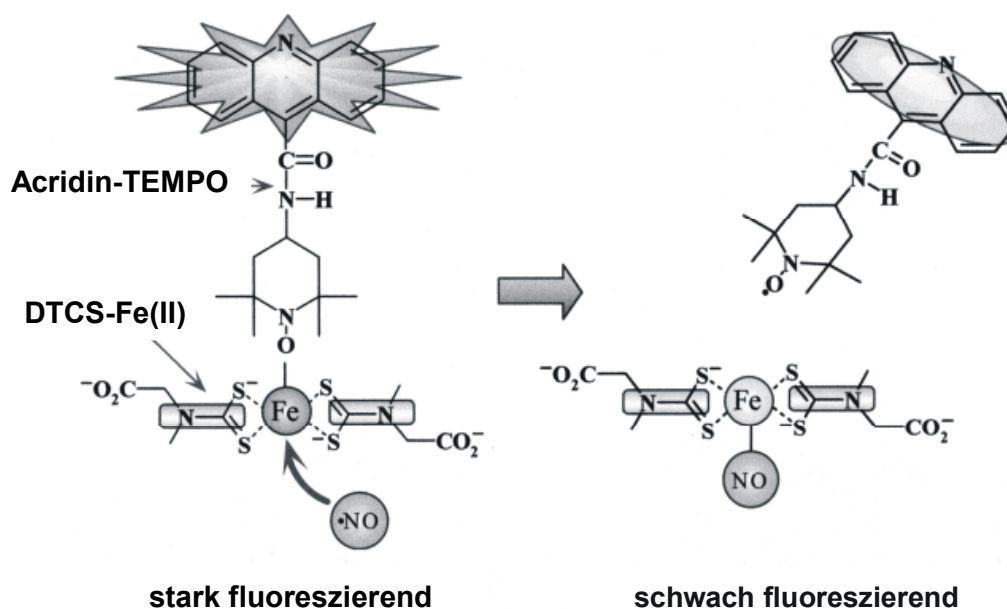


Abb. 18: $\text{NO}^{\bullet}$ -Nachweis mittels Fluoreszierende DTC-Komplexe nach Lit.⁵⁶

Hierbei liegt vor der Reaktion mit $\text{NO}^{\bullet}$ ein stark fluoreszierendes System vor. Die höhere Bindungsaffinität von Stickstoffmonoxid zum Dithiocarbamat-Fe(II)-Komplex setzt das „Acridin-TEMPOL“ als Radikal frei, welches aufgrund eines intramolekularen Quenching⁵⁶ nur noch schwach fluoresziert. Die Abnahme der Fluoreszenz ist direkt proportional zur Konzentration an $\text{NO}^{\bullet}$.

Cobalt-Komplexe

Eine weitere Strategie zum direkten Nachweis von $\text{NO}^{\bullet}$ beruht auf der Fluoreszenzlöschung durch Übergangsmetallionen mit teilweise besetzten d-Zuständen⁵⁷. Als Ligand liegt hier ein Aminotroponiminat (ATI)-Ring vor. Dieser ist über ein Iminstickstoffatom mit einem Dansylfluorophor modifiziert und über den Stickstoff durch eine Kette aus vier Methylengruppen mit einer analogen zweiten Einheit verknüpft. In Abwesenheit von $\text{NO}^{\bullet}$,

⁵⁶ Y. Katayama, N. Soh, M. Maesa, *Chem. Phys. Chem.* **2001**, 2, S. 655 - 661

⁵⁷ K. J. Franz, N. Singh, *Angew. Chem.* **2000**, 112, S. 2194 - 2197

wird die Fluoreszenz des Fluorophors durch das Co(II)-Zentralatom fast komplett gelöscht. In Gegenwart von $\text{NO}^\bullet$ kommt es zur Bildung einer Cobalddinitrosylverbindung, die nur dann möglich ist, wenn einer der DATI-Arme dissoziiert (s. Abb. 19). Dabei wird das intramolekulare Quenching des Fluorophors aufgehoben. Die $\text{NO}^\bullet$ Nachweisgrenze wurde auf 50 – 100 μM abgeschätzt⁵⁷.

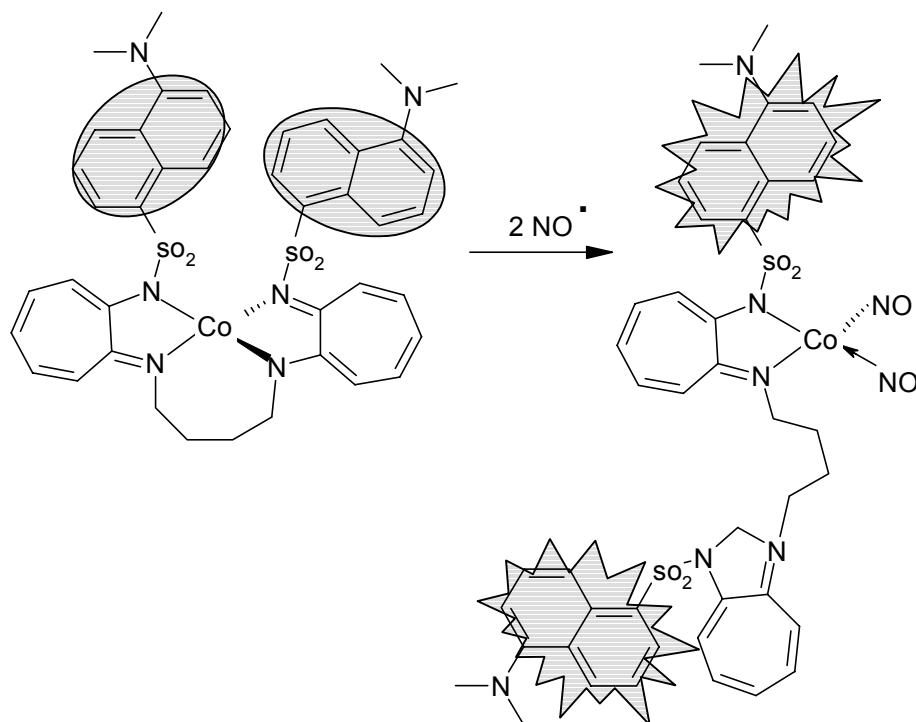


Abb. 19: $\text{NO}^\bullet$ -Nachweis durch Bildung des Cobalddinitrosylkomplexes⁵⁷

Fluorezierende- $\text{NO}^\bullet$ -Cheletropic-Traps (FNOCT)

Eine Weiterentwicklung der cheletropen Spinfänger (Nitric Oxide Cheletropic Trap = NOCT (vgl. Seite 17) sind die sogenannten fluoreszenzfähigen cheletropen Fänger (FNOCT)⁵⁸. Bei der Reaktion mit $\text{NO}^\bullet$ entsteht aus dem nicht fluoreszierenden FNOCT zwar ein Phenanthron-Fluorophor, doch vermindert das gleichzeitig entstehende Nitroxid-Radikal die Eigenfluoreszenz durch ein intramolekulares Quenching⁵⁸. Erst durch die Reduktion des Nitroxids zum Hydroxylamin, die unter physiologischen Bedingungen langsam eintritt oder durch Zugabe von Ascorbinsäure beschleunigt werden kann, entsteht der blaue Fluorophor, der zur quantitativen Bestimmung von $\text{NO}^\bullet$ herangezogen werden kann (s. **Fehler!**

⁵⁸

P. Meineke, U. Rauen, H. de Groot, H. G. Korth, R. Sustmann, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, S. 1738-1747

Ungültiger Eigenverweis auf Textmarke.). Der $\text{NO}^\bullet$ Nachweis mittels der FNOCT's wurde in Alveolar-Makrophagen nach Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) nachgewiesen⁵⁹. Nachteilig wirkt sich hier die Notwendigkeit der Reduktion zur Ausbildung der maximalen Fluoreszenz aus.

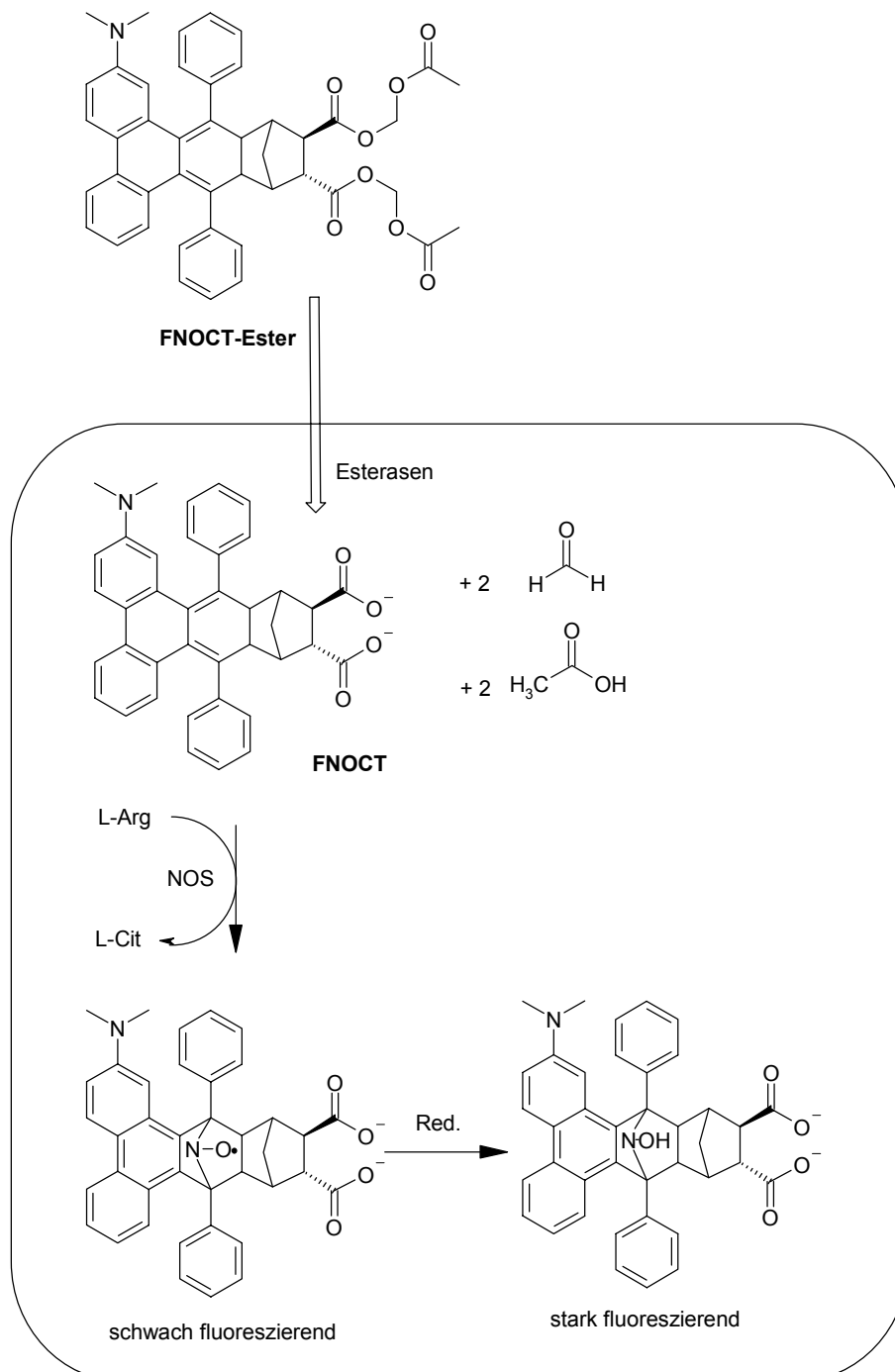


Abb. 20: FNOCT's zum Nachweis von $\text{NO}^\bullet$

⁵⁹

P. Meineke, U. Rauen, H. de Groot, H. G. Korth, R. Sustmann, *Biol. Chem.* **2000**, 381, S. 575 - 582

2 ZIEL DER ARBEIT

Wie in der Einleitung ausführlich dargestellt, besitzt Stickstoffmonoxid (NO[•]) eine große Bedeutung im Bereich der Biochemie, Physiologie und der Pathophysiologie. Dabei werden dem genuinen NO[•] überwiegend positive Effekte zugeordnet, da es als Botenstoff maßgeblich an der Auslösung von wichtigen Stoffwechselprozessen beteiligt ist, die insgesamt einen zytoprotektiven Charakter aufweisen. Dagegen können einige Folgeprodukte von NO[•] vor allem mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auch zytotoxisch wirken. Allerdings darf die Rolle derartiger „reaktiver Nitrogenspezies (RNS)“ z.B. beim programmierten Zelltod (Apoptose) oder im Entzündungsgeschehen nicht nur negativ bewertet werden.

In jedem Fall stellt sich für die an der NO[•]-Forschung interessierten Arbeitsgruppen immer wieder die Frage nach dem wann, wo und wie einer NO[•]-Freisetzung, unabhängig davon, ob die NO[•]-Bildung über biologische Mechanismen oder spontan wie z.B. aus einigen NO[•]-Donatoren stattfindet. Da die biologische Halbwertszeit von NO[•] äußerst kurz ist und sich eine Fülle von verschiedenen Folgeprodukten bilden kann, sollte die Detektion von NO[•] schnell, spezifisch und mit hoher Empfindlichkeit, jedoch mit möglichst geringem apparativem Aufwand erfolgen.

Unter diesen Aspekten scheint nach heutigem Stand der Forschung nur noch eine fluorimetrische Detektion derartigen Anforderungen zu genügen. Durch die Entwicklung leistungsfähiger Fluoreszenz-Mikroskope unter Einschluss konfokaler⁶⁰ Techniken ist es heute möglich, in biologischem Gewebe, in Zellkulturen oder sogar in einzelnen Zellen eine Fluoreszenzdetektion mit hoher Empfindlichkeit erfolgreich durchzuführen.

Aus diesen Gründen schien es vielversprechend, auf der Grundlage von NOXYL (**1**), einem in der eigenen Arbeitsgruppe entwickelten NO[•]-Fänger^{29,31}, einen geeigneten Fluoreszenztest für NO[•] zu erarbeiten.

1 reagiert mit hohen Konzentrationen von NO[•] ($>10^{-3}$ mol/l) fast quantitativ zu einem Nitroderivat (**3**)³¹ unter Einbau des angebotenen NO[•]. Diese Eigenschaft macht **1** zu einem geeigneten Reagenz für ein *in-vitro*-screening von NO[•]-Donoren unter oxidativen Bedingungen, da das Produkt leicht mittels DC und HPLC quantifiziert werden kann. Allerdings schied eine fluorimetrische Detektion entsprechender Derivate von vornherein

⁶⁰ A. Lamprecht, U. Schäfer, C. M. Lehr, *Pharm. Ztg.* **2002**, 4, S. 34 - 39

aus, da Nitro-Substituenten als Strukturelement von Fluorophoren stets eine starke Löschung der Fluoreszenz (Quenching) mit sich bringen.

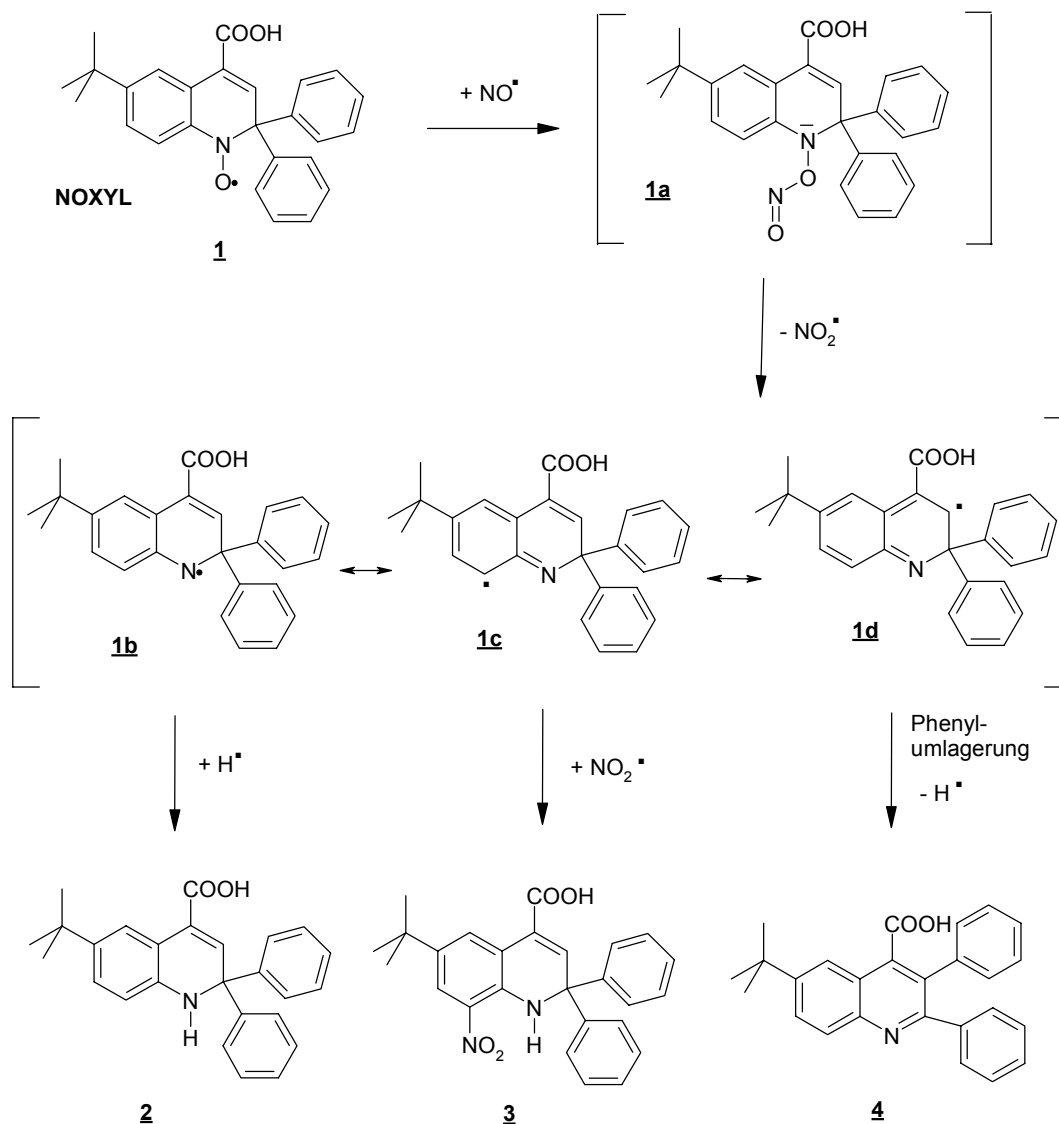
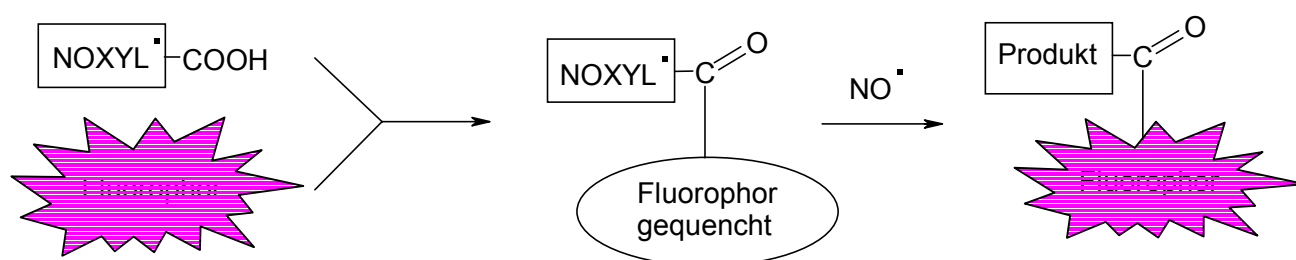


Abb. 21: $\text{NO}^\bullet$ -Nachweis mittels **1**

Setzt man **1** dagegen bei geringeren $\text{NO}^\bullet$ -Konzentrationen ein³¹, so bleibt die Reaktivität und Selektivität gegenüber $\text{NO}^\bullet$ zwar erhalten, doch ändert sich das Produktspektrum signifikant zu Gunsten der nicht nitrierten Produkte **2** und **4**, da dann die Rekombination des intermediär gebildeten Aminylradikals **1b** – **d** mit den $\text{NO}_2^\bullet$ Radikalen in den Hintergrund tritt und dessen unspezifische Nebenreaktionen dominieren (s. Abb. 21). Dieses Reaktionsverhalten wurde ursprünglich als Nachteil bewertet, da das angebotene $\text{NO}^\bullet$ nun nicht mehr im Produkt enthalten ist (keine „ $\text{NO}^\bullet$ -Fänger“-Eigenschaften mehr im Hinblick auf die isolierten Produkte). Im Zusammenhang mit der Frage nach fluoreszierenden Derivaten eröffneten sich damit allerdings neue Möglichkeiten zum „indirektem“ Nachweis von $\text{NO}^\bullet$.

Durch Derivatisierung von **1** mit einem potenten Fluorophor sollte ein Reagenz hergestellt werden, bei dem die fluoreszierenden Eigenschaften wegen eines intramolekularen Quenching mit dem NOXYL-Radikal möglichst weitgehend unterdrückt werden, die Reaktivität gegenüber NO[•] jedoch erhalten bleibt. Nach der NO[•]-Reaktion sollten um so weniger Nitroprodukte entstehen, je geringer die NO[•]-Konzentration gewählt wird. Dagegen war zu erwarten, dass unter solchen Bedingungen die nicht nitrierten Derivate **2** und **4** als Hauptprodukte gebildet werden, bei denen die fluoreszierenden Eigenschaften voll zur Geltung kommen können. Das Prinzip dieser neuartigen NO[•]-Detektion ist in Schema 2 dargestellt.



Schema 2: Nachweisprinzip des neuen NO[•]-Reagenzes

Ziel der vorgelegten Arbeit war es deshalb, dieses theoretische Konzept erstmals praktisch zu realisieren. Dazu sollten geeignete Derivate von **1** mit potenten Fluorophoren entwickelt werden, die zur Detektion von NO[•] im biologischen Systemen geeignet sind.

Daraus ergeben sich folgende Aufgaben für diese Dissertation:

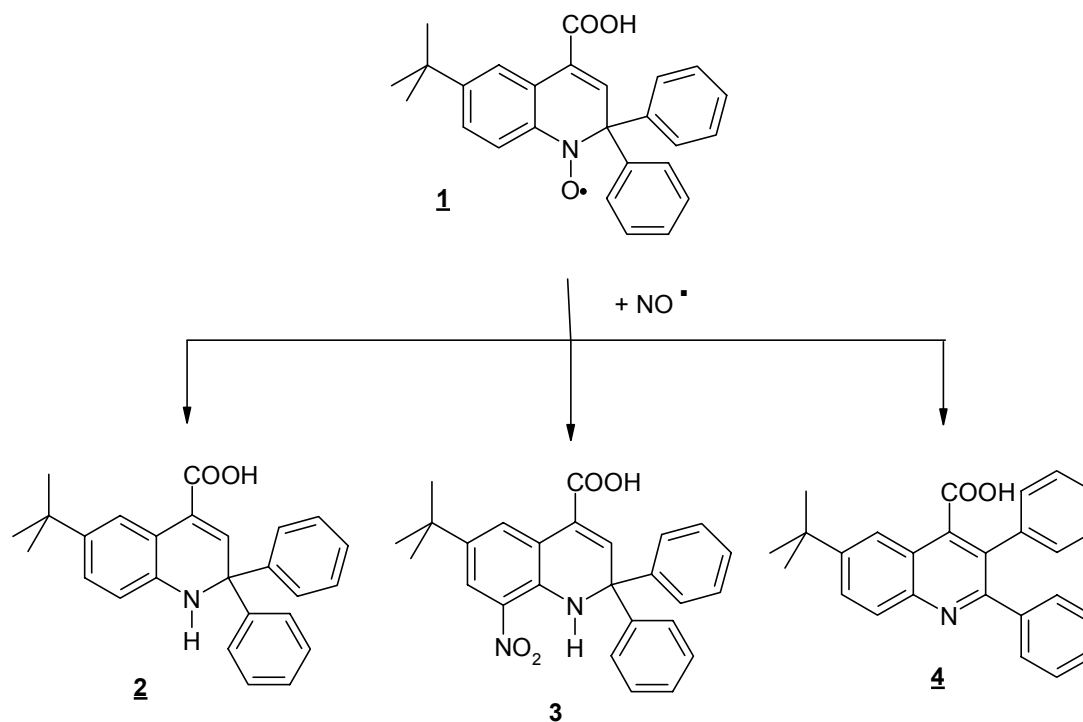
- Auswahl geeigneter Fluorophore als Kupplungspartner für **1**,
- Synthese und Charakterisierung radikalischer NOXYL-Derivate mit ausgewählten Fluorophoren,
- Durchführung der Nachweisreaktion von NO[•] mit den dargestellten Derivaten, unter Variation der Bedingungen,
- Isolierung und Strukturaufklärung der Reaktionsprodukte, sowie deren qualitative und quantitative Analytik,
- Auswahl geeigneter Reagenzien und deren Erprobung an Kulturen NO[•]-produzierender Zellen.

Damit sollte ein Beitrag zur Verbesserung einer orts- und zeitaufgelösten fluorimetrischen Detektion von NO[•] in biologischer Umgebung geleistet werden.

3 CHEMISCH-ALLGEMEINER TEIL

3.1 Synthesestrategie

Ziel dieser Arbeit war es, das Aminoxyl NOXYL **1** als Abfangreagenz für $\text{NO}^\bullet$ mit einem Fluorophor zu koppeln. Dadurch sollte eine fluorimetrische Detektion von $\text{NO}^\bullet$ ermöglicht werden, die eine deutliche Verbesserung der Nachweisgrenze herbeiführen sollte.



Schema 3: Hauptprodukte der $\text{NO}^\bullet$ -Reaktion mit NOXYL (**1**)

Grzesiok²⁹ und Höbler³¹ konnten zeigen, dass bei der Reaktion von **1** mit $\text{NO}^\bullet$ in Abhängigkeit von der $\text{NO}^\bullet$ -Konzentration und vom Sauerstoffangebot drei Hauptprodukte entstehen.

Im Vordergrund des Interesses stand seinerzeit das Nitroderivat **3** als Produkt eines direkten Nachweises von $\text{NO}^\bullet$, das hier in das Substrat eingebaut wurde. Die Detektion erfolgte mittels UV/Vis-Spektroskopie, die durch einen hohen Extinktionskoeffizienten zusätzlich begünstigt wird. Darüber hinaus konnte Höbler nachweisen, dass sich mit sinkender stationärer $\text{NO}^\bullet$ -Konzentration das Produktspektrum zu Ungunsten des Nitroproduktes verschiebt und der Anteil von **2** und **4** ansteigt³¹. Diese Tatsache muss bei einem fluorimetrischen Nachweis beachtet werden, da Fluorophore, die Nitrogruppen als

Substituenten aufweisen, wegen eines intramolekularen Quenching, nur eine geringe bzw. keine Fluoreszenz zeigen dürften.

Zur Kopplung eines Fluorophors an **1** bietet sich die Carboxylfunktion an. Zu den häufigsten Derivatisierungsreaktionen von Carbonsäuren zählen die Bildung von Estern und Amiden. Da die Ester- und Amiddarstellung selten ohne Aktivierungsreagenzien durchgeführt wird und deren Einfluss auf die Stabilität des Aminoxylradikals **1b** - **1d** (s. S. 27) schlecht abzuschätzen war, wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst verschiedene Reagenzien an unterschiedlichen Modellsubstanzen getestet. Bei der Auswahl der Modellcarbonsäuren wurden folgende Eigenschaften des Edukts und der zu erwartenden Produkte berücksichtigt:

- **1** ist ein paramagnetisches Radikal,
- **3** ist diamagnetisch, weist jedoch eine Nitrogruppe als Substituent auf,
- bei allen Strukturen **1** - **4** ist die Carboxylgruppe an einem sp^2 -hybridisierten C-Atom substituiert.

Die beiden ersten Eigenschaften sind für die fluorimetrischen Eigenschaften von Bedeutung, da sie ein intramolekulares Quenching^{61,62,63,64} verursachen. Der spezielle Charakter der Säuren könnte bei der Darstellung der Derivate von Bedeutung sein, da bekannt ist, dass die Reaktivität von Carbonsäuren deutlich von deren übriger Struktur abhängig ist⁶⁵. Aus diesem Grund wurden die fünf in Abb. 22 gezeigten Carbonsäuren als Modellsubstanzen ausgewählt, da sie insgesamt als geeignet erschienen, die physikochemischen und reaktiven Eigenschaften der Verbindung **1** – **4** reell widerzuspiegeln.

⁶¹ J. R. Lakowicz, *Prinziples of Fluorescence Spectroscopy*, **1999**, Sec. Ed., Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, Kap. 9.1.A

⁶² S. A. Green, D. J. Simpson, G. Zhou, P. S. Ho, N. V. Blough, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, S. 7337 - 7346

⁶³ J. A. Green, L. A. Singer, J. H. Parks, *J. Chem. Phys.* **1973**, S. 2690 - 2695

⁶⁴ G. G. Guilbault, *Pract. Fluorescence* **1973**, Marcel Dekker, Inc., New York, Kap. 3. E. II S.87 ff

⁶⁵ H. Beyer, W. Walter, *Lehrbuch der organischen Chemie*, 3. Auflage S. Hirzel Verlag, Stuttgart, **1991**

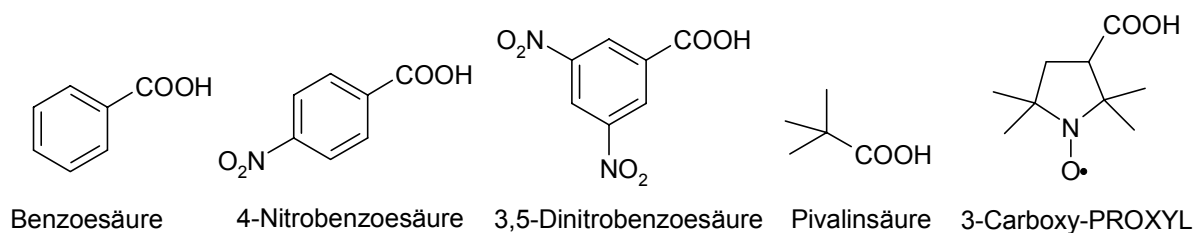


Abb. 22: verwendete Modellcarbonsäuren

An diesen Modellcarbonsäuren sollte erprobt werden, welche Fluorophore für den angestrebten Zweck geeignet sind, und welche Derivatisierungsmethode dann vorteilhaft anzuwenden war. Darüber hinaus war geplant, neben NOXYL selbst auch die zu erwartenden Produkte **2** – **4** der NO[•]-Reaktion, die als authentisches Material in geringer Menge zur Verfügung standen, unter den optimierten Reaktionsbedingungen mit den für den angestrebten Zweck als geeignet ermittelten Fluorophoren zu derivatisieren. Mit diesen Vergleichssubstanzen wurde angestrebt, die analytischen Reaktionen besser und zielgerichtet verfolgen zu können.

Aus der Fülle der kommerziell verfügbaren Fluoreszenzmarker kamen nur solche in Betracht, die über geeignete funktionelle Gruppen zur Derivatisierung einer Carbonsäure verfügen. Dabei war anzustreben, dass die Darstellung der Produkte aufgrund der Instabilität einiger Edukte möglichst unter milden Bedingungen und wegen geringster Mengen der verfügbaren Vergleichssubstanzen mit hohen Ausbeuten durchgeführt werden konnten. Eine zweite Forderung betraf die fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften wie z.B. die Differenz von Anregungs- und Emissionswellenlänge sowie die Quantenausbeute. Diese Eigenschaften waren für einen orts aufgelösten Nachweis von NO[•] in biologischer Umgebung (Zellen, Gewebe etc.) besonders wichtig, da es hier zu einer Konkurrenz mit sogenannten intrinsischen Fluorophoren⁶⁶ kommt. Insbesondere tragen Nucleinsäuren aber auch bestimmte Proteinbausteine (wie z.B. Tryptophan) und Redox-Coenzyme (wie NADH oder Flavine) zu dieser Eigenfluoreszenz⁶⁷ der Zellen bei, gegen die ein Fluoreszenzmarker sich behaupten muss. Da die intrinsischen Fluorophore in einem Bereich von 250 – 350 nm angeregt werden und im Bereich von ca. 280 – 470 nm⁶⁶ emittieren, ergibt sich daraus die Forderung, dass ein geeigneter Fluorophor eine Anregung oberhalb 350 nm aufweisen und

⁶⁶ R. Winter, F. Noll, *Meth. d. Biophysikal. Chemie*, B. G. Teubner, Stuttgart, **1998**, Kapitel V.5, S. 296 - 344

⁶⁷ C. R. Cantor, P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry*, Freeman & Company, San Francisco, **1980** Bd II

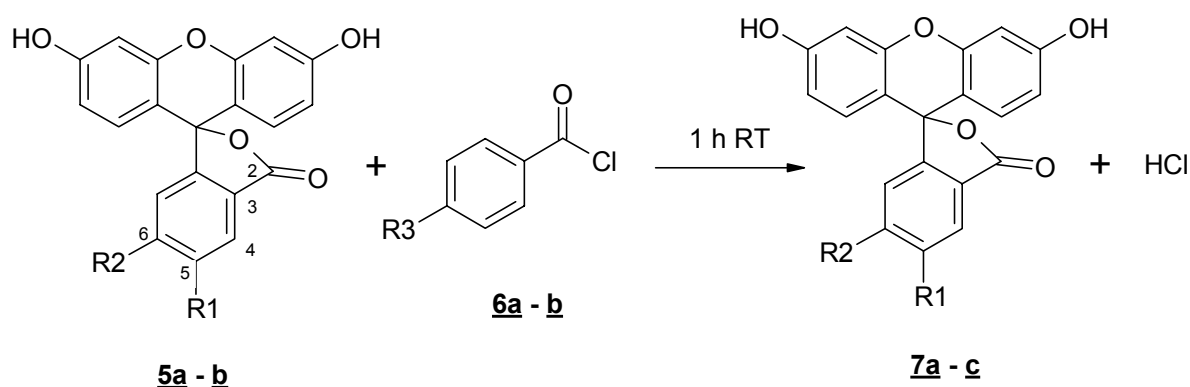
das Emissionsmaximum oberhalb von 470 nm liegen sollte. Dadurch könnte eine Beeinträchtigung bzw. Verfälschung der Aussage aufgrund der Eigenfluoreszenz der Zellen vermieden werden.

3.1.1 Synthese und Identifizierung von Aminofluoreszeinderivaten

Das Fluoreszein-Grundgerüst dient in der Literatur häufig als Standardsubstanz zur Beschreibung der Fluoreszenz⁶¹. Darüber hinaus werden seit kurzem auch Derivate des Fluoreszeins zum Nachweis von NO[•] eingesetzt⁶⁸, so dass zunächst auch im Rahmen dieser Arbeit ein großes Interesse an diesem Fluorophor bestand. Aus diesem Grund sollten zunächst ausgewählte Amide von 5-Aminofluoreszein **5a** und 6-Aminofluoreszein **5b** synthetisiert werden.

Darstellung von Amiden über Säurechloride

5- und 6-Aminofluoreszein wurden zunächst mit Benzoylchlorid **6a** und p-Nitrobenzoylchlorid **6b** zu den entsprechenden Amiden **7a** - **c** umgesetzt. Die Verwendung der beiden Benzoessäurederivate sollte erste Hinweise geben, ob und welchen Einfluss die Amidbildung auf die Fluoreszenzeigenschaften der Produkte hat. Die Darstellung der Amide **7a** - **c** erfolgte zunächst durch die Umsetzung der Komponenten in Aceton mit einem bis zu 5-fachem Überschuss der Säurechloride. Nach dieser einfachen Methode konnten die Amide **7a** - **c** (s. Abb. 23) ohne Hilfsbase in guter Ausbeute als kristalline Fällungen direkt aus den Ansätzen abgetrennt werden.

⁶⁸H. Kojima, Y. Urano, *Angew. Chem.* **1999**, 111, Nr. 21, S. 3419 - 3422

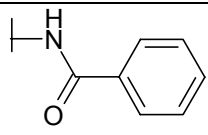
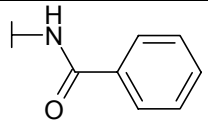
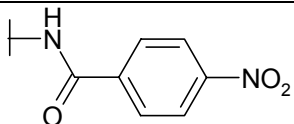
	R1	R2	R3
<u>5a</u>	NH ₂	H	
<u>5b</u>	H	NH ₂	
<u>6a</u>			H
<u>6b</u>			NO ₂
<u>7a</u>		H	
<u>7b</u>	H		
<u>7c</u>	H		

Abb. 23: Übersicht über die dargestellten Amidofluoreszeine

Die Charakterisierung der erhaltenen Amide **7a** – **c** erfolgte mittels Elementaranalyse, IR-Spektroskopie, Massenspektrometrie und ¹H-NMR-Spektroskopie.

¹H-NMR-Spektroskopie

Da das sehr breite Signal für die beiden phenolischen OH-Protonen zwischen 5 und 7 ppm die Interpretation erschwert hätten, wird in Abb. 24 das ¹H-NMR-Spektrum von **7c** in DMSO-d₆ nach Zusatz von D₂O exemplarisch dargestellt. Im Spektrum fallen zunächst zwei separierte Signale auf: ein mit D₂O nicht austauschbares Singulett für das Amid-NH-Proton bei 11 ppm und ein angespaltenes Singulett bei 7.75 ppm für H-1. Außerdem erkennt man zwei „Multipletts“, für jeweils 6 und 7 Protonen, die nach Inkrementberechnungen und dem Aufspaltungsmuster wie folgt zugeordnet werden können. Bei höchstem Feld erscheinen die 6 aromatischen Protonen des phenolischen Xanthen-Teils.

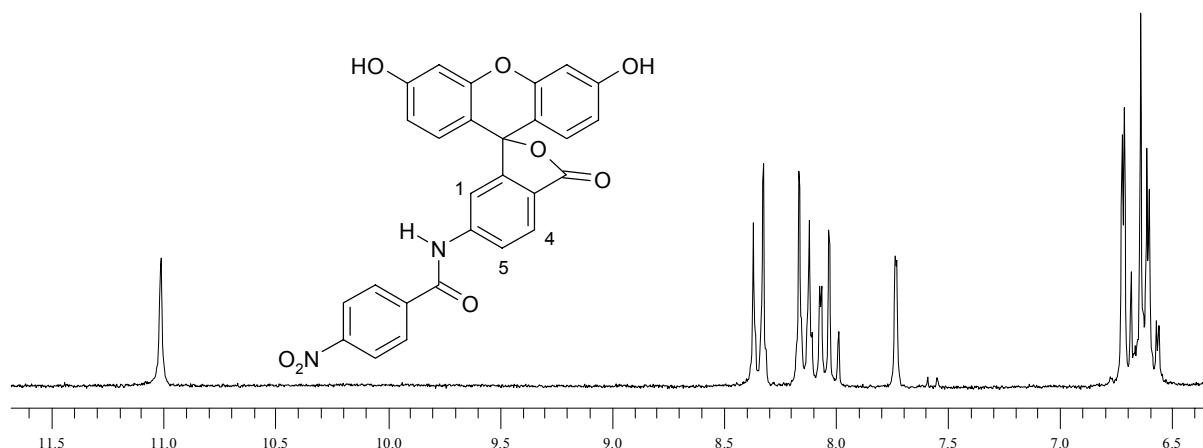


Abb. 24: ^1H -NMR-Spektrums von **7c** ($\text{DMSO-}d_6 + \text{D}_2\text{O}$)

Die Detailansicht ermöglicht eine exakte Auswertung der Daten im Bereich von 7.7 bis 8.4 ppm, dadurch können diese Signale sicher zugeordnet werden. Deutlich zu erkennen ist das typische AA'BB'-Signal der 4 Protonen des p-Nitrobenzamid-Teils zwischen 8.1 und 8.4 ppm. Die drei Protonen H-1, H-4 und H-5 spalten zu einem ABX-Spektraltyp auf. Dabei liegt X = H-1 bei höchstem Feld (7.73 ppm) und zeigt wegen der Kopplung mit H-5 eine Aufspaltung von ~ 1 Hz. Im AB-Teil erkennt man noch deutlich das Dublett um 8.02 ppm für H-4, während das Doppeldublett für H-5 im linken Teil vom großen Nachbarsignal aus dem AA'BB'-Teil überlagert wird und deshalb nicht mehr klar erkannt werden kann.

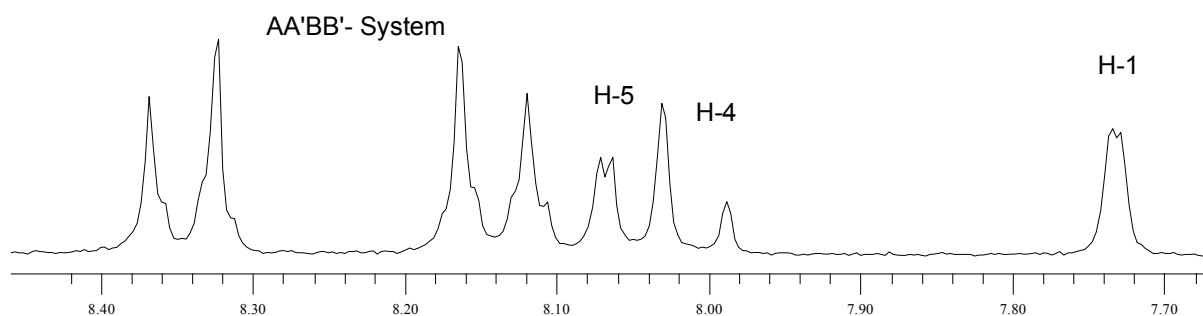


Abb. 25: Detailansicht des ^1H -NMR-Spektrums von **7c** ($\text{DMSO-}d_6 + \text{D}_2\text{O}$)

Vergleicht man das ^1H -NMR-Spektrum von **7c** mit dem des Ausgangsamins **5b** (s. Abb. 26) so erkennt man den Effekt der Acylierung des „Anilins“ als starke Tieffeldverschiebung der Protonen an Position 1, 4 und 5. Hier erscheinen diese Protonen als AMX-Typ bei 6.09 für H-1, bei 6.73 ppm für H-5 und bei 7.56 ppm für H-4.

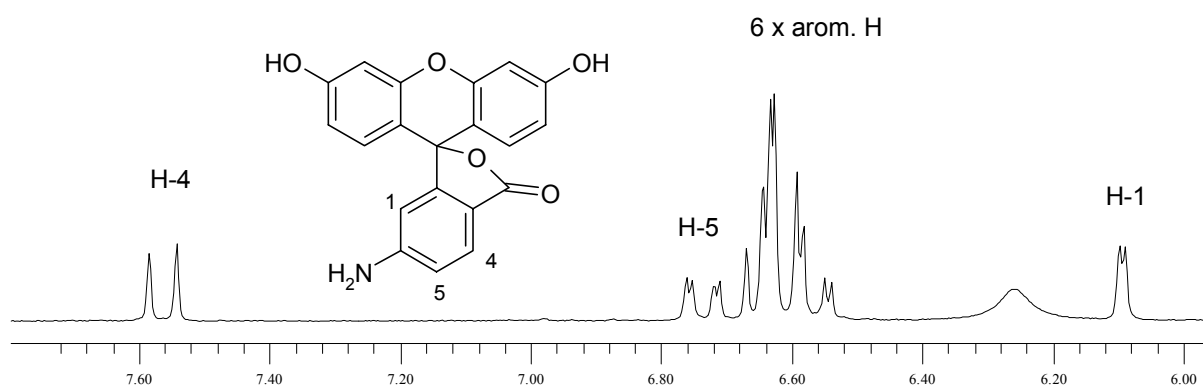


Abb. 26: Detailansicht des ^1H -NMR-Spektrum von **5b** in $\text{DMSO}-d_6$

Fluoreszenzspektroskopische Eigenschaften

Die beiden Ausgangsamine **5a** und **5b** zeigen gegenüber Fluoreszein ein deutliches intramolekulares Quenching, so dass die Quantenausbeuten im Bereich von 0.02⁶⁹ liegen. Ähnliche fluorimetrische Eigenschaften wie die des Fluoreszeins ergeben sich erst, wenn das nichtbindende Elektronenpaar des Amins durch kovalente oder elektrostatische Bindung unzugänglich für einen Elektronen-Transfer gemacht wird, was durch die Derivatisierung zum Amid in **7a** und **7b** erreicht⁶⁹ werden kann. Das Substrat **7c** zeigt eine verminderte Fluoreszenz, welches aber durch die Nitrogruppe hervorgerufen wird. 1990 konnte Munkholm zeigen, dass Nitrobenzoesäureamide von 5-Aminofluoreszein eine reduzierte Fluoreszenz aufweisen, wobei die Position der Nitrogruppe einen Einfluss auf das Ausmaß des Quenching besitzt⁶⁹.

Die Anregungs- und Emissionswellenlängen der Amide **7a** – **c** wurden in Methanol ermittelt (s. Tab. 1).

Substanz	Excitation [nm]	Emission [nm]
7a	470	518
7b	470	526
7c	474	526

Tab. 1: Excitations- und Emissionswellenlängen von **7a** – **c**

⁶⁹

C. Munkholm, D. R. Parkinson, D. R. Walt, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, S. 2608 - 2612

Anschließend wurden die Fluoreszenzintensitäten unterschiedlich konzentrierter Lösungen von **7a** – **c** bestimmt und in einem Diagramm dargestellt.

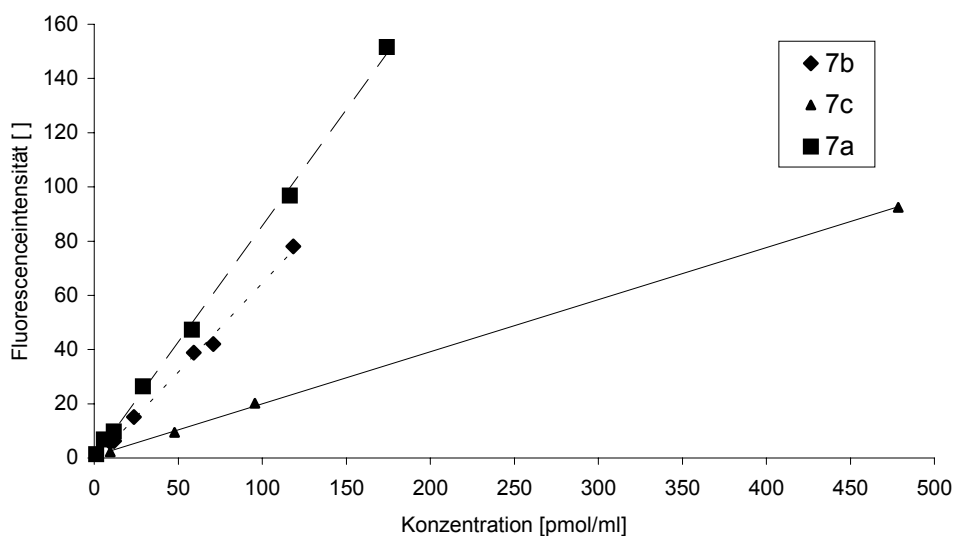


Abb. 27: Fluoreszenzintensität von **7a** - **7c** abhängig von der Konzentration

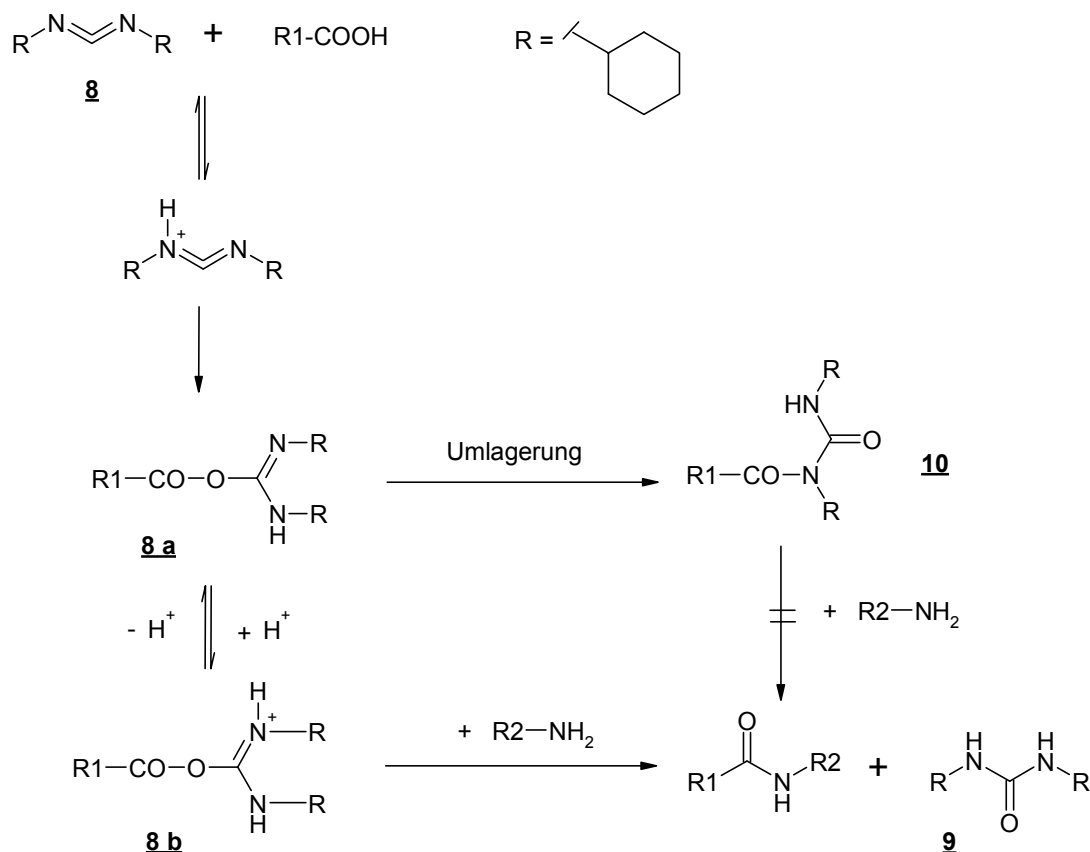
Aus Abb. 27 erkennt man einerseits, dass die Fluoreszenz aller Modellsubstanzen sehr gut linear mit der Konzentration zunimmt, andererseits weisen beide Benzoessäureamide **7a** und **7b** eine 5-fach-höhere Fluoreszenzintensität als das p-Nitrobenzoessäureamid **7c** auf. Diese Eigenschaften zeigen deutlich, dass Nitrogruppen als Substituenten im Fluorophor ein starkes Quenching verursacht. Diese Tatsache muss demnach auch beim Nachweis von NO[•] im Hinblick auf evtl. entstehende Nitroprodukte beachtet werden.

Nachdem die Acylierung der beiden Aminofluoreszeine mit den verschiedenen Benzoylchloriden in guter Ausbeute gelungen war, sollte auch NOXYL (**1**) auf diesem Weg derivatisiert werden. Doch scheiterten alle Versuche, das freie Radikal **1** mittels Thionylchlorid zum Säurechlorid umzusetzen. Selbst nach dem Abdestillieren des überschüssigen Thionylchlorids bei max. 30°C im Vakuum zersetzte sich **1** vollständig, so dass weder mit **5a** noch mit **5b** ein definiertes Produkt erhalten werden konnte.

Darstellung von Amiden mittels DCC-Methode

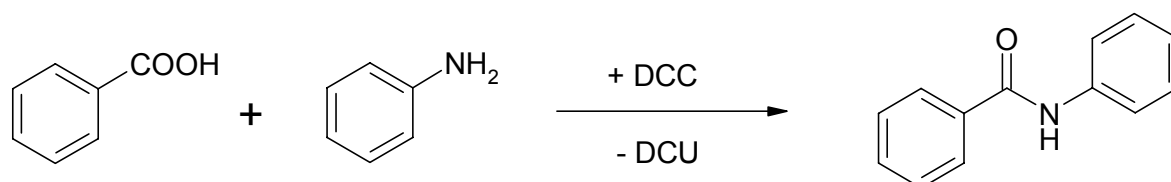
Da die Synthese der Amide aus **5a**, **5b** und **1** über das entsprechende Säurechlorid nicht möglich war, musste eine alternative Methode verwendet werden. Für die Synthese von

Peptiden wird häufig N,N'-**D**icyclohexylcarbodiimid (DCC) **8** verwendet⁷⁰. Hierbei wird die freie Carbonsäure direkt in eine aktive Zwischenstufe **8a/8b** verwandelt, welche anschließend mit dem Amin zum Amid reagiert, wobei das Harnstoffderivat **9** (DCU) als Nebenprodukt anfällt (s. Schema 4). Problematisch ist hierbei jedoch die Möglichkeit der Umlagerung von **8a** zu einem N-Acylharnstoffderivat **10**, welches nicht mehr mit dem Amin zum Amid reagieren kann.



Schema 4: Carbonsäureaktivierung mittels DCC **8** und Amiddarstellung

Vorversuche mit äquimolaren Mengen Benzoesäure und Anilin als Modellsubstanzen führten wie erwartet zu dem gewünschten Benzanilid in hoher Ausbeute.

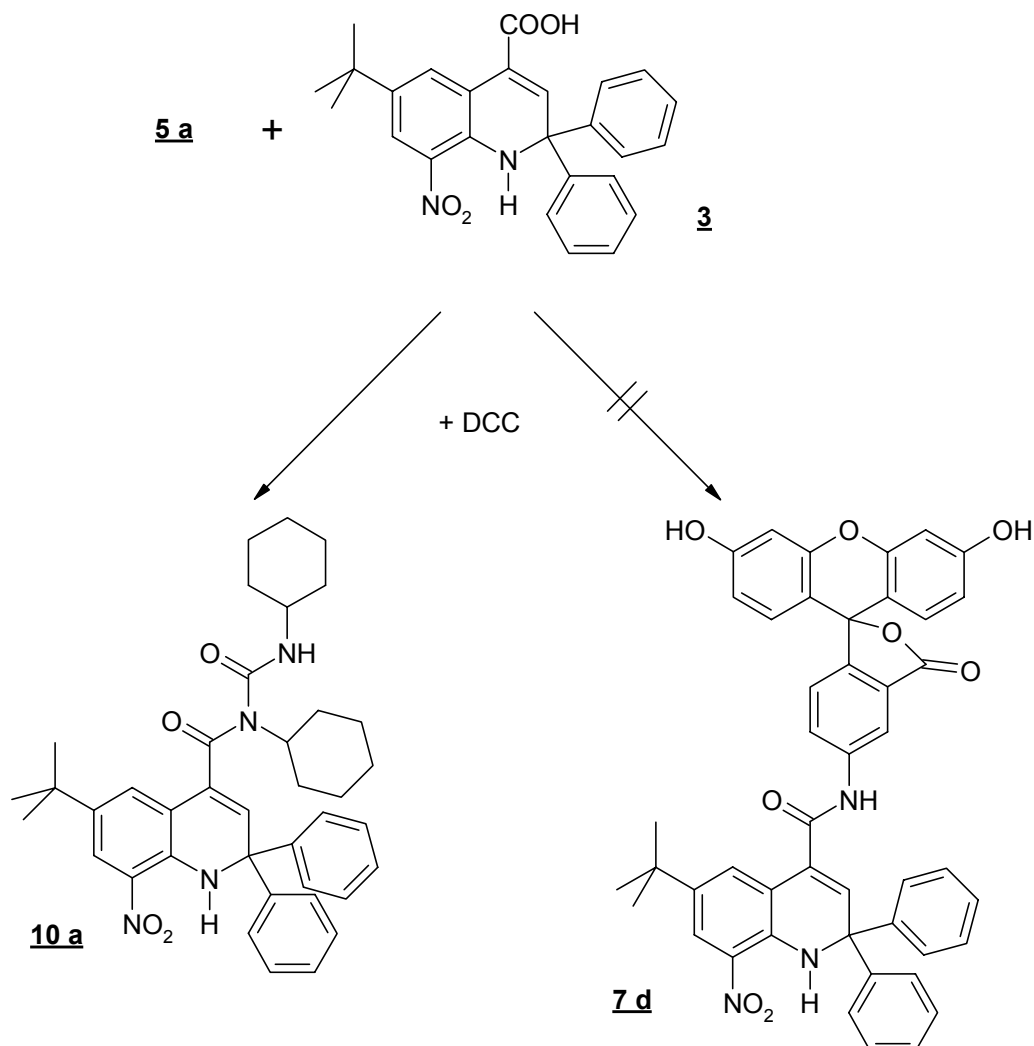


Schema 5: Darstellung von Benzanilid mittels DCC-Methode

⁷⁰

J. C. Sheehan, J. J. Hlavka, *J. org. Chem. Soc.* **1955**, 77, S. 103 - 105

Setzt man dagegen die Aminofluoreszeine **5a** bzw. **5b** mit Benzoessäure oder p-Nitrobenzoessäure nach dieser Methode um, erhält man nicht die vorher beschriebenen Amide **7a** – **7c**. Deswegen war es keine Überraschung, dass auch die Darstellung von **7d** auf diesem Weg nicht möglich war.



Schema 6: Umsetzung von **3** mit **5a** mittels DCC-Methode

Trotz vielfältiger Variation der Versuchsbedingungen erhielt man stets laut DC ein Produktgemisch, aus dem jedoch nur **10a** isoliert und charakterisiert werden konnte.

Damit erwies sich die DCC-Methode in Kombination mit den Aminofluoreszeinen zur Darstellung der gewünschten Zielstrukturen als nicht geeignet. Eine mögliche Ursache könnte die Multifunktionalität dieser Fluoreszenzsonden sein, da hier nicht nur die Aminogruppe als potentieller Reaktionspartner, sondern zusätzlich auch das Lacton sowie die beiden phenolischen Gruppen zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund wurden die Versuche mit den Aminofluoreszeinen als Fluoreszenzsonde an dieser Stelle abgebrochen.

3.1.2 Synthese und Charakterisierung von Dansylhydrazinderivaten

Dansylchlorid ist ein vielfach benutztes Reagenz zur Identifizierung und Quantifizierung von Aminosäuren⁷¹, da die entsprechenden Amidderivate eine intensive Fluoreszenz aufweisen. Daher wurde überprüft, ob Dansylhydrazin **11**, welches zur Funktionalisierung von Carbonylverbindungen und Carbonsäuren geeignet ist⁷², Hydrazide bildet, deren fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften für die Anwendung als NO⁺-Nachweisreagenz zweckmäßig sind.

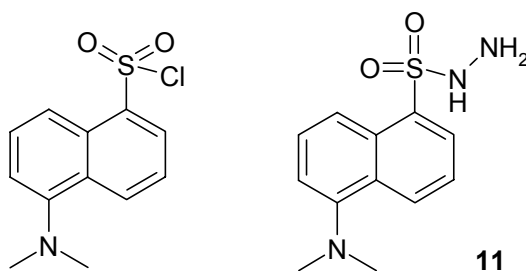
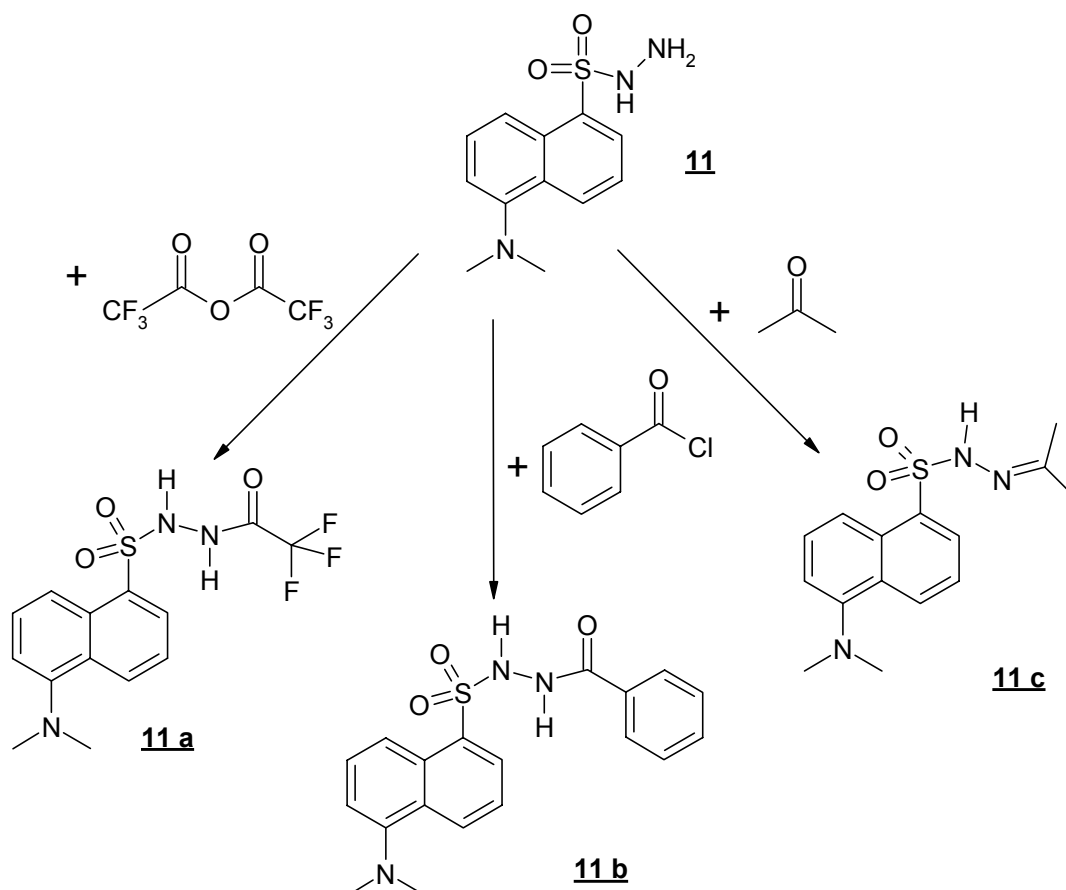


Abb. 28: *Dansylchlorid und Dansylhydrazin **11***

Da hier zunächst die Untersuchung der fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften im Blickpunkt des Interesses standen, wurden die Hydrazide **11a** und **11b**, sowie das Hydrazon des Acetons **11c** hergestellt.

⁷¹ K. Eger, R. Troschütz, H. J. Roth, *Arzneistoffanalyse*, 4. Auflage, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, **1999**, S. 156 ff

⁷² J. M. Anderson, *Anal. Biochem.* **1986**, 152, S. 146 - 150



Schema 7: Darstellung verschiedener Dansylhydrazinderivate

Die Darstellung von **11a** – **c** erfolgte durch die Anwendung der üblichen Methoden. Die analysenreinen Substanzen wurden mittels IR, MS und ^1H -NMR-Spektroskopie und Elementaranalyse charakterisiert.

Fluoreszenzspektroskopische Eigenschaften

Zur Bestimmung der fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften wurden die Spektren von **11** und **11a** – **c** in Methanol als Lösungsmittel aufgenommen. Die Anregung aller Substanzen erfolgte im Bereich von 340 nm. Dabei zeigten sie ein Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von ca. 530 nm. Exemplarisch sind die beiden Absorptions- und die Emissionsspektren von **11a** und **11c** kombiniert in Abb. 29 dargestellt.

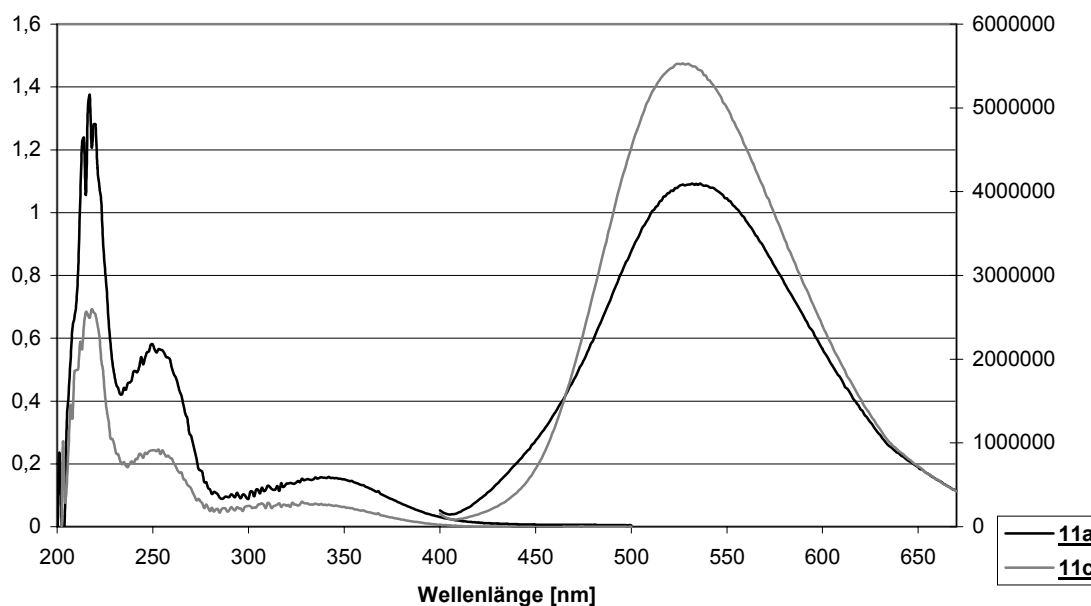


Abb. 29: Fluoreszenzspektren von **11a** und **11c** (in Methanol)

Die oben abgebildeten Spektren zeigen, dass es einerseits zu keiner Überlappung der Anregungs- und Emissionsspektren kommt, und andererseits dass es unerheblich ist, ob eine Derivatisierung zum Hydrazid oder zum Hydrazon durchgeführt wird, da die Spektren fast identisch sind. Im Hinblick auf eine Anwendung als $\text{NO}^{\bullet}$ -Sonde im biologischen Bereich ist die Anregung im Bereich von 340 nm wegen der Anregung zellulärer Strukturen als eher ungünstig anzusehen⁶⁶. Positiv ist jedoch die Tatsache, dass das Emissionsmaximum bei ca. 530 nm liegt, also außerhalb des Emissionsbereichs intrinsischer Fluorophore. Das Fluoreszenzspektren zeigt aber außerdem, dass das Absorptionsmaximum (hier 225 nm) nicht unweigerlich der Anregungswellenlänge entsprechen muss.

Zusätzlich zu den Fluoreszenzspektren wurden die Quantenausbeuten Φ_f von **11** und den Derivaten **11a** – **c** in Methanol gegenüber Chininsulfat als Referenzsubstanz⁷³ bestimmt (s. Tab. 2).

⁷³

J. N. Demas, G. A. Crosby, *The Journal of Physical Chemistry* **1971**, 75, S. 991 - 1024

Substanz	Quantenausbeute* Φ_f
<u>11</u>	0.39
<u>11a</u>	0.26
<u>11b</u>	0.13
<u>11c</u>	0.26

*Referenz: Chininsulfat in 1 N H₂SO₄ [0.55]⁷⁴

Tab. 2: Quantenausbeuten von **11** und **11a** – **c** (in Methanol)

Der Ausgangsfluorophor Dansylhydrazin **11** zeigt eine Quantenausbeute von 0.39, die sich durch die Derivatisierung zu den Hydraziden deutlich verringert. Während das Trifluoracetylhydrazid **11a** die gleiche Quantenausbeute wie das Hydrazon **11c** aufweist, sinkt diese beim Benzohydrazid **11b** überraschenderweise auf die Hälfte ab.

Im Verlauf der Quantenausbeutenbestimmung zeigten die methanolischen Lösungen von **11a** und **11b** schon nach 1h eine deutliche Verfärbung, was auf eine verminderte Photostabilität dieser Derivate und damit auf eine Zersetzung hinweist.

Nach Auswertung aller Fakten ergab sich, dass die Verwendung von Dansylhydrazin als Fluorophor für den angestrebten Zweck dieser Arbeit nicht günstig erscheint, da die Produkte einerseits nicht photostabil sind und andererseits eine relativ geringe Quantenausbeute erwarten lassen.

3.1.3 Synthese und Charakterisierung von Cumarinestern

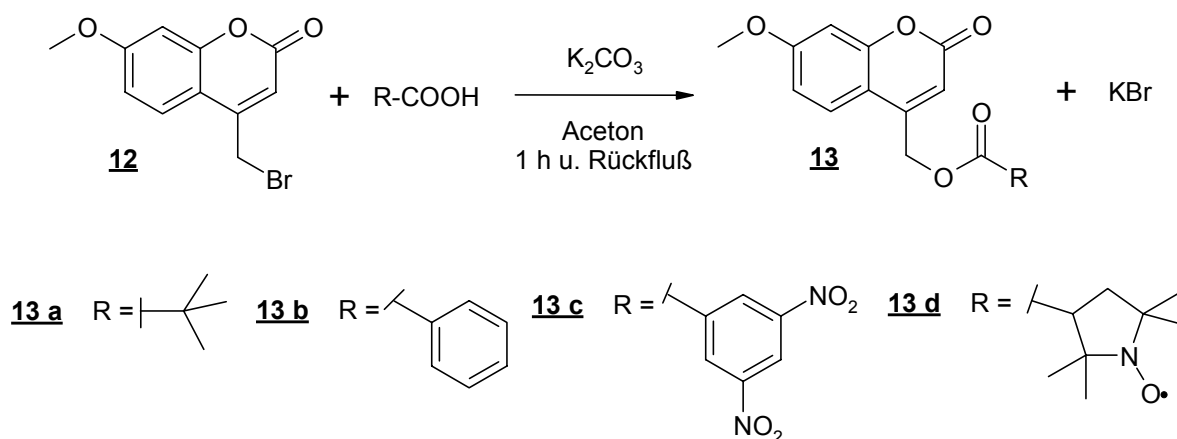
Auf der Suche nach potenten Fluorophoren stößt man immer wieder auf das CumarinGrundgerüst⁶¹. Pharmazeutisch werden Cumarine z.B. Phenprocoumon (Marcumar®) als Vitamin-K Antagonist eingesetzt⁷⁵. Die hervorragenden fluorimetrischen Eigenschaften der Cumarine werden z.B. zur Prüfung auf Verfälschungen von Bibernellwurzeln durch ähnlichen Umbelliferen⁷⁶ oder für den Nachweis von Acetessigsäure mit Resorcin im Harn genutzt. Die Verwendung von Cumarinen als Fluoreszenzsonden und damit die Ausnutzung ihrer fluorimetrischen Eigenschaften ist äußerst vielfältig.

⁷⁴ G. Jones II, W. R. Jackson, *Chemical Physics Letters* **1980**, 72, S. 391 - 395

⁷⁵ E. Mutschler, *Arzneimitteltherapie*, 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlags GmbH, Stuttgart, **1996**, S. 428 ff

⁷⁶ E. Steinegger, R. Hänsel, *Pharmakognosie*, Springer Verlag, Berlin, **1992**, S. 376 - 383

Im Hinblick auf die Problemstellung in dieser Arbeit war besonders die Kopplung fluoreszierender Cumarinderivate an Carbonsäuren von Bedeutung. Als potentielles Reagenz bot sich dazu das kommerziell verfügbare 4-Bromomethyl-7-methoxycumarin (**12**) an, das u.a. seit Mitte der 70er Jahre im Bereich der toxikologischen Analyse von Herbiziden⁷⁷ Anwendung findet. Dabei erfolgt die Darstellung der 7-Methoxycumarin-4-methylcarbonsäureester **13** mittels Ein-Topf-Synthese⁷⁸ analog Schema 8. In Anlehnung an die in Literatur^{77,78} angegebene Vorschrift wurden zunächst die Modellester **13a** – **d** hergestellt.



Schema 8: Darstellung und Übersicht der 7-Methoxycumarin-4-methylcarbon-säureester **13a** – **d**

Dabei interessierte insbesondere, ob die erforderlichen experimentellen Bedingungen geeignet waren, um auf die Problemsubstanzen (NOXYL und dessen NO[•]-Reaktionsprodukte) übertragen werden zu können. Außerdem sollte an diesen Estern untersucht werden, wie sich die physikochemischen Eigenschaften, insbesondere das fluoreszenzspektroskopische Verhalten durch die Variation der Säurekomponente verändert. Mit **13a** – **d** konnten auf diesem Weg Modellsubstanzen zugänglich gemacht werden, welche u.a. als Quencher fungieren sollten⁶¹. Die Charakterisierung der dargestellten Cumarinester erfolgte durch Elementaranalyse, IR-Spektroskopie, Massenspektrometrie sowie ¹H-NMR-Spektroskopie. Das Radikal **13d** wurde zusätzlich an Hand des ESR-Spektrums identifiziert (s. S. 73).

⁷⁷ W. Dünges, *Chromatographia* **1976**, 9, S. 624 - 626

⁷⁸ W. Dünges, *Analytical Chemistry* **1977**, 49, S. 442 - 445

Fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften

Zur Charakterisierung der optischen Eigenschaften wurden die Fluoreszenzspektren und die Quantenausbeuten Φ_f des Bromids **12** und der vier Ester **13a** - **d** bestimmt. In Abb. 30 sind die Spektren von **13a** und **13b** exemplarisch abgebildet.

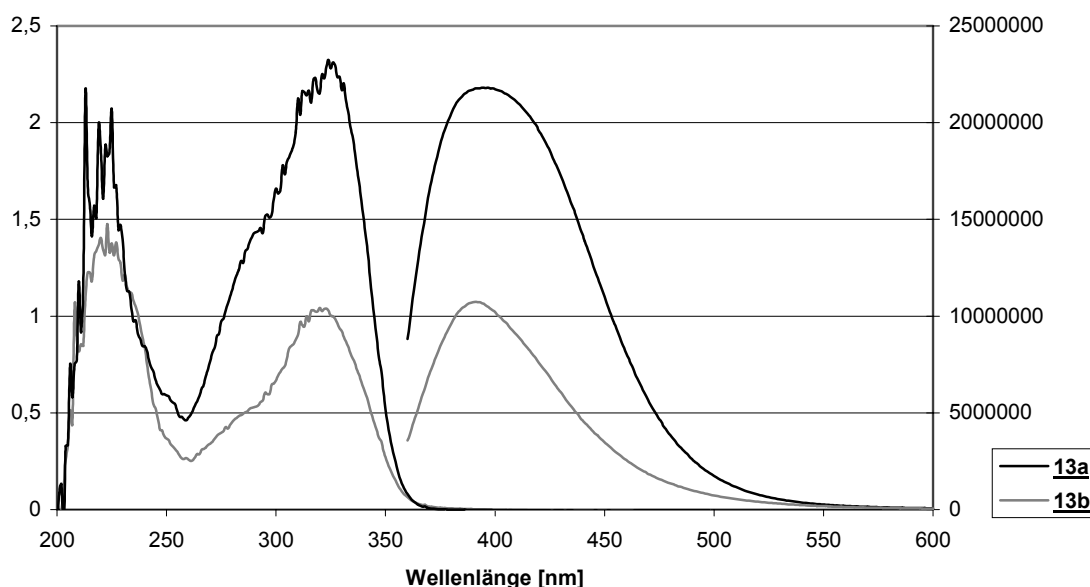


Abb. 30: Fluoreszenzspektren von **13a** und **b** (in Methanol)

Die Maxima der Excitations- und Emissionswellenlängen sowie die Quantenausbeuten sind in Tab. 3 angegeben.

Substanz (Formel s. S. 44)	Excitation [nm]	Emission [nm]	Quanten- ausbeute Φ_f^*
12	356	399	0.16
13a	346	392	0.20
13b	339	396	0.23
13c	320	392	0.01
13d	325	401	0.11

*Referenz: Chininsulfat in 1 N H₂SO₄ [0.55]⁷⁴

Tab. 3: Fluoreszenzspektroskopische Eigenschaften der Methoxycumarinester

Aus den ermittelten Daten für die Wellenlängen der Anregung und der Emission erkennt man bereits die Probleme, die sich in dieser Stoffklasse ergeben würden. Durch die Interaktion mit natürlichen Zellbestandteilen (intrinsische Fluoreszenz) dürfte die Detektion

von NO[•]-Reaktionsprodukten erheblich erschwert wenn nicht sogar unmöglich sein. Noch gravierender aber dürften die Probleme sein, die sich bei der insgesamt bescheidenen Quantenausbeute ergeben. (max. ~20% bei **13a/b**). Die weitere Verminderung beim Edukt **12** ist auf den Schweratomeffekt^{61,64} von Brom zurückzuführen. Durch die Einführung der Nitrogruppen wird bei **13c** die Fluoreszenz praktisch unterdrückt, während die radikalische Nitroxidstruktur von **13d** ebenfalls eine starke Reduktion der Quantenausbeute bewirkt, die jedoch nicht so drastisch ausfällt wie bei **13c**.

Überträgt man diese Befunde auf die entsprechenden NOXYL-Derivate, so war zu befürchten, dass das Ausgangsradikal im Vergleich zu den erwarteten Reaktionsprodukten eine zu starke Fluoreszenz aufweist. Damit wäre der NO[•]-Nachweis im biologischen Milieu nicht besonders effizient zu führen.

Außer den insgesamt ungünstigen fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften gab es noch weitere Gründe von der Darstellung entsprechender Cumarinester in der NOXYL-Reihe abzusehen. Die experimentellen Bedingungen zur basenkatalysierten Esterbildung⁷⁸ schienen wegen der Instabilität von NOXYL (**1**) nicht sehr geeignet. Zudem sollte auch im Hinblick auf eine biologische Anwendung bedacht werden, dass intrazelluläre Esterasen die Struktur des Reagenzes zunichte machen könnten. Dennoch schien die Verwendung von anderen Cumarinen als Fluoreszenzsonden besonders interessant, da diese Stoffklasse wegen ihrer günstigen fluorimetrischen Eigenschaften in der Literatur häufig als Fluoreszenzsonde⁷⁹ eingesetzt wird. Deshalb sollte im weiteren Verlauf der Arbeit nach besseren Fluorophoren aus dieser Stoffklasse gesucht werden.

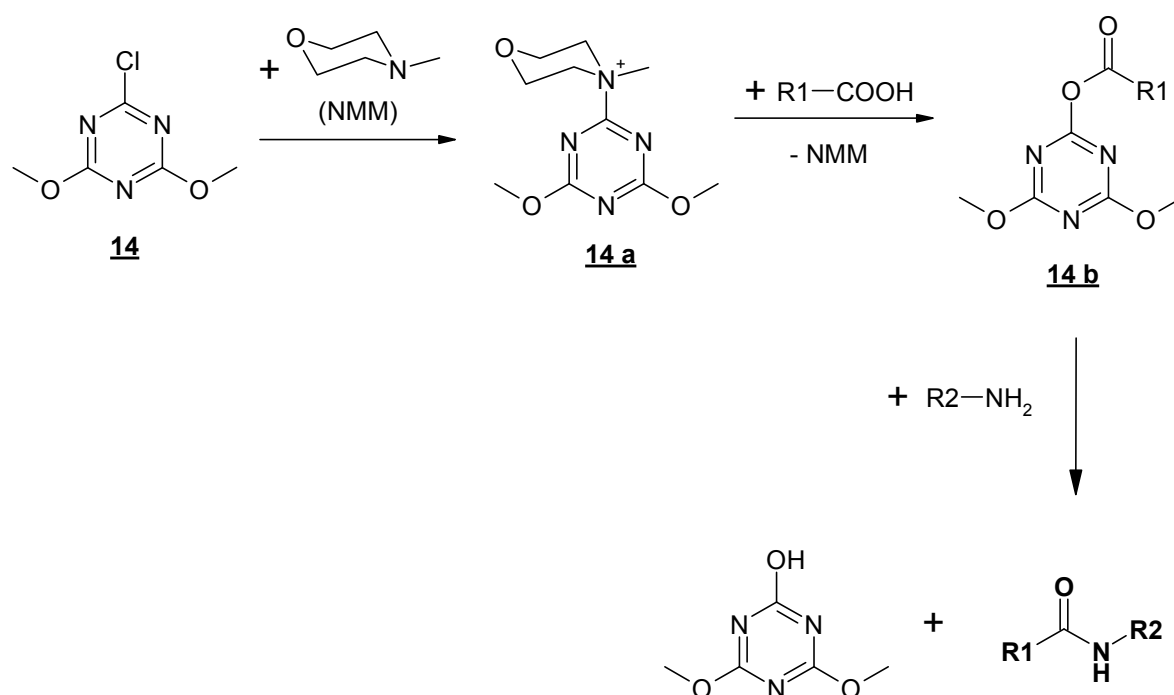
3.1.4 Erprobung der CDMT-Methode zur Darstellung von Amiden

Aus den Ergebnissen der bisher durchgeführten Vorversuche zur Kupplung von Fluorophoren an Carbonsäuren wurde abgeleitet, dass für den angestrebten Zweck nur solche Methoden in Frage kommen, bei denen die Aktivierung der Säurekomponente möglichst schonend erfolgt (Instabilität von NOXYL!). Darüber hinaus war jedoch entscheidend, dass die anschließende Reaktion mit der Alkohol- oder Aminkomponente möglichst einheitlich und in guter Ausbeute zu den gewünschten Derivaten führt. Die DCC-

⁷⁹ K. Hoffmann, R. M. Söll, A. G. Beck-Sickinger, M. Jung, *Bioconjugate Chem.* **2001**, 12, S. 51-55

Methode ist zwar zur Aktivierung von Carbonsäuren geeignet, war die rasche Umlagerung zum aktivierten Intermediats jedoch der Amidbildung bevorzugt. Deshalb wurde nach Alternativen zur schonenden aber effizienten Synthese entsprechender Säurederivate gesucht.

Dazu bot sich das 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin (CDMT) (**14**) an, das häufig zur Darstellung von Estern, Carbonsäureanhydriden und Amiden⁸⁰ verwendet wird. **14** bildet mit N-Methylmorpholin (NMM) das reaktive Zwischenprodukt **14a**, welches mit einer Carbonsäure zum Intermediat **14b** und anschließend mit einem Amin zum Amid⁸¹ reagiert (s. Schema 9).



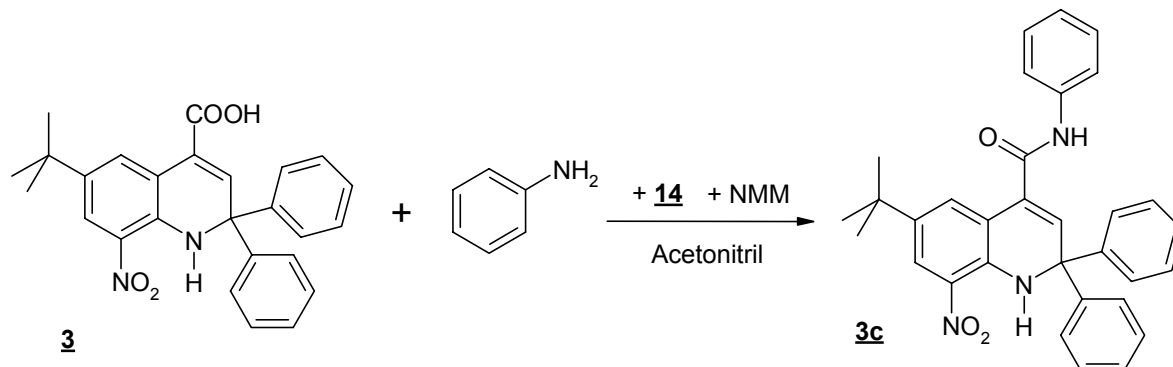
Schema 9: Allgemeine Darstellung von Amiden mittels der CDMT-Methode

Diese Methode wurde zunächst für die Darstellung des Anilids **3c** erprobt, da die Carbonsäure **3** in ausreichender Menge zur Verfügung stand (s. Schema 10). Durch Abänderung der Literaturvorschrift konnte das dort angegebene Eintopfverfahren dahingehend optimiert werden, dass NMM zu einer Lösung der übrigen Ausgangskomponenten in Acetonitril unter Eiskühlung zugetropft wird (s. AAV 2). Die Aufarbeitung des Ansatzes ist einfach (s. Exp. Teil) und **3c** war direkt in respektablen

⁸⁰ Z. J. Kaminski, *Tetrahedron Letters* **1985**, 26, S. 2901 - 2904

⁸¹ Z. J. Kaminski, P. Paneth, J. Rudzinski, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, S. 4248 - 4255

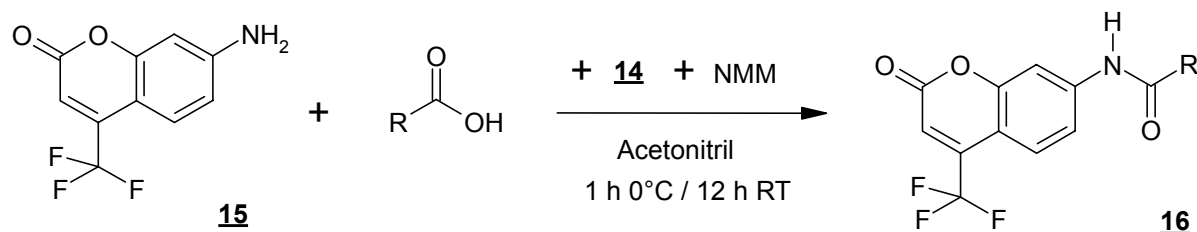
Ausbeuten erhältlich. Damit bot sich dieses Verfahren auch für die Darstellung weiterer Amide im Sinne der Problemstellung an. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit konnte durch Optimierung der CDMT-Methode oftmals auch eine quantitative Umsetzung erreicht werden.



Schema 10: Darstellung von **3c** mittels CDMT-Methode

3.1.5 Acylierung von 7-Amino-4-trifluormethylcumarin **15** mittels CDMT-Methode

Das Aminocumarin **15** wird in der Literatur häufig als empfindliche Fluoreszenzsonde beschrieben⁸². Aus diesem Grund wurde dieses kommerziell verfügbare Cumarin ausgewählt, um daraus nach der optimierten CDMT-Methode die Amide der eingangs erwähnten Modellcarbonsäuren darzustellen und die spektroskopischen Eigenschaften zu ermitteln. Dabei interessierte insbesondere das fluorimetrische Verhalten der Produkte. Die auf S. 46 beschriebene modifizierte Eintopfsynthese lieferte nach optimierter Aufarbeitung und SC-Reinigung an Kieselgel die Amide **16a** – **e** in guten Ausbeuten als analysenreine, kristalline Substanzen (s. Abb. 31).



⁸²

E. R. Bissell, A. R. Mitchell, R. E. Smith, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, S. 2283 - 2287

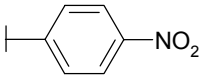
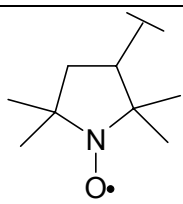
16	R
<u>a</u>	- CH ₃
<u>b</u>	- C(CH ₃) ₃
<u>c</u>	- C ₆ H ₅
<u>d</u>	
<u>e</u>	

Abb. 31: Übersicht über die dargestellten Amide **16a** – **e**

Die Charakterisierung der Amide **16a** – **e** erfolgte mittels der gebräuchlichen Methoden: Elementaranalyse, Massenspektrometrie, ¹H-NMR-Spektroskopie, IR-Spektroskopie und durch die Aufnahme eines ESR-Spektrums von **16e** (s. S. 73).

¹H-NMR-Spektroskopie

Die ¹H-NMR-Spektren der Trifluormethylcumarine **16** weisen eine Besonderheit auf, die am Beispiel von **16d** genauer betrachtet werden soll (s. Abb. 32).

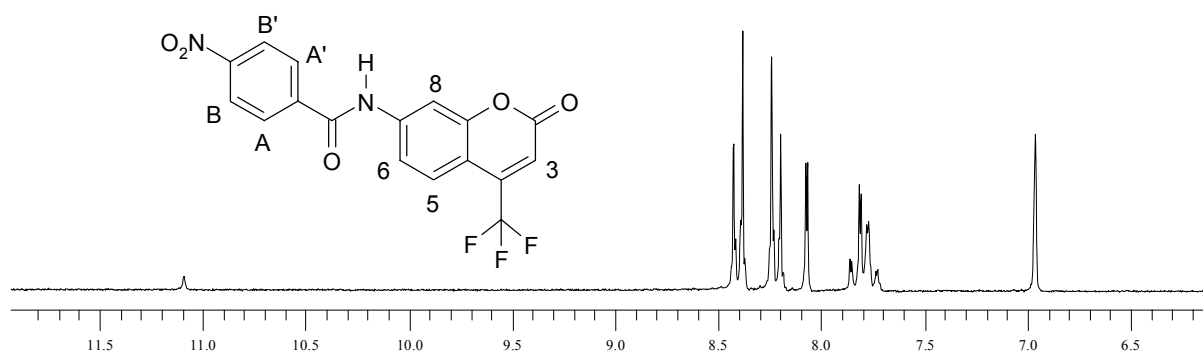


Abb. 32: ¹H-NMR-Spektrum von **16d** (DMSO-d₆)

Während H-3 das erwartete Singulett bei höchstem Feld ergibt, zeigen die drei übrigen Protonen an den Positionen 5, 6 und 8 ein auf den ersten Blick merkwürdiges Kopplungsmuster das in der Detailansicht Abb. 33 besser zu erkennen ist.

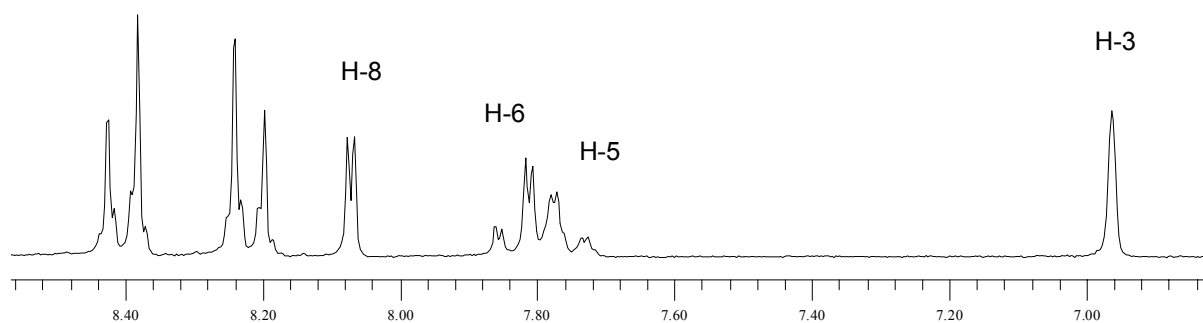


Abb. 33: Detailansicht des ^1H -NMR-Spektrums von **16d** ($\text{DMSO}-d_6$)

Abgesetzt vom typischen AA'BB'-Multipllett für die 4 Protonen des p-Nitrobenzamid-Teils erkennt man die bei höherem Feld liegenden Signale für H-8 als schmales Dublett mit einer Kopplungskonstante $^4J_{6,8} = 1.8 \text{ Hz}$. Diese Kopplung findet sich auch im Doppeldublett für H-6 bei $\delta > 7.8 \text{ ppm}$ ($^3J_{5,6} = 8.8 \text{ Hz}$; $^4J_{6,8} = 1.8 \text{ Hz}$). Das erwartete Dublett für H-5 ($^3J_{5,6} = 8.8 \text{ Hz}$) ist jedoch ebenfalls noch weiter aufgespalten, wenn gleich die Kopplung nicht gut aufgelöst ist.

Da diese Aufspaltung nur von einer Fernkopplung mit den Fluoratomen der Trifluormethylgruppe herrühren kann, müsste man eigentlich eine doppelte Quartettstruktur für H-5 erwarten, die bei **16d** nur angedeutet, im Spektrum von **15** (s. Abb. 34) jedoch deutlich zu erkennen ist. Dort ist auch die entsprechende Kopplungskonstanten von $\sim 2.1 \text{ Hz}$ direkt aus dem Spektrum zu entnehmen.

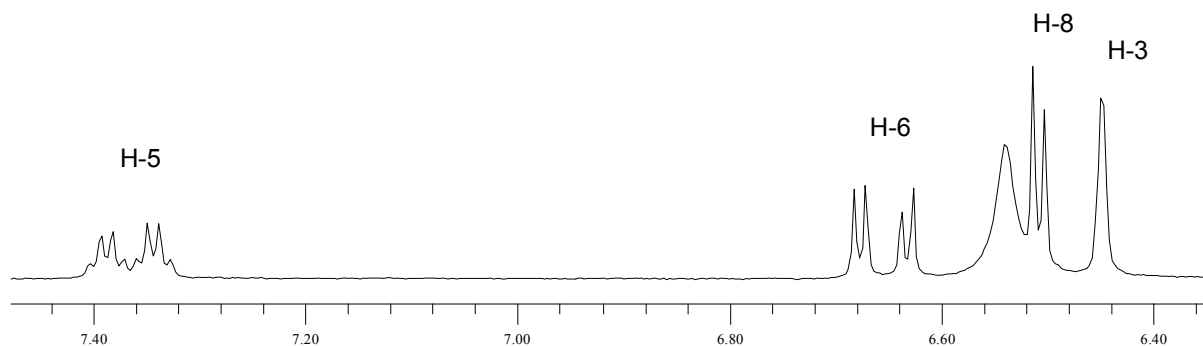


Abb. 34: Detailansicht des ^1H -NMR-Spektrums von **15** ($\text{DMSO}-d_6$)

Fluoreszenzspektroskopische Eigenschaften

Zur Charakterisierung der 7-Amino-4-trifluormethylcumarin-Derivate wurden die Fluoreszenzspektren, Anregungs- und Emissionswellenlängen, sowie die Quantenausbeuten Φ_f ermittelt und in Tab. 4 zusammengefasst.

Substanz (Formel s. S. 49)	Excitation [nm]	Emission [nm]	Quanten- ausbeute Φ_f^*
<u>15</u>	372	480	0.72
<u>16a</u>	370	440	0.44
<u>16b</u>	374	450	0.42
<u>16c</u>	340	454	0.46
<u>16d</u>	-	-	0.01
<u>16e</u>	-	-	0.04

*Referenz: Chininsulfat in 1 N H₂SO₄ [0.55]⁷⁴

Tab. 4: Fluoreszenzspektroskopische Daten von **15** und **16a – e**

In Abb. 35 wird das Fluoreszenzspektrum von **16c** exemplarisch dargestellt.

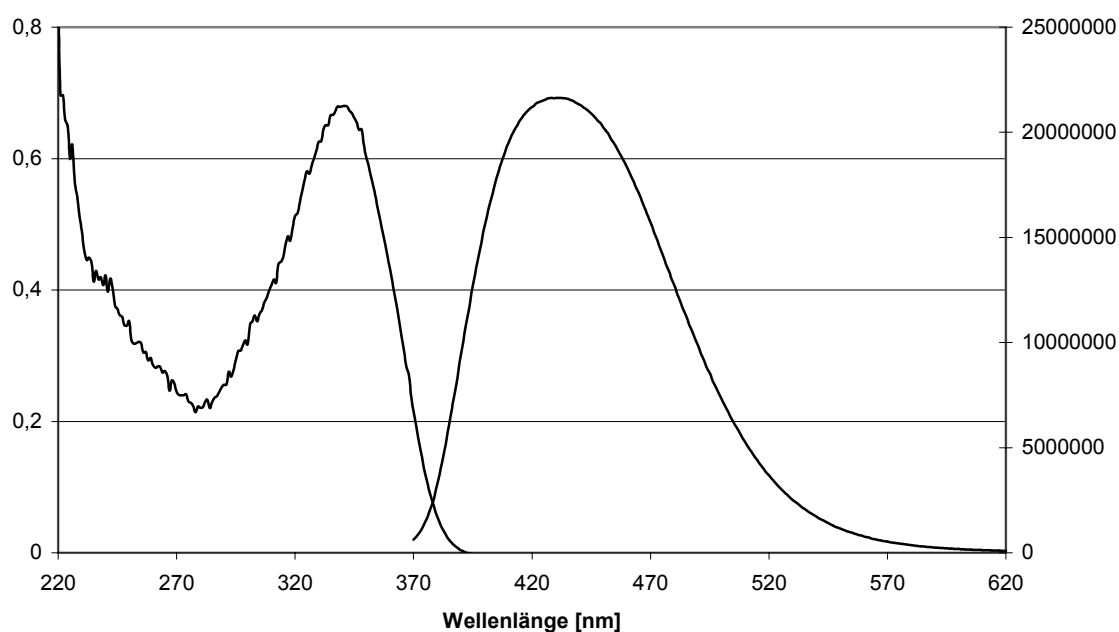


Abb. 35: Fluoreszenzspektrum von **16c**

Das Edukt 7-Amino-4-trifluormethylcumarin **15** weist eine sehr hohe Quantenausbeute Φ_f auf, während die Einführung des Nitroxids oder eines NO₂-Substituenten auch hier wieder die Quantenausbeuten erheblich mindern. Aus Tab. 4 geht jedoch auch hervor, dass die Amide ohne einen quenchenden Substituenten (**16a – c**) eine stark verminderte Φ_f zeigen. Die Anregung der Amide erfolgt im Bereich von ca. 370 nm und die Emission bei ca. 450 nm liegt (vgl. Tab. 4), dadurch liegt eine Überlappung mit dem Anregungs- und Emissionsbereich der intrinsischen Fluorophore vor, wodurch eine eindeutige Aussagekraft

der $\text{NO}^\bullet$ -Nachweisreaktion erschwert würde. Die Verminderte Fluoreszenz der Trifluorcumarinamide bzw. die höhere Quantenausbeute von **15** nutzte E. R. Bissell zur Charakterisierung von Peptidasen⁸².

3.2 Synthese und Charakterisierung von Derivaten der „Butterflyaminocumarine“ (BAC)

In der Literatur⁸³ ist beschrieben, dass die Quantenausbeute von 7-Aminocumarinen steigt, wenn man von primären zu tertiären Aminogruppen in Position 7 übergeht, wobei die Einbettung des Stickstoffes in ein starres Ringsystem noch größere Effekte zeigte. Die so optimierte Struktur wird auch als „N-6-Butterflyaminocumarin“ (BAC) bezeichnet (s. Abb. 36), wobei 6 für die Ringgröße der „Schmetterlingsflügel“ steht.

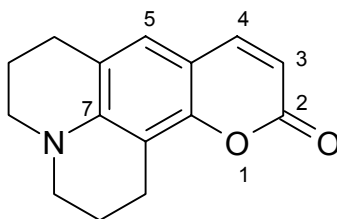


Abb. 36: Grundstruktur der „N-6-Butterflyaminocumarine“ (BAC)

Außerdem weisen derartige Cumarine in polaren Lösungsmitteln eine bis zu 2500-fach größere Photostabilität als Fluoreszein, eine 1000-fach größere Stabilität als 7-Diethylamino-4-methylcumarin und eine 50-fach größere Stabilität als Rhodamin 6G⁸⁴ gegenüber einem Xenon Laser auf⁸³.

Diese vielversprechenden „N-6-Butterflyaminocumarine“ (BAC's) wurden deshalb als Fluorophore ausgewählt und sollten im weiteren Verlauf der Arbeit näher untersucht werden. Deshalb soll hier kurz auf die Nomenklatur und Bezifferung des gesamten Grundgerüsts eingegangen werden (s. Abb. 37):

⁸³ C. S. Chaurasia, J. M. Kauffman, *J. Heterocyclic Chem.* **1990**, 27, S. 727 - 733

⁸⁴ A. N. Flechter, D. E. Bliss, J. M. Kauffman, *Opt. Commun.* **1975**, 47

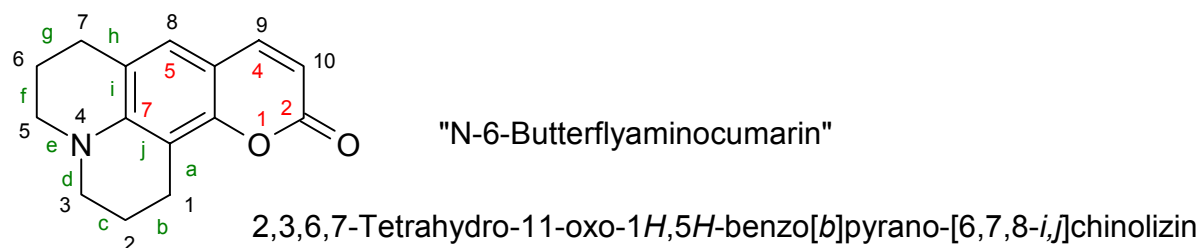
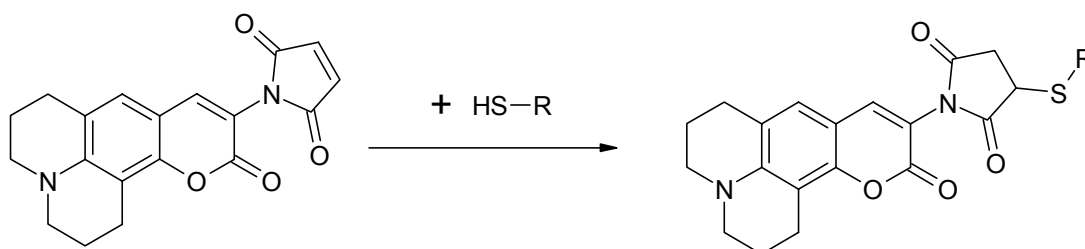


Abb. 37: Nummerierung und Benennung von BAC lt. Chemical Abstracts

Aufgrund einer Ausnahme-Regel besitzt das Chinolizin die höchste Priorität des Systems. Daraus resultiert die korrekte Bezeichnung des Grundgerüsts, die in Abb. 37 angegeben ist

In der Bioanalytik werden Derivate dieser Cumarine für verschiedene Zwecke verwendet: so dient das Maleinsäureimid (BACM) zum Nachweis von Thiolen⁸³.



Schema 11: BACM als Thiol-Reagenz

Das Benzoxazol-Derivat wird auch als Laserfarbstoff C-525 bezeichnet und verstärkt spezifisch die Chemilumineszenz von angeregten Triplett-Carbonylverbindungen. Es wird zum Nachweis von kurzlebigen Dioxetanen verwandt⁸⁵.

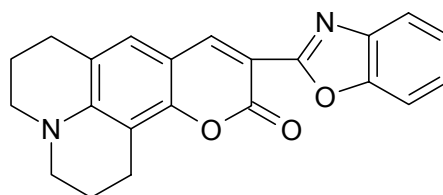


Abb. 38: Laserfarbstoff C-525

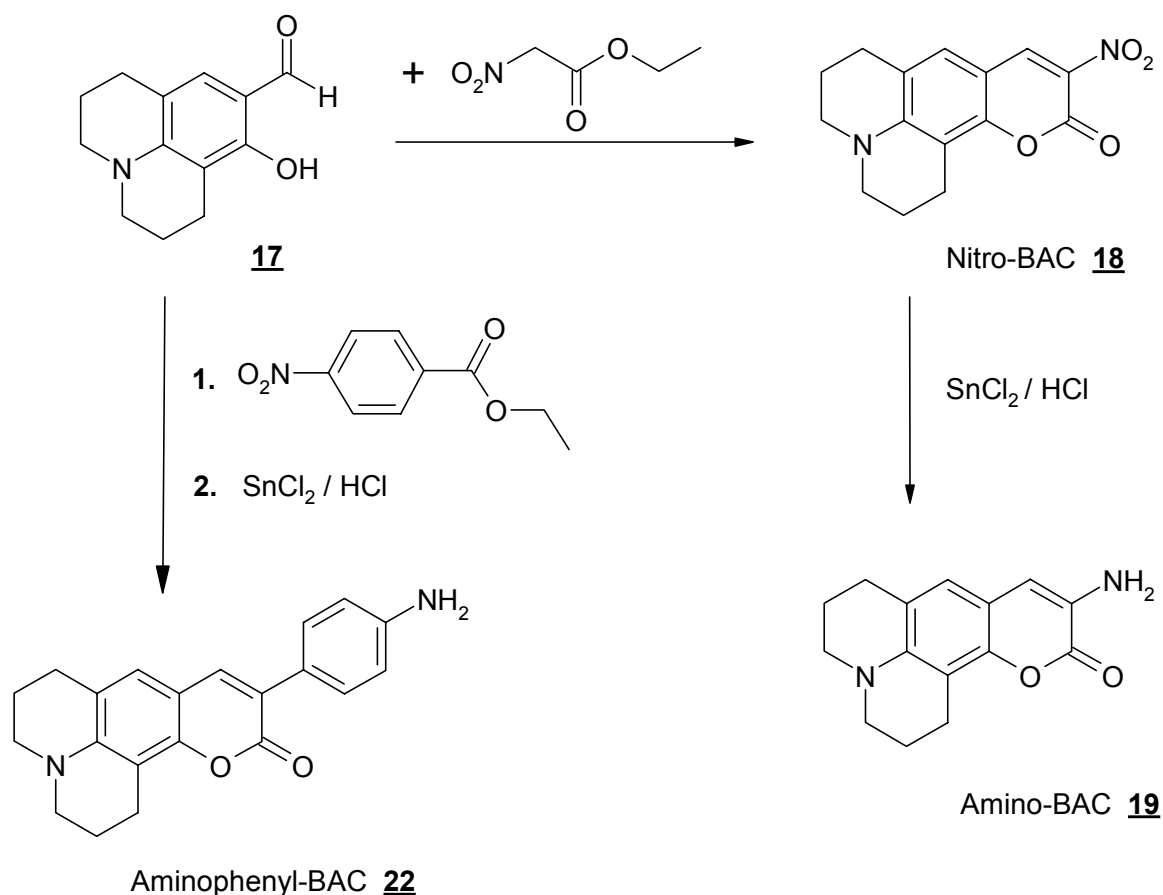
3.2.1 Auswahl und Darstellung geeigneter BAC-Derivate

Für die Problemstellung in dieser Arbeit schienen solche Amino-BAC-Derivate geeignet, bei denen nach der Acylierung die günstigen fluorimetrischen Eigenschaften möglichst in vollem Umfang erhalten bleiben. Solche Amino-BAC-Derivate sind in der Literatur beschrieben,

⁸⁵

V. S. Sharov, K. Briviba, H. Sies, *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, 26, S. 833 - 843

doch sind sie nicht kommerziell verfügbar. Deshalb mussten die beiden Derivate **19** (Amino-BAC) und **22** (Aminophenyl-BAC) nach Literaturangaben zunächst dargestellt und charakterisiert werden. Dabei konnte die Vorschrift an einigen Stellen verbessert und so die Ausbeute und Reinheit der Produkte gesteigert werden. Die Synthese geht vom Phenolaldehyd **17** aus, der mit Ethylnitroacetat zum Nitro-BAC **18** cyclisiert wird. Nach der Reduktion mit Zinn(II)-chlorid erhält man das Amino-BAC **19** in praktisch quantitativer Ausbeute. Auf gleichem Weg wurde das phenyloge Nitroderivat **21** und durch Reduktion das Aminophenyl-BAC-Derivat **22** in analysenreiner Form dargestellt.



Schema 12: Synthese von Amino-BAC **19** und Aminophenyl-BAC **22**

3.2.1.1 Synthese und Charakterisierung von Amido-BAC-Derivaten (**20**)

Die Darstellung der Amide **20** erfolgte nach der optimierten CDMT-Methode (s. S. 46). Als Säurekomponenten dienten die bereits früher verwendeten „Modellsäuren“, NOXYL selbst (**20g**), sowie zwei Chinolincarbonsäuren, die als Vorstufen von **1** in ausreichender Menge zur Verfügung standen. Die Isolierung der Amide **20** war z.T. sehr aufwändig, da die üblichen Extraktionensmethoden nicht direkt zu analysenreinen Produkten führten. Außerdem kam es bei längerer Bearbeitung der Ansätze zunehmend zu einer

fortschreitenden Zersetzung der Produkte. Daher war es notwendig die Rohprodukte einer präparativen SC zu unterziehen. Auf diesem Weg konnten alle Derivate **20a** – **g** in analysenreiner Form, wenn auch z.T. in geringer Ausbeute, zugänglich gemacht werden.

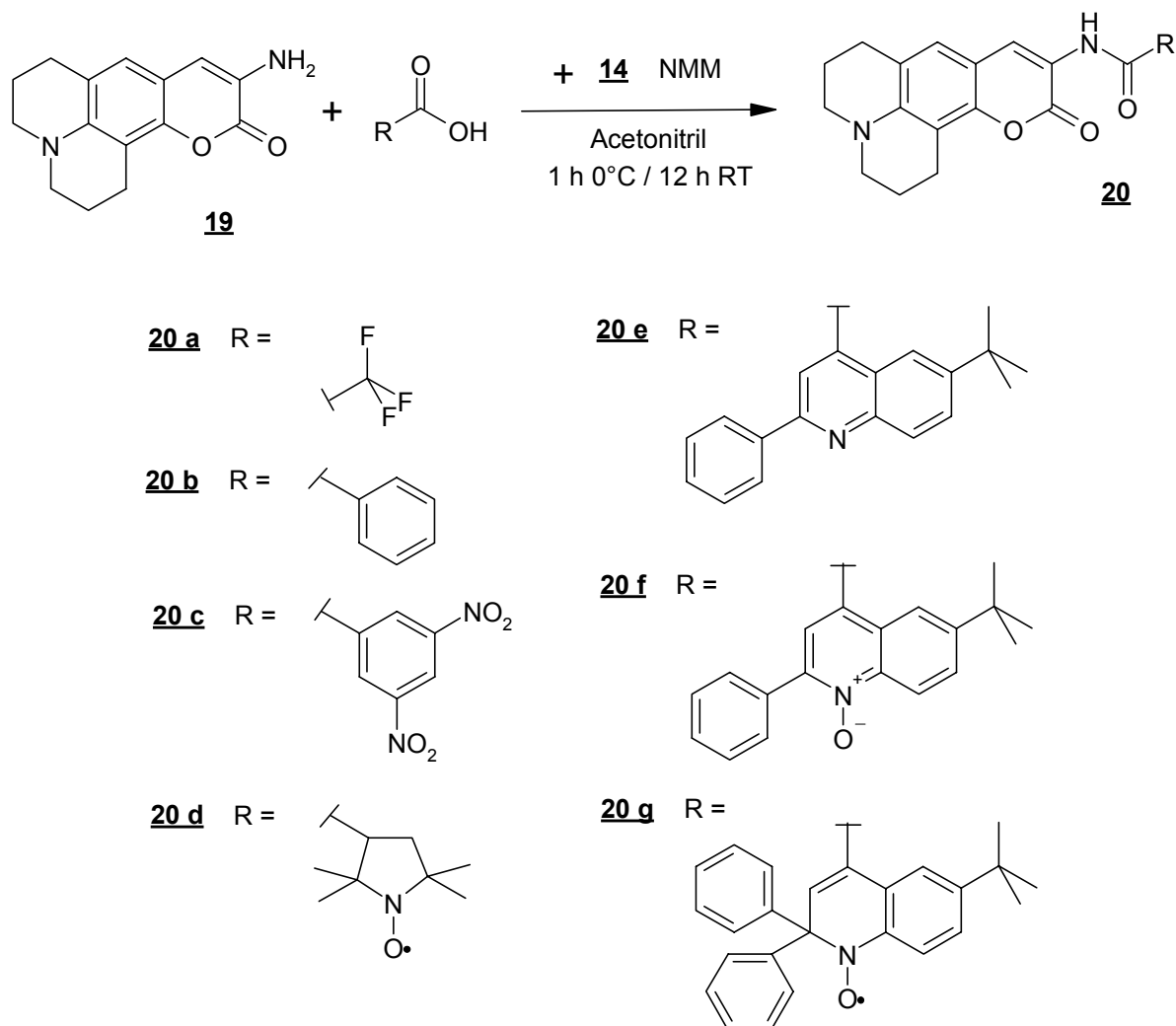


Abb. 39: Übersicht über die dargestellten Amido-BAC-Derivate **20a** - **g**

3.2.1.2 Charakterisierung der Amido-BAC-Derivate

Die in Abb. 39 aufgeführten Amide **20a** – **g** wurden durch Elementaranalyse, IR-Spektroskopie, Massenspektrometrie und ^1H -NMR-Spektroskopie – im Fall der Radikale **20d** und **20g** mittels ESR-Spektroskopie (s. S. 73) - charakterisiert. Nachfolgend soll am Beispiel von **20f** die spektroskopischen Eigenschaften dieser Stoffklasse beschrieben werden.

Infrarotspektroskopie

Im IR-Spektrum von **20f** (KBr-Preßling) fallen die intensiven Absorptionsbanden im Carbonylbereich auf, die dem Lacton (1715 cm^{-1}) und dem Amid (bei 1623 und 1558 cm^{-1}) zugeordnet werden können. Dagegen sind die NH-Banden des sekundären Amids im Bereich von $3300 - 3400\text{ cm}^{-1}$ nur schwach ausgeprägt.

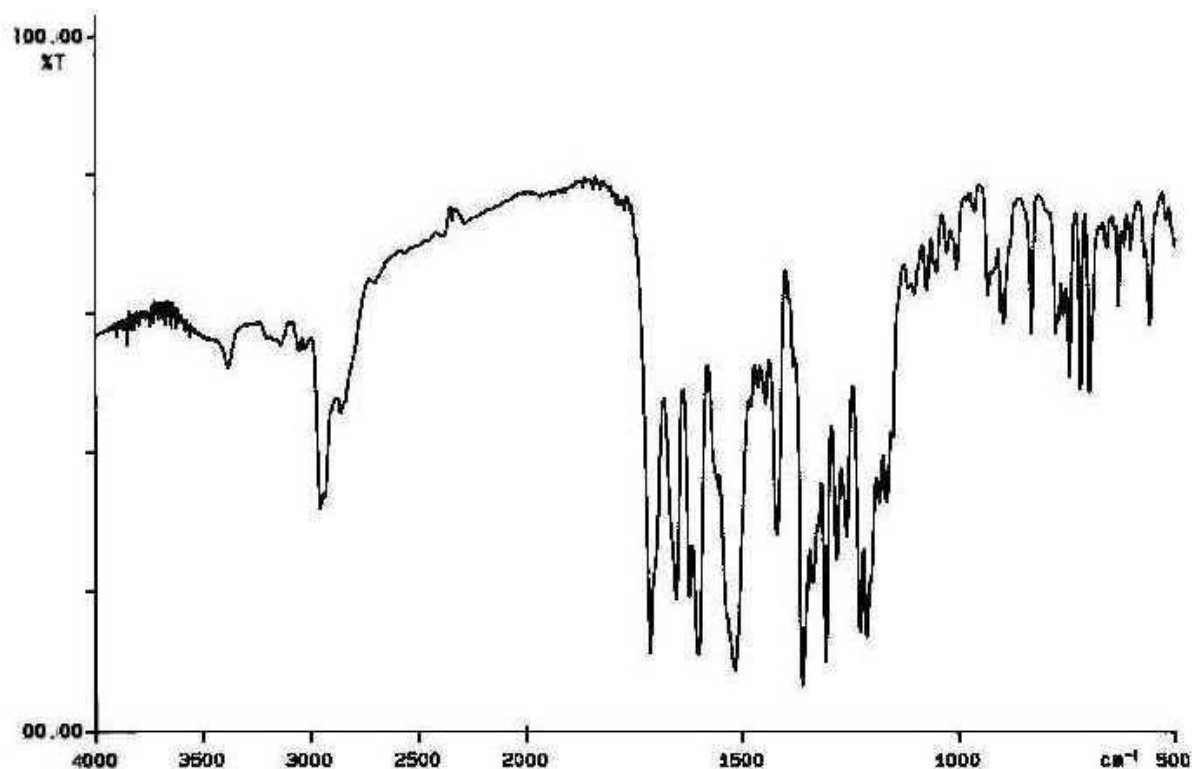


Abb. 40: IR-Spektrum von **20f** (KBr-Preßling)

Massenspektrometrie

Die mittels Elektronenstoßionisation bei 70 eV aufgenommenen Massenspektren der Amide **20** zeigen intensive Molekülionen, während beim N-oxid **20f** nur das nach Abspaltung des Sauerstoffs resultierende Bruchstück bei $m/z = 543$ registriert wird, das dann allerdings den Basispeak darstellt (s. Abb. 41).

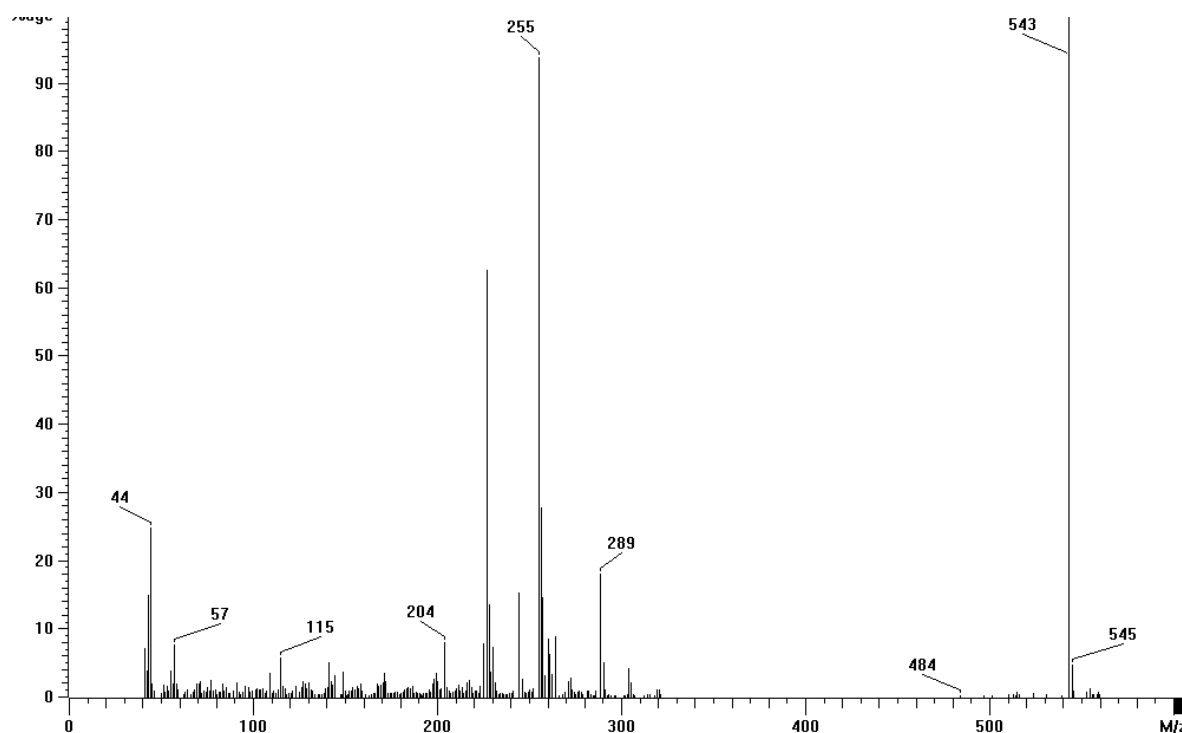


Abb. 41: MS-Spektrum von **20f** (Elektronenstoßionisation)

Nach Spaltung der Amidbindung wird das Amino-BAC-Fragment bei $m/z = 255$ mit fast ebenso hoher Intensität registriert. Durch Elimination von CO bildet sich daraus das entsprechende Benzofuran mit $m/z = 227$. Interessant ist das Bruchstück geringer Intensität bei $m/z = 304$, das offensichtlich aus der Amidspaltung des intakten N-Oxids stammt ($559 - 255 = 304$).

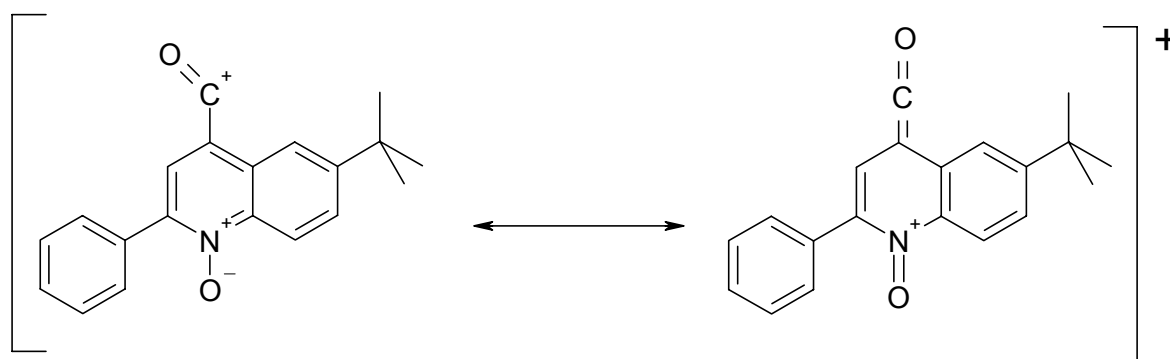


Abb. 42: Mögliche Struktur des Bruchstücks $m/z = 304$

Seine Stabilität dürfte von einer Delokalisierung des Acylions herrühren (s. Abb. 42), so dass daraus nicht der Sauerstoff, sondern bevorzugt eine Methylgruppe aus dem *tert.*-Butyl-Rest abgespalten wird ($304 - 15 = 289$).

¹H-NMR-Spektroskopie

Im ¹H-NMR-Spektrum von **20f** (s. Abb. 43) sind die Protonen des BAC-Anteils gut zu erkennen. Neben den beiden Singulets bei δ 7.0 (H-8) und 7.8 ppm (H-9) erkennt man die Signale des Chinolizidinteils wie sie in der Ausschnittsvergrößerung zu geordnet sind. Während die „mittleren“ Methylenprotonen praktisch magnetisch äquivalent sind, unterscheiden sich die dem Stickstoff benachbarten CH₂-Gruppen wenig, die „benzylichen“ Protonen an C-1 und C-7 jedoch so deutlich, dass sie als getrennte Triplets registriert werden.

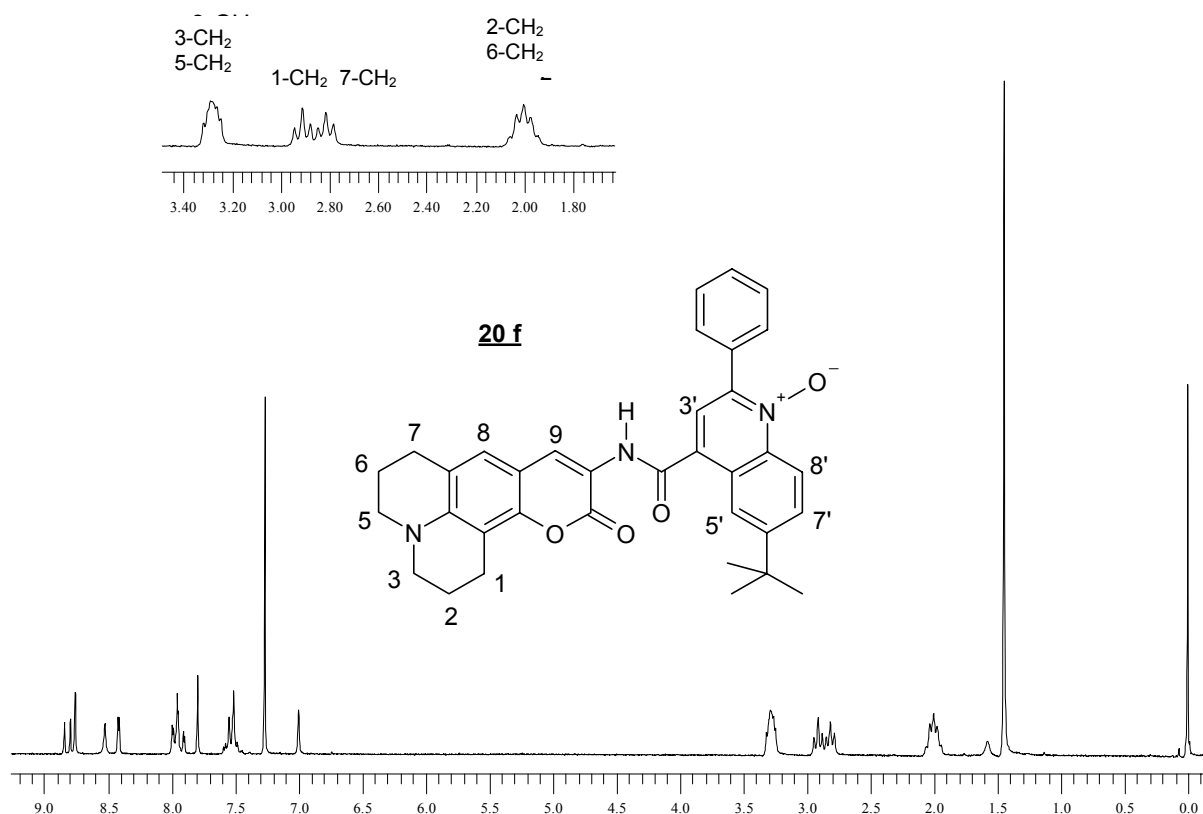


Abb. 43: 200 MHz ¹H-NMR-Spektrum von **20f** (CDCl₃)

Auch fast alle Protonen des Chinolin-N-Oxids ergeben separate Signale (s. Abb. 44). Nur das Doppeldublett für H-7' ist mit dem Multipllett für die beiden ortho-ständigen Protonen des Phenylsubstituenten überlagert.

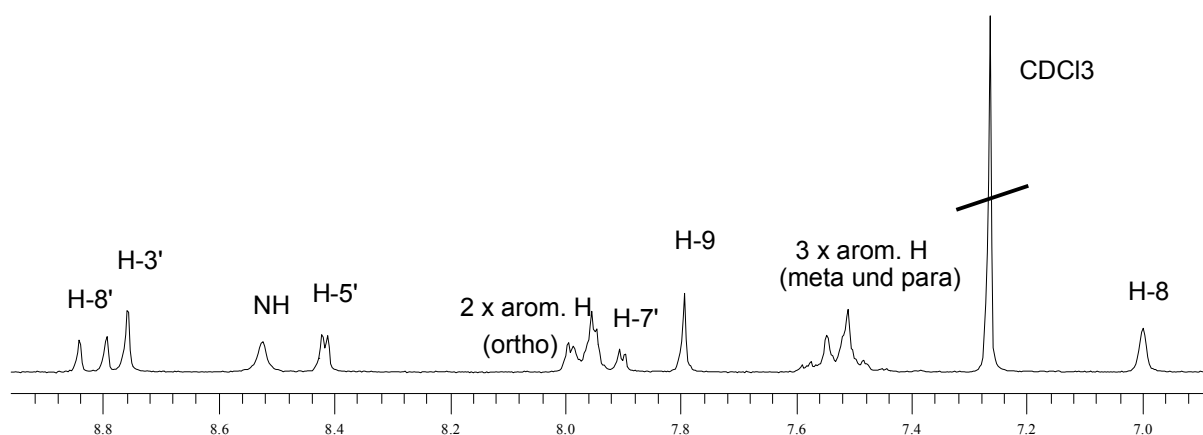


Abb. 44: Detailansicht des ^1H -NMR-Spektrum von **20f** (CDCl_3)

Fluoreszenzspektroskopische Eigenschaften

In Abb. 45 ist exemplarisch für die Amido-BAC-Derivate das Fluoreszenzspektrum des Trifluoracetamids **20a** dargestellt.

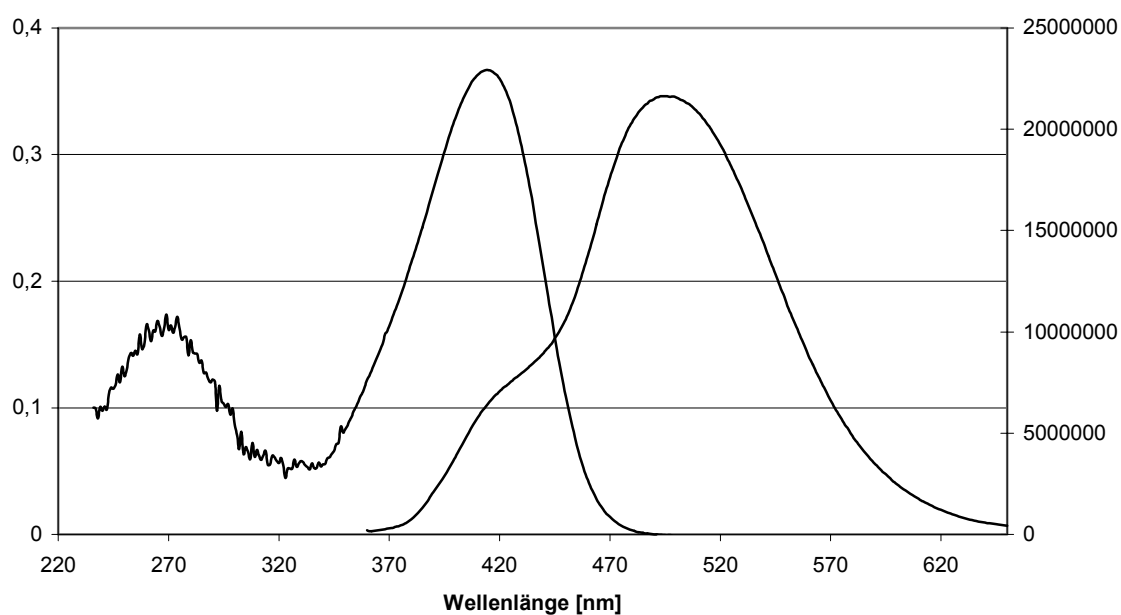


Abb. 45: Fluoreszenzspektrum von **20a** (in Methanol)

Die Anregungs- und Emissionsmaxima sowie die entsprechenden Quantenausbeuten Φ_f (gegen Chininsulfat⁷⁴ wie vorher) sind in Tab. 5 gegenübergestellt.

Substanz (Formeln s. S. 55)	Excitation [nm]	Emission [nm]	Quanten- ausbeute Φ_f^*
<u>19</u>	420	509	0.69
<u>20a</u>	413	496	0.25
<u>20b</u>	420	496	0.25
<u>20c</u>	420	495	0.07
<u>20d</u>	420	494	0.05
<u>20e</u>	420	494	0.01
<u>20f</u>	420	500	0.07
<u>20g</u>	-	-	0.05

*Referenz: Chininsulfat in 1 N H₂SO₄ [0.55]

Tab. 5: Fluoreszenzdaten der Amido-BAC-Derivate

Aus diesen Kennzahlen lassen sich die folgenden Schlüsse ziehen:

- Die für alle Derivate ermittelte optimale **Anregungswellenlänge** von ca. 420 nm ist für Zellversuche ideal, da es in diesem Bereich zu keiner Konkurrenz mit intrinsischen Fluorophoren kommt.
- Die **Emission** hat ein Maximum bei ca. 500 nm und ist damit genügend weit von der Anregungswellenlänge entfernt, so dass es trotz einer Überlappung im Bereich von 400 – 450 nm nicht zu problematischen Wechselwirkungen kommt.
- Die **Quantenausbeute** ist beim Amino-BAC **19** am höchsten und sinkt bereits bei den „einfachen“ Amiden **20a** und **20b** auf ein Drittel ab. Alle anderen Derivate **20c** – **20g** weisen mit Ausbeuten von unter 10 % sehr ungünstige Eigenschaften auf. Die Ursachen eines solchen Verhaltens sind bei **20c**, **20d** und **20g** klar: sowohl die Nitrogruppen als auch der Radikalcharakter der Säurekomponente sind Gründe für ein intramolekulares Quenching. Die schlechten Quantenausbeuten bei **20e** und **20f** rühren vom sog. Förster-Effekt und werden in Kapitel 3.2.3 (S. 68) genauer betrachtet. Sie spielen allerdings für den angestrebten Zweck keine Rolle, da beim NO[•]-Nachweis nur 1,2-Dihydrochinolin-Derivate vorkommen.

Wertung der Ergebnisse

Nach Auswertung der präparativen und der fluoreszenzspektroskopischen Befunde kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die Amino-BAC-Derivate sich nur bedingt für eine NO[•]-Detektion eignen würden. Aus diesem Grund wurde nachfolgend das Aminophenyl-BAC unter den gegebenen Gesichtspunkten betrachtet.

3.2.2 Synthese und Charakterisierung der Amidophenyl-BAC-Derivate (23)

Die Darstellung der vom Aminophenyl-BAC 22 abgeleiteten Amide 23a - k erfolgte nach der im Kapitel 3.1.4 beschriebenen optimierten CDMT-Methode (s. S. 46). Bei der Auswahl der Carbonsäuren a – k wurden verschiedene Kriterien berücksichtigt:

- Die Verwendung der Modellsäuren a – d diene zur Optimierung der Methode und zur Untersuchung der fluorimetrischen Eigenschaften.
- Die Säuren e – g stellen das Abfangreagenz selbst g bzw. die zu erwartenden Hauptprodukte e und f der NO[•]-Nachweisreaktion dar.
- Die Säuren h und i stellen Vorstufen von 1 dar, deren Aminophenyl-BAC-Derivate zum einen interessant waren, um die Reinheit von 23g zu bestimmen. Außerdem war vorgesehen, die Synthese von 23g eventuell auch direkt aus den Vorstufen 23h bzw. 23i vorzunehmen.

Die Säuren j und k wurden bei modifizierten NO[•]-Reaktionen³¹ von 1 als Nebenprodukte isoliert, so dass auch deren fluoreszenzmarkierten Amide von großem Interesse waren.

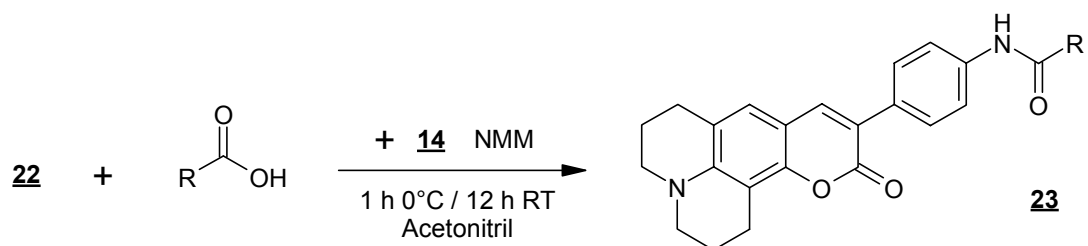
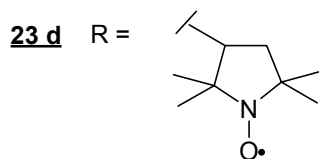
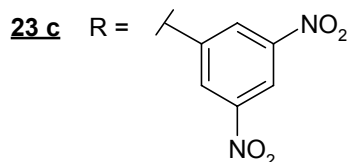
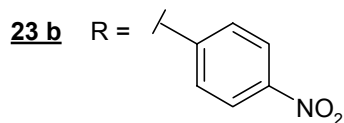
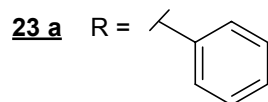
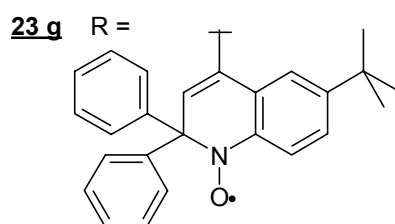
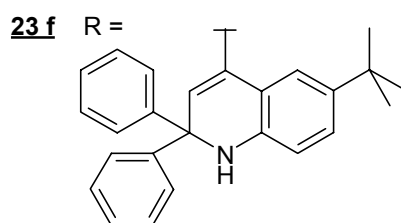
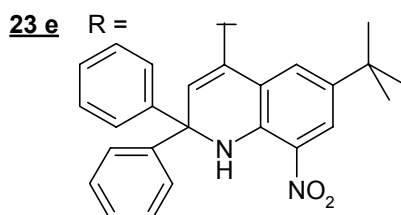
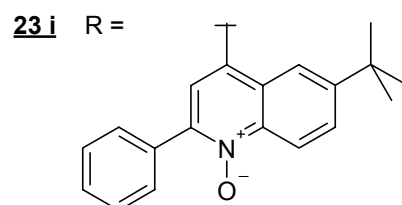
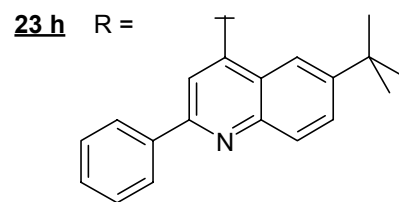
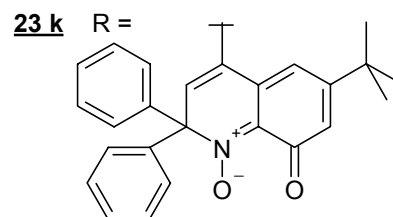
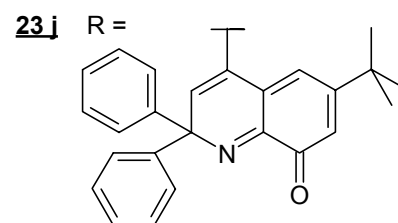
**Modellcarbonsäuren:****Carbonsäuren 1, 2 und 3:****Vorstufen von 1:****Oxidationsprodukte von 1:**

Abb. 46: Übersicht der dargestellten Amide **23a - k**

Die Ausbeuten der einzelnen Amide **23** sind u.a. davon abhängig, dass man das Lösungsmittel Acetonitril unmittelbar vor der Reaktion sorgfältig absolutiert und die Ansätze unter Lichtausschluss durchführt. Die Aufarbeitung der Ansätze muss zügig erfolgen. Mit Ausnahme von **23g** werden die übrigen Amide mittels präparativer Säulenchromatographie (gegebenenfalls als Flash-Chromatographie) isoliert und sofort aus Methylenchlorid mit

Petrolether ausgefällt. Die stets pulvrig-kristallinen Derivate wurden spektroskopisch charakterisiert. Die Elementaranalysen entsprachen mit einzelnen Ausnahmen den üblichen Anforderungen.

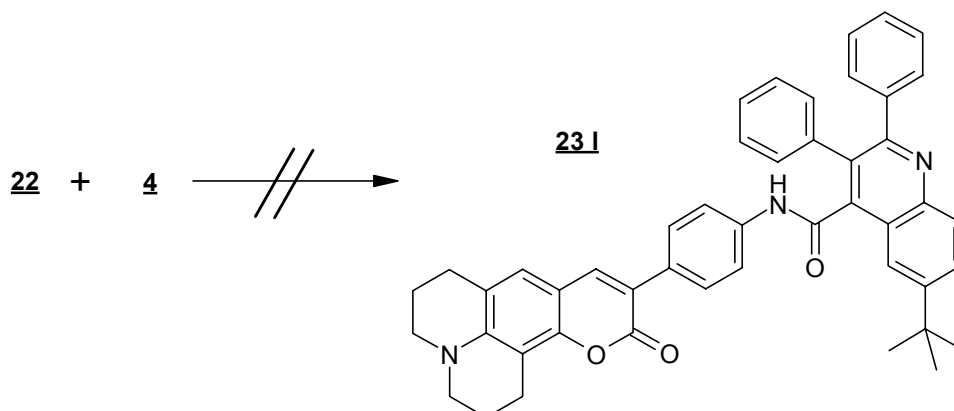


Abb. 47: Versuch der Darstellung von 23l

Als ein weiteres Reaktionsprodukt der NO[•]-Reaktion von 1, das vor allem unter Oxidationsbedingungen gebildet wird, sollte auch die Chinolincarbonsäure 4 (s. S. 27) mit 22 zum Amid 23l umgesetzt werden. Trotz intensiver Bemühungen konnte kein entsprechendes Amid isoliert werden. Später zeigte sich, dass dieses Amid auch nicht als Reaktionsprodukt bei der Reaktion von 23g mit NO[•] identifiziert werden konnte. Dagegen konnte in geringen Mengen ein Nebenprodukt isoliert und als ein Triazinderivat 24 charakterisiert werden.

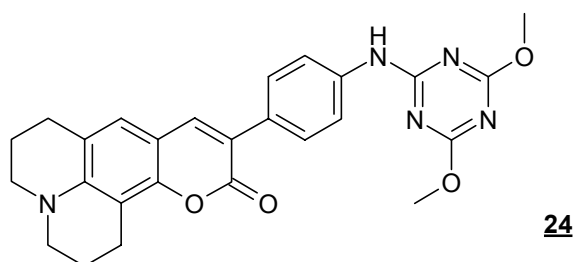


Abb. 48: Nebenprodukt 24

Die Charakterisierung der Amide 23a - k erfolgte mit den üblichen spektroskopischen Verfahren. Die beiden Radikale 23d und 23g durch die Aufnahme von ESR- anstelle von ¹H-NMR-Spektren (s. Kapitel 3.2.4, S. 73).

3.2.2.1 Charakterisierung der Amide **23** am Beispiel von **23e**

Infrarotspektroskopie

Die Infrarotspektren der Amide **23** sind im Bereich der Schlüsselbanden sehr ähnlich. Am Beispiel von **23e** erkennt man die breite Absorptionsbande bei $\sim 3500\text{ cm}^{-1}$ für die NH-Valenzschwingungen des Amids und des 1,2-Dihydrochinolins. Die Carbonylbande bei 1684 cm^{-1} ist typisch für den ungesättigten Lactonring des Cumarins. Die beiden Amidbanden finden sich bei 1615 und 1564 cm^{-1} . Die aromatische Nitrogruppe zeigt sich mit zwei intensiven Banden bei 1518 und 1308 cm^{-1} .

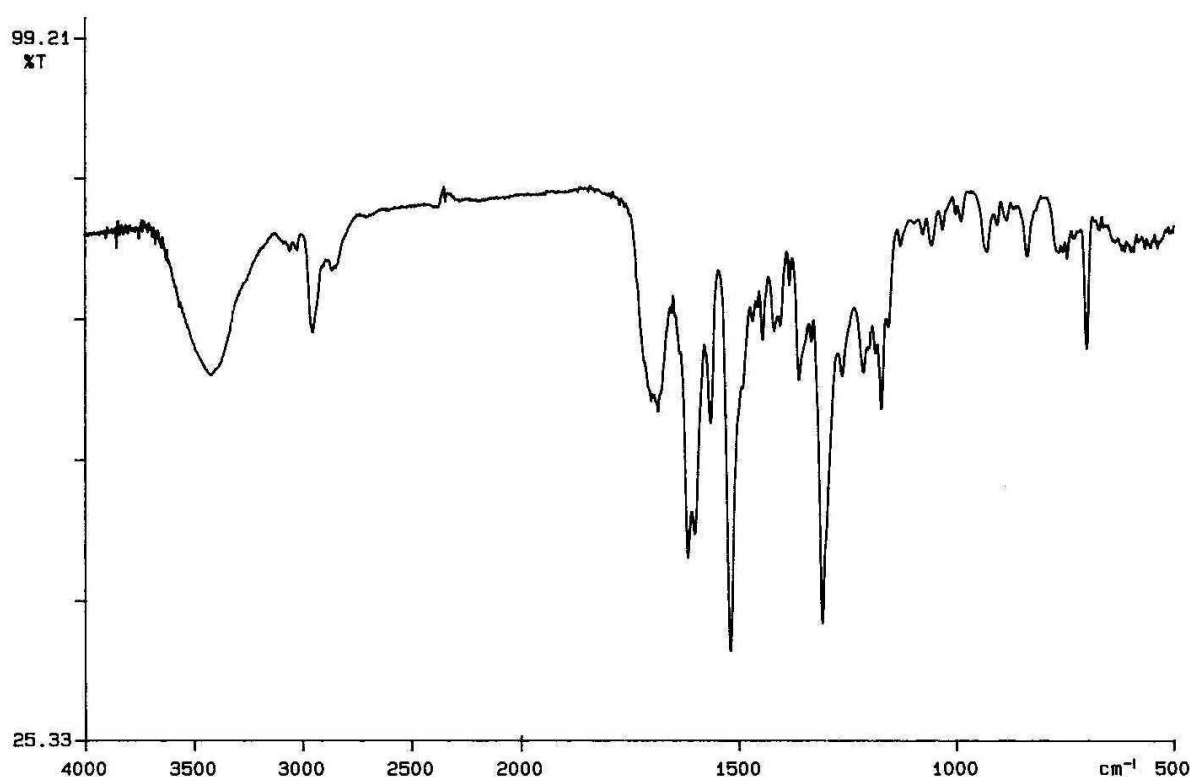


Abb. 49: IR-Spektrum von **23e** (KBr-Preßling)

Massenspektrometrie

Viele der Aminophenyl-BAC-Derivate **23** lieferten bei der standardmäßig durchgeführten Elektronenstoßionisation (EI) oft keine intakten Molekülonen. In diesen Fällen wurden zusätzlich zur Absicherung FAB-Spektren aufgenommen, wodurch eine Detektion von $M+H$ und $M+Na$ möglich war.

¹H-NMR-Spektroskopie

Im Spektrum von **23e** (s. Abb. 50) erkennt man die typischen Signale der Methylenprotonen im Chinolizidinanteil. In der Detailansicht (Abb. 51) lassen sich alle übrigen Signale eindeutig den entsprechenden Protonen zuordnen. Die mit D₂O austauschbaren NH-Signale liegen bei 7.8 (Dihydrochinolin) bzw. bei 8.9 ppm (Amid). Neben den Multipletts um 7.3 ppm (2 x Phenyl) und 7.6 ppm (AA'BB') erscheinen alle anderen Protonen als Singuletts (H-3', H-8, H-9) bzw. Dubletts (H-5', H-7').

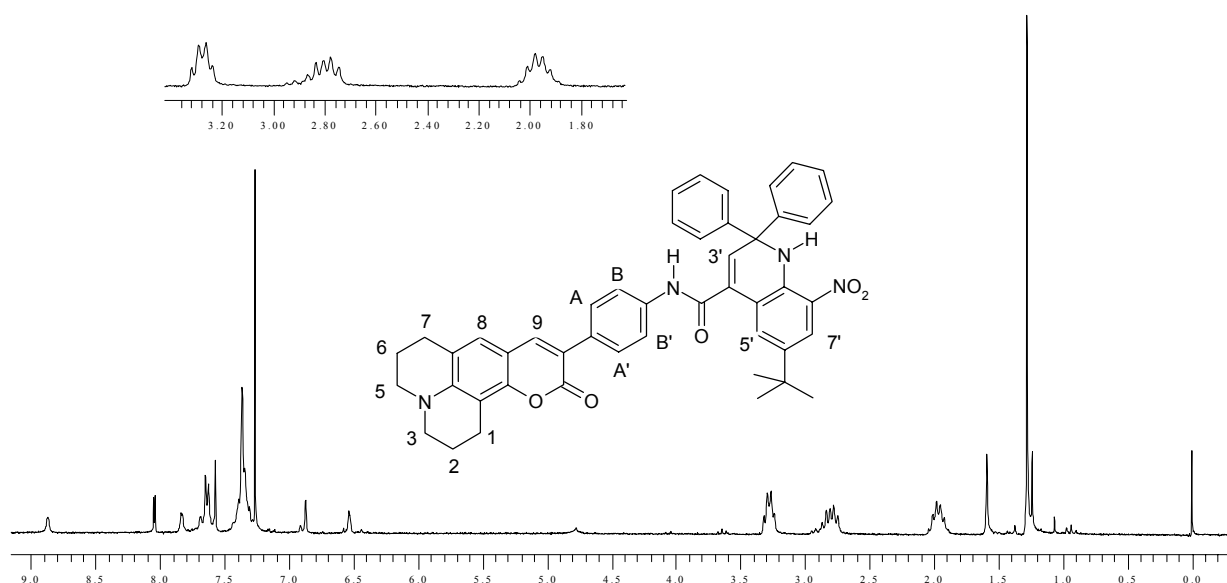


Abb. 50: ¹H-NMR-Spektrum von **23e** (CDCl₃)
CDCl₃

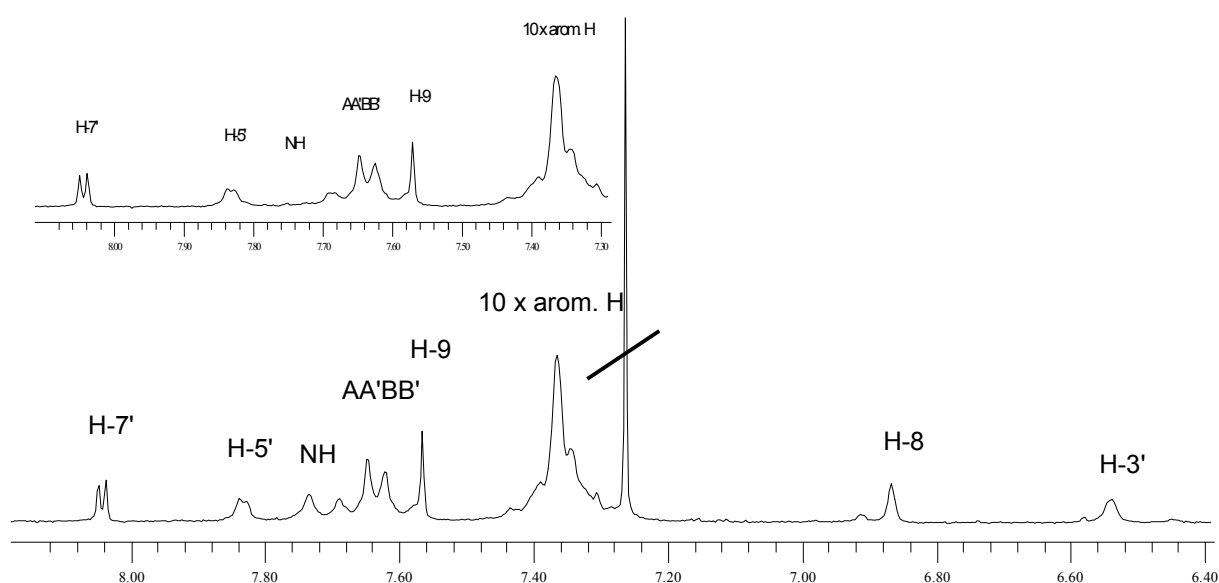


Abb. 51: Detailansicht des ¹H-NMR-Spektrums von **23e** (CDCl₃) incl. Detailansicht des Spektrum + D₂O

Fluoreszenzspektroskopische Eigenschaften

In Tab. 6 werden die Anregungs- und Emissionswellenlängen der fluoreszierenden Aminophenyl-BAC Derivate tabellarisch aufgelistet.

Substanz	Excitation [nm]	Emission [nm]
<u>22</u>	420	523
<u>23a</u>	420	490
<u>23b</u>	420	498
<u>23f</u>	420	495

Tab. 6: Anregungs- und Emissionswellenlängen von **22**, **23a**, **23b** und **23f** (in Methanol)

Abb. 52 zeigt exemplarisch das Fluoreszenzspektrum von **23f** in Methanol.

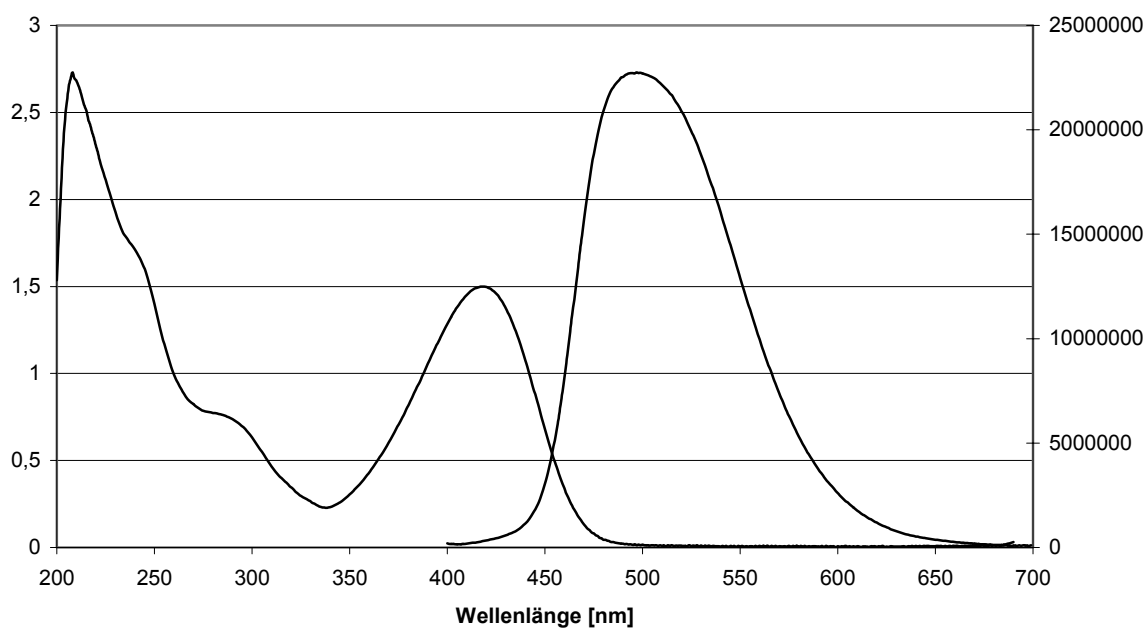


Abb. 52: Fluoreszenzspektrum von **23f** (in Methanol)

Die Anwendung von Amidophenyl-BAC-Derivaten zur fluorimetrischen Detektion von NO[•] sind für die biologische Anwendung geeignet, da eine Überlappung der Emission mit intrinsischen Fluorophoren nicht möglich ist. Zudem wurden die Quantenausbeuten Φ_f der Amide **23a** – **g** sowie des Ausgangsfluorophors **22** in Methanol gegen Chininsulfat bestimmt und in Tab. 7 zusammengefasst.

Substanz	Säure R =	Quantenausbeute Φ_f
<u>22</u>	Aminophenyl-BAC	0.66
<u>23a</u>	Benzoessäure	0.79
<u>23b</u>	p-Nitrobenzoessäure	0.20
<u>23c</u>	3,5-Dinitrobenzoessäure	0.06
<u>23d</u>	3-Carboxy-PROXYL	0.19
<u>23e</u>	Nitro-NOXYL (<u>3</u>)	0.02
<u>23f</u>	Dihydrochinolin (<u>2</u>)	0.82
<u>23g</u>	NOXYL (<u>1</u>)	0.15

*Referenz: Chininsulfat in 1 N H₂SO₄ [0.55]⁷⁴

Tab. 7: Quantenausbeuten von **22** und **23a** – **g** (in Methanol)

Aus diesen Werten geht hervor, dass die relativ hohe Quantenausbeute des Ausgangsfluorophors **22** durch die Amidbildung mit Benzoessäure deutlich gesteigert wird. Die Einführung einer oder zwei Nitrogruppen im Säureanteil führt zu einem dramatischen Quenching, so dass **23c** kaum noch fluoresziert. Den gleichen Effekt bewirkt die Nitrogruppe im Nitro-NOXYL-Derivat **23e**. Demgegenüber zeigen die Nitroxid-Radikale **23d** und **23g** eine überraschend geringe Fluoreszenzminderung auf ca. 15 – 20%.

Von großer Bedeutung sind jedoch die Quantenausbeuten von **23e** und **23f**, die als potentielle NO'-Produkte von **23g** auftreten können. Während das Nitroderivat **23e** praktisch nicht fluoresziert, zeigt das Dihydrochinolinamid **23f** die höchste Quantenausbeute aller Aminophenyl-BAC-Derivate. Deshalb dürfte der Effekt beim Nachweis von NO' um so größer sein, je weniger vom Nitroprodukt **23e** und je mehr von **23f** gebildet wird. Da der Anteil am Nitroprodukt jedoch – wie bekannt – bei geringem NO'-Angebot stark zurückgeht, bestand berechtigte Hoffnung, dass **23g** eine gute Fluoreszenzsonde für NO' in biologischer Umgebung sein könnte.

Als eher ungünstig muss allerdings die relativ hohe Quantenausbeute der Messsonde **23g** selbst bewertet werden, so dass mit einer verhältnismäßig hohen Grundfluoreszenz gerechnet werden muss. Deshalb war es notwendig, dass die erforderliche Konzentration von **23g** in biologischen Experiment möglichst weit abgesenkt werden sollte (s. Kapitel 3.4, S. 92).

3.2.3 Diskussion verschiedener Quenchingmechanismen am Beispiel von 23e und 23g

Bei der Auswertung der fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften ergab sich, dass sowohl die Aminoxy-Radikale als auch die diamagnetischen Nitroverbindungen nur eine sehr geringe Quantenausbeute aufweisen. Dieses als Quenching (Summe aller Prozesse, die zur Fluoreszenzminderung beitragen) bezeichnete Phänomen kann verschiedene Ursachen haben, auf die nachfolgend in gebotener Kürze eingegangen werden soll.

Durch Absorption von Licht geeigneter Wellenlänge gelangen die Elektronen eines Moleküls in die angeregten Singulettzustände S_1 , S_2 , S_3 etc. (M^*). Die Abgabe der Energie bei der Rückkehr in den Grundzustand S_0 sind in Abb. 53 noch einmal zusammengefasst^{66,67}.

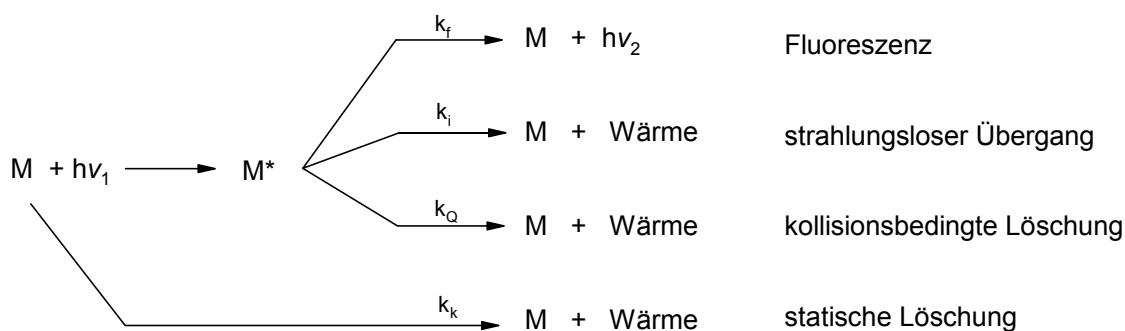
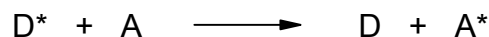


Abb. 53: Relaxationsprozesses eines angeregten Moleküls M^*

Die Größe der Geschwindigkeitskonstanten (k_f , k_i , k_Q und k_k) entscheidet über den bevorzugten Weg der Relaxation und damit auch über die Quantenausbeute Φ_f .

Ein elektronisch angeregter Donor D^* kann seine Energie auch auf einen Akzeptor A im Grundzustand übertragen. Diese Übertragung kann inter- und intramolekular erfolgen.



Die Energie des angeregten Donors D^* kann vom Akzeptor A übernommen werden, wenn eine spektrale Überlappung möglich ist. Dieser Effekt wird als **Förster-Transfer** oder „Resonance- Energy Transfer“ bezeichnet und wird durch das folgende Schema allgemein wiedergegeben^{61,64}.

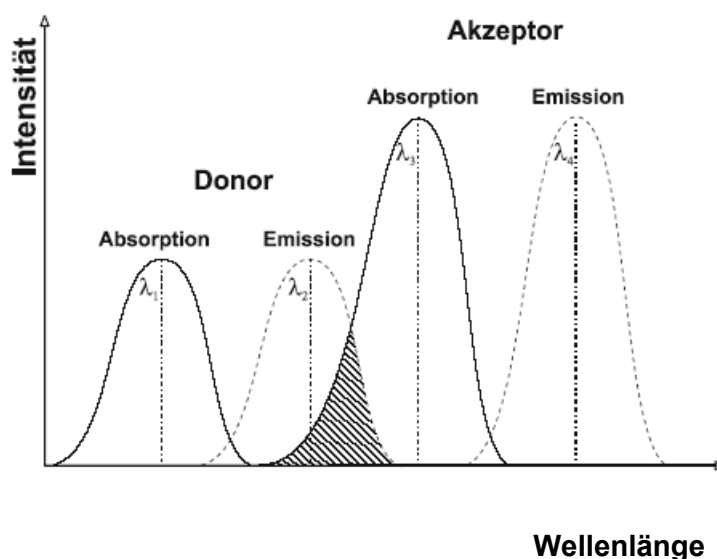
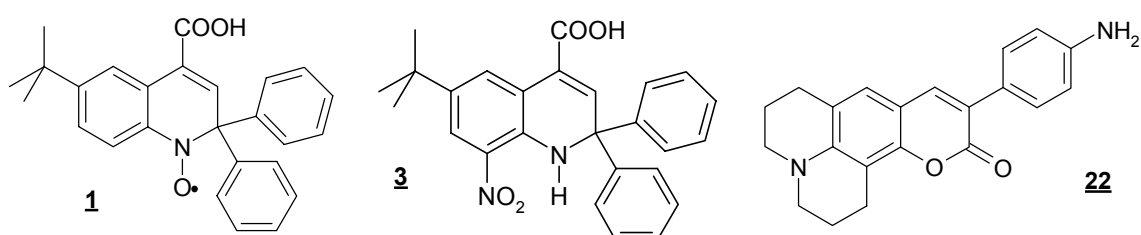


Abb. 54: Absorptions- und Emissionsspektren eines Donor-Akzeptorpaars

Dieser Quenching-Mechanismus findet durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen statt und ist über Distanzen bis zu 80 Å wirksam⁶⁶. Vergleicht man die Absorptionsspektren der Carbonsäuren **1** und **3** so wird eine bathochrome Verschiebung von **1** sichtbar, die spektral mit dem Fluoreszenzspektrum des Aminophenyl-BAC **22** überlappt, so dass prinzipiell der Förster-Transfer als Quenchingmechanismus bei beiden Amiden möglich ist, jedoch aufgrund der stärkeren Überlappung bei **23e** eine höhere Wahrscheinlichkeit aufweist.



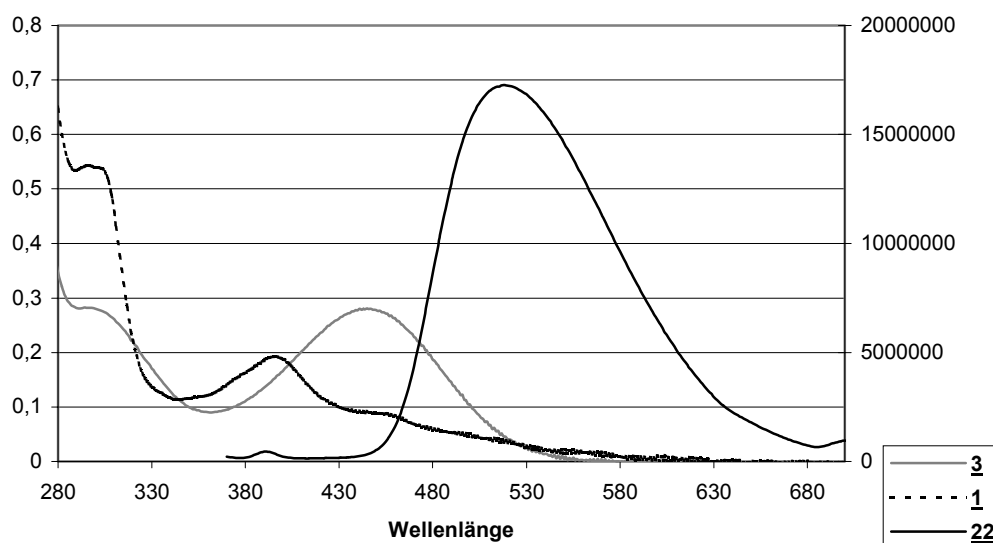


Abb. 55: Absorptionsspektren von 1 und 3, sowie Emissionsspektrum von 22

Dexter-Energietransfer

Eine weitere Möglichkeit der Energieübertragung findet durch Elektronenaustausch bei Distanzen $< 15 \text{ \AA}$ statt. Hierbei nähern sich zwei Chromophore so stark an, dass es zu einer Überlappung der Orbitale kommt, so dass es je nach Lage der Orbitale zu einer Oxidation oder Reduktion des angeregten Donors D^* (Fluorophor) kommen kann. Dieser Quenchingmechanismus wird als **Dexter Energietransfer** bezeichnet.

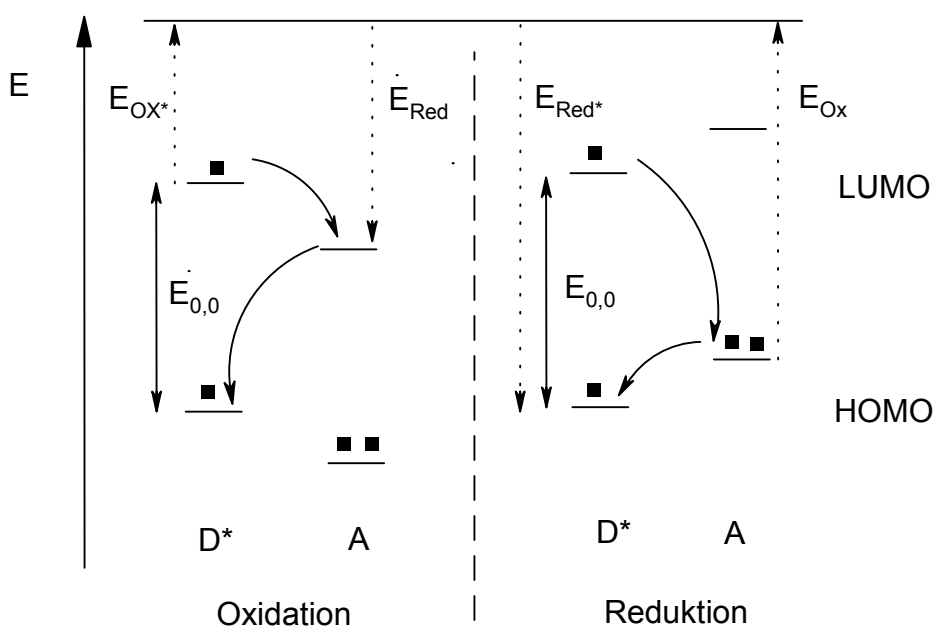


Abb. 56: Energiebilanzschema für den Elektronentransfer nach Dexter

Durch Anwendung der Rehm-Weller-Gleichung (Gl. 6) kann die freie Enthalpie ΔG_{ET} für den Elektronenaustausch berechnet werden.

$$\Delta G_{\text{ET}} = E_{\text{Ox}} - E_{\text{Red}} - E_{0,0} + \Delta G_{\text{Solv}}$$

Gl. 6: *Rehm-Weller-Gleichung*

In diese Berechnung gehen die Singulettenergie $E_{0,0}$, sowie die elektrochemischen Zellpotentiale E_{Ox} bzw. E_{Red} der einzelnen Komponenten ein. Die außerdem in der Rehm-Weller-Gleichung enthaltene Solvatationsenergie der entstehenden Ionen ΔG_{Solv} soll hier bei dieser Modellberechnung vernachlässigt werden. Je negativer ΔG_{ET} , desto wahrscheinlicher ist eine Fluoreszenzminderung auf Grund von Elektronentransfer nach **Dexter**.

Simuliert man die Struktur von **23g** durch räumliche Annäherung ($\sim 15 \text{ \AA}$) der beiden Donor-/Akzeptormoleküle Tempo und Cumarin C-102 (s. Abb. 57), deren zur Berechnung erforderlichen Potentiale bekannt sind (vgl. Tab. 8), so ergeben sich die beiden folgenden Möglichkeiten eines Elektronentransfers nach Dexter.

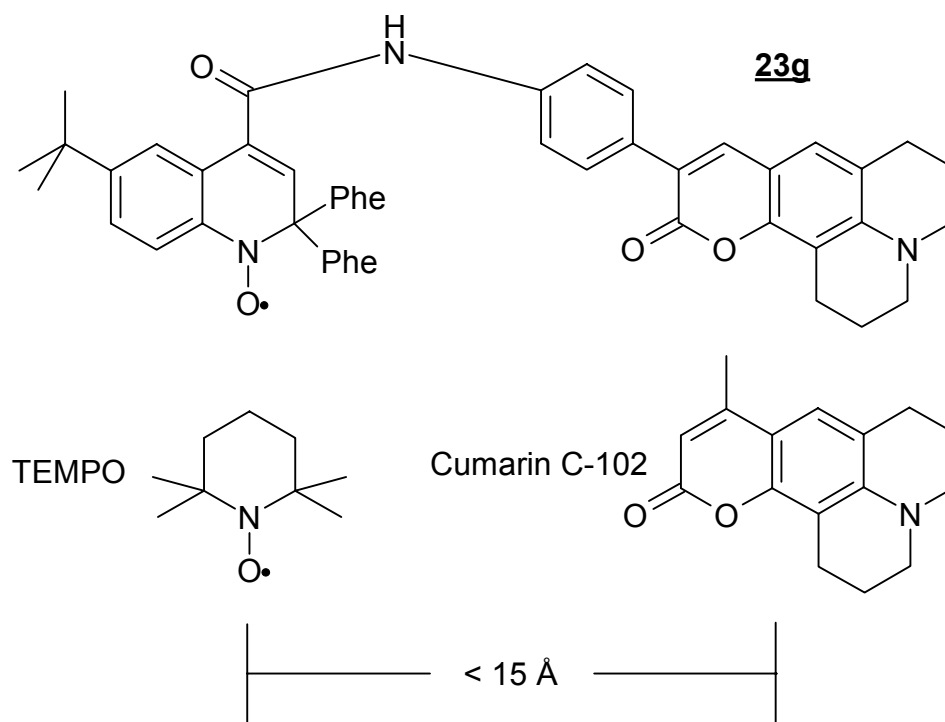
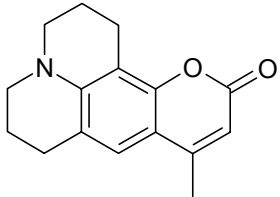
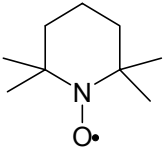


Abb. 57: *Gegenüberstellung von **23g** und Cumarin C-102/TEMPO*

Substanz	$E_{0,0}$ [eV]	E_{Ox} [V] vs SCE*	E_{Red} [V] vs SCE*
 Cumarin C-102	2,93 ⁸⁶	0,87 ⁸⁶	- 2.18 ⁸⁶
 TEMPO		0.63 ⁸⁷	- 1.76 ⁸⁷

* gegen eine gesättigte Calomelelektrode

Tab. 8: elektrochemische Potentiale von TEMPO und Cumarin C-102

1. Cumarin wird oxidiert und Nitroxid wird reduziert

$$\Delta G_{\text{ET1}} = 0.87 - (-1.76) - 2.93 = -0.30 \text{ eV} \quad \longrightarrow \text{Quenching möglich}$$

2. Cumarin wird reduziert und Nitroxid oxidiert

$$\Delta G_{\text{ET2}} = 0.63 - (-2.18) - 2.93 = -0.12 \text{ eV} \quad \longrightarrow \text{Quenching möglich}$$

Aus dieser Modellberechnung kann abgeleitet werden, dass beim Radikal **23g** eine Fluoreszenzlöschung durch **Elektronentransfer nach Dexter** möglich und damit wahrscheinlich ist.

⁸⁶ C. Seidel, Dissertation Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg **1992**

⁸⁷ L. Meites, P. Zuman, *Handbook Series in Organic Electrochem.*

3.2.4 ESR-Spektroskopie

Stabile Radikale vom Typ der Aminoxyle (Nitroxide) können als paramagnetische Spezies nicht durch NMR-Spektren charakterisiert werden, da es dort zu einer starken Verbreiterung der Absorptionssignale kommt, die im Extremfall nicht mehr registriert werden.

Hier hilft die **Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR)**^{88,89,90} weiter, da das Elektron – ähnlich wie z.B. das Proton – einen Eigendrehimpuls aufweist, dessen magnetisches Moment zunächst statistisch über alle Raumrichtungen verteilt ist. Nach Einbringen einer paramagnetischen Probe in ein magnetisches Feld der Induktion B_0 (magnetische Flussdichte; Einheit [1 Gauß [G] = 10^{-4} Tesla [T]]), kommt es zur Ausrichtung des Spins parallel oder antiparallel zur Feldrichtung [$M(+\frac{1}{2})$; $M(-\frac{1}{2})$]. Dabei ist der energieärmere Zustand ($E = -\frac{1}{2}g\mu B_0$) geringfügig stärker besetzt als der Zustand höherer Energie („gegen“ die Feldrichtung). Der Übergang von $M(-\frac{1}{2})$ nach $M(+\frac{1}{2})$ erfolgt durch Aufnahme von Energie aus einem Mikrowellensender unter sogenannten Resonanzbedingungen, so dass für jedes ungepaarte Elektron ein Absorptionssignal registriert werden kann.

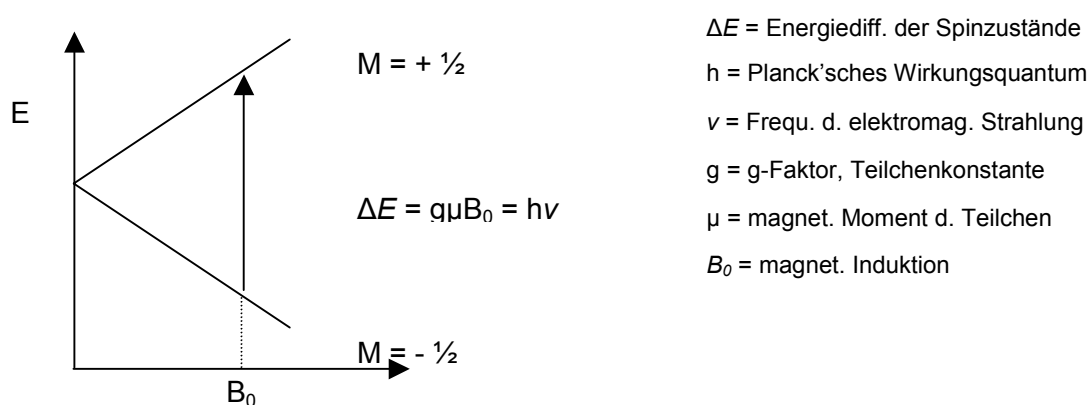


Abb. 58: Aufspaltung der Energieniveaus durch Anlegen des Magnetfeldes

Dabei ist der g-Faktor für die „Umgebung“ des Elektrons charakteristisch (wie die chemische Verschiebung δ (ppm) bei der NMR-Spektroskopie). Die Aufspaltung des Signals in der ESR-Spektroskopie – meist als 1. Ableitung registriert – gibt die Beeinflussung durch

⁸⁸ F. Bär, A. Berndt, K. Dimroth, *Chemie in unserer Zeit* **1975**, 1, S. 18 - 24

⁸⁹ F. Bär, A. Berndt, K. Dimroth, *Chemie in unserer Zeit* **1975**, 2, S. 43 - 49

⁹⁰ K. Mäder, *PZ Prisma* **1998**, 5, S. 202 - 212

benachbarte Magnetfelder entsprechend aktiver Atomkerne wieder und wird ähnlich wie in der NMR-Spektroskopie als Kopplung mit den entsprechenden Kopplungskonstanten $a[\text{mT}]$ angegeben. Die entsprechenden Werte werden nicht direkt aus dem ESR-Spektrum entnommen, sondern nach Iteration simuliert, bis das simulierte und experimentelle Spektrum übereinstimmen. Die in dieser Arbeit enthaltenen ESR-Spektren wurden mit einem 9.8 GHz Spektrometer bei Raumtemperatur in Chloroform nach Entfernung des Luftsauerstoffs aufgenommen.

Am Beispiel von **23d** (Abb. 59) erkennt man die Aufspaltung des ESR-Signals zu einem Triplett mit der Kopplungskonstante $a(\text{N}) = 1.469 \text{ mT}$, die aus der Kopplung mit dem Stickstoff (^{14}N ; $I = 1$) resultiert.

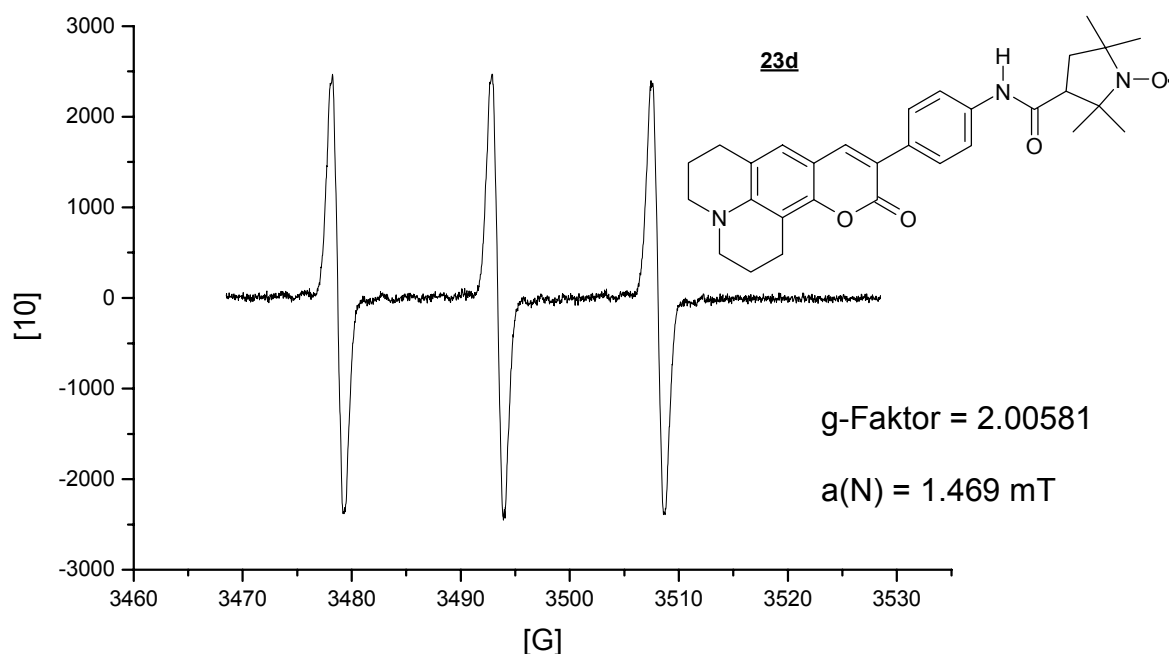


Abb. 59: ESR-Spektrum von **23d** (CHCl_3)

Beim NOXYL-Amid **23g** zeigt das Triplett ($a(\text{N}) = 1.015 \text{ mT}$) eine weitere Hyperfeinstruktur, die durch Aufspaltung mit den am Mesomerie-System des Radikals beteiligten Wasserstoff-Kernen zustande kommt. Die entsprechenden Kopplungskonstanten sind aus Abb. 60 zu entnehmen.

$g = 2.0014$

$\alpha(N) = 1.015 \text{ [mT] (1N)}$

$\alpha(H_8) = 0.317 \text{ [mT] (1H)}$

$\alpha(H_3) = 0.138 \text{ [mT] (1H)}$

$\alpha(H_7) = 0.112 \text{ [mT] (1H)}$

$\alpha(H_5) = 0.100 \text{ [mT] (1H)}$

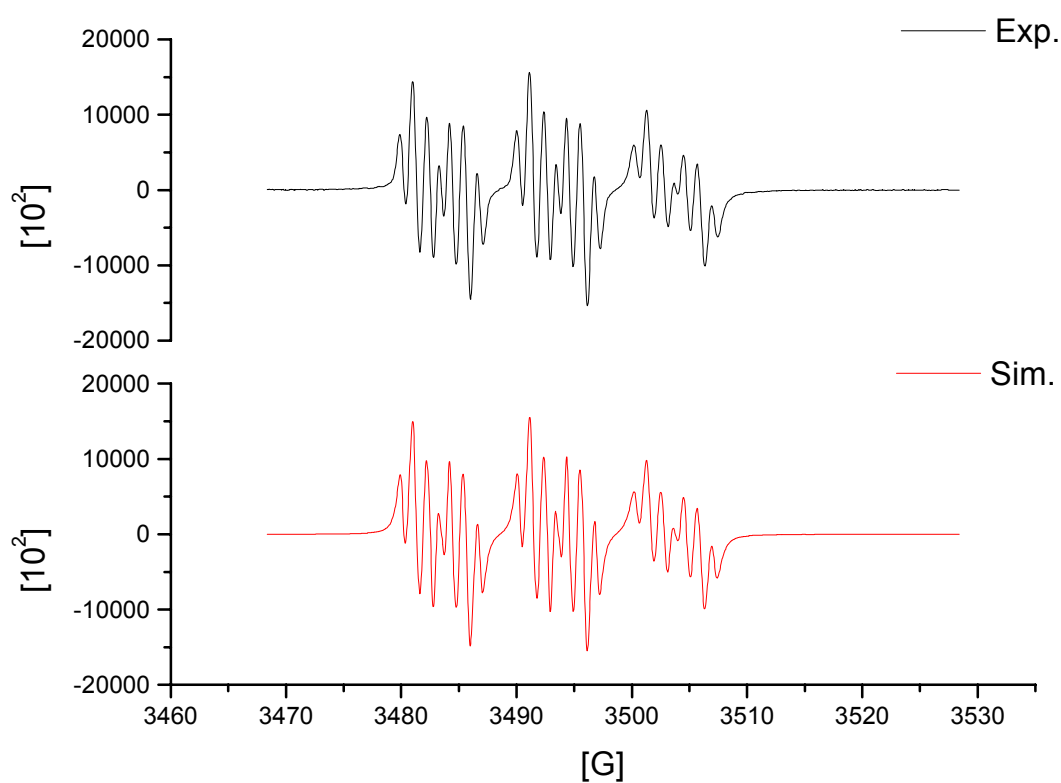
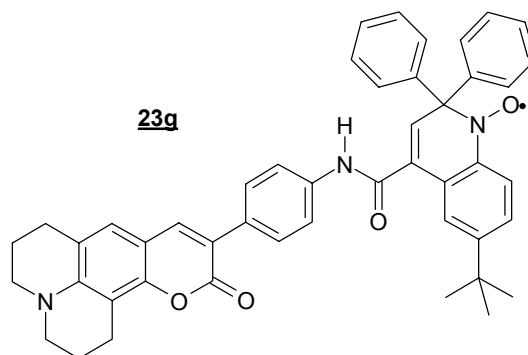


Abb. 60: Simuliertes und experimentelles ESR-Spektrum von **23g** (CHCl_3)

3.3 Untersuchungen zur NO[•]-Detektion in Lösung mit **23g**

Für eine fluorimetrische NO[•]-Detektion kamen von den in dieser Arbeit hergestellten Verbindungen grundsätzlich die beiden BAC-Amide von NOXYL (**1**) **20g** und **23g** in Frage. Es gab jedoch verschiedene Gründe, sich ausschließlich auf die Untersuchungen mit dem Aminophenyl-BAC-Derivat **23g** zu konzentrieren.

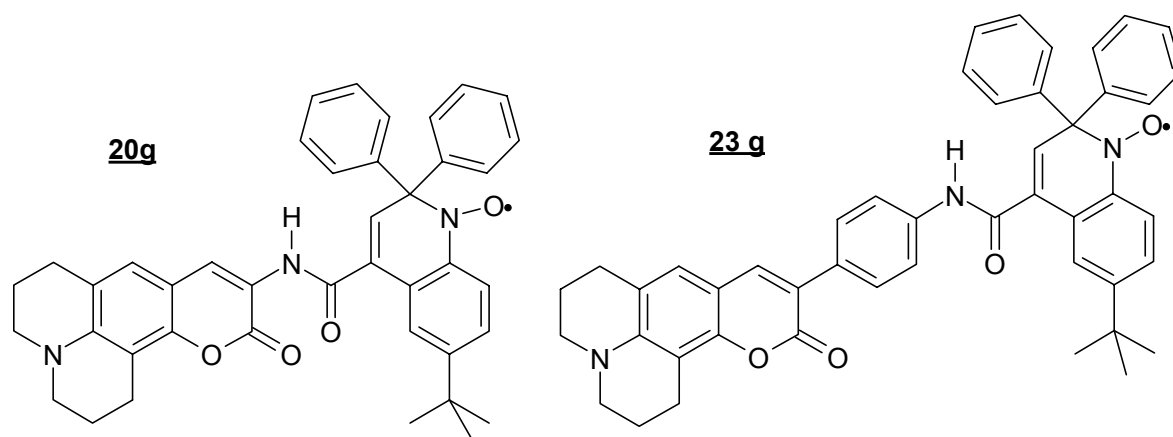
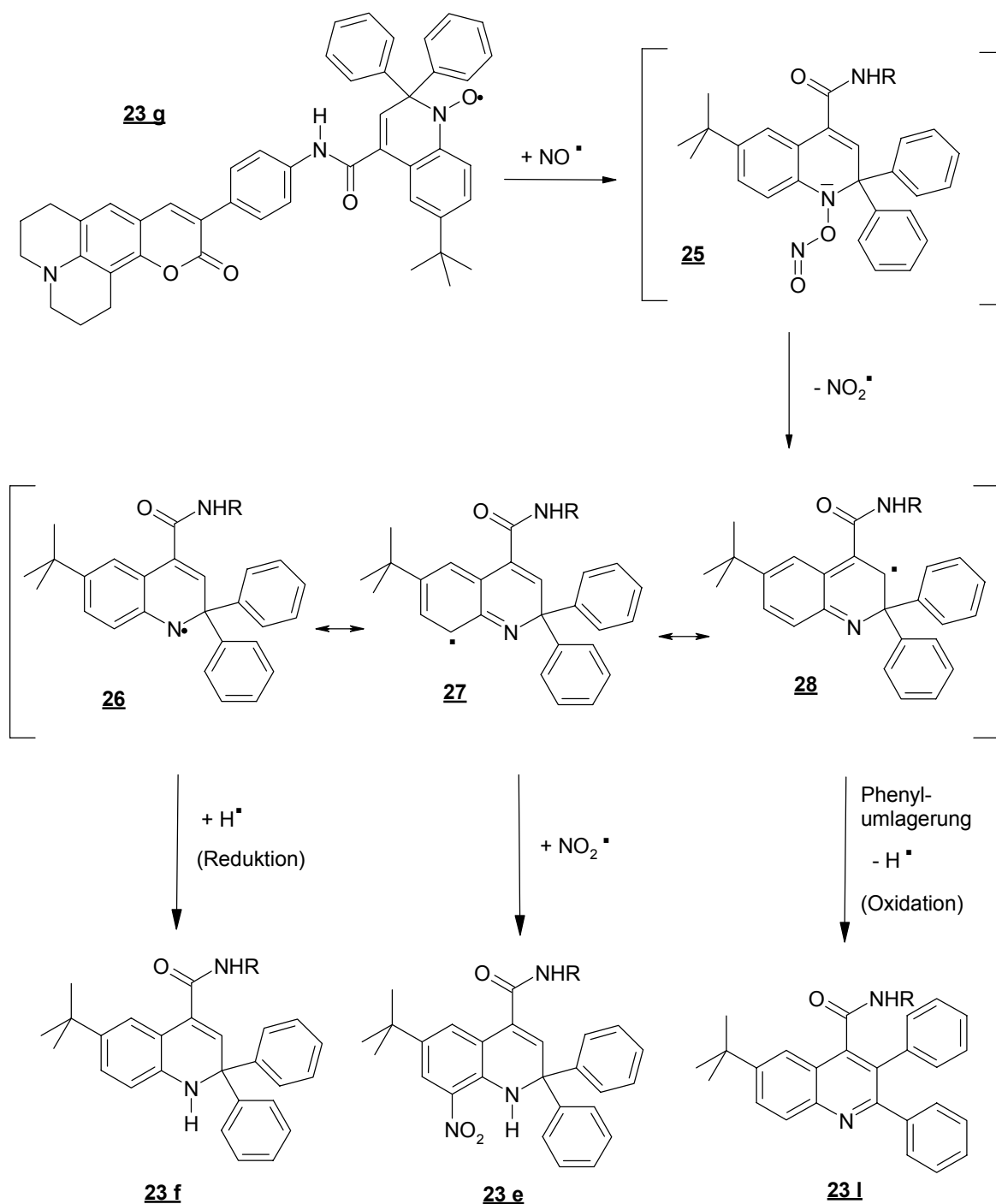


Abb. 61: **20g** und **23g**, potentielle Abfangreagenzien für NO[•]

- Die Darstellung von **23g** gestaltet sich im Vergleich zu **20g** vorteilhafter, da bereits das Edukt Aminophenyl-BAC in höherer Ausbeute hergestellt werden konnte.
- Die Stabilität von **23g** ist signifikant größer als diejenige von **20g**, da unspezifische Zersetzungsprodukte erst später und in geringerer Menge entstehen.
- Die zu erwartenden Reaktionsprodukte von **23g** mit NO[•], zeigen die für den angestrebten Zweck erforderlichen optimalen fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften.

Überträgt man die von Gresziok³⁰ und Höbler³¹ erzielten Ergebnisse der NO[•]-Reaktion von NOXYL auf **23g**, so waren grundsätzlich die Amide **23e**, **23f** und **23i** als Produkte zu erwarten. Während die beiden ersten als authentische Vergleichssubstanzen zur Verfügung standen, waren die Eigenschaften von **23i** unbekannt, da diese Verbindung nicht aus den Komponenten dargestellt werden konnte. In Schema 13 wird der postulierte Reaktionsablauf für den Nachweis von NO[•] mittels **23g** angegeben.



Schema 13: Postulierter Reaktionsverlauf beim Nachweis von $\text{NO}^\bullet$ mittels **23g**

Während bei den früheren Untersuchungen die Nitro-substituierten Carbonsäure **3**, welcher der Substanz **23e** analog ist, im Mittelpunkt des Interesses stand („direkter $\text{NO}^\bullet$ -Nachweis“), wurde für den nunmehr angestrebten Zweck einer möglichst empfindlichen, aber gleichzeitig spezifischen $\text{NO}^\bullet$ -Detektion durch Fluorimetrie ein höherer Anteil an **23f** angestrebt.

Für die Entstehung der unterschiedlichen Produkte ist es entscheidend, welche **stationäre $\text{NO}_2^\bullet$ -Konzentration** im Verlauf der Reaktion auftritt (vgl. Schema 13). So war zu erwarten,

dass der Anteil von **23e** unter anaeroben Bedingungen absinkt, da $\text{NO}_2^\cdot$ nicht mehr direkt aus $\text{NO}^\cdot$ entsteht, sondern nur noch **25** als $\text{NO}_2^\cdot$ -Quelle in Frage kommt.

Darüber hinaus sollte auch die **stationäre $\text{NO}^\cdot$ -Konzentration** einen Einfluss auf die Produktverteilung haben. So reagiert $\text{NO}^\cdot$ nicht nur mit **23g** zu **25**, sondern auch mit $\text{NO}_2^\cdot$ zu N_2O_3 , das durch Hydrolyse zu Nitrit aus dem Gleichgewicht entfernt wird. Aus diesem Grund sollte auch die Kinetik der Freisetzung von $\text{NO}^\cdot$ einen Einfluss auf die Produktverteilung haben.

Ein dritter Aspekt ergab sich aus den weiteren Rahmenbedingungen der $\text{NO}^\cdot$ -Reaktion von **23g**, insbesondere der An- oder Abwesenheit von Reduktions- oder Oxidationsmitteln. Während sich das intermediär auftretende Aminylradikal (**26** – **28**) durch Reduktion zum Dihydrochinolin **23f** stabilisieren kann, sollte die weitere Oxidation zum Chinolin **23i** führen.

Alle bisherigen Untersuchungen an NOXYL selbst wurden wegen der unbefriedigenden Analytik der Produkte nur in relativ konzentrierten Ansätzen durchgeführt. Mit **23g** steht nunmehr erstmals ein Reagenz zur Verfügung mit dem eine Simulation der biologischen $\text{NO}^\cdot$ -Freisetzung in Zellen möglich schien. Dabei sollten verschiedene $\text{NO}^\cdot$ -Donatoren unter aeroben und anaeroben Bedingungen untersucht werden.

Die einzelnen Modell-Ansätze wurden zunächst mittels DC qualitativ untersucht und an ausgewählten Beispielen auch quantitativ analysiert. Die Proben wurden direkt über eine RP_{18} -Säule mit verschiedenen Detektoren untersucht. Die Nachweisgrenze wurde für **23g** bzw. **23e** mit $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l (UV-Detektion bei 225, 250 und 420 nm) und mit $5 \cdot 10^{-9}$ mol/l für **23f** (Fluoreszenzdetektion Anregung bei 420 nm, Emission bei 505 nm) bei einem Injektionsvolumen von 10 μl ermittelt.

3.3.1 Überprüfung des Funktionsprinzips

Zunächst sollte überprüft werden, ob **23g** tatsächlich als Abfangreagenz für $\text{NO}^\cdot$ fungiert. Zu diesem Zweck wurde $\text{NO}^\cdot$ *in situ* aus einer vorgelegten Natriumnitrit-Lösung durch Zugabe einer schwefelsauren, äquimolaren KI-Lösung beides im 5-fachen Überschuss freigesetzt. Durch Austreiben mittels Stickstoff wurde $\text{NO}^\cdot$ in einem Chemilumineszenzdetektor mittels Ozon quantitativ bestimmt (vgl. S. 11). Dieser Versuch ($n = 3$) galt als Referenz. In einem Parallelversuch wurde neben der Natriumnitritlösung auch der $\text{NO}^\cdot$ -Fänger (**23g** bzw. **1**) vorgelegt wurde. Die Ergebnisse sind sehr gut reproduzierbar ($\sim 1\%$ Abw.) und in Abb. 62

graphisch dargestellt. Der rote Kurvenverlauf zeigt die freigesetzte $\text{NO}^{\bullet}$ -Menge, im *Blindversuch* ohne Abfangreagenz. Nach Zusatz der $\text{NO}^{\bullet}$ -Fänger **1** (grüne Kurve) und **23g** (blaue Kurve) wird nur noch ein Teil des freigesetzten $\text{NO}^{\bullet}$ detektiert.

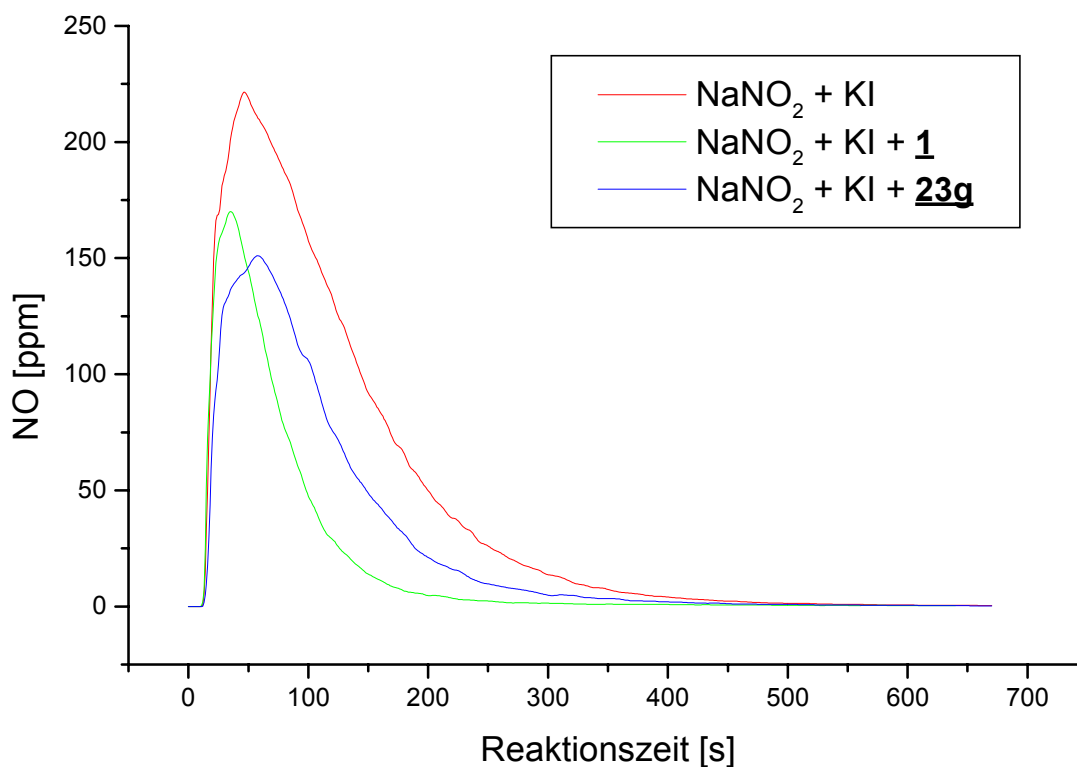


Abb. 62: $\text{NO}^{\bullet}$ -Detektion mittels Chemilumineszenzdetektion

Sowohl das Maximum als auch die Fläche unter der Kurve (AUC) sind in Anwesenheit der $\text{NO}^{\bullet}$ -Fänger deutlich geringer als im Blindversuch, so dass das Prinzip der Abfangreaktion bestätigt wird. Vergleicht man die beiden Kurvenverläufe für **1** und **23g** so fällt auf, dass **1** schneller und effektiver mit $\text{NO}^{\bullet}$ reagiert als **23g**. Die Gründe für eine solche unterschiedliche Reaktivität sind nicht klar und wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

	$\text{NO}^{\bullet}$ -Menge [AUC]	$\text{NO}^{\bullet}$ -Menge [%]
Blindversuch ($\emptyset$)	29782.65	100
+ 1	12076.75	40.5
+ 23g	17742.94	59.6

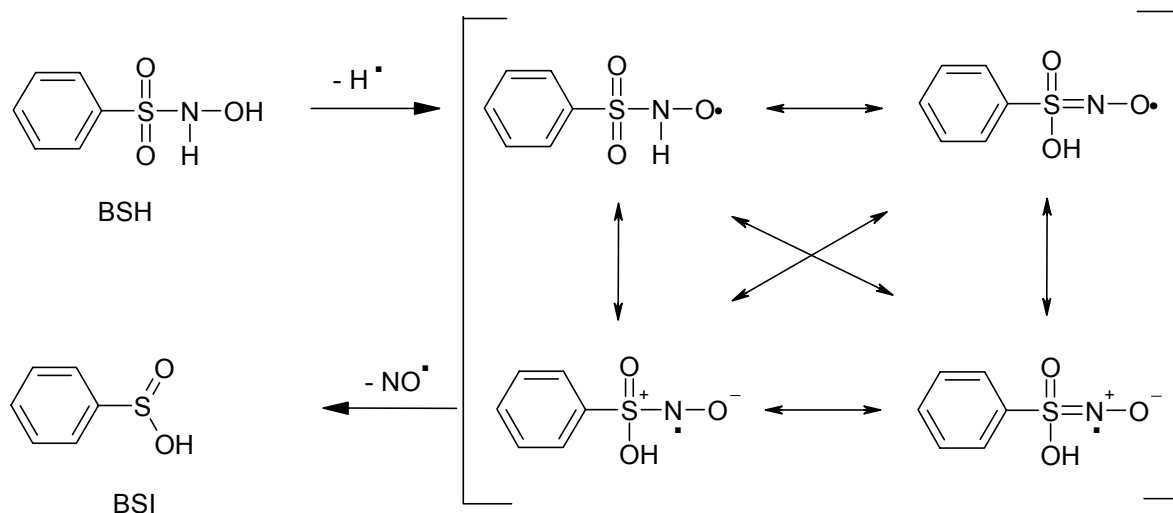
Tab. 9: Detektierte $\text{NO}^{\bullet}$ -Menge in Relation zum Blindversuch

3.3.2 Reaktion von **23g** mit verschiedenen NO[•]-Donatoren

Für eine verlässliche Analytik der Reaktionsprodukte bei der Detektion von NO[•] mit **23g** wurden NO[•]-Donatoren eingesetzt, die das Radikal in Lösung langsam freisetzen. Diese Technik ist vorteilhafter als die Verwendung von NO[•]-Gas, da sich die NO[•]-Konzentration besser steuern lässt, wodurch sich die Simulation der physiologischen Bedingungen wesentlich verbessert. Ein weiterer Vorteil von NO[•]-Donatoren besteht darin, die NO[•]-Freisetzung besser verändern zu können, diese kann entweder reduktiv, oxidativ oder aber spontan erfolgen. Da die reduktive Freisetzung von NO[•] aus Nitraten nur therapeutische Bedeutung besitzt, wurde auf dieses Prinzip hier verzichtet. Als NO[•]-Donatoren wurden im Verlauf dieser Arbeit Benzolsulphydroxamsäure (BSH) und N,N'-Nitrosoamin-N'-oxide (NONOate) eingesetzt.

Benzolsulphydroxamsäure

BSH zerfällt in wässriger Lösung in Gegenwart von Oxidationsmitteln über ein Sulfonyl-Aminoxyl-Radikal bevorzugt gemäß Schema 14 in NO[•] und Benzolsulfinsäure (BSI)⁹¹. Die oxidative NO[•]-Freisetzung aus BSH ist stark pH-Wert abhängig und nimmt bei höheren pH-Werten zu. Bei Ausschluss einer Oxidation zerfällt BSH pH-abhängig in BSI und HNO⁹¹, ohne dass dabei NO[•] auftritt.



Schema 14: Bildung von NO[•] aus BSH unter oxidativen Bedingungen

⁹¹

R. Zamora, A. Grzesiok, H. Weber, M. Feelisch, *Biochem. J.* **1995**, 312, S 333 - 339

N,N'-Nitrosoamin-N'-oxide (NONOate)

Diese Verbindungen werden auch als Diazeniumdiolate benannt, häufiger ist jedoch die Bezeichnung NOC oder NONOate. Die Darstellung von NONOaten erfolgt aus den Diaminen mit NO[•] unter erhöhtem Druck in polaren, aprotischen Lösungsmitteln⁹² (s. Abb. 63).

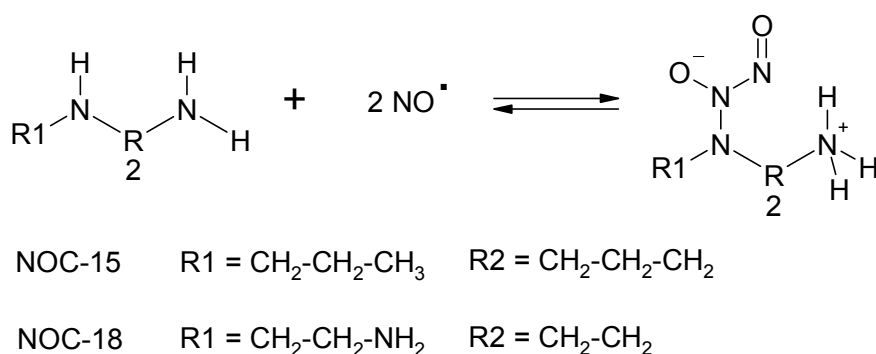


Abb. 63: *Darstellung und Zerfall der NONOate*

Als Feststoff stellen die NONOate stabile Verbindungen dar, die allerdings in Lösung spontan ohne Zusatz von Oxidations- oder Reduktionsmitteln wieder in ihre Edukte zerfallen. Daraus ergibt sich eine Freisetzung von 2 mol NO[•] pro mol NONOat, wobei die Freisetzungsgeschwindigkeit von den Resten R₁ und R₂ abhängig ist⁹².

In dieser Arbeit wurden NOC-15 und NOC-18 verwendet, deren Halbwertszeiten in wässriger Lösung bei pH 7.4 und 22°C :

- $t_{1/2}(\text{NOC-15}) = 76.6 \text{ min}$
- $t_{1/2}(\text{NOC-18}) = 3400 \text{ min}$

betragen⁹², wodurch verschiedene NO[•]-Freisetzungskinetiken simuliert werden sollten.

3.3.2.1 Umsetzung von **23g** mit BSH/Hexacyanoferrat (III)

Aus früheren Arbeiten³¹ war bekannt, dass Ausbeute und Produktverteilung nach der Reaktion von NOXYL (**1**) mit BSH und Hexacyanoferrat(III) maßgeblich von den Versuchsbedingungen abhängen.

⁹²

J. A. Hrabie, J. R. Klose, D. A. Wink, L. K. Keefer, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, S. 1472 - 1476

Setzt man relativ hohe Konzentrationen von **1** ($> 10^{-2}$ mol/l) mit einem 10% Überschuss von BSH und Hexacyanoferrat(III) in wässriger/acetonitrilhaltiger Pufferlösung bei pH 7.4 um, so erhält man unter aeroben Bedingungen in fast quantitativer Ausbeute (ca. 90%) das Nitroderivat **3** neben geringen Mengen der Nebenprodukte **2** und **4**.

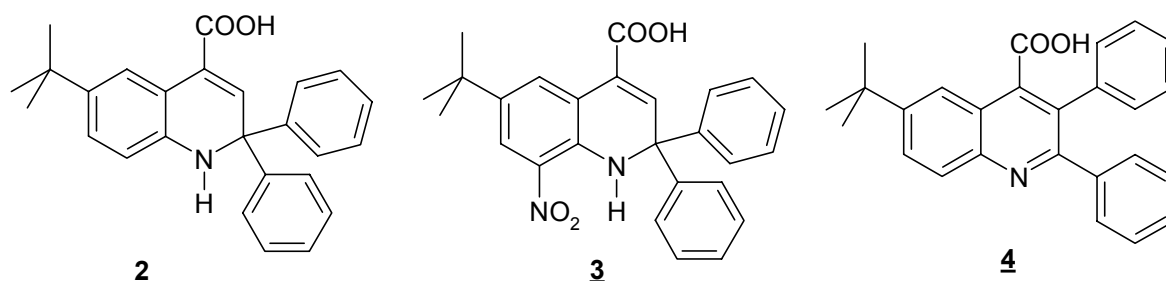


Abb. 64: Produktspektrum der Reaktion von **1** mit $\text{NO}^{\bullet}$

Bei geringerer Ausgangskonzentration von **1** (10^{-3} bis 10^{-4} mol/l) verändert sich das Produktspektrum gravierend. Die Anteile von **2** und **4** nehmen zu Lasten von **3** zu. Ein großer Überschuss an Oxidationsmittel begünstigt die Bildung von **4**.

Senkt man die Konzentration der Reaktanden noch weiter ab ($< 10^{-5}$ mol/l), so trifft das aus BSH freigesetzte $\text{NO}^{\bullet}$ auf einen großen Überschuss an gelöstem Luftsauerstoff, der als $\text{NO}^{\bullet}$ -Fänger mit **1** konkurriert ($2 \text{ NO}^{\bullet} + \text{O}_2 \longrightarrow 2 \text{ NO}_2^{\bullet}$). Aus diesem Grund wird unter aeroben Bedingungen die $\text{NO}^{\bullet}$ -Reaktion mit **1** bei einer Grenzkonzentration von $< 10^{-6}$ mol/l des Aminoxyldradikals praktisch unterdrückt, so dass keine Produkte resultieren. Damit in Einklang stehen die Befunde zur biologischen Halbwertszeit von $\text{NO}^{\bullet}$, die um so kleiner wird, je höher die Sauerstoffkonzentration im Umfeld der $\text{NO}^{\bullet}$ -Bildung ist. Daraus folgt zwangsläufig, dass ein Nachweis von genuinem $\text{NO}^{\bullet}$ streng genommen nur unter praktisch anaeroben Bedingungen möglich ist.

Aus diesem Grund wurden die Modellversuche zum Nachweis von $\text{NO}^{\bullet}$ aus BSH und anderen $\text{NO}^{\bullet}$ -Donatoren mit dem $\text{NO}^{\bullet}$ -Reagenz **23g** nur unter Ausschluss von Sauerstoff in einer Argon-Atmosphäre und wegen der geringen Löslichkeit von **23g** in Wasser in einem 1:1 Gemisch aus Acetonitril und Phosphatpuffer pH 7.4 durchgeführt.

Die Konzentration von **23g** in den Ansätzen wurde exemplarisch mit $1 \cdot 10^{-4}$ bzw. $6 \cdot 10^{-6}$ mol/l gewählt. Das $\text{NO}^{\bullet}$ -generierende System bestand aus äquimolaren Mengen BSH und Kaliumhexacyanoferrat(III) in jeweils 10- bis 20-fachem Überschuss relativ zu **23g**. Die Analytik der Ansätze erfolgte nach Extraktion der Produkte mit Dichlormethan oder direkt aus der Ansatzlösung nach einer Reaktionszeit von 2 Stunden durch HPLC auf RP_{18} -Säulen

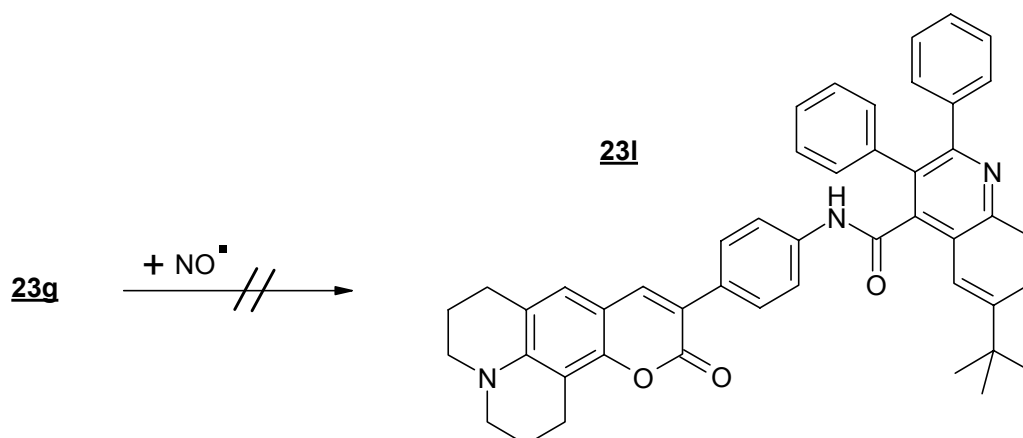
mittels UV/Vis – bzw. Fluoreszenzdetektor. Die quantitative Auswertung erfolgte nach Kalibrierung mit Hilfe authentischer Vergleichssubstanzen. Die Ergebnisse sind beispielhaft in Abb. 65 wiedergegeben.

Ausgangskonzentration von 23g [mol/l]	Molares Verhältnis 23g : BSH: $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$	Produktausbeute [%]	
		23e	23f
$1 \cdot 10^{-4}$	1 : 20 : 20	7.5	26.25
$1 \cdot 10^{-6}$	1 : 10 : 10	–	13.0

Abb. 65: Umsetzung von **23g** mit BSH/Hexacyanoferrat(III)

Die Angaben zur Produktausbeute entsprechen dem absoluten Anteil in %, ihre Summe ergibt die Gesamtausbeute, der zu 100 % stellt den Anteil von unverändertem Edukt dar. Nach der Auswertung dieser Ergebnisse fällt auf, dass die Produktausbeute insgesamt relativ gering ist und die Bildung des Nitroderivats **23e** –wie erwartet – durch den „Verdünnungseffekt“ zurückgedrängt wird bzw. ausbleibt.

Überraschenderweise konnte jedoch unter diesen Bedingungen außer **23e** und **23f** kein weiteres Reaktionsprodukt identifiziert werden.



Schema 15: Mögliche Bildung von **23l**

Daraus folgt, dass es im Verlauf der $\text{NO}^\bullet$ -Reaktion von **23g**, anders als beim „freien“ NOXYL (**1**), vermutlich aufgrund einer sterischen Abschirmung der 3-Position im 1,2-Dihydrochinolinring durch den voluminösen Amidrest, nicht zu einer Phenylumlagerung unter Ausbildung einer aromatischen Chinolinstruktur (**23l**) kommt.

3.3.2.2 Umsetzung von **23g** mit den NONOaten NOC-15 und NOC-18 unter anaeroben Bedingungen

Die NONOate NOC-15 und NOC-18 setzen in wässriger Lösung pH- und temperaturabhängig spontan NO• frei. Die Halbwertszeiten betragen bei 22°C und pH 7.4:

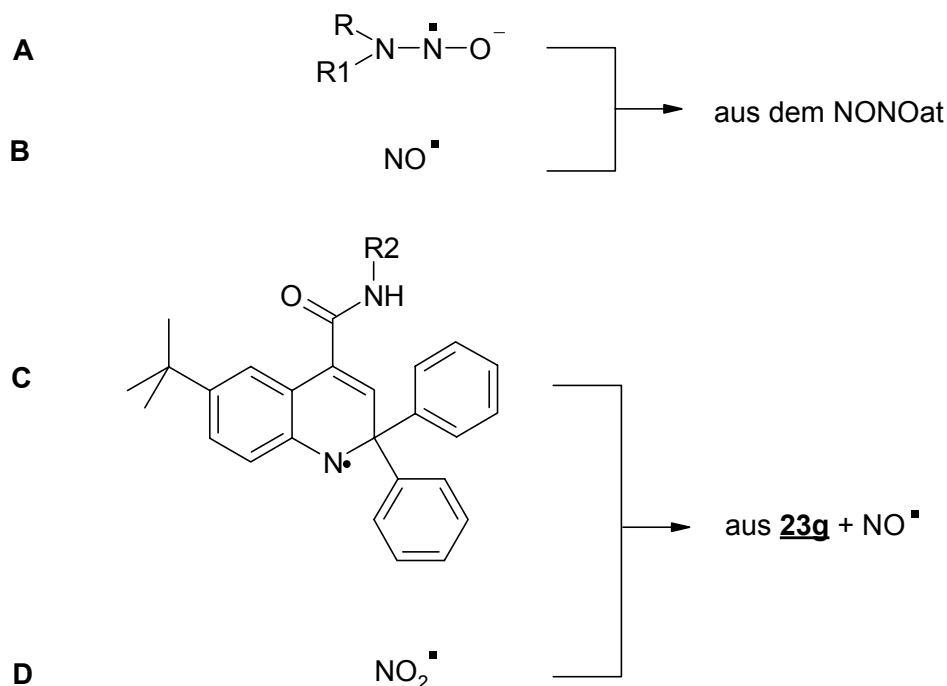
NOC-15	76.6 min	
NOC-18	3400 min	8 min (37°C)

Damit gehört NOC-15 zu den „schnellen“ und NOC-18 zu den „langsamen“ NONOaten, die für eine Umsetzung mit **23g** geeignet erschienen.

Die Konzentration von **23g** wurde wie bei der BSH-Reaktion im Bereich von 10^{-3} bis 10^{-4} mol/l gewählt. Die NONOate wurden im molaren Verhältnis von 1- (äquimolar) bis 600-fach (großer Überschuss) am Anfang der Reaktion auf einmal zugesetzt. Die Ansätze wurden unter Ausschluss von Luft in einer Argon-Atmosphäre in einem Gemisch aus Acetonitril/Phosphatpuffer pH 7.4 durchgeführt. Die Analytik erfolgte nach unterschiedlichen Reaktionszeiten wie in Kapitel 3.3.2.1 beschrieben. Die Angaben zur Produktausbeute entsprechen dem absoluten Anteil in %, ihre Summe ergibt die Gesamtausbeute, der Rest zu 100% stellt den Anteil von unverändertem Edukt dar. In Tab. 10 und sind einige der typischen Reaktionsansätze exemplarisch wieder gegeben.

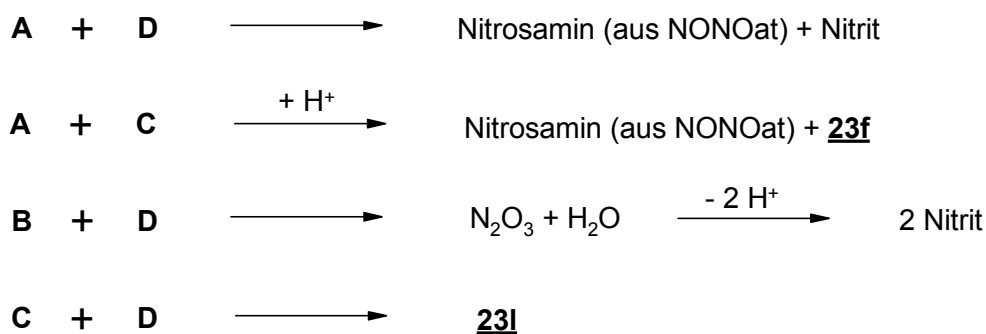
23g : NOC-15	Reaktions- temperatur	Reaktions- zeit	Reaktionsprodukte [%]	
			27e	27f
1 : 600	20°C	2 h	46.1	23.2
1 : 600	37°C	2 h	46.2	27.3
1 : 10	20°C	2 h	-	14.6
1 : 10	37°C	2 h	22.3	14.1
1 : 1	37°C	2 h	-	13.7
1 : 1	37°C	24 h	52.1	43.6

Tab. 10: Umsetzung von **23g** (10^{-4} mol/l) mit NOC-15 unter verschiedenen Bedingungen



Schema 17: Mögliche Radikal-Intermediate bei der anaeroben Reaktion von **23g** mit NONOaten

Ohne eine weitere Beteiligung von Sauerstoff oder anderen redox-aktiven Reagenzien sind daraus folgende Kreuzreaktionen denkbar.



Schema 18: Mögliche Reaktionen der Radikal-Intermediate

Art und Menge der gebildeten Produkte (s. Tab. 10 und Tab. 11) werden demnach durch die Konzentration der Intermediate und der Reaktionskinetik der beteiligten Partner bestimmt.

Aus den durchgeführten Versuchen mit **23g** und den NONOaten NOC-15 und NOC-18 lässt sich der Schluss ziehen, dass die Bildung von **23e** (Nitroprodukt) nur dann beobachtet wird, wenn es zu einer relativ hohen stationären $\text{NO}_2^{\bullet}$ -Konzentration kommt. Diese Bedingungen können auf verschiedene Weise realisiert werden.

- Hohe Konzentration an NONOaten
- Rasche Freisetzung von NO[•] durch die Verwendung von „schnellen“ NONOaten (NOC-15 anstelle von NOC-18)
- Schnelle Freisetzung von NO[•] durch Erhöhung der Reaktions-temperatur

Bei einer relativ geringen stationären NO[•]-Konzentration, die den biologischen Verhältnissen ähnlich ist, bleibt die Bildung des Nitroproduktes **23e** praktisch aus. Dagegen kommt es unter solchen Bedingungen fast ausschließlich zur Bildung von **23f**, dessen fluoreszenzspektroskopische Eigenschaften für einen Nachweis von NO[•] im biologischen Milieu optimal sein sollten.

3.3.2.4 Struktur des Nebenproduktes **30**

Bei einigen Umsetzungen von **23g** mit einem hohen Überschuss an NOC-15 konnte im HPLC-Chromatogramm eine weitere, unbekannte Substanz **30** UV/Vis-spektroskopisch detektiert werden, von der zunächst die Struktur **23i** angenommen wurde.

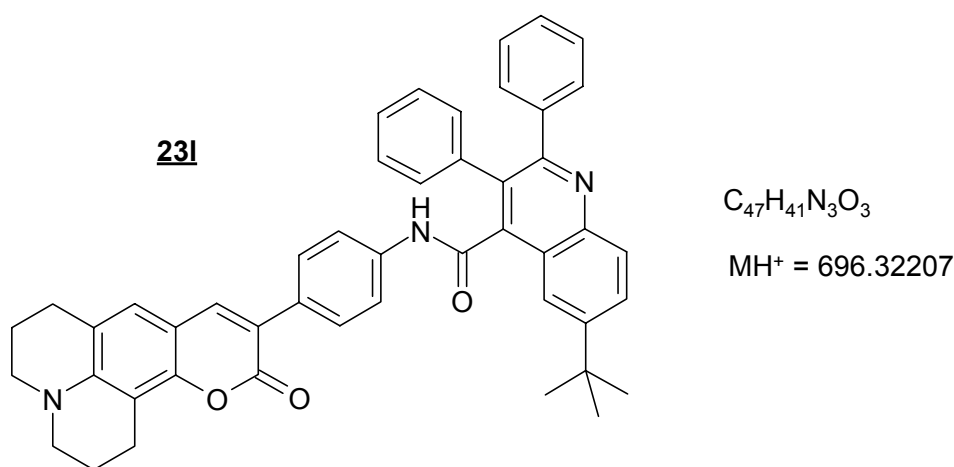


Abb. 66: Strukturformel von **23i**

Mit Hilfe eines LC/MS/MS-Spektrums (Abb. 67) konnte diese Struktur **23i** jedoch nicht bestätigt werden. Vielmehr ergab sich aus diesem Massenspektrum ein relatives Molekulargewicht von 711, das den Rückschluss auf ein Di-dehydro-oxo-Produkt von **23f** erlaubte und durch ein hochaufgelöstes MS mit MH^+ (712.2984) bestätigt wurde.

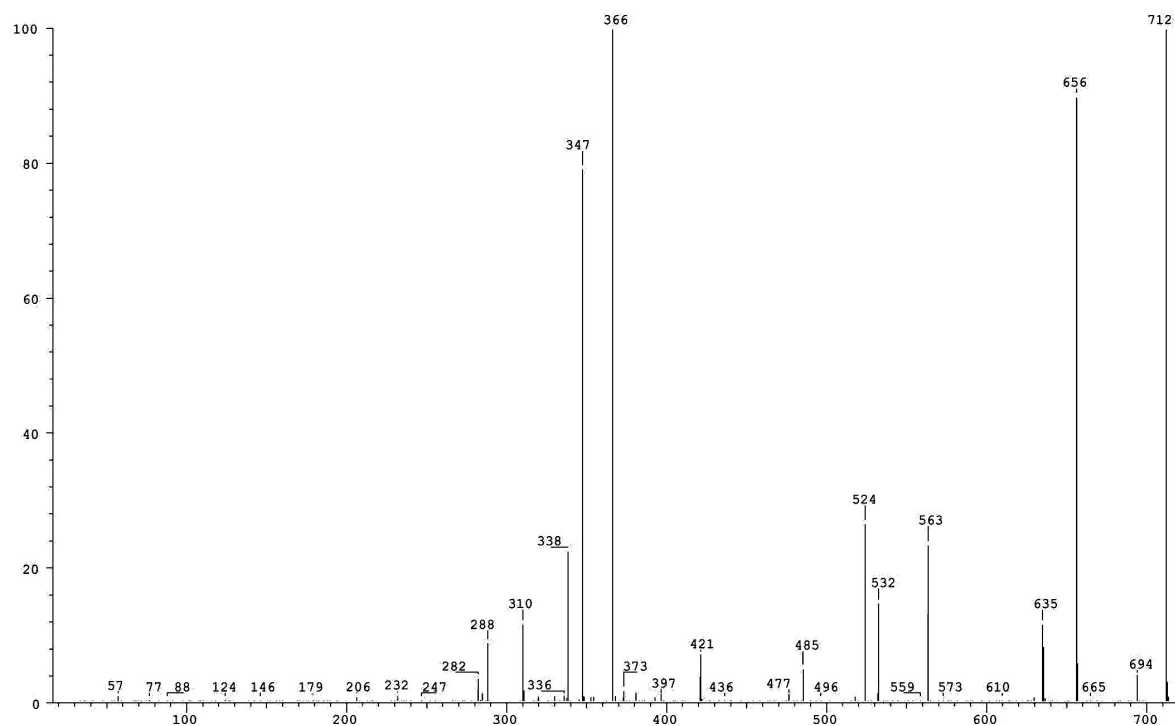


Abb. 67: LC/MS/MS-Spektrum des Nebenproduktes **30**

Auf der Suche nach der tatsächlichen Struktur der unbekannten Verbindung **30** stieß man zwangsläufig auf das Chinolon **23i** (s. Abb. 68), das in Form der entsprechenden Carbonsäure schon früher als Nebenprodukt der NO[•]-Reaktion von NOXYL-1 isoliert worden war³¹ und in geringer Menge zur Verfügung stand.

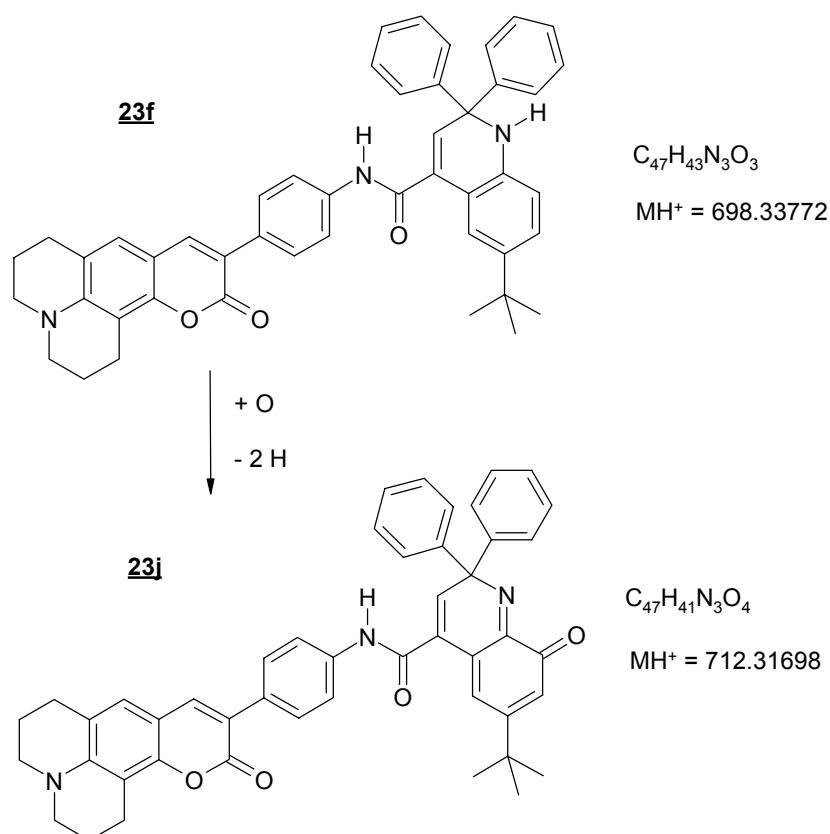


Abb. 68: Vergleich der Substanzdaten von **23f** und **23j**

Unabhängig davon taucht im LC/MS/MS von **30** (Abb. 67, S. 88) ein intensives Fragment mit $m/z = 347$ auf, während bei **23j** und **23f** das Aminophenyl-BAC wie erwartet, als MH^+ bei $m/z = 333$ registriert wird (s. Abb. 69). Daraus geht eindeutig hervor, dass die Oxidation nicht im Chinolin sondern im Phenyl-BAC-Anteil erfolgt war. Dagegen wird sowohl bei **23f** als auch bei **30** in den LC/MS/MS-Spektren der „nicht oxidierte“ Dihydrochinolin-Teil als intensives Acylion bei $m/z = 366$ registriert (vgl. Abb. 69).

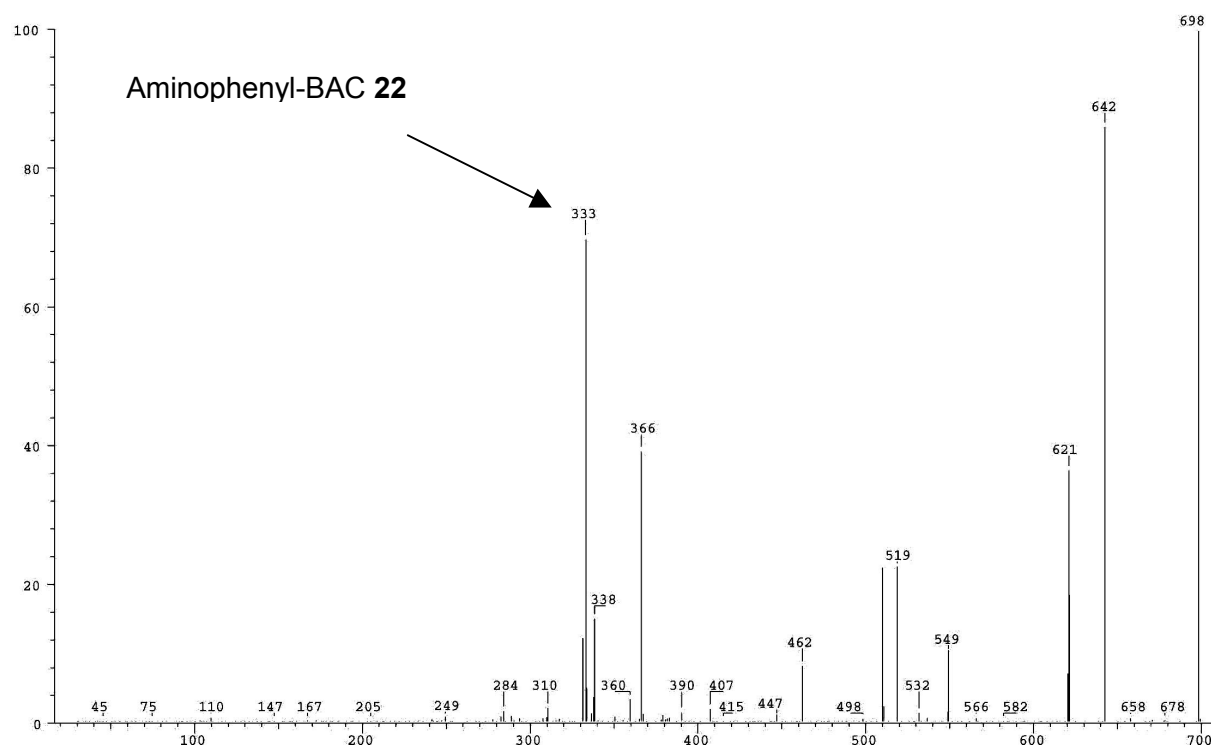


Abb. 69: LC/MS/MS-Spektrum von **23f**

Damit kann dem Produkt **30** die u.a. Struktur zugeordnet werden, wobei die Lokalisation der Carbonylgruppe an C-3 oder C-5 nicht möglich war, da außer dem MS keine weiteren spektroskopischen Daten zur Verfügung standen.

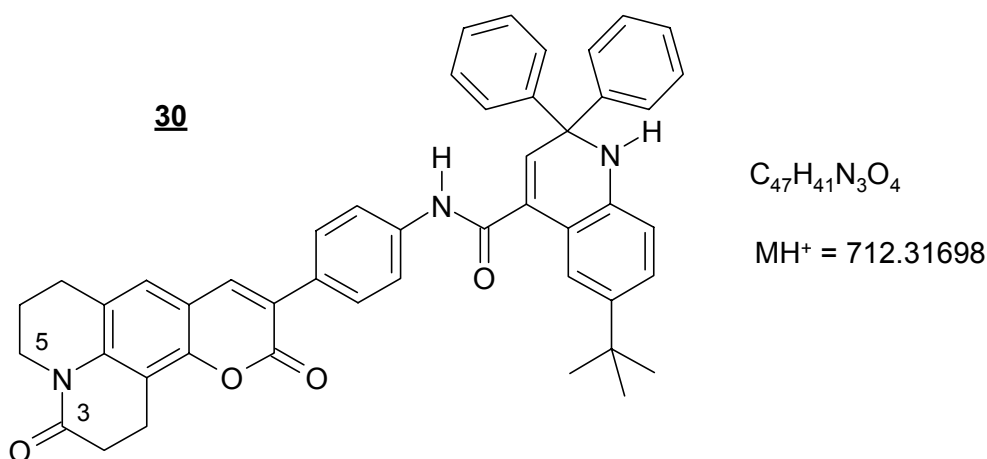


Abb. 70: Strukturvorschlag für **30**

Die Oxidation von Chinolizidinen zu Lactamen ist nicht ungewöhnlich und wird in der Literatur am Beispiel von Sabadilla Alkaminen⁹⁴ oder Spartein⁹⁵ beschrieben. Allerdings

⁹⁴ H. Möhrle, *Arch. Pharmazie (Weinheim)* **1961**, 294, S. 749 - 758

⁹⁵ O. E. Edwards, F. H. Clarke, B. Douglas, *Canadian J. Chemistry* **1954**, 32, S. 235 - 241

erfolgte die Oxidation dort mit Quecksilberacetat, während hier das intermediär auftretende $\text{NO}_2^\bullet$ -Radikal als Oxidationsmittel fungieren dürfte.

Aus diesem Grund wurde auch das Aminophenyl-BAC 22 selbst einer aeroben $\text{NO}^\bullet$ -Reaktion unterzogen. Es überraschte nicht, dass hierbei ebenfalls ein entsprechendes Lactam der Struktur 31 identifiziert werden konnte, das im MS das gleiche Schlüsselbruchstück aufweist, das auch bei 30 auftrat und mittels hochauflösender MS bestätigt werden konnte.

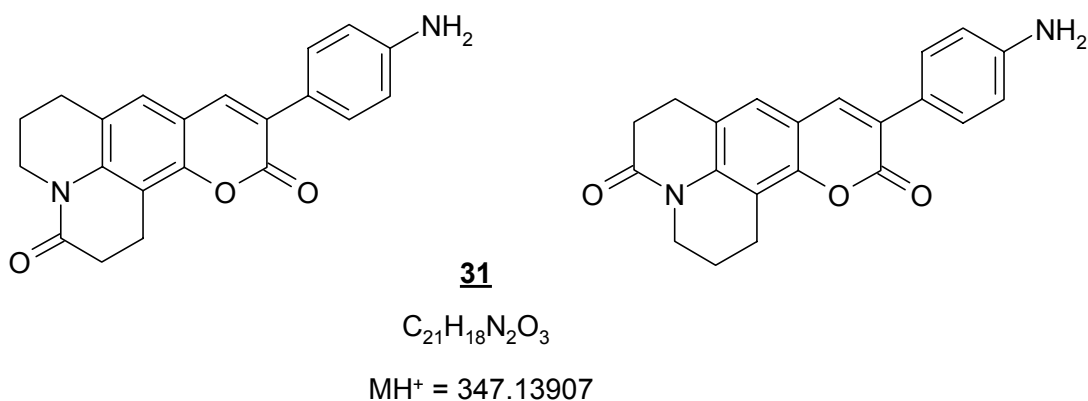


Abb. 71: Strukturvorschläge für 31

Insgesamt kann festgestellt werden, dass 30 und 31 nur dann auftreten, wenn intermediär hohe stationäre Konzentrationen von $\text{NO}_2^\bullet$ -Radikalen auftreten.

3.4 Untersuchung des NO[•]-Detektors **23g** in Kulturen humaner Endothelzellen

Nach den vielversprechenden Ergebnissen bei der NO[•]-Detektion mit dem Amid **23g** aus NOXYL (**1**) und dem Aminophenyl-BAC (**22**) sollten entsprechende Untersuchungen an NO[•]-produzierenden Zellkulturen auch durchgeführt werden, um die Eignung als Messsonde für biologische Systeme zu erproben. Dazu wurden EA-hy926 Zellen verwendet, die von Edgell⁹⁶ als humane endotheliale Zelllinie entwickelt wurde.

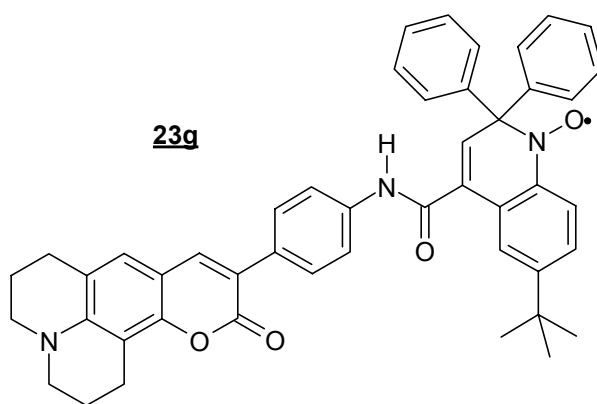


Abb. 72: **23g**, neue potentielle Messsonde für NO[•]

3.4.1 Materialien und Methoden

Bei den EA-hy926-Zellen handelt es sich um eine permanente, klonfreie Zelllinie mit ausgeprägten Wachstumseigenschaften. Sie weist typische endotheliale Zellstrukturen wie kopfsteinpflasterartige Morphologie, Weibel-Palade-Körperchen und den darin gespeicherten von-Willebrand-Faktor auf.

Als Medium wurde eine Mischung aus Medium M199^A ohne Phenolrot, mit Pen-Strep^B und 2% FCS (fötales Kälberserum^C) verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in Kulturflaschen aus Polypropylen (25 cm²) kultiviert. Für die Subkultivierung wurden die

⁹⁶ J. Bauer, M. Margolis, C. Schreiner, C. J. S. Edgell, J. Azizkhan, E. Lazarowski, R. L. Juliano, *J. Cellular Physiol.* **1992**, 153, S. 437 - 449

^A Zellmedium Sigma Prod. Nr. M3769

^B Penicillin G-Kalium-Salz-Streptomycin-Sulfat

^C Biochrom KG Prod. Nr. S0115 Charg. 133EE

Zellen bei Konfluenz (Vorliegen eines geschlossenen Zellmonolayers) 1:5 passagiert. Die Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit PBS^D durch 0.2% Trypsinlösung abgelöst und auf neue Kulturflaschen verteilt.

3.4.2 Überprüfung der Zytotoxizität von **23g** mittels MTT-Test

Die Zelltoxizität von **23g** wurde mittels des MTT-Testes ermittelt. Es handelt sich dabei um das fast farblose 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid^E, welches durch mitochondriale Dehydrogenasen in ein blaues, wasserunlösliches Formazan umgewandelt wird (s. Abb. 73). Zwischen der Konzentration des Farbstoffs und der mitochondrialen Aktivität und somit auch der Vitalität der Zellen besteht ein linearer Zusammenhang.

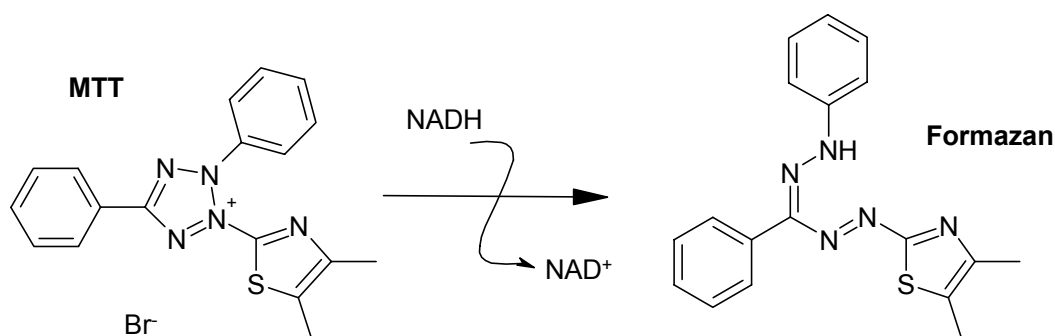


Abb. 73: Reaktion beim MTT-Test

Für den MTT-Test wurden Zellen von einer konfluenten 25 cm²-Flasche auf eine 96 Lochplatte (96 well) ausgesät und bis zur erneuten Konfluenz kultiviert.

Die EA-hy926 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von **23g** inkubiert. Jedes Well wurde mit 100 µl Substratlösung versetzt. Der getestete Konzentrationsbereich lag zwischen 10 nM bis 10 µM zuzüglich einer Blindprobe. Als Medium wurde auch wurde die oben angegebene Mischung verwendet. Nach 1-stündiger Inkubation mit der Substratlösung wurde pro Well 10 µl einer MTT-Lösung (5 mg MTT/ml PBS^D, steril filtriert) dazu pipettiert. Nach weiteren 4 h bei 37°C werden die Zellen mit 100 µl SDS-HCl^F (1 g SDS/10 ml 0.01 N HCl) pro Well versetzt. Anschließend werden sie über Nacht bei 37°C inkubiert. Die 96

D. Phosphat-Buffer-Salinzusatz; Dulbecco Phosphat Buffer Salin Produkt Nr. D5652 Sigma

E. MTT Sigma Produkt Nr. M5655

F. Natriumdodecylsulfat-Hydrochlorid

Lochplatte wird am darauf folgenden Tag mittels eines Plattenreader mit einem Filter von 550 nm ausgelesen.

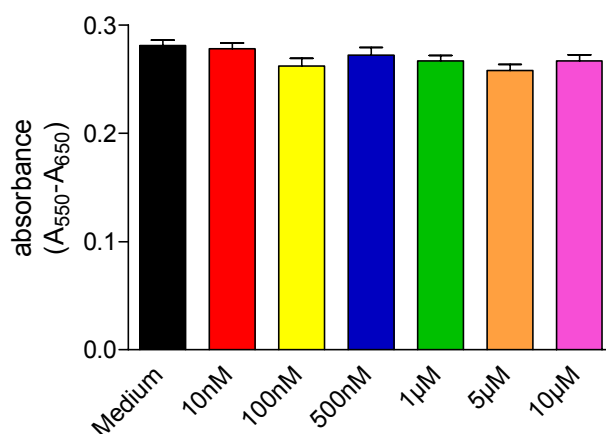


Abb. 74: Ergebnis des MTT-Testes von EA-hy926 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von **23g** inkubiert

Das Ergebnis des MTT-Testes in Abb. 74 zeigt, dass sich die Zellaktivität ohne Inkubation mit **23g** nicht signifikant von der mitochondrialen Aktivität derjenigen Zellen unterscheiden, die mit **23g** inkubiert wurden. Dies gilt für den gesamten Konzentrationsbereich bis 10 µM **23g**.

Als Blindprobe **ohne Zellen** wurde eine weitere Microtiterplatte nur mit verschiedenen **23g** Konzentrationen beschickt. Hiermit sollte gezeigt werden, dass weder **23g** das Formazan bildet, noch dass die gemessene Absorption durch die Grundabsorption von **23g** hervorgerufen wird.

Die Absorption aller Blindproben liegt im Bereich von 0.03 bis 0.04 (s. Abb. 75) und kann daher vernachlässigt werden.

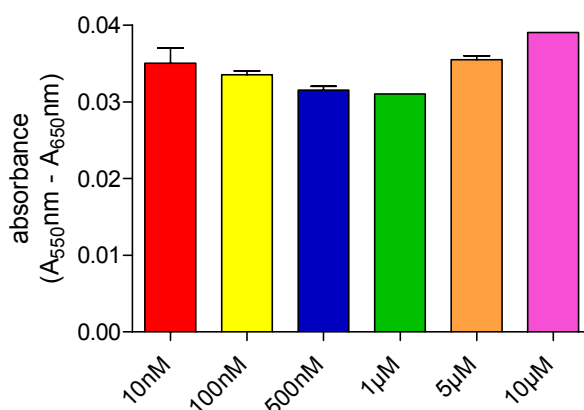


Abb. 75: Ergebnis MTT-Test verschiedener **23g**-Lösungen **ohne Zellen**

3.4.3 Ermittlung der optimalen Substratkonzentration von **23g** für den intrazellulären Nachweis von NO[•]

Nachdem gezeigt werden konnte, dass **23g** im getesteten Konzentrationsbereich nicht zytotoxisch wirkt, sollte für die weiteren Versuche ermittelt werden, mit welcher optimalen Substratkonzentration die EA-hy926 Zellen inkubiert werden müssen, um den NO[•]-Nachweis optimal und reproduzierbar zu gestalten. Dazu wurden je zwei Ansätze mit der zu untersuchenden Konzentration an **23g** inkubiert. Ein Ansatz wird zusätzlich mit 4- α -**P**horbol-12-**m**yristat-13-**a**cetate (PMA, Razemat) inkubiert. Dieser **P**rotei**k**inase-**C**-Aktivator (PKC-Aktivator) stimuliert über die Aktivierung der PKC die NO[•]-Synthase, so dass die NO[•]-Konzentration in den Zellen über die Basisrate hinaus ansteigt. Um die resultierende Fluoreszenz messen zu können, werden die Zellen zunächst lysiert (1.5 mg EDTA und 0.1 % Triton in 10 ml PBS^D) bevor die Microtiterplatten durch einen Fluoreszenzplattenreader ausgelesen werden.

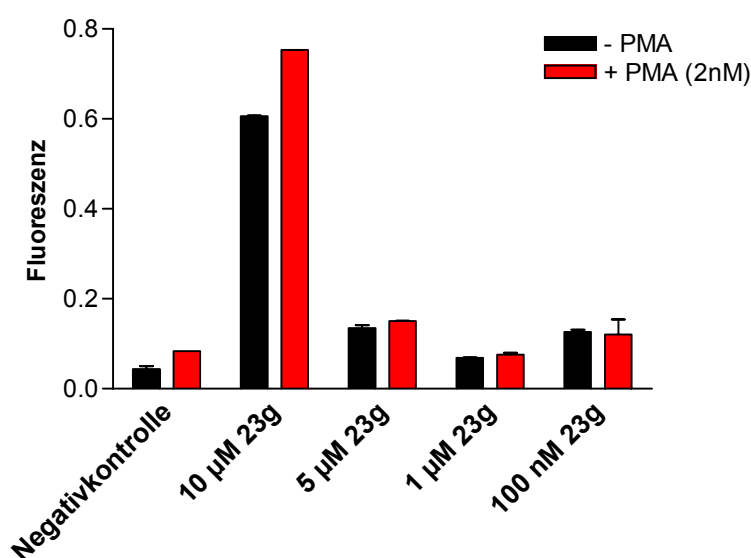


Abb. 76: Fluoreszenz der Zelllysate, die mit verschiedenen **23g** Konzentrationen inkubiert wurden, mit und ohne PMA-Stimulation

In Abb. 76 zeigen die schwarzen Balken die Fluoreszenz des Zelllysates ohne Stimulation mit PMA an und die roten Balken das stimulierte Zelllysate bei gleicher Substratkonzentration. Es wurde ein Konzentrationsbereich von 0 nM (Negativkontrolle) bis 10 μ M untersucht. Der schwarze Balken der Negativkontrolle (ohne **23g**) zeigt eine Fluoreszenz von 0.037. Nach der Stimulation des Kontrolllysates durch PMA stieg diese nur auf 0.083 an. Bei einer Konzentration von 10 μ M wurde beim Zelllysate ohne Stimulation eine Fluoreszenz von 0.6

gemessen. Durch die Stimulation stieg der Wert signifikant auf 0.75. Verringerte man die Substratkonzentration bis auf 100 nM wurde kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle sichtbar. Bei 100 nM **23g** ist auch gleichzeitig die Nachweisgrenze erreicht.

3.4.4 Langzeitinkubation mit einem Proteinkinase C-Stimulator (PMA)

Nach Ermittlung der optimalen Substratkonzentration von 10 μM **23g** wurde eine Langzeitinkubation mit und ohne (Kontrolle) Stimulator PMA über 18 h durchgeführt, jeweils mit und ohne (Blindversuch) **23g** (s. Abb. 77).

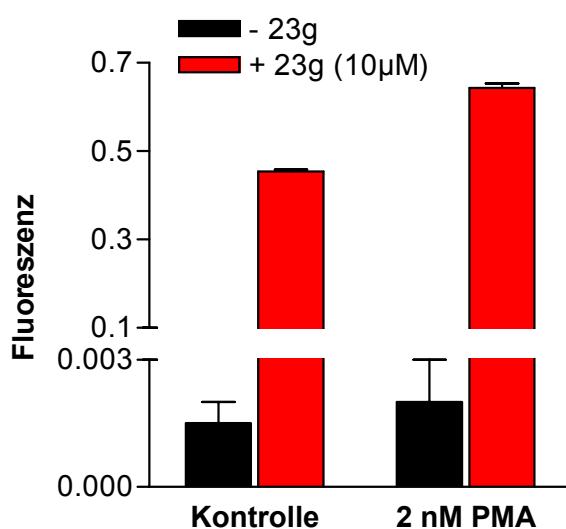


Abb. 77: Ergebnis der Langzeitinkubation von PMA

Während bei den Blindversuchen (schwarze Balken) ohne $\text{NO}^{\bullet}$ -Detektor eine maximale Fluoreszenz von 0.02 bzw. 0.03 erreicht wurde, stieg die Fluoreszenz nach Zusatz von **23g** (rote Balken) auf 0.44 (ohne Stimulation) bzw. 0.60 (mit Stimulation) an.

3.4.5 Darstellung der stimulierten EA-hy926 Zellen im Fluoreszenzmikroskop

Analog der unter 3.4.4 beschriebenen Inkubation wurden Zellen auf Objektträger transferiert und unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Anregung erfolgte durch einen Argonlaser bei 488 nm und die Emission wurde bei 505 nm betrachtet. Die folgenden Aufnahmen zeigen die Ergebnisse zum orts aufgelösten Nachweis von $\text{NO}^{\bullet}$.

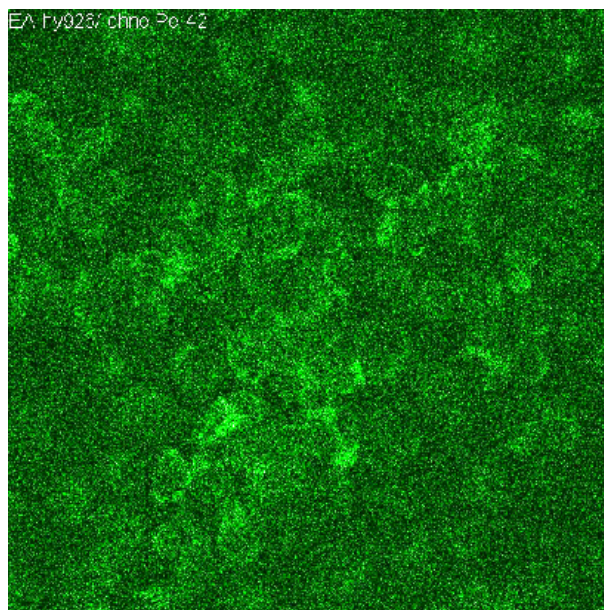


Abb. 78: *Eigenfluoreszenz von EA-hy926 Zellen*

In der obigen Abb. 78 ist die nicht stimulierten Zellen der Zelllinie EA-hy926 ohne Zusatz von **23g** abgebildet. Zu erkennen sind lediglich unscharfe Zellumrisse, die aus der Grundfluoreszenz der Zellen resultieren.

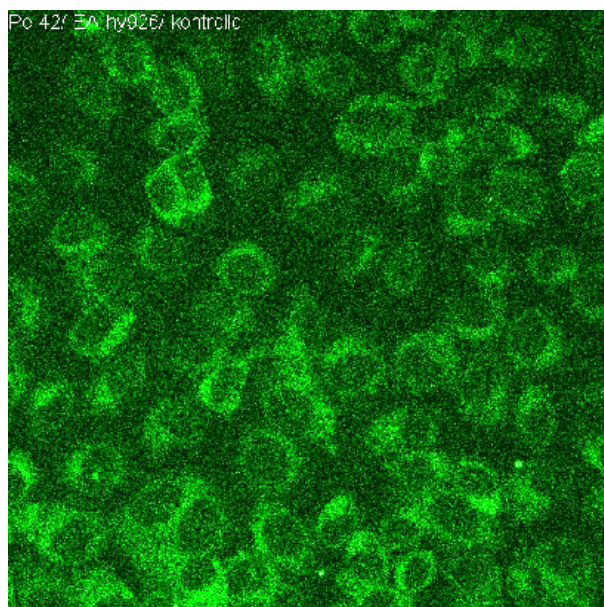


Abb. 79: *Fluoreszenz von EA-hy926 Zellen nach Zusatz von **23g***

Abb. 79 zeigt die gleiche Zelllinie nach Inkubation mit **23g**. Es ist gut zu erkennen, dass im Umkreis der dunkel erscheinenden Zellkerne, also im Zytosol, eine verstärkte Fluoreszenz sichtbar ist.

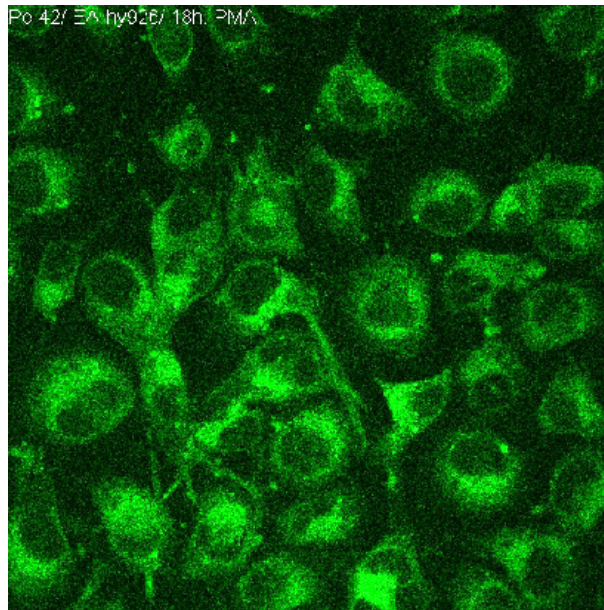


Abb. 80: Fluoreszenz von EA-hy926 Zellen nach Zusatz von 23g und 18 h Inkubation mit PMA

Die Zellen wurden nicht nur mit 23g inkubiert, sondern zusätzlich noch 18 Stunden mit PMA stimuliert, dadurch wurde die Synthese von NO* gegenüber den nichtstimulierten EA-hy926 Zellen stärker angeregt, so dass das Fluoreszenzsignal im Zytosol signifikant verstärkt sichtbar wurde (s. Abb. 80).

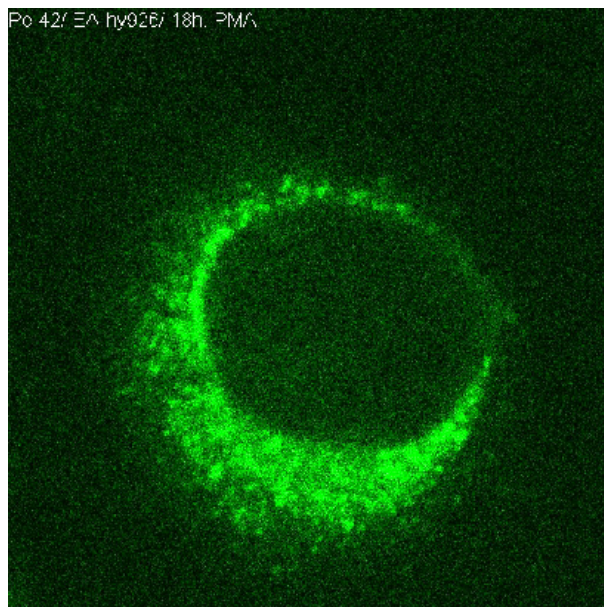


Abb. 81: Vergrößerung einer einzelnen Zelle aus Abb. 80

Abb. 81 zeigt einen Detailausschnitt einer einzelnen Zelle. Hier ist klar zu erkennen, dass die NO*-Synthese offensichtlich im Zytosol in der Nähe der Zellkerne stattfindet.

3.4.6 Qualitativer Nachweis der Reaktionsprodukte der Reaktion von **23g** mit NO[•] im Medium über den EA-hy926 Zellen und im Zelllysate

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass **23g** nicht zytotoxisch wirkt und ein orts aufgelöster Nachweis von NO[•] möglich ist, sollte durch einen weiteren Zellversuch Rückschlüsse über den Transport von **23g** und dessen NO[•]-Reaktionsprodukte **23e** und **23f** getroffen werden.

Zu diesem Zweck wurden 9 Wells mit den endothelialen EA-hy-926 Zellen beschickt. (Zur Verdeutlichung der Vorgehensweise bei der Aufarbeitung der Proben dient neben der nachfolgenden Versuchsbeschreibung Abb. 82.) Davon wurden 3 Wells mit Zellmedium (ohne **23g**) versetzt und 1 h inkubiert (Blindversuche). Die übrigen 6 Wells wurden 1 h mit der Zellmediumlösung inkubiert, die zusätzlich **23g** enthielt, so dass eine Inkubation mit der vorher ermittelten optimalen Konzentration von 10 µM/l stattfand. Nach einstündiger Inkubation wurde das überstehende Medium aus allen Wells abgenommen. Diese Zellmediumlösungen (M 1-9) konnten direkt für die HPLC-Analytik verwendet werden. Nach der Abnahme des Zellmediums wurden die Zellen mit einer PBS-Lösung gewaschen. Diese Waschlösungen wurden erneut aufgefangen und als Proben (W 1-9) analysiert. Die 3 Wells ohne **23g** (Blindversuche) wurden einer Zelllyse mittels Lysat-Lösung unterzogen. Diese lysierten Zellen wurden zentrifugiert (5 min, 14000 g) und das so gewonnene Zelllysate (L 1-3) wurde dadurch von den festen Zellbestandteilen getrennt und für die HPLC-Analytik verwendet. Die Zellen der übrigen 6 Wells wurden wieder mit Medium (ohne **23g**) versetzt und weiter inkubiert. Die Inkubation von 3 Wells wurde nach einer Stunde beendet (t = 1 h). Die oben beschriebene Behandlung der Zellen wurde wiederholt, d.h. überstehendes Medium wurde abgenommen (M 10-12), Erhalt von 3 Waschlösungen (W 10-12) und 3 Zelllysatlösungen (L 4-6). Die Inkubation der verbleibenden 3 Wells wurde erst nach 3 Stunden beendet (t = 3 h) und nach der oben beschriebenen Methode der Aufarbeitung unterworfen. Für die HPLC-Analytik wurden dadurch weitere 3 Lösungen (M 13-15), 3 Waschlösungen (W 13-15) und 3 Zelllysatlösungen (L 7-9) erhalten.

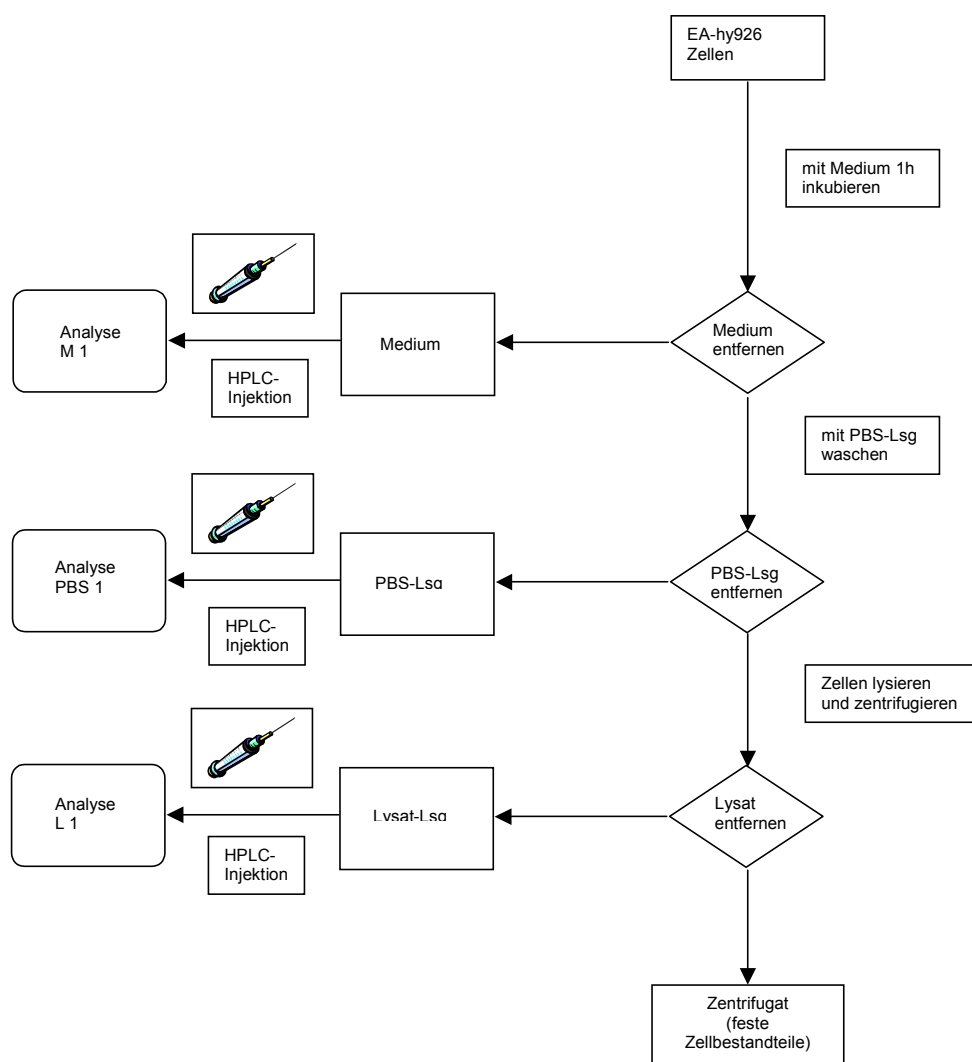


Abb. 82: Schematische Darstellung der Behandlung der Proben

Die abgenommenen Medien (M 1-18), die Waschlösungen (PBS 1-18) und die Zelllysate (L 1-12) wurden mit Hilfe der HPLC-Methode (s. Kapitel 3.3, S. 76) analysiert. Eine quantitative Aussage über die Menge an **23g**, welche innerhalb einer einstündigen Inkubation in die Zellen gelangt ist, war nicht möglich, da die eingesetzte Lösung am Rand der Nachweisgrenze für **23g** lag und dadurch der nicht in die Zellen gelangte Anteil von **23g** im Überstand nicht mehr zu detektieren war. Da die Nachweisgrenze für das Nitroderivat **23e** mit der von **23g** identisch ist, war auch ein Nachweis von **23e** in allen Proben (M 1-18; PBS 1-18; L 1-18) nicht möglich. Eine quantitative Aussage über den Anteil an gebildeten Reaktionsprodukten und unverändertem Reagenz **23g** konnte demnach nicht vorgenommen werden, so dass nur eine „semiquantitative“ Auswertung von **23f** über die erhaltenen Chromatogramme vorgenommen und in den drei unten aufgeführten Tabellen zusammengefasst werden konnte.

EA-hy926 Zellen mit Medium **ohne 23g** 1 h inkubiert und anschließend lysiert

(Blindversuch mit $t = 0$)

Probe	<u>23f</u>	Probe	<u>23f</u>	Probe	<u>23f</u>
Überstand M 1	/	Waschlsg W 1	/	Lysat L 1	/
Überstand M 2	/	Waschlsg W 2	/	Lysat L 2	/
Überstand M 3	/	Waschlsg W 3	/	Lysat L 3	/

Tab. 12: Ergebnisse des Blindversuches

EA-hy926 Zellen mit Medium **mit 23g** 1 h inkubiert, wieder 1h nur mit Medium inkubiert und dann erst lysiert ($t = 1h$)

Probe	<u>23f</u>	Probe	<u>23f</u>	Probe	<u>23f</u>	Probe	<u>23f</u>	Probe	<u>23f</u>
M 4	+	W 4	+	M 10	+	W 10	+	L 4	+++
M 5	+	W 5	/	M 11	+	W 11	+	L 5	+++
M 6	++	W 6	+	M 12	+	W 12	+	L 6	+++

Tab. 13: Nachweis von 23f nach 1 h Inkubation mit 23g und einer weiteren Stunde Reaktionszeit

EA-hy926 Zellen mit Medium **mit 23g** 1 h inkubiert, wieder 3h nur mit Medium inkubiert und dann erst lysiert ($t = 3h$)

Probe	<u>23f</u>	Probe	<u>23f</u>	Probe	<u>23f</u>	Probe	<u>23f</u>	Probe	<u>23f</u>
M 7	++	W 7	/	M 13	+++	W 13	/	L 7	+
M 8	+	W 8	+	M 14	+++	W 14	/	L 8	+
M 9	++	W 9	/	M 15	+++	W 15	/	L 9	+

Tab. 14: Nachweis von 23f nach 1 h Inkubation mit 23g und drei weiteren Stunden Reaktionszeit

Wie nicht anders zu erwarten konnte das NO⁺-Reaktionsprodukt 23f im Blindversuch nicht im überstehenden Medium, in der Waschlösung und auch nicht im Zelllysate nachgewiesen werden. Betrachtet man in Tab. 13 und Tab. 14 die Medien (M 4-9) und die Waschlösungen (W 4-9) nach 1 h Inkubation mit 23g, konnte hier schon das Reaktionsprodukt 23f nachgewiesen werden. Dies zeigt einerseits, dass dafür 23g in die Zellen gelangt ist, 23f gebildet wurde und wieder aus den Zellen ins überstehende Medium wieder abgegeben wurde. Nach einer weiteren Stunde gelangte mehr 23f ins überstehende Medium, und durch

Verlängerung der Inkubation auf 3 h konnte eine Verdreifachung des Peaks von **23f** im Chromatogramm beobachtet werden.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Seit der Entdeckung von Stickstoffmonoxid ($\text{NO}^\bullet$) als endothelialer Botenstoff (EDRF) durch Furchgott, Ignarro und Murad (Nobelpreis 1998) ist die große Bedeutung dieses „anorganischen Hormons“ für viele Bereiche der Biochemie, Physiologie und Medizin erkannt und in einer wahren Flut von Publikationen dokumentiert worden. Dagegen ist die Zahl der Arbeiten, die sich mit dem spezifischen Nachweis des metastabilen Radikals in biologischen Systemen beschäftigen, relativ gering. Dabei wird $\text{NO}^\bullet$ meistens nicht als solches, sondern in Form seiner stabilen Reaktionsprodukte nachgewiesen, da die biologische Halbwertszeit von $\text{NO}^\bullet$ sehr kurz ist (5 – 30 Sekunden).

Aus diesem Grund besteht besonderes Interesse vieler Arbeitsgruppen an einem praktikablen orts- und zeitaufgelösten Nachweisverfahren für $\text{NO}^\bullet$. Als problematisch stellt sich dabei die äußerst geringe Konzentration des Radikals in biologischen Systemen dar, dem am besten eine fluoreszenzspektroskopischen Methode gerecht werden kann.

Unter dieser Prämisse sollte in der vorliegenden Arbeit ein fluorimetrisches Verfahren zur $\text{NO}^\bullet$ -Detektion ausgearbeitet werden, das auf dem Prinzip des „ $\text{NO}^\bullet$ -Fängers“ NOXYL (**A**) beruht. Dieses stabile Aminoxy-Radikal wurde vor einiger Zeit im eigenen Arbeitskreis entwickelt. Es reagiert in Abhängigkeit von der stationären $\text{NO}^\bullet$ -Konzentration zu diamagnetischen Produkten **B** – **D**, die mit einer klassischen Analytik (HPLC, UV-Detektion) erfasst werden können. Allerdings ist die Nachweisgrenze für $\text{NO}^\bullet$ so hoch, dass NOXYL selbst für eine $\text{NO}^\bullet$ -Detektion in biologischen Systemen nicht in Frage kam.

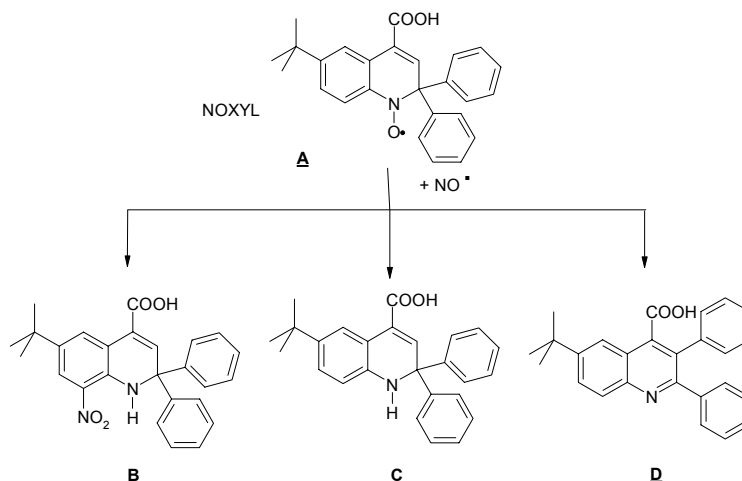


Abb. 83: NOXYL **A** und dessen Reaktionsprodukte **B** – **D**

Deshalb wurde versucht, NOXYL über die Carboxylgruppe mit Fluorophoren zu derivatisieren, um so die Empfindlichkeit zu verbessern. Dieses Konzept stellt im Vergleich

mit den bisher bekannten fluorimetrischen Detektionsmethoden ein **neuartiges** Messprinzip dar. Auf Grund theoretischer Überlegungen war zu erwarten, dass derartige Derivate von NOXYL (**A**) wegen ihres Radikalcharakters nur eine verminderte Fluoreszenzquantenausbeute zeigen, während die fluoreszenzmarkierten Produkte **B** – **D** als diamagnetische Verbindungen eine möglichst starke Fluoreszenz aufweisen. Damit sollte eine unmittelbare NO[•]-Detektion durch Verstärkung einer schwachen Grundfluoreszenz angestrebt werden.

Ein systemimpliziertes Problem bestand allerdings zusätzlich darin, dass auch vom fluoreszenzmarkierten Produkt **B** ein intramolekulares Quenching zu erwarten war, da der fluoreszenzmindernde Effekt von Nitrogruppen bekannt ist. Das Ausmaß dieser Quenching-Effekte auf die spektroskopischen Eigenschaften der betreffenden Verbindungen war allerdings im Vorfeld schwer abzuschätzen, zumal Art und Struktur der Fluorophore zunächst noch nicht festgelegt waren. Außerdem war aus früheren Arbeiten bekannt, dass der Anteil des Nitroproduktes **B** zugunsten von **C** und **D** stark zurückgeht, wenn die stationäre NO[•]-Konzentration abfällt. Diese früher als Nachteil empfundene Tatsache (NOXYL als NO[•]-„Fänger“!) könnte sich aber im biologischen Milieu eher als Vorteil erweisen.

Aus diesem Grund wurde zunächst nach geeigneten Fluorophoren für eine Derivatisierung von NOXYL gesucht. Da das freie Radikal nur in begrenztem Umfang zur Verfügung stand und eine Nachsynthese sehr aufwändig ist, wurden die Methoden zur Kupplung eines Fluorophors an ausgewählten Modellcarbonsäuren erprobt (s. Abb. 84).

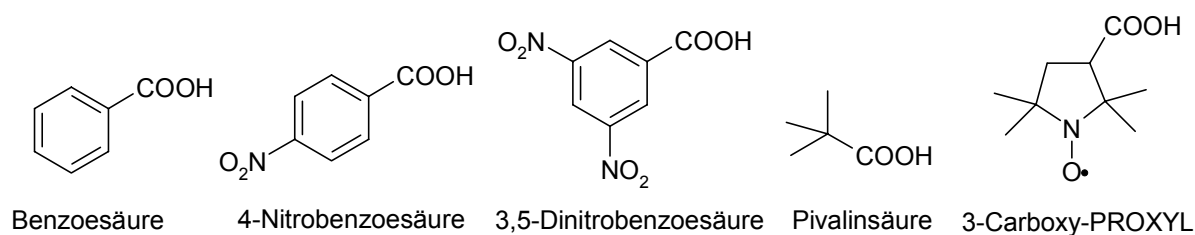


Abb. 84: verwendete Modellcarbonsäuren

Diese Säuren wurden mit den entsprechend funktionalisierten Fluorophoren (s. Abb. 85) unter möglichst milden Bedingungen in der Regel zu den Amiden derivatisiert, die durch Elementaranalyse und mit den üblichen spektroskopischen Methoden charakterisiert wurden (IR, ¹H-NMR, MS, UV/Vis, ESR). Im Vordergrund standen jedoch die fluorimetrischen Eigenschaften, insbesondere das Ausmaß des Stokes-Shifts und die Quantenausbeute.

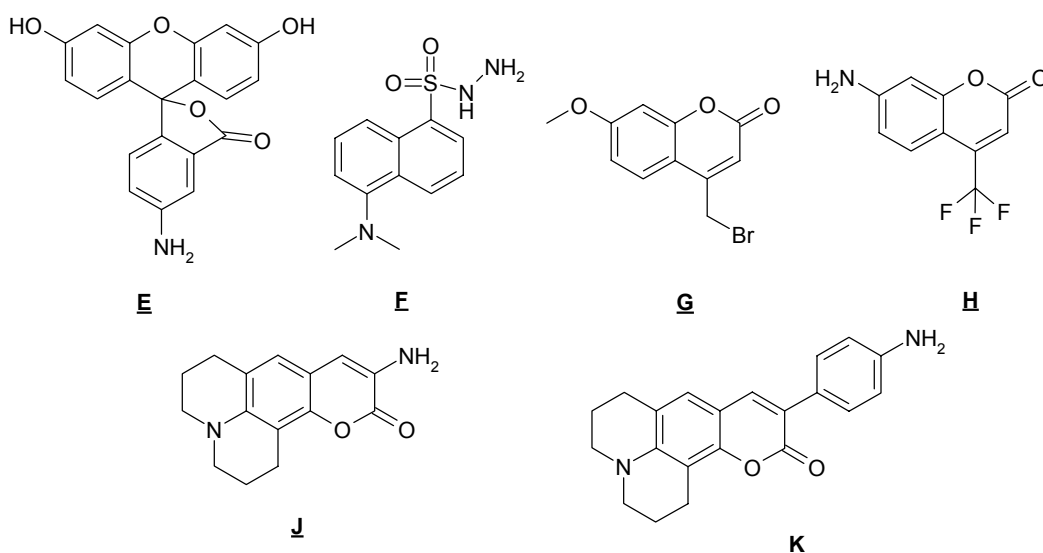


Abb. 85: verwendete Fluorophore

Während die Aminofluoreszeine E, das Dansylhydrazin F, das Methoxycoumarin G und das Aminocoumarin H aus verschiedenen Gründen als Kopplungspartner ungeeignet wären, erwiesen sich die BAC-Derivate J und K als gute Fluoreszenzmarker. Mit Hilfe der CDMT-Methode ließen sich die Amide der Modellcarbonsäuren unter sehr milden Bedingungen in hoher Ausbeute darstellen. Die fluorimetrischen Eigenschaften waren für den angestrebten Zweck optimal, da die Anregungs- und Emissionswellenlängen weit genug auseinander lagen und keine Interferenz mit biologischen Fluorophoren zu befürchten war.

Mit der optimierten CDMT-Methode konnte anschließend nicht nur das Radikal NOXYL selbst, sondern auch dessen NO[•]-Hauptprodukte B und C sowie einige Vorstufen und verfügbare Nebenprodukte der NO[•]-Reaktion mit den BAC-Derivaten J und K derivatisiert und charakterisiert werden. Dagegen scheiterten alle Versuche, das 2,3-Diphenylchinolin D in die entsprechenden Amide umzuwandeln, die jedoch auch später niemals auftraten.

Mit den zur Verfügung stehenden Vergleichssubstanzen I – III wurde eine analytische HPLC-Methode zur quantitativen Bestimmung mittels UV- und Fluoreszenz-Detektion ausgearbeitet, um damit die NO[•]-Freisetzung aus NO[•]-Donatoren unter verschiedenen experimentellen Bedingungen untersuchen zu können.

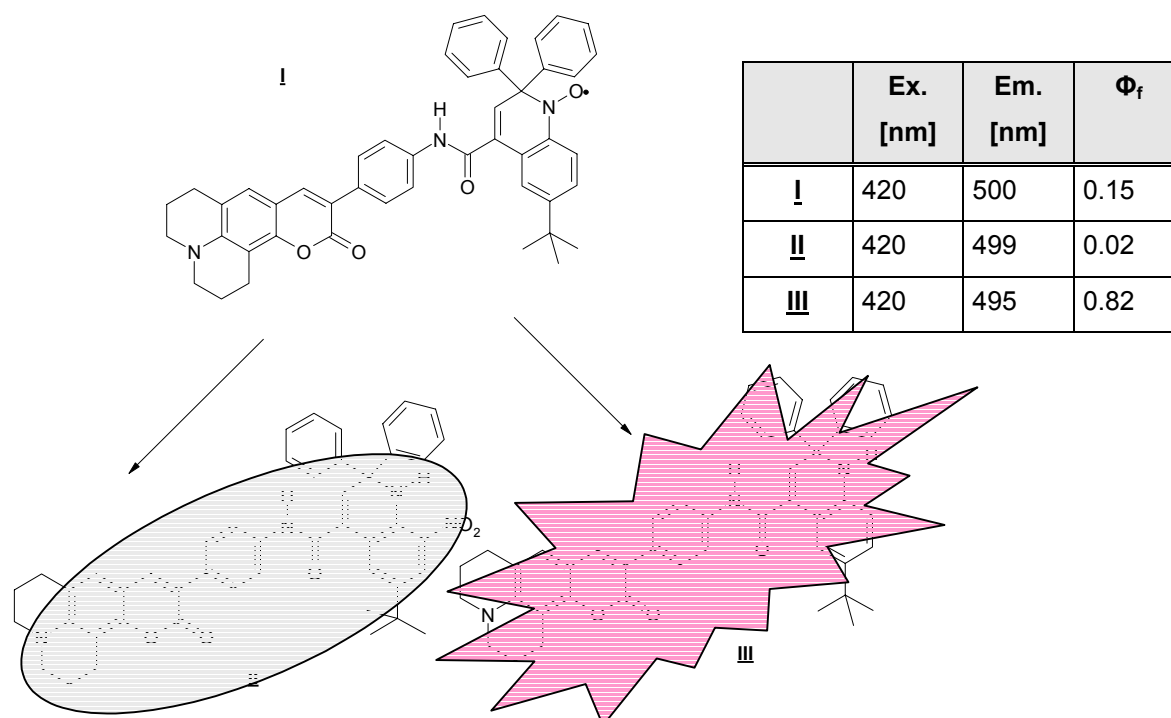


Abb. 86: Hauptprodukte **II** und **III** bei der Reaktion von **I** mit NO^*

Das Produktspektrum war von der Art des NO^* -Donators und den Reaktionsbedingungen der NO^* -Freisetzung abhängig (stationäre NO^* -, NO_2^* und O_2 -Konzentration, Einfluss von Oxidations- und Reduktionsmitteln). Selbst unter anaeroben Bedingungen traten im mittleren Konzentrationsbereich (bis ca. 10^{-4} mol/l) stets **II** und **III** nebeneinander auf. In stark verdünnten Lösungen (10^{-6} mol/l) geht der Anteil des Nitroproduktes **II** praktisch auf Null zurück. Damit steigt das Fluoreszenzsignal für den NO^* -Nachweis deutlich an. Für **III** wurde eine Nachweisgrenze von $5 \cdot 10^{-9}$ mol/l ermittelt (HPLC-Methode, Fluoreszenzdetektor).

Untersuchungen an humanen Endothelzellen (EA-hy926) bestätigten die analytischen Ergebnisse. Dabei erwies sich **I** als nicht zytotoxisch im erforderlichen Konzentrationsbereich (10 nM – 10 μM). Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Excitation bei 488 nm, Emission bei 505 nm) konnte der Bereich einer stimulierten NO^* -Produktion in der Nähe der Zellkerne deutlich visualisiert werden.

Mit dem vorgestellten Reagenz **I** steht ein **neuartiges** Detektionsprinzip für Stickstoffmonoxid (NO^*) zur Verfügung, welches sich nicht nur für biologische Anwendungen, sondern auch für andere Aufgabenstellungen eignet.

5 EXPERIMENTELLER TEIL

5.1 Verwendete Geräte

<u>Chromatographie:</u>	DC: DC-Aluminiumfolien Kieselgel 60 F ₂₅₄ (Merck Nr. 5554) SC: Sorbens: Kieselgel 60, Korngröße 0,04-0,063 mm (Merck Nr. 9385)																					
<u>Elementaranalyse:</u>	Zentrale Einrichtung der Chemie/Pharmazie Mikroanalyse der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Perkin Elmer PE 2400 CHN Elementar Analysen, Mikrowaage Perkin Elmer AD-6 Auto Balance.																					
<u>IR-Spektroskopie:</u>	Perkin Elmer FT IR Spektralphotometer 1600 Angaben in Wellenzahlen ν [cm ⁻¹], Festsubstanzen als KBr-Preßlinge. Charakterisierung der Schwingung durch: Transmission [%] <table><tr><td>vw</td><td>(very weak)</td><td>90 – 70</td></tr><tr><td>w</td><td>(weak)</td><td>70 – 50</td></tr><tr><td>m</td><td>(medium)</td><td>50 – 30</td></tr><tr><td>s</td><td>(strong)</td><td>30 – 10</td></tr><tr><td>vs</td><td>(very strong)</td><td>10 – 0</td></tr><tr><td>sh</td><td>(shoulder)</td><td></td></tr><tr><td>br</td><td>(broad)</td><td></td></tr></table>	vw	(very weak)	90 – 70	w	(weak)	70 – 50	m	(medium)	50 – 30	s	(strong)	30 – 10	vs	(very strong)	10 – 0	sh	(shoulder)		br	(broad)	
vw	(very weak)	90 – 70																				
w	(weak)	70 – 50																				
m	(medium)	50 – 30																				
s	(strong)	30 – 10																				
vs	(very strong)	10 – 0																				
sh	(shoulder)																					
br	(broad)																					
<u>Massenspektrometrie:</u>	Die Angaben [m/z (relative Intensität in Prozent)] entsprechen - wenn nicht anders angegeben – den EI Massenspektren (Finnigan MAT 4000; 70 eV). FAB – Massenspektren wurden mittels Finnigan MAT 8000 aufgenommen.																					
<u>NMR-Spektroskopie:</u>	Bruker AC-200 ¹ H-HNMR-Spektroskopie: Messfrequenz 200 MHz Angaben der chemischen Verschiebung δ in ppm gegen TMS als interner Standard.																					
<u>pH-Meter:</u>	Mikroprozessor-pH-Meter Multi-Calimatic, Knick mit pH-Glaselektrode Typ 405-T, F.Nr. 105962, Ingold																					

<u>Schmelzpunkt 1:</u>	Apotec [®] , Angaben in °C ohne Korrektur.
<u>HPLC 1:</u>	Pumpe Waters 510; Injektor Waters U6K; Photo Dioden Array incl. Waters Software RP ₁₈ -Säule 20 cm LiChrosorb (5 µm) Merck Cat. 50333 Vorsäule RP ₁₈ -Säule 2 cm LiChrosorb (7 µm)
<u>HPLC 2:</u>	Pumpe Dionex P580 Pumpe Degaser ERC – 3215 UV-Detektor Gynotek ÄUVD340S Fluorimeter Hitachi F1000; Time const. 1; Sensitivity 0.5 incl. Software Chromeleon Vers. 6.1 RP ₁₈ -Säule 20 cm LiChrosorb (5 µm) Merck Cat. 50333 Vorsäule RP ₁₈ -Säule 2 cm LiChrosorb (7 µm)
<u>Chemilumineszenz:</u>	CLD 70 E Chemilumineszenze NO/NO _x Analyzer Detektor incl. Software zur Auswertung (ECO-physics)

5.2 Abkürzungen

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	<u>B</u> utterfly <u>a</u> minoc <u>u</u> marin - 2,3,6,7-tetrahydro-11-oxo-1 <i>H</i> ,5 <i>H</i> ,11 <i>H</i> -benzo [<i>b</i>]pyrano[6,7,8- <i>i,j</i>]chinolizin
ber.	berechnet
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BSH	Benzolsulfhydroxamsäure
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett
dd	Dublett vom Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid

dt	Dublett vom Triplett
d. Th.	der Theorie
EDRF	endothelial-derived relaxing factor
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie
Ether	Diethylether
evtl.	eventuell
FAB	Fast-Atomic-Bombardement
FAD	Flavinadenindinucleotid
FMN	Flavinmononucleotid
gef.	gefunden
Gl.	Gleichung
Hb	Hämoglobin
HbO ₂	Oxyhämoglobin
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
IR	Infrarot; Infrarotspektroskopie
J	Betrag der Kopplungskonstante
Kap.	Kapitel
konz.	konzentriert
m	Multiplett
M [•]	Molekülion
MetHb	Methhämoglobin
min.	minütiger
MS	Massenspektrometrie
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NMR	Kernresonanz; Kernresonanz-Spektroskopie
NO [•]	Stickstoffmonoxid
NO ⁻	Nitroxyl
NOC-15	1-Hydroxy-2-oxo-3-(3-aminopropyl)-3-propyl-1-triazin
NOC-18	1-Hydroxy-2-oxo-3,3-bis(2-aminoethyl)-1-triazin
NONOate	N,N'-Nitrosamin-N'-oxide
NOS	NO [•] -Synthase
NOXYL	6- <i>tert.</i> -Butyl-4-carboxyl-2,2-diphenyl-1,2-dihydrochinoliny-1-oxyl
o.a.	oben angegeben
PE	Petrolether 60/80
Phe	Phenyl
p.o.	per oral
ppm	parts per million
PROXYL	3-Carboxy-PROXYL
proz.	prozentig

q	Quartett
R _f	relative Wanderungsstrecke
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RP	reversed phase
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
s.	siehe
S.	Seite
SC	präparative Säulenchromatographie
Schmp.	Schmelzpunkt
Sdp.	Siedepunkt
t	Triplett
t _{1/2}	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle
THF	Tetrahydrofuran
v	Wellenzahl
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
verd.	verdünnt
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil

5.3 Chemikalien

Alle Lösungsmittel wurden in technischer Qualität aus dem zentralen Chemikalienlager der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bezogen und vor Gebrauch über eine 50 cm Vigreux-Kolonne destilliert bzw. falls erforderlich nach den üblichen Verfahren absolutiert. Die übrigen Feststoffchemikalien entsprechen einer p.A. Qualität.

5-Aminofluorescein	Fluka
6-Aminofluorescein	Fluka
7-Amino-4-trifluormethylcumarin	Aldrich
Benzoessäure	Riedel-de-Haen
Benzolsulphhydroxamsäure	Fluka
Benzoylchlorid	Merck

4-Brommethyl-7-methoxycumarin	Aldrich
3-Carboxy-PROXYL	Aldrich
2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin	Aldrich
Citronensäure- Monohydrat	J.T. Baker
Dansylhydrazin	Lancaster
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid	Riedel-de-Haen
3,5-Dinitrobenzoesäure	Acros
4,6 Diphenylthieno[3,4-d]-1,3diazol-2-on-5,5-dioxide	Aldrich
Ethyl-4-nitrophenylacetat	Lancaster
Ethylnitroacetat	Lancaster
9-Formyl-8-julolidinol	Aldrich
Kaliumcarbonat	J.T. Baker
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Merck
Kieselgel 60, 0.04-0.063 nm	Merck
Magnesiumsulfat, wasserfrei	Grüssing
Molekularsieb 4 A	Roth
Natriumhydrogencarbonat	J.T. Baker
4-Nitrobenzoesäure	Schumann
4-Nitrobenzoylchlorid	Acros
N-Methylmorpholin	Acros
Thionylchlorid	Merck
Trifluoressigsäureanhydrid	Riedel-de-Haen
Zinn(II)chlorid · 2 H ₂ O	J.T. Baker

0.1 M Phosphatpuffer pH 7.4 wurde folgendermaßen dargestellt:

Lösung 1: 4.546 g KH₂PO₄ in 500 ml Aqua bidest.

Lösung 2: 11.876 g Na₂HPO₄ in 1000 ml Aqua

74 ml Lösung 1 werden mit 426 ml der Lösung 2 gemischt und der pH-Wert wird mit einer Glaselektrode eingestellt.

5.4 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1: *Darstellung der Amide mit N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid*

0,01 mol Carbonsäure und 0,015 mol Amin werden in ca. 30 ml absolutem Dichlormethan vorgelegt. Eine äquimolare Lösung N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid in ca. 15 ml Dichlormethan wird langsam unter Rühren zugetropft. Diese Mischung wird 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 1-2 Tropfen Eisessig wird der ausgefallene N,N'-Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und das Filtrat mit 2%iger Schwefelsäure, 2%iger Natriumhydrogencarbonat – Lösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat wird die Lösung zur Trockne eingeeengt und aus Diethylether umkristallisiert.

AAV 2: *Darstellung der Amide mit 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin*

Äquimolare Mengen Carbonsäure und 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin sowie ein 10 %iger Überschuss Amin werden in ca. 20 ml Acetonitril vorgelegt. Die äquimolare Menge N-Methylmorpholin, in ca. 10 ml Acetonitril gelöst, wird langsam unter Eiskühlung zugetropft und 2 h gerührt. Anschließend wird 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand mit Elutionsmittel aufgenommen und das Amid wird über eine Säulenchromatographie isoliert.

AAV 3: *Darstellung der Ester aus 4-Brommethyl-7-methoxycumarin*

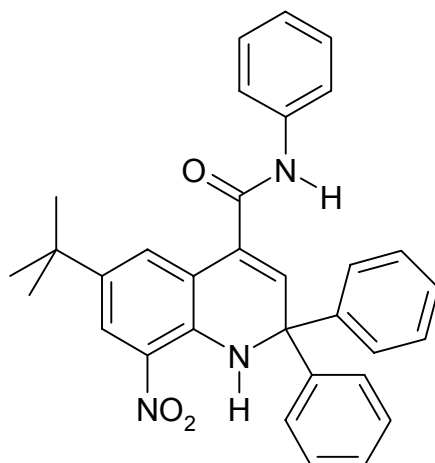
0.25 mmol 4-Brommethyl-7-methoxycumarin und 0.25 mmol Carbonsäure werden mit ca. 1.3 g Kaliumcarbonat 1 h unter Rückfluss erhitzt. Der Niederschlag wird abfiltriert und der Überstand am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wird aus Ethanol umkristallisiert bzw. über Säulenchromatographie isoliert und aus Methylenchlorid/Petrolether 60-80 umkristallisiert.

5.5 Verwendete Fließmittelsysteme

FM 1	Toluol	Aceton	90	:	10	
FM 2	Toluol	Aceton	80	:	20	
FM 3	Toluol	Aceton	70	:	30	
FM 4	Toluol	Methanol	100	:	3	
FM 4	Toluol	Ethylacetat	90	:	10	
FM 5	n-Hexan	Aceton	90	:	10	
FM 6	Toluol	Ethylacetat	60	:	40	
FM 7	Ethylacetat		100			
FM 8	n-Hexan	Aceton	80	:	20	
FM 9	Toluol	Ethylacetat	60	:	40	
FM 10	Toluol	Aceton	60	:	40	
FM 11	Toluol	Aceton	65	:	35	
FM 12	Toluol	Aceton	Petrolether	90	:	10 : 10
FM 13	n-Hexan	Aceton	60	:	40	
FM 14	Toluol	Aceton	95	:	5	
FM 15	Toluol	Aceton	75	:	25	
FM 16	Toluol	Methanol	90	:	10	

5.6 Substanzdaten

6-*tert.*-Butyl-8-nitro-2,2-diphenyl-1,2-dihydrochinolin-4-carbonsäureanilid (**3c**)



Darstellung: 46 mg (0.5 mmol) Anilin, 88 mg (0.5 mmol) 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin **14**, 214 mg (0.5 mmol) 6-*tert*-Butyl-8-nitro-2,2-diphenyl-1,2-dihydrochinolin-4-carbonsäure **3** und 100 µl N-Methylmorpholin werden nach AAV 2 umgesetzt. Das Amid wird durch Säulenchromatographie (FM Toluol/Aceton/Petrolether 90:10:5) isoliert und aus Methylenchlorid/Petrolether 60/80 auskristallisiert.

Ausbeute: 56 % d. Th.

Schmp.: 220°C

R_f-Wert: 0.57 (FM 1)

IR (KBr), [cm⁻¹]: 3338 (m, sh) 47.7, 3057 (m) 49.1, 2961 (m) 39.6, 1652 (m) 40.3, 1636 (m) 34.1, 1597 (s) 27.7, 1519 (s) 10.4, 1442 (s) 20.7

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) [ppm]:

1.26	s	9 H	<i>tert</i> .-Butyl	
6.52	s	1 H	H-3	
7.21 – 7.46	m	13 H	10 arom. H; 2 ortho H; p-Phenyl H	
7.56	m	3 H	2 arom. H; -NH-CO-	
7.82	“d”	1 H	H-5	⁴ J = 2.2 Hz
8.08	“d”	1 H	H-7	⁴ J = 2.2 Hz
8.87	s	1 H	NH	

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) [ppm]:

1.21	s	9 H	<i>tert</i> .-Butyl	
6.85	s	1 H	H-3	
7.13	„t“	1 H	p-Phenyl H	
7.33	m	12 H	10 arom. H; 2 ortho	
7.69	m	3 H	2 arom. H; -NH-CO-	
7.9	s	1 H	H-5	

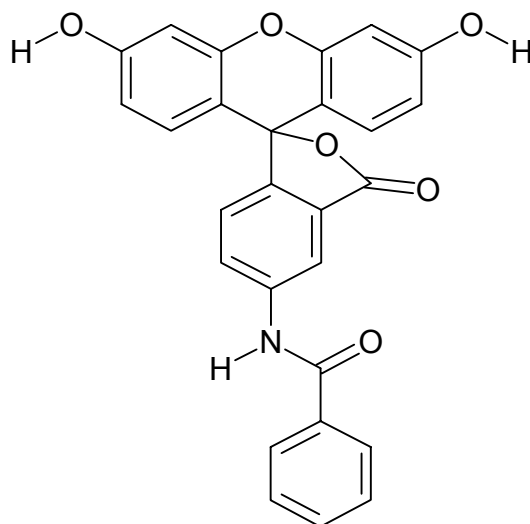
8.73	s	1 H	H-7	
10.48	s	1 H	NH	(aust. mit D ₂ O)

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 504 M⁺ (3.4), 426 (100), 380 (21.6), 278 (5.6), 244 (12.7), 115 (9.9), 105 (22.6)

Elementaranalyse:

C ₃₂ H ₂₉ N ₃ O ₃	(503.6)	ber.:	C	76.32	H	5.80	N	8.34
		gef.:	C	76.56	H	5.91	N	8.12

5-Benzoylamino fluorescein (7a)



Darstellung: 65 mg (0.46 mmol) Benzoylchlorid 6a und 49 mg (0.14 mmol) 5-Amino fluorescein 5a werden in ca. 15 ml Aceton gelöst und bei Raumtemperatur 1 h gerührt. Das Rohprodukt wird abfiltriert, in Ethanol gelöst mit Petrolether 60/80 gefällt.

Ausbeute: 64 % d. Th.

Schmp.: ab 205°C Zersetzung

R_f-Wert: 0.54 (FM 10)

IR (KBr), [cm⁻¹]: 2921 (s,br) 21.4, 2602 (m) 31.9, 1712 (m) 32.4, 1681 (m) 35.7, 1637 (s) 16.1, 1599 (vs) 5.5, 1519 (s) 16.2, 1455 (vs) 9.5

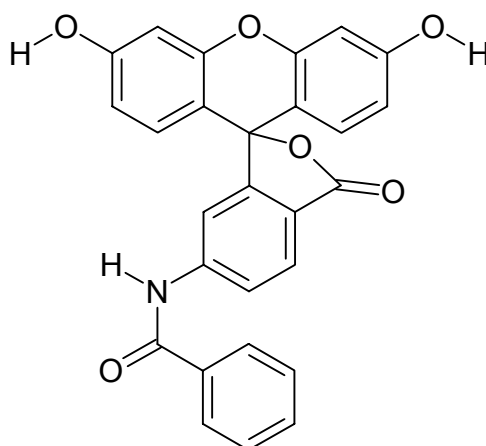
¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) [ppm]:

5.0	„s“	1 H	-NH	(aust. mit D ₂ O)
6.5 – 6.8	m	6 H	Xanthen-Teils	
7.25	d	1 H	H-1	³ J = 4.1 Hz
7.5 – 7.8	m	3 H	H-3', H-4', H-5'	(Benzoyl-Rest)
8.0	„d“	2 H	H-2', H-6'	(Benzoyl-Rest)
8.15	d	1 H	H-6	
8.5	s	1 H	H-4	
10.8	s	2 H	-OH	

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 451 M⁺• (0.4), 407 (17.6), 302 (27.8), 287 (22.3), 122 (37), 105 (100), 77 (50.4), 44 (74.2)

C₂₇H₁₇NO₆ (451.4)

6-Benzoylamino fluorescein (**7b**)



Darstellung: Zu einer Lösung von 84 mg (0.6 mmol) Benzoylchlorid **6a** in ca. 1 ml

Aceton wird eine Lösung von 49 mg (0.15 mmol) 6-Aminofluorescein **5b** in ca. 5 ml Aceton unter Rühren zugetropft. Nach 1 h Rühren bei Raumtemperatur wird der entstehende Niederschlag abfiltriert und mit Aceton gewaschen und aus Ethanol/Petrolether 60/80 gefällt.

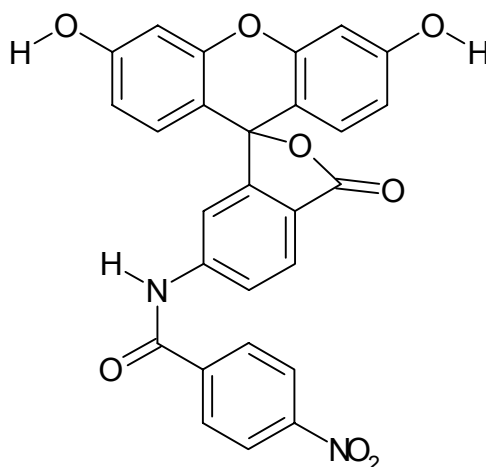
Ausbeute: 60 % d. Th.
Schmp.: ab 225°C Zersetzung
R_f-Wert: 0.5 (FM 10)
IR (KBr), [cm⁻¹]: 2970 (s,br) 19.0, 2602 (m) 33.7, 1677 (s) 19.9, 1637 (vs) 9.5, 1600 (vs) 3.4, 1537 (vs) 6.2, 1456 (vs) 6.7, 1375 (s) 11.0, 1311 (vs) 5.4

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) [ppm]:

5.35	„s“	1 H	-NH	(aust. mit D ₂ O)
6.5 – 6.75	m	6 H	Xanthen-Teil	
7.4 – 7.65	m	3 H	H-3', H-4', H-5'	
7.75	s	1 H	H-1	
7.9 – 8.1	m	4 H	arom. H	
10.7	s	2 H	-OH	

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 451 M⁺• (0.9), 407 (26.9), 366 (15.6), 302 (31.8), 287 (41.2), 122 (23.5), 105 (100), 77 (43.9)

C₂₇H₁₇NO₆ (451.4)

6-(4-Nitrobenzoylamino)-fluoreszein (7c)

Darstellung: Eine Lösung aus 204 mg (1.1 mmol) 4-Nitrobenzoylchlorid **6b** und 69 mg (0.2 mmol) 6-Aminofluorescein **5b** in ca. 10 ml Aceton wird 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Der entstehende orange Niederschlag wird abfiltriert und aus Ethanol/Petrolether 60/80 umkristallisiert.

Ausbeute: 80 % d. Th.

Schmp.: 310 °C

R_f-Wert: 0.56 (FM 10)

IR (KBr), [cm⁻¹]: 3362 (s) 28.1, 1462 (s) 24.5, 1628 (s) 24.2, 1584 (m) 39.1, 1500 (s) 16.1, 1405 (s) 11.5

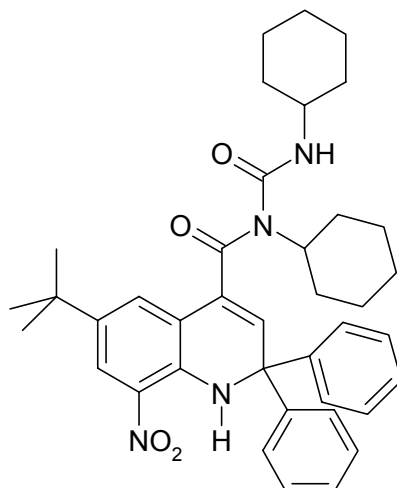
¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) [ppm]:

6.7	m	6 H	Xanthen-Teil
7.7	s	1 H	H-1
8.0	m	2 H	H-4, H-5
8.25	q	4 H	AA'BB'-System
11.0	s	2 H	-OH

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 497 M⁺ (100), 467 (7.0), 348 (11)

C₂₇H₁₆N₂O₈ (496.4)

1-(6-*tert*-Butyl-8-nitro-2,2-diphenyl-1,2-dihydrochinolin-4-carboxyl)-1,3-dicyclohexyl-harnstoff (10a**)**



Darstellung: Zu einer Lösung von 40 mg (0.1 mmol) 6-*tert*-Butyl-8-nitro-2,2-diphenyl-1,2-dihydrochinolin-4-carbonsäure **3** und 21.5 mg (0.1 mmol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid in 6 ml Dichlormethan werden 36 mg (0.1 mmol) 5-Aminofluorescein **5a** in ca. 5 ml Dichlormethan unter Rühren zugetropft. Nach 24 h Rühren bei Raumtemperatur wird der Ansatz zur Trockne eingeeengt und mit Diethylether wieder aufgenommen. Die organische Phase wird mit 2% H₂SO₄, 2% NaHCO₃ und mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet und einer Säulenchromatographie (Toluol : Aceton 80:20) unterzogen.

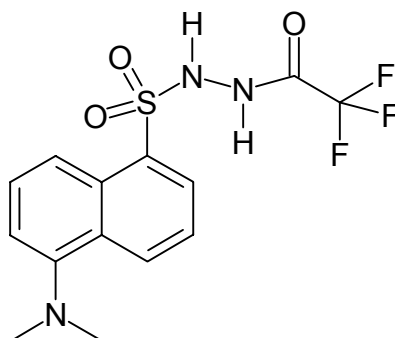
Ausbeute: < 1 % d. Th.

R_f-Wert: 0.9 (FM 2)

MS (DCI) [m/z]: 651 M⁺(+NH₄)

(INCOS 50 Finnigan MAT,
Reaktandgas NH₃)

C₃₉H₄₆N₄O₄ (496.4)

Trifluoressigsäuredansylhydrazid (11a)

Darstellung: 10 mg (0.04 mmol) Dansylhydrazin **11** werden in ca. 10 ml Methylenchlorid gelöst und 20 mg (0.09 mmol) Trifluoressigsäureanhydrid unter Rühren hinzugefügt. Die Lösung wird ca. 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit 200 ml Wasser versetzt. Die gelbgefärbte organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und abfiltriert. Die Methylenchloridphase wird soweit eingeeengt bis eine übersättigte Lösung vorliegt und dann wird mit Petrolether 60/80 auskristallisiert.

Ausbeute: 95 % d. Th.

Schmp.: 207°C gelb-grüne Nadeln

R_f-Wert: 0.25 (FM 1)

IR (KBr), [cm⁻¹]: 3427 (w, br) 53.8, 3151 (m) 40.4, 2426 (w) 57.1, 1657 (s) 24.8, 1473 (m) 39.3, 1343 (s) 24.3

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) [ppm]:

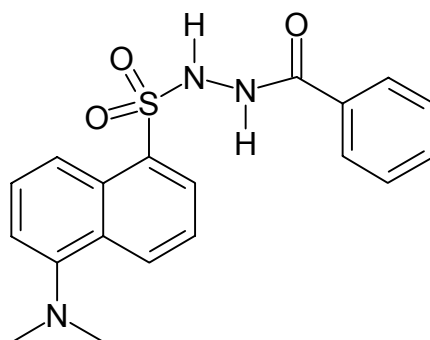
3.0	s	6 H	-N(CH ₃) ₂
7.4 – 7.7	m	3 H	H-4, H-6, H-8
8.1	d	1 H	H-2
8.5 – 8.7	m	2 H	H-3, H-7
10.3	s	1 H	N-H
10.6	s	1 H	N-H

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 361 M⁺• (7.4), 170 (100), 154 (62.5), 127 (66), 84 (85.6), 64 (72.4)

Elementaranalyse:

C ₁₄ H ₁₄ N ₃ O ₃ SF ₃	(361.35)	ber.:	C	46.50	H	3.90	N	11.60
		gef.:	C	46.32	H	3.75	N	11.50

Benzoessäuredansylhydrazid (11b)



Darstellung: 450 mg (3.0 mmol) Benzoylchlorid werden in ca. 5 ml trockenem Dioxan gelöst. 50 mg (0.2 mmol) Dansylhydrazin 11 werden in ca. 6 ml trockenem Dioxan langsam zugetropft. Dabei fällt das Produkt als Niederschlag aus. Die Suspension wird in 20 ml Eiswasser geben, mit 1 N HCl angesäuert und abfiltriert. Der Niederschlag wird mit Wasser gewaschen und aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 57 % d. Th.

Schmp.: 215°C zitronengelbe Kristalle

R_f-Wert: 0.4 (FM 2)

IR (KBr), [cm⁻¹]: 3427 (w, br) 53.8, 3151 (m) 40.4, 2426 (w) 57.1, 1657 (s) 24.8, 1473 (m) 39.3, 1343 (s) 24.3

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) [ppm]:

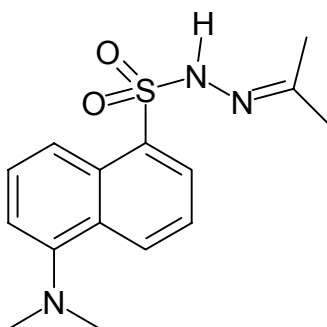
2.99	s	6 H	-N(CH ₃) ₂	
7.3 – 7.7	m	8 H	H-4, H-6, H-8, 5 arom. H	³ J = 8 Hz

8.2	d	1 H	H-2
8.6	t	2 H	H-3, H-7
10.3	s	1 H	N-H
10.6	s	1 H	N-H

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 369 $M^{+•}$ (0.9), 217 (10.1), 203 (22), 170 (100), 154 (40.2), 127 (64.9), 105 (31.3), 77 (67.1)

$C_{19}H_{19}N_3O_3S$ (369.4)

Aceton-dansylhydrazon (**11c**)



Darstellung: 51 mg (0.2 mmol) Dansylhydrazin **11** und 9 ml Aceton abs. werden bei Raumtemperatur gerührt, anschließend wird 2 h unter Rückfluss erhitzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 2 Tropfen 3 N HCl entfärbt sich die Lösung spontan und das Produkt fällt als Niederschlag aus. Das Hydrazon wird aus Methylenchlorid/Petrolether 60/80 auskristallisiert.

Ausbeute: 65 % d. Th.

Schmp.: 230°C

R_f-Wert: 0.8 (FM 2)

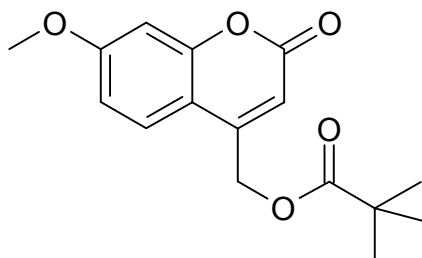
IR (KBr), [cm⁻¹]: 3440 (w, br) 57.5, 3002 (m, br) 35.3, 2802 (w, sh) 56.3, 2343 (m) 31.0, 1810 (vw) 79.6, 1733 (vw) 77.2, 1646 (w) 65.8, 1510 (m) 44.6, 1474 (s) 24.5, 1417 (s) 20.4

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) [ppm]:

1.7	s	3 H	-CH ₃
1.8	s	3 H	-CH ₃
3.1	s	6 H	-N(CH ₃) ₂
7.5 – 7.8	m	3 H	H-4, H-6, H-8
8.2	d	1 H	H-2
8.6 – 8.8	m	2 H	H-3, H-7
10.5	s	1 H	N-H

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 305 M⁺ (8.6), 185 (13.4), 170 (100), 154 (40.9), 128 (80.8), 77 (31.8), 71 (28.2), 64 (44.7)

C₁₅H₁₉N₃O₂S (305.4)

7-Methoxycumarin-4-methylpivalat (13a)

Darstellung: 135 mg (0.5 mmol) 4-Bromomethyl-7-methoxycumarin 12, 26 mg (0.25 mmol) Pivalinsäure und 1.3 g Kaliumcarbonat werden in ca. 25 ml Aceton abs. gelöst und 1h unter Rückfluss erhitzt. Der Niederschlag wird abfiltriert und die Lösung am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde mit Dichlormethan aufgenommen und mit Petrolether 60/80 gefällt. 4-Bromomethyl-7-methoxycumarin 12 wird mittels fraktionierter Fällung aus dem Ansatz entfernt. Der Ester wird mit Dichlormethan gelöst und mit Petrolether 60/80 gefällt.

Ausbeute: 85 % d. Th.
Schmp.: 106°C
R_f-Wert: 0.82 (FM 10)
IR (KBr), [cm⁻¹]: 3447 (m, br) 52.1, 2970 (m) 47.3, 1733 (s) 30.0, 1714 (s) 21.2, 1612 (s) 32.2, 1480 (m) 57.5, 1415 (m) 55.9

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) [ppm]:

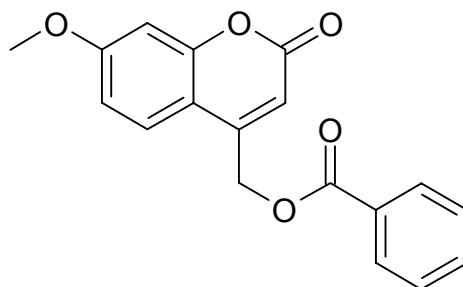
1.22	s	9 H	<i>tert.</i> -Butyl	
3.86	s	3 H	-CH ₃	
5.3	s	2 H	-CH ₂ -	
6.2	s	1 H	H-3	
6.95 – 7.05	m	2 H	H-5, H-6	
7.6	d	1 H	H-8	⁴ J = 8 Hz

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 290 M⁺• (20.5), 256 (6.3), 206 (41.8), 161 (22.8), 149 (78.5), 57 (100)

Elementaranalyse:

C ₁₆ H ₁₈ O ₅	(290.30)	ber.:	C	66.19	H	6.25
		gef.:	C	65.91	H	6.06

7-Methoxycumarin-4-methylbenzoat (13b)



Darstellung: 135 mg (0.5 mmol) 4-Bromomethyl-7-methoxycumarin **12**, 35 mg (0.25 mmol) Benzoesäure und 1.3 g Kaliumcarbonat werden nach AAV 3 zur Darstellung des Esters eingesetzt. Der Ester wird mittels Säulenchromatographie (Toluol : Ethylacetat 60:40) gereinigt. Die vereinigten Fraktionen werden bis zur Trockne eingedampft und mit Dichlormethan gelöst und mit Petrolether 60/80 gefällt.

Ausbeute: 53 % d. Th.

Schmp.: 176°C

R_f-Wert: 0.39 (FM 11)

IR (KBr), [cm⁻¹]: 3415 (w, br) 62.5, 2978 (w) 66.0, 2939 (w) 61.6, 1716 (s) 3.1, 1614 (s) 10.7, 1398 (s) 33.95, 1280 (s) 7.5, 1121 (s) 16.9

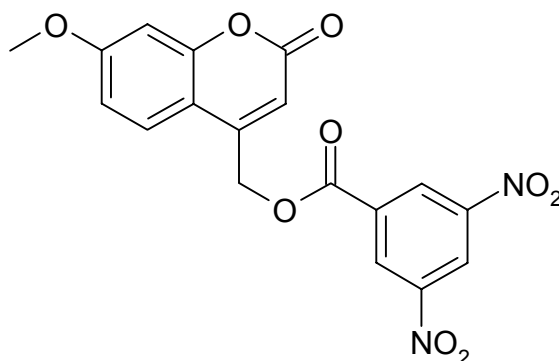
¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) [ppm]:

3.8	s	3 H	-CH ₃	
4.8	s	2 H	-CH ₂ -	
6.45	s	1 H	H-3	
6.95 – 7.10	m	2 H	H-5, H-6	
7.5 – 7.85	m	5 H	arom. H	
8.1	d	1 H	H-8	⁴ J = 8 Hz

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 310 M⁺• (5.33), 270 (42.2), 206 (17.6), 161 (85.9), 149 (42.1), 105 (33.9), 91 (100)

Elementaranalyse:

C ₁₈ H ₁₄ O ₅	(310.3)	ber.:	C	69.70	H	4.55
		gef.:	C	61.48	H	4.23

7-Methoxycumarin-4-methyl-3,5-dinitrobenzoat (13c)

Darstellung: 135 mg (0.5 mmol) 4-Bromomethyl-7-methoxycumarin 12, 53 mg (0.25 mmol) 3,5-Dinitrobenzoesäure und 1.3 g Kaliumcarbonat werden in ca. 25 ml Aceton abs. gelöst und 1h unter Rückfluss erhitzt. Der Niederschlag wird abfiltriert und die Lösung am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird mit Dichlormethan aufgenommen und anschließend mit Petrolether 60/80 gefällt.

Ausbeute: 53 % d. Th.

Schmp.: 138°C

R_f-Wert: 0.82 (FM 11)

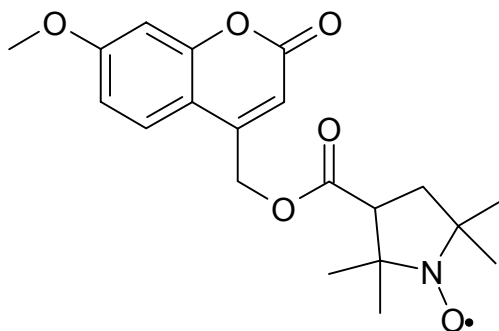
¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) [ppm]:

3.8	s	3 H	-CH ₃	
4.7	s	2 H	-CH ₂ -	
6.3	s	1 H	H-3	
6.95 – 7.10	m	2 H	H-5, H-6	
7.6	d	1 H	H-8	⁴ J = 8 Hz
8.9	s	1 H	p-Phenyl H	
9.05	s	2 H	ortho H	

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 206 M⁺ (100), 178 (61.2), 149 (71.9), 121 (30.4)

Elementaranalyse:

$C_{18}H_{12}N_2O_9$	(400.30)	ber.:	C	54.00	H	3.02	N	6.99
		gef.:	C	53.87	H	2.98	N	6.80

7-Methoxy-cumarin-4-methyl-PROXYL-3-carboxylat (13d)

Darstellung: 135 mg (0.5 mmol) 4-Bromomethyl-7-methoxycumarin 12, 47 mg (0.25 mmol) 3-Carboxy-PROXYL und 1.3 g Kaliumcarbonat werden in ca. 20 ml Aceton abs. 1h unter Rückfluss erhitzt. Der Niederschlag wird abfiltriert und die Lösung am Rotationsverdampfer eingengt und mit Ethanol umkristallisiert. Der erhaltene Niederschlag wird wieder abfiltriert und der Ester über Säulenchromatographie (Toluol : Ethylacetat 60:40) gereinigt. Die vereinigten Fraktionen werden bis zur Trockne eingedampft und mit Dichlormethan gelöst und mit Petrolether 60/80 gefällt.

Ausbeute: 53 % d. Th.

Schmp.: 119 °C

R_f-Wert: 0.42 (FM 9)

IR (KBr), [cm⁻¹]: 3451 (w,breit) 67.1, 2972 (m) 53.1, 1727 (s) 23.2, 1613 (s) 25.7, 1515 (m) 66.0, 1283 (s) 46.4

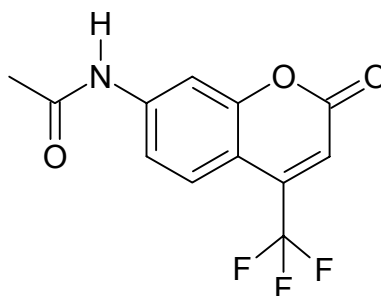
ESR-Spektrum (9.8 GHz, CDCl₃, RT):

$g = 2.00581$ $\alpha(N) = 1.462$ [mT] (1N)

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 374 M⁺• (32.7), 344 (18.6), 288 (14.8), 206 (11.7), 190 (24.8), 83 (100)

Elementaranalyse:

$C_{20}H_{24}NO_6$	(374.41)	ber.:	C	64.16	H	6.46	N	3.74
		gef.:	C	63.83	H	6.48	N	3.46

7-Acetamido-4-(trifluormethyl)-cumarin (16a)

Darstellung: 97 mg (0.55 mmol) 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin **14** und 52 mg (0.86 mmol) Eisessig werden in 10 ml Dichlormethan suspendiert und 50 μ l (0.4 mmol) N-Methylmorpholin in ca. 10 ml Dichlormethan zugetropft. Anschließend wird 4 h bei 0°C gerührt. Danach werden 101 mg (0.46 mmol) 7-Amino-4-trifluormethylcumarin **15** und weitere 150 μ l N-Methylmorpholin in ca. 20 ml Dichlormethan suspendiert und zugetropft, weitere 2 h bei 0°C und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Niederschlag wird abfiltriert. Die Mutterlauge wird mit 20%iger Citronensäure und gesättigter Natriumhydrogencarbonat – Lösung gewaschen. Die organische Phase wird zur Trockne eingeeengt und das Rohprodukt wird mit Hilfe der Säulenchromatographie (Toluol : Aceton 90:10) aufgereinigt. Die Kristallisation des Amids erfolgt aus Dichlormethan/Petrolether 40/60.

Ausbeute: 44 % d. Th.

Schmp.: 185°C

R_f-Wert: 0.14 (FM 1)

IR (KBr),[cm⁻¹]: 3335 (m) 38.7, 23069 (m) 38.7, 1711 (vs) 9.0, 1620 (s) 13.7, 1514 (s) 18.7, 1412 (m) 31.5, 1289 (s) 17.7

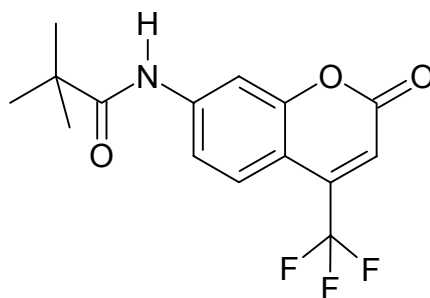
¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) [ppm]:

2.11	s	3 H	-CH ₃	
6.89	s	1 H	H-3	
7.45 – 7.55	m	1 H	H-5	³ J = 8.8 Hz; J = 2 Hz
7.6 – 7.7	m	1 H	H-6	³ J = 8.8 Hz; J = 2 Hz
7.90	s	1 H	H-8	
10.55	s	1 H	N-H	(aust. mit D ₂ O)

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 271 M⁺ (53.6), 252 (2.9), 229 (71.9), 201 (100), 172 (17.7), 148 (19.1)

Elementaranalyse:

C ₁₂ H ₈ NO ₃ F ₃	(271.19)	ber.:	C	53.10	H	3.00	N	5.20
		gef.:	C	51.16	H	2.97	N	4.72

7-Pivaloylamido-4-(trifluormethyl)-cumarin (16b)

Darstellung: 169 mg (0.96 mmol) 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin 14, 62 mg (0.61 mmol) Pivalinsäure, 21 mg (0.96 mmol) 7-Amino-4-trifluormethylcumarin 15 und 110 µl (0.9 mmol) N-Methylmorpholin werden nach AAV 2 umgesetzt. Das Amid wird über Säulenchromatographie isoliert (Elutionsmittel: Toluol : Aceton 90:10) und aus Methylenchlorid/Petrolether 60/80 umkristallisiert.

Ausbeute: 35 % d. Th.
Schmp.: 258°C
R_f-Wert: 0.53 (FM 1)
IR (KBr), [cm⁻¹]: 3365 (vs) 8.9, 2960 (m) 47.5, 1715 (vs) 4.6, 1620 (vs) 9.8, 1577 (vs) 6.7, 1410 (s) 12.0, 1290 (s) 17.4

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) [ppm]:

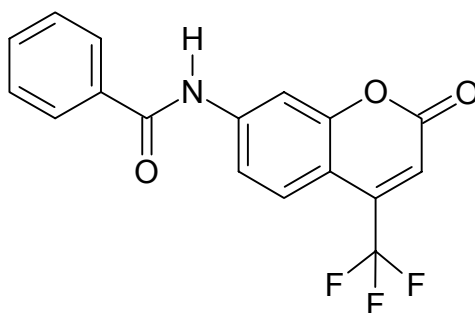
1.25	s	9 H	<i>tert.</i> -Butyl	
6.9	s	1 H	H-3	
7.6 – 7.77	“m”	2 H	H-5, H-6	³ J = 8 Hz; J = 2 Hz
7.99	s	1 H	H-8	
9.77	s	1 H	N-H	(aust. mit D ₂ O)

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 313 M⁺• (33.8), 294 (4.6), 270 (11.6), 229 (58.6), 201 (48.4), 172 (15.8), 151 (17.7), 56 (100)

Elementaranalyse:

C ₁₅ H ₁₄ NO ₃ F ₃	(313.27)	ber.:	C	57.50	H	4.50	N	4.47
		gef.:	C	57.36	H	4.61	N	4.31

7-Benzamido-4-(trifluormethyl)-cumarin (**16c**)



Darstellung: 67 mg (0.5 mmol) Benzoesäure, 54 mg (0.25 mmol) 7-Amino-4-trifluormethylcumarin **15**, 85 mg (0.5 mmol) 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin **14** und 60 µl

(0.5 mmol) N-Methylmorpholin werden nach AAV 2 umgesetzt. Über eine Säulenchromatographie (Elutionsmittel Toluol : Aceton 95:5) kann das Amid isoliert werden und aus Methylenchlorid/Petrolether 60/80 umkristallisiert.

Ausbeute: 53% d. Th.
Schmp.: 225°C
R_f-Wert: 0.57 (FM 1)
IR (KBr), [cm⁻¹]: 3371 (vs) 3.5, 3073 (m) 41.9, 1715 (vs) 1.5, 1678 (vs) 4.0, 1621 (vs) 2.4, 1600 (vs) 5.3, 1582 (vs) 1.9, 1525 (s) 11.9, 1410 (vs) 3.3

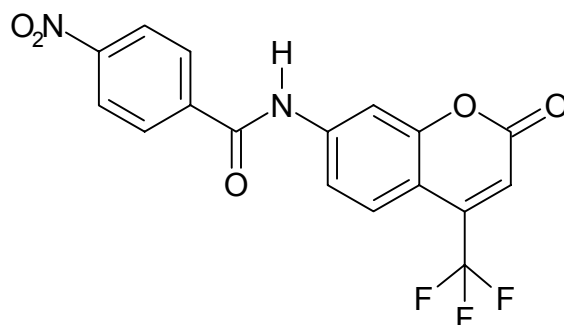
¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) [ppm]:

6.93	s	1 H	H-3	
7.7	m	5 H	arom. H	
8.0	„q“	2 H	H-5, H-6	
8.1	s	1 H	H-8	
10.8	s	1 H	N-H	(aust. mit D ₂ O)

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 333 M⁺• (28.4), 257 (0.9), 229 (7.9), 201 (10.2), 172 (8.8), 151 (10.5), 104 (100), 77 (83.9)

Elementaranalyse:

C ₁₇ H ₁₀ NO ₃ F ₃	(333.27)	ber.:	C	61.27	H	3.02	N	4.20
		gef.:	C	59.55	H	3.00	N	3.93

7-(4-Nitrobenzamido)-4-(trifluormethyl)-cumarin (16d)

Darstellung: Eine Lösung aus 210 mg (1.1 mmol) 4-Nitrobenzoylchlorid und 50 mg (0.2 mmol) 7-Amino-4-trifluormethylcumarin 15 in ca. 10 ml Aceton wird über 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Der entstehende Niederschlag wird abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 28 % d. Th.

Schmp.: 285°C

R_f-Wert: 0.65 (FM 2)

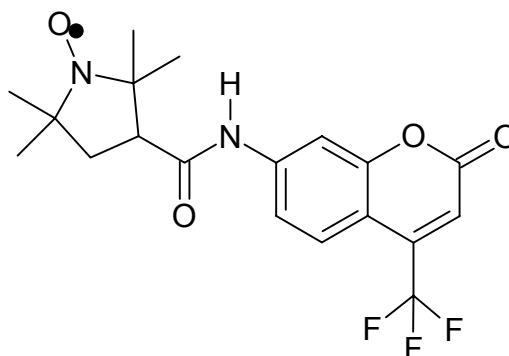
¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) [ppm]:

6.96	s	1 H	H-3	
7.75	„m“	1 H	H-5	³ J = 8.8 Hz; J = 1.8
7.85	„m“	1 H	H-6	
8.07	d	1 H	H-8	J = 1.8 Hz
8.15 – 8.45	dd	4 H	AA'BB'-System	
11.08	s	1 H	N-H	(aust. mit D ₂ O)

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 378 M⁺ (34.8), 331 (2.7), 229 (6.2), 201 (7.9), 149 (100), 119 (43.3), 103 (96.2)

Elementaranalyse:

$C_{17}H_9N_2O_5F_3$	(378.26)	ber.:	C	53.98	H	2.40	N	7.40
		gef.:	C	53.70	H	2.41	N	7.14

7-(3-PROXYL-carbamoyl)-4-(trifluormethyl)-cumarin (16e)

Darstellung: 97 mg (0.5 mmol) 3-Carboxy-PROXYL, 87 mg (0.5 mmol) 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin 14, 53 mg (0.23 mmol) 7-Amino-4-trifluormethylcumarin 15 und 60 μ l (0.5 mmol) N-Methylmorpholin werden analog der AAV 2 umgesetzt. Das Amid wird mittels Säulenchromatographie (Elutionsmittel Toluol : Ethylacetat 60:40) isoliert und aus Methylenchlorid/Petrolether 60/80 auskristallisiert.

Ausbeute: 53 % d. Th.

Schmp.: 203°C

R_f-Wert: 0.29 (FM 2)

IR (KBr), [cm⁻¹]: 3316 (m) 35.1, 2978 (m) 36.1, 1726 (vs) 5.8, 1699 (vs) 11.6, 1616 (vs) 5.7, 1517 (vs) 6.5, 1410 (vs) 8.9, 1282 (vs) 9.7

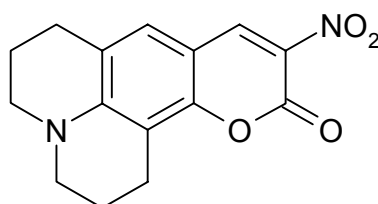
ESR-Spektrum (9.8 GHz, CDCl₃, RT):

$g = 2.00585$ $\alpha(N) = 1.462$ [mT] (1N)

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 397 M⁺• (27.4), 367 (19.3), 324 (14.3), 229 (55.4), 200 (33.8), 168 (8.3), 110 (71.6)

Elementaranalyse:

$C_{19}H_{20}N_2O_4F_3$	(397.37)	ber.:	C	57.40	H	5.06	N	7.03
		gef.:	C	56.78	H	5.20	N	6.64

10-Nitro-2,3,6,7-tetrahydro-11-oxo-1*H*,5*H*,11*H*-benzo[*b*]pyrano[6,7,8-*i,j*] chinolizin**Nitro-BAC (18)**

Darstellung: Die Substanz wird analog der Literaturstelle⁸³ J. Heterocycl. Chem., 27, 727 (1990) synthetisiert und aufgereinigt. Nach IUPAC würde sich folgender Name ergeben: 2,3,6,7-Tetrahydro-10-nitro-11-oxo-1*H*,5*H*,11*H*-pyrano[3,2-*g*]pyrido[3,2,1-*i,j*] chinolin.

Ausbeute: 83 % d. Th.

Schmp.: 250 - 251°C

R_f-Wert: 0.48 (FM 7)

IR (KBr),[cm⁻¹]: 3447 (w, br) 61.4, 2943 (m) 49.1, 1733 (s) 13.6, 1624 (vs) 1.9, 1584 (s) 13.3, 1525 (vs) 1.9, 1265 (vs) 0.4, 1211 (vs) 9.6, 1199 (s) 10.5

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) [ppm]:

1.8 – 2.0	m	4 H	2-CH ₂ , 6-CH ₂	
2.6 – 2.8	t	4 H	1-CH ₂ , 7-CH ₂	³ J = 6 Hz
3.3 – 3.5	„t“	4 H	3-CH ₂ , 5-CH ₂	
7.30	s	1 H	H-8	
8.82	s	1 H	H-9	

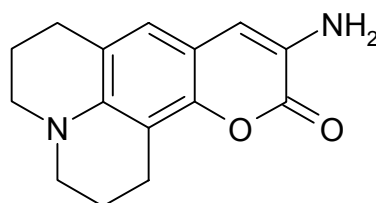
MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 286 M⁺ (66.5), 256 (29.6), 228 (19.3), 212 (54.2), 184 (100), 128 (36.1), 105 (16.8), 77 (25.2)

Elementaranalyse:

C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₄	(286.29)	ber.:	C	62.90	H	4.90	N	9.80
		gef.:	C	62.05	H	4.82	N	9.23

10-Amino-2,3,6,7-tetrahydro-11-oxo-1*H*,5*H*,11*H*-benzo[*b*]pyrano[6,7,8-*i,j*] Chinolizin

Amino-BAC (19)



Darstellung: Die Substanz wird analog der Literaturstelle⁸³ J. Heterocycl. Chem., 27, 727 (1990) synthetisiert. Der salzsaure Reaktionsansatz wird auf ca. 150 ml Eiswasser gegossen und mit Methylenchlorid ausgeschüttelt wird. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Die Methylenchloridphase wird eingengt bis eine übersättigte Lösung vorliegt und mit Petrolether 60/80 ausgefällt.

Ausbeute: 93 % d. Th.

Schmp.: 123 - 125°C

R_f-Wert: 0.79 (FM 7)

IR (KBr),[cm⁻¹]: 3455 (m) 38.6, 2957 (m) 47.2, 2851 (w) 54.4, 1717 (vs) 5.4, 1631 (s) 18.9, 1599 (s) 28.5

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) [ppm]:

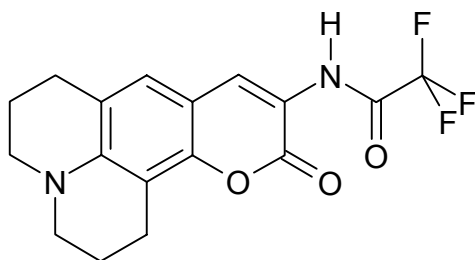
1.75 – 2.0	m	4 H	2-CH ₂ , 6-CH ₂	³ J = 6 Hz
2.65 – 2.8	q	4 H	1-CH ₂ , 7-CH ₂	³ J = 6 Hz
3.15 – 3.4	„t“	4 H	3-CH ₂ , 5-CH ₂	³ J = 5 Hz
5.1	„s“	2 H	-NH ₂	
7.0	s	1 H	H-8	
7.36	s	1 H	H-9	

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 256 M⁺• (100), 227 (27.1), 199 (15.1), 184 (16.1), 171 (15.5), 149 (15.7), 113 (22.2)

Elementaranalyse:

C ₁₅ H ₁₆ N ₂ O ₂	(256.31)	ber.:	C	70.29	H	6.29	N	10.93
		gef.:	C	70.04	H	6.36	N	11.09

N-(2,3,6,7-Tetrahydro-11-oxo-1*H*,5*H*,11*H*-benzo[*b*]pyrano[6,7,8-*i,j*]chinolizin-10-yl)-trifluoracetamid **Trifluoracetamido-BAC (20a)**



Darstellung: 50 mg (0.2 mmol) Amino-BAC **19** und Trifluoressigsäureanhydrid im 2-fachen Überschuss werden in Aceton gelöst und 3 h gerührt. Das Amid wird mittels Säulenchromatographie (FM Toluol/Aceton 95:5) isoliert und aus Methylenchlorid/Petrolether 60/80 umkristallisiert.

Ausbeute: 40 % d. Th.

Schmp.:	205°C
R_f-Wert:	0.4 (FM1)
IR (KBr), [cm⁻¹]:	2934 (w) 53.1, 2857 (w) 58.7, 1724 (s) 15.1, 1694 (vs) 3.9, 1622 (s) 25.3, 1599 (vs) 9.3, 1555 (s) 15.3, 1514 (m) 35.2, 1315 (vs) 5.84

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) [ppm]:

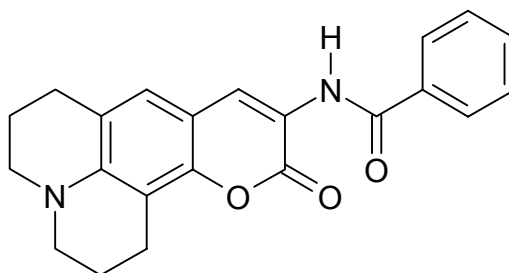
1.8 – 2.0	m	4 H	2-CH ₂ , 6-CH ₂	J = 6 Hz
2.65 – 2.8	q	4 H	1-CH ₂ , 7-CH ₂	J = 6 Hz
3.2 – 3.3	„t“	4 H	3-CH ₂ , 5-CH ₂	J = 5 Hz
7.0	s	1 H	H-8	
8.0	s	1 H	H-9	
10.8	s	1 H	-NH	(aust. mit D ₂ O)

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 352 M⁺ (100), 255 (19.7), 227 (61.5), 141 (17.3)

Elementaranalyse:

C ₁₇ H ₁₅ N ₂ O ₃ F ₃	(352.32)	ber.:	C	57.96	H	4.29	N	7.95
		gef.:	C	57.82	H	4.28	N	7.73

N-(2,3,6,7-Tetrahydro-11-oxo-1*H*,5*H*,11*H*-benzo[*b*]pyrano[6,7,8-*i,j*]chinolizin-10-yl)-benzamid **Benzamido-BAC (20b)**



Darstellung: 82 mg (0.3 mmol) Amino-BAC **19**, 88 mg (0.5 mmol) 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin **14**, 61 mg (0.5 mmol) Benzoesäure und 50 µl N-Methylmorpholin werden nach AAV 2 umgesetzt. Nachdem über Nacht bei Raumtemperatur gerührt wird, kann der Ansatz am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt, in Methylenchlorid gelöst und mit Petrolether 60/80 ausgefällt werden. Die Fällung wird mit Petrolether aufgenommen und zum Sieden erhitzt. Der Niederschlag wird aus Petrolether 60/80 umkristallisiert.

Ausbeute: 14 % d. Th.

Schmp.: 174°C

R_f-Wert: 0.64 (FM 14)

IR (KBr), [cm⁻¹]: 3398 (w) 50.5, 2937 (w) 55.5, 1697 (s) 18.2, 1661 (s) 20.6, 1604 (s) 16.3, 1522 (vs) 9.8, 1367 (s) 13.9

¹H-NMR (200 MHz, Aceton) [ppm]:

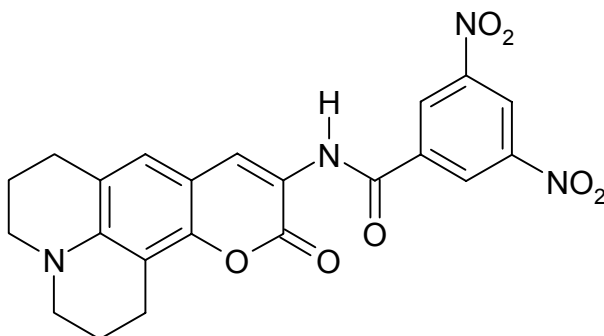
1.9 – 2.0	m	4 H	2-CH ₂ , 6-CH ₂	³ J = 6 Hz
2.75 – 2.90	„q“	4 H	1-CH ₂ , 7-CH ₂	³ J = 6 Hz
3.25 – 3.35	m	4 H	3-CH ₂ , 5-CH ₂	³ J = 5 Hz
7.0	s	1 H	H-8	
7.5 – 7.65	m	3 H	arom. H (ortho)	
7.95 – 8.05	m	2 H	arom. H (meta + para)	
8.6	s	1 H	H-9	

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 360 M⁺ (80.5), 255 (100), 227 (78.3), 171 (23.0), 105 (65.9), 77 (76.4)

Elementaranalyse:

C ₂₂ H ₂₀ N ₂ O ₃	(360.40)	ber.:	C	73.30	H	5.59	N	7.77
		gef.:	C	73.30	H	5.76	N	7.83

N-(2,3,6,7-Tetrahydro-11-oxo-1*H*,5*H*,11*H*-benzo[*b*]pyrano[6,7,8-*i,j*]chinolizin-10-yl)-3,5-dinitrobenzamid **3,5-Dinitrobenzamido-BAC (20c)**



Darstellung: 82 mg (0.3 mmol) Amino-BAC 19, 44 mg (0.25 mmol) 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin 14 und 105 mg (0.57 mmol) 3,5-Dinitrobenzoesäure werden in ca. 20 ml Acetonitril p.A. gelöst und bei Eiskühlung unter Rühren werden 150 µl N-Methylmorpholin langsam zugetropft. Nach 1 h Rühren bei 0°C wird anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 43 % d. Th.

Schmp.: 253°C unter Zersetzung

R_f-Wert: 0.62 (FM 9)

IR (KBr),[cm⁻¹]: 3336 (w) 66.5, 2943 (w) 63.2, 2846 (w) 66.9, 1699 (m) 40.7, 1671 (m) 32.0, 1622 (m) 37.0, 1601 (s) 26.2, 1530 (s) 15.1, 1369 (m) 31.6, 1308 (m) 33.4

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) [ppm]:

1.8 – 2.0	m	4 H	2-CH ₂ , 6-CH ₂	
2.7 – 2.85	q	4 H	1-CH ₂ , 7-CH ₂	³ J = 4 Hz
3.2 – 3.25	m	4 H	3-CH ₂ , 5-CH ₂	
7.1	s	1 H	H-8	
8.2	s	1 H	H-9	
8.9	“m”	1 H	H-4'	

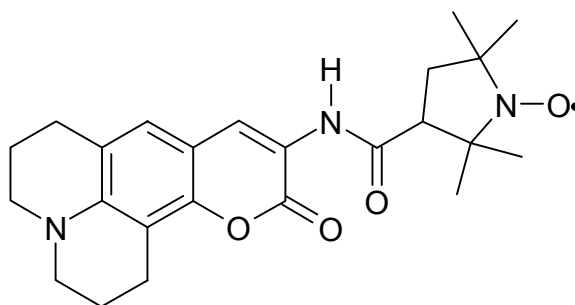
9.1	"m"	2 H	H-2', H-6'	
10.53	s	1 H	-NH	(aust. mit D ₂ O)

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 450 M⁺ (55.0), 420 (6.6), 255 (27.4), 227 (41.8)

Elementaranalyse:

C ₂₂ H ₁₈ N ₄ O ₇	(450.41)	ber.:	C	58.66	H	4.03	N	12.44
		gef.:	C	58.46	H	4.18	N	12.15

N-(2,3,6,7-Tetrahydro-11-oxo-1*H*,5*H*,11*H*-benzo[*b*]pyrano[6,7,8-*i,j*]chinolizin-10-yl)-3-PROXYL-carbonsäureamid **PROXYL-3-carbamoyl-BAC (20d)**



Darstellung: Nach AAV 2 werden 82 mg (0.25 mmol) Amino-BAC **19**, 88 mg (0.5 mmol) 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin **14**, 94 mg (0.5 mmol) 3-Carboxy-PROXYL und 100 µl N-Methylmorpholin umgesetzt. Das Amid wird mittels Säulenchromatographie (FM Isopropylether/Methanol 100:2) isoliert und durch Fällung mit Petrolether 60/80 aus Methylenchlorid umkristallisiert.

Ausbeute: 14 % d. Th.

Schmp.: ab 120°C Zersetzung

R_f-Wert: 0.77 (FM 13)

IR (KBr),[cm⁻¹]: 3565 (w,sh) 58.1, 3395 (m) 49.6, 3316 (m) 46.9, 2972 (s) 27.5, 2935 (m) 31.9, 1698 (vs) 5.2, 1681 (vs) 7.3, 1622 (s) 17.0, 1605 (vs) 8.1, 1522 (vs) 6.9

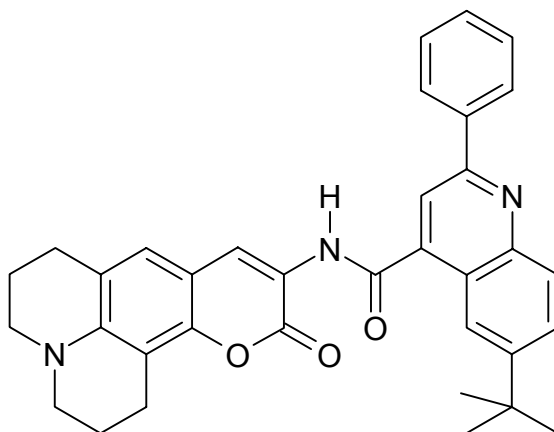
ESR-Spektrum (9.8 GHz, CDCl₃, RT):

$g = 2.00581$ $\alpha(N) = 1.4693$ [mT] (1N)

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 425 M⁺ (2.6), 410 (4.0), 338 (7.5), 282 (18.6), 256 (100),
197 (17.7)

C₂₄H₃₀N₃O₄ (424.52)

N-(2,3,6,7-Tetrahydro-11-oxo-1*H*,5*H*,11*H*-benzo[*b*]pyrano[6,7,8-*i,j*]chinolizin-10-yl)-6-*tert*-butyl-2-phenylchinolin-4-carbonsäureamid (20e)



Darstellung: Analog nach AAV 2 werden 82 mg (0.32 mmol) Amino-BAC 19, 44 mg (0.25 mmol) 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin 14, 76 mg (0.25 mmol) 6-*tert*-Butyl-2-phenylchinolin-4-carbonsäure³¹ und 100 µl N-Methylmorpholin umgesetzt. Der Ansatz wird 72 h bei Raumtemperatur gerührt und bis zur Trockne eingengt. Das Amid wird über Säulenchromatographie (FM n-Hexan/Aceton 80:20) isoliert und mit Methylenchlorid/Petrolether 60/80 auskristallisiert.

Ausbeute: 24 % d. Th.

Schmp.: ab 215°C Zersetzung

R_f-Wert: 0.43 (FM 8)

IR (KBr),[cm⁻¹]: 3383 (m) 43.5, 3325 (m) 33.5, 3060 (w) 52.1, 2950 (m) 30.7, 1693 (s) 13.6, 1666 (s) 10.4, 1604 (vs) 7.3, 1525 (vs) 4.7, 1368 (vs) 7.4, 1306 (s) 18.0

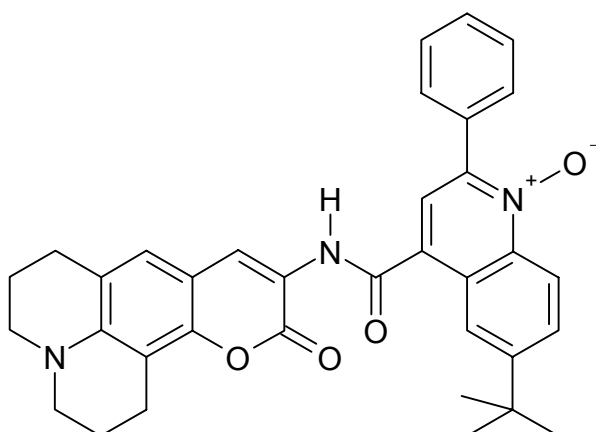
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) [ppm]:

1.4	s	9 H	<i>tert.</i> Butyl	
1.85 – 1.95	m	4 H	2-CH ₂ , 6-CH ₂	
2.7 – 2.85	“q”	4 H	1-CH ₂ , 7-CH ₂	
3.2 – 3.25	m	4 H	3-CH ₂ , 5-CH ₂	
7.15	s	1 H	H-8	
7.5 – 7.7	m	4 H	arom. H	
8.28	s	1 H	H-9	
7.95 – 8.4	“m”	5 H	arom. H	
10.3	s	1 H	-NH	(aust. mit D ₂ O)

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 543 M⁺• (88.3), 306 (73.5), 255 (100), 227 (65.4), 204 (13.6)

C₃₅H₃₃N₃O₃ (543.66)

N-(2,3,6,7-Tetrahydro-11-oxo-1*H*,5*H*,11*H*-benzo[*b*]pyrano[6,7,8-*i,j*]chinolizin-10-yl)-6-*tert.*-butyl-2-phenylchinolin-4-carbonsäureamid-1-oxid (20f)



Darstellung: 110 mg (0.43 mmol) Amino-BAC 19, 59 mg (0.33 mmol) 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin 14, 108 mg (0.33 mmol) 6-*tert*-Butyl-2-phenyl-4-chinolincarbonsäure-

1-oxid³¹ und 100 µl N-Methylmorpholin werden nach AAV 2 zur Reaktion gebracht. Hierbei entsteht ein Niederschlag, der abfiltriert wird, mit Diethylether gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 33 % d. Th.
Schmp.: ab 245°C unter Zersetzung
R_f-Wert: 0.53 (FM 2)
IR (KBr), [cm⁻¹]: 3385 (w) 52.4, 2958 (m) 32.1, 2863 (m) 45.8, 1715 (s) 11.3, 1654 (s) 19.1, 1623 (s) 19.4, 1602 (s) 11.2, 1518 (vs) 9.0, 1361 (vs) 6.8, 1307 (s) 10.2

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) [ppm]:

1.4	s	9 H	<i>tert.</i> Butyl	
1.9 – 2.1	m	4 H	2-CH ₂ , 6-CH ₂	
2.75 – 2.95	dt	4 H	1-CH ₂ , 7-CH ₂	³ J = 6 Hz
3.25 – 3.4	m	4 H	3-CH ₂ , 5-CH ₂	³ J = 5 Hz
7.0	s	1 H	H-8	
7.45 – 7.6	m	3 H	arom. H	
7.7	s	1 H	H-9	
7.9 – 8.0	m	3 H	H-7'; 2 arom. H	
8.4	s	1 H	H-5'	
8.5	s	1 H	-NH	(aust. mit D ₂ O)
8.8	s	1 H	H-3'	
8.9	d	1 H	H-8'	³ J = 9 Hz

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) [ppm]:

1.4	s	9 H	<i>tert.</i> Butyl	
1.8 – 2.0	m	4 H	2-CH ₂ , 6-CH ₂	
2.7 – 2.85	q	4 H	1-CH ₂ , 7-CH ₂	³ J = 6 Hz

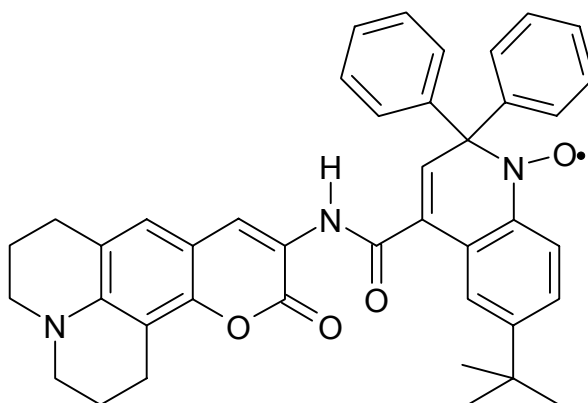
3.2 – 3.25	m	4 H	3-CH ₂ , 5-CH ₂
7.1	s	1 H	H-8
7.5 – 7.75	m	3 H	arom. H
7.95	s	1 H	H-9
8.0 – 8.15	m	3 H	arom. H
8.3	s	1 H	H-3'
8.45	“d”	1 H	H-5'
8.65	d	1 H	H-8'
10.2	s	1 H	-NH (aust. mit D ₂ O)

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 543 (M-16) (100), 289 (18.1), 255 (93.7), 227 (62.6), 204 (8.0), 115 (5.7)

Elementaranalyse:

C₃₅H₃₃N₃O₄ (559.66) ber.: C 75.11 H 5.90 N 7.51
gef.: C 74.28 H 5.92 N 7.21

N-[4-(2,3,6,7-Tetrahydro-11-oxo-1*H*,5*H*,11*H*-benzo[*b*]pyrano[6,7,8-*i,j*]chinolizin-10-yl)]-6-*tert*-butyl-2,2-diphenyl-1,2-dihydrochinolin-4-carbonsäure-amid-1-oxyl
NOXYL-amido-BAC (20g)



Darstellung: Zur Reaktion werden 100 mg (0.25 mmol) NOXYL³¹ **1**, 50 mg (0.28 mmol) 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin **14**, 64 mg (0.25 mmol) Amino-BAC **19** und 150 μ l N-Methylmorpholin nach AAV 2 gebracht. Der Rückstand wird in Toluol gelöst und mit Petrolether 60/80 fraktioniert gefällt.

Ausbeute: 89 % d. Th.

Schmp.: 158 - 160°C

R_f-Wert: 0.72 (FM 7)

IR (KBr), [cm⁻¹]: 3472 (s, sh) 23.4, 2945 (s) 22.0, 2848 (s) 25.7, 1693 (s) 11.5, 1615 (vs) 8.3, 1585 (vs) 6.6, 1559 (s) 13.0, 1519 (vs) 5.9, 1468 (m) 33.2, 1337 (vs) 7.9

ESR-Spektrum (9.8 GHz, CDCl₃, RT):

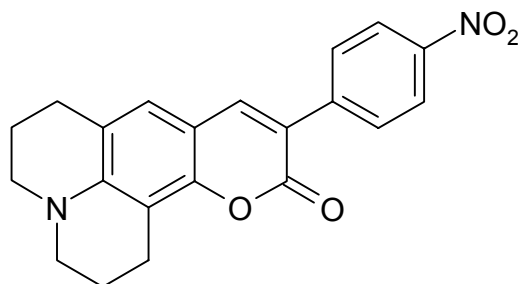
g = 2.0014 $\alpha(\text{N}) = 1.019$ [mT] (1N)
 $\alpha(\text{H}_8) = 0.318$ [mT] (1H)
 $\alpha(\text{H}_3) = 0.135$ [mT] (1H)
 $\alpha(\text{H}_7) = 0.113$ [mT] (1H)
 $\alpha(\text{H}_5) = 0.100$ [mT] (1H)

Elementaranalyse:

C ₄₁ H ₃₈ N ₃ O ₄	(636.78)	ber.:	C	77.34	H	6.02	N	6.60
		gef.:	C	77.77	H	6.36	N	5.97

10-(4-Nitrophenyl)-2,3,6,7-tetrahydro-11-oxo-1H,5H,11H-benzo[b]pyrano[6,7,8-i,j]

chinolizin Nitrophenyl-BAC (21**)**



Darstellung: Die Substanz wird analog der Literaturstelle⁸³ J. Heterocycl. Chem., 27, 727 (1990) synthetisiert und aufgereinigt.

Ausbeute: 92 % d. Th.

Schmp.: 278°C

R_f-Wert: 0.72 (FM 7)

IR (KBr), [cm⁻¹]: 3472 (s, sh) 23.4, 2945 (s) 22.0, 2848 (s) 25.7, 1693 (s) 11.5, 1615 (vs) 8.3, 1585 (vs) 6.6, 1559 (s) 13.0, 1519 (vs) 5.9, 1468 (m) 33.2, 1337 (vs) 7.9

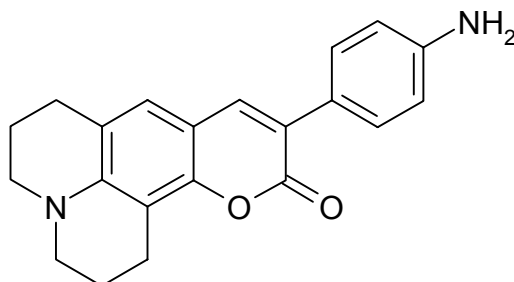
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) [ppm]:

1.9 – 2.1	m	4 H	2-CH ₂ , 6-CH ₂	³ J = 6 Hz
2.7 – 3.0	dt	4 H	1-CH ₂ , 7-CH ₂	³ J = 6 Hz
3.25 – 3.4	m	4 H	3-CH ₂ , 5-CH ₂	
6.9	s	1 H	H-8	
7.7	s	1 H	H-9	
7.9	m	2 H	H-2', H-6' (AA')	
8.2	m	2 H	H-3', H-5' (BB')	

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 362 M⁺ (100), 332 (36.7), 316 (23.7), 158 (16.9)

Elementaranalyse:

C ₂₁ H ₁₈ N ₂ O ₄	(362.39)	ber.:	C	69.60	H	5.01	N	7.73
		gef.:	C	69.55	H	4.96	N	7.66

10-(4-Aminophenyl)-2,3,6,7-tetrahydro-11-oxo-1*H*,5*H*,11*H*-benzo[*b*]pyrano[6,7,8-*i,j*]**chinolizin****Aminophenyl-BAC (22)**

Darstellung: Die Substanz wird analog der Literaturstelle⁸³ J. Heterocycl. Chem., 27, 727 (1990) synthetisiert. Der salzsaure Reaktionsansatz wird auf ca. 150 ml Eiswasser gegossen und mit Methylenchlorid ausgeschüttelt wird. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Die Methylenchloridphase wird eingengt bis eine übersättigte Lösung vorliegt und mit viel Petrolether 60/80 ausgefällt.

Ausbeute: 96 % d. Th.

Schmp.: 214 - 215°C

R_f-Wert: 0.68 (FM 7), 0.16 (FM 1)

IR (KBr), [cm⁻¹]: 3565 (w) 68.9, 3424 (w) 58.8, 3331 (w) 55.7, 3227 (w) 66.6, 2934 (w) 58.9, 1690 (s) 23.4, 1614 (s) 13.7, 1519 (s) 23.5, 1361 (w) 52.3, 1307 (s) 18.2, 1299 (s) 17.4

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) [ppm]:

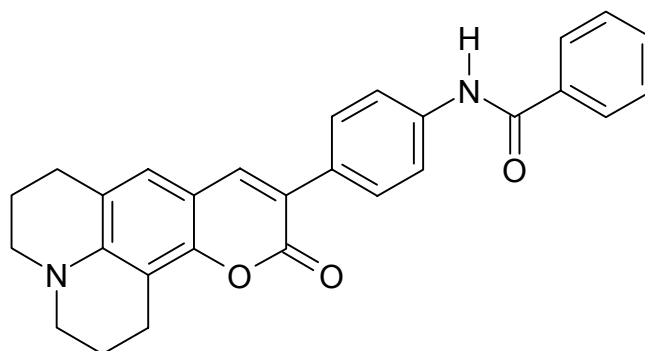
2.0	m	4 H	2-CH ₂ , 6-CH ₂	
2.90	dt	4 H	1-CH ₂ , 7-CH ₂	³ J = 6 Hz
3.27	m	4 H	3-CH ₂ , 5-CH ₂	
3.8	s	2 H	-NH ₂	(aust. mit D ₂ O)
6.73	m	2 H	H-3', H-5'	
6.87	s	1 H	H-8	
7.55	m	1 H	H-9, H-2', H-6'	

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 332 M⁺ (47.0), 304 (14.2), 275 (8.6), 167 (14.3), 130 (11.5), 43 (100)

Elementaranalyse:

C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₂	(332.41)	ber.:	C	75.90	H	6.06	N	8.43
		gef.:	C	75.65	H	6.25	N	8.18

N-[4-(2,3,6,7-Tetrahydro-11-oxo-1*H*,5*H*,11*H*-benzo[*b*]pyrano[6,7,8-*i,j*]chinolizin-10-yl)phenyl]-benzamid **Benzamido-Phenyl-BAC (23a)**



Darstellung: 31 mg (0.25 mmol) Benzoesäure, 44 mg (0.25 mmol) 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin **14**, 57 mg (0.13 mmol) Aminophenyl-BAC **22** und 25 µl N-Methylmorpholin werden nach AAV 2 umgesetzt. Das Amid wird über eine Säulenchromatographie (Elutionsmittel Toluol : Aceton 90:10) isoliert. Die Umkristallisation erfolgt aus Methylenchlorid/Petrolether 60/80.

Ausbeute: 63 % d. Th.

Schmp.: 197°C

R_f-Wert: 0.63 (FM 2)

IR (KBr),[cm⁻¹]: 3316 (m, sh) 48.4, 3052 (w) 67.5, 2941 (w) 55.6, 2846 (w) 58.3, 1669 (s) 19.7, 1614 (s) 13.4, 1593 (s) 15.4, 1520 (vs) 7.3

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) [ppm]:

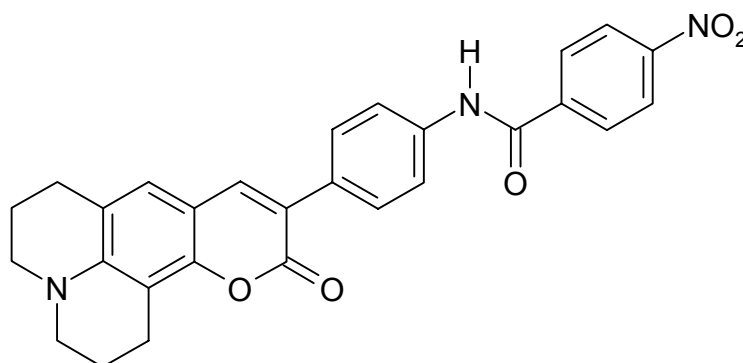
1.8 – 2.0	m	4 H	2-CH ₂ , 6-CH ₂	
2.7 – 2.85	„q“	4 H	1-CH ₂ , 7-CH ₂	³ J = 5 Hz
3.2 – 3.35	„t“	4 H	3-CH ₂ , 5-CH ₂	
7.10	s	1 H	H-8	
7.5 – 7.6	m	5 H	arom. H	
7.65 – 7.9	dd	4 H	AA'BB'-System	J = 8.8 Hz
7.9	s	1 H	H-9	
10.3	s	1 H	N-H	

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 437 M⁺ (54.8), 331 (41.8), 274 (7.3), 105 (72.0), 77 (69.8), 44 (100)

Elementaranalyse:

C ₂₈ H ₂₄ N ₂ O ₃	(436.52)	ber.:	C	77.04	H	5.54	N	6.42
		gef.:	C	74.71	H	5.14	N	6.13

N-[4-(2,3,6,7-Tetrahydro-11-oxo-1*H*,5*H*,11*H*-benzo[*b*]pyrano[6,7,8-*i,j*]chinolizin-10-yl)phenyl]-4-nitrobenzamid **4-Nitrobenzamido-Phenyl-BAC (23b)**



Darstellung: Analog AAV 2 werden 42 mg (mmol) 4-Nitrobenzoesäure, 44 mg (0.25 mmol) 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin 14, 57 mg (0.13 mmol) Aminophenyl-BAC 22 und

50 µl N-Methylmorpholin zur Reaktion gebracht. Das Amid wird über eine Säulenchromatographie (FM : Toluol : Aceton 65:35) isoliert. Die Umkristallisation erfolgt aus Methylenchlorid/Petrolether 60/80.

Ausbeute: 23 % d. Th.
Schmp.: 235°C
R_f-Wert: 0.4 (FM1)
IR (KBr), [cm⁻¹]: 3372 (m) 49.2, 3331 (m) 48.5, 3106 (w) 60.3, 2941 (m) 47.1, 2845 (w) 50.8, 1675 (s) 21.6, 1614 (s) 10.6, 1599 (s) 10.6, 1518 (vs) 6.0, 1307 (vs) 8.7

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) [ppm]:

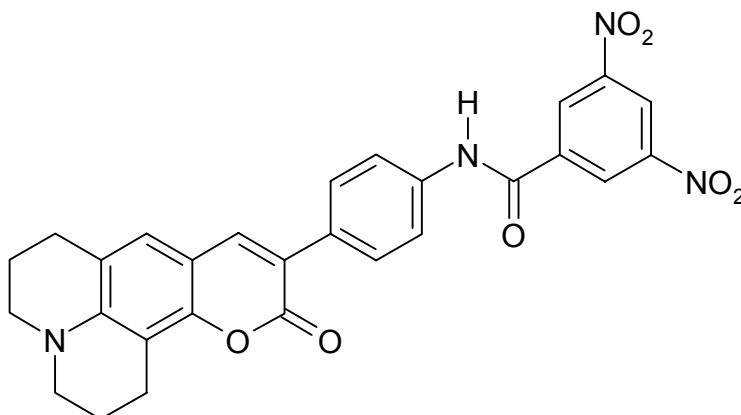
1.8 – 2.0	m	4 H	2-CH ₂ , 6-CH ₂	
2.7 – 2.85	m	4 H	1-CH ₂ , 7-CH ₂	
3.2 – 3.3	m	4 H	3-CH ₂ , 5-CH ₂	
7.1	s	1 H	H-8	
7.7 – 7.9	dd	4 H	AA'BB'-System	J = 9 Hz
7.99	s	1 H	H-9	
8.2 – 8.4	dd	4 H	CC'DD'-System	J = 7 Hz
10.6	s	1 H	N-H	(aust. mit D ₂ O)

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 481 M⁺ (100), 451 (29.1), 374 (25.7), 360 (40.2), 332 (47.4), 289 (20.0), 247 (24.9), 205 (25.6), 83 (87.5)

Elementaranalyse:

C ₂₈ H ₂₃ N ₃ O ₅	(481.51)	ber.:	C	69.85	H	4.81	N	8.73
		gef.:	C	66.63	H	4.90	N	8.29

N-[4-(2,3,6,7-Tetrahydro-11-oxo-1*H*,5*H*,11*H*-benzo[*b*]pyrano[6,7,8-*i,j*]chinolizin-10-yl)phenyl]-3,5-dinitrobenzamid 3,5-Dinitrobenzamido-Phenyl-BAC (23c**)**



Darstellung: Zur Reaktion nach AAV 2 werden 108 mg (0.5 mmol) 3,5-Dinitrobenzoesäure, 88 mg (0.5 mmol) 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin **14**, 112 mg (0.5 mmol) Aminophenyl-BAC **22** und 150 µl N-Methylmorpholin gebracht. Das Amid wird über Säulenchromatographie (FM Toluol/Aceton 80 : 20) isoliert und das Produkt aus Methylenchlorid/Petrolether 60/80 kristallisiert.

Ausbeute: 19 % d. Th.

Schmp.: ab 272°C Zersetzung

R_f-Wert: 0.71 (FM15)

IR (KBr),[cm⁻¹]: 3411 (w, br) 63.5, 2937 (w) 65.6, 2846 (w) 67.7, 1673 (w) 51.8, 1613 (w) 42.3, 1597 (m) 41.7, 1543 (m) 46.0, 1521 (m) 35.3

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) [ppm]:

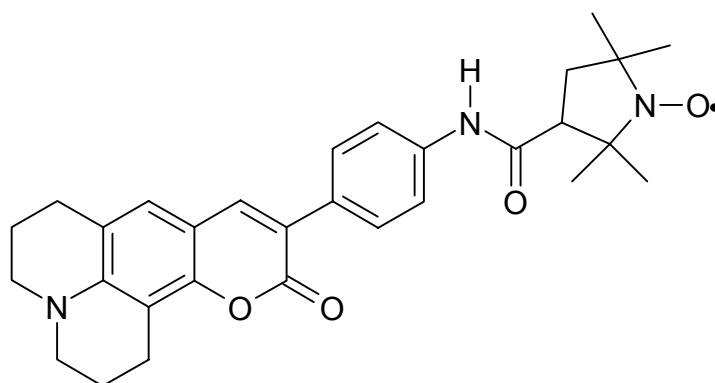
1.8 – 2.0	m	4 H	2-CH ₂ , 6-CH ₂	
2.7 – 2.9	m	4 H	1-CH ₂ , 7-CH ₂	
3.25 – 3.35	m	4 H	3-CH ₂ , 5-CH ₂	
7.1	s	1 H	H-8	
7.75 – 7.9	dd	4 H	AA'BB'-System	J = 9 Hz

8.0	s	1 H	H-9	
9.0	s	1 H	p-Phenyl H	
9.2	"d"	2 H	ortho H	J = 2 Hz
10.9	s	1 H	N-H	(aust. mit D ₂ O)

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 526 M⁺ (12.6), 413 (62.3), 391 (97.6)

C₂₈H₂₂N₄O₇ (526.50)

N-[4-(2,3,6,7-Tetrahydro-11-oxo-1*H*,5*H*,11*H*-benzo[*b*]pyrano[6,7,8-*i,j*]chinolizin-10-yl)phenyl]-PROXYL-3-carbonsäureamid **PROXYL-3-carbamoyl-Phenyl-BAC (23d)**



Darstellung: 46 mg (0.25 mmol) 3-Carboxy-PROXYL, 44 mg (0.25 mmol) 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin 14, 57 mg (0.13 mmol) Aminophenyl-BAC 22 und 25 µl (0.25 mmol) N-Methylmorpholin werden nach AAV 2 umgesetzt. Der Ansatz wird am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt, mit Methylenchlorid aufgenommen und mit verdünnter NaOH und Wasser gewaschen. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet und das Produkt aus Methylenchlorid/Petrolether 60/80 gefällt.

Ausbeute: 57 % d. Th.

Schmp.: 251°C unter Zersetzung

R_f-Wert: 0.26 (FM 9)

IR (KBr), [cm⁻¹]: 3323 (m, sh) 47.5, 2971 (w) 54.2, 2933 (w) 52.6, 1681 (s) 25.2, 1614 (s) 17.4, 1599 (s) 16.5, 1519 (s) 13.6, 1308 (s) 13.1

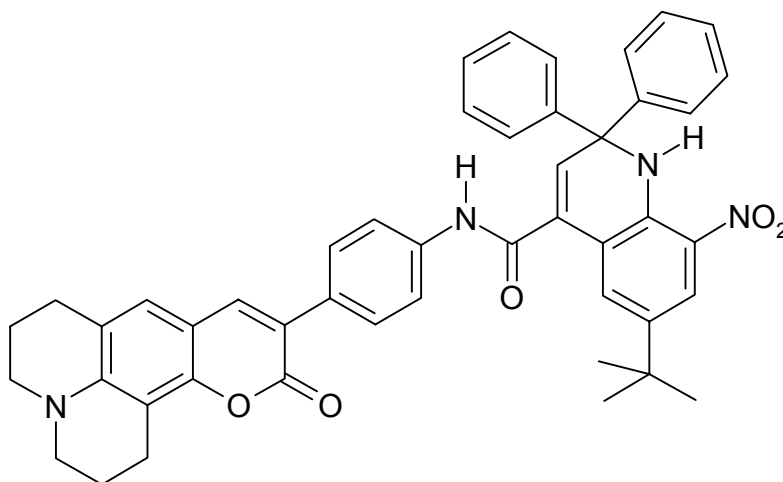
ESR-Spektrum (9.8 GHz, CDCl₃, RT):

$g = 2.00581$ $\alpha(N) = 1.4693$ [mT] (1N)

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 500 M⁺ (0.6), 485 (12.2), 332 (35.5), 256 (100), 178 (13.4), 154 (9.4), 99 (22.0)

C₃₀H₃₄N₃O₄ (500.62)

N-[4-(2,3,6,7-Tetrahydro-11-oxo-1*H*,11*H*-benzo[*b*]pyrano[6,7,8-*i,j*]chinolizin-10-yl)phenyl]-6-*tert*-butyl-8-nitro-2,2-diphenyl-1,2-dihydrochinolin-4-carbon-säureamid
(23e)



Darstellung: 107 mg (0.25mmol) 6-*tert*-Butyl-8-nitro-2,2-diphenyl-1,2-dihydrochinolin-4-carbonsäure³¹ **3**, 44 mg (0.25 mmol) 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin **14**, 83 mg (0.25 mmol) Aminophenyl-BAC **22** und 50 µl (0.25 mmol) N-Methylmorpholin werden nach AAV 2 zur Reaktion gebracht. Das Amid wird über Säulenchromatographie (FM Methylenchlorid/Aceton 100:10) isoliert und aus Methylenchlorid/Petrolether 60/80 kristallisiert.

Ausbeute: 30 % d. Th.
Schmp.: ab 180°C setzt Zersetzung ein
R_f-Wert: 0.91 (FM 12)
IR (KBr), [cm⁻¹]: 3422 (w,br) 63.9, 2951 (w) 68.4, 1684 (w) 60.2, 1615 (m) 44.8, 1518 (m) 35.0, 1308 (m) 37.9

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) [ppm]:

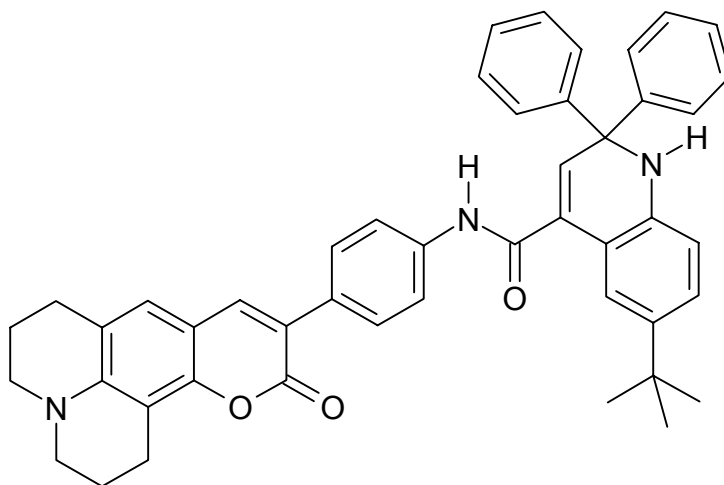
1.27	s	9 H	<i>tert.</i> -Butyl	
1.9 – 2.05	m	4 H	2-CH ₂ , 6-CH ₂	
2.7 – 2.9	m	4 H	1-CH ₂ , 7-CH ₂	
3.2 – 3.35	q	4 H	3-CH ₂ , 5-CH ₂	³ J = 5 Hz
6.53	s	1 H	H-3'	
6.86	s	1 H	H-8	
7.3 – 7.45	m	10 H	arom. H	
7.56	s	1 H	H-9	
7.55 – 7.7	dd	4 H	AA'BB'-System	
7.73	„s“	1 H	H-5'	
7.75	s	1 H	-NH	(aust. mit D ₂ O)
8.0	„s“	1 H	H-7'	
8.87	s	1 H	N-H	Amid

MS (FAB) [m/z]: 742 Molekülion

Elementaranalyse:

C ₄₇ H ₄₂ N ₄ O ₅	(742.88)	ber.:	C	75.99	H	5.70	N	7.54
		gef.:	C	75.55	H	5.72	N	6.86

N-[4-(2,3,6,7-Tetrahydro-11-oxo-1*H*,5*H*,11*H*-benzo[*b*]pyrano[6,7,8-*i,j*]chinolizin-10-yl)phenyl]-6-*tert*.-butyl-2,2-phenyl-1,2-dihydrochinolin-4-carbonsäureamid (23f**)**



Darstellung: Nach AAV 2 werden 50 mg (0.13 mmol) 6-*tert*-Butyl-2,2-diphenyl-1,2-dihydrochinolin-4-carbonsäure³¹ **2**, 45 mg (0.25 mmol) 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin **14**, 45 mg (0.13 mmol) Aminophenyl-BAC **22** und 100 µl N-Methylmorpholin umgesetzt. Das Produkt wird über Säulenchromatographie (Toluol/Ethylacetat 90:10) isoliert und aus Methylenchlorid mit Petrolether 60/80 auskristallisiert.

Ausbeute: 16 % d. Th.

Schmp.: ab 188°C Zersetzung

R_f-Wert: 0.47 (FM 1)

IR (KBr),[cm⁻¹]: 3416 (w) 68.1, 3055 (vw) 76.1, 2950 (w) 69.8, 2366 (vw) 78.6, 1699 (w) 68.0, 1616 (w) 55.6, 1517 (w) 53.9, 1307 (w) 51.7

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) [ppm]:

1.15	s	9 H	<i>tert</i> .-Butyl
1.8 – 2.0	m	4 H	2-CH ₂ , 6-CH ₂
2.7 – 2.85	m	4 H	1-CH ₂ , 7-CH ₂
3.2 – 3.35	„t“	4 H	3-CH ₂ , 5-CH ₂
6.4	s	1 H	H-3'

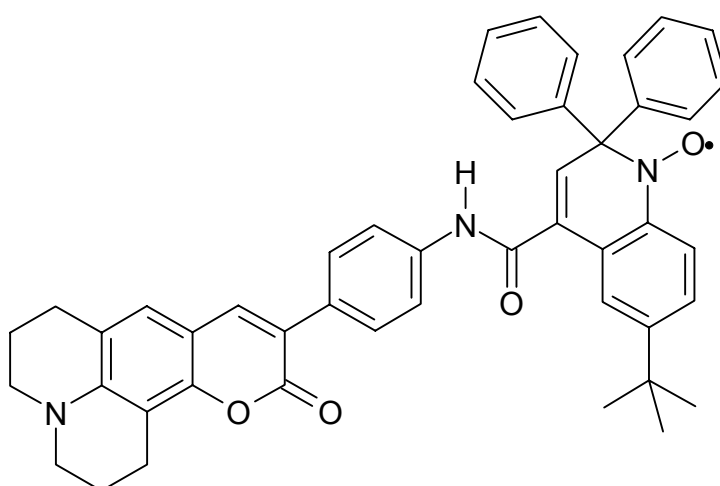
7.1	s	1 H	H-8
6.8 – 7.3	m	4 H	H-5', H-7', H-8', -NH
7.4	m	10 H	arom. H
7.65 – 7.8	dd	4 H	AA'BB'-System
8.0	s	1 H	H-9
10.3	s	1 H	N-H

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 621 (100), 424 (11.3), 338 (31.3), 310 (66.1), 279 (32.6), 105 (26.0), 91 (80.4)

Elementaranalyse:

$C_{47}H_{43}N_3O_3$	(697.89)	ber.:	C	80.89	H	6.21	N	6.02
		gef.:	C	79.39	H	5.86	N	5.69

N-[4-(2,3,6,7-Tetrahydro-11-oxo-1*H*,5*H*,11*H*-benzo[*b*]pyrano[6,7,8-*i,j*]chinolizin-10-yl)phenyl]-6-*tert*.-butyl-2,2-diphenyl-1,2-dihydrochinolin-4-carbonsäure-amid-1-oxyl
NOXYL-amido-Phenyl-BAC (23g)



Darstellung: Zur Reaktion werden 398.5 mg (1.0 mmol) NOXYL³¹ **1**, 351.2 mg (2.0 mmol) 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin **14**, 332.4 mg (1.0 mmol) Aminophenyl-BAC **22**

und 202 μl N-Methylmorpholin nach AAV 2 gebracht. Der Rückstand wird in Toluol gelöst mit Petrolether 60/80 versetzt und fraktioniert gefällt.

Ausbeute: 96 % d. Th.
Schmp.: 182°C
R_f-Wert: 0.44 (FM 1)
IR (KBr), [cm⁻¹]: 3409 (w, br) 61.5, 3057 (w) 67.1, 3029 (w) 67.7, 2949 (m) 47.9, 1684 (m) 37.6, 1616 (s) 19.3, 1600 (s) 20.9, 1563 (m) 35.8, 1517 (s) 15.2, 1307 (s) 13.1

ESR-Spektrum (9.8 GHz, CDCl₃, RT):

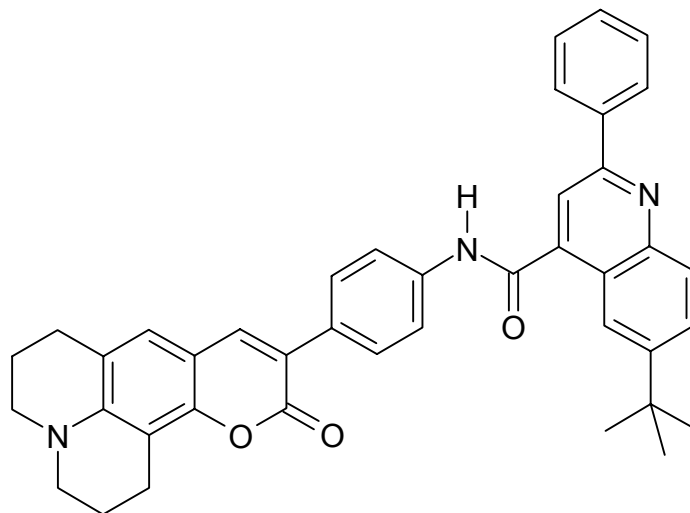
$g = 2.0014$ $\alpha(\text{N}) = 1.015 \text{ [mT]} (1\text{N})$
 $\alpha(\text{H}_8) = 0.317 \text{ [mT]} (1\text{H})$
 $\alpha(\text{H}_3) = 0.138 \text{ [mT]} (1\text{H})$
 $\alpha(\text{H}_7) = 0.112 \text{ [mT]} (1\text{H})$
 $\alpha(\text{H}_5) = 0.100 \text{ [mT]} (1\text{H})$

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 636 (M-Phe) (9.5), 621 (100), 332 (74), 337 (67), 310 (60.7), 302 (38.4), 274 (15)

Elementaranalyse:

$\text{C}_{47}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_4$	(712.87)	ber.:	C	79.19	H	5.94	N	5.89
		gef.:	C	78.88	H	5.86	N	5.44

N-[4-(2,3,6,7-Tetrahydro-11-oxo-1*H*,5*H*,11*H*-benzo[*b*]pyrano[6,7,8-*i,j*]chinolizin-10-yl)phenyl]-6-*tert*.-butyl-2-phenylchinolin-4-carbonsäureamid (23h**)**



Darstellung: Nach AAV 2 werden 76 mg (0.25 mmol) 6-*tert*-Butyl-2-phenylchinolin-4-carbonsäure³¹, 44 mg (0.25 mmol) 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin **14**, 57 mg (0.13 mmol) Aminophenyl-BAC **22** und 100 μ l N-Methylmorpholin zur Reaktion gebracht. Der Ansatz wird am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedunstet, der Rückstand mit Methylenchlorid aufgenommen und mit Wasser, 5 %iger NaOH und Wasser gewaschen. Die verbleibende organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, eingedunstet und durch Petrolether 60/80 wird das Amid fraktioniert ausgefällt.

Ausbeute: 38 % d. Th.

Schmp.: ab 198°C Zersetzung

R_f-Wert: 0.75 (FM 9)

IR (KBr), [cm⁻¹]: 3409 (m,br) 44.3, 3082 (w) 55.8, 2962 (w) 51.9, 1733 (w) 52.0, 1674 (m) 48.8, 1653 (w) 51.8, 1611 (m) 42.0,

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆) [ppm]:

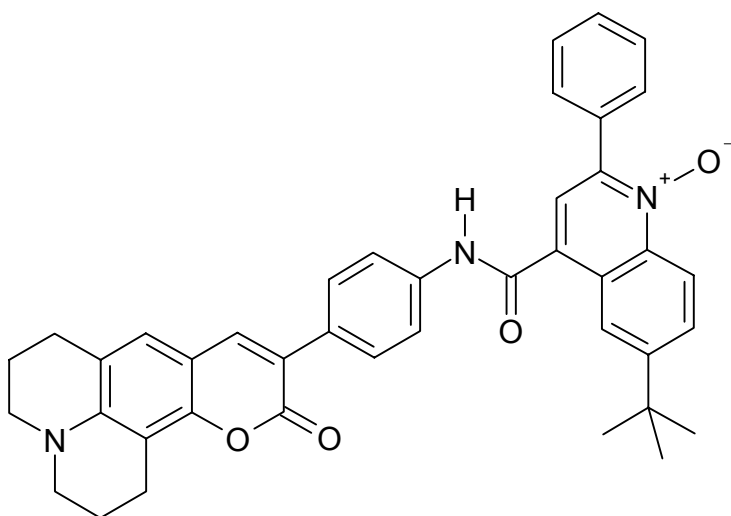
1.4	s	9 H	<i>tert</i> .-Butyl
1.8 – 2.0	m	4 H	2-CH ₂ , 6-CH ₂
2.3 – 2.5	m	4 H	1-CH ₂ , 7-CH ₂

3.2 – 3.4	m	4 H	3-CH ₂ , 5-CH ₂
7.5 – 8.5	m	10 H	H-8, H-3', H-5', H-7', H-8', arom. H
7.8 – 8.0	dd	4 H	AA'BB'-System
8.7	s	1 H	H-9
11.15	s	1 H	N-H

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 619 M⁺• (32.3), 331 (27.8), 303 (32.4), 290 (35.8), 244 (14.3), 149 (34.8), 44 (100)

C₄₁H₃₇N₃O₃ (619.76)

N-[4-(2,3,6,7-Tetrahydro-11-oxo-1*H*,5*H*,11*H*-benzo[*b*]pyrano[6,7,8-*i,j*]chinolizin-10-yl)phenyl]-6-*tert*.-butyl-2-phenylchinolin-4-carbonsäureamid-1-oxid (23i**)**



Darstellung: 110 mg (0.3 mmol) Aminophenyl-BAC **22**, 44 mg (0.25 mmol) 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin **14**, 81 mg (0.25 mmol) 6-*tert*-Butyl-2-phenyl-4-chinolincarbonsäure-1-oxid³¹ und 100 µl N-Methylmorpholin werden nach AAV 2 umgesetzt. Der entstehende Niederschlag wird abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und getrocknet.

Ausbeute: 93 % d. Th.

Schmp.: ab 175°C Zersetzung
R_f-Wert: 0.31 (FM 2)
IR (KBr), [cm⁻¹]: 3419 (w,br) 60.5, 3281 (w) 63.3, 2951 (w) 51.5, 1717 (w) 52.7, 1700 (w) 50.5, 1616 (s) 27.9, 1599 (s) 25.5, 1518 (s) 23.5, 1308 (s) 15.9,

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) [ppm]:

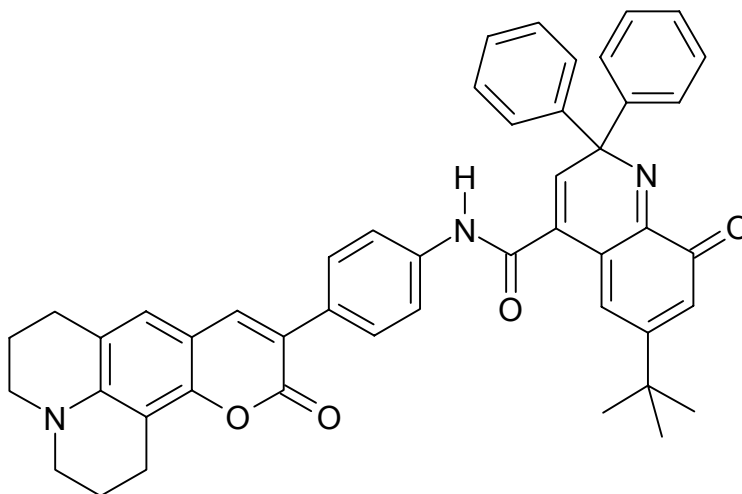
1.4	s	9 H	<i>tert.</i> -Butyl	
1.8 – 2.0	„q“	4 H	2-CH ₂ , 6-CH ₂	³ J = 6 Hz
2.7 – 2.85	m	4 H	1-CH ₂ , 7-CH ₂	
3.2 – 3.35	m	4 H	3-CH ₂ , 5-CH ₂	
7.10	s	1 H	H-8	
7.5 – 7.65	m	2 H	H-7', H-5'	
7.7 – 7.9	dd	4 H	AA'BB'-System	J = 9 Hz
7.99	s	1 H	H-9	
8.0 – 8.2	m	5 H	arom. H	
8.4	„s“	1 H	H-3'	
8.68	d	1 H	H-8'	
10.8	s	1 H	N-H	(aust. mit D ₂ O)

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 635 M⁺• (2.3), 620 (100), 332 (16.6), 331 (64.2), 302 (26.0), 260 (18.5), 204 (8.8)

Elementaranalyse:

C ₄₁ H ₃₇ N ₃ O ₄	(635.76)	ber.:	C	77.46	H	5.87	N	6.61
		gef.:	C	75.31	H	6.03	N	7.07

N-[4-(2,3,6,7-Tetrahydro-11-oxo-1*H*,5*H*,11*H*-benzo[*b*]pyrano[6,7,8-*i,j*]chinolizin-10-yl)phenyl]-6-*tert*.-butyl-2,2-diphenyl-8-oxo-2*H*,8*H*-chinolin-4-carbonsäure-amid (23j)



Darstellung: Zur Reaktion werden 40 mg (0.1 mmol) 6-*tert*-Butyl-2,2-diphenyl-8-oxo-2*H*,8*H*-chinolin-4-carbonsäure³¹, 21 mg (0.12 mmol) 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin 14, 40 mg (0.12 mmol) Aminophenyl-BAC 22 und 50 µl N-Methylmorpholin nach AAV 2 gebracht. Der Niederschlag wird abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und getrocknet. Am Rotationsverdampfer wird das Filtrat zur Trockne eingengt und das Amid über Säulenchromatographie (Toluol/Methanol 90:10) isoliert und aus Methylenchlorid mit Petrolether 60/80 auskristallisiert.

Ausbeute: 26 % d. Th.

Schmp.: ab 185°C Zersetzung

R_f-Wert: 0.41 (FM16)

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) [ppm]:

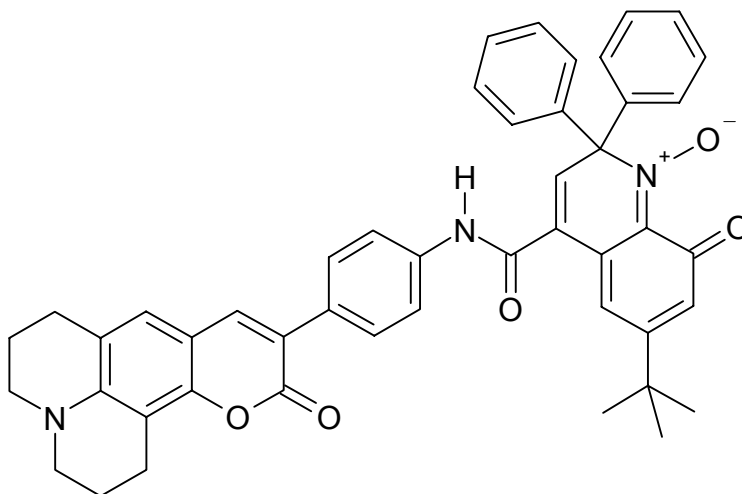
1.22	s	9 H	<i>tert</i> .-Butyl	
1.9 – 2.1	m	4 H	2-CH ₂ , 6-CH ₂	
2.75 – 2.95	dt	4 H	1-CH ₂ , 7-CH ₂	³ J = 6 Hz
3.2 – 3.35	m	4 H	3-CH ₂ , 5-CH ₂	
6.4	s	1 H	H-3	

6.91	s	1 H	H-8
7.17	s	1 H	H-9
7.3 – 7.4	m	10 H	arom. H
7.53	s	1 H	H-5'
7.56	m	4 H	AA'BB'-System
7.78	s	1 H	H-7'

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%): 633 (32.7), 494 (12.7), 436 (5.2), 358 (40.9), 333 (20.6), 332 (100), 78 (45.4)

$C_{47}H_{41}N_3O_4$ (711.86)

N-[4-(2,3,6,7-Tetrahydro-11-oxo-1*H*,5*H*,11*H*-benzo[*b*]pyrano[6,7,8-*i,j*]chinolizin-10-yl)phenyl]-6-*tert*.-butyl-2,2-diphenyl-8-oxo-2*H*,8*H*-chinolin-4-carbonsäure-amid-1-oxid
(**23k**)



Darstellung: 41 mg (0.1 mmol) 6-*tert*-Butyl-8-oxo-2,2-diphenyl-2*H*,8*H*-chinolin-4-carbonsäure-1-oxid³¹, 21 mg (0.12 mmol) 2-Chlor-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin **14**, 40 mg (0.12 mmol) Aminophenyl-BAC **22** und 100 µl N-Methylmorpholin werden nach AAV 2

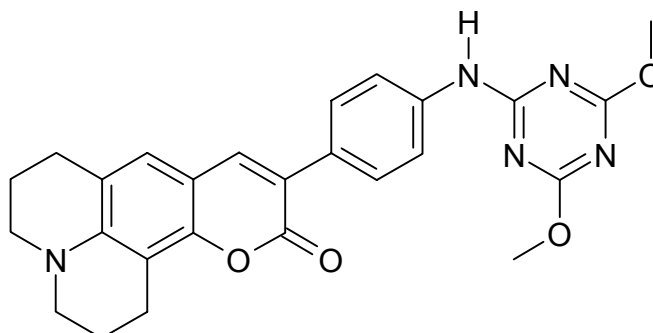
umgesetzt. Das Amid wird über Säulenchromatographie (Toluol/Methanol 100:3) isoliert und aus Methylenchlorid mit Petrolether 60/80 auskristallisiert.

Ausbeute: 14 % d. Th.
Schmp.: ab 185°C Zersetzung
R_f-Wert: 0.66 (FM16)
IR (KBr), [cm⁻¹]: 3420 (w) 63.1, 3057 (w) 66.1, 2951 (w) 53.2, 2362 (vw) 77.6, 1684 (s) 27.0, 1616 (s) 14.3, 1565 (s) 22.3, 1518 (s) 19.9, 1308 (s) 16.7

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) [ppm]:

1.16	s	9 H	<i>tert.</i> -Butyl	
1.8 – 2.0	m	4 H	2-CH ₂ , 6-CH ₂	³ J = 6 Hz
2.7 – 2.85	m	4 H	1-CH ₂ , 7-CH ₂	
3.2 – 3.35	m	4 H	3-CH ₂ , 5-CH ₂	³ J = 5 Hz
6.38	s	1 H	H-3'	
6.74	s	1 H	H-8	
7.10	"s"	2 H	H-9, H-5'	
7.25 – 7.5	m	10 H	arom. H	
7.7 – 7.8	"m"	4 H	AA'BB'-System	
7.98	s	1 H	H-7'	
10.67	s	1 H	N-H	(aust. mit D ₂ O)

N-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-N-[4-(2,3,6,7-tetrahydro-11-oxo-1*H*,5*H*,11*H*-benzo[*b*]pyrano[6,7,8-*i,j*]chinolizin-10-yl)]phenyl-amin (24)



Darstellung: Dieses Derivat des Aminophenyl-BAC konnte aus einem Ansatz zur Darstellung des Amids aus p-Nitrobenzoesäure und Aminophenyl-BAC 22 durch Säulenchromatographie (FM Toluol/Aceton 65:35) als Nebenprodukt isoliert werden.

Ausbeute: 23 % d. Th.

Schmp.: ab 235°C Zersetzung

R_f-Wert: 0.8 (FM 1)

IR (KBr),[cm⁻¹]: 3421 (w,sh) 64.9, 3299 (w) 59.2, 2934 (w) 61.9, 2842 (w) 65.9, 1684 (m) 49.7, 1613 (s) 24.4, 1565 (s) 18.7, 1516 (m) 32.6

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆) [ppm]:

1.8 – 2.0	m	4 H	2-CH ₂ , 6-CH ₂	
2.68 – 2.83	“q”	4 H	1-CH ₂ , 7-CH ₂	³ J = 6 Hz
3.2 – 3.35	„t“	4 H	3-CH ₂ , 5-CH ₂	³ J = 5 Hz
3.92	s	6 H	2 x -CH ₃	
7.08	s	1 H	H-8	
7.6 – 7.85	dd	4 H	AA'BB'-System	J = 9 Hz
7.95	s	1 H	H-9	
10.2	s	1 H	N-H	(aust. mit D ₂ O)

MS (EI, 70 eV) [m/z], (%):	471 M ⁺⁺ (38.8), 371 (4), 290 (8.2), 269 (22), 206 (21.6), 121 (33.9), 106 (100)
C₂₇H₂₅N₅O₅	(499.52)

5.7 HPLC-Untersuchungen

Für die Reaktionen von **23g** mit verschiedenen NO[•]-Donatoren und den durchgeführten Zellversuche wurde eine HPLC-Methode zur Identifizierung der Substanzen **23e**, **23f** und **23g** etabliert und kalibriert.

HPLC-System:

Säule:	RP ₁₈ -Säule 20 cm LiChrosorb (5 µm) Merck Cat. 50333	
Vorsäule:	RP ₁₈ -Säule 1 cm LiChrosorb	
Flow:	1.0 ml/min	
Detektion:	UV/Vis 225 nm, 250 nm, 300 nm; 420 nm Fluorimeter Excit. 420 nm und Em. 505 nm	
Injektionsvolumen:	10 µl	
Retentionszeit:	23e	37 min
	23f	23 min
	23g	26 min

Kalibrierung für **23e**, **23f** und **23g**

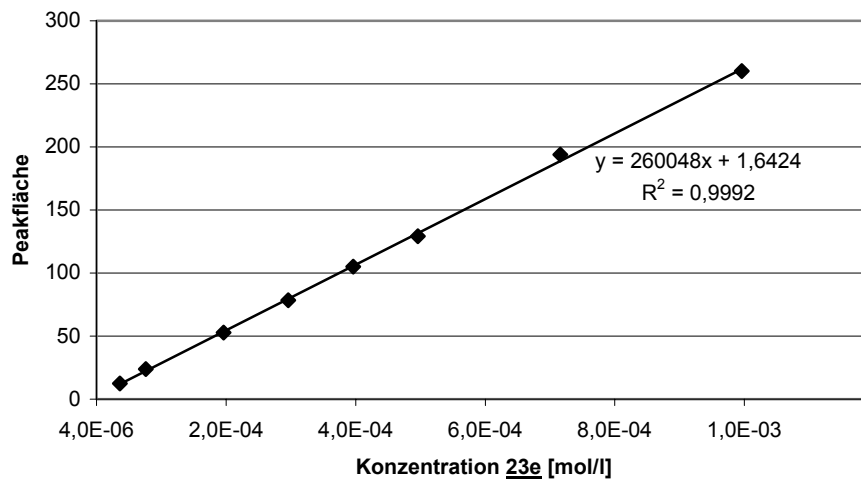
Für die Kalibrierung wurden Stammlösungen von **23e**, **23f** und **23g** in Aceton p.a. eingesetzt und aus diesen eine Verdünnungsreihe hergestellt und der HPLC-Methode unterworfen.

Kalibrierlösungen:

Lösungen der Referenzsubstanzen	ca. genau 7.0 mg 23e/23f/23g wurden in einen 10 ml Messkolben eingewogen und mit Aceton p.a. aufgefüllt (entspricht ca. 1*10 ⁻³ mol/l)
---------------------------------	--

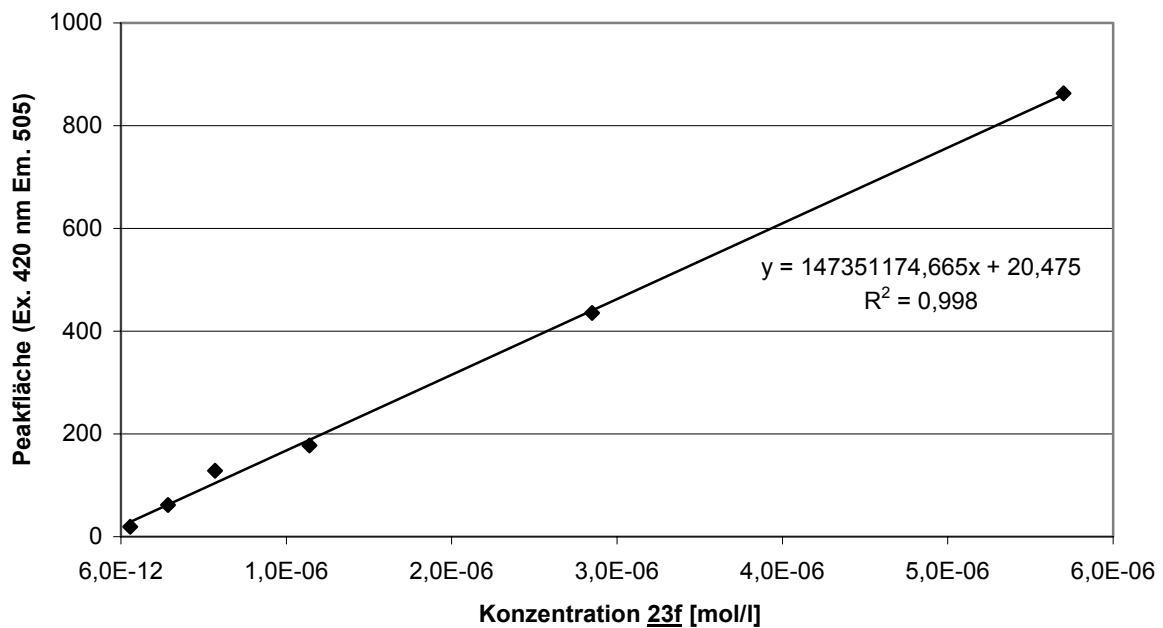
Die Analyse der Verdünnungsreihen der drei Substanzen ergaben folgende Kalibriergeraden.

Für **23e** resultierte bei 420 nm:



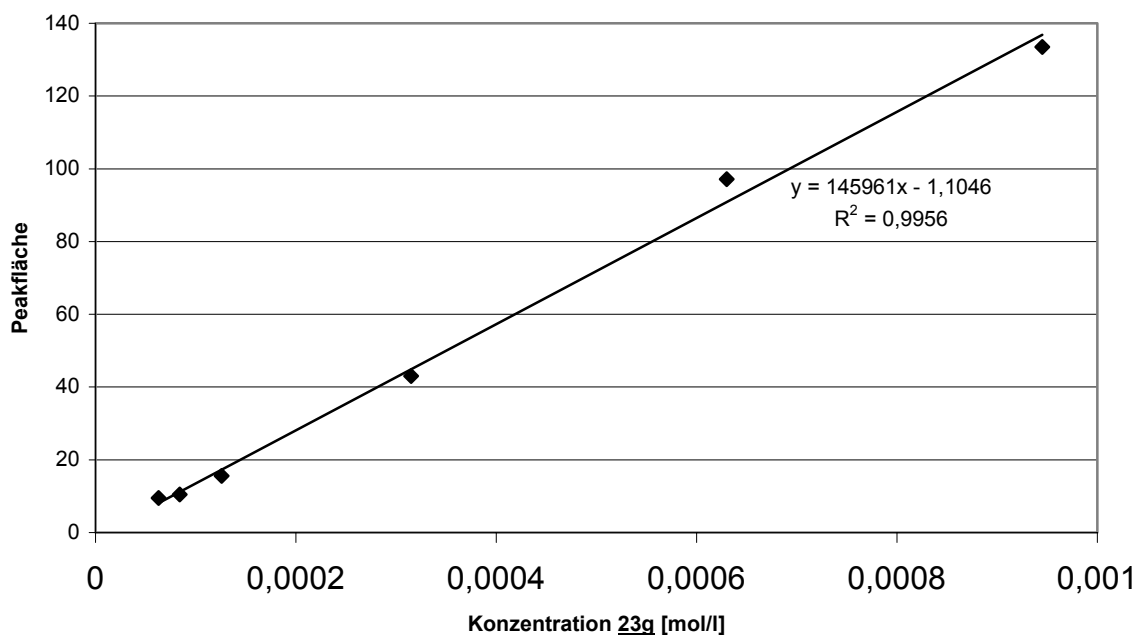
Anhand der Detektion bei 420 nm kann eine Linearität für **23e** im Bereich von $1 \cdot 10^{-3}$ bis ca. $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l nachgewiesen werden.

Für **23f** resultierte durch Anregung bei 420 nm und Emission bei 505 nm:



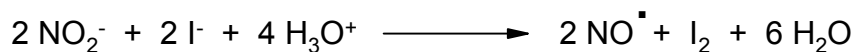
Die Linearität ist im Bereich zwischen $6 \cdot 10^{-6}$ mol/l bis $6 \cdot 10^{-8}$ mol/l über die Fluorimetrische Detektion gegeben.

Für **23g** ergab sich durch die Detektion bei 420 nm folgende Kalibriergerade:



5.8 Überprüfung des Funktionsprinzips

Zur Überprüfung des Prinzips wurde mittels Chemilumineszenzdetektors durchgeführt.



Lösung 1: 5 mmol/l Natriumnitrit (34.5 mg/100ml)

Lösung 2: mol/l Schwefelsäure (980 mg/100ml)
0.14 mol/l Kaliumsulfat (2.439 g/100ml)
0.1 mol/l Kaliumiodid (1.66 g/100ml)

Lösung 3: 50 ml Acetonitril p.a
50 ml Phosphat Puffer pH 7.4

Blindversuch:

In einem 50 ml Reaktionskolben wurden 2.0 ml der Lösung 1 und 10 ml der Lösung 3 vorgelegt, zügig zugetropft wurden 20 ml der Lösung 2. Die gesamte Apparatur, sowie die verwendeten Lösungen wurden vorher mittels Stickstoff entgast. Dieser Versuch wurde dreimal durchgeführt.

Versuche mit NO[•]-Fängern

In einem 50 ml Reaktionskolben wurden 0.05 mmol eines NO[•]-Fängers (**1** oder **23g**) und 2.0 ml der Lösung 1 und 10 ml der Lösung 3 vorgelegt, zügig zugetropft wurden 20 ml der Lösung 2. Die gesamte Apparatur, sowie die verwendeten Lösungen wurden vorher mittels Stickstoff entgast.

	NO [•] -Menge [AUC]	NO [•] -Menge [%]
Blindversuch 1	29619.24	100
Blindversuch 2	30313.76	
Blindversuch 3	29414.96	
+ 1	12076.75	40.8
+ 23g	17742.94	59.9

5.9 Umsetzung von **23 g** mit verschiedenen NO[•]-Donatoren

5.9.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften zur Umsetzung mit NO[•]-Donatoren (AAV)

AAV 1: Umsetzung von **23g** mit NO[•]-Donatoren

In einem Rundkolben wurden XX,XX mg (= X mmol) **Edukt 1** in Y ml Acetonitril gelöst und mit Z ml 0.1 M Phosphatpuffer pH 7,5 (s. Kapitel 5.3) verdünnt. Dazu wurden YY,YY mg (= Y mmol) **Edukt 2** als Feststoff oder in Lösung (Lösemittel angegeben) und gegebenenfalls ZZ,ZZ mg (= Z mmol) **Edukt 3** zugegeben. (Edukt 3 wurde in Phosphatpuffer pH 7.4 gelöst und langsam zugetropft.) Der Ansatz wurde unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Sauerstoff Ultraschall 5 min und durch spülen mit Argon entfernt. Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur gerührt und nach XX h/min eine Probe entnommen und direkt für die HPLC-Analytik verwendet.

AAV 2: Umsetzung von **23g** mit NONOaten

Die Durchführung erfolgte analog AAV 1, wurde der Ansatz nach XX h/min abgebrochen und die wässrige Phase drei mal mit Dichlormethan (falls davon abgewichen wurde, ist das

entsprechend andere Lösemittel angegeben) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und i. Vak. zur Trockne eingengt. Das Produktgemisch wurde über eine SC getrennt und anschließend gefällt und umkristallisiert.

Die Angaben zur Produktausbeute entsprechen dem absoluten Anteil in %, ihre Summe ergibt die Gesamtausbeute, der zu 100 % stellt den Anteil von unverändertem Edukt 1 dar.

5.9.2 Umsetzung von **23g** mit BSH

- a. Unter Argon wurde die Reaktion gemäß AAV 1 durchgeführt

Edukt 1: 3.6 mg (0.005 mmol) **23g** in 5 ml Acetonitril und 25 ml Puffer

Edukt 2: 16.8 mg (0.1 mmol) BSH als Feststoff

Edukt 3: 32.8 mg (0.1 mmol) Kaliumhexacyanoferrat(III) in 20 ml Puffer über 0.5 h zugetropft

Nach 2 h wurde eine Probe mittels HPLC untersucht:.

- b. Unter Argon wurde die Reaktion gemäß AAV 1 durchgeführt

Edukt 1: 1.0 ml (3.6mg/50ml = 0.1mmol/l) **23g** in 5 ml Acetonitril und 45 ml Puffer

Edukt 2: 8.4 mg (0.05 mmol) BSH

Edukt 3: 16.4 mg (0.05 mmol) Kaliumhexacyanoferrat(III) in 50 ml Puffer über 5 h zugetropft

Nach 2 h wurde eine Probe mittels HPLC untersucht:

Ausgangskonzentration von 23g [mol/l]	Molares Verhältnis 23g : BSH: $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$	Produktausbeute [%]	
		23e	23f
a	1 : 20 : 20	7.5	26.25
b	1 : 10 : 10	–	13.0

5.9.3 Umsetzung von **23g** mit NOC-15

- a. Unter Argon wurde die Reaktion gemäß AAV 1 durchgeführt

Edukt 1: 3.6 mg (0.005 mmol) **23g** in 5 ml Acetonitril und 45 ml Puffer

Edukt 2: YY mg NOC-15 als Feststoff

Nach X h wurde eine Probe mittels HPLC untersucht:

23g : NOC-15	Reaktions- temperatur	Reaktions- zeit	Reaktionsprodukte [%]	
			27e	27f
1 : 600	20°C	2 h	46.1	23.2
1 : 600	37°C	2 h	46.2	27.3
1 : 10	20°C	2 h	-	14.6
1 : 10	37°C	2 h	22.3	14.1
1 : 1	37°C	2 h	-	13.7
1 : 1	37°C	24 h	52.1	43.6

5.9.4 Umsetzung von **22** mit NOC-15

- a. Unter Argon wurde die Reaktion gemäß AAV 1 durchgeführt

Edukt 1: 33.0 mg (0.05 mmol) **22** in 5 ml Acetonitril und 45 ml Puffer

Edukt 2: 14.5 mg (0.055 mmol) NOC-15 als Feststoff

Nach 24 h wurde eine Probe mittels LC-MS, LC-MS-MS und ICR untersucht.

5.9.5 Umsetzung von **23g** mit NOC-18

- a. Unter Argon wurde die Reaktion gemäß AAV 1 durchgeführt

Edukt 1: 71.0 mg (0.1 mmol) **23g** in 25 ml Acetonitril und 25 ml Puffer

Edukt 2: 17.0 mg (0.11 mmol) NOC-15 in 10 ml Puffer gelöst

Nach 14 Tagen wurde eine Probe direkt aus dem Ansatz mittels HPLC untersucht. Der gesamte Reaktionsansatz wurde anschließend erst mit 3•30 ml Dichlormethan und mit 3•30 ml Diethylether extrahiert. Beide Extrakte wurden ebenfalls mittels HPLC analysiert.

- b. Unter Argon wurde die Reaktion gemäß AAV 1 durchgeführt
Edukt 1: 35.5 mg (0.05 mmol) **23g** in 250 ml Acetonitril und 250 ml Puffer
Edukt 2: 17.0 mg (0.11 mmol) NOC-15 in 10 ml Puffer gelöst

Nach 14 Tagen wurde eine Probe direkt aus dem Ansatz mittels HPLC untersucht. Der gesamte Reaktionsansatz wurde anschließend erst mit 3•30 ml Dichlormethan und mit 3•30 ml Diethylether extrahiert. Beide Extrakte wurden ebenfalls mittels HPLC analysiert.

23g : NOC-18	Reaktions- temperatur	Reaktions- zeit	Reaktionsprodukte [%]	
			27e	27f
1.6•10 ⁻³ mol/l	22°C	14 Tage	10.2	88.3
1.6•10 ⁻⁴ mol/l	22°C	14 Tage	2.0	98.0

5.9.6 Methoden zur Identifizierung der Struktur 30

The electro-spray ionisation MS spectra (ESI) were obtained with a TSQ 7000 instrument (Finnigan, San Jose, California, U.S.A.). For the MS/MS experiments, argon was used as the collision gas.

The chromatographic conditions for the MS experiments are given below.

Sample	HPLC instrument, column and flow	Solvent	Gradient
XXXXX	<u>HPLC:</u> HP 1100, <u>Column:</u> LiChrospher 60 RP Select B, 5 µm, 250 x 2 mm (VDS Optilab), <u>Flow:</u> 0.2 ml/min	A: 0.1% formic acid in water; B: 0.1% formic acid in acetonitrile	0min. 50% B, at 90min. 100% B, at100min. 100% B at101min. 50% B

The FT-MS spectrum was obtained with an APEX III 70e Fourier Transform Mass Spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA, U.S.A.).

The chromatographic condition for the MS experiment are given below.

Sample	HPLC instrument, column and flow	Solvent	Gradient
XXXXXX	<u>HPLC</u> : Agilent 1100, <u>Column</u> : YMC-ODS-AQ, 3 μ m, 150 x 2 mm (YMC), <u>Flow</u> : 0.2 ml/min	A: 0.1% formic acid in water; B: 0.1% formic acid in acetonitrile	0-1 min. 5% B, at 25 min. 95% B, at 35 min. 95% B

5.10 Zellversuche mit 23g an EA-hy926 Zellen

5.10.1 Verwendete Materialien

Abkürzungen:

Zellkultur:	EA-hy926
Medium:	Medium M199 Sigma Produkt Nr. M3769
Pen-Strep	Penicillin-Streptokinase-Lösung
FCS	fötales Kälberserum Biochrom KG Produkt Nr. S0115 Chargen Nr. 133 EE
PBS	Phosphat Buffer Salin Katalog Nr.
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid Sigma Produkt Nr. M5655
SDS	Natriumdodecylsulfat
PMA	4- α -Phorbol-12-myristat-13-acetat (Razemat) Proteinkinase C-Aktivator (PKC) AppliChem.
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
Triton	Octaphenolpoly(ethylenglycolether) _n

Lösungen:

Supplement-Lösung (für die Darstellung von 1000 ml)

9.55g	PBS Dulbecco ohne Ca/Mg
100 mg	Penicillin G-Kalium Salz (Sigma Produkt Nr. P7794)
100 mg	Streptomycin – Sulfat (Sigma Produkt Nr. S.9137)
178.7 g	HEPES (AppliChem. CAS-NO. 7365-45-9)

Diese Lösung wird 1:15 mit Medium M199 verdünnt.

Für alle Zellversuche wurde die folgende Nährlösung verwendet:

241 mg L-Glutamin (= 3.3 mM) werden in 22 ml Supplement gelöst, steril filtriert und mit 500 ml Medium M199 versetzt und dazu werden 2% FCS zugegeben.

Für die Darstellung der Trypsinlösung: werden 0.53 g Trypsin (Sigma), 3.34 g PBS und 0.07 g EDTA (Sigma Produkt Nr. 9884) gelöst.

Darstellung der PMA-Lösung:

Eine Stammlösung von 0.001 mol/l PMA in DMSO werden mit Medium auf eine 2 nM Lösung verdünnt.

Herstellung der Substratlösungen:

Ca. 3.56 mg **23g** wurden genau eingewogen und in 500µl DMSO gelöst (Stammlösung) und entspricht einer 10 mM Lösung. Diese Stammlösung entsprechend zur Darstellung der verschiedenen Konzentrationen mit Medium verdünnt. Durch eine 1:1000 Verdünnung erhielt man die 10µM Lösung von **23g**, welche als optimale Konzentration für weitere Versuche ermittelt wurde. Für Versuche bei denen eine 6 Well Platte verwendet wurde, ist eine Menge von 1 ml/pro Well eingesetzt worden.

Überprüfung auf Zytotoxizität mittels MTT-Test

Plattenreader für MTT-Test

E_{max} precision microplat reader

Fa. Molecular Devices, Ismaning/München

Ermittlung der optimalen Konzentration von 23g für den intrazellulären Nachweis von NO[•] und Langzeitinkubation mit einem Proteinkinase-C-Stimulator

Fluoreszenzplattenreader

Fluostar P; Ex. 485 nm; Em. 538 nm

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

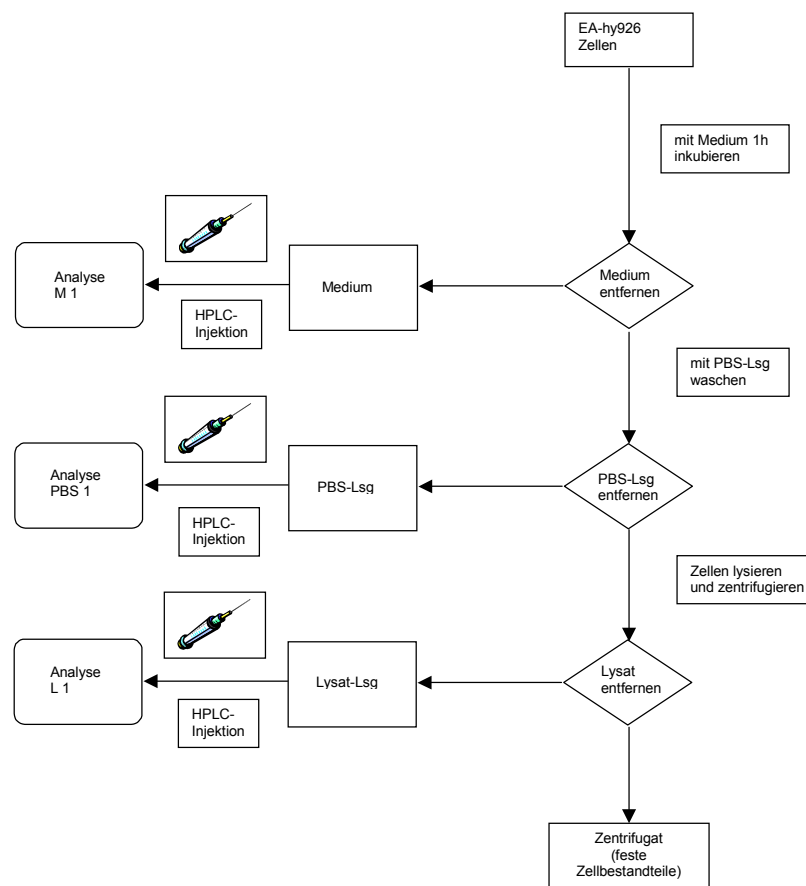
Fluoreszenzmikroskop

LSM 5 Pascal; Ex. 488 nm; Em. 505 nm

Fa. Carl Zeiss, Jena

Qualitativer Nachweis - im Medium über den EA-hy926 Zellen und im Zelllysats - der Reaktionsprodukte der Reaktion von 23g mit NO[•]

Nach dem unten angegebenen Schema wurden die Proben bearbeitet und mittels der oben beschriebenen HPLC-Methode analysiert (s. S. 168).



6 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Holleman, Wieberg, *Lehrbuch der anorganischen Chemie* **1985**, 91.-100. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, S. 580 - 583
- 2 S. Pfeiffer, B. Mayer, B. Hemmens, *Angew. Chem.* **1999**, 111, S.1824 - 1844
- 3 R. Henning, *Nachr. Chem. Techn. Lab.* **1993**, 4, 412 - 418
- 4 R. F. Furchgott, *Angew. Chem.*, **1999**, 111, 1990 – 2000
- 5 L. J. Ignarro, *Angew. Chem.* , **1999**, 111, 2002 – 2013
- 6 F. Murad, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 1970 – 1989
- 7 J. Lehmann, *Pharmazie in unserer Zeit* **1998**, 2, S. 52-57
- 8 L. J. Ignarro, G. M. Buga, K.S. Wood, R. E. Byrns, G. Chaudhuri, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, S.9265 - 9269
- 9 D. S. Bredt, P. H. Hwang, S. H. Snyder, *Nature* **1991**, 351, S. 714 - 718
- 10 J. Garthwaite, S. L. Charles, R. Chess-Williams, *Nature* **1988**, 336, S. 385 - 388
- 11 J. R. Lancaster, J. B. Hibbs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, S. 1223 - 1328
- 12 F. Müllershausen, D. Koesling, A. Friebe, *BIOspektrum* **2003**, 9, S. 687 - 690
- 13 W. K. Alderton, C. E. Cooper, R. G. Knowles, *Biochem. J.* **2001**, 357, S. 593 - 615
- 14 H. H. H. W. Schmidt, *Med. Mo. Pharm.* **1994**, 17, S. 168 - 185
- 15 C. Nathan, Q. W. Xie, *Cell.* **1994**, 78, S. 915 - 918
- 16 E. Mutschler, *Arzneimittelwirkungen*, 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlags GmbH, Stuttgart, **1996**, S. 467 - 470
- 17 J. D. Arzt, B. Schmidt, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 21, S.18253 - 18256
- 18 B. Furlong, A. M. Henderson, M. J. Lewis, J. A. Smith, *Br. J. Pharmacol.* **1987**, 90, S. 687 - 692
- 19 J. V. d. Voorde, M. Claeys, I. Leusen, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1989**, 14 (Suppl. 11) S.55 - 61
- 20 K. Schrör, S. Förster, I. Woditsch, H. Schröder, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1989**, 14 (Suppl. 11) S. 29 - 34
- 21 Y. Kitamura, T. Uzawa, *Anal. Chem.* **2000**, 72, S. 2957 - 2962
- 22 V. Brovkovich, E. Stolarczyk, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, 19, S. 135 – 143
- 23 M. Pontie', C. Gobin, *Anal. Chim. Acta* **2000**, 411, S. 175 - 185
- 24 Y. Xian, W. Zhang, *Anal. Chim. Acta* **2000**, 415, S.127 - 133
- 25 M. Pallini, A. Curulli, *Electroanal.* **1998**, 15, S.1010 - 1016

- 26 M. Feelisch, J. S. Stamler (Hrsg.) in: „*Methods in Nitric Oxide Research*“, J. Wiley & Sons, **1996**, Part VI
- 27 L. Ney, G. Kemming, *Res Exp. Med* **1999**, 199, S. 121 - 128
- 28 M. Wada, T. Ikehata, Y. Yoshida, N. Kuroda, K. Nakashima, *Anal. Scienc.* **1998**, 14, S. 1177-1179
- 29 A. Grzesiok, Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **1994**
- 30 H. Weber, A. Grezsiok, *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1994**, 327, S. 789 - 792
- 31 H. Höbler, Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **1998**
- 32 G. B. Richter-Addo, P. Legzdins in: „Metal Nitrosyls“, Oxford University Press, Oxford, **1992** und dort zitierte Literatur
- 33 S. S. Greenberg, D. E. Wilcox, G. M. Rubanyi, *Circ. Res.* **1990**, 67, S.1446 - 1452
- 34 A. F. Vanin, P. I. Mordvintcev, A. L. Kleschchev, *Stud. Biophys.* **1984**, 102, S. 135 - 140
- 35 A. F. Vanin, *Methods Enzymol.* **1999**, 301, S.269 - 279
- 36 V. Quaresima, H. Takehara, K. Tsushima, M. Ferrari, H. Utsumi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 221, S.729 - 734
- 37 G. Wie, V. L. Dawson, J. L. Zweier, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, 1455, S.23 - 34
- 38 T. Yoshimura, H. Yokoyama, S. Fuji, F. Takayama, K. Oikawa, H. Kamada, *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, S. 992 - 994
- 39 S. V. Paschenko, V. V. Khramtsov, M. P. Skatchkov, V. F. Pljusnin, E. Bassenge, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 14, S. 992 - 994
- 40 C. S. Lai, A. M. Komarov, *FEBS Lett.* **1994**, 345, S. 120 - 124
- 41 Y. Katayama, N. Soh, M. Maeda, *Chemphyschem.* **2001**, 2, S. 655 - 661
- 42 H. G. Korth, K. U. Ingold, R. Sustmann, H. de Groot, H. Sies, *Angew. Chem.* **1992**, 104, S. 915 - 917
- 43 H. G. Korth, H. Weber, in „*Methods in Nitric Oxide Research*“ (M. Feelisch and J.S. Stamler, Eds.) **1996**, S. 383
- 44 H. G. Korth, R. Sustmann, P. Lommès, T. Paul, A. Ernst, H. de Groot, L. Hughes, K.U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, S. 2767 - 2777
- 45 T. Paul, M. A. Hassan, H. G. Korth, R. Sustmann, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, S. 6835 - 6848
- 46 L. Marx, A. Rassat, *Angew. Chemie* **2000**, 112, S. 4668 - 4670
- 47 M. Wade, T. Ikehata, *Anal. Sci.* **1998**, 14, S. 1177 - 1179

- 48 H. Kojima, K. Sakurai, *Biol. Pharm. Bull.* **1997**, 20, S. 1229 - 1232
- 49 H. Kojima, Y. Urano, *Angew. Chem.* **1999**, 111, Nr. 21, S. 3419 - 3422
- 50 M. O. Lopez-Figueroa, C. Caamano, *Biochem. Biophysic. Research Comm.* **2000**, 272, S. 129 - 133
- 51 H. Kojima, N. Nakatsubo, *Anal. Chem.* **1998**, 70, S. 2446 - 2453
- 52 K. Sugimoto, S. Fuji, *Histochem. Cell Biol.* **2000**, 113, S. 341 - 347
- 53 H. Kojima, N. Nakatsubo, *NeuroReport* **1998**, 9, S. 3345 - 3348
- 54 H. Kojima, M. Hirotsu, *Anal. Chem.* **2001**, 73, S. 1967 - 1973
- 55 H. Kojima, M. Hirotsu, *Tetrahedron Letters* **2000**, 41, S. 69 - 72
- 56 Y. Katayama, N. Soh, M. Maesa, *Chem. Phys. Chem.* **2001**, 2, S. 655 - 661
- 57 K. J. Franz, N. Singh, *Angew. Chem.* **2000**, 112, S. 2194 - 2197
- 58 P. Meineke, U. Rauen, H. de Groot, H. G. Korth, R. Sustmann, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, S. 1738-1747
- 59 P. Meineke, U. Rauen, H. de Groot, H. G. Korth, R. Sustmann, *Biol. Chem.* **2000**, 381, S. 575 - 582
- 61 J. R. Lakowicz, *Prinziples of Fluorescence Spectroscopy*, **1999**, Sec. Ed., Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, Kap. 9.1.A
- 62 S. A. Green, D. J. Simpson, G. Zhou, P. S. Ho, N. V. Blough, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, S. 7337 - 7346
- 63 J. A. Green, L. A. Singer, J. H. Parks, *J. Chem. Phys.* **1973**, S. 2690 - 2695
- 64 G. G. Guilbault, *Pract. Fluorescence* **1973**, Marcel Dekker, Inc., New York, Kap. 3. E. II S.87 ff
- 65 H. Beyer, W. Walter, *Lehrbuch der organischen Chemie*, 3. Auflage S.Hirzel Verlag, Stuttgart, **1991**
- 66 R. Winter, F. Noll, *Meth. d. Biophysikal. Chemie*, B. G. Teubner, Stuttgart, **1998**, Kapitel V.5, S. 296 - 344
- 67 C. R. Cantor, P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry*, Freeman & Company, San Francisco, **1980** Bd II
- 68 H. Kojima, Y. Urano, *Angew. Chem.* **1999**, 111, Nr. 21, S. 3419 - 3422
- 69 C. Munkholm, D. R. Parkinson, D. R. Walt, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, S. 2608 - 2612
- 70 J. C. Sheehan, J. J. Hlavka, *J. org. Chem. Soc.* **1955**, 77, S. 103 - 105
- 71 K. Eger, R. Troschütz, H. J. Roth, *Arzneistoffanalyse*, 4. Auflage, Deutscher

- Apotheker Verlag Stuttgart, **1999**, S. 156 ff
- 72** J. M. Anderson, *Anal. Biochem.* **1986**, 152, S. 146 - 150
- 73** J. N. Demas, G. A. Crosby, *The Journal of Physical Chemistry* **1971**, 75, S. 991 - 1024
- 74** G. Jones II, W. R. Jackson, *Chemical Physics Letters* **1980**, 72, S. 391 - 395
- 75** E. Mutschler, *Arzneimitteltherapie*, 7. Auflage, Wissenschaftliche Verlags GmbH, Stuttgart, **1996**, S. 428 ff
- 76** E. Steinegger, R. Hänsel, *Pharmakognosie*, Springer-Verlag, Berlin, **1992**, S. 376 - 383
- 77** W. Düniges, *Chromatographia* **1976**, 9, S. 624 - 626
- 78** W. Düniges, *Analytical Chemistry* **1977**, 49, S. 442 - 445
- 79** K. Hoffmann, R. M. Söll, A. G. Beck-Sickinger, M. Jung, *Bioconjugate Chem.* **2001**, 12, S. 51-55
- 80** Z. J. Kaminski, *Tetrahedron Letters* **1985**, 26, S. 2901 - 2904
- 81** Z. J. Kaminski, P. Paneth, J. Rudzinski, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, S. 4248 - 4255
- 82** E. R. Bissell, A. R. Mitchell, R. E. Smith, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, S. 2283 - 2287
- 83** C. S. Chaurasia, J. M. Kauffman, *J. Heterocyclic Chem.* **1990**, 27, S. 727 - 733
- 84** A. N. Flechter, D. E. Bliss, J. M. Kauffman, *Opt. Commun.* **1975**, 47
- 85** V. S. Sharov, K. Briviba, H. Sies, *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, 26, S. 833 - 843
- 86** C. Seidel, Dissertation Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg **1992**
- 87** L. Meites, P. Zuman, *Handbook Series in Organic Electrochem.*
- 88** F. Bär, A. Berndt, K. Dimroth, *Chemie in unserer Zeit* **1975**, 1, S. 18 - 24
- 89** F. Bär, A. Berndt, K. Dimroth, *Chemie in unserer Zeit* **1975**, 2, S. 43 - 49
- 90** K. Mäder, *PZ Prisma* **1998**, 5, S. 202 - 212
- 91** R. Zamora, A. Grzesiok, H. Weber, M. Feelisch, *Biochem. J.* **1995**, 312, S. 333 - 339
- 92** J. A. Hrabie, J. R. Klose, D. A. Wink, L. K. Keefer, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, S. 1472 - 1476
- 93** O. Grapentin, *Dissertation* **1998**, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf und dort zitierte Literatur
- 94** H. Möhrle, *Arch. Pharmazie (Weinheim)* **1961**, 294, S. 749 - 758
- 95** O. E. Edwards, F. H. Clarke, B. Douglas, *Canadian J. Chemistry* **1954**, 32, S. 235 - 241
- 96** J. Bauer, M. Margolis, C. Schreiner, C. J. S. Edgell, J. Azizkhan, E. Lazarowski, R. L.

Juliano, J. *Cellular Physiol.* **1992**, 153, S. 437 - 449

Danksagung

Herrn Prof. C. Seidel (Institut für Physikalische Chemie, Düsseldorf) danke ich sehr herzlich für die Unterstützung und Diskussionsbereitschaft zum Thema Fluoreszenz und die Möglichkeit in seinem Arbeitskreis Versuche durchführen zu können.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rösen (Deutsches Diabetes Forschungsinstitut, Düsseldorf) für das zur Verfügung stellen der humanen Endothelzelllinie und die Möglichkeit die Fluoreszenzsonde zu testen; außerdem Daniela Hertzfeld und Christiane Bellin für die Durchführung der Zellversuche.

Herrn Dr. H. G. Korth (Inst. für Org. Chemie, Universität GH Essen) danke ich für die Aufnahme der ESR-Spektren.

Herrn Dipl.-Ing. A. Lagojda (Bayer Corpscience, Metaboliten Environment Fate, Monheim) danke ich sehr herzlich für die Aufnahme der Massenspektren mittels LC/MS, LC/MS/MS und der hochauflösenden Massenspektren.

Frau Nora Stellisch danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der HPLC-Analysen, ebenso wie Frau Karin Voigt;

Frau Schmitz für die Leihgabe des Fluoreszenzdetektors inkl. Software;

Frau K. Christoph für die Aufnahme der IR-Spektren, Herrn H. Jansen für Anfertigung von Massenspektren, Herrn H. Mathew für die Aufnahme der NMR-Spektren und Frau G. Zerta für die Anfertigung der Elementaranalysen;

Herrn Dr. H. J. Hemmerling für die Hilfe bei Nomenklaturfragen;

Frau Magdalene Matyja gilt ein besonderer Dank, nicht nur für Ihren unermüdlichen und engagierten Einsatz während der Betreuung des Biochemie Praktikums, sondern für die immerwährende Bereitschaft bei einer Tasse „Krümmeltee“ zu zuhören.

Ich danke meinen Kollegen Carsten Esser, Marc Heipke, Sabine Plücker und Ekkehart Salamon, für die gute Zusammenarbeit, während der Betreuung des Biochemie Praktikums. Außerdem Barbara Giofredda, Julia Wessel und Dirk Welsch für die „zusätzliche“ Unterstützung und Diskussionsbereitschaft, sowie Frank Sunkel und Joachim Schönlaue.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei allen Freunden, insbesondere Iris, bedanken die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit in vielfältiger Weise unterstützt haben.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die immer bei den Verwirklichungen meiner Ziele hinter mir standen.

Ein letzter besonderer Dank gilt Kai für die hilfreiche Unterstützung, der Durchsicht sowie Formatierung des Manuskripts.

DANKE

Lebenslauf

Name:	Sylvia Pesch	
Geburtsdatum:	20.05.1970	
Geburtsort:	Duisburg	
Eltern:	Marianne Pesch , geb. Nusch Rudolf Pesch	
Familienstand:	ledig	
Schulbildung:	1976 – 1977	Gemeinschaftsgrundschule in Duisburg-Meiderich
	1977 – 1980	Konrad-Duden Grundschule in Wesel
	1980 – 1989	Konrad-Duden Gymnasium in Wesel
Abiturprüfung:	08.05.1989	
Berufsausbildung:	08.89 – 07.92	Chemielaborantin Bayer AG in Leverkusen
Berufstätigkeit:	07.92 – 10.92	Chemielaborantin Bayer AG in Leverkusen
Pharmaziestudium:	WS 1992/93-WS 1997/98	H. Heine-Universität Düsseldorf
Pharmaziepraktikum:	11.97 – 04.98	Apotheke am Kirchplatz, Düsseldorf
	05.98 – 10.98	Bayer AG, Leverkusen Pharmazeut. Technologie Entwicklung
Pharmazeut. Prüfung:	19.01.1999	
Approbation:	05.02.1999	
Berufstätigkeit:	03.99 – 06.99	Projektarbeit, Bayer S.p.A Mailand, Italien
Begin dieser Arbeit:	15. Juli 1999	
Assistententätigkeit:	seit 15. Juli 1999	wissenschaftliche Hilfskraft/Angestellte am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf