

Etablierung einer milden Heck-Matsuda-Reaktion zur Synthese von Stilbennitronen und deren Anwendung als fluoreszierende 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. André Karbach

Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer

Kaiserslautern, 2016

Für meine Eltern

„Man kann ein Problem nicht mit den gleichen Denkstrukturen lösen, die zu seiner Entstehung beigetragen haben.“

Albert Einstein

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum März 2013 bis November 2016 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Biochemie, der Technischen Universität Kaiserslautern.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. E. Trommer für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die interessante Aufgabenstellung, sowie für die stetige Diskussionsbereitschaft.

Ebenso bedanke ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises, die mir bei Fragen immer hilfreich zur Seite standen und für ein angenehmes Arbeitsklima sorgten.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 23.02.2017

Promotionskommission:

Vorsitzender: Jun.-Prof. Dr. A. T. Cartus

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. E. Trommer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. J. Pierik

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Theorie	1
1.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	2
1.1.1 Superoxidationradikale	2
1.1.2 Hydroxylradikale	3
1.1.3 ROS - Entgiftung	4
1.2 <i>Spin Trapping</i>	5
1.2.1 Nitrone	5
1.3 Fluoreszierende <i>Spin Traps</i>	8
1.3.1 Fluorochrome	8
1.4 Theorie.....	11
1.4.1 Photophysikalische Prozesse	11
1.4.1.1 Jablonski-Termschema	11
1.4.1.2 Absorption	12
1.4.1.3 Strahlungslose Übergänge	12
1.4.1.4 Fluoreszenz	12
1.4.1.5 Stokes-Verschiebung	13
1.4.1.6 Fluoreszenzlöschung	13
1.4.1.7 Phosphoreszenz	14
1.4.2 EPR(ESR)-Spektroskopie	14
1.4.2.1 Theoretische Grundlagen	15
1.4.2.2 Hyperfeinstruktur	17
2 Stand der Forschung und Aufgabenstellung	19
3 Ergebnisse und Diskussion	23
3.1 Synthese des <i>N-tert</i> -Butyl- <i>p</i> -nitro- <i>o</i> -methoxystilben-nitrons (17a) und davon abgeleiteter auxochrom-substituierter Derivate (17b-i)	23
3.1.1 Synthese von 2-(4-Bromphenyl)-[1,3]-dioxolan (12)	24
3.1.2 Synthese von (<i>E</i>)-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)styryl)trimethylsilan (13)	24
3.1.3 Versuche zur Synthese des <i>N-tert</i> -Butyl- <i>p</i> -nitrostilbennitrons (17c)	26
3.1.3.1 Synthese des <i>p</i> -Nitrostilbenaldehyds (16c)	26
3.1.3.2 Synthese des <i>N-tert</i> -Butyl- <i>p</i> -nitrostilbennitrons (17c)	27

3.1.4	Synthese von substituierten Aryldiazoniumtetrafluoroboraten (15)	28
3.1.5	Versuche zur Synthese auxochrom-substituierter Stilbenaldehyde (16)	29
3.1.5.1	Versuche zur Synthese von Methoxy-substituierten Nitrostilbenaldehyden (16a/b)	29
3.1.5.2	Screening der Heck-Reaktion zur Darstellung von <i>N-tert</i> -Butyl- <i>p</i> -nitro- <i>o</i> -methoxystilbenaldehyd (16a)	31
3.1.5.3	Untersuchung des Anwendungsbereichs der optimierten Heck-Variante	32
3.1.6	Versuche zur Synthese auxochromer Stilbennitronderivate (17)	34
3.1.6.1	Versuch zur Synthese des <i>N-tert</i> -Butyl- <i>p</i> -nitro- <i>o</i> -methoxystilben nitrons (17a)	34
3.1.6.2	Synthese auxochrom-substituierter Stilbennitrone (17)	34
3.2	ESR-spektroskopische Untersuchungen der substituierten Stilbennitrone (17)	36
3.2.1	ESR-spektroskopische Untersuchungen von PNOMSN (17a)	38
3.2.2	ESR-spektroskopische Untersuchungen von ONMMSN (17b)	39
3.2.3	ESR-spektroskopische Untersuchungen von PNSN (17c)	40
3.2.4	ESR-spektroskopische Untersuchungen von SN (17d)	41
3.2.5	ESR-spektroskopische Untersuchungen von PMSN (17e)	42
3.2.6	ESR-spektroskopische Untersuchungen von PSSN (17f)	43
3.2.7	ESR-spektroskopische Untersuchungen von PCISN (17g)	44
3.2.8	ESR-spektroskopische Untersuchungen von PDMASN (17h)	45
3.2.9	Diskussion der ESR-spektroskopischen Untersuchungen von Stilbennitronen (17)	46
3.3	Untersuchung der optischen Eigenschaften von Stilbennitronderivaten (17)	47
3.3.1	Absorptions- und Emissionsspektrum von PNOMSN (17a)	47
3.3.2	Absorptions- und Emissionsspektrum von ONMMSN (17b)	48
3.3.3	Absorptions- und Emissionsspektrum von PNSN (17c)	48
3.3.3.1	Vergleich der Absorptions- und Emissionsmaxima von PNOMSN (17a), ONMMSN (17b) und PNSN (17c)	49
3.3.3.2	NMR-spektroskopische Interpretationen der 3D-Struktur von ONMMSN (17b)	50
3.3.3.3	<i>Ab initio</i> Rechnungen von ONMMSN (17b) und PNOMSN (17a) ...	52
3.3.4	Absorptions- und Emissionsspektrum von SN (17d)	54
3.3.5	Absorptions- und Emissionsspektrum von PMSN (17e)	55

3.3.6	Absorptions- und Emissionsspektrum von PSSN (17f)	55
3.3.7	Absorptions- und Emissionsspektrum von PCISN (17g)	56
3.3.8	Absorptions- und Emissionsspektrum von PDMASN (17h)	57
3.3.9	Absorptions- und Fluoreszenzmaxima der synthetisierten Stilbennitron- derivate (17)	57
3.4	Fluoreszenz-Quenching-Experimente mit Stilbennitronderivaten (17)	58
3.4.1.1	Fluoreszenzquenching von PNOMSN (17a) mittels Fenton	58
3.4.1.2	Fluoreszenzquenching von PNOMSN (17a) mittels XO/HX	59
3.4.2.1	Fluoreszenzquenching von ONMMSN (17b) mittels Fenton	59
3.4.2.2	Fluoreszenzquenching von ONMMSN (17b) mittels XO/HX	60
3.4.3.1	Fluoreszenzquenching von PNSN (17c) mittels Fenton	61
3.4.3.2	Fluoreszenzquenching von PNSN (17c) mittels XO/HX	61
3.4.4.1	Fluoreszenzquenching von SN (17d) mittels Fenton	62
3.4.4.2	Fluoreszenzquenching von SN (17d) mittels XO/HX	62
3.4.5.1	Fluoreszenzquenching von PMSN (17e) mittels Fenton	63
3.4.5.2	Fluoreszenzquenching von PMSN (17e) mittels XO/HX	64
3.4.6.1	Fluoreszenzquenching von PSSN (17f) mittels Fenton	64
3.4.6.2	Fluoreszenzquenching von PSSN (17f) mittels XO/HX	65
3.4.7.1	Fluoreszenzquenching von PCISN (17g) mittels Fenton	66
3.4.7.2	Fluoreszenzquenching von PCISN (17g) mittels XO/HX	66
3.4.8.1	Fluoreszenzquenching von PDMASN (17h) mittels Fenton	67
3.4.8.2	Fluoreszenzquenching von PDMASN (17h) mittels XO/HX	69
3.4.8.3	Fluoreszenzspektrum von PDMASA (16h)	70
3.5	Zytotoxizitätstests	71
3.5.1	SRB-Tests von PNOMSN (17a)	71
3.5.1.1	Ergebnisse des SRB-Tests mit MCF7-Zellen	72
3.5.1.2	Ergebnisse des SRB-Tests mit HeLa-Zellen	73
3.5.1.3	Ergebnisse des SRB-Tests mit <i>wt</i> -Mef	74
3.6	<i>In vitro</i> Untersuchungen von <i>p</i> -Nitro- <i>o</i> -methoxystilbennitron (17a) am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop	75
3.6.1	Tests auf Eigenfluoreszenz	76
3.6.2	Subzelluläre Akkumulation von PNOMSN (17a)	77

3.6.2.1	Akkumulationsvergleich mit Kompartiment-spezifischen Farbstoffen in MCF7-Zellen	78
3.6.2.2	Akkumulationsvergleich mit Kompartiment-spezifischen Farbstoffen in HeLa-Zellen	79
3.6.2.3	Akkumulationsvergleich mit Kompartiment-spezifischen Farbstoffen in <i>wt</i> -Mef	80
3.6.2.4	Diskussion der zellulären Ansammlung von PNOMSN 17a	81
3.6.3	Nachweis von zellulären ROS mit PNOMSN 17a	81
3.6.3.1	MCF7-Zellen	81
3.6.3.1.1	Fluoreszenzabnahme durch Blanking / Bleaching	81
3.6.3.1.2	Fluoreszenzquenching nach Zugabe von Rotenon (20)	84
3.6.3.1.3	Fluoreszenzquenching nach Zugabe von Antimycin A (21)	86
3.6.3.1.4	Fluoreszenzquenching nach Zugabe von Rotenon (20) und Antimycin A (21)	88
3.6.3.2	HeLa-Zellen	90
3.6.3.2.1	Fluoreszenzabnahme durch Blanking / Bleaching	90
3.6.3.2.2	Fluoreszenzquenching nach Zugabe von Rotenon (20)	92
3.6.3.2.3	Fluoreszenzquenching nach Zugabe von Antimycin A (21)	94
3.6.3.2.4	Fluoreszenzquenching nach Zugabe von Rotenon (20) und Antimycin A (21)	96
3.6.3.3	<i>wt</i> -Mef	98
3.6.3.3.1	Fluoreszenzabnahme durch Blanking / Bleaching	98
3.6.3.3.2	Fluoreszenzquenching nach Zugabe von Rotenon (20)	100
3.6.3.3.3	Fluoreszenzquenching nach Zugabe von Antimycin A (21)	102
3.6.3.3.4	Fluoreszenzquenching nach Zugabe von Rotenon (20) und Antimycin A (21)	104
3.6.3.3.5	Diskussion der Ergebnisse des <i>in vitro</i> -Fluoreszenzquenchings von PNOMSN (17a)	105
3.7	<i>Ex vitro</i> -Nachweis extrahierter Spin-Addukte	106
3.7.1	Extrahierbare Nitroxylradikale in Kunststoffverbrauchsmaterialien	107
3.7.2	<i>Ex vitro</i> EPR-Messungen <i>in vitro</i> gebildeter Nitroxylradikale	111
3.8	Synthese eines Xanthennitronderivats	113
3.8.1	Synthese von 3',6'-Dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-4'-carbaldehyd (Fluoreszeinaldehyd; 25)	113

3.8.2	Synthese von (<i>Z</i>)- <i>N</i> -((3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-4'-yl)methylen)-2-methylpropan-2-aminoxid (Fluoreszeinnitron; 26)	114
3.9	ESR-spektroskopische Untersuchungen von FN (26)	115
3.9.1	ESR-spektroskopische Untersuchungen von FN (26) mittels Fenton-Reagenz	115
3.9.2	ESR-spektroskopische Untersuchungen von FN (26) mit Hypoxanthin / Xanthinoxidase	116
3.9.3	Untersuchung der optischen Eigenschaften von FN (26) und der Versuch des Fluoreszenzquenchings mittels Hypoxanthin / Xanthinoxidase	119
3.10	Synthese eines cyclischen und fluoreszierenden Nitrons	121
3.10.1	Darstellung von 2-Ethoxycarbonyl-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid (EMPO; 2)	121
3.10.1.1	Synthese von 2-Methyl-2-nitro-5-oxovaleriansäureethylester (28)	121
3.10.1.2	Synthese von EMPO (2)	122
3.10.2	Synthese von <i>N</i> ¹ -(7-Nitrobenzo[<i>c</i>][1,2,5]oxadiazol-4-yl)ethan-1,2-diamin (NBD-ethandiamin; 29)	123
3.10.3	Synthese von 2-Methyl-2-((2-((7-nitrobenzo[<i>c</i>][1,2,5]oxadiazol-4-yl)-amino)ethyl)carbamoyl)-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid (NBD-AECMPO; 30)	124
3.10.4	Synthese von 2-((2-Aminoethyl)carbamoyl)-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid (AECMPO; 31)	125
3.10.5	Synthese von 2-((2-(4-(Dimethylamino)naphthalen-1-sulfonamido)ethyl)carbamoyl)-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid (Dansyl-AECMPO; 32)	125
3.10.6	Diskussion der Ergebnisse zur Synthese eines cyclischen und fluoreszierenden Nitrons	126
4	Zusammenfassung und Ausblick	127
4.1	Zusammenfassung	127
4.2	Ausblick	131
5	Experimenteller Teil	133
5.1	Geräte und Arbeitstechniken	133
5.1.1	Verwendete Messgeräte	133
5.1.2	Chromatographische Methoden	134
5.1.3	Arbeitstechniken Chemikalien und Lösungsmittel	135

5.1.4	Software	136
5.2	Synthese des <i>N</i> - <i>tert</i> -Butyl- <i>p</i> -nitro- <i>o</i> -methoxystilben-nitrons (17a) und davon abgeleiteter auxochrom-substituierter Derivate (17b-h)	137
5.2.1	Synthese von 2-(4-Bromphenyl)-[1,3]-dioxolan (12)	137
5.2.2	Synthese von (<i>E</i>)-(4-(1,3-dioxolan-2-yl)styryl)-trimethylsilan (13)	137
5.2.3	Versuche zur Synthese des <i>N</i> - <i>tert</i> -butyl- <i>p</i> -nitrostilbennitrons (17c)	138
5.2.3.1	Synthese des <i>p</i> -Nitrostilbenaldehyds (16c)	138
5.2.3.1	Synthese des <i>N</i> - <i>tert</i> -Butyl- <i>p</i> -nitrostilbennitrons (17c)	139
5.2.4	Synthese von substituierten Aryldiazoniumtetrafluoroboraten (15)	140
5.2.4.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift	140
5.2.4.2	Synthese von 2-Methoxy-4-nitrobenzoldiazoniumtetrafluoroborat (15a)	141
5.2.4.3	Synthese von 3-Methoxy-6-nitrobenzoldiazoniumtetrafluoroborat (15b)	141
5.2.4.4	4-Nitrobenzoldiazoniumtetrafluoroborat (15c)	141
5.2.4.5	Synthese von Benzoldiazoniumtetrafluoroborat (15d)	141
5.2.4.6	Synthese von 4-Methoxybenzoldiazoniumtetrafluoroborat (15e)	141
5.2.4.7	Synthese von 4-Sulfonsäurebenzoldiazoniumtetrafluoroborat (15f) ..	142
5.2.4.8	4-Chlorbenzoldiazoniumtetrafluoroborat (15g)	142
5.2.4.9	Synthese von 4-Dimethylaminobenzoldiazoniumtetrafluoroborat (15h)	142
5.2.4.10	Synthese von 2-Hydroxy-4-nitrobenzoldiazoniumtetrafluoroborat (15i)	142
5.2.5	Versuche zur Synthese auxochrom-substituierter Stilbenaldehyde (16)	143
5.2.5.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift der optimierten milden Heck-analogen Reaktion zur Synthese formylierter <i>trans</i> -stilbene (16a-h)	143
5.2.5.2	Synthese von (<i>E</i>)-4-(2-Methoxy-4-nitrostyryl)benzaldehyd (16a) ..	143
5.2.5.3	Synthese von (<i>E</i>)-4-(3-Methoxy-2-nitrostyryl)benzaldehyd (16b) ..	144
5.2.5.4	Synthese von (<i>E</i>)-4-(4-Nitrostyryl)benzaldehyd (16c)	144
5.2.5.5	Synthese von (<i>E</i>)-4-Styrylbenzaldehyd (16d)	145
5.2.5.6	Synthese von (<i>E</i>)-4-(4-Methoxystyryl)benzaldehyd (16e)	145
5.2.5.7	Synthese von (<i>E</i>)-4-(4-Sulfostyryl)benzaldehyd (16f)	146
5.2.5.8	Synthese von (<i>E</i>)-4-(4-Chlorostyryl)benzaldehyd (16g)	147
5.2.5.9	Synthese von (<i>E</i>)-4-(4-Dimethylaminostyryl)benzaldehyd (16h)	147

5.2.6	Versuche zur Synthese auxochromer Stilbennitronderivate (17)	148
5.2.6.1	Allgemeine Arbeitsvorschrift	148
5.2.6.2	Synthese von (<i>Z</i>)- <i>N</i> -(4-((<i>E</i>)-2-Methoxy-4-nitrostyryl)benzyliden)-2-methyl-propan-2-aminoxid (17a)	149
5.2.6.3	Synthese von (<i>Z</i>)- <i>N</i> -(4-((<i>E</i>)-3-Methoxy-2-nitrostyryl)benzyliden)-2-methyl-propan-2-aminoxid (17b)	149
5.2.6.4	Synthese von (<i>Z</i>)-2-Methyl- <i>N</i> -(4-((<i>E</i>)-4nitrostyryl)benzylidene)-propan-2-aminoxid (17c)	150
5.2.6.5	Synthese von (<i>Z</i>)-2-Methyl- <i>N</i> -(4-((<i>E</i>)-styryl)benzyliden)propan-2-aminoxid (17d)	151
5.2.6.6	Synthese von (<i>Z</i>)- <i>N</i> -(4-((<i>E</i>)-4-Methoxystyryl)benzyliden)-2-methylpropan-2-aminoxid (17e)	151
5.2.6.7	Synthese von (<i>Z</i>)-2-Methyl- <i>N</i> -(4-((<i>E</i>)-4-sulfostyryl)benzyliden)-propan-2-aminoxid (17f)	152
5.2.6.8	Synthese von (<i>Z</i>)- <i>N</i> -(4-((<i>E</i>)-4-chlorostyryl)benzylidene)-2-methylpropan-2-aminoxid (17g)	153
5.2.6.9	Synthese von (<i>Z</i>)- <i>N</i> -(4-((<i>E</i>)-4-(Dimethylamino)styryl)benzyliden)-2-methyl-propan-2-aminoxid (17h)	154
5.3	Synthese eines Xanthennitronderivats	155
5.3.1	Synthese von 3',6'-Dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-4'-carbaldehyd (Fluoreszeinaldehyd; 25)	155
5.3.2	Synthese von (<i>Z</i>)- <i>N</i> -((3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-4'-yl)methylen)-2-methylpropan-2-aminoxid (Fluoreszeinnitron; 26)	156
5.4	Synthese eines cyclischen und fluoreszierenden Nitrons	157
5.4.1	Synthese von 2-Methyl-2-nitro-5-oxovaleriansäureethylester (28)	157
5.4.2	Synthese von EMPO (2)	157
5.4.3	Synthese von <i>N</i> ¹ -(7-Nitrobenzo[<i>c</i>][1,2,5]oxadiazol-4-yl)ethan-1,2-diamin ((NBD-ethandiamin (29))	158
5.4.4	Synthese von 2-Methyl-2-((2-((7-nitrobenzo[<i>c</i>][1,2,5]oxadiazol-4-yl)-amino)ethyl)carbamoyl)-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid ((NBD-AECMPO; (30))	159
5.4.5	Synthese von 2-((2-Aminoethyl)carbamoyl)-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid (AECMPO; 31)	159
5.4.6	Synthese von 2-((2-(4-(Dimethylamino)naphthalen-1-sulfonamido)ethyl)carbamoyl)-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid (Dansyl-AECMPO; (32))	160

5.5	EPR-Spektroskopie	161
5.5.1	Verwendete Lösungen	161
5.5.2	Probenvorbereitung mit Fenton-Reagenz	161
5.5.3	Probenvorbereitung mit XO / HX- System	162
5.5.4	Probenvorbereitung nach <i>in vitro-spin trapping</i>	162
5.5.5	Probenvorbereitung zur Detektion von Nitroxiden in Kunststoffverbrauchs- materialien	163
5.5.6	EPR-Parameter	163
5.6	Untersuchungen der optischen Eigenschaften	164
5.6.1	Benötigte Lösungen	164
5.6.2	UV / Vis- Spektroskopie	164
5.6.3	Fluoreszenzspektroskopie	164
5.6.4	Fluoreszenz- <i>Quenching</i> -Experimente	165
5.7	Arbeiten mit Zellen	166
5.7.1	Zellkultur	166
5.7.2	Abernten von Zellen	166
5.7.3	Bestimmung der Zellzahl	166
5.7.4	SRB-Test von PNOMSN (17a)	167
5.8	<i>In vitro</i> Fluoreszenz- <i>Quenching</i> -Experimente am <i>cLSM</i> mit PNOMSN (17a)	168
5.8.1	Vorbereitung der Zellen	168
5.8.2	Verwendete Lösungen	168
5.8.3	Versuchsbeschreibung	169
6	Literaturverzeichnis	172
A	Anhang: Spektren dargestellter Verbindungen	179
A1	2-(4-Bromphenyl)-[1,3]-dioxolan (12)	179
A2	(<i>E</i>)-(4-(1,3-dioxolan-2-yl)styryl)-trimethylsilan (13)	181
A3	2-Methoxy-4-nitrobenzoldiazoniumtetrafluoroborat (15a)	183
A4	3-Methoxy-6-nitrobenzoldiazoniumtetrafluoroborat (15b)	183
A5	Benzoldiazoniumtetrafluoroborat (15d)	184
A6	4-Methoxybenzoldiazoniumtetrafluoroborat (15e)	184
A7	4-Sulfonsäurebenzoldiazoniumtetrafluoroborat (15f)	185
A8	4-Dimethylaminobenzoldiazoniumtetrafluoroborat (15h)	185

A9	2-Hydroxy-4-nitrobenzoldiazoniumtetrafluoroborat (15i)	186
A10	(<i>E</i>)-4-(2-Methoxy-4-nitrostyryl)benzaldehyd (16a)	187
A11	(<i>E</i>)-4-(3-Methoxy-2-nitrostyryl)benzaldehyd (16b)	189
A12	(<i>E</i>)-4-(4-Nitrostyryl)benzaldehyd (16c)	191
A13	(<i>E</i>)-4-Styrylbenzaldehyd (16d)	193
A14	(<i>E</i>)-4-(4-Methoxystyryl)benzaldehyd (16e)	195
A15	(<i>E</i>)-4-(4-Sulfostyryl)benzaldehyd (16f)	197
A16	(<i>E</i>)-4-(4-Chlorostyryl)benzaldehyd (16g)	199
A17	(<i>E</i>)-4-(4-Dimethylaminostyryl)benzaldehyd (16h)	201
A18	(<i>Z</i>)- <i>N</i> -(4-((<i>E</i>)-2-Methoxy-4-nitrostyryl)benzyliden)-2-methyl-propan-2-aminoxid (17a)	203
A19	(<i>Z</i>)- <i>N</i> -(4-((<i>E</i>)-3-Methoxy-2-nitrostyryl)benzyliden)-2-methyl-propan-2-aminoxid (17b)	205
A20	(<i>Z</i>)-2-Methyl- <i>N</i> -(4-((<i>E</i>)-4-nitrostyryl)benzylidene)propan-2-amin-oxid (17c)	207
A21	(<i>Z</i>)-2-Methyl- <i>N</i> -(4-((<i>E</i>)-styryl)benzyliden)propan-2-aminoxid (17d)	209
A22	(<i>Z</i>)- <i>N</i> -(4-((<i>E</i>)-4-Methoxystyryl)benzyliden)-2-methylpropan-2-aminoxid (17e)	211
A23	(<i>Z</i>)-2-Methyl- <i>N</i> -(4-((<i>E</i>)-4-sulfostyryl)benzyliden)propan-2-aminoxid (17f)	213
A24	(<i>Z</i>)- <i>N</i> -(4-((<i>E</i>)-4-chlorostyryl)benzylidene)-2-methylpropan-2-amin-oxid (17g)	215
A25	(<i>Z</i>)- <i>N</i> -(4-((<i>E</i>)-4-(Dimethylamino)styryl)benzyliden)-2-methylpropan-2-aminoxid (17h)	217
A26	3',6'-Dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-4'-carb- aldehyd (Fluoreszeinaldehyd; (25))	219
A27	(<i>Z</i>)- <i>N</i> -((3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xan-then]-4'- yl)-methylen)-2-methylpropan-2-aminoxid (Fluoreszeinnitron; (26))	221
A28	2-Methyl-2-nitro-5-oxovaleriansäureethylester (28)	223
A29	EMPO (2)	225
A30	<i>N</i> ¹ -(7-Nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-yl)ethan-1,2-diamin ((NBD- ethandiamin (29))	227
A31	2-Methyl-2-((2-((7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-yl)-amino)-ethyl)- carbamoyl)-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid ((NBD-AECMPO; (30))	229
A32	2-((2-Aminoethyl)carbamoyl)-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid (AECMPO; 31)	230

A33	2-((2-(4-(Dimethylamino)naphthalen-1-sulfonamido)ethyl)carb-amoyl)-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid (Dansyl-AECMPO; (32))	231
B	Danksagung	232
C	Eidesstattliche Erklärung	234
D	Lebenslauf	235
E	Publikationen	236

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Der sauerstoffgekoppelte Kohlenstoffkreislauf.	1
Abbildung 2:	Schaubild zur Bildung, Wirkung und Entgiftung ausgewählter ROS. ...	4
Abbildung 3:	Prinzip des <i>spin trappings</i>	5
Abbildung 4:	Mesomere Grenzstrukturen eines Nitrons.	6
Abbildung 5:	Beispiele häufig verwendeter Spin Traps.	6
Abbildung 6:	Beispielreaktion einer aliphatischen, fluoreszierenden Spin-Trap (Fluorophor- <i>tert</i> -butyl-nitron) mit Hydroxyl-Radikal zum Spin-Addukt (Nitroxid-Radikal).	8
Abbildung 7:	Strukturformeln von DAPI 4 und Acridinorange 5	9
Abbildung 8:	Strukturformeln von Fluoreszein 6 und Rhodamin 7	9
Abbildung 9:	Strukturformeln von NBD-Chlorid 8 , Dansylchlorid 9 und Sangers Reagenz 10	9
Abbildung 10:	Struktur des 4-(<i>p</i> -Hydroxybenzyliden)-imidazolidin-5-on 11 in GFP. 10	
Abbildung 11:	Jablonski-Termschema: Verändert nach Haken und Wolf (2006). Singulettzustand, S_n (mit $n \geq 0$), und Triplettzustand, T_n (mit $n \geq 1$)..	11
Abbildung 12:	Stokes-Verschiebung anhand eines idealisierten Absorptions- und Emissionsspektrum mit spiegelbildlichem Bandenmuster.	13
Abbildung 13:	Zeeman-Aufspaltung – Die Energetische Entartung der Spinzustände wird in einem homogenen Magnetfeld B_0 aufgehoben.	16
Abbildung 14:	Hyperfeinaufspaltung – drei EPR-Signale durch die Wechselwirkung des Elektrons mit einem Kernspin von $I = 1$	18
Abbildung 15:	Strukturformel des <i>N-tert</i> -Butyl- <i>p</i> -nitrostilbennitrons 17c	19
Abbildung 16:	Akkumulation des <i>N-tert</i> -Butyl- <i>p</i> -nitrostilbennitrons 17 entlang des negativen Potentialgradienten in Mitochondrien. A) $U = 30 - 60$ mV B) $U = 180$ mV	20
Abbildung 17:	Syntheschema für ein auxochrom-substituiertes <i>N-tert</i> -Butyl- <i>p</i> -nitrostilbennitron 17 nach Hauck.	22
Abbildung 18:	Retrosynthese auxochrom-substituierter Stilbennitronderivate 17	23
Abbildung 19:	Synthese von 2-(4-Bromphenyl)-[1,3]-dioxolan 12	24
Abbildung 20:	Synthese von (<i>E</i>)-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)styryl)trimethylsilan 13	25
Abbildung 21:	Synthese des <i>p</i> -Nitrostilbenaldehyds 16c	26

Abbildung 22:	Postulierter Katalysezyklus einer milden Heck – (Matsuda) Reaktion mit Aryldiazoniumtetrafluorboraten 15 und dem silylierten Styren 13	27
Abbildung 23:	Synthese des <i>N-tert</i> -Butyl- <i>p</i> -nitrostilbennitrons 17c	27
Abbildung 24:	Synthese von Benzoldiazoniumtetrafluorboraten 15	28
Abbildung 25:	Strukturen und Ausbeuten dargestellter Phenylidiazoniumsalze 15	29
Abbildung 26:	Versuch zur Synthese eines Methoxy-substituierten Nitrostilbenaldehyds 16a/b	30
Abbildung 27:	Screening einer milden Heck-analogen Reaktion mit Verbindung 15a	31
Abbildung 28:	Untersuchung des Anwendungsbereichs der optimierten, milden Heck-Reaktion.	32
Abbildung 29:	Versuch zur Synthese des <i>N-tert</i> -Butyl- <i>o</i> -methoxy- <i>p</i> -nitrostilbennitrons 17a	34
Abbildung 30:	Weiterentwickelte Synthese zu Darstellung von substituierten Stilbennitronen 17	35
Abbildung 31:	Fenton-Reaktion zur Bildung von Hydroxylradikalen.	36
Abbildung 32:	Xanthinoxidase-katalysierte Oxidation von Hypoxanthin über Xanthin zur Harnsäure unter Bildung von Superoxidanionradikalen. .	36
Abbildung 33:	Strukturen und EPR-Spektren der Hydroxid- und Hydroperoxid-Addukte von PNOMSN 17a	38
Abbildung 34:	Strukturen und EPR-Spektren der Hydroxid- und Hydroperoxid-Addukte von ONMMSN 17b	39
Abbildung 35:	Strukturen und EPR-Spektren der Hydroxid- und Hydroperoxid-Addukte von PNSN 17c	40
Abbildung 36:	Strukturen und EPR-Spektren der Hydroxid- und Hydroperoxid-Addukte von SN 17d	41
Abbildung 37:	Strukturen und EPR-Spektren der Hydroxid- und Hydroperoxid-Addukte von PMSN 17e	42
Abbildung 38:	Strukturen und EPR-Spektren der Hydroxid- und Hydroperoxid-Addukte von PSSN 17f	43
Abbildung 39:	Strukturen und EPR-Spektren der Hydroxid- und Hydroperoxid-Addukte von PCISN 17g	44
Abbildung 40:	Strukturen und EPR-Spektren der Hydroxid- und Hydroperoxid-Addukte von PDMASN 17h	45
Abbildung 41:	Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von PNOMSN 17a in Ethylacetat.	47

Abbildung 42:	Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von ONMMSN 17b in Ethylacetat.	48
Abbildung 43:	Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von PNSN 17c in Ethylacetat.	48
Abbildung 44:	Vicinal olefinische ³ J-Kopplung der <i>cis</i> / <i>trans</i> - Isomere von ONMMSN 17b	50
Abbildung 45:	Vergleich des NOE von <i>o,o'</i> -Protonen bei <i>cis</i> - und <i>trans</i> -ONMMSN ((<i>Z</i>)- und (<i>E</i>)- 16b).	50
Abbildung 46:	2D-NOESY-Spektrum von ONMMSN 17b	51
Abbildung 47:	Aromatischer Bereich des 2D-NOESY-Spektrums von ONMMSN 17b mit verstärkter Kopplungsauflösung.	52
Abbildung 48:	Kugel-Stab-Modell von ONMMSN 17b nach Strukturoptimierung via Gaussian.	53
Abbildung 49:	Quantentheoretisch, optimierte Strukturen von PNOMSN 17a , ONMMSN 17b und dem theoretisch, planaren ONMMSN <i>t</i> - 17b ; ergänzt durch die jeweiligen Energien (Wellenlänge in nm) und Intensitäten (a.u.) relevanter, elektronischer Übergänge.	54
Abbildung 50:	Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von SN 17d in Ethylacetat.	54
Abbildung 51:	Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von PMSN 17e in Ethylacetat.	55
Abbildung 52:	Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von PSSN 17f in Ethylacetat.	55
Abbildung 53:	Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von PCISN 17g in Ethylacetat.	56
Abbildung 54:	Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von PDMASN 17h in Ethylacetat.	57
Abbildung 55:	Normierte Fluoreszenzabnahme von PNOMSN 17a durch Fenton in Ethylacetat.	58
Abbildung 56:	Normierte Fluoreszenzabnahme von PNOMSN 17a durch ein XO-System in Ethylacetat.	59
Abbildung 57:	Normierte Fluoreszenzabnahme von ONMMSN 17b durch Fenton in Ethylacetat.	59
Abbildung 58:	Normierte Fluoreszenzabnahme von ONMMSN 17b durch ein XO-System in Ethylacetat.	60
Abbildung 59:	Normierte Fluoreszenzabnahme von PNSN 17c durch Fenton in Ethylacetat.	61

Abbildung 60:	Normierte Fluoreszenzabnahme von PNSN 17c durch ein XO-System in Ethylacetat.	61
Abbildung 61:	Normierte Fluoreszenzabnahme von SN 17d durch Fenton in Ethylacetat.	62
Abbildung 62:	Normierte Fluoreszenzabnahme von SN 17d durch ein XO-System in Ethylacetat.	62
Abbildung 63:	Normierte Fluoreszenzabnahme von PMSN 17e durch Fenton in Ethylacetat.	63
Abbildung 64:	Normierte Fluoreszenzabnahme von PMSN 17e durch ein XO-System in Ethylacetat.	64
Abbildung 65:	Normierte Fluoreszenzabnahme von PSSN 17f durch Fenton in Ethylacetat.	64
Abbildung 66:	Normierte Fluoreszenzabnahme von PSSN 17f durch ein XO-System in Ethylacetat.	65
Abbildung 67:	Normierte Fluoreszenzabnahme von PCISN 17g durch Fenton in Ethylacetat.	66
Abbildung 68:	Normierte Fluoreszenzabnahme von PCISN 17g durch ein XO-System in Ethylacetat.	66
Abbildung 69:	Normierte Fluoreszenzabnahme von PDMASN 17h durch Fenton in Ethylacetat.	67
Abbildung 70:	Wiederholter Versuch zur Fluoreszenzabnahme von PDMASN 17h durch Fenton in Ethylacetat.	68
Abbildung 71:	Normierte Fluoreszenzabnahme von PDMASN 17h (doppelter Konzentration) via Fenton in Ethylacetat.	68
Abbildung 72:	Normierte Fluoreszenzabnahme von PDMASN 17h durch ein XO-System in Ethylacetat.	69
Abbildung 73:	Normiertes Fluoreszenzspektrum und Strukturformel von <i>p</i> -Dimethyl-aminostilbenaldehyd 16h in Ethylacetat.	70
Abbildung 74:	Strukturformel von Sulforhodamin B (SRB) 19	71
Abbildung 75:	Zellwachstumskurve von MCF7-Zellen mit PNOMSN 17a	72
Abbildung 76:	Dosis/Wirkungskurve von PNOMSN 17a auf MCF7-Zellen.	72
Abbildung 77:	Zellwachstumskurve von HeLa-Zellen mit PNOMSN 17a	73
Abbildung 78:	Dosis/Wirkungskurve von PNOMSN 17a auf HeLa-Zellen.	73
Abbildung 79:	Zellwachstumskurve von <i>wt</i> -Mef mit PNOMSN 17a	74
Abbildung 80:	Dosis/Wirkungskurve von PNOMSN 17a auf <i>wt</i> -Mef-Zellen.	74
Abbildung 81:	Strukturen der Atmungsketteninhibitoren Rotenon 20 und Antimycin A 21	75

Abbildung 82:	Strukturen von TMRE 22 und AO 23	76
Abbildung 83:	Eigenfluoreszenz von MCF7-Zellen.	76
Abbildung 84:	Eigenfluoreszenz von HeLa-Zellen.	76
Abbildung 85:	Eigenfluoreszenz von <i>wt</i> -Mef-Zellen.	77
Abbildung 86:	Subzellulärer Akkumulationsvergleich von PNOMSN 17a zu TMRE 22 in MCF7-Zellen.	78
Abbildung 87:	Subzellulärer Akkumulationsvergleich von PNOMSN 17a zu Acridinorange 23 in MCF7-Zellen.	78
Abbildung 88:	Subzellulärer Akkumulationsvergleich von PNOMSN 17a zu TMRE 22 in HeLa-Zellen.	79
Abbildung 89:	Subzellulärer Akkumulationsvergleich von PNOMSN 17a zu Acridinorange 23 in HeLa-Zellen.	79
Abbildung 90:	Subzellulärer Akkumulationsvergleich von PNOMSN 17a zu TMRE 22 in <i>wt</i> -Mef-Zellen.	80
Abbildung 91:	Subzellulärer Akkumulationsvergleich von PNOMSN 17a zu Acridinorange 23 in <i>wt</i> -Mef-Zellen.	80
Abbildung 92:	Blanking / Bleaching von PNOMSN 17a auf MCF7-Zellen.....	82
Abbildung 93:	Zeitlicher Verlauf des Blankings / Bleachings von PNOMSN 17a auf MCF7-Zellen.	82
Abbildung 94:	Fluoreszenzquenching von PNOMSN 17a auf MCF7-Zellen nach Zugabe von Rotenon 20	84
Abbildung 95:	Zeitlicher Verlauf des Fluoreszenzquenchings von PNOMSN 17a auf MCF7-Zellen nach Zugabe von Rotenon 20	84
Abbildung 96:	Fluoreszenzquenching von PNOMSN 17a auf MCF7-Zellen nach Zugabe von Antimycin A 21	86
Abbildung 97:	Zeitlicher Verlauf des Fluoreszenzquenchings von PNOMSN 17a auf MCF7-Zellen nach Zugabe von Antimycin A 21	86
Abbildung 98:	Fluoreszenzquenching von PNOMSN 17a auf MCF7-Zellen nach Zugabe von Rotenon 20 und Antimycin A 21	88
Abbildung 99:	Zeitlicher Verlauf des Fluoreszenzquenchings von PNOMSN 17a auf MCF7-Zellen nach Zugabe von Rotenon 20 und Antimycin A 21	88
Abbildung 100:	Blanking / Bleaching von PNOMSN 17a auf HeLa-Zellen.	90
Abbildung 101:	Zeitlicher Verlauf des Blankings / Bleachings von PNOMSN 17a auf HeLa-Zellen.	90
Abbildung 102:	Fluoreszenzquenching von PNOMSN 17a auf HeLa-Zellen nach Zugabe von Rotenon 20	92

Abbildung 103:	Zeitlicher Verlauf des Fluoreszenzquenchings von PNOMSN 17a auf HeLa-Zellen nach Zugabe von Rotenon 20	92
Abbildung 104:	Fluoreszenzquenching von PNOMSN 17a auf HeLa-Zellen nach Zugabe von Antimycin A 21	94
Abbildung 105:	Zeitlicher Verlauf des Fluoreszenzquenchings von PNOMSN 17a auf HeLa-Zellen nach Zugabe von Antimycin A 21	94
Abbildung 106:	Fluoreszenzquenching von PNOMSN 17a auf HeLa-Zellen nach Zugabe von Rotenon 20 und Antimycin A 21	96
Abbildung 107:	Zeitlicher Verlauf des Fluoreszenzquenchings von PNOMSN 17a auf HeLa-Zellen nach Zugabe von Rotenon 20 und Antimycin A 21	96
Abbildung 108:	Blanking / Bleaching von PNOMSN 17a auf <i>wt</i> -Mef-Zellen.	98
Abbildung 109:	Zeitlicher Verlauf des Blankings / Bleachings von PNOMSN 17a auf <i>wt</i> -Mef.	98
Abbildung 110:	Fluoreszenzquenching von PNOMSN 17a auf <i>wt</i> -Mef nach Zugabe von Rotenon 20	100
Abbildung 111:	Zeitlicher Verlauf des Fluoreszenzquenching von PNOMSN 17a auf <i>wt</i> -Mef nach Zugabe von Rotenon 20	100
Abbildung 112:	Fluoreszenzquenching von PNOMSN 17a auf <i>wt</i> -Mef nach Zugabe von Antimycin A 21	102
Abbildung 113:	Zeitlicher Verlauf des Fluoreszenzquenchings von PNOMSN 17a auf <i>wt</i> -Mef nach Zugabe von Antimycin A 21	102
Abbildung 114:	Fluoreszenzquenching von PNOMSN 17a auf <i>wt</i> -Mef nach Zugabe von Rotenon 20 und Antimycin A 21	104
Abbildung 115:	Zeitlicher Verlauf des Fluoreszenzquenchings von PNOMSN 17a auf <i>wt</i> -Mef nach Zugabe von Rotenon 20 und Antimycin A 21	104
Abbildung 116:	EPR-Spektrum von unbekanntem Nitroxylradikalen in Ethylacetat nach MCF7-Zellextraktion.	107
Abbildung 117:	EPR-Spektrum von unbekanntem Nitroxylradikalen in Ethylacetat nach HeLa-Zellextraktion.	107
Abbildung 118:	EPR-Spektrum von unbekanntem Nitroxylradikalen in Ethylacetat nach <i>wt</i> -Mef-Zellextraktion.	108
Abbildung 119:	(Photo-)oxidation eines TEMP- (HALS) - zum TEMPO-Derivat mit anschließender Radikaladdition.	109
Abbildung 120:	Beispiel für ein EPR-Spektrum ohne extrahierte Nitroxylradikale. ...	109
Abbildung 121:	Auswahl von EPR-Spektren extrahierter Nitroxylradikale aus konischen Zentrifugenröhrchen unterschiedlicher Größe; verschiedener Hersteller; variiertes Inkubationszeiten der Lösungsmittel; mit oder ohne Lichtexposition.	110

Abbildung 122:	Struktur eines Spin-Addukts von PNOMSN 17a	111
Abbildung 123:	EPR-Spektrum eines Spin-Addukts von PNOMSN 17a in Ethylacetat nach MCF7-Zellextraktion.	111
Abbildung 124:	EPR-Spektrum eines Spin-Addukts von PNOMSN 17a in Ethylacetat nach HeLa-Zellextraktion.	112
Abbildung 125:	EPR-Spektrum eines Spin-Addukts von PNOMSN 17a in Ethylacetat nach <i>wt</i> -Mef-Extraktion.	112
Abbildung 126:	Synthese von Fluoreszeinaldehyd (FA) 25	113
Abbildung 127:	Synthese von Fluoreszeinnitron (FN) 26	114
Abbildung 128:	Struktur und EPR-Spektrum des Hydroxyl-Addukts von FN 26	115
Abbildung 129:	Struktur und EPR-Spektrum einer ca. 20 mM Lösung des Hydroperoxyl-Addukts von FN 26	116
Abbildung 130:	EPR-Spektrum der verdünnten Probe (ca. 10 mM) des Hydroperoxyl-Addukts von FN 26	117
Abbildung 131:	EPR-Spektrum der verdünnten Probe (ca. 2 mM) des Hydroperoxyl-Addukts von FN 26	117
Abbildung 132:	EPR-Spektrum verdünnten Probe (ca. 200 μ M) des Hydroperoxyl-Addukts von FN 26	118
Abbildung 133:	EPR-Spektrum einer 2 mM Probe des Hydroperoxyl-Addukts von FN 26	118
Abbildung 134:	Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von FN 26 in H ₂ O (pH 7) und dessen Fluoreszenzabnahme durch ein XO-System.	120
Abbildung 135:	Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von FN 26 in H ₂ O (pH 9) und dessen Fluoreszenzabnahme durch ein XO-System.	120
Abbildung 136:	Synthese von 2-Methyl-2-nitro-5-oxovaleriansäureethylester 28	121
Abbildung 137:	Eintopfreaktion zur Synthese von EMPO 2	122
Abbildung 138:	EPR-Spektren von EMPO 2 und des entsprechenden β -OH-Addukts (via Fenton-Reagenz).	123
Abbildung 139:	Synthese von NBD-ethandiamin 29	124
Abbildung 140:	Synthese von NBD-AECMPO 30	124
Abbildung 141:	Synthese von AECMPO 31	125
Abbildung 142:	Synthese von Dansyl-AECMPO 32	126
Abbildung 143:	Strukturformel von 3-(Dimethylamino)-4-nitrophenyldiazonium-tetrafluoroborat 15k	131

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Anilinderivate 14 zur Synthese der Diazoniumsalze 15	28
Tabelle 2:	Ergebnisse des Screenings zur Darstellung von <i>N-tert</i> -Butyl- <i>p</i> -nitro- <i>o</i> -methoxystilbenaldehyd 16a	31
Tabelle 3:	Anwendungsbereich der optimierten Variante der Heck-Reaktion.	33
Tabelle 4:	Abkürzungen und Ausbeuten synthetisierter Stilbennitronderivate 17	35
Tabelle 5:	Vergleich der Hyperfeinkopplungskonstanten von 17a-h mit PBN 3	46
Tabelle 6:	Absorptions- und Emissionsmaxima der Stilbennitrone 17 in Ethylacetat. ...	57
Tabelle 7:	Halbwertszeiten und prozentuale Fluoreszenzabnahme von PNOMSN 17a auf den untersuchten Zelllinien mit und ohne Zugabe an Atmungsketteninhibitoren.	105
Tabelle 8:	Verwendete Software.	136
Tabelle 9:	Einwaagen synthetisierter spin traps zur EPR-Spektroskopie.	161
Tabelle 10:	Verwendete Parameter für die EPR-spektroskopischen Messungen.	163
Tabelle 11:	Einwaagen synthetisierter Nitrone für optische Messungen.	164
Tabelle 12:	Pipettierschema zum Fluoreszenz- <i>Quenching</i> mittels Fenton-Reagenz.	165
Tabelle 13:	Pipettierschema zum SRB-Test.	167
Tabelle 14:	Einstellungen für die Zeitserie bei den Fluoreszenz- <i>Quenching</i> -Experimenten mit PNOMSN 17a	169
Tabelle 15:	Einstellungen für die Bildaufnahme mit TMRE 22 am <i>cLSM</i>	170
Tabelle 16:	Einstellungen für die Bildaufnahme mit AO 23 am <i>cLSM</i>	170
Tabelle 17:	Einstellungen für die Bildaufnahme mit PNOMSN 17a am <i>cLSM</i>	171

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
<i>a</i>	Hyperfeinkopplungskonstante
ad	zu; Endvolumen einer Verdünnung
AECMPO	2-((2-Aminoethyl)carbamoyl)-2-methyl-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -pyrrol-1-oxid
Alox	Aluminiumoxid
AO	Acridinorange
äquiv.	Äquivalente
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>attenuated total reflection</i>
a.u.	<i>atomic units</i>
AscH [•]	Ascorbylradikal
AscH ₂	Ascorbinsäure
B	magnetische Flussdichte
B3LYP	DFT-Methode nach Becke, 3- <i>parameter</i> , Lee-Yang-Parr
br. S.	breites Signal
Bsp.	Beispiel
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CDCl ₃	deutertes Chloroform
<i>cLSM</i>	<i>confocal laser scanning microscope</i>
cw	<i>continuous wave</i>
Cyp P450	Cytochrome P450
Cyt c	Cytochrom C
δ	chemische Verschiebung [ppm]
d	Duplett, Tage
dd	dupliertes Duplett, bidestilliert
dB	Dezibel
DC	Dünnschichtchromatographie

DFT	Dichtefunktionaltheorie
d. h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DMPO	5,5-Dimethyl-1-pyrrolin- <i>N</i> -oxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-d6	6-fach deuteriertes Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
E	Energie
ϵ	Extinktionskoeffizient
e^-	Elektron
ED ₅₀	Effektivdosis von 50 %
EDRF	<i>endothelium-derived relaxing factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoß-Ionisation
EMPO	2-Ethoxycarbonyl-2-methyl-3,4-dihydro-2 <i>H</i> -pyrrol-1-oxid
EPR	<i>electron paramagnetic resonance</i>
ESR	<i>electron spin resonance</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> oder <i>et aliae</i> ; Bedeutung: und andere
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
ϕ	Diederwinkel
FA	3',6'-Dihydroxy-3-oxo-3 <i>H</i> -spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-4'-carbaldehyd oder Fluoreszeinaldehyd
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FN	(<i>Z</i>)- <i>N</i> -((3',6'-dihydroxy-3-oxo-3 <i>H</i> -spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-4'-yl)methylen)-2-methylpropan-2-aminoxid oder Fluoreszeinnitron
FT	Fourier-Transformation
γ_E	gyromagnetisches Verhältnis eines Elektrons
g_E	Landé- Faktor; 2.00232
g	Gramm
G	Gauss

GC	Gaschromatographie
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GHz	Gigahertz
GPX	Glutathionperoxidasen
GSH	Glutathion
GSR	Glutathionreduktase
GSSG	Glutathiondisulfid
h	Stunde, Planck'sches Wirkungsquantum
H	magnetische Feldstärke
\hbar	reduziertes Planck'sches Wirkungsquantum
HALS	<i>hindered amine light stabilizers</i>
HeLa	menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i>
HRMS	<i>high-resolution mass spectrometry</i>
HX	Hypoxanthin
Hz	Hertz in s^{-1}
I	Kernspin
IC	<i>internal conversion</i>
IR	Infrarot
ISC	<i>intersystem crossing</i>
IVR	<i>intermolecular vibrational relaxation</i>
J	Kopplungskonstante in Hz
Kap.	Kapitel
KAT	Katalase
l	Liter
λ	Wellenlänge
LC ₅₀	mittlere letale Konzentration
LC ₈₀	letale Konzentration von 80 %
Lsg.	Lösung
LUMO	<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>
M	Molar; molare Masse
m	Multiplett, Masse, <i>medium signal</i>
m	<i>meta</i>
+M	positiver mesomerer Effekt

–M	negativer mesomerer Effekt
max.	maximal
μ_B	Bohr'sches Magneton
MCF7	Michigan Cancer Foundation 7, Brustkrebszelllinie
m_e	Ruhemasse eines Elektrons
MeOH	Methanol
μ_E^z	z-Komponente des magnetischen Momentseines Elektrons
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
MHz	Megahertz
min	Minuten
ml	Milliliter
m_l	magnetische Quantenzahl
μl	Mikroliter
mM	Millimolar
μM	Mikromolar
MPLC	<i>medium pressure liquid chromatography</i> ; Flashchromatographie
MS	Massenspektrometrie
ms	Millisekunde
m_s	magnetischer Spin-Quantenzahl
mU	Milliunits
mV	Millivolt
n.a.	<i>not available</i> oder <i>not applicable</i>
NAD ⁺	Nicotinamadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamadenindinukleotidphosphat
NBD	7-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanz)
NOE	<i>nuclear Overhauser effect</i>
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy</i>
ns	Nanosekunde
<i>o</i>	<i>ortho</i>

OD	optische Dichte
ONMMSN	<i>o</i> -Nitro- <i>m</i> -methoxystilbennitron
<i>p</i>	<i>para</i>
Φ_F	Quantenausbeute
PBN	Phenyl- <i>N</i> - <i>tert</i> -butylnitron
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCISN	<i>p</i> -Chlorostilbennitron
PDMASA	<i>p</i> -Dimethylaminostilbenaldehyd
PDMASN	<i>p</i> -Dimethylaminostilbennitron
PE 40/60	Petrolether 40-60 °C
Ph	Phenyl
PMSN	<i>p</i> -Methoxystilbennitron
PNSN	<i>p</i> -Nitrostilbennitron
PNOMSN	<i>p</i> -Nitro- <i>o</i> -Methoxystilbennitron
PSSN	<i>p</i> -Sulfonsäurestilbennitron
PTLC	<i>preparative thin layer chromatography</i>
<i>p</i> -TsOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
ppm	<i>parts per million</i>
q	Quartett
R	allgemeiner Substituent
RI-CC2	<i>resolution-of-the-identity – second-order approximate coupled-cluster</i>
RNOS	<i>reactive nitrogen and oxygen species</i>
RF	Rückfluss
RPMI	Zellkulturmedium (von Roswell Park Memorial Institute)
ROI	<i>region of interest</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, <i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett; Sekunde; Spinquantenzahl; <i>strong signal</i>
S	Singulettzustand
s	Betrag der Spinquantenzahl
S_EAr	elektrophile aromatische Substitution
Sdp.	Siedepunkt
Smp.	Schmelzpunkt
S_NAr	nukleophile aromatische Substitution

SOD	Superoxiddismutase
sog.	sogenannt
SRB	Sulforhodamin B
t	Triplett
T	Triplettzustand
$T_{1/2}$	Halbwertszeit
τ_F	Fluoreszenzlebensdauer
TBAA	Tetrabutylammoniumacetat
TCA	Trichloressigsäure
TDDFT	<i>time-dependent density functional theory</i>
TEA	Triethylamin
TEMP	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxyl
<i>tert</i>	tertiär
TMRE	Tetramethylrhodaminethylester-perchlorat
TMS	Trimethylsilylgruppe
TOF	<i>time-of-flight</i>
TZVP	<i>triple-zeta valence polarized</i> , Ahlrichs Basissatz
u	Units
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
Vis	Visuell
Vit C	Vitamin C
Vit E	Vitamin E
vgl.	vergleiche
w	<i>weak signal</i>
<i>wt</i> -MEF	<i>wild type mouse embryonic fibroblasts</i>
XO	Xanthinoxidase
z	Ladung
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung und Theorie

Vor etwa 3 Milliarden Jahren entwickelte sich auf der Erde der wohl bedeutendste biologische Vorgang – die oxygene Photosynthese. Diese war die Grundlage für die Weiterentwicklung gärender Organismen.

Den Vorläufern der heutigen Cyanobakterien (Blaualgen) war es gelungen, unabhängig von angebotenen Reduktionsmitteln der Ur-Nährmedien (reduzierte Schwefel- und Stickstoffverbindungen), allein mit der Energie des Lichts und Wasser als Elektronendonator, NADP zu reduzieren, dabei chemische Energie in Form von ATP zu gewinnen und somit autotroph energiereiche organische Verbindungen (z.B. Kohlenhydrate) aufzubauen. Zudem wurde vermehrt Sauerstoff als „Abfallprodukt“ in die Atmosphäre entlassen. Beides war die Basis zur Entwicklung heterotropher Aerobier, welche diesen Abfall in sehr ökonomischer Weise nutzten um die Assimilationsprodukte zu metabolisieren (Elstner *et al.*, 1986; Schatz, 2005; Olsen, 2006; Leinisch, 2009).

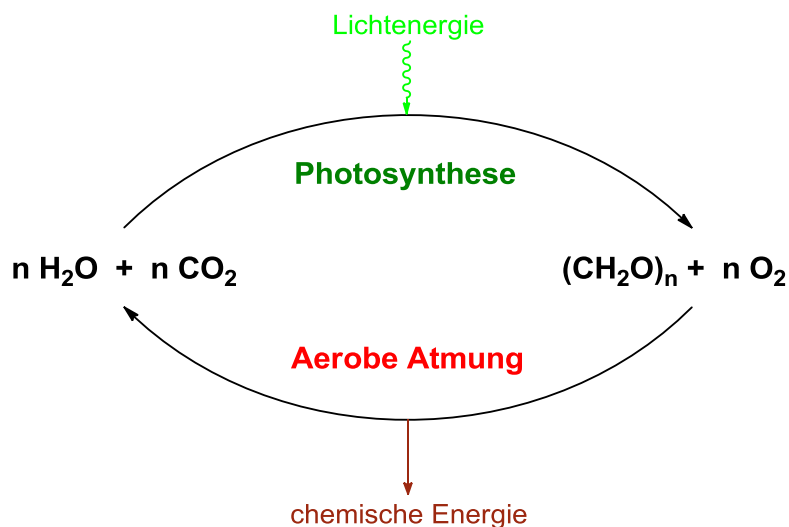


Abbildung 1: Der sauerstoffgekoppelte Kohlenstoffkreislauf.

Eine Milliarde Jahre später hatten sich genügend organische Energiereserven angereichert, sodass sich aerobe Vielzeller entwickelten. In der Zwischenzeit sammelte sich zunehmend molekularer Sauerstoff in der Uratmosphäre an. Aufgrund der stark oxidierenden Atmosphäre zogen sich die zuvor prävalenten gärenden Anaerobier in die wenigen sauerstofffreien Regionen der Erde zurück. Das hohe Redoxpotential von Sauerstoff ermöglichte hingegen den vielzelligen, atmenden Organismen, mittels eines immer komplexer werdenden Verwertungssystems (Atmungskette), sehr effektiv Energie (stark exergone Reaktionen) zu gewinnen. Dies waren die Voraussetzungen für höheres Leben. Sie hatten sich jedoch auch

den Zelltod „erarbeitet“, denn die aerobe Lebensweise ist ein schmaler Grat zwischen der Unumgänglichkeit Sauerstoff zu aktivieren und gleichzeitig der Gefahr hochreaktive Überschussmetabolite – sog. reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu bilden (Elstner, 1986; Kohen & Nyska 2002; Madigan & Martinko, 2009).

1.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Die meisten der *in vivo* vorkommenden ROS sind „freie Radikale“ und haben einen paramagnetischen Charakter. Sie sind sauerstoffhaltige Moleküle mit einem ungepaarten Elektron ($m_s = \pm 1/2$), also Elektronenmangelsysteme, was deren hohe Reaktivität, die damit einhergehende kurze Halbwertszeit (ms - ns) und somit deren pathophysiologisches Potential erklärt. Solche reaktiven Spezies können Hydroxyl-, Peroxyl-, Alkoxy- und Superoxidation- Radikale sein und sind dauerhaft im Organismus vorhanden (Boveris *et al.*, 1977). Nichtradikalische ROS sind u.a. Wasserstoffperoxid, Hypochloridanionen und Singulett-Sauerstoff (Hauck *et al.*, 2012).

Normalerweise werden etwa 2 % des respirierten Sauerstoffs in ROS umgewandelt. Die Bildung und Entgiftung dieser stehen in der Regel in Homöostase zueinander. Überwiegt jedoch die Radikalproduktion, so spricht man von oxidativem Stress (z.B. durch Mangelernährung oder Krankheiten; Wippich, 2003).

1.1.1 Superoxidationradikale

Bei aerob atmenden Vielzellen (bspw. Menschen) wird der größte Teil von ROS während normaler metabolischer Prozesse gebildet. In Nebenreaktionen des mitochondrialen Energiestoffwechsels, können z.B. im Rahmen der Atmungskette durch Fehlübertragungen von Elektronen Superoxidationradikale ($O_2^{\cdot-}$) entstehen. Aber auch gering abgeschirmte, autoxidierbare Zwischenprodukte, wie Semichinone oder Flavine können Elektronen an O_2 verlieren. Darüber hinaus gelten Nebenreaktionen der Xanthinoxidase (XO, Purin Metabolismus), von Cyp P450 und auch die spontane Autoxidation von Hämoglobin, als weitere $O_2^{\cdot-}$ -Produzenten (Cadenas & Davies, 2000; Dröge, 2002; Inoue *et al.*, 2003; Turrens, 2003).

Superoxidationradikale können im Organismus sowohl als starke Base, Nukleophil und starkes Reduktionsmittel (für Chinone und Übergangsmetallionen wie Fe^{3+} und Cu^{2+}), aber auch als Oxidationsmittel (für Ascorbinsäure) reagieren (Hauck, 2007). Kontrovers diskutiert wird dessen stimulierende Wirkung. Im Gehirn z.B. sollen Superoxidationradikale selbst

vasodilatierend wirken, was dort zu einer verbesserten Signalübertragung und Gedächtnisbildung beiträgt. (Kishida & Klann, 2007). Auf der anderen Seite reagieren diese schnell mit dem *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) NO ab, was eine Gefäßrelaxation wiederum erschwert. In der Gesamtheit der literarischen Quellen scheint eine regulatorische Funktion am wahrscheinlichsten zu sein (Wippich, 2003).

Mit einer Halbwertszeit von etwa 50 ms ist das Superoxidanionradikal nicht übermäßig reaktiv. Als primäre, mobile Spezies stellt sie so jedoch den Ausgangspunkt für eine Vielzahl von weiteren ROS dar (Leinisch 2009; Abbildung 2).

Neben der regulatorischen Funktion bei *signaling*- Prozessen, ist ein weiterer Punkt, der die Bilateralität von Superoxidanionradikalen beschreibt, deren gezielte Produktion in Granulozyten um phagozytierte Pathogene, wie Bakterien, abzutöten. Diese Zellen des angeborenen Immunsystems besitzen dazu plasmamembranständige NADPH-Oxidasen. Aus Superoxidanionradikalen werden, über Wasserstoffperoxid als Zwischenprodukt, Hydroxylradikale generiert, die stark zytotoxisch auf endozytierte Mikroorganismen wirken (*respiratory burst*). Außerhalb von Granulozyten kann dies unbeabsichtigt auf dieselbe Weise erfolgen. Zudem kann die Einwirkung von ionisierender Strahlung (UV, Röntgen- und γ -Strahlung) auf Gewebe zu einer Radiolyse von Wasser und somit direkt zur Bildung dieser hochreaktiven Sauerstoffspezies (OH) führen (Abbildung 2; Christen & Jaussi, 2005).

1.1.2 Hydroxylradikale

Hydroxylradikale besitzen eine physiologische Halbwertszeit von ca. 2 ns. Sie können aus jeder C-H-Bindung ein Wasserstoffatom abstrahieren, oxidativ Proteine schädigen (besonders empfindlich sind Methionin-, Histidin- und Tryptophanreste), an ungesättigte oder aromatische Verbindungen addieren und somit Lipide peroxidieren. Bei mehrfach ungesättigten Fettsäuren kann auch eine Radikalkettenreaktion eingeleitet werden. Zudem können sie in der DNA Strangbrüche und Veränderungen einzelner Basen hervorrufen, was zu Fehlpaarungen und Mutationen führt (Hauck, 2007). Die Folgen des beschriebenen Reaktionsverhaltens sind Krankheiten wie Arteriosklerose, Bluthochdruck, Diabetes Typ II, Entzündungen, Ichämie / Reperfusionssyndrom, Krebs, als auch bestimmte neurodegenerative Erkrankungen. Auch beim Alterungsprozess spielt diese ROS eine entscheidende Rolle (Abbildung 2; Kohen & Nyska, 2002; Hauck *et al.*, 2012).

Auch Antioxidantien wie Tocopherole (Vitamin E) und Ascorbat (Vitamin C) fangen in nicht-enzymatischen Reaktionen kurzlebige Radikale ab (sog. *scavenger*), indem sie homolytisch dehydriert werden. Das überschüssige Elektron wird über deren π -System delocalisiert und somit vorübergehend stabilisiert. Vitamin E schützt als fettlöslicher *scavenger* besonders Membranlipide, da es z.B. Radikalkettenreaktionen abbricht. Vitamin C kann als wasserlösliche Verbindung Tocopherylradikale regenerieren, aber auch direkt Radikale inaktivieren und Fe^{3+} reduzieren. Ascorbylradikale werden auch GSH-gekoppelt zu Ascorbat regeneriert (Abbildung 2; Christen & Jaussi, 2005; Hauck 2007)

1.2 *Spin Trapping*

Der Nachweis von freien Radikalen stellt den Chemiker vor eine besondere Herausforderung. Zum einen ist eine direkte Detektion aufgrund der kurzen Halbwertszeit nicht möglich. Zum anderen liefern auch die stabileren *scavenger*- Radikale keinen Beitrag zur Aufklärung der abgefangenen ROS.

1971 wurde dafür von Janzen eine indirekte Methode vorgeschlagen – das sog. *spin trapping*. Dieser Ausdruck setzt sich aus den Begriffen *spin-labeling* und *radical trapping* zusammen (Janzen, 1971). Dabei handelt es sich um eine analytische Technik bei der mit Hilfe von synthetischen *spin traps* (Spin-Fallen) kurzlebige Primär-Radikale eingefangen und via *electron paramagnetic resonance* (EPR)-Spektroskopie detektiert werden können, da sie selbst zu langlebigeren, persistenten Radikalen reagieren. Die Produkte einer solchen Radikaladditionsreaktion werden als Spin-Addukte bezeichnet (Abbildung 3; Hauck, 2007).

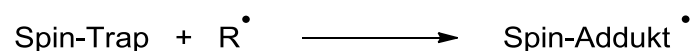


Abbildung 3: Prinzip des *spin trapings*.

1.2.1 Nitrone

Als *spin traps* werden neben C-Nitroso-Verbindungen, meist Nitrone (Azomethinoxide) eingesetzt.

Der Begriff Nitron setzt sich aus dem engl. „*nitrogen*“ und „*ketone*“ zusammen. Dessen funktionelle Gruppe ist das *N*-Oxid eines Imins und ist aus chemischer Sicht einer Carbonylgruppe ähnlich. Nitrone sind zudem 1,3-dipolare Verbindungen allylischen Charakters mit einem Stickstoff als Zentralatom (Bietz, 2008).

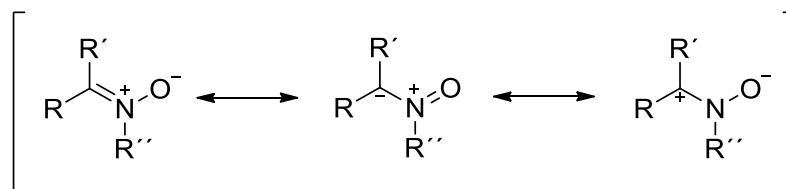


Abbildung 4: Mesomere Grenzstrukturen eines Nitrons.

Die Darstellung von Nitronen erfolgt häufig über eine Kondensationsreaktion von Carbonylen mit *N*-monosubstituierten Hydroxylaminen (Matsuo *et al.*, 2001). Zudem können sie über eine Oxidation von sekundären Aminen und Hydroxylaminen mit Metalloxiden, Perwolframaten oder Oxaziridin-Salzen hergestellt werden (Karbach *et al.*, 2014).

Nitrone sind auch vielseitig einsetzbare Intermediate in der organisch präparativen Chemie, wie beispielsweise für die stereoselektive Synthese von Isoxazolidinen (Dugovič *et al.*, 2003), in der Kinugasa-Reaktion mit terminalen Alkinen zur Darstellung von β -Lactamen (Marco-Contelles, 2004), sowie als Substrate für radikalische Polymerisationen (Karbach *et al.*, 2014; Sciannamea *et al.*, 2005).

Man unterteilt Nitrone in cyclische und aliphatische *spin traps* (Abbildung 5). Beispiele für cyclische *spin traps* sind DMPO **1** (5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-*N*-oxid) und EMPO **2** (2-Ethoxycarbonyl-2-methyl-2-pyrrolin-*N*-oxid). Der bekannteste und meist verwendete Vertreter der aliphatischen Nitronen ist das PBN **3** (Phenyl-*N-tert*-butylnitron).

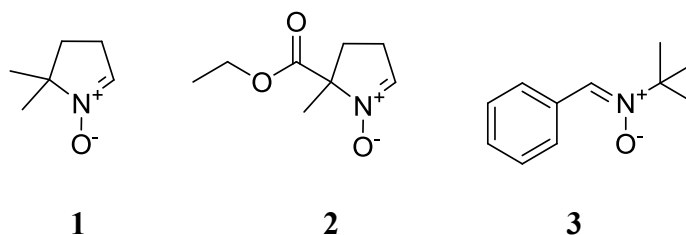


Abbildung 5: Beispiele häufig verwendeter *spin traps*.

Die Vorteile cyclischer Nitrone **1** und **2**, gegenüber derer des aliphatischen Typs **3**, liegen in der besseren Wasserlöslichkeit und einer geringeren Toxizität. Dagegen ist ihre Herstellung, Aufreinigung und Handhabung sehr aufwendig, da bei Raumtemperatur, mit Luftsauerstoff oder Lichtexposition sehr schnell radikalische Zersetzungsprodukte gebildet und somit die EPR-spektroskopischen Messungen beeinflusst werden. Wenn man die Spin-Addukte betrachtet, so besitzen cyclische Nitroxidradikale meist höhere Halbwertszeiten, was eine quantitative Interpretation der EPR-Spektren erleichtert. Wenn jedoch eine qualitative

Aussage zu der addierten radikalischen Spezies im Vordergrund steht, werden aufgrund der erwähnten Probleme, oft aliphatische Nitrone bevorzugt verwendet (Hauck, 2007).

Die qualitative Zuordnung, eines durch Nitrone eingefangenen Primärradikals, erfolgt in der EPR-Spektroskopie über die Hyperfeinkopplung (Fermi-Kontakt-Wechselwirkung) des ungepaarten Elektrons mit dem Kernspin des ^{14}N ($I = 1$). Dadurch entsteht z.B. ein für aliphatische Nitroxylradikale typisches 3-Linien-Signal (siehe Kap. 1.4.2.2). Bei diesen Spin-Addukten ist meist auch ein Wasserstoffatom in β -Position gebunden. Das freie Elektron koppelt auch mit dessen Kernspin ($I = 1/2$), wodurch zusätzlichen Signale entstehen (Dupletts der 3-Linien). Über den Abstand zwischen den Signalen der jeweiligen Dupletts kann man eine zweite Hyperfeinkopplungskonstante (a -Tensor) bestimmen, welche je nach Primärradikal am β -Kohlenstoff einen dafür spezifischen Wert annimmt.

Deshalb bieten Nitrone als *spin traps* die Möglichkeit *in vivo* entstandene Radikale nachzuweisen und somit mehr über deren Bildungsprozess bei speziellen Stoffwechselfvorgängen zu erfahren. Dabei stellt die zelluläre Lokalisation der Nitrone, als auch die Methode zur Identifikation entsprechender Spin-Addukte eine Herausforderung dar (Leinisch, 2009).

Zum einen kann man Radikale *in situ* detektieren, indem z.B. kultivierte Zellen direkt nach der Zugabe einer *spin trap* im EPR-Spektrometer vermessen werden. Diese Methode ermöglicht eine zeitaufgelöste Betrachtung der Radikalbildung. Da auf zellulärer Ebene die Konzentration der Spin-Addukte im nanomolaren Bereich liegt und es weder möglich ist sauerstofffrei zu arbeiten, noch diese aufzukonzentrieren, sind die Linien des Spektrums so verbreitert, dass keine Dupletts aufgelöst werden können und das Signal- Rausch- Verhältnis meist nicht optimal ist (Leinisch, 2009).

Zum anderen können *in vitro* gebildete Radikale *ex vivo* nachgewiesen werden, indem man die gebildeten Nitroxidradikale extrahiert. Zum Zellaufschluss und zu deren Extraktion wird häufig ein organisches Lösungsmittel wie Ethylacetat verwendet. Dadurch ist es möglich die Spin-Addukte aufzukonzentrieren, die Lösung zu entgasen und somit qualitativ aussagekräftige EPR- Spektren zu erhalten. Eine quantitative Interpretation ist aufgrund dieser Art der Probenaufbereitung, einhergehend mit einer relativ geringen Halbwertszeit der Spin-Addukte, nicht möglich (Leinisch, 2009).

1.3 Fluoreszierende *Spin Traps*

Die kovalente Verknüpfung eines organischen Fluorophors mit einer Nitron-Einheit erlaubt neben dem klassischen *spin trapping* und EPR-spektroskopischer Analyse, die Lokalisierung des Ortes der Entstehung von ROS auf subzellulärer Ebene, via konfokaler Laser-scanning-Mikroskopie (*cLSM*) (Abbildung 6; Hauck *et al.*, 2012).

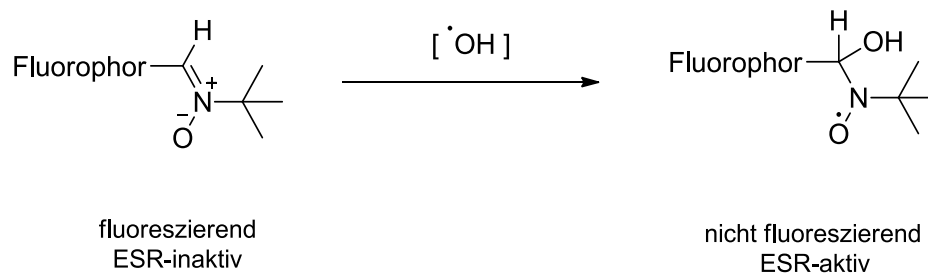


Abbildung 6: Beispielreaktion einer aliphatischen, fluoreszierenden *spin trap* (Fluorophor-*tert*-Butylnitron) mit Hydroxylradikal zum Spin-Addukt (Nitroxidradikal).

Das Prinzip dieser Radikalbildungs-Lokalisierung besteht darin, dass primäre Radikale an die Doppelbindung des fluoreszierenden *spin trapping*-Agens addieren und das freie Elektron des gebildeten Nitroxidradikals, mit dem π -System des aromatischen Chromophors wechselwirken kann. Die Folge wäre die Veränderung dessen elektronischer Struktur, was mit einem Zusammenbruch der Fluoreszenz einhergeht (Karbach *et al.*, 2014; Hauck *et al.*, 2012; vgl. Kap. 1.4.1.6; Fluoreszenzlöschung; sog. *Quenching*). Zudem eröffnet eine solche Kombination die Möglichkeit die zelluläre Akkumulation von *spin traps* zu steuern.

1.3.1 Fluorochrome

Für das biologische Imaging wurden zahlreiche, kompartimentspezifische Fluoreszenzfarbstoffe sog. Fluorochrome zur Kontrastierung oder Markierung abgegrenzter zellulärer Bereiche synthetisiert. Diese wurden so konstruiert, dass sie beispielsweise in die DNA (auch dsRNA) interkalieren (aromatische π - π -(Stapel-)Wechselwirkung), sich aufgrund ihrer Hydrophobizität in Membranen einlagern, sich als intrazelluläre pH-Indikatoren eignen oder auch zur Aminosäureanalytik verwendet werden können (Autorenkollektiv, 1999).

Solche organischen Fluorophore sind meist polycyclische, (hetero-) aromatische Ring-systeme. Beispiele dafür sind Xanthen-, Acridin-, Oxazin-, NBD -, Dansyl-, Coumarin-, und Indol- Derivate (Kopp, 2015).

Häufig verwendete Vertreter zum Anfärben des Zellkerns (DNA-interkalierend) sind 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) **4** und Acridinorange (AO) **5**.

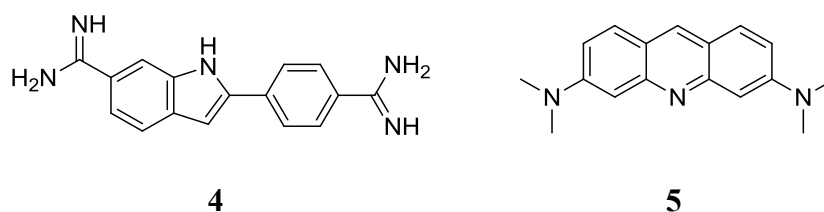


Abbildung 7: Strukturformeln von DAPI **4** und Acridinorange **5**.

Derivate des Fluoresceins **6** und Rhodamins **7** (Xanthenfarbstoffe) werden *in vivo*, je nach Funktionalisierung, als Ligand für alle erwähnten Untersuchungsbereiche eingesetzt.

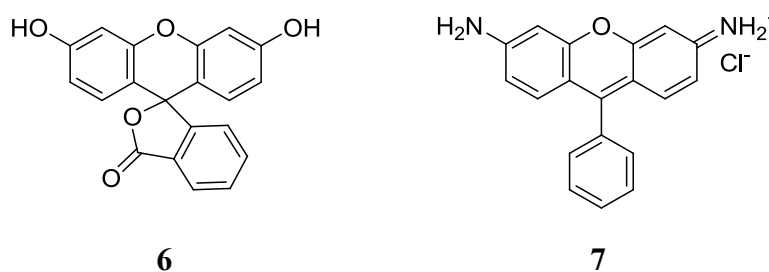


Abbildung 8: Strukturformeln von Fluorescein **6** und Rhodamin **7**.

Halogen-substituierte Fluorophore wie NBD-Chlorid **8**, Dansylchlorid **9** oder Sangers Reagenz **10** reagieren für gewöhnlich mit primäre Aminogruppen von terminalen Aminosäuren (oder anderen Nucleophilen, S_NAr) und markieren somit Proteine.

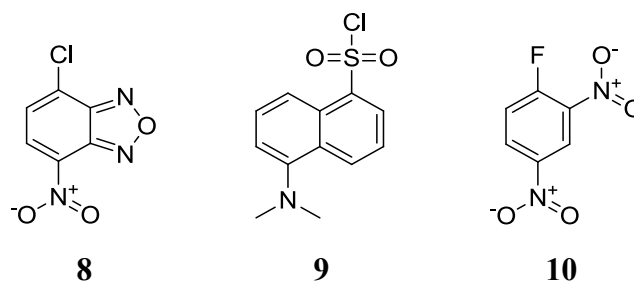
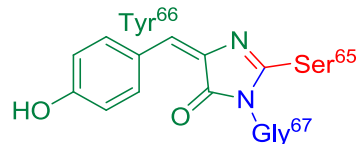


Abbildung 9: Strukturformeln von NBD-Chlorid **8**, Dansylchlorid **9** und Sangers Reagenz **10**.

Da sich die Seitenketten cyclischer Nitrone leicht zu primären Aminen modifizieren lassen, bieten diese Fluoreszenzfarbstoffe einen vielversprechenden Zugang zu cyclischen und gleichzeitig fluoreszierenden *spin traps* (Hauck, 2007). Ein direkter Zugang zu aliphatischen, fluoreszierenden Nitronen stellt sich schwieriger dar, da kaum formylierte Fluorophore käuflich zu erwerben sind.

Die wohl bedeutendste Errungenschaft im Bereich des Bio-*Imagings* war die Entdeckung eines biologischen Fluorochromes – dem aus 238 Aminosäuren bestehenden, grün fluoreszierenden Proteins (*Green Fluorescent Protein*, GFP). Dessen fluoreszierende Eigenschaft basiert auf einer rein endogenen autokatalytischen Cyclisierung einer Tripeptidsequenz (Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷), mit anschließender Oxidation zum entsprechenden, aromatischen Chromophor (Abbildung 10; Autorenkollektiv, 1999).



11

Abbildung 10: Struktur des 4-(*p*-Hydroxybenzyliden)-imidazolidin-5-on **11** in GFP.

Das GFP-Gen eignet sich somit perfekt als sog. Reporter gen zur Untersuchung von *in vivo*-Prozessen. Mittels der Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht das exprimierte GFP als Fusionsprotein u.a. eine ortsaufgelöste Detektion des modifizierten Zielproteins (Cubitt *et al.*, 1995; Heim *et al.*, 1995; Heim *et al.*, 1994; Reid & Flynn, 1997).

1.4 Theorie

1.4.1 Photophysikalische Prozesse

Nachdem Valenzelektronen eines Farbstoffmoleküls durch die Absorption von Licht in einen energiereicheren sog. angeregten Zustand übergegangen sind, kann diese Energie wieder, spontan in Form von Strahlung, welche man als Fluoreszenz bezeichnet, abgegeben werden (Biskup, 2016).

1.4.1.1 Jablonski-Termschema

Der Zusammenhang zwischen Lichtabsorption und Fluoreszenz (sowie Phosphoreszenz) wird für gewöhnlich in einem Jablonski- Termschema dargestellt (Abbildung 11).

Die Vektorgraphik zeigt die elektronischen Zustände (fette Linien) mit ihrer Spin-Multiplizität und -Konfiguration. Diese sind ergänzt durch die Schwingungszustände v (dünne Linien) innerhalb der jeweiligen elektronischen Zustände. Zudem werden die wichtigsten strahlenden und strahlungslosen Prozesse illustriert (Biskup, 2016).

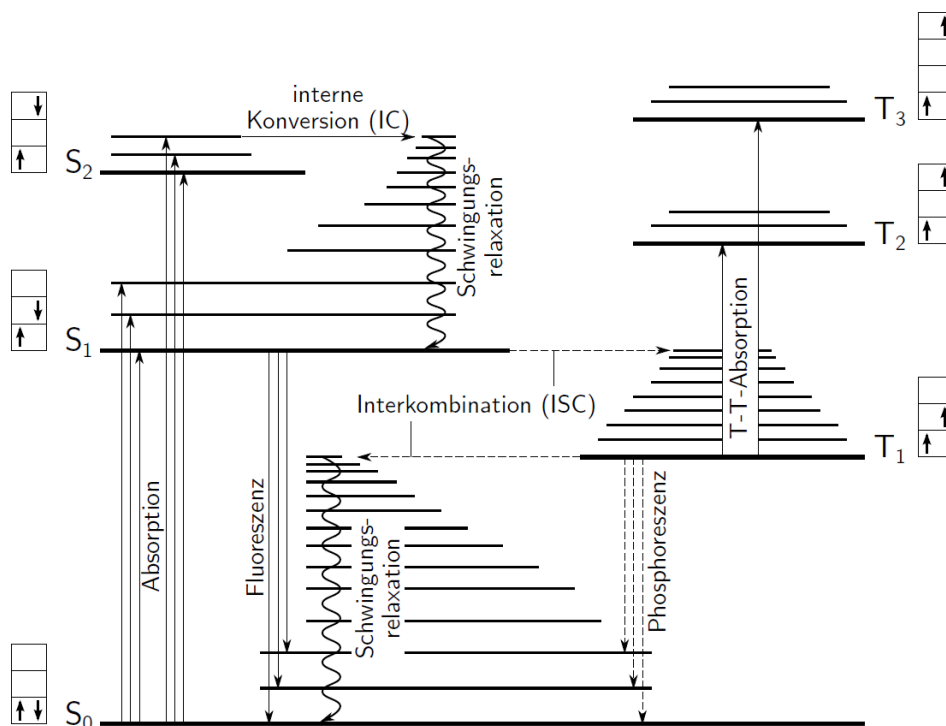


Abbildung 11: Jablonski-Termschema: Verändert nach Haken und Wolf (2006). Singulettzustand, S_n (mit $n \geq 0$), und Triplettzustand, T_n (mit $n \geq 1$) (Biskup, 2016).

1.4.1.2 Absorption

Bei Raumtemperatur befinden sich die meisten Moleküle im Schwingungsgrundzustand ($v = 0$) des elektronischen Grundzustandes (S_0) (Boltzmann-Verteilung). Von dort aus werden, durch Absorption von Photonen, Elektronen sehr schnell, somit ohne Veränderung der Molekülgeometrie (Massenträgheit der Atomkerne), in eines der angeregten elektronischen Schwingungsniveaus ($S_n \geq 1, v = n$) angehoben (Abbildung 11). Die Wahrscheinlichkeit für solche elektronischen Übergänge ist deshalb abhängig von der Güte der Orbitalüberlappung zwischen dem S_0 ($v = 0$) - Zustand und elektronisch angeregten Schwingungszuständen (S_n ; Franck-Condon-Prinzip). Somit charakterisiert das Absorptionsspektrum die Schwingungsstruktur der angeregten elektronischen Zustände (Biskup, 2016).

1.4.1.3 Strahlungslose Übergänge

Befindet sich das Molekül in einem höheren Schwingungszustand ($v = n$) von angeregten S_n -Zuständen, wird durch Schwingungen (Molekülstöße) Energie in Form von Wärme abgegeben, bis es innerhalb dieses Zustandes den Schwingungsgrundzustand ($v = 0$) erreicht hat (Schwingungsrelaxation, IVR). Ein weiterer strahlungsloser Prozess stellt die interne Konversion (IC) dar. Dabei gehen Elektronen aus einem elektronisch angeregten Schwingungszustand ($S_n, v = n$) in ein hohes Schwingungsniveau ($v = n + x$) des darunterliegenden Zustands gleicher Multiplizität (S_{n-1}) über (Abbildung 11; Atkins, 2004; Stohrer, 1991).

1.4.1.4 Fluoreszenz

Falls sich Moleküle mit großen delokalisierten π -Elektronensystemen (z.B. polycyclische Aromaten) im Schwingungsgrundzustand ihres ersten angeregten elektronischen Zustandes ($S_1, v = 0$) befinden, können diese (nach der Regel von Kasha ausschließlich von dort), unter Abgabe von Photonen, auf manche Schwingungsniveaus des S_0 -Zustands übergehen. Dieser photophysikalische Prozess wird als Fluoreszenz bezeichnet (Abbildung 11). Eine charakteristische Fluoreszenzdauer liegt bei etwa 10 ns (10^{-9} s). Auch bei diesen Übergängen gilt das Franck-Condon-Prinzip (S_1 ($v = 0$) \rightarrow S_0 ($v = n$)), weshalb das Fluoreszenzspektrum die Schwingungsstruktur des elektronischen Grundzustands charakterisiert (Biskup, 2016).

1.4.1.5 Stokes-Verschiebung

Häufig ist es der Fall, dass sich die Schwingungsstrukturen des elektronisch angeregten Zustandes (S_1) und des Grundzustandes (S_0) ähneln, wodurch das Fluoreszenzspektrum annähernd spiegelbildlich zum Absorptionsspektrum ist (Abbildung 12).

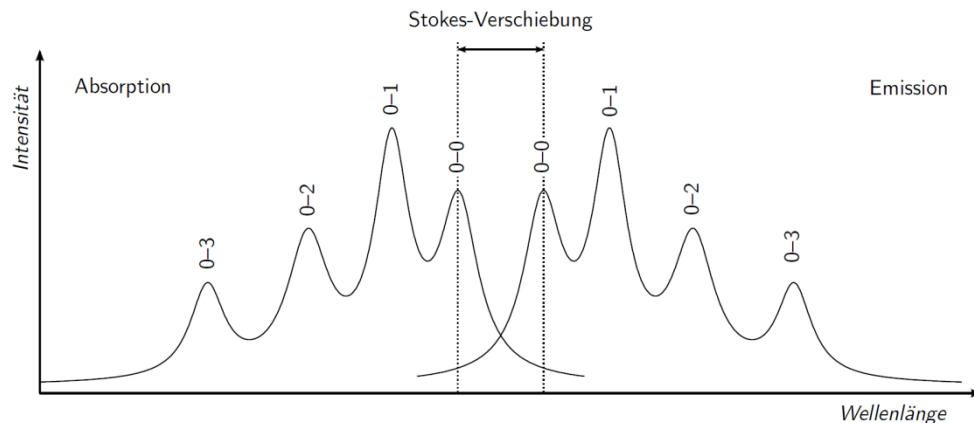


Abbildung 12: Stokes-Verschiebung anhand eines idealisierten Absorptions- und Emissionsspektrum mit spiegelbildlichem Bandenmuster (siehe auch Abbildung 11; Biskup, 2016).

Verglichen mit dem Absorptionsspektrum ist das Emissionsspektrum nach der Kasha-Regel bzw. aufgrund von Schwingungsrelaxation bathochrom (langwelliger, rot) verschoben. Diese sog. Stokes-Verschiebung kann durch die chemische Umgebung des Fluorophors verstärkt werden (sog. Lösungsmittelrelaxation). Das Milieu hat zudem einen Effekt auf dessen Quantenausbeute Φ_F und die Fluoreszenzlebensdauer τ_F (Abbildung 12; Biskup, 2016).

1.4.1.6 Fluoreszenzlöschung

Die Fluoreszenzlöschung oder das *Quenching* ist ein reversibler, zerstörungsfreier Vorgang, bei dem die Fluoreszenzintensität abnimmt. Durch exogene Faktoren wird der Fluorophor, entweder strahlungsfrei in seinen elektronischen Grundzustand (S_0) überführt, oder dessen elektronische Anregung in höhere Niveaus verhindert. Zu den wichtigsten Effekten die ein *Quenching* auslösen können, zählen (Klessinger & Michl, 1995; Hauck, 2007):

- Stoßlöschung: Dabei wird die Energie nach Kollision mit einem Quencher auf diesen übertragen.
- Komplexbildung: Ein Quenchemolekül koordiniert an den Fluorophor, wodurch die Konzentration an fluoreszenzfähigem Farbstoff reduziert wird.
- Förster-Resonanzenergietransfer (FRET): Der Fluorophor fungiert als Energie- Donor und überträgt diese strahlungslos auf einen anderen Farbstoff (Akzeptor).
- Nitroxylradikale: Ein Sonderfall bei dem ein ungepaartes Elektron mit dem π -System des Fluorophors wechselwirkt und dies mit einer Veränderung der HOMO- bzw. LUMO-Energieniveaus einhergeht.

1.4.1.7 Phosphoreszenz

Die Interkombination (*Intersystem Crossing*, ISC) ist ein weiterer strahlungsfreier Vorgang ausgehend vom Schwingungsgrundzustand des S_1 -Zustands. Dabei geht das Molekül in ein erhöhtes Schwingungsniveau des Triplett-Zustands (T_1) über (spinverboten) und relaxiert anschließend über Schwingungen in den langlebigen Schwingungsgrundzustand von T_1 . Aus diesem kann es auch zu einem strahlenden, zeitlich verzögertem Übergang – der Phosphoreszenz, in S_0 kommen (Abbildung 11).

1.4.2 EPR(ESR)-Spektroskopie

Die *Electron Paramagnetic Resonance* (EPR) oder *Electron Spin Resonance* (ESR) ist eine spektroskopische Messmethode, die eng mit der Kernspinresonanzspektroskopie verwandt ist. Beide basieren auf einer resonanten Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit magnetischen Momenten. Im Fall der NMR (*nuclear magnetic resonance*)- Spektroskopie werden die magnetische Momente von Atomkernen (Kernspin von $I \neq 0$) untersucht. EPR-spektroskopische Messungen beruhen hingegen auf dem magnetischen Moment von Elektronen. Somit können paramagnetische Substanzen, also Verbindungen mit ungepaarten Elektronen ($m_s \neq 0$), wie Radikale, Übergangsmetallkomplexe und Metalloproteine mit beispielweise Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} als Zentralmetallionen, sowie Sauerstoff untersucht werden. Bringt man eine solche Probe in ein externes Magnetfeld und strahlt Mikrowellen ein, lässt die detektierte Absorption Rückschlüsse auf die magnetische Umgebung des freien Elektrons zu. Die zeitliche Auflösung der EPR-Spektroskopie liegt zwischen 10 und 100 ns. Die Nachweisgrenze entspricht mit etwa 10^{11} Spins / Probevolumen (μl -Bereich) einer minimalen

Konzentration von 10^{-9} mol/l. Somit zählt die EPR zu den sensitivsten Methoden in der spektroskopischen Strukturaufklärung und ist um etwa das 10000-fache empfindlicher als die NMR-Spektroskopie (Nachweisgrenze ca. 10^{-5} mol/l) (Haimann, 2012; Schweiger, 2003).

1.4.2.1 Theoretische Grundlagen

Elektronen, besitzen neben ihrer negativen Ladung, Masse und Bahndrehimpuls, auch einen Eigendrehimpuls. Dieser sog. Spin entsteht durch Rotation des Elektrons um seine eigene Achse. Diesem ist die Quantenzahl $s = 1/2$ mit dem Betrag $|s| = \hbar\sqrt{s(s+1)}$ ($\hbar = h/2\pi$; das reduzierte Planck'sche Wirkungsquantum) zugeordnet. Projiziert man den Betrag des Elektronenspins auf die z-Achse, somit in Richtung des äußeren Magnetfelds, ergibt sich daraus $m_s\hbar$. Die magnetische Spinquantenzahl m_s beträgt je nach Orientierung $+1/2$ oder $-1/2$ und ist dabei mit einem magnetischen Moment μ_E verknüpft (Haimann, 2012).

$$\mu_E = \gamma_E \cdot s \quad (1)$$

Das gyromagnetische Verhältnis des Elektrons beträgt $\gamma_E = -g_E \cdot e / 2m_e$. e ist dabei die Elementarladung, m_e die Ruhemasse des Elektrons und g_E der Landé-Faktor, welcher einen Wert von 2.00232 einnimmt. Betrachtet man nur die z-Komponente des magnetischen Moments μ_E^z und bezieht das Bohr'sche Magneton $\mu_B = e\hbar/2m_e$ mit ein, so erhält man:

$$\mu_E^z = m_s \cdot g_E \cdot \mu_B \quad (2)$$

Normalerweise sind die Spinzustände $m_s = \pm 1/2$ entartet. Legt man ein äußeres Magnetfeld der Stärke B_0 in z-Richtung an, wechselwirkt das magnetische Moment des Elektrons μ_E^z mit diesem und die Entartung wird aufgehoben (Zeeman-Effekt). Die Energie dieser Wechselwirkung wird beschrieben durch:

$$E = -\mu_E^z \cdot B_0 = m_s \cdot g_E \cdot \mu_B \cdot B_0 \quad (3)$$

Die Energiedifferenz ΔE zwischen den Spinzuständen $m_s = \pm 1/2$ ist somit proportional zur magnetischen Feldstärke B_0 und beträgt:

$$\Delta E = E_2 - E_1 = g_E \cdot \mu_B \cdot B_0 \quad (4)$$

Bei der EPR-Spektroskopie wird dem System Energie in Form von Strahlung einer resonanten Frequenz ν (Mikrowellen) zugeführt. Dadurch wird ein elektronischer Übergang zwischen den Spinniveaus induziert (Abbildung 13).

$$\Delta E = h\nu \quad (5)$$

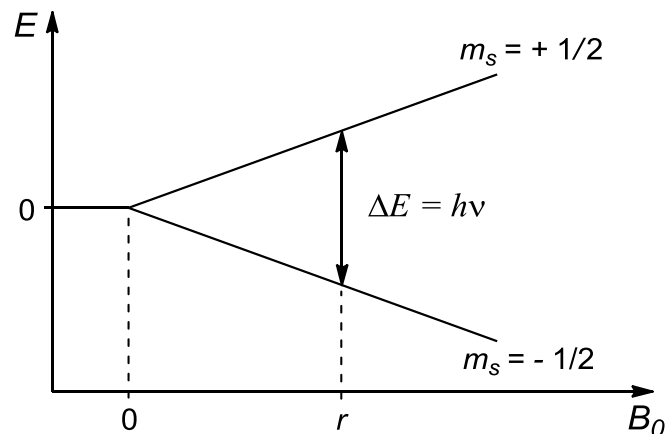


Abbildung 13: Zeeman-Aufspaltung – Die energetische Entartung der Spinzustände wird in einem homogenen Magnetfeld B_0 aufgehoben (Angelehnt an Wertz und Bolton, 1972).

Durch Spin-Bahn-Kopplungen des Elektrons, innerhalb eines Moleküls, sind die Resonanzbedingungen abweichend von denen eines freien Elektrons (Abschirmkonstante σ). Dies wird über den sogenannten g -Faktor beschrieben (Haimann, 2012; Göpel & Ziegler, 1994):

$$g = (1 - \sigma)g_E \quad (6)$$

Aus den Formeln (4), (5) und (6) ergibt sich somit:

$$\Delta E = h\nu = g \cdot \mu_B \cdot B_0 \quad (7)$$

Gleichung (7) zeigt, dass man die Mikrowellenfrequenz bei konstantem Magnetfeld, oder die Magnetfeldstärke bei konstanter Mikrowellenlänge variieren kann.

Aus technischen Gründen arbeiten die meisten EPR-Spektrometer mit konstanten Resonanzfrequenzen im Bereich von 9-10 GHz und variabler Magnetfeldstärke im Tesla-Bereich (3400 G/ X-Band). Bei der Aufnahme eines ESR-Spektrums wird zur Verbesserung

des Signal-Rausch-Verhältnisses das Magnetfeld durch zusätzliche Spulen am Hohlraumresonator moduliert. Somit kommt es zur phasenempfindlichen Signalverstärkung; detektiert wird jedoch die erste Ableitung der Mikrowellenabsorption in Abhängigkeit von der Magnetfeldstärke (Kopp, 2015; Hauck, 2007).

1.4.2.2 Hyperfeinstruktur

Wenn ein Radikal mit dem äußeren Magnetfeld wechselwirkt, würde man bei einem elektronischen Übergang von $m_s = -1/2$ zu $+1/2$ ein „Ein-Linien-Spektrum“ erwarten (Abbildung 13). Meist werden jedoch mehrere Signale detektiert, die aus weiteren Wechselwirkungen des Elektronenspins mit den magnetischen Momenten benachbarter *Nuclei* entstehen. Dieses Phänomen wird als Hyperfeinstruktur bezeichnet. Dabei addiert sich das Magnetfeld jeden Kernspins vektoriell auf das äußere Magnetfeld. Das lokale magnetische Feld (B_{lokal}) das auf die Elektronen wirkt ist somit:

$$B_{\text{lokal}} = B_0 + am_l \quad (8)$$

m_l ist dabei die magnetische Kernspinquantenzahl und a die Hyperfein-Kopplungskonstante, mit der Dimension eines Magnetfelds. Diese entspricht dem Abstand der Linien im Spektrum. Eine EPR- Linie spaltet sich in $(2I + 1)$ Hyperfeinlinien auf. Betrachtet man beispielsweise ein Nitroxidradikal so besitzt der zum freien Elektron benachbarte ^{14}N -Kern einen Spin von $I = 1$. Es ergibt sich demnach ein „Drei-Linien-Spektrum“ (Abbildung 14).

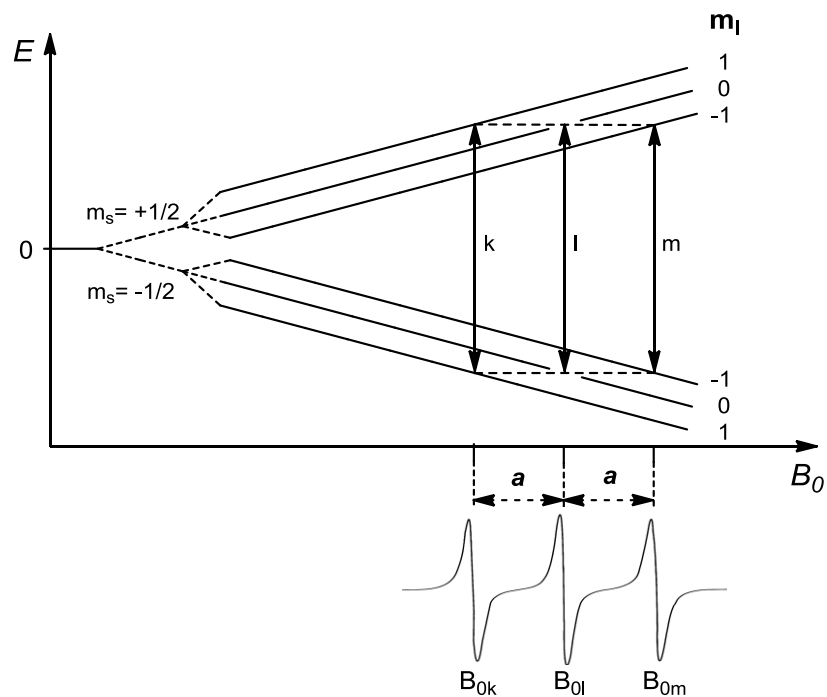


Abbildung 14: Hyperfeinaufspaltung – drei EPR-Signale durch die Wechselwirkung des Elektrons mit einem Kernspin von $I = 1$ (Angelehnt an Wertz und Bolton, 1972).

Die Hyperfeinstruktur ist somit ein wichtiges Merkmal zur Charakterisierung einer paramagnetischen Probe (Berliner, 2003; Atkins, 2004; Weil & Bolton, 2006; Jeschke, 2006; Haimann, 2012).

2 Stand der Forschung und Aufgabenstellung

Die weitreichenden, pathobiochemischen Folgen von ROS treiben Forscher weltweit an ein erweitertes mechanistisches Verständnis über deren Entstehung zu erlangen (siehe Kap. 1.1). Ein Ansatz dies zu realisieren bildet die beschriebene Methode des *spin trappings* (Kap. 1.2) mit fluoreszierenden Nitronen, in Kombination mit der konfokalen Laser-scanning-Mikroskopie (*cLSM*). Die ESR-spektroskopische Untersuchung ermöglicht dabei, anhand der Spin-Addukte (Nitroxylradikale) die eingefangene Radikal-Spezies zu charakterisieren. Diese sollen zudem fluoreszenzmikroskopisch einem zellulären Kompartiment zugeordnet werden können (Kap. 1.3; Pou *et al.*, 1995).

Likhtenshtein und Hideg schlugen schon in den achtziger Jahren vor Nitroxid-Radikale mit einem Fluorophor zu koppeln, welches erst nach Reduktion der Nitroxid-Einheit (via Radikaladdition) in biologischen oder gar lebenden Systemen zu fluoreszieren beginnt (Bystryak *et al.*, 1986).

Hideg verwendete fluoreszierende Pyrroline, welche hauptsächlich durch Singulett-Sauerstoff zu Nitroxiden oxidiert werden konnten und dadurch nicht mehr fluoreszierten (Kalai *et al.*, 1998).

Rosen und seine Mitarbeiter untersuchten fluoreszierende Nitrophenyl-Nitrone, bezüglich der Fluoreszenzabnahme nach einer Reaktion mit α -Hydroxyethyl-Radikalen und stellten fest, dass es weder zur Fluoreszenzabnahme, noch zu einer Bildung von Nitroxid-Radikalen kam, woraufhin diese Arbeiten nicht fortgesetzt wurden (Pou *et al.*, 1995).

Vor einigen Jahren gelang die Synthese und erste Anwendung eines fluoreszierenden Nitrons, mit einer *p*-Nitrostilben-Einheit als Fluorophor, welches für den Nachweis von zellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) geeignet war. Kurzlebige Radikale wurden unter Bildung eines Nitroxid-Radikals abgefangen, was mit einer Fluoreszenzabnahme des *p*-Nitrostilbennitrons (PNSN) **17c** einherging (Abbildung 15; Hauck, 2007; Leinisch, 2009; Hauck *et al.*, 2012).

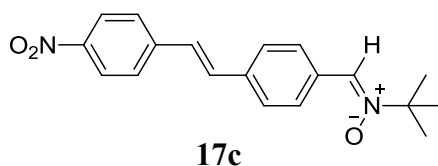


Abbildung 15: Strukturformel des *N*-*tert*-Butyl-*p*-nitrostilbennitrons **17c**.

Bei *in vitro* Fluoreszenzuntersuchungen wurde nach Inkubation mit **17c** festgestellt, dass sich dieses Nitron, fast ausschließlich in den Mitochondrien akkumuliert hatte (Farkas *et al.*, 1989). Diese Akkumulation lässt sich möglicherweise auf einen Effekt von sogenannten Skulachev-Ionen (Ubichinon- oder Plastochinon- Derivate mit langen, hydrophoben Seitenketten und einer positiv geladenen Triphenylphosphonium- Gruppe) zurückführen. Die positive Ladung ist hier über die aromatischen Ringe delokalisiert, wodurch eine Membranpermeation entlang eines negativen Potentialgradienten vom Extrazellularraum, in die Zelle und schließlich zu den Mitochondrien (das einzige menschliche Organell mit negativem Potential) ermöglicht wird (Abbildung 16). Ähnliche Effekte wurden mit bestimmten amphiphilen, dipolaren Verbindungen beobachtet, zu denen auch Nitron **17c** gehört (Hauck *et al.*, 2012).

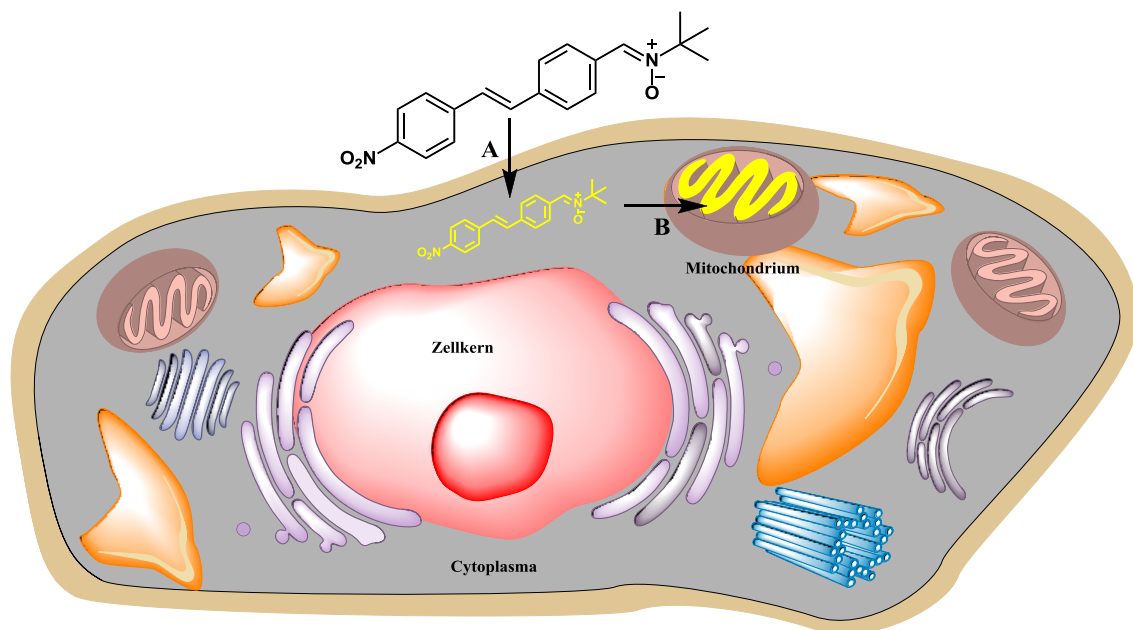


Abbildung 16: Akkumulation des *N-tert-Butyl-p-nitrostilbennitrons* **17** entlang des negativen Potentialgradienten in Mitochondrien.

A) $U = 30 - 60 \text{ mV}$

B) $U = 180 \text{ mV}$

Die Fluoreszenz von Verbindung **17c** nahm innerhalb von etwa 20 min langsam ab. Dieser Zeitraum verringerte sich, durch Erzeugung von Hydroxyl-Radikalen via Fenton-Reaktion (Walling, 1975) auf wenige Sekunden (Hauck *et al.*, 2009). Ähnliche Ergebnisse wurden in Gegenwart von Atmungsketteninhibitoren erhalten, bei denen Superoxidationradikale vermehrt produziert werden (Dlaskova *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2001).

Das Absorptionsmaximum von PNSN **17c** liegt jedoch bei 378 nm und war bei Messungen am Fluoreszenz-Mikroskop ausschließlich im UV-Bereich anzuregen (Hauck, 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb ein Stilbennitron hergestellt werden, das bei höheren Wellenlängen absorbiert. Dadurch soll es ermöglicht werden *in vitro*- Messungen an einem, derzeit konventionellen Laser-scanning-Mikroskop (Anregungslaser bei 488 nm) durchzuführen, die UV-induzierte Radikalproduktion und eine mögliche Störung, durch absorbierende Zellbestandteile zu minimieren und dennoch die beschriebenen, günstigen Eigenschaften eines Stilbennitrons beizubehalten (Karbach *et al.*, 2014).

Bathochrome Substituenten wie $-OH$, $-NR_2$ und $-OCH_3$, sog. Auxochrome, würden das aromatische System des *N-tert*-Butyl-*p*-nitrostilbennitrons **17c** erweitern und somit dessen Fluoreszenz rotverschieben. Wenn sich an ein und demselben Farbstoffmolekül auxochrome (+ M-Effekt) und antiauxochrome (– M-Effekt der Nitrogruppe) Gruppen in ihrer Wirkung ergänzen, also die eine funktionelle Gruppe die Elektronendichte im π -Elektronensystem erhöht (+ M-Effekt), während die andere sie gleichzeitig verringert (– M-Effekt), wird dieser bathochrome Effekt am meisten verstärkt.

Die von Hauck publizierte Weise zur Darstellung von Nitron **17c** konnte bisher nicht auf die Synthese davon abgeleiteter, auxochrom-substituierter Strukturen **17** übertragen werden (Hauck *et al.*, 2009).

Bei der Heck-Reaktion von (*E*)-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)styryl)trimethylsilan **13** mit verschiedenen Aryldiazoniumsalzen **15** (ausgenommen 4-Nitrobenzoldiazoniumtetrafluoroborat (**15c**)) wurde stets durch Palladium die Schutzgruppe entfernt und die Diazoniumgruppe abgespalten. So wurde nach der wässrigen Aufarbeitung das zum Diazoniumsalz **15** korrespondierende Phenol, sowie der entschützte Styrylaldehyd **18** erhalten (Hauck, 2007). In einem Ausschlussverfahren grenzte Hauck mögliche Fehlerquellen (Abbildung 17; in rot) schon etwas ein, legte aber anschließend den Fokus auf die biologische Anwendung von PNSN **17c** (Hauck, 2007).

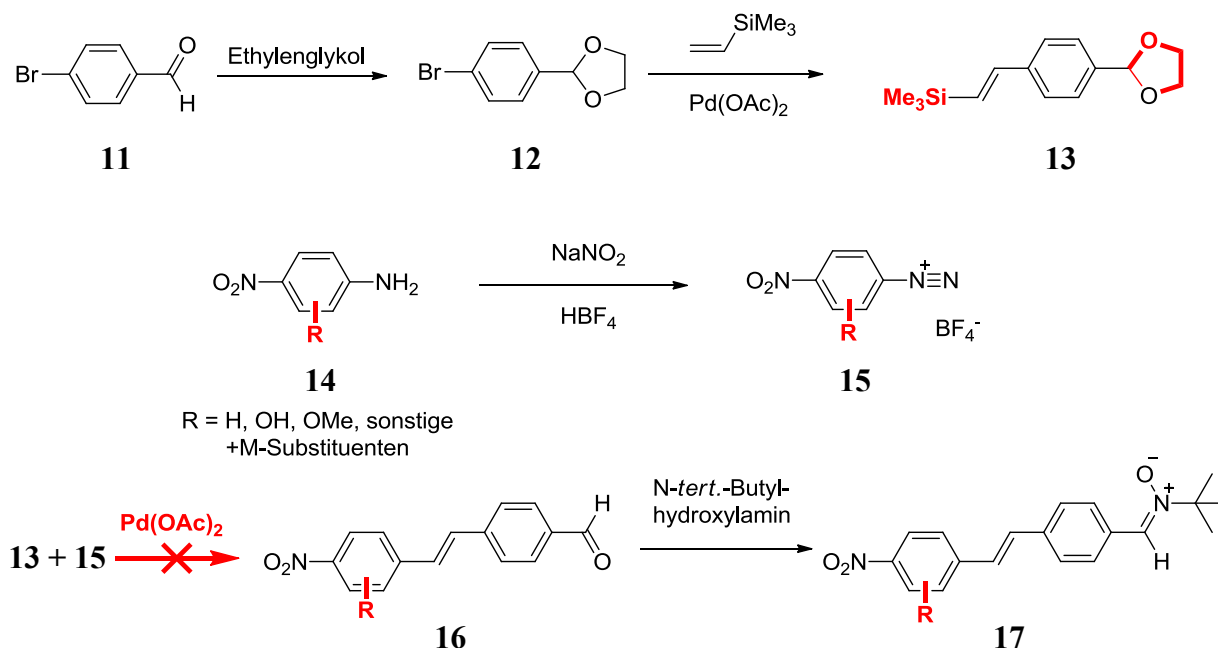


Abbildung 17: Syntheschema für ein auxochrom-substituiertes *N-tert-Butyl-p*-nitrostilben-nitron **17** nach Hauck.

Ausgehend von dieser limitierten Syntheseroute (Abbildung 17), soll im Idealfall eine Substituenten-unabhängige Methode zur Darstellung von Stilbennitronen **17** etabliert werden. Ein synthetisiertes, auxochrom-substituiertes Nitrostilbennitronderivat **17a/b** soll im weiteren Verlauf dieser Arbeit, bezüglich dessen *spin trapping*-, Akkumulations- und optischen Verhaltens, sowohl in Modellsystemen, als auch *in vitro*, ausgiebig untersucht und die Ergebnisse mit denen von Nitron **17c** verglichen werden.

Zudem sollte EMPO **2** synthetisiert werden. Dieses cyclische Nitron **2** soll einen Beitrag zur aktuellen Krebsforschung am Universitätsklinikum Homburg leisten, indem bei bestimmten Bedingungen radikalische ROS *in vivo* quantifiziert werden sollen (AK Trommer). Anhand neuer Literatur soll versucht werden EMPO **2** mit einem der halogenierten Fluorophore **8**, **9** und **10** (siehe Kap. 1.3.1; Abbildung 9) zu koppeln und gegebenenfalls erste Messungen im radikalgenerierenden Modellsystem durchzuführen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese des *N*-*tert*-Butyl-*p*-nitro-*o*-methoxystilben-nitrons (**17a**) und davon abgeleiteter auxochrom-substituierter Derivate (**17b-i**)

Grundlage für folgende Synthesen sind die Arbeiten von Dr. Stefan Hauck. Diese wurden reproduziert, optimiert oder weiterentwickelt (Hauck *et al.*, 2009; Hauck, 2007).

Die gängigste und älteste Weise aliphatische Nitrone wie Verbindung **17** zu synthetisieren, ist eine Kondensationsreaktion von Carbonylen mit verschiedenen Hydroxylaminen (Kap. 1.2.1). Um substituierte Stilbene als Fluorophore nutzen zu können, müssen somit entsprechende Stilbenaldehyde **16** als Vorstufe hergestellt werden (Abbildung 18). Diese wurden anfänglich über eine Wittig-Reaktion dargestellt. Aufgrund einer geringen Stereoselektivität ($E : Z = 27 : 63$) und einer damit verbundenen, aufwendigen Trennung der *cis* / *trans* – Isomere, sind diese sehr schwer zugänglich, als auch teuer in der Herstellung (Hauck, 2007). Deshalb soll eine Ligand-freie, Heck-analoge Reaktion etabliert werden. Eine solche Pd(II)-katalysierte Reaktion zeichnet sich durch eine gute (*E*)-Selektivität und hohe Ausbeuten bei ähnlichen Systemen aus (Reetz, 2004). Hauck testete zunächst eine „klassische“ Variante dieser Reaktion bei hohen Temperaturen. Durch die geringe Anzahl an geeigneten Styrolderivaten ist diese jedoch begrenzt. Danach entwickelte er eine mildere Variante mit Diazoniumsalzen, die ein spezielles Styrylbenzaldehydsystem **13** erforderte. Trotz einer hohen Auswahl an funktionalisierten Phenyl-diazoniumsalzen, konnte auf diese Weise nur der *p*-Nitro-substituierte Stilbenaldehyd **16c** dargestellt werden. Im Rahmen seiner Arbeiten begann Hauck mit der systematischen Suche nach der Ursache, führte diese Studie jedoch nicht fort.

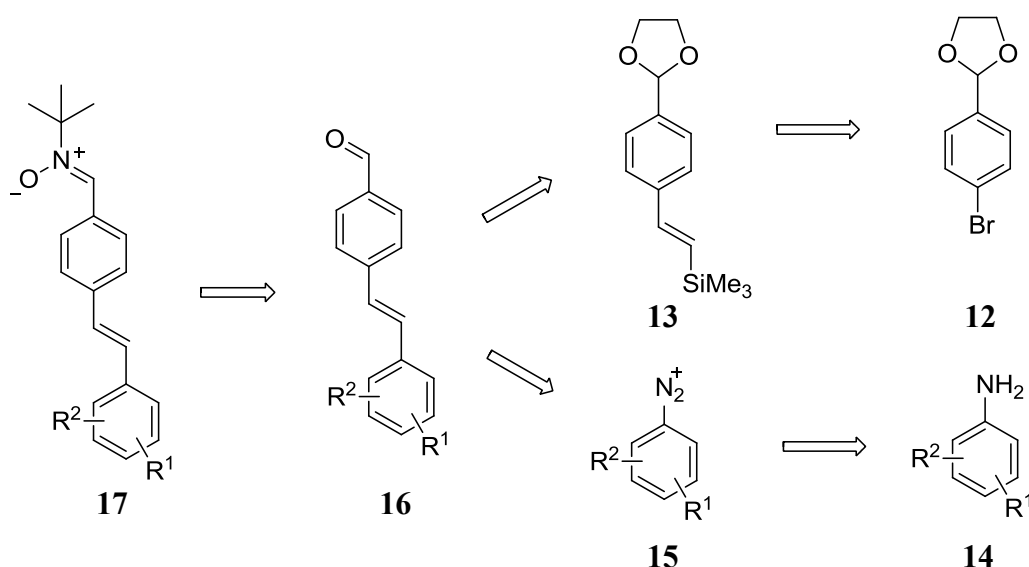


Abbildung 18: Retrosynthese auxochrom-substituierter Stilbennitronderivate **17**.

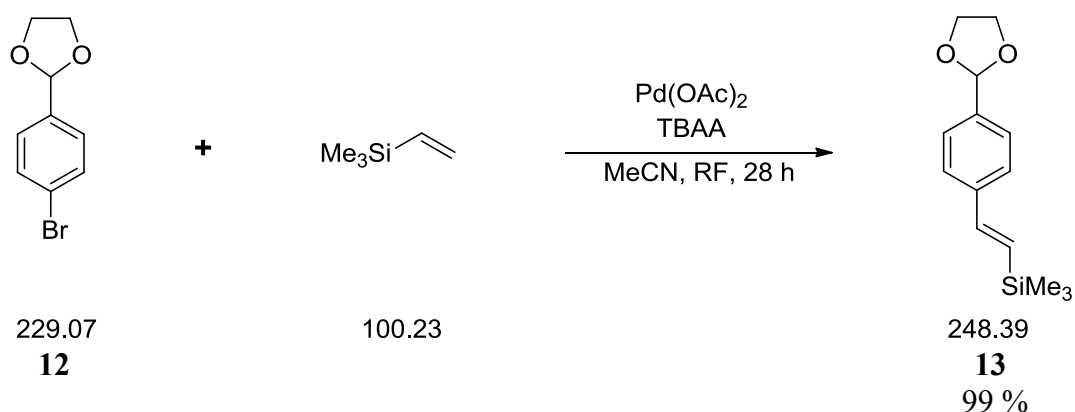


Abbildung 20: Synthese von (*E*)-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)styryl)trimethylsilan **13**.

Die Vinylierung von 2-(4-Bromphenyl)-[1,3]-dioxolan **12** zum entsprechenden, silylierten Styrolderivat **13**, erfolgte über eine Ligand-freie, Palladium-katalysierte Kreuzkupplung. Diese Synthese orientiert sich an etablierten Vorschriften für die Umsetzung von Iodaryl-Verbindungen mit Trimethylvinylsilan (Hauck, 2007; Karabelas & Hallberg, 1986; Nilsson & Hallberg, 1990; Jeffery, 1999). Als Additive / Cokatalysatoren werden nach T. Jeffery dabei quartäre Alkylammoniumsalze, wie Tetrabutylammoniumacetat (TBAA) verwendet. Die Umsatzrate, als auch Silan-Selektivität dieser Heck-analogen Reaktion wurden so auch für den hier vorliegenden Fall nahezu quantitativ. Dabei fungiert das sterisch gehinderte Ammoniumsalz als Base und als Stabilisator der Trimethylsilan-Komponente. Zuvor wurde letzteres nach Karabelas & Hallberg auch mit Silbersalzen realisiert. Zudem wurde gezeigt, dass eine kostengünstigere Variante mit Trialkoxyvinylsilanen keine Alternative bezüglich der Ausbeuten darstellt (Karabelas & Hallberg, 1986). Da die Brom-Verbindung **12** eine geringere Reaktivität als die in der Literatur beschriebenen Iod-Verbindungen aufweist, wurde die Temperatur von RT bzw. 50 °C zum Rückfluss erhöht (Hauck, 2007). Die spektroskopischen Untersuchungen ergaben, dass das (*E*)-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)styryl)trimethylsilan **13** rein dargestellt werden konnte. Verglichen mit Hauck konnte per Kugelrohrdestillation der Ausbeutenverlust bei der Aufreinigung von **13** minimiert werden.

3.1.3 Versuche zur Synthese des *N*-*tert*-Butyl-*p*-nitrostilbennitrons (17c)

3.1.3.1 Synthese des *p*-Nitrostilbenaldehyds (16c)

Nach Hauck wurde 4-Nitrobenzoldiazoniumtetrafluoroborat **15c** bei Raumtemperatur unter Inertgasatmosphäre in trockenem Methanol mit einer äquimolaren Menge an (*E*)-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)styryl)trimethylsilan **13** und 2 mol-% Pd(OAc)₂ als Katalysator umgesetzt. Nach Abschluss der Gasentwicklung folgten eine wässrige Aufarbeitung, sowie eine säulenchromatographische Reinigung. Es konnte der entsprechende *trans*-konfigurierte Stilbenaldehyd **16c** als gelber Feststoff in einer Ausbeute von 81 % isoliert werden (Abbildung 21).

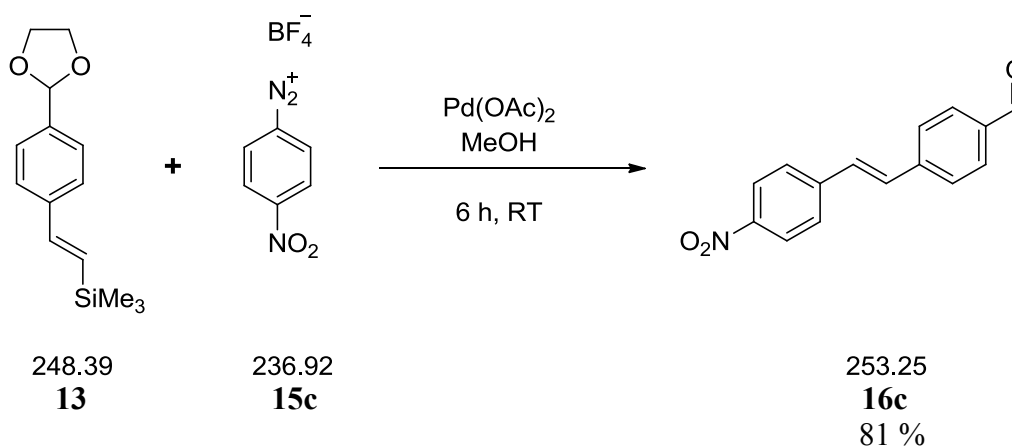


Abbildung 21: Synthese des *p*-Nitrostilbenaldehyds **16c**.

Diese Reaktion zur *trans*-selektiven Stilbensynthese orientiert sich an Heck-Reaktionen unter milden Bedingungen, wobei auch hier Ligand-frei gearbeitet wurde. Insbesondere wegen der Ähnlichkeit der Systeme sind die Vorschriften von Ikenaga und Sengupta hervorzuheben. Statt eines vinyl-terminal unsubstituierten Styrols wurde auf das Trimethylsilanderivat **13** zurückgegriffen, da ansonsten eine verstärkte Zersetzung des Diazoniumsalzes **15c** erwartet wurde (Ikenaga *et al.*, 1987; Sengupta *et al.*, 1998; Hauck, 2007). Zudem begünstigt die sperrige TMS-Komponente die (*E*)-Selektivität dieser Reaktion und stellt neben der Diazoniumgruppe eine weitere sehr gute Abgangsgruppe dar (Abbildung 22; Kikukawa *et al.*, 1981; Karbach *et al.*, 2014). Dies war bei der Wahl der Reaktionsbedingungen zur Synthese ähnlicher Verbindungen zu berücksichtigen (Kap. 3.1.5.3). Die analytischen Daten weisen darauf hin, dass der reine Aldehyd **16c** dargestellt werden konnte.

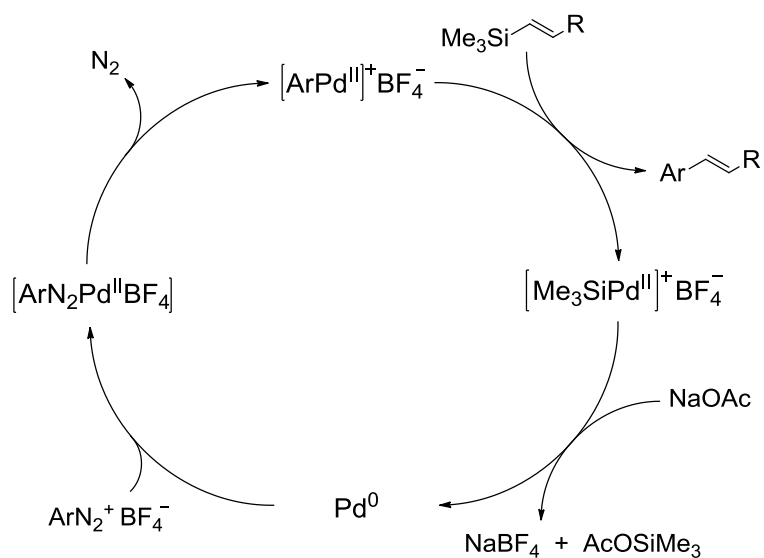


Abbildung 22: Postulierter Katalysezyklus einer milden Heck– (Matsuda) Reaktion mit Aryldiazoniumtetrafluorboraten **15** und dem silylierten Styren **13** (Angelehnt an Kikukawa & Matsuda, 1977).

3.1.3.2 Synthese des *N*-tert-Butyl-*p*-nitrostilbennitrons (**17c**)

Zur Synthese des *N*-tert-Butyl-*p*-nitrostilbennitrons **17c** nach Hauck wurde *p*-Nitrostilbenaldehyd **16c** mit dem 1.5-fachen molaren Überschuss an *N*-tert-Butylhydroxylamin-hydrochlorid und einer katalytischen Menge *p*-Toluolsulfonsäure für 17 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach anschließender wässriger Aufarbeitung und säulenchromatographischer Aufreinigung wurde das reine, gelb-grüne Produkt **17c** in einer Ausbeute von 72 % isoliert (Abbildung 23).

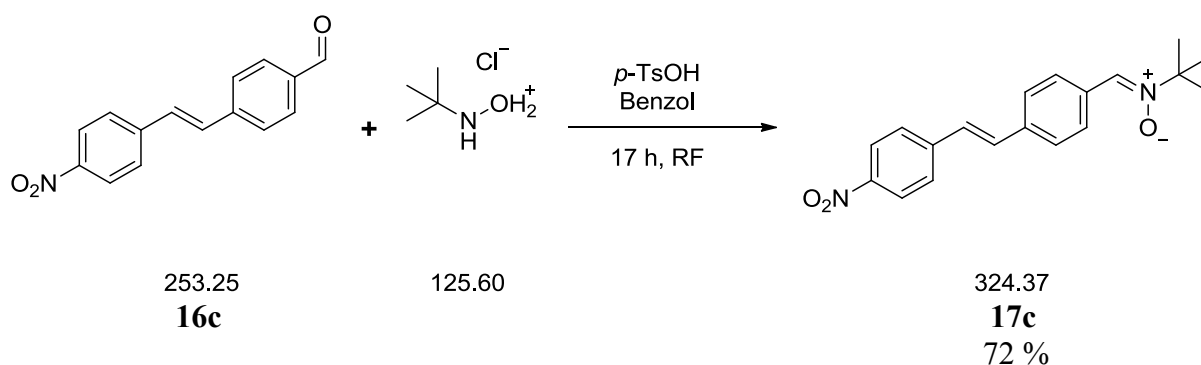


Abbildung 23: Synthese des *N*-tert-Butyl-*p*-nitrostilbennitrons **17c**.

Über einen nukleophilen Angriff des *N-tert*-Butylhydroxylamins am positiv-polarisierten Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe kommt es zur Kondensation unter Ausbildung der Doppelbindung. Das entstandene Benzol-Wasser-Azeotrop wurde mittels Wasserabscheider entfernt, um die Gleichgewichtsreaktion zugunsten des *N-tert*-Butyl-*p*-nitrostilbennitrons **17c** zu verschieben. Analog zur beschriebenen Synthese wurde diese Reaktion auch in Toluol durchgeführt, welche in einer wesentlich geringeren Ausbeute resultierte.

3.1.4 Synthese von substituierten Aryldiazoniumtetrafluorboraten (**15**)

Die Anilinderivate **14** wurden zu einer 20 %-igen HBF₄-Lösung der doppelten molaren Menge gegeben. Bei -10 °C wurde eine äquimolare, wässrige NaNO₂-Lösung zugegeben. Das beim Erwärmen der Lösung ausgefallene, zu Verbindung **14** korrespondierende Diazoniumsalz **15** wurde filtriert, mehrfach gewaschen und im Vakuum getrocknet. (Dunker *et al.* 1936; Becker & Grossmann, 1990; Wang *et al.*, 2003; Masllorens *et al.* 2005; Hauck *et al.*, 2009; Abbildung 24).

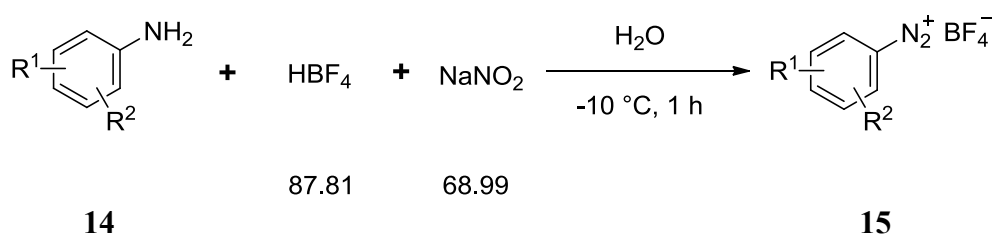


Abbildung 24: Synthese von Benzoldiazoniumtetrafluorboraten **15**.

Tabelle 1: Anilinderivate **14** zur Synthese der Diazoniumsalze **15**.

Eintrag	Derivat			<i>M</i> (g/mol)
	14	R ¹	R ²	
1	14a	2-OMe	4-NO ₂	168.15
2	14b	2-NO ₂	5-OMe	168.15
3	14c*	4-NO ₂	H	138.12
4	14d	H	H	93.13
5	14e	4-OMe	H	123.15
6	14f	4-SO ₃ H	H	173.19
7	14g*	4-Cl	H	127.57
8	14h	4-NMe ₂	H	136.19
9	14i	2-OH	4-NO ₂	154.12
10	14j	2-NO ₂	4-NO ₂	183.12

* wurde nicht umgesetzt

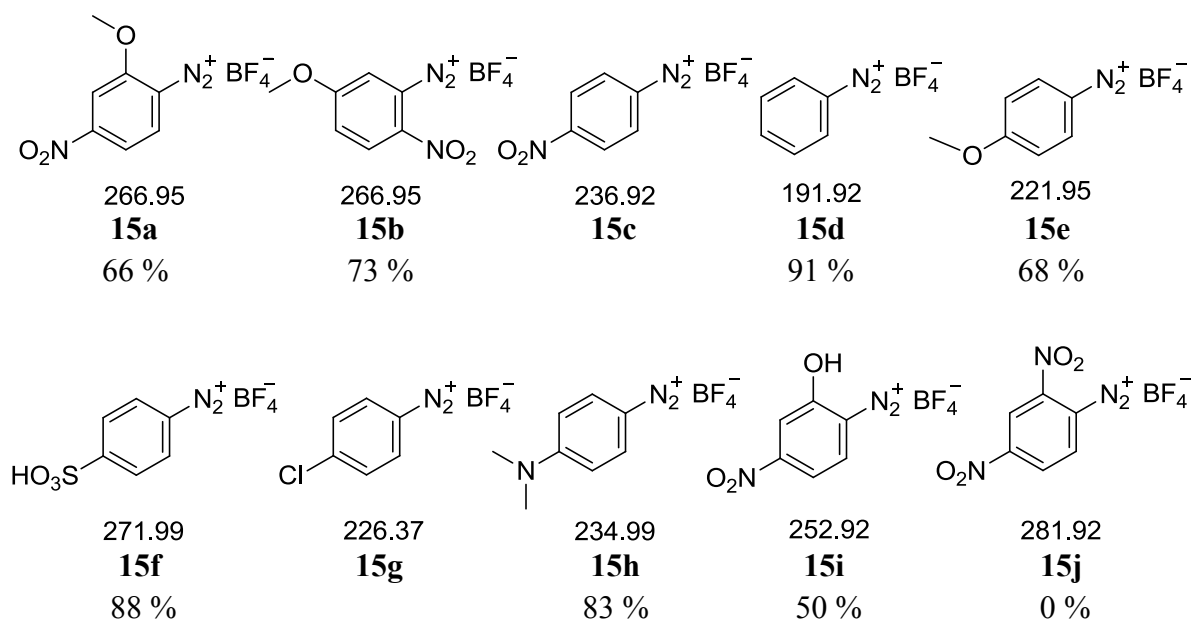


Abbildung 25: Strukturen und Ausbeuten dargestellter Phenyldiazoniumsalze **15**.

Die Diazotierung der aromatischen Amine **14** mit Natriumnitrit erfolgte durch einen elektrophilen Angriff des, durch Protonierung der salpetrigen Säure, gebildeten Nitrosonium-Kations an der Amino-Funktion. Die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren zeigen, dass die gewünschten Produkte **15** in den aufgeführten Ausbeuten dargestellt werden konnten (Abbildung 25).

Das Diazoniumsalz **15c** wurde über Acros bezogen. Verbindung **15g** wurde von B. Bayarmagnai (AK Goossen / TU Kaiserslautern) bezogen und analog zur erwähnten Methode, im Rahmen der Publikation „One-Pot Sandmeyer Trifluoromethylation and Trifluoromethylthiolation“, hergestellt (Bayarmagnai *et al.*, 2014).

Somit entstand ein modularisiertes System aus den Edukten **15**, welches viele der gängigen auxochromen Arylsubstituenten beinhaltet, die das aromatische π -System erweitern und so auch die gewünschte bathochrome Verschiebung der Absorption von Stilbenen bewirkt (Abbildung 25).

3.1.5 Versuche zur Synthese auxochrom-substituierter Stilbenaldehyde (**16**)

3.1.5.1 Versuche zur Synthese von Methoxy-substituierten Nitrostilbenaldehyden (**16a/b**)

Die Diazoniumsalze **15a** und **15b** wurden unter Inertgasatmosphäre zu einer Lösung aus einer äquimolaren Menge an (*E*)-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)styryl)trimethylsilan **13** und 2 mol-% $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ in trockenem Methanol gegeben und 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt (analog zu Kap. 3.1.3.1; Hauck, 2009). Nach wässriger Aufarbeitung und anschließender

Analytik der Rohprodukte wurden jeweils 99 % des entschützten Aldehyds **18** aus Edukt **13** isoliert (Abbildung 26).

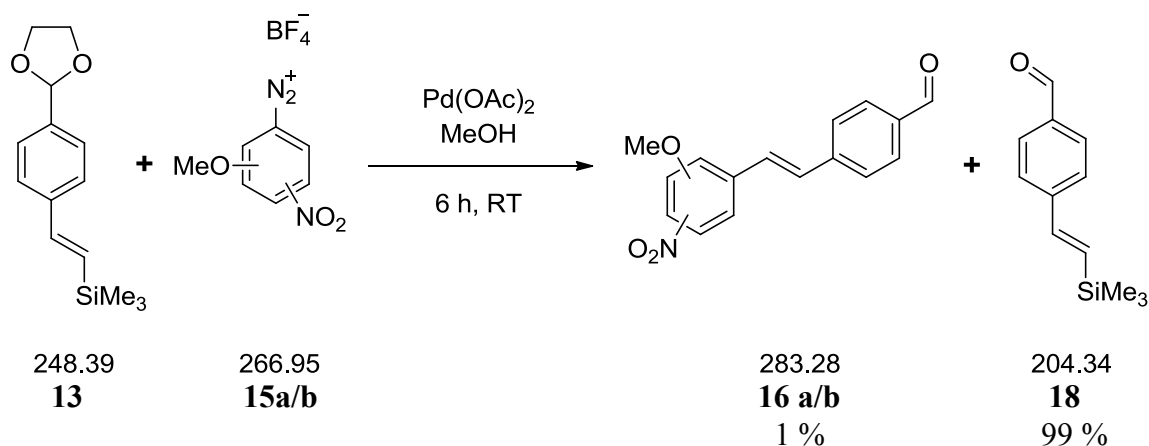


Abbildung 26: Versuch zur Synthese eines Methoxy-substituierten Nitrostilbenaldehyds **16a/b**.

Für diese milde Heck-Reaktion zwischen (*E*)-4-(1,3-Dioxolan-2-yl)styryltrimethylsilan **13** und *o*-Methoxy-*p*-nitrobenzoldiazoniumtetrafluoroborat **15a**, sowie *m*-Methoxy-*o*-nitrobenzoldiazoniumtetrafluoroborat **15b** wurden, jeweils nach spektroskopischer Analyse, nur Spuren der gewünschten Produkte **16a/b** gefunden. Schon während des Ansetzens der Reaktionen war sowohl eine Gasentwicklung, als auch eine Verfärbung der Lösung zu beobachten. Dies deutete auf eine schnelle Zersetzung der Diazoniumsalze **15a** und **15b**, bereits vor der Ausbildung des Palladium-Aryl-Komplexes hin (siehe Katalyse-Zyklus, Abbildung 22).

Anschließend wurden Proben aller verfügbaren Diazoniumsalze **15** bei Raumtemperatur in reinem Methanol gelöst und die zeitliche Gasentwicklung visuell verglichen.

Mit Abstand am schnellsten zersetzte sich das *o*-Methoxy-*p*-nitrobenzoldiazoniumtetrafluoroborat **15a**.

In einem weiteren Versuch wurde die Reaktionsdauer mit dem vermeintlich, instabilsten Diazoniumsalz **15a** auf eine Stunde verkürzt und die Reaktionslösung während der gesamten Dauer auf 0 °C gekühlt. Dies erhöhte die Ausbeute des *o*-Methoxy-*p*-nitrostilbenaldehyds **16a** auf 25 % und führte zu einer geringeren Entschützung von Verbindung **13**.

3.1.5.2 Screening der Heck-Reaktion zur Darstellung von *N-tert-Butyl-p-nitro-o-methoxystilbenaldehyd (16a)*

Ausgehend von den Versuchen in Kap. 3.1.5.1 wurde die Reaktion zur Synthese von Verbindung **16a** einem Screening unterzogen, bei dem das molare Verhältnis der Reaktanden **13** zu **15a**, die Menge an Katalysator, im besonderen die Temperatur und die Reaktionszeit variierten. Der Fokus dabei lag auf der Ausbeutensteigerung, unter Berücksichtigung einer möglichst effizienten Umsetzung. Nach einer $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Analyse wurden per manueller Integration die prozentualen Rohproduktverhältnisse der (*E*)- und (*Z*)-Stilbenaldehyde **16a** und des entschützten Styrylsilans **18** bestimmt (Abbildung 27, Tabelle 2).

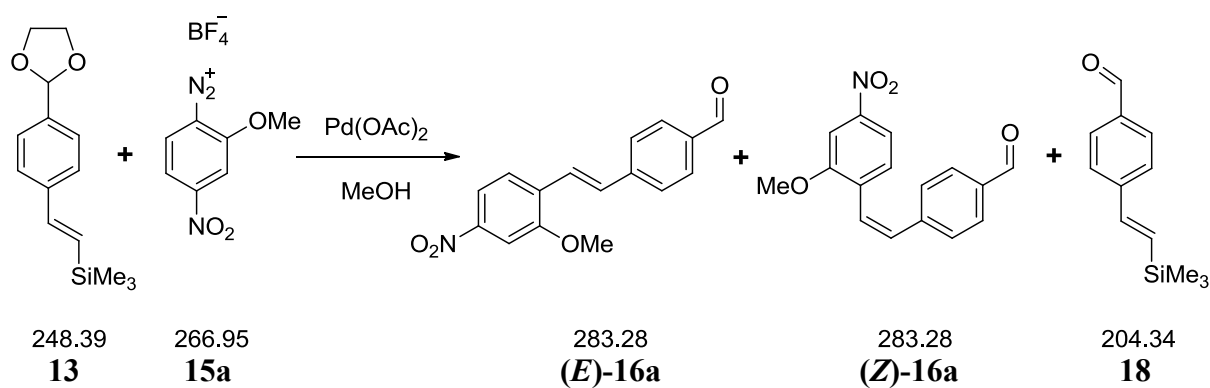


Abbildung 27: Screening einer milden Heck-analogen Reaktion mit Verbindung **15a**.

Tabelle 2: Ergebnisse des Screenings zur Darstellung von *N-tert-Butyl-p-nitro-o-methoxystilbenaldehyd 16a*.

Eintrag	Verhältnis von 13:15a	Katalysator (mol-%)	Zeit ^a (h)	Zeit ^b (h)	Ausbeute ^c (%) von (E)-16a	Ausbeute ^c (%) von (Z)-16a	Ausbeute ^c (%) von 18
1	1:1	2	0	6	1	0	99
2	1:1	2	1	5	62	8	30
3	1:1	2	6	0	32	0	68
4	1:1	4	1	5	71	9	20
5	2:1	2	1	5	53	25	22
6	1:1	2	3	15	82	4	14
7	1:1	2	3	15 ^d	21	0	79
8	1:1	20	1	5	82	9	9

^a Initiale Reaktionszeit unter $-10\text{ }^\circ\text{C}$

^b Nachfolgende Reaktionszeit bei RT

^c Rohproduktverhältnisse per Integration der $^1\text{H-NMR}$ Spektren (400 MHz)

^d Nachfolgende Reaktionszeit bei $4\text{ }^\circ\text{C}$

Die Einträge 2 und 3 bestätigen die thermische Instabilität des Diazoniumsalzes **15a** in Reaktionslösung. Verglichen mit Verbindung **15c** scheint die zusätzliche Methoxy-Funktionalisierung dafür ausschlaggebend zu sein. Eintrag 2 zeigt, dass die Ausbeute an (*E*)-**16a** deutlich auf 62 % erhöht werden konnte, indem während der ersten Stunde unter $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt wurde. Eine permanente Kühlung über die gesamte Reaktionsdauer von 6 h resultierte in vollständiger *trans*-Selektivität, bei verringertem Umsatz und verstärkter Entschützung von Verbindung **13** (Eintrag 3). Davon ausgehend war es notwendig die Bedingungen so auszubalancieren, dass die Entschützung zum Aldehyd **18**, als auch die *cis*-Isomerisierung zu Stilben (*Z*)-**16a** unterdrückt und stattdessen eine schnelle Bildung von Verbindung (*E*)-**16a** begünstigt wird. Dies wurde durch das Erhöhen der Menge an Katalysator erreicht (Einträge 4 und 8). Als alternativer Weg zu Eintrag 8 wurde in Eintrag 6 die Reaktionszeit bei $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, als auch die darauffolgende Reaktionszeit bei Raumtemperatur, um das 3-fache erhöht, dabei die Katalysatormenge bei 2 mol-% gehalten und somit auch eine Ausbeute von 82 % an PNOMSA (*Z*)-**16a** erhalten. Aus ökonomischen Gründen (homogener Katalysator) wurden letztere Bedingungen für weitere Untersuchungen gewählt.

3.1.5.3 Untersuchung des Anwendungsbereichs der optimierten Heck-Variante

Tabelle 3 umfasst den Anwendungsbereich dieser milden Heck-analogen Reaktion (vgl. Kap. 3.1.5.2) unter optimierten Bedingungen (Tabelle 2, Eintrag 6). Die Edukte **15** wurden so gewählt, dass viele auxochrome- und antiauxochrome Substituierten abgedeckt werden.

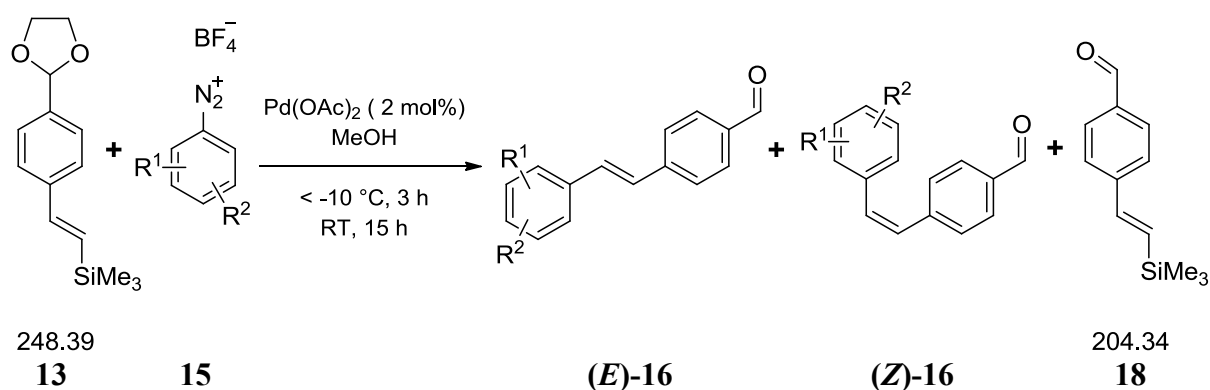


Abbildung 28: Untersuchung des Anwendungsbereichs der optimierten, milden Heck-Reaktion.

Tabelle 3: Anwendungsbereich der optimierten Variante der Heck-Reaktion.

Eintrag	15	R ¹	R ²	Ausbeute ^a (%) von (E)-16	Ausbeute ^a (%) von (Z)-16	Ausbeute ^a (%) von 18	Isolierte Ausbeute ^b von (E)-16 (%)
1	15a	2-OMe	4-NO ₂	82	4	14	69
2	15b	2-NO ₂	5-OMe	66	28	6	52
3	15c	4-NO ₂	H	87	9	4	81
4	15d	H	H	79	13	8	72
5	15e	4-OMe	H	84	8	8	76
6	15f	4-SO ₃ H	H	38	8	54	25 ^c
7	15g	4-Cl	H	80	11	9	60
8	15h	4-NMe ₂	H	48	39	13	36
9	15i	2-OH	4-NO ₂	0	0	100	0

^aRelative Rohproduktausbeute bestimmt via ¹H-NMR (400 MHz).

^bAufreinigung via MPLC.

^cKristallisation während der Aufarbeitung.

Wenn man in Tabelle 3 die relativen Ausbeuten der gewünschten *trans*-Produkte (**E**)-**16** miteinander vergleicht, so zeigen die Einträge 1, 3, 4, 5 und 7 ähnliche Werte im Bereich von 79-87 %. Im Gegensatz zu Diazoniumsalz **15a** (Eintrag 1) ergab dessen Regioisomer **15b** aus Eintrag 2, in Reaktion mit Trimethylsilan **13**, eine weitaus höhere Ausbeute des *cis*-Stilbens (**Z**)-**16b**. Es wurde postuliert, dass dies am großen, polaren Nitro-Substituenten in *ortho*-Position liegen und es somit verstärkt zu Coulomb-Wechselwirkungen mit den vicinal olefinischen Wasserstoffatomen kommen könnte. Um diese Vermutung zu bestätigen wurden in Kap. 3.3.3.3 Kraftfeld-, als auch *ab initio*- Rechnungen durchgeführt. Im Fall von Verbindung **15i** konnte keines der Stilbenaldehyde (**E**)- und (**Z**)-**16i** isoliert werden, da dessen Hydroxylgruppe höchstwahrscheinlich an die Pd(II)-Spezies koordiniert. Stattdessen kam es hierbei zu einer vollständigen Entschützung von Verbindung **13** (Eintrag 9). Die hohe (*Z*)-Selektivität der Reaktion mit 4-(*N,N*-Dimethylamino)phenyldiazonium-tetrafluoroborat **15h** (Eintrag 8) lässt sich derzeit noch nicht erklären. Mit dem Diazoniumsalz der aromatischen Sulfonsäure **15f** wurde eine geringere, relative Ausbeute (38 %) des dazu korrespondierenden Stilbenaldehyds (**E**)-**16f** erzielt, was möglicherweise auf dessen mäßiger Löslichkeit in Methanol beruht.

3.1.6 Versuche zur Synthese auxochromer Stilbennitronderivate (17)

3.1.6.1 Versuch zur Synthese des *N-tert*-Butyl-*p*-nitro-*o*-methoxystilbennitrons (17a)

Analog zu Kap. 3.1.3.2 wurde auch zur Synthese des *N-tert*-Butyl-*o*-methoxy-*p*-nitrostilbennitrons **17a** nach Hauck der Stilbenaldehyd **16a** zusammen mit 1.5 Äquivalenten *N-tert*-Butylhydroxylamin-hydrochlorid und einer katalytischen Menge *p*-Toluolsulfonsäure für 17 h unter Rückfluss erhitzt. Das entstandene Benzol-Wasser-Azeotrop wurde mittels Wasserabscheider entfernt. Nach anschließender wässriger Aufarbeitung konnte das gewünschte Produkt **17a** nicht isoliert werden (Abbildung 29).

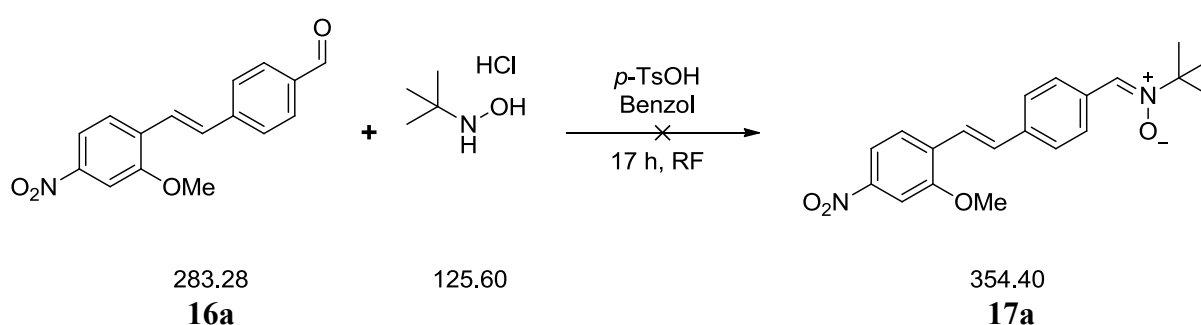


Abbildung 29: Versuch zur Synthese des *N-tert*-Butyl-*o*-methoxy-*p*-nitrostilbennitrons **17a**.

Über einen nukleophilen Angriff des *N-tert*-Butylhydroxylamins am Carbonyl-C-Atom von **16a** sollte sich nach Wasserabspaltung die Doppelbindung ausbilden. Die Reaktionsbedingungen wurden bezüglich der Synthese des *N-tert*-Butyl-*p*-nitrostilbennitrons **17c** (vgl. Kap. 3.1.3.2) nicht verändert. Zu klären war, ob auch hier als ausschlaggebender Punkt die zusätzliche Methoxy-Funktionalisierung von **16a** verantwortlich ist. Dazu wurde dieser Versuch mit identischem Ergebnis wiederholt. Eine Anpassung der Reaktionsbedingungen war somit erforderlich, um das gewünschte mehrfach-substituierte Nitron **17a** zu erhalten (Kap. 3.1.6.2).

3.1.6.2 Synthese auxochrom-substituierter Stilbennitrone (17)

In Kooperation mit C. Kopp wurde für die Synthese der Stilbennitrone **17** (als auch der Naphthalsäureimid-Nitron) die publizierte Weise zur Darstellung von Nitron **17c** nach Hauck (Hauck 2007; Kap. 3.1.3.2) dahingehend modifiziert, dass bei Raumtemperatur in Methylenchlorid gearbeitet wurde. Zudem wurde die Reaktionszeit auf 10 Tage erhöht, das gebildete Wasser mittels trockenem Magnesiumsulfat der Reaktion entzogen und leicht alkalische Bedingungen gewählt, um eine mögliche Zersetzung der säurelabilen Nitron-

Komponente zu verhindern. Somit konnten Ausbeuten zwischen 40 und 52 % erzielt werden (Karbach *et al.*, 2014; Kopp, 2015).

Trotz der Verwendung von Inertgas, wurde für diese Reaktion eine langsame, basen-induzierte Oxidation des Hydroxylamins zur entsprechenden Nitroso-Verbindung postuliert (Karbach *et al.*, 2014), da bei der wässrigen Aufarbeitung eine bläuliche, leichtsiedende (jedoch nicht charakterisierbare) Flüssigkeit separiert werden konnte (Stowell, 1971). Bestätigt wurde dies durch eine alle 2 Tage wiederholte Zugabe der doppelten, molaren Menge an neutralisiertem *N-tert*-Butylhydroxylamin-hydrochlorid. Dies führte zu quantitativen Ausbeuten der Nitrone **17a/b/e/f** (Einträge 1, 2, 5 und 6). In den anderen Fällen (**17c/d/g/h**) variierten die Ausbeuten zwischen 61 und 65 % (Abbildung 30; Einträge 3, 4, 7 und 8; Karbach *et al.*, 2014).

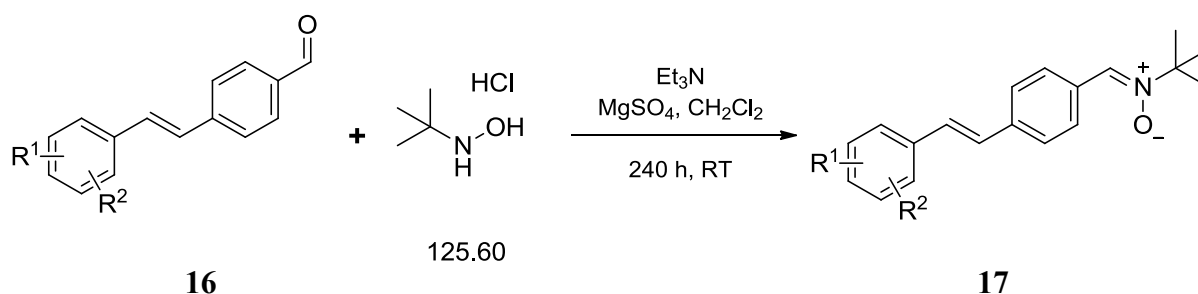


Abbildung 30: Weiterentwickelte Synthese zu Darstellung von substituierten Stilbennitronen **17**.

Tabelle 4: Abkürzungen und Ausbeuten synthetisierter Stilbennitronderivate **17**.

Eintrag	Abkürzung	17	R ¹	R ²	Ausbeute (%)
1	PNOMSN	17a	2-OMe	4-NO ₂	100
2	ONMMSN	17b	2-NO ₂	5-OMe	100
3	PNSN	17c	4-NO ₂	H	65 ^a
4	SN	17d	H	H	61 ^a
5	PMSN	17e	4-OMe	H	100
6	PSSN	17f	4-SO ₃ H	H	100
7	PCISN	17g	4-Cl	H	64 ^a
8	PDMASN	17h	4-NMe ₂	H	65 ^a

^a Isolierte Ausbeute von **17** nach der Aufreinigung via MPLC.

3.2 ESR-spektroskopische Untersuchungen der substituierten Stilbennitronen (17)

Vor ihrer biologischen Anwendung wurden die synthetisierten Stilbennitronderivate **17** im Modellsystem auf ihre Fähigkeit zum *spin trapping* hin untersucht. Hierzu wurden zwei Prozesse, die *in vivo* radikalische ROS generieren, *ex vivo* nachgestellt:

Fenton-Reaktion: Bildung von Hydroxylradikalen via Reduktion von Wasserstoffperoxid durch Fe(II):

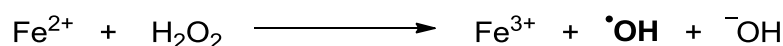


Abbildung 31: Fenton-Reaktion zur Bildung von Hydroxylradikalen.

Xanthinoxidase (XO)-System: Bildung von Superoxidanionradikalen via XO-katalysierter Oxidation von Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure:

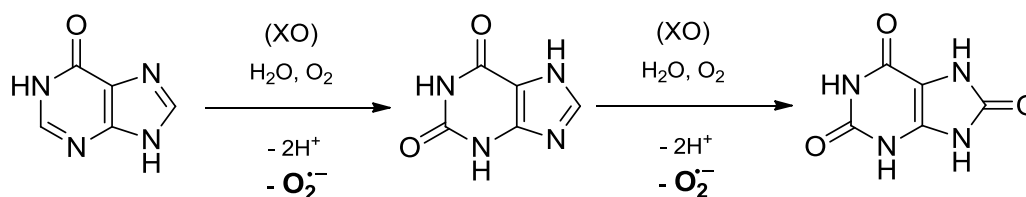


Abbildung 32: Xanthinoxidase-katalysierte Oxidation von Hypoxanthin über Xanthin zur Harnsäure unter Bildung von Superoxidanionradikalen.

Unter Normalbedingungen würden Superoxidanionradikale, gemäß der Haber-Weiss-Reaktion, bereits mit Spuren von Fe^{3+} oder Cu^{2+} weiter zu Hydroxylradikalen reagieren (Kap. 1.1.2, Abbildung 2). Um dem entgegenzuwirken wurde der Chelator DTPA (Diethylen-triaminpentaessigsäure) dem System zugesetzt.

Für die folgenden EPR-spektroskopischen Untersuchungen wurde eine neue Methode zur Probenaufbereitung etabliert. Dabei war es essentiell vollständig entgaste Lösungsmittel zu verwenden, da im Spektrum eine sauerstoffbedingte Linienverbreiterung (paramagnetischer Triplett-Sauerstoff; $\cdot\bar{\text{O}}-\bar{\text{O}}\cdot$) die Auflösung der weiteren Hyperfeinkopplung mit dem β -H-Nucleus (Dupletts) erschwert wird.

Zunächst wurden 1 mM Lösungen der Nitrone **17** in entgastem Ethylacetat (500 µl), mit einer wässrigen Fenton-Lösung oder gepufferten Hypoxanthin / Xanthinoxidase-Suspension derselben Menge (je 10 mM) für 5 bzw. 10 min inkubiert (Kuppusamy & Zweier, 1989).

Da bei der Probenvorbereitung nicht dauerhaft unter Inertgasatmosphäre gearbeitet werden konnte, wurde die separierte, organische Phase mittels längerer Stickstoffeinleitung zusätzlich entgast und so gleichzeitig auf etwa 100 µl (5 mM) aufkonzentriert. Die Vermessung der jeweiligen Proben erfolgte in Schutzgas gefluteten Glaskapillaren.

Die dabei verwendeten Parameter wurden, verglichen mit den literarischen Quellen, nur leicht variiert und sind im experimentellen Teil aufgeführt (Hauck, 2007; Leinisch, 2009).

3.2.1 ESR-spektroskopische Untersuchungen von PNOMSN (17a)

Mittels der ROS-generierenden Systeme (siehe Kap. 3.2) wurden die entsprechenden Nitroxylradikale (Spin-Addukte) von PNOMSN **17a** gebildet und in entgaster, organischer Phase mit 10 Scans vermessen (Abbildung 33):

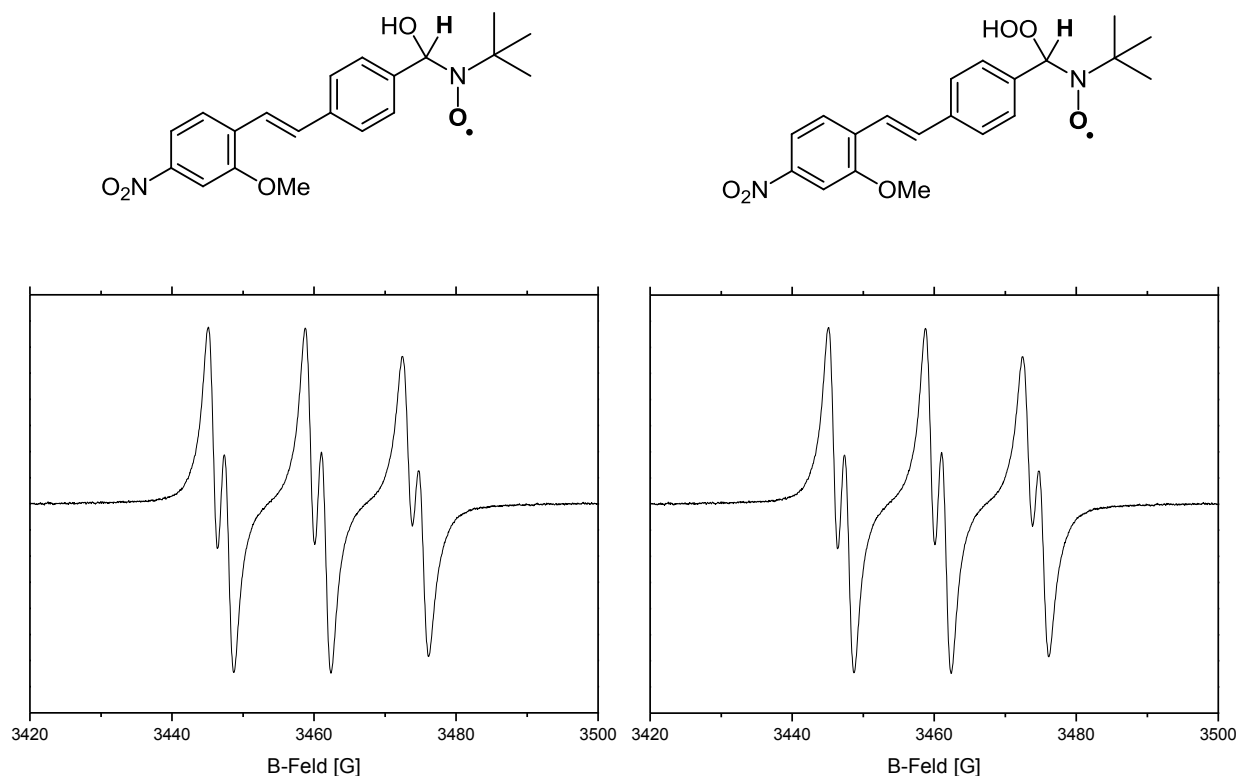


Abbildung 33: Strukturen und EPR-Spektren der Hydroxid- und Hydroperoxid-Addukte von PNOMSN **17a**.

Es wurden für Nitroxylradikale typische drei Linien-Signale detektiert. Für das OH-Addukt (Abbildung 33, links) wurde eine Hyperfeinkopplungskonstante von $a_N = 13.69$ G bestimmt. Die weitere Aufspaltung durch β -H-Kopplung ergab eine Konstante von $a_H = 2.28$ G. Für das Hydroperoxid-Addukt (Abbildung 33, rechts) wurde eine Hyperfeinkopplungskonstante von $a_N = 13.67$ G ermittelt, welche wiederum durch β -H-Kopplung in $a_H = 2.30$ G aufgespalten wurde.

3.2.2 ESR-spektroskopische Untersuchungen von ONMMSN (17b)

Mittels der radikalgenerierenden Systeme (vgl. Kap. 3.2) wurden die entsprechenden Nitroxylradikale (Spin-Addukte) von ONMMSN **17b** gebildet und in entgaster, organischer Phase mit 10 Scans vermessen (Abbildung 34):

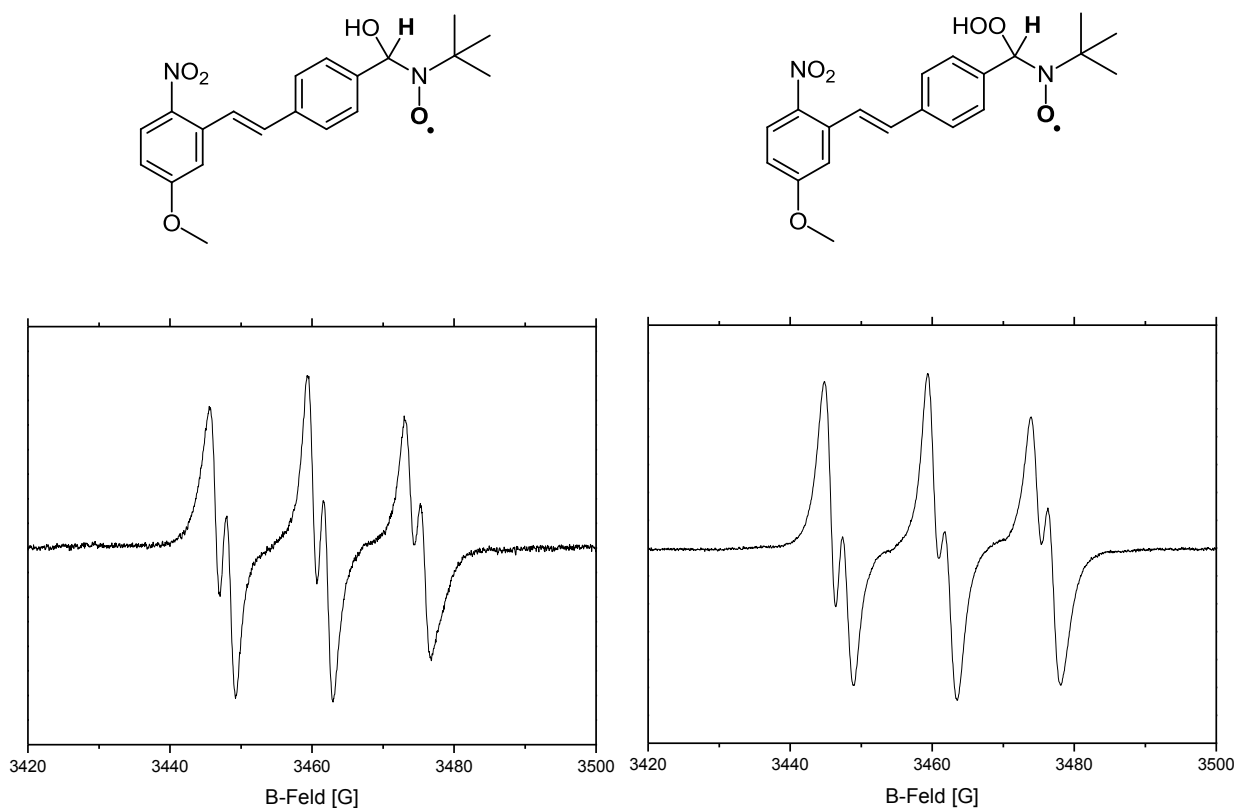


Abbildung 34: Strukturen und EPR-Spektren der Hydroxid- und Hydroperoxid-Addukte von ONMMSN **17b**.

Es wurden für Nitroxylradikale typische drei Linien-Signale detektiert. Für das OH-Addukt (Abbildung 34, links) wurde eine Hyperfeinkopplungskonstante von $a_N = 13.75$ G bestimmt. Die weitere Aufspaltung durch β -H-Kopplung ergab eine Konstante von $a_H = 2.26$ G. Für das Hydroperoxid-Addukt (Abbildung 34, rechts) wurde eine Hyperfeinkopplungskonstante von $a_N = 13.63$ G ermittelt, welche wiederum durch β -H-Kopplung in $a_H = 2.24$ G aufgespalten wurde.

3.2.3 ESR-spektroskopische Untersuchungen von PNSN (17c)

Mittels der radikalgenerierenden Systeme (vgl. Kap. 3.2) wurden die entsprechenden Nitroxylradikale (Spin-Addukte) von PNSN **17c** gebildet und in entgaster, organischer Phase mit 10 Scans vermessen (Abbildung 35):

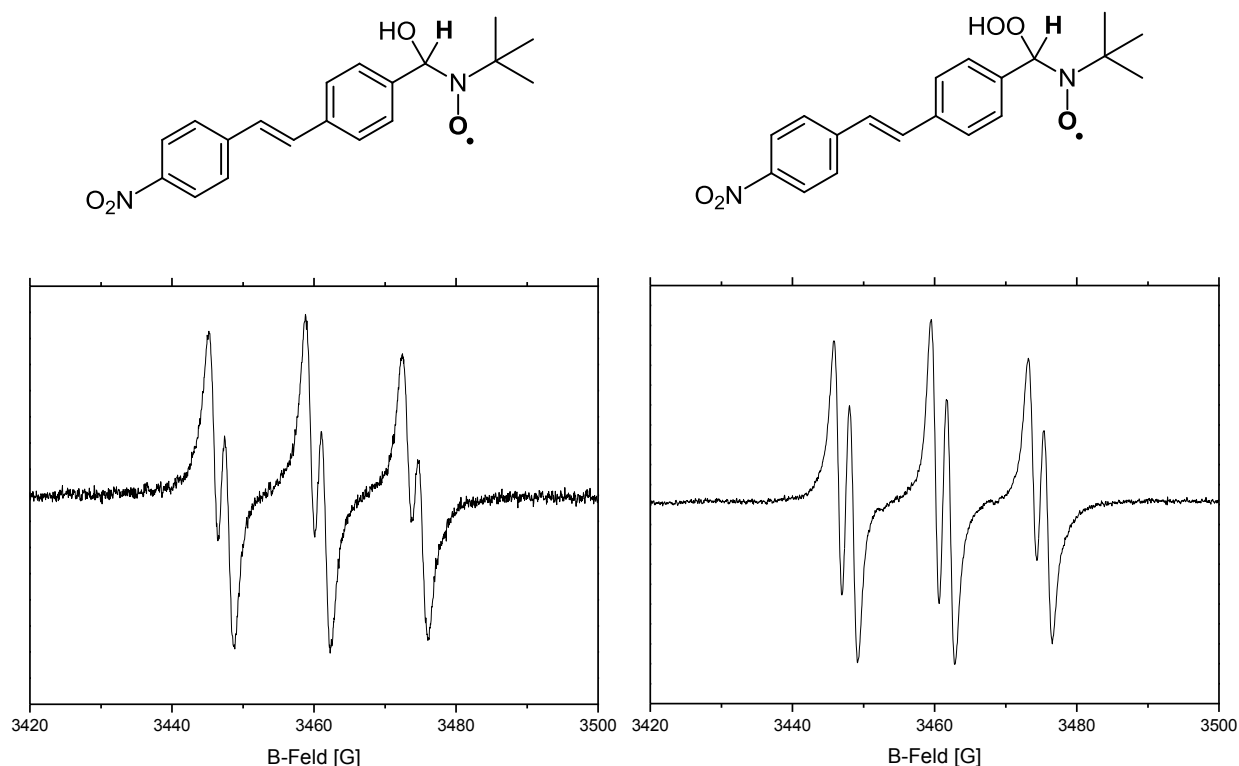


Abbildung 35: Strukturen und EPR-Spektren der Hydroxid- und Hydroperoxid-Addukte von PNSN **17c**.

Es wurden für Nitoxylradikale typische drei Linien-Signale detektiert. Für das OH-Addukt (Abbildung 35, links) wurde eine Hyperfeinkopplungskonstante von $a_N = 13.67$ G bestimmt. Die weitere Aufspaltung durch β -H-Kopplung ergab eine Konstante von $a_H = 2.19$ G. Für das Hydroperoxid-Addukt (Abbildung 35, rechts) wurde eine Hyperfeinkopplungskonstante von $a_N = 14.57$ G ermittelt, welche wiederum durch β -H-Kopplung in $a_H = 2.52$ G aufgespalten wurde.

3.2.4 ESR-spektroskopische Untersuchungen von SN (17d)

Mittels der radikalgenerierenden Assays (vgl. Kap. 3.2) wurden die entsprechenden Nitroxylradikale (Spin-Addukte) von SN **17d** hergestellt und in entgaster, organischer Phase mit 10 Scans vermessen (Abbildung 36):

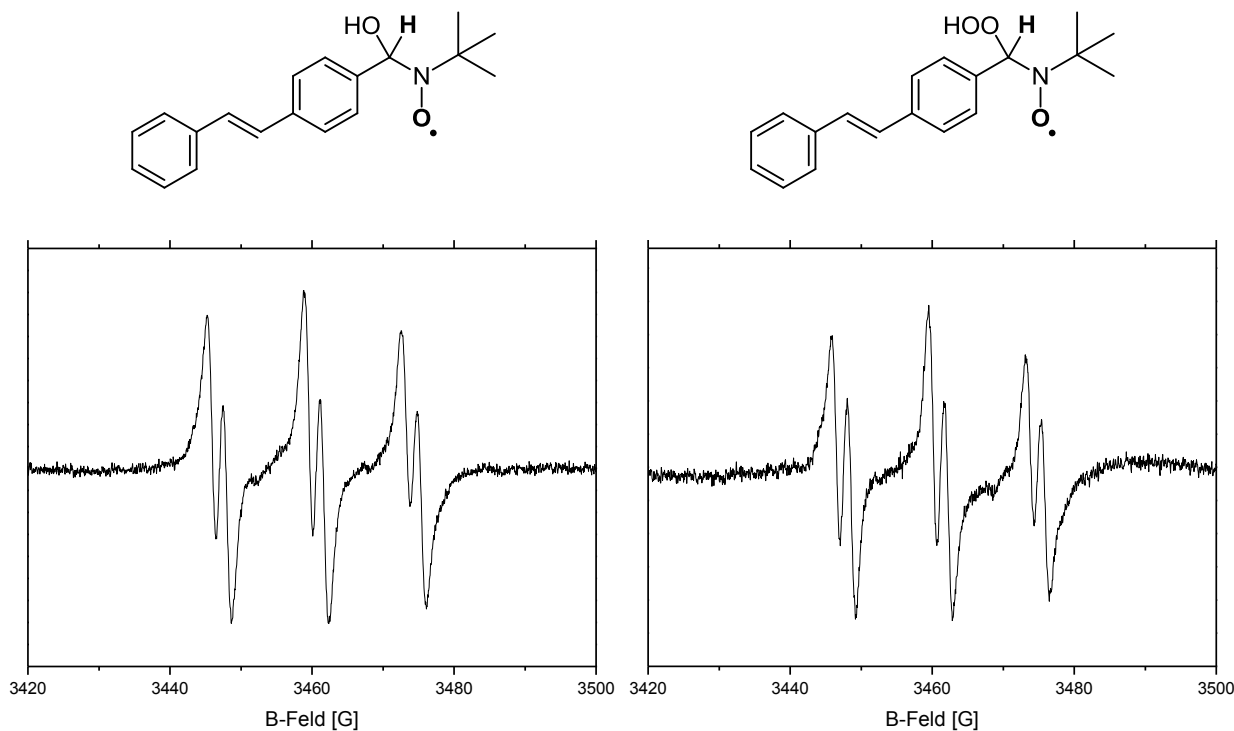


Abbildung 36: Strukturen und EPR-Spektren der Hydroxid- und Hydroperoxid-Addukte von SN **17d**.

Es wurden für Nitroxylradikale typische drei Linien-Signale detektiert. Für das OH-Addukt (Abbildung 36, links) wurde eine Hyperfeinkopplungskonstante von $a_N = 13.69$ G bestimmt. Die weitere Aufspaltung durch β -H-Kopplung ergab eine Konstante von $a_H = 2.24$ G. Für das Hydroperoxid-Addukt (Abbildung 36, rechts) wurde eine Hyperfeinkopplungskonstante von $a_N = 13.66$ G ermittelt, welche wiederum durch β -H-Kopplung in $a_H = 2.20$ G aufgespalten wurde.

3.2.5 ESR-spektroskopische Untersuchungen von PMSN (17e)

Mittels der radikalgenerierenden Assays (vgl. Kap. 3.2) wurden die entsprechenden Nitroxylradikale (Spin-Addukte) von PMSN **17e** gebildet und in entgaster, organischer Phase mit 10 Scans vermessen (Abbildung 37):

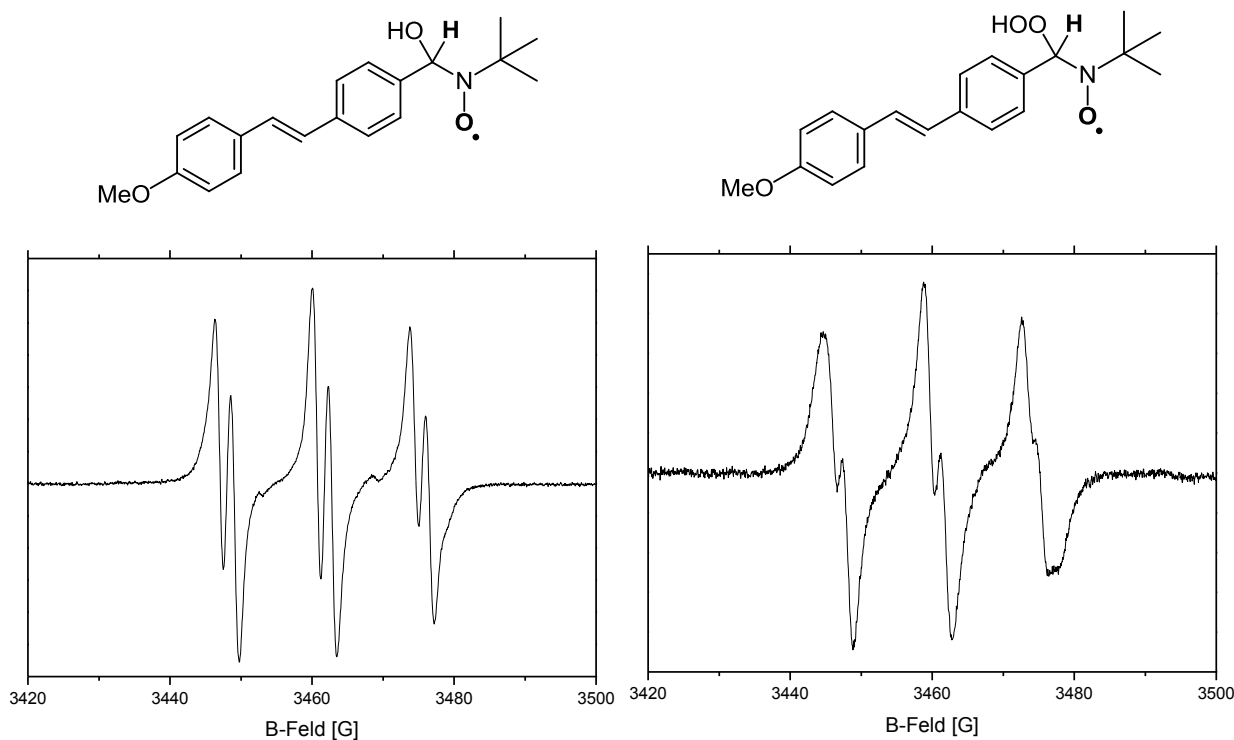


Abbildung 37: Strukturen und EPR-Spektren der Hydroxid- und Hydroperoxid-Addukte von PMSN **17e**.

Es wurden für Nitoxylradikale typische drei Linien-Signale detektiert. Für das OH-Addukt (Abbildung 37, links) wurde eine Hyperfeinkopplungskonstante von $a_N = 13.72$ G bestimmt. Die weitere Aufspaltung durch β -H-Kopplung ergab eine Konstante von $a_H = 2.22$ G. Für das Hydroperoxid-Addukt (Abbildung 37, rechts) wurde eine Hyperfeinkopplungskonstante von $a_N = 14.06$ G ermittelt, welche wiederum durch β -H-Kopplung in $a_H = 2.45$ G aufgespalten wurde.

3.2.6 ESR-spektroskopische Untersuchungen von PSSN (17f)

Mittels der radikalgenerierenden Assays (vgl. Kap. 3.2) wurden die entsprechenden Nitroxylradikale (Spin-Addukte) von PSSN **17f** hergestellt und in entgaster, organischer Phase mit 10 Scans vermessen (Abbildung 38):

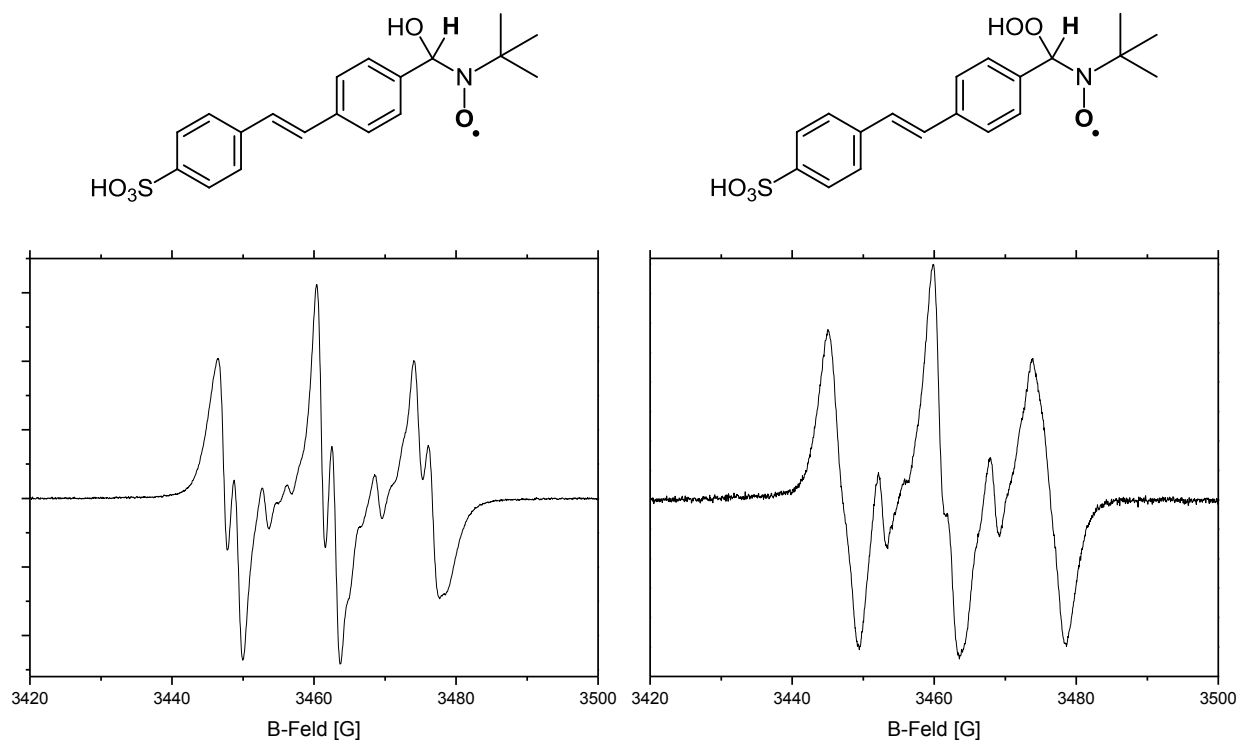


Abbildung 38: Strukturen und EPR-Spektren der Hydroxid- und Hydroperoxid-Addukte von PSSN **17f**.

Es wurden für Nitoxylradikale typische drei Linien-Signale detektiert. Für das OH-Addukt (Abbildung 38, links) wurde eine Hyperfeinkopplungskonstante von $a_N = 13.81$ G bestimmt. Die weitere Aufspaltung durch β -H-Kopplung ergab eine Konstante von $a_H = 2.13$ G. Für das Hydroperoxid-Addukt (Abbildung 38, rechts) wurde eine Hyperfeinkopplungskonstante von $a_N = 13.81$ G ermittelt. Trotz mehrfachen Entgasens und wiederholter Durchführung konnte hierfür keine Kopplung des Radikals mit dem β -Wasserstoffkern aufgelöst werden. In beiden Spektren sind zusätzliche, unerwartete Signale bei 3452 G, 3460 G und 3468 G zu erkennen, die durch eine etwaige Verunreinigung, bzw. aufgrund von schlechter Löslichkeit (da Suspension) und somit intermolekularer Kopplung, zustande gekommen sein könnten.

3.2.7 ESR-spektroskopische Untersuchungen von PCISN (17g)

Mittels der radikalgenerierenden Assays (vgl. Kap. 3.2) wurden die entsprechenden Nitroxylradikale (Spin-Addukte) von PCISN **17g** hergestellt und in entgaster, organischer Phase mit 10 Scans vermessen (Abbildung 39):

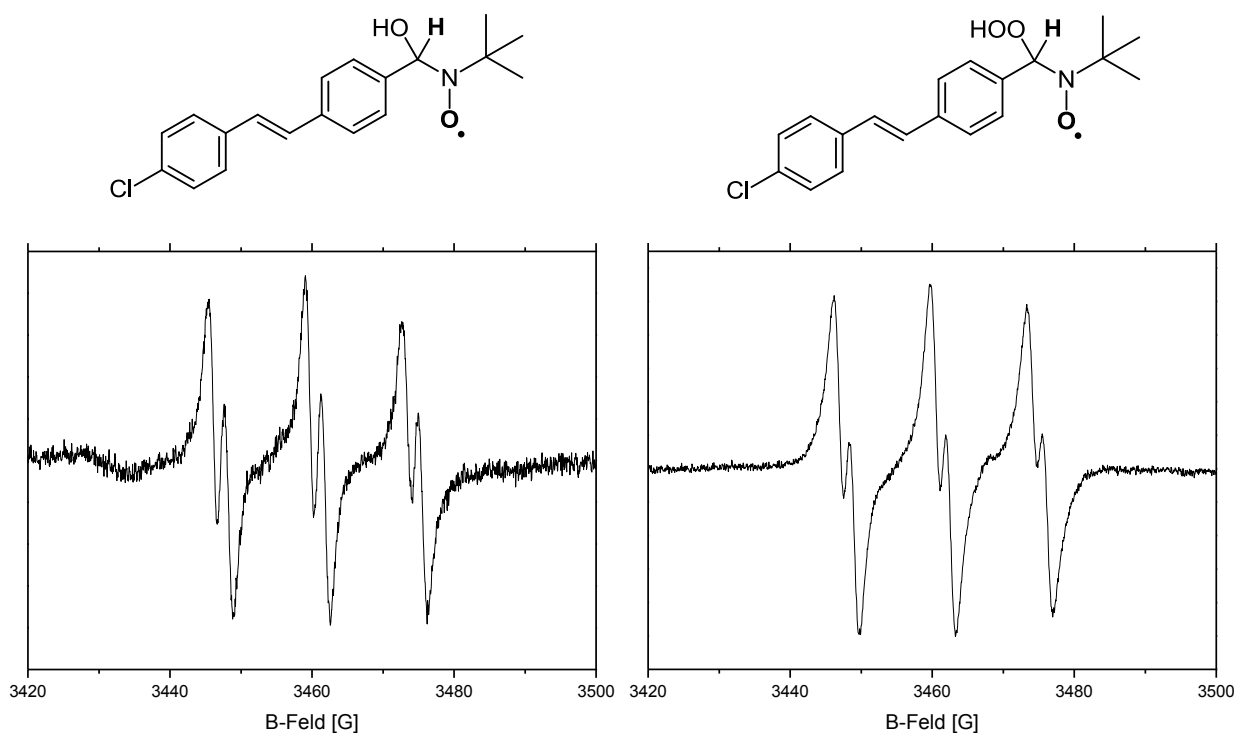


Abbildung 39: Strukturen und EPR-Spektren der Hydroxid- und Hydroperoxid-Addukte von PCISN **17g**.

Es wurden für Nitoxylradikale typische drei Linien-Signale detektiert. Für das OH-Addukt (Abbildung 39, links) wurde eine Hyperfeinkopplungskonstante von $a_N = 13.67$ G bestimmt. Die weitere Aufspaltung durch β -H-Kopplung ergab eine Konstante von $a_H = 2.25$ G. Für das Hydroperoxid-Addukt (Abbildung 39, rechts) wurde eine Hyperfeinkopplungskonstante von $a_N = 13.51$ G ermittelt, welche wiederum durch β -H-Kopplung in $a_H = 2.24$ G aufgespalten wurde.

3.2.8 ESR-spektroskopische Untersuchungen von PDMASN (17h)

Mittels der radikalgenerierenden Assays (vgl. Kap. 3.2) wurden die entsprechenden Nitroxylradikale (Spin-Addukte) von PDMASN **17h** gebildet und in entgaster, organischer Phase mit 10 Scans vermessen (Abbildung 40):

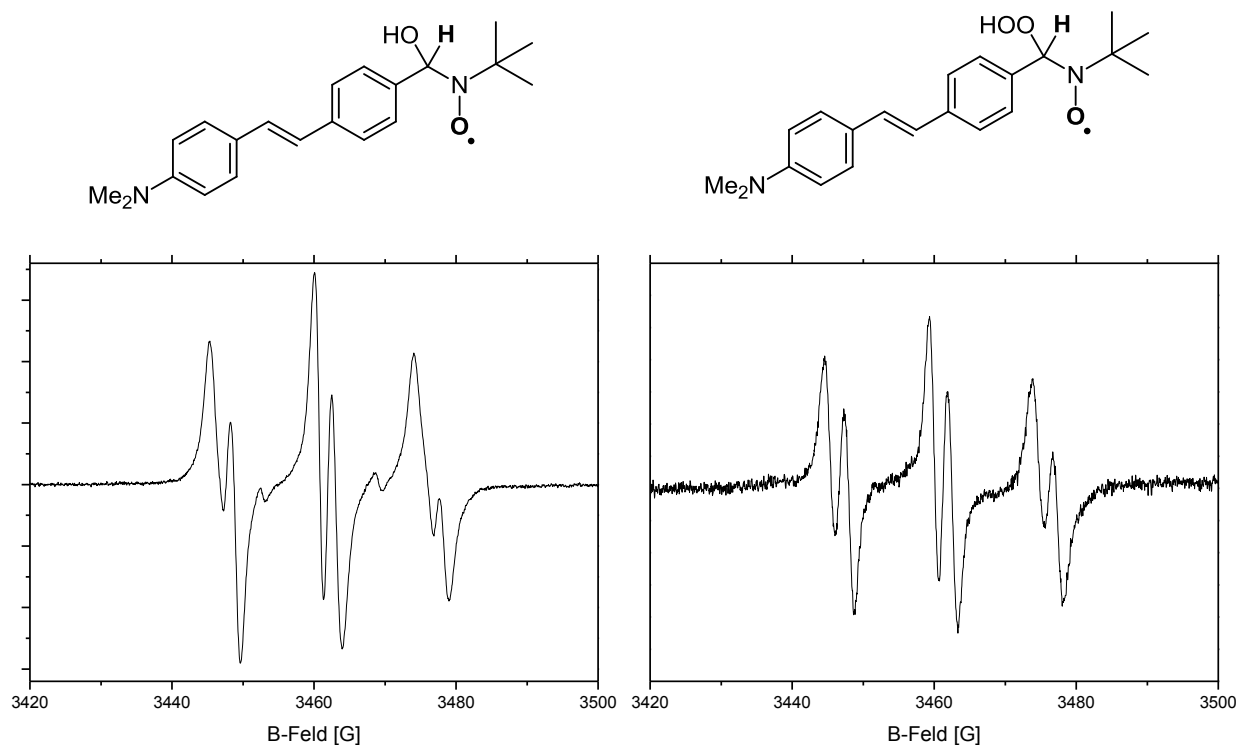


Abbildung 40: Strukturen und EPR-Spektren der Hydroxid- und Hydroperoxid-Addukte von PDMASN **17h**.

Es wurden für Nitroxylradikale typische drei Linien-Signale detektiert. Für das OH-Addukt (Abbildung 40, links) wurde eine Hyperfeinkopplungskonstante von $a_{\text{N}} = 14.49$ G bestimmt. Die weitere Aufspaltung durch β -H-Kopplung ergab eine Konstante von $a_{\text{H}} = 2.78$ G. Für das Hydroperoxid-Addukt (Abbildung 40, rechts) wurde eine Hyperfeinkopplungskonstante von $a_{\text{N}} = 14.67$ G ermittelt, welche wiederum durch β -H-Kopplung in $a_{\text{H}} = 2.66$ G aufgespalten wurde. In beiden Spektren sind zusätzliche, unerwartete Signale bei 3452 G, 3460 G und 3468 G zu erkennen. Neben den zuvor (Kap. 3.2.6) erläuterten Gründen, wurde hier zunächst eine Kopplung mit dem ^{14}N -Kern des *p*-Dimethylamino-Substituenten postuliert. Da die Signale jedoch identisch (hier weniger ausgeprägt) mit denen in Kap 3.2.6 sind, scheint eine Verunreinigung am wahrscheinlichsten zu sein.

3.2.9 Diskussion der ESR-spektroskopischen Untersuchungen von Stilbennitronen (17)

Für alle synthetisierten Stilbennitronderivate **17** konnte nachgewiesen werden, dass diese in der Lage sind als *spin traps* zu fungieren und mit verschiedenen, radikalischen ROS, EPR-spektroskopisch detektierbare Nitroxylradikale zu bilden. Im Vergleich zu vorherigen Arbeiten auf dem Gebiet der fluoreszierenden *spin traps*, wurden sehr deutliche Dupletts und erstmals gut aufgelöste Spektren der Hydroperoxyl-Addukte erhalten. In allen Spektren (Kap. 3.2) ist im Hochfeldbereich eine leichte Abnahme der Signalintensität zu beobachten. Diese lässt auf hohe Konzentrationen schließen (Hauck, 2007).

Vergleicht man die ermittelten Hyperfeinkopplungskonstanten der Hydroxid- und Hydroperoxid- Addukte von **17a-h** miteinander, erkennt man weder für die a_N -, noch für die a_H -Werte eindeutigen Tendenzen. In diesen Fällen ist somit eine EPR-spektroskopische Bestimmung der addierten ROS nicht möglich. Die Größenordnung der OH-Addukte ergibt jedoch eine gute Übereinstimmung mit den Kopplungskonstanten von PBN **3** (Buettner, 1987).

Tabelle 5: Vergleich der Hyperfeinkopplungskonstanten von **17a-h** mit PBN **3**.

Abkürzung	Nitron	OH-Addukt ^a		OOH-Addukt ^a	
		a_N / G	a_H / G	a_N / G	a_H / G
PBN ^b	3	13.71	2.10	14.90	4.28
PNOMSN	17a	13.69	2.28	13.67	2.30
ONMMSN	17b	13.75	2.26	13.63	2.24
PNSN	17c	13.67	2.19	14.57	2.52
SN	17d	13.69	2.24	13.66	2.20
PMSN	17e	13.72	2.22	14.06	2.45
PSSN	17f	13.81	2.13	13.81	---
PCISN	17g	13.67	2.25	13.51	2.24
PDMASN	17h	14.49	2.78	14.67	2.66

^a Vermessen in EtOAc

^b (Buettner, 1987)

3.3 Untersuchung der optischen Eigenschaften von Stilbennitronderivaten (17)

Zur Untersuchung der synthetisierten Stilbennitrone **17** auf deren Absorptions- und Emissionsverhalten wurden jeweils 100 μM EtOAc-Lösungen am UV / Vis-Spektrometer vermessen. Für die Messungen am Fluoreszenzspektrometer wurden diese Lösungen auf 1 μM verdünnt.

3.3.1 Absorptions- und Emissionsspektrum von PNOMSN (17a)

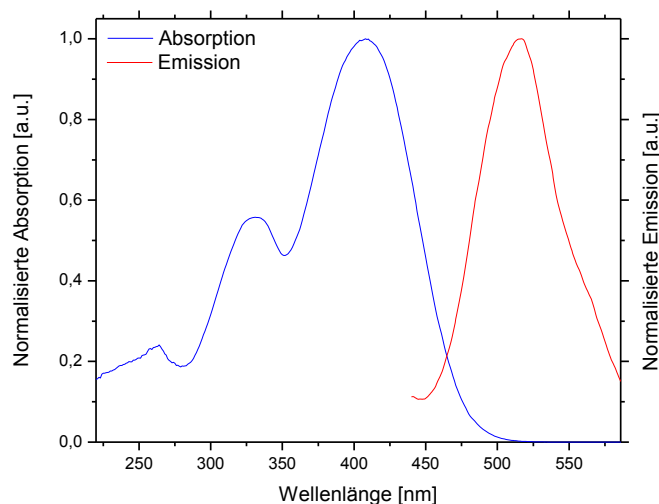


Abbildung 41: Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von PNOMSN **17a** in Ethylacetat.

Das Absorptionsspektrum (Abbildung 41, blau) zeigt drei Banden mit einem globalen Maximum bei 395 nm und weiteren lokalen Maxima bei 326 nm und 261 nm. Bei einer Anregungswellenlänge von 395 nm, als auch 405 nm, welche der des UV-Lasers für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen (Kap. 3.6) entspricht, wurde eine starke Emissionsbande, mit einem Maximum bei 516 nm detektiert (Abbildung 41, rot). Bei der Anregung mit einer Wellenlänge des nächst niederfrequenten Lasers von 488 nm, wurde eine für mikroskopische Untersuchungen ungenügend schwache Emission registriert.

3.3.2 Absorptions- und Emissionsspektrum von ONMMSN (17b)

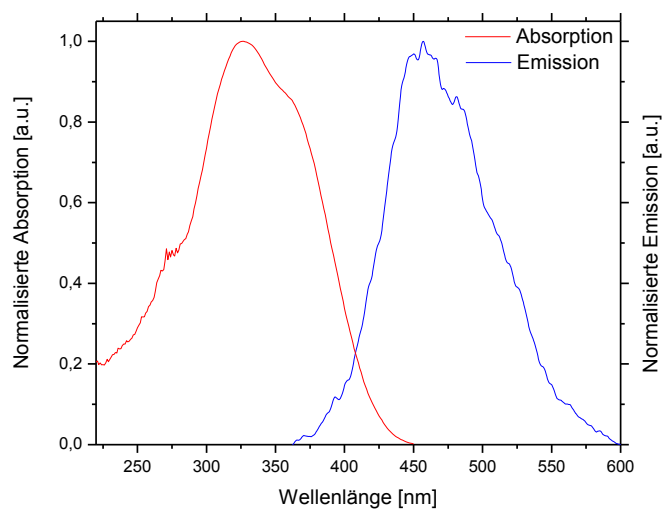


Abbildung 42: Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von ONMMSN **17b** in Ethylacetat.

Das Absorptionsspektrum (Abbildung 42, blau) zeigt zwei Banden mit einem globalen Maximum bei 326 nm und einem weiteren lokalen Maximum bei 363 nm. Bei einer Anregungswellenlänge von 326 nm wurde eine Emissionsbande mit einem Maximum bei 444 nm detektiert (Abbildung 42, rot).

3.3.3 Absorptions- und Emissionsspektrum von PNSN (17c)

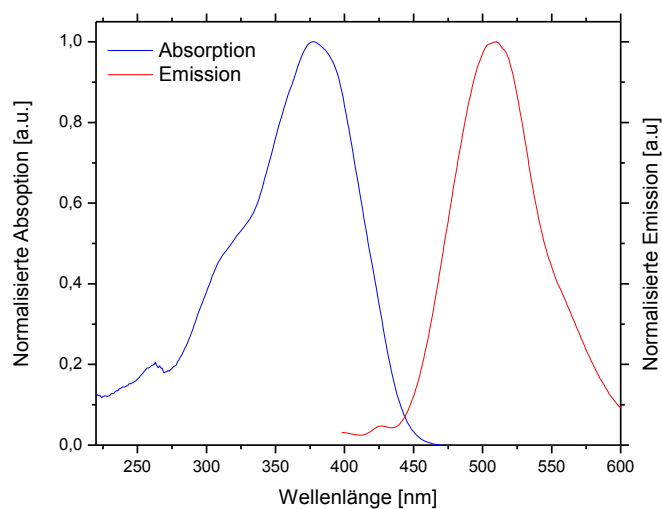


Abbildung 43: Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von PNSN **17c** in Ethylacetat.

Das Absorptionsspektrum (Abbildung 43, blau) zeigt zwei Banden mit einem globalen Maximum bei 378 nm und weitere lokale Maxima bei 317 nm und 262 nm. Bei einer Anregungswellenlänge von 378 nm wurde eine Emissionsbande mit einem Maximum bei 510 nm detektiert (Abbildung 43, rot).

3.3.3.1 Vergleich der Absorptions- und Emissionsmaxima von PNOMSN (17a), ONMMSN (17b) und PNSN (17c)

Im Vergleich mit dem von Hauck untersuchten PNSN **17c**, wurden PNOMSN **17a** und ONMMSN **17b** so konzipiert, dass sich deren Absorptionsmaxima so stark rot verschieben sollten, damit eine Laseranregung mit 488 nm möglich ist. Anhand der Literaturwerte für die Absorptionen von Nitrobenzol und *meta*- bzw. *para*-Nitroanisol konnte von einer bathochromen Verschiebungen um ca. 60 bzw. 40 nm ausgegangen werden (Breitmaier & Jung, 2005; Hesse, Mayer & Zeeh, 2005; NIST Chemistry WebBook, 2016).

Die Rotverschiebung der Absorption von PNOMSN **17a** beläuft sich jedoch auf 17 nm, weshalb auch für die folgende, biologische Anwendung (Kap. 3.6) ein UV-Laser zu dessen Anregung verwendet wurde. Die zusätzliche Funktionalisierung könnte jedoch auch einen Einfluss auf die zelluläre Akkumulation der *spin trap* **17a** haben. Zudem eignet sich Verbindung **17a** sehr gut für Vergleichsstudien mit PNSN **17c**.

Die stark hypsochrome Verschiebung der Absorption (um 52 nm), sowie der Emission (um 66 nm) von ONMMSN **17b** und somit auch die große Differenz zum entsprechenden Konstitutionsisomer (Regioisomer) PNOMSN **17a** (Abs. 69 nm, Em. 72 nm) war nicht abzusehen. Erwartet wurde eine maximale Blauverschiebung um etwa 20 nm (NIST Chemistry WebBook, 2016).

Zur Erklärung dieses Phänomens war zunächst von einer *cis*-Isomerisierung des ONMMSN **17b** auszugehen, da erfahrungsgemäß eine längere Lichtexposition dies bewirken kann. Zudem spricht die sterisch anspruchsvolle Nitrogruppe in *ortho*-Position für eine verstärkte Wechselwirkung mit der Vinyl-Komponente. Schon bei der Synthese von ONMMSA **16b** war anhand der prozentualen Ausbeutenverhältnisse von (*E*)-**16b** zu (*Z*)-**16b** in Tabelle 2 (Kap. 3.1.5.3), eine verstärkte Tendenz zum *cis*-Isomer (*Z*)-**16b** zu erkennen.

Innerhalb von *cis*-Stilbenen kommt es zu einer VAN-DER-WAALS-Abstoßung der *o,o'*-H-Atome, die einen Phenyl-Ring aus der Koplanarität des restlichen Moleküls hinauszwingt. Infolge dieser Verdrillung (30°, sog. Propellerform) können sich die Kohlenstoff-*p*-Orbitale im (*Z*)-Stilben nicht mehr coaxial überlappen. *cis*-Stilbene absorbieren daher weniger stark (hypochromer Effekt) und kurzwelliger (15 nm) als *trans*-Stilbene (Breitmaier & Jung, 2005).

3.3.3.2 NMR-spektroskopische Interpretationen der 3D-Struktur von ONMMSN (17b)

Nach ^1H -NMR-spektroskopischer Analytik von ONMMSN **17b** wurde der vicinal olefinischen Kopplung eine Konstante von $^3J_{\text{HH}} = 16.4$ Hz zugeordnet. Nach der KARPLUS-Beziehung, welche die Abhängigkeit solcher Kopplungen vom Diederwinkel ϕ beschreibt, liegt dieser Wert im Bereich für *trans*-Konfigurationen (*Z*-Konfig. = 7 – 12 Hz; *E*-Konfig. = 14 – 19 Hz; Karplus, 1963).

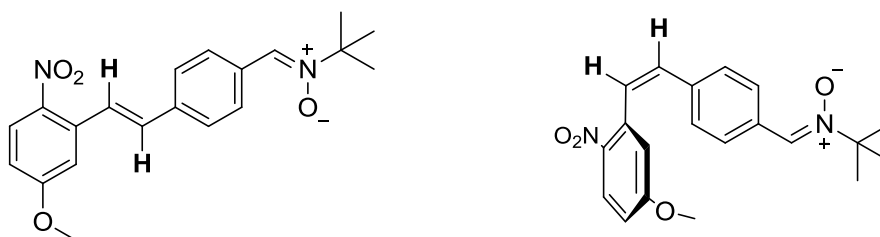


Abbildung 44: Vicinal olefinische 3J -Kopplung der *cis* / *trans* - Isomere von ONMMSN **17b**. Bestätigt wurde die (*E*)-Konfiguration mittels der *nuclear Overhauser enhancement (and exchange) spectroscopy* (NOESY). Die eingesetzte Aldehydvorstufe (**Z**)-**16b**, welche chromatographisch vom entsprechenden Konfigurationsisomer (**E**)-**16b** getrennt wurde (Kap. 3.1.5.3), wurde dafür auf diese Weise vermessen. Bei dieser Art der zweidimensionalen ^1H -NMR-Spektroskopie wechselwirken räumlich benachbarte Wasserstoffkerne miteinander, falls deren Kernspins nicht skalar miteinander koppeln (ohne *J*-Kopplung). Besonders aufschlussreich war hierbei der *nuclear Overhauser effect* (NOE; blau) zwischen den rot markierten *o,o'*-Protonen (Abbildung 45).

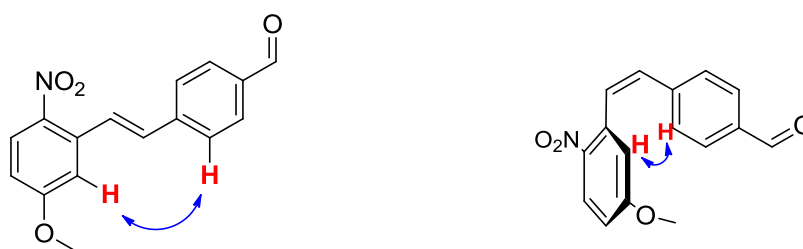


Abbildung 45: Vergleich des NOE von *o,o'*-Protonen bei *cis*- und *trans*-ONMMSN ((**Z**)- und (**E**)-**16b**).

Im gemessenen 2D-NOESY-Spektrum ist bei Standardeinstellungen des NMR-Analyseprogramms (*ACD / NMR Processor*) keine Kopplungen der *o,o'*-H-Atomkerne zu erkennen (Abbildung 46; räumliche Kopplungen werden hier in Höhenkurven, von grün über gelb zu rot dargestellt)

Im vergrößerten, aromatischen Ausschnitt sind die Bereiche in denen Signale zu erwarten waren in blau markiert (Abbildung 46). Erst nach rechnerischer Verstärkung aller Wechselwirkungen sind dort schwache Kopplungen zu erkennen (Abbildung 47).

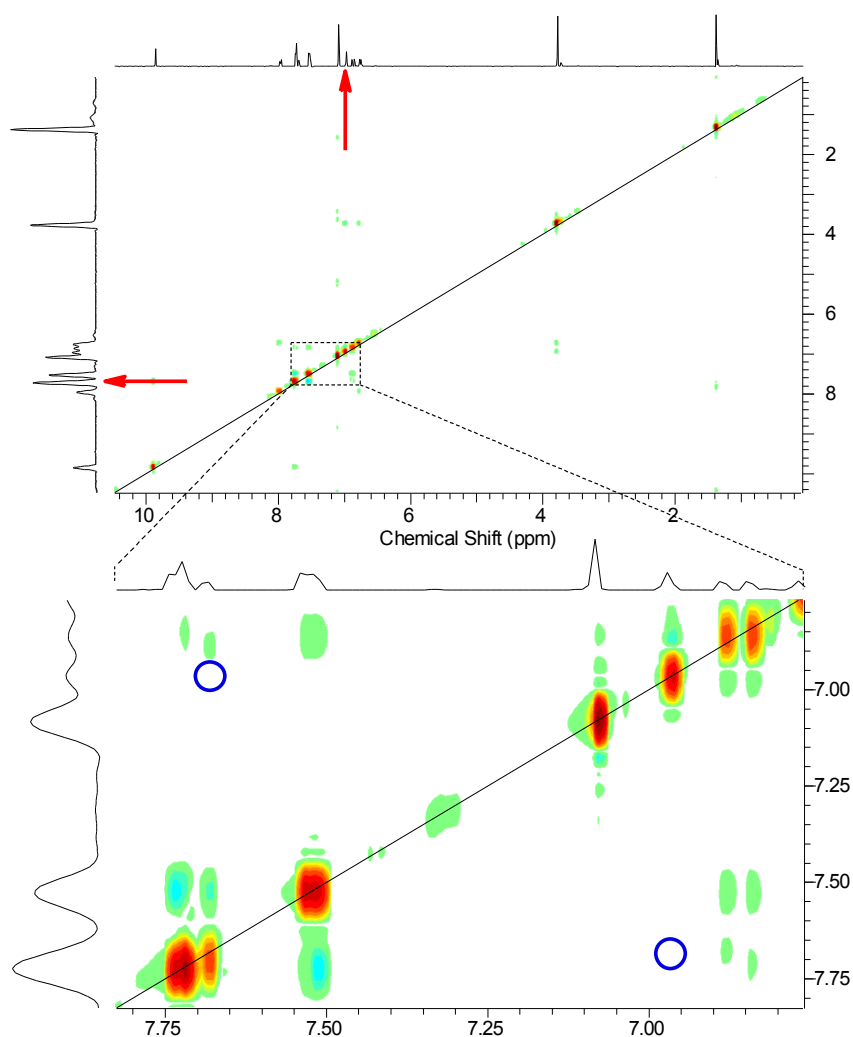


Abbildung 46: 2D-NOESY-Spektrum von ONMMSN **17b**.

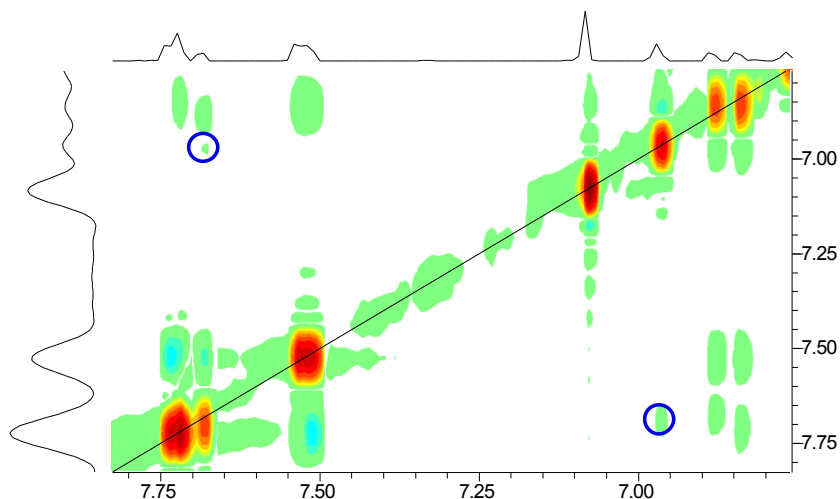


Abbildung 47: Aromatischer Bereich des 2D-NOESY-Spektrums von ONMMSN **17b** mit verstärkter Kopplungsauflösung.

Da bei (*Z*)-Stilbenen sich die *ortho*-H-Atome so nah kommen, dass dies zu einer Verdrillung führt, die das Molekül aus seiner Aromatizität heraus zwingt, kann man davon ausgehen, dass die Signale wesentlich intensiver sein sollten, als es in diesem Fall detektiert wurde (Abbildung 47).

Für die vergleichsweise, stark hypsochrome Verschiebung von Verbindung **17b**, kommt also weder die Summe der mesomeren Effekte, durch *para*-Stellung der Substituenten zueinander, noch eine *cis*-Isomerisierung infrage. Daher wurde eine einfache Struktur-optimierende Kraftfeldrechnung durchgeführt. Dabei konnte auch für die (*E*)-Konstitution von Stilben **17b** eine Torsion um den beschriebenen Winkel von etwa 30° beobachtet werden. Dies liefert jedoch auch keine vollständige Erklärung, weshalb quantentheoretische Rechnungen durchgeführt wurden.

3.3.3.3 *Ab initio* Rechnungen von ONMMSN (**17b**) und PNOMSN (**17a**)

Alle Berechnungen wurden von Dr. Andreas Molberg (FB Theoretische Chemie der TU Kaiserslautern; AK van Wüllen) durchgeführt.

Die Strukturen der Konstitutionsisomere ONMMSN **17b** und PNOMSN **17a** wurden mittels Berny Algorithmus optimiert (Peng *et al.*, 1996), welcher im Programmpaket Gaussian 09 implementiert ist (Frisch *et al.*, 2009). Lösungsmittelleffekte (EtOAc) wurden mittels COSMOS simuliert. Als Integrationsgitter (*grid*) wurde m4 gewählt.

Die Geometrieoptimierung von PNOMSN **17a** ergab eine vollständig planare Struktur. Bei (*E*)-ONMMSN **17b** wurde gezeigt, dass sich der substituierte Phenylring um 45.95° aus der Ebene dreht (Abbildung 48). Lösungsmittel-Effekte waren bei den Simulationen unbedeutend. Diese beeinflussen nur die absoluten Wellenzahlen bei elektronischen Anregungen, nicht jedoch die Relativen.

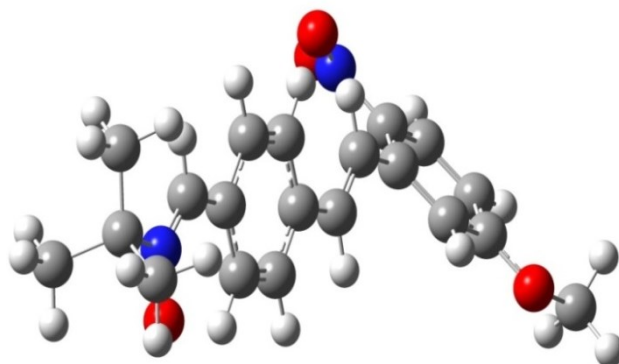


Abbildung 48: Kugel-Stab-Modell von ONMMSN **17b** nach Strukturoptimierung via Gaussian.

Die Methode zur Berechnung der Absorptionsmaxima (Übergangsenergien) war eine nichtrelativistische, zeitabhängige Dichtefunktionaltheorie (TDDFT), mit dem Funktional B3LYP (Miehlich *et al.*, 1989; gradientenkoriertes Austausch-Korrelationsfunktional) und dem Basissatz TZVP (Schäfer *et al.*, 1994). Die weiteren Rechnungen wurden mit dem Programmpaket TURBOMOLE (Version 6.5) erstellt (Ahlrichs *et al.*, 1989; Häser & Ahlrichs, 1989). Hierzu wurden die vertikalen elektronischen Anregungen, sowie der Dipoloperator in Längendarstellung, mittels (RI-)CC2 (*Resolution-of-the-identity*), berechnet (Hättig & Weigend, 2000). Als Basissatz und Hilfsbasis diente dabei ebenfalls TZVP. Es wurden nur Orbitale mit einer Orbitalenergie größer -3 Hartree explizit berücksichtigt. Die Kernorbitale waren bei allen Berechnungen eingefroren.

Neben den strukturoptimierten Verbindungen **17a** und **17b** wurden zu Vergleichszwecken auch die elektronischen Übergänge des theoretisch, planaren ONMMSN **17b** berechnet (Hättig & Köhn, 2002; Abbildung 49).

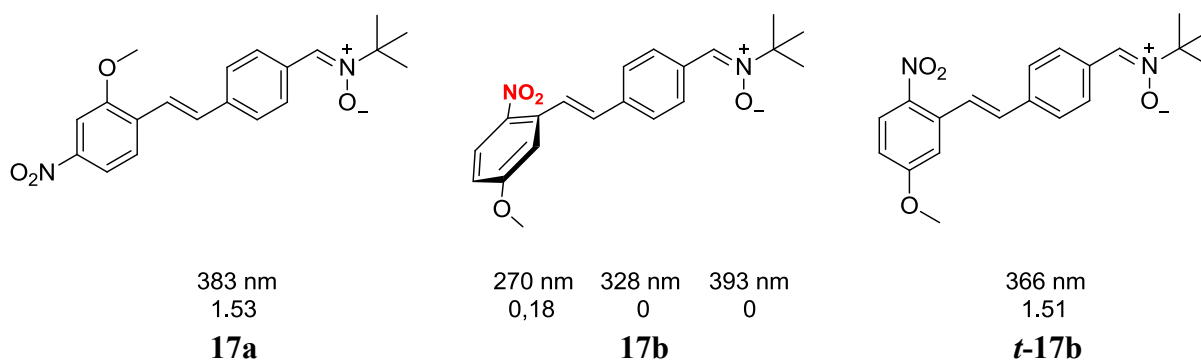


Abbildung 49: Quantentheoretisch, optimierte Strukturen von PNOMSN **17a**, ONMMSN **17b** und dem theoretisch, planaren ONMMSN **t-17b**; ergänzt durch die jeweiligen Energien (Wellenlänge in nm) und Intensitäten (a.u.) relevanter, elektronischer Übergänge.

Offensichtlich hat die Verdrillung des *o*-Nitro-substituierten Phenyl-Ringes in (*E*)-Stilben **17b** um 45.95° zur Folge, dass dessen *p*-Orbitale kaum noch mit denen des Styrylgerüsts überlappen. Daher sind auch keine elektronischen π -Übergänge zwischen diesen möglich.

Das detektierte Absorptionsmaximum von ONMMSN **17b** (326 nm) lässt sich somit dem „isolierten“ *p*-Nitroanisolrest (318 nm) zuordnen (NIST Chemistry WebBook, 2016).

3.3.4 Absorptions- und Emissionsspektrum von SN (17d)

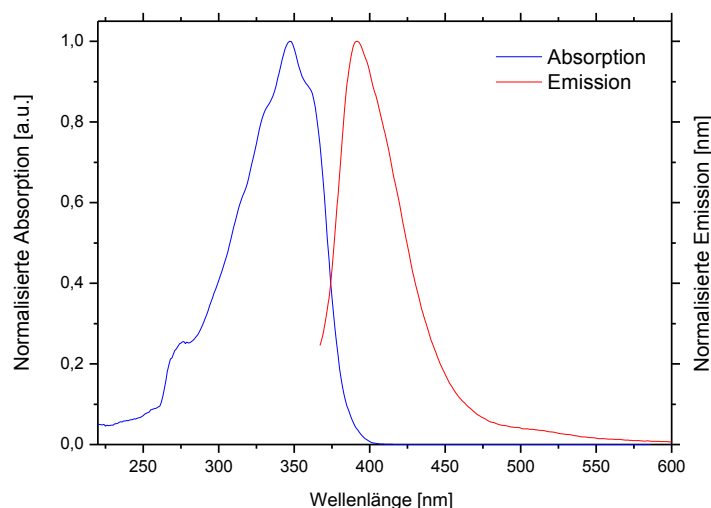


Abbildung 50: Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von SN **17d** in Ethylacetat.

Das Absorptionsspektrum (Abbildung 50, blau) zeigt vier Banden mit einem globalen Maximum bei 347 nm und weitere lokale Maxima bei 276 nm, 332 nm und 360 nm. Bei einer Anregungswellenlänge von 347 nm wurde eine Emissionsbande mit einem Maximum bei 392 nm detektiert (Abbildung 50, rot).

3.3.5 Absorptions- und Emissionsspektrum von PMSN (17e)

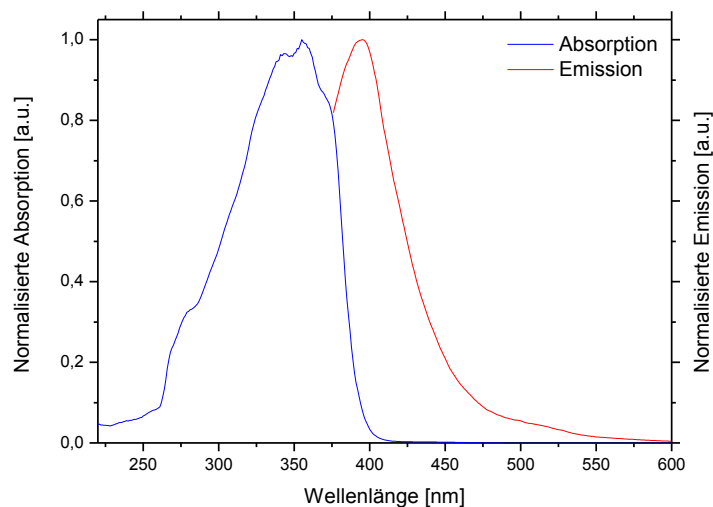


Abbildung 51: Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von PMSN 17e in Ethylacetat.

Das Absorptionsspektrum (Abbildung 51, blau) zeigt vier Banden mit einem globalen Maximum bei 356 nm und weitere lokale Maxima bei 279 nm, 334 nm und 369 nm. Bei einer Anregungswellenlänge von 356 nm wurde eine Emissionsbande mit einem Maximum bei 396 nm detektiert (Abbildung 51, rot).

3.3.6 Absorptions- und Emissionsspektrum von PSSN (17f)

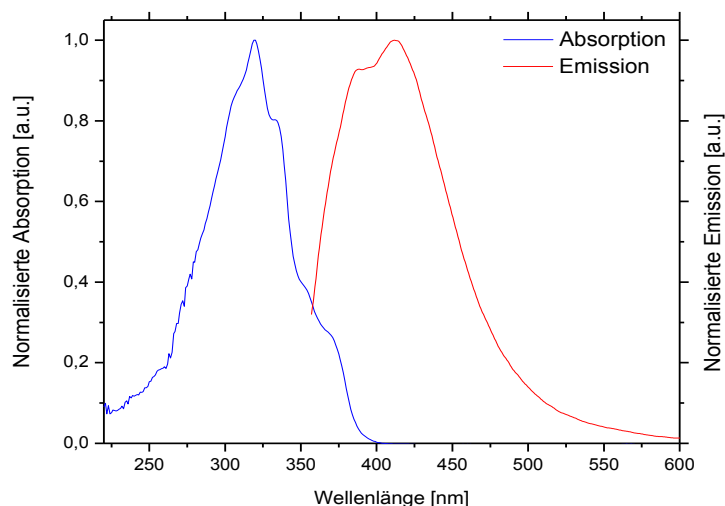


Abbildung 52: Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von PSSN 17f in Ethylacetat.

Das Absorptionsspektrum (Abbildung 52, blau) zeigt drei Banden mit einem globalen Maximum bei 319 nm und weitere lokale Maxima bei 334 nm und 368 nm. Bei einer Anregungswellenlänge von 319 nm wurde eine Emissionsbande mit einem Maximum bei 363 nm detektiert (Abbildung 52, rot).

3.3.7 Absorptions- und Emissionsspektrum von PCISN (17g)

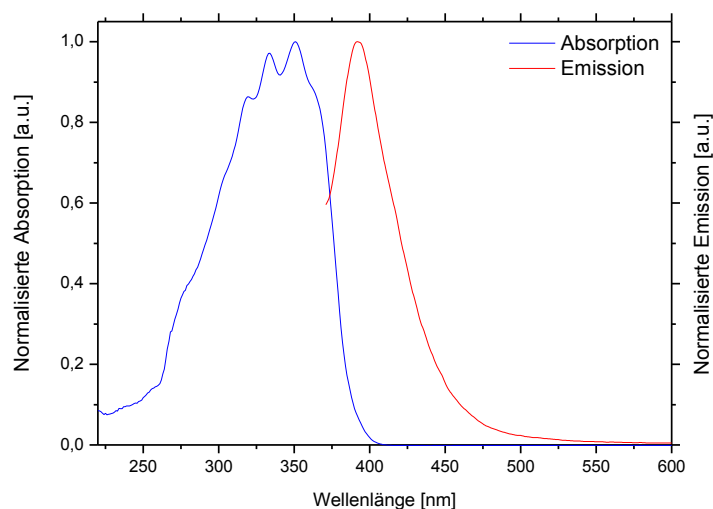


Abbildung 53: Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von PCISN 17g in Ethylacetat.

Das Absorptionsspektrum (Abbildung 53, blau) zeigt drei Banden mit einem globalen Maximum bei 319 nm und weitere lokale Maxima bei 334 nm und 368 nm. Bei einer Anregungswellenlänge von 319 nm wurde eine Emissionsbande mit einem Maximum bei 392 nm detektiert (Abbildung 53, rot).

3.3.8 Absorptions- und Emissionsspektrum von PDMASN (17h)

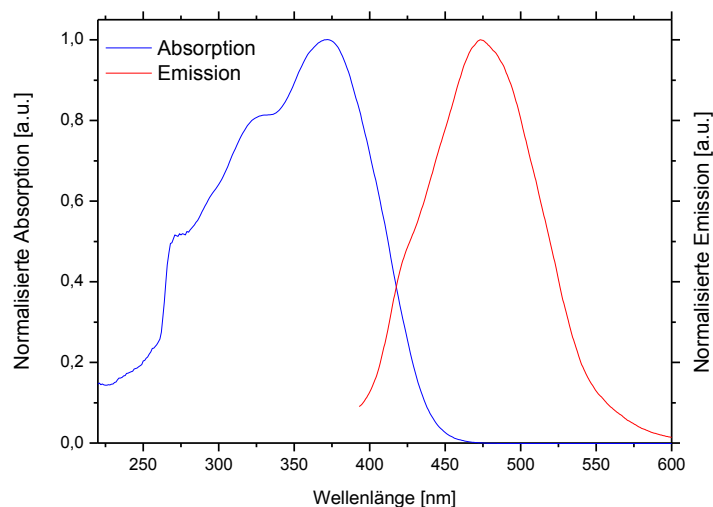


Abbildung 54: Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von PDMASN **17h** in Ethylacetat.

Das Absorptionsspektrum (Abbildung 54, blau) zeigt drei Banden mit einem globalen Maximum bei 371 nm und weitere lokale Maxima bei 272 nm und 327 nm. Bei einer Anregungswellenlänge von 371 nm wurde eine Emissionsbande mit einem Maximum bei 474 nm detektiert (Abbildung 54, rot).

3.3.9 Absorptions- und Fluoreszenzmaxima der synthetisierten Stilbennitronderivate (17)

Tabelle 6: Absorptions- und Emissionsmaxima der Stilbennitrone **17** in Ethylacetat.

Nitrone 17	Absorptionsmaximum ^a	Fluoreszenzmaximum ^a ($\lambda_{\text{ex}} = \text{max. Abs.}$)
17a	395 nm	516 nm
17b	326 nm	444 nm
17c	378 nm	510 nm
17d	356 nm	396 nm
17e	347 nm	392 nm
17f	319 nm	363 nm
17g	351 nm	392 nm
17h	371 nm	474 nm

^a Vermessen in EtOAc.

3.4 Fluoreszenz-*Quenching*-Experimente mit Stilbennitronderivaten (17)

Im Kapitel 3.2 wurde mittels Fenton-Reagenz, als auch Xanthinoxidase (XO) / Hypoxanthin (HX) nachgewiesen, dass im Modellsystem alle synthetisierten Stilbennitronderivate **17** in der Lage sind Hydroxyl- und Superoxidanion-Radikale einzufangen. Innerhalb der jeweiligen Spin-Addukte kann das stabilisierte, ungepaarte Elektron mit dem kovalent gebundenen Chromophor wechselwirken. In der Regel geht dies mit einer Veränderung dessen HOMO-LUMO-Niveaus einher und führt somit zum Zusammenbruch der Fluoreszenz (vgl. Kap. 1.4.1.6).

Es wurden entsprechende Fluoreszenz-*Quenching*-Experimente durchgeführt. Dazu wurden 100 μM Nitron-EtOAc-Lösung in einer Quarzküvette vermessen und gegebenenfalls soweit verdünnt, dass die Anfangsintensitäten der Emissionen in vergleichbaren Bereichen lagen. Die fluoreszierenden, organischen Lösungen wurden anschließend mit einer wässrigen Fenton-Lösung, oder gepufferten Hypoxanthin / Xanthinoxidase-Suspension (je 10 mM) für 2 bzw. 10 min inkubiert. Vor der jeweiligen Vermessung wurde die wässrige Phase wieder entfernt.

3.4.1.1 Fluoreszenzquenching von PNOMSN (17a) mittels Fenton

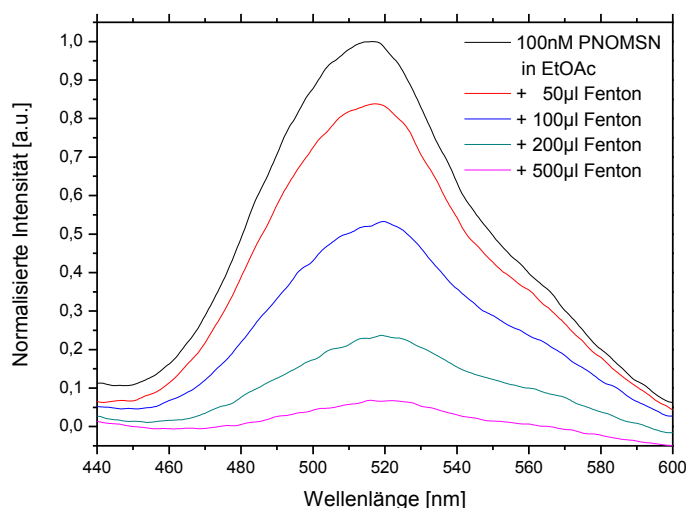


Abbildung 55: Normierte Fluoreszenzabnahme von PNOMSN **17a** durch Fenton in Ethylacetat.

Das normierte Fluoreszenzspektrum von PNOMSN **17a** illustriert die Abnahme dessen Fluoreszenz nach Inkubation mit zunehmenden Volumen an Fenton-Reagenz (Abbildung 55). Nach einer Gesamtzugabe von 500 μl Fenton-Lösung wurde eine fast vollständige Quenchung der Ausgangsfluoreszenz festgestellt.

3.4.1.2 Fluoreszenzquenching von PNOMSN (17a) mittels XO / HX

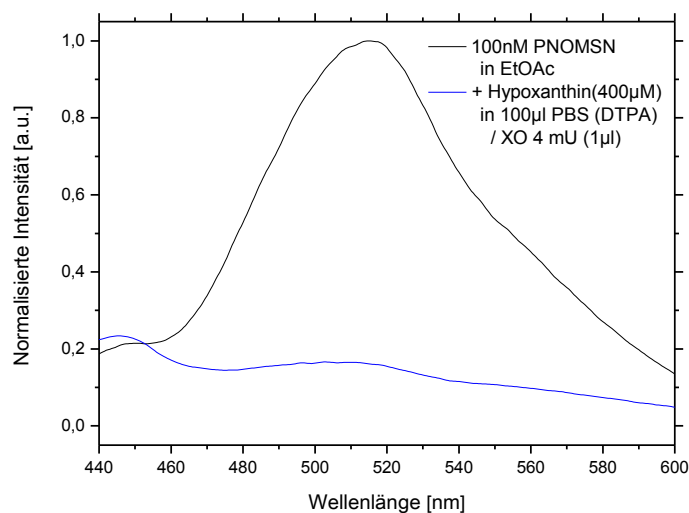


Abbildung 56: Normierte Fluoreszenzabnahme von PNOMSN **17a** durch ein XO-System in Ethylacetat.

Das normierte Fluoreszenzspektrum von PNOMSN **17a** veranschaulicht die Abnahme dessen Fluoreszenz mittels wässriger XO / HX-Suspension (Abbildung 56). Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde eine fast vollständige Quenchung der Ausgangsfluoreszenz festgestellt.

3.4.2.1 Fluoreszenzquenching von ONMMSN (17b) mittels Fenton

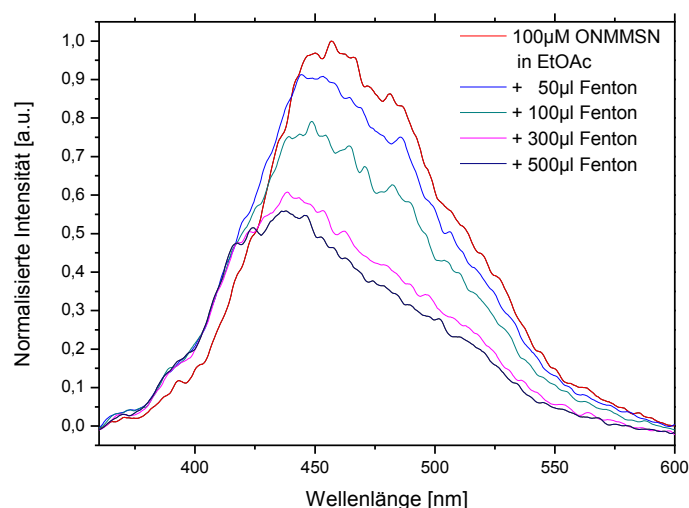


Abbildung 57: Normierte Fluoreszenzabnahme von ONMMSN **17b** durch Fenton in Ethylacetat.

Das normierte Fluoreszenzspektrum von ONMMSN **17b** illustriert die Abnahme dessen Fluoreszenz nach Inkubation mit zunehmenden Volumen an Fenton-Reagenz (Abbildung 57). Nach einer Gesamtzugabe von 500 μl Fenton-Lösung wurde eine Fluoreszenzquenchung um etwa 45 % der Ausgangsintensität festgestellt. Trotz eines noch 100-fach molaren Überschusses an Fenton-Reagenz, kann diese partielle Quenchung auf die erhöhte ONMMSN **17b**-Konzentration (100 μM) in Kombination mit dessen „*spin-trapping*-Effizienz“ und einer verminderten Wechselwirkung des stabilisierten Radikals, mit dem verdrillten 4-Nitroanisolrest zurückgeführt werden.

3.4.2.2 Fluoreszenzquenching von ONMMSN (17b) mittels XO / HX

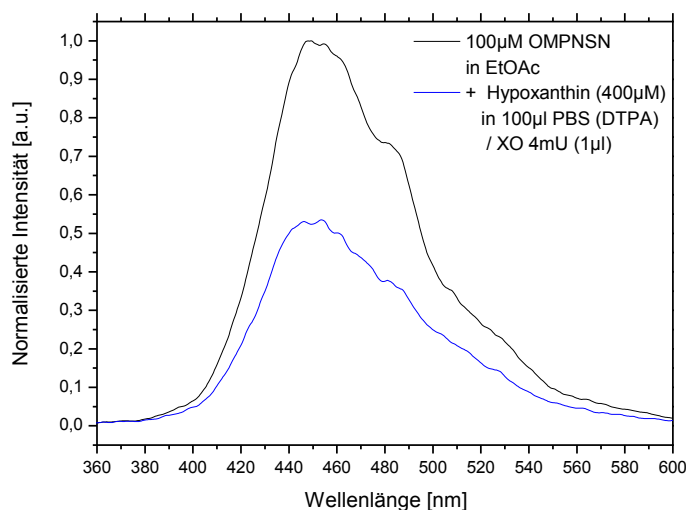


Abbildung 58: Normierte Fluoreszenzabnahme von ONMMSN **17b** durch ein XO-System in Ethylacetat.

Das normierte Fluoreszenzspektrum von ONMMSN **17b** illustriert die Abnahme dessen Fluoreszenz mittels wässriger XO / HX-Suspension (Abbildung 58). Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde eine Fluoreszenzquenchung um etwa 47 % festgestellt. Wie schon in Kap. 3.4.2.1 beschrieben, könnte diese partielle Abnahme, sowohl auf der erhöhten Konzentration und Effektivität der verwendeten *spin trap* **17b**, als auch einer verminderten intramolekularen Wechselwirkung des Chromophors, mit dem freien Elektron des entsprechenden Spin-Addukts beruhen.

3.4.3.1 Fluoreszenzquenching von PNSN (17c) mittels Fenton

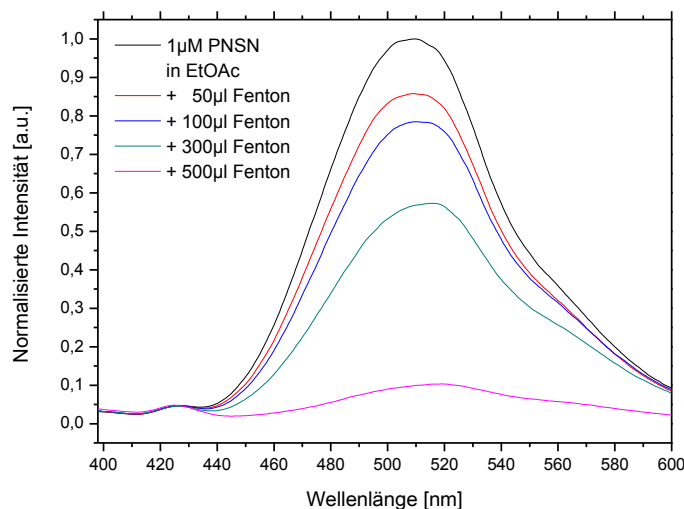


Abbildung 59: Normierte Fluoreszenzabnahme von PNSN 17c durch Fenton in Ethylacetat.

Das normierte Fluoreszenzspektrum von PNSN 17c veranschaulicht die Abnahme dessen Fluoreszenz nach Inkubation mit zunehmenden Volumen an Fenton-Reagenz (Abbildung 59). Nach einer Gesamtzugabe von 500 µl Fenton-Lösung wurde eine fast vollständige Quenchung der Ausgangsfluoreszenz festgestellt.

3.4.3.2 Fluoreszenzquenching von PNSN (17c) mittels XO / HX

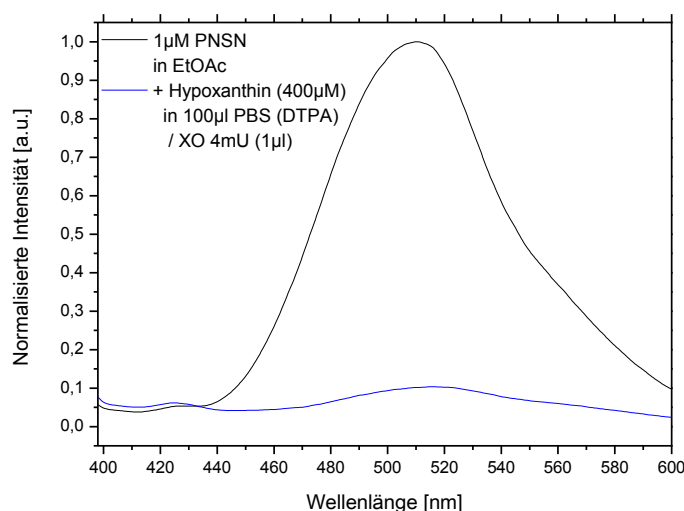


Abbildung 60: Normierte Fluoreszenzabnahme von PNSN 17c durch ein XO-System in Ethylacetat.

Das normierte Fluoreszenzspektrum von PNSN 17c illustriert die Abnahme dessen Fluoreszenz mittels wässriger XO / HX-Suspension (Abbildung 60). Nach einer

Inkubationszeit von 10 min wurde eine fast vollständige Quenchung der Ausgangsfluoreszenz festgestellt.

3.4.4.1 Fluoreszenzquenching von SN (17d) mittels Fenton

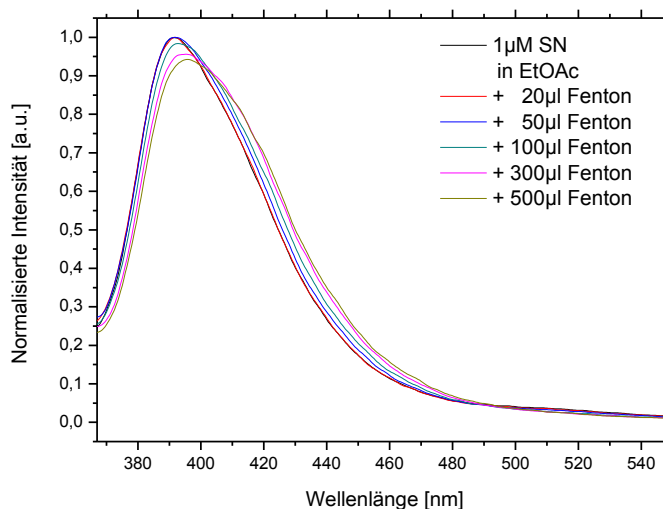


Abbildung 61: Normierte Fluoreszenzabnahme von SN 17d durch Fenton in Ethylacetat.

Das normierte Fluoreszenzspektrum von SN 17d zeigt eine unwesentliche Abnahme dessen Fluoreszenz nach Inkubation mit zunehmenden Volumen an Fenton-Reagenz (Abbildung 61). Somit konnte kein *Quenching* nachgewiesen werden.

3.4.4.2 Fluoreszenzquenching von SN (17d) mittels XO / HX

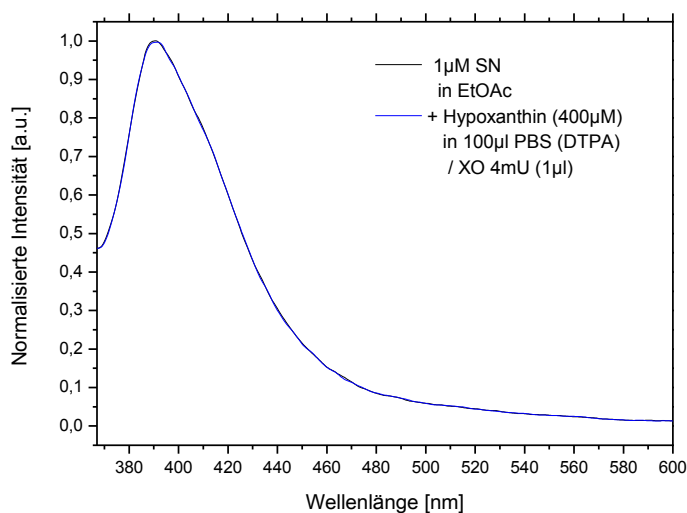


Abbildung 62: Normierte Fluoreszenzabnahme von SN 17d durch ein XO-System in Ethylacetat.

Das normierte Fluoreszenzspektrum von SN **17d** zeigt eine unwesentliche Abnahme dessen Fluoreszenz mittels wässriger XO / HX-Suspension (Abbildung 62). Somit konnte kein *Quenching* nachgewiesen werden.

3.4.5.1 Fluoreszenzquenching von PMSN (17e) mittels Fenton

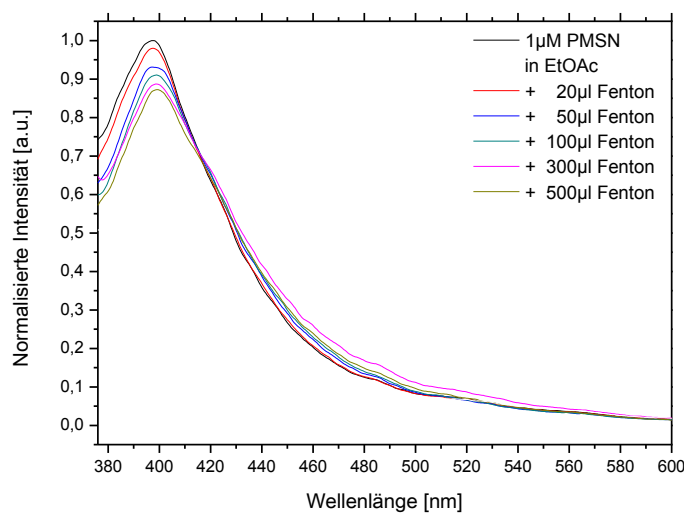


Abbildung 63: Normierte Fluoreszenzabnahme von PMSN **17e** durch Fenton in Ethylacetat.

Das normierte Fluoreszenzspektrum von PMSN **17e** zeigt eine minimale Abnahme dessen Fluoreszenz nach Inkubation mit zunehmenden Volumen an Fenton-Reagenz (Abbildung 63). In diesem Fall kann man von keinem *Quenching* ausgehen. Der leichte Fluoreszenzabfall lässt sich auf eine geringe Löslichkeit von **17e** in Wasser zurückführen.

3.4.5.2 Fluoreszenzquenching von PMSN (17e) mittels XO / HX

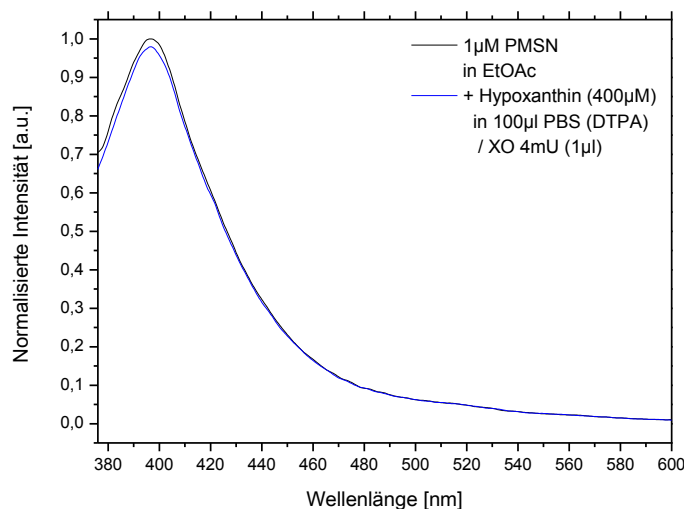


Abbildung 64: Normierte Fluoreszenzabnahme von PMSN **17e** durch ein XO-System in Ethylacetat.

Das normierte Fluoreszenzspektrum von PMSN **17e** zeigt eine minimale Abnahme der Fluoreszenz mittels wässriger XO / HX-Suspension (Abbildung 64). In diesem Fall kann man von keinem *Quenching* ausgehen. Der leichte Fluoreszenzabfall lässt sich auf eine geringe Löslichkeit von **17e** in Wasser zurückführen.

3.4.6.1 Fluoreszenzquenching von PSSN (17f) mittels Fenton

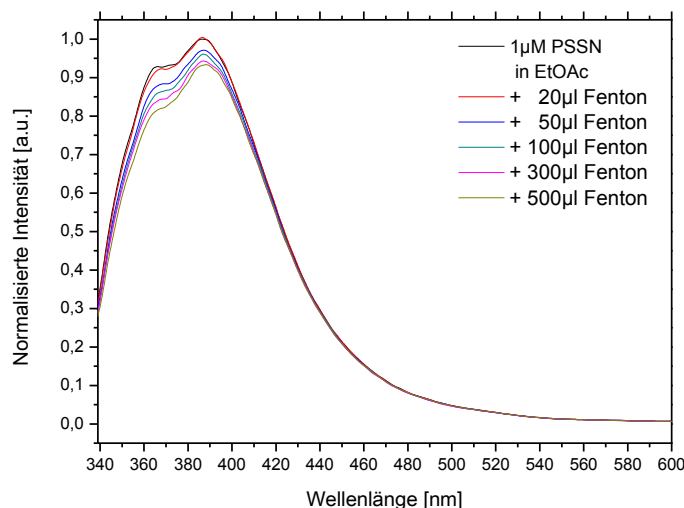


Abbildung 65: Normierte Fluoreszenzabnahme von PSSN **17f** durch Fenton in Ethylacetat.

Das normierte Fluoreszenzspektrum von PSSN **17f** zeigt eine minimale Abnahme dessen Fluoreszenz nach Inkubation mit zunehmenden Volumen an Fenton-Reagenz (Abbildung 65). In diesem Fall kann man von keinem *Quenching* ausgehen. Der leichte Fluoreszenzabfall lässt sich auf eine geringe Löslichkeit von **17f** in Wasser zurückführen.

3.4.6.2 Fluoreszenzquenching von PSSN (17f) mittels XO / HX

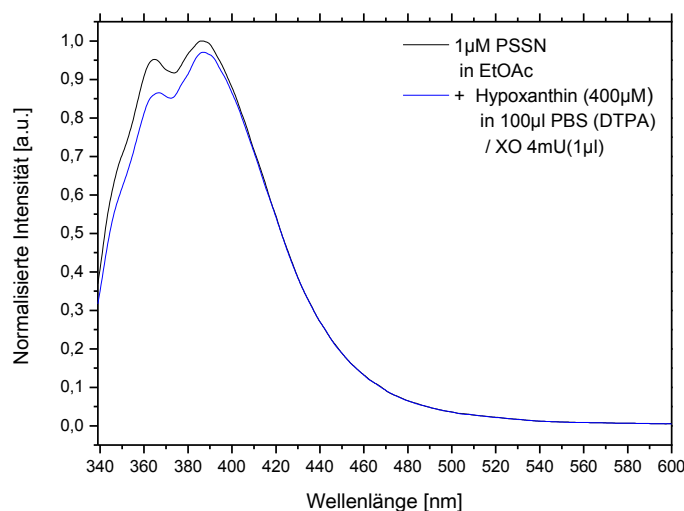


Abbildung 66: Normierte Fluoreszenzabnahme von PSSN **17f** durch ein XO-System in Ethylacetat.

Das normierte Fluoreszenzspektrum von PSSN **17f** zeigt eine minimale Abnahme dessen Fluoreszenz mittels wässriger XO / HX-Suspension (Abbildung 66). In diesem Fall kann man von keinem *Quenching* ausgehen. Der leichte Fluoreszenzabfall lässt sich auf eine geringe Löslichkeit von **17f** in Wasser zurückführen.

3.4.7.1 Fluoreszenzquenching von PCISN (17g) mittels Fenton

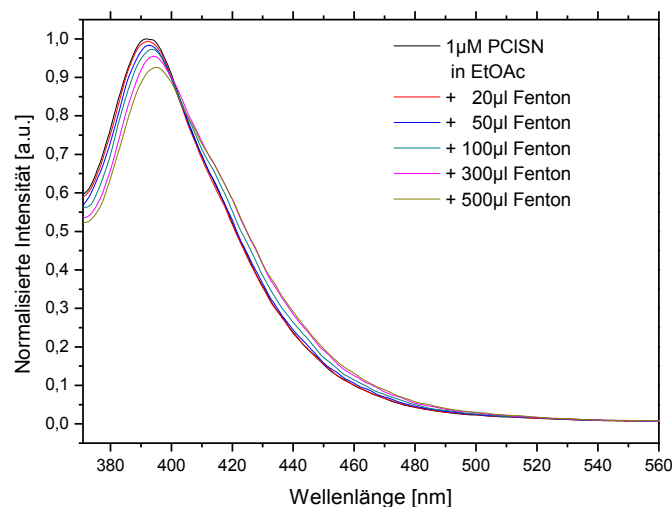


Abbildung 67: Normierte Fluoreszenzabnahme von PCISN **17g** durch Fenton in Ethylacetat. Das normierte Fluoreszenzspektrum von PCISN **17g** zeigt eine unwesentliche Abnahme dessen Fluoreszenz nach Inkubation mit zunehmenden Volumen an Fenton-Reagenz (Abbildung 67). Somit konnte kein *Quenching* nachgewiesen werden.

3.4.7.2 Fluoreszenzquenching von PCISN (17g) mittels XO / HX

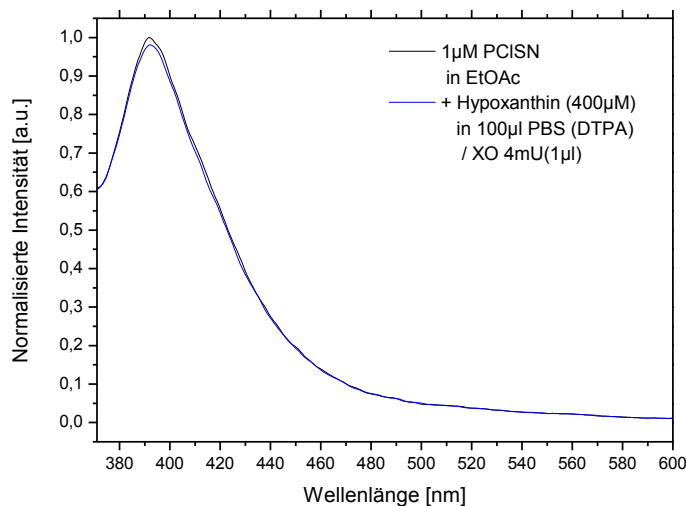


Abbildung 68: Normierte Fluoreszenzabnahme von PCISN **17g** durch ein XO-System in Ethylacetat.

Das normierte Fluoreszenzspektrum von PCISN **17g** zeigt eine unwesentliche Abnahme dessen Fluoreszenz mittels wässriger XO / HX-Suspension (Abbildung 68). Somit konnte kein *Quenching* nachgewiesen werden.

3.4.8.1 Fluoreszenzquenching von PDMASN (17h) mittels Fenton

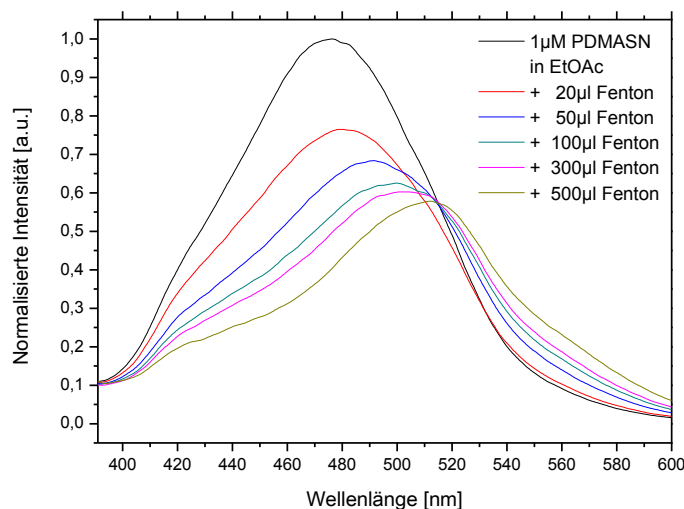


Abbildung 69: Normierte Fluoreszenzabnahme von PDMASN **17h** durch Fenton in Ethylacetat.

Das normierte Fluoreszenzspektrum von PDMASN **17h** illustriert die Abnahme dessen Fluoreszenz nach Inkubation mit zunehmenden Volumen an Fenton-Reagenz (Abbildung 69). Nach einer Gesamtzugabe von 500 µl Fenton-Lösung wurde eine Fluoreszenzquenchung um etwa 42 % festgestellt.

Zunächst wurde postuliert, dass die erhebliche, bathochrome Verschiebung (um 37 nm) einzig durch eine interne Umwandlung zustande gekommen sein kann, da sich alle Fluoreszenz-Kurven in einem Punkt schneiden. Auf dem Gebiet der Absorptionsspektroskopie spricht man von einem „isosbestischen Punkt“. Weniger wahrscheinlich ist eine Strahlungs-induzierte Reaktion. Eine Radikal-bedingte Konversion scheint plausibel, aufgrund der hohen Reaktivität und diversen Reaktionsmöglichkeiten.

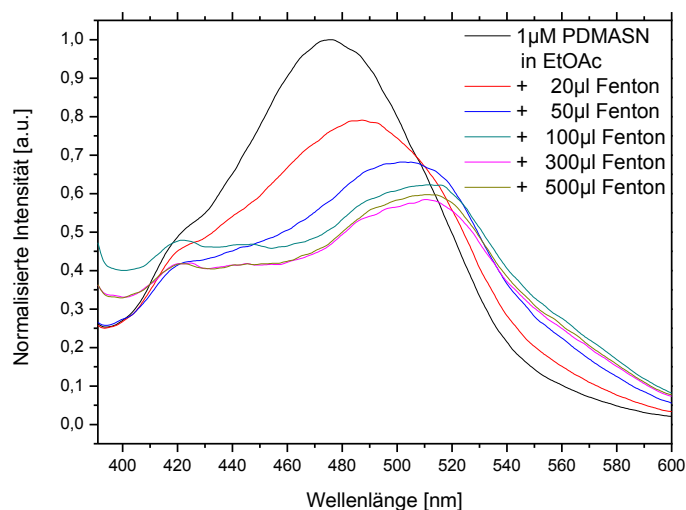


Abbildung 70: Wiederholter Versuch zur Fluoreszenzabnahme von PDMASN **17h** durch Fenton in Ethylacetat.

Beim Test auf Reproduzierbarkeit fiel auf, dass die Rotverschiebung nach dem *Quenching* vorhanden war, die Kurven sich jedoch nicht in einem „isobestischen Punkt“ schneiden und eine zusätzliche Bande bei 420 nm sichtbar wurde (Abbildung 70).

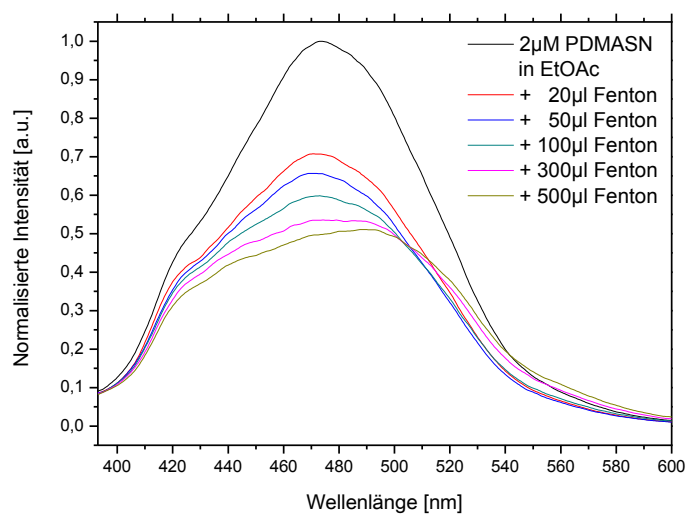


Abbildung 71: Normierte Fluoreszenzabnahme von PDMASN **17h** (doppelter Konzentration) via Fenton in Ethylacetat.

Mit der doppelten Konzentration an PDMASN **17h** waren die erwähnten Besonderheiten nur ansatzweise ausgeprägt (Abbildung 71).

3.4.8.2 Fluoreszenzquenching von PDMASN (17h) mittels XO / HX

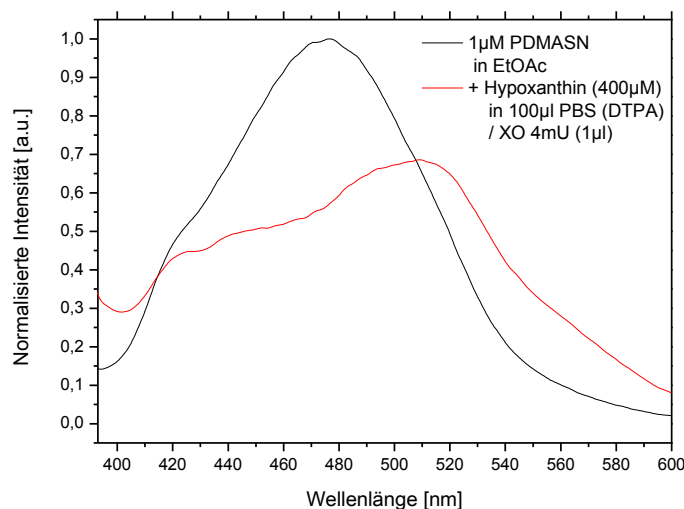


Abbildung 72: Normierte Fluoreszenzabnahme von PDMASN **17h** durch ein XO-System in Ethylacetat.

Das normierte Fluoreszenzspektrum von PDMASN **17h** illustriert die Abnahme dessen Fluoreszenz nach Inkubation mit wässriger XO / HX-Suspension (Abbildung 72). Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde eine Abnahme der Fluoreszenz um etwa 32 % festgestellt. Sowohl die zusätzliche Bande bei 420 nm, als auch die Verschiebung um 37 nm zu höheren Wellenlängen wurde aufgelöst. Da man hier eine gleichwertige, bathochrome Verschiebung wie in Abbildung 70 erkennt, der Quencheffekt jedoch wesentlich geringer ausfällt, ist dies neben den diskutierten Faktoren ein zusätzliches Indiz für eine Verunreinigung der Probe.

Nach Betrachtung der NMR-Spektren (^1H , ^{13}C) von PDMASN **17h** fiel auf, dass trotz zweifacher säulenchromatographischer Aufreinigung noch etwa 4-5 % des Eduktes PDMASA **16h** vorhanden waren (per manueller Integration der entsprechenden Peaks) und dies als Ursache in Frage kommt. In Folge dessen wurde eine 50 nM- PDMASA **16h** - EtOAc-Lösung (was 5 % Verunreinigung entspricht) auch bei 371 nm angeregt und dessen Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Dabei wurde eine vergleichbare Fluoreszenzintensität (wie bei der kontaminierten 1 μM PDMASN **17h**- Lösung), bathochrome Verschiebung und zweite Bande bei 420 nm eruiert (Abbildung 73).

3.4.8.3 Fluoreszenzspektrum von PDMASA (16h)

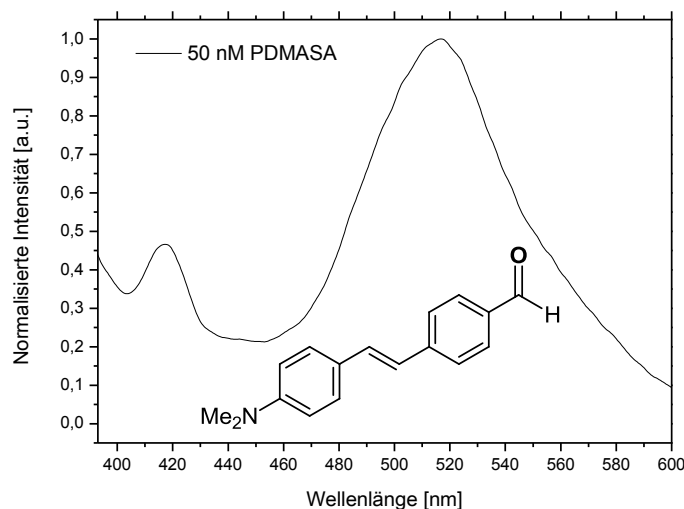


Abbildung 73: Normiertes Fluoreszenzspektrum und Strukturformel von *p*-Dimethylamino-stilbenaldehyd **16h** in Ethylacetat.

Die Quantenausbeute der Aldehydvorstufe **16h** ist somit um etwa das 20-fache höher, als die des entsprechenden Stilbennitrons **17h** (Abbildung 73).

Zudem bestätigt dieser Sachverhalt indirekt, dass Nitroxylradikale Fluoreszenzen intramolekular, weniger jedoch intermolekular per Kollision quenchen.

3.5 Zytotoxizitätstests

Da die Verbindung **17a**, neben dem bereits untersuchten Nitron **17c**, das einzige der Nitrone **17** ist, dass geeignete *spin trapping*- und optische Eigenschaften besitzt, soll diese *in vitro* auf ihre biologische Anwendbarkeit getestet werden. Zuvor wurde Nitron **17a** mittels des Sulforhodamin B (SRB)-Assays hinsichtlich seiner Toxizität auf drei verschiedenen, adhären Zellen getestet. Dabei macht man sich die Eigenschaft von Sulforhodamin B **19** (SRB; Kiton Red S, Abbildung 74) zunutze, dass es elektrostatisch an alle zellulären Proteine bindet. Somit kann die Zelldichte basierend auf der Messung des Gesamtproteingehalts bestimmt werden (Kopp, 2015).

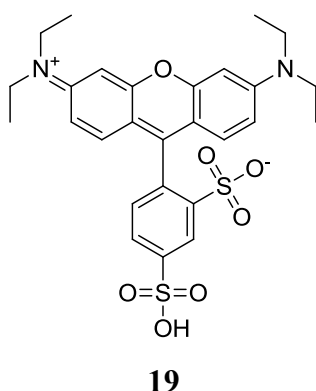


Abbildung 74: Strukturformel von Sulforhodamin B (SRB) **19**.

3.5.1 SRB-Tests von PNOMSN (**17a**)

Nach der Inkubation von PNOMSN **17a** (verschiedene Konzentrationen einer Lösung in DMSO) für 3 d auf eine definierte Zellzahl, wurden die unbeschädigten Zellmonoschichten mit 10 %-iger Trichloressigsäure (TCA) fixiert und geschädigte Zellen ausgewaschen. Anschließend wurden die lebenden Zellen mit SRB **19** angefärbt und der überschüssige Farbstoff durch wiederholtes Waschen mit 1 %-iger Essigsäure entfernt. Das Protein-gebundene, dipolare Rhodamin-Pigment **19** wurde für die photometrische OD-Bestimmung bei 570 nm in 10 mM Tris-Base gelöst.

Je Zelllinie wurden drei unabhängige Tests durchgeführt und deren Mittelwerte gebildet. Per Definition gilt eine Substanz als nicht toxisch, wenn mindestens 80 % der Zellen am Leben sind (LC₈₀). Des Weiteren wurden die mittlere letale Konzentration (LC₅₀) und die mittlere effektive Dosis (ED₅₀) bestimmt.

3.5.1.1 Ergebnisse des SRB-Tests mit MCF7-Zellen

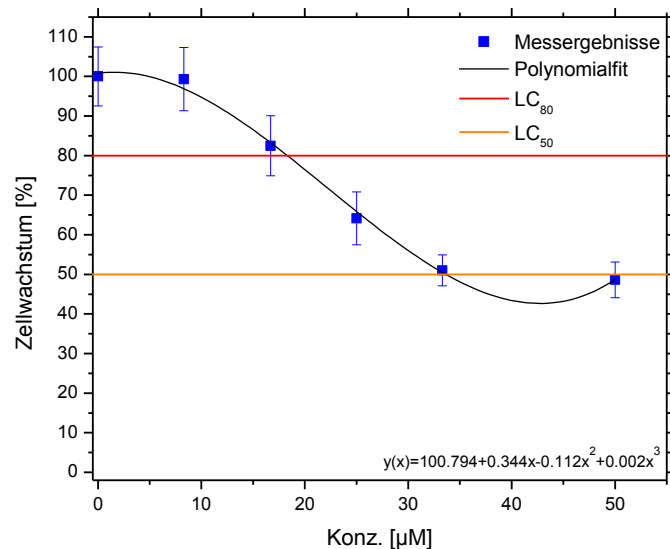


Abbildung 75: Zellwachstumskurve von MCF7-Zellen mit PNOMSN 17a.

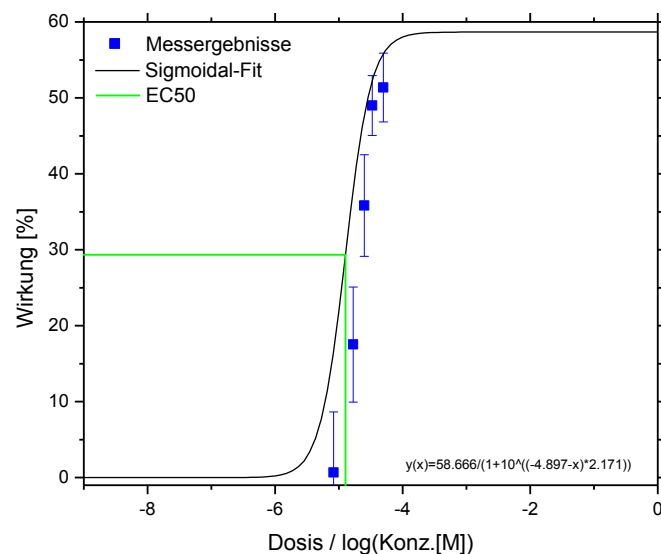


Abbildung 76: Dosis / Wirkungskurve von PNOMSN 17a auf MCF7-Zellen.

PNOMSN 17a wirkt auf MCF7-Zellen ab einer Konzentration von 18.291 μM zytotoxisch (LC_{80}). Der LC_{50} -Wert beläuft sich auf 33.634 μM (Abbildung 75). Aus der logarithmischen Auftragung ist nach sigmoidalem Fit eine mittlere effektive Dosis (ED_{50}) von 12.667 μM zu entnehmen (Abbildung 76). Die, bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen (Kap. 3.6), zugegebene Konzentration an PNOMSN 17a, liegt bei 10 μM und somit unterhalb des toxischen Bereichs.

3.5.1.2 Ergebnisse des SRB-Tests mit HeLa-Zellen

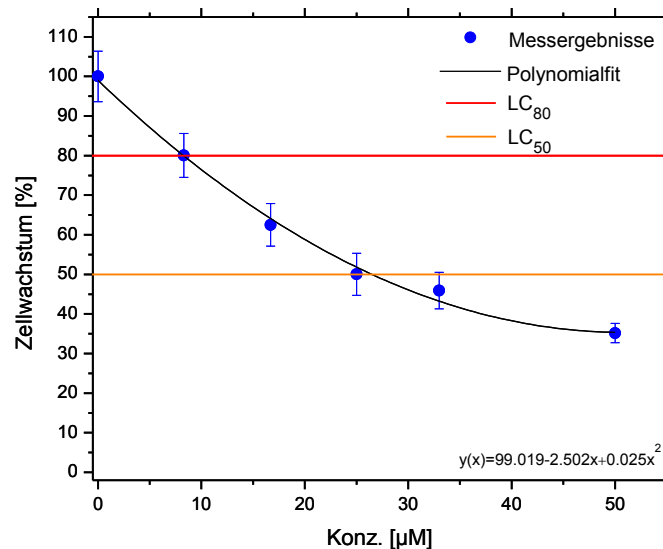


Abbildung 77: Zellwachstumskurve von HeLa-Zellen mit PNOMSN 17a.

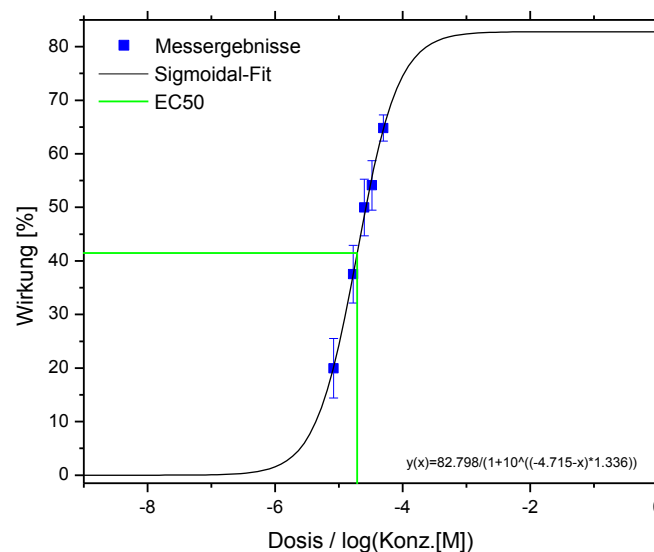


Abbildung 78: Dosis / Wirkungskurve von PNOMSN 17a auf HeLa-Zellen.

PNOMSN 17a wirkt auf HeLa-Zellen ab einer Konzentration von 8.288 µM zytotoxisch (LC₈₀). Der LC₅₀-Wert wird bei einer Konzentration von 26.732 µM erreicht (Abbildung 77). Aus der logarithmischen Auftragung ist nach sigmoidalem Fit eine mittlere effektive Dosis (ED₅₀) von 19.297 µM zu entnehmen (Abbildung 78). Die, bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen (Kap. 3.6), zugegebene Konzentration an PNOMSN 17a, liegt bei 10 µM, somit im leicht toxischen Bereich. Dabei beträgt die Inkubationszeit jedoch 20 min (hier bei 3 d), weshalb kein großer Effekt zu erwarten war.

3.5.1.3 Ergebnisse des SRB-Tests mit *wt*-Mef

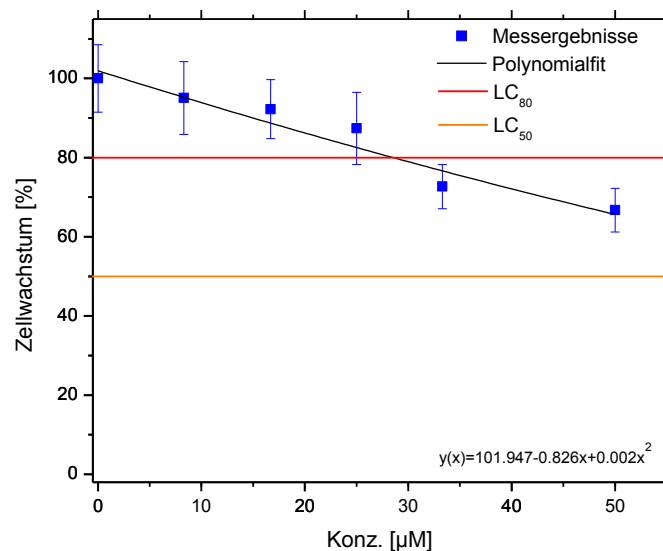


Abbildung 79: Zellwachstumskurve von *wt*-Mef mit PNOMSN 17a.

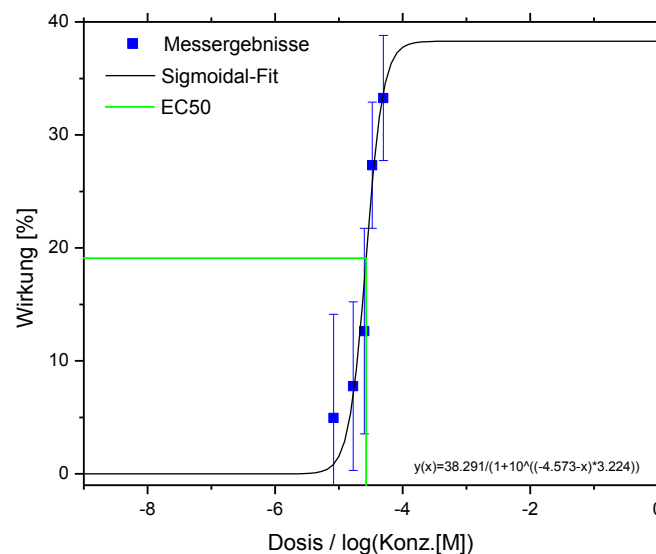


Abbildung 80: Dosis / Wirkungskurve von PNOMSN 17a auf *wt*-Mef-Zellen.

PNOMSN 17a wirkt auf *wild-type mouse embryonic fibroblasts* (*wt*-MEF) ab einer Konzentration von 28.543 µM zytotoxisch (LC₈₀). Der LC₅₀-Wert wird bei einer Konzentration von 77.392 µM erreicht (Abbildung 79). Aus der logarithmischen Auftragung ist nach sigmoidalem Fit eine mittlere effektive Dosis (ED₅₀) von 26.730 µM zu entnehmen (Abbildung 80). Die, bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen (Kap. 3.6), zugegebene Konzentration an PNOMSN 17a, liegt bei 10 µM und somit unterhalb des toxischen Bereichs.

3.6 *In vitro* Untersuchungen von *p*-Nitro-*o*-methoxystilbennitron (17a) am konfokalen Laser-scanning-Mikroskop

In Anlehnung an Kopp wurde zur Untersuchung von zellulär gebildeten ROS, *in vitro*-Experimente mit PNOMSN **17a** an einem konfokalen Laser-scanning-Mikroskop (*cLSM*) durchgeführt. Dazu wurden MCF7- und HeLa-Zellen und *wt*-MEF mit einer PNOMSN **17a**-DMSO-Lösung angefärbt, dessen Akkumulation verfolgt und bei mitochondrialer Ansammlung, unter Zugabe von Atmungsketteninhibitoren (Rotenon **20** und/oder Antimycin A **21**; zur vermehrten Radikalbildung) überprüft, ob dessen Fluoreszenz gequencht wird (Kopp, 2015).

Das Insektizid und Piscizid, Rotenon **20** blockiert dazu den Elektronentransport an Komplex I (NADH-Dehydrogenase) der Atmungskette (Swanson *et al.*, 2009). Antimycin A **21**, welches aus *Streptomyces antibioticus* gewonnen wird, bindet an den Komplex III und inhibiert dort die Übertragung der Elektronen von Coenzym Q auf Cytochrom c (Abbildung 81; Huang *et al.*, 2005).

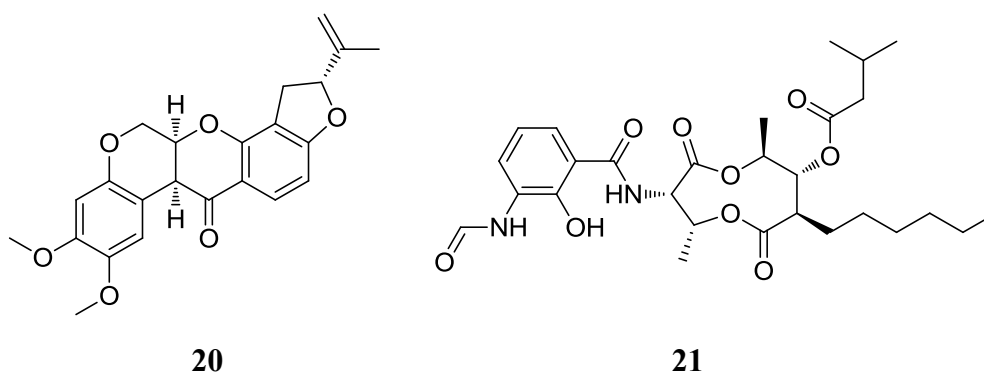


Abbildung 81: Strukturen der Atmungsketteninhibitoren Rotenon **20** und Antimycin A **21**.

Beide Atmungsketteninhibitoren **20**, **21** wurden zunächst gesondert auf alle Zelllinien angewendet und diese mikroskopisch auf Eigenfluoreszenz, durch etwaige Stoffwechselprodukte, wie z.B. NADPH, untersucht (Lakowicz, 2006).

Zur subzellulären Lokalisierung von PNOMSN **17a** bzw. der eingefangenen Radikale wurde zu Vergleichszwecken das Perchlorat des Mitochondrien-spezifischen Farbstoffs Tetramethylrhodaminethylester (TMRE) **22** und das DNA-interkalierende, basische Acridinorange (AO) **23** eingesetzt. AO **23** akkumuliert deshalb hauptsächlich im Zellkern, aber auch saure Kompartimente wie Mitochondrien werden angefärbt (Abbildung 82; Farkas *et al.*, 1989).

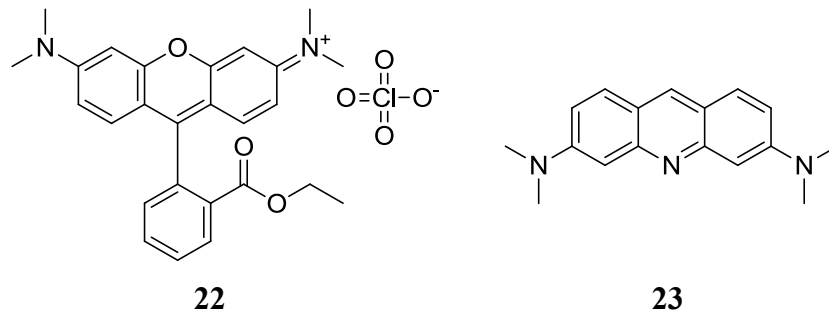


Abbildung 82: Strukturen von TMRE **22** und AO **23**.

3.6.1 Tests auf Eigenfluoreszenz

Besonders bei der Verwendung eines UV-Lasers können zahlreiche Stoffwechselprodukte angeregt werden und *in vitro* die Fluoreszenzuntersuchungen verfälschen.

Aus diesem Grund wurde ohne die Zugabe von Nitron **17a** eine Mischung aus Rotenon **20** und Antimycin A **21** zu den verwendeten Zelllinien appliziert und dieses am konfokalen Laser-scanning-Mikroskop auf Eigenfluoreszenz untersucht (Abbildungen 83, 84 und 85).

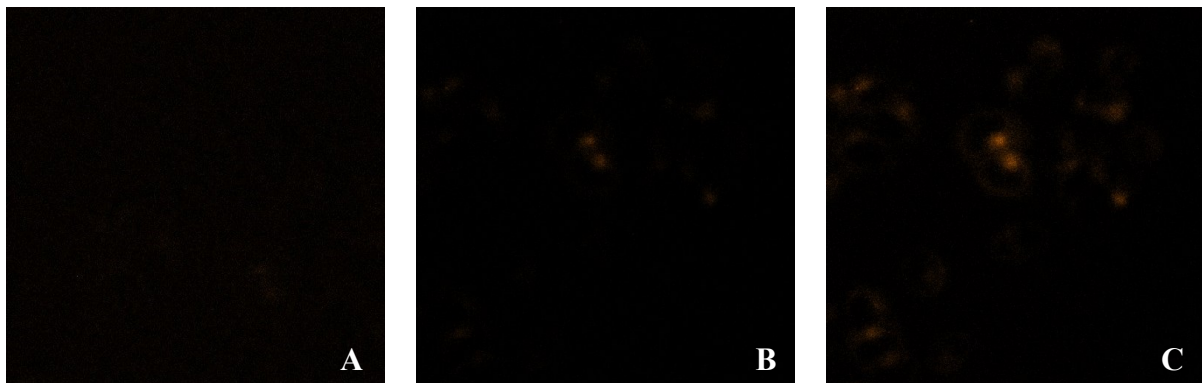


Abbildung 83: Eigenfluoreszenz von MCF7-Zellen.

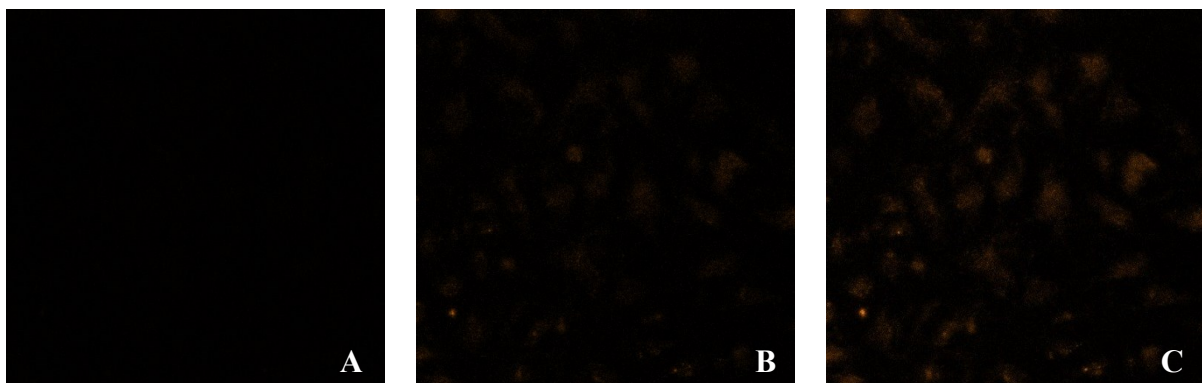


Abbildung 84: Eigenfluoreszenz von HeLa-Zellen.

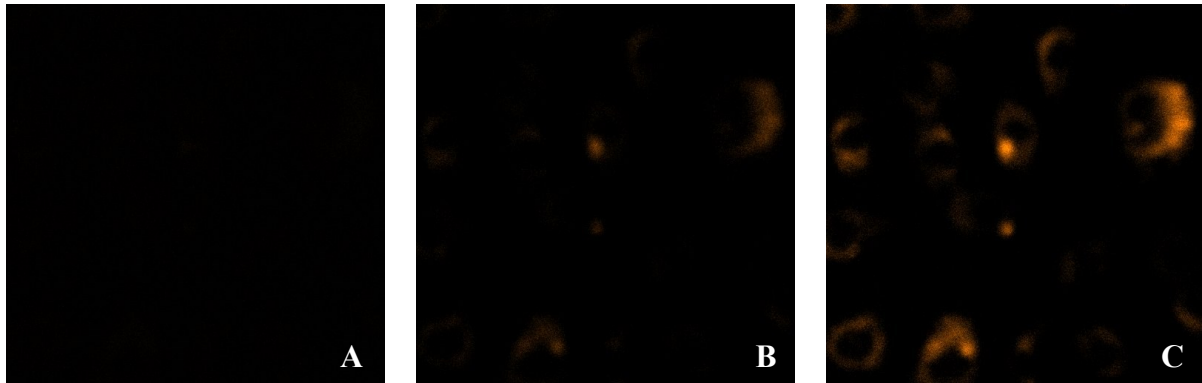


Abbildung 85: Eigenfluoreszenz von *wt*-Mef-Zellen.

Bei einer jeweiligen Anregungswellenlänge von 405 nm und einer Laserstärke von 3 % zeigten die untersuchten Zelllinien keine Eigenfluoreszenz (Bilder A der Abbildungen 83, 84 und 85). Diese Einstellungen entsprechen derer späterer Messungen mit PNOMSN **17a** (Kap. 3.6.2., 3.6.3) und sind im experimentellen Teil aufgeführt. Somit kann eine Beeinträchtigung durch zelleigene Chromophore oder fluoreszierende Stoffwechselprodukte ausgeschlossen werden.

Um Emissionen sichtbar zu machen, musste jeweils die Stärke des Anregungslasers auf 50 % (Bilder B) bzw. 100 % (Bilder C) erhöht werden (Abbildungen 83, 84 und 85).

3.6.2 Subzelluläre Akkumulation von PNOMSN (**17a**)

Bei bisherigen *in vitro*-Fluoreszenzuntersuchungen von Nitronen (PNSN **17c**, Naphtalimdsäurederivate) wurde festgestellt, dass sich diese fast ausschließlich in den Mitochondrien akkumuliert hatten (Farkas *et al.*, 1989; Hauck, 2007; Kopp, 2015). Um zu testen, ob PNOMSN **17a** sich in Zellen und wenn auch mitochondrial ansammelt, wurde Vergleichsmessungen mit TMRE **22** und Acridinorange **23** durchgeführt.

3.6.2.1 Akkumulationsvergleich mit Kompartiment-spezifischen Farbstoffen in MCF7-Zellen

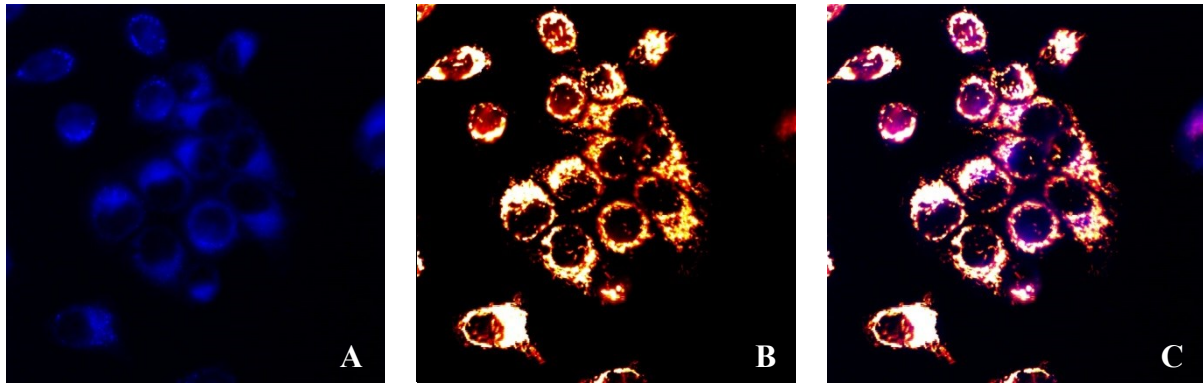


Abbildung 86: Subzellulärer Akkumulationsvergleich von PNOMSN **17a** zu TMRE **22** in MCF7-Zellen.

Die Bilder von Nitron **17a** (A, blau) und TMRE **22** (B, Red Hot) in Abbildung 86 lassen eine sehr gute Übereinstimmung der intrazellulären Farbstoffverteilung erkennen. Anhand der überlagerten Bilder in C (violett/cyan) wird deutlich, dass sich PNOMSN **17a** in den Mitochondrien, der MCF7-Zellen, akkumuliert. Deshalb konnten *in vitro*-Experimente mit PNOMSN **17a** und Atmungsketteninhibitoren an MCF7-Zellen durchgeführt werden.

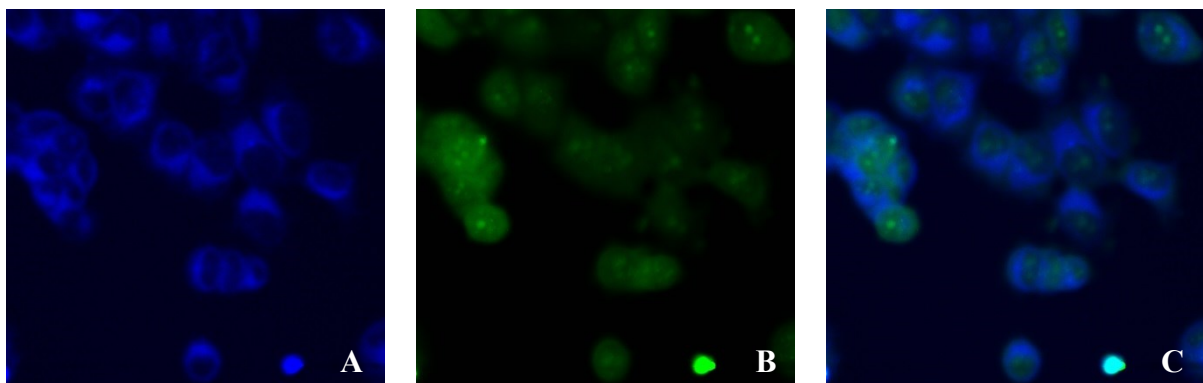


Abbildung 87: Subzellulärer Akkumulationsvergleich von PNOMSN **17a** zu Acridinorange **23** in MCF7-Zellen.

Den Vergleichsmessungen mit AO **23** (Bild B) ist zu entnehmen, dass sich PNOMSN **17a** (Bild A) nicht im Zellkern von MCF7-Zellen ansammelt. Besonders bei der Überlagerung der Akkumulationen in Bild C ist die intensivste Grünfärbung von AO **23** nicht übereinstimmend mit der Blaufärbung von PNOMSN **17a**. Eine relativ gute Deckung mit PNOMSN **17a** ergeben die schwachgrünen Bereiche von AO **23**. Dies ist ein weiteres Indiz für die mitochondriale Anhäufung, da Acridinorange **23** auch in geringem Maße im sauren Intermembranraum akkumuliert (Abbildung 87).

3.6.2.2 Akkumulationsvergleich mit Kompartiment-spezifischen Farbstoffen in HeLa-Zellen

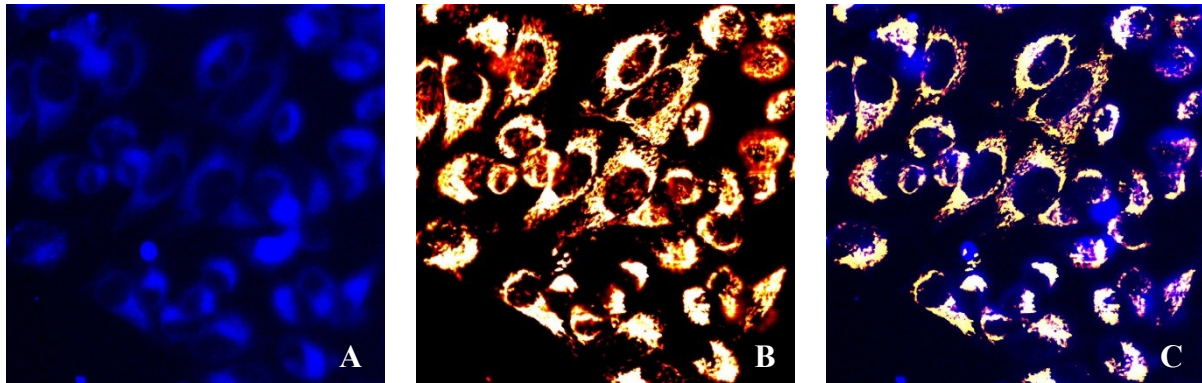


Abbildung 88: Subzellulärer Akkumulationsvergleich von PNOMSN 17a zu TMRE 22 in HeLa-Zellen.

Die Bilder von Nitron 17a (A, blau) und TMRE 22 (B, Red Hot) in Abbildung 88 lassen eine sehr gute Übereinstimmung der intrazellulären Farbstoffverteilung erkennen. Anhand der überlagerten Bilder in C (violett/grün) wird deutlich, dass sich PNOMSN 17a in den Mitochondrien, der HeLa-Zellen, akkumuliert. Deshalb ist es möglich *in vitro*-Experimente mit PNOMSN 17a und Atmungsketteninhibitoren an HeLa-Zellen durchzuführen.

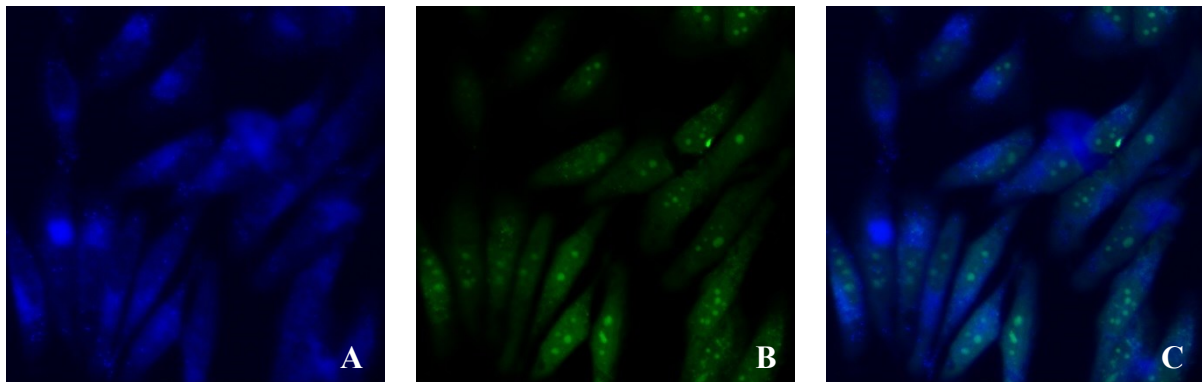


Abbildung 89: Subzellulärer Akkumulationsvergleich von PNOMSN 17a zu Acridinorange 23 in HeLa-Zellen.

Den Vergleichsmessungen mit AO 23 (Bild B) ist zu entnehmen, dass sich PNOMSN 17a (Bild A) nicht im Zellkern von HeLa-Zellen ansammelt. Besonders bei der Überlagerung der Akkumulationen in Bild C ist die intensivste Grünfärbung von AO 23 nicht übereinstimmend mit der Blaufärbung von PNOMSN 17a. Eine relativ gute Deckung mit PNOMSN 17a ergeben die schwachgrünen Bereiche von AO 23. Dies ist ein weiteres Indiz für die mitochondriale Anhäufung, da Acridinorange 23 auch in geringem Maße im sauren Intermembranraum akkumuliert (Abbildung 89).

3.6.2.3 Akkumulationsvergleich mit Kompartiment-spezifischen Farbstoffen in *wt*-Mef

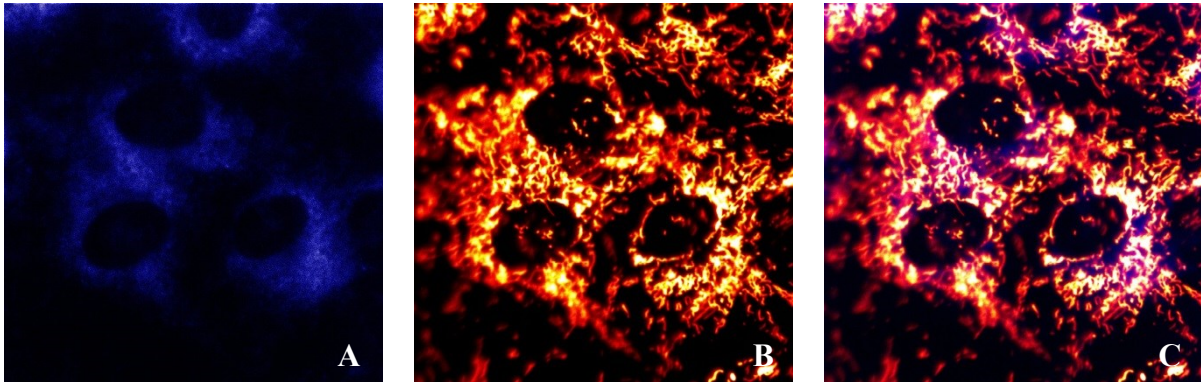


Abbildung 90: Subzellulärer Akkumulationsvergleich von PNOMSN **17a** zu TMRE **22** in *wt*-Mef-Zellen.

Die Bilder von Nitron **17a** (A, blau) und TMRE **22** (B, Red Hot) in Abbildung 90 lassen eine sehr gute Übereinstimmung der intrazellulären Farbstoffverteilung erkennen. Anhand der überlagerten Bilder in C (violett/grün) wird deutlich, dass sich PNOMSN **17a** in den Mitochondrien, von *wt*-Mef, akkumuliert. Aus diesem Grund konnten *in vitro*-Experimente mit PNOMSN **17a** und Atmungsketteninhibitoren an *wt*-Mef durchgeführt werden.

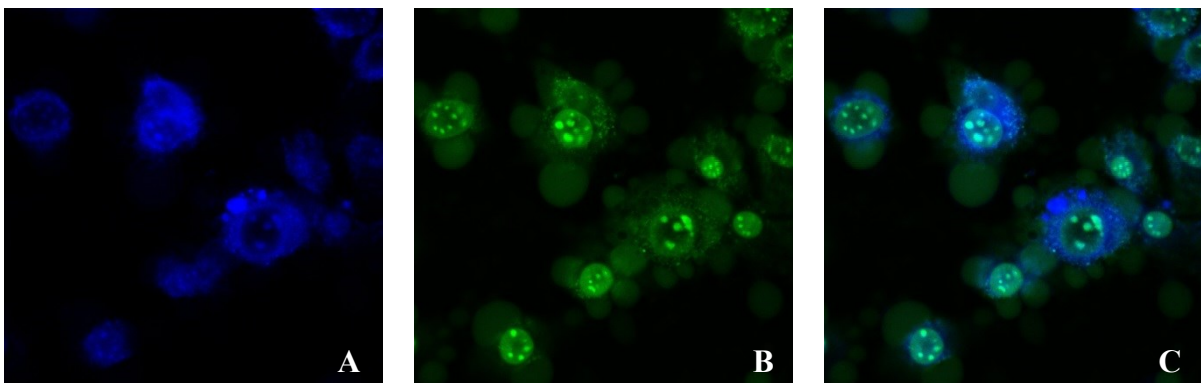


Abbildung 91: Subzellulärer Akkumulationsvergleich von PNOMSN **17a** zu Acridinorange **23** in *wt*-Mef-Zellen.

Den Vergleichsmessungen mit Acridinorange **23** (Bild B) ist zu entnehmen, dass sich PNOMSN **17a** (Bild A) auch in den *Nucleoli* des Zellkerns von *wt*-Mef konzentriert. Besonders bei der Überlagerung der Akkumulationen in Bild C sind intensive türkise Bereiche innerhalb der *Nuclei* zu erkennen. Im restlichen Zellkern sammelt sich AO **23**, nicht aber PNOMSN **17a** an. Die schwachgrünen Regionen außerhalb der *Nuclei* sind wiederum übereinstimmend mit der Blaufärbung von PNOMSN **17a**. Letzteres ist ein weiteres Indiz für dessen mitochondriale Anhäufung, da Acridinorange **23** auch in geringem Maße im sauren Intermembranraum akkumuliert (Abbildung 91).

3.6.2.4 Diskussion der zellulären Ansammlung von PNOMSN (17a)

Die selektive Akkumulation von PNOMSN **17a** und anderer aromatischer Nitronen (PNSN **17c**, Naphthalsäureimid-Nitronen) in den Mitochondrien lässt sich möglicherweise auf den beschriebenen Effekt von sogenannten Skulachev-Ionen (Kap. 2) zurückführen.

Warum grade bei *wt*-Mef eine zusätzliche Ansammlung in *Nucleoli* erfolgt, lässt sich derzeit nicht erklären, zumal C. Kopp, im Rahmen seiner Doktorarbeit mit Naphthalsäureimid-Nitronen, denselben Effekt auch in HeLa-Zellen beobachtete.

3.6.3 Nachweis von zellulären ROS mit PNOMSN (17a)

3.6.3.1 MCF7-Zellen

3.6.3.1.1 Fluoreszenzabnahme durch Blanking / Bleaching

Vor den Fluoreszenzquenching-Experimenten unter Zugabe von Rotenon **20** und/oder Antimycin A **21**-DMSO-Lösungen wurde zunächst eine Blankprobe aus reinem Dimethylsulfoxid (DMSO) desselben Volumens zu den jeweiligen Zelllinien appliziert. Gleichzeitig wurde die Fluoreszenzstabilität von PNOMSN **17a** bei entsprechender Laserbestrahlung (3 %) überprüft.

Dafür wurden die Zellen, analog zum eigentlichen Versuch, mit Nitron **17a** für 20 min inkubiert und mit dazu identischen Geräteeinstellungen für 3 min vermessen (Blanking / Bleaching; Kopp, 2015)

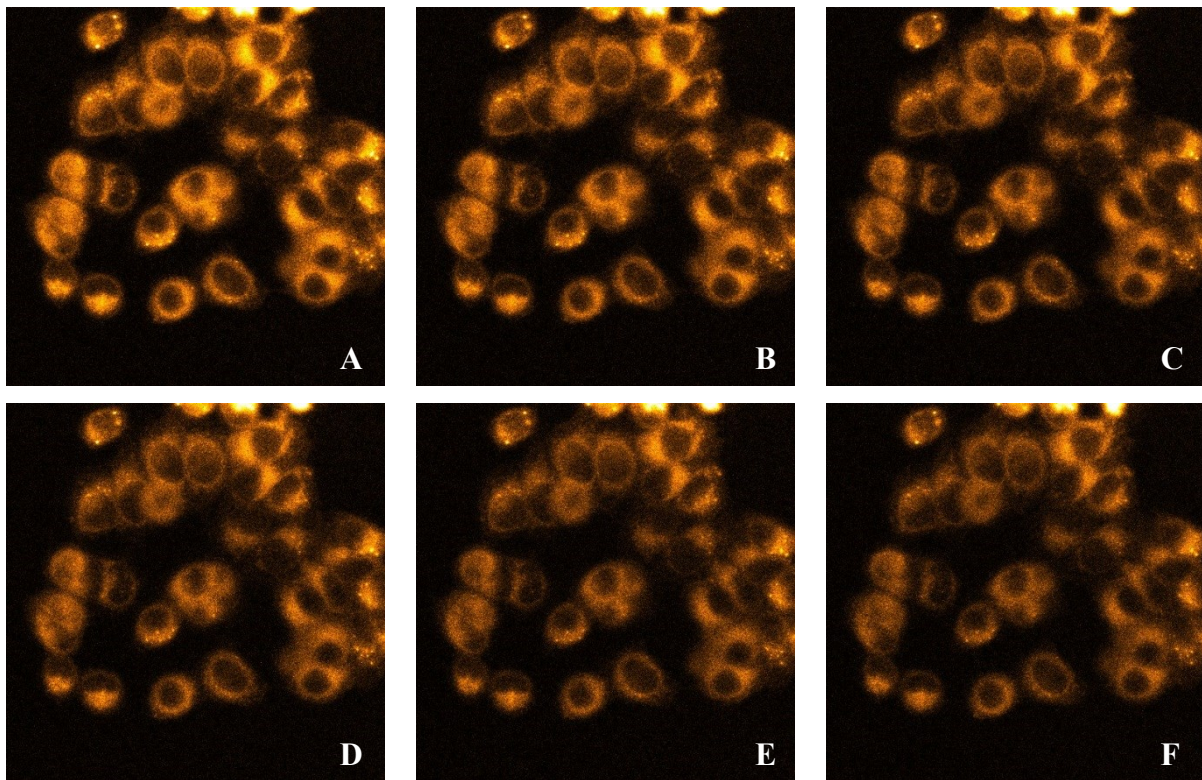


Abbildung 92: Blanking / Bleaching von PNOMSN 17a auf MCF7-Zellen.

Bilder: A = 0 s B = 6 s C = 12 s
 D = 18 s E = 33 s F = 66 s

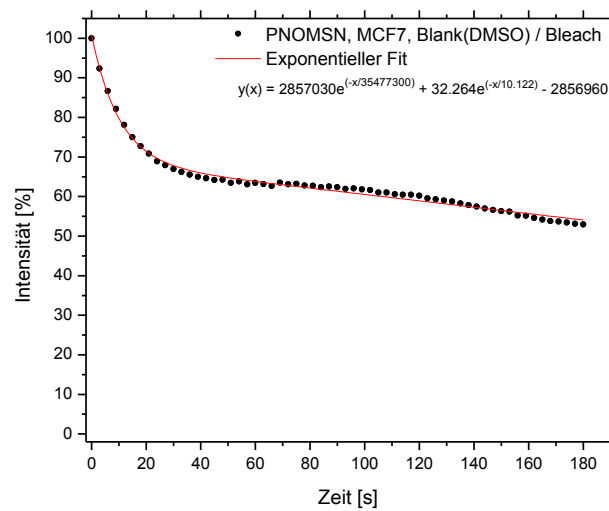


Abbildung 93: Zeitlicher Verlauf des Blankings / Bleachings von PNOMSN 17a auf MCF7-Zellen.

Die Bilder A-F in Abbildung 92 illustrieren die langsame Fluoreszenzabnahme von mitochondrial-akkumuliertem PNOMSN **17a** in MCF7-Zellen. Den zeitlichen Verlauf der Gesamtemissionsintensität (ROI = gesamtes Bild) beschreibt der Graph in Abbildung 93. Diesem ist zu entnehmen, dass zu Beginn der Messung die Fluoreszenz etwas stärker abfällt, als es im restlichen Zeitraum der Fall ist (vgl. Bild A, B, C und D). Die Verteilung des manuell, zugeführten DMSO scheint somit den Versuch anfangs etwas zu beeinflussen. Ab 30 s ist ein schwächerer, annähernd linearer Abfall der Fluoreszenz zu beobachten. Da auch ohne Inhibitoren einige Radikale produziert und von PNOMSN **17a** eingefangen werden, scheint das Bleaching, durch den Anregungslaser vernachlässigbar gering zu sein.

Nach 60 Sekunden wurde eine Fluoreszenz von 64 % der Ausgangsintensität detektiert. Diese ist ausreichend, um innerhalb des relevanten Messzeitraumes aussagekräftige *Quenching*-Experimente mit Inhibitorzugabe durchzuführen. Nach 3 min lag die Fluoreszenzintensität noch bei 56 % was für eine hohe Fluoreszenzstabilität von PNOMSN **17a** spricht ((Bild E, F); Kopp, 2015).

3.6.3.1.2 Fluoreszenzquenching nach Zugabe von Rotenon (20)

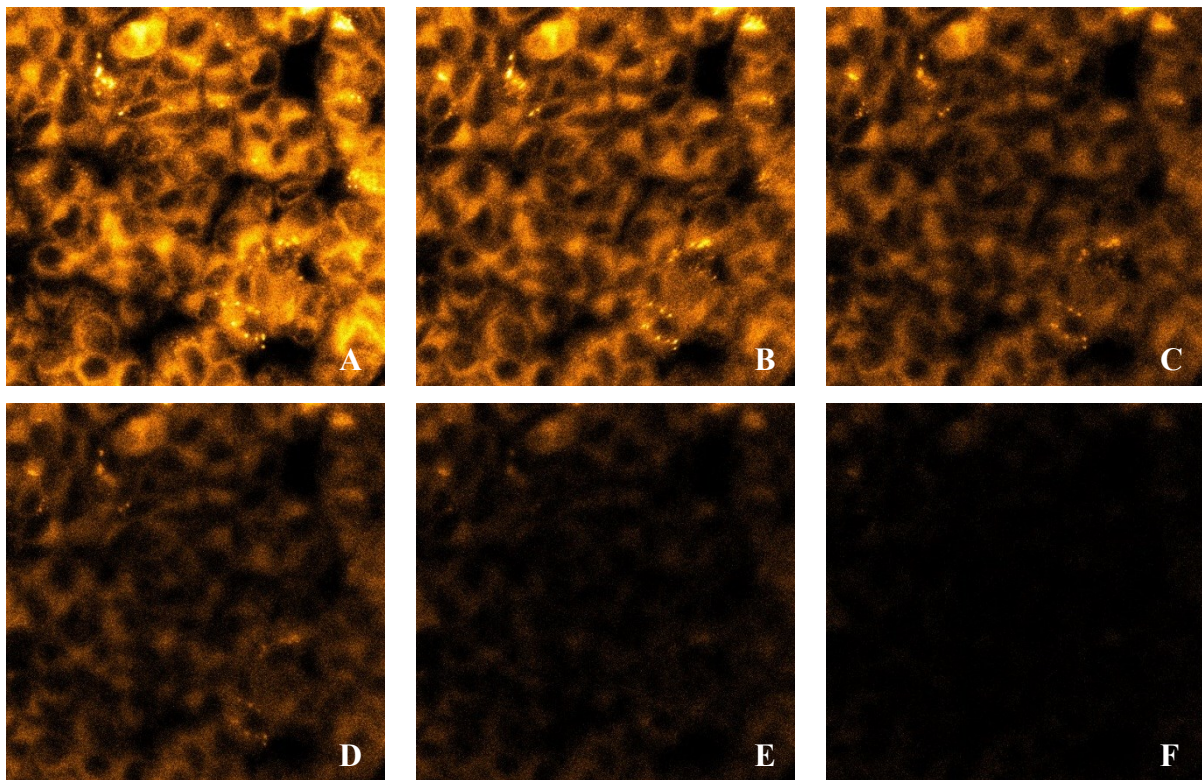


Abbildung 94: Fluoreszenzquenching von PNOMSN **17a** auf MCF7-Zellen nach Zugabe von Rotenon **20**.

Bilder: A = 0 s B = 6 s C = 12 s
 D = 18 s E = 36 s F = 72 s

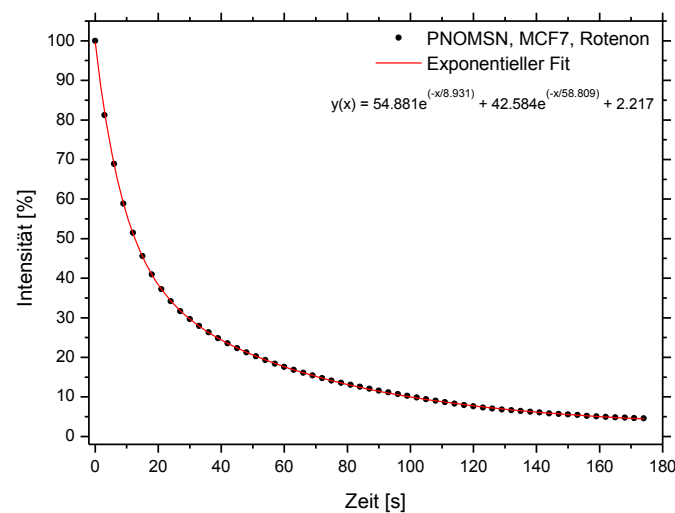


Abbildung 95: Zeitlicher Verlauf des Fluoreszenzquenchings von PNOMSN **17a** auf MCF7-Zellen nach Zugabe von Rotenon **20**.

Die Bilder A-F in Abbildung 94 visualisieren die Fluoreszenzabnahme von mitochondrial-akkumuliertem PNOMSN **17a** in MCF7-Zellen nach Zugabe einer Rotenon **20**-DMSO-Lösung. Der zeitliche Verlauf der Gesamtemissionsintensität (ROI = gesamtes Bild) wird durch den Graphen in Abbildung 95 veranschaulicht. Diesem ist zu entnehmen, dass unmittelbar nach der Inhibitorzugabe die Fluoreszenz stark abnimmt. Der anfängliche Quench-Effekt ist hierbei viel ausgeprägter und schneller als mit reinem DMSO bei Blanking / Bleaching-Versuchen (Kap. 3.6.3.1.1; vgl. Bilder A, B, C, und D). Die Halbwertszeit der Fluoreszenz beträgt 13 Sekunden. Nach 36 s wurde eine Fluoreszenz von 26 % der Ausgangsintensität detektiert (Bild E). Am Ende der Aufzeichnung lag die Fluoreszenzintensität bei 5 %, was angesichts der hohen Fluoreszenzstabilität von PNOMSN **17a** und den Versuchen im Modellsystem (Kap. 3.2 und Kap. 3.4) ein eindeutiger Nachweis für subzelluläres *spin trapping* darstellt.

3.6.3.1.3 Fluoreszenzquenching nach Zugabe von Antimycin A (21)

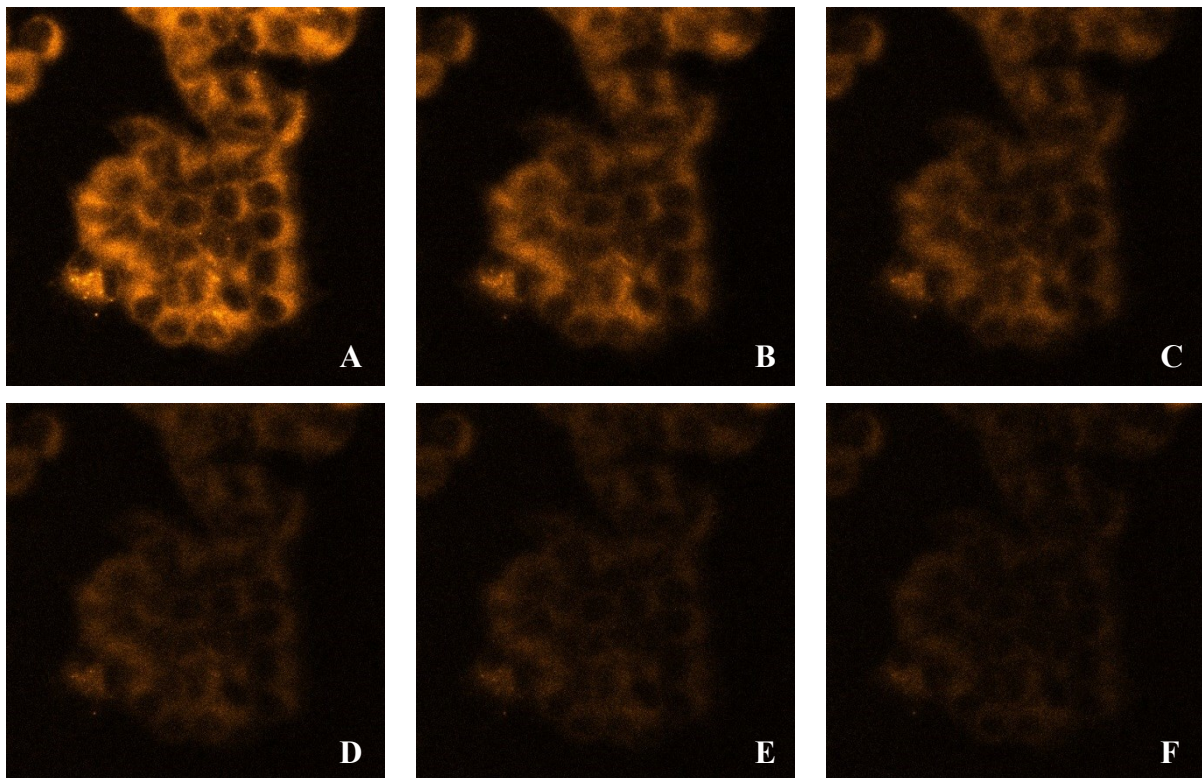


Abbildung 96: Fluoreszenzquenching von PNOMSN 17a auf MCF7-Zellen nach Zugabe von Antimycin A 21.

Bilder: A = 0 s B = 6 s C = 12 s
 D = 21 s E = 30 s F = 60 s

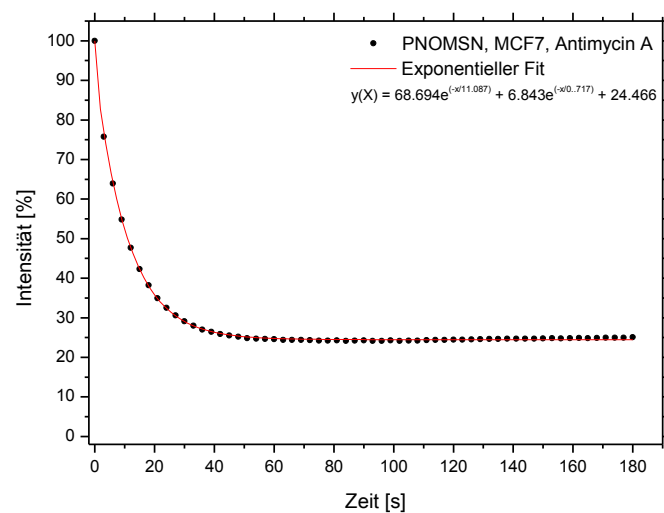


Abbildung 97: Zeitlicher Verlauf des Fluoreszenzquenchings von PNOMSN 17a auf MCF7-Zellen nach Zugabe von Antimycin A 21.

Die Bilder A-F in Abbildung 96 visualisieren die Fluoreszenzabnahme von mitochondrial-akkumuliertem PNOMSN **17a** in MCF7-Zellen nach Zugabe einer Antimycin A **21**-DMSO-Lösung. Der zeitliche Verlauf der Gesamtemissionsintensität (ROI = gesamtes Bild) wird durch den Graphen in Abbildung 97 veranschaulicht. Diesem ist zu entnehmen, dass unmittelbar nach der Inhibitorzugabe die Fluoreszenz stark abnimmt. Der anfängliche Quench-Effekt ist hierbei viel ausgeprägter und schneller als mit reinem DMSO (Kap. 3.6.3.1.1; vgl. Bilder A, B, C, und D). Die Halbwertszeit der Fluoreszenz beträgt 11 s. Ab 40 s stagniert die Fluoreszenz bei etwa 24 % der Ausgangsintensität (Bild F). Dennoch liegt die Fluoreszenz zum Ende der Aufzeichnung um 32 % unterhalb der von Blanking / Bleaching-Experimenten nach 3 min. Somit kann von subzelluläres *spin trapping* ausgegangen werden.

3.6.3.1.4 Fluoreszenzquenching nach Zugabe von Rotenon (20) und Antimycin A (21)

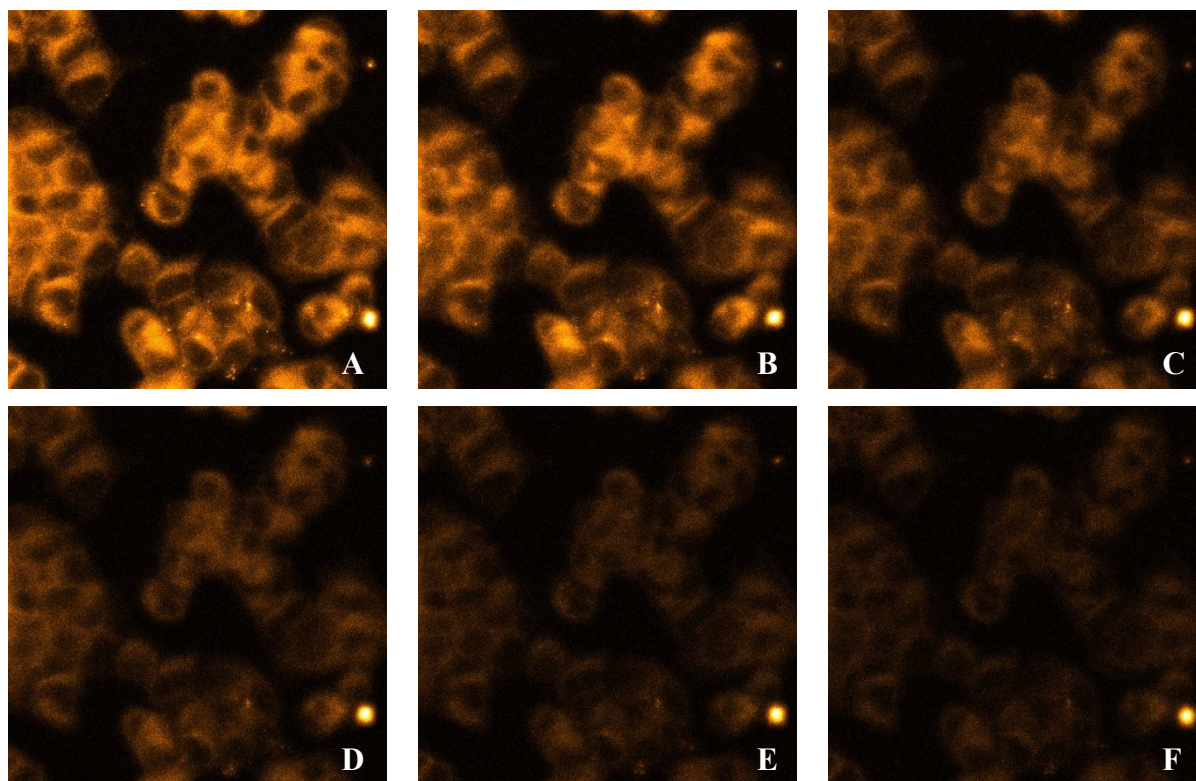


Abbildung 98: Fluoreszenzquenching von PNOMSN 17a auf MCF7-Zellen nach Zugabe von Rotenon 20 und Antimycin A 21.

Bilder: A = 0 s B = 6 s C = 12 s
 D = 21 s E = 42 s F = 69 s

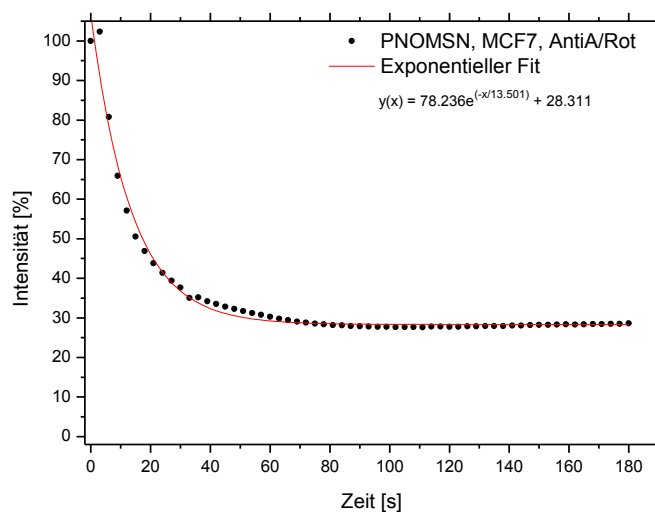


Abbildung 99: Zeitlicher Verlauf des Fluoreszenzquenchings von PNOMSN 17a auf MCF7-Zellen nach Zugabe von Rotenon 20 und Antimycin A 21.

Die Bilder A-F in Abbildung 98 visualisieren die Fluoreszenzabnahme, von mitochondrial-akkumuliertem PNOMSN **17a** in MCF7-Zellen nach Zugabe einer Mischung aus Antimycin A und Rotenon in DMSO. Der zeitliche Verlauf der Gesamtemissionsintensität (ROI = gesamtes Bild) wird durch den Graphen in Abbildung 99 veranschaulicht. Diesem ist zu entnehmen, dass unmittelbar nach der Inhibitorzugabe die Fluoreszenz stark abnimmt. Der anfängliche Quench-Effekt ist hierbei viel ausgeprägter und schneller als mit reinem DMSO (Kap. 3.6.3.1.1; vgl. Bilder A, B, C, und D). Die Halbwertszeit der Fluoreszenz beträgt 15 s. Ab 57 s stagniert die Fluoreszenz bei etwa 28 % der Ausgangsintensität (Bild F). Dennoch liegt Fluoreszenz zum Ende der Aufzeichnung um 28 % unterhalb der beim Blanking / Bleaching nach 3 min. Somit kann von subzellulärem *spin trapping* ausgegangen werden.

3.6.3.2 HeLa-Zellen

3.6.3.2.1 Fluoreszenzabnahme durch Blanking / Bleaching

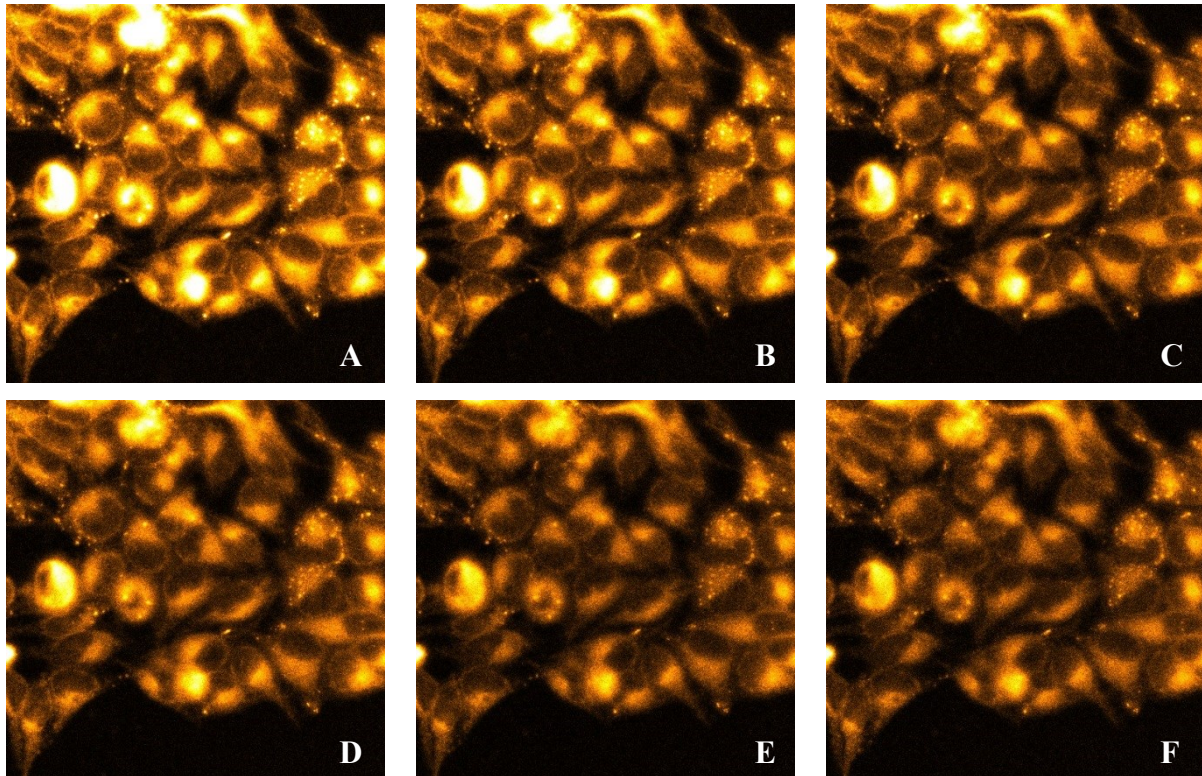


Abbildung 100: Blanking / Bleaching von PNOMSN 17a auf HeLa-Zellen.

Bilder: A = 0 s B = 6 s C = 12 s
 D = 18 s E = 36 s F = 69 s

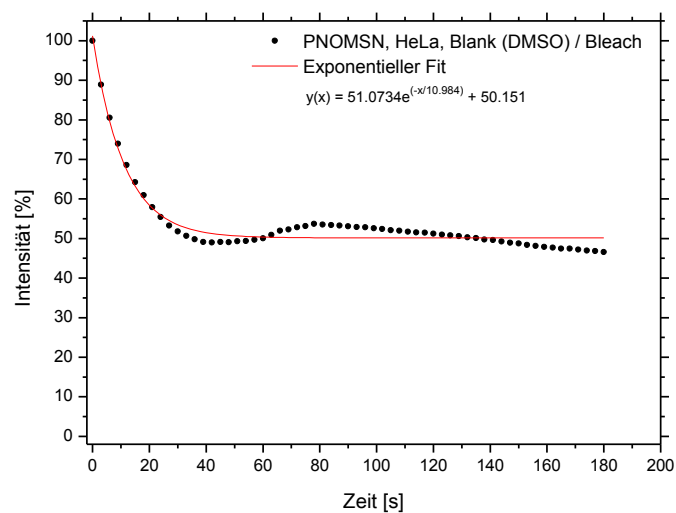


Abbildung 101: Zeitlicher Verlauf des Blankings / Bleachings von PNOMSN 17a auf HeLa-Zellen.

Die Bilder A-F der Abbildung 100 illustrieren die Fluoreszenzabnahme, von mitochondrial-akkumuliertem PNOMSN **17a** in HeLa-Zellen. Den zeitlichen Verlauf der Gesamtemissionsintensität (ROI = gesamtes Bild) beschreibt der Graph in Abbildung 101. Diesem ist zu entnehmen, dass zu Beginn der Messung die Fluoreszenz stärker abnimmt, als im restlichen Zeitraum (vgl. Bild A, B, C und D). Die Verteilung des manuell zugegebenen DMSO hat hier einen stärkeren Einfluss auf die Fluoreszenz, als bei Blank / Bleach-Versuchen mit MCF7-Zellen (Kap. 3.6.3.1) und *wt*-Mef (Kap. 3.6.3.2). Bei sehr hoher Ausgangsintensität der Fluoreszenz (Bild A) wurde ein solcher Effekt häufiger beobachtet. Deshalb wurde bei *Quenching*-Versuchen am *cLSM* auf vergleichbare Anfangsintensitäten geachtet.

Ab 40 s erholt sich die Fluoreszenz leicht und ab 70 s ist ein schwacher, annähernd linearer Abfall der Fluoreszenz zu beobachten. Da auch ohne Inhibitoren einige Radikale produziert und von PNOMSN **17a** eingefangen werden, scheint das Bleaching, durch den Anregungslaser vernachlässigbar gering zu sein. Nach 60 s wurde eine Fluoreszenz von 51 % der Ausgangsintensität detektiert. Diese ist noch ausreichend um innerhalb des relevanten Messzeitraumes aussagekräftige *Quenching*-Experimente nach Inhibitorzugabe durchzuführen. Nach 3 min lag die Fluoreszenzintensität noch bei 47 %, was für eine hohe Fluoreszenzstabilität von PNOMSN **17a** spricht ((Bild E, F); Kopp, 2015)

3.6.3.2.2 Fluoreszenzquenching nach Zugabe von Rotenon (20)

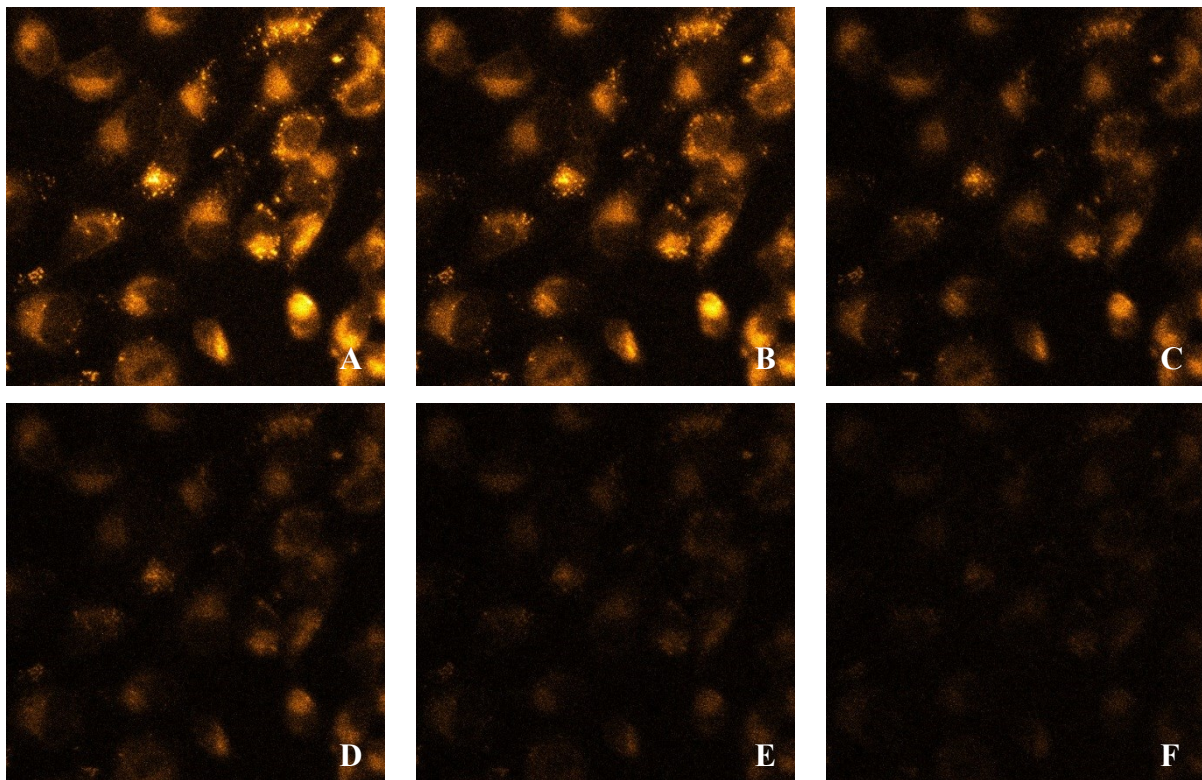


Abbildung 102: Fluoreszenzquenching von PNOMSN 17a auf HeLa-Zellen nach Zugabe von Rotenon 20.

Bilder: A = 0 s B = 3 s C = 9 s
 D = 15 s E = 30 s F = 60 s

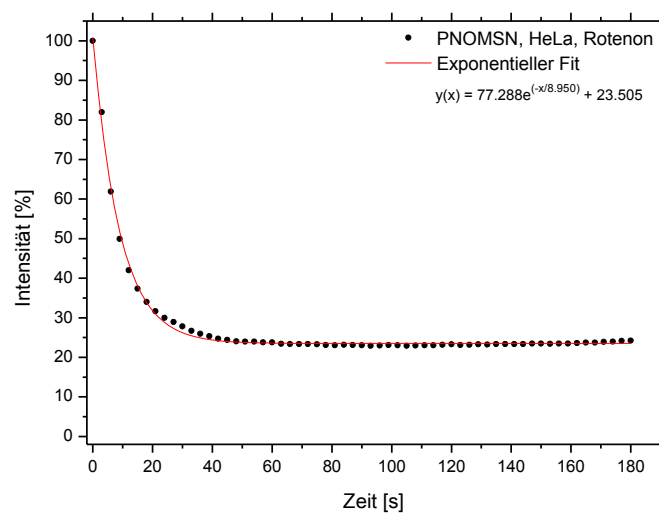


Abbildung 103: Zeitlicher Verlauf des Fluoreszenzquenchings von PNOMSN 17a auf HeLa-Zellen nach Zugabe von Rotenon 20.

Die Bilder A-F in Abbildung 102 visualisieren die Fluoreszenzabnahme, von mitochondrial-akkumuliertem PNOMSN in HeLa-Zellen nach Zugabe einer Rotenon **20**-DMSO-Lösung. Der zeitliche Verlauf der Gesamtmissionsintensität (ROI = gesamtes Bild) wird durch den Graphen in Abbildung 103 veranschaulicht. Diesem ist zu entnehmen, dass unmittelbar nach der Inhibitorzugabe die Fluoreszenz stark abnimmt. Der anfängliche Quench-Effekt ist hierbei viel ausgeprägter und schneller als mit reinem DMSO bei Blanking / Bleaching-Versuchen (Kap. 3.6.3.2.1; vgl. Bilder A, B, C, und D). Die Halbwertszeit der Fluoreszenz beträgt 9 s. Ab 39 s stagniert die Fluoreszenz bei etwa 23 % der Ausgangsintensität (Bild F). Dennoch liegt die Fluoreszenz am Ende der Aufzeichnung um 24 % unterhalb der beim Blanking / Bleaching nach 3 min. Somit kann von subzellulärem *spin trapping* ausgegangen werden.

3.6.3.2.3 Fluoreszenzquenching nach Zugabe von Antimycin A (21)

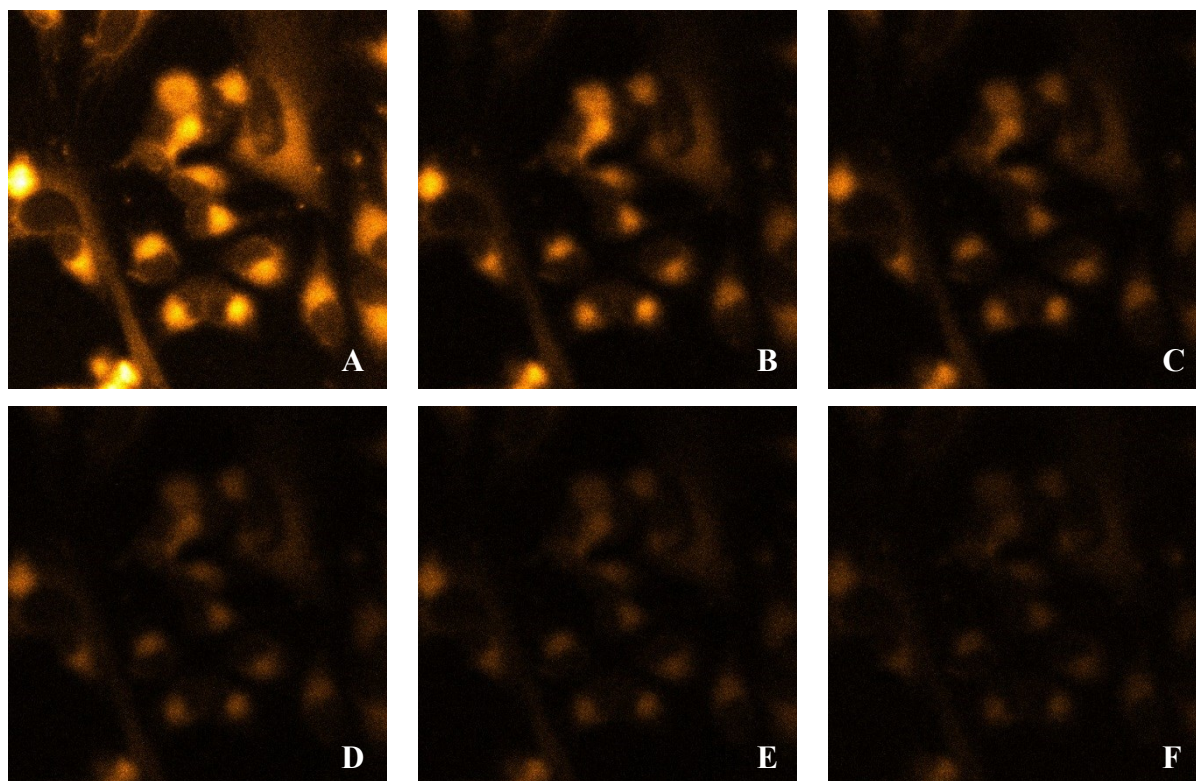


Abbildung 104: Fluoreszenzquenching von PNOMSN 17a auf HeLa-Zellen nach Zugabe von Antimycin A 21.

Bilder: A = 0 s B = 3 s C = 9 s
 D = 15 s E = 21 s F = 60 s

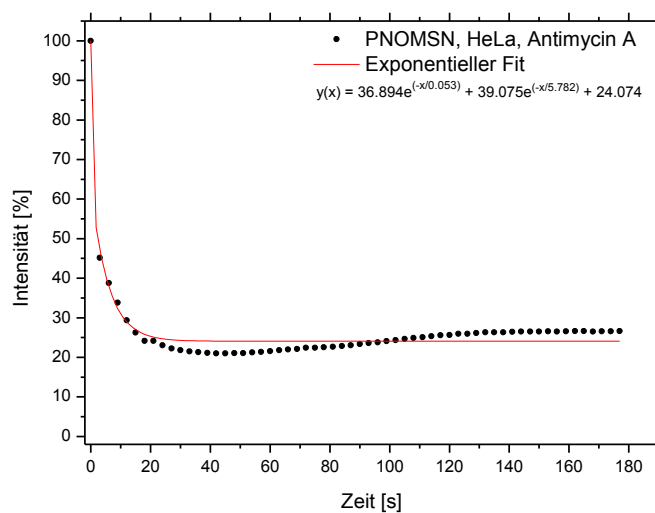


Abbildung 105: Zeitlicher Verlauf des Fluoreszenzquenchings von PNOMSN 17a auf HeLa-Zellen nach Zugabe von Antimycin A 21.

Die Bilder A-F in Abbildung 104 visualisieren die Fluoreszenzabnahme von mitochondrial-akkumuliertem PNOMSN **17a** in HeLa-Zellen nach Zugabe einer Antimycin A **21**-DMSO-Lösung. Der zeitliche Verlauf der Gesamtemissionsintensität (ROI = gesamtes Bild) wird durch den Graphen in Abbildung 105 veranschaulicht. Diesem ist zu entnehmen, dass unmittelbar nach der Inhibitorzugabe die Fluoreszenz stark abnimmt. Der anfängliche Quench-Effekt ist hierbei viel ausgeprägter und schneller als mit reinem DMSO bei Blanking / Bleaching-Versuchen (Kap. 3.6.3.2.1; vgl. Bilder A, B, C, und D). Die Halbwertszeit der Fluoreszenz beträgt 3 s. Ab 25 s stagniert die Fluoreszenz bei etwa 22 % der Ausgangsintensität (Bild F). Dennoch liegt die Fluoreszenz am Ende der Aufzeichnung um 25 % unterhalb der beim Blanking / Bleaching nach 3 min. Somit kann von subzellulärem *spin trapping* ausgegangen werden.

3.6.3.2.4 Fluoreszenzquenching nach Zugabe von Rotenon (20) und Antimycin A (21)

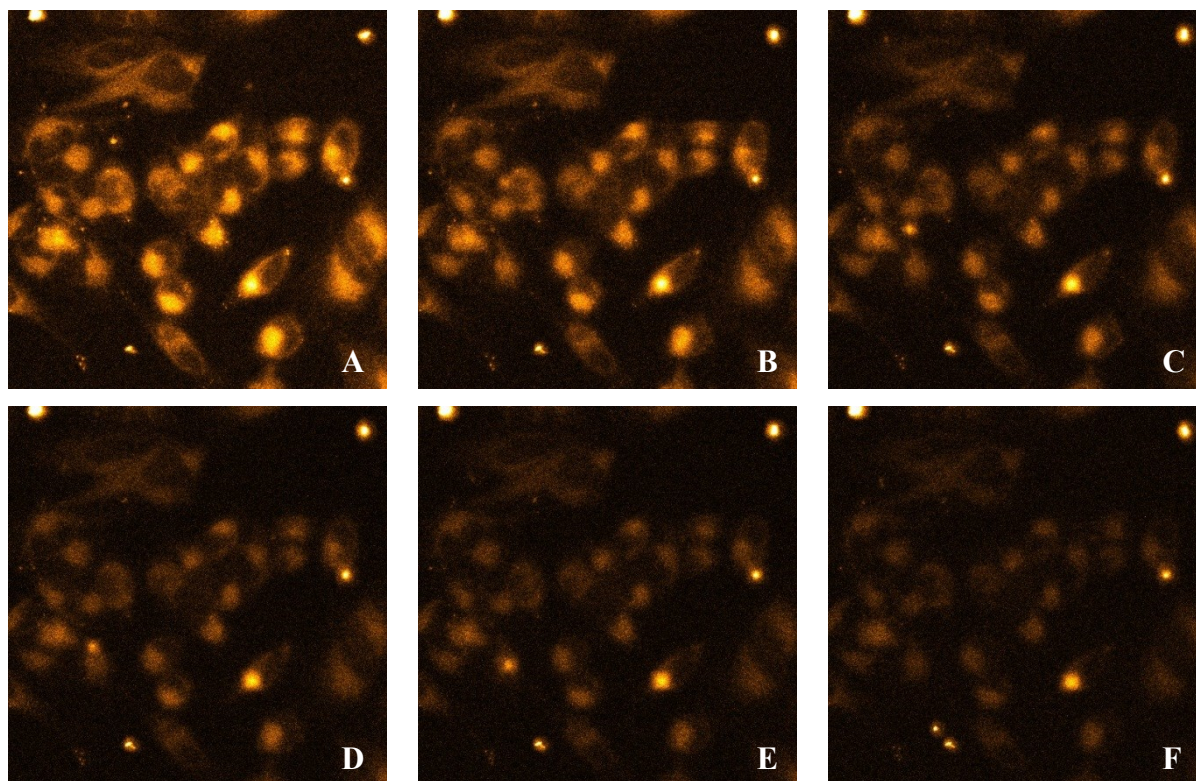


Abbildung 106: Fluoreszenzquenching von PNOMSN 17a auf HeLa-Zellen nach Zugabe von Rotenon 20 und Antimycin A 21.

Bilder: A = 0 s B = 9 s C = 18 s
 D = 27 s E = 36 s F = 72 s

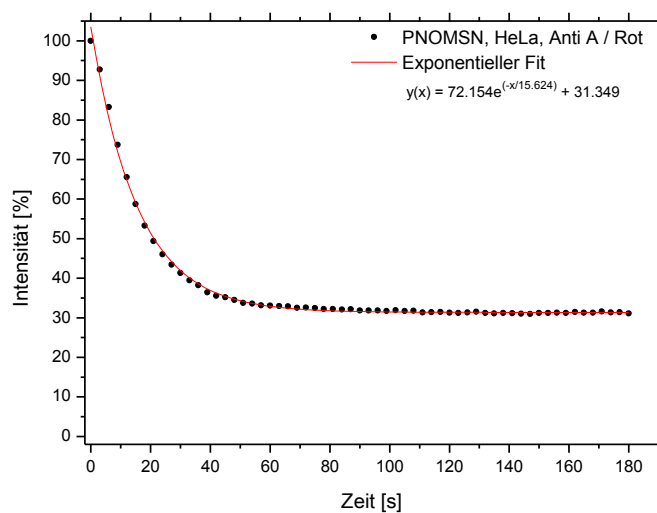
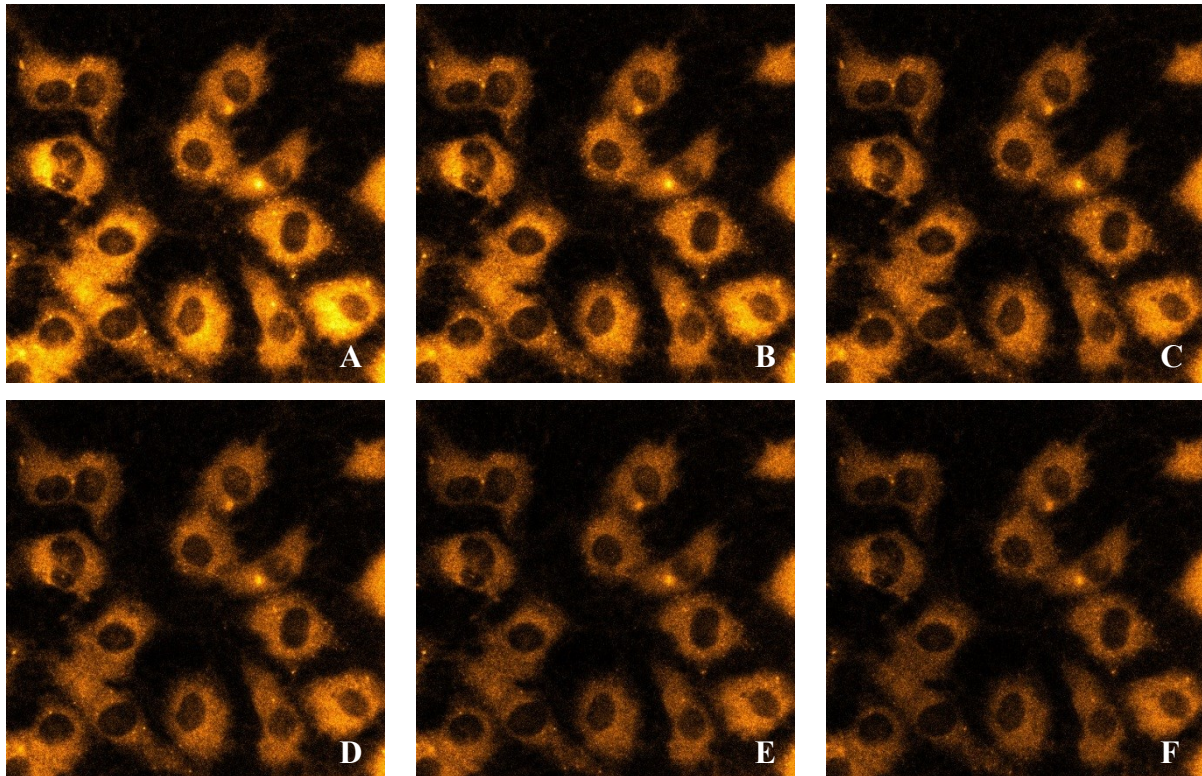
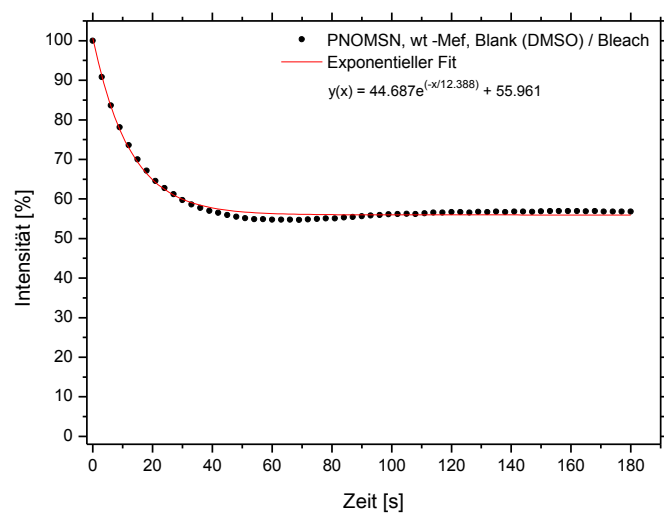


Abbildung 107: Zeitlicher Verlauf des Fluoreszenzquenchings von PNOMSN 17a auf HeLa-Zellen nach Zugabe von Rotenon 20 und Antimycin A 21.

Die Bilder A-F in Abbildung 106 visualisieren die Fluoreszenzabnahme von mitochondrial-akkumuliertem PNOMSN **17a** in HeLa-Zellen nach Zugabe einer Mischung aus Antimycin A **21** und Rotenon **20** in DMSO. Der zeitliche Verlauf der Gesamtemissionsintensität (ROI = gesamtes Bild) wird durch den Graphen in Abbildung 107 veranschaulicht. Diesem ist zu entnehmen, dass unmittelbar nach der Inhibitorzugabe die Fluoreszenz stark abnimmt. Der anfängliche Quench-Effekt ist hierbei viel ausgeprägter und schneller als mit reinem DMSO (Kap. 3.6.3.2.1; vgl. Bilder A, B, C, und D). Die Halbwertszeit der Fluoreszenz beträgt 20 s. Ab 54 s stagniert die Fluoreszenz bei etwa 32 % der Ausgangsintensität (Bild F). Dennoch liegt die Fluoreszenz am Ende der Aufzeichnung um 15 % unterhalb der beim Blanking / Bleaching nach 3 min. Somit kann von subzellulärem *spin trapping* ausgegangen werden.

3.6.3.3 *wt*-Mef**3.6.3.3.1** Fluoreszenzabnahme durch Blanking / Bleaching**Abbildung 108:** Blanking / Bleaching von PNOMSN 17a auf *wt*-Mef-Zellen.

Bilder: A = 0 s B = 6 s C = 12 s
 D = 18 s E = 33 s F = 66 s

**Abbildung 109:** Zeitlicher Verlauf des Blankings / Bleachings von PNOMSN 17a auf *wt*-Mef.

Die Bilder A-F in Abbildung 108 illustrieren die langsame Fluoreszenzabnahme, von mitochondrial-akkumuliertem PNOMSN **17a** in *wt*-Mef. Den zeitlichen Verlauf der Gesamtemissionsintensität (ROI = gesamtes Bild) beschreibt der Graph in Abbildung 109. Wie auch schon bei MCF7- als auch HeLa-Zellen ist diesem zu entnehmen, dass anfangs die Fluoreszenz etwas stärkerer zurückgeht, als es im restlichen Zeitraum der Fall ist (vgl. Bild A, B, C und D). Die Verteilung des manuell, zugeführten DMSO scheint somit auch hier den Versuch wären der ersten 30 Sekunden zu beeinflussen. Danach ist ein schwacher, annähernd linearer Abfall der Fluoreszenz zu beobachten. Man kann davon ausgehen, dass auch ohne Inhibitoren einige Radikale produziert und von PNOMSN eingefangen werden. Somit scheint das Bleaching, durch den Anregungslaser vernachlässigbar gering zu sein. Nach 60 s wurde eine Fluoreszenz von 56 % der Ausgangsintensität detektiert. Diese ist ausreichend um innerhalb des relevanten Messzeitraumes aussagekräftige *Quenching*-Experimente nach Inhibitorzugabe durchzuführen. Nach 3 min lag die Fluoreszenzintensität noch bei 55 %, was für eine hohe Fluoreszenzstabilität von PNOMSN **17a** spricht (Bild E, F).

3.6.3.3.2 Fluoreszenzquenching nach Zugabe von Rotenon (20)

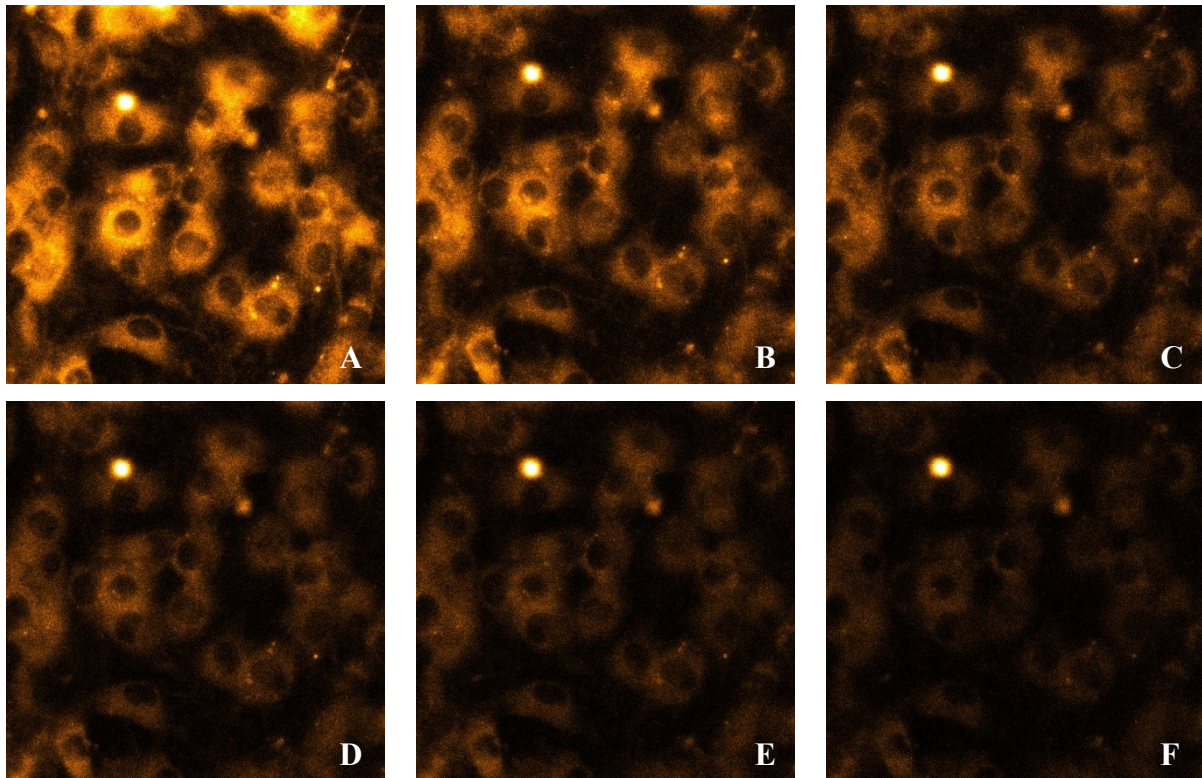


Abbildung 110: Fluoreszenzquenching von PNOMSN 17a auf *wt*-Mef nach Zugabe von Rotenon 20.

Bilder: A = 0 s B = 6 s C = 12 s
 D = 21 s E = 36 s F = 72 s

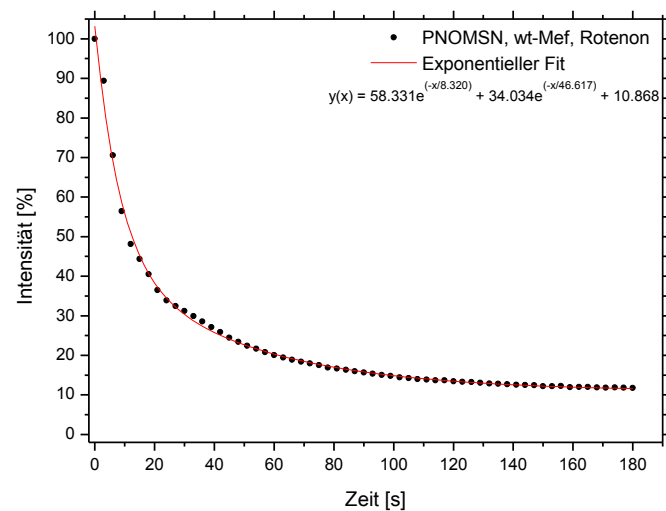


Abbildung 111: Zeitlicher Verlauf des Fluoreszenzquenching von PNOMSN 17a auf *wt*-Mef nach Zugabe von Rotenon 20.

Die Bilder A-F in Abbildung 110 visualisieren die Fluoreszenzabnahme, von mitochondrial-akkumuliertem PNOMSN **17a** in *wt*-Mef nach Zugabe einer Rotenon **20**-DMSO-Lösung. Der zeitliche Verlauf der Gesamtemissionsintensität (ROI = gesamtes Bild) wird durch den Graphen in Abbildung 111 veranschaulicht. Diesem ist zu entnehmen, dass unmittelbar nach der Inhibitorzugabe die Fluoreszenz stark abnimmt. Der anfängliche Quench-Effekt ist hierbei viel ausgeprägter und schneller als mit reinem DMSO bei Blanking / Bleaching-Versuchen (Kap. 3.6.3.3.1; vgl. Bilder A, B, C, und D). Die Halbwertszeit der Fluoreszenz beträgt 11 s. Nach 36 s wurde eine Fluoreszenz von 27 % der Ausgangsintensität detektiert (Bild E). Am Ende der Aufzeichnung lag die Fluoreszenzintensität bei 11 %, was angesichts der hohen Fluoreszenzstabilität von PNOMSN **17a** und den Versuchen im Modellsystem (Kap. 3.2 und Kap. 3.4), ein eindeutiger Nachweis für subzelluläres *spin trapping* darstellt.

3.6.3.3.3 Fluoreszenzquenching nach Zugabe von Antimycin A (21)

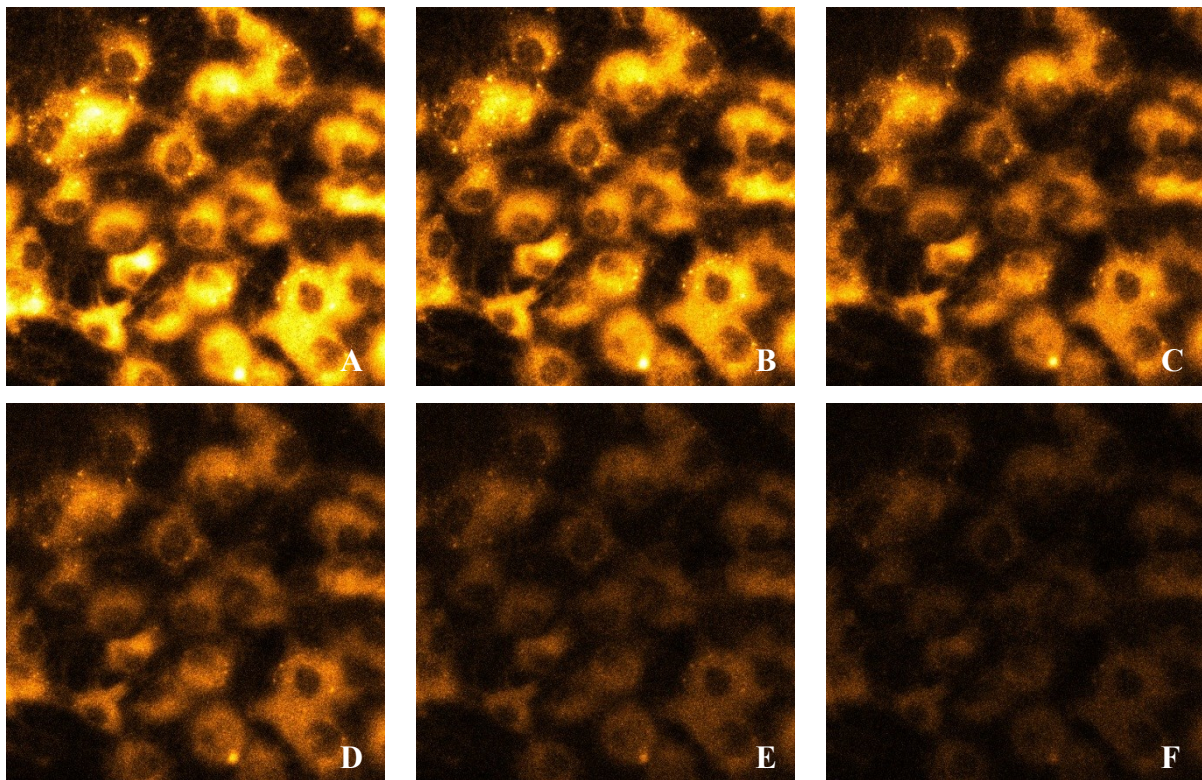


Abbildung 112: Fluoreszenzquenching von PNOMSN 17a auf *wt*-Mef nach Zugabe von Antimycin A 21.

Bilder: A = 0 s B = 3 s C = 9 s
 D = 15 s E = 30 s F = 60 s

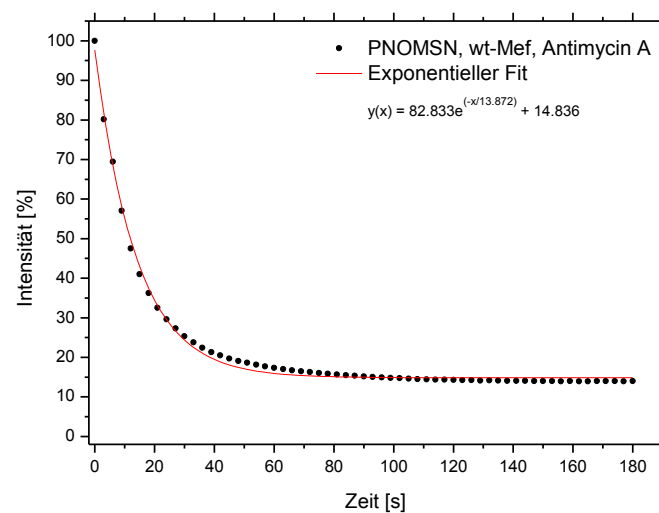


Abbildung 113: Zeitlicher Verlauf des Fluoreszenzquenchings von PNOMSN 17a auf *wt*-Mef nach Zugabe von Antimycin A 21.

Die Bilder A-F in Abbildung 112 visualisieren die Fluoreszenzabnahme, von mitochondrial-akkumuliertem PNOMSN **17a** in *wt*-Mef nach Zugabe einer Antimycin A **21**-DMSO-Lösung. Der zeitliche Verlauf der Gesamtemissionsintensität (ROI = gesamtes Bild) wird durch den Graphen in Abbildung 113 veranschaulicht. Diesem ist zu entnehmen, dass unmittelbar nach der Inhibitorzugabe die Fluoreszenz stark abnimmt. Der anfängliche Quench-Effekt ist hierbei viel ausgeprägter und schneller als mit reinem DMSO bei Blanking / Bleaching-Versuchen (Kap. 3.6.3.3.1; vgl. Bilder A, B, C, und D). Die Halbwertszeit der Fluoreszenz beträgt 11 s. Nach 30 s wurde eine Fluoreszenz von 24 % der Ausgangsintensität detektiert (Bild E). Am Ende der Aufzeichnung lag die Fluoreszenzintensität bei 14 %, was angesichts der hohen Fluoreszenzstabilität von PNOMSN **17a** und den Versuchen im Modellsystem (Kap. 3.2 und Kap. 3.4) ein eindeutiger Nachweis für subzelluläres *spin trapping* darstellt.

3.6.3.3.4 Fluoreszenzquenching nach Zugabe von Rotenon (20) und Antimycin A (21)

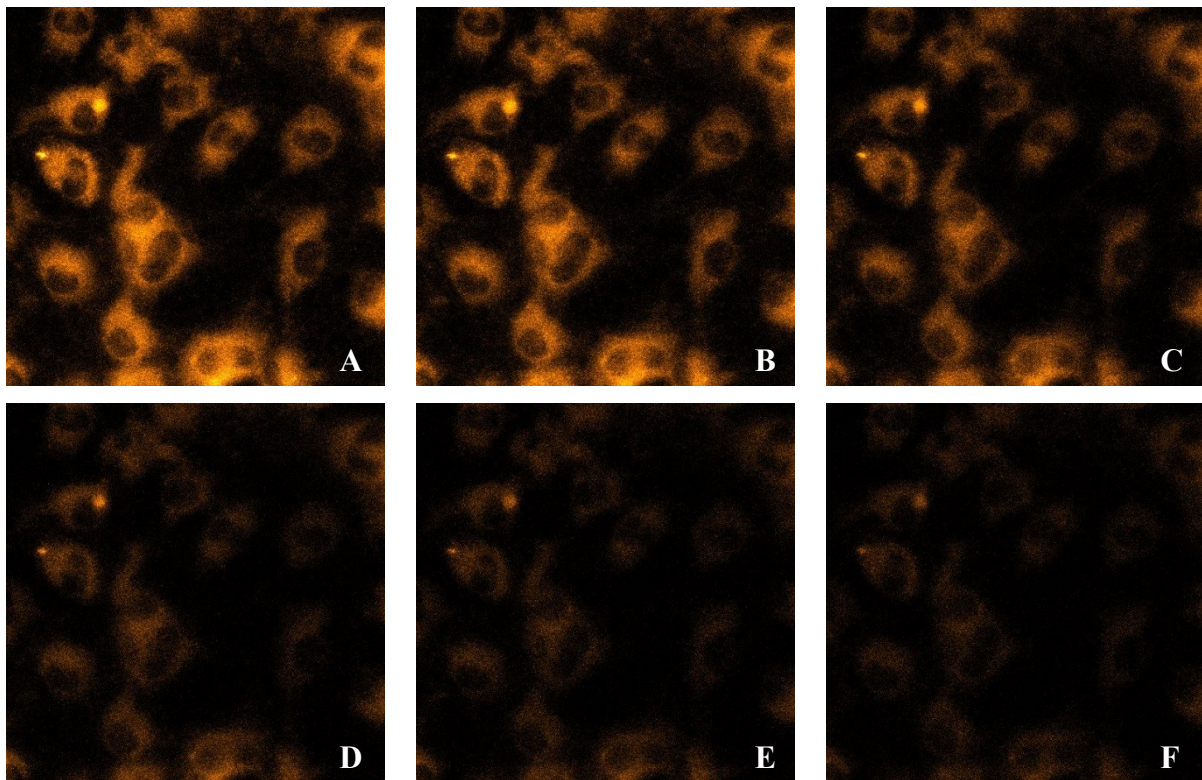


Abbildung 114: Fluoreszenzquenching von PNOMSN 17a auf *wt*-Mef nach Zugabe von Rotenon 20 und Antimycin A 21.

Bilder: A = 0 s B = 3 s C = 9 s
 D = 18 s E = 30 s F = 60 s

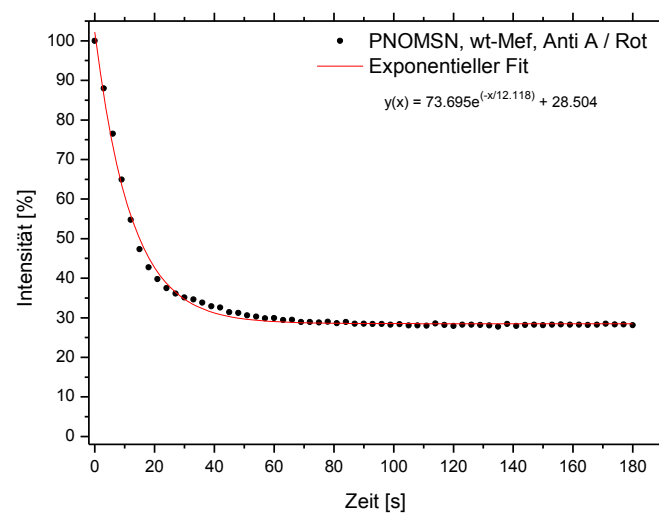


Abbildung 115: Zeitlicher Verlauf des Fluoreszenzquenchings von PNOMSN 17a auf *wt*-Mef nach Zugabe von Rotenon 20 und Antimycin A 21.

Die Bilder A-F in Abbildung 114 visualisieren die Fluoreszenzabnahme, von mitochondrial-akkumuliertem PNOMSN **17a** in *wt*-Mef nach Zugabe einer Mischung aus Antimycin A **21** und Rotenon **20** in DMSO. Der zeitlichen Verlauf der Gesamtemissionsintensität (ROI = gesamtes Bild) wird durch den Graphen in Abbildung 115 veranschaulicht. Diesem ist zu entnehmen, dass unmittelbar nach der Inhibitorzugabe die Fluoreszenz stark abnimmt. Der anfängliche Quench-Effekt ist hierbei viel ausgeprägter und schneller als mit reinem DMSO (Kap. 3.6.3.3.1; vgl. Bilder A, B, C, und D). Die Halbwertszeit der Fluoreszenz beträgt 14 s. Ab 51 s stagniert die Fluoreszenz bei etwa 28 % der Ausgangsintensität (Bild F). Dennoch liegt Fluoreszenz am Ende der Aufzeichnung um 27 % unterhalb der beim Blanking / Bleaching nach 3 min. Somit kann von subzellulärem *spin trapping* ausgegangen werden.

3.6.3.3.5 Diskussion der Ergebnisse des *in vitro*- Fluoreszenzquenchings von PNOMSN (17a)

Anhand der adhärennten Zelllinien MCF7, HeLa und *wt*-Mef konnte fluoreszenzmikroskopisch gezeigt werden, dass PNOMSN **17a** fähig ist mitochondrial-gebildete Radikale einzufangen. Die anfängliche Abnahme dessen Fluoreszenz, während der zellulären Verteilung von DMSO (Lösungsmittel für Atmungsketteninhibitoren; Blanking / Bleaching), störte die Experimente nur in geringem Maß. Der Quench-Effekt nach Zugabe von Rotenon **20** oder Antimycin A **21** fiel wesentlich stärker aus. Ungewöhnlich hingegen ist, dass der gleichzeitige Einsatz beider Inhibitoren in signifikant höheren Halbwertszeiten und „Endfluoreszenzen“ (nach 3 min) resultierte (Zusammenfassung der Ergebnisse von Kap. 3.6.3; Tabelle 7).

Tabelle 7: Halbwertszeiten und prozentuale Fluoreszenzabnahme von PNOMSN **17a** auf den untersuchten Zelllinien mit und ohne Zugabe an Atmungsketteninhibitoren.

Zelllinie	MCF7		HeLa		<i>wt</i> -Mef	
	$T_{1/2}$	nach 3 min	$T_{1/2}$	nach 3 min	$T_{1/2}$	nach 3 min
Blanking / Bleaching	n. a.	56 %	63 s	47 %	n. a.	55 %
Rotenon 20	13 s	5 %	9 s	23 %	11 s	11 %
Antimycin A 21	11 s	32 %	3 s	22 %	11 s	14 %
Rotenon 20 und Antimycin A 21	15 s	28 %	20 s	32 %	14 s	28 %

^a von **17a** bezüglich der normierten Ausgangsintensität (100 %)

3.7 *Ex vitro*-Nachweis extrahierter Spin-Addukte

Neben dem fluoreszenzmikroskopischen Nachweis *in vitro*-gebildeter Radikale durch PNOMSN 17a (Kap. 3.6), sollen in dieser zusätzlichen Studie, die dazu korrespondierenden Nitroxidradikale aus Zellen extrahiert und EPR-spektroskopisch vermessen werden.

Bezüglich der Probenvorbereitung für Studien am *cLSM*, blieben bei diesen Versuchen sowohl die Inkubationszeiten, als auch *spin trap*- Konzentrationen unverändert. Das Probevolumen, bzw. die Zellanzahl wurde um das 10-fache erhöht, um höhere Konzentrationen der Spin-Addukte zu erzielen. Da die Inhibitorzugabe lokal am Objektiv des *cLSMs* erfolgte, wurde auch dessen Menge um den Faktor 10 erhöht.

Der durch DMSO angelöste Zellrasen wurde separiert, in entgastem Ethylacetat eingelegt, gevortext und per *sonifier* aufgeschlossen.

Auch für die folgenden EPR-spektroskopischen Untersuchungen wurden vollständig entgaste Lösungsmittel verwendet, um eine sauerstoffbedingte Linienverbreiterung zu minimieren. Da bei der Probenvorbereitung nicht dauerhaft unter Inertgasatmosphäre gearbeitet werden konnte, wurde die separierte, organische Phase mittels längerer Stickstoffeinleitung zusätzlich entgast und so gleichzeitig auf etwa 100 µl aufkonzentriert. Die Vermessung der jeweiligen Proben erfolgte in Schutzgas gefluteten Glaskapillaren.

Die Parameter dazu wurden bzgl. der literarischen Quellen nur leicht variiert und sind im experimentellen Teil aufgeführt (Hauck, 2007; Leinisch, 2009).

3.7.1 Extrahierbare Nitroxylradikale in Kunststoffverbrauchsmaterialien

Im Rahmen dieser Studie wurde für alle drei Zelllinien, ein für Nitroxylradikale typisches 3-Linien-Signal detektiert. Ungewöhnlich hingegen war die sehr hohe, teils maximale Signalintensität.

Im Modellsystem (Kap. 3.2) wurde mit identischen Messparametern und einer etwa 5-fach höherer Spinaddukt-Konzentration (Annahme einer vollständigen Extraktion und vergleichbar effizientem *radical trapping*) ein wesentlich schlechteres Signal / Rausch-Verhältnis registriert. Zudem konnte trotz mehrfachen Entgasens keine weiteren Hyperfeinwechselwirkungen mit β -Wasserstoffkernen aufgelöst werden (Abbildung 116, 117 und 118).

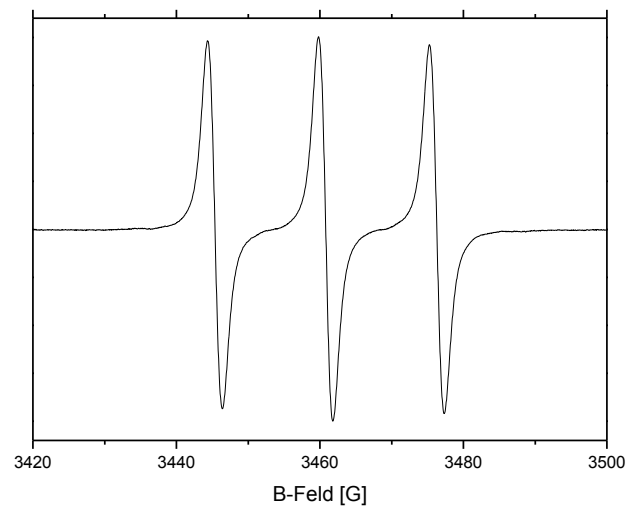


Abbildung 116: EPR-Spektrum von unbekanntem Nitroxylradikalen in Ethylacetat nach MCF7-Zellextraktion.

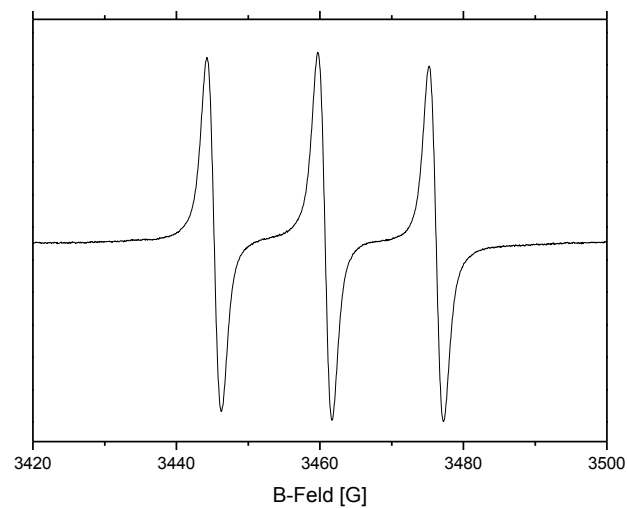


Abbildung 117: EPR-Spektrum von unbekanntem Nitroxylradikalen in Ethylacetat nach HeLa-Zellextraktion.

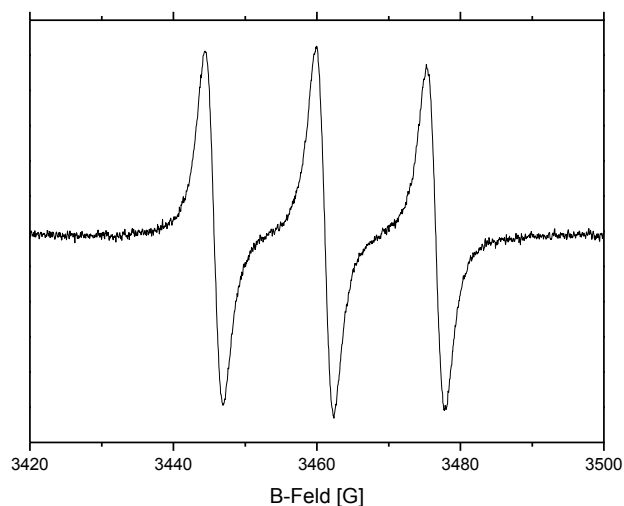


Abbildung 118: EPR-Spektrum von unbekanntem Nitroxylradikalen in Ethylacetat nach *wt*-Mef-Zellextraktion.

Aufgrund der Annahme einer äußeren Verunreinigung durch Radikale wurden die Experimente unter Ausschluss von Nitron **17a** wiederholt. Da jeweils die gleichen Signale detektiert wurden, konnten die Nitroxidradikale nicht aus PNOMSN **17a** entstanden sein.

Während eines Ausschlussverfahrens wurde weder eine Kontamination der EPR-*cavity*, noch der Zellkultur (-Flaschen) festgestellt. Nach Vermessung des Extraktionsmittels stellte sich heraus, dass die Verunreinigung mit Nitroxylradikalen dem konische Zentrifugenröhrchen, indem Ethylacetat für mehrere Tage lagerte, zugeordnet werden kann.

Was schon seit längerem bekannt, aber nur selten berücksichtigt wird ist, dass sog. *Extractables* und *Leachables* aus Kunststoffen von Verbrauchsmaterialien herausgelöst und die Versuchsdaten und deren Interpretation beeinflussen können. Dies bezieht sich hauptsächlich auf biochemische und biologische *Assays* (Olivieri *et al.*, 2012). Die pharmazeutische Industrie ist derzeit der einzige Industriezweig, der verpflichtet ist, toxikologische Studien und Bewertungen von *Extractables* und *Leachables* ihrer Produkte zu veranlassen. Aus der EPR-spektroskopischer Sicht wurde dies bisher noch nicht betrachtet.

Es ist allgemein bekannt, dass sog. *hindered amine light stabilizer* (HALS), Polyolefinen und anderen Polymeren zugesetzt werden. Diese gängigen Additive wirken als Radikalfänger, bzw. Antioxidantien und schützen das Material gegen dessen photochemische Zersetzung (Przybytniak *et al.*, 2005). Somit wird davon ausgegangen, dass oxidierte HALS-Verbindungen der Grund für ein überlagertes EPR-Signal ist (Abbildung 119).

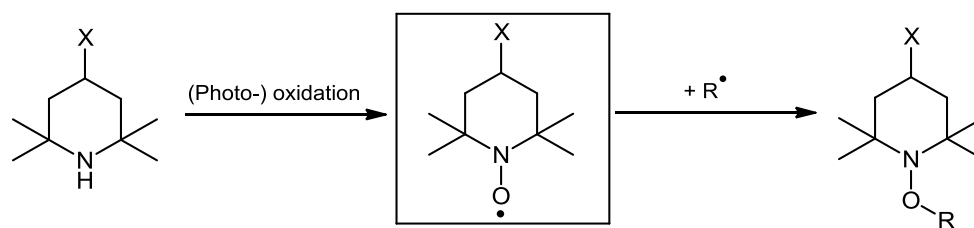


Abbildung 119: (Photo-)oxidation eines TEMP- (HALS) - zum TEMPO-Derivat mit anschließender Radikaladdition.

In einer Reihe von Experimenten wurden Verbrauchsmaterialien, wie konische Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml), Pipettenspitzen und Mikrozentrifugenröhrchen von zwei verschiedenen Herstellern (Greiner und Sarstedt), für 2 bis 7 Tage mit Ethylacetat (EtOAc), Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Wasser (H₂O) inkubiert. Die Kunststoffe wurden während der Inkubationszeit im Dunkeln gehalten, oder natürlichem Licht ausgesetzt. Die Extrakte wurden mehrfach entgast, eingengt und via EPR vermessen.

Die Proben aller in DMSO und Wasser eingelegten Verbrauchsmaterialien enthielten keine Nitroxidradikale. Auch die EPR-Spektren von Pipettenspitzen und Mikrozentrifugenröhrchen zeigen kein Signal für Nitroxide (Abbildung 120).

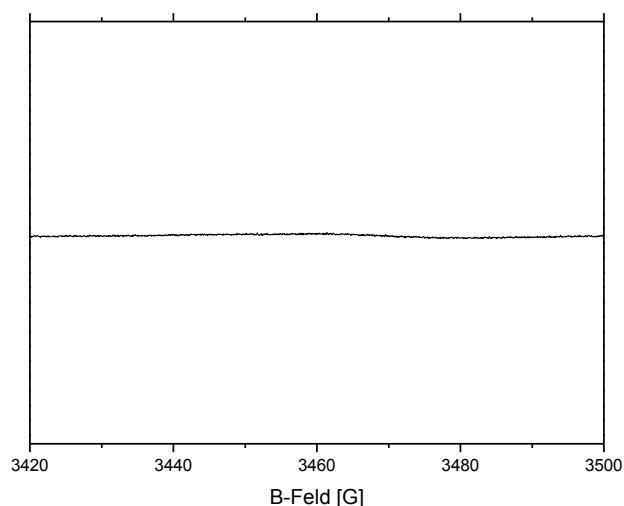


Abbildung 120: Beispiel für ein EPR-Spektrum ohne extrahierte Nitroxylradikale.

Die EPR-Spektren der Ethylacetat- und DMF-Extrakte von konische Zentrifugenröhrchen (beider Hersteller), mit als auch ohne Bestrahlung, bestätigten die Anwesenheit von Nitroxiden, wobei geringfügige Unterschiede der Signalintensitäten festgestellt wurden (Abbildung 121).

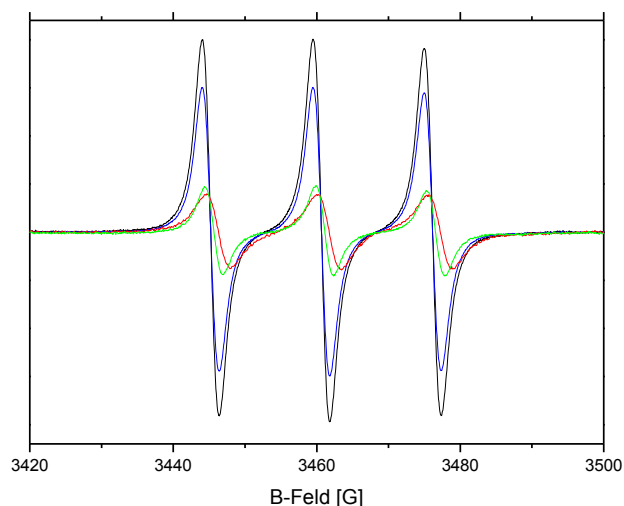


Abbildung 121: Auswahl von EPR-Spektren extrahierter Nitroxylradikale aus konischen Zentrifugenröhrchen unterschiedlicher Größe; verschiedener Hersteller; variiertes Inkubationszeiten der Lösungsmittel; mit oder ohne Lichtexposition.

Schwarz: 50 ml konisches Zentrifugenröhrchen; Sarstedt; EtOAc; 7 d

Blau: 50 ml konisches Zentrifugenröhrchen; Greiner; DMF; 7 d

Rot: 15 ml konisches Zentrifugenröhrchen; Greiner; EtOAc; 2 d

Grün: 15 ml konisches Zentrifugenröhrchen; Greiner; EtOAc; 2 d; Belichtung

Die Hersteller der untersuchten Verbrauchsmaterialien konnten keine Auskunft über mögliche HALS-Verbindung in ihren Kunststoffprodukten geben.

Analytischen Dienstleistern für die Pharmaindustrie sind HALS-Verbindungen als *Extractables* ein Begriff. Die oxidierten TEMPO-Derivate jedoch nicht. Als Zwischenprodukte in Polymeren (Abbildung 119) sind diese wahrscheinlich in nur sehr geringen Konzentrationen vorhanden. Da die EPR-Spektroskopie ein sehr sensitives Verfahren zum Nachweis kleinster paramagnetischer Mengen darstellt (Kap. 1.4.2), können schon geringste Verunreinigungen einen signifikanten Einfluss auf die Spektren haben.

Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, ist das Vermeiden von Kunststoffen bei der Probenvorbereitung. Verbrauchsmaterialien durch Glas zu ersetzen (Kap. 3.7.2), ist bei solchen Experimenten nicht immer möglich, da sterile Laborprodukte aus Polymeren gefertigt werden. Zudem werden sie aufgrund ihrer Haltbarkeit und geringen Kosten bevorzugt verwendet.

Da man bei Kunststoffen nicht auf die etablierten HALS-Additive verzichten kann, sollte sich jeder EPR-Spektroskopiker einer möglichen Kontamination mit Nitroxylradikalen bewusst sein, falls Proben in organischen Lösungsmitteln gelöst und in Kontakt mit Verbrauchsmaterialien kommen.

3.7.2 *Ex vitro* EPR-Messungen *in vitro* gebildeter Nitroxylradikale

Analog zu der in Kap. 3.7 beschriebenen Weise wurden die *in vitro* gebildeten, zu PNOMSN **17a** korrespondierenden Spin-Addukte (Abbildung 122) extrahiert, entgast, eingengt und via EPR vermessen. Dabei wurde sorgfältig darauf geachtet, dass das zu untersuchende Extrakt nicht mit Polymeren (siehe Kap. 3.7.1) in Berührung kam.

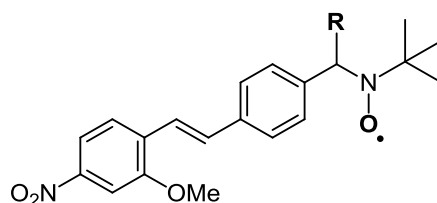


Abbildung 122: Struktur eines Spin-Addukts von PNOMSN **17a**.

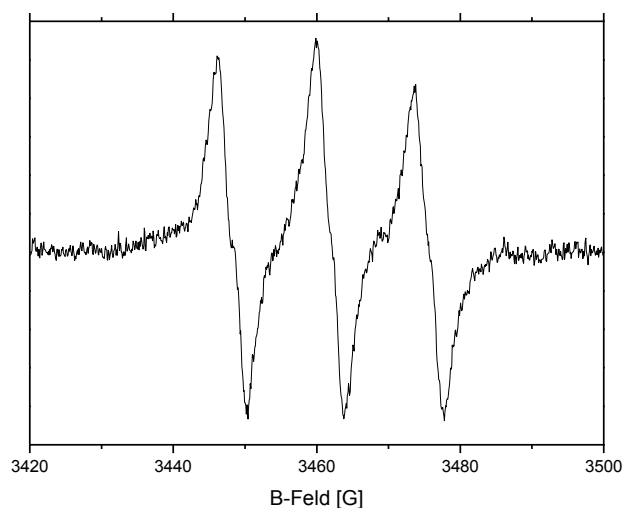


Abbildung 123: EPR-Spektrum eines Spin-Addukts von PNOMSN **17a** in Ethylacetat nach MCF7-Zellextraktion.

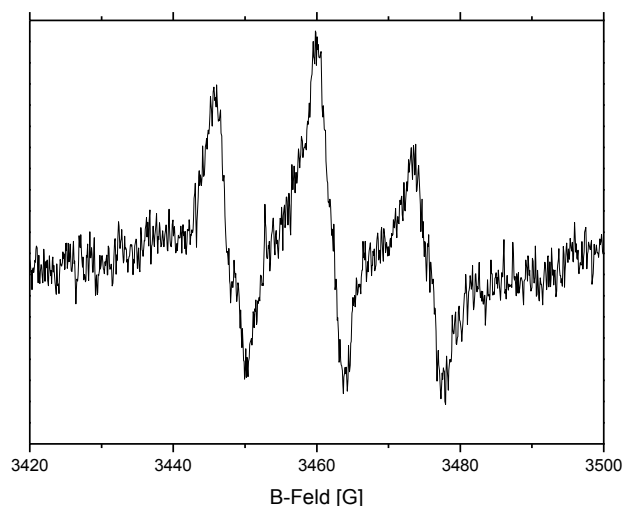


Abbildung 124: EPR-Spektrum eines Spin-Addukts von PNOMSN **17a** in Ethylacetat nach HeLa-Zellextraktion.

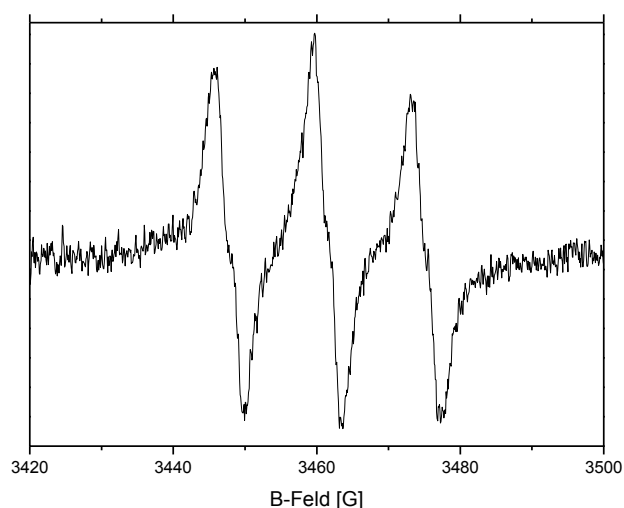


Abbildung 125: EPR-Spektrum eines Spin-Addukts von PNOMSN **17a** in Ethylacetat nach *wt*- Mef-Extraktion.

Es konnte nachgewiesen werden, dass PNOMSN **17a** auch *in vitro* (MCF7, HeLa und *wt*-Mef-Zellen; Abbildung 123, 124 und 125) in der Lage ist als *spin trap* zu fungieren und dort mit radikalischen ROS, EPR-spektroskopisch detektierbare Nitroxylradikale zu bilden (Abbildung 122). Im Gegensatz zu den Messungen im Modellsystem (Kap. 3.2) konnte bei dieser wiederholten Versuchsreihe, trotz mehrfachen Entgasens nur Ansätze der sekundären Hyperfeinwechselwirkung mit β -H-Kernen in Form von Dupletts aufgelöst werden.

3.8 Synthese eines Xanthennitronderivats

3.8.1 Synthese von 3',6'-Dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-4'-carbaldehyd (Fluoreszeinaldehyd; **25**)

Nach Wang *et al.* wurde Fluoreszein **24** in einer Mischung aus Chloroform / Methanol (5 : 3) und 2 mol-% 15-Krone-5, mit einer 50 %-igen NaOH-Lösung der 21-fachen molaren Menge umgesetzt, sodass sich die Reaktionstemperatur bei 55 °C einpendelte. Das Reaktionsgemisch wurde für weitere 5 h bei Raumtemperatur gerührt, danach die Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt und der Rückstand per Säulenchromatographie aufgereinigt. Somit konnte das reine Produkt **25** in einer Ausbeute von 31 % (Lit. 34 %) isoliert werden (Wang *et al.*, 2005; Abbildung 116).

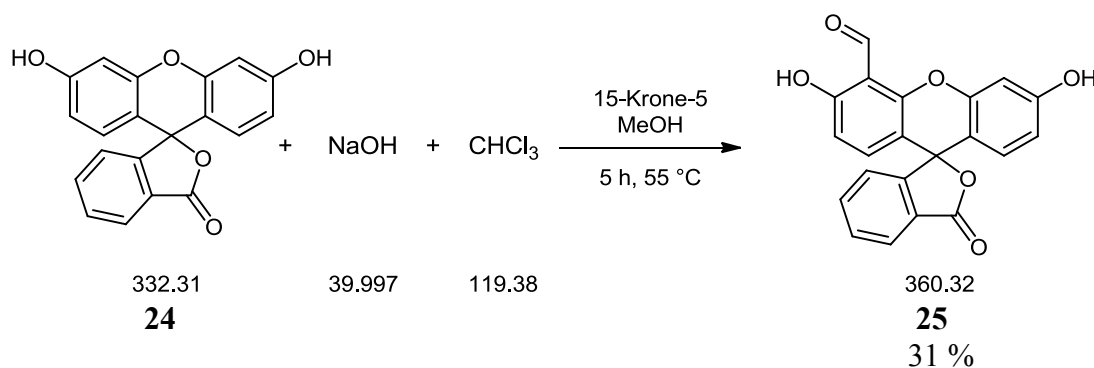


Abbildung 126: Synthese von Fluoreszeinaldehyd (FA) **25**.

Die Mono-Formylierung von Fluoreszein **24** in *ortho*-Position erfolgte gemäß einer Reimer-Tiemann-Reaktion. In stark alkalischer Lösung reagiert dabei das entsprechende Phenolat von **24** mit *in situ* generiertem Dichlorcarben (aus Chloroform). Auf dessen Anlagerung folgt eine Chloridanion-Abspaltung und Hydrolyse. Nach weiterer Chlorid-Abstraktion entsteht ein Dienon, welches in Tautomerie zum aromatischen Aldehyd **25** steht.

Verglichen mit der bekannteren Gattermann-Aldehydsynthese liegt der Vorteil in einer selektiven Substitution (S_EAr) des *ortho*-Protons, wodurch die Bildung von Nebenprodukten, auf Kosten der Ausbeute, minimiert wird (Reimer & Tiemann, 1876). Die spektroskopischen Untersuchungen ergaben, dass der FA **25** rein dargestellt werden konnte.

3.8.2 Synthese von (Z)-N-((3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-4'-yl)methylen)-2-methylpropan-2-aminoxid (Fluoreszeinnitron; 26)

Analog zur optimierten Weise in Kapitel 3.3.3.3 wurde unter Inertgasatmosphäre Fluoreszeinaldehyd **25**, im leicht basischen Milieu mit *N-tert*-Butylhydroxylaminhydrochlorid für 240 h unter Zugabe von wasserfreiem Magnesiumsulfat in trockenem Methylenchlorid, bei Raumtemperatur umgesetzt. Alle 2 Tage folgte die wiederholte Zugabe von 2 äquiv. *N-tert*-Butylhydroxylaminhydrochlorid und 2.2 äquiv. Triethylamin. Die filtrierte Reaktionsmischung wurde nach wässriger Aufarbeitung am Hochvakuum vom Lösungsmittel befreit, wodurch das reine Produkt in quantitativer Ausbeute erhalten wurde (Karbach *et al.*, 2014; Kopp, 2015; Abbildung 127).

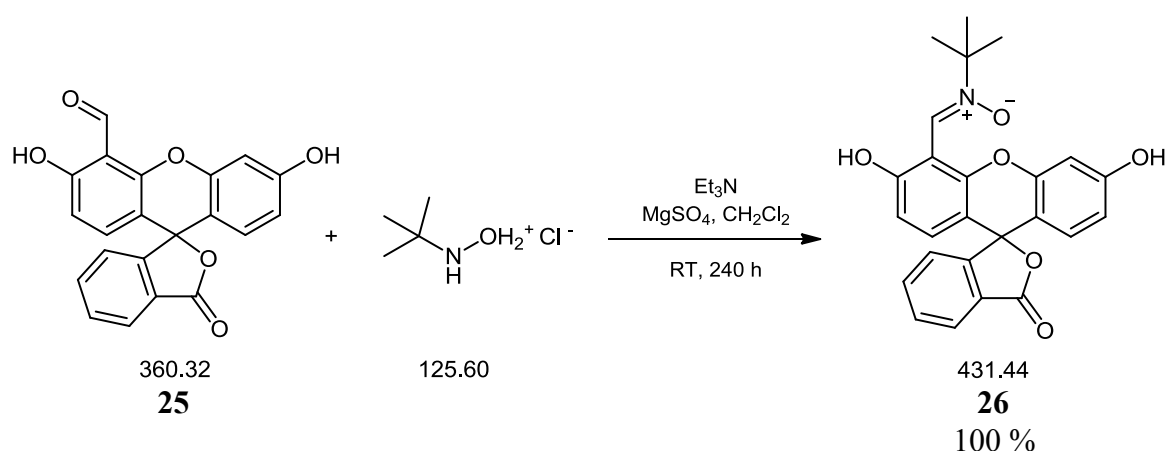


Abbildung 127: Synthese von Fluoreszeinnitron (FN) **26**.

Über einen nukleophilen Angriff des neutralisierten *N-tert*-Butylhydroxylaminhydrochlorids am positiv-polarisierten Carbonyl-C-Atom von **25**, kommt es nach Kondensation zur Ausbildung der Doppelbindung (analog einer Schiff-Basen-Synthese). Das entstandene Wasser wurde mittels Magnesiumsulfat entzogen, um diese Gleichgewichtsreaktion zugunsten des Fluoreszeinnitrons **26** zu verschieben (Karbach *et al.*, 2014).

3.9 ESR-spektroskopische Untersuchungen von FN (26)

Analog zu Kap. 3.2 wurde eine 1 mM Lösung aus Fluoreszeinnitron **26** in Ethylacetat, mit Fenton-Reagenz (Kap. 3.9.1) oder einem gepufferten Hypoxanthin / Xanthinoxidase-System (Kap. 3.9.2) derselben Menge inkubiert, die separierte organische Phase konzentriert (5 mM), entgast und via EPR vermessen (Kuppusamy & Zweier, 1989).

3.9.1 ESR-spektroskopische Untersuchungen von FN (26) mittels Fenton-Reagenz

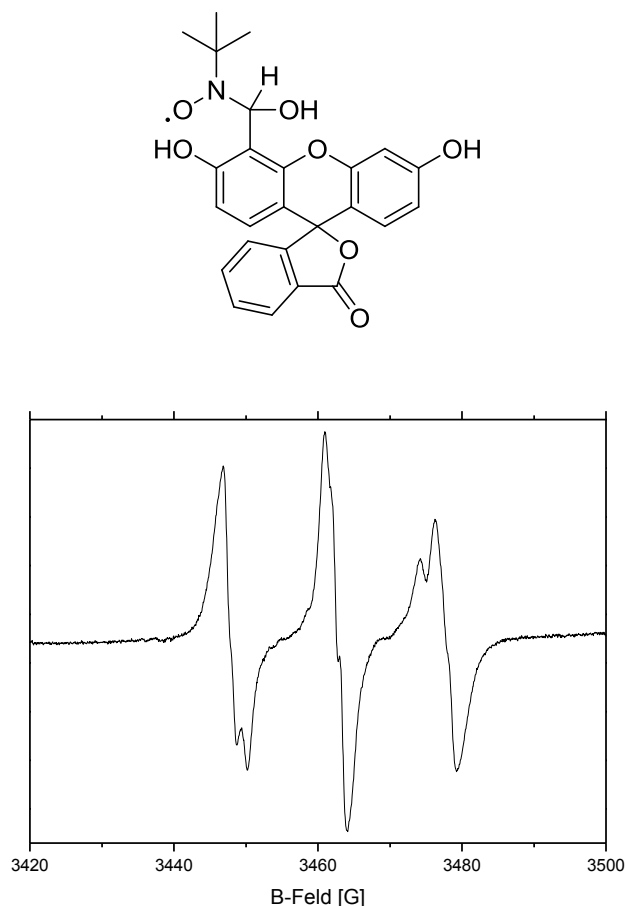


Abbildung 128: Struktur und EPR-Spektrum des Hydroxyl-Addukts von FN **26**.

Das Spektrum in Abbildung 128 zeigt, dass via Fenton-Reaktion ein zu FN **26** korrespondierendes OH-Spin-Addukt generiert werden konnte. Aufgrund der spektralen Form kann man von zwei paramagnetischen Verbindungen ausgehen. Diese lassen sich auf strukturelle Eigenschaften von Fluoreszein **24** zurückführen. Zum einen kann der Fluoreszein-Rest sowohl in chinoider (frei Säure), als auch lactoider Form (Spiro-Lacton, Abbildung 128) vorliegen. Zum anderen kann durchaus ein Teil des Fluoreszeinnitrons **26** (de)protoniert sein (pH-Indikator). Da die Spektren beider Komponenten überlagern, konnten keine Hyperfeinkopplungskonstanten bestimmt werden. Die Aufspaltung durch β -H-Kopplung ist dennoch ansatzweise zu erkennen (mittleres Signal).

3.9.2 ESR-spektroskopische Untersuchungen von FN (26) mit Hypoxanthin / Xanthinoxidase

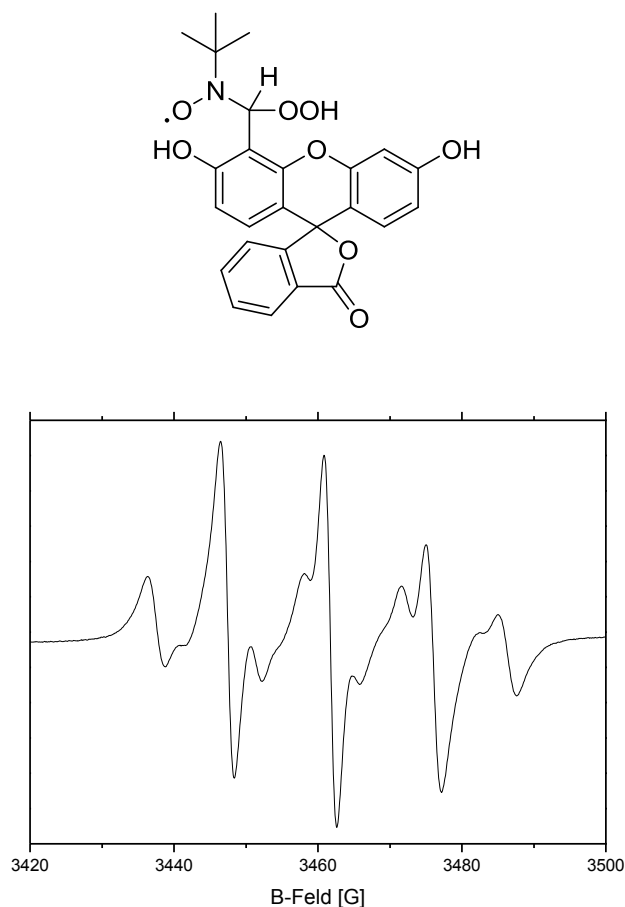


Abbildung 129: Struktur und EPR-Spektrum einer ca. 20 mM Lösung des Hydroperoxyl-Addukts von FN **26**.

Wie schon in Kap. 3.9.1 sind auch im EPR-Spektrum des OOH-Addukts von Fluoresceinnitron **26** Signale zu erkennen, die für zwei radikalischen Verbindungen sprechen. Zudem zeichnen sich 5 statt 3 Linien ab, was auf eine zusätzliche Wechselwirkung schließen lässt (Abbildung 129). Es wurde postuliert, dass diese auf einem intermolekularen Effekt zurückzuführen ist, da beim Entgasen der Probe, jene stärker (auf etwa 20 mM) aufkonzentriert wurde. Es ist bekannt, dass Fluorescein **24** in höheren Konzentrationen als Dimer vorliegen kann (π - π - Stapel; Speiser & Chisena, 1987). Aus diesem Grund wurde die verwendete Probe um die Hälfte, das 10- und 100-fache verdünnt und bei identischen Geräteeinstellungen vermessen.

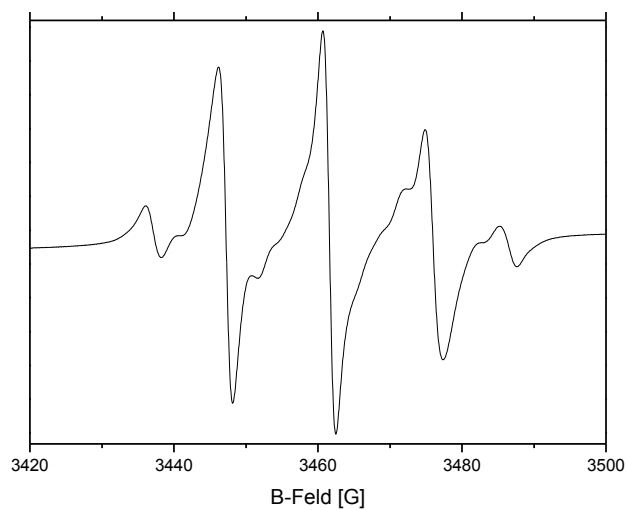


Abbildung 130: EPR-Spektrum der verdünnten Probe (ca. 10 mM) des Hydroperoxyl Addukts von FN 26.

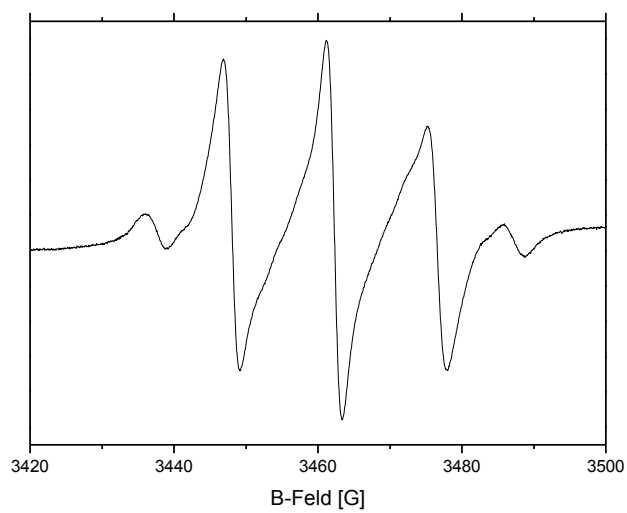


Abbildung 131: EPR-Spektrum der verdünnten Probe (ca. 2 mM) des Hydroperoxyl-Addukts von FN 26.

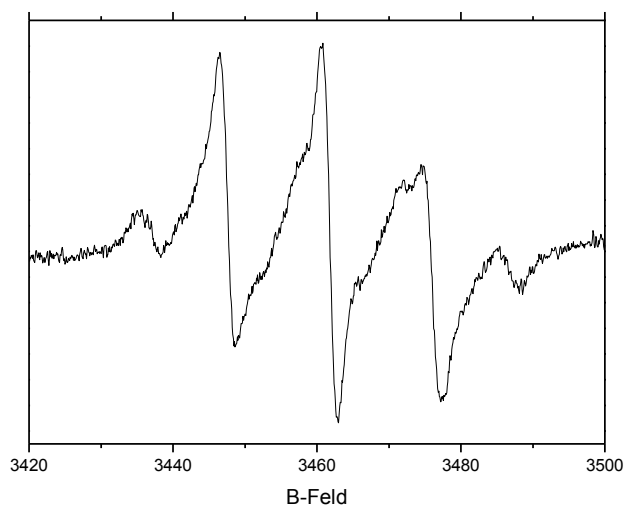


Abbildung 132: EPR-Spektrum verdünnten Probe (ca. 200 μM) des Hydroperoxyl-Addukts von FN 26.

Den Abbildungen 130, 131 und 132 ist zu entnehmen, dass der 5-Liniencharakter der EPR-Probe bestehen bleibt. Dies sprach entweder gegen eine dimerisiertes OOH-Addukt von 26, oder für dessen Erhalt trotz Verdünnung.

In einem weiteren Versuch wurde bei identischer Vorgehensweise die 1 mM Probe via Gaseinleitung auf etwa 2 mM konzentriert (entspricht der Konzentration in Abbildung 131) und vermessen.

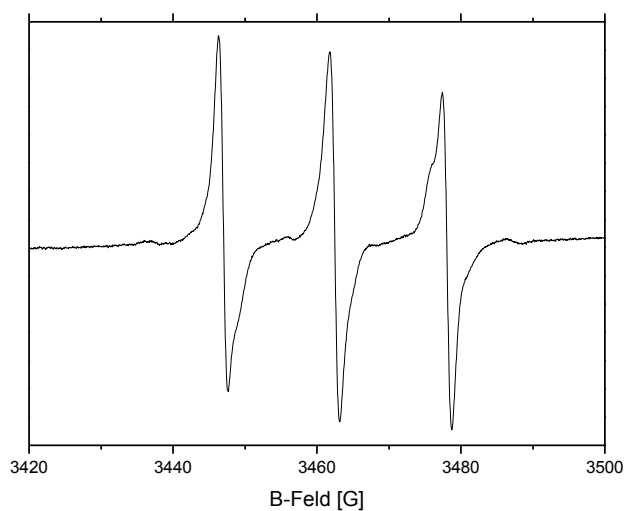


Abbildung 133: EPR-Spektrum einer 2 mM Probe des Hydroperoxyl-Addukts von FN 26.

Das Spektrum in Abbildung 133 zeigt das „3-Linien-Signal“ der Hydroperoxyl-Addukte von Fluoresceinnitron **26**. Ansatzweise sind noch 5 Linien (Signale bei 3437 G und 3487 G) zu erkennen, was für einen sehr geringen Anteil des Dimers spricht. Demzufolge scheinen sich stabile Fluoresceinnitron **26**- Dimere in Ethylacetat ab Konzentrationen von ≤ 2 mM auszubilden.

3.9.3 Untersuchung der optischen Eigenschaften von FN (26) und der Versuch des Fluoreszenzquenchings mittels Hypoxanthin / Xanthinoxidase

Zur Untersuchung des synthetisierten Fluoresceinnitrons **26** auf dessen Absorptions-, Emissions- und Quenchverhaltens wurde eine 1 μ M wässrige Lösungen (beinhaltet 10 μ mol Hypoxanthin) bei pH 7 und pH 9 am UV / Vis- und Fluoreszenzspektrometer vermessen.

Zuvor wurde eruiert, dass FN **26** sowohl in unpolaren, als auch polar aprotischen, organischen Lösungsmittel (Ethylacetat, Chloroform, DMSO, Aceton) fast keine Fluoreszenz aufweist. Zurückzuführen ist dies vermutlich darauf, dass in solchen Lösungsmitteln die Rotation des *Tert*-Butylnitron-Restes weniger eingeschränkt ist, als in polar protischen Lösungsmitteln wie H₂O (aufgrund von H-Brücken; Cheng *et al.*, 2011). Deshalb wurde bei den folgenden Experimenten Nitron **26**, trotz mäßiger Löslichkeit, in wässriger Phase vermessen und auch in selbiger die ROS generiert. In der Literatur wird beschrieben, dass die Fluoreszenzintensität von Fluorescein **24** in schon leicht saurem Milieu stark abfällt, weshalb bei den Versuchen des Fluoreszenzquenchings auf Fenton-Reagenz (50 mM H₂O₂, pH \ll 7) verzichtet werden musste (Stamper *et al.*, 2009). Die Messungen von Verbindung **26** erfolgten sowohl im neutralen, wässrigen Phase, als auch bei pH 9, was einer Basizität entspricht, bei welcher Fluorescein **24** eine sehr gute Quantenausbeute (Welsch, 2016) und Xanthinoxidase eine hohe Umsatzrate von Hypoxanthin, erzielt.

Nach der jeweiligen, spektroskopischen Bestimmung der Absorption und Emission wurde in beiden Fällen Xanthinoxidase (4 mU) zu der Fluoresceinnitron **26**- Hypoxanthin- Probe appliziert, für 10 min inkubiert und nochmals in analoger Weise vermessen (Abbildungen 134 und 135).

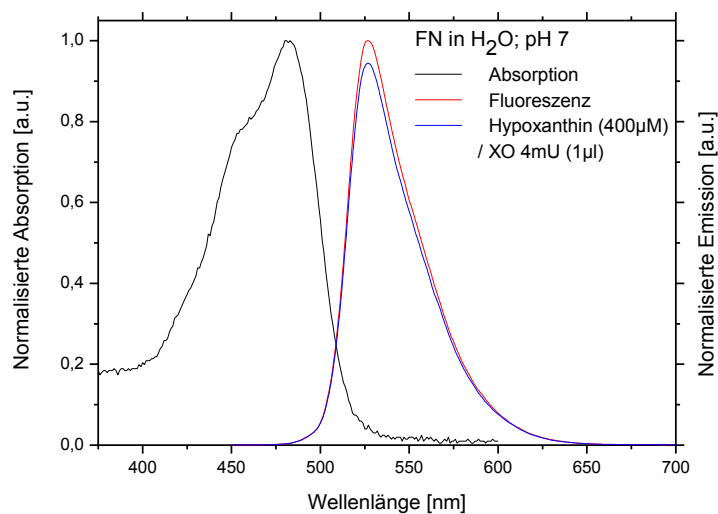


Abbildung 134: Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von FN **26** in H₂O (pH 7) und dessen Fluoreszenzabnahme durch ein XO-System.

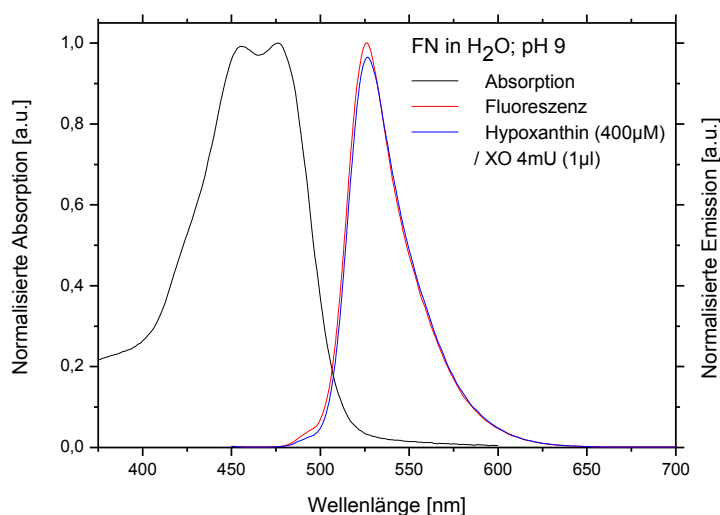


Abbildung 135: Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von FN **26** in H₂O (pH 9) und dessen Fluoreszenzabnahme durch ein XO-System.

Die normierten Absorptionsspektren von FN **26** (Abbildung 134 und 135, schwarz) zeigen je zwei Banden mit einem globalen Maximum bei 479 nm und einem weiteren lokalen Maximum bei 457 nm. Bei einer Anregungswellenlänge von 479 nm wurde jeweils eine Emissionsbande mit einem Maximum bei 526 nm detektiert (Abbildung 134 und 135, rot). Die normierten Fluoreszenzspektren von FN **26** zeigen jeweils eine minimale Abnahme der Emission nach Inkubation von XO (Abbildung 134 und 135, blau). In beiden Fällen kann man von keinem *Quenching* ausgehen. Der leichte Fluoreszenzabfall lässt sich möglicherweise auf die geringfügige Verdünnung zurückführen.

3.10 Synthese eines cyclischen und fluoreszierenden Nitrons

Im Rahmen seiner Doktorarbeit versuchte Hauck in etlichen Ansätzen EMPO **2** oder dessen Derivate via nukleophiler Substitution an gängige Fluorochrome zu koppeln (Hauck, 2007). Die jeweilige Analytik aller Versuche, zeigte jedoch keine Umsetzung zu den gewünschten fluoreszierenden, cyclischen Nitronen. Davon ausgehend wurde in Kooperation mit Patrica Schweickert, nach Rücksprache mit Hauck und neuer Literatur weitere Versuche unternommen (Hauck, 2015; Taratayko *et al.*, 2013).

3.10.1 Darstellung von 2-Ethoxycarbonyl-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid (EMPO; **2**)

3.10.1.1 Synthese von 2-Methyl-2-nitro-5-oxovaleriansäureethylester (**28**)

Zur Synthese von 2-Methyl-2-nitro-5-oxovaleriansäureethylester **28** nach Hauck wurde unter Schutzgasatmosphäre, 2-Nitropropionsäureethylester **27** (bezogen von SCBT) Basenkatalysiert, mit dem 1.5-fachen molaren Überschuss an Acrolein umgesetzt. Nach 6 h, bei 10 °C, in trockenem Acetonitril wurde das Reaktionsgemisch wässrig / sauer aufgearbeitet, worauf das Produkt **28** in quantitativer Ausbeute isoliert wurde (Hauck, 2007; Ono, 1983; Ballini & Petrini, 1986; Abbildung 136).

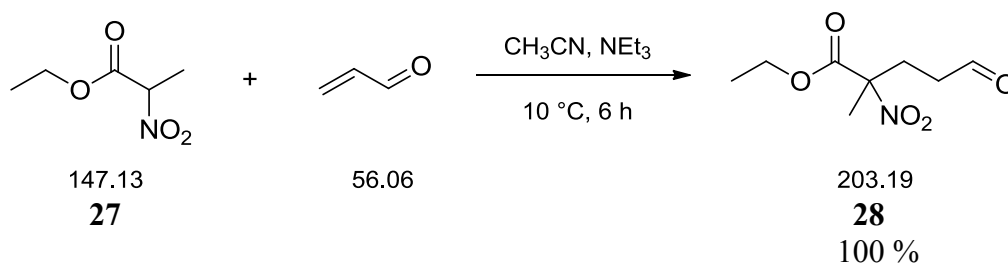


Abbildung 136: Synthese von 2-Methyl-2-nitro-5-oxovaleriansäureethylester **28**.

Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine klassische Michael-Addition des α, β -ungesättigten Aldehyds Acrolein, an das durch Triethylamin deprotonierte α -C-Atom (Carbanion) des nitrierten Carbonsäureesters **27**. Bezüglich der verwendeten Literatur konnte die Ausbeute nochmals gesteigert werden (Hauck, 2007). Den analytischen Daten ist zu entnehmen, dass Verbindung **28** rein dargestellt werden konnte. Diese sind im experimentellen Teil explizit aufgeführt.

3.10.1.2 Synthese von EMPO (2)

Zur Synthese von EMPO **2** wurde eine Lösung aus 2-Methyl-2-nitro-5-oxovaleriansäureethylester **28** in Methanol / H₂O (2 : 1) mit einer wässrigen Ammoniumchloridlösung der doppelten molaren Menge versetzt. Nach der portionsweisen Zugabe eines 10-fachen Überschusses an Zinkpulver wurde 4 h bei RT gerührt. Die aufkonzentrierte Reaktionsmischung wurde mit Borax gesättigt, für eine weitere Stunde gerührt und mehrfach mit Methylenchlorid extrahiert. Nach entfernen des Lösungsmittels und säulenchromatographischer Reinigung konnte EMPO **2** in einer Ausbeute von 40 % isoliert werden (Hauck, 2007; Abbildung 137).

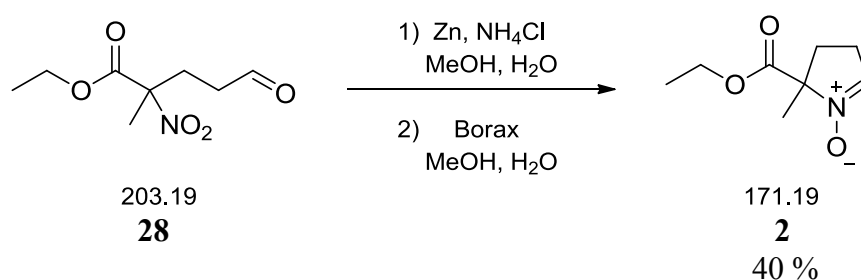


Abbildung 137: Eintopfreaktion zur Synthese von EMPO **2**.

Der erste Schritt dieser Eintopfreaktion ist eine in Mischphase durch Zink vermittelte Reduktion der Nitrogruppe zum entsprechenden Hydroxylamin. Gefolgt wird dies von einer Cyclisierung via Kondensation, nach dessen nukleophilen Angriff am Carbonylkohlenstoff, unter Ausbildung der Nitron-Funktion von **2**.

Die Menge, als auch die Qualität des eingesetzten Zink-Pulvers sind hierbei ausschlaggebend für eine selektive Reduktion. In Abhängigkeit von Alter und Lagerbedingungen kann dessen Aktivität sehr schwanken. Je nach Zn-Charge kommt es entweder zu einer unvollständigen Reduktion der Nitrogruppe, zur vermehrten Bildung des durchreduzierten Amins (nach Ringschluss, Pyrrolin), oder sogar zur Reduktion der Aldehyd-Funktion. Alle Fälle haben einen Ausbeutenverlust zur Folge. Deshalb wurde zunächst, in einigen Testansätzen, das optimale Verhältnis für die verwendete Zink-Charge bestimmt (Hauck, 2007). Mit der hier verwendeten 10-fachen Molarität wurde, neben dem gewünschten EMPO **2**, auch das entsprechende, cyclisierte Imin erhalten.

Die Analytische Daten von EMPO **2** stehen im Einklang mit denen der Literatur und sind im experimentellen Teil aufgeführt.

Im Rahmen der Dissertation von Benjamin Selmke (2016) wurde gezeigt, dass das synthetisierte EMPO **2** in der Lage ist als *spin trap* zu fungieren (Abbildung 138).

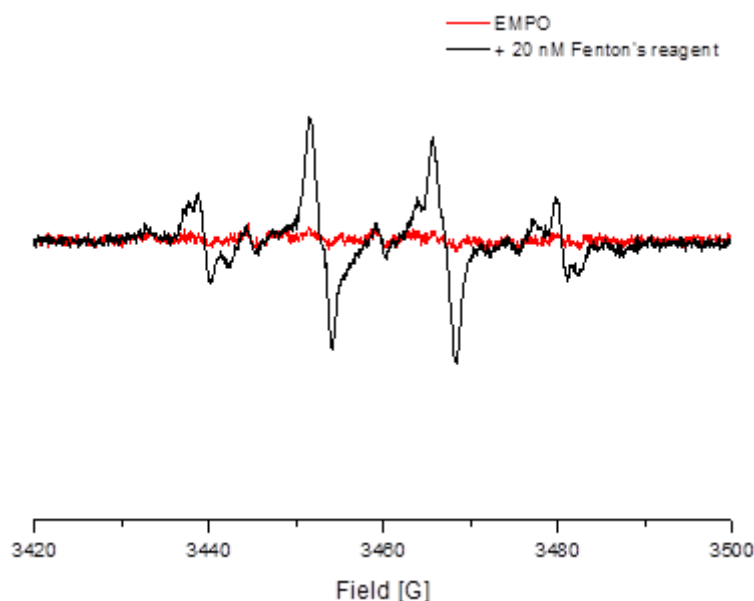


Abbildung 138: EPR-Spektren von EMPO **2** und des entsprechenden β -OH-Addukts (via Fenton-Reagenz; Quelle: B. Selmke, AK Trommer).

3.10.2 Synthese von N^1 -(7-Nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-yl)ethan-1,2-diamin (NBD-ethandiamin; **29**)

Zunächst wurde Ethylendiamin in Methanol mit einem Überschuss an 12 M Salzsäure zu 2-Ethan-1,2-diaminhydrochloride umgesetzt. Zur Synthese von NBD-ethandiamin **29** nach Hauck wurde zu dieser Lösung eine äquimolare Menge NBD-Chlorid **8** in Methanol gegeben und der Ansatz unter Rückfluss erhitzt. Tropfenweise wurde eine ebenfalls äquimolare Menge wässriger Natriumhydrogencarbonat-Lösung hinzugefügt. Nach einer Stunde wurde das Reaktionsgemisch auf 0 °C gekühlt, der dabei ausgefallenen Feststoff abfiltriert, mit eiskaltem Methanol gewaschen und getrocknet (Heberer, 1985; Hauck, 2007). Somit konnte das reine N^1 -(7-Nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-yl)ethan-1,2-diamin **29** als rote Kristalle in einer Ausbeute von 43 % isoliert werden (Abbildung 139).

3.10.4 Synthese von 2-((2-Aminoethyl)carbamoyl)-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid (AECMPO; 31)

Nach Taratayko *et al.* wurde zur Synthese von AECMPO **31**, EMPO **2** mit dem 10-fachen Überschuss Ethylendiamin in Methanol für 48 h bei RT zur Reaktion gebracht. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und nach säulenchromatographischer Aufreinigung Verbindung **31** in einer Ausbeute von 27 % erhalten (Taratayko *et al.*, 2013; Abbildung 141).

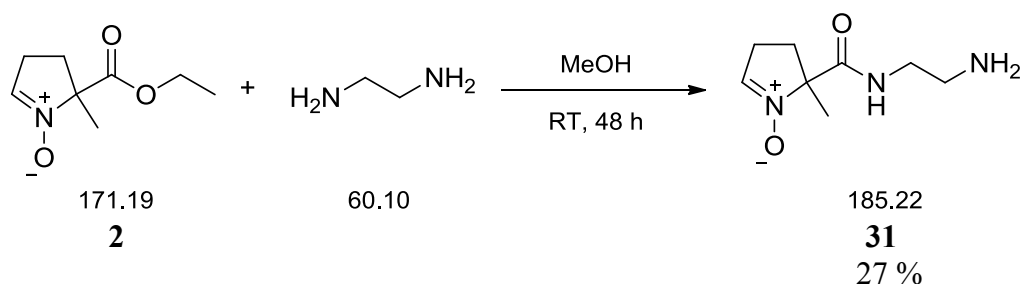


Abbildung 141: Synthese von AECMPO **31**.

Die Aminolyse von EMPO **2** zu AECMPO **31** folgt einer nukleophilen Substitution des Ethanolat-Restes durch Ethylendiamin, unter Bildung des entsprechenden Carboxamids **31** (Buddrus & Schmidt, 2015).

Die analytische Daten von AECMPO **31** sind im experimentellen Teil aufgeführt.

3.10.5 Synthese von 2-((2-(4-(Dimethylamino)naphthalen-1-sulfonamido)ethyl)carbamoyle)-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid (Dansyl-AECMPO; 32)

Zu einer Lösung Dansylchlorid **9** und einer äquimolaren Menge Triethylamin in wasserfreiem Acetonitril wurde eine Lösung derselben Stoffmenge AECMPO **31** in wasserfreiem Acetonitril gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 1.5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Vakuum konzentriert. Der Rückstand wurde in Chloroform aufgenommen, mehrfach gewaschen, getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt (Taratayko *et al.*, 2013; Abbildung 142). Dem $^1\text{H-NMR}$ des zurückgebliebenen Feststoffs war zu entnehmen, dass das Produkt **32** dargestellt werden konnte. Nach diversen Versuchen zur Aufreinigung, via präparativer Schichtchromatographie (PTLC), oder Flashchromatographie (MPLC), wurden jeweils nur Zersetzungsprodukte des Dansyl-AECMPO **32** erhalten.

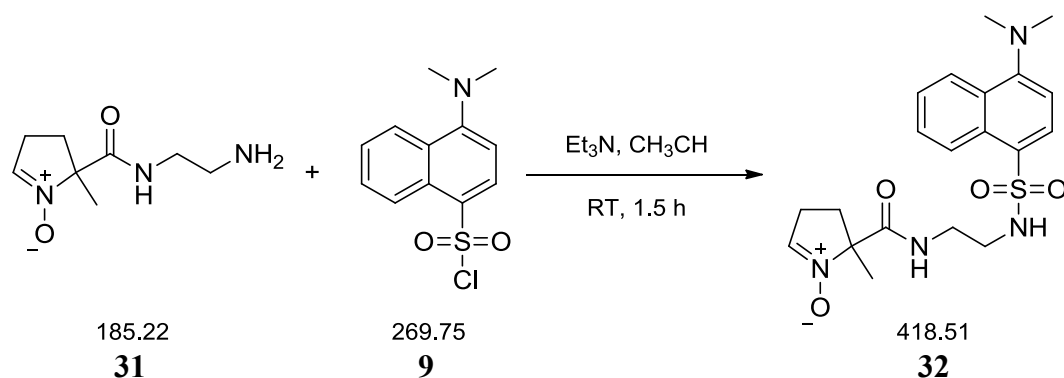


Abbildung 142: Synthese von Dansyl-AECMPO **32**.

Nach der nukleophilen Addition von Ethan-1,2-diaminhydrochlorid an der positiv-polarisierten Sulfonylgruppe der Verbindung **9**, wird HCl abgespalten und Dansyl-AECMPO **32** gebildet (S_N; Annenkov *et al.*, 2015).

3.10.6 Diskussion der Ergebnisse zur Synthese eines cyclischen und fluoreszierenden Nitrons

Die cyclischen und fluoreszierenden Nitrone **30** (Kap. 3.11.3) und **32** (Kap. 3.11.5) konnten mit großer Wahrscheinlichkeit dargestellt, jedoch nicht isoliert und somit auch nicht deren Ausbeuten bestimmt werden. Die ¹H-NMR-Signalsätze der jeweiligen Rohprodukte sind dem experimentellen Teil und die Spektren dem Anhang zu entnehmen.

Alle Versuche der Säulen- oder Dickschicht-chromatographischen Aufreinigung resultierten in Zersetzungsprodukten der fluoreszierenden Nitrone **30** und **32**. Sowohl für die stationäre, als auch mobile Phase wurden schon viele der für Nitrone gängigen Trägermaterialien (Alox und verschiedenen Kieselgele), Elutionsmittelgemische und pH-Werte (u.a. auch analog zu Kap. 3.11.1.2 und 3.11.4) getestet. Aufgrund apparativer Gegebenheiten konnte dabei jedoch nicht vollständig unter Inertgas gearbeitet werden.

4 Zusammenfassung und Ausblick

4.1 Zusammenfassung

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war die Synthese eines auxochrom-substituierten Derivats von *p*-Nitrostilbennitron (PNSN) **17c**, sowie dessen biologische Anwendung als fluoreszierende *spin trap*, zur Identifikation und Lokalisation von zellulär gebildeten ROS.

Dafür wurde zunächst die von Hauck *et al.* (2009) publizierte Weise zur Darstellung von Verbindung **17c** erfolgreich reproduziert und dabei Teilsyntheseschritte zur Herstellung von 2-(4-Bromphenyl)-[1,3]-dioxolan **12** und (*E*)-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)styryl)trimethylsilan **13**, bzgl. deren Aufreinigung und Ausbeuten optimiert. Die Synthese der zu PNSN **17c** korrespondierenden Aldehydvorstufe **16c**, konnte sowohl von Hauck, als auch im Rahmen dieser Arbeit, nicht auf mehrfach-funktionalisierte Stilbenaldehyde **16** übertragen werden. Stets wurden bei dieser Ligand-freien Heck-(Matsuda)-Reaktion, durch den Pd(II)-Katalysator, die Schutzgruppe von Silan **13** entfernt und die, zu den eingesetzten Phenyl Diazoniumsalzen **15** (ausgenommen **15c**), korrespondierenden Phenole erhalten.

Es fiel auf, dass es unmittelbar nach der Zugabe der Methoxy-substituierten Nitrobenzoldiazoniumtetrafluoroborate **15a/b**, zu einer starken Gasentwicklung und Verfärbung der Reaktionslösungen kam. Dies deutete auf eine schnelle, thermische Zersetzung der Diazoniumsalze hin. Deshalb wurde diese Kreuzkupplungsreaktion einem Screening unterzogen, bei dem das molare Verhältnis der Reaktanden **13** und **15a** (unter Bedingungen nach Hauck am instabilsten), die Menge an Katalysator, im besonderem die Temperatur und die Reaktionszeit variierten (9 Ansätze). Die effektivste Umsetzung erfolgte durch das Erhöhen der gesamten Reaktionszeit um das 3-fache, bei einer initialen Kühlung auf unter -10 °C (2 mol-% PdOAc; **13** : **15a** – 1 : 1).

Nun galt es zu überprüfen, ob sich die optimierten Bedingungen auch auf anderweitig-funktionalisierte Phenyl Diazoniumsalze **15b-i** übertragen lassen. Dies gelang in den meisten Fällen (**15c-g**) bei ähnlich hohen Ausbeuten der gewünschten *trans*-Stilbenaldehyde (*E*)-**16**, wobei die Reaktion von Silan **13** mit *m*-Methoxy-*o*-nitro-benzoldiazoniumtetrafluoroborat **15b** und *p*-Dimethylaminobenzoldiazoniumtetrafluoroborat **15h** eine stärkere *cis*-Selektivität aufwies. Somit konnte die milde Heck-Reaktion zur Darstellung von *p*-Nitrostilbenaldehyd **16c** nach Hauck, zu einem Substituenten-unabhängigen Verfahren (ausgenommen Hydroxylgruppen (**15i**)) weiterentwickelt werden.

Auch zur Synthese von *N-tert*-Butyl-*p*-nitro-*o*-methoxystilbennitron **17a** aus dem Aldehyd (**E**)-**16a** musste die publizierte Methode zur Darstellung von **17c** stark modifiziert werden. Es wurde bei Raumtemperatur, in Methylenchlorid gearbeitet, Wasser mittels Magnesiumsulfat der Reaktion entzogen, leicht alkalische Bedingungen gewählt, die Reaktionszeit auf 10 d, sowie die Zugabe an neutralisiertem *N-tert*-Butylhydroxylamin-hydrochlorid erhöht. Diese Bedingungen führten zu höheren, teils quantitativen Ausbeuten aller Nitrone **17a-h**.

Vor der biologischen Anwendung wurden die dargestellten Stilbennitronderivate **17** auf ihre optischen Eigenschaften, im radikalgenerierenden Modellsystem (Hydroxyradikale via Fenton-Reagenz, Superoxidanionradikale mittels Xanthinoxidase (XO)- System), auf ihre Fähigkeit zum *spin trapping* und einem potentiellen, damit einhergehenden Fluoreszenzquenching untersucht.

EPR-spektroskopische Messungen zeigten, dass alle Nitrone **17** in der Lage sind als *spin trap* zu fungieren. Die sekundäre Hyperfeinwechselwirkung der stabilisierten Radikale (Spin-Addukte von **17**) mit β -Wasserstoff-*Nuclei* konnte nach verbesserter Probenaufbereitung aufgelöst werden. Die entsprechenden *a*-Tensoren der OH-Addukte ergaben eine gute Übereinstimmung mit denen des PBN **3**.

Zur Untersuchung der Nitrone **17** auf ihre optischen Eigenschaften, wurden Absorptions- und Fluoreszenzspektren aufgenommen und die energetischen Maxima der elektronischen Übergänge bestimmt. Ungewöhnlich dabei waren die Absorptionsmaxima von *N-tert*-Butyl-*p*-nitro-*o*-methoxystilbennitron **17a** und *N-tert*-Butyl-*o*-nitro-*m*-methoxy-stilbennitron **17b**. Im Vergleich mit PNSN **17c** fiel die bathochrome Verschiebung von Verbindung **17a** geringer aus als erwartet. Zudem war bei ONMMSN **17b** ein starker hypochromer Effekt und eine hypsochrome Verschiebung um 52 nm zu erkennen, weshalb dessen 3D-Struktur ausgiebig untersucht wurde (NMR, NOESY, Kraftfeld- und quantentheoretische Rechnungen).

Weitere Experimente mit den Stilbennitronen **17** zeigten, dass die Verbindungen **17a**, **17b**, **17c** und **17h**, sowohl Hydroxyl-, als auch Superoxidanionradikale einfangen und stabilisieren können und dies mit einer Fluoreszenzabnahme (*Quenching*) einhergeht.

In der Summe aller Untersuchungen im Modellsystem stellt PNOMSN **17a** das einzige der synthetisierten *spin traps* **17** dar, welches verbesserte Eigenschaften bzgl. des bereits erforschten **17c** aufwies. Aus diesem Grund wurde **17a** *in vitro* auf seine biologische Anwendbarkeit überprüft.

Zuvor wurde *N-tert*-Butyl-*p*-nitro-*o*-methoxystilbennitron **17a** mittels des Sulforhodamin B (SRB)-Assays hinsichtlich seiner Toxizität auf drei Zelllinien (MCF7, HeLa, *wt*-Mef) getestet. Diese Tests fielen für die verwendeten Konzentrationen späterer Messungen negativ aus.

Alle Zelllinien wurden zunächst auf Eigenfluoreszenz untersucht. Anschließend wurden diese mit **17a** angefärbt, via konfokaler Laser-*scanning*-Mikroskopie (*cLSM*) dessen subzelluläre Akkumulation verfolgt (Vergleichsstudien mit Tetramethylrhodaminethylester (TMRE) **22** und Acridinorange (AO) **23**) und bei mitochondrialer Ansammlung, unter Zugabe von Atmungsketteninhibitoren (Rotenon **20** und/oder Antimycin A **21**; zur vermehrten Radikalbildung) überprüft, ob dessen Fluoreszenz gequencht wird.

Es konnte eine gewisse Eigenfluoreszenz der Zellen nachgewiesen werden, welche bei der verwendeten Stärke des Anregungslasers (405 nm) die folgenden Quench-Experimente nicht beeinflusste. Wie schon PNSN **17c**, akkumulierte auch PNOMSN **17a**, selektiv in Mitochondrien. Zudem wurde in *wt*-Mef eine vermehrte Ansammlung in den *Nucleoli* detektiert. PNOMSN **17a** wies auch *in vitro* eine hohe Fluoreszenzstabilität auf.

Sowohl an MCF7- und HeLa-Zellen, als auch *wt*-Mef konnte fluoreszenzmikroskopisch gezeigt werden, dass PNOMSN **17a** fähig ist mitochondrial-gebildete Radikale einzufangen. Eine anfängliche Abnahme dessen Fluoreszenz, während der zellulären Verteilung von DMSO (Lösungsmittel für Atmungsketteninhibitoren; Blanking / Bleaching- Versuche), störte die Experimente nur in geringem Maß. Der Quench-Effekt nach Zugabe von Rotenon **20** oder Antimycin A **21** fiel wesentlich stärker aus. Ungewöhnlich hingegen ist, dass der gleichzeitige Einsatz beider Inhibitoren in signifikant höheren Halbwertszeiten und „Endfluoreszenzen“ (nach 3 min) resultierte.

In einer zusätzlichen Studie sollten die Spin-Addukte von PNOMSN **17a** aus den Zellen extrahiert und EPR-spektroskopisch vermessen werden. Für alle drei Zelllinien wurde ein für Nitroxylradikale typisches 3-Linien-Signal detektiert. Auffällig hingegen waren die sehr hohen, teils maximalen Signalintensitäten. Zudem konnte keine weitere Hyperfeinwechselwirkung mit dem β -H-Kern von **17a** aufgelöst werden. Im Rahmen eines Ausschlussverfahrens wurde festgestellt, dass Nitroxylradikale aus dem konischen Zentrifugenröhrchen, indem Ethylacetat für mehrere Tage lagerte, extrahiert wurden. In einer Reihe von Experimenten wurden dieser Sachverhalt für Zentrifugenröhrchen verschiedener Hersteller (variierte Inkubationszeit der Lösungsmittel; mit oder ohne Lichtexposition) mit

Ethylacetat und DMF als Extraktionsmittel bestätigt. Somit wird davon ausgegangen, dass oxidierte HALS (*hindered amine light stabilizer*; gängige Kunststoffadditive)- Verbindungen (TEMPO-Derivate) für das starke, überlagerte EPR-Signal verantwortlich sind. In den anschließenden Experimenten wurde sorgfältig darauf geachtet, dass das zu untersuchende Extrakt nicht mit Polymeren in Berührung kam. So konnte nachgewiesen werden, dass PNOMSN **17a** auch *in vitro* mit radikalischen ROS, EPR-spektroskopisch detektierbare Nitroxylradikale bildet.

Wie schon erwähnt, konnte mittels PNOMSN **17a** die gewünschte Rotverschiebung der Absorptionswellenlänge (bzgl. **17c**) erzielt werden. Diese reichte jedoch nicht aus um am *cLSM* mit dem nächst niederfrequenteren Laser (488 nm) anregen zu können. Aus diesem Grund wurde ein passendes Fluorochrom zum entsprechenden Nitron funktionalisiert. Die Synthese von Fluoresceinnitron (FN) **26** erfolgte aus Fluoresceinaldehyd (FA) **25**, nach der für die Stilbennitron **17** optimierten Methode, in quantitativer Ausbeute. Zuvor konnte FA **25** über eine Reimer-Tiemann-Reaktion in einer Ausbeute von 31 % (Lit. 34%) aus Fluorescein **24** dargestellt werden.

Die EPR-spektroskopische Untersuchung von FN **26** lies erkennen, dass zwei paramagnetischen Verbindungen entstanden sind. Da Fluorescein **24** sowohl in chinoider (freie Säure), als auch lactoider Form (Spiro-Lacton) vorliegen kann, scheint dies auch für die Spin-Addukte von Fluoresceinnitron **26** zu gelten. In höheren Konzentrationen (ab etwa 2 mM) wurden zusätzliche Wechselwirkungen aufgelöst, welche sehr wahrscheinlich auf stabile Dimere (π - π - Stapel) der Fluoresceinnitron **26** - Addukte zurückzuführen sind.

Fluoresceinnitron **26** wurde auch hinsichtlich seines Absorptions-, Emissions- und Quenchverhaltens untersucht. Dabei wurde eruiert, dass **26** sowohl in unpolaren, als auch polar aprotischen Lösungsmitteln fast keine Fluoreszenz aufweist. In wässriger Phase (pH 7 und pH 9) wurde eine Absorptionsbande mit einem Maximum von 479 nm und ein Emissionsmaximum bei 526 nm detektiert. Nach der Zugabe des Radikal-generierenden XO-Systems konnte kein *Quenching* dessen Fluoreszenz nachgewiesen werden, weshalb von *in vitro*- Experimenten Abstand genommen wurde.

Um radikalische ROS *in vivo* quantifizieren zu können (Kooperation mit dem Universitätsklinikum des Saarlandes), wurde nach Hauck die cyclische *spin trap* EMPO **2** synthetisiert (Ausbeute: 40 %). Dafür wurde zunächst die entsprechende Vorstufe, 2-Methyl-

2-nitro-5-oxovaleriansäureethylester **28**, in quantitativer Ausbeute dargestellt. Bezüglich der verwendeten Literatur konnte diese nochmals gesteigert werden.

In etlichen Ansätzen versuchte Hauck vergebens cyclische und fluoreszierende Nitrone herzustellen. Somit wurde anhand aktueller Literatur versucht EMPO **2**, oder das daraus derivatisierte AECMPO **31**, via nukleophiler Substitution an halogenierte Fluorophore wie NBD-Chlorid **8** oder Dansylchlorid **9** zu koppeln. Dazu wurde zunächst aus Verbindung **8**, NBD-ethandiamin **29** in einer Ausbeute von 43 % dargestellt. Dessen anschließende Umsetzung mit EMPO **2** führte zu dem Ergebnis, dass das Rohprodukt deutliche $^1\text{H-NMR}$ -Signale des gewünschten NBD-AECMPO **30** aufwies. Diverse Versuche dessen chromatographischer Aufreinigung ergaben jedoch ausschließlich Zersetzungsprodukte von **30**. Gleiches gilt auch für die Umsetzung von AECMPO **31** mit Dansylchlorid **9** zu 2-((2-(4-(Dimethylamino)naphthalen-1-sulfonamido)ethyl)carbamoyl)-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid **32**, sowie dessen Aufreinigung.

4.2 Ausblick

Das für die biologischen Anwendungen verwendete PNOMSN **17a** wies leicht verbesserte Eigenschaften im Vergleich zu *p*-Nitrostilbennitron **17c** auf. Die erwartete Rotverschiebung des Absorptionsmaximums auf > 430 nm konnte damit jedoch nicht erzielt werden. Somit war auch die Anregung des Fluorophors nicht mit einem energieärmeren *Vis*-Laser zu realisieren.

Das Ziel sollte also weiterhin sein, den störenden UV-Laser für *in vitro*-Untersuchungen zu umgehen (zusätzliche Radikal-Produktion) und dennoch die günstigen Eigenschaften der Stilbennitrone **17** beizubehalten. Die in dieser Arbeit etablierte Methode zu deren Synthese bietet die Möglichkeiten dazu. Dafür sollten Aryldiazoniumsalze **15** verwendet werden die einen noch stärkeren bathochromen Effekt mit sich bringen. Beispiele dafür sind 3-(Dimethylamino)-4-nitrophenyldiazoniumtetrafluoroborat **15k** oder polycyclische aromatische Diazoniumsalze mit entsprechenden Substituenten.

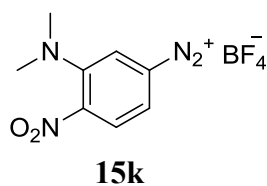


Abbildung 143: Strukturformel von 3-(Dimethylamino)-4-nitrophenyldiazoniumtetrafluoroborat **15k**.

Bei den ESR-spektroskopischen Untersuchungen aller Stilbennitrone **17** konnten keine eindeutigen Unterschiede zwischen den OH- und OOH-Addukten festgestellt werden. Trotz der Verwendung eines Chelators für die XO-vermittelte Produktion von Superoxidationradikalen wird vermutet, dass dennoch vermehrt OH-Radikale entstanden (Haber-Weiß-Reaktion) und eingefangen wurden. Ein Lösungsansatz stellt das Vermeiden der Metallkanüle bei der Probenvorbereitung dar. Außerdem sollte nach Buettner (1987) versucht werden ein anderes $O_2^{\bullet-}$ -generierendes Modellsystem zu verwenden.

Ein weiteres interessantes Ergebnis dieser Arbeit ist, dass nur die Fluoreszenzen der Stilbennitrone **17a, b, c, h** nach ROS- Addition gequench wurden. Dem sollte nachgegangen werden.

Für die Fluoreszenzquenching-Experimente am *cLSM* sollte überprüft werden, ob ethanolische Lösungen der Atmungsketten-Inhibitoren den Versuch anfänglich weniger beeinflussen als DMSO. Die Permeabilität der verwendeten Zellen wäre ohne DMSO jedoch deutlich eingeschränkt. Somit wäre auch die Wirkung der Inhibitoren mit zeitlicher Verzögerung zu erwarten. Ungewöhnlich und deshalb ein wünschenswertes Ziel weiterer Untersuchungen wären sowohl die Akkumulation von PNOMSN **17a** in den *Nucleoli*, als auch das wesentlich langsamere *Quenching* nach der Applikation einer Mischung aus Rotenon **20** und Antimycin A **21**.

Um eindeutig sagen zu können, dass (oxidierte) HALS- Verbindungen für die Kontamination von EPR-Proben verantwortlich sind, sollten die, aus den Zentrifugenröhrchen extrahierten, stabilen Radikale isoliert und anderweitig analysiert werden.

EMPO **2**, als auch AECMPO **31** sollte in Zukunft auch unmittelbar vor der Kopplung mit einem Fluorophor (**8, 9** oder **10**) aufbereitet werden (z.B. über Aktivkohle). Außerdem sollte bei der Aufreinigung der dargestellten cyclischen und fluoreszierenden *spin traps* **30** und **32**, vollständig unter Schutzgasatmosphäre gearbeitet werden.

5 Experimenteller Teil

5.1 Geräte und Arbeitstechniken

5.1.1 Verwendete Messgeräte

Schmelzpunkte (Smp.):

Schmelzpunkte wurden an einem DigiMelt MPA161 der Firma SRS (maximale Messtemperatur 260 °C) bestimmt. Es wurde stets der Mittelwert aus 3 Messungen angegeben.

Infrarotspektren (IR):

Die IR-Spektren wurden an einem FT-IR-Gerät (Spektrum 100) der Firma Perkin Elmer mit einem universellen ATR-Aufsatz aufgenommen.

Kernresonanzspektren ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$):

Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte bei 22 °C mit den FT-NMR-Geräten DPX 200, DPX 400 und DPX 600 der Firma Bruker. Die chemischen Verschiebungen der Signale wurden in Einheiten der δ -Skala angegeben [ppm]. Als interner Standard dienten bei $^1\text{H-NMR}$ -Spektren Resonanzsignale nicht deuterierter Moleküle, die im verwendeten deuterierten Lösungsmittel enthalten waren [$\delta_{\text{H}} = 7.27$ (CDCl_3), $\delta_{\text{H}} = 2.50$ (DMSO-d_6)] sowie die entsprechenden Signale bei $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren [$\delta_{\text{C}} = 77.0$ (CDCl_3), $\delta_{\text{C}} = 39.5$ (DMSO-d_6)]. Die Multiplizität der Signale wurde durch folgende Abkürzungen wiedergegeben: s = Singulett, d = Dublett, dd = dupliertes Duplett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett und br. s. = breites Signal. Die Kopplungskonstanten J wurden in Hertz (Hz) angegeben. Bei Überlagerung unterschiedlicher Multiplizitäten in einem Resonanzsignal erfolgte deren Angabe nach absteigender Größe der Kopplungskonstanten.

Elektronenspinresonanzspektren (ESR/EPR):

EPR-Messungen wurden an einem CW/FT-ESR-Spektrometer der Firma Bruker (Elexsys E580) unter Verwendung einer *flexline* dielektrischen *cavity* (ER4118X-MD-5) durchgeführt.

UV/Vis- und Fluoreszenzspektren:

Die Aufnahmen von UV/Vis-Spektren erfolgte an einem UV/Vis-Spektrometer (*GENESYS 10 uv Scanning*) der Firma Thermo Scientific. Fluoreszenzspektren und die Fluoreszenz-*Quenching*-Experimente wurden an einem *Luminescence spectrometer (LS50B)* der Firma Perkin Elmer durchgeführt.

HRMS (High resolution mass spectra):

HRMS wurden an einem GC-MS-TOF Spektrometer mit EI-Ionisation (Waters GCT premier micromass) gemessen.

Confocal laser scanning microscope (cLSM):

Die *in vitro*- Fluoreszenzuntersuchungen wurden an einem konfokales Laser *scanning* Mikroskop (LSM 700 mit AxioExaminer.D1) der Carl Zeiss Microscopy GmbH durchgeführt (AG Deitmer, TU Kaiserslautern). Hierzu wurde ein *40x / 0,80w Objektiv* mit einer peltiergekühlten CCD-Kamera (Till Photonics), sowie ein variabler *dichroic mirror* mit *T405/488/568/647-Filtern* verwendet. Es wurde mit Lasern der Wellenlängen 405 nm und 488 nm angeregt. Die Fluoreszenzen wurde zwischen 480 und 550 nm detektiert.

Zellkultur:

Die kultivierten Zellen wurden ein einem Inkubator (Innova CO-170) der Firma Eppendorf aufbewahrt. Alle Arbeiten in der Zellkultur erfolgten unter einer Sterilbank (*LaminAir HLB 2448*) der Firma Heraeus Instruments. Die Zellen wurden unter einem Mikroskop (In Wert IT 400 Trino) der Firma VWR begutachtet.

Sonstiges:

Die pH-Werte wurden mittels pH-Papier oder einem pH-Meter der Firma WTW eingestellt. Zum Zentrifugieren wurde die *CentriFuge 5415 C* der Firma Eppendorf verwendet. Zum einwiegen von Feststoffen wurden die Waagen L610D und 1601 MP8-1 der Sartorius AG verwendet.

5.1.2 Chromatographische Methoden*Dünnschichtchromatographie (DC):*

Es kamen die DC-Alufolien Polygram Sil G/UV₂₅₄ mit 0.2 mm Kieselgel der Firma *Macherey-Nagel* zum Einsatz. Zur Detektion der Substanzen wurden die Fluoreszenzlöschungen bei 254 nm und 366 nm, oder Anfärbereagentien wie KMnO₄-Lösung (3 g KMnO₄, 20 g K₂CO₃, 15 g NaOH, 300 mL Wasser), Ioddampf, schwefelsaures *p*-Anisaldehyd (10 mL *p*-Anisaldehyd, 10 mL konz. H₂SO₄, 200 mL EtOH) oder FeCl₃ (1 Gew-% in abs. EtOH) verwendet.

Säulenchromatographie:

Als Säulenfüllmaterial diente zum einen Kieselgel der Firma Merck mit einer Korngröße von 40–63 μm und Alox (Aluminiumoxid basisch I; Aluminiumoxid neutral) von der Chemikalienausgabe der TU Kaiserslautern. Die Säulen wurden nass befüllt und bei Bedarf zur Regulierung der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase vorsichtig unter Druck gesetzt (Flashsäulenchromatographie).

5.1.3 Arbeitstechniken Chemikalien und Lösungsmittel

Als Inertgas wurde Stickstoff oder Argon verwendet. Bei Arbeiten unter Inertgasatmosphäre kamen Kanülen- und Standard-Schlenk-Techniken zum Einsatz. Feste Einsatzstoffe wurden an Luft eingewogen, dann in den entsprechenden Glasgeräten im Ölpumpenvakuum von Sauerstoff und Feuchtigkeitsspuren befreit und das Gefäß mit Schutzgas befüllt. Kommerziell erhältliche Ausgangskemikalien (Sigma-Aldrich, Merck, Acros Organics, SCBT, Roth Chemikalienausgabe der TU Kaiserslautern) wurden, wenn nicht anders angegeben, bei einer Reinheit $\geq 95\%$ direkt eingesetzt. Lösungsmittel kamen in kommerzieller Qualität zum Einsatz, wenn dies nicht gesondert angegeben ist. Die Trocknung von Lösungsmitteln erfolgte nach den üblichen Verfahren (Perrin, 1980). Getrocknete Lösungsmittel wurden über 4 Å Molekularsieben und unter Stickstoff oder Argon aufbewahrt.

5.1.4 Software

Tabelle 8: Verwendete Software.

Programm	Hersteller
ACD / NMR Processor	Advanced Chemistry Development, Inc.
ChemBio Draw Ultra 11	CambrigeSoft Corp.
ChemBio Draw 3D	CambrigeSoft Corp.
ChemSketch	Advanced Chemistry Development, Inc.
Citavi 5	Swiss Academic Software
COSMOS	COSMOS GbR
Excel 2010	Microsoft Corp.
Gaussian09	Gaussian Inc.
ImageJ 1.51f	Wayne Rasband (NIH)
LSM Image	Carl Zeiss GmbH
Nomograph	Sigma-Aldrich Corp.
Origin 8	OriginLab Corp.
Photoshop	Adobe Systems, Inc.
TURBOMOLE	Turbomole GmbH
UV WinLab L900	PerkinElmer Corp.
Word 2010	Microsoft Corp.
Xepr	Bruker Corp.
Xming	Colin Harrison

5.2 Synthese des *N-tert-Butyl-p-nitro-o-methoxystilben-nitrons* (17a) und davon abgeleiteter auxochrom-substituierter Derivate (17b-h)

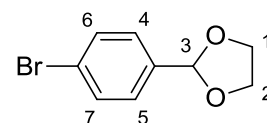
5.2.1 Synthese von 2-(4-Bromphenyl)-[1,3]-dioxolan (12)

Zu einer Lösung aus 4-Brombenzaldehyd **11** (20.0 g, 107 mmol) in Toluol (160 ml) wurden Ethylenglykol (39.8 g, 642 mmol, 35.8 ml) und eine katalytische Menge *p*-Toluolsulfonsäure (204 mg, 1.07 mmol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 22 h mit Wasserabscheider unter Rückfluss gerührt. Anschließend wurde der Ansatz auf H₂O (150 ml) gegeben. Die wässrige wurde von der organischen Phase separiert, mit Diethylether (3 × 100 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen getrocknet (MgSO₄). Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der gelbe, ölige Rückstand mittels Vakuumdestillation (3.1 × 10⁻¹ mbar, 131–137 °C) aufgereinigt.

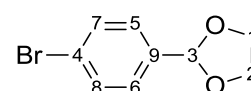
Ausbeute: 22.7 g (99 mmol, 93 %) eines farblosen Öls **12**, das nach einigen Tagen Standzeit bei Raumtemperatur teilweise zu weißen Nadeln kristallisierte.

IR (ATR): 2951 (m), 2883 (m), 1075 (s), 1011 (s), 814 (s) cm⁻¹.

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ [ppm] = 3.99 – 4.15 (m, 4 H, H_{1,2}), 5.79 (s, 1 H, H₃), 7.37 (d, ³J_{HH} = 8.5 Hz, 2 H, H_{4,5}), 7.54 (d, ³J_{HH} = 8.5 Hz, 2 H, H_{6,7}).



¹³C-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ [ppm] = 65.3 (C_{1,2}), 103.0 (C₃), 123.2 (C₄), 128.1 (C_{5,6}), 131.4 (C_{7,8}), 137.0 (C₉).



HRMS (EI): m/z [M]⁺ für C₉H₉BrO₂

berechnet: 227.9786, 229.9766

gefunden: 227.9784, 229.9772

5.2.2 Synthese von (*E*)-(4-(1,3-dioxolan-2-yl)styryl)-trimethylsilan (13)

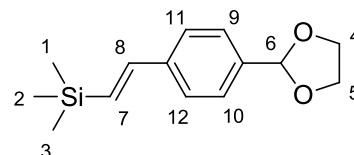
Es wurden 2-(4-Bromphenyl)-1,3-dioxolan **12** (9.16 g, 40.0 mmol) unter Inertgasatmosphäre in trockenem Acetonitril (40 ml) gelöst, anschließend Tetrabutylammoniumacetat (31.1 g, 100 mmol), Palladium(II)-acetat (269 mg, 1.20 mmol) und Vinyltrimethylsilan (8.27 g, 80 mmol, 12.00 ml) hinzugegeben und mit trockenem Acetonitril (10 ml) nachgespült. Das Reaktionsgemisch wurde für 28 h unter Rückfluss erhitzt. Die nun schwarze Lösung wurde auf H₂O (80 ml) gegeben und mit Diethylether (2 × 150 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet (MgSO₄) und das Lösungsmittel unter vermindertem

Druck entfernt. Der braune Rückstand wurde via Vakuumdestillation (2.9×10^{-2} mbar, 141–146 °C) aufgereinigt.

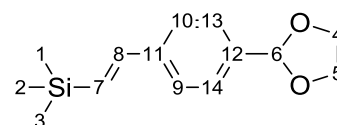
Ausbeute: 9.88 g (39.8 mmol, 99 %) eines farblosen Öls **13**.

IR (ATR): 2954 (m), 2887 (m), 1247 (s), 1081 (s), 835 (s) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ [ppm] = 0.00 (s, 9 H, $\text{H}_{1,2,3}$), 3.78 – 3.97 (m, 4 H, $\text{H}_{4,5}$), 5.61 (s, 1 H, H_6), 6.34 (d, $^3J_{\text{HH}} = 19.1$ Hz, 1 H, H_7), 6.72 (d, $^3J_{\text{HH}} = 19.1$ Hz, 1 H, H_8), 7.28 (s, 4 H, $\text{H}_{9,10,11,12}$).



$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = -1.38 ($\text{C}_{1,2,3}$), 65.1 ($\text{C}_{4,5}$), 103.4 (C_6), 126.2 (C_7), 126.5 (C_8), 130.1 ($\text{C}_{9,10}$), 137.4 (C_{11}), 139.1 (C_{12}), 143.0 ($\text{C}_{13,14}$).



HRMS (EI): m/z [M] $^+$ für $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{Si}$

berechnet: 248.1233

gefunden: 248.1231

5.2.3 Versuche zur Synthese des *N-tert-butyl-p-nitrostilbennitrons* (**17c**)

5.2.3.1 Synthese des *p*-Nitrostilbenaldehyds (**16c**)

4-Nitrophenyldiazoniumtetrafluoroborat **15c** (476 mg, 2.01 mmol) wurde unter Inertgasatmosphäre in trockenem MeOH (40 ml) gelöst. Anschließend wurden (*E*)-(4-(1,3-dioxolan-2-yl)styryl)trimethylsilan **13** (500 mg, 2.01 mmol) und Palladium-(II)-acetat (9.03 mg, 402 μmol , 2 mol%) zugegeben. Es wurde für 6 h bei RT gerührt, anschließend der Ansatz auf H_2O (50 ml) gegeben und mit Ethylacetat (3×40 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet (MgSO_4), das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt von **16c** wurde per Säulenchromatographie (Kieselgel, PE 40/60 – EtOAc, 5 : 1) aufgereinigt.

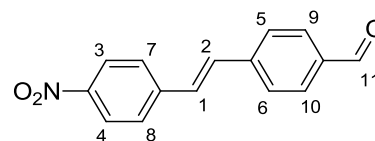
Ausbeute: 392 mg (1.55 mmol, 77 %) eines gelben Feststoffs **16c**.

Smp.: 212–216 °C.

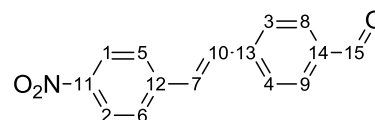
$R_f = 0.26$ (PE 40/60 – EtOAc, 6 : 1).

IR (ATR): 2958 (w), 2924 (w), 2822 (w), 2717 (w), 1687 (m), 1600 (m), 1501 (s), 1330 (s) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 7.23 (s, 1 H, H_1), 7.27 (s, 1 H, H_2), 7.66 (m, 4 H, $\text{H}_{3,4,5,6}$), 7.89 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.53$ Hz, 2 H, $\text{H}_{7,8}$), 8.22 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.53$ Hz, 2 H, $\text{H}_{9,10}$), 10.0 (s, 1 H, H_{11}).



$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = 124.2 ($\text{C}_{1,2}$), 127.3 ($\text{C}_{3,4}$), 127.5 ($\text{C}_{5,6}$), 129.6 (C_7), 130.3 ($\text{C}_{8,9}$), 131.8 (C_{10}), 136.1 (C_{11}), 142.0 (C_{12}), 142.9 (C_{13}), 147.3 (C_{14}), 191.5 (C_{15}).



HRMS (EI): m/z [M] $^+$ für $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_3$
 berechnet: 253.0739
 gefunden: 253.0738

5.2.3.2 Synthese des *N-tert-Butyl-p-nitrostilbennitrons* (**17c**)

(*E*)-4-(4-Nitrostyryl)benzaldehyd **16c** (127 mg, 0.50 mmol) wurde zusammen mit *N*-(*tert*-Butyl)hydroxylamin-hydrochlorid (94.2 mg, 0.75 mmol) in Benzol (30 ml) gelöst. Nach Zugabe einer Spatelspitze *p*-Toluolsulfonsäure, wurde für 17 Stunden mit Wasserabscheider unter Rückfluss erhitzt. Danach wurde der Ansatz auf H_2O (50 ml) gegeben, mit Ethylacetat (3×40 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen getrocknet (MgSO_4). Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde der entstandene gelbe Feststoff säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, PE 40/60 – EtOAc – Triethylamin, 1 : 2 : 0.01).

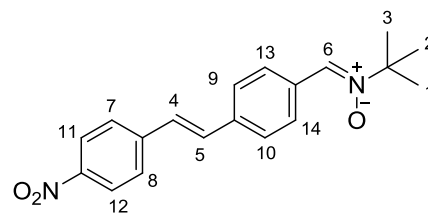
Ausbeute: 116 mg (0.36 mmol, 72 %) eines gelb-grünen Feststoffs **17c**.

Smp.: 204-207 °C.

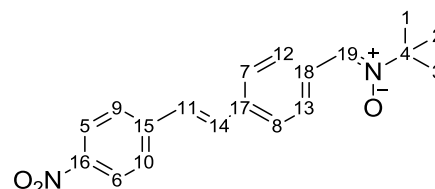
$R_f = 0.35$ (PE 40/60 – EtOAc – Triethylamin, 1 : 2 : 0.01).

IR (ATR): 3102 (w), 2983 (w), 2925 (w), 2854 (w), 1522 (s), 1338 (s), 1107 (m), 964 (m), 861 (s) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 1.64 (s, 9 H, $\text{H}_{1,2,3}$), 7.22 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9.30$ Hz, 1 H, H_4), 7.28 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9.30$ Hz, 1 H, H_5), 7.58 (s, 1 H, H_6), 7.61 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.60$ Hz, 2 H, $\text{H}_{7,8}$), 7.66 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.80$ Hz, 2 H, $\text{H}_{9,10}$), 8.24 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.80$ Hz, 2 H, $\text{H}_{11,12}$), 8.33 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.60$ Hz, 2 H, $\text{H}_{13,14}$).



$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = 28.4 ($\text{C}_{1,2,3}$), 71.1 (C_4), 124.2 ($\text{C}_{5,6}$), 127.0 ($\text{C}_{7,8}$), 127.1 ($\text{C}_{9,10}$), 127.3 (C_{11}), 129.2 ($\text{C}_{12,13}$), 129.4 (C_{14}), 131.3 (C_{15}), 132.5 (C_{16}), 137.6 (C_{17}), 143.6 (C_{18}), 146.9 (C_{19}).



HRMS (EI): m/z [M] $^+$ für $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$

berechnet: 324.1473

gefunden: 324.1485

UV/Vis (EtOAc): λ_{max} (ϵ) = 262 (3923), 317 (9615), 378 (19083) nm.

5.2.4 Synthese von substituierten Aryldiazoniumtetrafluorboraten (15)

5.2.4.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift

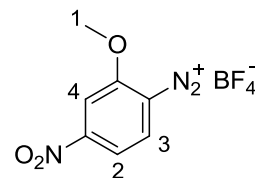
Unter Inertgasatmosphäre wurden die jeweiligen Anilinderivate **14** (16.0 mmol) in 20 %iger HBF_4 -Lösung (10 ml) gelöst und auf -10 °C abgekühlt. Unter heftigem Rühren wurde über eine halbe Stunde wässrige NaNO_2 -Lösung (1.10 g, 16.0 mmol, 6 ml H_2O) zugetropft, wobei die Temperatur maximal bis 0 °C anstieg. Durch das ausgefallene korrespondierende Diazoniumsalz **15** trübte und dickte die Reaktionslösung ein, nach 1 h wurde dieser Feststoff abfiltriert und mit eiskalter, 5 %iger HBF_4 -Lösung (15 ml), eiskaltem H_2O (25 ml) und kaltem Diethylether (25 ml) gewaschen. Das so erhaltene Aryldiazoniumtetrafluorborat **15** wurde über Nacht im Vakuum getrocknet und anschließend im Hochvakuum von restlichem Lösungsmittel befreit.

5.2.4.2 Synthese von 2-Methoxy-4-nitrobenzoldiazoniumtetrafluorborat (**15a**)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift (Kap. 5.1.4.1) wurde das Anilinderivat **14a**: 2-Methoxy-4-nitroanilin (2.69 g, 16.0 mmol) umgesetzt.

Ausbeute: 2.83 g (10.6 mmol, 66 %) eines rotbraunen Feststoffs **15a**.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 4.37 (s, 3 H, H_1), 8.23 (m, 2 H, $\text{H}_{2,3}$), 8.41 – 8.42 (m, 1 H, H_4).

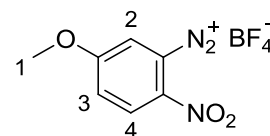


5.2.4.3 Synthese von 3-Methoxy-6-nitrobenzoldiazoniumtetrafluorborat (**15b**)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift (Kap. 5.1.4.1) wurde das Anilinderivat **14b**: 5-Methoxy-2-nitroanilin (2.69 g, 16.0 mmol) umgesetzt.

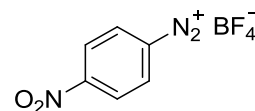
Ausbeute: 3.12 g (11.7 mmol, 73 %) eines rotbraunen Feststoffs **15b**.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 4.11 (s, 3 H, H_1), 7.98 – 8.74 (m, 1 H, H_2), 8.74 – 8.82 (m, 2 H, $\text{H}_{3,4}$).



5.2.4.4 4-Nitrobenzoldiazoniumtetrafluorborat (**15c**)

4-Nitrobenzoldiazoniumtetrafluorborat (**15c**) war kommerziell zu erwerben und wurde von Acros bezogen.

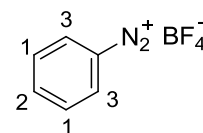


5.2.4.5 Synthese von Benzoldiazoniumtetrafluorborat (**15d**)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift (Kap. 5.1.4.1) wurde das Anilinderivat **14d**: Anilin (1.49 g, 16.0 mmol) umgesetzt.

Ausbeute: 2.80 g (14.6 mmol, 91 %) eines weißen Feststoffs **15d**.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 7.97 – 8.05 (m, 2 H, H_1), 8.25 – 8.33 (m, 1 H, H_2), 8.67 – 8.72 (m, 2 H, H_3).

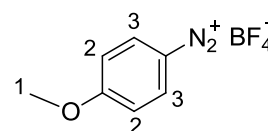


5.2.4.6 Synthese von 4-Methoxybenzoldiazoniumtetrafluorborat (**15e**)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift (Kap. 5.1.4.1) wurde das Anilinderivat **14e**: 4-Methoxyanilin (1.97 g, 16.0 mmol) umgesetzt.

Ausbeute: 2.42 g (10.9 mmol, 68 %) eines gelblichen Feststoffes **15e**.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 4.07 (s, 3 H, H_1), 7.47 – 7.55 (m, 2 H, H_2), 8.60 – 8.68 (m, 2 H, H_3).

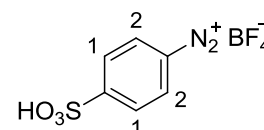


5.2.4.7 Synthese von 4-Sulfonsäurebenzoldiazoniumtetrafluorborat (**15f**)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift (Kap. 5.1.4.1) wurde das Anilinderivat **14f**: 4-Aminobenzolsulfonsäure (2.77 g, 16.0 mmol) umgesetzt.

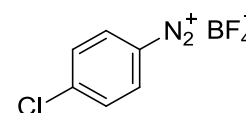
Ausbeute: 3.83 g (14.1 mmol, 88 %) eines gräulichen Feststoffs **15f**.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 400 MHz): δ [ppm] = 4.85 (br. s, 1 H, SO_3H), 7.27 – 7.73 (m, 2 H, H_1), 8.07 – 8.66 (m, 2 H, H_2).



5.2.4.8 4-Chlorbenzoldiazoniumtetrafluorborat (**15g**)

4-Chlorbenzoldiazoniumtetrafluorborat **15g** wurde von B. Bayarmagnai (AK Goossen / TU Kaiserslautern) bezogen und analog zur allgemeinen Arbeitsvorschrift (Kap. 5.1.4.1) hergestellt.

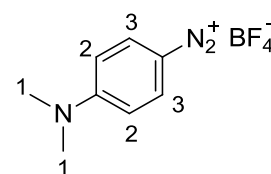


5.2.4.9 Synthese von 4-Dimethylaminobenzoldiazoniumtetrafluorborat (**15h**)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift (Kap. 5.1.4.1) wurde das Anilinderivat **14h**: 4-Dimethylphenylendiamin (2.18 g, 16.0 mmol) umgesetzt.

Ausbeute: 3.12 g (13.3 mmol, 83 %) eines orangenen Feststoffs **15h**.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 400 MHz): δ [ppm] = 3.26 (s, 6 H, H_1), 7.07 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9.70$ Hz, 2 H, H_2), 8.23 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9.70$ Hz, 2 H, H_3).

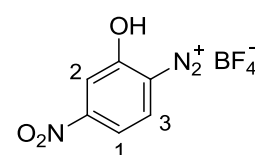


5.2.4.10 Synthese von 2-Hydroxy-4-nitrobenzoldiazoniumtetrafluorborat (**15i**)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift (Kap. 5.1.4.1) wurde das Anilinderivat **14i**: 2-Amino-4-nitrophenol (2.47 g, 16.0 mmol) umgesetzt.

Ausbeute: 2.02 g (7.99 mmol, 50 %) eines weinrot-glänzenden Feststoffs **15i**.

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6 , 400 MHz): δ [ppm] = 4.11 (br. s, 1 H, OH), 6.90 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9.50$ Hz, 1 H, H_1), 7.29 (s, 1 H, H_2), 7.89 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9.70$ Hz, 1 H, H_3).



5.2.5 Versuche zur Synthese auxochrom-substituierter Stilbenaldehyde (**16**)

5.2.5.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift der optimierten milden Heck-analogen Reaktion zur Synthese formylierter *trans*-Stilbene (**16a-h**)

Unter Inertgasatmosphäre wurde bei ≤ -10 °C, zu einer Lösung aus dem entsprechenden Aryldiazoniumtetrafluorborat **15** (4 mmol) in trockenem MeOH (50 ml) schnellstmöglich Palladium(II)-acetat (0.08 mmol) und (*E*)-(4-(1,3-Dioxolan-2-yl)styryl)trimethylsilan **13** (4 mmol) gegeben. Der Ansatz wurde bei dieser Temperatur für 3 h gehalten und über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung auf H₂O (100 ml) gegeben und die organische Phase separiert. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 × 100 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen getrocknet (MgSO₄), filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, PE - EtOAc), um den reinen Stilbenaldehyd **16** zu erhalten.

5.2.5.2 Synthese von (*E*)-4-(2-Methoxy-4-nitrostyryl)benzaldehyd (**16a**)

Aus dem Aryldiazoniumtetrafluorborat **15a** (1.07 g, 4 mmol) und **13** (994 mg, 4 mmol).

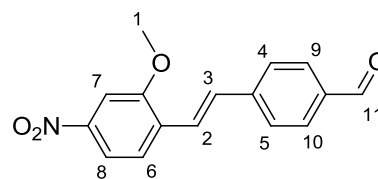
Ausbeute: 784 mg (69 %, 2.76 mmol) eines gelben Feststoffes **16a**.

Smp.: 154-156 °C.

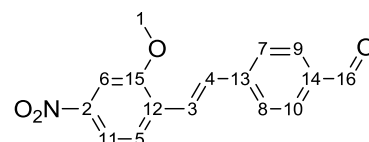
R_f = 0.30 (PE 40/60 – EtOAc, 5 : 1).

IR (ATR): 3070 (w), 2972 (w), 2837 (w), 2752 (w), 1697 (m), 1600 (m), 1339 (s), 1250 (s) cm⁻¹.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4.03 (s, 3 H, H₁), 7.31 (d, ³J_{HH} = 16.6 Hz, 1 H, H₂), 7.62 (d, ³J_{HH} = 16.6 Hz, 1 H, H₃), 7.70 - 7.76 (m, 3 H, H_{4,5,6}), 7.79 (d, ³J_{HH} = 2.2 Hz, 1 H, H₇), 7.87 - 7.93 (m, 3 H, H_{8,9,10}), 10.03 (s, 1 H, H₁₁).



¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ [ppm] = 56.2 (C₁), 86.2 (C₂), 106.1 (C₃), 116.2 (C₄), 124.9 (C₅), 126.7 (C₆), 127.5 (C_{7,8}), 130.3 (C_{9,10}), 131.7 (C₁₁), 132.3 (C₁₂), 135.9 (C₁₃), 142.8 (C₁₄), 157.1 (C₁₅), 191.6 (C₁₆).



HRMS (EI): m/z [M]⁺ für C₁₆H₁₃NO₄

berechnet: 283.0845

gefunden: 283.0846

5.2.5.3 Synthese von (*E*)-4-(3-Methoxy-2-nitrostyryl)benzaldehyd (**16b**)

Aus dem Aryldiazoniumtetrafluoroborat **15b** (1.07 g, 4 mmol) und **13** (994 mg, 4 mmol).

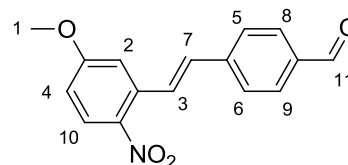
Ausbeute: 584 mg (52%, 2.08 mmol) eines gelben Feststoffs **16b**.

Smp.: 155–157 °C.

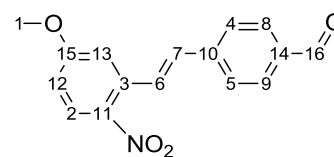
R_f = 0.32 (PE 40/60 – EtOAc, 4 : 1).

IR (ATR): 3082 (w), 3007 (w), 2826 (w), 2742 (w), 1690 (m), 1602 (m), 1295 (s), 1209 (s) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 3.97 (s, 3 H, H_1) 6.94 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 9.2$ Hz, 2.8 Hz, 1 H, H_2), 7.05 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.1$ Hz, 1 H, H_3), 7.16 (d, $^3J_{\text{HH}} = 2.8$ Hz, 1 H, H_4), 7.71 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{5,6}$), 7.90 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.1$ Hz, 1 H, H_7), 7.92 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{8,9}$), 8.15 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9.2$ Hz, 1 H, H_{10}), 10.04 (s, 1 H, H_{11}).



$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = 31.0 (C_1), 85.6 (C_2), 113.5 (C_3), 127.6 ($\text{C}_{4,5}$), 127.9 (C_6), 128.5 (C_7), 130.3 ($\text{C}_{8,9}$), 132.1 (C_{10}), 135.8 (C_{11}), 143.5 (C_{12}), 150.3 (C_{13}), 151.4 (C_{14}), 163.4 (C_{15}), 191.6 (C_{16}).



HRMS (EI): m/z [M] $^+$ für $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_4$

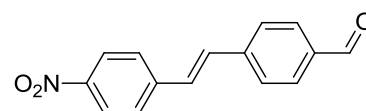
berechnet: 283.0845

gefunden: 283.0846

5.2.5.4 Synthese von (*E*)-4-(4-Nitrostyryl)benzaldehyd (**16c**)

Aus dem Aryldiazoniumtetrafluoroborat **15c** (948 mg, 4 mmol) und **13** (994 mg, 4 mmol).

Ausbeute: 822 mg (81 %, 3.24 mmol) eines gelben Feststoffes **16c**. Analytik: siehe Kap. 5.1.3.1.



5.2.5.5 Synthese von (*E*)-4-Styrylbenzaldehyd (**16d**)

Aus dem Aryldiazoniumtetrafluoroborat **15d** (768 mg, 4 mmol) und **13** (994 mg, 4 mmol).

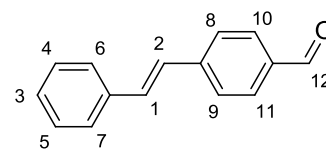
Ausbeute: 597 mg (72%) eines weißen Feststoffs **16d**.

Smp.: 107–110 °C.

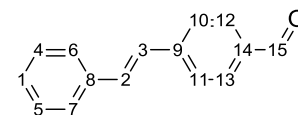
R_f = 0.35 (PE 40/60 – EtOAc, 4 : 1).

IR (ATR): 3030 (w), 2820 (w), 2724 (w), 1694 (s), 1592 (m), 964 (s) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.16 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.2$ Hz, 1 H, H_1), 7.28 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.2$ Hz, 1 H, H_2), 7.34 (m, 1 H, H_3), 7.16 (m, 2 H, $\text{H}_{4,5}$), 7.57 (m, 2 H, $\text{H}_{6,7}$), 7.67 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{8,9}$), 7.89 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{10,11}$), 10.01 (s, 1 H, H_{12}).



$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ [ppm] = 126.9 (C_1), 127.3 (C_2), 128.5 (C_3), 128.9 ($\text{C}_{4,5}$), 130.3 ($\text{C}_{6,7}$), 132.2 (C_8), 135.3 (C_9), 136.5 ($\text{C}_{10,11}$), 143.4 ($\text{C}_{12,13}$), 176.4 (C_{14}), 191.7 (C_{15}).



HRMS (EI): m/z [M] $^+$ für $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}$
 berechnet: 208.0888
 gefunden: 208.0890

5.2.5.6 Synthese von (*E*)-4-(4-Methoxystyryl)benzaldehyd (**16e**)

Aus dem Aryldiazoniumtetrafluoroborat **15e** (888 mg, 4 mmol) und **13** (994 mg, 4 mmol).

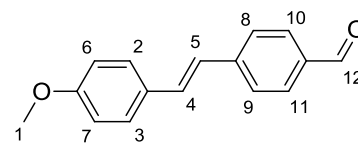
Ausbeute: 720 mg (76%, 3.04 mmol) eines schwach gelben Feststoffs **16e**.

Smp.: 131–133 °C.

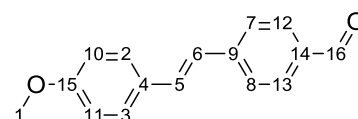
R_f = 0.31 (PE 40/60 – EtOAc, 8 : 1).

IR (ATR): 3024 (w), 2935 (w), 2837 (w), 2749 (w), 1681 (s), 1596 (s), 1508 (s), 1246 (s), 1175 (s), 1022 (s), 967 (s), 831 (s) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 3.86 (s, 3 H, H_1), 6.94 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{2,3}$), 7.02 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.3$ Hz, 1 H, H_4), 7.24 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.3$ Hz, 1 H, H_5), 7.51 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{6,7}$), 7.64 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz, 2 H, $\text{H}_{8,9}$), 7.87 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz, 2 H, $\text{H}_{10,11}$), 9.99 (s, 1 H, H_{12}).



$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 55.4 (C_1), 114.3 ($\text{C}_{2,3}$), 125.2 (C_4), 126.3 (C_5), 126.6 (C_6), 128.3 ($\text{C}_{7,8}$), 129.3 (C_9), 130.3 ($\text{C}_{10,11}$), 131.8 ($\text{C}_{12,13}$), 135.0 (C_{14}), 143.9 (C_{15}), 191.7 (C_{16}).



HRMS (EI): m/z [M] $^+$ für $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_2$
 berechnet: 238.0994
 gefunden: 238.1001

5.2.5.7 Synthese von (*E*)-4-(4-Sulfostryl)benzaldehyd (**16f**)

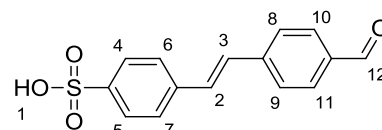
Aus dem Aryldiazoniumtetrafluoroborat **15f** (1.63 g, 6 mmol) und **13** (1.49 g, 6 mmol).

Ausbeute: 430 mg (25%, 1.50 mmol) eines beigen Feststoffs **16f**.

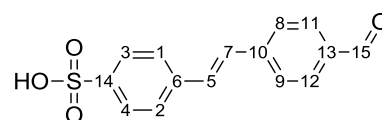
Smp.: 241–243 °C.

IR (ATR): 3399 (s), 3044 (w), 3018 (w), 2896 (w), 2860 (w), 1687 (s), 1606 (m), 1190 (s), 1126 (s), 1035 (s), 829 (s) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 3.35 (s, 1 H, H_1), 7.40 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.1$ Hz, 1 H, H_2), 7.49 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.1$ Hz, 1 H, H_3), 7.24 (br. s, 4 H, $\text{H}_{4,5,6,7}$), 7.84 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{8,9}$), 7.91 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{10,11}$), 9.99 (s, 1 H, H_{12}).



$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 126.0 ($\text{C}_{1,2}$), 126.3 ($\text{C}_{3,4}$), 127.1 (C_5), 127.7 (C_6), 130.0 (C_7), 131.5 ($\text{C}_{8,9}$), 135.1 (C_{10}), 136.5 ($\text{C}_{11,12}$), 143.1 (C_{13}), 148.2 (C_{14}), 192.4 (C_{15}).



5.2.5.8 Synthese von (*E*)-4-(4-Chlorostyryl)benzaldehyd (**16g**)

Aus dem Aryldiazoniumtetrafluoroborat **15g** (582 mg, 2.57 mmol) und **13** (639 mg, 2.57 mmol).

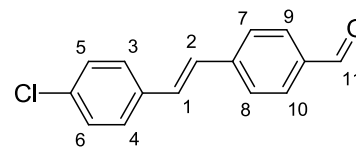
Ausbeute: 373 mg (60 %, 1.54 mmol) eines weißen Feststoffes **16g**.

Smp.: 134-137 °C.

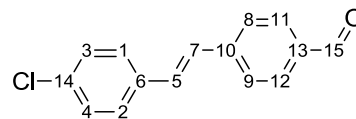
$R_f = 0.35$ (PE 40/60 – EtOAc, 5 : 1).

IR (ATR): 3026 (w), 2828 (w), 2737 (w), 1690 (m), 1598 (m), 1165 (m), 971 (m), 829 (s), 790 (m) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.13 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.2$ Hz, 1 H, H_1), 7.22 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.1$ Hz, 1 H, H_2), 7.37 (m, 2 H, $\text{H}_{3,4}$), 7.49 (m, 2 H, $\text{H}_{5,6}$), 7.66 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{7,8}$), 7.89 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{9,10}$), 10.0 (s, 1 H, H_{11}).



$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 127.0 ($\text{C}_{1,2}$), 127.9 ($\text{C}_{3,4}$), 128.1 ($\text{C}_{5,6}$), 129.1 (C_7), 130.3 ($\text{C}_{8,9}$), 130.8 (C_{10}), 134.2 (C_{11}), 135.1 (C_{12}), 135.5 (C_{13}), 143.0 (C_{14}), 191.6 (C_{15}).



HRMS (EI): m/z [M] $^+$ für $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClO}$
 berechnet: 242.0498
 gefunden: 242.0496

5.2.5.9 Synthese von (*E*)-4-(4-Dimethylaminostyryl)benzaldehyd (**16h**)

Aus dem Aryldiazoniumtetrafluoroborat **15h** (940 mg, 4 mmol) und **13** (994 mg, 4 mmol).

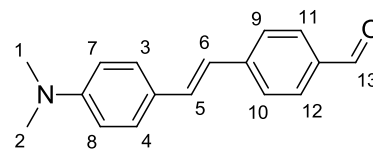
Ausbeute: 366 mg (36 %, 1.44 mmol) eines dunkel-gelben Feststoffs **16h**.

Smp.: 212–214 °C.

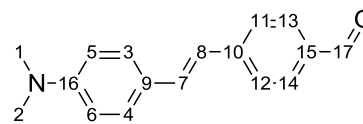
$R_f = 0.29$ (PE 40/60 – EtOAc, 8 : 1).

IR (ATR): 3021 (w), 2892 (w), 2851 (w), 2803 (w), 1686 (m), 1584 (m), 1352 (m), 1162 (m), 967 (m), 820 (s) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 3.02 (s, 6 H, $\text{H}_{1,2}$), 6.73 (m, 2 H, $\text{H}_{3,4}$), 6.95 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.1$ Hz, 1 H, H_5), 7.22 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.1$ Hz, 1 H, H_6), 7.46 (m, 2 H, $\text{H}_{7,8}$), 7.61 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{9,10}$), 7.84 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{11,12}$), 9,97 (s, 1 H, H_{13}).



$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 40.4 ($\text{C}_{1,2}$), 112.24 ($\text{C}_{3,4}$), 122.7 ($\text{C}_{5,6}$), 126.3 (C_7), 128.2 (C_8), 129.2 (C_9), 129.6 (C_{10}), 130.3 ($\text{C}_{11,12}$), 131.5 ($\text{C}_{13,14}$), 132.5 (C_{15}), 134,5 (C_{16}), 191.7 (C_{17}).



HRMS (EI): m/z [M] $^+$ für $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}$

berechnet: 251.1310

gefunden: 251.1315

5.2.6 Versuche zur Synthese auxochromer Stilbennitronderivate (17)

5.2.6.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus *N-tert*-Butylhydroxylamin-hydrochlorid (502 mg, 4 mmol) und Triethylamin (445 mg, 612 μl , 4.4 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (10 ml), zu einer Lösung des entsprechenden Stilbenaldehyds **16** (0.5 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (50 ml) gegeben und für weitere 216 h bei RT gerührt. Alle 2 d wurde eine frische Lösung aus *N-tert*-Butylhydroxylamin-hydrochlorid (502 mg, 4 mmol) und Triethylamin (445 mg, 612 μl , 4.4 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (10 ml) zugesetzt. Auf jede Zugabe folgte eine zusätzliche Portion wasserfreies MgSO_4 (481 mg, 4 mmol). Nach Ende der Reaktionszeit wurde die Reaktionsmischung filtriert, das Filtrat getrocknet, der zurückgebliebene Feststoff mit H_2O (3 \times 20 ml) gewaschen und in EtOAc aufgenommen. Die organische Phase wurde getrocknet (MgSO_4) und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Falls nötig wurde das entstandene, fluoreszierende Nitron **17** via Säulenchromatographie (Kieselgel, PE – EtOAc - Triethylamin) aufgereinigt.

5.2.6.2 Synthese von (*Z*)-*N*-(4-((*E*)-2-Methoxy-4-nitrostyryl)benzyliden)-2-methylpropan-2-aminoxid (**17a**)

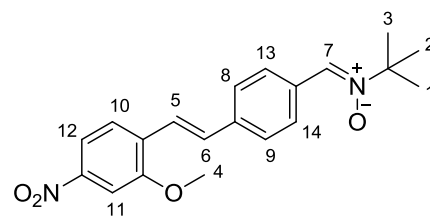
Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift (Kap. 5.1.6.1) wurde (*E*)-4-(2-Methoxy-4-nitrostyryl)benzaldehyd (**16a**, 200 mg, 706 μmol) umgesetzt.

Ausbeute: 249 mg (100 %, 706 μmol) eines gelben Feststoffs **17a**.

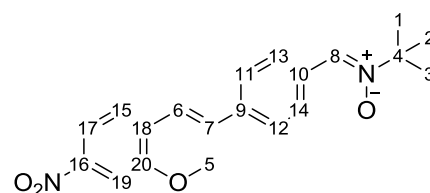
Smp.: 203–206 °C.

IR (ATR): 3083 (w), 2981 (w), 2921 (w), 2853 (w), 1510 (m), 1340 (s), 1248 (m), 1089 (m), 969 (m), 860 (s), 831 (m) cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 3.02 (s, 9 H, $\text{H}_{1,2,3}$), 4.01 (s, 3 H, H_4), 7.28 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.6$ Hz, 1 H, H_5), 7.54 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.6$ Hz, 1 H, H_6), 7.57 (s, 1 H, H_7), 7.62 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 2 H, $\text{H}_{8,9}$), 7.72 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, 1 H, H_{10}), 7.77 (d, $^3J_{\text{HH}} = 2.1$ Hz, 1 H, H_{11}), 7.88 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 8.5, 2.1$ Hz, 1 H, H_{12}), 8.31 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 2 H, $\text{H}_{13,14}$).



^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 28.4 ($\text{C}_{1,2,3}$), 56.1 (C_4), 71.0 (C_5), 106.0 (C_6), 116.2 (C_7), 118.4 (C_8), 122.5 (C_9), 126.3 (C_{10}), 127.1 ($\text{C}_{11,12}$), 129.1 ($\text{C}_{13,14}$), 129.5 (C_{15}), 131.0 (C_{16}), 132.6 (C_{17}), 138.4 (C_{18}), 147.7 (C_{19}), 156.9 (C_{20}).



HRMS (EI): m/z [M] $^+$ für $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$

berechnet: 354.1580

gefunden: 354.1578

UV/Vis (EtOAc): λ_{max} (ϵ) = 261 (3070), 326 (6940), 395 (13910) nm.

5.2.6.3 Synthese von (*Z*)-*N*-(4-((*E*)-3-Methoxy-2-nitrostyryl)benzyliden)-2-methylpropan-2-aminoxid (**17b**)

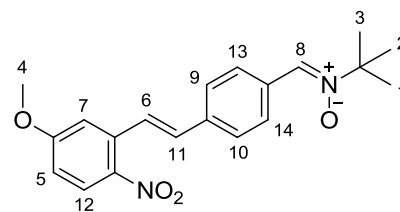
Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift (Kap. 5.1.6.1) wurde (*E*)-4-(3-Methoxy-2-nitrostyryl)benzaldehyd (**16b**, 283 mg, 1 mmol) umgesetzt.

Ausbeute: 353 mg (100 %, 1 mmol) eines gelben Feststoffs **17b**.

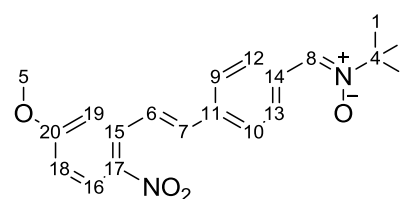
Smp.: 137–139 °C.

IR (ATR): 3077 (w), 2980 (w), 2937 (w), 2845 (w), 1501 (s), 1293 (s), 1126 (m), 1086 (s), 863 (m), 831 (s) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.64 (s, 9 H, $\text{H}_{1,2,3}$), 3.95 (s, 3 H, H_4), 6.90 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 9.2, 2.8$ Hz, 1 H, H_5), 7.04 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.4$ Hz, 1 H, H_6), 7.16 (d, $^3J_{\text{HH}} = 2.8$ Hz, 1 H, H_7), 7.58 (s, 1 H, H_8), 7.72 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, 2 H, $\text{H}_{9,10}$), 7.61 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.4$ Hz, 1 H, H_{11}), 7.88 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9.2$ Hz, 1 H, H_{12}), 8.32 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 2 H, $\text{H}_{13,14}$).



$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 28.4 ($\text{C}_{1,2,3}$), 56.0 (C_4), 71.0 (C_5), 112.8 (C_6), 113.5 (C_7), 125.8 (C_8), 127.1 ($\text{C}_{9,10}$), 127.7 (C_{11}), 129.1 ($\text{C}_{12,13}$), 129.5 (C_{14}), 131.1 (C_{15}), 133.0 (C_{16}), 136.9 (C_{17}), 138.0 (C_{18}), 141.0 (C_{19}), 163.2 (C_{20}).



HRMS (EI): m/z [M] $^+$ für $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$

berechnet: 354.1580

gefunden: 354.1575

UV/Vis (EtOAc): λ_{max} (ϵ) = 326 (6554), 363 (5637) nm.

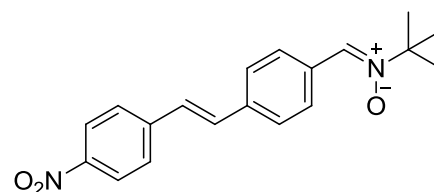
5.2.6.4 Synthese von (Z)-2-Methyl-N-(4-((E)-4-nitrostyryl)benzylidene)propan-2-amin-oxid (17c)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift (Kap. 5.1.6.1) wurde (*E*)-4-(-2-Nitrostyryl)-benzaldehyd (**16c**, 127 mg, 0.5 mmol) umgesetzt.

Ausbeute: 105 mg (65 %, 0.33 mmol)

eines gelben Feststoffs **17c**.

Analytik: siehe Kap. 5.1.3.2.



5.2.6.5 Synthese von (*Z*)-2-Methyl-*N*-(4-((*E*)-styryl)benzyliden)propan-2-aminoxid (**17d**)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift (Kap. 5.1.6.1) wurde (*E*)-4-Styrylbenzaldehyd (**16d**, 104 mg, 0.5 mmol) umgesetzt.

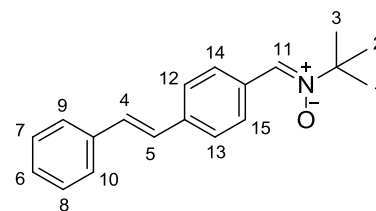
Ausbeute: 85 mg (61 %, 0.31 mmol) eines weißen Feststoffs **17d**.

Smp.: 142–145 °C.

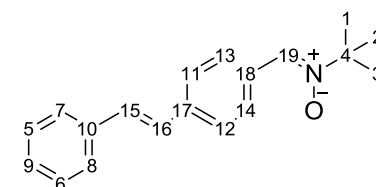
$R_f = 0.39$ (PE 40/60 – EtOAc – Triethylamin, 1 : 2 : 0.01).

IR (ATR): 3026 (w), 2975 (w), 2934 (w), 2873 (w), 1359 (s), 1178 (s), 1124 (m), 966 (s), 830 (s), 722 (s), 688 (s) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.64 (s, 9 H, $\text{H}_{1,2,3}$), 7.12 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.2$ Hz, 1 H, H_4), 7.20 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.2$ Hz, 1 H, H_5), 7.29 (dd, $^3J_{\text{HH}} = 2 \times 7.5$ Hz, 1 H, H_6), 7.38 (t, $^3J_{\text{HH}} = 2 \times 7.5$ Hz, 2 H, $\text{H}_{7,8}$), 7.54 (m, 2 H, $\text{H}_{9,10}$), 7.56 (s, 1 H, H_{11}), 7.88 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, 2 H, $\text{H}_{12,13}$), 8.32 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, 2 H, $\text{H}_{14,15}$).



$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 28.4 ($\text{C}_{1,2,3}$), 71.0 (C_4), 126.5 ($\text{C}_{5,6}$), 126.7 ($\text{C}_{7,8}$), 127.9 (C_9), 128.0 (C_{10}), 128.8 ($\text{C}_{11,12}$), 129.1 ($\text{C}_{13,14}$), 129.7 (C_{15}), 129.9 (C_{16}), 130.2 (C_{17}), 137.1 (C_{18}), 139.0 (C_{19}).



HRMS (EI): m/z [M] $^+$ für $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}$

berechnet: 279.1623

gefunden: 279.1617

UV/Vis (EtOAc): λ_{max} (ϵ) = 276 (7124), 332 (23278), 347 (27928), 360 (24805) nm.

5.2.6.6 Synthese von (*Z*)-*N*-(4-((*E*)-4-Methoxystyryl)benzyliden)-2-methylpropan-2-aminoxid (**17e**)

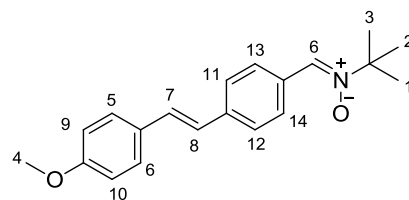
Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift (Kap. 5.1.6.1) wurde (*E*)-4-(2-Methoxystyryl)benzaldehyd (**16e**, 119 mg, 0.5 mmol) umgesetzt.

Ausbeute: 249 mg (100 %, 0.5 mmol) eines gelben Feststoffs **17e**.

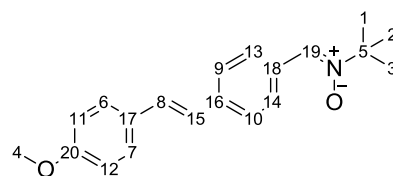
Smp.: 210–215 °C.

IR (ATR): 2999 (w), 2968 (w), 2931 (w), 2838 (w), 1508 (m), 1246 (s), 1177 (s), 1034 (s), 837 (s) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.63 (s, 9 H, $\text{H}_{1,2,3}$), 3.85 (s, 3 H, H_4), 6.92 (m, 2 H, $\text{H}_{5,6}$), 6.99 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.4$ Hz, 1 H, H_7), 7.16 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.4$ Hz, 1 H, H_8), 7.58 (m, 2 H, $\text{H}_{9,10}$), 7.53 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, 2 H, $\text{H}_{11,12}$), 7.54 (s, 1 H, H_{13}), 8.28 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, 2 H, $\text{H}_{14,15}$).



$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 28.4 ($\text{C}_{1,2,3}$), 55.4 (C_4), 70.7 (C_5), 114.2 ($\text{C}_{6,7}$), 125.9 (C_8), 126.2 ($\text{C}_{9,10}$), 127.9 ($\text{C}_{11,12}$), 129.1 ($\text{C}_{13,14}$), 129.4 (C_{15}), 129.8 (C_{16}), 129.9 (C_{17}), 131.6 (C_{18}), 139.4 (C_{19}), 159.6 (C_{20}).



HRMS (EI): m/z [M] $^+$ für $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_2$
 berechnet: 309.1729
 gefunden: 309.1737

UV/Vis (EtOAc): λ_{max} (ϵ) = 279 (11839), 334 (35105), 356 (36376), 369 (31674) nm.

5.2.6.7 Synthese von (Z)-2-Methyl-N-(4-((E)-4-sulfostyryl)benzyliden)propan-2-aminoxid (17f)

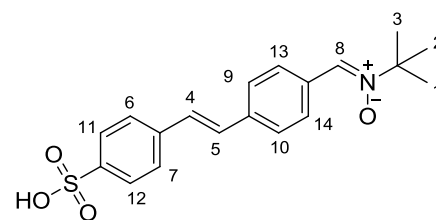
Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift (Kap. 5.1.6.1) wurde (E)-4-(4-Sulfostyryl)benzaldehyd (**16f**, 204 mg, 706 μmol) umgesetzt.

Ausbeute: 253 mg (100 %, 705 μmol) eines beigen Feststoffs **17f**.

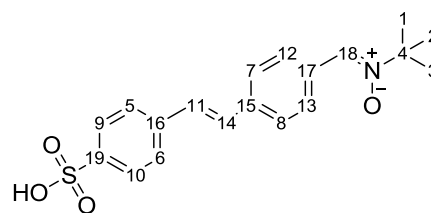
Smp.: 209–211 $^{\circ}\text{C}$.

IR (ATR): 2962 (w), 2932 (w), 2874 (w), 1199 (s), 1030 (s), 1177 (s), 727 (s), 704 (s) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.62 (s, 9 H, $\text{H}_{1,2,3}$), 7.10 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.3$ Hz, 1 H, H_4), 7.18 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.3$ Hz, 1 H, H_5), 7.48 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{6,7}$), 7.55 (s, 1 H, H_8), 7.56 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, 2 H, $\text{H}_{9,10}$), 7.91 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{11,12}$), 8.28 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.5$ Hz, 2 H, $\text{H}_{13,14}$).



^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 28.4 ($\text{C}_{1,2,3}$), 59.9 (C_4), 126.1 ($\text{C}_{5,6}$), 126.5 ($\text{C}_{7,8}$), 126.7 ($\text{C}_{9,10}$), 128.3 (C_{11}), 129.1 ($\text{C}_{12,13}$), 129.5 (C_{14}), 129.7 (C_{15}), 130.2 (C_{16}), 137.6 (C_{17}), 138.9 (C_{18}), 146.6 (C_{19}).



HRMS (EI): m/z [M] $^+$ für $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_4\text{S}$
 berechnet: 359.1191
 gefunden: 359.1180

UV/Vis (EtOAc): λ_{max} (ϵ) = 319 (39640), 334 (31596), 368 (10788) nm.

5.2.6.8 Synthese von (*Z*)-*N*-(4-((*E*)-4-chlorostyryl)benzylidene)-2-methylpropan-2-amin-oxid (**17g**)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift (Kap. 5.1.6.1) wurde (*E*)-4-(4-Chlorostyryl)benzaldehyd (**16g**, 121 mg, 0.5 mmol) umgesetzt.

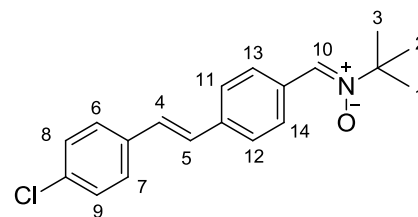
Ausbeute: 100 mg (64 %, 0.32 mmol) eines weißen Feststoffs **17g**.

Smp.: 196–198 °C.

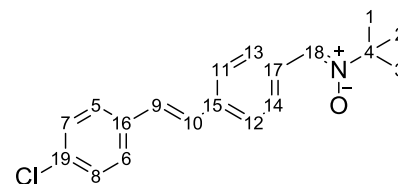
R_f = 0.36 (PE 40/60 – EtOAc – Triethylamin, 1 : 2 : 0.01).

IR (ATR): 3019 (w), 2977 (w), 2938 (w), 1362 (s), 1131 (s), 970 (s), 845 (s), 825 (s) cm^{-1} .

^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.64 (s, 9 H, $\text{H}_{1,2,3}$), 7.08 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.1$ Hz, 1 H, H_4), 7.15 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.1$ Hz, 1 H, H_5), 7.48 (m, 2 H, $\text{H}_{6,7}$), 7.56 (m, 2 H, $\text{H}_{8,9}$), 7.56 (s, 1 H, H_{10}), 7.56 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 2 H, $\text{H}_{11,12}$), 8.30 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 2 H, $\text{H}_{13,14}$).



^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 28.4 ($\text{C}_{1,2,3}$), 70.8 (C_4), 126.6 ($\text{C}_{5,6}$), 127.8 ($\text{C}_{7,8}$), 128.5 (C_9), 128.6 (C_{10}), 128.9 ($\text{C}_{11,12}$), 129.1 ($\text{C}_{13,14}$), 133.5 (C_{15}), 135.6 (C_{16}), 137.6 (C_{17}), 138.6 (C_{18}), 142.4 (C_{19}).



HRMS (EI): m/z [M] $^+$ für $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{ClNO}$
 berechnet: 313.1234
 gefunden: 313.1232

UV/Vis (EtOAc): λ_{max} (ϵ) = 319 (14771), 334 (16621), 351 (17119) nm.

5.2.6.9 Synthese von (*Z*)-*N*-(4-((*E*)-4-(Dimethylamino)styryl)benzyliden)-2-methylpropan-2-aminoxid (**17h**)

Nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift (Kap. 5.1.6.1) wurde (*E*)-4-(4-Dimethylaminostyryl)benzaldehyd (**16h**, 200 g, 706 μmol) umgesetzt.

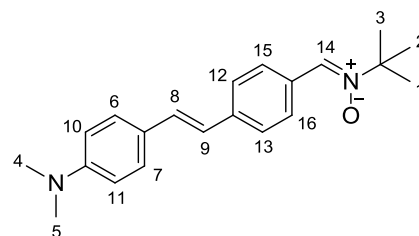
Ausbeute: 249 mg (65 %) eines gelben Feststoffs **17h**.

Smp.: 157–159 °C.

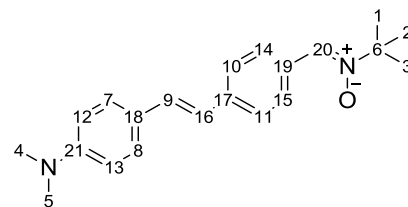
R_f = 0.40 (PE 40/60 – EtOAc – Triethylamin, 1 : 2 : 0.01).

IR (ATR): 3093 (w), 2972 (w), 2929 (w), 2801 (w), 1521 (s), 1359 (s), 1190 (m), 1106 (s), 811 (s) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.63 (s, 9 H, $\text{H}_{1,2,3}$), 3.00 (s, 6 H, $\text{H}_{4,5}$), 6.72 (m, 2 H, $\text{H}_{6,7}$), 6.92 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.2$ Hz, 1 H, H_8), 7.07 (d, $^3J_{\text{HH}} = 16.2$ Hz, 1 H, H_9), 7.44 (m, 2 H, $\text{H}_{10,11}$), 7.53 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 1 H, $\text{H}_{12,13}$), 7.53 (s, 1 H, H_{14}), 8.26 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 2 H, $\text{H}_{15,16}$).



$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 28.4 ($\text{C}_{1,2,3}$), 40.4 ($\text{C}_{4,5}$), 70.4 (C_6), 112.4 ($\text{C}_{7,8}$), 123.6 (C_9), 125.9 ($\text{C}_{10,11}$), 127.8 ($\text{C}_{12,13}$), 129.2 ($\text{C}_{14,15}$), 129.3 (C_{16}), 130.0 (C_{17}), 131.4 (C_{18}), 140.0 (C_{19}), 141.0 (C_{20}), 144.4 (C_{21}).



HRMS (EI): m/z [M] $^+$ für $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}$

berechnet: 322.2045

gefunden: 322.2061

UV/Vis (EtOAc): λ_{max} (ϵ) = 272 (9667), 327 (15161), 371 (18688) nm.

5.3 Synthese eines Xanthennitronderivats

5.3.1 Synthese von 3',6'-Dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-4'-carbaldehyd (Fluoreszeinaldehyd; 25)

Fluoreszein **24** (2.00 g, 6 mmol) wurde in einer Mischung aus Chloroform (14.8 g, 124 mmol, 10 ml), Methanol (4.75 g, 148 mmol, 6 ml) und 15-Krone-5 (30 mg, 136 μ mol, 27.3 μ l) gegeben. Anschließend wurde eine 50 %-ige NaOH-Lösung (5 g, 125 mmol) vorsichtig zugegeben, sodass sich die Reaktionstemperatur bei 55 °C einpendelte. Das Reaktionsgemisch wurde für weitere 5 h bei RT gerührt, danach die Lösungsmittel im Hochvakuum entfernt und der Rückstand per Säulenchromatographie (Kieselgel, MeOH - CH₂Cl₂, zunächst 1 : 16 dann 1 : 8) aufgereinigt.

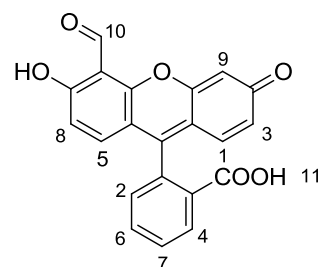
Ausbeute: 670 mg (1.85 mmol, 31 %) eines gelben Feststoffs **25**.

Smp.: n. a.

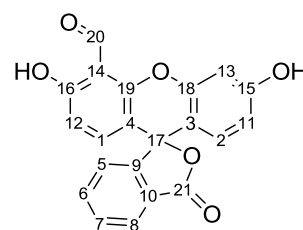
R_f = 0.21 (MeOH - CH₂Cl₂, 1 : 16), 0.49 (MeOH - CH₂Cl₂, 1 : 8).

IR (ATR): 3278 (w), 3076 (w), 2919 (w), 1723 (m), 1644 (m), 1467 (m), 1226 (s), 1107 (s), 847 (m), 753 (s), 694 (s) cm⁻¹.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 6.61 (s, 1 H, H₁), 6.71 (d, ³J_{HH} = 8.8 Hz, 1 H, H₂), 6.85 (s, 1 H, H₃), 6.95 (d, ³J_{HH} = 8.8 Hz, 1 H, H₄), 7.32 (d, ³J_{HH} = 6.6 Hz, 1 H, H₅), 7.71–7.83 (m, 2 H, H_{6,7}), 8.02 (d, ³J_{HH} = 6.6 Hz, 1 H, H₈), 10.27 (s, 1 H, H₉), 10.63 (s, 1 H, H₁₀), 11.89 (s, 1 H, H₁₁).



¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 48.6 (C₁), 81.8 (C₂), 102.6 (C₃), 109.1 (C₄), 109.6 (C₅), 113.4 (C₆), 113.5 (C₇), 124.0 (C₈), 124.8 (C₉), 125.9 (C₁₀), 129.0 (C₁₁), 130.3 (C₁₂), 135.8 (C₁₃), 136.5 (C₁₄), 150.8 (C₁₅), 152.1 (C₁₆), 152.3 (C₁₇), 159.6 (C₁₈), 162.9 (C₁₉), 168.5 (C₂₀), 192.8 (C₂₁).



HRMS (EI): m/z [M]⁺ für C₂₁H₁₂O₆

berechnet: 360.0634

gefunden: 360.0736; Fragmente deutlich erkennbar

5.3.2 Synthese von (Z)-N-((3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-4'-yl)methylen)-2-methylpropan-2-aminoxid (Fluoreszeinnitron; 26)

Unter Argonatmosphäre wurde eine Mischung aus *N-tert*-Butylhydroxylamin-hydrochlorid (355 mg, 2.82 mmol) und Triethylamin (314 mg, 432 μ l, 3.11 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (8 ml), zu einer Lösung des entsprechenden FA **25** (127 mg, 353 μ mol) in trockenem CH_2Cl_2 (35 ml) gegeben und für weitere 216 h bei RT gerührt. Alle 2 d wurde eine frische Lösung aus aus *N-tert*-Butylhydroxylamin-hydrochlorid (355 mg, 2.82 mmol) und Triethylamin (314 mg, 432 μ l, 3.11 mmol) in trockenem CH_2Cl_2 (8 ml) zugesetzt. Auf jede Zugabe folgte eine zusätzliche Portion wasserfreies MgSO_4 (340 mg, 2.82 mmol). Nach Ende der Reaktionszeit wurde die Reaktionsmischung filtriert, das Filtrat getrocknet, der zurückgebliebene Feststoff mit H_2O (3×15 ml) gewaschen und in EtOAc aufgenommen. Die organische Phase wurde getrocknet (MgSO_4) und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Ausbeute: 153 mg (353 μ mol, 100 %) eines gelben Feststoffs **26**.

Smp.: n. a.

IR (ATR): 3071 (w), 2963 (w), 2810 (w), 1757 (m), 1585 (m), 1448 (m), 1374 (m), 1260 (m), 1093 (s), 1009 (s), 788 (s) cm^{-1} .

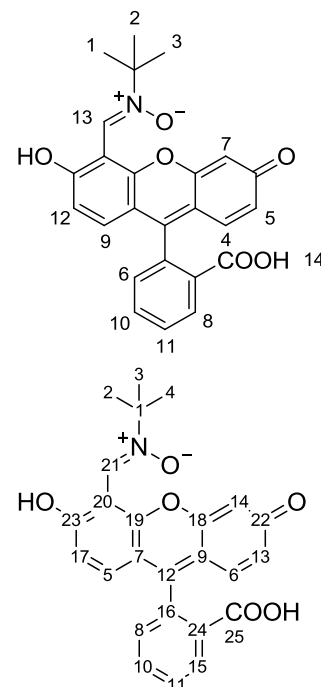
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 1.71 (s, 9 H, $\text{H}_{1,2,3}$), 6.56 (m, 1 H, H_4), 6.64 (s, 1 H, H_5), 6.66 (s, 1 H, H_6), 6.71 (d, $^3J_{\text{HH}} = 2.3$ Hz, 1 H, H_7), 6.81 (m, 1 H, H_8), 7.14 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 1 H, H_9), 7.64 (m, 2 H, $\text{H}_{10,11}$), 8.04 (d, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 1 H, H_{12}), 8.44 (s, 1 H, H_{13}), 11.89 (br. s, 1 H, H_{14}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 25.6 (C_1), 28.3 ($\text{C}_{2,3,4}$), 92.6 (C_5), 103.2 (C_6), 105.7 (C_7), 116.7 (C_8), 124.1 (C_9), 126.0 (C_{10}), 129.5 (C_{11}), 129.6 (C_{12}), 129.8 (C_{13}), 132.8 (C_{14}), 133.1 (C_{15}), 142.4 (C_{16}), 144.1 (C_{17}), 150.4 (C_{18}), 150.8 (C_{19}), 160.6 (C_{20}), 162.9 (C_{21}), 185.3 (C_{22}), 192.2 (C_{23}), 204.8 (C_{24}), 208.9 (C_{25}).

HRMS (EI): m/z [M] $^+$ für $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{NO}_6$

berechnet: 431.1369

gefunden: 431.1402



5.4 Synthese eines cyclischen und fluoreszierenden Nitrons

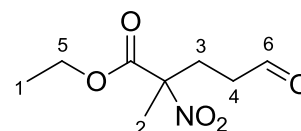
5.4.1 Synthese von 2-Methyl-2-nitro-5-oxovaleriansäureethylester (**28**)

Unter Schutzgasatmosphäre wurde zu einer Lösung aus 2-Nitropropionsäureethylester **27** (1.08 g, 7.34 mmol) und Triethylamin (72.4 µg, 7.34 mmol, 99.2 µl) in trockenem Acetonitril, Acrolein (617 mg, 11.01 mmol, 734.79 µl) gegeben und für 6 h, bei 10 °C gerührt. Anschließend wurde der Ansatz auf Eiswasser (15 ml) gegeben und mit 1M HCl neutralisiert. Die organische Phase wurde mit Methylenchlorid (3 × 5 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen getrocknet (MgSO₄) und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

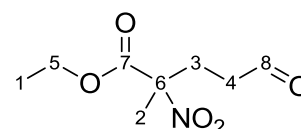
Ausbeute: 1.49 g (7.34 mmol, 100 %) eines hellgelben Öls **28**.

IR (ATR): 3493 (m), 2992 (s), 2940 (s), 2908 (m), 2840 (m), 2736 (m), 2392 (w), 1755 (s), 1551 (s), 1452 (s), 1348 (s), 1253 (s), 1139 (s), 1018 (s), 857 (s), 674 (m), 539 (m) cm⁻¹.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1.25 (t, ³J_{HH} = 7.15 Hz, 3 H, H₁), 1.74 (s, 3 H, H₂), 2.40 – 2.52 (m, 2 H, H₃), 2.55 – 2.60 (m, 2 H, H₄), 4.23 (q, ³J_{HH} = 7.15 Hz, 2 H, H₅), 9.72 (s, 1 H, H₆).



¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 13.61 (C₁), 21.64 (C₂), 28.47 (C₃), 38.27 (C₄), 62.93 (C₅), 91.57 (C₆), 166.79 (C₇), 199.17 (C₈).



HRMS (EI): m/z [M+H]⁺ für C₈H₁₃NO₅

berechnet: 204.0867

gefunden: 204.0872

5.4.2 Synthese von EMPO (**2**)

Zu einer Lösung aus 2-Methyl-2-nitro-5-oxovaleriansäureethylester **28** (670 mg, 3.30 mmol) in Methanol (6 ml) und H₂O (3 ml) wurde eine Lösung aus Ammoniumchlorid (353 mg, 6.70 mmol) in H₂O (3 ml) gegeben, wobei das Reaktionsgemisch eintrübte. Innerhalb von 30 min folgte eine portionsweise Zugabe von Zinkpulver (2.01 g, 30.74 mmol). Anschließend wurde für weitere 4 h bei RT gerührt, das Gemisch filtriert und das gelbe Filtrat auf 2/3 dessen Volumens aufkonzentriert. Die konzentrierte Reaktionsmischung wurde mit Borax gesättigt, für eine weitere Stunde gerührt, mehrfach mit Methylenchlorid (3 × 10 ml) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen getrocknet (MgSO₄). Nach entfernen des Lösungsmittels

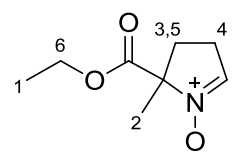
unter vermindertem Druck, wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, PE 40/60 – EtOH, 7 : 3), anschließend mit reinem Ethanol von der Säule eluiert und somit isoliert.

Ausbeute: 226 mg (1.32 mmol, 40 %) eines hellgelben Öls **2**.

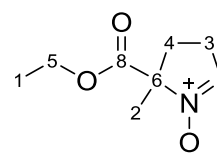
$R_f = 0.09$ (Kieselgel, PE 40/60 – EtOH, 7 : 3)

IR (ATR): 3380 (s), 3092 (m), 2982 (s), 2946 (s), 2873 (m), 1741 (s), 1646 (m), 1589 (s), 1453 (s), 1375 (s), 1218 (s), 1104 (s), 1020 (s), 952 (m), 853 (m), 697 (m), 529 (m) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.23 (t, $^3J_{\text{HH}} = 7.15$ Hz, 3 H, C_1), 1.65 (s, 3 H, C_2), 2.06 – 2.14 (m, 1 H, C_3), 2.49 – 2.62 (m, 2 H, C_4), 2.67 – 2.74 (m, 1 H, C_5), 4.14 – 4.24 (m, 2 H, C_6), 6.91 (t, $^3J_{\text{HH}} = 2.64$ Hz, 1 H, C_7).



$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 14.22 (C_1), 21.18 (C_2), 26.11 (C_3), 32.68 (C_4), 62.51 (C_5), 79.26 (C_6), 135.42 (C_7), 170.13 (C_8).



HRMS (EI): m/z [M] $^+$ für $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_3$

berechnet: 171.0890

gefunden: 171.0895

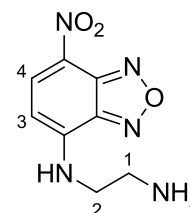
5.4.3 Synthese von N^1 -(7-Nitrobenzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-4-yl)ethan-1,2-diamin ((NBD-ethandiamin (**29**)))

Ethylendiamin (670 μl , 10 mmol) und 12 M HCl (832 μl) wurden in Methanol (60 ml) gelöst. Über 40 min wurde dazu eine Lösung aus 4-Chloro-7-nitrobenzofurazan **8** (2.0 g, 10 mmol) in Methanol (40 ml) getropft, dann unter Rückfluss erhitzt und langsam eine Lösung aus Natriumhydrogencarbonat (840 mg, 10 mmol) in H_2O (20 ml) hinzugefügt. Nach einer 1 h wurde das Reaktionsgemisch auf 0 $^\circ\text{C}$ gekühlt, der dabei ausgefallenen Feststoff abfiltriert, mit eiskaltem Methanol (3×10 ml) gewaschen und im Vakuum von restlichen Lösungsmitteln befreit.

Ausbeute: 970 mg (4.30 mmol, 43%) eines dunkelbraunen Pulvers **29**.

IR (ATR): 3327 (m), 3082 (w), 1583 (m), 1479 (m), 1363 (m), 1250 (s), 1220 (s), 1119 (s), 989 (m), 900 (m), 838 (m), 737 (m) cm^{-1} .

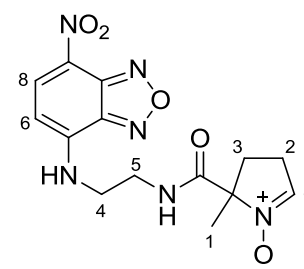
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 3.08-3.17 (m, 2 H, H_1), 3.85 (s, 2 H, H_2), 6.49 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.80$, 1 H, H_3), 8.53 (d, $^3J_{\text{HH}} = 8.80$, 1 H, H_4).



5.4.4 Synthese von 2-Methyl-2-((2-((7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-yl)-amino)-ethyl)carbamoyl)-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid ((NBD-AECMPO); (30))

Unter Schutzgasatmosphäre wurde N^1 -(7-Nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-yl)ethan-1,2-diamin **29** (112 mg, 0.5 mmol) und EMPO **2** (86 mg, 0.5 mmol) in 20 % Natriummethanolat (108 mg) für 96 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ unter Argon gelagert. Dessen $^1\text{H-NMR}$ zeigte deutliche Signale des Produktes. Alle Versuche zur Aufreinigung via Dickschichtchromatographie (PTLC) oder Flashchromatographie (MPLC) resultierten in Zersetzungsprodukten von NBD-AECMPO **30**.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 1.33 (s, 3 H, H_1), 1.77 – 1.86 (m, 2 H, H_2), 2.33 – 2.38 (m, 2 H, H_3), 3.39 (m, 2 H, H_4), 3.77 (m, 2 H, H_5), 6.10 (m, 1 H, H_6), 6.72 (s, 1 H, H_7), 7.86 (m, 1 H, H_8).

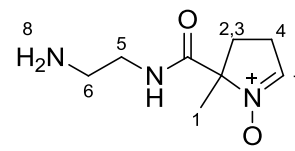


5.4.5 Synthese von 2-((2-Aminoethyl)carbamoyl)-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid (AECMPO; 31)

Unter Schutzgasatmosphäre wurden EMPO **2** (100 mg, 0.58 mmol) und Ethylendiamin (390 μl , 0.58 mmol) in trockenem Methanol für 48 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel, CH_3Cl – MeOH – TEA , 30 : 10 : 1).

Ausbeute: 29 mg (0.16 mmol, 27%) eines gelblichen Öls **31**.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1.71 (s, 3 H, H_1), 2.10 – 2.16 (m, 1 H, H_2), 2.58 – 2.62 (m, 2 H, H_3), 2.81 – 2.86 (m, 2 H, H_4), 2.97 – 3.00 (m, 1 H, H_5), 3.28 – 3.31 (m, 1 H, H_6), 6.99 (m, 1 H, H_7), 8.65 (br. s, 1 H, H_8).



HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ für $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$

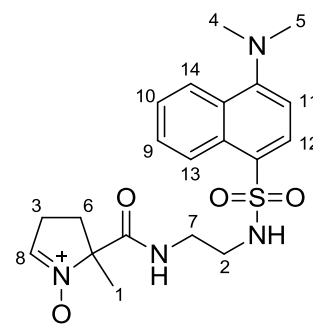
berechnet: 185.1159

gefunden: 185.1164

5.4.6 Synthese von 2-((2-(4-(Dimethylamino)naphthalen-1-sulfonamido)ethyl)carbamoyl)-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid (Dansyl-AECMPO; (32))

Unter Argonatmosphäre wurde zu einer Lösung aus AECMPO **31** (926 mg, 0.5 mmol) in wasserfreiem Acetonitril (10 ml), eine Lösung aus Dansylchlorid **9** (135 mg, 0.5 mmol) und Triethylamin (80 μL , 0.5 mmol) in wasserfreiem Acetonitril (2.5 ml) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde 90 min bei RT gerührt und unter vermindertem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde in CH_3Cl (10 ml) aufgenommen, mehrfach mit *brine* gewaschen (3×10 ml), getrocknet (MgSO_4) und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Dem $^1\text{H-NMR}$ des zurückgebliebenen Feststoffs war zu entnehmen, dass das Produkt **32** dargestellt wurde. Nach diversen Versuchen zur Aufreinigung via präparativer Schichtchromatographie (PTLC) oder Flashchromatographie (MPLC) wurden jeweils nur Zersetzungsprodukte des Dansyl-AECMPO **32** erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ [ppm] = 1.60 (s, 3 H, H_1), 2.75 – 2.78 (m, 2 H, H_2), 2.85 – 2.87 (m, 2 H, H_3), 2.89 (s, 6 H, $\text{H}_{4,5}$), 2.92 – 2.94 (m, 2 H, H_6), 3.02 – 3.05 (m, 2 H, H_7), 6.99 (s, 1H, H_8), 8.20 – 8.23 (m, 1 H, H_9), 8.24 – 8.26 (m, 1 H, H_{10}), 8.25 – 8.28 (m, 2 H, $\text{H}_{11,12}$), 8.53 – 8.55 (m, 1 H, H_{13}), 8.54 – 8.56 (m, 1 H, H_{14}).



5.5 EPR-Spektroskopie

5.5.1 Verwendete Lösungen

Für die ESR-spektroskopischen Untersuchung wurden jeweils 2500 μl einer 1 mM Lösung der Stilbennitronen **17** und des Fluoresceinnitrons **26** in entgastem Ethylacetat hergestellt:

Tabelle 9: Einwaagen synthetisierter *spin traps* zur EPR-Spektroskopie.

Nitron	Einwaage [mg] [*]
PNOMSN 17a	0.89
ONMMSN 17b	0.89
PNSN 17c	0.81
SN 17d	0.70
PMSN 17e	0.77
PSSN 17f	0.90
PCISN 17g	0.78
PDMASN 17h	0.81
FN 26	1.03

* ad 2500 μl EtOAc

Fenton-Reagenz (Kopp, 2015):

100 mM H_2O_2 -Lösung: 510 μl 30 %iges H_2O_2 ad 50 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

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 $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

XO / HX-System (Mitchell *et al.*, 2013):

10 mM Hypoxanthin-DTPA-Lösung:

13.60 mg Hypoxanthin und 39.34 mg DTPA ad 10 ml PBS-Puffer, mit HCl auf pH = 7.2 eingestellt.

Xanthinoxidase (XO): 1 u / ml, der Firma Serva.

5.5.2 Probenvorbereitung mit Fenton-Reagenz

Zu 500 μl der organischen Lösungen von den Stilbennitronen **17** wurden je 300 μl der 10 mM Fe^{2+} -Lösung und 300 μl der 100 mM H_2O_2 -Lösung gegeben. Das Gemisch wurde für 5 min gevortext und die wässrige von der organischen Phase getrennt. Die separierte organische Phase wurde bei mäßiger Stickstoffeinleitung (Kanüle) so lange entgast, bis diese auf etwa 100 μl (5 mM) aufkonzentriert wurde. Gleichzeitig wurde die Glaskapillare mit Schutzgas

geflutet (Kanüle) und verschlossen. Danach wurden 5 – 10 µl der entgasten organischen Phase in die Kapillare gefüllt, diese verschlossen und mit den folgenden Geräteeinstellungen vermessen (Tabelle 10, Kap. 5.5.6).

5.5.3 Probenvorbereitung mit XO / HX- System

Zu 500 µl der organischen Lösungen von den Stilbenitronen **17** und des FN **26** wurden je 800 µl 10 mM Hypoxanthin-DTPA-Lösung und 2 µl (8 mU) der XO-Suspension gegeben und für 5 min inkubiert. Danach wurde das Gemisch für 5 min gevortext. Anschließend wurde die wässrige von der organischen Phase getrennt. Die separierte organische Phase wurde bei mäßiger Stickstoffeinleitung (Kanüle) so lange entgast, bis diese auf etwa 100 µl (5 mM) aufkonzentriert wurde (für die Konzentrationen mit FN **26** siehe Kap. 3.9.2). Gleichzeitig wurde die Glaskapillare mit Schutzgas geflutet (Kanüle) und verschlossen. Danach wurden 5 – 10 µl der entgasten organischen Phase in die Kapillare gefüllt, diese verschlossen und mit den folgenden Geräteeinstellungen vermessen (Tabelle 10, Kap. 5.5.6).

5.5.4 Probenvorbereitung nach *in vitro*- spin trapping

In einer Gewebekulturflasche (T75, Sarstedt) wurde bei stabilem Wachstum der verwendeten Zelllinien (MCF7, HeLa und *wt*-Mef) das entsprechenden Medium durch 10 ml, 10 µM PNOMSN **17a**- DMSO-versetztes, Medium ersetzt und für 20 – 30 min im Brutschrank inkubiert (siehe Kap. 5.7). Anschließend wurde das Medium verworfen, 10 ml frisches, mit 1 µM Rotenon **20** / Antimycin A **21**- DMSO-versetztes, Medium hinzugegeben und für 10 – 15 min im Brutschrank inkubiert (siehe Kap. 5.7). Das Medium wurde verworfen, der angelöste Zellrasen abgesaugt und in ein konisches Zentrifugenröhrchen überführt. Danach wurden 2 ml EtOAc hinzugegeben, die Suspension 30 s gevortext und 30 s per *sonifier* die Zellen aufgeschlossen. Anschließend wurde die organische Lösung vom Zellrückstand getrennt (1 min zentrifugieren bei 1000 rpm). Die separierte organische Phase wurde bei mäßiger Stickstoffeinleitung (Kanüle) so lange entgast, bis diese auf etwa 100 µl aufkonzentriert wurde. Gleichzeitig wurde die Glaskapillare mit Schutzgas geflutet (Kanüle) und verschlossen. Danach wurden 5 – 10 µl der entgasten organischen Phase in die Kapillare gefüllt, diese verschlossen und mit den folgenden Geräteeinstellungen vermessen (Tabelle 10, Kap. 5.5.6).

Bei späteren Messungen wurden alle Kunststoffverbrauchsmaterialien, die mit dem zu untersuchenden Extrakt in Berührung kamen, durch Glasgeräte ersetzt.

5.5.5 Probenvorbereitung zur Detektion von Nitroxiden in Kunststoffverbrauchs-materialien

In einer Reihe von Experimenten wurden konische Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml), 8 Pipettenspitzen (1000 μl) und 8 Mikrozentrifugenröhrchen (2 ml) von den Herstellern Greiner und Sarstedt, für 2 und 7 Tage, mit 10 ml oder 40 ml EtOAc, DMF, DMSO, H₂O inkubiert. Die Verbrauchsmaterialien wurden während der Inkubationszeit im Dunkeln gehalten, oder natürlichem Licht ausgesetzt. Anschließend wurden die jeweilige organische Lösung in einen Kolben überführt und am Rotationsverdampfer (bei 30 °C) auf etwa 1 ml konzentriert. Bei mäßiger Stickstoffeinleitung (Kanüle) wurde die Lösung so lange entgast, bis diese auf etwa 100 μl aufkonzentriert wurde. Gleichzeitig wurde die Glaskapillare mit Schutzgas geflutet (Kanüle) und verschlossen. Danach wurden 5 – 10 μl der entgasten organischen Phase in die Kapillare gefüllt, diese verschlossen und mit den folgenden Geräteeinstellungen vermessen (Tabelle 10, Kap. 5.5.6). Bei zu hoher Signalintensität wurde der *receiver gain* auf 80 dB verringert.

5.5.6 EPR-Parameter

Tabelle 10: Verwendete Parameter für die EPR-spektroskopischen Messungen (Hauck, 2007).

Parameter	Einstellungen
Center field [G]	3460
Sweep width [G]	80
Number of points	2048
Number of scans	10
Microwave frequency [GHz]	9.71
Conversion Time [ms]	81.92
Modulation Frequency [kHz]	100
Modulation Amplitude [G]	1
Power [mW]	20
Power attenuation [dB]	10
Receiver gain [dB]	90
Time Constant [ms]	81.92

5.6 Untersuchungen der optischen Eigenschaften

5.6.1 Benötigte Lösungen

Zur Untersuchung der synthetisierten Stilbennitronen **17** und des FN **26** auf deren optische Eigenschaften wurden jeweils 25 ml einer 100 μ M, entgasten Ethylacetatlösung hergestellt:

Tabelle 11: Einwaagen synthetisierter Nitronen für optische Messungen.

Nitronen	Einwaage [mg] [*]
PNOMSN 17a	0.89
ONMMSN 17b	0.89
PNSN 17c	0.81
SN 17d	0.70
PMSN 17e	0.77
PSSN 17f	0.90
PCISN 17g	0.78
PDMASN 17h	0.81
FN 26	1.03

* ad 25 ml EtOAc

5.6.2 UV / Vis- Spektroskopie

Zunächst wurde am UV / Vis- Spektrometer in einer Quarzglasküvette (SUPRASIL 300 der Heraeus Quarzglas GmbH) das Spektrum des Lösungsmittels (entgastes EtOAc) als Blank aufgenommen. Anschließend wurden in selbiger Küvette jeweils 1.5 ml der 100 μ M Nitron-Lösungen von 220 – 600 nm vermessen (Tabelle 11).

5.6.3 Fluoreszenzspektroskopie

Hierzu wurde die Lösung von **17a** auf 100 nM (1.5 μ l ad 1500 μ l EtOAc), die Lösungen von **17c-h** und **26** (pH 7 und pH 9) auf 1 μ M mit entgastem EtOAc verdünnt (15 μ l ad 1500 μ l EtOAc) und **17b** unverdünnt in einer Quarzglasküvette (SUPRASIL 300 der Heraeus Quarzglas GmbH) vermessen (Tabelle 11). Angeregt wurde jeweils mit der Wellenlänge des detektierten Absorptionsmaximums (nach Kap. 3.3.9 und 5.6.2). Die Fluoreszenzspektren wurden von, 10 nm rotverschoben bzgl. Anregungswellenlänge, bis 600 nm aufgenommen.

5.6.4 Fluoreszenz-*Quenching*-Experimente

Fenton-Reagenz (Kopp, 2015):

Dafür wurden nach Kap. 5.6.3 die Lösungen der Stilbennitron 17 vermessen. Anschließend wurden nacheinander erhöhte Volumina der 10 mM Fe^{2+} - und der 100 mM H_2O_2 -Lösung hinzugegeben, diese Mischung für 60 s inkubiert (gelegentliches Mischen der Phasen) und die organische Lösung vermessen (siehe *Fenton-Reagenz* in Kap. 5.5.1). Nach 5 min wurde diese Messung wiederholt. Zur weiteren Kontrolle der Fluoreszenzabnahme wurde bei der maximalen Zugabe der *Fenton-Reagenz*-Lösung nach 15 min eine zusätzliche Messung durchgeführt.

Tabelle 12: Pipettierschema zum Fluoreszenz-*Quenching* mittels *Fenton-Reagenz*.

Messung	Lösungen der Stilbennitron 17 [μl]	Zugabe der 10 mM Fe^{2+} -Lösung [μl]	Zugabe der 100 mM H_2O_2 -Lösung [μl]
1	1500	0	0
2	1500	10	10
3	1500	25	25
4	1500	50	50
5	1500	150	150
6	1500	250	250

XO / HX- System (Mitchell *et al.*, 2013):

Dafür wurden nach Kap. 5.6.3 die Lösungen der Stilbennitron 17 und FN 26 vermessen. Anschließend wurden 100 μl der 10 mM Hypoxanthin-DTPA-Lösung und 1 μl (4 mU) der *XO*-Suspension hinzugegeben (siehe *XO / HX- System* in Kap. 5.5.1) und für 5 min inkubiert. Danach wurden die Phasen für 5 min in der Küvette durchgemischt. Nach der Trennung der Phasen wurde die organische Lösung vermessen. Zur Kontrolle der Fluoreszenzabnahme wurde nach 15 min diese Messung wiederholt.

5.7 Arbeiten mit Zellen

Alle Arbeiten mit Zellen wurden nach Kopp, im Inkubator oder der Sterilbank mit sterilen Medien, Lösungen und Geräten durchgeführt (Kopp, 2015).

5.7.1 Zellkultur

Es wurden die adhärenenten Zelllinien MCF7, HeLa und *wt*-Mef kultiviert. Dies geschah in einem Inkubator bei 37 °C mit 5 % CO₂. Sonstigen Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Außer für die Messungen am *cLSM* (Kap. 5.8), wurden nur sterile Lösungen, Medien und Geräte verwendet. Nach 2 Tagen bzw. nach Bedarf wurde das jeweilige Medium (RPMI für MCF7 und DMEM für HeLa und *wt*-Mef; jeweils mit 10 % FBS und 1 % Penicillin / Streptomycin) durch Frisches ausgetauscht.

Zum Passagieren der Zellen wurden diese nach Kap. 5.7.2 abgeerntet und einige Tropfen der Zellsuspension in 20 ml frischem, vorgewärmten Medium inokuliert.

5.7.2 Abernten von Zellen

Hierzu wurden ausschließlich sterile Geräte, Lösungen und Medien verwendet. Vor dem Kontakt mit Zellen wurden die verwendeten Lösungen und Medien auf 37 °C erwärmt. Zunächst wurde das entsprechende Medium vom Zellrasen entfernt und dieser mit PBS-Puffer (5 – 10 ml) gewaschen. Danach wurden 2.5 – 3.5 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben und für 3 – 4 min im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden durch Klopfen auf die *clean bench* vom Boden der Kulturflasche gelöst. Durch Zugabe von 7 ml des jeweiligen Mediums wurde die Lyse gestoppt und die Zellsuspension, nach mehrfachem Überspülen des Flaschenbodens, in ein steriles, konisches Zentrifugenröhrchen überführt.

5.7.3 Bestimmung der Zellzahl

Für den SRB-Test von **17a** (Kap. 5.7.4) war es notwendig die Zellzahl zu bestimmen. Dies geschah mittels einer Neubauer-*improved*-Zählkammer. Dazu wurden 10 µl gevortexte Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau-Lösung versetzt, diese vermischt und die Hälfte dieser Mischung in die Zählkammer gegeben. Geschädigte Zellen waren blau gefärbt und wurden bei der Zählung unter dem Durchsichtmikroskop nicht erfasst.

5.7.4 SRB-Test von PNOMSN (17a)

Zunächst wurden die Zellen nach Kap. 5.7.2 geerntet und die Anzahl der Zellen nach Kap. 5.7.3 bestimmt. Wie auch schon bei Kopp zeigte sich, dass für den SRB-Test eine Zellzahl von 10000 Zellen / ml am besten eignete.

Eine Zellsuspension von 500000 Zellen wurde ad 50 ml Medium gegeben, kurz gevortext und je 1 ml dieser Mischung auf die *wells* zweier 24-well-Platten verteilt. Diese wurden im Brutschrank für 2 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Dann wurde eine 10 mM PNOMSN **17a**- DMSO-Lösung (1.77 mg ad 500 µl DMSO) hergestellt.

Das verbrauchte Medium aus den *wells* beider Platten wurde durch, PNOMSN **17a**- DMSO-Lösung versetztes Medium verschiedener Konzentrationen, nach dem folgendem Pipettierschema (Tabelle 13) ersetzt. Die DMSO-Konzentration betrug 0.5 %, was von Kopp (2015) in einem separatem SRB-Test, als atoxisch für allen verwendeten Zelllinien, bewertet wurde.

Tabelle 13: Pipettierschema zum SRB-Test.

c (17a) je <i>well</i> [µM]	V (10 mM 17a in DMSO) [µl]	V (DMSO) [µl]	V (Medium) [µl]
0	0	30	5970
8.3	5	25	5970
16.7	10	20	5970
25.0	15	15	5970
33.3	20	10	5970
50.0	30	0	5970

Nach der Inkubation für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂, wurden 100 µl einer 50 %igen TCA-Lösung zum Medium gegeben und für 1 h im Kühlschrank inkubiert. Das Medium wurde anschließend verworfen, die *wells* mit kaltem Wasser (je 3 × 5 ml) gewaschen und 1 h bei 60 °C getrocknet. Anschließend wurden pro *well* 250 µl SRB-Lösung (0.4 % Sulforhodamin B in 1 %iger Essigsäure) gegeben und für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die SRB-Lösung wurde verworfen und die *wells* mit kaltem Wasser (je 3 × 5 ml) und 1 %iger

Essigsäure (je 3×5 ml) gewaschen. Die 24-well-Platten wurden anschließend wieder für 1 h bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet.

Je *well* wurden $500\text{ }\mu\text{l}$ Tris-Base Puffer pipettiert, die Platten einmal geschwenkt und bei $\lambda = 564\text{ nm}$ in einem *plate reader* vermessen. Pro Messung wurde auch eine Blank-Platte mit reinem Tris-Base Puffer ($500\text{ }\mu\text{l}$ je *well*) befüllt, diese vermessen und im Rahmen der Auswertung von den Messwerten abgezogen.

5.8 *In vitro* Fluoreszenz-Quenching-Experimente am *cLSM* mit PNOMSN (17a)

5.8.1 Vorbereitung der Zellen

Für die *in vitro* Fluoreszenz-Quenching-Experimente am *cLSM* wurden die verwendeten Zelllinien (MCF7, HeLa und *wt-Mef*) nach Kap. 5.7.1 kultiviert. Als ein stabiles Wachstum zu verzeichnen war wurden die jeweiligen Zellen abgeerntet (Kap. 5.7.2). Danach wurden sterile *coverslips* auf die *wells* von 6-Well-Platten verteilt (je *well* ein *coverslip*) und jeweils 1 ml des entsprechenden, vorgewärmten Mediums hinzugegeben. Danach wurden 2 – 3 Tropfen der geernteten Zellsuspension je *well* hinzugegeben und die Platten für 3 – 4 Tage im Inkubator inokuliert.

5.8.2 Verwendete Lösungen

2 mM PNOMSN 17a - DMSO-Lösung:	0.90 mg von 17a ad $1275\text{ }\mu\text{l}$ DMSO
100 μM Rotenon 20 - DMSO-Lösung:	3.94 mg von 20 ad 10 ml DMSO (1 mM) Davon $100\text{ }\mu\text{l}$ ad $900\text{ }\mu\text{l}$ DMSO
100 μM Antimycin A 21 - DMSO-Lösung:	5.49 mg von 21 ad 10 ml DMSO (1 mM) Davon $100\text{ }\mu\text{l}$ ad $900\text{ }\mu\text{l}$ DMSO
40 μM TMRE 22 - PBS-Lösung:	5.15 mg von 22 ad 10 ml PBS-Puffer (1 mM) Davon $40\text{ }\mu\text{l}$ ad $960\text{ }\mu\text{l}$ PBS-Puffer
100 μM Acridinorange 23 - PBS-Lösung:	2.65 mg von 23 ad 10 ml PBS-Puffer (1 mM) Davon $100\text{ }\mu\text{l}$ ad $900\text{ }\mu\text{l}$ PBS-Puffer

5.8.3 Versuchsbeschreibung

Allgemeine Vorgehensweise

Zunächst wurden 5 μl der 2 mM PNOMSN **17a**- DMSO-Lösung zu 1000 μl des entsprechenden Mediums (10 μM ; RPMI für MCF7-Zellen und DMEM für HeLa-Zellen und *wt*-Mef) gegeben. Ein mit Zellen bewachsenes *coverslip* wurde mit einer Pinzette in eine kleine Petrischale überführt. In diese wurde das zuvor hergestellte 10 μM PNOMSN **17a**- und DMSO-haltige Medium gegeben und 20 – 30 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde der *coverslip* mit reinem Medium ($2 \times 1 \text{ ml}$) gewaschen, mit Silikon-Fett auf der entsprechenden Probenhalterung fixiert, diese mittig unter dem Objektiv des *cLSMs* platziert und befestigt. Danach wurde 1 ml frisches Medium auf der Halterung verteilt. Möglichst schnell wurde versucht die Einstellungen zu finden bei denen die gewünschte Fluoreszenz sichtbar wurde.

Quenching-Experimente

Für den jeweiligen *Quenching*-Versuch wurden 2 μl der 100 μM Rotenon **20**- DMSO-Lösung, der 100 μM Antimycin A **21**- DMSO-Lösung oder einer 1 : 1 Mischung aus beiden Inhibitorlösungen am Objektiv hinzupipettiert. Gleichzeitig wurde die Messung mit folgenden Geräteeinstellungen gestartet (Tabelle 14).

Tabelle 14: Einstellungen für die Zeitserie bei den Fluoreszenz-*Quenching*-Experimenten mit PNOMSN **17a**.

Parameter	Einstellungen
Anregungslaser [nm]	405
Laserstärke [%]	3
Gain	746
Bildaufnahmeintervall [s]	3
Zyklen	60
Fluoreszenzfilter [nm]	500 - 550
Bildpunkte	512×512
Aufnahmebereich [μm]	160×160

Vergleichsstudien zur Akkumulation

Für die Vergleichsstudien mit den Kompartiment-spezifischen Farbstoffen TMRE und Acridinorange (AO) wurde zusätzlich, neben den 5 μl der 2 mM PNOMSN **17a**- DMSO-Lösung, entweder 2 μl der 40 μM TMRE **22**- oder 100 μM Acridinorange **23**- PBS-Lösung für 20–30 min inkubiert und ohne Inhibitorzugabe mit folgenden Geräteeinstellungen vermessen (Tabellen 15, 16 und 17).

Tabelle 15: Einstellungen für die Bildaufnahme mit TMRE **22** am *cLSM*.

Parameter	Einstellungen
Anregungslaser [nm]	555
Laserstärke [%]	2.5
Gain	600
Fluoreszenzfilter [nm]	580 - 630
Bildpunkte	2048 \times 2048
Aufnahmebereich [μm]	160 \times 160

Tabelle 16: Einstellungen für die Bildaufnahme mit AO **23** am *cLSM*.

Parameter	Einstellungen
Anregungslaser [nm]	488
Laserstärke [%]	4
Gain	652
Fluoreszenzfilter [nm]	530 - 660
Bildpunkte	2048 \times 2048
Aufnahmebereich [μm]	160 \times 160

Tabelle 17: Einstellungen für die Bildaufnahme mit PNOMSN **17a** am *cLSM*.

Parameter	Einstellungen
Anregungslaser [nm]	405
Laserstärke [%]	3
Gain	746
Fluoreszenzfilter [nm]	490 - 540
Bildpunkte	2048 × 2048
Aufnahmebereich [μm]	160 × 160

Eigenfluoreszenz

Zum Test auf Eigenfluoreszenz wurden die Zellen ohne die Inkubation eines Farbstoffes, nach analoger Zugabe der Inhibitoren am Objektiv mit gleichen Geräteeinstellungen, wie bei den Vergleichsstudien, ohne Fluoreszenzfilter, vermessen (nach Tabelle 17) und die Laserstärke sukzessive bis auf 100 % erhöht.

6 Literaturverzeichnis

- Ahlrichs, R., Bär, M., Häser, M., Horn, H., Kölmel, C. "Electronic Structure Calculations on Workstation Computers: The Program System TURBOMOLE" *Chem. Phys. Lett.* 162 (165), **1989**.
- Annenkov, V.V., Verkhozina, O.N., Shishlyannikova, T.A. & Danilovtseva, E.N. "Application of 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole in analysis: fluorescent dyes and unexpected reaction with tertiary amines." *Analytical Biochemistry* 486, **2015**: 5-13.
- Atkins, P. W. „Physikalische Chemie, 3rd Ed.“ *Wiley-VCH*, **2004**.
- Autorenkollektiv „Lexikon der Biologie“ *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg **1999** – URL: <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/fluorochrome/25373>.
- Autorenkollektiv „Organikum, 21. Ausgabe“ *Wiley-VCH*, **2001**.
- Ballini, R. & Petrini, M. "Facile and inexpensive synthesis of 4-Oxoalkanoic acids from primary nitroalkanes and acrolein." *Synthesis*, **1986**: 1024-1026.
- Bayarmagnai, B., Matheis, C., Risto, E., Gooßen, L. J. ” One-Pot Sandmeyer Trifluoromethylation and Trifluoromethylthiolation.” *Adv. Synth. Catal.* 356, **2014**: 2343-2348
- Becker, H. G. O., Grossmann, K. "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), **1990**: 241-250.
- Berliner, L. J. "In Vivo EPR (ESR) - Theory and Application" *Springer-Verlag*, **2003**.
- Bietz, J. „Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“, **2008**.
- Biskup, T. „Skript Fluoreszenz, Universität Freiburg“, **2016**: – URL: <http://www.radicals.uni-freiburg.de/ak/mitarbeiterinnen/biskup/pcg/fluoreszenz>
- Boveris, A. "Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide" *Adv. Exp. Med. Biol.* 78, **1977**: 67-82.
- Breitmaier, E. & Jung, G. „Organische Chemie; Grundlagen, Stoffklassen, Reaktionen, Konzepte, Molekülstruktur; 5. überarbeitete Auflage“ *Georg Thieme Verlag*, **2005**.
- Buddrus, J. & Schmidt, B. „Grundlagen der Organischen Chemie, 5. Auflage“ *de Gruyter-Verlag, Berlin*, **2015**: 572.

- Buettner, G.R. "Spin Trapping: ESR Parameters of spin adducts" *Free Radical Biology & Medicine* 3, **1987**: 259-303.
- Bystryak, I.M., Likhtenshtein, G.I., Kotelnikov, A.I., Hankovsky, O. & Hideg, K. "The influence of the molecular dynamics of the solvent on the photoreduction of nitroxy radicals." *Russian J. Phys. Chem.* 60, **1986**: 1679-1683.
- Cadenas, E. & Davies, K.J.A. "Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging" *Free Radical Biol. Med.* 29, **2000**: 222-230.
- Christen, P. & Jaussi, R. „Biochemie; Eine Einführung mit 40 Lerneinheiten" *Springer-Verlag*, **2005**.
- Cubitt A.B., Heim R., Adams S.R., Boyd A.E., Gross L.A., Tsien R.Y. "Understanding, improving and using green fluorescent proteins" *Trends Biochem Sci* 20 (11), **1995**: 448-55.
- Dlaskova, A., Hlavata, L. & Jezek, P. "Oxidative stress caused by blocking of mitochondrial complex I H(+) pumping as link in aging/disease vicious cycle" *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 40, **2008**: 1792-1805.
- Dröge, W. "Free radicals in the physiological control of cell function" *Physiological Rev.* 82, **2002**: 47-95.
- Dunker, M. F. W., Starkey, E. B., Jenkins, G. L. "The Preparation of Some Organic Mercurials from Diazonium Borofluorides." *J. Am. Chem. Soc.* 58, **1936**: 2308-2309.
- Dugovič, B., Hametner C., und Prónayová N. "Diastereoselectivity of nitrene 1,3-dipolar cycloaddition to Baylis-Hillman adducts." *ARKIVOC XIV*, **2003**: 162-169.
- Elstner, E.F., Bors W. und Wilmanns W. „Reaktive Sauerstoffspezies in der Medizin: Grundlagen und Klinik" *Springer-Verlag*, **1986**: 1-20.
- Farkas, D.L., Wei, M.D., Febroriello, P., Carson, J.H. & Loew, L.M. "Simultaneous imaging of cell and mitochondrial membrane potentials" *Biophys. J.* 56, **1989**: 1053-1069.
- Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel H. B. *et al.* „Gaussian 09" *Revision B.01*, *Gaussian, Inc., Wallingford, CT*, **2009**.
- Göpel, W. & Ziegler, C. „Struktur der Materie: Grundlagen, Mikroskopie und Spektroskopie" *Teubner, Stuttgart, Leipzig*, **1994**.
- Gottlieb, H.E., Kotlyar, V. und Nudelman, A. "NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities" *J. Org. Chem.*, **1997**: 7512-7515.
- Haimann, M. „Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern" **2012**.

- Han, D., Williams, E. & Cadenas, E. "Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space" *Biochem. J.* 353, **2001**: 411-416.
- Häser, M. & Ahlrichs, R. "Improvements on the direct SCF method" *J. Comput. Chem.* 10, 104, **1989**: 104–111.
- Hättig, C. & Weigend, F. "CC2 excitation energy calculations on large molecules using the resolution of the identity approximation" *J. Chem. Phys.* 113, **2000**: 5154.
- Hättig, C. & Köhn, A. "Transition moments and excited-state first-order properties in the coupled-cluster model CC2 using the resolution-of-the-identity approximation" *J. Chem. Phys.* 117, **2002**: 6939.
- Hauck, S. „persönliche Mitteilung“ **2015**.
- Hauck, S., Lorat, Y., Leinisch, F., Kopp, C., Abrossinow, J., und Trommer, W. E. „Fluorescent Nitrones for the Study of ROS Formation with Subcellular Resolution.“ In Nitroxides - Theory, Experiment and Applications, Ed.: Kokorin A. I., Rrijeka (Croatia), *InTech*, **2012**: 347-368.
- Hauck, S. „Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern“ **2007**.
- Hauck, S., Lorat, Y., Leinisch, F., und Trommer, W. E. "*p*-Nitrostilbene-*tert*-Butyl-Nitrone: a Novel Fluorescent Spin Trap for Detection of ROS with Subcellular Resolution" *Appl. Magn. Reson.*, **2009**: 133-147.
- Heberer, H., Kersting, H., Matschiner, H. „Derivatisierung von Amininen mit 4-substituierten 7-Nitrobenz-2,1,3-oxadiazolen.“ *Journal f. prakt. Chemie* 3, **1985**: 487-504.
- Heim, R., Cubitt, A.B., Tsien, R.Y. "Improved green fluorescence" *Nature* 373 (6516), **1995**: 663-4.
- Heim, R., Prasher D.C., Tsien R.Y. "Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91 (26), **1994**: 12501-4.
- Hesse, M., Mayer, H. & Zeeh, B. „Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie; 7. überarbeitete Auflage" *Georg Thieme Verlag*, **2005**.
- Huang, L., Cobessi, D., Tung, E. Y., und Berry, E. A. "Binding of the Respiratory Chain Inhibitor Antimycin to the Mitochondrial bc1 Complex: A New Crystal Structure Reveals an Altered Intramolecular Hydrogen-bonding Pattern." *J. Mol. Biol.* 351, **2005**: 573-597.
- Ikenaga, K., Kikukawa, K., Matsuda, T. "Stereospecific Arylation of Alkenylsilanes with Arylpalladium Acetates" *J. Org. Chem.* 52, **1987**: 1276-1280.

- Inoue, M., Sato, E.F., Nishikawa, M., Park, A.-M., Kira, Y, Imada, I. & Utsumi, K. "Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life" *Current Med. Chem.* 10, **2003**: 2495-2505.
- Janzen, E.G. "Spin trapping." *Acc. Chem. Res.*, **1971**: 31-40.
- Jeffery, T. "Tetraalkylammonium salt-based catalyst systems for directing the arylation of vinyltrimethylsilane" *Tetrahedron Lett.* 40, **1999**: 1673-1676.
- Jeschke, G. „Einführung in die ESR-Spektroskopie; Vorlesungs-Skript“ *Universität Konstanz*, **2006**.
URL: https://www.ethz.ch/content/dam/ethz/special-interest/chab/physical-chemistry/eprdam/documents/basicEducation/skripts/epr_skript_mainz_1998.pdf
- Kalai, T., Hideg, E., Vass, I. & Hideg, K. "Double fluorescent and spin sensors for detection of reactive oxygen species in the thylakoid membrane" *Free Radical Biol. Med.* 24, **1998**: 649-652.
- Karabelas, K., Hallberg, A. "Synthesis of (*E*)-(2-Arylethenyl)silanes by Palladium-Catalyzed Arylation of Vinylsilanes in the Presence of Silver Nitrate" *J. Org. Chem.* 51, **1986**: 5286-5290.
- Karplus M. "In Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance" *JACS* 85, **1963**: 2870–2871.
- Karbach, A., Stemler, T., Kopp, C., & Trommer, W. E. "Synthesis of Novel Fluorescent Stilbenenitrones via a Mild, Ligand-Free Heck-Type Reaction of (*E*)-[4-(1,3-Dioxolan-2-yl)styryl]trimethylsilane with Benzene Diazonium Tetrafluoroborate Derivatives." *Synthesis* 46, **2014**: 3103-3109.
- Klessinger, M., und Michl, J. „Photophysical Processes in Excited States and Photochemistry of Organic Molecules" *VCH*, **1995**: 243-306.
- Kikukawa, K., Maemura, K., Kiseki, Y., Wada, F., Matsuda, T & Giam, C.S. "Palladium(0)-catalyzed arylation of olefins by arylamines and an alkyl nitrite" *J. Org. Chem.* 46 (24), **1981**: 4885–88.
- Kikukawa, K.; Matsuda, T. "Reaction of Diazonium Salts with Transition Metals. I. Arylation of Olefins with Arenediazonium Salts Catalyzed by Zero Valent Palladium" *Chemistry Letters* 2, **1977**: 159.
- Kishida, K. T., & Klann E. "Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory" *Antioxid Redox Signal.* 9, **2007**: 233-244.
- Kohen, R. & Nyska, A. "Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification" *Toxicol. Pathol.* 30, **2002**: 620-650.

- Kopp, C. „Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern“, **2015**.
- Kuppusamy, P. & Zweier, J. L. “Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation.” *J. Biol. Chem.* 264, **1989**: 9880-9884.
- Lakowicz, J. R. “Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd Ed.” *Springer*, **2006**.
- Leinisch, F. „Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern“, **2009**.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. „Brock Mikrobiologie 11. aktualisierte Auflage“ *Pearson Studium*, **2009**: 337-343, 631-649.
- Marco-Contelles, J. „ β -Lactam-Synthese durch die Kinugasa-Reaktion“, *Angew. Chem. Int. Ed.* 116 (17), **2004**: 2198–2200.
- Masllorens, J., Bouquillon, S., Roglans, A., Hénin, F., Muzart, J. "The Heck-type arylation of allylic alcohols with arenediazonium salts." *J. Organomet. Chem.* 690, **2005**: 3822-3826.
- Matsuo, J., Shibata T., Kitagawa H., und Mukaiyama T. “A convenient method for the synthesis of nitrones by oxidation of *N,N*-disubstituted hydroxylamines with *N-tert*-butylphenylsulfinimidoyl chloride.“ *ARKIVOC X*, **2001**: 58-65.
- Miehlich, B., Savin, A., Stoll, H., Preuss, H. “Results obtained with the correlation energy density functionals of Becke and Lee, Yang and Parr” *Chem. Phys. Lett.* 157, **1989**: 200-206.
- Mitchell, D. G., Rosen, G. M., Tseitlin, M., Symmes, B., Eaton, S.S. & Eaton, G. R. “Use of Rapid-Scan EPR to Improve Detection Sensitivity for Spin-Trapped Radicals.“ *Biophys. J.* 105, **2013**: 338-342.
- Nilsson, K., Hallberg, A. "The Effect of Triethylamine on the Palladium-Catalyzed Arylation of Vinyltrimethylsilane" *Acta Chemica Scandinavica* 44, **1990**: 288-290.
- NIST Chemistry WebBook ”NIST Standard Reference Database Number 69” *U.S. Secretary of Commerce on behalf of the United States of America*, **2016**. – URL: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C98953&Units=SI&Mask=400#UV-Vis-Spec>
<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C555033&Units=SI&Mask=400#UV-Vis-Spec>
<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C100174&Units=SI&Mask=400#UV-Vis-Spec>
- Olivieri, A., Degenhardt, O.S., McDonald, G.R., Narang, D., Paulsen, I.M., Kozuska, J.L. & Holt, A. ”On the disruption of biochemical and biological assays by chemicals leaching from disposable laboratory plasticware” *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 90 (6), **2012**: 697-703.
- Olson, J.M. “Photosynthesis in the archaean era” *Photosynth. Res.* 88 (2), **2006**: 109-117.

- Ono, N., Miyake, H., Kaji, A. "A new synthesis of 1,5-Dicarbonyl compounds under neutral conditions." *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1983**: 875-876.
- Ouari, O., Chalier, F., Bonaly, R., Pucci, B., Tordo, P. "Synthesis and spin-trapping behaviour of glycosylated nitrones" *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1998**: 2299-2307.
- Peng, C., Ayala, P., Schlegel, H.B., and Frisch, M.J. "Using redundant internal coordinates to optimize equilibrium geometries and transition states" *J. Comput. Chem.* 17 (1), **1996**: 49-56.
- Perrin, D.D., Armarego, W.L.F., "Purification of Laboratory Chemicals 2. Aufl.", *Pergamon Press, Oxford*, **1980**.
- Pou, S., Bhan, A., Bhadi, V.S., Wu, S.Y., Hosmane, R.S., & Rosen G.M. "The use of fluorophore-containing spin traps as potential probes to localize free radicals in cells with fluorescence imaging methods." *FASEB J.*, **1995**: 1085-1090.
- Pou, S., *et al.* "A Fluorophore-Containing Nitroxide as a Probe to Detect Superoxide and Hydroxyl Radical Generated by Stimulated Neutrophils" *Anal. Biochem.*, **1993**: 85-90.
- Przybytniak, G., Mirkowski, K., Rafalski, A., Nowicki, A., Legocka, I., Zimek, Z. "Effect of hindered amine light stabilizers on the resistance of polypropylene towards ionizing radiation" *Nukleonika*, 50 (4), **2005**: 153-159.
- Reetz, M.T. & de Vries, J.G. "Ligand-free Heck reactions using low Pd-loading" *Chem. Commun.* 14, **2004**: 1559-63.
- Reid, B. G. & Flynn, G.C. "Chromophore formation in green fluorescent protein"; *Biochemistry* 36 (22), **1997**: 6786-91.
- Reimer, K. & Tiemann, F., *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 9, **1876**: 1285.
- Schäfer, A., Huber, C. and Ahlrichs, R. "Fully optimized contracted Gaussian basis sets of triple zeta valence quality for atoms Li to Kr" *J. Chem. Phys.* 100, **1994**: 5829.
- Schatz, G. "Jeff's View: on Science and Scientists" *Elsevier Science* 12, **2005**.
- Schweiger, A. „Elektronen Spin Resonanz“ *Skript ETH Zürich*, **2003**, 1-97.
- Sciannamea, V., Guerrero-Sanchez, C. A., Schubert, U. S., Catala, J.-M., Jerome R. & Detrembleur, C. "Ability of nitrones of various structures to control the radical polymerization of styrene mediated by in situ formed nitroxides." *Polymer* 46, **2005**: 9632-9641.
- Sengupta, S., Sadhukan, S.K., Singh, R.S., Pal, N., "Synthesis of dendritic stilbenoid compounds: Heck reactions for the periphery and the core" *Tetrahedron Lett.* 43, **2002**: 1117-1121.

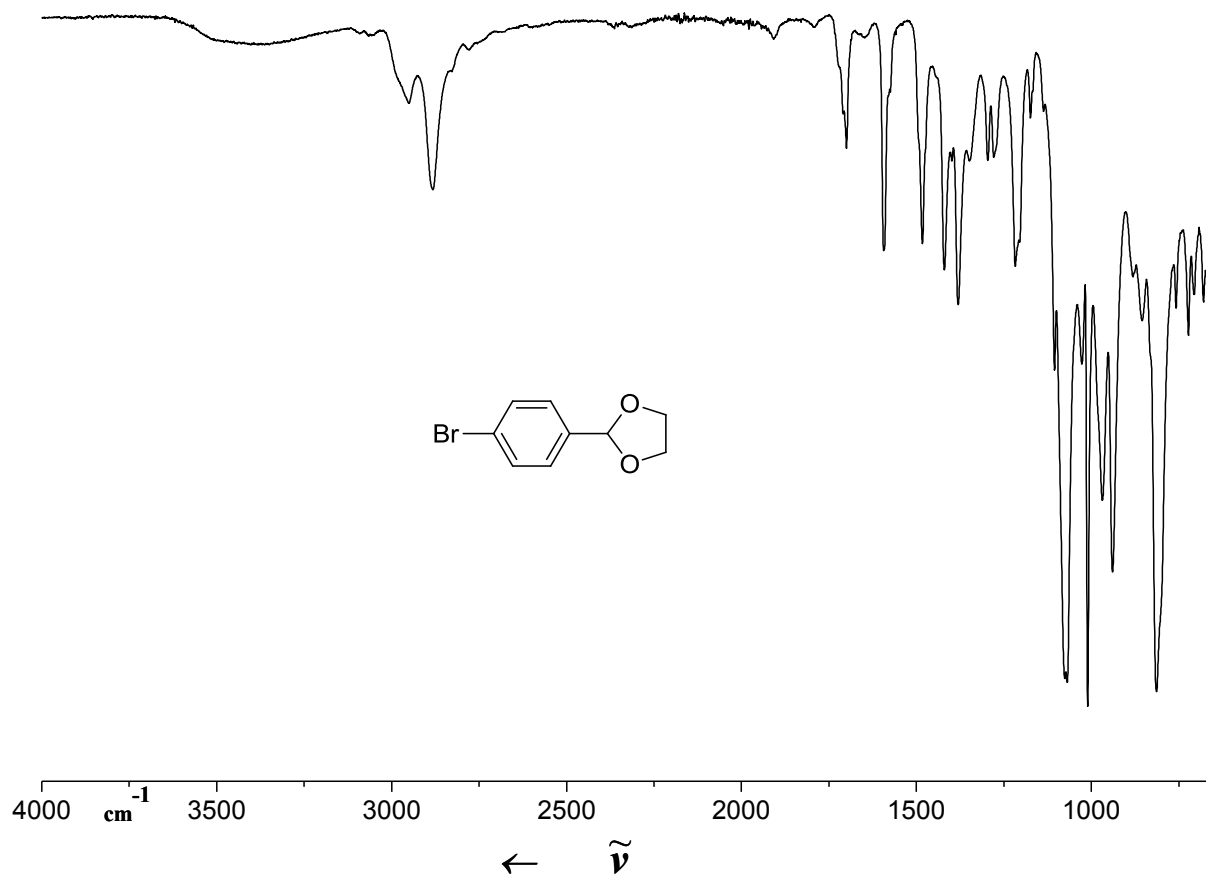
- Speiser, S. & Chisena, F.L. "Optical bistability in fluorescein dyes" *Appl. Phys. B.* 45 (3), **1987**: 137–144.
- Stamper, R.L., Lieberman, M.F., Drake, M.V. "Becker-Shaffer's Diagnosis and Therapy of the Glaucomas. 8. Auflage" *Elsevier Health Sciences*, **2009**: 47–50.
- Stohrer, W.D. „Die konzeptionellen Grundlagen der Photochemie.“ *Praxis der Naturwissenschaften. Chemie* 40, **1991**: 15-22.
- Stowell, J.C. "tert-Alkylnitroso compounds. Synthesis and dimerization equilibriums" *J. Org. Chem.* 36 (20) **1971**: 3055–3056.
- Taratayko, A.I., Becker, C.S., Grigor'ev, I.A., Gatilov, Y.V., Rybalova, T.V., Reznikova, V.A. "Synthesis of 3,4-dihydro-2H-pyrrole 1-oxide based aldonitrones as potential spin trapping agents" *ARKIVOC IV*, **2013**: 272-290.
- Turrens, J.F. "Mitochondrial formation of reactiveoxygenspecies" *J. Physiol.* 552, **2003**: 335-344.
- Walling, C. "Fenton's reagent revisited" *Acc. Chem. Res.* 8, **1975**: 125-131.
- Walton, R., Lahti, P. M., "An Efficient, Simple Synthesis of 4-Azidobenzaldehyde" *Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry* 28:6, **1998**:1087-1092.
- Wang, C., Tan, L.-S., He, J.-P., Hu, H.-W., Xu, J.-H. "Synthesis of Unsymmetrical Divinylbenzenes by Palladium Catalyzed Sequential Heck Reactions Starting from Carboxybenzenediazonium Salts." *Synth. Commun.* 33 (5), **2003**: 773-782.
- Wang, W., Rusin, O., Xu, X., Kwang, K.K., Escobedo, J.O., Fakayode, S.O., Fletcher, K.A., Lowry M., Schowalter, C.M., Lawrence, C.M., Fronczek, F.R., Warner, I.M, and Strongin R.M. "Detection of homocysteine and cysteine." *J. Am. Chem. Soc.* 127 (45), **2005**: 15949–58.
- Weil, J.A. & Bolton, J. R. "Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications, 2nd Ed" *Hoboken: Wiley*, **2006**.
- Welsch, N. „Fluorescein; Römpp Online“ *Georg Thieme Verlag*, 2016. – URL: <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-06-01371>
- Wertz, J. E. & Bolton, J. E. "Electron Spin Resonance - Elementary Theory and Practical Applications" *Chapman and Hall, New York*, **1972**.
- Wippich, N. „Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg“, **2003**.

A Anhang: Spektren dargestellter Verbindungen

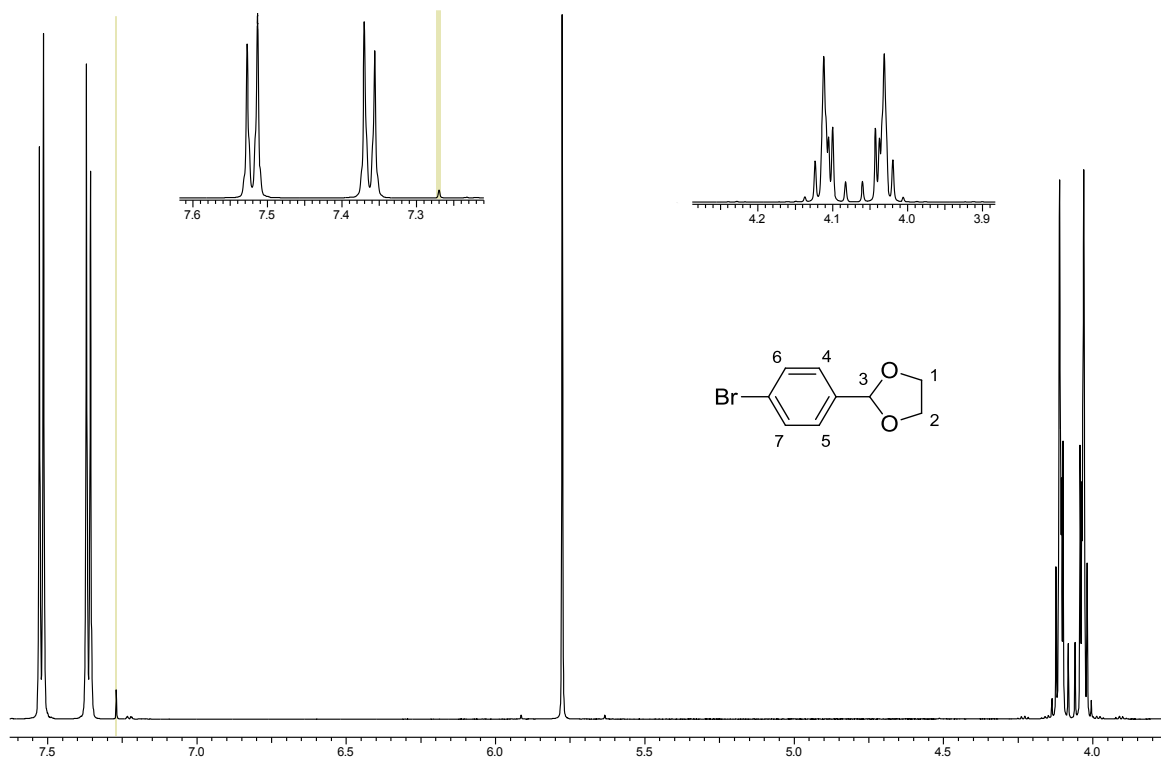
A1 2-(4-Bromphenyl)-[1,3]-dioxolan (12)

Farbloses Öl; Sdp.: $3.1 \cdot 10^{-1}$ mbar: 131-137 °C

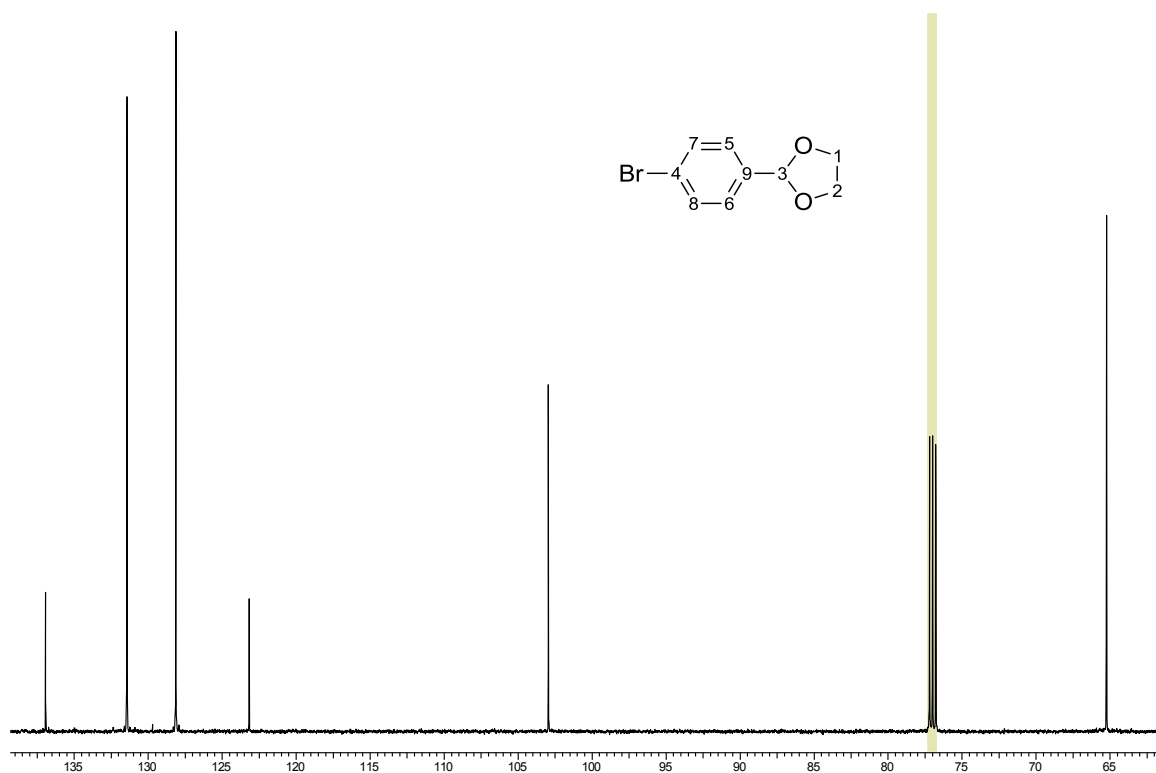
IR (ATR): 2951 (m), 2883 (m), 1075 (s), 1011 (s), 814 (s) cm^{-1} .



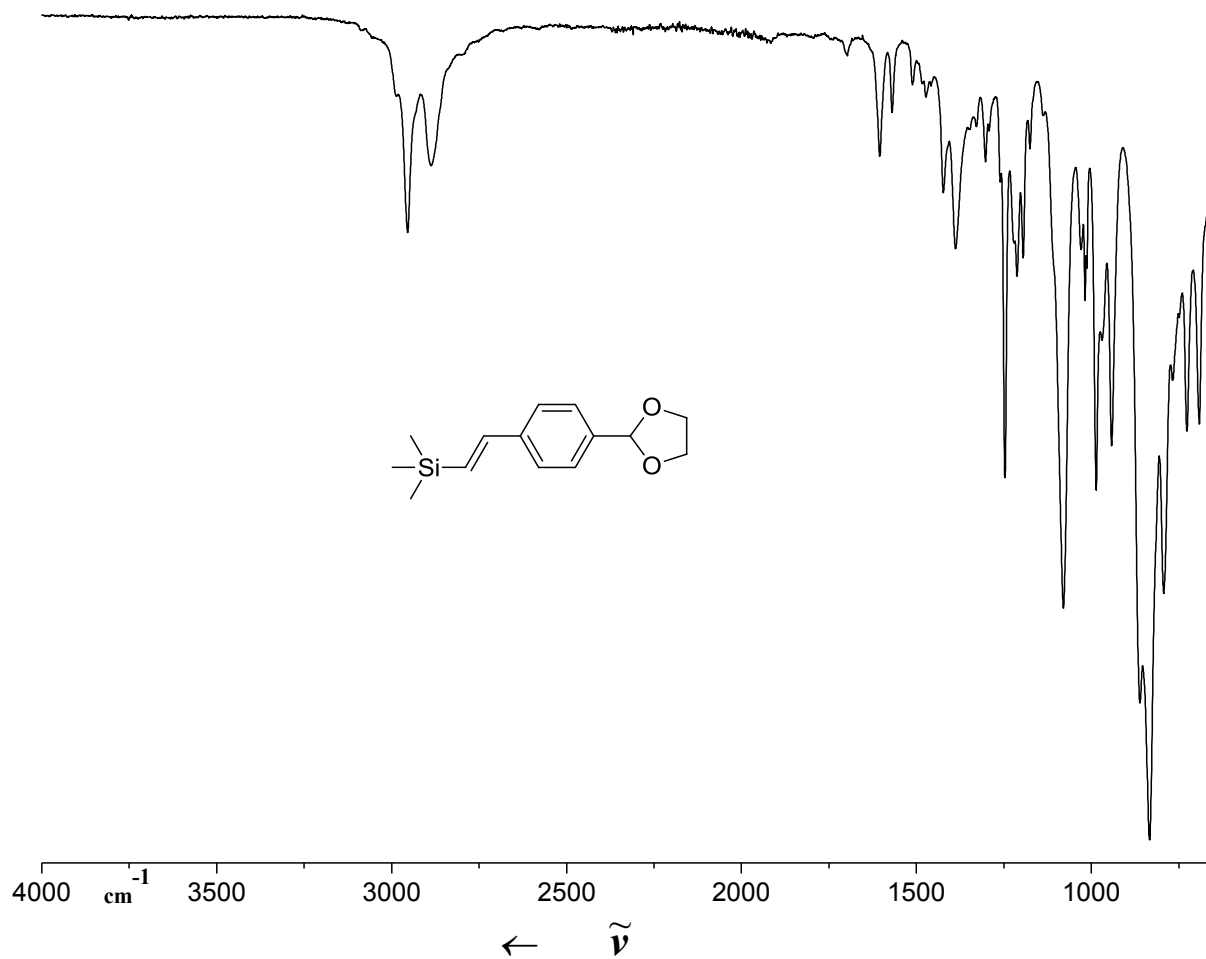
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.99 - 4.15$ (m, 4 H, $\text{H}_{1,2}$), 5.79 (s, 1 H, H_3), 7.37 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, $\text{H}_{4,5}$), 7.54 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, $\text{H}_{6,7}$).



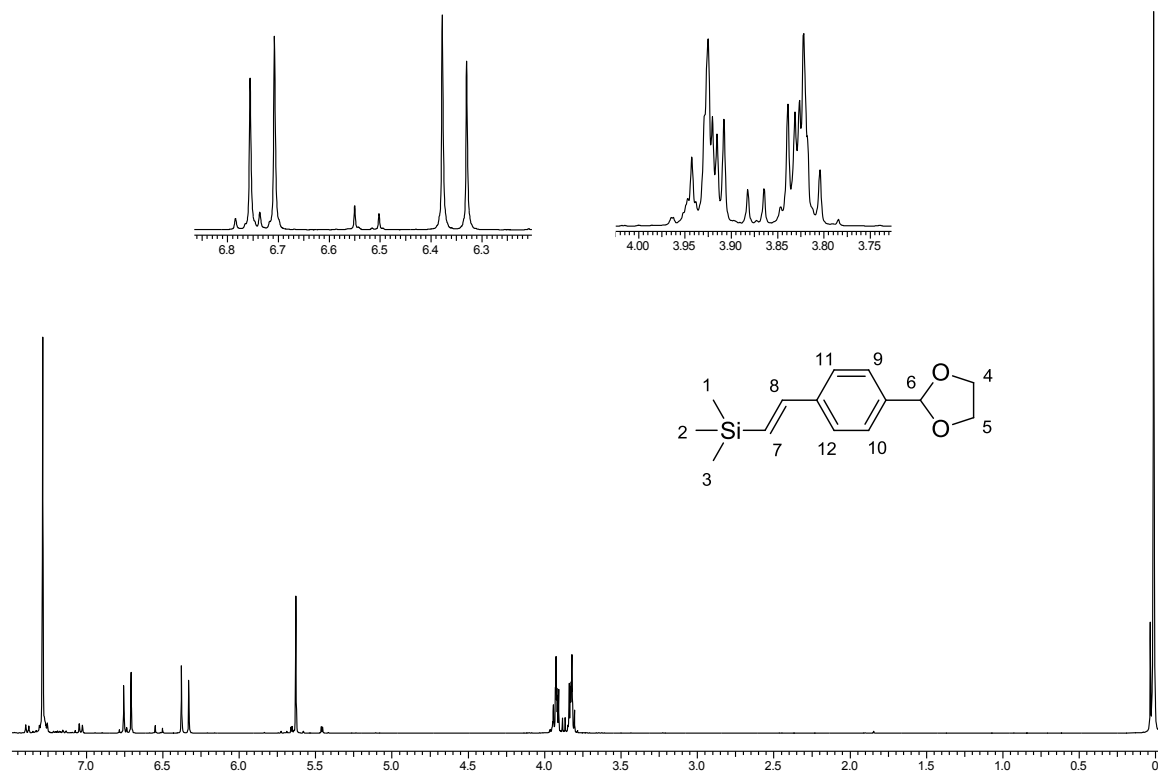
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 65.3$ ($\text{C}_{1,2}$), 103.0 (C_3), 123.2 (C_4), 128.1 ($\text{C}_{5,6}$), 131.4 ($\text{C}_{7,8}$), 137.0 (C_9).



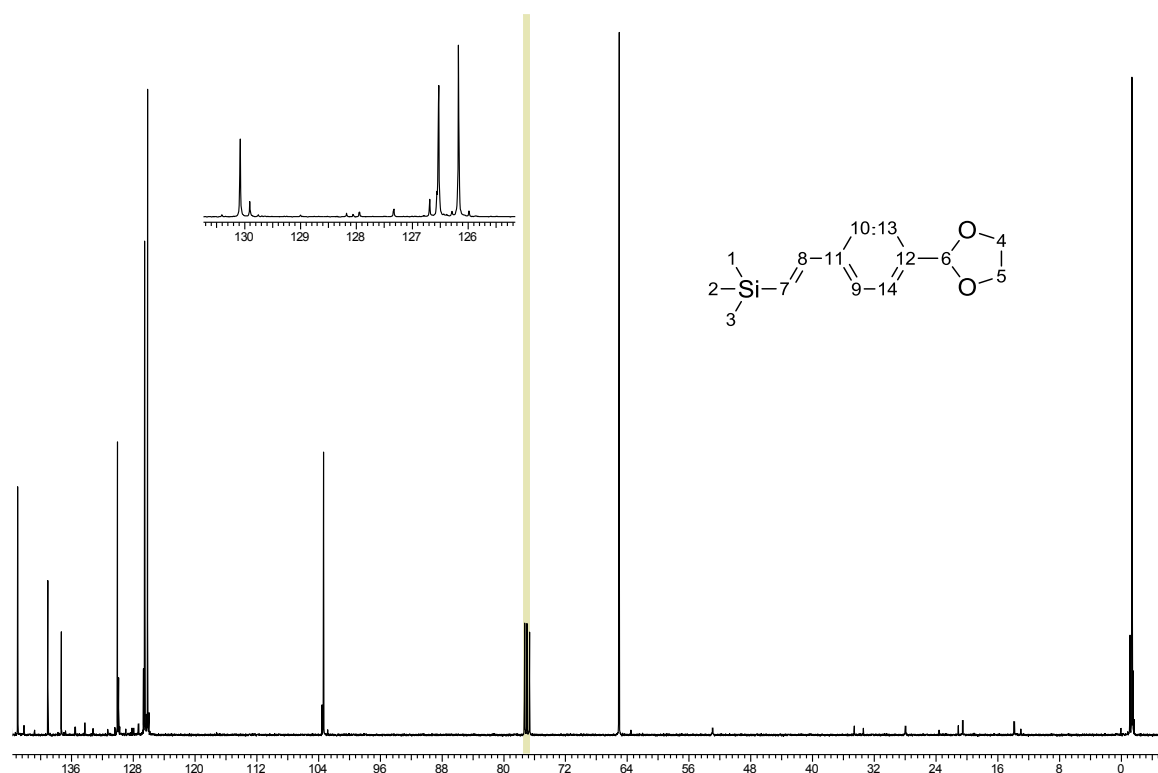
HRMS (EI): m/z [M] $^+$ berechnet für $\text{C}_9\text{H}_9\text{BrO}_2$: 227.9786, 229.9766; gefunden: 227.9784, 229.9772.

A2 (E)-(4-(1,3-dioxolan-2-yl)styryl)-trimethylsilan (13)Farbloses Öl; Sdp.: $2.9 \cdot 10^{-2}$ mbar, 141-146 °CIR (ATR): 2954 (m), 2887 (m), 1247 (s), 1081 (s), 835 (s) cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) $\delta = 0.00$ (s, 9 H, $\text{H}_{1,2,3}$), 3.78 – 3.97 (m, 4 H, $\text{H}_{4,5}$), 5.61 (s, 1 H, H_6), 6.34 (d, $J = 19.1$ Hz, 1 H, H_7), 6.72 (d, $J = 19.1$ Hz, 1 H, H_8), 7.28 (s, 4 H, $\text{H}_{9,10,11,12}$).



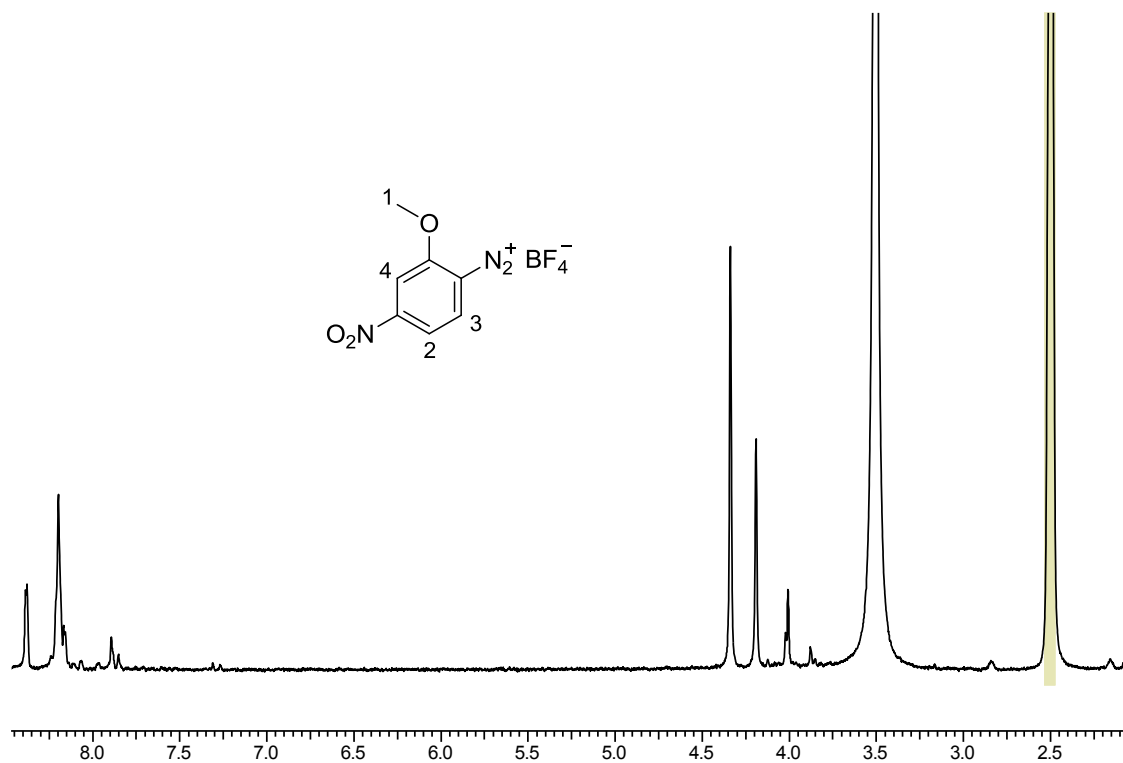
$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = -1.38$ ($\text{C}_{1,2,3}$), 65.1 ($\text{C}_{4,5}$), 103.4 (C_6), 126.2 (C_7), 126.5 (C_8), 130.1 ($\text{C}_{9,10}$), 137.4 (C_{11}), 139.1 (C_{12}), 143.0 ($\text{C}_{13,14}$).



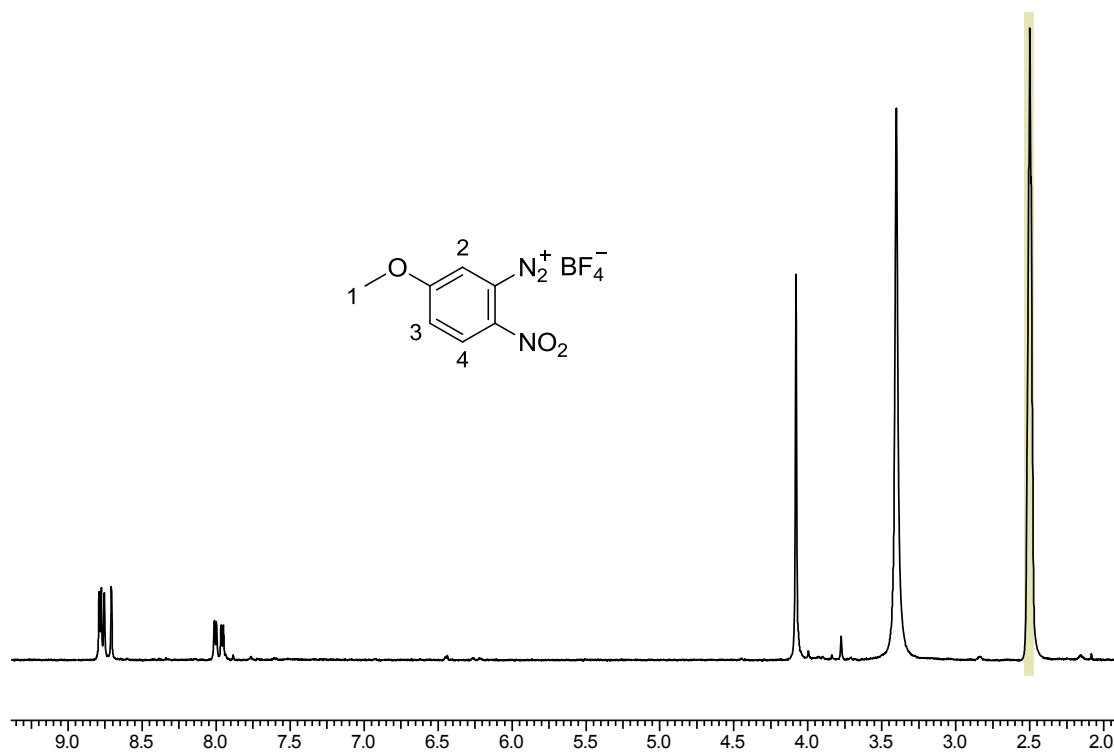
HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{Si}$: 248.1233; gefunden: 248.1231.

A3 2-Methoxy-4-nitrobenzoldiazoniumtetrafluoroborat (15a)

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 4.37$ (s, 3H, H_1), 8.23 (m, 2 H, $\text{H}_{2,3}$), 8.41 – 8.42 (m, 1 H, H_4).

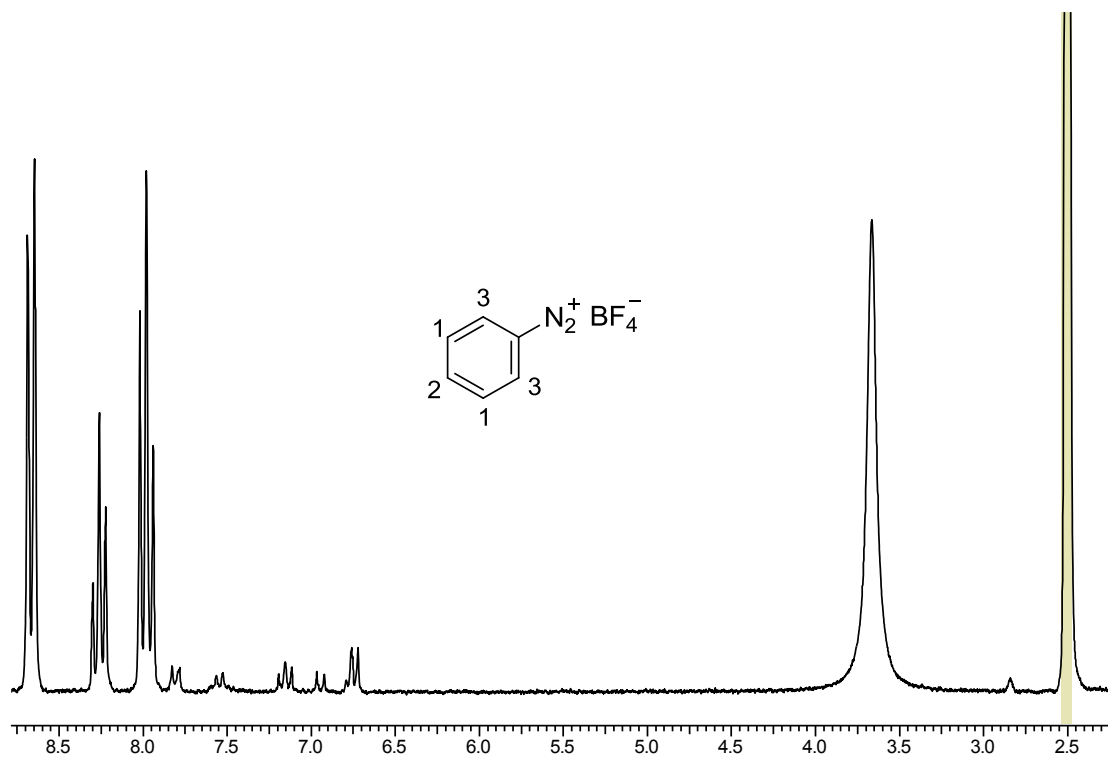
**A4 3-Methoxy-6-nitrobenzoldiazoniumtetrafluoroborat (15b)**

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 4.11$ (s, 3 H, H_1), 7.98 – 8.74 (m, 1 H, H_2), 8.74 – 8.82 (m, 2 H, $\text{H}_{3,4}$).

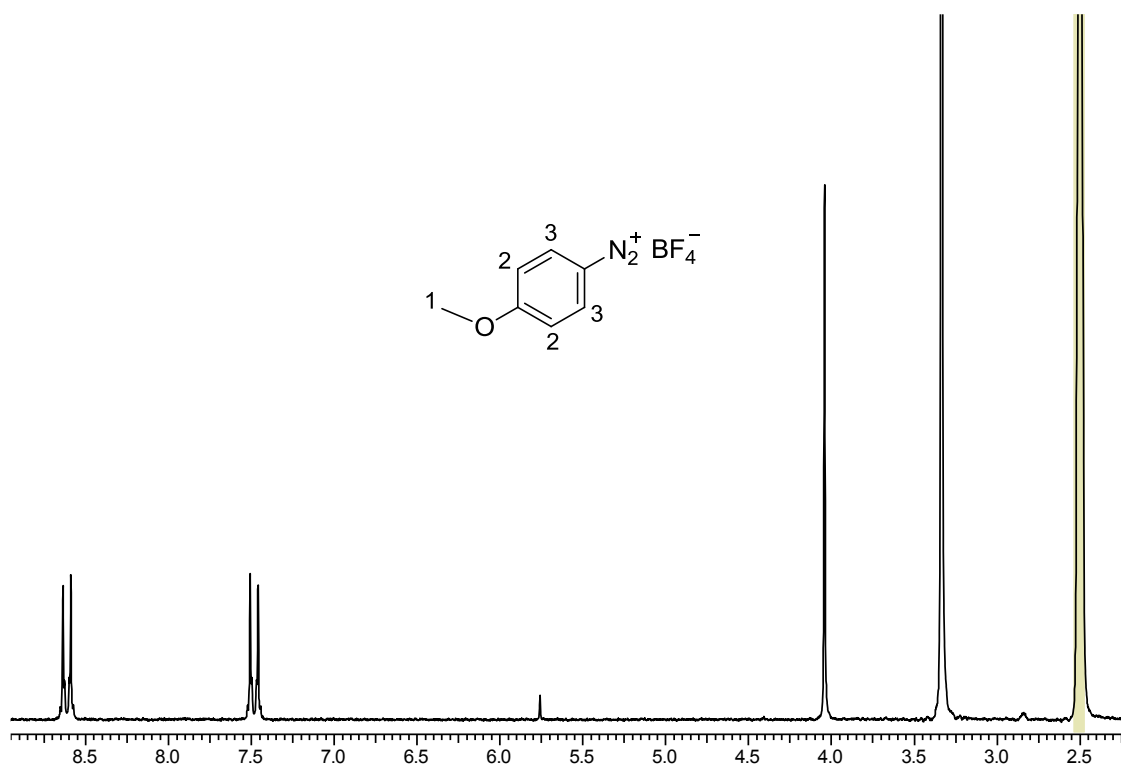


A5 Benzoldiazoniumtetrafluorborat (15d)

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 7.97 - 8.05$ (m, 2 H, H_1), $8.25 - 8.33$ (m, 1 H, H_2), $8.67 - 8.72$ (m, 2 H, H_3).

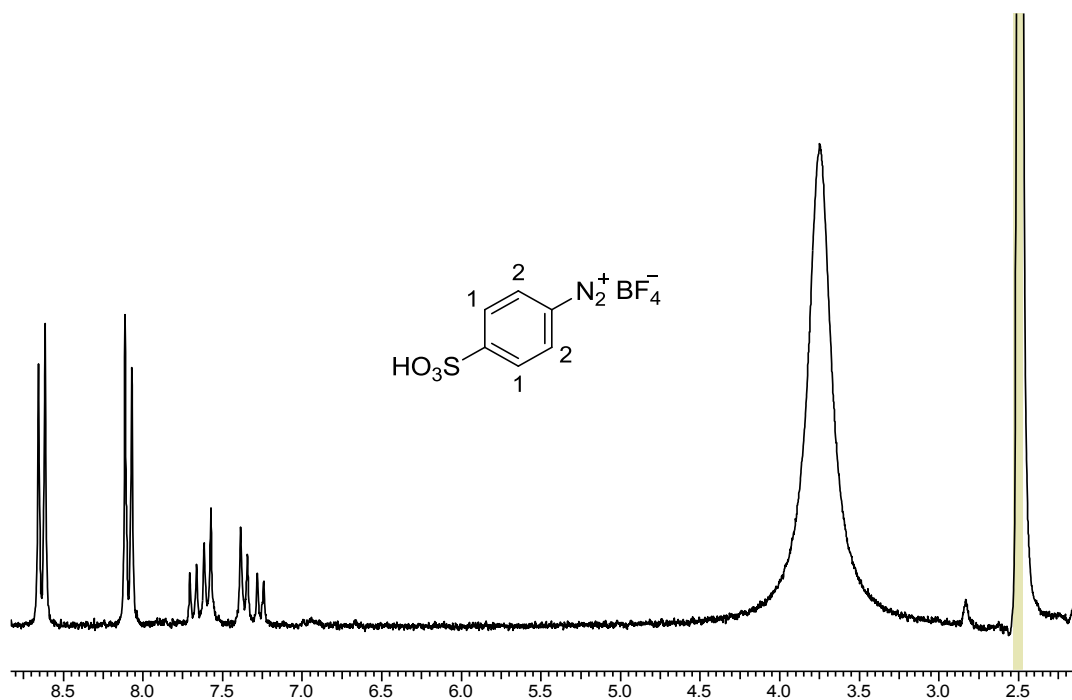
**A6 4-Methoxybenzoldiazoniumtetrafluorborat (15e)**

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): $\delta = 4.07$ (s, 3 H, H_1), $7.47 - 7.55$ (m, 2 H, H_2), $8.60 - 8.68$ (m, 2 H, H_3).

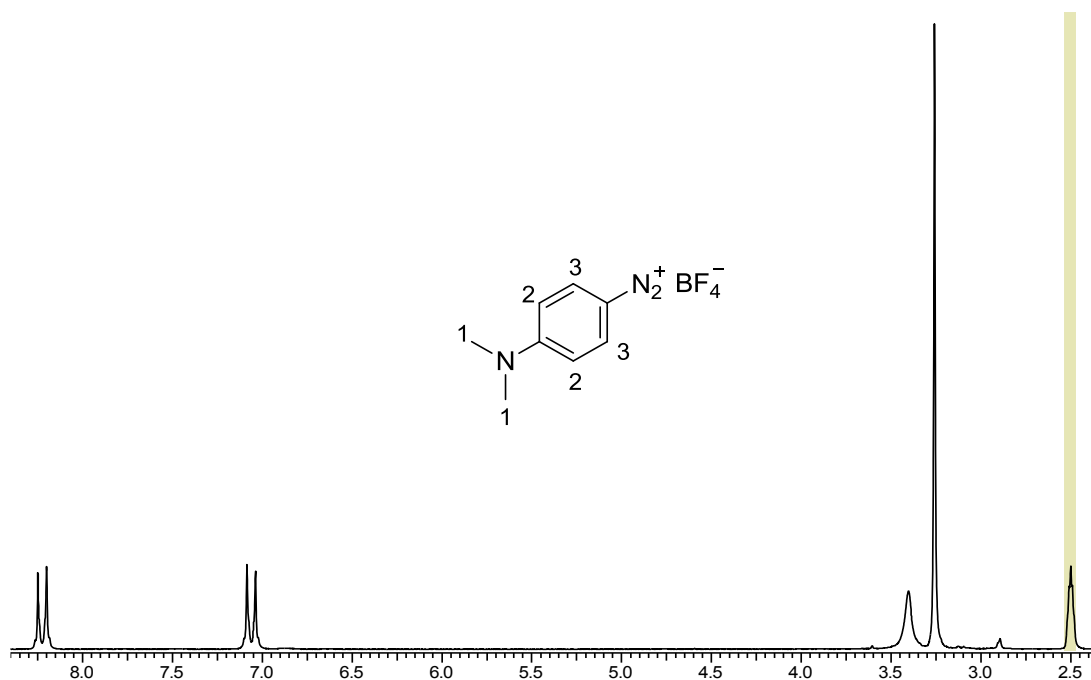


A7 4-Sulfonsäurebenzoldiazoniumtetrafluorborat (15f)

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): $\delta = 4.85$ (br. s, 1 H, SO_3H), 7.27 – 7.73 (m, 2 H, H_1), 8.07 – 8.66 (m, 2 H, H_2).

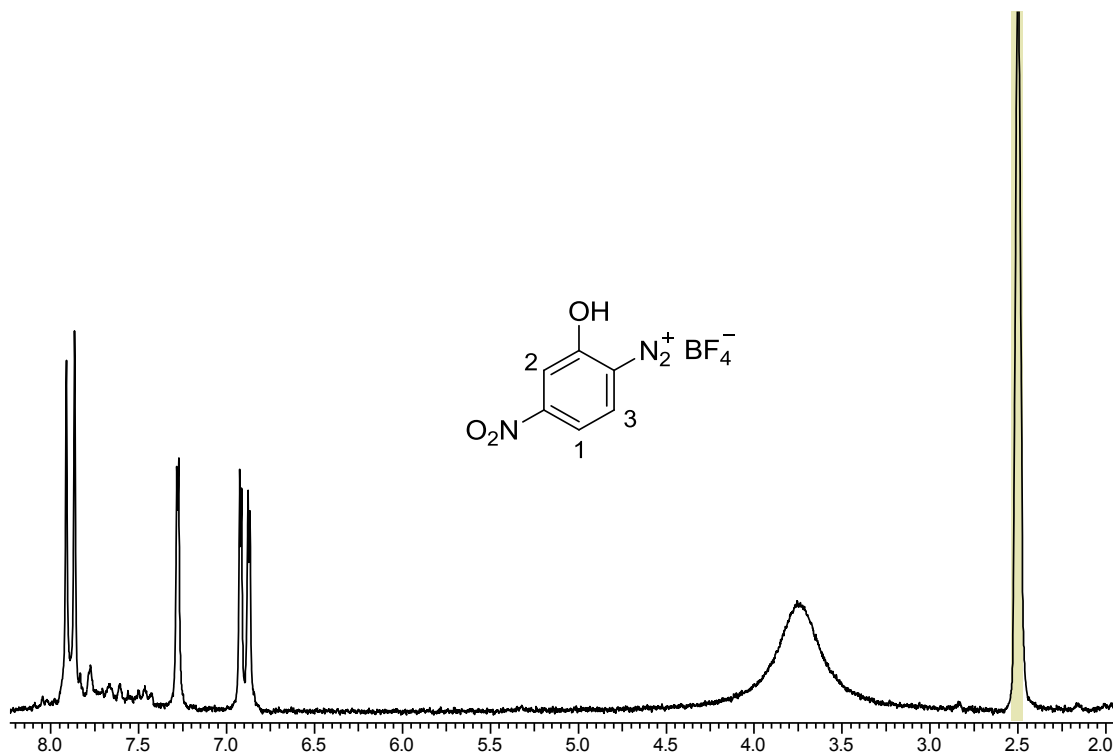
**A8 4-Dimethylaminobenzodiazoniumtetrafluoroborat (15h)**

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): $\delta = 3.26$ (s, 6 H, H_1), 7.07 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9.70$ Hz, 2 H, H_2), 8.23 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9.70$ Hz, 2 H, H_3).



A9 2-Hydroxy-4-nitrobenzoldiazoniumtetrafluoroborat (15i)

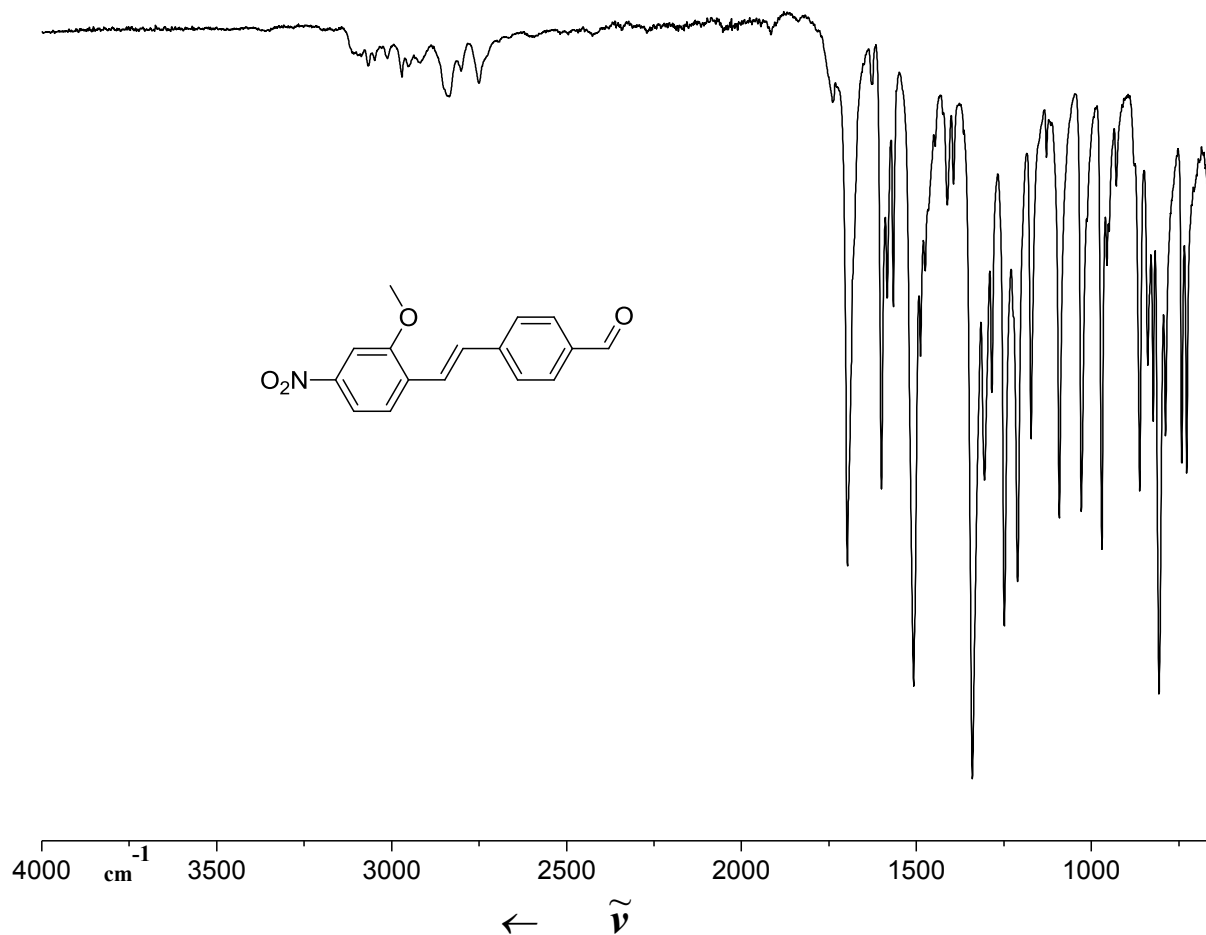
^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): $\delta = 4.11$ (br. s, 1 H, OH), 6.90 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9.50$ Hz, 1 H, H₁), 7.29 (s, 1 H, H₂), 7.89 (d, $^3J_{\text{HH}} = 9.70$ Hz, 1 H, H₃).



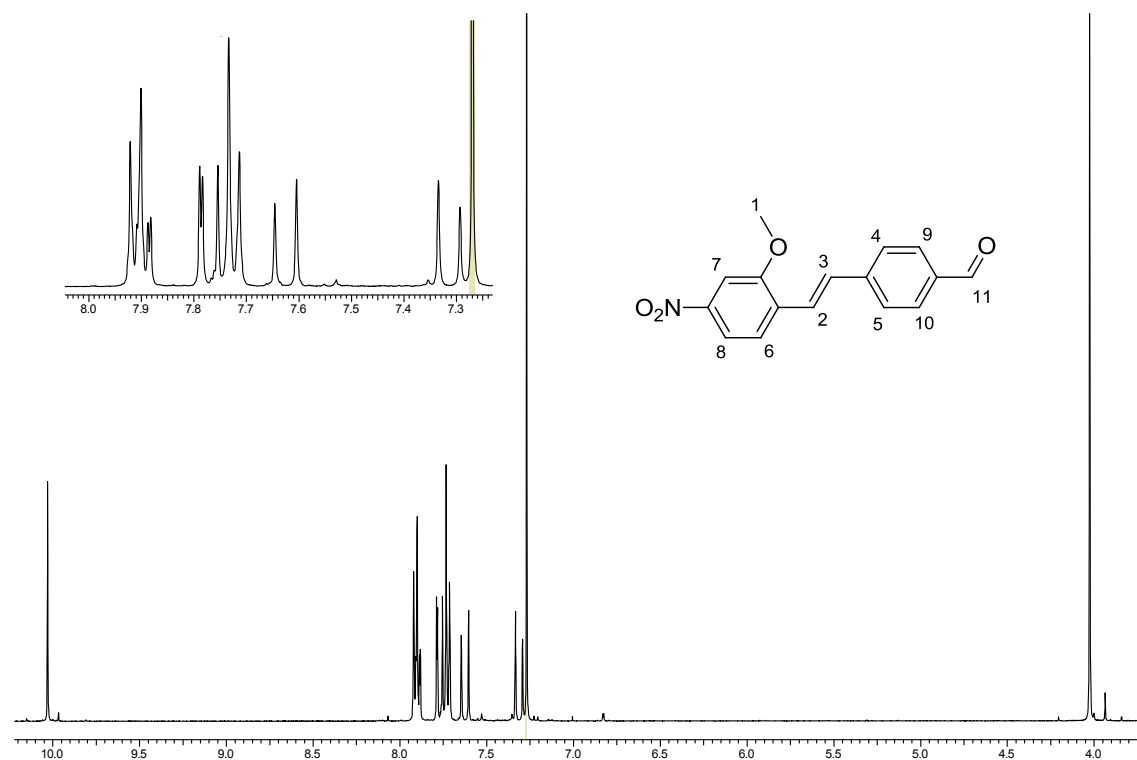
A10 (E)-4-(2-Methoxy-4-nitrophenyl)benzaldehyd (16a)

Gelber Feststoff; Smp.: 154-156 °C; $R_f = 0.30$ (PE 40/60 – EtOAc, 5:1).

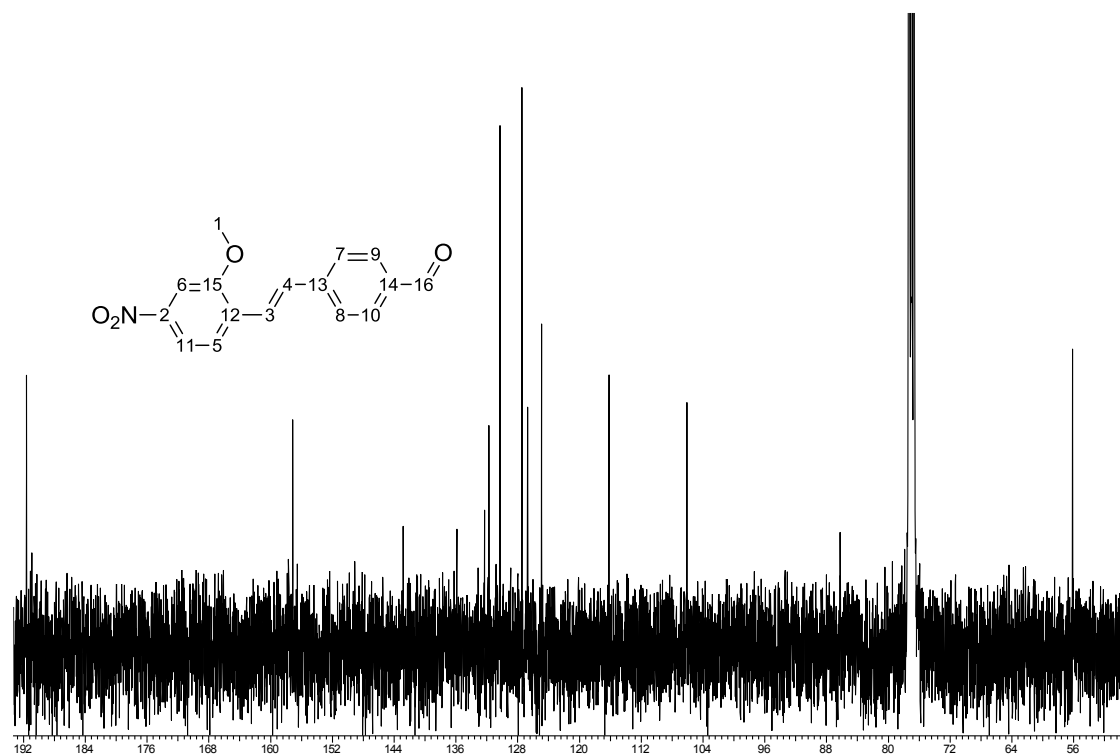
IR (ATR): 3070 (w), 2972 (w), 2837 (w), 2752 (w), 1697 (m), 1600 (m), 1339 (s), 1250 (s) cm^{-1} .



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.03$ (s, 3 H, H_1), 7.31 (d, $J = 16.6$ Hz, 1 H, H_2), 7.62 (d, $J = 16.6$ Hz, 1 H, H_3), 7.70 - 7.76 (m, 3 H, $\text{H}_{4,5,6}$), 7.79 (d, $J = 2.2$ Hz, 1 H, H_7), 7.87 - 7.93 (m, 3 H, $\text{H}_{8,9,10}$), 10.03 (s, 1 H, H_{11}).



$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 56.2$ (C_1), 86.2 (C_2), 106.1 (C_3), 116.2 (C_4), 124.9 (C_5), 126.7 (C_6), 127.5 ($\text{C}_{7,8}$), 130.3 ($\text{C}_{9,10}$), 131.7 (C_{11}), 132.3 (C_{12}), 135.9 (C_{13}), 142.8 (C_{14}), 157.1 (C_{15}), 191.6 (C_{16}).

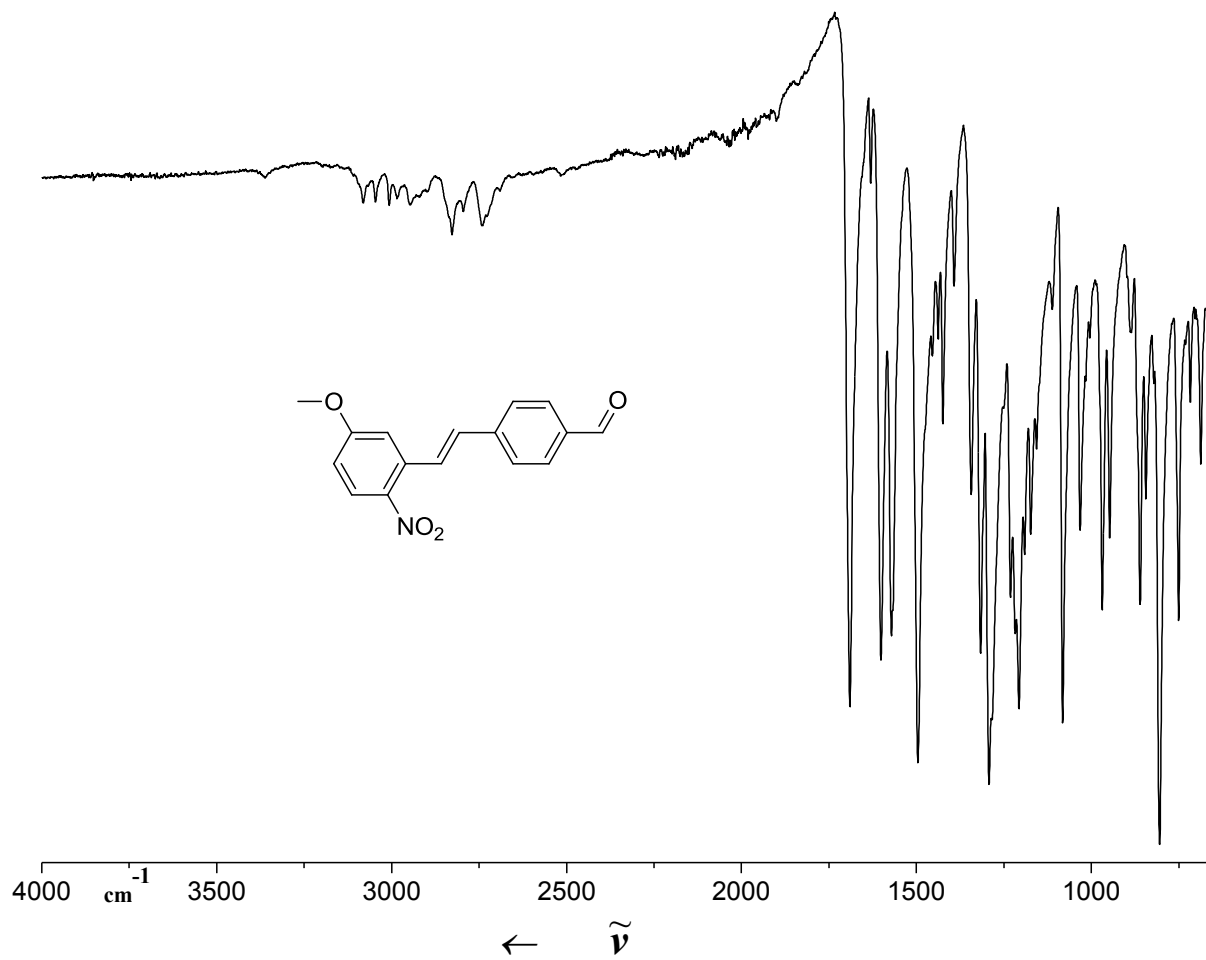


HRMS (EI): m/z [M] $^+$ berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_4$: 283.0845; gefunden: 283.0846.

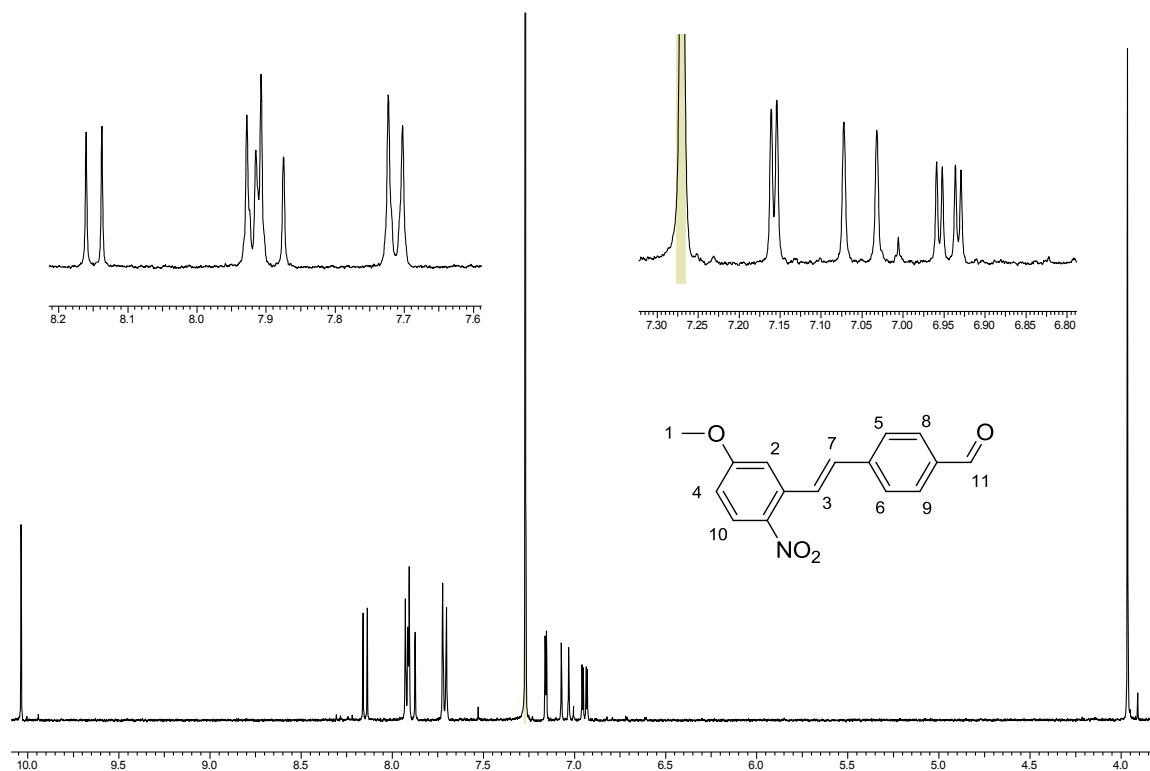
A11 (E)-4-(3-Methoxy-2-nitrostyryl)benzaldehyd (16b)

Gelber Feststoff; Smp.: 155-157 °C; $R_f = 0.32$ (PE 40/60 – EtOAc, 4:1).

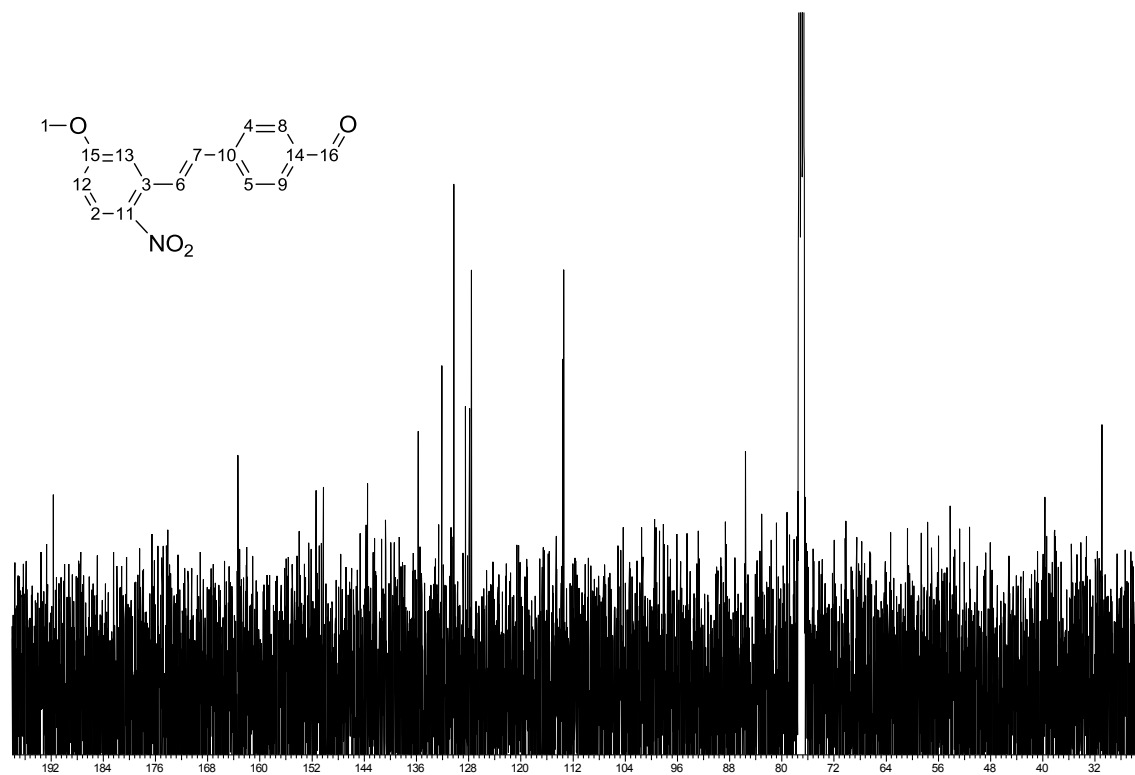
IR (ATR): 3082 (w), 3007 (w), 2826 (w), 2742 (w), 1690 (m), 1602 (m), 1295 (s), 1209 (s) cm^{-1} .



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.97$ (s, 3 H, H_1), 6.94 (dd, $J = 9.2$ Hz, 2.8 Hz, 1 H, H_2), 7.05 (d, $J = 16.1$ Hz, 1 H, H_3), 7.16 (d, $J = 2.8$ Hz, 1 H, H_4), 7.71 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{5,6}$), 7.90 (d, $J = 16.1$ Hz, 1 H, H_7), 7.92 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{8,9}$), 8.15 (d, $J = 9.2$ Hz, 1 H, H_{10}), 10.04 (s, 1 H, H_{11}).



$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 31.0$ (C_1), 85.6 (C_2), 113.5 (C_3), 127.6 ($\text{C}_{4,5}$), 127.9 (C_6), 128.5 (C_7), 130.3 ($\text{C}_{8,9}$), 132.1 (C_{10}), 135.8 (C_{11}), 143.5 (C_{12}), 150.3 (C_{13}), 151.4 (C_{14}), 163.4 (C_{15}), 191.6 (C_{16}).

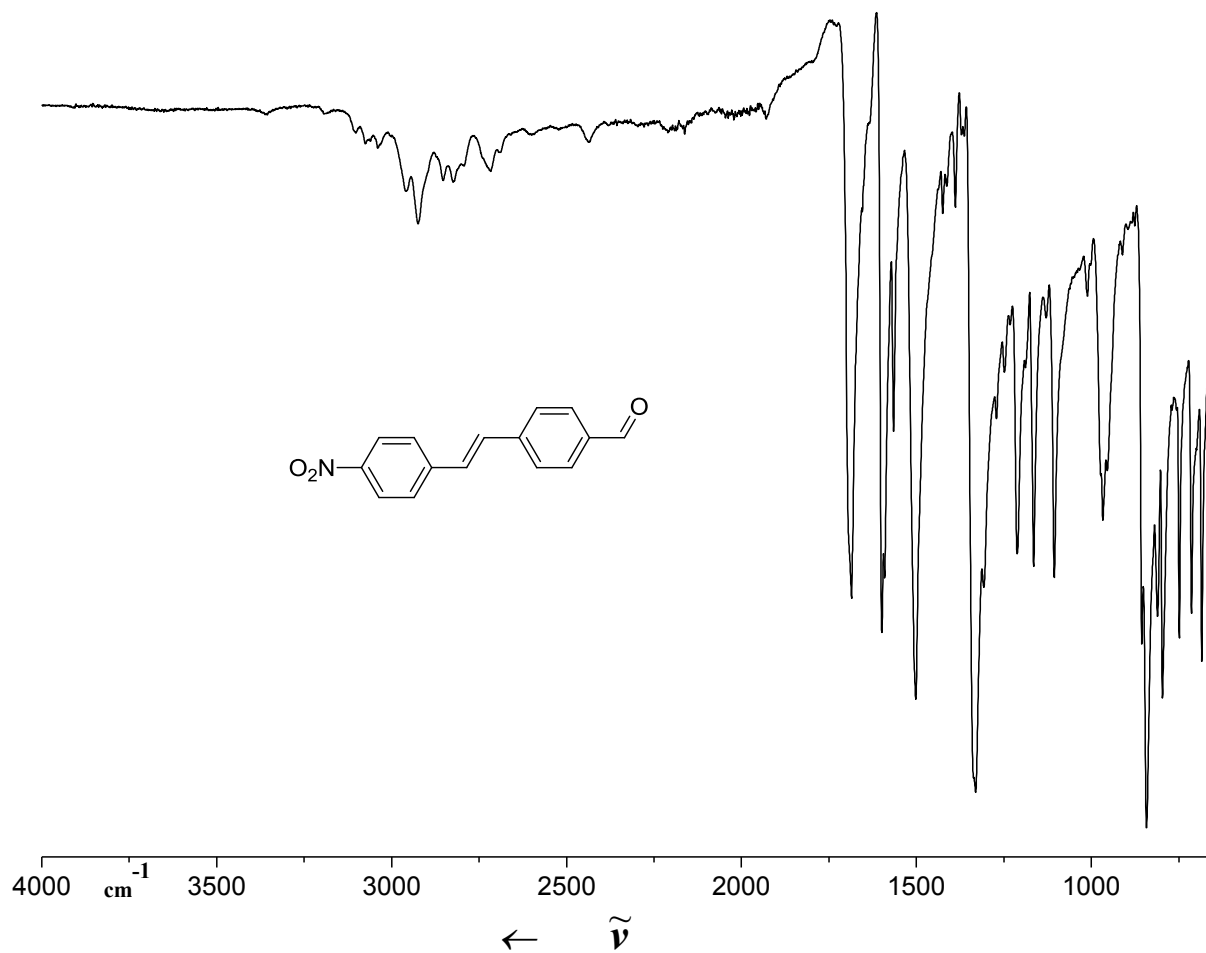


HRMS (EI): m/z [$\text{M}]^+$ berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_4$: 283.0845; gefunden: 283.0846.

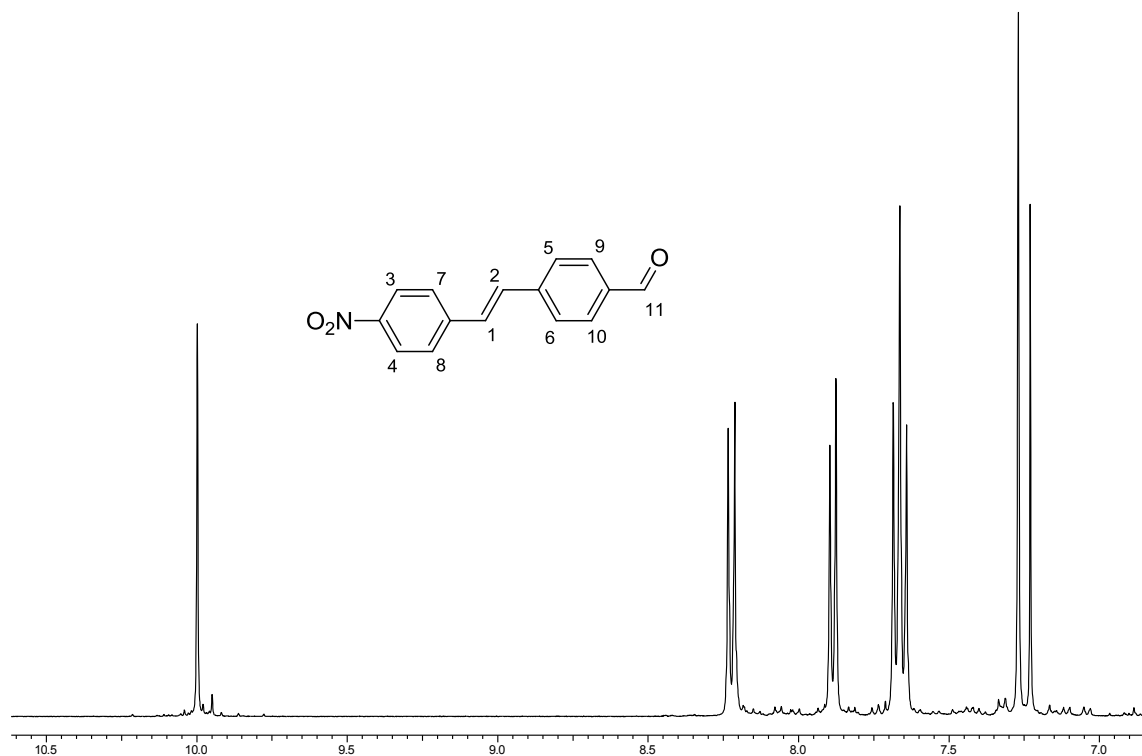
A12 (E)-4-(4-Nitrostyryl)benzaldehyd (16c)

Gelber Feststoff; Smp 212-216°C; $R_f = 0.26$ (PE 40/60 – EtOAc, 6:1).

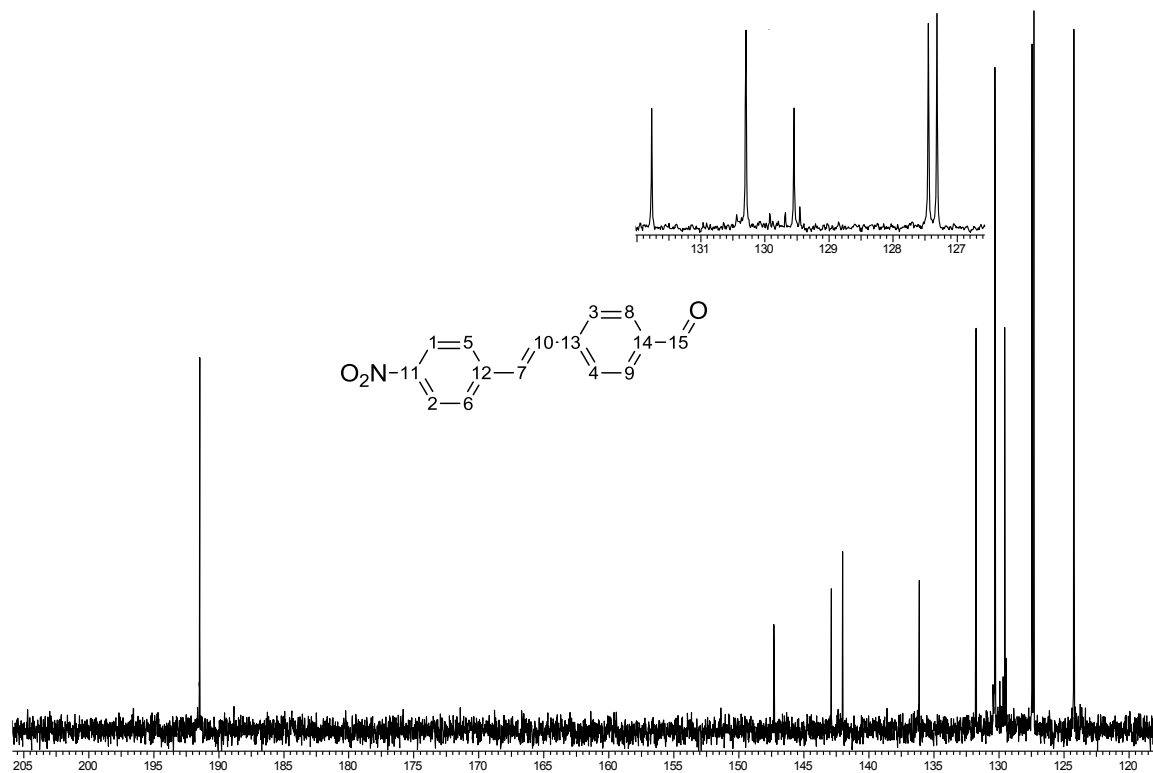
IR (ATR): 2958 (w), 2924 (w), 2822 (w), 2717 (w), 1687 (m), 1600 (m), 1501 (s), 1330 (s) cm^{-1} .



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.23$ (s, 1 H, H_1), 7.27 (s, 1 H, H_2), 7.66 (m, 4 H, $\text{H}_{3,4,5,6}$), 7.89 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, $\text{H}_{7,8}$), 8.22 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, $\text{H}_{9,10}$), 10.0 (s, 1 H, H_{11}).



$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 124.2$ ($\text{C}_{1,2}$), 127.3 ($\text{C}_{3,4}$), 127.5 ($\text{C}_{5,6}$), 129.6 (C_7), 130.3 ($\text{C}_{8,9}$), 131.8 (C_{10}), 136.1 (C_{11}), 142.0 (C_{12}), 142.9 (C_{13}), 147.3 (C_{14}), 191.5 (C_{15}).

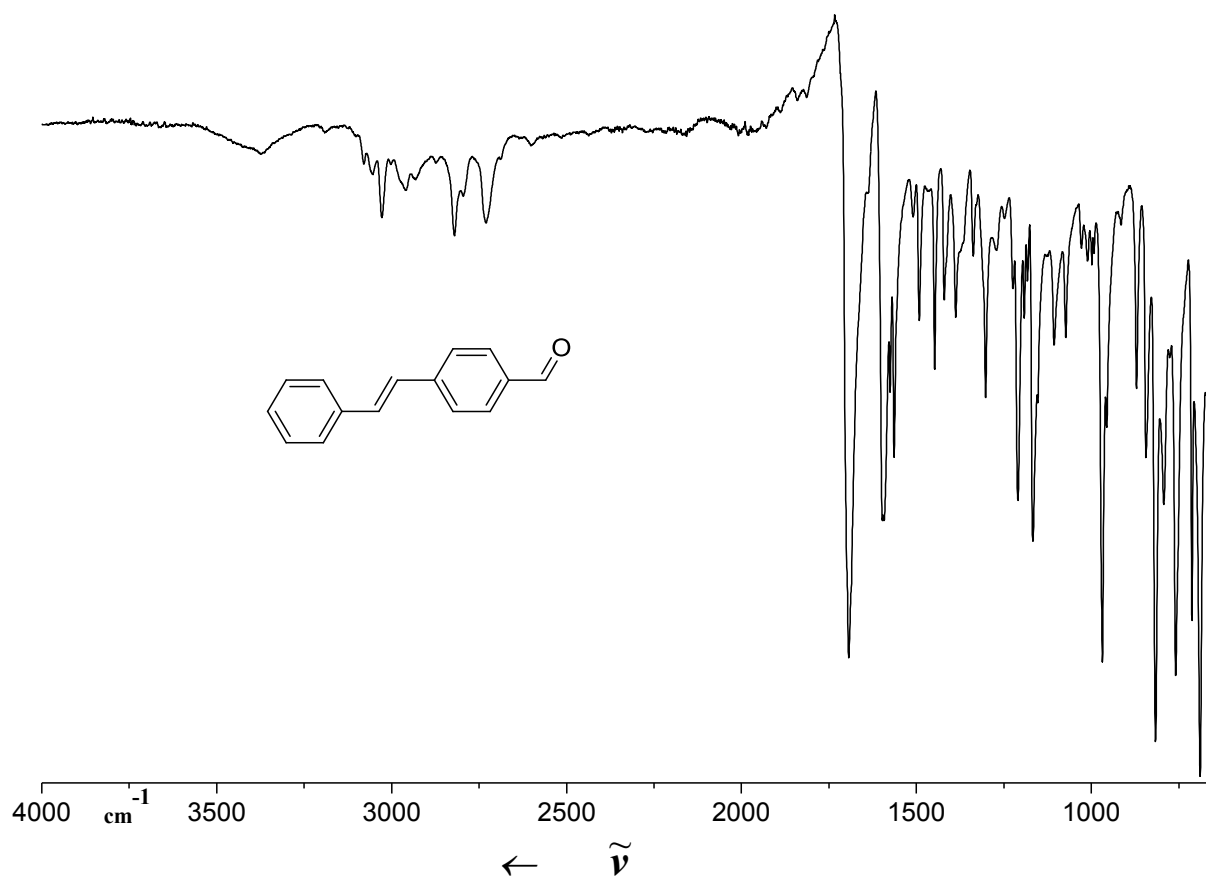


HRMS (EI): m/z [M] $^+$ berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_3$: 253.0739; gefunden: 253.0738.

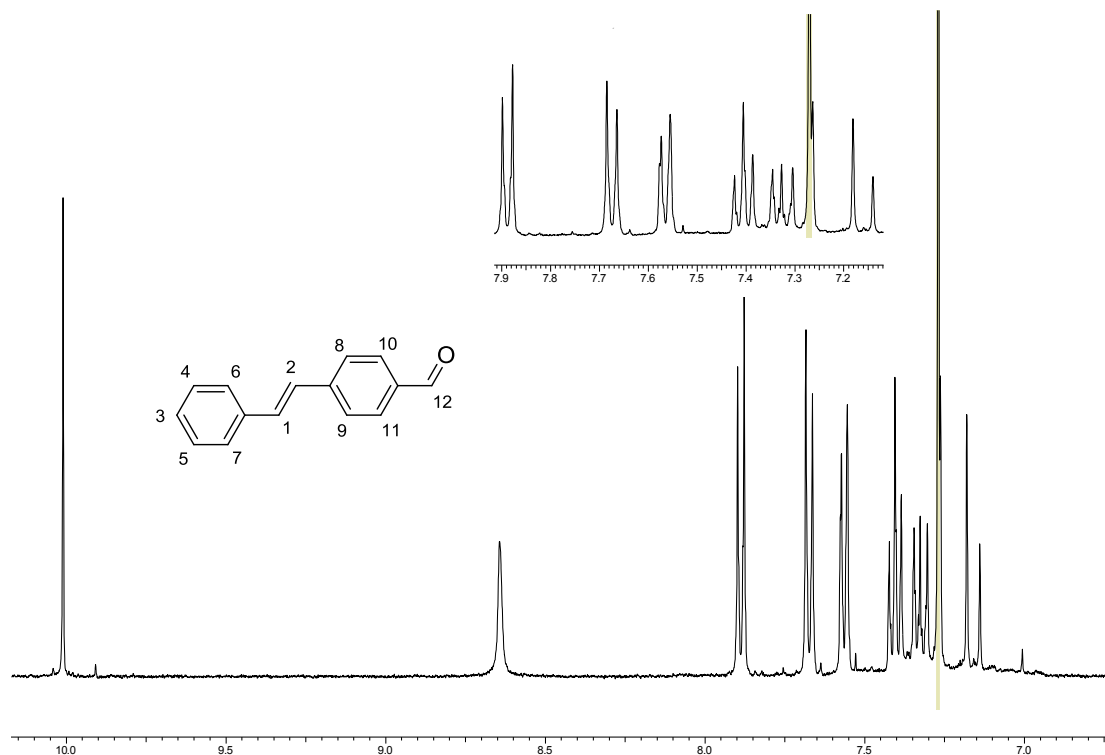
A13 (E)-4-Styrylbenzaldehyd (16d)

Weißer Feststoff; Smp.: 107-110 °C; $R_f = 0.35$ (PE 40/60 – EtOAc, 4:1).

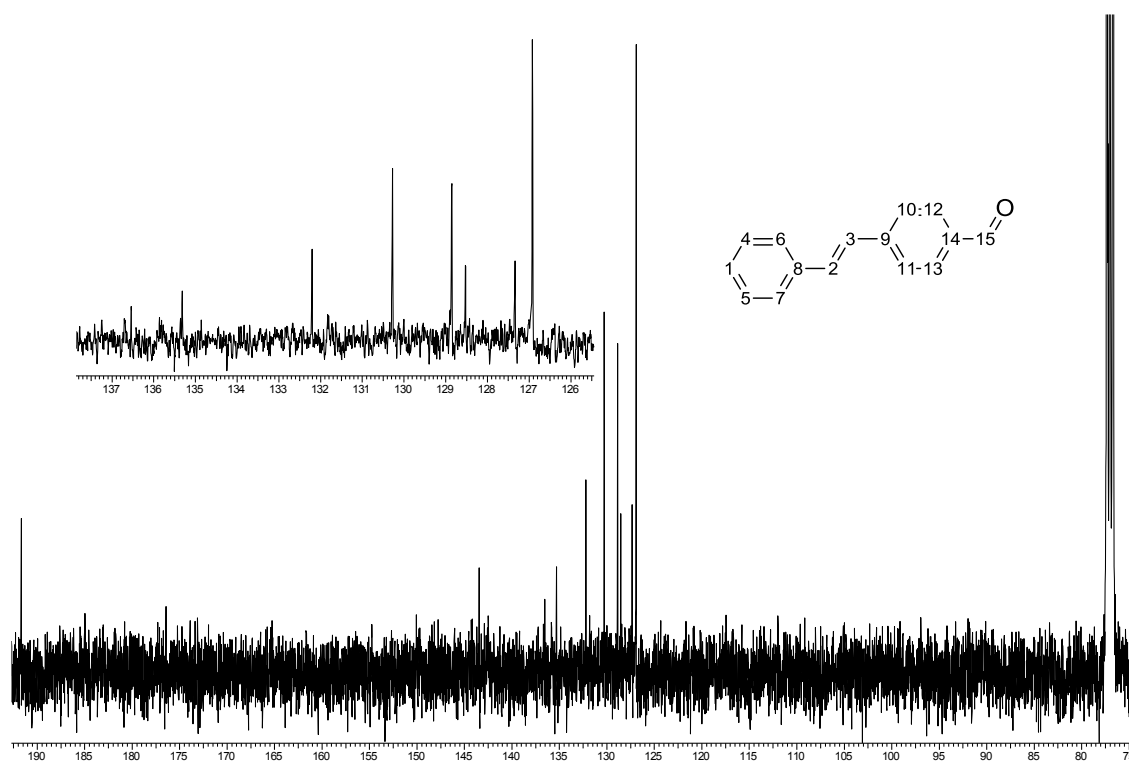
IR (ATR): 3030 (w), 2820 (w), 2724 (w), 1694 (s), 1592 (m), 964 (s) cm^{-1} .



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.16$ (d, $J = 16.2$ Hz, 1 H, H_1), 7.28 (d, $J = 16.2$ Hz, 1 H, H_2), 7.34 (m, 1 H, H_3), 7.16 (m, 2 H, $\text{H}_{4,5}$), 7.57 (m, 2 H, $\text{H}_{6,7}$), 7.67 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{8,9}$), 7.89 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{10,11}$), 10.01 (s, 1 H, H_{12}).



$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta = 126.9$ (C_1), 127.3 (C_2), 128.5 (C_3), 128.9 ($\text{C}_{4,5}$), 130.3 ($\text{C}_{6,7}$), 132.2 (C_8), 135.3 (C_9), 136.5 ($\text{C}_{10,11}$), 143.4 ($\text{C}_{12,13}$), 176.4 (C_{14}), 191.7 (C_{15}).

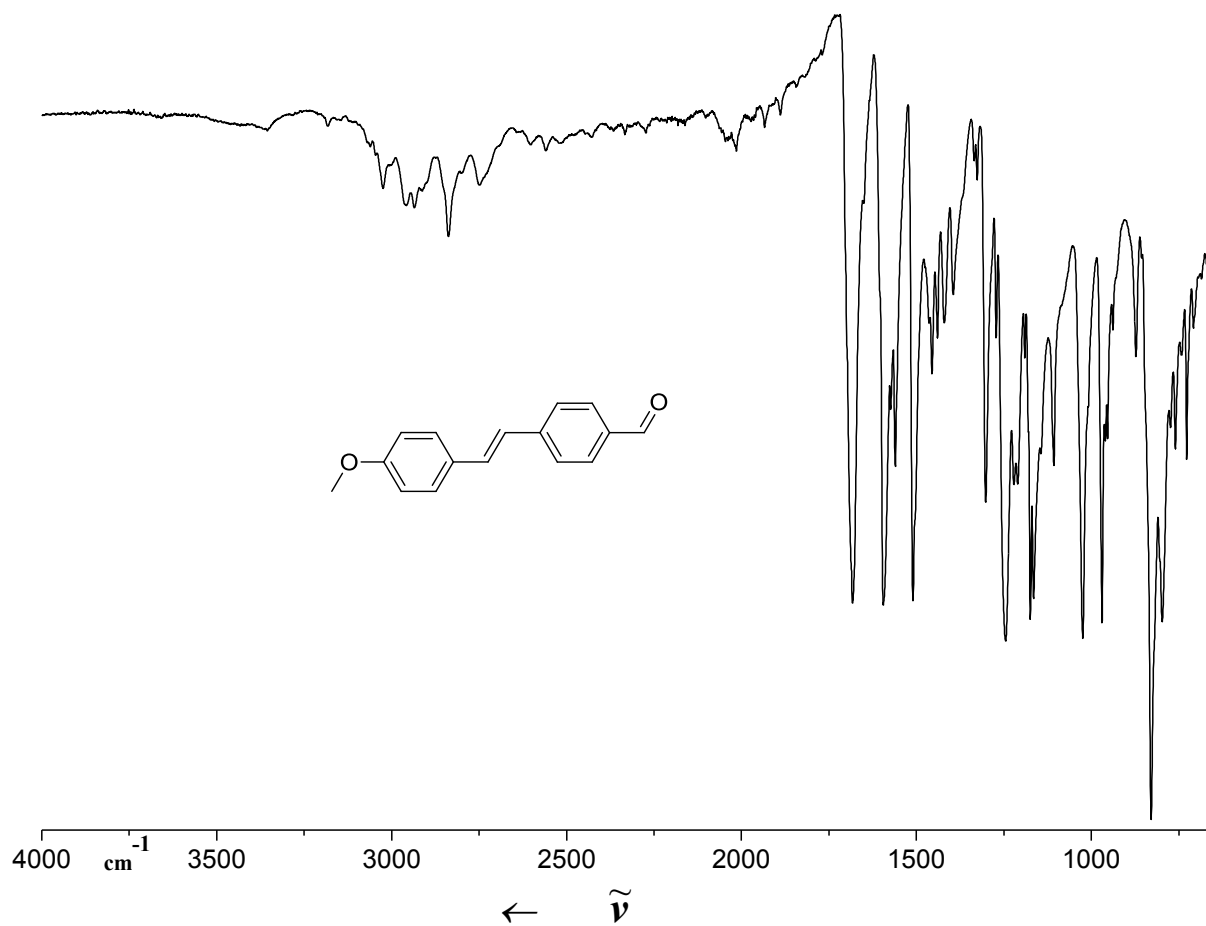


HRMS (EI): m/z [M] $^+$ berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}$: 208.0888; gefunden: 208.0890.

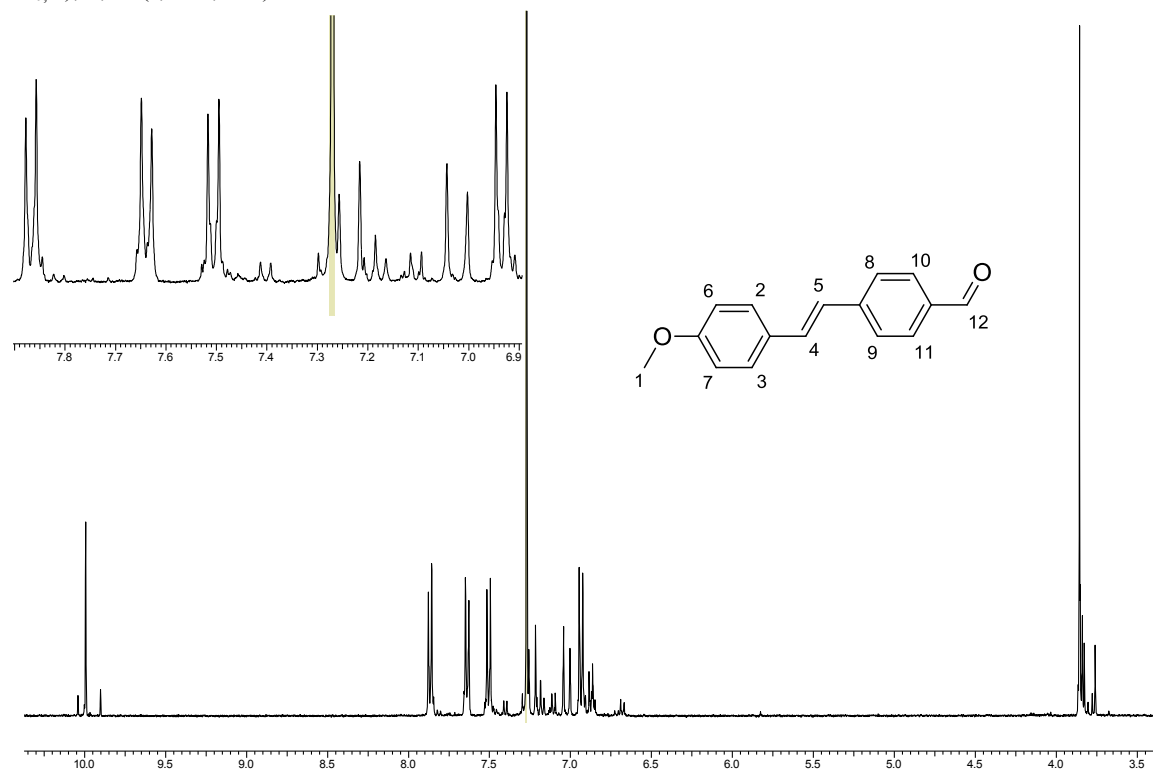
A14 (E)-4-(4-Methoxystyryl)benzaldehyd (16e)

Schwach gelber Feststoff; Smp.: 131-133 °C; $R_f = 0.31$ (PE 40/60 – EtOAc, 8:1).

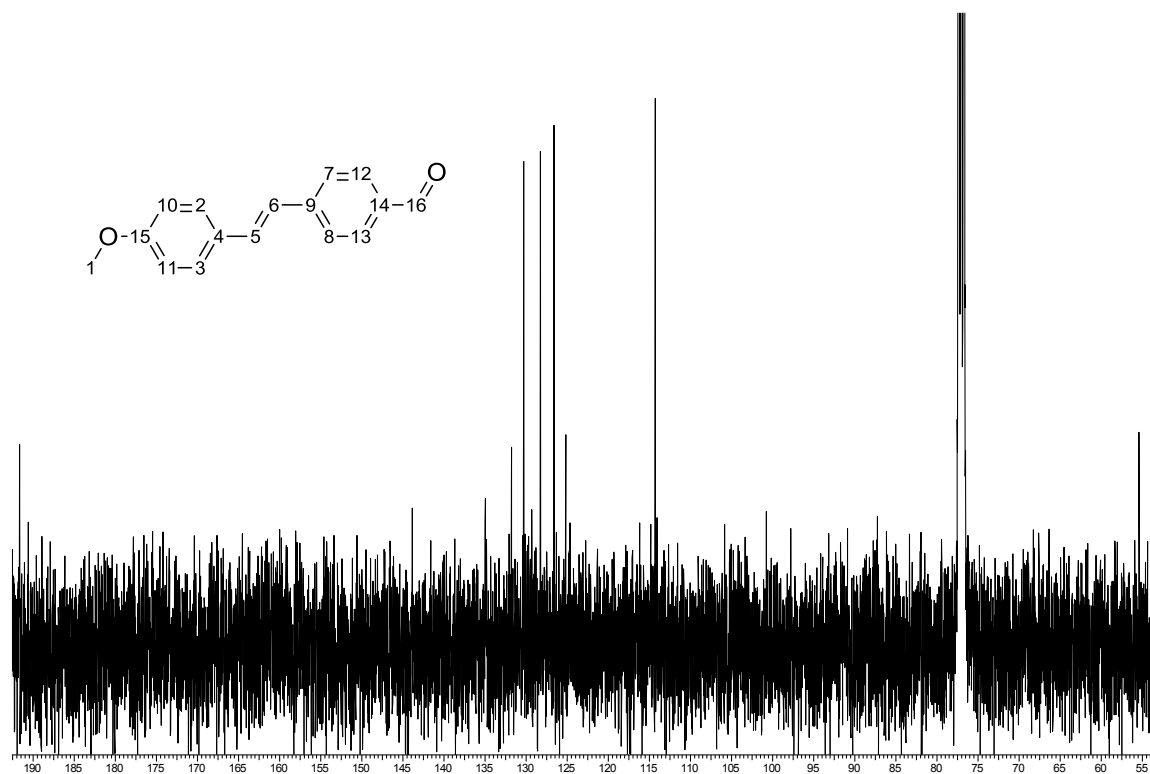
IR (ATR): 3024 (w), 2935 (w), 2837 (w), 2749 (w), 1681 (s), 1596 (s), 1508 (s), 1246 (s), 1175 (s), 1022 (s), 967 (s), 831 (s).



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.86$ (s, 3 H, H_1), 6.94 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{2,3}$), 7.02 (d, $J = 16.3$ Hz, 1 H, H_4), 7.24 (d, $J = 16.3$ Hz, 1 H, H_5), 7.51 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{6,7}$), 7.64 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H, $\text{H}_{8,9}$), 7.87 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H, $\text{H}_{10,11}$), 9.99 (s, 1 H, H_{12}).



$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 55.4$ (C_1), 114.3 ($\text{C}_{2,3}$), 125.2 (C_4), 126.3 (C_5), 126.6 (C_6), 128.3 ($\text{C}_{7,8}$), 129.3 (C_9), 130.3 ($\text{C}_{10,11}$), 131.8 ($\text{C}_{12,13}$), 135.0 (C_{14}), 143.9 (C_{15}), 191.7 (C_{16}).

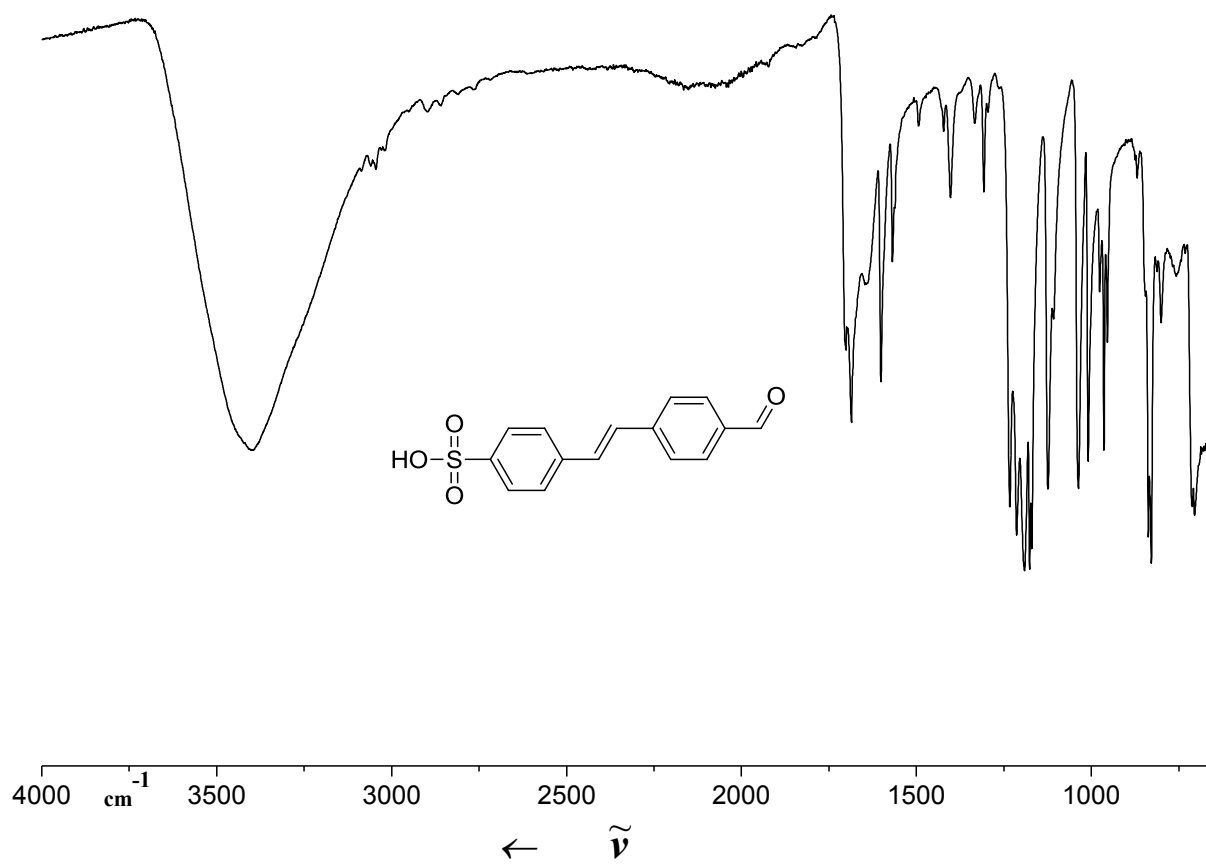


HRMS (EI): m/z [M] $^+$ berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_2$: 238.0994; gefunden: 238.1001.

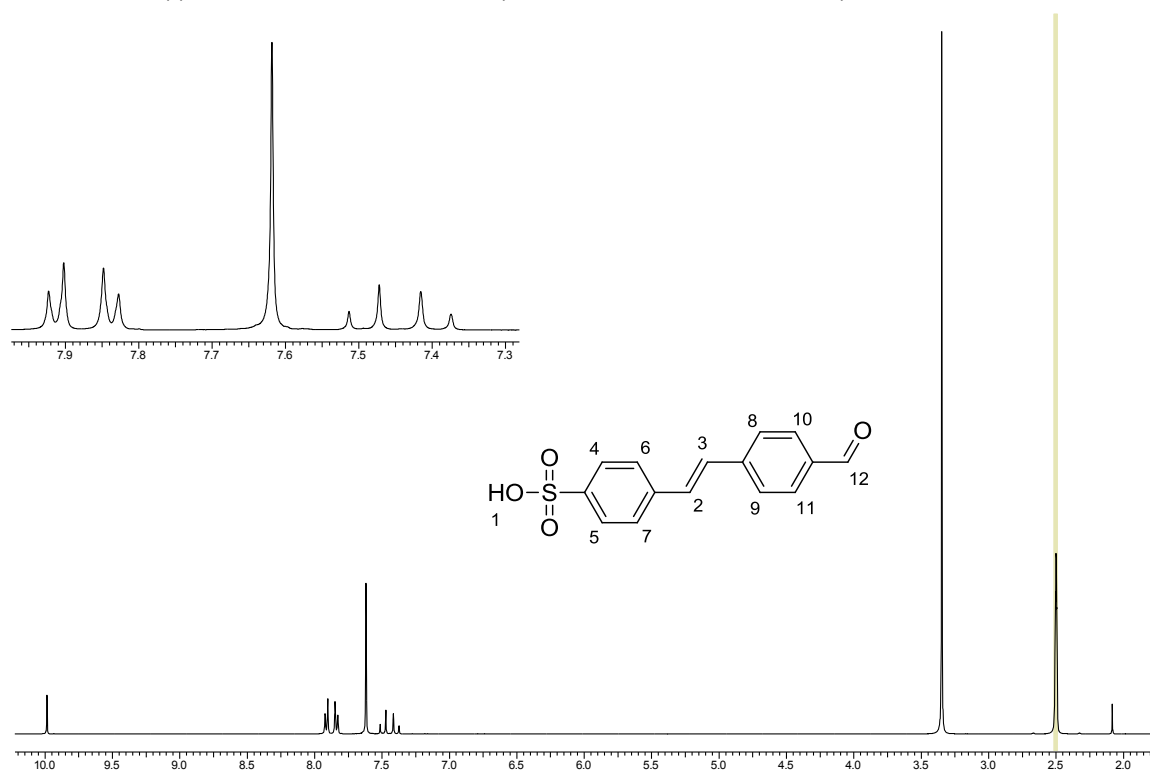
A15 (E)-4-(4-Sulfostyryl)benzaldehyd (16f)

Beiger Feststoff; Smp.: 241-243 °C.

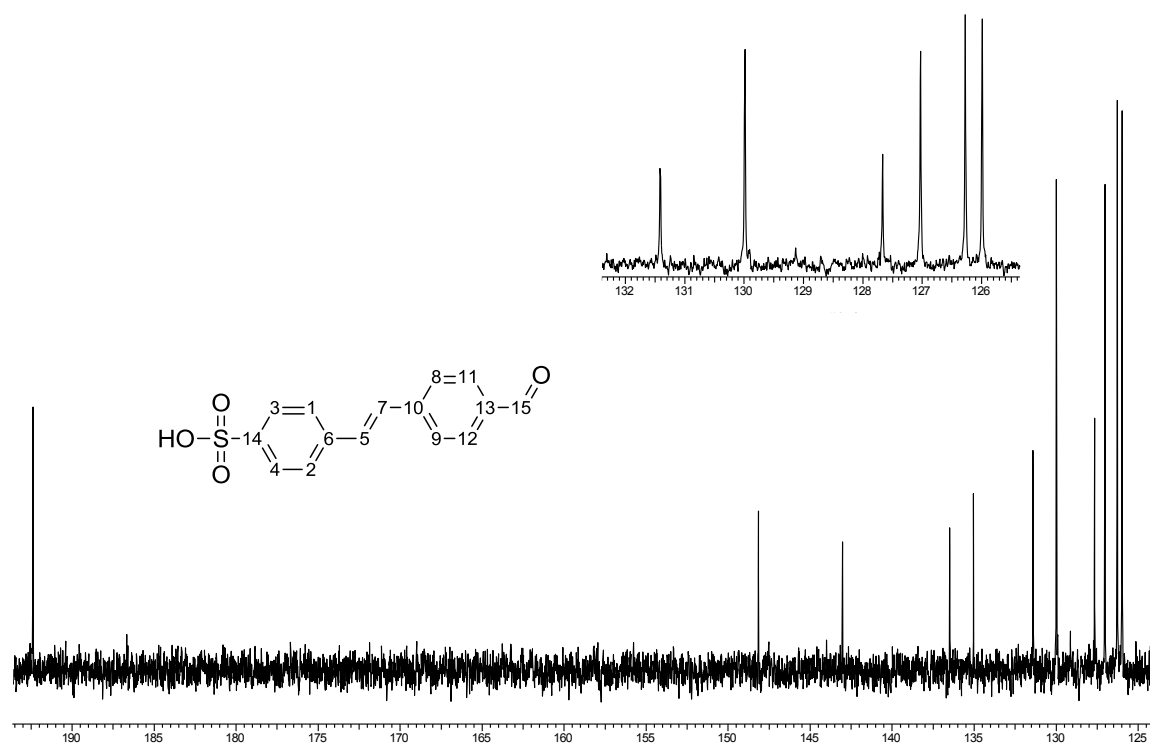
IR (ATR): 3399 (s), 3044 (w), 3018 (w), 2896 (w), 2860 (w), 1687 (s), 1606 (m), 1190 (s), 1126 (s), 1035 (s), 829 (s).



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.35$ (s, 1 H, H_1), 7.40 (d, $J = 16.1$ Hz, 1 H, H_2), 7.49 (d, $J = 16.1$ Hz, 1 H, H_3), 7.24 (br. s, 4 H, $\text{H}_{4,5,6,7}$), 7.84 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{8,9}$), 7.91 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{10,11}$), 9.99 (s, 1 H, H_{12}).



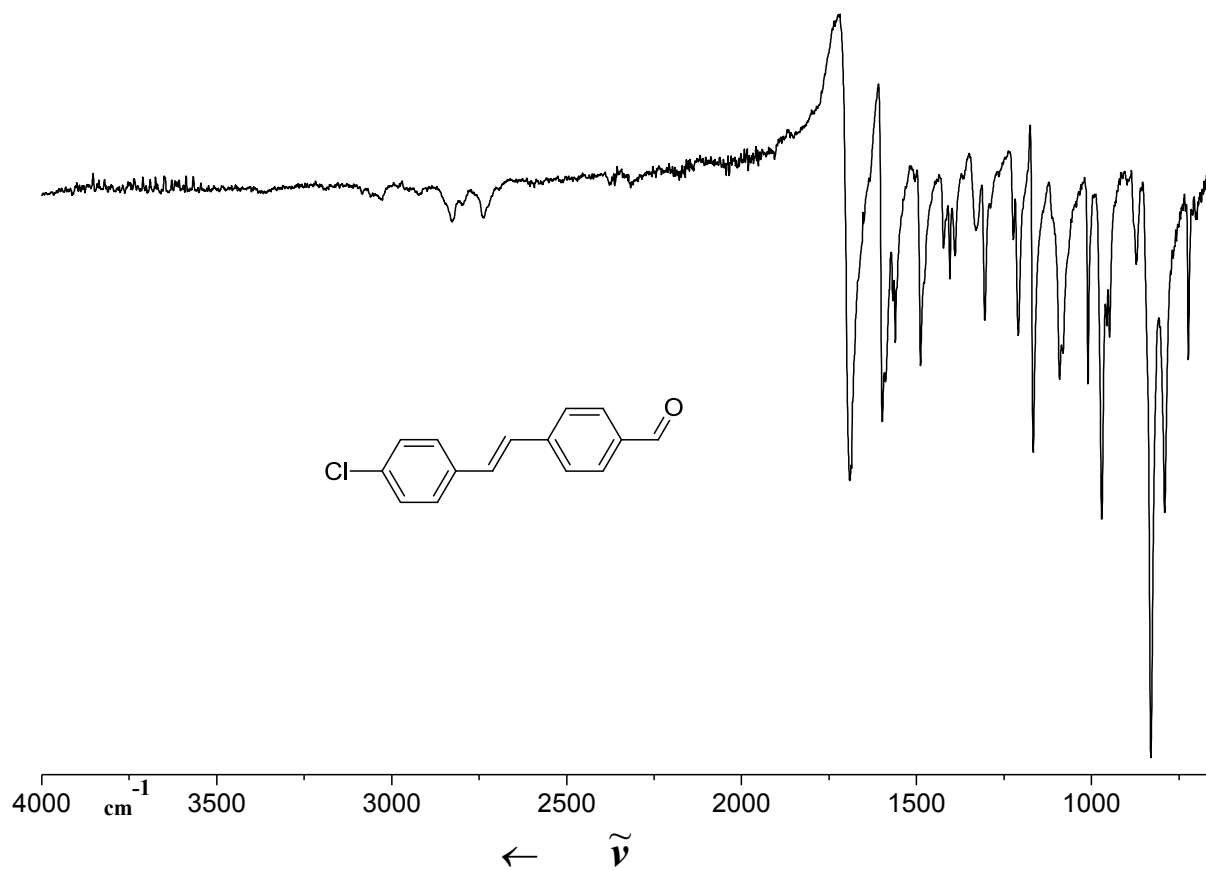
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 126.0$ ($\text{C}_{1,2}$), 126.3 ($\text{C}_{3,4}$), 127.1 (C_5), 127.7 (C_6), 130.0 (C_7), 131.5 ($\text{C}_{8,9}$), 135.1 (C_{10}), 136.5 ($\text{C}_{11,12}$), 143.1 (C_{13}), 148.2 (C_{14}), 192.4 (C_{15}).



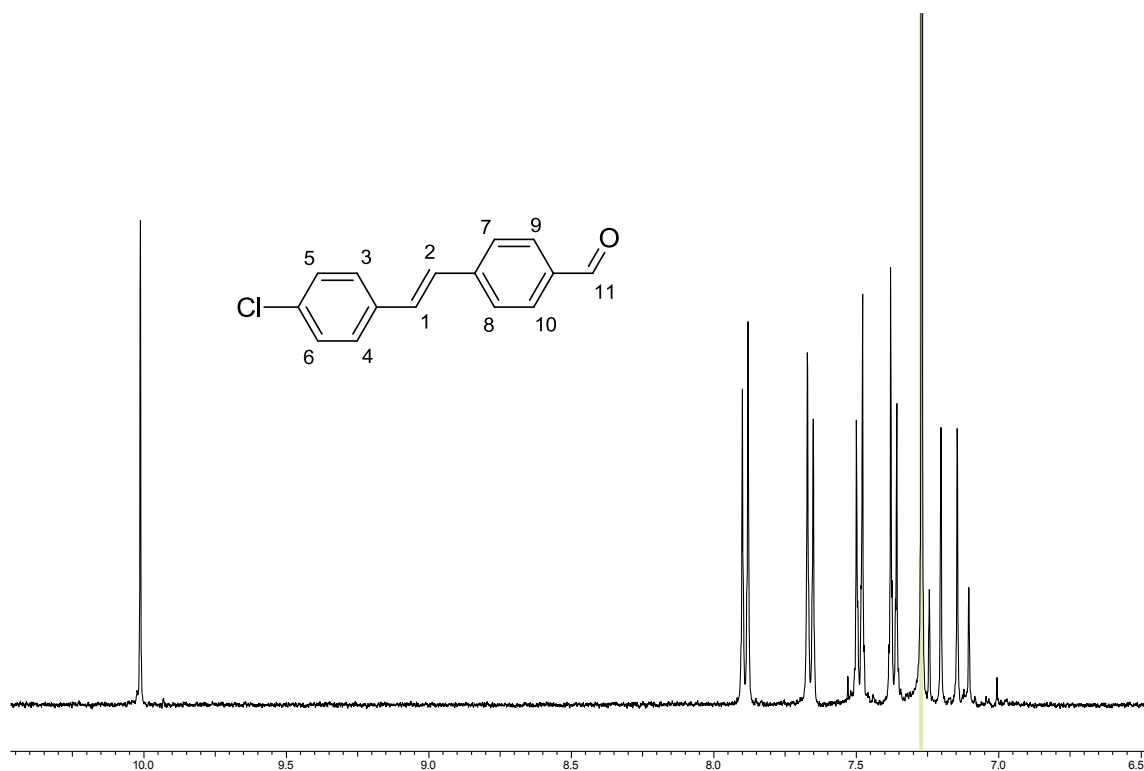
A16 (E)-4-(4-Chlorostyryl)benzaldehyd (16g)

Weißer Feststoff; Smp.: 134-137 °C; $R_f = 0.35$ (PE 40/60 – EtOAc, 5:1).

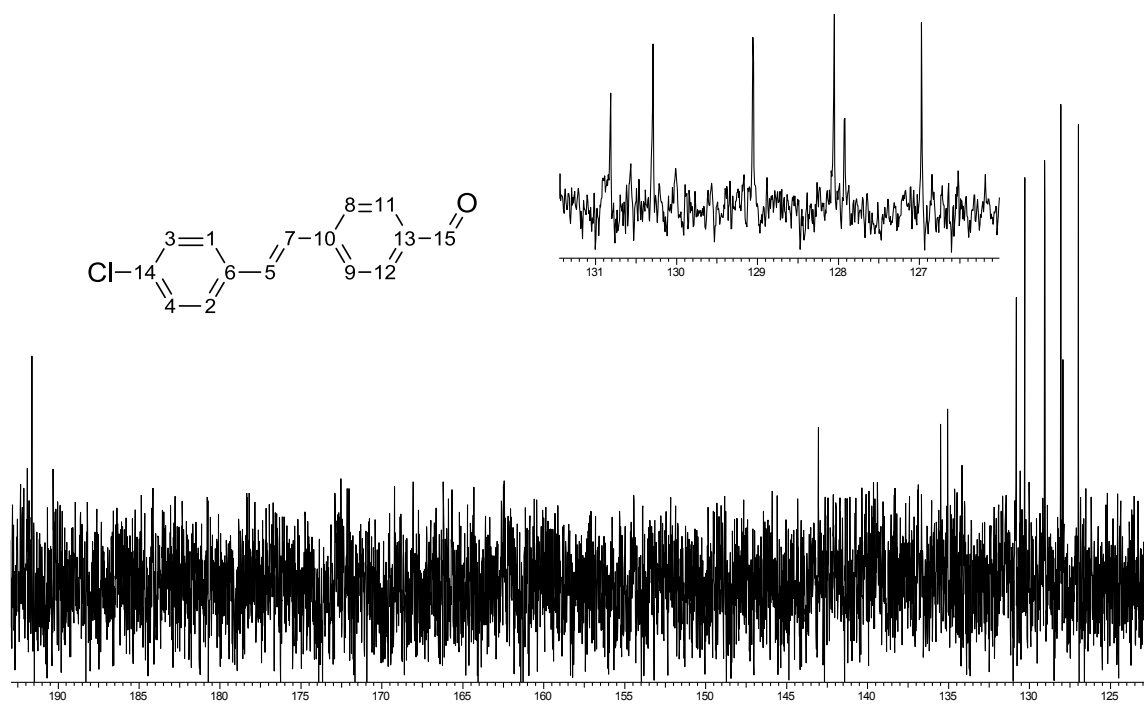
IR (ATR): 3026 (w), 2828 (w), 2737 (w), 1690 (m), 1598 (m), 1165 (m), 971 (m), 829 (s), 790 (m).



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 7.13$ (d, $J = 16.2$ Hz, 1 H, H_1), 7.22 (d, $J = 16.1$ Hz, 1 H, H_2), 7.37 (m, 2 H, $\text{H}_{3,4}$), 7.49 (m, 2 H, $\text{H}_{5,6}$), 7.66 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{7,8}$), 7.89 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{9,10}$), 10.0 (s, 1 H, H_{11}).



^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 127.0$ ($\text{C}_{1,2}$), 127.9 ($\text{C}_{3,4}$), 128.1 ($\text{C}_{5,6}$), 129.1 (C_7), 130.3 ($\text{C}_{8,9}$), 130.8 (C_{10}), 134.2 (C_{11}), 135.1 (C_{12}), 135.5 (C_{13}), 143.0 (C_{14}), 191.6 (C_{15}).

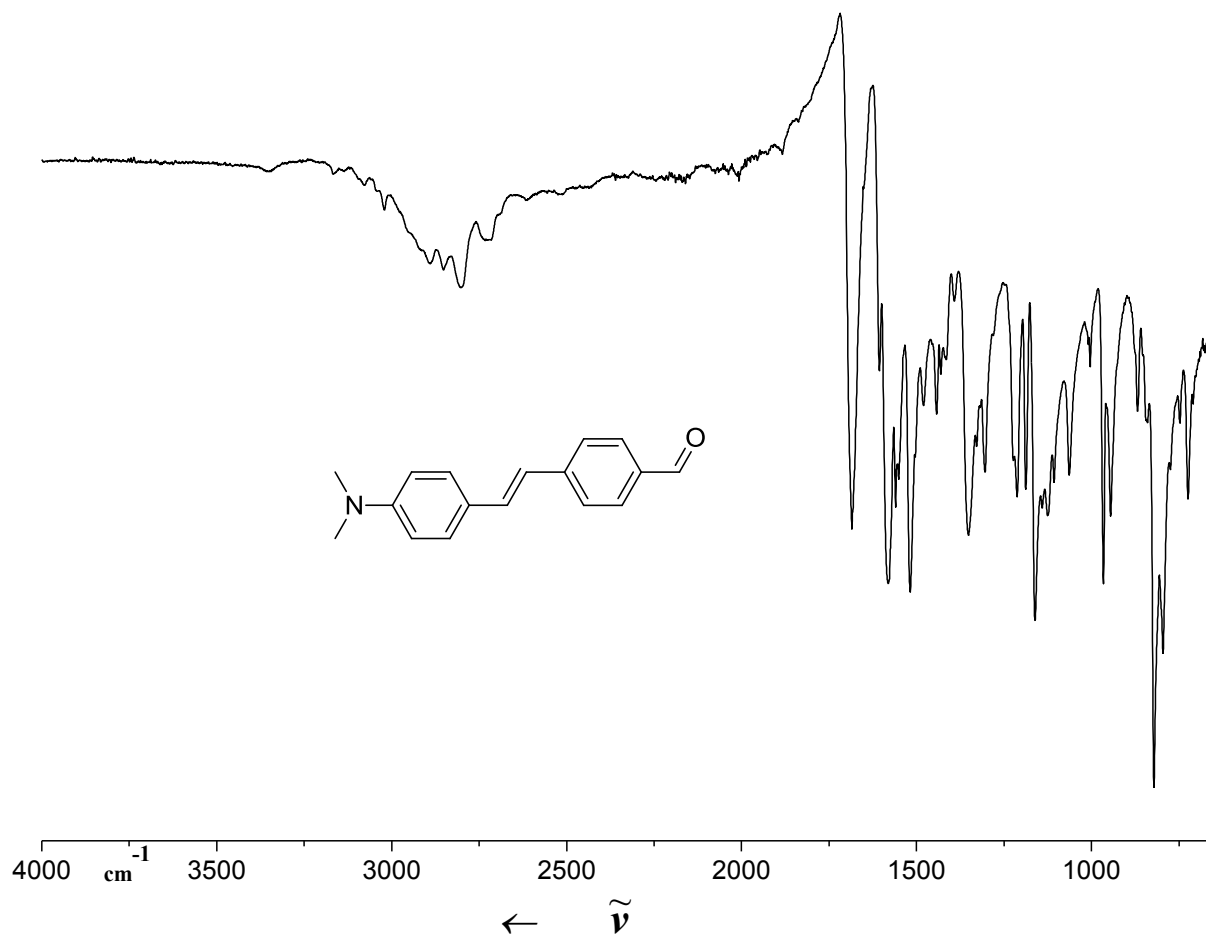


HRMS (EI): m/z [M] $^+$ berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClO}$: 242.0498; gefunden: 242.0496.

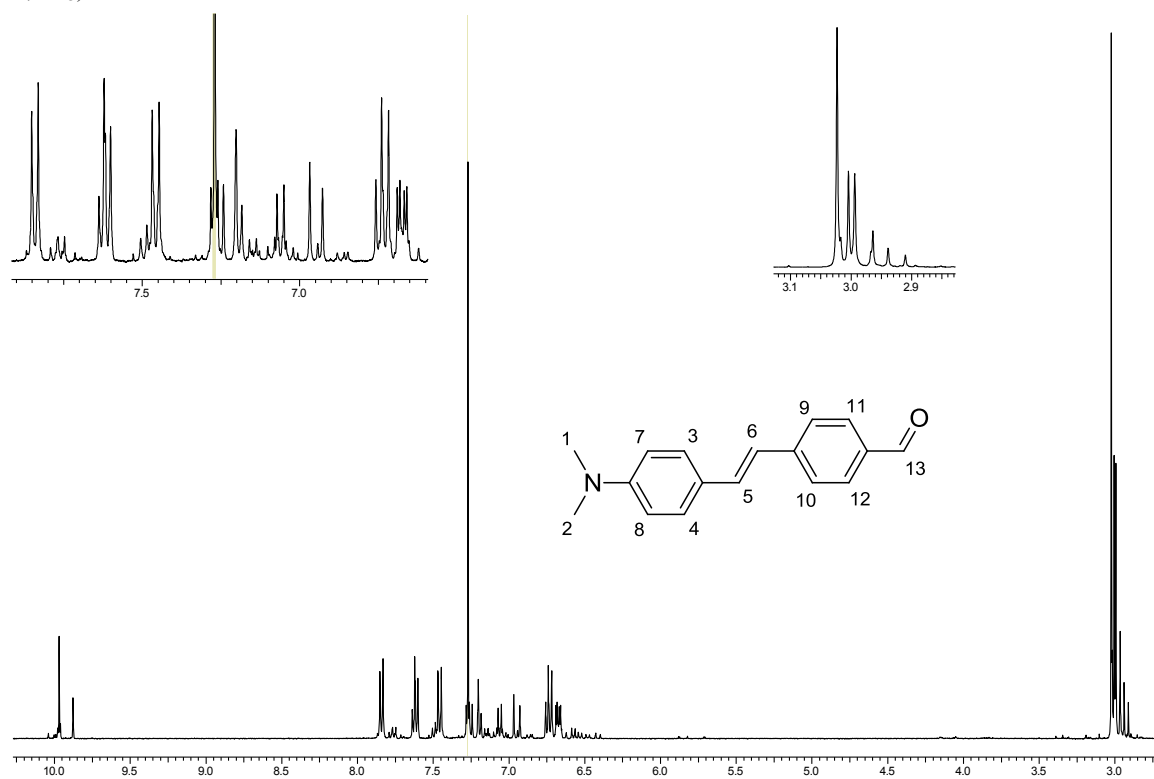
A17 (E)-4-(4-Dimethylaminostyryl)benzaldehyd (16h)

Dunkelgelber Feststoff; Smp.: 212-214 °C; $R_f = 0.29$ (PE 40/60 – EtOAc, 8:1).

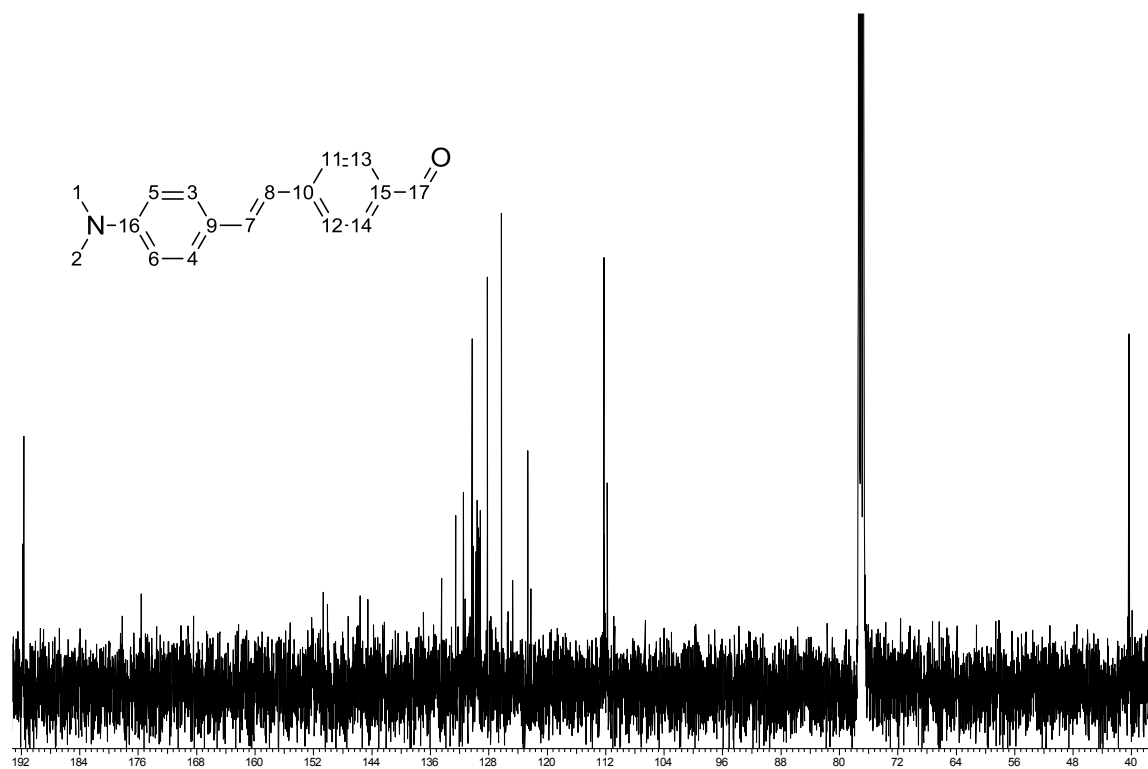
IR (ATR): 3021 (w), 2892 (w), 2851 (w), 2803 (w), 1686 (m), 1584 (m), 1352 (m), 1162 (m), 967 (m), 820 (s).



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.02$ (s, 6 H, $\text{H}_{1,2}$), 6.73 (m, 2 H, $\text{H}_{3,4}$), 6.95 (d, $J = 16.1$ Hz, 1 H, H_5), 7.22 (d, $J = 16.1$ Hz, 1 H, H_6), 7.46 (m, 2 H, $\text{H}_{7,8}$), 7.61 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{9,10}$), 7.84 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{11,12}$), 9.97 (s, 1 H, H_{13}).



^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 40.4$ ($\text{C}_{1,2}$), 112.24 ($\text{C}_{3,4}$), 122.7 ($\text{C}_{5,6}$), 126.3 (C_7), 128.2 (C_8), 129.2 (C_9), 129.6 (C_{10}), 130.3 ($\text{C}_{11,12}$), 131.5 ($\text{C}_{13,14}$), 132.5 (C_{15}), 134.5 (C_{16}), 191.7 (C_{17}).

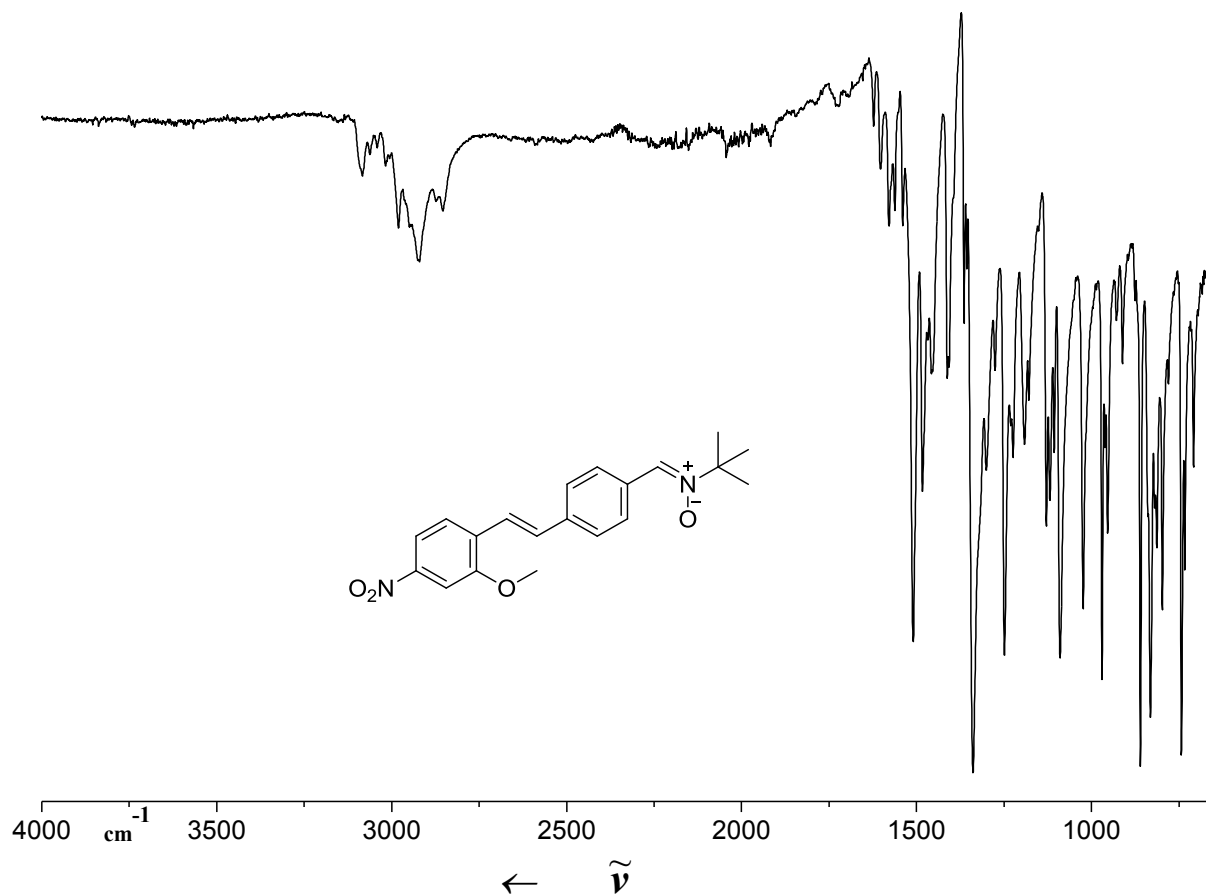


HRMS (EI): m/z [M] $^+$ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}$: 251.1310; found: 251.1315.

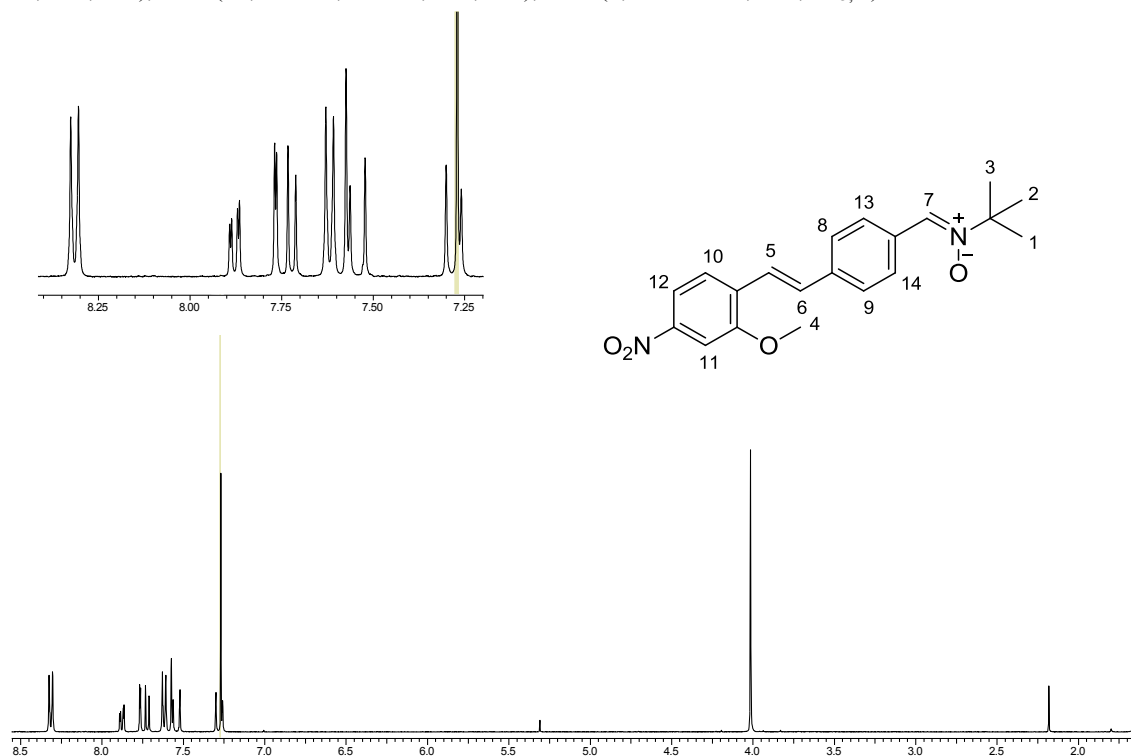
A18 (Z)-N-(4-((E)-2-Methoxy-4-nitrostyryl)benzyliden)-2-methyl-propan-2-aminoxid (17a)

Gelber Feststoff; Smp 203-206 °C.

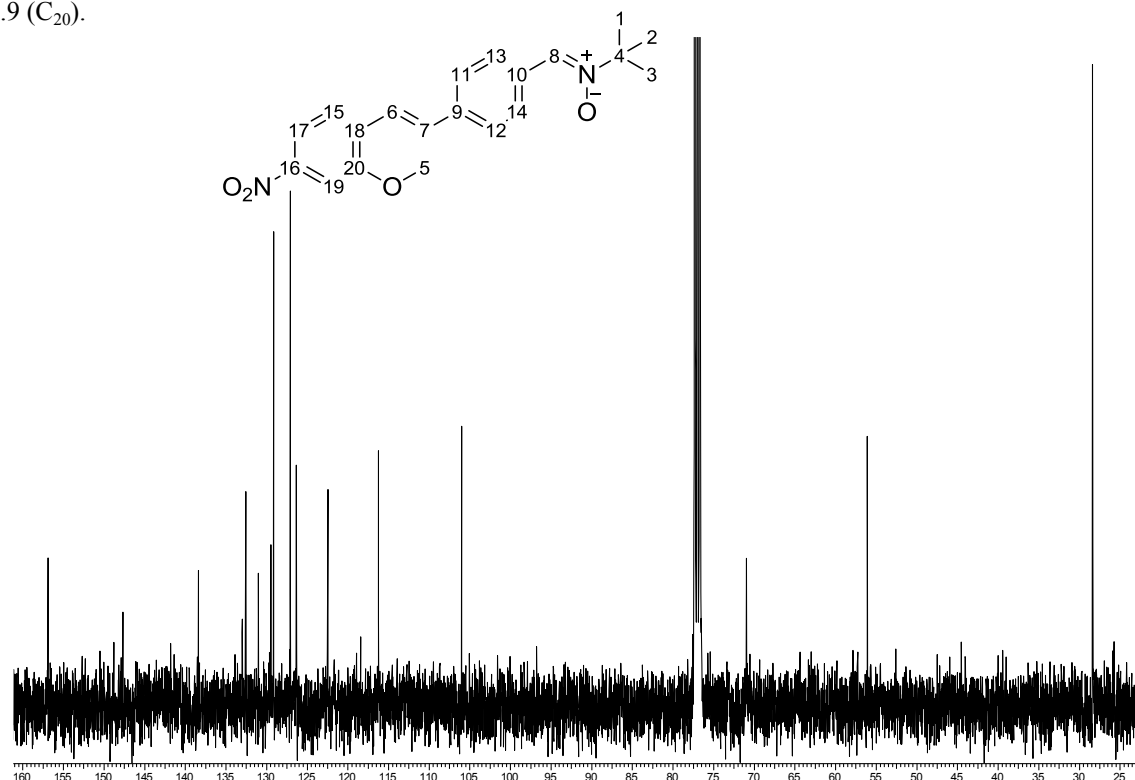
IR (ATR): 3083 (w), 2981 (w), 2921 (w), 2853 (w), 1510 (m), 1340 (s), 1248 (m), 1089 (m), 969 (m), 860 (s), 831 (m).



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.02$ (s, 9 H, $\text{H}_{1,2,3}$), 4.01 (s, 3 H, H_4), 7.28 (d, $J = 16.6$ Hz, 1 H, H_5), 7.54 (d, $J = 16.6$ Hz, 1 H, H_6), 7.57 (s, 1 H, H_7), 7.62 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, $\text{H}_{8,9}$), 7.72 (d, $J = 8.5$ Hz, 1 H, H_{10}), 7.77 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, H_{11}), 7.88 (dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz, 1 H, H_{12}), 8.31 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, $\text{H}_{13,14}$).



^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 28.4$ ($\text{C}_{1,2,3}$), 56.1 (C_4), 71.0 (C_5), 106.0 (C_6), 116.2 (C_7), 118.4 (C_8), 122.5 (C_9), 126.3 (C_{10}), 127.1 ($\text{C}_{11,12}$), 129.1 ($\text{C}_{13,14}$), 129.5 (C_{15}), 131.0 (C_{16}), 132.6 (C_{17}), 138.4 (C_{18}), 147.7 (C_{19}), 156.9 (C_{20}).



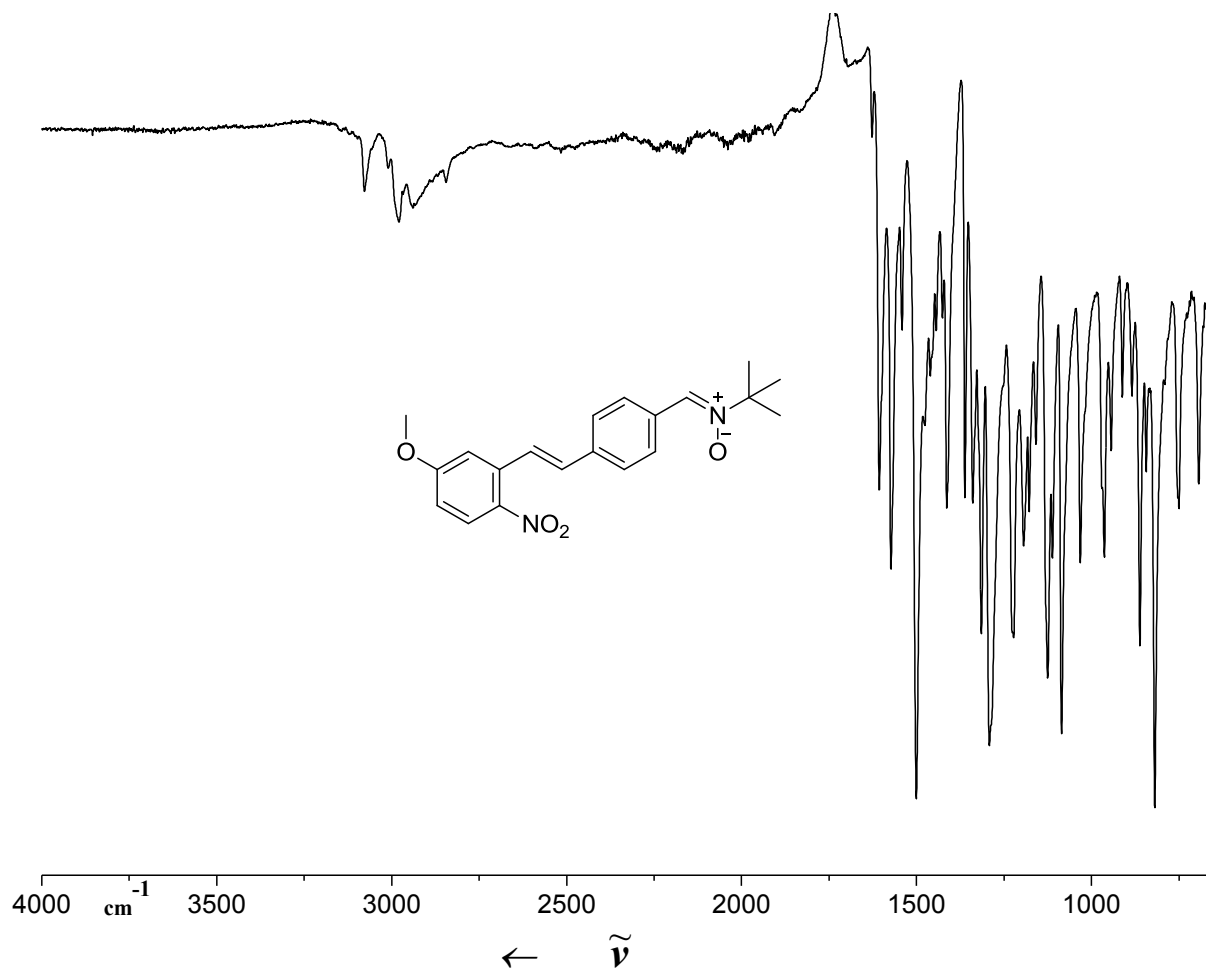
HRMS (EI): m/z [M] $^+$ calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$: 354.1580; found: 354.1578.

UV/Vis (EtOAc): λ_{max} (ϵ) = 261 (3070), 326 (6940), 395 (13910) nm.

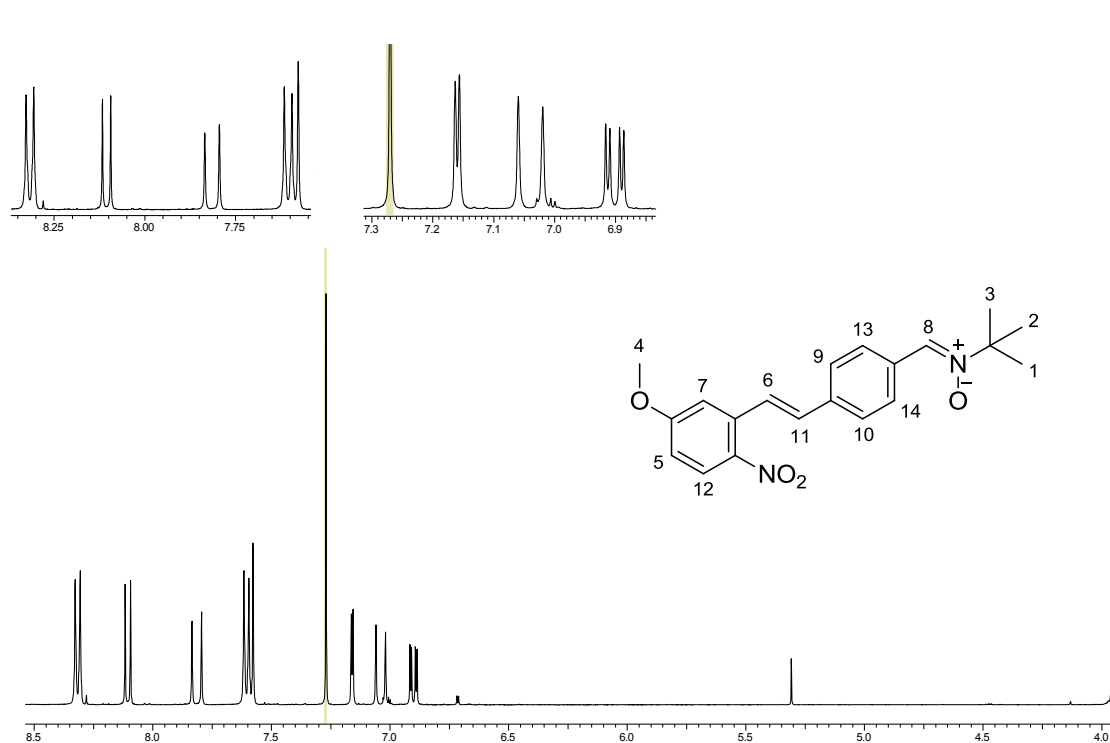
A19 (Z)-N-(4-((E)-3-Methoxy-2-nitrostyryl)benzyliden)-2-methyl-propan-2-aminoxid (17b)

Gelber Feststoff; Smp.: 137-139 °C.

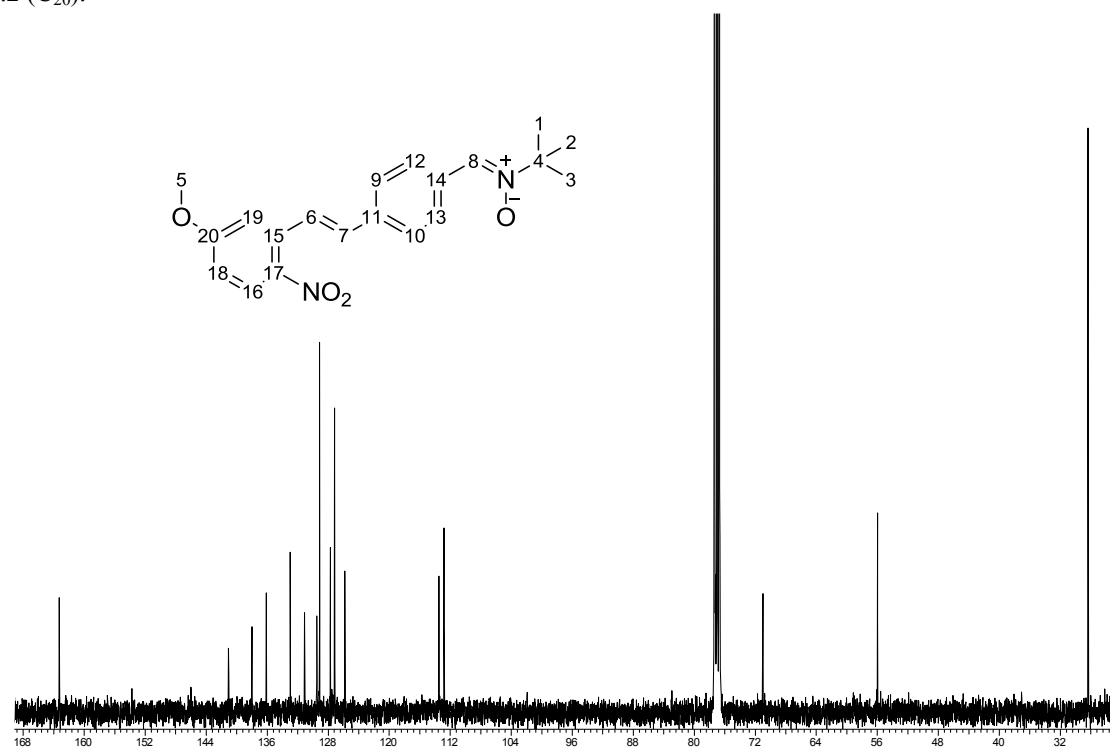
IR (ATR): 3077 (w), 2980 (w), 2937 (w), 2845 (w), 1501 (s), 1293 (s), 1126 (m), 1086 (s), 863 (m), 831 (s).



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.64$ (s, 9 H, $\text{H}_{1,2,3}$), 3.95 (s, 3 H, H_4), 6.90 (dd, $J = 9.2, 2.8$ Hz, 1 H, H_5), 7.04 (d, $J = 16.4$ Hz, 1 H, H_6), 7.16 (d, $J = 2.8$ Hz, 1 H, H_7), 7.58 (s, 1 H, H_8), 7.72 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, $\text{H}_{9,10}$), 7.61 (d, $J = 16.4$ Hz, 1 H, H_{11}), 7.88 (d, $J = 9.2$ Hz, 1 H, H_{12}), 8.32 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, $\text{H}_{13,14}$).



$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 28.4$ ($\text{C}_{1,2,3}$), 56.0 (C_4), 71.0 (C_5), 112.8 (C_6), 113.5 (C_7), 125.8 (C_8), 127.1 ($\text{C}_{9,10}$), 127.7 (C_{11}), 129.1 ($\text{C}_{12,13}$), 129.5 (C_{14}), 131.1 (C_{15}), 133.0 (C_{16}), 136.9 (C_{17}), 138.0 (C_{18}), 141.0 (C_{19}), 163.2 (C_{20}).

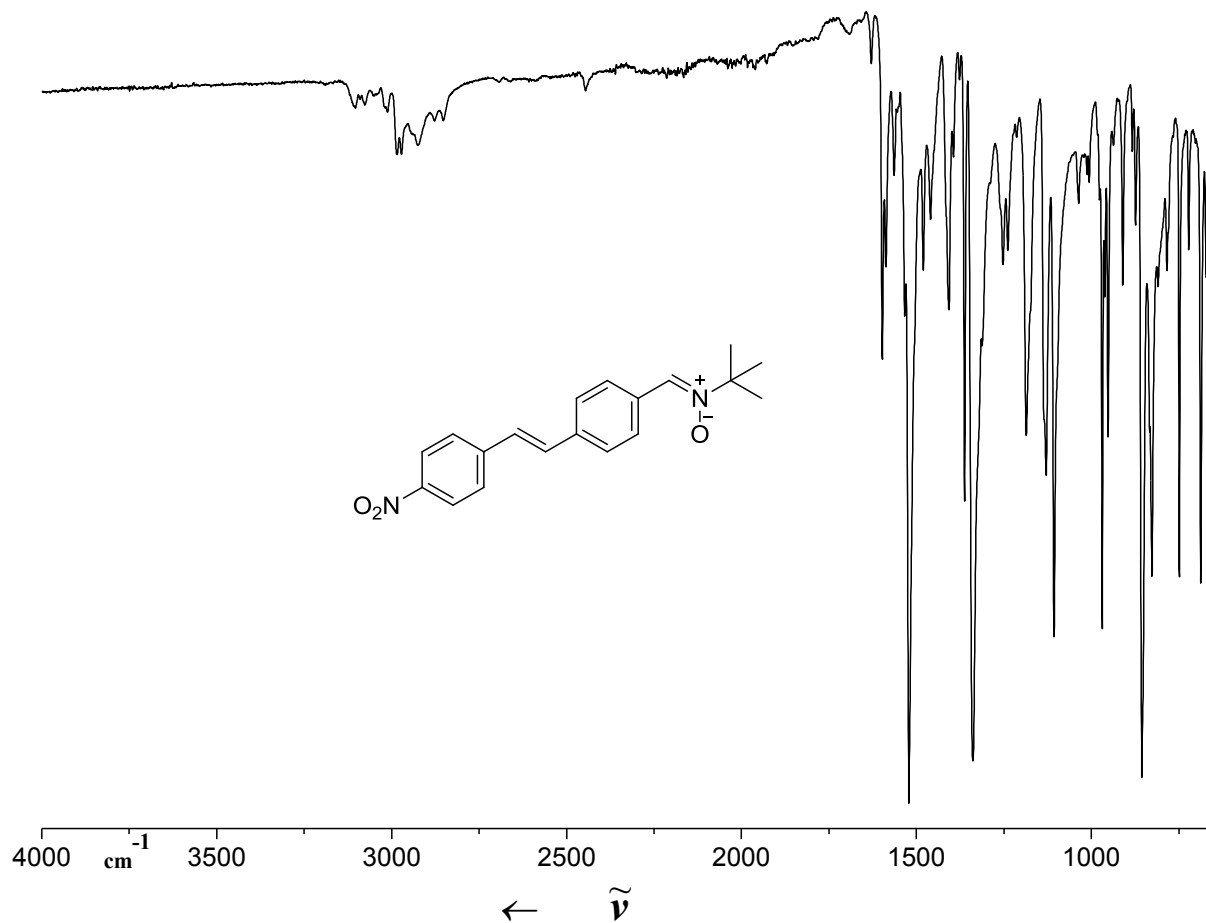


HRMS (EI): m/z [M] $^+$ berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$: 354.1580; gefunden: 354.1575.

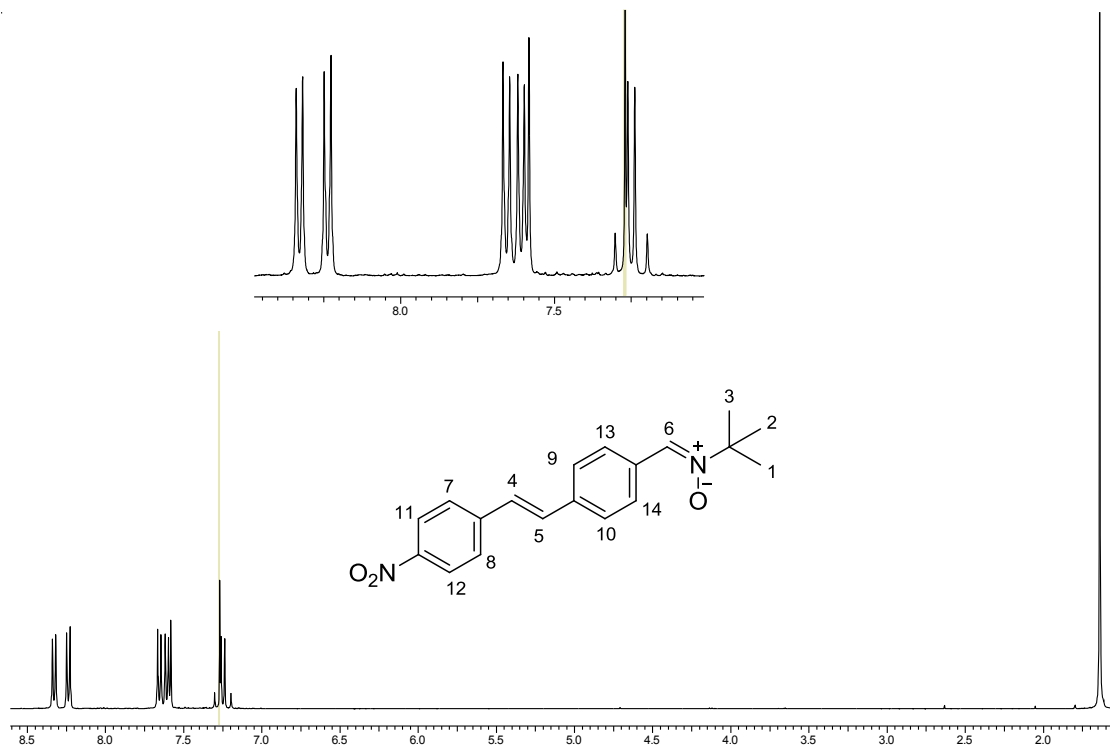
UV/Vis (EtOAc): λ_{max} (ϵ) = 326 (6554), 363 (5637) nm.

A20 (Z)-2-Methyl-N-(4-((E)-4-nitrostyryl)benzylidene)propan-2-amin-oxid (17c)Gelber Feststoff; Smp.: 204-207 °C, $R_f = 0.35$ (PE 40/60 – EtOAc – Triethylamine, 1:2:0.01).

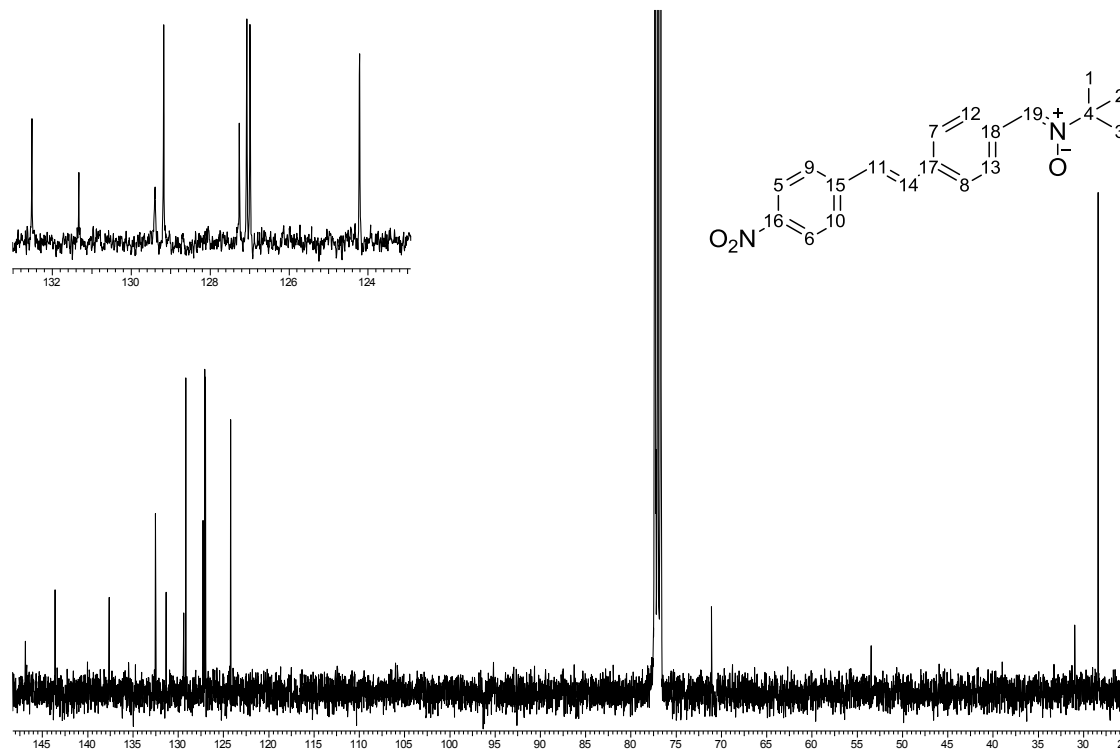
IR (ATR): 3102 (w), 2983 (w), 2925 (w), 2854 (w), 1522 (s), 1338 (s), 1107 (m), 964 (m), 861 (s).



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.64$ (s, 9 H, $\text{H}_{1,2,3}$), 7.22 (d, $J = 16.5$ Hz, 1 H, H_4), 7.28 (d, $J = 16.5$ Hz, 1 H, H_5), 7.58 (s, 1 H, H_6), 7.61 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, $\text{H}_{7,8}$), 7.66 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H, $\text{H}_{9,10}$), 8.24 (d, $J = 8.8$ Hz, 2 H, $\text{H}_{11,12}$), 8.33 (d, $J = 8.6$ Hz, 2 H, $\text{H}_{13,14}$).



^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 28.4$ ($\text{C}_{1,2,3}$), 71.1 (C_4), 124.2 ($\text{C}_{5,6}$), 127.0 ($\text{C}_{7,8}$), 127.1 ($\text{C}_{9,10}$), 127.3 (C_{11}), 129.2 ($\text{C}_{12,13}$), 129.4 (C_{14}), 131.3 (C_{15}), 132.5 (C_{16}), 137.6 (C_{17}), 143.6 (C_{18}), 146.9 (C_{19}).



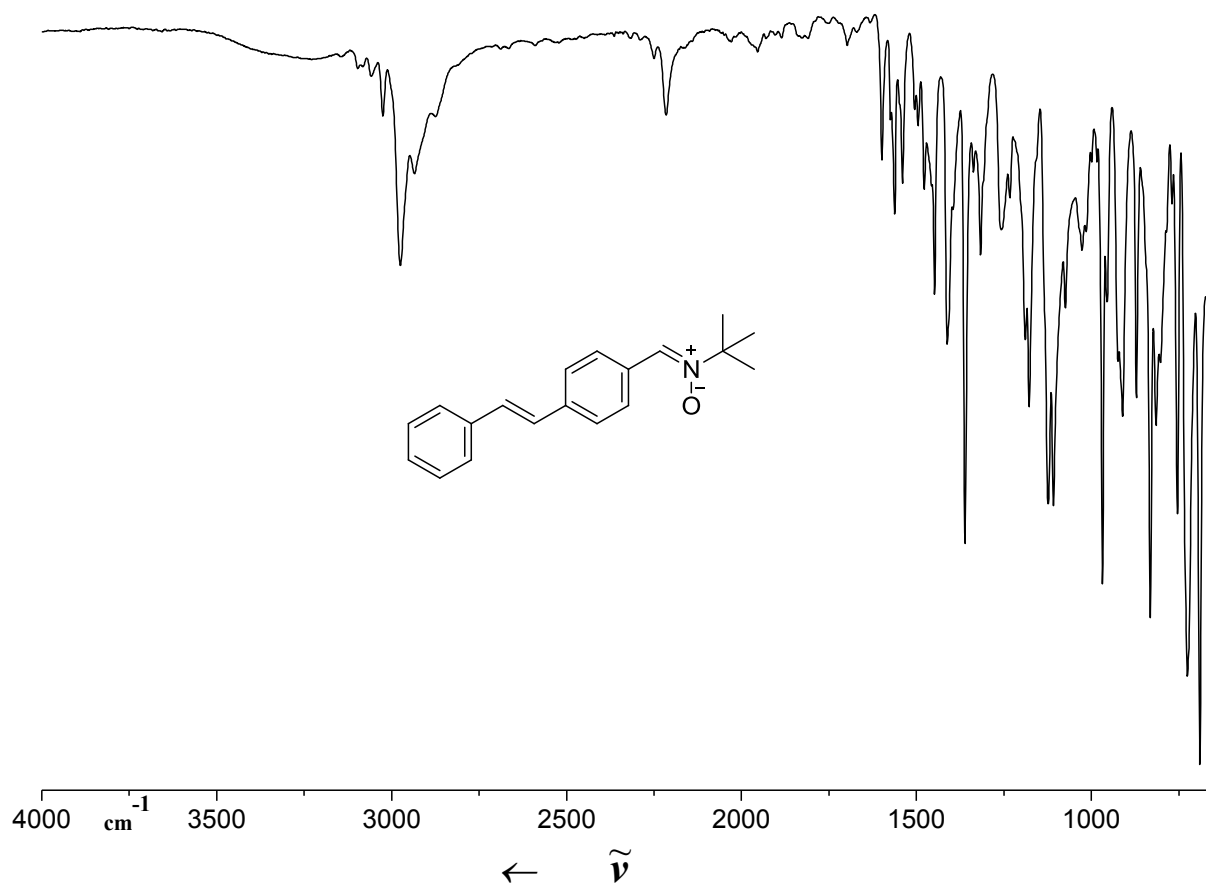
HRMS (EI): m/z [M] $^+$ berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$: 324.1473; gefunden: 324.1485.

UV/Vis (EtOAc): λ_{max} (ϵ) = 262 (3923), 317 (9615), 378 (19083) nm.

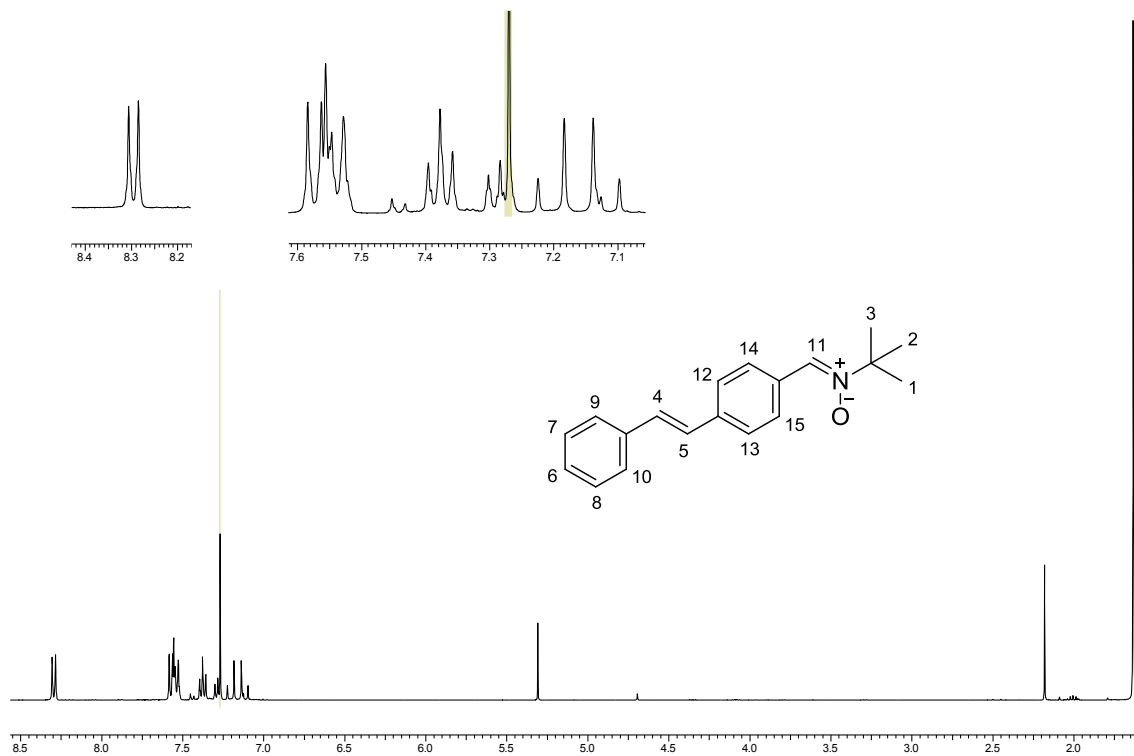
A21 (Z)-2-Methyl-N-(4-((E)-styryl)benzyliden)propan-2-aminoxid (17d)

Weißer Feststoff; Smp.: 142-145 °C, $R_f = 0.39$ (PE 40/60 – EtOAc – Triethylamine, 1:2:0.01).

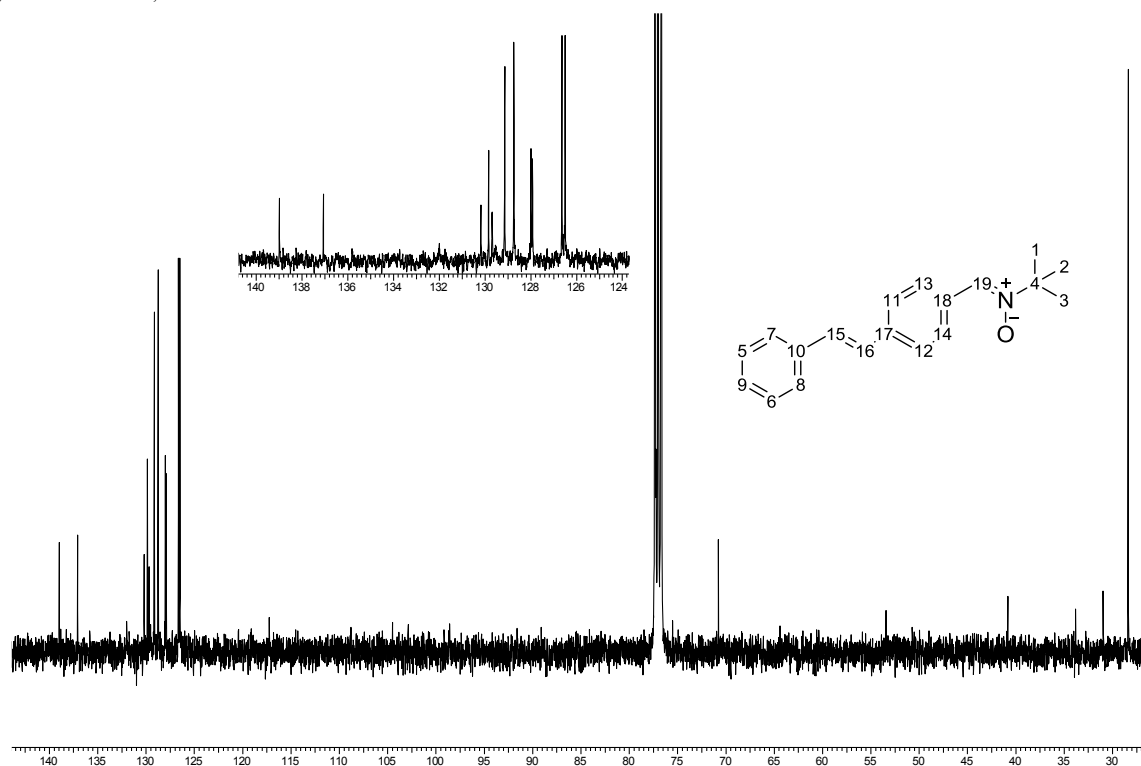
IR (ATR): 3026 (w), 2975 (w), 2934 (w), 2873 (w), 1359 (s), 1178 (s), 1124 (m), 966 (s), 830 (s), 722 (s), 688 (s).



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.64$ (s, 9 H, $\text{H}_{1,2,3}$), 7.12 (d, $J = 16.2$ Hz, 1 H, H_4), 7.20 (d, $J = 16.2$ Hz, 1 H, H_5), 7.29 (dd, $J = 2 \times 7.5$ Hz, 1 H, H_6), 7.38 (t, $J = 2 \times 7.5$ Hz, 2 H, $\text{H}_{7,8}$), 7.54 (m, 2 H, $\text{H}_{9,10}$), 7.56 (s, 1 H, H_{11}), 7.88 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, $\text{H}_{12,13}$), 8.32 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, $\text{H}_{14,15}$).



$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 28.4$ ($\text{C}_{1,2,3}$), 71.0 (C_4), 126.5 ($\text{C}_{5,6}$), 126.7 ($\text{C}_{7,8}$), 127.9 (C_9), 128.0 (C_{10}), 128.8 ($\text{C}_{11,12}$), 129.1 ($\text{C}_{13,14}$), 129.7 (C_{15}), 129.9 (C_{16}), 130.2 (C_{17}), 137.1 (C_{18}), 139.0 (C_{19}).



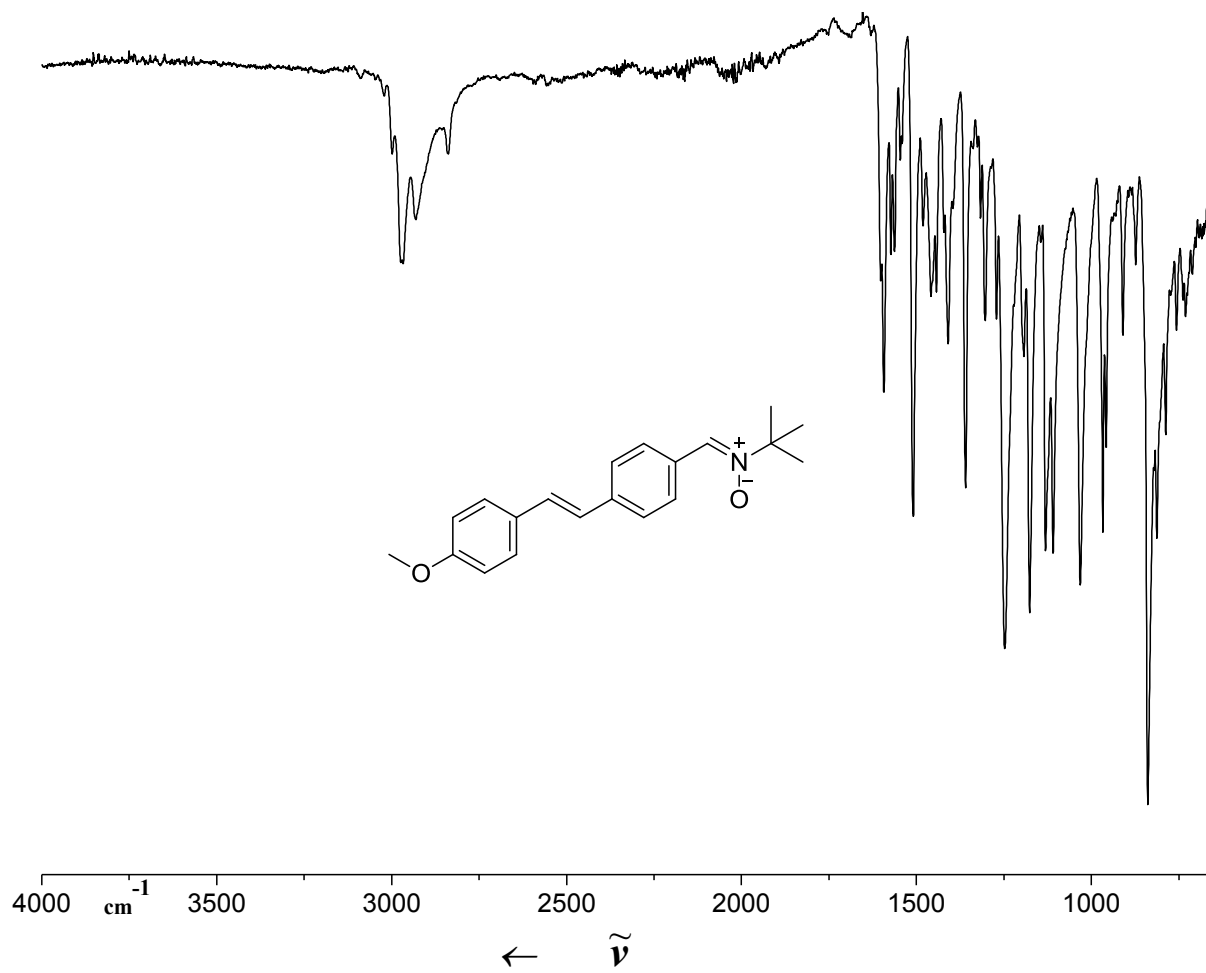
HRMS (EI): m/z [M] $^+$ berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}$: 279.1623; gefunden: 279.1617.

UV/Vis (EtOAc): λ_{max} (ϵ) = 276 (7124), 332 (23278), 347 (27928), 360 (24805) nm.

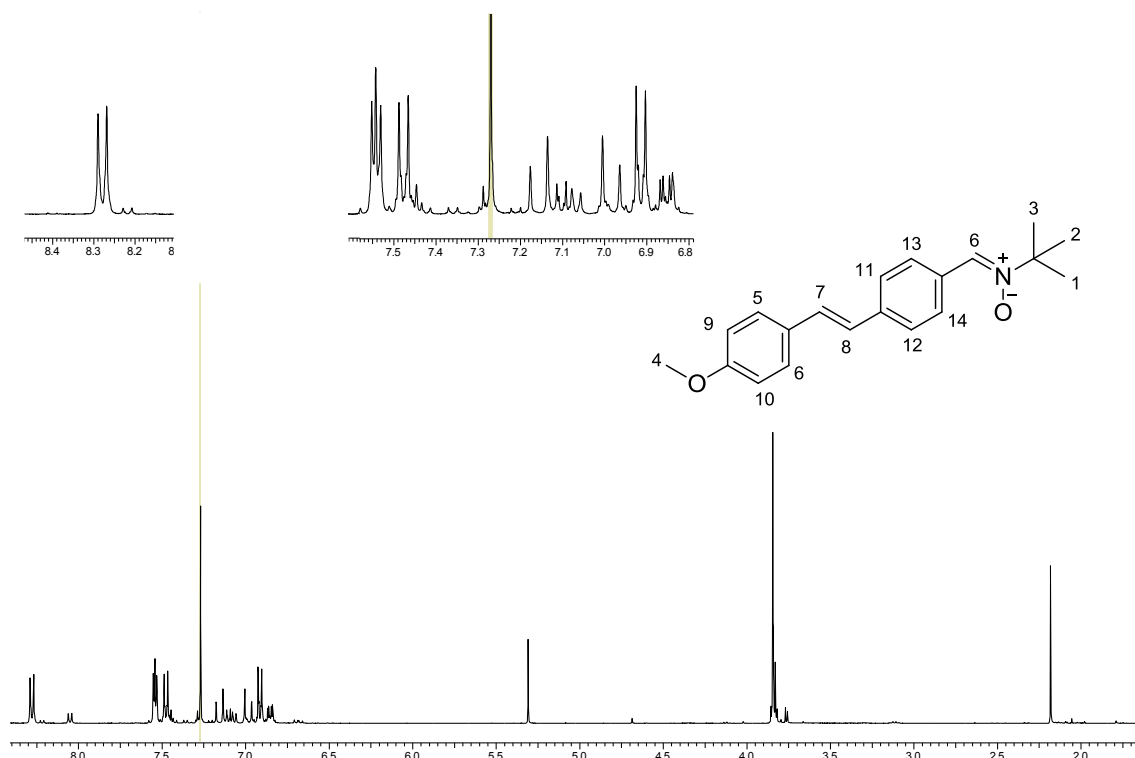
A22 (Z)-N-(4-((E)-4-Methoxystyryl)benzyliden)-2-methylpropan-2-aminoxid (17e)

Gelber Feststoff; Smp.: 210-215 °C.

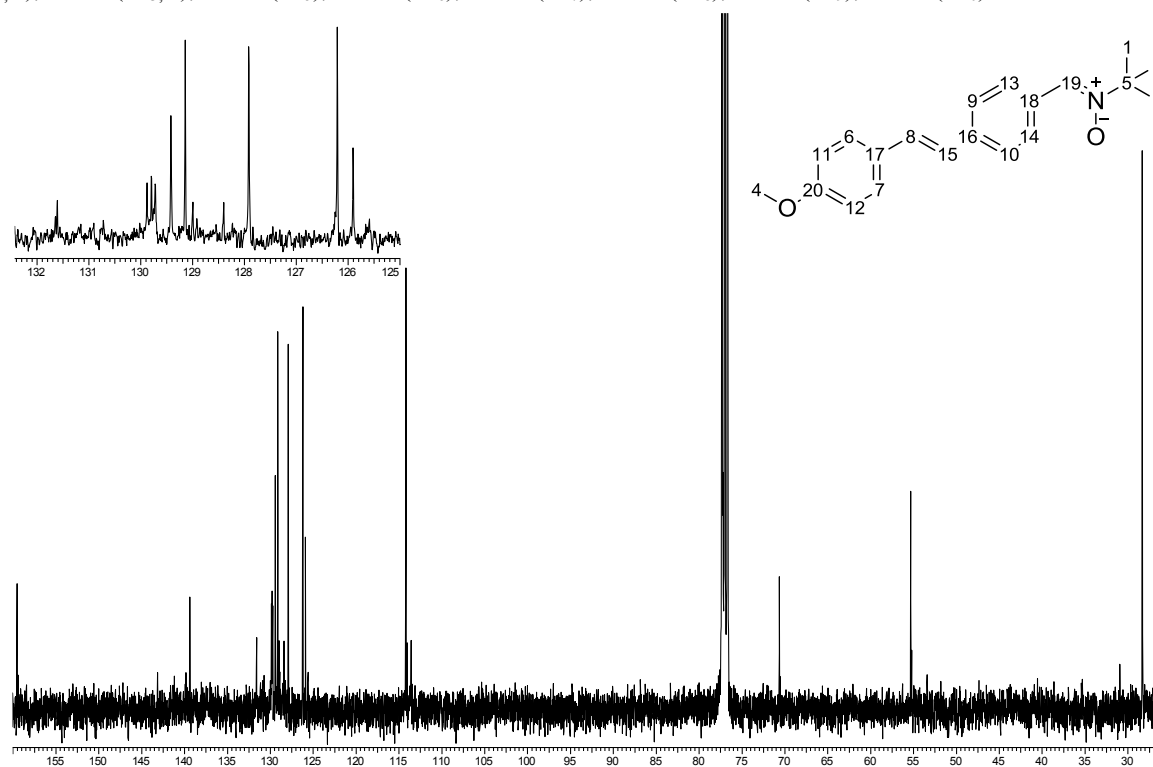
IR (ATR): 2999 (w), 2968 (w), 2931 (w), 2838 (w), 1508 (m), 1246 (s), 1177 (s), 1034 (s), 837 (s).



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.63 (s, 9 H, $\text{H}_{1,2,3}$), 3.85 (s, 3 H, H_4), 6.92 (m, 2 H, $\text{H}_{5,6}$), 6.99 (d, J = 16.4 Hz, 1 H, H_7), 7.16 (d, J = 16.4 Hz, 1 H, H_8), 7.58 (m, 2 H, $\text{H}_{9,10}$), 7.53 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, $\text{H}_{11,12}$), 7.54 (s, 1 H, H_{13}), 8.28 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, $\text{H}_{14,15}$).



^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 28.4 ($\text{C}_{1,2,3}$), 55.4 (C_4), 70.7 (C_5), 114.2 ($\text{C}_{6,7}$), 125.9 (C_8), 126.2 ($\text{C}_{9,10}$), 127.9 ($\text{C}_{11,12}$), 129.1 ($\text{C}_{13,14}$), 129.4 (C_{15}), 129.8 (C_{16}), 129.9 (C_{17}), 131.6 (C_{18}), 139.4 (C_{19}), 159.6 (C_{20}).



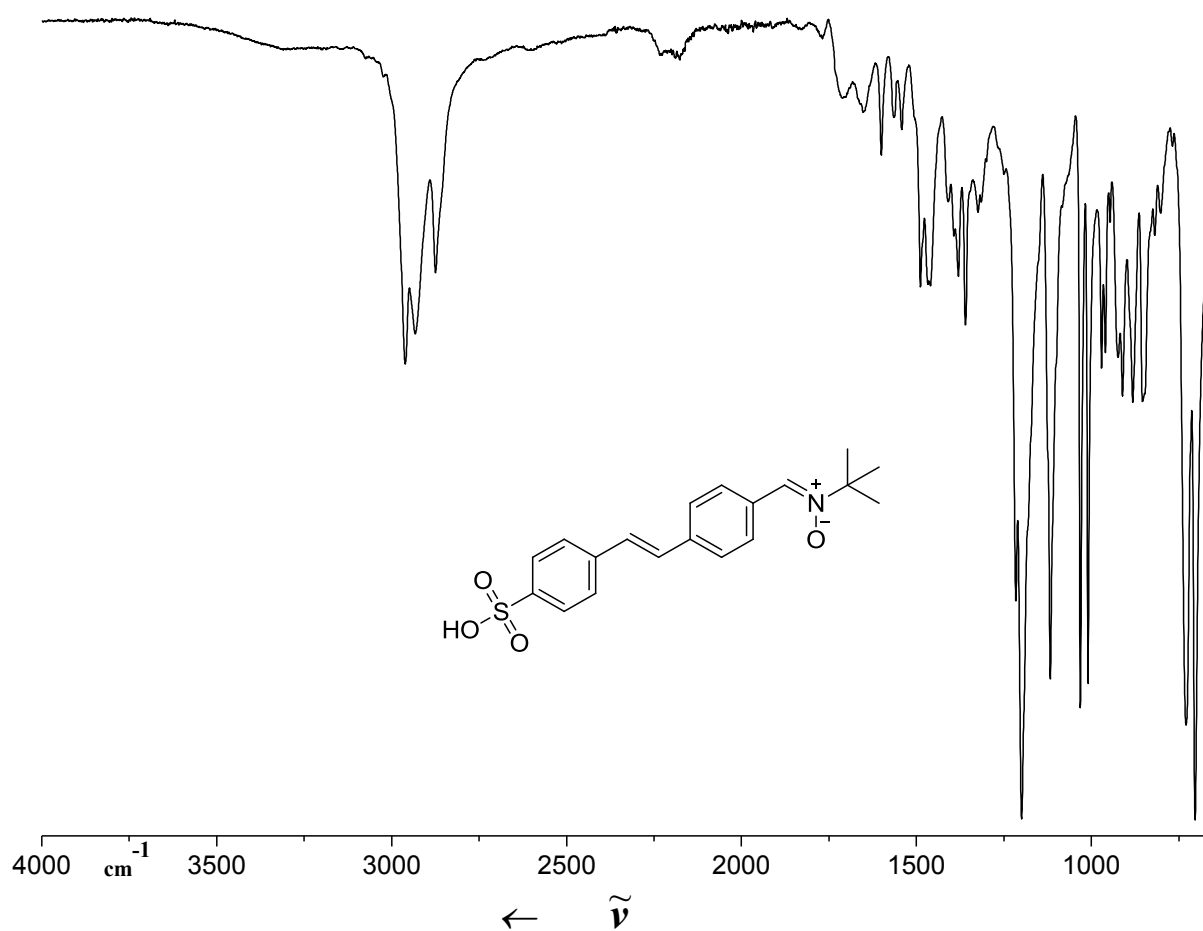
HRMS (EI): m/z [M] $^+$ berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_2$: 309.1729; gefunden: 309.1737.

UV/Vis (EtOAc): λ_{max} (ϵ) = 279 (11839), 334 (35105), 356 (36376), 369 (31674) nm.

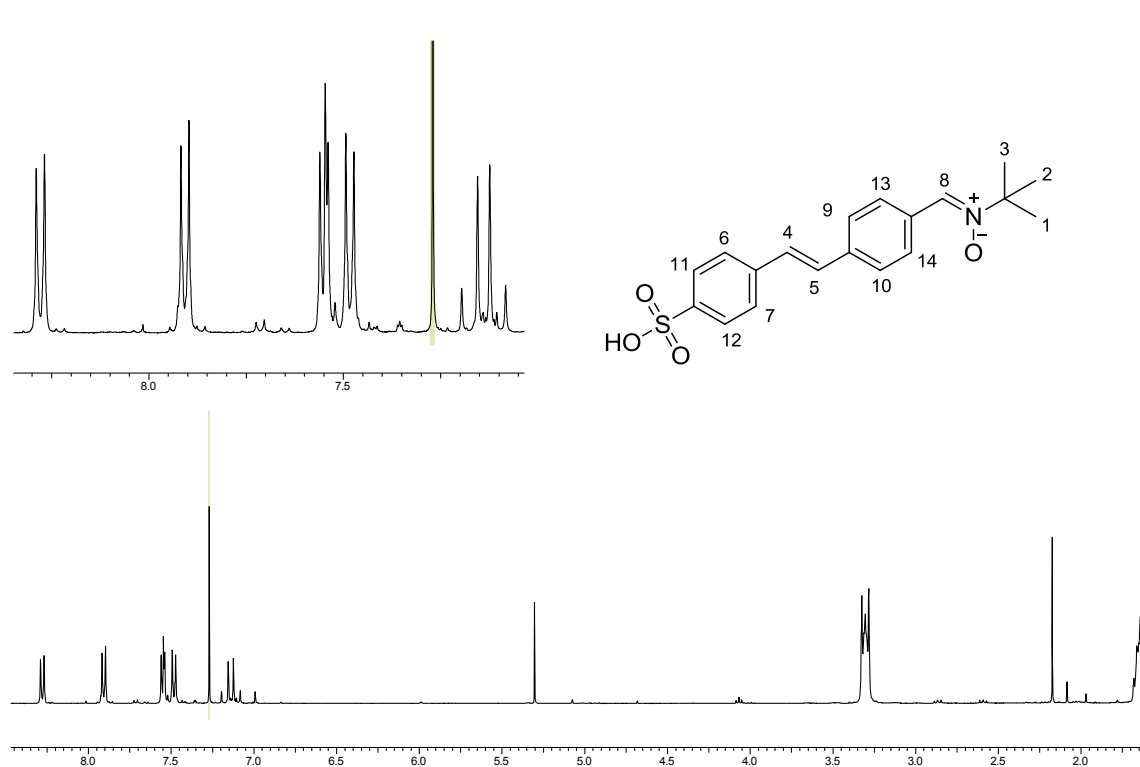
A23 (Z)-2-Methyl-N-(4-((E)-4-sulfoxyphenyl)benzyliden)propan-2-aminoxid (17f)

Beiger Feststoff; Smp.: 209-211 °C.

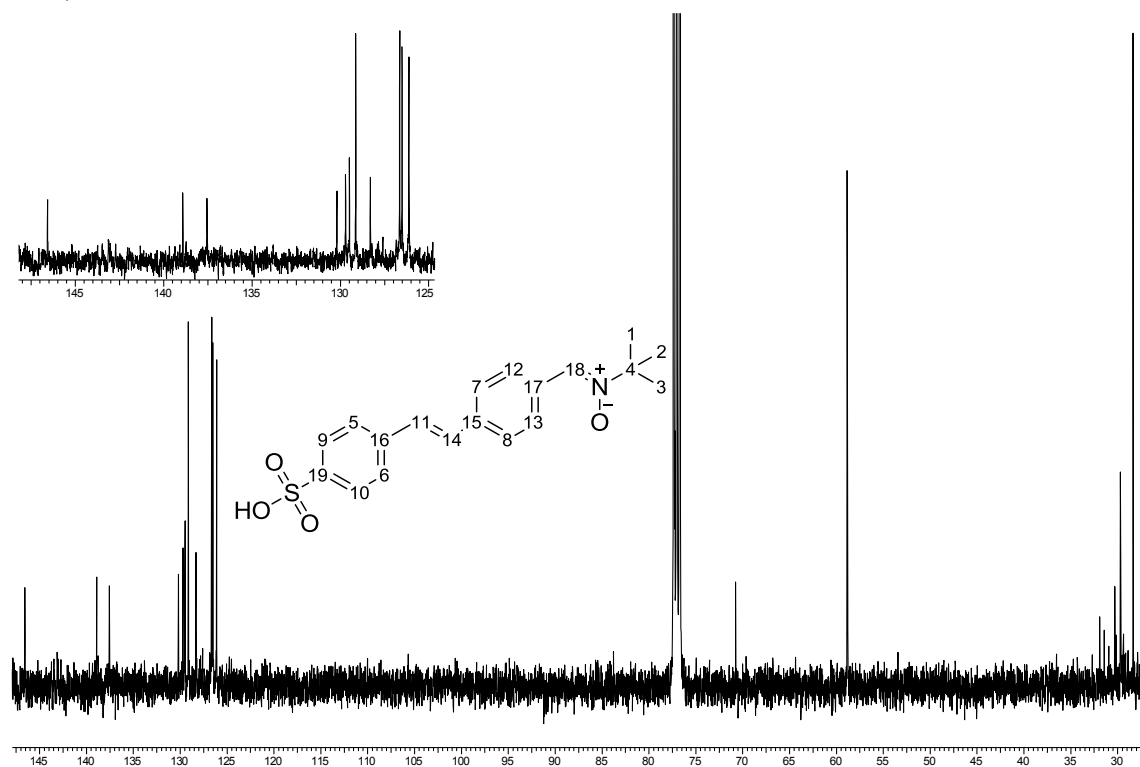
IR (ATR): 2962 (w), 2932 (w), 2874 (w), 1199 (s), 1030 (s), 1177 (s), 727 (s), 704 (s).



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.62$ (s, 9 H, $\text{H}_{1,2,3}$), 7.10 (d, $J = 16.3$ Hz, 1 H, H_4), 7.18 (d, $J = 16.3$ Hz, 1 H, H_5), 7.48 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{6,7}$), 7.55 (s, 1 H, H_8), 7.56 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, $\text{H}_{9,10}$), 7.91 (d, $J = 8.3$ Hz, 2 H, $\text{H}_{11,12}$), 8.28 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, $\text{H}_{13,14}$).



$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 28.4$ ($\text{C}_{1,2,3}$), 59.9 (C_4), 126.1 ($\text{C}_{5,6}$), 126.5 ($\text{C}_{7,8}$), 126.7 ($\text{C}_{9,10}$), 128.3 (C_{11}), 129.1 ($\text{C}_{12,13}$), 129.5 (C_{14}), 129.7 (C_{15}), 130.2 (C_{16}), 137.6 (C_{17}), 138.9 (C_{18}), 146.6 (C_{19}).

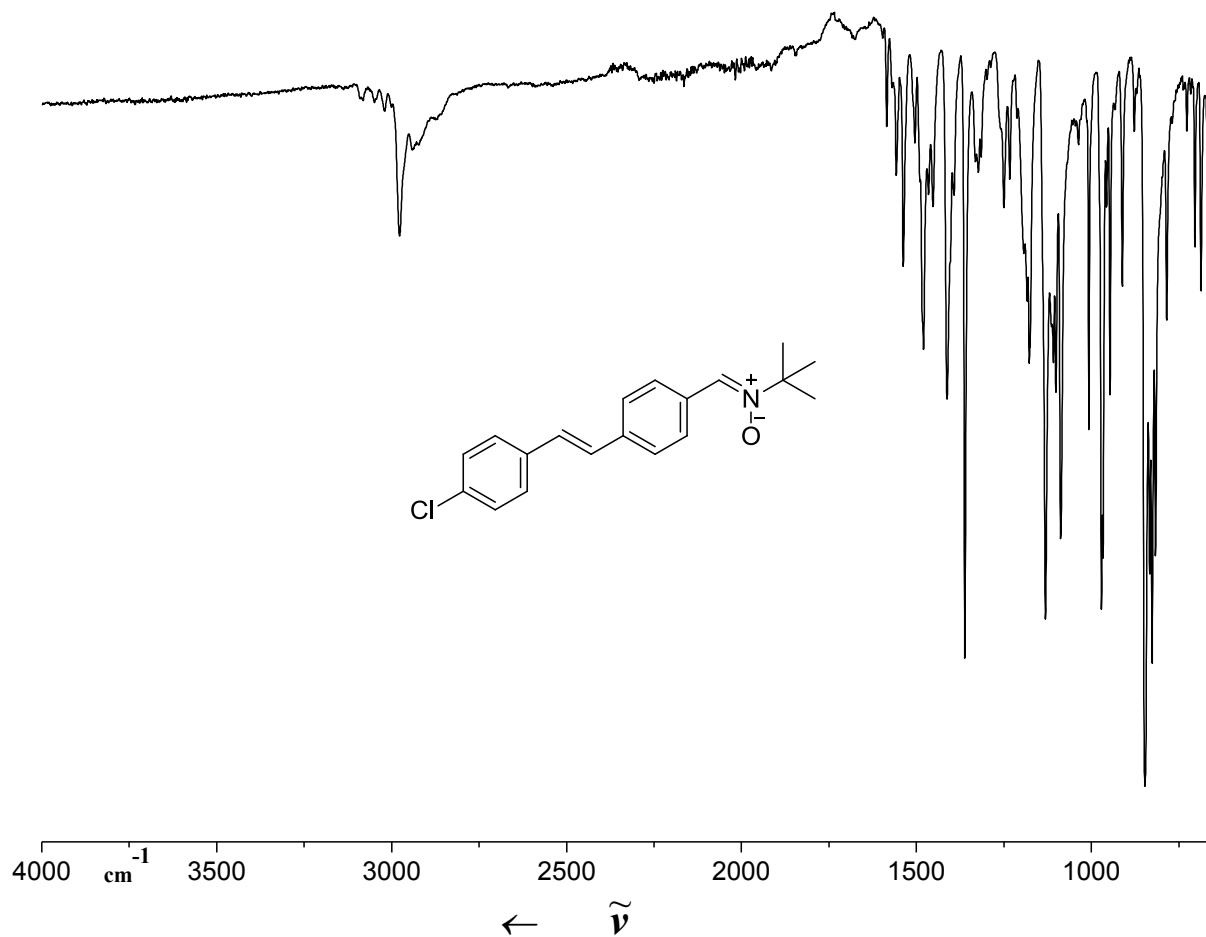


HRMS (EI): m/z [M]⁺ berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_4\text{S}$: 359.1191; gefunden: 359.1180.

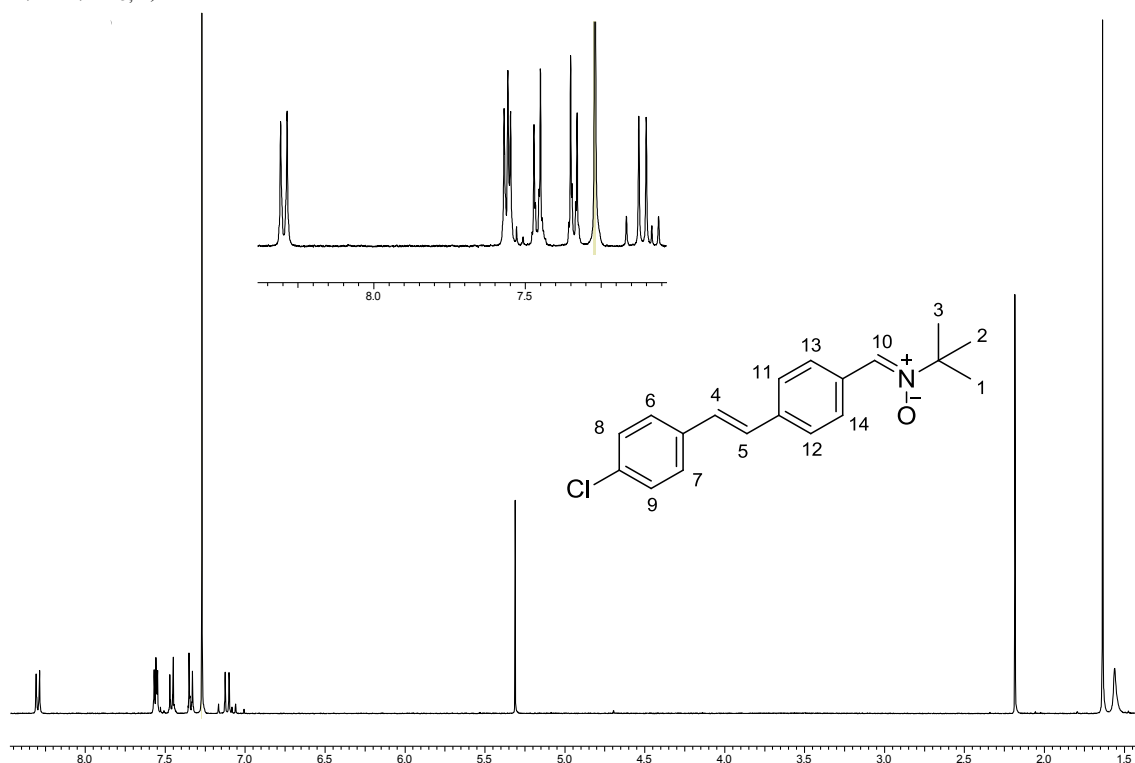
UV/Vis (EtOAc): λ_{max} (ϵ) = 319 (39640), 334 (31596), 368 (10788) nm.

A24 (Z)-N-(4-((E)-4-chlorostyryl)benzylidene)-2-methylpropan-2-amin-oxid (17g)Weißer Feststoff; Smp.: 196-198 °C, $R_f = 0.36$ (PE 40/60 – EtOAc – Triethylamine, 1:2:0.01).

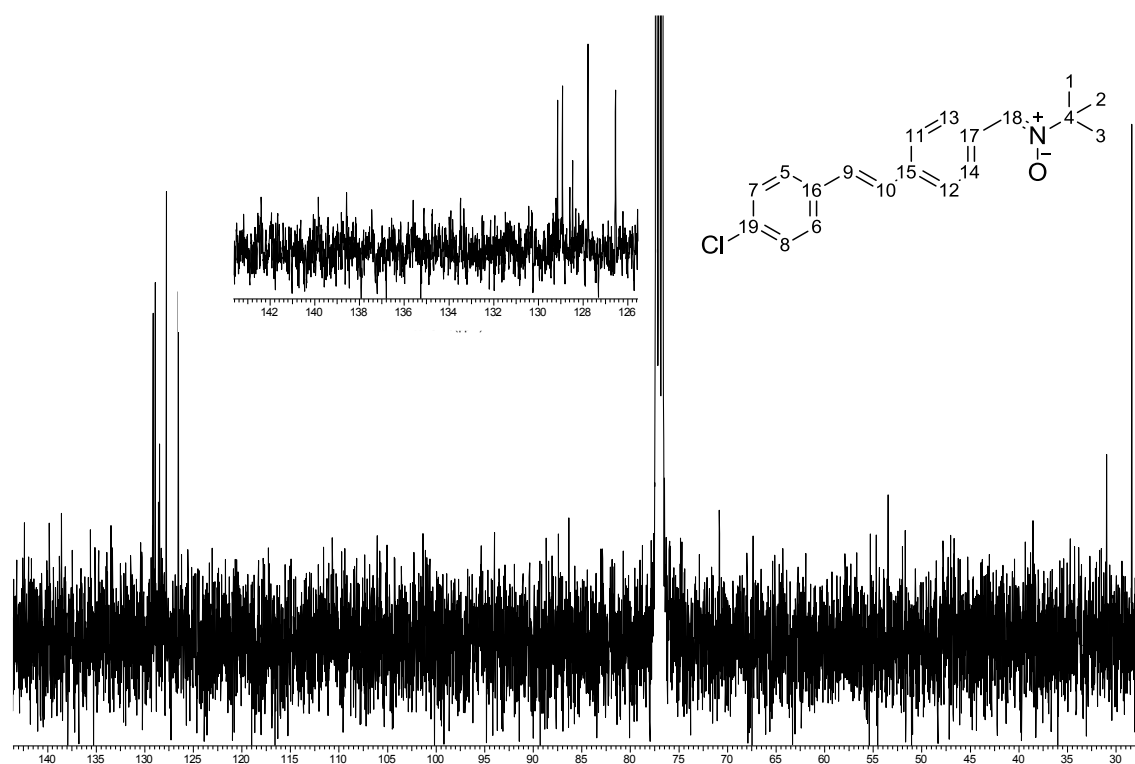
IR (ATR): 3019 (w), 2977 (w), 2938 (w), 1362 (s), 1131 (s), 970 (s), 845 (s), 825 (s).



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.64$ (s, 9 H, $\text{H}_{1,2,3}$), 7.08 (d, $J = 16.1$ Hz, 1 H, H_4), 7.15 (d, $J = 16.1$ Hz, 1 H, H_5), 7.48 (m, 2 H, $\text{H}_{6,7}$), 7.56 (m, 2 H, $\text{H}_{8,9}$), 7.56 (s, 1 H, H_{10}), 7.56 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, $\text{H}_{11,12}$), 8.30 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, $\text{H}_{13,14}$).



^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 28.4$ ($\text{C}_{1,2,3}$), 70.8 (C_4), 126.6 ($\text{C}_{5,6}$), 127.8 ($\text{C}_{7,8}$), 128.5 (C_9), 128.6 (C_{10}), 128.9 ($\text{C}_{11,12}$), 129.1 ($\text{C}_{13,14}$), 133.5 (C_{15}), 135.6 (C_{16}), 137.6 (C_{17}), 138.6 (C_{18}), 142.4 (C_{19}).

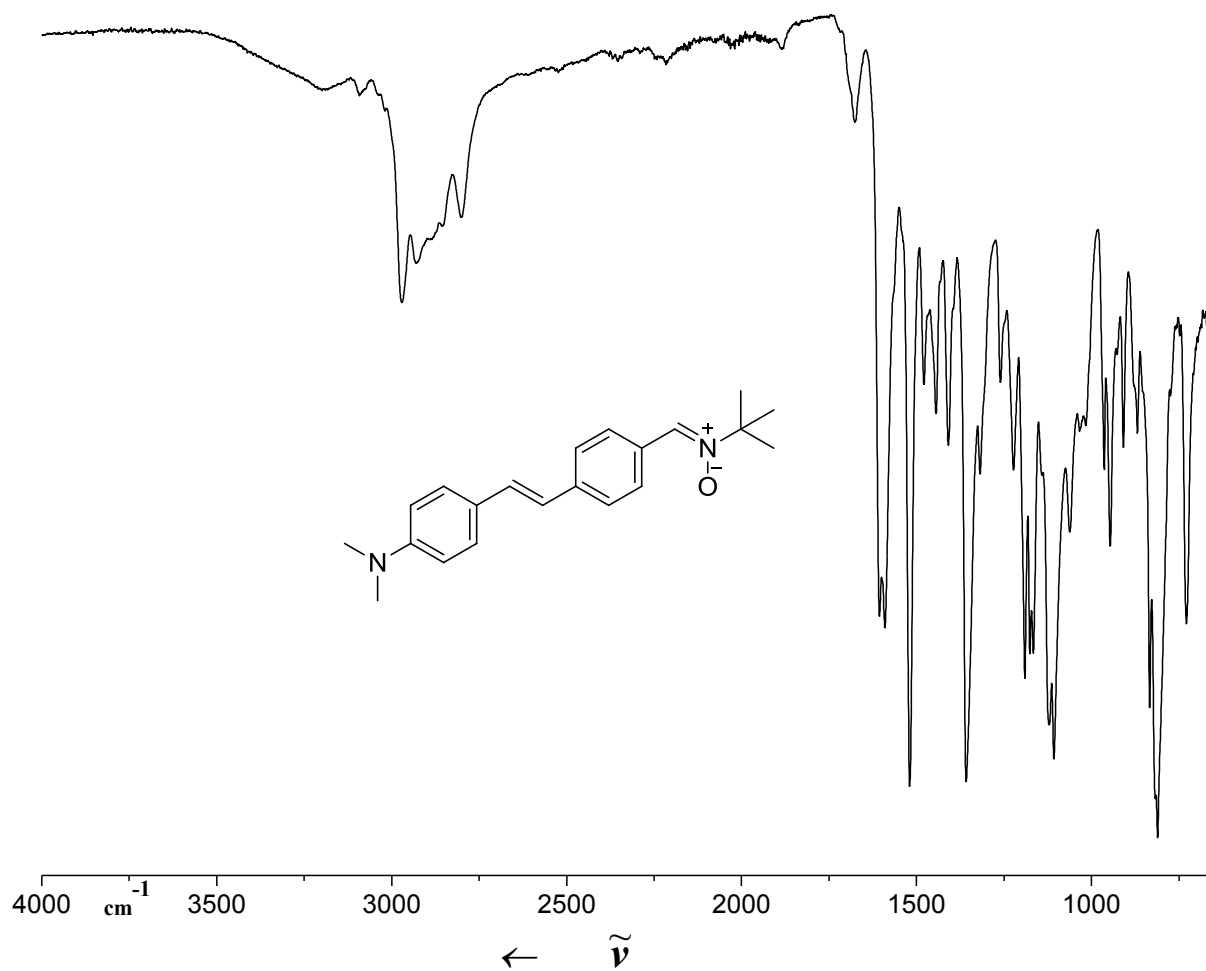


HRMS (EI): m/z [M] $^+$ berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{ClNO}$: 313.1234; gefunden: 313.1232.

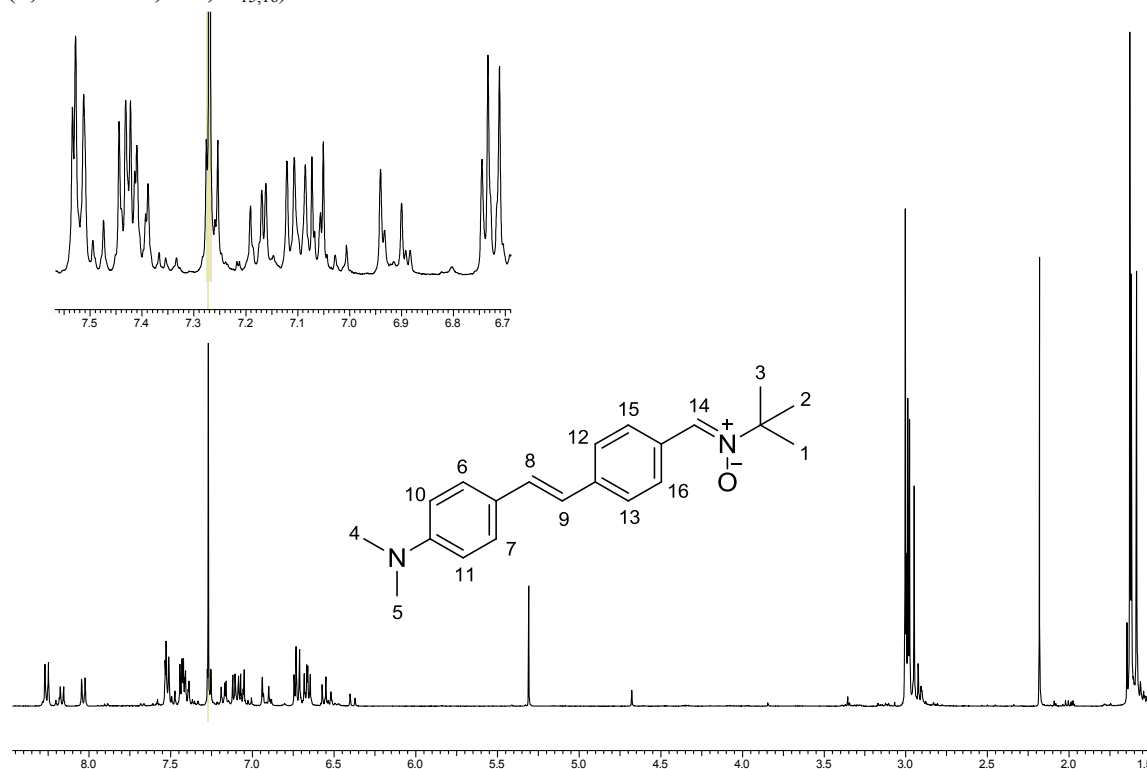
UV/Vis (EtOAc): λ_{max} (ϵ) = 319 (14771), 334 (16621), 351 (17119) nm.

A25 (Z)-N-(4-((E)-4-(Dimethylamino)styryl)benzyliden)-2-methylpropan-2-aminoxid (17h)Gelber Feststoff; Smp 157-159 °C, $R_f = 0.40$ (PE 40/60 – EtOAc – Triethylamine, 1:2:0.01).

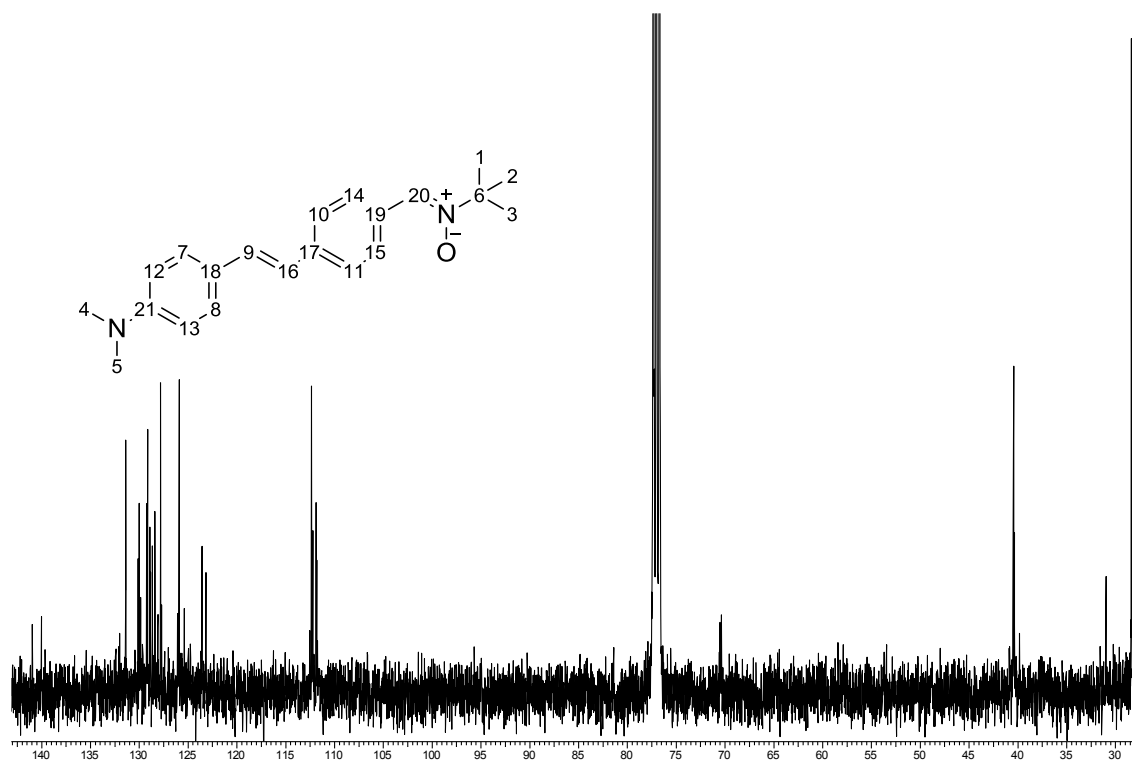
IR (ATR): 3093 (w), 2972 (w), 2929 (w), 2801 (w), 1521 (s), 1359 (s), 1190 (m), 1106 (s), 811 (s).



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.63$ (s, 9 H, $\text{H}_{1,2,3}$), 3.00 (s, 6 H, $\text{H}_{4,5}$), 6.72 (m, 2 H, $\text{H}_{6,7}$), 6.92 (d, $J = 16.2$ Hz, 1 H, H_8), 7.07 (d, $J = 16.2$ Hz, 1 H, H_9), 7.44 (m, 2 H, $\text{H}_{10,11}$), 7.53 (d, $J = 8.4$ Hz, 1 H, $\text{H}_{12,13}$), 7.53 (s, 1 H, H_{14}), 8.26 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, $\text{H}_{15,16}$).



$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 28.4$ ($\text{C}_{1,2,3}$), 40.4 ($\text{C}_{4,5}$), 70.4 (C_6), 112.4 ($\text{C}_{7,8}$), 123.6 (C_9), 125.9 ($\text{C}_{10,11}$), 127.8 ($\text{C}_{12,13}$), 129.2 ($\text{C}_{14,15}$), 129.3 (C_{16}), 130.0 (C_{17}), 131.4 (C_{18}), 140.0 (C_{19}), 141.0 (C_{20}), 144.4 (C_{21}).



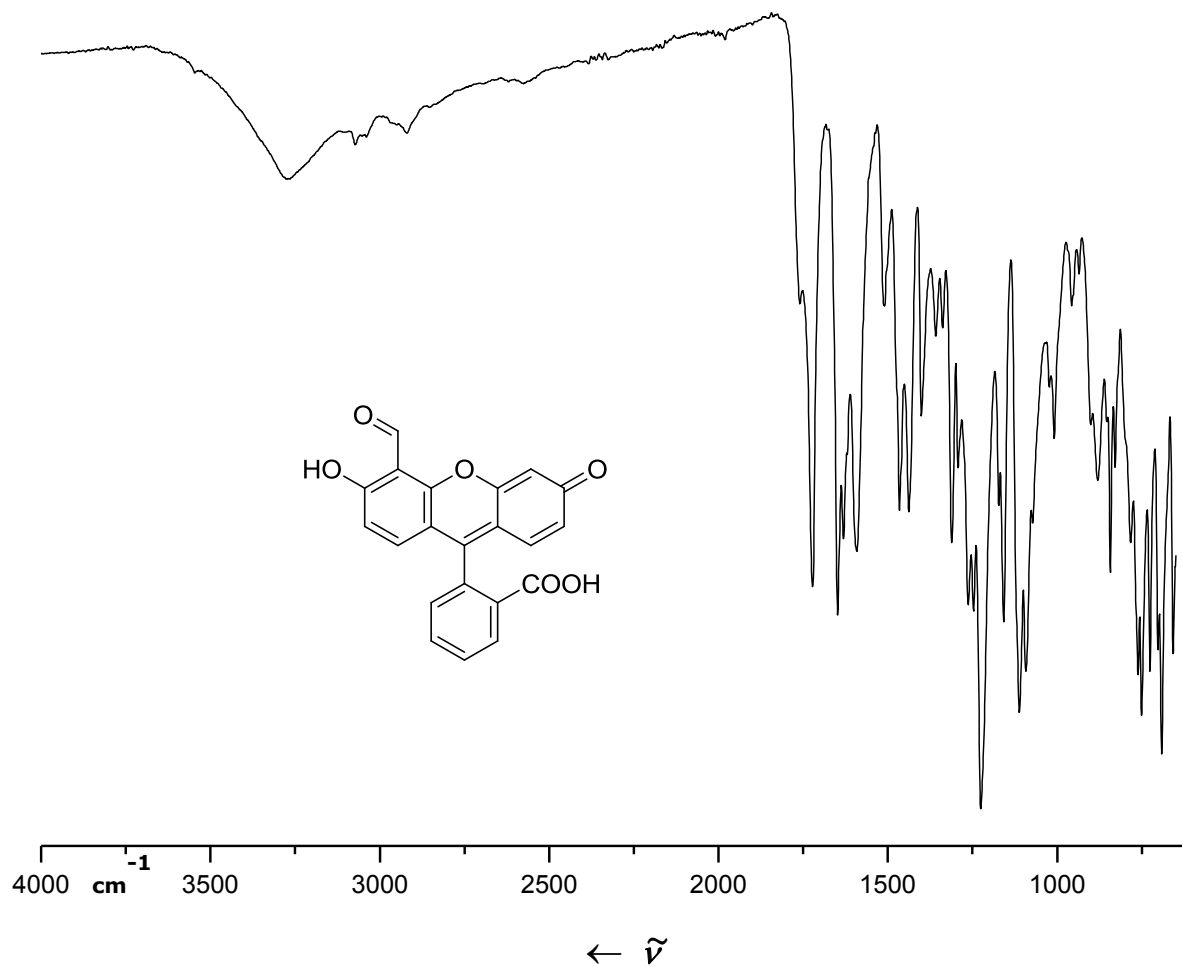
HRMS (EI): m/z [M] $^+$ berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}$: 322.2045; gefunden: 322.2061.

UV/Vis (EtOAc): λ_{max} (ϵ) = 272 (9667), 327 (15161), 371 (18688) nm.

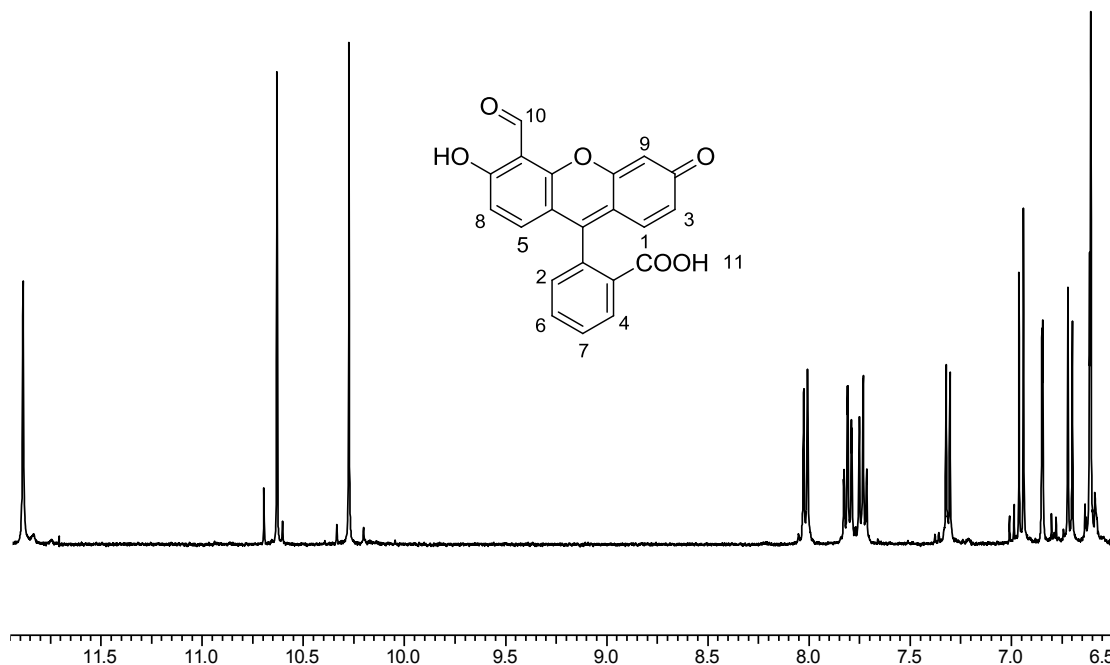
**A26 3',6'-Dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-4'-carbaldehyd
(Fluoreszeinaldehyd; (25))**

Gelber Feststoff; Smp: n. a., $R_f = 0.21$ (MeOH - CH_2Cl_2 , 1 : 16), 0.49 (MeOH - CH_2Cl_2 , 1 : 8)

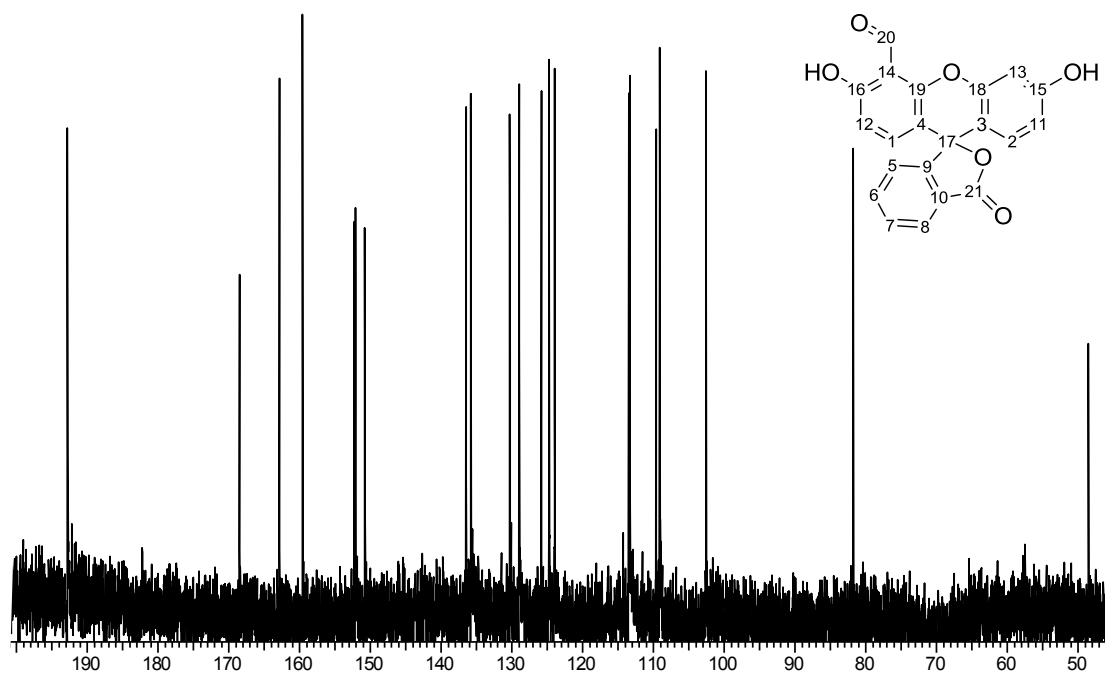
IR (ATR): 3278 (w), 3076 (w), 2919 (w), 1723 (m), 1644 (m), 1467 (m), 1226 (s), 1107 (s), 847 (m), 753 (s), 694 (s).



^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 6.61 (s, 1 H, H₁), 6.71 (d, J = 8.8 Hz, 1 H, H₂), 6.85 (s, 1 H, H₃), 6.95 (d, J = 8.8 Hz, 1 H, H₄), 7.32 (d, J = 6.6 Hz, 1 H, H₅), 7.71–7.83 (m, 2 H, H_{6,7}), 8.02 (d, J = 6.6 Hz, 1 H, H₈), 10.27 (s, 1 H, H₉), 10.63 (s, 1 H, H₁₀), 11.89 (s, 1 H, H₁₁).



^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 48.6 (C₁), 81.8 (C₂), 102.6 (C₃), 109.1 (C₄), 109.6 (C₅), 113.4 (C₆), 113.5 (C₇), 124.0 (C₈), 124.8 (C₉), 125.9 (C₁₀), 129.0 (C₁₁), 130.3 (C₁₂), 135.8 (C₁₃), 136.5 (C₁₄), 150.8 (C₁₅), 152.1 (C₁₆), 152.3 (C₁₇), 159.6 (C₁₈), 162.9 (C₁₉), 168.5 (C₂₀), 192.8 (C₂₁).

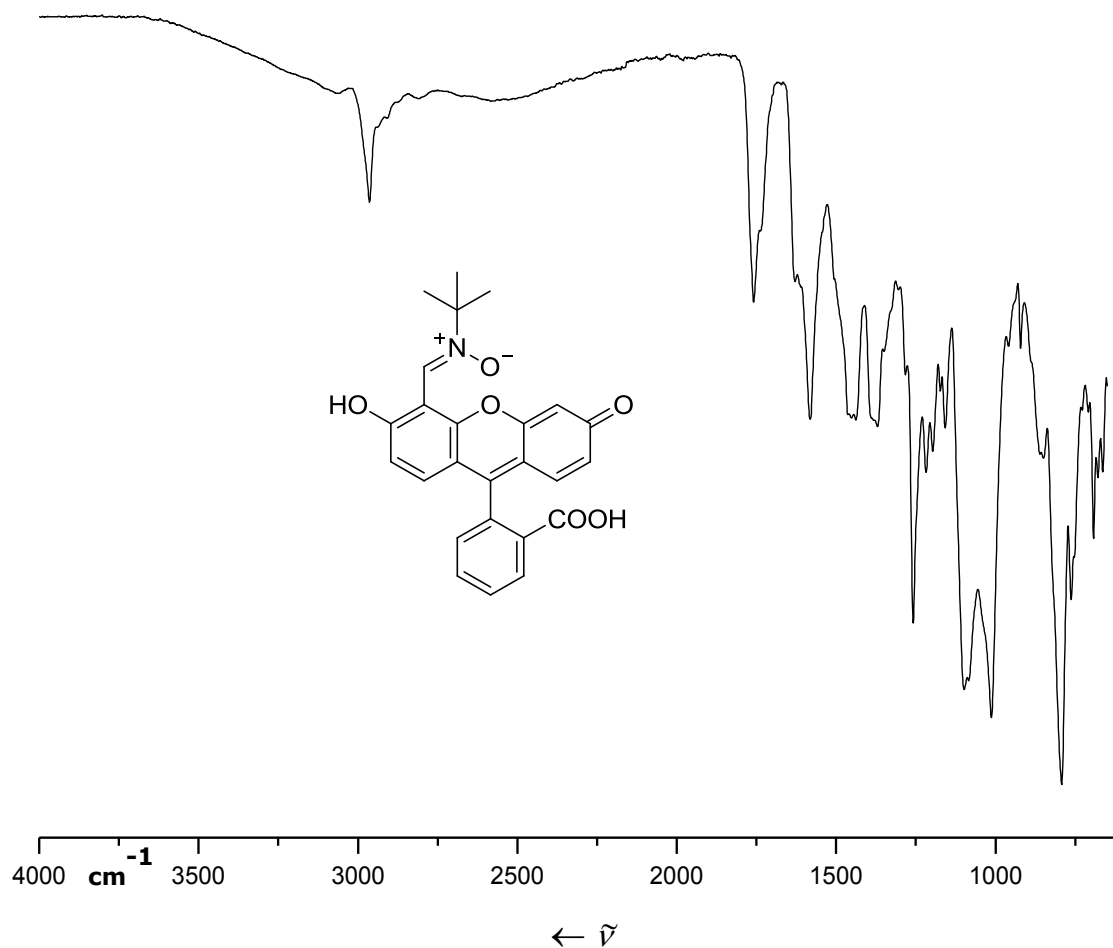


HRMS (EI): m/z [M]⁺ berechnet für C₂₁H₁₂O₆: 360.0634; gefunden: 360.0736; Fragmente deutlich erkennbar.

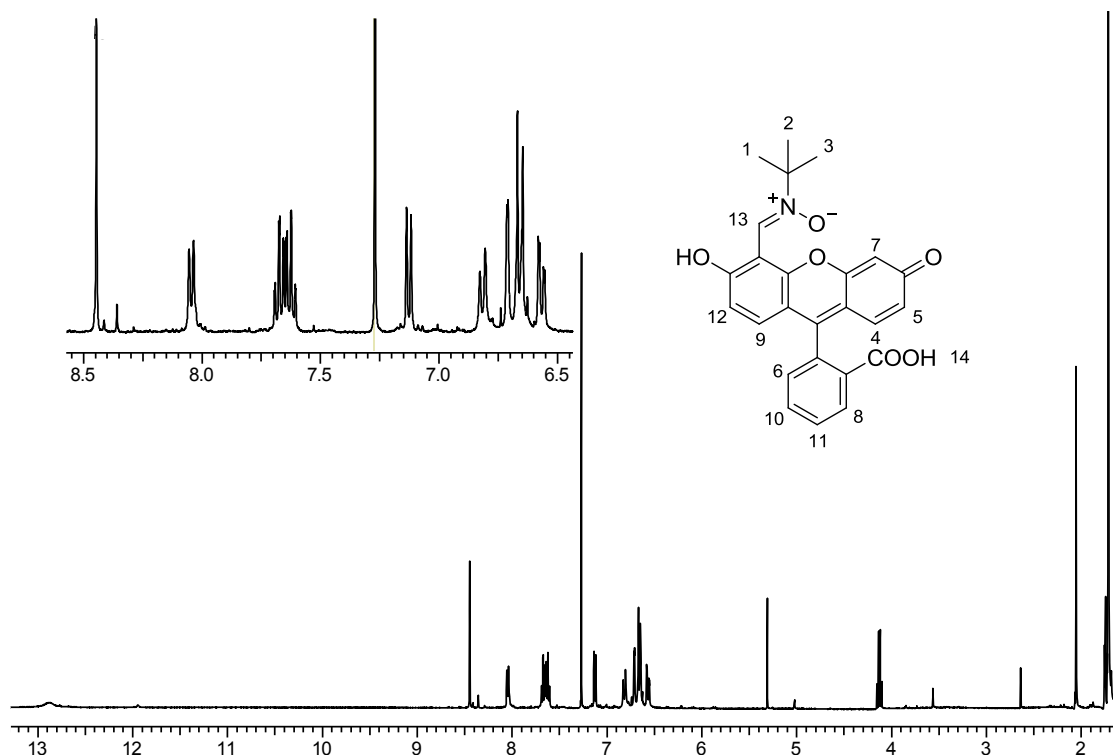
A27 (Z)-N-((3',6'-dihydroxy-3-oxo-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xan-then]-4'-yl)-methylen)-2-methylpropan-2-aminoxid (Fluoreszeinnitron; (26))

Gelber Feststoff

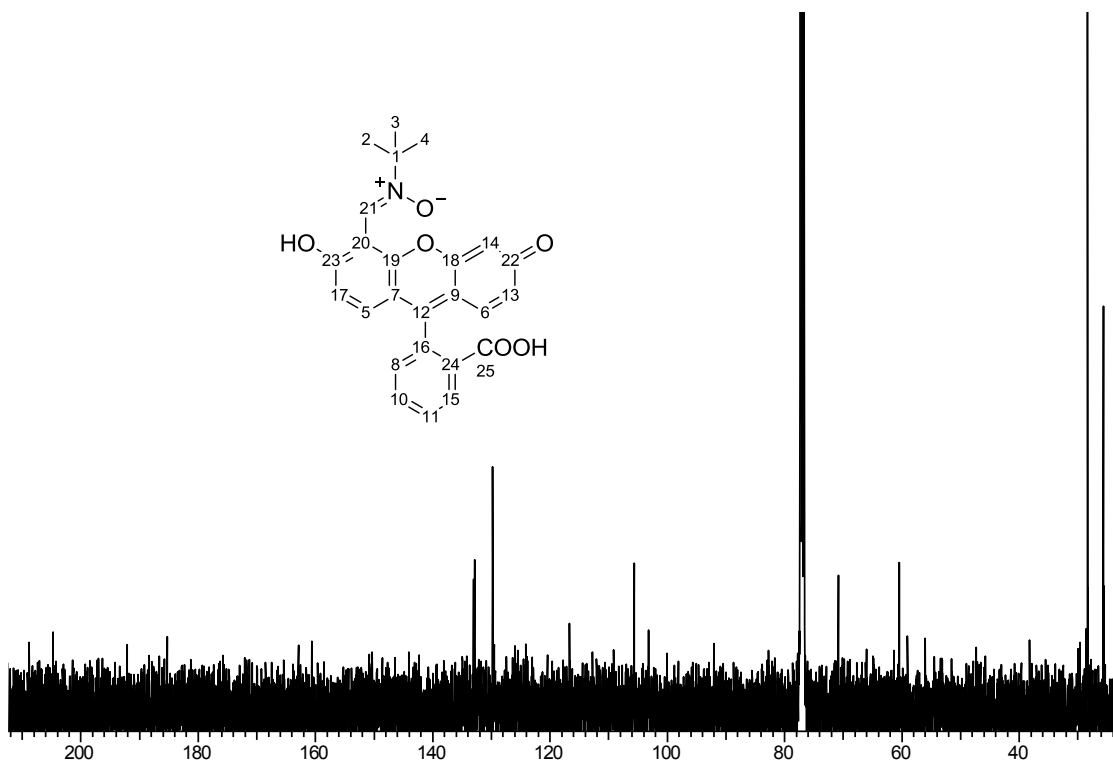
Smp.: n. a.

IR (ATR): 3071 (w), 2963 (w), 2810 (w), 1757 (m), 1585 (m), 1448 (m), 1374 (m), 1260 (m), 1093 (s), 1009 (s), 788 (s) cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 1.71 (s, 9 H, $\text{H}_{1,2,3}$), 6.56 (m, 1 H, H_4), 6.64 (s, 1 H, H_5), 6.66 (s, 1 H, H_6), 6.71 (d, $J = 2.3$ Hz, 1 H, H_7), 6.81 (m, 1 H, H_8), 7.14 (d, $J = 7.4$ Hz, 1 H, H_9), 7.64 (m, 2 H, $\text{H}_{10,11}$), 8.04 (d, $J = 7.4$ Hz, 1 H, H_{12}), 8.44 (s, 1 H, H_{13}), 11.89 (br. s, 1 H, H_{14}).



$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 25.6 (C_1), 28.3 ($\text{C}_{2,3,4}$), 92.6 (C_5), 103.2 (C_6), 105.7 (C_7), 116.7 (C_8), 124.1 (C_9), 126.0 (C_{10}), 129.5 (C_{11}), 129.6 (C_{12}), 129.8 (C_{13}), 132.8 (C_{14}), 133.1 (C_{15}), 142.4 (C_{16}), 144.1 (C_{17}), 150.4 (C_{18}), 150.8 (C_{19}), 160.6 (C_{20}), 162.9 (C_{21}), 185.3 (C_{22}), 192.2 (C_{23}), 204.8 (C_{24}), 208.9 (C_{25}).

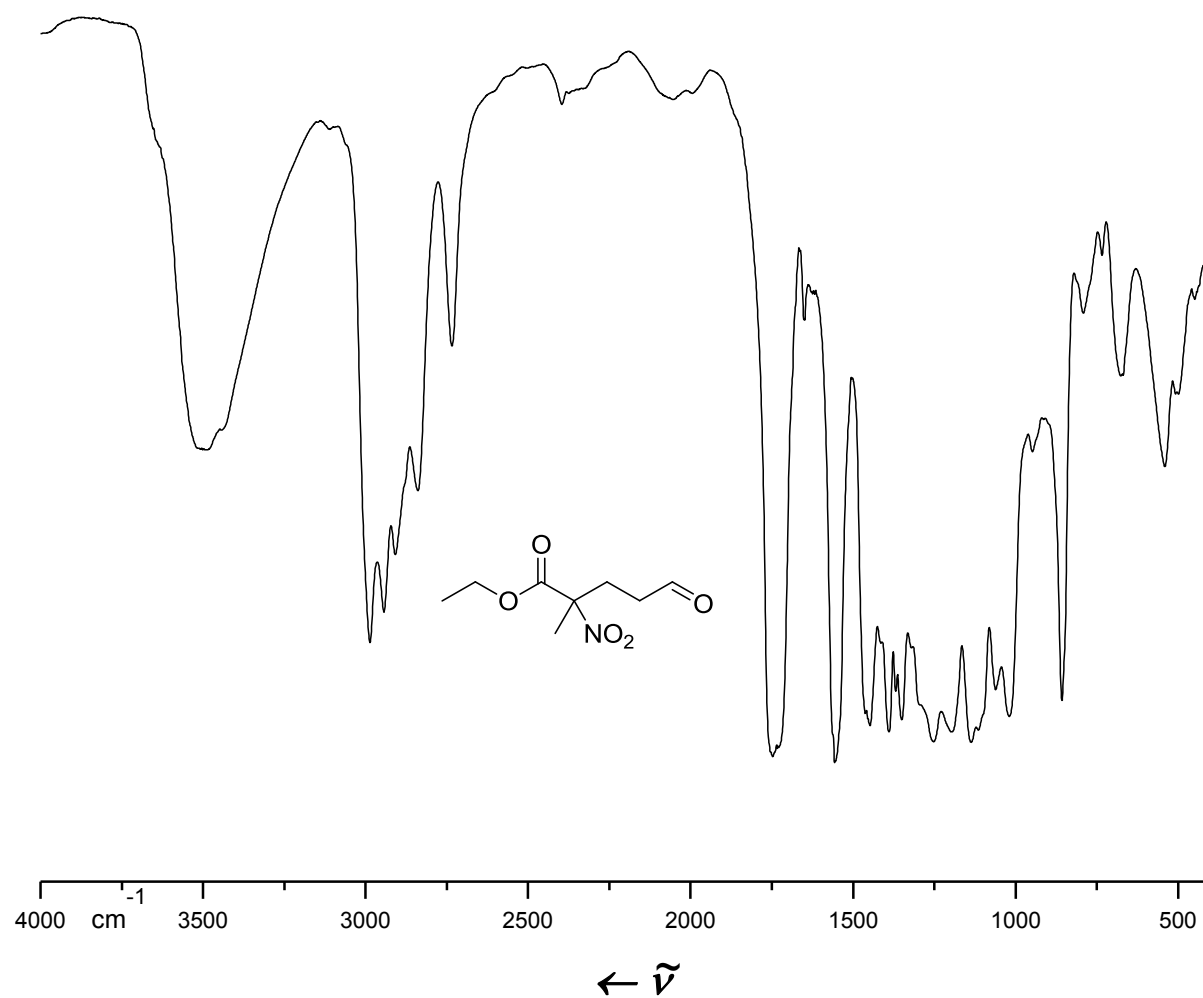


HRMS (EI): m/z [M] $^+$ berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{NO}_6$: 431.1369; gefunden: 431.1402.

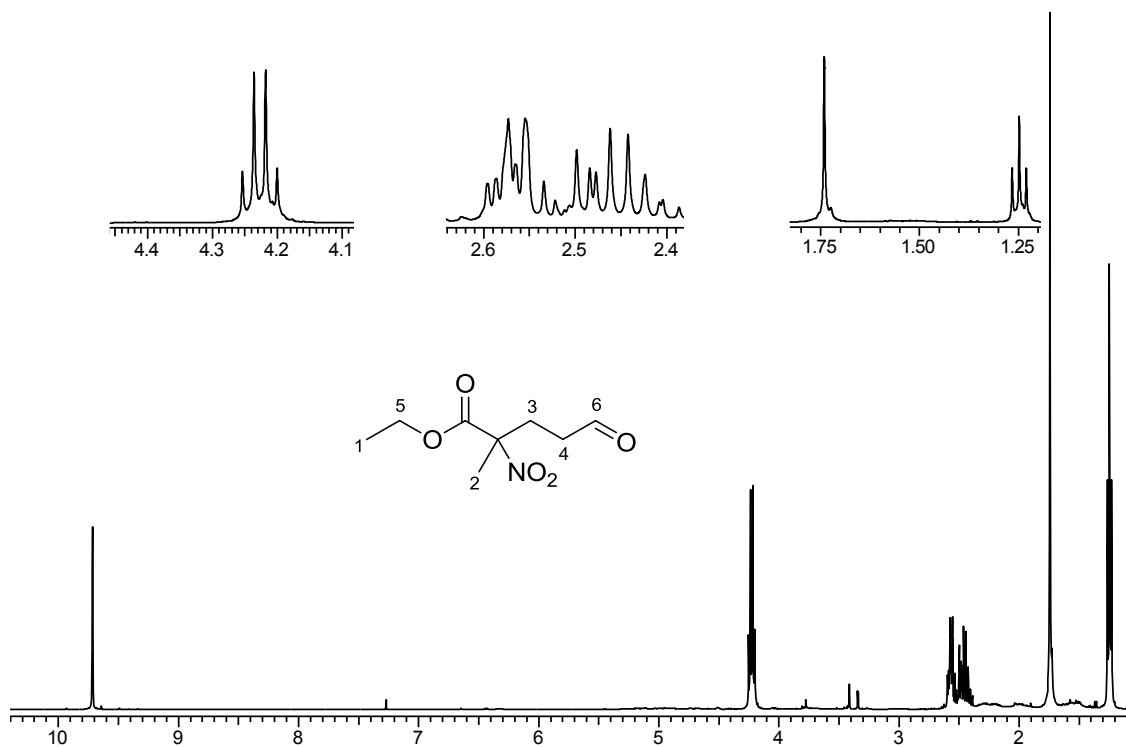
A28 2-Methyl-2-nitro-5-oxovaleriansäureethylester (28)

Hellgelbes Öl

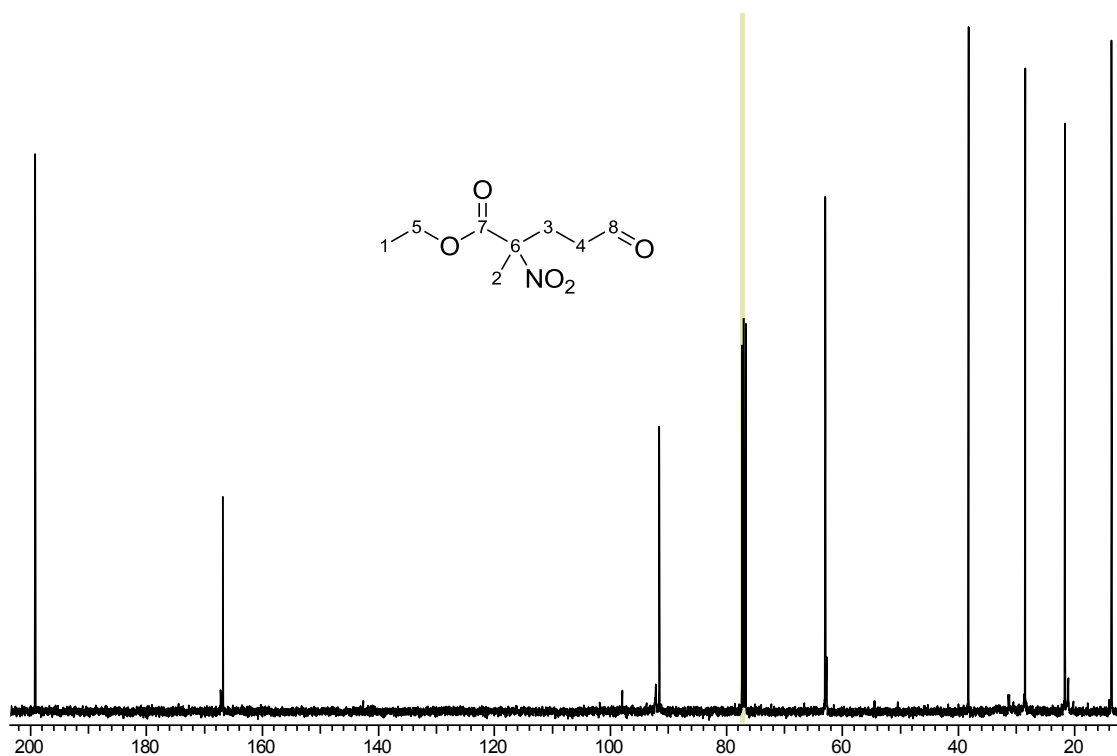
IR (ATR): 3493 (m), 2992 (s), 2940 (s), 2908 (m), 2840 (m), 2736 (m), 2392 (w), 1755 (s), 1551 (s), 1452 (s), 1348 (s), 1253 (s), 1139 (s), 1018 (s), 857 (s), 674 (m), 539 (m) cm^{-1} .



$^1\text{H NMR}$ (400.13 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.25$ (t, $J = 7.15$ Hz, 3 H, H_1), 1.74 (s, 3 H, H_2), 2.40 – 2.52 (m, 2 H, H_3), 2.55 – 2.60 (m, 2 H, H_4), 4.23 (q, $J = 7.15$ Hz, 2 H, H_5), 9.72 (s, 1 H, H_6).



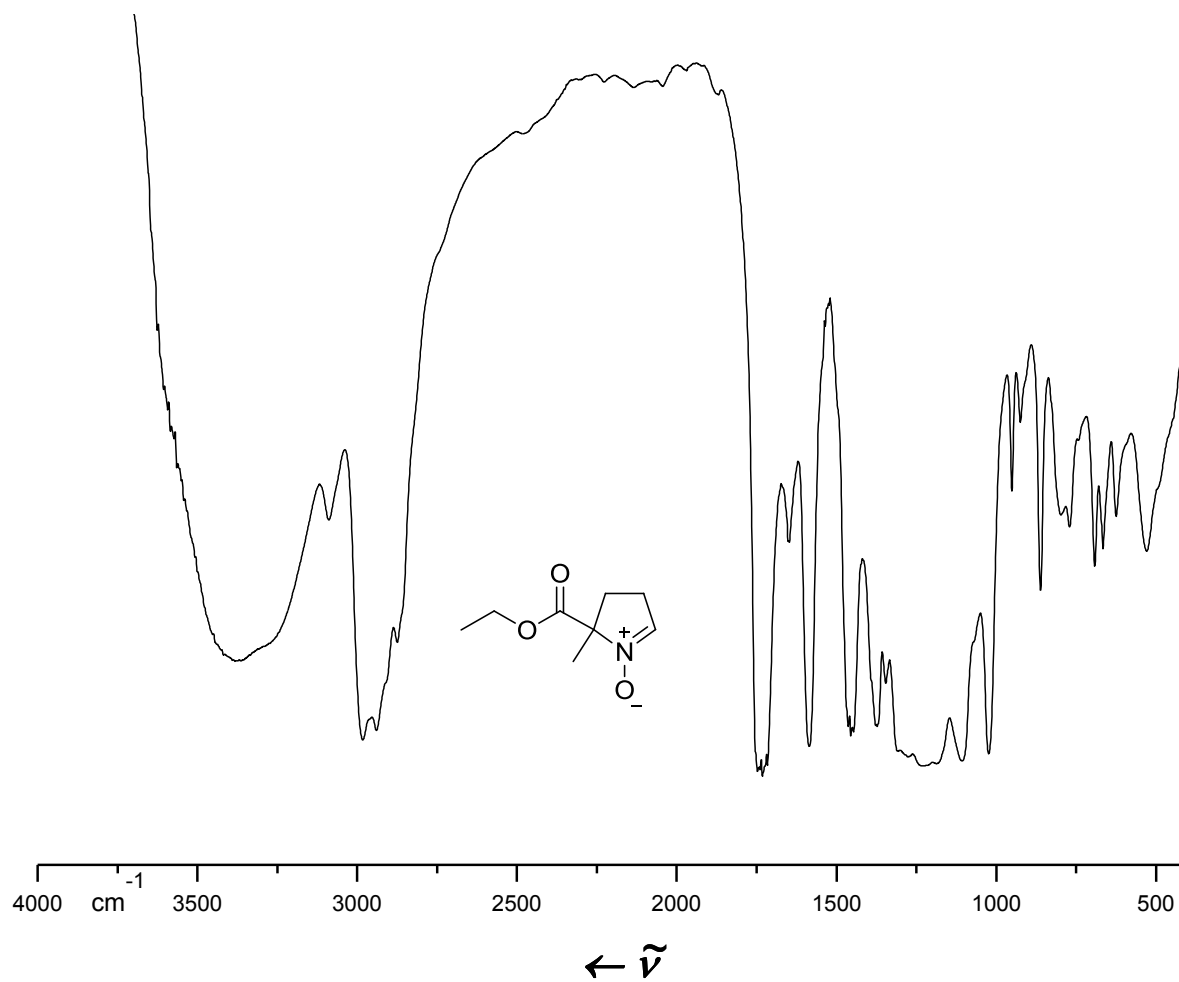
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 13.61 (C_1), 21.64 (C_2), 28.47 (C_3), 38.27 (C_4), 62.93 (C_5), 91.57 (C_6), 166.79 (C_7), 199.17 (C_8).



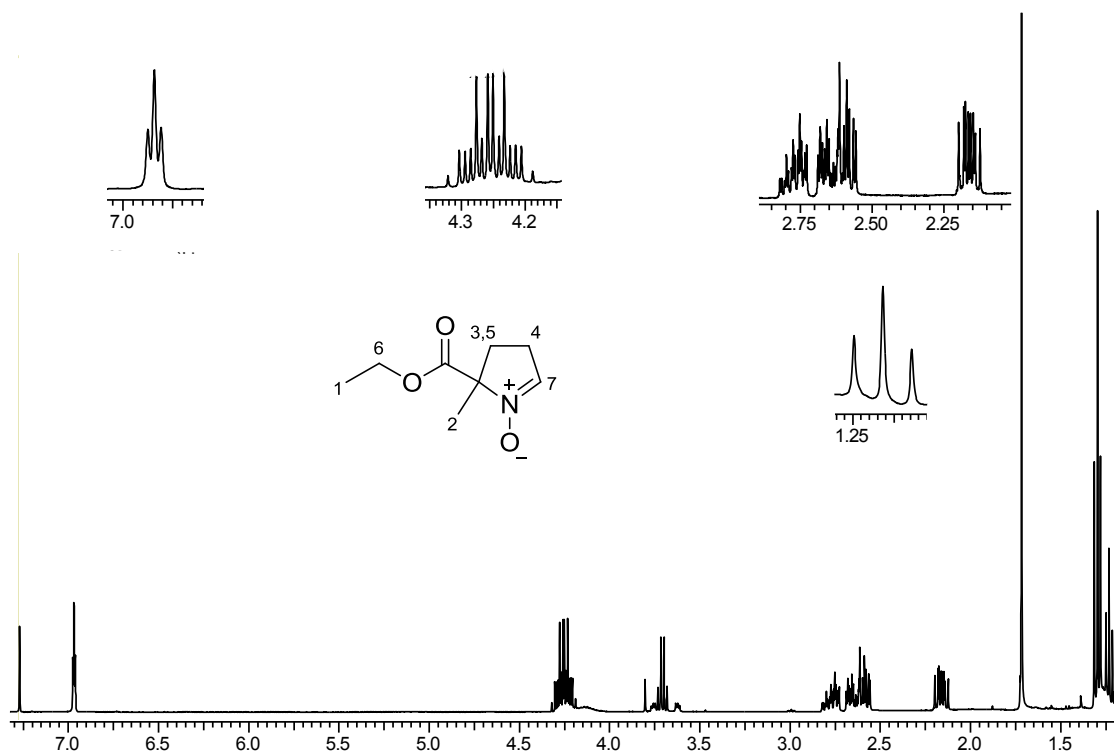
HRMS (EI): m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ für $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_5$ berechnet: 204.0867, gefunden: 204.0872.

A29 EMPO (2)

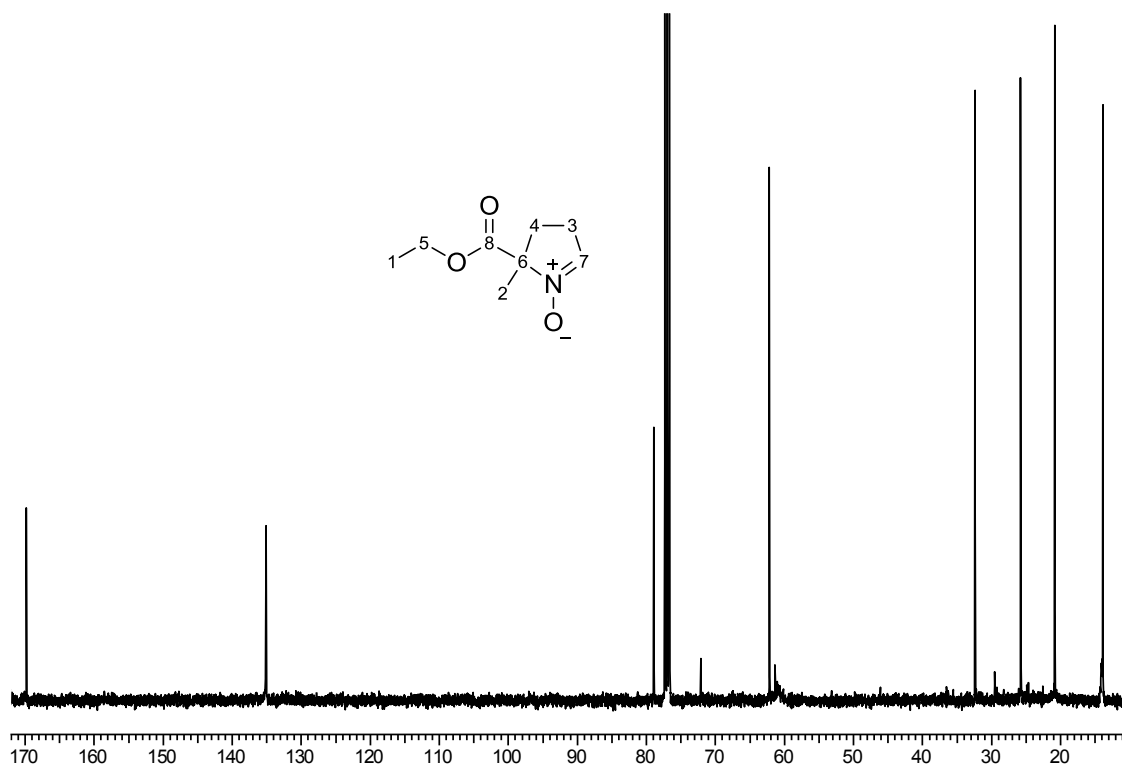
Hellgelbes Öl

IR (ATR): 3380 (s), 3092 (m), 2982 (s), 2946 (s), 2873 (m), 1741 (s), 1646 (m), 1589 (s), 1453 (s), 1375 (s), 1218 (s), 1104 (s), 1020 (s), 952 (m), 853 (m), 697 (m), 529 (m) cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.23$ (t, $J = 7.15$ Hz, 3 H, C_1), 1.65 (s, 3 H, C_2), 2.06 – 2.14 (m, 1 H, C_3), 2.49 – 2.62 (m, 2 H, C_4), 2.67 – 2.74 (m, 1 H, C_5), 4.14 – 4.24 (m, 2 H, C_6), 6.91 (t, $J = 2.64$ Hz, 1 H, C_7).



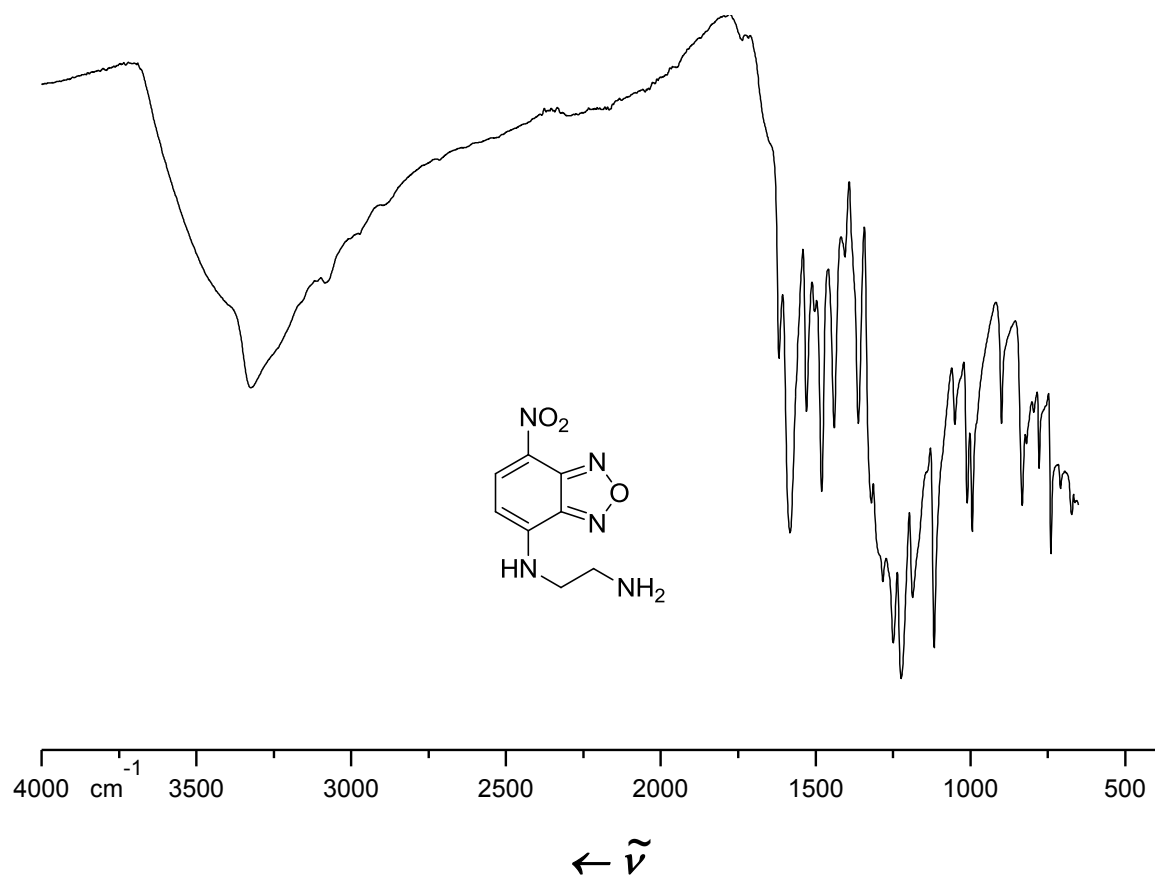
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 14.22$ (C_1), 21.18 (C_2), 26.11 (C_3), 32.68 (C_4), 62.51 (C_5), 79.26 (C_6), 135.42 (C_7), 170.13 (C_8).



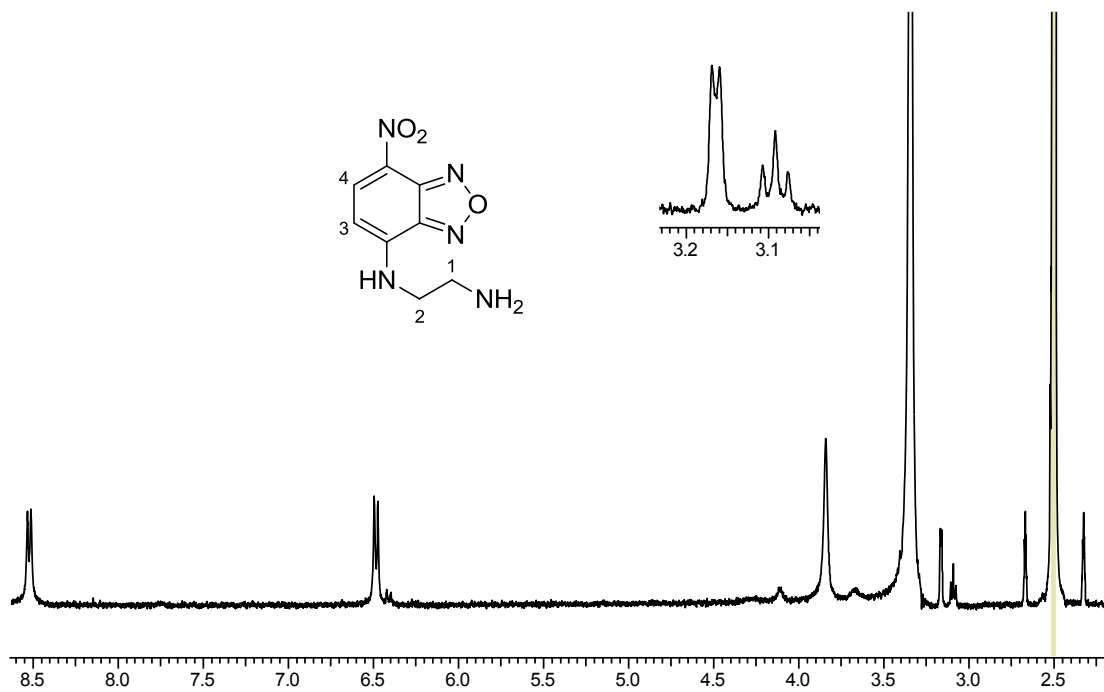
HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ für $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_3$ berechnet: 171.0890, gefunden: 171.0895.

A30 N¹-(7-Nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-yl)ethan-1,2-diamin ((NBD-ethandiamin (29))

Dunkelbraunes Pulver

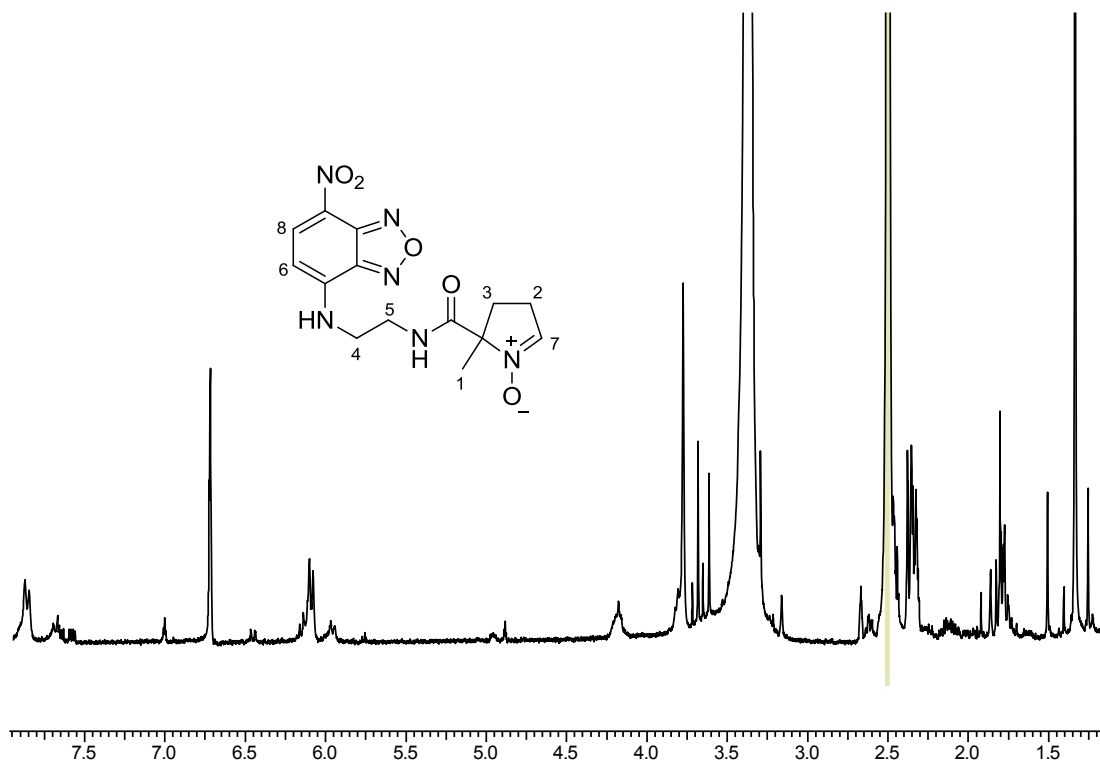
IR (ATR): 3327 (m), 3082 (w), 1583 (m), 1479 (m), 1363 (m), 1250 (s), 1220 (s), 1119 (s), 989 (m), 900 (m), 838 (m), 737 (m) cm⁻¹.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 3.08-3.17 (m, 2 H, H₁), 3.85 (s, 2 H, H₂), 6.49 (d, J = 8.80, 1 H, H₃), 8.53 (d, J = 8.80, 1 H, H₄).



A31 2-Methyl-2-((2-((7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-yl)-amino)-ethyl)carbamoyl)-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid ((NBD-AECMPO; (30))

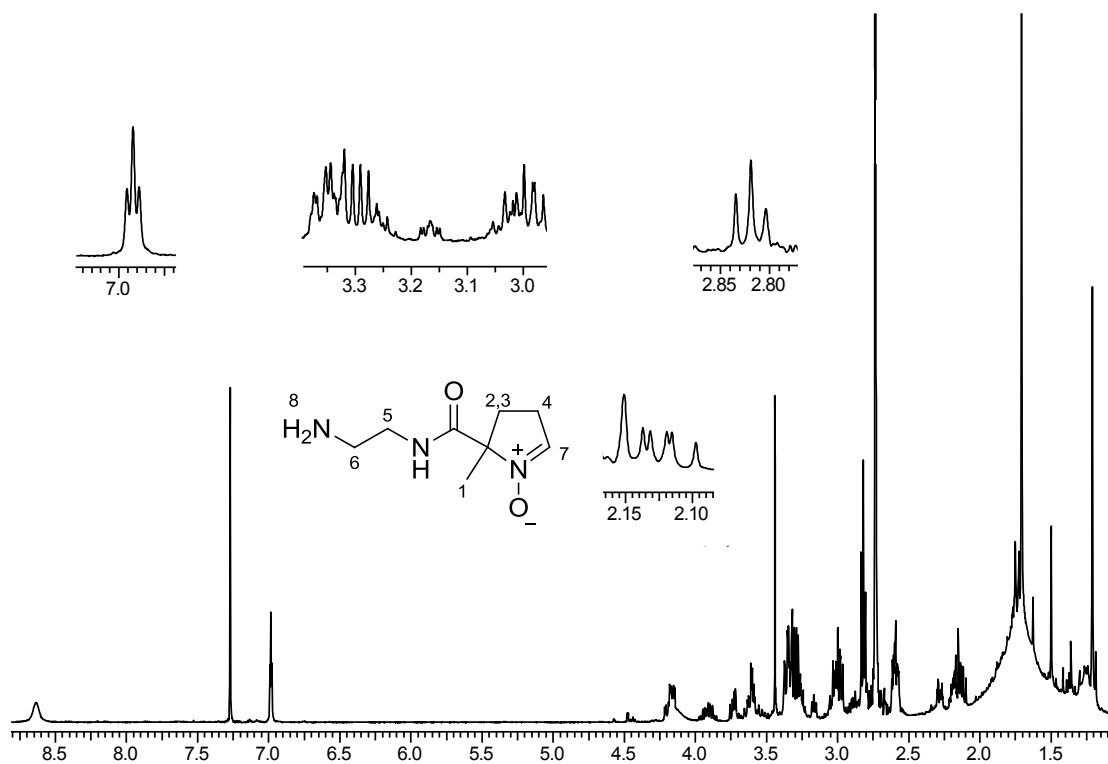
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 1.33 (s, 3 H, H₁), 1.77 – 1.86 (m, 2 H, H₂), 2.33 – 2.38 (m, 2 H, H₃), 3.39 (m, 2 H, H₄) 3.77 (m, 2 H, H₅), 6.10 (m, 1H, H₆), 6.72 (s, 1 H, H₇), 7.86 (m, 1 H, H₈).



**A32 2-((2-Aminoethyl)carbamoyl)-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid
(AECMPO; 31)**

Gelbliches Öl

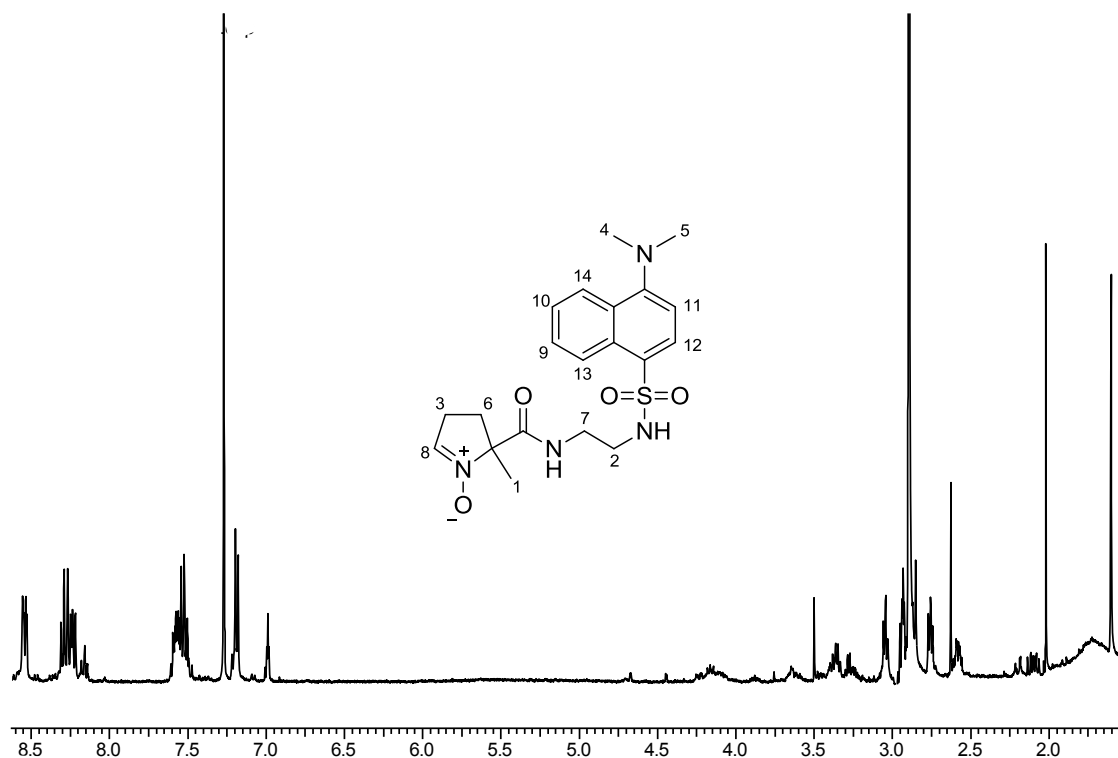
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.71$ (s, 3 H, H_1), 2.10 – 2.16 (m, 1 H, H_2), 2.58 – 2.62 (m, 2 H, H_3), 2.81 – 2.86 (m, 2 H, H_4), 2.97 – 3.00 (m, 1 H, H_5), 3.28 – 3.31 (m, 1 H, H_6), 6.99 (m, 1 H, H_7), 8.65 (br. s, 1 H, H_8).



HRMS (EI): m/z $[\text{M}]^+$ für $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ berechnet: 185.1159, gefunden: 185.1164.

A33 2-((2-(4-(Dimethylamino)naphthalen-1-sulfonamido)ethyl)carb-amoyl)-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid (Dansyl-AECMPO; (32))

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 1.60$ (s, 3 H, H_1), 2.75 – 2.78 (m, 2 H, H_2), 2.85 – 2.87 (m, 2 H, H_3), 2.89 (s, 6 H, $\text{H}_{4,5}$), 2.92 – 2.94 (m, 2 H, H_6), 3.02 – 3.05 (m, 2 H, H_7), 6.99 (s, 1H, H_8), 8.20 – 8.23 (m, 1 H, H_9), 8.24 – 8.26 (m, 1 H, H_{10}), 8.25 – 8.28 (m, 2 H, $\text{H}_{11,12}$), 8.53 – 8.55 (m, 1 H, H_{13}), 8.54 – 8.56 (m, 1 H, H_{14}).



B Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während der Zeit meines Studiums und der Promotion in Kaiserslautern unterstützt haben.

Mein ausdrücklicher Dank gilt:

- Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Vergabe des interessanten Themas, anregende Diskussionen, das entgegengebrachte Vertrauen und die hervorragende Betreuung während dieser Arbeit.
- Prof. Dr. Antonio J. Pierik für anregende Gespräche und die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Dissertation.
- Jun.-Prof. Dr. Alexander T. Cartus für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.
- Herrn Prof. Dr. Joachim W. Deitmer und insbesondere Frau Dr. Anne Thyssen für die Unterstützung und Bereitstellung des konfokalen Laser-Scanning Mikroskopes (Abteilung Zoologie der TU Kaiserslautern).
- den Mitarbeitern der Arbeitskreise Trommer und Pierik für die angenehme Arbeitsatmosphäre und viele wertvolle Tipps.
- Dr. Christian Kopp für die freundschaftliche Zusammenarbeit und Unterstützung im Labor, sowie anregende Diskussionen.
- meinen Diplomanden Tobias Stemler und Patrica Schweickert für die engagierte und fröhliche Zusammenarbeit im Rahmen dieses Forschungsprojekts.
- meinen Forschungspraktikanten Julian Menges und Ricardo Schlämann für die gute Arbeit.
- Dr. Reinhard Philipp und Dr. Stefan Hauck für anregende Gespräche.
- Elke Litmianski für die Unterstützung bei ESR-Messungen von *extractables*.
- Aline Werner für die Hilfe bei Zellkulturarbeiten.
- Frau Ruth Bergsträßer für die HRMS-Messungen.
- dem Team der Chemikalienausgabe (Lucky, Jürgen und Franky) deren Tür auch außerhalb der Öffnungszeiten immer für mich offen stand.
- Dr.-Ing. Alexander Brächer, Christoph Michel Schmalen, Ina Klockner, und Tobias Stemler für die Korrektur dieser Arbeit.

-
- meinen Studienkollegen und Freunden Alex A., Alex B., Alex C., Bechie, Chen, Dan, Julian, Mr. T., Sabrina, Schmalinski, Sen2, Thomy, Thorsten, T-Low und Tobi für die wundervolle Zeit und Ihre persönliche Unterstützung.
 - meiner Familie!
 - vor allem meinen Eltern, denen ich für die moralische und auch finanzielle Unterstützung an dieser Stelle explizit danken möchte. Durch eine Vielzahl kleiner und großer Dinge haben sie mir das Leben in den letzten Jahren enorm erleichtert. Vielen Dank für Euren Rückhalt und dass Ihr immer an mich geglaubt habt.

C Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet, sowie Literaturzitate kenntlich gemacht habe.

Kooperationsprojekte sind ausdrücklich als solche gekennzeichnet und die Mitarbeiter genannt.

Ich erkläre außerdem, dass diese Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Kaiserslautern, den 15.12.2016

André Karbach

D Lebenslauf

Studium

- 02/2017 Abschluss als **Doktor der Naturwissenschaften** (Dr. rer. nat.)
Technische Universität Kaiserslautern
- Titel der Dissertation:
„Etablierung einer milden Heck-Matsuda-Reaktion zur Synthese von Stilbennitronen und deren Anwendung als fluoreszierende Spin Traps“
- 03/2013 bis 12/2016 **Promotionsstudium der Chemie**
Technische Universität Kaiserslautern
Lehrstuhl für Biochemie
Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. E. Trommer
- 02/2013 Abschluss als **Diplom-Chemiker** (Dipl.-Chem.)
Technische Universität Kaiserslautern
- Titel der Diplomarbeit:
„Versuche zur Synthese neuartiger fluoreszierender Nitrone“
- 04/2007 bis 02/2013 **Studium der Chemie**
Technische Universität Kaiserslautern
- Schwerpunkt Life Science / Biochemie
 - Spezialisierung auf Organische Synthese und Analytik

Berufliche Erfahrung

- 05/2006 bis 02/2007 Aushilfstätigkeit im Berufsfeld eines IT-Systemelektronikers

Schulbildung

- 04/2006 **Allgemeine Hochschulreife**
Staatliches Herzog-Johann-Gymnasium, Simmern/Hunsrück
(Math.-Nat.-Wiss.)

E Publikationen

- Synthesis of Novel Fluorescent Stilbenenitrones via a Mild, Ligand-Free Heck-Type Reaction of (*E*)-[4-(1,3-Dioxolan-2-yl)styryl]trimethylsilane with Benzene Diazonium Tetrafluoroborate Derivatives

Karbach, A., T. Stemler, C. Kopp, and W. E. Trommer.

Synthesis 46, 2014: 3103-3109.

- Warning: Extractable Nitroxide Radicals in Plastic Consumables

Karbach, A., P. Schweickert, E. Litmianski and W. E. Trommer.

EPR newsletter 26 (3), 2016: 11-12.

