

Neuartige Nitrosohydrazine
als NO[•]-Donoren
Synthese, Struktur, Stereochemie und NO[•]-Freisetzung

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

vorgelegt von

Carsten Peter Esser

aus Mönchengladbach

Düsseldorf 2005

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: 01. Juli 2005

Meiner Familie

1	Einleitung	1
1.1	Bedeutung von Stickstoffmonoxid in Physiologie und Biochemie	2
1.1.1	Entdeckung des Endothelium derived relaxing factor (EDRF)	3
1.1.2	Reaktion mit Sauerstoff	5
1.1.3	Reaktion mit Superoxid	5
1.1.4	Nitrosierungsreaktionen	6
1.1.5	Reaktion mit Hämoglobin	7
1.1.6	Reaktion mit Metallzentren	8
1.1.7	Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase	9
1.2	Biosynthese des NO [•]	10
1.3	Chemischer Aufbau der NO [•] -Synthasen	11
1.4	NO [•] -Donoren	13
1.4.1	In der Therapie eingesetzte NO [•] -Donoren	14
1.4.2	N-Nitrosamine	23
1.4.3	Nitrosimine	24
1.4.4	S-Nitrosothiole	24
1.4.5	Diazeniumdiolate (NONOate)	25
1.4.6	Oxadiazole (Furoxane)	26
1.4.7	Tautomeriefähige Oxime	27
1.4.8	Angeli's Salz (Na ₂ N ₂ O ₃ , Natriumtrioxodinitrat)	28
1.4.9	Kupferron	29

1.4.10	N-Nitrosamide, N-Nitrosoguanidine	29
1.4.11	Piloty's Säure $\equiv$ N-Hydroxybenzolsulfonamid $\equiv$ Benzolsulfhydroxamsäure (BSH)	31
1.5	Oxidativer Stress	32
1.5.1	Entstehung reaktiver Sauerstoffverbindungen	32
1.5.2	Physiologische Inaktivierungsmechanismen	34
1.5.3	Oxidativer Stress und Gefäßzellen	35
1.6	Nachweisverfahren für Stickstoffmonoxid (NO $\cdot$)	43
1.6.1	Biologische Verfahren	43
1.6.2	Physikochemische Verfahren	44
1.6.3	UV/Vis-Spektroskopischer Nachweis	47
1.6.4	ESR-Spektroskopischer Nachweis	50
1.6.5	Fluoreszenz-Spektroskopischer Nachweis	52
1.6.6	Wertung der verschiedenen Nachweismethoden	53
2	Ziel der Arbeit	54
3	Chemisch-allgemeiner Teil	59
3.1	Modellsubstanzen	60
3.1.1	Modellsubstanzen vom Typ A	61
3.1.2	Modellsubstanzen vom Typ B	71
3.1.3	Modellsubstanzen vom Typ C	79
3.1.4	Modellsubstanzen vom Typ D	89

3.2	^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren der Nitrosohydrazine	101
3.2.1	Rotamere Nitrosohydrazine	101
3.2.2	Temperaturabhängigkeit der ^1H -NMR-Spektren	106
3.2.3	Interaktion des Methylphenylaminrestes mit der NO-Gruppe in den Modellsubstanzen der Gruppen C und D	107
3.3	Untersuchung der $\text{NO}^\bullet$ -Freisetzung aus den Modellsubstanzen der Gruppen A – D	117
3.3.1	Messplatz und Methode der $\text{NO}^\bullet$ -Freisetzung	117
3.3.2	$\text{NO}^\bullet$ -Freisetzung aus den Modellsubstanzen der Gruppe A	122
3.3.3	$\text{NO}^\bullet$ -Freisetzung aus den Modellsubstanzen der Gruppe B	1228
3.3.4	$\text{NO}^\bullet$ -Freisetzung aus den Modellsubstanzen der Gruppe C	129
3.3.5	$\text{NO}^\bullet$ -Freisetzung aus den Modellsubstanzen der Gruppe D	132
3.3.6	Diskussion	133
4	Zusammenfassung	141
5	Konkordanz	147
6	Experimenteller Teil	149
6.1	Verwendete Geräte	150
6.2	Abkürzungsverzeichnis	151
6.3	Chemikalien	154
6.4	Allgemeine Arbeitsvorschriften	156
6.5	Substanzdaten	159

7	Literaturverzeichnis	235
---	----------------------	-----

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von Stickstoffmonoxid in Physiologie und Biochemie

$\text{NO}^\bullet$, ist ein farbloses, giftiges, nicht brennbares Gas, das in Wasser schlecht besser in organischen Lösungsmitteln löslich ist. Es enthält ein ungepaartes Elektron. Das einzelne, den Radikalcharakter ausmachende Elektron befindet sich in einem π^* - (antibindenden) Orbital. Es resultiert daraus formal eine $2^{1/2}$ -fach-Bindung mit einer Bindungslänge von 1,150 Å. Bei Blitzentladungen in der Atmosphäre, im Lichtbogen und in Verbrennungsmotoren wird Stickstoff mit Sauerstoff umgesetzt, und es entsteht das thermodynamisch instabile $\text{NO}^\bullet$ -Radikal. Ist diese Verbindung erst einmal gebildet, ist sie kinetisch in Abwesenheit von Sauerstoff hinreichend stabil, dass sie sogar in Druckgasflaschen abgefüllt und im Labor genutzt werden kann. Die Dimerisierungstendenz ist gering und nimmt bei tiefen Temperaturen zu, so dass es bevorzugt als Distickstoffdioxid vorliegt.

Da das Ionisierungspotential von $\text{NO}^\bullet$ sehr gering ist (9,25eV), kann durch Abspaltung des π^* -Elektrons das Nitrosyl-Kation NO^+ (Nitrosonium-Ion) entstehen. NO^+ ist mit seiner Dreifachbindung dem molekularen Stickstoff und Kohlenmonoxid (CO) isoelektronisch und durch seine freien Elektronenpaare wie CO ein guter Komplexligand, wie zum Beispiel im Nitroprussidnatrium (s. Abb. 7).

Wenn $\text{NO}^\bullet$ ein Elektron aufnimmt, entsteht das Nitroxylat-Anion NO^- als korrespondierende Base der hyposalpetrigen Säure. Dieses Teilchen ist dem molekularen Sauerstoff isoelektronisch und kann wie dieser in verschiedenen Spinzuständen vorliegen, dem Triplettzustand und dem angeregten Singulettzustand (mit gepaarten Elektronen). NO^- ist aber im Verhältnis zum Sauerstoff ein sehr instabiles Molekül und zerfällt sehr leicht nach Protonierung und Dimerisierung zu N_2O . Diese Reaktion ist für die Analytik von NO^- von grosser Bedeutung¹.

¹ Rehse, K., Schleifer, K.J., Martens, a., Kämpfe, M. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1994**, 327, 393 - 397

Stickstoffmonoxid ($\text{NO}^{\bullet}$) ist eines der zurzeit am intensivsten untersuchten Moleküle in der Biomedizin. Dies beruht auf den vielseitigen Funktionen von $\text{NO}^{\bullet}$ bei verschiedenen chemischen und biochemischen Prozessen, wobei das Ziel im Vordergrund steht, neue Pharmaka zur Therapie kardiovaskulärer, neuronaler und entzündlich-infektiöser Erkrankungen zu entwickeln. Die Substitutionstherapie mit $\text{NO}^{\bullet}$ -Donoren nimmt bereits eine zentrale Stellung innerhalb der pharmakotherapeutischen Strategien zur Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen ein². Die physiologischen Wirkungen von $\text{NO}^{\bullet}$ können nur durch eine genaue Kenntnis der sehr komplexen Chemie dieses Botenstoffes verstanden werden. Das freie Radikal $\text{NO}^{\bullet}$ ist ein reaktives Molekül. Einige Reaktionsprodukte sind biologisch inaktiv, einige weisen eine $\text{NO}^{\bullet}$ -ähnliche Aktivität auf, und andere sind sogar toxisch. Die Beteiligung von $\text{NO}^{\bullet}$ bei zellulären Reaktionen ist sehr komplex, da die entscheidenden Schritte auch über hochaktive Intermediate ablaufen können, die schwierig zu detektieren sind.

1.1.1 Entdeckung des Endothelium derived relaxing factor (EDRF)

1980 berichteten Robert F. Furchgott und J.V.Zawadzki, dass funktionstüchtige Endothelzellen für die Relaxation von Arterien mittels Acetylcholin oder verwandter muskarinerge Agonisten eine wesentliche Rolle spielen. Sie wiesen darauf hin, dass die Relaxation das Ergebnis einer endothelialen Antwort auf eine Stimulation durch muskarinerge Agonisten darstellt. Diese Antwort erfolgt in Form eines leicht diffundierenden Faktors, der so auf die benachbarten glatten Muskelzellen einwirken kann und deren Relaxation auslöst. Diesen Faktor nannten Furchgott und Zawadzki „Endothelium derived relaxing factor“ (EDRF). Es wurde gezeigt, dass EDRF die lösliche Guanylylcyclase in glattmuskulären Zellen aktiviert und dadurch den Spiegel an cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) anhebt. Es schien ein kausaler

² Loscalzo, J., Welch, G. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **1995**, 38, 87 - 104

Zusammenhang zwischen der angehobenen Konzentration von cGMP und der Relaxation der glatten Muskelzellen zu bestehen. Obwohl potente Abfangmoleküle für EDRF existieren, wie zum Beispiel Hämoglobin oder Superoxidanionradikale, konnte die chemische Natur von EDRF 1987 von Palmer, Ferrige und Moncada³ aufgeklärt und gezeigt werden, dass es sich bei EDRF um NO[•] handelt. Zwei Jahre danach wurde nachgewiesen, dass das in den Endothelzellen synthetisierte NO[•] das Produkt einer Calcium/Calmodulin-abhängigen Oxigenase darstellt. Diese NO[•]-Synthase (NOS) katalysiert die Oxidation eines Guanidinostickstoffs von L-Arginin, wobei NO[•] und Citrullin resultieren. Seit der Entdeckung von NO[•] wird die Bedeutung als Regulator von verschiedenen physiologischen Prozessen immer deutlicher^{4,5}. Zu diesen Prozessen zählen neben der Blutdruckregulation und der Thrombozyten-Aggregationshemmung vor allem die Funktion als Effektor in der Immunabwehr⁶ sowie die Übertragung von Signalen im Nervensystem^{7,8}. Als kleines, unpolares Molekül ist NO[•] in der Lage, auch durch Membranen zu diffundieren und somit seine biologischen Targetstrukturen zu erreichen. Die biologische Halbwertszeit für dieses instabile Teilchen beträgt dabei, je nach den Bedingungen 1 – 10 Sekunden.

³ Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., Moncada, S. *Nature* **1987**, 327, 524 - 526

⁴ Müller, S., Gewaltig, M.T., Kojda, G. *Med. Monatss. Pharmazeuten* **2002**, 2, 45 - 51

⁵ Loscalzo, J., Welch, G. *Progg. Cardiovasc. Disc.* **1995**, 38, 87 - 104

⁶ Lancaster, J.R., Hibbs, J.B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 1223 - 1328

⁷ Bredt, D.S., Hwang, P.H., Snyder, S.H. *Nature* **1991**, 351, 714 - 718

⁸ Garthwaite, J., Charles, S.L., Chess-Williams, R. *Nature* **1988**, 336, 385 - 388

1.1.2 Reaktion mit Sauerstoff

NO[•] reagiert an der Luft in einer Reaktion 3. Ordnung zu braunrotem Stickstoffdioxid (NO₂[•]) (s. Abb. 1). Sowohl bei niedriger NO[•]-Konzentration, als auch bei Sauerstoffmangel läuft die NO₂[•]-Bildung extrem langsam. Während eine **gesättigte NO[•]-Lösung** an der Luft spontan zu NO₂[•] oxidiert, dauert dieser Vorgang bei einer nanomolaren NO[•]-Konzentration, die den physiologischen Bedingungen ähnelt, mindestens 15 – 30 min⁹. Da NO[•] in dieser Zeit andere biologische Zielstrukturen erreicht, spielt diese Reaktion im physiologischen Geschehen normalerweise kaum eine Rolle.

Die Reaktion von NO[•] mit O₂ wird in der Atmosphäre beim sog. „Los Angeles Smog“ beobachtet. Das NO₂[•] ist ein braunes Gas mit Radikalcharakter, welches eine relativ große Dimerisierungstendenz aufweist.



Abb. 1: Reaktion von NO[•] mit Sauerstoff

1.1.3 Reaktion mit Superoxid

Als Radikal reagiert NO[•] rasch mit anderen Radikalen. In biologischer Umgebung hat die direkte bimolekulare Reaktion mit Superoxid O₂^{•-} zu Peroxynitrit [Oxoperoxonitrat

⁹ Feelisch, M., Stamler, J.S. *Methods in Nitric Oxide Research*, John Wiley & Sons, Chichester **1996**

(-1)] besondere Bedeutung¹⁰. Die Bildung von Peroxynitrit aus $\text{NO}^\bullet$ und Superoxid geschieht mit nahezu diffusionskontrollierter Geschwindigkeit ($4,3 - 6,7 \times 10^9 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)¹¹. Peroxynitrit ist ein starkes Oxidationsmittel ($E(\text{ONOO}^-, 2\text{H}^+/\text{NO}_2^\bullet, \text{H}_2\text{O}) = 1,6\text{V}$ bei pH 7,0) und reagiert mit nahezu allen Klassen von Biomolekülen in vitro¹².

1.1.4 Nitrosierungsreaktionen

Unter physiologischen Bedingungen wird die Reaktion zwischen $\text{NO}^\bullet$ und $\text{O}_2^{\bullet-}$ in Gegenwart anderer potentieller Reaktanden sehr kompliziert. Insbesondere reduzierte Thiole kommen nahezu überall vor. Bei physiologischem pH-Wert werden Thiole in Anwesenheit von Sauerstoff durch $\text{NO}^\bullet$ zu S-Nitrosothiolen nitrosiert¹³. In vivo werden verschiedene Thiole, beispielsweise Glutathion, zur Erhaltung des Redoxstatus der Zelle benötigt. S-Nitrosothiole sind hochwirksame $\text{NO}^\bullet$ -Donoren und weisen ein ähnliches Wirkprofil auf wie $\text{NO}^\bullet$.

Im Unterschied zu S-Nitrosierungen, welche häufig physiologisch positive Auswirkungen haben, führen N-Nitrosierungen fast immer zu schädlichen Wirkungen. Ein Intermediat der $\text{NO}^\bullet$ -Autoxidation, wahrscheinlich Distickstofftrioxid, kann in einer direkten Reaktion primäre Amine in DNA-Basen nitrosieren¹⁴.

¹⁰ Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 1620 - 1624

¹¹ Huie, R.E., Padmaja, S., *Free Radical Res. Commun.* **1993**, 18, 195 - 199

¹² Pryor, W.A., Squadrito, G.L. *Am. J. Physiol. L.* **1995**, 12, L699 - L722

¹³ Wink, D.A., Nims, R.W. et al. *Chem. Res. Toxicol.* **1994**, 7, 519 - 525

¹⁴ Tamir, S., Burney, S., Tannenbaum, S.R. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, 9, 821 - 827

1.1.5 Reaktion mit Hämoglobin

NO^{*} reagiert mit Oxyhämoglobin (OxyHb) in einer Reaktion zweiter Ordnung mit einer Geschwindigkeitskonstanten von ca. $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ zu Methämoglobin (MetHb) und Nitrat¹⁵. Da die NO^{*}-Abhängigkeit bei dieser Reaktion strikt erster Ordnung und die Reaktion auch bei hohen NO^{*}-Konzentrationen nicht limitiert ist, nimmt man an, dass NO^{*} direkt mit dem Häm-gebundenen Sauerstoff reagiert. NO^{*} bindet auch an die Desoxy-Form von Hämoglobin und an MetHb. Allerdings wird die Bindung an Methämoglobin durch ein Wassermolekül an der sechsten Koordinationsstelle des Häm-Eisens behindert. Daher ist die Assoziationsfähigkeit ungefähr hundertfach geringer als die Geschwindigkeit der Assoziation an das Eisen(II)-Häm der Desoxy-Form¹⁶. Durch die schnelle Reaktion mit OxyHb hat freies NO^{*}, welches endogen produziert oder von Therapeutika freigesetzt wird, keine systemischen Wirkungen. Für die neuronale Signalwirkung von NO^{*} hat diese Reaktion wahrscheinlich keine Bedeutung, da die Entfernungen zu den nächstgelegenen Blutgefässen um ein Vielfaches grösser sind.

¹⁵ Doyle, M.P., Hocksta, J.W. *J. Inorg. Biochem.* **1981**, 14, 351 - 358

¹⁶ Sharma, V.S., Traylor, T.G., Gardiner, R., Mizukami, H. *Biochemistry* **1987**, 26, 33837 - 33843

1.1.6 Reaktion mit anderen Metallzentren

Zellen enthalten mehrere Arten von Metalloproteinen, die $\text{NO}^\bullet$ binden oder mit $\text{NO}^\bullet$ reagieren, beispielsweise Cytochrom-P-450-Enzyme oder Cytochrom-c-Oxidase¹⁷. Die bezüglich Sauerstoff kompetitive Bindung von $\text{NO}^\bullet$ an die Cytochrom-c-Oxidase resultiert in einer Hemmung der mitochondrialen Atmungskette: dies ist eine zentrale toxische Wirkung von $\text{NO}^\bullet$ im Rahmen inflammatorischer und ischämischer Prozesse¹⁸. Darüber hinaus wurden auch Reaktionen von $\text{NO}^\bullet$ mit zink- und kupferhaltigen Proteinen beschrieben^{19,20}. Die Bindung von $\text{NO}^\bullet$ an Proteine, die Eisen-Schwefel-Cluster enthalten, führt zur Bildung von Eisen-Nitrosylkomplexen²¹.

¹⁷ Wink, D.A., Osawa, Y., Darbyshire, J.F., Jones, C.R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, 300, 115 - 123

¹⁸ Brown, G.C., Cooper, C.E. *FEBS Lett.* **1994**, 356, 295 - 298

¹⁹ Gorren, A.C.F., de Broer, A., Wever, R. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, 916, 38 - 47

²⁰ Cooper, C.E., Torres, J., Sharpe, M.A., Wilson, M.T. *FEBS Lett.* **1997**, 414, 281 - 284

²¹ Radi, R. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, 9, 828 - 835

1.1.7 Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase

Die meisten physiologischen Wirkungen von NO^{*} beruhen auf einer bis zu 200fachen Aktivierung der löslichen Guanylylcyclase (sGC), die einen Häm-Anteil aufweist^{22,23}. In Gegenwart von Mg²⁺ oder Mn²⁺-Ionen katalysiert die sGC die Cyclisierung von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) zu cyclischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP), das als intrazelluläres Signalmolekül die Aktivität verschiedener Proteinkinasen und Phosphodiesterasen sowie die Öffnung von Ionenkanälen beeinflusst und so eine Zellantwort auslöst. Im Unterschied zu Hämoglobin bindet die sGC den Sauerstoff nur sehr schlecht. Außerdem erfolgt die Dissoziation von NO^{*} vom Häm der sGC im Vergleich zum Hämoglobin und Myoglobin ungewöhnlich schnell²⁴, was auch die Folge einer Oxidation des Häm-Eisens sein könnte²⁵.

²² Ignarro, L.J. *Pharmacol. Toxicol.* **1990**, 67, 1 - 7

²³ Koesling, D. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1998**, 358, 123 - 126

²⁴ Kharitonov, V.G., Sharma, V.S., Magde, D., Koesling, D. *Biochemistry* **1997**, 36, 6814 - 6818

²⁵ Dierks, E.A., Burstyn, J.N. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, 351, 1 - 7

1.2 Biosynthese des NO[•]

An der Bereitstellung von endogenem NO[•] ist die NO[•]-Synthase (NOS) beteiligt, von der mehrere Isoformen bekannt sind. Diese sind im Körper weit verbreitet und haben verschiedene wichtige physiologische Funktionen²⁶. Dazu gehören Regulation des Blutdruckes, lokale Vasomotion, Signaltransduktion im ZNS und Beiträge zur Immunabwehr^{27,28,29}. Die NOS bildet NO[•], indem sie eine Sauerstoff- und NADPH-abhängige Oxidation eines Guanidinostickstoffs der Aminosäure L-Arginin katalysiert. Die Reaktion verläuft in zwei Schritten, in deren Verlauf es zu einer Fünfelektronen-Oxidation kommt. Im ersten Schritt wird L-Arginin unter Bereitstellung von zwei Reduktionsäquivalenten aus NADPH zu N^ω-Hydroxy-L-Arginin oxidiert. Im zweiten Schritt wird N^ω-Hydroxy-L-Arginin in einer Dreielektronen-Oxidation in Gegenwart von Sauerstoff unter Verbrauch nur eines Reduktionsäquivalentes aus NADPH zu Citrullin, dem korrespondierenden Harnstoffderivat, und NO[•] oxidiert.

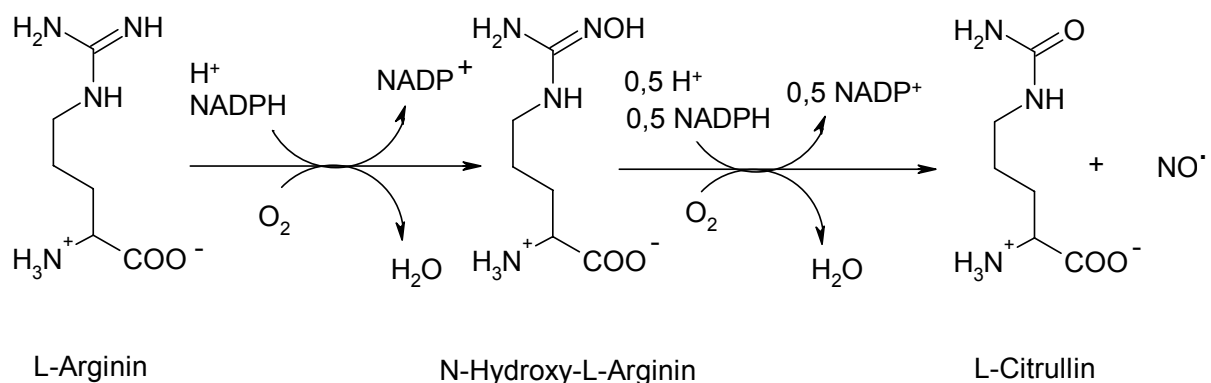


Abb. 2: Biosynthese von NO[•]

²⁶ Nathan, C., Xie, Q. *Journal Biol. Chem.* **1994**, 269, 13725 - 8

²⁷ Moncada, S., Higgs, A. *New England Journal Med.* **1993**, 329, 2002 - 12

²⁸ Green, J.S., Sacheller, L.F., Marletta, M.A. *Immunol. Letters* **1994**, 43, 87 - 94

²⁹ Wilson, R.I., Yanovsky, J., Gödecke, A. *Nature* **1997**, 386, 338

1.3 Chemischer Aufbau der NO[•]-Synthasen

Die katalytisch aktive NOS ist ein Homodimer eines Hämproteins wobei das Monomere abhängig von der jeweiligen Isoform ein Molekulargewicht von 130 kDa bis 160 kDa aufweist. Jedes NOS-Monomer besitzt an seinem aminoterminalen Ende eine Domäne mit Oxidaseeigenschaften und an seinem carboxyterminalen Ende eine Domäne mit Reduktaseeigenschaften. In der Reduktasedomäne befinden sich Bindungsstellen für die Redoxkofaktoren NADPH, Flavinmononukleotid (FMN), Flavinadeninindinukleotid (FAD) und Calmodulin. Zwei Reduktionsäquivalente werden von NADPH über FMN und FAD zur Oxidasedomäne unter der Kontrolle des Calcium / Calmodulinkomplexes transferiert. Das reaktive Zentrum befindet sich in der Oxidasedomäne, wo ein Äquivalent Tetrahydrobiopterin (B4H) und eine Hämgruppe lokalisiert sind.

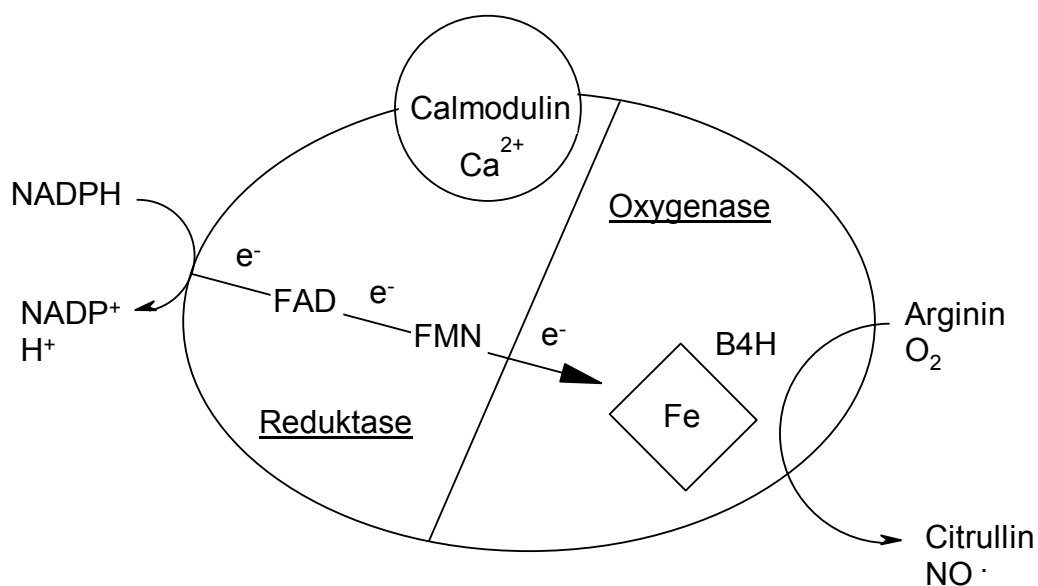


Abb. 3: Schematische Darstellung der NO-Synthase-Domänen

Von der NO-Synthase sind bis heute drei Isoformen bekannt:

- die neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS I), Molekulargewicht: 160 kDa
- die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS II), Molekulargewicht: 130 kDa
- die endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOS III), Molekulargewicht: 133 kDa

Die Isoformen der NO[•]-Synthase unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Lokalisierung, Regulation, katalytischen Eigenschaften und Hemmbarkeit. Dennoch ist eine Homologie der Aminosäuresequenz von ca. 55% feststellbar. Die neuronale NO-Synthase ist diejenige Isoform, die zuerst in neuronalem Gewebe entdeckt wurde. Dort stellt sie die vorherrschende Isoform da. iNOS stellt die induzierbare Isoform da. Sie wurde in vielen unterschiedlichen Zellen und Geweben gefunden. eNOS dagegen wurde in vaskulären Endothelzellen entdeckt.

Die lange Zeit vorgenommene Einteilung der NO[•]-Synthasen hinsichtlich

- konstitutiv (eNOS, nNOS) / induzierbar (iNOS)
- zytosolisch (iNOS, nNOS) / membrangebunden (eNOS)

erscheint heute nicht mehr zweckmässig, da inzwischen bekannt ist, dass alle drei Isoformen sowohl durch unterschiedliche Stimuli induziert als auch konstitutiv exprimiert werden können. Ferner können die drei Isoformen sowohl membrangebunden als auch zytosolisch vorliegen.

Eine Unterscheidung hinsichtlich der Calcium Abhängigkeit und dem Ausmaß der NO[•]-Produktion ist noch immer üblich:

- eNOS und nNOS: - Calcium-abhängig
- geringe NO[•]-Produktion (~nM)
- iNOS: - Calcium-unabhängig
- höhere NO[•]-Produktion (~µM).

1.4 NO[•]-Donoren

Die Entdeckung, dass es sich bei EDRF um NO[•] handelt, stimulierte nicht nur die biologische Grundlagenforschung, sondern auch die Suche nach neuen Wirkstoffen. Das Missverhältnis zwischen der überragenden Bedeutung dieses neuen Mediators einerseits und der geringen Zahl an „alten“, noch in Unkenntnis ihres Wirkprinzips entwickelten NO[•]-Pharmaka andererseits war offensichtlich. Eingesetzt wurden verschiedene Nitrit- bzw. Nitratester, die sogenannten „Nitrate“ oder Nitrovasodilatoren (s. Abb. 5), das Molsidomin (s. Abb. 8) und in Sonderfällen Nitroprussid-Natrium (s. Abb. 7). Die Nitrovasodilatoren stellen Prodrugs dar, die enzymatisch im glatten Gefäßmuskel zu NO[•] metabolisiert werden müssen, um ihre Wirkung zu entfalten (s. Abb. 4)

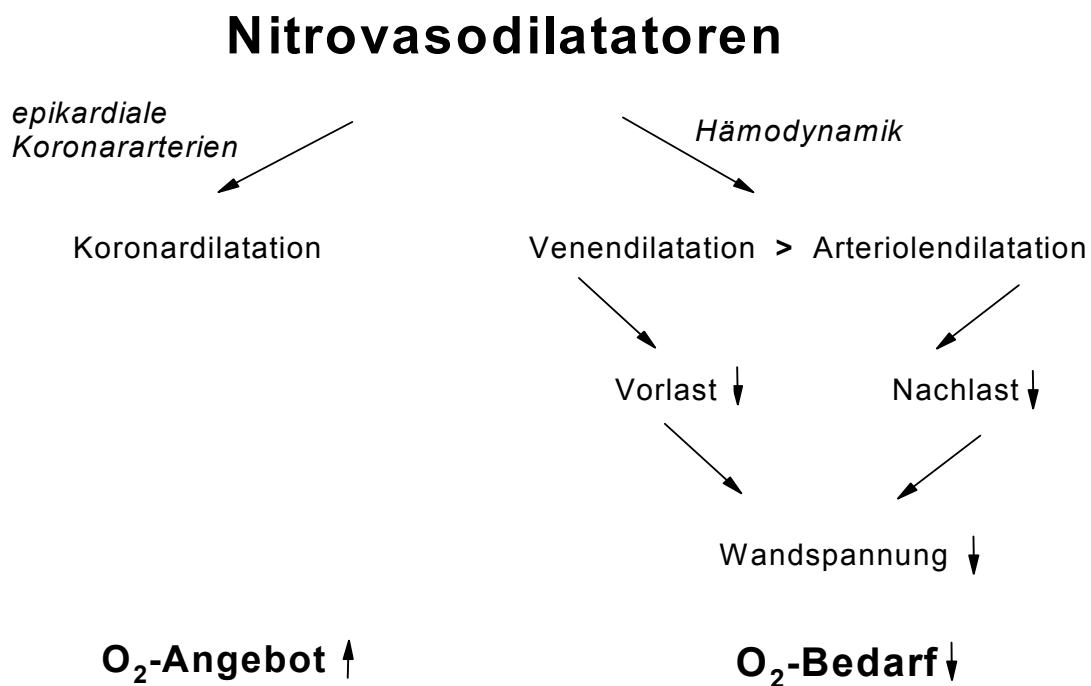
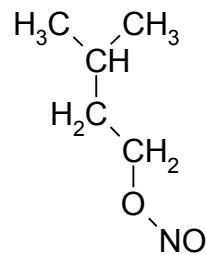


Abb. 4: Wirkungen der Nitrovasodilatoren

1.4.1 In der Therapie eingesetzte NO[•]-Donoren

Organische Nitrite, organische Nitrate

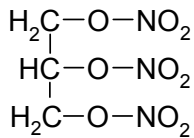


Amylnitrit

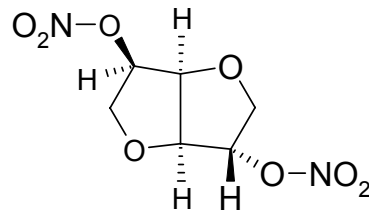
Amylnitrit war die erste Verbindung gewesen, die therapeutisch im Zusammenhang mit der Koronaren Herzkrankheit eingesetzt wurde und deren Wirkprinzip auf NO[•] beruht³⁰. Es ist eine leicht flüchtige Flüssigkeit, die inhaliert und über die Lunge resorbiert wird. Die Wirkung tritt innerhalb von 30 Sekunden ein, hält allerdings nur wenige Minuten an. Die Anwendung ist heute weitgehend obsolet³¹.

³⁰ Brunton, T.L., *Lancet* **1867**, 97 - 8

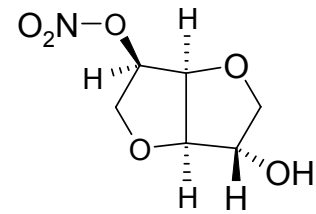
³¹ Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. *Allg. Pharmakol. U. Toxikol.* Elsevier, Urban & Fischer Verlag **2001**, 491



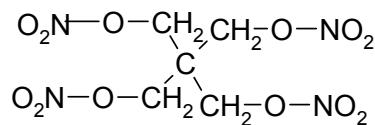
Glyceroltrinitrat



Isosorbiddinitrat



Isosorbid-5-mononitrat

Pentaerythrityl-
tetranitrat**Abb. 5: Therapeutisch eingesetzte organische Nitrate**

Der therapeutische Anwendungsbereich organischer Nitrater ist die Koronare Herzkrankheit (KHK). Der positive Effekt des Glyceroltrinitrats wurde bereits 1879 von Murrel³² beschrieben. In diese Klasse gehören auch Isosorbiddinitrat und dessen Metabolit Isosorbidmononitrat. Daneben kann Pentaerythrityltetranitrat in der Therapie eingesetzt werden, das zusätzlich auch antioxidative Eigenschaften aufweisen soll³³. Glyceroltrinitrat und Isosorbiddinitrat werden sublingual bzw. buccal resorbiert. Als Spray oder Zerbeisskapsel gegeben dienen sie zur Kupierung oder kurzfristigen Prophylaxe des Angina-pectoris-Anfalls. Oral werden höhere Dosen von Glyceroltrinitrat und Isosorbiddinitrat sowie 5'-Isosorbidmononitrat und Pentaerythrityltetranitrat zur Dauertherapie der Koronaren Herzkrankheit eingesetzt. Der allgemein akzeptierte Wirkungsmechanismus beinhaltet die Aufnahme der org. Nitrate in vaskuläre, glatte Muskelzellen, wo sie zu NO[•] umgesetzt werden. NO[•] aktiviert dann die lösliche Guanylyl-Cyclase, woraufhin der cGMP-Spiegel

³² Murrel, W., *Lancet* **1879**,1, 80-81

³³ Fessler, B., *DAZ* **20**, **2003**, 58 - 60

angehoben wird. Daraufhin wird eine cGMP-abhängige Proteinkinase aktiviert was zu einer Vasorelaxation führt (s. Abb. 6). Jedoch gibt es noch Unklarheiten in diesem übergeordneten Bild. Insbesondere der präzise Mechanismus der Umwandlung von Glyceroltrinitrat in NO^{*} wird intensiv debatiert.

Ein bemerkenswerter Nachteil dieser Wirkstoffe ist ein partieller Wirkungsverlust im Laufe einer ununterbrochenen Behandlung. Dieses Phänomen wird als Nitrattoleranz bezeichnet³⁴. Die vorgebrachten Hypothesen, die diesen Wirkungsverlust erklären sollen, haben hauptsächlich eine Dysfunktion der Mechanismen zum Gegenstand, die bei der Biotransformation der Nitrate in NO^{*} involviert sind. Ferner wurde entdeckt, dass nach einer Nitratgabe vermehrt reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden. Diese bewirken eine verstärkte Umwandlung von NO^{*} in Peroxynitrit und damit eine geringere Aktivierung der Guanylylcyclase³⁵. Auch dem oxidativem Stress wurde eine gewisse Rolle zugewiesen, da durch Antioxidantien, wie z.B. Vitamin C^{36,37} oder Vitamin E³⁸, eine Toleranzentwicklung teilweise reversibel war.

Außerdem wurde eine „Feed-back“-Regulation innerhalb der NO^{*}/cGMP-Signaltransduktion entdeckt. Durch Stimulation der NO^{*}-sensitiven Guanylyl-Cyclase kommt es zur Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration. Neben der Aktivierung der cGMP-Kinase führt cGMP zur direkten Aktivierung der Phosphodiesterase 5 (PDE5) und bewirkt damit eine Verstärkung des eigenen

³⁴ Abrams, J., Glasser, S.P. *Am. J. Cardiol.* **1998**, 81, 3A – 14A

³⁵ Mutschler, E. *Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie u. Toxikologie* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart **2001**, S. 555

³⁶ Parker, M., Lee, W., Kessler, P.D., Gorrlieb ; S.S., Medina, N., Yashak, M., *New England J. Med.* **1987**, 317, 799 - 804

³⁷ Bassenge, E., Fink, N., Skatchkov, M., Fink, B., *J. Clin. Invest.* **1998**, 102, 67 - 71

³⁸ Watanabe, H., Kaknani, M., Ohtsuka, S., Sugishita, Y. *Circulation* **1998**, 97, 886 - 891

Abbaus. Darüber hinaus kommt es zu einer Phosphorylierung des Enzyms durch die cGMP-Kinase, was die Affinität der PDE5 für cGMP erhöht³⁹ (s. Abb. 6; S. 17).

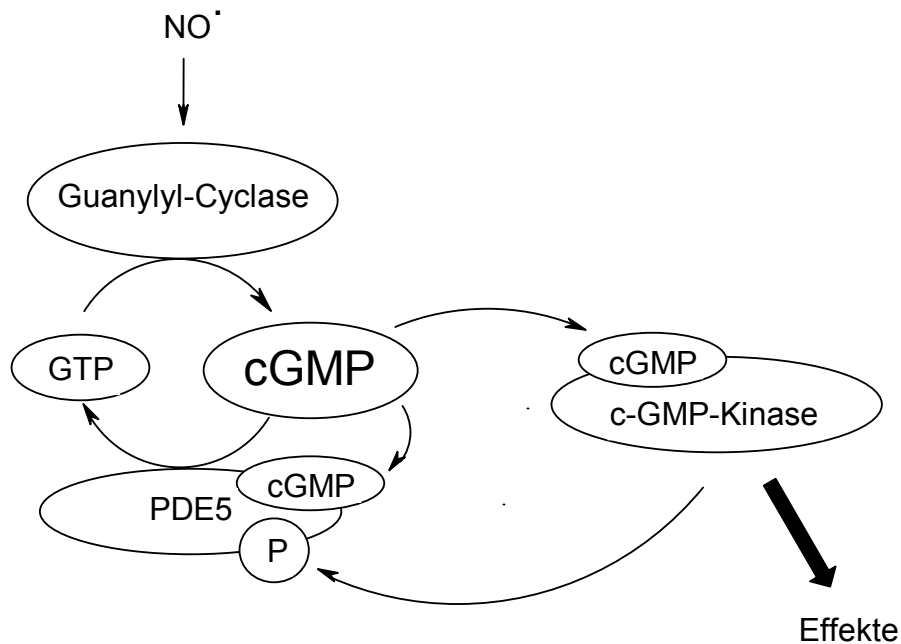


Abb. 6: Regulation innerhalb der NO/cGMP-Signaltransduktion

Abgesehen von der Nitrattoleranz, die mittels einer Intervalltherapie⁴⁰ (nitratfreies Intervall während der Nacht) umgangen werden kann, gibt es noch weitere Limitierungen einer Nitrattherapie, wie z.B. Kopfschmerz, Flush oder Hypotension.

³⁹ Müllershausen, F., Koesling, D., Friebe, A. *BIOspektrum* **2003**, 9, 687 – 690

⁴⁰ Watanabe, H., Kaknani, M., Ohtsuka, S., Sugishita, Y. *Circulation* **1997**, 96, 2545 - 2550

Nitroprussid-Natrium

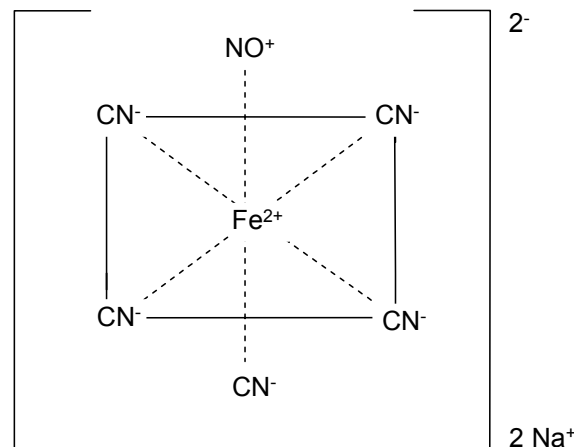


Abb. 7: Nitroprussid-Natrium

Ein NO^* -Donor, der nicht-enzymatisch NO^* abgibt, ist Nitroprussid-Natrium. Es setzt thermisch und photochemisch NO^* frei, ist jedoch rel. stabil im Dunkeln und in wässrigen Lösungen unter physiologischen Bedingungen⁴¹. Aufgrund der Unabhängigkeit der Wirkung von der Enzymausstattung der glatten Muskelzelle bewirkt Nitroprussid-Natrium eine starke Dilatation der koronaren Widerstandsgefäße. Da auch die peripheren Widerstandsgefäße von dieser Wirkung betroffen sind, kommt es zu einer starken Senkung des Blutdrucks⁴². Eine orale Gabe ist wegen der raschen gastrointestinalen Inaktivierung erfolglos. Bei einer i.v. Infusion kann der Blutdruck mit Nitroprussid-Natrium „titriert“ werden. Die Plasmahalbwertszeit beträgt nur 3-4 Minuten. Der Wirkungsmechanismus ist sehr komplex und letztlich nicht geklärt⁴³. Nitroprussid-Natrium scheint einer reduktiven Bioaktivierung⁴⁴ zu bedürfen, da es spontan kein NO^* freisetzt, sondern erst durch

⁴¹ Rao, D.N., Cederbaum, A.R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, 321, S. 363

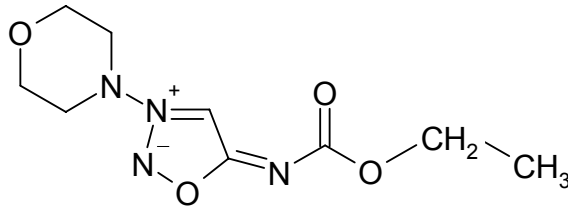
⁴² Schächinger, V., Zeiher, A.M. *Internist* **1997**, 38, 438 – 447

⁴³ Duchstein, H.J., Rieder S. *Arch. Pharm.* **1995**, 328, 317 - 324

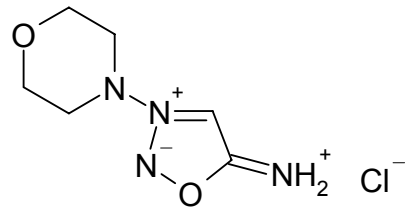
⁴⁴ Kowaluk, E.A., Seth, P., Fung, H.-L. *J. Pharmacol. Exp. Theor.* **1992**, 262, 916 - 922

Licht oder Reduktionsmittel wie z.B. Cystein, Ascorbat oder Glutathion⁴⁵ aktiviert werden muss.

Molsidomin, Linsidomin, Nitrosohydrazine



Molsidomin (Corvaton®)



Linsidomin

(SIN-1)

Abb. 8: **Therapeutisch eingesetzte Sydnonimine**

Daneben findet in Deutschland als Vasodilatator ein Sydnonimin (Molsidomin) Einsatz in der oralen oder intravenösen Therapie der Angina pectoris. Molsidomin wird zu 90% enteral resorbiert und mit einer Halbwertszeit von 60 – 90 Minuten in der Leber zu dem wirksamen Metaboliten SIN-1 (Linsidomin) verstoffwechselt⁴⁶.

⁴⁵ Bates, J.N., Baker, M.T., Guerra Jr., R., Harrison, D.G. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, 42, Suppl. 157 - 165

⁴⁶ Dendorfer, A. *Pharmakologie der Nitrate und anderer NO-Donatoren* Bundesverband Niedergelassener Kardiologen e.V. Herz Sonderheft 1, **1996**, 21, 38 - 49

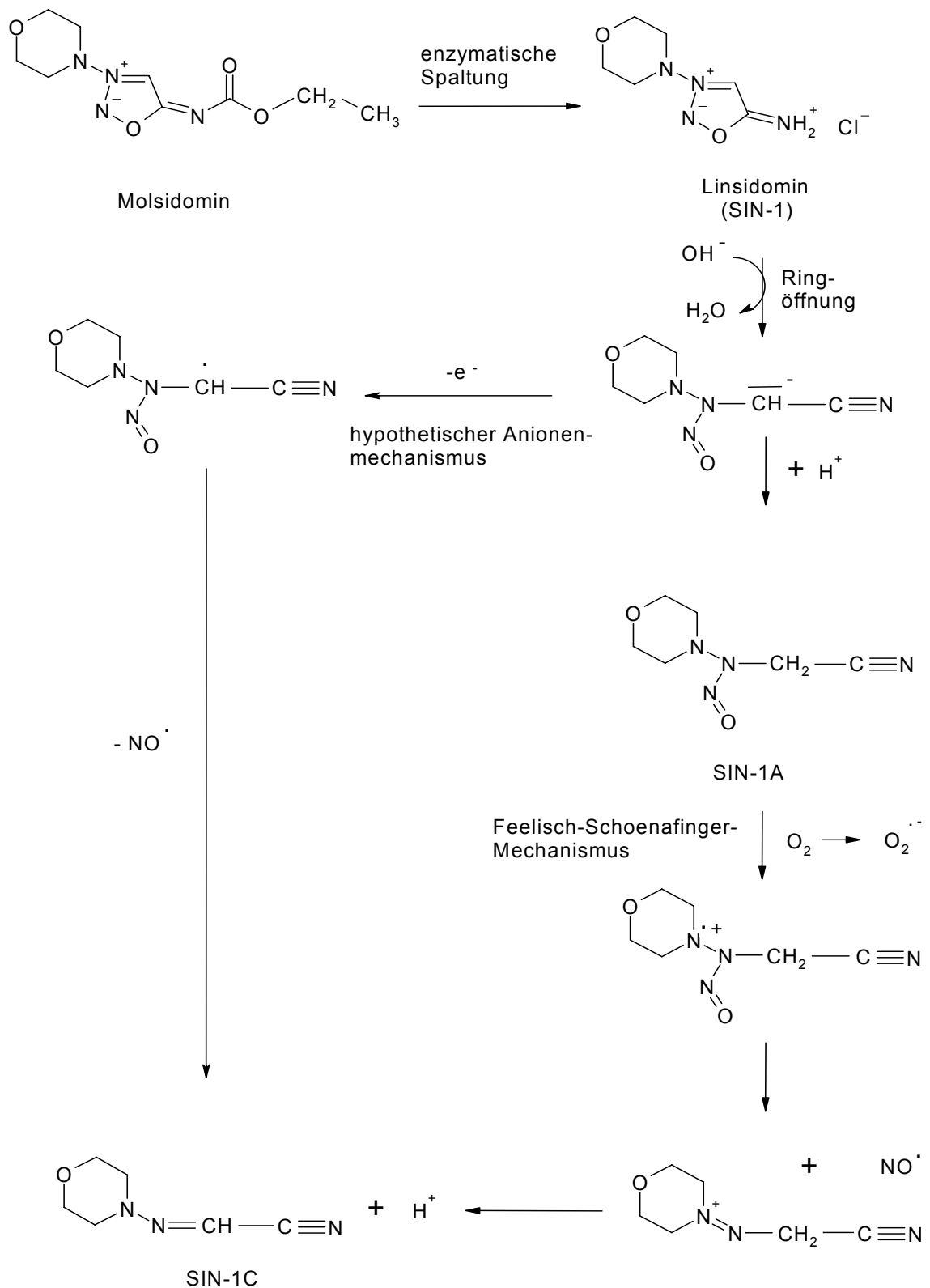


Abb. 9: Mechanismus der Freisetzung von $\text{NO}^\cdot$ aus Sydnoniminen^{49, 144, 47}

⁴⁷ Duchstein, H.-J., Riederer, S., Erbach, C. *Pharmazie in unserer Zeit* **1999**, 28, 207

SIN-1, das aus wässriger Bicarbonatlösung unter Argon aus Molsidomin gebildet werden kann, wird am besten bei Temperaturen um -80°C unter einer trockenen, inerten Atmosphäre gelagert. Selbst unter diesen Bedingungen ist die Stabilität auf wenige Monate begrenzt. Aus Linsidomin bildet sich nach einer nichtenzymatischen Ringöffnung die ringoffene Form SIN-1A aus der $\text{NO}^{\bullet}$ abgespalten werden kann⁴⁸.

In einer neueren Arbeit wird der von Schoenafinger vorgeschlagene Weg zur $\text{NO}^{\bullet}$ -Freisetzung zugunsten eines alternativen Mechanismus, bei dem der entscheidende Schritt nicht über die Bildung eines Hydrazinyl-Radikals sondern eines Kohlenstoff-Radikals an der aktiven Methylengruppe diskutiert wird, der energetisch offensichtlich günstiger ist⁴⁹.

N-Nitrosohydrazine, wie z.B. SIN-1A zeigen eine charakteristische Lichtsensibilität und sind hochgradig empfänglich für eine oxidative Weiterreaktion. Die Stabilität kann wesentlich gesteigert werden, wenn man SIN-1A mit Cyclodextrin komplexiert. Die Stabilität bei Raumtemperatur erhöht sich dadurch auf mehrere Jahre. In wässrigen Lösungen setzen diese Komplexe sofort und über einen längeren Zeitraum mit voraussagbaren Raten $\text{NO}^{\bullet}$ frei. Die $\text{NO}^{\bullet}$ -Freisetzung wird durch die Gegenwart von Sauerstoff und Übergangsmetallen (insbesondere Kupfer) gesteigert. Thiole als Bestandteile der Lösung haben jedoch kaum Einfluss auf die Freisetzungsraten.

Die Wirkung des direkten $\text{NO}^{\bullet}$ -Donors SIN-1 als Wirkmetabolit von Molsidomin scheint nur in geringem Maße einer Nitrattoleranz unterworfen zu sein. So konnte gezeigt werden, dass die dreimal tägliche Gabe von 8 mg retardiertem Molsidomin über 21 Tage zu keiner Toleranzentwicklung führt⁵⁰. Unter Dauerinfusion mit Molsidomin lässt die blutdrucksenkende Wirkung um 67% nach. Dies konnte auf eine neurohumorale Gegenregulation und nicht auf eine direkte pharmakodynamische

⁴⁸ Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. *Allg. Pharmakol. U. Toxikol.* Elsevier, Urban & Fischer Verlag **2001**, 491 - 493

⁴⁹ Rojas Wahl, R.U. *J. Molecular Modeling* **2004**, 10, 121 - 129

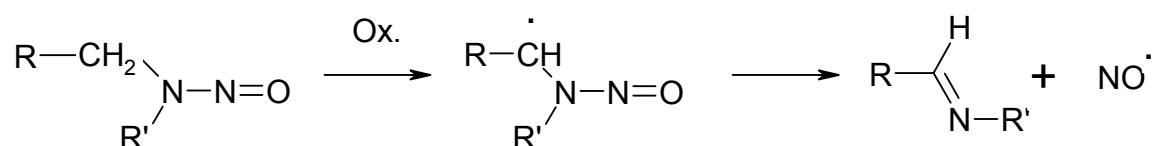
⁵⁰ Rudolph, W., Dirschinger, J. *Clinical comparison of nitrates and sydnonimines* **1991**, 12, 33 - 41

Toleranz zurückgeführt werden⁵¹. Im Vergleich zu den organischen Nitraten wirkt Molsidomin selektiver auf den Venentonus sowie auf die pulmonalarteriellen Gefäße, wodurch überwiegend die Vorlast und nur in einem geringeren Ausmaß die Nachlast gesenkt werden.

⁵¹ Unger, P., Leone, A., Staroukine, M., Degre, S., Berkenboom, G. *J. Cardiovasc. Pharmacol* **1991**, 18, 888 - 894

Neben diesen in der Therapie eingesetzten Substanzen gibt noch eine Reihe weiterer Substanzklassen ohne therapeutische Verwendung.

1.4.2 N-Nitrosamine

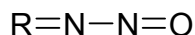


N-Nitrosamine werden durch N-Nitrosierung eines Dialkyl-, Alkylaryl-, oder cyclischen sekundären Amins gebildet. Zur NO[•]-Freisetzung bedürfen sie der metabolischen Aktivierung⁵². Als initialen Schritt wurde die Einelektron-Oxidation eines der α-Kohlenstoffatome vorgeschlagen, woraus die Bildung eines instabilen α-Nitrosaminradikals resultiert⁵³. Darauf können sowohl eine Dealkylierung wie auch eine oxidative oder reduktive Denitrosierung folgen. Abhängig von den Resten R und R' sollte es möglich sein, das Verhältnis Dealkylierung/ Denitrosierung zu Gunsten der Denitrosierung zu verschieben. Da hier allerdings Daten über den Metabolismus solcher Substanzen weitgehend fehlen, sind Aussagen über Struktur-Aktivitätsbeziehungen spekulativ.

⁵² DeRubertis, F.R., Craven, P.A. *Science* **1976**, 193, 897 - 9

⁵³ Gangolli, S.D., van den Brandt, P.A., Feron, V.J. *Eur. J. Pharmacol. Environ. Toxicol. Pharmacol.* **1994**, 292, 1 - 38

1.4.3 Nitrosimine



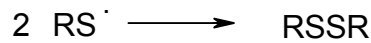
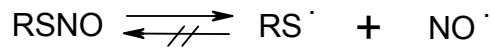
Nitrosimine werden hergestellt durch Nitrosierung der entsprechenden Imine. Nitrosimine zeigen Freisetzung von sowohl NO^* als auch N_2O ⁵⁴. N_2O wird vermutlich über das Intermediat HNO gebildet. In der Gegenwart von Thiolen ist die Bildung von N_2O begünstigt auf Kosten der Bildung von NO^* . Das lässt vermuten, dass ein oxidativer Prozess für die Aktivierung vonnöten ist. In wässrigen Lösungen sind Nitrosimine relativ stabil, vorausgesetzt die Lösungen werden kühl und vor Licht geschützt gelagert.

1.4.4 S-Nitrosothiole

S-Nitrosothiole werden mittels S-Nitrosierung von primären, sekundären und tertiären Thiolen erhalten. Tertiäre S-Nitrosothiole sind in der Regel stabiler als primäre. Cysteinreste in Proteinen können ebenfalls nitrosiert werden⁵⁵. In physiologischen Pufferlösungen zerfallen S-Nitrosothiole mehr oder weniger schnell in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen unter Bildung der korrespondierenden Disulfide und NO^* .

⁵⁴ Rehse, K., Schleifer, K.J., Lüdtke, E., Böhme, E. *Arch. Pharmacol.* **1994**, 327, 359 - 64

⁵⁵ Stamler, J.S., Simon, D.I., Osborne, J.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 444 - 8



Die Stabilität wässriger Lösungen hängt von der Temperatur, dem pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck, Nukleophilen, Redox-aktiven Spezies und Spuren von Metallionen in der Lösung ab. Zusätzlich zur homolytischen Spaltung können S-Nitrosothiole auch unter Bildung von NO^+ und NO^- zerfallen. In biologischen Systemen spielt die heterolytische Dissoziation zwar nicht die vorherrschende, zumindest aber eine grosse Rolle. Obwohl sich S-Nitrosothiole *in vitro* hinsichtlich ihrer Stabilität deutlich unterscheiden sind sie in ihrem pharmakodynamischen Verhalten sehr ähnlich. Eine *in vivo* Verabreichung eines S-Nitrosothiols führt offensichtlich rasch zu einer Umnitrosierung auf Gewebe- und Plasmathiole⁵⁶. So konnte gezeigt werden, dass S-Nitrosoproteine die Nitrosogruppe auf Thiole mit geringem Molekulargewicht übertragen und umgekehrt⁵⁷.

1.4.5 Diazeniumdiolate (NONOate)

NONOate sind Addukte von $\text{NO}^\cdot$ und Nukleophilen. Die $\text{NO}^\cdot$ -Freisetzungsraten der NONOate korrelieren *in vitro* gut mit ihren vasorelaxierenden Aktivitäten. Dasselbe gilt für *in vivo* Untersuchungen. NONOate werden als spontan $\text{NO}^\cdot$ -freisetzende Substanzen angesehen⁵⁸. Das bedeutet, dass die Freisetzungsraten unbeeinflusst sind von anderen biologischen Reaktanden. Die Struktur des Rückgrats, an dem die

⁵⁶ Simon, D.I., Stamler, J.S., Jaraki, O. *Arter. Thromb.* **1993**, 13(6), 791 - 9

⁵⁷ Stamler, J.S. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **1995**, 196, 19 - 36

⁵⁸ Morley, D., Keefer, L.K. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1993**, 22(7), 3 - 9

beiden $\text{NO}^\bullet$ -Moleküle gebunden vorliegen, beeinflusst deutlich die $\text{NO}^\bullet$ -Freisetzungsgeschwindigkeit. Ferner spielen die Temperatur und der pH-Wert der Lösung eine bedeutende Rolle. Als Nukleophile dienen üblicherweise primäre oder sekundäre Amine. Die Zersetzung erfolgt in wässriger Lösung spontan unter Umkehrung der Bildungsreaktion:



Abb. 10: Bildung und Zerfall der NONOate

1.4.6 Oxadiazole (Furoxane)

Furoxane, stabile N-Oxide der 1,2,5-Oxadiazole, zeigen eine vasodilatatorische Wirkung⁵⁹. Aufgrund der NO-Strukturen und einer möglichen offenkettigen Zwischenstufe ist eine NO-vermittelte Wirkungsauslösung denkbar.

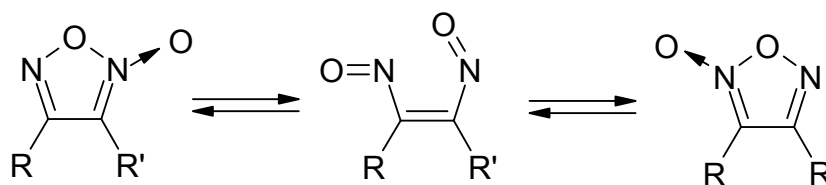


Abb. 11: Umlagerung von Furoxanen

Der Abbau der Furoxane wird beschleunigt durch Anwesenheit von Thiolgruppen und einem Anheben des pH-Wertes. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass Thiolatanionen eine Rolle bei diesem Prozess spielen. Der Reaktionsmechanismus

⁵⁹ Gosh, P.B., Everitt, B.J. *J. Med. Chem.*, **1974**, 17, 203 - 206

erscheint sehr komplex. Er beinhaltet mehrere z.T. hypothetische Zwischenstufen, die letztlich in der Bildung von α,β -Dioximen, S-Nitrosothiol und den korrespondierenden oxidierten Thiolen resultieren.

1.4.7 Tautomeriefähige Oxime

FK409 (($\pm$)-4-(E)-Ethyl-2-[(E)-hydroxyimino]-5-nitro-3-hexenamid), ursprünglich ein Fermentationsprodukt aus *Streptomyces griseoporeus*⁶⁰, das inzwischen auch synthetisch hergestellt wurde, zeigt eine gefässerweiternde Wirkung und eine Hemmwirkung auf die Plättchenaggregation⁶¹. Es soll in wässriger Lösung $\text{NO}^\bullet$ freisetzen, welches durch Chemilumineszenz, ESR-Spektroskopie und Nitrit-Analyse nachgewiesen wurde. Der Freisetzungsmechanismus soll Sauerstoff- und Thiol-unabhängig verlaufen⁶². Bislang ist aber noch unklar, auf welche Weise diese $\text{NO}^\bullet$ -Freisetzung erfolgt.

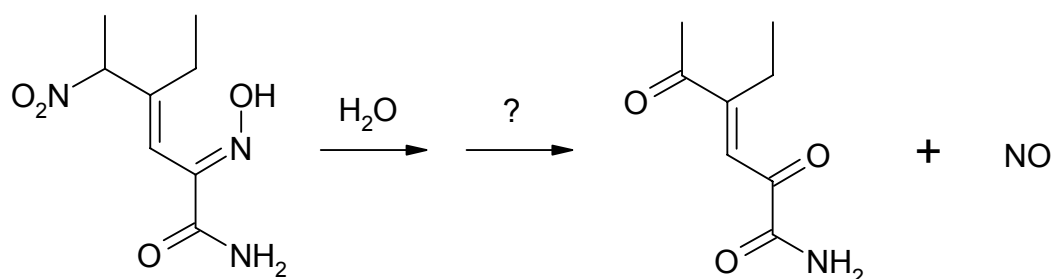


Abb. 12: Zerfall von FK 409

⁶⁰ Hino, M., Iwami, M., Okamoto, M. *J. Antibiot.* **1989**, 42, 1578 - 83

⁶¹ Thomas, G., Ramwell, P.W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, 164(2), 889 - 93

⁶² Kita, Y., Sato, N., Yamamoto, T. *Eur. J. Pharmacol.* **1994**, 260(2-3), 163 - 8

1.4.8 Angeli's Salz ($\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$, Natriumtrioxodinitrat)

Angeli's Salz ($\text{pK}_{\text{S1}}=2,4$; $\text{pK}_{\text{S2}}=9,4$)^{63,64} zerfällt bei einem physiologischen pH-Wert hydrolytisch in Nitroxylat und Nitrit. Diese Reaktion ist jedoch stark pH-abhängig, denn die eigentlich instabile Spezies ist das monoprotonierte Anion HN_2O_3^- , welches in einem pH-Bereich von 3,5 – 8,5 als Hauptkomponente vorliegt^{65,66}. Angeli's Salz hat eine relaxierende Wirkung an der isolierten Rattenaorta.



Abb. 13: Zerfall von Angeli's Salz

Die relaxierende Wirkung kann durch L-Cystein gehemmt werden. Des weiteren ist bekannt, dass Angeli's Salz im physiologischen pH-Bereich nicht nur ein guter NO^- -Donor ist, sondern in Anwesenheit von Oxidationsmitteln auch $\text{NO}^\bullet$ -Radikale liefert. Der Mechanismus ist hier jedoch noch nicht endgültig geklärt^{67,82}.

⁶³ Lee, M.J.C., Elberling, J.A., Nagasawa, H.T. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 3648 - 52

⁶⁴ Hughes, M.N., Wimbledon, P.E. *J. Chem. Soc. Dalton* **1976**, 703 - 7

⁶⁵ Donald, C.E., Hughes, M.N., Thompson, J.M., Bonner, F.T. *Inorg. Chem.* **1986**, 25, 2676 - 7

⁶⁶ Hughes, M.N., Wimbledon, P.E. *J. Chem. Soc. Dalton* **1977**, 1650 - 3

⁶⁷ Fokuto, J.M., Hobbs, A.J., Ignarro, L.J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, 196, 707 - 13

1.4.9 Kupferron

Kupferron ist das Ammoniumsalz von N-Nitroso-N-phenylhydroxylamin und wird als Chelatbildner für verschiedene Metallkationen⁶⁸ benutzt. Die freie Säure ($pK_s=4,42$) ist in Wasser schwer löslich und nicht beständig⁶⁹. Dagegen löst sich Kupferron gut in Wasser und die neutrale Lösung ist unter Ausschluss von Oxidationsmitteln stabil bis $pH \geq 5$ ⁷⁰. Durch elektrochemische Oxidation ($E^0=+0,4V$) oder mit Wasserstoffperoxid / Peroxidase kommt es über eine Einelektronen-Oxidation zu einem irreversiblen Zerfall⁷¹.

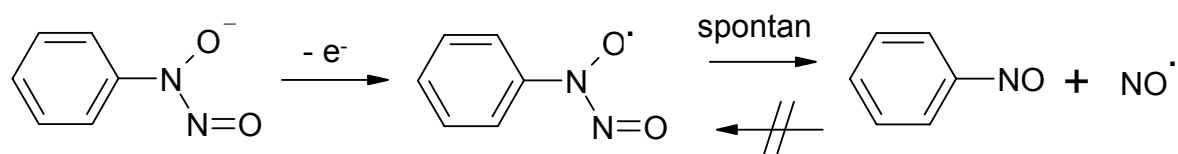


Abb. 14: Zerfall von Kupferron durch Oxidation

1.4.10 N-Nitrosamide, N-Nitrosoguanidine

N-Nitrosamide sind N-Acyl-substituierte N-Nitrosoderivate von N-Alkylharnstoffen, N-Alkylcarbamaten und N-Alkylamiden. Nitrosamide sind instabil bei physiologischem pH. Sie zerfallen nicht-enzymatisch unter Bildung elektrophiler Intermediate. Diese

⁶⁸ Gastinger, E. Z. *Anal. Chem.* **1953**, 139, 1 - 14

⁶⁹ Kowach, E.G. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1958**, 91, 844 - 50

⁷⁰ Lawless, J.G., Hawley, M.D. *Anal. Chem.* **1968**, 40, 948 - 51

⁷¹ Alston, T.A., Porter, D.J.T., Bright, H.J. *J. Biol. Chem.* **1991**, 257, 229 - 306

Intermediate ähneln denen, die aus Nitrosaminen resultieren, ohne dass jedoch zu ihrer Bildung eine metabolische Aktivierung nötig wäre. Viele getestete Substanzen dieser Klasse sind starke Carcinogene⁷². NO[•]-Freisetzung wurde für verschiedene N-Nitrosoharnstoffderivate und Nitrosoguanidine gezeigt^{73,74}. Das N-Nitrosoharnstoffderivat BCNU (1,3-Bis(2-chlorethyl)-1-nitrosoharnstoff) aktiviert die lösliche Guanylylcyclase unabhängig von der Anwesenheit von Sauerstoff, jedoch in einem viel geringeren Ausmaß als das N-Nitrosoguanidin-Derivat MNNG (1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin)⁷⁵. Eine Interaktion von N-Nitrosoguanidinen mit Thiolen führt zu einem gesteigerten Zerfall, der allerdings mit einer Aktivitätsabnahme⁷⁶ einher geht. Hier ist eine Bildung von S-Nitrosothiolen als Intermediate möglich⁷⁷.

⁷² Bennet, A., Pegg, A.E. *Cancer Res.* **1981**, 41, 2786 - 90

⁷³ Potter, D.W., Reed, D.J. *Arch. Biochem. Biophys.* **1982**, 216(1), 158 - 69

⁷⁴ Schulz, U., McCalla, D.R. *Can. J. Chem.* **1969**, 47, 2021 - 77

⁷⁵ De Rubertis, F.R., Craven, P.A. *Biochem. Biophys. Acta* **1977**, 499, 337 - 51

⁷⁶ De Rubertis, F.R., Craven, P.A. *J. Biol. Chem.* **1977**, 252(16), 5804 - 14

⁷⁷ Ignarro, L.J., Edwards, J.C., Gruetter, D.Y. *FEBS Lett.* **1980**, 110(2), 275 - 8

1.4.11 Piloty's Säure $\equiv$ N-Hydroxybenzolsulfonamid $\equiv$ Benzolsulfhydroxamsäure (BSH)

Piloty's Säure ist eine schwache Säure ($pK_s=9,29$) und wird als Nachweisreagenz für Aldehyde eingesetzt, wobei Hydroxamsäuren entstehen, die mit Eisen(III)-Salzen farbige Komplexe ergeben (Angeli-Rimini-Test). Sie ist je nach den gewählten Bedingungen auch ein $\text{NO}^\bullet$ - und NO^- -Donor^{78,79,80,81,82}. In alkalischer Lösung zerfällt BSH durch Disproportionierung quantitativ zu Benzolsulfinsäure (BSI) und NO^- . Wird das NO^- nicht abgefangen, so dimerisiert und zerfällt es zu Wasser und N_2O . Während BSH im Bereich von $\text{pH}=6-9$ hydrolysestabil ist und nur sehr langsam wie oben beschrieben zerfällt, kommt es in Gegenwart von Oxidationsmitteln zur Bildung eines Sulfonyl-Aminoxyl-Radikals, das spontan unter Freisetzung von $\text{NO}^\bullet$ zu BSI zerfällt:

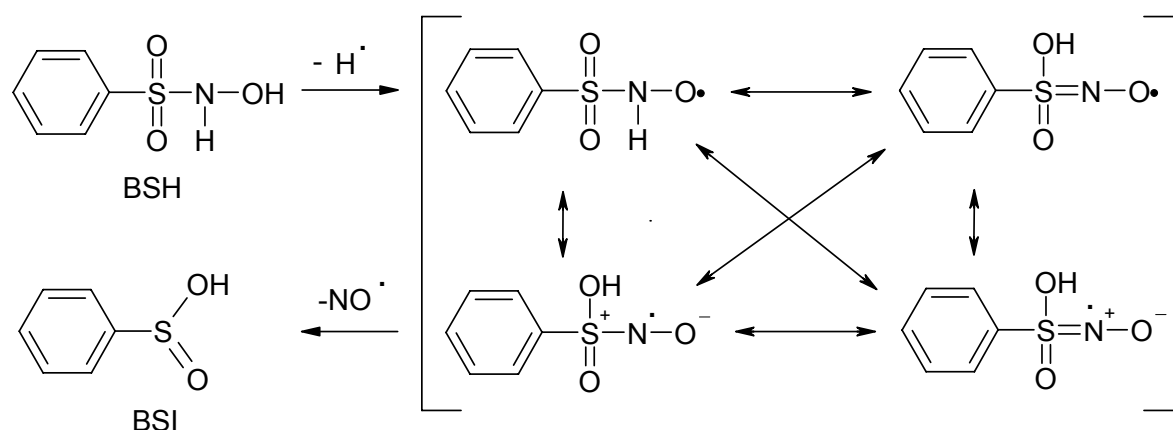


Abb. 15: Freisetzung von $\text{NO}^\bullet$ aus BSH

⁷⁸ Oddo, G., Delo, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1936**, 69, 294 - 8

⁷⁹ Angeli, A. *Gazz. Chim. Ital.* **1903**, 33(II), 245

⁸⁰ Bonner, F.T., Ko, Y. *Inorg. Chem.* **1992**, 31, 1514 - 19

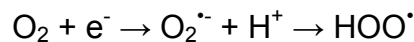
⁸¹ Seel, F., Bliefert, C. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1972**, 390, 187 - 96

⁸² Zamora, R., Grzesiok, A., Weber, H., Feelisch, M. *Biochem. J.* **1995**, 312, 333 - 9

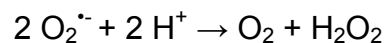
1.5 Oxidativer Stress

1.5.1 Entstehung reaktiver Sauerstoffverbindungen

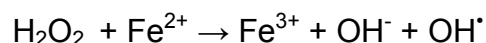
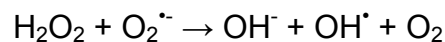
Der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) liegt eine unvollständige Reduktion von molekularem Sauerstoff zugrunde. Das Sauerstoffmolekül enthält zwei ungepaarte Valenzelektronen, von denen jedes ein separates Orbital besetzt, das von einem zweiten Elektron aufgefüllt werden kann. So kann molekularer Sauerstoff zu Superoxidradikalanion ($O_2^{\cdot-}$) reduziert werden, das zum Superoxid protoniert werden kann:



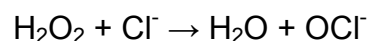
Superoxid kann wiederum durch das Enzym Superoxiddismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reduziert werden, wobei ein zweites Molekül zu Sauerstoff oxidiert wird:



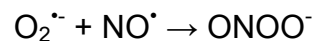
Wasserstoffperoxid kann aufgrund seiner geringen Reaktivität auch durch Zellmembranen frei diffundieren. Über verschiedene Reaktionswege können in der Folge hochtoxische Hydroxyl-Radikale entstehen. Bei der Haber-Weiss-Reaktion wird Wasserstoffperoxid durch Superoxid reduziert. Diese Reaktion verläuft jedoch bei physiologischem pH sehr langsam in Gegenwart von freien Metallionen wie z.B. Eisen(II) jedoch wesentlich schneller:



In neutrophilen Granulozyten und Monozyten reagiert Wasserstoffperoxid mit Myeloperoxidase in Anwesenheit von Halogenidionen wie z.B. Chloridionen zur hypochlorigen Säure, die ein potentes Oxidationsmittel darstellt.



Durch Interaktion von Superoxid mit $\text{NO}^\bullet$ entsteht das zytotoxische Peroxynitrit (ONOO^-):



Peroxynitrit ist eine reaktive Komponente, die leicht mit Proteinen reagieren kann.

Enzymatisch entsteht Superoxid in geringen Mengen als Nebenprodukt der mitochondrialen Zellatmung, weiterhin durch mischfunktionelle Oxidasen, zahlreiche Flavin-abhängige Oxidationsreaktionen, vermutlich durch die Cyclooxygenase sowie durch photosynthetische Sauerstoffreduktion. Pathophysiologisch von Interesse ist die Superoxidbildung durch Xanthinoxidase bei der postischämischen Gewebeschädigung. Eine wesentliche Rolle spielt Superoxid zudem bei der NADPH-abhängigen Sauerstoffreduktion durch Leukozyten und Makrophagen. Hier ist die Bildung von Superoxid normalerweise gering, während der Aktivierung und Phagozytose (respiratorischer Ausbruch) steigt sie jedoch um mehr als das Zehnfache an.

Nicht-enzymatisch erfolgt die Bildung von Superoxid bei der Autoxidation von Hydrochinonen, Catecholaminen, Leukoflavinen, Thiolen und Übergangsmetallen. Hämoglobin und Myoglobin werden als klassische Sauerstoff-transportierende Moleküle angesehen. Das Häm-Eisen kann in der Ferro (+2) oder Ferri (+3)-Oxidationsstufe vorliegen. Bei der Umwandlung zu den Ferri-Formen (Methämoglobin und Metmyoglobin) erfolgt langsame Freisetzung von Superoxid.

Wasserstoffperoxid entsteht durch Dismutation von Superoxid sowie durch verschiedene enzymatische Reaktionen, wie z.B. Monoaminoxidase-Reaktionen.

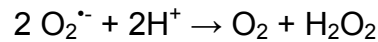
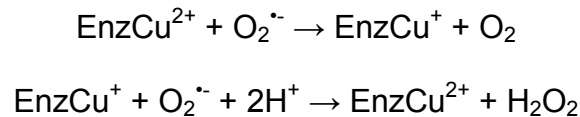
Das Hydroxyl-Radikal wird unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich durch Übergangsmetall-katalysierte Interaktion von Superoxid mit Wasserstoffperoxid oder Hydroperoxiden gebildet, z.B. in entzündetem Gewebe. Die Bildung von Hydroxyl-Radikalen ist daher z.B. von Eisen abhängig, dessen Verfügbarkeit extrazellulär durch Transferrin und intrazellulär durch Ferritin kontrolliert wird. Lysosomales Laktoferritin beschleunigt die Hydroxyl-Radikal-Bildung tausendfach. Als weitere biologische Quellen für das Hydroxyl-Radikal kommt der Zerfall von organischen Hydroperoxiden in Betracht. Ebenfalls Bedeutung für die Produktion von Hydroxyl-

Radikalen besitzen ionisierende Strahlen, da ein wesentlicher Teil der biologischen Strahlenwirkung auf der radiolytischen Erzeugung von Hydroxyl-Radikalen aus dem Zellwasser beruht.

1.5.2 Physiologische Inaktivierungsmechanismen⁸³

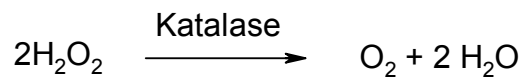
Entsprechend der Exposition gegenüber aktiven Sauerstoffspezies haben sich in den Zellen Entgiftungsmechanismen herausgebildet. Die beteiligten Enzyme stellen ein biologisches Antioxidanssystem dar, darüber hinaus verfügt der Organismus auch über nicht-enzymatische Antioxidantien (Scavenger). Hierzu gehören das membranständige α -Tocopherol, in der wässrigen Phase Ascorbinsäure und schliesslich β -Carotin. Enzymatische Antioxidantien sind im Organismus und im subzellulären Bereich spezifisch verteilt und besitzen hohe Aktivität in der Zelle. Charakteristisch für diese Enzymreaktionen ist die Beteiligung von Übergangsmetallen, die sowohl bei der Aktivierung als auch bei der Inaktivierung aktiver Sauerstoffspezies als Katalysatoren fungieren. Das in den letzten Jahren am intensivsten erforschte Enzym ist in diesem Zusammenhang die Superoxid-Dismutase (SOD). In Eukaryonten sind in erster Linie die im Zytosol lokalisierte Kupfer-Zink-SOD sowie die mitochondriale Mangan-SOD zu erwähnen. Das im kupferhaltigen Enzym befindliche Zink dient nur strukturellen Erfordernissen. Das positiv geladene Metallion (Kupfer oder Mangan) hat die Aufgabe, ein Elektron von einem negativ geladenen Superoxid auf ein anderes zu übertragen, da sich diese bei neutralem und alkalischen pH abstossen. Die elektrostatische Barriere wird damit umgangen:

⁸³ Müller, K. *Pharm. in u. Zeit* **1988**, 17, 71 - 80



Während intrazellulär gebildetes Superoxid rasch inaktiviert wird, hat die extrazelluläre Spezies eine gewisse Überlebenschance, da die extrazelluläre SOD-Aktivität extrem gering ist.

Katalase, ein Hämenzym, dient der Entgiftung von Wasserstoffperoxid und katalysiert dessen spontane Dismutation mit einer Steigerungsrate von 10^8 :



Katalase kontrolliert hauptsächlich den peroxisomalen Wasserstoffperoxid-Stoffwechsel. Das im Zytosol und in den Mitochondrien anfallende Wasserstoffperoxid wird durch Glutathionperoxidase (GPO) reduziert. Dabei entsteht aus Glutathion ein Disulfid, welches wiederum durch das Flavoprotein GSSG-Reduktase regeneriert wird:



Das Selenenzym Glutathionperoxidase reagiert aufgrund seiner geringen Substratspezifität zusätzlich mit physiologischen Hydroperoxiden wie Prostaglandin G_2 und Hydroxyperoxy-eicosatetraensäuren (HPETE).

1.5.3 Oxidativer Stress und Gefäßzellen

Eine strategisch wichtige Position zwischen dem zirkulierenden Blut und den Gefäßmuskelzellen nehmen die Endothelzellen ein. Sie sind somit den hämodynamischen Auswirkungen des arteriellen Blutdrucks und des Blutflusses in

besonderem Maße ausgesetzt. Eine Interaktion mit den Blut- und Gefäßwandzellen findet durch die Freisetzung von Mediatoren statt, welche die Funktion benachbarter Zellen beeinflussen. Innerhalb der Gefäßwand wird NO^{*} fast ausschliesslich in den Endothelzellen gebildet⁸⁷. Eine weitere Möglichkeit ist die Expression von Oberflächenmolekülen, die die Adhäsion zirkulierender Zellen vermitteln⁸⁴. Unter physiologischen Bedingungen werden über adhäsionshemmende, antikoagulante und fibrinolytische Mechanismen die Thrombozytenresistenz der Gefäßwand gesichert. Gleichzeitig erfolgt eine Kontrolle des Gefäßtonus bzw. Proliferation der glatten Muskelzellen durch relaxierende und wachstumshemmende Mediatoren. Kommt es jedoch zu einer Störung der Redox-Balance, sind Funktionsstörungen der Endothelzelle mit einer verringerten Vasorelaxation und einer verstärkten vaskulären Zelladhäsion die Folge^{85,86}. Eine reduzierte Bioverfügbarkeit von NO^{*} geht einher mit der oben beschriebenen Beeinträchtigung der Endothelfunktion. Neben der Vasorelaxation zählen auch andere potentiell protektive Wirkungen physiologischer NO^{*}-Konzentrationen in der Gefäßwand wie die Hemmung der Thrombozytenaggregation, Hemmung der Leukozytenadhäsion und Hemmung der Zellproliferation sowie Hemmung der Apoptose⁸⁷. Die Leukozyten-Endothel-Bindung wird durch Verminderung der Expression von Zelloberflächenadhäsionsmolekülen durch NO^{*} moduliert. Vasokonstriktion und Hypertension werden durch Superoxid gefördert, indem es den NO^{*}-Effekten entgegen wirkt, was wiederum zu einer Erhöhung des Thromboserisikos führt. Aufgrund von oxidativem Stress in vaskulären glatten Muskelzellen kommt es zu Proliferation und Hypertrophie in den entsprechenden Bereichen. Dabei scheint ein direkter Zusammenhang zwischen dem Zellwachstum und dem Ausmaß des oxidativen Stress zu bestehen, was

⁸⁴ Griendling, K.K., Alexander, R.W. *FASEB Journal* **1996**, 10(2), 283 - 92

⁸⁵ Liao, J.K. *Clin. Chem.* **1998**, 44, 1799 - 1808

⁸⁶ Münzel, T., Sayegh, H., Freeman, B.A., Tarpey, M.M., Harrison, D.G. *J. Clin. Invest.* **1995**, 1, 187 - 194

⁸⁷ Weber, M., Harrison, D.G., Kojda, G. *Mediz. Monats. F. Pharm.* **2000**, 23,1,12 - 17

vermuten lässt, dass die endotheliale Produktion von NO^{*} eine wichtige Schutzfunktion ausübt.

Heute ist bekannt, dass die Bioverfügbarkeit von NO^{*} in der Blutgefäßwand bei den häufigsten kardiovaskulären Erkrankungen deutlich eingeschränkt ist, wobei das Ausmaß dieser Einschränkung vom Schweregrad der Erkrankung abhängt⁸⁷. In allen Stadien von Gefässerkrankungen sind Vasokonstriktion, Leukozyten-Adäsion, Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen, LDL-Oxidation und Aktivierung der Blutplättchen Ausdruck des oxidativen Stress. Somit ist oxidativer Stress eng mit Krankheiten wie Atherosklerose und Restenose, sowie mit Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen einschliesslich Hyperlipidämie, Bluthochdruck, Diabetes mellitus und Rauchen verbunden^{88,89}.

1.5.3.1 Atherosklerose

Die bei weitem häufigste Ursache einer myokardialen Ischämie stellt eine inadäquate Sauerstoff-Zufuhr infolge Atherosklerose der großen Koronargefäße dar. Bei der Atherosklerose handelt es sich um eine komplexe, langsam fortschreitende Krankheit der Arterienwand, die zu Schlaganfall, Herzinfarkt und peripherem Gefäßverschluss führen kann als Antwort auf eine Dysfunktion des Endothels. Aus noch nicht geklärter Ursache kommt es zur Zunahme der Media- und Intimadicke als Folge von Flüssigkeits- und Fetteinlagerung, Makrophageneinwanderung und Muskelzellproliferation. Schon bei Kindern können erste Veränderungen festgestellt werden, die sogenannten fatty streaks, welche sich durch eine massive Ansammlung von lipidhaltigen Schaumzellen bilden. Schaumzellen sind cholesterinüberladene Makrophagen im subendothelialen Spalt⁹⁰. Makrophagen werden durch Aufnahme von modifizierten Lipoproteinen zu Schaumzellen transformiert. Ein bedeutender Mediator für Atherogenese, Plaqueprogression und Atherombildung ist hierbei das

⁸⁸ Griendling, K.K., Alexander R.W. *FASEB J.* **1996**, 10(2), 283 - 292

⁸⁹ Ross, R. *N. Engl. J. Med.* **1986**, 314, 488 - 500

⁹⁰ Ross, R., Wight, T.N., Strandness, E., Thiele, B. *Am. J. Pathol.* **1984**, 114, 79 - 93

oxidierte LDL (oxLDL)⁹¹. Glatte Muskelzellen werden von Wachstumsfaktoren aktiviert, die von dem geschädigten Endothel und angelagerten Blutplättchen abgegeben werden⁸⁹. Die mit LDL beladenen Makrophagen setzen Radikale, Proteasen und Lipasen frei, die das Eindringen von glatten Muskelzellen durch die elastische Membran fördern. Sie geben ihren kontraktile differenzierten Zelltyp auf und wandern aus der Media durch die interne elastische Lamina in die Intima. Als dedifferenzierte Muskelzellen bilden sie dort die Neointima⁹² und sezernieren verstärkt extrazelluläre Matrix⁹³. Über das Stadium des atherosklerotischen Plaques kommt es durch fortschreitenden Umbau der Arterienwand zu Gefäßstenosen. Bereits im 3. Lebensjahrzehnt können sich fibröse Plaques gebildet haben. Kennzeichen dieser Plaques ist ein zentraler nekrotischer Bereich, der durch eine fibromuskuläre Deckschicht zur Lumenseite hin abgeschlossen ist. Der nekrotische Bereich enthält Lipide, Cholesterinkristalle, Calciumablagerungen und eine grosse Anzahl von lipidbeladenen Makrophagen und Muskelzellen, während die fibromuskuläre Deckschicht aus eingewanderten glatten Muskelzellen, Makrophagen, Leukozyten und einem Verbund von Elastin, Kollagenfibrillen und Proteoglykan besteht. Die genannten Phänomene resultieren in der Bildung eines fibrösen Gewebes, des atherosklerotischen Plaques, der im fortgeschrittenen Stadium einreissen kann⁹⁴ und durch einen Thrombus abgedeckt wird. Im Laufe der Zeit können sich daraus komplizierte Läsionen mit Ulzerationen, Thrombosen, Hämorrhagien und Verkalkungen entwickeln. Meist sind Atherothrombosen als Finalstadium für den Gefäßverschluss verantwortlich⁹⁰.

Oxidativer Stress spielt eine bedeutende Rolle im Prozess der Plaqueprogression. Superoxid und Peroxynitrit führen zu einer Oxidation von LDL und induzieren

⁹¹ Ross, R. *Annual Review of Physiology* **1995**, 57, 791 - 804

⁹² Glakov, S., Weisenberg, E., Zarins, C.K., Stankunvicius, R., Kolettis, G.J. *N:Engl. J. Med.* **316**, 1371 - 1375

⁹³ Ang, A.H., Tachas, G., Campbell, J.H., Bateman, J.F. *Biochem J.* **1990**, 265, 461 - 469

⁹⁴ Fuster, V., Ross, R., Topol, E.J. *Atherosclerosis and coronary artery disease* **1996**, 1, Lippincott-Raven, Philadelphia, 492 - 510

endotheliale Dysfunktion. Über den Scavenger-Rezeptor nehmen Makrophagen und glatte Muskelzellen oxidierte LDL-Partikel auf. Oxidiertes LDL hemmt die endothelabhängige Relaxation. Die Kontraktion der glatten Muskelzellen ist abhängig vom Oxidationszustand des LDL. Heinle⁹⁵ konnte zeigen, dass oxLDL, wenn es direkt auf Gefäß-Segmente von normocholesterinämischen Kaninchen gegeben wurde, eine verstärkte Kontraktion hervorrief. Natives LDL dagegen hatte nur einen geringen Effekt auf die glatte Muskelzelle. Oxidiertes LDL, nicht jedoch natives LDL, vermindert die Expression der endothelialen NO^{*}-Synthase auf dem mRNA-Level⁹⁶. Außerdem stimuliert oxLDL die Synthese von Lactosylceramid, ein Glycosphingolipid, das in hohen Konzentrationen in fatty streaks und intimalen Plaques zu finden ist. Lactosylceramid kann als second messenger fungieren und über Aktivierung der NADPH-Oxidase zur vaskulären Zellproliferation und Superoxidproduktion führen⁹⁷. Interessanterweise wird in Makrophagen und glatten Muskelzellen atherosklerotischer Läsionen reichlich SOD und induzierbare NO^{*}-Synthase exprimiert. Dennoch ist eine oxidative Schädigung der Gefäßwand über Malondialdehyd-Lysin, Hydroxynonenal-Lysin und Nitrotyrosin nachweisbar. Diese Substanzen sind charakteristisch für oxLDL und peroxynitrit-modifizierte Proteine⁹⁸. Fukai⁹⁹ charakterisierte extrazelluläre SOD, die in atherosklerotischen Plaques gebildet wird, und fand eine neuartige Form mit einer Deletion von 10 Basenpaaren und einer Punktmutation. Die Funktion dieser veränderten SOD muss noch untersucht werden. Eventuell führen diese genetischen Veränderungen zu einer beeinträchtigten Wirkung. Auch andere endogene Oxidantien haben für die LDL-Oxidation und die Entstehung der Atherosklerose eine Bedeutung. In vitro-Untersuchungen mit Buthioninsulfoximin, einem Inhibitor der Glutathion-Synthese, demonstrierten eine signifikante Verminderung von Glutathion und der

⁹⁵ Heinle, H., Veigel, C., Tries, S. *Free rad. Res. Comm.* **1990**, 11(6), 281 - 286

⁹⁶ Liao, J.K., Shin, W.S., Lee, W.Y., Clark, S.L. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270 (1), 319 - 324

⁹⁷ Catterjee, S. *Ater. Thromb. Vasc. Biol.* **1998**, 18, 1523 - 1533

⁹⁸ Luoma, J.S., Stralin.P., Marklund., S.L. *Ater. Thromb. Vasc. Biol.* **1998**, 8, 157 - 167

⁹⁹ Fukai, T., Folz, R.J., Landmesser, U., Harrison, D.G. *Cardiovascular Research* **2002**, 55, 239 - 49

Glutathionperoxidase-Aktivität gepaart mit einem hohen Peroxidspiegel und einem Anstieg der LDL-Oxidation um das Doppelte. Andererseits bewirkt L-2-Oxothiazolidin-4-Carboxylsäure, die die Glutathion-Synthese durch Anstieg der intrazellulären Cystein-Konzentration erhöht, sowie Selen, das die Glutathionperoxidase-Synthese und –Aktivität fördert, eine Reduktion der LDL-Oxidation um die Hälfte. In vivo zeigten Apolipoprotein E-defiziente Mäuse bei Selen-Supplementierung eine 30%ige Reduktion der atherosklerotischen Plaquefläche¹⁰⁰. An der Entstehung und Progression der Atherosklerose können reaktive Sauerstoffspezies, wie z.B. Superoxid somit in vielfältiger Weise beteiligt sein. Zu der Entstehung des Krankheitsbildes kann sowohl Superoxid selbst als auch die durch Superoxid vermittelte Inaktivierung von NO^{*} und die Generierung des oxLDL beitragen.

1.5.3.2 Hypercholesterinämie

Hypercholesterinämie war der erste pathologische Zustand, der mit einer verminderten endothelabhängigen Vasorelaxation in Verbindung gebracht wurde⁸⁷. Cholesteringefütterte Kaninchen zeigten eine signifikante Erhöhung der Plasmalipidperoxidation¹⁰¹ und einen deutlichen Anstieg der Superoxidproduktion. Durch die Behandlung mit Probukol konnte der Superoxidspiegel normalisiert und die endothelabhängige vaskuläre Dysfunktion aufgehoben werden. L-Arginin, ein Vorläufer von NO^{*}, normalisiert die Superoxidbildung und erhöht den NO^{*}-Spiegel. Bei Patienten mit erblicher Hypercholesterinämie verbesserte sich durch 5-Methyltetrahydrofolat (essentieller Cofaktor für die NO^{*}-Produktion) die eingeschränkte endothelabhängige Vasodilatation dosisabhängig¹⁰². Weiterhin rief Hypercholesterinämie bei Ratten gesteigerte Entzündungsreaktionen hervor, die mit SOD und Oxypurinol vermindert werden konnten¹⁰³. Vieles spricht dafür, dass

¹⁰⁰ Rosenblat, M., Aviram, M. *Free Rad. Biol. Med.* **1998**, 24, 305 - 317

¹⁰¹ Heinle, H., Liebich, H. *Atherosclerosis* **1980**, 37, 637 - 640

¹⁰² Verhaar, M.C., Wever, R.M., Kastelein, J.J. *Circulation* **1998**, 97, 237 - 241

¹⁰³ Kurose, I, Wolf, R.E., Grisham, D.N., Grager, D.N. *Ater. Tromb. Vasc. Biol.* **1998**, 18, 1583 - 1588

zwischen den Veränderungen in der Balance zwischen vaskulärer NO[•]-Produktion und Superoxiden einerseits und Hypercholesterinämie und der koronaren Herzkrankheit andererseits ein Zusammenhang besteht⁸⁷.

1.5.3.3 Bluthochdruck

Bluthochdruck ist ein bedeutender Risikofaktor für kardiovaskuläre Krankheiten wie Atherosklerose¹⁰⁴. Erhöhter Druck auf die Gefäßwand stimuliert die Bildung vasoaktiver Substanzen, wie z.B. Endothelin-1 und Angiotensin II, die Funktion und Wachstum der Gefäßzellen verändern. Es kommt zur Verengung der Kapillaren, Vasokonstriktion und vaskulärer Hypertrophie¹⁰⁵. Durch die Verdickung der Media wird das Lumen eingeengt¹⁰⁶. Eine Reihe von Hinweisen für die Superoxidproduktion bei Bluthochdruck stammen von indirekten Nachweisen der Radikalbildung wie der Reduktion von NBT (Nitrobluetetrazolium)⁸⁷.

Bei Bluthochdruck wird im Endothel und in den Fibroblasten der Adventitia¹⁰⁷ verstärkt Superoxid gebildet, was zu einer Verschlechterung der Vasodilatation führt. Hypertensive Tiere zeigen außerdem einen Anstieg von Lipidperoxiden in der thorakalen Aorta und im Plasma sowie erniedrigte SOD-Aktivität. Behandlung mit α-Tocopherol bewirkt eine Erniedrigung des Blutdrucks und eine Reduktion des Lipidperoxidationsspiegels¹⁰⁸. Patienten mit Bluthochdruck hatten im Vergleich zur normotensiven Kontrollgruppe eine höhere Plasma-Glutathion-Peroxidase-Aktivität

¹⁰⁴ Collins, R., Peto, R., MacMahon, S., Herbert, P., Fiebach, N.H., Eberlein, K.A., Godwin, J., Qizilbash, N., Taylor, J.O., Hennekens, C.H. *Lancet* **1990**, 335, 827 - 838

¹⁰⁵ MacMahon et al. *Lancet* **1990**, 335, 765 - 774

¹⁰⁶ Strauer, B.E. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1992**, 19 (Suppl.), 67 - 80

¹⁰⁷ Di Wang, H., Hope, S., Du, Y., Quinn, M.T., Pagano, P.J., Cohen, R.A. *Hypertension* **1999**, 33, 1225 - 1232

¹⁰⁸ Newez, M.A., Nawal, N.N. *Am Hypertens.* **1998**, 12, 1480 - 1485

und Malondialdehyd-Spiegel im Plasma, jedoch niedrigere SOD-Aktivität und reduzierte Vitamin A- und E-Spiegel¹⁰⁹.

Hypertension ist eine sehr komplexe und multifaktorielle Erkrankung, bei der mehrere biologische Mechanismen betroffen sind. Dabei sind spezifische Gene, Wachstumsfaktoren, kardiale, nephrologische und neurologische Mechanismen beteiligt. Die Symptome der essentiellen Krankheitsform können nur medikamentös behandelt werden. Dementsprechend stehen für die Initial- oder Monotherapie der Hypertonie Diuretika, β -Blocker, ACE-Hemmer, Calcium-Antagonisten, α_1 -Blocker zur Verfügung¹¹⁰. Zu den Risikofaktoren zählen u.a. Erkrankungen der Niere, Diabetes, Gicht, Rauchen, übermäßiger Alkoholgenuss, Bewegungsarmut und Übergewicht.

¹⁰⁹ Russo, C. et al. *J Hypertens* **1998**, 16, 1267 - 1271

¹¹⁰ Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Förstermann, U., Starke, K. *Allg. u. spez. Pharm. u. Toxik.* **2001**, Urban & Fischer Verlag, München Jena, 8. Aufl.

1.6 Nachweisverfahren für Stickstoffmonoxid (NO[•])

Zum Nachweis von NO[•] sind unterschiedliche Verfahren beschrieben.

1.6.1 Biologische Verfahren

NO[•] ist ein potenter Aktivator der löslichen Guanylylcyclase (s.S.9). Diese Wirkung lässt sich zu einem Bioassay ausbauen, bei dem NO[•] nicht direkt, sondern indirekt über die Stimulation des Enzyms quantifiziert wird¹¹¹. Neben dieser häufig angewendeten Methode werden noch andere Methoden angewendet, wie z.B. die Hemmung der Thrombozytenaggregation¹¹², die Dilatationsmessung an isolierten Rattenaorten¹¹³ und die Koronarfluss-Messung an nach Langendorff präparierten Meerschweinchen- und Kaninchenherzen¹¹⁴. Vorteilhaft an diesen Methoden ist die hohe Empfindlichkeit (die Nachweisgrenze für NO[•] sinkt in den femtomolaren Bereich). Hinsichtlich Spezifität, Robustheit und Praktikabilität überzeugen diese Methoden meistens nicht: so ist z.B. NO⁻ ebenfalls in der Lage, die lösliche Guanylylcyclase zu aktivieren. Die Variabilität hinsichtlich Anwesenheit von Oxidations- und Reduktionsmitteln, sowie der Temperatur oder des pH-Wertes ist nicht immer gegeben. Ferner ist die Verwendung eines Tiermodells aufwändig und kostspielig.

¹¹¹ Arzt, J.D., Schmidt, B. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 21, 18253 - 18256

¹¹² Furlong, B., Henderson, A.M., Lewis, M.J., Smith, J.A. *Br. J. Pharmacol.* **1987**, 90, 687 - 692

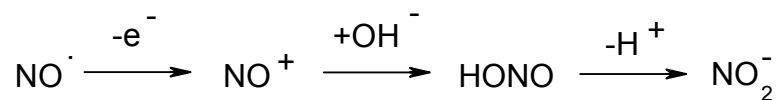
¹¹³ Voorde, J.V.d., Claeys, M., Leusen, I. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1989**, 14(Suppl.11), 55 - 61

¹¹⁴ Schrör, K., Förster, S., Woditsch, I., Schröder, H. *J. Cardiovasc Pharmacol.* **1989**, 14(Suppl.11), 29

1.6.2 Physikochemische Verfahren

Elektrochemische Detektion

$\text{NO}^\bullet$ gehört zu den elektrochemisch reaktiven Spezies, die an der Oberfläche einer Metall-, Kohlenstoff- oder kohlenstoffmodifizierten Anode oxidiert werden können. Die Oxidation von $\text{NO}^\bullet$ verläuft dabei über einen Eielektronentransfer von $\text{NO}^\bullet$ zur Anode, woraus ein Nitrosoniumkation (NO^+) resultiert, das unmittelbar danach in Nitrit (NO_2^-) umgewandelt wird:



Der aus der Oxidation von $\text{NO}^\bullet$ entwickelte Stromfluss ist direkt proportional zur $\text{NO}^\bullet$ Konzentration mit einer Nachweisgrenze von 10 nmol/l. Als Elektrodenmaterial werden modifizierte Clark-Sauerstoffelektroden oder mit Nickelpolyporphyrin beschichtete Kohlefasern eingesetzt. Eine selektive gaspermeable hydrophobe Membran wird verwendet, um $\text{NO}^\bullet$ die Diffusion zur Elektrodenoberfläche zu ermöglichen, während der Zugang für Nitrit und andere ionische Spezies durch eine negativ geladene Beschichtung begrenzt wird. Keine dieser Elektroden ist jedoch selektiv für $\text{NO}^\bullet$. Freie Thiole, Kohlenmonoxid (CO) und einige Sauerstoffspezies werden z.B. miterfasst. Die Methode der elektrochemischen Detektion wurde u.a. für die $\text{NO}^\bullet$ -Bestimmung in Zellkulturen¹¹⁵ wie auch für die Messung des $\text{NO}^\bullet$ -Ausstroms aus Koronargefäßen am isolierten Rattenherz¹¹⁶ angewendet.

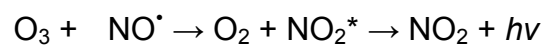
¹¹⁵ Tsukahara, H., Gordienko, M.S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, 193, 722 - 729

¹¹⁶ Engelman, D.T., Watanabe, M., Engleman, R.M., Rousou, J.A. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **1995** 110, 1047 - 1053

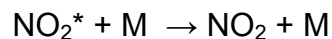
Chemilumineszenzdetektion von NO[•]

Nachweis in der Gasphase:

Dieses Verfahren ist in der Lage, ein lineares NO[•]-Signal über den gesamten Messbereich sowie ein kontinuierliches Signal spezifisch und mit kurzer Ansprechzeit zu liefern. Stickstoffmonoxid reagiert mit Ozon (O₃) zu Stickstoffdioxid (NO₂), wovon sich 20% im angeregten Zustand befinden. Während dieses angeregte NO₂^{*} wieder in den Grundzustand zurückkehrt, werden Lichtquanten (Chemilumineszenz) ausgesendet.

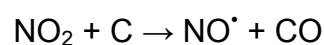


Die Strahlungsemission liegt im Wellenlängenbereich von 600 – 3000 nm mit einem Intensitätsmaximum bei ca. 1200 nm. Diese Chemilumineszenz wird photoelektrisch nachgewiesen. Bei einem Ozon-Überschuss ist das Signal proportional zur NO[•]-Konzentration. Der weitaus grösste Teil der angeregten Moleküle NO₂^{*} wird jedoch strahlungslos über Stösse mit anderen Molekülen (M) deaktiviert.



Um die Lichtausbeute zu erhöhen, wird der Druck in der Reaktionskammer herabgesetzt. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein NO₂^{*}-Molekül seine Anregungsenergie strahlungslos an einen Stosspartner M abgibt, steigt proportional mit dem Druck. Das Ausmaß dieses als „Quenching“ bezeichneten Effektes hängt außerdem von der Art des Stosspartners ab; z.B. „quenchen“ H₂O und CO₂ die angeregten Moleküle in stärkerem Maße als N₂ und O₂.

Um NO₂ in der Probenluft messen zu können, muss es vor der Messung in NO[•] umgewandelt werden. Damit diese Reduktion stattfinden kann, strömt das Gas durch einen Konverter, in dem eine Temperatur von 440°C herrscht. Enthält der Konverter beispielsweise Kohle als Reduktionsmittel, so läuft folgende Reaktion ab:



Die hohe Reaktionsgeschwindigkeit von $\text{NO}^\bullet$ mit Ozon ($\approx 10^7 \text{ l/mol}\cdot\text{s}$) und die extreme Empfindlichkeit der Chemilumineszenzdetektion ($\approx 100 \text{ pmol/l}$) erlauben eine kontinuierliche Bestimmung von $\text{NO}^\bullet$ in der Gasphase.

Um $\text{NO}^\bullet$ in wässrigen Proben zu quantifizieren, ist es nötig $\text{NO}^\bullet$ aus der flüssigen Phase in die Gasphase zu überführen. Das setzt voraus, dass $\text{NO}^\bullet$ sich rasch und vorzugsweise in die Gasphase verteilt. Die Henry-Konstante für $\text{NO}^\bullet$ beträgt 33,940 atm bei 37°C. Das bedeutet, dass 97% des $\text{NO}^\bullet$ -Gases sich in die Gasphase verteilen und nur 3 % in der flüssigen Phase zurück bleiben. Das Entweichen des $\text{NO}^\bullet$ aus der flüssigen Phase in die Gasphase wird durch das permanente Spülen der Lösung mit einem Trägergas (z.B. Stickstoff) bedeutend beschleunigt, welches dann in den Detektor geleitet wird.

Auch wenn das Gas $\text{NO}^\bullet$ unverzüglich vermessen werden kann, wird in biologischen Systemen $\text{NO}^\bullet$ häufig rasch zu Nitrat und Nitrit oxidiert. Um auch diese $\text{NO}^\bullet$ -Metaboliten zu detektieren wird Nitrat zunächst mit Hilfe der Nitratreduktase reduziert. Nitrit wird anschliessend mit Iodid unter sauren Bedingungen zu $\text{NO}^\bullet$ reduziert. Eine alternative Methode, um die $\text{NO}^\bullet$ Metaboliten auf diese Weise zu bestimmen, verwendet Vanadium(III) bei Raumtemperatur¹¹⁷.

Nachweis in homogener Lösung¹¹⁸:

Die Methode basiert auf der Bildung von Peroxynitrit aus $\text{NO}^\bullet$ und Wasserstoffperoxid. Peroxynitrit oxidiert Luminol. Im Verlauf der Reaktion bildet sich ein Aminophthalat-Derivat im angeregten Zustand, das unter Aussendung von Licht in den Grundzustand zurückkehrt:

¹¹⁷ Braman, R.S., Hendrix, S.A., *Anal. Chem.* **1989**, 61, 2751 - 2718

¹¹⁸ Kikuchi, K., Nagano, T., Hayakawa, H., Hirata, Y., Hirobe, M. *J. Biolog. Chem.* **1993**, 268, 23106 - 23110

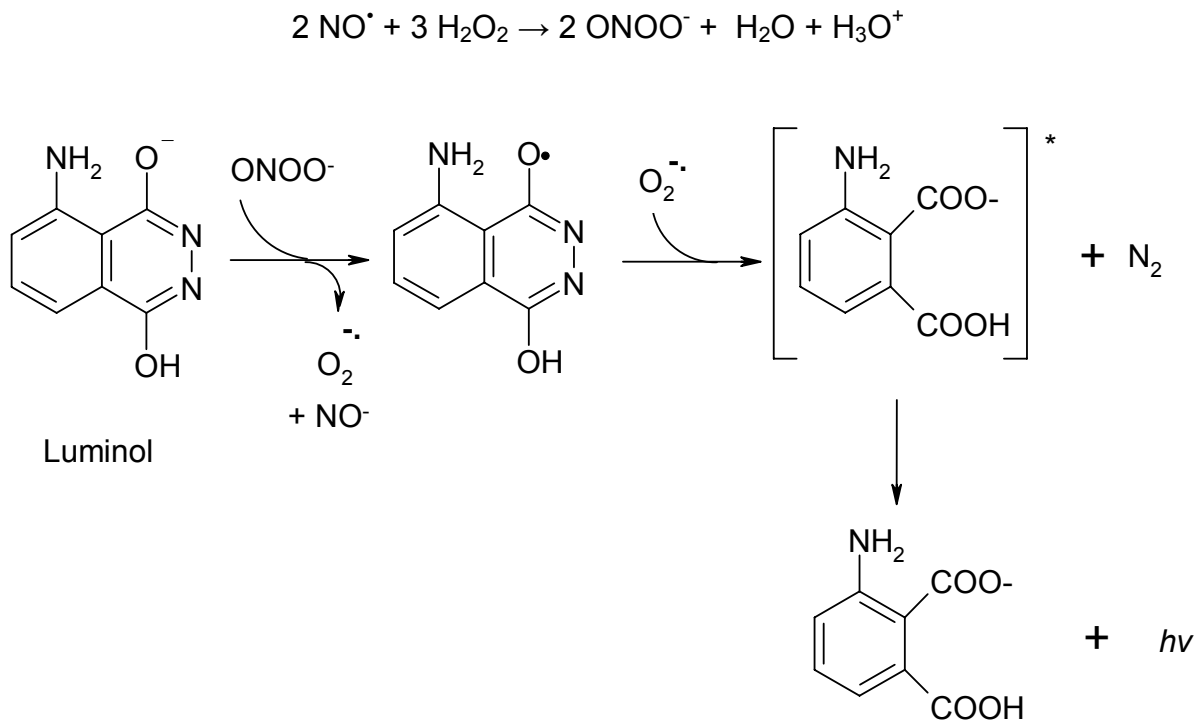


Abb. 16: Chemilumineszenz-Reaktion von Luminol

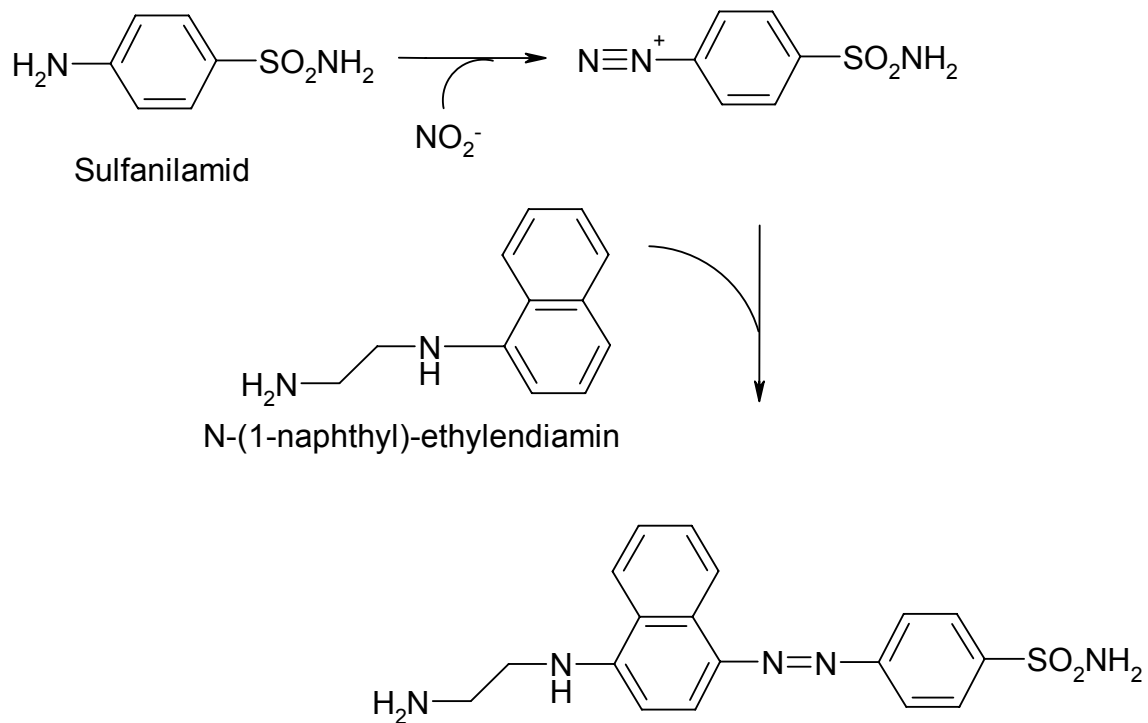
Die Empfindlichkeit dieser Bestimmungsmethode in homogener Lösung ist jedoch geringer als die Chemilumineszenz-Detektion von $\text{NO}^\bullet$ mit Ozon in der Gasphase.

1.6.3 UV/Vis-Spektroskopischer Nachweis

Griess Reaktion

Nitrit, ein stabiles Oxidationsprodukt von $\text{NO}^\bullet$, wird spektroskopisch mittels Griess-Reagenz quantifiziert. Nitrit reagiert in Mineralsaurer Lösung mit primären aromatischen Aminen (z.B. Sulfanilamid) zu Diazoniumsalzen, welche elektrophil an tertiäre aromatische Amine (z.B. Naphtylethylendiamin) kuppeln. Um sämtliche Produkte, die aus $\text{NO}^\bullet$ resultieren, zu bestimmen, muss Nitrat zu Nitrit reduziert werden. Dies geschieht üblicherweise mittels einer NADH abhängigen Nitratreduktase. Da NADH die anschließende spektroskopische Messung von Nitrit

stört, wird ein Überschuss an NADH durch eine LDH-katalysierte Reaktion mit Pyruvat entstört¹¹⁹.



Die Reaktion kann bei der Wellenlänge $\lambda = 548 \text{ nm}$ mithilfe eines Standardphotometers verfolgt werden und weist eine Sensitivität von 2 nmol/l auf. Die Auswertung erfolgt anhand von Eichgeraden.

Nitroxidradikale

NOXYL (6-tert-Buytl-4-caroxyl-2,2-diphenyl-1,2-dihydrochinoliny-1-oxyl) ist ein freies Radikal, das zum Nachweis von NO[•] geeignet ist. Bei Kontakt mit NO[•] reagiert es zu einem Hydroxylaminsalpetrigrsäureester, der spontan zu einem Aminylradikal zerfällt. Die stabilen Endprodukte der Reaktion von NO[•] mit NOXYL können mittels HPLC und UV/Vis-Detektion quantifiziert werden¹²⁰.

¹¹⁹ Medina, A., Nicholas, D.J.D., *Biochim Biophys Acta* **1957**, 23, 440 - 442

¹²⁰ Höbler, H., Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **1998**

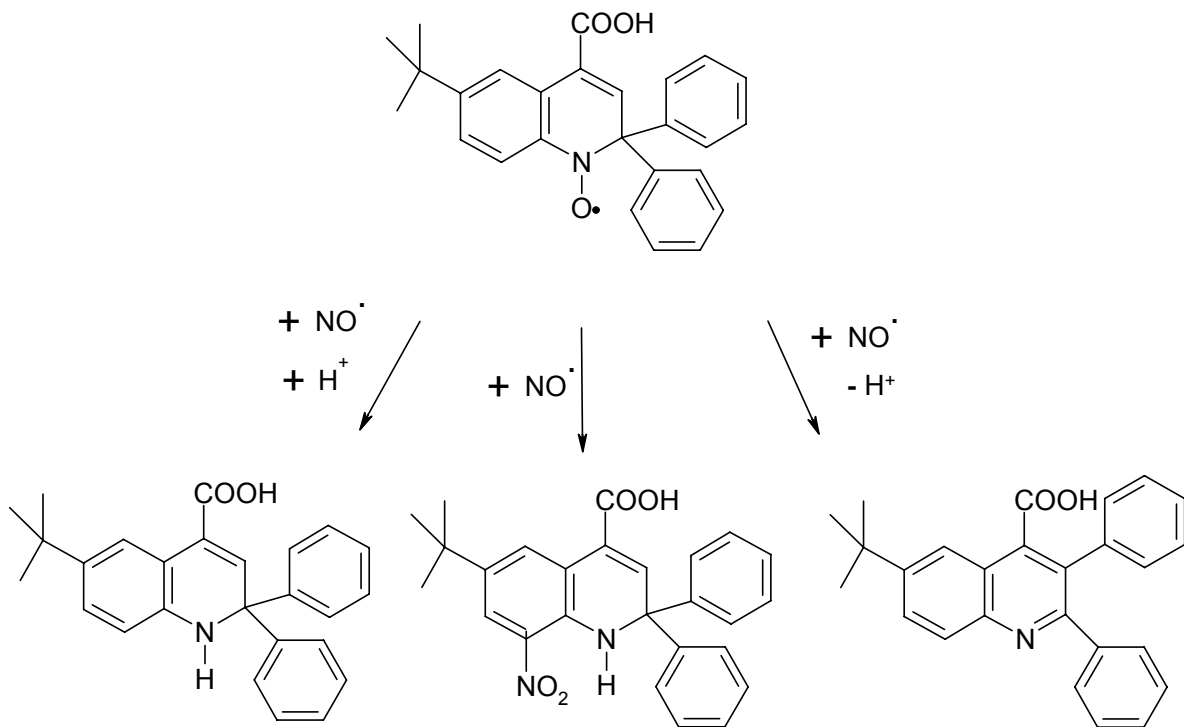
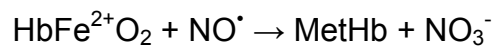


Abb. 17: Reaktion von NOXYL mit NO[•]

Methämoglobin-Methode

Die Reaktion von Oxyhämoglobin (HbO₂) mit NO[•] zur Bildung von Methämoglobin (MetHb) und Nitrat dient als Basis für diese weit verbreitete Methode zur Bestimmung von NO[•]¹²¹. Die rasche Reaktion von NO[•] mit HbO₂ (3,7x10⁷ l/mol*s) stellt sicher, dass in den meisten Fällen der NO[•]-Umsatz stöchiometrisch verläuft.



Für den Fall, dass Superoxid mit NO[•] konkurrieren, werden >100 U/ml SOD zugesetzt, wodurch die Effektivität der Methode erhöht wird und eventuelle Redoxreaktionen des Hämoglobins mit Superoxid begrenzt werden¹²². Eine

¹²¹ Feelisch, M., Stamler, J.S. in "Methods in Nitric Oxide Research", J.Wiley & Sons, **1996**, Part VI

¹²² Sutton, H.C., Roberts, P.B., Winterbourn, C.C. *Biochem J.* **1976**, 155, 503 - 510

Alternative dazu stellt die Möglichkeit dar, $\text{NO}^\bullet$ und Superoxid mittels MetHb-Bildung und Cytochrom-C Reduktion zu bestimmen¹²³. Verschiedene photometrische Methoden wurden angewandt, um die $\text{NO}^\bullet$ -abhängige Bildung von Methämoglobin zu bestimmen. Dabei werden zwei verschiedene Wellenlängen, nämlich 401/410 nm mit einer Bandbreite von 1 nm verwendet. Unter diesen Voraussetzungen liegt die Nachweisgrenze bei ca. 1 nmol/l $\text{NO}^\bullet$. Das Absorptionsspektrum von Methämoglobin ist jedoch pH-abhängig, so dass der pH-Wert während der Bestimmung unbedingt konstant gehalten werden muss.

1.6.4 ESR-Spektroskopischer Nachweis

Nitrosylkomplexe

$\text{NO}^\bullet$ bildet mit Übergangsmetallen, insbesondere dem Eisen, sog. Übergangsmetall-Nitrosylkomplexe. Abhängig von ihrer Struktur zeigen diese charakteristische Elektronen-Spin-Resonanzspektren (ESR-Spektren), mit deren Hilfe $\text{NO}^\bullet$ qualitativ und quantitativ bestimmt werden kann. In vivo wird häufig der Diethyldithiocarbamat-Fe(II)-Komplex verwendet, dessen hydrophobe Eigenschaften sich vorteilhaft auf die Vasopermeabilität auswirken.

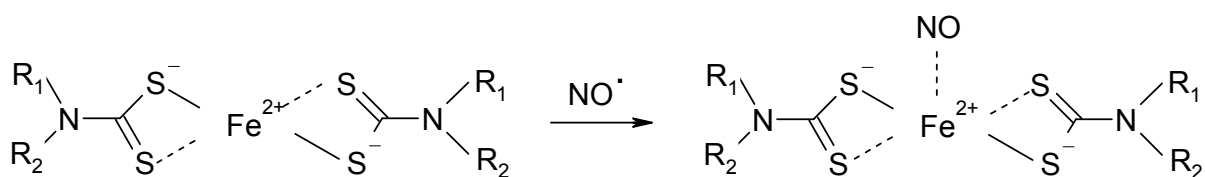


Abb. 18: $\text{NO}^\bullet$ -Nachweis mit Dithiocarbamat-Fe(II)-Komplexen

¹²³ Klem, M., Dahmann, R., Wink, D., Feelisch, M. *J Biol Chem* **1997**, 272, 9922 - 9932

Da alle Eisenkomplexe nicht die nötige Empfindlichkeit aufweisen, können nur unphysiologisch (pathologisch) hohe $\text{NO}^{\bullet}$ -Konzentrationen auf diese Weise nachgewiesen werden.

1.6.5 Fluoreszenz-Spektroskopischer Nachweis

Diaminofluoreszeine (DAF's) reagieren mit $\text{NO}^\bullet$ bei Anwesenheit von Sauerstoff unter Ausbildung einer Triazolgruppe zu fluoreszierenden Produkten. Streng genommen handelt es sich hierbei nicht um einen direkten $\text{NO}^\bullet$ -Nachweis, sondern um eine elegant modifizierte Griess-Reaktion. Die Quantenausbeute dieser Produkte (DAFT) ist um den Faktor 180 erhöht gegenüber den eingesetzten Diaminofluoreszeinen. Die Esterfunktion der DAF's bedingt eine gute Membranpermeabilität. Im Zytoplasma wird die Esterfunktion von intrazellulären Esterasen gespalten, was zu einer Anreicherung der DAF's im Zytosol führt. Der Einsatz der DAF's hat sich für den $\text{NO}^\bullet$ -Nachweis in verschiedenen Endothelzellen sowie in Hippocampuszellen von Ratten bewährt^{124,125}.

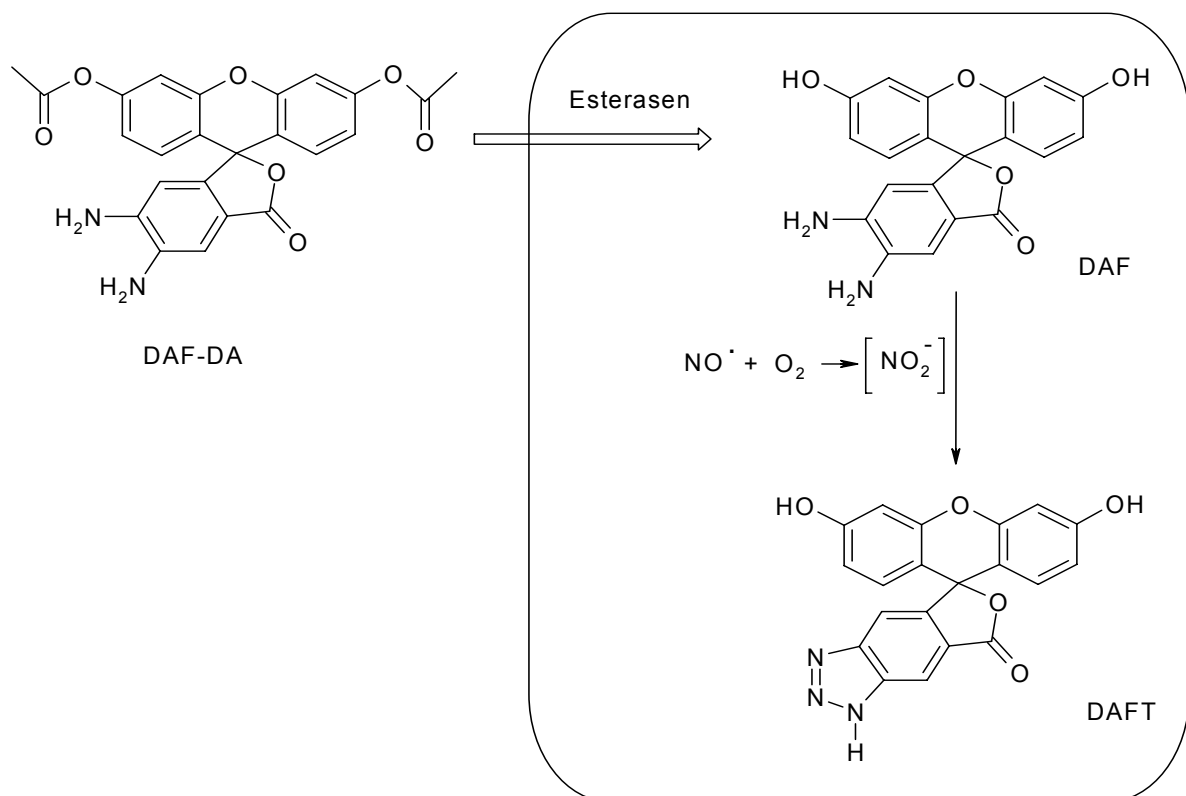


Abb. 19: Zelleinschleusung von DAF-DA und intrazelluläre Reaktion mit $\text{NO}^\bullet$

¹²⁴ Sugimoto, K., Fiji, S. *Cell. Biol.* **2000**, 113, 341 - 347

¹²⁵ Kojima, H., Hirotsu, M. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 1967 - 1973

1.6.6 Wertung der verschiedenen Nachweismethoden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein $\text{NO}^\bullet$ -Detektionsverfahren benötigt, mit dem eine kontinuierliche und über einen längeren Zeitraum hinweg erfolgende $\text{NO}^\bullet$ -Freisetzung aus den entwickelten $\text{NO}^\bullet$ -Donoren spezifisch und mit hoher Empfindlichkeit detektiert werden konnte. Dieses Verfahren sollte zudem unabhängig vom pH-Wert, evtl. vorhandener Redoxäquivalente und Temperatur der Probelösung sein. Aus diesen Gründen bot sich die $\text{NO}^\bullet$ -Detektion mittels der Chemilumineszenz-Methode in der Gasphase an (s.S.45). Die in der wässrigen Lösung freigesetzten Mengen $\text{NO}^\bullet$ werden dabei mit dem Trägergas aus der Lösung ausgetrieben und in den $\text{NO}^\bullet$ -Detektor geleitet. Damit ist eine räumliche Trennung vom Ort der $\text{NO}^\bullet$ -Freisetzung und der $\text{NO}^\bullet$ -Detektion gegeben, was die Unabhängigkeit des Detektorsignals von den oben genannten Einflussfaktoren gewährleistet. Hinsichtlich der Empfindlichkeit ist diese Methode kaum zu überbieten, da hiermit noch $\text{NO}^\bullet$ -Mengen im ppb-Bereich sicher detektiert werden können.

Eine weitere Anforderung an die Messmethode ist sicherlich die spezifische Detektion von $\text{NO}^\bullet$. Die Spezifität der Chemilumineszenz für $\text{NO}^\bullet$ ist bis heute unübertroffen. Die kommerziell erhältlichen Chemilumineszenz-Messgeräte zeichnen sich durch eine außerordentlich hohe Selektivität gegenüber anderen Gaskomponenten aus.

Aufgrund dieser Eigenschaften war die Chemilumineszenz-Detektion in der Gasphase die Methode der Wahl für die vorliegende Arbeit.

2 Ziel der Arbeit

Wie in der Einleitung ausführlich dargestellt, besitzt NO^* in der Biochemie, Physiologie und Pathophysiologie grosse Bedeutung. Bei der Therapie der Koronaren Herzkrankheit werden heute verschiedene Nitrate als Prodrugs eingesetzt, die enzymatisch unter Verbrauch von Thiolgruppen NO^* freisetzen. Auffälliger Nachteil einer solchen Therapie ist die dabei auftretende Nitrattoleranz.

Bei lebensbedrohenden hypertensiven Krisen oder zur kontrollierten Hypotension bei Operationen wird in der Klinik Nitroprussid-Natrium als spontaner NO^* -Donor eingesetzt. Lediglich für das in der Dauertherapie eingesetzte Molsidomin wird ein NO^* -Freisetzungsmechanismus diskutiert, in dessen Verlauf es zu einem Verbrauch an Oxidationsäquivalenten kommt.

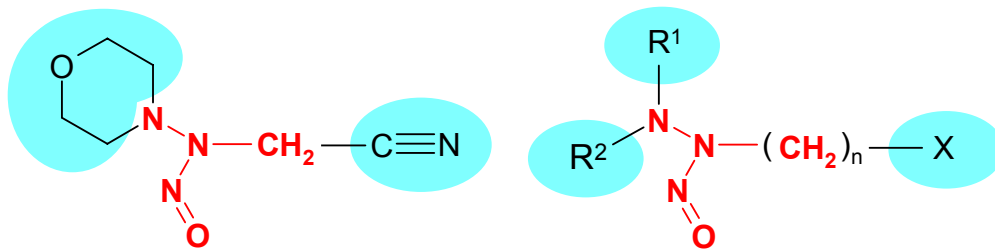
Ferner wurde in der Einleitung auf die pathologischen Zustände hingewiesen, die mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht werden können. Häufig besteht ein enger Zusammenhang zwischen den schädlichen Auswirkungen reaktiver Sauerstoffspezies und der unzulänglichen Bereitstellung von endogenem Stickstoffmonoxid, sowohl lokal als auch kausal: als Beispiel sei hier nur auf das komplexe Bild der endothelialen Dysfunktion hingewiesen (s.1.5.3; S. 35).

Während die Versorgung mit dem endogen gebildeten NO^* in den nicht geschädigten Gefässen noch gewährleistet ist, kommt es dort unter einer Nitrat-Therapie zur weiteren Erhöhung der NO^* -Konzentration. In der Folge sinkt in den noch gut durchbluteten Gefässen der Perfusionsdruck durch weitere Dilatation ab, so dass Blut aus den poststenotischen Bezirken abgeleitet wird. Ein solches negatives Umverteilungsphänomen wird klinisch auch „Steal-Effekt“ genannt.

Dieses Problem könnte dadurch umgangen werden, dass man einen NO^* -Donor einsetzt, der nicht reduktiv oder spontan und ungezielt, sondern nur in solchen Bezirken NO^* freisetzt, in denen die endogene NO^* -Produktion ohnehin als Folge von oxidativem Stress nicht ausreicht. Eine solche NO^* -Freisetzung wäre demnach an das Vorhandensein eines größeren Pools von Oxidationsäquivalenten gebunden.

Die einzige in Deutschland in der Therapie der koronaren Herzkrankheit eingesetzte Substanz, die NO^* auf oxidativem Weg freisetzt ist bisher das Molsidomin (s.Abb. 9; S.20). Zur Oxidation reicht hier jedoch schon molekularer Sauerstoff aus. Das bei dieser Reaktion gleichzeitig entstehende Superoxid trägt jedoch selbst zur

Inaktivierung von zytoprotektivem $\text{NO}^\bullet$ und zur Bildung von zytotoxischem Peroxynitrit bei.



SIN-1A
Aktiver Metabolit von Molsidomin

Nitrosohydrazinderivate
als Modellsubstanzen

	R^1	R^2	n	X
Typ A	Methyl	Methyl	1	(heteroanaloge) Carbonylfunktionen
Typ B	Methyl	Methyl	2	(heteroanaloge) Carbonylfunktionen
Typ C	Phenyl	Methyl	1	Carbonylfunktionen
Typ D	Phenyl	Methyl	1	Aryl (R-substituiert)

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, das im SIN-1A vorliegende Strukturelement eines N,N-disubstituierten N'-Nitrosohydrazins mit entsprechenden unterschiedlichen Substituenten (R^1 , R^2 und X) so abzuwandeln, dass dadurch nach Möglichkeit die Freisetzung von Stickstoffmonoxid ($\text{NO}^\bullet$) durch Oxidation günstig beeinflusst wird. Dabei wurde angestrebt, dass eine Autoxidation mit Sauerstoff möglichst unterbleibt.

Die Freisetzungskinetik der Modellsubstanzen sollte in Lösung unter kontrollierten Standardbedingungen mit Hilfe der Chemilumineszenz-Methode bestimmt werden.

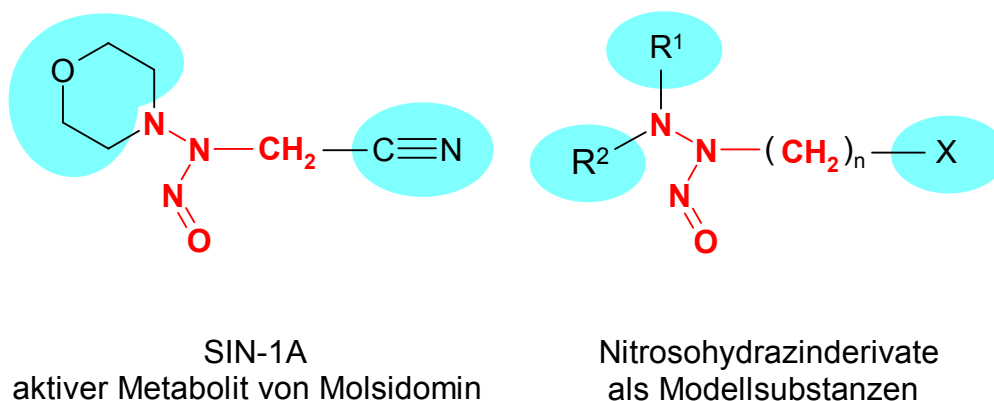
Dazu war im Einzelnen erforderlich:

- Synthese und analytische Charakterisierung verschiedener Hydrazine mit Hilfe adäquater Methoden
- Darstellung und möglichst vollständige Charakterisierung der entsprechenden Nitroso-Derivate (Modellsubstanzen)
- Ausarbeitung einer geeigneten Standardmethode zur Bestimmung der *in-vitro*-Freisetzung von NO[•] an geeigneten Beispielen
- Einrichtung eines Messplatzes zur kontinuierlichen Messung der Freisetzungskinetik von NO[•] aus den Modellsubstanzen mit Hilfe der Chemilumineszenz-Methode
- Auswertung der Ergebnisse in Hinblick auf die Ableitung von Zusammenhängen zwischen der Struktur der neuen NO[•]-Donoren und ihrem NO[•]-Freisetzungsverhalten.

3 Chemisch-allgemeiner Teil

3.1 Modellsubstanzen

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das im SIN-1A enthaltene Strukturelement eines N,N-disubstituierten N'-Nitrosohydrazins mit entsprechenden unterschiedlichen Substituenten (R^1 , R^2 und X) so abzuwandeln, um dadurch nach Möglichkeit die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO^*) durch Oxidation günstig zu beeinflussen.



1

Modell- substanzen	R^1	R^2	n	X
Typ A	Methyl	Methyl	1	(heteroanalogue) Carbonylfunktionen
Typ B	Methyl	Methyl	2	(heteroanalogue) Carbonylfunktionen
Typ C	Phenyl	Methyl	1	Carbonylfunktionen
Typ D	Phenyl	Methyl	1	Aryl (R-substituiert)

Die Darstellung der Nitrosohydrazine sollte durch Nitrosierung der entsprechenden Hydrazine erfolgen, die ebenso wie die Nitrosoderivate weitestgehend unbekannt waren.

3.1.1 Modellsubstanzen vom Typ A

Diese Gruppe weist die grösste Analogie zur Struktur von SIN-1A auf. Der Morpholinrest wird durch die Dimethylaminogruppe ersetzt. Als Substituenten X sollten außer der Nitrilgruppe auch eine Carbonamid- bzw. eine Carboxylfunktion eingeführt werden.

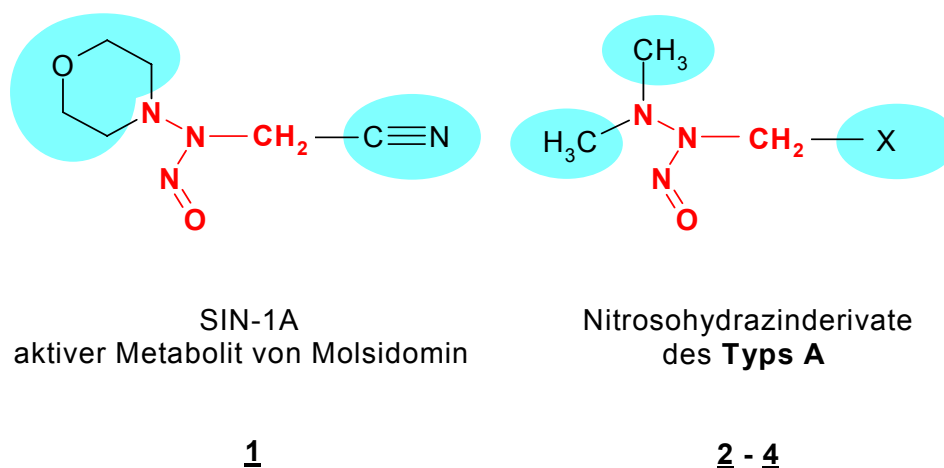
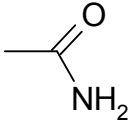
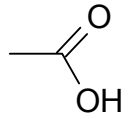


Abb. 20: Strukturvergleich von Nitrosohydrazinderivaten vom Typ A mit SIN-1A

Bezeichnung	X
<u>2</u>	$\text{—C}\equiv\text{N}$
<u>3</u>	
<u>4</u>	

In die Gruppe A gehört ebenfalls das Sydnonimin **6**, das als Analoges zum SIN-1 leicht aus **2** dargestellt werden kann (s.Abb. 23):

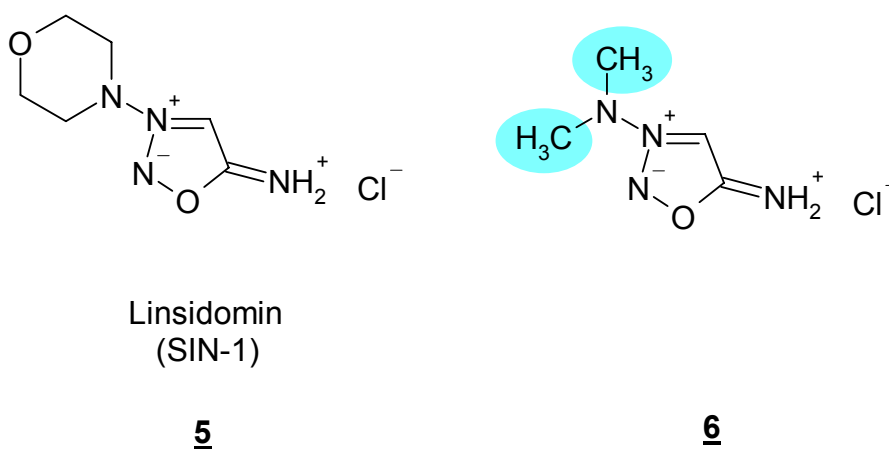


Abb. 21: Strukturvergleich von **6** mit SIN-1

3.1.1.1 Synthese und Eigenschaften der Hydrazine vom Typ A

Zur Synthese der Nitrosohydrazinderivate vom Typ A mussten zunächst die entsprechenden Hydrazinderivate als Edukte hergestellt werden.

Als einfachster Weg zu dem als gemeinsamem Edukt fungierenden Nitril **7** erwies sich die aus der Literatur bekannte Cyanalkylierung von 1,1-Dimethylhydrazin, die das gewünschte Produkt als ölige „Mannichbase“ in guter Ausbeute liefert, die aus dem Ansatz mit Diethylether extrahiert werden kann. Sie liefert ein analysenreines Hydrochlorid.

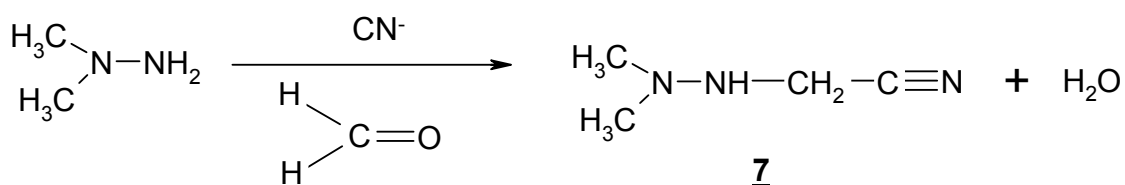


Abb. 22: Darstellung von **7**¹²⁶

¹²⁶ Masuda, K., Imashiro, Y., Kaneko, R., *Chem. Pharm. Bull.* **1970**, *18*, 128-132

Daraus konnten durch alkalische bzw. saure Hydrolyse die übrigen Hydrazine (**9** und **8**) in dieser Reihe zugänglich gemacht werden:

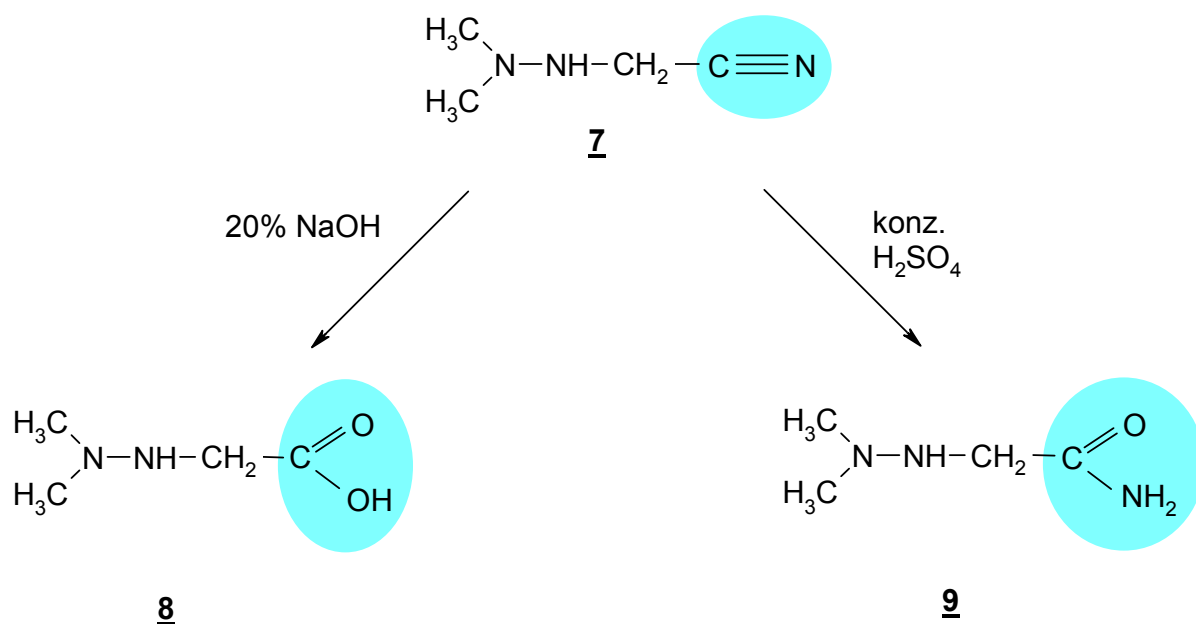


Abb. 23: Synthese der Hydrazine **8** und **9** des Typs A

Die sehr hydrophilen Hydrazine **8** und **9** konnten nur aus dem zur Trockene eingeeengten neutralen Ansatz der jeweiligen Hydrolysereaktion als Öle isoliert werden. Die bekannte Eigenschaft von Hydrazinen, durch Autoxidation in die entsprechenden Hydrazone überzugehen, zeigte sich bei den beiden Hydrazinen **8** und **9** in besonderem Maß. Um einerseits die Stabilität und andererseits die analytische Reinheit der öligen Substanzen zu verbessern, wurde versucht, die entsprechenden Hydrochloride herzustellen. Dabei konnte das Amid **9** als analysenreines Hydrochlorid kristallisiert werden, während entsprechende Versuche mit **8** fehlschlagen.

Spektroskopische Eigenschaften:

Die mittels Elektronenstossionisation aufgenommenen Massenspektren der kristallinen Hydrazinhydrochloride von **9** und **7** zeigen ebenso wie das ölige Hydrochlorid von **8** praktisch keine intakten Molekülonen. Die Fragmentierung ist

wenig charakteristisch. Dagegen tritt in allen Spektren ein Basispeak als Fragment mit $m/z = 59$ auf, das für die Dimethylhydrazinstruktur charakteristisch ist.

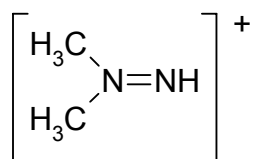


Abb. 24: Mögliche Struktur des Bruchstücks $m/z = 59$

Die IR-Spektren der Hydrazin-Hydrochloride von **8** und **7** zeigen neben intensiven NH-Banden der protonierten Hydrazinstruktur bei 3628 und 3683 cm^{-1} die erwarteten Absorptionsbanden für das Nitril bei 2255 cm^{-1} (KBr) und für die Carbonsäure bei 1744 cm^{-1} (Chloroform). Für das Hydrazinamid **9** wird eine intensive und breite Doppelbande um 1670 cm^{-1} und 1560 cm^{-1} (Chloroform) detektiert.

Die ^1H -NMR-Spektren der drei Hydrazine lassen sich nur teilweise miteinander vergleichen, da nicht alle Verbindungen als Hydrochloride gemessen wurden. Die in Tab. 1 wiedergegebenen Daten lassen jedoch eindeutig die beiden maßgeblichen Effekte auf die chemische Verschiebung der Resonanzsignale erkennen: den induktiven Effekt des Substituenten X einerseits und den Einfluss der Protonierung am Hydrazinstickstoff andererseits.

	X	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagdown \\ \text{N}— \\ \diagup \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	$—\text{NH}-\text{CH}_2-\text{X}$
7 HCl	CN	2,92 (s)	4,29 (s)
9 HCl	CONH ₂	2,84 (s)	3,64 (s)
8	COO ⁻	2,61 (s)	3,13 (d)

Tab. 1: Chemische Verschiebung [ppm] der Protonensignale in den Hydrazinen des Typs A

Ein weiterer Unterschied zeigt sich in der Kopplung der Methylenprotonen mit dem NH-Proton der Hydrazingruppe. Bei den beiden Hydrochloriden kommt es zu einem schnellen Austausch der NH-Protonen mit dem in der Probe stets enthaltenen Wasser, so dass kein NH-Signal geortet werden kann und die Methylenprotonen als Singulett erscheinen. Dagegen scheint der Austausch bei der Carbonsäure **8** so verlangsamt, dass das NH ein Triplett und die Methylenprotonen ein Dublett ergeben, welches sich nach dem D₂O-Austausch zu einem Singulett vereinfacht.

An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass aufgrund der raschen Oxidation des Hydrazins **8** zu dem entsprechenden Hydrazon **8a** stets nur ein Gemisch der beiden Komponenten isoliert werden konnte. Da **8a** jedoch auf unabhängigem Weg in reiner Form synthetisiert und charakterisiert werden konnte, war eine eindeutige Zuordnung der Signale in den ¹H-NMR-Spektren der beiden Komponenten möglich.

In Abb. 25 ist exemplarisch für die Hydrazine der Gruppe A das Kernresonanzspektrum von dem Hydrochlorid **9** dargestellt.

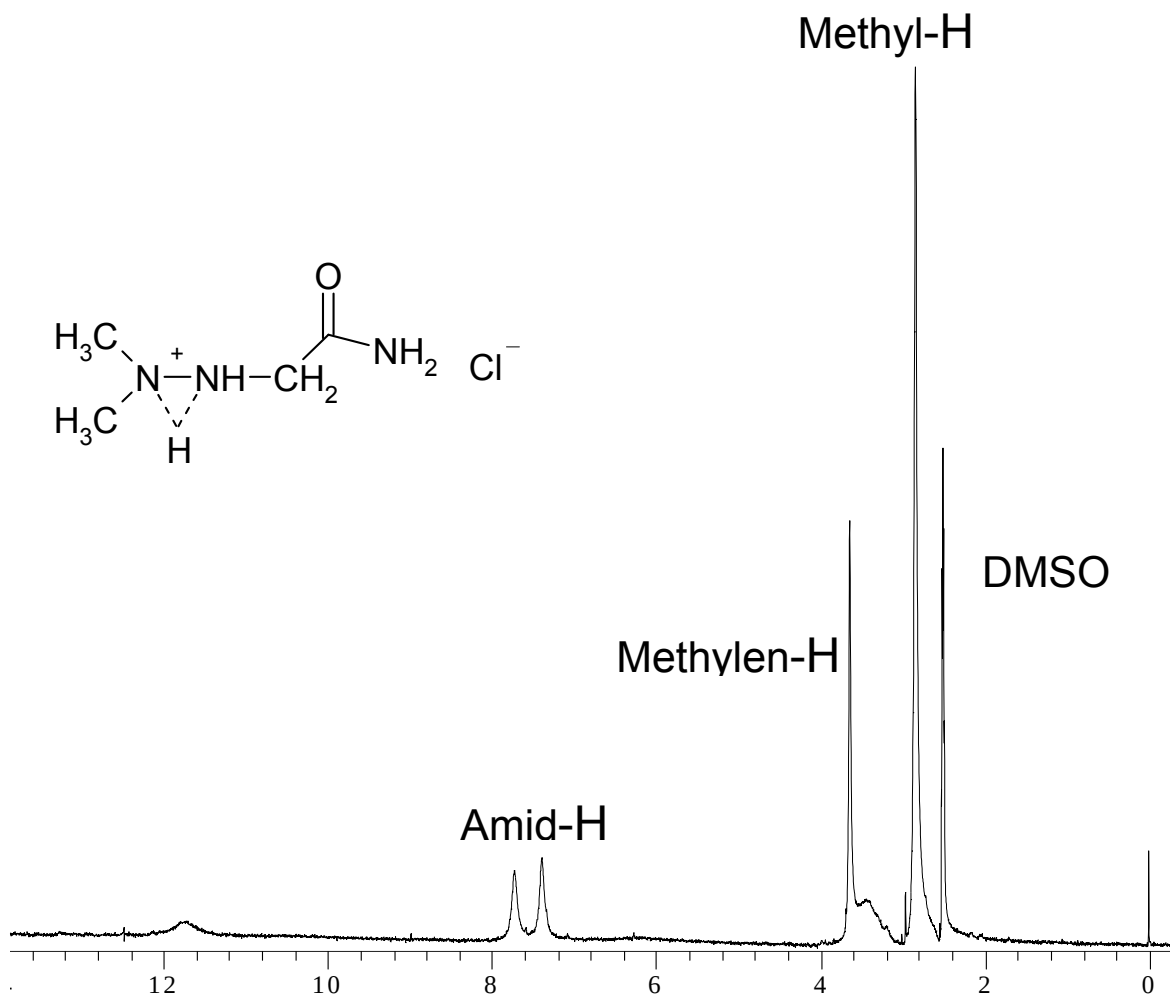


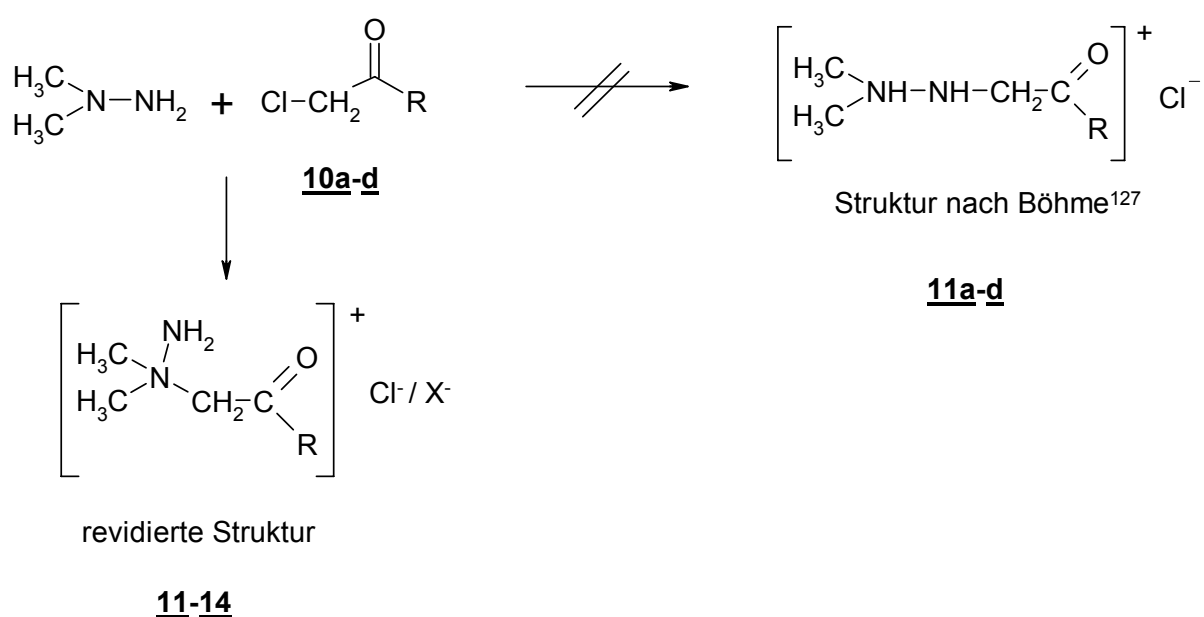
Abb. 25: 200MHz ^1H NMR-Spektrum vom Hydrochlorid **9** (d_6 -DMSO)

3.1.1.2 Hydrazinoessigsäure-Derivate nach Böhme und Martin¹²⁷: Eine Strukturrevision

Im Gegensatz zu der unter 3.1.1.1 beschriebenen Darstellung der gewünschten Derivate führte der von Böhme und Martin für diesen Zweck angegebene Syntheseweg über eine Alkylierung von 1,1-Dimethylhydrazin mit Chloressigsäurederivaten nicht zum Erfolg. Danach erhält man zwar die von den Autoren beschriebenen Produkte was die physikochemischen und spektroskopischen Daten anbelangt, doch muss die Struktur revidiert werden, da sich eine Diskrepanz zu den unter 3.1.1.1 und in den späteren Kapiteln beschriebenen Verbindungen ergibt. Die nach Böhme¹²⁷ hergestellten Substanzen (s. Abb. 26) lassen sich weder aus einer wässrigen Lösung noch aus dem Trockenrückstand mit Chloroform oder Ethylacetat extrahieren. Sie können nur aus

dem wasserfreien Rückstand mit Ethanol extrahiert werden und zeigen auch bei der DC auf Kieselgel ein abnormes Verhalten: selbst mit sehr polaren Fließmitteln bleiben sie am Startfleck „sitzen“.

Die Massenspektren zeigen keinerlei Moleküllionen, wogegen Fragmente mit $m/z = 57$, 58 und 59 hier jeweils den Basispeak (bzw. Peaks sehr hoher Intensität) ergeben. Auch die IR-Spektren sehen eher „unverdächtig“ aus, da sich die Ester- und Amidcarbonylbanden bei ca. 1740 bzw. 1670 cm^{-1} in üblichen Bereichen wieder finden.

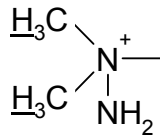
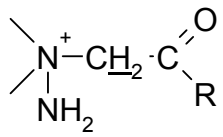


	X	R
11	ClO ₄	-O-CH ₂ -CH ₃
12	ClO ₄	-O-CH ₂ -C ₆ H ₅
13	Cl	-NH-CH ₂ -C ₆ H ₅
14	---	-O ⁻

Abb. 26: Revidierte Struktur der Hydrazine nach Böhme und Martin¹²⁷

¹²⁷ Böhme, H., Martin, F. *Arch. Pharmaz.* **1974**, 307, 277-281

Dagegen liefern die ^1H -NMR-Spektren den Beweis für die Quartärstruktur der Reaktionsprodukte: unabhängig vom Anion X^- - zur besseren Kristallisation wurden die Chloride in einigen Fällen in die Perchlorate verwandelt – weisen die Signale der Dimethylhydrazin- und Methylenprotonen eine deutliche Tieffeldverschiebung gegenüber den tertiären Hydrazinen auf, selbst wenn letztere in protonierter Form vorliegen.

Substanz	X	R		
14 ¹⁾	---	$-\text{COO}^-$	3,23	3,68
13 ¹⁾	Cl	$-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$	3,42	4,41
11 ²⁾	ClO_4	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	3,72	4,73
12 ²⁾	ClO_4	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$	3,74	4,82

Tab. 2: ^1H -NMR-Daten der quartären Hydraziniumsalze ($\delta[\text{ppm}]$ gegen TMS in $\text{DMSO}-d_6$ ¹⁾ bzw. in Aceton- d_6 ²⁾)

Aus Tab. 2 ist ersichtlich, dass die paramagnetische Verschiebung der Protonen der beiden äquivalenten Methylgruppen im Fall der vergleichbaren Carbonsäuren (**14** vs. **8**) über 0,6 ppm und die der Methylenprotonen 0,55 ppm beträgt (s. Tab. 1, S.64). Ähnliche Verhältnisse findet man beim Vergleich von **13** mit dem Hydrochlorid des primären Amids **9**. Die entsprechenden Perchlorate der Ester **11** und **12** zeigen – wie nicht anders erwartet – eine noch ausgeprägtere Tieffeldverschiebung der beiden Protonensignale (s.Tab. 2).

In allen Fällen lassen sich diese Effekte auf die direkte Nachbarschaft der betrachteten Protonen zum quartären Stickstoff-Zentrum der Hydrazinium-Struktur zurückführen, wobei der Rest R an der Carbonylgruppe einen zusätzlichen Einfluss ausübt. Damit müssen die seinerzeit von Böhme vorgeschlagenen Strukturen revidiert werden.

3.1.1.3 Synthese und Eigenschaften der Nitrosohydrazine vom Typ A

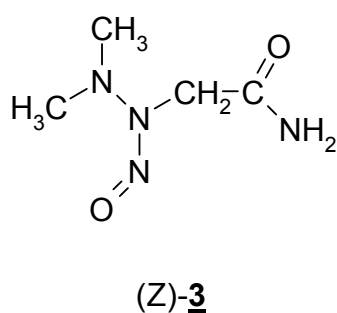
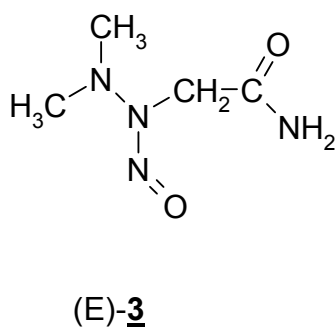
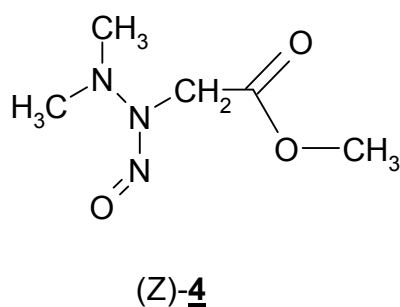
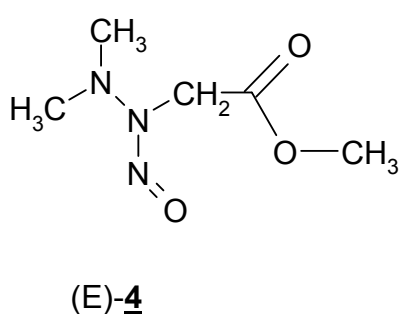
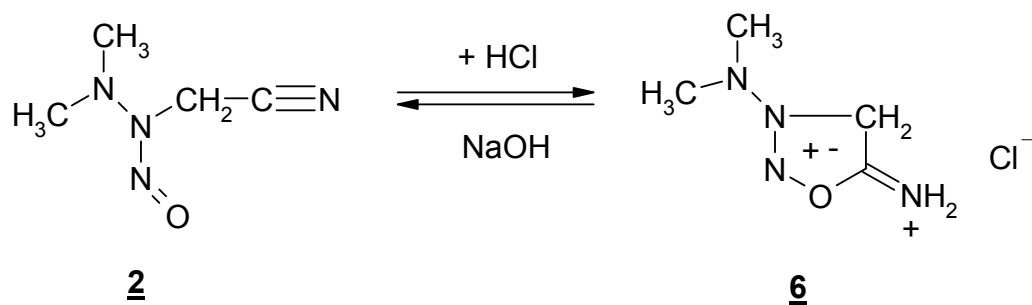


Abb. 27: Struktur der Nitrosohydrazine vom Typ A

Ein häufig verwendetes Reagenz zur Nitrosierung von Hydrazinen ist Salpetrige Säure in wässriger Lösung bei einem pH < 5. Der zugrunde liegende Reaktionsmechanismus wurde intensiv untersucht. Weder Salpetrige Säure noch Nitrit reagieren direkt mit den Hydrazinen. Zunächst bildet sich das nitrosierende Agens aus einem nukleophilen Katalysator und protonierter Salpetriger Säure. In Gegenwart von z.B. Iodidionen oder Thiocyanationen ist die Reaktionsgeschwindigkeit der Nitrosierung erhöht. In Abwesenheit solcher

Nukleophile kann das Nitrition selber als Katalysator fungieren, wobei sich als reaktives Agens Distickstofftrioxid bildet.

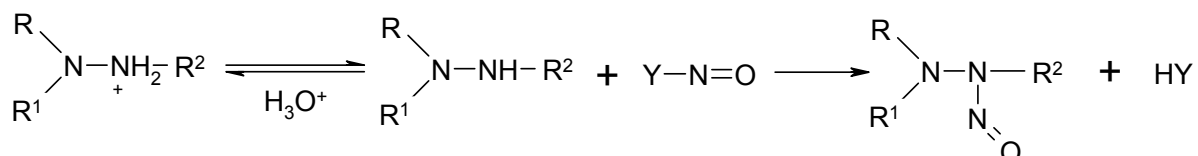
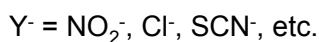
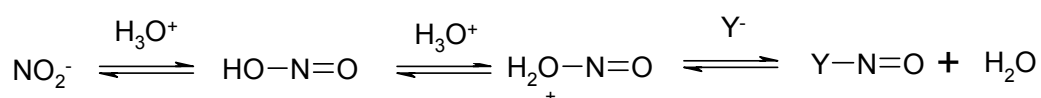


Abb. 28: Mechanismus für die Nitrosierung von Hydrazinen in wässriger Salpetriger Säure

Die säurekatalysierte Nitrosierung der Hydrazine lieferte die entsprechenden Nitrosohydrazinderivate des Typs A (s. Abb. 27). Aufgrund der zu den Ausgangshydrazinen **9** und **8** erhöhten Lipophilie der Nitrosohydrazine, konnten diese durch flüssig/flüssig-Extraktion aus den Nitrosierungsansätzen mit Diethylether als Öle extrahiert werden.

Bei der säurekatalysierten Nitrosierung von **7** entsteht zunächst das ölige Nitrosohydrazinderivat **2**, das durch Lösen in methanolischer Salzsäure und Einengen der Lösung im Vakuum zum kristallinen Sydnonimin **6** cyclisiert. Durch Alkalisieren wird das Nitril zurück erhalten.

Spektroskopische Eigenschaften:

Das EI-Massenspektrum von **6** zeigt keinen Molpeak, jedoch wird unter anderem ein für Sydnonimine typisches Fragment mit $m/z = 54$ detektiert¹²⁸.

¹²⁸ Yashuniskii, V.G., Kholodov, L.E., *Russian Chemical Review* **1980**, 49, 28 - 45

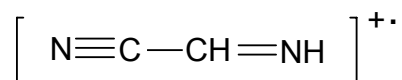


Abb. 29: Mögliche Struktur des Bruchstücks $m/z = 54$

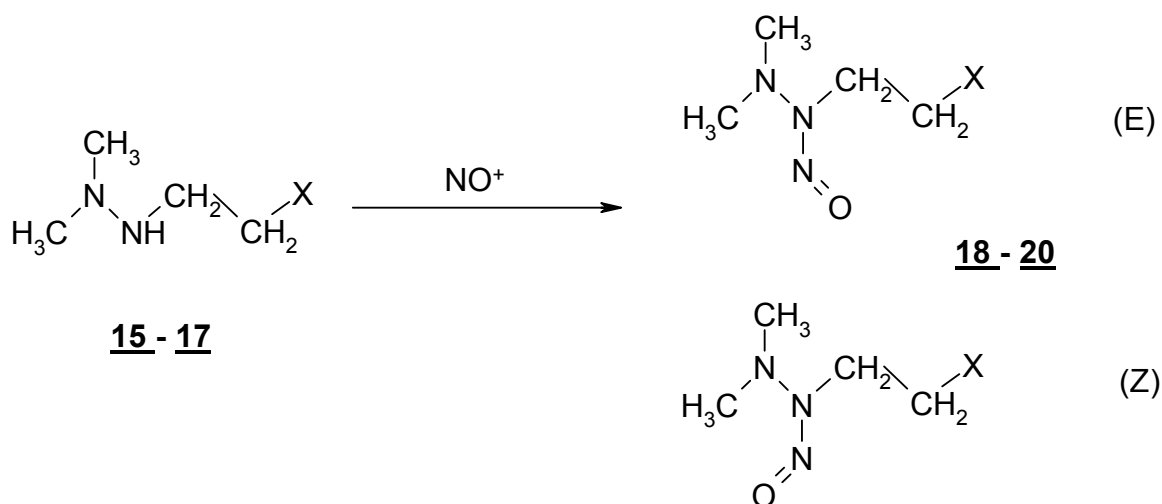
Im IR-Spektrum von **6** lassen sich der Valenzschwingung der exo-cyclischen Imin-Bindung eine breite, intensive Bande bei $1670 - 1680 \text{ cm}^{-1}$ zuordnen. Die Valenzschwingung der Iminium-Gruppe absorbiert bei 1570 cm^{-1} .

Im ^1H -NMR-Spektrum von **6** kommt der Wasserstoff wie in Sydnoniminringen üblich bei 8,26 ppm, die Protonen der Dimethylamingruppe bei 3,38 ppm zur Resonanz.

Obwohl die für die NMR-Spektren hergestellten Lösungen der Nitrosohydrazine vom Typ A aufgrund ihrer Instabilität stets einen unterschiedlichen Anteil der entsprechenden Hydrazone enthielten, ließen sich die Signale eindeutig zuordnen, da die reinen Hydrazone als Vergleichsubstanzen zur Verfügung standen. Dennoch waren die ^1H -NMR-Spektren der Nitrosohydrazine wegen der auftretenden Rotamere nicht ganz einfach zu interpretieren. Da diese Problematik auch in allen anderen beschriebenen Nitroso-Derivaten auftrat, sollen die NMR-Spektren der verschiedenen Typen in einem späteren Kapitel (Kap.3.2) gesondert beschrieben werden.

3.1.2 Modellsubstanzen vom Typ B

Bei dieser Gruppe von Modellsubstanzen handelt es sich um N,N-Dimethylhydrazinopropionsäure-Derivate als Homologe des Typs A, bei denen die funktionelle Gruppe X um eine weitere Methylengruppe vom nitrosierten Hydrazinstickstoff N' abrückt. Als Substituenten X sollte außer der Nitrilgruppe auch eine Carbonamid- bzw. eine Carbonsäureesterfunktion eingeführt werden.



Hydrazine vom Typ B	X	Nitrosohydrazine vom Typ B
15	$-\text{C}\equiv\text{N}$	18
16	$-\text{C}(=\text{O})\text{O}-\text{CH}_3$	19
17	$-\text{C}(=\text{O})\text{NH}_2$	20

Abb. 30: Struktur der Modellsubstanzen vom Typ B

Für die Synthese der Nitrosohydrazine wurden zunächst die entsprechenden Hydrazine nach Literaturmethoden hergestellt.

3.1.2.1 Synthese und Eigenschaften der Hydrazine vom Typ B

1,1-Dialkylhydrazine reagieren mit aktivierten Alkenen in Abhängigkeit der Substituenten je nach den Reaktionsbedingungen entweder zu den gewünschten

1,1,2-Trialkylhydrazinen oder zu quartären Hydraziniumsalzen^{129,130}. So konnten das Nitril **15** und das Amid **17** in rein wässriger Lösung bei RT als farblose, ölige Substanzen in guten Ausbeuten dargestellt werden.

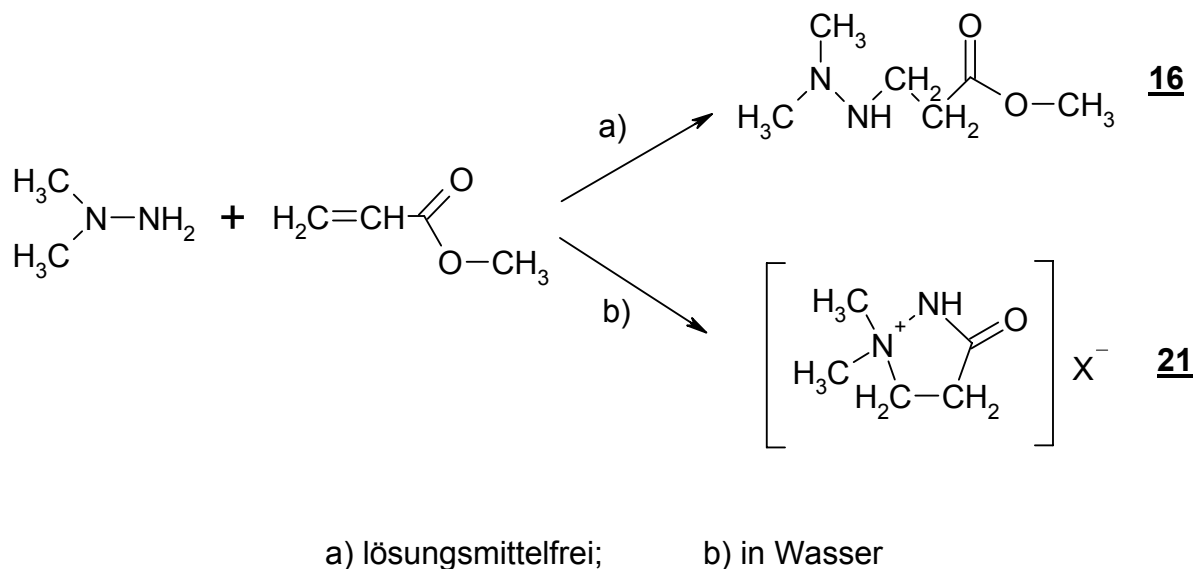


Abb. 31: Lösungsmittel-abhängige Reaktion von N,N-Dimethylhydrazin und Methacrylat

Dagegen resultierte unter diesen Bedingungen beim Acrylsäuremethylester ein Produkt mit völlig anderen Eigenschaften, das als kristallines Oxalat charakterisiert werden konnte. Nach einer bevorzugten Hydrolyse des Esters resultiert hier im sauren Reaktionsmilieu das quartäre Pyrazolidinon **21**¹²⁹, das als Oxalat kristallisiert und charakterisiert werden konnte.

Schließlich gelang die Darstellung des Esters **16**, indem die Komponenten ohne Lösungsmittel zur Reaktion gebracht wurden (s. Abb. 31). Mittels ethanolischer Oxalsäurelösung konnten alle Hydrazine dieses Typs in kristalline Salze überführt werden.

¹²⁹ Le Berre, A., Porte, C., *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1976**, 476 - 482

¹³⁰ Giller, A. et al., *Chem. Heterocycl. Comp.* **1975**, 11, 1378 - 1382

Spektroskopische Eigenschaften der Hydrazine vom Typ B

Die mittels Elektronenstossionisation (70eV) aufgenommenen Massenspektren zeigen jeweils den Molpeak mit geringer Intensität. Der Basispeak ist jedoch in allen Fällen ein Fragment mit $m/z = 45$, bzw. $m/z = 44$. Außerdem wird jeweils auch das Bruchstück mit $m/z = 59$ mit hoher Intensität registriert (vgl. die Hydrazinoessigsäure-Derivate S. 68).

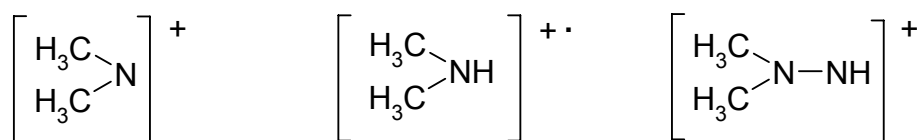


Abb. 32: Mögliche Strukturen der Bruchstücke $m/z = 44$, $m/z = 45$ und $m/z = 59$

In Abb. 33 ist exemplarisch für die Hydrazine der Gruppe B das Massenspektrum von dem Oxalat **15** dargestellt.

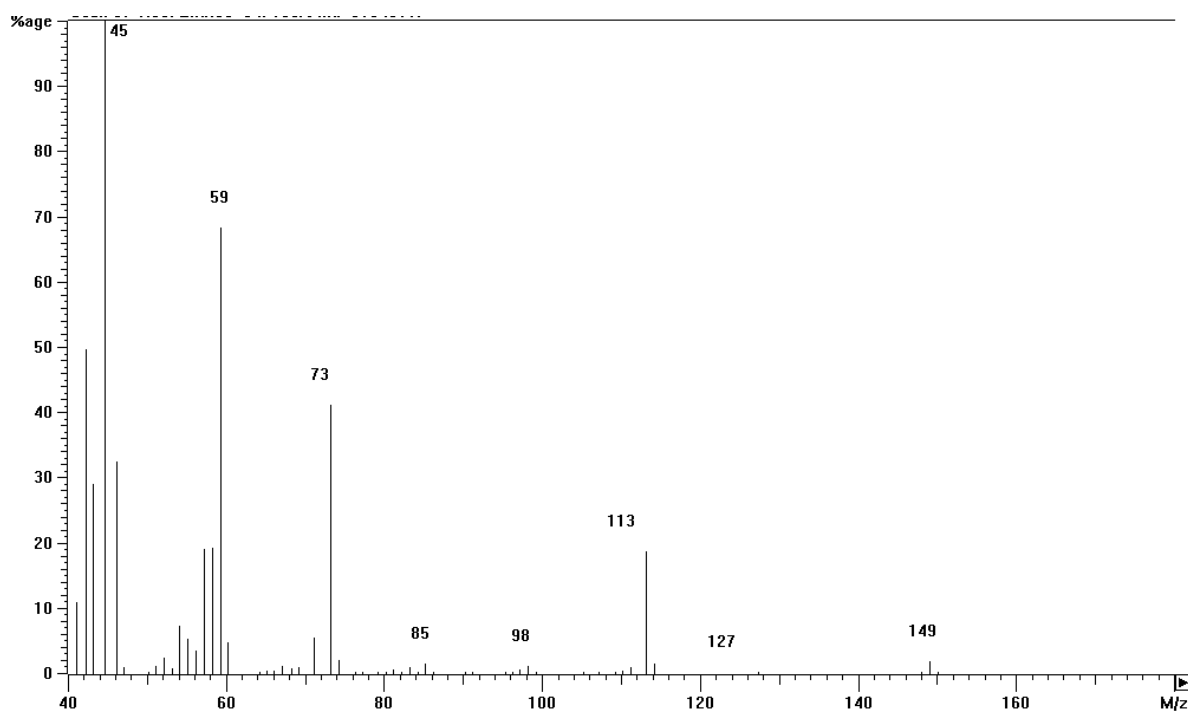


Abb. 33: MS-Spektrum vom Oxalat **15**

In den Infrarotspektren der Hydrazine lassen sich die funktionellen Gruppen durch die charakteristischen Absorptionsbanden belegen (Tab. 3).

In den ^1H -NMR-Spektren der Hydrazine ist der induktive Einfluss der Substituenten X auf die benachbarten Methylenprotonen deutlich erkennbar (Tab.3).

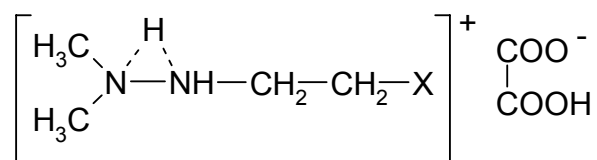


Abb. 34: Allg. Struktur der Hydraziniumhydrogenoxalate der Gruppe B

				^1H -NMR (DMSO; δ ppm)		
	X	M ⁺ [%]	IR (KBr; ycm^{-1})	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagdown \\ \text{N} - \\ \diagup \\ \text{H}_3\text{C} \end{array}$	$-\text{NH}-\text{CH}_2-$	$-\text{CH}_2-\text{X}$
15	-CN	18,6	2250	2,60	2,98	2,63
16	-COOCH ₃	29,4	1735	2,66	3,09	2,52
17	-CONH ₂	1,2	1624, 1674	2,69	3,08	2,33

Tab. 3: Spektroskopische Daten der Hydraziniumhydrogenoxalate vom Typ B

In Abb. 35 ist exemplarisch für die Hydraziniumhydrogenoxalate der Gruppe B das Kernresonanzspektrum von **17** dargestellt.

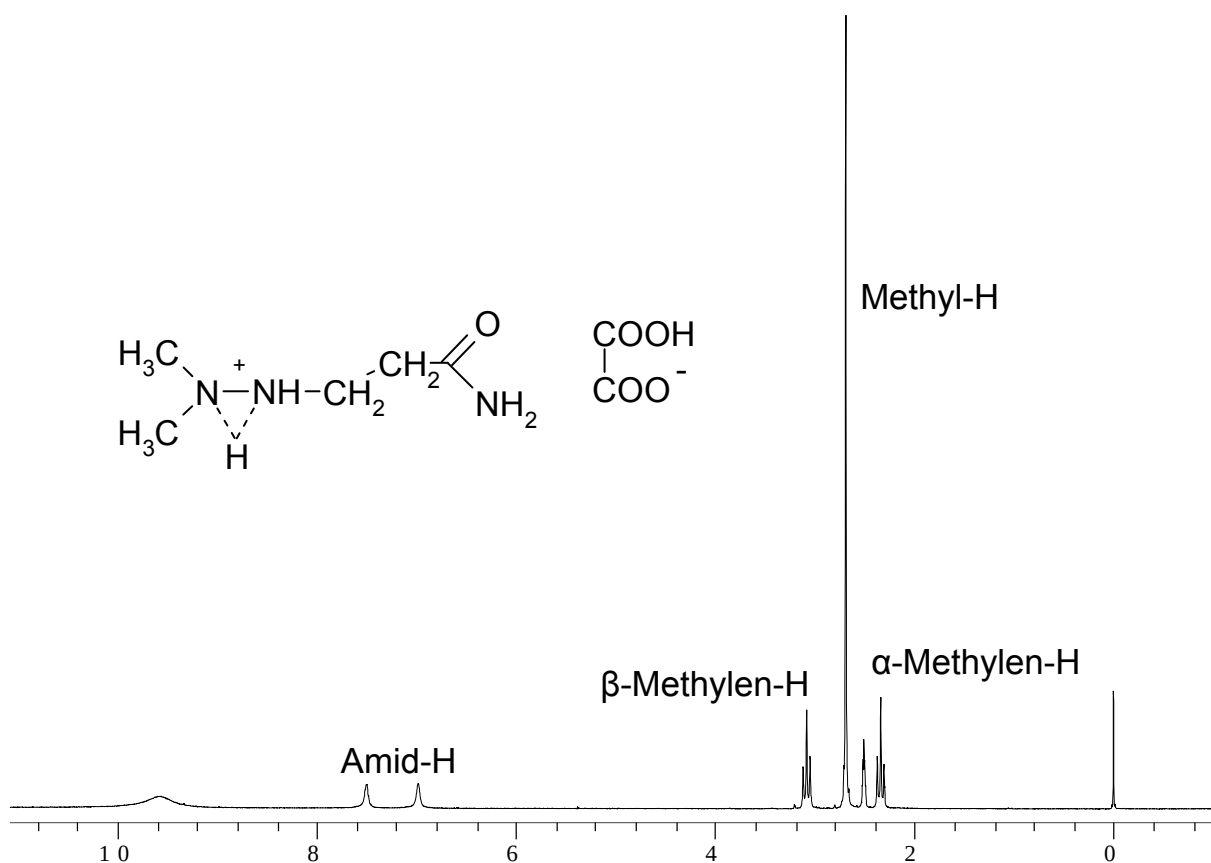
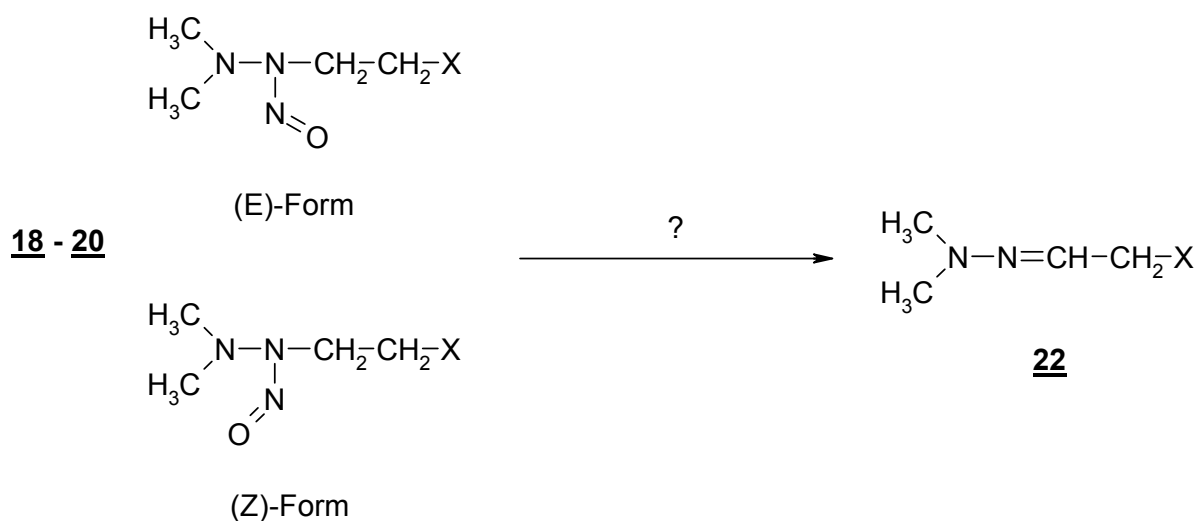


Abb. 35: 200MHz ¹H NMR-Spektrum vom Hydraziniumhydrogenoxalat **17** ($\text{d}_6\text{-DMSO}$)

3.1.2.2 Synthese und Eigenschaften der Nitrosohydrazine vom Typ B

Die Nitrosohydrazine wurden aus den entsprechenden Hydrazinen mittels sauer katalysierter Nitrosierung dargestellt (s.S.69).



Nitrosohydrazin	X	Hydrazon
18	-CN	---
19	-COOCH ₃	22
20	-CONH ₂	---

Abb. 36 Zerfall der Nitrosohydrazine vom Typ B

Bei den untersuchten Nitrosohydrazinen des Typs B handelt es sich durchweg um ölige Substanzen. Schon kurze Zeit nach ihrer Isolierung war eine langsame Zersetzung zu den entsprechenden Hydrazonen zu beobachten (DC), die selbst bei schonender Lagerung unter Lichtausschluss bei -20°C auftrat. Alle Versuche, die Nitrosohydrazine mittels Oxalsäure, Salzsäure oder Perchlorsäure in kristalline Salze zu überführen, schlugen fehl.

Spektroskopische Eigenschaften der Nitrosohydrazine vom Typ B:

In den EI-Massenspektren aller Derivate konnte kein Moleküllion detektiert werden, was auf einen sehr leichten Zerfall der Verbindungen schliessen lässt. Im Spektrum von **20** bildet ein Fragment mit $m/z = 30$ den Basispeak, was von der abgespaltenen NO-Gruppe herrühren kann. Im Spektrum von **19** zeigt sich ein Fragment mit sehr

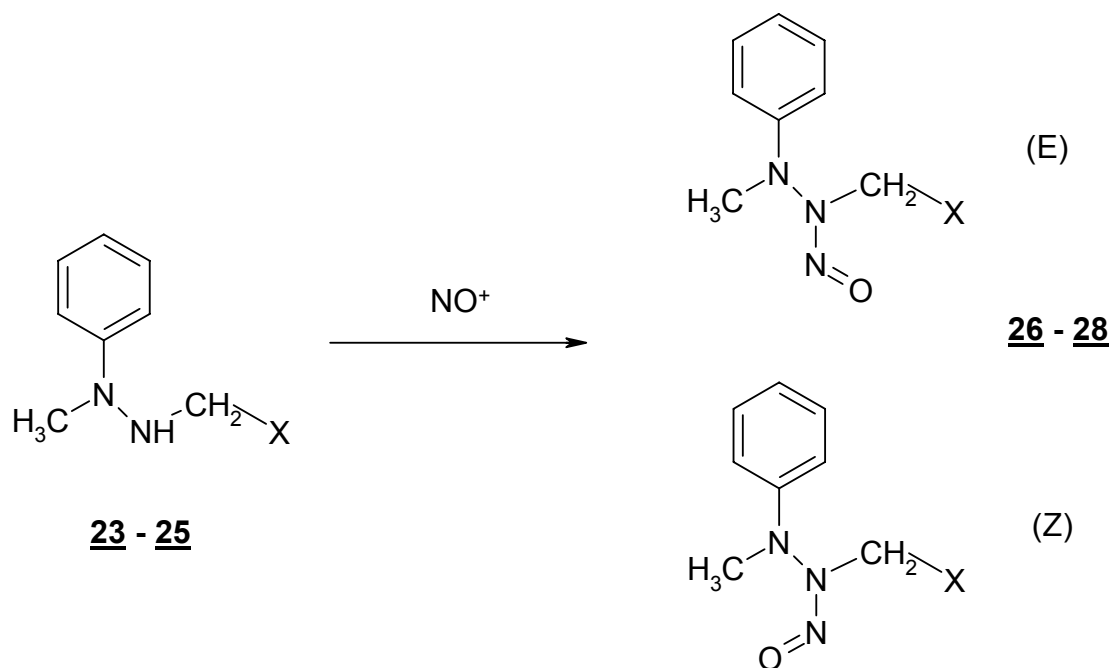
hoher Masse für $[M-30]^+$ bei $m/z = 145$, was ebenfalls auf die Abspaltung der Nitrosogruppe hindeutet. Ein weiteres Signal mit $m/z = 59$ ist typisch für Methylester.

Von **19** wurden zusätzlich noch FAB-Massenspektren aufgenommen. Als Matrix wurden sowohl Glycerin als auch 3-Nitrobenzylalkohol verwendet. Hier findet sich ein Signal für $[M-H]^+$ bei 174 bzw. ein Peak bei $[M-30]^+$, was erneut auf eine sehr leichte Abspaltung der Nitrosogruppe hinweisen könnte.

Auch die NMR-Spektren der Nitrosohydrazine aus dieser Gruppe werden im Kontext mit den NMR-Spektren der übrigen Nitrosohydrazinderivate in einem gesonderten Kapitel 3.2 (s.S.101) diskutiert.

3.1.3 Modellsubstanzen vom Typ C

Im Unterschied zu den Modellsubstanzen der Typen A und B sollte in dieser Reihe eine der beiden Methylgruppen im Hydrazin durch einen Phenylrest substituiert werden.



Hydrazine Typ C	X	Nitrosohydrazine Typ C
<u>23</u>	-COOH	<u>26</u>
<u>24</u>	-COO-CH ₂ -C ₆ H ₅	<u>27</u>
<u>25</u>	-CO-NH-CH ₂ -C ₆ H ₅	<u>28</u>

Abb. 37: Struktur der Modellsubstanzen vom Typ C

Als mehr oder weniger elektronegativer wirkende Gruppen X sollte die Carboxylgruppe und deren Benzylester bzw. das Benzylamid hergestellt werden. Dazu mussten zunächst die bisher noch nicht beschriebenen Hydrazinoessigsäurederivate 23, 24 und 25 zugänglich gemacht werden. Die anschließende Nitrosierung sollte zu den gewünschten Nitrosoderivaten führen (s. Abb. 37).

3.1.3.1 Synthese und Eigenschaften der Hydrazine vom Typ C

Zunächst wurde versucht, das Hydrazin **25** nach einer von Tverdokhlebov et al.¹³¹ in Analogie zu der von Böhme vorgeschlagenen allgemeinen Methode¹²⁷ durch Acylierung von N-Methyl-N-phenylhydrazin mit Chloressigsäurebenzylamid darzustellen. Dabei resultierte trotz vielfach variierten Reaktionsbedingungen stets nur das Anilinderivat **30**, das als Hydrochlorid in analysenreiner Form kristallisiert werden konnte.

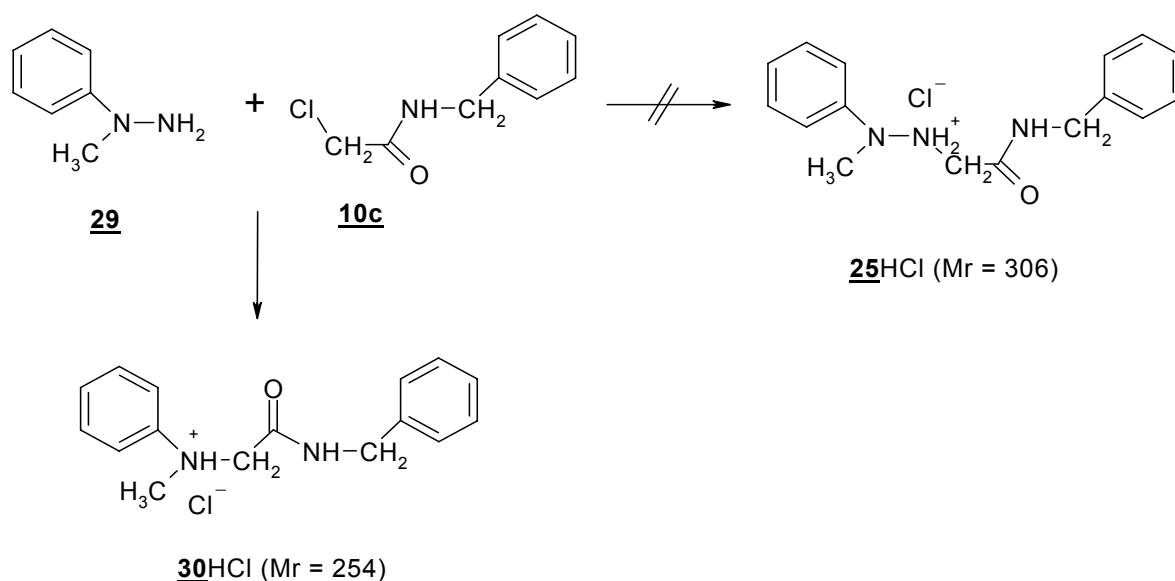


Abb. 38: Versuch der Darstellung von **25** nach Tverdokhlebov et al.

Sowohl das Massenspektrum von **30** (Molekülion $m/z = 254$ und Basispeak $m/z = 120$) als auch die Elementaranalyse bestätigen den Verlust eines Stickstoffs.

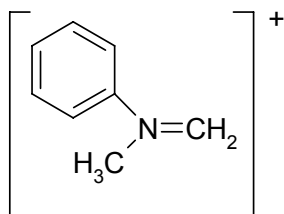


Abb. 39: Mögliche Struktur des Fragments $m/z = 120$.

¹³¹ Tverdokhlebov, A.V. et al., *Chem. Hetero. Comp.* **1998**, 34, 44 - 50

Charakteristisch für die Anilin-Partialstruktur sind auch die im ^1H -NMR-Spektrum abgesetzten und hochfeldverschobenen Signale für die beiden ortho-ständigen Phenylprotonen („Dublett“) und das „Triplett“ für das para-Phenylproton. Die Amidstruktur in **30** wird durch eine intensive Doppelbande für die Amidgruppe bei 1648 und 1521cm^{-1} bestätigt.

Über die Art der Eliminierung des Stickstoffs ist in der Literatur nichts bekannt. Deshalb kann nur darüber spekuliert werden, dass es zunächst ähnlich wie in Kapitel 3.1.1.2, S. 69) evtl. zur Bildung einer quartären Hydraziniumverbindung **A** kommt, die jedoch im Ansatz instabil ist und in **30** fragmentiert.

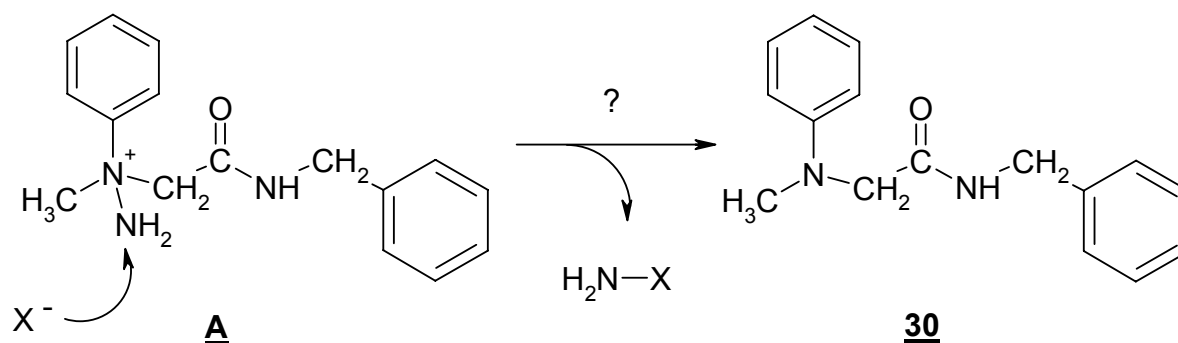


Abb. 40: Hypothese zur Bildung von **30**

Über die Natur der eliminierten Aminogruppe kann hier keine Aussage getroffen werden, da keine Versuche zur Identifizierung dieser Spezies unternommen wurden. Denkbar wäre eine Abspaltung von Hydroxylamin bei der Alkalisierung des Ansatzes zur Extraktion der Base **A**.

Zur Darstellung der gewünschten Hydrazine musste daher ein alternativer Weg beschritten werden, der in Abb. 41 skizziert ist.

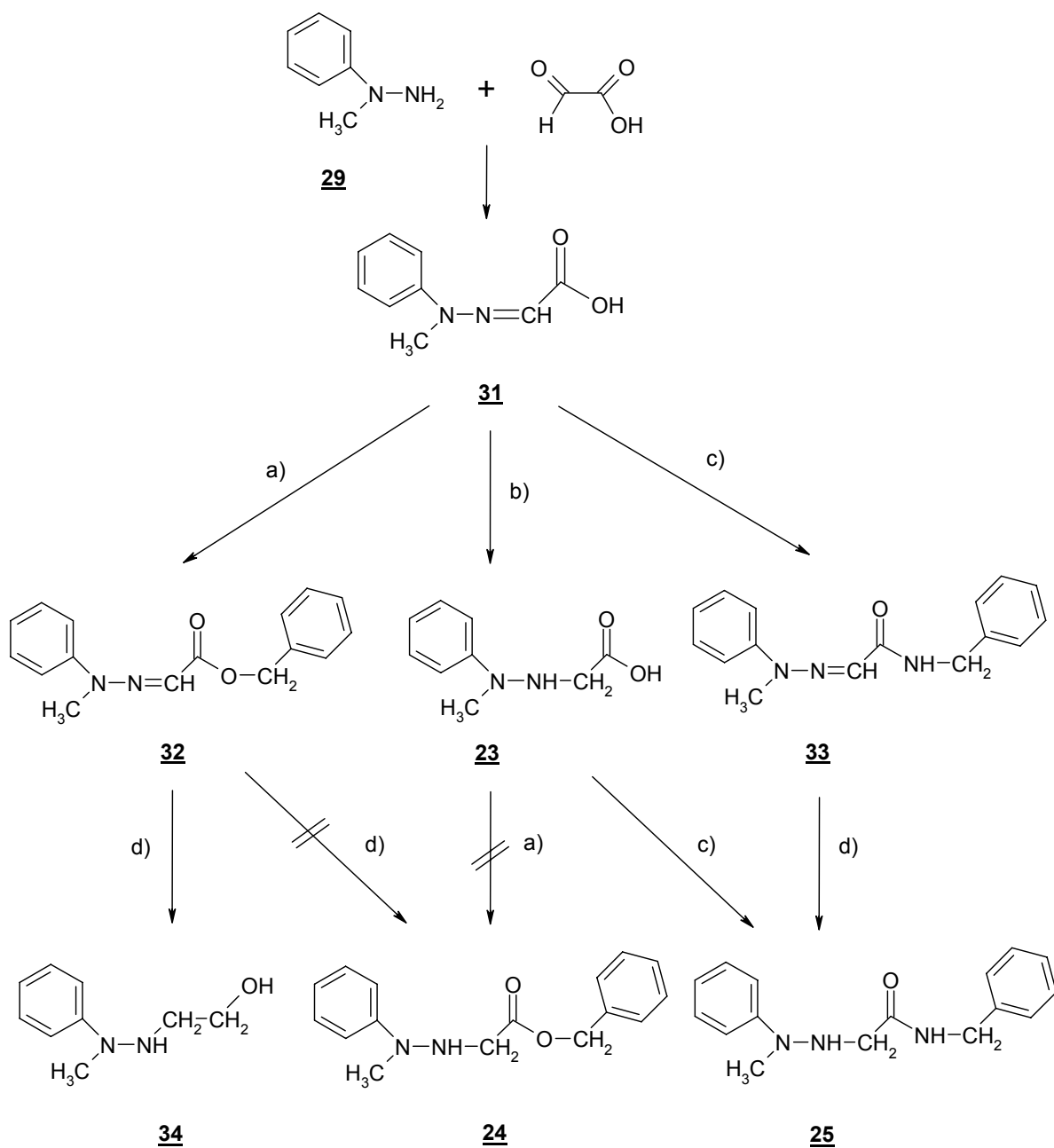


Abb. 41: Synthese der Hydrazine vom Typ C

Methylphenylhydrazin kondensiert mit Glyoxylsäure glatt und mit guter Ausbeute zu der entsprechenden Hydrazonecarbonsäure **31**.

Mittels Natriumborhydrid in wasserfreiem Acetonitril gelingt deren Reduktion zur Hydrazinossigsäure **23** in guter Ausbeute. Die Aufarbeitung der Ansätze muss zügig erfolgen, da es sonst zu einer raschen Reoxidation des Hydrazins zum Ausgangshydrazon kommt. Durch Überführung des Hydrazins in das Hydrochlorid kann die Stabilität verbessert werden.

Im Gegensatz zur geglückten Borhydridreduktion der Hydrazonocarbonsäure **31** konnten die mittels DCC-Methode hergestellten Derivate, der Ester **32** und das Amid **33**, nicht auf diese Weise reduziert werden. Dagegen verlief die Umsetzung mit Lithiumaluminiumhydrid in wasserfreiem Ether nur im Fall des Amids **33** zufrieden stellend, während der Ester **32** unter diesen Bedingungen fast komplett hydrolysierte und die Carbonsäurestruktur bis zum prim. Alkohol **34** reduziert wurde.

Das Amid **25** stellt ein viskoses, oxidationsempfindliches Öl dar, weswegen es in das kristalline Hydrochlorid umgewandelt wurde, das bei Lagerung im Tiefkühlschrank bei -20°C ausreichend stabil war.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass über die in Abb. 41 aufgezeigten Wege bis auf **24** alle gewünschten Verbindungen in für weitere Umsetzungen ausreichenden Mengen zugänglich gemacht werden konnten. Obwohl das Hydrazin **24** nicht zur Verfügung stand, war die Synthese des entsprechenden Nitrosoderivates durch Veresterung der nitrosierten Carbonsäure **26** möglich (s. Kap.3.1.3.2, S.86). Zudem erwies es sich als vorteilhaft, über die entsprechenden Hydrazone als Vergleichssubstanzen zu verfügen, da diese als Reaktionsprodukte bei der Eliminierung von Stickstoffmonoxid aus den Nitrosohydrazinen zu erwarten waren.

Spektroskopische Eigenschaften:

Die EI-Massenspektren der Hydrochloride der Hydrazinderivate dieses Typs zeigen jeweils ein deutliches Molekülion in allerdings unterschiedlicher Intensität. In den Spektren fallen deutliche Signale bei $m/z = 106$ und 121 auf, die typisch für die Methylphenylhydrazinstruktur sind.

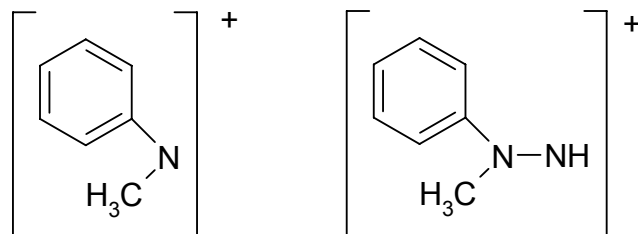


Abb. 42: Mögliche Strukturen der Bruchstücke $m/z = 106$ und $m/z = 121$

In Abb. 43 ist exemplarisch für die Hydrazine der Gruppe C das Massenspektrum vom Hydrochlorid von **25** dargestellt.

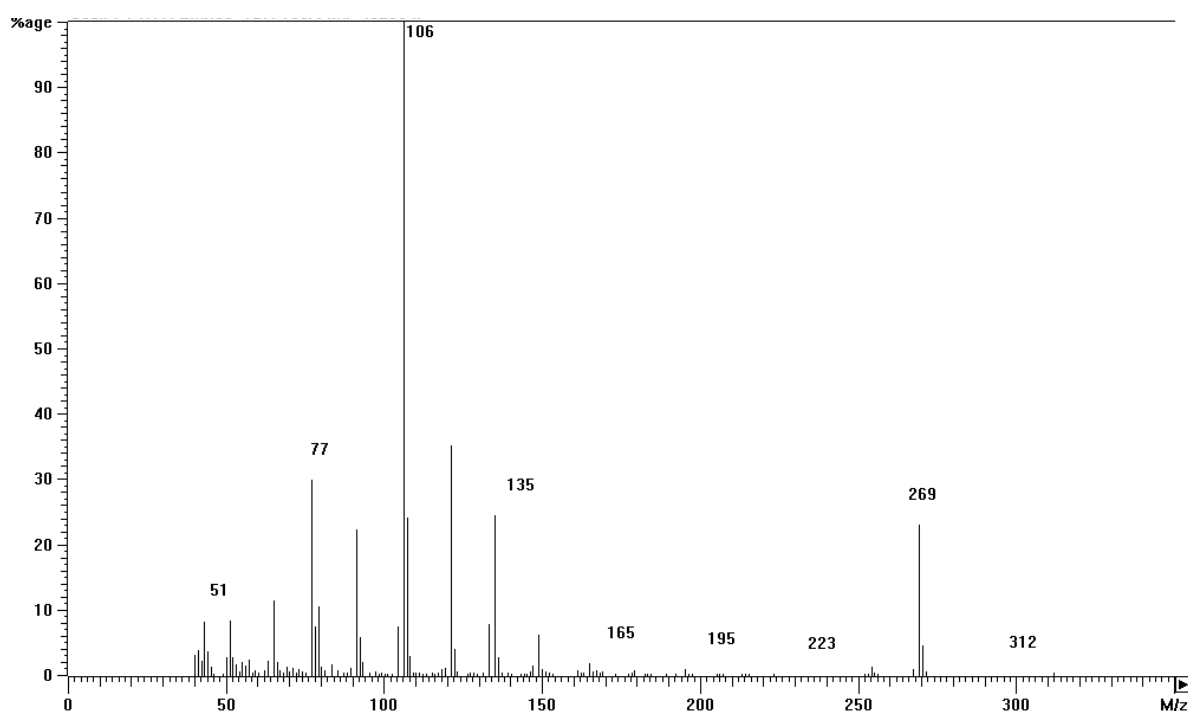


Abb. 43: MS-Spektrum vom Hydrochlorid **25**

Die Infrarot-Spektren (KBr) der Hydrochloride von **23**, **25** und **34** bestätigen die jeweiligen funktionellen Gruppen: die Carboxylgruppe bei 1716 und das Amid mit einer typischen Doppelbande bei 1650 und 1578 cm^{-1} sowie die ausgeprägten Banden für die C-H-Valenzschwingungen bei 2926 und 2732 cm^{-1} vom Hydrochlorid **34**.

Die ^1H -NMR-Spektren zeigen keine Kopplung der protonierten Hydrazinstruktur mit den benachbarten Methylenprotonen. Für die Hydrochloride **25** und **23** wird stets nur ein Singulett für die entsprechenden Methylenprotonen registriert. Im Kernresonanzspektrum von dem Hydrochlorid **34** sind die Signale für die Protonen der benachbarten Methylengruppen zu zwei Triplets aufgespalten.

In Abb. 44 ist exemplarisch für die Hydrazine der Gruppe C das Kernresonanzspektrum von dem Hydrochlorid **25** dargestellt.

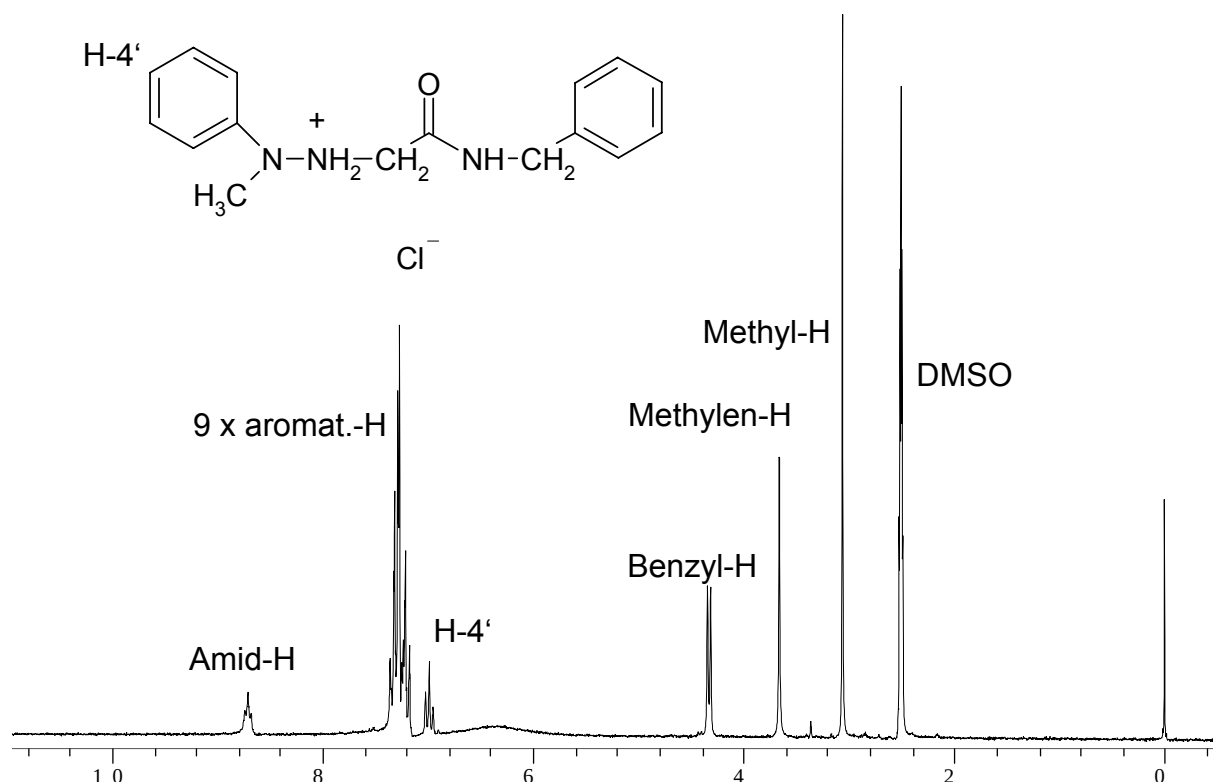
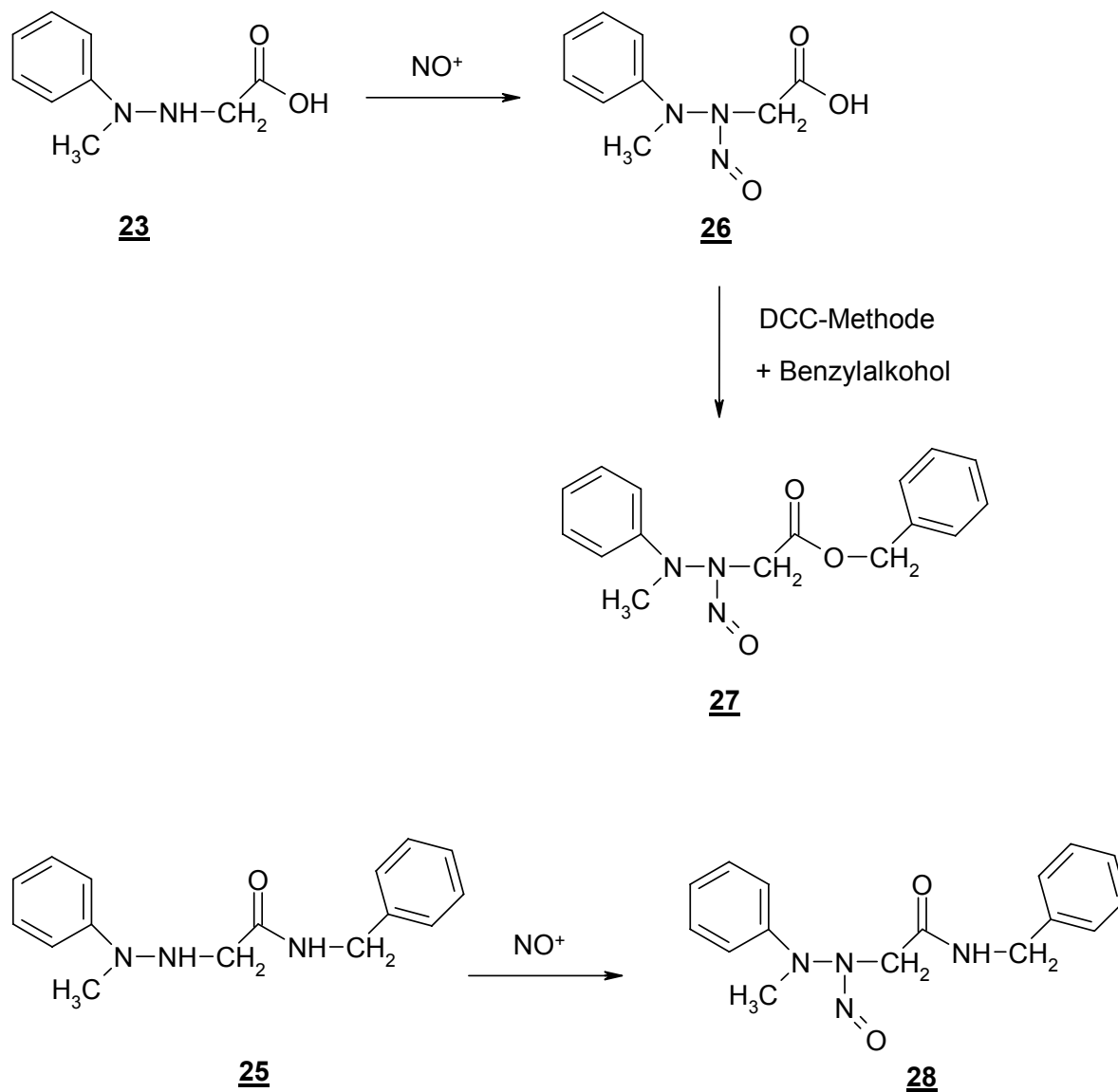


Abb. 44: 200MHZ ^1H NMR-Spektrum vom Hydrochlorid **25** (d_6 -DMSO)

3.1.3.2 Synthese und Eigenschaften der Nitrosohydrazine vom Typ C

Die Nitrosohydrazine **26** und **28** wurden wie früher aus den entsprechenden Hydrazinen mittels sauer katalysierter Nitrosierung dargestellt (s.S.69). **27** konnte über die Veresterung von **26** mit Benzylalkohol zugänglich gemacht werden.



Bei den Nitrosohydrazinen **26**, **27** und **28** handelt es sich um kristalline Substanzen, die allerdings auch bei Lagerung unter sehr schonenden Bedingungen (-20°C bei Lichtausschluss) eine langsame Zersetzung in die entsprechenden Hydrazone zeigten. So war die Carbonsäure **26** nur wenige Tage und der Ester **27** einige Wochen ohne nennenswerte Hydrazonbildung haltbar. Dagegen zeigte das

Carbonamid **28** die höchste Stabilität in dieser Gruppe. Während eines Jahres wurde das entsprechende Hydrazone nur in Spuren gebildet.

Spektroskopische Eigenschaften:

Sämtliche Nitrosohydrazine zeigen in den EI-Massenspektren keine intakten Molekülionen. Von **26** und **28** wurden FAB-Massenspektren aufgenommen (Matrix: m-Nitrobenzylalkohol). Hier treten die erwarteten $[M+1]^+$ -Ionen jedoch auch nur mit geringer Intensität auf, während ein intensiveres Bruchstück bei $[M-30]^+$ registriert wird, was auf die Abspaltung von $\text{NO}^\bullet$ hindeutet.

In Abb. 45 ist exemplarisch für die Hydrazine der Gruppe C das EI-Massenspektrum von **28** dargestellt.

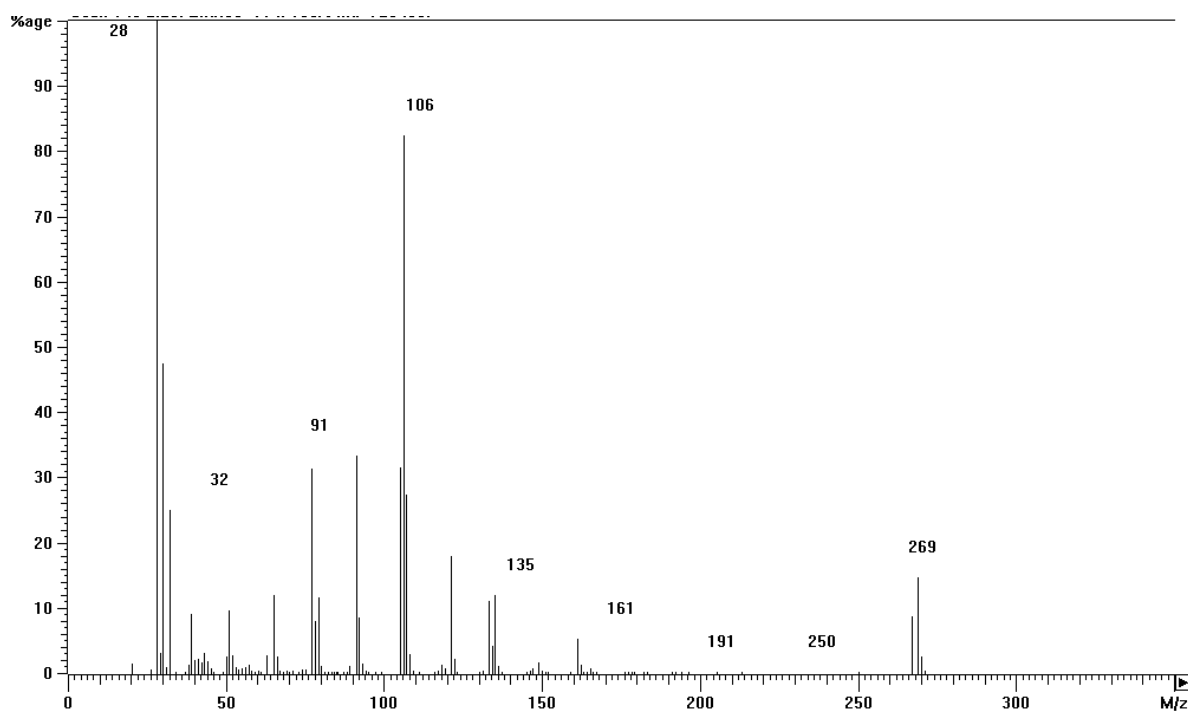


Abb. 45: EI-MS-Spektrum von **28**

Die IR-Spektren der Nitrosohydrazine zeigen neben den üblichen Absorptionsbanden der funktionellen Gruppen die intensive Absorptionsbande für die N-NO-Valenzschwingung im Bereich um $1440 - 1456\text{cm}^{-1}$.

Die NMR-Spektren der Nitrosohydrazine dieser Gruppe werden im Kontext mit den NMR-Spektren der übrigen Gruppen in einem gesonderten Kapitel 3.2 vorgestellt.

3.1.4 Modellsubstanzen vom Typ D

Bei den Modellverbindungen in dieser Gruppe wird die Nitrilgruppe im SIN-1A durch unterschiedlich substituierte Phenylreste und der Morpholinrest durch ein Methylphenylamin ersetzt.

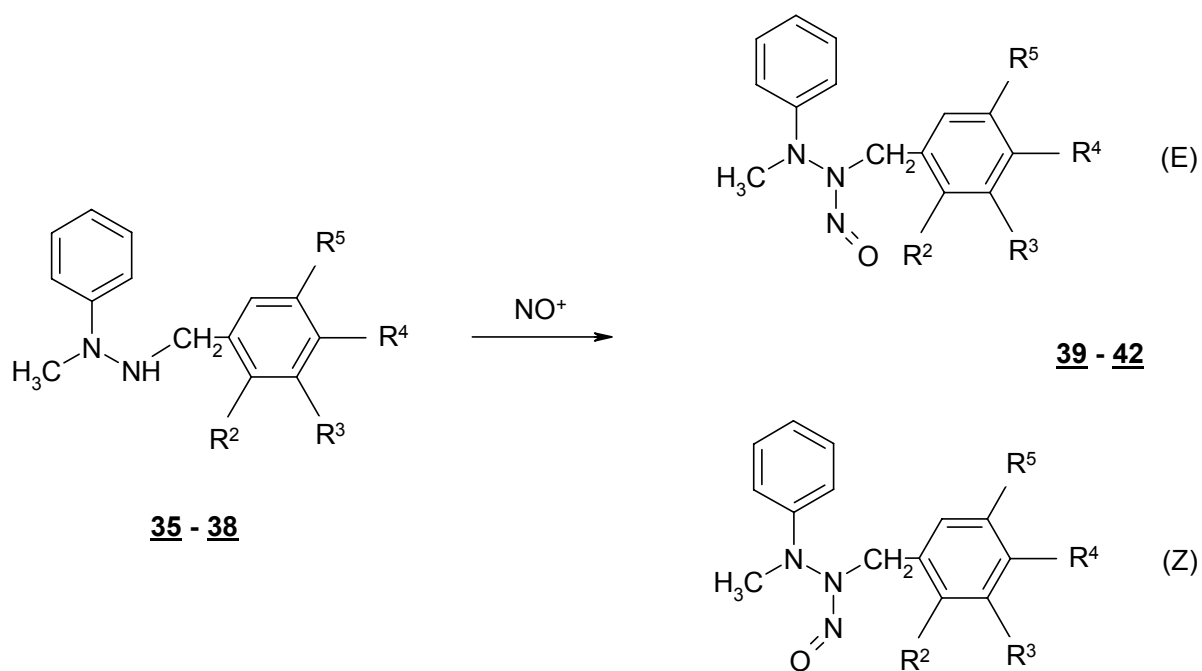


Abb. 46: Nitrosohydrazinderivate vom Typ D

Hydrazine Typ D	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	Nitroso- hydrazine Typ D
35	H	H	H	H	39
36	Cl	H	H	H	40
37	H	H	CF ₃	H	41
38	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	42

Auch die Nitroverbindungen der Gruppe D wurden über die entsprechenden Hydrazinderivate zugänglich gemacht.

3.1.4.1 Synthese und Eigenschaften der Hydrazine vom Typ D

Für die Darstellung der erforderlichen Hydrazine bot sich die Reduktion der Hydrazone an, die problemlos aus dem N-Methyl-N-phenylhydrazin und den entsprechenden Benzaldehyden zugänglich waren. Bei den dargestellten Hydrazonen handelt es sich um nahezu farblose, kristalline Substanzen.

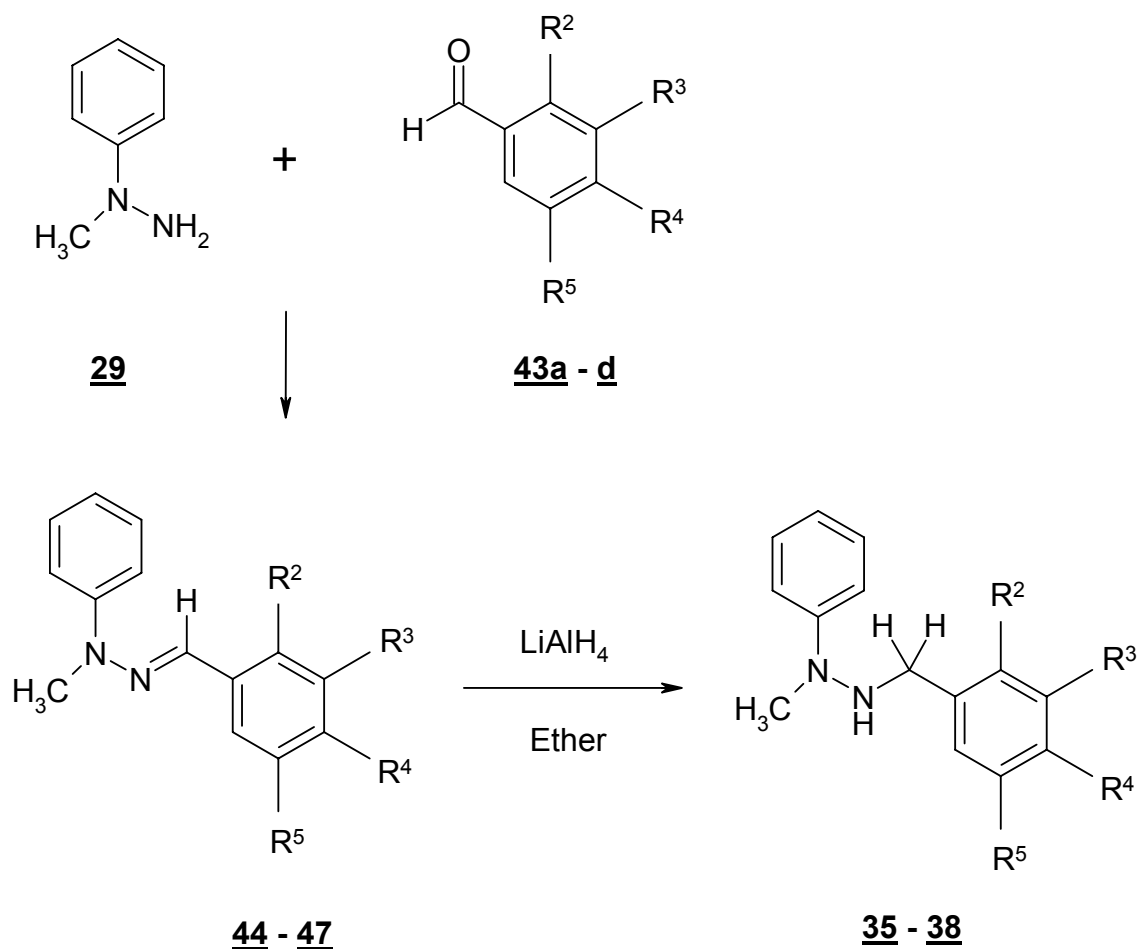


Abb. 47: Synthese der Hydrazine vom Typ D

Hydrazone	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	Hydrazine
<u>44</u>	H	H	H	H	<u>35</u>
<u>45</u>	Cl	H	H	H	<u>36</u>
<u>46</u>	H	H	CF ₃	H	<u>37</u>
<u>47</u>	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	<u>38</u>

Spektroskopische Eigenschaften:

Die Massenspektren der Hydrazine der Gruppe D (Beispiel: **38** als Hydrochlorid, Abb. 48) zeigen neben einem relativ intensiven Molpeak ein typisches Fragment bei M-2, das auf die leichte Dehydrierung zum Hydrazon hindeutet. Daneben erkennt man das jeweilige typische Benzylion (bei **38**: $m/z = 181$) und das Methylphenylhydrazyl-Kation bei $m/z = 121$ bzw. 122 jeweils mit hoher Intensität.

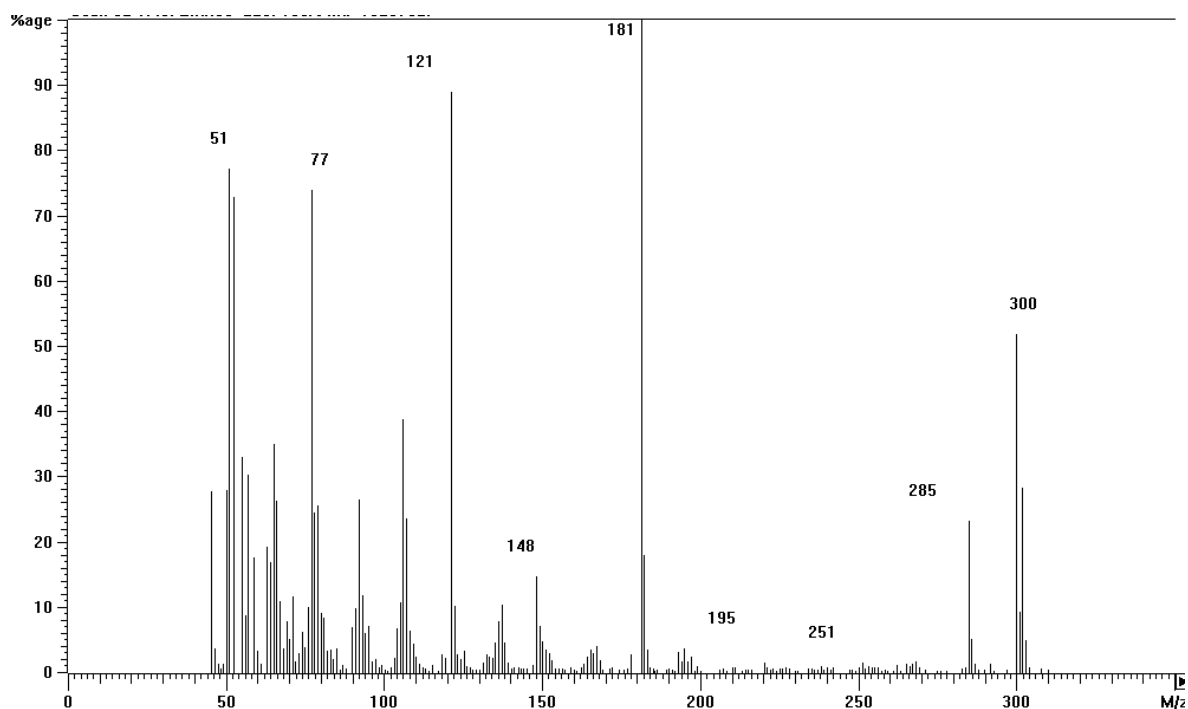


Abb. 48: Massenspektrum vom Hydrochlorid **38**

Die IR-Spektren der Hydrazin-Hydrochloride weisen keine Besonderheiten auf. Oberhalb und unterhalb von 3000 cm^{-1} findet man die Absorptionsbanden für die ungesättigten bzw. gesättigten CH-Valenzschwingungen. Typisch sind auch die breiten und komplexen Banden für die NH-Valenzschwingungen der protonierten Hydrazine im Bereich zwischen 2200 und 2700 cm^{-1} und die scharfe, intensive Aromatenabsorption im Bereich von 1500 bis 1600 cm^{-1} .

Auch die in DMSO-d_6 aufgenommenen $^1\text{H-NMR}$ -Spektren bestätigen die Struktur der Hydrazine. In keinem Fall kommt es zu einer Kopplung der Methylenprotonen mit dem Hydrazin-Proton.

In Abb. 49 ist als Beispiel für die Hydrazine der Gruppe D das Kernresonanzspektrum vom Hydrochlorid **38** dargestellt.

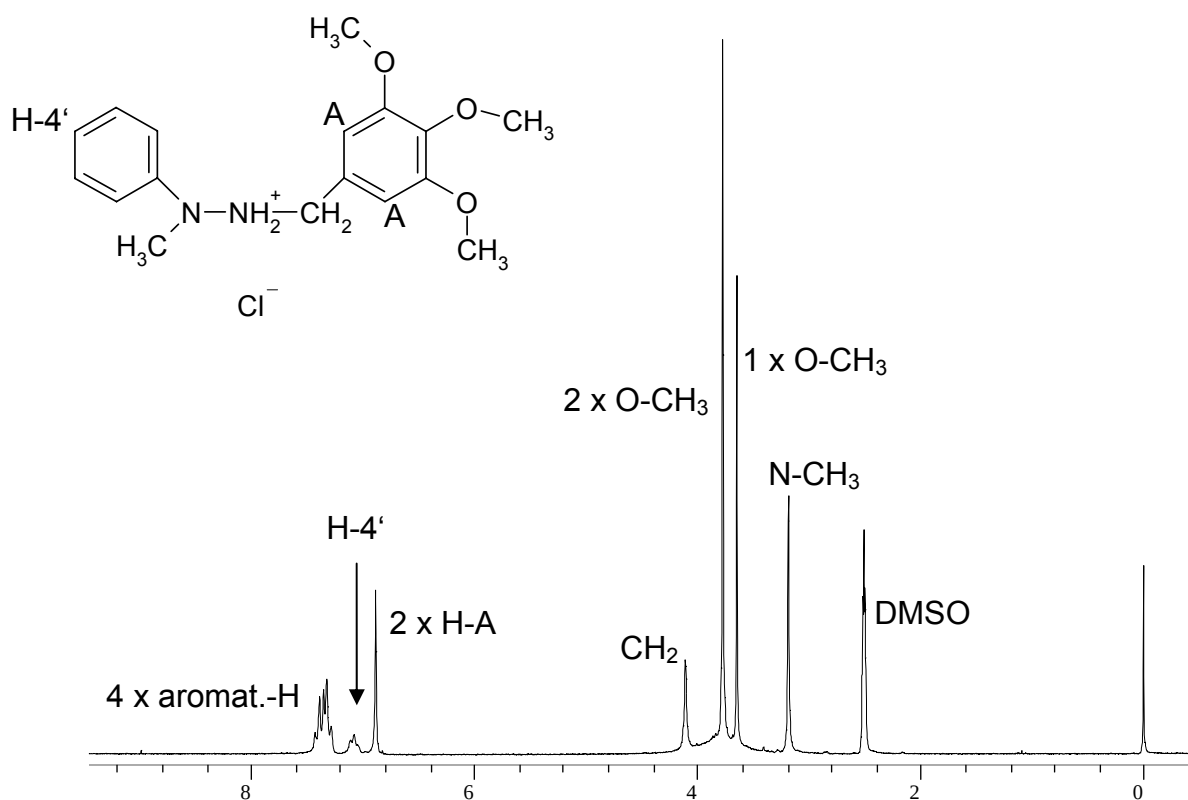


Abb. 49: 200MHz $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum vom Hydrochlorid **38** ($\text{d}_6\text{-DMSO}$)

3.1.4.2 Synthese und Eigenschaften weiterer Hydrazone vom Typ D

Daneben wurden noch einige kristalline, bisher in der Literatur noch nicht beschriebene Hydrazone vom Typ D dargestellt. Leider war es jedoch trotz vieler Versuche nicht möglich, die entsprechenden Hydrazine zu erhalten (schlechte Löslichkeit, Probleme bei der Isolierung, reduktive Veränderung von R⁴).

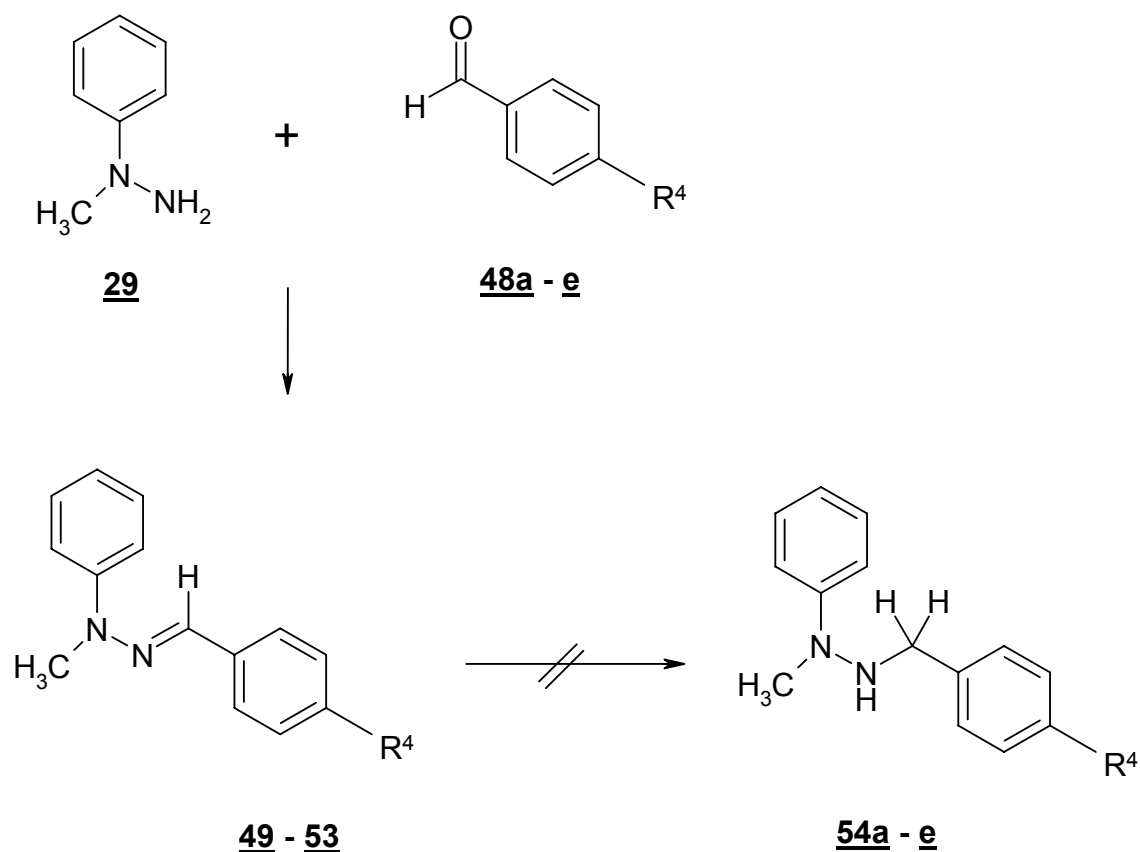
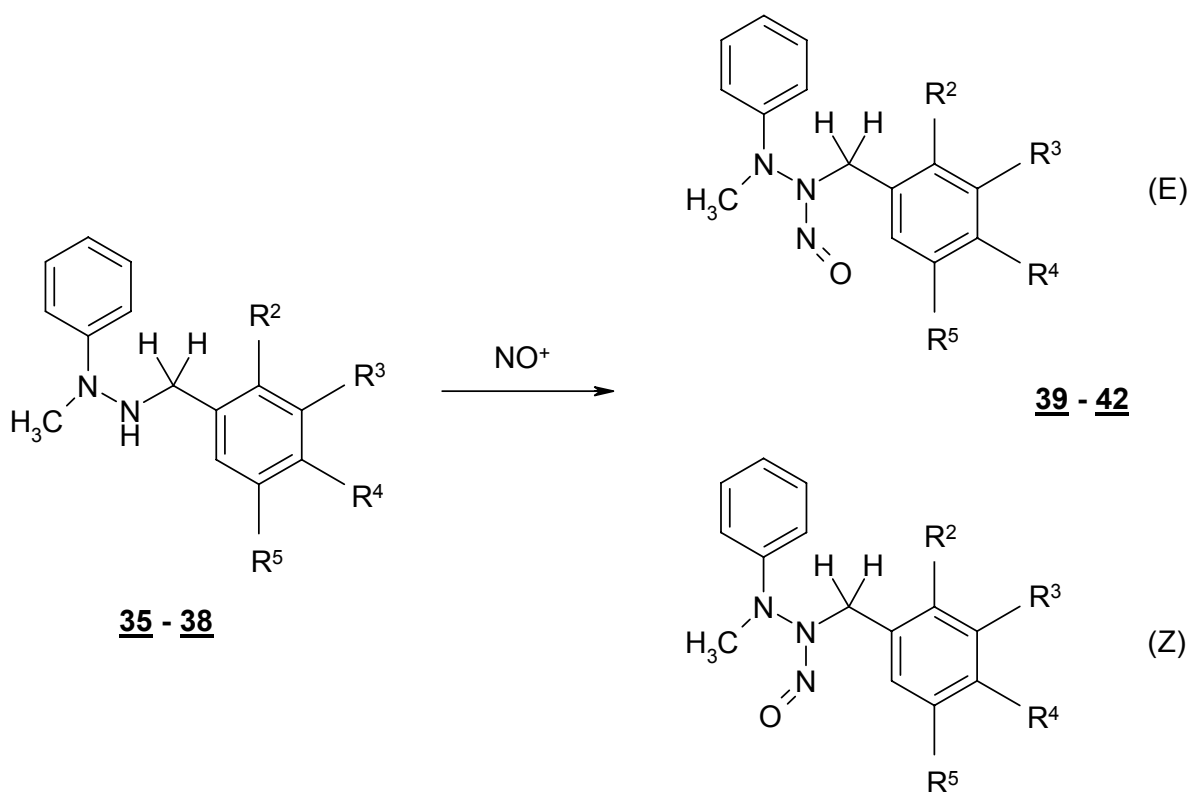


Abb. 50: Weitere Hydrazone vom Typ D

Hydrazon	<u>49</u>	<u>50</u>	<u>51</u>	<u>52</u>	<u>53</u>
R ⁴	COOH	CN	N(CH ₃) ₂	NO ₂	OH

3.1.4.3 Synthese und Eigenschaften der Nitrosohydrazine vom Typ D

Die Nitrosohydrazine wurden aus den entsprechenden Hydrazinen mittels sauer katalysierter Nitrosierung dargestellt (vgl. S. 69).



Hydrazine Typ D	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	Nitroso- hydrazine Typ D
<u>35</u>	H	H	H	H	<u>39</u>
<u>36</u>	Cl	H	H	H	<u>40</u>
<u>37</u>	H	H	CF ₃	H	<u>41</u>
<u>38</u>	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	<u>42</u>

Abb. 51: Nitrosohydrazinderivate vom Typ D

Während das Nitrosohydrazin **42** eine blass-ockerfarbene, kristalline Substanz darstellt, bleiben die übrigen Nitrosohydrazine **39**, **40** und **41** dieser Gruppe bei Raumtemperatur ölig. Bei Lagerung unter schonenden Bedingungen (-20°C,

Lichtausschluss) trat eine langsame Zersetzung der öligen Substanzen in die entsprechenden Hydrazone ein (DC). Dagegen konnte das kristalline **42** einige Wochen ohne nennenswerte Hydrazonbildung aufbewahrt werden. Versuche zur Überführung der Nitrosohydrazinderivate in kristalline Hydrochloride schlugen fehl.

Spektroskopische Eigenschaften:

Wie nicht anders erwartet, liefern die EI-Massenspektren von **39** und **42** keine intakten Molekülionen. Dagegen findet man ein typisches Fragment bei $[M-30]^+$ und den zugehörigen Peak bei $m/z = 30$ für das Nitrosoniumion. Im Übrigen enthalten die Spektren die typischen Aromatenbruchstücke, wie sie auch in den Hydrazinen auftraten.

In Abb. 52 ist exemplarisch für die Hydrazine der Gruppe D das Massenspektrum von **42** dargestellt.

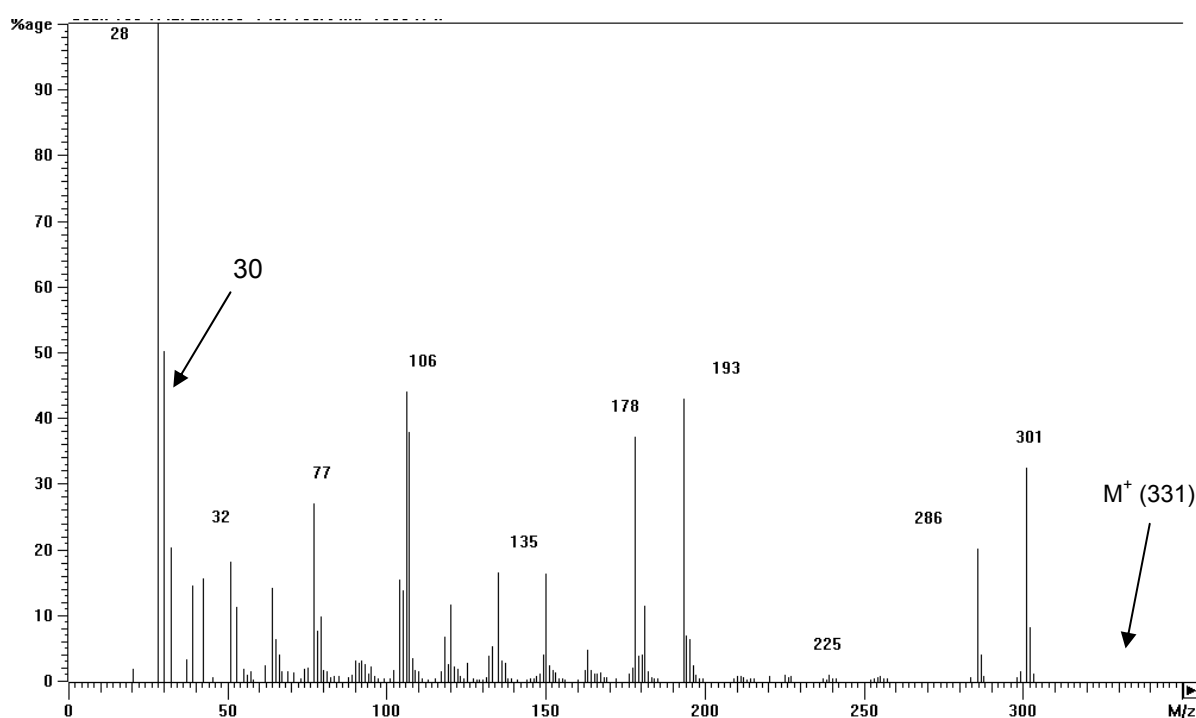
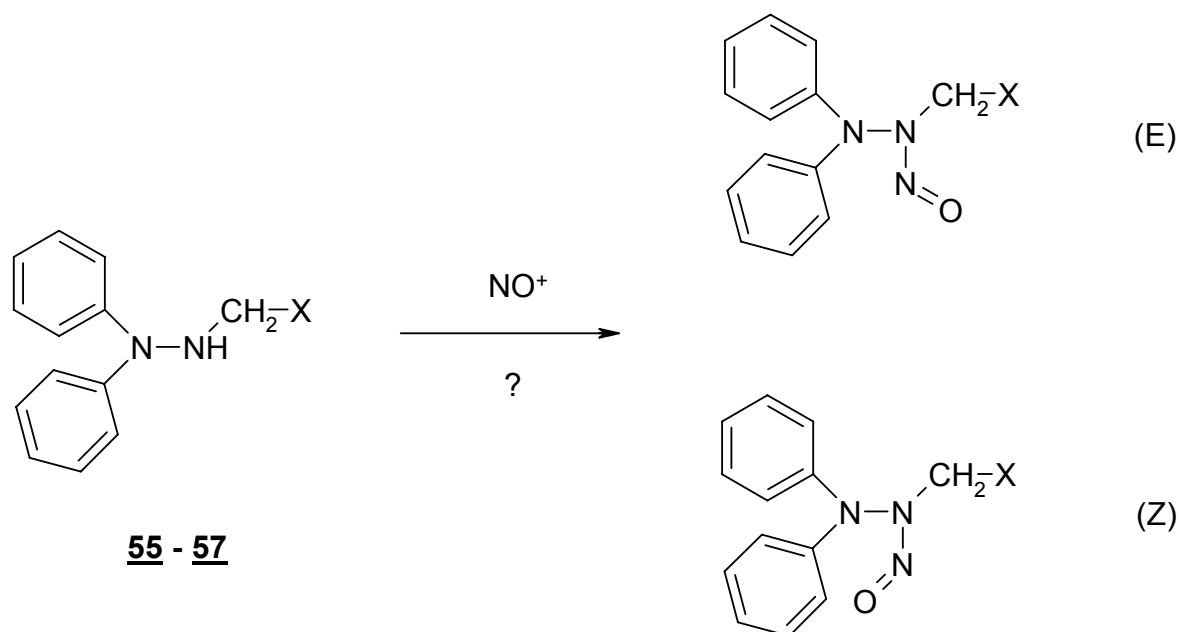


Abb. 52: MS-Spektrum von **42**

In dem IR-Spektrum von **42** fehlen erwartungsgemäss die NH-Banden und stattdessen findet man die intensive Absorptionsbande für die N-NO-Valenzschwingung bei 1461cm^{-1} .

3.1.5 Modellsubstanzen vom Typ E

Im Unterschied zu den Modellsubstanzen der Typen A – D sollte in dieser Reihe das Hydrazin durch zwei Phenylreste substituiert werden.



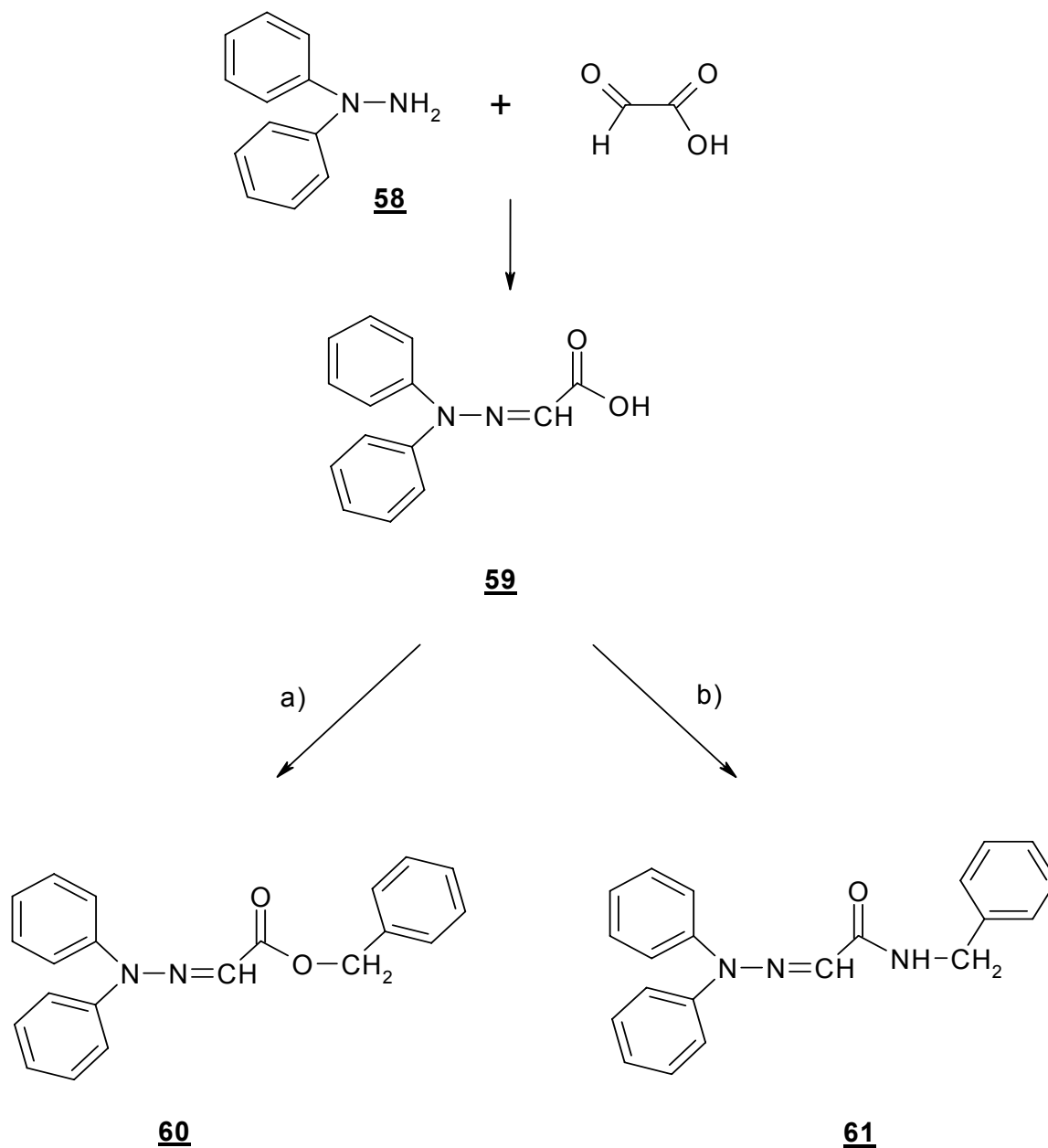
Hydrazine Vom Typ E	X	Nitroso- hydrazine vom Typ E
55	COOH	----
56	COO-CH ₂ -C ₆ H ₅	----
57	CO-NH-CH ₂ -C ₆ H ₅	----

Abb. 53: Struktur der Modellsubstanzen vom Typ E

Als mehr oder weniger elektronegativer wirkende Gruppen X sollten die Nitrosoderivate mit einer Carboxylgruppe und deren Benzylester bzw. Benzylamid substituiert sein. Die Nitrosoverbindungen sollten über die entsprechenden Hydrazinderivate zugänglich gemacht werden.

3.1.5.1 Synthese und Eigenschaften der Hydrazine vom Typ E

Für die Darstellung der Hydrazine bot sich der schon zuvor beschrittene Weg einer Reduktion der entsprechenden Hydrazone an. Diese waren aus dem kristallinen Kondensationsprodukt **59** von N,N-Diphenylhydrazin mit Glyoxylsäure mit anschliessender Veresterung bzw. Amidierung als gut kristallisierende Substanzen mit korrekter Elementaranalyse zugänglich.



a) DCC / Benzylalkohol / DMAP

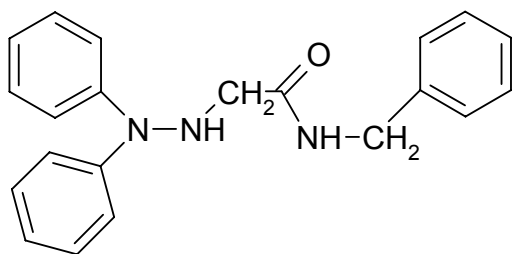
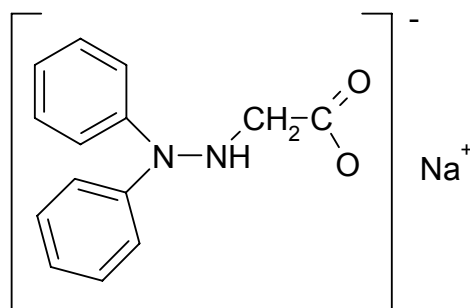
b) DCC / Benzylamin / DMAP

Abb. 54: Synthese der Hydrazone vom Typ E

Die Struktur der Hydrazone ergab sich zweifelsfrei aus den EI-Massenspektren (Basispeak jeweils $m/z = 168$), als auch aus den IR-Spektren (1669 und 1589 cm^{-1} für die Carbonsäure, 1640 cm^{-1} für das Amid und 1714 cm^{-1} für den Ester).

Auch die ^1H -NMR-Spektren (s. Exp. Teil) stehen im Einklang mit den geforderten Strukturen.

Während die Reduktion des Amids **61** mit Lithiumaluminiumhydrid das Hydrazin **57** lieferte, wurde der Ester **60** nach dieser Methode zum Alkohol reduziert. Verwendet man Borhydrid so bleibt eine Reduktion des Hydrazons aus.

**57****55**

Reduktionsversuche der Hydrazonocarbonsäure **59** mittels Lithiumaluminiumhydrid und Natriumborhydrid schlugen ebenfalls fehl. Darum wurde zur Synthese der Hydrazincarbonsäure **55** ein alternativer Weg beschritten: Diphenylhydrazinhydrochlorid wurde mit Bromessigsäureethylester umgesetzt¹³², woraus das blassviolette, kristalline Natriumsalz der Hydrazincarbonsäure **55** resultierte.

¹³² Vorländer, Bittens, *Chem. Ber.* **1935**, 68, 2269 – 2274

3.1.5.2 Versuche zur Synthese der Nitrosohydrazine vom Typ E (s.S.96)

Zur Synthese des Nitrosoderivats aus dem korrespondierenden Hydrazin **57** wurde zunächst die bewährte Methode mit Salpetriger Säure in Gegenwart von Zitronensäure in Methanol hier unter Argon herangezogen. Nach der üblichen Aufarbeitung des Ansatzes resultierte ein Gemisch zweier Komponenten, wovon der überwiegende Teil das Ausgangshydrazin **57** mit geringen Anteilen des entsprechenden Hydrazons **61** ausmachte. Diese beiden Komponenten konnten eindeutig in dem Gemisch identifiziert werden (DC und ^1H -NMR-Spektren).

Außer der bewährten Nitrosierungsmethode mit Hilfe der Salpetrigen Säure wurden im Falle der Hydrazine vom Typ E noch weitere Methoden zur Nitrosierung der Hydrazine herangezogen. So wurde das Hydrazin mit N-Brom-succinimid¹³³ und Nitrit unter Argon umgesetzt. Dabei bilden Nitrit und N-Brom-succinimid Distickstofftetroxid, das dann *in statu nascendi* mit dem Hydrazin das entsprechende Nitrosohydrazin liefern soll. Aus diesem Ansatz wurden mittels SC an Kieselgel drei Fraktionen isoliert werden, wovon eine dem Hydrazon **61** (DC, EI-MS) zugeordnet werden konnte. Von den beiden anderen Fraktionen wurde jeweils sowohl ein Massenspektrum als auch ein ^1H -NMR-Spektrum aufgenommen. Aus den EI-Massenspektren kann entnommen werden, dass es in dem einen Fall zu einer doppelten Bromierung, in dem anderen Fall zu einer dreifachen Bromierung gekommen war. Damit schied diese Methode als ungeeignet aus.

Als weiteres Nitrosierungsmittel kam Isopentylnitrit zum Einsatz. Das Hydrazinamid **57** zeigte innerhalb von zwei Stunden jedoch nur eine geringfügige Umsetzung zum korrespondierenden Hydrazon **61**, das auf Zusatz von Schwefelsäure nach kurzer Zeit zum Hauptprodukt wurde.

Auch die Diphenylhydrazinocarbonsäure **55** entzog sich hartnäckig einer N-Nitrosierung. Somit war es nicht möglich, die gewünschten Modellsubstanzen vom Typ E herzustellen.

¹³³ Nakajima, M., Warner, J.C., Anselme, J.-P. *Tetrahedron Letters* **1984**, 25, 2619 - 2622

Aus den mit **57** durchgeführten Versuchen kann allerdings geschlossen werden, dass es eventuell doch zu einer intermediären Nitrosierung kommt, die gebildeten Produkte aber sofort wieder zu den Hydrazonen zerfallen, wobei entweder $\text{NO}^{\bullet}$ oder Nitroxylat gebildet wird, was jedoch nicht überprüft wurde. Möglich wäre auch eine direkte Redoxreaktion zwischen dem Diphenylhydrazin-Derivat und den Nitrosierungsreagenzien. Es wurden jedoch keine Versuche zur Identifizierung der entsprechenden Reduktionsprodukte unternommen.

3.2 ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren der Nitrosohydrazine

In diesem Kapitel sollen die Besonderheiten der Kernresonanzspektren der Nitrosohydrazinderivate der Gruppen A – D besprochen werden.

3.2.1 Rotamere Nitrosohydrazine

Die ^1H -NMR-Spektren der dargestellten Nitrosohydrazine zeigen bei einer Aufnahmetemperatur von 23°C - insbesondere für die der Nitrosogruppe nahen Wasserstoffkerne verdoppelte Signale - die ähnlich wie beim N',N'-Dimethyl-N-methylnitrosohydrazin¹³⁴ auf die Anwesenheit von Rotationsisomeren (Rotameren) zurückzuführen sind. Die N-NO-Bindung enthält einen hohen Doppelbindungsanteil aufgrund der Delokalisation des freien Elektronenpaares des Stickstoffs über die Doppelbindung des N-N=O-Systems. Dadurch ist die Rotation um die N-NO-Bindung partiell gehindert und die Substituenten der Hydrazinogruppe befinden sich in verschiedener magnetischer Umgebung. Die Beschreibung der mesomeren Grenzstrukturen macht dies deutlich (s.Abb. 55).

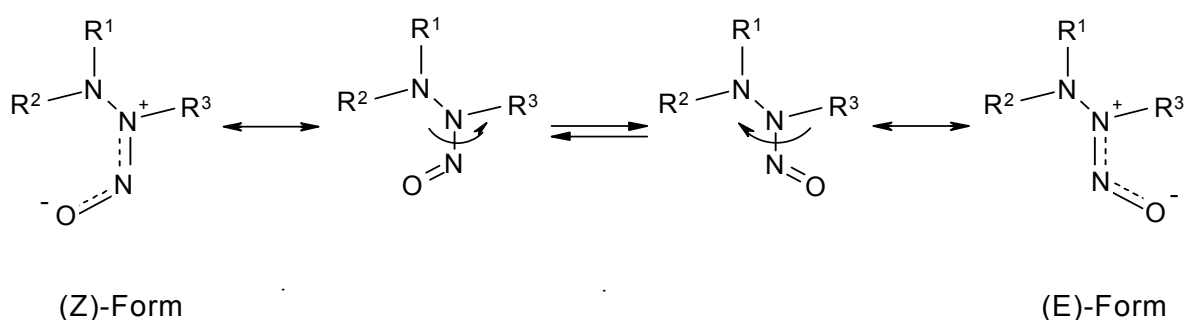


Abb. 55: Mesomere Grenzstrukturen rotamerer Nitrosohydrazinderivate

¹³⁴ Axenrod, T., Pregosin, P.S., *Tetrahedron Letters* **1968**, 51, 5293 - 5297

Vorraussetzung für das Auftreten rotamerer Signale im Spektrum ist eine relativ langsame Umwandlung der verschiedenen Rotamere innerhalb der NMR-Zeitskala. In diesem Fall lässt sich das Mengenverhältnis der beteiligten Isomeren durch Integration der Signalfächen bestimmen. Eine strukturelle Zuordnung der im NMR-Spektrum erscheinenden Rotamere mit Hilfe der chemischen Verschiebungen ist jedoch nur bei genauer Kenntnis der bevorzugten Konformation möglich, da nach Untersuchungen von Chow and Colon¹³⁵ die Anisotropie der Nitrosogruppe auf gleiche Substituenten unterschiedliche Effekte nach sich ziehen kann. So wird ein Proton, das sich syn zum Sauerstoff in einer coplanaren Anordnung mit der NNO-Gruppe befindet relativ zu einem anti-Proton **abgeschirmt**. Befinden sich die betrachteten Protonen jedoch nicht in einer weitgehend coplanaren Anordnung mit der NNO-Ebene, so kann es auch zu einem umgekehrten Effekt, d.h. zu einer Entschirmung der syn-orientierten Protonen kommen¹³⁶.

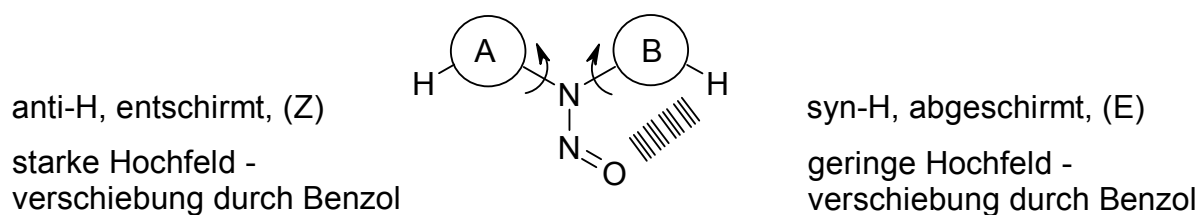


Abb. 56: Einfluss der Sauerstoffposition auf die Substituenten

Hilfreich bei der Zuordnung der verschiedenen Resonanzsignale zu den rotationsisomeren Formen sind sog. Lösungsmittelverschiebungen („solvent shifts“) durch Variation des Lösungsmittels. Die Ausbildung von bevorzugten Kollisionskomplexen bei der Solvation der untersuchten Verbindungen mit stark anisotropen Lösungsmitteln wie z.B. Benzol führt in der Regel zu beträchtlichen Veränderungen der chemischen Verschiebungen (δ -Werte) im Vergleich zur Verwendung der üblichen Lösungsmittel wie CDCl_3 oder DMSO-d_6 . So werden bei Verwendung von Benzol die Signale für Protonen anti zum Sauerstoff einer N-NO-

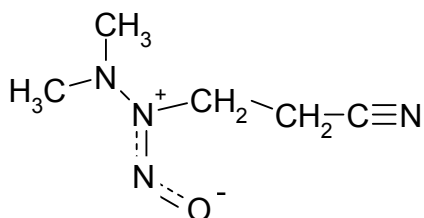
¹³⁵ Chow, Y.L., Colon, C.J., *Canadian Journal of Chemistry* **1968**, 46, 2827 - 2833

¹³⁶ Nelsen, S.F., Gannett, P.M., Steffek, D.J. *J. Org.Chem.* **1980**, 45, 3857 - 3860

Gruppe viel stärker hochfeldverschoben als die Protonen in der entsprechenden syn-Position¹³⁷.

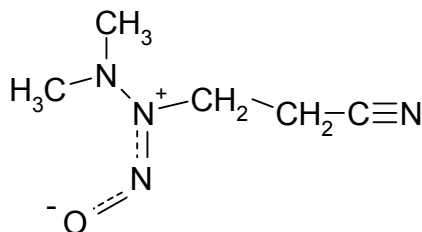
Die Zuordnung der Signale im ^1H -NMR-Spektrum soll am Beispiel des Nitrosohydrazinderivates **18** diskutiert werden, das sowohl in DMSO- d_6 und Benzol- d_6 als auch in zwei verschiedenen Benzol- d_6 -Verdünnungen mit DMSO- d_6 vermessen wurde.

18 tritt in Form der beiden (E)- und (Z)-Rotamere auf.



18 (E)-Form

Spezies A (73%)



18 (Z)-Form

Spezies B (27%)

Abb. 57: (E), (Z)-Rotamere von **18**

In den ^1H -NMR-Spektren von **18** (DMSO- d_6 und Benzol- d_6) (s. Tab. 4) können die Signale eindeutig zwei Spezies A (73%) und B (27%) zugeordnet werden.

¹³⁷ Karbatsos, C.J., Taller, R.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 4373 - 4378

	Spezies, (Rotamer)	$\delta(\text{DMSO-d}_6)$	$\delta(\text{Benzol-d}_6)$	Hochfeldshift: $\Delta\delta = \delta(\text{DMSO-d}_6) - \delta(\text{Benzol-d}_6)$
$(\text{CH}_3)_2\text{N-}$	A, (E)	2,93	2,47	0,46
	B, (Z)	2,76	2,40	0,36
-N- CH_2 -	A, (E)	3,89	3,03	0,86
	B, (Z)	4,33	3,31	1,02
- CH_2 -CN	A, (E)	2,79	1,53	1,26
	B, (Z)	3,02	1,60	1,42

Tab. 4: Chemische Verschiebung $\delta(\text{ppm})$ der ^1H -NMR-Signale von (E)- und (Z)-**18** in DMSO-d_6

Im ^1H -NMR-Spektrum (DMSO-d_6) treten die Methylenprotonen der Spezies A bei höherem Feld in Resonanz als die entsprechenden Methylenprotonen der Spezies B. Unter der berechtigten Annahme, dass die coplanare Anordnung der beteiligten Gruppen nicht behindert ist, folgt daraus eindeutig, dass die Methylenprotonen in Spezies A syn zum NO-Sauerstoff, in Spezies B dagegen anti konfiguriert sind. Bei den Singulets für die sechs N-Methylprotonen ergeben sich naturgemäss die umgekehrten Effekte. Eine weitere Bestätigung dieser Zuordnung erfolgte durch den Wechsel des Lösungsmittels: In Benzol-d_6 wird das Resonanzsignal der anti-ständigen Methylenprotonen deutlich stärker hochfeldverschoben als das Signal für die entsprechenden syn-ständigen Methylenprotonen (1,02 gegenüber 0,86 ppm bzw. 1,42 gegenüber 1,26 ppm, s. Tab. 4 und Abb. 58). Auch das vom Lösungsmittel weitgehend unabhängige Mengenverhältnis der beiden Rotamere deutet auf die getroffene Zuordnung hin, da Spezies A ((E)-Form) energieärmer erscheint als Spezies B ((Z)-Form). Somit bestätigen alle gefundenen Ergebnisse die Richtigkeit der getroffenen Zuordnung.

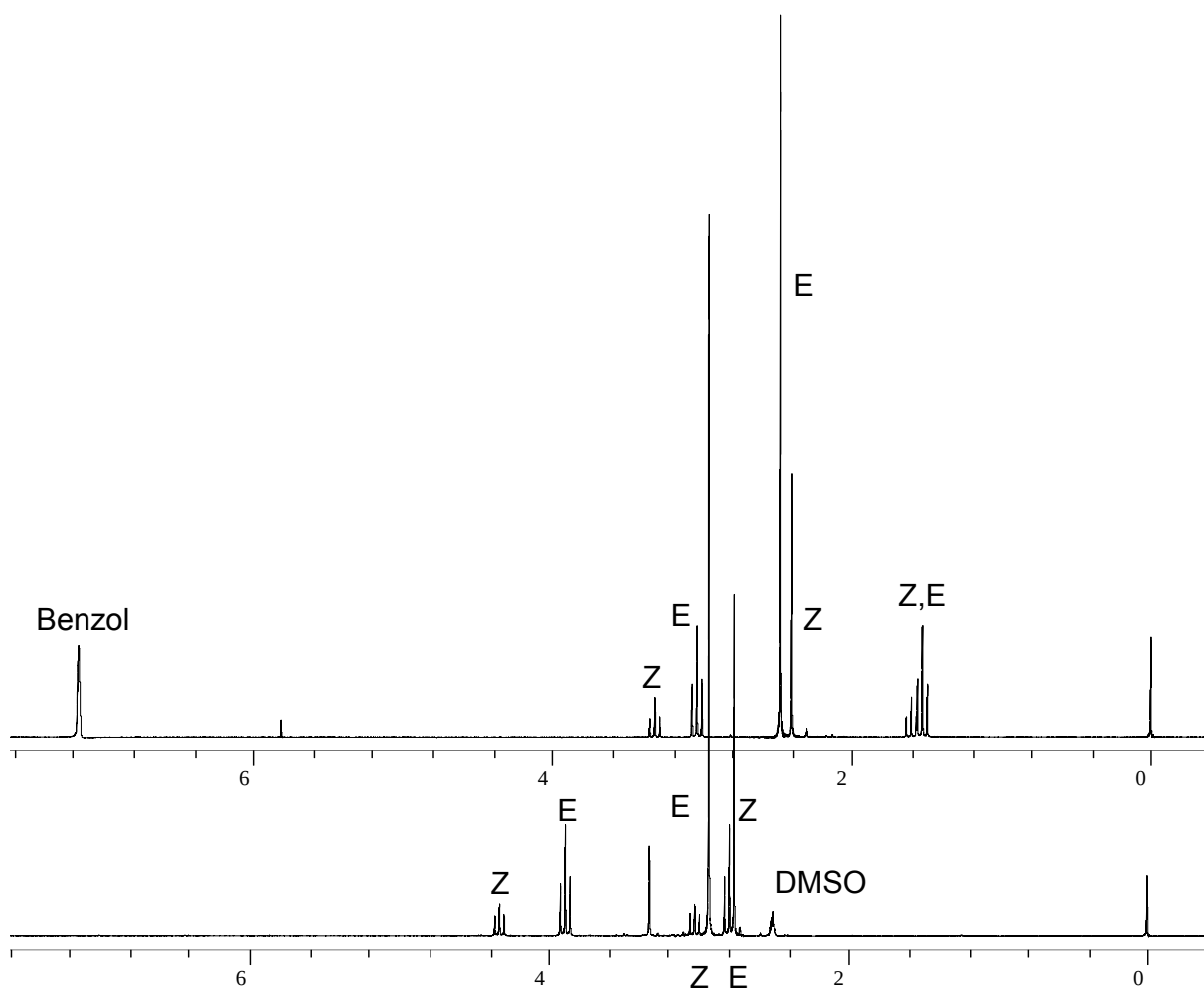
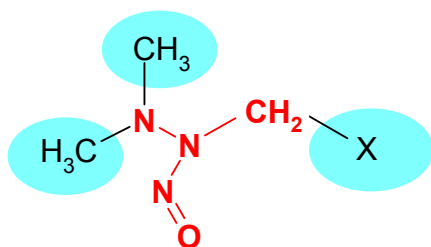


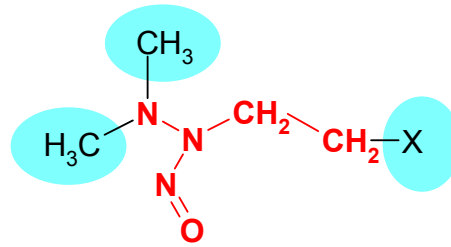
Abb. 58: 200MHz ^1H NMR-Spektren von **18** in verschiedenen Lösungsmitteln

In gleicher Weise können die entsprechenden Resonanzsignale der Modellsubstanzen A und B in den ^1H -NMR-Spektren der Rotamerengemische zugeordnet werden (Tab. 5).



Nitrosohydrazinderivate
des **Typs A**

2 - 4



Nitrosohydrazinderivate
des **Typs B**

18 - 20

Gruppe	Modellsubstanz	Verteilung, (E)- / (Z)-Form	δ in [ppm] $\text{CH}_3\text{-N-}$	δ in [ppm] $\text{-N(NO)-CH}_2\text{-}$
Typ A	<u>3</u>	88%, (E)	2,84	4,21
		12%, (Z)	2,71	4,69
Typ B	<u>18</u>	73%, (E)	2,93	3,89
		27%, (Z)	2,76	4,33
	<u>19</u>¹⁾	82%, (E)	2,96	3,96
		18%, (Z)	2,80	4,35
	<u>20</u>	77%, (E)	2,86	3,78
		23%, (Z)	2,72	4,21

Tab. 5: Chemische Verschiebung (δ [ppm]) der ^1H -NMR-Signale der rotameren Nitrosohydrazine in DMSO-d_6 bzw. CDCl_3 ¹⁾

3.2.2 Temperaturabhängigkeit der ^1H -NMR-Spektren

Wie gezeigt beobachtet man im ^1H -NMR-Spektrum von **18** bei der normalen Messtemperatur von 23°C jeweils zwei Signale für die entsprechenden Protonen. Bei einer Temperaturerhöhung bis auf ca. 80°C (in DMSO) bleiben diese Spektren weitgehend unverändert. Bei weiterer Temperaturerhöhung auf ca. 120°C tritt zwar eine Verbreiterung der dann nicht mehr gut aufgelösten Signale ein, doch zeigt sich dabei eine zunehmende Zersetzung der Substanz. Deshalb konnte die Temperatur

und H_B magnetisch nicht mehr äquivalent sind (ähnlich einer CH_2 -X-Gruppe neben einem Asymmetriezentrum s.Abb. 60).

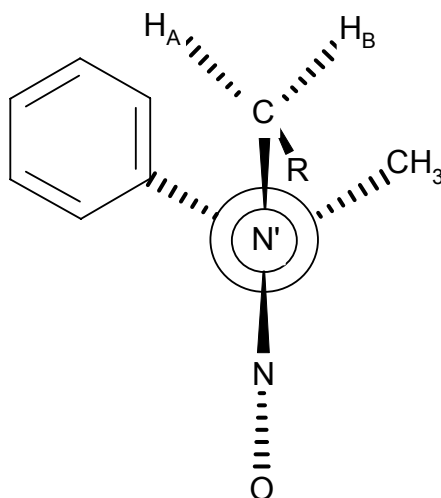


Abb. 60: Sterische Anordnung (in einer Art „Newman-Projektion“) der Substituenten in den (Z)-rotameren Nitrosohydrazinen vom Typ C und D. Das zentral gezeichnete nitrosierte N' verdeckt das dahinter liegende N -Atom des Hydrazins, dessen Rotation um die N - N' -Achse behindert ist.

Damit werden diese Protonen diastereotop und haben verschiedene Resonanzlagen. Bei normaler Messtemperatur ergibt sich auf Grund der noch vorhandenen Beweglichkeit kein scharfes AB-Signal, sondern nur zwei breite, kaum erkennbare Absorptionsbanden, die jedoch schon bei 40°C koaleszieren, und bei 60°C ein rel. scharfes Singulett ergeben (s.Abb. 61).

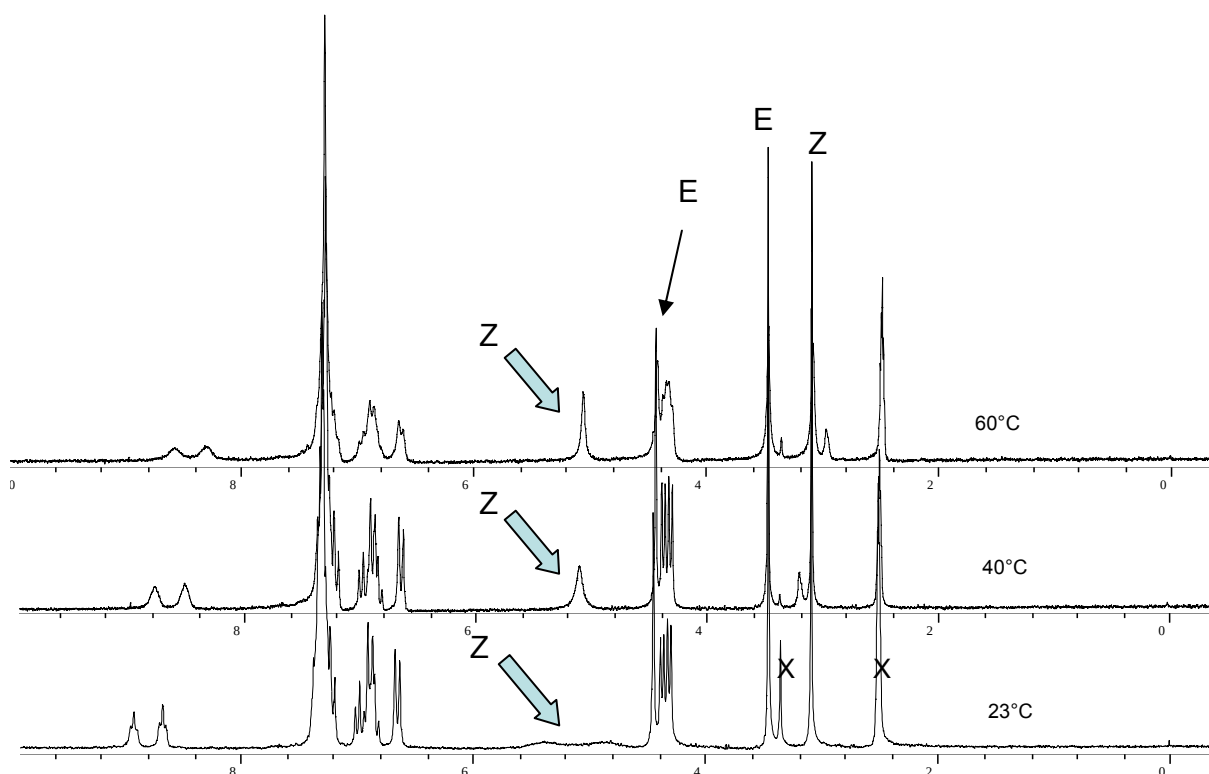


Abb. 61: Temperaturabhängige 200MHz ^1H -NMR-Spektren von **28** (DMSO-d_6)

Für die beobachteten Effekte gibt es nach einer intensiven Recherche an bekannten Nitrosohydrazinen kein Beispiel. Ein Grund könnte darin liegen, dass bislang keine derartigen aromatisch-aliphatisch substituierten Derivate vom Typ C und D bekannt sind.

Die besonderen Verhältnisse im (Z)-rotameren Nitrosohydrazin lassen sich vielleicht am besten mit der sog. Atropisomerie rotationsbehinderter Biphenyle vergleichen, die auch als Konformationsenantiomerie bezeichnet wird¹³⁸. Die Methylenprotonen der beweglicheren (E)-konfigurierten Nitrosohydrazine werden mit einem scharfen Singulett bei ca. 4,4 ppm detektiert. Die eingeschränkte Rotation um die N,N-Hydrazingruppe der (Z)-konfigurierten Vertreter zeigt sich jedoch in einem mehr oder weniger breiten Signal für die entsprechenden Methylenprotonen, wobei jedes einzelne Proton getrennt registriert wird.

Betrachtet man die Abb. 60 („Newman-Projektion“ der (Z)-Rotameren), so ist bei den entsprechenden (E)-Rotameren lediglich der Nitroso-Sauerstoff nach „vorne“, d.h. syn zur substituierten Methylengruppe orientiert. Dadurch entfällt der Grund für die behinderte Rotation des methyl-phenyl-substituierten Hydrazinstickstoffs N, und damit auch die Anisotropie für die Methylenprotonen. Diese „sehen“ im zeitlichen

Mittel die gleiche magnetische Umgebung und kommen deshalb auch bei normaler Messtemperatur als scharfes Singulett und wie erwartet (syn-orientiert zum NO-Sauerstoff) bei höherer Feldstärke zur Resonanz (s.Abb. 61). Auch die Zuordnung der übrigen Signale steht im Einklang mit den bisher beschriebenen Effekten. Die N-Methylgruppe der E-Form (anti-NO) erscheint als Signal bei tieferem Feld (3,44 ppm) als beim Z-Rotameren (3,08 ppm). Auch die benzylichen Methylenprotonen und die austauschbaren NH-Signale der Amidgruppe werden für (E)- und (Z)-Formen getrennt registriert.

Nimmt man das ^1H -NMR-Spektrum von **28** in Benzol- d_6 auf, so fällt zunächst auf, dass sich das Rotameren-Verhältnis (anders als bei **18**) stark verändert. Unter Einbeziehung der vorangegangenen Diskussion ergibt die quantitative Auswertung der Signale, dass die (E)-Form nun stark überwiegt ($\sim 83\%$). Allerdings ist der solvent-shift durch Benzol nicht mehr in der gleichen Weise wie früher zu interpretieren: Mit der Einführung eines Phenyl-Substituenten am Hydrazin gehorcht die Verschiebung nun nicht mehr den gleichen Prinzipien wie bei den N-dialkylierten Derivaten. Offensichtlich bilden sich bei **28** bedingt durch die beiden Aromaten andere Benzol-Solvate, sodass Rückschlüsse über das Ausmaß der Hochfeldeffekte problematisch werden.

Umgekehrt bedeutet dies, dass die Auswertung derartiger solvent-shifts nur innerhalb strukturell sehr ähnlicher Verbindungen erlaubt ist.

^{13}C -NMR-Spektrum von **28**

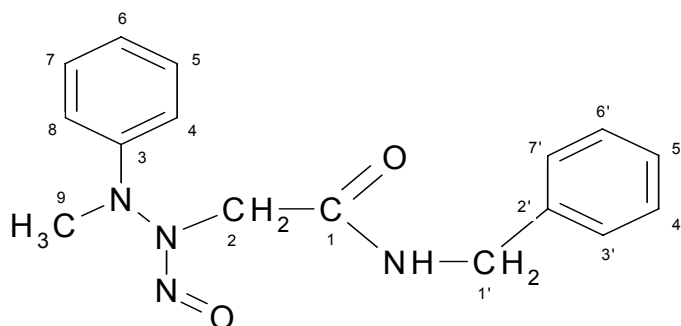


Abb. 62: Bezifferung der C-Atome von **28**

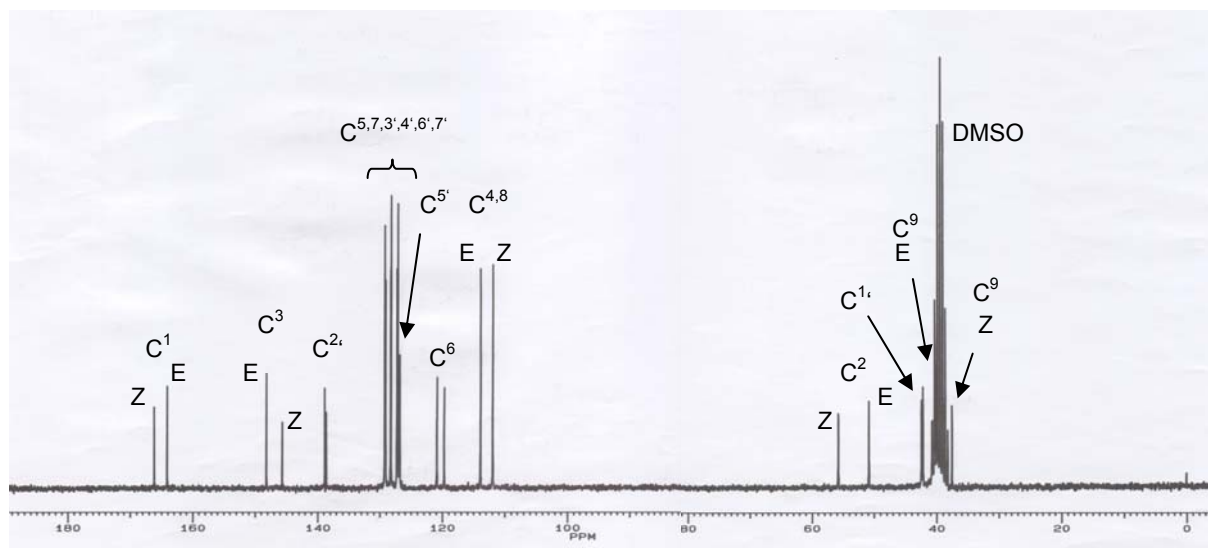


Abb. 63: 200MHz ^{13}C -NMR-Spektrum von **28** (DMSO- d_6)

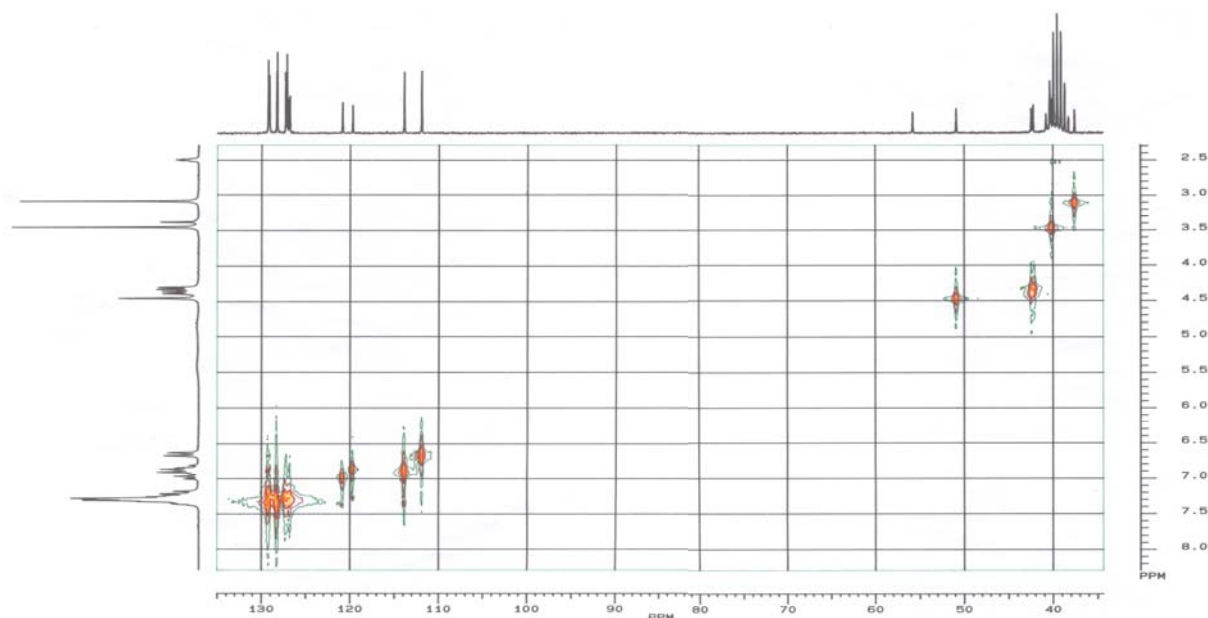


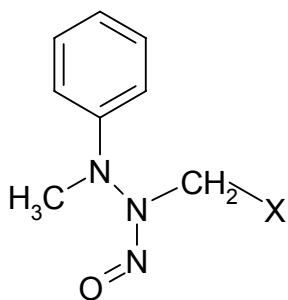
Abb. 64: 200MHz ^1H , ^{13}C -korreliertes NMR-Spektrum von **28** (DMSO- d_6)

Auch in dem von **28** in DMSO- d_6 aufgenommenen ^{13}C -NMR-Spektrum erkennt man die beiden Rotamere an jeweils verdoppelten Signalen. Der Unterschied der chemischen Verschiebung wird umso grösser, je räumlich näher die Atome an der NNO-Gruppe lokalisiert sind. In gleicher Weise wie die Protonen so werden auch die ^{13}C -Signale dann zu relativ höherem Feld verschoben, wenn sie syn zum Nitroso-Sauerstoff angeordnet sind, während die anti-ständigen C-Kerne paramagnetisch

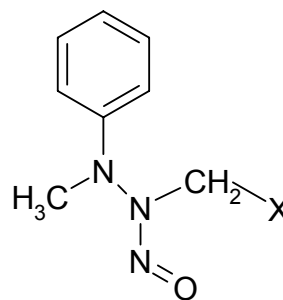
beeinflusst werden. Berücksichtigt man diese Effekte, so ergibt sich die Zuordnung der nicht korrelierten C-Signale wie in Abb. 63 gezeigt.

Aus dem ^1H , ^{13}C -korrelierten Spektrum (Abb. 64) lassen sich weitere Informationen gewinnen: Das aus dem Aromaten-Multiplett am deutlichsten hochfeld-abgesetzte Signal („Dublett“ bei ca. 6,7 ppm) steht für H-4 und H-8 der (Z)-Form, während (E)-H-4 und (E)-H-8 zusammen mit (E)- und (Z)-H-6 zusammenfallen. Die beiden Signale für die N-Methylgruppe sind z.T. vom DMSO überlagert, jedoch an Hand ihrer Kreuzsignale gut zu identifizieren. Während die Methylengruppe (C-2) der (E)-Form bei 50,8 ppm das erwartete Kreuzsignal liefert, wird ein solches für die (Z)-Form bei 55,7 ppm nicht registriert, da die Protonensignale zu unscharf sind. Auch damit wird die früher getroffene Struktur bestätigt.

Allg. Formel der Nitrosohydrazine der Gruppe C:



(Z)-Form

26 - 28

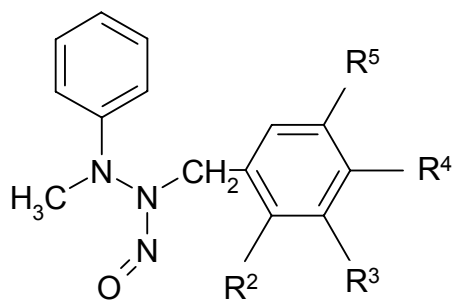
(E)-Form

Modellsubstanz	X	Verteilung, (E)- / (Z)-Form	δ in [ppm] $\text{CH}_3\text{-N-}$	δ in [ppm] $\text{-N(NO)-CH}_2\text{-}$
<u>28</u>		53%, (E)	3,44	4,44
		47%, (Z)	3,08	4,8 / 5,4 sehr breit
<u>26</u>	—COOH	64%, (E)	3,42	4,44
		36%, (Z)	3,13	ca. 5,0 sehr breit
<u>27</u>		70%, (E)	3,41	4,64
		30%, (Z)	3,10	ca. 5,6 sehr breit

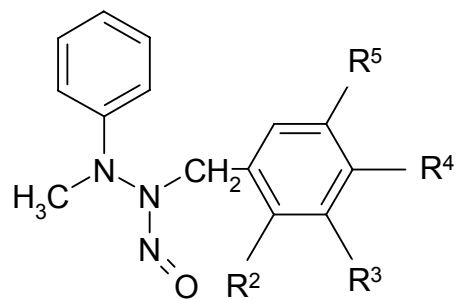
Tab. 6: Rotamerenverhältnis und chem. Verschiebung der $^1\text{H-NMR}$ -Signale (DMSO-d_6) der Nitrosohydrazine der Gruppe C

Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der beiden anderen Nitrosohydrazine aus der Gruppe C zeigen ähnliche Effekte (Tab. 6): Bei den (Z)-Rotameren, deren Menge im Lösungsmittel DMSO gegenüber **28** deutlich abnimmt, erkennt man die sehr breiten Signale für die Methylenprotonen. Dagegen ergeben die Methylenprotonen der (E)-Formen scharfe Singulets. Die Methylgruppen der (E)-Formen kommen - wie erwartet - bei tieferem Feld zur Resonanz als bei den (Z)-Rotameren.

Allg. Formel der Nitrosohydrazine der Gruppe D:



(Z)-Form

39 - 42

(E)-Form

Modellsubstanz	Verteilung, (E)- / (Z)-Form	δ in [ppm] $\text{CH}_3\text{-N-}$	δ in [ppm] $\text{-N(NO)-CH}_2\text{-}$
<u>39</u> $\text{R}^{2-5} = \text{H}$	30%, (E)	3,27	4,98
	70%, (Z)	2,82	ca. 5,5 sehr breit
<u>40</u> $\text{R}^2 = \text{Cl}, \text{R}^{3-5} = \text{H}$	22%, (E)	3,26	5,11
	78%, (Z)	2,85	ca. 5,6 breit
<u>42</u> $\text{R}^2 = \text{H}, \text{R}^{3-5} = \text{-OCH}_3$	38%, (E)	3,30	4,91
	62%, (Z)	2,89	ca. 5,5 sehr breit
<u>41</u> $\text{R}^4 = \text{-CF}_3, \text{R}^{2,3,5} = \text{H}$	34%, (E)	3,32	5,08
	66%, (Z)	2,86	ca. 5,5 sehr breit

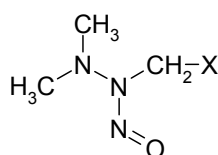
Tab. 7: Rotamerenverhältnis und chem. Verschiebung der $^1\text{H-NMR}$ -Signale (DMSO-d_6) der Nitrosohydrazine von Gruppe D

In den ^1H -NMR-Spektren der Modellsubstanzen der Gruppe D beobachtet man die gleichen Besonderheiten wie bei Gruppe C. Die Methylenprotonen der (Z)-Rotameren liefern jeweils ein kaum erkennbares, sehr breites Resonanzsignal, während das entsprechende Signal der (E)-Formen bei höherem Feld als scharfes Singulett erscheint. Auf den ersten Blick überraschend ist die Tatsache, dass in DMSO der Anteil der (Z)-Rotameren nun deutlich überwiegt. (Tab. 7).

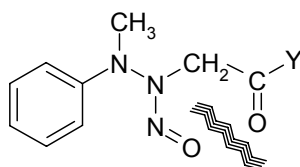
Verhältnis der (E)-/(Z)-Isomere in den Gruppen A - D

Vergleicht man die verschiedenen Gruppen der Modellsubstanzen miteinander, so fallen bei gleichen Messbedingungen deutliche Unterschiede im Verhältnis der rotameren Nitrosohydrazine auf:

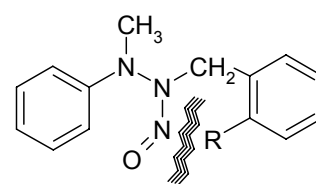
In den Gruppen **A** und **B** überwiegen die (E)-konfigurierten Spezies mit ca. 80% (s.Tab. 5, S.106). Dieser Trend erscheint plausibel vor dem Hintergrund der sterischen Wechselwirkungen zwischen der Nitrosogruppe und den übrigen Substituenten am Nitrosyl-tragenden Stickstoffatom. Der Nitrosyl-Sauerstoff orientiert sich bevorzugt auf die Seite der X-substituierten α -Methylengruppe, da hier die geringere Hinderung gegenüber den beiden Methylgruppen zu erwarten ist.



Gruppen **A + B**



Gruppe **C**



Gruppe **D**

(E)-Form deutlich begünstigt (>70%) (E)-Form noch begünstigt (>50%) (Z)-Form begünstigt (>60%)

Abb. 65: Sterische Wechselwirkungen in den Nitrosohydrazinen der Gruppen A - D

In der Gruppe **C** liegt der Anteil der (E)-konfigurierten Rotameren zwar ebenfalls über 50%, jedoch ist der Unterschied nicht mehr so ausgeprägt wie in den Gruppen **A** und **B** (s.Tab. 6, S.113). Dies überrascht zunächst, da man vom voluminöseren N-Methylphenylsubstituenten eigentlich eine grössere sterische Hinderung und damit einen noch höheren (E)-Anteil als bei **A** und **B** erwarten sollte. Da jedoch vor allem bei **28** der umgekehrte Effekt beobachtet wird (53% (E) / 47% (Z)) scheinen die

Verhältnisse komplexer zu sein. So dürfen außer den sterischen Wechselwirkungen auch elektronische Effekte durch die zusätzliche Carbonylgruppe an der α -Methylen-Position wirken, die zu einer elektrostatischen Repulsion des Nitrosyl-Sauerstoffs beitragen können. Dass dieser Effekt sich nicht auch bei **3** (Typ **A**) auswirkt, liegt wahrscheinlich am nicht weiter substituierten Amid-Stickstoff.

In der Gruppe **D** kehrt sich das Verhältnis der beiden Rotamere zu Gunsten der (Z)-Formen um, die nun mit ca. 70% deutlich überwiegen (s.Tab. 7, S.114). Im Vergleich zur Gruppe **C** ist die α -Methylengruppe nun direkt mit einem Phenylring substituiert, wodurch die ungünstigen Wechselwirkungen mit dem NO-Sauerstoff zunehmen. Besonders ausgeprägt ist dieses Phänomen beim Nitrosohydrazin **40** zu beobachten, das aufgrund des ortho-Chlor-Substituenten einen besonders hohen Anteil von fast 80% des (Z)-Rotameren aufweist.

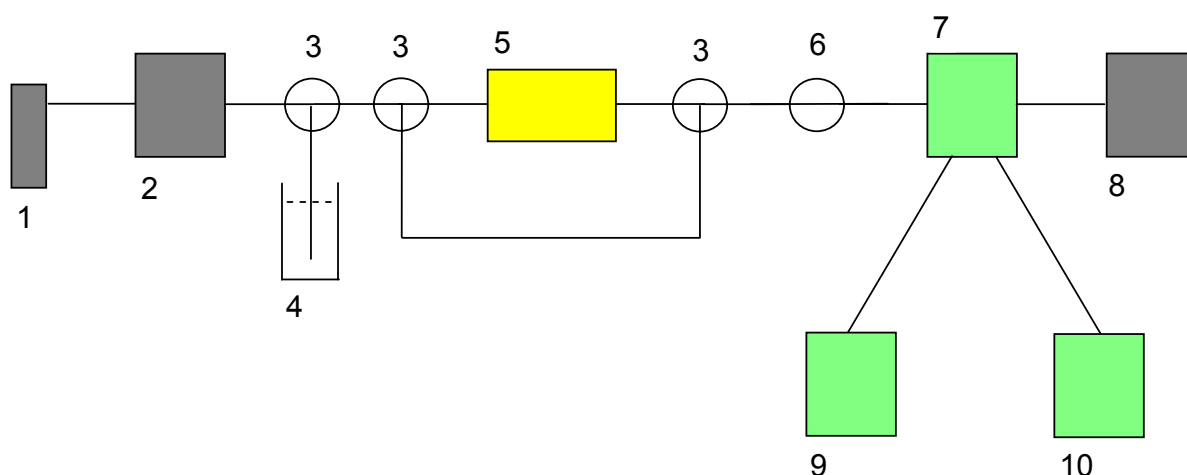
3.3 Untersuchung der NO[•]-Freisetzung aus den Modellsubstanzen der Gruppen A - D

3.3.1 Messplatz und Methode der NO[•]-Freisetzung

Die Kinetik der NO[•]-Freisetzung aus den Modellsubstanzen der Gruppen A – D sollte unter kontrollierten Standardbedingungen mit Hilfe der Chemilumineszenz-Methode bestimmt werden. Dazu war die Einrichtung eines Messplatzes zur kontinuierlichen Bestimmung von NO[•] in der Gasphase nach Austreiben aus der Ansatzlösung erforderlich.

3.3.1.1 Messplatz

Zur NO[•]-Bestimmung wurde ein NO/NO_x-Chemilumineszenzdetektor CLD 70 E (ECO- Physics) verwendet, der in ein Rechnersystem zur Datenerfassung und zur Fernbedienung des Detektors eingebunden wurde. Zur Messdatenaufzeichnung wurde das Excel-Add-in „NO_x View CLD 2xls“ verwendet. Das Messprinzip des Detektors beruht auf der Messung der Chemilumineszenz, die aus der Reaktion von NO[•] mit Ozon resultiert (s. S. 45). Als Trägergas wurde Stickstoff 4.0 (>99,99% Reinheit) verwendet, das über eine Glaskapillare in die Reaktionslösung eingeleitet wurde (s. Abb. 66). Auf diese Weise wurde das freigesetzte NO[•] aus der Reaktionslösung ausgetrieben und mit dem Trägergasstrom direkt in den Detektor geleitet. Der vom Detektor angezeigte Messwert gibt die momentane NO[•]-Konzentration im Trägergas in der Reaktionskammer des Detektors in [Vpm = volume per million $\equiv$ ppm (V/V)] an.



- | | | | |
|----|--------------------------------|-----|--------------------------------------|
| 1: | Stickstoff-Gasflasche | 5: | Reaktionsgefäß |
| 2: | Waschflaschensystem | | für die NO [•] -Freisetzung |
| 3: | Dreiwegehahn | 6: | Nadelventil |
| 4: | Tauchgefäß mit Parafin und | 7: | NO _x -Analysator CLD 70 E |
| | Quecksilber zum Konstanthalten | 8: | Ozon-Zerstörer/Vakuumpumpen- |
| | des Atmosphärendruckes in der | | Einheit |
| | Apparatur | 9: | Rechner |
| | | 10: | Schreiber |

Abb. 66: Installation des Messplatzes zur NO[•]-Detektion

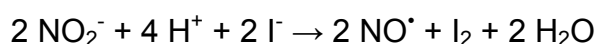
3.3.1.2 Methode

Bei den Untersuchungen zur NO[•]-Freisetzung resultieren NO[•]-Tränergaskonzentrations-Zeit-Kurven mit einem typischen, steil ansteigenden Ast, einem Konzentrationsmaximum $c_{\max}$ zum Zeitpunkt $t_{\max}$ und einem allmählich abfallenden Teil (z.B. Abb. 67). Charakteristisch für die verwendete Messmethode ist die im Vergleich zur NO[•]-Freisetzung schnelle Austreibung des NO[•] aus der Probenlösung mit Hilfe des Trärgases. Die NO[•]-Freisetzung stellt somit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Reaktionsfolge Freisetzung –

Austreibung – Detektion dar. Ein Maß für die freigesetzte Menge NO[•] ist demnach die Fläche unter der NO[•]-Trägergaskonzentrations-Zeit-Kurve („area under the curve“, AUC). Mithilfe der AUC und dem idealen Gasgesetz ($p \cdot V = n \cdot R \cdot T$) kann die in einem bestimmten Zeitraum freigesetzte NO[•]-Menge in [μmol] berechnet werden. Diese Menge kann anschliessend mit der theoretisch zu erwartenden NO[•]-Menge („% der theoretisch berechneten NO[•]-Menge“) verglichen werden.

3.3.1.3 Modellsystem Nitrit/Iodid zur NO[•]-Freisetzung

Zur Überprüfung des Messverfahrens wurde NO[•] *in situ* aus einer vorgelegten Natriumnitrit-Lösung (10 μmol) durch Zugabe einer schwefelsauren Kaliumiodid-Lösung (50 μmol) freigesetzt. Nitrit oxidiert dabei in saurer Lösung Iodid zu Iod mit einer Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten $k = 3,2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ in einer Reaktion quasi-erster-Ordnung entsprechend folgender Gleichung¹³⁹:



Dieses System wurde bereits umfassend zur Bestimmung von Nitrit durch Messung des in der Reaktion des Analyten mit einem Überschuss an Iodid stöchiometrisch gebildeten Triiodids angewendet¹⁴⁰. Durch Austreiben mittels Stickstoff wurde das freigesetzte NO[•] im werkseitig kalibrierten Chemilumineszenzdetektor quantitativ bestimmt. Diese Bestimmung wurde mit zwei verschiedenen Nitritmengen durchgeführt (jeweils n=3) und zeigte dreierlei:

1. Die freigesetzte NO[•]-Menge entsprach $\sim 73 \pm 2\%$ der berechneten Menge, die theoretisch aus der vorgelegten Nitritmenge freigesetzt werden könnte, wenn man eine Ausbeute von 100% im Detektor annimmt.
2. Die Fehlergrenze überstieg bei keinem Einzelversuch die Grenze von $\pm 2\%$ vom Mittelwert.
3. Die detektierte NO[•]-Menge ist unabhängig vom Volumen der Reaktionslösung.

¹³⁹ Mori, V., Bertotti, M. *Electroanalysis* **1999**, 11, 234 - 237

¹⁴⁰ Sen, N., Baddoo, P.A., Seaman, S.W. *J. Chrom. A* **1994**, 673, 77 - 84

In Abb. 67 ist eine typische NO[•]-Tränergaskonzentrations-Zeit-Kurve exemplarisch dargestellt:

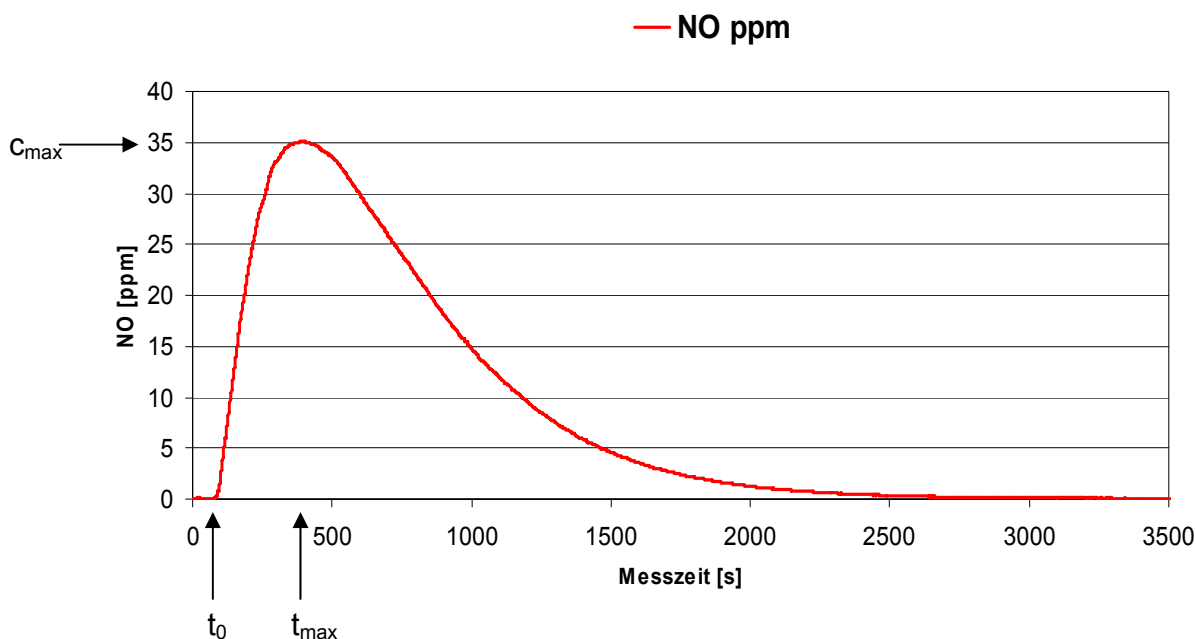


Abb. 67: NO[•]-Tränergaskonzentrations-Zeit-Kurve mit Nitrit/Iodid-System

Vom Beginn der Messung bei $t = 0$ Sekunden an bis zum Zeitpunkt t_0 (Abb. 67, Pfeil) durchströmt das inerte Trägergas die vorgelegte Nitrit-Lösung (10 μmol Natriumnitrit). Zum Zeitpunkt t_0 wird diese Nitrit-Lösung mit der schwefelsauren Iodid-Lösung versetzt, ohne dass das System durch weitere Einflüsse (wie z.B. Sauerstoffzufuhr) gestört wird (geschlossenes System). Im Zeitintervall von $t = 0$ bis $t_0 = 66$ Sekunden wird nahezu konstant die bei der unteren Messbereichsgrenze liegende äußerst geringe Menge von 0,06 ppm NO[•] im Trägergas vom Detektor registriert. Nach Zugabe der schwefelsauren Iodid-Lösung bei t_0 steigt das Messsignal innerhalb von ca. 5,4 Minuten ($t_{max} - t_0 = 323$ Sekunden) bis $t_{max} = 389$ Sekunden auf $c_{max} = 35,1$ ppm NO[•] im Trägergas an. Bis $t = 3500$ Sekunden ist das Messsignal allmählich wieder bis auf 0,05 ppm NO[•] abgesunken. Durch Integration der Fläche unter der Kurve wird die AUC, und mit deren Hilfe die gesamte detektierte Menge NO[•] zu 7,31 μmol (= 73,1% der theoretisch berechneten Menge) bestimmt.

3.3.1.4 Modellsystem Benzolsulfhydroxamsäure (BSH) / Kaliumhexacyanoferrat(III) zur NO[•]-Freisetzung

In einer zweiten Reihe wurde das am Nitrit validierte Messverfahren der NO[•]-Freisetzung auch auf Benzolsulfhydroxamsäure (BSH) angewendet. Wie unter 1.4.11 (s.S.31) beschrieben, setzt diese Substanz unter oxidativen Bedingungen pH-abhängig NO[•] frei, wobei sich Kaliumhexacyanoferrat(III) am besten bewährt hat¹⁴¹. Wie erwartet bestand ein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Menge BSH und der detektierten NO[•]-Menge. Die Reaktionsgeschwindigkeit weist eine deutliche pH-Abhängigkeit auf. Bei einer Anhebung des pH-Wertes der Probelösung von pH 7,5 auf 8,0 kommt es zu einer beschleunigten NO[•]-Bildung, die insgesamt detektierte NO[•]-Menge änderte sich dagegen nicht (planimetrisch ausgewertete Versuche).

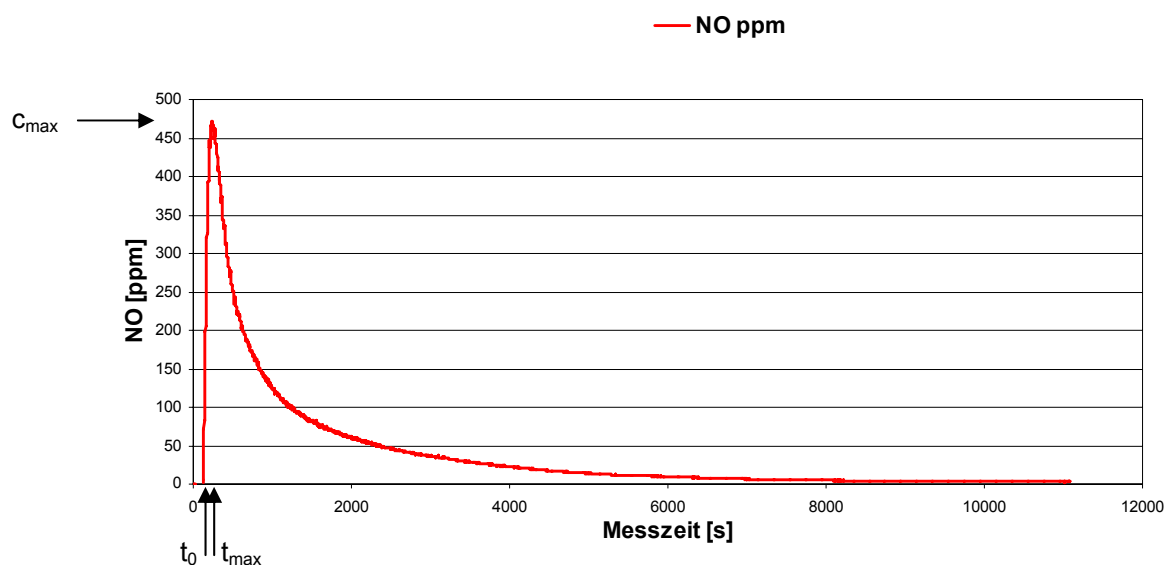


Abb. 68: NO[•]-Tränergaskonzentrations-Zeit-Kurve von BSH/Kaliumhexacyanoferrat(III) bei pH 8,0

In Abb. 68 ist die Konzentrations-Zeit-Kurve der NO[•]-Freisetzung aus BSH in wässriger, Acetonitril-haltiger Pufferlösung bei pH 8,0 dargestellt. Zum Zeitpunkt

¹⁴¹ Zamora, R., Grezsiok, A., Weber, H., Feelisch, M. *Biochem. J.* **1995**, 312, 333 - 339

$t_0 = 118$ Sekunden wurde der vorgelegten, vom Trägergas durchströmten BSH-Lösung (0,144 mmol / 50 ml) die 5-fache Menge Kaliumhexacyanoferrat(III) auf einmal zugesetzt. Darauf stieg das bis dahin konstante Detektor-Mess-Signal von praktisch 0 ppm $\text{NO}^\bullet$ innerhalb von ca. 2 Minuten ($t_{\text{max}} - t_0 = 127$ Sekunden) steil auf $c_{\text{max}} = 473$ ppm $\text{NO}^\bullet$ an. Nach ca. 3 Stunden fiel es bis auf ca. 3 ppm ab. Mit Hilfe der Integration der AUC wird die gesamte detektierte $\text{NO}^\bullet$ -Menge zu 0,108 mmol $\text{NO}^\bullet$ berechnet und ergibt überraschenderweise - ähnlich wie bei der $\text{NO}^\bullet$ -Freisetzung aus Iodid (s.S.119) - wiederum nur ca. 75% der theoretisch möglichen $\text{NO}^\bullet$ -Menge.

3.3.2 $\text{NO}^\bullet$ -Freisetzung aus den Modellsubstanzen der Gruppe A

Die $\text{NO}^\bullet$ -Freisetzung aus den Nitrosohydrazinen der Gruppe A wurde entsprechend AVV1 gemäss Kap. 6.4 analysiert: 0,335 mmol des jeweiligen Nitrosohydrazins wurden in zuvor 0,5 h mit Stickstoff entgaster wässriger, Acetonitril-haltiger Pufferlösung bei pH 7,5 mit Hilfe eines Chemilumineszenzdetektors unter Ausschluss von Luft unter Stickstoff analysiert (Abwarten bis die auf eingetragenen Luftsauerstoff zurückzuführende $\text{NO}^\bullet$ -Entwicklung abgeklungen ist, danach Feststellen der spontanen $\text{NO}^\bullet$ -Freisetzung des jeweiligen Nitrosohydrazins).

Das als Lösungsmittel verwendete Wasser-Acetonitril-Gemisch war erforderlich, um die Löslichkeit der Nitrosohydrazine einerseits und der anorganischen Reagenzien andererseits hinreichend zu gewährleisten.

Das Zeitintervall $t = 0$ Sekunden bis t_0 wurde individuell gewählt. Die Zugabe des Oxidationsmittels zum Zeitpunkt t_0 war erst dann möglich, wenn eventuelle Vorreaktionen abgeklungen waren und anschliessend die spontane $\text{NO}^\bullet$ -Freisetzung (ohne Oxidationsmittel) sicher bestimmt werden konnte. Während der Messungen wurde zum Zeitpunkt t_0 die berechnete fünffach-molare Menge (=1,675 mmol) Kaliumhexacyanoferrat(III) zugesetzt.

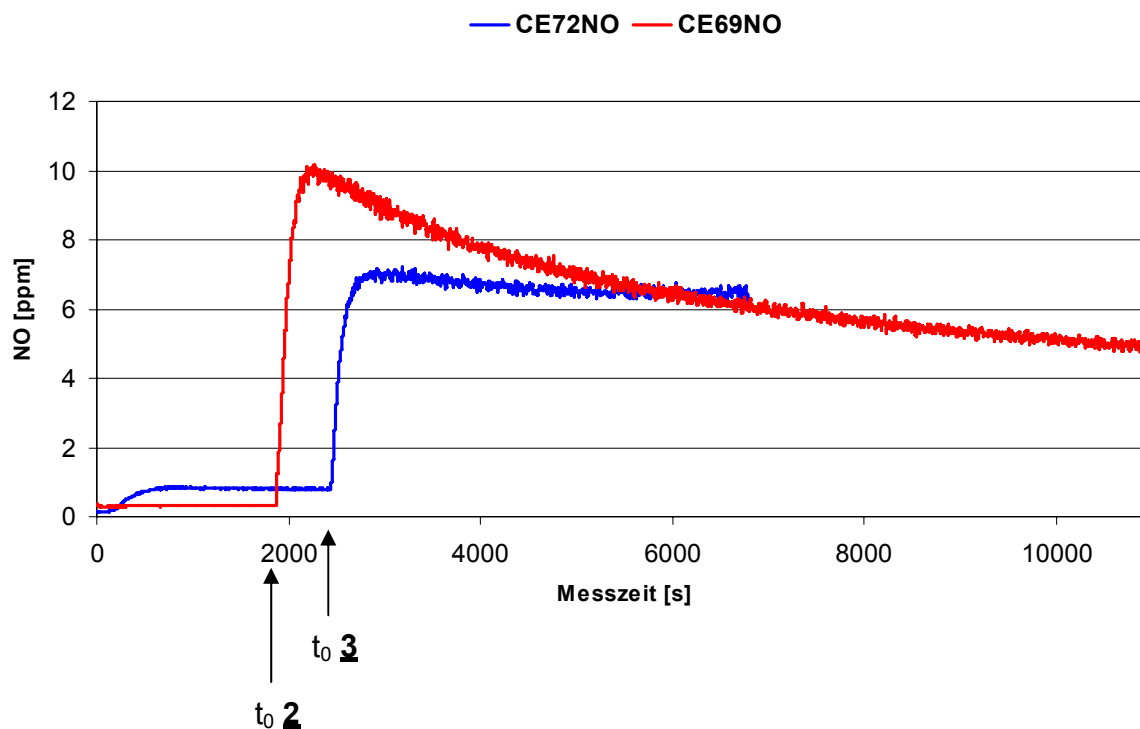


Abb. 69: $\text{NO}^{\bullet}$ -Tränergaskonzentrations-Zeit-Kurven von Modellsubstanzen der Gruppe A nach AVV1

	spontane $\text{NO}^{\bullet}$ -Freisetzung $t < t_0$		$t_{\max} - t_0$ [min]	max. $\text{NO}^{\bullet}$ -Freisetzung $c_{\max}$ (bei $t_{\max}$)		ges. $\text{NO}^{\bullet}$ -Freisetzung innerhalb t_0 bis $t_0 + 84$ min in $[\mu\text{g}] \text{NO}^{\bullet}$ (bzw. % der theor. ber. Menge)
	in [ppm] $\text{NO}^{\bullet}$	in [$\mu\text{g}/\text{min}$]		in [ppm] $\text{NO}^{\bullet}$	in [$\mu\text{g}/\text{min}$]	
2	0,31	0,14	6,9	10,16	4,56	183,3 ($\approx 1,8\%$)
3	0,80	0,36	12,5	7,19	3,23	244,3 ($\approx 2,4\%$)

Tab. 8: Charakteristische Parameter zur Charakterisierung der $\text{NO}^{\bullet}$ -Tränergaskonzentrations-Zeit-Kurven von Modellsubstanzen der Gruppe A

In Tab. 8 sind die charakteristischen Parameter der NO[•]-Tränergaskonzentrations-Zeit-Kurven aufgelistet:

- die spontane, equilibrierte NO[•]-Freisetzung vor Zusatz des Oxidationsmittels ($t < t_0$) in [ppm bzw. µg/min]
- die Zeitdauer vom Zusatz des Oxidationsmittels ab dem Zeitpunkt t_0 bis zum Erreichen des Maximums $t_{\max}$ in [min]
- die maximale NO[•]-Freisetzungsrage $c_{\max}$ zum Zeitpunkt $t_{\max}$ in [ppm bzw. µg/min]
- die innerhalb des Zeitintervalls von 84 min nach t_0 freigesetzte Menge NO[•] in [µg] bzw. in Prozent der theoretisch berechneten Menge NO[•]

Das Zeitintervall von 84 Minuten wurde willkürlich gewählt und stellt einen Kompromiss zwischen den praktischen Anforderungen (endliche Messzeiten!) und der Tatsache dar, dass spätestens nach dieser Zeit die jeweils charakteristische NO[•]-Freisetzung aus den verschiedenen NO[•]-Donoren beobachtet oder extrapoliert werden kann.

Die spontane NO[•]-Freisetzung aus **2** ist nur schwach ausgeprägt (0,31 ppm NO[•]). Auf Zusatz von Kaliumhexacyanoferrat(III) kommt es zu einer deutlichen Steigerung der NO[•]-Freisetzungsrage auf ca. 10 ppm NO[•], die dann kontinuierlich auf ca. 5 ppm NO[•] innerhalb der Messzeit abfällt.

Die spontane NO[•]-Freisetzung von **3** liegt mit ca. 0,8 ppm NO[•] nicht wesentlich höher als die von **2**. Auf Zusatz des Oxidationsmittels kommt es zu einer deutlichen Steigerung der NO[•]-Freisetzung auf ca. 7 ppm NO[•]. Danach schliesst sich ein Plateau bei ca. 6,75 ppm NO[•] an.

Mit Hilfe des gut zugänglichen und als Substanz stabilen Sydnominins **6**, das in Lösung mit **2** im Gleichgewicht steht, sollte der Einfluss von unterschiedlichen Oxidationsmitteln überprüft werden. Neben Kaliumhexacyanoferrat(III) wurden Iod-Lösung (Lugol'sche-Lösung 5%), wässrige Silbernitrat-Lösung und Wasserstoffperoxid-Lösung verwendet.

Die Normalpotentiale dieser Oxidationsmittel unterscheiden sich folgt:

- $E^0([\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} / [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}) = 0,36\text{V}$
- $E^0(\text{I}_2/\text{I}^-) \approx E^0(\text{I}_3^-/\text{I}^-) = 0,54\text{V}$
- $E^0(\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}) = 1,39\text{V}$ (pH 7,5)
- $E^0(\text{Ag}^+/\text{Ag}^0) = 0,80\text{V}$

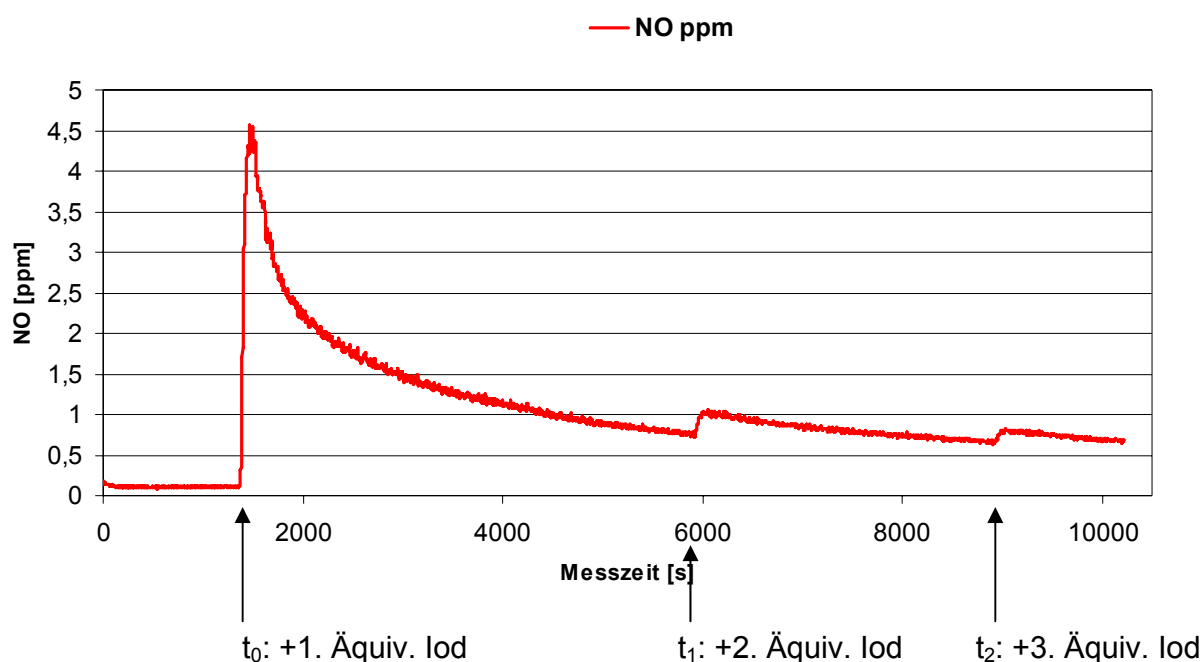


Abb. 70: NO^* -Tränergaskonzentrations-Zeit-Kurven von **2** unter Verwendung von Iod als Oxidationsmittel nach AVV2

Nach Gleichgewichtseinstellung der spontanen NO^* -Freisetzung ($t = 0$ Sek. bis t_0) wurde (analog **AVV2**) zunächst ein Äquivalent Iod zugesetzt (s.Abb. 70), worauf es zu einem raschen Anstieg der NO^* -Freisetzungsrates bis auf ca. 4,5 ppm NO^* kam, der allerdings geringer ausfiel als bei Verwendung von Kaliumhexacyanoferrat(III). Der kontinuierliche Abfall erfolgte dagegen schneller als mit dem Eisenkomplex. Auf Zusatz eines weiteren Äquivalents Iod kam es zwar wieder zu einem Anstieg, der jedoch wesentlich moderater ausfiel, worauf sich wieder eine Phase der Ermässigung bis auf ca. 0,6 ppm NO^* anschloss. Ein drittes Äquivalent Iod führte

dann nur noch zu einer marginalen $\text{NO}^{\bullet}$ -Freisetzung. Die insgesamt freigesetzte Menge $\text{NO}^{\bullet}$ beträgt weniger als 1% der theoretisch berechneten Menge.

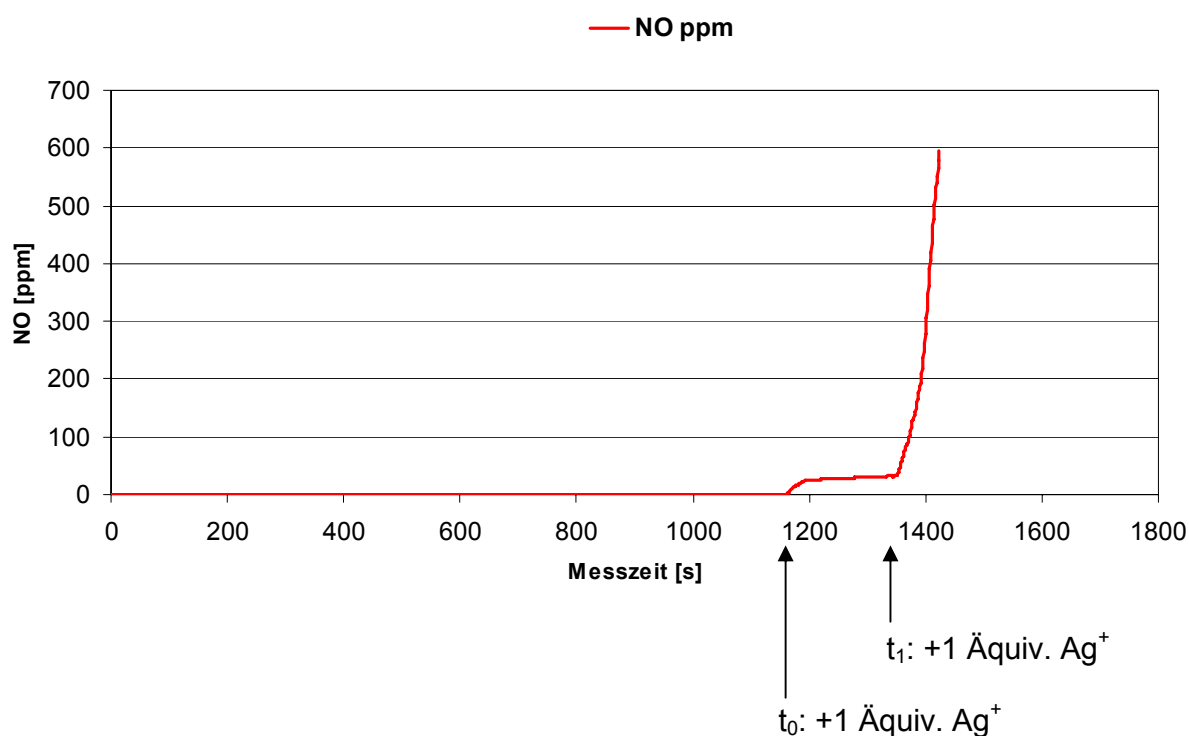


Abb. 71: $\text{NO}^{\bullet}$ -Tränergaskonzentrations-Zeit-Kurven von **2** unter Verwendung von Silbernitrat als Oxidationsmittel (AVV4)

Nach Einstellung des Gleichgewichts der spontanen $\text{NO}^{\bullet}$ -Freisetzung (Zeitintervall $t = 0$ Sek. bis t_0) wurde (analog **AVV 4**) zunächst ein Äquivalent Silbernitrat zugesetzt. Da der $\text{NO}^{\bullet}$ -Donor als Hydrochlorid in die Reaktion eingesetzt wurde, kommt es zunächst zu der erwarteten Fällungsreaktion. Trotz der nur äußerst begrenzten Menge gelöster Silberionen ($\text{pL}(\text{AgCl}) = 10,0$) kommt es danach zu einer raschen Steigerung der $\text{NO}^{\bullet}$ -Freisetzungsrates bis auf ca. 30 ppm $\text{NO}^{\bullet}$. Auf Zusatz eines weiteren Äquivalentes Silbernitrat (t_1) stieg die $\text{NO}^{\bullet}$ -Freisetzung schlagartig bis über den Messbereich des Detektors (> 500 ppm $\text{NO}^{\bullet}$) hinaus an, sodass die Messung rasch beendet werden musste, da der Messbereich des Detektors überschritten wurde.

In einem weiteren Versuch mit **2** wurde das Oxidationsmittel Kaliumhexacyanoferrat(III) gegen Wasserstoffperoxid-Lösung (fünffacher Überschuss) ausgetauscht.

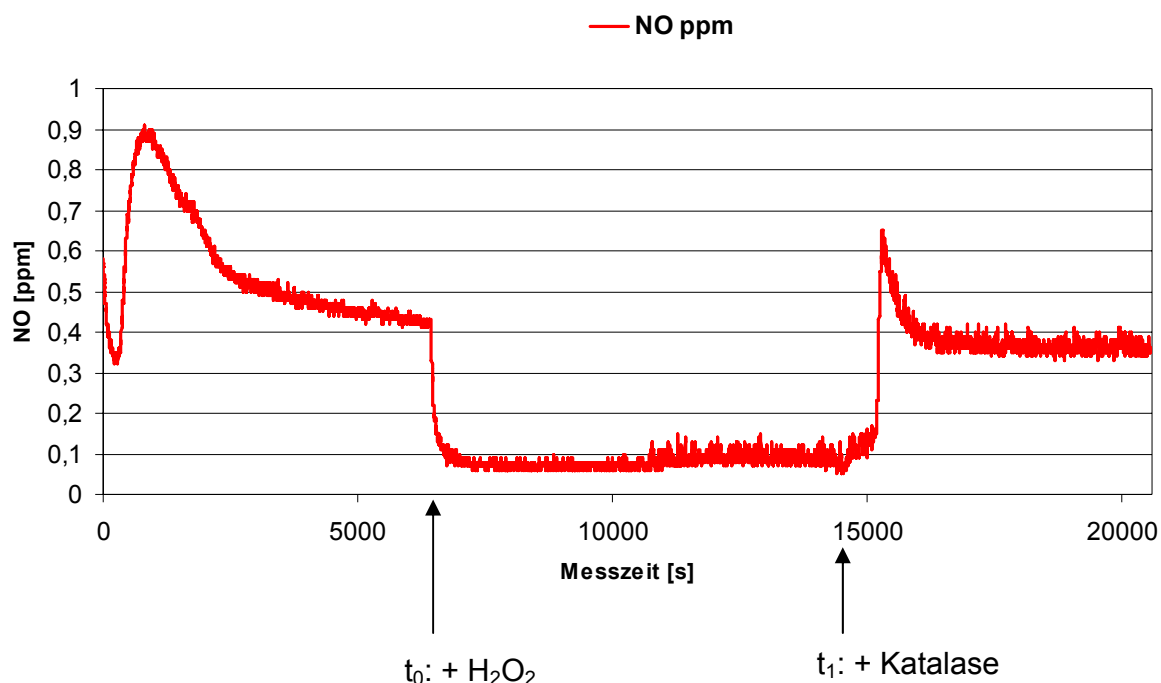


Abb. 72: NO[•]-Tränergaskonzentrations-Zeit-Kurven von **2** unter Verwendung von Wasserstoffperoxid und Katalase

Nach der Gleichgewichtseinstellung wurde (analog **AVV3**) die entsprechende Menge Wasserstoffperoxid (t_0) zugesetzt, worauf es sofort zu einer deutlichen **Verminderung** der detektierten Menge NO[•] kam, die danach auf diesem niedrigen Niveau für ca. 140 min nahezu konstant blieb. Nach Zugabe von Katalase (t_1) kam es nach einem kurzen Sprung zu der gleichen Freisetzungsrate wie vor der Wasserstoffperoxid-Zugabe.

In einem Parallelversuch wurde kein Einfluss von Katalase selbst auf die spontane NO[•]-Freisetzung aus **2** festgestellt.

3.3.3 NO[•]-Freisetzung aus den Modellsubstanzen der Gruppe B

Drei Nitrosohydrazine der Gruppe B wurden entsprechend AVV1, auf ihre NO[•]-Freisetzungseigenschaften untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 73 graphisch dargestellt und in Tab. 9 ausgewertet.

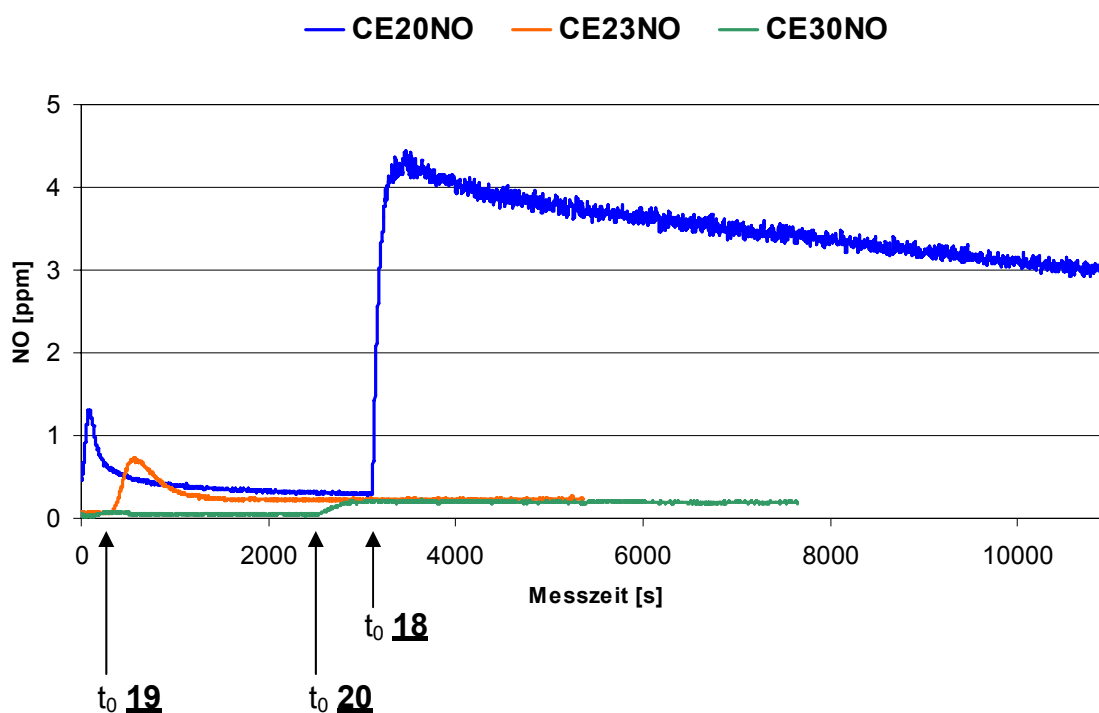


Abb. 73: NO[•]-Trägergaskonzentrations-Zeit-Kurven von Modellsubstanzen der Gruppe B nach AVV1

	spontane NO [•] -Freisetzung $t < t_0$		$t_{\max} - t_0$ [min]	max. NO [•] -Freisetzung $c_{\max}$ (bei $t_{\max}$)		ges. NO [•] -Freisetzung innerhalb t_0 bis t_0+84 min in [µg] (bzw. % der theor. ber. Menge)
	in [ppm] NO [•]	in [µg/min]		in [ppm] NO [•]	in [µg/min]	
18	0,29	0,13	6,1	4,45	2,00	138,5 (≈ 1,4%)
19	0,06	0,03	3,9	0,74	0,33	10,2 (≈ 0,1%)
20	0,04	0,02	10,1	0,22	0,10	7,2 (≈ 0,1%)

Tab. 9: Charakteristische Parameter zur Charakterisierung der NO[•]-Trärgaskonzentrations-Zeit-Kurven von Modellsubstanzen der Gruppe B

Vor Zugabe des Oxidationsmittels (Zeitintervall $t = 0$ Sek. bis t_0) zeigen **19** und **20** nach der Gleichgewichtseinstellung sehr geringe, spontane NO[•]-Freisetzungsraten, die beim Nitril **18** deutlich höher liegt. Nach Zugabe von Kaliumhexacyanoferrat(III) ist in allen drei Fällen ein Anstieg der NO[•]-Freisetzung festzustellen, der im Falle des Nitrils **18** jedoch wesentlich stärker ausfällt als bei den beiden übrigen Modellsubstanzen.

3.3.4 NO[•]-Freisetzung aus den Modellsubstanzen der Gruppe C

Die Nitrosohydrazine der Gruppe C wurden entsprechend AVV1 auf ihre NO[•]-Freisetzungseigenschaften untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 74 graphisch dargestellt und in Tab. 10 ausgewertet.

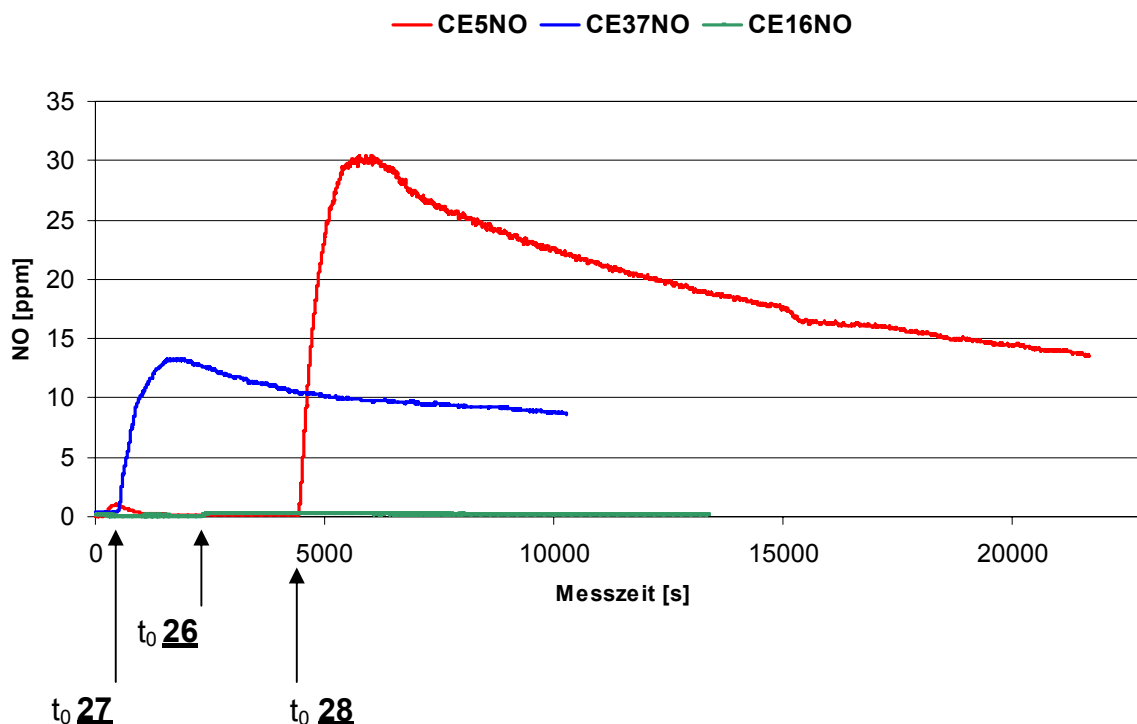


Abb. 74: $\text{NO}^{\bullet}$ -Tränergaskonzentrations-Zeit-Kurven von Modellschubstanzen der Gruppe C nach AVV1

	spontane $\text{NO}^{\bullet}$ -Freisetzung $t < t_0$		$t_{\text{max}} - t_0$ [min]	max. $\text{NO}^{\bullet}$ -Freisetzung c_{max} (bei t_{max})		ges. $\text{NO}^{\bullet}$ -Freisetzung innerhalb t_0 bis $t_0 + 84$ min in $[\mu\text{g}]$ (bzw. % der theor. ber. Menge)
	in [ppm] $\text{NO}^{\bullet}$	in $[\mu\text{g}/\text{min}]$		in [ppm] $\text{NO}^{\bullet}$	in $[\mu\text{g}/\text{min}]$	
28	0,14	0,06	26,9	30,46	13,7	944,8 ($\approx 9,4\%$)
27	0,37	0,17	20,1	13,31	5,98	411,1 ($\approx 4,1\%$)
26	0,06	0,03	6,3	0,33	0,15	9,3 ($\approx 0,1\%$)

Tab. 10: Charakteristische Parameter der $\text{NO}^{\bullet}$ -Tränergaskonzentrations-Zeit-Kurven von Modellschubstanzen der Gruppe C

Vor Zugabe des Oxidationsmittels (jeweiliges t_0) zeigen alle Vertreter der Gruppe C sehr ähnliche, kaum messbare spontane $\text{NO}^{\bullet}$ -Freisetzungsraten. Auf Zusatz von Kaliumhexacyanoferrat(III) (t_0) sind dagegen deutliche Unterschiede festzustellen.

Nicht nur innerhalb dieser Gruppe, sondern auch im Vergleich mit allen zuvor bei denselben Bedingungen untersuchten Nitrosohydrazinen zeigt das Amid **28** das grösste Maximum der NO[•]-Freisetzung mit ca. 30 ppm NO[•]. Der Benzylester **27** weist mit $c_{\max} = 13,5$ ppm das zweithöchste $c_{\max}$ aller untersuchten Donoren auf. Dagegen kommt es bei der Carbonsäure **26** nach Zusatz des Oxidationsmittels kaum zu einer Steigerung der basalen NO[•]-Freisetzung.

Wegen der außergewöhnlich hohen NO[•]-Freisetzung aus **28** wurde in einem weiteren Experiment das Oxidationsmittel Kaliumhexacyanoferrat(III) gegen Iod-Lösung ausgetauscht, welche in Form einer äquimolaren 5%-igen Lugol'schen-Lösung zur Reaktion gebracht wurde. Die NO[•]-Tränergaskonzentrations-Zeit-Kurve ist in Abb. 75 dargestellt.

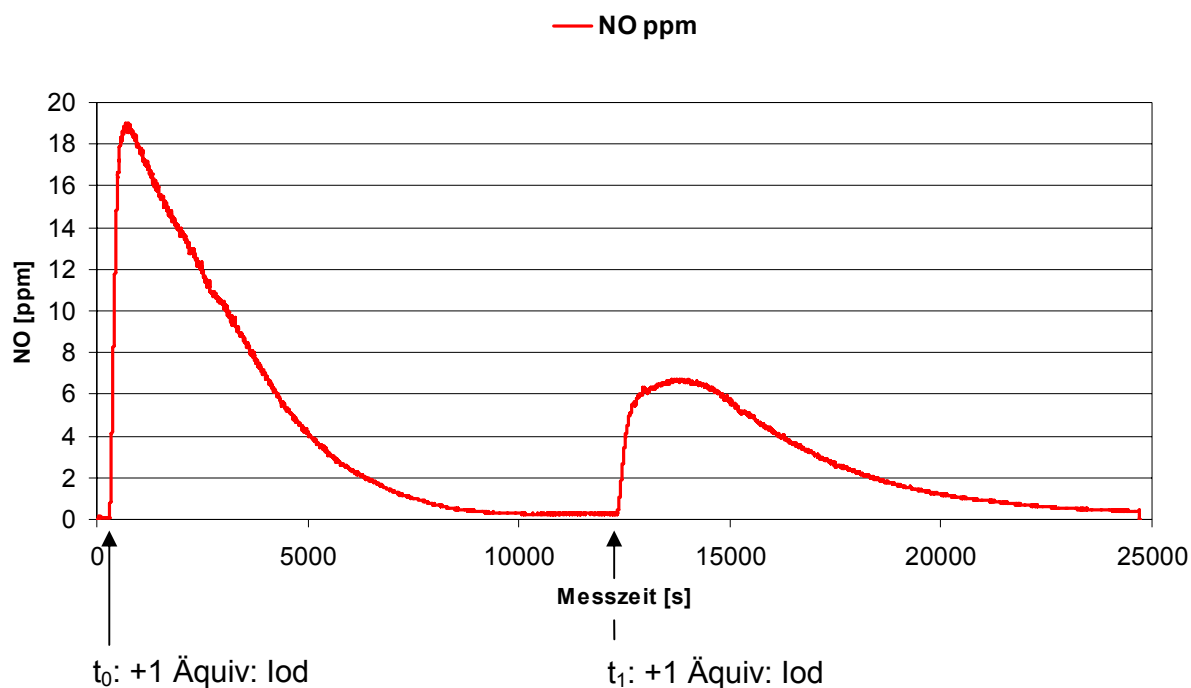


Abb. 75: NO[•]-Tränergaskonzentrations-Zeit-Kurven von **28** und Iod-Lösung (analog AVV2)

Auf Zusatz der Iodlösung (t_0) setzt eine intensive NO[•]-Freisetzung ein ($c_{\max} \approx 18$ ppm NO[•]), die allerdings relativ rasch wieder auf die Basislinie abfällt. Nach der Gleichgewichtseinstellung wurde ein weiteres Äquivalent Iod der Reaktionslösung zugesetzt (t_1). Danach beobachtet man einen erneuten Anstieg der NO[•]-Rate, die

jedoch nur noch ein Drittel des ursprünglichen Anstiegs ausmacht. Die insgesamt freigesetzte Menge $\text{NO}^{\bullet}$ beträgt ca. 7% der theoretisch berechneten Menge.

3.3.5 $\text{NO}^{\bullet}$ -Freisetzung aus den Modellsubstanzen der Gruppe D

Die Ergebnisse der $\text{NO}^{\bullet}$ -Freisetzung dieser Modellsubstanzen sind in Abb. 76 graphisch dargestellt.

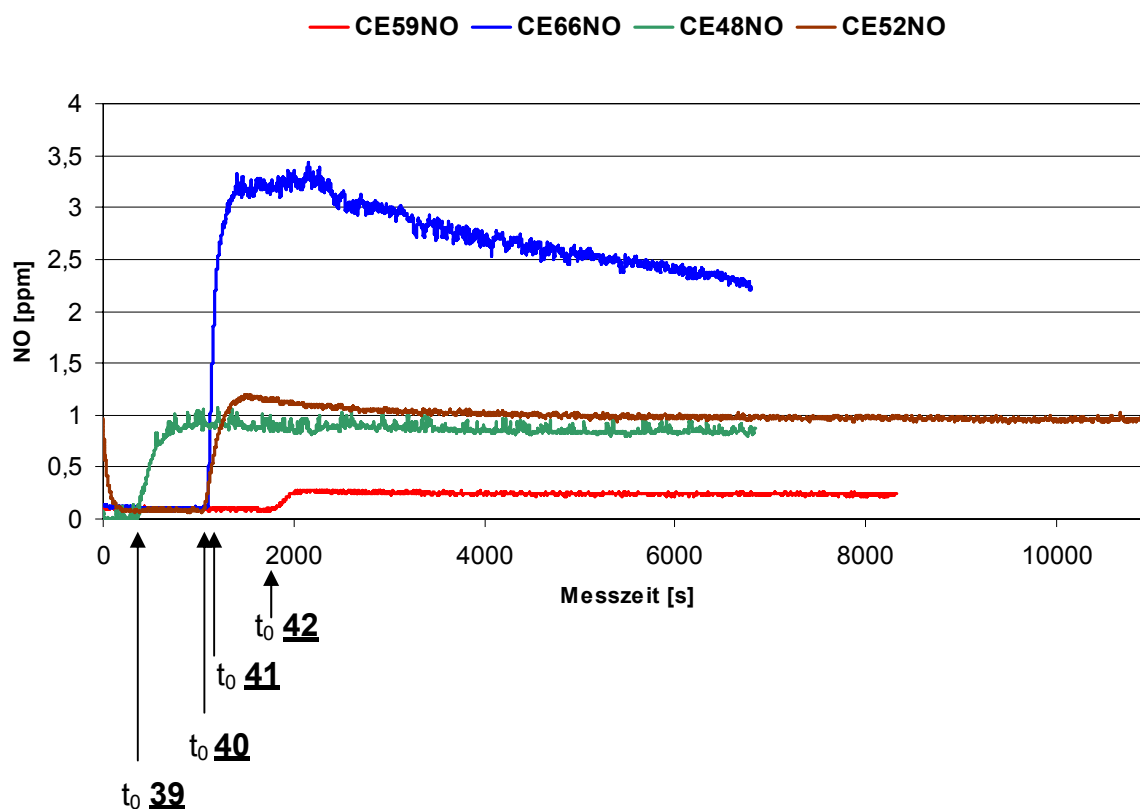


Abb. 76: $\text{NO}^{\bullet}$ -Tränergaskonzentrations-Zeit-Kurven von Modellsubstanzen der Gruppe D nach AVV1

	spontane NO [•] -Freisetzung $t < t_0$		$t_{\max} - t_0$ [min]	max. NO [•] -Freisetzung $c_{\max}$ (bei $t_{\max}$)		ges. NO [•] -Freisetzung innerhalb t_0 bis t_0+84 min in [µg] (bzw. % der theor. ber. Menge)
	in [ppm] NO [•]	in [µg/min]		in [ppm] NO [•]	in [µg/min]	
42	0,09	0,04	5,0	0,28	0,13	9,0 (≈ 0,1%)
41	0,09	0,04	19,2	3,44	1,55	103,1 (≈ 1,0%)
39	0,02	0,01	14,2	1,07	0,48	32,4 (≈ 0,3%)
40	0,09	0,04	7,6	1,20	0,54	38,4 (≈ 0,4%)

Tab. 11: Charakteristische Parameter der NO[•]-Trärgaskonzentrations-Zeit-Kurven der Modellsubstanzen der Gruppe D

Die Vertreter der Gruppe D setzen vor Zugabe des Oxidationsmittels (t_0) nur geringe Mengen NO[•] spontan frei. Dagegen werden auf Zusatz von Kaliumhexacyanoferrat(III) (t_0) signifikant höhere und auch unterschiedliche NO[•]-Konzentrationen detektiert. **41** zeigt dabei mit ca. 3,5 ppm kurz nach der Zugabe des Oxidationsmittels die grösste $c_{\max}$ in dieser Gruppe (s.Tab. 11). Während sich im Falle der Nitrosohydrazine **42**, **39** und **40** zügig ein stabiles Plateau einstellt, kommt es bei **41** nach der höheren Initialphase (3 ppm vs 1 ppm) zu einem kontinuierlichen Abfall der NO[•]-Freisetzung.

3.3.6 Diskussion

3.3.6.1 Untersuchung der NO[•]-Freisetzung aus den Modell-Reaktionen

Bei der Auswertung der beiden Modellsysteme zur NO[•]-Freisetzung (Nitrit/Iodid und BSH/Kaliumhexacyanoferrat(III)) fällt auf, dass die detektierte NO[•]-Menge nur ca.

75% der theoretischen Ausbeute entspricht. Ein Grund könnte darin liegen, dass für das Austreiben des NO[•] aus der Reaktionslösung Stickstoff der Qualität 4.0, der einen Gehalt von 99,99% aufweist, als Trägergas verwendet wurde. Spuren von Sauerstoff als Verunreinigung in diesem Stickstoff könnten zu NO₂ reagieren, das jedoch nicht gemessen wurde.

Die mit den beiden Modellreaktionen durchgeführten Versuche zeigten jedoch zweierlei:

1. Die gute Reproduzierbarkeit der NO[•]-Trägergaskonzentrations-Zeit-Kurven.
2. Den linearen Zusammenhang zwischen der eingesetzten Menge der Donoren (Nitrit bzw. BSH) und der detektierten NO[•]-Menge.

Die gemessenen absoluten NO[•]-Mengen entsprachen zwar nur ca. 75% der theoretisch freigesetzten NO[•]-Menge, doch wurde auf die Verwendung eines weiter aufgereinigten Stickstoffs als Trägergas aus Kostengründen verzichtet.

3.3.6.2 Auswahl eines geeigneten Oxidationsmittels

Im Rahmen der Untersuchungen der NO[•]-Freisetzung aus den Modellsubstanzen der Gruppen A – D wurden vier verschiedene Oxidationsmittel zur Freisetzung des NO[•] aus den Modellsubstanzen auf ihre Tauglichkeit erprobt:

- Kaliumhexacyanoferrat(III) $E^0([\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}) = 0,36\text{V}$
- Iod $E^0([\text{I}_2]/\text{I}^-) = 0,54\text{V}$
- Wasserstoffperoxid-Lsg. $E^0(\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}) = 1,39\text{V (pH7,5)}$
- Silbernitrat-Lösung $E^0(\text{Ag}^+/\text{Ag}^0) = 0,80\text{V}$

Silbernitrat ist als Oxidationsmittel ungeeignet, da es zu einer schlagartigen NO[•]-Freisetzung kommt, so dass Kinetikuntersuchungen unmöglich werden.

Wasserstoffperoxid weist das höchste Redox-Potential aller verwendeten Oxidationsmittel auf und sollte daher ebenfalls zur Oxidation der Nitrosohydrazine geeignet sein. Tatsächlich beobachtet man jedoch nach kurzem Anstieg einen

signifikanten Abfall der $\text{NO}^\bullet$ -Detektion, die nach Zerstörung des Peroxids durch Katalase wieder auf das Niveau der Spontanrate ansteigt. Daraus lässt sich ableiten, dass evtl. entstehendes $\text{NO}^\bullet$ sofort mit dem im gleichen Zuge entstehenden Hydroxyl-Radikal zu Nitrit abreagiert^{142,143}. Ferner ist neben dem in Abb. 77 dargestellten Weg auch die direkte Reaktion von Wasserstoffperoxid mit $\text{NO}^\bullet$ möglich (s. Abb. 16, S. 47). Daher wurden keine weiteren Versuche unter Zusatz von Peroxidase vorgenommen.

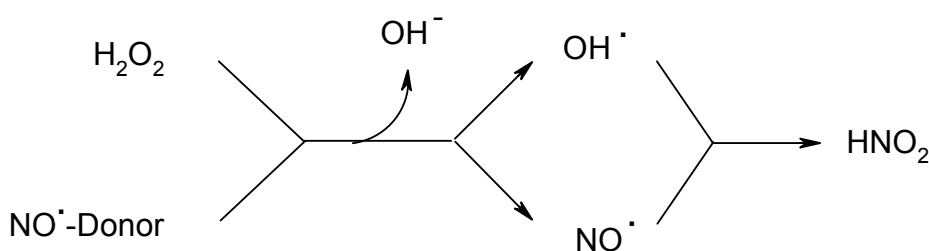


Abb. 77: Abfangreaktion von $\text{NO}^\bullet$ durch Reduktionsprodukte des Wasserstoffperoxids

So erwiesen sich Iod und Kaliumhexacyanoferrat(III) als Oxidationsmittel der Wahl, wobei Hexacyanoferrat(III) trotz des geringeren Potentials die stärkere $\text{NO}^\bullet$ -Freisetzung bewirkte. Aus diesem Grund wurde dieses Oxidationsmittel für die Standard-Versuche ausgewählt.

3.3.6.3 Einfluss der Substituenten am Nitrosohydrazin auf die $\text{NO}^\bullet$ -Freisetzung

Vergleicht man die bei exakt den gleichen Bedingungen untersuchten Nitrosohydrazine der Gruppen A – D hinsichtlich der ermittelten $\text{NO}^\bullet$ -Freisetzung in % der theoretischen Ausbeute innerhalb des Zeitintervalls von 84 Minuten, so ergibt sich das in Abb. 79 dargestellte Ranking:

¹⁴² Lehrb. d. anorg. Chem., Holleman-Wiberg, de Gruyter-Verlag, 101. Aufl., S. 536

¹⁴³ Jourdeuil, D., Jourdeuil, F.I., Kutchukian, P.S. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 28799 – 28805

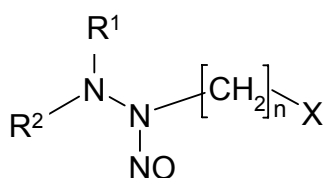
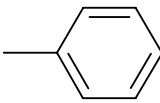
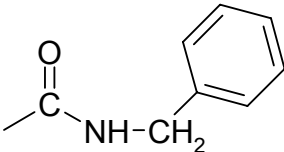
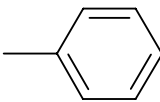
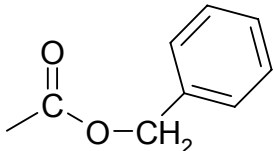
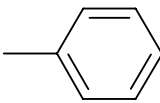
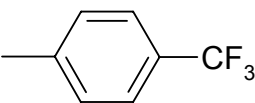
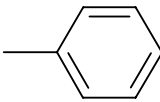
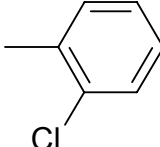
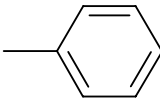
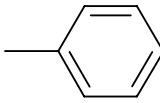
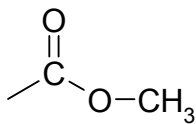
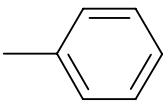
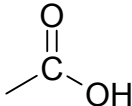
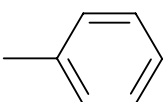
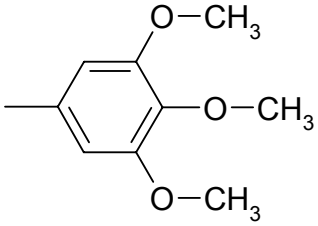
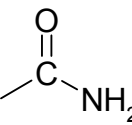


Abb. 78: Struktur der untersuchten Nitrosohydrazine

Bezeichnung	Gruppe	R ¹	R ²	n	X	[%]
<u>28</u>	C	—CH ₃		1		9,4
<u>27</u>	C	—CH ₃		1		4,1
<u>3</u>	A	—CH ₃	—CH ₃	1	-CONH ₂	2,4
<u>2</u>	A	—CH ₃	—CH ₃	1	—C≡N	1,8
<u>18</u>	B	—CH ₃	—CH ₃	2	—C≡N	1,4
<u>41</u>	D	—CH ₃		1		1,0
<u>40</u>	D	—CH ₃		1		0,4
<u>39</u>	D	—CH ₃		1		0,3

<u>19</u>	B	—CH ₃	—CH ₃	2		0,1
<u>26</u>	C	—CH ₃		1		0,1
<u>42</u>	D	—CH ₃		1		0,1
<u>20</u>	B	—CH ₃	—CH ₃	2		0,1

Tab. 12: Auflistung der Modellsubstanzen der Gruppen A – D sortiert nach absteigender Geschwindigkeit der NO[•]-Freisetzung in [%] der theor. Ausbeute nach AVV1

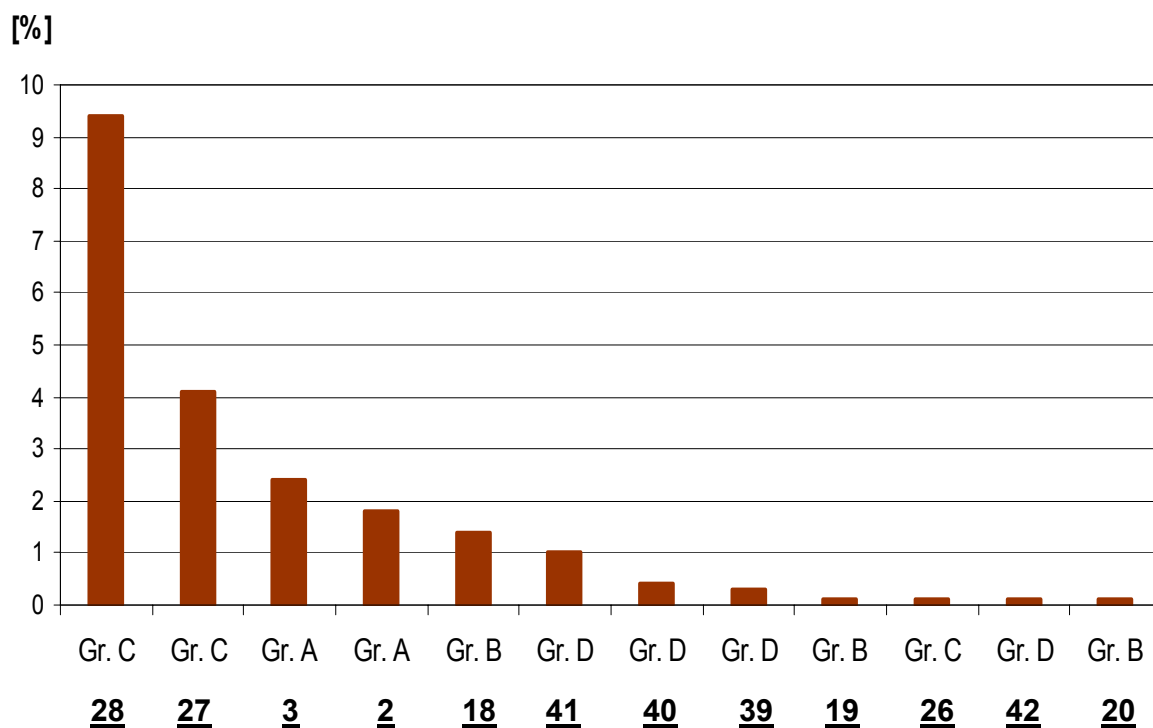


Abb. 79: NO[•]-Freisetzung nach Hexacyanoferrat(III)-Oxidation der Nitrosohydrazine in [%] der theoretisch möglichen Ausbeute

Eindeutiger Sieger mit fast 10% der theoretischen NO[•]-Ausbeute ist **28** gefolgt von **27**, mit ca. 4%, die beide aus der **Gruppe C** stammen. Die untersuchten Modellsubstanzen aus der **Gruppe A** nehmen die Plätze 3 (**3**) und 4 (**2**) ein.

Ordnet man diesen vier NO[•]-Donoren die entsprechenden Substituenten zu (s. Tab. 12), so fällt auf, dass es sich durchweg um Nitroso-Derivate der Hydrazinoessigsäure handelt. Den grössten Effekt auf die NO[•]-Freisetzung üben die N-Methyl-N-phenyl-Substituenten einerseits und die Amide andererseits aus. Zwei Methyl-Substituenten am Hydrazin reduzieren ebenso wie eine Nitrilfunktion anstelle der Amide die Bereitschaft zur oxidativen NO[•]-Abspaltung deutlich.

Auffällig ist der enorme Unterschied der Freisetzungsgeschwindigkeiten jedoch innerhalb der Gruppe C: hier sind sowohl die beiden Vertreter mit den höchsten Freisetzungsraten von allen untersuchten Modellsubstanzen zu finden, als auch die Carbonsäure **26**, die überraschend weit abgeschlagen bei 0,1% Ausbeute landet. Bei den für die Untersuchungen gewählten Standardbedingungen (pH 7,5) liegt **26** fast vollständig deprotoniert vor. Somit unterscheidet sich **26** von den übrigen Vertretern der Gruppe C dadurch, dass die elektronegativen Effekte des Carbonylkohlenstoffs im Carbonsäureanion verloren gehen. Diese Veränderung geht praktisch mit dem Verlust der NO[•]-Freisetzung parallel.

Die entsprechende Carbonsäure aus der Gruppe A, mit deren Hilfe dieser Effekt hätte bestätigt werden können stand leider für die Untersuchung der NO[•]-Freisetzung nicht zur Verfügung, da sie nicht analysenrein herzustellen war.

Bei der **Gruppe B** handelt es sich um Nitroso-Derivate der Dimethylhydrazinopropionsäure, die sich von denjenigen der Gruppen A und C u.a. dadurch unterscheiden, dass die Carbonylfunktion um eine weitere Methylengruppe von der Nitrosohydrazinstruktur abgerückt ist. Durch den grösseren Abstand wirken sich die elektronischen Effekte der Carbonylfunktion schwächer auf die Nitrosohydrazinstruktur aus. Insofern ist in dieser Gruppe der vorher beschriebene Effekt in abgeschwächter Form zu erkennen.

In der **Gruppe D** ist das Nitrosohydrazin anstelle der Essigsäurederivate mit verschiedenen Benzylresten substituiert. Diese Benzylreste ermöglichen durch den Einbau entsprechender Substituenten im Phenylring, einen unterschiedlichen Effekt

auf die benzyllische Methylengruppe und damit eine Variation des elektronischen Effektes auf das Nitrosohydrazingrundgerüst. Hierbei zeigte sich, dass ein p-Trifluormethyl- bzw. ein o-Chlor-Benzylrest einen moderat positiven Einfluss auf die NO[•]-Freisetzung hat. Dagegen wirken drei Methoxyreste (**42**) eher stabilisierend.

Zum Mechanismus der NO[•]-Freisetzung über den Weg eines Hydrazinyl-Radikalktions (analog Schoenafinger¹⁴⁴) oder eines Kohlenstoff-Radikals an der aktiven Methylengruppe (analog Rojas⁴⁹) kann aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Verbindungen kein abschliessendes Urteil gefällt werden, da beide Mechanismen zur Erklärung der beobachteten Effekte herangezogen werden können.

Insgesamt stellen die in in dieser Arbeit beschriebenen neuartigen Nitrosohydrazine NO[•]-Donoren dar, die eine äußerst geringe spontane NO[•]-Freisetzung zeigen. Dagegen setzen sie nach einer Ein-Elektronen-Oxidation vermehrt NO[•] frei, wobei das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Freisetzung deutlich mit dem Substitutionsmuster der Nitrosohydrazinstruktur variieren. Damit stehen erstmals NO[•]-Donoren aus dieser Stoffgruppe zur Verfügung, die einen gezielten Einsatz in biologischen Systemen ermöglichen.

¹⁴⁴ Bohn, H., Schönafinger, K. J. *Cardiovasc. Pharmacol.* **1989**, 14 (Suppl.11), 13 - 22

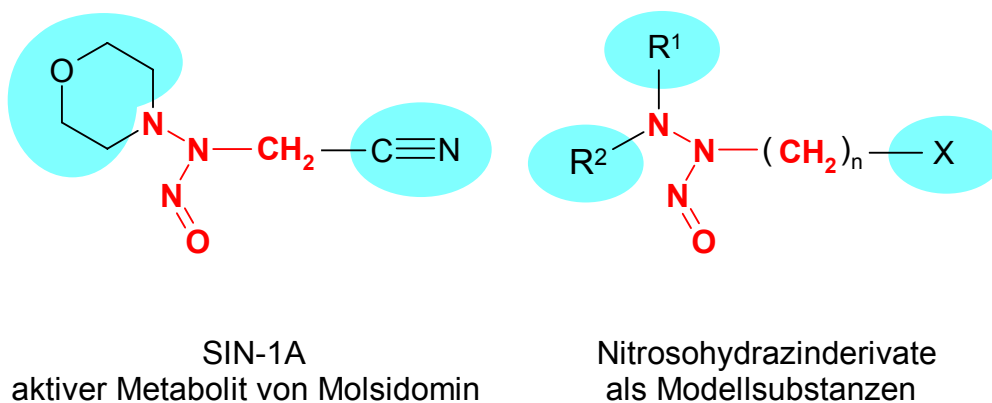
4 Zusammenfassung

Das freie Radikal Stickstoffmonoxid ($\text{NO}^\bullet$) ist an einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse beteiligt. Die wichtigste Funktion ist die Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase durch Reaktion des $\text{NO}^\bullet$ mit dem Häm-Eisen. In der Folge kommt es u.a. zur Vasodilatation, zur Inhibition der Plättchenaggregation und –adhäsion, zur unspezifischen Immunabwehr und zur Modulation der Neurotransmission.

Für die Entdeckung der überragenden biologischen Bedeutung von $\text{NO}^\bullet$ erhielten Furchgott, Murad und Ignarro 1998 den Nobelpreis für Medizin.

Zu den bekannten „ $\text{NO}^\bullet$ -Pharmaka“ zählen die „Nitrate“, Molsidomin und Nitroprussid-Natrium. Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit kann $\text{NO}^\bullet$ ausschliesslich in Form solcher Prodrugs verabreicht werden, die unter physiologischen Bedingungen eine für die Wirkung genügende Menge $\text{NO}^\bullet$ freisetzen. Dieser Freisetzungsprozess vollzieht sich bei den in der Therapie eingesetzten $\text{NO}^\bullet$ -Pharmaka lediglich bei Molsidomin unter Verbrauch von Oxidationsäquivalenten. Dieser Prozess ist unter dem Gesichtspunkt der durch oxidativen Stress initiierten bzw. geförderten pathophysiologischen Veränderungen der arteriellen Gefässwand mit der Folge drastischer Einschränkungen der Gefässfunktion von Vorteil.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das im SIN-1A, einem Metaboliten des Molsidomin, vorliegende Strukturelement eines N,N-disubstituierten N'-Nitrosohydrazins mit entsprechenden Substituenten abgewandelt und die resultierenden Modellsubstanzen (Nitrosohydrazine) sowohl in Bezug auf ihre spontane (basale) $\text{NO}^\bullet$ -Freisetzung als auch auf ihre $\text{NO}^\bullet$ -Freisetzungseigenschaften unter oxidativen Bedingungen charakterisiert. Die auf unterschiedlichsten Wegen synthetisierten Modellsubstanzen lassen sich aufgrund ihrer Struktur zu vier **Gruppen A – D** zusammenfügen, wobei fast ausnahmslos zunächst die entsprechenden Hydrazine hergestellt und anschliessend zu den jeweiligen Nitrosohydrazinen umgesetzt wurden.



1

Modell- substanzen	R ¹	R ²	n	X
Typ A	Methyl	Methyl	1	(heteroanaloge) Carbonylfunktionen
Typ B	Methyl	Methyl	2	(heteroanaloge) Carbonylfunktionen
Typ C	Phenyl	Methyl	1	Carbonylfunktionen
Typ D	Phenyl	Methyl	1	Aryl (R-substituiert)

Die Hydrazine der **Gruppe A** wurden über den Weg der Cyanalkylierung von 1,1-Dimethylhydrazin zugänglich gemacht.

Die Hydrazine der **Gruppe B** wurden nach Reaktion von N,N-Dimethylhydrazin mit verschiedenen aktivierten Alkenen (hier Acrylsäurederivate) hergestellt.

Für die Herstellung der Modellsubstanzen aus **Gruppe C** wurden zunächst als Vorstufen die jeweiligen Hydrazone durch Kondensation von N,N-Methylphenylhydrazin mit Glyoxylsäure mit anschliessender Amidbildung unter Verwendung der schonenden DCC-Methode hergestellt. Nach der Reduktion der Hydrazone mit komplexen Metallhydriden resultieren die gewünschten Hydrazine.

Die Modellsubstanzen der **Gruppe D** wurden durch Kondensation des N,N-Methylphenylhydrazins mit verschiedenen Benzaldehydderivaten mit anschliessender Reduktion der Hydrazone zugänglich gemacht.

Die Nitrosohydrazine der Gruppen A, B und D liessen sich durch Umsetzung der Hydrazine mit Natriumnitrit bei pH 3 – 4 herstellen. Dieses Verfahren führt in der Gruppe C nicht in jedem Fall zum Erfolg. So gelingt die Herstellung eines Benzylesters nur durch Veresterung der entsprechenden bereits nitrosierten Carbonsäure.

Die spektroskopische Charakterisierung der Nitrosohydrazine zeigte insbesondere im Bereich der NMR-Spektroskopie - nicht unerwartet – das Vorliegen rotamerer Spezies. Dabei treten durch die Wechselwirkung der räumlich gewinkelten Nitrosogruppe mit den übrigen Substituenten interessante, bisher noch nie Beschriebene Besonderheiten in den ^1H -NMR-Spektren auf, die durch dynamische NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden konnten. Die bei verschiedenen Temperaturen und unter Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel aufgenommenen NMR-Spektren erlauben eine eindeutige Zuordnung der (E)- und (Z)-Isomere bei allen Modellsubstanzen.

Die in der Spektroskopie erkannten Besonderheiten der jeweiligen Substituenten zeigen sich jedoch auch bei den Experimenten zur $\text{NO}^\bullet$ -Freisetzung. Die analysenreinen Modellsubstanzen der Gruppen A – D wurden auf ihre Eigenschaften als $\text{NO}^\bullet$ -Donoren mit Hilfe der spezifischen Chemilumineszenzmethode untersucht. Dazu wurde das Verfahren mit einem $\text{NO}^\bullet$ -Donor an geeigneten Standardmodellen optimiert und validiert (Bestimmung des freigesetzten $\text{NO}^\bullet$ mittels eines durch die Reaktionslösung geleiteten Trägergasstromes). Die Auswertung der unter exakt gleichen Bedingungen ermittelten $\text{NO}^\bullet$ -Trägergaskonzentrations-Zeit-Kurven ermöglicht eine Abschätzung der Substituenten-Einflüsse auf die oxidative $\text{NO}^\bullet$ -Freisetzung aus den Modellsubstanzen.

Die höchsten Freisetzungsraten zeigen überraschenderweise die Nitroso-Derivate der Hydrazinoessigsäureamide, insbesondere dann, wenn eine N-Methyl-N-phenyl Substitution vorliegt. Eine freie Carboxylfunktion senkt hier die $\text{NO}^\bullet$ -Freisetzung praktisch auf Null ab. Entsprechende Ester setzen nach der Oxidation mittlere $\text{NO}^\bullet$ -Mengen frei.

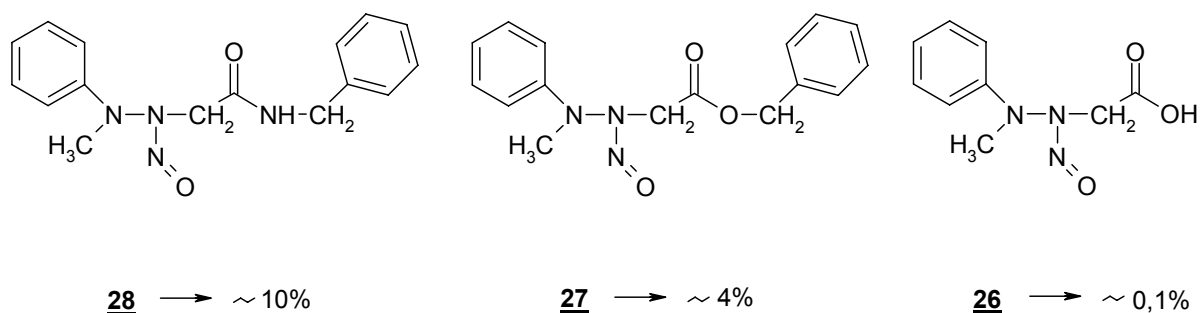


Abb. 80: Modellsubstanzen von Gruppe C und deren NO[•]-Freisetzungsmenge

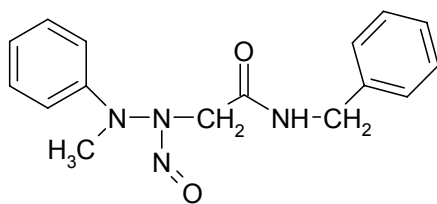
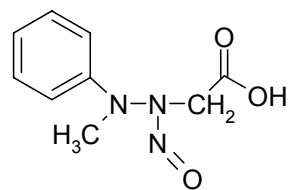
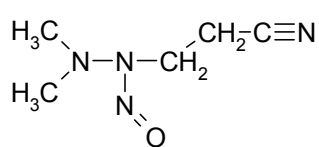
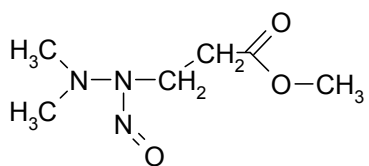
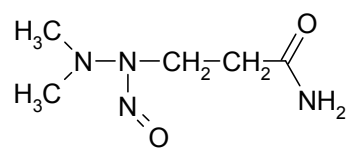
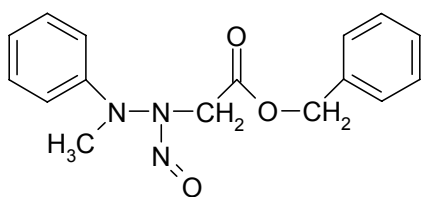
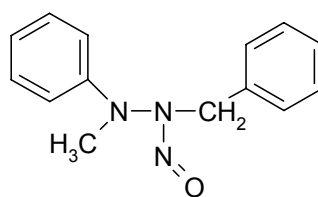
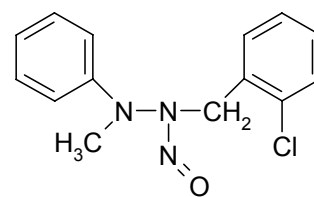
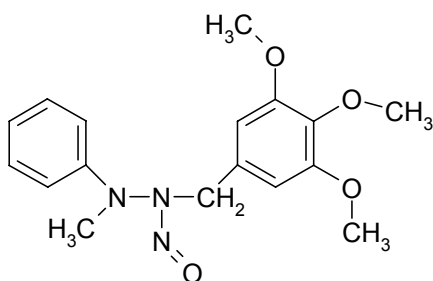
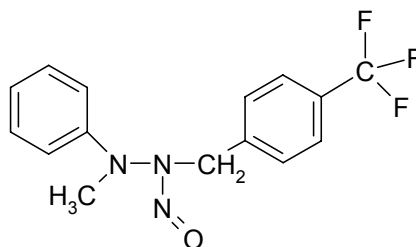
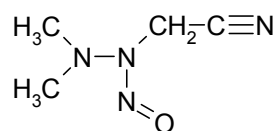
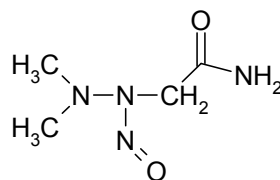
Bei Ersatz der N-Phenylgruppe durch einen Methylsubstituenten sinkt die Tendenz zur NO[•]-Freisetzung ebenfalls deutlich ab (auf ~ 2%).

Alle anderen untersuchten Modellsubstanzen setzen im betrachteten Zeitraum unter den gewählten Standardbedingungen nur sehr geringe Mengen NO[•] frei (<1%), die allerdings noch deutlich über der Spontan-Rate liegen.

Insgesamt stellen die in dieser Arbeit beschriebenen neuartigen Nitrosohydrazine NO[•]-Donoren dar, bei denen das Ausmaß und die Geschwindigkeit der NO[•]-Freisetzung deutlich mit dem Substitutionsmuster variieren. Damit stehen erstmals NO[•]-Donoren aus dieser Stoffgruppe zur Verfügung, die einen gezielten Einsatz in biologischen Systemen ermöglichen.

5 Konkordanz

Strukturformeln und Bezeichnung

CE5NO (**28**)CE16NO (**26**)CE20NO (**18**)CE23NO (**19**)CE30NO (**20**)CE37NO (**27**)CE48NO (**39**)CE52NO (**40**)CE59NO (**42**)CE66NO (**41**)CE69NO (**2**)CE72NO (**3**)

6 Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Geräte

Schmelzpunkte:

Gallenkamp-Apparatur, Sanyo
unkorrigierte Werte

IR-Spektren:

Perkin Elmer Series FT IR-Spektralphotometer

Festschubstanz als KBr-Presslinge, Flüssigkeiten in CHCl₃,

Angaben in Wellenzahlen ν [cm⁻¹]

Charakterisierung der Schwingungen durch:

		Transmission [%]
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)	

Massenspektren:

Die Angaben [m/z (relative Intensitäten in Prozent)] entsprechen den EI-Massenspektren (Finnigan MAT 4000; Ionisierungsenergie 70 eV)

FAB-Spektren wurden mittels Finnigan MAT 4000 aufgenommen, Matrix: Glycerol, p-Nitrobenzylalkohol (jeweils angegeben)

NMR-Spektren:

Bruker AC 200, Messfrequenz 200 MHz

austauschbar = austauschbar mit D₂O, sofern nichts anderes angegeben

Die chemische Verschiebung ist angegeben in ppm (δ -Skala) mit Tetramethylsilan als inneren Standard.

Elementaranalyse:

Zentrale Einrichtung der WE Chemie/Pharmazie „Mikroanalyse“ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Perkin Elmer 2400 CHN Elemental Analyser, Mikrowaage
Perkin Elmer AD-6 Auto Balance

Dünnschichtchromatographie:

DC-Aluminiumfolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck Nr. 5554)
Die Laufstrecke betrug jeweils 10 cm.
Detektion: UV-Löschung, CAMAG UV-Betrachter (254/366 nm)

Säulenchromatographie:

Kieselgel 60, Korngröße 0,040 – 0,063 mm (Merck Nr. 9385)

Chemilumineszenz:

CLD 70 E Chemilumineszenz NO/NO_x Analyzer Detektor
Incl. Software zur Auswertung (ECO-Physics)

pH-Meter:

Mikroprozessor pH-Meter Multi-Calimatic, Knick
Mit pH-Glaselektrode Typ 405-T, F.Nr. 105962, Ingold

6.2 Abkürzungsverzeichnis

AVV	allgemeine Arbeitsvorschrift
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ATP	Adenosintriphosphat
B4H	Tetrahydrobiopterin
ber.	berechnet
br	breit (IR/NMR)
BSH	Benzolsulfhydroxamsäure
bzw.	beziehungsweise

ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
δ	chemische Verschiebung in ppm (NMR)
d	Dublett (NMR)
DC	Dünnschichtchromatographie
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
d. Th.	der Theorie
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
EI	Elektronenstoßionisation
eNOS	endotheliale NO [•] -Synthase
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie
FAB	Fast-Atomic-Bombardement
FMN	Flavinmononukleotid
FM	Fließmittel
gef.	gefunden
GTP	Guanosintriphosphat
Hz	Herz
HbO ₂	Oxyhämoglobin
iNOS	induzierbare NO [•] -Synthase
IR	Infrarotspektroskopie
i.v.	intra venös
J	Betrag der Kopplungskonstanten
Kap.	Kapitel
KHK	koronare Herzkrankheit
konz.	konzentriert
L	Liter
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LDL	low density lipoproteines
m	milli, Multiplet (NMR), medium (IR)
M ^{+•}	Molekülion
MetHb	Methämoglobin
min	Minuten

mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
m/z	Quotient aus Masse und Ladung
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMR	Kernresonanzspektroskopie
nNOS	neuronale NO [•] -Synthase
NO [•]	Stickstoffmonoxid
NO ⁻	Nitroxyl
NONOate	N,N'-Nitrosamin-N'-oxide
NOS	NO [•] -Synthase
o	ortho
org.	organisch
oxLDL	oxidierte low density lipoproteines
OxyHb	Oxyhämoglobin
p	para
P	Phosphat
p.A.	zur Analyse
Phe	Phenyl
ppm	parts per million
proz.	prozentig
q	Quartett (NMR)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
R _f	relative Laufstrecke
RF	Rückfluss
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR), strong (IR)
s.	siehe
S.	Seite
SC	Säulenchromatographie
sh	shoulder
sGC	lösliche Guanylylcyclase
Schmp.	Schmelzpunkt
Sdp.	Siedepunkt
SOD	Superoxiddismutase

t	Triplett (NMR)
T	Teil(e), Temperatur
Tab.	Tabelle
THF	Tetrahydrofuran
ν	Wellenzahl in cm^{-1}
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
verd.	verdünnt
vgl.	vergleiche
vs	very strong (IR), versus
vw	very weak
w	weak
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.S.	zur Synthese
z.T.	zum Teil
“ ”	erscheint als...

6.3 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. nach den üblichen Verfahren getrocknet. Die übrigen Chemikalien entsprechen einer p.A. Qualität.

70%ige Perchlorsäure	Merck
Acrylamid	Acros
Acrylsäuremethylester	Fluka
Acrylsäuretertiärbutylamid	Acros

Ammoniumchlorid	Roth
Anionenaustauscher, stark basisch	Merck
Benzyl 2-chloracetat	Aldrich
Benzylamin	Fluka
p-Carboxybenzaldehyd	Janssen
o-Chlorbenzaldehyd	Schuchardt
4-Cyanobenzaldehyd	Lancaster
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid	Riedel-de-Haen
p-Dimethylaminobenzaldehyd	Merck
N,N-Dimethylhydrazin	Fluka
N,N-Diphenylhydrazinhydrochlorid	Aldrich
Ethyl 2-chloracetat	Merck
Glyoxylsäure-monohydrat	Merck
p-Hydroxybenzaldehyd	Janssen
Iod	Merck
Kaliumcyanid	Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat	J. T. Baker
Kaliumhexacyanoferrat (II)	Merck
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Merck
Kaliumiodid	Acros
Kaliumsulfat	Grüssing
Katalaselösung	Boehringer
Kieselgel 60, 0,04-0,063	Merck
Lithiumaluminiumhydrid	Merck
Magnesiumsulfat	Grüssing
Methyl-3,3-dimethoxypropionat	Lancaster
N,N-Methylphenylhydrazin	Fluka
Natrium	Merck
Natriumacetat	Fluka
Natriumbicarbonat	J. T. Baker
Natriumborhydrid	Roth
Natriumchlorid	Fluka
di-Natriumhydrogenphosphat	Riedel-de-Haen
Natriumhydroxid	Merck

Natriumnitrit	Fluka
Natriumsulfit	Acros
Oxalsäure	Merck
Pd/C-Katalysator, 10% Pd	Merck
Phosphoroxchlorid	Fluka
p-Nitrobenzaldehyd	Schuchardt
Silbernitrat	Roth
Stickstoff 4.0	Messer Griesheim
Thionylchlorid	Merck
p-Trifluormethylbenzaldehyd	Acros
3,4,5-Trimethoxybenzaldehyd	Janssen Chimica
Wasserstoffperoxid 30%	J. T. Baker
Zinkfeile	Merck
Zitronensäure	Fluka

6.4 Allgemeine Arbeitsvorschriften

Messung der NO[•]-Freisetzung aus den Modellsubstanzen mit Hilfe der Chemilumineszenz-Detektion

AVV 1:

Zur Installation des Chemilumineszenzdetektors und seiner Peripherie siehe Kap. 3.3.1.

Der Chemilumineszenzdetektor wird mindestens eine Stunde vor Beginn der Messung in Betrieb genommen, um konstante Druck- und Temperaturwerte in der Reaktionskammer zu erreichen. Alle Messungen finden bei Raumtemperatur statt.

0,335 mmol des jeweiligen $\text{NO}^\bullet$ -Donors werden in einen trockenen 100 ml Dreihalskolben (= Reaktionsgefäß) eingewogen. Über zwei Öffnungen wird das Reaktionsgefäß mit zwei Tropftrichtern mit Druckausgleich verbunden, wovon der eine 50,0 ml eines Lösungsmittelgemisches (s.u.) und der andere 552 mg Kaliumhexacyanoferrat(III) (=1,675 mmol) gelöst in 25,0 ml desgleichen Lösungsmittelgemisches enthalten. Das Lösungsmittelgemisch besteht aus Sörensen-Phosphatpuffer (pH 7,5) und Acetonitril p.A. im Volumenverhältnis 1 : 1, wovon sich der Phosphat-Puffer pH 7,5 (eingestellt gegen pH-Messelektrode) wie folgt zusammensetzt: 33,6 mg Kaliumdihydrogenphosphat und 253 mg di-Natriumhydrogenphosphat werden in 25,0 ml Wasser gelöst.

Das Lösungsmittelgemisch wird unmittelbar vor Verwendung eine $\frac{1}{2}$ Stunde mit Stickstoff entgast. Das Trägergas wird vor dem Einleiten in das Reaktionsgefäß durch drei Waschflaschen geleitet, (Kap. 3.3.1) die mit konz. Schwefelsäure, Kaliumhydroxydplättchen und konz. Schwefelsäure in dieser Reihenfolge gefüllt sind. Nach dem Einbau des lichtgeschützten Reaktionsgefäßes sowie der beiden Tropftrichter in die Apparatur erfolgt der Trägergasfluss durch die dritte, noch freie Öffnung des Reaktionsgefäßes über eine Glaskapillare in das Reaktionsgefäß, sodass die Reaktionslösung später permanent vom Trägergas (= Stickstoff 4.0) durchspült wird. Anschliessend wird der Trägergasstrom über die Druckausgleichsverbindung eines der beiden Tropftrichter aus dem Reaktionsgefäß in den Detektor geleitet. Nach dem Einbau des Reaktionsgefäßes sowie der beiden Tropftrichter in die Apparatur stellt der Messplatz ein geschlossenes System dar. Die mit den entsprechenden Mengen $\text{NO}^\bullet$ -Donor und den Lösungen beschickte Apparatur wird 30 Minuten mit Stickstoff 4.0 gespült, um evtl. eingetragenen Sauerstoff zu entfernen.

Das Lösungsmittelgemisch (50 ml) wird durch Öffnen des Tropftrichters ohne Unterbrechung des Trägergasflusses und ohne Öffnen der Apparatur auf einmal in das Reaktionsgefäß geleitet, was zum schnellen Lösen des vorgelegten $\text{NO}^\bullet$ -Donors führt. Die Aufzeichnung der vom Detektor angezeigten Messdaten wird gestartet ($t = 0$ Sekunden). Nach Equilibrierung des vom Detektor angezeigten Messwertes (in $[\text{ppm} \equiv \text{Vpm} = \text{volume per million}] \text{NO}^\bullet$ im Trägergasstrom) wird die in dem zweiten

Tropftrichter enthaltene Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung, wiederum ohne Unterbrechung des Trägergasstromes und ohne Öffnen der Apparatur, auf einmal der Reaktionslösung zugesetzt ($t = t_0$).

Die vom Detektor angezeigten Messdaten werden entweder von einem Analog-Schreiber aufgezeichnet oder von dem Rechnersystem, in das der Detektor integriert ist, gespeichert.

AVV 2:

Analog **AVV1**, jedoch wird die Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung ausgetauscht gegen eine Iod-Lösung:

200,0 mg Iod und 400,0 mg Kaliumiodid werden in 20,0 ml Wasser gelöst. 12,75 ml dieser Lösung werden mit 12,25 ml Lösungsmittelgemisch (analog AVV1: Sörensen-Phosphatpuffer pH7,5/Acetonitril = 1:1) auf 25,0 ml verdünnt. Die resultierende Iod-Lösung enthält 0,502 mmol Iod entsprechend den eingesetzten 0,335 mmol $\text{NO}^\bullet$ -Donor.

Diese Iod-Lösung wird $\frac{1}{2}$ Stunde mit Stickstoff entgast und ersetzt die Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung in **AVV1**. Aus dem graduierten Tropftrichter werden zum Zeitpunkt $t = t_0$ bzw. t_1 bzw. t_2 jeweils 8,33 ml ($\equiv 0,167$ mmol Iod) von der Iod-Lösung der Reaktions-Lösung auf einmal zugesetzt.

AAV 3:

Analog **AVV1**, jedoch wird die Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung ausgetauscht gegen eine Wasserstoffperoxid-Lösung:

9,50 ml 0,3%iger Wasserstoffperoxid-Lösung wird mit 15,50 ml Lösungsmittelgemisch (analog **AVV1**: Sörensen-Phosphatpuffer pH7,5/Acetonitril = 1:1) auf 25,0 ml verdünnt. Die resultierende Wasserstoffperoxid-Lösung enthält 0,835 mmol Wasserstoffperoxid entsprechend den eingesetzten 0,335 mmol $\text{NO}^\bullet$ -Donor. Die Wasserstoffperoxid-Lösung wird eine $\frac{1}{2}$ Stunde mit Stickstoff entgast und ersetzt die Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung in **AVV1**.

Vor Versuchsbeginn wird abweichend von **AVV1** ein weiterer Tropftrichter auf den mit 50,0 ml Lösungsmittelgemisch beschickten Tropftrichter gesteckt. Dieser Tropftrichter ist mit einer entgasten Lösung aus 10 Tropfen einer Katalaselösung (Ethanol, Glycerol-Lösung) in 5,0 ml Lösungsmittelgemisch (analog **AVV1**) gefüllt, und

ermöglicht die Zugabe der 5,0 ml Katalase-Lösung während der Messung ohne den Trägergasstrom zu unterbrechen oder die Apparatur zu öffnen.

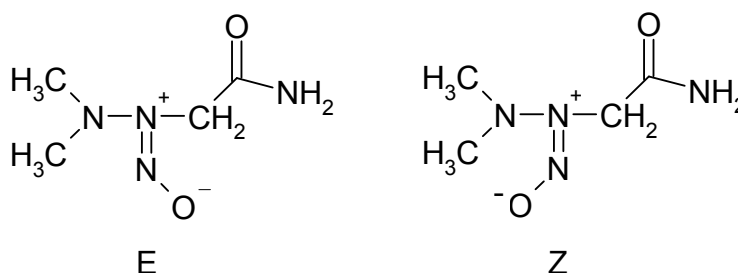
AVV4:

Analog **AVV1**, jedoch wird einerseits die Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung gegen eine Silbernitrat-Lösung (s.u.) ausgetauscht und andererseits als Lösungsmittelgemisch eine Lösung von Wasser und Acetonitril im Volumenverhältnis 1:1 verwendet.

Folgende wässrige Silbernitrat-Lösung ersetzt die Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung: 113,8 mg Silbernitrat werden in 25,0 ml Lösungsmittelgemisch (analog **AVV4**!) gelöst und eine $\frac{1}{2}$ Stunde mit Stickstoff unmittelbar vor Versuchsbeginn entgast. Diese Silbernitrat-Lösung enthält 0,670 mmol Silberionen entsprechend den eingesetzten 0,335 mmol $\text{NO}^{\cdot-}$ -Donor. Mit Hilfe des graduierten Tropftrichters werden zweimal ($t = t_0$ bzw. t_1) 12,5 ml Silbernitrat-Lösung ($\equiv$ 0,335 mmol Silberionen) während der Messung zugesetzt ohne den Trägergasstrom zu unterbrechen oder die Apparatur zu öffnen.

6.5 Substanzdaten

2-(N',N'-Dimethyl-N-nitrosohydrazino)acetamid (**3**)

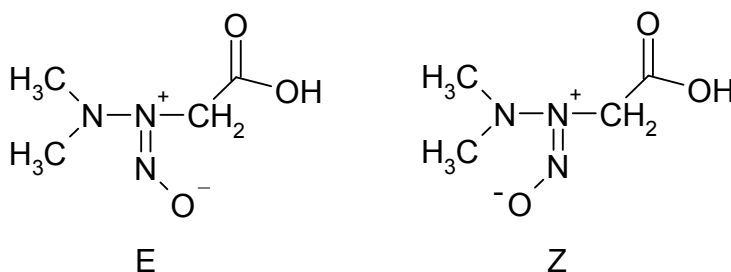


Darstellung: 200 mg des Hydrazinhydrochlorids (**9**) ($\sim$ 0,96 mmol) werden in 10 ml Wasser gelöst. Die Lösung wird mittels Zitronensäure auf einen pH-Wert von 3-4 eingestellt. Nach Zugabe von 103 mg Natriumnitrit ($\sim$ 1,5 mmol) gelöst in 5 ml Wasser wird die Lösung 30 min unter Lichtausschluss stehen gelassen. Die Lösung wird anschliessend mit Diethylether erschöpfend extrahiert. Die org. Phasen werden getrocknet über Magnesiumsulfat und eingeengt. Es resultiert ein gelbes, viskoses Öl.

Ausbeute: 106 mg (95 % d. Th.)

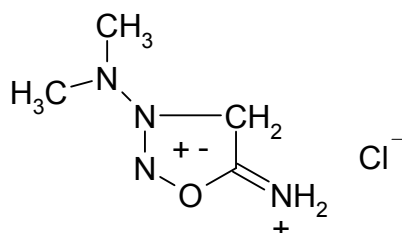
^1H -NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d_6 , [ppm]:

2,71	0,7H	s	Z: $(\text{CH}_3)_2\text{-N-}$	
2,84	5,3H	s	E: $(\text{CH}_3)_2\text{-N-}$	
4,21	1,8H	s	E: $\text{-N-CH}_2\text{-CO-}$	
4,69	0,2H	s	Z: $\text{-N-CH}_2\text{-CO-}$	
7,05 / 7,40	0,2H	d	E: -CO-NH_2	AB-System
7,12 / 7,51	1,8H	d	Z: -CO-NH_2	AB-System

2-(N',N'-Dimethyl-N-nitrosohydrazino)essigsäure (4)

Darstellung: 200 mg des Hydrazinhydrochlorids (**8**) (~ 0,96 mmol) werden in 10 ml Wasser gelöst. Die Lösung wird mittels Zitronensäure auf einen pH-Wert von 3-4 eingestellt. Nach Zugabe von 103 mg Natriumnitrit (~ 1,5 mmol) gelöst in 5 ml Wasser wird die Lösung 30 min unter Lichtausschluss stehen gelassen. Die Lösung wird anschliessend mit Diethylether erschöpfend extrahiert. Die org. Phasen werden getrocknet über Magnesiumsulfat und eingeeengt. Es resultiert ein gelbes, viskoses Öl.

Ausbeute: 95 mg (85 % d. Th.)

3-Dimethylaminosydnonimin-hydrochlorid (6)

Darstellung: 200 mg des Hydrazinhydrochlorids (**7**) (~ 1,5 mmol) werden in 10 ml Wasser gelöst. Die Lösung wird mittels Zitronensäure auf einen pH-Wert von 3-4 eingestellt. Nach Zugabe von 152 mg Natriumnitrit (~ 2,2 mmol) gelöst in 5 ml Wasser wird die Lösung 30 min unter Lichtausschluss stehen gelassen. Die Lösung wird anschliessend mit Diethylether erschöpfend extrahiert. Die org. Phasen werden vereinigt, getrocknet über Magnesiumsulfat und eingeeengt. Der Rückstand wird aufgenommen in 0,6 ml 4,4N-methanol. HCl und 5 min unter Lichtausschluss stehen gelassen. Die Lösung wird mit 20 ml trockenen Diethylether versetzt. Es bilden sich blass gelbe Kristalle, die abgetrennt und umkristallisiert werden aus Ethanol / Diethylether.

Ausbeute: 188 mg (76 % d. Th.)

Schmp.: 175°C (Ethanol / Diethylether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3177 (vs), 3014 (vs), 1670 (vs), 1570 (s), 1464 (vs), 1391 (vs), 1124 (s), 708 (s), 568 (s), 418 (s)

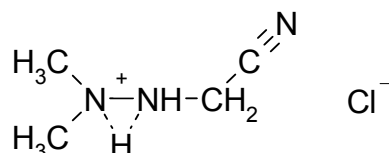
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 97 (57), 96 (41), 59 (100), 57 (61), 55 (66), 54 (36)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

3,38	6H	s	(CH ₃) ₂ -N-
8,26	1H	s	-N-CH-C-
9,49	2H	s	-C=NH ₂ ⁺

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
C ₄ H ₉ ClN ₄ O (164,59)	ber.:	29,19	5,51	34,04
	gef.:	29,42	5,54	32,87

N-Cyanomethyl-N',N'-dimethylhydrazinium-chlorid (7)

Darstellung: 1,0 g N,N-Dimethylhydrazin (~ 16,6 mmol) werden unter Eiskühlung gelöst in 3,3 ml Wasser. Es werden 1,25 ml konz. HCl, 1,08 g KCN gel. in 2,3 ml Wasser und 1,35 ml 37%ige Formaldehydlösung hinzugegeben. Nach 10 h Rühren wird die Lösung mit Diethylether erschöpfend extrahiert. Die org. Phasen werden vereinigt, getrocknet über Magnesiumsulfat und mit 2,5 ml 4,4N-methanol. HCl versetzt. Es bildet sich ein orange kristalliner Niederschlag, der abgetrennt und umkristallisiert wird aus Ethanol / Diethylether.

Ausbeute: 1,46 g (65 % d. Th.)

Schmp.: 126°C (Ethanol / Diethylether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3683 (w), 3628 (w), 3178 (s), 2622 (s), 2468 (s), 2255 (w), 1540 (m), 1479 (m), 1174 (w), 1058 (m), 857 (m), 565 (w)

Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 83 (7), 72 (32), 71 (22), 59 (100), 54 (10), 52 (5)

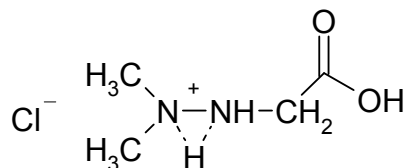
¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

2,92	6H	s	(CH ₃) ₂ -N-
4,29	2H	s	-N-CH ₂ -C-
7,0	1H	"br"	-NH-

1H nicht zu erkennen

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
C ₄ H ₉ N ₃ •HCl (135,59)	ber.:	35,43	7,43	30,99
	gef.:	34,89	7,46	29,78

N-Carboxymethyl-N',N'-dimethylhydrazinium-chlorid (8)

Darstellung: 500mg (~3,7mmol) des Hydrazinonitrilhydrochlorids (**7**) werden in 10ml 20%iger Natronlauge gelöst und 24h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss stehen gelassen. Die Lösung wird mit Diethylether extrahiert und mit 20%iger Schwefelsäure unter Eiskühlung neutralisiert. Die wässrige Lösung wird im Vakuum zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird mit einem Chloroform-Isopropanol-Gemisch (7:3) extrahiert. Der Extrakt wird getrocknet über Magnesiumsulfat und im Vakuum eingengt. Der ölige Rückstand wird in 30ml Diethylether aufgenommen und mit 1ml 4,4N-methanol. HCl und 30ml abs. Diethylether versetzt. Das sich absetzende Öl wird abgetrennt. Unter Vakuum wird restliches Lösungsmittel entfernt.

Ausbeute: 310 mg (54 % d. Th.)

IR-Spektrum, CHCl₃, [cm⁻¹]: 3683 (w), 3628 (vw), 1744 (m), 1522 (m), 1476 (m), 1424 (m), 1016 (m), 929 (s), 627 (s)

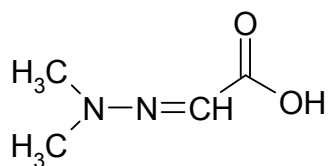
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 117 (9), 73 (85), 59 (65), 57 (100), 55 (83), 45 (47)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

2,61	s	6H	-N-(CH ₃) ₂	
3,13	d	2H	-N-CH ₂ -CO-	³ J = 5,5 Hz
4,40	t	1H	-NH-	austauschbar ³ J = 5,5 Hz

1 HCl und -COOH nicht zu erkennen

(Dimethylhydrazono)essigsäure (**8a**)



Darstellung: Zu der Lösung von 1,84 g (~ 20 mmol) Glyoxylsäuremonohydrat in 40 ml Ethanol gibt man unter Rühren 1,26 g (~ 21 mmol) N,N-Dimethylhydrazin. Nach 0,5 h Erwärmen auf 40°C wird im Vakuum zur Trockne eingeengt und aus Chloroform / Petrolether umkristallisiert. Es resultieren farblose Kristalle.

Ausbeute: 2,08 g (88 % d. Th.)

R_f-Wert: 0,21 Toluol 7T / Isopropanol 3T

Schmp.: 90°C (Chloroform / Petrolether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3851 (m), 3709 (m), 3432 (s), 3004 (m), 2940 (s), 2790 (s), 2724 (s), 2613 (s), 1651 (vs), 1531 (vs), 1442 (s), 1401 (s), 1366 (s), 1324 (s), 1269 (vs), 1217 (vs), 1089 (vs), 1040 (s), 1007 (m), 967 (s), 598 (s)

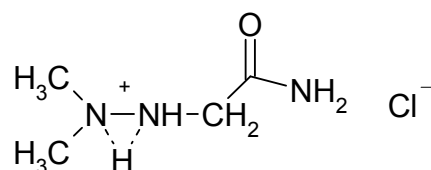
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 116 (37) [M⁺], 105 (16), 99 (18), 83 (16), 75 (25), 74 (24), 71 (46), 59 (25), 57 (30), 53 (55), 43 (100)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, CDCl₃, [ppm]:

3,20	s	6H	(CH ₃) ₂ -N-
6,42	s	1H	HOOC- <u>CH</u> =N-
10,45	s	1H	-COOH

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
C ₄ H ₈ N ₂ O ₂ (116,12)	ber.:	41,37	6,94	24,12
	gef.:	41,34	7,07	23,85

N-Carbamoylmethyl-N',N'-dimethylhydrazinium-chlorid (9)

Darstellung: 500 mg des Hydrazinhydrochlorids (**7**) (~ 3,7 mmol) werden unter Eiskühlung in 10 ml konz. Schwefelsäure gelöst und 24 h unter Lichtausschluss bei RT gerührt. Der Ansatz wird in 80 ml Eiswasser einfließen gelassen. Mit 10%iger-Natronlauge wird die Lösung neutralisiert und mit Diethylether extrahiert. Die wässrige Phase wird im Vakuum zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird mit einem Chloroform-Isopropanol-Gemisch (7:3) extrahiert. Der Chloroform-Isopropanol-Extrakt wird getrocknet über Magnesiumsulfat, eingengt und in trockenem Diethylether aufgenommen. Diese Lösung wird mit 1ml 4,4N-methanol. HCl versetzt. Der Niederschlag wird abgetrennt und umkristallisiert aus Ethanol / Diethylether.

Ausbeute: 605 mg (79 % d. Th.)

Schmp.: 125°C (Ethanol / Diethylether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3512 (s), 3404 (s), 2895 (s), 1688 - 1662 (vs), 1560 (vs), 1548 (vs), 1322 (s), 1162 (s), 1092 (s), 946 (s)

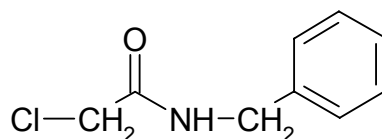
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 117 (12), 73 (100), 71 (26), 59 (93), 57 (44), 46 (88)

^1H -NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO- d_6 , [ppm]:

2,84	6H	s	(CH ₃) ₂ -N-
3,64	2H	s	-N-CH ₂ -CO-
7,2 - 7,5	1H	"br"	-CO-NH ₂
7,6 - 7,9	1H	"br"	-CO-NH ₂
11,7	1H	"br"	-N-NH-
1H nicht zu erkennen			

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
C ₄ H ₁₁ N ₃ O•HCl•3H ₂ O (207,65)	ber.:	23,14	8,74	20,24
	gef.:	23,58	7,05	20,20

N-Benzyl-chloracetamid (10c)

Darstellung: Zu einer auf 0°C abgekühlten Mischung aus 575 mg Chloressigsäureethylester und 0,5 ml Wasser werden 2,0 ml Benzylamin gegeben. Man rührt bei 0°C bis zum Ausfallen eines weißen Niederschlags. Der Niederschlag wird abgetrennt und umkristallisiert aus Aceton / Wasser.

<u>Ausbeute:</u>	470 mg	(55% d. Th.)
<u>R_f-Wert:</u>	0,52	Dichlormethan
<u>Schmp.:</u>	93°C	(Aceton / Wasser)

IR-Spektrum, CHCl₃, [cm⁻¹]: 3423 (s), 1673 (vs), 1530 (vs), 1454 (m), 1410 (m)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹] 3277 (vs), 3063 (m), 3030 (m), 3006 (m), 1650 (vs), 1604 (m), 1556 (vs), 1460 (s), 1426 (s), 1237 (s), 1062 (m), 745 (s), 698 (s), 591 (m), 505 (s)

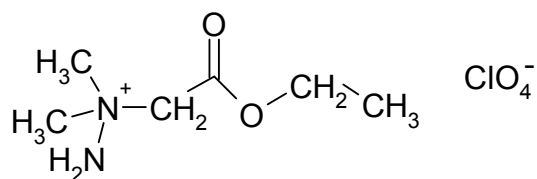
Massenspektrum, EI 70 mV, [m/z], (%): 183 (9) [M^{+}], 149 (20), 148 (100), 107 (67), 91 (65), 77 (24), 65 (18), 51 (23)

^1H -NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO- d_6 , [ppm]:

4,13	s	2H	Cl-CH ₂ -CO	
4,31	d	2H	-C-CH ₂ -N-	$^3J = 5,9 \text{ Hz}$
7,21-7,45	m	5H	arom. H	
8,76	s	1H	-CO-NH-C	

<u>Elementaranalyse:</u>		%C	%H	%N
C ₉ H ₁₀ ClNO (183,64)	ber.:	58,87	5,49	7,63
	gef.:	58,71	5,55	7,58

N-Ethoxycarbonylmethyl-N,N-dimethylhydrazinium-perchlorat (**11**)



Darstellung: Zu 1,2 g N,N-Dimethylhydrazin (~ 20 mmol) in 10 ml Chloroform tropft man unter Rühren und Feuchtigkeitsausschluss bei 0°C 2,2 g Ethyl 2-chloracetat (~ 18 mmol), rührt anschließend noch 1 h unter Eiskühlung und 2 h bei Raumtemperatur. Nach kurzem Erwärmen unter Rückfluss wird eingeeengt. Der Rückstand wird in 5 ml Ethanol gelöst. Nach Zusatz von 3,4 g 70%iger Perchlorsäure und 100 ml Diethylether bilden sich blassgelbe Kristalle, die aus Acetonitril umkristallisiert werden.

<u>Ausbeute:</u>	4,43g	(90 % d. Th.)
<u>R_f-Wert:</u>	0,43	Toluol 3T/ Isopropanol 2T
<u>Schmp.:</u>	76°C	(Acetonitril)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3445 (m), 3313 (m), 3208 (m), 3111 (m), 3016 (m), 2024 (w), 1745 (s), 1558 (w, br), 1210 (s), 1154 (s), 1091 (s), 1027 (s), 626 (m), 595 (w), 538 (vw)

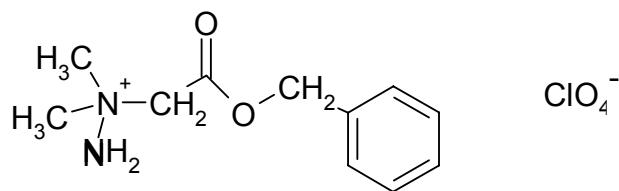
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 216 (2), 208 (2), 166 (7), 142 (28),
130 (17), 114 (29), 72 (38), 57 (100),
45 (27)

^1H -NMR-Spektrum, 200 MHz, Aceton- d_6 , [ppm]:

1,30	t	3H	$\underline{\text{CH}_3}\text{-CH}_2\text{-}$	$^3\text{J} = 7,2 \text{ Hz}$
3,72	s	6H	$(\text{CH}_3)_2\text{-N-}$	
4,33	q	2H	$\text{CH}_3\text{-}\underline{\text{CH}_2}\text{-}$	$^3\text{J} = 7,2 \text{ Hz}$
4,73	s	2H	$\text{-N-CH}_2\text{-CO-}$	
6,20	s	2H	-N-NH_2	

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
$\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_6\text{Cl}$ (246,65)	ber.:	29,19	6,08	11,35
	gef.:	29,30	6,23	11,11

N-Benzoyloxycarbonylmethyl-N,N-dimethylhydrazinium-perchlorat (12)

Darstellung: Zu 1,2 g N,N-Dimethylhydrazin (~ 19 mmol) in 10 ml Chloroform tropft man unter Rühren und Feuchtigkeitsausschluss bei 0°C eine Lösung aus 4,0 g Benzyl 2-chloracetat in 10 ml Chloroform, rührt anschließend noch 1 h unter Eiskühlung und 2 h bei Raumtemperatur. Nach kurzem Erwärmen unter Rückfluss wird eingeeignet. Der Rückstand wird in 5 ml Ethanol gelöst. Nach Zusatz von 3,4 g 70%iger Perchlorsäure und 100 ml Diethylether bilden sich blassgelbe Kristalle, die aus Acetonitril umkristallisiert werden.

Ausbeute: 5,23 g (86 % d. Th.)

R_f-Wert: 0,35 Toluol 1T / Isopropanol 1T

Schmp.: 40°C (Acetonitril)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3422 (m), 3322 (m), 3254 (m), 3180 (m), 1735 (s), 1684 (w), 1653 (w), 1615 (m), 1478 (m), 1191 (m), 1089 (s), 627 (s)

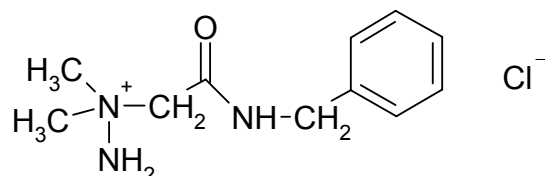
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 270 (3), 263 (7), 194 (46), 116 (31), 105 (87), 91 (68), 57 (100)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, Aceton-d₆, [ppm]:

3,74	s	6H	(CH ₃) ₂ -N-
4,82	s	2H	-N-CH ₂ -CO-
5,34	s	2H	-C-CH ₂ -O-
7,42-7,47	m	5H	arom. H
nicht zu erkennen		2H	-N-NH ₂

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
C ₁₁ H ₁₇ N ₂ O ₂ ClO ₄ (308,72)	ber.:	42,76	5,51	9,07
	gef.:	42,60	5,45	9,08

N-(Benzylaminocarbonylmethyl)-N,N-dimethylhydrazinium-chlorid (13)

Darstellung: 500 mg des Chloressigsäureamids (10c) (~ 2,7 mmol) gelöst in 6 ml Dichlormethan werden zu einer Lösung gegeben aus 164 mg N,N-Dimethylhydrazin (~ 2,7 mmol) in 2 ml Dichlormethan. Nach 20 min Rühren bei Raumtemperatur fällt ein weißer Niederschlag aus, der abgetrennt und umkristallisiert wird aus Ethanol / Diethylether.

Ausbeute: 560 mg (85 % d. Th.)

R_f-Wert: 0,03-0,12 Dichlormethan 3T / Methanol 4T / 25%ige Ammoniaklsg. 1T

Schmp.: 115°C (Ethanol / Diethylether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3627 (w), 3442 (m), 3263 (vs), 3189 (s), 3126 (s), 3038 (s), 3016 (s), 2840 (m), 2519 (w), 1670 (vs), 1587 (vs), 1565 (vs), 1457 (s), 1236 (s), 1089 (s), 963 (s), 937 (s), 745 (s), 726 (s)

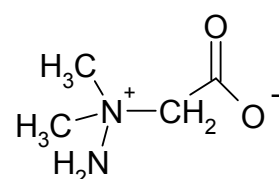
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 203 (10), 177 (11), 148 (36), 106 (25), 91 (100), 59 (47), 58 (91), 50 (40), 44 (57), 42 (54)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

3,42	s	6H	-N-(CH ₃) ₂	
4,36	d	2H	-N-CH ₂ -C-	³ J = 5,9 Hz
4,41	s	2H	-N-CH ₂ -CO-	
6,47	s	2H	-N-NH ₂	
7,23-7,39	m	5H	arom. H	
9,41	t	1H	-CO-NH-CH ₂ -	³ J = 5,9 Hz

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
C ₁₁ H ₁₈ N ₃ OCl (243,74)	ber.:	54,21	7,44	17,24
	gef.:	54,16	7,70	17,13

(N,N-Dimethylhydrazinio)acetat (14)

Darstellung: 3,0 g N-Benzoyloxycarbonylmethyl-N,N-dimethylhydrazinium-perchlorat (12) gelöst in 3 ml Wasser werden über eine Säule gegeben, die mit einem mit Hydroxidionen beladenen und neutralgewaschenen stark basischen Anionenaustauscher gefüllt ist. Das Eluat wird mit Diethylether erschöpfend extrahiert und die wässrige Phase eingengt zur Trockene. Es resultieren daraus weisse Kristalle, die aus Methanol / Diethylether umkristallisiert werden.

Ausbeute: 1,25g (95% d. Th.)

Schmp.: 175°C (Methanol / Diethylether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3399 (s), 3262 (vs), 3136 (s), 2954 (s), 2654 (m), 1620 (vs), 1506 (m), 1474 (s), 1435 (m), 1420 (s), 1380 (vs), 1309 (s), 1208 (s), 1171 (s), 965 (s), 921 (s), 712 (s), 556 (s)

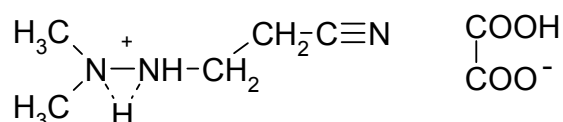
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 103 (9), 91 (7), 83 (17), 72 (28), 58 (48), 44 (100)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

3,23	s	6H	(CH ₃) ₂ -N-
3,68	s	2H	-N-CH ₂ -CO-
6,54	s	2H	-N-NH ₂

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
$C_4H_{10}N_2O_2 \cdot H_2O$ (136,15)	ber.:	35,28	8,88	20,57
	gef.:	35,14	8,66	20,13

N-(2-Cyanoethyl)-N',N'-dimethylhydrazinium-hydrogenoxalat (15)

Darstellung: 300 mg N,N-Dimethylhydrazin (~ 5 mmol) werden mit 5 ml Wasser und 212 mg Acrylonitril (~ 4 mmol) versetzt und bei RT 3 Tage gerührt. Die Lösung wird eingeeengt zur Trockne. Der Rückstand wird aufgenommen in wenig Ethanol und in eine Lösung aus 360 mg Oxalsäure in 5 ml Ethanol gegossen. Es bildet sich ein weisser Niederschlag, der abgetrennt und umkristallisiert wird aus Methanol / Diethylether.

Ausbeute: 422 mg (52 % d. Th.)

R_f-Wert: 0,31 (freie Base) Dichlormethan 19T / Isopropanol 1T

Schmp.: 122°C (Methanol / Diethylether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3434 (m), 3253 (m), 3045 (m), 2679 (m), 2458 (m), 1624 (s), 1473 (m), 1403 (s), 1278 (m), 1115 (m), 901 (w), 720 (s), 583 (w)

Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 113 (19) [M⁺], 73 (41), 59 (68), 58 (19), 57 (19), 46 (32), 45 (100), 42 (50)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, D₂O, [ppm]:

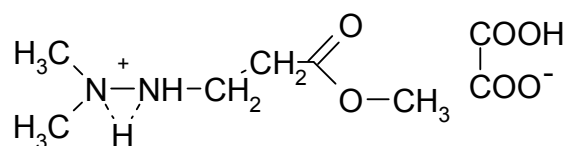
2,71	2H	t	-CH ₂ -CH ₂ -CN	³ J = 6,2 Hz
3,04	6H	s	(CH ₃) ₂ -N-	
3,26	2H	t	-N-CH ₂ -CH ₂ -	³ J = 6,2 Hz
	3H		-NH ₂ -, -COOH	ausgetauscht

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

2,60	6H	s	(CH ₃) ₂ -N-	
2,63	2H	t	-CH ₂ -CH ₂ -CN	³ J = 6,5 Hz
2,98	2H	t	-N-CH ₂ -CH ₂ -	³ J = 6,5 Hz
7,8	3H	„br“	-NH ₂ -, -COOH	

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
C ₇ H ₁₃ N ₃ O ₄ (203,20)	ber.:	41,38	6,45	20,68
	gef.:	42,20	6,45	20,16

N-[2-(Methoxycarbonyl)ethyl]-N',N'-dimethylhydrazinium-hydrogenoxalat (16)

Darstellung: 300 mg N,N-Dimethylhydrazin (~ 5 mmol) werden mit 344 mg Acrylsäuremethylester (~ 4 mmol) versetzt und bei RT 24 h gerührt. Die Lösung wird eingeeengt zur Trockne. Der Rückstand wird aufgenommen in wenig Ethanol und in eine Lösung aus 360 mg Oxalsäure in 5 ml Ethanol gegossen. Es bildet sich ein weißer Niederschlag, der abgetrennt und umkristallisiert wird aus Methanol / Diethylether.

Ausbeute: 500 mg (53 % d. Th.)

R_f-Wert: 0,14 (freie Base) Chloroform 100T / Isopropanol 3T

Schmp.: 117°C (Methanol / Diethylether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3450 (s), 3251 (m), 2954 (s), 2689 (s), 1735 (s), 1624 (s), 1441 (s), 1326 (m), 1212 (s), 1026 (m), 720 (s), 592 (w)

Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 146 (29) [M⁺-90], 113 (3), 73 (46), 59 (98), 58 (27), 44 (100), 42 (46)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, D₂O, [ppm]:

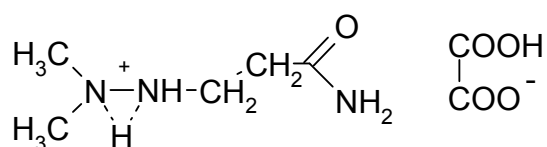
2,60	2H	t	-CH ₂ -CH ₂ -CO-	³ J = 6,4 Hz
2,98	6H	s	(CH ₃) ₂ -N-	
3,24	2H	t	-N-CH ₂ -CH ₂ -	³ J = 6,4 Hz
3,66	3H	s	CH ₃ -O-	
	3H		-NH ₂ -, -COOH	ausgetauscht

^1H -NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO- d_6 , [ppm]:

2,52	2H	t	$-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CO}-$	$^3\text{J} = 6,7 \text{ Hz}$
2,66	6H	s	$(\text{CH}_3)_2\text{-N-}$	
3,09	2H	t	$-\text{N}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-$	$^3\text{J} = 6,7 \text{ Hz}$
3,61	3H	s	$\text{CH}_3\text{-O-}$	
7,5	3H	"br"	$-\text{NH}_2-, -\text{COOH}$	austauschbar

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6$ (236,22)	ber.:	40,68	6,83	11,86
	gef.:	40,41	6,80	11,56

N-(2-Carbamoylethyl)-N',N'-dimethylhydrazinium-hydrogenoxalat (17**)**

Darstellung: 150mg N,N-Dimethylhydrazin (~ 2,5 mmol) werden in 10 ml Wasser gelöst und mit 140 mg Acrylamid (~ 2 mmol) versetzt. Die Lösung wird 3 Tage gerührt und anschliessend eingengt. Das resultierende gelbe Öl wird aufgenommen in wenig Ethanol und in eine Lösung aus 360 mg Oxalsäure (~ 4 mmol) in 5 ml Ethanol gegossen. Es bildet sich ein weisser Niederschlag, der abgetrennt und umkristallisiert wird aus Methanol / Diethylether.

Ausbeute: 234 mg (53 % d. Th.)

Schmp.: 124°C (Methanol / Diethylether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3393 (s), 3195 (s), 2830 (m), 1674 (vs), 1624 (vs), 1429 (s), 1360 (m), 1279 (m), 962 (m), 887 (m), 708 (s), 492 (s)

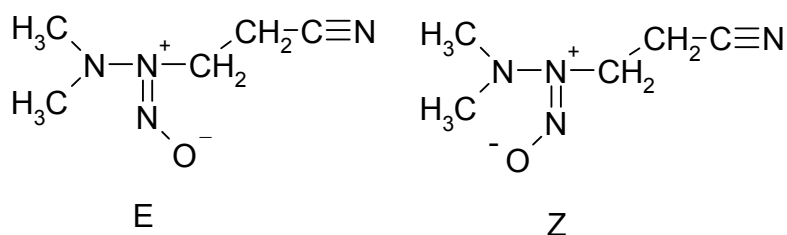
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 131 (1) [M⁺-90], 73 (6), 71 (20), 60 (19), 59 (42), 55 (27), 46 (100), 45 (100)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

2,34	t	2H	-CH ₂ -CH ₂ -CO-	³ J = 6,9 Hz
2,69	s	6H	(CH ₃) ₂ -N-	
3,08	t	2H	-NH-CH ₂ -CH ₂ -	³ J = 6,9 Hz
6,98	s	1H	-CO-NH ₂	
7,50	s	1H	-CO-NH ₂	
9,5	“br”	3H	-N-NH ₂ - , -COOH	

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
C ₇ H ₁₅ N ₃ O ₅ (221,21)	ber.:	38,01	6,83	19,00
	gef.:	37,91	6,88	18,75

N-(2-Cyanoethyl)-N',N'-dimethylhydraziniumhydrogenoxalat (18**)**

Darstellung: 1,01 g des Hydrazinoxalates (**15**) (~ 5 mmol) werden in 10 ml Wasser gelöst und gekühlt auf 0°C. Unter Eiskühlung wird eine Lösung aus 410 mg Natriumnitrit (~ 6 mmol) in 10 ml Wasser langsam zugetropft. Man lässt 0,5 h unter Eiskühlung Rühren und anschließend noch 0,5 h bei RT. Die Lösung wird mit Dichlormethan erschöpfend extrahiert. Die org. Phase wird mit Wasser neutralgewaschen, getrocknet mittels Magnesiumsulfat und eingeeengt. Es resultiert ein gelbbraunes Öl.

Ausbeute: 830 mg (95 % d. Th.)

R_f-Wert: 0,39 Dichlormethan 100T / Isopropanol 3T

IR-Spektrum, CHCl₃, [cm⁻¹]: 2964 (m), 2255 (w), 1518 (s), 1453 (s), 1338 (m), 1120 (m), 1020 (m)

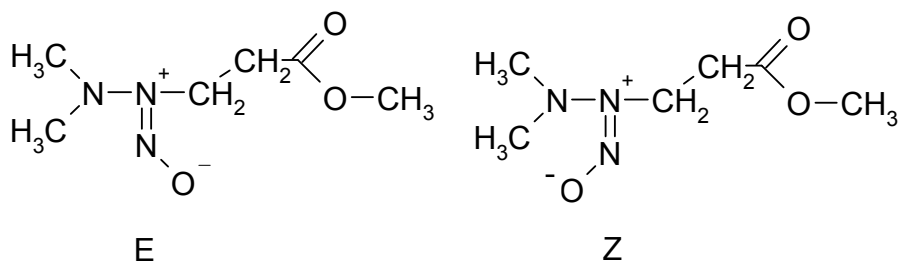
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 112 (7), 111 (100), 107 (66), 106 (44), 79 (18), 71 (30), 66 (88), 52 (91), 45 (87)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

2,76	1,6H	s	Z: (CH ₃) ₂ -N-	
2,79	1,6H	t	E: -CH ₂ -CH ₂ -C-	³ J = 6,5 Hz
2,93	4,4H	s	E: (CH ₃) ₂ -N-	
3,02	0,4H	t	Z: -CH ₂ -CH ₂ -C-	³ J = 6,1 Hz
3,89	1,6H	t	E: -N-CH ₂ -CH ₂ -	³ J = 6,5 Hz
4,33	0,4H	t	Z: -N-CH ₂ -CH ₂ -	³ J = 6,1 Hz

^1H -NMR-Spektrum, 200 MHz, Benzol- d_6 , [ppm]:

1,53	1,5H	t	E: $-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{C}-$	$^3J = 6,5 \text{ Hz}$
1,60	0,5H	t	Z: $-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{C}-$	$^3J = 6,7 \text{ Hz}$
2,40	1,6H	s	Z: $(\text{CH}_3)_2\text{-N-}$	
2,47	4,4H	s	E: $(\text{CH}_3)_2\text{-N-}$	
3,03	1,5H	t	E: $-\text{N}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-$	$^3J = 6,5 \text{ Hz}$
3,31	0,5H	t	Z: $-\text{N}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-$	$^3J = 6,7 \text{ Hz}$

Methyl 3-(N',N'-dimethyl-N-nitrosohydrazino)propionat (19**)**

Darstellung: 1,18 g des Hydrazinoxalates (**16**) (~ 5 mmol) werden in 10 ml Wasser gelöst und gekühlt auf 0°C. Unter Eiskühlung wird eine Lösung aus 410 mg Natriumnitrit (~ 6 mmol) in 10 ml Wasser langsam zugetropft. Man lässt 0,5 h unter Eiskühlung rühren und anschließend noch 0,5 h bei RT. Die Lösung wird mit Dichlormethan erschöpfend extrahiert. Die org. Phase wird mit Wasser neutral gewaschen, getrocknet mittels Magnesiumsulfat und eingeeengt. Es resultiert ein gelbbraunes Öl.

Ausbeute: 820 mg (94 % d. Th.)

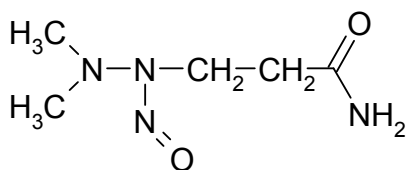
R_f-Wert: 0,65 Chloroform 100T / Isopropanol 3T

Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 145 (28) [M-30]⁺, 85 (100), 72 (27),
59 (10), 44 (71), 43 (38)

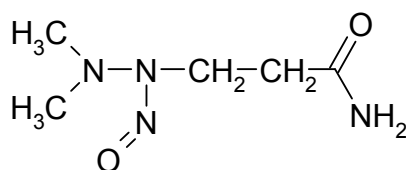
Massenspektrum, FAB 70 eV, [m/z], (%): 176 (5) [M+1]⁺, 175 (5) [M]⁺, 174
(19) [M-1]⁺, 157 (25), 146 (11), 145
(9), 99 (14), 85 (16), 59 (22), 58 (100)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, CDCl₃, [ppm]:

2,59	1,6H	t	E: -CH ₂ -CH ₂ -CO-	³ J = 7,0 Hz
2,80	1,3H	s	Z: (CH ₃) ₂ -N-	
2,84	0,4H	t	Z: -CH ₂ -CH ₂ -CO-	³ J = 6,9 Hz
2,96	4,7H	s	E: (CH ₃) ₂ -N-	
3,71	2,3H	s	E: -O-CH ₃	
3,73	0,7H	s	Z: -O-CH ₃	
3,96	1,6H	t	E: -N-CH ₂ -CH ₂ -	³ J = 7,0 Hz
4,35	0,4H	t	Z: -N-CH ₂ -CH ₂ -	³ J = 6,9 Hz

3-(N',N'-Dimethyl-N-nitrosohydrazino)propionamid (20)

E



Z

Darstellung: 1,11 g des Hydrazinoxalates (17) (~ 5 mmol) werden in 10 ml Wasser gelöst und gekühlt auf 0°C. Unter Eiskühlung wird eine Lösung aus 410 mg Natriumnitrit (~ 6 mmol) in 10 ml Wasser langsam zugetropft. Man lässt 0,5 h unter Eiskühlung rühren und anschließend noch 0,5 h bei RT. Die Lösung wird mit Dichlormethan erschöpfend extrahiert. Die org. Phase wird mit Wasser neutral gewaschen, getrocknet mittels Magnesiumsulfat und eingeeengt. Es resultiert ein gelbbraunes Öl.

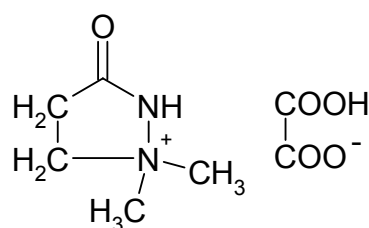
Ausbeute: 0,76g (95% d. Th.)

R_f-Wert: 0,56 Chloroform 100T / Isopropanol 3T

Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 56 (4), 48 (14), 42 (74), 30 (100)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

2,30	1,5H	t	E: -CH ₂ -CO-	³ J = 7,3Hz
2,51	0,5H	t	Z: -CH ₂ -CO-	³ J = 6,9Hz
2,72	1,4H	s	Z: -N-(CH ₃) ₂	
2,86	4,6H	s	E: -N-(CH ₃) ₂	
3,78	1,5H	t	E: -N-CH ₂ -	³ J = 7,3Hz
4,21	0,5H	t	Z: -N-CH ₂ -	³ J = 6,8Hz
6,91	0,8H	s	E: -CO-NH ₂	
7,24	0,2H	s	Z: -CO-NH ₂	
7,39	0,8H	s	E: -CO-NH ₂	
7,60	0,2H	s	Z: -CO-NH ₂	

1,1-Dimethyl-3-oxo-pyrazolidinium-hydrogenoxalat (21)

Darstellung: 300 mg des N,N-Dimethylhydrazins (~ 5,0 mmol) gelöst in 5 ml Wasser werden mit 344 mg Acrylsäuremethylester (~ 4,0 mmol) versetzt. Nach 3 Tagen wird der Reaktionsansatz eingeeengt. Der ölige Rückstand wird aufgenommen in wenig Ethanol und versetzt mit einer Lösung aus 180 mg Oxalsäure (~ 2,0 mmol) in 5 ml Ethanol. Es fallen weisse Kristalle aus, die abgetrennt und umkristallisiert werden aus Ethanol.

Ausbeute: 710 mg (80 % d. Th.)

Schmp.: 103°C (Ethanol)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3852 (w), 3452 (s), 3006 (s), 2807 (s), 2743 (s), 2344 (m), 1732 (vs), 1701 (s), 1471 (s), 1446 (s), 1315 (s), 1278 (s), 1110 (s), 971 (m), 878 (m), 721 (vs), 516 (s)

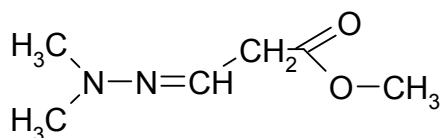
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 113 (11), 86 (7), 73 (11), 72 (24), 59 (66), 44 (100)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

2,85	2H	t	-CH ₂ -CH ₂ -CO-	³ J = 8,0 Hz
3,26	6H	s	(CH ₃) ₂ -N ⁺ -	
3,93	2H	t	-N-CH ₂ -CH ₂ -	³ J = 8,0 Hz
7,1	2H	„br“	-COOH, -NH-CO-	

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₅ •H ₂ O (222,20)	ber.:	37,84	6,35	12,61
	gef.:	37,74	6,78	12,32

Methyl 3-(Dimethylhydrazono)propionat (22)

Darstellung: 500 mg Methyl-3,3-dimethoxypropionat (~ 3,4 mmol) werden in 5 ml 2N-HCl gelöst und 30 min bei RT gerührt. Die Lösung wird mit 5 ml 2N-NaOH neutralisiert. Mit Zitronensäure wird die Lösung auf einen pH-Wert von 4-5 eingestellt. Dann werden 205 mg N,N-Dimethylhydrazin (~ 3,4 mmol) zugetropft und es wird 10 min gerührt. Die Lösung wird mit Dichlormethan erschöpfend extrahiert. Die org. Phase wird mit Wasser neutralgewaschen, getrocknet über Magnesiumsulfat und eingeeengt. Es resultiert ein blassgelbes Öl.

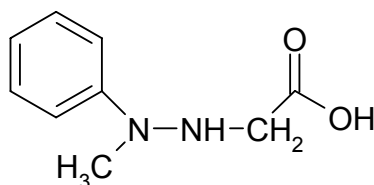
Ausbeute: 110 mg (22 % d. Th.)

R_f-Wert: 0,11 Methylenchlorid 100T / Isopropanol 3T

Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 144 (24) [M⁺], 112 (15), 85 (42), 43 (100)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

2,85	6H	s	(CH ₃) ₂ -N-	
3,36	2H	d	-CH=CH ₂ -CO-	³ J = 5,5 Hz
3,77	3H	s	CH ₃ -O-	
6,68	1H	t	-N=CH-CH ₂ -	³ J = 5,5 Hz

2-(N'-Methyl-N'-phenylhydrazino)essigsäure (23)

Darstellung: 200 mg der Hydrazonoessigsäure (**31**) (~ 1,1 mmol) werden in 20 ml trockenen Acetonitril gelöst und mit 50 mg Natriumborhydrid (~ 1,3 mmol) versetzt. Nach 2,5 h wird das Reaktionsgemisch auf 5 ml eingengt, mit 30 ml Diethylether versetzt und wiederholt mit 1%iger Natronlauge extrahiert. Die Wasserphase wird neutralisiert mit 20%iger Schwefelsäurelösung und verdünnt mit 20%iger Schwefelsäurelösung im Verhältnis 1:1. Die Lösung wird mit Diethylether extrahiert und mit Natriumbicarbonat neutralisiert. Mit 20%iger Schwefelsäurelösung wird die Lösung auf pH 3-4 eingestellt und erschöpfend mit Diethylether extrahiert. Die Diethyletherphase wird getrocknet und eingengt auf 5 ml. Die Lösung wird mit 0,5 ml 4,4N-methanol. HCl versetzt. Die überstehende Lösung wird vom öligen Niederschlag abdekantiert. Der ölige Niederschlag wird dreimal mit je 100 ml trockenem Diethylether geschüttelt. Die dabei resultierenden Kristalle werden aus Methanol / Diethylether umkristallisiert werden.

Ausbeute:	95 mg	(47 % d. Th.)
R_f-Wert:	0,14	Dichlormethan 19T / Essigsäure 1T
Schmp.:	60°C	(Diethylether / n-Hexan)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3301 (m), 2967 (w), 2526 (w), 1716 (m), 1597 (m), 1499 (m), 1441 (w), 1251 (m), 1116 (w), 747 (m), 691 (m), 507 (w)

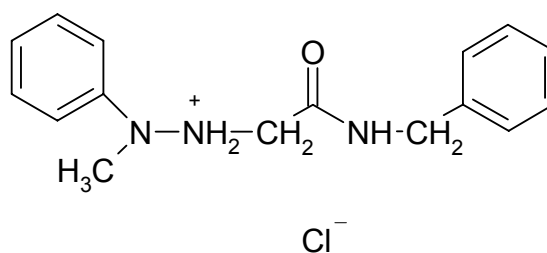
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 180 (48) [M⁺], 133 (16), 121 (100), 107 (31), 106 (86), 92 (32), 79 (27), 77 (80), 65 (19), 51 (38), 44 (19)

^1H -NMR-Spektrum, 200 MHz, CDCl_3 , [ppm]:

2,3 – 4,3	1H	“br”	-NH-
3,07	3H	s	$\text{CH}_3\text{-N-}$
3,71	2H	s	-NH- <u>CH_2</u> -COO-
6,85 – 7,35	5H	m	arom. H
7,1	1H	“br”	-COOH

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ (180,21)	ber.:	59,99	6,71	15,55
	gef.:	59,72	6,81	15,60

N-Benzylaminocarbonylmethyl-N',N'-methylphenylhydrazinium-chlorid (25)

Darstellung: 200 mg der Hydrazonoessigsäure (**33**) (~ 0,75 mmol) werden in 25 ml trockenem Diethylether gelöst und mit 175 mg Lithiumaluminiumhydrid versetzt. Nach 10 min Rühren lässt man das überschüssige Lithiumaluminiumhydrid mit 5 ml Ethylacetat abreagieren und versetzt die Lösung mit 30 ml Wasser. Nach Abtrennen der org. Phase wird diese mit 1%iger Schwefelsäurelösung extrahiert, mit Wasser neutralgewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Abtrennen vom Trocknungsmittel wird die Lösung mit 0,5 ml 4,4N-methanol. HCl und 70 ml trockenem Diethylether versetzt. Die überstehende Lösung wird vom öligen Niederschlag abdekantiert. Der ölige Niederschlag wird dreimal mit je 100 ml trockenem Diethylether geschüttelt wodurch blassgelbe Kristalle resultieren, die aus Methanol / Diethylether umkristallisiert werden.

Ausbeute: 200 mg (72 % d. Th.)
R_f-Wert: 0,21 Diethylether 3 T / Toluol 2 T
Schmp.: 99°C (Methanol / Diethylether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3188 (m), 3060 (m), 2934 (m), 1650 (vs), 1588 (s), 1578 (s), 1503 (m), 1452 (m), 1431 (m), 1026 (w), 730 (m), 688 (m), 455 (w)

IR-Spektrum, CHCl₃, [cm⁻¹]: 3238 (w), 1678 (s), 1598 (w), 1333 (w)

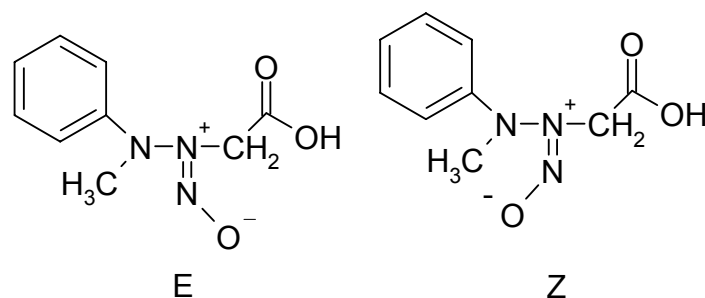
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 269 (23) ([M⁺]-36), 254 (5), 135 (25), 121 (35), 107 (24), 106 (100), 91 (22), 77 (30), 65 (11), 51 (8)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, Aceton-d₆, [ppm]:

3,06	s	3H	-N-CH ₃	
3,65	s	2H	-N-CH ₂ -CO-	
4,33	d	2H	-N-CH ₂ -C-	³ J = 6,0 Hz
5,6 – 6,9	„br“	2H	-N-NH ₂ -	
6,98	t	1H	p-Anilin H	
7,17-7,35	m	9H	arom. H	
8,70	t	1H	-CO-NH-	³ J = 5,7 Hz

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O·HCl (305,65)	ber.:	63,05	6,28	13,79
	gef.:	63,06	6,54	13,57

(N'-Methyl-N-nitroso-N'-phenylhydrazino)essigsäure (26)

Darstellung: 100 mg der Hydrazinoessigsäure (**23**) (~ 0,6 mmol) werden in 10 ml Methanol gelöst. Mit Zitronensäure wird ein pH von 3-4 eingestellt. Zu dieser Lösung werden 60 mg Natriumnitrit (~ 0,9 mmol) gelöst in 5 ml Methanol, gegeben. Nach 30 min unter Lichtausschluss wird die Lösung mit Diethylether extrahiert. Die org. Phase wird eingeeengt auf ein Volumen von 5 ml. Auf Zusatz von 5 ml n-Hexan bilden sich blassgrüne Kristalle, die abgetrennt und aus Diethylether / n-Hexan umkristallisiert werden.

Ausbeute:	70 mg	(60 % d. Th.)
R_f-Wert:	0,5	Ethylacetat 19T / Essigsäure 1T
Schmp.:	88°C	(Diethylether / n-Hexan)

IR-Spektrum, CHCl₃, [cm⁻¹]: 3316 (w), 1733 (s), 177 (s), 1600 (vs), 1574 (s), 1500 (vs), 1455 (s), 1326 (s), 1105 (vs), 994 (m), 893 (m)

Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 180 (14), 134 (53), 133 (67), 121 (34),
107 (41), 106 (100), 79 (42), 77 (85),
51 (37), 44 (72)

Massenspektrum, FAB 70 eV, [m/z], (%): 210 (9) [M⁺+1], 179 (61), 152 (18),
(Matrix: m-Nitrobenzylalkohol) 124 (18), 107 (56), 77 (100)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, CDCl₃, [ppm]:

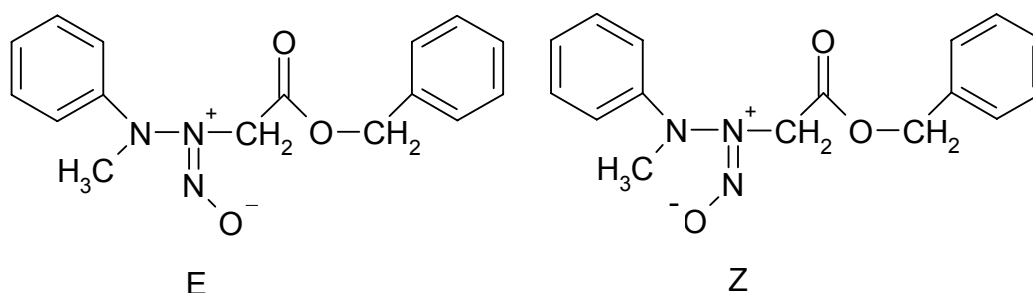
3,27	s	0,9H	Z: -N-CH ₃	
3,53	s	2,1H	E: -N-CH ₃	
4,35	s	1,4H	E: -N-CH ₂ -CO-	
4,8 – 5,5	br	0,6H	Z: -N-CH ₂ -CO-	
6,56	d	1,4H	Z: H-2',6'	³ J = 8,1 Hz
6,76 – 7,39	m	3,6H	E: H-2',6'; E + Z: H-3',4',5'	
7,6 – 10,0	br	1H	E + Z: -COOH	

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

3,13	s	1,1H	Z: -N-CH ₃	
3,42	s	1,9H	E: -N-CH ₃	
4,44	s	1,3H	E: -N-CH ₂ -CO-	
4,6 – 5,4	„br“	0,7H	Z: -N-CH ₂ -CO-	
6,65	d	0,7H	Z: H-2',6'	³ J = 8,6 Hz
6,84 – 7,46	m	4,3H	E: H-2',6'; E + Z: H-3',4',5'	
11,6 – 13,4	“br”	1H	-COOH	austauschbar

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
C ₉ H ₁₁ N ₃ O ₃ (209,20)	ber.:	51,67	5,30	20,09
	gef.:	52,95	5,19	18,80

Benzyl 2-(N'-methyl-N'-phenyl-N-nitrosohydrazino)acetat (27)

Darstellung: 300 mg der Nitrosohydrazinessigsäure (26) (~ 1,4 mmol) werden in 100 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Unter Eiskühlung werden 325 mg DCC (~ 1,6 mmol), 50 mg DMAP und 800 mg Benzylamin (~ 7,4 mmol) zugesetzt und unter Argon die Lösung 1 h unter Eiskühlung gerührt. Anschliessend wird 11 h bei Raumtemperatur ebenfalls unter Argon gerührt und die überstehende Lösung vom ausgefallenen Niederschlag (= DCU) abgetrennt. Die Lösung wird mit 1%iger NaOH und 1%iger Schwefelsäurelösung extrahiert und eingengt. Der Rückstand wird mittels SC an Kieselgel (FM: Dichlormethan 20T / Ethylacetat 1T) aufgereinigt. Die entsprechenden Fraktionen werden vereinigt, getrocknet über Magnesiumsulfat und eingengt. Der resultierende Rückstand wird umkristallisiert aus Diethylether / n-Hexan.

Ausbeute:	150 mg	(36 % d. Th.)
R_f-Wert:	0,56	Dichlormethan
Schmp.:	214°C	(Diethylether / n-Hexan)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3440 (m), 3026 (m), 1712 (s), 1599 (m), 1545 (s), 1599 (m), 1545 (s), 1456 (m), 1299 (m), 1160 (s), 1020 (m), 846 (m), 752 (m), 509 (w)

Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 269 (3) [M⁺-30], 106 (16), 91 (22), 77 (10), 30 (100)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

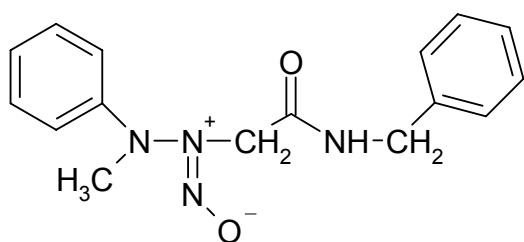
3,10	0,9H	s	Z: CH ₃ -N-
3,41	2,1H	s	E: CH ₃ -N-
4,64	1,4H	s	E: -N-CH ₂ -CO-
5,16	1,4H	s	E: -O-CH ₂ -C-
5,25	0,6H	s	Z: -O-CH ₂ -C-
5,0 – 6,0	0,6H	“br”	Z: -N-CH ₂ -CO-
6,68	0,6H	“d”	H: H-2,6
6,84-7,00	2,4H	m	E + Z: H-4 ; E: H-2,6
7,16-7,43	7H	m	E + Z: H-3,5,2',3',4',5',6'

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, Benzol-d₆, [ppm]:

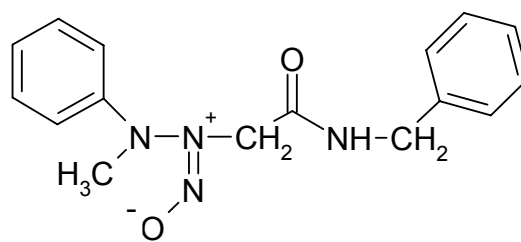
3,03	0,8H	s	Z: CH ₃ -N-
3,04	2,2H	s	E: CH ₃ -N-
3,75	1,5H	s	E: -N-CH ₂ -CO-
4,84	1,5H	s	Z: -O-CH ₂ -C-
4,85	0,5H	s	E: -O-CH ₂ -C-
5,28	0,5H	s	Z: -N-CH ₂ -CO-
6,33	0,5H	“d”	Z: H-2,6
6,49	1,5H	“d”	E: H-2,6
6,81	1H	m	E + Z: H-4
7,00-7,37	7H	m	E + Z: H-3,5,2',3',4',5',6'

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₃ (299,33)	ber.:	64,20	5,72	14,04
	gef.:	63,15	5,84	14,11

N-Benzyl-2-(N'-methyl-N'-phenyl-N-nitrosohydrazino)acetamid (28)

E



Z

Darstellung: Zu einer Lösung aus 150 mg des Hydrazinhydrochlorids (25) (~ 0,49 mmol) und 50 mg Zitronensäure in 10 ml Methanol wird eine Lösung aus 60 mg Natriumnitrit (~ 0,9 mmol) in 10 ml Methanol gegeben. Nach 30 Minuten Stehen unter Lichtausschluss werden 130 ml Wasser zugesetzt, worauf sich alsbald blass gelbe Kristalle absetzen, die aus Methanol / Wasser umkristallisiert werden.

Ausbeute: 66 mg (45 % d. Th.)
R_f-Wert: 0,33 Toluol 19T / Isopropanol 1T
Schmp.: 90°C (Methanol / Wasser)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3296 (s), 3086 (w), 3062 (w), 3028 (w), 2915 (w), 2824 (vw), 1661 (vs), 1600 (s), 1584 (w), 1565 (s), 1500 (s), 1454 (s), 1441 (s), 1425 (m), 1093 (w), 1029 (m), 747 (s), 692 (s)

Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 269 (15), 267 (9), 135 (12), 133 (11), 121 (18), 107 (27), 106 (82), 105 (32), 91 (33), 77 (32), 65 (12), 32 (25), 30 (48), 28 (100)

Massenspektrum, FAB 70 eV, [m/z], (%): 299 (1) [M⁺+1], 269 (10), 268 (10), 155 (24), 152 (14), 138 (32), 137 (55), 77 (55), 63 (34)
 (Matrix: m-Nitrobenzylalkohol)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, 23°C, [ppm]:

3,08	s	1,4H	Z: -N-CH ₃	
3,44	s	1,6H	E: -N-CH ₃	
4,29	d	1,1H	E: -NH-CH ₂ -C-	³ J = 5,9 Hz
4,35	d	0,9H	Z: -NH-CH ₂ -C-	³ J = 5,9 Hz
4,44	s	1,1H	E: -N-CH ₂ -CO-	
4,8	“br”	0,5H	Z: -N-CH ₂ -CO-	
5,4	“br”	0,5H	Z: -N-CH ₂ -CO-	
6,6 – 6,7	m	0,9H	Z: H-4,8	
6,7 – 7,3	m	9,0H	E + Z: H-5,6,7,3',4',5',6',7'	
			E: H-4,8	
8,68	t	0,5H	E: -CO-NH-CH ₂ -	
8,92	t	0,5H	Z: -CO-NH-CH ₂ -	

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, 40°C, [ppm]:

3,07	s	1,4H	Z: -N-CH ₃	
3,45	s	1,6H	E: -N-CH ₃	
4,29	d	1,1H	E: -NH-CH ₂ -C-	³ J = 5,9 Hz
4,35	d	0,9H	Z: -NH-CH ₂ -C-	³ J = 5,9 Hz
4,42	s	1,1H	E: -N-CH ₂ -CO-	
5,1	“br”	0,9H	Z: -N-CH ₂ -CO-	
6,6 – 6,7	m	0,9H	Z: H-4,8	
6,7 – 7,5	m	9,1H	E + Z: H-5,6,7,3',4',5',6',7',	
			E: H-4,8	
8,5	„br“	0,5H	E: -CO-NH-CH ₂ -	
8,7	„br“	0,5H	Z: -CO-NH-CH ₂ -	

^1H -NMR-Spektrum, 200 MHz, Benzol- d_6 , [ppm]:

3,07	s	0,9H	Z: -N-CH ₃	
3,20	s	2,1H	E: -N-CH ₃	
3,60	s	1,4H	E: -N-CH ₂ -CO-	
ca. 4,0	"br"	0,6H	Z: -N-CH ₂ -CO- ; nur an der Integration erkennbar	
4,08	d	1,4H	E: -N-CH ₂ -C-	$^3J = 5,9 \text{ Hz}$
4,43	d	0,6H	Z: -N-CH ₂ -C-	$^3J = 6,0 \text{ Hz}$
4,7	"br"	0,3H	Z: -CO-NH- ; austauschbar: beide Signale	
5,0	"br"	0,7H	E: -CO-NH- ; rutschen zusammen	
6,3 - 6,4	m	0,6H	Z: H-4,8	
6,5 - 6,6	m	1,4H	E: H-4,8	
6,7 - 7,2	m	8H	H-5,6,7,3',4',5',6',7'	

 ^1H -NMR-Spektrum, 200 MHz, CDCl_3 , [ppm]:

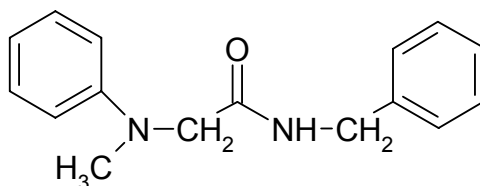
3,18	s	0,9H	Z: -N-CH ₃	
3,50	s	2,1H	E: -N-CH ₃	
4,30	s	1,4H	E: -N-CH ₂ -CO-	
4,42	d	1,4H	E: -CO-CH ₂ -C-	$^3J = 5,8 \text{ Hz}$
4,49	d	0,6H	Z: -CO-CH ₂ -C-	$^3J = 5,7 \text{ Hz}$
4,95-5,05	s	0,6H	Z: -N-CH ₂ -CO-	
6,06-6,13	s	1H	E + Z: -CO- <u>NH</u> -CH ₂ -	austauschbar
6,52-6,56	"dd"	0,6H	Z: H-4,8	
6,77-7,40	m	9,4H	E + Z: H-5,6,7,3',4',5',6',7' E: H-4,8	

¹³C-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

37,5	Z: -N-CH ₃
39,9	E: -N-CH ₃
42,2	E: -NH- <u>CH</u> ₂ -C-
42,4	Z: -NH- <u>CH</u> ₂ -C-
50,8	E: -N- <u>CH</u> ₂ -CO-
55,7	Z: -N- <u>CH</u> ₂ -CO-
111,9	Z: C-4,8
113,9	E: C-4,8
119,7	Z: C-6
120,8	E: C-6
126,8-129,2	E + Z: C-5,7,3',4',5',6',7'
138,6-138,8	E + Z: C-2'
145,6	Z: C-3
148,1	E: C-3
164,1	E: -CH ₂ - <u>CO</u> -NH-
166,1	Z: -CH ₂ - <u>CO</u> -NH-

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
C ₁₆ H ₁₈ N ₄ O ₂ (298,35)	ber.:	64,41	6,08	18,78
	gef.:	63,71	5,69	18,03

N-Benzyl-2-(methylphenylamino)acetamid (30)

Darstellung: 440 mg N,N-Methylphenylhydrazin (~ 3,6 mmol) gelöst in 10 ml trockenen Butanol und 300 mg des Chloressigsäureamids (10c) (~ 1,6 mmol) gelöst in 10 ml trockenen Butanol werden vereinigt und 6,5 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen bildet sich ein feiner weißer Niederschlag, der abgetrennt wird. Das Filtrat wird eingeeengt bis fast zur Trockne. Dabei fallen blassgelbe Kristalle aus, die abgetrennt und aus Diethylether / Petrolether umkristallisiert werden.

Ausbeute: 410 mg (99 % d. Th.)

R_f-Wert: 0,41 Toluol 9T / Isopropanol 1T

Schmp.: 102°C (Diethylether / Petrolether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3419 (w), 3232 (m), 3087 (w), 1648 (s), 1601 (m), 1574 (w), 1521 (m), 1507 (s), 1329 (m), 1251 (m), 749 (m), 690 (m)

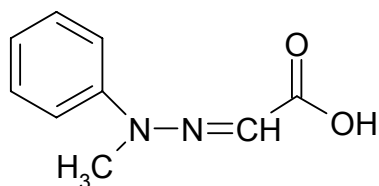
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 254 (9) [M⁺], 121 (13), 120 (100), 105 (11), 104 (14), 91 (14), 77 (18), 51 (8), 42 (9)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

3,00	s	3H	-N-CH ₃	
3,94	s	2H	-N-CH ₂ -CO-	
4,28	d	2H	-C-CH ₂ -N-	³ J = 6,0 Hz
6,62-6,68	m	3H	2 x o-, 1 x p-Anilin H	
7,13-7,33	m	7H	arom. H	
8,44	t	1H	-CO-NH-CH ₂ -	³ J = 6,0 Hz

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O (254,33)	ber.:	75,56	7,13	11,01
	gef.:	74,65	7,23	11,29

2-(Methylphenylhydrazono)essigsäure (31)

Darstellung: Zu einer Lösung aus 200 mg N,N-Methylphenylhydrazin (~ 1,6 mmol) und 100 mg Zitronensäure in 10 ml Wasser wird eine Lösung aus 121 mg Glyoxylsäure in 10 ml Wasser gegeben. Nach wenigen Sekunden bildet sich ein kristalliner Niederschlag, der abgetrennt und umkristallisiert wird aus Ethanol.

Ausbeute: 260 mg (89 % d. Th.)
R_f-Wert: 0,59 Methanol 1T / Dichlormethan 9T
Schmp.: 172°C (Ethanol)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 2939 (m), 2611 (m), 2370 (m), 1720 (s), 1653 (w), 1602 (m), 1553 (s), 1502 (s), 1457 (m), 1438 (s), 1296 (m), 1268 (s), 1121 (m), 998 (w), 877 (m), 697 (m), 503 (w)

IR-Spektrum, CHCl₃, [cm⁻¹]: 3442 (w), 1740 (vs), 1686 (m), 1544 (vs), 1499 (vs), 1420 (w), 1320 (s), 604 (s)

Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 178 (47) [M⁺], 149 (13), 133 (96), 107 (26), 106 (84), 91 (11), 79 (47), 77 (100), 65 (17), 51 (38), 44 (23)

^{13}C -NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO- d_6 , [ppm]:

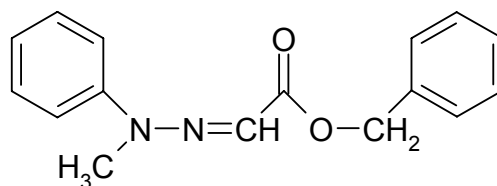
33,8	$\text{CH}_3\text{-N-}$
116,2	C-2',6'
122,2	-N=CH-COO-
122,4	C-4'
128,9	C-3', 5'
146,3	ipso C-1'
165,4	-CH-COOH

 ^1H -NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO- d_6 , [ppm]:

3,40	s	3H	$\text{CH}_3\text{-N-}$
6,86	s	1H	-N=CH-CO-
7,04	„t“	1H	p-Anilin H
7,29 – 7,59	m	4H	arom. H
12,23	s	1H	-COOH

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ (178,19)	ber.:	60,67	5,66	15,72
	gef.:	60,40	5,87	15,42

Benzyl (methylphenylhydrazono)acetat (32)

Darstellung: 3 g der Hydrazonessigsäure (**31**) (~ 16,9 mmol), 3,85 g DCC (~ 18,7 mmol), 5,5 g Benzylalkohol (~ 51 mmol) und 50 mg DMAP werden in 100 ml trockenem Dichlormethan unter Eiskühlung gelöst. Nach 1 h unter Eiskühlung wird 11 h bei RT gerührt. Der gebildete Niederschlag wird abgetrennt, und die org. Phase mit 1%iger NaOH und 1%iger Schwefelsäurelösung extrahiert. Die org. Phase wird mit Wasser neutralgewaschen und eingengt. Der Rückstand wird in wenig Diethylether aufgenommen. Auf Zusatz von n-Hexan bildet sich ein Niederschlag, der abgetrennt und umkristallisiert wird aus Diethylether / n-Hexan.

Ausbeute: 3,53 g (78 % d. Th.)
R_f-Wert: 0,59 Ethylacetat
Schmp.: 63°C (Diethylether / n-Hexan)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3419 (w), 3060 (w), 1714 (s), 1545 (s), 1456 (w), 1298 (m), 1158 (s), 1118 (s), 1021 (m), 847 (w), 752 (m), 697 (m), 510 (vw)

IR-Spektrum, CHCl₃, [cm⁻¹]: 1720 (s), 1697 (s), 1600 (m), 1548 (vs), 1494 (vs), 1420 (s), 1273 (vs), 1163 (vs), 989 (m), 626 (s)

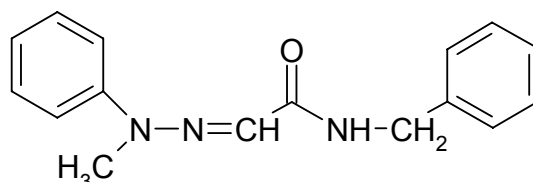
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 268 (48) [M⁺], 133 (46), 106 (46), 91 (100), 77 (40), 65 (18), 51 (13)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

3,41	3H	s	CH ₃ -N-
5,26	2H	s	-O-CH ₂ -C-
6,99	1H	s	-N=CH-CO-
7,06	1H	„t“	p-Anilin H
7,32-7,40	9H	m	arom. H

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₂ (268,32)	ber.:	71,62	6,01	10,44
	gef.:	71,77	5,96	10,43

N-Benzyl-2-(methylphenylhydrazono)acetamid (33**)**

Darstellung: 500 mg der Hydrazonoessigsäure (**31**) (~ 2,8 mmol) und 50 mg DMAP werden 15 ml trockenen Dichlormethan gelöst und gekühlt auf 0°C. Dazu werden 600 mg Benzylamin (~ 5,6 mmol) und 700 mg DCC (~ 3,4 mmol) gegeben. Nach 1 h Rühren bei 0°C wird 9 h gerührt bei RT. Das als weisse Flocken ausgefallene DCU wird mittels Filtration abgetrennt und das Filtrat zweimal mit 1%iger NaOH und anschliessend zweimal mit 1%iger Schwefelsäurelösung extrahiert. Die org. Phase wird neutralgewaschen mit Wasser und eingengt. Der ölige Rückstand wird aufgereinigt mittels SC an Kieselgel (FM : Methylenchlorid 19T / Isopropanol 1T) . Die entsprechenden Fraktionen werden vereinigt, getrocknet über Magnesiumsulfat und eingengt. Es resultieren blassgelbe Kristalle, die aus Diethylether / n-Hexan umkristallisiert werden.

<u>Ausbeute:</u>	300 mg	(40 % d. Th.)
<u>R_f-Wert:</u>	0,42	Ethylacetat
<u>Schmp.:</u>	83°C	(Diethylether / n-Hexan)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3305 (m), 2928 (w), 2366 (w), 1644 (s), 1598 (s), 1558 (m), 1498 (s), 1452 (m), 1278 (m), 1217 (s), 1120 (m), 752 (m), 693 (m), 573 (w)

IR-Spektrum, CHCl₃, [cm⁻¹]: 3421 (w), 2935 (m), 1654 (vs), 1555 (vs), 1454 (m), 1422 (ms), 1337 (m), 1309 (m), 624 (s)

Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 267 (23) [M⁺], 161 (12), 133 (21), 106 (100), 91 (41), 77 (28), 56 (18)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

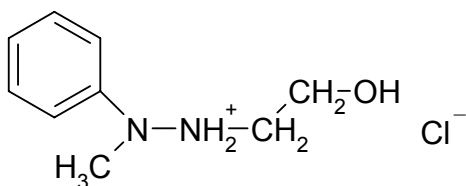
3,36	3H	s	CH ₃ -N-	
4,42	2H	d	-NH-CH ₂ -C-	³ J = 6,3 Hz
6,89	1H	s	-N=CH-CO-	
6,95	1H	t	p-Anilin H	
7,02 – 7,37	7H	m	arom. H	
7,50 – 7,56	2H	„d“	2 x o-Anilin H	
8,52	1H	t	-CO-NH-CH ₂ -	³ J = 6,3 Hz

^{13}C -NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d_6 , [ppm]:

33,4	$\text{CH}_3\text{-N-}$
41,9	$\text{-NH-CH}_2\text{-C-}$
115,9	C-2',6'
121,6	C-4'
125,9	-N=CH-CO-
126,5	C-4''
127,0	C-2'',6''
128,1	C-3'', 5''
128,8	C-3', 5'
140,1	ipso C-1''
146,4	ipso- C-1'
164,2	=C-CO-NH-

Elementaranalyse:

	%C	%H	%N
$\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$ (267,33)	ber.: 71,89	6,41	15,72
	gef.: 71,67	6,65	15,62

N-(2-Hydroxyethyl)-N'-methyl-N'-phenylhydrazinium-chlorid (34)

Darstellung: 200 mg des Hydrazonessigsäureamids (32) (~ 0,75 mmol) werden in 25 ml trockenem Diethylether gelöst und mit 175 mg Lithiumaluminiumhydrid versetzt. Nach 20 min Rühren lässt man das überschüssige Lithiumaluminiumhydrid mit 5 ml Ethylacetat abreagieren und versetzt die Lösung mit 30 ml Wasser. Nach Abtrennen der org. Phase wird diese mit 1%iger Schwefelsäurelösung extrahiert, mit Wasser neutralgewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Abtrennen vom Trocknungsmittel wird die Lösung mit 0,5 ml 4,4N-methanol. HCl und 70 ml trockenem Diethylether versetzt. Die überstehende Lösung wird vom öligen Niederschlag abdekantiert. Der ölige Niederschlag wird dreimal mit je 100 ml trockenem Diethylether geschüttelt, wodurch blassgelbe Kristalle resultieren, die aus Methanol / Diethylether umkristallisiert werden.

Ausbeute: 98 mg (65 % d. Th.)

R_f-Wert: 0,38 (freie Base) Ethylacetat

Schmp.: 83°C (Methanol / Diethylether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3382 (m), 2926 (m), 2732 (m), 1588 (m), 1499 (m), 1455 (w), 1122 (w), 928 (w), 759 (w), 434 (w)

Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 166 (55) [M⁺], 135 (29), 121 (69), 106 (100), 92 (27), 79 (25), 77 (64), 51 (24)

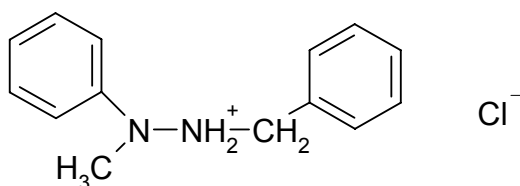
¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

3,05	2H	t	-NH- <u>CH₂</u> -CH ₂ -	³ J = 5,3 Hz
3,13	3H	s	CH ₃ -N-	
3,69	2H	t	-CH ₂ - <u>CH₂</u> -OH	³ J = 5,3 Hz
7,12	1H	„t“	p-Anilin H	
7,29-7,44	4H	m	arom. H	

-OH, -NH₂- nicht zu erkennen

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
C ₉ H ₁₅ ClN ₂ O (202,68)	ber.:	53,33	7,46	13,82
	gef.:	52,99	7,30	13,59

N-Benzyl-N'-methyl-N'-phenylhydrazinium-chlorid (35)

Darstellung: 420 mg des Hydrazons (**44**) (~ 2 mmol) werden in einer Lösung aus jeweils 2 ml tockenen Diethylether und trockenen THF gelöst. Diese Lösung wird zu einer Suspension aus 100 mg Lithiumaluminiumhydrid in einer Lösung aus jeweils 4 ml trockenen Diethylether und trockenen THF zugetropft. Nach 20 min Erhitzen unter RF werden 100 mg Lithiumaluminiumhydrid zugesetzt und 1 h unter RF gekocht. Dann wird wenig Ethylacetat zum Abreagieren des überschüssigen Lithiumaluminiumhydrids zugesetzt. Nach Abklingen der Gasentwicklung werden erst 20 ml Wasser und dann 20 ml Dichlormethan zugesetzt. Die org. Phase wird abgetrennt, mit Wasser neutralgewaschen, getrocknet über Magnesiumsulfat und auf ein Volumen von ca. 5 ml eingeeengt. Es werden 0,7 ml 4,4N-methanol. HCl und 20 ml trockenen Diethylether zugegeben. Es bildet sich ein Niederschlag, der abgetrennt und umkristallisiert wird aus Ethanol / Diethylether.

Ausbeute: 340 mg (68 % d. Th.)

R_f-Wert: 0,34 (freie Base) Toluol

Schmp.: 120°C (Ethanol / Diethylether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3446 (w), 2900 (m), 2575 (s), 2440 (m), 1584 (m), 1494 (m), 778 (m), 689 (s), 523 (m)

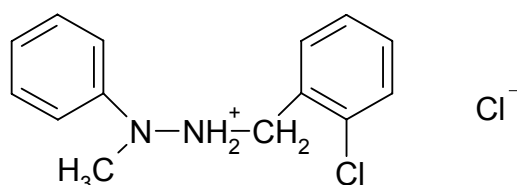
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 212 (3), 210 (17), 121 (27), 106 (33), 91 (26), 77 (70), 52 (100)

^1H -NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO- d_6 , [ppm]:

3,18	3H	s	$\text{CH}_3\text{-N-}$
3,5-5,5	2H	br	$\text{-N-NH}_2^+\text{-CH}_2\text{-}$
4,16	2H	s	$\text{-NH}_2^+\text{-CH}_2\text{-C-}$
7,08	1H	„t“	p-Anilin H
7,26-7,70	9H	m	arom. H

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
$\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{Cl}$ (248,75)	ber.:	67,60	6,89	11,26
	gef.:	67,56	6,90	11,40

N-(2-Chlorbenzyl)-N'-methyl-N'-phenylhydrazinium-chlorid (36)

Darstellung: 500 mg des Hydrazons (**45**) (~ 2 mmol) werden in einer Lösung aus jeweils 2 ml trockenem Diethylether und trockenem THF gelöst. Die Lösung wird zu einer Suspension aus 100 mg Lithiumaluminiumhydrid in einer Lösung aus jeweils 4 ml trockenem Diethylether und trockenem THF gegeben und 2 h zum Sieden erhitzt. Mit wenig Ethylacetat lässt man den Überschuss Lithiumaluminiumhydrid vollständig abreagieren, versetzt mit 20 ml Dichlormethan und wäscht die org. Phase mit Wasser neutral. Die org. Phase wird getrocknet über Magnesiumsulfat und eingeengt auf ca. 5 ml. Es werden 0,7 ml 4,4 N- methanol. HCl und 20 ml trockenen Diethylether zugesetzt. Der sich bildende Niederschlag wird abgetrennt und umkristallisiert aus Ethanol / Diethylether.

Ausbeute: 420 mg (74 % d. Th.)
R_f-Wert: 0,41 (freie Base) Toluol
Schmp.: 122°C (Ethanol / Diethylether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3431 (m), 3056 (m), 2908 (m), 2754 (s), 2644 (s),
2535 (s), 2430 (s), 1596 (m), 1574 (s), 1496 (s),
1411 (m), 1055 (m), 770 (s), 703 (s), 449 (m)

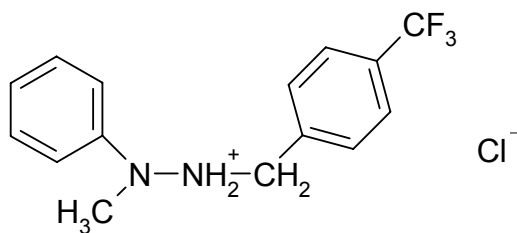
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 246 (13), 244 (5), 126 (27), 122 (49),
106 (69), 91 (81), 78 (77), 64 (91), 52
(100)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

3,13	3H	s	CH ₃ -N-
4,12	2H	s	-N-CH ₂ -C-
4,5	1H	“br”	-NH-
6,80-7,0	1H	„t“	p-Anilin H
7,0-7,7	8H	m	arom. H

1H nicht zu erkennen

<u>Elementaranalyse:</u>	%C	%H	%N
C ₁₄ H ₁₅ N ₂ Cl ₁ •HCl•H ₂ O	ber.: 55,83	6,02	9,30
(301,20)	gef.: 56,97	5,76	9,29

N-(4-Trifluormethylbenzyl)-N'-methyl-N'-phenylhydrazinium-chlorid (37)

Darstellung: 500 mg des Hydrazons (**46**) (~ 1,6 mmol) werden in einer Lösung aus jeweils 2 ml trockenem Diethylether und trockenem THF gelöst. Die Lösung wird zu einer Suspension aus 100 mg Lithiumaluminiumhydrid in einer Lösung aus jeweils 4 ml trockenem Diethylether und trockenem THF gegeben und 2 h zum Sieden erhitzt. Mit Ethylacetat lässt man den Überschuss Lithiumaluminiumhydrid vollständig abreagieren, versetzt mit 20 ml Dichlormethan und wäscht die org. Phase mit Wasser neutral. Die org. Phase wird getrocknet über Magnesiumsulfat und eingeeengt auf ca. 5 ml. Es werden 0,7 ml 4,4N-methanol. HCl und 20 ml trockenen Diethylether zugesetzt. Der sich bildende Niederschlag wird abgetrennt und umkristallisiert aus Ethanol / Diethylether.

Ausbeute: 290 mg (57 % d. Th.)

R_f-Wert: 0,29 (freie Base) Toluol

Schmp.: 142°C (Diethylether / n-Hexan)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3063 (m), 2933 (s), 2649 (s), 2441 (s), 1596 (s),
1503 (s), 1323 (vs), 1155 (s), 1116 (vs), 1155 (s),
1018 (s), 755 (s), 430 (w)

Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 280 (6) [M⁺], 278 (32), 122 (93), 106
(74), 79 (29), 77 (100), 65 (28), 50
(95), 49 (36)

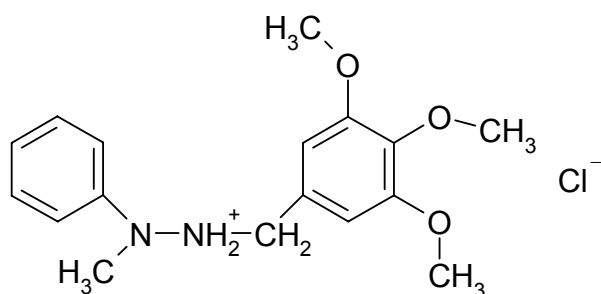
¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

3,22	3H	s	CH ₃ -N-
4,28	2H	s	-N-CH ₂ -C-
7,04-7,11	1H	"t"	p-Anilin H
7,28-7,49	4H	m	2 x o-, 2 x m-Anilin H
7,76-7,85	4H	m	arom. H

-NH₂- nicht zu erkennen

Elementaranalyse:

	%C	%H	%N
C ₁₅ H ₁₆ F ₃ Cl N ₂	ber.: 56,88	5,09	8,84
	gef.: 57,17	5,26	8,80

N-(3,4,5-Trimethoxybenzyl)-N'-methyl-N'-phenylhydrazinium-chlorid (38)

Darstellung: 500 mg des Hydrazons (**47**) (~ 1,7 mmol) werden in einer Lösung aus jeweils 2 ml trockenem Diethylether und trockenem THF gelöst. Die Lösung wird zu einer Suspension aus 100 mg Lithiumaluminiumhydrid in einer Lösung aus jeweils 4 ml trockenem Diethylether und trockenem THF gegeben und 2 h zum Sieden erhitzt. Mit wenig Ethylacetat lässt man den Überschuss Lithiumaluminiumhydrid vollständig abreagieren, versetzt mit 20 ml Dichlormethan und wäscht die org. Phase mit Wasser neutral. Die org. Phase wird getrocknet über Magnesiumsulfat und eingeeengt auf ca. 5 ml. Es werden 0,7 ml 4,4N-methanol. HCl und 20 ml trockener Diethylether zugesetzt. Der sich bildende Niederschlag wird abgetrennt und umkristallisiert aus Ethanol / Diethylether.

Ausbeute: 370 mg (65 % d. Th.)
R_f-Wert: 0,2 (freie Base) Dichlormethan 20T / Ethylacetat 1T
Schmp.: 160°C (Ethanol / Diethylether)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3064 (w), 2941 (s), 2723 (s), 2660 (s), 1590 (s), 1579 (s), 1504 (s), 1464 (s), 1423 (s), 1330 (s), 1253 (s), 1121 (vs), 996 (s), 834 (m), 457 (w)

Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 302 (28), 300 (52), 285 (23), 181 (100), 121 (89), 106 (39), 77 (74), 65 (35), 51 (77)

^1H -NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO- d_6 , [ppm]:

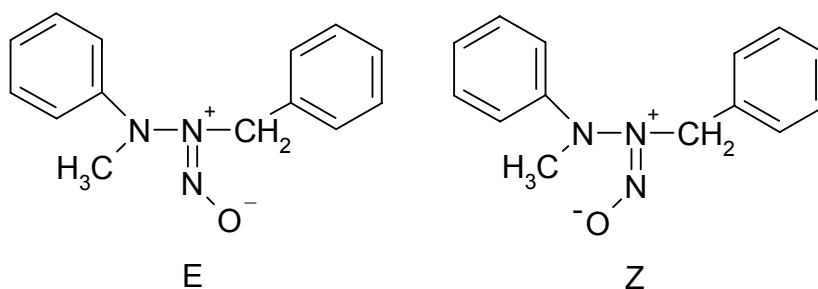
3,18	3H	s	$\text{CH}_3\text{-N-}$
3,64	3H	s	o: -O-CH_3
3,7	1H	“br”	-NH-
3,77	6H	s	m: 2 x -O-CH_3
4,10	2H	s	$\text{-N-CH}_2\text{-C-}$
6,88	2H	s	H-2,6
7,00-7,18	1H	“t”	p-Anilin H
7,28-7,42	4H	m	arom. H

1H nicht zu erkennen

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{HCl}$ (338,83)	ber.:	60,26	6,84	8,27
	gef.:	60,35	7,01	8,18

N-Benzyl-N'-methyl-N-nitroso-N'-phenylhydrazin (39)



Darstellung: 500 mg des Hydrazinhydrochlorids (**35**) (~ 1,7 mmol) werden in 5 ml Methanol gelöst. Mit Zitronensäure wird die Lösung angesäuert bis zur deutl. sauren Rkt. auf pH-Papier und mit einer Lösung aus 170 mg Natriumnitrit (~ 2,5 mmol) in 3 ml Wasser versetzt. Nach 30 min Stehen unter Lichtausschluss werden 20 ml Wasser zugesetzt. Die Lösung wird erschöpfend mit Dichlormethan extrahiert. Die org. Phase wird getrocknet über Magnesiumsulfat und eingeengt.

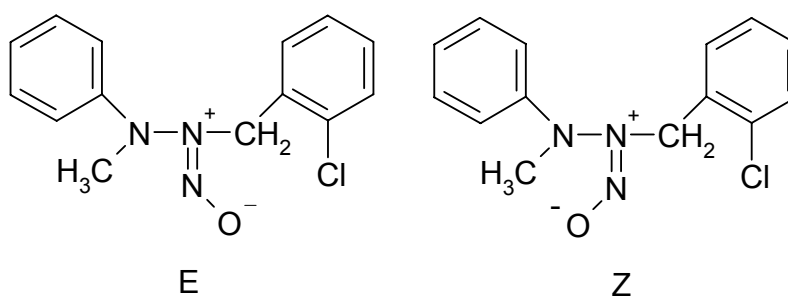
Ausbeute: 394 mg (99 % d. Th.)

R_f-Wert: 0,26 Toluol

Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 210 (3), 106 (4), 77 (6), 50 (5), 42 (4),
37 (5), 30 (75)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

2,82	2,1H	s	Z: CH ₃ -N-
3,27	0,9H	s	E: CH ₃ -N-
4,98	0,6H	s	E: -N-CH ₂ -C-
5,1-6,0	1,4H	br	Z: -N-CH ₂ -C-
6,49	1,4H	„d“	Z: H-2,6
6,50-7,73	8,6H	m	E: H-2,6; E + Z: H-3,4,5,2',3',4',5',6'

N-(2-Chlorbenzyl)-N'-methyl-N-nitroso-N'-phenylhydrazin (40)

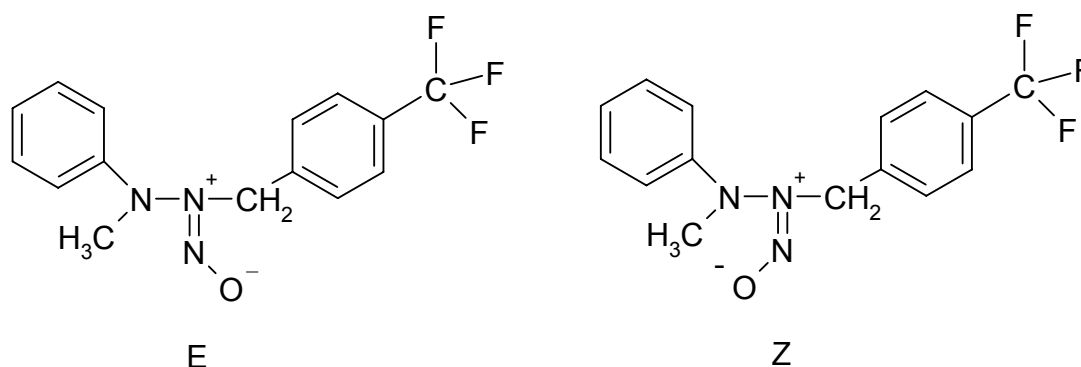
Darstellung: 480 mg des Hydrazinhydrochlorids (~ 1,7 mmol) (**36**) werden in 5 ml Methanol gelöst. Mit Zitronensäure wird die Lösung angesäuert bis zur deutl. sauren Rkt. auf pH-Papier und mit einer Lösung aus 170 mg Natriumnitrit (~ 2,5 mmol) in 3 ml Wasser versetzt. Nach 30 min Stehen unter Lichtausschluss werden 20 ml Wasser zugesetzt. Die Lösung wird erschöpfend mit Dichlormethan extrahiert. Die org. Phase wird getrocknet über Magnesiumsulfat und eingengt.

Ausbeute: 462 mg (99 % d. Th.)

R_f-Wert: 0,33 Toluol

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

2,85	2,4H	s	Z: CH ₃ -N-
3,26	0,6H	s	E: CH ₃ -N-
5,11	0,4H	s	E: -N-CH ₂ -C-
5,6	1,6H	“br”	Z: -N-CH ₂ -C-
6,45	1,6H	“d”	Z: H-2,6
6,63-7,59	7,4H	m	E: H-2,6; E + Z: H-3,4,5,3',4',5',6'

N-(4-Trifluormethylbenzyl)-N'-methyl-N-nitroso-N'-phenylhydrazin (41)

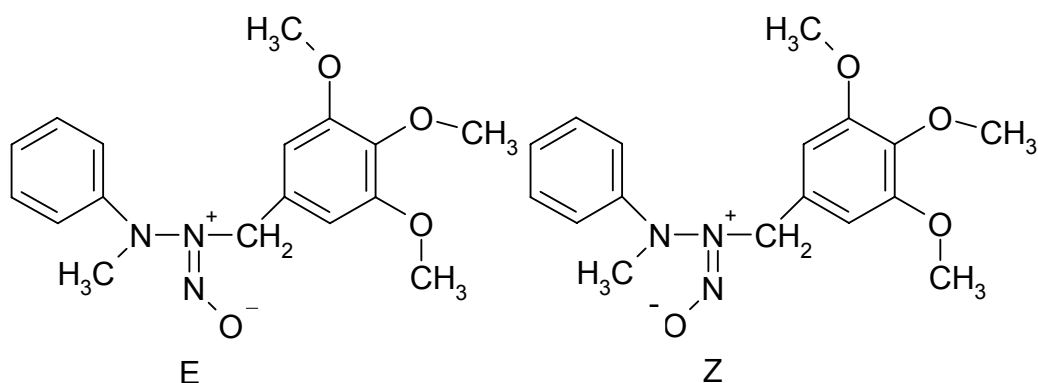
Darstellung: 400 mg des Hydrazinhydrochlorids (**37**) (~ 1,3 mmol) werden in 20 ml Methanol gelöst. Es wird Zitronensäure bis zur deutl. sauren Rkt hinzugefügt. Diese Lösung wird mit einer Lösung aus 260 mg Natriumnitrit (~ 3,8 mmol) in 5 ml Wasser vereinigt. Nach 30 min Stehen unter Lichtausschluss wird die Lösung mit 30 ml Wasser verdünnt und erschöpfend mit Dichlormethan extrahiert. Die org. Phasen werden vereinigt, getrocknet und eingeeengt. Es resultiert ein gelbes, viskoses Öl.

Ausbeute: 397 mg (99 % d. Th.)

R_f-Wert: 0,36 Toluol

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

2,86	2,0H	s	Z: CH ₃ -N-	
3,34	1,0H	s	E: CH ₃ -N-	
5,08	0,7H	s	E: -N-CH ₂ -C-	
4,4 - 6,0	1,3H	br	Z: -N-CH ₂ -C-	
6,48	1,3H	"d"	Z: H-2,6	AA'-System
6,65 - 7,92	7,7H	m	E: H-2,6; E+Z: H-3,4,5,2',3',5',6'	

N-(3,4,5-Trimethoxybenzyl)-N'-Methyl-N-nitroso-N'-phenylhydrazin (42)

Darstellung: 575 mg des Hydrazinhydrochlorids (~ 1,7 mmol) (**38**) werden in 5 ml Methanol gelöst. Mit Zitronensäure wird die Lösung angesäuert bis zur deutl. sauren Rkt. auf pH-Papier und mit einer Lösung aus 170 mg Natriumnitrit (~ 2,5 mmol) in 3 ml Wasser versetzt. Nach 30 min Stehen unter Lichtausschluss werden 20 ml Wasser zugesetzt. Die Lösung wird erschöpfend mit Dichlormethan extrahiert. Die org. Phase wird getrocknet über Magnesiumsulfat und eingeeengt. Der Rückstand wird umkristallisiert aus Diethylether / n-Hexan.

Ausbeute: 557 mg (99 % d. Th.)

R_f-Wert: 0,44 Dichlormethan 20T / Ethylacetat 1T

Schmp.: 85°C (Diethylether / n-Hexan)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 2940 (w), 1593 (s), 1506 (s), 1461 (s), 1331 (m), 1236 (s), 1126 (vs), 1009 (m), 759 (m)

Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 302 (8), 301 (32), 286 (20), 193 (43), 178 (37), 107 (38), 106 (44), 77 (27), 30 (100)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

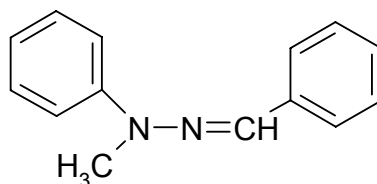
2,89	1,9H	s	Z: CH ₃ -N-
3,30	1,1H	s	E: CH ₃ -N-
3,61	1,1H	s	E: p -O-CH ₃
3,64	2,2H	s	E: 2 x m -O-CH ₃
3,66	1,9H	s	Z: p -O-CH ₃
3,73	3,8H	s	Z: 2 x m -O-CH ₃
4,91	0,7H	s	E: -N-CH ₂ -C-
5,1 - 5,8	1,3H	„br“	Z: -N-CH ₂ -C-
6,48 - 6,52	2H	m	E + Z: H-2,6
6,7 - 7,3	5H	m	E + Z: H-2',3',4',5',6'

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, Benzol-d₆, [ppm]:

2,60	1,9H	s	Z: CH ₃ -N-
2,84	1,1H	s	E: CH ₃ -N-
3,26	3,9H	s	Z: 2x m -O-CH ₃
3,28	2,1H	s	E: 2x m -O-CH ₃
3,79	1H	s	E: p -O-CH ₃
3,80	2H	s	Z: p -O-CH ₃
4,67	0,7H	s	E: -N-CH ₂ -C-
4,5 – 5,5	1,3H	“br”	Z: -N-CH ₂ -C-
6,28	0,7H	s	E: H-2,6
6,3 - 7,2	6,3H	m	Z: H-2,6; E + Z: H-2',3',4',5',6'

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
C ₁₇ H ₂₁ N ₃ O ₄ (331,37)	ber.:	61,62	6,39	12,68
	gef.:	61,50	6,37	12,52

Benzaldehydmethylphenylhydrazin (44)

Darstellung: Zu einer Lösung aus 1,0 g N,N-Methylphenylhydrazin (~ 8,2 mmol) in 20 ml Ethanol werden 880 mg Benzaldehyd (~ 8,1 mmol) gegeben. Innerhalb 30 min bei 40°C bilden sich weisse Kristalle, die abgetrennt und umkristallisiert werden aus Diethylether / n-Hexan.

Ausbeute: 1,3 g (76% d. Th.)

R_f-Wert: 0,56 Toluol

Schmp.: 102°C (Diethylether / n-Hexan)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3095 (s), 2815 (s), 1954 (m), 1601 (vs), 1560 (vs), 1383 (vs), 1183 (vs), 970 (s), 878 (s), 744 (vs), 500 (m)

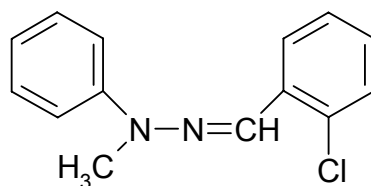
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 210 (35) [M⁺], 106 (59), 104 (45), 79 (19), 77 (84), 63 (33), 51 (100)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

3,42	3H	s	CH ₃ -N-
6,86-6,93	1H	„t“	p-Anilin H
7,24-7,44	7H	m	arom. H
7,70-7,74	3H	m	2 x o-Anilin H; -N=CH-C-

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
C ₁₄ H ₁₄ N ₂ (210,28)	ber.:	79,97	6,71	13,32
	gef.:	79,69	6,83	13,39

2-Chlorbenzaldehydmethylphenylhydrazon (45)

Darstellung: 1,0 g N,N-Methylphenylhydrazin (~ 8,2 mmol) wird in 10 ml Ethanol gelöst und mit 1,15 g o-Chlorbenzaldehyd (~ 8,2 mmol) gelöst in 10 ml Ethanol versetzt. Nach 10 min Rühren bei RT werden 10 ml Wasser zugesetzt. Der darauf ausfallende Niederschlag wird abgetrennt und umkristallisiert aus Diethylether / n-Hexan.

Ausbeute: 1,9 g (95 % d. Th.)
R_f-Wert: 0,67 Toluol
Schmp.: 50°C (Diethylether / Methanol)

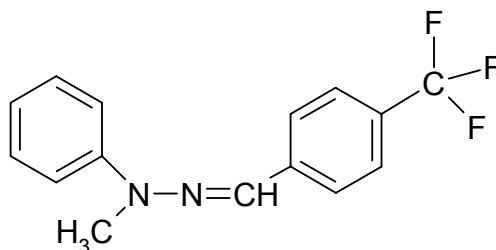
IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3446 (m), 1598 (s), 1552 (s), 1499 (vs), 1381 (s), 1120 (s), 1033 (s), 752 (s), 577 (m)

Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 244 (16) [M⁺], 137 (16), 105 (61), 77 (40), 75 (21), 65 (22), 52 (100)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

3,46	3H	s	CH ₃ -N-
6,94	1H	„t“	p-Anilin H
7,26-7,50	7H	m	arom. H
7,79	1H	s	-N=CH-
8,01-8,06	1H	„d“	arom. H

Elementaranalyse:	%C	%H	%N	
C ₁₄ H ₁₃ ClN ₂ (244,73)	ber.:	68,71	5,35	11,45
	gef.:	68,80	5,45	11,48

4-Trifluoromethylbenzaldehyd-methylphenylhydrazon (46)

Darstellung: 1,0 g N,N-Methylphenylhydrazin (~ 8,2 mmol) werden in 5 ml Methanol gelöst und mit einer Lösung aus 1,43 g p-Trifluormethylbenzaldehyd (~ 8,2 mmol) gelöst in 5 ml Methanol versetzt. Der sich bildende Niederschlag wird abgetrennt und umkristallisiert aus Diethylether / n-Hexan.

Ausbeute: 2,0 g (88 % d. Th.)

R_f-Wert: 0,64 Toluol

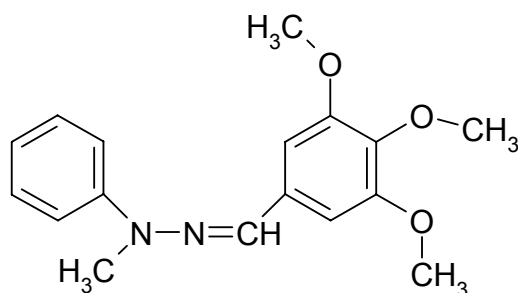
Schmp.: 91°C (Diethylether / n-Hexan)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 2993 (s), 2343 (m), 1588 (s), 1502 (vs), 1406 (s), 1380 (s), 1324 (vs), 1176 (vs), 879 (vs), 756 (vsd), 696 (vs), 493 (m)

Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 278 (82), 277 (30), 106 (79), 79 (47), 77 (100), 66 (29), 50 (88), 49 (42)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

3,46	3H	s	CH ₃ -N-
6,90-6,98	1H	"t"	p-Anilin H
7,29-7,47	4H	m	2 x o-, 2 x m-Anilin H
7,71-7,76	2H	„d“	arom. H
7,78	1H	s	-N=CH-
7,88-7,92	2H	„d“	arom. H

3,4,5-Trimethoxybenzaldehydmethylphenylhydrazon (47)

Darstellung: 1,0 g N,N-Methylphenylhydrazin (~ 8,2 mmol) werden in 5 ml Ethanol gelöst. Zu dieser Lösung werden 1,42 g 3,4,5-Trimethoxybenzaldehyd (~ 7,2 mmol), gelöst in 15 ml Ethanol, gegeben. Nach 20 min wird der sich gebildete Niederschlag abgetrennt und umkristallisiert aus Diethylether / n-Hexan.

Ausbeute: 2,05 g (95 % d. Th.)

R_f-Wert: 0,59 Dichlormethan 10T / Ethylacetat 1T

Schmp.: 105°C (Diethylether / n-Hexan)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3446 (w), 1592 (s), 1498 (s), 1410 (m), 1385 (m), 1232 (m), 1125 (s), 751 (w)

Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 300 (41), 285 (32), 107 (38), 106 (66), 79 (44), 77 (100), 66 (42), 65 (38), 64 (45), 53 (79), 51 (98), 50 (55)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

3,40	3H	s	CH ₃ -N-
3,69	3H	s	p: -O-CH ₃
3,84	6H	s	m: 2 x -O-CH ₃
6,85-6,89	1H	"t"	p-Anilin H
7,03	2H	s	arom. H
7,26-7,43	4H	m	arom. H
7,64	1H	s	-N=CH-C-

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, Benzol-d₆, [ppm]:

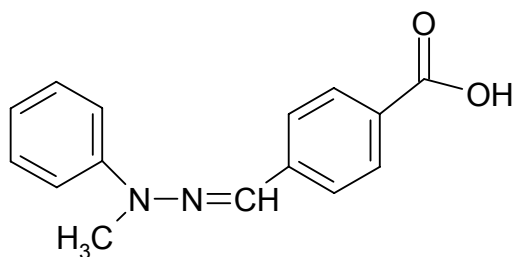
2,76	3H	s	CH ₃ -N-
3,49	3H	s	p: -O-CH ₃
3,89	6H	s	m: 2 x -O-CH ₃
6,87-6,95	1H	"t"	p-Anilin H
7,05	2H	s	arom. H
7,16	1H	s	-N=CH-C-
7,25-7,33	4H	m	arom. H

¹³C-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

32,9	-N-CH ₃
55,8	m: 2 x -O-CH ₃
60,0	p: -O-CH ₃
103,1	C-2,6
114,6	C-3',5'
119,9	C-4'
128,9	C-2',6'
132,2-132,3	C-4; -N=CH-C-
137,5	ipso C-1
147,4	ipso C-1'
153,0-153,1	C-3,5

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₃ (300,36)	ber.:	67,98	6,71	9,33
	gef.:	67,83	6,83	9,21

4-(Methylphenylhydrazonomethyl)benzoesäure (49)

Darstellung: Zu 1,0 g N,N-Methylphenylhydrazin (~ 8,2 mmol) gelöst in 5 ml Ethanol werden 1,23 g p-Carboxybenzaldehyd (~ 8,2 mmol) gelöst in 50 ml Ethanol gegeben. Nach 1 min wird der sich gebildete Niederschlag abgetrennt und umkristallisiert aus Diethylether / n-Hexan.

Ausbeute: 1,98 g (95 % d. Th.)

R_f-Wert: 0,33 Ethylacetat

Schmp.: 125°C (Diethylether / n-Hexan)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 2993 (s), 1686 (vs), 1599 (vs), 1430 (vs), 1382 (s), 1292 (vs), 1173 (vs), 891 (s), 746 (s), 542 (m)

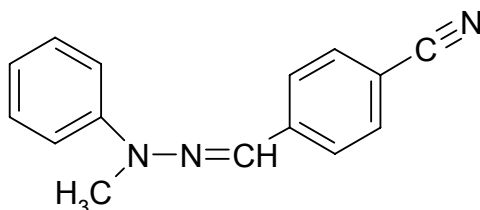
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 254 (1) [M⁺], 147 (5), 107 (21), 106 (20), 77 (21), 76 (10), 65 (14)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, THF-d₈, [ppm]:

3,35	3H	s	CH ₃ -N-
6,73-6,81	1H	„t“	p-Anilin H
7,11-7,21	2H	„d“	m-Anilin H
7,28-7,34	2H	„d“	o-Anilin H
7,52	1H	s	-N=CH-C-
7,63-7,67	2H	„d“	arom. H
7,86-7,91	2H	„d“	arom. H
11,0-11,3	1H	br	-COOH

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
$C_{15}H_{14}N_2O_2$ (254,29)	ber.:	70,85	5,55	11,02
	gef.:	70,78	5,45	11,01

4-(Methylphenylhydrazonomethyl)benzonitril (50)

Darstellung: 1,0 g N,N-Methylphenylhydrazin (~ 8,2 mmol) werden in 5 ml Methanol gelöst und mit einer Lösung aus 970 mg 4-Cyanobenzaldehyd (~ 7,4 mmol) in 5 ml Methanol versetzt. Nach 20 min Stehen bei Raumtemperatur wird die Lösung abgekühlt auf 6°C. Es bildet sich ein Niederschlag, der abgetrennt und umkristallisiert wird aus Diethylether / n-Hexan.

<u>Ausbeute:</u>	1,78 g	(95 % d. Th.)
<u>R_f-Wert:</u>	0,64	Dichlormethan 20T / Ethylacetat
<u>Schmp.:</u>	99°C	(Diethylether / n-Hexan)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3053 (m), 2219 (vs), 1597 (s), 1570 (vs), 1540 (vs), 1497 (vs), 1379 (vs), 1167 (vs), 1115 (vs), 975 (m), 970 (s), 751 (s), 551 (m)

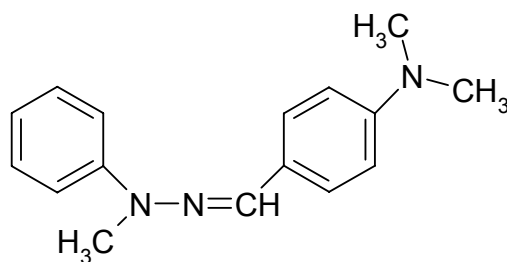
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 235 (4) [M⁺], 128 (69), 106 (42), 77 (74), 75 (33), 52 (37), 51 (100), 50 (64)

^1H -NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d_6 , [ppm]:

3,46	3H	s	$\text{CH}_3\text{-N-}$
6,91-6,99	1H	m	p-Anilin H
7,73	1H	s	-N=CH-
7,29-7,48	4H	m	arom. H
7,73-7,89	4H	m	arom. H

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
$\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3$ (235,29)	ber.:	76,57	5,57	17,86
	gef.:	76,37	5,75	17,94

N,N-Dimethyl-N-[4-(methylphenylhydrazonomethyl)phenyl]amin (51)

Darstellung: 1,0 g N,N-Methylphenylhydrazin (~ 8,2 mmol) werden in 10 ml Ethanol gelöst. Zu dieser Lösung werden 1,22 g p-Dimethylaminobenzaldehyd (~ 8,2 mmol), gelöst in 10 ml Ethanol, gegeben. Auf Zusatz von 10 ml Wasser bildet sich ein weisser Niederschlag, der aus Diethylether / n-Hexan umkristallisiert werden kann.

<u>Ausbeute:</u>	1,97 g	(95 % d. Th.)
<u>R_f-Wert:</u>	0,5	Dichlormethan
<u>Schmp.:</u>	118°C	(Diethylether / n-Hexan)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3446 (m), 2897 (m), 1600 (vs), 1523 (s), 1500 (vs), 1359 (s), 1184 (s), 1116 (s), 819 (s), 742 (s), 688 (m), 560 (w)

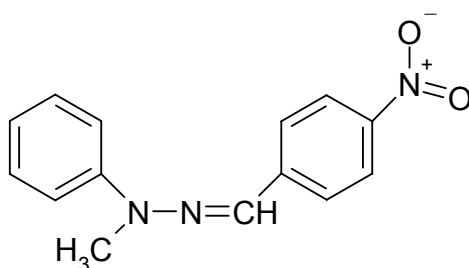
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 253 (81), 147 (20), 107 (29), 106 (27), 79 (39), 77 (76), 65 (27), 63 (25), 52 (33), 51 (100)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

2,94	6H	s	(CH ₃) ₂ -N-
3,36	3H	s	CH ₃ -N-
6,72-6,85	3H	m	arom. H
7,22-37	4H	m	arom. H
7,52-7,56	2H	"d"	arom. H
7,62	1H	s	-N=CH-C-

Elementaranalyse:

	%C	%H	%N
C ₁₆ H ₁₉ N ₃ (253,35)			
ber.:	75,85	7,56	16,59
gef.:	75,69	7,60	16,69

4-Nitrobenzaldehydmethylphenylhydrazon (52)

Darstellung: 1,0 g N,N-Methylphenylhydrazin (~ 8,2 mmol) werden in 5 ml Ethanol gelöst. Zu dieser Lösung werden 1,24 g p-Nitrobenzaldehyd (~ 8,2 mmol), gelöst in 10 ml Ethanol, gegeben. Nach 20 min wird der sich gebildete Niederschlag abgetrennt und umkristallisiert aus Diethylether / n-Hexan.

Ausbeute: 1,99 g (95 % d. Th.)
R_f-Wert: 0,61 Dichlormethan
Schmp.: 128°C (Diethylether / n-Hexan)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3444 (s), 1593 (s), 1508 (s), 1382 (s), 1327 (vs), 1193 (s), 1108 (s), 880 (vs), 756 (s), 694 (s), 502 (m)

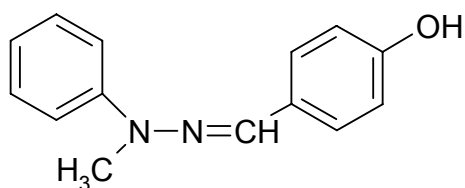
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 255 (66), 106 (74), 79 (46), 77 (90), 66 (24), 63 (21), 57 (22), 55 (28), 51 (100), 46 (43)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

3,49	3H	s	CH ₃ -N-
6,94-7,01	1H	„t“	p-Anilin H
7,31-7,39	2H	„t“	m-Anilin H
7,45-7,50	2H	„d“	o-Anilin H
7,80	1H	s	-N=CH-C-
7,90-7,95	2H	„d“	arom. H
8,22-8,27	2H	„d“	arom. H

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
C ₁₄ H ₁₃ N ₃ O ₂ (255,28)	ber.:	65,87	5,13	16,46
	gef.:	65,69	5,31	16,47

4-(Methylphenylhydrazonomethyl)phenol (53)

Darstellung: 1,0 g N,N-Methylphenylhydrazin (~ 8,2 mmol) werden mit 20 ml Wasser versetzt. Dazu wird soviel Zitronensäure gegeben, bis die gesamte Menge Hydrazin gelöst ist. Zu dieser Lösung wird eine Lösung aus 1,0 g p-Hydroxybenzaldehyd in 10 ml Ethanol gegeben. Nach 10 min Stehen bei RT wird der Niederschlag abgetrennt und umkristallisiert aus Diethylether / n-Hexan.

Ausbeute: 1,78g (96 % d. Th.)
R_f-Wert: 0,61 Dichlormethan 20T / Ethylacetat 1T
Schmp.: 128°C (Diethylether / n-Hexan)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3312 (s), 1600 (s), 1558 (m), 1513 (s), 1500 (s), 1381 (s), 1241 (s), 1116 (s), 883 (s), 745 (s), 691 (s), 526 (m)

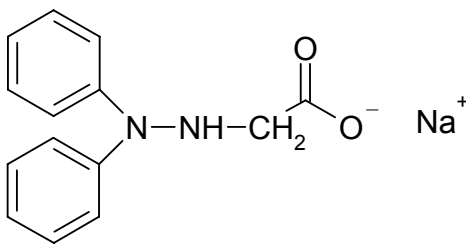
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 226 (11) [M⁺], 121 (17), 109 (24), 108 (38), 78 (54), 65 (31), 64 (32), 52 (37), 51 (40), 50 (100), 48 (61)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

3,37	3H	s	CH ₃ -N-
6,77-6,87	3H	m	arom. H
7,23-7,39	4H	m	arom. H
7,52-7,56	2H	m	arom. H
7,62	1H	s	-N=CH-
9,59	1H	s	Phenol

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
C ₁₄ H ₁₄ N ₂ O (226,28)	ber.:	71,47	6,85	11,91
	gef.:	70,38	6,22	11,46

Natrium-(N',N'-Diphenylhydrazino)acetat (55)

Darstellung: 3,1 g N,N-Diphenylhydrazinhydrochlorid (~ 14 mmol) werden in 15 ml trockenen Ethanol gelöst und mit einer Lösung aus 320 mg Natrium in 10 ml trockenen Ethanol versetzt. Es werden 1,37 g Ethyl 2-bromacetat (~ 8,2 mmol) zugegeben und die Lösung 90 min unter Rückfluss erhitzt. Die Lösung wird auf ca. 5 ml eingeeengt und mit 7 ml 15%iger NaOH (~ 26,3 mmol) versetzt. Nach 30 min Erhitzen unter Rückfluss wird der Lösung 10 ml Wasser zugesetzt und mit Diethylether extrahiert. Die Wasserphase wird mit 1N-HCl neutralisiert und mit Zitronensäure auf einen pH-Wert von 3-4 eingestellt. Die Lösung wird erschöpfend mit Diethylether extrahiert. Die org. Phase wird eingeeengt, aufgenommen in 5 ml Wasser und solange mit 10%iger NaOH versetzt bis ein Niederschlag auftritt. Der Niederschlag wird abgetrennt und umkristallisiert aus Ethanol / n-Hexan.

Ausbeute: 971 mg (42 % d. Th.)

Schmp.: 80°C (Ethanol / n-Hexan)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3420 (w), 1589 (vs), 1496 (s), 1416 (s), 1300 (m), 748 (m), 694 (m), 590 (w)

Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 169 (28), 168 (189), 84 (35), 77 (46),
71 (29), 66 (38), 65 (33), 63 (25), 57
(20), 52 (21), 51 (100), 50 (35)

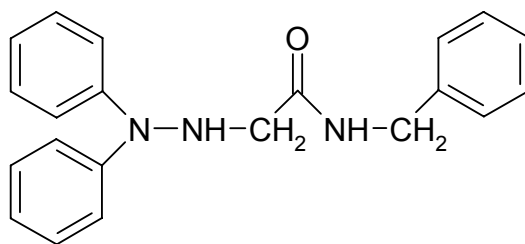
^1H -NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO- d_6 , [ppm]:

3,07	2H	d	-N-CH ₂ -CO-
5,05	1H	t	-N- <u>NH</u> -CH ₂ -
6,8 – 7,5	10H	m	aromat. H

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2\text{Na}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (282,27)	ber.:	59,57	5,35	9,92
	gef.:	59,40	5,43	9,83

N-Benzyl-2-(N',N'-diphenylhydrazino)acetamid (**57**)



Darstellung: 230 mg des Hydrazonoessigsäureamids (**61**) (~ 0,7 mmol) werden in 100 ml trockenen Diethylether gelöst. Die Lösung wird mit 160 mg Lithiumaluminiumhydrid versetzt. Nach 10 min lässt man den Überschuss Lithiumaluminiumhydrid abreagieren mit 5 ml Ethylacetat und wäscht die org. Phase mit Wasser neutral. Man trocknet die org. Phase mit Magnesiumsulfat und engt des Volumen ein auf ca. 5 ml. Auf Zusatz von n-Hexan kommt es zur Bildung eines weissen Niederschlags, der abgetrennt und umkristallisiert wird aus Diethylether / n-Hexan.

Ausbeute: 130 mg (56 % d. Th.)
R_f-Wert: 0,44 Ethylacetat 7T / n-Hexan 3T
Schmp.: 109°C (Diethylether / n-Hexan)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3392 (m), 3272 (w), 1658 (w), 1587 (w), 1493 (w), 1452 (w), 1384 (w), 1265 (w), 1119 (w), 858 (w), 747 (w), 695 (w), 544 (w)

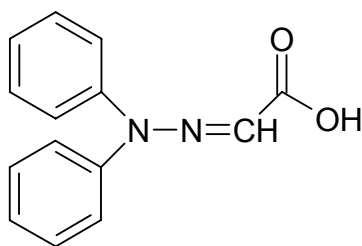
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 331 (17) [M⁺], 197 (29), 184 (32), 169 (100), 147 (37), 92 (47), 77 (29), 57 (34), 43 (20)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

3,36	2H	d	-NH-CH ₂ -CO-	³ J = 5,0 Hz
4,29	2H	d	-NH-CH ₂ -C-	³ J = 6,0 Hz
5,66	1H	t	-N-NH-CH ₂ -	³ J = 5,1 Hz
				austauschbar
6,99 – 7,00	2H	m	2 x p-Anilin H	
7,14 – 7,31	13H	m	arom. H	
8,29	1H	t	-CO-NH-CH ₂ -	³ J = 6,0 Hz

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
C ₂₁ H ₂₁ N ₃ O (331,42)	ber.:	76,11	6,39	12,68
	gef.:	75,95	6,41	12,42

Diphenylhydrazonoessigsäure (59)

Darstellung: 500 mg N,N-Diphenylhydrazinhydrochlorid (~ 2,3 mmol) und 210 mg Glyoxylsäure (~ 2,3 mmol) werden in 30 ml Wasser gelöst. Nach 2 h Rühren wird der gebildete Niederschlag abgetrennt und umkristallisiert aus Isopropanol / n-Hexan.

Ausbeute: 500 mg (90 % d. Th.)

R_f-Wert: 0,11 n-Hexan 1T / Ethylacetat 1T

Schmp.: 201°C (Isopropanol / n-Hexan)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3011 (m), 2876 (m), 2703 (m), 2556 (m), 1968 (w), 1694 (s), 1669 (vs), 1589 (m), 1540 (s), 1449 (s), 1290 (s), 1122 (s), 985 (m), 702 (s), 604 (m)

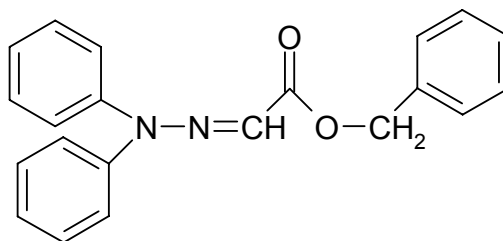
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 240 (38) [M⁺], 195 (20), 168 (100), 167 (83), 77 (18), 51 (26), 44 (12)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

6,49	1H	s	-N=CH-CO-
7,09-7,50	10H	m	arom. H
nicht zu erkennen	1H		-COOH

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ₂ (240,26)	ber.:	69,99	5,03	11,66
	gef.:	69,83	4,71	11,56

Benzyl (diphenylhydrazono)acetat (60)

Darstellung: 1,6 g der Hydrazonessigsäure (**59**) (~ 6,7 mmol), 1,4 g DCC (~ 6,8 mmol), 50 mg DMAP und 4,0 g Benzylalkohol (~ 37 mmol) werden unter Eiskühlung in 100 ml trockenem Dichlormethan gelöst und 1 h unter Eiskühlung, dann 11 h bei RT gerührt. Der gebildete Niederschlag (= DCU) wird abgetrennt. Die Lösung wird mit 1%iger NaOH und anschliessend mit 1%iger Schwefelsäurelösung extrahiert. Die org. Phase wird mit Wasser neutralgewaschen und eingengt. Der Rückstand wird aufgereinigt mittels SC an Kieselgel (FM: Ethylacetat 1T / n-Hexan 1T). Die entsprechenden Fraktionen werden vereinigt, getrocknet über Magnesiumsulfat und eingengt. Der Rückstand wird umkristallisiert aus Diethylether / n-Hexan.

Ausbeute:	1,8 g	(81 % d. Th.)
R_f-Wert:	0,62	Ethylacetat
Schmp.:	106°C	(Diethylether / n-Hexan)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3061 (m), 2118 (m), 1714 (vs), 1590 (m), 1546 (vs), 1457 (m), 1288 (m), 1172 (vs), 1117 (vs), 863 (m), 701 (s), 638 (m), 523 (m)

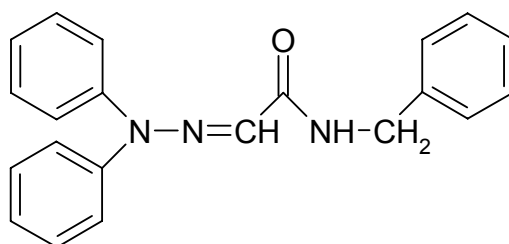
Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 330 (49) [M⁺], 195 (34), 168 (100), 91 (43), 77 (25), 65 (50), 51 (64)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, DMSO-d₆, [ppm]:

5,21	2H	s	-O-CH ₂ -C-
6,34	1H	s	-N=CH-CO-
7,19	4H	"d"	4 x o-Anilin H
7,28-7,41	7H	m	arom. H
7,47-7,55	4H	"t"	arom. H

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
C ₂₁ H ₁₈ N ₂ O ₂ (330,39)	ber.:	76,34	5,49	8,48
	gef.:	76,26	5,72	8,76

N-Benzyl-2-(diphenylhydrazono)acetamid (61**)**

Darstellung: 400 mg der Hydrazonessigsäure (**59**) (~ 1,7 mmol) werden mit 230 mg Benzylamin (~ 2,2 mmol), 450 mg DCC (~ 2,2 mmol) und 50 mg DMAP in 100 ml trockenen Dichlormethan unter Eiskühlung gelöst. Nach 1 h Rühren unter Eiskühlung wird 11 h bei RT gerührt. Der gebildete Niederschlag (= DCU) wird abgetrennt und die Lösung zuerst mit 1%iger NaOH und anschliessend mit 1%iger Schwefelsäurelösung extrahiert. Die org. Phase wird eingengt und der Rückstand mittels SC an Kieselgel (FM = Toluol 47T / Isopropanol 3T) aufgereinigt. Die entsprechenden Fraktionen werden vereinigt, getrocknet über Magnesiumsulfat und eingengt. Es resultieren blass violette Kristalle, die aus Isopropanol / n-Hexan umkristallisiert werden.

Ausbeute: 350 mg (63 % d. Th.)
R_f-Wert: 0,39 n-Hexan 1T / Ethylacetat 1T
Schmp.: 153°C (Isopropanol / n-Hexan)

IR-Spektrum, KBr, [cm⁻¹]: 3285 (s), 3062 (w), 1640 (vs), 1588 (s), 1494 (s),
1352 (w), 1214 (vs), 1116 (m), 1026 (w), 888 (m),
698 (s), 593 (m)

Massenspektrum, EI 70 eV, [m/z], (%): 329 (28) [M⁺], 195 (24), 169 (51), 168
(100), 167 (62), 149 (17), 91 (62), 77
(17), 51 (15)

¹H-NMR-Spektrum, 200 MHz, CDCl₃, [ppm]:

4,60	2H	d	-NH-CH ₂ -C-	³ J = 6,2 Hz
6,57	1H	s	-N=CH-CO-	
7,08-7,46	15H	m	arom. H	
nicht zu erkennen	1H		-CO-NH-	

Elementaranalyse:

		%C	%H	%N
C ₂₁ H ₁₉ N ₃ O (329,41)	ber.:	76,57	5,81	12,76
	gef.:	76,40	5,97	12,62

7 Literaturverzeichnis

- 1 Rehse, K., Schleifer, K.J., Martens, a., Kämpfe, M. *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger)* **1994**, 327, 393 - 397
- 2 Loscalzo, J., Welch, G. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **1995**, 38, 87 - 104
- 3 Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., Moncada, S. *Nature* **1987**, 327, 524 - 526
- 4 Müller, S., Gewaltig, M.T., Kojda, G. *Med. Monatsschr.* **2002**, 2, 45 - 51
- 5 Loscalzo, J., Welch, G. *Prog. Cardiovasc. Disc.* **1995**, 38, 87 - 104
- 6 Lancaster, J.R., Hibbs, J.B. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 1223 - 1328
- 7 Bredt, D.S., Hwang, P.H., Snyder, S.H. *Nature* **1991**, 351, 714 - 718
- 8 Garthwaite, J., Charles, S.L., Chess-Williams, R. *Nature* **1988**, 336, 385 - 388
- 9 Feelisch, M., Stamler, J.S. *Methods in Nitric Oxide Research*, John Wiley & Sons, Chichester **1996**
- 10 Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 1620 - 1624
- 11 Huie, R.E., Padmaja, S., *Free Radical Res. Commun.* **1993**, 18, 195 - 199
- 12 Pryor, W.A., Squadrito, G.L. *Am. J. Physiol. L.* **1995**, 12, L699 – L722
- 13 Wink, D.A., Nims, R.W. et al. *Chem. Res. Toxicol.* **1994**, 7, 519 - 525
- 14 Tamir, S., Burney, S., Tannenbaum, S.R. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, 9, 821 - 827
- 15 Doyle, M.P., Hocksta, J.W. *J. Inorg. Biochem.* **1981**, 14, 351 - 358
- 16 Sharma, V.S., Traylor, T.G., Gardiner, R., Mizukami, H. *Biochemistry* **1987**, 26, 33837 - 33843

- 17 Wink, D.A., Osawa, Y., Darbyshire, J.F., Jones, C.R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, 300, 115 - 123
- 18 Brown, G.C., Cooper, C.E. *FEBS Lett.* **1994**, 356, 295 - 298
- 19 Gorren, A.C.F., de Broer, A., Wever, R. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, 916, 38 - 47
- 20 Cooper, C.E., Torres, J., Sharpe, M.A., Wilson, M.T. *FEBS Lett.* **1997**, 414, 281 - 284
- 21 Radi, R. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, 9, 828 - 835
- 22 Ignarro, L.J. *Pharmacol. Toxicol.* **1990**, 67, 1 - 7
- 23 Koesling, D. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1998**, 358, 123 - 126
- 24 Kharitonov, V.G., Sharma, V.S., Magde, D., Koesling, D. *Biochemistry* **1997**, 36, 6814 - 6818
- 25 Dierks, E.A., Burstyn, J.N. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, 351, 1 - 7
- 26 Nathan, C., Xie, Q. *Journal Biol. Chem.* **1994**, 269, 13725 - 8
- 27 Moncada, S., Higgs, A. *N. Engl. J. Med.* **1993**, 329, 2002 - 12
- 28 Green, J.S., Sacheller, L.F., Marletta, M.A. *Immunol. Letters* **1994**, 43, 87 - 94
- 29 Wilson, R.I., Yanovsky, J., Gödecke, A. *Nature* **1997**, 386, 338
- 30 Brunton, T.L., *Lancet* **1867**, 97 - 8
- 31 Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. *Allg. Pharmakol. U. Toxikol.* **2001**, Elsevier, Urban & Fischer Verlag, 491
- 32 Murrel, W., *Lancet* **1879**, 1, 80-81
- 33 Fessler, B., *Deutsche Apotheker Zeitung* 20, **2003**, 58 - 60

- 34 Abrams, J., Glasser, S.P. *Am. J. Cardiol.* **1998**, 81, 3A – 14A
- 35 Mutschler, E. Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie u. Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, **2001**, 555
- 36 Parker, M., Lee, W., Kessler, P.D., Gorrlieb ; S.S., Medina, N., Yashak, M., *N. Engl. J. Med.* **1987**, 317, 799 - 804
- 37 Bassenge, E., Fink, N., Skatchkov, M., Fink, B., *J. Clin. Invest.* **1998**, 102, 67 - 71
- 38 Watanabe, H., Kaknani, M., Ohtsuka, S., Sugishita, Y. *Circulation* **1998**, 97, 886 - 891
- 39 Müllershausen, F., Koesling, D., Friebe, A. *BIOspektrum* **2003**, 9, 687 – 690
- 40 Watanabe, H., Kaknani, M., Ohtsuka, S., Sugishita, Y. *Circulation* **1997**, 96, 2545 - 2550
- 41 Rao, D.N., Cederbaum, A.R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, 321, S. 363
- 42 Schächinger, V., Zeiher, A.M. *Internist* **1997**, 38, 438 – 447
- 43 Duchstein, H.J., Rieder S. *Arch. Pharm.* **1995**, 328, 317 - 324
- 44 Kowaluk, E.A., Seth, P., Fung, H.-L. *J. Pharmacol. Exp. Theor.* **1992**, 262, 916 - 922
- 45 Bates, J.N., Baker, M.T., Guerra Jr., R., Harrison, D.G. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, 42, Suppl. 157 - 165
- 46 Dendorfer, A. Pharmakologie der Nitrate und anderer NO-Donatoren **1996**, Bundesverband Niedergelassener Kardiologen e.V. Herz Sonderheft 1, 21, 38 - 49
- 47 Duchstein, H.-J., Riederer, S., Erbach, C. *Pharmazie in unserer Zeit* **1999**, 28, 207

- 48 Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. *Allg. Pharmacol. U. Toxikol.* Elsevier, Urban & Fischer Verlag, **2001**, 491 - 493
- 49 Rojas Wahl, R.U. *J. Molecular Modeling* **2004**, 10, 121 - 129
- 50 Rudolph, W., Dirschinger, J. *Clinical comparison of nitrates and sydnonimines* **1991**, 12, 33 - 41
- 51 Unger, P., Leone, A., Staroukine, M., Degre, S., Berkenboom, G. J. *Cardiovasc. Pharmacol.* **1991**, 18, 888 - 894
- 52 DeRubertis, F.R., Craven, P.A. *Science* **1976**, 193, 897 - 9
- 53 Gangolli, S.D., van den Brandt, P.A., Feron, V.J. *Eur. J. Pharmacol. Environ. Toxicol. Pharmacol.* **1994**, 292, 1 - 38
- 54 Rehse, K., Schleifer, K.J., Lüdtkke, E., Böhme, E. *Arch. Pharmacol.* **1994**, 327, 359 - 64
- 55 Stamler, J.S., Simon, D.I., Osborne, J.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 444 - 8
- 56 Simon, D.I., Stamler, J.S., Jaraki, O. *Arter. Thromb.* **1993**, 13(6), 791 - 9
- 57 Stamler, J.S. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1995**, 196, 19 - 36
- 58 Morley, D., Keefer, L.K. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1993**, 22(7), 3 - 9
- 59 Gosh, P.B., Everitt, B.J. *J. Med. Chem.*, **1974**, 17, 203 - 206
- 60 Hino, M., Iwami, M., Okamoto, M. *J. Antibiot.* **1989**, 42, 1578 - 83
- 61 Thomas, G., Ramwell, P.W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, 164(2), 889 - 93
- 62 Kita, Y, Sato, N., Yamamoto, T. *Eur. J. Pharmacol.* **1994**, 260(2-3), 163 - 8
- 63 Lee, M.J.C., Elberling, J.A., Nagasawa, H.T. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 3648 - 52

- 64 Hughes, M.N., Wimbledon, P.E. *J. Chem. Soc. Dalton* **1976**, 703 - 7
- 65 Donald, C.E., Hughes, M.N., Thompson, J.M., Bonner, F.T. *Inorg. Chem.* **1986**, 25, 2676 - 7
- 66 Hughes, M.N., Wimbledon, P.E. *J. Chem. Soc. Dalton* **1977**, 1650 - 3
- 67 Fokuto, J.M., Hobbs, A.J., Ignarro, L.J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, 196, 707 - 13
- 68 Gastinger, E. *Z. Anal. Chem.* **1953**, 139, 1 - 14
- 69 Kowach, E.G. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1958**, 91, 844 - 50
- 70 Lawless, J.G., Hawley, M.D. *Anal. Chem.* **1968**, 40, 948 - 51
- 71 Alston, T.A., Porter, D.J.T., Bright, H.J. *J. Biol. Chem.* **1991**, 257, 229 - 306
- 72 Bennet, A., Pegg, A.E. *Cancer Res.* **1981**, 41, 2786 - 90
- 73 Potter, D.W., Reed, D.J. *Arch. Biochem. Biophys.* **1982**, 216(1), 158 - 69
- 74 Schulz, U., McCalla, D.R. *Can. J. Chem.* **1969**, 47, 2021 - 77
- 75 De Rubertis, F.R., Craven, P.A. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, 499, 337 - 51
- 76 De Rubertis, F.R., Craven, P.A. *J. Biol. Chem.* **1977**, 252(16), 5804 - 14
- 77 Ignarro, L.J., Edwards, J.C., Gruetter, D.Y. *FEBS Lett.* **1980**, 110(2), 275 - 8
- 78 Oddo, G., Delo, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1936**, 69, 294 - 8
- 79 Angeli, A. *Gazz. Chim. Ital.* **1903**, 33(II), 245
- 80 Bonner, F.T., Ko, Y. *Inorg. Chem.* **1992**, 31, 1514 - 19
- 81 Seel, F., Bliefert, C. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1972**, 390, 187 - 96
- 82 Zamora, R., Grzesiok, A., Weber, H., Feelisch, M. *Biochem. J.* **1995**, 312, 333 - 9

- 83 Müller, K. *Pharm. Unserer Zeit* **1988**, 17, 71 - 80
- 84 Griendling, K.K., Alexander, R.W. *FASEB Journal* **1996**, 10(2), 283 - 92
- 85 Liao, J.K. *Clin. Chem.* **1998**, 44, 1799 - 1808
- 86 Münzel, T., Sayegh, H., Freeman, B.A., Tarpey, M.M., Harrison, D.G. *J. Clin. Invest.* **1995**, 1, 187 - 194
- 87 Weber, M., Harrison, D.G., Kojda, G. *Med. Monatsschr.* **2000**, 23,1,12 - 17
- 88 Griendling, K.K., Alexander R.W. *FASEB J.* **1996**, 10(2), 283 - 292
- 89 Ross, R. *N. Engl. J. Med.* **1986**, 314, 488 - 500
- 90 Ross, R., Wight, T.N., Strandness, E., Thiele, B. *Am. J. Pathol.* **1984**, 114, 79 - 93
- 91 Ross, R. *Ann. Rev. Physiol.* **1995**, 57, 791 - 804
- 92 Glakov, S., Weisenberg, E., Zarins, C.K., Stankunvicius, R., Kolettis, G.J. *N. Engl. J. Med.* 316, 1371 - 1375
- 93 Ang, A.H., Tachas; G., Campbell, J.H., Bateman, J.F. *Biochem J.* **1990**, 265, 461 - 469
- 94 Fuster, V., Ross, R., Topol, E.J. *Atherosclerosis and coronary artery disease* **1996**, 1, Lippincott-Raven, Philadelphia, 492 - 510
- 95 Heinle, H., Veigel, C., Tries, S. *Free Rad. Res. Comm.* **1990**, 11(6), 281 - 286
- 96 Liao, J.K., Shin, W.S., Lee, W.Y., Clark, S.L. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270 (1), 319 - 324
- 97 Catterjee, S. *Ater. Thromb. Vasc. Biol.* **1998**, 18, 1523 - 1533
- 98 Luoma, J.S., Stralin.P., Marklund., S.L. *Ater. Thromb. Vasc. Biol.* **1998**, 8, 157 - 167

- 99 Fukai, T., Folz, R.J., Landmesser, U., Harrison, D.G. *Cardiovasc. Res.* **2002**, 55, 239 - 49
- 100 Rosenblat, M., Aviram, M. *Free Rad. Biol. Med.* **1998**, 24, 305 - 317
- 101 Heinle, H., Liebich, H. *Atherosclerosis* **1980**, 37, 637 - 640
- 102 Verhaar, M.C., Wever, R.M., Kastelein, J.J. *Circulation* **1998**, 97, 237 - 241
- 103 Kurose, I., Wolf, R.E., Grisham, D.N., Grager, D.N. *Ater. Tromb. Vasc. Biol.* **1998**, 18, 1583 - 1588
- 104 Collins, R., Peto, R., MacMahon, S., Herbert, P., Fiebach, N.H., Eberlein, K.A., Godwin, J., Qizilbash, N., Taylor, J.O., Hennekens, C.H. *Lancet* **1990**, 335, 827 - 838
- 105 MacMahon et al. *Lancet* **1990**, 335, 765 - 774
- 106 Strauer, B.E. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1992**, 19 (Suppl.), 67 - 80
- 107 Di Wang, H., Hope, S., Du, Y., Quinn, M.T., Pagano, P.J., Cohen, R.A. *Hypertension* **1999**, 33, 1225 - 1232
- 108 Newez, M.A., Nawal, N.N. *Am. Hypertens.* **1998**, 12, 1480 - 1485
- 109 Russo, C. et al. *J. Hypertens.* **1998**, 16, 1267 - 1271
- 110 Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Förstermann, U., Starke, K. *Allg. u. spez. Pharm. u. Toxik.* **2001**, Urban & Fischer Verlag, München Jena, 8. Aufl.
- 111 Arzt, J.D., Schmidt, B. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 21, 18253 - 18256
- 112 Furlong, B., Henderson, A.M., Lewis, M.J., Smith, J.A. *Br. J. Pharmacol.* **1987**, 90, 687 - 692
- 113 Voorde, J.V.d., Claeys, M., Leusen, I. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1989**, 14(Suppl.11), 55 - 61

- 114** Schrör, K., Förster, S., Woditsch, I., Schröder, H. *J. Cardiovasc Pharmacol.* **1989**, 14(Suppl.11),29 - 34
- 115** Tsukahara, H., Gordienko, M.S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, 193, 722 - 729
- 116** Engelman, D.T., Watanabe, M., Engleman, R.M., Rousou, J.A. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **1995** 110, 1047 - 1053
- 117** Braman, R.S., Hendrix, S.A., *Anal. Chem.* **1989**, 61, 2751 - 2718
- 118** Kikuchi, K., Nagano, T., Hayakawa, H., Hirata, Y., Hirobe, M. *J. Biolog. Chem.* **1993**, 268, 23106 - 23110
- 119** Medina, A., Nicholas, D.J.D., *Biochim. Biophys. Acta* **1957**, 23, 440 - 442
- 120** Höbler, H., Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf **1998**
- 121** Feelisch, M., Stamler, J.S. *Methods in Nitric Oxide Research*, J.Wiley & Sons, **1996**, Part VI
- 122** Sutton, H.C., Roberts, P.B., Winterbourn, C.C. *Biochem. J.* **1976**, 155, 503 - 510
- 123** Klem, M., Dahmann, R., Wink, D., Feelisch, M. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 9922 - 9932
- 124** Sugimoto, K., Fiji, S. *Cell. Biol.* **2000**, 113, 341 - 347
- 125** Kojima, H., Hirotsu, M. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 1967 - 1973
- 126** Masuda, K., Imashiro, Y., Kaneko, R., *Chem. Pharm. Bull.* **1970**, 18, 128-132
- 127** Böhme, H., Martin, F. *Arch. Pharmaz.* **1974**, 307, 277-281
- 128** Yashuniskii, V.G., Kholodov, L.E., *Russ. Chem. Rev.* **1980**, 49, 28 - 45
- 129** Le Berre, A., Porte, C., *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1976**, 476 - 482

- 130** Giller, A. et al., *Chem. Heterocycl. Comp.* **1975**, 11, 1378 - 1382
- 131** Tverdokhlebov, A.V. et al., *Chem. Heterocycl. Comp.* **1998**, 34, 44 - 50
- 132** Vorländer, Bittens, *Chem. Ber.* **1935**, 68, 2269 – 2274
- 133** Nakajima, M., Warner, J.C., Anselme, J.-P. *Tetrahedron Letters* **1984**, 25, 2619 - 2622
- 134** Axenrod, T., Pregosin, P.S., *Tetrahedron Lett.* **1968**, 51, 5293 - 5297
- 135** Chow, Y.L., Colon, C.J. *Can. J. Chem.* **1968**, 46, 2827 - 2833
- 136** Nelsen, S.F., Gannett, P.M., Steffek, D.J. *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 3857 - 3860
- 137** Karbatsos, C.J., Taller, R.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 4373 - 4378
- 138** Friebolin, H., *Ein- u. zweidim. NMR-Spektrosk.*, VCH Verlagsgesellschaft, 2. Aufl. **1992**, 286
- 139** Mori, V., Bertotti, M. *Electroanalysis* **1999**, 11, 234 - 237
- 140** Sen, N., Baddoo, P.A., Seaman, S.W. *J. Chrom. A* **1994**, 673, 77 - 84
- 141** Zamora, R., Grezsiok, A., Weber, H., Feelisch, M. *Biochem. J.* **1995**, 312, 333 - 339
- 142** Lehrb. d. anorg. Chem., Holleman-Wiberg, de Gruyter-Verlag, 101. Aufl., S. 536
- 143** Jourd'heuil, D., Jourd'heuil, F.I., Kutchukian, P.S. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 28799 – 28805
- 144** Bohn, H., Schönafinger, K. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1989**, 14 (Suppl.11), 13 - 22

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Weber danke ich sehr herzlich für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die entgegengebrachte Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Kuckländer für die Übernahme des Koreferats.

Frau K. Christoph danke ich für die Aufnahme der IR-Spektren, Herrn H. Jansen für die Anfertigung der Massenspektren, Herrn H. Matthew für die Aufnahme der NMR-Spektren und Frau G. Zerta für die Anfertigung der Elementaranalysen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Magdalene Matyja einerseits für ihr ausserordentliches Engagement während der Betreuung des Biochemie Praktikums und andererseits für ihre praktische sowie moralische Unterstützung dieser Arbeit.

Ausserdem bedanke ich mich bei meinen Kollegen Andre Kaeßler, Elisa Winterer, Marc Heipke, Sylvia Pesch, Sabine Plücker und Ekkehart Salamon für die gute Zusammenarbeit im Praktikum 5. Semester, Frank Sunkel und Joachim Schönlaue für die stete Diskussionsbereitschaft sowie Holger Steinmaß für die Bewältigung Computer-technischer Herausforderungen verschiedenster Art.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Freunden und Kollegen bedanken, die mir fachlich oder persönlich bei der Fertigstellung dieser Arbeit zur Seite gestanden haben.

Ein letzter grosser Dank gilt meiner Familie für ihr stetiges Vertrauen in mich und ihre unermüdliche Unterstützung bei der Verwirklichung meiner Ziele.

Lebenslauf

Name:	Carsten Esser	
Geburtsdatum:	31.03.1974	
Geburtsort:	Mönchengladbach	
Familienstand:	ledig	
Schulbildung:	Juli 1980 – Juni 1984	Katholische Grundschule Marktfeldstrasse
	Juli 1984 – Juni 1993	Math.-Nat.-Gymnasium
Schulabschluß:	Allg. Hochschulreife	
Pharmaziestudium:	SS 1994 – WS 98/99	H.-Heine-Universität Düsseldorf
Pharmaziepraktikum:	01.01.1999 – 30.06.1999	Friedrich-Apotheke, in Mönchengladbach
	01.07.1999 – 31.12.1999	Ulmen-Apotheke, in Mönchengladbach
Pharmazeut. Prüfung:	März 2000	
Approbation:	April 2000	
Beginn dieser Arbeit:	01.04.2000	
Assistententätigkeit: :	01.04.2000 – 31.12.2000	wissenschaftliche Hilfskraft
	01.01.2001 – 31.12.2004	Angestellter am Institut für Pharmazeutische Chemie der Heinrich-Heine-Universität
Berufstätigkeit:	seit 01.02.2005	Apotheker in der Gerricus- Apotheke, Düsseldorf