

Versuche zur Synthese neuartiger fluoreszierender Spin-Traps

Vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"
genehmigte

DISSERTATION
(D 386)

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Stefan Hauck

Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer

2007

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen Juni 2003 und März 2007 im Fachbereich Chemie / Abteilung Biochemie der Technischen Universität Kaiserslautern.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer für die Überlassung dieses höchst interessanten Themas, für die gewährten Freiräume bei der Durchführung dieser Arbeit und für die stetige Diskussionsbereitschaft. Weiterhin danke ich für die vielen lehrreichen Einblicke auch in andere Gebiete der Chemie.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 26. April 2007

Promotionskommission:

Vorsitzender:	Prof. Dr. T. Kietzmann
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. E. Trommer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Eisenbrand

Für meine Eltern

Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.

Galileo Galilei

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Freie Radikale, Reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) und Oxidativer Stress	1
1.2	Spin-Trapping.....	3
1.2.1	Funktionsweise der Methode	3
1.2.2	Aliphatische Spin-Traps	4
1.2.3	Zyklische Spin-Traps	4
1.3	Fluoreszenz und Fluoreszenzfarbstoffe.....	5
1.3.1	Fluoreszenz.....	5
1.3.2	Fluoreszenzlöschung	6
1.3.3	Fluoreszenzfarbstoffe	7
1.3.3.1	NBD-Farbstoffe	7
1.3.3.2	NDA-Farbstoffe	8
1.3.3.3	FITC-Derivate	8
1.3.3.4	Dansyl-Derivate	8
1.3.3.5	BODIPY-Farbstoffe.....	9
1.4	Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie	10
1.4.1	Allgemeines	10
1.4.2	Theoretische Grundlagen	10
1.4.3	Die Hyperfeinstruktur	12
2	Problemstellung.....	13
3	Eigene Ergebnisse	15
3.1	Allgemeine Synthesewege	15
3.2	Synthese von EMPO	16
3.2.1	Synthese von 2-Brompropionsäureethylester	16
3.2.2	Synthese von 2-Nitropropionsäureethylester	17
3.2.3	Synthese von 2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-ethylester	20
3.2.4	Synthese von 4-[1,3]-Dioxolan-2-yl-2-methyl-2-nitro-buttersäure-ethyl-ester.....	20
3.2.5	Synthese von 4-[1,3]-Dioxolan-2-yl-2-hydroxyamino-2-methyl-buttersäure-ethylester.....	21
3.2.6	Synthese von EMPO.....	22

3.3	EMPO-Umsetzungen.....	24
3.3.1	Umsetzungen vor Erreichen der Nitronstufe	24
3.3.2	Umsetzungen auf Nitronstufe zur Bildung von NBD-Derivaten	24
3.4	Synthese von BocAEMPO und AEMPO	28
3.4.1	Synthese von 2-Brompropionsäure-2- <i>tert</i> -butoxycarbonylamino-ethyl-ester	28
3.4.2	Synthese von 2-Nitropropionsäure-2- <i>tert</i> -butoxycarbonylamino-ethyl-ester.....	28
3.4.3	Synthese von 2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-2- <i>tert</i> -butoxy-carbonyl-amino-ethylester.....	29
3.4.4	Synthese von BocAEMPO als Eintopfreaktion	29
3.4.5	Synthese von AEMPO	31
3.5	Versuche zur Umsetzung von AEMPO.....	32
3.6	Synthese von BocEAEMPO und EAEMPO.....	47
3.6.1	Synthese von Ethyl-(2-hydroxyethyl)-carbamatsäure- <i>tert</i> -butylester.....	47
3.6.2	Synthese von 2-Brompropionsäure-2-(<i>tert</i> -butoxycarbonyl-ethylamino)-ethylester	47
3.6.3	Synthese von 2-Nitropropionsäure-2-(<i>tert</i> -butoxycarbonyl-ethylamino)-ethylester	48
3.6.4	Synthese von 2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-2-(<i>tert</i> -butoxycarbonyl-ethylamino)-ethylester.....	48
3.6.5	Synthese von BocEAEMPO als Eintopfreaktion	49
3.6.6	Synthese von EAEMPO	50
3.7	Versuche zur Umsetzung von EAEMPO	52
3.8	Synthese anderer Nitrone	55
3.8.1	Synthese von HMPO.....	55
3.8.2	DEPMPO-Synthese	56
3.8.2.1	Synthese von Ethoxyphosphit	56
3.8.2.2	Synthese von Diethyl-(2-methyl-2-pyrrolidiny)phosphonat	56
3.8.2.3	Synthese von DEPMPO.....	57
3.8.3	DEPMPO-Derivate.....	58
3.8.3.1	Synthese von 4-Hydroxybenzoesäure-cyanomethylester	58
3.8.3.2	Synthese von Cyanomethyl-4{[ethoxy(oxido)phosphino]oxy}benzoat	58
3.8.3.3	Synthese von 4-[Ethoxy-(2-methyl-pyrrolidin-2-yl)-phosphinoyloxy]-benzoe-säurecyanomethylester	59
3.8.4	Versuch zur Synthese des Nitrons.....	59
3.8.5	Direktsynthesen	60

3.8.5.1	Versuche zur Synthese eines NBD-Derivats.....	60
3.8.5.1.1	Synthese von 2-Brom-propionsäure-2-[ethyl-(7-nitro-benzo[2,1,3]-oxadiazol-4-yl)-amino]-ethylester	60
3.8.5.1.2	Synthese von 2-Nitropropionsäure-2-aminoethylester	61
3.8.5.2	Versuche zur Synthese eines BODIPY-Derivats.....	62
3.8.5.2.1	Synthese von 4-Nitropentanal	62
3.8.5.2.2	Synthese von 2-(3-Nitrobutyl)-1,3-dioxolan	62
3.8.5.2.3	Synthese von 6-(1,3-Dioxolan-2-yl)-4-methyl-4-nitrohexanal.....	63
3.8.5.2.4	Versuch zur Synthese von 8-[2-(2-Methyl-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -pyrrol-1-oxid)ethyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (MPOE-BODIPY).....	63
3.9	Synthese von Farbstoffsystemen.....	65
3.9.1	Synthese von NBD-Derivaten.....	65
3.9.1.1	Synthese von 2-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol	65
3.9.1.2	Synthese von N [*] 1 [*] -(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-ethan-1,2-diamin	66
3.9.1.3	Synthese von 2-[Ethyl-(7-Nitro-[2,1,3]-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol.....	67
3.9.1.4	Synthese von 4-Methoxy-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol).....	68
3.9.1.5	UV- und Fluoreszenzspektren der NBD-Derivate	68
3.9.2	Synthese von BODIPY-Derivaten	69
3.9.2.1	Synthese von 8-(4-Bromphenyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (BP-BODIPY).....	69
3.9.2.2	Synthese von 8-(2-Bromethyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (BE-BODIPY).....	70
3.9.2.3	Synthese von 8-(4-Benzoessäurecyanomethylester)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetra-methyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (Cyanomethyl-BODIPY).....	71
3.9.2.3.1	Synthese von 4-Formyl-benzoessäurecyanomethylester	71
3.9.2.3.2	Synthese von Cyanomethyl-4-[(<i>Z</i>)-(3,5-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2-yl)-(3,5-dimethyl-2 <i>H</i> -pyrrol-2-yliden)methyl]benzoat.....	71
3.9.2.3.3	Synthese von 8-(4-Benzoessäurecyanomethylester)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (Cyanomethyl-BODIPY)	72
3.9.2.4	UV- und Fluoreszenzspektren der BODIPY-Farbstoffe	73
3.9.2.4.1	Spektrum des BP-BODIPY.....	73
3.9.2.4.2	Spektrum des BE-BODIPY	73
3.9.2.4.3	Spektrum des Cyanomethyl-BODIPY.....	74
3.10	ESR-spektroskopische Charakterisierung der zyklischen Spin-Traps.....	75

3.10.1	Artefakt- & Adduktspektren, deren Zustandekommen und Zerfall	75
3.10.2	Cis-trans-Isomerie bei Spin-Traps- und Spin-Addukten	78
3.10.3	Auswertung der Spektren	83
3.10.4	Simulation der Spektren	84
3.10.5	Probenbereitung	86
3.10.6	Benötigte Lösungen	87
3.10.7	Umsetzung von DMPO als Referenzsubstanz	89
3.10.8	Umsetzung von EMPO als Referenzsubstanz	97
3.10.9	Umsetzung von BocAEMPO	103
3.10.10	Umsetzung von BocEAEMPO	107
3.10.11	Umsetzung von AEMPO	112
3.10.12	Umsetzung von EAEMPO	116
3.10.13	Diskussion der Zerfallskonstanten und der Halbwertszeiten	121
3.11	Versuche zur Erzeugung von Superoxid-Radikalen	130
3.11.1	Vorbemerkung zu den gemessenen Superoxid-Addukt-Spektren	130
3.11.1.1	Versuche mit dem Xanthin-Oxidase-System	130
3.11.1.2	Versuche mit dem Fe(III)-H ₂ O ₂ -NaOH-System	131
3.11.1.3	Versuche mit dem KO ₂ -DMSO-System	132
3.12	Synthese aliphatischer Nitrone	136
3.12.1	Allgemeines zu Synthese	136
3.12.2	Synthese von verschiedenen substituierten Benzoldiazoniumtetra- fluorborat-Salzen	137
3.12.3	Synthese von TMS-Stryol-Derivaten	139
3.12.3.1	Synthese von 1-Brom-4-dimethoxymethyl-benzol	139
3.12.3.2	Synthese von [2-(4-Dimethoxymethyl-phenyl)-vinyl]-trimethyl-silan	140
3.12.3.3	Synthese von 2-(4-Bromphenyl)-[1,3]-dioxolan	140
3.12.3.4	Synthese von [2-(4-[1,3]-Dioxolan-2-yl-phenyl)-vinyl]-trimethyl-silan	141
3.12.4	Synthese von Stilbenen	141
3.12.4.1	Synthese von Stilbenderivaten, Variante 1	141
3.12.4.2	Synthese von Stilbenderivaten, Variante 2	142
3.12.4.3	Limitierungen der Diazoniumsalz-Variante	143
3.12.5	Synthese von Stilbennitronen	144
3.12.5.1	Synthese von N-Cyclohexylstilbennitron	144
3.12.5.2	Synthese von N-tert-Butyl-stilbennitronen	145
3.13	ESR-spektroskopische Charakterisierung der aliphatischen Spin-Traps	146

3.13.1	Probenbereitung	146
3.13.2	Umsetzung von N-Cyclohexyl- α -[trans-(4-styryl-phenyl)]-nitron.....	146
3.13.3	Umsetzung von N- <i>tert</i> -Butyl- α -[trans-(4-styryl-phenyl)]-nitron	147
3.13.4	Umsetzung von N- <i>tert</i> -Butyl-Nitrostilbennitron	148
3.13.5	Diskussion der gemessenen Hyperfeinkopplungskonstanten.....	149
3.14	UV- und Fluoreszenzspektren der Stilbennitrone.....	150
3.14.1	Spektrum des N-Cyclohexyl- α -[trans-(4-styryl-phenyl)]-nitrons	150
3.14.2	Spektrum des N- <i>tert</i> -Butyl- α -[trans-(4-styryl-phenyl)]-nitrons.....	150
3.14.3	Spektrum des N- <i>tert</i> -Butyl-nitrostilbennitrons.....	151
3.14.4	Versuche zum Fluoreszenzquenching mit Nitrostilbennitron	151
3.15	Zellkultur-Experimente.....	154
3.15.1	Verwendete Zellen.....	154
3.15.2	Inkubation von COS-7-Zellen mit N- <i>tert</i> -Butyl-nitrostilbennitron.....	154
3.15.2.1	Benötigte Lösungen.....	154
3.15.2.2	Versuchsdurchführung	154
3.15.2.2.1	LSM-Aufnahmen	155
3.15.2.2.2	ApoTome-Aufnahmen.....	156
3.15.2.2.3	SpectraCube-Aufnahmen	157
4	Zusammenfassung	162
4.1	Synthese zyklischer Spin-Traps	162
4.2	ESR-spektroskopische Charakterisierung der neuen zyklischen Spin-Traps	163
4.3	Synthese aliphatischer Spin-Traps	164
4.4	ESR-spektroskopische Charakterisierung der aliphatischen Spin-Traps.....	164
4.5	Fluoreszenzmessungen	165
4.6	Zellkultur-Versuche	165
4.7	Ausblick	165
5	Experimenteller Teil.....	167
5.1	Verwendete Geräte	167
5.2	Allgemeine Arbeitstechniken	168
5.2.1	Lösungsmittel & Schutzgas	168
5.2.2	Chemikalien.....	169
5.3	Synthesen zyklischer Nitrone	169
5.3.1	Synthese von EMPO.....	169

5.3.1.1	Synthese von 2-Brompropionsäureethylester	169
5.3.1.2	Synthese von 2-Nitropropionsäureethylester	171
5.3.1.3	Synthese von 2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-ethylester	173
5.3.1.4	Synthese von 4-[1,3]-Dioxolan-2-yl-2-methyl-2-nitro-buttersäure-ethylester .	176
5.3.1.5	Synthese von 4-[1,3]-Dioxolan-2-yl-2-hydroxyamino-2-methyl- buttersäure-ethylester.....	178
5.3.1.6	Synthese von EMPO.....	181
5.3.1.7	Synthese von EMPO ausgehend von 2-Methyl-2-nitro-5- oxopentansäure-ethylester als Eintopfreaktion	182
5.3.2	Synthese von BocAEMPO und AEMPO	186
5.3.2.1	Synthese von 2-Brompropionsäure-2- <i>tert</i> -butoxycarbonylamino- ethylester	186
5.3.2.2	Synthese von 2-Nitropropionsäure-2- <i>tert</i> -butoxycarbonylamino- ethylester	188
5.3.2.3	Synthese von 2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-2- <i>tert</i> - butoxycarbonyl-amino-ethylester	190
5.3.2.4	Synthese von BocAEMPO als Eintopfreaktion	193
5.3.2.5	Synthese von AEMPO	196
5.3.3	Synthese von BocEAEMPO und EAEMPO	200
5.3.3.1	Synthese von Ethyl-(2-hydroxyethyl)-carbamatsäure- <i>tert</i> -butylester.....	200
5.3.3.2	Synthese von 2-Brompropionsäure-2-(<i>tert</i> -butoxycarbonyl-ethylamino)- ethyl-ester	202
5.3.3.3	Synthese von 2-Nitropropionsäure-2-(<i>tert</i> -butoxycarbonyl-ethylamino)- ethyl-ester	205
5.3.3.4	Synthese von 2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-2-(<i>tert</i> - butoxycarbonyl-ethylamino)-ethylester.....	208
5.3.3.5	Synthese von BocEAEMPO als Eintopfreaktion	210
5.3.3.6	Synthese von EAEMPO	214
5.4	Farbstoffsynthesen	217
5.4.1	Synthese von NBD-Systemen	217
5.4.1.1	Synthese von 2-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol	217
5.4.1.2	Synthese von N ¹ -(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-ethan-1,2-diamin	219
5.4.1.3	Synthese von 2-[Ethyl-(7-Nitro-[2,1,3]-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol.....	221
5.4.1.4	Synthese von 4-Methoxy-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol).....	223
5.4.2	Synthese von BODIPY-Systemen	225

5.4.2.1	Synthese von 8-(4-Bromphenyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (BP-BODIPY).....	225
5.4.2.2	Synthese von 8-(2-Bromethyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (BE-BODIPY).....	226
5.4.2.3	Synthese von 8-(4-Benzoessäurecyanomethylester)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (Cyanomethyl-BODIPY)....	228
5.4.2.3.1	Synthese von 4-Formyl-benzoessäurecyanomethylester	228
5.4.2.3.2	Synthese von Cyanomethyl-4-[(Z)-(3,5-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-2-yl)-(3,5-dimethyl-2 <i>H</i> -pyrrol-2-yliden)methyl]benzoat.....	229
5.4.2.3.3	Synthese von Cyanomethyl-Bodipy	231
5.4.3	EMPO-Umsetzungen	234
5.4.3.1	Umsetzungen vor Erreichen der Nitronstufe	234
5.4.3.2	Umsetzungen auf Nitronstufe	235
5.4.4	Umsetzungen von AEMPO.....	241
5.4.5	Umsetzungen von EAEMPO	251
5.4.6	Direktsynthesen	254
5.4.6.1	Synthese von 2-Bromo-propionsäure-2-[ethyl-(7-nitro-benzo[2,1,3]-oxadi-azol-4-yl)-amino]-ethylester	254
5.4.6.2	Synthese eines BODIPY-Nitrons	255
5.4.6.2.1	Synthese von 4-Nitropentanal	255
5.4.6.2.2	Synthese von 2-(3-Nitrobutyl)-1,3-dioxolan	257
5.4.6.2.3	Synthese von 6-(1,3-Dioxolan-2-yl)-4-methyl-4-nitrohexanal.....	259
5.4.6.2.4	Versuch zur Umsetzung zum BODIPY-System	262
5.4.7	Sonstige Nitronsynthesen	264
5.4.7.1	Synthese von HMPO.....	264
5.4.7.2	DEPMPO-Synthese	266
5.4.7.2.1	Synthese von Ethoxyphosphit	266
5.4.7.2.2	Synthese von Diethyl-(2-methyl-2-pyrrolidinyl)phosphonat.....	267
5.4.7.2.3	Synthese von DEPMPO	268
5.4.7.3	DEPMPO-Derivate.....	271
5.4.7.3.1	Synthese von 4-Hydroxybenzoessäure-cyanomethylester.....	271
5.4.7.3.2	Synthese von Cyanomethyl 4-{[ethoxy(oxido)phosphino]oxy}benzoat	272
5.4.7.3.3	Synthese von 4-[Ethoxy-(2-methyl-pyrrolidin-2-yl)-phosphinoxyloxy]-benzoessäure-cyanomethylester	273
5.5	Synthese von aliphatischen Nitronen	275

5.5.1	Synthese von verschieden substituierten Benzoldiazoniumtetrafluoroborat-Salzen.....	275
5.5.2	Synthese geschützter TMS-Styrol-Derivate.....	276
5.5.2.1	Synthese von 1-Brom-4-dimethoxymethyl-benzol.....	276
5.5.2.2	Synthese von [2-(4-Dimethoxymethyl-phenyl)-vinyl]-trimethyl-silan.....	277
5.5.2.3	Synthese von 2-(4-Bromphenyl)-[1,3]-dioxolan.....	279
5.5.2.4	Synthese von [2-(4-[1,3]-Dioxolan-2-yl-phenyl)-vinyl]-trimethyl-silan.....	281
5.5.3	Synthese von Stilben-Derivaten.....	283
5.5.3.1	Synthese von Stilbenderivaten, Variante 1.....	283
5.5.3.2	Synthese von Stilbenderivaten, Variante 2.....	287
5.5.4	Synthese von Stilbennitronen.....	290
5.5.4.1	Synthese von Cyclohexylstilbennitron.....	290
5.5.4.2	Synthese von N-tert-Butyl-stilbennitronen.....	292
5.6	ESR-Messungen der zyklischen Nitrone.....	297
5.6.1	Geräteeinstellungen.....	297
5.6.2	Probenbereitung.....	297
5.6.3	Bestimmung der Zerfallskonstanten k_d und der Halbwertszeiten $t_{1/2}$ für die zyklischen Nitrone.....	300
5.6.3.1	Bestimmung der Zerfallskonstante k_d und Halbwertszeit $t_{1/2}$ von DMPO.....	300
5.6.3.2	Bestimmung der Zerfallskonstante k_d und Halbwertszeit $t_{1/2}$ von EMPO.....	307
5.6.3.3	Bestimmung der Zerfallskonstante k_d und Halbwertszeit $t_{1/2}$ von BocAEMPO.....	314
5.6.3.4	Bestimmung der Zerfallskonstante k_d und Halbwertszeit $t_{1/2}$ von BocEAEMPO.....	321
5.6.3.5	Bestimmung der Zerfallskonstante k_d und Halbwertszeit $t_{1/2}$ von AEMPO.....	328
5.6.3.6	Bestimmung der Zerfallskonstante k_d und Halbwertszeit $t_{1/2}$ von EAEMPO....	335
5.6.4	Erzeugung von Superoxid-Radikalen.....	342
5.6.4.1	Versuche mit dem XOD-System.....	342
5.6.4.2	Versuche mit dem Fe(III)-H ₂ O ₂ -NaOH-System.....	342
5.6.4.3	Versuche mit dem KO ₂ -DMSO-System.....	343
5.6.5	Simulation der ESR-Spektren der zyklischen Nitrone mit EasySpin.....	344
5.7	ESR-Messungen aliphatischer Nitrone.....	348
5.7.1	Geräteeinstellungen.....	348
5.7.2	Probenbereitung.....	349
5.7.3	Versuchsdurchführung.....	350

5.7.4	Simulation der ESR-Spektren der Stilbennitron mit EasySpin.....	350
5.8	Versuche zum Fluoreszenzquenching von Nitrostilbennitron	350
5.9	Zellkultur-Experimente	351
5.9.1	Verwendete Zellen.....	351
5.9.2	Inkubation von COS-7-Zellen mit N- <i>tert</i> -Butyl-nitrostilbennitron.....	351
5.9.2.1	Benötigte Lösungen.....	351
5.9.2.2	Versuchsdurchführung	351
6	Literaturverzeichnis.....	353
	Danksagung	364
	Lebenslauf	367

1 Einleitung

1.1 Freie Radikale, Reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) und Oxidativer Stress

Unter dem Begriff „freies Radikal“ versteht man Moleküle oder Molekül-Bruchstücke, bei denen nicht alle Elektronen gepaart vorliegen. Sie besitzen einen von Null verschiedenen Spin und sind damit paramagnetisch. Aufgrund dieser Eigenschaft zeigen freie Radikale eine sehr hohe Reaktivität gegenüber anderen Verbindungen in Kombination mit sehr kurzen Halbwertszeiten.

Radikale, egal welchen Ursprungs, sind in biologischen Systemen ständig vorhanden. Teilweise werden sie vom Organismus selbst generiert, um die Reaktivität der ROS zur Vernichtung und anschließendem Abbau von Bakterien, sowie von abgestorbenen Zellen zu nutzen. Inflammatorische Reaktionen des Körpers mit Beteiligung von polymorphkernigen Leukocyten, Makrophagen und Monocyten in Kombination mit einer gesteigerten Sauerstoffaufnahme stimulieren eine Steigerung der Produktion von Superoxidanion-Radikalen und Wasserstoffperoxid (Fantone 1982).

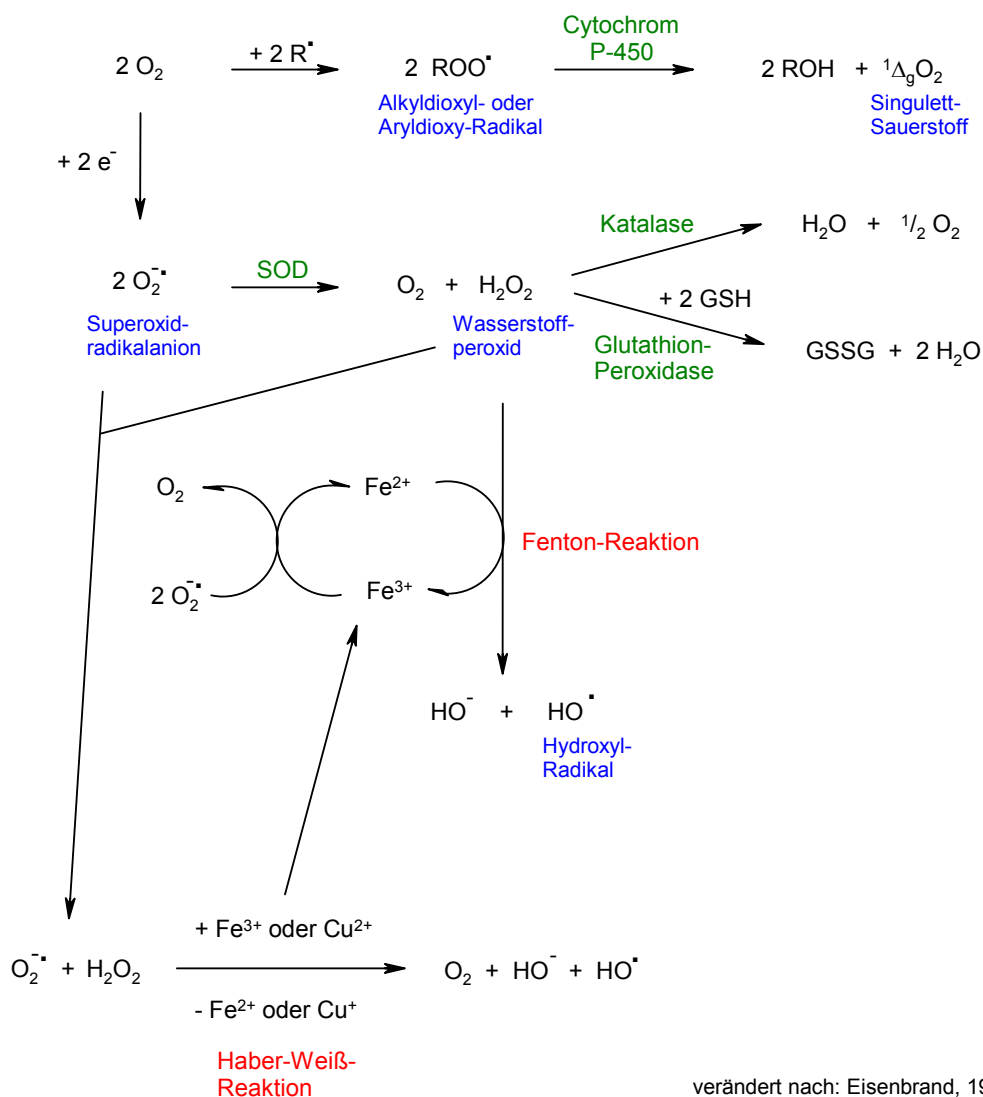
Der größere Anteil der ROS entsteht jedoch unbeabsichtigt in Nebenreaktionen des Energiestoffwechsels und der Fremdstoffmetabolisierung. So kommt es in den Mitochondrien bei der Reduktion von molekularem Sauerstoff in der Atmungskette durch Fehlübertragungen der ablaufenden Ein-Elektronen-Reduktionen an zahlreichen Stellen zur Bildung reaktiver Spezies, wie Superoxidanion-, Hydroxyl-, Alkoxy- und Peroxyl-Radikalen sowie von Hydroperoxiden (Boveris 1977).

Aus diesem Grund besitzen alle Organismen vielfältige Abfang- und Entgiftungsmechanismen um Schädigungen der Zellen abzuwenden. Eine bedeutende Rolle kommt hier auch Antioxidantien, wie Ascorbinsäure und Tocopherolen zu, die als Radikalfänger wirken.

In vivo nimmt besonders das Superoxidradikalanion eine herausragende Position ein (Pryor 1986; Raha 2000). Es ist sowohl eine starke Base, als auch ein starkes Reduktionsmittel für Übergangsmetallionen und Chinone. Letztere werden dabei selbst zu radikalischen Semichinonen reversibel reduziert. Gleichzeitig kann es als Nukleophil reagieren und ist zudem ein schwaches Oxidationsmittel, z.B. für Ascorbinsäure. Es selbst ist nicht übermäßig reaktiv, dient jedoch als Startpunkt einer Reihe von Reaktionen, die im Schema auf der nächsten Seite abgebildet sind (Marquardt 1997).

Die Abbauprodukte des Superoxidradikalanions sind Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale. Letztere sind mit einer physiologischen Halbwertszeit von ca. 2 ns extrem reaktiv, können Wasserstoffatome aus jeder C-H-Bindung abstrahieren und Additionsreaktionen mit aromatischen Systemen eingehen. Ferner sind sie für die Bildung von Strangbrüchen in der DNA und für die Modifikation der Nucleobasen verantwortlich. Darüber hinaus spielen sie eine zentrale Rolle bei der Lipidperoxidation und der oxidativen Schädigung von Proteinen.

Singulett-Sauerstoff ($^1\Delta_g\text{O}_2$) spielt bei einigen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine Rolle, wie beispielsweise der Phagozytose oder der Prostaglandin-Biosynthese.



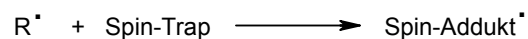
Darüber hinaus spielen freie Radikale bei einer Vielzahl von Erkrankungen und degenerativen Prozessen eine Rolle. Hierzu zählen die Atherosklerose, sowie das Ischämie- und Reperfusionssyndrom. Untersuchungen belegen vielfältige Schädigungen an Proteinen,

Membranen und DNA *in vivo* als auch *in vitro* (Raha 2000). Weiterhin kann oxidativer Stress für die Initiation und Promotion der Tumorbildung verantwortlich sein.

1.2 Spin-Trapping

1.2.1 Funktionsweise der Methode

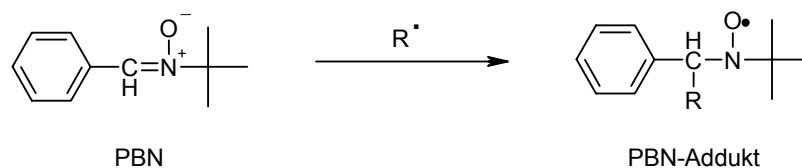
Unter Spin-Trapping versteht man das Einfangen eines kurzlebigen Radikals durch eine chemische Substanz, die dabei ihrerseits zu einem langlebigen Radikal reagiert, das als Spin-Addukt bezeichnet wird.



Die Möglichkeit, eine Radikaladdition zum Nachweis kurzlebiger Radikale nutzen zu können, wurde erstmals bei der Studie der Dehydrogenierung von Hydroaromaten erkannt. Dabei entstehen verschiedene Radikale, die mit Phenyl-*tert*-butyl-nitron (PBN) zu stabileren Radikalen abreagieren. Aufgrund der Ähnlichkeiten zwischen dem Spin-Labeling und dem Radical Trapping wurde 1971 von Janzen der Begriff Spin-Trapping für diese neue Nachweismethode eingeführt (Janzen 1971). Typische Spin-Trap-Verbindungen sind C-Nitroso-Verbindungen und Nitrone. Bei letzteren unterscheidet man zwei Klassen von Spin-Traps: Aliphatische Nitrone vom PBN-Typ, sowie zyklische Nitrone, deren bekanntester Vertreter das DMPO ist. Bei der Reaktion der kurzlebigen Radikale mit der C-N-Doppelbindung der Nitrongruppe entsteht in der Folge ein stabileres Nitroxyl-Radikal. Dieses kann mit Hilfe der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie) detektiert werden. Da im Spin-Addukt ein β -H-Atom vorhanden ist, werden die Spektren durch dessen Kopplung komplexer. Dabei sind die erhaltenen Hyperfeinkopplungskonstanten typisch für ein bestimmtes eingefangenes Primärradikal. Aus diesem Grund ist die Spin-Trapping-Technik sehr interessant für den Nachweis reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) und anderer im Stoffwechsel produzierter Radikale, wie z.B. NO, da deren Addukte individuell unterscheidbar sind und in erster Näherung einen direkten Rückschluss auf das primär gebildete kurzlebige Radikal ermöglichen.

1.2.2 Aliphatische Spin-Traps

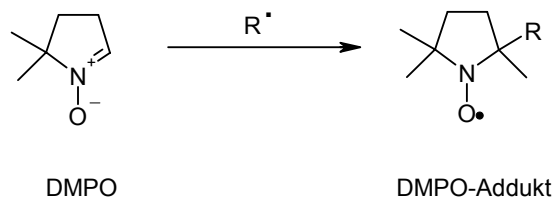
Die älteste und am meisten verwendete Spin-Trap-Verbindung des aliphatischen Typs stellt das Phenyl-*tert*-butyl-nitron (PBN) da. Dieses ist ein gut lagerbarer, relativ unempfindlicher Feststoff, der sich in einer Vielzahl von Lösungsmitteln löst. Jedoch sind die erhaltenen Spin-Addukte oft instabiler als die der zyklischen Verbindungen. Zudem sind die gemessenen Spektren komplizierter zu interpretieren. Aus diesem Grund kommen mittlerweile hauptsächlich Spin-Traps vom zyklischen Typ zum Einsatz.



Im Rahmen dieser Arbeit wurden Synthesen von Derivaten vorgenommen, die eine Weiterentwicklung des aliphatischen Spin-Trap-Typs darstellen.

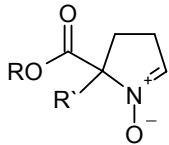
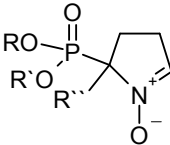
1.2.3 Zyklische Spin-Traps

Die Referenzverbindung im Spin-Trapping mit zyklischen Spin-Traps stellt die wohl älteste verwendete Spin-Trap dieses Typs, das 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO) dar (Janzen 1989).



Es eignet sich zum Nachweis einer Vielzahl von Radikalen, ist gut wasserlöslich und besitzt eine geringere Toxizität als aliphatische Spin-Traps. Obwohl DMPO als Feststoff kommerziell erhältlich ist, stellt seine Reinheit ein großes Problem dar. Dies gilt allerdings auch für alle anderen zyklischen Spin-Traps. Die käuflichen Chargen enthalten stets Zersetzungs- und Nebenprodukte, die ihrerseits bereits radikalisch sind und daher im ESR-Spektrum für eine Vielzahl von

Artefaktensignalen sorgen. Deren Entfernung stellt die erste von vielen Hürden zu einem erfolgreichen Spin-Trapping-Experiment dar. Insbesondere sollte erwähnt werden, dass die zyklischen Spin-Traps durch Lichteinfluss zersetzbar sind und am besten bei - 80 °C unter Argonatmosphäre gelagert werden. DMPO eignet sich nur bedingt zum Nachweis des physiologisch interessanten Superoxidradikals. Daher wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl von Spin-Traps synthetisiert, die eine Alkoxy-carbonylgruppe bzw. Dialkoxyphosphorylgruppe statt einer der Methylgruppen des DMPOs besitzen. Diese Spin-Traps vom EMPO- und DEPMPO-Typ sind zum Nachweis für eine große Auswahl an Radikalen geeignet. Insbesondere auch für das Superoxid-Radikalanion. Im Folgenden ist eine Auswahl der wichtigsten Vertreter dieser Spin-Traps präsentiert (Stolze 2003; Villamena 2004).

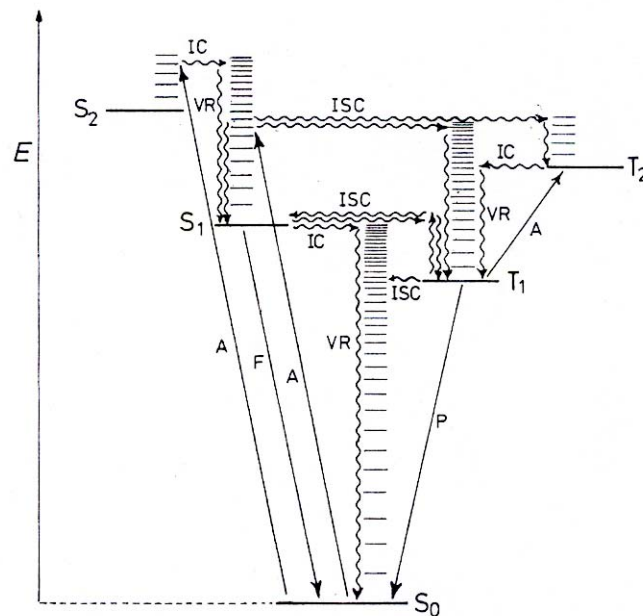
EMPO-Typ			DEPMPO-Typ			
						
Name	R	R'	Name	R	R'	R''
EMPO	Ethyl	Methyl	DEPMPO	Ethyl	Ethyl	Methyl
PrMPO	Propyl	Methyl	DPPMPO	Propyl	Propyl	Methyl
BMPO (BocMPO)	<i>t</i> -Butyl	Methyl	DBPMPO	Butyl	Butyl	Methyl
<i>t</i> BuEPO	<i>t</i> -Butyl	Ethyl	DIPPMPO	<i>i</i> -Propyl	<i>i</i> -Propyl	Methyl
EPPO	Propyl	Propyl	DEPPEPO	Ethyl	Ethyl	Phenylethyl
<i>t</i> BuPPO	<i>t</i> -Butyl	Propyl	DMMPO	Methyl	Methyl	Methyl

1.3 Fluoreszenz und Fluoreszenzfarbstoffe

1.3.1 Fluoreszenz

Unter Fluoreszenz versteht man die spontane Emission von Licht, die auftritt, während ein Molekül durch Lichtabsorption angeregt wird. Bei Raumtemperatur befinden sich die meisten Moleküle auf dem niedrigsten Schwingungszustand des elektronischen Grundzustandes (S_0). Durch Absorption von Lichtquanten kann der Übergang in andere, höher angeregte elektronische Zustände (S_1 , S_2) erfolgen. Von diesen angeregten Zuständen aus können viele verschiedene

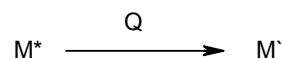
Prozesse zur Rückkehr in den Grundzustand stattfinden. Einer dieser Vorgänge besteht in der Schwingungsrelaxation auf den niedrigsten Schwingungszustand des angeregten elektronischen Zustandes. Von dort aus erfolgt die Rückkehr in den elektronischen Grundzustand durch Emission eines Photons. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz bezeichnet und ist im abgebildeten Jablonski-Diagramm mit „F“ bezeichnet.



Jablonski-Diagramm (Quelle: Klessinger, 1990)

1.3.2 Fluoreszenzlöschung

Fluoreszenzlöschung (engl. Quenching) ist ein weit verbreitetes Phänomen, das auf verschiedenen Mechanismen beruhen kann. Dabei können photophysikalische Prozesse, die nicht zur Bildung neuer chemischer Spezies führen, nach folgender Gleichung beschrieben werden:



M' ist hierbei entweder der Grundzustand des Moleküls oder ein anderer angeregter Zustand von M. In Abhängigkeit des Löschmoleküls Q unterscheidet man Selbstlöschung (Q = M), Konzentrationslöschung und Löschung durch Fremdmoleküle oder Verunreinigungen (Klessinger 1990). Ein besonderer Fall ist die Fluoreszenzlöschung durch die Addition eines Radikals. Durch

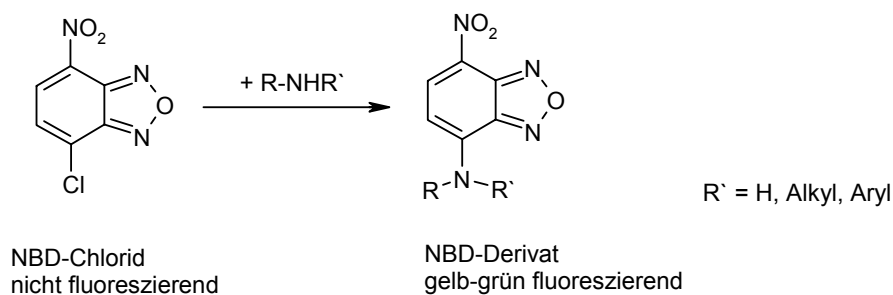
das dann vorhandene ungepaarte Elektron kommt es ebenfalls zum Zusammenbruch der Fluoreszenz.

1.3.3 Fluoreszenzfarbstoffe

Im Laufe der Zeit wurde eine fast unüberschaubare Anzahl an Reagenzien zur Erzeugung von Fluoreszenzfarbstoffen entwickelt und für verschiedenste Zwecke verwendet (Haugland 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurden insbesondere 7-Nitro-2,1,3-oxadiazol-Derivate (NBD), Naphthalen-2,3-dicarboxyaldehyd (NDA), Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Danysl-Chlorid, sowie BODIPY-Farbstoffe eingesetzt bzw. synthetisiert. Alle Derivate dienen zur Kopplung an Aminogruppen.

1.3.3.1 NBD-Farbstoffe

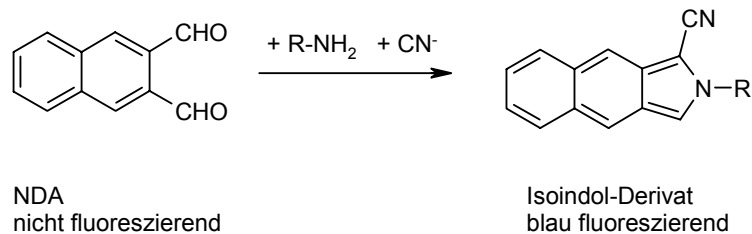
NBD-Chlorid wurde erstmal 1968 zur Modifikation von Aminogruppen eingesetzt. Es reagiert auch mit Alkoholen und Thiolen, jedoch wesentlich langsamer. Die Alkohol- und Thiolderivate fluoreszieren zudem bei kürzeren Wellenlängen und weniger intensiv als die Amino-Derivate. NBD-Derivate finden eine breite Anwendung, insbesondere für chromatographische Zwecke (Burr 1975; Heberer 1985; Heberer 1986; Bakthavachalam 1991; Uchiyama 1998; Sakai 1999; Xia 2001).



Absorptions- und Emissionsspektren, Quantenausbeute sowie Extinktionskoeffizienten sind bei NBD-Farbstoffen stark lösungsmittelabhängig. Insbesondere die Fluoreszenzquantenausbeute von sekundären Aminderivaten in Wasser kann sehr klein sein (Haugland 2002).

1.3.3.2 NDA-Farbstoffe

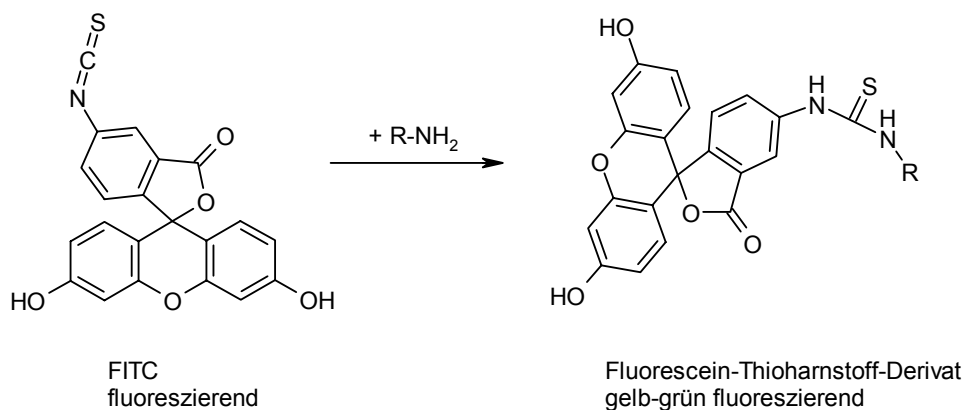
Naphthalen-2,3-dicarboxyaldehyd (NDA) wird erst durch die Reaktion mit primären Aminen in Gegenwart eines Überschuss an Cyanid zu einem fluoreszierenden Isoindol-System umgesetzt.



Hauptanwendung von NDA ist die Modifikation von Proteinen vor oder nach einer Auftrennung per HPLC oder Kapillar-Elektrophorese (Carlson 1986; de Montigny 1987; Oates 1989; Ueda 1991; Haugland 2002).

1.3.3.3 FITC-Derivate

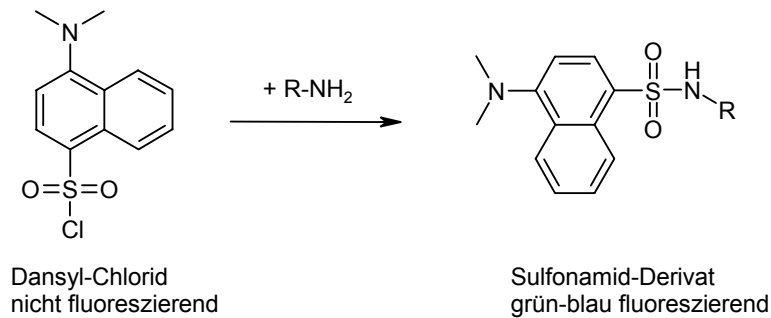
Fluorescein-Isothiocyanant (FITC) findet seine Hauptanwendung in der Aminosäureanalytik. Die Thiocyanat-Gruppe reagiert dabei mit der Aminogruppe der Aminosäure zu einem stabilen Thioharnstoff (Miller 1988; Bradshaw 1994; Britz-McKibbin 1999; Nitz 2000; Haugland 2002).



1.3.3.4 Dansyl-Derivate

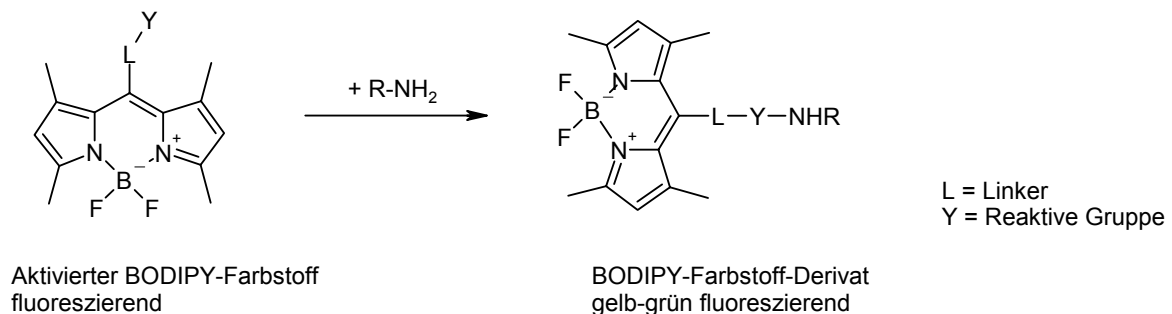
Das zunächst nicht-fluoreszierende Dansyl-Chlorid reagiert mit Aminen zu blau-grün fluoreszierenden Sulfonamiden. Anwendungsgebiete sind auch hier wieder die Aminosäure-

analytik und der Protein- und Wirkstoffmetabolit-Nachweis. Die Emissionsmaxima und Quantenausbeuten sind, in Analogie zu den NBD-Farbstoffen, abhängig von Lösungsmiteleinflüssen und der chemischen Umgebung des Moleküls (Gros 1969; Burr 1975; Kálai 1998; Haugland 2002).



1.3.3.5 BODIPY-Farbstoffe

BODIPY-Farbstoffe gehören zu den besten verfügbaren Fluoreszenzfarbstoffen und finden daher seit ihrer Erstsynthese 1968 eine immer größere Anwendung (Treibs 1968; Becke 1971; Kálai 2003; Gabe 2004; Basaric 2005; Golovkova 2005).



Sie besitzen sehr hohe Extinktionskoeffizienten und Fluoreszenzquantenausbeuten, oftmals auch in wässriger Umgebung. Sie liefern auch weitgehend von Lösungsmittel-Polarität und pH-Wert unabhängige Spektren. Zudem ist ihr Emissionsbereich durch geschickte Wahl der Seitenketten über nahezu das gesamte sichtbare Spektrum einstellbar und es besteht die Möglichkeit zur Multiphotonen-Anregung. Letztere ist in Hinblick auf die sonst allgegenwärtigen Probleme mit Photobleaching-Prozessen besonders interessant (Haugland 2002).

1.4 Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie

1.4.1 Allgemeines

Die Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie) beruht auf der Absorption von elektromagnetischer Strahlung durch paramagnetische Substanzen, d.h. Verbindungen mit ungepaarten Elektronen. Das Zeitfenster dieser Methode, in dem dynamische Prozesse verfolgt werden können, liegt zwischen 10^{-11} 10^{-7} Sekunden und kann durch Ausnutzen von Sättigungstransfer-Effekten (ST-ESR) bis auf 10^{-4} Sekunden ausgedehnt werden (McConnell 1976; Hyde, 1979).

1.4.2 Theoretische Grundlagen

Der Bahndrehimpuls L und der Eigendrehimpuls S , der sich seinerseits aus s_x , s_y und s_z , den Komponenten in x-, y-, und z-Richtung, zusammensetzt, ergeben den Gesamtdrehimpuls J eines Elektrons. Bei organischen Molekülen kann der Bahndrehimpuls vernachlässigt werden.

Die z-Komponente des Eigendrehimpulses, d.h. die Komponente in Richtung des äußeren Magnetfeldes, ist neben dem Betrag des Spins die einzige Größe, die bei einer genauen Messung zugänglich ist. Sie wird mit Hilfe der Quantenzahlen $m_s = +1/2$ und $m_s = -1/2$ beschrieben.

Der Elektronenspin erzeugt ein magnetisches Moment μ_E , dessen z-Komponente μ_E^z nur zwei Werte annehmen darf, die den Spinquantenzahlen $m_s = +1/2$ oder $m_s = -1/2$ entsprechen.

Die zugehörige Formel lautet:
$$\mu_E^z = -m_s \times g_E \times \mu_B \quad (1)$$

mit dem Landé-Faktor g_E , einer dimensionslosen Zahl, die für das freie Elektron 2,0023 beträgt und dem Bohrschen Magneton μ_B . Da das Elektron eine negative Ladung trägt, haben μ_E^z und m_s unterschiedliche Vorzeichen. Per Definition wird die z-Richtung dem äußeren Magnetfeld gleichgesetzt. Daher beschreibt die Komponente μ_E^z des Moments das Verhalten des Elektrons im Magnetfeld.

Beim Anlegen eines externen Magnetfeldes wird die Entartung der Spinzustände aufgehoben und die Eigendrehimpulsvektoren richten sich parallel oder antiparallel dazu aus (Zeeman-Effekt).

Für die z-Komponente gilt dann:

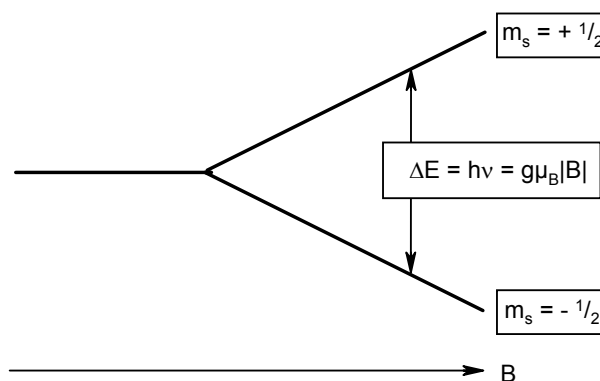
$$s_z = \frac{h}{2\pi} |m_s| \quad (2)$$

Hierbei kann m_s die Werte $\pm 1/2$ annehmen; h ist das Planck'sche Wirkungsquantum.

Der Energieunterschied zwischen den beiden bevorzugten Positionen beträgt

$$\Delta E = h\nu = g_E \times \mu_B \times H \quad (3)$$

und ist von der Magnetfeldstärke abhängig, was folgende Abbildung verdeutlicht:



Somit ist die Aufspaltung der entarteten Zustände proportional zur Stärke des angelegten Magnetfeldes.

Wird dem System nun Energie in Form elektromagnetischer Strahlung der Resonanzfrequenz ν zugeführt, so kommt es zu Übergängen zwischen den beiden Zeemanschen Energieniveaus E_1 und E_2 , bei denen das Elektron seinen Spinzustand ändert (Spinwechsel).

Der gyromagnetische Quotient γ_E , der Proportionalitätsfaktor zwischen der Resonanzfrequenz ν und der Feldstärke H , ist gegeben durch

$$\gamma_E = \frac{\nu}{H} = \frac{g_E \cdot \mu_B}{h} \quad (4)$$

und beträgt 2,802 MHz/Gauss mit $g_E = 2,0023$. Somit ist es möglich, die Resonanzbedingung durch variieren von ν und / oder H zu erfüllen.

Aus technischen Gründen arbeiten die meisten ESR-Spektrometer so, dass bei konstanter Frequenz ν (~ 10 GHz, X-Band) die Feldstärke H variiert wird. Aufgezeichnet wird die erste Ableitung der Absorptionsintensität des Signals nach der Feldstärke H .

Um bei der Aufnahme eines ESR-Spektrums ein günstiges Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten, wird das Magnetfeld durch seitlich am Hohlraumresonator angebrachte Zusatzspulen moduliert. Das Signal kann somit frequenz- und phasensensitiv verstärkt werden; dadurch optimiert man zwar das Signal-Rausch-Verhältnis, jedoch resultiert daraus auch die erste Ableitung des Signals.

1.4.3 Die Hyperfeinstruktur

Für gewöhnlich ist im ESR-Spektrum jedoch wesentlich mehr als ein Ein-Linien-Signal detektierbar. Bei guter Auflösung können in Lösung mehr als hundert Linien auftreten. Diese als Hyperfeinstruktur bezeichnete Aufspaltung des Signals, ist Folge der Wechselwirkung des ungepaarten Elektrons mit dem Kernspin benachbarter Atome. Sie ist von der Stärke H des äußeren Magnetfeldes unabhängig. Genau wie beim Elektron wird für die Beschreibung des Kerns im äußeren Magnetfeld nur die Kenntnis der Komponente μ_N^z seines magnetischen Momentes in z -Richtung benötigt. Analog zur Gleichung (1) ergibt sich für μ_N^z

$$\mu_N^z = -M_I \times g_N \times \beta_N \quad (5)$$

μ_N^z ist von M_I abhängig, das $2 \cdot I + 1$ Werte annehmen kann.

Beim Nitroxylradikal sind die benachbarten Atome das ^{14}N mit $I = 1$ und das ^{16}O mit $I = 0$ (keine Wechselwirkung), wodurch das Ein-Linien-Signal des Elektrons eine Hyperfeinstruktur von $2 \cdot I + 1$, also 3 Linien erhält.

Gemäß der Auswahlregel $\Delta M_S = \pm 1; \quad \Delta M_I = 0$

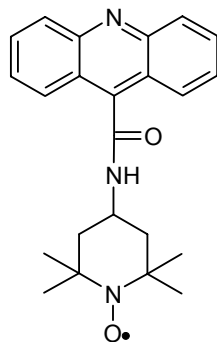
sind nur die Übergänge erlaubt, die zwischen Spinzuständen gleicher Quantenzahl M_I stattfinden. Im Falle der Spin-Trap-Verbindungen kommt es zur Kopplung des Elektronenspins mit den Kernspins des benachbarten ^{14}N -Atoms, wodurch zunächst ein Drei-Linien-Spektrum resultiert, das jedoch durch die weitere Kopplung mit einem ^1H -Kern dupliziert wird.

2 Problemstellung

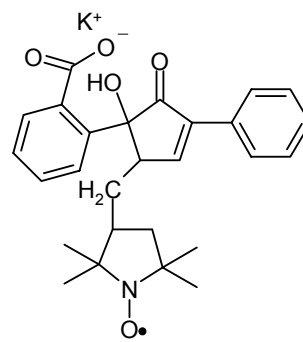
Wie bereits in der Einleitung erläutert wurde, stellt die Möglichkeit des Nachweises von kurzlebigen Radikalen mit Hilfe der ESR-Spektroskopie eine wichtige Methode zum Verständnis vieler physiologischer Vorgänge dar. Da reaktive Sauerstoffspezies auch bei einer Vielzahl von Krankheiten eine Rolle spielen, ist deren Nachweis ein wichtiger Schritt zum Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen und ist somit letztlich der erste von vielen Schritten zum Ermöglichen einer Therapie, die an den Ursachen angreift, und nicht nur Symptome therapiert.

Limitiert wird diese Methode durch die fehlende Ortsauflösung, da in einem Proberöhrchen in einem Spektrometer gemessen wird und somit das Gesamtsignal einer Probe erfasst wird, ohne eine Zuordnung zum exakten Entstehungsort innerhalb der Zelle zu ermöglichen.

Die Fluoreszenzmikroskopie, insbesondere die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie, bietet genau diese Eigenschaft. So ist es möglich Zellen in sehr hoher Auflösung dreidimensional abzubilden, wodurch prinzipiell auch die Entstehungsorte von Radikalen nachgewiesen werden können, sofern eine geeignete fluoreszierende Verbindung zur Reaktion mit den Radikalen zur Verfügung stehen. Die etablierten Farbstoffe (s. Abbildung) zum Nachweis von Hydroxy- und Superoxidradikalen basieren auf der Rekombination einer Spin-Labelverbindung mit anhängendem Fluorophor und dem Radikal. Die Verbindung fluoresziert aufgrund der erwähnten Fluoreszenzlöschung zunächst nicht. Durch die Rekombination mit dem Radikal wird jedoch die Fluoreszenzlöschung unterbunden und die Farbstoffmoleküle fluoreszieren. So kann zwar die Entstehung von Radikalen ortsaufgelöst nachgewiesen werden, jedoch kann hier keine wirklich sichere Aussage über das abgefangene Radikal getroffen werden, da kein ESR-Signal mehr detektierbar ist.

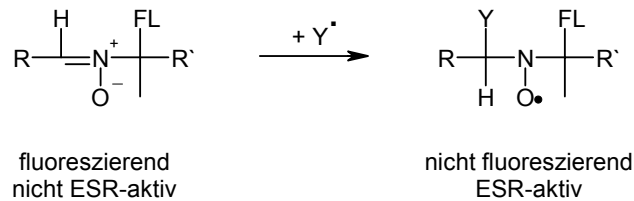


TEMPO-9-AC (A7923)
Molecular Probes Inc.



Proxyl-Fluorescamin (C7924)
Molecular Probes Inc.

Ziel dieser Arbeit sollte die Synthese einer Spin-Trap-Verbindung sein, die aufgrund einer fluoreszierenden Gruppe dazu in der Lage ist, beide wünschenswerten Eigenschaften in sich zu vereinen. Dies bedeutet, dass die fluoreszierende Verbindung beim Abfangen eines kurzlebigen Radikals eine Fluoreszenzlöschung erfährt und gleichzeitig ESR-aktiv wird.



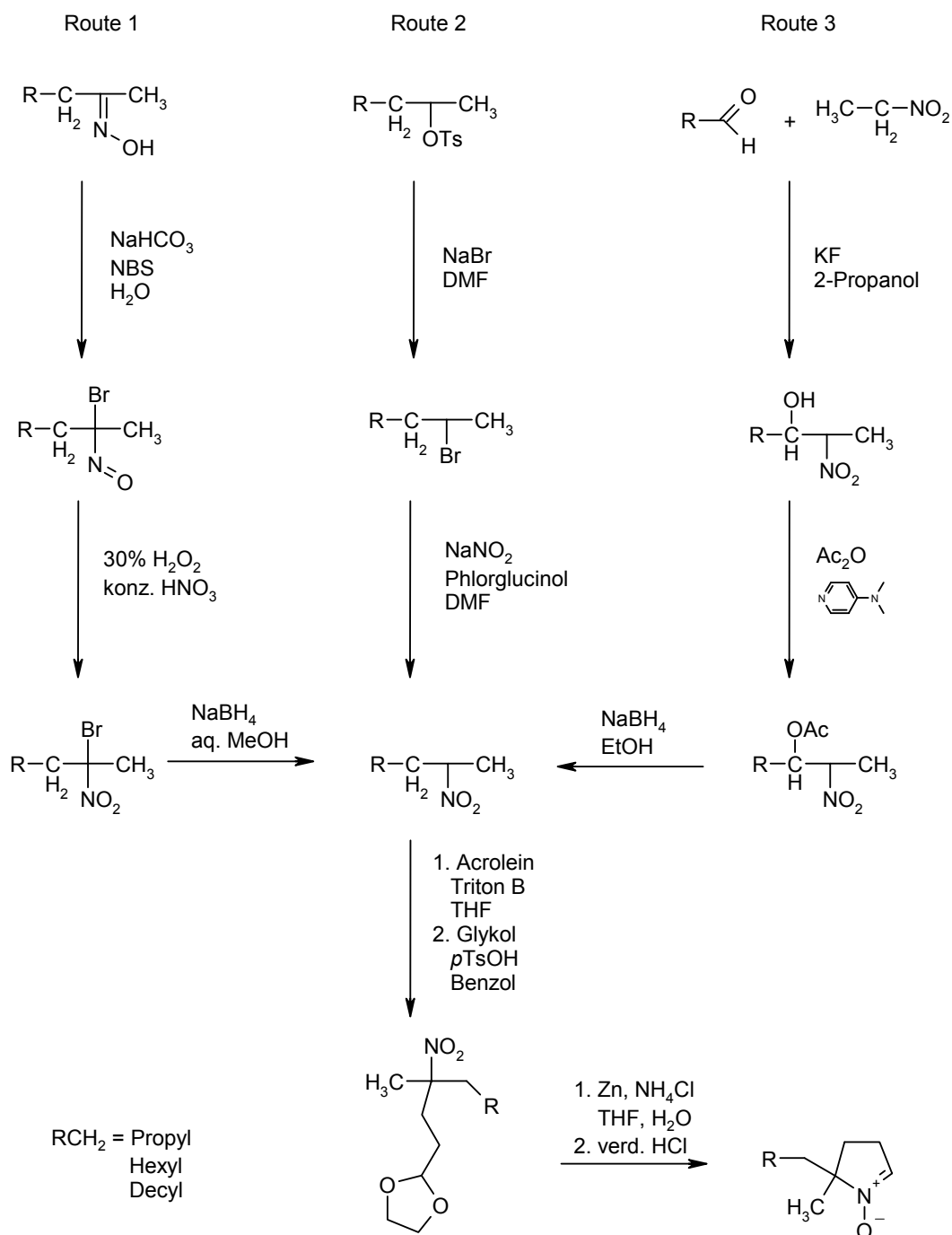
Zu diesem Zweck sollte zunächst die Synthese von EMPO etabliert und versucht werden, durch eine Umesterung der Ethoxycarbonylgruppe ein Fluorophor zu integrieren. Im Falle eines Scheiterns dieser Strategie sollte versucht werden auf andere Weise eine Fluoreszenzmarkierung einer zyklischen Spin-Trap-Verbindung zu realisieren. Die synthetisierten Spin-Traps sollten dann sowohl ESR- als auch fluoreszenzspektroskopisch charakterisiert und in ersten Versuchen in Zellen auf ihre Anwendbarkeit geprüft werden.

Ein weiteres Ziel war die Modifikation von aliphatischen Spin-Traps um das gleiche Ziel zu erreichen. Hierbei sollte erprobt werden, ob die Synthese einer stilbenhaltigen Spin-Trap und deren Erprobung realisierbar ist. Diese würde ebenfalls beide Eigenschaften in sich vereinen.

3 Eigene Ergebnisse

3.1 Allgemeine Synthesewege

Für die Synthese von zyklischen Nitronen bieten sich drei mögliche Syntheserouten an (Haire 1982):

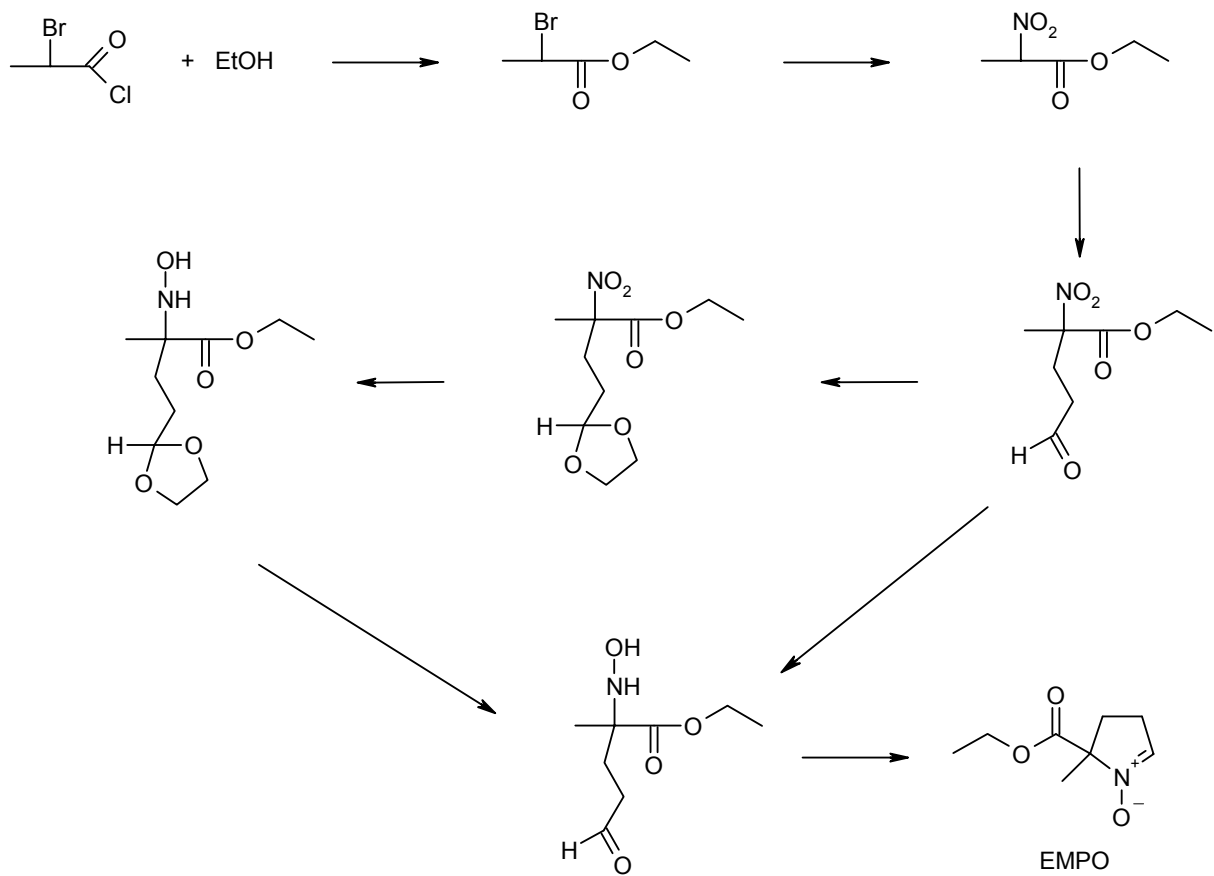


Grundlage für die Synthesen zyklischer Nitronen in dieser Arbeit stellt eine Abwandlung der Route 2 dar. Insbesondere wird in der vorliegenden Arbeit stets mit 2-Brompropionylchlorid und einer

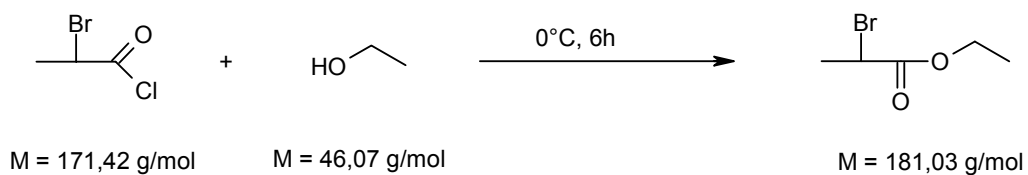
zu veresternden Alkoholkomponente begonnen. Die folgenden Schritte werden dann in Anlehnung zum obigen Schema durchgeführt.

3.2 Synthese von EMPO

Syntheschema:



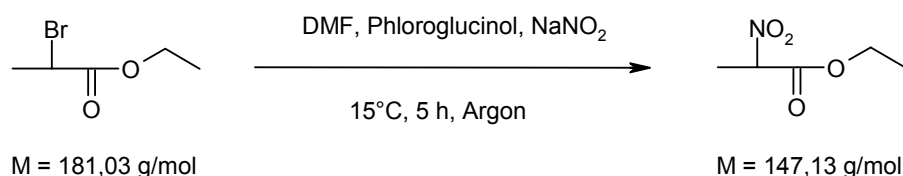
3.2.1 Synthese von 2-Brompropionsäureethylester



Die Umsetzung von 2-Brompropionylchlorid in trockenem Ethanol unter Argonatmosphäre ergibt in 95 % Ausbeute 2-Brompropionsäureethylester als hellgelbes Öl.

Die Analytik-Daten sind im Einklang mit den verfügbaren Literaturwerten und im Experimentellen Teil aufgeführt.

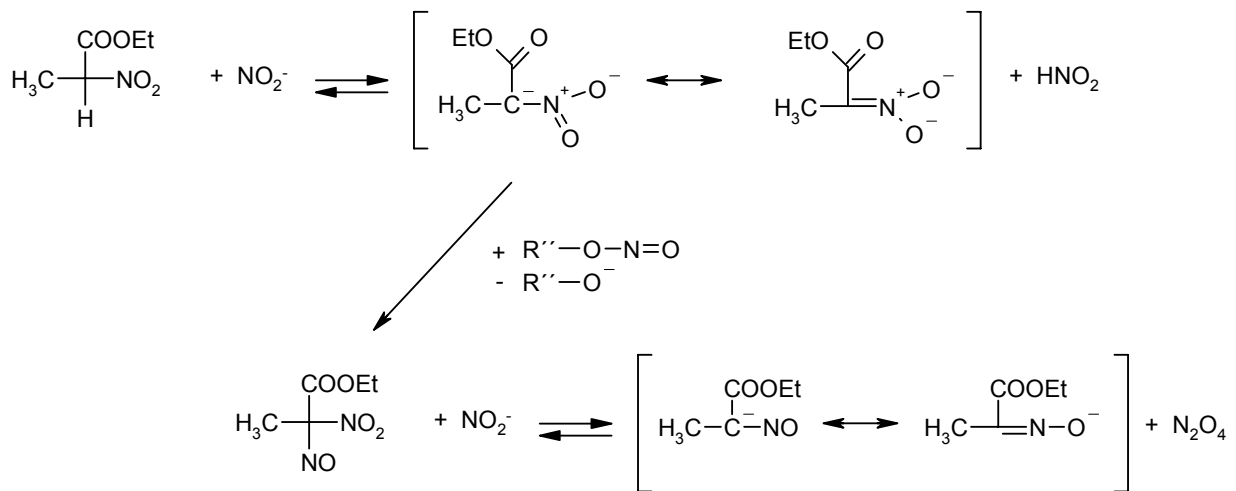
3.2.2 Synthese von 2-Nitropropionsäureethylester



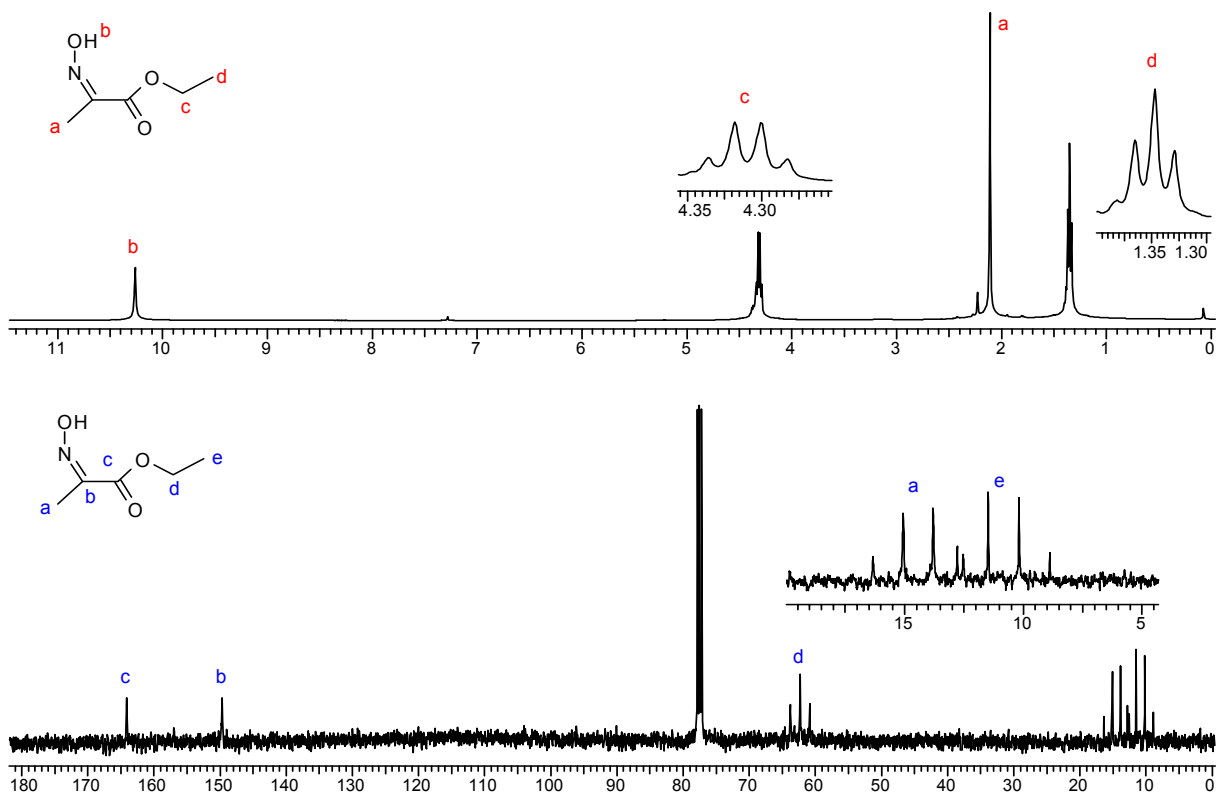
Bei der Umsetzung von 2-Brompropionsäureethylester mit Natriumnitrit in Dimethylformamid kam es bei ersten Syntheseversuchen zu unvorhergesehenen Komplikationen. Ursache hierfür war die Verwendung von Phloroglucinol-Dihydrat, das auch in den bekannten Literaturstellen verwendet wird (Zhang 2000; Zhao 2001; Stolze 2003). Phloroglucinol (1,3,5-Trihydroxybenzol) ist ein bifunktionelles Additiv und dient zur Verbesserung der Löslichkeit von Natriumnitrit in DMF. DMF ist in der Lage Kationen gut zu solvatisieren, während die Anionen weitgehend unsolvatisiert vorliegen. Daher sind sie für die Bromkomponente als Reaktionspartner sehr gut verfügbar, da keine Energie zur Desolvatisierung aufgebracht werden muss, was sich auch in einem schnellen Reaktionsverlauf zeigt. Es kann jedoch nur, wenn ausreichende Mengen des Nitrits gelöst sind, zur Reaktion mit der Bromkomponente kommen. Hier kommt Phloroglucinol zum Einsatz, wobei diese Funktion auch durch Harnstoff übernommen werden kann. Diesem fehlt jedoch eine sehr wichtige zweite Funktionalität: Bei der Reaktion sekundärer Brom- und Iodverbindungen mit Natriumnitrit konkurrieren zwei Reaktionen in gleichem Maße. Einerseits die gewünschte Bildung der Nitroverbindung, andererseits die Bildung eines Nitritesters. Phloroglucinol kann Nitritester unter Bildung von Nitrosophloroglucinol abfangen. Letzteres ist für die tiefrote Färbung der Reaktionslösung verantwortlich (Kornblum 1956). Ohne Phloroglucinol kommt es zur Zersetzung des Nitroproduktes, da es mit entstandenen Nitritestern und Natriumnitrit wie auf der folgenden Seite abgebildet reagiert. Das Nitrition dient dabei als Base (Kornblum 1956; Reinheckel 1967).

Bereits geringe Mengen des Nitritesters reichen aus um die Nitrokomponente nach diesem Schema vollständig zu zerstören. Einzige Voraussetzung ist dabei, dass die Nitroverbindung ein α -H-Atom besitzt. Entgegen der Literaturangaben konnte mit Phloroglucinol-Dihydrat nicht das gewünschte Produkt 2-Nitropropionsäureethylester gewonnen werden, sondern nur ein weißer kristalliner Feststoff, der aufgrund seiner NMR-Spektren, CHN-Analyse und Massenspektrometrie als Ethylpyruvatoxim (Ethyl-2-(hydroxyimino)-propanoat) identifiziert werden konnte. Bei der

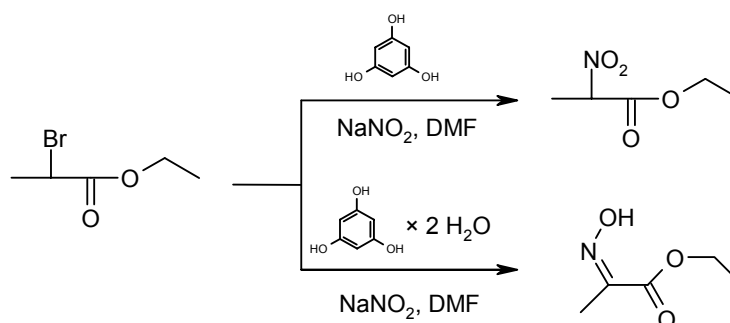
Umsetzung kommt es nicht nur zur Bildung des tiefroten Nitrosophloroglucinols, sondern auch zur Bildung des blau-grünen Nitrosonitroesters (s. Abb.), wobei die Geschwindigkeit der Farbwechsel durch Änderung der Reaktionstemperatur nahezu beliebig beschleunigt und verlangsamt werden kann. Die Bildung des Ethylpyruvatoxims steht in gutem Einklang zu den oben beschriebenen Zersetzungsprozessen (Kornblum 1956). So entsteht es als Tautomersierungsprodukt des intermediären Nitrosocarbanions zum Salz des Oxims. Der bei der Nitrosierung entstehende Alkohol kann mit N_2O_4 wieder zum Nitritester reagieren, wodurch der Katalysezyklus geschlossen wird.



$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3) und $^{13}\text{C-NMR}$ (100,61 MHz, CDCl_3) des Ethylpyruvatoxims:



Da auch Wasser als Base dienen kann, ist hier die Fehlerquelle bei Verwendung des Phloroglucinol-Dihydrats zu suchen.



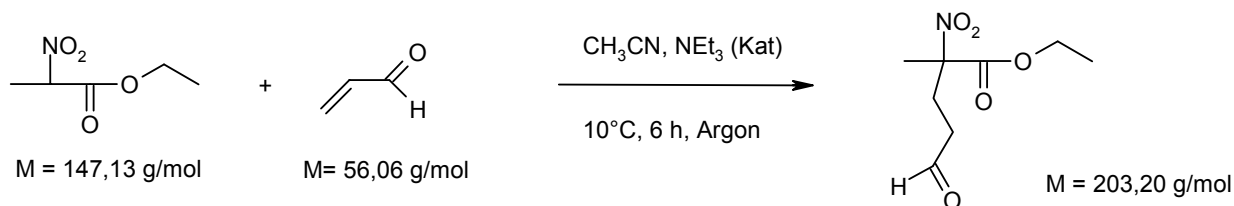
Verwendet man anstatt des Phloroglucinol-Dihydrats die wasserfreie Verbindung, so verläuft die Reaktion zum gewünschten Produkt (Kornblum 1956), wobei der Farbwechsel von farblos über gelb, orange zu einer dunkelroten Lösung führt und grün-blaue oder schwarze Farberscheinungen erwartungsgemäß vollständig ausbleiben.

In diesem Zusammenhang ist jedoch die Qualität des verwendeten Phloroglucinols von entscheidender Bedeutung. Die Qualität schwankt dabei von Hersteller zu Hersteller und auch bei Verwendung des selben Herstellers können Chargen-Schwankungen auftreten. Beste Erfahrungen wurden mit Phloroglucinol von Acros bzw. Lancaster-Synthesis gemacht. Grundsätzlich empfiehlt es sich, sowohl das Natriumnitrit als auch das Phloroglucinol über Phosphorpentoxid in einem Exsikkator aufzubewahren.

Bei der Umsetzung von 2-Brompropionsäureethylester (198,00 mmol) mit Natriumnitrit (389,00 mmol) und wasserfreiem Phloroglucinol (237,00 mmol) in getrocknetem und frisch destilliertem DMF unter Argonatmosphäre erhält man 2-Nitropropionsäureethylester als gelbes Öl. Zur Extraktion des Produkts wird bei der Aufarbeitung Diethylether benutzt. Dieser löst jedoch zum Teil das Phloroglucinol. Aus diesem Grund nimmt man das einrotierte Extrakt in 50 ml CHCl₃ auf und lagert die Lösung über Nacht bei -20 °C. Am nächsten Tag kann das ausgefallene Phloroglucinol dann abfiltriert werden. Die Ausbeute dieser Umsetzung liegt bei 65 %. Die Analytik-Daten sind im Einklang mit den verfügbaren Literaturwerten und im Experimentellen Teil aufgeführt.

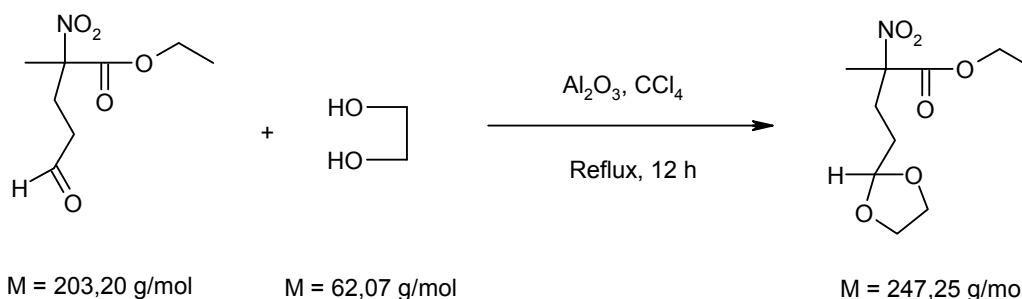
Als interessante Option besteht die Möglichkeit, die Umsetzung auf Amberlit IRA 900 in der Nitro-Form durchzuführen (Scardovi 2002). Hierbei können laut Literatur ebenfalls vergleichbare Ausbeuten erzielt werden, weshalb auf eine Erprobung dieser Variante verzichtet wurde.

3.2.3 Synthese von 2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-ethylester



2-Nitropropionsäureethylester (74,03 mmol) wird in trockenem Acetonitril unter Argonatmosphäre mit Acrolein (111,00 mmol) in einer Michael-analogen Reaktion umgesetzt (Ono 1983; Ballini 1986). Die Ausbeute dieser Reaktion liegt bei 95 %. Die Analytik-Daten sind im Einklang mit den verfügbaren Literaturwerten und im Experimentellen Teil aufgeführt.

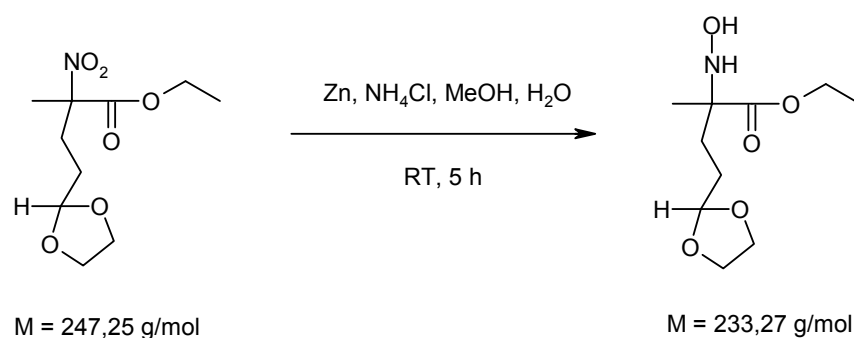
3.2.4 Synthese von 4-[1,3]-Dioxolan-2-yl-2-methyl-2-nitro-buttersäure-ethylester



Bei der ersten Synthese von EMPO wurde sicherheitshalber die Aldehydgruppe als 1,4-Dioxolan geschützt (Showler 1966; Greene 1999), da in der folgenden Synthesestufe bei der Reduktion der Nitrogruppe prinzipiell auch die Aldehydfunktion reduziert werden kann. Hierzu wurde eine als hocheffizient beschriebene Variante gewählt (Kamitori 1985), die zunächst auch eine sehr leichte Aufarbeitung durch Filtration versprach: 2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-ethylester (57,17 mmol) wird in CCl_4 gelöst, mit 2 Äquivalenten Ethylenglykol (128,81 mmol) und 0,5 Äquivalenten saurem Aluminiumoxid (26,67 mmol) versetzt und die Mischung für 12 Stunden unter Rückfluss gekocht. Man erhält so 4-[1,3]-Dioxolan-2-yl-2-methyl-2-nitro-buttersäure-ethylester als hochviskoses hell orangefarbenes Öl. Die vergleichsweise schlechte Ausbeute von nur 68 % gegenüber 90-100 % Ausbeute der Literatur resultiert aus Problemen bei der

Aufarbeitung, da das Aluminiumoxid nach dem Reaktionsende als gelartige Masse im CCl_4 vorliegt und das Produkt adsorbiert. Insofern stellt die klassische Variante mit *para*-Toluolsulfonsäure, Benzol und Wasserabscheider eine bessere Alternative in diesem Schritt dar (Haire 1982). Die Analytik-Daten sind im Einklang mit den verfügbaren Literaturwerten und im Experimentellen Teil aufgeführt.

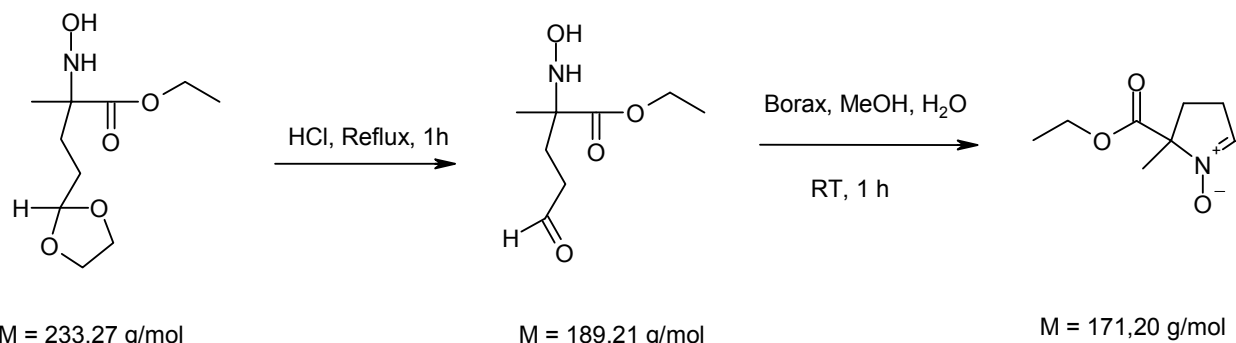
3.2.5 Synthese von 4-[1,3]-Dioxolan-2-yl-2-hydroxyamino-2-methyl-buttersäure-ethylester



Zur Reduktion der Nitrofunktion zum Hydroxylamin wird eine Reduktion mit Zink und Ammoniumchlorid in einer Mischphase durchgeführt (Prelog 1962; Gattermann 1982; Still 1989; Still 1990; Yamada 1998). Diese Methode stellt nach wie vor die einzige anwendbare Möglichkeit dar, um aus dem vorliegenden Edukt das Hydroxylamin zu erzeugen. Alternative Methoden, wie z.B. die Verwendung von vier Äquivalenten Samariumdiodid als Reduktionsmittel mit Methanol als Protonenquelle, sind bei vergleichbaren oder höheren (bis 88%) Ausbeuten aus finanziellen Gründen nicht praktikabel (Kende 1991). Alternativ kann die Reduktion durch den Einsatz von Natriumamalgam erreicht werden (Piloty 1897). Da hierfür jedoch nur ein 2,5 %iges Amalgam benötigt wird, verbietet sich diese Methode alleine schon aus Gründen des Umweltschutzes.

Zur Umsetzung wird daher 4-[1,3]-Dioxolan-2-yl-2-methyl-2-nitro-buttersäure-ethyllester (16,18 mmol) in einer 1 : 1 Mischung aus Methanol und Wasser gelöst. Das trübe Lösungsmittelgemisch wird dann mit einer wässrigen Ammoniumchlorid-Lösung (74,82 mmol) versetzt und portionsweise Zink-Pulver (132,74 mmol) im Überschuss zugegeben. Schon nach Zugabe der ersten Portion Zink bildet sich auf der Mischung ein hellgrauer Schaum, der für einen positiven Reaktionsverlauf charakteristisch ist. Nach der Aufarbeitung erhält man mit einer Ausbeute von 61 % 4-[1,3]-Dioxolan-2-yl-2-hydroxyamino-2-methyl-buttersäure-ethyllester als hochviskoses Öl. Die zugehörigen Analytik-Daten sind im Experimentellen Teil aufgeführt.

3.2.6 Synthese von EMPO

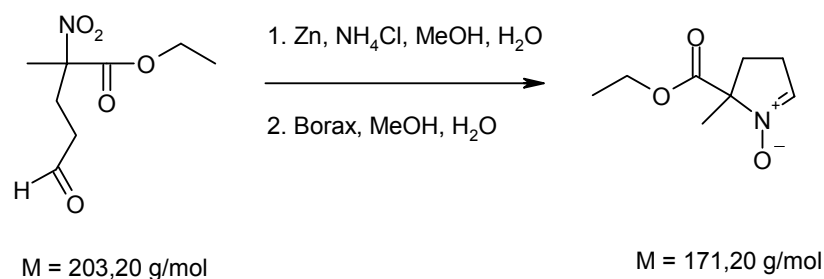


Zur Synthese von EMPO wird 4-[1,3]-Dioxolan-2-yl-2-hydroxyamino-2-methyl-buttersäure-ethylester (23,84 mmol) in verdünnter Salzsäure unter Rückfluss gekocht. Nach der Extraktion des nun entschützten Aldehyds mit Dichlormethan wird die organische Phase einrotiert. Das Rohprodukt wird in Methanol und Wasser (5 : 1) gelöst, mit Borax gesättigt und bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Aufarbeitung erhält man ein Rohprodukt, das im $^1\text{H-NMR}$ deutlich EMPO-Signalsätze zeigt.

Zur weiteren Aufreinigung wird das Rohprodukt durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 getrennt. Dabei wird zunächst mit einer Mischung aus 7 : 3 Petrolether und Ethanol eine Grobtrennung durchgeführt, gefolgt von einer Feinreinigung mit 1 : 1 Pentan und Ethanol. Das Produkt wird in beiden Durchgängen mit Ethanol vom Kieselgel eluiert.

Die Ausbeute liegt bei dieser Variante bei 51 %.

Alternativ kann die Synthese von EMPO aber auch ausgehend von 2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-ethylester als Eintopfreaktion durchgeführt werden:

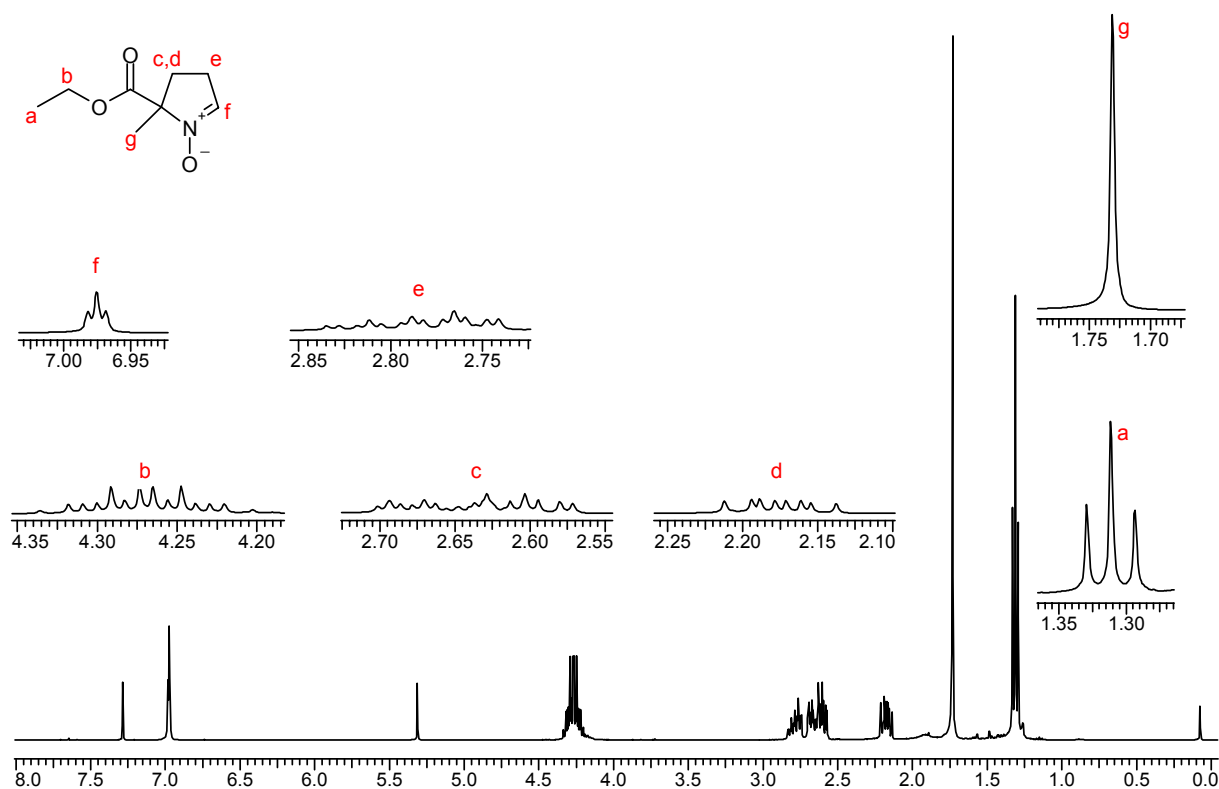


Hierbei wird 2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-ethylester (5,61 mmol) ebenfalls in einer 1 : 1 Mischung aus Methanol und Wasser gelöst und mit einer wässrigen Ammoniumchlorid-Lösung (11,22 mmol) versetzt. Im Anschluss wird portionsweise Zink-Pulver (50,49 mmol) zugegeben.

Auch hier entsteht direkt nach der Zugabe der ersten Portion Zink ein hellgrauer Schaum auf der Mischung.

Bei dieser Variante der Reaktion ist jedoch die verwendete Zink-Menge wesentlich für den Erfolg der Umsetzung. So kann die Qualität des Zink-Pulvers in Abhängigkeit von Alter und Lagerbedingungen beträchtlich schwanken. Falls die Aktivität des Pulvers zu gering ist, erfolgt nur eine unvollständige Reduktion der Nitrogruppe. Ist die Aktivität zu groß, so kann auch die ungeschützt vorliegende Aldehydfunktion reduziert werden. In beiden Fällen sinkt somit die Ausbeute drastisch ab. Daher sollte immer mit einem per Testansatz bestimmten Molverhältnis gearbeitet werden, das bei Verwendung einer neuen Charge Zink-Pulver immer neu bestimmt werden muss.

Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der Ansatz filtriert und am Rotationsverdampfer eingedunstet. Dieses Konzentrat wird mit Borax gesättigt, für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und mit Dichlormethan extrahiert. Das Rohprodukt zeigt im $^1\text{H-NMR}$ deutlich EMPO-Signalsätze und wird, wie bereits vorne beschrieben, durch Säulenchromatographie gereinigt.



Man erhält so EMPO mit einer Ausbeute von 40 %. Da hierbei jedoch in der Summe drei Schritte umgangen werden ist diese Ausbeute fast das Doppelte der mit der klassischen Schutzgruppenvariante erreichten. Beginnend mit den Ausbeuten des Schützens des 2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-ethylester bis zum EMPO über alle Stufen liegt sie hier bei nur 21 %. Auch mit einer effektiveren Syntheseveriante für das Schützen des Aldehyds ist die zu letzt

beschriebene Methode effizienter. Auf der vorherigen Seite ist ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von EMPO abgebildet (400,13 MHz, CDCl_3). Die restlichen Analytik-Daten sind im Einklang mit den verfügbaren Literaturwerten und im Experimentellen Teil aufgeführt.

Charakteristisch für die zyklischen Nitrone ist das Triplett (Signal f) des Doppelbindungs-Protons im Bereich zwischen 6,80 und 7,10 ppm. Beim EMPO ist dieses Signal bei 6,976 ppm mit einer $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstanten von 2,64 Hz zu finden. Weiterhin sind die komplexen Multipletts der Ring-Protonen (Signale c, d, e) typisch für die zyklischen Nitrone.

3.3 EMPO-Umsetzungen

3.3.1 Umsetzungen vor Erreichen der Nitronstufe

Basische Esterspaltung auf Stufe des Dioxolangeschützeten Michael-Produkts

2,44 mmol des Dioxolans werden mit 2,45 mmol KOH in einer 1 : 2 Mischung aus Ethanol und Wasser für 4 Stunden unter Rückfluss gekocht. Die rotbraune Reaktionsmischung wird dann im Eisbad mit Salzsäure neutralisiert, wobei sie sich gelb-braun färbt. Man extrahiert mit Diethylether, trennt die Phasen und trocknet die organische Phase mit CaCl_2 . Das verbleibende braune Öl zeigt im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nur Zersetzungsprodukte.

Basische Esterspaltung auf Stufe des Dioxolangeschützten Hydroxylamins

2,14 mmol des Hydroxylamins werden mit 2,14 mmol KOH in Methanol für eine Stunde zum Rückfluss erhitzt. Die rotbraune Reaktionsmischung wird dann im Eisbad mit HCl neutralisiert, wobei sie sich gelb-braun färbt. Man extrahiert mit Diethylether, trennt die Phasen und trocknet die organische Phase mit CaCl_2 . Das verbleibende braune Öl zeigt im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nur Zersetzungsprodukte.

3.3.2 Umsetzungen auf Nitronstufe zur Bildung von NBD-Derivaten

0,82 mmol EMPO werden mit 0,64 mmol 2-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol und 7,67 mmol KCN in Ethanol unter Argonatmosphäre für 24 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wird dann mit 1g $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ gelöst in 1 ml H_2O versetzt, um KCN bzw. HCN zu entfernen. Nach Filtration des entstehenden Niederschlags erhält man eine klare orangene Lösung. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und der Hochvakuumpumpe

verbleibt ein roter Feststoff. DC-Proben des Ansatzes zeigen mehrere schwach fluoreszierende Banden. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Rohproduktes zeigt nur Zersetzungsprodukte.

0,45 mmol 2-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol werden in THF gelöst und auf 0°C abgekühlt. Dann werden langsam $280\ \mu\text{l}$ einer 1M n-Butyllithium-Lösung in Hexan zugegeben und die Mischung für 10 Minuten gerührt. Hierzu werden 0,45 mmol EMPO gegeben und der Ansatz für 1,5 Stunden im Eisbad bei 0°C gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der entstandene Niederschlag abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet. DC-Proben des Ansatzes zeigen mehrere schwach fluoreszierende Banden. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Rohproduktes zeigt nur Zersetzungsprodukte.

0,45 mmol 2-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol werden in Acetonitril gelöst und mit 98,07 mmol Al_2O_3 sowie 0,29 mmol EMPO versetzt. Der Ansatz wird für 24 Stunden unter Argonatmosphäre zum Rückfluss erhitzt. Nach Abfiltrieren des Al_2O_3 wird das Lösungsmittel abrotiert. Nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum zeigen DC-Proben des Ansatzes mehrere schwach fluoreszierende Banden. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Rohproduktes zeigt nur Zersetzungsprodukte.

0,73 mmol EMPO werden unter Argonatmosphäre in 10 ml trockenem CH_2Cl_2 gelöst und 5 ml trockene TFA zugegeben. Nach 5 Minuten Rühren werden 1,00 mmol 2-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol zugegeben und für weitere 2 Stunden gerührt. Nach Entfernen der Lösungsmittel-TFA-Mischung im Hochvakuum verbleibt ein braunes Öl. DC-Versuche zeigen mehrere zum Teil fluoreszierende Banden. Die Trennung durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 mit 19:1 CH_2Cl_2 und Methanol liefert 3 Fraktionen. Die zugehörigen $^1\text{H-NMR}$ -Spektren zeigen nur Zersetzungsprodukte.

0,81 mmol EMPO werden unter Argonatmosphäre in trockener TFA gelöst. Nach 5 Minuten Rühren werden 0,62 mmol 2-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol zugegeben und für weitere 5 Stunden bei 60°C gerührt. Nach Entfernen der TFA im Hochvakuum verbleibt ein braunes Öl. DC-Versuche zeigen eine sehr dünne fluoreszierende Bande zwischen den Eduktbanden.

Um größere Mengen der fluoreszierenden Bande zu erhalten, wurde dieser Versuch mit gleichen Ansatzgrößen und -verhältnissen mehrfach wiederholt, wobei die Reaktionszeit variiert wurde. Rührzeiten von 2, 5, 10, 24, 48 und 120 Stunden bringen ebenso wie eine stufenweise Temperaturerhöhung bis zum Rückfluss keine Veränderungen im Produktbild.

0,35 mmol EMPO werden zusammen mit 0,29 mmol 2-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol in THF gelöst und bei 0 °C mit 1,00 ml einer 1M n-Butyllithium-Lösung in Hexan versetzt. Die Mischung wird für 30 Minuten bei 0 °C gerührt und dann auf Raumtemperatur erwärmt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird das Lösungsmittel abgetrennt und das verbleibende Öl im Hochvakuum getrocknet. DC-Proben des Ansatzes zeigen mehrere verschmiert laufende schwach fluoreszierende Banden. Das ¹H-NMR-Spektrum des Rohproduktes zeigt nur Zersetzungsprodukte.

200,00 mg EMPO werden zusammen mit 260,00 mg 2-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol und 2,00 g gemörsertem 4 Å-Molsieb in 20 ml TFA gelöst und unter Argon-Atmosphäre für 4 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Man erhält nach Entfernen der TFA im Hochvakuum ein braunes Öl. DC-Versuche zeigen eine sehr dünne fluoreszierende Bande zwischen den Eduktbanden. Wiederholung des Versuchs mit auf 4 Tage verlängerter Reaktionszeit liefert allerdings keine höhere Ausbeute dieser Bande und führt zusätzlich zur vollständigen Zersetzung des Molsiebs in eine schleimige Masse.

Stabilitäts- und Spaltungstests mit EMPO in TFA:

0,58 mmol EMPO werden in 5 ml TFA gelöst und für 24 Stunden gerührt. Nach Abtrennen der TFA im Hochvakuum erhält man im zugehörigen ¹H-NMR-Spektrum ausschließlich die Signalsätze von EMPO. Die Wiederholung des Versuchs bei Rührzeiten von 2, 5, 10, 24, 48 und 120 Stunden bringen ebenso wie eine stufenweise Temperaturerhöhung bis zum Rückfluss keine Veränderungen.

Umsetzung von EMPO mit 1,2-Diaminoethan:

1,17 mmol EMPO werden für 3 Stunden in 10 ml 1,2-Diaminoethan gerührt. Da keine Umsetzung in der DC-Kontrolle erkennbar ist, wird der Ansatz sukzessive länger gerührt, bis nach 48 Stunden Rührzeit mit dem Erhitzen angefangen wird. Bis zum Erreichen des Rückflusses ändert sich das Produktbild auch hier nicht. Nach einer Stunde bei 116 °C erhält man jedoch nur noch eine schmierige Bande auf der DC-Platte. Im zugehörigen ¹H-NMR-Spektrum zeigen sich ausschließlich Zersetzungsprodukte.

0,58 mmol EMPO werden in Dioxan gelöst und mit 0,58 mmol 1,2-Diaminoethan versetzt. Nach 2 Stunden Rühren bei Raumtemperatur zeigt sich auf der DC-Platte keine Umsetzung. Der Ansatz wird sukzessive länger gerührt, bis nach 48 Stunden Rührzeit mit dem Erhitzen angefangen wird. Auch nach 2 Stunden Rühren bei Rückfluss ändert sich das Produktbild nicht. Es findet keine

Umsetzung statt. Die Wiederholung des Versuchs mit anderen Lösungsmitteln bringt ebenfalls keine Umsetzung.

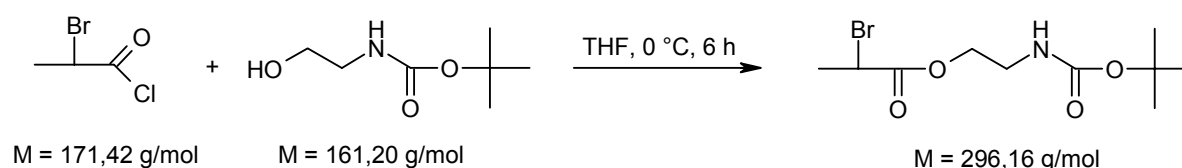
Umsetzungen von EMPO mit verschiedenen Basen zwecks Esterspaltung führen entweder zur Zersetzung des EMPO oder zeigen keine Wirkung!

Base	Rührzeit [h]	Temperatur	Ergebnis
NaOMe	2 / 12	RT	Keine Umsetzung
NaOMe	12 / 12	Rückfluss in THF	Keine Umsetzung
NEt ₃	1	RT	Zersetzung
(iPr) ₂ NEt	1	RT	Zersetzung
DABCO	1	RT	Keine Umsetzung
DBU	2	RT	Keine Umsetzung
TBD	2 / 12 / 24	RT	Keine Umsetzung
TBD	2 / 12 / 24	Rückfluss in THF	Keine Umsetzung

3.4 Synthese von BocAEMPO und AEMPO

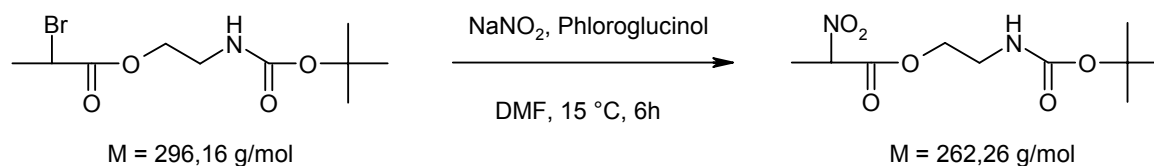
Die Synthese von BocAEMPO verläuft analog zur EMPO-Synthese. Da dort bereits ausreichend die Syntheseschritte diskutiert wurden, wird an dieser Stelle nur der Syntheseweg kurz vorgestellt.

3.4.1 Synthese von 2-Brompropionsäure-2-*tert*-butoxycarbonylamino-ethyl-ester



2-Brompropionylchlorid (292,00 mmol) wird zu einer Lösung von N-Boc-ethanolamin (326,00 mmol) in trockenem THF unter Argonatmosphäre zugetropft. Dabei wird mit Kaliumcarbonat die entstehende Salzsäure abgepuffert, um einer vorzeitige Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppe entgegen zu wirken. Man erhält 2-Brompropionsäure-2-*tert*-butoxycarbonylamino-ethylester als hellgelbes Öl mit 89 % Ausbeute. Die Analytikdaten sind im Experimentellen Teil aufgeführt.

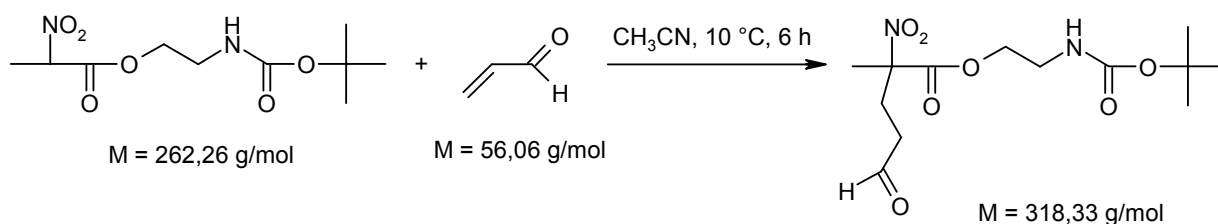
3.4.2 Synthese von 2-Nitropropionsäure-2-*tert*-butoxycarbonylamino-ethyl-ester



Natriumnitrit (289,85 mmol) und Phloroglucinol (586,79 mmol) werden in 250 ml frisch destilliertem DMF unter Argon-Atmosphäre gelöst und auf 0 °C im Eisbad abgekühlt. Dann wird portionsweise 2-Brompropionsäure-2-*tert*-butoxycarbonylamino-ethylester (259,24 mmol) zugegeben. Direkt bei der Zugabe des Esters färbt sich die Reaktionsmischung tief rot. Zur Extraktion des Produkts wird bei der Aufarbeitung auch hier Diethylether benutzt. Aufgrund der

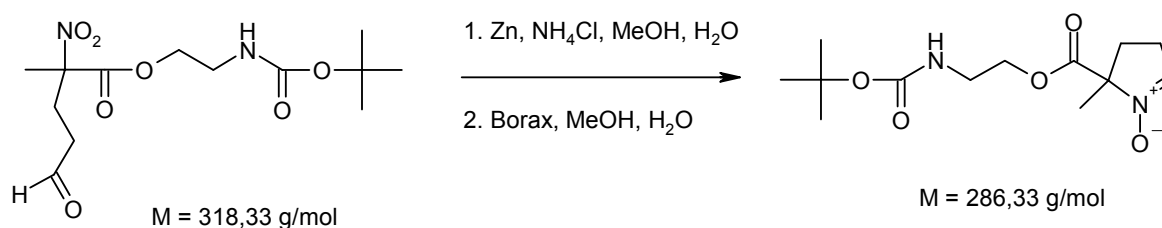
Löslichkeitsproblematik des Phloroglucinols in Diethylether wird genau wie im analogen Reaktionsschritt der EMPO-Synthese verfahren. Man erhält 2-Nitropropionsäure-2-*tert*-butoxycarbonylamino-ethylester als viskoses orangegelbes Öl mit einer Ausbeute von 66,5 %. Die Analytik-Daten sind im Experimentellen Teil aufgeführt.

3.4.3 Synthese von 2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-2-*tert*-butoxycarbonylamino-ethylester



Zu einer Lösung von 2-Nitropropionsäure-2-*tert*-butoxycarbonylamino-ethylester (40,49 mmol) in trockenem Acetonitril gibt man unter Argonatmosphäre bei 10 °C Triethylamin als Katalysator zu, gefolgt von Acrolein (80,18 mmol). Man erhält nach der Aufarbeitung 2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-2-*tert*-butoxycarbonylamino-ethylester als hellgelbes viskoses Öl mit einer Ausbeute von 97 %. Die Analytik-Daten sind im Experimentellen Teil aufgeführt.

3.4.4 Synthese von BocAEMPO als Eintopfreaktion

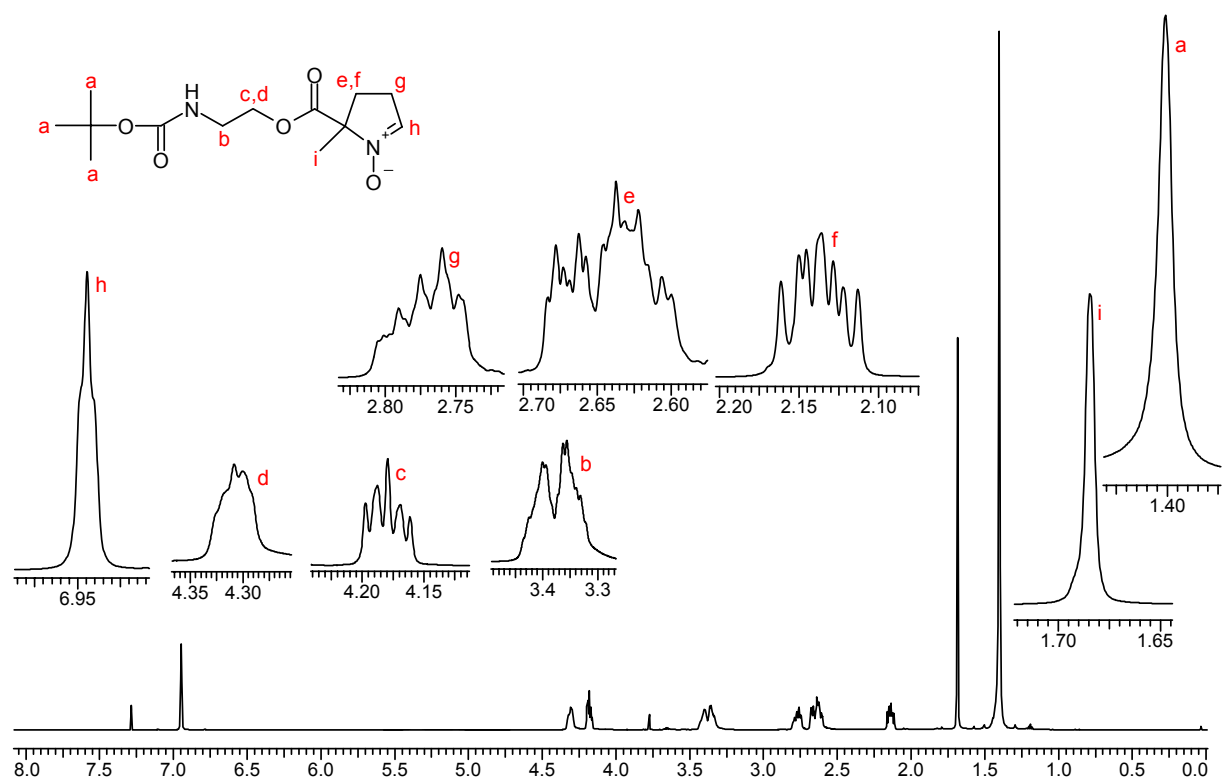


2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-2-*tert*-butoxycarbonylamino-ethylester (7,85 mmol) wird in einer 1 : 1 Mischung aus Methanol und Wasser gelöst und eine wässrige Ammoniumchloridlösung (17,20 mmol) zugefügt. Zu dieser Mischung wird portionsweise Zink-Pulver (64,99 mmol) zugegeben. Schon nach Zugabe der ersten Portion Zink bildet sich auf der Mischung ein hellgrauer Schaum. Analog zur EMPO-Synthese gilt auch hier die Restriktion bezüglich der verwendeten Zinkmenge. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird das überschüssige Zink-Pulver vom

Ansatz abfiltriert und dieser am Rotationsverdampfer eingengt. Dieses Konzentrat wird mit Borax gesättigt. Man erhält nach der Extraktion ein Rohprodukt, das im $^1\text{H-NMR}$ deutlich BocAEMPO-Signalsätze zeigt und zur weiteren Aufreinigung durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 gereinigt wird. Dabei wird zunächst mit einer Mischung aus 7 : 3 Petrolether und Ethanol eine Grobtrennung durchgeführt, gefolgt von einer Feinreinigung mit 1 : 1 Pentan und Ethanol. Das Produkt wird in beiden Durchgängen mit Ethanol vom Kieselgel eluiert.

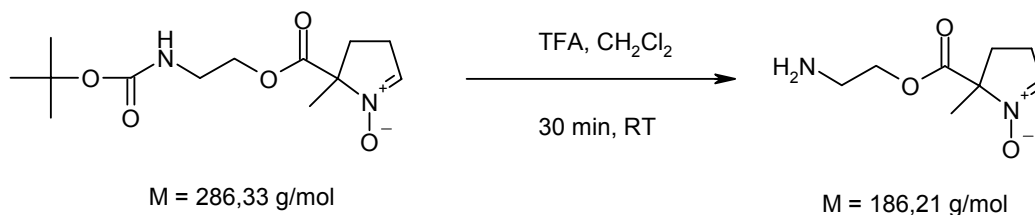
Die Ausbeute beträgt 53 %.

Im Folgenden ist ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von BocAEMPO (600,13 MHz, CDCl_3) abgebildet. Die restlichen Analytikdaten befinden sich im Experimentellen Teil und entsprechen den Erwartungen.



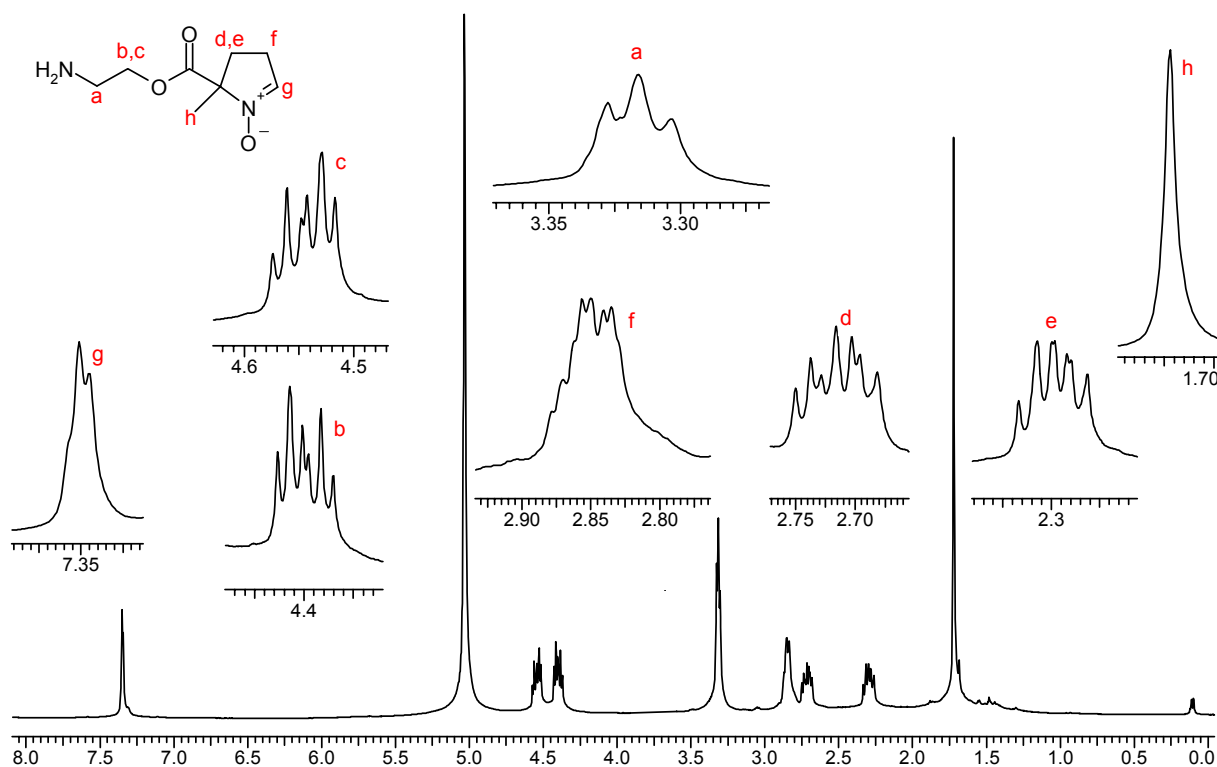
Auch bei BocAEMPO ist das typische Triplet (Signal h) des Doppelbindungs-Protons bei 6,929 ppm mit einer $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstante von 2,35 Hz zu sehen. Ebenso zeigen die Ringprotonen komplexe Multipletts (Signale e, f, g).

3.4.5 Synthese von AEMPO



BocAEMPO (1,01 mmol) wird mit 5 ml trockenem Dichlormethan und trockener Trifluoressigsäure im Verhältnis 1 : 1 für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Direkt nach Zugabe der Trifluoressigsäure zeigt sich eine rege Gasentwicklung. Nach Abschluss der Gasentwicklung entfernt man das Lösungsmittelgemisch im Hochvakuum. Das so erhaltene Triflat-Salz des AEMPO wird in Dichlormethan aufgenommen und mit Polystyrol-gebundenem 1,5,7-Triazabicyclo[4.4.0]-dec-5-en (PL-TBD) für 30 Minuten gerührt. Das PL-TBD wird abfiltriert und das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Man erhält so hochreines AEMPO mit 100 % Ausbeute.

Im Folgenden ist ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von AEMPO (400,13 MHz, CD_3OD) abgebildet. Die restlichen Analytikdaten befinden sich im Experimentellen Teil und entsprechen den Erwartungen.

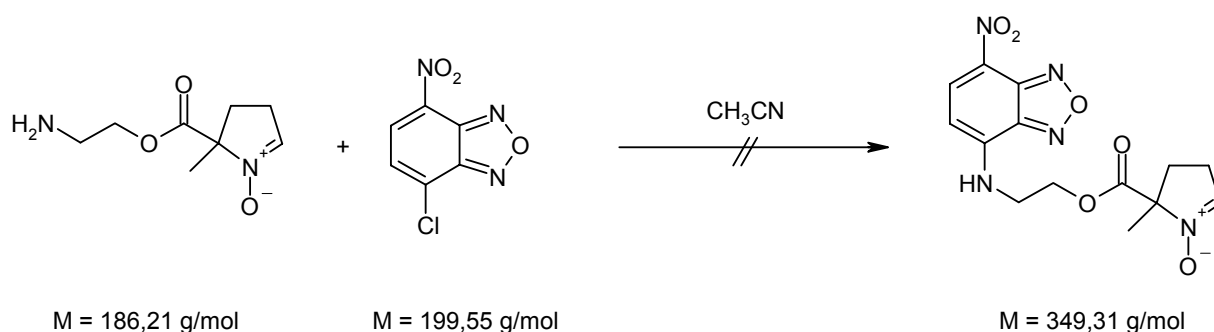


Bei AEMPO ist das typische Triplett (Signal g) des Doppelbindungs-Prottons bei 7,372 ppm nicht vollständig aufgelöst. Als $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstante konnten 2,25 Hz gemessen werden. Die Ringprotonen zeigen auch hier komplexe Multipletts (Signale d, e, f).

3.5 Versuche zur Umsetzung von AEMPO

Analog zu Synthesevorschriften zur Herstellung von NBD-Farbstoffen aus NBD-Chlorid und Aminen (Burr 1975; Summers 1975; Heberer 1985; Uchiyama 1998; Onoda 2002) wurde versucht, AEMPO als Aminkomponente umzusetzen. NBD-markierte Aminosäuren und Proteine werden seit Jahrzehnten erfolgreich in der Analytik verwendet.

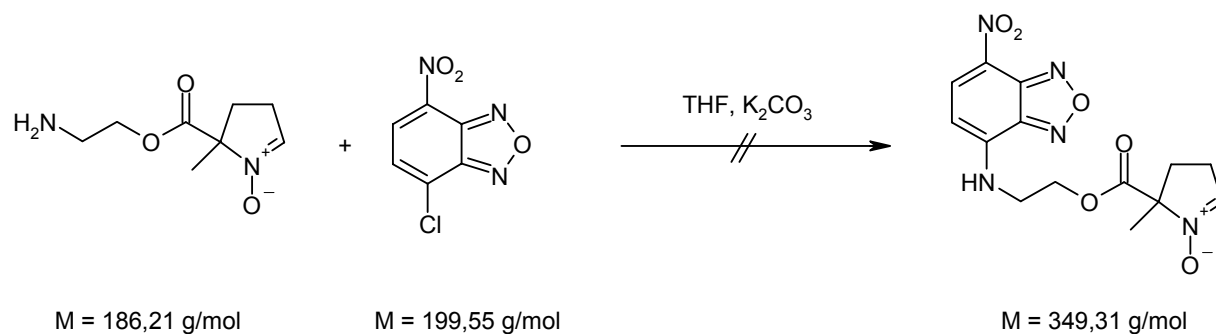
Diese Umsetzungen sollten zunächst in Anlehnung an eine Synthesevorschrift erfolgen, mit der bereits komplexere NBD-Farbstoffe hergestellt wurden (Onoda 2002):



Hierzu werden 3,87 mmol AEMPO in Acetonitril gelöst und eine Lösung von 3,36 mmol NBD-Chlorid in Acetonitril über 10 Minuten zugetropft. Nach 10 Minuten wird die Reaktion durch Entfernen des Lösungsmittels im Hochvakuum gestoppt. Man erhält ein braunes Öl. DC-Versuche zeigen mehrere Banden, die teilweise gelb sind und fluoreszieren. Eine Säulenchromatographie mit 1 : 1 Acetonitril und Wasser auf einer RP18-Säule liefert 3 Fraktionen, deren $^1\text{H-NMR}$ -Spektren jedoch nur Zersetzungsprodukte des Nitrons zeigen.

Wiederholungen des Versuchs mit anderen stationären Phasen (Al_2O_3 , Kieselgel 60) und anderen Lösungsmittelgemischen brachten ebenfalls keine Ergebnisse.

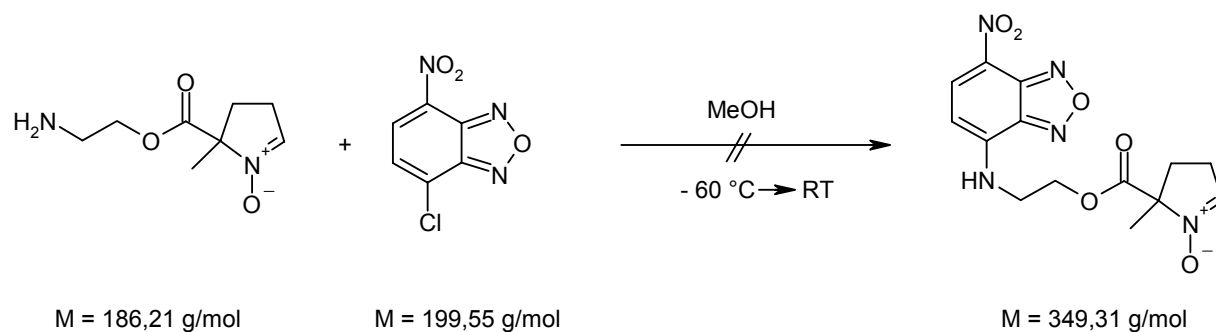
Um eine Umsetzung zu erleichtern, wurde daher in einem weiteren Versuch die Zugabe von verschiedenen Basen erprobt (Xia 2001). Ziel war es, die Protonierung des Amins durch freiwerdende Salzsäure zu verhindern. Dabei muss jedoch die Base so gewählt werden, dass eine Umsetzung mit dem NBD-Chlorid sowie die Zersetzung des Nitrons ausgeschlossen werden kann.



0,38 mmol AEMPO, gelöst in trockenem THF, werden auf 0 °C gekühlt, mit 0,38 mmol Kaliumcarbonat und 0,38 mmol NBD-Chlorid-Lösung in THF versetzt und für 30 Minuten bei 0 °C gerührt. Da augenscheinlich keine Umsetzung stattfindet, wird der Ansatz auf Raumtemperatur erwärmt und 30 Minuten gerührt, schließlich auf 50 °C erwärmt und für 30 Minuten gerührt. Die Lösung färbt sich dabei orange. DC-Versuche zeigen mehrere Banden, die teilweise gelb sind und fluoreszieren. Die Säulenchromatographie mit 4 : 1 Pentan und Aceton auf einer Kieselgel 60-Säule liefert 2 Fraktionen, deren ¹H-NMR-Spektren jedoch nur Zersetzungsprodukte des Nitrons zeigen.

Wiederholungen des Versuchs unter Zugabe von anderen Basen (*i*Pr₂EtN, Et₃N, DABCO, DBU, TBD, Borax, NaOMe) bringen bei gleicher Variation der Rührzeiten und Temperaturen ebenfalls keine Ergebnisse. Als Besonderheit: PL-TBD reagiert selektiv mit NBD-Chlorid ab, wodurch bei einer Umsetzung mit PL-TBD-Überschuss alles AEMPO zurückgewonnen werden konnte.

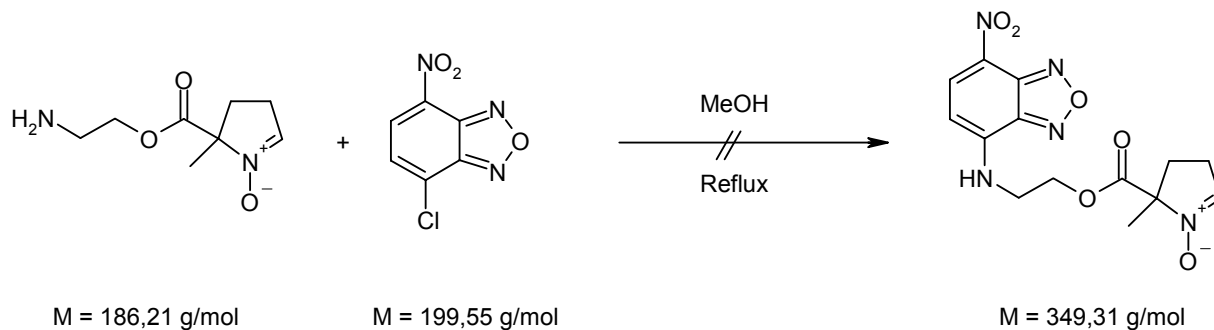
Auch ein Kopplungsversuch bei tiefer Temperatur brachte keine Verbesserung. Ziel war es, durch die Temperaturkontrolle die Reaktion soweit zu verlangsamen, dass die Bildung der unerwünschten Produkte ausbleibt.



Daher wurden 0,62 mmol AEMPO in Methanol gelöst und auf -60 °C abgekühlt. Nach Zutropfen von 0,59 mmol NBD-Chlorid in Methanol wird der Ansatz auf Raumtemperatur aufgetaut. Die hellgelbe Lösung zeigt auch bei der DC-Kontrolle keinerlei Umsetzung. Diese erfolgt erst bei Temperaturen > 20 °C, was sich auch in einer Zunahme der Färbung in Richtung orange-rot

bemerkbar macht. Nach 12 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird die nun tiefrote Lösung auf einer DC-Platte aufgetrennt und liefert 4 teilweise fluoreszierende Banden. Die Auftrennung des Ansatz auf Kieselgel 60 mit 1 : 1 Pentan und Ethanol liefert 4 Fraktionen, die alle in den zugehörigen $^1\text{H-NMR}$ -Spektren Zersetzungsprodukte des Nitrons zeigen.

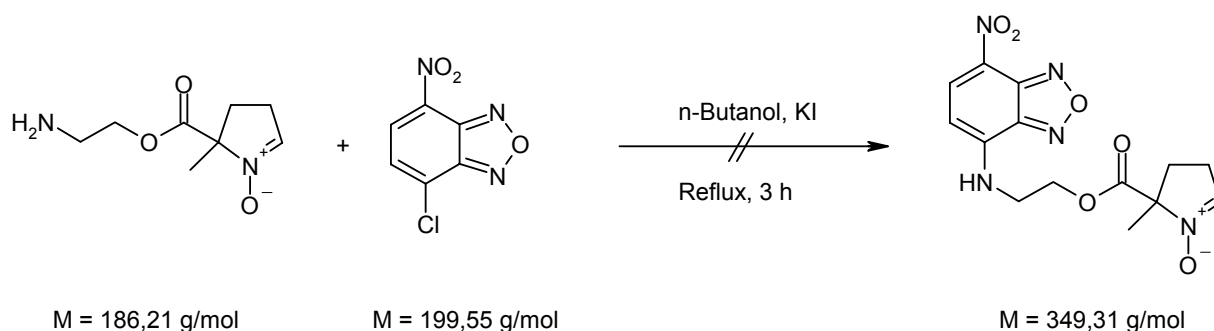
Als weitere Alternative wurde ausprobiert, ob eine *in situ*-Erzeugung des AEMPO erfolgreich sein würde.



Hierbei werden 0,37 mmol BocAEMPO zusammen mit 0,37 mmol NBD-Chlorid in trockenem Methanol gelöst und zum Rückfluss erhitzt. Bei Erreichen des Rückfluss werden tropfenweise 1 ml trockene Trifluoressigsäure zugegeben. Sofort bei Zugabebeginn färbt sich der Ansatz dunkelrot. DC-Kontrolle über 50 Stunden Reaktionszeit hinweg zeigt die Bildung mehrerer Banden, von der eine dominiert und auch fluoresziert. Die Trennung des Ansatz auf Kieselgel 60 mit 1 : 1 Pentan und Ethanol ergibt 5 Fraktionen deren $^1\text{H-NMR}$ -Spektren jedoch nur Zersetzungsprodukte des Nitrons zeigen.

Wiederholungen des Versuch mit kürzeren Reaktionszeiten, niedrigeren Temperaturen sowie als Variante mit Ethanol als Lösungsmittel bringen die selben Resultate.

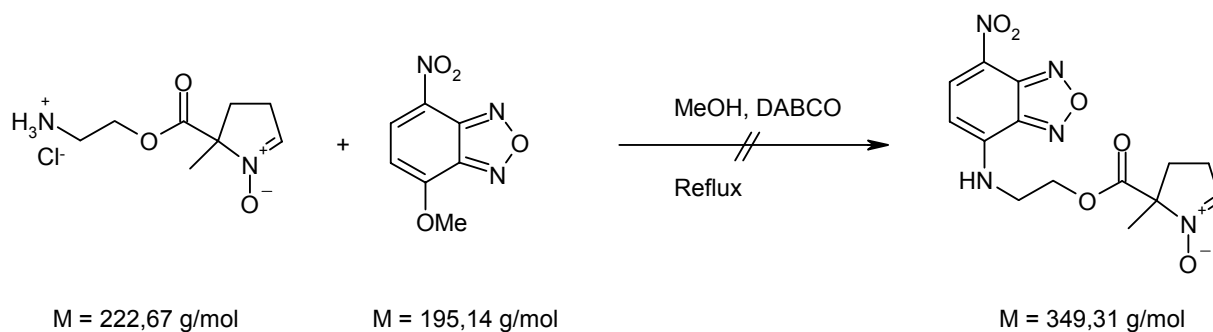
Als weitere Variante wurde versucht, die Umsetzung unter Argonatmosphäre in n-Butanol als Lösungsmittel mit katalytischen Mengen Kaliumiodid durchzuführen (Bakthavachalam 1991).



Dabei werden 1,10 mmol AEMPO zusammen mit 1,10 mmol NDB-Chlorid in n-Butanol gelöst und mit 5,0 mg Kaliumiodid versetzt. Der Ansatz wird für 3 Stunden unter Argonatmosphäre zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird Diethylether zugegeben und die tiefrote Lösung über Nacht bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Es entsteht ein Niederschlag, der abfiltriert und mit Diethylether gewaschen wird. Der Durchfluss wird einrotiert und wie der Niederschlag im Hochvakuum getrocknet. $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der beiden Fraktion zeigen jedoch nur Zersetzungsprodukte.

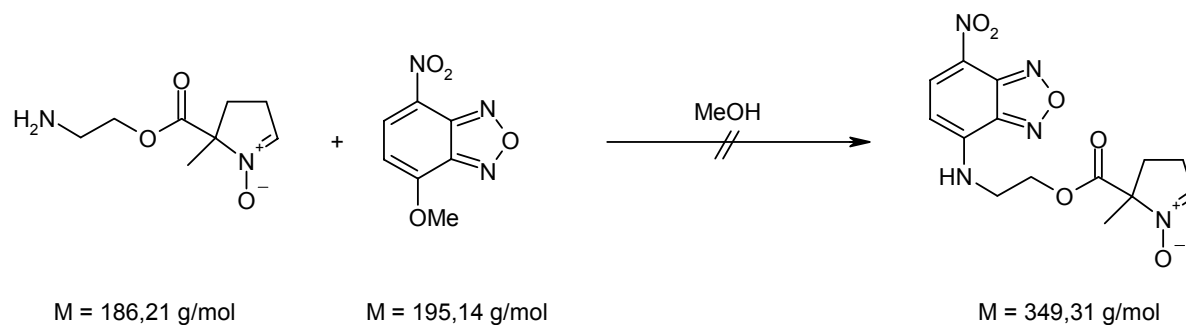
Da diese Methoden allesamt nicht erfolgreich waren, wurde versucht analog der Variante 2 der NBD-Farbstoffsynthese vorzugehen und das Hydrochlorid des AEMPO einzusetzen.

Bei dieser Methode wird durch Zutropfen von Base zum AEMPO-Hydrochlorid die stationäre Konzentration des freienamins niedrig gehalten, wodurch die Selektivität der Reaktion steigt (Heberer 1985).



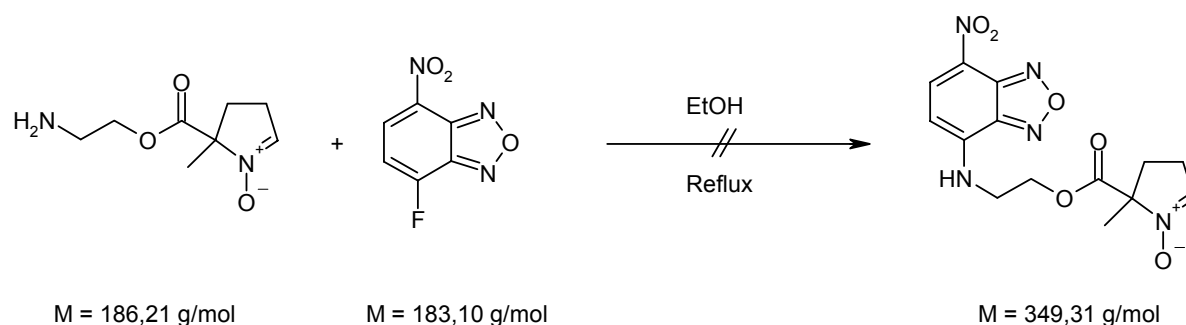
Hierzu werden 1,80 mmol NBD-Chlorid in Methanol gelöst, 1,80 mmol AEMPO-Hydrochlorid zugegeben und zum Rückfluss erhitzt. Dann wird tropfenweise eine Lösung von DABCO in Wasser zugetropft. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der Ansatz auf Eis abgekühlt. DC-Kontrolle zeigt drei Banden an. Nach Auftrennung der Banden auf Kieselgel 60 mit 1 : 1 Pentan und Ethanol werden die Fraktionen im $^1\text{H-NMR}$ untersucht. Alle zeigen nur Zersetzungsprodukte des Nitrons.

Da in der Literatur (Heberer 1985) die mangelnde Spezifität des NBD-Chlorids als mögliche Fehlerquelle bei der Umsetzung mit primären Aminen diskutiert wird, wurde versucht mit dem unreaktiveren, aber gegenüber primären Aminen als selektiver beschriebenen 4-Methoxy-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol) eine Umsetzung zu erreichen (Heberer 1985).



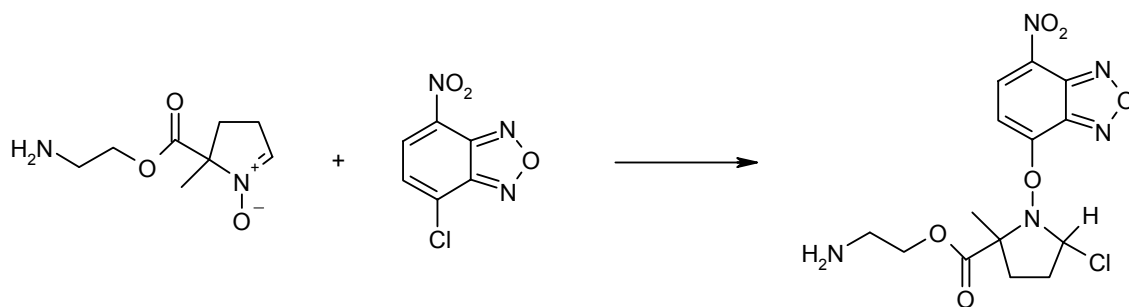
Die Umsetzung von 1,58 mmol AEMPO in trockenem Methanol mit 1,58 mmol 4-Methoxy-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol) führt, über 48 Stunden hinweg unter regelmäßiger DC-Kontrolle gerührt, nicht zur Reaktion. Daher wird der Ansatz für 36 Stunden zum Rückfluss erhitzt. DC-Versuche zeigen mehrere Banden, die teilweise gelb sind und fluoreszieren. Die Säulenchromatographie mit 9 : 1 Dichlormethan und Methanol auf einer Kieselgel 60-Säule liefert 2 Fraktionen, deren $^1\text{H-NMR}$ -Spektren jedoch nur Zersetzungsprodukte des Nitrons zeigen. Wiederholungen des Versuchs unter Zugabe von Basen (K_2CO_3 , $i\text{Pr}_2\text{EtN}$, Et_3N , DABCO, DBU, TBD) bringen bei gleicher Variation der Rührzeiten und Temperaturen ebenfalls kein Ergebnis.

Eine weitere Alternative zum NBD-Chlorid stellt das wesentlich reaktivere Fluor-Derivat dar.



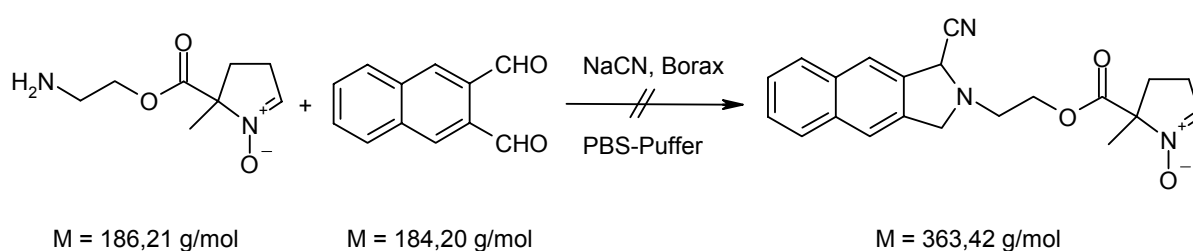
In Anlehnung an Literaturvorschriften (Heberer 1985; Uchiyama 1998) werden 0,41 mmol NBD-Fluorid in trockenem Ethanol gelöst und bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre eine Lösung von 0,42 mmol AEMPO in Ethanol zugegeben. Der Ansatz wird für 15 Minuten zum Rückfluss erhitzt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Eine DC-Kontrolle des Produkts liefert 6 gelbe fluoreszierende Banden. Die Auftrennung des Ansatz auf Kieselgel 60 mit 1 : 1 Dichlormethan und Ethanol liefert 6 Fraktionen, die alle nur in $^1\text{H-NMR}$ -Spektren Zersetzungsprodukte des Nitrons zeigen.

Als Ursache für das Scheitern der Umsetzungen mit NBD-Derivaten dürfte die Reaktion des Nitrons als Sauerstoff-Nucleophil verantwortlich sein. Aus der Literatur ist seit langem bekannt, dass Nitrone mit einer Vielzahl von Substraten sowohl als Kohlenstoff- als auch als Sauerstoff-Nucleophil reagieren (Breuer 1989; Grigor'ev 2000; Lombardo 2000). Im vorliegenden Fall liegt nahe, dass sich die NBD-Derivate gemäß ihrer Reaktivität in einer nucleophilen Substitutionsreaktion umsetzen, dabei tritt jedoch das negativ geladene Sauerstoff-Atom der Nitrongruppierung an die Stelle der Aminogruppe mit ihrem freien Elektronenpaar :



Da auch mit der getesteten Vielzahl und Vielfalt der Synthesevorschriften keine Umsetzung des AEMPO mit den NBD-Derivaten erreicht werden konnte, wurde in einem nächsten Syntheseversuch Naphthalen-2,3-dicarboxyaldehyd (NDA) als Reagenz verwendet. Dieses wird seit den 1980er Jahren zur Markierung von Aminosäuren und Proteinen verwendet.

Analog zu Literaturvorschriften (Carlson 1986; de Montigny 1987; Oates 1989; Ueda 1991) wurde AEMPO in einem Borax-Puffer wie folgt umgesetzt:



0,35 mmol AEMPO werden in PBS-Puffer gelöst, mit einer 0,1 M Borax-Lösung versetzt und dann 0,52 mmol NDA, gelöst in Methanol, sowie 0,71 mmol Natriumcyanid, gelöst in Wasser, zugegeben. Der Ansatz wird bei Raumtemperatur gerührt. Die gelbe Suspension färbt sich dabei über rot-braun innerhalb von 30 Minuten fast schwarz. Nach Extraktion mit Chloroform zeigt ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, dass das NDA nicht vollständig umgesetzt wurde.

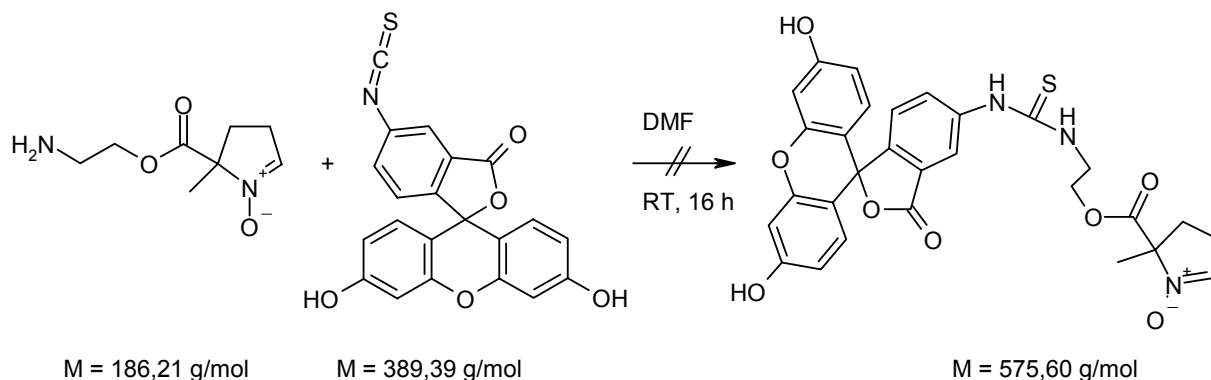
Die gleiche Ansatzgröße wird daraufhin nach obiger Vorschrift zusammengegeben und für 24 Stunden auf 60 °C erhitzt. Nach der Extraktion mit Chloroform zeigt eine DC-Kontrolle vier

verschiedenfarbig fluoreszierende Banden. Die Trennung des Extrakts auf Kieselgel 60 mit einem Gradienten aus Dichlormethan und Pentan (1 : 9 → 1 : 1) gefolgt von reinem Dichlormethan und Ethanol ergibt vier Fraktionen, deren $^1\text{H-NMR}$ -Spektren jedoch nur Zersetzungsprodukte des Nitrons zeigen, wenn gleich auch NDA-Farbstoffe entstanden sind.

In diesem Zusammenhang sind vermutlich dieselben Prozesse abgelaufen, die bereits bei den Umesterungsversuchen von EMPO mit Kaliumcyanid als Base zur Zersetzung geführt haben. Die Hoffnung, mit dem bei der Synthese der zyklischen Nitronen verwendeten, und daher erwiesenermaßen verträglichen, Borax-Puffer dieses zu unterbinden, wurde nicht erfüllt.

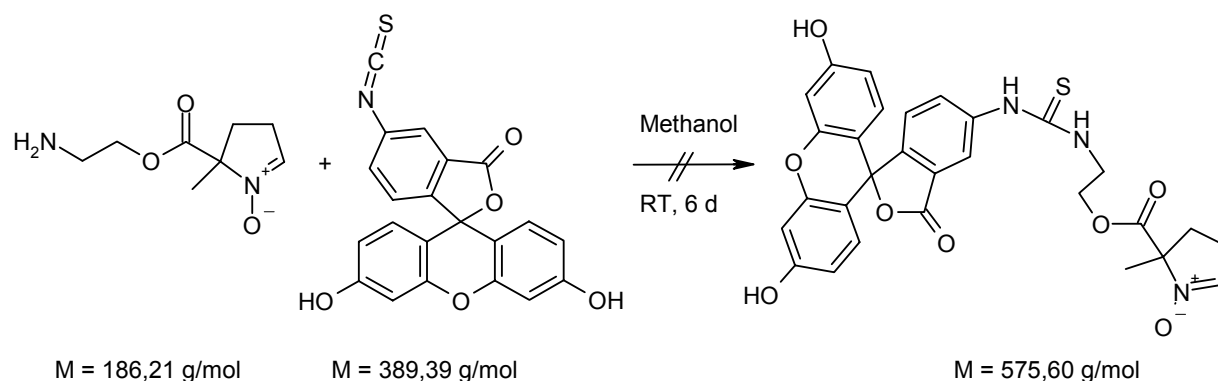
In einer weiteren Versuchsreihe sollte dann die Umsetzung mit Fluorescein-isothiocyanat (FITC) getestet werden. Bei dieser Methode entstehen Thioharnstoffderivate aus der Reaktion des Aminoendes einer Komponente mit der Isothiocyanatgruppe des Fluoresceins. Diese Methode wird, ebenso wie die bereits oben Beschriebenen, seit Jahrzehnten zur Markierung von Aminosäuren und Proteinen benutzt.

In einem ersten Kopplungsversuch wurde analog zur Literaturvorschrift (Bradshaw 1994) verfahren:



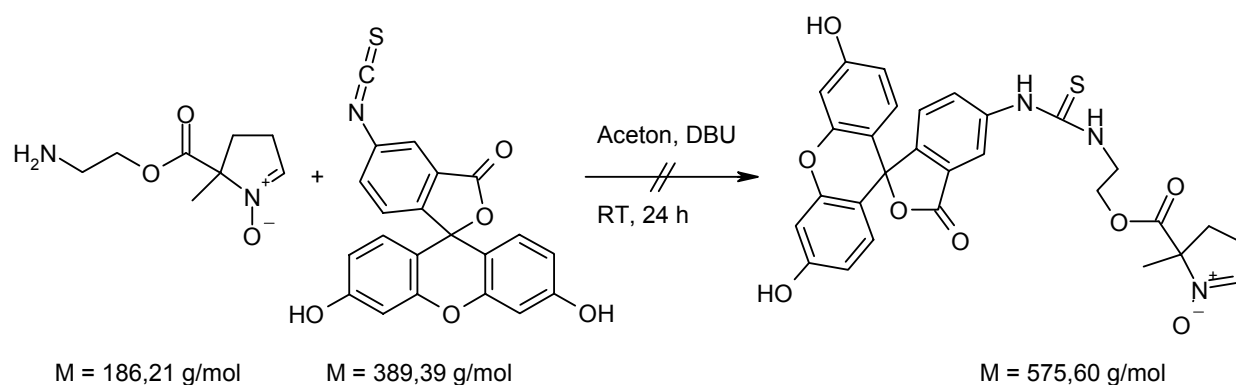
0,61 mmol AEMPO werden zusammen mit 0,61 mmol FITC in DMF unter Argonatmosphäre für 16 Stunden unter Lichtausschluss gerührt. Die DC-Kontrolle zeigt keine Fluoreszenzbande außer der des FITC. Nach Verlängerung der Rührzeit auf 48 Stunden bildet sich ein orangener Niederschlag. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Niederschlag im Hochvakuum getrocknet. Ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt jedoch nur Zersetzungsprodukte des Nitrons, wenn gleich auch Fluorescein-Derivate vorhanden sind.

In einer weiteren Variante wurde darauf hin versucht eine Umsetzung in Methanol zu erreichen:



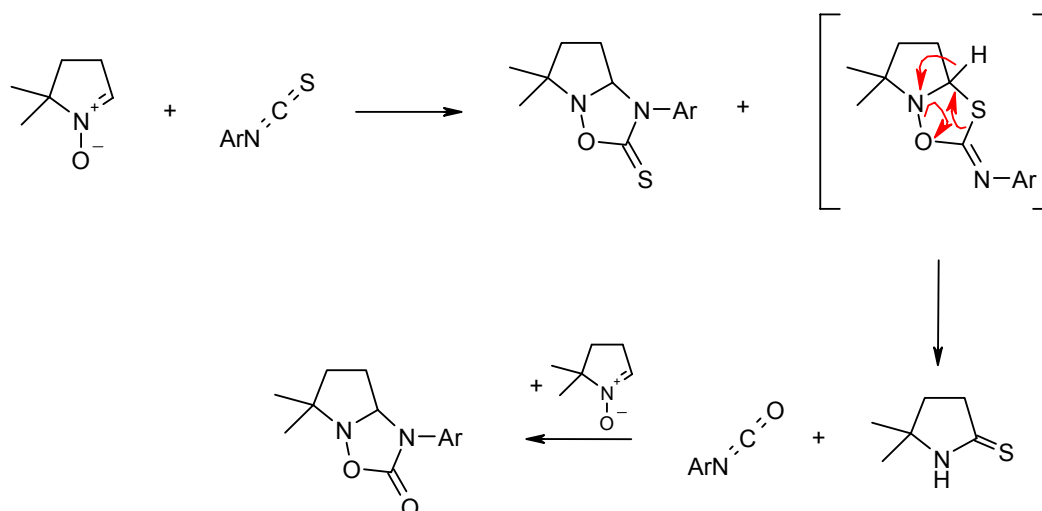
Hierbei werden 0,60 mmol AEMPO mit 0,60 mmol FITC in Methanol gelöst und für insgesamt 16 Stunden bei Raumtemperatur unter ständiger DC-Kontrolle gerührt. Da keine Umsetzung zu erkennen ist, wird die Rührzeit auf insgesamt 6 Tage verlängert. Nach dieser Zeit sind auf der DC-Platte zwei orange leuchtende, fluoreszierende Banden zu erkennen. Eine Auftrennung auf Kieselgel 60 mit 1 : 1 Pentan und Ethanol liefert zwei Fraktionen. $^1\text{H-NMR}$ -Spektren zeigen jedoch nur Fluorescein-Derivate, ohne jedoch Nitronsignale aufzuweisen.

Eine alternative Methode stellt die Umsetzung in Aceton unter basischer Pufferung dar (Miller 1988; Britz-Mckibbin 1999). Hierbei wurde jedoch auf den Einsatz eines wässrigen Natriumcarbonat-Puffers aufgrund schlechter Erfahrungen mit der Verträglichkeit gegenüber dem Nitron verzichtet und stattdessen DBU als Base eingesetzt:



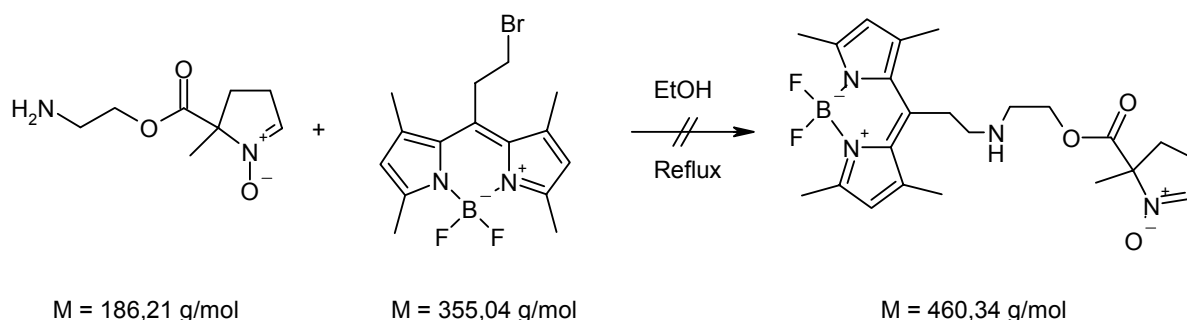
0,32 mmol AEMPO werden zusammen mit 0,32 mmol FITC und DBU in Aceton gelöst und bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert, mit Diethylether und Aceton gewaschen und mit Methanol gelöst. Ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Probe zeigt jedoch auch hier nur FITC-Signale.

Verantwortlich für die erhaltenen Ergebnisse mit FITC ist eine unerwünschte Reaktion des Nitrons. So setzt sich augenscheinlich nicht die Amino-Gruppe des AEMPO mit dem Isothiocyanat um, sondern direkt die Nitronstruktur. Diese Reaktivität ist in der Literatur gut dokumentiert (Black 1973; Black 1978; Zinner 1979; Breuer 1989). Es kommt dabei mit aromatischen Isothiocyanaten zu folgender Reaktion:



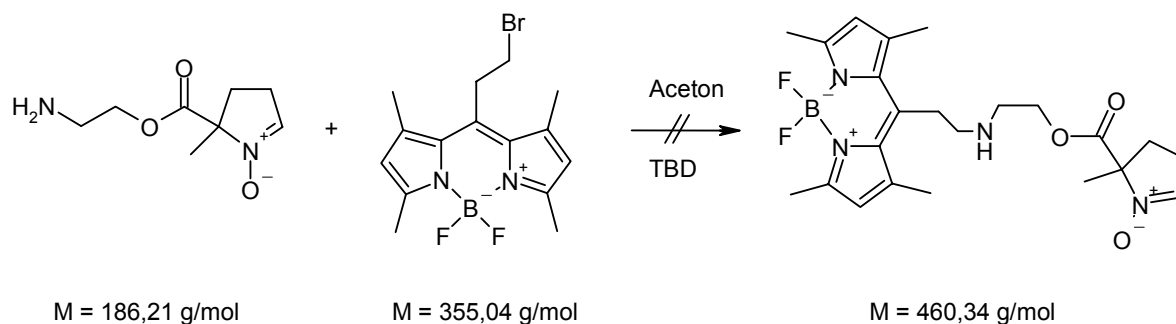
Diese Reaktionsfolge erklärt die Beobachtung, dass im NMR nur FITC-Signale zu erkennen sind, das Nitron jedoch nicht intakt vorliegt.

Als weiterer Farbstofftyp kamen BODIPY-Derivate zum Einsatz. Diese wurden erstmals 1968 synthetisiert (Treibs 1968) und finden seitdem eine breite Anwendung in verschiedenen Anwendungsbereichen (Chen 2000; Kálai 2003; Gabe 2004; Basaric 2005; Golovkova 2005).

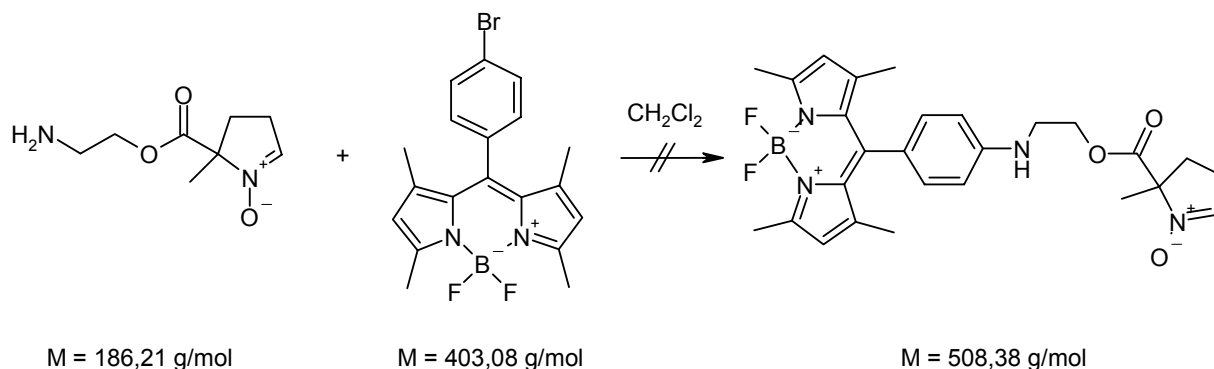


1,02 mmol AEMPO werden zusammen mit 0,51 mmol 8-(2-Bromethyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacene (BE-BODIPY) in Ethanol gelöst und 26,00 μl DBU als Base zugegeben. Der Ansatz wird unter Argon-Atmosphäre für 2 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach der Aufarbeitung wird ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum gemessen. Es zeigt nur Zersetzungsprodukte.

Eine analoge Versuchsdurchführung mit DMF als Lösungsmittel bei 100 °C liefert auch hier nur Zersetzungsprodukte. Diese bilden auch bei diesem Versuch auf der DC-Platte 8 Banden aus, deren Farbspektrum von gelb-grün über orange, rotviolett, grün bis hin zu braun und schwarz reicht.

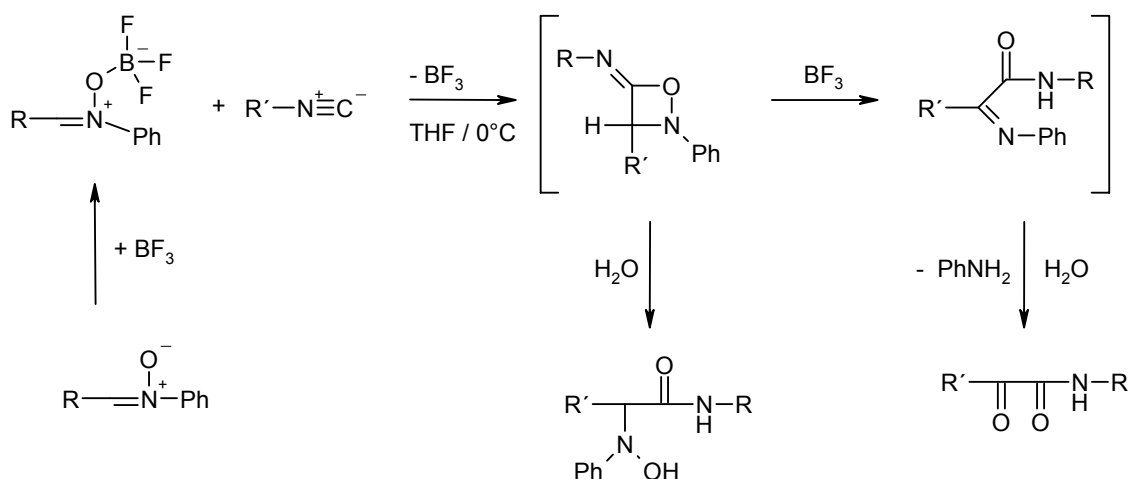


0,99 mmol AEMPO werden zusammen mit 0,33 mmol BE-BODIPY in 20 ml Aceton gelöst und mit 120 mg TBD versetzt. Der Ansatz wird für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Da eine DC-Kontrolle keine Umsetzung zeigt, wird zum Rückfluss erhitzt. Die DC-Kontrolle zeigt daraufhin eine Bande an. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels im Hochvakuum zeigen sich jedoch im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Ansatzes nur Zersetzungsprodukte.



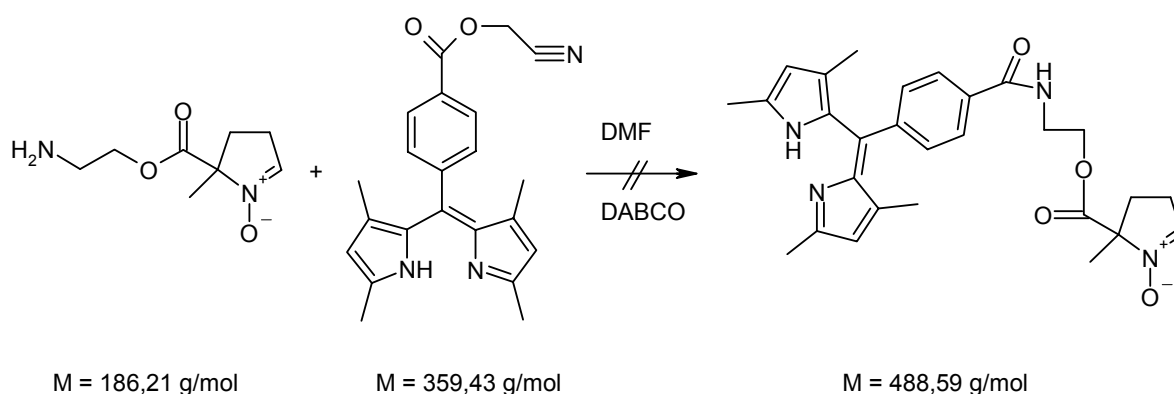
0,11 mmol AEMPO werden in Dichlormethan gelöst und mit 0,11 mmol 8-(4-Bromphenyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (BP-BODIPY) versetzt. Der Ansatz wird bei Raumtemperatur unter DC-Kontrolle für 24 Stunden gerührt. Da keine Umsetzung erfolgt, werden 0,11 mmol $i\text{Pr}_2\text{EtN}$ als Base zugegeben und für 2 Stunden unter DC-Kontrolle weitergerührt. Da erneut keine Umsetzung erfolgt, wird anschließend unter DC-Kontrolle für 24 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Auch hier ist keine Umsetzung zu erkennen, was durch die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren bestätigt wird.

Das Scheitern dieser Versuche kann viele Ursachen haben, da die eingesetzten BODIPY-Systeme eine Vielzahl denkbarer Reaktionen eingehen können. Zunächst ist erstaunlich, dass es mit den aliphatischen Brom-BODIPYs überhaupt zur Zersetzung kommt. Aus sterischen Gründen wäre eher zu erwarten, dass keine Umsetzung zustande kommt, da das BODIPY-System selbst seine reaktive Seitenkette durch die Methylreste abschirmt. Bei der Zersetzung könnte eventuell die Bor-Brücke eine Rolle spielen, da bekannt ist, dass Nitronen mit BF_3 Komplexe ausbilden, die dann ihrerseits durch eine stärkere Polarisierung der Nitron Gruppe leicht weiterreagieren (Zeeh 1969):



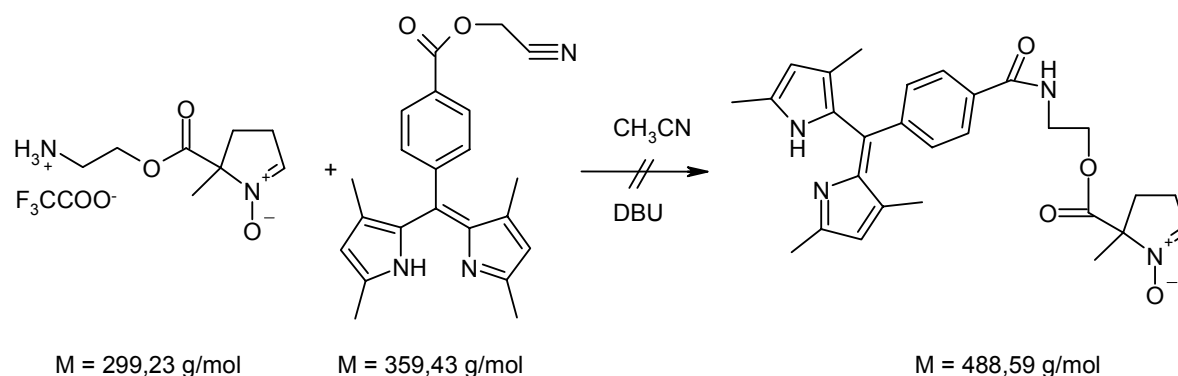
Insbesondere bei höheren Temperaturen ist eine analoge Reaktion im ersten Schritt denkbar, da dann möglicherweise die Nitron-Gruppe die Bor-Brücke aufbrechen kann. Das so „geöffnete“ Indacensystem kann dann eventuell mit seinen Ring-Stickstoffatomen intramolekular oder mit einem weiteren Äquivalent des Nitrons weiterreagieren (Aurich 1981).

Versuche zur Umsetzung von AEMPO mit einem Cyanomethylester-Derivat einer BODIPY-Vorstufe verliefen ebenfalls erfolglos:



0,64 mmol AEMPO werden mit 0,64 mmol Cyanomethyl-4-[(Z)-(3,5-dimethyl-1*H*-pyrrol-2-yl)(3,5-dimethyl-2*H*-pyrrol-2-yliden)methyl]benzoat in DMF gelöst und mit 10mol% DABCO als Katalysator versetzt. Der Ansatz wird für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die DC-Kontrolle zeigt keine Umsetzung. Das Erhitzen auf 100 °C für 2 Stunden führt jedoch zur Zersetzung, wie ein ¹H-NMR-Spektrum bestätigt.

Ein weiterer Versuch wurde in Acetonitril als Lösungsmittel unternommen:

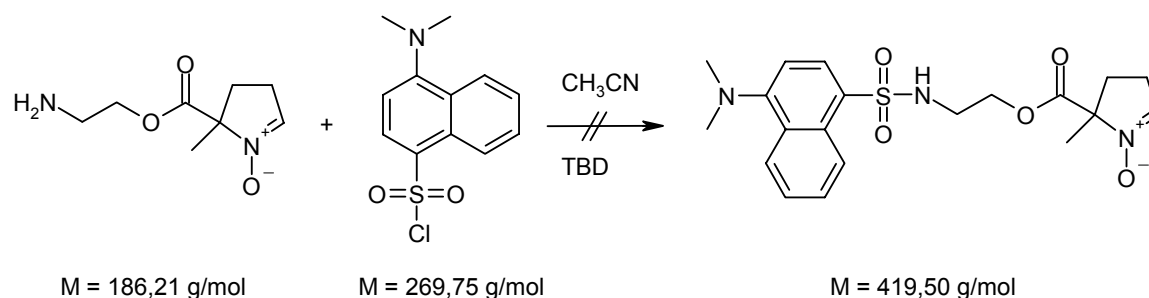


0,43 mmol BocAEMPO werden mit TFA in Dichlormethan entschützt. Nach Abziehen der Lösungsmittel-TFA-Mischung im Hochvakuum wird der Ansatz in Acetonitril aufgenommen, 64,50 μl DBU als Base zugegeben und 0,43 mmol Cyanomethyl-4-[(Z)-(3,5-dimethyl-1*H*-pyrrol-2-yl)(3,5-dimethyl-2*H*-pyrrol-2-yliden)methyl]benzoat zugegeben. Nach 18 Stunden bei Raumtemperatur wird per DC der Umsatz kontrolliert. Da zwei neue Banden detektiert werden, wird der Ansatz auf Kieselgel 60 mit 1 : 1 Pentan und Ethanol getrennt. Die ¹H-NMR-Spektren dieser Banden zeigen jedoch nur Zersetzungsprodukte.

Eine Wiederholung des Versuchs mit TBD als Base führt zu exakt gleichen Ergebnissen. Ebenso führt ein Ansatz mit TBD als Base bei einer Stunde Rückfluss in Acetonitril nur zu Zersetzungsprodukten.

Grund für diesen Reaktionsverlauf ist die Umsetzung der Nitronstruktur mit dem aktivierten Ester. Die hierbei ablaufenden Reaktionen sind weiter unten für die Umsetzung mit Säurechloriden beschrieben und können in ähnlicher Form auch auf den stark aktivierten Cyanomethylester übertragen werden. Als weitere Variante ist hier auch die Umsetzung des Indacensystems mit der Nitronstruktur denkbar, zumal im BODIPY-Vorläufer noch keine Borbrücke die reaktiven Stickstoffe blockiert (Aurich 1981).

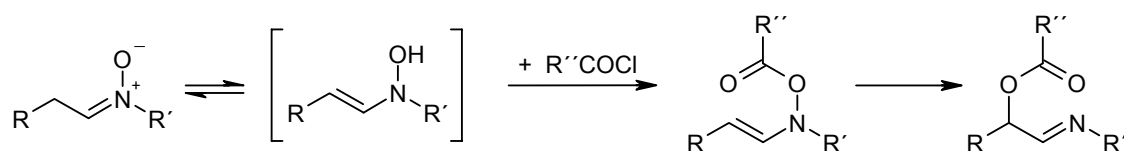
Als letzter Kopplungspartner wurde Dansyl-Chlorid getestet. Dieses wird, wie die anderen Farbstoffe auch, seit Jahrzehnten als Fluoreszenzlabel für Aminosäuren, Peptide, Proteine und Amino-funktionalisierte Moleküle verwendet (Gros 1969; Burr 1975; Kálai 1998). Hierbei reagiert es auch mit stark funktionalisierten Reaktionspartnern wie Uracil, Thymin oder Spinlabelverbindungen selektiv und mit guten Ausbeuten ab.



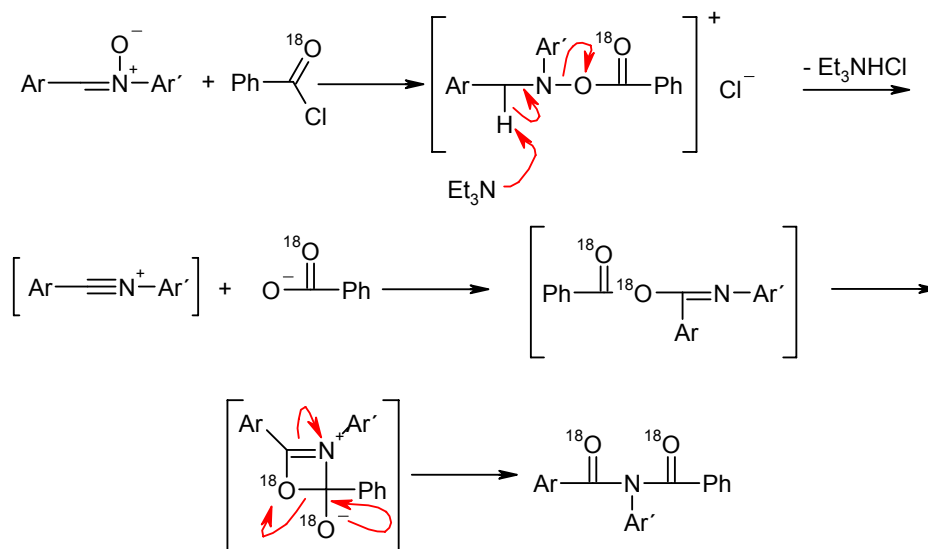
0,80 mmol AEMPO werden zusammen mit 0,80 mmol Dansyl-Chlorid in Acetonitril gelöst, mit TBD versetzt und für 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der Ansatz auf Kieselgel 60 mit 2 : 8 Pentan und Ethanol aufgetrennt. Man erhält eine hellgelbe, bläulich fluoreszierende Fraktion. Das zugehörige $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt jedoch nur Signalsätze des Dansyl-Systems.

Ein analog durchgeführter Versuch ohne TBD-Zugabe führt direkt zur Bildung eines Niederschlags. Das zugehörige $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt nur Signalsätze des Dansyl-Systems.

Als mögliche Erklärung für dieses Ergebnis kann hier eine Reaktion des Nitrons mit dem Säurechlorid dienen. So reagieren Nitrene mit Carbonsäurechloriden in einer Acylierungs-Umlagerungsreaktion zu α -Acyloxyimininen nach folgendem Schema (Cummins 1983):

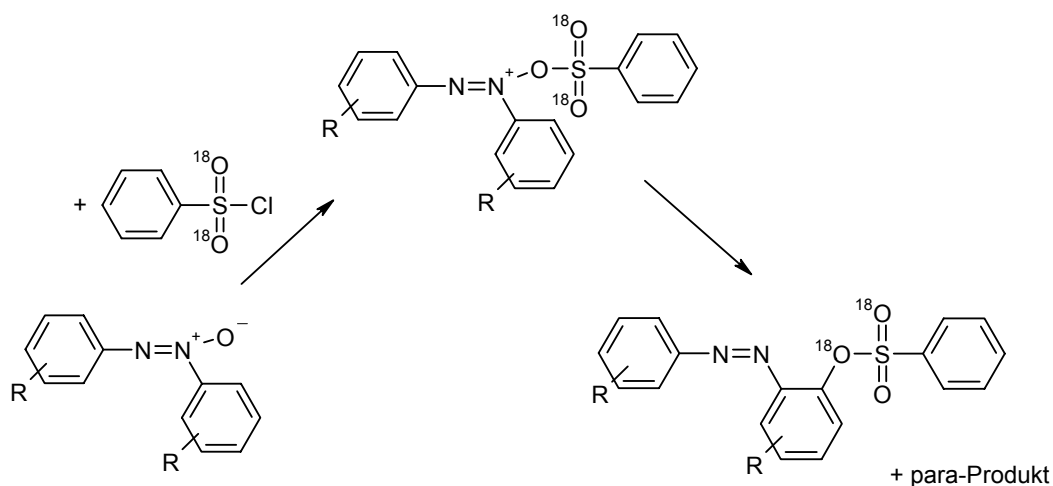


Für den Fall, dass die Reste des Nitrons Arylsysteme sind, kommt es unter Basenkatalyse zu einem anderen Verlauf, da die Umlagerung nicht wie oben stattfinden kann (Heine 1982). Man erhält durch die Bildung eines Nitriliumions und eines Benzoessäureions eine Zwischenstufe, die dann in einer Mumm-Umlagerung zu $\text{N,N}'$ -Diacylaminen nach folgendem Schema führt:

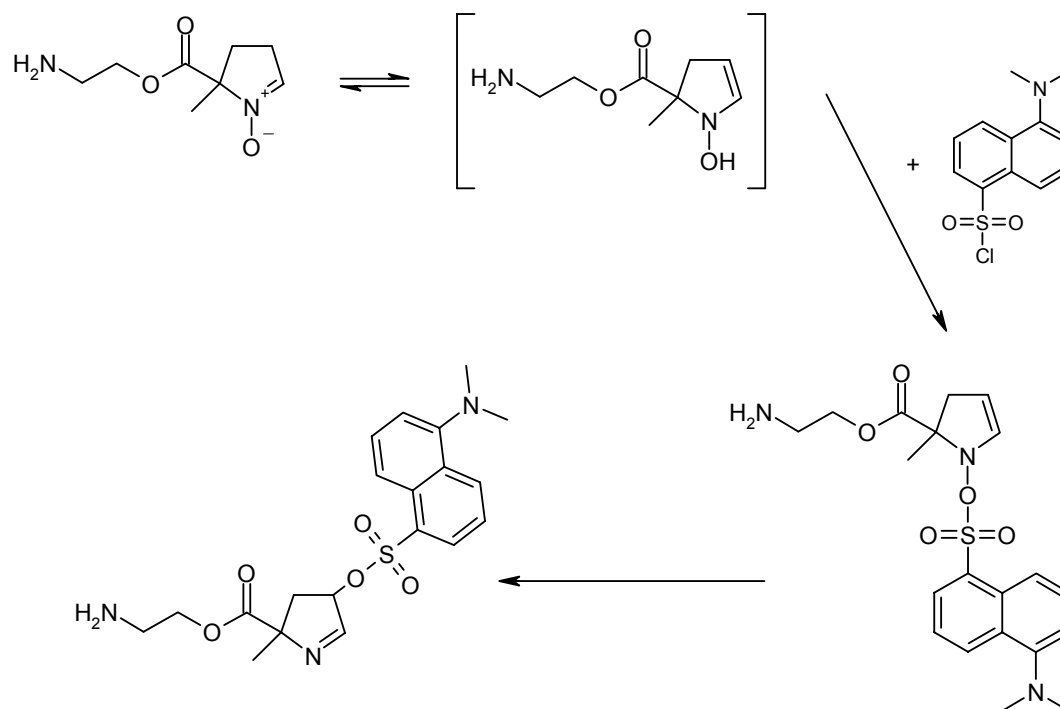


Die Bildung des Benzoesäureions lässt sich dabei durch ^{18}O -Markierung bestätigen. In der Folge erhält man so das ^{18}O -Isotop in beiden möglichen Positionen, was im Formelbild durch doppelte ^{18}O -Beschriftung angedeutet wird.

Ein anderer Reaktionsverlauf ist für die Umsetzung von $\text{N,N}'$ -Diaryldiazoxy-Verbindungen dokumentiert. Hierbei kommt es bei der Umsetzung mit Benzolsulfonsäurechlorid (Liotta 1974), zur Bildung ortho- und para-substituierter Produkte, wobei ebenfalls durch ^{18}O -Markierung der Mechanismus bestätigt wurde:



Überträgt man diese Reaktionsvarianten auf zyklische Nitrone und Dansylchlorid, so kommt man im konkreten Fall zu folgender Reaktionsfolge:



Der abgebildete Reaktionsablauf scheint zunächst zwar unwahrscheinlich, da zum Einen die freie Aminogruppe vorhanden ist, die eigentlich besser zugänglich sein sollte und zudem aufgrund der höheren Stabilität des gebildeten Amids auch zum energetisch günstigeren Produkt führt.

Setzt man jedoch voraus, dass die tautomere Form des Nitrons entsteht, so ist der restliche Reaktionsverlauf erklärbar. Zwar gibt es in der Literatur keine Hinweise für die Existenz des abgebildeten Hydroxyenamins (Breuer 1989), jedoch könnte dieses als Zwischenstufe bei der Umsetzung mit Dansylchlorid entstehen. Bedingt durch das Fünfringsystem des Nitrons ist die Ausbildung eines vorgebildeten Sechsringsystems wie beim Carbonsäurechlorid nicht möglich. Allerdings kann in diesem Fall das Vorhandensein des Sulfonsäureesters sterische Probleme kompensieren, da der Radius des Schwefelatoms gegenüber einem Kohlenstoffatom deutlich größer ist. Zum Anderen stehen in dem Sulfonsäureester zwei Sauerstoffatome als mögliche Reaktionspartner zur Verfügung, wodurch die Reaktion „über“ das Ringsystem hinweg durchaus möglich scheint.

3.6 Synthese von BocEAEMPO und EAEMPO

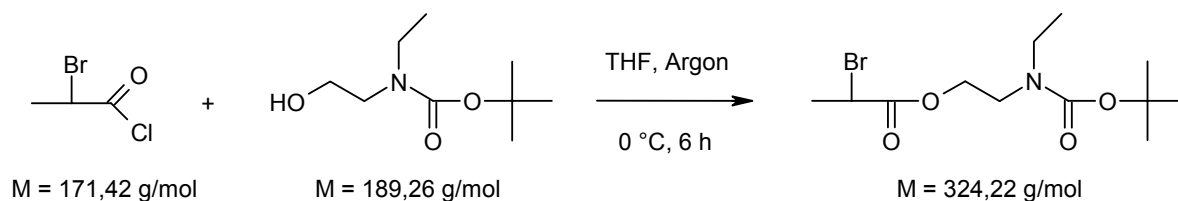
Die Synthese von BocEAEMPO verläuft ab dem zweiten Reaktionsschritt ebenfalls analog zur EMPO-Synthese. Da dort bereits ausreichend die Syntheseschritte diskutiert wurden, wird an dieser Stelle nur der Syntheseweg kurz vorgestellt.

3.6.1 Synthese von Ethyl-(2-hydroxyethyl)-carbamatsäure-*tert*-butylester



Die Synthese orientiert sich an Standardprozeduren aus der Literatur (Einhorn 1991; Khalil 1996). Zu einer Lösung von 2-(Ethylamino)-ethanol (229,00 mmol) in trockenem Methanol wird unter Verwendung eines Eisbades portionsweise Di-*tert*-butyl-dicarbonat (229,10 mmol) zugegeben. Die Reaktion verläuft unter Kohlendioxid-Entwicklung stark exotherm. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird Ethyl-(2-hydroxyethyl)-carbamatsäure-*tert*-butylester mit einer Ausbeute von 85 % mit Diethylether extrahiert. Die zugehörigen Analytik-Daten sind im Experimentellen Teil aufgeführt.

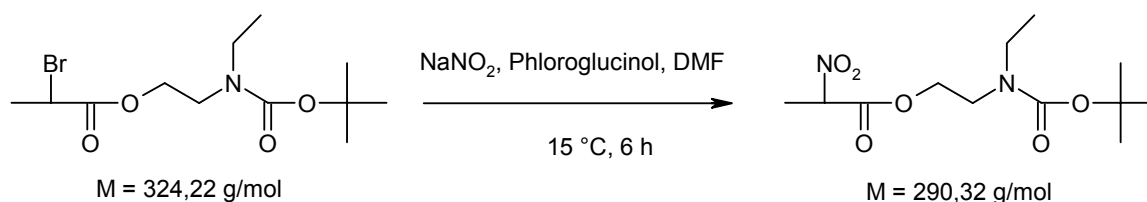
3.6.2 Synthese von 2-Brompropionsäure-2-(*tert*-butoxycarbonyl-ethylamino)-ethylester



2-Brompropionylchlorid (124,00 mmol) wird zu einer Lösung von Ethyl-(2-hydroxyethyl)-carbamatsäure-*tert*-butylester (123,57 mmol) in trockenem THF unter Argonatmosphäre

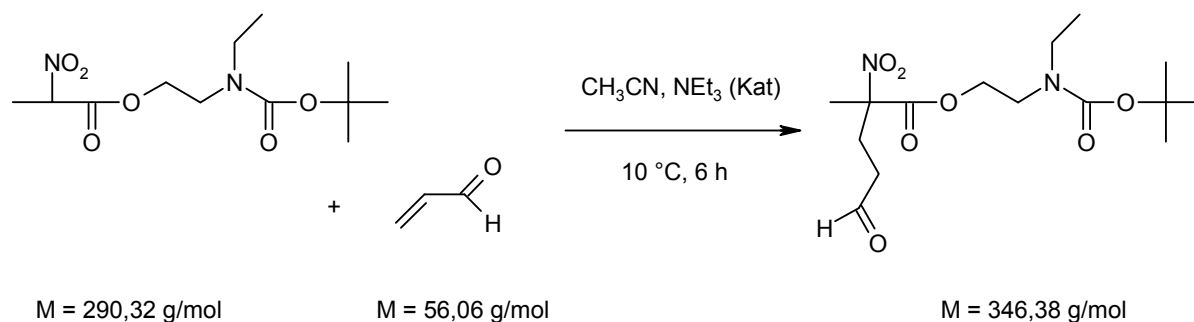
zutropft. Im THF wird vor dem Zutropfen Kaliumcarbonat als Puffer für die entstehende Salzsäure suspendiert. Nach Ende der Reaktionszeit wird der Ansatz mit Diethylether extrahiert. Man erhält 2-Brompropionsäure-2-(*tert*-butoxycarbonyl-ethylamino)-ethylester als hellgelbes Öl in einer Ausbeute von 99 %. Die Analytik-Daten sind im Experimentellen Teil aufgelistet.

3.6.3 Synthese von 2-Nitropropionsäure-2-(*tert*-butoxycarbonyl-ethylamino)-ethylester



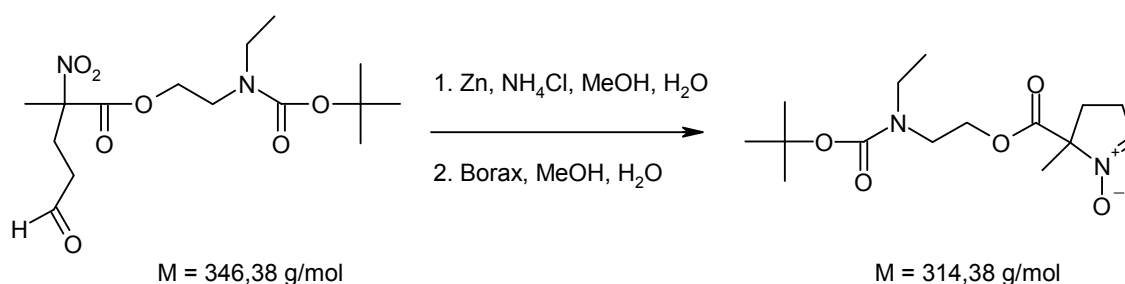
Natriumnitrit (217,39 mmol) und Phloroglucinol (317,18 mmol) werden in DMF unter Argon-Atmosphäre gelöst und portionsweise 2-Brompropionsäure-2-(*tert*-butoxycarbonyl-ethylamino)-ethylester (122,45 mmol) zugegeben. Direkt bei der Zugabe des Esters färbt sich die Reaktionsmischung tief rot. Zur Extraktion des Produkts wird bei der Aufarbeitung auch hier Diethylether benutzt. Aufgrund der Löslichkeitsproblematik des Phloroglucinols in Diethylether wird genau wie im analogen Reaktionsschritt der EMPO-Synthese verfahren. Man erhält 2-Nitropropionsäure-2-(*tert*-butoxycarbonyl-ethylamino)-ethylester als viskoses orangefarbenes Öl in einer Ausbeute von 76 %. Die Analytik-Daten sind im Experimentellen Teil aufgelistet.

3.6.4 Synthese von 2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-2-(*tert*-butoxycarbonyl-ethylamino)-ethylester



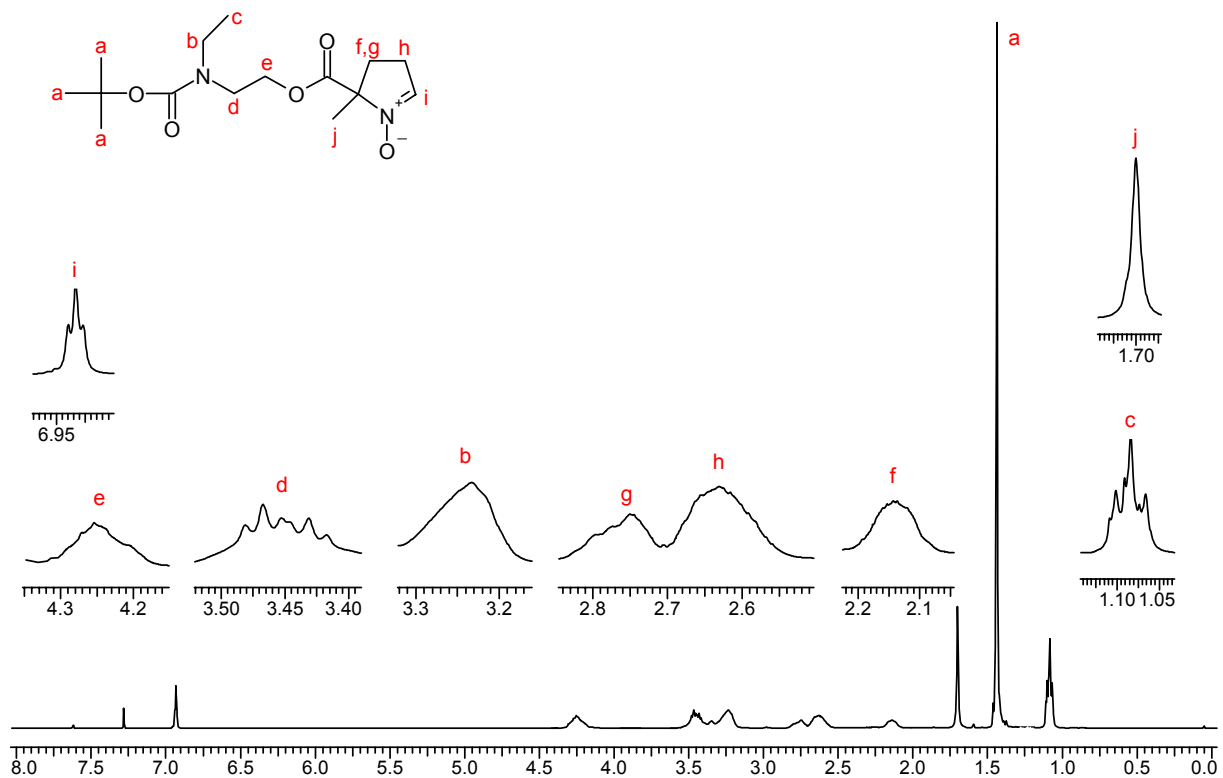
Zu einer Lösung von 2-Nitropropionsäure-2-(*tert*-butoxycarbonyl-ethylamino)-ethylester (92,52 mmol) in trockenem Acetonitril gibt man unter Argonatmosphäre Triethylamin als Katalysator und dann Acrolein (148,59 mmol) zu. Nach Ablauf der Reaktionszeit erhält man 2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-2-(*tert*-butoxycarbonyl-ethylamino)-ethylester als hellgelbes viskoses Öl in einer Ausbeute von 97 %. Die zugehörigen Analytik-Daten sind im Experimentellen Teil tabelliert.

3.6.5 Synthese von BocEAEMPO als Eintopfreaktion



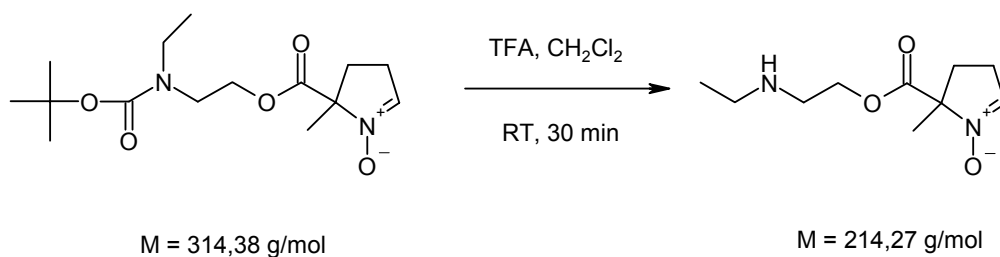
2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-2-(*tert*-butoxycarbonyl-ethylamino)-ethylester (43,30 mmol) wird in einer 1 : 1 Mischung aus Methanol und Wasser gelöst und mit einer wässrigen Ammoniumchloridlösung (110,30 mmol) versetzt. Hierzu wird portionsweise Zink-Pulver (183,51 mmol) zugegeben. Schon nach Zugabe der ersten Portion Zink bildet sich auf der Mischung ein hellgrauer Schaum. Analog zur EMPO-Synthese gelten auch hier die Restriktionen bezüglich der verwendeten Zinkmenge. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird das überschüssige Zink-Pulver vom Ansatz abfiltriert und dieser am Rotationsverdampfer eingedunstet. Dieses Konzentrat wird mit Borax gesättigt. Man erhält nach der Extraktion ein Rohprodukt, das im $^1\text{H-NMR}$ deutliche BocEAEMPO-Signalsätze zeigt und zur weiteren Aufreinigung durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 gereinigt wird. Dabei wird zunächst mit einer Mischung aus 7 : 3 Petrolether und Ethanol eine Grobtrennung durchgeführt, gefolgt von einer Feinreinigung mit 1 : 1 Pentan und Ethanol. Das Produkt wird in beiden Durchgängen mit Ethanol vom Kieselgel eluiert. Die Ausbeute beträgt 55 %.

Im Folgenden ist ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (400,13 MHz, CDCl_3) von BocEAEMPO abgebildet. Die restlichen Analytikdaten befinden sich im Experimentellen Teil.



Das Doppelbindungsproton erscheint auch in diesem Fall als Triplett (Signal i) bei 6,929 ppm mit einer $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstante von 2,64 Hz. Die Ringprotonen bilden komplexe Multipletts aus (Signale f, g, h), die allerdings nicht gut aufgelöst werden konnten.

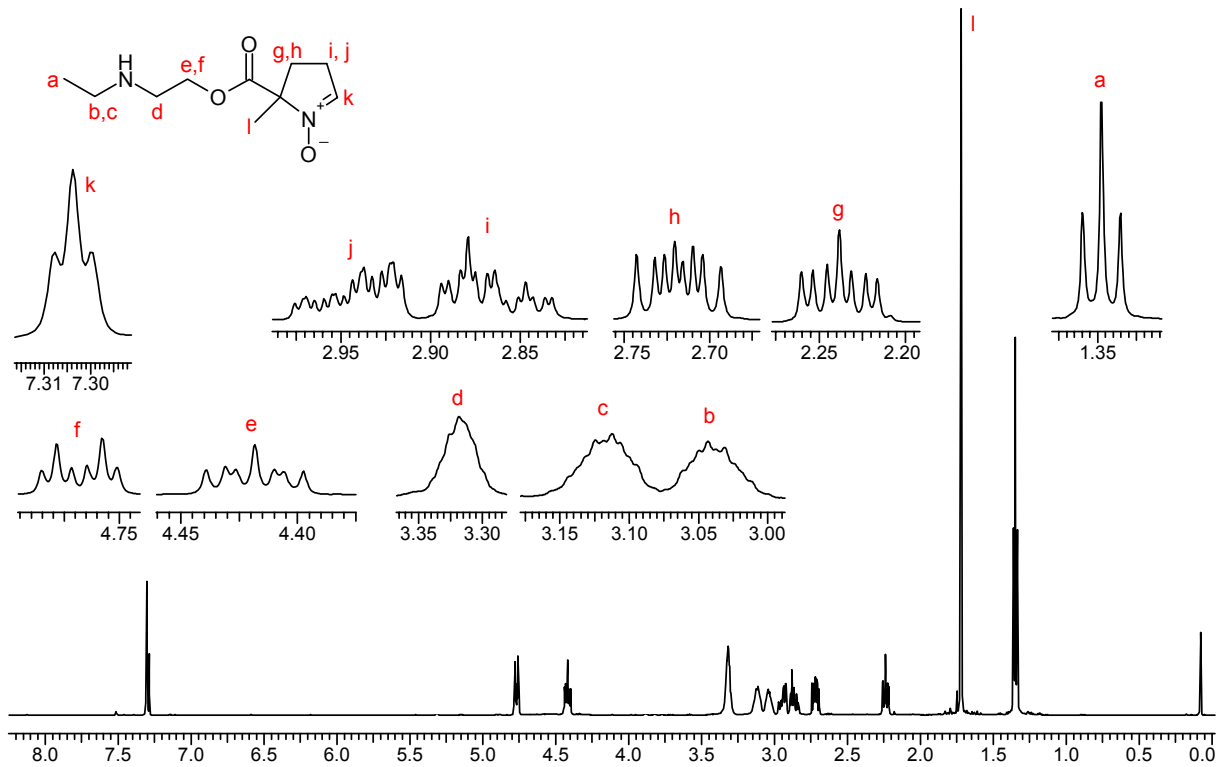
3.6.6 Synthese von EAEMPO



BocEAEMPO (1,08 mmol) wird mit 5 ml trockenem Dichlormethan und trockener Trifluoressigsäure im Verhältnis 1 : 1 für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Direkt nach Zugabe der Trifluoressigsäure zeigt sich eine rege Gasentwicklung. Nach Abschluss der Gasentwicklung entfernt man das Lösungsmittelgemisch im Hochvakuum. Das so erhaltene Triflat-Salz des AEMPO wird in Dichlormethan aufgenommen und mit Polystyrol-gebundenem 1,5,7-Triazabicyclo[4.4.0]-dec-5-en (PL-TBD) für 30 Minuten gerührt. Das PL-TBD wird abfiltriert und

das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Man erhält so hochreines EAEMPO mit 100 % Ausbeute.

Im Folgenden ist ein ^1H -NMR-Spektrum von EAEMPO (600,13 MHz, CDCl_3) abgebildet. Die restlichen Analytikdaten befinden sich im Experimentellen Teil.

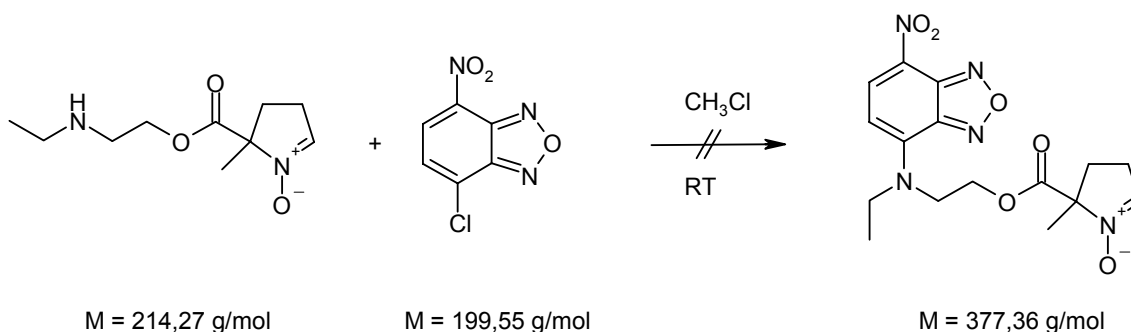


Deutlich ist auch hier das Triplett des Doppelbindungsprotons (Signal k) bei 7,300 ppm mit einer $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstante von 2,30 Hz zu erkennen. Auch hier zeigen die Ringprotonen (Signale g, h, i, j) komplexe Multiplletts.

3.7 Versuche zur Umsetzung von EAEMPO

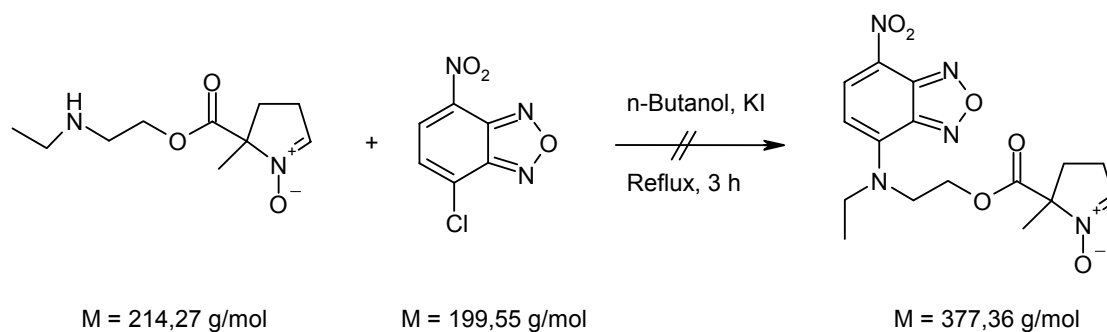
Die Umsetzungen von EAEMPO wurden ausschließlich mit NBD- und BODIPY-Derivaten vorgenommen.

Bei den Versuchen mit NBD-Chlorid sollte versucht werden, ob der Einsatz des sekundärenamins des EAEMPO zu einer Umsetzung führt. In der Literatur wird die vergleichsweise geringe Spezifität des NBD-Chlorids gegenüber primären Aminen diskutiert, während die Umsetzung mit sekundären Aminen zu besseren Ergebnissen führt (Heberer 1985). Dies erklärt sich aus einer Verstärkung des nucleophilen Charakters des sekundärenamins durch den +I-Effekt der zusätzlichen Alkylgruppe gegenüber dem primären Amin.



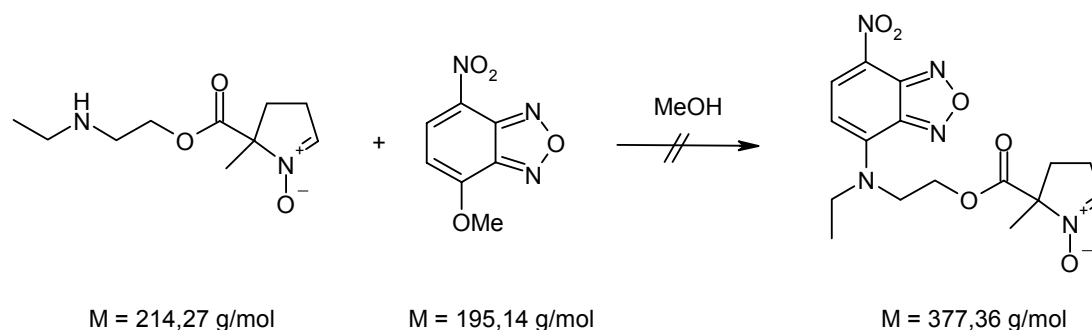
0,30 mmol EAEMPO werden in Chloroform gelöst und 0,30 mmol NBD-Chlorid, gelöst in Chloroform zugegeben. Die hellorange Lösung wird unter DC-Kontrolle für 36 Stunden gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit zeigen sich auf der DC-Platte mehrere orangene Banden, die auch fluoreszieren. Eine Trennung der Banden auf Kieselgel 60 mit 1 : 1 Pentan und Ethanol, gefolgt von Ethanol und Dichlormethan gibt 3 Fraktionen, deren $^1\text{H-NMR}$ -Spektren jedoch nur Zersetzungsprodukte des Nitrons zeigen.

Wiederholungen des Versuchs in Ethanol, THF sowie in Kombination dieser Lösungsmittel mit Basen (Borax, TBD) bringen bei gleicher Variation der Rührzeiten und Temperaturen ebenfalls keine Ergebnisse.



In einer weiteren Umsetzung wird unter Argonatmosphäre in n-Butanol als Lösungsmittel mit katalytischen Mengen Kaliumiodid gearbeitet (Bakthavachalam 1991).

1,11 mmol EAEMPO werden zusammen mit 1,11 mmol NDB-Chlorid in n-Butanol gelöst und mit 5,0 mg Kaliumiodid versetzt. Der Ansatz wird für 3 Stunden unter Argonatmosphäre zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird Diethylether zugegeben und die tiefrote Lösung über Nacht bei $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Es entsteht ein Niederschlag, der abfiltriert und mit Diethylether gewaschen wird. Der Durchfluss wird einrotiert und wie der Niederschlag im Hochvakuum getrocknet. Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der beiden Fraktionen zeigen jedoch nur Zersetzungsprodukte.



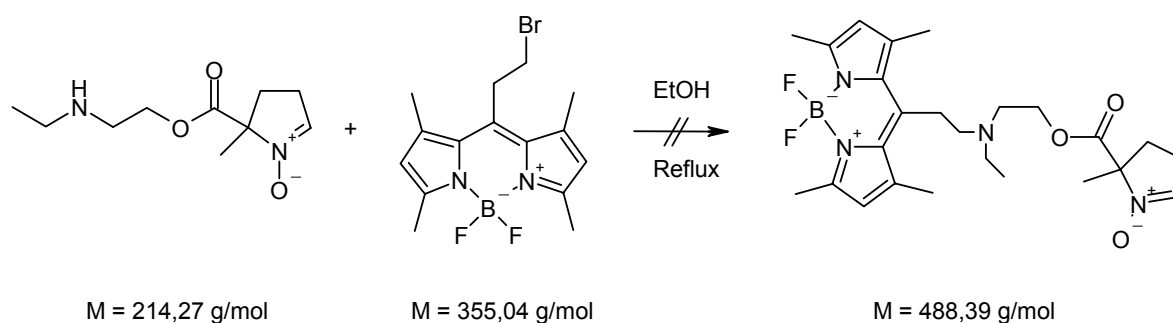
Analog zum Vorgehen bei den AEMPO-Umsetzungen wurde auch hier getestet, ob das unreaktivere, dafür aber selektivere 4-Methoxy-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol) zu einem Erfolg führen könnte (Heberer 1985).

0,23 mmol EAEMPO werden in trockenem Methanol gelöst und mit 0,23 mmol mit 4-Methoxy-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol) versetzt. Der Ansatz wird für 18 Stunden unter regelmäßiger DC-Kontrolle gerührt, zeigt aber keine Umsetzung an. Daher wird der Ansatz für 2,5 Stunden zum Rückfluss erhitzt. DC-Versuche zeigen zu diesem Zeitpunkt noch keine Umsetzung. Nach insgesamt 19 Stunden Rückfluss zeigen sich dann 4 Banden, die teilweise gelb sind und fluoreszieren. Säulenchromatographie mit 1 : 1 Pentan und Ethanol auf einer Kieselgel 60-Säule liefert 2 Fraktionen, deren $^1\text{H-NMR}$ -Spektren jedoch nur Zersetzungsprodukte des Nitrons zeigen.

Wiederholungen des Versuchs in Ethanol, THF sowie in Kombination dieser Lösungsmittel mit Basen (Borax, TBD) bringen bei gleicher Variation der Rührzeiten und Temperaturen ebenfalls keine Ergebnisse.

Die Reaktion des Nitrons mit NBD-Chlorid bzw. 4-Methoxy-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol) wurde bereits an anderer Stelle ausführlich diskutiert. In diesem Fall dürften die gleichen Gründe für das Scheitern der Umsetzungen verantwortlich sein. Offenbar reicht auch die höhere Nucleophilie des sekundären Amins nicht aus, um mit dem Sauerstoff der Nitrongruppe bei der Umsetzung mit NBD-Derivaten konkurrieren zu können.

Bei der Umsetzung mit BODIPY-Derivaten wurde ebenfalls versucht, die größere Nucleophilie des sekundären Amins des EAEMPO zu nutzen.



2,14 mmol EAEMPO werden zusammen mit 0,24 mmol BE-BODIPY (0,24 mmol) in Ethanol gelöst und 26,00 μl DBU als Base zugegeben. Der Ansatz wird unter Argon-Atmosphäre für 2 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Ein im Anschluss an die Aufarbeitung gemessenes $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt nur Zersetzungsprodukte.

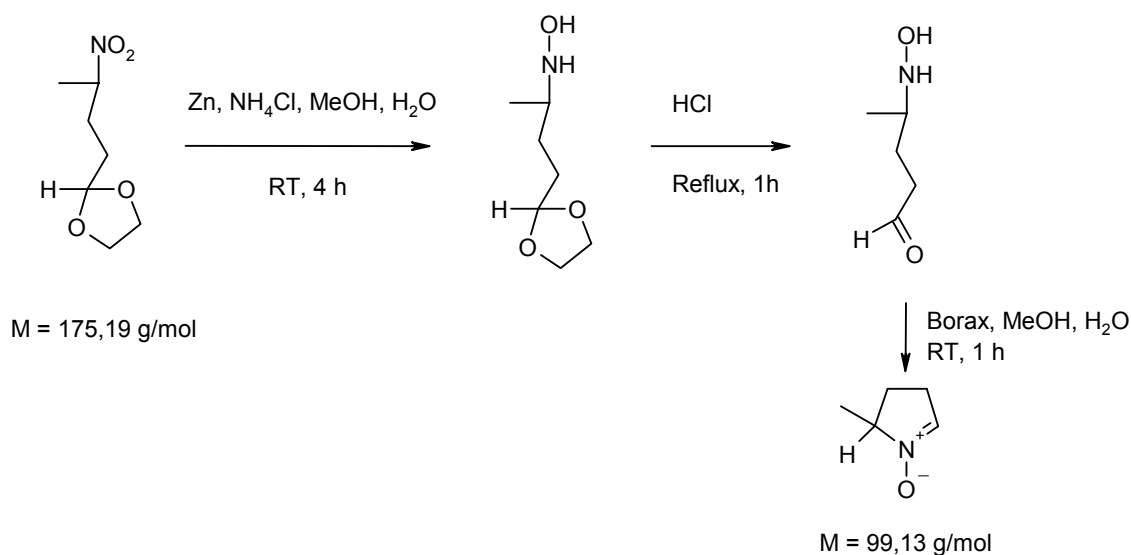
Die analoge Versuchsdurchführung mit DMF als Lösungsmittel bei 100 °C liefert ebenfalls nur Zersetzungsprodukte. Diese bilden auf der DC-Platte insgesamt 8 Banden aus, deren Farbspektrum von gelb-grün über orange, rotviolett, grün hin zu braun und schwarz reicht.

Auch bei diesen Umsetzungen dürfte die direkte Reaktion der Nitronstruktur verantwortlich für das Scheitern der Umsetzung sein. Eine Diskussion der möglichen Ursachen wurde bereits früher durchgeführt.

3.8 Synthese anderer Nitrone

Im Folgenden werden die Synthesen anderer Nitronsysteme beschrieben, die vom ursprünglichen Synthesepfad EMPO-artiger Spin-Traps abweichen. HMPO sollte zu spektroskopischen Zwecken synthetisiert werden, wozu die Edukte der Direktsynthese eines BODIPY-Nitrons (s. 3.8.5.2.2) verwendet werden konnten. Um Erfahrung mit der Synthese von DEPMPO-artigen Spin-Traps zu gewinnen, wurde zunächst die Synthese von DEPMPO nachvollzogen. Im Anschluss sollte die Synthese eines Derivats getestet werden.

3.8.1 Synthese von HMPO



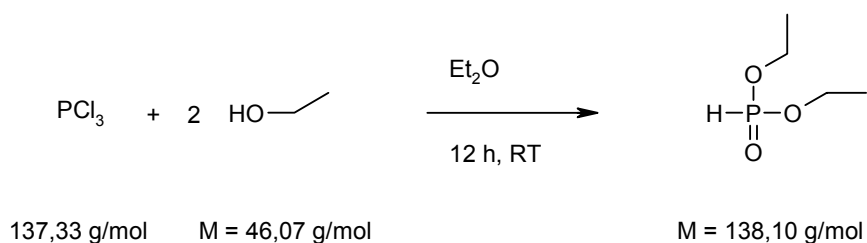
2-(3-Nitrobutyl)-1,3-dioxolan (13,60 mmol) wird in Methanol gelöst, mit Wasser und Ammoniumchlorid (34,03 mmol) versetzt. Dann wird über 30 Minuten Zink-Pulver (81,51 mmol) zugegeben und für 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird das überschüssige Zink-Pulver abfiltriert, mit Methanol gewaschen und das Filtrat auf die Hälfte einrotiert. Nach der Zugabe von 12 M Salzsäure wird für eine Stunde zum Rückfluss erhitzt. Die orange-rote Lösung wird einrotiert, erneut mit einer 1 : 1 Mischung aus Methanol und Wasser aufgenommen, mit Borax gesättigt und für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Aufarbeitung erhält man ein rotbraunes Öl, das im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum deutlich Signale des Nitrons zeigt, aber noch stark verunreinigt ist. Die Ausbeute des Rohprodukts beträgt 1,78 g.

Der Versuch einer Aufreinigung durch Säulenchromatographie scheitert sowohl auf Kieselgel 60, Al_2O_3 , als auch RP18-Säulenmaterial an der Zersetzung des Produkts, welches daher nicht rein

isoliert werden kann. Der Nachweis des Nitrons HMPO ist aus den Daten des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums des Rohproduktes möglich.

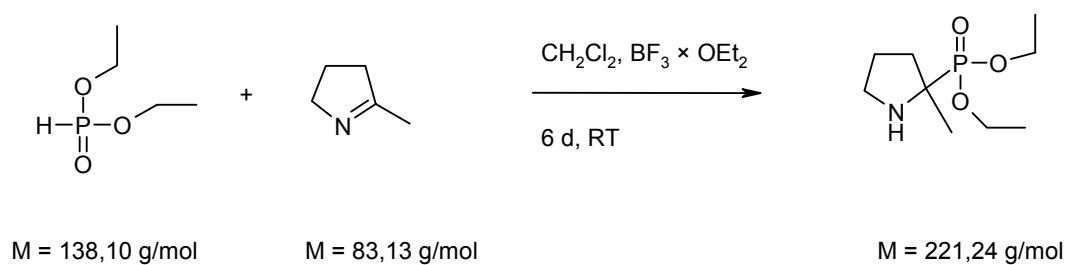
3.8.2 DEPMPO-Synthese

3.8.2.1 Synthese von Ethoxyphosphit



PCl_3 (109,00 mmol) wird zu einer auf 0°C gekühlten Lösung von Ethanol (218,00 mmol) in trockenem Diethylether unter Argonatmosphäre langsam über 2 Stunden zugetropft und für weitere 12 Stunden bei 10°C gerührt. Im Anschluss wird der Ansatz auf Eis gegeben und mit KOH-Plätzchen neutralisiert. Die wässrige Phase wird abgetrennt und einrotiert. Die so erhaltene braune Masse wird mit 150 ml Ethanol extrahiert. Das Extrakt wird filtriert und einrotiert. Man erhält so Diethoxyphosphit als salzfreien hellbraunen Feststoff mit einer Ausbeute von 75 %. Die Analytikdaten sind im Experimentellen Teil aufgeführt.

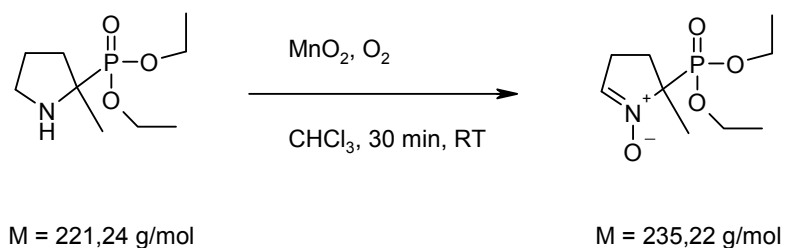
3.8.2.2 Synthese von Diethyl-(2-methyl-2-pyrrolidinyl)phosphonat



Diethoxyphosphit (25,20 mmol) wird in trockenem Dichlormethan gelöst und unter Argonatmosphäre 2-Methyl-1-pyrrolin (25,20 mmol) zugegeben. Dann werden noch $200 \mu\text{l}$ $\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$ (1,40 mmol) als Katalysator zugesetzt und der Ansatz für 6 Tage unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der Ansatz auf Wasser gegeben und mit Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und einrotiert. Man erhält so nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum ein farbloses Öl

mit einer Ausbeute von 30 % (7,56 mmol). Das zugehörige $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ist im Experimentellen Teil aufgeführt.

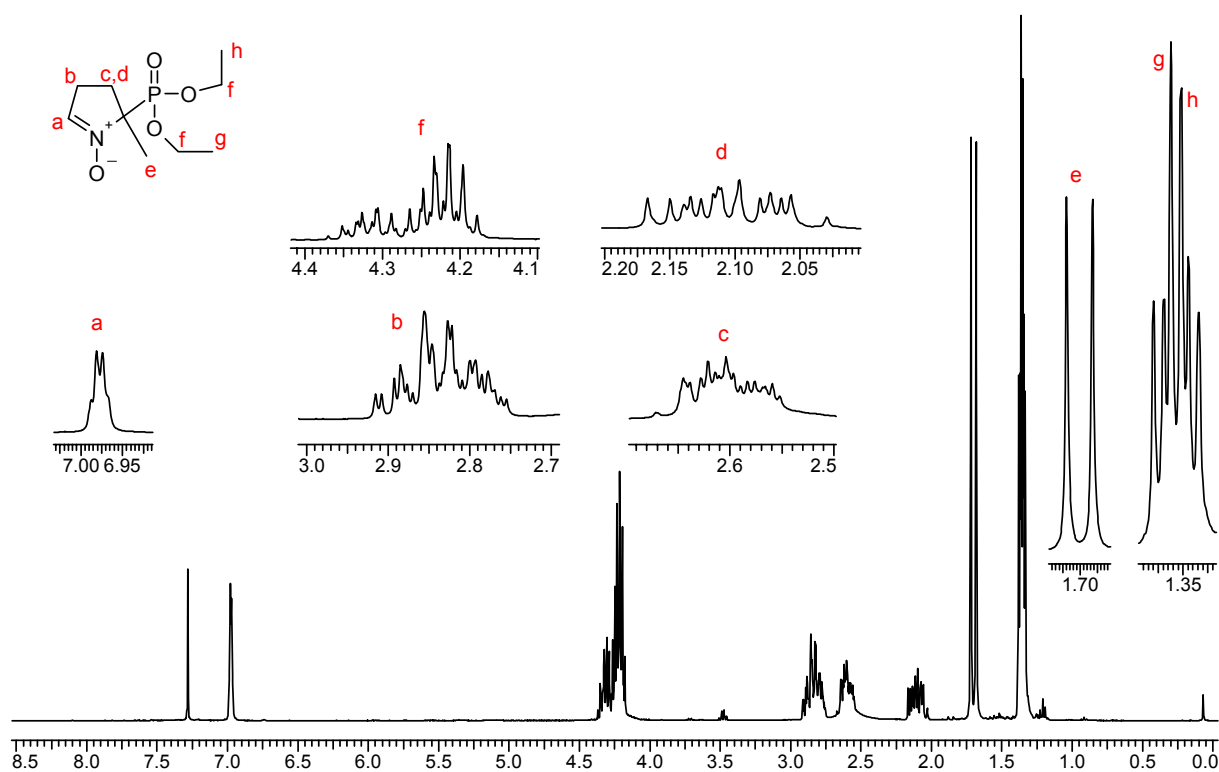
3.8.2.3 Synthese von DEPMPO



Diethyl-(2-methyl-2-pyrrolidinyl)phosphonat (7,56 mmol) wird in Chloroform gelöst und mit 250 mg MnO_2 als Katalysator versetzt. Dann wird über 30 Minuten Sauerstoff durch die Lösung geleitet. Im Anschluss wird das MnO_2 abfiltriert und der Ansatz über Kieselgel 60 mit Dichlormethan und Ethanol (8,5 : 1,5) getrennt. Man erhält DEPMPO als hygroskopisches farbloses Öl mit einer Ausbeute von 25 % (1,89 mmol).

Im Folgenden ist ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von DEPMPO abgebildet, die restlichen Analytikdaten befinden sich im Experimentellen Teil.

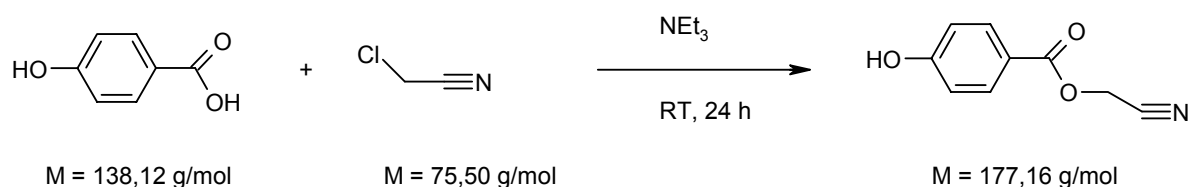
$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3):



Wie bei den anderen zyklischen Nitronen auch, ist hier das Doppelbindungs-Proton bei 6,977 ppm zu finden. Allerdings hat der Signalsatz eine zusätzliche Aufspaltung durch das Phosphoratom vorzuweisen. Die Kopplungskonstanten werden dabei zu $^3J_{\text{HH}} = 2,64 \text{ Hz}$ und $^3J_{\text{PH}} = 5,28 \text{ Hz}$ bestimmt. Die Ringprotonen erscheinen als Multipletts und sind durch Phosphorkopplungen weiter aufgespalten als sonst üblich. Weiterhin ist die Aufspaltung der Methylgruppen und der Ethylreste durch die Phosphorkopplung deutlich zu erkennen.

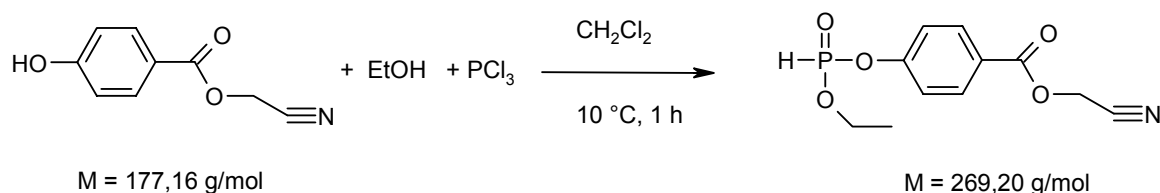
3.8.3 DEPMPO-Derivate

3.8.3.1 Synthese von 4-Hydroxybenzoesäure-cyanomethylester



Hydroxybenzoesäure (0,10 mol) wird bei 0 °C in Triethylamin gelöst und dann portionsweise Chloracetonitril (0,15 mol) zugegeben. Der Ansatz wird für 30 Minuten bei 0 °C gerührt und dann für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der erhaltene extrem harte weiße Feststoff zerkleinert und in einer 2 : 1 Mischung aus Ethylacetat und Methanol gelöst, abfiltriert und einrotiert. Nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum erhält man 4-Hydroxybenzoesäure-cyanomethylester als gelblichen Feststoff mit 80 % Ausbeute (0,08 mol). Die zugehörigen Analytikdaten sind im Experimentellen Teil aufgeführt.

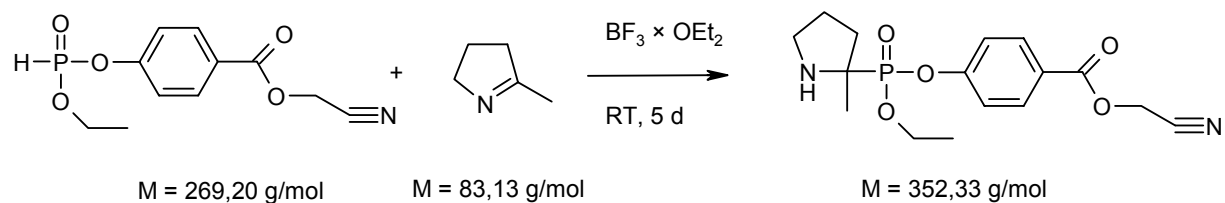
3.8.3.2 Synthese von Cyanomethyl-4-{[ethoxy(oxido)phosphino]oxy}benzoat



4-Hydroxybenzoesäure-cyanomethylester (54,75 mmol) wird zusammen mit Ethanol (54,75 mmol) in trockenem Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dann wird langsam über 30

Minuten PCl_3 (36,50 mmol) zugetropft und für eine Stunde bei 10 °C weitergerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der Ansatz auf Eis gegeben und mit KOH-Plätzchen neutralisiert. Nach der Aufarbeitung wird der Ansatz durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 und 1 : 1 Pentan und Ethanol getrennt. Man erhält eine Produktfraktion, die nach Einrotieren und Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum als hellgelbes Öl mit einer Ausbeute von 20,5 % (7,48 mmol) verbleibt. Die Analytikdaten sind im Experimentellen Teil tabelliert.

3.8.3.3 Synthese von 4-[Ethoxy-(2-methyl-pyrrolidin-2-yl)-phosphinoyloxy]-benzoesäurecyanomethylester



Cyanomethyl-4{[ethoxy(oxido)phosphino]oxy}benzoat (4,02 mmol) wird zusammen mit 2-Methyl-1-pyrrolin (4,02 mmol) in trockenem Dichlormethan gelöst, mit $\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$ (6 mol%) versetzt und für 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der Ansatz aufgearbeitet und durch Säulenchromatographie Kieselgel 60 mit 1 : 1 Pentan und Ethanol gereinigt. Man erhält eine Produktfraktion, die nach Einrotieren und Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum als hellgelbes Öl verbleibt. Die Ausbeute beträgt 54 % (2,18 mmol), die Analytikdaten sind im Experimentellen Teil aufgeführt.

3.8.4 Versuch zur Synthese des Nitrons

Der Versuch 4-[Ethoxy-(2-methyl-pyrrolidin-2-yl)-phosphinoyloxy]-benzoesäurecyanomethylester zum korrespondierenden Nitron zu oxidieren wurde mit Natriumwolframat und Wasserstoffperoxid in Anlehnung an eine Vorschrift von Hardy (Hardy 2005) unternommen. Mit dieser Vorschrift wurde jedoch kein Produkt erhalten. Aufgrund der geringen vorhandenen Substanzmengen wurden keine weiteren Versuche mehr unternommen um funktionalisierte DEPMPO-Derivate zu erhalten. Prinzipiell ist es jedoch möglich, durch Oxidation Nitrone aufzubauen. Alternative Möglichkeiten stellen beispielsweise die Verwendung von MnO_2 , PbO_2

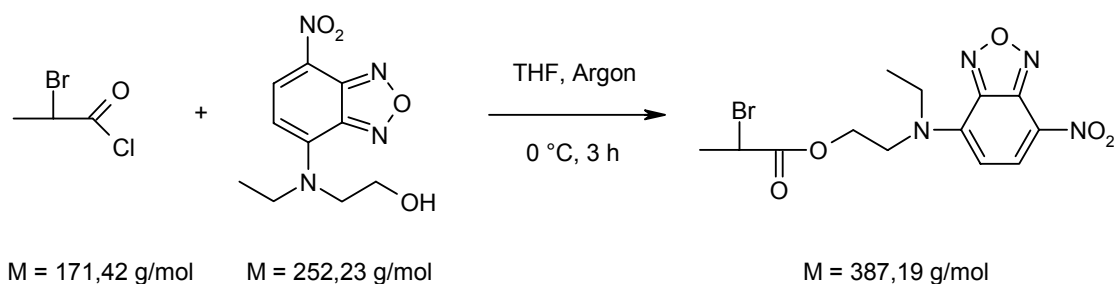
oder vergleichbarer Katalysatorsysteme in Kombination mit dem Durchleiten von Sauerstoff dar. Mit dieser Variante konnte auch DEPMPO synthetisiert werden.

3.8.5 Direktsynthesen

Aufgrund der hohen Reaktivität der zyklischen Nitrone wurde in weiteren Syntheseversuchen versucht, die Fluoreszenzmarkierung von Anfang an in das Molekül zu integrieren. Vorteil dieser Vorgehensweise ist das Vermeiden einer Umsetzung des fertigen Nitronsystems, was eine erfolgreiche Synthese der gewünschten Verbindungen verspricht. Der Nachteil liegt in der Farbigkeit und Fluoreszenz der einzelnen Reaktionsstufen, die durchlaufen werden müssen. Bei jeder Umsetzung entsteht neben dem gewünschten Hauptprodukt auch eine unvermeidbare Menge farbiger, fluoreszierender Nebenprodukte, die eine Aufarbeitung erschweren oder gar unmöglich machen können.

3.8.5.1 Versuche zur Synthese eines NBD-Derivats

3.8.5.1.1 Synthese von 2-Brom-propionsäure-2-[ethyl-(7-nitro-benzo[2,1,3]oxadiazol-4-yl)-amino]-ethylester

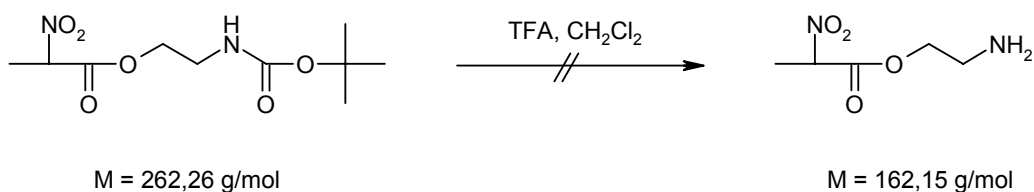


2-[Ethyl-(7-Nitro-[2,1,3]-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol (26,76 mmol) wird in trockenem THF unter Argonatmosphäre gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dann wird 2-Brompropionsäurechlorid (26,77 mmol) gelöst in trockenem THF über 3 Stunden zugetropft. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der Ansatz aufgearbeitet und einrotiert. Nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum erhält man 2-Brom-propionsäure-2-[ethyl-(7-nitro-benzo[2,1,3]oxadiazol-4-yl)-amino]-ethylester als rotes Öl mit einer Ausbeute von 50 %. Die Analytikdaten sind im Experimentellen Teil aufgelistet.

In der nächsten Reaktionsstufe wurde versucht, aus 2-Brom-propionsäure-2-[ethyl-(7-nitrobenzo[2,1,3]oxadiazol-4-yl)-amino]-ethylester die entsprechende 2-Nitro-Verbindung herzustellen. Allerdings konnte nach der Umsetzung analog dem entsprechenden Schritt der EMPO-Synthese keinerlei Produkt mehr isoliert werden. Offenbar kam es in der Reaktionslösung zu einer Reaktion des Farbstoffsystems mit dem gelösten Natriumnitrit bzw. einer der anderen während der Reaktion gebildeten Verbindungen. Aufgrund der starken Farbigkeit der 2-Brom-Verbindung kann keine Aussage getroffen werden, ob es während der Nitrierung zur Bildung von Nitrosophloroglucinol kam, das ebenfalls tief rot ist. Abschließend muss der direkte Umsetzungsversuch eines NBD-Derivats auf dieser Stufe als gescheitert betrachtet werden.

Als Alternative wurde versucht, über 2-Nitropropionsäure-2-aminoethylester einen Zugang zur NBD-Derivat-Synthese zu finden.

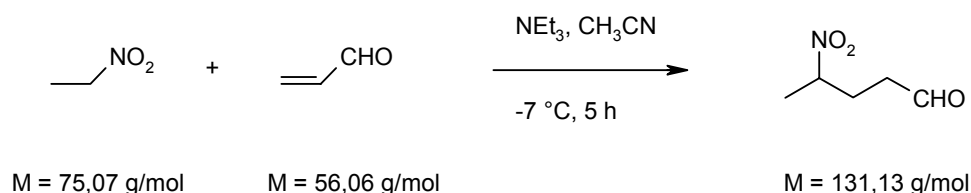
3.8.5.1.2 Synthese von 2-Nitropropionsäure-2-aminoethylester



2-Nitropropionsäure-2-*tert*-butoxycarbonylamino-ethylester (3,70 mmol) wird in 5,00 ml Dichlormethan gelöst, mit 5,00 ml TFA versetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird das Lösungsmittelgemisch im Hochvakuum entfernt und das so erhaltene Triflat-Salz des 2-Nitropropionsäure-2-aminoethylesters wird in Dichlormethan aufgenommen und mit 1 g PL-TBD für 30 Minuten gerührt. Das PL-TBD wird abfiltriert und das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Das NMR zeigt jedoch nicht das erwartete Produkt, sondern im wesentlichen Zersetzungsprodukte.

3.8.5.2 Versuche zur Synthese eines BODIPY-Derivats

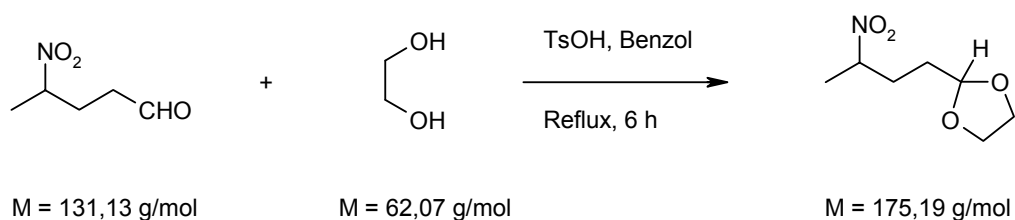
3.8.5.2.1 Synthese von 4-Nitropentanal



Nitroethan (389,00 mmol) wird in getrocknetem Acetonitril gelöst, auf $-7\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt und mit Triethylamin als Base versetzt. Dann wird über 30 Minuten Acrolein (778,00 mmol) zugetropft und für weitere 5 Stunden bei $-7\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der Ansatz auf Eiswasser gegeben und mit Salzsäure neutralisiert. Nach der Aufarbeitung wird durch Vakuumdestillation 4-Nitropentanal als gelbes Öl bei $52\text{--}65\text{ }^\circ\text{C}$ Siedebereich erhalten. Wenn die Destillation nicht rechtzeitig abgebrochen wird besteht in Analogie zur DMPO-Synthese (Janzen, 1989) Explosionsgefahr. Sicherheitshalber sollte daher gegen Ende der Destillation zwar im Vakuum, aber ohne weiteres Aufheizen gearbeitet werden!

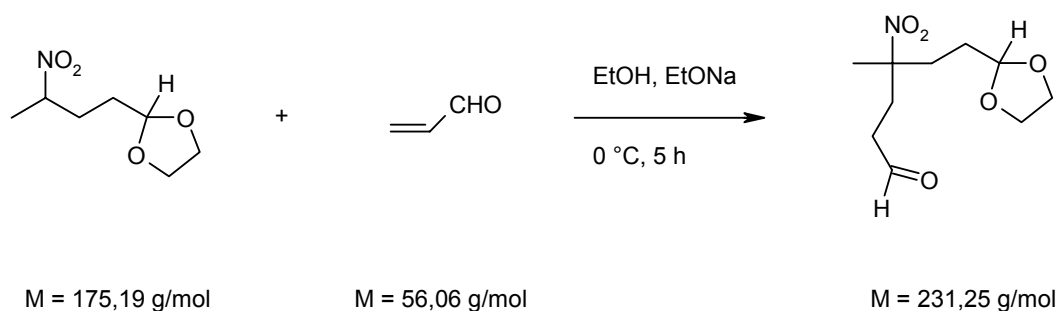
Die Ausbeute beträgt 28 %. Die Analytikdaten sind im Experimentellen Teil aufgeführt.

3.8.5.2.2 Synthese von 2-(3-Nitrobutyl)-1,3-dioxolan



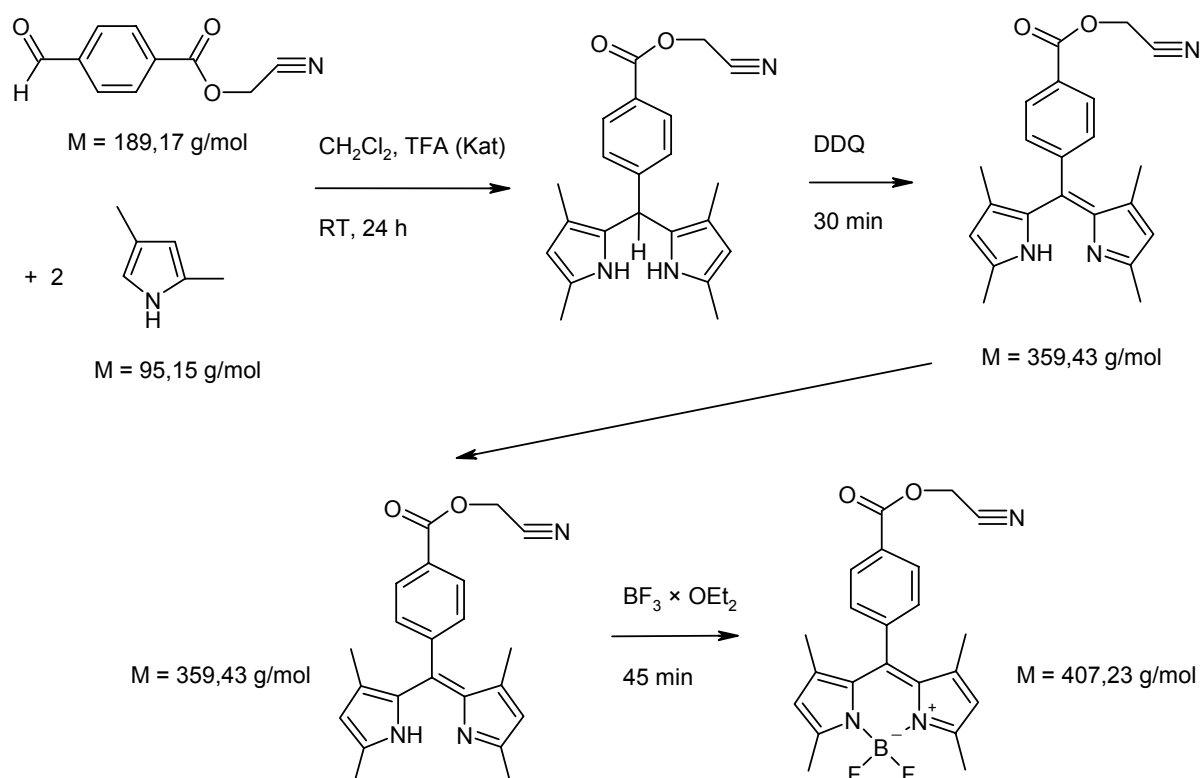
4-Nitropentanal (164,00 mmol) wird zusammen mit Ethylenglykol (246,00 mmol) und *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat als Katalysator in Benzol gelöst und für 6 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Das entstehende Benzol-Wasser-Azeotrop wird am Wasserabscheider entfernt. Nach der Aufarbeitung erhält man 2-(3-Nitrobutyl)-1,3-dioxolan als orangenes Öl in 85 % Ausbeute. Die Analytikdaten sind im Experimentellen Teil dokumentiert.

3.8.5.2.3 Synthese von 6-(1,3-Dioxolan-2-yl)-4-methyl-4-nitrohexanal

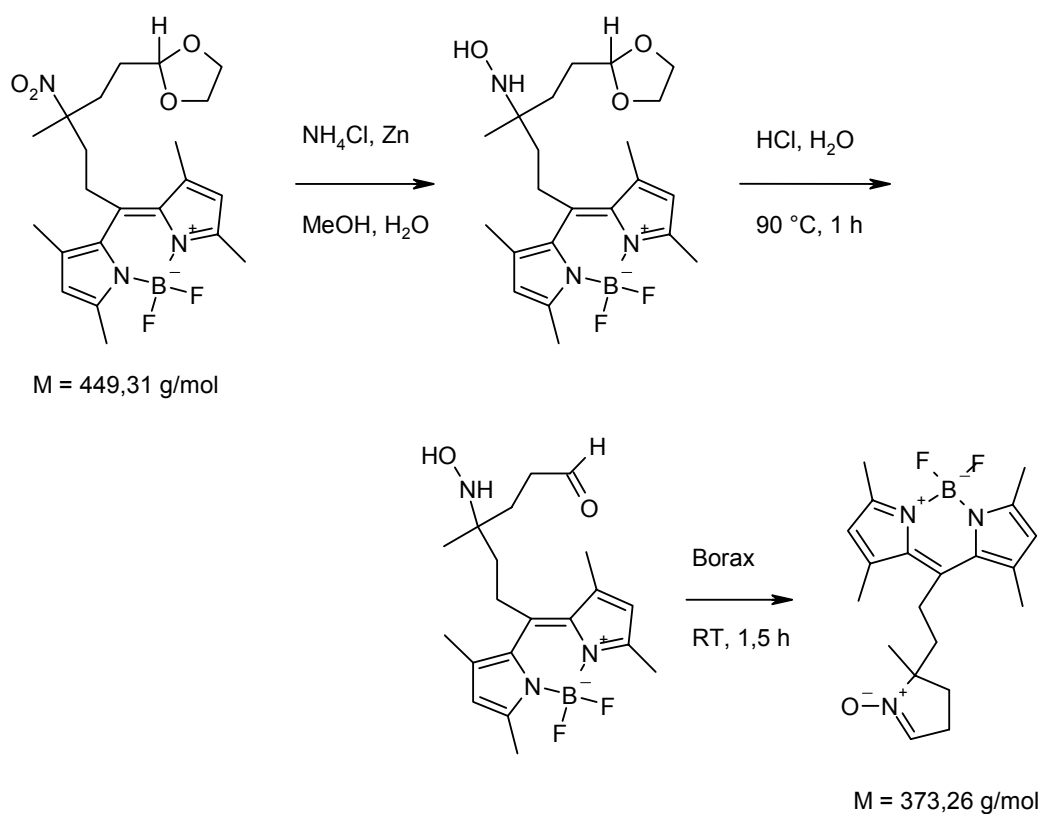


Natrium (4,30 mmol) wird in trockenem Ethanol aufgelöst. Zu dieser Lösung wird 2-(3-Nitrobutyl)-1,3-dioxolan (22,90 mmol) zugegeben und für 20 Minuten gerührt. Dann wird die Lösung auf 0 °C gekühlt und Acrolein (25,10 mmol) über 20 Minuten zugetropft. Während der 5 Stunden Reaktionszeit bei 0 °C färbt sich die Lösung rot. Nach der Aufarbeitung erhält man ein braunes Öl, das durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 mit 4 : 1 Pentan und Ethylacetat aufgetrennt wird. Die Ausbeute beträgt 16 %, die Analytikdaten sind im Experimentellen Teil aufgelistet.

3.8.5.2.4 Versuch zur Synthese von 8-[2-(2-Methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid)ethyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (MPOE-BODIPY)



6-(1,3-Dioxolan-2-yl)-4-methyl-4-nitrohexanal (3,63 mmol) wird mit 2,4-Dimethylpyrrol (7,26 mmol) in Dichlormethan gelöst, mit TFA als Katalysator versetzt und für 19 Stunden gerührt. Dann wird DDQ (7,26 mmol) zugegeben und für 30 Minuten gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit werden Ethyldiisopropylamin (28,50 mmol) und $\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$ (39,20 mmol) zugegeben und für weitere 45 Minuten gerührt. Nach der Aufarbeitung erhält man mit 33 % Ausbeute ein tiefviolettes Öl, das gelb-grün fluoresziert. Auf eine Charakterisierung wurde, wegen der geringen Substanzmenge, verzichtet und direkt die Reduktion und Zyklisierung zum Nitron versucht.



Hierzu wird das BODIPY-Dioxolan (1,20 mmol) in Methanol gelöst, mit Wasser versetzt und NH_4Cl (2,52 mmol) zugegeben. Dann wird über 30 Minuten hinweg Zn-Pulver (7,20 mmol) zugegeben und für weitere 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wird das Zink-Pulver abfiltriert und mit Aceton von anhaftendem Produkt gereinigt. Das rote Filtrat wird dann auf die Hälfte einrotiert, mit 12 M Salzsäure versetzt und bei 90 °C Ölbadtemperatur für eine Stunde gerührt. Im Anschluss wird der Ansatz abgekühlt, mit Borax gesättigt und weitere 1,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Aufarbeitung wird der Ansatz über eine Kieselgel 60-Säule mit 100 % Dichlormethan gesäult. Man erhält so eine rötliche, intensiv gelb-grün fluoreszierende Fraktion, die allerdings nach dem Entfernen des Lösungsmittels nur knapp 5 mg Produkt ergibt und sich daher nicht NMR-spektroskopisch charakterisieren lässt.

Aufgrund der Fluoreszenz lässt sich jedoch vermuten, dass der Syntheseweg prinzipiell erfolgreich verläuft. Ob jedoch wirklich Nitron entstanden ist, kann nur ein größerer Ansatz oder eine drastische Ausbeutesteigerung zeigen. Da im vorliegenden Fall die letzten 4 Reaktionsschritte sehr unergiebig sind, wurde dieser Syntheseweg nicht weiter verfolgt.

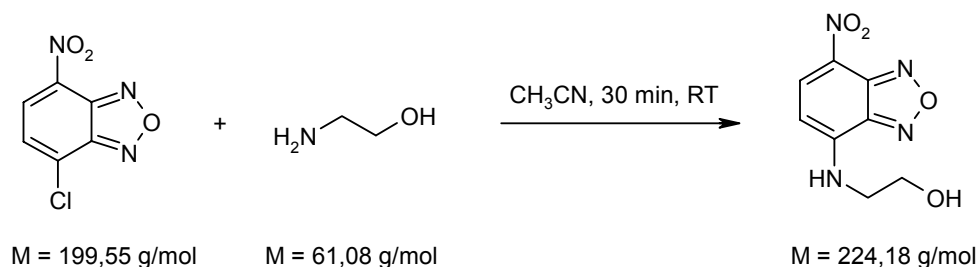
3.9 Synthese von Farbstoffsystemen

3.9.1 Synthese von NBD-Derivaten

Für die Synthese von NBD-Derivaten existiert in der Literatur eine Vielzahl von Quellen. In der vorliegenden Arbeit wurde insbesondere auf den Arbeiten von Heberer aufgebaut (Heberer 1985). Die dort vorgestellten Synthesewege wurden auch für die Synthese von zyklischen Nitronderivaten ausprobiert.

3.9.1.1 Synthese von 2-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol

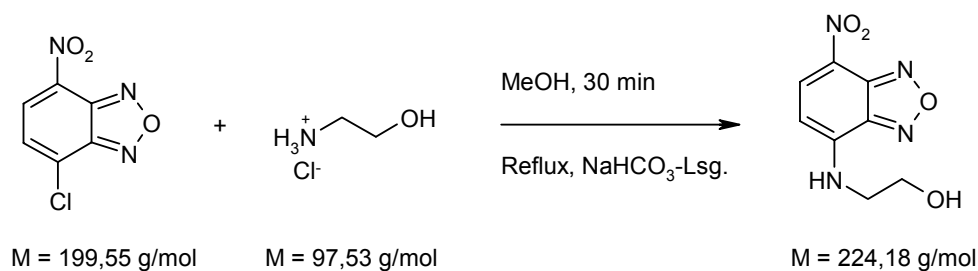
Variante 1:



NBD-Chlorid (2,50 mmol) wird in trockenem Acetonitril unter Argonatmosphäre gelöst und Ethanolamin (2,80 mmol) zugegeben. Direkt nach der Zugabe des Ethanolamins beginnt sich die hellgelbe NBD-Chlorid-Lösung über orange nach dunkelrot zu färben. Nach 30 Minuten Reaktionszeit wird das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt und der dunkelrote Feststoff durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 mit 19 : 1 Dichlormethan und Methanol getrennt. Man erhält so 2-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol als kräftig orangener Feststoff.

Ausbeute: 40 % (1,00 mmol)

Variante 2:



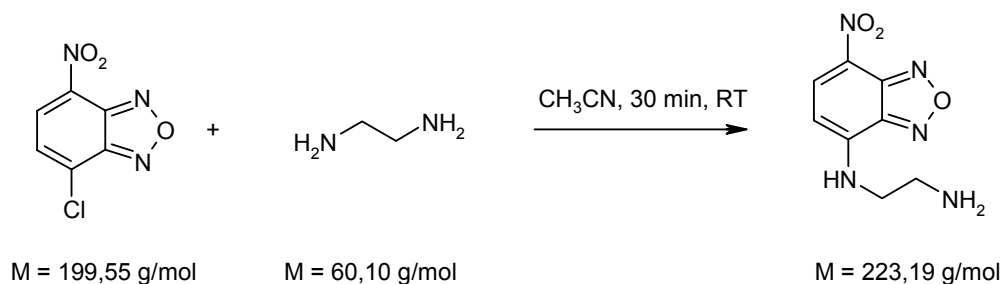
NBD-Chlorid (5,00 mmol) wird in Methanol gelöst. Ethanolamin (7,50 mmol) wird mit 625 μl 12 M HCl zum Ethanolaminhydrochlorid umgesetzt und zur NBD-Chlorid-Lösung zugegeben. Der Ansatz wird zum Rückfluss erhitzt und tropfenweise eine Lösung von Natriumhydrogencarbonat (15,00 mmol) in Wasser zugetropft. Nach 30 Minuten Reaktionszeit wird der Ansatz auf Eis abgekühlt. Die ausgefallenen Kristalle werden abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Man erhält so 2-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol als kräftig orangener Feststoff.

Ausbeute: 80 %

Die Analytikdaten sind im Experimentellen Teil aufgeführt und entsprechen den Literaturwerten.

3.9.1.2 Synthese von N*1*-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-ethan-1,2-diamin

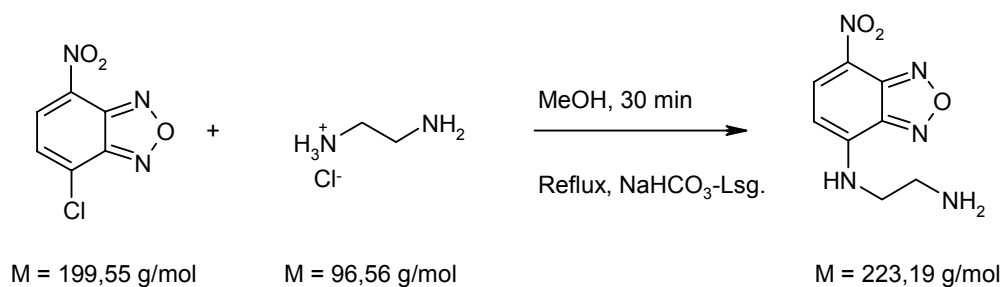
Variante 1:



1,2-Diaminoethan (1,65 mmol) wird in trockenem Acetonitril gelöst. NBD-Chlorid (1,65 mmol) wird ebenfalls in Acetonitril gelöst und über eine Stunde langsam zur Amin-Lösung zugetropft. Direkt bei Beginn des Zutropfens färbt sich die farblose Amin-Lösung orange-rot. Nach 30 Minuten Reaktionszeit wird das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt und der rote Feststoff durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 mit 19 : 1 Dichlormethan und Methanol getrennt. Man erhält so N*1*-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-ethan-1,2-diamin als braun-roten Feststoff.

Ausbeute: 38,5 % (0,64 mmol)

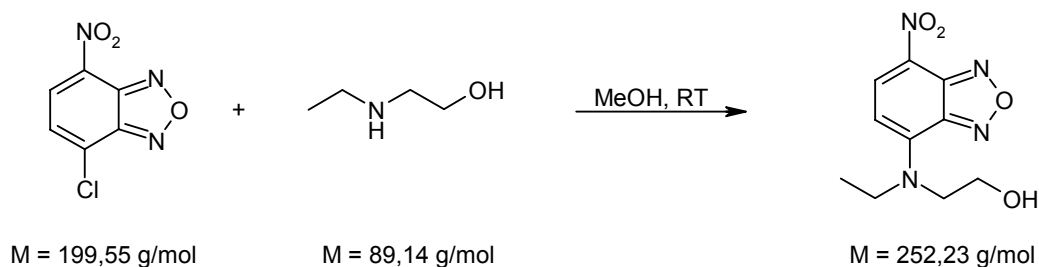
Variante 2:



NBD-Chlorid (5,00 mmol) wird in Methanol gelöst. 1,2-Diaminoethan (5,00 mmol) wird mit 416 μl 12 M HCl zum Hydrochlorid umgesetzt und in Methanol gelöst. Die NBD-Cl-Lösung wird über 40 Minuten zugetropft. Der Ansatz wird zum Rückfluss erhitzt und tropfenweise eine Lösung von Natriumhydrogencarbonat (5,00 mmol) in Wasser zugetropft. Nach 60 Minuten Reaktionszeit wird der Ansatz auf Eis abgekühlt. Die ausgefallenen Kristalle werden abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Man erhält so N^{*}1^{*}-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-ethan-1,2-diamin als braunroten Feststoff. Ausbeute: 65,5 %

Die Analytikdaten sind im Experimentellen Teil aufgeführt und entsprechen den Literaturwerten.

3.9.1.3 Synthese von 2-[Ethyl-(7-Nitro-[2,1,3]-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol

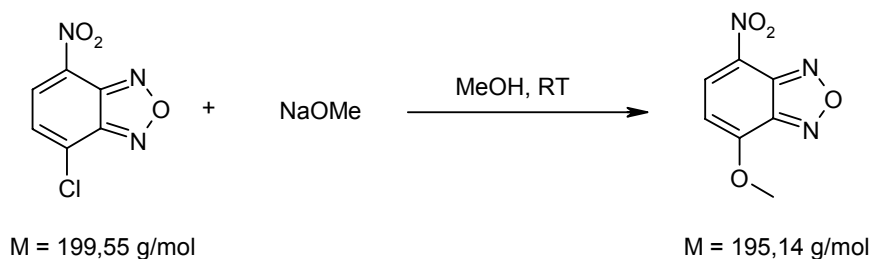


NBD-Chlorid (50,11 mmol) wird in trockenem Methanol gelöst und bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre langsam 2-(Ethylamino)ethanol (50,11 mmol) in Methanol über eine Stunde zugetropft. Da das Produkt nicht ausfällt, wird der Ansatz nach Ablauf der Reaktionszeit einrotiert und in wenig Ethanol gelöst. Diese Lösung wird für 16 Stunden bei -20 °C gelagert, wobei sich das Produkt als leuchtend hellroter Feststoff niederschlägt der dann abfiltriert und gewaschen wird.

Ausbeute: 53,5 % (26,76 mmol)

Die Analytikdaten befinden sich im Experimentellen Teil und entsprechen den Literaturwerten.

3.9.1.4 Synthese von 4-Methoxy-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol)



Trockenes Methanol wird mit Natrium (8,70 mmol) versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Zu dieser Lösung wird bei Raumtemperatur NBD-Chlorid (8,52 mmol) zugegeben und für 19 Stunden gerührt. Die zunächst hellgelbe Lösung verfärbt sich rasch rötlich. Nach Ablauf der Reaktionszeit filtriert man die ausgefallenen ockergelben Kristalle ab und kristallisiert um. Man erhält 4-Methoxy-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol) als ockergelben Feststoff.

Ausbeute: 30 % (2,56 mmol)

Die Analytikdaten befinden sich im Experimentellen Teil und entsprechen den Literaturwerten.

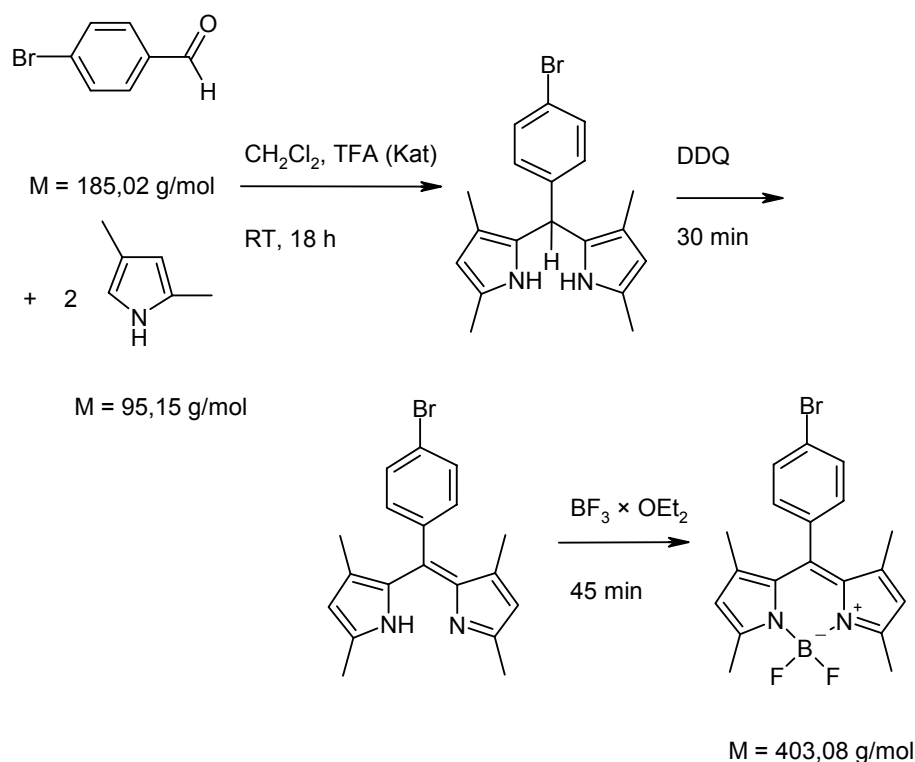
3.9.1.5 UV- und Fluoreszenzspektren der NBD-Derivate

Die UV- und Fluoreszenzspektren der NBD-Derivate entsprechen den Literaturwerten (Heberer 1985; Heberer 1986). Daher wurde auf eine Abbildung der Spektren aus Platzgründen verzichtet.

3.9.2 Synthese von BODIPY-Derivaten

Die Synthese von BODIPY-Verbindungen erfolgt in Anlehnung an die zahlreichen Literaturvorschriften (Treibs 1968; Chen 2000; Kálai 2003; Gabe 2004; Basaric 2005).

3.9.2.1 Synthese von 8-(4-Bromphenyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (BP-BODIPY)

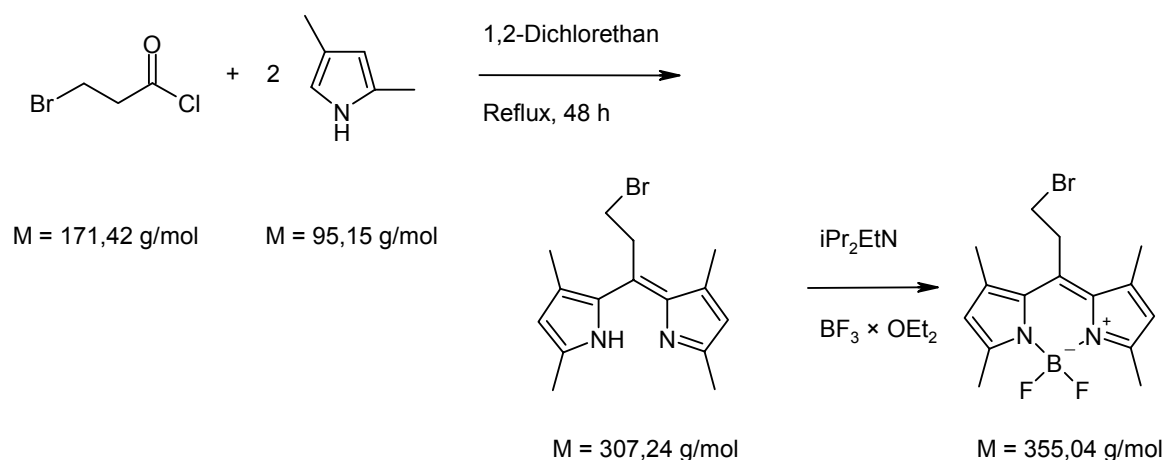


Brombenzaldehyd (5,40 mmol) wird zusammen mit 2,4-Dimethylpyrrol (10,80 mmol) unter Argonatmosphäre in trockenem Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von einem Tropfen trockener TFA als Katalysator wird der Ansatz über 18 Stunden gerührt. Direkt nach Zugabe der TFA setzt ein Farbumschlag von hellgelb zu einem tiefen rot-violett ein. Nach 18,5 Stunden rühren wird DDQ (5,40 mmol) zugegeben und für weitere 30 Minuten unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Dann werden bei 0°C Diisopropylethylamin und Bortrifluoridetherat zugegeben und für weitere 45 Minuten bei Raumtemperatur weitergerührt. Nach der Aufarbeitung wird durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 mit 100% Dichlormethan als Laufmittel das Produkt als grün-gelb fluoreszierender, violetter Feststoff erhalten.

Ausbeute: 24 % (1,30 mmol)

Die Analytikdaten sind im Experimentellen Teil aufgeführt und entsprechen den Erwartungen.

3.9.2.2 Synthese von 8-(2-Bromethyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (BE-BODIPY)



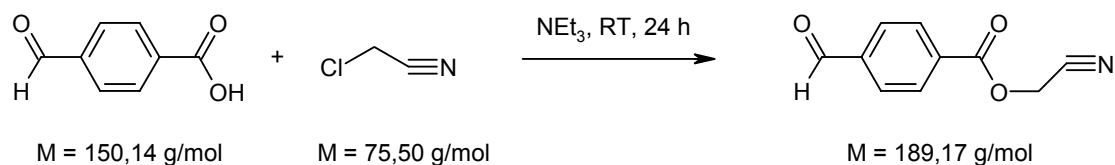
3-Brompropionsäurechlorid (5,00 mmol) wird zusammen mit 2,4-Dimethylpyrrol (10,00 mmol) in 1,2-Dichlorethan gelöst und für 48 Stunden unter Argonatmosphäre zum Rückfluss erhitzt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt und mit Diisopropylethylamin versetzt. Nach weiteren 5 Minuten gibt man Bortrifluoridetherat zu und lässt für weitere 40 Minuten bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre rühren. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der Ansatz durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 mit 100% Dichlormethan als Laufmittel aufgearbeitet. Das Rohprodukt wird durch eine weitere Chromatographie mit 3:1 Pentan und Ethanol als Laufmittel aufgereinigt. Man erhält BE-BODIPY als grün-gelb fluoreszierenden, violetten Feststoff.

Ausbeute: 15 % (0,77 mmol)

Die Analytikdaten sind im Experimentellen Teil aufgeführt und entsprechen den Erwartungen.

3.9.2.3 Synthese von 8-(4-Benzoessäurecyanomethylester)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (Cyanomethyl-BODIPY)

3.9.2.3.1 Synthese von 4-Formyl-benzoessäurecyanomethylester

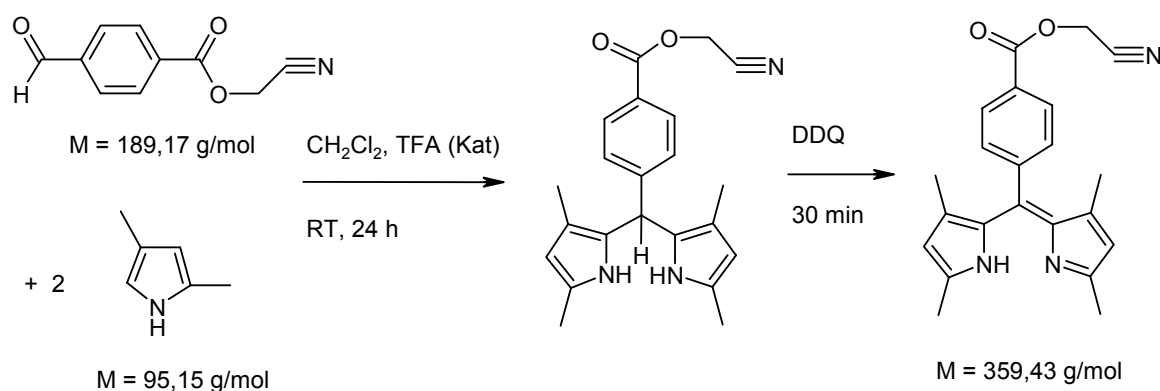


Carboxybenzaldehyd (71,00 mmol) wird bei 0 °C unter Argonatmosphäre in Triethylamin gelöst. Dann wird Chloracetonitril (142,00 mmol) zugegeben und für eine Stunde bei 0 °C gerührt. Danach wird der Ansatz für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur weitergerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit hat sich ein brauner, sehr fester Niederschlag im Kolben gebildet, der durch Zugabe von Ethylacetat gelöst wird. Nach der Aufarbeitung erhält man 4-Formylbenzoessäurecyanomethylester als braunes Öl.

Ausbeute: 68,5 %

Die Analytikdaten sind im Experimentellen Teil aufgeführt und entsprechen den Erwartungen.

3.9.2.3.2 Synthese von Cyanomethyl-4-[(Z)-(3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-yl)-(3,5-dimethyl-2H-pyrrol-2-yliden)methyl]benzoat



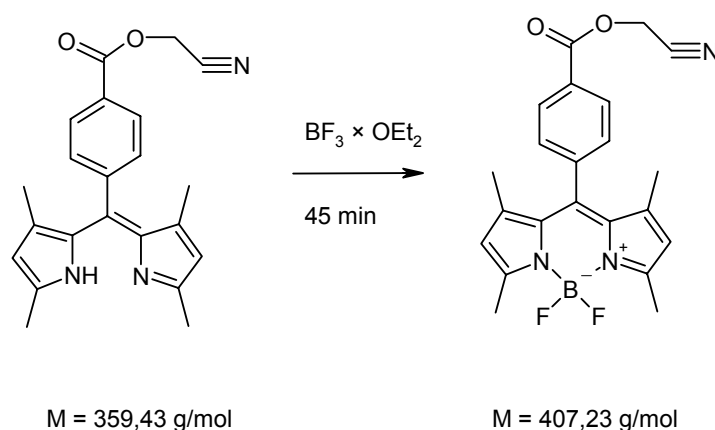
4-Formylbenzoessäurecyanomethylester (5,00 mmol) wird zusammen mit 2,4-Dimethylpyrrol (10,00 mmol) in trockenem Dichlormethan unter Argonatmosphäre gelöst und mit einem Tropfen

trockener Trifluoressigsäure als Katalysator versetzt. Die anfänglich gelb-braune Lösung beginnt sich direkt nach Zugabe der TFA violett zu färben. Der Ansatz wird für 24 Stunden unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird DDQ (5,00 mmol) zugegeben und für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird der Ansatz aufgearbeitet und durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 mit 100 % Dichlormethan als Laufmittel gereinigt. Das Produkt haftet als tiefvioletter Farbstoff am Kieselgel an und wird mit einer 1 : 1 Mischung aus Ethanol und Aceton vom Kieselgel gelöst.

Ausbeute: 46 %

Die Analytikdaten sind im Experimentellen Teil aufgeführt und entsprechen den Erwartungen.

3.9.2.3.3 Synthese von 8-(4-Benzoessäurecyanomethylester)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (Cyanomethyl-BODIPY)



Cyanomethyl-4-[(Z)-(3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-yl)-(3,5-dimethyl-2H-pyrrol-2-yliden)methyl]-benzoat (0,14 mmol) wird in trockenem Dichlormethan gelöst und bei 0 °C mit Diisopropylethylamin versetzt. Nach 5 Minuten wird Bortrifluoridetherat zugegeben und für weitere 45 Minuten bei Raumtemperatur weitergerührt. Der Ansatz wird dann durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 mit 100% Dichlormethan als Laufmittel als grün-gelb fluoreszierender, violetter Feststoff erhalten.

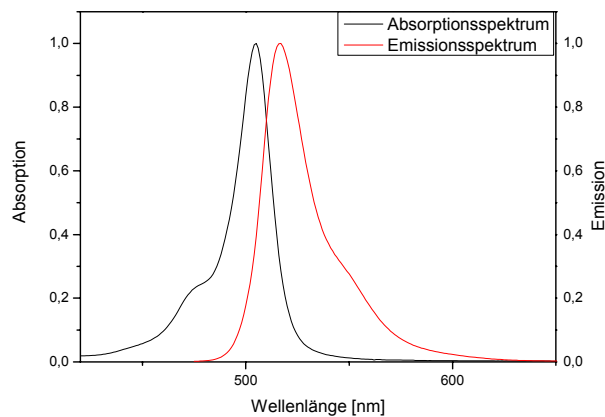
Ausbeute: 22 %

Die Analytikdaten sind im Experimentellen Teil aufgeführt und entsprechen den Erwartungen.

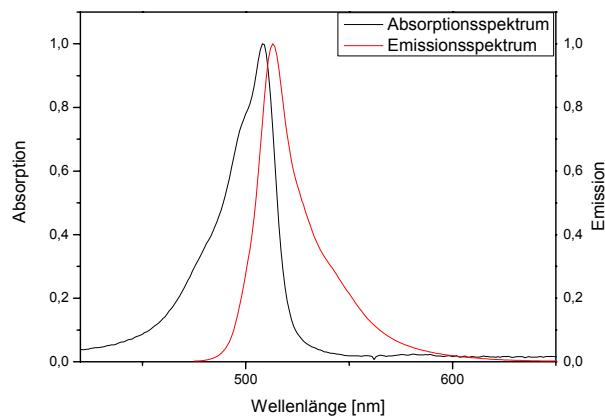
3.9.2.4 UV- und Fluoreszenzspektren der BODIPY-Farbstoffe

Im Folgenden sind die normierten UV- und Fluoreszenzspektren der drei synthetisierten BODIPY-Farbstoffe abgebildet. Auffällig ist die große Ausprägung der Symmetrie der UV- und der Fluoreszenzspektren. Da BODIPY-Farbstoffe sowohl sehr hohe Extinktionskoeffizienten, als auch sehr hohe Fluoreszenzquantenausbeuten besitzen, kann trotz der nahe beieinander liegenden Anregungs- und Fluoreszenzmaxima weit außerhalb des Anregungsmaximums eingestrahlt werden, weshalb die Fluoreszenzspektren allesamt vollständig abbildbar sind.

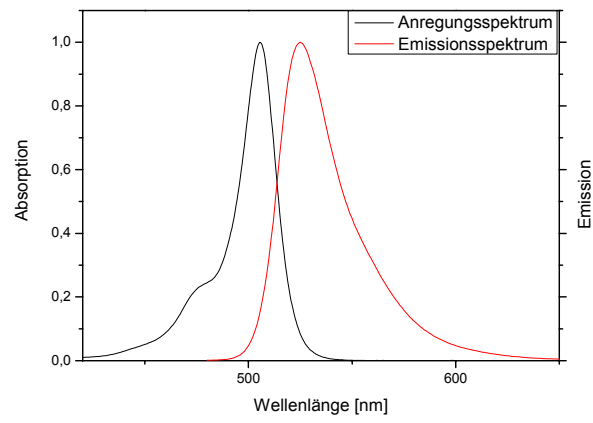
3.9.2.4.1 Spektrum des BP-BODIPY



3.9.2.4.2 Spektrum des BE-BODIPY



3.9.2.4.3 Spektrum des Cyanomethyl-BODIPY



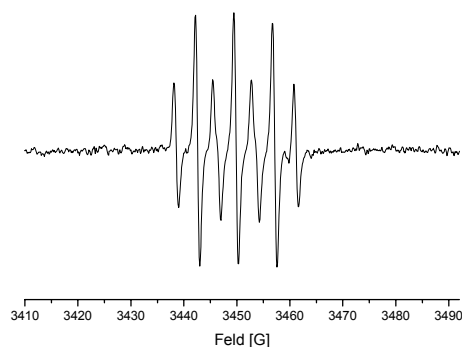
3.10 ESR-spektroskopische Charakterisierung der zyklischen Spin-Traps

Die neu synthetisierten zyklischen Spin-Traps BocAEMPO, BocEAEMPO, AEMPO und EAEMPO wurden zusammen mit EMPO und DMPO in Spin-Trapping-Experimenten eingesetzt. Ziel dieser Versuche war

- die Messung von ESR-Spektren mit verschiedenen Radikalen und Bestimmung der Hyperfeinkopplungen.
- die Bestimmung der Zerfallskonstanten k_d und der Halbwertszeiten der verschiedenen Spin-Addukte aus Mehrfachbestimmungen.
- der Vergleich dieser Daten mit Literaturwerten und Auswertung bezüglich einer Regelmäßigkeit der Stabilitäten.
- die Simulation der experimentell gewonnenen ESR-Spektren mit EasySpin.

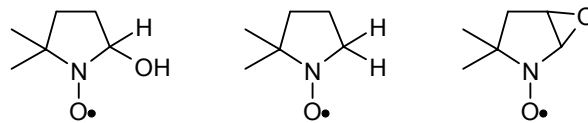
3.10.1 Artefakt- & Adduktspektren, deren Zustandekommen und Zerfall

In der Literatur wird in einer Vielzahl von Stellen die Bildung und der Zerfall von Artefaktsignalen bzw. der gewollten Spin-Addukte diskutiert (Janzen 1969; Makino 1989; Dikalov 2005). Im Verlauf der Vorarbeiten zu den ESR-Versuchen dieser Arbeit wurde ebenfalls ein Artefaktspektrum beobachtet. Dieses entstand bei der Umsetzung von DMPO in bidestilliertem Wasser statt in PBS-Puffer in Analogie zu dem weiter unten aufgeführten Pippetierschema für DMPO-OH-Addukte mit den dort verwendeten Lösungen bei gleicher Konzentration der DMPO-Lösung.

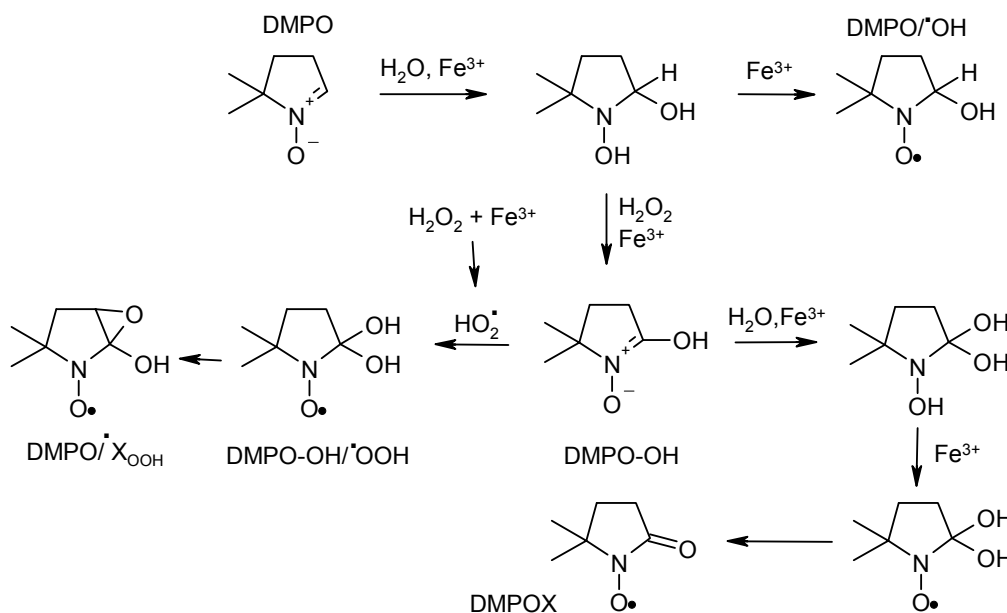


In diesem Spektrum liegen die gemessenen Hyperfeinkopplungskonstanten bei $a_N = 7,29$ und $a_{H\gamma} = 4,09$ Gauss. Aufgrund der beobachteten Kopplungskonstanten und Linienformen kann davon

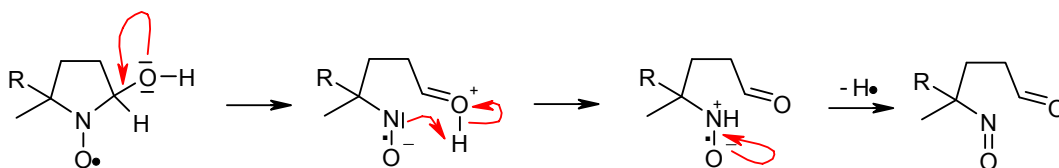
ausgegangen werden, dass es sich hierbei um das Spektrum von DMPOX handelt (Finkelstein 1980), dessen Entstehung weiter unten erläutert wird. Die Literatur veranschaulicht eindrucksvoll die Komplexität der Reaktionen bei einem Spin-Trapping-Experiment. Für DMPO wurde von Makino *et al.* (Makino 1989) in Kaninchenserum-Proben ein ESR-Spektrum gemessen, das in der Summe aus 19 Linien verschiedener Intensitäten besteht. Durch HPLC, MS und NMR konnten dabei diese 19 Linien auf das DMPO-OH-Addukt (4 Linien), DMPO-H-Addukt (9 Linien) und ein zunächst nicht identifizierbares weiteres Addukt mit 6 Linien zurückgeführt werden. Dieses erwies sich aus einer Auswahl von Möglichkeiten als Oxidationsprodukt des Epoxyhydroxylamins.



Janzen berichtet in seinem Artikel über die Synthese von DMPO (Janzen 1989) von Aminoxyilverunreinigungen, die ein Triplett Spektrum ergeben und ebenfalls über die 6-Linien-Spezies, die Makino identifizieren konnte. In einem weiteren Artikel (Dikalov 2005) wird die Bildung von Artefakten in Spin-Trapping-Systemen von DMPO und DEPMPO beschrieben. Durch Analyse der Spektren von DEPMPO-Superoxid-Addukten konnte nachgewiesen werden, dass deren Hyperfeinkopplungsstrukturen durch Zerfallsprodukte des Superoxidaddukts verursacht werden. Dabei kommt es zu einer Reaktionsfolge, die auch für DMPO-OH-Addukte durch nukleophile Addition von Wasser beschrieben ist, wobei die genauen Mechanismen im Dunkeln liegen:

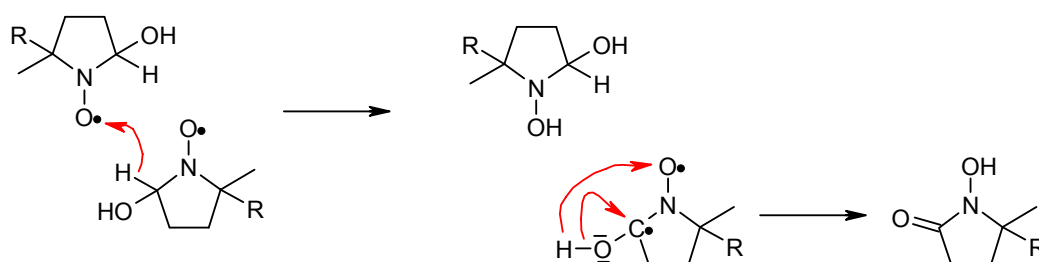


Zerfallsvorgänge sind auch in der theoretischen Arbeit von Villamena *et al.* (Villamena 2004) untersucht worden. Für den unimolekularen Zerfall von OH-Addukten wird dabei folgender Mechanismus vorgeschlagen:



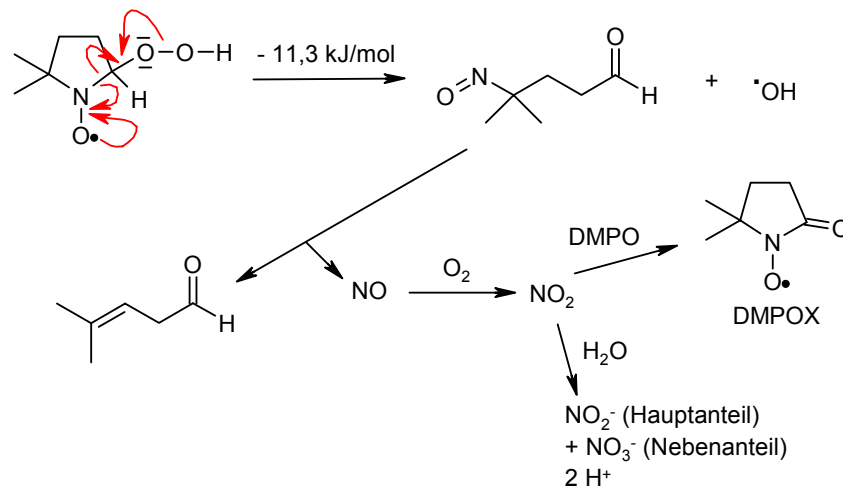
Gestützt wird dieser Mechanismus durch die nachweislich geringere Stabilität des DMPO-OH-Adduktes in basischem Milieu (Marriott 1980). Die Bindungsstärke der C-N-Bindung wird durch die Ladung am Nitroxyl-Stickstoff beeinflusst, diese ihrerseits wiederum durch die induktiven Effekte der Substituenten an der C5-Position. Da eine relativ negative Ladungsdichte am Stickstoff die C-N-Bindung stabilisieren kann, beeinflussen die Ladungsdichten um die Nitroxylgruppe die Stabilität des Ringsystems (Villamena 2004), was auch aus der theoretischen Arbeit folgt. Berechnungen der Ladungsverteilung ergeben eine signifikante Erhöhung der Ladungsdichte am C5 der Alkoxyphosphoryl-Derivate im Vergleich zu den Alkoxy-carbonyl-Derivaten. Dies steht auch im Einklang mit den experimentellen Werten für die Stabilität der Addukte. Für das DMPO-OH-Addukt ergibt sich darüber hinaus auch die positivste Partiaalladung am Stickstoff für alle berechneten Systeme, was aufgrund des obigen Mechanismus auch direkt eine Erklärung für die vergleichsweise kurze Halbwertszeit dieses Adduktes liefert.

Auch ein bimolekularer Zerfallsmechanismus wurde für OH-Addukte beschrieben (Khramtsov 1999):



Durch den weiteren Zerfall des entstehenden Hydroxylamins bzw. des Enols des Nitrons kommt man zu paramagnetischen Spezies, wie beispielsweise DMPOX. Dabei ist die Leichtigkeit der β -H-Abstraktion vom OH-Addukt abhängig von der Konformation des β -H-Atoms relativ zum einfach besetzten p-Orbital des Nitroxyl-Stickstoffatoms (Breuer 1989). Hierfür ist die Aktivierungsenergie dann am geringsten, wenn sich das abzuspaltende H-Atom in der selben Ebene wie das einfach besetzte Orbital befindet (Villamena 2004).

Für den Zerfall von Superoxid-Addukten existiert ebenfalls ein unimolekularer Mechanismus (Locigno 2005):

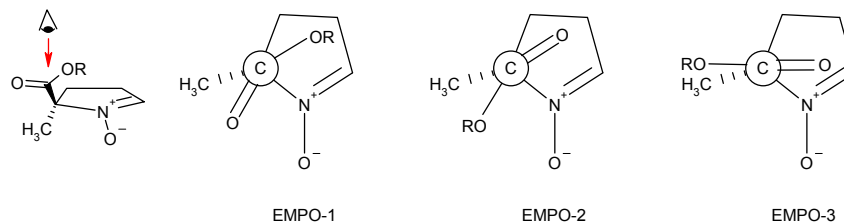


Die Bildung von NO beginnt dabei bei neutralem pH-Bereich und nimmt mit Abnahme des pH-Wertes stark zu. Im Basischen findet dagegen keine NO -Bildung statt. Da bei den Messungen von Superoxid-Radikalen in dieser Arbeit im neutralen Bereich gearbeitet wurde, konnte keine NO -Bildung im ESR-Spektrum detektiert werden.

Es kann davon ausgegangen werden, dass andere Radikal-Addukte nach ähnlichen Mechanismen in unimolekularen und bimolekularen Prozessen zerfallen.

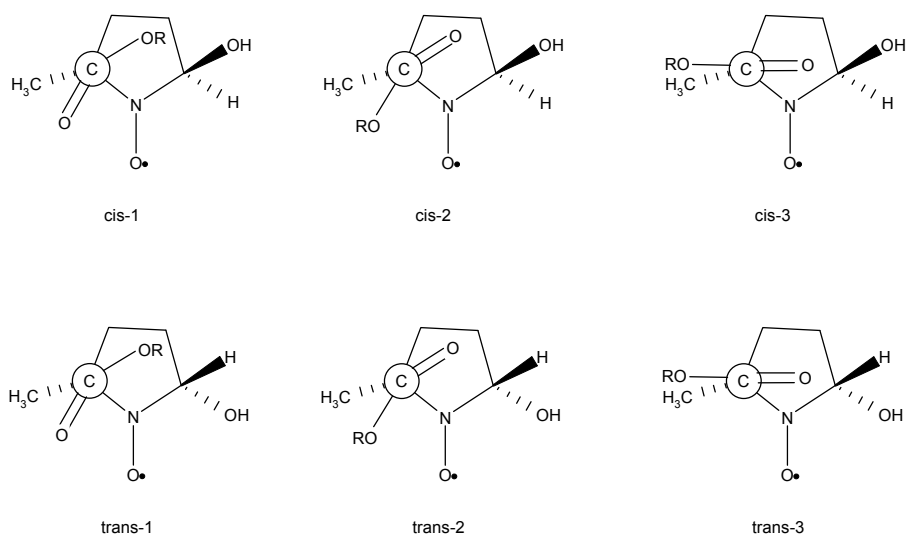
3.10.2 Cis-trans-Isomerie bei Spin-Traps- und Spin-Addukten

Pyrrolin-N-oxide können in verschiedenen Konformerformen vorliegen. Dabei ergeben sich für Spin-Traps vom EMPO-Typ drei Möglichkeiten, bei denen aus energetischen Gründen das Konformer 2 bevorzugt ist, was auch durch theoretische Ansätze (Villamena 2004) bestätigt wird:

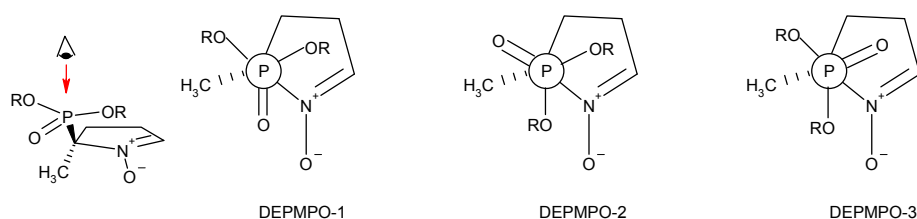


Bei der Umsetzung mit Radikalen, kommt es zur Bildung von Isomerenpaaren am Doppelbindungs-Kohlenstoffatom des Nitrons, je nachdem von welcher Seite aus der Angriff des Radikals erfolgt. In Abhängigkeit von der relativen Lage des Alkoxy-carbonyl-Substituenten

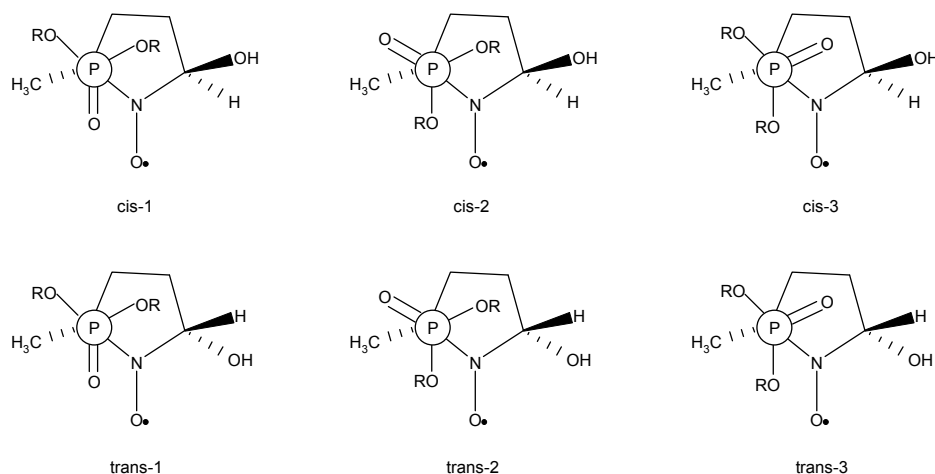
gegenüber der OH-Gruppe werden die Addukte als cis- und trans-Isomere bezeichnet. Die thermodynamischen Daten für die Spin-Trapping-Reaktion eines OH-Radikals mit $\Delta E_{\text{rxn}} = -58$ kcal/mol zeigen die starke Exothermie der Reaktion an. Dabei sind die Reaktionen von Alkoxy-carbonyl-substituierten Nitronen weniger exotherm, wie die der Alkoxyphosphoryl-Derivate (DEPMPO-artige Traps). Bei carboxylierten Nitronen ist dabei generell die Bildung des trans-Adduktes bevorzugt, am stabilsten ist dabei das Konformer mit trans-1-Konformation (Villamena 2004):



Bei Pyrrolin-N-oxiden mit Alkoxyphosphoryl-Substituenten erhält man das umgekehrte Ergebnis. So ist bereits auf Nitron-Ebene das Konformer 3 bevorzugt, da hier die Substituenten aus sterischen Gründen nicht mit dem Ringsystem kollidieren:



Bei der Reaktion mit Radikalen erhält man in Analogie zu den Alkoxy-carbonyl-Derivaten diastereotope Addukte, wobei hier generell die cis-Addukte und besonders das cis-3-Addukt für OH-Radikale, bevorzugt sind (Villamena 2004):

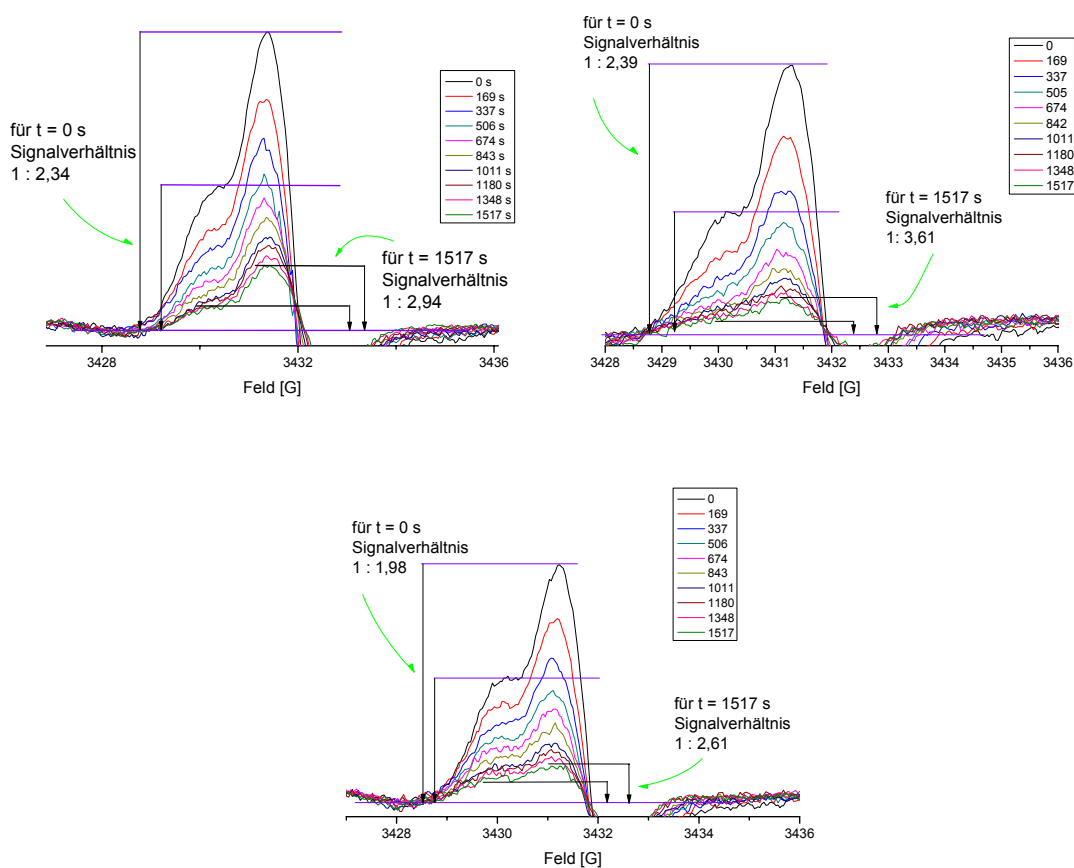


Ursache hierfür ist die Möglichkeit zur leichten Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Substituenten. Aus den gemessenen Daten geht hervor, dass manche der neu synthetisierten Spin-Traps eine außergewöhnliche Stabilität für manche der Addukte besitzen. In diesen Fällen handelt es sich möglicherweise um die Folge von Effekten, die in Analogie zu der Isomerenverteilung der Alkoxyphosphoryl-Nitronen zu sehen ist. Die sterisch aufwendigen Reste der Boc-Derivate könnten eine Stabilität des cis-Isomers verursachen, die vorhandene Amino-Funktion der geschützten Derivate möglicherweise ebenfalls. Eine weitere Fortsetzung dieser Diskussion erfolgt an späterer Stelle in Verbindung mit konkreten Messwerten.

In Folge der Bildung von cis-trans-Paaren kommt es zu Besonderheiten in den ESR-Spektren mancher Spin-Addukte (Villamena 2003). Zum Einen zeigen die Isomerenpaare verschiedene Hyperfeinkopplungskonstanten, was im ESR zu überlagerten Spektren führt. Diese müssen bei Simulationen als getrennte Spezies berechnet und mit einer adäquaten Gewichtung miteinander verrechnet werden um dem gemessenen Spektrum zu entsprechen. Zum Anderen besitzen die Isomerenpaare verschiedene Stabilitäten und zerfallen daher mit verschiedenen Zeitkonstanten, was die Berechnung von Zerfallskonstanten und Halbwertszeiten zusätzlich kompliziert. Die alternative Möglichkeit, dass die Spektren der Isomeren verschiedene Werte für g besitzen, konnte durch Experimente an L-, S- und X-Band-ESR-Spektrometern als Ursache ausgeschlossen werden (Tsai 2003).

Da die β -H-Kopplungen in Nitroxiden eine dihedrale Abhängigkeit zeigen, können durch die Analyse der $a_{\text{H}\beta}$ -Hyperfeinkopplung der 5-gliedrigen Ringsysteme die cis- und trans-Diastereomeren des Spin-Addukts unterschieden werden. Dabei korrespondiert der größere $a_{\text{H}\beta}$ -Wert mit der pseudo-axialen Orientierung der $\text{C}_{\text{H}\beta}$ -Bindung (Rockenbauer 1993). Daher erhält man in vielen Fällen für Hydroxy-, Alkoxy- und Alkyl-Radikal-Addukte klar aufgelöste Spektren der cis- und trans-Diastereomeren (Olive 2000; Zhang 2000; Zhao 2001; Stolze 2003; Stolze 2005; Stolze 2005; Culcasi 2006). Simulierte ESR-Daten, basierend auf Spektren mit 4096

Messpunkten zeigen, dass das cis-Diastereomer die Spezies mit den größeren $a_{\text{H}\beta}$ -Hyperfeinkopplungen darstellt. Die Stabilität betreffend existieren kontroverse Aussagen in der Literatur. Theoretische Berechnungen ergeben für EMPO-OH eine größere Stabilität für das trans-Isomer (Villamena 2004), während andererseits aus experimentellen Befunden eine höhere Stabilität für das cis-Isomer begründet wird (Culcasi 2006). In der vorliegenden Arbeit wurden die gemessenen Kinetiken der EMPO-OH-Addukte auf diesen Effekt hin analysiert. Betrachtet man sich die Spektren, so sieht man deutlich die kleinen Signale des cis-Isomers und die größeren Signale des trans-Isomers. Im Verlauf der Messzeit ändert sich das Verhältnis der Isomere, wie man in den folgenden Abbildungen sieht:



Aus den drei durchgeführten Messreihen resultieren folgende Verhältnisse:

Verhältnis cis- zu trans-Isomer für $t = 0$ s	Verhältnis cis- zu trans-Isomer für $t = 1517$ s
1 : 2,34	1 : 2,94
1 : 2,39	1 : 3,61
1 : 1,98	1 : 2,61

Als limitierend muss bei diesen Ergebnissen jedoch gesehen werden, dass nur mit 2048 Messpunkten gemessen wurde. Daher muss die Aussagekraft der Spektren als vergleichsweise

geringer betrachtet werden, da im betreffenden Bereich ein stärkerer Effekt durch Rauschen vorhanden ist. Trotzdem stützen die Daten eindeutig die theoretische Berechnung, nach der das trans-Isomer des EMPO-OH-Adduktes stabiler ist.

Bei den OH-Addukten der Spin-Traps BocAEMPO und BocEAEMPO erhält man ebenfalls Isomere in stark verschiedenen Verhältnissen. Da hier jedoch die Kopplungen der cis- und trans-Isomere näher beisammen liegen, sieht man in den ESR-Spektren eine wesentlich geringere Aufspaltung, die bei der Simulation analog zum EMPO über eine Gewichtung des cis-trans-Verhältnis berücksichtigt wird. Bei AEMPO und EAEMPO zeigt sich die Isomerenbildung sogar nur in Form einer etwas asymmetrischen Linienverbreiterung, weshalb für die OH-Addukte der Spin-Traps AEMPO und EAEMPO aus den erhaltenen Spektren kein sicherer Rückschluss auf das Isomerenverhältnis gezogen werden kann. Die Spektren zeigen keine Besonderheiten in der Linienform und bei der Simulation erhält man ausgezeichnete Übereinstimmungen, wenn man nur von einer Spezies ausgeht. Dies legt den Schluss nahe, dass zum Einen die Kopplungskonstanten der Isomere sehr ähnlich sind und sich die Linien daher analog zum BocAEMPO und BocEAEMPO stark überlagern. Zum Anderen kann davon ausgegangen werden, dass die Isomere in einem Verhältnis nahe 1:1 entstehen, da sonst trotz ähnlicher Kopplungskonstanten größere Asymmetrien in den Linien auftreten müssten (s. EMPO-OH). Insbesondere sollte in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen werden, dass sich im ESR-Spektrum viele Faktoren niederschlagen: So gehen zum Einen Effekte des Experiments auf Geräteebeine ein, d.h. die genauen Messparameter, Übermodulation oder „power broadening effects“ (Robinson 1999). Zum Anderen spielen Prozesse in der Reaktionslösung eine große Rolle. Die Form der Lorentzfunktion wird beschrieben durch die g- und A-Tensoren des Elektrons als auch durch die Rotations-Korrelationszeit des Moleküls (Robinson 1999). Durch Stöße mit Sauerstoffmolekülen oder anderen Spin-Addukten kommt es zu einer Linienverbreiterung, die durch die Hyperfeinkopplungen mit den verschiedenen ^1H -Kernen des Moleküls zusätzlich nochmals durch einen inhomogenen Beitrag verstärkt wird (Tsai 2003). In der Summe hat dies zur Folge, dass die augenscheinliche Abwesenheit von Isomeren in den ESR-Spektren von AEMPO-OH- und EAEMPO-OH-Addukten als Folge der oben genannten Vorgänge zu sehen ist und real trotzdem Isomere vorhanden sind, die sich in ihren Kopplungen stark ähneln und aufgrund der Messbedingungen im Spektrum nicht aufgelöst werden können.

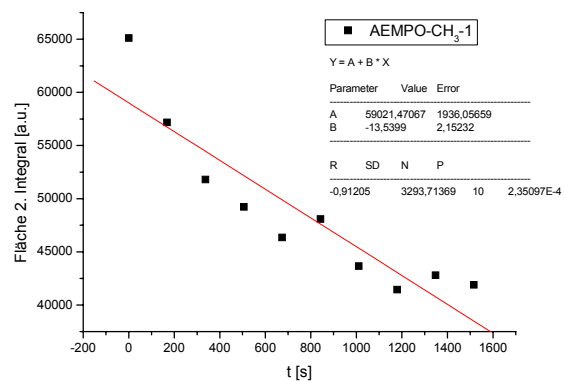
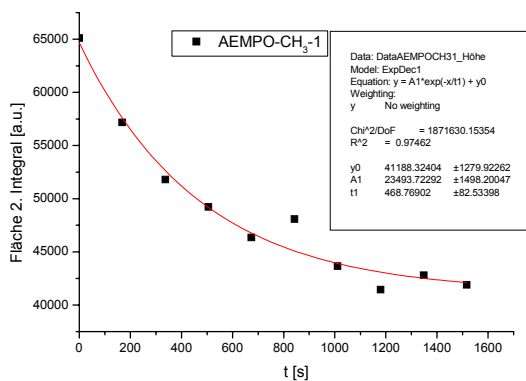
3.10.3 Auswertung der Spektren

Zur Berechnung der Zerfallskonstanten k_d und der Halbwertszeiten $t_{1/2}$ wurden die zeitabhängig gemessenen Spektren doppelt integriert und die so gewonnenen Flächenwerte gegen die Zeit aufgetragen. Die Integration erfolgte stets über das gesamte gemessene Spektrum von 80 Gauss „Breite“ mit einer Auflösung von 2048 Punkten. Für die so gewonnenen Messpunkte wurde jeweils eine exponentielle Zerfallsfunktion erster Ordnung berechnet. Da wie bereits weiter oben erwähnt die Vorgänge in einem Spin-Trapping-Experiment sehr komplex sind, beschreibt diese Funktion nur bedingt die wahren Verhältnisse. So sollte statt von einem Zerfall erster Ordnung besser von einem Zerfall Pseudo-erster Ordnung gesprochen werden, da Anteile verschiedener Vorgänge wie z.B. unimolekularer und bimolekularer Zerfallsreaktionen in Kombination mit sekundärer Radikalneubildung in der Summe nur den Anschein eines Zerfalls erster Ordnung ergeben. Zusätzlich kommen noch die Effekte durch die Isomerenbildung hinzu, die eine Interpretation zusätzlich erschweren. So beschreiben Culcasi *et al.* (Culcasi 2006) das kinetische Verhalten der OH-Addukte als eine Mischung aus unimolekularen und bimolekularen Prozessen. Diese hängen stark von den experimentellen Bedingungen ab, weshalb sich aufgrund der experimentell ermittelten Zerfallskonstanten für eine detaillierte Berechnung teilweise sogar deren Vorzeichen vertauschen, da je nach Versuchsbedingung sekundäre Radikalbildungsprozesse eine verschieden ausgeprägte Rolle spielen. Hinzu kommen unterschiedliche Stabilitäten der Isomere, wobei letztlich eine genaue Aussage über die Ursache dieser Unterschiede an der Vielzahl der Parameter scheitert. So wurde von Culcasi *et al.* (Culcasi 2006) ein langsamerer Zerfall von cis-OH-Addukten in Fenton-Ansätzen gefunden. Ob jedoch in diesem Fall das cis-Isomer stabiler ist oder sekundäre Radikal-Bildung für eine Veränderung des cis-trans-Verhältnis verantwortlich ist, konnte nicht festgestellt werden.

Unter diesen Gesichtspunkten beschreiben die für die Messpunkte vorgenommenen Berechnungen also nur teilweise die (unbekannte) Realität.

Aus diesem Grund ergeben sich für manche Radikale nahezu lineare Abfolgen der Messpunkte, die weder mit einem Zerfall erster Ordnung, noch mit einer linearen Regression exakt beschrieben werden können. In solchen Fällen wurde für die Berechnung der Halbwertszeiten und der Zerfallskonstanten versucht durch eine Kombination zu konkreten Zahlenwerten zu kommen. Dabei wurden die Zerfallskonstanten aus den t_1 -Werten der Exponentialfunktion bestimmt, während diese dann meist für eine Halbwertszeitberechnung nicht nutzbar waren, da man beim Auflösen des Gleichungssystems zu negativen Logarithmen kam, die nicht lösbar sind.

Aus der angewandten linearen Regression wurden dann die Halbwertszeiten berechnet. Dabei wurde bewusst jeder der zehn vorhandenen Messpunkt berücksichtigt, wengleich dadurch augenscheinlich eine schlechte Korrelation erhalten wurde, da meist der erste Messwert weit von den restlichen Messwerten entfernt lag. Letztlich kann auch in diesem Fall nicht exakt bestimmt werden, an welcher Stelle einer komplexeren Zerfallsfunktion die Regression angelegt wird. Daher ergeben die auf die hier benutzte Methode erhaltenen Funktionen eher konservativere Werte für die Halbwertszeit, da durch die Berücksichtigung eines stark abweichenden ersten Messwertes die Steigung größer wird. Zur Veranschaulichung sollen folgende Beispiele dienen, die konkrete Anwendung inklusive der verwendeten Formeln ist später beim DMPO-OH-Addukt erläutert:



Für den exponentiellen Zerfall erhält man einen Korrelationskoeffizienten von $R^2=0,97462$, für die lineare Regression einen Korrelationskoeffizienten von $R = -0,91205$. Im ersten Fall kann aus dem t_1 -Wert der Gleichung eine sinnvolle Zerfallskonstante berechnet werden, da jedoch nicht die Halbwertszeit erreicht wird, ergibt sich für den Versuch die Gleichung nach der Zeitachse zu lösen ein negativer Logarithmus, der nicht berechenbar ist. Aus der linearen Regression kann dieser jedoch problemlos bestimmt werden. Durch die Einbeziehung des ersten Messpunktes nimmt die Steigung zu (R wird schlechter) wodurch früher die Zeitachse geschnitten wird, was eine kleinere Halbwertszeit bedeutet, als unter Auslassen des ersten Messpunktes.

3.10.4 Simulation der Spektren

Zur Simulation der ESR-Spektren wurde die Funktion Garlic des EasySpin-Programmpakets benutzt. Diese Simulationssoftware basiert auf Matlab und ist daher recht flexibel für eine Vielzahl von Anwendungen einsetzbar und im Bedarfsfall mit Hilfe von Matlab-Funktionen erweiterbar

(Stoll 2006). „Garlic“ dient zur Simulation isotroper CW-ESR-Spektren für Spin-Systeme mit $S=1/2$ und einer beliebigen Anzahl von Kernspins mit $I \geq 1/2$.

Die zur Simulation der gemessenen ESR-Spektren benötigten Befehlszeilen sind im Experimentellen Teil der Arbeit aufgeführt. Exemplarisch sollen hier kurz die berücksichtigten Parameter anhand der Simulation des DMPO-OH-Addukts vorgestellt werden. Die hierzu benötigten Befehlszeilen sehen wie folgt aus:

```
Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[41.54,41.54],'n',[1 1]);
Sys.lw = [0.09 0.09];
Exp.Range = [341.2 349.2];
Exp.mwFreq = 9.668;
garlic (Sys,Exp);
```

Dabei definiert der Befehl „Sys“ das simulierte Spin-System. Hierbei geht der g-Wert (g), die Art der gekoppelten Kerne (Nucs), die Kopplungskonstanten (A, in MHz) und die Anzahl der Kerne (n) ein.

Der Befehl „Sys.lw“ gibt die Linienbreite der Lorentz- und der Gaussfunktion an. Hierbei kann auch auf eine Gaussfunktion verzichtet werden, indem an zweiter Position in der Klammer eine 0 eingegeben wird.

Mit „Exp.Range“ wird der Messbereich (in mT) und mit „Exp.mwFreq“ die Mikrowellenfrequenz (in GHz) festgelegt. Die Berechnung des Spektrums startet durch die Eingabe des Befehls „garlic(Sys,Exp)“. Für weitere Möglichkeiten des Programmpakets sei auf die Literatur verwiesen (Stoll 2006).

In den meisten Fällen ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung der Simulation und der gemessenen Spektren. Die vorhandenen Abweichungen bestehen primär aus Unterschieden im Basisbereich der Linien und in Differenzen der Intensitäten. Da jedoch in ein gemessenes ESR-Spektrum sehr viele Parameter eingehen, die bei der Simulation unberücksichtigt bleiben, sind die hier erhaltenen Werte als sehr gut zu bezeichnen. Wie bereits weiter oben erwähnt beeinflussen Effekte des Experiments und des Spektrometers, wie z.B. die genauen Messparameter, Übermodulation oder „power broadening effects“ (Robinson 1999) die Linienform der ESR-Spektren. Insbesondere durch Stöße mit Sauerstoffmolekülen oder anderen Spin-Addukten kommt es zu einer Linienverbreiterung, die durch teilweise nicht aufgelösten Hyperfeinkopplungen mit den verschiedenen ^1H -Kernen des Moleküls zusätzlich nochmals durch einen inhomogenen Beitrag verstärkt wird (Tsai 2003). Auch Konzentrationseffekte der zu

messenden Substanz und paramagnetische Verunreinigungen (Robinson 1999; Culcasi 2006) können die Linienform beeinflussen.

3.10.5 Probenbereitung

Bei der Probenbereitung ist zu beachten, dass Stammlösungen zyklischer Nitronen unmittelbar vor geplanten ESR-Messungen frisch präpariert werden müssen. Auch frisch synthetisierte Spin-Traps sind mit geringen Anteilen radikalischer Spezies kontaminiert. Diese liefern naturgemäß Grund- und Artefaktsignale im ESR-Spektrum. Zur Aufreinigung wird entweder per Vakuumdestillation die reine Spin-Trap von den paramagnetischen Verunreinigungen abdestilliert oder über Aktivkohle aufgereinigt, wobei die paramagnetischen Verunreinigungen von der Aktivkohle absorbiert werden (Barr; Zhao; Finkelstein 1980; Marriott 1980; Janzen 1989; Zhao 2001; Jackson 2002; Villamena 2002). Dabei fungiert die Aktivkohle wie eine RP-Säule: Polare Lösungsmittel eluieren nur das Nitron, während unpolare Lösungsmittel sowohl das Nitron als auch die Verunreinigungen eluieren. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit der Aktivkohle-Variante aufgereinigt:

Eine kleine Menge der Spin-Trap-Verbindung wird in Methanol gelöst und über Aktivkohle gereinigt. Bei dieser Methode kommt es aufgrund der Absorption der Spin-Trap in die Aktivkohle zu Substanzverlusten von 10-30 %. Dies muss bei der Planung der Experimente berücksichtigt werden. Das detaillierte Verfahren ist im Experimentellen Teil beschrieben. Die so erhaltene Spin-Trap wird dann eingewogen und mit passenden Mengen PBS-Puffer, pH = 7,2 aufgefüllt, um eine Konzentration von 100 mM einzustellen. Zur Überprüfung der Reinheit werden dann zwei Versuche durchgeführt:

- Messung der Stammlösung: Wenn eine ausreichende Qualität für die Messungen erreicht ist, sind keine Grundsignale mehr zu sehen, die über einer Intensität von 3000 A.U. liegen. Manchmal ist nach einem Reinigungsdurchgang immer noch ein Artefaktsignal vorhanden. Um dieses weiter zu minimieren wird die Aufreinigung wiederholt, wobei dann entgegen des ersten Durchgangs das erhaltene Aktivkohlepellet mit Methanol extrahiert wird.

- Sobald die Grundsignale einen akzeptablen Wert erreicht haben, wird die Stammlösung auf Artefaktsignale durch Lösungsmittelkontamination untersucht. Hierzu wird ein Fenton-Ansatz für die Erzeugung von OH-Radikale angesetzt (s. unten). Bei diesem Versuch sollte dann nur das Pseudo-Quartett-Spektrum des OH-Addukts der verwendeten Spin-Trap gemessen werden. Andernfalls sind noch Methanolreste vorhanden, die das typische duplizierte Triplet-Spektrum zeigen. In diesem Fall wird die Probe komplett mit dem PBS-Puffer im Hochvakuum trocken gezogen und für einige Stunden im Vakuum (1×10^{-3} mbar) belassen. Danach wird erneut in PBS aufgenommen und der Versuch wiederholt.

Sobald diese Vorversuche positiv verlaufen sind, kann mit den eigentlichen Messungen begonnen werden. Die so gewonnene Spin-Trap-Lösung kann für maximal 14 Tage verwendet werden. Dabei sollte sie während der Messungen dunkel auf Eis und am Ende jedes Messtages unter Argon bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zum nächsten Tag gelagert werden. Genauere Angaben zum Vorgehen befinden sich im Experimentellen Teil der Arbeit.

3.10.6 Benötigte Lösungen

Zur Erzeugung der Radikale werden folgende weitere Lösungen benötigt:

PBS-Puffer, pH = 7,2 (Zusammensetzung s. Experimenteller Teil)

Fenton-Lösungen:

100 mM H_2O_2 -Lösung: 510,00 μl H_2O_2 30 %ig ad 50 ml H_2O bidest.

10 mM Fe^{2+} -Lösung: 196,10 mg $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ad 50 ml H_2O bidest.

Beide Lösungen werden stets frisch für eine Messreihe angesetzt. Bei Verwendung an aufeinander folgenden Tagen muss nicht täglich neu angesetzt werden. Die Lösungen wurden maximal 14 Tage verwendet.

Lösungen und Zusätze:

für SO_3 -Radikale: 100 mM-Lösung: 126,00 mg NaSO_3 ad 10 ml PBS-Puffer, pH = 7,2

für CO_2 -Radikale: 100 mM-Lösung: 68,00 mg Na-Formiat ad 10 ml PBS-Puffer, pH = 7,2

für CH_2OH -Radikale: Methanol p.a. nach Pipettierschema, s.unten.

für $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ -Radikale: Ethanol p.a. nach Pipettierschema, s.unten

für CH_3 -Radikale: DMSO p.a. nach Pipettierschema, s.unten

Die beiden Lösungen für SO_3^- - und CO_2 -Radikale werden stets frisch für eine Messreihe angesetzt. Bei Verwendung an aufeinander folgenden Tagen muss nicht täglich neu angesetzt werden. Auch diese Lösungen wurden maximale 14 Tage verwendet.

Die Pipettierschemata für die einzelnen Umsetzungen sind bei den zugehörigen Spektren aufgeführt. Dort sind auch die gemessenen Hyperfeinkopplungskonstanten und die berechneten Zerfallskonstanten k_d , sowie die Halbwertszeiten der Addukte tabelliert.

Exemplarisch wird bei der Umsetzung von DMPO mit Fenton-Reagenz zur Erzeugung des DMPO-OH-Addukts das Vorgehen zur Bestimmung der Halbwertszeiten der Addukte beschrieben. Bei den anderen Spin-Traps und Radikalen wurde analog dazu verfahren. Die zugehörigen Messreihen sind im Experimentellen Teil aufgeführt. Es folgen tabelliert die so berechneten Halbwertszeiten und Hyperfeinkopplungskonstanten, sowie ein Vergleich der gemessenen Spektren mit Simulationen, die mit dem Programmteil Garlic des EasySpin-Programmpakets simuliert wurden (Stoll 2006). Die zugehörigen Befehlszeilen sind ebenfalls im Experimentellen Teil aufgeführt. Am Ende jedes Abschnitts werden die erhaltenen Zerfallskonstanten und Halbwertszeiten, sofern möglich, mit Literaturwerten verglichen und diskutiert.

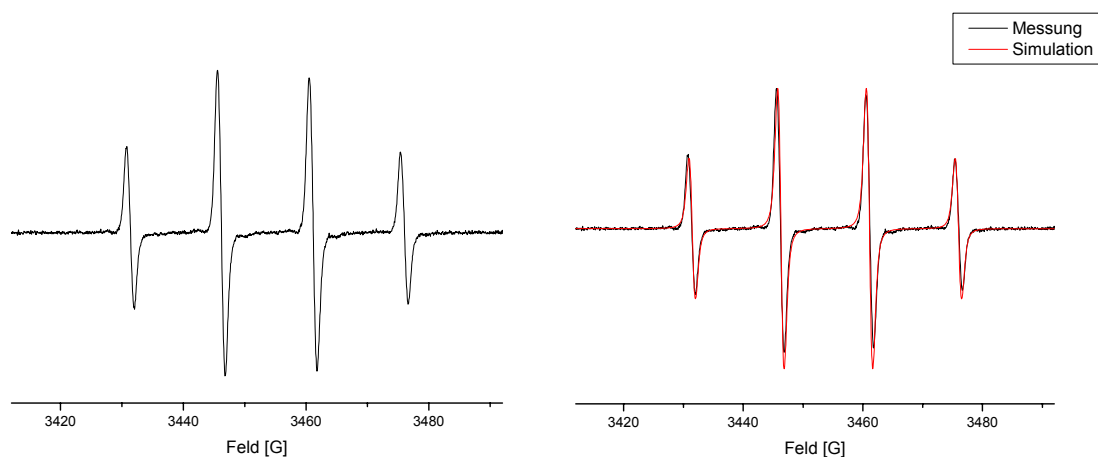
3.10.7 Umsetzung von DMPO als Referenzsubstanz

Verwendet wurde eine Stammlösung der Konzentration $c = 100,05 \text{ mM}$.

Die Umsetzungen erfolgten nach folgendem Pipettierschema, wobei jeder Versuch dreimal neu angesetzt und vermessen wurde.

Radikale	OH	SO ₃	CO ₂	CH ₂ OH	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
Spin-Trap-Stamml. [μl]	10	10	10	10	10	10
H ₂ O ₂ -Lös. [μl]	20	20	20	20	20	20
Fe ²⁺ -Lös. [μl]	20	20	20	20	20	20
PBS-Puffer [μl]	50	0	0	30	30	30
Zusätze [μl]	0	50	50	20	20	20

Man erhält folgendes ESR-Spektrum für das OH-Addukt:



Zur Bestimmung der Zerfallskonstanten k_d und der Halbwertszeiten wurden von einem Ansatz zehn ESR-Spektren mit jeweils 2048 Punkten Auflösung nacheinander aufgenommen. Diese Spektren wurden mit Origin 7.5 zweifach integriert und die so erhaltenen Flächenintegrale gegen die Zeit aufgetragen. Man erhält dann aus diesen Daten durch den Fit eines Exponentiellen Zerfalls erster Ordnung gemäß der Gleichung $y = y_0 + A_1 \times e^{-x/t_1}$ die zugehörige Zerfallskonstante und Halbwertszeit nach folgenden Rechnungen:

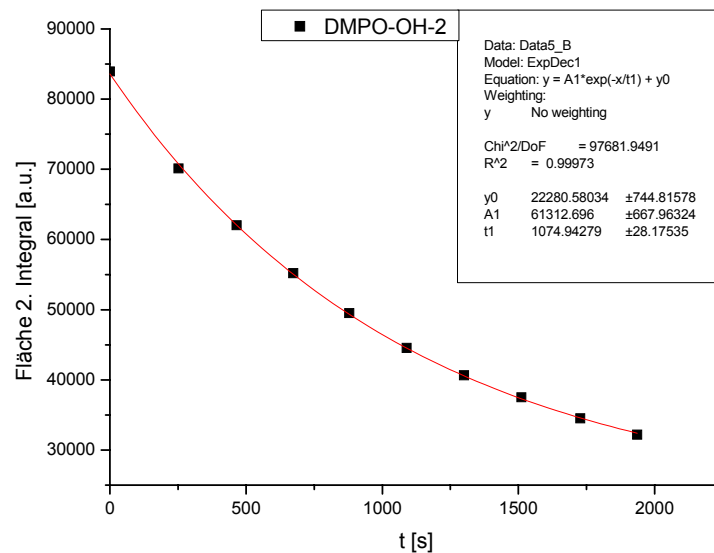
Für die Zerfallskonstante k_d gilt: $k_d = 1/t_1 \text{ [s}^{-1}\text{]}$

Für die Halbwertszeiten gilt:

$$x = t_{1/2} = -1 \times \ln \left(\frac{\left(\frac{y_0 + A_1}{2} \right) - y_0}{A_1} \right) \times t_1 \text{ [s]}$$

Für alle anderen Messungen wurde analog hierzu verfahren. Ausnahmen sind explizit aufgeführt.

Zur Absicherung der Aussagekraft der errechneten Zerfallskonstanten und Halbwertszeiten wurde jede Messreihe dreimal wiederholt und daraus jeweils ein Mittelwert mit Standardabweichung berechnet. Exemplarisch ist hier eine der Zerfallskurven abgebildet. Die Datensätze für die restlichen Messungen befinden sich im Experimentellen Teil.

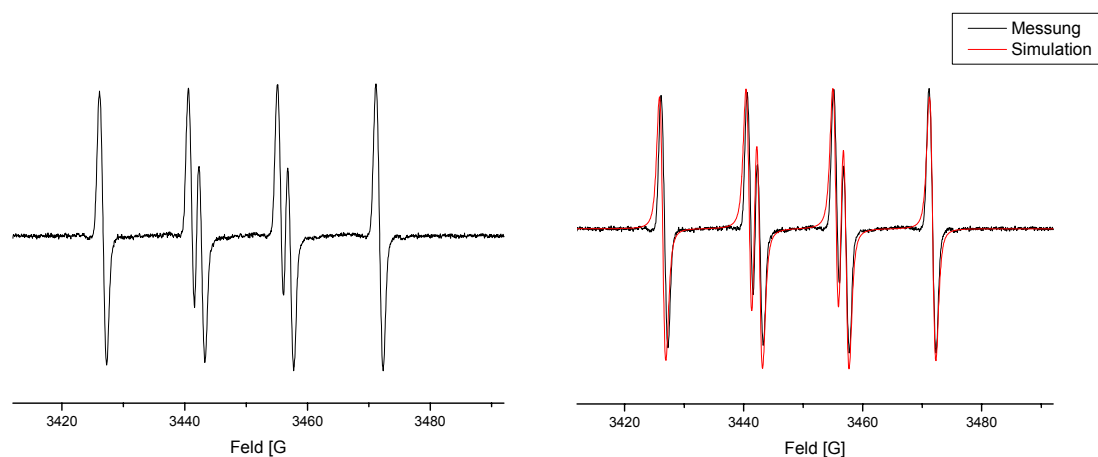


Man erhält aus den Spektren und der Auswertung folgende Werte :

k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
		$a_{H\beta}$	a_N
$[10^{-3} \text{ s}^{-1}]$	[s]		
$0,60 \pm 0,30$	1796 ± 577	14,82	14,82

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen von einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern mit dem Spin des ungepaarten Elektrons zugrunde gelegt.

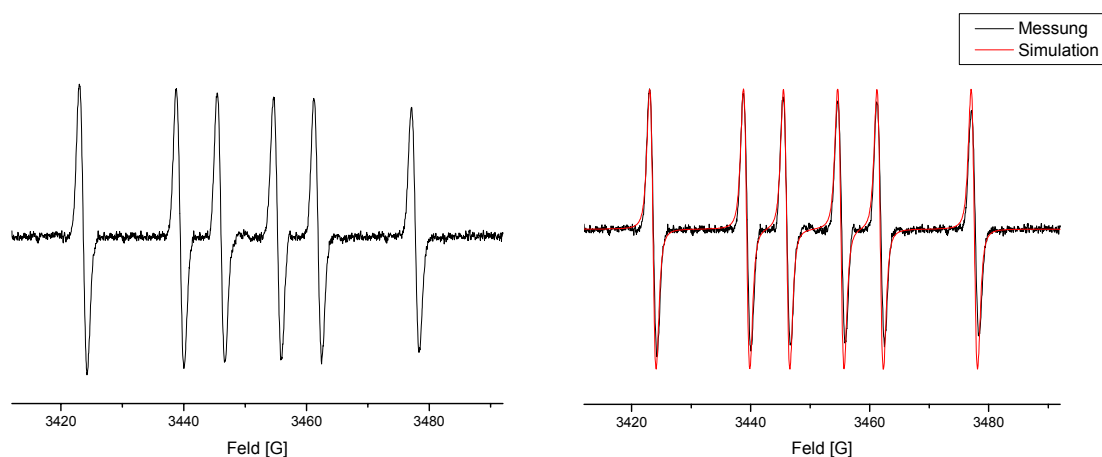
Für das DMPO-SO₃-Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
[10^{-3} s^{-1}]	[s]	$a_{H\beta}$	a_N
$2,71 \pm 0,76$	390 ± 82	16,24	14,53

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen von einem ¹⁴N- und einem ¹H-Kern mit dem Spin des ungepaarten Elektrons zugrunde gelegt.

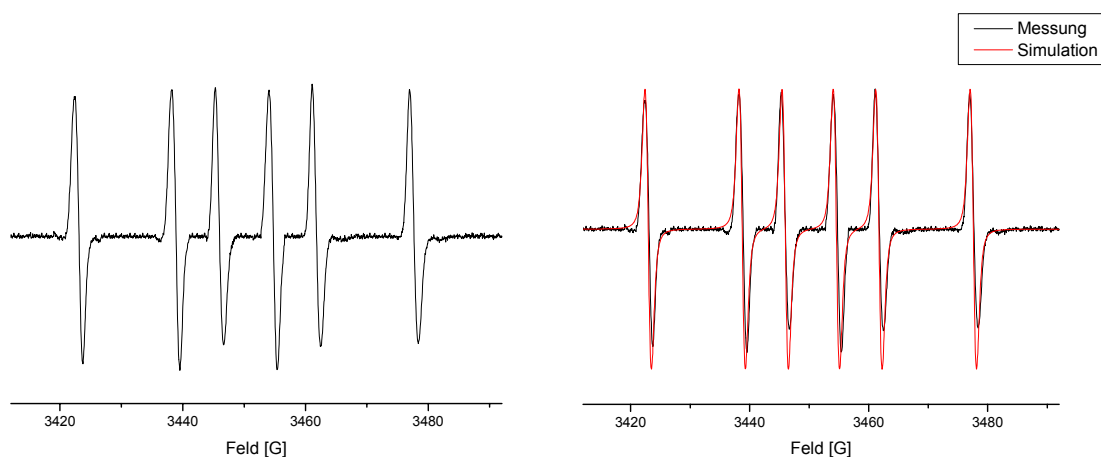
Für das DMPO-CH₂OH-Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
[10^{-3} s^{-1}]	[s]	$a_{H\beta}$	a_N
$1,45 \pm 0,43$	717 ± 283	22,41	15,76

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen von einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern mit dem Spin des ungepaarten Elektrons zugrunde gelegt.

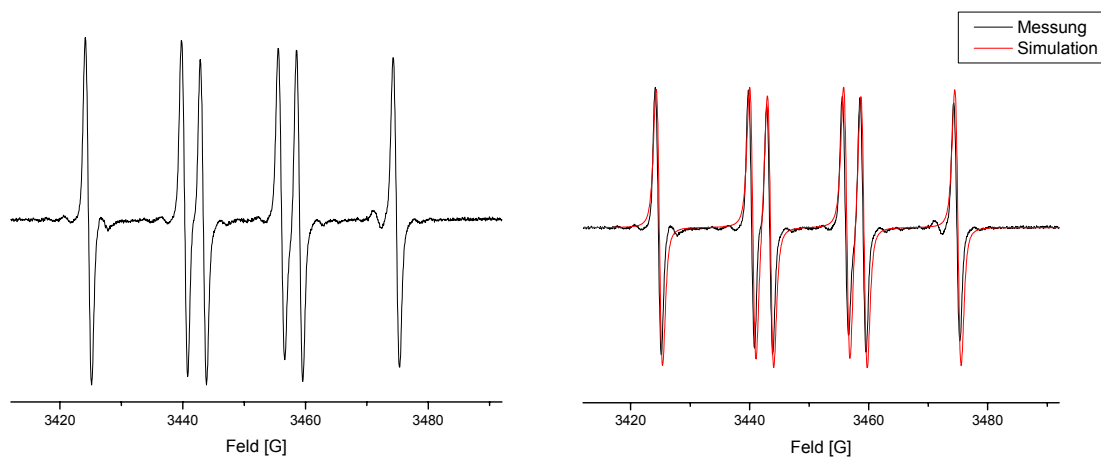
Für das DMPO- CH_3CHOH -Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfinekopplungskonstanten [G]	
$[10^{-3} \text{ s}^{-1}]$	[s]	$a_{\text{H}\beta}$	a_{N}
$3,11 \pm 0,76$	397 ± 201	22,98	15,78

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen von einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern mit dem Spin des ungepaarten Elektrons zugrunde gelegt.

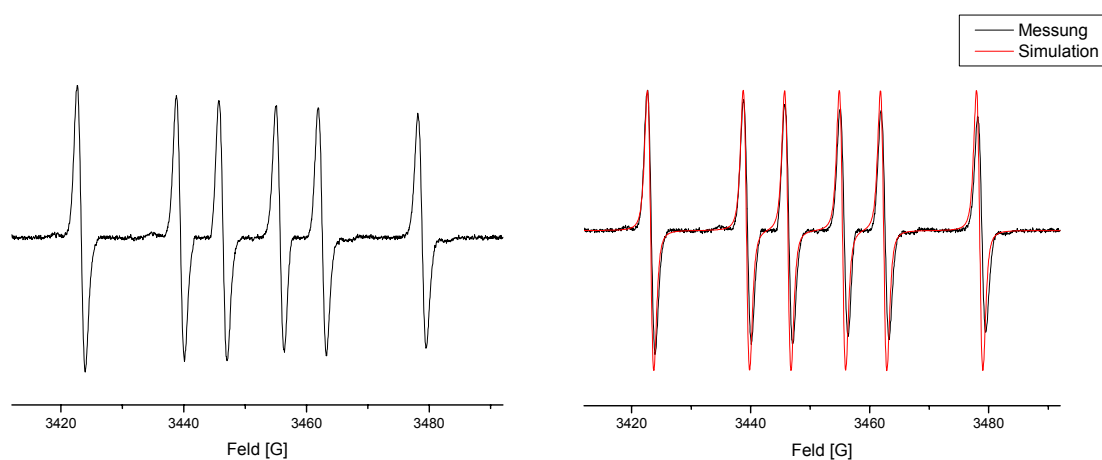
Für das DMPO- CO_2 -Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
$[10^{-3} \text{ s}^{-1}]$	[s]	$a_{H\beta}$	a_N
$0,92 \pm 0,17$	1258 ± 248	18,65	15,73

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen von einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern mit dem Spin des ungepaarten Elektrons zugrunde gelegt.

Für das DMPO- CH_3 -Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
$[10^{-3} \text{ s}^{-1}]$	[s]	$a_{H\beta}$	a_N
$0,98 \pm 0,18$	338 ± 162	23,01	16,10

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen von einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern zugrunde gelegt.

Aus dem Vergleich der gemessenen Hyperfeinkopplungskonstanten mit den verfügbaren Literaturwerten erhält man folgende Ergebnisse:

Die Hyperfeinkopplungskonstanten sind, bedingt durch ihre Abhängigkeit vom gewählten Lösungsmittel und je nach Versuchsbedingungen, verschieden groß. Ausgiebige Untersuchungen zum Lösungsmittelleffekt sind in der Literatur bekannt (Finkelstein 1980; Janzen 1982). Die hier erhaltenen Abweichungen in Abhängigkeit von der Polarität sind zum Teil extrem groß und liegen

beispielsweise für das DMPO-*tert*-Butoxyl-Addukt bei 16,21 % für die a_N -Kopplung und bei 161,50% für die a_H -Kopplung (Janzen 1982).

Die gemessenen Werte für DMPO-Addukte dieser Arbeit sind im Einklang mit den Literaturdaten:

Hyperfeinkopplungskonstanten für DMPO-OH [G]			Lösungsmittel	Quelle
a_N	$a_{H\beta}$	$a_{H\gamma}$		
14,82	14,82	-	PBS, pH = 7,2	Diese Arbeit
14,95	14,95	-	-	(Stolze 2000)
14,90	14,90	-	PBS, pH = 7,4	(Nishizawa 2004)
14,70	14,70	-	PBS	(Masaki 1995)
15,00	15,00	-	PBS, pH = 6,0	(Marriott 1980)
14,30	14,30	-	PBS, pH = 7,8	(Makino 1989)
14,90	14,90	-	-	(Rosen 2004)
15,30	15,30	0,61 / 0,25	H ₂ O	(Harbour 1974)
14,90	14,90	-	PBS, pH = 7,4	(Zhao 2001)
14,90	14,90	-	HEPES, pH = 7,4	(Vasquez-Vivar 2000)
15,01	15,01	-	H ₂ O	(Janzen 1989)
14,90	14,90	-	-	(Finkelstein 1980)
14,85	14,85	-	H ₂ O	(Barr)

Weitere Werte für DMPO-OH-Addukte sind von Buettner (Buettner 1987) in einem Übersichtsartikel tabelliert. Sie liegen ebenfalls wie die Messwerte im Bereich der oben tabellierten Werte.

Hyperfeinkopplungskonstanten für DMPO-SO ₃ [G]		Lösungsmittel	Quelle
a_N	$a_{H\beta}$		
14,53	16,24	PBS, pH = 7,2	Diese Arbeit
14,70	16,00	H ₂ O, pH = 7,0	(Buettner 1987)
14,55	16,16	H ₂ O	
14,70	16,00	Puffer, pH = 7,9	
14,40	15,90	Puffer, pH = 7,8	
14,50	16,10	Puffer, pH = 7,8	
14,63	16,50	H ₂ O, pH = 8,5	
14,70	16,00	Puffer, pH = 7,4	

Die gemessenen Werte sind in guter Übereinstimmung mit den Literaturwerten.

Hyperfeinkopplungskonstanten für DMPO-CH ₂ OH [G]		Lösungsmittel	Quelle
a _N	a _{Hβ}		
15,76	22,41	PBS, pH = 7,2	Diese Arbeit
15,95	22,69	PBS, pH = 6,0	(Marriott 1980)
16,00	22,70	H ₂ O	(Finkelstein 1980)
14,66	20,67	Benzol	(Buettner 1987)
16,00	22,70	H ₂ O	
15,95	22,69	H ₂ O, pH = 6,0	
15,87	22,57	H ₂ O	

Das Vorliegen des Sauerstoff-zentrierten DMPO-OCH₃-Addukts kann ausgeschlossen werden, da dessen Kopplungskonstanten mit a_N = 14,45 G; a_{Hβ} = 10,01 G; a_{Hγ} = 1,35 G (Dikalov 2003) vollkommen von den hier gemessenen Werten abweichen.

Hyperfeinkopplungskonstanten für DMPO-CH ₃ CHOH [G]		Lösungsmittel	Quelle
a _N	a _{Hβ}		
15,78	22,98	PBS, pH = 7,2	Diese Arbeit
15,80	22,80	PBS, pH = 7,4	(Nishizawa 2004)
15,80	22,80	Puffer, pH = 7,4	(Buettner 1987)
15,80	22,90	Puffer, pH = 7,5	
16,00	23,00	Puffer, pH = 7,4	
15,80	22,80	H ₂ O	
15,80	22,90	H ₂ O	
15,80	22,80	Puffer, pH = 7,4 / EtOH 9:1	
16,00	23,00	Puffer, pH = 7,8	
15,80	23,00	Puffer, pH = 7,0	
15,80	22,80	H ₂ O	(Finkelstein 1980)

Das Vorliegen eines β-C-zentrierten DMPO-CH₂CH₂OH-Addukts kann nicht ganz ausgeschlossen werden. Der einzige verfügbare Literaturwert beschreibt Kopplungskonstanten von a_N = 15,98 G und a_H = 22,83 G (Buettner 1987) und liegt damit exakt im gleichen Schwankungsbereich, wie die Werte für das DMPO-CH₃CHOH-Addukt. Die Werte für die Kopplungskonstanten eines Sauerstoff-zentrierten DMPO-OCH₂CH₃-Addukts liegen bei a_N = 13,22 G und a_H = 6,69 G, gemessen in Benzol bzw. a_N = 13,50 G und a_H = 7,40 G, gemessen in Ethanol (Buettner 1987). Sie sind vollkommen außerhalb des Bereichs der Messwerte, wodurch die Existenz einer Sauerstoff-zentrierten Spezies ausgeschlossen werden kann.

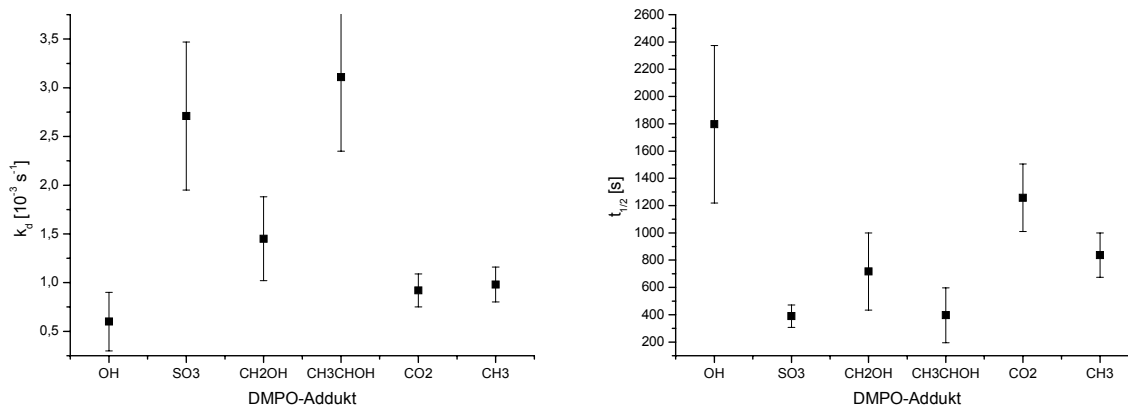
Hyperfeinkopplungskonstanten für DMPO-CO ₂ [G]		Lösungsmittel	Quelle
a _N	a _{Hβ}		
15,73	18,65	PBS, pH = 7,2	Diese Arbeit
15,60	18,70	H ₂ O, pH = 5,5	(Buettner 1987)
15,80	19,10	H ₂ O	
15,60	18,80	Puffer, pH = 7,0	
15,60	18,70	Puffer, pH = 11,0	
15,69	18,70	Puffer, pH = 7,0	
15,80	18,60	Puffer, pH = 7,0	
15,60	18,70	Puffer, pH = 7,0	
15,70	18,80	Puffer, pH = 7,4	
15,60	18,70	H ₂ O	(Finkelstein 1980)
15,60	18,70	PBS, pH = 7,4	(Nishizawa 2004)

Die gemessenen Werte liegen im Erwartungsbereich für das DMPO-CO₂-Addukt.

Hyperfeinkopplungskonstanten für DMPO-CH ₃ [G]		Lösungsmittel / pH-Wert	Quelle
a _N	a _{Hβ}		
16,10	23,01	PBS, pH = 7,2	Diese Arbeit
16,33	23,24	H ₂ O	(Buettner 1987)
16,10	23,00	H ₂ O	
16,40	23,40	Puffer, pH = 7,4	
16,10	23,00	H ₂ O / DMSO 19 : 1	
16,40	23,40	Puffer, pH = 7,4	
16,10	23,00	H ₂ O + 30% DMSO	(Barr)

Die gemessenen Werte liegen exakt im zu erwartenden Bereich.

Im Anschluss sind die experimentell erhaltenen Werte für die Zerfallskonstanten k_d und die Halbwertszeiten $t_{1/2}$ graphisch dargestellt. Eine Diskussion der Werte erfolgt am Ende des Kapitels unter 3.10.13.



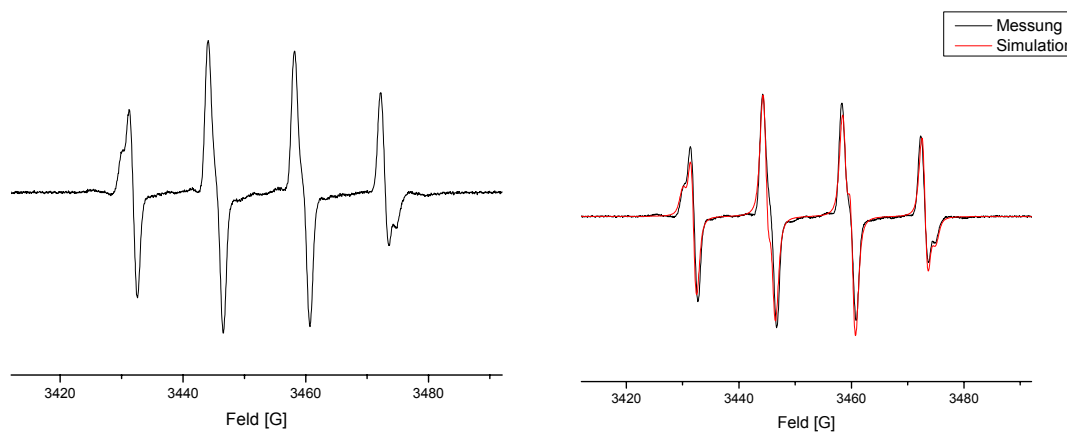
3.10.8 Umsetzung von EMPO als Referenzsubstanz

Verwendet wurde eine Stammlösung der Konzentration $c = 99,97 \text{ mM}$.

Die Umsetzungen erfolgten nach folgendem Pipettierschema, wobei jeder Versuch dreimal neu angesetzt und vermessen wurde.

Radikale	OH	SO ₃	CO ₂	CH ₂ OH	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
Spin-Trap-Stamml. [μl]	20	20	20	20	20	20
H ₂ O ₂ -Lös. [μl]	20	20	20	20	20	20
Fe ²⁺ -Lös. [μl]	20	20	20	20	20	20
PBS-Puffer [μl]	40	20	20	20	20	20
Zusätze [μl]	0	20	20	20	20	20

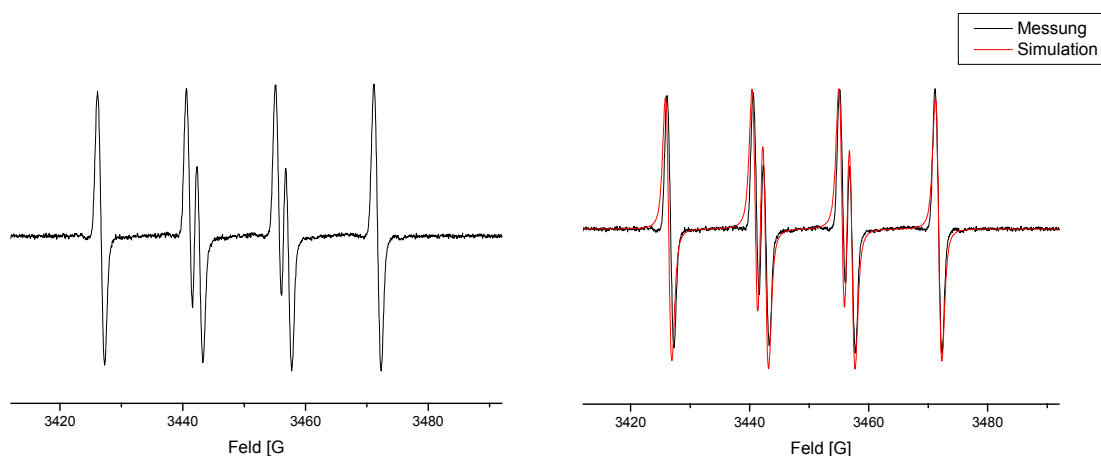
Man erhält für das EMPO-OH-Addukt folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
$[10^{-3} \text{ s}^{-1}]$	[s]	$a_{H\beta}$	a_N
$2,04 \pm 0,46$	434 ± 89	12,87	12,87

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Spektren des cis- und des trans-Isomers des EMPO-OH-Adduktes im Verhältnis 3 : 7 miteinander verrechnet. Für das cis-Isomer wurden die Kopplungen von einem ^{14}N - und zwei ^1H -Kernen mit dem Spin des ungepaarten Elektrons zugrunde gelegt. Die Kopplungen des trans-Isomers wurden mit der Wechselwirkung des Spins des ungepaarten Elektrons und einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern simuliert.

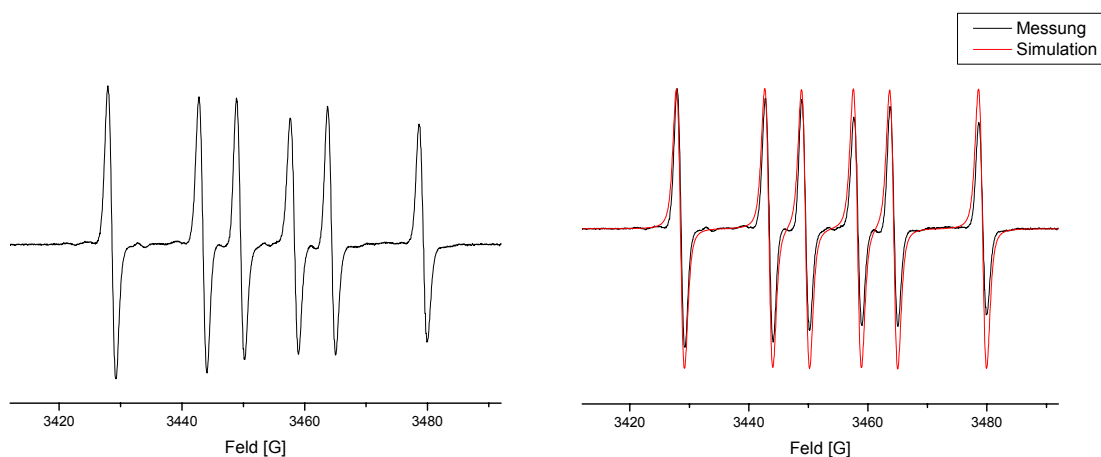
Für das EMPO-SO₃-Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
$[10^{-3} \text{ s}^{-1}]$	[s]	$a_{H\beta}$	a_N
$5,57 \pm 1,70$	155 ± 37	14,47	12,51

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen von einem ^{14}N - und zwei ^1H -Kernen mit dem Spin des ungepaarten Elektrons zugrunde gelegt.

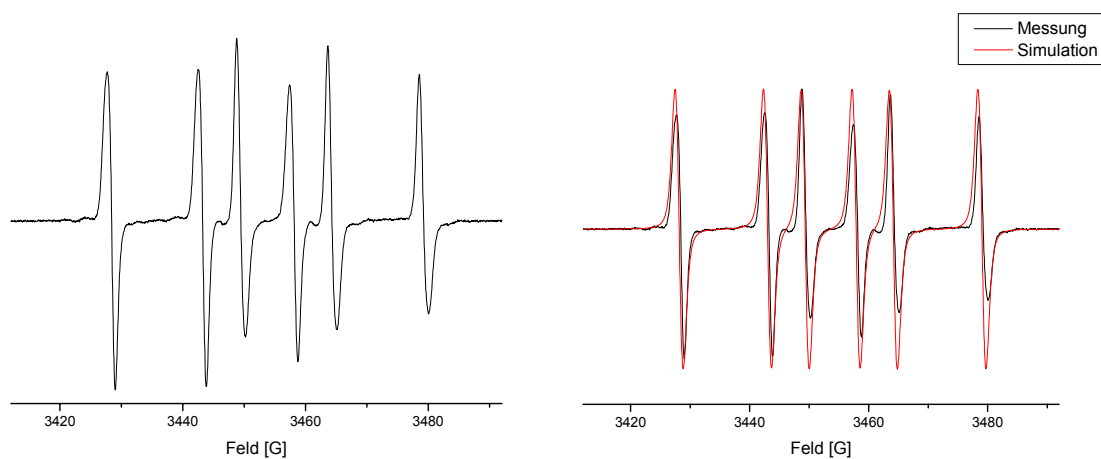
Für das EMPO-CH₂OH-Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
		$a_{H\beta}$	a_N
[10 ⁻³ s ⁻¹]	[s]		
3,33 ± 0,41	487 ± 63	20,98	14,85

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen von einem ¹⁴N- und einem ¹H-Kern mit dem Spin des freien Elektrons zugrunde gelegt.

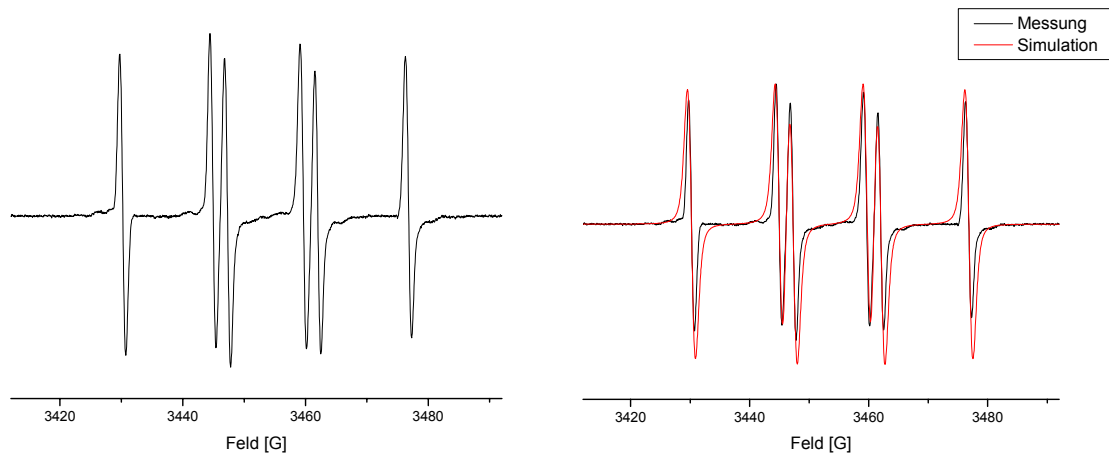
Für das EMPO-CH₃CHOH-Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
		$a_{H\beta}$	a_N
[10 ⁻³ s ⁻¹]	[s]		
2,37 ± 0,25	987 ± 312	21,13	14,84

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplung des Spins des ungepaarten Elektrons mit einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern berücksichtigt.

Für das EMPO-CO₂-Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:

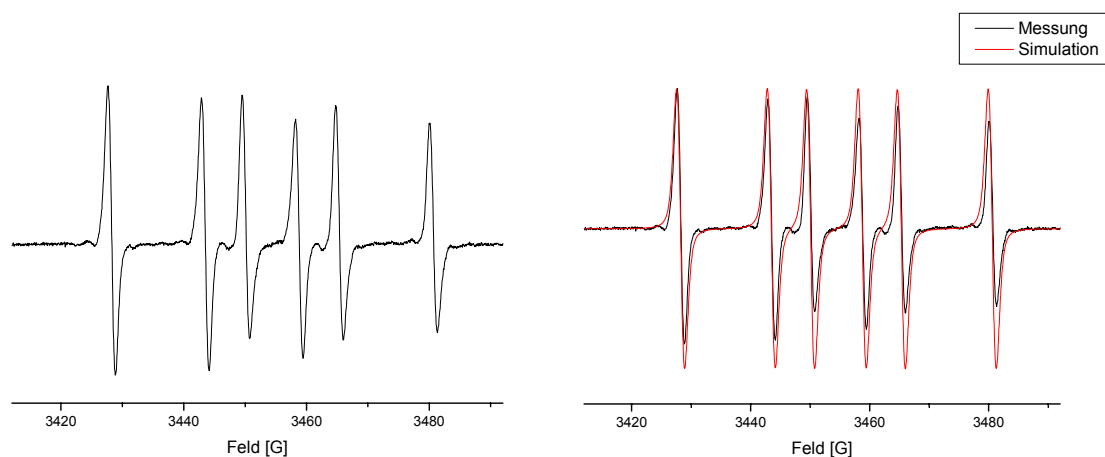


k_d	$t_{1/2}$	Hyperfinekopplungskonstanten [G]	
[10^{-3} s^{-1}]	[s]	$a_{\text{H}\beta}$	a_{N}
$1,44 \pm 0,77$	3447 ± 659	17,08	14,74

In diesem Fall musste auf eine lineare Auswertung für die Bestimmung der Halbwertszeiten zurückgegriffen werden, da mit der Annahme eines exponentiellen Zerfalls keine Zeiten bestimmt werden konnten. Die Korrelationskoeffizienten der linearen Regressionen der drei Messreihen liegen zwischen $R = 0,922$ und $0,970$.

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen von einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern zugrunde gelegt.

Für das EMPO-CH₃-Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfinekopplungskonstanten [G]	
$[10^{-3} \text{ s}^{-1}]$	$[\sigma]$	$a_{\text{H}\beta}$	a_{N}
$3,25 \pm 0,10$	380 ± 51	21,82	15,24

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen von einem ¹⁴N- und einem ¹H-Kern zugrunde gelegt.

Die gemessenen Werte für EMPO-Addukte dieser Arbeit sind im Einklang mit den Literaturdaten:

Hyperfinekopplungskonstanten für EMPO-OH [G]			Lösungsmittel	Quelle
a_{N}	$a_{\text{H}\beta}$	$a_{\text{H}\gamma}$		
12,87	12,87	-	PBS, pH = 7,2	Diese Arbeit
14,00	15,00	0,90	-	(Stolze 2003; Stolze 2006)
14,00	12,58	-	-	
13,50	14,80	0,80	PBS, pH = 7,4	(Zhang 2000)
13,50	12,40	-	PBS, pH = 7,4	
14,00	15,10	0,90	PBS, pH = 7,0	(Olive 2000)
14,00	12,70	-	PBS, pH = 7,0	
14,20	14,20	1,20	PBS, pH = 7,0	
14,10	12,70	-	PBS, pH = 7,0	

Hyperfinekopplungskonstanten für EMPO-SO ₃ [G]			Lösungsmittel	Quelle
a_{N}	$a_{\text{H}\beta}$	$a_{\text{H}\gamma}$		
12,51	14,47	-	PBS, pH = 7,2	Diese Arbeit
13,70	15,10	0,40	PBS, pH = 7,0	(Olive 2000)

Hyperfeinkopplungskonstanten für EMPO-CH ₂ OH [G]		Lösungsmittel	Quelle
a _N	a _{Hβ}		
14,85	20,98	PBS, pH = 7,2	Diese Arbeit
14,95	21,25	-	(Stolze 2006)

Die Werte für das EMPO-OCH₃-Addukt liegen mit a_N = 13,74 G, a_{Hb} = 10,87 bzw. 7,81 G und a_{Hg} = 0,55 bzw. 0,50 G (Stolze 2006) außerhalb des Wertebereichs der Messungen. Daher kann das Vorliegen dieses Adduktes ausgeschlossen werden.

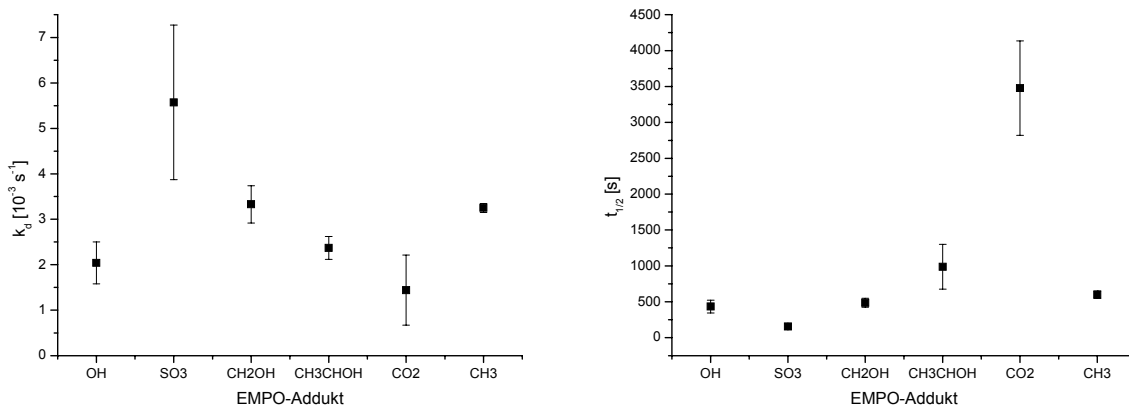
Hyperfeinkopplungskonstanten für EMPO-CH ₃ CHOH [G]		Lösungsmittel	Quelle
a _N	a _{Hβ}		
14,84	21,13	PBS, pH = 7,2	Diese Arbeit

Hier sind leider keine Referenzwerte verfügbar, jedoch kann aufgrund der Ähnlichkeit mit den Werten für das EMPO-CH₂OH-Addukt davon ausgegangen werden, dass es sich hier ausschließlich um das EMPO-CH₃CHOH-Addukt handelt.

Hyperfeinkopplungskonstanten für EMPO-CO ₂ [G]		Lösungsmittel	Quelle
a _N	a _{Hβ}		
14,74	17,08	PBS, pH = 7,2	Diese Arbeit
14,80	17,20	PBS, pH = 7,0	(Olive 2000)

Hyperfeinkopplungskonstanten für EMPO-CH ₃ [G]		Lösungsmittel	Quelle
a _N	a _{Hβ}		
15,24	21,82	PBS, pH = 7,2	Diese Arbeit
15,42	22,30	-	(Stolze 2006)
15,40	22,60	PBS, pH = 7,0	(Olive 2000)
15,40	21,70	PBS, pH = 7,0	

Im Anschluss sind die experimentell erhaltenen Werte für die Zerfallskonstanten k_d und die Halbwertszeiten t_{1/2} graphisch dargestellt. Eine Diskussion der Werte erfolgt am Ende des Kapitels unter 3.10.13.



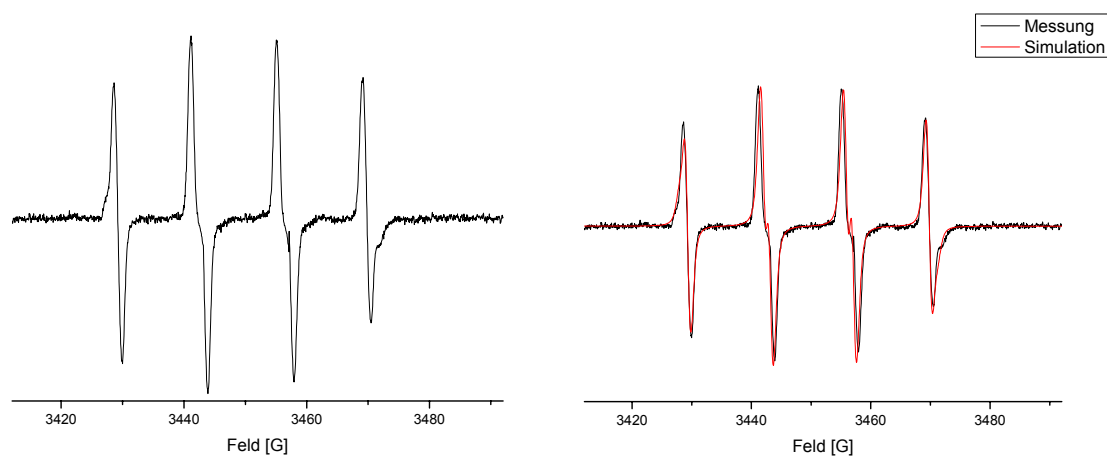
3.10.9 Umsetzung von BocAEMPO

Verwendet wurde eine Stammlösung der Konzentration $c = 100,02 \text{ mM}$.

Die Umsetzungen erfolgten nach folgendem Pipettierschema, wobei jeder Versuch dreimal neu angesetzt und vermessen wurde.

Radikale	OH	SO ₃	CO ₂	CH ₂ OH	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
Spin-Trap-Stamml. [μl]	20	20	20	20	20	10
H ₂ O ₂ -Lös. [μl]	20	20	20	20	20	20
Fe ²⁺ -Lös. [μl]	20	20	20	20	20	20
PBS-Puffer [μl]	40	10	10	20	20	40
Zusätze [μl]	0	30	30	20	20	10

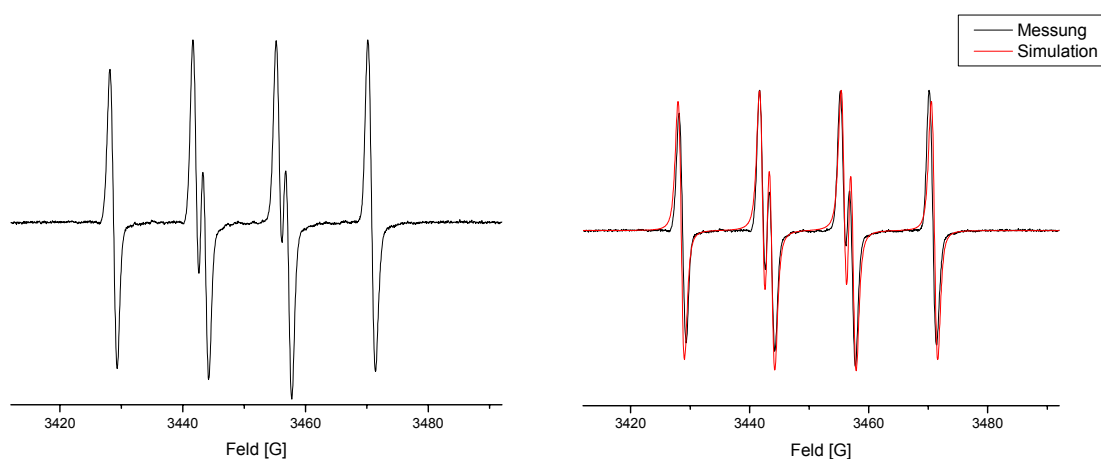
Für das BocAEMPO-OH-Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
$[10^{-3} \text{ s}^{-1}]$	[s]	$a_{H\beta}$	a_N
$1,96 \pm 0,17$	500 ± 75	13,56	13,56

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die simulierten Spektren des cis- und des trans-Isomers des BocAEMPO-OH-Addukts im Verhältnis 1 : 3 miteinander verrechnet. Für das cis-Isomer wurden die Kopplungen von einem ^{14}N - und zwei ^1H -Kernen mit dem Spin des ungepaarten Elektrons zugrunde gelegt. Für die Kopplungen des trans-Isomers wurden die Wechselwirkungen des Spins des ungepaarten Elektrons mit einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern berücksichtigt.

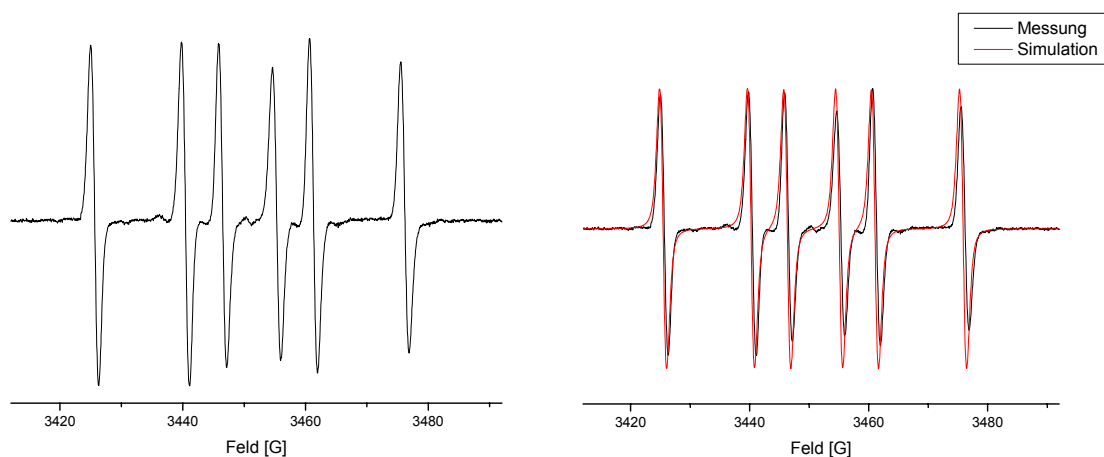
Für das BocAEMPO-SO₃-Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
$[10^{-3} \text{ s}^{-1}]$	[s]	$a_{H\beta}$	a_N
$1,22 \pm 0,33$	1325 ± 339	15,18	13,57

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen des Spin des ungepaarten Elektrons mit einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern zugrunde gelegt.

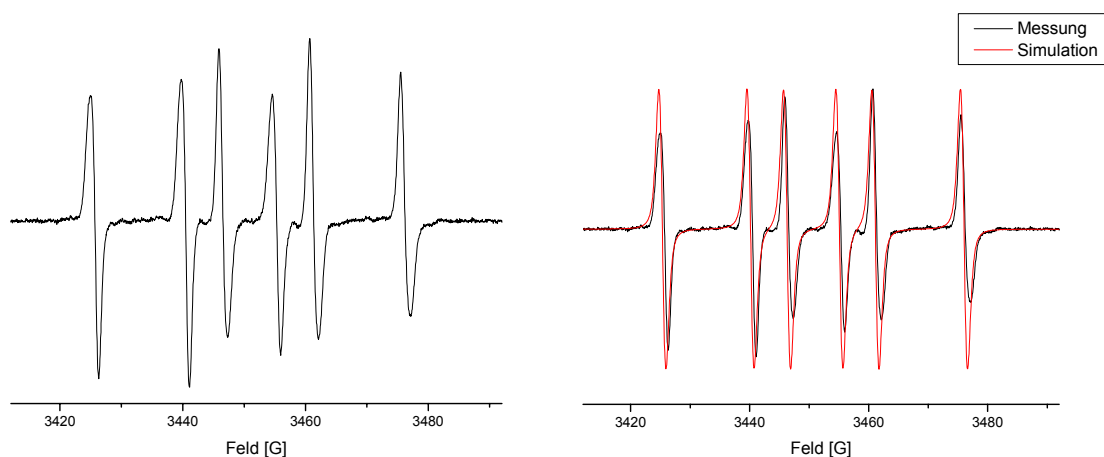
Für das BocAEMPO-CH₂OH-Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
[10^{-3} s^{-1}]	[s]	$a_{H\beta}$	a_N
$2,84 \pm 0,12$	450 ± 42	20,84	14,76

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen von einem ¹⁴N- und einem ¹H-Kern mit dem Spin des freien Elektrons zugrunde gelegt.

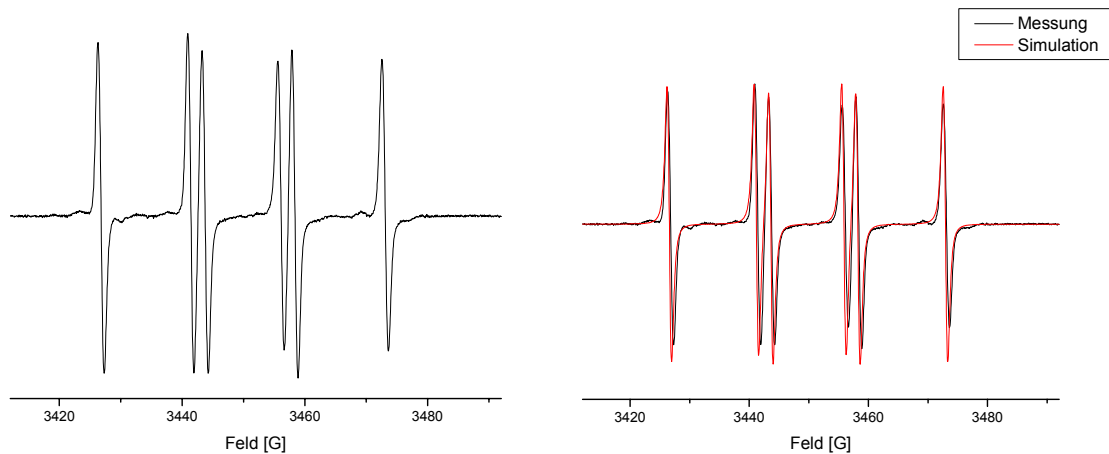
Für das BocAEMPO-CH₃CHOH-Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
[10^{-3} s^{-1}]	[s]	$a_{H\beta}$	a_N
$1,83 \pm 0,23$	661 ± 38	20,94	14,85

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen von einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern mit dem Spin des ungepaarten Elektrons zugrunde gelegt.

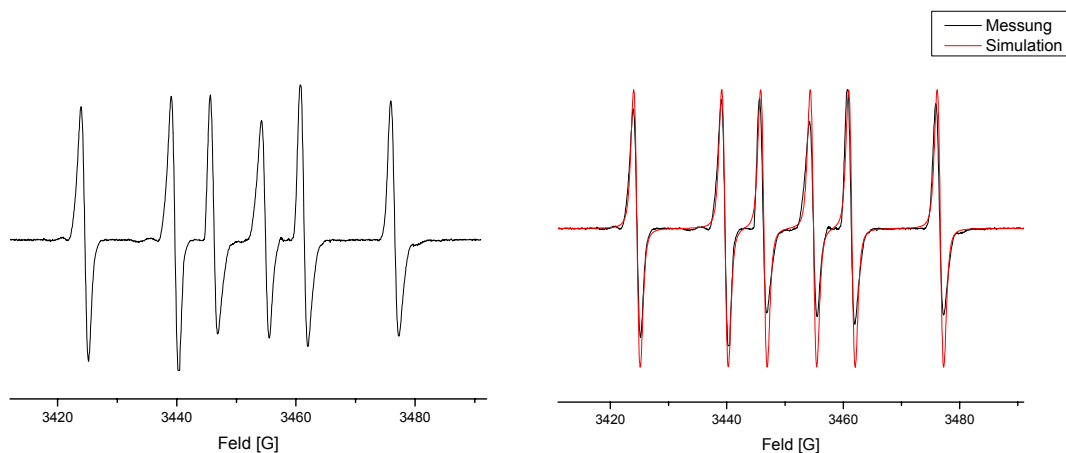
Für das BocAEMPO- CO_2 -Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfinekopplungskonstanten [G]	
		$a_{\text{H}\beta}$	a_{N}
$[10^{-3} \text{ s}^{-1}]$	[s]		
$0,69 \pm 0,46$	2046 ± 218	17,01	14,64

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen von einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern mit dem Spin des ungepaarten Elektrons zugrunde gelegt.

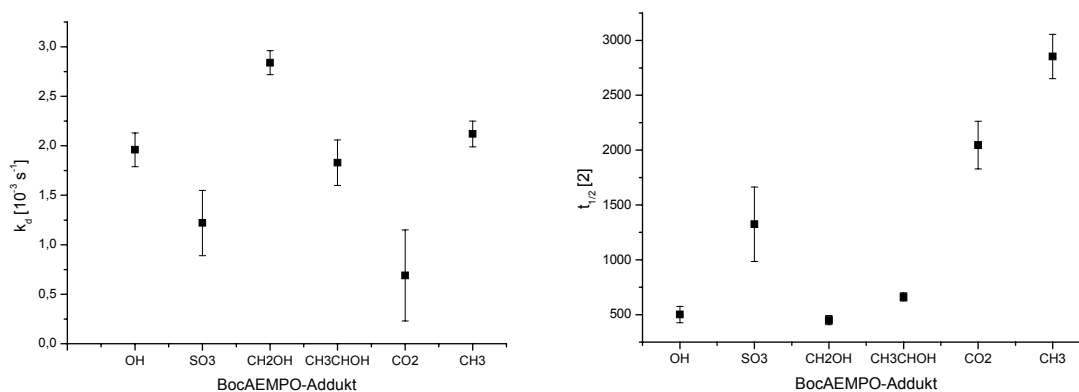
Für das BocAEMPO- CH_3 -Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
		$a_{H\beta}$	a_N
$2,12 \pm 0,13$	2854 ± 202	21,72	15,16

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen des Spins des ungepaarten Elektrons mit einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern berücksichtigt.

Im Anschluss sind die experimentell erhaltenen Werte für die Zerfallskonstanten k_d und die Halbwertszeiten $t_{1/2}$ graphisch dargestellt. Eine Diskussion der Werte erfolgt am Ende des Kapitels unter 3.10.13.



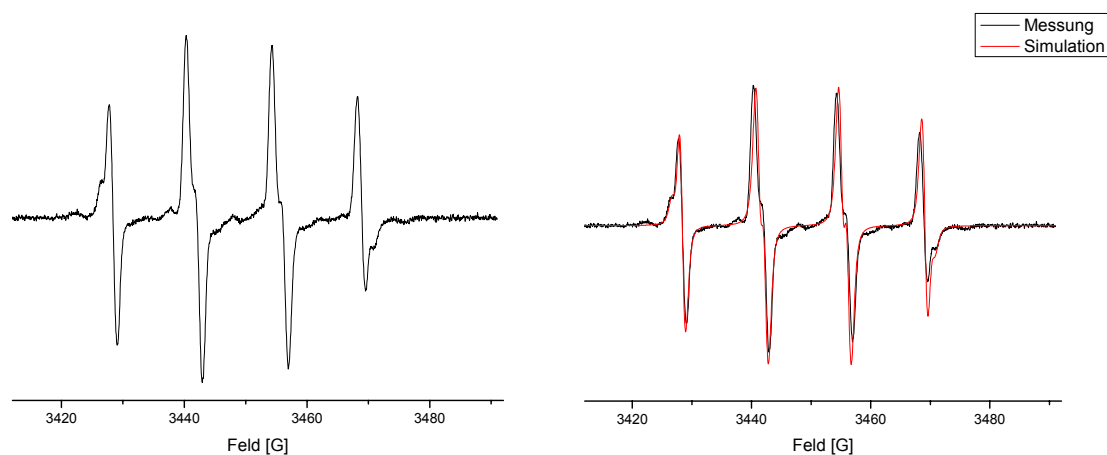
3.10.10 Umsetzung von BocEAEMPO

Verwendet wurde eine Stammlösung der Konzentration $c = 100,07 \text{ mM}$.

Die Umsetzungen erfolgten nach folgendem Pipettierschema, wobei jeder Versuch dreimal neu angesetzt und vermessen wurde.

Radikale	OH	SO ₃	CO ₂	CH ₂ OH	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
Spin-Trap-Stamml. [μl]	20	20	20	20	20	20
H ₂ O ₂ -Lös. [μl]	20	20	20	20	20	20
Fe ²⁺ -Lös. [μl]	20	20	20	20	20	20
PBS-Puffer [μl]	40	10	10	20	20	20
Zusätze [μl]	0	30	30	20	20	20

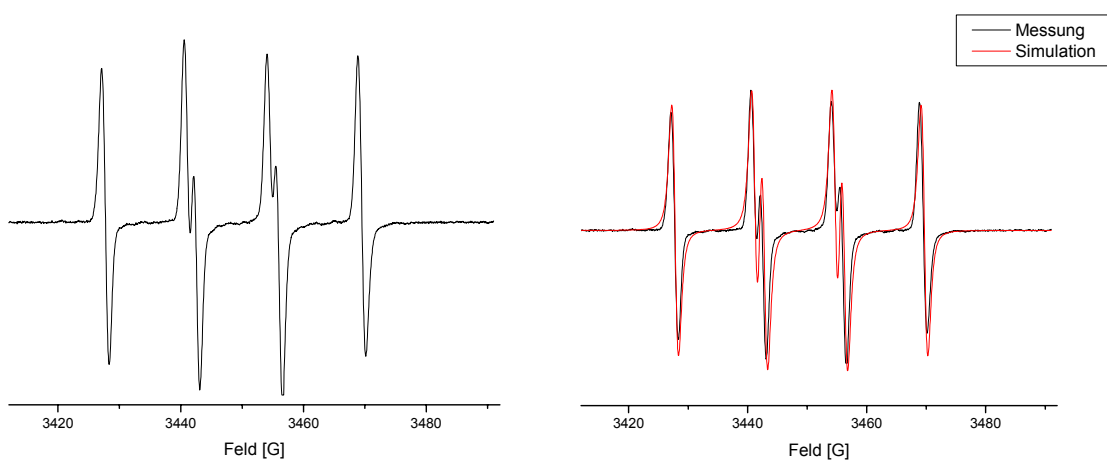
Für die BocEAEMPO-OH-Addukte erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
		$a_{H\beta}$	a_N
$[10^{-3} \text{ s}^{-1}]$	[s]		
$2,45 \pm 1,29$	428 ± 147	12,56	12,56

Die Simulation mit Garlic ergibt in guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Spektren des cis- und des trans-Isomers im Verhältnis 1 : 3 miteinander verrechnet. Für das cis-Isomer wurden die Kopplungen von einem ^{14}N - und zwei ^1H -Kernen mit dem Spin des ungepaarten Elektrons berücksichtigt. Für das trans-Isomer wurde die Kopplung des Spins des ungepaarten Elektrons mit einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern simuliert.

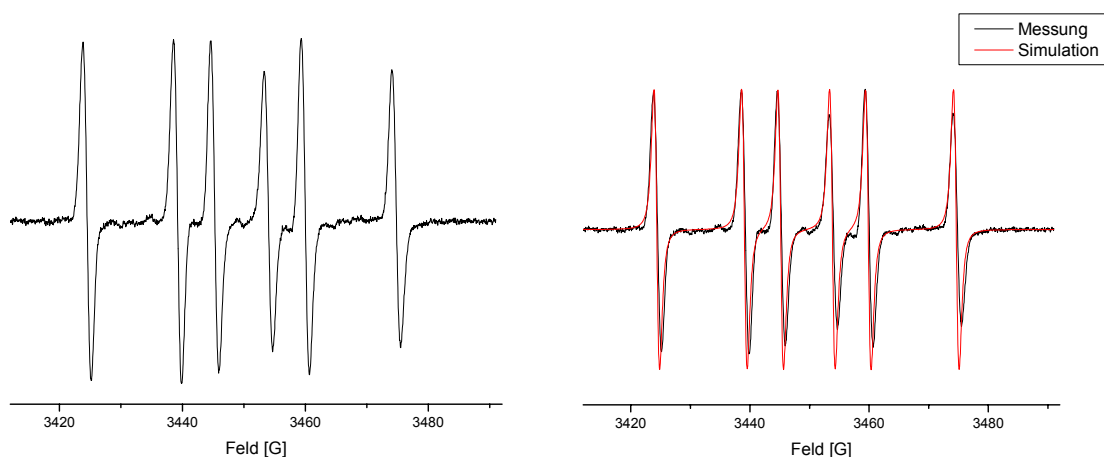
Für das BocEAEMPO-SO₃-Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
		$a_{H\beta}$	a_N
$[10^{-3} \text{ s}^{-1}]$	[s]		
$0,73 \pm 0,38$	1136 ± 91	15,01	13,43

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen von einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern mit dem Spin des freien Elektrons zugrunde gelegt.

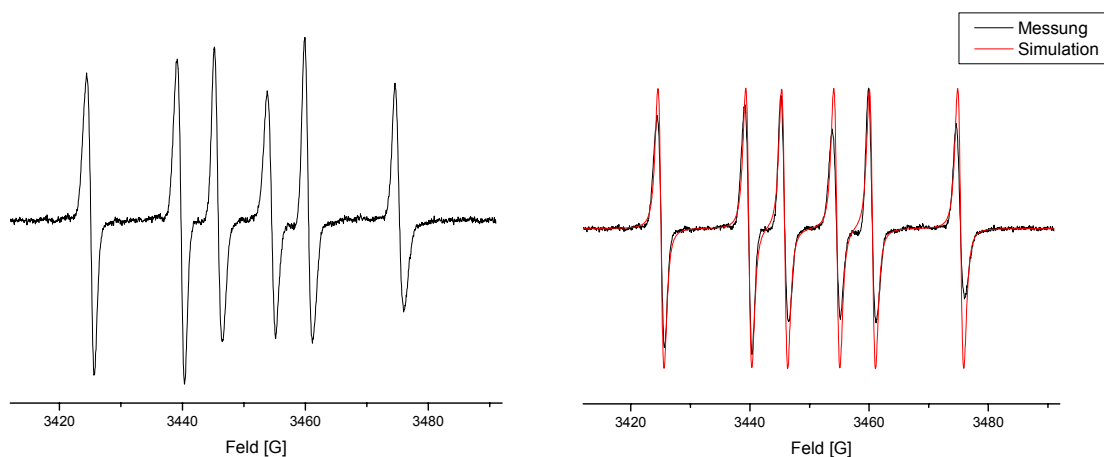
Für das BocEAEMPO- CH_2OH -Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
		$a_{\text{H}\beta}$	a_{N}
$[10^{-3} \text{ s}^{-1}]$	[s]		
$3,54 \pm 0,07$	471 ± 46	20,77	14,72

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen des Elektronenspins mit einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern zugrunde gelegt.

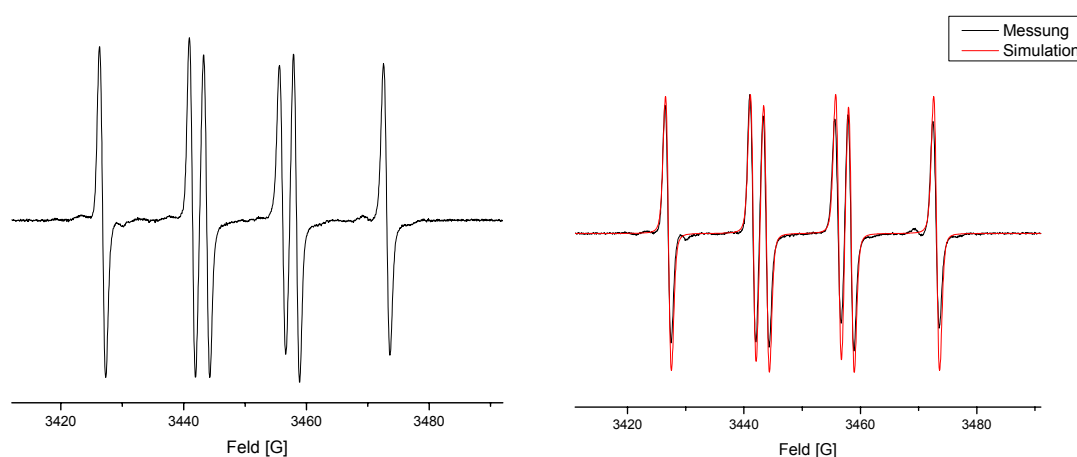
Für das BocEAEMPO- CH_3CHOH -Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
$[10^{-3} \text{ s}^{-1}]$	[s]	$a_{H\beta}$	a_N
$1,95 \pm 0,36$	604 ± 123	20,74	14,75

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen von einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern mit dem Spin des ungepaarten Elektrons zugrunde gelegt.

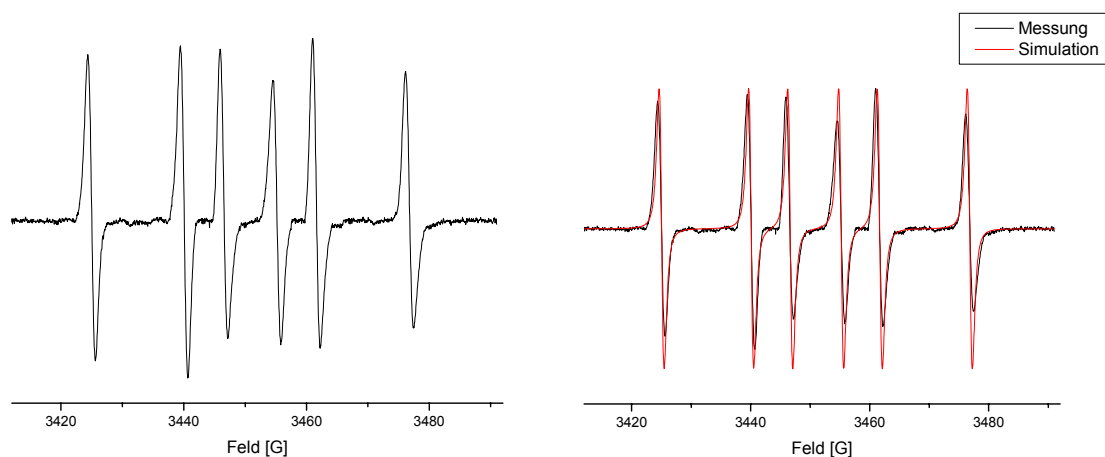
Für das BocEAEMPO- CO_2 -Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
$[10^{-3} \text{ s}^{-1}]$	[s]	$a_{H\beta}$	a_N
$1,57 \pm 0,48$	2564 ± 259	16,85	14,63

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen von einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern mit dem Spin des ungepaarten Elektrons berechnet.

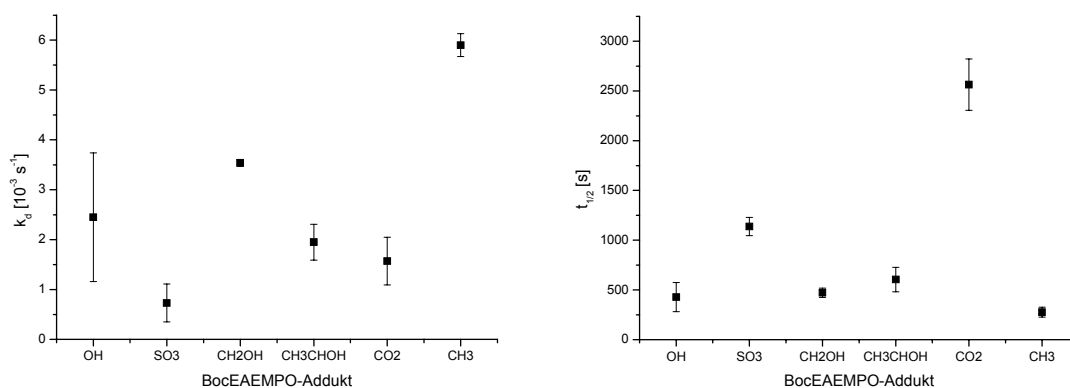
Für das BocEAEMPO-CH₃-Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
		$a_{H\beta}$	a_N
[10 ⁻³ s ⁻¹]	[s]		
5,90 ± 0,23	270 ± 50	21,59	15,07

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen des Spins des freien Elektrons mit einem ¹⁴N- und einem ¹H-Kern zugrunde gelegt.

Im Anschluss sind die experimentell erhaltenen Werte für die Zerfallskonstanten k_d und die Halbwertszeiten $t_{1/2}$ graphisch dargestellt. Eine Diskussion der Werte erfolgt am Ende des Kapitels unter 3.10.13.



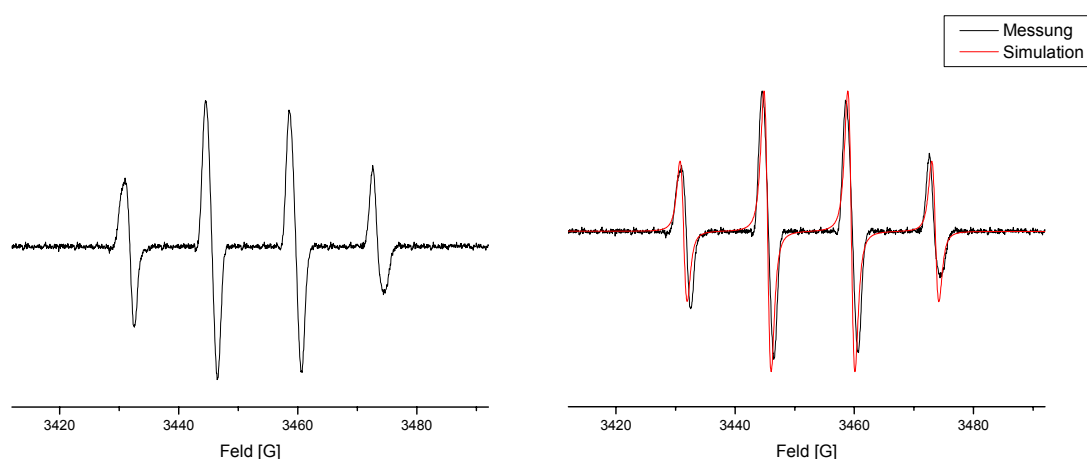
3.10.11 Umsetzung von AEMPO

Verwendet wurde eine Stammlösung der Konzentration $c = 100,02 \text{ mM}$.

Die Umsetzungen erfolgten nach folgendem Pipettierschema, wobei jeder Versuch dreimal neu angesetzt und vermessen wurde.

Radikale	OH	SO ₃	CO ₂	CH ₂ OH	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
Spin-Trap-Stamml. [μl]	10	10	10	10	10	10
H ₂ O ₂ -Lös. [μl]	20	20	20	20	20	20
Fe ²⁺ -Lös. [μl]	20	20	20	20	20	20
PBS-Puffer [μl]	50	30	30	30	30	30
Zusätze [μl]	0	20	20	20	20	20

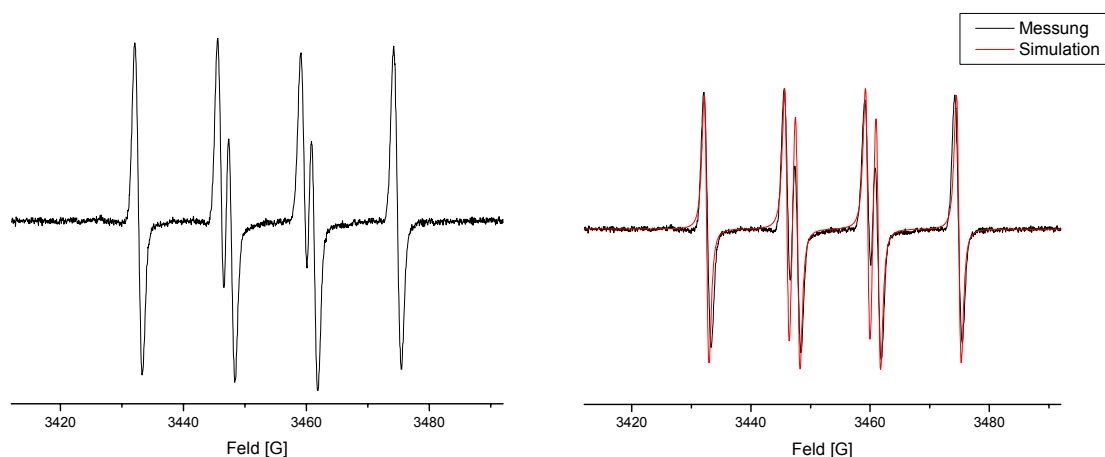
Für das AEMPO-OH-Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
[10^{-3} s^{-1}]	[s]	$a_{H\beta}$	a_N
$1,74 \pm 0,49$	635 ± 218	14,05	14,05

Die Simulation mit Garlic ergibt in guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen von einem ¹⁴N- und einem ¹H-Kern mit dem Spin des freien Elektrons zugrunde gelegt.

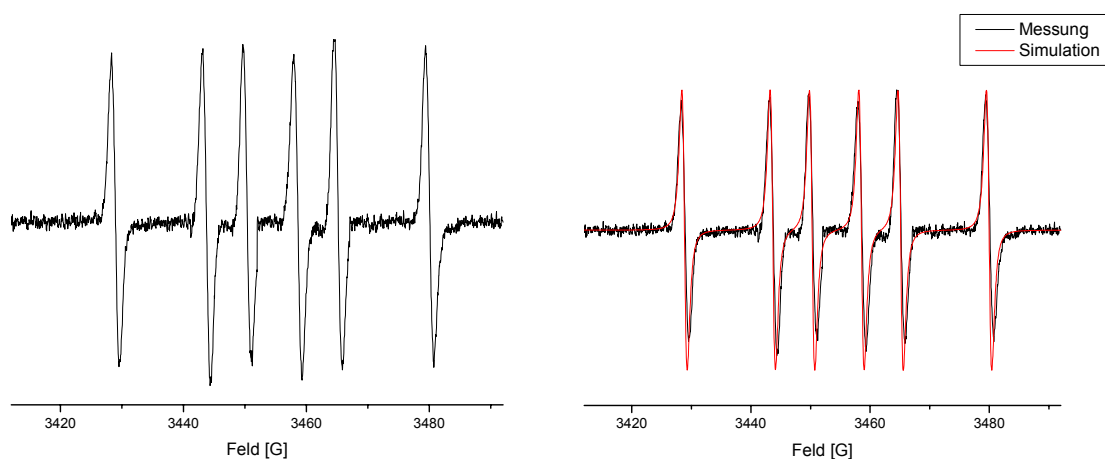
Für das AEMPO-SO₃-Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
		$a_{H\beta}$	a_N
[10 ⁻³ s ⁻¹]	[s]		
1,39 ± 0,46	732 ± 145	15,28	13,50

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen von einem ¹⁴N- und einem ¹H-Kern mit dem Spin des ungepaarten Elektrons berechnet.

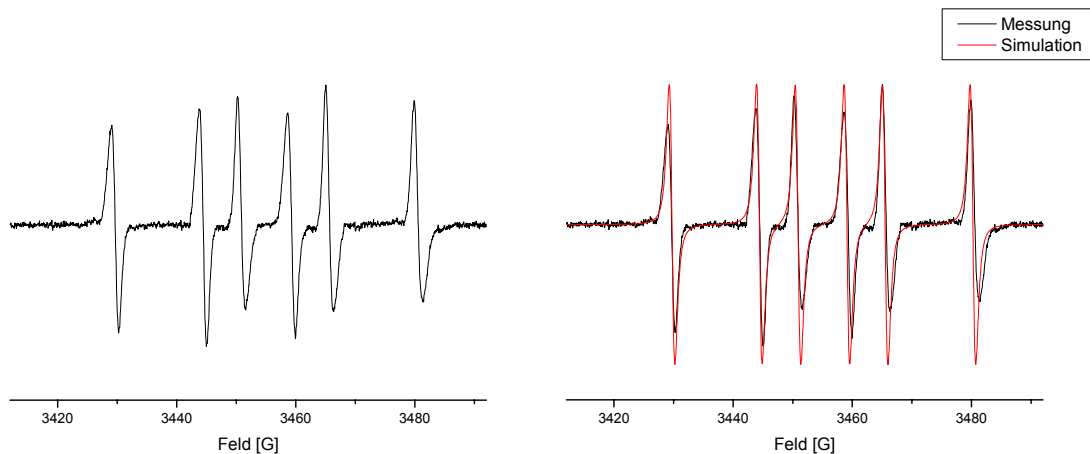
Für das AEMPO-CH₂OH-Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
		$a_{H\beta}$	a_N
[10 ⁻³ s ⁻¹]	[s]		
n.b., s. unten	2028 ± 427	21,40	14,83

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen von einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern mit dem Spin des ungepaarten Elektrons berücksichtigt.

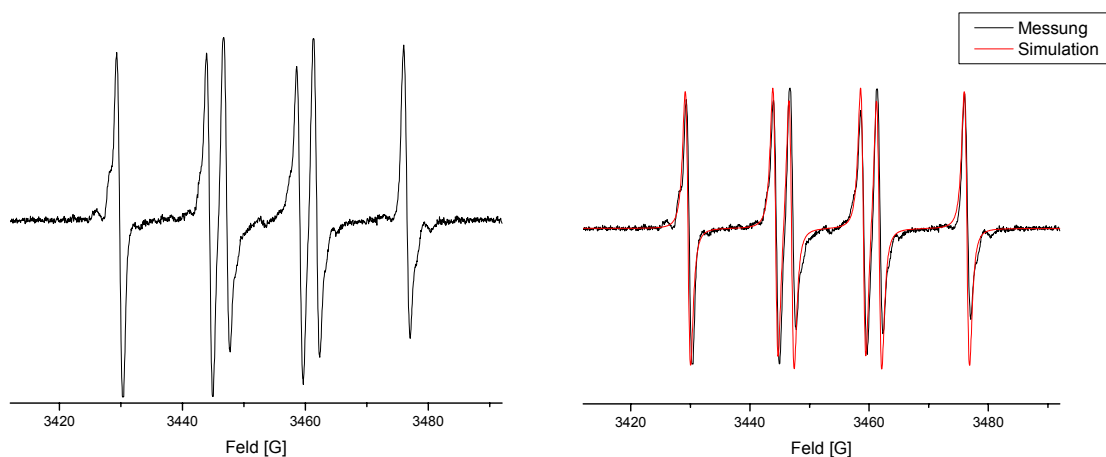
Für das AEMPO- CH_3CHOH -Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
		$a_{\text{H}\beta}$	a_{N}
$[10^{-3} \text{ s}^{-1}]$	[s]		
$0,47 \pm 0,43$	1702 ± 281	21,09	14,66

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen von einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern mit den Spin des ungepaarten Elektrons zugrunde gelegt.

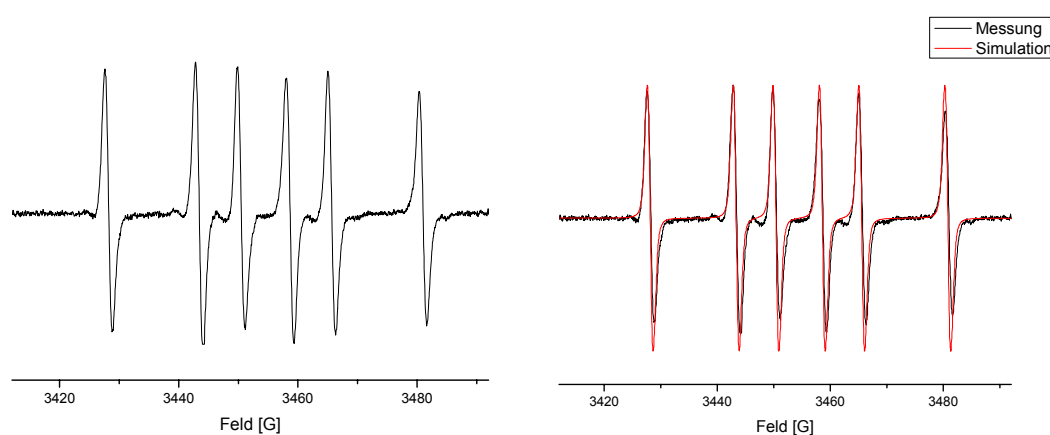
Für das AEMPO- CO_2 -Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
$[10^{-3} \text{ s}^{-1}]$	[s]	$a_{\text{H}\beta}$	a_{N}
$1,09 \pm 0,33$	746 ± 215	17,37	14,68

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen des Spins des ungepaarten Elektrons mit einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern zugrunde gelegt.

Für das AEMPO- CH_3 -Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:

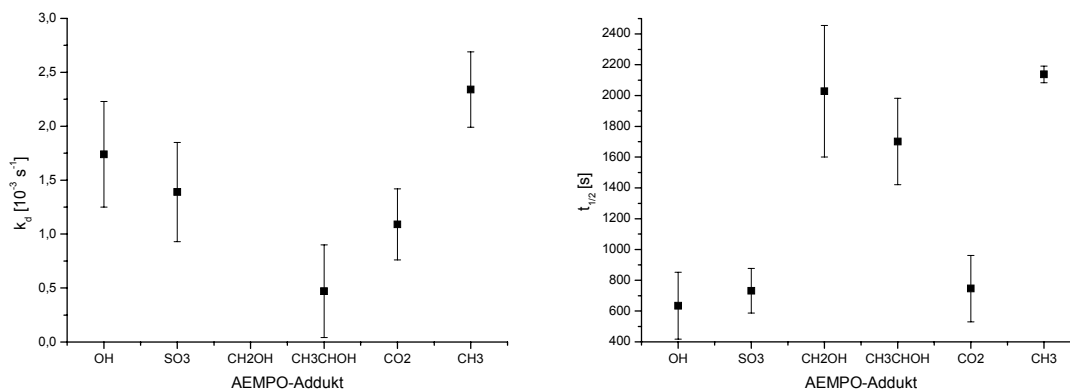


k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
$[10^{-3} \text{ s}^{-1}]$	[s]	$a_{\text{H}\beta}$	a_{N}
$2,34 \pm 0,35$	2138 ± 54	22,23	15,22

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen von einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern mit dem Spin des ungepaarten Elektrons berechnet.

Im Anschluss sind die experimentell erhaltenen Werte für die Zerfallskonstanten k_d und die Halbwertszeiten $t_{1/2}$ graphisch dargestellt. Eine Diskussion der Werte erfolgt am Ende des Kapitels unter 3.10.13. Für das AEMPO- CH_2OH -Addukt konnte zunächst keine Zerfallskonstante und Halbwertszeit bestimmt werden, da der Zerfall nahezu linear verläuft und ein exponentieller Zerfall nicht mit aussagekräftiger Zeitkonstante bestimmt werden kann. Da die Zerfallskonstante k_d das Reziproke der Zeitkonstante darstellt, ist diese daher auch nicht bestimmbar. Um einen Wert

für die Halbwertszeit zu erhalten, wurde in diesem Fall eine lineare Regression benutzt und $t_{1/2}$ daraus berechnet.



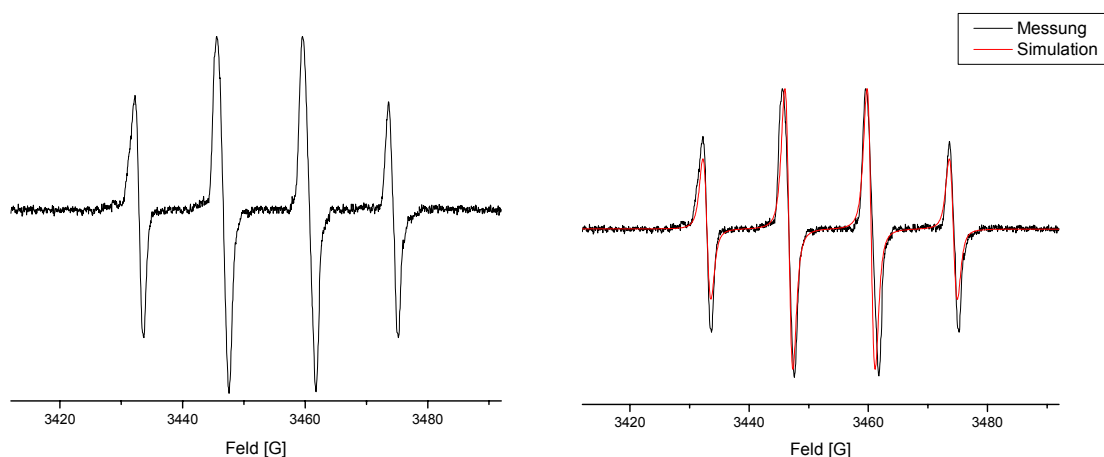
3.10.12 Umsetzung von EAEMPO

Verwendet wurde eine Stammlösung der Konzentration $c = 100,01 \text{ mM}$.

Die Umsetzungen erfolgten nach folgendem Pipettierschema, wobei jeder Versuch dreimal neu angesetzt und vermessen wurde.

Radikale	OH	SO ₃	CO ₂	CH ₂ OH	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
Spin-Trap-Stamml. [μl]	20	10	10	10	10	10
H ₂ O ₂ -Lös. [μl]	20	20	20	20	20	20
Fe ²⁺ -Lös. [μl]	20	20	20	20	20	20
PBS-Puffer [μl]	40	30	30	30	30	30
Zusätze [μl]	0	20	20	20	20	20

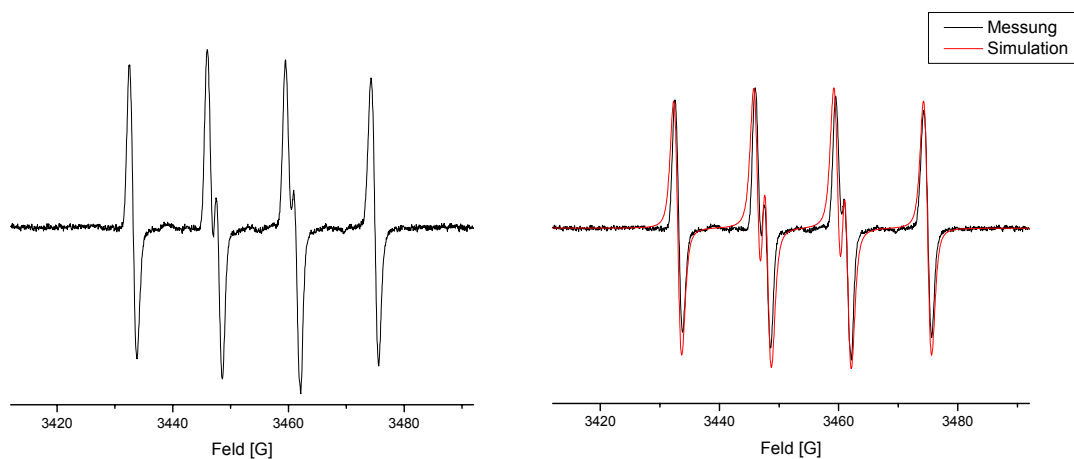
Für das EAEMPO-OH-Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
		$a_{H\beta}$	a_N
$[10^{-3} \text{ s}^{-1}]$	[s]		
$3,00 \pm 0,49$	262 ± 24	13,29	13,29

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen von einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern mit dem Spin des ungepaarten Elektrons zugrunde gelegt.

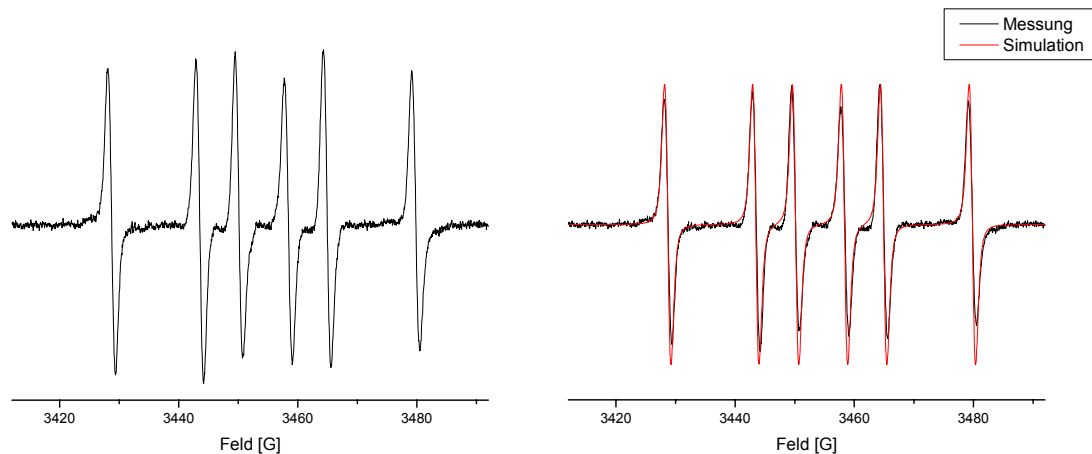
Für das EAEMPO-SO₃-Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
		$a_{H\beta}$	a_N
$[10^{-3} \text{ s}^{-1}]$	[s]		
$0,31 \pm 0,25$	1488 ± 193	15,07	13,41

Die Simulation mit Garlic ergibt in guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen von einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern mit dem Spin des ungepaarten Elektrons berechnet.

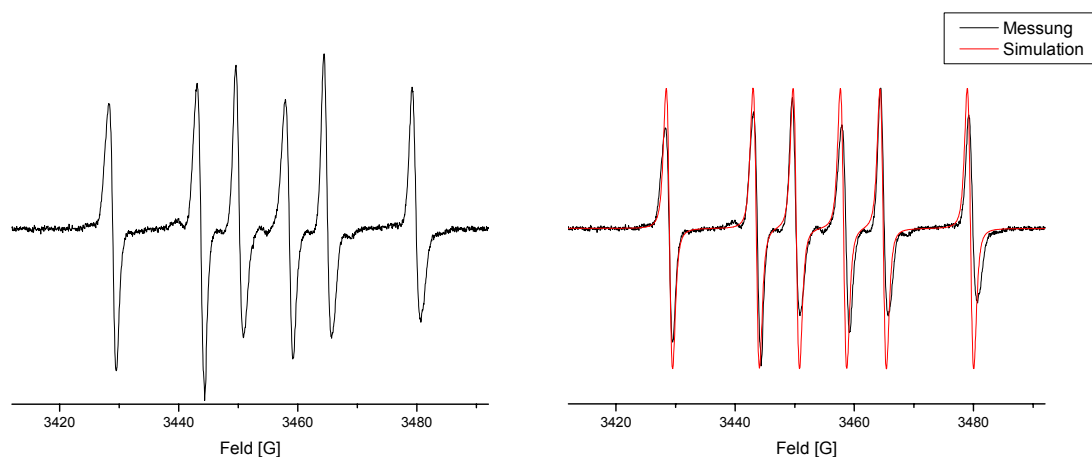
Für das EAEMPO- CH_2OH -Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
		$a_{\text{H}\beta}$	a_{N}
$[10^{-3} \text{ s}^{-1}]$	[s]		
$0,61 \pm 0,03$	2020 ± 199	21,43	14,81

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen des Spin des ungepaarten Elektrons mit einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern zugrunde gelegt.

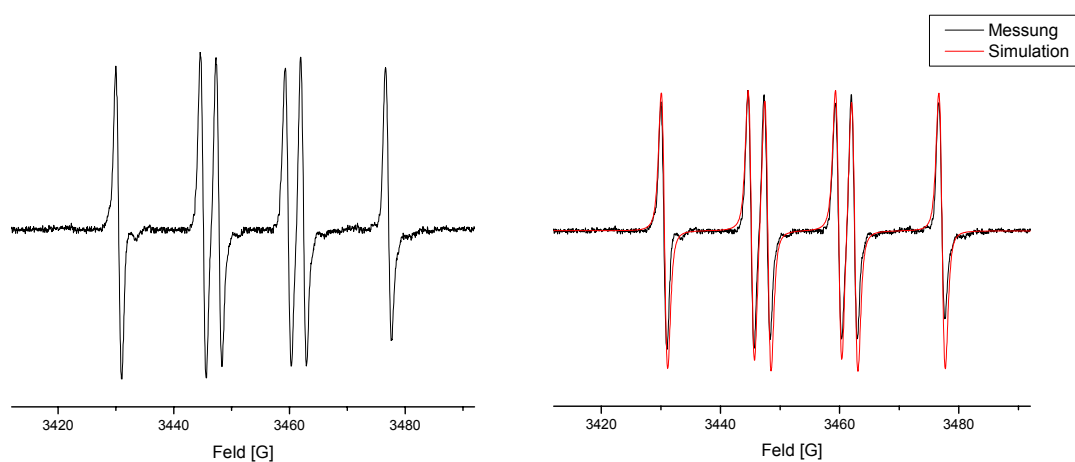
Für das EAEMPO- CH_3CHOH -Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
$[10^{-3} \text{ s}^{-1}]$	[s]	$a_{H\beta}$	a_N
$0,73 \pm 0,30$	2131 ± 576	21,27	14,85

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen von einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern mit dem Spin des ungepaarten Elektrons berücksichtigt.

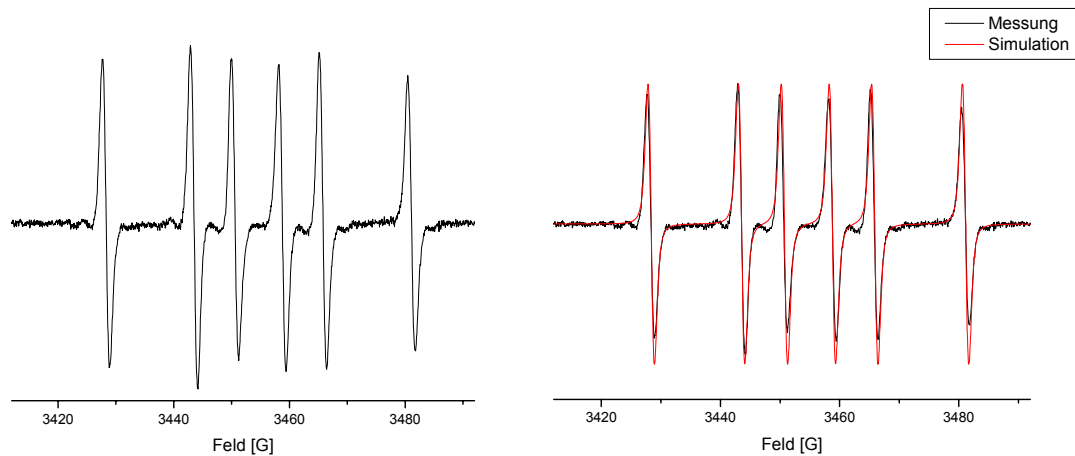
Für das EAEMPO-CO₂-Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
$[10^{-3} \text{ s}^{-1}]$	[s]	$a_{H\beta}$	a_N
$0,49 \pm 0,23$	1624 ± 186	17,33	14,60

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen von einem ^{14}N - und einem ^1H -Kern mit dem Spin des ungepaarten Elektrons zugrunde gelegt.

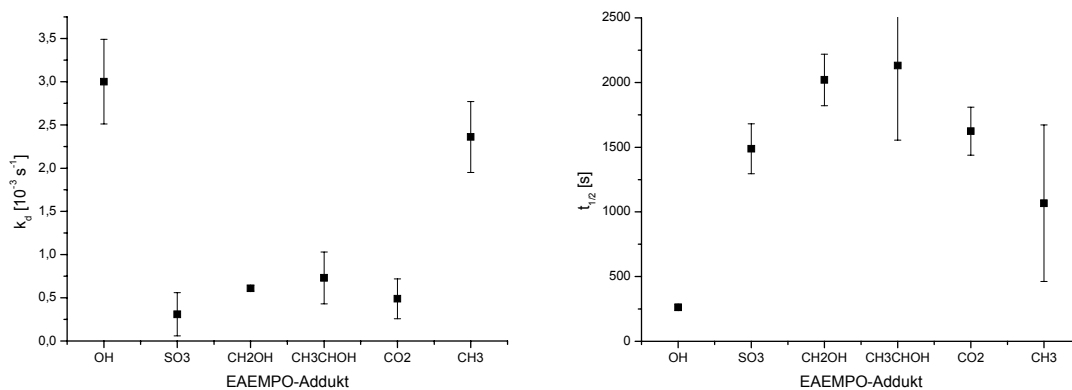
Für das EAEMPO-CH₃-Addukt erhält man folgende Spektren und Daten:



k_d	$t_{1/2}$	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]	
		$a_{H\beta}$	a_N
[10 ⁻³ s ⁻¹]	[s]		
2,36 ± 0,41	1067 ± 605	22,33	15,19

Die Simulation mit Garlic ergibt in sehr guter Übereinstimmung die Linienform des experimentellen Spektrums (s. Abb.). Dabei wurden die Kopplungen des Spins des ungepaarten Elektrons mit einem ¹⁴N- und einem ¹H-Kern berechnet.

Im Anschluss sind die experimentell erhaltenen Werte für die Zerfallskonstanten k_d und die Halbwertszeiten $t_{1/2}$ graphisch dargestellt. Eine Diskussion der Werte erfolgt am Ende des Kapitels unter 3.10.13.



3.10.13 Diskussion der Zerfallskonstanten und der Halbwertszeiten

Sowohl für die Zerfallskonstante k_d als auch für die Halbwertszeiten sind in der Literatur nahezu keine Daten verfügbar, obwohl diese Werte essentiell für die Planung eines Spin-Trapping-Experiments sind. Ohne Kenntnis der k_d bzw. der Halbwertszeit kann nur schlecht abgeschätzt werden, ob die Verwendung einer bestimmten Spin-Trap-Verbindung bei gegebenem experimentellem System überhaupt sinnvoll ist. Nur wenn gewährleistet ist, dass die nachzuweisenden Radikale in vertretbarer Zeit generiert und detektiert werden können, kann ein verwertbares Resultat gewonnen werden. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Zerfallskonstante k_d abhängig von der Spin-Trap-Konzentration, des Lösungsmittels und des pH-Wertes ist. Insofern sind Literaturwerte bezüglich dieser Rahmenbedingungen stets zu überprüfen. Ohne diese Angaben sind die Werte nahezu wertlos.

Der Vergleich der berechneten Zerfallskonstanten k_d ist für DMPO nur mit den Daten einer Quelle für das DMPO-OH-Addukt möglich. Hierbei liegen die aus eigenen Messungen berechneten Werte im Bereich der Schwankung der Literaturwerte, wobei die wesentlich höhere Konzentration und die Verwendung von Wasser als Lösungsmittel berücksichtigt werden müssen.

DMPO-Addukt	k_d [10^{-3} s^{-1}]	Lösungsmittel / pH-Wert / c(Trap) [mM]	Quelle
OH	$0,60 \pm 0,30$	PBS / 7,2 / 20	Diese Arbeit
OH	0,47	H ₂ O / 6,0 / 100	(Marriott 1980)
OH	0,84	H ₂ O / 7,0 / 100	
OH	0,98	H ₂ O / 8,0 / 100	

Vergleicht man die berechneten Zerfallskonstanten k_d für EMPO mit Literaturwerten, so kann auch hier nur das EMPO-OH-Addukt als Vergleich herangezogen werden. Dabei ist zu beachten, dass die Literaturwerte mit abweichenden Konzentrationen in Wasser gewonnen wurden. Der selbst gewonnene Wert ist zweimal größer als jener der Literatur, was einem doppelt so schnellen Zerfall entspricht.

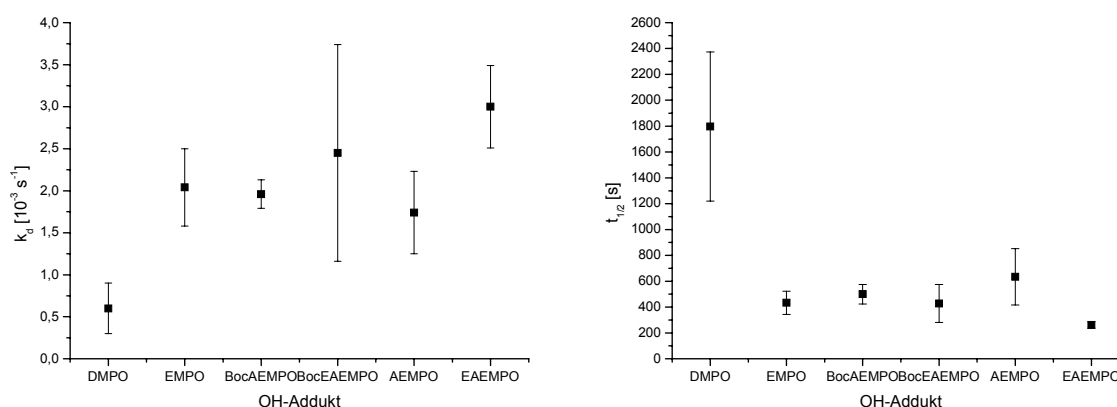
EMPO-Addukt	k_d [10^{-3} s^{-1}]	Lösungsmittel / pH-Wert / c(Trap) [mM]	Quelle
OH	$2,04 \pm 0,46$	PBS / 7,2 / 20	Diese Arbeit
OH	1,25	H ₂ O / 7,2 / 200	(Allouch 2005)
OH	0,65	H ₂ O / 7,2 / 30	
OH	0,60	H ₂ O / 7,2 / 10	

Dieselben Limitierungen, die bei der Bestimmung der Zerfallskonstanten gelten, treffen auch für die Messung der Halbwertszeiten zu. In diesem Fall ist nur ein Zahlenwert verfügbar, der ebenfalls in Abhängigkeit von der Konzentration, dem Lösungsmittel und dem pH-Wert betrachtet werden muss:

Addukt	Halbwertszeit [s]	Quelle
DMPO-OH	1796 ± 577	Diese Arbeit
DMPO-OH	870	(Marriott 1980)

Im Anschluss sind die Werte für die Zerfallskonstanten k_d und die Halbwertszeiten $t_{1/2}$ nochmals graphisch aufgetragen. Hierbei wurden die verwendeten Spin-Traps jeweils gegen eines der generierten Radikale aufgetragen, um einen besseren Vergleich zwischen den einzelnen Spin-Traps zu ermöglichen:

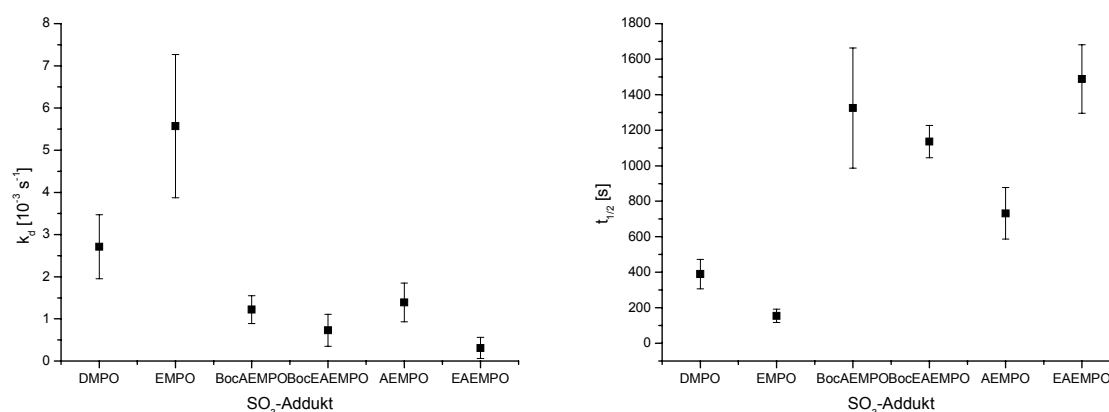
OH-Radikale:



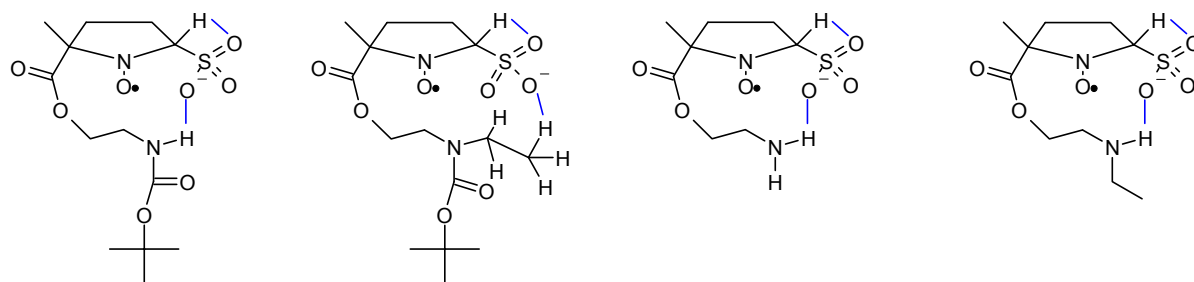
Aus den Zerfallskonstanten k_d und den Halbwertszeiten $t_{1/2}$ ergibt sich für DMPO durch die Reihe hinweg die größte Halbwertszeit, was auch mit der kleinsten Zerfallskonstante korreliert. Die neu synthetisierten Spin-Traps liegen mit ihren Werten im selben Bereich wie EMPO. Aus einer ersten theoretischen Arbeit von Villamena *et al.* (Villamena 2003) ergeben sich für die cis- und trans-Isomere des EMPOs keine klaren Präferenzen für eines der Isomere. So sind die Energieunterschiede zwischen dem trans-Isomer einerseits und dem cis-Isomer mit Wasserstoffbrücke zwischen Carbonyl-Sauerstoff und Proton des addierten OH-Radikals andererseits, minimal. Dies entspricht auch den experimentellen Befunden in zumindest einer Arbeit (Stolze 2005), der zu Folge die Isomere im Verhältnis 1 : 1 für EMPO-OH gefunden wurden. In einer neueren Arbeit von Villamena *et al.* (Villamena 2004) wurde jedoch berechnet, dass bevorzugt das trans-Isomer bei EMPO-artigen Spin-Traps entsteht. Die hier erhaltenen

Resultate passen ausgezeichnet zu diesen Berechnungen, wobei eine Präferenz des trans-Isomers zumindest für das EMPO-OH-, BocAEMPO-OH- und das BocEAEMPO-OH-Addukt aus den Spektren nachgewiesen werden konnte (Verhältnis 7 : 3, 3 : 1 und 3 : 1, s. oben). Bedingt durch die Isomerie kann aufgrund sterischer Restriktionen bei den trans-Isomeren generell keine Stabilisierung des OH-Adduktes durch eine Wechselwirkung mit dem Aminoesterresten zustande kommen. Für die cis-Isomere ist eine direkte Wechselwirkung zwischen Carbonyl-Sauerstoff und OH-Proton für EMPO und BocMPO berechnet worden, dabei ist jedoch der Abstand um 2,17 Å größer als zwischen dem Phosphoryl-Sauerstoff und OH-Proton der Alkylphosphoryl-Traps (2,03 Å). Aufgrund der großen Bindungsweite ist daher der Energiegewinn durch Wasserstoffbrückenbildung bei den Alkoxy-carbonyl-Traps sehr klein, wodurch eine klare Präferenz für die cis-Konformation wie bei den Alkoxyphosphoryl-Traps verloren geht (Villamena 2003). Insgesamt sind jedoch für alle diese Spin-Traps die OH-Addukte hinreichend stabil um problemlose ESR-Messungen zu ermöglichen.

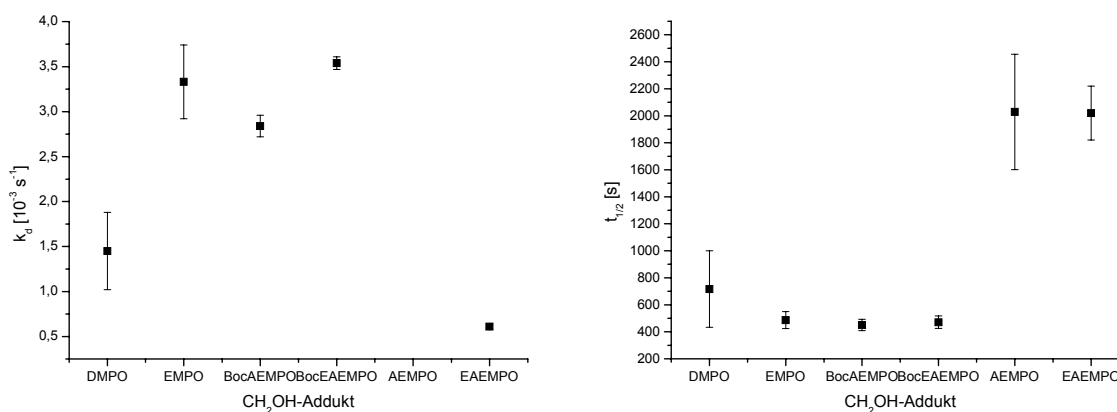
SO₃-Radikale:



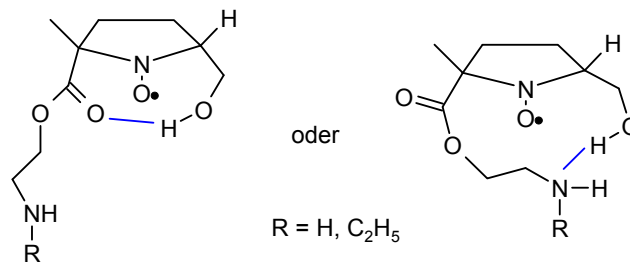
Aus den Zerfallskonstanten k_d und den Halbwertszeiten $t_{1/2}$ ergeben sich für die neu synthetisierten Spin-Traps wesentlich höhere Stabilitäten für SO₃-Radikale als für die etablierten Traps DMPO und EMPO. Der Nachweis von SO₃-Addukten ist mit den neuen Spin-Traps über einen 2-4 mal längeren Zeitraum möglich, als mit den etablierten Traps DMPO und EMPO. Ursache hierfür ist möglicherweise die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Aminoresten und der SO₃-Gruppe. Voraussetzung dafür ist jedoch die bevorzugte Ausbildung des cis-Isomers. Je nach Spin-Trap kann dabei die SO₃-Gruppe in mehr oder weniger gute Wechselwirkung treten:



Für das BocAEMPO-Addukt ergibt sich eine intensive Wechselwirkung, die durch die sperrige Boc-Gruppe stabilisiert wird. Gleiches gilt für das BocEAEMPO-Addukt, bei dem jedoch nur eine Wechselwirkung mit dem Ethylrest möglich ist. Da Wasserstoff-Brücken zu Alkylsubstituenten sehr schwach sind, kann dies als Erklärung für die etwas geringere Stabilität des BocEAEMPO-Derivats dienen. Für das AEMPO-Addukt ergibt sich durch die Wechselwirkung mit den beiden Amino-Wasserstoff-Atomen zwar prinzipiell eine sehr intensive Wechselwirkung, diese wird jedoch durch die hohe Flexibilität des Aminoethylsterests teilweise kompensiert, was die vergleichsweise niedrigen Werte für k_d und $t_{1/2}$ erklären könnte. Das EAEMPO-Addukt profitiert im Vergleich zum AEMPO-Addukt von dem Ethylrest, der den verbleibenden Amino-Wasserstoff in Richtung der SO_3 -Gruppe drängt bzw. dort fixiert. Zusätzlich kann möglicherweise eine Wechselwirkung zwischen SO_3 -Gruppe und dem benachbarten Wasserstoffatom stattfinden und somit ebenfalls stabilisierend wirken. Eine definitive Aussage zur Stabilität ist unter Ermangelung einer zum SO_3 -Radikal passenden theoretischen Arbeit nicht möglich. Jedoch ergibt sich aus einer Arbeit von Rockenbauer *et al.* (Rockenbauer 1993) für Nitroxid-Radikale eine Bevorzugung der cis-Isomere auch bei voluminösen Substituenten. Insofern ist also die Ausbildung der cis-Isomere bei der Addition von SO_3 -Radikalen nicht unwahrscheinlich zumal für EMPO die Energiedifferenzen zwischen cis- und trans-Isomeren nicht sehr hoch sind (Villamena 2003; Villamena 2004) und in der Literatur nur die Existenz eines Isomers für das EMPO- SO_3 -Addukt beschrieben ist (Olive, 2000).

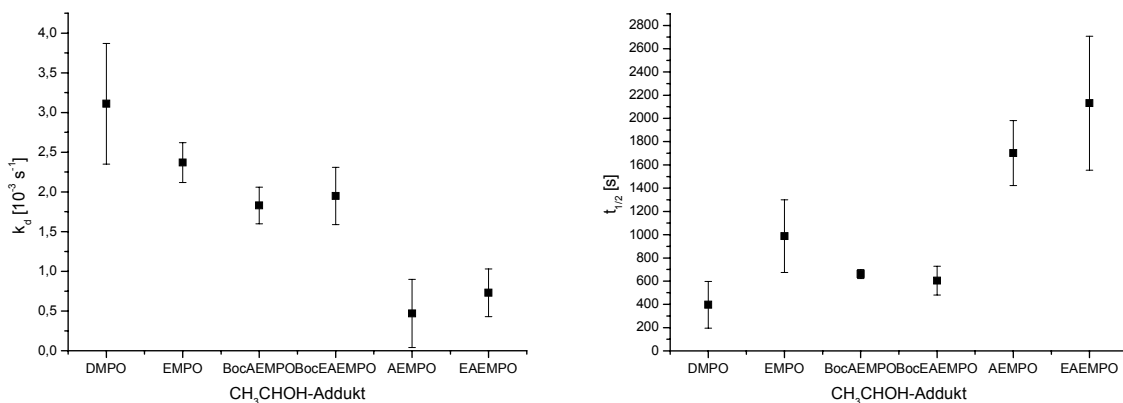
CH₂OH-Radikale:

Aus den Zerfallskonstanten k_d und den Halbwertszeiten $t_{1/2}$ ergeben sich für CH₂OH-Radikale ungewöhnlich hohe Stabilitäten für die beiden neuen Spin-Traps AEMPO und EAEMPO. Für AEMPO konnte zunächst keine Zerfallskonstante und Halbwertszeit bestimmt werden, da der Zerfall nahezu linear verläuft und ein exponentieller Zerfall nicht mit aussagekräftiger Zeitkonstante bestimmt werden kann. Da die Zerfallskonstante k_d das Reziproke der Zeitkonstante darstellt, ist diese daher auch nicht bestimmbar. Um einen Wert für die Halbwertszeit zu erhalten, wurde in diesem Fall eine lineare Regression benutzt und $t_{1/2}$ daraus berechnet. Als Erklärung für die außergewöhnliche Stabilität der AEMPO- bzw. EAEMPO-Addukte bieten sich in diesem Fall zwei Möglichkeiten an: Zum Einen kann durch die zusätzliche Methyleneinheit die Distanz zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff und der OH-Gruppe des addierten Methanol-Radikals stark verkleinert werden. Kommt es dann zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke in Analogie zu den Alkylphosphoryl-Derivaten, bedeutet diese einen starken Energiegewinn für das Molekül, wodurch das cis-Isomer begünstigt sein sollte (Villamena 2004). Zum Anderen kann die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Aminoethyl-Terminus und dem addierten Alkohol eine zweite oder eine alternative Möglichkeit zur Stabilisierung darstellen. Beide Reste sind groß genug um den Pyrrolin-Ring zu überspannen und in Wechselwirkung zu treten, wobei auch hier das cis-Isomere bevorzugt entstehen muss. Die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen den beiden Gruppierungen ist dabei nahe liegend, wobei im Gegensatz zum SO₃-Addukt die Aminofunktion als Akzeptor und die Hydroxyfunktion als Donor fungiert:

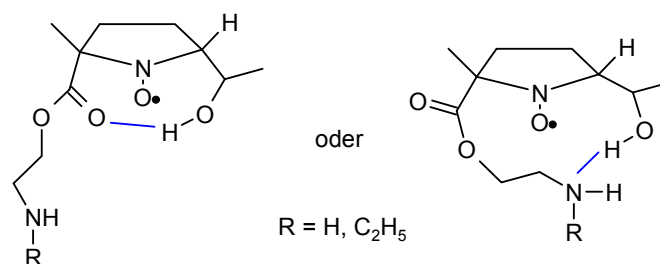


Die dem EMPO vergleichbare Stabilität der Boc-geschützten Spin-Traps könnte demzufolge aus einer sterischen Hinderung herrühren. Dabei verhindern die *tert*-Butoxycarbonylgruppen entweder die Ausbildung des *cis*-Isomers oder aber es kann aufgrund sterischer Effekte in der Estergruppierung keine günstige Position für eine Wechselwirkung erreicht werden. Da die Arbeit von Rockenbauer *et al.* (Rockenbauer 1993) für Nitroxidradikale trotz sterisch aufwendiger Gruppen eine Bevorzugung von *cis*-Isomeren dokumentiert, dürfte der zweite Fall wahrscheinlicher sein. Letztlich ist aber auch hier ohne eine theoretische Berechnung der Energien für die verschiedenen Isomere keine sichere Aussage möglich. Aus der Literatur folgt für das EMPO-CH₂OH-Addukt nur die Existenz eines Isomers, wobei keine Aussage getroffen wird, um welches es sich dabei handelt (Stolze 2005; Stolze 2006).

CH₃CHOH-Radikale:

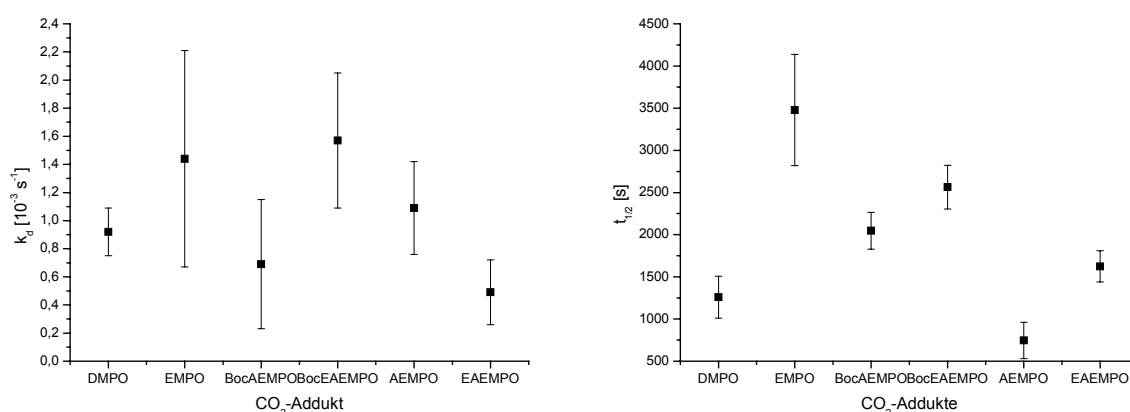


Aus den Zerfallskonstanten k_d und den Halbwertszeiten $t_{1/2}$ ergeben sich auch für CH₃CHOH-Radikale ungewöhnlich hohe Stabilitäten für die beiden neuen Spin-Traps AEMPO und EAEMPO. Auch hier kann in Analogie zum CH₂OH-Addukt die außergewöhnliche Stabilität der AEMPO- bzw. EAEMPO-Addukte durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken erklärt werden. In diesem Fall ist die Ausbildung der Brücken auch durch das addierte Ethanolfragment begünstigt, da hier zusätzlich die Methylgruppe des Ethanoles durch sterische Einflüsse die Wechselwirkung zwischen den Resten erleichtert:



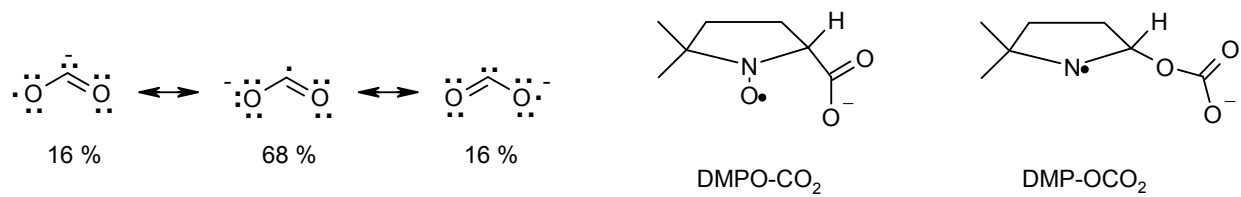
Für die vergleichsweise geringe Stabilität der Boc-Derivate können dieselben Argumente wie beim CH₂OH-Addukt angeführt werden. Auch hier folgt aus der Literatur für das EMPO-CH₃CHOH-Addukt nur die Existenz eines Isomers, wobei ebenfalls wie beim EMPO-CH₂OH-Addukt keine Aussage getroffen wird, um welches es sich dabei handelt (Stolze 2005; Stolze 2006).

CO₂-Radikale:

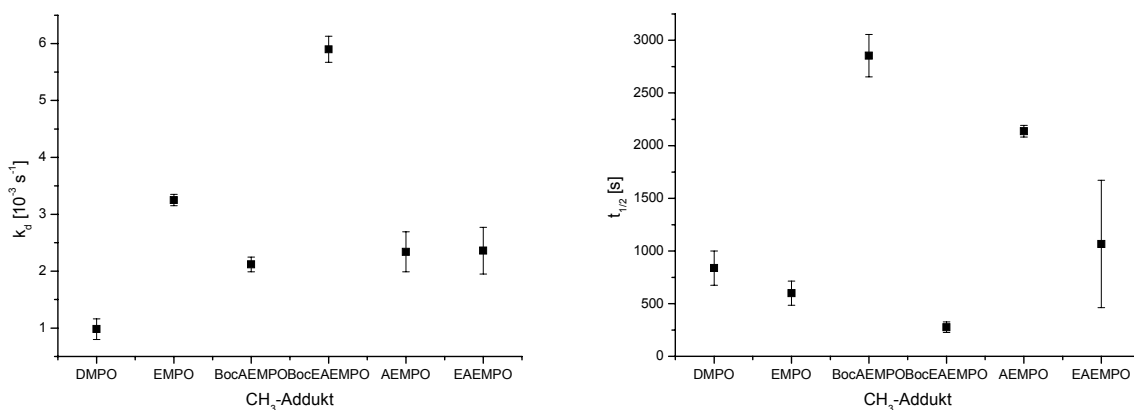


Bei den CO₂-Radikal-Addukten lässt sich für die neuen Spin-Traps keine besondere Stabilisierung feststellen. Insgesamt sind die Addukte der esterhaltigen Spin-Traps mit Ausnahme des AEMPO-Adduktes allesamt sehr stabil, was einen problemlosen Nachweis durch ESR-Spektroskopie ermöglicht. Laut Literatur existiert vom EMPO-CO₂-Addukt nur ein Isomer (Olive 2000). Aus einer Arbeit von Villamena *et al.* (Villamena 2006) ergeben sich auch mechanistische Erkenntnisse zum Reaktionsverlauf. So ist für die Reaktion des Carboxyl-Radikal-Anions mit der Spin-Trap nicht die Ladung relevant, sondern die Spin-Dichte oder Spin-Population. So liegt trotz anderer Ladungsverteilung die Spin-Population mit 68 % beim Kohlenstoff-Atom, dass dann auch die Reaktion mit der Spin-Trap eingeht. Energieberechnungen ergeben zwar eine thermodynamische Bevorzugung eines Aminylradikals mit DMPO (DMP-OCO₂) in wässriger Lösung, da dieses jedoch sehr reaktiv ist dominieren in den ESR-Spektren ausschließlich die Kohlenstoff-zentrierten CO₂-Addukte (Villamena 2006). Da die Werte für die freie Enthalpie mit $\Delta G_{298K, aq} = -12,1$ kcal/mol in

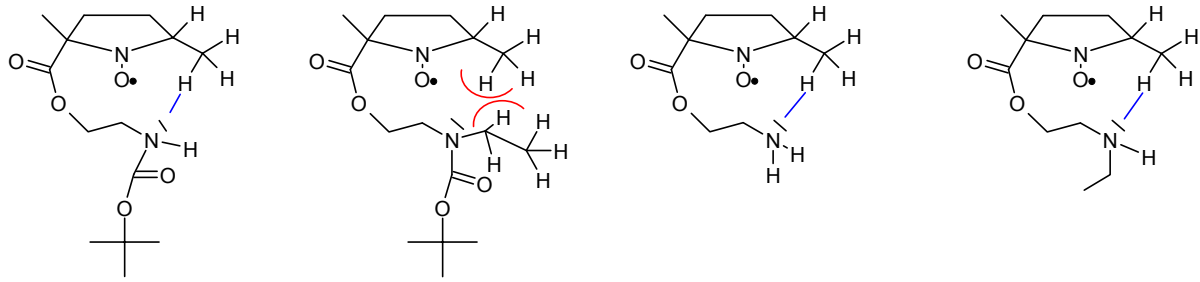
der selben Größenordnung wie die des Mercapto-Radikals ($\Delta G_{298K,aq} = -12,8$ kcal/mol) liegen, könnte CO_2 -Radikal-Bildung auch physiologisch relevant sein.



CH_3 -Radikale:



Die Stabilität der CH_3 -Addukte unterliegt sehr starken Schwankungen. Insbesondere das BocAEMPO- und das AEMPO-Addukt scheinen jedoch sehr viel stärker stabilisiert zu sein, als die CH_3 -Addukte der anderen untersuchten Spin-Traps. Auch hier ist wieder die Ausbildung von Wasserstoffbrücken denkbar. Prinzipiell sind wieder Wechselwirkungen zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff und der Methylgruppe bzw. zwischen den Substituenten der Estergruppen und der Methylgruppe möglich. Allerdings sind diese Wechselwirkungen sehr schwach und daher generell fragwürdig. Betrachtet man aber BocAEMPO- und AEMPO-Addukte einerseits und BocEAEMPO- und EAEMPO-Addukte andererseits, so scheint es plausibel, dass die Stabilitätsunterschiede von der Zugänglichkeit der Aminogruppe abhängen könnten. Besonders im Vergleich ist hier das entschützte Derivat EAEMPO stabiler als das BocEAEMPO, das aus sterischen Gründen gar keine Wechselwirkung eingehen kann:



Allerdings gilt auch hier wie bei allen anderen Radikal-Addukten, dass ohne entsprechende Berechnungen keine endgültigen Aussagen über die Ursache der Stabilisierung getroffen werden können. In der Literatur wird das Vorkommen von cis- und trans-Isomeren des EMPO-CH₃-Addukts beschrieben (Olive, 2000). Wenn man nach den allgemeinen Aussagen über die Kopplungskonstanten eine Zuordnung vornimmt, so entsteht das cis-Addukt zu 83 % gegenüber 17 % trans-Addukt.

3.11 Versuche zur Erzeugung von Superoxid-Radikalen

3.11.1 Vorbemerkung zu den gemessenen Superoxid-Addukt-Spektren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Methoden zum Erzeugen von Superoxid-Radikalen getestet. Einerseits wurde versucht mit Hilfe des Xanthinoxidase-Systems (XOD-System) Superoxid auf enzymatischem Wege zu erzeugen. Andererseits wurden zwei Vorschriften erprobt, nach denen auch chemischem Wege ohne enzymatische Katalyse Superoxid entstehen soll.

3.11.1.1 Versuche mit dem Xanthin-Oxidase-System

Die Umsetzung von DMPO und EMPO mit Superoxid-Radikalen wurde nach der Vorschrift von Frejaville *et al.* (Frejaville 1995) versucht. Die hierzu benötigten Lösungen wurden alle frisch hergestellt.

Benötigte Lösungen:

4 mM Hypoxanthin-Lösung (10 ×):

5,44 mg Hypoxanthin in 1 ml 0,5 M NaOH lösen
ad 10 ml mit PBS-Puffer, pH = 7,2 mit HCl wieder eingestellt

10 mM DTPA-Lösung (10 ×):

39,34 mg DTPA ad 10 ml PBS, pH = 7,2

Für einen Reaktionsansatz wurde folgendes Pipettierschema benutzt:

Lösung	Menge [μ l]	Endkonzentration [mM] oder Aktivität [U/ml]
Hypoxanthin-Lösung	10	0,4
DTPA-Lösung	10	1
Spin-Trap-Stamml. (100 mM)	1	1
XOD-Lösung (1,00 U/ml)	40	0,4
PBS-Puffer, pH = 7,2	39	-

Unmittelbar nach dem Zusammengeben der Lösungsbestandteile wurde mit den ESR-Messungen angefangen. Allerdings konnte sowohl für EMPO als auch für DMPO nur eine sehr geringe Menge des OH-Adduktes nachgewiesen werden. Die Messung von Superoxid-Addukt-Spektren misslang. Da das verwendete Enzym bereits seit längerer Zeit in Gebrauch war, wurde dieses auf seine Reinheit und Aktivität überprüft. Die genaue Durchführung dieser Versuche wurde bereits an anderer Stelle beschrieben (Hauck 2003). Der XOD-Aktivitäts-Assay ergab eine Aktivität von 1,48 U/ml gegenüber 1 U/ml Mindestaktivität laut Hersteller (Serva), das SDS-Gel zeigte keine Verunreinigungen, weshalb das Enzym als Fehlerquelle ausgeschlossen werden kann.

3.11.1.2 Versuche mit dem Fe(III)-H₂O₂-NaOH-System

Diese Umsetzungen von DMPO, BocAEMPO und BocEAEMPO wurden nach einer Vorschrift von Zhou *et al.* (Zhou 2006) versucht.

Benötigte Lösungen:

Fe³⁺-Lösung (4 mM):

51,90 mg FeCl₃ ad 20 ml H₂O bidest.

H₂O₂/NaOH-Lösung (5 mM):

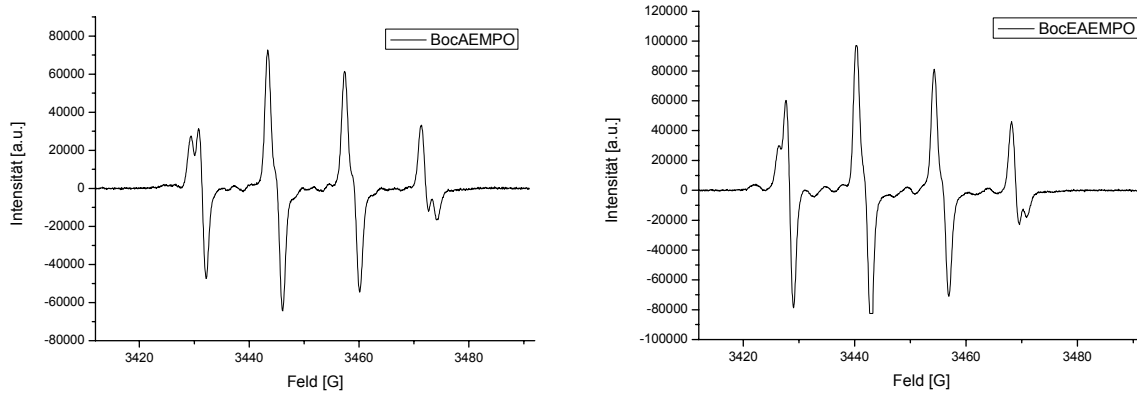
10,00 mg NaOH ad H₂O bidest., pH auf 11,3 mit HCl einstellen
dann Zugabe von 25,5 µl H₂O₂ (30 %ig)

Für einen Reaktionsansatz wurde folgendes Pipettierschema benutzt:

Lösung	Menge [µl]	Endkonzentration [mM]
H ₂ O ₂ /NaOH-Lösung	20	1,25
Fe ³⁺ -Lösung	20	1
Spin-Trap-Stamml. (100 mM)	60	60

Unmittelbar nach dem Zusammengeben der Lösungsbestandteile wurde mit den ESR-Messungen angefangen. Für alle Spin-Traps konnten OH-Addukt-Spektren mit sehr hohen Intensitäten aufgenommen werden. Auffällig war hierbei, dass die Bildung der cis-Isomere offenbar in dieser Reaktionslösung stärker begünstigt war, als bei den „normalen“ Fenton-Ansätzen. So konnte

sowohl bei BocAEMPO als auch bei BocEAEMPO eine Linienaufspaltung gesehen werden, die bei den sonstigen Messungen der OH-Addukte für diese Spin-Traps nicht aufgelöst werden konnten:



Der Nachweis von Superoxid-Radikalen ist jedoch auch mit diesem System nicht gelungen.

3.11.1.3 Versuche mit dem KO_2 -DMSO-System

Die Umsetzungen aller sechs Spin-Traps erfolgte nach den Vorschriften von Locigno *et al.* (Locigno 2005) und Börsterling (Börsterling 1981).

Benötigte Lösungen:

10 mM Fe^{2+} -Lösung, s. Fenton-Lösungen

Spin-Trap-Stammlösungen, s. andere Trapping-Versuche

Schwefelsäure (10 mM)

5,33 μl H_2SO_4 konz (98-99%ig)

ad 10 ml H_2O bidest.

Kaliumsuperoxid-Lösung (14 mM)

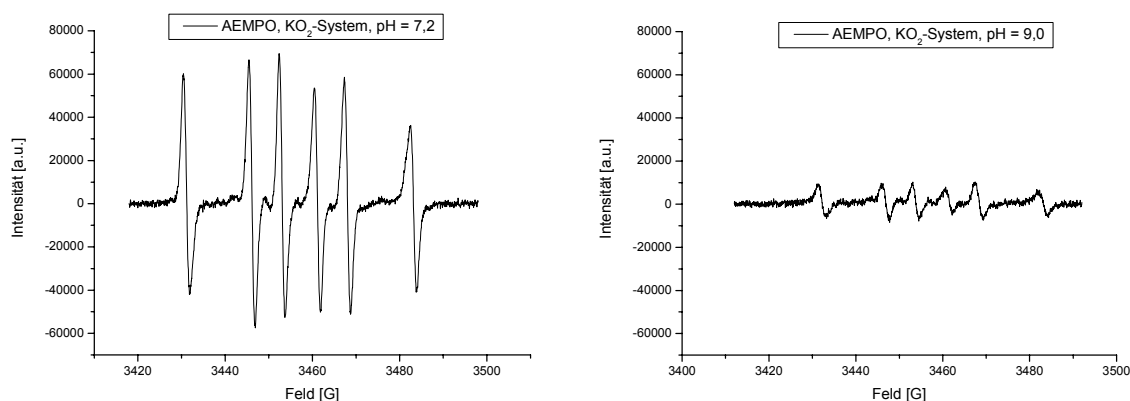
1 mg KO_2

ad 1 ml DMSO

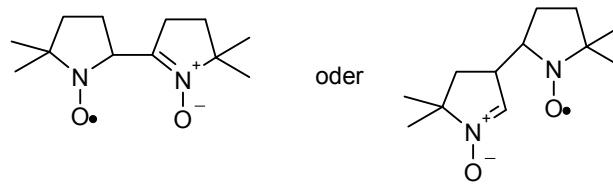
Pipettierschemata:

Lösung	Superoxid, pH = 9,0	Superoxid, pH = 7,2
Spin-Trap-Stammlösung [μl]	20	20
KO_2 -Lös. [μl]	60	40
Fe^{2+} -Lös. [μl]	20	20
Schwefelsäure [μl]	0	20

In einem ersten Versuchsdurchgang mit AEMPO wurde untersucht, ob mit Kaliumsuperoxid in obigem System überhaupt Superoxidradikale in ausreichender Ausbeute zur Durchführung eines Spin-Trapping-Experiments erzeugt werden können. Zwar konnten sowohl bei der basischen, als auch bei der neutralen Variante Spektren aufgenommen werden, jedoch stimmen die Linienformen der Addukte nicht mit den Erwartungen überein (Vasquez-Vivar 2000). Die schnelle Intensitätsabnahme spricht für das Vorliegen eines sehr instabilen Radikal-Adduktes. Da bei diesen Versuchsvarianten DMSO verwendet wird, lag der Schluss nahe, dass aus DMSO und Kaliumsuperoxid Methylradikale generiert werden. Aufgrund der Tatsache, dass die Messungen der „Superoxid-Radikale“ in einer 40 %igen DMSO-Lösung durchgeführt wurden, ergeben sich geringfügige Unterschiede der erhaltenen Hyperfeinkopplungskonstanten gegenüber den Werten, die man im Fenton-Ansatz mit 10 % DMSO für CH_3 -Addukte erhält. Insofern führt also die Umsetzung in diesem System nur zu sehr intensiven Methyl-Addukten und nicht zu den gewünschten Superoxid-Addukten.

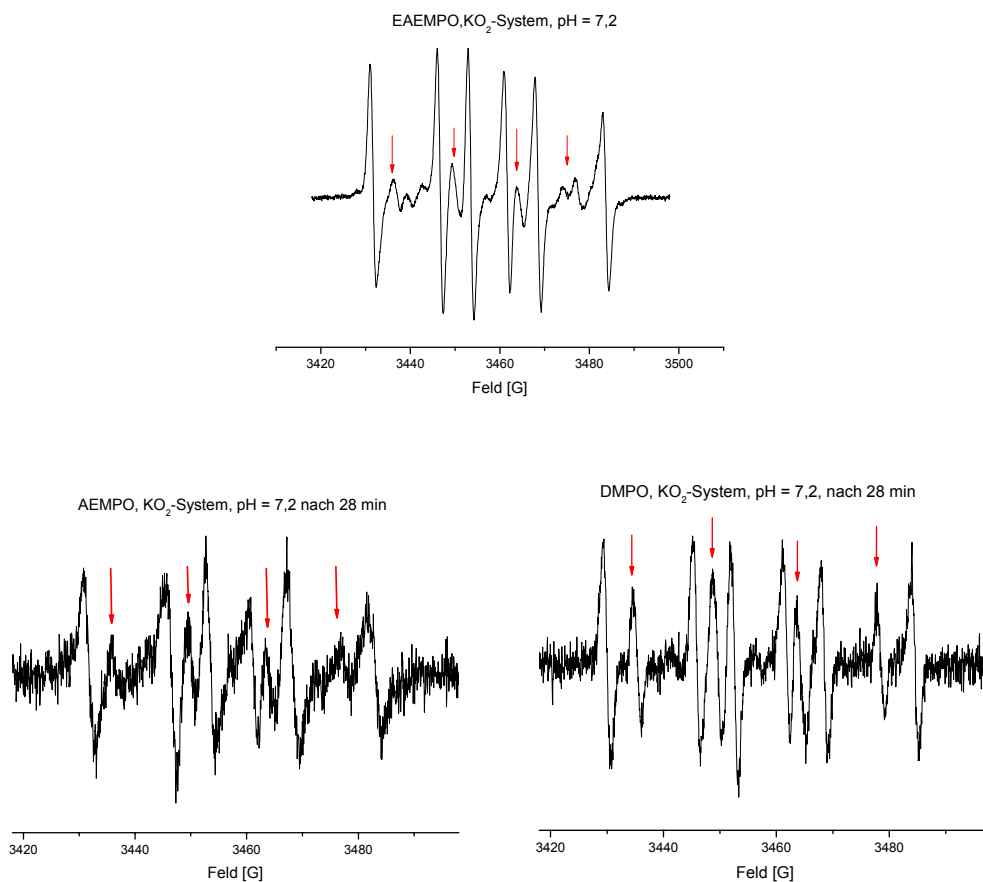


In diesem Zusammenhang ist noch interessant, dass die Bildung eines DMPO-Adduktes in einem Fe-EDTA-haltigen System bei Zugabe von DMPO laut Finkelstein *et al.* (Finkelstein 1980) zu einem ESR-Spektrum mit vergleichbaren Kopplungskonstanten und Linienformen führt. In diesem Fall wurde die Bildung eines DMPO-Dimers postuliert, für das folgende Strukturvorschläge existieren:



Weitere Veröffentlichungen zu diesem speziellen Sachverhalt existieren nicht. Durch einen seltsamen Zufall ergeben sich für die so erhaltenen DMPO- und EMPO-Addukte Halbwertszeiten, die genau im Bereich der publizierten Daten der Superoxid-Addukte liegen. Da jedoch die Hyperfeinkopplungskonstanten nicht zum Superoxid-Spektrum passen und aufgrund der Versuchsbedingungen die Methylradikalbildung denkbar ist, spricht alles für die Bildungen der CH_3 -Addukte.

Bei den so erhaltenen Spektren von EAEMPO sieht man bereits bei Beginn der Messungen zusätzlich die OH-Addukte im ESR-Spektrum (Pfeile). Diese treten auch bei den anderen Spin-Traps im Verlauf einer Messreihe (28 Minuten) hervor:



Da diese Varianten nicht geeignet waren um Superoxid-Radikale zu generieren, wurde versucht mit Kaliumsuperoxid ohne DMSO-Zusatz einen Erfolg zu erzielen. Hierzu wurde die Spin-Trap EMPO nach folgendem Schema verwendet:

Lösung	V1	V2	V3	V4	V5
Spin-Trap-Stammlösung [μ l]	20	20	20	40	60
PBS-Puffer [μ l]	80	60	40	20	0
Fe ²⁺ -Lös. [μ l]	0	0	20	20	20
Schwefelsäure [μ l]	0	20	20	20	20

Hierbei wurde das Kaliumsuperoxid immer als Feststoff zugesetzt. Aus den fünf Versuchen ergeben sich folgende Resultate: Aus der ersten und zweiten Umsetzung (V1 und V2) lassen sich nur sehr schwache ESR-Signale detektieren, die keiner Radikalspezies zuordenbar sind, da die Auflösung der Spektren nicht ausreichend ist. Ursache ist hierfür sicherlich auch die Zersetzung der Spin-Trap bei der Reaktion des KO₂ im wässrigen Milieu. Bei Zusatz von Säure lässt sich der pH-Wert neutral halten, wodurch die Signale stärker werden. Letztlich erhält man aus den Versuchen V3 bis V5 jedoch nur immer intensiver werdende OH-Addukt-Spektren, auf deren Abbildung verzichtet wurde.

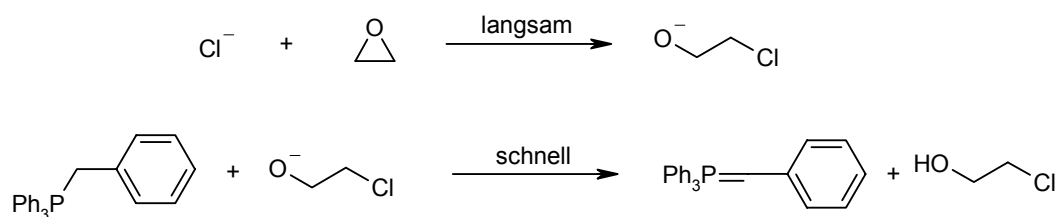
3.12 Synthese aliphatischer Nitrone

3.12.1 Allgemeines zu Synthese

4-Styrylbenzaldehyd wurde anfänglich aus Triphenylbenzylphosphoniumchlorid, Terephthalaldehyd und Ethylenoxid in einer Wittig-Reaktion nach folgendem Schema hergestellt (Drefahl 1961; Manecke 1970; Castells 1979):

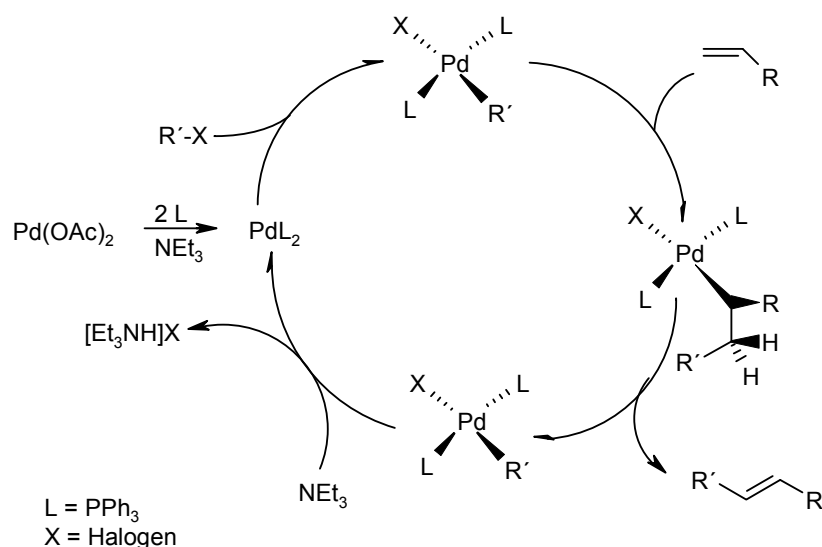


Dabei wird *in situ* aus Ethylenoxid und dem Triphenylphosphoniumchlorid das aktive Phosphoran hergestellt:



Zwar verläuft diese Reaktion quantitativ, jedoch erhält man dabei nur zu 27 % den (E)-4-Styrylbenzaldehyd. Zudem sind für die Reaktion Druckschlenkrohre von Nöten und die Reaktionsdauer beträgt ca. 45 Stunden. Im Anschluss ist dann noch eine aufwendige Trennung der Isomere notwendig. Daher waren Stilbenaldehydderivate lange Zeit, wenn überhaupt, nur zu sehr hohen Preisen erhältlich.

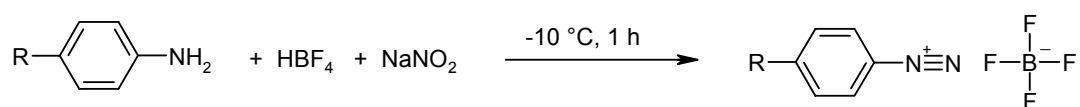
Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit versucht die Synthese komplett auf ligandenfreie Heck-Reaktionen (Reetz 2004) umzustellen, da hierbei mit sehr hohen Ausbeuten (oftmals quantitativ) und meist auch sehr hoher Stereoselektivität das Produkt hergestellt werden kann. Die Heck-Reaktion bietet die Möglichkeit eine Vielzahl von zum Teil hochfunktionalisierten Substraten bei geschickter Wahl der Reaktionsbedingungen in sehr hohen Ausbeuten selektiv umzusetzen (Kikukawa 1981; Riermeier 1997; Littke 2001; Sengupta 2002; Tucker 2002). Der Katalysezyklus der Heckreaktion verläuft wie folgt (Elschenbroich 1993):



Im hier vorliegenden Fall wurde die Reaktion ohne Zusatz eines Liganden durchgeführt und zwei Varianten erprobt.

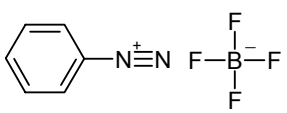
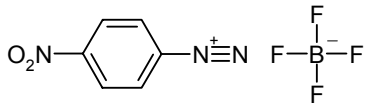
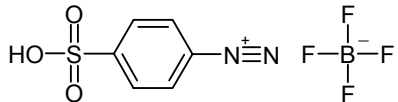
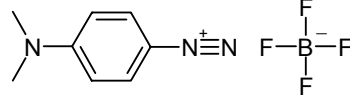
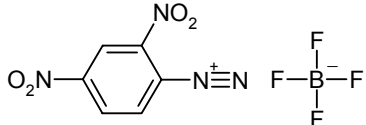
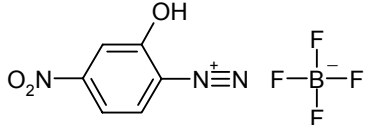
Zum Einen eine „klassische“ Variante bei hoher Temperatur, zum Anderen eine mildere Variante über die Kopplung von Diazoniumsalzen. Die „klassische“ Variante wird limitiert durch die geringe Auswahl an geeigneten Styrolysystemen. Die verfügbaren Verbindungen sind oft mit störenden Stabilisatoren versehen oder in nur schlechter Reinheit (90 %) verfügbar, wodurch die Variabilität der Synthese stark limitiert wird. Daher wurde versucht mit der Diazoniumsalz-Variante ein „Baukastensystem“ zu entwickeln, um die Synthese von Derivaten zu vereinfachen. Als Edukte dienen hier in großer Auswahl verfügbare aromatische Amine. Dafür muss im Gegenzug ein Styrylbenzaldehyd-System hergestellt werden. Ist dieses jedoch einmal vorhanden, lässt sich prinzipiell sehr leicht der weitere Rest des potentiellen Stilbenaldehyds modifizieren. Vorteilhaft ist bei beiden Versionen die Tatsache, dass ligandenfrei gearbeitet werden kann, da die sonst benötigten Phosphan-Liganden teilweise sehr teuer und empfindlich sind.

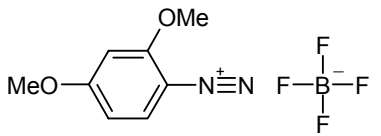
3.12.2 Synthese von verschiedenen substituierten Benzoldiazoniumtetrafluorborat-Salzen



65,00 mmol der entsprechenden aromatischen Aminoverbindung werden in 20%iger HBF_4 gelöst und auf -10 °C abgekühlt. Unter heftigem Rühren werden dann über 1 Stunde 65,00 mmol einer

wässrigen NaNO_2 -Lösung zugetropft, wobei die Temperatur maximal bis 0°C steigen gelassen wird. Durch das ausfallende Diazoniumsalz trübt und dickt die Reaktionslösung schnell ein. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird das Diazoniumsalz über einen Büchnertrichter abgetrennt und gewaschen. Das so erhaltene Diazoniumtetrafluorborat-Salz wird über Nacht im Exsikkator getrocknet und anschließend kurz im Hochvakuum von restlichem Diethylether befreit, wobei eine Erwärmung über 30°C wegen Explosionsgefahr vermieden wird. Die Herstellung orientiert sich dabei an etablierten Vorschriften (Dunker 1936; Becker 1990; Wang 2003; Masllorens 2005) Synthetisierte Diazoniumsalze mit Ausbeuten:

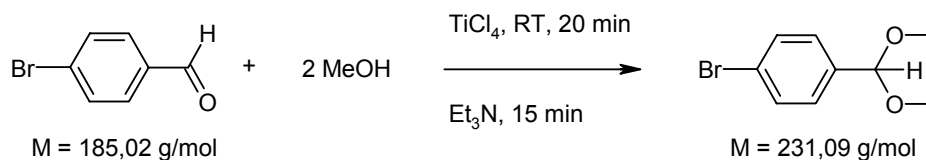
Diazoniumsalz	Strukturformel	Ausbeute	Farbe
Benzoldiazonium-tetrafluorborat	 $M = 191,92 \text{ g/mol}$	95 %	weiß
4-Nitro-benzoldiazonium-tetrafluorborat	 $M = 236,92 \text{ g/mol}$	97 %	hellbraun
4-Benzolsulfonsäure-diazonium-tetrafluorborat	 $M = 271,98 \text{ g/mol}$	76 %	weiß
4-Dimethylamino-benzoldiazonium-tetrafluorborat	 $M = 234,99 \text{ g/mol}$	89,5 %	schwarz
2,4-Dinitro-benzoldiazonium-tetrafluorborat	 $M = 281,92 \text{ g/mol}$	96 %	gelb
2-Hydroxy-4-nitro-benzoldiazonium-tetrafluorborat	 $M = 252,92 \text{ g/mol}$	89 %	leuchtend orangerot

2,4-Dimethoxybenzoldiazonium-tetrafluoroborat	 <p>M = 251,97 g/mol</p>	94 %	tiefviolett
---	---	------	-------------

3.12.3 Synthese von TMS-Styrol-Derivaten

Zur Synthese der benötigten Styrylbenzaldehyde muss zunächst die Aldehydfunktion des 4-Brombenzaldehyds geschützt werden. Im zweiten Reaktionsschritt wird dann eine Umsetzung mit Trimethylvinylsilan in einer ersten Heck-Reaktion vorgenommen. Als Alternative besteht hier auch die Möglichkeit zur Palladium-katalysierten Umsetzung einer Grignard-Verbindung (Liu 2004), jedoch wird dann 4-Iodbenzaldehyd statt 4-Brombenzaldehyd benötigt, das nicht käuflich erhältlich ist.

3.12.3.1 Synthese von 1-Brom-4-dimethoxymethyl-benzol

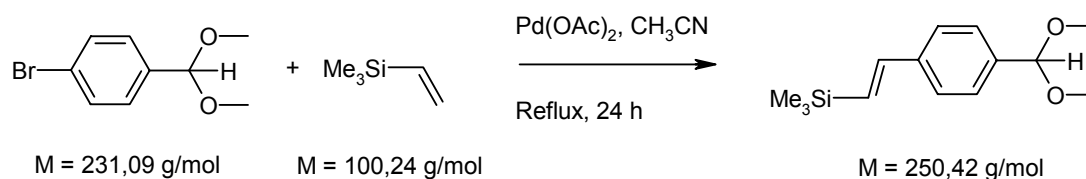


4-Brombenzaldehyd (54,05 mmol) wird in trockenem Methanol gelöst und bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre mit TiCl_4 als Katalysator versetzt (Clerici 1998). Nach 20 Minuten rühren wird Triethylamin zugeben und für 15 Minuten weitergerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der Ansatz aufgearbeitet. Nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum erhält man 1-Brom-4-dimethoxymethyl-benzol als gelbliches Öl.

Ausbeute: 98 % (52,97 mmol)

Die Analytikdaten sind im Experimentellen Teil aufgeführt und entsprechen den Erwartungen.

3.12.3.2 Synthese von [2-(4-Dimethoxymethyl-phenyl)-vinyl]-trimethyl-silan



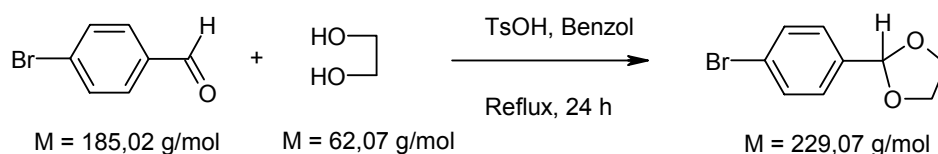
Die Synthese orientiert sich an etablierten Vorschriften für die Umsetzung von Iodaryl-Verbindungen mit Trimethylvinylsilan (Karabelas 1986; Nilsson 1990; Jeffery 1999). Da die Brom-Verbindungen unreaktiver sind als die Iod-Verbindungen, musste die Temperatur abweichend zur Literatur (RT, 50 °C) bis zum Rückfluss erhöht werden.

1-Brom-4-dimethoxymethyl-benzol (17,09 mmol) wird unter Argonatmosphäre in trockenem Acetonitril gelöst. Nach Zugabe von Tetrabutylammoniumacetat (42,70 mmol) und Pd(OAc)₂ (4 mol%) wird Trimethylvinylsilan (34,18 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 24 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach Ende der Reaktionszeit wird die nun schwarze Lösung aufgearbeitet. Nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum erhält man [2-(4-Dimethoxymethyl-phenyl)-vinyl]-trimethyl-silan als dunkelbraunes Öl.

Ausbeute: 95 % (16,24 mmol)

Die Analytikdaten sind im Experimentellen Teil aufgeführt und entsprechen den Erwartungen.

3.12.3.3 Synthese von 2-(4-Bromphenyl)-[1,3]-dioxolan

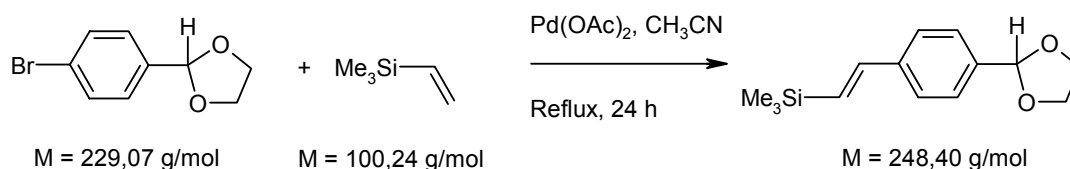


4-Brombenzaldehyd (27,02 mmol) wird in Benzol gelöst und mit Ethylenglykol (40,53 mmol) sowie einer Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure als Katalysator versetzt (Newman 1958; Showler 1966). Die Reaktionsmischung wird für 12 Stunden zum Rückfluss erhitzt und mit einem Wasserabscheider regelmäßig das abgetrennte Benzol-Wasser-Azeotrop entfernt. Nach der Aufarbeitung werden die Lösungsmittelreste im Hochvakuum abgetrennt und man erhält 2-(4-Bromphenyl)-[1,3]-dioxolan als orangegelbes Öl, das nach einigen Tagen Standzeit bei Raumtemperatur teilweise nadelartig kristallisiert.

Ausbeute: 98 % (26,53 mmol)

Die Analytikdaten entsprechen den Erwartungen und sind im Experimentellen Teil aufgelistet.

3.12.3.4 Synthese von [2-(4-[1,3]-Dioxolan-2-yl-phenyl)-vinyl]-trimethyl-silan



Die Synthese erfolgt in Analogie zur Synthese des Dimethylacetal-Derivats.

2-(4-Bromphenyl)-[1,3]-dioxolan (4,65 mmol) wird unter Argonatmosphäre in trockenem Acetonitril gelöst. Nach Zugabe von Tetrabutylammoniumacetat (11,60 mmol) und Pd(OAc)_2 (3 mol%) wird Trimethylvinylsilan (9,30 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 30 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach Ende der Reaktionszeit wird die nun schwarze Lösung aufgearbeitet. Nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum erhält man [2-(4-[1,3]-Dioxolan-2-yl-phenyl)-vinyl]-trimethyl-silan als dunkelbraunes Öl.

Ausbeute: 94 % (4,37 mmol)

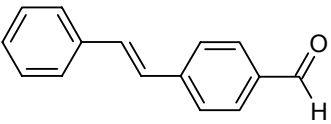
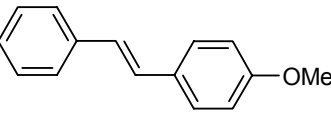
Die Analytikdaten sind im Experimentellen Teil aufgelistet und entsprechen den Erwartungen.

3.12.4 Synthese von Stilbenen

3.12.4.1 Synthese von Stilbenderivaten, Variante 1

Diese Synthese-Variante orientiert sich an der Vorschrift von Yao *et al.* (Yao 2003) und stellt die „klassische“ Version der Heck-Reaktion bei hoher Temperatur dar, sieht man davon ab, dass ligandenfrei gearbeitet wird.

Zu einer Lösung von 1,00 mmol eines Brombenzaldehydderivats in DMA werden unter Argonatmosphäre 1,20 mmol eines Styrolerivats und 2mol% Pd(OAc)_2 zugegeben. Als Base werden 2,00 mmol K_3PO_4 verwendet. Die Reaktionslösung wird für 24 Stunden auf 140 °C erhitzt. Nach Reaktionsende ist die Lösung schwarz gefärbt und wird auf Wasser gegeben. Nach Extraktion mit Ethylacetat erhält man die Stilbene als farbige Feststoffe.

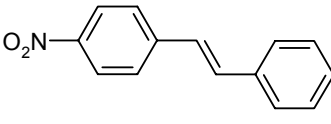
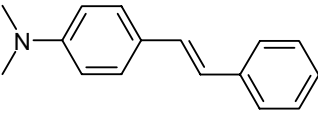
Stilbenderivat	Strukturformel	Ausbeute	Farbe
4-((E)-Styryl)-benzaldehyd	 $M = 208,26 \text{ g/mol}$	99 %	Feststoff: hellgelb Lösung: hellgelb
4-Methoxy-4-((E)-styryl)-benzol	 $M = 210,28 \text{ g/mol}$	95 %	Feststoff: hellgrau Lösung: gelblich

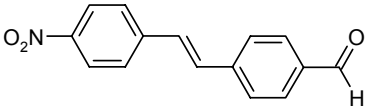
Die Analytikdaten der so erhaltenen Produkte sind im Experimentellen Teil aufgeführt und entsprechen den Erwartungen.

3.12.4.2 Synthese von Stilbenderivaten, Variante 2

Bei dieser Synthesevariante wurde ebenfalls in Anlehnung an etablierte Vorschriften (Wang 2003; Masllorens 2005; Artuso 2006) verfahren, wobei insbesondere wegen der Ähnlichkeit der Systeme die Vorschriften von Ikenaga *et al.* (Ikenaga 1987) und Sengupta *et al.* (Sengupta 1998) hervorzuheben sind.

1,00 mmol Diazoniumtetrafluoroborat-Salz wird mit 1,00 mmol der entsprechenden Styrolerivate und 2 mol% Pd(OAc)₂ in trockenem Methanol bei Raumtemperatur für 5 Stunden rühren gelassen. Nach Abschluss der Gasentwicklung gibt man den Ansatz auf Wasser und extrahiert mit Ethylacetat. Nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum erhält man die Stilbene als farbige Feststoffe.

Stilbenderivat	Strukturformel	Ausbeute	Farbe
1-Nitro-4-((E)-styryl)-benzol	 $M = 225,25 \text{ g/mol}$	99 %	Feststoff: gelb Lösung: gelb
Dimethyl-[4-((E)-styryl)-phenyl]-amin	 $M = 223,32 \text{ g/mol}$	95 %	Feststoff: grau-schwarz Lösung: tiefgrün

4-[(E)-2-(4-Nitrophenyl)-vinyl]-benzaldehyd	 <p style="text-align: center;">M = 253,26 g/mol</p>	95 %	Feststoff: gelb-grün Lösung: gelb
---	---	------	--------------------------------------

Die Analytikdaten, der so erhaltenen Produkte, sind im Experimentellen Teil aufgeführt und entsprechen den Erwartungen.

3.12.4.3 Limitierungen der Diazoniumsalz-Variante

Die Versuche zur Umsetzung der anderen Diazoniumsalze in dieser Reaktion scheiterten an der Reaktionsträgheit der TMS-Styrolkomponenten. Zunächst wurde versucht die Umsetzungen mit [2-(4-Dimethoxymethyl-phenyl)-vinyl]-trimethyl-silan zu realisieren. Allerdings wurde in den Kopplungsversuchen stets durch das Palladium die Schutzgruppe entfernt und vom Diazoniumsalz die Diazoniumgruppe abgespalten. So wurde nach der wässrigen Aufarbeitung stets das zum Diazoniumsalz korrespondierende Phenol sowie das 4-((E)-2-Trimethylsilylanyl-vinyl)-benzaldehyd erhalten. Die Reaktion wurde unter GC-MS- und NMR-Kontrolle mit den 4-Nitrobenzol-, den 4-Benzolsulfonsäure- und den 4-(Dimethyl)aminobenzol-Diazoniumsalzen in Toluol, Acetonitril und THF mit Pd(OAc)₂ als Katalysator ausprobiert. Da nur die oben beschriebenen Resultate erhalten wurden, wurden die Versuche exakt gleich mit einem Pd(dba)₂-Katalysator (Ikenaga 1986) wiederholt, führten aber zum selben negativen Ergebnis. Um die Fehlerquelle einzugrenzen, wurde dann zunächst versucht festzustellen, ob die synthetisierten Diazoniumsalze reaktionsfähig waren. Hierzu wurde nach der Synthesevariante 2 die Umsetzung des 4-Nitrobenzol- und des 4-(Dimethyl)aminobenzol-Diazoniumsalzes mit Styrol erfolgreich durchgeführt. Als nächste Fehlerquelle wurde die starke Funktionalisierung der oben verwendeten Diazoniumsalze vermutet (Gooßen 2006). Um diesen Sachverhalt zu klären, wurde versucht Benzoldiazoniumtetrafluoroborat mit [2-(4-Dimethoxymethyl-phenyl)-vinyl]-trimethyl-silan zu koppeln. Dieser Versuch misslang, wodurch sich die Ursache auf die TMS-Styrol-Komponente eingrenzen ließ. Die Einführung einer stabileren Schutzgruppe sollte für Abhilfe sorgen, weshalb [2-(4-[1,3]-Dioxolan-2-yl-phenyl)-vinyl]-trimethyl-silan synthetisiert wurde. Mit dieser Verbindung konnte jedoch nur der 4-[(E)-2-(4-Nitrophenyl)-vinyl]-benzaldehyd erfolgreich synthetisiert werden. Die anderen Diazoniumsalz-Umsetzung führten weiterhin zum entschützten TMS-Benzaldehyd und zum Phenol. Versuche die TMS-Gruppe bei verschiedenen Temperaturen durch Zugabe von Kaliumfluorid in verschiedenen Lösungsmittel zu entfernen, scheiterten

(Conejero 2004). Auch der Einsatz von Tetrabutylammoniumfluorid in verschiedenen Lösungsmitteln brachte keinen Erfolg. Die TMS-Gruppe konnte trotz Erhöhung der Reaktionstemperatur bis auf 110 °C in Toluol mit beiden Reagenzien nicht abgespalten werden. Offenbar liegen in den TMS-Styrol-Derivaten besonders stabilisierende elektronische Bedingungen vor.

Versuche zur Umsetzung der drei anderen oben aufgeführten Diazoniumsalze verliefen ebenfalls ohne den gewünschten Erfolg.

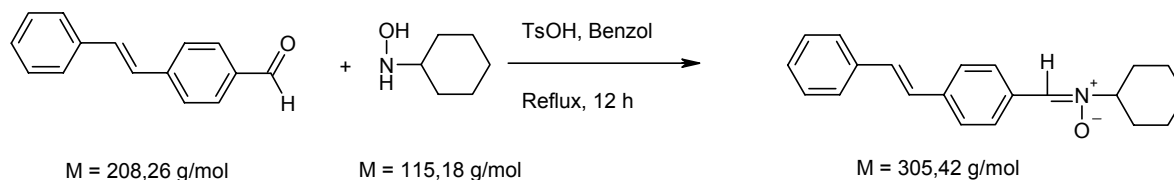
Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die neu eingeführte Synthese ein großes Potential birgt, sofern die Reaktivitätsproblematik der TMS-Styryl-benzaldehyd-Komponente überwunden werden kann.

3.12.5 Synthese von Stilbennitronen

Zur Synthese von aliphatischen Spin-Trap-Verbindungen bieten sich zwei Synthesewege an. Zum Einen kann in Analogie zum Zyklisierungsschritt der Synthesen für zyklische Spin-Trap-Verbindungen ein Aldehyd mit einer Nitroverbindung zusammen mit Zink-Staub und Eisessig umgesetzt werden (Huie 1985).

Die andere Möglichkeit besteht in der Aldolkondensation eines Aldehyds und eines Hydroxylamins (Torssell 1978; Zhang 1989; Liu 2005). Da Cyclohexylhydroxylamin und N-tert-Butylhydroxylamin käuflich erhältlich sind, entfällt deren Synthese.

3.12.5.1 Synthese von N-Cyclohexylstilbennitron



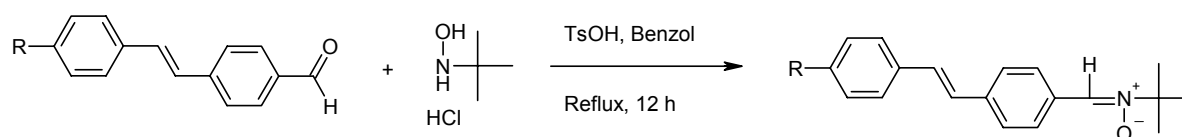
4-((E)-Styryl)benzaldehyd (6,24 mmol) wird zusammen mit N-Cyclohexylhydroxylamin (8,68 mmol) in Benzol gelöst. Nach Zugabe einer Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure als Katalysator wird der Ansatz für 12 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Das entstehende Benzol-Wasser-Azeotrop wird mit einem Wasserabscheider regelmäßig entfernt. Nach Abschluss der Reaktionszeit wird der Ansatz am Rotationsverdampfer eingengt, über wenig Aktivkohle filtriert und das restliche

Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Nach weiteren zwei Filtrationen über Aktivkohle mit Ethanol als Lösungsmittel erhält man nach Entfernen des Lösungsmittels im Hochvakuum Cyclohexylstilbennitron als hellgelben Feststoff.

Ausbeute: 46 % (2,86 mmol)

Die Analytikdaten sind im Experimentellen Teil aufgeführt und entsprechen den Erwartungen.

3.12.5.2 Synthese von N-*tert*-Butyl-stilbennitronen



1,0 mmol eines Stilbenbenzaldehyds wird zusammen mit 1,5 mmol N-*tert*-Butylhydroxylaminhydrochlorid in Benzol gelöst. Nach Zugabe einer Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure als Katalysator, wird der Ansatz für 12 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Das entstehende Benzol-Wasser-Azeotrop wird mit einem Wasserabscheider regelmäßig entfernt. Nach Abschluss der Reaktionszeit wird der Ansatz aufgearbeitet und man erhält das entsprechende N-*tert*-Butylstilbennitron als farbigen Feststoff.

Stilbennitronderivat	Ausbeute
 $M = 279,39 \text{ g/mol}$	62 %
 $M = 324,38 \text{ g/mol}$	75 %

Die Analytikdaten der so erhaltenen Produkte sind im Anhang aufgeführt und entsprechen den Erwartungen.

3.13 ESR-spektroskopische Charakterisierung der aliphatischen Spin-Traps

3.13.1 Probenbereitung

Bei den aliphatischen Spin-Traps ist im Gegensatz zu den zyklischen Nitronen keine besondere Aufreinigung vor Beginn einer Messung notwendig. Da die Stilbennitronen allesamt Feststoffe sind, wurde bereits bei deren Synthese eine für ESR-Messungen ausreichende Reinheit erreicht.

Benötigte Lösungen:

PBS-Puffer, pH = 7,2 (Zusammensetzung s. Experimenteller Teil)

Fenton-Lösungen:

100 mM H₂O₂-Lösung: 510,00 µl H₂O₂ 30 %ig ad 50 ml H₂O bidest.

10 mM Fe²⁺-Lösung: 196,10 mg (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ × 6 H₂O ad 50 ml H₂O bidest.

Die Löslichkeiten der Stilbennitronen schwank sehr. Wenn gleich auch keine der drei hergestellten Verbindungen wirklich wasserlöslich ist, so sind trotzdem Unterschiede feststellbar. Das Cyclohexylderivat ist praktisch unlöslich, von den beiden *tert*-Butyl-Derivaten ist die Nitro-Verbindung die besser lösliche. Für Spin-Trapping-Versuche konnten in PBS-Puffer daher nur folgende Nitron-Suspensionen hergestellt werden:

7,63 mg N-Cyclohexyl- α -[trans-(4-styryl-phenyl)]-nitron (0,025 mmol) ad 500 µl PBS-Puffer

6,98 mg N-*tert*-Butyl- α -[trans-(4-styryl-phenyl)]-nitron (0,025 mmol) ad 500 µl PBS-Puffer

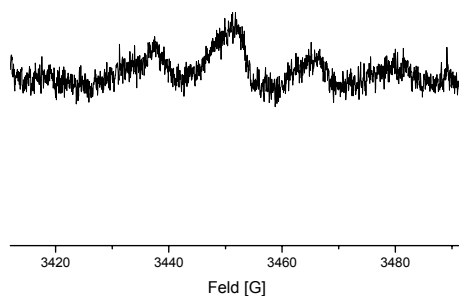
8,11 mg N-*tert*-Butyl-Nitrostilbennitron (0,025 mmol) ad 500 µl PBS-Puffer

3.13.2 Umsetzung von N-Cyclohexyl- α -[trans-(4-styryl-phenyl)]-nitron

In einem ersten Versuch wurde getestet, ob Radikale in wässriger Lösung messbar sind.

Hierzu wurden 50 µl der N-Cyclohexyl-Stilbennitron-Lösung mit 25 µl Fe²⁺-Lösung und 25 µl H₂O₂-Lösung zusammengegeben und direkt ein ESR-Spektrum gemessen. Da kein Signal detektiert werden konnte, wurde der gleiche Ansatz wiederholt, diesmal jedoch mit 100 µl

entgastem Ethylacetat extrahiert und mit drei Scans gemessen. Das organische Extrakt zeigt ein schwaches ESR-Signal, in dem trotzdem drei Linien erkennbar sind. Die Hyperfeinkopplungskonstante wurde zu $a_N = 13,58$ G bestimmt. Die a_H -Kopplung konnte in diesem Spektrum nicht aufgelöst werden.

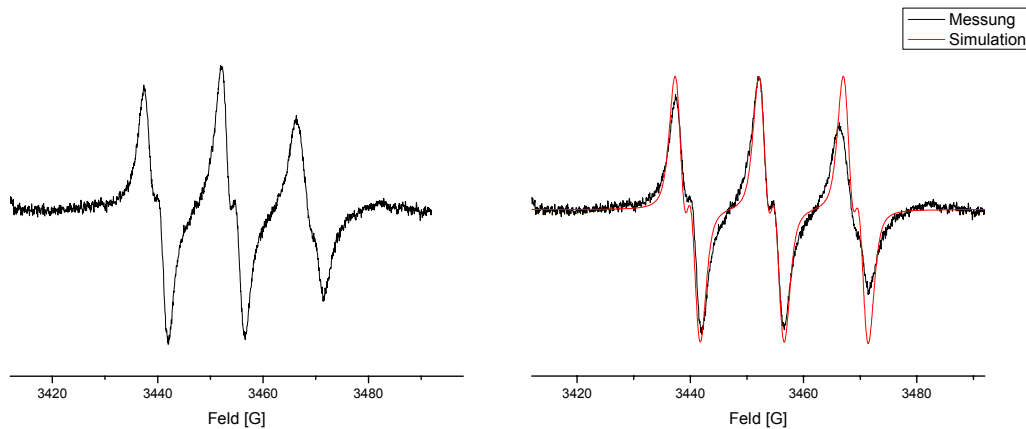


Somit konnten die Resultate von Schneider (Schneider 1999) widerlegt werden, der weder in der wässrigen Phase noch in einem benzolischen Extrakt Radikale nachweisen konnte und daher davon ausging, dass die Cyclohexyl-Verbindung nicht als Spin-Trap verwendbar sei.

3.13.3 Umsetzung von *N-tert*-Butyl- α -[*trans*-(4-styryl-phenyl)]-nitron

Da auch bei dieser Verbindung ein Messversuch der wässrigen Reaktionslösung erfolglos blieb wurde auch in diesem Fall das organische Extrakt gemessen.

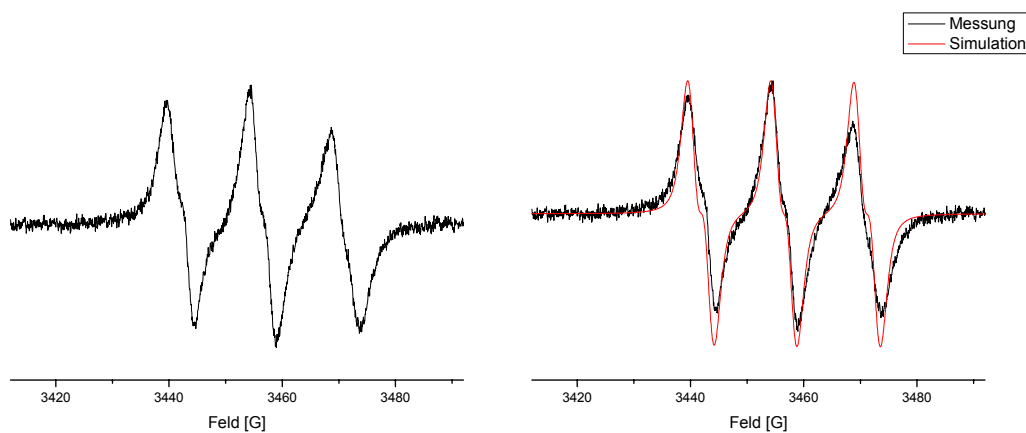
50 μ l der *N-tert*-Butyl-Stilbennitron-Lösung werden mit 25 μ l Fe^{2+} -Lösung und 25 μ l H_2O_2 -Lösung zusammengegeben und mit 100 μ l entgastem Ethylacetat extrahiert und mit einem Scan gemessen. Das organische Extrakt zeigt deutlich ein ESR-Signal mit drei Linien mit einer Hyperfeinkopplungskonstanten von $a_N = 14,84$ G, die nochmals durch eine Kopplung von $a_H = 2,37$ G aufgespaltet werden. Die Simulation mit Garlic ergibt eine gute Übereinstimmung.



3.13.4 Umsetzung von *N-tert*-Butyl-Nitrostilbennitron

Auch bei dem Nitro-Derivat konnte in der wässrigen Reaktionslösung kein ESR-Spektrum aufgenommen werden.

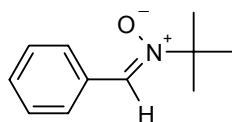
50 μl der *N-tert*-Butyl-Nitrostilbennitron-Lösung werden mit 25 μl Fe^{2+} -Lösung und 25 μl H_2O_2 -Lösung zusammengegeben und mit 100 μl entgastem Ethylacetat extrahiert und mit einem Scan gemessen. Das organische Extrakt zeigt auch hier deutlich ein ESR-Signal mit drei Linien mit einer Hyperfeinkopplungskonstanten von $a_{\text{N}} = 14,68$ G, die nochmals durch eine Kopplung von $a_{\text{H}} = 2,44$ G aufgespaltet werden. Auch für das Nitrostilbennitron ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit der Simulation.



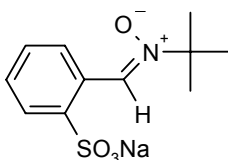
3.13.5 Diskussion der gemessenen Hyperfeinkopplungskonstanten

Betrachtet man die experimentell gewonnenen Daten im Vergleich mit dem Literaturwert für das Ethylacetat-Extrakt eines PBN-Fenton-Ansatz, so ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit den dort tabellierten Kopplungskonstanten:

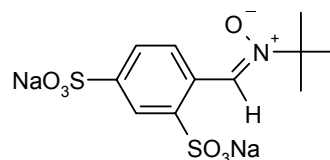
Spin-Trap	Hyperfeinkopplungskonstanten [G]		Quelle
	a_N	a_H	
Cyclohexyl-N.	13,58	n. bestimmbar	Diese Arbeit
N-tert-Butyl-N.	14,84	2,37	Diese Arbeit
N-tert-Bu.-Nitro	14,68	2,44	Diese Arbeit
PBN	13,71	2,10	(Buettner 1987)



PBN



S-PBN



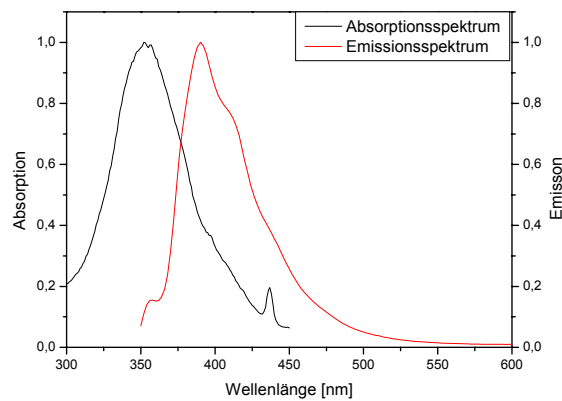
NXY-059

Der Vergleich mit den Werten für OH-Addukt-Spektren des PBN, S-PBN und NXY-059 in Wasser ergibt für die Kopplungskonstanten vergleichbare Größenordnungen, wenn man die Auswirkung von Lösungsmittelleffekten auf die Hyperfeinkopplungskonstanten beachtet (Maples 2001). Versuche, besser aufgelöste Spektren durch Entfernen des Ethylacetats an der Hochvakuumpumpe und Wiederaufnahmen des Rückstandes in Argon-gesättigtem Ethylacetat zu erhalten, blieben bei allen drei Substanzen erfolglos.

Weitere Versuche, andere Radikale nachzuweisen oder Zerfallskonstanten und Halbwertszeiten zu bestimmen, wurden nicht unternommen.

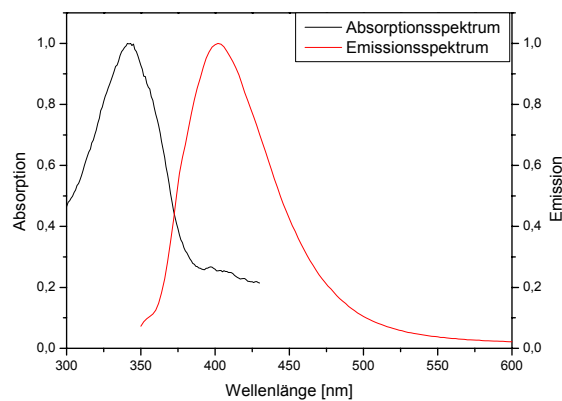
3.14 UV- und Fluoreszenzspektren der Stilbennitron

3.14.1 Spektrum des N-Cyclohexyl- α -[trans-(4-styryl-phenyl)]-nitrons



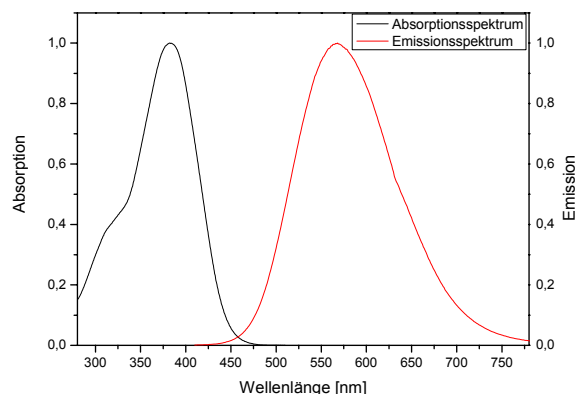
Normiertes Absorptions- und normiertes Emissionsspektrum von N-Cyclohexyl- α -[trans-(4-styryl-phenyl)]-nitron in Ethylacetat.

3.14.2 Spektrum des N-*tert*-Butyl- α -[trans-(4-styryl-phenyl)]-nitrons



Normiertes Absorptions- und normiertes Emissionsspektrum von N-*tert*-Butyl- α -[trans-(4-styryl-phenyl)]-nitron in Ethylacetat.

3.14.3 Spektrum des *N*-*tert*-Butyl-nitrostilbennitron

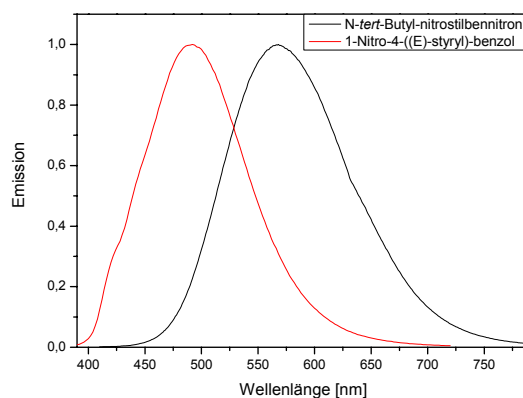


Normiertes Absorptions- und normiertes Emissionsspektrum von *N*-*tert*-Butyl-nitrostilbennitron in Chloroform.

3.14.4 Versuche zum Fluoreszenzquenching mit Nitrostilbennitron

Setzt man Stilbennitron mit Radikalen um, so kommt es bei der Addition zum Verlust der C-N-Doppelbindung und zur Bildung der Nitroxyl-Gruppe.

Die Auswirkung eines Unterschieds in der Konjugation sieht man gut beim Vergleich der Fluoreszenzspektren von 1-Nitro-4-((*E*)-styryl)-benzol, dem besagte Bindung fehlt, und dem *N*-*tert*-Butyl-nitrostilbennitron. Beide Spektren wurden in Chloroform aufgenommen und sind normiert. Das Emissionsmaximum liegen für das 1-Nitro-4-((*E*)-styryl)-benzol bei 490 nm, für das *N*-*tert*-Butyl-nitrostilbennitron dagegen bei 566 nm.

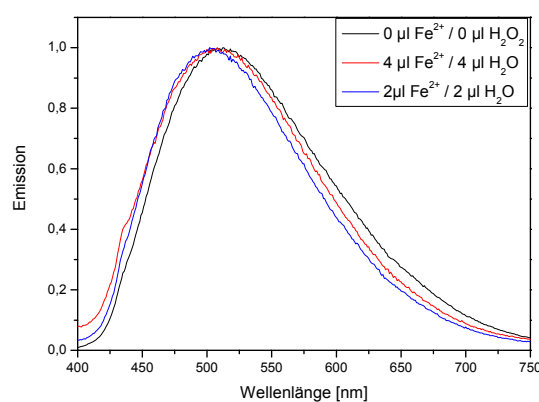
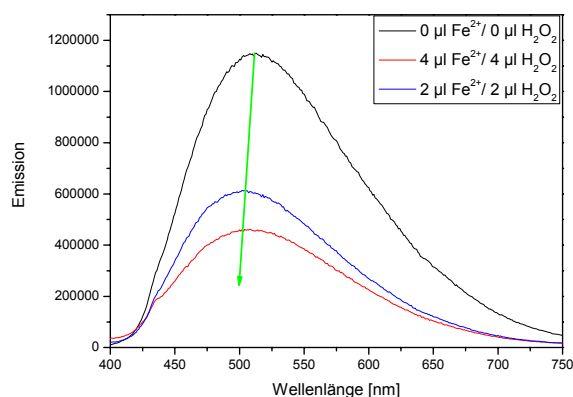


Erwartungsgemäß ist auch bei der Umsetzung von *N-tert*-Butyl-nitrostilbennitron mit Hydroxyl-Radikalen dieser Effekt beobachtbar. Eine Lösung von *N-tert*-Butyl-nitrostilbennitron in Ethanol wird nach folgendem Schema mit den weiter oben beschriebenen Fenton-Lösungen versetzt:

Messung	Zugabe Fe ²⁺ -Lösung, 10 mM	Zugabe H ₂ O ₂ -Lösung, 100 mM	Summe der Zugaben
	[μ l]	[μ l]	[μ l]
1	0	0	0
2	+ 4	+4	8
3	+ 2	+ 2	12

Da die C-N-Doppelbindung in Konjugation mit dem restlichen Fluorophor steht, wirkt sich deren Verlust direkt auf das Spektrum aus. Es ist eine hypsochrome Verschiebung zu erkennen, die sich in einer kontinuierlichen Verschiebung des Maximums des Spektrums hin zu kürzeren Wellenlängen bemerkbar macht (s. obere Abbildung, grüner Pfeil & normierte Abbildung unten). Da die Unterschiede nicht sehr groß ausfallen, ist in diesem Fall nur eine Verschiebung des Maximums erkennbar, es können keine getrennten Emissionsmaxima der beiden Spezies aufgelöst werden. Der andere Prozess ist die erwartete Fluoreszenzlöschung durch das Entstehen des paramagnetischen Spin-Addukts. Durch das Vorhandensein des ungepaarten Elektrons ändern sich die HOMO-LUMO-Niveaus und die Fluoreszenz bricht gewissermaßen ein, wie man deutlich in der oberen Abbildung erkennen kann. Dabei ist der Quenching-Effekt nach der Zugabe der ersten 4 μ l der Fenton-Reagenzien am stärksten. Die Zugabe von weiteren 2 μ l der beiden Fenton-Reagenzien führt zu einer kleinen Verstärkung des Quenching. Der Versuch, den Effekt durch die weitere Zugabe von Fenton-Reagenz weiter zu verfolgen, scheiterte. Es kommt zum Ausfallen eines Feststoffs in der Lösung. Aufgrund der daraus resultierenden Streuung konnten keine weiteren Messungen durchgeführt werden.

Versuche, die Messreihe in Wasser oder DMSO zu wiederholen, scheiterten an der schlechten Löslichkeit des *N-tert*-Butyl-nitrostilbennitrons, die zu einer Trübung der Lösung führte.



Die prozentuale Abnahme der Fluoreszenz wurde durch Integration über die Emissionspektren berechnet. So beträgt der Verlust durch die Zugabe der ersten Portion der Fenton-Lösungen 46 %, nach Zugabe der zweiten Portion dann 60 % bezogen auf das erste Spektrum.

Eine parallel durchgeführte Messreihe nur mit Wasserzugabe zeigt zwar einen leichten Verdünnungseffekt (ca. 4 %) bezüglich der Intensität der Spektren, jedoch ist dieser vernachlässigbar im Vergleich zum beobachteten Effekt bei Zugabe der Fenton-Reagenzien.

Eine Drift der Anregungs- und Emissionswellenlänge aufgrund der Zugabe der wässrigen Lösungen ist als mögliche Fehlerquelle auszuschließen. Da die Dielektrizitätskonstanten von Wasser mit $\epsilon = 78,54$ und Ethanol mit $\epsilon = 24,30$ schon sehr groß sind, ist der Einfluss auf die Lösungsmittelabhängigkeit des UV-Spektrums und des Fluoreszenzspektrums vernachlässigbar.

Gemäß folgender Formel für das Reaktionsfeld ergibt sich unter Vernachlässigung der multiplikativ eingehenden Terme für große Dielektrizitätskonstanten ein Grenzwert von $1/2$:

$$F_{RG} = \frac{2(\epsilon_{DK} - 1)}{a^3 4\pi\epsilon_0 (2\epsilon_{DK} + 1)} \mu_g$$

Setzt man ε für Wasser bzw. für Ethanol in diese Gleichung ein, so erhält man als Werte für Wasser 0,49 und für Ethanol 0,47.

3.15 Zellkultur-Experimente

3.15.1 Verwendete Zellen

Für die Versuche zur Inkubation wurden COS-7-Zellen benutzt, die von der AG Kietzmann freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden.

Bei COS-7-Zellen handelt es sich um eine Nierenzelllinie, die aus CV-1 Zellen der Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) durch Transformation mit dem SV40-Virus entstanden sind (Gluzman 1981). Die Zellen tragen das T-Antigen und können daher mit Vektoren, die auf dem T-Antigen basieren, transfiziert werden. Die Fibroblasten wachsen als Monolayer und unterliegen der Sicherheitsstufe S1 für gentechnische Arbeiten (DSMZ 2007).

3.15.2 Inkubation von COS-7-Zellen mit N-*tert*-Butyl-nitrostilbennitron

3.15.2.1 Benötigte Lösungen

PBS-Puffer, pH = 7,2, steril (Zusammensetzung s. Experimenteller Teil)

20 mM Stammlösung des Nitrons :

1,10 mg N-*tert*-Butyl-nitrostilbennitron ad 154 μ l DMSO mit 20 % Pluronic[®] F-127

3.15.2.2 Versuchsdurchführung

COS-7-Zellen, ausgesät auf blanken Glas-Deckgläschen oder mit 0,1% Gelatine beschichteten Glas-Deckgläschen, werden mit einer Inkubations-Lösung des Nitrons für 30 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden die Deckgläschen auf einen Objektträger überführt und direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert.

Die verwendeten Konzentrationen sind im Folgenden tabelliert:

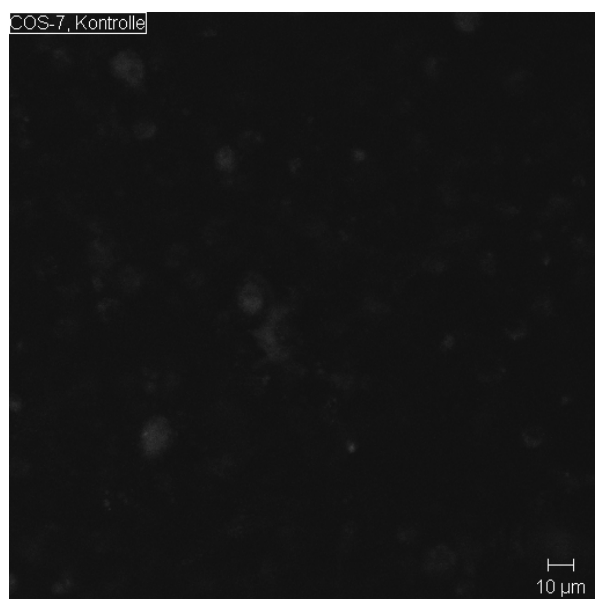
Probename	Endkonzentration [μM]	Nitron-Stammlösung [μl]	PBS-Puffer [μl]
LSM-Apo	20	3	2997
SpCube 1	33	5	2995
SpCube 2	66	10	2990
SpCube 3	75	15	2985
SpCube 4	133	20	2980

Um brauchbare Aufnahmen der Zellen zu bekommen wurden verschiedene Geräte getestet. Das Hauptproblem liegt dabei auf dem ungünstigen Anregungsbereich des N-tert-Butyl-nitrostilbennitrons im Ultravioletten.

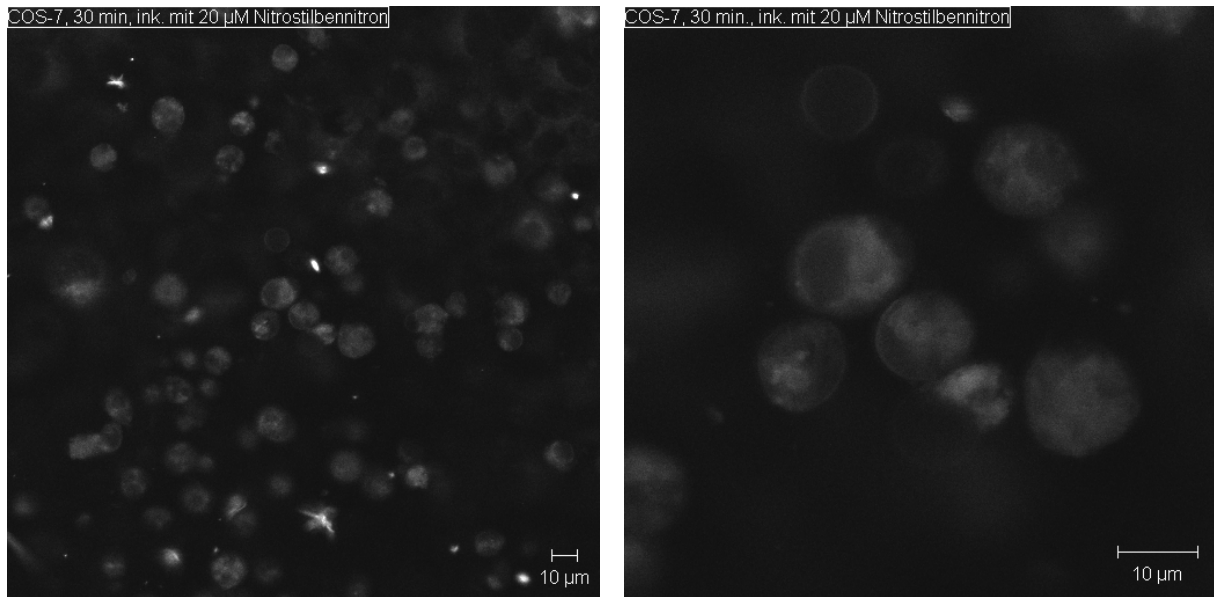
3.15.2.2.1 LSM-Aufnahmen

Die Inkubation erfolgte nach obiger Vorschrift mit der Probelösung „LSM-Apo“. Die Endkonzentration bei der Inkubation beträgt $20 \mu\text{M}$.

Bei ersten Aufnahmen auf dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop der AG Deitmer konnte der Farbstoff nur mit einem Laser bei 458 nm angeregt werden. Da diese Linie die schwächste des angeschlossenen Lasers ist, musste mit 100 % Leistung eingestrahlt werden, um überhaupt noch eine Anregung zu erreichen. Da das Nitron ein sehr guter Fluorophor ist, konnte auch mit dieser Anregungswellenlänge noch eine Messung durchgeführt werden. Im Folgenden sind die so entstandenen Abbildungen zu sehen:



Kontrolle ohne Farbstoff



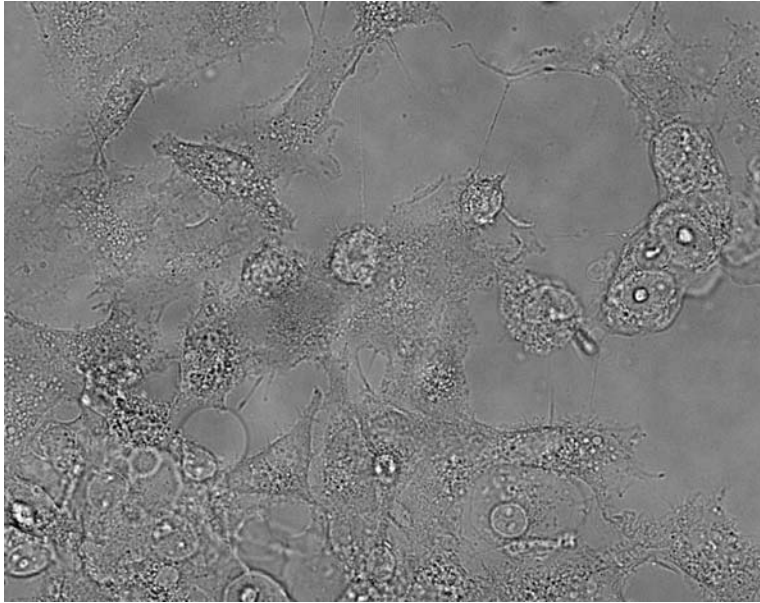
Nach 30 minütiger Inkubation mit 20 µM *N-tert*-Butyl-nitrostilbennitron. Rechts: Ausschnitt des linken Bildes.

Auf den Aufnahmen ist deutlich zu erkennen, dass die Zellen offenbar den Farbstoff aufnehmen und dieser nicht in den Zellkern eindringen kann. Da aufgrund der oben erwähnten Probleme mit der Anregung und Intensität mit komplett geöffnetem Pin-Hole gemessen werden musste, sind die vorliegenden Bilder nicht konfokal. Unter den gegebenen Bedingungen waren keine besseren Aufnahmen realisierbar.

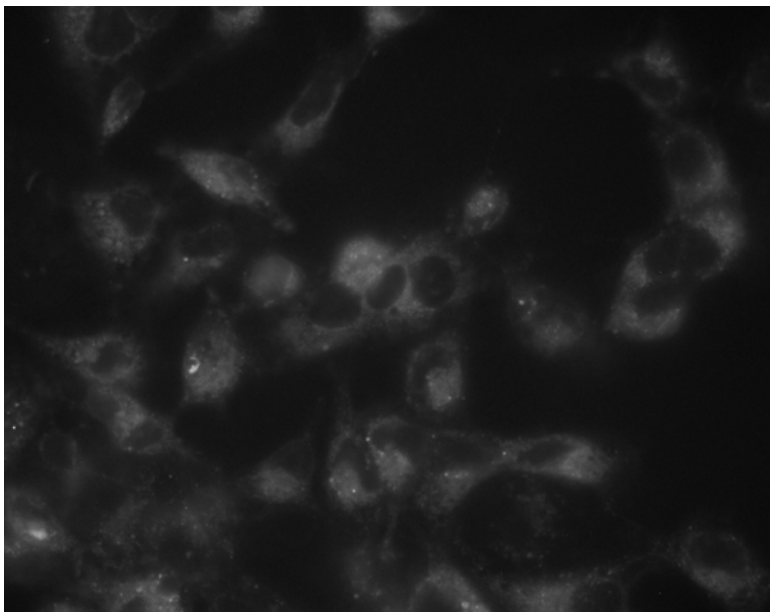
3.15.2.2.2 ApoTome-Aufnahmen

Als Alternative wurde als nächstes versucht mit Hilfe des ApoTome-Geräts der AG Neuhaus bessere Aufnahmen zu realisieren. Dieses Mikroskop kann durch eine spezielle Technik mittels optischer Gitter quasi-konfokale Bildqualität erreichen, wobei auch Schnittaufnahmen durch eine Zelle möglich sind. Die resultierenden Bilder sind in ihrer Qualität denen eines Laser-Scanning-Mikroskops vergleichbar. Da dort eine Anregung bei 450 nm erfolgen kann, bestand die Hoffnung durch diesen kleinen Schritt in Richtung des Absorptionsmaximums eine größere Intensität der Fluoreszenz zu erreichen.

Die Inkubation erfolgte nach obiger Vorschrift mit der Probelösung „LSM-Apo“. Die Endkonzentration bei der Inkubation beträgt somit auch hier 20 µM.



Durchlichtaufnahme der inkubierten Probe



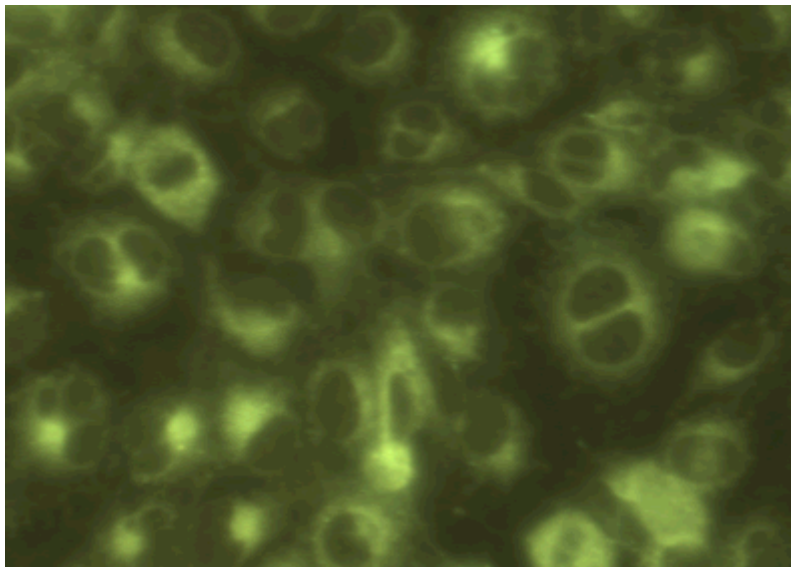
Fluoreszenzaufnahme nach 30 minütiger Inkubation mit 20 μM N-tert-Butyl-nitrostilbennitron

Die hier gewonnenen Bilder bestätigen die Ergebnisse der LSM-Aufnahmen. Die Messung einer unbehandelten Probe ergibt keine Emission von Autofluoreszenz.

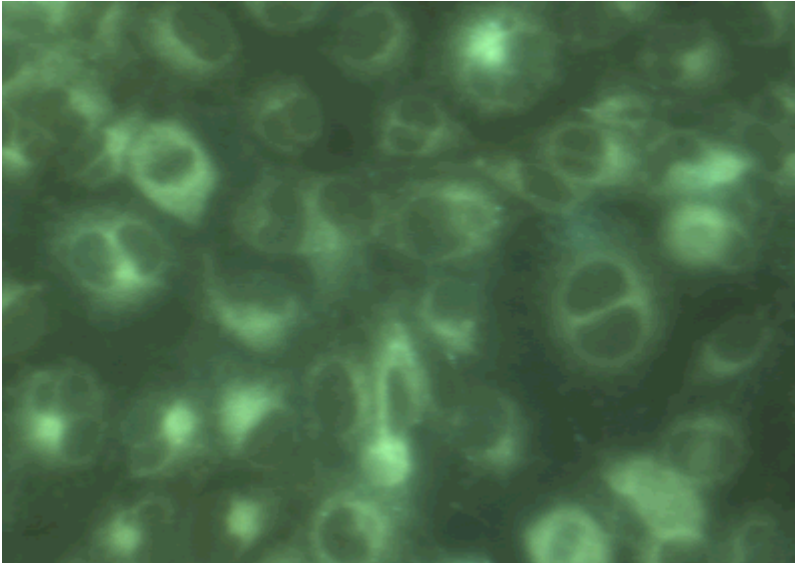
3.15.2.2.3 SpectraCube-Aufnahmen

In einem letzten Versuchsdurchgang wurde versucht auf dem Fluoreszenz-Mikroskop der AG Foth, das mit einem SepctraCube-Detektor ausgestattet ist, bessere Aufnahmen zu erreichen.

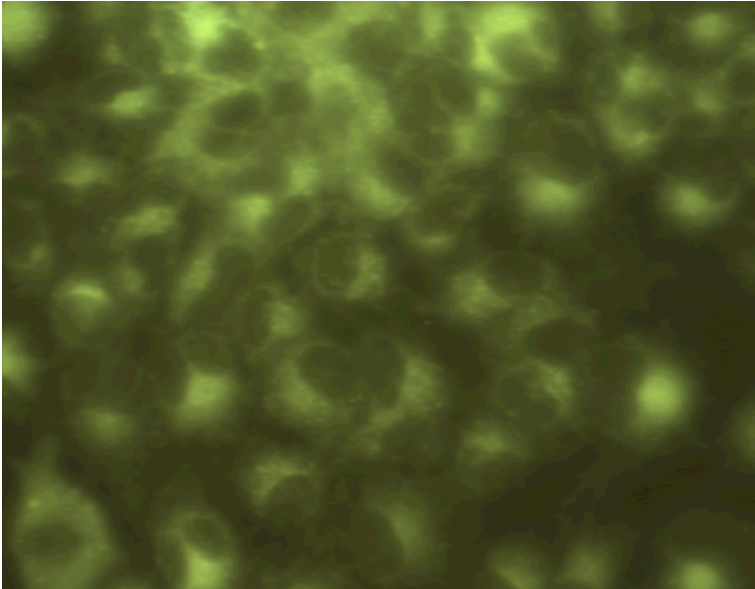
Dieses Gerät ist mit einer Vielzahl von Lichtquellen betreibbar, da auch entsprechende Filtereinheiten vorhanden sind. So konnten hier Aufnahmen mit Anregungswellenlängen von 388 nm und 405 nm angefertigt werden. Die Limitierungen dieses Geräts liegen jedoch darin, dass die Lichtquelle, eine sehr helle LED, nur stufenweise durch Filtereinsätze regelbar ist. Da die COS-7-Zellen sehr klein sind, kam es daher bei den Messungen zu Problemen mit der Kontrasteinstellung, da entweder zu wenig Licht zur Anregung auf die Probe gelangte oder aber so viel, dass der Kontrast sehr schlecht wurde. Bei den Aufnahmen an diesem Mikroskop sollte getestet werden, ob verschiedene Konzentrationen des Farbstoffes zu Änderungen in der Anfärbung führen. Insbesondere sollte untersucht werden, ob es zu spezifischen Färbungen einzelner Strukturen innerhalb der Zelle kommt. Aufgrund der technischen Limitierungen wurde erst mit der Probe „SpCube2“, d.h. mit einer Endkonzentration von $66 \mu\text{M}$ eine Färbung der Zellen aufnehmbar. In diesen Messreihen wurden auch die Gelatine-beschichteten Deckgläschen verwendet. Die Erhöhung der Konzentrationen auf 75 und $133 \mu\text{M}$ Endkonzentration führte zu keinen erkennbaren Unterschieden. Im Folgenden sind die so erhaltenen Aufnahmen abgebildet:



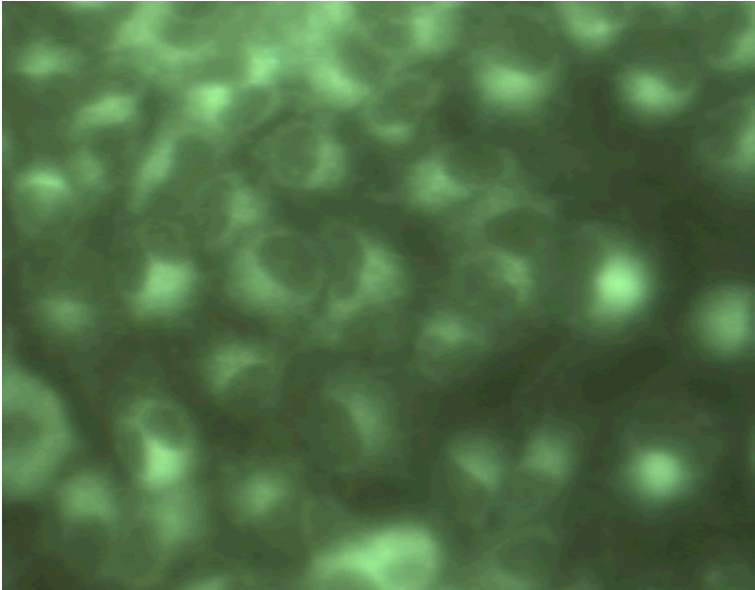
$66 \mu\text{M}$, 405 nm, 200 fach



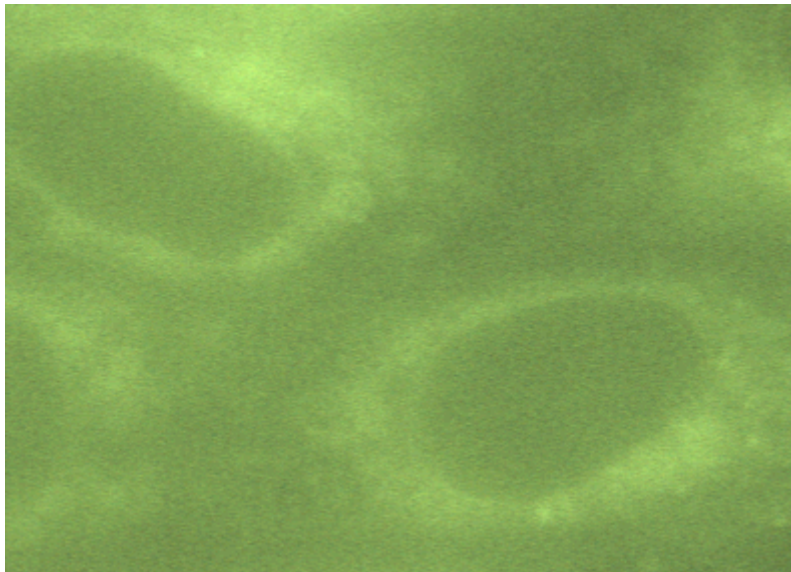
66 μ M, 388 nm, 200 fach



133 μ M, 405 nm, 200 fach



133 μ M, 388 nm, 200 fach

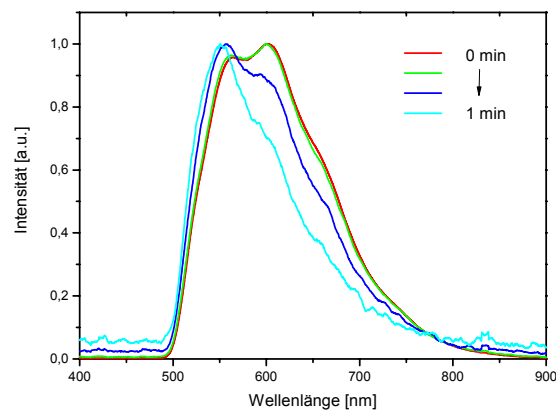
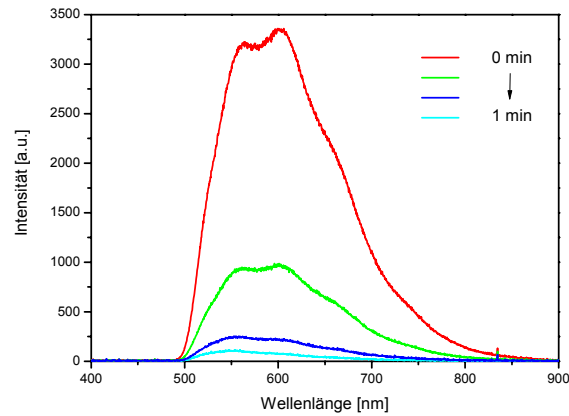
133 μM , 405 nm, 1000 fach

Messungen der Autofluoreszenz der Zellen ergaben bei 388 nm Anregungswellenlänge keinerlei Emission. Bei einer Anregung bei 405 nm Wellenlänge wurde nur eine sehr schwache Autofluoreszenz erkennbar, die aufgrund ihrer geringen Intensität nicht fotografisch festgehalten werden konnte. Auf die Abbildung der Aufnahmen mit einer Konzentration von 75 μM N-tert-Butyl-nitrostilbennitron wurde verzichtet, da hier keine Unterschiede zu den anderen Aufnahmen festgestellt werden konnten.

Die erhaltenen Bilder bestätigen die bisherigen Resultate, nach denen der Farbstoff zwar die Zellen, nicht aber deren Kern anfärbt. Aufgrund der technischen Limitierungen konnte auch an diesem Mikroskop keine bessere Auflösung von Details erreicht werden.

Während der Messungen wurden noch folgende Beobachtungen gemacht:

Nach einer kurzen orangegelben Fluoreszenz wird die sonst beobachtete grüne Fluoreszenz sichtbar. Dabei sinkt auch die Intensität sehr schnell ab. Um diesen Vorgang auch quantitativ zu erfassen, wurde mit einem Faserspektrometer ein unter dem Mikroskop mit 405 nm Wellenlänge belichteter Objektträger gemessen. Die folgenden Spektren wurden über einen Zeitraum von einer Minute gemessen:



Der starke Intensitätsverlust ist eindeutig die Folge des Photobleachings des N-*tert*-Butyl-nitrostilbenenitrons. Betrachtet man die normalisierten Spektren, so ist deutlich die hypsochrome Verschiebung des Spektrums zu erkennen. Das Maximum verschiebt sich von 602 nm auf 551 nm. Ursache dieser Verschiebung ist die photoinduzierte (E)-(Z)-Isomerisierung des N-*tert*-Butyl-nitrostilbenenitrons. Die gemessene Differenz von 51 nm resultiert aus dem Übergang vom (E)- zum (Z)-Isomer und ist in gutem Einklang mit Literaturwerten, die zwischen 40 nm und 125 nm schwanken (Bendig 1978).

4 Zusammenfassung

4.1 Synthese zyklischer Spin-Traps

Nach anfänglichen Schwierigkeiten aufgrund falscher Angaben in Literaturvorschriften konnte die Synthese von EMPO nachvollzogen und hinsichtlich der benötigten Syntheseschritte und der Ausbeute optimiert werden.

Versuche zur Umesterung des EMPOs durch basen-katalysierte oder säure-vermittelte Esterhydrolyse sind an der Empfindlichkeit des EMPO gegenüber Basen, bzw. der Reaktionsträgheit auch gegenüber starken Säuren gescheitert. Ebenso konnte keine Umesterung mit NBD-Farbstoffsystemen erreicht werden.

Aus diesem Grund wurde die Synthese der neuen Spin-Trap-Verbindungen BocAEMPO etabliert und mit deren entschützter Variante AEMPO erneut die Umsetzung mit Farbstoffen ausprobiert. Zu diesem Zweck wurden auch drei verschiedene neue BODIPY-Farbstoffe synthetisiert, die aufgrund ihrer Funktionalisierung mit der zyklischen Spin-Trap reagieren können. Sowohl die Umsetzung des AEMPO mit NBD-, NDA-, FITC- und BODIPY-Derivaten, als auch mit Dansylchlorid scheiterten an der zu hohen Reaktivität der Nitrongruppe.

Die Synthese von BocEAEMPO und dem entschützten Derivat EAEMPO wurde etabliert und Versuche unternommen, letzteres ebenfalls mit den Farbstoffsystemen zu Fluoreszenz-markierten Spin-Trap-Verbindungen umzusetzen. Da auch hier die Reaktionen nicht zu den gewünschten Ergebnissen führten, wurde in weiteren Versuchen getestet, ob Synthesen erfolgreich verlaufen können, bei denen die Fluoreszenzfarbstoffe entweder sehr früh in der Synthese eingebaut werden bzw. das Farbstoffsystem während des Syntheseweg aufgebaut wird, bevor die sensible Nitron-Gruppe generiert wird.

Die Umsetzungen, der Edukte für die neuen Boc-geschützten Spin-Traps mit NBD-Chlorid, führten aufgrund der benötigten Reaktionsbedingungen ebenfalls nicht zum Erfolg. Hier wurden im Syntheseverlauf die Farbstoffe zerstört.

Ein Syntheseversuch zum Aufbau eines BODIPY-Farbstoff-Systems in Kombination mit einem Nitron führte zu einem Teilerfolg. Zumindest konnte aus dem erhaltenen Produkt eine Fluoreszenz detektiert werden, was bestätigt, dass das Farbstoffsystem die Reaktionsbedingungen unversehrt übersteht. Da die Effizienz der Gesamtsynthese über alle Stufen jedoch extrem schlecht war, wurden hier keine weiteren Optimierungen versucht. Aus den Startmaterialien dieser Synthese konnte auch erfolgreich die Spin-Trap HMPO hergestellt werden.

Als Alternative wurde versucht, ein funktionalisiertes DEPMPO-Derivat zu synthetisieren. Hierzu wurde zunächst die vom sonst verwendeten Syntheseweg völlig verschieden verlaufende Synthese des DEPMPO erfolgreich nachvollzogen. Ein Benzoessäurecyanomethylester-Derivat des DEPMPO konnte bis zur vorletzten Stufe erfolgreich hergestellt werden. Letztlich scheiterte diese Synthese am Versagen der beim DEPMPO erfolgreichen Oxidationsreaktion zum Nitron.

4.2 ESR-spektroskopische Charakterisierung der neuen zyklischen Spin-Traps

In einem nächsten Schritt wurden durch ESR-spektroskopische Untersuchungen die neuen Spin-Traps BocAEMPO, BocEAEMPO, AEMPO und EAEMPO auf ihre Fähigkeit zum Abfangen verschiedener Radikale getestet. Durch Dreifachbestimmungen der jeweiligen Messreihen mit je 10 Messpunkten konnten für OH-, SO₃·-, CO₂·-, CH₂OH-, CH₃CHOH- sowie für CH₃-Radikale in Fenton-Reaktionen die Halbwertszeiten und Zerfallskonstanten bestimmt werden. Ein Vergleich mit den ebenfalls gemessenen Referenzverbindungen DMPO und EMPO sowie mit verfügbaren Literaturwerten ergab für diese neuen zyklischen Spin-Traps vergleichbare Werte für die gemessenen Radikale. Weiterhin wurden auch drei verschiedene Ansätze zur Messung des Superoxidationradikals getestet. Die enzymatische Variante über das Xanthin-Oxidase-System erzeugt zwar Superoxidationradikale, jedoch in so geringen Konzentrationen, dass keine aufgelösten Spektren des Superoxids erhältlich waren. Es konnte hier immer nur das Zerfallsprodukt des Superoxids-, das OH-Addukt, in geringen Mengen detektiert werden. Zwei andere Methoden, mit deren Hilfe auf chemischem Wege Superoxid generiert werden sollte, führten ebenfalls nicht zum gewünschten Erfolg. So ergibt die Umsetzung der Spin-Traps in einem Fe(III)-H₂O₂-NaOH-System nur die OH-Addukt-Spektren, wenngleich in diesem Fall die OH-Addukt-Isomere des BocAEMPO und des BocEAEMPO sehr gut aufgelöst werden konnten. Dies war bei den Fenton-Ansätzen zur Messung des OH-Adduktes nicht gelungen. Die Umsetzung mit Kaliumsuperoxid in DMSO, gepuffert mit Schwefelsäure liefert dagegen ausschließlich die Methylradikalspektren der Spin-Traps. Besonders auffällig ist hierbei, dass die gemessenen Zerfallskonstanten für EMPO und DMPO in dieser Reaktionslösung denen des jeweiligen Superoxid-Addukts entsprechen. Da im Reaktionsverlauf auch OH-Addukt-Anteile in den Spektren hervortreten, kann so recht schnell ein falscher Eindruck über die erhaltenen Produkte entstehen. Die Hyperfeinkopplungskonstanten unterscheiden sich jedoch eindeutig von denen des Superoxid-Addukts. Die Umsetzung mit Kaliumsuperoxid in gepufferter Fe³⁺-haltiger Lösung ergibt jedoch nur Spektren des OH-Addukts mit sehr hoher Intensität.

4.3 Synthese aliphatischer Spin-Traps

Die Synthese von Stilbenaldehyden wurde durch die Einführung neuer Synthesemethoden in ihrer Effizienz drastisch gesteigert. Die Ausbeuten für die hergestellten Stilbene und Stilbenaldehyde liegen im Bereich von 90-99 % bei ausschließlicher Bildung des gewünschten (E)-Isomers. Durch die Heck-Reaktion können die Produkte in sehr guter Reinheit gewonnen werden. Aufwendige Trennungen der Isomere sowie Reinigungsschritte, wie bei der bisher verwendeten Wittig-Reaktion, entfallen weitestgehend.

Die Erprobung zweier Varianten der Heck-Reaktion zeigte Limitierungen aufgrund der benötigten Reaktionspartner. So können in der klassischen Reaktion bei hohen Temperaturen nicht alle gewünschten Kopplungen realisiert werden, da die Verfügbarkeit der hierzu benötigten Styrolsysteme limitiert ist. Die alternative Reaktionsvariante mit Diazoniumsalzen ist aufgrund der milderen Reaktionsbedingungen und der höheren Flexibilität bezüglich der möglichen Kopplungspartner der klassischen Variante überlegen. Im konkreten Fall sind jedoch die benötigten TMS-Styryl-benzaldehyd-Derivate aufgrund besonderer elektronischer Stabilisierungen vergleichsweise reaktionsträge. Diese Trägheit führt zum Versagen der Reaktion mit manchen der gewählten Diazoniumsalze. Versuche die störende TMS-Gruppe mit Kaliumfluorid oder Tetrabutylammoniumfluorid in verschiedenen Lösungsmitteln unter Variation der Reaktionszeit und Temperatur zu entfernen sind ebenfalls an dieser Stabilisierung gescheitert.

Die Synthese der Stilbennitronen konnte mit den beiden erhaltenen Stilbenaldehyden nachvollzogen werden und führte zur Synthese von N-Cyclohexyl- α -[trans-[4-(styryl-phenyl)]-nitron, N-*tert*-Butyl- α -[trans-(4-styryl-phenyl)]nitron sowie N-*tert*-Butyl-nitrostilbennitron.

4.4 ESR-spektroskopische Charakterisierung der aliphatischen Spin-Traps

ESR-spektroskopisch ist mit allen drei Stilbennitronen die Messung von Radikal-Addukten möglich. Hierzu wurden in einer Suspension des Stilbennitrons in PBS-Puffer mittels Fenton-Reaktion Hydroxylradikale generiert, die dann im Ethylacetat-Extrakt der wässrigen Phase messbar waren. Ein direkter Nachweis der Spin-Addukte in der wässrigen Phase war nicht möglich. Dabei konnten für das N-Cyclohexyl- α -[trans-(4-styryl-phenyl)]-nitron die Ergebnisse von Schneider (Schneider 1999) widerlegt werden, der mit dieser Verbindung keine Radikalbildung nachweisen konnte. Die Effizienz dieser Verbindung ist jedoch sehr gering.

Für die beiden *N-tert*-Butyl-Derivate ergeben sich vergleichbare Spin-Trapping-Eigenschaften. Die erhaltenen Spektren sind in ihren Kopplungskonstanten und Linienformen denen des PBN vergleichbar, wenngleich jedoch hier immer das organische Extrakt gemessen werden musste.

4.5 Fluoreszenzmessungen

Die Einführung der Nitrogruppe beim Nitrostilbennitron verbessert die Löslichkeit der Verbindung ein wenig, sorgt jedoch in erster Linie für eine starke Verschiebung des Anregungs- und des Emissionsspektrums hin zu größeren Wellenlängen. So absorbiert das *N-tert*-Butyl- α -[trans-(4-styryl-phenyl)]-nitron in Chloroform bei 342 nm und emittiert bei 401 nm Wellenlänge. Die Nitrostilbenvariante absorbiert dagegen bei 382 nm und emittiert bei 568 nm Wellenlänge. Insofern konnte durch die Einführung der Nitrogruppe eine Verschiebung der Absorption und Emission in Richtung des sichtbaren Spektrums erreicht werden.

Die Messung einer Fluoreszenzlöschung bei Zugabe von Fenton-Reagenzien verlief erfolgreich. Die Fluoreszenzlöschung war ausreichend intensiv um auch in Zellkultur-Versuchen einen sichtbaren Effekt erwarten zu können.

4.6 Zellkultur-Versuche

In einer ersten Versuchsreihe wurde versucht Fluoreszenzaufnahmen inkubierter COS-7-Zellen anzufertigen. Da der Farbstoff jedoch immer noch im UV-Bereich absorbiert, waren hier nur bedingt Messungen möglich. Aus technischen Gründen konnten auf keinem der drei getesteten Mikroskope hochauflösende Aufnahmen von inkubierten Zellen angefertigt werden. Die vorhandenen Aufnahmen zeigen gleichmäßig gefärbte Zellen, bei denen einzig der Kern dunkel hervortritt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass bei den bisher getesteten Konzentrationen noch keine spezifische Färbung einzelner Zellstrukturen gelungen ist, die Zellen jedoch den Farbstoff aufnehmen können.

4.7 Ausblick

Die extrem hohe Reaktivität der Nitrogruppe in Kombination mit den vielfältigen Reaktionsmöglichkeiten dieser Gruppierung machen eine direkte Umsetzung des „fertigen“

Nitrons mit Farbstoffen unmöglich, da diese selbst funktionalisiert sein müssen, um überhaupt eine Reaktion eingehen zu können. Aus den Erfahrungen dieser Arbeit ergibt sich dabei, dass immer bevorzugt die Nitrongruppierung abreagiert. So wird es durch den hier beschriebenen Syntheseweg nicht möglich sein, Fluoreszenz- und Spin-Trapping-Eigenschaften in einem Molekül zu vereinen. Mehr Erfolg verspricht eine Direktsynthese, bei der der Farbstoffanteil des Moleküls vor der Nitron-Spin-Trap synthetisiert wird. Wie aber aus den Syntheseversuchen des BODIPY-Derivats hervorgeht, wäre hier noch ein extremer Optimierungsbedarf nötig, um nennenswerte Ausbeuten zu erlangen. Insbesondere muss dabei berücksichtigt werden, dass bei allen Synthesestufen tief farbige Verbindungen erhalten werden, die zudem ab dem Erreichen einer gewissen Stufe auch noch fluoreszieren. Daher werden Aufreinigung und Trennung der erhaltenen Produkte stark erschwert. Hinzu kommt noch, dass ein analysenreines Produkt (NMR, CHN, Fluoreszenz) trotzdem nicht direkt eine ausreichende Qualität für ESR-Versuche besitzen muss. Möglicherweise sind dann noch Reinigungsschritte zum Erlangen der „ESR-Reinheit“ notwendig, die mit einem weiteren Substanzverlust verbunden sind. Dies ist aus den Erfahrungen her massiv abhängig vom Aggregatzustand der Spin-Trap-Verbindung. So werden Öle tendenziell mehr paramagnetische Verunreinigungen aufweisen, als Feststoffe.

In diesem Zusammenhang bieten die aliphatischen Stilbennitron-Spin-Traps eine gute Alternative zu den zyklischen Nitronen. Durch die Einführung der Synthese über Heck-Reaktionen konnte die bisher limitierende Synthese des benötigten Stilbenaldehyds drastisch verbessert werden. Eine weitere Optimierung dieser Synthesen könnte die Möglichkeit bieten, wasserlöslichere Stilbennitronen zu generieren, die durch geeignete Substitution im sichtbaren Spektrum anregbar und somit auf einem konventionellen Laser-Scanning-Mikroskop messbar sind. Alternativ kann jedoch auch die Verwendung eines Laser-Scanning-Mikroskops mit UV-Quelle mit der hier synthetisierten Verbindung neue Erkenntnisse über Radikalreaktion in lebenden Zellen liefern.

5 Experimenteller Teil

5.1 Verwendete Geräte

Elementaranalysen wurden nach Standardmethoden mit einem Elemental Analyzer 240 der Fa. Perkin Elmer durchgeführt.

Zur Aufnahme der Kernresonanzspektren wurden die Puls-FT-NMR-Spektrometer AC200, AMX400 sowie Avance600 der Fa. Bruker Biospin verwendet. Die chemische Verschiebung δ wird in ppm angegeben. Die Messfrequenzen und Lösungsmittel sind bei den NMR-Spektren angeführt.

Zur Charakterisierung der Spinmultiplizitäten werden folgende Abkürzungen verwendet:

Abkürzung	Multiplizität
s	Singulett
d	Dublett
t	Triplett
m	Multiplett

Zur Aufnahme der Elektronenspinresonanzspektren wurde das CW/FT-ESR-Spektrometer ELEXSYS E580 der Fa. Bruker Biospin verwendet. Zum Einsatz kam die dielektrische Cavity ER4118 X-MD-5. Genaue Angaben der Messparameter befinden sich jeweils bei den Abschnitten zur ESR-Spektroskopie.

Infrarot-Spektren wurden auf einem Perkin Elmer FT-IR 16 PC gemessen.

Zur Messung von UV/Vis-Spektren wurde eine Perkin Elmer UV/Vis/NIR Lambda 900-Spektrometer verwendet.

Für die Messungen der Fluoreszenz-Spektren wurde ein Fluoro Max-2-Spektrometer der Fa. ISA Jobin Yvon Spex verwendet.

Zur Fluoreszenz-Mikroskopie wurden folgende Mikroskop-Systeme verwendet:

Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop Zeiss LSM 510, FB Biologie, AG Deitmer, TU Kaiserslautern
Zeiss ApoTome mit Zeiss Axiovert 440 Mikroskop, FB Biologie, AG Neuhaus, TU Kaiserslautern

Zeiss Axioskop mit SpectraCube-Detektor der Fa. Applied Spectral Imaging, FB Physik, AG Foth, TU Kaiserslautern

Zur Messung der Fluoreszenzspektren der cis-trans-Isomerisierung des Nitrostilbennitrons wurde ein Faserspektrometer USB2000 der Fa. Avantes BV benutzt.

Zum Einstellen des pH-Wertes wurde ein pH-Meter der Fa. WTW verwendet.

Als Zentrifuge kam eine Eppendorf Zentrifuge 5415 C zum Einsatz.

Weiterhin wurden die Waagen Sartorius L610D und Sartorius 1601 MP8-1 verwendet.

5.2 Allgemeine Arbeitstechniken

5.2.1 Lösungsmittel & Schutzgas

Alle Produkte wurden, sofern dies notwendig war, unter Argon-Atmosphäre (Reinheit 4.8, zusätzlich über eine CaCl_2 /Blaugel-Säule getrocknet) unter Anwendung der Schlenk-Technik synthetisiert. Glasgeräte wurden - wenn nötig - vor Gebrauch ausgeheizt und an der Hochvakuum Pumpe evakuiert. Es wurden ausschließlich getrocknete Lösungsmittel für feuchtigkeitssensible Syntheseschritte benutzt. Dabei wurden folgende Trockenmittel verwendet:

Lösungsmittel	Trockenmittel
Acetonitril	Calciumhydrid
Dichlormethan	Phosphorpentoxid
1,2-Dichlorethan	Phosphorpentoxid
Diethylether	Natrium
Dioxan	Calciumchlorid
DMA	Destillation und Molsieb 4 Å
DMF	Destillation und Molsieb 4 Å
Ethanol	Phosphorpentoxid oder Molsieb 3 Å
Methanol	Molsieb 3 Å
THF	Natrium-Kalium-Legierung
Toluol	Natrium
Trifluoressigsäure	Destillation, Molsieb 4 Å

Alle sonstigen Lösungsmittel wurden über die Chemikalienausgabe der TU Kaiserslautern bezogen und ohne weitere Behandlung in den Reinheitsgraden „p.a.“ oder „technisch“ verwendet.

5.2.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien zur Synthese wurden in den Reinheitsgraden „p.a.“, „99 %“ oder besser bei den Firmen Sigma-Aldrich, Lancaster-Synthesis oder Acros erworben.

Phloroglucinol und Natriumnitrit wurden im Exsikkator über Phosphorpentoxid aufbewahrt. Wasserstoffperoxid, 30 %, stabilisiert, p.a. der Fa. Merck wurde unter Lichtausschluss bei 4 °C gelagert.

Zur Flash-Säulen-Chromatographie wurden Kieselgel 60 (40-63 μm) sowie Aluminiumoxid 90 neutral der Fa. Merck verwendet. Weiterhin wurde eine RP-18-Säule für die MPLC verwendet.

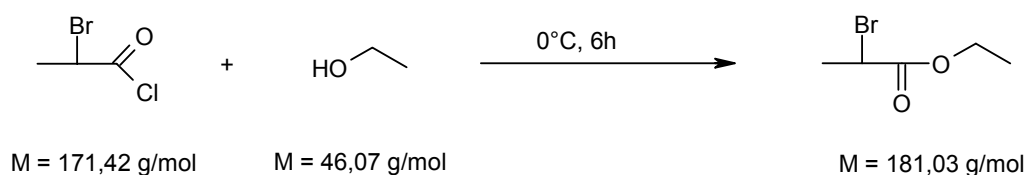
Dünnschichtchromatographien wurden ausschließlich auf Polygram SIL G/UV₂₅₄-Platten der Fa. Macherey-Nagel sowie auf DC-Alufolien Aluminiumoxid 60 F₂₅₄ und DC-Fertigplatten RP-18 F_{254s} der Fa. Merck durchgeführt.

Alle anderen Chemikalien waren in der Arbeitsgruppe vorhanden.

5.3 Synthesen zyklischer Nitrone

5.3.1 Synthese von EMPO

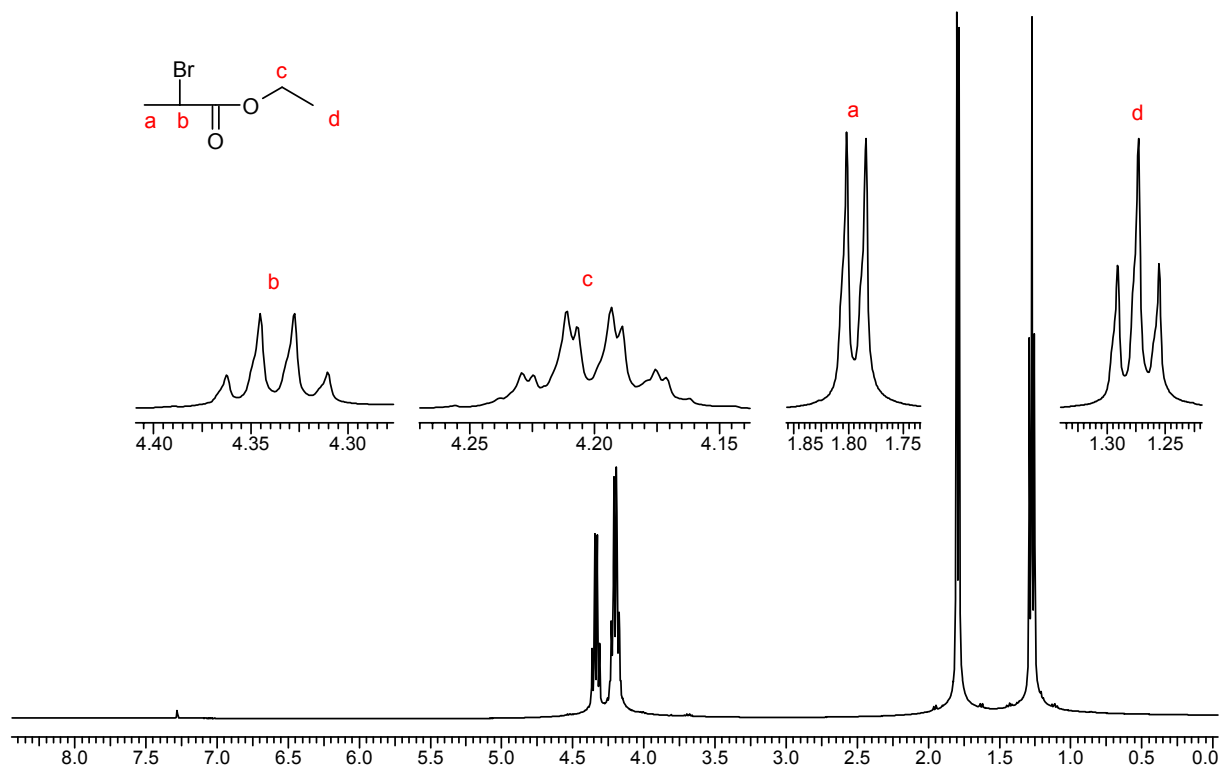
5.3.1.1 Synthese von 2-Brompropionsäureethylester



6 ml 2-Brompropionylchlorid (58,00 mmol) werden über 6 Stunden zu 100 ml über P_2O_5 getrocknetem Ethanol unter Argonatmosphäre zugetropft. Die Temperatur wird dabei mit einem Eisbad auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ gehalten. Nach dem Ende der Reaktionszeit wird der Ansatz auf Eiswasser gegeben und mit $3 \times 100\text{ ml}$ Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit $MgSO_4$ getrocknet, abfiltriert, einrotiert und im Hochvakuum von letzten Lösungsmittelresten befreit. Man erhält 2-Brompropionsäureethylester als hellgelbes Öl.

Ausbeute: 95 % (55,10 mmol)

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

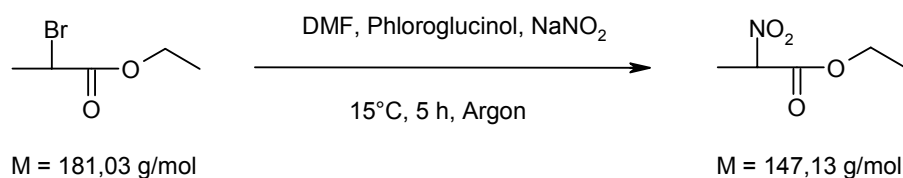


Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	1,802	d	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,04$
b	4,328	dq	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,04, ^4J_{\text{HH}} = 1,76$
c	4,207	dq	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,34, ^4J_{\text{HH}} = 1,76$
d	1,273	t	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,34$

Elementaranalyse:

	C	H	N
berechnet [%]	33,17	5,01	0,00
gefunden [%]	33,20	4,98	0,00

5.3.1.2 Synthese von 2-Nitropropionsäureethylester

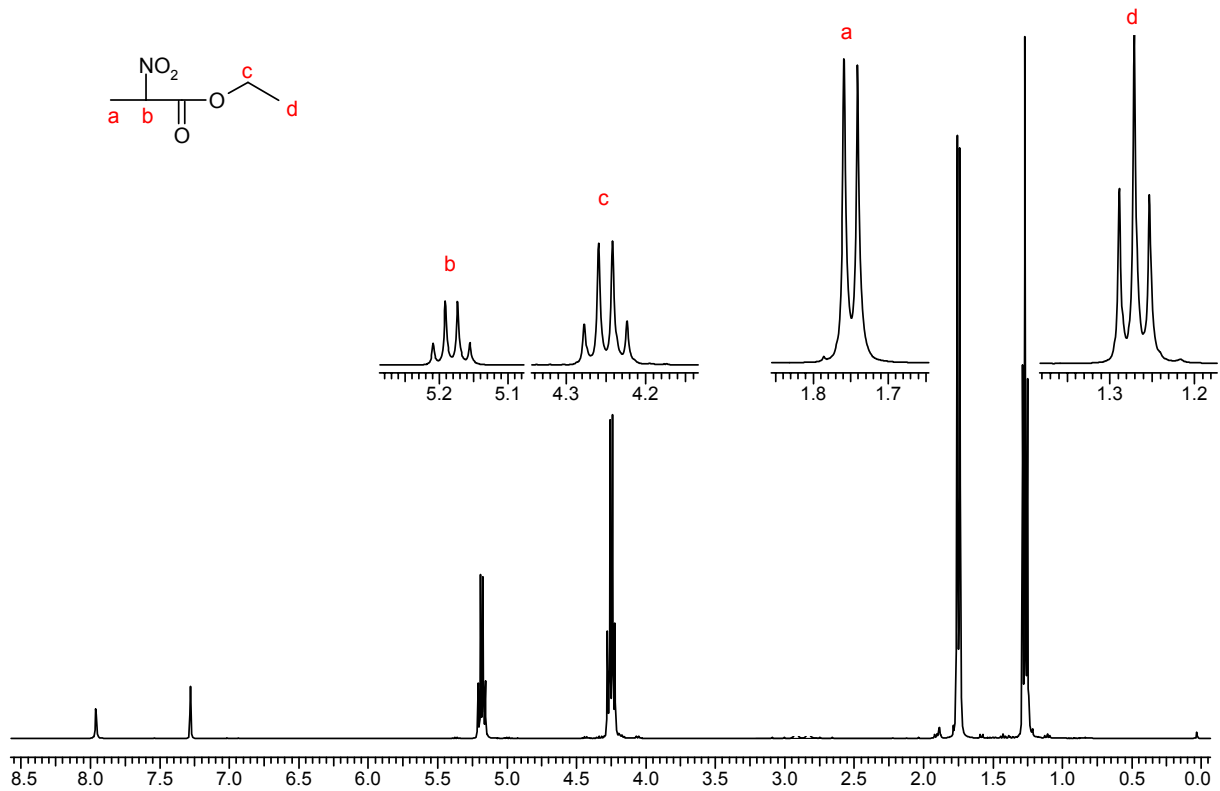


20 g NaNO_2 (389,00 mmol) und 30 g Phloroglucinol (237,90 mmol) werden in 200 ml frisch destilliertem DMF unter Argon-Atmosphäre gelöst und auf 0°C im Eisbad abgekühlt. Dann werden portionsweise 35,97 g 2-Brompropionsäureethylester (198,00 mmol) zugegeben. Sobald die Zugabe erfolgt ist, erwärmt man auf 15°C und lässt die Reaktionsmischung für 5 Stunden bei dieser Temperatur rühren. Direkt bei der Zugabe des Esters färbt sich die Reaktionsmischung tief rot. Nach Ablauf der Reaktionszeit gibt man die Mischung auf Eiswasser und extrahiert mit $5 \times 100 \text{ ml}$ Diethylether. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit je 100 ml gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen, wobei sich die anfänglich rötliche Etherphase hellgelb färbt und die wässrige Phase die rote Farbe annimmt. Die organische Phase wird mit MgSO_4 getrocknet, filtriert und einrotiert. Da Phloroglucinol im Produkt teilweise löslich ist, nimmt man das einrotierte Extrakt in 50 ml CHCl_3 auf und lagert die Lösung über Nacht bei -20°C . Am nächsten Tag filtriert man das ausgefallene Phloroglucinol ab und rotiert das Lösungsmittel ab. Nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum erhält man 2-Nitropropionsäureethylester als gelbes Öl.

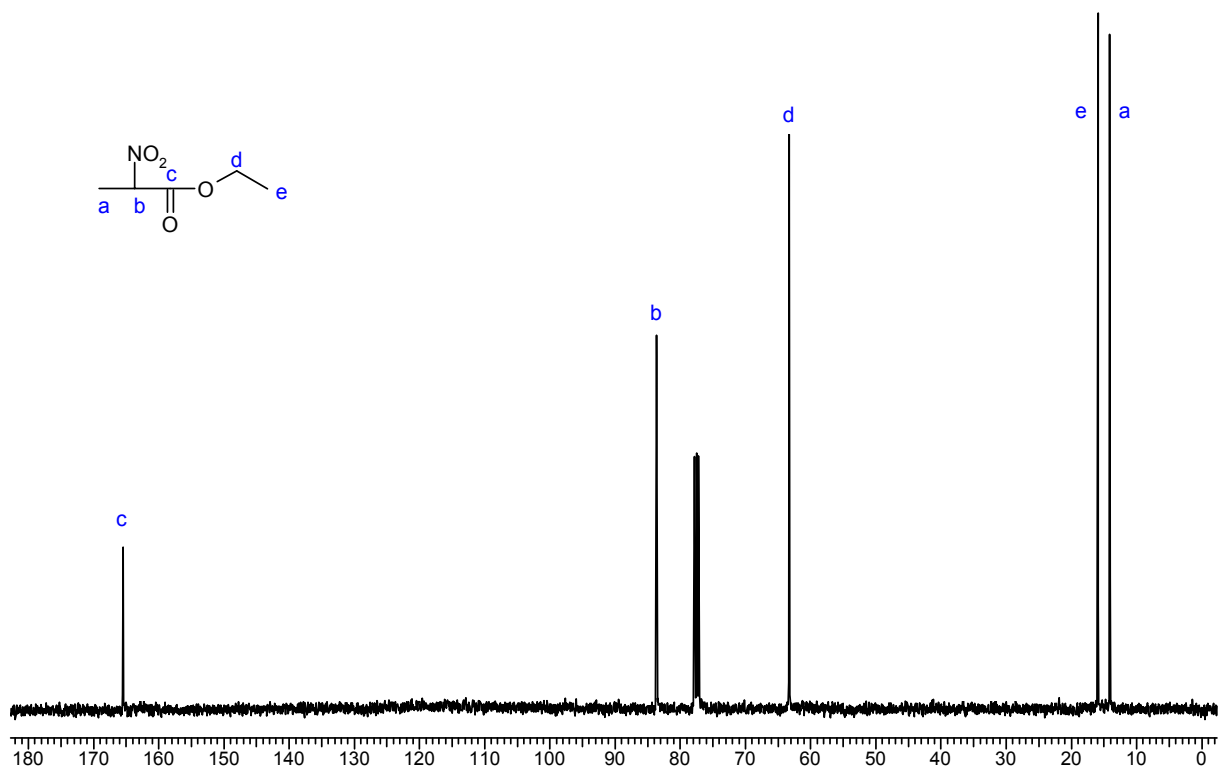
Ausbeute: 65 % (128,70 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3):

Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	1,741	d	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,04$
b	5,192	q	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,04$
c	4,242	q	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,04$
d	1,271	t	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,04$



$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CDCl_3):

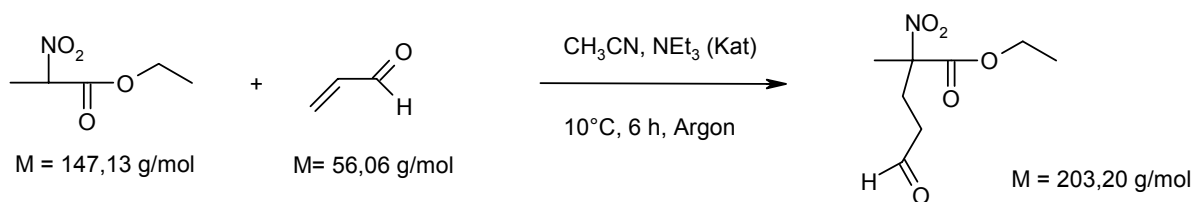


Signal	δ [ppm]
a	14,112
b	83,594
c	165,464
d	63,265
e	15,935

Elementaranalyse:

	C	H	N
berechnet [%]	40,82	6,17	9,52
gefunden [%]	40,68	6,12	9,55

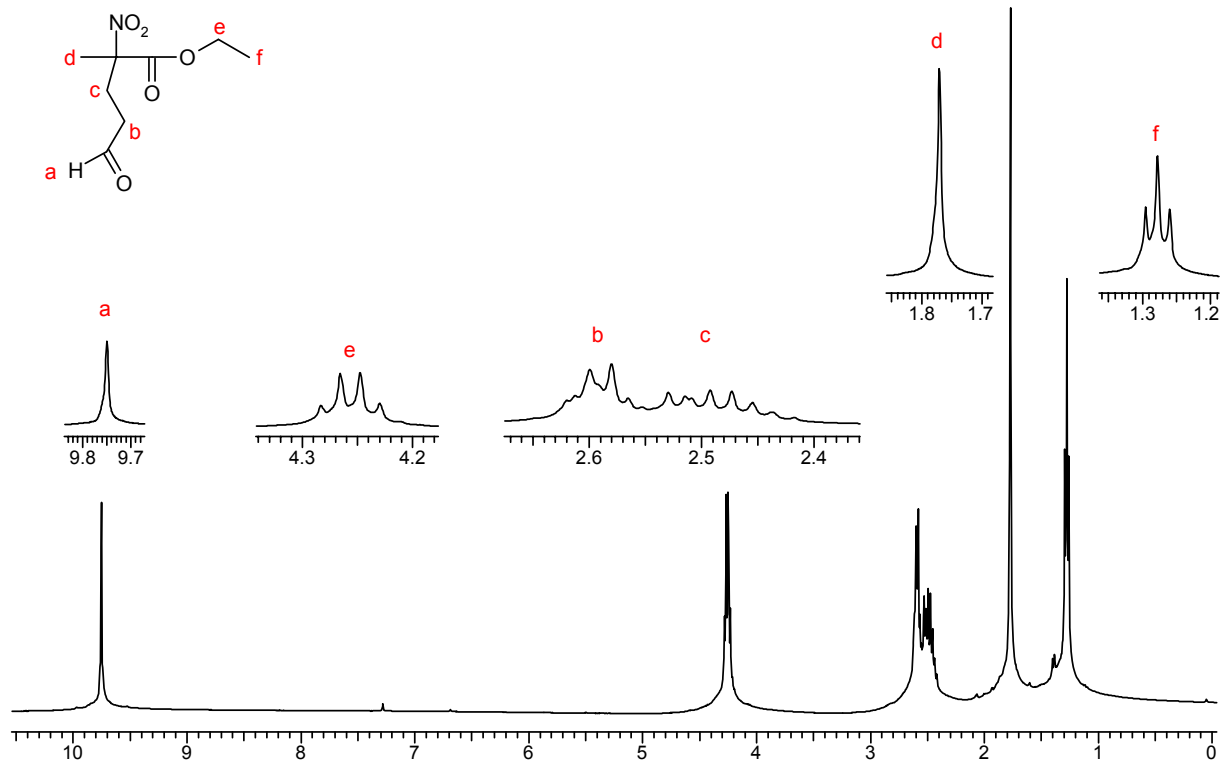
5.3.1.3 Synthese von 2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-ethylester



Zu einer Lösung von 11,00 g 2-Nitropropionsäureethylester (74,03 mmol) in 100 ml über CaH_2 getrocknetem Acetonitril gibt man unter Argonatmosphäre bei 10 °C 1 ml Triethylamin zu. Danach werden 7,30 ml Acrolein (111,00 mmol) zugegeben. Nach 6 Stunden Rühren bei 10 °C wird der Ansatz auf Eiswasser gegeben und mit HCl neutralisiert. Die organische Phase wird mit 3 \times 50 ml CH_2Cl_2 extrahiert. Nach dem Trocknen der vereinigten organischen Phasen mit Na_2SO_4 wird der Ansatz filtriert, einrotiert und im Hochvakuum von Lösungsmittelresten befreit. Man erhält so 2-Methy-2-nitro-5-oxopentansäure-ethylester als hellgelbes viskoses Öl.

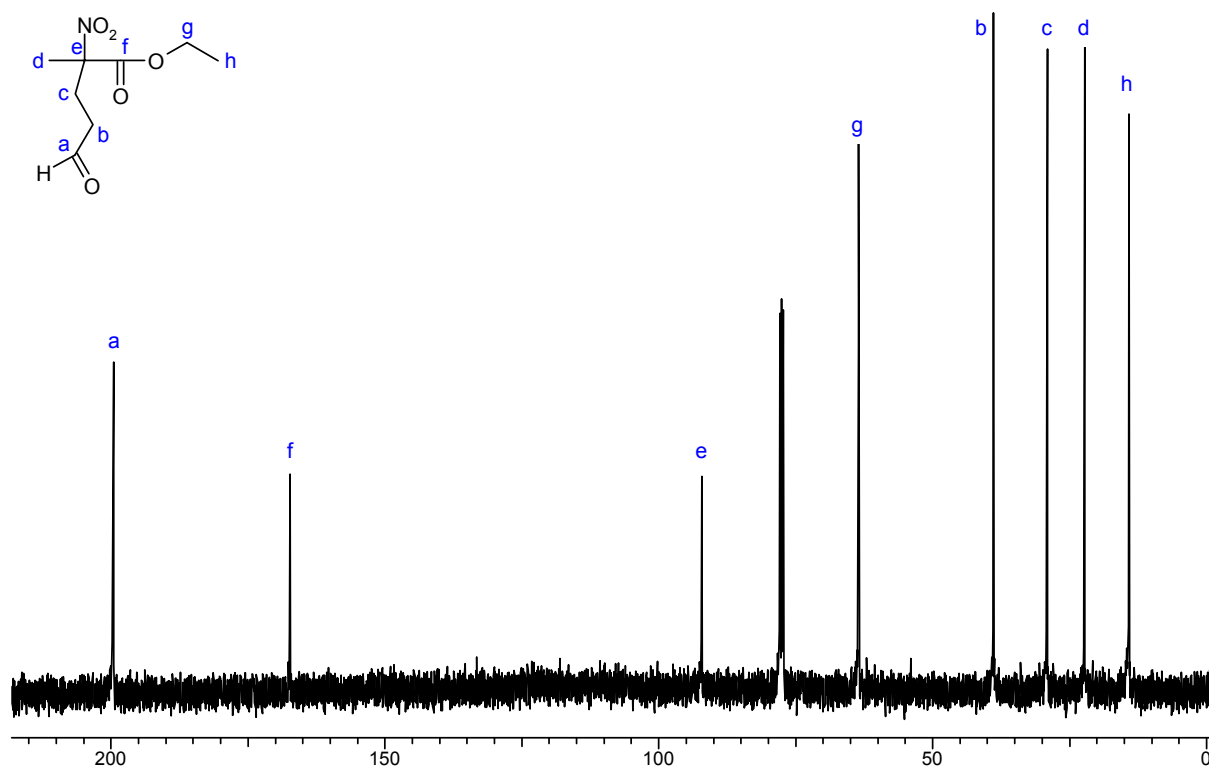
Ausbeute: 95 % (70,60 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3):



Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	9,749	s	1 H	-
b	2,581	m	2 H	-
c	2,493	m	2 H	-
d	1,771	s	3 H	-
e	4,248	q	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 6,99$
f	1,278	t	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 6,99$

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CDCl_3):



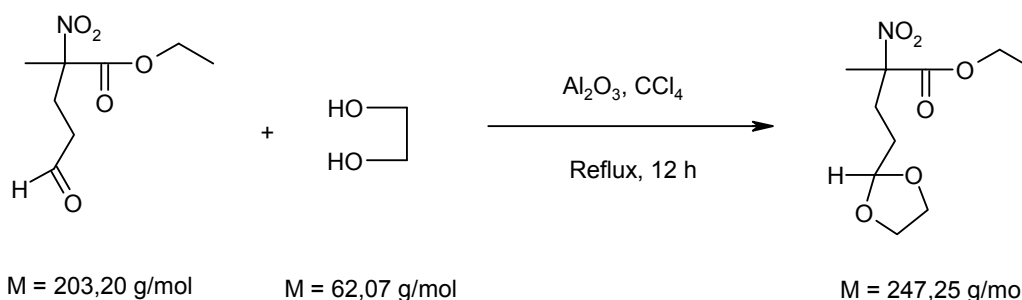
Signal	δ [ppm]
a	199,486
b	38,832
c	29,116
d	22,214
e	91,979
f	167,291
g	63,433
h	14,156

Die Datenzuordnung des entkoppelten ^{13}C -NMR-Spektrums korreliert mit den Ergebnissen eines DEPT-Spektrums.

Elementaranalyse:

	C	H	N
berechnet [%]	47,29	6,45	6,89
gefunden [%]	47,44	6,37	7,11

5.3.1.4 Synthese von 4-[1,3]-Dioxolan-2-yl-2-methyl-2-nitro-buttersäure-ethyllester

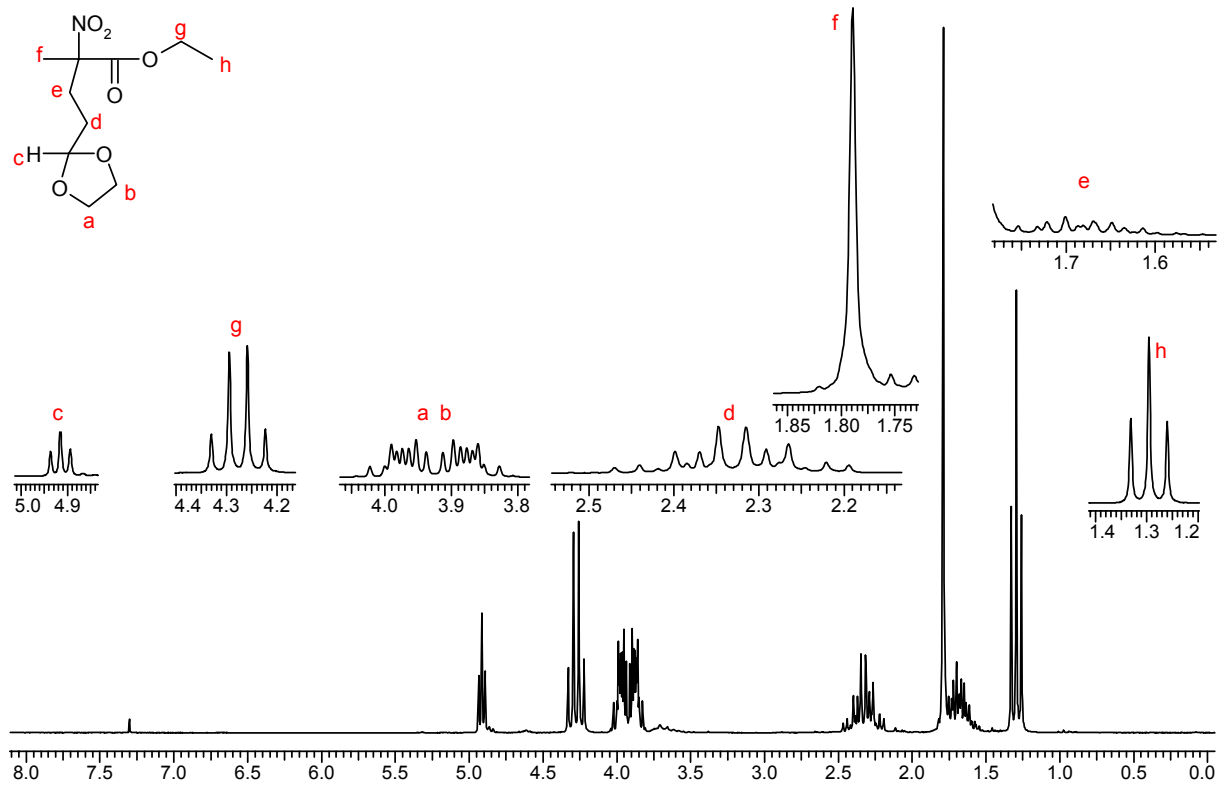


11,61 g 2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-ethyllester (57,17 mmol) werden in 100 ml CCl_4 gelöst und 8,88 ml Ethylenglykol (128,81 mmol) und 4 g saures Al_2O_3 (26,67 mmol) zugegeben. Die Mischung wird für 12 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Dann gibt man den Ansatz auf 100 ml Wasser, extrahiert mit 3×100 ml CH_2Cl_2 , wäscht mit 3×50 ml gesättigter NaHCO_3 -Lösung und trocknet die vereinigten organischen Phasen mit Na_2SO_4 . Nach Filtration und Einrotieren entfernt man die Lösungsmittelreste im Hochvakuum und erhält so 4-[1,3]-Dioxolan-2-yl-2-methyl-2-nitro-buttersäure-ethyllester als hochviskoses hell orangefarbenes Öl. Die vergleichsweise schlechte Ausbeute resultiert aus einer problematischen Aufarbeitung, da das Al_2O_3 nach dem Reaktionsende als gelartige Masse im CCl_4 vorliegt und das Produkt adsorbiert.

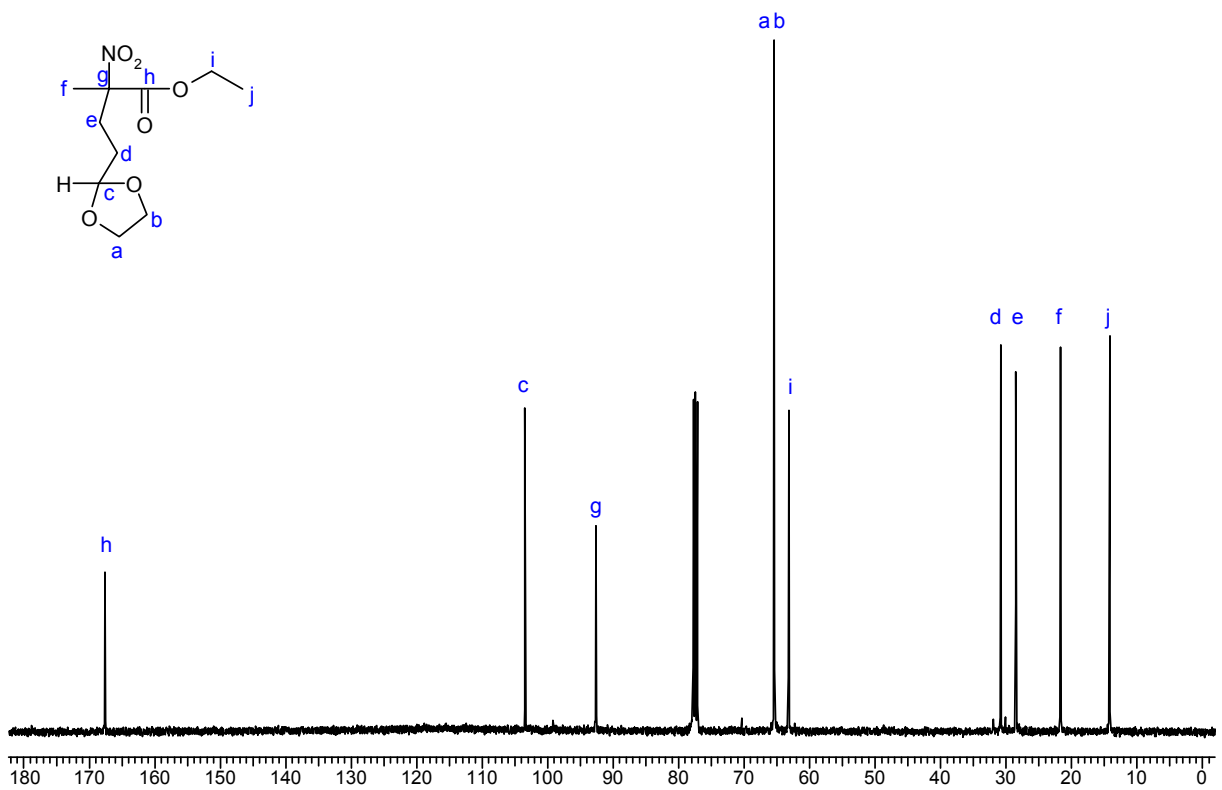
Ausbeute: 68 % (39,10 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (200,31 MHz, CDCl_3):

Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a, b	3,919	m	4 H	
c	4,897	t	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 4,09$
d	1,677	m	2 H	
e	2,299	m	2 H	
f	1,771	s	3 H	
g	4,249	q	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,15$
h	1,278	t	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,15$



$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CDCl_3):



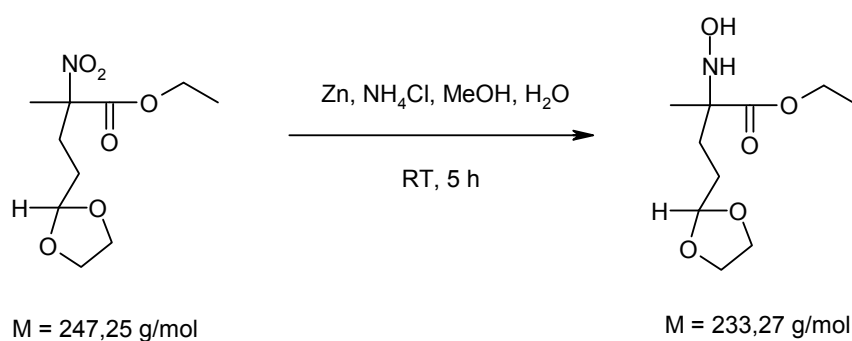
Signal	δ [ppm]
a, b	65,431
c	103,486
d	30,852
e	28,351
f	21,729
g	92,686
h	167,540
i	63,107
j	14,125

Die Datenzuordnung des entkoppelten ^{13}C -NMR-Spektrums korreliert mit den Ergebnissen eines DEPT-Spektrums.

Elementaranalyse:

	C	H	N
berechnet [%]	48,58	6,93	5,66
gefunden [%]	49,07	7,00	6,02

5.3.1.5 Synthese von 4-[1,3]-Dioxolan-2-yl-2-hydroxyamino-2-methyl-buttersäure-ethylester

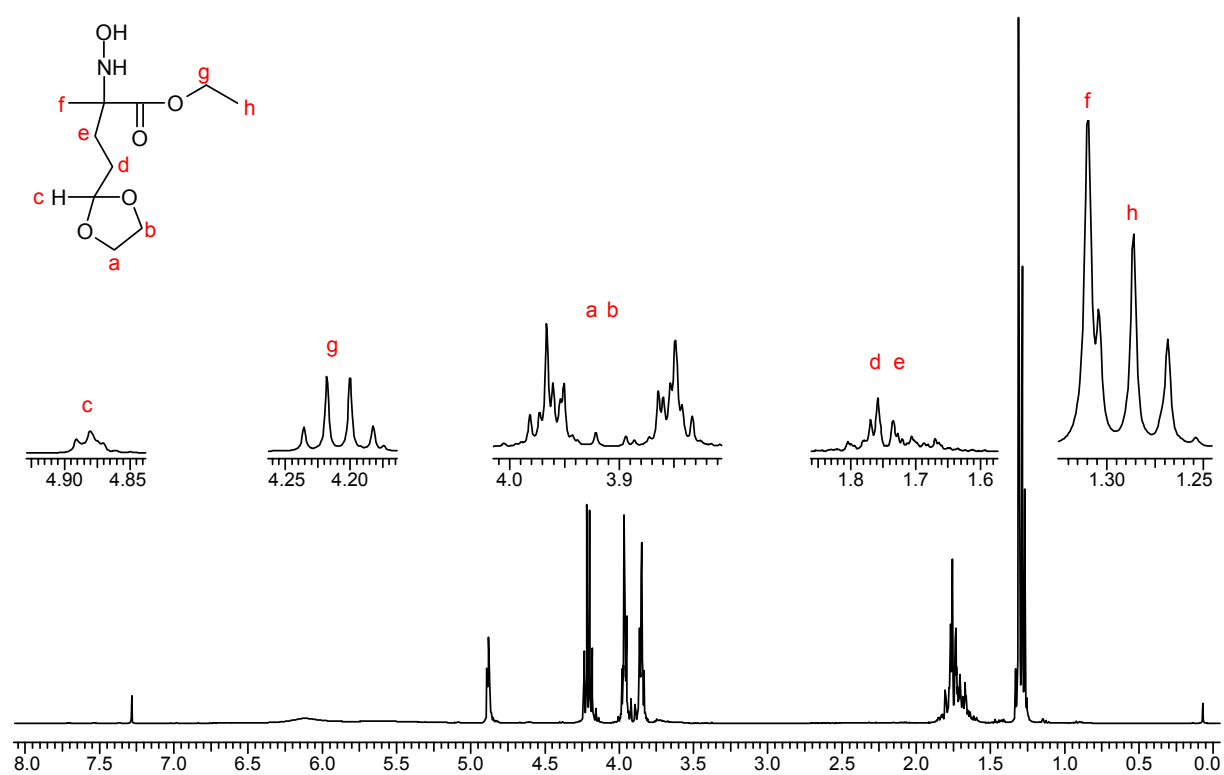


4,00 g 4-[1,3]-Dioxolan-2-yl-2-methyl-2-nitro-buttersäure-ethyl-ester (16,18 mmol) werden in 50 ml Methanol gelöst und diese Mischung mit 40 ml H_2O versetzt. Das Lösungsmittelgemisch trübt dabei stark ein. Dann werden 1,88 g NH_4Cl (74,82 mmol) in 10 ml H_2O gelöst und

zugegeben. Zu dieser Mischung wird über 30 Minuten portionsweise 8,68 g Zn-Pulver (132,74 mmol) zugegeben. Schon nach Zugabe der ersten Portion Zink bildet sich auf der Mischung ein hellgrauer Schaum. Nach 4 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird das überschüssige Zink-Pulver vom Ansatz abfiltriert und dieser am Rotationsverdampfer zur Trockne einrotiert. Nach Entfernen letzter Lösungsmittelreste an der Hochvakuumpumpe erhält man so 4-[1,3]-Dioxolan-2-yl-2-hydroxyamino-2-methyl-buttersäure-ethylester als hochviskoses Öl.

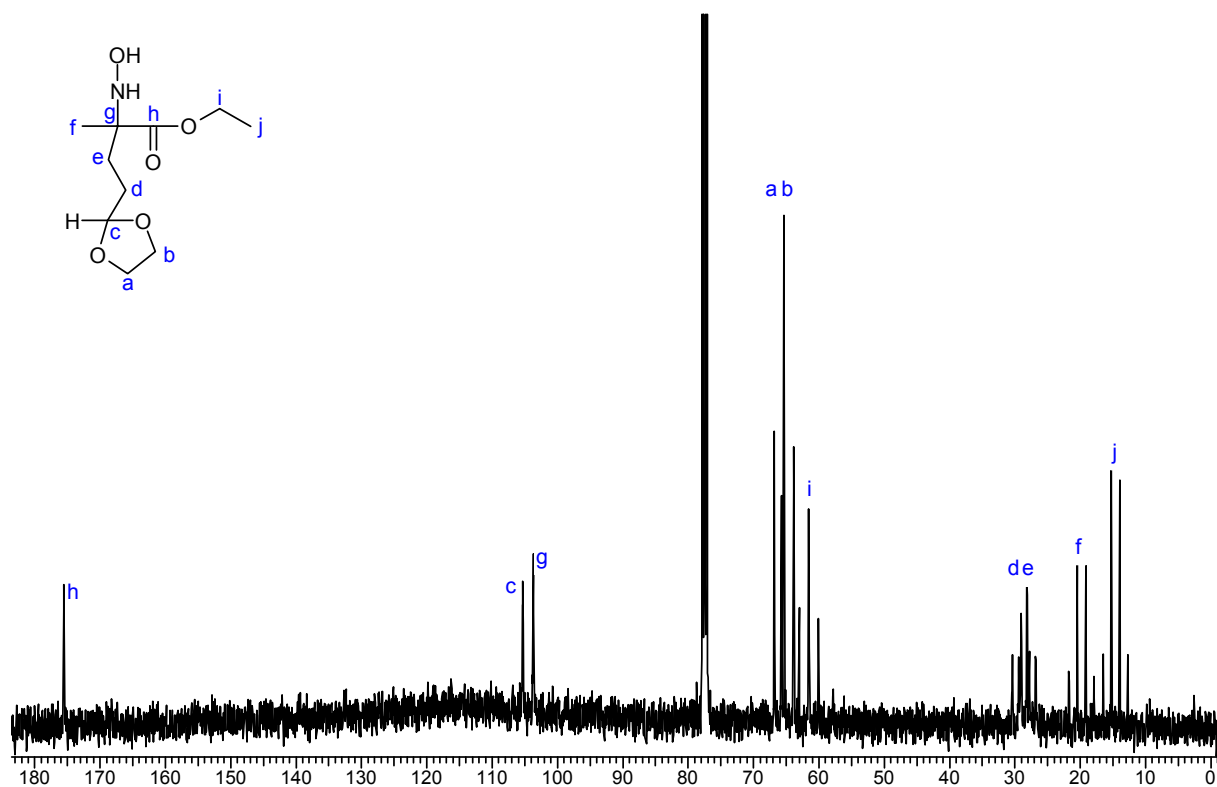
Ausbeute: 61 % (9,84 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3):



Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a, b	3,894	m	4 H	
c	4,881	t	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 4,11$
d, e	1,720	m	4 H	
f	1,310	s	3 H	-
g	4,200	q	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,04$
h	1,286	t	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,04$

^{13}C -NMR (100,61 MHz, CDCl_3):



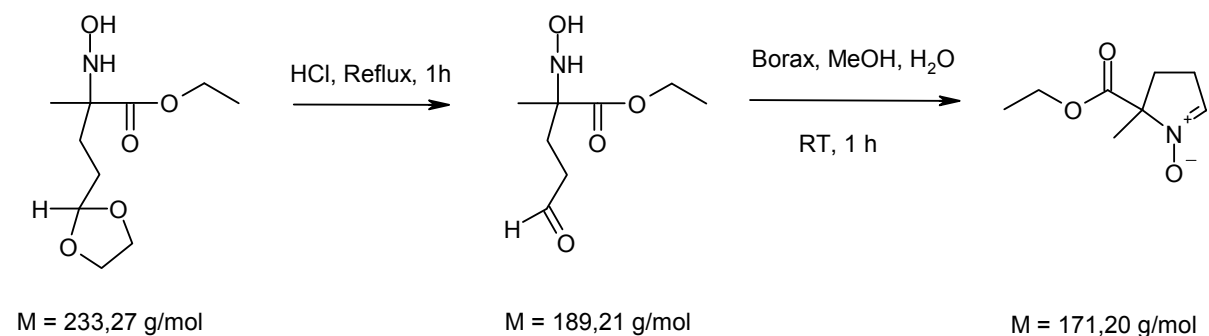
Signal	δ [ppm]	Multiplizität
a, b	65,250	t
c	104,507	d
d	29,085	t
e	28,129	t
f	19,760	q
g	92,686	s
h	175,493	s
i	61,563	t
j	14,673	q

Die Datenzuordnung des gekoppelten ^{13}C -NMR-Spektrums korreliert mit den Ergebnissen eines entkoppelten ^{13}C -Spektrums sowie mit einem DEPT-Spektrum.

Elementaranalyse:

	C	H	N
berechnet [%]	51,49	8,21	6,00
gefunden [%]	51,75	8,43	6,31

5.3.1.6 Synthese von EMPO



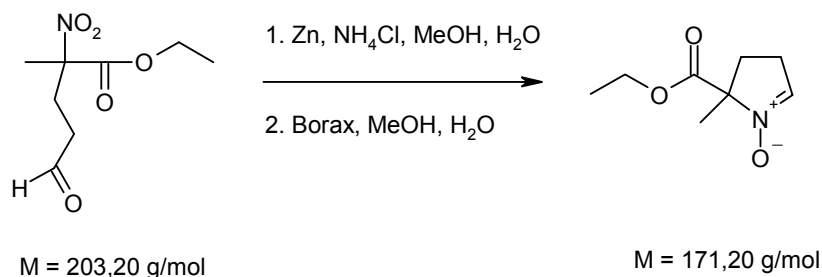
5,65 g 4-[1,3]-Dioxolan-2-yl-2-hydroxyamino-2-methyl-buttersäure-ethylester (23,84 mmol) werden mit 60 ml H₂O und 50 ml 0,5 M HCl versetzt und für eine Stunde zum Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wird mit 3 × 50 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden einrotiert. Dann wird das Rohprodukt in 50 ml Methanol und 10 ml H₂O gelöst, mit Borax gesättigt und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss daran wird das Borax abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum erhält man ein Rohprodukt, das im ¹H-NMR deutlich EMPO-Signalsätze zeigt.

Zur weiteren Aufreinigung wird das Rohprodukt durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 getrennt. Dabei wird zunächst mit einer Mischung aus 7 : 3 Petrolether und Ethanol eine Grobtrennung durchgeführt, gefolgt von einer Feinreinigung mit 1 : 1 Pentan und Ethanol. Das Produkt wird in beiden Durchgängen mit Ethanol vom Kieselgel eluiert.

Ausbeute: 51 % (12,06 mmol)

Analytik-Daten siehe Eintopfsynthese für EMPO, folgende Seite.

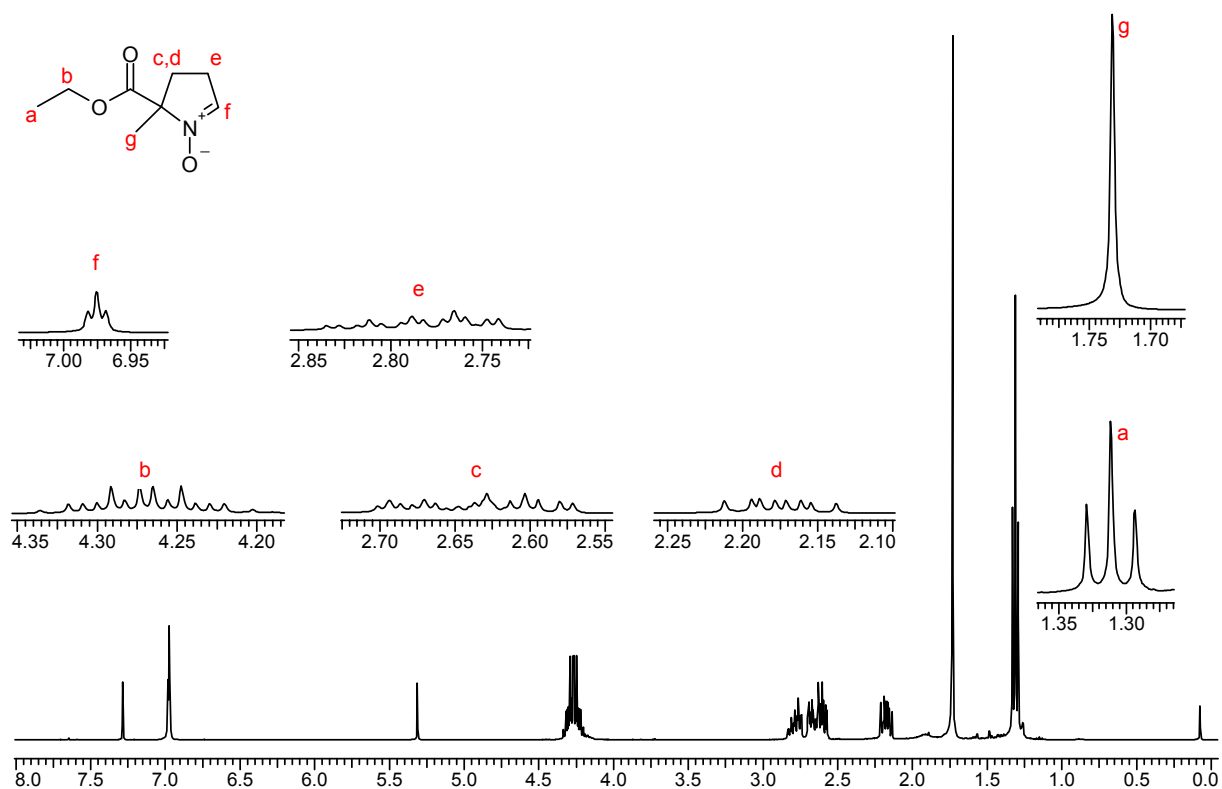
5.3.1.7 Synthese von EMPO ausgehend von 2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-ethylester als Eintopfreaktion



1,14 g 2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-ethylester (5,61 mmol) wird in 10 ml Methanol gelöst und diese Mischung mit 5 ml H₂O versetzt. Das Lösungsmittelgemisch trübt dabei stark ein. Dann werden 0,60 g NH₄Cl (11,22 mmol) in 5 ml H₂O gelöst und zugegeben. Zu dieser Mischung wird über 30 Minuten portionsweise 3,30 g Zn-Pulver (50,49 mmol) zugegeben. Schon nach Zugabe der ersten Portion Zink bildet sich auf der Mischung ein hellgrauer Schaum. Nach 4 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird das überschüssige Zink-Pulver vom Ansatz abfiltriert und dieser am Rotationsverdampfer eingeeengt. Dieses Konzentrat wird mit Borax gesättigt. Der Ansatz wird für eine Stunde bei RT gerührt. Dann extrahiert man mit 3 × 20 ml CH₂Cl₂. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Na₂SO₄ getrocknet und einrotiert. Nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum erhält man ein Rohprodukt, das im ¹H-NMR deutlich EMPO-Signalsätze zeigt.

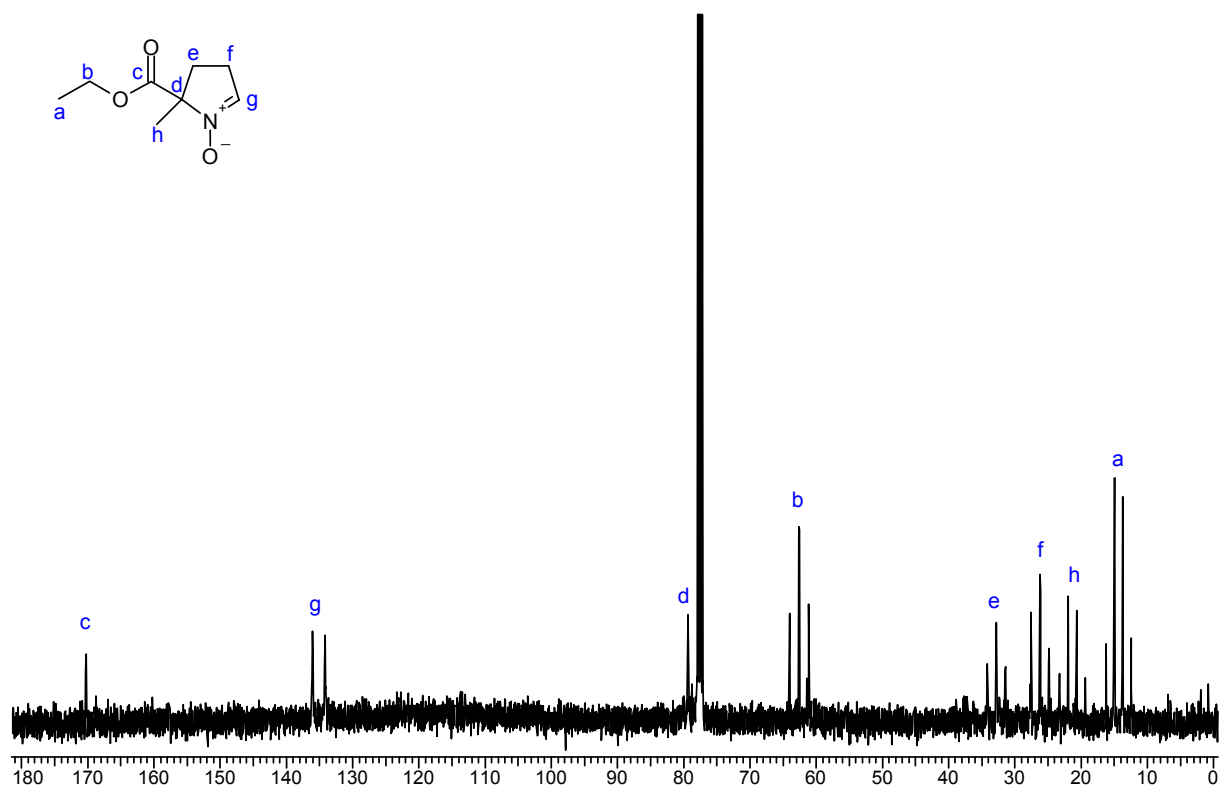
Zur weiteren Aufreinigung wird das Rohprodukt durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 getrennt. Dabei wird zunächst mit einer 7 : 3 Mischung aus Petrolether und Ethanol eine Grobtrennung durchgeführt, gefolgt von einer Feinreinigung mit 1 : 1 Pentan und Ethanol. Das Produkt wird in beiden Durchgängen mit Ethanol vom Kieselgel eluiert.

Ausbeute: 40 % (2,24 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3):

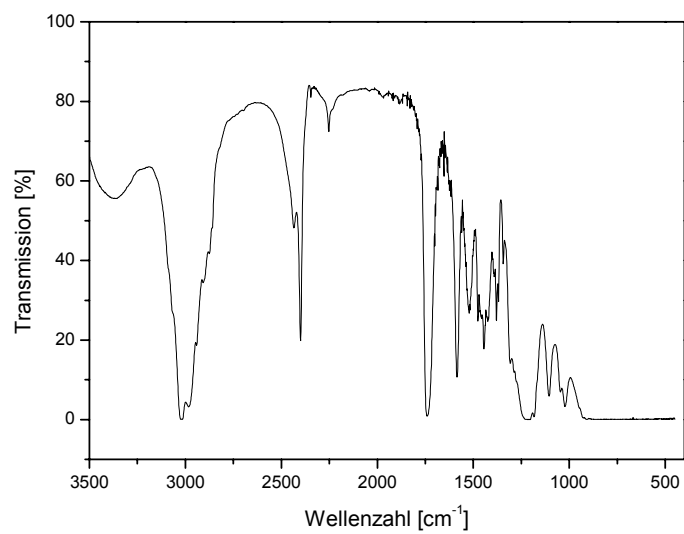
Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	1,312	t	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,33$
b	4,256	m	2 H	-
c	2,179	m	1 H	-
d	2,629	m	1 H	-
e	2,782	m	2 H	-
f	6,976	t	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 2,64$
g	1,732	s	3 H	-

^{13}C -NMR (100,61 MHz, CDCl_3):



Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten [Hz]
a	14,295	q	$^1J_{\text{CH}} = 125$
b	62,511	t	$^1J_{\text{CH}} = 148$
c	170,279	s	-
d	79,335	s	-
e	32,820	t	$^1J_{\text{CH}} = 133$
f	26,205	t	$^1J_{\text{CH}} = 138$
g	135,158	d	$^1J_{\text{CH}} = 188$
h	21,319	q	$^1J_{\text{CH}} = 127$

Die Datenzuordnung des gekoppelten ^{13}C -NMR-Spektrums korreliert mit den Ergebnissen eines entkoppelten ^{13}C -Spektrums sowie mit einem DEPT-Spektrum.

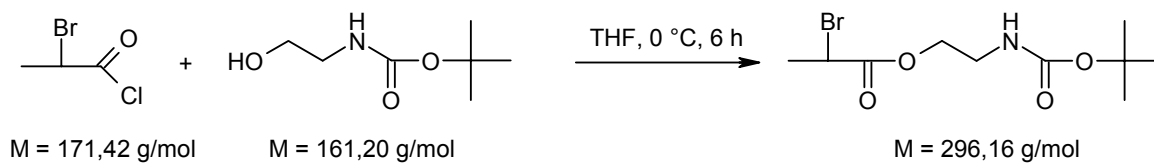
IR-Spektrum (CHCl_3):

Elementaranalyse:

	C	H	N
berechnet [%]	56,13	7,65	8,18
gefunden [%]	56,24	7,78	8,28

5.3.2 Synthese von BocAEMPO und AEMPO

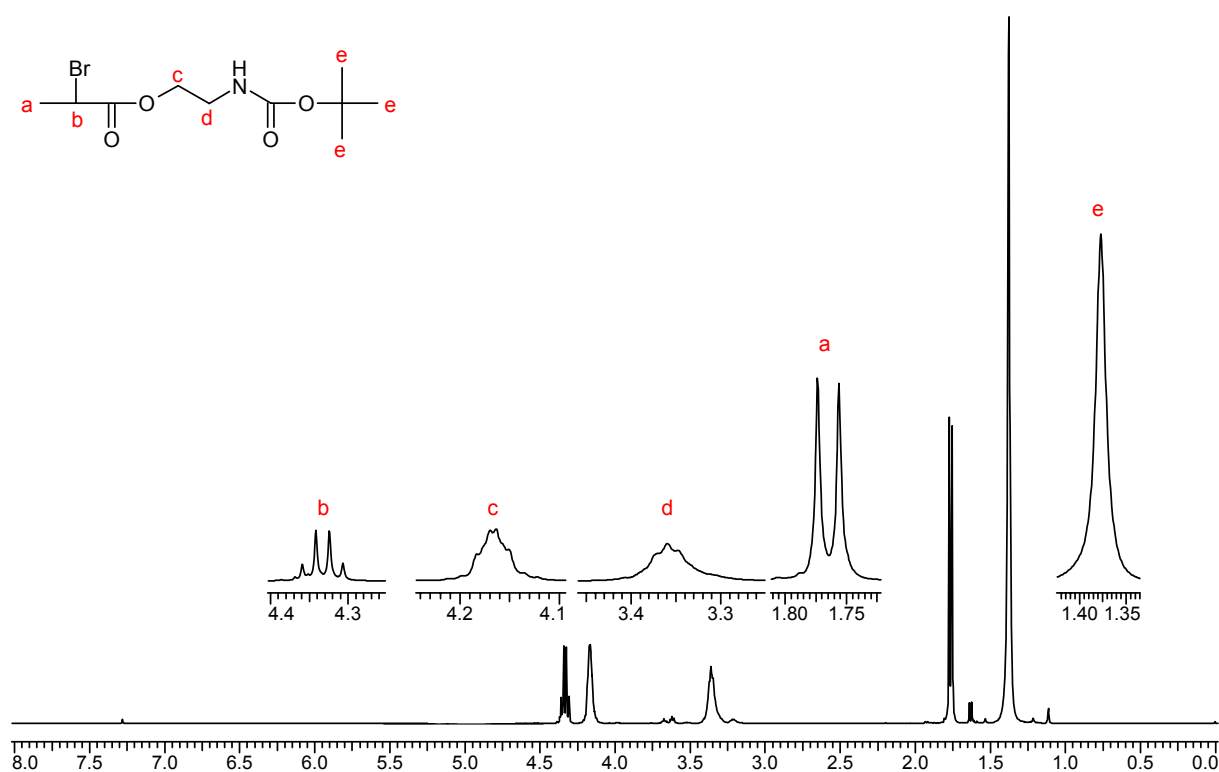
5.3.2.1 Synthese von 2-Brompropionsäure-2-*tert*-butoxycarbonylamino-ethylester



30 ml 2-Brompropionylchlorid (292,00 mmol) werden über 6 Stunden zu einer Lösung von 50 ml N-Boc-ethanolamin (326,00 mmol) in 200 ml über Na/K-Legierung getrocknetem THF unter Argonatmosphäre zugegeben. Die Temperatur wird dabei mit einem Eisbad auf 0 °C gehalten. Nach Ende der Reaktionszeit wird der Ansatz auf Eiswasser gegeben und mit 3 × 100 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit MgSO₄ getrocknet, abfiltriert, einrotiert und im Hochvakuum von letzten Lösungsmittelresten befreit. Man erhält 2-Brompropionsäure-2-*tert*-butoxycarbonylamino-ethylester als hellgelbes Öl.

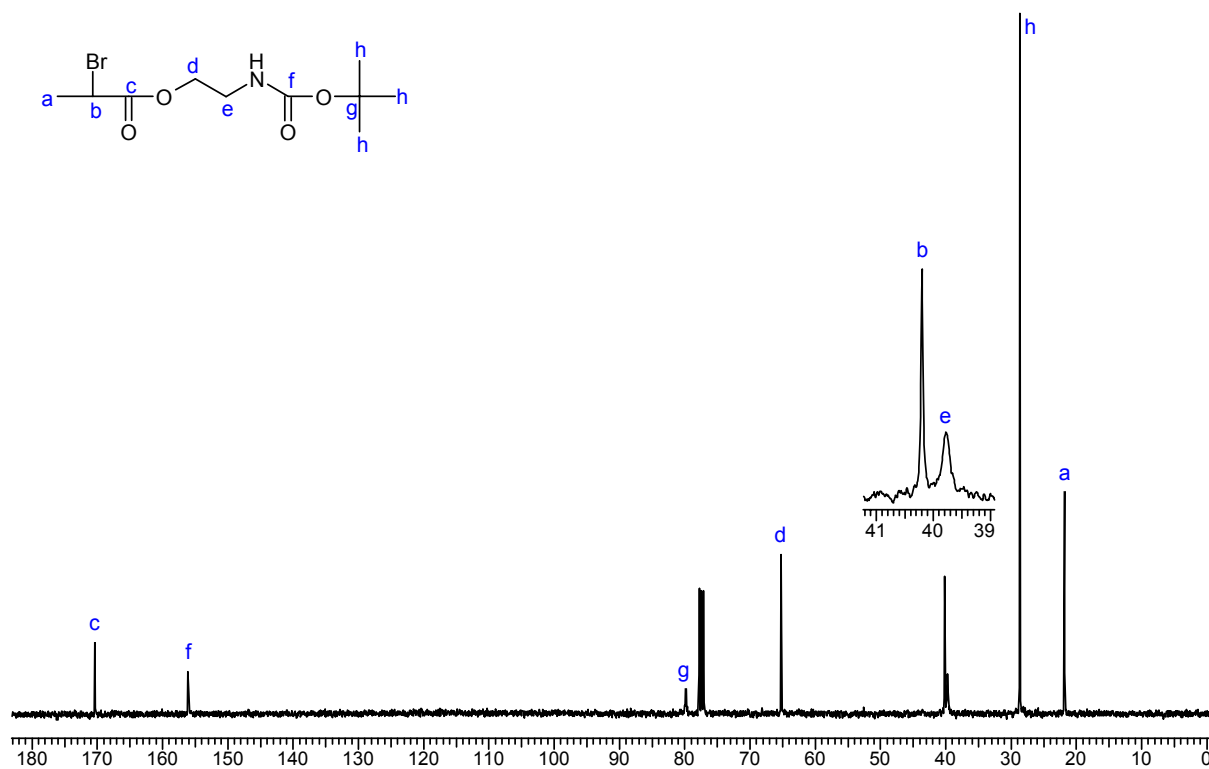
Ausbeute: 89 % (259,24 mmol)

¹H-NMR (400,13 MHz, CDCl₃):



Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	1,757	d	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,043$
b	4,325	q	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,043$
c	4,164	m	2 H	
d	3,360	m	2 H	
e	1,377	s	9 H	

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CDCl_3):



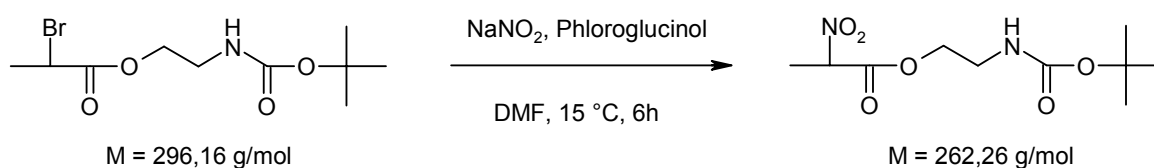
Signal	δ [ppm]
a	21,700
b	40,041
c	170,431
d	65,272
e	39,676
f	156,138
g	79,876
h	28,693

Die Datenzuordnung des entkoppelten ^{13}C -NMR-Spektrums korreliert mit den Ergebnissen eines DEPT-Spektrums.

Elementaranalyse:

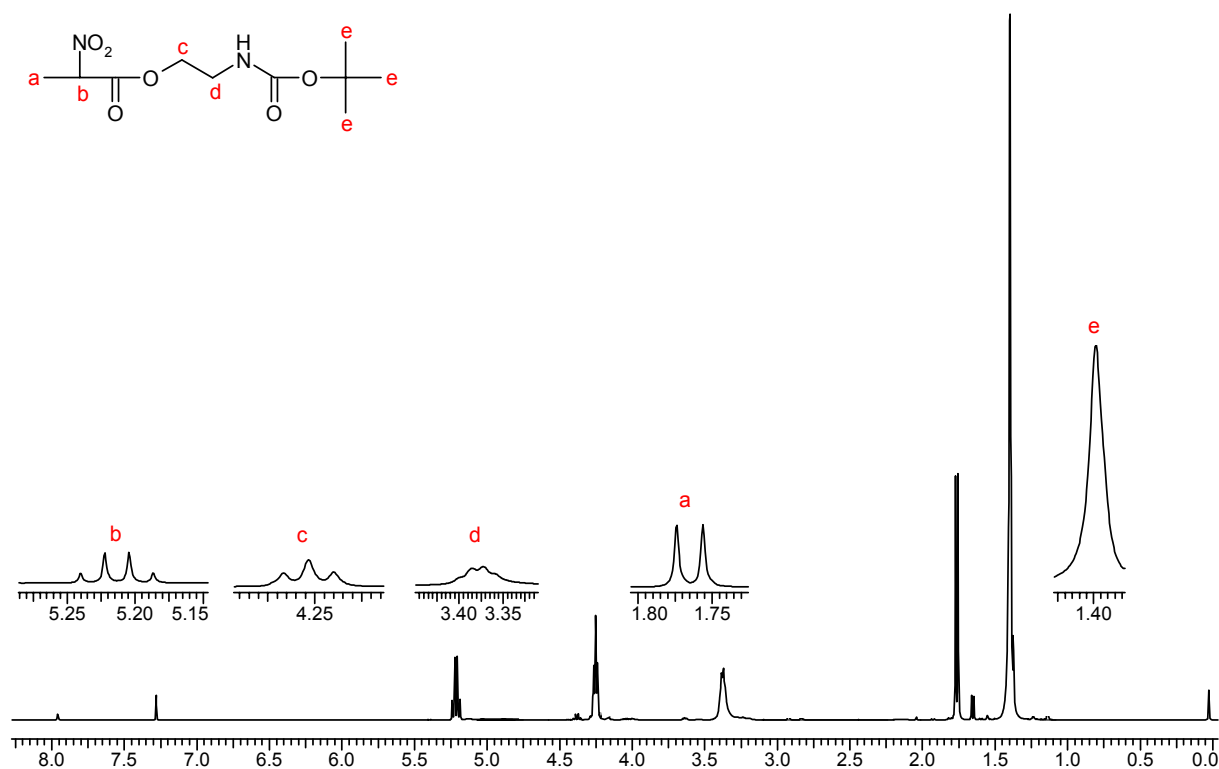
	C	H	N
berechnet [%]	40,56	6,13	4,73
gefunden [%]	40,70	6,20	4,85

5.3.2.2 Synthese von 2-Nitropropionsäure-2-*tert*-butoxycarbonylamino-ethylester



20,00 g NaNO_2 (289,85 mmol) und 74 g Phloroglucinol (586,79 mmol) werden in 250 ml frisch destilliertem DMF unter Argonatmosphäre gelöst und auf 0°C im Eisbad abgekühlt. Dann werden portionsweise 76,52 g 2-Brompropionsäure-2-*tert*-butoxycarbonylamino-ethylester (259,24 mmol) zugegeben. Sobald die Zugabe erfolgt ist, erwärmt man auf 15°C und lässt die Reaktionsmischung für 6 Stunden bei dieser Temperatur rühren. Direkt bei der Zugabe des Esters färbt sich die Reaktionsmischung tiefrot. Nach Ablauf der Reaktionszeit gibt man die Mischung auf Eiswasser und extrahiert mit $5 \times 100 \text{ ml}$ Diethylether. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit je 100 ml gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen, wobei sich die anfänglich rötliche Etherphase hellgelb färbt und die wässrige Phase die rote Farbe annimmt. Die organische Phase wird mit MgSO_4 getrocknet, filtriert und einrotiert. Da Phloroglucinol im Produkt teilweise löslich ist, nimmt man das einrotierte Extrakt in 100 ml CHCl_3 auf und lagert die Lösung über Nacht bei -20°C . Am nächsten Tag filtriert man das ausgefallene Phloroglucinol ab und rotiert das Lösungsmittel ab. Nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum erhält man 2-Nitropropionsäure-2-*tert*-butoxycarbonylamino-ethylester als viskoses orangefarbenes Öl.

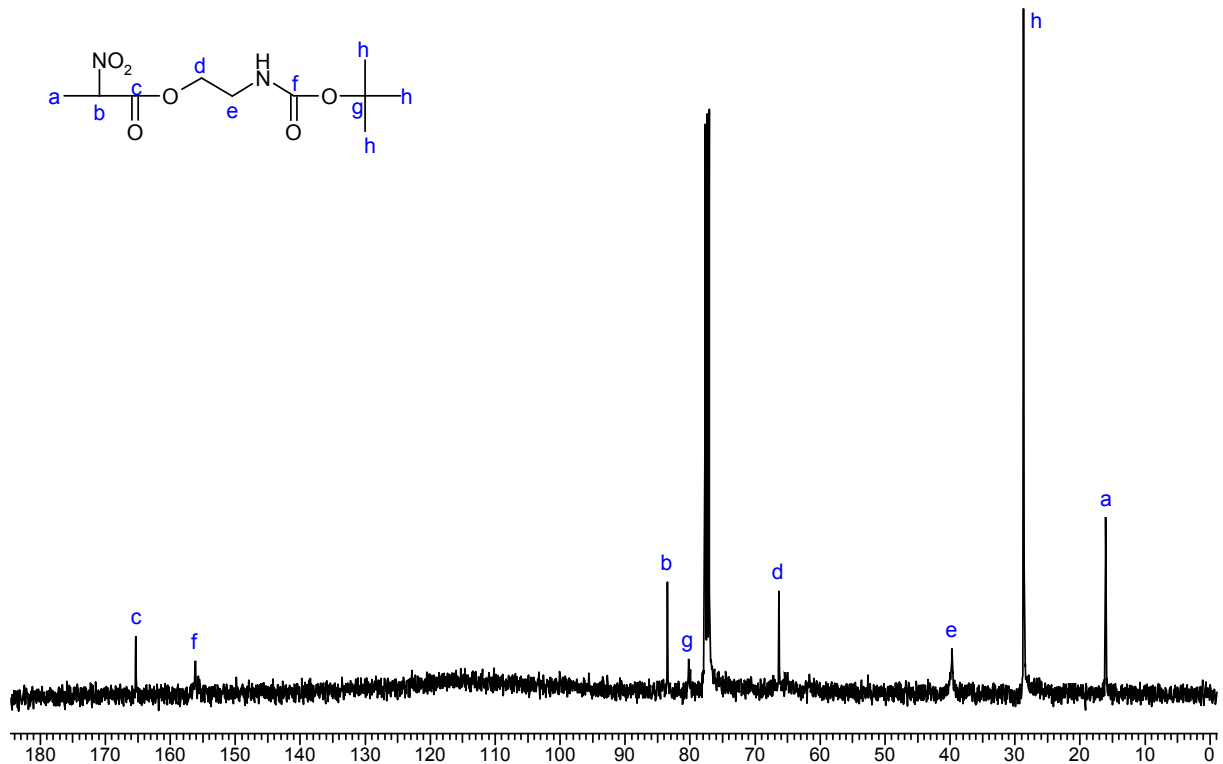
Ausbeute: 66,5 % (172,39 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3):

Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	1,827	d	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,043$
b	5,225	q	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,043$
c	4,303	m	2 H	-
d	3,428	m	2 H	-
e	1,448	s	9 H	-

 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CDCl_3):

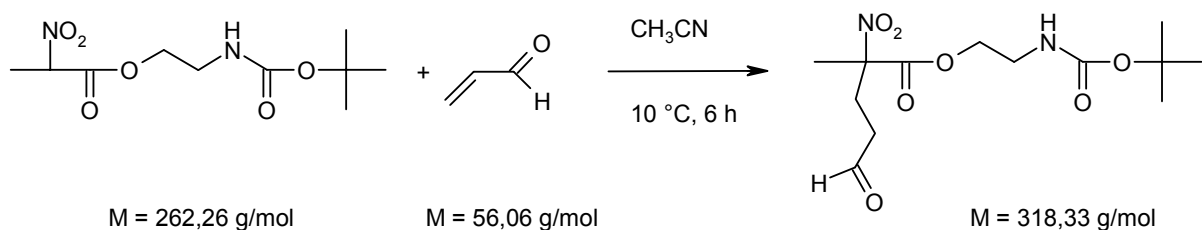
Signal	δ [ppm]
a	16,057
b	83,502
c	165,313
d	66,321
e	39,760
f	156,125
g	80,247
h	28,701



Elementaranalyse:

	C	H	N
berechnet [%]	45,80	6,92	10,68
gefunden [%]	46,02	7,00	10,75

5.3.2.3 Synthese von 2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-2-*tert*-butoxycarbonyl-amino-ethylester

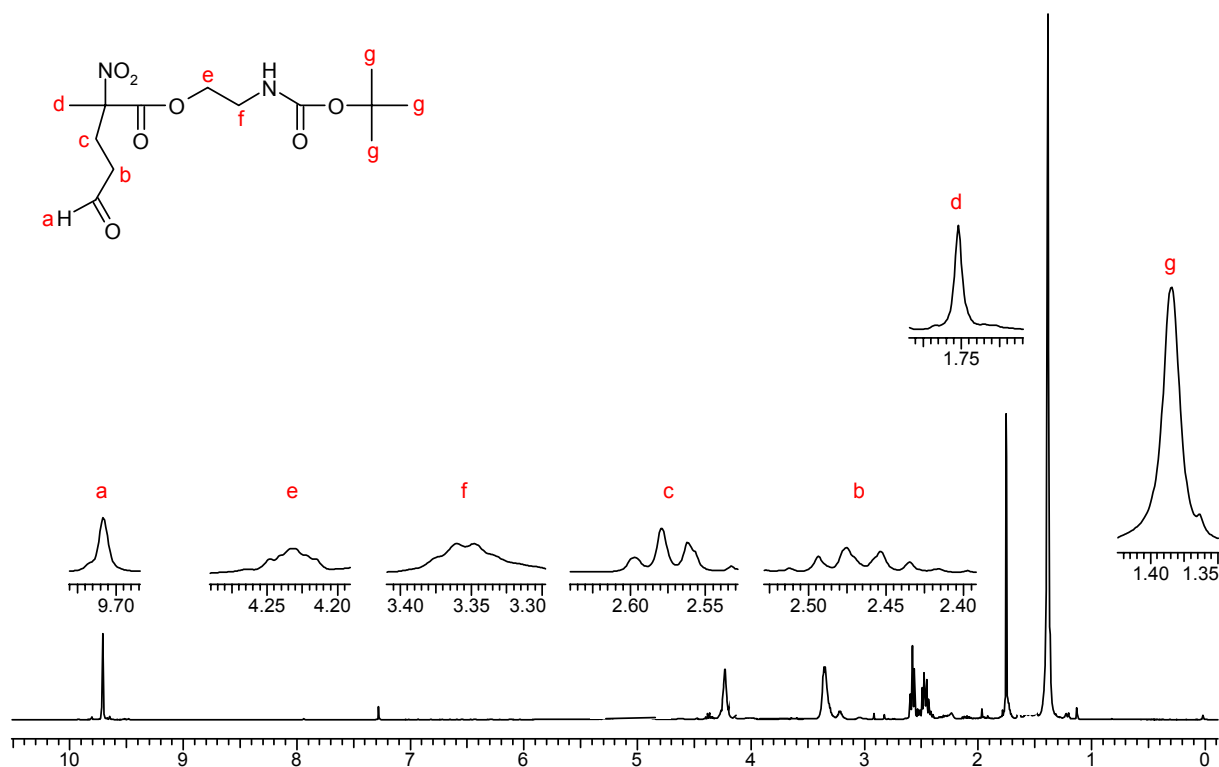


Zu einer Lösung von 10,62 g 2-Nitropropionsäure-2-*tert*-butoxycarbonylamino-ethylester (40,49 mmol) in 100 ml über CaH₂ getrocknetem Acetonitril gibt man unter Argonatmosphäre bei 10 °C 1 ml Triethylamin zu. Danach werden 5 ml Acrolein (80,18 mmol) zugegeben. Nach 6 Stunden

Rühren bei 10°C wird der Ansatz auf Eiswasser gegeben und mit HCl neutralisiert. Die organische Phase wird mit 3×100 ml CH_2Cl_2 extrahiert. Nach dem Trocknen der vereinigten organischen Phasen mit Na_2SO_4 wird der Ansatz filtriert, einrotiert und im Hochvakuum von Lösungsmittelresten befreit. Man erhält so 2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-2-*tert*-butoxycarbonylamino-ethylester als hellgelbes viskoses Öl.

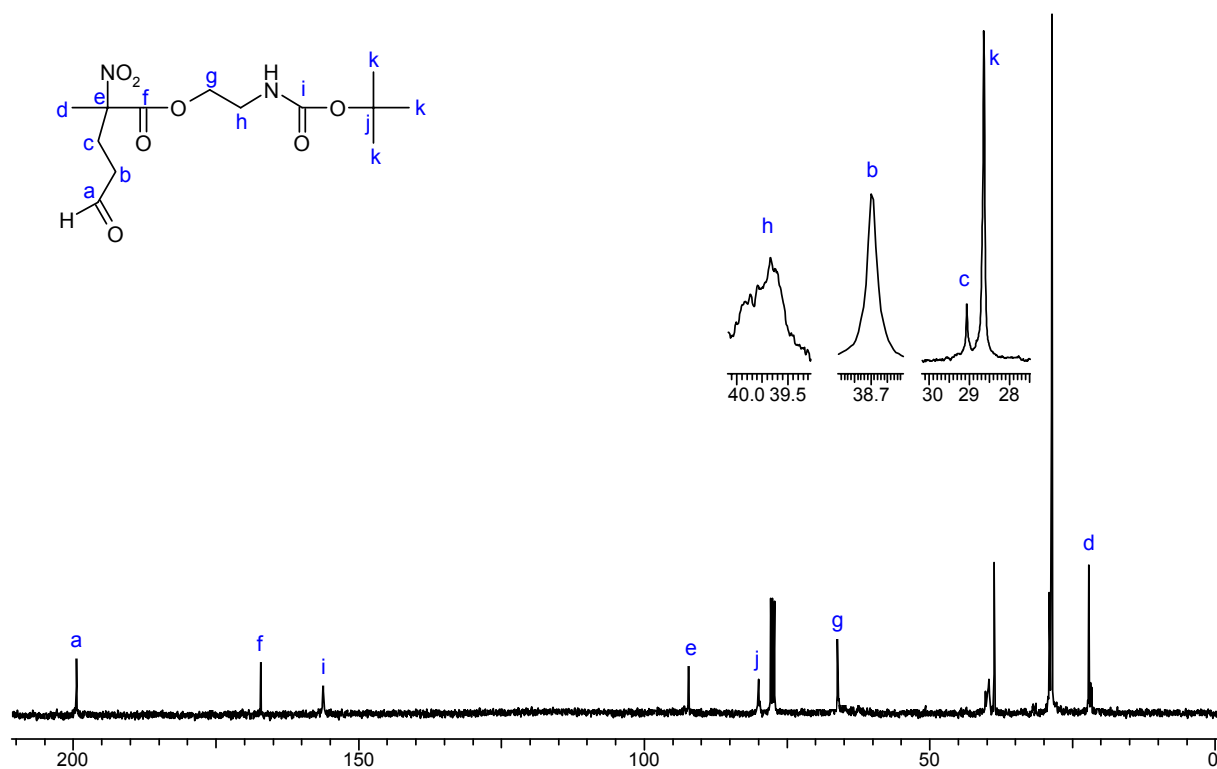
Ausbeute: 97 % (39,27 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3):



Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	9,673	s	1 H	-
b	2,443	m	2 H	-
c	2,548	m	2 H	-
d	1,720	s	3 H	-
e	4,199	m	2 H	-
f	3,326	m	2 H	-
g	1,352	s	9 H	-

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CDCl_3):

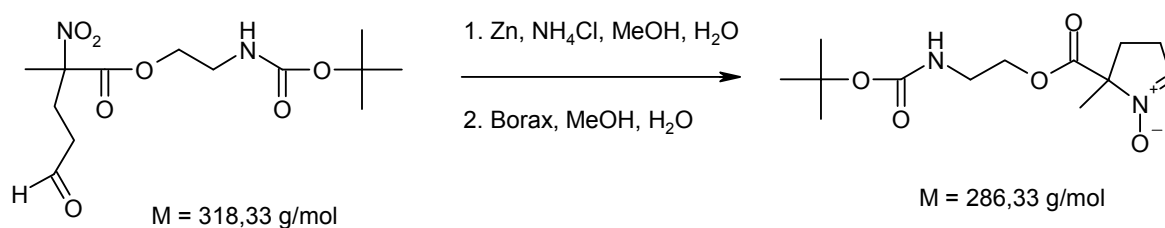


Signal	δ [ppm]
a	199,393
b	38,703
c	29,070
d	22,179
e	92,209
f	167,154
g	66,153
h	39,667
i	156,183
j	79,988
k	28,640

Elementaranalyse:

	C	H	N
berechnet [%]	49,05	6,97	8,80
gefunden [%]	49,46	7,13	9,01

5.3.2.4 Synthese von BocAEMPO als Eintopfreaktion

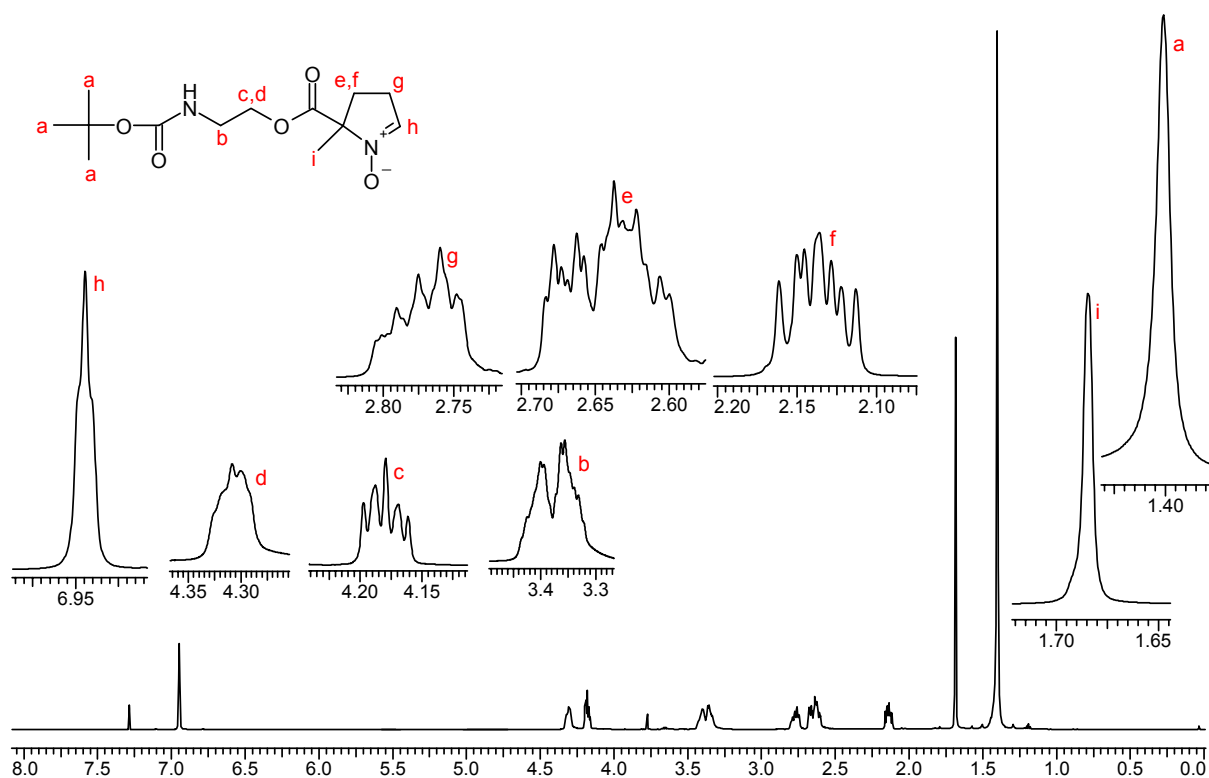


2,50 g 2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-2-*tert*-butoxycarbonylamino-ethylester (7,85 mmol) werden in 30 ml Methanol gelöst und diese Mischung mit 40 ml H₂O versetzt. Das Lösungsmittelgemisch trübt dabei stark ein. Dann werden 0,93 g NH₄Cl (17,20 mmol) in 10 ml H₂O gelöst und zugegeben. Zu dieser Mischung wird über 30 Minuten portionsweise 4,25 g Zn-Pulver (64,99 mmol) zugegeben. Schon nach Zugabe der ersten Portion Zink bildet sich auf der Mischung ein hellgrauer Schaum. Nach 4 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird das überschüssige Zink-Pulver vom Ansatz abfiltriert und dieser am Rotationsverdampfer eingeeengt. Dieses Konzentrat wird mit Borax gesättigt. Der Ansatz wird für eine Stunde bei RT gerührt. Dann extrahiert man mit 3 × 50 ml CH₂Cl₂. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Na₂SO₄ getrocknet und einrotiert. Nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum erhält man ein Rohprodukt, das im ¹H-NMR deutlich BocAEMPO-Signalsätze zeigt.

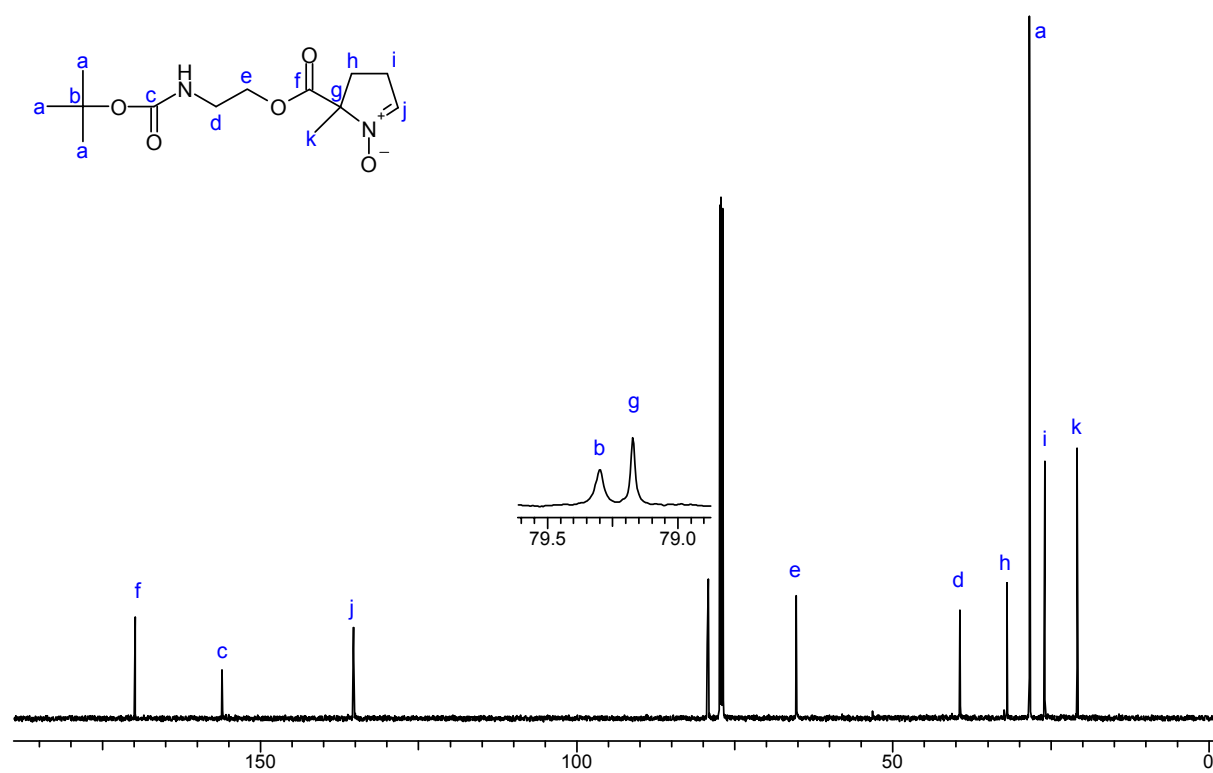
Zur weiteren Aufreinigung wird das Rohprodukt durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 getrennt. Dabei wird zunächst mit einer Mischung aus 7 : 3 Petrolether und Ethanol eine Grobtrennung durchgeführt, gefolgt von einer Feinreinigung mit 1 : 1 Pentan und Ethanol. Das Produkt wird in beiden Durchgängen mit Ethanol vom Kieselgel eluiert.

Ausbeute: 53 % (4,18 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (600,13 MHz, CDCl_3):

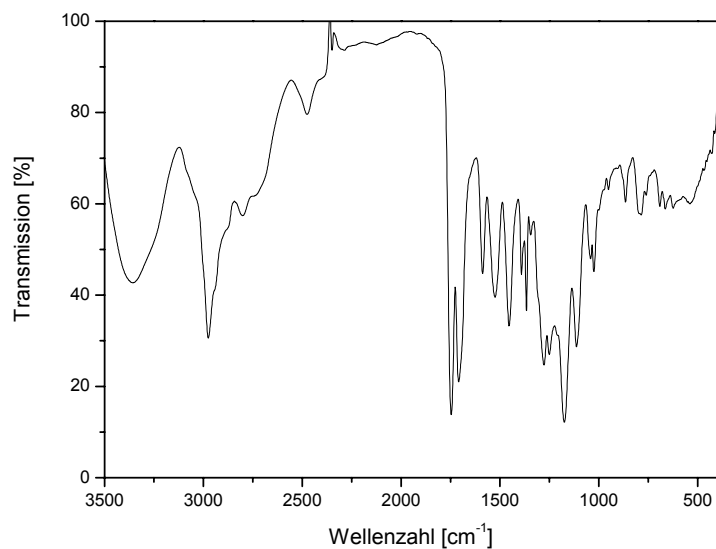


Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	1,361	s	9 H	-
b	3,323	m	2 H	-
c	4,136	m	1 H	-
d	4,249	m	1 H	-
e	2,097	m	1 H	-
f	2,603	m	1 H	-
g	2,735	m	2 H	-
h	6,929	t	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 2,35$
i	1,641	s	3 H	-

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CDCl_3):

Signal	δ [ppm]
a	28,370
b	79,300
c	156,030
d	39,390
e	65,260
f	169,790
g	79,170
h	31,920
i	25,990
j	135,27
k	20,860

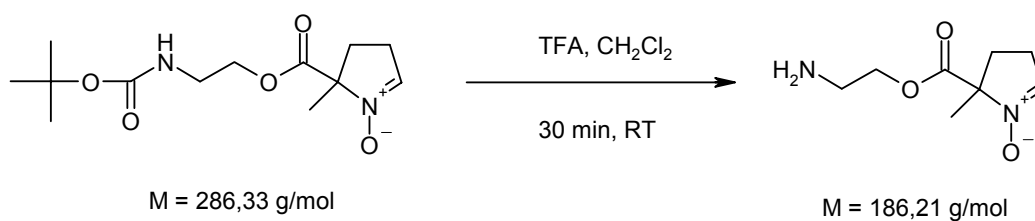
IR-Spektrum (Film in KCl):



Elementaranalyse:

	C	H	N
berechnet [%]	54,53	7,74	9,78
gefunden [%]	54,76	7,80	9,93

5.3.2.5 Synthese von AEMPO

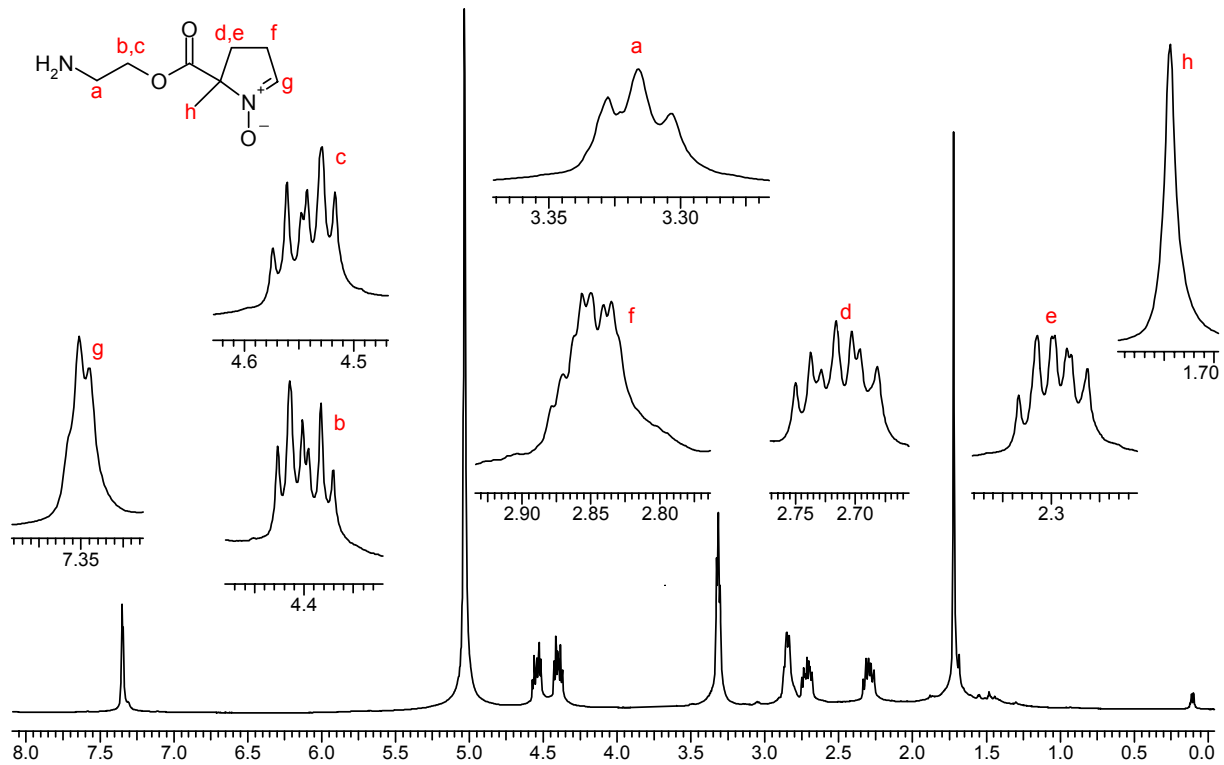


290 mg BocAEMPO (1,01 mmol) werden mit 5 ml trockenem CH_2Cl_2 und 5 ml trockener TFA versetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Direkt nach Zugabe der TFA zeigt sich eine rege Gasentwicklung. Nach Abschluss der Gasentwicklung entfernt man das Lösungsmittelgemisch im Hochvakuum. Das so erhaltene Triflat-Salz des AEMPO wird in 10 ml

CH_2Cl_2 aufgenommen und mit 1 g PL-TBD für 30 Minuten gerührt. Das PL-TBD wird abfiltriert und das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Man erhält so hochreines AEMPO.

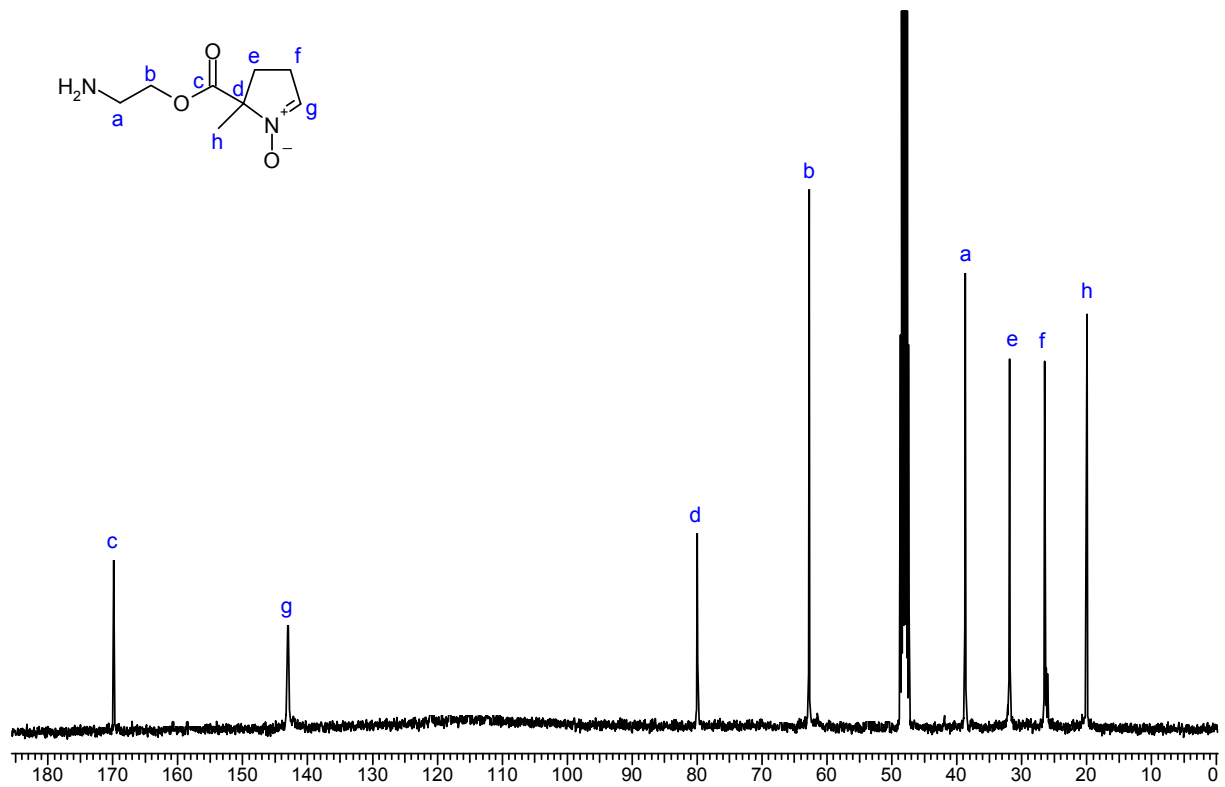
Ausbeute: 100 % (1,01 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CD_3OD):



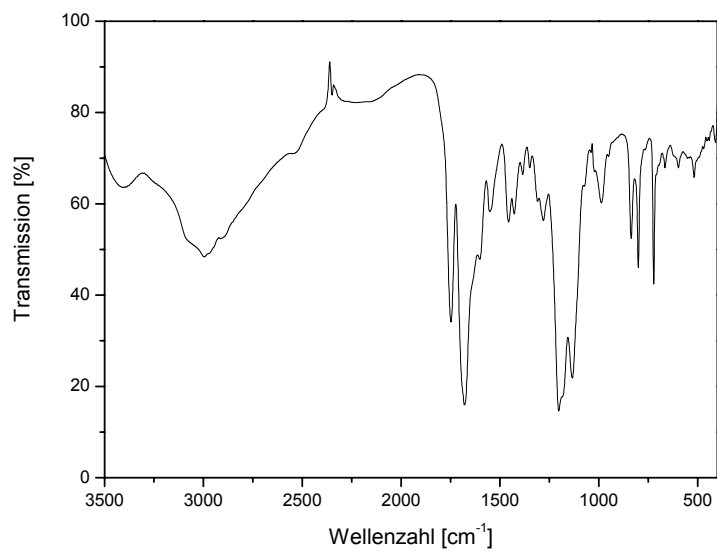
Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	3,326	t	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 5,09$
b	4,410	dt	1 H	5,09 12,72
c	4,453	dt	1 H	5,09 12,72
d	2,293	m	1 H	-
e	2,723	m	1 H	-
f	2,859	m	2 H	-
g	7,372	t	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 2,25$
h	1,721	s	3 H	-

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CD_3OD):



Signal	δ [ppm]
a	38,71
b	62,669
c	169,79
d	79,988
e	31,890
f	26,467
g	142,635
h	19,941

IR-Spektrum (Film in KCl):

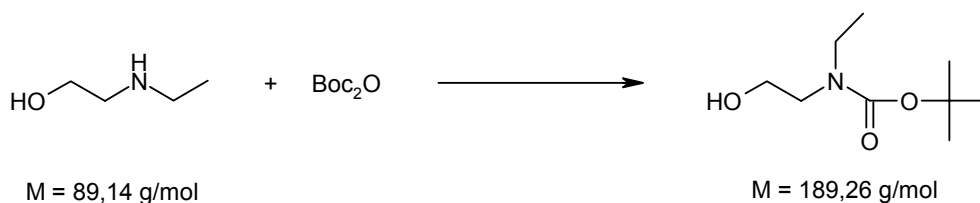


Elementaranalyse:

	C	H	N
berechnet [%]	51,60	7,58	15,04
gefunden [%]	51,37	7,43	14,88

5.3.3 Synthese von BocEAEMPO und EAEMPO

5.3.3.1 Synthese von Ethyl-(2-hydroxyethyl)-carbamatsäure-*tert*-butylester



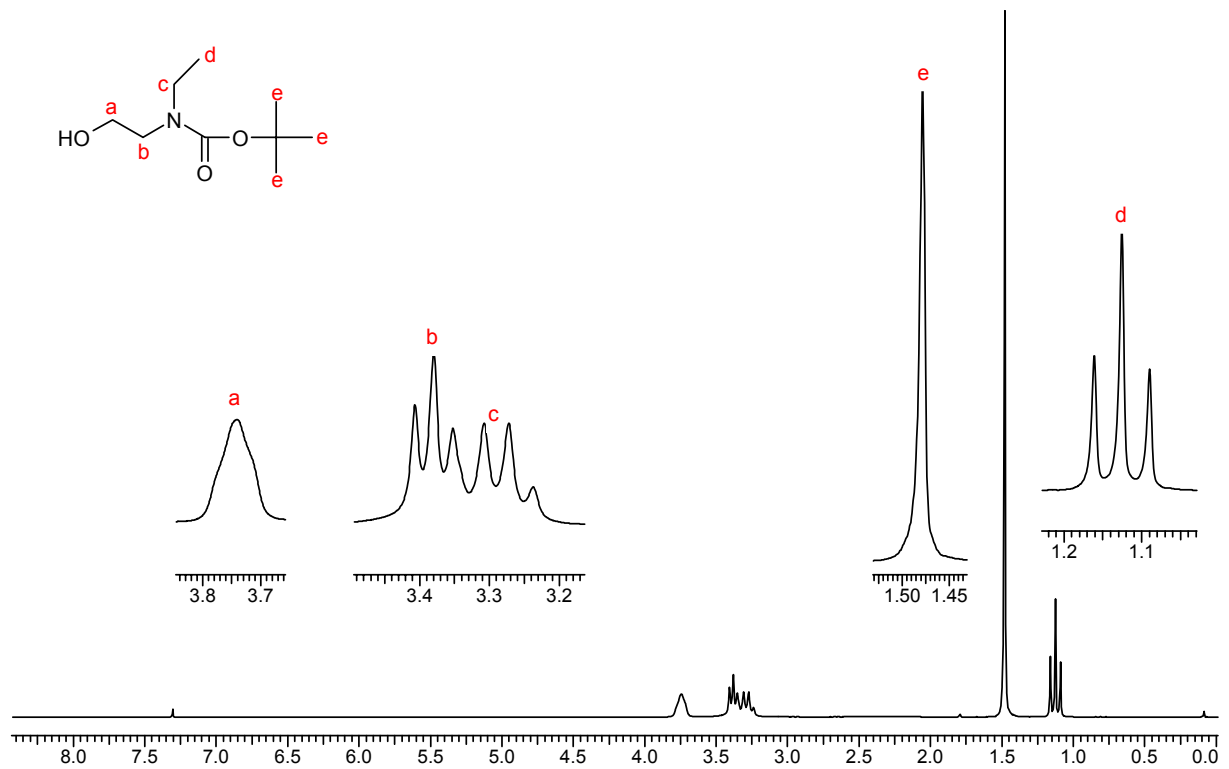
Zu einer Lösung von 22,34 ml 2-(Ethylamino)-ethanol (229,00 mmol) in 100 ml trockenem Methanol werden portionsweise 50,00 g Di-*tert*-butyl-dicarbonat (229,10 mmol) zugegeben. Dabei wird der Reaktionsansatz mit einem Eisbad auf RT gehalten, da die Reaktion unter Gasentwicklung stark exotherm verläuft. Nach weiteren 40 Minuten rühren bei RT wird der Ansatz nochmals für 2 Stunden auf 70 °C erhitzt. Nach Abschluss der Gasentwicklung wird auf RT abgekühlt, mit 50 ml H₂O versetzt und mit 3 × 50 ml Diethylether extrahiert.

Die organische Phase wird mit Na₂SO₄ getrocknet, abfiltriert und einrotiert. Nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum erhält man Ethyl-(2-hydroxyethyl)-carbamatsäure-*tert*-butylester.

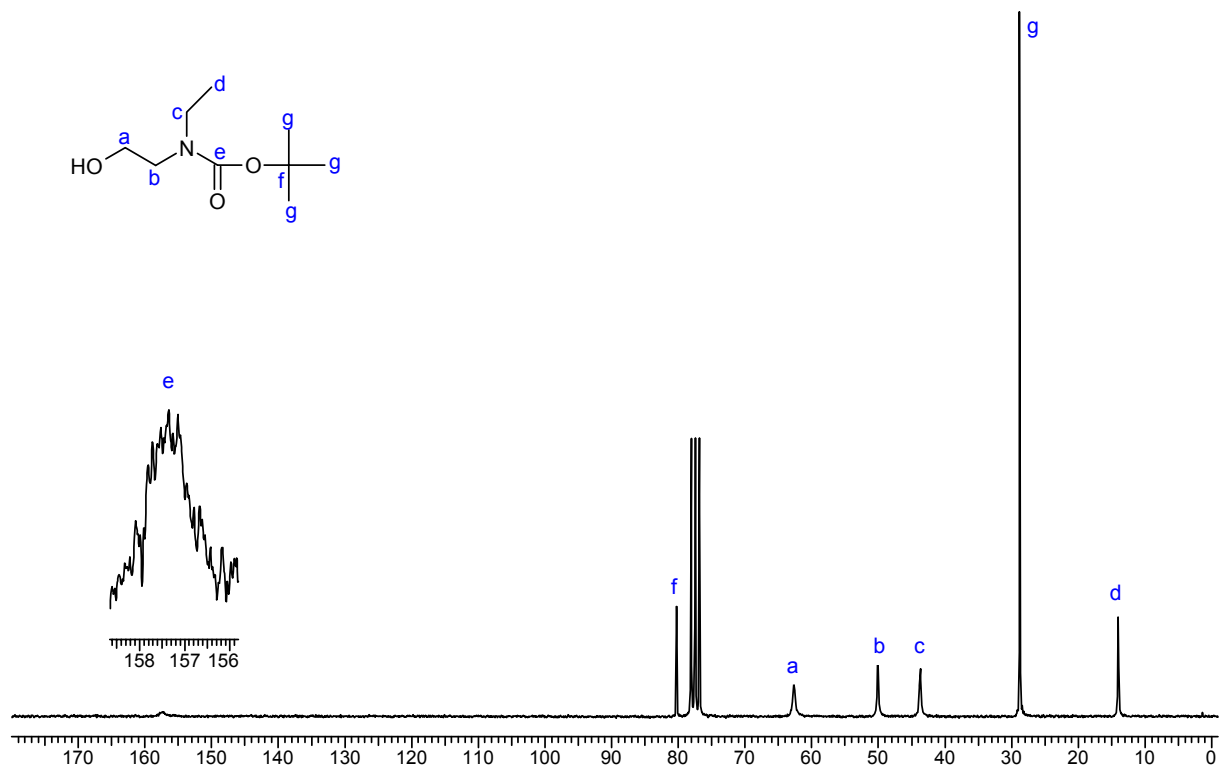
Ausbeute: 85 % (194,65 mmol)

¹H-NMR (200,13 MHz, CDCl₃):

Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	3,741	m	2 H	-
b	3,380	t	2 H	³ J _{HH} = 5,44
c	3,273	q	2 H	³ J _{HH} = 7,06
d	1,125	t	3 H	³ J _{HH} = 7,06
e	1,479	s	9 H	-



$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (50,32 MHz, CDCl_3):

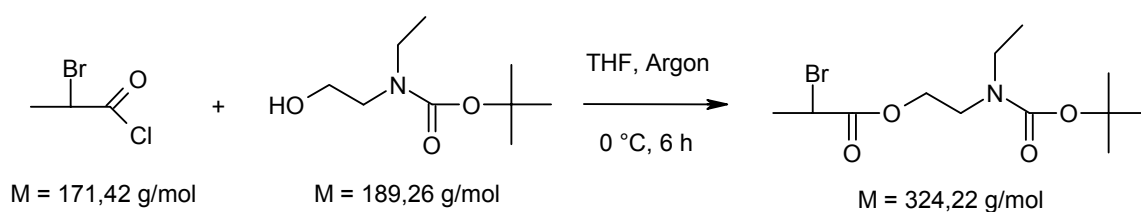


Signal	δ [ppm]
a	62,699
b	50,084
c	43,710
d	14,028
e	157,353
f	80,251
g	28,813

Elementaranalyse:

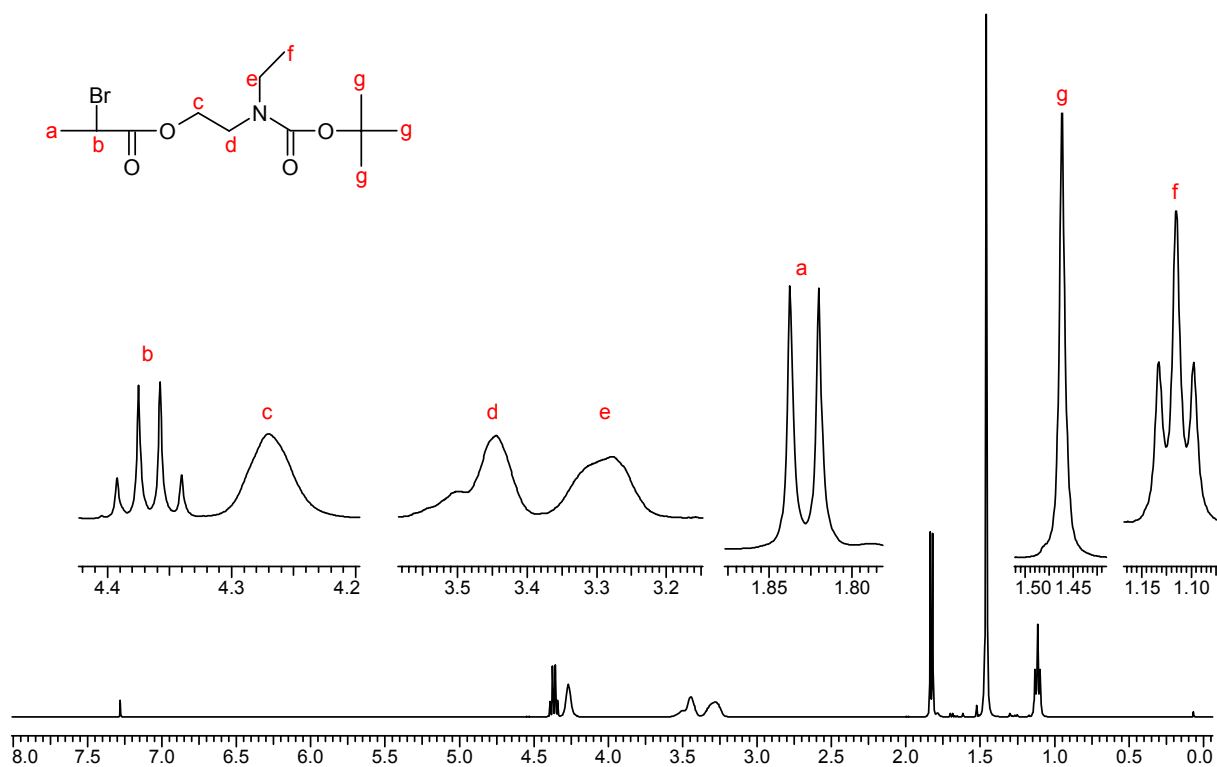
	C	H	N
berechnet [%]	57,12	10,12	7,40
gefunden [%]	57,34	10,41	7,81

5.3.3.2 Synthese von 2-Brompropionsäure-2-(*tert*-butoxycarbonyl-ethylamino)-ethyl-ester



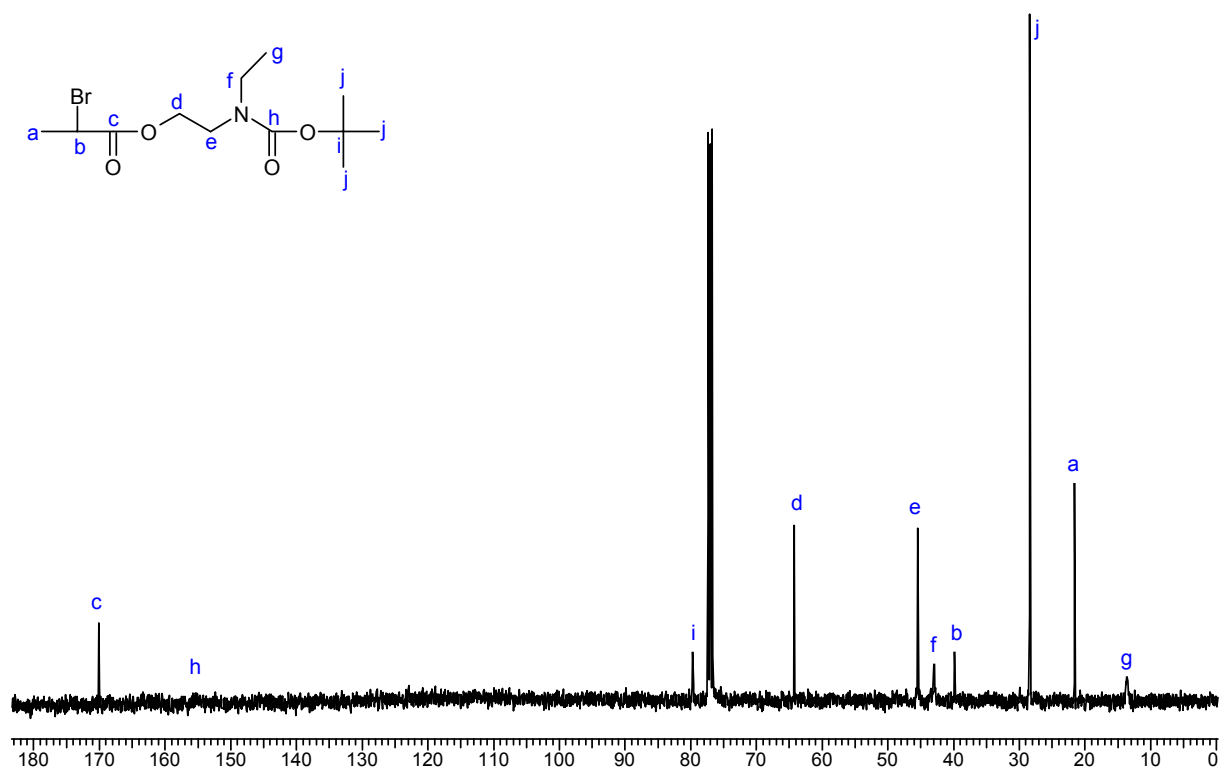
12,70 ml 2-Brompropionylchlorid (124,00 mmol) werden über 6 Stunden zu einer Lösung von 34,40 g Ethyl-(2-hydroxyethyl)-carbamatsäure-*tert*-butylester (123,57 mmol) in 200 ml über Na/K-Legierung getrocknetem THF unter Argonatmosphäre zutropft. Im THF werden vor dem Zutropfen 17,14 g K_2CO_3 (124,00 mmol) als basischer Puffer suspendiert. Die Temperatur wird während des Zutropfens mit einem Eisbad auf 0°C gehalten. Nach Ende der Reaktionszeit wird der Ansatz auf Eiswasser gegeben und mit 3 × 100 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit MgSO_4 getrocknet, abfiltriert, einrotiert und im Hochvakuum von letzten Lösungsmittelresten befreit. Man erhält 2-Brompropionsäure-2-(*tert*-butoxycarbonyl-ethylamino)-ethylester als hellgelbes Öl.

Ausbeute: 99 % (122,40 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3):

Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	1,838	d	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,04$
b	4,375	q	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,04$
c	4,271	m	2 H	-
d	3,445	m	2 H	-
e	3,278	m	2 H	-
f	1,116	t	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,04$
g	1,462	s	9 H	-

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CDCl_3):

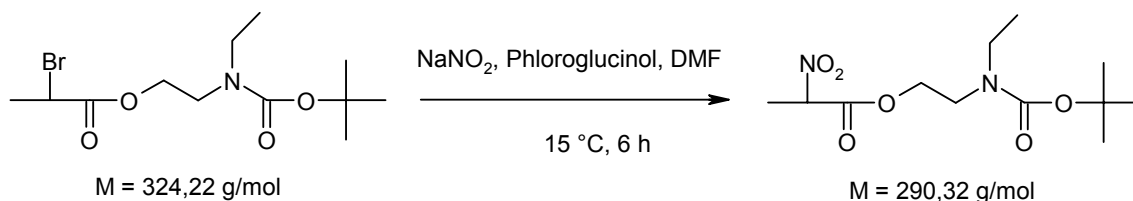


Signal	δ [ppm]
a	21,585
b	39,811
c	170,007
d	64,204
e	45,448
f	42,930
g	13,645
h	155,374
i	79,640
j	28,394

Elementaranalyse:

	C	H	N
berechnet [%]	44,46	6,84	4,32
gefunden [%]	44,66	7,03	4,56

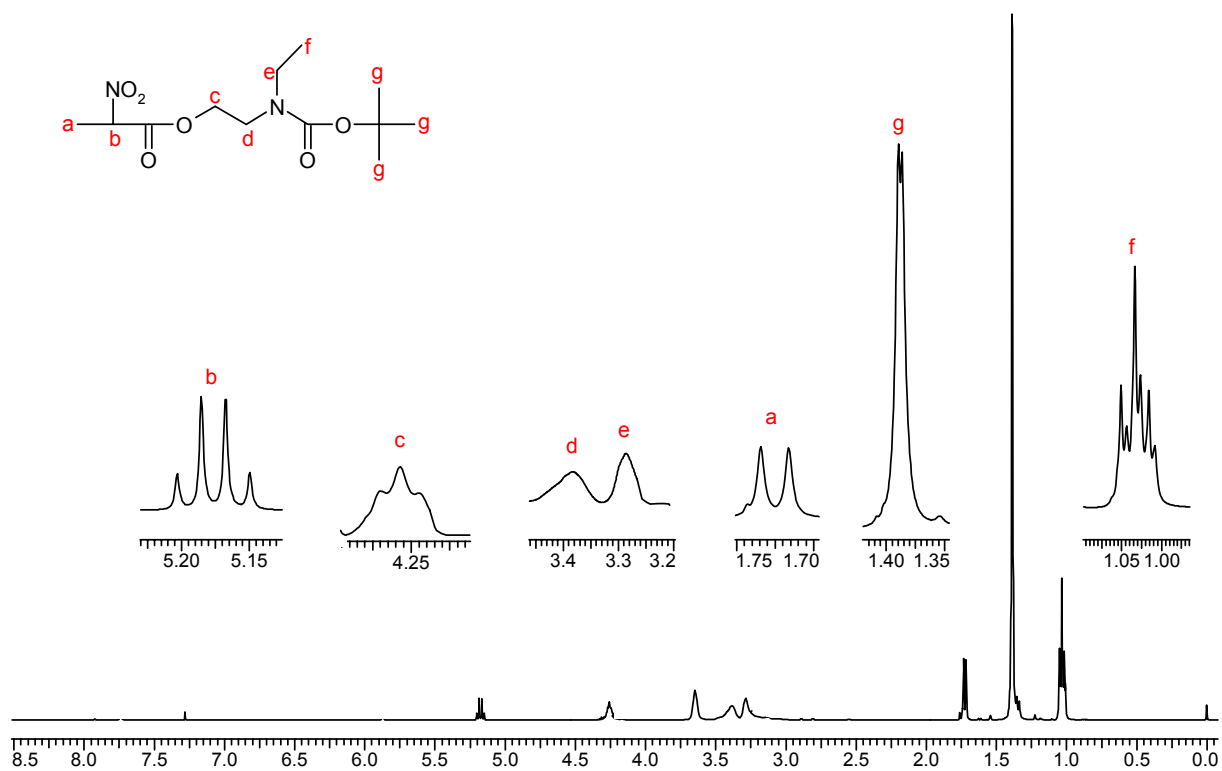
5.3.3.3 Synthese von 2-Nitropropionsäure-2-(*tert*-butoxycarbonyl-ethylamino)-ethyl-ester



15,00 g NaNO_2 (217,39 mmol) und 40,00 g Phloroglucinol (317,18 mmol) werden in 200 ml frisch destilliertem DMF unter Argonatmosphäre gelöst und auf 0°C im Eisbad abgekühlt. Dann werden portionsweise 39,70 g 2-Brompropionsäure-2-(*tert*-butoxycarbonyl-ethylamino)-ethylester (122,45 mmol) zugegeben. Sobald die Zugabe erfolgt ist, erwärmt man auf $15 \text{ }^\circ\text{C}$ und lässt die Reaktionsmischung für 6 Stunden bei dieser Temperatur rühren. Direkt bei der Zugabe des Esters färbt sich die Reaktionsmischung tiefrot. Nach Ablauf der Reaktionszeit gibt man die Mischung auf 200 ml Eiswasser und extrahiert mit $5 \times 100 \text{ ml}$ Diethylether. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit je 100 ml gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen, wobei sich die anfänglich rötliche Etherphase hellgelb färbt und die wässrige Phase die rote Farbe annimmt. Die organische Phase wird mit MgSO_4 getrocknet, filtriert und einrotiert. Da Phloroglucinol im Produkt teilweise löslich ist, nimmt man das einrotierte Extrakt in 100 ml CHCl_3 auf und lagert die Lösung über Nacht bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Am nächsten Tag filtriert man das ausgefallene Phloroglucinol ab und rotiert das Lösungsmittel ab. Nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum erhält man 2-Nitropropionsäure-2-(*tert*-butoxycarbonyl-ethylamino)-ethylester als viskoses orangefarbenes Öl.

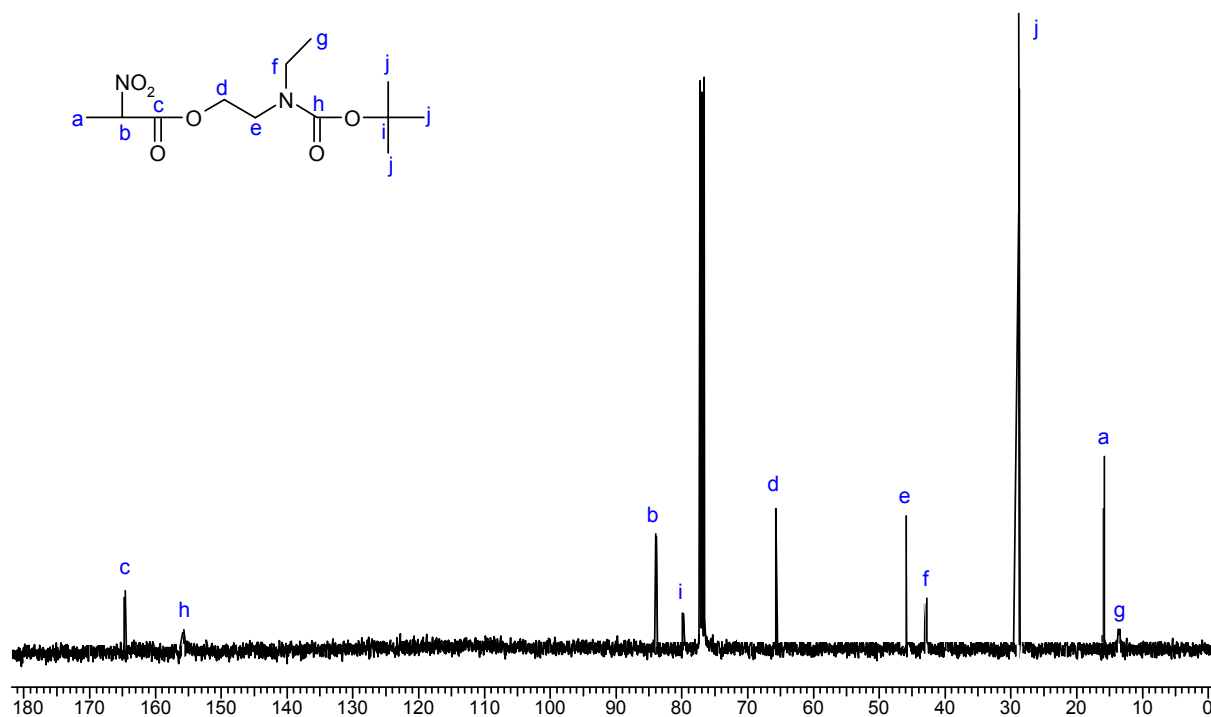
Ausbeute: 75,5 % (92,52 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3):



Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	1,717	d	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,04$
b	5,186	q	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,04$
c	4,257	m	2 H	-
d	3,384	m	2 H	-
e	3,286	m	2 H	-
f	1,034	t	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,04$
g	1,390	s	9 H	-

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CDCl_3):

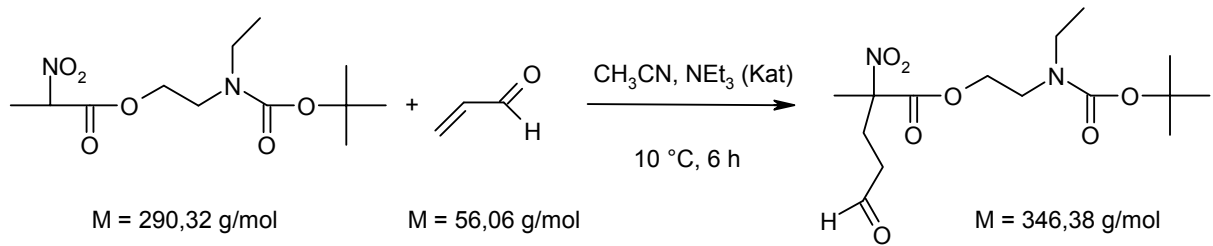


Signal	δ [ppm]
a	15,942
b	83,273
c	164,889
d	65,213
e	45,408
f	42,921
g	13,513
h	155,354
i	79,602
j	28,400

Elementaranalyse:

	C	H	N
berechnet [%]	49,65	7,64	9,65
gefunden [%]	49,81	7,77	9,81

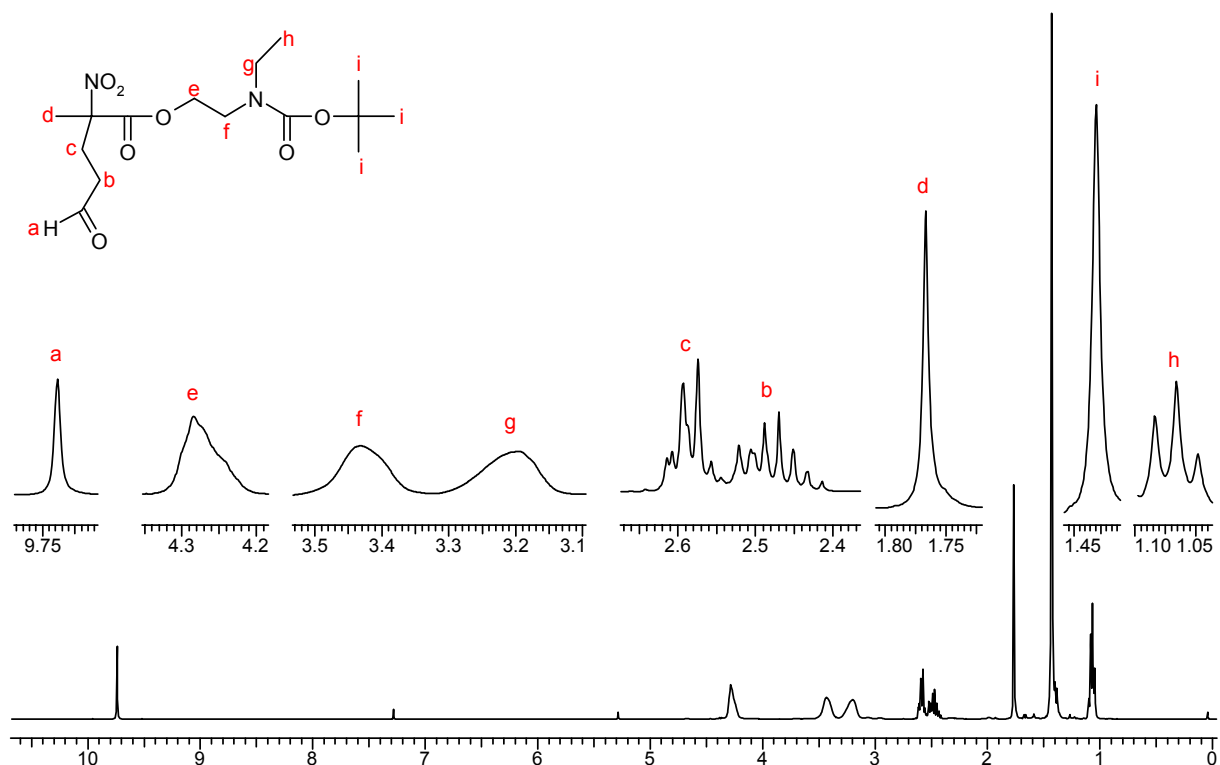
5.3.3.4 Synthese von 2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-2-(*tert*-butoxycarbonyl-ethylamino)-ethylester



Zu einer Lösung von 26,86 g 2-Nitropropionsäure-2-(*tert*-butoxycarbonyl-ethylamino)-ethylester (92,52 mmol) in 150 ml über CaH_2 getrocknetem Acetonitril gibt man unter Argonatmosphäre bei 10 °C 1 ml Triethylamin zu. Danach werden 9,8 ml Acrolein (148,59 mmol) zugegeben. Nach 6 Stunden Rühren bei 10 °C wird der Ansatz auf Eiswasser gegeben und mit HCl neutralisiert. Die organische Phase wird mit $3 \times 50 \text{ ml CH}_2\text{Cl}_2$ extrahiert. Nach Trocknen der vereinigten organischen Phasen mit Na_2SO_4 wird der Ansatz filtriert, einrotiert und im Hochvakuum von Lösungsmittelresten befreit. Man erhält so 2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-2-(*tert*-butoxycarbonyl-ethylamino)-ethylester als hellgelbes viskoses Öl.

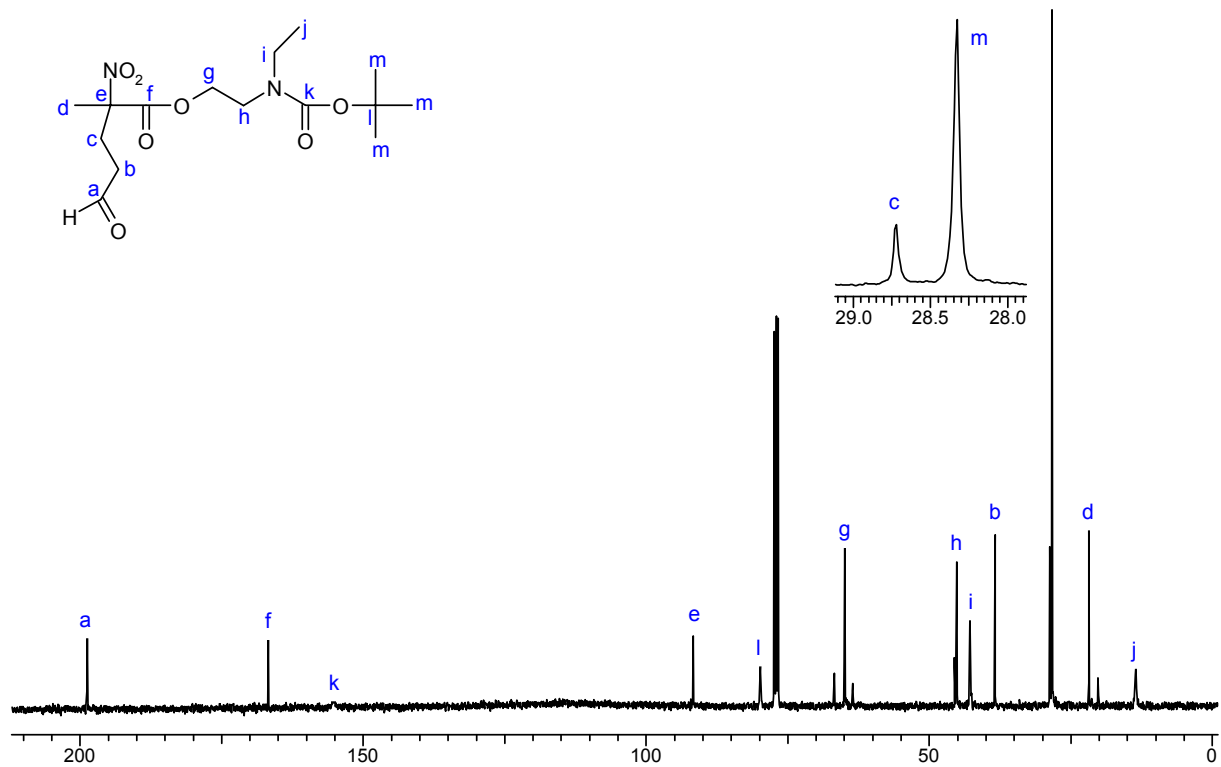
Ausbeute: 97 % (89,96 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3):



Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	9,739	s	1 H	-
b	2,489	m	2 H	-
c	2,588	m	2 H	-
d	1,767	s	3 H	-
e	4,285	m	2 H	-
f	3,432	m	2 H	-
g	3,159	m	2 H	-
h	1,067	t	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,16$
i	1,430	s	9 H	-

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CDCl_3):

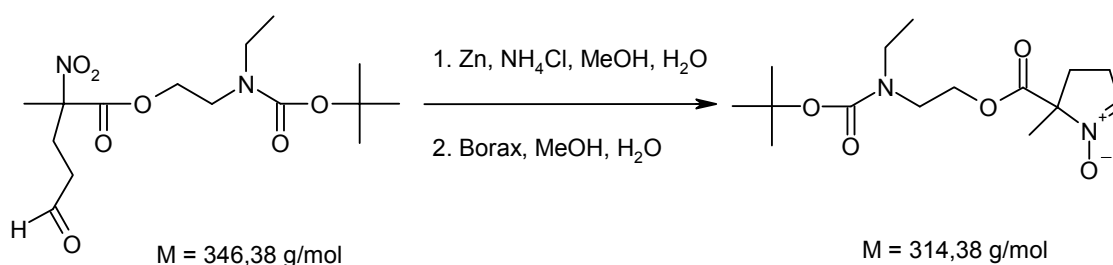


Signal	δ [ppm]
a	198,721
b	38,397
c	28,727
d	21,817
e	91,698
f	166,774
g	64,952
h	45,188
i	42,772
j	13,515
k	155,200
l	79,784
m	28,330

Elementaranalyse:

	C	H	N
berechnet [%]	52,01	7,57	8,09
gefunden [%]	52,12	7,68	8,21

5.3.3.5 Synthese von BocEAEMPO als Eintopfreaktion



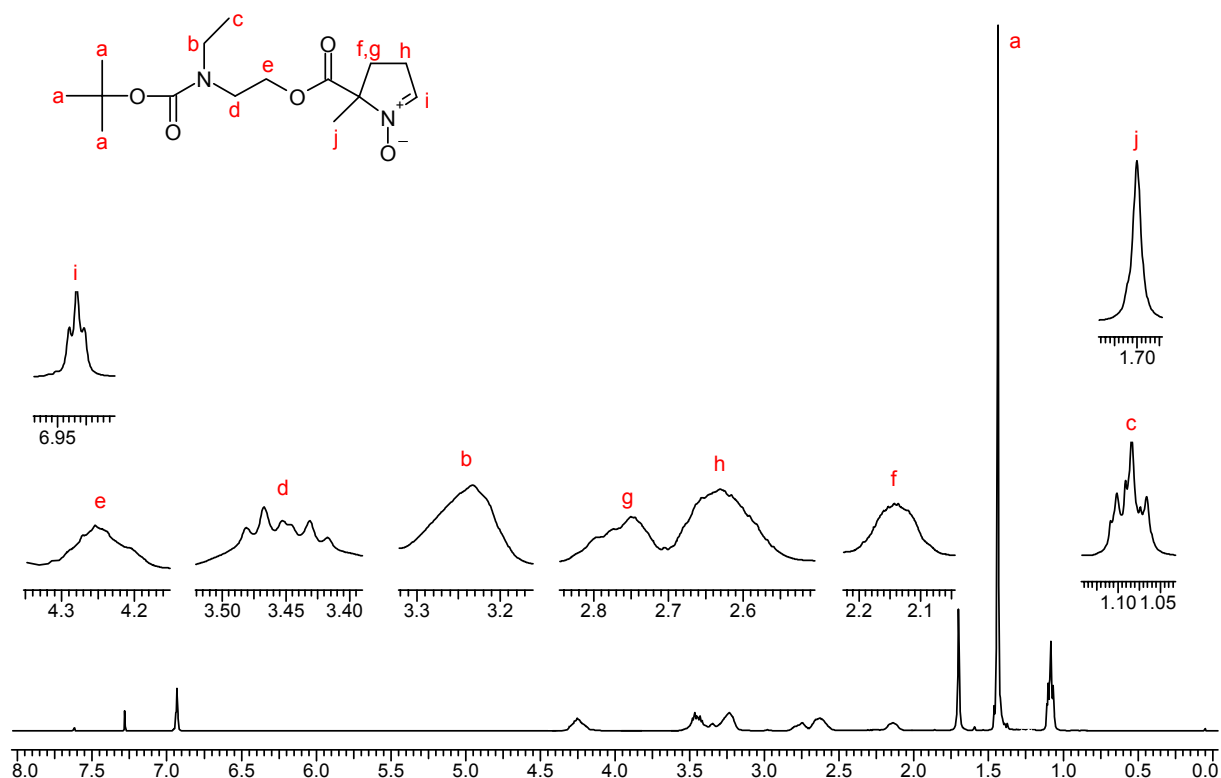
15,00 g 2-Methyl-2-nitro-5-oxopentansäure-2-(*tert*-butoxycarbonyl-ethylamino)-ethylester (43,30 mmol) werden in 100 ml Methanol gelöst und diese Mischung mit 90 ml H₂O versetzt. Das Lösungsmittelgemisch trübt dabei stark ein. Dann werden 5,9 g NH₄Cl (110,30 mmol) in 10 ml H₂O gelöst und zugegeben. Zu dieser Mischung werden über 30 Minuten portionsweise 12,00 g Zn-Pulver (183,51 mmol) zugegeben. Schon nach Zugabe der ersten Portion Zink bildet sich auf

der Mischung ein hellgrauer Schaum. Nach 4 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird das überschüssige Zink-Pulver vom Ansatz abfiltriert und dieser am Rotationsverdampfer eingedunstet. Das tiefrote Konzentrat wird mit Borax gesättigt. Der Ansatz wird für eine Stunde bei RT gerührt. Dann extrahiert man mit 3×50 ml CH_2Cl_2 . Die vereinigten organischen Phasen werden mit Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert. Nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum erhält man ein Rohprodukt, das im $^1\text{H-NMR}$ deutlich BocEAEMPO-Signalsätze zeigt.

Zur weiteren Aufreinigung wird das Rohprodukt durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 getrennt. Dabei wird zunächst mit einer Mischung aus 7 : 3 Petrolether und Ethanol eine Grobtrennung durchgeführt, gefolgt von einer Feinreinigung mit 1 : 1 Pentan und Ethanol. Das Produkt wird in beiden Durchgängen mit Ethanol vom Kieselgel eluiert.

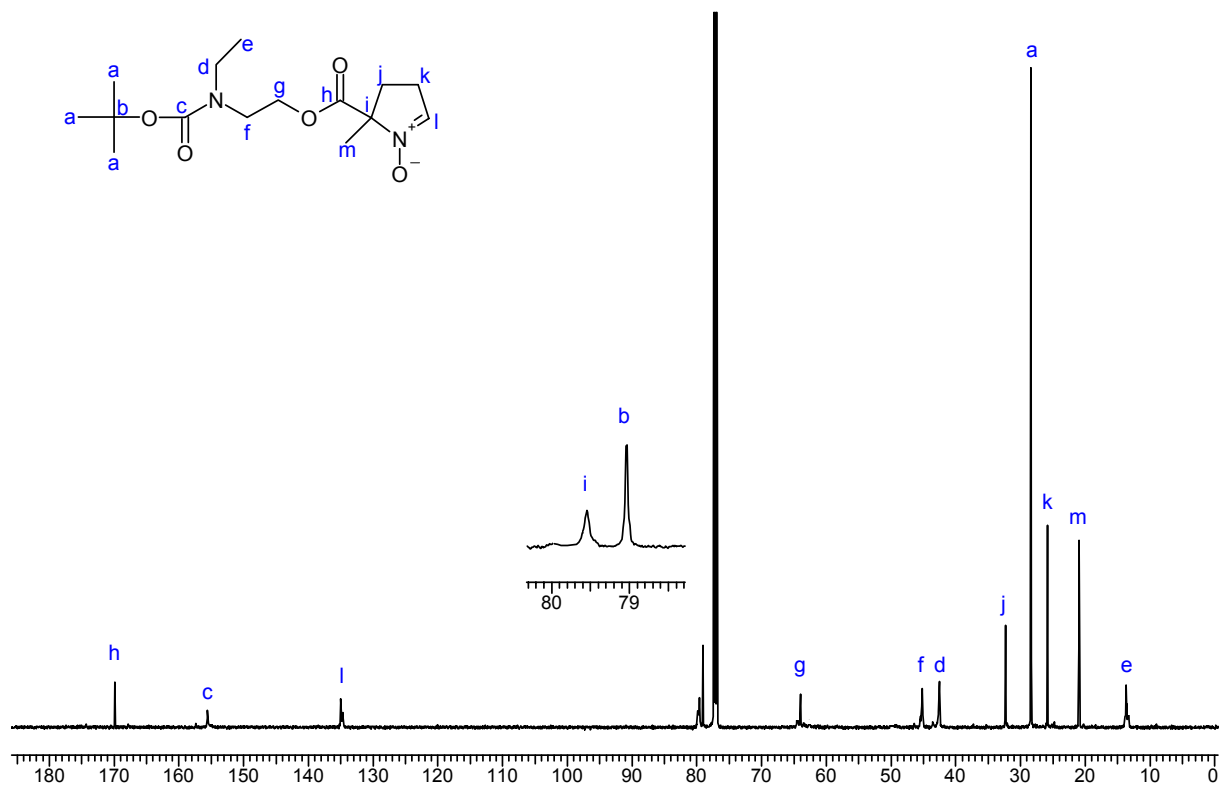
Ausbeute: 55 % (23,87 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (600,13 MHz, CDCl_3):



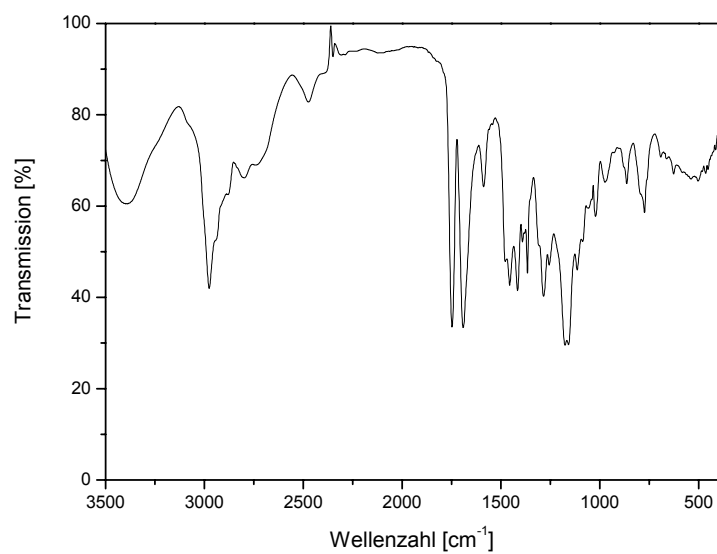
Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	1,435	s	9 H	-
b	3,235	m	2 H	-
c	1,082	dt	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,04 \text{ 2,64}$
d	3,451	m	2 H	-
e	4,251	m	2 H	-
f	2,141	m	1 H	-
g	2,747	m	1 H	-
h	2,629	m	2 H	-
i	6,929	t	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 2,64$
j	1,698	s	3 H	-

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (150.90 MHz, CDCl_3):



Signal	δ [ppm]
a	28,400
b	79,030
c	155,550
d	42,500
e	13,500
f	45,140
g	63,980
h	169,840
i	79,550
j	32,310
k	25,850
l	134,970
m	21,000

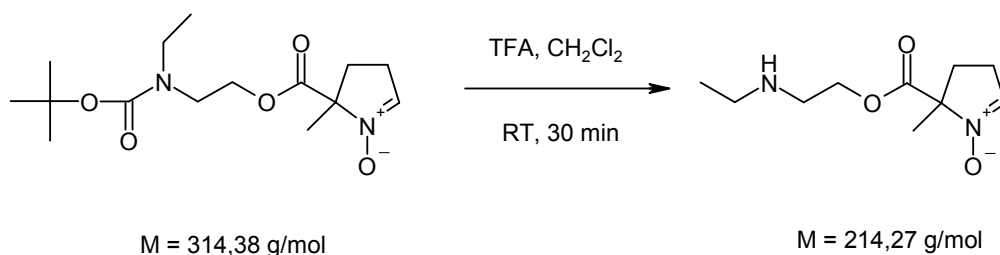
IR-Spektrum (Film in KCl):



Elementaranalyse:

	C	H	N
berechnet [%]	57,31	8,34	8,91
gefunden [%]	57,48	8,49	9,03

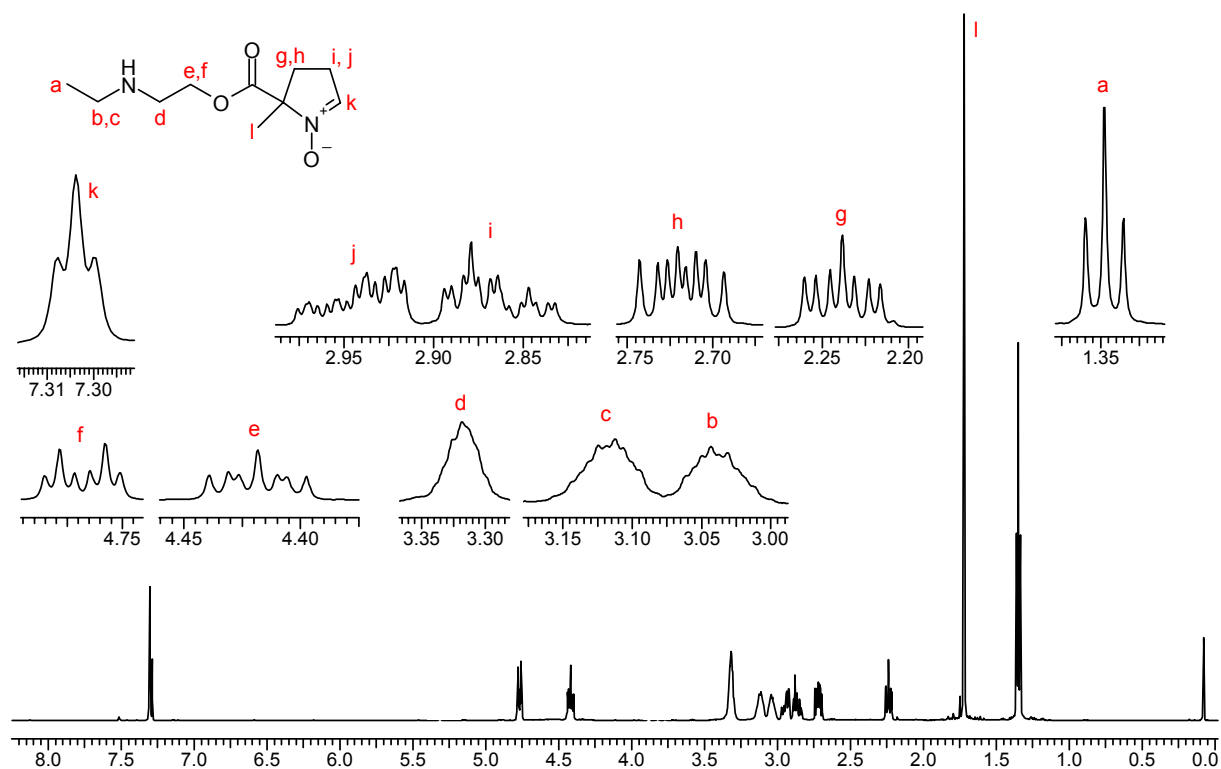
5.3.3.6 Synthese von EAEMPO



340,00 mg BocEAEMPO (1,08 mmol) werden mit 5 ml trockenem CH_2Cl_2 und 5 ml trockener TFA versetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Direkt nach Zugabe der TFA zeigt sich eine rege Gasentwicklung. Nach Abschluss der Gasentwicklung entfernt man das Lösungsmittelgemisch im Hochvakuum. Das so erhaltene Triflat-Salz des EAEMPO wird in 10 ml CH_2Cl_2 aufgenommen und mit 1 g PL-TBD für 30 Minuten gerührt. Das PL-TBD wird abfiltriert und das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Man erhält so hochreines EAEMPO.

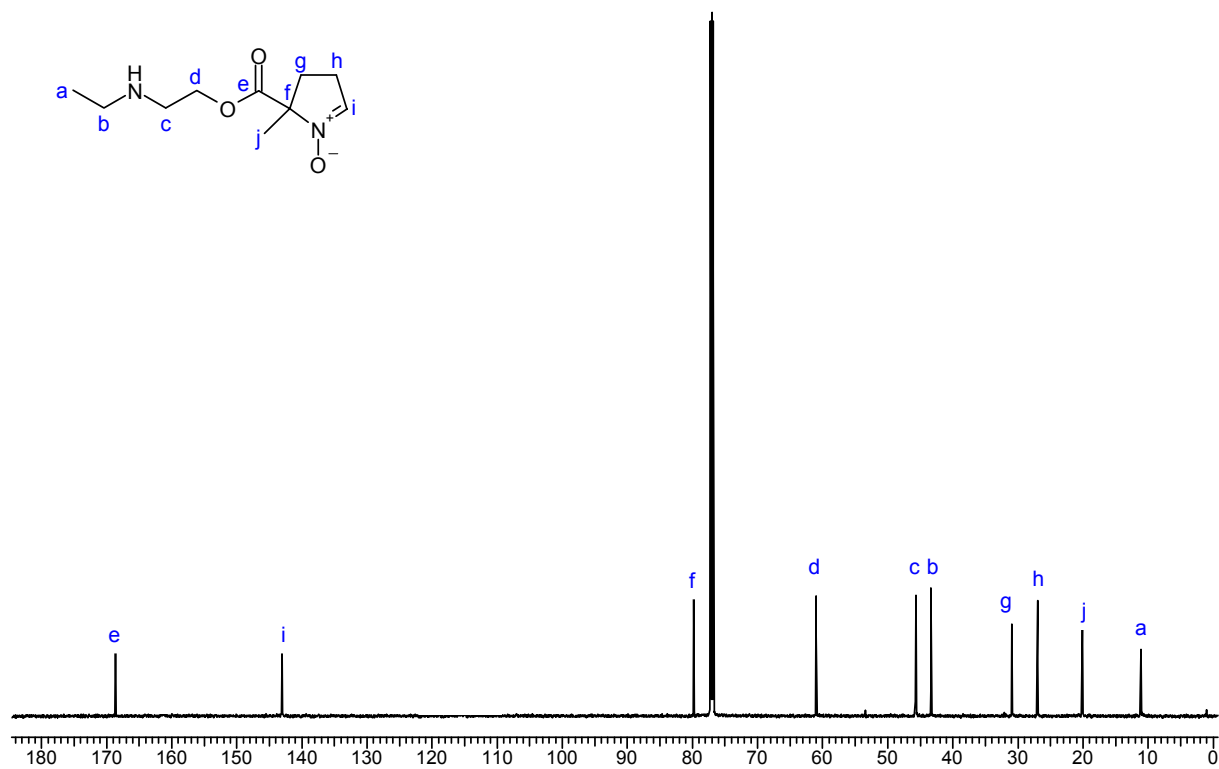
Ausbeute: 100 % (1,08 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (600,13 MHz, CDCl_3):



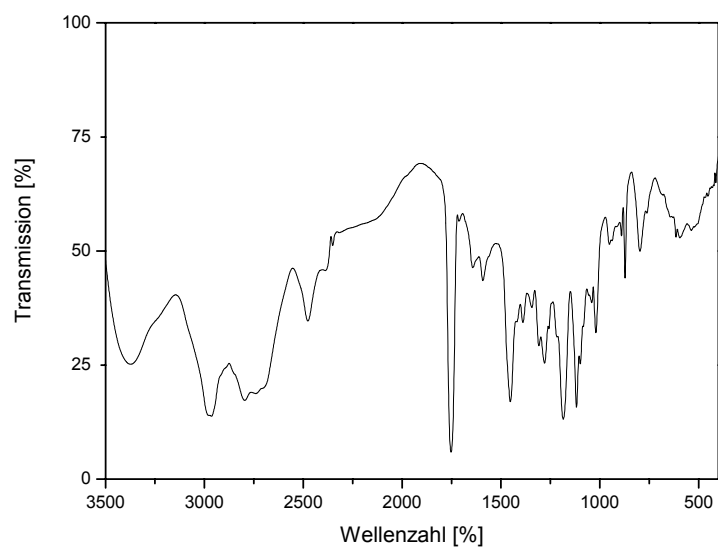
Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	1,350	t	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,56$
b	3,040	m	1 H	-
c	3,110	m	1 H	-
d	3,320	m	2 H	-
e	4,420	m	1 H	-
f	4,765	dt	1 H	$^{-3}J_{\text{HH}} = 8,22; ^4J_{\text{HH}} = 4,28$
g	2,240	m	1 H	-
h	2,720	m	1 H	-
i	2,860	m	1 H	-
j	2,940	m	1 H	-
k	7,300	t	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 2,30$
l	1,720	s	3 H	-

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (150,90 MHz, CDCl_3):



Signal	δ [ppm]
a	11,090
b	43,360
c	45,740
d	61,020
e	168,620
f	79,810
g	30,940
h	27,010
i	143,110
j	20,140

IR-Spektrum (Film in KCl):



Elementaranalyse:

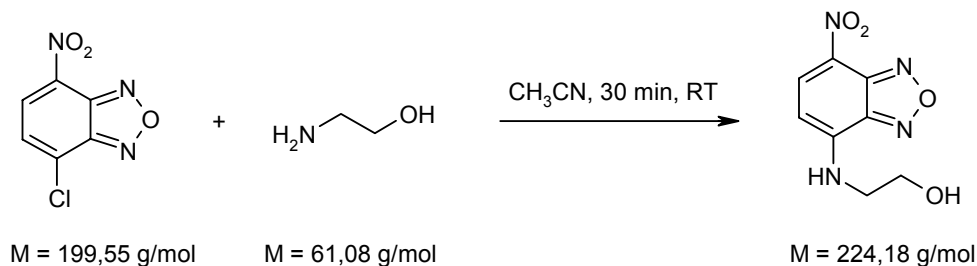
	C	H	N
berechnet [%]	56,06	8,47	13,07
gefunden [%]	56,18	8,53	13,12

5.4 Farbstoffsynthesen

5.4.1 Synthese von NBD-Systemen

5.4.1.1 Synthese von 2-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol

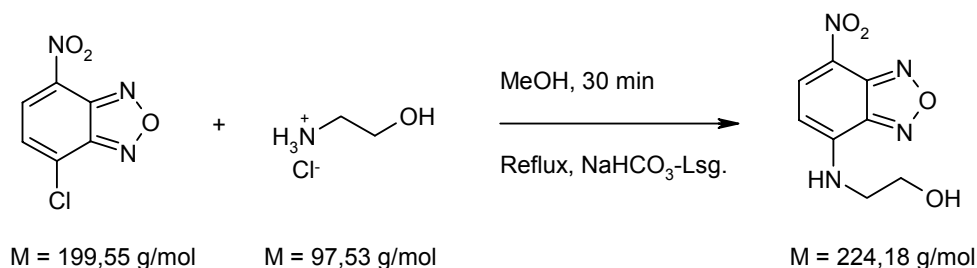
Variante 1:



500,00 mg NBD-Cl (2,50 mmol) werden in 50 ml trockenem Acetonitril unter Argonatmosphäre gelöst und 170,00 μl Ethanolamin (2,80 mmol) zugegeben. Direkt nach der Zugabe des Ethanolamins beginnt sich die hellgelbe NBD-Cl-Lösung über orange nach dunkelrot zu färben. Nach 30 Minuten Reaktionszeit wird das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt und der dunkelrote Feststoff durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 mit 19 : 1 Dichlormethan und Methanol getrennt. Man erhält so 2-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol als kräftig orangenen Feststoff.

Ausbeute: 40 % (1,00 mmol)

Variante 2:

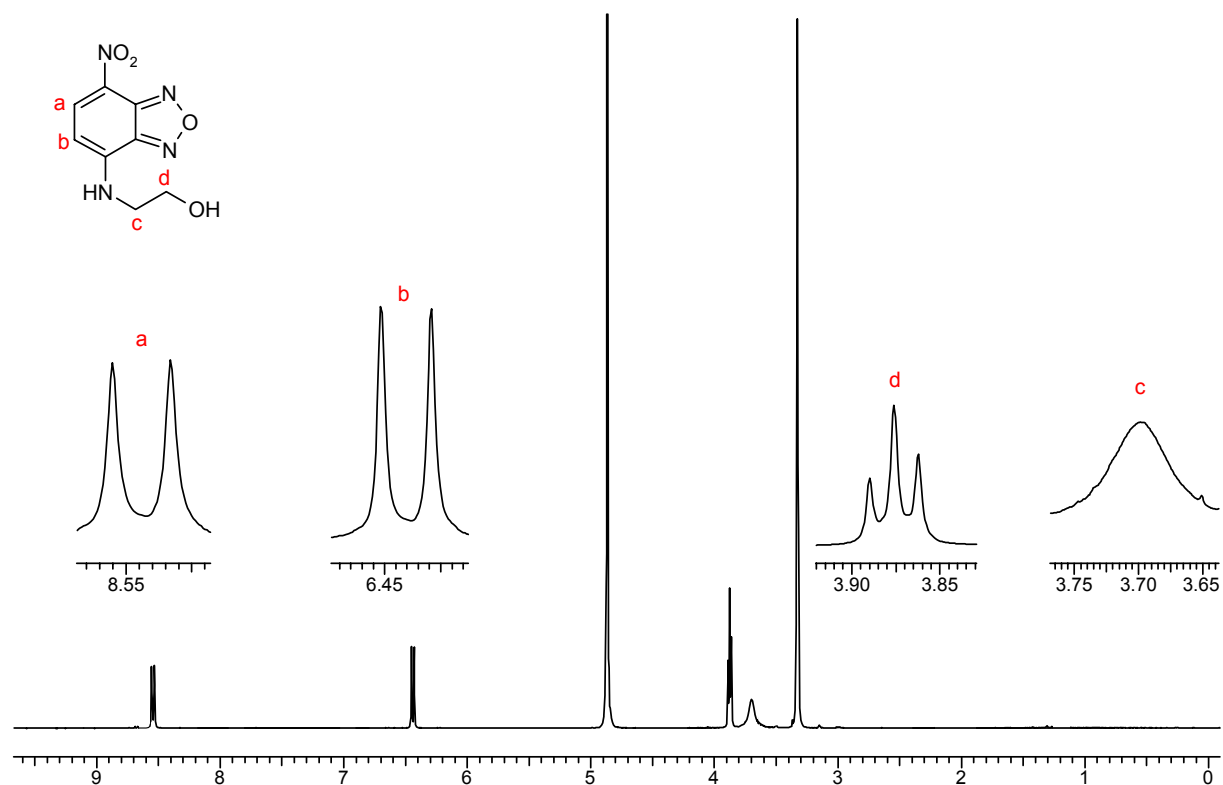


1,00 g NBD-Cl (5,00 mmol) werden in 30 ml Methanol gelöst. 451,00 μl Ethanolamin (7,50 mmol) werden mit 625,00 μl 12 M HCl zum Ethanolaminhydrochlorid umgesetzt und zur NBD-

Lösung zugegeben. Der Ansatz wird zum Rückfluss erhitzt und tropfenweise eine Lösung von 1,26 g NaHCO_3 (15,00 mmol) in 20 ml H_2O zugetropft. Nach 30 Minuten Reaktionszeit wird der Ansatz auf Eis abgekühlt. Die ausgefallenen Kristalle werden abfiltriert und mit 10 ml $-80\text{ }^\circ\text{C}$ kaltem Methanol gewaschen. Man erhält so 2-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol als kräftig orangen Feststoff.

Ausbeute: 80 %

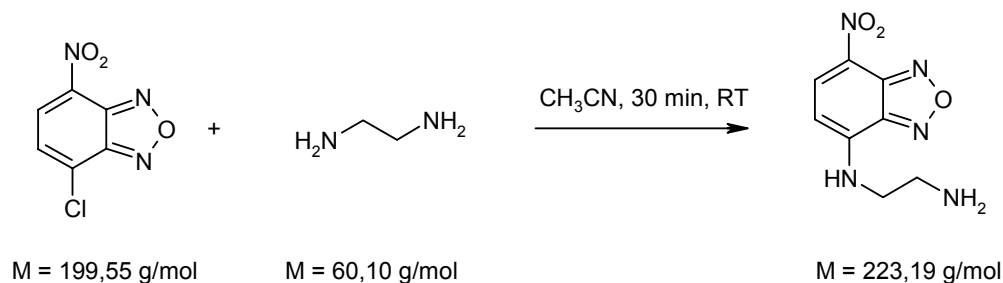
$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CD_3OD):



Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	8,533	d	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 9,00$
b	6,452	d	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 9,00$
c	3,697	m	2 H	-
d	3,876	t	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 5,58$

5.4.1.2 Synthese von N^{*}1^{*}-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-ethan-1,2-diamin

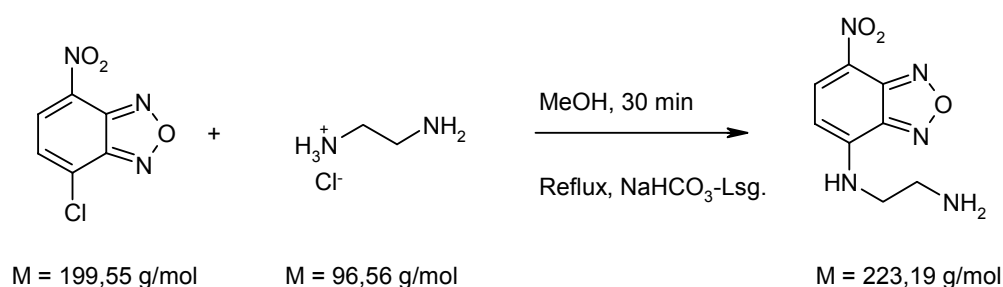
Variante 1:



111,00 μl 1,2-Diaminoethan (1,65 mmol) werden in 60 ml Acetonitril gelöst. 330,00 mg NBD-Cl (1,65 mmol) werden in weiteren 50 ml Acetonitril gelöst und über eine Stunde langsam zur Amin-Lösung zugetropft. Direkt bei Beginn des Zutropfens färbt sich die farblose Amin-Lösung orange-rot. Nach 30 Minuten Reaktionszeit wird das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt und der rote Feststoff durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 mit 19 : 1 Dichlormethan und Methanol getrennt. Man erhält so N^{*}1^{*}-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-ethan-1,2-diamin als braun-roten Feststoff.

Ausbeute: 38,5 % (0,64 mmol)

Variante 2:

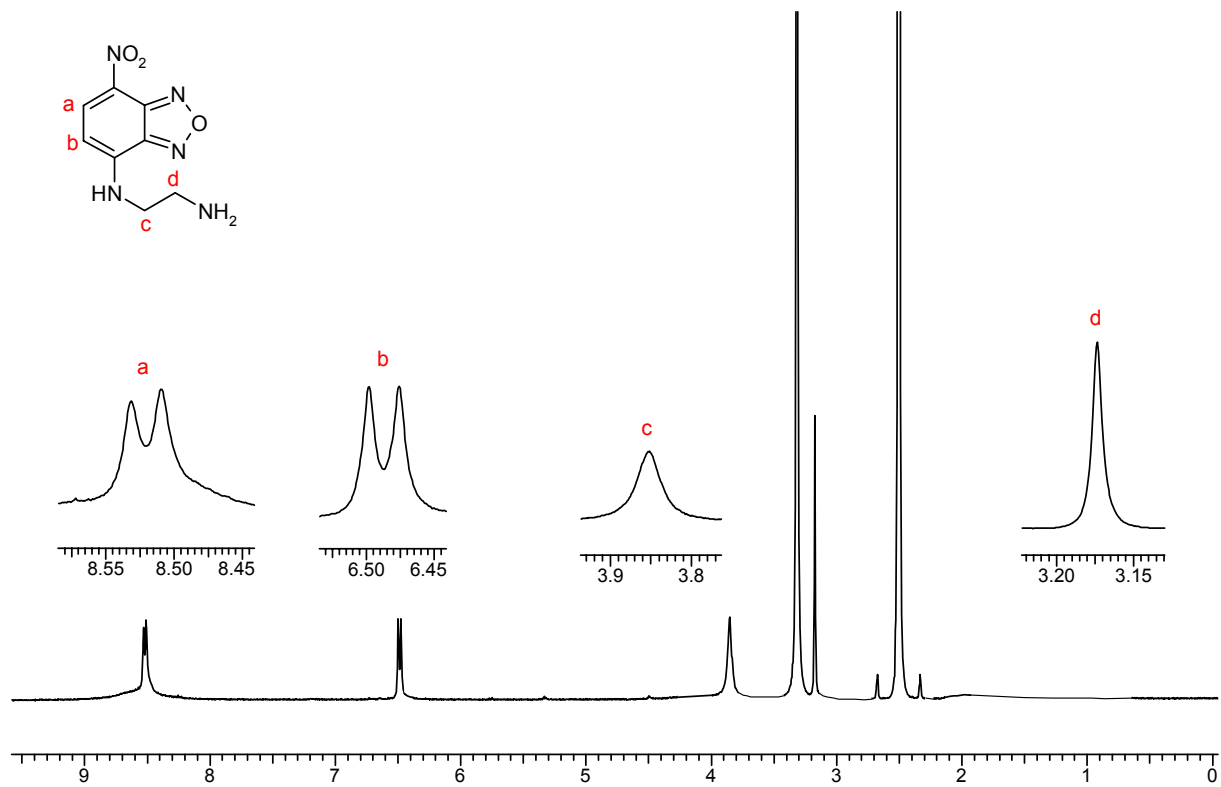


1,00 g NBD-Cl (5,00 mmol) werden in 20 ml Methanol gelöst. 335,00 μl 1,2-Diaminoethan (5,00 mmol) werden mit 416,00 μl 12 M HCl zum Hydrochlorid umgesetzt und in 30 ml Methanol gelöst. Die NBD-Cl-Lösung wird über 40 Minuten zugetropft. Der Ansatz wird zum Rückfluss erhitzt und tropfenweise eine Lösung von 420 mg NaHCO₃ (5,00 mmol) in 10 ml H₂O zugetropft. Nach 60 Minuten Reaktionszeit wird der Ansatz auf Eis abgekühlt. Die ausgefallenen Kristalle

werden abfiltriert und mit 10 ml $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem Methanol gewaschen. Man erhält so N*1*-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)-ethan-1,2-diamin als braun-roten Feststoff.

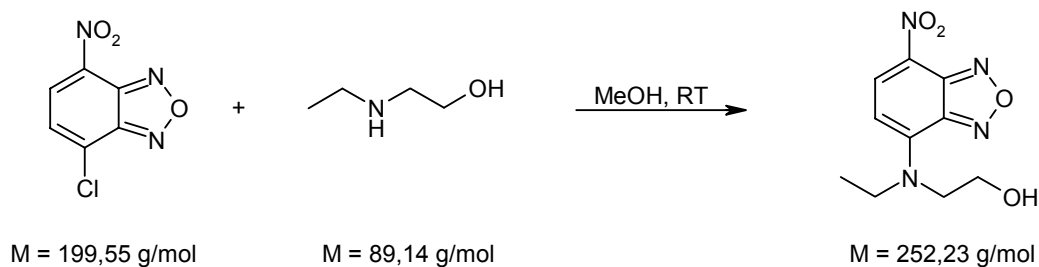
Ausbeute: 65,5 %

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, DMSO- D_6):



Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	8,510	d	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,80$
b	6,489	d	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,80$
c	3,852	m	2 H	-
d	3,174	m	2 H	-

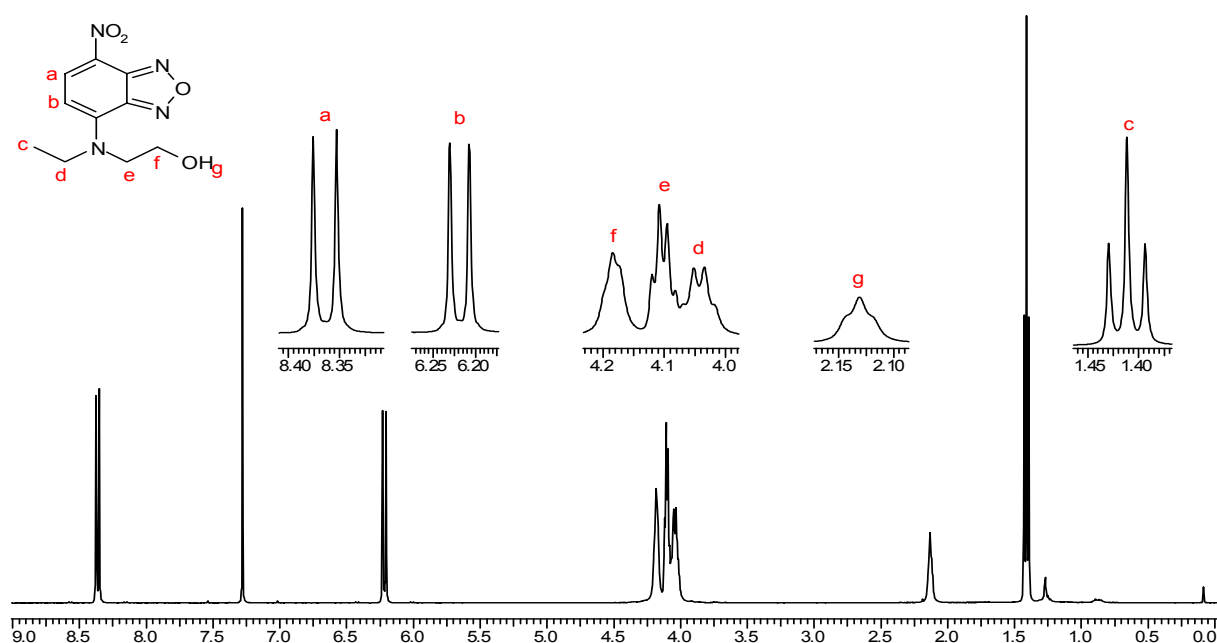
5.4.1.3 Synthese von 2-[Ethyl-(7-Nitro-[2,1,3]-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol



10,00 g NBD-Cl (50,11 mmol) werden in 200 ml Methanol gelöst und bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre langsam 4,89 ml 2-(Ethylamino)ethanol (50,11 mmol) in 100 ml Methanol über eine Stunde zugetropft. Da das Produkt nicht ausfällt, wird der Ansatz nach Ablauf der Reaktionszeit einrotiert und in wenig Ethanol gelöst. Diese Lösung wird für 16 Stunden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, wobei sich das Produkt als leuchtend hellroter Feststoff niederschlägt. Der Feststoff wird über einen auf $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlten Büchnertrichter abfiltriert und mit 100 ml $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem Ethanol gewaschen. Der verbleibende hellrote Feststoff wird im Hochvakuum getrocknet.

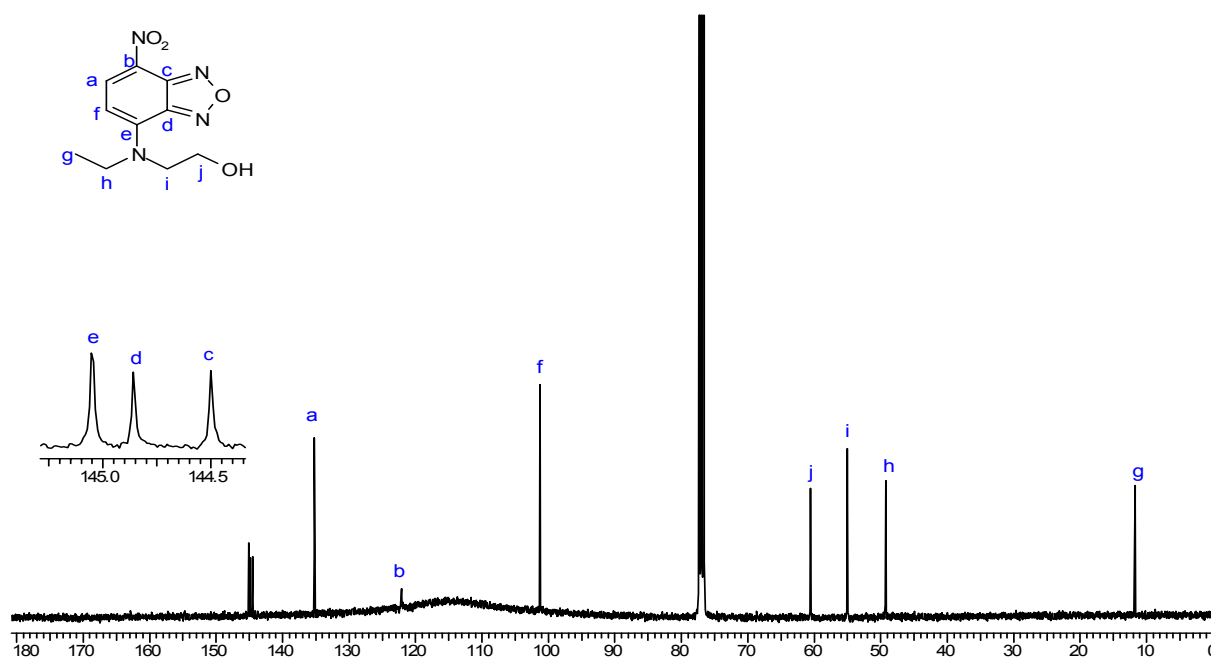
Ausbeute: 53,5 % (26,76 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3):



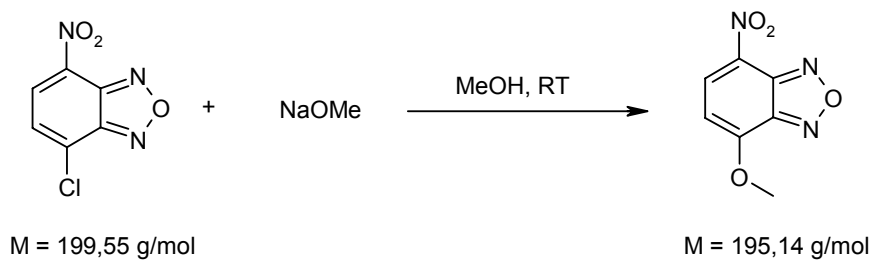
Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	8,365	d	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 9,00$
b	6,219	d	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 9,00$
c	1,412	t	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 6,99$
d	4,052	q	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 6,99$
e	4,108	t	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 9,00$
f	4,185	t	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 9,00$
g	2,131	s	1 H	-

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CDCl_3):



Signal	δ [ppm]
a	135,220
b	122,147
c	144,504
d	144,862
e	145,053
f	101,294
g	11,769
h	49,268
i	55,015
j	60,582

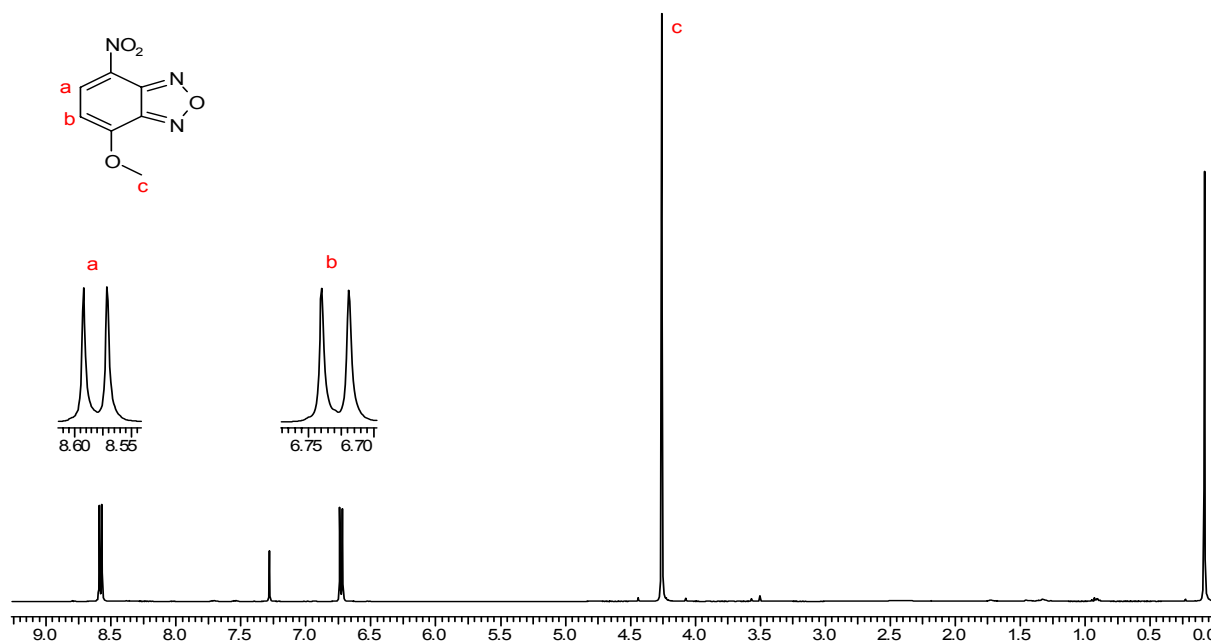
5.4.1.4 Synthese von 4-Methoxy-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol)



20 ml trockenes Methanol werden mit 200,00 mg Natrium (8,70 mmol) versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Zu dieser Lösung werden bei Raumtemperatur 1,70 g NBD-Cl (8,52 mmol) gegeben und für 19 Stunden gerührt. Die zunächst hellgelbe Lösung verfärbt sich rasch rötlich. Nach Ablauf der Reaktionszeit filtriert man die ausgefallenen ockergelben Kristalle aus der zuvor auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlten tiefroten Methanollösung ab. Die Kristalle werden mit 10 ml $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem Methanol gewaschen. Zum Umkristallisieren werden die Kristalle in 20 ml Methanol gelöst, mit 5 ml Chloroform versetzt und über Nacht bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die ausgefallenen Kristalle werden erneut abfiltriert und im Vakuum getrocknet. Man erhält 4-Methoxy-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol) als ockergelben Feststoff.

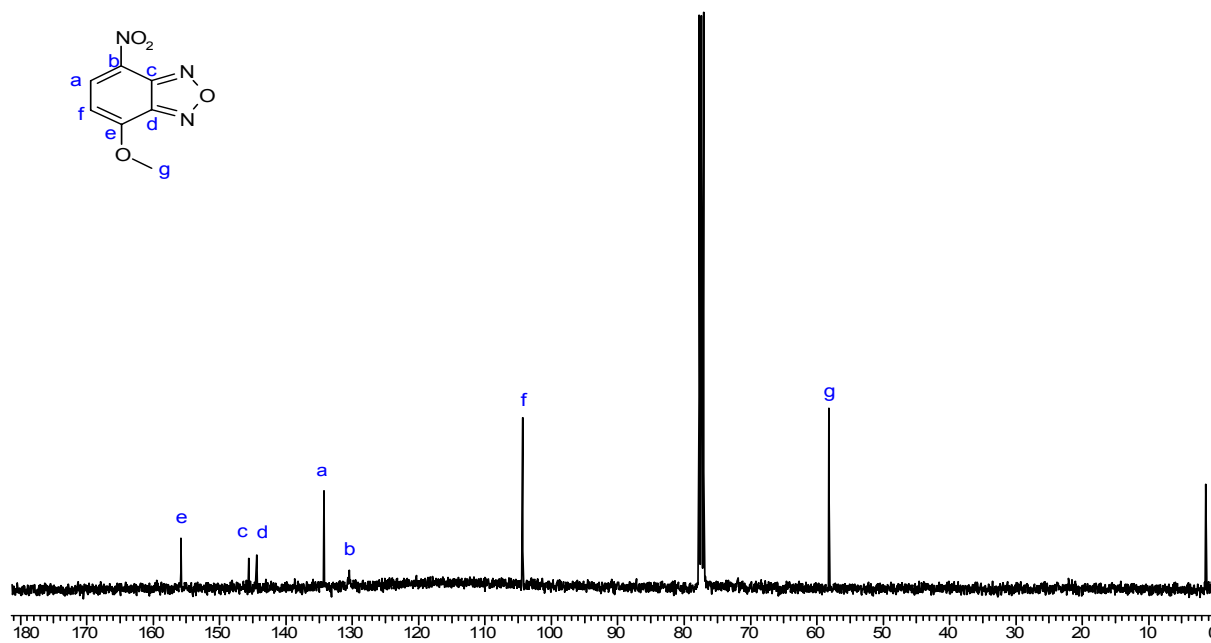
Ausbeute: 30 % (2,56 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3):



Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	8,592	d	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,17$
b	6,719	d	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,17$
c	4,263	s	3 H	-

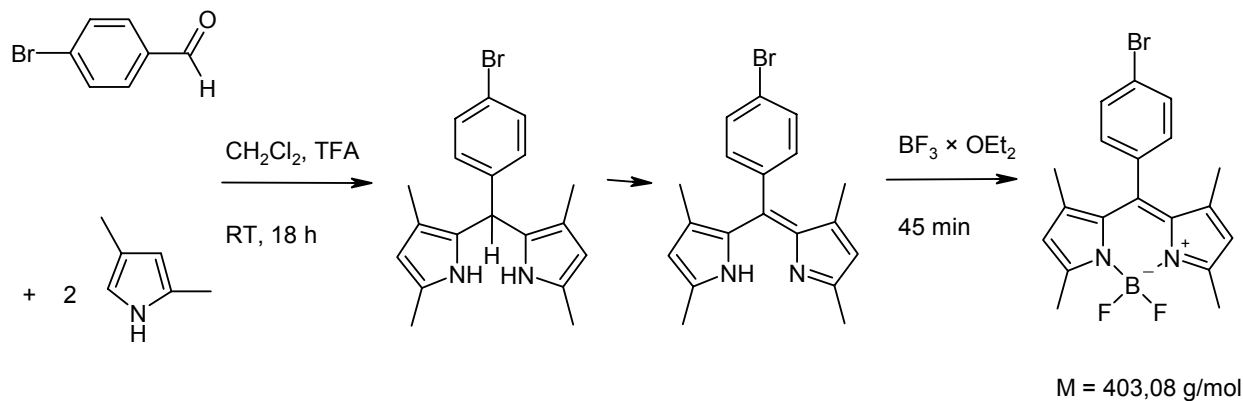
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CDCl_3):



Signal	δ [ppm]
a	134,201
b	130,402
c	145,594
d	144,355
e	155,771
f	104,310
g	58,177

5.4.2 Synthese von BODIPY-Systemen

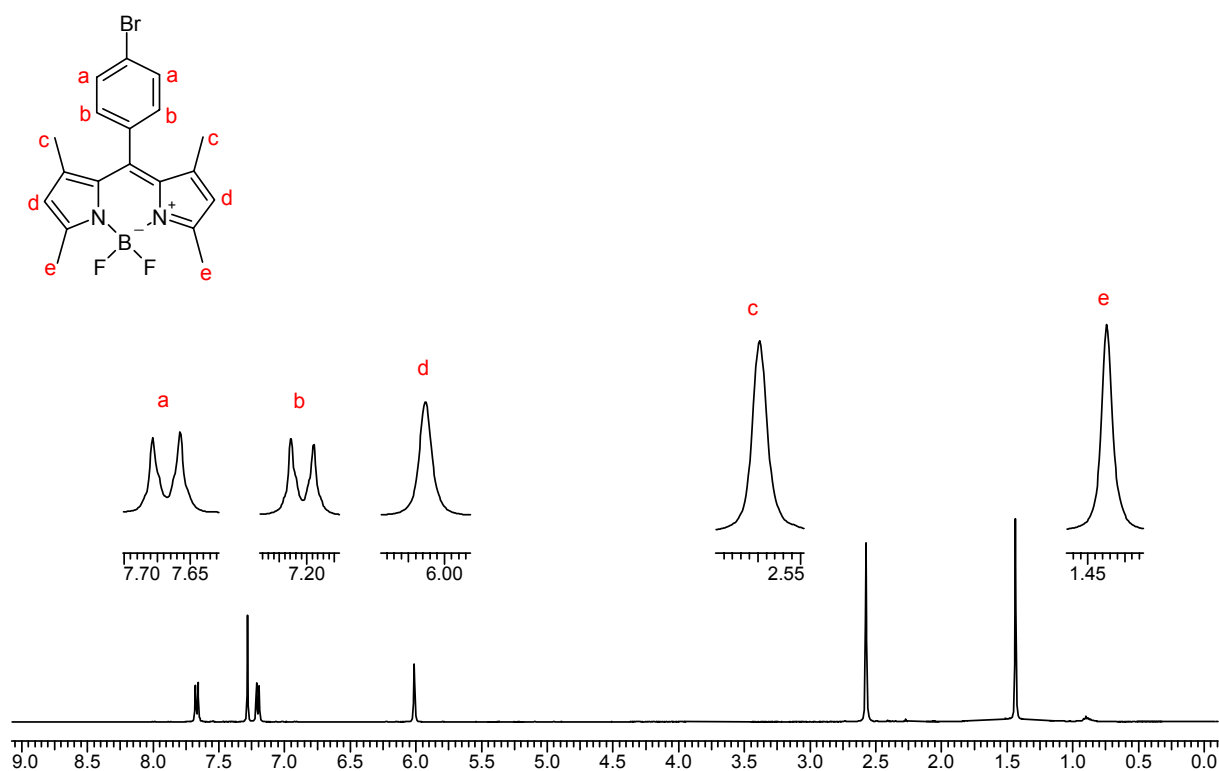
5.4.2.1 Synthese von 8-(4-Bromphenyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (BP-BODIPY)



1,00 g Brombenzaldehyd (5,40 mmol) wird zusammen mit 1,11 ml 2,4-Dimethylpyrrol (10,80 mmol) unter Argonatmosphäre in 50 ml trockenem Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von einem Tropfen trockener TFA als Katalysator wird der Ansatz über 18 Stunden gerührt. Direkt nach Zugabe der TFA setzt ein Farbumschlag von hellgelb zu einem tiefen rot-violett ein. Nach 18,5 Stunden Rühren werden 1,23 g DDQ (5,40 mmol) zugegeben und für weitere 30 Minuten unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Dann werden bei 0 °C 10,00 ml Diisopropylethylamin und 10,00 ml $\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$ zugegeben und für weitere 45 Minuten bei Raumtemperatur weitergerührt. Der Ansatz wird dann auf 50 ml H_2O gegeben und die organische Phase abgetrennt und mit Na_2SO_4 getrocknet. Durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 mit 100% Dichlormethan als Laufmittel wird als grün-gelb fluoreszierender, violetter Feststoff erhalten.

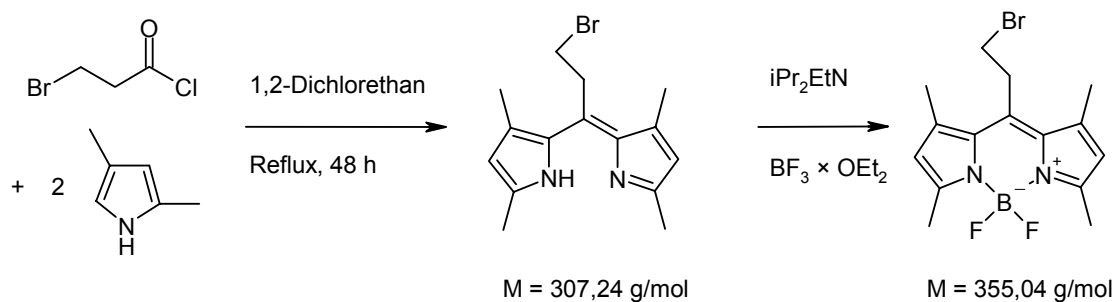
Ausbeute: 24 % (1,30 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3):



Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	7,658	d	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,25$
b	7,188	d	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,25$
c	2,576	s	6 H	-
d	6,019	s	2 H	-
e	1,442	s	6 H	-

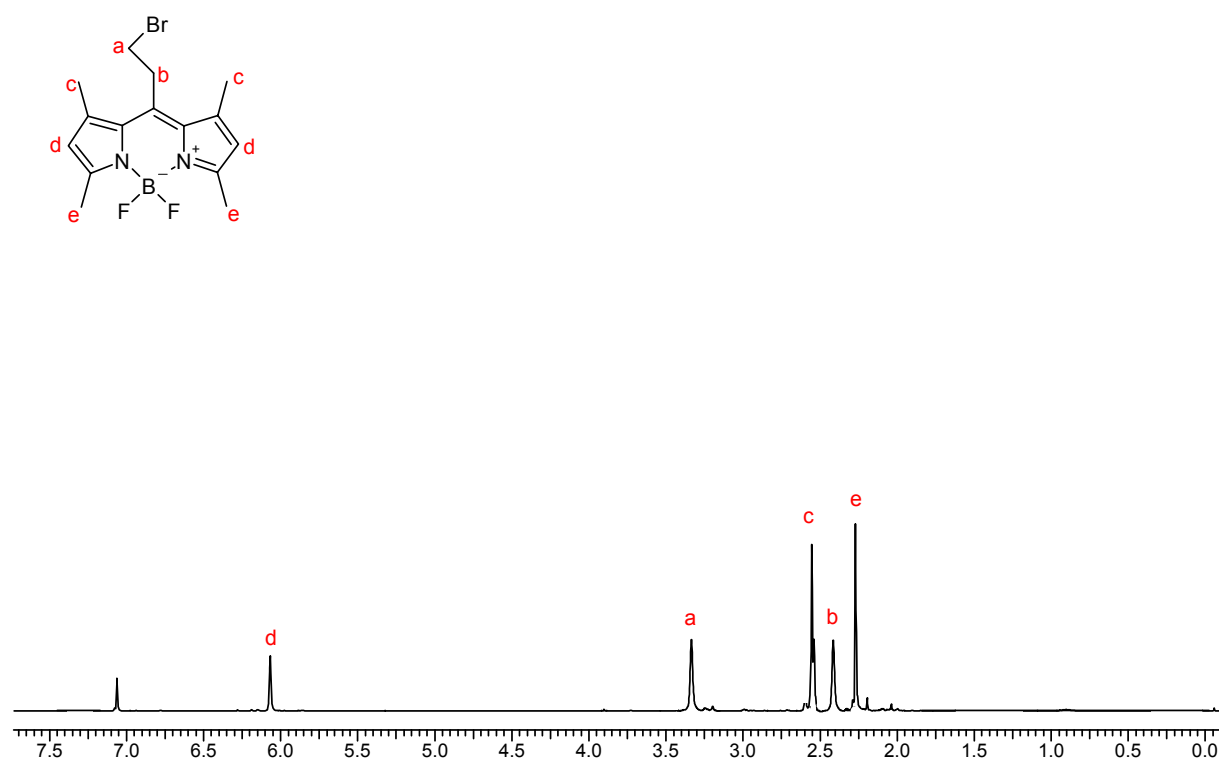
5.4.2.2 Synthese von 8-(2-Bromethyl)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (BE-BODIPY)



504 μl 3-Brompropionsäurechlorid (5,00 mmol) werden zusammen mit 1,03 ml 2,4-Dimethylpyrrol (10,00 mmol) in 50 ml 1,2-Dichlorethan gelöst und für 48 Stunden unter Argonatmosphäre zum Rückfluss erhitzt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 10,00 ml Diisopropylethylamin versetzt. Nach weiteren 5 Minuten gibt man 10,00 ml $\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$ zu und lässt für weitere 40 Minuten bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre rühren. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der Ansatz durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 mit 100% Dichlormethan als Laufmittel aufgearbeitet. Das Rohprodukt wird durch eine weitere Chromatographie mit 3 : 1 Pentan und Ethanol als Laufmittel aufgereinigt. Man erhält als grün-gelb fluoreszierenden, violetten Feststoff.

Ausbeute: 15 % (0,77 mmol)

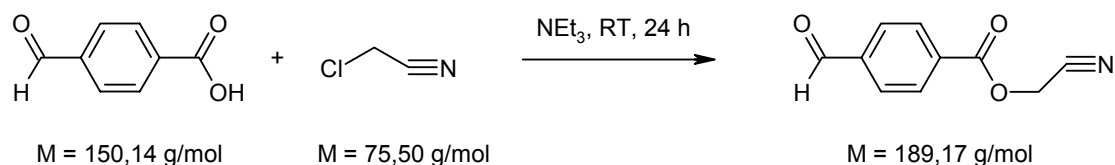
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3):



Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	3,340	m	2 H	-
b	2,433	m	1 H	-
c	2,554	s	6 H	-
d	6,067	s	2 H	-
e	2,269	s	6 H	-

5.4.2.3 Synthese von 8-(4-Benzoessäurecyanomethylester)-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen (Cyanomethyl-BODIPY)

5.4.2.3.1 Synthese von 4-Formyl-benzoessäurecyanomethylester

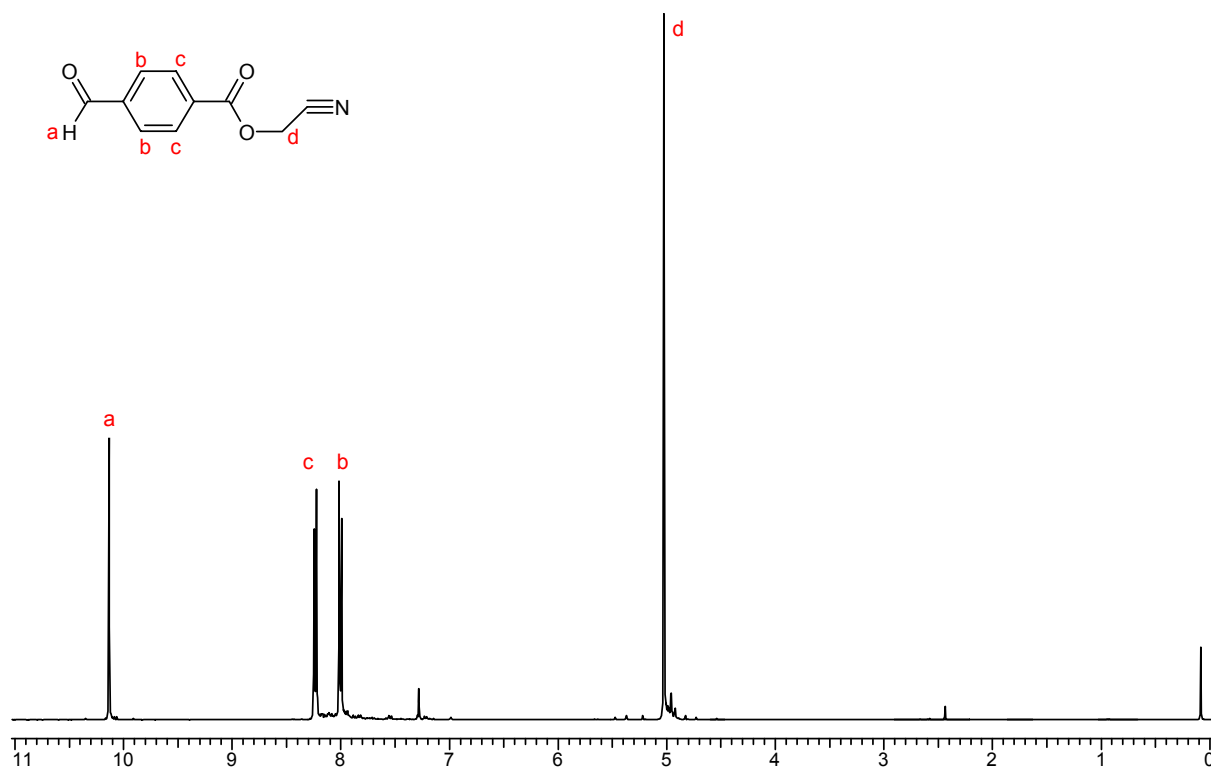


10,68 g Carboxybenzaldehyd (71,00 mmol) werden bei 0 °C unter Argonatmosphäre in 50 ml Triethylamin gelöst. Dann werden 8,98 ml Chloracetonitril (142,00 mmol) zugegeben und für eine Stunde bei 0 °C weitergerührt. Danach wird der Ansatz für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit hat sich ein brauner, sehr fester Niederschlag im Kolben gebildet, der durch Zugabe von 150 ml Ethylacetat und 30 Minuten rühren gelöst wird. Die Lösung wird filtriert und die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgetrennt. Nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum erhält man 4-Formylbenzoessäurecyanomethylester als braunes Öl.

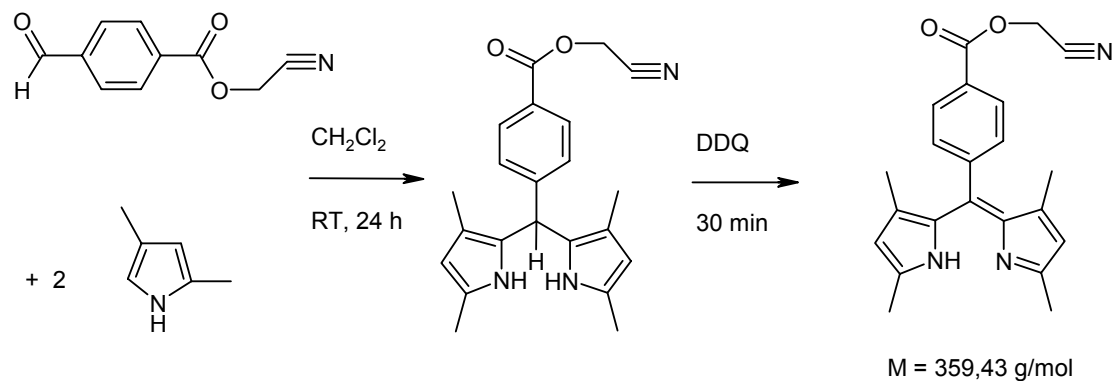
Ausbeute: 68,5 %

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3):

Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	10,134	s	1 H	-
b	8,012	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,44$
c	8,225	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,44$
d	5,208	s	2 H	-



5.4.2.3.2 Synthese von Cyanomethyl-4-[(Z)-(3,5-dimethyl-1*H*-pyrrol-2-yl)-(3,5-dimethyl-2*H*-pyrrol-2-yliden)methyl]benzoat

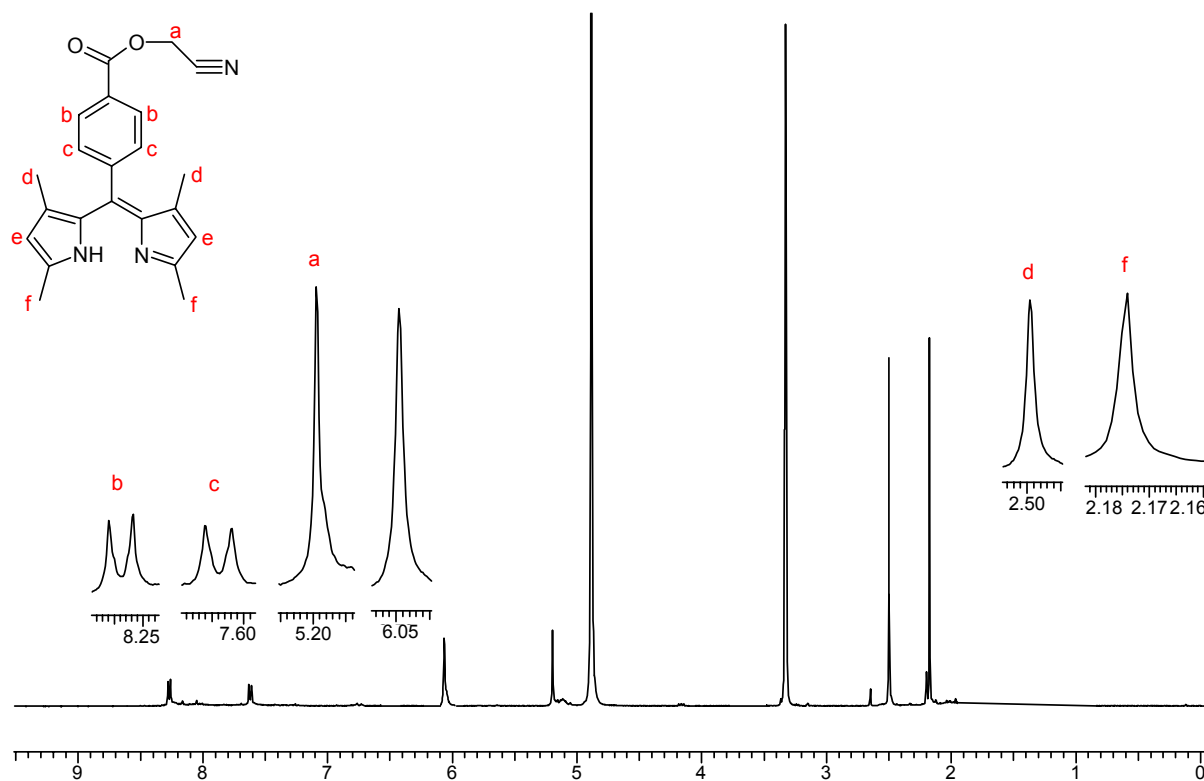


945,00 mg 4-Formylbenzoesäurecyanomethylester (5,00 mmol) werden zusammen mit 1,03 ml 2,4-Dimethylpyrrol (10,00 mmol) in 200 ml trockenem Dichlormethan unter Argonatmosphäre gelöst und mit einem Tropfen trockener TFA als Katalysator versetzt. Die anfänglich gelb-braune Lösung beginnt sich direkt nach Zugabe der TFA violett zu färben. Der Ansatz wird für 24 Stunden unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit werden 1,17 g DDQ (5,00 mmol) zugegeben und für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Dann wird der Ansatz auf 50 ml Eiswasser gegeben, die organische Phase wird extrahiert und mit

Na_2SO_4 getrocknet. Durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 mit 100 % Dichlormethan als Laufmittel können Verunreinigungen entfernt werden. Das Produkt haftet als tiefvioletter Farbstoff am Kieselgel an und wird mit einer 1 : 1 Mischung aus Ethanol und Aceton vom Kieselgel gelöst.

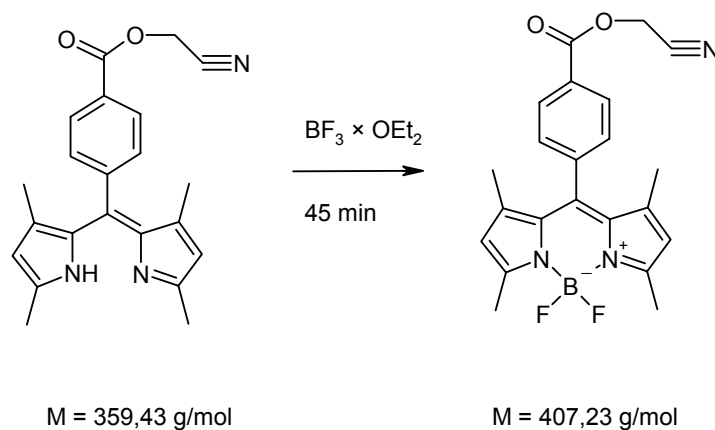
Ausbeute: 46 %

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



Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	5,198	s	1 H	-
b	8,269	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,61$
c	7,609	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,61$
d	2,498	s	6 H	-
e	6,050	s	2 H	-
f	2,175	s	6 H	-

5.4.2.3.3 Synthese von Cyanomethyl-Bodipy

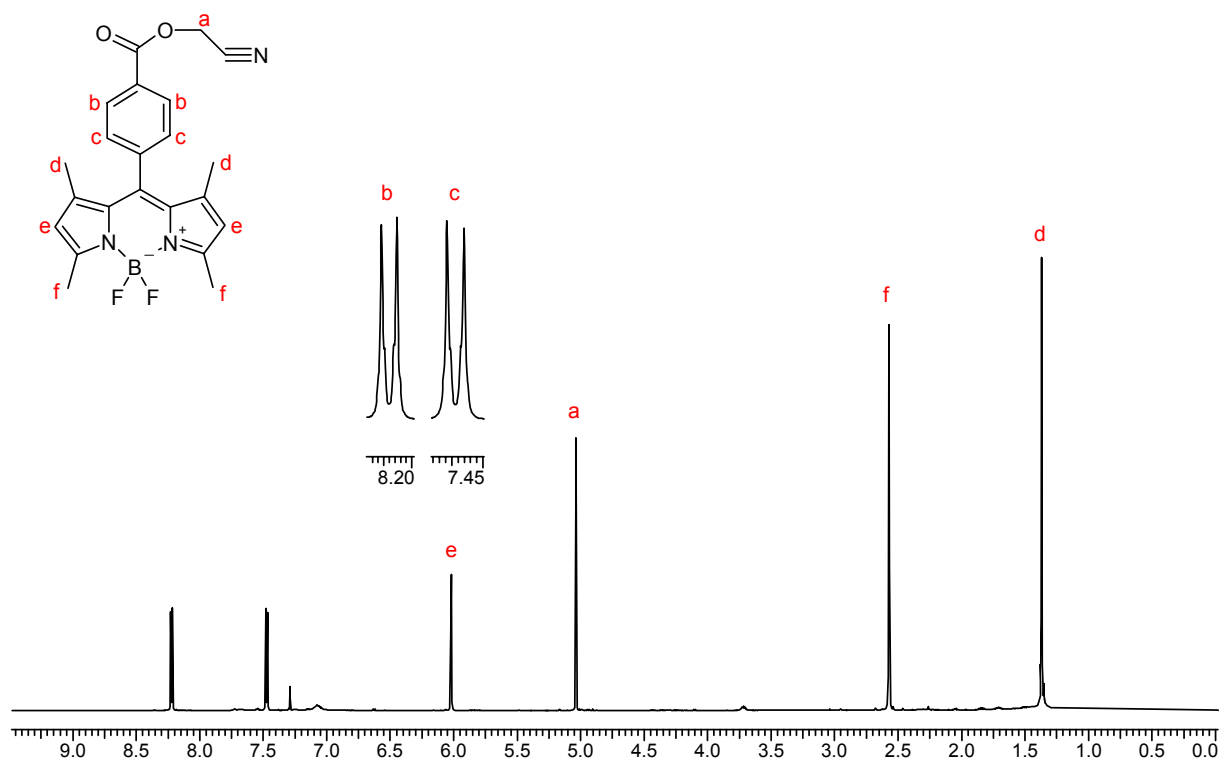


50,00 mg Dipy1 (0,14 mmol) werden in 10 ml Dichlormethan gelöst und bei 0°C mit 2,00 ml Diisopropylethylamin versetzt. Nach 5 Minuten werden 2,00 ml $\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$ zugegeben und für weitere 45 Minuten bei Raumtemperatur weitergerührt. Der Ansatz wird dann auf 50 ml H_2O gegeben und die organische Phase abgetrennt und mit Na_2SO_4 getrocknet. Durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 mit 100% Dichlormethan als Laufmittel wird das Produkt als grün-gelb fluoreszierender, violetter Feststoff erhalten.

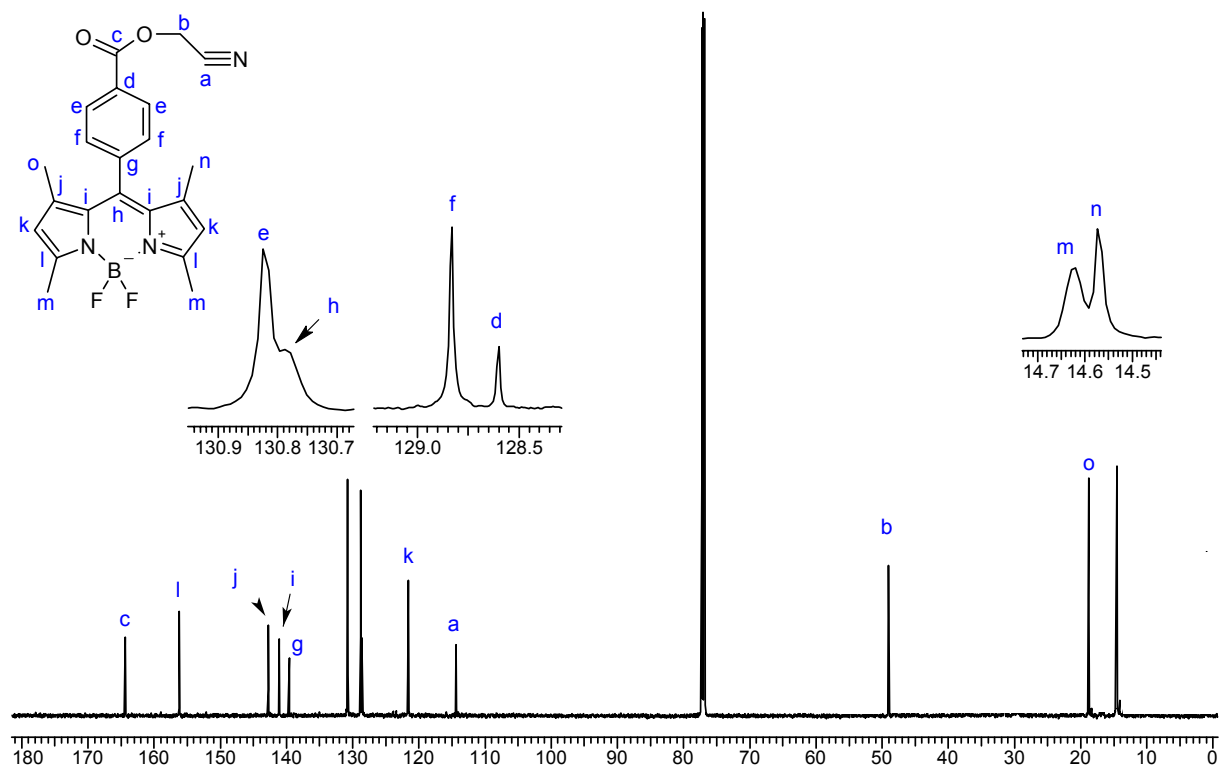
Ausbeute: 76 % (0,11 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (600,13 MHz, CDCl_3):

Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	5,035	s	2 H	-
b	8,220	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,32$
c	7,472	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,32$
d	1,370	s	6 H	-
e	6,018	s	2 H	-
f	2,570	s	6 H	-



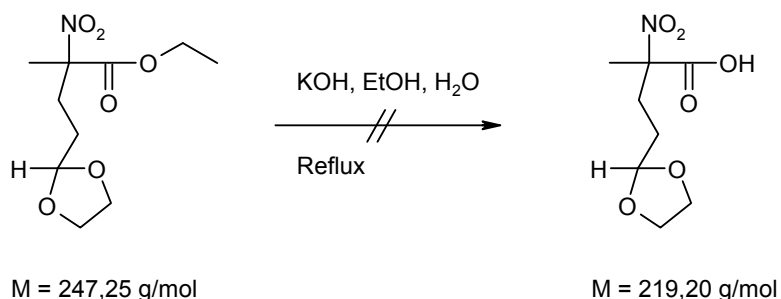
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (150,90 MHz, CDCl_3):



Signal	δ [ppm]
a	114,370
b	49,090
c	164,380
d	128,600
e	130,820
f	128,830
g	139,600
h	130,790
i	141,160
j	142,790
k	121,650
l	156,22
m	14,625
n	14,570
o	18,810

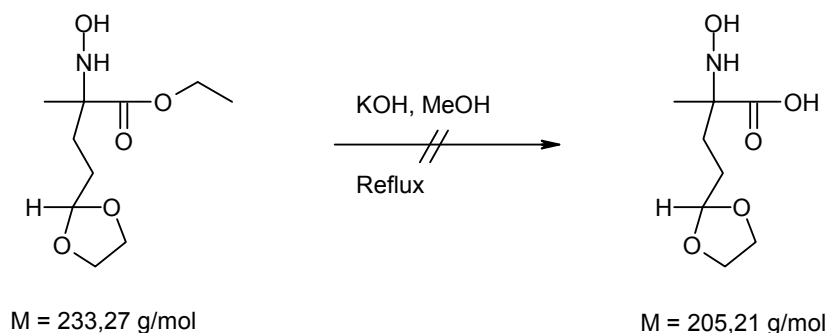
5.4.3 EMPO-Umsetzungen

5.4.3.1 Umsetzungen vor Erreichen der Nitronstufe



Basische Esterspaltung auf Stufe des Dioxolangeschützten Michael-Produkts:

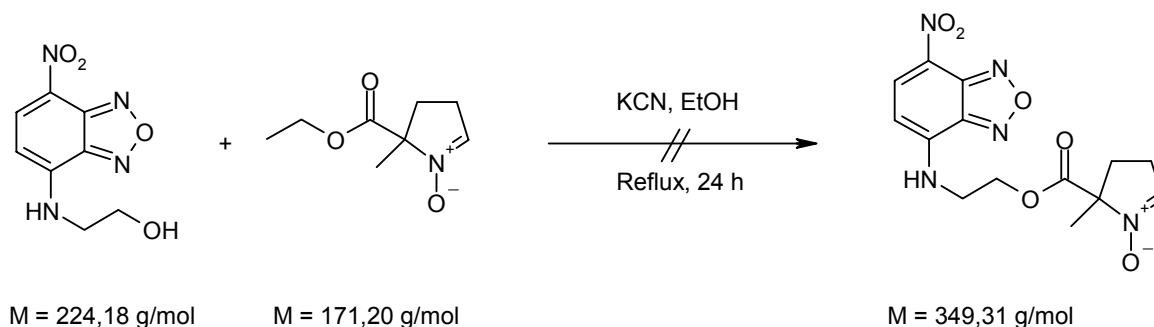
604,00 mg des Dioxolans (2,44 mmol) werden mit 137,00 mg KOH (2,44 mmol) in einer 1 : 2 Mischung aus Ethanol und Wasser für 4 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Die rotbraune Reaktionsmischung wird dann im Eisbad mit HCl neutralisiert, wobei sie sich gelb-braun färbt. Man extrahiert mit Diethylether, trennt die Phasen und trocknet die organische Phase mit CaCl_2 . Das verbleibende braune Öl zeigt im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nur Zersetzungsprodukte.



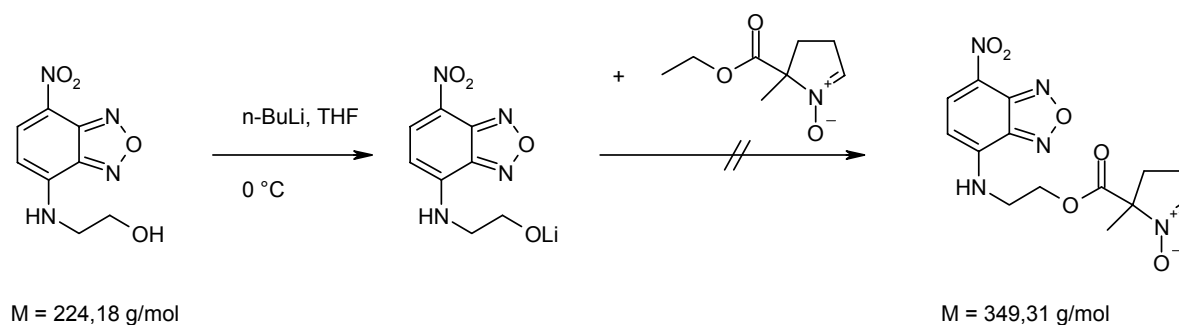
Basische Esterspaltung auf Stufe des Dioxolangeschützten Hydroxylamins:

500,00 mg des Hydroxylamins (2,14 mmol) werden mit 120,00 mg KOH (2,14 mmol) in 10 ml Methanol für eine Stunde zum Rückfluss erhitzt. Die rotbraune Reaktionsmischung wird dann im Eisbad mit HCl neutralisiert, wobei sie sich gelb-braun färbt. Man extrahiert mit Diethylether, trennt die Phasen und trocknet die organische Phase mit CaCl_2 . Das verbleibende braune Öl zeigt im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nur Zersetzungsprodukte.

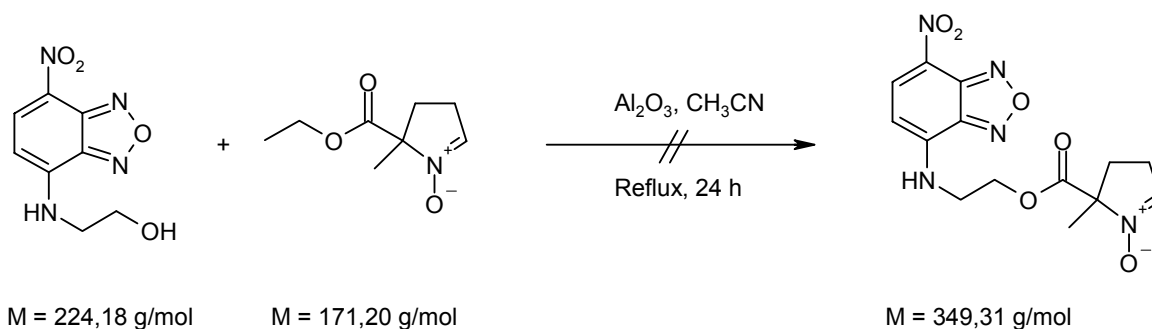
5.4.3.2 Umsetzungen auf Nitronstufe



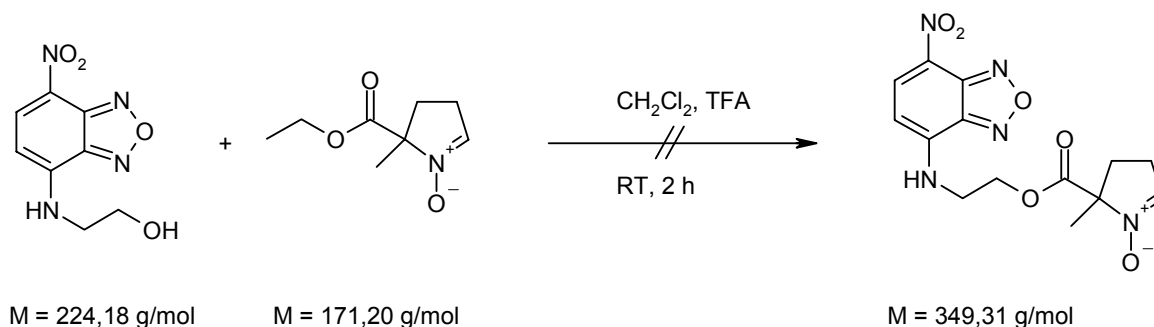
140,00 mg EMPO (0,82 mmol) werden mit 144,00 mg 2-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol (0,64 mmol) und 50,00 mg KCN (0,77 mmol) in 25 ml Ethanol unter Argonatmosphäre für 24 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wird dann mit 1g $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ gelöst in 1 ml H_2O versetzt, um KCN bzw. HCN zu entfernen. Nach Filtration des entstehenden Niederschlags erhält man eine klare orangene Lösung. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer und der Hochvakuumpumpe verbleibt ein roter Feststoff. DC-Proben des Ansatzes zeigen mehrere schwach fluoreszierende Banden. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Rohproduktes zeigt nur Zersetzungsprodukte.



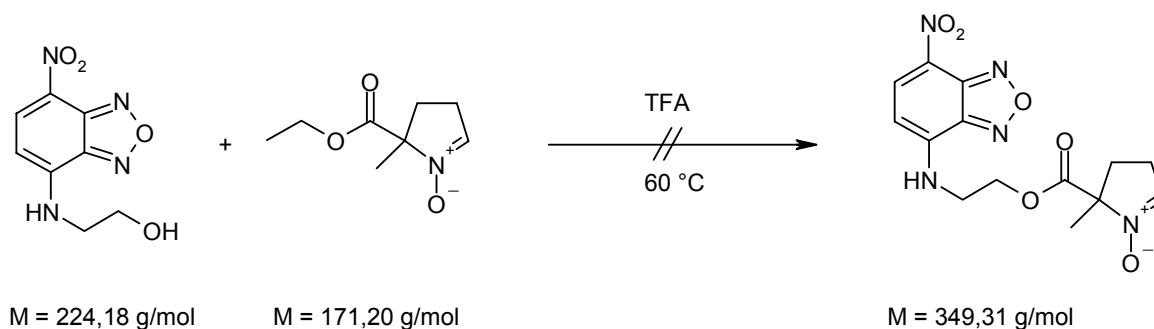
100,00 mg 2-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol (0,45 mmol) werden in 20 ml THF gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Dann werden langsam 280 μl einer 1M n-Butyllithium-Lösung in Hexan zugegeben und die Mischung für 10 Minuten gerührt. Hierzu werden 76,30 mg EMPO (0,45 mmol) gegeben und der Ansatz für 1,5 Stunden im Eisbad bei 0 °C gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der entstandene Niederschlag abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet. DC-Proben des Ansatzes zeigen mehrere schwach fluoreszierende Banden. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Rohproduktes zeigt nur Zersetzungsprodukte.



100,00 mg 2-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol (0,45 mmol) werden in 80 ml Acetonitril gelöst und mit 10,00 g Al_2O_3 (98,07 mmol) sowie 50,00 mg EMPO (0,29 mmol) versetzt. Der Ansatz wird für 24 Stunden unter Argon-Atmosphäre zum Rückfluss erhitzt. Nach Abfiltrieren des Al_2O_3 wird das Lösungsmittel abrotiert. Nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum zeigen DC-Proben des Ansatzes mehrere schwach fluoreszierende Banden. Das ^1H -NMR-Spektrum des Rohproduktes zeigt nur Zersetzungsprodukte der Edukte.

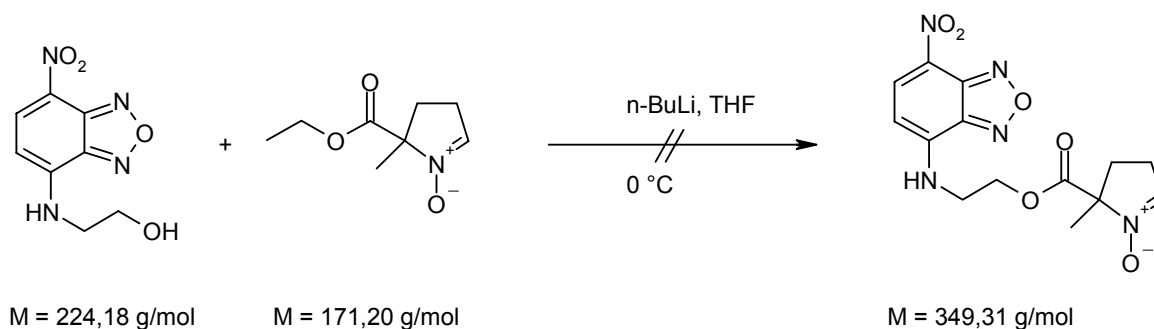


125,00 mg EMPO (0,73 mmol) werden unter Argon-Atmosphäre in 10 ml trockenem CH_2Cl_2 gelöst und 5 ml trockene TFA zugegeben. Nach 5 Minuten rühren werden 225,00 mg 2-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol (1,00 mmol) zugegeben und für weitere 2 Stunden gerührt. Nach Entfernen der Lösungsmittel-TFA-Mischung im Hochvakuum verbleibt ein braunes Öl. DC-Versuche zeigen mehrere zum Teil fluoreszierende Banden. Die Trennung durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 mit 19 : 1 CH_2Cl_2 und Methanol liefert 3 Fraktionen. Die zugehörigen ^1H -NMR-Spektren zeigen nur Zersetzungsprodukte des Farbstoffs.

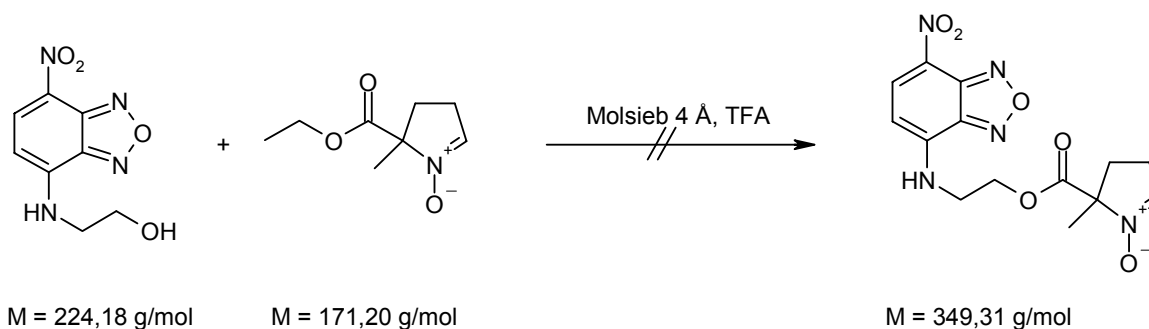


139,00 mg EMPO (0,81 mmol) werden unter Argonatmosphäre in 15 ml trockener TFA gelöst. Nach 5 Minuten Rühren werden 141,00 mg 2-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol (0,62 mmol) zugegeben und für weitere 5 Stunden bei 60 °C gerührt. Nach Entfernen der TFA im Hochvakuum verbleibt ein braunes Öl. DC-Versuche zeigen eine sehr dünne fluoreszierende Bande zwischen den Eduktbanden.

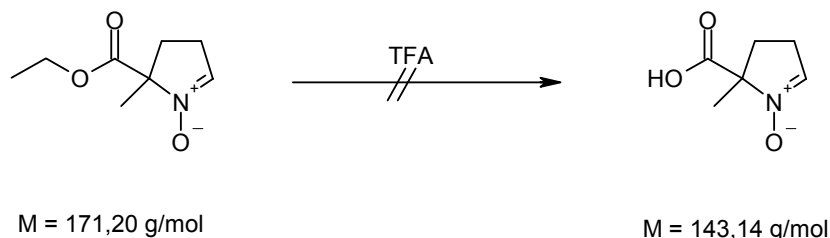
Um größere Mengen der fluoreszierenden Bande zu erhalten wurde dieser Versuch mit gleichen Ansatzgrößen und –verhältnissen mehrfach wiederholt, wobei die Reaktionszeit variiert wurde. Rührzeiten von 2, 5, 10, 24, 48 und 120 Stunden bringen ebenso, wie eine stufenweise Temperaturerhöhung bis zum Rückfluss, keine Veränderungen im Produktbild.



60,00 mg EMPO (0,35 mmol) werden zusammen mit 66,00 mg 2-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol (0,29 mmol) in 20 ml THF gelöst und bei 0 °C mit 1,00 ml einer 1M n-Butyllithium-Lösung in Hexan versetzt. Die Mischung wird für 30 Minuten bei 0 °C gerührt und dann auf RT erwärmt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird das Lösungsmittel abfiltriert und im das verbleibende Öl im Hochvakuum getrocknet. DC-Proben des Ansatzes zeigen mehrere verschmiert laufende, schwach fluoreszierende Banden. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Rohproduktes zeigt nur Zersetzungsprodukte.

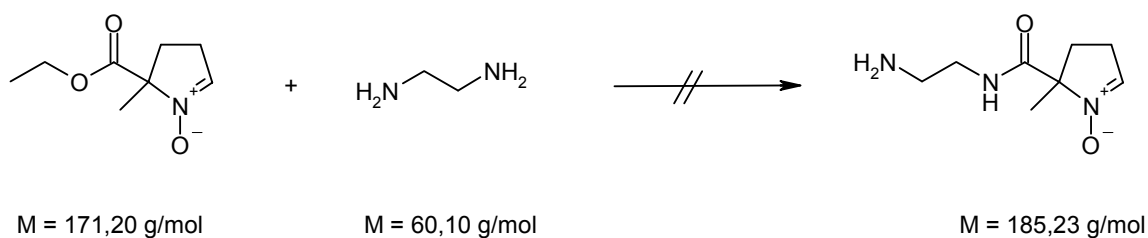


200,00 mg EMPO (1,16 mmol) werden zusammen mit 260,00 mg 2-[(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol (1,16 mmol) und 2,00 g gemörsertem 4 Å-Molsieb in 20 ml TFA gelöst und unter Argon-Atmosphäre für 4 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Man erhält nach Entfernen der TFA im Hochvakuum ein braunes Öl. DC-Versuche zeigen eine sehr dünne fluoreszierende Bande zwischen den Eduktbanden. Die Wiederholung des Versuchs mit auf 4 Tage verlängerter Reaktionszeit liefert allerdings keine höhere Ausbeute dieser Bande und führt zusätzlich zur vollständigen Zersetzung des Molsiebs in eine schleimige Masse. $^1\text{H-NMR}$ -Spektren zeigen nur Zersetzungsprodukte der Edukte.



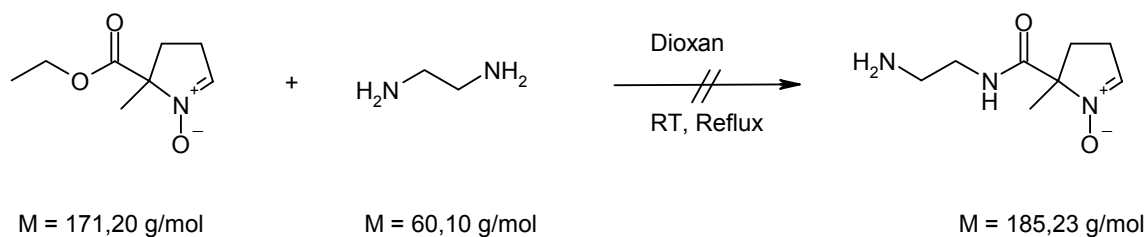
Stabilitäts- und Spaltungstests mit EMPO in TFA:

100,00 mg EMPO werden in 5 ml TFA gelöst und für 24 Stunden gerührt. Nach Abtrennen der TFA im Hochvakuum erhält man im zugehörigen $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ausschließlich die Signalsätze von EMPO. Die Wiederholung des Versuchs bei Rührzeiten von 2, 5, 10, 24, 48 und 120 Stunden bringen ebenso, wie eine stufenweise Temperaturerhöhung bis zum Rückfluss, keine Veränderungen.



Umsetzung von EMPO mit 1,2-Diaminoethan:

200,00 mg EMPO (1,17 mmol) werden für 3 Stunden in 10 ml 1,2-Diaminoethan gerührt. Da keine Umsetzung in der DC-Kontrolle erkennbar ist, wird der Ansatz sukzessive länger gerührt, bis nach 48 Stunden Rührzeit mit dem Erhitzen angefangen wird. Bis zum Erreichen des Rückfluss ändert sich das Produktbild auch hier nicht. Nach 1 Stunde bei 116 °C erhält man jedoch nur noch eine schmierige Bande auf der DC-Platte. Im zugehörigen $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigen sich ausschließlich Zersetzungsprodukte.

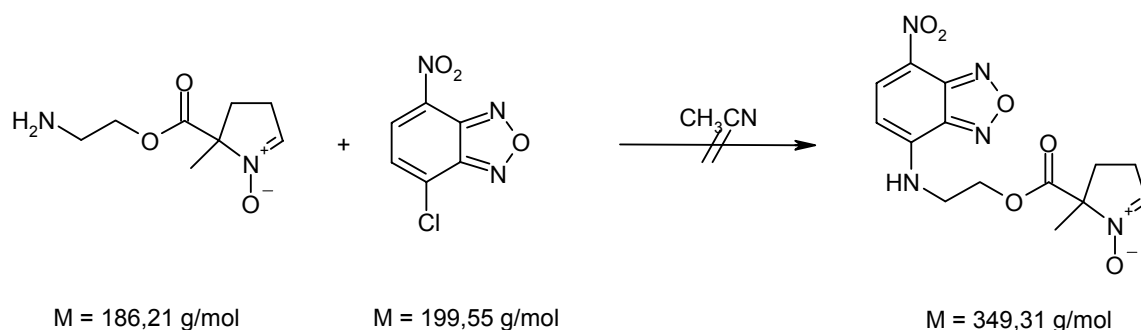


100,00 mg EMPO (0,58 mmol) werden in 20 ml Dioxan gelöst und mit 39,00 μl 1,2-Diaminoethan versetzt. Nach 2 Stunden Rühren bei RT zeigt sich auf der DC-Platte keine Umsetzung. Der Ansatz wird sukzessive länger gerührt, bis nach 48 Stunden Rührzeit mit dem Erhitzen angefangen wird. Auch nach 2 Stunden bei Rückfluss ändert sich das Produktbild nicht. Es findet keine Umsetzung statt. Wiederholung des Versuchs mit anderen Lösungsmitteln bringt ebenfalls keine Umsetzung.

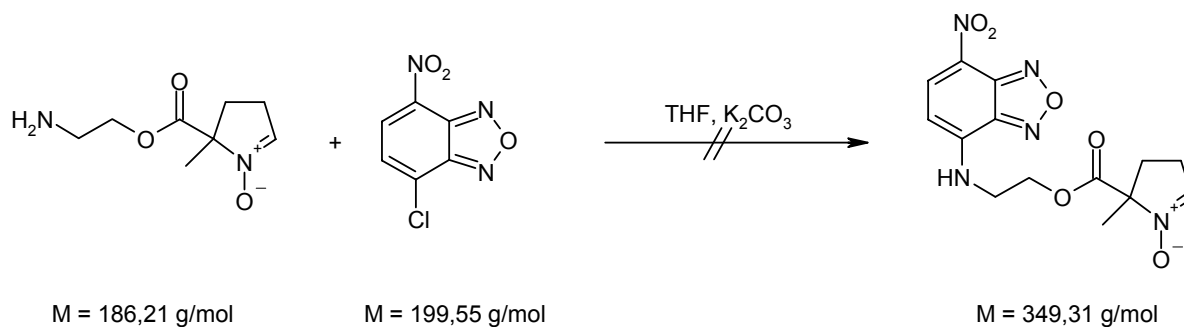
Umsetzungen von EMPO mit verschiedenen Basen zwecks Esterspaltung führen entweder zur Zersetzung des EMPO oder zeigen keine Wirkung!

Base	Rührzeit [h]	Temperatur	Ergebnis
NaOMe	2 / 12	RT	Keine Umsetzung
NaOMe	12 / 12	Rückfluss in THF	Keine Umsetzung
NEt ₃	1	RT	Zersetzung
(iPr) ₂ NEt	1	RT	Zersetzung
DABCO	1	RT	Keine Umsetzung
DBU	2	RT	Keine Umsetzung
TBD	2 / 12 / 24	RT	Keine Umsetzung
TBD	2 / 12 / 24	Rückfluss in THF	Keine Umsetzung

5.4.4 Umsetzungen von AEMPO



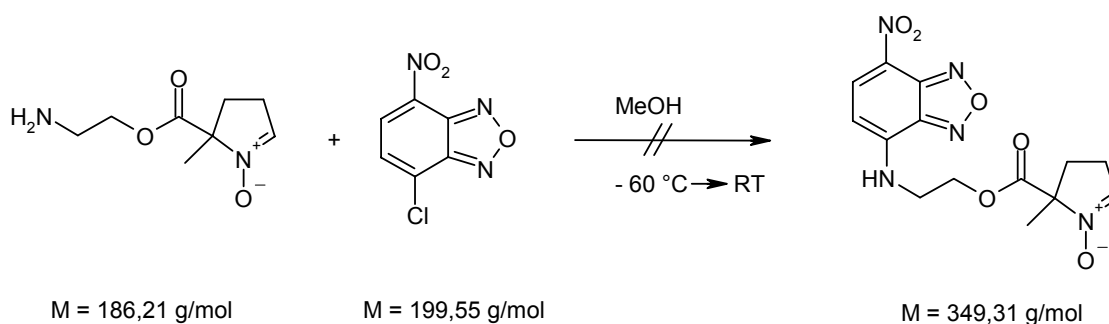
720,00 mg AEMPO (3,87 mol) werden in 30 ml Acetonitril gelöst und hierzu eine Lösung von 670,00 mg NBD-Chlorid (3,36 mmol) in 20 ml Acetonitril über 10 Minuten zugegeben. Nach 10 Minuten wird die Reaktion durch Entfernen des Lösungsmittels im Hochvakuum gestoppt. Man erhält ein braunes Öl. DC-Versuche zeigen mehrere Banden, die teilweise gelb sind und fluoreszieren. Säulenchromatographie mit 1 : 1 Acetonitril und Wasser auf einer RP18-Säule liefert 3 Fraktionen, deren $^1\text{H-NMR}$ -Spektren jedoch nur Zersetzungsprodukte des Nitrons zeigen. Wiederholungen des Versuchs mit anderen stationären Phasen (Al_2O_3 , Kieselgel 60) und anderen Lösungsmittelgemischen bringen ebenfalls keine Ergebnisse.



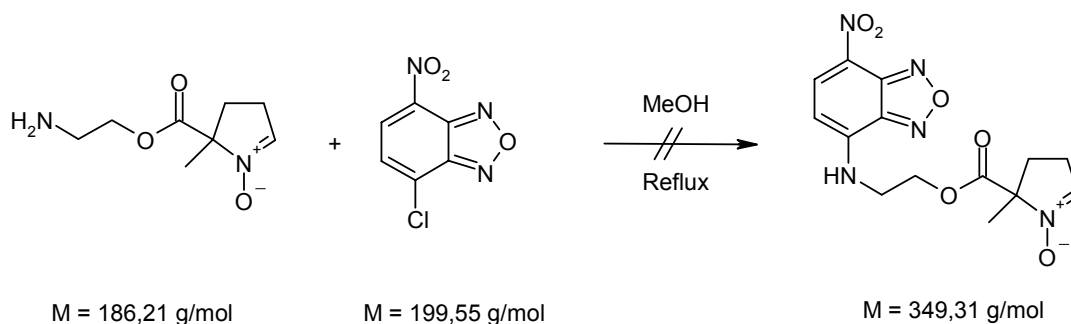
70,00 mg AEMPO (0,38 mmol) werden in 20 ml über Na/K-Legierung getrocknetem THF gelöst und auf 0°C gekühlt. Dann werden 20 ml THF mit K_2CO_3 gesättigt und zur AEMPO-Lösung zugegeben. Nach Zugabe von 76,00 mg NBD-Chlorid (0,38 mmol) wird der Ansatz für 30 Minuten bei 0°C gerührt. Da augenscheinlich keine Umsetzung stattfindet, wird der Ansatz auf Raumtemperatur erwärmt und 30 Minuten gerührt, schließlich wird auf 50°C erwärmt und für 30 Minuten gerührt. Die Lösung färbt sich orange. Das Lösungsmittel wird im Hochvakuum entfernt. DC-Versuche zeigen mehrere Banden, die teilweise gelb sind und fluoreszieren.

Säulenchromatographie mit 4 : 1 Pentan und Aceton auf einer Kieselgel 60-Säule liefert 2 Fraktionen, deren $^1\text{H-NMR}$ -Spektren jedoch nur Zersetzungsprodukte des Nitrons zeigen.

Wiederholungen des Versuchs unter Zugabe von Basen (*i*Pr₂EtN, Et₃N, DABCO, DBU, TBD, Borax, NaOMe) bringen bei gleicher Variation der Rührzeiten und Temperaturen ebenfalls keine Ergebnisse. Als Besonderheit: PL-TBD reagiert selektiv mit NBD-Chlorid ab, wodurch bei einer Umsetzung mit PL-TBD-Überschuss alles AEMPO zurückgewonnen werden konnte.



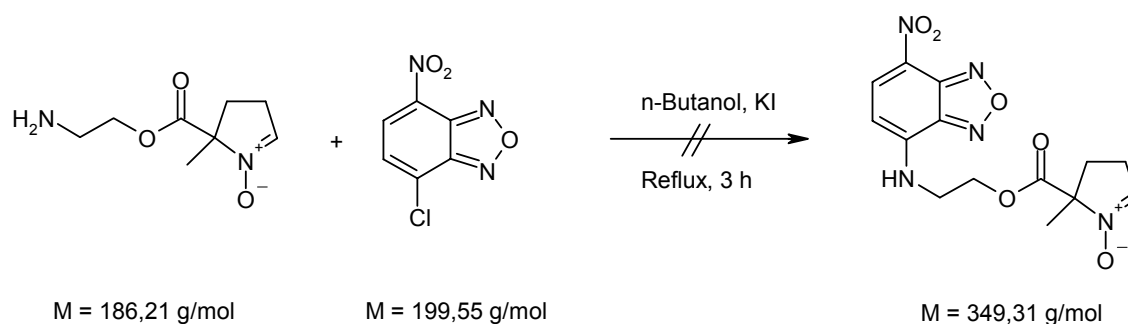
115,10 mg AEMPO (0,62 mmol) werden in 5 ml Methanol gelöst und auf $-60\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Dann werden 120,00 mg NBD-Chlorid (0,59 mmol) gelöst in 5 ml Methanol zugetropft und der Ansatz auf Raumtemperatur erwärmt (Dauer: 6 Stunden). Die hellgelbe Lösung zeigt keinerlei Umsetzung bei DC-Kontrolle. Erst bei Temperaturen $> 20\text{ }^\circ\text{C}$ setzt eine Umsetzung ein. Nach 12 Stunden Rühren bei Raumtemperatur wird die nun tiefrote Lösung auf einer DC-Platte aufgetrennt und liefert 4 teilweise fluoreszierende Banden. Eine Auftrennung des Ansatz auf Kieselgel 60 mit 1 : 1 Pentan und Ethanol liefert 4 Fraktionen, die alle nur in $^1\text{H-NMR}$ -Spektren Zersetzungsprodukte des Nitrons zeigen.



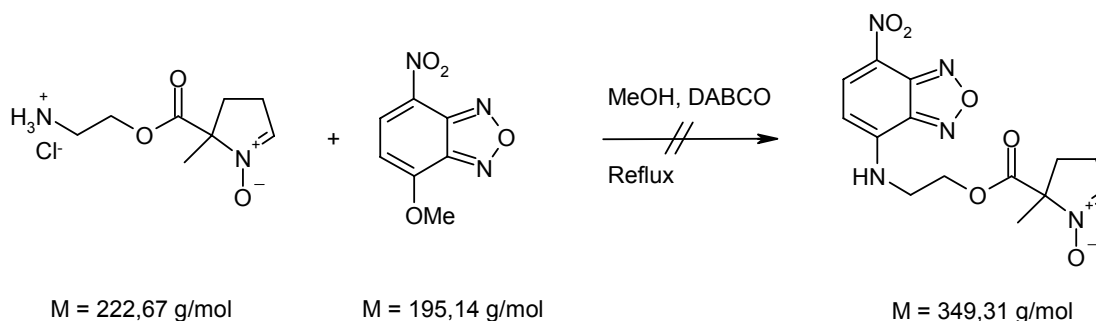
105,00 mg BocAEMPO (0,37 mmol) werden zusammen mit 75,00 mg NBD-Chlorid (0,37 mmol) in 20 ml trockenem Methanol gelöst und zum Rückfluss erhitzt. Bei Erreichen des Rückfluss werden tropfenweise 1 ml trockene TFA zugegeben. Sofort bei Zugabebeginn färbt sich der

Ansatz dunkelrot. DC-Kontrolle über 50 Stunden Reaktionszeit hinweg zeigt die Bildung mehrerer Banden, von der eine dominiert und auch fluoresziert. Eine Trennung des Ansatz auf Kieselgel 60 mit 1 : 1 Pentan und Ethanol ergibt 5 Fraktionen, deren $^1\text{H-NMR}$ -Spektren jedoch nur Zeretzungsprodukte des Nitrons zeigen.

Wiederholungen des Versuch mit kürzeren Reaktionszeiten, niedrigeren Temperaturen sowie als Variante mit Ethanol als Lösungsmittel bringen dieselben Resultate.

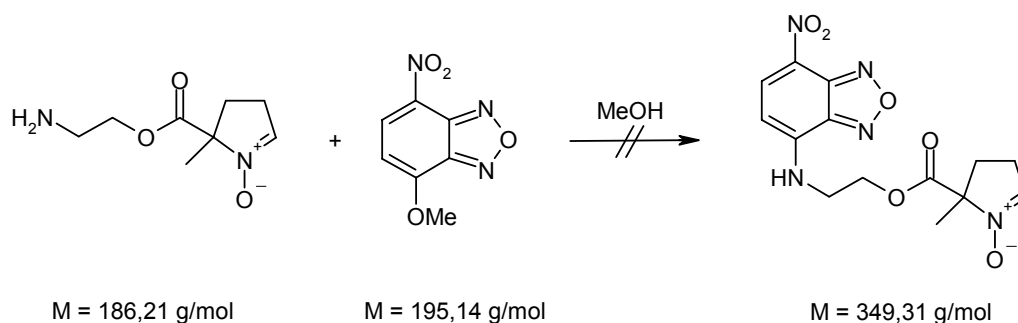


223,45 mg AEMPO (1,10 mmol) werden zusammen mit 219,50 mg NDB-Chlorid (1,10 mmol) in 10 ml n-Butanol gelöst und mit 5,0 mg KI versetzt. Der Ansatz wird für 3 Stunden unter Argonatmosphäre zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen werden 150 ml Diethylether zugegeben und die tiefrote Lösung über Nacht bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Es entsteht ein Niederschlag, der abfiltriert und mit Diethylether gewaschen wird. Der Durchfluss wird einrotiert und wie der Niederschlag im Hochvakuum getrocknet. $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der beiden Fraktionen zeigen jedoch nur Zeretzungsprodukte.



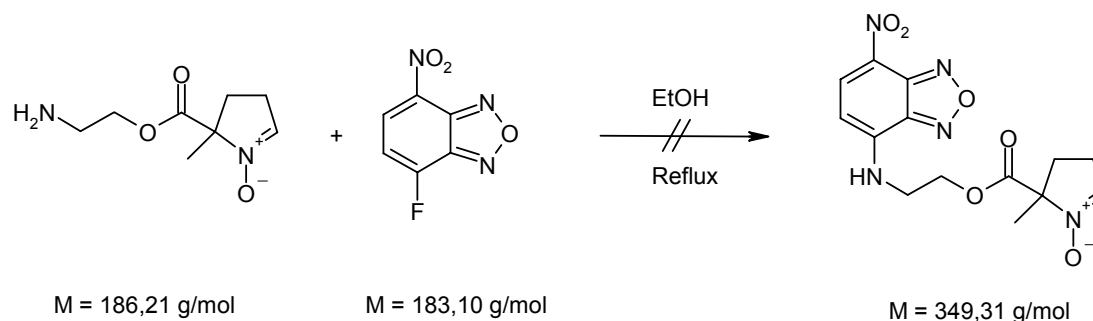
359,00 mg NBD-Chlorid (1,80 mmol) werden in 10 ml Methanol gelöst. 340,00 mg AEMPO (1,80 mmol) werden mit $152,00\ \mu\text{l}$ 12 M HCl zum Hydrochlorid umgesetzt und zur NBD-Chlorid-Lösung zugegeben. Der Ansatz wird zum Rückfluss erhitzt und tropfenweise eine Lösung von

400,00 mg DABCO in 10 ml H₂O zugetropft. Nach 30 Minuten Reaktionszeit wird der Ansatz auf Eis abgekühlt. DC-Kontrolle zeigt drei Banden an. Nach Auftrennung der Banden auf Kieselgel 60 mit 1 : 1 Pentan und Ethanol werden die Fraktionen im ¹H-NMR untersucht. Alle zeigen nur Zersetzungsprodukte des Nitrons.



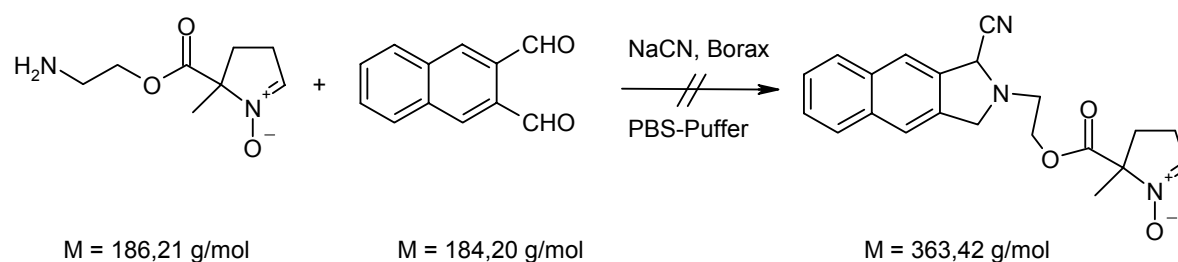
295,00 mg AEMPO (1,58 mmol) werden in 20 ml trockenem Methanol gelöst und mit 310,00 mg 4-Methoxy-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol) (1,58 mmol) versetzt. Der Ansatz wird für 48 Stunden unter regelmäßiger DC-Kontrolle gerührt, zeigt aber keine Umsetzung an. Daher wird der Ansatz für 36 Stunden zum Rückfluss erhitzt. DC-Versuche zeigen mehrere Banden, die teilweise gelb sind und fluoreszieren. Säulenchromatographie mit 9 : 1 Dichlormethan und Methanol auf einer Kieselgel 60-Säule liefert 2 Fraktionen, deren ¹H-NMR-Spektren jedoch nur Zersetzungsprodukte des Nitrons zeigen.

Wiederholungen des Versuchs unter Zugabe von Basen (K₂CO₃, *i*Pr₂EtN, Et₃N, DABCO, DBU, TBD) bringen bei gleicher Variation der Rührzeiten und Temperaturen ebenfalls keine Ergebnisse.



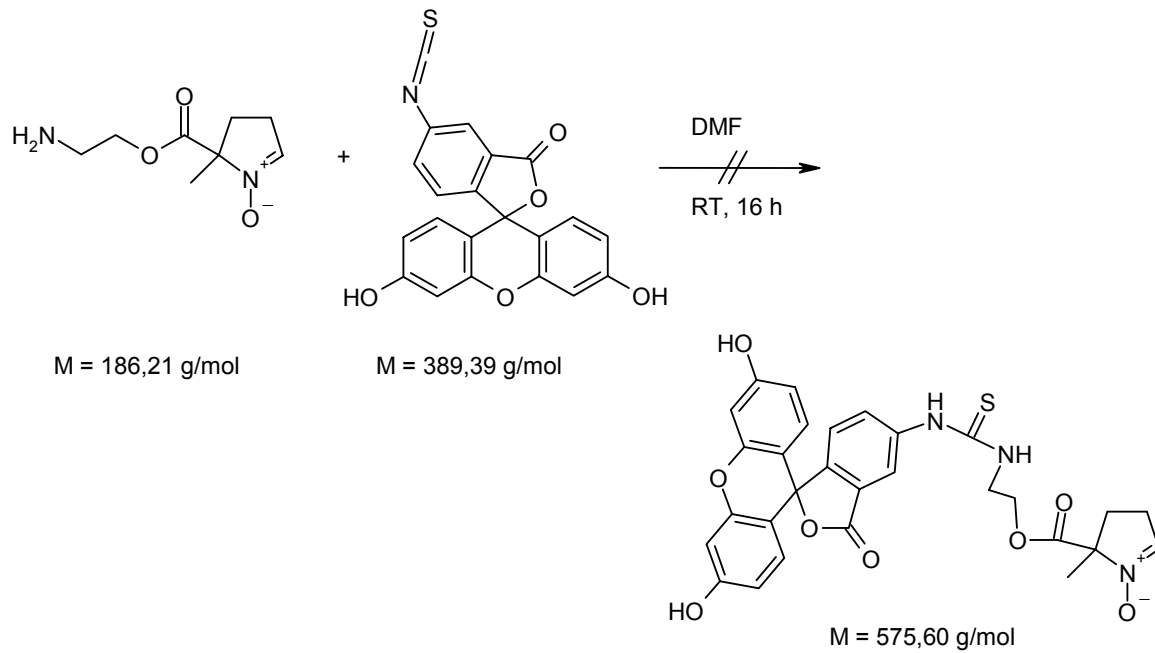
75,00 mg NBD-F (0,41 mmol) werden in 10,00 ml trockenem Ethanol gelöst und bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre eine Lösung von 78,24 mg AEMPO (0,42 mmol) in 10,00 ml Ethanol zugegeben. Der Ansatz wird für 15 Minuten zum Rückfluss erhitzt. Nach Ablauf

der Reaktionszeit wird das Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. DC-Kontrolle des Produkts liefert 6 gelbe fluoreszierende Banden. Die Auftrennung des Ansatz auf Kieselgel 60 mit 1 : 1 Dichlormethan und Ethanol liefert 6 Fraktionen, die alle nur in $^1\text{H-NMR}$ -Spektren Zersetzungsprodukte des Nitrons zeigen.

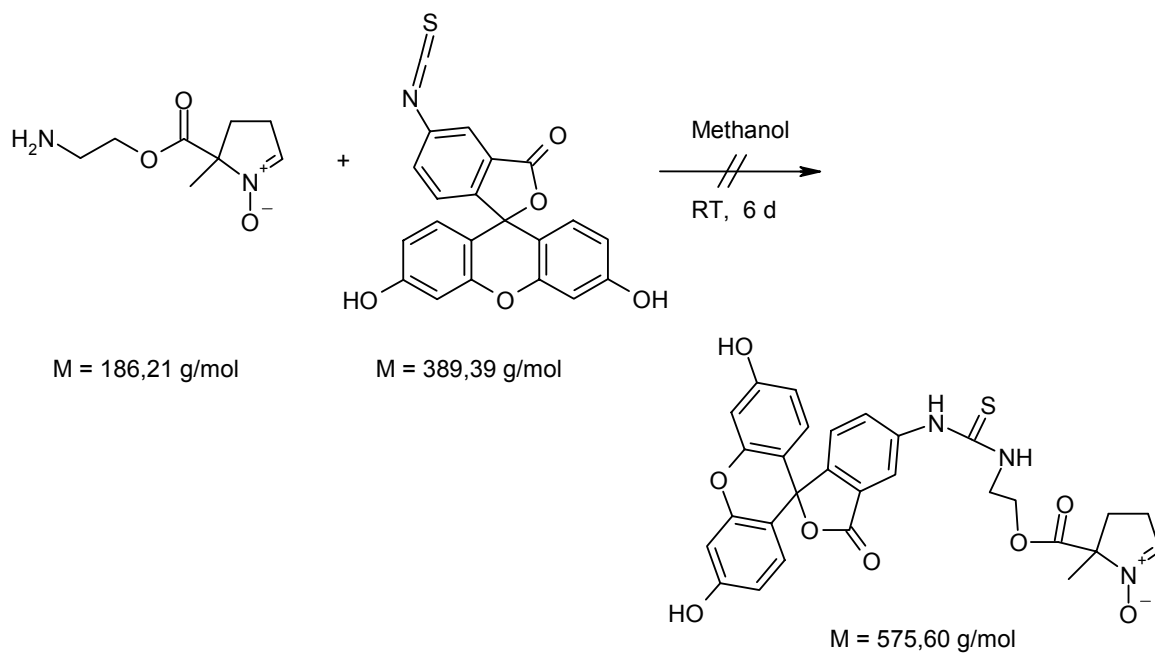


65,00 mg AEMPO (0,35 mmol) werden in 1 ml PBS-Puffer gelöst, mit 10 ml einer 0,1 M Borax-Lösung versetzt und dann 95,70 mg NDA (0,52 mmol) gelöst in 5 ml Methanol und 35,00 mg NaCN (0,71 mmol) gelöst in 1 ml H_2O zugegeben. Der Ansatz wird für 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die gelbe Suspension färbt sich innerhalb von 30 Minuten über rotbraun bis hin zu fast schwarz. Nach Extraktion mit Chloroform zeigt ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, dass NDA nicht vollständig umgesetzt wurde.

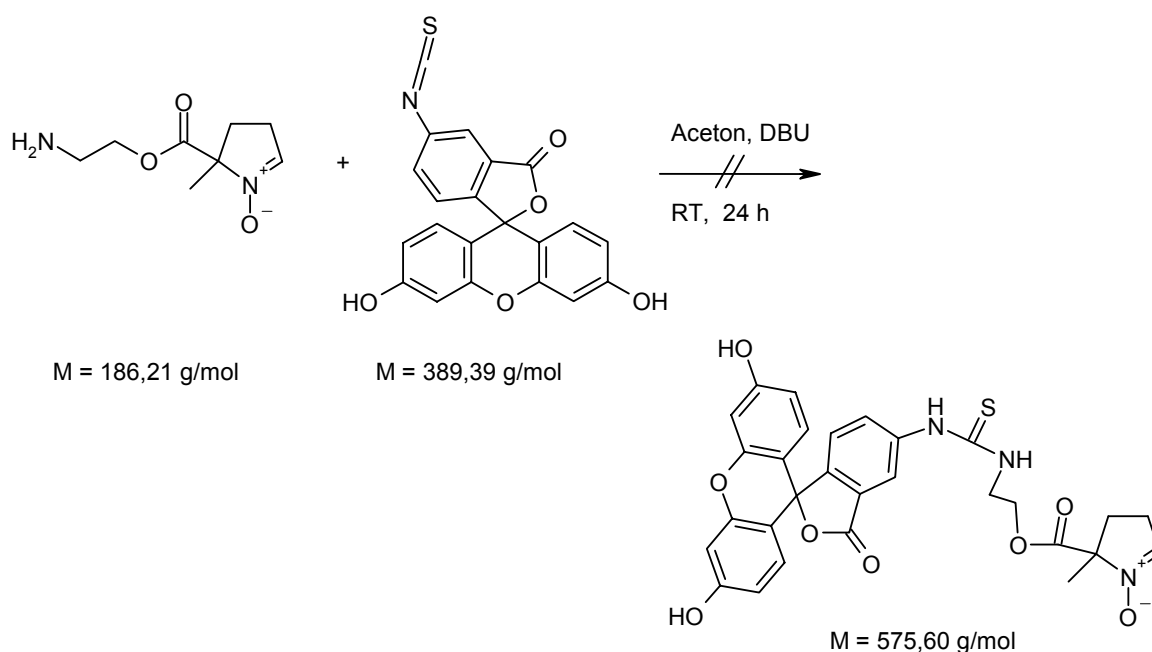
Die gleiche Ansatzgröße wird daraufhin nach obiger Vorschrift zusammengegeben und für 24 Stunden auf 60°C erhitzt. Nach der Extraktion mit Chloroform zeigt eine DC-Kontrolle vier verschiedenfarbig fluoreszierende Banden. Die Trennung des Extrakts auf Kieselgel 60 mit einem Gradienten aus Dichlormethan und Pentan (1 : 9 \rightarrow 1 : 1) gefolgt von reinem Dichlormethan und Ethanol ergibt vier Fraktionen, deren $^1\text{H-NMR}$ -Spektren jedoch nur Zersetzungsprodukte des Nitrons zeigen, wenn gleich auch NDA-Farbstoffe entstanden sind.



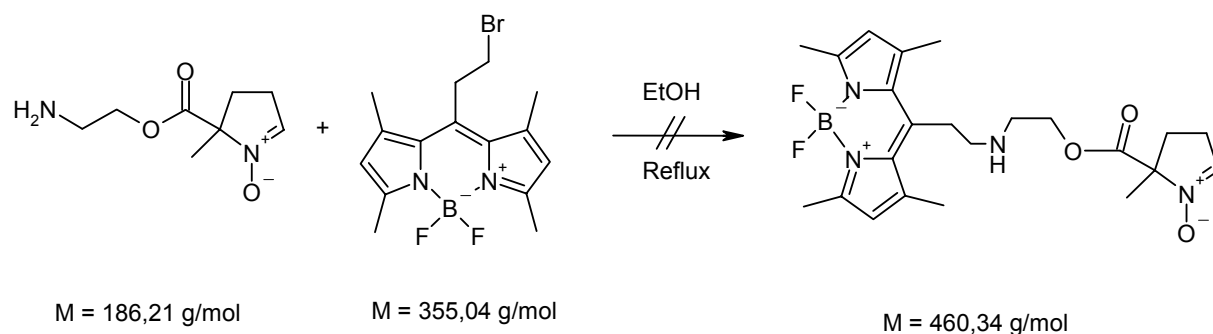
113,00 mg AEMPO (0,61 mmol) werden zusammen mit 236,3 mg FITC (0,61 mmol) in 10,00 ml DMF unter Argonatmosphäre für 16 Stunden unter Lichtausschluss gerührt. DC-Kontrolle zeigt keine Fluoreszenzbande außer die des FITC. Nach Verlängerung der Rührzeit auf 48 Stunden bildet sich ein orangner Niederschlag. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Niederschlag im Hochvakuum getrocknet. Ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt jedoch nur Zersetzungsprodukte des Nitrons, wenn gleich auch Fluorescein-Derivate vorhanden sind.



123,00 mg AEMPO (0,66 mmol) werden mit 247,30 mg FITC (0,66 mmol) in 15 ml Methanol gelöst und für insgesamt 16 Stunden bei Raumtemperatur unter ständiger DC-Kontrolle gerührt. Da keine Umsetzung zu erkennen ist, wird die Rührzeit auf insgesamt 6 Tage verlängert. Nach dieser Zeit sind auf der DC-Platte zwei orange-leuchtende, fluoreszierende Banden zu erkennen. Die Auftrennung auf Kieselgel 60 mit 1 : 1 Pentan und Ethanol liefert zwei Fraktionen. $^1\text{H-NMR}$ -Spektren zeigen jedoch nur Fluorescein-Derivate ohne jedoch Nitronsignalsätze zu zeigen.

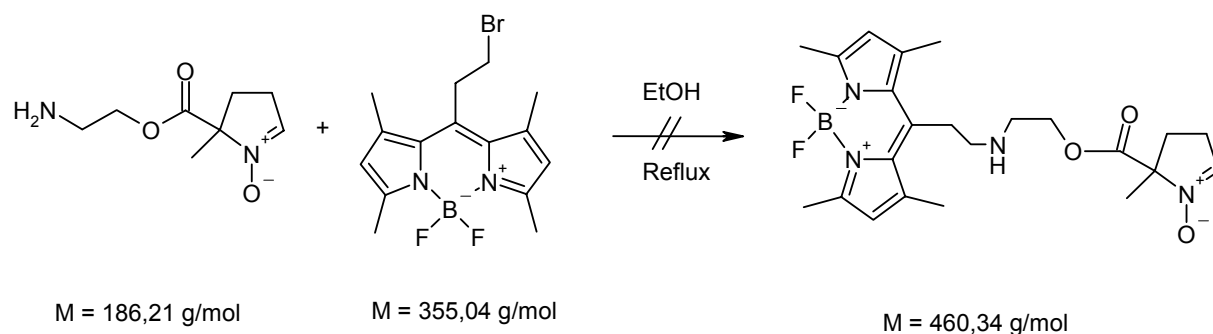


59,30 mg AEMPO (0,32 mmol) werden zusammen mit 124,00 mg FITC (0,32 mmol) und 50 μl DBU in 10 ml Aceton gelöst und bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert, mit je 20 ml Diethylether und Aceton gewaschen und mit 50 ml Methanol gelöst. Ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Probe zeigt nur FITC-Signalsätze.

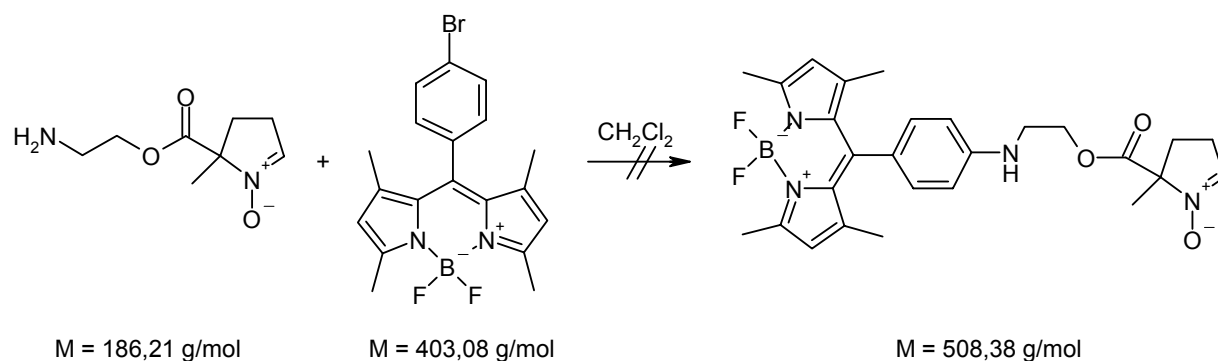


190,25 mg AEMPO (1,02 mmol) werden zusammen mit 177,75 mg BE-BODIPY (0,51 mmol) in 20 ml Ethanol gelöst und 26,00 μl DBU als Base zugegeben. Der Ansatz wird unter Argon-Atmosphäre für 2 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wird nach Ablauf der Reaktionszeit auf 10 ml H_2O gegeben und mit 50 ml Diethylether extrahiert. Die organische Phase wird mit Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Hochvakuum wird ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum gemessen. Es zeigt nur Zersetzungsprodukte.

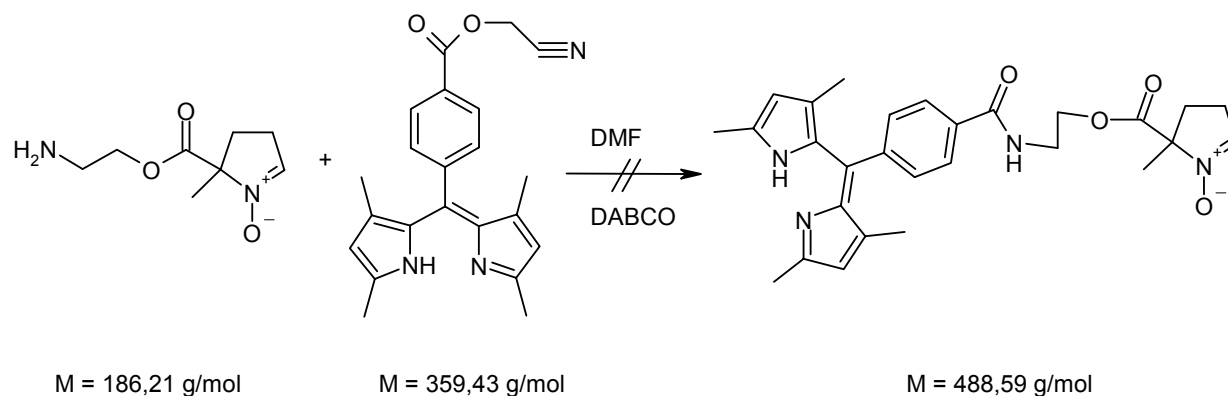
Eine analoge Versuchsdurchführung mit DMF als Lösungsmittel bei 100 °C liefert auch hier nur Zersetzungsprodukte. Diese bilden auch bei diesem Versuch auf der DC-Platte 8 Banden aus, deren Farbspektrum von gelb-grün über orange, rotviolett, grün bis hin zu braun und schwarz reicht.



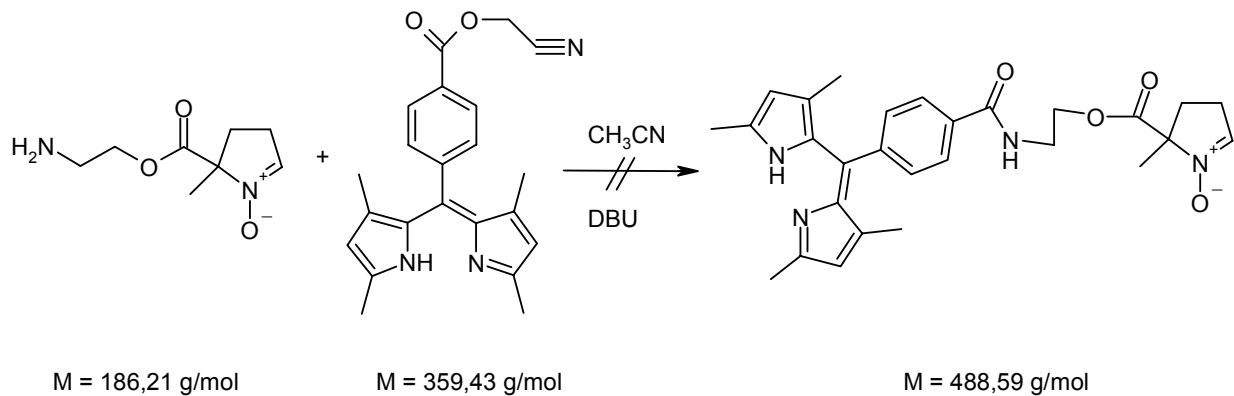
185,88 mg AEMPO (0,99 mmol) werden zusammen mit 118,33 mg (0,33 mmol) BE-BODIPY in 20 ml Aceton gelöst und mit 120 mg TBD versetzt. Der Ansatz wird für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Da eine DC-Kontrolle keine Umsetzung zeigt, wird zum Rückfluss erhitzt. Die DC-Kontrolle zeigt daraufhin eine Bande an. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Hochvakuum zeigen sich im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Ansatzes jedoch nur Zersetzungsprodukte.



20,79 mg AEMPO (0,11 mmol) werden in 10 ml Dichlormethan gelöst und mit 45,00 mg BP-BODIPY (0,11 mmol) versetzt. Der Ansatz wird bei Raumtemperatur unter DC-Kontrolle für 24 Stunden gerührt. Da keine Umsetzung erfolgt, werden 14 μ l *i*Pr₂EtN (0,11 mmol) als Base zugegeben und für 2 Stunden unter DC-Kontrolle weitergerührt. Da erneut keine Umsetzung erfolgt, wird anschließend unter DC-Kontrolle für 24 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Auch hier ist keine Umsetzung zu erkennen, was durch die ¹H-NMR-Spektren bestätigt wird.

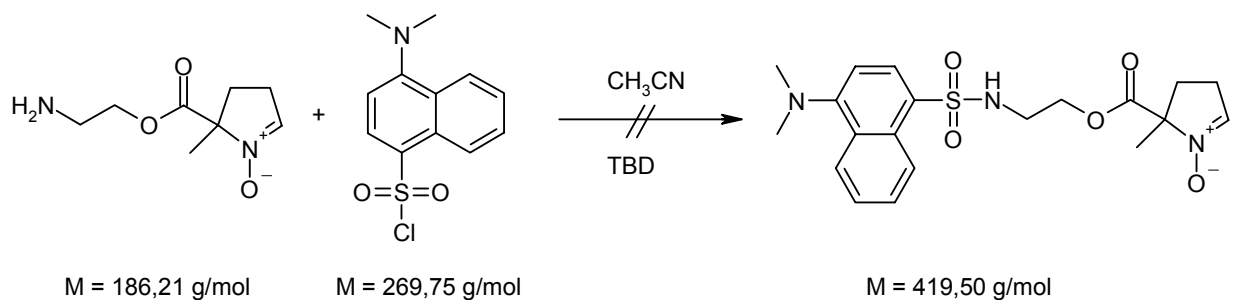


119,20 mg AEMPO (0,64 mmol) werden mit 230,10 mg (0,64 mmol) Cyanomethyl-4-[(Z)-(3,5-dimethyl-1*H*-pyrrol-2-yl)(3,5-dimethyl-2*H*-pyrrol-2-ylidene)methyl]benzoat in 50 ml DMF gelöst und 7,00 mg DABCO (10 mol%) als Katalysator zugegeben. Der Ansatz wird für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die DC-Kontrolle zeigt keine Umsetzung. Ein Erhitzen auf 100 °C für 2 Stunden führt jedoch zur Zersetzung, wie ein ¹H-NMR-Spektrum bestätigt.



123,00 mg BocAEMPO (0,43 mmol) werden mit TFA in Dichlormethan entschützt. Nach Abziehen der Lösungsmittel-TFA-Mischung im Hochvakuum wird der Ansatz in 10 ml Acetonitril aufgenommen, 64,50 μl DBU als Base zugegeben und 154,80 mg Cyanomethyl-4-[(Z)-(3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-yl)(3,5-dimethyl-2H-pyrrol-2-ylidene)methyl]benzoat (0,43 mmol) zugegeben. Nach 18 Stunden bei Raumtemperatur wird per DC der Umsatz kontrolliert. Da zwei neue Banden vorhanden sind, wird der Ansatz auf Kieselgel 60 mit 1 : 1 Pentan und Ethanol getrennt. Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Banden zeigen jedoch nur Zersetzungsprodukte.

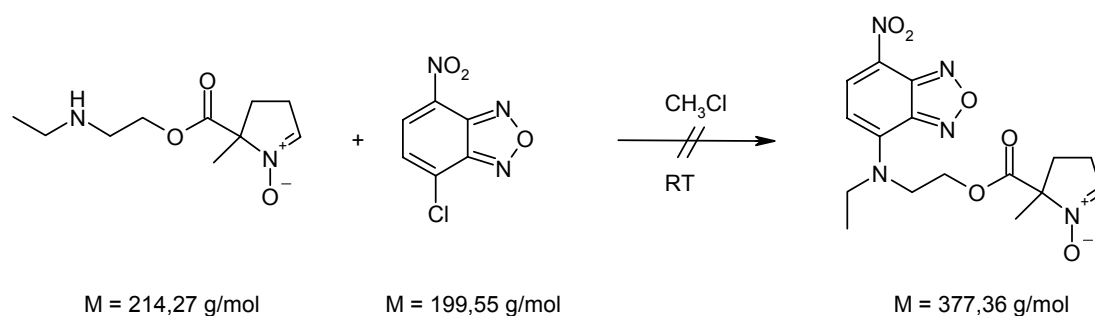
Eine Wiederholung des Versuchs mit TBD als Base führt zu exakt gleichen Ergebnissen. Ebenso führt ein Ansatz mit TBD als Base bei Rückfluss in Acetonitril nur zu Zersetzungsprodukten.



150,00 mg AEMPO (0,80 mmol) werden zusammen mit 217,00 mg Dansyl-Chlorid (0,80 mmol) in 10 ml Acetonitril gelöst und für 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der Ansatz auf Kieselgel 60 mit 2 : 8 Pentan und Ethanol aufgetrennt. Man erhält eine hellgelbe, bläulich fluoreszierende Fraktion. Das zugehörige $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt jedoch nur Signalsätze des Dansyl-Systems.

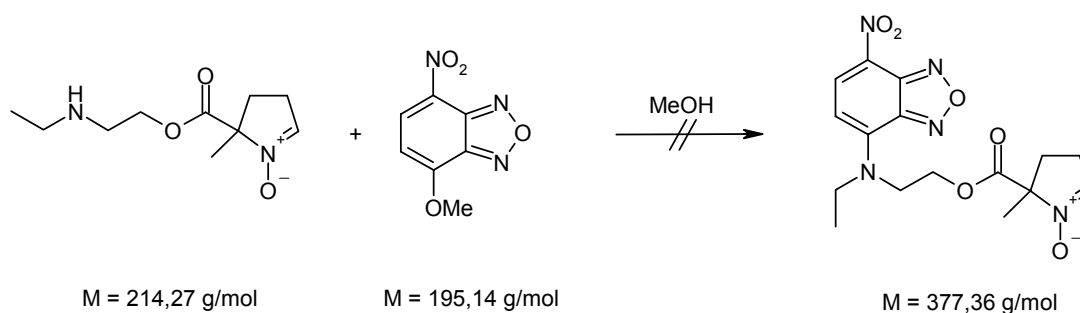
Ein analog durchgeführter Versuch ohne TBD-Zugabe führt direkt zur Bildung eines Niederschlags. Das zugehörige $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt nur Signalsätze des Dansyl-Systems.

5.4.5 Umsetzungen von EAEMPO



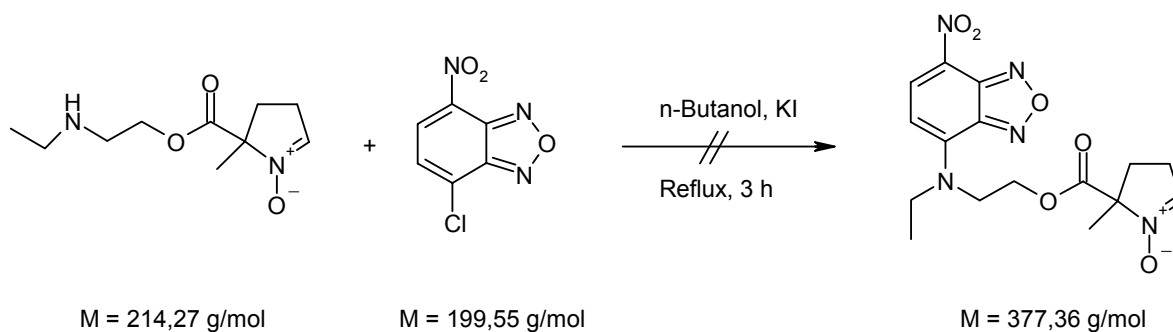
94,30 mg EAEMPO (0,30 mmol) werden in 20 ml Chloroform gelöst und 59,87 mg NBD-Chlorid (0,30 mmol), gelöst in 20 ml Chloroform, zugegeben. Die hellorangene Lösung wird unter DC-Kontrolle für 36 Stunden gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit zeigen sich auf der DC-Platte mehrere orangene Banden, die auch fluoreszieren. Die Trennung der Banden auf Kieselgel 60 mit 1 : 1 Pentan und Ethanol, gefolgt von Ethanol und Dichlormethan ergibt 3 Fraktionen, deren $^1\text{H-NMR}$ -Spektren jedoch nur Zersetzungsprodukte des Nitrons zeigen.

Wiederholungen des Versuchs in Ethanol, THF sowie in Kombination dieser Lösungsmittel mit Basen (Borax, TBD) bringen bei gleicher Variation der Rührzeiten und Temperaturen ebenfalls kein Ergebnis.

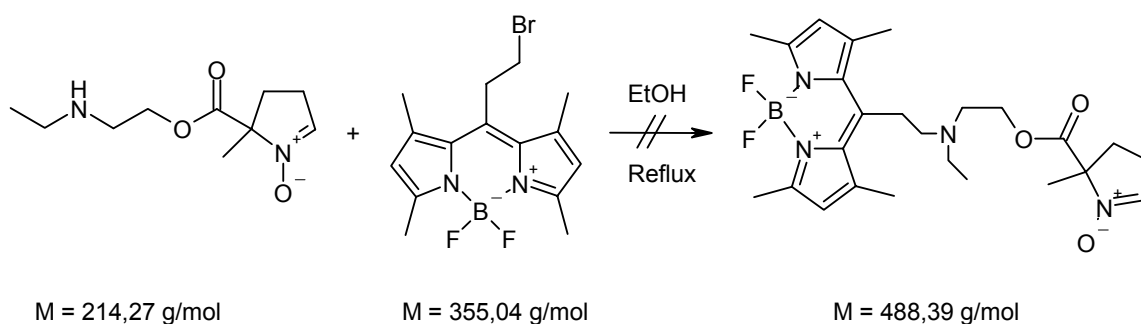


73,60 mg EAEMPO (0,23 mmol) werden in 10 ml trockenem Methanol gelöst und mit 46,72 mg 4-Methoxy-(7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazol) (0,23 mmol) versetzt. Der Ansatz wird für 18 Stunden unter regelmäßiger DC-Kontrolle gerührt, zeigt aber keine Umsetzung an. Daher wird der Ansatz für 2,5 Stunden zum Rückfluss erhitzt. DC-Versuche zeigen zu diesem Zeitpunkt noch keine Umsetzung. Nach insgesamt 19 Stunden Rückfluss zeigen sich dann 4 Banden, die teilweise gelb sind und fluoreszieren. Säulenchromatographie mit 1 : 1 Pentan und Ethanol auf einer Kieselgel 60-Säule liefert 2 Fraktionen, deren $^1\text{H-NMR}$ -Spektren jedoch nur Zersetzungsprodukte des Nitrons zeigen.

Wiederholungen des Versuchs in Ethanol, THF sowie in Kombination dieser Lösungsmittel mit Basen (Borax, TBD) bringt bei gleicher Variation der Rührzeiten und Temperaturen ebenfalls kein Ergebnis.



235,68 mg EAEMPO (1,11 mmol) werden zusammen mit 219,50 mg NDB-Chlorid (1,11 mmol) in 10 ml n-Butanol gelöst und mit 5,0 mg KI versetzt. Der Ansatz wird für 3 Stunden unter Argonatmosphäre zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen werden 150 ml Diethylether zugegeben und die tiefrote Lösung über Nacht bei $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Es entsteht ein Niederschlag, der abfiltriert und mit Diethylether gewaschen wird. Der Durchfluss wird einrotiert und wie der Niederschlag im Hochvakuum getrocknet. $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der beiden Fraktionen zeigen jedoch nur Zersetzungsprodukte.



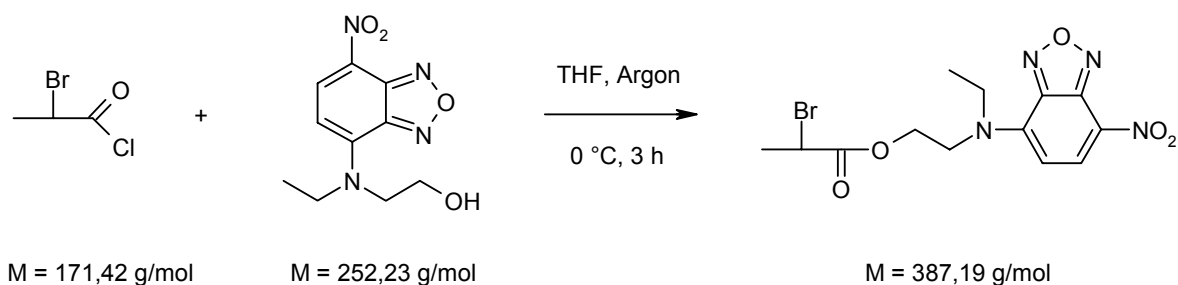
458,00 mg EAEMPO (2,14 mmol) werden zusammen mit 85,00 mg BODIPY (0,24 mmol) in 20 ml Ethanol gelöst und $26,00 \mu\text{l}$ DBU als Base zugegeben. Der Ansatz wird unter Argon-Atmosphäre für 2 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wird nach Ablauf der Reaktionszeit auf 10 ml H_2O gegeben und mit 50 ml Diethylether extrahiert. Die organische Phase wird mit

Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Hochvakuum wird ein ^1H -NMR-Spektrum gemessen. Es zeigt nur Zersetzungsprodukte.

Eine analoge Versuchsdurchführung mit DMF als Lösungsmittel bei 100 °C liefert ebenfalls nur Zersetzungsprodukte. Diese bilden auf der DC-Platte insgesamt 8 Banden aus, deren Farbspektrum von gelb-grün über orange, rotviolett, grün hin zu braun und schwarz reicht.

5.4.6 Direktsynthesen

5.4.6.1 Synthese von 2-Bromo-propionsäure-2-[ethyl-(7-nitro-benzo[2,1,3]oxadiazol-4-yl)-amino]-ethylester

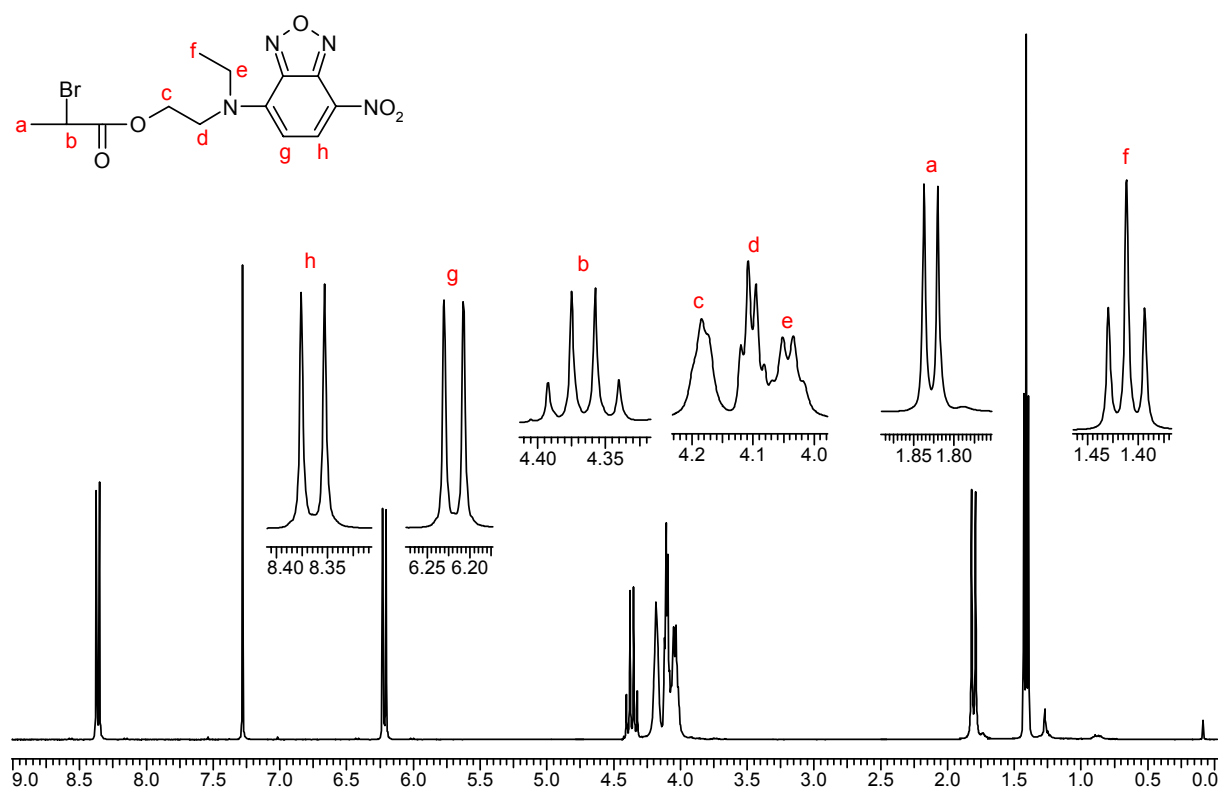


7,75 g 2-[Ethyl-(7-Nitro-[2,1,3]-benzoxadiazol-4-yl)amino]ethanol (26,76 mmol) werden in 200 ml über Na/K-Legierung getrocknetem THF unter Argonatmosphäre gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dann werden 2,75 ml 2-Brompropionsäurechlorid (26,77 mmol), gelöst in 30 ml trockenem THF, über 3 Stunden zugetropft. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der Ansatz mit Eis versetzt und vorsichtig mit 200 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung neutralisiert. Nach Extraktion mit 3 × 100 ml Chloroform werden die vereinigten organischen Phasen mit Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und einrotiert. Nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum erhält man 2-Bromo-propionsäure-2-[ethyl-(7-nitro-benzo[2,1,3]oxadiazol-4-yl)-amino]-ethylester als rotes Öl.

Ausbeute: 50 % (13,38 mmol)

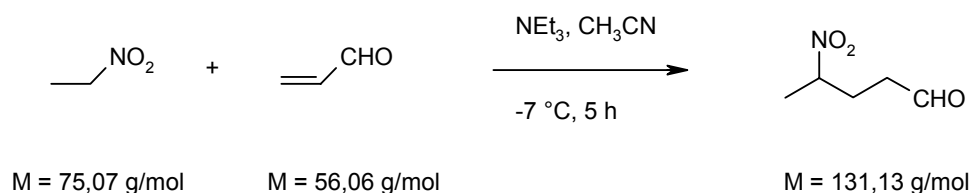
¹H-NMR (400,13 MHz, CDCl₃):

Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	1,830	d	3 H	³ J _{HH} = 9,01
b	4,456	q	1 H	³ J _{HH} = 9,01
c	4,175	m	2 H	-
d	4,100	m	2 H	-
e	4,040	q	2 H	³ J _{HH} = 7,30
f	1,413	t	3 H	³ J _{HH} = 7,30
g	6,274	d	1 H	³ J _{HH} = 9,20
h	8,352	d	1 H	³ J _{HH} = 9,20



5.4.6.2 Synthese eines BODIPY-Nitrons

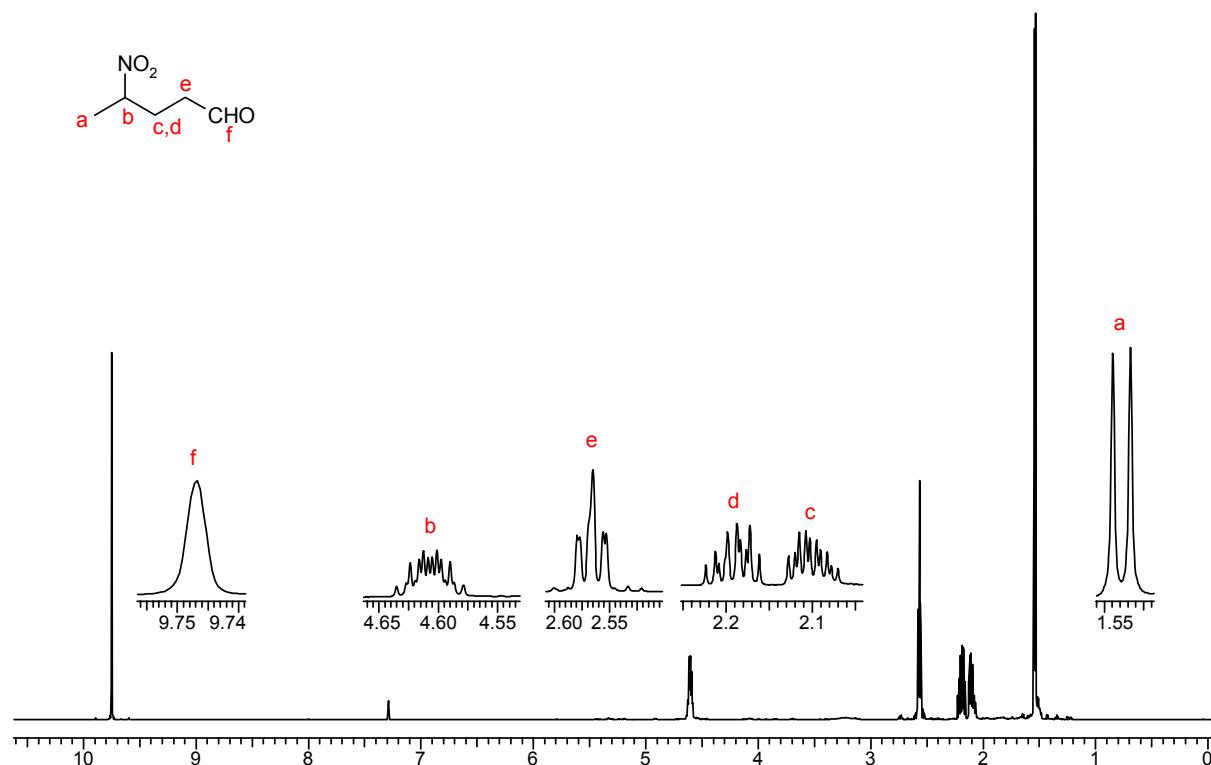
5.4.6.2.1 Synthese von 4-Nitropentanal



35,00 ml Nitroethan (389,00 mmol) werden in 100 ml über CaH_2 getrocknetem Acetonitril gelöst, auf $-7\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt und mit 3,5 ml Triethylamin (25,20 mmol) als Base versetzt. Dann werden über 30 Minuten 51,00 ml Acrolein (778,00 mmol) zugetropft und für weitere 5 Stunden bei $-7\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der Ansatz auf 150 ml Eiswasser gegeben und mit 12 N HCl neutralisiert. Die organische Phase wird mit 50 ml gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen, mit 3×50 ml Dichlormethan extrahiert, mit Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert. Durch Vakuumdestillation wird dann 4-Nitropentanal als gelbes Öl bei $52\text{-}65\text{ }^\circ\text{C}$ Siedebereich erhalten. Achtung! Es besteht Explosionsgefahr, wenn die Destillation nicht rechtzeitig abgebrochen wird. Sicherheitshalber sollte gegen Ende der Destillation zwar im Vakuum, aber ohne weiteres Aufheizen gearbeitet werden!

Ausbeute: 28 % (137,00 mmol)

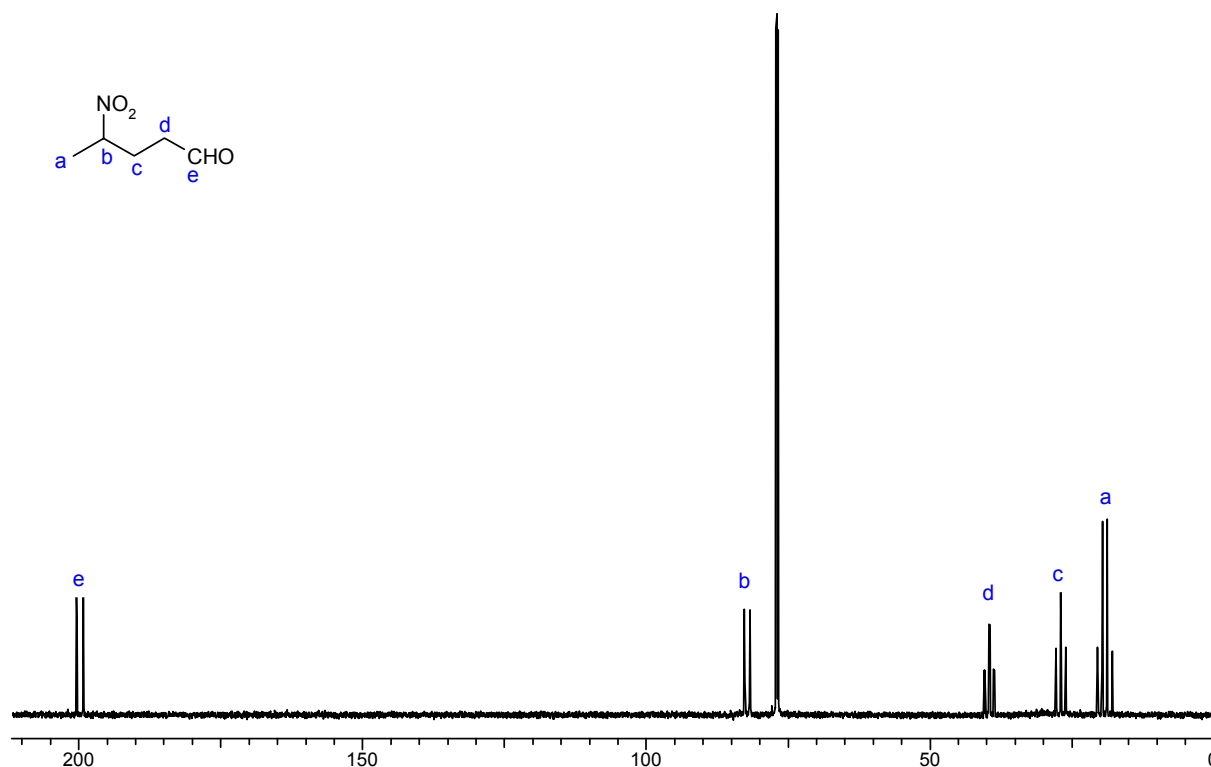
$^1\text{H-NMR}$ (600,13 MHz, CDCl_3):



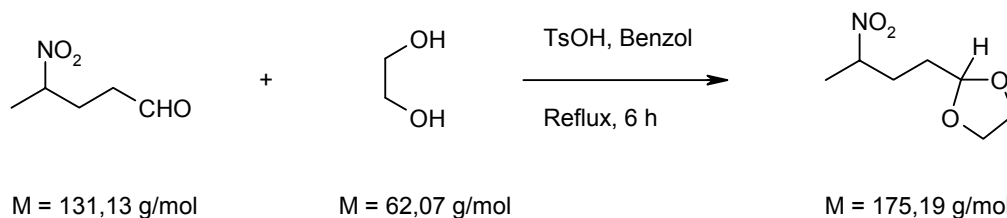
Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	1,541	d	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 6,65$
b	4,612	m	1 H	-
c	2,100	m	1 H	-
d	2,190	m	1 H	-
d	2,574	t	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 6,85$
e	9,758	s	1 H	-

$^{13}\text{C-NMR}$ (150,90 MHz, CDCl_3):

Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten [Hz]
a	19,250	q	$^1J_{\text{CH}} = 130$
b	82,350	d	$^1J_{\text{CH}} = 146$
c	27,000	t	$^1J_{\text{CH}} = 130$
d	39,660	dt	$^1J_{\text{CH}} = 128; ^3J_{\text{CH}} = 25$
e	199,90	d	$^1J_{\text{CH}} = 175$



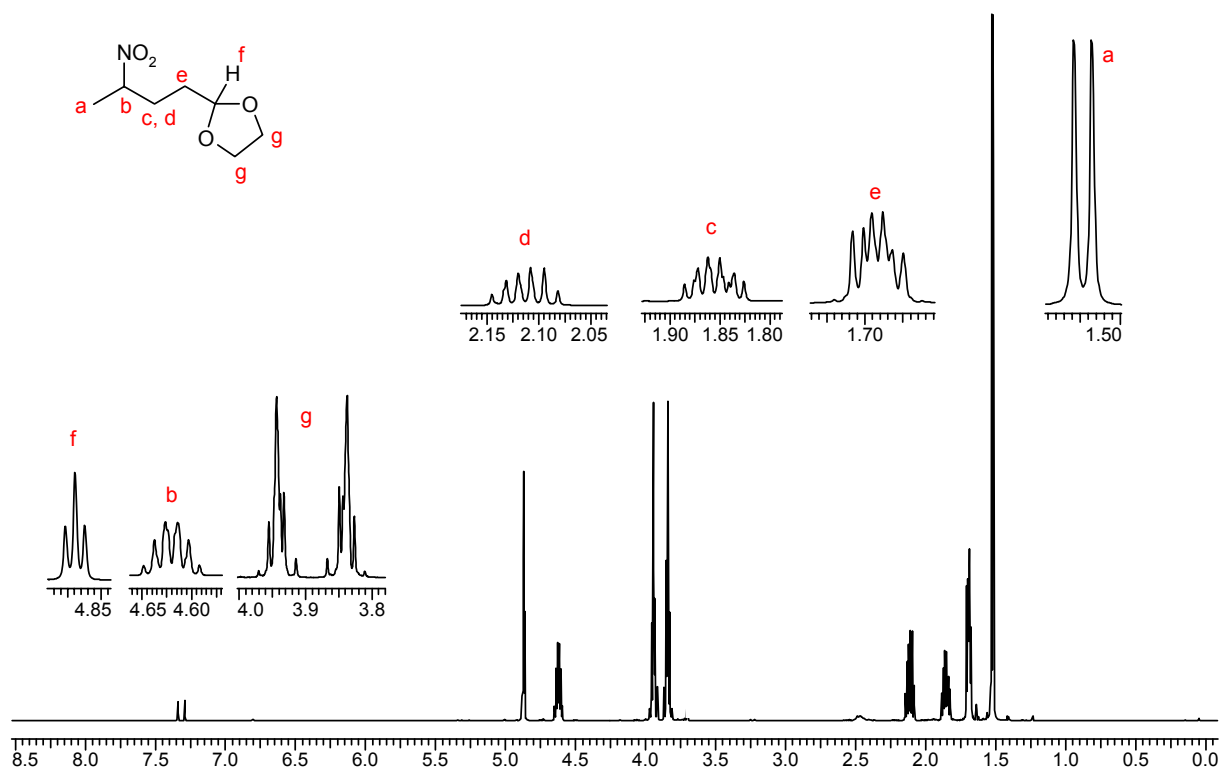
5.4.6.2.2 Synthese von 2-(3-Nitrobutyl)-1,3-dioxolan



21,52 g 4-Nitropentanal (164,00 mmol) werden zusammen mit 15,29 g Ethylenglykol (246,00 mmol) und 0,30 g *p*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat (1,58 mmol) als Katalysator in 60 ml Benzol gelöst und für 6 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Das entstehende Benzol-Wasser-Azeotrop wird am Wasserabscheider entfernt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der Ansatz mit 200 ml Pentan versetzt und mit $3 \times 50 \text{ ml}$ gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, mit Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert. Nach Entfernen der Lösungsmittelreste erhält man 2-(3-Nitrobutyl)-1,3-dioxolan als orangenes Öl.

Ausbeute: 85 % (140,00 mol)

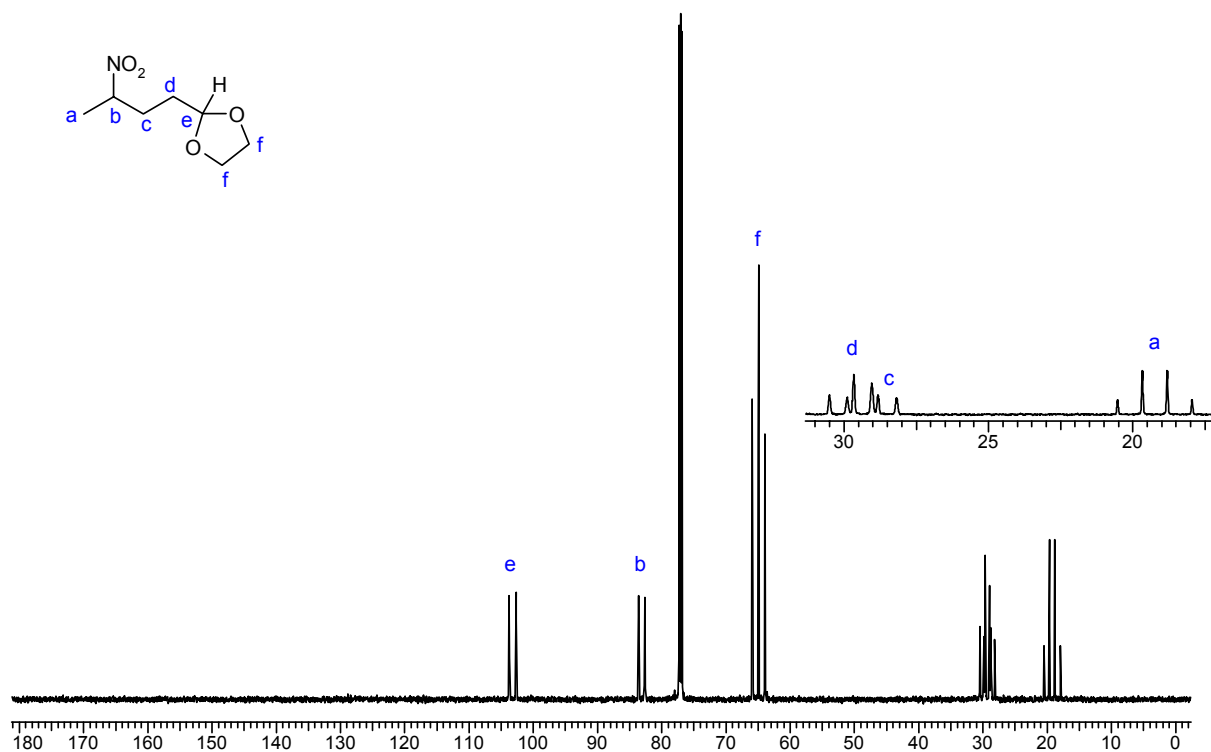
$^1\text{H-NMR}$ (600,13 MHz, CDCl_3):



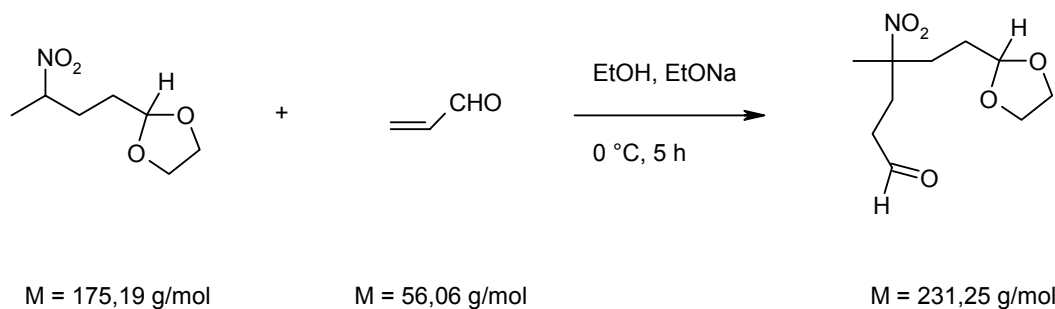
Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	1,522	d	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 6,65$
b	4,630	m	1 H	-
c	1,853	m	1 H	-
d	2,115	m	1 H	-
e	1,694	m	2 H	-
f	4,877	t	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 4,30$
g	3,887	m	4 H	-

$^{13}\text{C-NMR}$ (150,90 MHz, CDCl_3):

Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten [Hz]
a	19,250	q	$^1J_{\text{CH}} = 130$
b	83,160	d	$^1J_{\text{CH}} = 148$
c	29,040	t	$^1J_{\text{CH}} = 128$
d	29,660	t	$^1J_{\text{CH}} = 128$
e	103,220	d	$^1J_{\text{CH}} = 166$
f	64,970	t	$^1J_{\text{CH}} = 148$



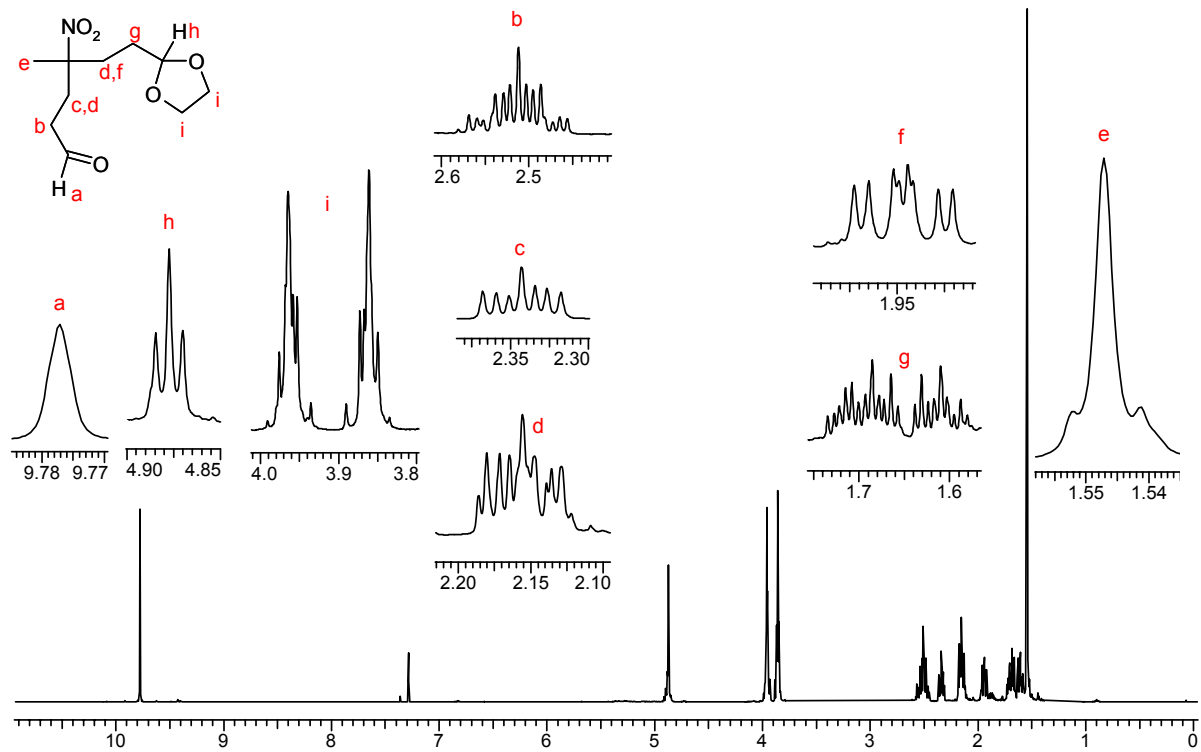
5.4.6.2.3 Synthese von 6-(1,3-Dioxolan-2-yl)-4-methyl-4-nitrohexanal



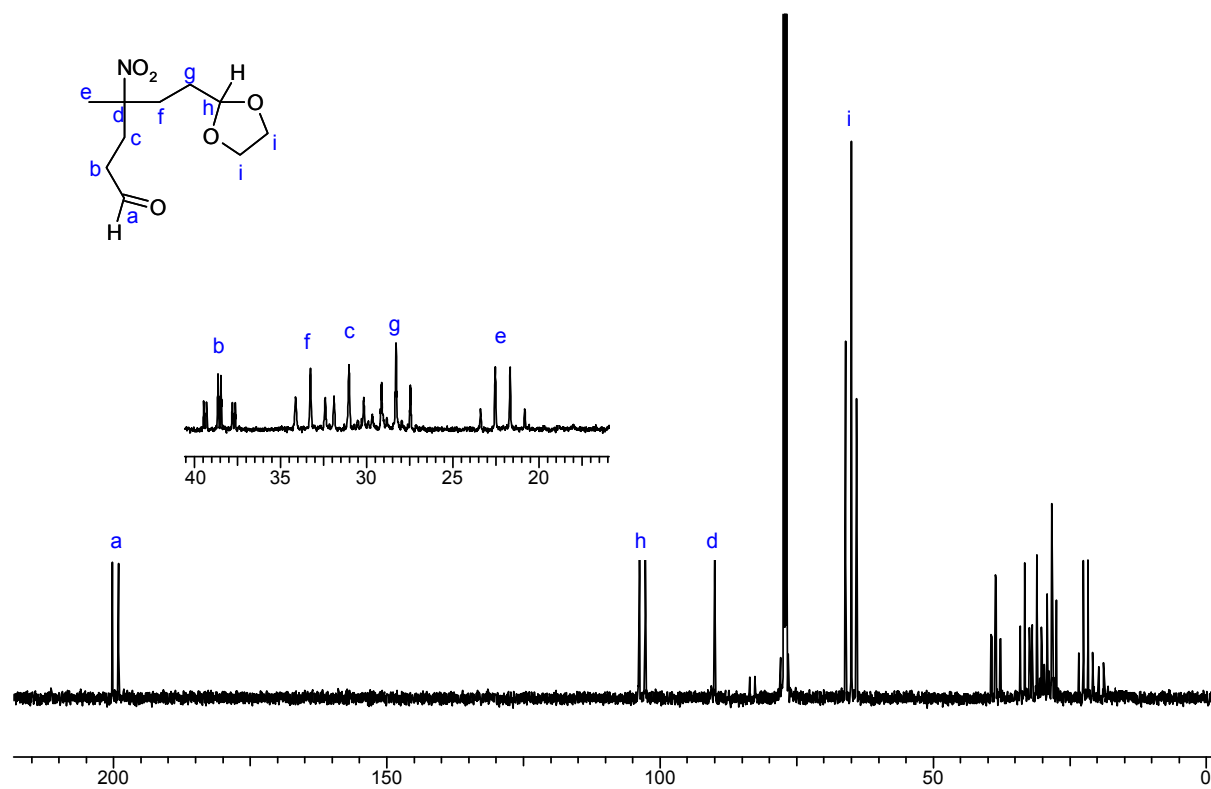
0,10 g Natrium (4,30 mmol) werden in 10,00 ml Ethanol gelöst. Zu dieser Lösung werden 4,00 g 2-(3-Nitrobutyl)-1,3-dioxolan (22,90 mmol) zugegeben und für 20 Minuten gerührt. Dann wird die Lösung auf 0 °C gekühlt und 1,64 ml Acrolein (25,10 mmol) über 20 Minuten zugetropft. Die Lösung wird im Anschluss für 5 Stunden bei 0 °C gerührt, wobei eine Rotfärbung entsteht. Nach Abschluss der Reaktionszeit wird der Ansatz auf 50 ml Eiswasser gegeben und mit 12 N Salzsäure neutralisiert. Die organische Phase wird mit 50 ml NaHCO_3 gewaschen, mit 50 ml Dichlormethan extrahiert und mit Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und das verbleibende braune Öl wird durch Säulenchromatographie auf Kieselgel 60 mit 4 : 1 Pentan und Ethylacetat aufgetrennt.

Ausbeute: 16 % (3,63 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (600,13 MHz, CDCl_3):

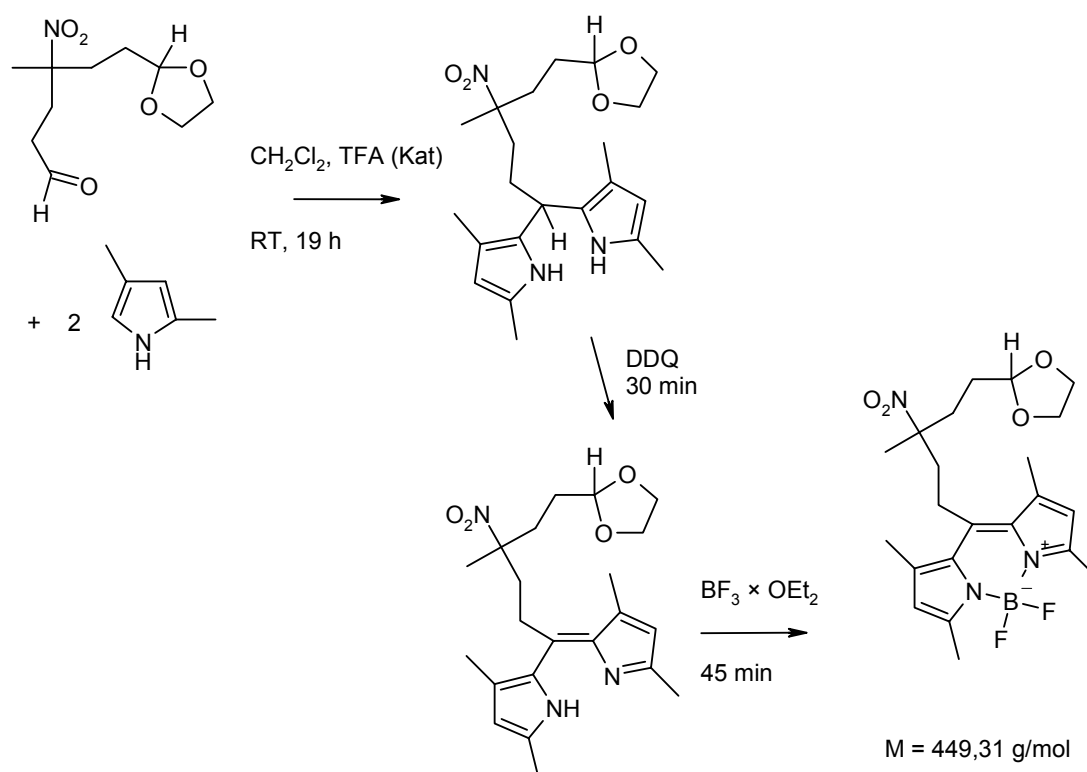


Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	9,780	s	1 H	-
b	2,510	m	2 H	-
c	2,340	m	1 H	-
d	2,160	m	2 H	-
e	1,550	t	3 H	$^4J_{\text{HH}} = 3,58$
f	1,945	m	1 H	-
g	1,660	m	2 H	-
h	4,880	t	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 4,36$
i	3,925	m	4 H	-

^{13}C -NMR (150,90 MHz, CDCl_3):

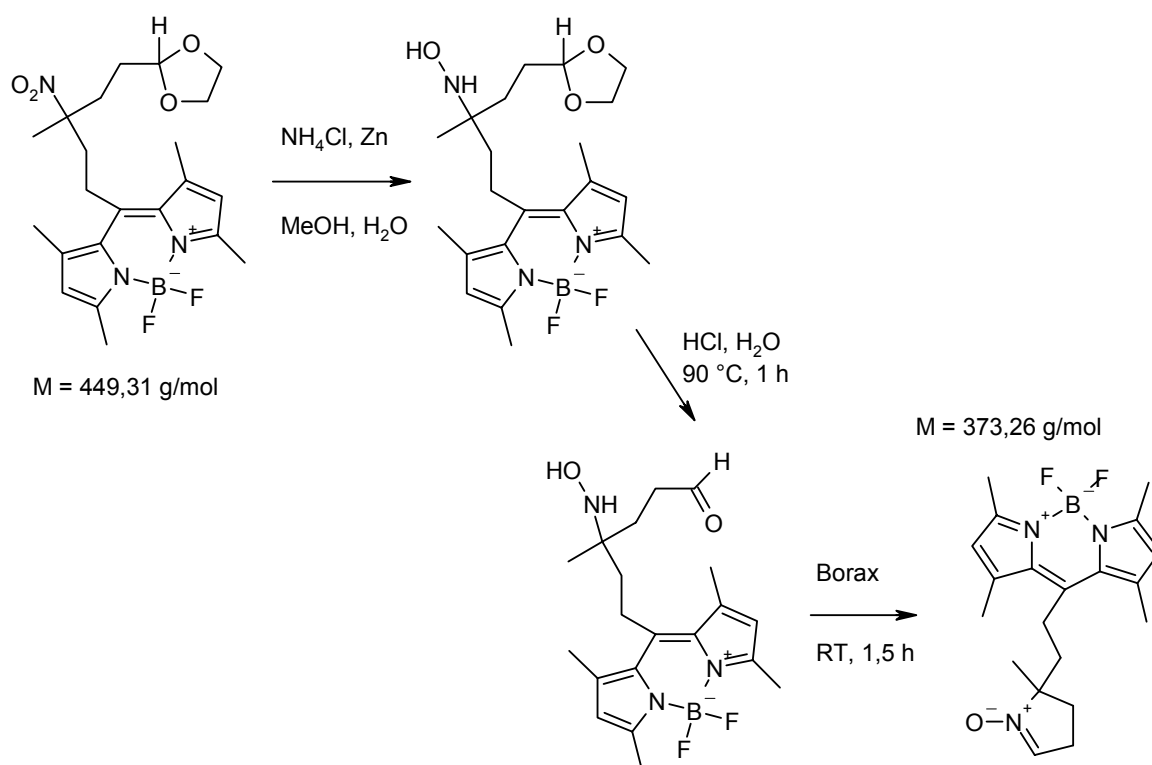
Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten [Hz]
a	199,60	d	$^1J_{\text{CH}} = 175$
b	38,55	dt	$^1J_{\text{CH}} = 126; ^3J_{\text{CH}} = 26$
c	31,03	t	$^1J_{\text{CH}} = 130$
d	90,00	s	-
e	22,08	q	$^1J_{\text{CH}} = 130$
f	33,27	t	$^1J_{\text{CH}} = 129$
g	28,28	t	$^1J_{\text{CH}} = 127$
h	103,21	d	$^1J_{\text{CH}} = 166$
i	65,04	t	$^1J_{\text{CH}} = 148$

5.4.6.2.4 Versuch zur Umsetzung zum BODIPY-System



0,84 g 6-(1,3-Dioxolan-2-yl)-4-methyl-4-nitrohexanal (3,63 mmol) werden mit 0,691 g 2,4-Dimethylpyrrol (7,26 mmol) in 20 ml Dichlormethan gelöst, mit einem Tropfen TFA als Katalysator versetzt und für 19 Stunden gerührt. Dann werden 1,65 g DDQ (7,26 mmol) zugegeben und für 30 Minuten gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit werden 5,00 ml Diisopropylethylamin (28,50 mmol) und 5,00 ml $\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$ (39,20 mmol) zugegeben und für weitere 45 Minuten gerührt. Der Ansatz wird dann auf 100 ml gesättigte NaHCO_3 -Lösung gegeben, die tiefviolette organische Phase abgetrennt, mit Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Hochvakuum erhält man ein tiefviolettes Öl, das gelb-grün fluoresziert.

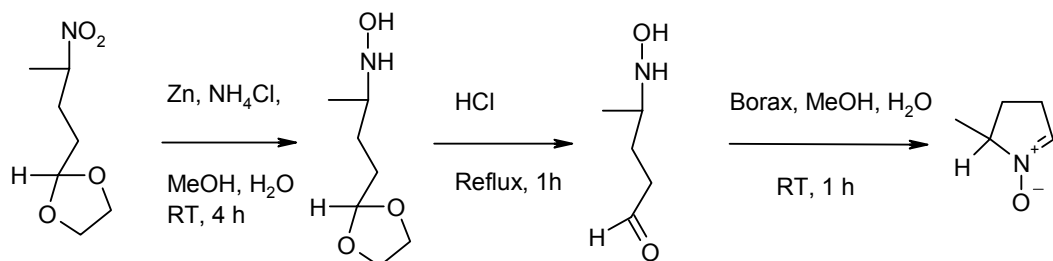
Ausbeute: 33 % (1,20 mmol)



539,17 mg BODIPY-Dioxolan (1,20 mmol) werden in 100 ml Methanol gelöst, mit 50 ml H₂O versetzt und 134,80 mg NH₄Cl (2,52 mmol) zugegeben. Dann werden über 30 Minuten hinweg 470,10 mg Zn-Pulver (7,20 mmol) zugegeben und für weitere 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Zink-Pulver wird dann abfiltriert und mit Aceton von anhaftendem Produkt gereinigt. Das rote Filtrat wird dann auf die Hälfte einrotiert, mit 1 ml 12 M Salzsäure versetzt und bei 90 °C Ölbadtemperatur für eine Stunde gerührt. Im Anschluss wird der Ansatz abgekühlt, mit Borax gesättigt und weitere 1,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird mit 100 ml Dichlormethan extrahiert, die organische Phase mit Na₂SO₄ getrocknet und einrotiert. Danach wird der Ansatz über eine Kieselgel 60-Säule mit 100 % Dichlormethan gesäult. Man erhält so eine rötliche, intensiv gelb-grün fluoreszierende Fraktion, die allerdings nach dem Entfernen des Lösungsmittels nur knapp 5 mg Produkt ergibt und sich daher nicht charakterisieren lässt. Aufgrund der Fluoreszenz lässt sich jedoch vermuten, dass der Syntheseweg prinzipiell erfolgreich verläuft, da die eingesetzten Reagenzien nicht den Farbstoff zerstören.

5.4.7 Sonstige Nitronsynthesen

5.4.7.1 Synthese von HMPO



$M = 175,19 \text{ g/mol}$

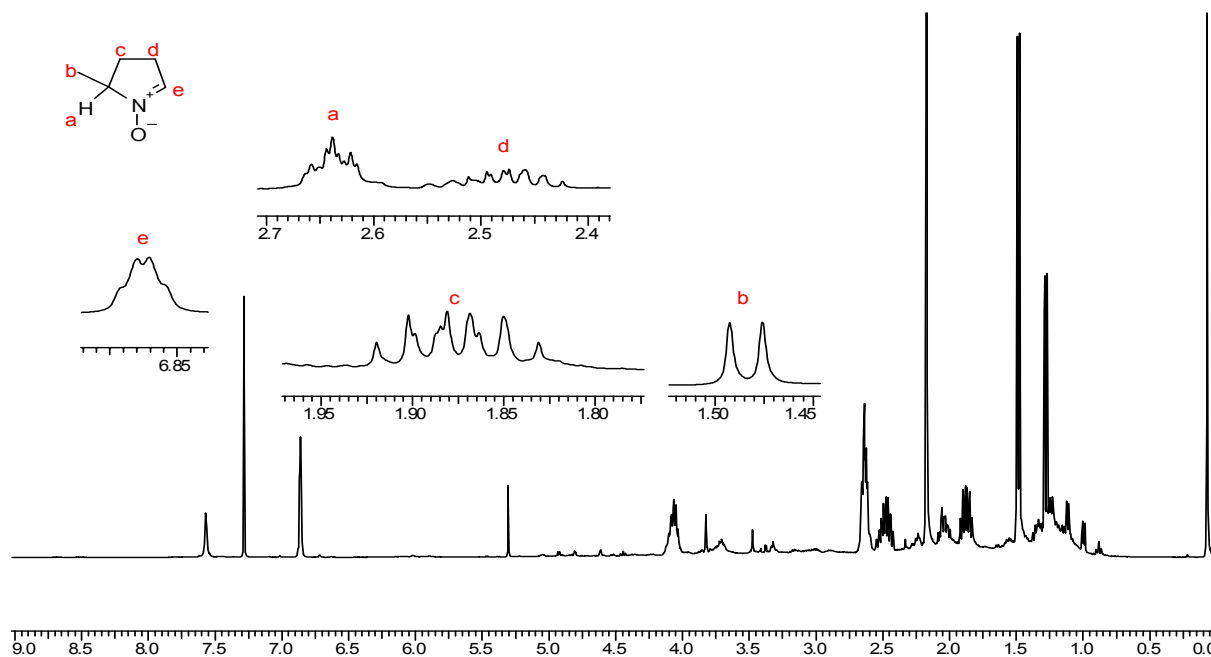
$M = 99,13 \text{ g/mol}$

2,38 g 2-(3-Nitrobutyl)-1,3-dioxolan (13,60 mmol) werden in 75 ml Methanol gelöst, mit 75 ml H_2O und 1,82 g NH_4Cl (34,03 mmol) versetzt. Dann werden über 30 Minuten 5,33 g Zn-Pulver (81,51 mmol) zugegeben und für 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird das überschüssige Zn-Pulver abfiltriert, mit Methanol gewaschen und das Filtrat auf die Hälfte einrotiert. Nach der Zugabe von 5 ml 12 M Salzsäure wird für eine Stunde zum Rückfluss erhitzt. Die nun orange-rote Lösung wird einrotiert, erneut mit 60 ml einer 1 : 1 Mischung aus Methanol und H_2O aufgenommen, mit Borax gesättigt und für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wird mit 50 ml Dichlormethan extrahiert, die organische Phase mit Na_2SO_4 getrocknet und einrotiert. Nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum erhält man ein rotbraunes Öl, das im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum deutlich Signale des Nitrons zeigt, aber noch stark verunreinigt ist.

Da aufgrund starker Explosionsgefahr eine Vakuumdestillation nicht in Frage kommt, wird versucht, durch Säulenchromatographie eine Trennung zu erreichen. Jedoch zersetzt sich das Produkt sowohl auf Kieselgel 60, Al_2O_3 , als auch auf RP18-Säulenmaterial und kann daher nicht rein isoliert werden.

Ausbeute des Rohprodukts: 1,78 g

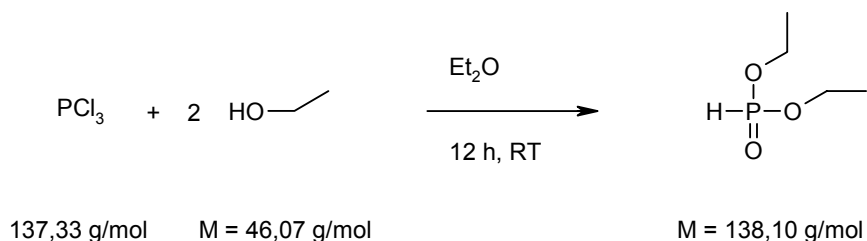
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): Signalsätze aus Rohspektrum entnommen:



Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	2,620	dt	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 6,602, 2,348$
b	1,476	d	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 6,749$
c	1,863	m	2 H	-
d	2,457	m	2 H	-
e	6,843	pseudo-q	1 H	-

5.4.7.2 DEPMPO-Synthese

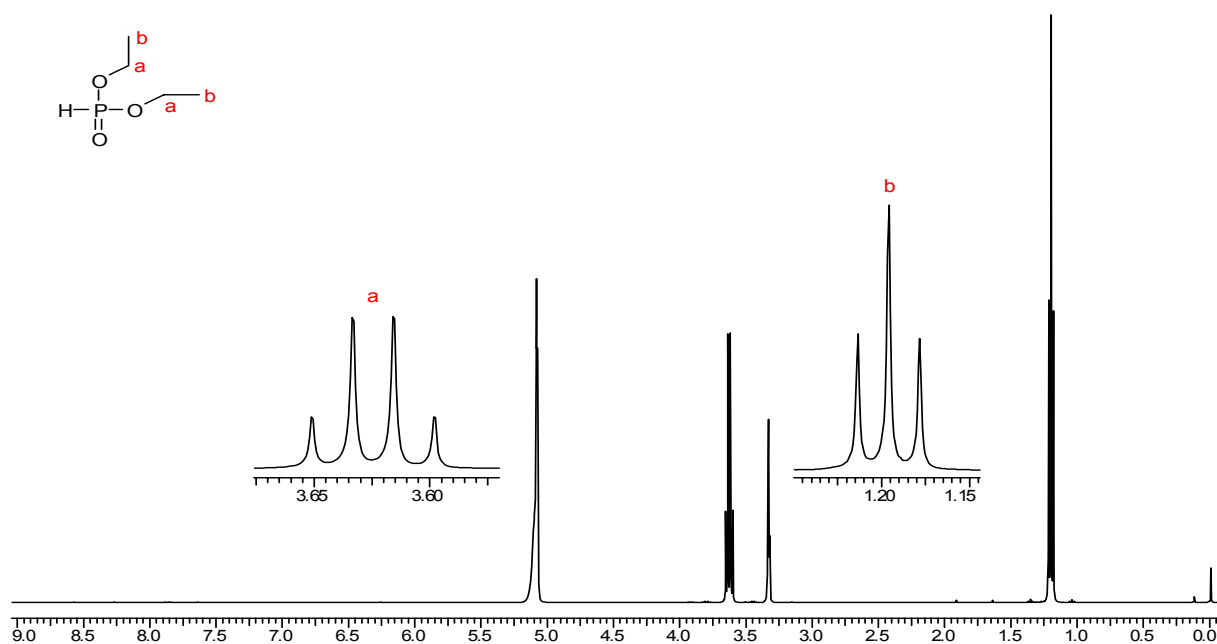
5.4.7.2.1 Synthese von Ethoxyphosphit



15,00 g PCl_3 (109,00 mmol) werden zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von 12,70 ml Ethanol (218,00 mmol) in 120 ml trockenem Diethylether unter Argonatmosphäre langsam über 2 Stunden zugetropft. Dann wird der Ansatz weitere 12 Stunden bei 10 °C gerührt. Im Anschluss wird der Ansatz auf Eis gegeben und mit KOH-Plätzchen neutralisiert. Die wässrige Phase wird dann abgetrennt und einrotiert. Die so erhaltene braune Masse wird mit 150 ml Ethanol extrahiert. Das Extrakt wird filtriert und einrotiert. Man erhält so Diethoxyphosphit als salzfreien hellbraunen Feststoff.

Ausbeute: 75 % (81,75 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CD_3OD):

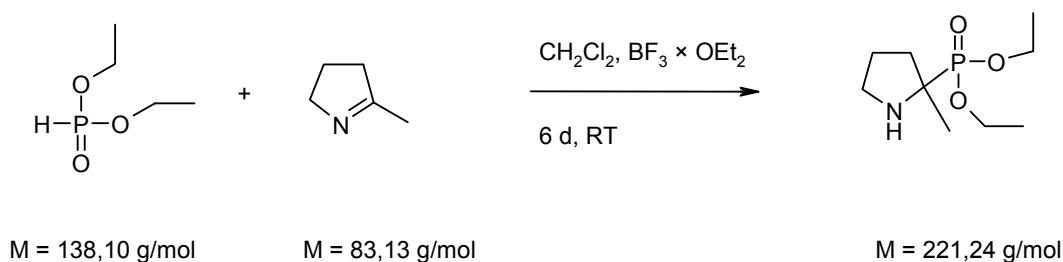


Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	3,634	q	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,043$
b	1,196	t	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,043$

^{31}P -NMR (161,98 MHz, CD_3OD):

$\delta = 5,00$ ppm

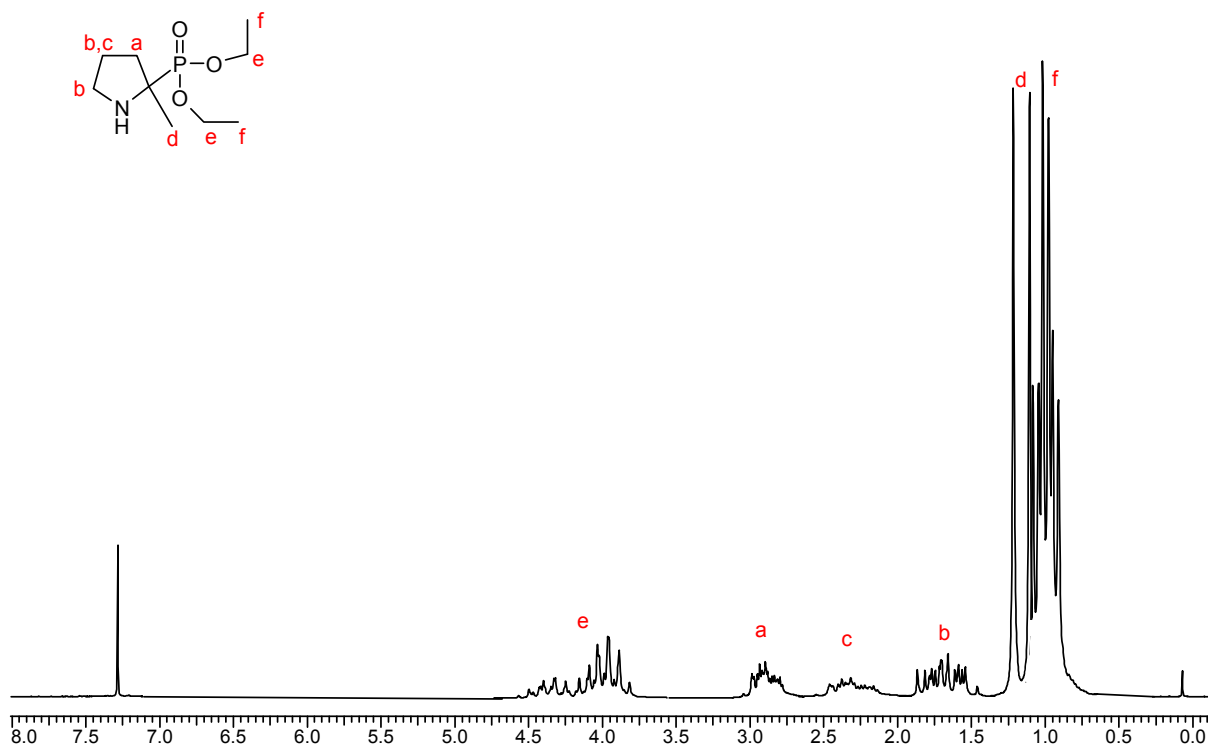
5.4.7.2.2 Synthese von Diethyl-(2-methyl-2-pyrrolidinyl)phosphonat



3,48 g Diethoxyphosphit (25,20 mmol) werden in 20,00 ml trockenem Dichlormethan gelöst und unter Argonatmosphäre 2,40 ml 2-Methyl-1-pyrrolin (25,20 mmol) zugegeben. Dann werden noch 200 μl $\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$ (1,40 mmol) als Katalysator zugesetzt und der Ansatz für 6 Tage unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der Ansatz auf 20 ml Wasser gegeben und mit 40 ml Dichlormethan extrahiert. Die organische Phase wird mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und einrotiert. Man erhält so nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum ein farbloses Öl mit einer Ausbeute von 30 % (7,56 mmol).

^1H -NMR (400,13 MHz, CDCl_3):

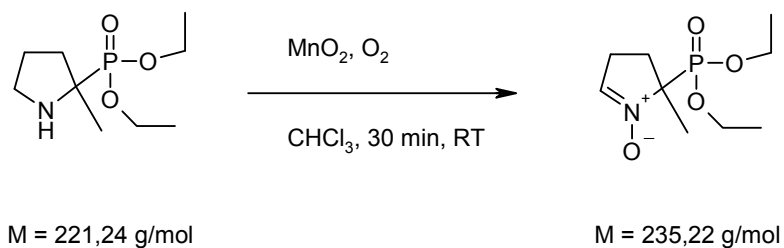
Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	2,800	m	2 H	-
b	1,650	m	3 H	-
c	2,600	m	1 H	-
d	2,320	d	3 H	$^3J_{\text{PH}} = 14,97$
e	4,200	m	4 H	-
f	1,050	dt	6 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,05$



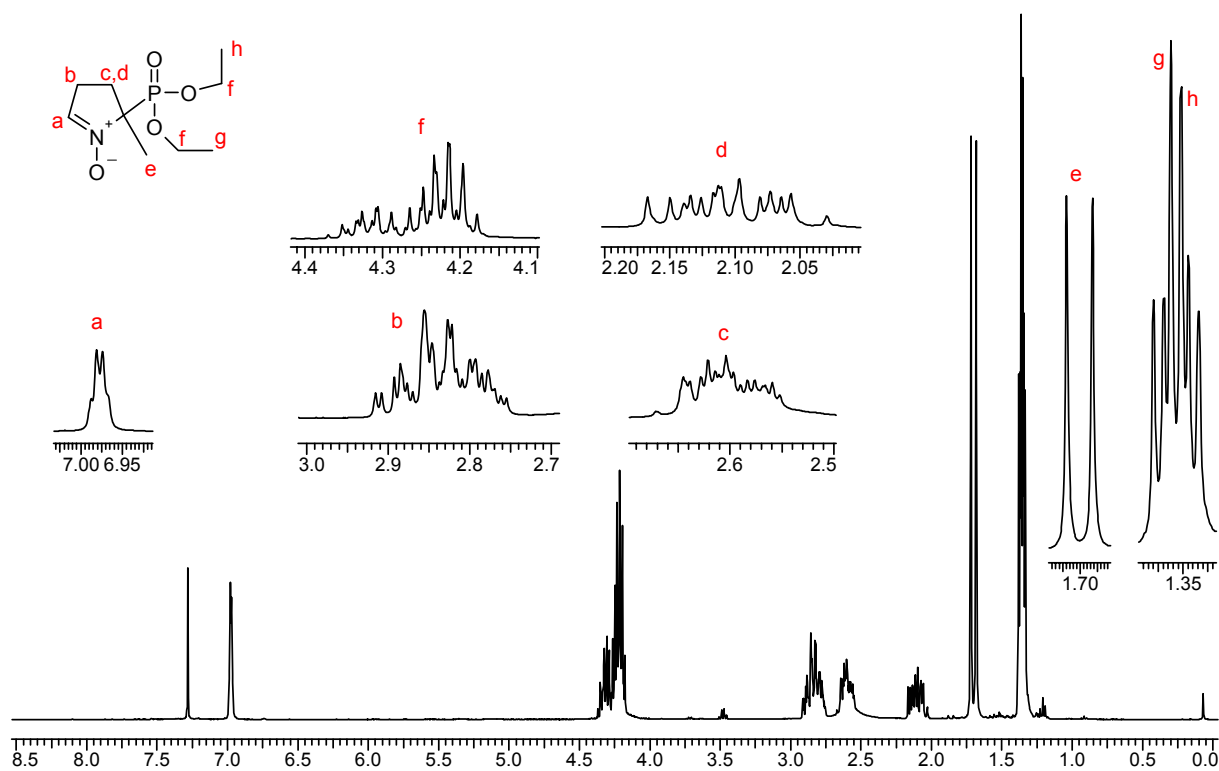
^{31}P -NMR (81,01 MHz, CDCl_3):

$\delta = 28,37$ ppm

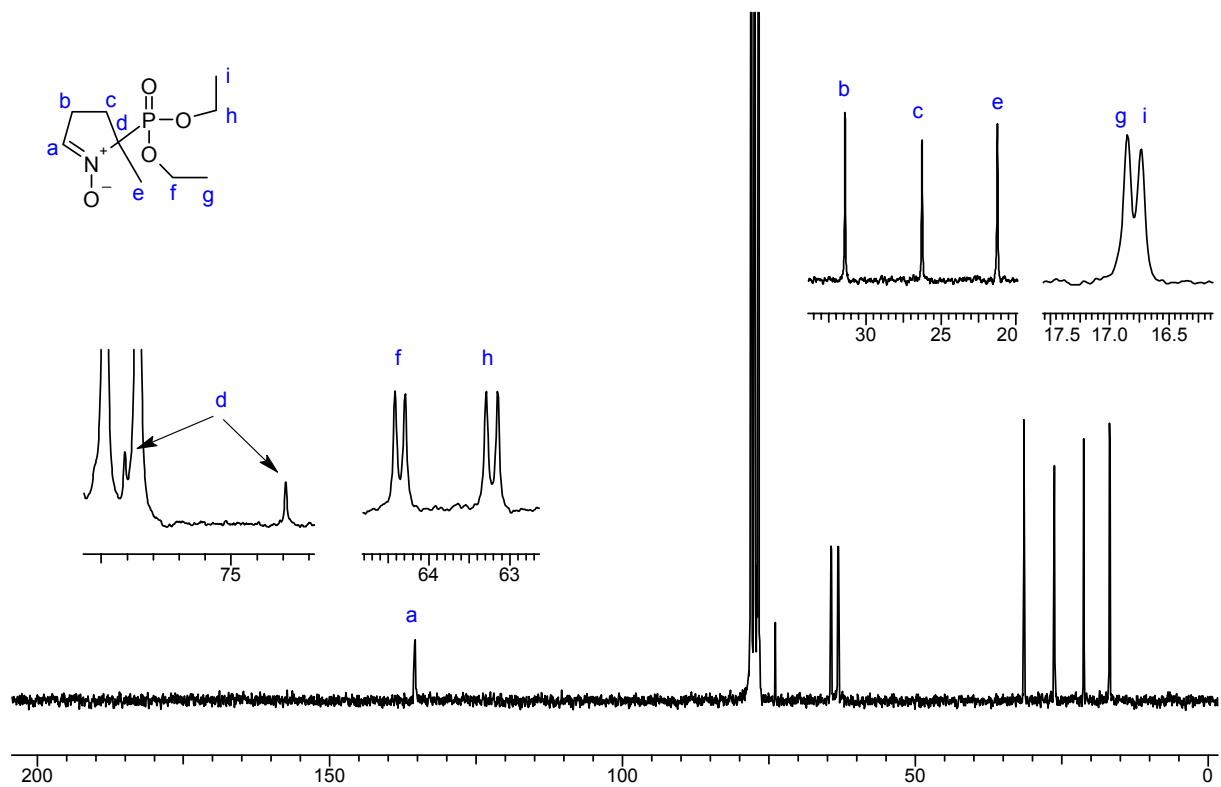
5.4.7.2.3 Synthese von DEPMPO



1,67 g Diethyl-(2-methyl-2-pyrrolidinyloxy)phosphonat (7,56 mmol) werden in 20 ml CHCl_3 gelöst und mit 250 mg MnO_2 als Katalysator versetzt. Dann wird über 30 Minuten Sauerstoff durch die Lösung geleitet. Im Anschluss wird das MnO_2 abfiltriert und der Ansatz über Kieselgel 60 mit Dichlormethan und Ethanol (8,5 : 1,5) getrennt. Man erhält DEPMPO als hygroskopisches farbloses Öl mit einer Ausbeute von 25 % (1,89 mmol).

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3):

Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	6,977	dt	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 2,64$; $^3J_{\text{PH}} = 5,28$
b	2,835	m	2 H	-
c	2,600	m	1 H	-
d	2,100	m	1 H	-
e	1,700	d	3 H	$^3J_{\text{PH}} = 14,97$
f	4,270	m	4 H	-
g	1,360	t	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,04$
h	1,350	t	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,04$

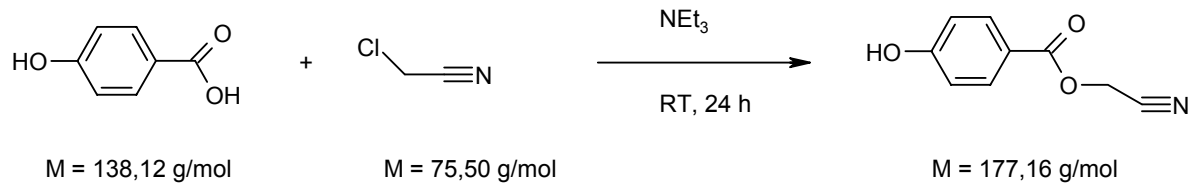
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (50,32 MHz, CDCl_3)

Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Kopplungskonstanten [Hz]
a	135,560	s	-
b	31,400	s	-
c	26,260	s	-
d	75,495	d	$^1J_{\text{CP}} = 156,27$
e	21,240	s	-
f	64,355	d	$^2J_{\text{CP}} = 6,44$
g	16,850	s	-
h	63,220	d	$^2J_{\text{CP}} = 6,44$
i	16,730	s	-

 ^{31}P -NMR (81,01 MHz, CDCl_3): $\delta = 23,64$ ppm

5.4.7.3 DEPMPO-Derivate

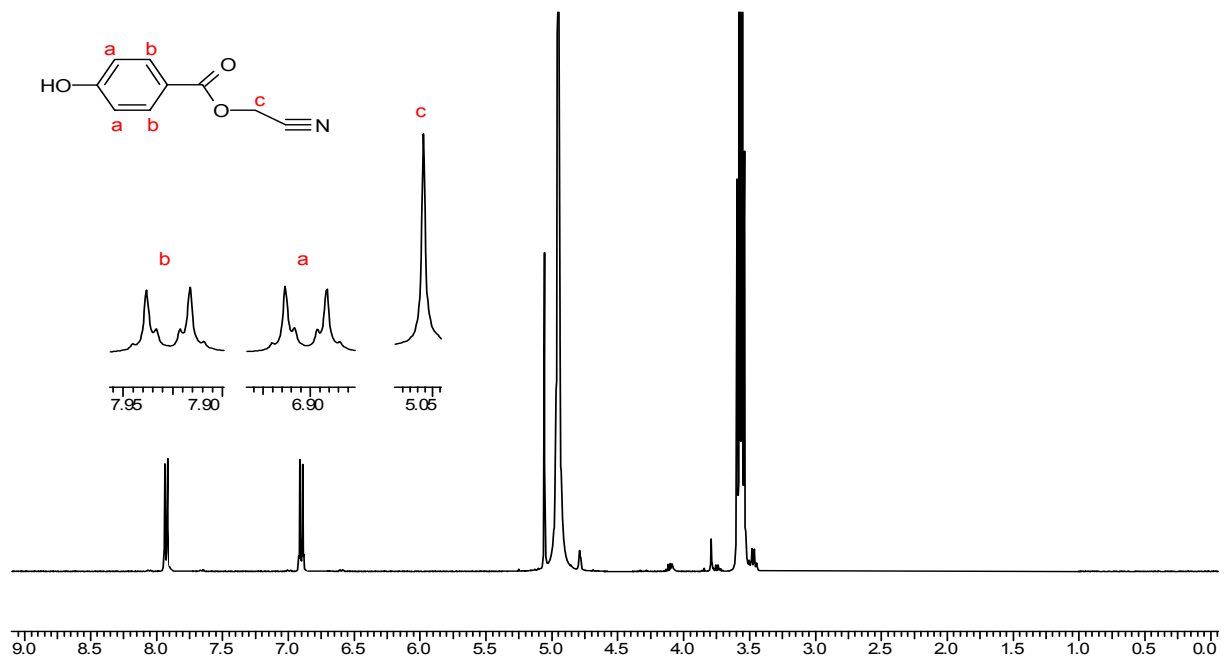
5.4.7.3.1 Synthese von 4-Hydroxybenzoesäure-cyanomethylester



13,80 g Hydroxybenzoesäure (0,10 mol) werden bei 0 °C in 50,00 ml Triethylamin gelöst und dann portionsweise 9,52 ml Chloracetonitril (0,15 mol) zugegeben. Der Ansatz wird für weitere 30 Minuten bei 0 °C gerührt und dann für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der erhaltene extrem harte weiße Feststoff zerkleinert und in einer 2 : 1 Mischung aus Ethylacetat und Methanol gelöst, abfiltriert und einrotiert. Nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum erhält man 4-Hydroxybenzoesäure-cyanomethylester als gelblichen Feststoff.

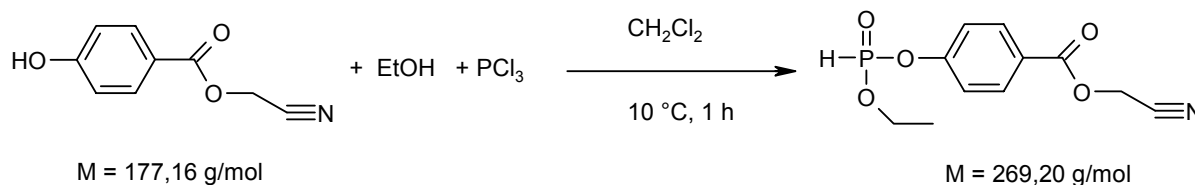
Ausbeute: 80 % (0,08 mol)

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CD_3OD):



Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	6,908	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,803$
b	7,934	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,803$
c	5,056	s	2 H	-

5.4.7.3.2 Synthese von Cyanomethyl 4-[[ethoxy(oxido)phosphino]oxy]benzoat

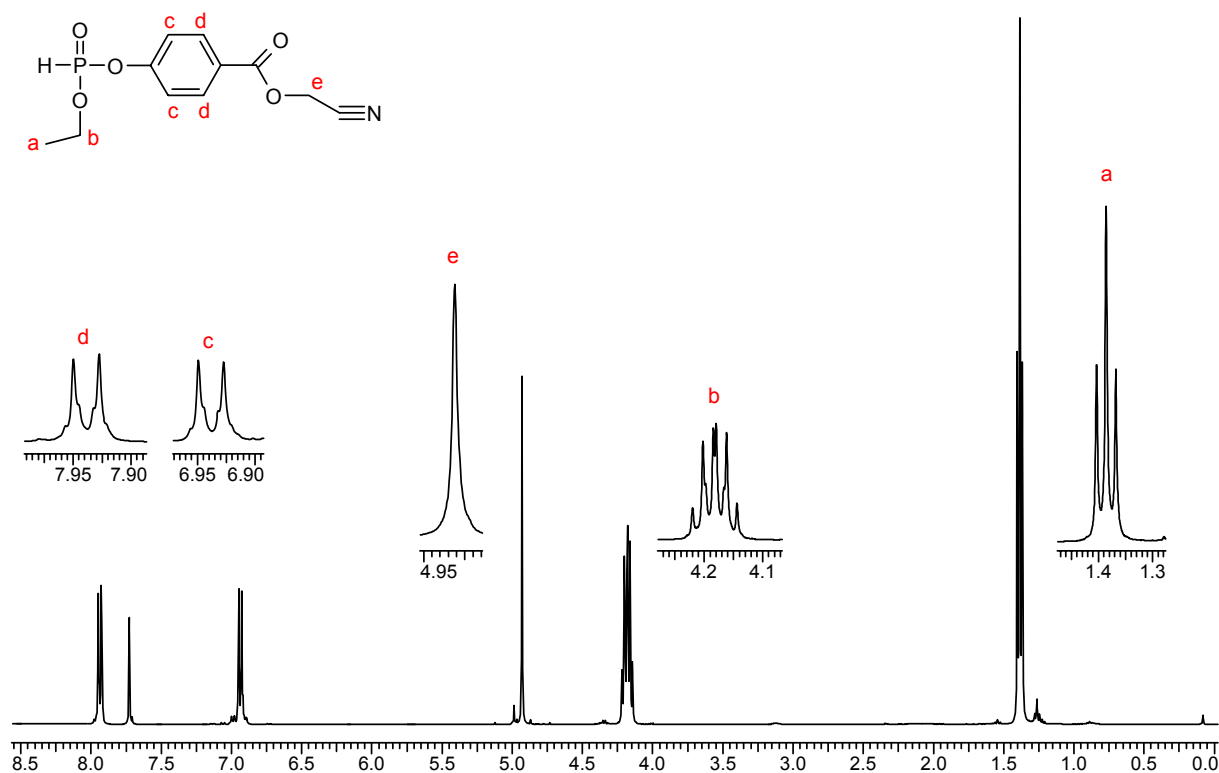


9,69 g 4-Hydroxybenzoesäure-cyanomethylester (54,75 mmol) werden zusammen mit 2,50 g Ethanol (54,75 mmol) in 100 ml trockenem Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dann werden langsam über 30 Minuten 5,00 g PCl_3 (36,50 mmol) zugetropft und für eine Stunde bei 10 °C weitergerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der Ansatz auf Eis gegeben und mit KOH-Plätzchen neutralisiert. Die hellgelbe organische Phase wird abgetrennt und mit Na_2SO_4 getrocknet. Zur Reinigung wird der Ansatz auf Kieselgel 60 mit 1 : 1 Pentan und Ethanol gesäult. Man erhält eine Produktfraktion, die nach Einrotieren und Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum als hellgelbes Öl verbleibt.

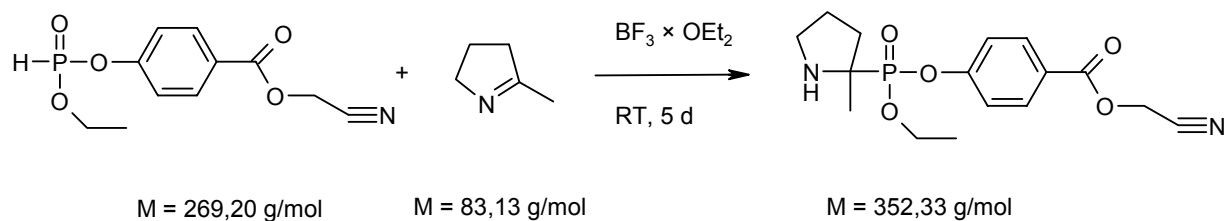
Ausbeute: 20,5 % (7,48 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3):

Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	1,386	t	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,043$
b	4,815	dq	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,043$; $^3J_{\text{PH}} = 1,95$
c	6,944	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,803$
d	7,933	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,803$
e	4,931	s	2 H	-



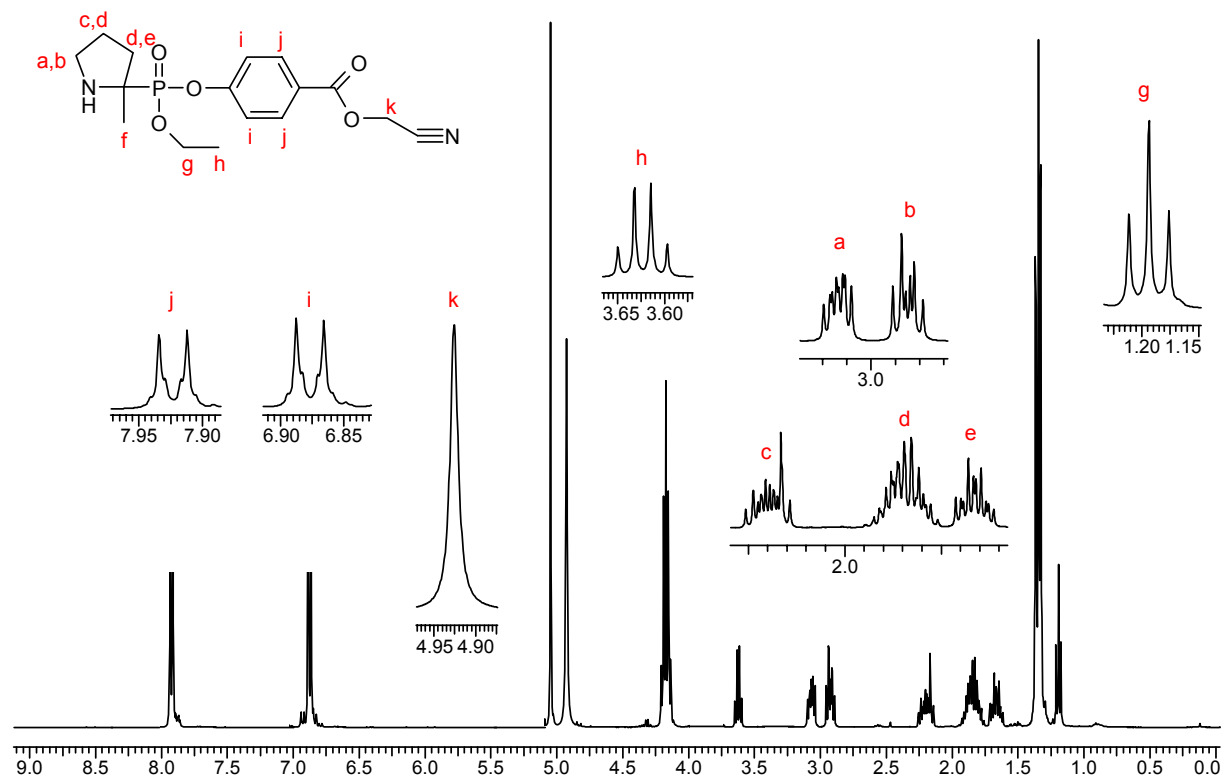
5.4.7.3.3 Synthese von 4-[Ethoxy-(2-methyl-pyrrolidin-2-yl)-phosphinoyloxy]-benzoesäure-cyanomethylester



1,07 g Cyanomethyl 4-[[ethoxy(oxido)phosphino]oxy]benzoat (4,02 mmol) werden zusammen mit 382,00 μl 2-Methyl-1-pyrrolin (4,02 mmol) in 20 ml trockenem Dichlormethan gelöst, mit 30,00 μl $\text{BF}_3 \times \text{OEt}_2$ (6 mol%) versetzt und für 5 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der Ansatz auf Wasser gegeben, die organische Phase mit 50 ml Dichlormethan extrahiert, mit Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und einrotiert. Zur Reinigung wird der Ansatz auf Kieselgel 60 mit 1 : 1 Pentan und Ethanol gesäult. Man erhält eine Produktfraktion, die nach Einrotieren und Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum als hellgelbes Öl verbleibt.

Ausbeute: 54 % (2,18 mmol)

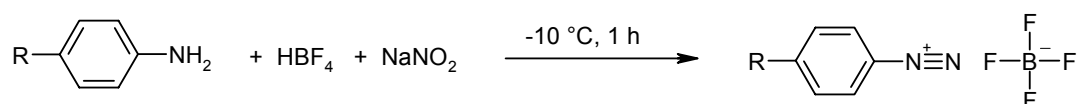
$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CD_3OD):



Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	3,071	m	1 H	-
b	2,902	m	1 H	-
c	2,205	m	1 H	-
d	1,846	m	2 H	-
e	1,661	m	1 H	-
f	1,369	s	3 H	-
g	3,625	q	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 6,994$
h	1,180	t	3 H	$^3J_{\text{HH}} = 6,994$
i	6,883	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,901$
j	7,917	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,901$
k	4,925	s	2 H	-

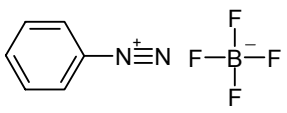
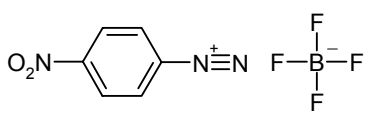
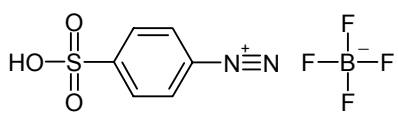
5.5 Synthese von aliphatischen Nitronen

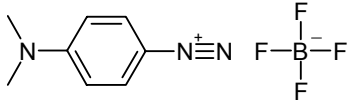
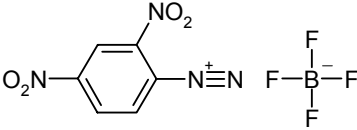
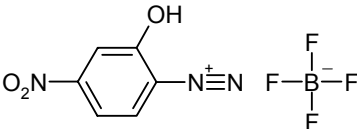
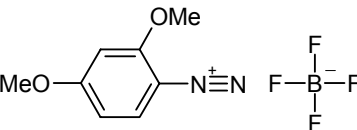
5.5.1 Synthese von verschieden substituierten Benzoldiazoniumtetrafluoroborat-Salzen



65,00 mmol der entsprechenden aromatischen Aminoverbindung werden in 100 ml 20%iger HBF_4 gelöst und auf $-10\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Unter heftigem Rühren werden dann über eine Stunde 65,00 mmol einer wässrigen NaNO_2 -Lösung zugetropft, wobei die Temperatur maximal bis 0°C steigen darf. Durch das ausfallende Diazoniumsalz trübt und dickt die Reaktionslösung schnell ein. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird das Diazoniumsalz über einen Büchnertrichter abgetrennt. Zur Reinigung wird mit 50 ml eiskalter, 5%iger HBF_4 , 100 ml eiskaltem Wasser und 100 ml kaltem Diethylether gewaschen. Das so erhaltene Diazoniumtetrafluoroborat-Salz wird über Nacht im Exsikkator getrocknet und anschließend kurz im Hochvakuum von restlichem Diethylether befreit, wobei eine Erwärmung über $30\text{ }^\circ\text{C}$ vermieden wird. Explosionsgefahr!

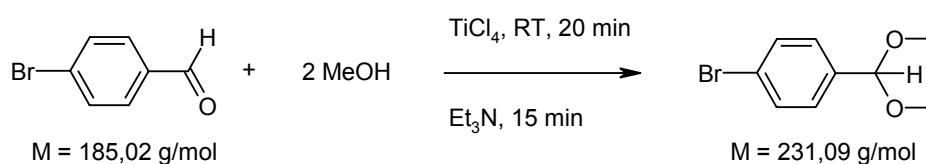
Synthetisierte Diazoniumsalze mit Ausbeuten:

Diazoniumsalz	Strukturformel	Ausbeute	Farbe
Benzoldiazoniumtetrafluoroborat	 $M = 191,92\text{ g/mol}$	95 %	weiß
4-Nitrobenzoldiazoniumtetrafluoroborat	 $M = 236,92\text{ g/mol}$	97 %	hellbraun
4-Benzolsulfonsäurediazoniumtetrafluoroborat	 $M = 271,98\text{ g/mol}$	76 %	weiß

4-Dimethylamino- benzoldiazonium- tetrafluoroborat	 M = 234,99 g/mol	89,5 %	schwarz
2,4-Dinitro- benzoldiazonium- tetrafluoroborat	 M = 281,92 g/mol	96 %	gelb
2-Hydroxy-4-nitro- benzoldiazonium- tetrafluoroborat	 M = 252,92 g/mol	89 %	leuchtend orangerot
2,4-Dimethoxy- benzoldiazonium- tetrafluoroborat	 M = 251,97 g/mol	94 %	tiefviolett

5.5.2 Synthese geschützter TMS-Styrol-Derivate

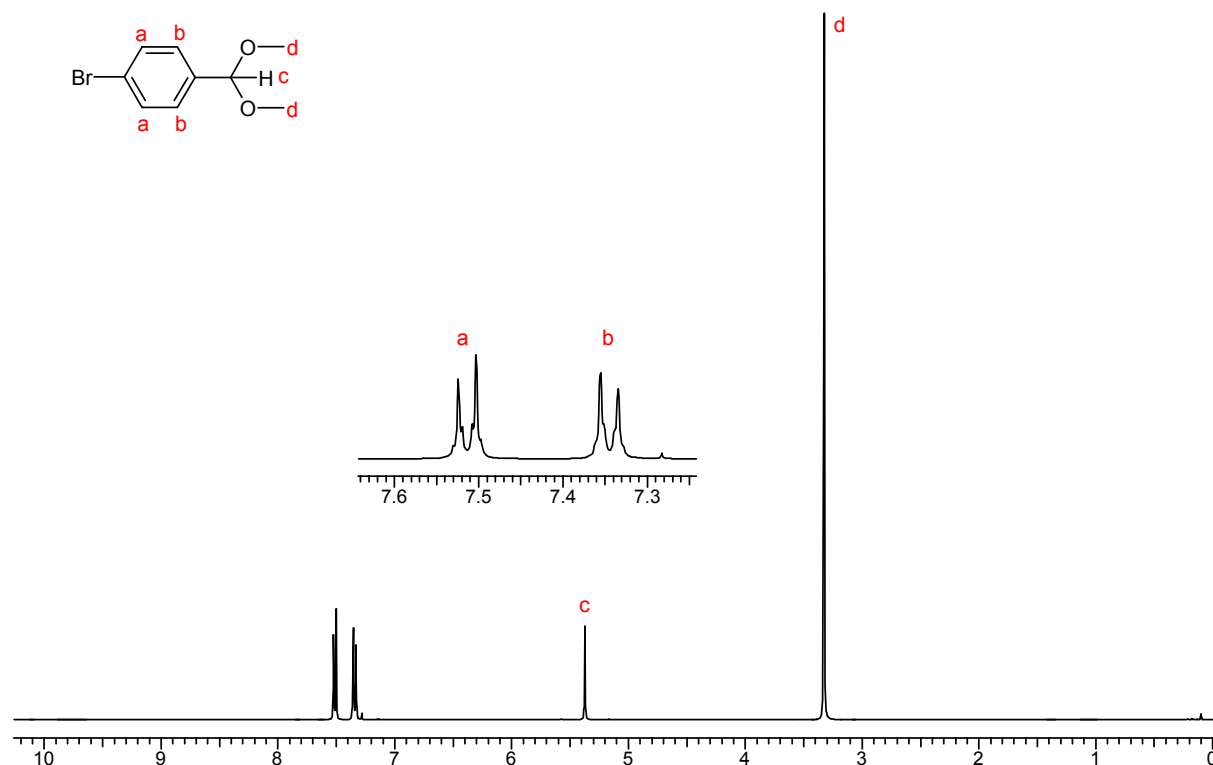
5.5.2.1 Synthese von 1-Brom-4-dimethoxymethyl-benzol



10,00 g 4-Brombenzaldehyd (54,05 mmol) werden in 100 ml trockenem Methanol gelöst und bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre mit 80 μl TiCl_4 versetzt. Nach 20 Minuten Rühren bei RT werden 200 μl Triethylamin zugeben und für 15 Minuten weitergerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der Ansatz auf Wasser gegeben und die organische Phase mit 3×50 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit MgSO_4 getrocknet, filtriert und einrotiert. Nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum erhält man 1-Brom-4-dimethoxymethyl-benzol als gelbliches Öl.

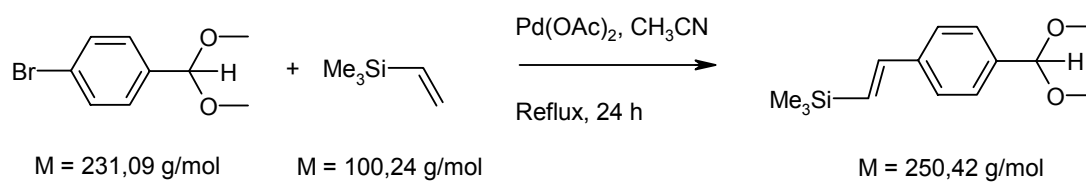
Ausbeute: 98 % (52,97 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3):



Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	7,519	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,52$
b	7,355	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,52$
c	5,375	s	1 H	-
d	3,326	s	6 H	-

5.5.2.2 Synthese von [2-(4-Dimethoxymethyl-phenyl)-vinyl]-trimethyl-silan

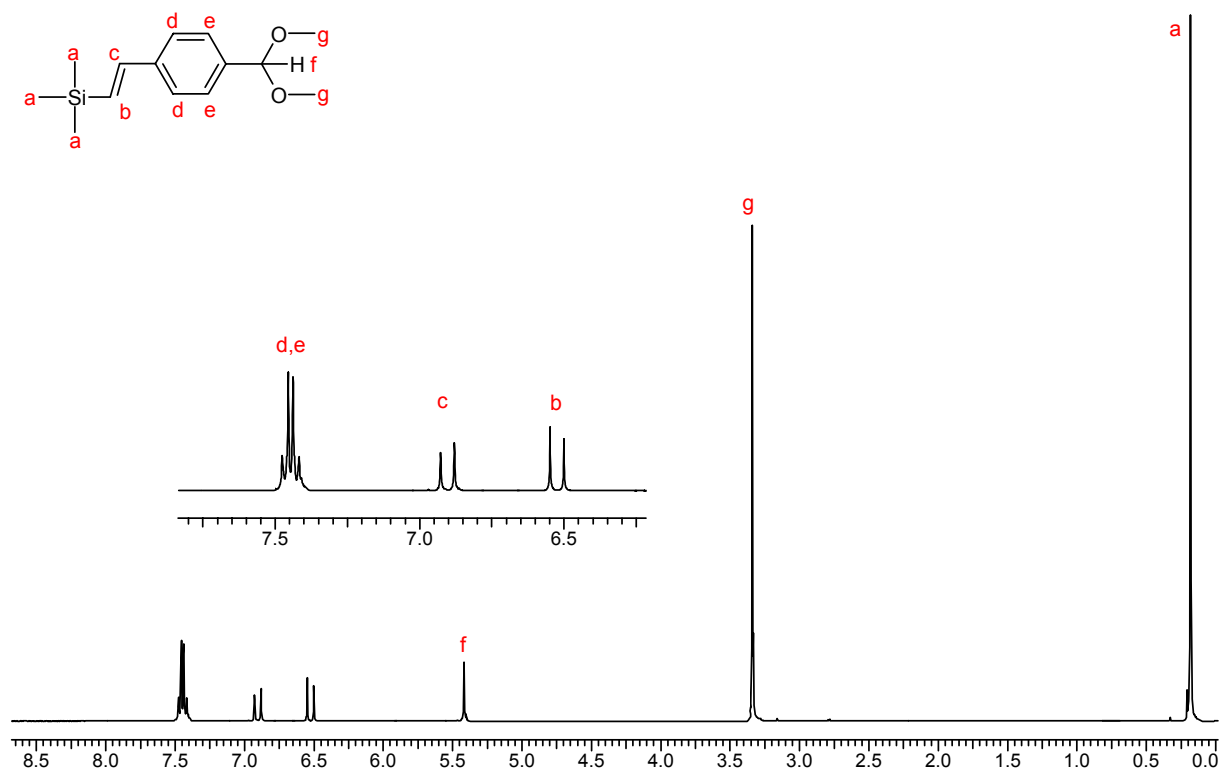


3,95 g 1-Brom-4-dimethoxymethyl-benzol (17,09 mmol) werden unter Argonatmosphäre in 20 ml über CaH_2 getrocknetem Acetonitril gelöst. Nach Zugabe von 12,88 g Tetrabutylammoniumacetat

(42,70 mmol) und 153 mg Pd(OAc)₂ (4 mol%) werden 5,28 ml Trimethylvinylsilan (34,18 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 24 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach Ende der Reaktionszeit wird die nun schwarze Lösung auf Wasser gegeben und mit 50 ml Diethylether extrahiert. Die organische Phase wird mit MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und einrotiert. Nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum erhält man [2-(4-Dimethoxymethyl-phenyl)-vinyl]-trimethyl-silan als dunkelbraunes Öl.

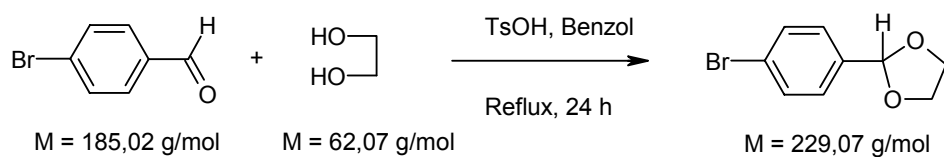
Ausbeute: 95 % (16,24 mmol)

¹H-NMR (400,13 MHz, CDCl₃):



Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	0,181	s	9 H	-
b	6,527	d	1 H	³ J _{HH} = 19,10
c	6,911	d	1 H	³ J _{HH} = 19,10
d	7,476	d	2 H	³ J _{HH} = 8,51
e	7,439	d	2 H	³ J _{HH} = 8,51
f	5,417	s	1 H	-
g	3,341	s	6 H	-

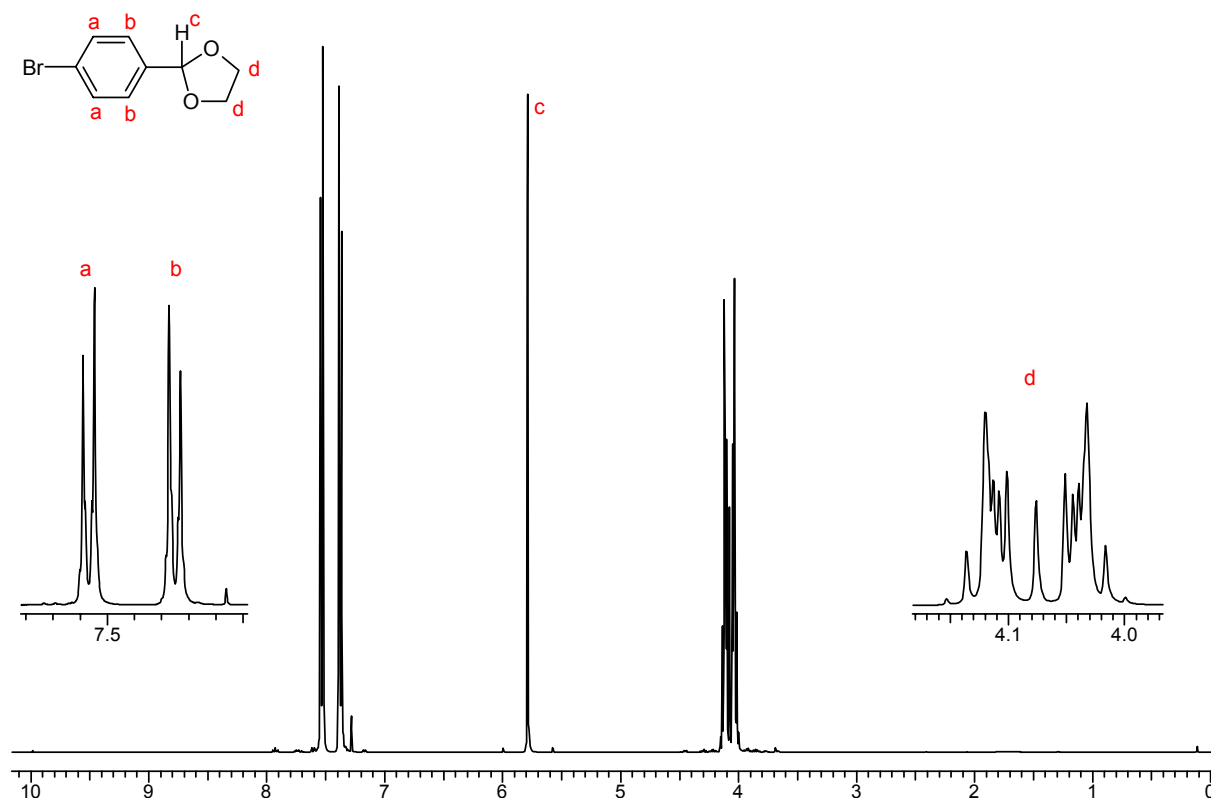
5.5.2.3 Synthese von 2-(4-Bromphenyl)-[1,3]-dioxolan



5,00 g 4-Brombenzaldehyd (27,02 mmol) werden in 30 ml Benzol gelöst und mit 2,26 ml Ethylenglykol (40,53 mmol) sowie einer Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure als Katalysator versetzt. Die Reaktionsmischung wird für 12 Stunden zum Rückfluss erhitzt und mit einem Wasserabscheider regelmäßig das abgetrennte Benzol-Wasser-Azeotrop entfernt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wird der Ansatz auf Wasser gegeben und mit $3 \times 25 \text{ ml}$ Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit MgSO_4 getrocknet, abfiltriert und einrotiert. Nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum erhält man 2-(4-Bromphenyl)-[1,3]-dioxolan als orangegelbes Öl, das nach einigen Tagen Standzeit bei Raumtemperatur teilweise nadelartig kristallisiert.

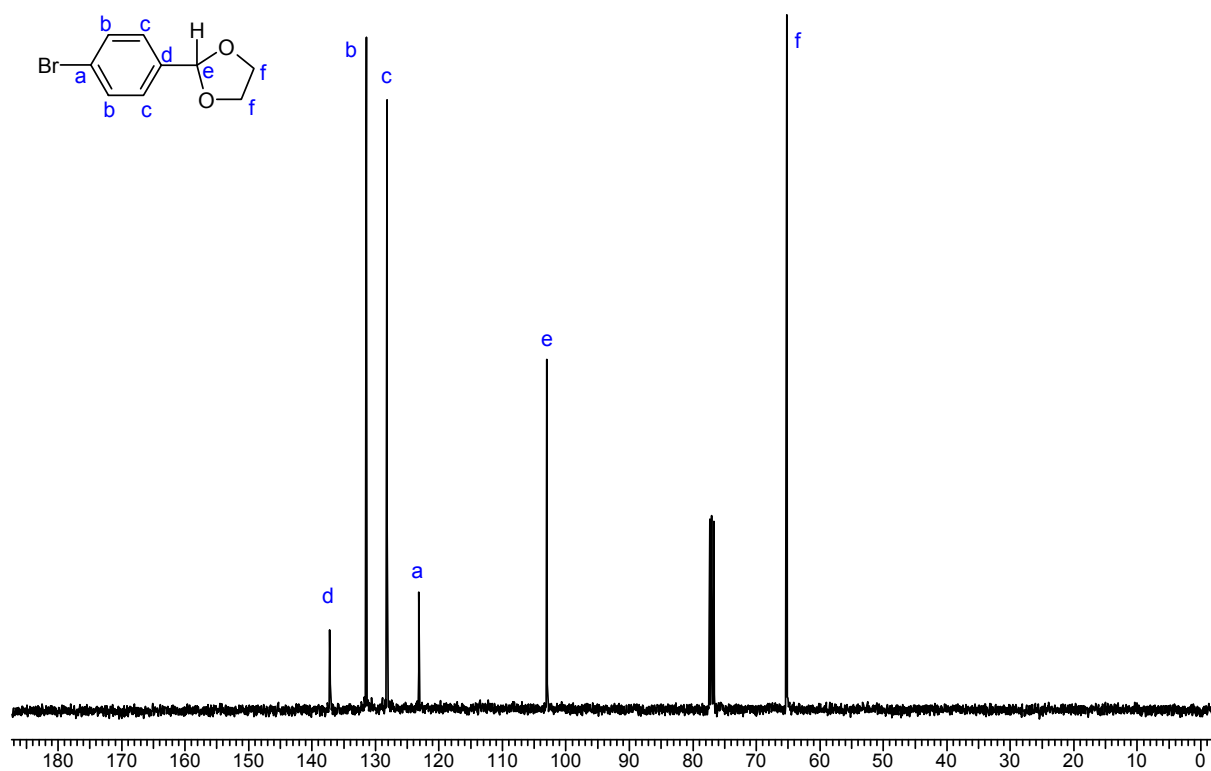
Ausbeute: 98 % (26,53 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3):



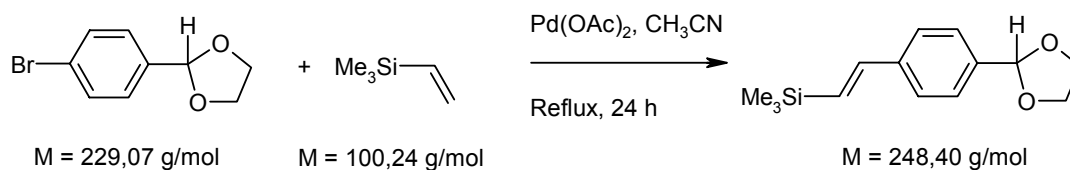
Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	7,541	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,52$
b	7,370	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,52$
c	5,789	s	1 H	-
d	4,076	m	4 H	-

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CDCl_3):



Signal	δ [ppm]
a	123,170
b	131,479
c	128,178
d	137,221
e	103,029
f	65,283

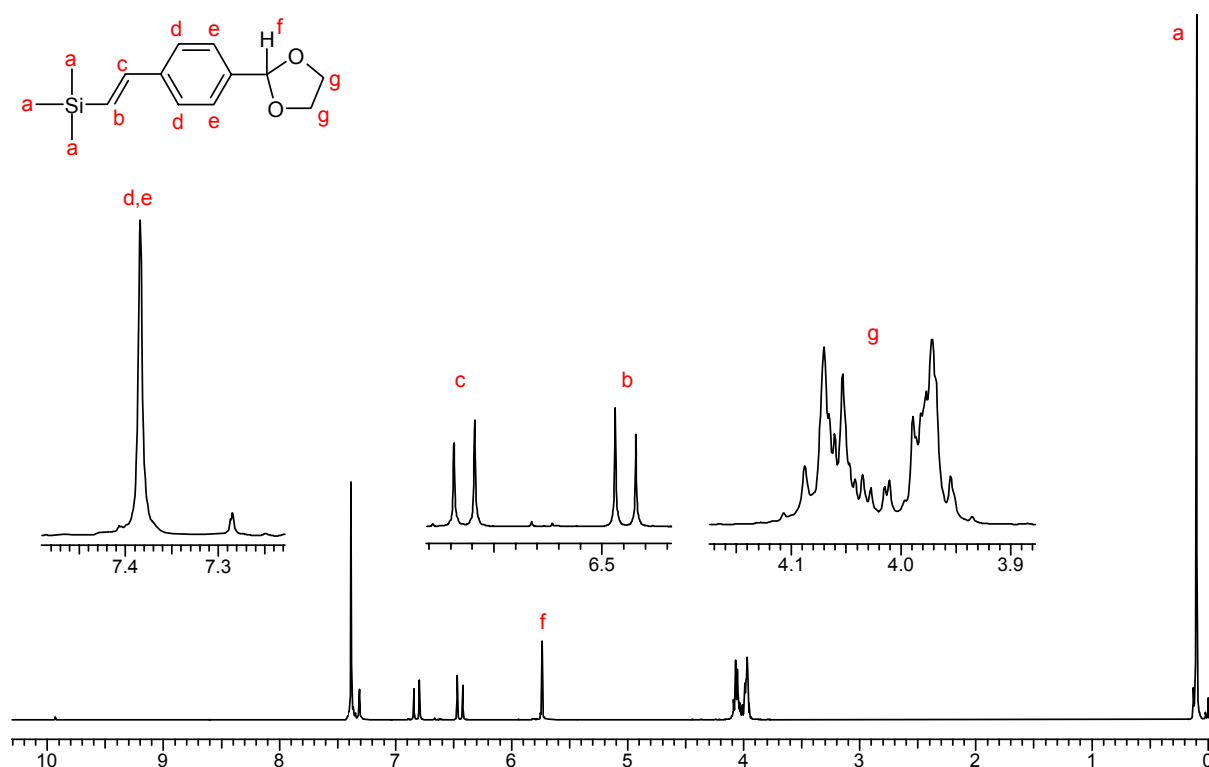
5.5.2.4 Synthese von [2-(4-[1,3]-Dioxolan-2-yl-phenyl)-vinyl]-trimethyl-silan



1 g 2-(4-Bromphenyl)-[1,3]-dioxolan (4,65 mmol) wird unter Argonatmosphäre in 10 ml über CaH_2 getrocknetem Acetonitril gelöst. Nach Zugabe von 3,50 g Tetrabutylammoniumacetat (11,60 mmol) und 31,00 mg $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (3 mol%) werden 1,35 ml Trimethylvinylsilan (9,30 mmol) zugegeben und das Reaktionsgemisch für 30 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Nach Ende der Reaktionszeit wird die nun schwarze Lösung auf Wasser gegeben und mit 100 ml Diethylether extrahiert. Die organische Phase wird mit MgSO_4 getrocknet, abfiltriert und einrotiert. Nach Entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum erhält man [2-(4-[1,3]-Dioxolan-2-yl-phenyl)-vinyl]-trimethyl-silan als dunkelbraunes Öl.

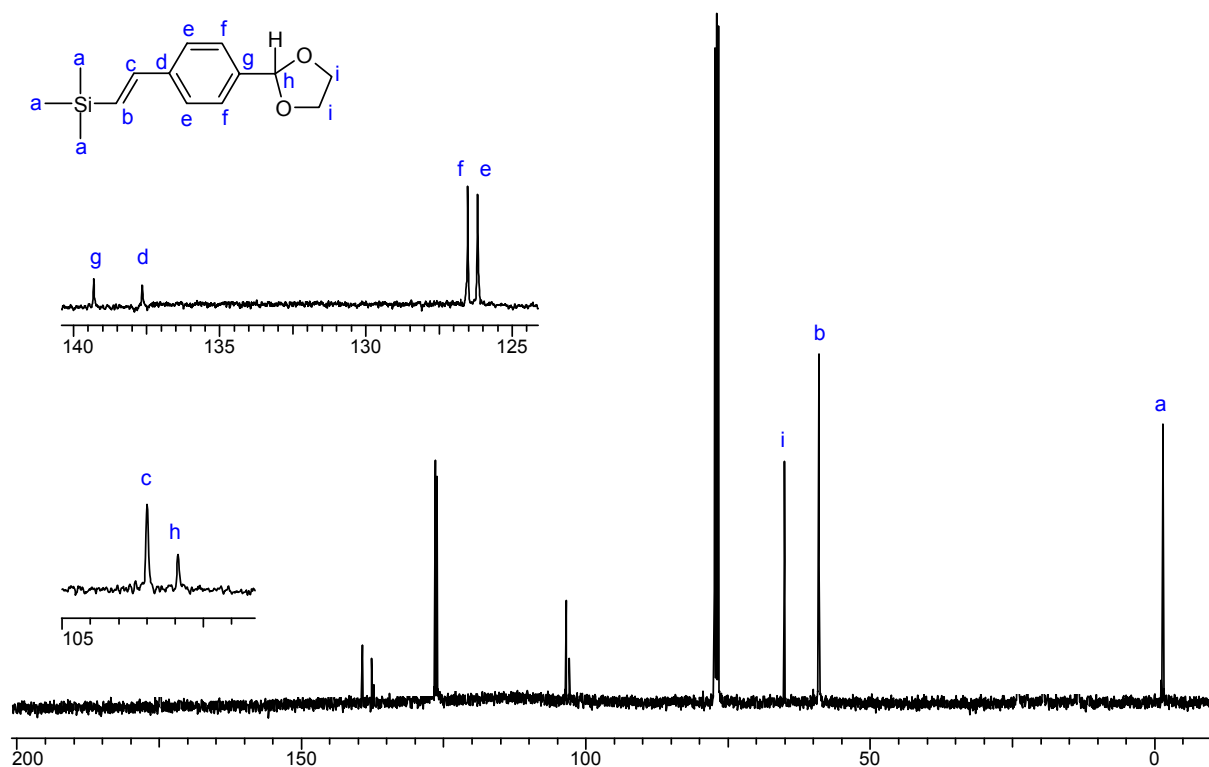
Ausbeute: 94 % (4,37 mmol)

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3):



Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	0,100	s	9 H	-
b	6,445	d	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 19,08$
c	6,820	d	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 19,08$
d, e	7,384	s	4 H	-
f	5,745	s	1 H	-
g	4,011	m	4 H	-

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CDCl_3):

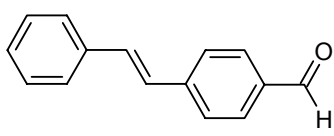
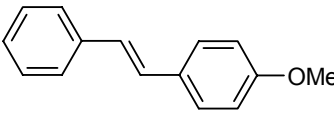


Signal	δ [ppm]
a	-1,430
b	59,090
c	103,500
d	137,650
e	126,190
f	126,520
g	139,310
h	102,940
i	65,120

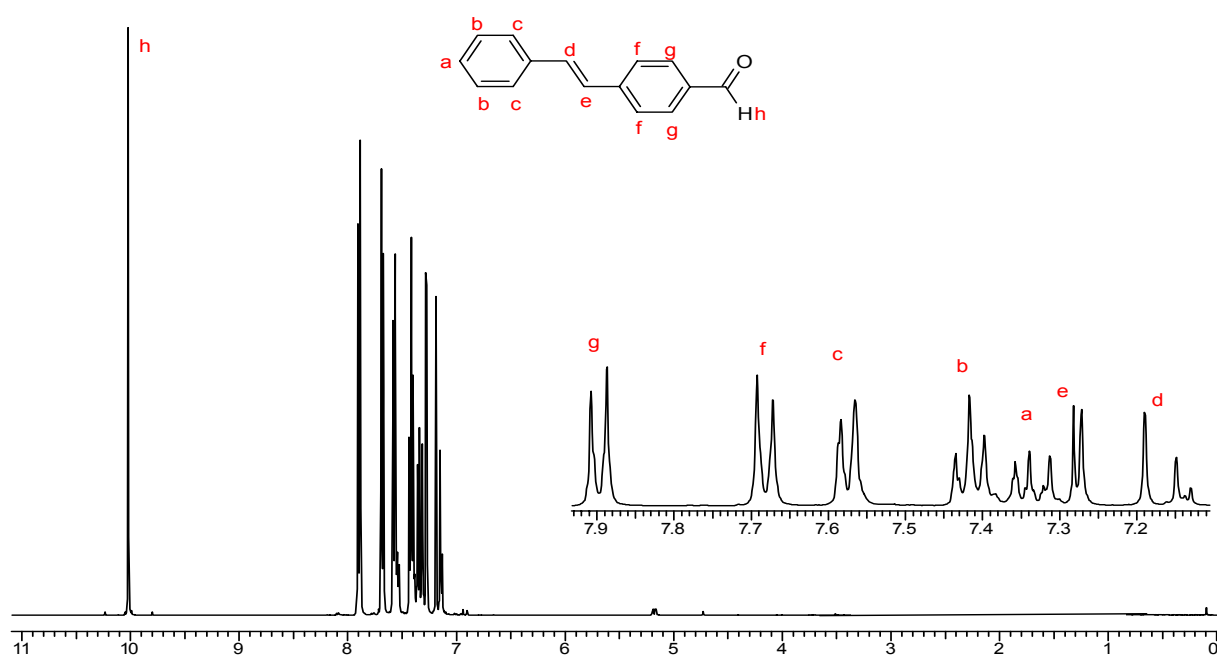
5.5.3 Synthese von Stilben-Derivaten

5.5.3.1 Synthese von Stilbenderivaten, Variante 1

Zu einer Lösung von 1,00 mmol eines Brombenzaldehydderivats in 5 ml DMA werden unter Argonatmosphäre 1,20 mmol eines Styrolderivats und 2mol% Pd(OAc)₂ zugegeben. Als Base werden 2,00 mmol K₃PO₄ verwendet. Die Reaktionslösung wird für 24 Stunden auf 140 °C erhitzt. Nach Reaktionsende hat sich die Lösung schwarz gefärbt und wird auf Wasser gegeben. Nach Extraktion mit 3 × 20 ml Ethylacetat erhält man die Stilbene als farbige Feststoffe.

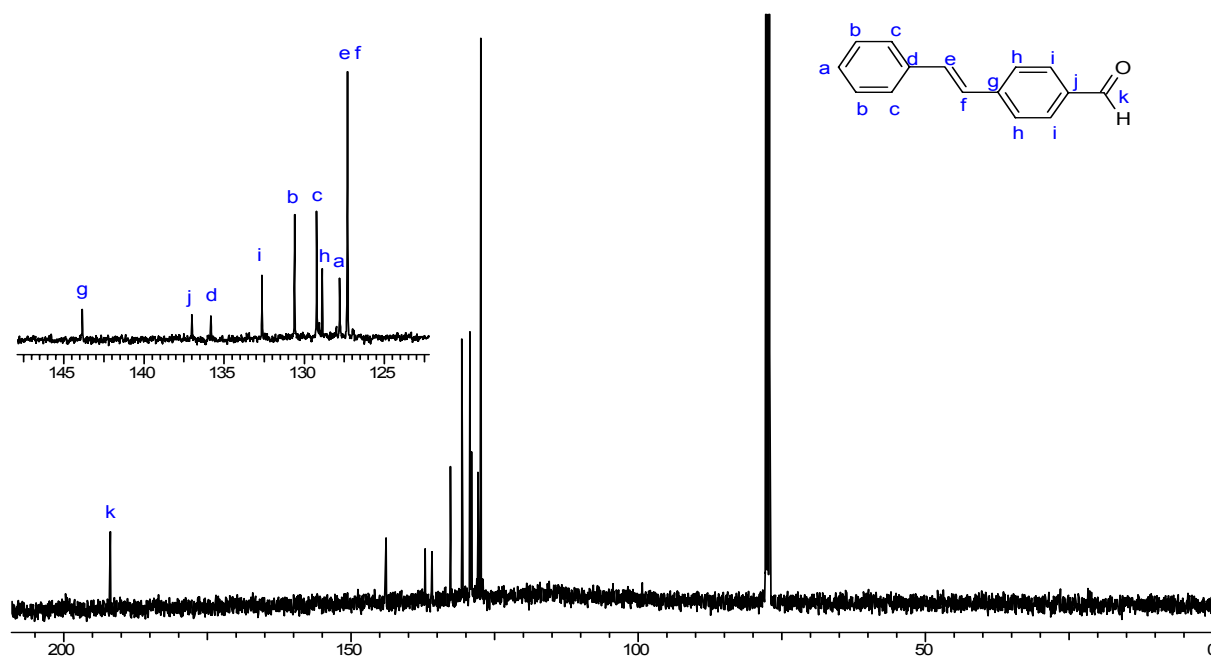
Stilbenderivat	Strukturformel	Ausbeute	Farbe
4-((E)-Styryl)-benzaldehyd	 <p>M = 208,26 g/mol</p>	99 %	Feststoff: hellgelb Lösung: hellgelb
4-Methoxy-4-((E)-styryl)-benzol	 <p>M = 210,28 g/mol</p>	95 %	Feststoff: hellgrau Lösung: gelblich

¹H-NMR (400,13 MHz, CDCl₃): 4-((E)-Styryl)-benzaldehyd

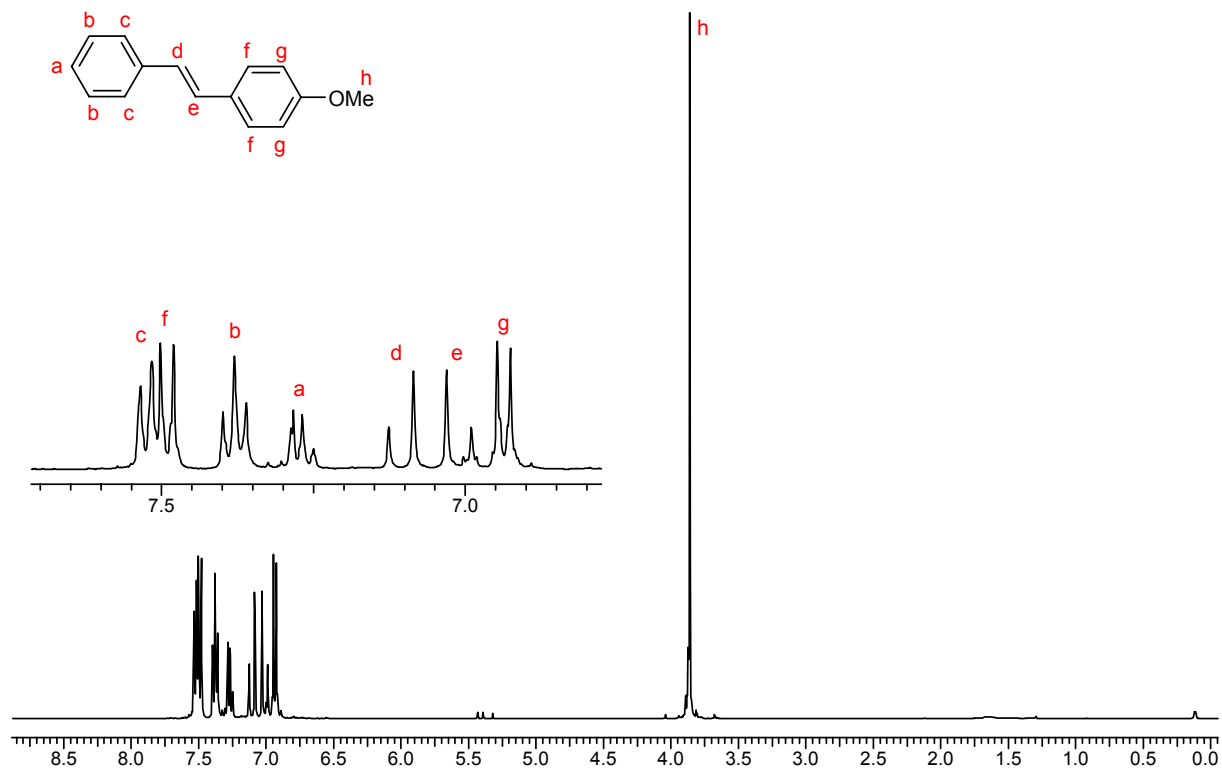


Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	7,340	t	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,34$
b	7,471	t	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 6,97$
c	7,566	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 6,97$
d	7,190	s	1 H	-
e	7,270	s	1 H	-
f	7,672	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,07$
g	7,887	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,44$
h	10,021	s	1 H	-

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CDCl_3): 4-((E)-Sytryl)-benzaldehyd

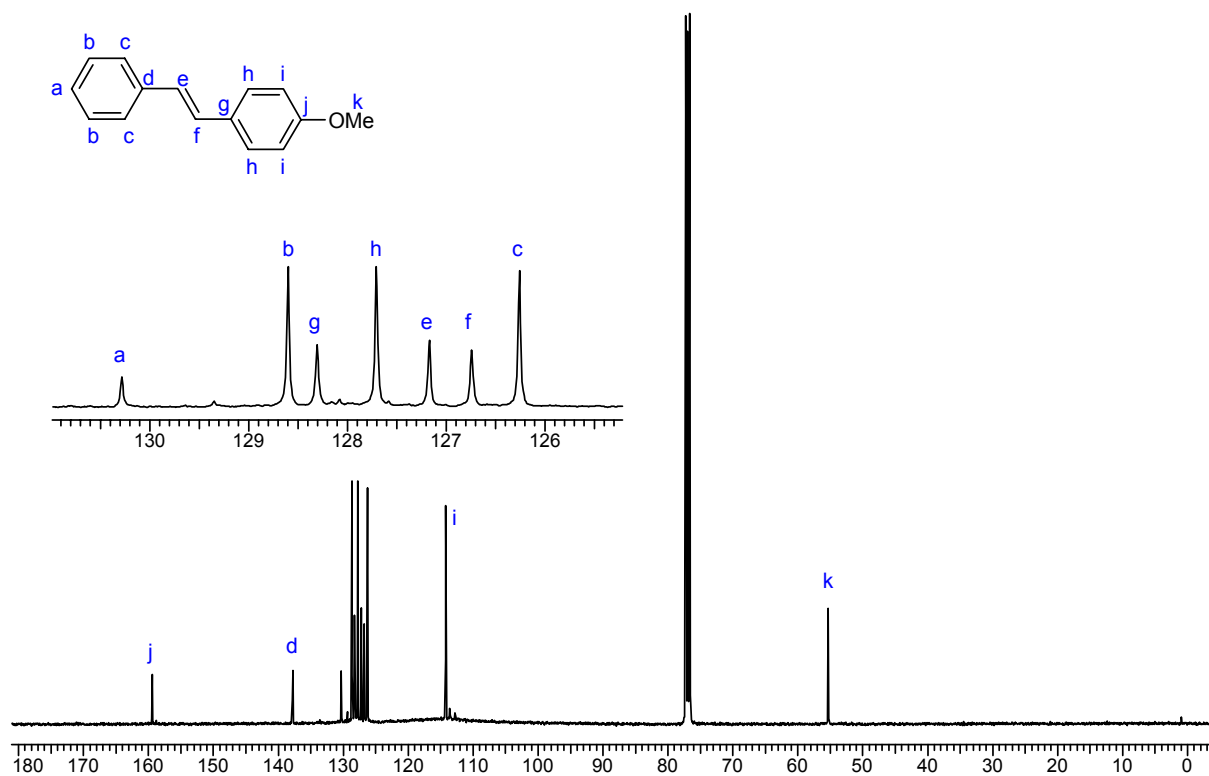


Signal	δ [ppm]
a	127,783
b	130,597
c	128,783
d	135,816
e, f	127,295
g	143,842
h	129,215
i	132,626
j	137,004
k	191,857

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3): 4-Methoxy-4-((E)-styryl)-benzol

Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	7,269	t	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,31$
b	7,381	t	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,31$
c	7,516	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,31$
d	7,086	d	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 16,21$
e	7,003	d	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 16,21$
f	7,502	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,58$
g	6,931	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,58$
h	3,863	s	3 H	-

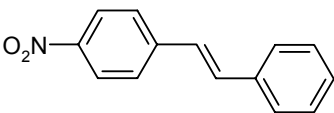
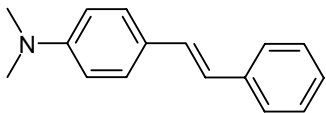
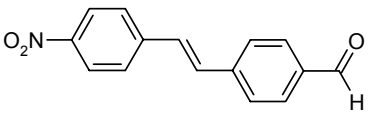
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (100,61 MHz, CDCl_3): 4-Methoxy-4-((E)-styryl)-benzol



Signal	δ [ppm]
a	130,175
b	128,658
c	126,269
d	137,684
e	127,645
f	127,224
g	128,233
h	127,736
i	114,163
j	159,339
k	55,335

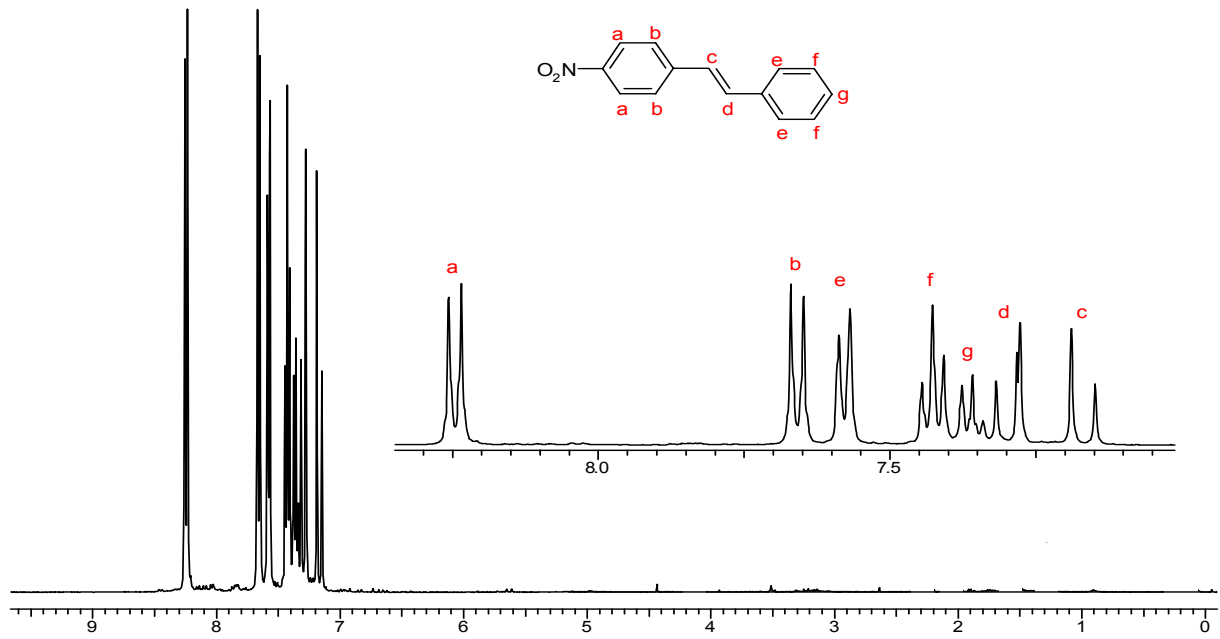
5.5.3.2 Synthese von Stilbenderivaten, Variante 2

1,00 mmol Diazoniumtetrafluorborat-Salz wird mit 1,00 mmol der entsprechenden Styrolerivate und 2 mol% Pd(OAc)₂ in 20 ml trockenem Methanol bei Raumtemperatur für 5 Stunden gerührt. Nach Abschluss der Gasentwicklung gibt man den Ansatz auf Wasser und extrahiert mit 50 ml Ethylacetat. Die organische Phase wird mit MgSO₄ getrocknet, abfiltriert und einrotiert. Nach entfernen der Lösungsmittelreste im Hochvakuum erhält man die Stilbene als farbige Feststoffe.

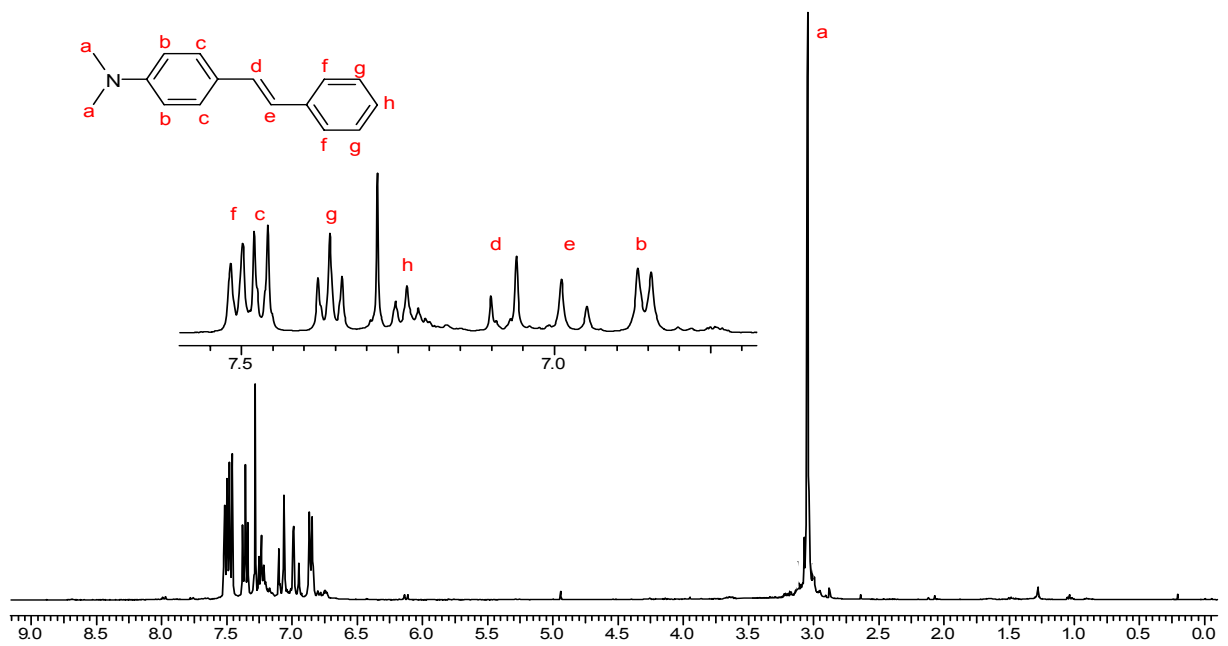
Stilbenderivat	Strukturformel	Ausbeute	Farbe
1-Nitro-4-((E)-styryl)-benzol	 M = 225,25 g/mol	99 %	Feststoff: gelb Lösung: gelb
Dimethyl-[4-((E)-styryl)-phenyl]-amin	 M = 223,32 g/mol	95 %	Feststoff: grau-schwarz Lösung: tiefgrün
4-[(E)-2-(4-Nitrophenyl)-vinyl]-benzaldehyd	 M = 253,26 g/mol	95 %	Feststoff: gelb-grün Lösung: gelb

¹H-NMR (400,13 MHz, CDCl₃): 1-Nitro-4-((E)-styryl)-benzol

Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	8,235	d	2 H	³ J _{HH} = 8,86
b	7,670	d	2 H	³ J _{HH} = 8,86
c	7,189	d	1 H	³ J _{HH} = 16,35
d	7,238	d	1 H	³ J _{HH} = 16,35
e	7,569	d	2 H	³ J _{HH} = 7,49
f	7,428	t	2 H	³ J _{HH} = 7,49
g	7,358	t	1 H	³ J _{HH} = 7,49

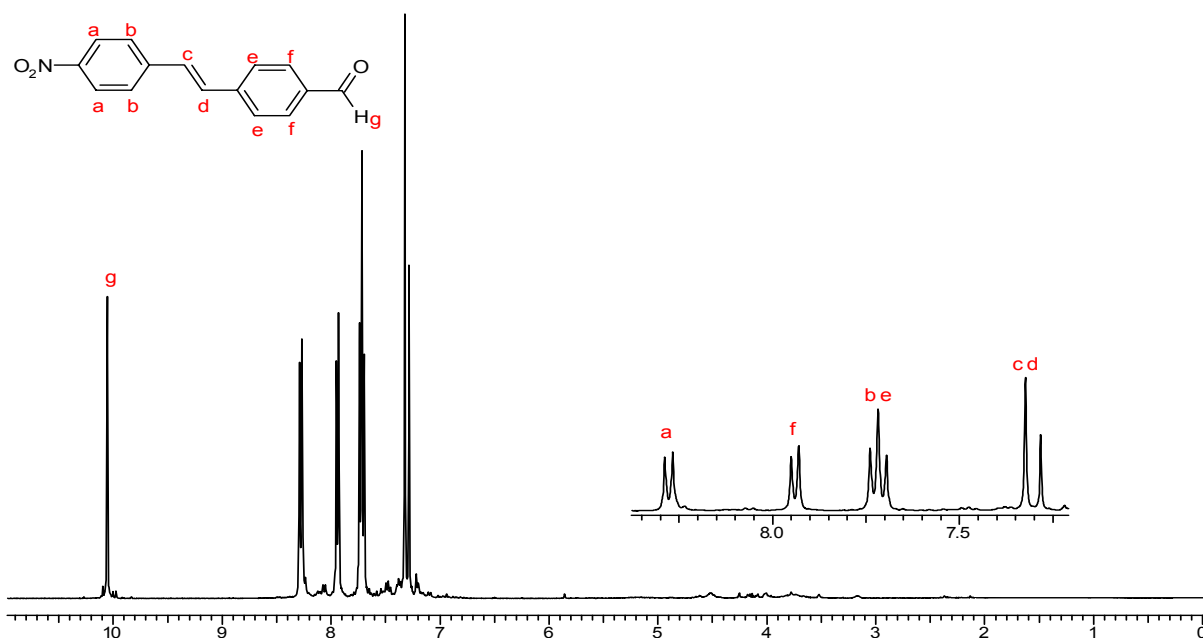


$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3): Dimethyl-[4-((E)-styryl)-phenyl]-amin



Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	3,046	s	6 H	-
b	6,845	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,85$
c	7,458	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,85$
d	7,071	d	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 16,35$
e	6,989	d	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 16,35$
f	7,499	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,49$
g	7,359	t	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,49$
h	7,236	t	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,49$

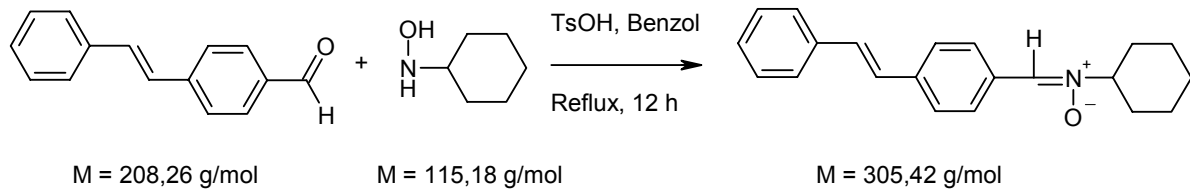
$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3): 4-[(E)-2-(4-Nitrophenyl)-vinyl]-benzaldehyd



Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
α	8,267	δ	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,52$
β, ϵ	7,718	$\pi\sigma\epsilon\upsilon\delta\sigma\tau$	4 H	-
χ, δ	7,324	σ	2 H	-
ϕ	7,930	δ	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,51$
γ	10,025	σ	1 H	-

5.5.4 Synthese von Stilbennitronen

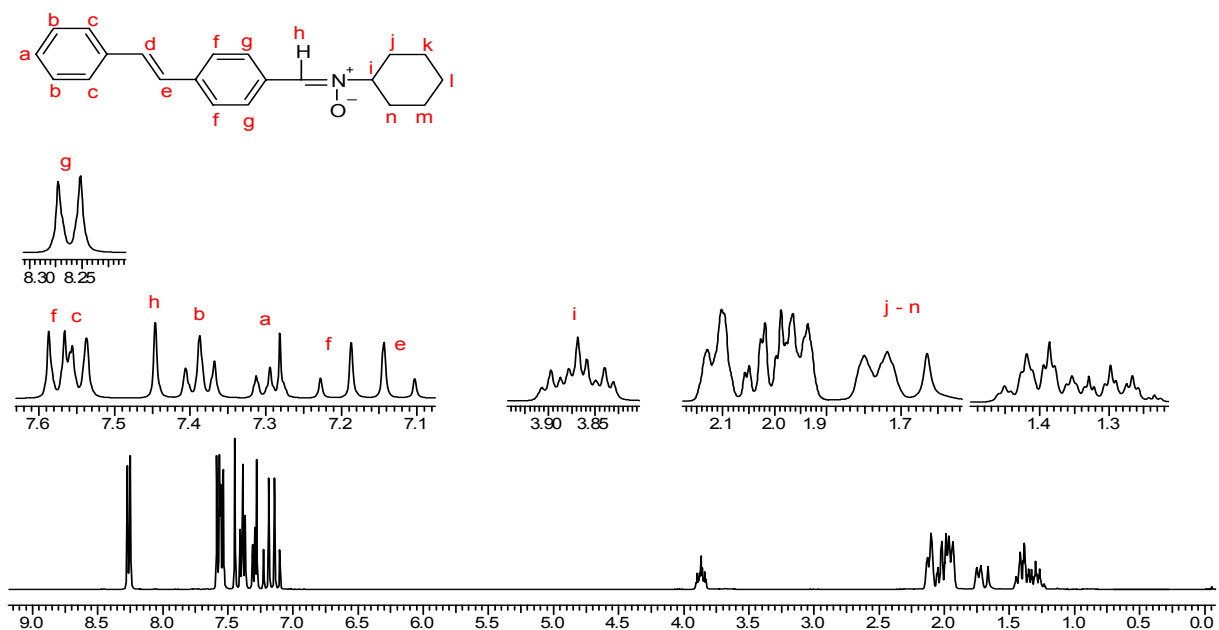
5.5.4.1 Synthese von Cyclohexylstilbennitron



1,36 g 4-((E)-Styryl)benzaldehyd (6,24 mmol) werden zusammen mit 1,00 g Cyclohexylhydroxylamin (8,68 mmol) in 30 ml Benzol gelöst. Nach Zugabe einer Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure als Katalysator, wird der Ansatz für 12 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Das entstehende Benzol-Wasser-Azeotrop wird mit einem Wasserabscheider regelmäßig entfernt. Nach Abschluss der Reaktionszeit wird der Ansatz am Rotationsverdampfer eingedunstet, über wenig Aktivkohle filtriert und das restliche Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt. Nach weiteren zwei Filtrationen über Aktivkohle mit Ethanol als Lösungsmittel erhält man nach Entfernen des Lösungsmittels im Hochvakuum Cyclohexylstilbennitron als hellgelben Feststoff.

Ausbeute: 46 % (2,86 mmol)

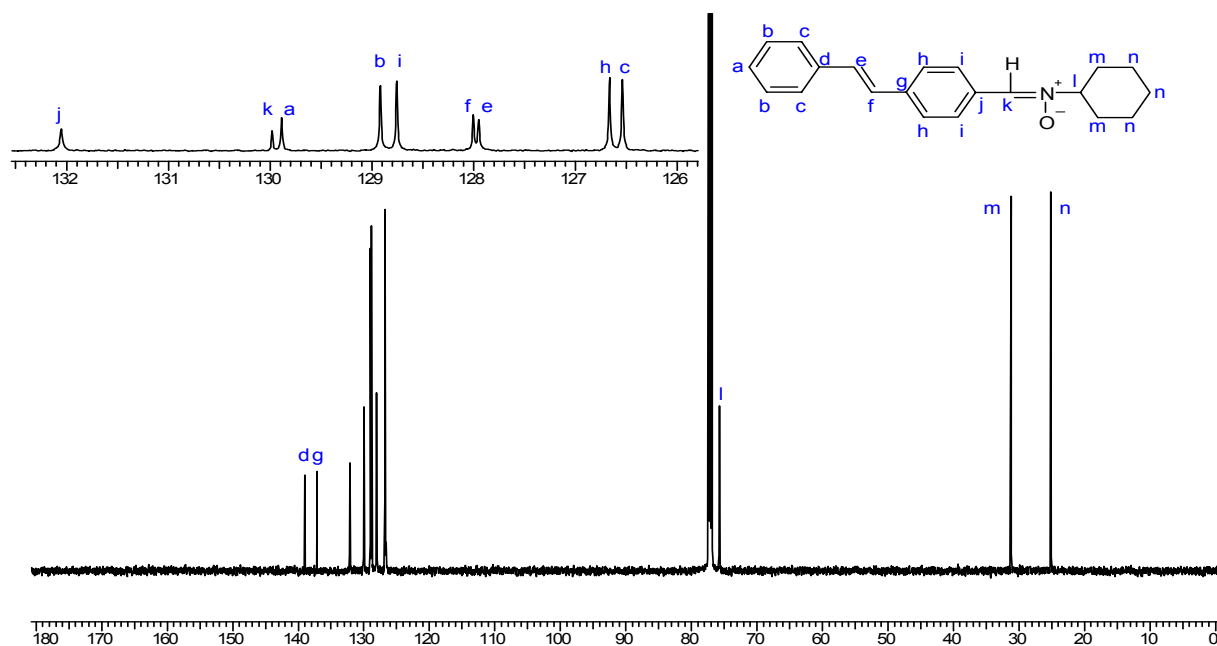
$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3):



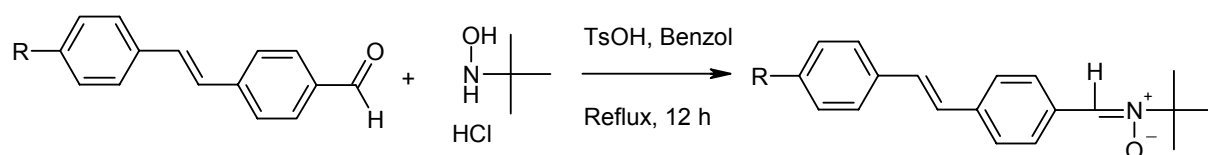
Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	7,295	t	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,31$
b	7,388	t	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,31$
c	7,537	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,31$
d	7,187	d	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 16,21$
e	7,144	d	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 16,21$
f	7,566	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,58$
g	8,251	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,58$
h	7,466	s	1 H	-
i	3,869	tt	1 H	7,63; 3,82
j-n	1,354; 1,720; 2,019	m	10 H	-

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (150,90 MHz, CDCl_3):

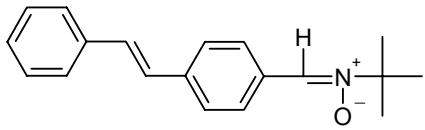
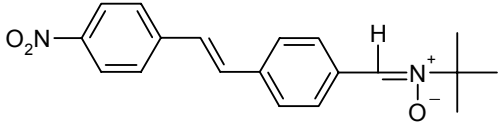
Signal	δ [ppm]
a	129,880
b	128,910
c	126,540
d	138,96
e	127,950
f	128,000
g	137,070
h	126,660
i	128,750
j	132,050
k	129,980
l	75,650
m	31,180
n	25,100



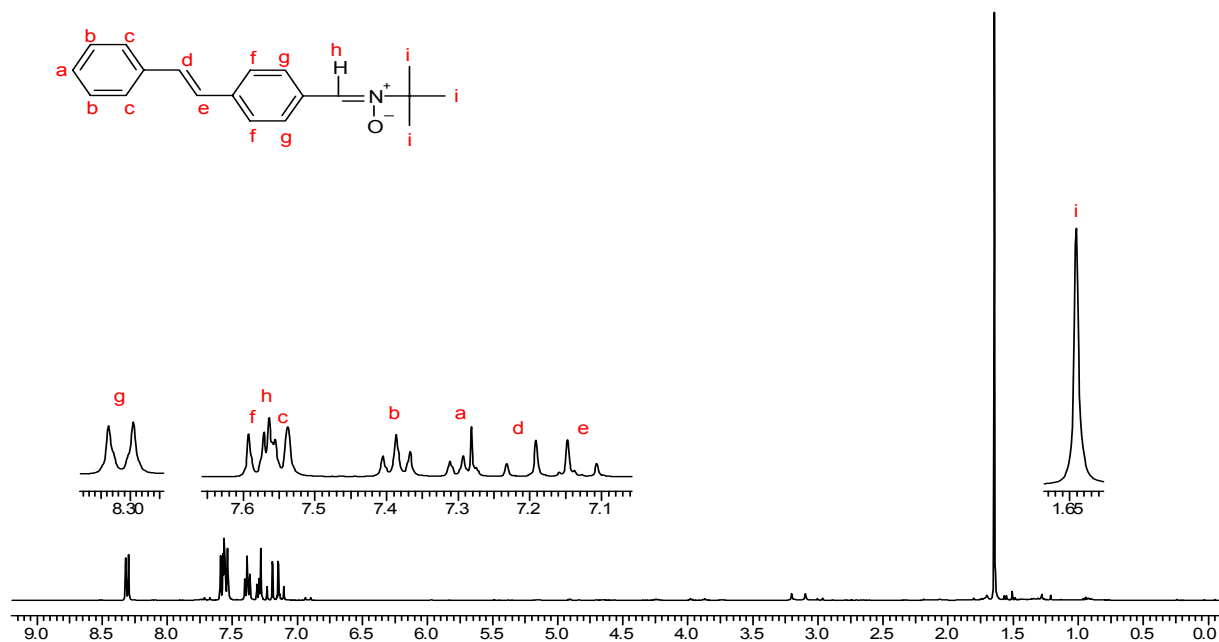
5.5.4.2 Synthese von N-*tert*-Butyl-stilbennitronen



1 mmol eines Stilbenbenzaldehyds wird zusammen mit 1,5 mmol N-*tert*-Butylhydroxylaminhydrochlorid in 30 ml Benzol gelöst. Nach Zugabe einer Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure als Katalysator, wird der Ansatz für 12 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Das entstehende Benzol-Wasser-Azeotrop wird mit einem Wasserabscheider regelmäßig entfernt. Nach Abschluss der Reaktionszeit wird der Ansatz auf Wasser gegeben, mit 3 × 50 ml Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels per Rotationsverdampfer bzw. Hochvakuumpumpe erhält man das entsprechende N-*tert*-Butylstilbennitron als farbigen Feststoff.

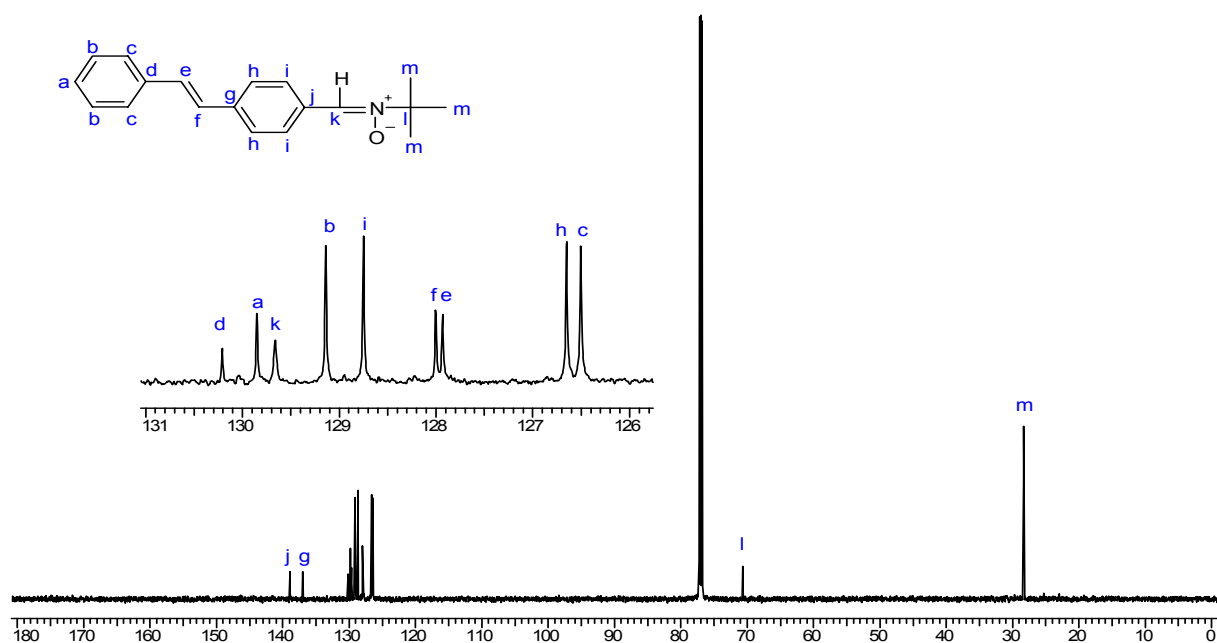
Stilbennitronderivat	Ausbeute
 $M = 279,39 \text{ g/mol}$	62 %
 $M = 324,38 \text{ g/mol}$	75 %

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CDCl_3): *N-tert-Butyl- α -[trans-(4-styryl-phenyl)]-nitron*



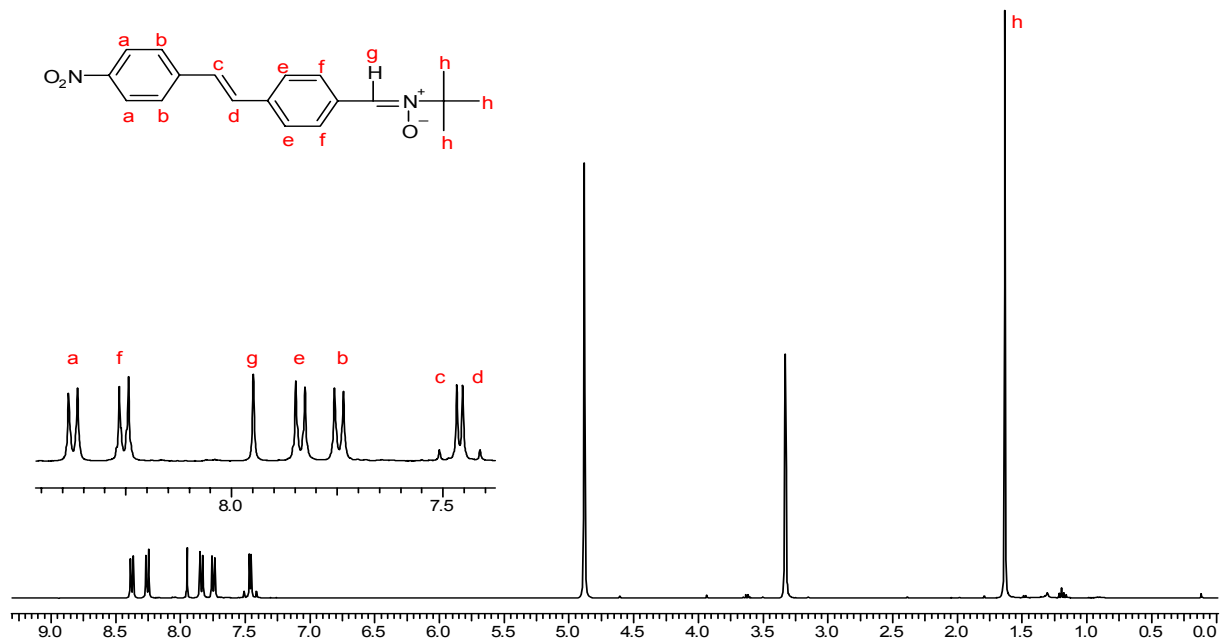
Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	7,293	t	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,34$
b	7,386	t	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,34$
c	7,538	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 7,34$
d	7,191	d	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 16,43$
e	7,128	d	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 16,43$
f	7,571	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,51$
g	8,319	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,51$
h	7,564	s	1 H	-
i	1,646	s	9 H	-

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (150,90 MHz, CDCl_3):



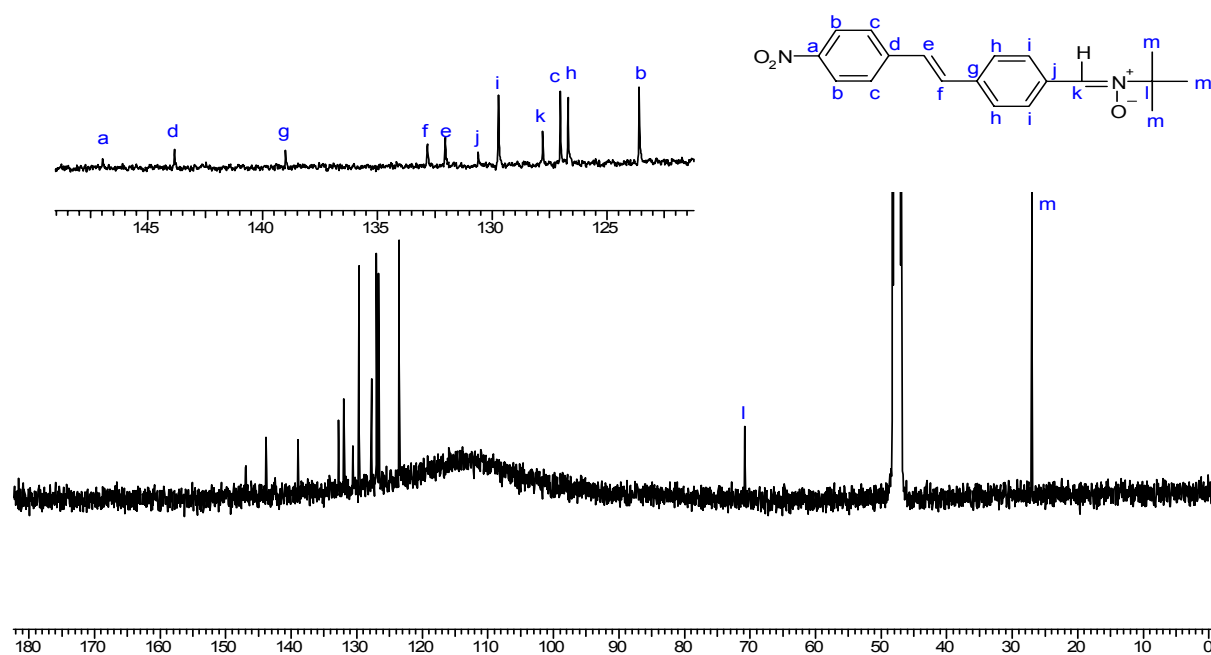
Signal	δ [ppm]
a	129,850
b	128,750
c	126,500
d	130,210
e	127,930
f	128,000
g	137,080
h	126,650
i	129,140
j	138,980
k	129,660
l	70,720
m	28,370

$^1\text{H-NMR}$ (400,13 MHz, CD_3OD): N-*tert*-Butyl- α -[*trans*-(4-(4-nitrostyryl)-phenyl)]-nitron



Signal	δ [ppm]	Multiplizität	Integral	Kopplungskonstanten [Hz]
a	8,386	t	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,27$
b	7,736	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,27$
c	7,487	d	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 16,53$
d	7,431	d	1 H	$^3J_{\text{HH}} = 16,53$
e	7,826	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,90$
f	8,248	d	2 H	$^3J_{\text{HH}} = 8,90$
g	7,949	s	1 H	-
h	1,634	s	9 H	-

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR (CD_3OD):



Signal	δ [ppm]
a	146,975
b	123,593
c	127,040
d	143,852
e	132,048
f	132,821
g	139,006
h	126,697
i	129,722
j	130,614
k	127,802
l	70,843
m	27,019

5.6 ESR-Messungen der zyklischen Nitrone

5.6.1 Geräteeinstellungen

Alle ESR-Messungen wurden in einer Quarzkapillare in der dielektrischen Cavity ER4118 X-MD-5 durchgeführt.

Parameter	Einstellungen
Temperatur	295 K
Konversionszeit	81,92 ms
Mikrowellenfrequenz	9,7 GHz
Mikrowellenleistung	20,166 mW
Modulationsfrequenz	100 kHz
Modulationsamplitude	1 G
Receiver Gain	90 dB
Spektrenbreite	80 G
Mittelfeld	3452 G
Zeitkonstante	81,92 ms
Scanzahl	1
Messpunkte	2048

5.6.2 Probenbereitung

Spin-Trap-Proben zyklischer Nitrone müssen unmittelbar vor geplanten ESR-Messungen frisch präpariert werden. Selbst wenn frisch synthetisierte Proben zum Einsatz kommen, die im NMR-Spektrum keinerlei Verunreinigungen aufweisen, ist immer ein kleiner Anteil als bereits radikalische Spezies in der Probe vorhanden und liefert Grund- und Artefaktsignale im ESR-Spektrum. Zur Aufreinigung wird daher wie folgt vorgegangen:

Eine kleine Menge der Spin-Trap-Verbindung wird in 10 ml Methanol p.a. gelöst. Als Mengenangabe kann aufgrund der unvermeidbaren Substanzverluste durch die Aufreinigung in etwa das 1,5 fache der Menge verwendet werden, die man für das Ansetzen einer 100 mM Stammlösung benötigt (s. unten). Diese Lösung wird zu gleichen Anteilen in Eppendorfgläser

gefüllt und mit wenig Aktivkohle (mg pro Eppi) versetzt, für 2 Minuten gevortext und dann in der Eppendorfszentrifuge für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird entnommen und über eine mit wenig Watte ausgestopfte Pasteurpipette in einen Kolben mit Hahn filtriert. Auf eine Extraktion des Aktivkohlepellets sollte verzichtet werden, da dort die paramagnetischen Spezies gebunden sind, wenngleich dabei auch viel Spin-Trap-Verbindung zurück gewonnen werden könnte.

Das Filtrat wird im Hochvakuum vom Lösungsmittel befreit, ausgewogen und in passender Menge in PBS-Puffer aufgenommen um $c = 100 \text{ mM}$ zu erreichen.

Zur Qualitätskontrolle werden folgende Versuche unternommen:

1. Messung der Stammlösung. Wenn eine ausreichende Qualität für die Messungen erreicht ist sind keine Grundsignale mehr zu sehen, die über einer Intensität von 3000 A.U. liegen. Manchmal ist nach einem Durchgang immer noch ein Artefaktsignal vorhanden. Um dieses weiter zu minimieren wird obige Prozedur wiederholt, wobei dann allerdings das Pellet extrahiert wird. Durch die Aufarbeitungsmethode gehen ca. 10 - 30 % der ursprünglich eingesetzten Spin-Trap-Verbindung verloren!
2. Ist obige Qualität bezüglich der Grundsignale erreicht, so muss unbedingt auf Artefakte untersucht werden, die durch Methanolreste verursacht werden können. Hierzu wird ein Fenton-Ansatz für OH-Radikale gemacht (s. Pipettierschemata unten). Sollte dann ein dupliziertes Triplett-Spektrum entstehen oder anteilig neben dem Pseudo-Quartett-Spektrum des OH-Addukts erkennbar sein, so sind Methanolreste vorhanden. In diesem Fall wird die Probe komplett mit dem PBS-Puffer im Hochvakuum trocken gezogen und für einige Stunden im Vakuum ($1 \times 10^{-3} \text{ mbar}$) belassen. Danach wird erneut in PBS aufgenommen und die Prozedur wiederholt.

Sobald diese Versuche positiv verlaufen sind, kann mit den eigentlichen Messungen begonnen werden. Die so gewonnene Lösung kann für maximal 5 Tage verwendet werden. Dabei sollte sie während der Messungen dunkel auf Eis und am Ende jedes Messtages unter Argon bei -20°C bis zum nächsten Tag gelagert werden.

Benötigte Lösungen:PBS-Puffer, pH = 7,2

8,10 g NaCl (130 mM)

0,92 g Na₂HPO₄ (4,5 mM)0,35 g NaH₂PO₄ × H₂O (2,5 mM)ad 1 l H₂O bidest

pH = 7,2 (NaOH)

Verwendete Spin-Trap-Stammlösungen:

62,50 mg DMPO	ad 5,52 ml PBS-Puffer pH = 7,2	c = 100,05 mM
210,00 mg EMPO	ad 12,27 ml PBS-Puffer pH = 7,2	c = 99,97 mM
98,80 mg BocAEMPO	ad 3,45 ml PBS-Puffer pH = 7,2	c = 100,02 mM
112,00 mg BocEAEMPO	ad 3,56 ml PBS-Puffer pH = 7,2	c = 100,07 mM
186,25 mg AEMPO	ad 10,00 ml PBS-Puffer pH = 7,2	c = 100,02 mM
214,30 mg EAEMPO	ad 10,00 ml PBS-Puffer pH = 7,2	c = 100,01 mM

Lagerung bei -80 °C unter Argonatmosphäre. Beim Gebrauch bei Messungen dunkel auf Eis aufbewahren. Verwendbarkeit der Lösung: maximal 14 Tage

Fenton-Lösungen:

100 mM H₂O₂-Lösung: 510,00 µl H₂O₂ 30 %ig ad 50 ml H₂O bidest.

10 mM Fe²⁺-Lösung: 196,10 mg (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ × 6 H₂O ad 50 ml H₂O bidest.

Beide Lösungen werden stets frisch für eine Messreihe angesetzt. Bei Verwendung an aufeinander folgenden Tagen muss nicht täglich neu angesetzt werden. Maximale Verwendbarkeit beider Lösungen: 14 Tage

Lösungen und Zusätze:

für SO₃-Radikale: 100 mM-Lösung: 126,00 mg NaSO₃ ad 10 ml PBS-Puffer, pH = 7,2

für CO₂-Radikale: 100 mM-Lösung: 68,00 mg Na-Formiat ad 10 ml PBS-Puffer, pH = 7,2

für CH₂OH-Radikale: Methanol p.a. nach Pipettierschema, s.unten.

für CH₂CH₂OH-Radikale: Ethanol p.a. nach Pipettierschema, s.unten

für CH₃-Radikale: DMSO p.a. nach Pipettierschema, s.unten

Die beiden Lösungen für SO₃- und CO₂-Radikale werden stets frisch für eine Messreihe angesetzt. Bei Verwendung an aufeinander folgenden Tagen muss nicht täglich neu angesetzt werden. Maximale Verwendbarkeit beider Lösungen: 14 Tage

5.6.3 Bestimmung der Zerfallskonstanten k_d und der Halbwertszeiten $t_{1/2}$ für die zyklischen Nitrone

5.6.3.1 Bestimmung der Zerfallskonstante k_d und Halbwertszeit $t_{1/2}$ von DMPO

Es wurde nach folgendem Pipettierschema mit den oben aufgeführten Lösungen verfahren:

Radikale	OH	SO ₃	CO ₂	CH ₂ OH	CH ₃ CHOH	CH ₃
Spin-Trap-Stamm. [μ l]	10	10	10	10	10	10
H ₂ O ₂ -Lös. [μ l]	20	20	20	20	20	20
Fe ²⁺ -Lös. [μ l]	20	20	20	20	20	20
PBS-Puffer [μ l]	50	0	0	30	30	30
Zusätze [μ l]	0	50	50	20	20	20

Die Bestimmung der Zerfallskonstanten k_d und der Halbwertszeit $t_{1/2}$ erfolgt durch zweifache Integration der gemessenen ESR-Spektren. Durch die Auftragung der so erhaltenen Flächen gegen die Zeit wird eine exponentieller Fit erster Ordnung gemäß folgender Gleichung gelegt:

$$y = y_0 + A_1 \times e^{-x/t_1}$$

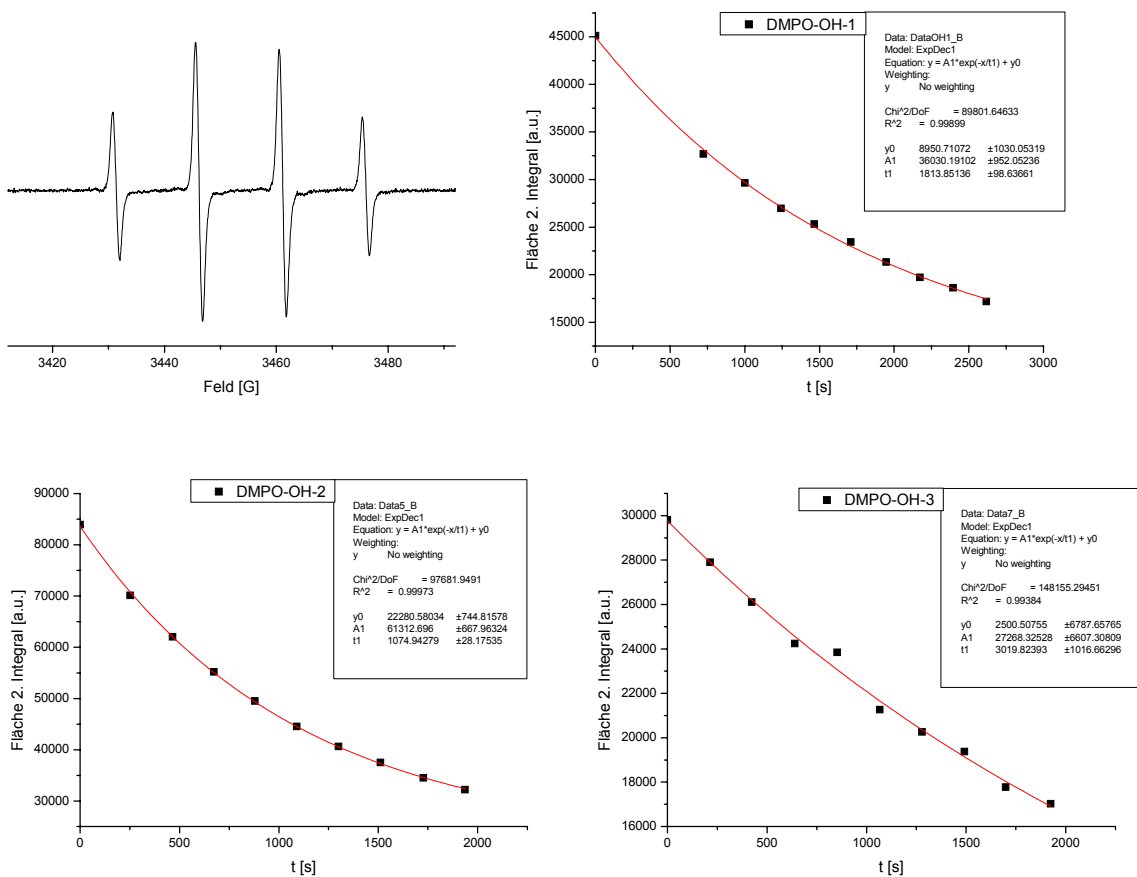
Die zugehörige Zerfallskonstante und Halbwertszeit erhält man nach folgenden Rechnungen:

Für die Zerfallskonstante k_d gilt: $k_d = 1/t_1$ [s⁻¹]

Für die Halbwertszeiten gilt: $x = t_{1/2} = -1 \times \ln \left(\frac{\left(\frac{y_0 + A_1}{2} \right) - y_0}{A_1} \right) \times t_1$ [s]

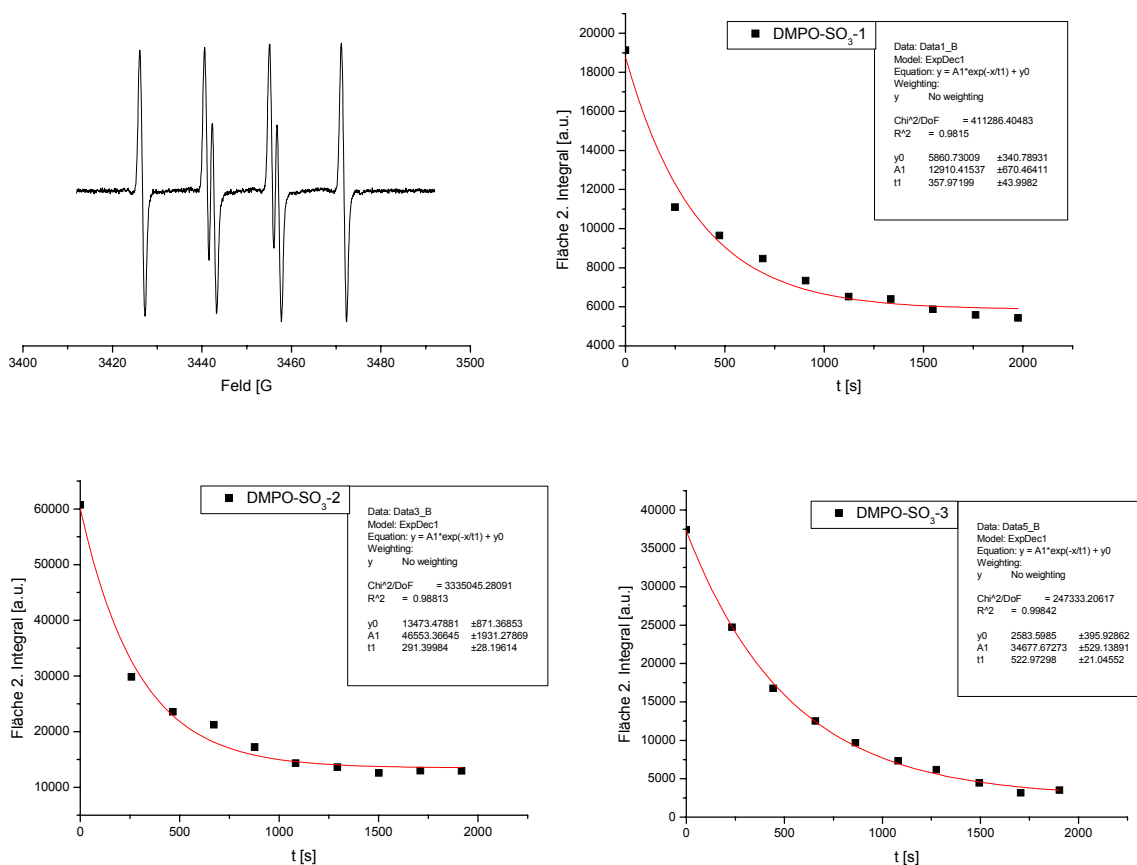
Für alle anderen Messungen wurde analog hierzu verfahren. Ausnahmen sind explizit aufgeführt. Durch Mittelwertbildung aus den so pro Einzelmessreihe erhaltenen Zerfallskonstanten und Halbwertszeiten erhält man die Zerfallskonstante k_d bzw. die Halbwertszeit $t_{1/2}$ mit zugehörigen Standardabweichungen.

Für das DMPO-OH-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:



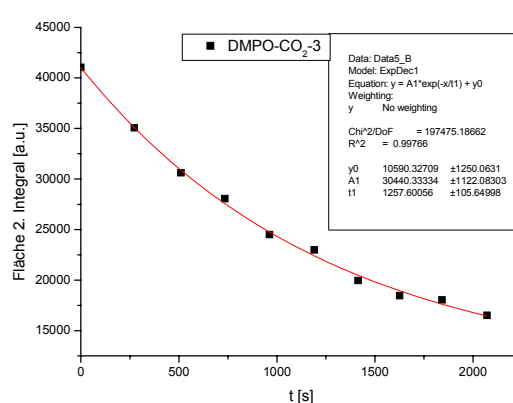
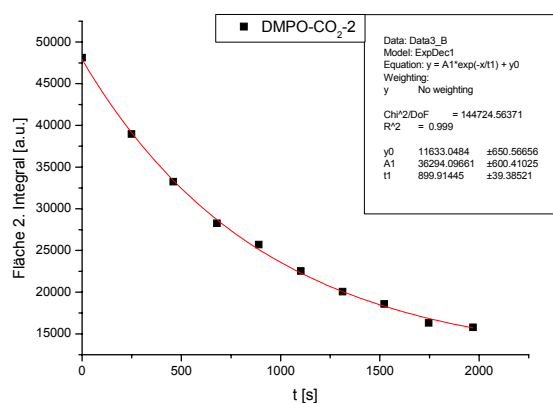
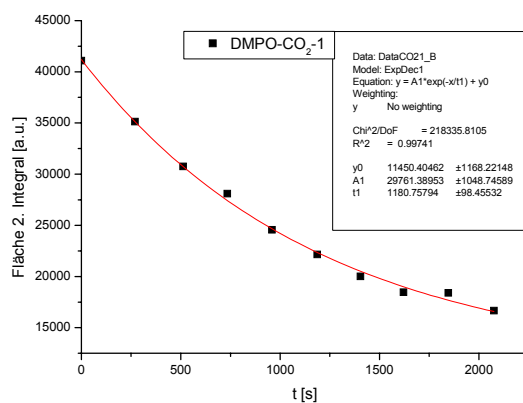
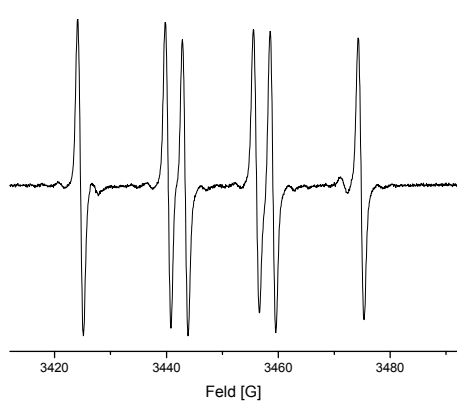
Zeit [s]	Fläche [a.u.] DMPO-OH-1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] DMPO-OH-2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] DMPO-OH-3
0	45130,33	0	83940,42	0	29813,55
723	32696,85	252	70138,82	214	27900,65
1000	29651,29	465	62021,47	423	26106,78
1243	26969,64	673	55209,06	639	24244,05
1465	25315,71	879	49529,14	853	23843,51
1710	23442,94	1090	44544,62	1066	21260,81
1947	21333,47	1300	40642,96	1279	20261,29
2172	19729,00	1511	37509,00	1491	19379,11
2394	18620,52	1727	34524,44	1699	17772,67
2618	17183,25	1936	32181,48	1925	17028,75

Für das DMPO-SO₃-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:



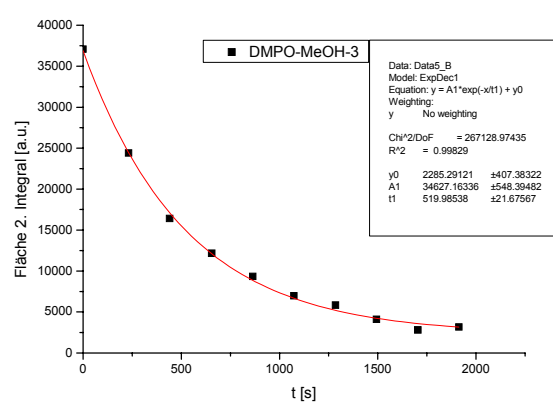
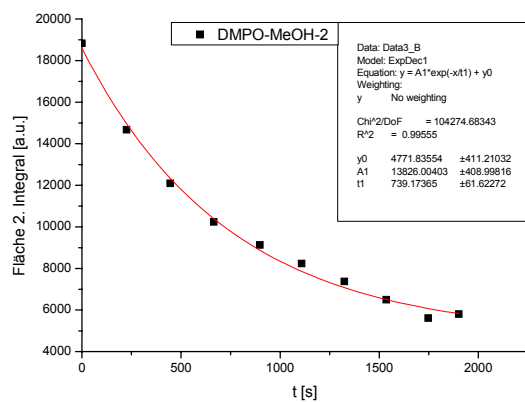
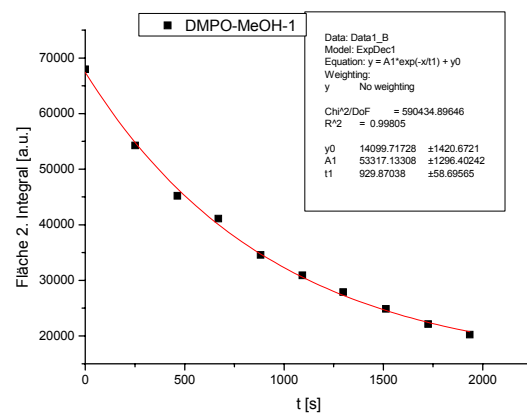
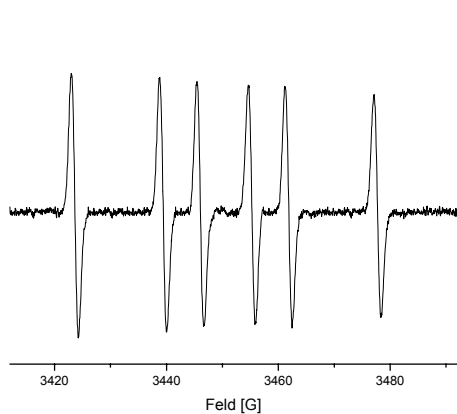
Zeit [s]	Fläche [a.u.] DMPO-SO ₃ -1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] DMPO-SO ₃ -2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] DMPO-SO ₃ -3
0	19133,73	0	60717,88	0	37429,32
249	11101,34	258	29799,31	233	24734,25
473	9642,85	466	23553,76	443	16764,00
691	8466,34	672	21229,04	658	12515,65
906	7342,07	877	17214,22	862	9682,23
1124	6516,99	1083	14323,90	1080	7331,44
1335	6398,32	1293	13632,29	1275	6186,21
1547	5866,20	1502	12579,37	1494	4462,88
1762	5588,13	1710	12985,62	1706	3152,68
1975	5432,42	1917	12947,81	1903	3514,44

Für das DMPO-CO₂-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:



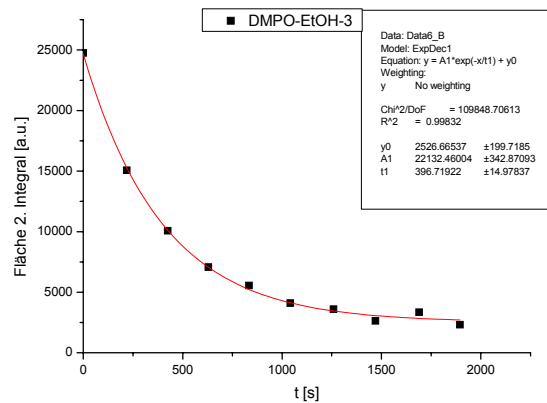
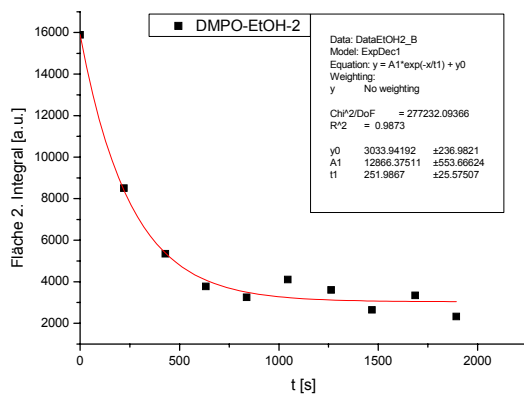
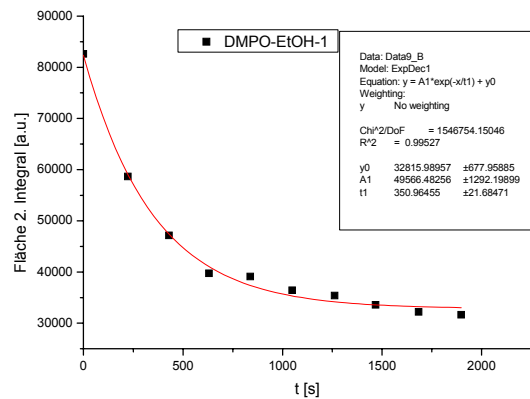
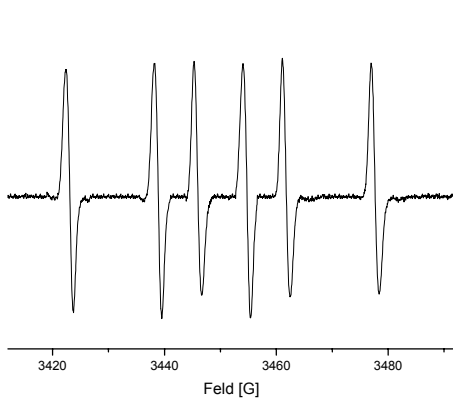
Zeit [s]	Fläche [a.u.] DMPO-CO ₂ -1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] DMPO-CO ₂ -2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] DMPO-CO ₂ -3
0	41094,80	0	48112,44	0	41045,15
270	35131,77	249	38961,37	273	35066,12
512	30748,48	460	33239,71	511	30602,83
734	28098,95	680	28255,11	734	28053,30
959	24550,13	890	25707,90	962	24504,48
1187	22143,52	1102	22529,62	1190	22987,87
1404	20007,31	1313	20053,64	1414	19961,66
1621	18470,54	1522	18585,03	1626	18454,89
1846	18381,92	1746	16322,75	1842	18036,27
2075	16661,60	1969	15771,79	2071	16515,95

Für das DMPO-CH₂OH-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:



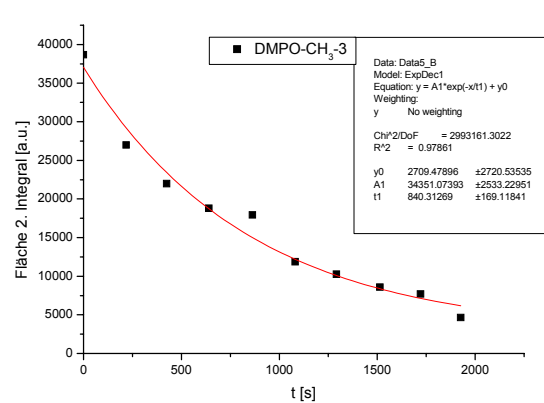
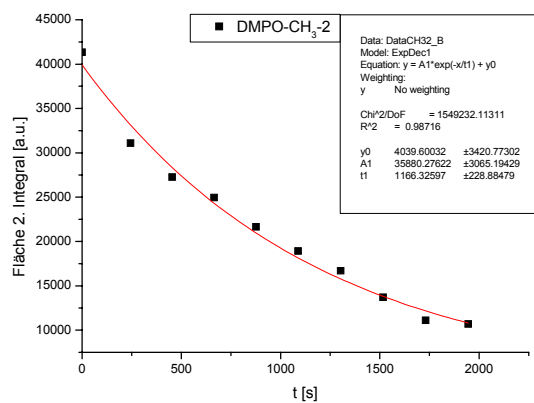
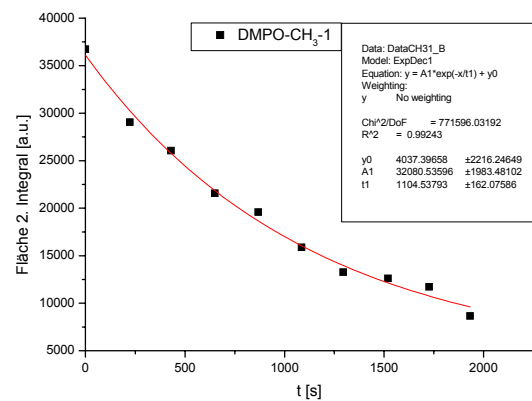
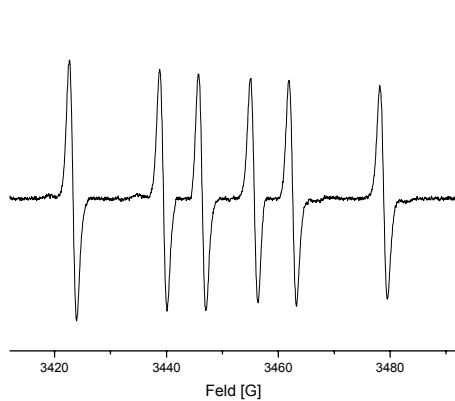
Zeit [s]	Fläche [a.u.] DMPO-CH ₂ OH- 1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] DMPO-CH ₂ OH- 2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] DMPO-CH ₂ OH- 3
0	67962,34	0	18834,60	0	37084,23
251	54271,73	226	14674,79	232	24389,15
464	45214,97	446	12091,24	441	16418,90
669	41080,15	666	10238,92	655	12170,55
882	34576,84	898	9126,65	864	9337,13
1093	30891,57	1109	8238,73	1074	6986,34
1298	27901,21	1324	7377,71	1285	5841,11
1513	24866,90	1535	6492,64	1494	4117,78
1725	22139,07	1747	5611,43	1705	2807,58
1935	20233,77	1901	5802,22	1913	3169,34

Für das DMPO-CH₃CHOH-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:



Zeit [s]	Fläche [a.u.] DMPO- CH ₃ CHOH-1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] DMPO- CH ₃ CHOH-2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] DMPO- CH ₃ CHOH-3
0	82637,31	0	15883,26	0	24752,07
223	58670,74	220	8504,63	219	15056,03
430	47157,38	429	5346,89	425	10081,38
631	39726,50	633	3776,67	629	7069,96
838	39134,25	838	3248,84	834	5553,27
1048	36432,43	1045	4108,99	1042	4108,99
1262	35387,72	1263	3602,60	1259	3602,60
1468	33581,21	1469	2646,01	1470	2646,01
1684	32186,71	1686	3341,72	1690	3341,72
1897	31639,30	1893	2320,74	1895	2320,74

Für das DMPO-CH₃-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:



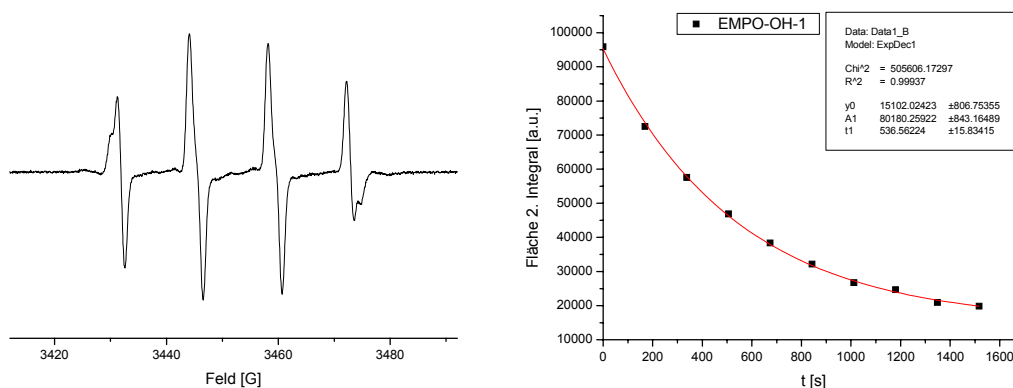
Zeit [s]	Fläche [a.u.] DMPO-CH ₃ -1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] DMPO-CH ₃ -2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] DMPO-CH ₃ -3
0	36742,11	0	41338,28	0	38674,35
223	29067,96	244	31086,82	218	27000,20
430	26052,97	454	27258,72	425	21985,21
650	21574,99	666	24941,12	640	18787,23
868	19594,79	876	21645,96	863	17927,03
1086	15883,16	1089	18919,07	1081	11865,62
1295	13272,94	1303	16689,36	1292	10255,40
1519	12614,10	1517	13714,01	1514	8596,56
1726	11722,73	1731	11129,22	1722	7705,19
1932	8656,48	1945	10693,49	1927	4638,94

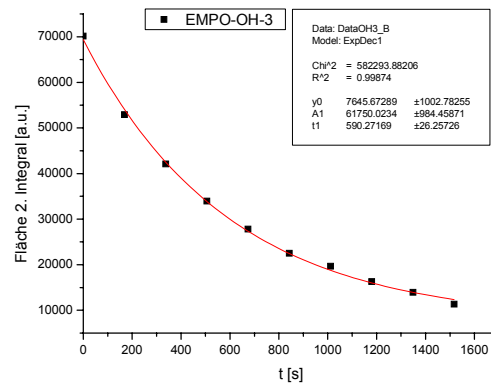
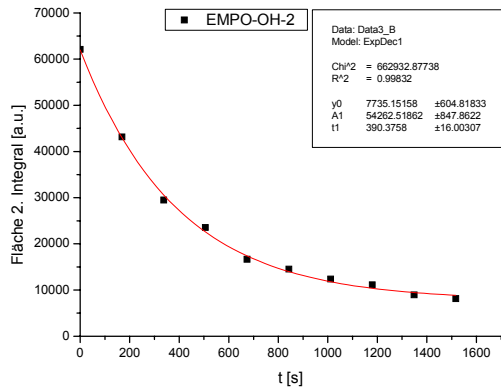
5.6.3.2 Bestimmung der Zerfallskonstante k_d und Halbwertszeit $t_{1/2}$ von EMPO

Es wurde nach folgendem Pipettierschema mit den oben aufgeführten Lösungen verfahren:

Radikale	OH	SO ₃	CO ₂	CH ₂ OH	CH ₃ CHOH	CH ₃
Spin-Trap-Stamml. [μ l]	20	20	20	20	20	20
H ₂ O ₂ -Lös. [μ l]	20	20	20	20	20	20
Fe ²⁺ -Lös. [μ l]	20	20	20	20	20	20
PBS-Puffer [μ l]	40	20	20	20	20	20
Zusätze [μ l]	0	20	20	20	20	20

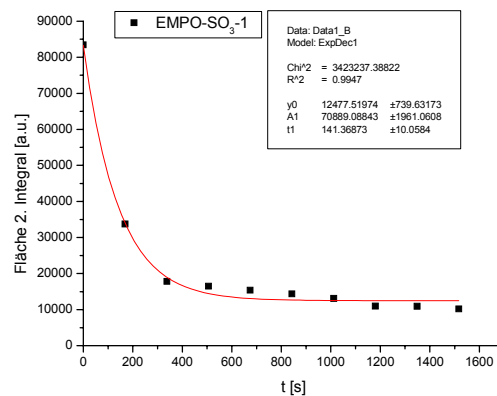
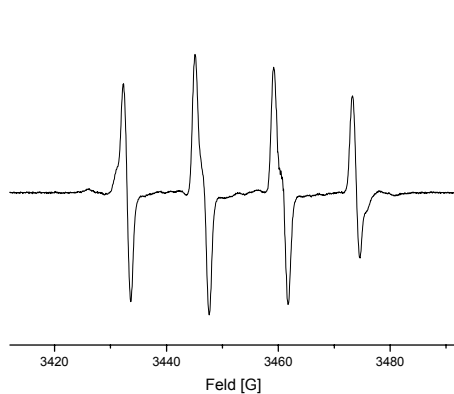
Für das EMPO-OH-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:

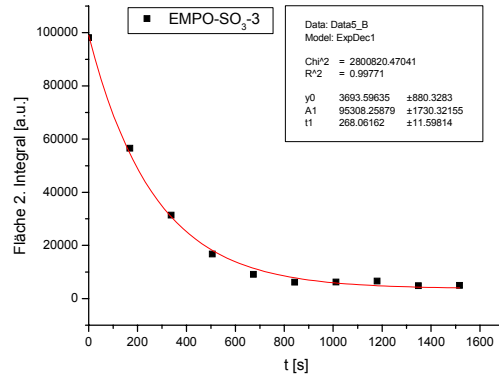
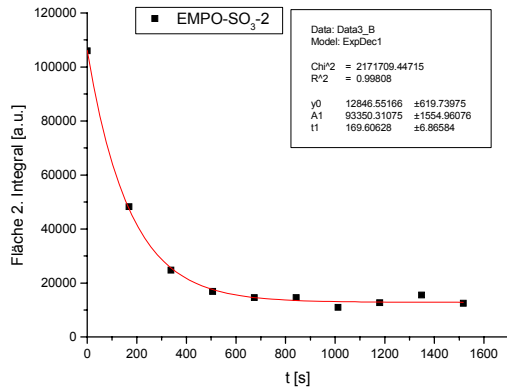




Zeit [s]	Fläche [a.u.] EMPO-OH-1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] EMPO-OH-2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] EMPO-OH-3
0	95892,81	0	62097,96	0	70144,41
168,951	72502,02	168,951	43131,41	168,951	52921,70
337,437	57578,14	337,437	29493,67	337,437	42084,60
505,925	46870,34	505,925	23529,73	505,925	33935,63
674,208	38380,42	674,208	16659,81	674,208	27824,15
842,906	32166,03	842,906	14508,15	842,906	22497,86
1011,38	26730,05	1011,38	12360,44	1011,38	19661,26
1179,87	24647,36	1179,87	11140,70	1179,87	16297,02
1348,36	20927,54	1348,36	8927,94	1348,36	13951,27
1516,85	19807,45	1516,85	8123,13	1516,85	11363,52

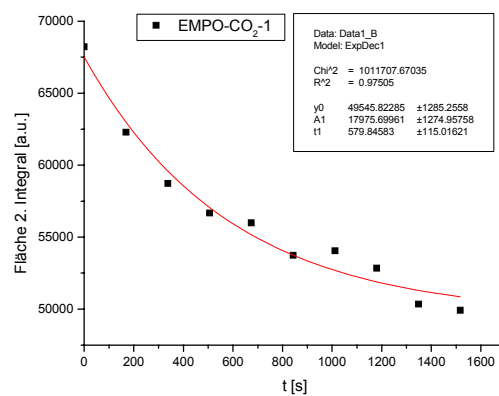
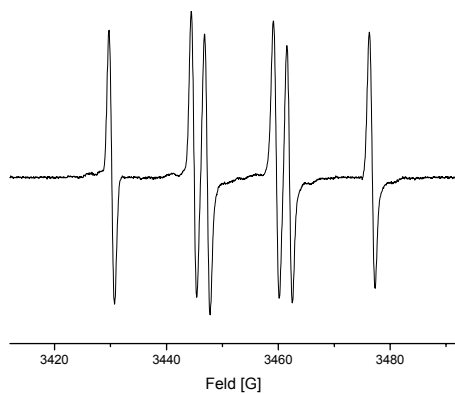
Für das EMPO-SO₃-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:

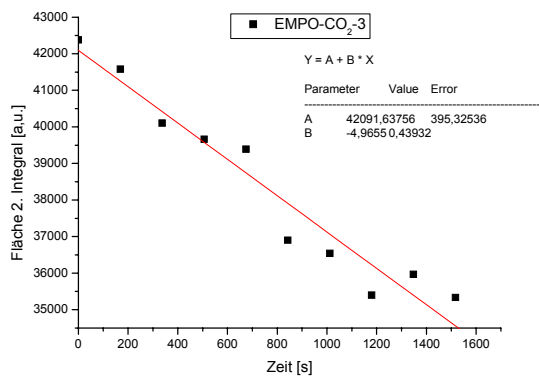
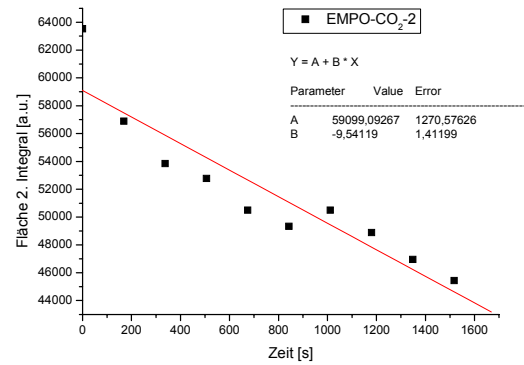
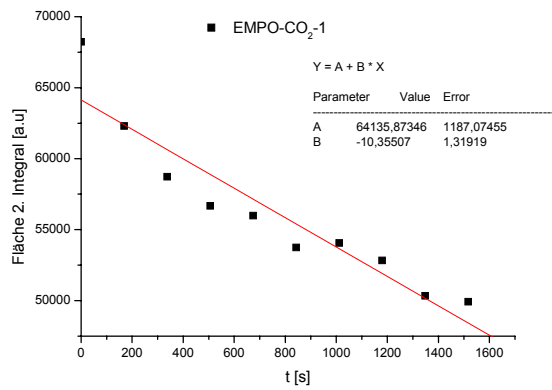
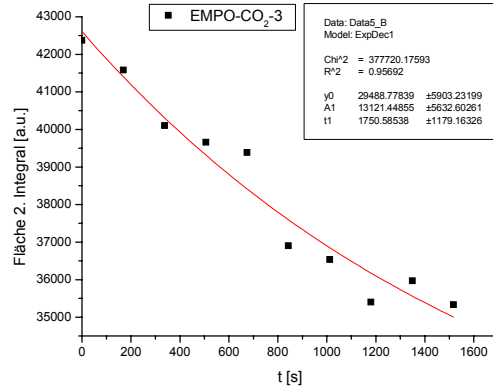
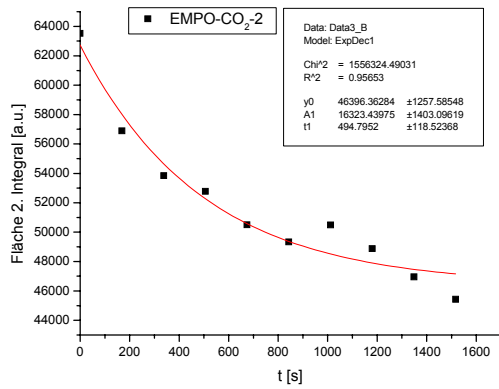




Zeit [s]	Fläche [a.u.] EMPO-SO ₃ -1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] EMPO-SO ₃ -2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] EMPO-SO ₃ -3
0	83447,74	0	106010,74	0	98128,13
168,951	33753,93	168,951	48234,24	168,951	56567,32
337,437	17825,32	337,437	24767,29	337,437	31372,90
505,925	16480,35	505,925	16854,25	505,925	16729,62
674,208	15413,91	674,208	14535,05	674,208	9116,08
842,906	14351,53	842,906	14527,79	842,906	6168,29
1011,38	13084,66	1011,38	10929,74	1011,38	6193,68
1179,87	10963,49	1179,87	12654,00	1179,87	6551,14
1348,36	10942,27	1348,36	15555,69	1348,36	4819,26
1516,85	10214,23	1516,85	12491,01	1516,85	4975,53

Für das EMPO-CO₂-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:

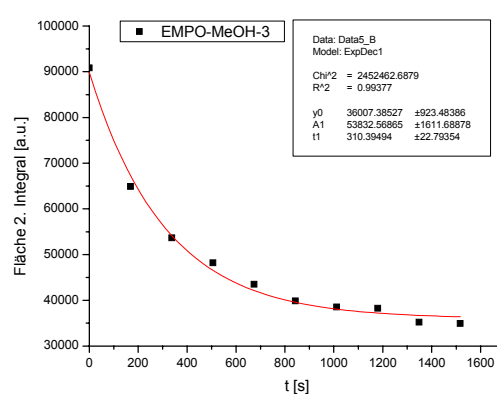
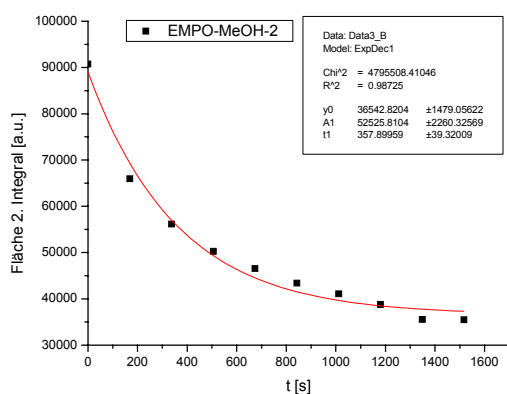
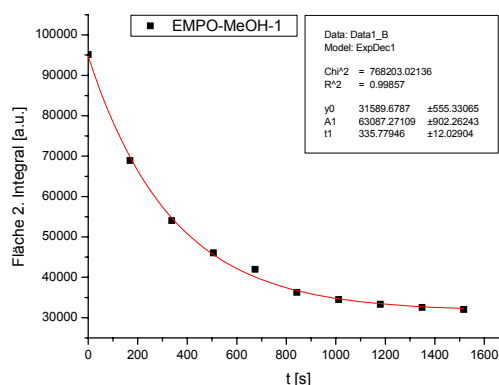
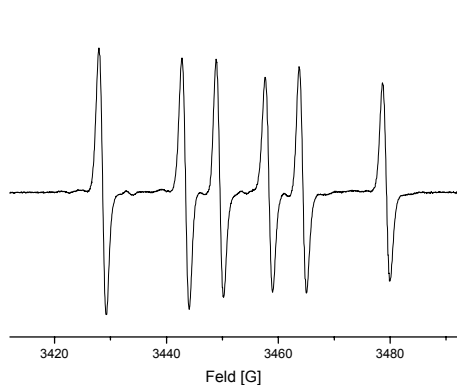




Zur Berechnung der Halbwertszeit wurden lineare Fits benutzt, da die Exponentialgleichungen des Zerfalls erster Ordnung negative und damit unlösbare In-Funktionen ergeben. Die Zerfallskonstanten wurden dagegen aus den Fits für einen Zerfall erster Ordnung berechnet.

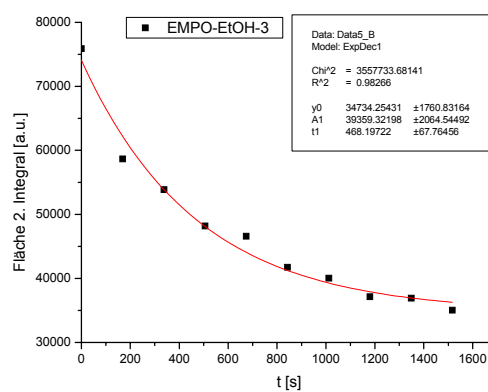
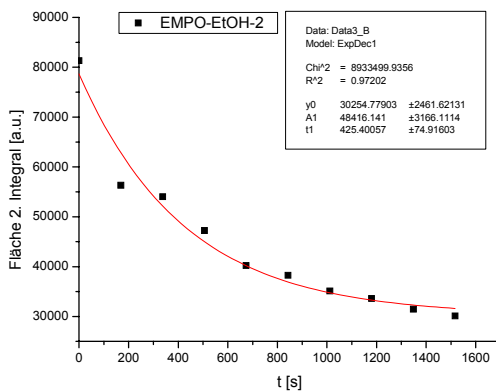
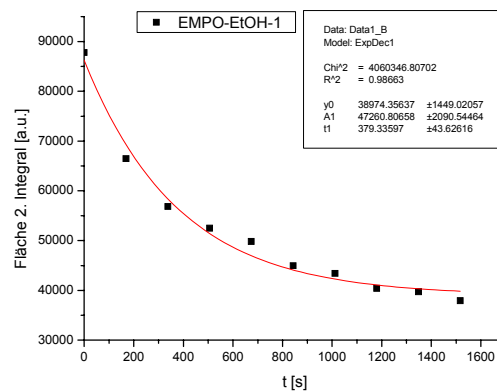
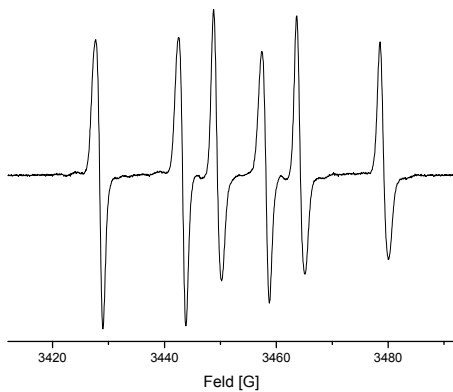
Zeit [s]	Fläche [a.u.] EMPO-CO ₂ -1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] EMPO-CO ₂ -2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] EMPO-CO ₂ -3
0	68216,70	0	63528,06	0	42378,51
168,951	62293,11	168,951	56890,30	168,951	41578,68
337,437	58731,64	337,437	53843,25	337,437	40103,06
505,925	56673,30	505,925	52773,35	505,925	39661,48
674,208	55992,55	674,208	50493,93	674,208	39388,10
842,906	53743,67	842,906	49334,12	842,906	36900,00
1011,38	54053,81	1011,38	50486,36	1011,38	36537,60
1179,87	52838,32	1179,87	48877,41	1179,87	35401,95
1348,36	50346,73	1348,36	46954,15	1348,36	35966,14
1516,85	49916,52	1516,85	45431,63	1516,85	35333,16

Für das EMPO-CH₂OH-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:



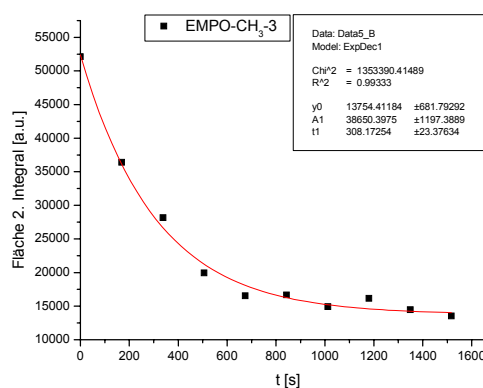
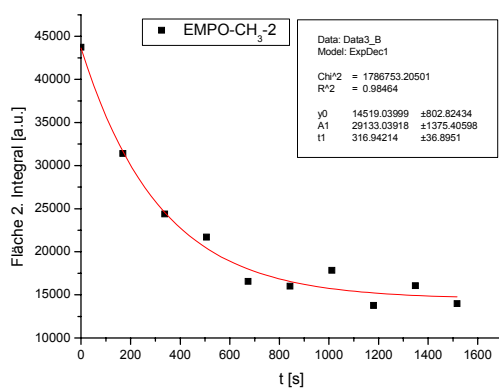
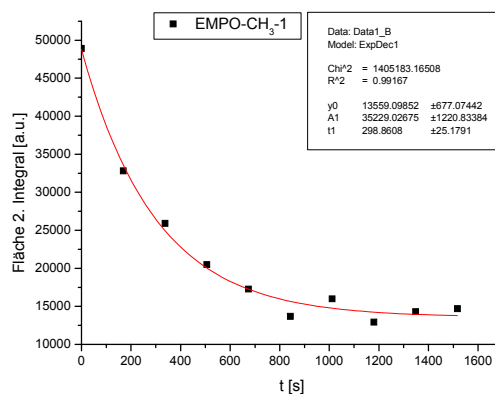
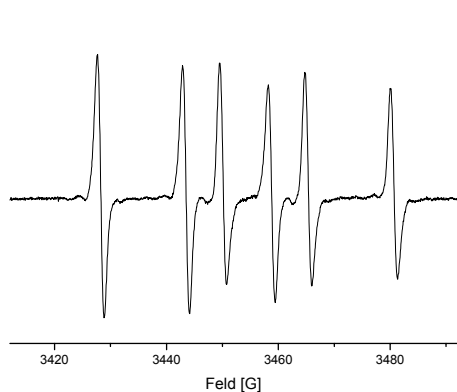
Zeit [s]	Fläche [a.u.] EMPO- CH ₂ OH-1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] EMPO- CH ₂ OH-2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] EMPO- CH ₂ OH-3
0	95110,21	0	90748,15	0	90861,90
168,951	68927,93	168,951	65947,69	168,951	64890,34
337,437	54039,11	337,437	56184,26	337,437	53671,28
505,925	46006,15	505,925	50272,98	505,925	48208,11
674,208	41943,68	674,208	46547,61	674,208	43497,76
842,906	36256,91	842,906	43389,06	842,906	39868,91
1011,38	34477,77	1011,38	41076,18	1011,38	38516,59
1179,87	33296,71	1179,87	38772,94	1179,87	38250,54
1348,36	32525,22	1348,36	35551,35	1348,36	35200,82
1516,85	32025,54	1516,85	35459,49	1516,85	34949,10

Für das EMPO-CH₃CHOH-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:



Zeit [s]	Fläche [a.u.] EMPO- CH ₃ CHOH-1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] EMPO- CH ₃ CHOH-2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] EMPO- CH ₃ CHOH-3
0	87798,64	0	81329,29	0	75885,50
168,951	66470,68	168,951	56324,26	168,951	58650,16
337,437	56830,96	337,437	54040,80	337,437	53852,77
505,925	52498,61	505,925	47218,53	505,925	48169,07
674,208	49831,01	674,208	40204,39	674,208	46570,02
842,906	44938,60	842,906	38272,41	842,906	41732,71
1011,38	43420,97	1011,38	35115,19	1011,38	40023,08
1179,87	40407,32	1179,87	33595,34	1179,87	37129,68
1348,36	39734,32	1348,36	31462,85	1348,36	36896,68
1516,85	37941,60	1516,85	30107,97	1516,85	35017,65

Für das EMPO-CH₃-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:



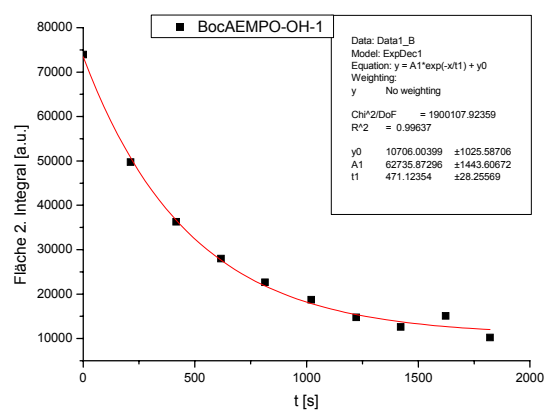
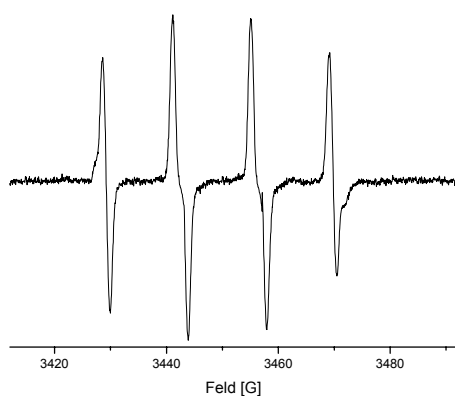
Zeit [s]	Fläche [a.u.] EMPO-CH ₃ -1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] EMPO-CH ₃ -2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] EMPO-CH ₃ -3
0	48923,83	0	43729,89	0	52113,74
168,951	32806,29	168,951	31395,50	168,951	36391,51
337,437	25913,76	337,437	24388,18	337,437	28175,94
505,925	20473,85	505,925	21696,80	505,925	19933,58
674,208	17259,95	674,208	16572,88	674,208	16534,20
842,906	13688,11	842,906	15997,55	842,906	16660,19
1011,38	15996,29	1011,38	17838,90	1011,38	14898,65
1179,87	12923,94	1179,87	13774,40	1179,87	16140,19
1348,36	14307,05	1348,36	16059,82	1348,36	14474,29
1516,85	14687,43	1516,85	13984,88	1516,85	13529,12

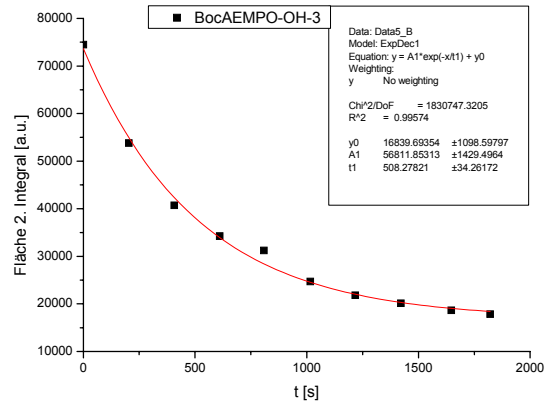
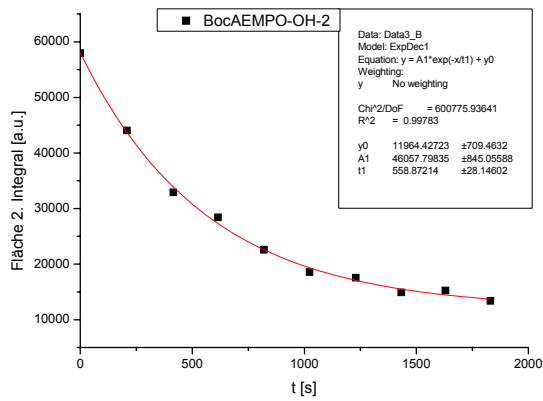
5.6.3.3 Bestimmung der Zerfallskonstante k_d und Halbwertszeit $t_{1/2}$ von BocAEMPO

Es wurde nach folgendem Pipettierschema mit den oben aufgeführten Lösungen verfahren:

Radikale	OH	SO ₃	CO ₂	CH ₂ OH	CH ₃ CHOH	CH ₃
Spin-Trap-Stamml. [μ l]	20	20	20	20	20	10
H ₂ O ₂ -Lös. [μ l]	20	20	20	20	20	20
Fe ²⁺ -Lös. [μ l]	20	20	20	20	20	20
PBS-Puffer [μ l]	40	10	10	20	20	40
Zusätze [μ l]	0	30	30	20	20	10

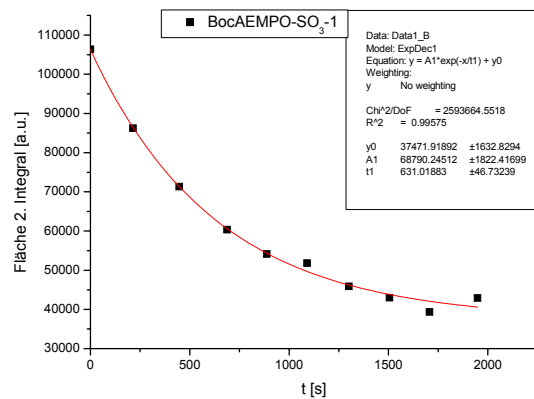
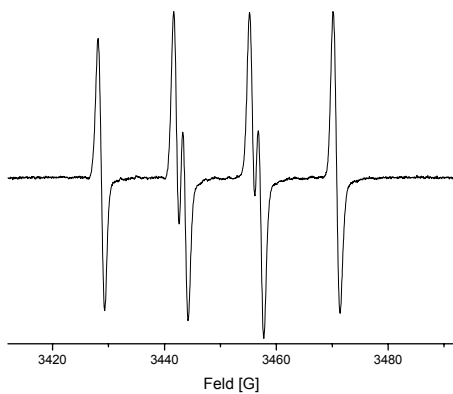
Für das BocAEMPO-OH-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:

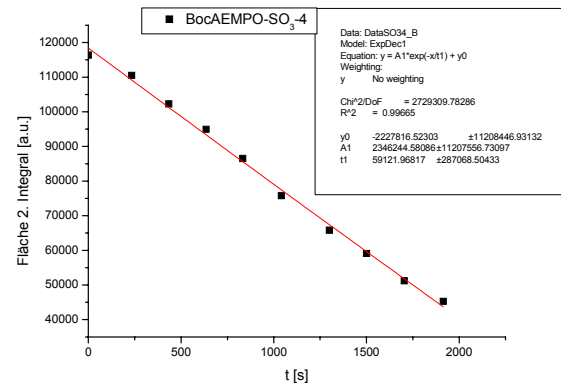
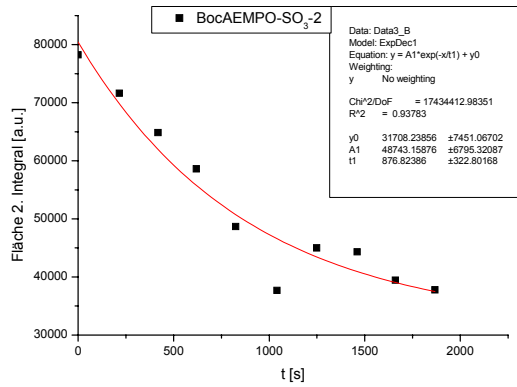




Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocAEMPO- OH-1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocAEMPO- OH-2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocAEMPO- OH-3
0	73931,95	0	57974,57	0	74477,48
212	49757,07	208	44046,43	204	53791,10
416	36276,46	415	32914,93	407	40737,47
617	27985,69	615	28388,95	611	34234,99
814	22680,44	820	22560,98	808	31198,65
1021	18706,26	1024	18554,41	1016	24686,46
1223	14772,12	1230	17558,22	1218	21809,35
1422	12629,96	1433	14913,03	1422	20117,23
1623	15091,07	1631	15248,17	1647	18657,34
1821	10237,09	1831	13393,38	1821	17838,45

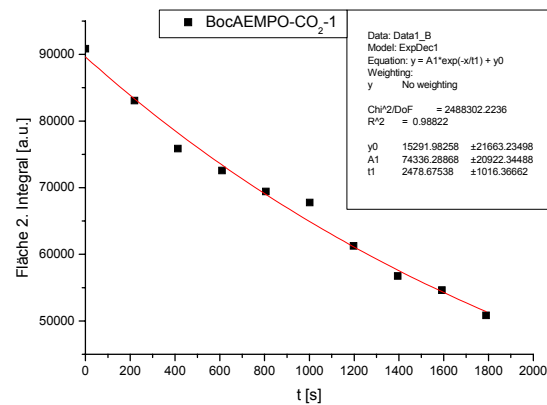
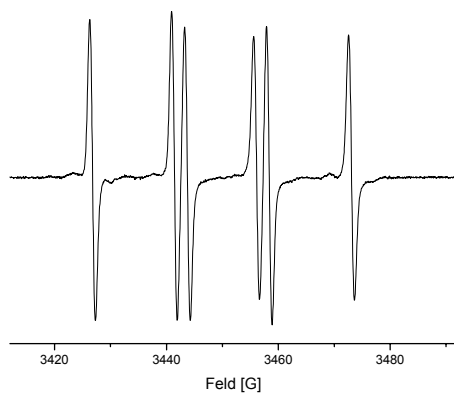
Für das BocAEMPO-SO₃-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:

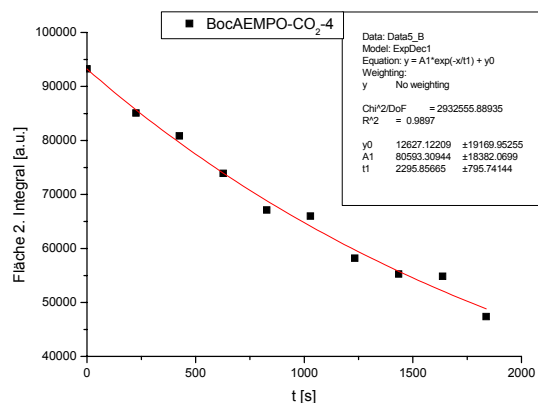
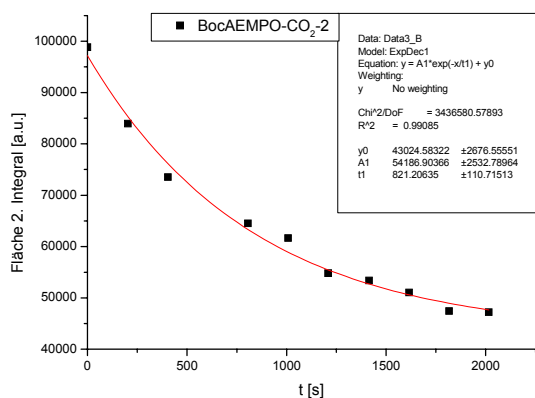




Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocAEMPO- SO ₃ -1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocAEMPO- SO ₃ -2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocAEMPO- SO ₃ -4
0	106376,16	0	78246,41	0	116340,081
214	86246,01	216	71622,40	234	110484,491
448	71309,27	418	64853,73	434	102284,739
688	60319,25	619	58623,57	636	94940,7289
888	54131,63	825	48658,91	833	86525,1141
1091	51791,66	1041	37689,14	1041	75781,8151
1300	45885,37	1249	45004,31	1300	65799,6005
1505	42988,23	1460	44310,39	1501	59074,1548
1707	39363,99	1660	39429,40	1704	51236,9604
1948	42934,81	1867	37789,75	1914	45262,1454

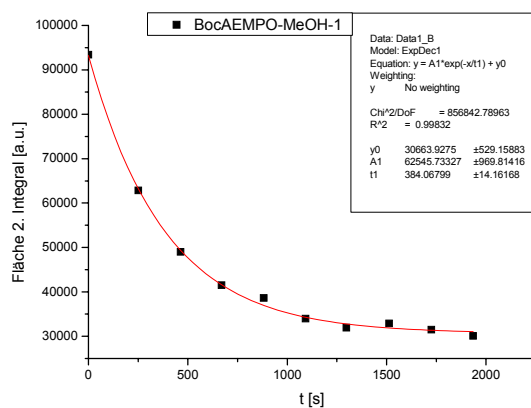
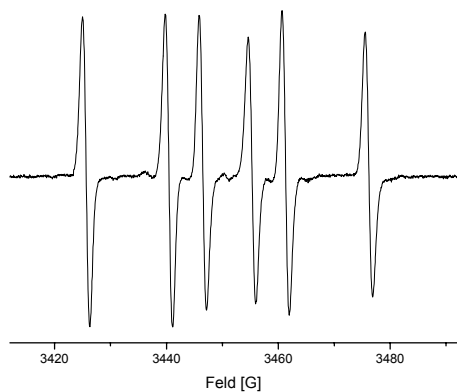
Für das BocAEMPO-CO₂-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:

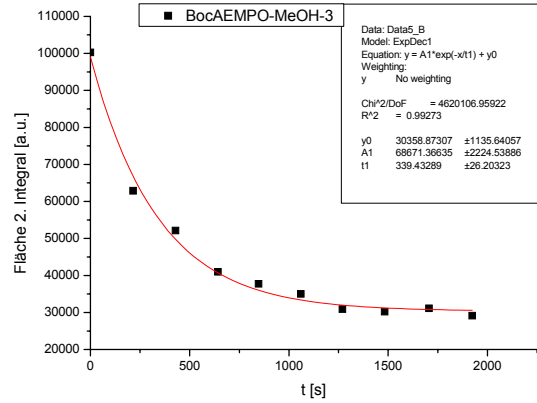
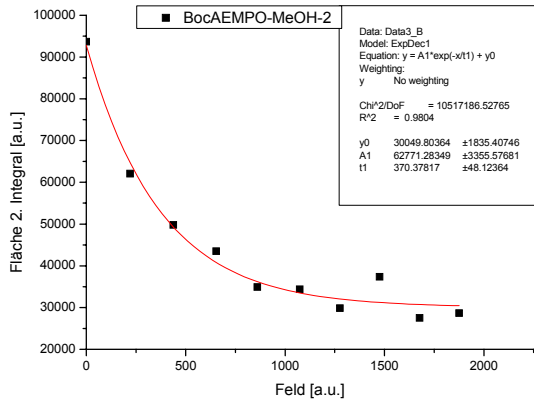




Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocAEMPO- CO ₂ -1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocAEMPO- CO ₂ -2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocAEMPO- CO ₂ -4
0	90852,86	0	98834,18	0	93261,5656
219	83084,95	203	83961,80	226	85095,4381
413	75854,73	404	73518,88	425	80831,7927
610	72588,41	806	64496,86	627	73917,3442
806	69426,20	1008	61668,60	827	67096,6688
1002	67779,60	1209	54791,61	1029	65982,3108
1198	61270,08	1414	53369,01	1233	58197,0238
1395	56761,86	1615	51039,78	1435	55244,9375
1592	54629,97	1817	47441,03	1637	54849,0612
1789	50838,69	2016	47227,62	1838	47366,6564

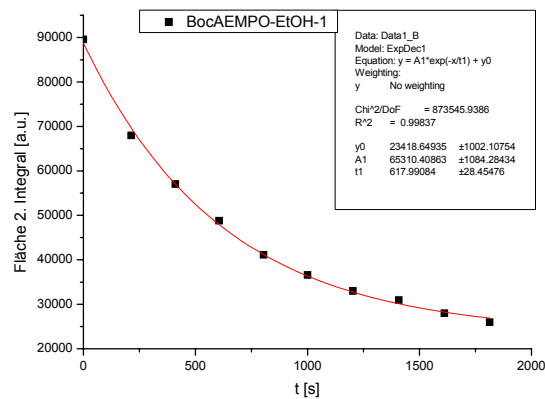
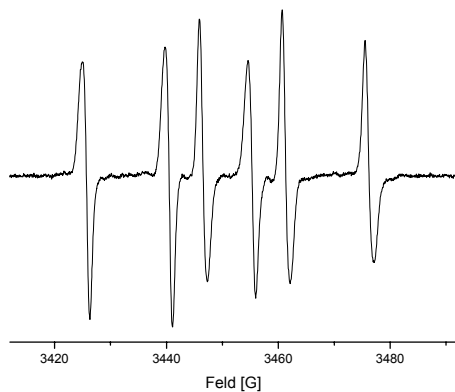
Für das BocAEMPO-CH₂OH-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:

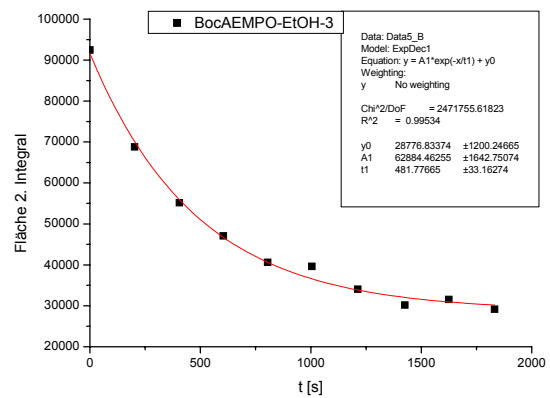
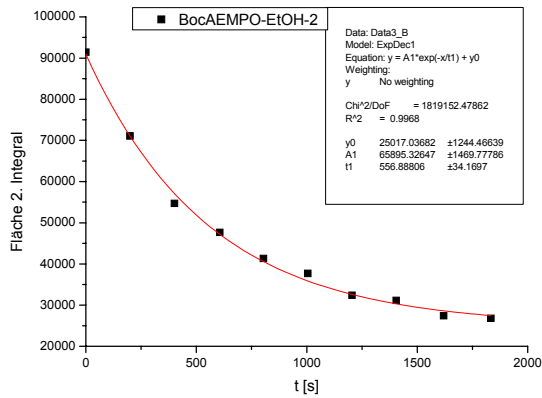




Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocAEMPO- CH ₂ OH-1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocAEMPO- CH ₂ OH-2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocAEMPO- CH ₂ OH-3
0	93385,49	0	93685,03	0	100236,44
251	62854,27	221	62083,64	215	62881,49
464	48982,85	438	49781,98	429	52136,73
669	41492,22	653	43487,12	642	40970,31
882	38647,32	860	34922,32	847	37712,82
1093	33975,68	1074	34369,79	1060	34992,94
1298	31924,10	1276	29850,79	1269	30928,80
1513	32907,38	1475	37388,34	1483	30208,79
1725	31462,55	1676	27475,47	1706	31117,91
1935	30113,20	1876	28654,27	1924	29164,74

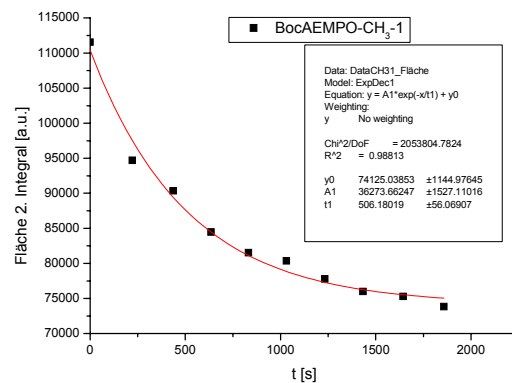
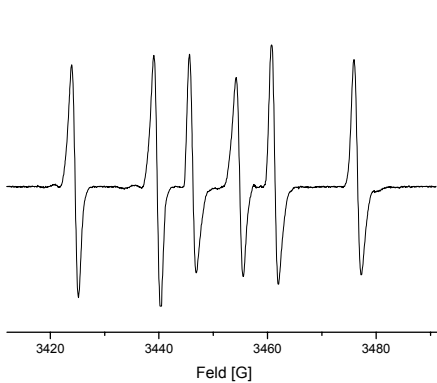
Für das BocAEMPO-CH₃CHOH-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:

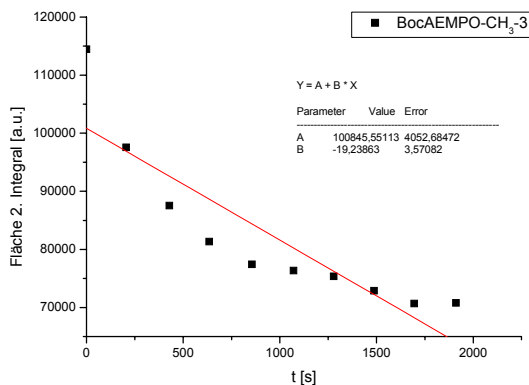
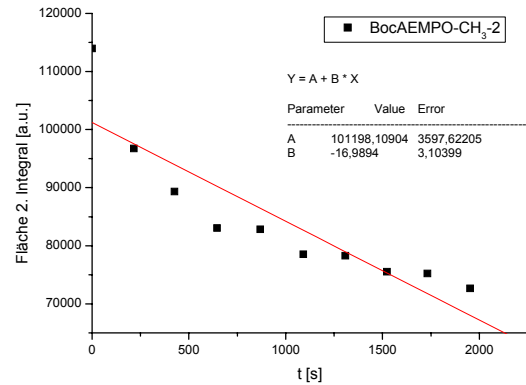
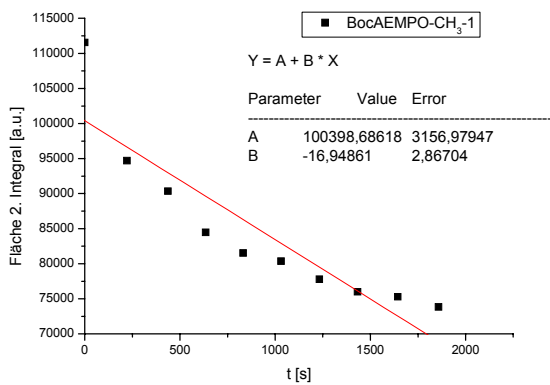
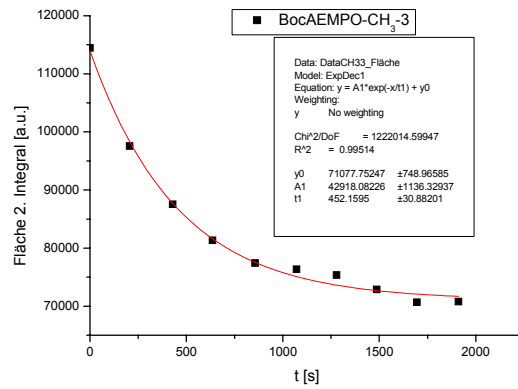
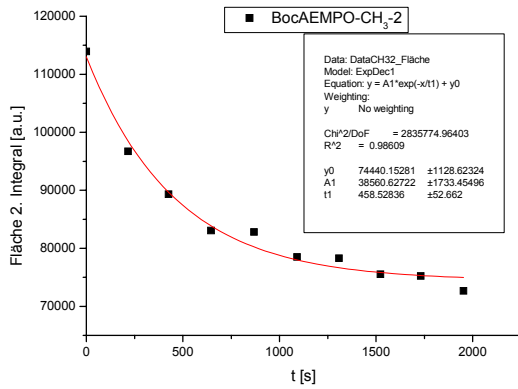




Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocAEMPO- CH ₃ CHOH-1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocAEMPO- CH ₃ CHOH-2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocAEMPO- CH ₃ CHOH-3
0	89562,14	0	91439,76	0	92480,04
213	67975,64	200	71081,81	202	68779,82
410	57028,61	401	54706,15	405	55155,90
606	48775,23	607	47661,09	604	47058,37
804	41117,31	804	41335,65	805	40606,20
1000	36572,18	1005	37689,14	1005	39632,15
1203	32989,27	1205	32379,21	1213	34037,03
1408	30960,59	1405	31116,51	1426	30180,88
1611	27990,74	1620	27422,97	1625	31520,03
1814	25963,40	1834	26767,02	1832	29156,45

Für das BocAEMPO-CH₃-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:





Zur Berechnung der Halbwertszeit wurden lineare Fits benutzt, da die Exponentialgleichungen des Zerfalls erster Ordnung negative und damit unlösbare In-Funktionen ergeben. Die Zerfallskonstanten wurden dagegen aus den Fits für einen Zerfall erster Ordnung berechnet.

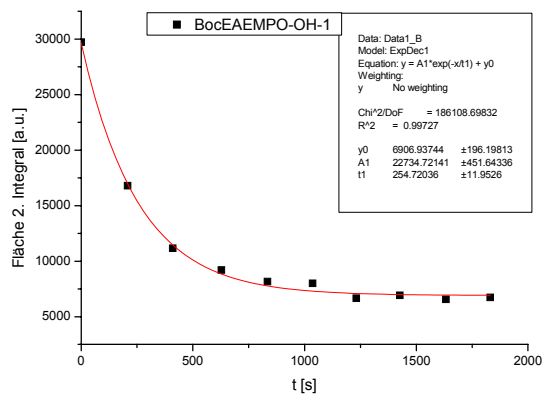
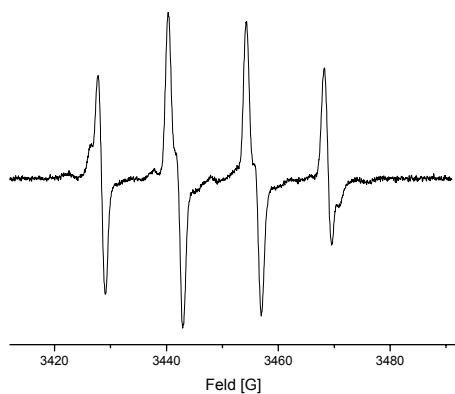
Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocAEMPO- CH ₃ -1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocAEMPO- CH ₃ -2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocAEMPO- CH ₃ -3
0	111550,55	0	113957,82	0	114461,48
222	94711,54	216	96739,01	205	97568,53
437	90350,07	426	89345,87	429	87526,11
635	84484,51	646	83042,60	635	81338,75
832	81541,59	868	82814,19	856	77429,86
1031	80377,80	1091	78505,17	1071	76353,87
1232	77794,48	1308	78289,16	1279	75368,00
1433	76006,99	1523	75537,28	1487	72890,60
1644	75303,73	1732	75229,13	1695	70648,67
1858	73836,73	1953	72653,36	1911	70794,47

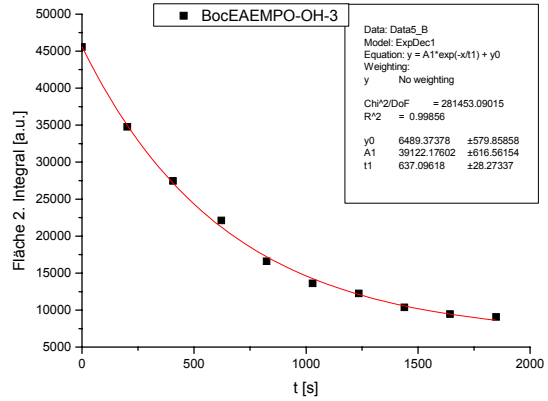
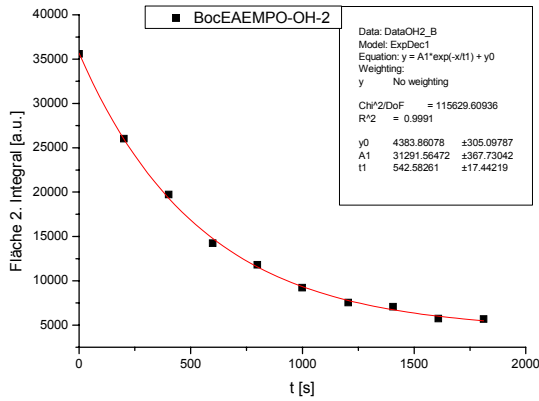
5.6.3.4 Bestimmung der Zerfallskonstante k_d und Halbwertszeit $t_{1/2}$ von BocEAEMPO

Es wurde nach folgendem Pipettierschema mit den oben aufgeführten Lösungen verfahren:

Radikale	OH	SO ₃	CO ₂	CH ₂ OH	CH ₃ CHOH	CH ₃
Spin-Trap-Stamml. [μ l]	20	20	20	20	20	20
H ₂ O ₂ -Lös. [μ l]	20	20	20	20	20	20
Fe ²⁺ -Lös. [μ l]	20	20	20	20	20	20
PBS-Puffer [μ l]	40	10	10	20	20	20
Zusätze [μ l]	0	30	30	20	20	20

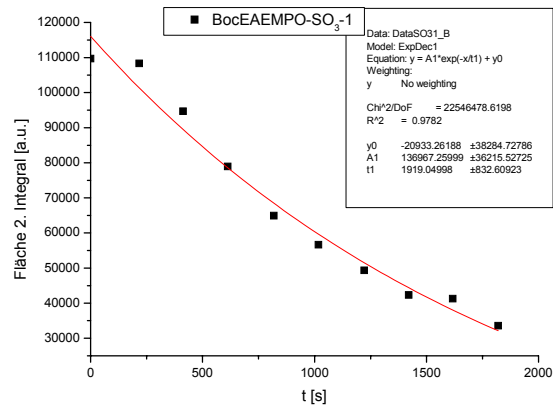
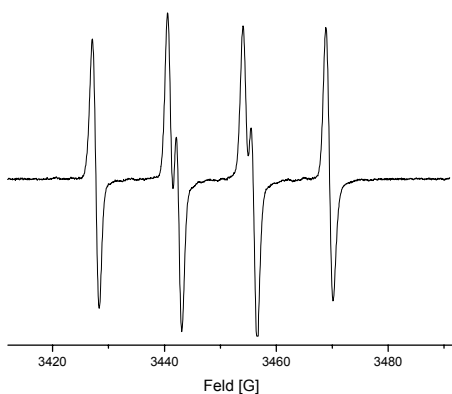
Für das BocEAEMPO-OH-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:

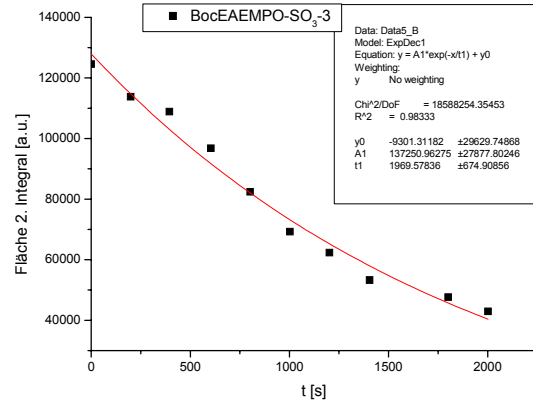
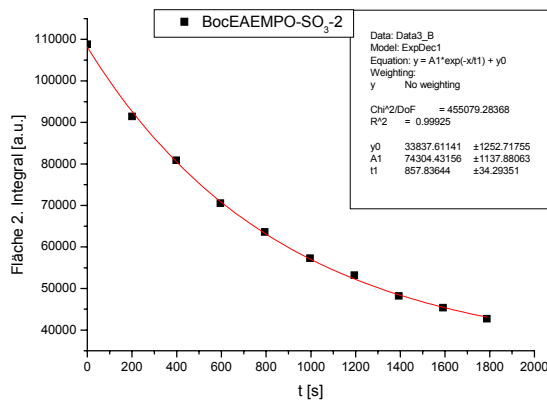




Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocEAEMPO- OH-1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocEAEMPO- OH-2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocEAEMPO- OH-3
0	29716,76	0	35596,37	0	45563,56
208	16795,73	201	26029,14	202	34774,32
410	11160,53	401	19742,61	406	27437,83
628	9199,99	598	14249,46	622	22123,43
834	8164,54	798	11811,33	824	16593,98
1036	8012,83	999	9214,05	1030	13618,23
1232	6656,30	1205	7554,06	1236	12238,39
1427	6910,11	1406	7073,20	1439	10373,35
1633	6550,68	1609	5732,99	1643	9459,26
1831	6730,54	1811	5686,14	1849	9074,07

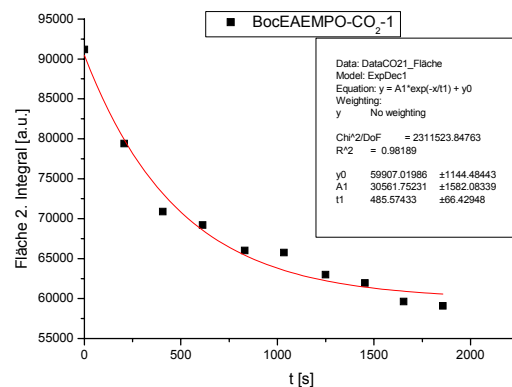
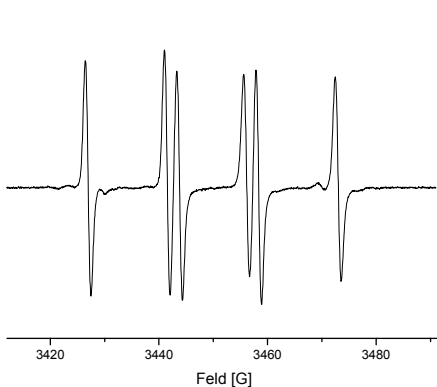
Für das BocEAEMPO-SO₃-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:

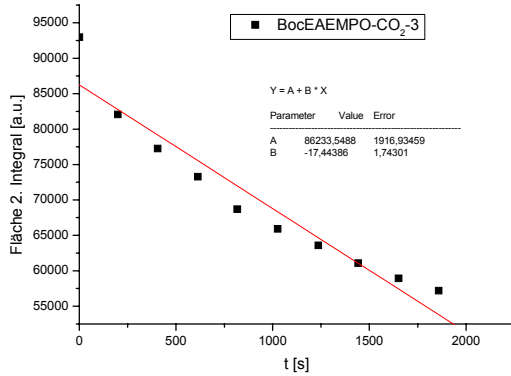
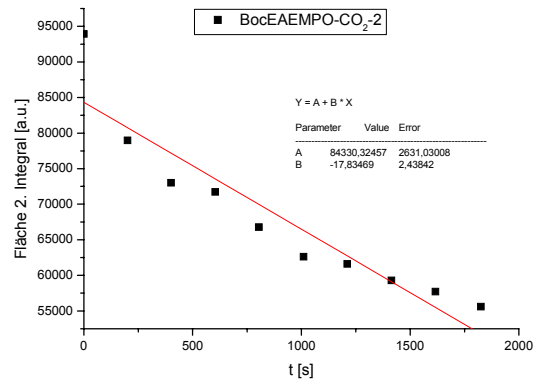
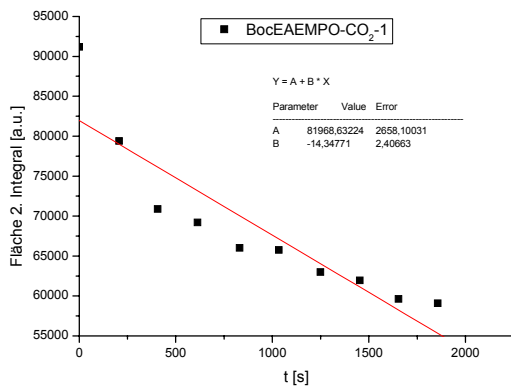
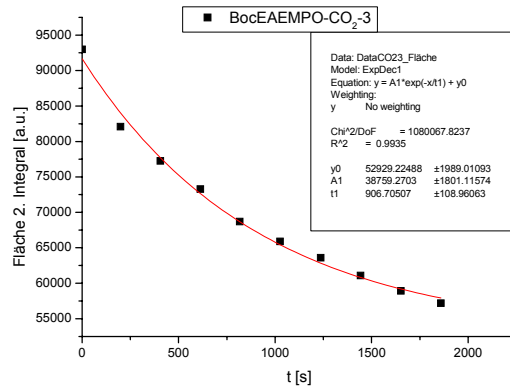
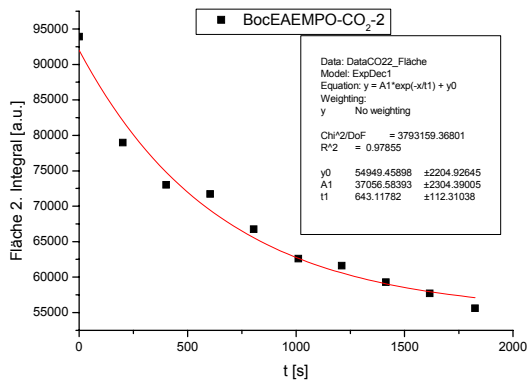




Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocEAEMPO-SO ₃ -1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocEAEMPO-SO ₃ -2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocEAEMPO-SO ₃ -3
0	109694,50	0	108788,63	0	124557,25
217	108329,45	201	91450,97	199	113745,34
413	94651,35	398	80880,94	395	108896,39
613	78930,04	596	70538,51	604	96812,69
818	64937,79	794	63591,09	802	82406,14
1018	56656,96	996	57264,27	1002	69271,55
1222	49386,89	1194	53202,22	1202	62347,84
1421	42309,83	1393	48182,26	1405	53268,56
1617	41752,41	1591	45359,05	1801	47684,89
1820	33591,30	1787	42739,10	2002	42964,42

Für das BocEAEMPO-CO₂-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:

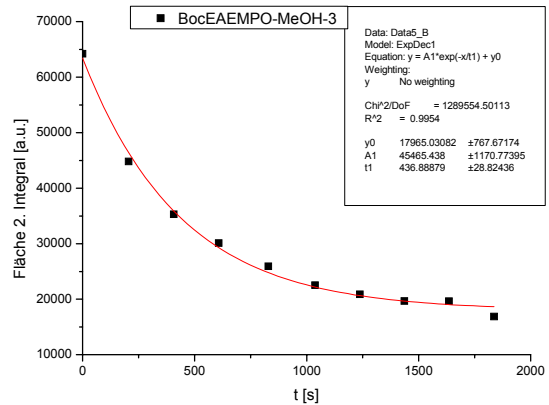
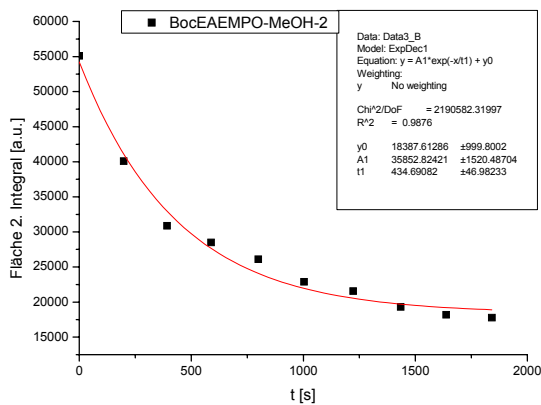
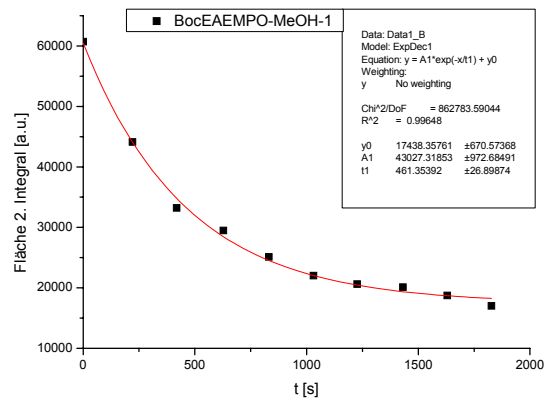
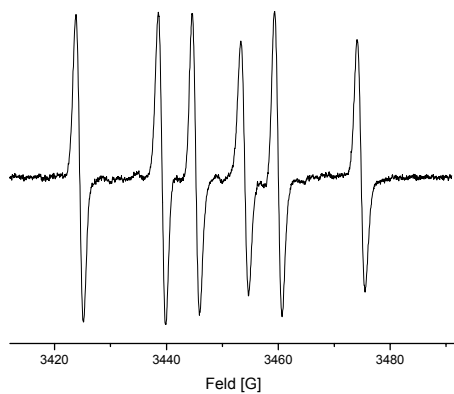




Zur Berechnung der Halbwertszeit wurden lineare Fits benutzt, da die Exponentialgleichungen des Zerfalls erster Ordnung negative und damit unlösbare In-Funktionen ergeben. Die Zerfallskonstanten wurden dagegen aus den Fits für einen Zerfall erster Ordnung berechnet.

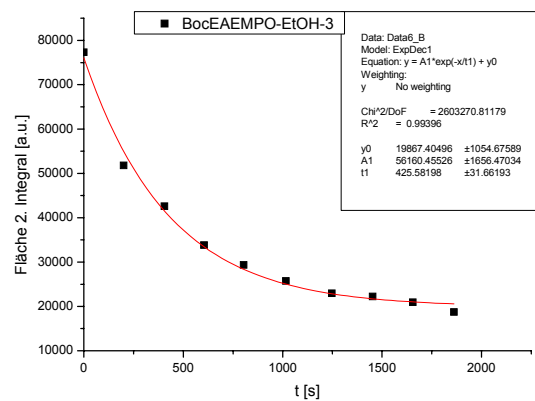
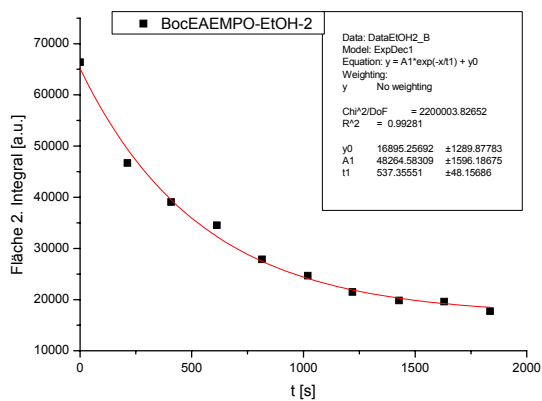
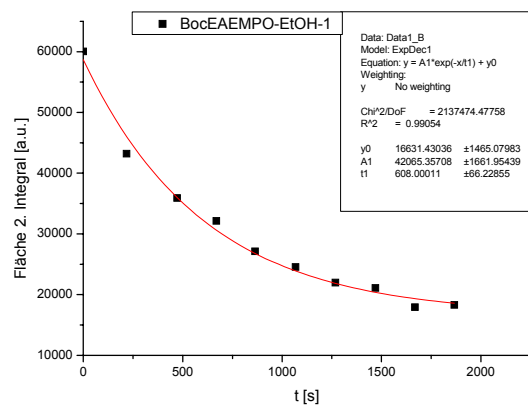
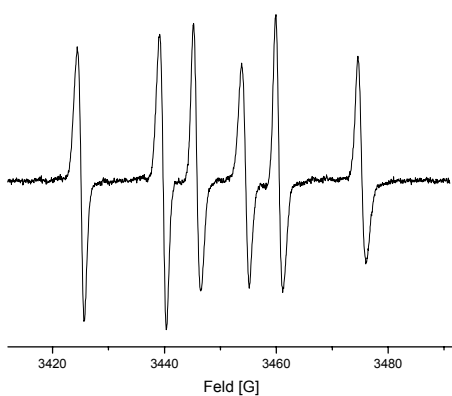
Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocEAEMPO- CO ₂ -1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocEAEMPO- CO ₂ -2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocEAEMPO- CO ₂ -3
0	91181,70	0	93929,39	0	92958,52
206	79419,91	201	78973,56	199	82081,86
407	70891,39	401	73008,18	406	77251,29
613	69213,38	604	71709,74	613	73288,01
831	66025,26	805	66761,37	817	68694,50
1034	65772,45	1010	62612,21	1026	65905,18
1249	62999,05	1211	61621,56	1236	63586,43
1453	61959,61	1414	59284,08	1443	61087,45
1654	59639,99	1616	57721,80	1652	58922,66
1857	59092,47	1825	55617,50	1859	57186,43

Für das BocEAEMPO-CH₂OH-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:



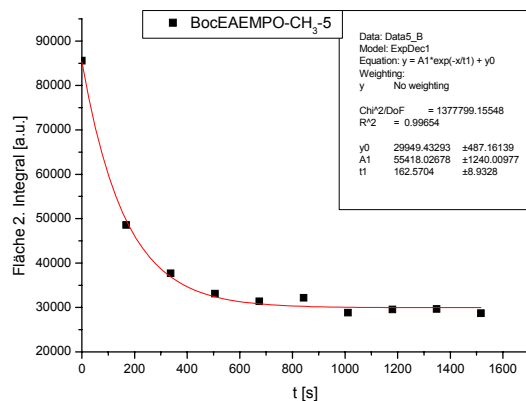
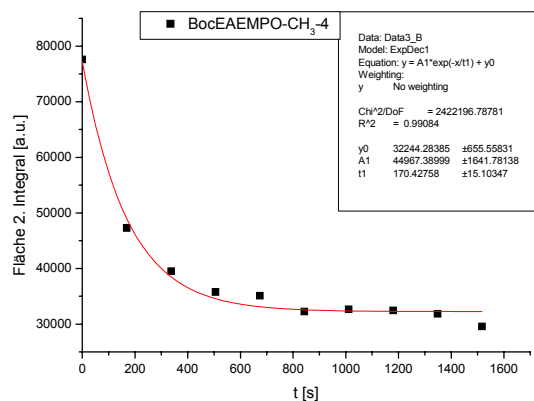
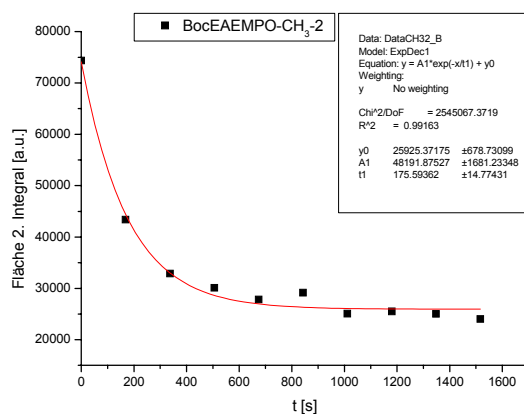
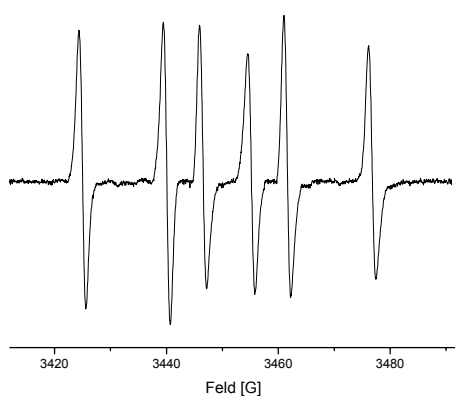
Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocEAEMPO- CH ₂ OH-1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocEAEMPO- CH ₂ OH-2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocEAEMPO- CH ₂ OH-3
0	60712,40	0	55107,95	0	64208,80
221	44099,98	198	40083,35	206	44798,27
419	33224,84	392	30860,55	407	35293,15
628	29481,59	588	28486,03	608	30109,82
832	25125,32	799	26102,46	829	25935,48
1031	21991,46	1004	22900,12	1038	22511,77
1227	20627,89	1223	21563,25	1238	20862,32
1432	20133,15	1435	19301,11	1437	19649,94
1630	18734,90	1638	18178,69	1636	19635,60
1828	17021,16	1842	17783,53	1837	16863,48

Für das BocEAEMPO-CH₃CHOH-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:



Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocEAEMPO- CH ₃ CHOH-1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocEAEMPO- CH ₃ CHOH-2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocEAEMPO- CH ₃ CHOH-3
0	60043,74	0	66406,68	0	77306,60
218	43224,44	212	46702,92	200	51778,28
472	35881,36	408	39061,77	405	42586,25
669	32119,33	613	34497,88	605	33829,53
864	27114,52	815	27890,32	804	29369,52
1068	24523,30	1020	24666,90	1016	25747,39
1268	21975,41	1219	21486,34	1248	22971,55
1470	21079,13	1428	19818,51	1453	22244,61
1668	17924,52	1630	19592,95	1655	20936,28
1866	18291,97	1835	17747,81	1862	18750,98

Für das BocEAEMPO-CH₃-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:



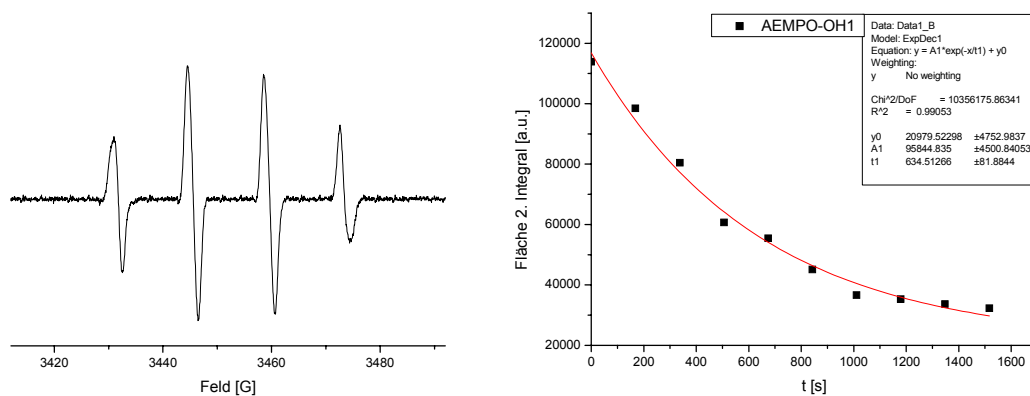
Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocEAEMPO- CH ₃ -2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocEAEMPO- CH ₃ -4	Zeit [s]	Fläche [a.u.] BocEAEMPO- CH ₃ -5
0	74387,89	0	77587,5535	0	85584,8545
168,641	43395,55	168,641	47293,9312	168,641	48558,7786
337,188	32874,58	337,188	39511,5818	337,188	37704,8673
505,671	30085,82	505,671	35777,4302	505,671	33122,014
674,165	27826,46	674,165	35090,0798	674,165	31408,5457
842,659	29163,34	842,659	32241,9922	842,659	32191,4851
1011,2	25059,50	1011,2	32650,3649	1011,2	28834,3266
1179,68	25518,38	1179,68	32444,274	1179,68	29539,0044
1348,17	25021,17	1348,17	31847,986	1348,17	29698,7196
1516,66	24001,60	1516,66	29581,0473	1516,66	28699,8295

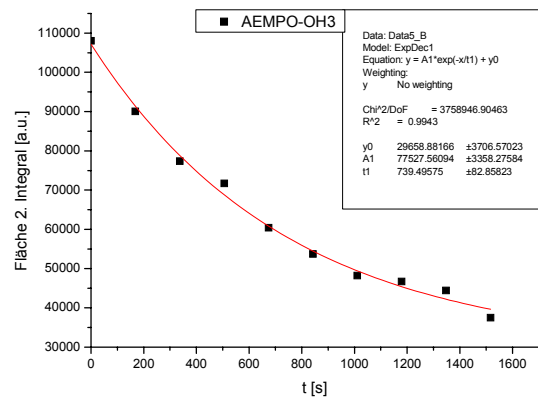
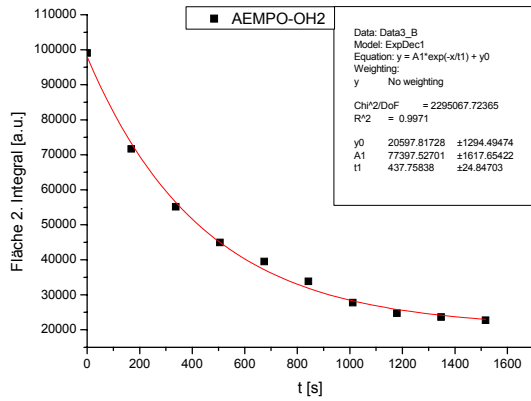
5.6.3.5 Bestimmung der Zerfallskonstante k_d und Halbwertszeit $t_{1/2}$ von AEMPO

Es wurde nach folgendem Pipettierschema mit den oben aufgeführten Lösungen verfahren:

Radikale	OH	SO ₃	CO ₂	CH ₂ OH	CH ₃ CHOH	CH ₃
Spin-Trap-Stamml. [μ l]	10	10	10	10	10	10
H ₂ O ₂ -Lös. [μ l]	20	20	20	20	20	20
Fe ²⁺ -Lös. [μ l]	20	20	20	20	20	20
PBS-Puffer [μ l]	50	30	30	30	30	30
Zusätze [μ l]	0	20	20	20	20	20

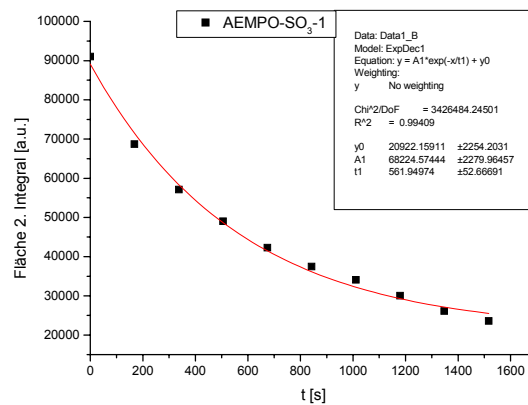
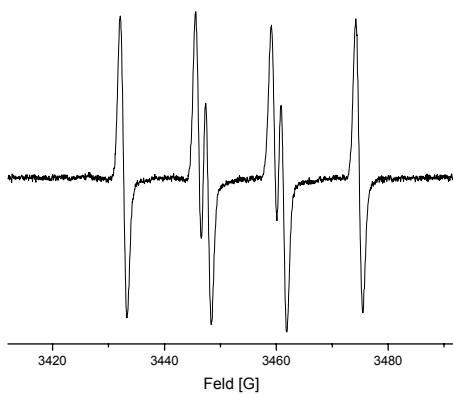
Für das AEMPO-OH-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:

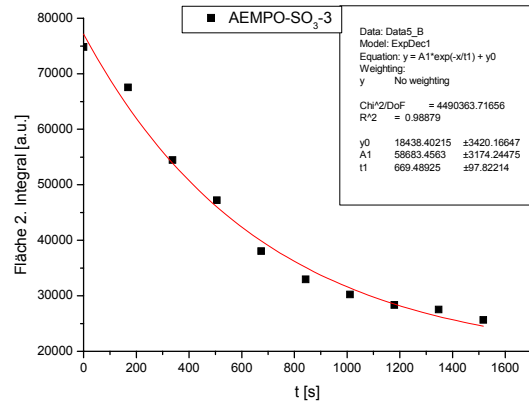
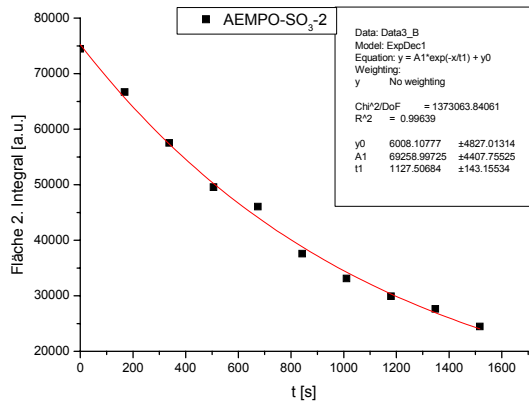




Zeit [s]	Fläche [a.u.] AEMPO-OH-1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] AEMPO-OH-2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] AEMPO-OH-3
0	113908,77	0	99051,10	0	108056,46
168,608	98437,21	168,608	71684,53	168,608	90062,98
337,1	80421,14	337,1	55148,82	337,1	77383,26
505,585	60686,64	505,585	44944,90	505,585	71682,73
674,004	55429,84	674,004	39504,21	674,004	60391,50
842,49	45118,49	842,49	33830,27	842,49	53690,87
1010,97	36614,58	1010,97	27723,82	1010,97	48210,03
1179,46	35309,08	1179,46	24780,02	1179,46	46704,91
1347,95	33647,74	1347,95	23649,32	1347,95	44399,41
1516,4	32285,15	1516,4	22729,86	1516,4	37497,87

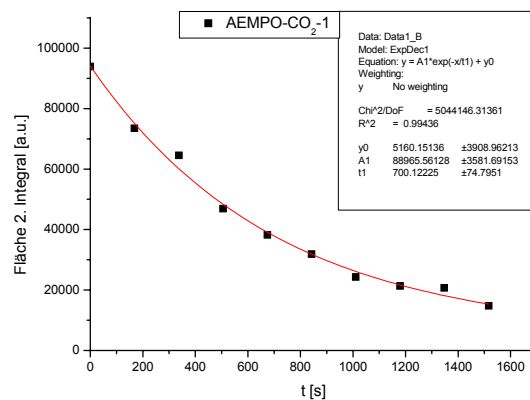
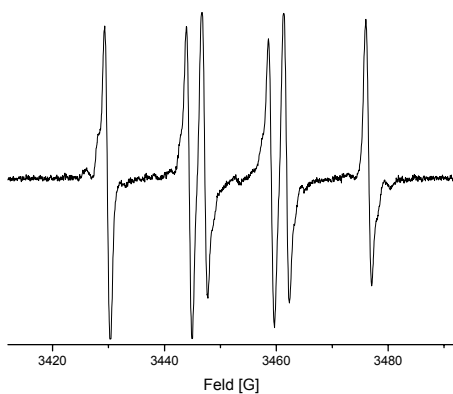
Für das AEMPO-SO₃-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:

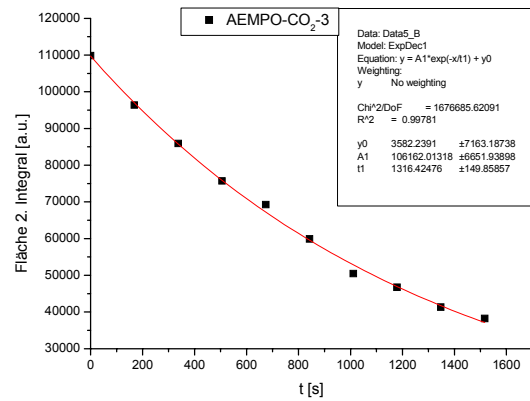
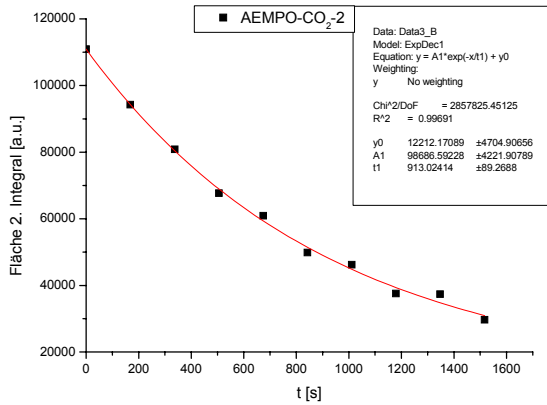




Zeit [s]	Fläche [a.u.] AEMPO-SO ₃ -1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] AEMPO-SO ₃ -2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] AEMPO-SO ₃ -3
0	91039,21	0	74489,95	0	74806,79
168,608	68686,99	168,608	66692,60	168,608	67531,76
337,1	57131,97	337,1	57526,62	337,1	54445,19
505,585	48989,40	505,585	49565,80	505,585	47217,23
674,004	42275,60	674,004	46061,15	674,004	38057,26
842,49	37461,37	842,49	37565,43	842,49	32955,88
1010,97	34098,39	1010,97	33141,24	1010,97	30246,50
1179,46	30007,01	1179,46	29924,56	1179,46	28336,18
1347,95	26130,65	1347,95	27629,68	1347,95	27548,76
1516,4	23596,50	1516,4	24461,53	1516,4	25672,20

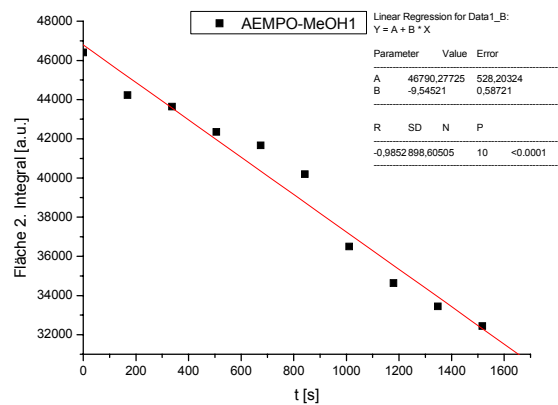
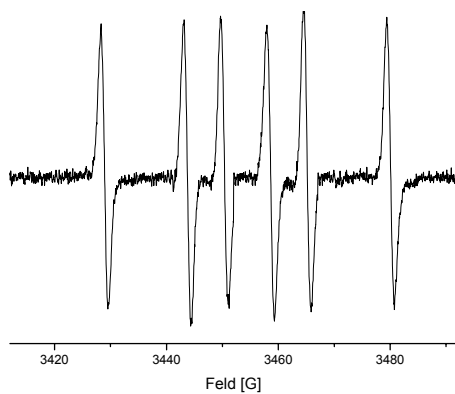
Für das AEMPO-CO₂-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:

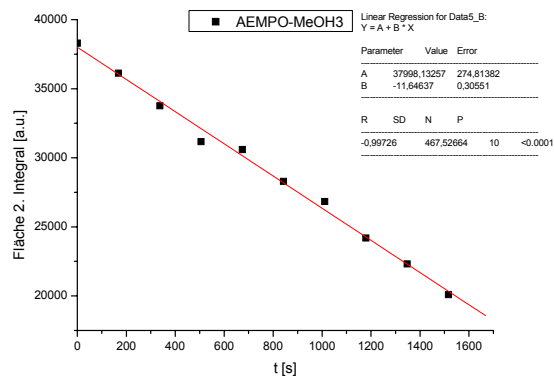
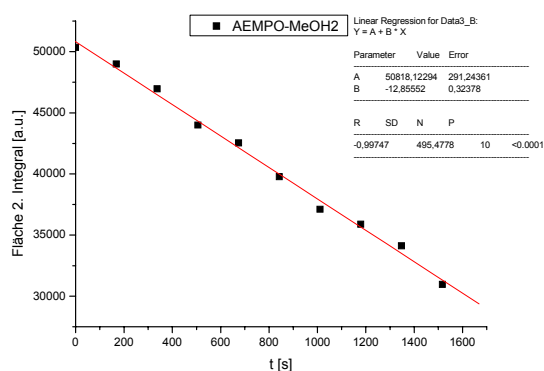




Zeit [s]	Fläche [a.u.] AEMPO-CO ₂ -1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] AEMPO-CO ₂ -2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] AEMPO-CO ₂ -3
0	93917,40	0	110905,57	0	109846,30
168,608	73468,91	168,608	94266,27	168,608	96363,41
337,1	64531,03	337,1	80842,95	337,1	85915,23
505,585	46929,88	505,585	67711,42	505,585	75712,92
674,004	38212,34	674,004	60914,81	674,004	69264,91
842,49	31851,56	842,49	49831,89	842,49	59910,10
1010,97	24345,17	1010,97	46231,52	1010,97	50477,83
1179,46	21347,64	1179,46	37547,48	1179,46	46704,49
1347,95	20696,64	1347,95	37315,21	1347,95	41333,55
1516,4	14722,65	1516,4	29643,84	1516,4	38214,73

Für das AEMPO-CH₂OH-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:

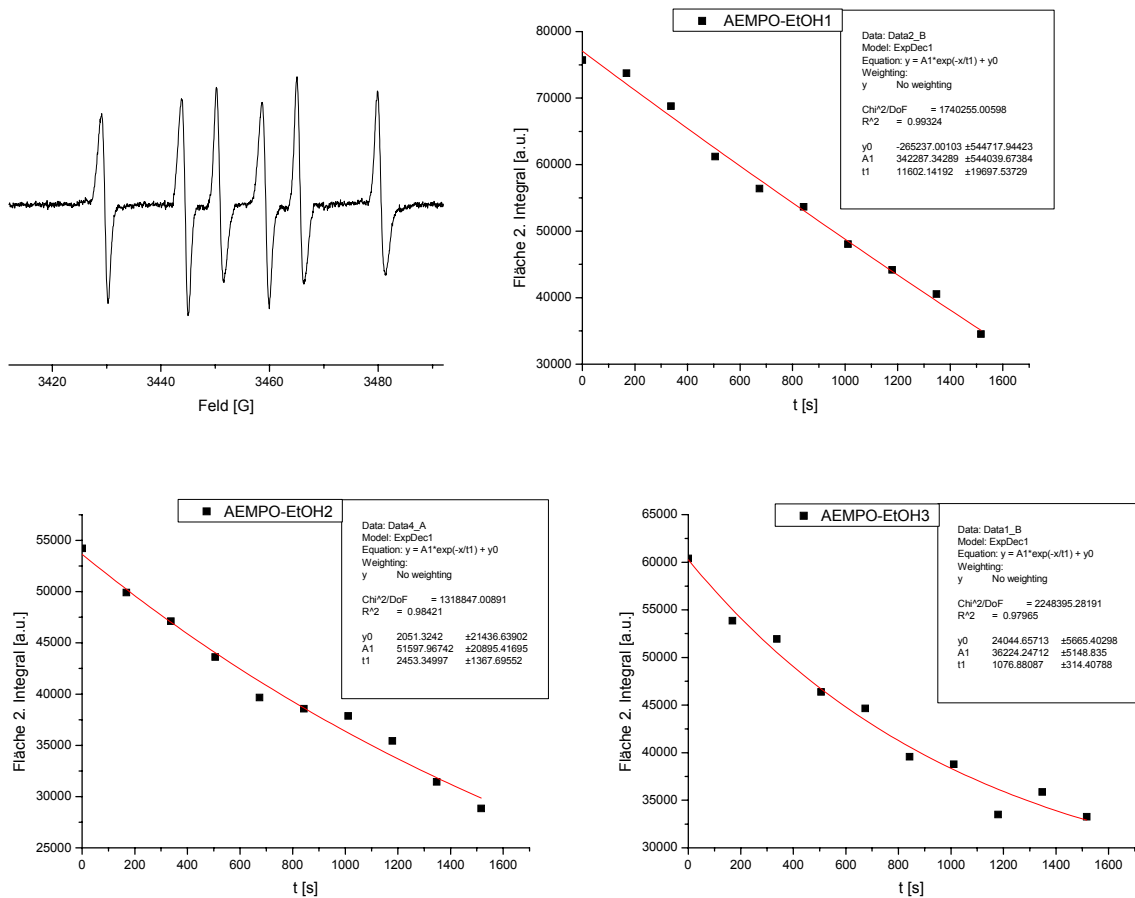




In diesem Fall wurde durch lineare Regression ausschließlich die Halbwertszeit berechnet. Der Versuch auch exponentielle Zerfallsfunktionen erster Ordnung zur Bestimmung der Zerfallskonstanten zu benutzen scheiterte an absurden Zeitkonstanten. Diese resultieren aus den nahezu linear verlaufenden Messwerten. Ursache ist hierfür letztendlich die Unkenntnis der realen Verhältnisse im Reaktionsansatz. Augenscheinlich versagt in diesem Fall die Beschreibung als Zerfallsreaktion Pseudo-erster Ordnung.

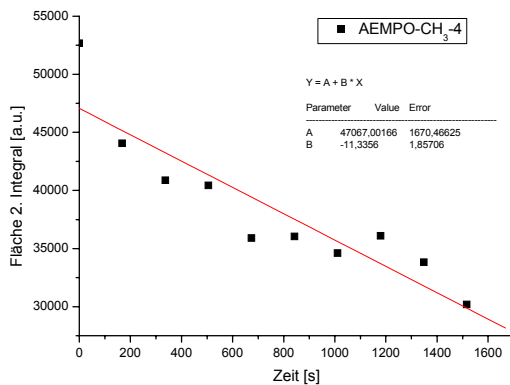
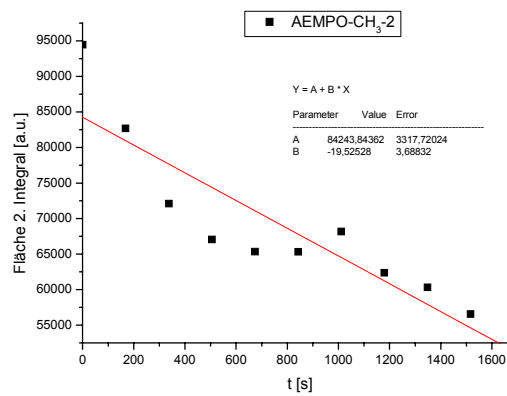
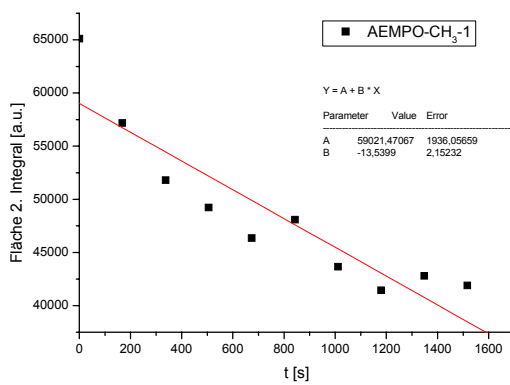
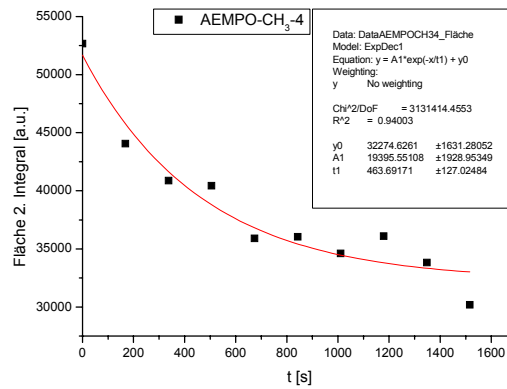
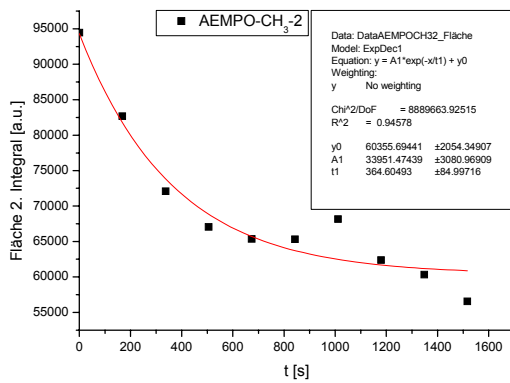
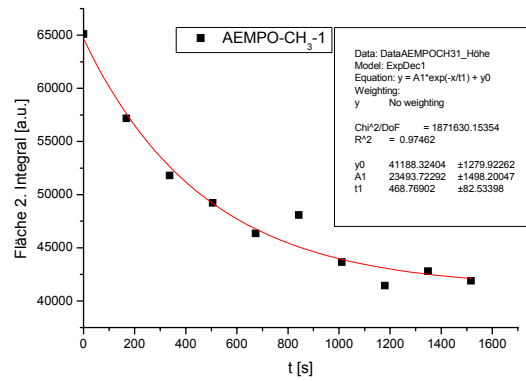
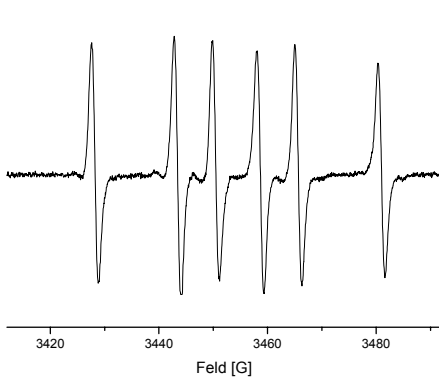
Zeit [s]	Fläche [a.u.] AEMPO- CH ₂ OH-1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] AEMPO- CH ₂ OH-2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] AEMPO- CH ₂ OH-3
0	46410,15	0	50349,56	0	38301,57
168,608	44234,95	168,608	48997,09	168,608	36127,77
337,1	43643,76	337,1	46955,23	337,1	33763,20
505,585	42353,54	505,585	43995,43	505,585	31161,12
674,004	41663,69	674,004	42545,81	674,004	30592,04
842,49	40198,98	842,49	39777,79	842,49	28296,14
1010,97	36503,85	1010,97	37107,69	1010,97	26835,58
1179,46	34635,61	1179,46	35892,76	1179,46	24196,12
1347,95	33445,18	1347,95	34123,03	1347,95	22315,35
1516,4	32435,88	1516,4	30958,99	1516,4	20083,07

Für das AEMPO-CH₃CHOH-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:



Zeit [s]	Fläche [a.u.] AEMPO- CH ₃ CHOH-1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] AEMPO- CH ₃ CHOH-2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] AEMPO- CH ₃ CHOH-3
0	75718,26	0	54221,82	0	60401,41
168,608	73748,04	168,608	49908,50	168,608	53865,33
337,1	68778,85	337,1	47131,18	337,1	51938,47
505,585	61195,96	505,585	43612,42	505,585	46376,95
674,004	56398,24	674,004	39668,28	674,004	44650,65
842,49	53663,73	842,49	38570,80	842,49	39564,64
1010,97	48029,77	1010,97	37879,21	1010,97	38788,25
1179,46	44164,67	1179,46	35430,16	1179,46	33500,78
1347,95	40537,72	1347,95	31446,50	1347,95	35875,39
1516,4	34509,77	1516,4	28851,93	1516,4	33265,55

Für das AEMPO-CH₃-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:



Zur Berechnung der Halbwertszeit wurden lineare Fits benutzt, da die Exponentialgleichungen des Zerfalls erster Ordnung negative und damit unlösbare In-Funktionen ergeben. Die Zerfallskonstanten wurden dagegen aus den Fits für einen Zerfall erster Ordnung berechnet.

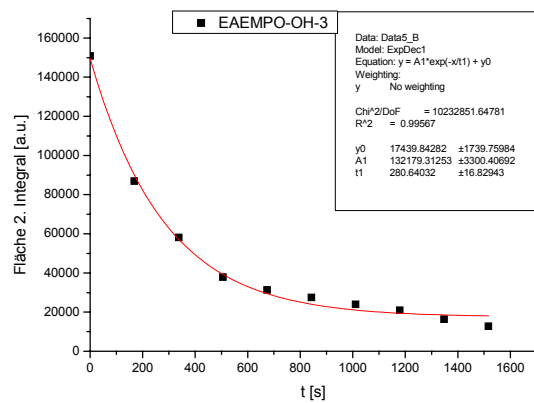
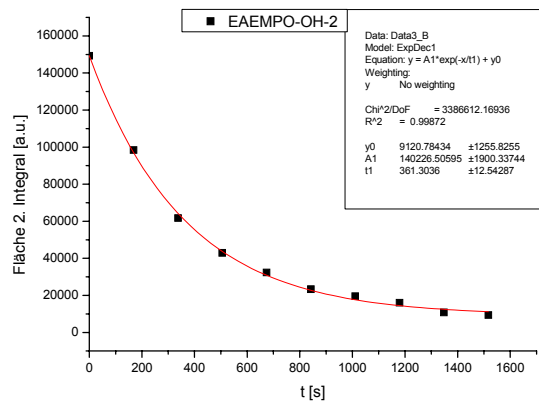
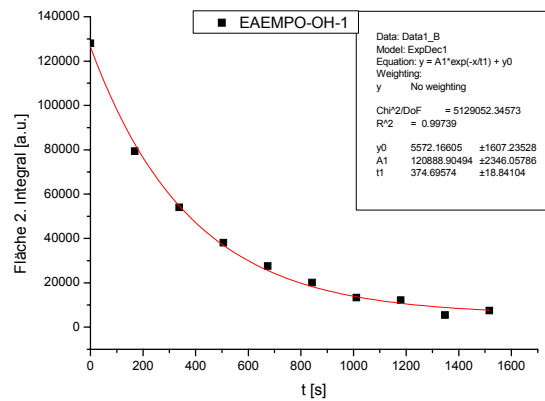
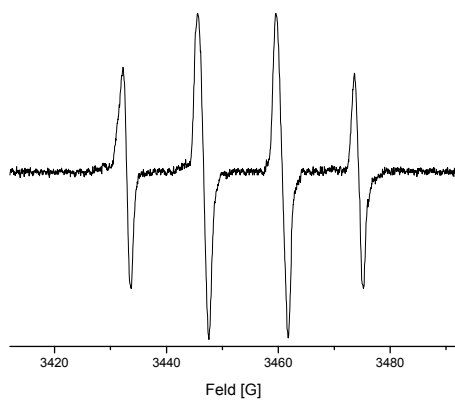
Zeit [s]	Fläche [a.u.] AEMPO-CH ₃ -1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] AEMPO-CH ₃ -2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] AEMPO-CH ₃ -4
0	65110,23	0	94446,38	0	52667,5179
168,608	57175,77	168,608	82686,94	168,608	44054,4653
337,1	51806,49	337,1	72079,65	337,1	40879,8457
505,585	49218,95	505,585	67073,68	505,585	40439,5735
674,004	46351,92	674,004	65344,13	674,004	35900,8313
842,49	48086,46	842,49	65320,37	842,49	36047,4599
1010,97	43667,71	1010,97	68171,86	1010,97	34607,3996
1179,46	41449,02	1179,46	62383,18	1179,46	36100,1925
1347,95	42795,69	1347,95	60330,72	1347,95	33828,4565
1516,4	41885,24	1516,4	56549,79	1516,4	30191,3546

5.6.3.6 Bestimmung der Zerfallskonstante k_d und Halbwertszeit $t_{1/2}$ von EAEMPO

Es wurde nach folgendem Pipettierschema mit den oben aufgeführten Lösungen verfahren:

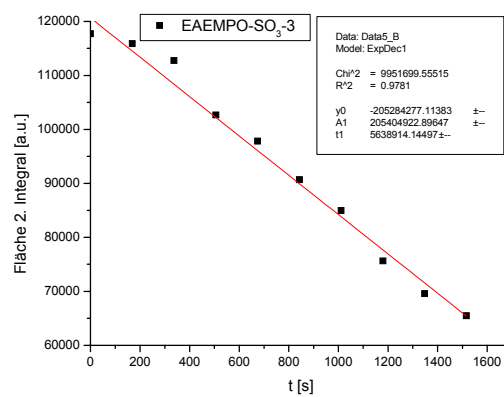
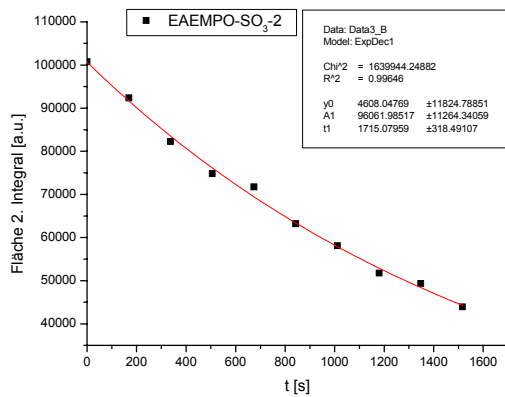
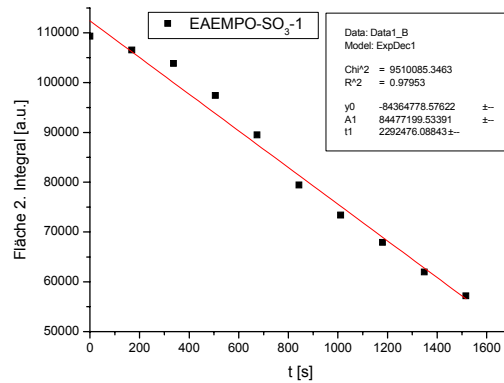
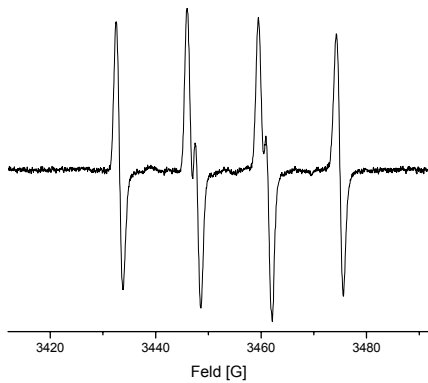
Radikale	OH	SO ₃	CO ₂	CH ₂ OH	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
Spin-Trap-Stamml. [μ l]	20	10	10	10	10	10
H ₂ O ₂ -Lös. [μ l]	20	20	20	20	20	20
Fe ²⁺ -Lös. [μ l]	20	20	20	20	20	20
PBS-Puffer [μ l]	40	30	30	30	30	30
Zusätze [μ l]	0	20	20	20	20	20

Für das EAEMPO-OH-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:



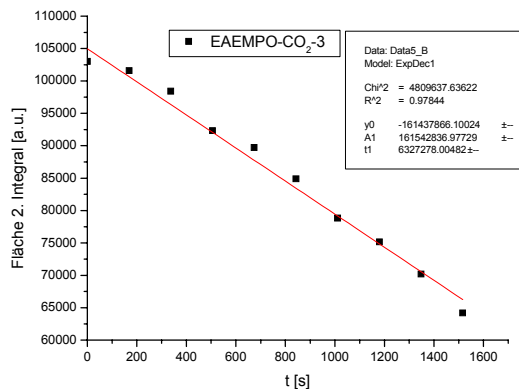
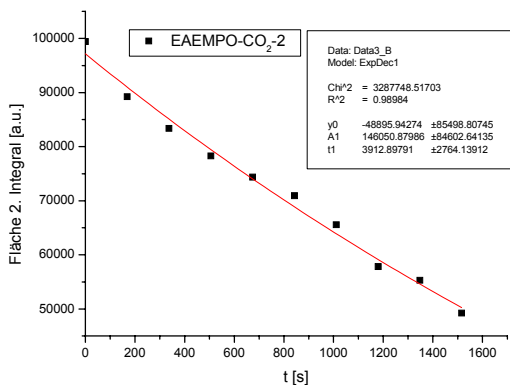
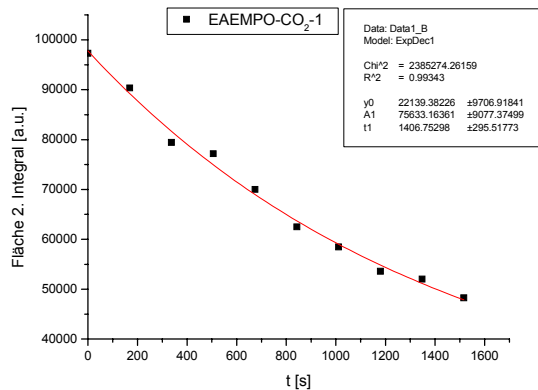
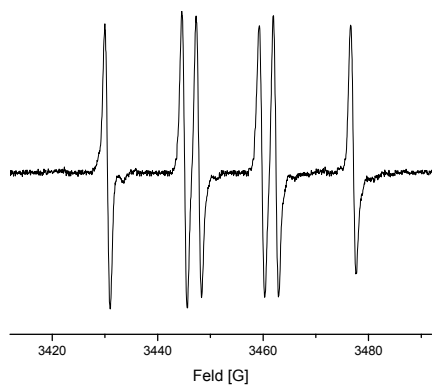
Zeit [s]	Fläche [a.u.] EAEMPO-OH-1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] EAEMPO-OH-2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] EAEMPO-OH-3
0	128073,79	0	149317,12	0	150846,09
168,608	79371,82	168,608	98381,10	168,608	86883,89
337,1	54079,38	337,1	61715,82	337,1	58073,51
505,585	38071,29	505,585	42950,33	505,585	37894,94
674,004	27541,41	674,004	32371,33	674,004	31307,47
842,49	20145,92	842,49	23284,32	842,49	27448,47
1010,97	13318,06	1010,97	19567,02	1010,97	23986,46
1179,46	12174,70	1179,46	16024,05	1179,46	20862,36
1347,95	5498,22	1347,95	10790,42	1347,95	16318,67
1516,4	7469,61	1516,4	9432,60	1516,4	12817,42

Für das EAEMPO-SO₃-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:



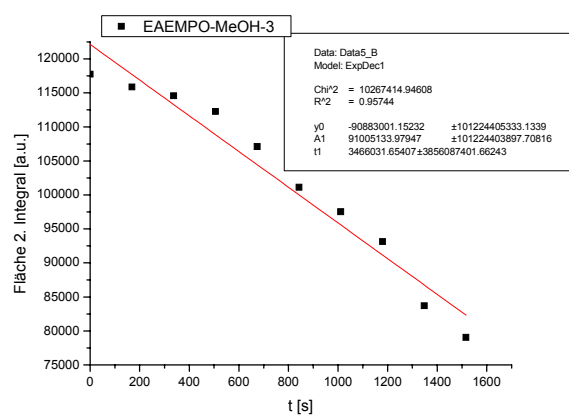
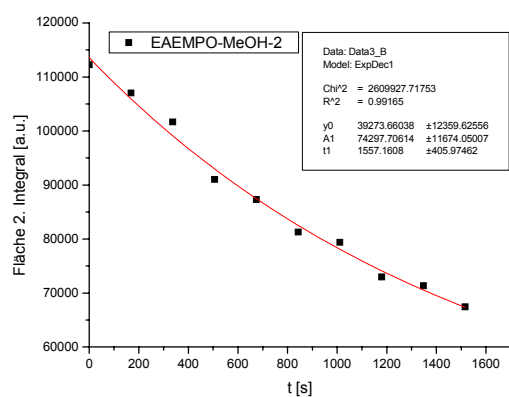
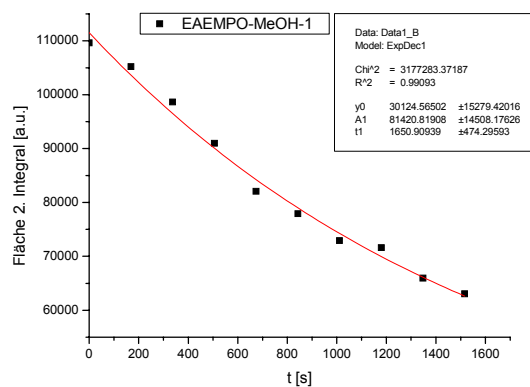
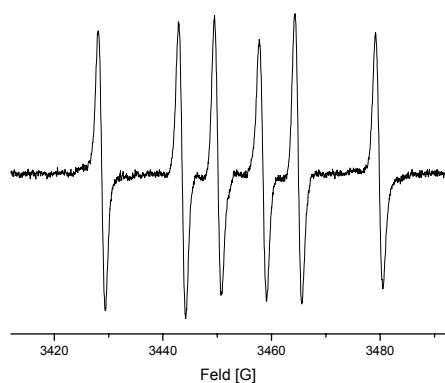
Zeit [s]	Fläche [a.u.] EAEMPO-SO ₃ -1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] EAEMPO-SO ₃ -2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] EAEMPO-SO ₃ -3
0	107340,40	0	100782,22	0	114700,02
168,608	106542,32	168,608	92381,62	168,608	115874,03
337,1	103842,85	337,1	82287,96	337,1	112769,02
505,585	97422,67	505,585	74819,84	505,585	102664,75
674,004	89518,20	674,004	71743,17	674,004	97799,07
842,49	79447,56	842,49	63211,00	842,49	90679,40
1010,97	73400,10	1010,97	58100,26	1010,97	84955,14
1179,46	67910,94	1179,46	51747,58	1179,46	75633,89
1347,95	61990,05	1347,95	49324,92	1347,95	69564,20
1516,4	57163,13	1516,4	43918,04	1516,4	65464,69

Für das EAEMPO-CO₂-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:



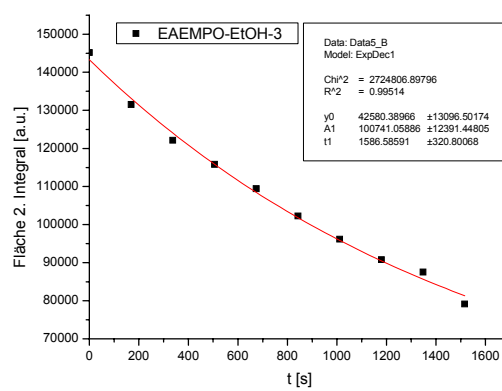
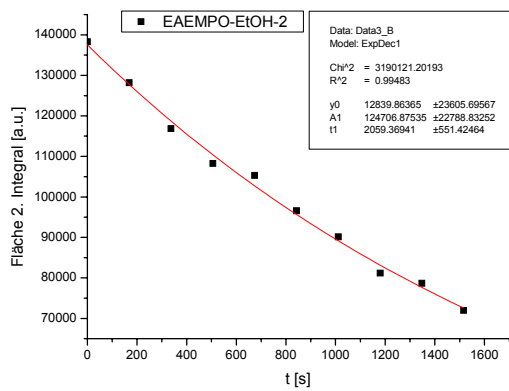
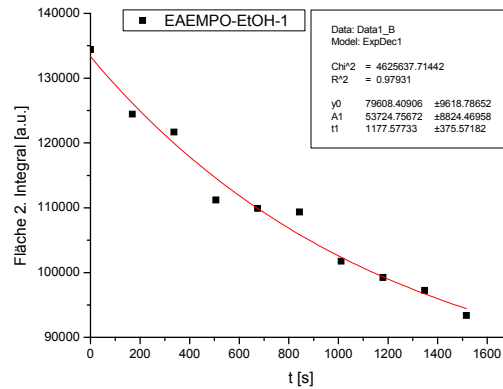
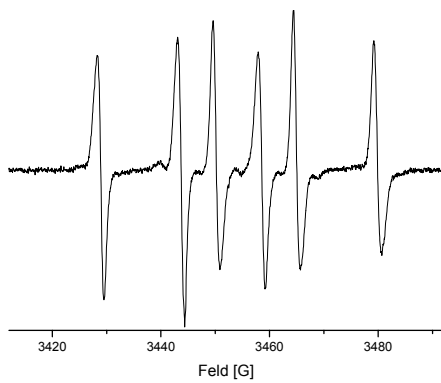
Zeit [s]	Fläche [a.u.] EAEMPO-CO ₂ -1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] EAEMPO-CO ₂ -2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] EAEMPO-CO ₂ -3
0	97314,34	0	99424,20	0	1030719,63
168,608	90358,20	168,608	89219,23	168,608	101599,27
337,1	79433,44	337,1	83386,29	337,1	98418,18
505,585	77177,85	505,585	78267,45	505,585	92309,15
674,004	69992,33	674,004	74373,02	674,004	89716,07
842,49	62486,77	842,49	70937,24	842,49	84889,61
1010,97	58491,93	1010,97	65551,22	1010,97	78834,95
1179,46	53585,47	1179,46	57829,12	1179,46	75174,47
1347,95	52033,83	1347,95	55279,41	1347,95	70191,93
1516,4	48272,01	1516,4	49215,80	1516,4	64196,81

Für das EAEMPO-CH₂OH-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:



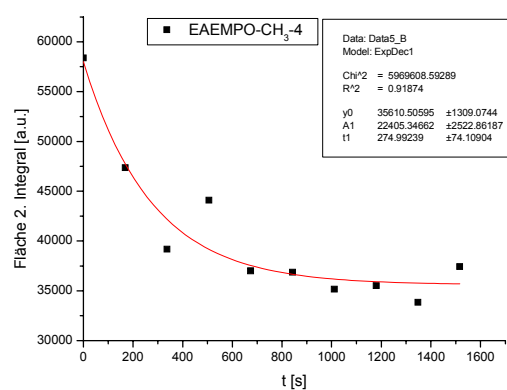
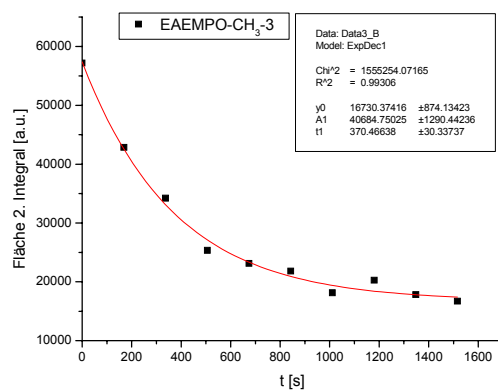
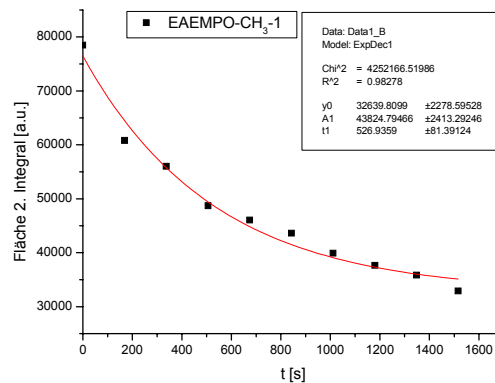
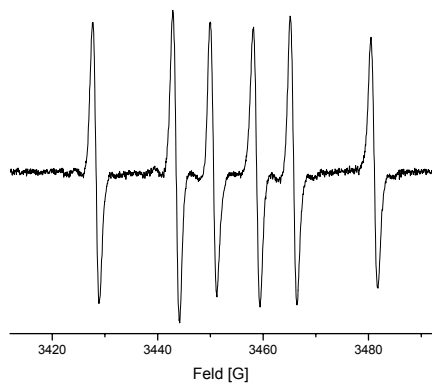
Zeit [s]	Fläche [a.u.] EAEMPO- CH ₂ OH-1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] EAEMPO- CH ₂ OH-2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] EAEMPO- CH ₂ OH-3
0	109633,53	0	112286,01	0	117741,27
168,608	105231,52	168,608	107021,19	168,608	115854,35
337,1	98652,24	337,1	101662,27	337,1	114570,31
505,585	90990,46	505,585	91032,47	505,585	112258,82
674,004	82057,15	674,004	87329,92	674,004	107115,58
842,49	77900,29	842,49	81273,50	842,49	101124,94
1010,97	72929,35	1010,97	79359,81	1010,97	97522,94
1179,46	71585,96	1179,46	72950,77	1179,46	93147,25
1347,95	65955,51	1347,95	71331,35	1347,95	83707,31
1516,4	63048,35	1516,4	67412,76	1516,4	79062,06

Für das EAEMPO-CH₃CHOH-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:



Zeit [s]	Fläche [a.u.] EAEMPO- CH ₃ CHOH-1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] EAEMPO- CH ₃ CHOH-2	Zeit [s]	Fläche [a.u.] EAEMPO- CH ₃ CHOH-3
0	134427,31	0	138278,24	0	145166,95
168,608	124448,20	168,608	128157,30	168,608	131539,16
337,1	121694,32	337,1	116835,65	337,1	122170,24
505,585	111215,80	505,585	108256,58	505,585	115806,40
674,004	109901,54	674,004	105295,18	674,004	109430,25
842,49	109360,11	842,49	96545,48	842,49	102250,80
1010,97	101760,96	1010,97	90131,51	1010,97	96156,07
1179,46	99237,46	1179,46	81196,92	1179,46	90770,34
1347,95	97261,44	1347,95	78674,59	1347,95	87510,88
1516,4	93387,65	1516,4	71994,82	1516,4	79131,40

Für das EAEMPO-CH₃-Addukt ergeben sich folgendes Spektrum und folgende Kinetik-Fits:



Zeit [s]	Fläche [a.u.] EAEMPO-CH ₃ -1	Zeit [s]	Fläche [a.u.] EAEMPO-CH ₃ -3	Zeit [s]	Fläche [a.u.] EAEMPO-CH ₃ -4
0	78493,77	0	57182,60	0	58394,9642
168,608	60795,39	168,608	42850,56	168,608	47370,143
337,1	56005,70	337,1	34218,05	337,1	39174,3958
505,585	48696,06	505,585	25343,08	505,585	44098,2934
674,004	46031,57	674,004	23125,44	674,004	37003,7278
842,49	43613,76	842,49	21813,20	842,49	36876,0417
1010,97	39911,46	1010,97	18139,79	1010,97	35168,7596
1179,46	37654,44	1179,46	20267,80	1179,46	35526,1692
1347,95	35863,71	1347,95	17802,32	1347,95	33855,8669
1516,4	32906,07	1516,4	16698,11	1516,4	37427,1163

5.6.4 Erzeugung von Superoxid-Radikalen

5.6.4.1 Versuche mit dem XOD-System

Benötigte Lösungen:

4 mM Hypoxanthin-Lösung (10 ×):

5,44 mg Hypoxanthin in 1 ml 0,5 M NaOH lösen
ad 10 ml mit PBS-Puffer, pH = 7,2 mit HCl wieder eingestellt

10 mM DTPA-Lösung (10 ×):

39,34 mg DTPA ad 10 ml PBS, pH = 7,2

Xanthinoxidase 1 u/ml, Fa. Serva, Heidelberg

Für einen Reaktionsansatz wurde folgendes Pipettierschema benutzt:

Lösung	Menge [μ l]	Endkonzentration [mM] oder Aktivität [U/ml]
Hypoxanthin-Lösung	10	0,4
DTPA-Lösung	10	1
Spin-Trap-Stamml. (100 mM)	1	1
XOD-Lösung (1,00 U/ml)	40	0,4
PBS-Puffer, pH = 7,2	39	-

5.6.4.2 Versuche mit dem Fe(III)-H₂O₂-NaOH-System

Benötigte Lösungen:

Fe³⁺-Lösung (4 mM):

51,90 mg FeCl₃ ad 20 ml H₂O bidest.

H₂O₂/NaOH-Lösung (5 mM):

10,00 mg NaOH ad H₂O bidest., pH auf 11,3 mit HCl einstellen,
dann Zugabe von 25,5 μ l H₂O₂ (30 %ig)

Für einen Reaktionsansatz wurde folgendes Pipettierschema benutzt:

Lösung	Menge [μl]	Endkonzentration [mM]
H ₂ O ₂ /NaOH-Lösung	20	1,25
Fe ³⁺ -Lösung	20	1
Spin-Trap-Stamml. (100 mM)	60	60

5.6.4.3 Versuche mit dem KO₂-DMSO-System

Benötigte Lösungen:

10 mM Fe²⁺-Lösung, s. Fenton-Lösungen

100 mM Spin-Trap-Stammlösungen, s. Erzeugung der anderen Radikale

Schwefelsäure (10 mM)

5,33 μl H₂SO₄ konz (98-99%ig)

ad 10 ml H₂O bidest

Kaliumsuperoxid-Lösung (14 mM)

1 mg KO₂

ad 1 ml DMSO

Es wurde nach folgendem Pipettierschemata vorgegangen:

Radikale	Superoxid, pH = 9,0	Superoxid, pH = 7,2
Spin-Trap-Stammlösung [μl]	20	20
KO ₂ -Lös. [μl]	60	40
Fe ²⁺ -Lös. [μl]	20	20
Schwefelsäure [μl]	0	20

Die Berechnung der Zerfallskonstanten k_d und der Halbwertszeit $t_{1/2}$ wurde analog zu den anderen Spin-Trapping-Versuchen durchgeführt.

5.6.5 Simulation der ESR-Spektren der zyklischen Nitronen mit EasySpin

Zur Simulation der ESR-Spektren der Spin-Addukte der zyklischen Nitronen wurde mit dem Programmteil Garlic des EasySpin-Programmpakets simuliert. Im Folgenden sind die zugehörigen Befehlszeilen tabelliert:

DMPO-Addukt	Programmcode
OH	<pre>Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[41.54,41.54],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.09 0.09]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.668;</pre>
SO ₃	<pre>Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[45.5,40.72],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.09 0.09]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.655;</pre>
CO ₂	<pre>Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[52.27,44.08],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.09 0.09]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.6574;</pre>
CH ₂ OH	<pre>Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[62.81,44.17],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.09 0.09]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.6593;</pre>
CH ₃ CHOH	<pre>Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[64.41,44.22],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.09 0.09]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.6584;</pre>
CH ₃	<pre>Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[64.54,45.12],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.09 0.09]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.66;</pre>

EMPO-Addukt	Programmcode	
OH	<pre>Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N,1H','A',[40.00,41.25,1.5],'n',[1 1 1]); Exp.mwFreq = 9.6646; Sys.lw = [0.10 0.09]; Exp.Range = [341.2 349.2];</pre>	Anteil: 30%

	<pre>Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[36.0,39.6],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.10 0.09]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.6646;</pre>	Anteil: 70 %
SO ₃	<pre>Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N,1H','A',[37.91,38.4,3.4],'n',[1 1 1]); Sys.lw = [0.10 0.12]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.6675;</pre>	
CO ₂	<pre>Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[47.88,41.31],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.10 0.12]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.6675;</pre>	
CH ₂ OH	<pre>Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[58.79,41.62],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.10 0.12]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.6685;</pre>	
CH ₃ CHOH	<pre>Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[59.22,41.59],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.10 0.12]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.6677;</pre>	
CH ₃	<pre>Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[61.15,42.71],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.10 0.12]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.67;</pre>	

BocAEMPO-Addukt	Programmcode	
OH	<pre>Sys = struct('g',2.00324,'Nucs','1H,14N,1H','A',[38.0,39.0,3.5],'n',[1 1 1]); Sys.lw = [0.09 0.09]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.672;</pre>	Anteil: 25 %
	<pre>Sys = struct('g',2.00324,'Nucs','1H,14N','A',[35.8,39.0],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.09 0.09]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.672;</pre>	Anteil: 75 %
SO ₃	<pre>Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[42.54,38.3],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.09 0.09]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.657;</pre>	

CO ₂	<pre> Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[47.67,41.03],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.09 0.05]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.6569; </pre>
CH ₂ OH	<pre> Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[58.4,41.37],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.1 0.1]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.6595; </pre>
CH ₃ CHOH	<pre> Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[58.68,41.62],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.1 0.1]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.6595; </pre>
CH ₃	<pre> Sys = struct('g',2.00323,'Nucs','1H,14N','A',[61.15,42.49],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.1 0.08]; Exp.Range = [341.1 349.1]; Exp.mwFreq = 9.675; </pre>

BocEAEMPO-Addukt	Programmcode	
OH	<pre> Sys = struct('g',2.00324,'Nucs','1H,14N,1H','A',[40.0,39.0,3.5],'n',[1 1 1]); Sys.lw = [0.09 0.09]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.6725; </pre>	Anteil: 25 %
	<pre> Sys = struct('g',2.00324,'Nucs','1H,14N','A',[36.0,39.0],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.09 0.09]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.6725; </pre>	Anteil: 75 %
SO ₃	<pre> Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[42.07,37.64],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.125 0.08]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.6569; </pre>	
CO ₂	<pre> Sys = struct('g',2.00323,'Nucs','1H,14N','A',[47.22,41.00],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.1 0.05]; Exp.Range = [341.1 349.1]; Exp.mwFreq = 9.6734 </pre>	
CH ₂ OH	<pre> Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[58.21,41.25],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.115 0.06]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.659; </pre>	

CH ₃ CHOH	<pre>Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[58.12,41.34],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.115 0.07]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.661;</pre>
CH ₃	<pre>Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[60.51,42.23],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.11 0.05]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.663;</pre>

AEMPO-Addukt	Programmcode
OH	<pre>Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[39.39,39.39],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.13 0.085]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.6645;</pre>
SO ₃	<pre>Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[42.82,37.83],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.10 0.05]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.668;</pre>
CO ₂	<pre>Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[48.68,41.14],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.12 0.05]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.666;</pre>
CH ₂ OH	<pre>Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[59.97,41.56],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.12 0.05]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.67;</pre>
CH ₃ CHOH	<pre>Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[59.1,41.08],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.13 0.05]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.6716;</pre>
CH ₃	<pre>Sys = struct('g',2.00323,'Nucs','1H,14N','A',[62.30,42.65],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.1 0.06]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.6858;</pre>

EAEMPO-Addukt	Programmcode
OH	<pre> Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[38.6,38.6],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.12 0.11]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.6676; </pre>
SO ₃	<pre> Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[42.23,37.58],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.10 0.12]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.66865; </pre>
CO ₂	<pre> Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[48.57,40.92],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.09 0.09]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.6685; </pre>
CH ₂ OH	<pre> Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[60.06,41.51],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.09 0.09]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.6695; </pre>
CH ₃ CHOH	<pre> Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[59.61,40.92],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.09 0.09]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.6695; </pre>
CH ₃	<pre> Sys = struct('g',2,'Nucs','1H,14N','A',[62.58,42.57],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.09 0.09]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.671; </pre>

5.7 ESR-Messungen aliphatischer Nitronne

5.7.1 Geräteeinstellungen

Alle ESR-Messungen wurden in einer Quarzkapillare in der dielektrischen Cavity ER4118 X-MD-5 durchgeführt.

Parameter	Einstellungen
Temperatur	295 K
Konversionszeit	81,92 ms
Mikrowellenfrequenz	9,7 GHz
Mikrowellenleistung	20,166 mW

Modulationsfrequenz	100 kHz
Modulationsamplitude	1 G
Receiver Gain	90 dB
Spektrenbreite	80 G
Mittelfeld	3452 G
Zeitkonstante	81,92 ms
Scanzahl	1
Messpunkte	2048

5.7.2 Probenbereitung:

Für die Messungen können die Stilbennitronen direkt ohne weitere Aufreinigung benutzt werden. Hierfür werden 50 mM Stammsuspensionen angesetzt.

Stammsuspensionen:

6,98 mg Stilbennitron ad 670 μ l PBS-Puffer $c = 50$ mM

6,00 mg Nitrostilbennitron ad 370 μ l PBS-Puffer $c = 50$ mM

30,00 mg Cyclohexylstilbennitron ad 196 μ l PBS-Puffer $c = 50$ mM

Die Verbindungen sind nur bedingt löslich. Daher werden die Suspensionen vor Gebrauch für 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt und unmittelbar vor Entnahme eines Aliquots für einen Versuchansatz nochmals gevortext.

Fenton-Lösungen:

100 mM H₂O₂-Lösung: 510,00 μ l H₂O₂ 30 %ig ad 50 ml H₂O bidest.

10 mM Fe²⁺-Lösung: 196,10 mg (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ × 6 H₂O ad 50 ml H₂O bidest.

Beide Lösungen werden stets frisch für eine Messreihe angesetzt. Bei Verwendung an aufeinander folgenden Tagen muss nicht täglich neu angesetzt werden. Maximale Verwendbarkeit beider Lösungen: 14 Tage

5.7.3 Versuchsdurchführung:

50 μl Stammsuspension + 25 μl H_2O_2 -Lösung + 25 μl Fe^{2+} -Lösung

vortexen

+ 150 μl Ethylacetat

vortexen

Abtrennen der Ethylacetatphase und Messung im ESR-Gerät

Verschiedene Versuche, Signale im wässrigen Medium zu detektieren, verlaufen nicht erfolgreich. Stets ist eine Extraktion notwendig. Daher wurden auch nur Versuche mit OH-Radikalen gemacht.

5.7.4 Simulation der ESR-Spektren der Stilbennitronen mit EasySpin

Zur Simulation der ESR-Spektren der Spin-Addukte der Stilbennitronen wurde mit dem Programmteil Garlic des EasySpin-Programmpakets simuliert. Im Folgenden sind die zugehörigen Befehlszeilen tabelliert:

OH-Addukt von	Programmcode
N- <i>tert</i> -Butyl- α -[trans-(4-styryl-phenyl)]-nitron	<pre>Sys = struct('g',2.00232,'Nucs','1H,14N','A',[6.64,41.59],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.21 0.15]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.681;</pre>
N- <i>tert</i> -Butyl-Nitrostilbennitron	<pre>Sys = struct('g',2.00232,'Nucs','1H,14N','A',[6.84,41.14],'n',[1 1]); Sys.lw = [0.21 0.21]; Exp.Range = [341.2 349.2]; Exp.mwFreq = 9.687;</pre>

5.8 Versuche zum Fluoreszenzquenching von Nitrostilbennitron

Zum Quenching wird eine Lösung von 0,5 mg Nitrostilbennitron in Ethanol gelöst und nach folgendem Schema in einer 3 ml Küvette mit H_2O_2 -Lösung und Fe^{2+} -Lösung (s. Fenton-Lösungen) versetzt:

Messung	Zugabe Fe ²⁺ -Lösung, 10 mM	Zugabe H ₂ O ₂ -Lösung, 100 mM	Summe der Zugaben
	[μ l]	[μ l]	[μ l]
1	0	0	0
2	+ 4	+4	8
3	+ 2	+ 2	12

Zur quantitativen Bestimmung des Quenching-Effekts wird über die Spektren integriert und die so erhaltenen Flächenwerte zueinander prozentual ins Verhältnis gesetzt.

5.9 Zellkultur-Experimente

5.9.1 Verwendete Zellen

Für die Versuche zur Inkubation wurden COS-7-Zellen benutzt, die von der AG Kietzmann freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden.

5.9.2 Inkubation von COS-7-Zellen mit N-*tert*-Butyl-nitrostilbennitron

5.9.2.1 Benötigte Lösungen

PBS-Puffer, pH = 7,2, steril (Zusammensetzung s. Experimenteller Teil)

20 mM Stammlösung des Nitrons :

1,10 mg N-*tert*-Butyl-nitrostilbennitron ad 154 μ l DMSO mit 20 % Pluronic[®] F-127

5.9.2.2 Versuchsdurchführung

COS-7-Zellen, ausgesät auf blanken Glas-Deckgläschen oder mit 0,1% Gelatine beschichteten Glas-Deckgläschen, werden mit einer Inkubations-Lösung des Nitrons für 30 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden die Deckgläschen auf einen Objekträger überführt und direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert.

Die verwendeten Konzentrationen sind im Folgenden tabelliert:

Probenname	Endkonzentration [μM]	Nitron-Stammlösung [μl]	PBS-Puffer [μl]
LSM-Apo	20	3	2997
SpCube 1	33	5	2995
SpCube 2	66	10	2990
SpCube 3	75	15	2985
SpCube 4	133	20	2980

6 Literaturverzeichnis

- Allouch, Ahmad; Roubaud, Valerie; Lauricella, Robert; Bouteiller, Jean-Claude; Tuccio, Béatrice (2005). "Spin trapping of superoxide by diester-nitrones." Org. Biomol. Chem. **3**: 2458-2462.
- Artuso, Emma; Barbero, Margherita; Degani, Iacopo; Dughera, Stefano; Fochi, Rita (2006). "Arenediazonium o-benzenedisulfonamides as efficient reagents for Heck-type arylation reactions." Tetrahedron **62**: 3146-3157.
- Aurich, H. G.; Duggal, S. K.; Höhle, P.; Klingelhöfer, H.-G. (1981). "Aminyloxide (Nitroxide), XXXIII, Oxidative Kupplung von Aminen und Hydroxylaminen mit Nitronen. Die Stereochemie von (Aminoalkyl)aminyloxiden." Chem. Ber. **114**: 2431-2439.
- Bakthavachalam, Venkatesalu.; Baidur, Nandkishore; Madras, Bertha K.; Neumeyer, John L. (1991). "Fluorescent Probes for Dopamine Receptors: Synthesis and Characterization of Fluorescein and 7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl Conjugates of D-1 and D-2 Receptor Ligands." J. Med. Chem. **34**: 3235-3241.
- Ballini, Roberto; Petrini, Marino (1986). "Facile and inexpensive synthesis of 4-Oxoalkanoic acids from primary nitroalkanes and acrolein." Synthesis: 1024-1026.
- Barr, D. P. "A Step-by-Step Procedure for Spin-Trapping the Hydroxyl Radical." Bruker EPR Division.
- Basaric, Nikola; Baruah, Mukulesh; Qin, Wenwu; Metten, Bert; Smet, Mario; Dehaen, Wim; Boens, Noel (2005). "Synthesis and spectroscopic characterisation of BODIPY based fluorescent off-on indicators with low affinity for calcium." Org. Biomol. Chem. **3**: 2755-2761.
- Becke, Friedrich; Fleig, Helmut; Päßler, Peter (1971). "Eine allgemeine Methode zur Herstellung von Carbonsäureamiden aus den entsprechenden Nitrilen, II." Liebigs Ann. Chem. **749**: 198-201.
- Becker, H. G. O.; Grossmann, K. (1990). "Spectral Sensitization of Dediazonation by the 2-Electron-Transfer System meso-Tetraphenylporphinato-dichlorostannate(IV)/10-Methyl-9-phenyl-9,10-dihydro-acridine." Journal f. prakt. Chemie **332**(2): 241-250.
- Bendig, J.; Beyermann, M.; Kreysig, D.; Schöneich, R.; Siegmund, M. (1978). "Photochemische (E)-(Z)-Isomerisierung substituierter Stilbene und Stilbenanaloger in Gegenwart von π -Akzeptoren." Journal f. prakt. Chemie **320**(5): 798-806.
- Black, David. St. C.; Crozier, Robert F.; Rae, Ian D. (1978). "Nitrones and Oxaziridines. XX. Intramolecular Nitron 1,3-Dipolar Cycloaddition by Substituent Interaction: Synthesis and Reduction of Some Tetrahydropyrroloisoxazoles." Aust. J. Chem. **31**: 2013-2022.
- Black, D. St.; Watson, K. G. (1973). "Nitrones and Oxaziridines. VIII. Cycloaddition Reactions of Nitrones with

- Isothiocyanates." Aust. J. Chem. **26**: 2473-2489.
- Bösterling, Bernhard; Trudell, James R. (1981). "Spin trap evidence for production of superoxide radical anions by purified NADPH-cytochrome P-450 reductase." Biochem. Biophys. Res. Commun. **98**.
- Boveris, A. (1977). "Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide." Adv. Exp. Med. Biol. **78**: 67-82.
- Bradshaw, Charles G.; Ceszowski, Karin; Turcatti, Gerardo; Beresford, Isabel J. M.; Chollet, André (1994). "Synthesis and Characterization of Selective Fluorescent Ligands for the Neurokinin NK2 Receptor." J. Med. Chem. **37**: 1991-1995.
- Breuer, Eli; Aurich, Hans Günter; Nielsen, Arnold (1989). Nitrones, nitronates and nitroxides. Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, John Wiley & Sons.
- Britz-Mckibbin, Philip; Vo, Hung C.; MacGillivray, Ross T. A.; Chen, David D. Y. (1999). "Analysis of γ -Carboxyglutamic Acid Content of Protein, Urine, and Plasma by Capillary Electrophoresis and Laser-Induced Fluorescence." Anal. Chem. **71**: 1633-1637.
- Buettner, G. R. (1987). "Spin Trapping: ESR parameters of spin adducts." Free Radic. Biol. Med. **3**: 259-303.
- Burr, John G.; Summers, W. A.; Lee, Y. L. (1975). "Energy transfer in fluorescent derivatives of uracil and thymine." J. Am. Chem. Soc. **97**: 245-247.
- Carlson, R. G.; Srinivasachar, K.; Givens, R.S.; Matuszewski, B.K. (1986). "New derivatizing agents for amino acids and peptides. 1. Facile synthesis of N-substituted 1-Cyanobenz[f]isoindoles and their spectroscopic properties." J. Org. Chem. **51**: 3978-3983.
- Castells, Josep; Font, Josep; Vergili, Albert (1979). "Reaction of Dialdehydes with Conventional and Polymer-supported Wittig Reagents." J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1: 1-6.
- Chen, Jiong; Burghart, Armin; Derecskei-Kovacs, Agnes; Burgess, Kevin (2000). "4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY) Dyes Modified for Extended Conjugation and Restricted Bond Rotations." J. Org. Chem. **65**: 2900-2906.
- Clerici, Angelo; Pastori, Nadia; Porta, Ombretta (1998). "Efficient Acetalisation of Aldehydes catalyzed by Titanium Tetrachloride in a Basic Medium." Tetrahedron **54**: 15679-15690.
- Conejero, Salvador; Díez, Josefina; Gamasa, María Pilar; Gimeno, José (2004). "Indenylruthenium(II) Aminoallenylidenes: New Building Blocks for the Synthesis of Highly Unsaturated Alkynyl and Allenylidene Complexes." Organometallics **23**: 6299-6310.
- Culcasi, Marcel; Rockenbauer, Antal; Mercier, Anne; Clément, Jean-Louis; Pietri, Sylvia (2006). "The line asymmetry of

- electron spin resonance spectra as a tool to determine the cis:trans ration for spin-trapping adducts of chiral pyrroline N-oxides: The mechanism of formation of hydroxyl radical adducts of EMPO, DEPMPO, and DIPPMPO in the ischemic-reperfused rat liver." Free. Radic. Biol. Med. **40**: 1524-1538.
- Cummins, Clark. H.; Coates, Robert M. (1983). "α-Oxygenation of aldehydes and cyclic ketones by acylation-rearrangement of nitrones." J. Org. Chem. **48**: 2070-2076.
- de Montigny, Pierre; Stobaugh, John F.; Givens, Richard S.; Carlson, Robert G. (1987). "Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde/cyanide ion: a rationally designed fluorogenic reagent for primary amines." Anal. Chem. **59**: 1096-1101.
- Dikalov, Sergey; Jiang, Jinjie; Mason, Ronald P. (2005). "Characterization of the high-resolution ESR spectra of superoxide radical adducts of DEPMPO and DMPO. Analysis of conformational exchange." Free Radic. Res. **39**(8): 825-836.
- Dikalov, Sergey; Tordo, Paul; Motten, Ann; Mason, Ronald P. (2003). "Characterization of the High Resolution ESR spectra of the Methoxyl Radical Adducts of DEPMPO." Free Radic. Res. **37**: 705-712.
- Drefahl, Günther; Plötner, Gerhard (1961). "Die Wittig-Reaktion mit *p*-Halogenmethyl-benzaldehyd." Chem. Ber.: 907-914.
- DSMZ (2007). COS-7: www.dsmz.de.
- Dunker, M. F. W.; Starkey, E. B.; Jenkins, G. L. (1936). "The Preparation of Some Organic Mercurials from Diazonium Borofluorides." J. Am. Chem. Soc. **58**: 2308-2309.
- Einhorn, Jaques; Einhorn, Cathy; Luche, Jean-Louis (1991). "A Mild and Efficient Sonochemical tert-Butoxycarbonylation of Amines from Their Salts." Synlett: 37-38.
- Eisenbrand, Gerhard; Metzler, Manfred (1994). Toxikologie für Chemiker. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag.
- Elschenbroich, Christoph; Salzer, Albrecht (1993). Organometallchemie. Stuttgart, B. G. Teubner.
- Fantone, J. C.; Ward, P. A. (1982). "Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions." Am. J. Path. **107**(3): 295-418.
- Finkelstein, Eli; Rosen, Gerald M.; Rauckman, Elmer J. (1980). "Spin Trapping of Superoxide and Hydroxyl radical: Practical Aspects." Archives of Biochemistry and Biophysics **200**: 1-16.
- Frejaville, Claudine; Karoui, Hakim; Tuccio, Béatrice; Le Moigne, Francois (1995). "5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide: a new efficient phosphorylated nitronne for the in vitro and in vivo spin trapping of oxygen centered radicals." J. Med. Chem. **38**: 258-265.

- Gabe, Yu; Urano, Yasuteru; Kikuchi, Kazuya; Kojima, Hirotasu; Nagano, Tetsuo (2004). "Highly Sensitive Fluorescence Probes for Nitric Oxide Based on Boron Dipyrromethene Chromophore-Rational Design of Potentially Useful Bioimaging Fluorescence Probe." J. Am. Chem. Soc. **126**: 3357-3367.
- Gattermann, L.; Wieland, T. (1982). Die Praxis des organischen Chemikers. Berlin, New York, de Gruyter.
- Gluzman, Y. (1981). "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants." Cell **23**(1): 175-182.
- Golovkova, Tatiana; Kozlov, Denis; Neckers, Douglas C. (2005). "Synthesis and properties of novel fluorescent switches." J. Org. Chem. **70**: 5545-5549.
- Gooßen, L. (2006). persönliche Mitteilung.
- Greene, Theodora; Wab, Peter (1999). Protective Groups in Organic Synthesis, Wiley-Interscience.
- Grigor'ev, I. A.; Bakunova, S. M.; Kirilyuk, I. A. (2000). "Reactions of cyclic α -methoxy nitrones with nucleophilic reagents." Russian Chemical Bulletin, International Edition **49**(12): 2031-2036.
- Gros, C.; Labouesse, B. (1969). "Study of the Dansylation Reaction of Amino Acids, Peptides and Proteins." European J. Biochem. **7**: 463-470.
- Haire, D. L.; Janzen, Edward G. (1982). "Synthesis and spin trapping kinetics of new alkyl substituted cyclic nitrones." Can. J. Chem. **60**: 1514-1522.
- Harbour, John R.; Chow, Vivian; Bolton, James R. (1974). "An electron spin resonance study of the spin adducts of OH and OH₂ radicals with nitrones in the ultraviolet photolysis of aqueous hydrogen peroxide solutions." Can. J. Chem. **52**: 3549-3553.
- Hardy, Micael; Ouari, Olivier; Charles, Lawrence; Finet, Jean-Pierre; Iacazio, Gilles; Monnier, Valérie; Rockenbauer, Antal; Tordo, Paul (2005). "Synthesis and Spin-Trapping Behaviour of 5-ChEPMPPO, a Cholesteryl Ester Analogue of the Spin Trap DEPMPO." J. Org. Chem. **70**: 10426-10433.
- Hauck, S. (2003). "Diplomarbeit."
- Haugland, R. P. (2002). Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Molecular Probes Inc.
- Heberer, H.; Kersting, H.; Matschiner H. (1985). "Derivatisierung von Aminen mit 4-substituierten 7-Nitrobenz-2,1,3-oxadiazolen." Journal f. prakt. Chemie **3**: 487-504.
- Heberer, H.; Matschiner, H. (1986). "UV-VIS- und IR-spektroskopische Untersuchungen an N-substituierten 4-Amino-7-nitrobenz-2,1,3-oxadiazolen." Journal f. prakt. Chemie **2**: 261-274.
- Heine, Harold W.; Zibuck, Regina; VandenHeuvel, William J. A. (1982). "Mechanisms for the Reactions of Nitrones

- with Aroyl Chlorides." J. Am. Chem. Soc. **104**: 3691-3694.
- Huie, Reeves; Cherry, William R. (1985). "Facile one-step synthesis of Phenyl-tert-butylNitrone (PBN) and its derivatives." J. Org. Chem. **50**: 1531-1532.
- Hyde, James S.; Dalton, Larry R. (1979). "Saturation-Transfer Spectroscopy" in Spin Labelling II; Academic Press; New York, San Francisco, London. 1-70.
- Ikenaga, Kazutoshi.; Kikukawa, Kiyoshi; Matsuda, Tsutomu (1986). "Reaction of Diazonium Salts with Transition Metals. Part 11. Palladium-catalyzed Aryldesilylation of Alkenylsilanes by Arenediazonium Salts." J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1: 1959-1964.
- Ikenaga, Kazutoshi; Kikukawa, Kiyoshi; Matsuda, Tsutomu (1987). "Stereospecific Arylation of Alkenylsilanes with Arylpalladium Acetates." J. Org. Chem. **52**: 1276-1280.
- Jackson, Simon, K.; Liu, Ke Jian, Liu, Miao; Timmins, Graham S. (2002). "Detection and removal of contaminating hydroxylamines from the spin trap DEPMPO, and re-evaluation of its use to indicate nitron radical cation formation and S_N1 reactions." Free Radic. Biol. Med. **32**(3): 228-232.
- Janzen, E. G. (1969). "Substituent effects on electron spin resonance spectra and stability of free radicals." Acc. Chem. Res. **2**: 279-288.
- Janzen, E. G. (1971). "Spin Trapping." Acc. Chem. Res. **4**: 31-40.
- Janzen, Edward G.; Coulter, Gregory A.; Oehler, Uwe M.; Bergsma, John P. (1982). "Solvent effects on the nitrogen and β -hydrogen hyperfine splitting constants of aminoxyl radicals obtained in spin trapping experiments." Can. J. Chem. **60**: 2725-2733.
- Janzen, Edward G.; Jandrisits, Linda T.; Shetty, R. V.; Haire, D. Larry (1989). "Synthesis and purification of 5,5-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxide for biological applications." Chem.-Biol. Interactions **70**: 167-172.
- Jeffery, T. (1999). "Tetraalkylammonium salt-based catalyst systems for directing the arylation of vinyltrimethylsilane." Tetrahedron Letters **40**: 1673-1676.
- Kálai, Tamás; Hideg, Éva; Jekö, József; Hideg, Kálmán (2003). "Synthesis of paramagnetic BODIPY dyes as new double (spin and fluorescence) sensors." Tetrahedron Letters **44**: 8497-8499.
- Kálai, Tamás; Hideg, Éva; Vass, Imre; Hideg, Kálmán (1998). "Double (fluorescent and spin) sensors for detection of reactive oxygen species in the thylakoid membrane." Free Rad. Biol. Med. **24**: 649-652.
- Kamitori, Yasuhiro; Hoyo, Masaru; Masuda, Ryoichi; Yoshida, Tatsushi (1985). "Alumina as an versatile catalyst for the selective acetalization of aldehydes." Tetrahedron Letters **26**(39): 4767-4770.

- Karabelas, Kostas; Hallberg, Anders (1986). "Synthesis of (E)-(2-Arylethenyl)silanes by Palladium-Catalyzed Arylation of Vinylsilanes in the Presence of Silver Nitrate" J. Org. Chem. **51**: 5286-5290.
- Kende, Andrew S.; Mendoza, José S. (1991). "Controlled reduction of nitroalkanes to alkyl hydroxylamines or amines by samarium diiodide." Tetrahedron Letters **32**: 1699-1702.
- Khalil, Ehab M.; Subasinghe., Nalin L.; Johnson, Rodney L. (1996). "An Efficient and High Yield Method for the N-tert-Butoxycarbonyl Protection of Sterically Hindered Amino Acids." Tetrahedron Letters **37**: 3441-3444.
- Khrantsov, Valery; Berliner, Lawrence J.; Clanton, Thomas L. (1999). "NMR Spin Trapping: Detection of Free Radical Reactions Using a Phosphorus-Containing Nitron Spin-Trap." Magn. Reson. Med. **42**: 228-234.
- Kikukawa, Kiyoshi; Maemura, Koji; Kiseki, Yasuyuki; Wada, Fumio; Matsuda, Tsutomu (1981). "Palladium(0)-Catalyzed Arylation of Olefins by Arylamines and an Alkyl Nitrite." J. Org. Chem. **46**: 4885-4888.
- Kornblum, Nathan; Blackwood, Robert K.; Mooberry, David D. (1956). "The Reaction of Aliphatic Nitro Compounds with Nitrite Esters." J. Am. Chem. Soc. **78**: 1501-1504.
- Kornblum, Nathan; Larson, Harold D.; Blackwood, Robert K.; Mooberry, David D.; Oliveto, Eugene P.; Graham, Galen E. (1956). "A New Method for the Synthesis of Aliphatic Nitro Compounds." J. Am. Chem. Soc. **78**: 1497-1501.
- Liotta, Dennis; Baker, A. D.; Goldstein, Stephen; Goldman, Norman L.; Weinstein-Lanse, Francine; Felsen-Reingold, Diane; Engel, Robert (1974). "Reactions of N-Aryl Nitrogen Oxides. 1. Selective Ortho Chlorination in the Reactions of Aryl Nitrones and Amine Oxides with Thionyl Chloride or Phosgene." J. Org. Chem. **39**(18): 2718-2722.
- Littke, Adam F.; Fu, Gregory C. (2001). "A Versatile Catalyst for Heck Reactions of Aryl Chlorides and Aryl Bromides under Mild Conditions." J. Am. Chem. Soc. **123**: 6989-7000.
- Liu, Yang Ping; Ji, Qiong Yi; Song, Yu Guang; Liu, Ke Jian; Liu, Bin; Tian, Qiu; Liu, Yang (2005). "A novel spin trap for targeting sulfhydryl-containing polypeptides." Chem. Commun.: 4943-4945.
- Liu, Zhiming; Yasseri, Amir A.; Loewe, Robert S.; Lysenko, Andrey B.; Malinovskii, Vladimir L., et al. (2004). "Synthesis of Porphyrins Bearing Hydrocarbon Tethers and Facile Covalent Attachment to Si(100)." J. Org. Chem. **69**: 5568-5577.
- Locigno, Edward J.; Zweier, Jay L.; Villamena, Frederick A. (2005). "Nitric oxide release from the unimolecular decomposition of the superoxide radical anion adduct of cyclic nitron in aqueous medium." Org. Biomol. Chem. **3**: 3220-3227.
- Lombardo, Marco; Trombini, Claudio (2000). "Nucleophilic Additions to Nitrones." Synthesis **6**: 759-774.

- McConnell, H. M. (1976) in Spin Labeling; Academic Press; New York, San Francisco, London: 525-560.
- Makino, Keisuke; Imaishi, Hiromasa; Morinishi, Shuji; Hagiwara, Takuya; Takeuchi, Tamio (1989). "An artifact in the ESR spectrum obtained by spin trapping with DMPO." Free Rad. Res. Comms. **6**: 19-28.
- Manecke, Georg; Lüttke, Sven (1970). "Über Synthesen einiger oligomerer substituierter Arylvinylene." Chem. Ber.: 700-707.
- Maples, Kirk R.; Ma, Fang; Zhang, Yong-Kang (2001). "Comparison of the radical Trapping Ability of PBN, S-PBN and NXY-059." Free. Rad. Res. **34**: 417-426.
- Marquardt, H.; Schäfer, S. G. (1997). Lehrbuch der Toxikologie. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
- Marriott, Paul R.; Perkins, M. John; Griller, David (1980). "Spin trapping for hydroxyl in water: a kinetic evaluation of two popular traps." Can. J. Chem. **58**: 803-807.
- Masaki, Hitoshi; Atsumi, Takamasa; Sakurai, Hiromu (1995). "Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation." Biochem. Biophys. Res. Commun. **206**: 474-479.
- Masllorens, Judit; Bouquillon, Soudrine; Roglans, Anna; Hélin, Françoise; Muzart, Jacques (2005). "The Heck-type arylation of allylic alcohols with arenediazonium salts." J. Organomet. Chem. **690**: 3822-3826.
- Miller, Larry; Phillips, Martin; Reisler, Emil (1988). "Polymerization of actin modified with fluorescein isothiocyanate." (Newman 1958) Eur. J. Biochem. **174**: 23-29.
- Newman, Melvin S.; Harper, Robert J. Jr. (1958). "Kinetic and equilibrium studies of cyclic ketal formation and hydrolysis." **80**: 6350-6355.
- Nilsson, Kristina.; Hallberg, Anders (1990). "The Effect of Triethylamine on the Palladium-Catalyzed Arylation of Vinyltrimethylsilane." Acta Chemica Scandinavica **44**: 288-290.
- Nishizawa, Chico; Takeshita, Keizo; Ueda, Jun-Ichi; Mizuno, Michiko (2004). "Hydroxyl radical generation caused by the reaction of singlet oxygen with a spin trap, DMPO, increases significantly in the presence of biological reductants." Free. Rad. Res. **38**(4): 385-392.
- Nitz, Mark; Bundle, David R. (2000). "Efficient Synthesis of 3,6-Dideoxy-b-D-arabino-hexopyranosyl-Terminated LacdiNac Glycan Chains of the Trichinella spiralis Parasite." J. Org. Chem. **65**: 3064-3073.
- Oates, Mary D. ; Jorgenson, James W. (1989). "Determination of Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde-labeled amino acids by open tubular liquid chromatography with electrochemical detection." Anal. Chem. **61**: 432-435.
- Olive, Gilles; Mercier, Anne; Le Moigne, François; Rockenbauer, Antal; Tordo, Paul (2000). "2-Ethoxycarbonyl-2-

- methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole-1-oxide: evaluation of the spin trapping properties." Free Radic. Biol. Med. **28**: 403-308.
- Ono, Noboru; Miyake, Hideyoshi; Kaji, Aritsune (1983). "A new synthesis of 1,5-Dicarbonyl compounds under neutral conditions." J. Chem. Soc., Chem. Commun.: 875-876.
- Onoda, Maki; Uchiyama, Seiichi; Santa, Tomofumi; Imai, Kazuhiro (2002). "A photoinduced electron-transfer reagent for peroxyacetic acid, 4-ethylthioacetyl-amino-7-phenylsulfonyl-2,1,3-benzoxadiazole, based on the method for predicting the fluorescence quantum yields." Anal. Chem. **74**: 4089-4096.
- Piloty, O.; Ruff, O. (1897). "Ueber die Reduction des tertiären Nitroisobutylglycerins und das Oxim des Dioxyacetons." Ber. Dtsch. Chem. Ges. **30**: 1658-1659.
- Prelog, V.; Walser, A. (1962). "75. Stoffwechselprodukte von Actinomyceten. Über die Synthese der Ferrioxamine B und D1." Helvetica Chimica Acta **75**: 631-637.
- Pryor, W. A. (1986). "Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions." Ann. Rev. Physiol. **48**: 657-667.
- Raha, S.; Robinson, B. H. (2000). TIBS **25**: 502-508.
- Reetz, Manfred T.; de Vries, Johannes G. (2004). "Ligand-free Heck reactions using low Pd-loading." Chem. Commun.: 1559-1563.
- Reinheckel, H.; Tauber, G. (1967). "Über halogen- und stickstoffhaltige Derivate aliphatischer Carbonsäuren, 7. Mitt.: Über Gewinnung und Reaktionen von α -Nitrocarbonsäureestern." Mh. Chem. **98**: 1944-1953.
- Riermeier, Thomas H.; Zapf, Alexander; Beller, Matthias (1997). "Palladium-catalyzed C-C- and C-N-coupling reactions of aryl chlorides." Topics in Catalysis **4**: 301-309.
- Robinson, B. H.; Mailer, C.; Reese, A. W. (1999). "Linewidth Analysis of Spin Labels in Liquids, I. Theory and Data Analysis." J. Magn. Res. **138**: 199-209.
- Robinson, B. H.; Mailer, C.; Reese, A. W. (1999). "Linewidth Analysis of Spin Labels in Liquids, II. Experimental." J. Magn. Res. **138**: 210-219.
- Rockenbauer, Antal; Korecz, László; Hideg, Kálmán (1993). "Ring Pseudorotation in Pyrrolidine N-Oxyl Radicals: an Analysis of ^{13}C -Hyperfine Structure of EPR spectra." J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2: 2149-2156.
- Rosen, Gerald M.; Beselman, Aleksandra; Tsai, Pei; Pou, Sovitj; Mailer, Colin; Ichikawa, Kazuhiro; Robinson, Bruce H.; Nielsen, Robert; Halpern, Howard J.; MacKerell Jr, Alexander D. (2004). "Influence of Conformation on the EPR Spectrum of 5,5-Dimethyl-1-hydroperoxy-1-pyrrolidinyl-oxyl: A Spin Trapped Adduct of Superoxide." J. Org. Chem. **69**: 1321-1330.

- Sakai, Teruyuki; Ehara., Hiromi; Koezuka, Yasuhiko (1999). "Synthesis of NDB- α -galactosylceramide and its immunologic properties." Org. Lett. **1**: 359-360.
- Scardovi, Noemi; Casalini, Andrea; Peri, Francesca; Righi, Paolo (2002). "Domino processes as a tool for recovering substandard reactions. Synthesis and use of nitroacetic acid esters and amides." Organic Letters **4**: 965-968.
- Schneider, M. (1999). "Dissertation, Universität Kaiserslautern."
- Sengupta, Saumira; Bhattacharyya., Sanchita; Sadhukhan, Subir Kumar (1998). "Synthesis of *trans*-4,4'-diiodostilbene and other symmetrical *trans*-stilbenes by Heck reaction of arenediazonium salts with vinyltriethoxysilane." J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1: 275-277.
- Sengupta, Saumira; Sadhukan, Subir Kumar; Singh, Rajkumar Sunil; Pal, Nilasish (2002). "Synthesis of dendritic stilbenoid compounds: Heck reactions for the periphery and the core." Tetrahedron Letters **43**: 1117-1121.
- Showler, Alan J.; Darley, Pat A. (1966). "Condensation products of Glycerol with aldehydes and ketones. 2-substituted m-Dioxan-5-ols and 1,3-Dioxolane-4-methanols." **6**: 427-440.
- Still, Ian W.; Strautmanis, Juris R. (1989). "Synthesis of N(10)-Acetylleudistomin L." 1041-1044.
- Still, Ian W.; Strautmanis, Juris R. (1990). "Approaches to the tetracyclic eudistomins: the synthesis of N(10)-acetylleudistomin L1." Can. J. Chem. **68**: 1408-1419.
- Stoll, Stefan; Schweiger, Arthur (2006). "EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR." J. Magn. Res. **178**: 42-55.
- Stolze, Klaus; Rohr-Udilova, Natascha; Rosenau, Thomas; Hofinger, Andreas; Kolarich, Daniel; Nohl, Hans (2006). "Spin trapping of C- and O-centered radicals with methyl-, ethyl-, pentyl-, and phenyl-substituted EMPO derivatives." Bioorg. Med. Chem. **14**: 3368-3376.
- Stolze, Klaus; Rohr-Udilova, Natascha; Rosenau, Thomas; Stadtmüller, Roswitha; Nohl, Hans (2005). "Very stable superoxide radical adducts of 5-ethoxycarbonyl-3,5-dimethyl-pyrroline N-oxide (3,5-EDPO) and its derivatives." Biochem. Pharmacol. **69**: 1351-1361.
- Stolze, Klaus; Udilova, Natascha; Nohl, Hans (2000). "Spin trapping of lipid radicals with DEPMPO-derived spin traps: detection of superoxide, alkyl and alkoxy radicals in aqueous and lipid phase." Free Radic. Biol. Med. **29**: 1005-1014.
- Stolze, Klaus; Udilova, Natascha; Rosenau, Thomas; Hofinger, Andreas (2003). "Synthesis and characterization of EMPO-derived 5,5-disubstituted 1-Pyrroline N-oxides as spin traps forming exceptionally stable superoxide spin adducts." Biol. Chem. **384**: 493-500.
- Stolze, Klaus; Udilova, Natascha; Rosenau, Thomas; Hofinger, Andreas; Nohl, Hans (2005). "Spin adduct formation

- from lipophilic EMPO-derived spin traps with various oxygen- and carbon-centered radicals." Biochem. Pharmacol. **69**: 297-305.
- Summers, W. A.; Lee, J. Y.; Burr J. G. (1975). "Synthesis of fluorescent labeled derivatives of Aminopropylpyrimidines." J. Org. Chem. **40**(11): 1559-1561.
- Torsell, Kurt; Zeuthen, Ole (1978). "Reaction of *t*-Butyl nitrones and Trimethylsilyl Nitronates. Synthesis and reactions of Isoxazolidines and 2-Isoxazolines." Acta Chemica Scandinavica **B32**: 118-124.
- Treibs, A.; Kreuzer, F.-H. (1968). "Difluorboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethanen." Liebigs Ann. Chem. **718**: 208-228.
- Tsai, Pei; Ichikawa, Kazuhiro; Mailer, Colin; Pou, Sovitj; Halpern, Howar J.; Robinson, Bruce H.; Nielsen, Robert; Rosen, Gerald M. (2003). "Esters of 5-Carboxyl-5-methyl-1-pyrroline N-Oxide: A Family of Spin Traps for Superoxide." J. Org. Chem. **68**: 7811-7817.
- Tucker, Charles E.; de Vries, Johannes G. (2002). "Homogeneous catalysis for the production of fine chemicals. Palladium- and nickel-catalysed aromatic carbon-carbon bond formation." Topics in Catalysis **19**: 111-118.
- Uchiyama, Seiichi; Santa, Tomofumi; Fukushima, Takeshi; Homma, Hiroshi (1998). "Effects of the substituent groups at the 4- and 7- positions on the fluorescence characteristics of benzofurazan compounds." J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2: 2165-2173.
- Ueda, Teruhisa.; Kitamura, Fumito; Mitchell, Rosalind; Metcalf, Timothy (1991). "Chiral separation of Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde-labeled amino acid enantiomers by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection." Anal. Chem. **63**: 2979-2981.
- Vasquez-Vivar, J.; Kalyanaraman., B. (2000). "Generation of superoxide from nitric oxide synthase." FEBS Letters **481**: 304-307.
- Villamena, Frederick A.; Hadad, Christopher M.; Zweier, Jay L. (2003). "Kinetic Study and Theoretical Analysis of Hydroxyl Radical Trapping and Spin Adduct Decay of Alkoxy-carbonyl and Dialkoxyphosphoryl Nitrones in Aqueous Media." J. Phys. Chem. A **107**: 4407-4414.
- Villamena, Frederick A.; Hadad, Christopher M.; Zweier, Jay L. (2004). "Theoretical study of the spin trapping of hydroxyl radical by cyclic nitrones: a density functional approach." J. Am. Chem. Soc. **126**: 1816-1829.
- Villamena, Frederick A.; Locigno, Edward J.; Rockenbauer, Antal; Hadad, Christopher M.; Zweier, Jay L. (2006). "Theoretical and Experimental Studies of the Spin Trapping of Inorganic Radicals by 5,5-Dimethyl-1-Pyrroline N-Oxide (DMPO). 1. Carbon Dioxide Radical Anion." J. Phys. Chem. A **110**: 13253-13258.
- Villamena, Frederick A.; Rockenbauer, Antal; Gallucci, Judith; Velayutham, Murugesan; Hadad, Christopher M. (2004).

- "Spin trapping by 5-carbamoyl-5-methyl-1-pyrroline N-oxide (AMPO): theoretical and experimental studies." J. Org. Chem. **69**: 7994-8004.
- Villamena, Frederick A. ; Zweier, Jay L. (2002). "Superoxide radical trapping and spin adduct decay of 5-tert-Butoxycarbonyl-5-methyl-1-pyrroline N-oxide (BocMPO): kinetics and theoretical analysis." J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2: 1340-1344.
- Wang, Chao; Tan, Lu-Shi; He, Jin-Ping; Hu, Hong-Wen; Xu, Jian-Hua (2003). "Synthesis of Unsymmetrical Divinylbenzenes by Palladium Catalyzed Sequential Heck Reactions Starting from Carboxybenzenediazonium Salts." Synth. Commun. **33**(5): 773-782.
- Xia, Zuping; Smith, Charles D. (2001). "Efficient synthesis of a fluorescent farnesylated Ras peptide." J. Org. Chem. **66**: 5241-5244.
- Yamada, Hideki; Kawate, Tomohiko; Matsumizu, Miyako; Nishida, Atsushi; Yamaguchi, Kentaro (1998). "Chiral lewis acid-mediated enantioselective Pictet-Sprengler reaction of Nb-Hydroxytryptamine with aldehydes." J. Org. Chem. **63**: 6348-6354.
- Yao, Qingwei; Kinney, Elizabeth P.; Yang, Zhi (2003). "Ligand-Free Heck Reaction: Pd(OAc)₂ as an Active Catalyst Revisited." J. Org. Chem. **68**(10): 7528-7531.
- Zeeh, B. (1969). "Reactions between Isocyanides and Nitrones." Synthesis **1**(1): 37.
- Zhang, Hao; Joseph, Joy; Vasquez-Vivar, Jeannette; Karoui, Hakim; Nsanzumuhire, Cline (2000). "Detection of superoxide anion using an isotopically labeled nitrone spin trap: potential biological applications." FEBS Letters **473**: 58-62.
- Zhang, Yongkang; Xu, Guangzhi (1989). "Synthesis of functionalized acyclic nitrone spin traps." Z. für Naturforschung **44b**: 1475-1477.
- Zhao, Hongtao; Joseph, Joy; Zhang, Hao; Karoui, Hakim; Kalyanaraman, B. (2001). "Synthesis and biochemical applications of a solid cyclic nitrone spin trap: a relatively superior trap for detecting superoxide anions and glutathyl radicals." Free Radic. Biol. Med. **31**: 599-606.
- Zhao, Hongtao; Joseph, Joy; Zhang, Hao; Hogg, Neil; Karoui, Hakim "Synthesis and biological applications of a solid cyclic nitrone spin trap: a relatively superior trap for detection of superoxide anions and glutathyl radicals." WWW-Adresse.
- Zhou, Nie; Qiu, Tian; Yang-ping, Liu; Yang, Liu (2006). "Superoxide anion radical generation in the NaOH/H₂O₂/Fe(III) system: a spin trapping ESR study." Magn. Res. Chem. **44**: 38-44.
- Zinner, Gerwalt; Eghtessad., Elisabeth (1979). "Über die [3+2]-Cycloaddition von Nitronen und Isothiocyanaten." Arch. Pharm. **312**: 907-913.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- In chronologischer Reihenfolge danke ich Frau Michaela Haimann, Herrn Marco Keller, Herrn Stefan Eßwein, Herrn Christoph Seubert, Frau Stephanie Faltermann, Frau Eva Werle und Herrn Daniel Dehe für ihre engagierte und erfolgreiche Mitarbeit im Rahmen des Fortgeschrittenenpraktikums Biochemie bzw. Organische Chemie.
- Herrn Prof. Kálmán Hideg, Universität Pécs, Ungarn, danke ich für wertvolle Tipps bei der Synthese des EMPO.
- Herrn Prof. Lukas Gooßen danke ich für Tipps und Tricks bei den metallorganischen Arbeiten, Frau Bettina Melzer danke ich für die Überlassung ihres Labors zu diesem Zweck.
- Ein besonderer Dank gilt Frau Christiane Müller für die unbürokratische Messung unzähliger NMR-Spektren, auch jenseits ihrer normalen Arbeitszeiten.
- Frau Michèle Graf und Herrn Christof Huber danke ich für die Messung der IR-Spektren und die Unterstützung jeglicher Art während des täglichen Laborbetriebs.
- Frau Sabine Stüwe und Herrn Carsten Reyheller danke ich für die Versorgung mit HCl in Dioxan.
- Herrn Dr. Ulrich Rösch danke ich für die Messung der UV- und Fluoreszenzspektren, sowie für viele unterhaltsame und lehrreiche Stunden in der physikalischen Chemie.
- Frau Birgit Dusch danke ich für die Messung der Elementaranalysen, Herrn Markus Weyland für die Messung der GC-MS-Proben.
- Herrn Prof. Kietzmann danke ich für die Überlassung der COS-7-Zellen. Ein besonderer Dank gilt Frau Jennifer Herrmann für die oft kurzfristige Bereitstellung der Proben und allen damit verbundenen Arbeiten.

- Herrn Prof. Neuhaus und Herrn Dr. Thorsten Möhlmann, FB Biologie, danke ich für die Bereitstellung des ApoTome-Mikroskops.
- Herrn Prof. Deitmer und Herrn PD Dr. Christian Lohr, FB Biologie, danke ich für die Aufnahmen auf dem Laser-Scanning-Mikroskop.
- Herrn Dr. Foth sowie Herrn Dr. Dirk Hüttenberger und Frau Regina Bruce-Micah, FB Physik, danke ich für die Aufnahmen auf dem SpectraCube-Mikroskop und die unterhaltsamen Stunden während dieser Arbeiten.
- Herrn Dr. Fabian Rozario, Herrn Dr. Dirk Mannweiler, Herrn Fabian Leinisch, Frau Sabine Becht und Frau Sandra Theison danke ich für die tolle Zusammenarbeit, für das sehr gute Arbeitsklima, ihre Unterstützung und viele tolle Gespräche.
- Frau Carolin Fluck, Frau Elke Litmianski und Frau Yvonne Lorat danke ich für ihre freundliche Hilfe und Unterstützung während der gesamten Zeit in der AG Trommer.
- Herrn Dr. Reinhard Philipp danke ich für die vielen Literaturbestellungen und sein offenes Ohr und seine Unterstützung bei vielen Problemen.
- Herrn Jürgen Rahm, Herrn Frank Schröer, Herrn Ludvik Napast und Herrn Wilfried Kahle für die unbürokratische Beschaffung aller benötigter Chemikalien sowie für technische Unterstützung.
- Herrn Dr. Harald Kelm für die zeitweise Überlassung einer Drehschiebervakuumpumpe.
- Ein besonderer Dank gilt meinen Korrektoren Frau Sandra Theison, Herrn Boris Bischoff sowie Herrn Dr. Dirk Mannweiler.
- Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Esma Arslan für ihre intensive Korrekturarbeit, ihre Verbesserungsvorschläge, Ideen und Unterstützung.

Lebenslauf

Name: Stefan Hauck

Anschrift: Damaschkestr. 50
67065 Ludwigshafen a. Rh.

Geburtsdatum: 14.05.1977

Geburtsort: Ludwigshafen a. Rh.

Eltern: Ulf Hauck
Eleonore Hauck (geb. Wolf)

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 1983 – 1987 Grundschule Niederfeldschule, Ludwigshafen
1987-1996 Geschwister-Scholl-Gymnasium, Ludwigshafen
06 / 1996 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung: 1996-2003 Studium der Chemie an der Universität Kaiserslautern
09 / 2002 – 03 / 2003 Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr.
W. E. Trommer
06 / 2003 – 03 / 2007 Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr.
Wolfgang E. Trommer

Ersatzdienst: seit 1994 Helfer der Bundesanstalt Technisches Hilfswerk