

**Synthese, Charakterisierung und Anwendung
von stabilen organischen Radikalen
als Spin-Sonden für die Elektronenspinresonanz-
Spektroskopie**



Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
– Biowissenschaften –
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

vorgelegt von

Frau Dipl. Pharm. Lisa Lampp
geb. am 24. September 1989 in Alsfeld

Gutachter:

1. Professor Peter Imming
2. Professor Karsten Mäder
3. Professor Klaus Müller

Halle (Saale) im Februar 2019

Verteidigt am 15. Mai 2019

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	XI
Abkürzungsverzeichnis.....	XII
Kurzfassung.....	XIV
Abstract.....	XV
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Elektronenspinresonanz.....	1
1.1.1 Das Grundprinzip der EPR-Spektroskopie.....	1
1.1.1.1 Physikalische Grundlagen.....	1
1.1.1.2 Aufbau eines CW-EPR-Spektrometers.....	2
1.1.1.3 Weitere EPR-Techniken.....	4
1.1.2 EPR-Spektren – Einflussfaktoren und Auswertung.....	5
1.1.2.1 Spektrale Aufspaltung durch Hyperfeinwechselwirkung.....	5
1.1.2.2 Parameter zur Charakterisierung von EPR-Spektren.....	6
1.2 Stabile Radikale.....	8
1.2.1 Einteilung organischer Radikale.....	8
1.2.2 Anwendung stabiler Radikale in der EPR-Spektroskopie: Spin-Sonde – Spin-Label – Spin-Falle.....	9
1.3 Zielstellung.....	10
2 Nitroxidradikale.....	12
2.1 Einleitung.....	12
2.1.1 Nitroxidradikale.....	12
2.1.1.1 Struktur und Synthese von Nitroxidradikalen.....	12
2.1.1.2 Magnetische Eigenschaften von Nitroxidradikalen.....	15
2.1.1.3 Anwendungsbeispiele für Nitroxidradikale.....	16
2.1.2 Zielstellung.....	16
2.2 Ergebnisse und Diskussion.....	18
2.2.1 Synthese.....	18
2.2.1.1 Synthese von <i>cis-7</i> , <i>trans-7</i> und 12	18
2.2.1.2 Nitroxide als Spin-Label – Synthese unterschiedlicher 12 - und 3-CP -markierter Substanzen.....	20
2.2.2 Kristall- und Molekülstrukturen von <i>cis-7</i> und 12	24
2.2.3 EPR-spektroskopische Charakterisierung der Radikale <i>cis-7</i> , <i>trans-7</i> und 12	27

2.2.3.1	Evaluierung des Einflusses von Molekülstruktur und pH-Wert auf die EPR-Spektren	27
2.2.3.2	Bestimmung der reduktiven Stabilität.....	31
2.2.4	EPR-spektroskopische Charakterisierung von 14 und 15	34
2.2.5	EPR-spektroskopische Charakterisierung des freien und Protein-gebundenen Spin-Labels 16	37
2.3	<i>Zusammenfassung</i>	40
2.4	<i>Experimenteller Teil</i>	41
2.4.1	Synthese.....	41
2.4.1.1	Materialien und allgemeine Methoden für die Synthese und analytische Charakterisierung	41
2.4.1.2	Synthesevorschriften	41
2.4.2	Kristallstrukturanalyse	52
2.4.3	EPR-Messungen.....	53
2.4.3.1	EPR-Spektren von cis/trans-7 , 12 und 3-CP	53
2.4.3.2	Bestimmung der reduktiven Stabilität mittels Ascorbinsäure-Assay	55
2.4.3.3	Vergleich der Spermin-gebundenen Nitroxide 14 und 15	55
2.4.3.4	Vergleich von Protein-gebundenem und freiem 16	56
3	Galvinoxylradikale	58
3.1	<i>Einleitung</i>	58
3.1.1	Galvinoxylradikale.....	58
3.1.1.1	Das erste Galvinoxylradikal und bekannte Derivate.....	58
3.1.1.2	Stabilität von Galvinoxyl und dessen Anwendungsbereich	59
3.1.2	Zielstellung	60
3.2	<i>Ergebnisse und Diskussion</i>	61
3.2.1	Synthese neuer Galvinoxylderivate	61
3.2.1.1	Galvinoxyl-D41.....	61
3.2.1.2	Adamantylgalvinoxyl.....	66
3.2.2	Analyse der EPR-Spektren von Galvinoxyl-D41 und Adamantylgalvinoxyl.....	67
3.2.2.1	Adamantylgalvinoxyl.....	67
3.2.2.2	Galvinoxyl-D41.....	69
3.2.3	Sauerstoffsensitivität von Galvinoxyl und Galvinoxyl-D41	71
3.2.3.1	Galvinoxyl.....	71
3.2.3.2	Galvinoxyl-D41.....	74
3.2.4	Stabilitätsuntersuchungen an Galvinoxyl und Adamantylgalvinoxyl.....	75
3.2.4.1	Bildung von Hydrogalvinoxyl als Nebenprodukt der Galvinoxyl-Synthese.....	75

3.2.4.2	Einfluss der Hydrogalvinoxyle auf die Radikalstabilität	76
3.2.4.3	Stabilisierung von Galvinoxylen durch andere Substanzen.....	78
3.2.4.4	Einfluss des Lösungsmittels auf die Radikalstabilität.....	79
3.3	Zusammenfassung	81
3.4	Experimenteller Teil.....	82
3.4.1	Synthese.....	82
3.4.1.1	Materialien und allgemeine Methoden für die Synthese und analytische Charakterisierung	82
3.4.1.2	Synthesevorschriften.....	82
3.4.2	EPR-Messungen	90
3.4.2.1	EPR-Messungen bei definiertem Sauerstoffgehalt	90
3.4.2.2	Stabilisierung von 31 durch 31-H	91
3.4.2.3	Stabilisierung von 31 durch andere Substanzen	92
3.4.2.4	Bestimmung der Stabilität von Galvinoxyl in unterschiedlichen Lösungsmitteln...	92
3.4.3	ESI-MS-Messungen.....	92
3.4.4	Bestimmung des 18-H -Gehalts von 18 mittels HPLC-Analyse	93
4	Triarylmethylradikale	94
4.1	Einleitung	94
4.1.1	Triarylmethylradikale	94
4.1.1.1	Das erste Triarylmethylradikal und daraus entstandene Tritylklassen	94
4.1.1.2	Struktur, Stabilität und magnetische Eigenschaften der Tetrathia- und Tetrachlorotrityle.....	95
4.1.1.3	Synthese von Tetrathia- und Tetrachlorotritylen	98
4.1.2	Verwendung von Triarylmethylradikale als Spin-Sonden in der EPR-Spektroskopie .	98
4.1.2.1	EPR-Oximetrie.....	99
4.1.2.2	Tetrathiatrityle zur simultanen Bestimmung von pH-Wert und Sauerstoffgehalt <i>in vivo</i>	102
4.1.3	Zielstellung	104
4.1.3.1	Untersuchung der Eignung verkapselter Trityle als sauerstoffsensitive Spin- Sonden für <i>in vivo</i> -EPR-Messungen bei 300 MHz	104
4.1.3.2	Untersuchung der Eignung neuer Methylenphosphonsäuretrityle als pH- und sauerstoffsensitive Spin-Sonden	106
4.2	Ergebnisse und Diskussion.....	107
4.2.1	Synthese.....	107
4.2.1.1	Tetrathiatriarylmethylradikale	107

4.2.1.2	Perchlorierte Triarylmethylradikale	111
4.2.2	Lipophile Gelformulierungen für die Verkapselung von Tritylradikalen als Spin-Sonden für die <i>in vivo</i> -EPR-Oximetrie bei 300 MHz	112
4.2.2.1	Zusammensetzung des <i>in situ</i> -Oleogels und des Emulgels	112
4.2.2.2	<i>In vitro</i> -Sauerstoffkalibrierung der verkapselten Trityle	114
4.2.2.3	<i>In vivo</i> -Untersuchungen der verkapselten Trityle	116
4.2.2.4	Zusammenfassung	122
4.2.3	EPR-spektroskopische Charakterisierung der Methylenphosphonsäuretrityle 39a und 40a	123
4.2.3.1	Analyse der Reinheit der Radikale 39a und 40a durch Simulation der EPR-Spektren	123
4.2.3.2	Untersuchung des Einflusses der Molekülstruktur auf die Hyperfeinkopplungskonstanten und die Linienbreiten	125
4.2.3.3	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	126
4.3	<i>Experimenteller Teil</i>	127
4.3.1	Synthese	127
4.3.1.1	Materialien und allgemeine Methoden für die Synthese und analytische Charakterisierung	127
4.3.1.2	Synthesevorschriften	127
4.3.2	Lipophile Trityle als Spin-Sonden für die EPR-Oximtrie	138
4.3.2.1	Materialien für die Gel-Herstellung und Probenpräparation	138
4.3.2.2	Herstellung der Gele	138
4.3.2.3	Probenpräparation für die <i>in vitro</i> -Sauerstoffkalibrierung	138
4.3.2.4	Präparation und Haltung der Tiere für die <i>in vivo</i> -EPR-Spektroskopie	139
4.3.2.5	CW-EPR-Messungen	140
4.3.2.6	Gepulste EPR-Messungen	141
4.3.3	EPR-spektroskopische Charakterisierung von 39 und 40	142
5	Zusammenfassung und Ausblick	143
5.1	<i>Nitroxide</i>	143
5.2	<i>Galvinoxyle</i>	144
5.3	<i>Triarylmethylradikale</i>	145
5.4	<i>Ausblick</i>	146
6	Materialien und allgemeine Methoden für die Synthese und analytische Charakterisierung	147
6.1	<i>Materialien</i>	147

6.2	<i>Arbeitstechniken</i>	147
6.2.1	Synthese unter inerten Bedingungen	147
6.2.2	Synthese in Druckgefäßen	148
6.2.3	Chromatographische Reinigung	148
6.2.3.1	Säulenchromatographie.....	148
6.2.3.2	MPLC.....	148
6.2.3.3	Präparative HPLC	148
6.3	<i>Analytische Methoden zur Charakterisierung</i>	149
6.3.1	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	149
6.3.2	Massenspektrometrie (MS).....	149
6.3.3	Infrarotspektroskopie (IR)	150
6.3.4	Schmelzpunktbestimmung.....	150
6.3.5	Dünnschichtchromatographie (DC).....	150
6.3.6	Bestimmung des Deuterierungsgrads	150
6.3.6.1	Bestimmung mittels NMR-Spektroskopie	150
6.3.6.2	Bestimmung mittels ESI-HRMS.....	151
	Literaturverzeichnis	a
	Danksagung	k
	Lebenslauf	l
	Publikationen und Poster	m
	Eigenständigkeitserklärung	o

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 (A) Räumliche Orientierung von Elektronenspins ohne (oben) und mit (unten) äußerem Magnetfeld. (B) Zeeman-Aufspaltung und Resonanzbedingung (nach Gerson et al. ⁶).....	1
Abbildung 2 Vereinfachte schematische Darstellung eines CW-EPR-Spektrometers. Nach G. Jeschke. ⁹	3
Abbildung 3 Detektion der 1. Ableitung der Absorptionskurve durch Magnetfeldmodulation. ΔV : Amplitude der Signalmodulation; ΔB_0 : Magnetfeldamplitude. Nach G. Jeschke. ⁹	3
Abbildung 4 Wechselwirkung des freien Elektrons mit einem Atomkern ($I = 1$) und daraus resultierende Energielevel und erlaubte Übergänge (nach Weil et al. ⁷).	5
Abbildung 5 Messgrößen zur Charakterisierung eines EPR-Spektrums.	6
Abbildung 6 Darstellung der Molekülstruktur organischer Radikale anhand von Beispielen.	9
Abbildung 7 Strukturen der ersten Nitroxidradikale.....	12
Abbildung 8 Einteilung der Nitroxide nach ihrer Grundstruktur.....	12
Abbildung 9 (A) Die Aminoxyl-Struktur in der (a) nichtionischen und (b) ionischen Form. (B) Disproportionierungsreaktion von Nitroxiden mit einem Proton am α -Kohlenstoffatom.....	13
Abbildung 10 Redoxreaktion der Aminoxyl-Gruppe.	13
Abbildung 11 Synthese der Aminoxyl-Gruppe.	14
Abbildung 12 Synthese unterschiedlicher Nitroxid-Derivate. (A) Synthese von Piperidin-Nitroxiden aus N-Methyl-tetramethylpiperidon. (B) De novo-Synthese von Piperidinen aus Bisphosphonaten. (C) Synthese von Pyrrolidin-Nitroxiden durch Favorskii-Umlagerung. (D) De novo-Synthese von Imidazolidin-Nitroxiden. ³⁰⁻³²	15
Abbildung 13 (A) Anstieg der reduktiven Stabilität in Abhängigkeit von Ringgröße (oben) und α -Substituenten (unten). ³⁰ (B) Molekülstrukturen der als Vergleich verwendeten Nitroxide 4-CT und 3-CP und des besonders stabilen Nitroxids 3-EtCP . (C) Strukturen von cis/trans-7 und 12	17
Abbildung 14 Synthese der Radikale cis/trans-7 und 12 . Reagenzien und Bedingungen: (I) m-CPBA, 1,2-Dichlorethan, Rückfluss, 4 h. (IIa) Diisopropylamin, Ethylvinylketon, CHCl_3 , 16 h, 60 °C. (IIb) Natriummethoxid, Ethylvinylketon,	

Methanol, 4.5 h, RT. (III) Zn, NH ₄ Cl, H ₂ O, 10 °C – RT, 4 - 12 h. (IVa) 1. Allylmagnesiumbromid, Ether, 1.5 - 12 h, -10 °C - RT. 2. Cu(OAc) ₂ , NH ₃ , O ₂ , Methanol, RT. (IVb) Wie IVa. (V) KMnO ₄ , 18-Krone-6, Benzol, 24 - 48 h, RT.	19
Abbildung 15 IR-Spektren der Radikale 6 und 11	20
Abbildung 16 Synthese von 14 und 15 . Reagenzien und Bedingungen: (I) Ethyltrifluoacetat, Methanol, -78 °C, 30 min. (II) Boc-Anhydrid in Methanol, 0 °C - RT, über Nacht. (III) NH ₃ bis pH 11, RT, 11 h. (IVa) 1. 12 , 4-DMAP, DCC, DCM, 2 h bei 0 °C, 24 h bei RT. 2. DCM, TFA, 3 h, RT. (IVb) 3-CP , 4-DMAP, DCC, DCM, 2 h bei 0 °C, 24 h bei RT. 2. DCM, TFA, 3 h, RT.	21
Abbildung 17 (A) Synthese von 16 . Reagenzien und Bedingungen: DIPEA, PyBOP, 3-CP , DCM, RT. (B) Kopplung von 16 an SCO-markiertes GFP mittels Kupfer-freier Click-Chemie. Reagenzien und Bedingungen: PBS-Puffer pH 7.4, 16 in DMSO, 2 h, RT.	23
Abbildung 18 Molekülstrukturen von cis-7 (2R, 5S) und 12 (2R) im Kristall. Die Kristallstrukturen sind zentrosymmetrisch, enthalten also jeweils beide Enantiomere. Auslenkungsellipsoide entsprechen 30 % der Aufenthaltswahrscheinlichkeit. Wasserstoffatome sind als Kugeln mit willkürlich gewählter Größe dargestellt.	24
Abbildung 19 cis-7 -Molekülketten (oben) und 12 -Dimere (unten). Die Moleküle sind über Wasserstoffbrückenbindungen (dargestellt als gestrichelte Linie) miteinander verknüpft. Kohlenstoff-gebundene Wasserstoffatome wurden zur Verbesserung der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Symmetriecodes: (a) -x+1, -y, -z; (b) -x, -y, -z+1.	26
Abbildung 20 X-Band-EPR-Spektren (rote Linie: simuliert, schwarze Linie: experimentell) von cis-7 , trans-7 , 12 und 3-CP in Phosphat-Puffer pH 7.4 (Ph. Eur., c = 1 mM) bei RT.	27
Abbildung 21 Mesomere Grenzstrukturen (a) und (b) der Nitroxid-Funktion und „Out-of- plane“-Winkel ϕ (c) der Nitroxid-Funktion.	28
Abbildung 22 pH-Wert-Abhängigkeit von a(N) von cis-7 , trans-7 , 12 und 3-CP . (A) Absolute Änderung und (B) relative Änderung von a(N) mit steigendem pH- Wert. C _{Radikal} = 0.5 mM in 150 mM NaCl-Lösung. pH-Wert-Einstellung erfolgte mit wässriger HCl- bzw. NaOH-Lösung.	30

Abbildung 23 Abnahme der Peakhöhe des Tieffeld-Peaks der getesteten Nitroxide nach Zugabe von Ascorbinsäure in Abhängigkeit von der Zeit. $C_{\text{Radikal}} = 0.5 \text{ mM}$, 10-facher Überschuss an Ascorbinsäure in Phosphat-Puffer pH 7.4 (50 mM, 2 mM EDTA), $n = 3$	32
Abbildung 24 Molekülstrukturen von 14 und 15 und Rotationsachsen der Nitroxidradikale.	35
Abbildung 25 Q-Band EPR-Spektren von (A) 14 und (B) 15 ($c = 0.5 \text{ mM}$) in Citrat-Puffer pH 5 (50 mM) mit und ohne Heparin (ca. 0.1 mM, 1 mg/ml, Aktivität 288 U/ml) und unterschiedlicher Ionenstärke (0 mM NaCl, 150 mM NaCl) bei RT im Vergleich.	36
Abbildung 26 Kovalente Bindung von MTSL an Cystein-Reste. ⁴¹	37
Abbildung 27 Oben: EPR-Spektren von (A) 16 (10 μM in PBS-Puffer pH 7.4) und (B) 16-GFP (ca. 10 μM in PBS-Puffer pH 7.4) bei unterschiedlichen Temperaturen. (Experimentelle Spektren: schwarz, simulierte Spektren: rot.); Unten: Hochfeld-Peaks von (C) 16 und (D) 16-GFP bei unterschiedlichen Temperaturen.	38
Abbildung 28 Synthese von Galvinoxyl 18 aus 4,4'-Methylenbis(2,6-di-tert-butylphenol) 17	58
Abbildung 29 Reaktion von 18 mit Sauerstoff unter Bildung des Endoperoxids von 18 (18-O₂).	59
Abbildung 30 Molekülstrukturen von Galvinoxyl-D41 (26) und Adamantylgalvinoxyl (31).	60
Abbildung 31 Deuterierung von 17 durch H/D-Austausch. Reagenzien und Bedingungen: (I) 5 % Pd/C (20 Gew.%), 5 % Pt/C (20 Gew.%), D ₂ O, 180 °C, H ₂ (1 atm), 15 to 24 h. (II) 1 % Pd/C (100 Gew.%), 1 % Pt/C (100 Gew.%), D ₂ O, 180 °C, H ₂ (1 atm), 24 h - 5 d.....	62
Abbildung 32 IR-Spektren von 19 (rot) und 17 (schwarz) im Vergleich.	62
Abbildung 33 Deuterierung von 21 durch eine H/D-Austausch-Reaktion. Reagenzien und Bedingungen: (I) 5 % Pd/C (20 Gew.%), 5 % Pt/C (20 Gew.%), D ₂ O, 180 °C, H ₂ (1 atm), 15 h - 3 d. (II) 1 % Pd/C (100 Gew.%), 1 % Pt/C (100 Gew.%), D ₂ O, 180 °C, H ₂ (1 atm), 2 d - 3 d.	63
Abbildung 34 Synthese von 26 ausgehend von deuterierten Edukten. Reagenzien und Bedingungen: (I) <i>tert</i> -Butanol (D10, 98 %), D ₂ SO ₄ (99.5 % D), 160 °C, 3 h, Glasdruckgefäß. (II) 5 % Pd/C (50 Gew.%), D ₂ (8 bar), DCM/Methanol-D1 (2:1), RT, 7 h. (III) Paraformaldehyd (D2, 99 %), Isopropanol-D1, NaOD (40 %) in	

D ₂ O, 35 °C, Argon, 40 min. (IV) K ₃ Fe(CN) ₆ , NaOD (40 %) in D ₂ O, Benzol-D ₆ , Argon, RT, 60 min.....	65
Abbildung 35 Synthese von 31 . Reagenzien und Bedingungen: (I) AdOH , AdBr , 210 °C, 3 h, Glasdruckgefäß. (II) 5 % Pd/C (50 wt %), H ₂ (5 bar), Methanol/DCM, RT, über Nacht. (III) Paraformaldehyd, Ameisensäure, Rückfluss, 2.5 h. (IV) K ₃ Fe(CN) ₆ , NaOH (40 %) in H ₂ O, Benzol, Argon, RT, 60 min.	66
Abbildung 36 Experimentelles (schwarz) und simuliertes (rot) L-Band-EPR-Spektrum von (A) 31 und (B) 18 (1 mM in Toluol unter Stickstoffatmosphäre, RT).	68
Abbildung 37 Dreidimensionale Struktur der Alkylsubstituenten von (A) 31 und (B) 18 . .	69
Abbildung 38 Experimentelles (schwarz) und simuliertes (rot) L-Band-EPR-Spektrum von 26 in (A) Toluol und (B) in Octanol (1 mM in unter Stickstoffatmosphäre, RT).	69
Abbildung 39 (A) Abhängigkeit der Linienbreite von 18 von der Sauerstoffkonzentration (c = 1 mM, n = 3); R ² = 0.999. (B) EPR-Spektren von 18 mit steigender Sauerstoffkonzentration bei RT.	72
Abbildung 40 (A) EPR-Spektren von 26 mit steigender Sauerstoffkonzentration. R ² = 0.997. (B) Linienbreite (ΔB_{pp}) von 26 in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration. (C) Änderung der Amplituden von 26 in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration in linearer und halblogarithmische Darstellung (R ² = 0.998). (c = 1 mM, n = 3).	74
Abbildung 41 Mögliche Reaktionswege für die Bildung von 18 und 18-H ausgehend vom Methylenbisphenol 17 . Abbildung adaptiert von Omelka et al. ⁹⁴	75
Abbildung 42 Bildung von 31-H aus 30 und 31	76
Abbildung 43 (A) Stabilisierung von 31 (c _{Start} = 1 mM in Toluol) durch 31-H . Die AUC wurde durch doppelte Integration der EPR-Spektren ermittelt. (C) EPR-Spektren von 31 mit 0 % und 50 % 31-H zu ausgewählten Zeitpunkten.	77
Abbildung 44 Stabilität von 18 in unterschiedlichen Lösungsmitteln (c _{Start} = 1 mM). Die AUC wurde durch doppelte Integration der erhaltenen EPR-Spektren bestimmt.	79
Abbildung 45 Molekülstruktur unterschiedlicher Triarylmethylradikale.....	94
Abbildung 46 Oxidative Decarboxylierung von Tetrathiatritylen.....	97
Abbildung 47 Der Effekt intermolekularer Wechselwirkung zwischen Spin-Sonden und Sauerstoff auf die Peak-zu-Peak-Linienbreite. Nach Ahmad et al. ²	100
Abbildung 48 Molekülstrukturen einiger pH-sensitiver Tritylradikale.....	102
Abbildung 49 Strukturmodell von Oleogelen und Emulgelen.	105

- Abbildung 50 Molekülstrukturen der für die Verkapselung verwendeten Trityle..... 105
- Abbildung 51 Molekülstrukturen der Methylenphosphonsäuretrityle **39a** und **40a**..... 106
- Abbildung 52 (A) Synthese der Tritylvorstufe **34**. Reagenzien und Bedingungen: (I) 1,2,4,5-Tetra-*tert*-butylthiobenzol (**32**), HBF₄ in Diethylether, Aceton-D₆, Toluol, 4 h RT, Reflux über Nacht. (II) **33**, n-BuLi, Chlorameisensäuremethylester, Diethylether, RT, über Nacht. (B) H/D-Austausch durch Keto-Enol-Tautomerie während Synthese-Schritt (I)..... 108
- Abbildung 53 Synthese von **36-D** ausgehend von Triarylmethanol **34**. Reagenzien und Bedingungen: (I) n-BuLi, TMEDA, Hexan, 4 h RT; Diboc, 2 d, RT. (II) BF₃•Diethylether, DCM (trocken), Argon, 1 h, RT; SnCl₂ in THF, 10 min, RT .
..... 108
- Abbildung 54 Synthese der Trityle **39a** und **40a**. Reagenzien und Bedingungen: (I) TMEDA, 2.5 M n-BuLi in Hexane, trockener Diethylether, 0 °C bis RT, 3.5 h, Paraformaldehyd-D₂ (99 % D), 24 h, RT. (II) ZnI₂, Triethylphosphit, trockenes Toluol, 80 °C, über Nacht. (IIIa) BF₃•Et₂O, DCM, 1 h, RT; SnCl₂ in trockenem THF, 10 min, RT. (IIIb) Bromotrimethylsilan, DCM, über Nacht, RT; Methanol, 4 h, Reflux..... 109
- Abbildung 55 ¹H-NMR von **37**..... 110
- Abbildung 56 Synthese der perchlorierten Trityle **44** und **45**. Reagenzien und Bedingungen: (I) AlCl₃, CHCl₃, Glasdruckgefäß, 160 °C, 45 min. (II) TMEDA, n-BuLi, THF, -78 °C, 1h; Chlorameisensäureethylester, -78 °C bis RT, über Nacht. (III) Bu₄NOH, THF, RT, 1 h; p-Chloranil, RT, über Nacht. (IV) konz. H₂SO₄, 90 °C, über Nacht. 112
- Abbildung 57 Molekülstrukturen der Inhaltsstoffe des Oleogels. 113
- Abbildung 58 (A) Sauerstoffkalibriergeraden der lipophilen Radikale gelöst in IPM (**36-D**, **36-H**: 1 mM; **44**: 5 mM) und Linienbreite der Radiale verkapselt in das Oleogel bei 0 % und 5 % O₂. (B) Sauerstoffkalibriergeraden des hydrophilen Radikals **46** (c = 1 mM) gelöst in PBS pH 7.4 und Linienbreite des Radikals verkapselt in das Emulgel bei 0 % und 5 % O₂. Die lineare Regression wurde mit den Daten der Radikallösungen in IPM bzw. PBS durchgeführt; n =3. Die Messwerte bei 0 % O₂ von **44** wurden bei der linearen Regression nicht berücksichtigt. 115
- Abbildung 59 Signalintensität (AUC) der verkapselten Radikale in vivo..... 118
- Abbildung 60 (A) Linienbreiten der verkapselten Radikale in vivo unter Normoxie (20.9 % O₂) und Hypoxie (10 % O₂) am Tag der Injektion. (B) Vorgehensweise bei der

Messung der EPR-Spektren mit unterschiedlichem Sauerstoffgehalt in der Atemluft.....	120
Abbildung 61 Peak-zu-Peak-Linienbreiten der Radikale an den Tagen 0 bis 14 unter Normoxie und die daraus berechneten Gewebesauerstoffkonzentrationen....	120
Abbildung 62 In vivo-EPR-Spektren von Radikal 36-D verkapselt im Oleogel an unterschiedlichen Tagen nach der Injektion. Sauerstoffgehalt der Atemluft während der Messung: 20.9 %. Schwarz: Rohdaten; rot: gefilterte Daten.....	122
Abbildung 63 X-Band-EPR-Spektren von (A) 39a mit etwa 5 % 39b und (B) 40a-c in DMSO ($c \approx 200 \mu\text{M}$, Proben entgast) bei 25 °C.	123
Abbildung 64 X-Band-EPR-Spektrum von 40a (gelöst im DCM, Konzentration unbekannt) vor dem Versuch der Reinigung bei RT. Schwarz: experimentelles Spektrum; rot: simuliertes Spektrum.	124
Abbildung 65 (A) Überlappung der Phosphor-3s-Orbitals mit dem Kohlenstoff-2pz-Orbital. Abbildung modifiziert nach Allen et al. ²⁰⁸ (B) Semichinonphosphatradikal 2,3,5,6-tetramethyl-1,4-benzosemichinon-1-phosphat.	125

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Ausgewählte Bindungslängen (Å) und Bindungswinkel (°) für die Radikale cis-7 und 12	25
Tabelle 2 Geometrie der Wasserstoffbrückenbindungen (Å,*) von cis-7 und 12	26
Tabelle 3 Hyperfeinkopplungskonstanten a und Peak-zu-Peak-Linienbreiten (ΔB_{pp}) von 3-CP , cis-7 , trans-7 und 12 bei unterschiedlichen pH-Werten.....	29
Tabelle 4 Maximale Änderung der Hyperfeinkopplungskonstante $\Delta a(N)_{max}$ in Abhängigkeit vom pH-Wert und pKa-Werte.....	31
Tabelle 5 Mittlere initiale Reduktionsrate (avg k) der getesteten Radikale und restliche Radikalmenge nach 90 min.	32
Tabelle 6 Swain/Lupton F-Parameter. ⁷⁶	34
Tabelle 7 Simulationsparameter von 16 und 16-GFP	39
Tabelle 8 Kristallographische Daten für cis-7 und 12	52
Tabelle 9 Geräteparameter für die EPR-Messung.	54
Tabelle 10 Geräteparameter für die EPR-Messung.	54
Tabelle 11 Geräteparameter für die EPR-Messung.	55

Tabelle 12 Geräteparameter für die EPR-Messung.	56
Tabelle 13 Zusammensetzung des PBS-Puffers (pH 7.4) für die Labeling-Reaktion	56
Tabelle 14 Geräteparameter für die EPR-Messung.	57
Tabelle 15 Ausbeute und Deuterierungsgrad* von 20 je nach Reaktionszeit	62
Tabelle 16 Ausbeute und Deuterierungsgrad* von 21 je nach Reaktionszeit	64
Tabelle 17 Weitere Versuche zur Deuterierung von 21 , insbesondere in meta-Position.....	64
Tabelle 18 Hyperfeinkopplungskonstanten und Linienbreiten der Radikale 31 und 18	69
Tabelle 19 Hyperfeinkopplungskonstanten und Linienbreiten von 26	70
Tabelle 20 Geräteparameter für die EPR-Messungen.....	90
Tabelle 21 Zusammensetzung der Proben.	91
Tabelle 22 Geräteparameter für die EPR-Messungen.....	92
Tabelle 23 Zusammensetzung der Formulierungen. Die Anteile sind in Massenprozent angegeben (% , m/m).	114
Tabelle 24 Parameter der in Abbildung 63 gezeigten Simulationen.....	124
Tabelle 25 Zusammensetzung der Gasgemische für die Equilibrierung der Proben.	139
Tabelle 26 Geräteparameter für die in vivo- und in vitro-EPR-Messung bei 300 MHz....	140
Tabelle 27 Geräteparameter für die gepulsten EPR-Messung bei 300 MHz.	141
Tabelle 28 Geräteparameter für die EPR-Messung.	142

Abkürzungsverzeichnis

ΔB_{pp}	Peak-zu-Peak-Linienbreite
η	Viskosität
ν	Frequenz
3-CP	3-Carboxy-Proxyl
4-CT	4-Carboxy-Tempo
4-DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
12-HSA	12-Hydroxystearinsäure
a	Hyperfeinkopplungskonstante
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Kurve)
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
Bu ₄ NOH	Tetrabutylammoniumhydroxid
n-BuLi	n-Butyllithium
CHCl ₃	Chloroform
<i>m</i> -CPBA	meta-Chloroperoxybenzoesäure
d	Tag
DC	Dünnschichtchromatographie

DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCU	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylharnstoff
DCM	Dichlormethan
Diboc	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
DIPEA	Diisopropylethanolamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EPR	electron paramagnetic resonance
ESI	Elektrosprayionisation
ESR	Elektronenspinresonanz
EtAc	Ethylacetat
Et ₂ O	Diethylether
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde
HAc	Essigsäure
HMB	Hexamethylbenzol
H-Tet	(4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)phenyl)-methanamin
IPM	Isopropylmyristat
MCT	Mittelkettige Triglyceride
NMP	N-Methylpyrrolidon
IR	Infrarot
LM	Lösungsmittel
MeOH	Methanol
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butyl-ether
MTSL	2,2,5,5-Tetramethyl-1-oxyl-3-methylmethanthiosulfonat
NMR	nuclear magnetic resonance
SDSL	Side Directed Spin Labeling
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
Ph. Eur.	Pharmacopoea Europaea (Europäisches Arzneibuch)
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat
RT	Raumtemperatur
SCO	cis-Cyclooctin
SPIEDAC	Strain-promoted inverse electron-demand Diels-Alder-Cycloaddition
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phospin
TCO	trans-Cyclooctin
TMEDA	Tetramethylethylendiamin

Kurzfassung

Die EPR-Spektroskopie („*electron paramagnetic resonance*“) ist eine Methode, mit der paramagnetische Substanzen wie stabile organische Radikale untersucht werden können.

EPR-Spektren solcher Radikale werden u. a. von der Molekülstruktur, der Anwesenheit anderer paramagnetischer Moleküle (z. B. Sauerstoff) oder von der Viskosität, Polarität und dem pH-Wert des umgebenden Mediums beeinflusst. Dadurch ergeben sich zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten für die EPR-Spektroskopie. In der Biologie wird die EPR-Spektroskopie z. B. zur Proteinstrukturanalyse verwendet. Weiterhin wird die EPR-Spektroskopie zur Bestimmung von Sauerstoffkonzentrationen und pH-Werten im Gewebe und Organen genutzt. Sie ist daher eine wichtige analytische Methode in der medizinischen Forschung und hat auch Potential in der medizinischen Diagnostik.

Ziel dieser Arbeit war es, die für diese Untersuchungen benötigten organischen Radikale direkt durch Strukturoptimierung oder indirekt durch Verkapselung in Gele zu optimieren, zu charakterisieren und deren Anwendbarkeit für unterschiedliche EPR-spektroskopische Methoden zu testen.

Es wurden neue Nitroxidradikale mit einer verbesserten reduktiven Stabilität synthetisiert, um deren Anwendbarkeit bei Untersuchungen auf Zellebene und *in vivo* zu verbessern. Weiterhin wurde die Anwendbarkeit von Nitroxiden für unterschiedliche Spin-Labeling-Methoden evaluiert.

Die Gruppe der Galvinoxylradikale wurde um zwei neue Derivate erweitert. Diese wurden mittels EPR charakterisiert. Weiterhin wurde die Stabilität von Galvinoxylen gegenüber Sauerstoff und unter unterschiedlichen Bedingungen untersucht. Ein wahrscheinlicher Mechanismus für die Stabilisierung gegenüber der Reaktion mit Sauerstoff wurde gefunden. Die Verwendung von Galvinoxylen als sauerstoffsensitive Spin-Sonden wurde evaluiert. Die Galvinoxyle zeigten eine gute Sauerstoffsensitivität und eignen sich daher bei Wahl der richtigen Bedingungen als Sonden in der EPR-Oximetrie.

Triarylmethylradikale wurden in lipophile Gele verkapselt und die Sauerstoffsensitivität *in vitro* und *in vivo* getestet. Die Verkapselung beeinflusste *in vitro* weder die Sensitivität noch die Linienbreite der Radikale. Für die *in vivo*-Untersuchung wurden die verkapselten Radikale in die Hinterbeine von weiblichen C3H-Mäusen injiziert. Die Radikale zeigten direkt nach in der Injektion eine gute Sauerstoffsensitivität, welche aber infolge der Invasivität der Injektion über den Beobachtungszeitraum verloren ging. Die Halbwertszeit der Radikale wurde durch das Verkapseln auf ca. drei Wochen verlängert.

Abstract

EPR spectroscopy (*'electron paramagnetic resonance'*) is an analytical method for the characterization of paramagnetic compounds. Stable organic radicals are widely used probes for different EPR applications.

EPR spectra are influenced by the molecular structure of the probes, the presence of other paramagnetic compounds (prominently, oxygen) and by the viscosity, polarity and pH of the embedding medium. Biological applications of EPR include protein structure analysis, the quantitative determination of oxygen levels and pH in tissues and organs. It is therefore an important analytical tool for medicinal research and a potentially useful tool for medicinal diagnostics.

The aim of this work was to optimize and characterize three types of stable organic radicals directly by structure variation und indirectly by encapsulation of radicals in lipophilic gels. The applicability of the new and encapsulated radicals for different EPR applications was investigated.

Three new nitroxide radicals were synthesized. They had improved reductive stability. Their application for different spin labeling methods was tested and compared with known nitroxides.

Two new galvinoxyl derivatives were synthesized and characterized by EPR spectroscopy. The stability of galvinoxyl against oxygen and under different conditions was determined. A probable mechanism for the stabilization against oxygen was found. The application of galvinoxyls as oxygen sensitive spin probes was evaluated. They had excellent oxygen sensitivity. They have the potential to be particularly useful for the EPR quantitation of physiological levels of oxygen.

Triarylmethylradicals were encapsulated in lipophilic gels. Their oxygen sensitivity was tested *in vitro* and *in vivo*. The encapsulation did not influence the oxygen sensitivity and linewidth *in vitro*. For *in vivo* studies the encapsulated radicals were injected in the hind leg of female C3H mice. The EPR signal of the injected radicals was measured over three weeks. The encapsulated radicals showed *in vivo* a good response to reduced oxygen concentration after application of the gels. Over time, the sensitivity got lost due to different reasons. Encapsulation prolonged the radicals' half-life to approx. three weeks.

1 Einleitung

1.1 Die Elektronenspinresonanz

Die Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR; englisch *electron paramagnetic resonance*, EPR) ist eng verwandt mit der Kernresonanzspektroskopie (NMR). Die EPR-Spektroskopie betrachtet dabei nicht die Magnetisierung von Kernen, sondern die Magnetisierung von ungepaarten Elektronen in einem von außen angelegten Magnetfeld. Das erste EPR-Experiment wurde von 1945 von E. Zavoisky durchgeführt.¹ Seitdem wurde die Methode stetig weiterentwickelt. Heutzutage findet sie Anwendung in nahezu allen Bereichen der Naturwissenschaften wie der Physik, Chemie, Biologie und Medizin.²⁻⁵

1.1.1 Das Grundprinzip der EPR-Spektroskopie

1.1.1.1 Physikalische Grundlagen

Mit der EPR-Spektroskopie ist die Detektion und Charakterisierung paramagnetischer Substanzen möglich. Paramagnetische Substanzen sind Stoffe mit ungepaarten Elektronen wie organische Radikale oder Übergangsmetalle.

Elektronen besitzen einen Eigendrehimpuls („Spin“), das heißt sie rotieren um ihre eigene Achse. Durch diese Drehung erhalten die Elektronen ein magnetisches Moment. Sie verhalten sich wie kleine Stabmagnete. Die Spinquantenzahl eines Elektrons (s) beträgt $\frac{1}{2}$ und kann bezogen auf die Drehachse zwei Richtungen annehmen.

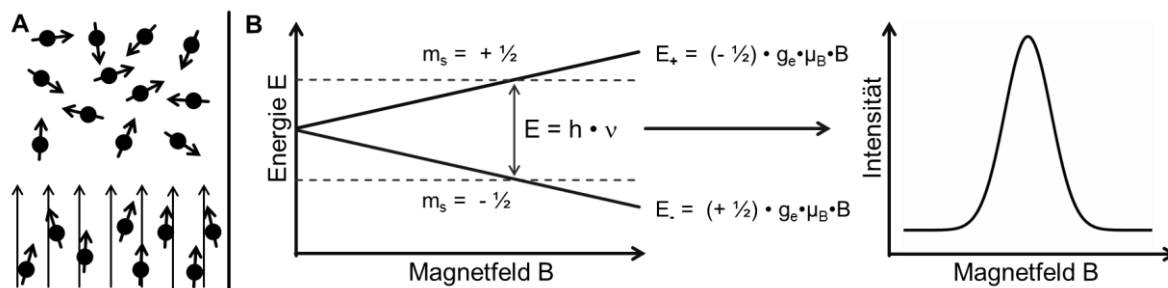


Abbildung 1 (A) Räumliche Orientierung von Elektronenspins ohne (oben) und mit (unten) äußerem Magnetfeld. (B) Zeeman-Aufspaltung und Resonanzbedingung (nach Gerson et al.⁶).

Daraus ergeben sich die magnetischen Spinquantenzahlen $m_s = \pm \frac{1}{2}$. Ohne ein äußeres Magnetfeld ist die Orientierung der „Elektronenspins“ im Raum zufällig, sodass nach außen

hin keine messbare Magnetisierung vorhanden ist. Wird die paramagnetische Substanz in ein Magnetfeld eingebracht, richten sich die Elektronenspins in diesem Magnetfeld aus (*Abbildung 1 (A)*). Die Ausrichtung erfolgt parallel oder antiparallel zum äußeren Magnetfeld. Durch die unterschiedliche Ausrichtung ergeben sich zwei energetisch unterschiedliche Zustände. Die Energiedifferenz ist direkt proportional zur Magnetfeldstärke. Die Aufspaltung der Elektronenspins nennt man auch „Zeeman“-Splitting (*Abbildung 1 (B)*).

Durch Bestrahlung mit elektromagnetischen Wellen können Übergänge zwischen den Elektronenspins induziert werden. Damit dies geschieht, muss die sog. „Resonanzbedingung“ erfüllt sein:

$$\Delta E = h * \nu = g * \mu_B * B$$

ΔE	= Energiedifferenz zwischen E_+ und E_-
h	= Plancksches Wirkungsquantum
ν	= Frequenz der Mikrowellenstrahlung
g	= g-Faktor (auch Landé-Faktor)
μ_B	= Bohrsches Magneton
B	= Magnetfeldstärke

Es kommt also nur dann zur Absorption elektromagnetischer Strahlung und damit zur Anregung von Übergängen zwischen den Elektronenspins, wenn die Energie dieser Strahlung genau der Energiedifferenz zwischen den beiden Elektronenspins entspricht. Die Menge absorbiertes Energie kann bei entsprechendem Messaufbau detektiert werden.^{2, 6-8}

1.1.1.2 Aufbau eines CW-EPR-Spektrometers

Die am häufigsten verwendete Messmethode ist die CW-EPR-Spektroskopie. Bei dieser Methode wird die Stärke des angelegten Magnetfelds kontinuierlich verändert, während die Frequenz der elektromagnetischen Strahlung konstant ist.

In *Abbildung 2* ist der Aufbau eines EPR-Spektrometers schematisch dargestellt. Eine Kernkomponente des Spektrometers ist die Mikrowellenquelle. Sie liefert elektromagnetische Strahlen mit einer konstanten, aber in einem gewissen Bereich variablen Wellenlänge. Die Mikrowellen werden im Zirkulator umgelenkt und in den Resonator geleitet. Die Abmessungen des Resonators sind auf die Wellenlänge abgestimmt, dadurch bildet sich eine stehende Welle aus und die eingestrahelte Energie wird im Resonator als

Wärmeenergie gespeichert. Da das Einbringen einer Probe die Dimensionen und Impedanz des Resonators beeinflussen, muss vor der Durchführung jeder Messung die Wellenlänge angepasst werden.

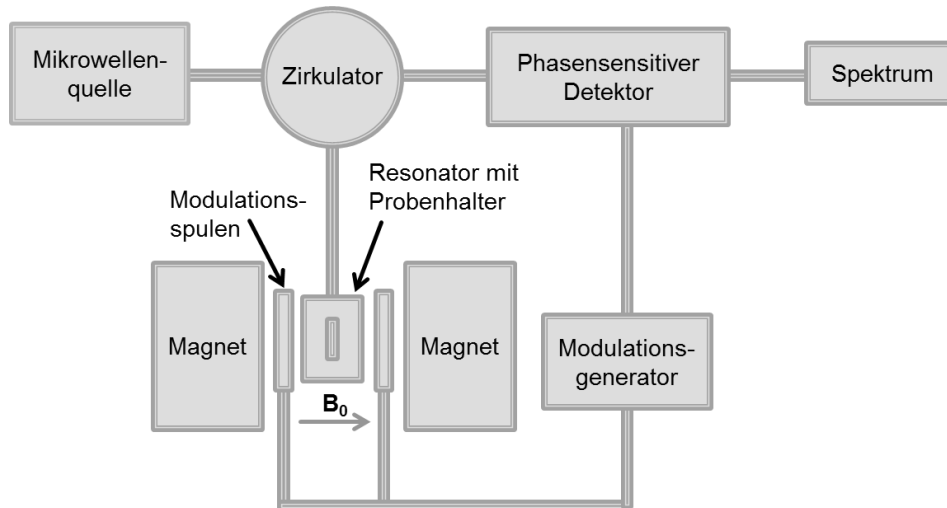


Abbildung 2 Vereinfachte schematische Darstellung eines CW-EPR-Spektrometers. Nach G. Jeschke.⁹

Im Resonanzfall wird von der Probe Strahlung absorbiert. Dies vergrößert die Impedanz des Resonators und es kommt zur Reflexion von Mikrowellenstrahlung. Diese wird über den Zirkulator zum Detektor geleitet und in ein Signal umgewandelt.

Um die Empfindlichkeit des Spektrometers zu verbessern, wird das angelegte Magnetfeld durch ein zweites oszillierendes Magnetfeld moduliert. Das dann im Resonanzfall entstehende ebenfalls modulierte Signal wird von einem phasensensitiven Detektor (auch „Lock-in“-Detektor) registriert und mit einem Referenzsignal verglichen.

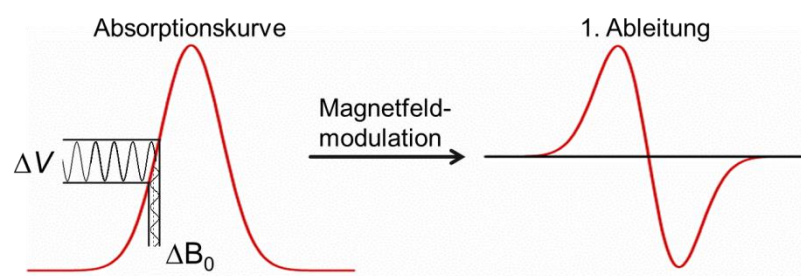


Abbildung 3 Detektion der 1. Ableitung der Absorptionskurve durch Magnetfeldmodulation. ΔV : Amplitude der Signalmodulation; ΔB_0 : Magnetfeldamplitude. Nach G. Jeschke.⁹

Signale wie thermisches Rauschen, deren Phase nicht mit dem Referenzsignal übereinstimmt, werden auf diese Weise herausgefiltert. Die Frequenz des Magnetfelds beträgt i. d. R. 100 kHz. Durch die Messung der Amplitude ΔV der Signalmodulation und Darstellung gegen das mittlere Magnetfeld B_0 erhält man als Signal keine Absorptionskurve, sondern die 1. Ableitung dieser (*Abbildung 3*).^{2, 7, 9}

EPR-Spektrometer werden je nach verwendetem Frequenzbereich in unterschiedliche Gruppen („Bänder“) eingeteilt. Am gängigsten sind X-Band-Spektrometer (ca. 9.5 GHz). Weitere sind L-Band (ca. 1 GHz), Q-Band (36 GHz) und W-Band (95 GHz).⁶ Je höher die Frequenz, desto besser ist die Auflösung der EPR-Spektren. Zugleich sinkt aber auch die Eindringtiefe der elektromagnetischen Strahlung, da diese durch nicht-resonante Absorption verloren geht und zur Erwärmung der Probe führt. Für *in vivo*-Messungen müssen daher geringe Frequenzen (L-Band oder kleiner) verwendet werden.^{2, 6, 10} Die *in vivo*-Messungen in dieser Arbeit (siehe 4.2.2.3) wurden an einem 300 MHz-Spektrometer durchgeführt.

1.1.1.3 Weitere EPR-Techniken

Neben der CW-EPR-Spektroskopie gibt es zahlreiche weitere Messvarianten. Eine wichtige Methode ist die Puls-EPR-Spektroskopie. Bei dieser wird mit einem konstanten Magnetfeld gearbeitet und die Probe mit leistungsstarken Mikrowellenimpulsen angeregt. Gemessen wird die zeitabhängige Relaxation der Probe. Aus diesen Daten wird mittels Fourier-Transformation ein EPR-Spektrum generiert. Die Puls-EPR-Spektroskopie ist sensitiver als die CW-EPR-Spektroskopie und benötigt in der Regel kürzere Messzeiten. Sie ist allerdings nur anwendbar, wenn die Spin-Sonden ausreichend schmale Linien bzw. lange Relaxationszeiten haben.^{7, 9}

Sowohl die CW- als auch die Puls-EPR-Spektroskopie können für bildgebende Verfahren (EPR-Imaging) verwendet werden. Beim EPR-Imaging können durch Verwendung von Magnetfeldgradienten in einer oder mehreren Raumrichtungen Informationen über die Verteilung der Sonden (*spatial imaging*) bzw. Informationen über die Verteilung und die Spektren (*spectral-spatial imaging*) erhalten werden. Das EPR-Imaging ist eine nützliche Methode in der pharmazeutischen Technologie (z.B. zur Untersuchung von „Drug-Delivery-Systemen“) und eine vielversprechende Methode für die *in vivo*-EPR-Oximetrie (siehe Abschnitt 4.1.2.1). Da die Auflösung des EPR-Imagings unter anderem von der Linienbreite der Spin-Sonde abhängt, eignen sich für dieses Verfahren vor allem Triarylmethylradikale (siehe Abschnitt 4.1.1).^{3, 4, 11, 12}

1.1.2 EPR-Spektren – Einflussfaktoren und Auswertung

1.1.2.1 Spektrale Aufspaltung durch Hyperfeinwechselwirkung

Ein freies Elektron selbst kann zunächst in zwei energetisch unterschiedlichen Zuständen ($m_s = \pm 1/2$, siehe *Abbildung 1 (B)*) vorliegen. Durch Kontakt mit Atomkernen, deren Kernspin ungleich null ist, werden diese Energielevels nochmals aufgespalten, da die Kerne durch ihr eigenes magnetisches Moment das lokale Magnetfeld beeinflussen. Die Anzahl der erlaubten Übergänge und damit die Aufspaltung des EPR-Signals hängt von der Anzahl und dem Kernspin der koppelnden Kerne ab. *Abbildung 4* zeigt die resultierende Aufspaltung durch Wechselwirkung des Elektrons mit einem Atomkern, dessen Kernspin $I = 1$ beträgt.

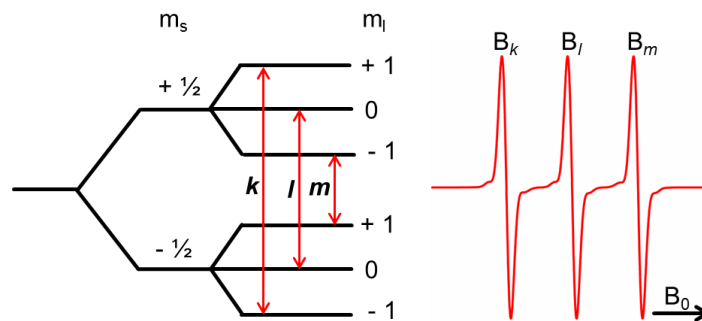


Abbildung 4 Wechselwirkung des freien Elektrons mit einem Atomkern ($I = 1$) und daraus resultierende Energielevel und erlaubte Übergänge (nach Weil et al.⁷).

Die Aufspaltung wird auch Hyperfeinkopplung genannt. Die Anzahl (N) der Linien im EPR-Spektrum durch Interaktion mit Gruppen von n_i ($i = a, b, \dots, x$) äquivalenten Kernen mit dem Kernspin I_i ($i = a, b, \dots, x$) wird nach unten gezeigter Gleichung berechnet. Das Intensitätsverhältnis der resultierenden Signale folgt dem „Pascalschen Dreieck“.^{6,7}

$$N = (2n_a I_a + 1) (2n_b I_b + 1) \dots (2n_x I_x + 1)$$

Die Wechselwirkung zwischen dem freien Elektron und Atomkernen beruht auf dem sogenannten *Fermi-Kontakt*. Beim direkten Fermi-Kontakt befindet sich das Elektron in einem s-Orbital bzw. einem Orbital mit partiellem s-Charakter. In s-Orbitalen hat das Elektron eine von null unterschiedliche Aufenthaltswahrscheinlichkeit am Kern und kann daher direkt mit diesem interagieren. Es treten aber auch Wechselwirkungen auf, wenn sich das freie Elektron in einem Orbital ohne s-Charakter befindet. In diesem Fall beruht die

Hyperfeinkopplung auf Mechanismen wie $\pi - \sigma$ -Polarisation und Hyperkonjugation (indirekter Fermi-Kontakt).¹³

1.1.2.2 Parameter zur Charakterisierung von EPR-Spektren

Abbildung 5 zeigt unterschiedliche Parameter, die zur Charakterisierung von EPR-Spektren herangezogen werden.

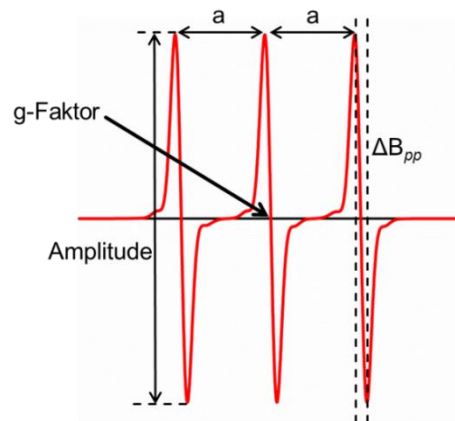


Abbildung 5 Messgrößen zur Charakterisierung eines EPR-Spektrums.

Hyperfeinkopplungskonstante a

Die Hyperfeinkopplungskonstante a bezeichnet den Abstand zwischen den einzelnen Signalen eines EPR-Spektrums. Die Angabe erfolgt in Tesla [T] bzw. Gauss [G] oder in Hertz [Hz]. Die Größe der Kopplungskonstante hängt von der Art des Kerns, der für die Kopplung verantwortlich ist und von der Spindichte des freien Elektrons an diesem Kern ab. Dabei gilt, je größer die Spindichte, desto größer ist die Hyperfeinkopplungskonstante.^{6, 13} Die Spindichteverteilung hängt wiederum wird von der Molekülstruktur selbst und der Molekülumgebung (z. B. von der Polarität des Lösungsmittels) ab. Kopplungen, die auf direktem Fermi-Kontakt beruhen, haben i. d. R. größere Kopplungskonstanten als solche, die auf indirektem Fermi-Kontakt beruhen. Die Atomart beeinflusst die Kopplungskonstante über den sog. *gyromagnetischen Faktor* g_n des Atomkerns. Je kleiner g_n , desto kleiner ist auch die Hyperfeinkopplungskonstante. Durch Austausch eines Protons ($g_H = 5.5854$) gegen Deuterium ($g_D = 0.8574$) verringert sich beispielsweise $a(D)$ um den Faktor $a(D) = a(H)5.5854/0.8573 = 0.1535 a(H)$.⁶

Der indirekte Fermi-Kontakt-Anteil der Elektron-Kern-Interaktion ist dipolar und damit richtungsabhängig (anisotrope Hyperfeinkopplung). Die Kopplungskonstante a eines Kerns X in z -, y - und x -Richtung ist daher in die Tensoren $a(X)_z$, $a(X)_y$ und $a(X)_x$ aufgeteilt. Bei EPR-Messungen in niedrig-viskosen Lösungen werden die anisotropen

Wechselwirkungen durch schnelle Molekülrotation ausgemittelt, sodass nur der isotrope Durchschnittswert a_{iso} gemessen werden kann.⁶

Peak-zu-Peak-Linienbreite ΔB_{pp} und Linienform

Die Peak-zu-Peak-Linienbreite wird in Tesla [T] oder Gauss [G] gemessen. Generell hängt die Linienbreite eines Radikals von dessen Relaxationszeit ab. Unter Relaxation versteht man den Rückfall der Elektronen aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand. Man unterscheidet die Spin-Gitter-Relaxation T_1 und die Spin-Spin-Relaxation T_2 . Bei der Spin-Gitter-Relaxation wird Energie an die Umgebung abgegeben. Die Spin-Spin-Relaxation ist energieerhaltend bezogen auf das Spin-System. Durch die Wechselwirkung zweier Spins tauschen diese jeweils den Zustand („Spin-Flip-Flop“), was die Lebenszeit jedes Spins verkürzt. Die Linienbreiten verhalten sich umgekehrt proportional zur Relaxationszeit. Der Einfluss von T_2 auf die Linienbreite ist wesentlich größer. Faktoren, die die Relaxationszeit verkürzen, führen zu einer homogenen Linienverbreiterung. Ein sehr wichtiger Prozess, der zur Beschleunigung der Relaxation führt, ist die „Austauschwechselwirkung“ zwischen zwei Spins (Heisenberg-Austausch). Diese Wechselwirkung wird in der EPR-Oximetrie zur Quantifizierung von Sauerstoff ausgenutzt. Austauschwechselwirkungen sind auch ursächlich für die konzentrationsabhängige Linienverbreiterung der EPR-Spektren von Radikalen.^{3, 6, 7}

Effekte, die unabhängig von der Relaxation, zur Linienverbreiterung (sog. inhomogene Verbreiterung) beitragen, sind z. B. unaufgelöste Hyperfeinkopplungen und anisotrope Interaktionen in Systemen mit gehinderter Rotation.⁷

EPR-Spektren können unterschiedliche Linienformen haben. Homogen verbreiterte Spektren haben in der Regel eine Lorentz-Form. Inhomogen verbreiterte Linien haben eher eine Gauss-Form. Mischen sich beide Zustände, spricht man von einer Voigt-Linienform.³

g-Faktor

Der g-Faktor (oder Landé-Faktor) ist eine dimensionslose Größe und vergleichbar mit der chemischen Verschiebung bei der NMR-Spektroskopie. Er wird im Zentrum des EPR-Spektrums gemessen und legt bei gegebener Frequenz ν die Position des EPR-Signals im Magnetfeld fest. Der g-Faktor eines freien Elektrons (g_e) beträgt 2.0023. Durch den Einfluss von Kernen in der Nähe des Elektrons ändert sich dieser Wert. Bei organischen Radikalen liegt der g-Faktor sehr nah an g_e und ist daher wenig informativ. Genau wie die Hyperfeinkopplung ist der g-Faktor anisotrop. In Lösung wird normalerweise aufgrund

schneller Molekülbewegung nur der isotrope g_{iso} -Faktor erfasst. Bei ausreichend langsamer Rotation kann man die Tensoren g_x , g_y und g_z unterscheiden.⁶

Amplitude

Die Amplitude eines EPR-Signals ist umgekehrt proportional zum Quadrat der Linienbreite. Im Idealfall hängt die Amplitude eines EPR-Signals bei konstanter Linienbreite nur von der Anzahl der Spins ab und kann daher zur Quantifizierung von Spins herangezogen. Bei sich ändernder Linienbreite ist die AUC („Area Under the Curve“) des doppelt integrierten EPR-Spektrums besser zur Quantifizierung geeignet. Aufgrund zahlreicher Einflussfaktoren, die das Spektrometer, die Probe selbst und die Interaktion zwischen Spektrometer und Probe betreffen, ist die quantitative EPR-Spektroskopie eine Herausforderung.¹⁴⁻¹⁶

Sowohl Amplitude als auch AUC können auch zur Bestimmung von Reaktionskinetiken herangezogen werden (siehe hierfür z. B. Abschnitt 2.2.3.2).

1.2 Stabile Radikale

Bei den meisten biologischen und biomedizinischen Anwendungen der EPR-Spektroskopie wie der Bestimmung von pH-Wert oder Sauerstoffkonzentration *in vivo* oder der Proteinstrukturanalyse müssen aufgrund der geringen Konzentration und kurzen Lebenszeit natürlich vorkommender paramagnetischer Substanzen exogene Spin-Sonden in das zu untersuchende System eingebracht werden. Zu diesem Zweck werden stabile organische Radikale verwendet.³

Bezogen auf organische Radikale bedeutet „stabil“, dass diese in einem ausreichend langen Zeitraum sowohl als Feststoff als auch in Lösung weder intra- noch intermolekulare Reaktionen eingehen. Dies wird durch die Delokalisierung und sterische Abschirmung des freien Elektrons erreicht.¹⁷⁻¹⁹

1.2.1 Einteilung organischer Radikale

Organische Radikale können nach unterschiedlichen Gesichtspunkten in Gruppen eingeteilt werden. Nach der Lokalisierung des ungepaarten Elektrons unterscheidet man σ - und π -Radikale. Bei σ -Radikalen befindet sich das ungepaarte Elektron in einem σ -Orbital, bei π -Radikalen in einem π -Orbital. Ein σ -Radikal ist beispielsweise das Vinyl-

Radikal ($\cdot\text{CH}_2=\text{CH}_2$). Sie sind normalerweise sehr reaktiv. Als Spin-Sonden verwendete stabile organische Radikale gehören daher zum Typ der π -Radikale.³

Die Einteilung kann weiterhin nach der Molekülstruktur erfolgen. Wichtige Radikalklassen, die auch im Zuge dieser Arbeit behandelt wurden, sind in *Abbildung 6* dargestellt. Die weitaus am häufigsten verwendeten Spin-Sonden sowohl für Untersuchungen *in vitro* als auch *in vivo* sind die Nitroxidradikale.²⁰ Triarylmethylradikale finden vor allem als sauerstoffsensitive Sonden in der *in vivo*-EPR-Oximetrie Anwendung.²¹ Galvinoxyle sind eine seit langem bekannte Untergruppe der Phenoxyradikale.²² Sie werden bisher vor allem als Radikalfänger und zur Bestimmung des antioxidativen Potentials anderer Substanzen verwendet.^{23, 24}

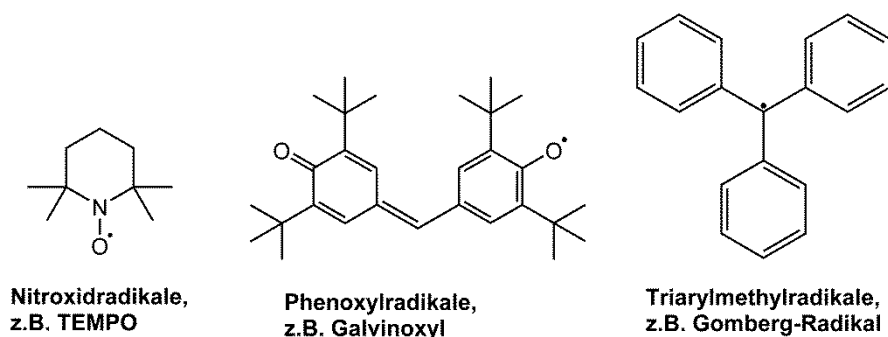


Abbildung 6 Darstellung der Molekülstruktur organischer Radikale anhand von Beispielen.

Die Eigenschaften von *Nitroxiden*, *Galvinoxylen* und *Triarylmethylradikalen* werden im Detail in den jeweiligen Kapiteln dieser Arbeit besprochen.

1.2.2 Anwendung stabiler Radikale in der EPR-Spektroskopie: Spin-Sonde – Spin-Label – Spin-Falle

Der Einfachheit halber wird in der EPR-Spektroskopie häufig von „Spin-Sonden“ gesprochen. Je nach Anwendungsart der Radikale unterscheidet man im Detail zwischen Spin-Sonde, Spin-Label (oder Marker) und Spin-Falle.

Spin-Sonden werden dem zu untersuchenden System durch einfaches Mischen hinzugefügt. Die Verteilung der Sonde in der Matrix hängt dann von den Eigenschaften der Sonde und der Matrix selbst ab. Die Sonden-Technik wird z. B. bei der EPR-Oximetrie verwendet oder auch in der pharmazeutischen Technologie zur Untersuchung der Arzneistofffreisetzung aus „Drug Delivery Systemen“.

Spin-Label oder -Marker werden kovalent mit dem zu untersuchenden System verknüpft. Diese Methode wird z. B. zur Proteinstrukturanalyse verwendet. Weitere Details zum Spin-Labeling werden in den Abschnitten 2.2.4 und 2.2.5 besprochen.

Spin-Fallen stellen einen Sonderfall da. Sie sind selbst keine Radikale, sondern werden zur Untersuchung sehr kurzlebiger Radikale wie reaktiver Sauerstoffspezies verwendet. Spin-Fallen reagieren mit diesen und überführen sie so in Radikale mit einer ausreichend langen Lebenszeit für die EPR-Spektroskopie.^{3, 25}

1.3 Zielstellung

Die Elektronenspinresonanz-Spektroskopie ist seit ihrer Entdeckung in den 1940er Jahren stetig weiterentwickelt worden. Heutzutage sind die Anwendungen und Techniken äußerst vielfältig, sodass die EPR-Spektroskopie eine essentielle analytische Methode in zahlreichen wissenschaftlichen Bereichen darstellt.³

Im Fokus dieser Arbeit standen biologische und biomedizinische Anwendungsbereiche der CW-EPR-Spektroskopie und die dafür als Spin-Sonden und Spin-Label benötigten stabilen organischen Radikale.

Die am häufigsten verwendeten stabilen Radikale sind die Nitroxide. Diese sind unter zahlreichen Bedingungen, jedoch *nicht* in der Gegenwart von Reduktionsmitteln stabil, was die *in vivo*-Anwendung erschwert. Im ersten Teil dieser Arbeit sollten daher Nitroxide synthetisiert und charakterisiert werden, die im Vergleich zu Standardnitroxiden eine verbesserte reduktive Stabilität aufweisen. Weiterhin sollte die Eignung neuer und bekannter Nitroxide für verschiedene Spin-Labeling-Anwendungen untersucht werden.

Eine Klasse stabiler Radikale, die bisher eher wenig Beachtung im biomedizinischen Bereich gefunden hat, sind die sogenannten Galvinoxyle. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher die Synthese und Charakterisierung neuer Galvinoxyl-derivate. Weiterhin sollten unterschiedliche Einflussfaktoren auf die Stabilität von Galvinoxyl-derivaten und deren Eignung als sauerstoffsensitive Spin-Sonden untersucht werden.

Ein wichtiges Forschungsgebiet in der Medizin ist die Bestimmung von Sauerstoffkonzentrationen in Geweben. Dies ist mittels der „EPR-Oximetrie“ möglich. Für die *in vivo*-EPR-Oximetrie eignen sich vor allem die Triarylmethylradikale als Spin-Sonden. Doch auch diese sind z. B. durch eine geringe *in vivo*-Halbwertszeit nicht uneingeschränkt anwendbar. Zur Verbesserung der Eigenschaften der Spin-Sonden, sollten daher unterschiedliche Triarylmethylradikale in lipophile Gele verkapselt und deren Eignung für

die EPR-Oximetrie überprüft werden. Da auch der pH-Wert einen kritischen Parameter *in vivo* darstellt, ist die simultane Messung von pH-Werten und Sauerstoffkonzentrationen *in vivo* vorteilhaft. Es sollten daher weiterhin Sauerstoff- und pH-sensitive Triarylmethylradikale synthetisiert und charakterisiert werden.

Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurden die Ergebnisse dieser Arbeit anhand der Radikalklassen in drei Hauptabschnitte gegliedert dargestellt. Details zu den einzelnen Radikalklassen, den speziellen EPR-Methoden und der jeweiligen Zielstellungen werden in diesen Abschnitten einleitend besprochen.

2 Nitroxidradikale

2.1 Einleitung

2.1.1 Nitroxidradikale

Nitroxide sind die am häufigsten verwendeten Spin-Sonden in der EPR-Spektroskopie. Bereits 1845 wurde das erste Nitroxidradikal Kaliumnitrosodisulfonat („Fremys Salz“, *Abbildung 7*) von Edmund Fremy entdeckt.²⁶ Noch heute wird Fremys Salz, z.B. als Oxidationsmittel und als Standard zur Quantifizierung anderer Radikale verwendet.^{7, 27} Die Synthese des ersten organischen Nitroxidradikals (Porphyrexid, *Abbildung 7*) wurde 1901 von Piloty und Schwerin publiziert.²⁸

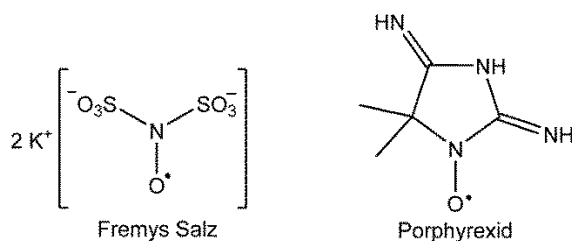


Abbildung 7 Strukturen der ersten Nitroxidradikale.

Aufgrund ihrer Bedeutung wird bis heute an der Synthese und Charakterisierung neuer Nitroxidradikale geforscht. Besonders im Fokus steht dabei die Verbesserung der Stabilität der Radikale *in vivo*.²⁹

2.1.1.1 Struktur und Synthese von Nitroxidradikalen

Anhand ihrer Struktur können Nitroxidradikale in unterschiedliche Typen unterteilt werden (*Abbildung 8*).³⁰ Neben den gezeigten cyclischen Nitroxiden gibt es auch acyclische Derivate wie Diphenylnitroxid oder Di-*tert*.butylnitroxid.⁷ Diese sind aber in der Praxis weniger relevant.

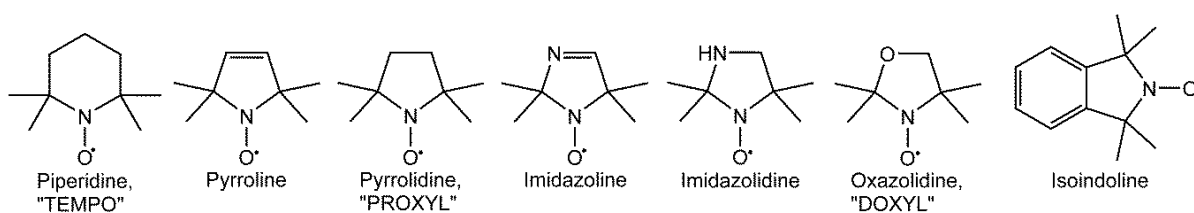


Abbildung 8 Einteilung der Nitroxide nach ihrer Grundstruktur.

Die Aminoxy-Gruppe

Verbindendes Strukturelement aller Nitroxidradikale ist die durch Alkyl- und Aryl-Gruppen zweifach substituierte „Aminoxy“-Gruppe (oder Nitroxid-Gruppe), welche zwei mesomere Grenzstrukturen ausbildet (*Abbildung 9 (A)*). Damit Nitroxidradikale stabil sind, ist es essentiell, dass an den α -Kohlenstoffatomen keine Protonen vorhanden sind, sondern diese vollständig durch Alkyl- oder Arylreste ausgetauscht sind. Ist dies nicht der Fall, disproportionieren die Nitroxide unter der Bildung eines Nitrons und eines Hydroxylamins (*Abbildung 9 (B)*). Die Geschwindigkeit der Disproportionierung hängt vom Substitutionsgrad und vom Lösungsmittel ab. Sowohl das Nitron als auch das Hydroxylamin können Folgereaktionen eingehen.^{7, 31}

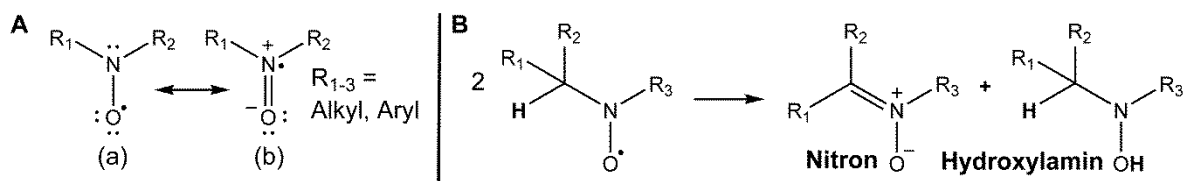


Abbildung 9 (A) Die Aminoxy-Struktur in der (a) nichtionischen und (b) ionischen Form. *(B)* Disproportionierungsreaktion von Nitroxiden mit einem Proton am α -Kohlenstoffatom.

Die Aminoxy-Gruppe ist unter zahlreichen Reaktionsbedingungen stabil, sodass Nitroxide ohne Beteiligung der N-O-Gruppe derivatisiert werden können. Das macht diese Radikale zu häufig genutzten Spin-Labeln. Unter reduktiven Bedingungen wird die Aminoxy-Gruppe allerdings zum diamagnetischen Hydroxylamin reduziert. Die Reduktionsrate wird neben den Reaktionsbedingungen auch stark durch die Struktur des Radikals beeinflusst. Sie ist vor allem für die *in vivo*-Anwendung wichtig. Einflussfaktoren auf die Reduktionsstabilität und die Bestimmung der Reduktionsrate werden genauer im Abschnitt 2.2.3.2 besprochen. Unter stark oxidativen Bedingungen wird die Aminoxy-Gruppe zum N-Oxoammonium-Kation oxidiert (*Abbildung 10*).^{7, 31}

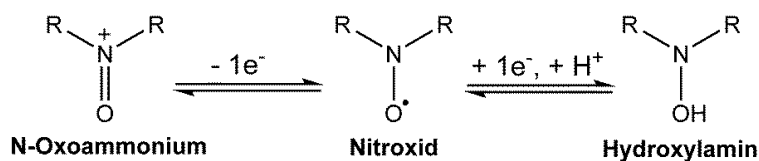


Abbildung 10 Redoxreaktion der Aminoxy-Gruppe.

Synthese von Nitroxidradikalen

Genauso vielseitig wie die Strukturen der Nitroxide sind auch die Wege, um diese zu synthetisieren. In dieser Arbeit soll daher nur ein kurzer Überblick über potentielle Synthesewege gegeben und einige Beispiele gezeigt werden. Detaillierte Beschreibungen können Übersichtsartikeln entnommen werden (z.B. Keana et al., Chem. Rev. 1978, 78, 37 - 64; Haugland et al., Electron Paramag. Reson., 2017, 25; Haugland et al., Chem. Soc. Rev., 2018, 47, 668 - 680.)

Die Aminoxyl-Gruppe wird meist durch Oxidation des korrespondierenden sekundärenamins oder Hydroxylamins in das Nitroxid eingeführt. Als Oxidationsmittel kommen beispielsweise H_2O_2 in Gegenwart von Na_2WO_4 , *m*-CPBA, O_2 mit katalytischen Mengen an Cu(II)-Salzen oder MnO_2 in Frage (Abbildung 11).³²⁻³⁴

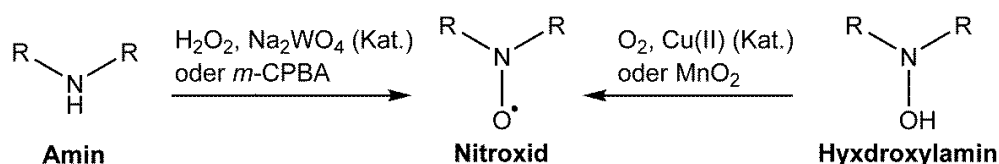


Abbildung 11 Synthese der Aminoxyl-Gruppe.

Sehr viele Piperidin-Nitroxide werden ausgehend vom kommerziell erhältlichen N-Methyl-tetramethylpiperidon (Abbildung 12 (A)) synthetisiert. Die Methyl-Gruppen in α -Position können durch „Keton-Austausch“ gegen andere funktionelle Gruppen substituiert werden. Auf diese Weise erhält man beispielsweise aus N-Methyl-tetramethylpiperidon die in Abbildung 12 (A) dargestellten Piperidine, welche dann zu Nitroxiden oxidiert werden. Alternativ können tetra-substituierte Piperidin-Ringe wie in Abbildung 12 (B) beispielhaft gezeigt auch *de novo* aus Bisphosphonaten und einem Keton mittels zweifacher Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion, gefolgt von einer doppelten Aza-Michael-Addition mit Ammoniak hergestellt werden.^{30, 32, 35}

Pyrroline und Pyrrolidine wie z. B. 2,2,5,5-Tetraethyl-3-carboxypyrrolidine-N-oxyl können aus den korrespondierenden Piperidin-Derivaten durch eine Favorskii-Umlagerung generiert werden (Abbildung 12 (C)) oder ebenfalls durch *de novo*-Synthese des Rings.³⁰ Die im Zuge dieser Arbeit synthetisierten Pyrrolidin-Derivate wurden *de novo* aus acyclischen Edukten nach einer Vorschrift von Hideg et al. hergestellt (siehe Abschnitt 2.2.1.1).^{33, 34} Imidazolidin-Nitroxide werden beispielsweise durch Kondensation von 1,2-Ethylendiamin-Derivaten mit Ketonen und anschließender Oxidation hergestellt (Abbildung 12 (D)).³¹ Imidazoline werden unter anderem durch Kondensation von α -Hydroxylaminoketonen mit einem weiteren Keton synthetisiert.³¹

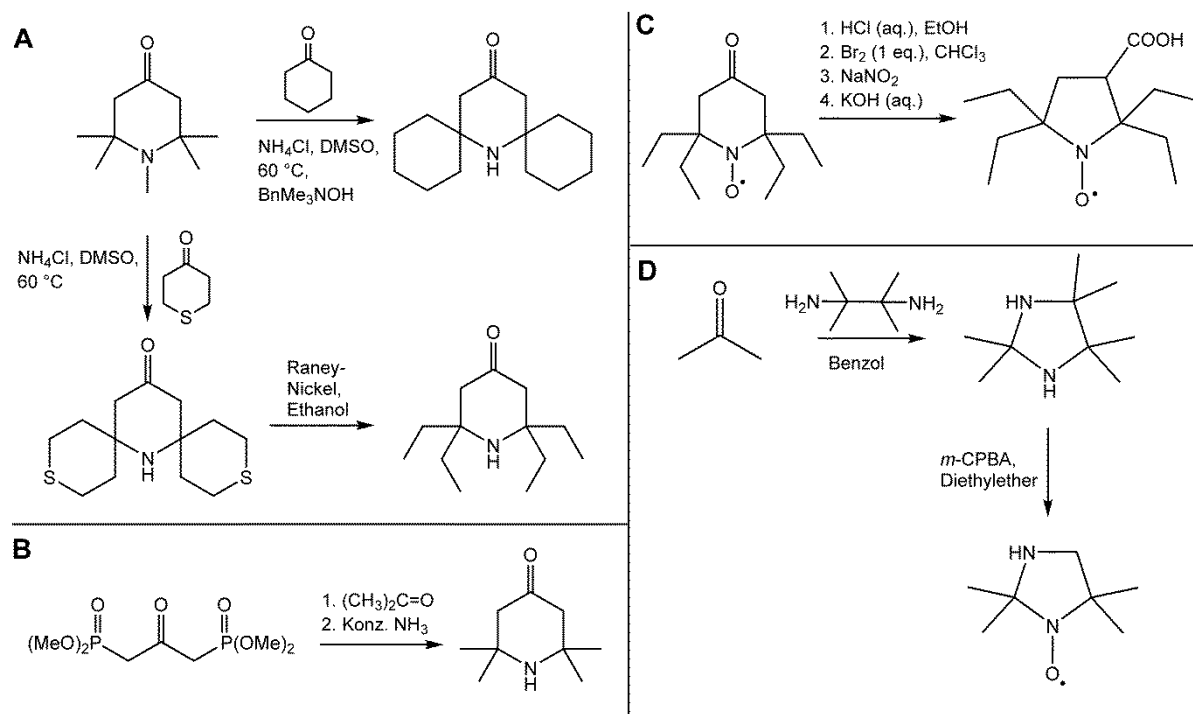


Abbildung 12 Synthese unterschiedlicher Nitroxid-Derivate. (A) Synthese von Piperidin-Nitroxiden aus N-Methyl-tetramethylpiperidon. (B) *De novo*-Synthese von Piperidinen aus Bisphosphonaten. (C) Synthese von Pyrrolidin-Nitroxiden durch Favorskii-Umlagerung. (D) *De novo*-Synthese von Imidazolidin-Nitroxiden.³⁰⁻³²

2.1.1.2 Magnetische Eigenschaften von Nitroxidradikalen

Die magnetischen Eigenschaften von Nitroxiden werden durch die Aminoxyl-Gruppe bestimmt. Die $2p_z$ -Orbitale des Stickstoffs und des Sauerstoffs überlappen und bilden eine $\pi_{\text{N-O}}$ -Drei-Elektronen-Bindung aus. Die Spindichte ist hauptsächlich über das Stickstoff- und das Sauerstoffatom verteilt, mit einer etwas höheren Dichte am Sauerstoff. Die genaue Verteilung wird von der Polarität der Umgebung und der Molekülstruktur, genauer von der Pyramidalisierung des Stickstoffs, beeinflusst. Diese hängt wiederum von der Ringgröße und den Ringsubstituenten ab.⁷ Da Sauerstoff keinen Kernspin hat, führt nur die Interaktion des Elektrons mit den Stickstoffkern (Kernspin $I = 1$) zu einer Signalaufspaltung in die typischen drei Linien. Zum Teil sind auch die Hyperfeinkopplungen des freien Elektrons mit ^{13}C -Kohlenstoffatomen des Rings und der Ringsubstituenten aufgelöst. Hyperfeinkopplungen mit Wasserstoffatomen sind aufgrund der geringen Spindichte sehr klein.³⁶ g -Faktoren und Hyperfeinkopplungskonstanten von Nitroxiden zeigen eine ausgeprägte Anisotropie. Die Tensoren des g -Faktors werden in der folgenden Reihenfolge kleiner: $g_{xx} > g_{yy} > g_{zz}$. Die Hyperfeinkopplungskonstanten a_{xx} und a_{yy} sind etwa gleich groß.

Beide sind wiederum deutlich kleiner als a_{zz} ($a_{xx} \approx a_{yy} < a_{zz}$). In Lösungsmitteln mit geringer Viskosität werden nur die isotropen Werte g_{iso} und a_{iso} gemessen. Sinkt die Rotationsgeschwindigkeit des Nitroxids z.B. durch Erhöhung der Viskosität, werden die EPR-Spektren zunehmend anisotrop, da die Tensoren weniger stark gemittelt werden.³² Auf den Einfluss der Ringgröße und der Ringsubstituenten auf die magnetischen Eigenschaften von Nitroxidradikalen wird in Abschnitt 2.2.3.1 genauer eingegangen.

2.1.1.3 Anwendungsbeispiele für Nitroxidradikale

Die Änderung von Parametern wie Viskosität, Polarität, Temperatur und pH-Wert, sowie die Anwesenheit anderer paramagnetischer Substanzen zeigt sich in einer Änderung des EPR-Spektrums eines Nitroxids.³⁶ Daraus ergibt sich eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten u.a. in den Bereichen Biochemie, Biomedizin und pharmazeutischen Technologie. So eignen sich Imidazolin- und Imidazolidin-Nitroxide aufgrund des zusätzlichen basischen Stickstoffs im Ring als pH-sensitive Spin-Sonden und -Label. Das Wissen um den pH-Wert in Geweben und Organen *in vivo* ist sehr wichtig, da viele physiologische und pathophysiologische Prozesse mit einer Änderung des pH-Werts einhergehen.^{37, 38} Gleiches gilt für die Sauerstoffkonzentration in Geweben und Organen.³⁹ Neben partikulären Spin-Sonden wie Lithium-Phtalocyaninen und löslichen Spin-Sonden wie Triarylmethylradikalen (siehe Abschnitt 4) werden auch Nitroxidradikale zur Bestimmung von Sauerstoffkonzentrationen *in vivo* verwendet.² Weiterhin können Nitroxide verwendet werden, um den Redoxstatus von Zellen und Geweben zu bestimmen.⁴⁰ Durch kovalente Bindung von Nitroxidradikalen an Makromoleküle wie Proteine, Peptide, DNA oder auch synthetische Polymere können diese strukturell charakterisiert werden („Side-directed spin labeling“, siehe auch Abschnitte 2.2.4 und 2.2.5).^{41, 42} Im Bereich der pharmazeutischen Technologie werden Nitroxide zur Untersuchung von „Drug Delivery“-Systemen eingesetzt.⁴

2.1.2 Zielstellung

Der größte Nachteil von Nitroxidradikalen, der die Anwendung *in vivo* bzw. auf zellulärer Ebene einschränkt, ist die geringe reduktive Stabilität. Es werden nach wie vor Anstrengungen unternommen, um die Stabilität von Nitroxidradikalen in dieser Hinsicht zu verbessern. Durch zahlreiche Studien wurden bereits Strukturmerkmale identifiziert, welche die reduktive Stabilität positiv oder negativ beeinflussen. Einen besonders großen Einfluss hat die Größe des Rings: Fünfgliedrige Nitroxide sind deutlich stabiler als Piperidin-

Nitroxide. Die Ringsubstituenten beeinflussen die Stabilität durch sterische, elektrostatische und induktive Effekte.⁴³⁻⁴⁵ Daraus ergibt sich die in *Abbildung 13 (A)* dargestellte Einteilung der Nitroxide. Eines der bisher stabilsten Nitroxidderivate (**3-EtCP**) ist in *Abbildung 13 (B)* dargestellt.

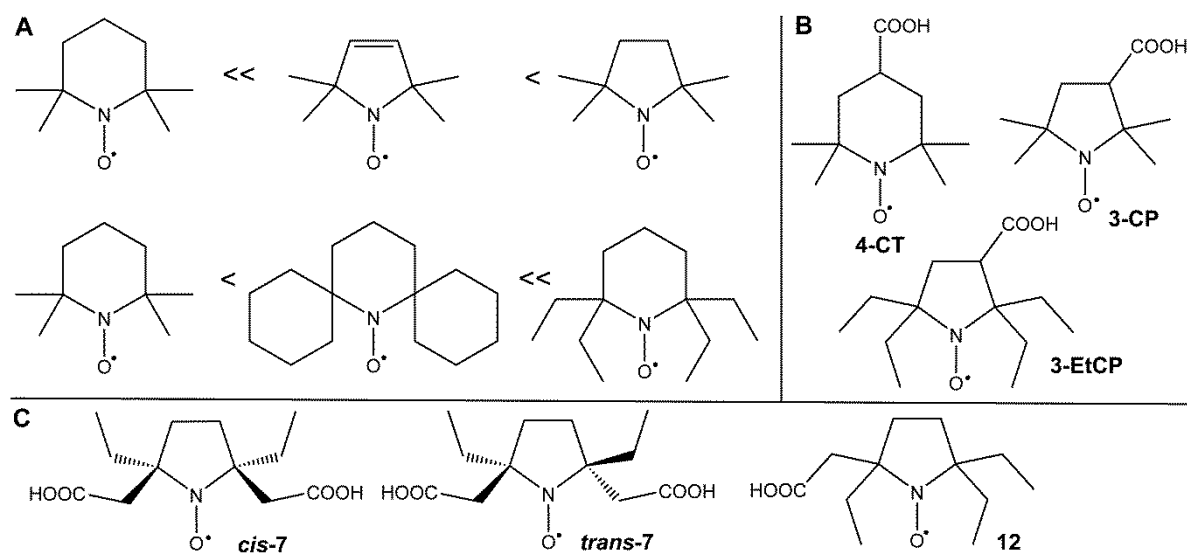


Abbildung 13 (A) Anstieg der reduktiven Stabilität in Abhängigkeit von Ringgröße (oben) und α -Substituenten (unten).³⁰ *(B)* Molekülstrukturen der als Vergleich verwendeten Nitroxide **4-CT** und **3-CP** und des besonders stabilen Nitroxids **3-EtCP**. *(C)* Strukturen von **cis/trans-7** und **12**.

In dieser Arbeit sollten weitere Nitroxidradikale (**cis/trans-7** und **12**, *Abbildung 13 (C)*) mit einer verbesserten reduktiven Stabilität synthetisiert werden. Diese sollten dann strukturell mittels Röntgenstrukturanalyse und EPR-spektroskopisch hinsichtlich ihrer magnetischen Eigenschaften und ihrer reduktiven Stabilität charakterisiert und mit den bekannten Nitroxiden **4-CT** und **3-CP** verglichen werden. Weiterhin sollte die Eignung von Nitroxid **12** als Spin-Label an einem Beispiel evaluiert und die Eignung eines Tetrazin-gekoppelten Nitroxid-Spin-Labels in der kupferfreien Click-Chemie zur Untersuchung von Proteinen untersucht werden.

2.2 Ergebnisse und Diskussion*

2.2.1 Synthese

2.2.1.1 Synthese von *cis*-**7**, *trans*-**7** und **12**

Die in *Abbildung 14* gezeigte Synthese der Nitroxidradikale **cis/trans-7** und **12** basiert auf einer von Hideg und Lex publizierten Syntheseroute.^{33,34} Sie beginnt mit der Herstellung der γ -Nitroketone **3** und **9**. Dafür wurden die beiden Nitroalkane 1-Nitropropan (**2**) und 3-Nitropentan (**8**) mit Ethylvinylketon umgesetzt. Da 3-Nitropentan (**8**) nicht kommerziell erhältlich ist, musste dieses zuvor noch aus 3-Aminopentan (**1**) hergestellt werden. Dazu wurde die Aminogruppe von 3-Aminopentan mit Hilfe von *meta*-Chlorperoxybenzoesäure zur Nitrogruppe oxidiert. Nitroalkane und α,β -ungesättigte Ketone reagieren in Gegenwart einer Base in Form einer Michael-Addition: Die Base deprotoniert zunächst das CH-azide Nitroalkan. Dieses starke Nukleophil greift dann am positivierten Ende der Doppelbindung des α,β -ungesättigte Ketons an und es kommt zur Ausbildung einer neuen C-C-Bindung.^{46,47} Zur Synthese des γ -Nitroketons **3** wurde Diisopropylamin als nicht-nukleophile Base eingesetzt. Bei der Synthese von **7** konnte durch die Verwendung von Natriummethoxid statt Diisopropylamin die Ausbeute von 38 % auf 53 % gesteigert werden. Die Reinigung erfolgte jeweils durch Vakuumdestillation. Im nachfolgenden Schritt wurden die γ -Nitroketone **3** und **9** zu den jeweiligen Nitronen (**4** und **10**) umgesetzt. Dazu wurde die Nitrogruppe im wässrigen, schwach sauren Milieu mit Zink zum Hydroxylamin reduziert. Die Hydroxylaminoketone cyclisieren unter Elimination von Wasser *in situ* zu den Nitronen **4** und **10**.⁴⁸ Entsprechend der ¹H-NMR-Analyse lagen die Nitrone im Rohprodukt bereits mit einer sehr hohen Reinheit vor. Zu diesem Zeitpunkt betragen die Ausbeuten zwischen 88 bis 98 %. Bei **4** zeigten sich jedoch nach längerer Lagerung (ca. 40 d bei 4 °C) nach DC-Untersuchungen zusätzliche Flecken. Die Flecken zeigten sich jedoch nicht durch zusätzliche Signale im ¹H – und ¹³C-NMR-Spektrum, was darauf hindeutet, dass die Verunreinigungen nur in einer sehr geringen Konzentration vorlagen. Dennoch wurde mittels Vakuumdestillation versucht, die Verunreinigungen zu entfernen. Dies gelang nur bedingt, da auch nach der Destillation von **4** noch zusätzliche Flecken auf der DC zu sehen waren. Die Ausbeute reduzierte sich durch die Destillation auf etwa 70 %.

* Die Ergebnisse der Synthese (Abschnitt 2.2.1.1), der röntgenkristallographischen und der EPR-spektroskopischen Charakterisierung (Abschnitte 2.2.2 und 2.2.3) der Nitroxide *cis-7*, *trans-7* und **12** wurden in der Zeitschrift „Journal of Molecular Structure“ veröffentlicht (Lampp et al., Journal of Molecular Structure **2019**, 1182, 87 - 94 (online: 08.01.2019)).

Da der sp^2 -hybridisierte Kohlenstoff der Nitrone aufgrund der permanenten positiven Ladung am Stickstoff sehr elektronenarm ist, eignet sich diese Substanzgruppe sehr gut für Additionsreaktionen an diesem Kohlenstoff mit nukleophilen Reagenzien. Diese Reaktivität wurde in den Schritten IVa und IVb ausgenutzt, um Allylgruppen mittels Grignard-Reaktion im Fünfring in Position 2 (Synthese von **11**) bzw. 2 und 5 (Synthese von **6** über **5**) einzuführen. Dafür wurden die Nitrone **4** und **10** in trockenem Diethylether mit Allylmagnesiumbromid umgesetzt.

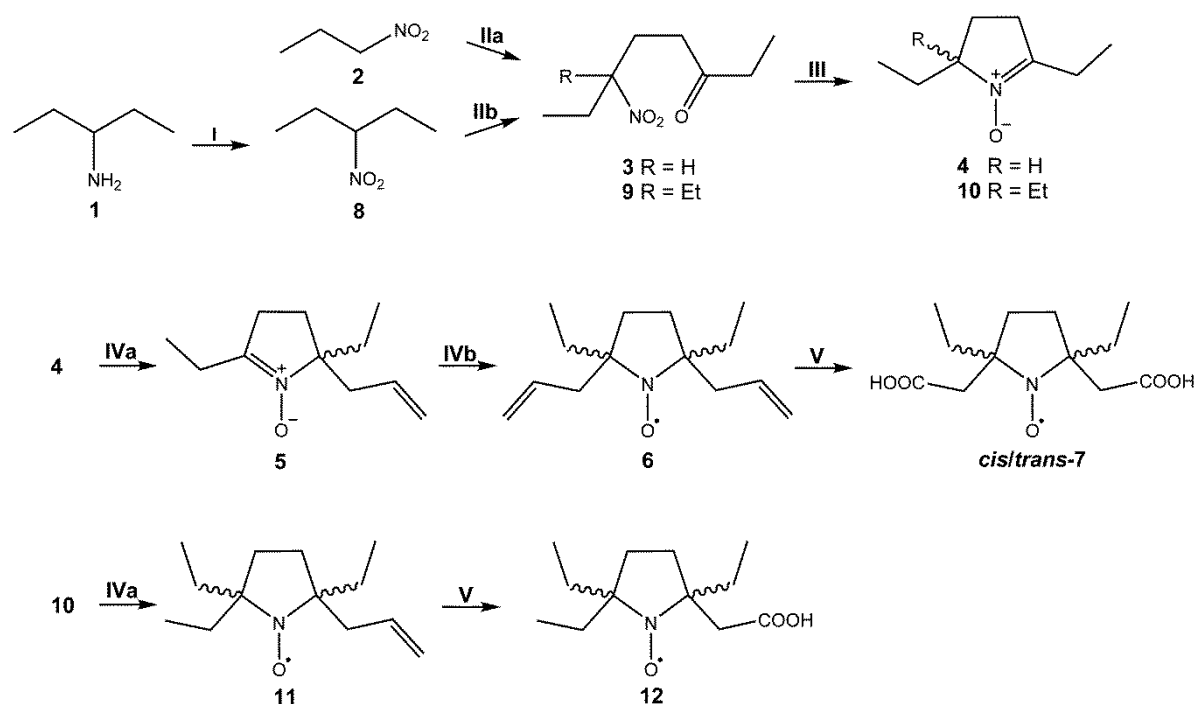


Abbildung 14 Synthese der Radikale *cis/trans-7* und **12**. Reagenzien und Bedingungen: (I) *m*-CPBA, 1,2-Dichlorethan, Rückfluss, 4 h. (IIa) Diisopropylamin, Ethylvinylketon, CHCl_3 , 16 h, 60°C . (IIb) Natriummethoxid, Ethylvinylketon, Methanol, 4,5 h, RT. (III) Zn, NH_4Cl , H_2O , 10°C - RT, 4 - 12 h. (IVa) 1. Allylmagnesiumbromid, Ether, 1,5 - 12 h, -10°C - RT. 2. $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, NH_3 , O_2 , Methanol, RT. (IVb) Wie IVa. (V) KMnO_4 , 18-Krone-6, Benzol, 24 - 48 h, RT.

Durch das Einführen der Alkylreste entstehen zunächst die N-Hydroxy-Derivate von **5** und **11**. Diese wurden nicht isoliert, sondern nach Austausch des Lösungsmittels gegen Methanol im basischen zu dem neuen Nitron **5** bzw. zum N-Oxyl-Radikal **11** oxidiert. Als Katalysator für die Reaktion wurde Kupfer(II)acetat verwendet. Als Oxidationsmittel diente Sauerstoff. Um **6** zu gewinnen, wurde die Grignard-Reaktion und nachfolgende Oxidation mit **5** wiederholt. Die vollständige Umsetzung der Hydroxylamine zu den Nitroxid-Radikalen

6 und **11** konnte mittels IR-Spektroskopie bestätigt werden (*Abbildung 15*), da beide Spektren im Bereich zwischen $3600 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ keine OH-Streckschwingung zeigen. Zum Vergleich: Das strukturverwandte 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-*N*-hydroxylamin hat eine intensive Bande bei 3580 cm^{-1} , die eindeutig der *N*-Hydroxy-Gruppe zuzuordnen ist.⁴⁹ Das IR-Spektrum beider Radikale zeigt außerdem eine Bande bei ca. 3076 cm^{-1} , die charakteristisch für die C-H-Streckschwingungen terminaler Alkene ist.

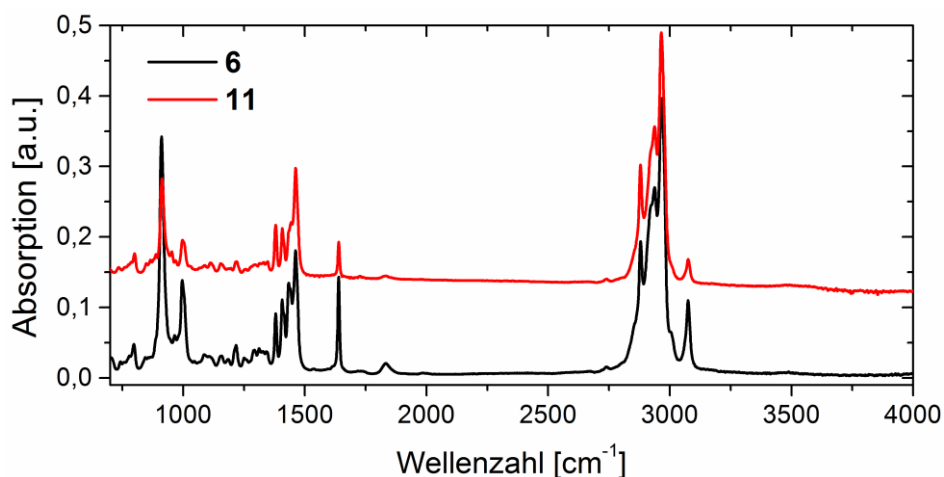


Abbildung 15 IR-Spektren der Radikale **6** und **11**.

Der letzte Schritt in der Synthese von *cis/trans-7* und **12** ist die Oxidation der terminalen Alken-Gruppen von **6** und **11** zu Carboxy-Gruppen. Als Oxidationsmittel für diese Reaktion wurde Kaliumpermanganat in Benzol verwendet. Als Lösungsvermittler für KMnO_4 wurde der Kronenether 18-Krone-6 verwendet. Die Ausbeuten bei dieser Reaktion waren sehr gering (*cis/trans-7*: ca. 10 %, **12**: ca. 29 %), da zahlreiche Nebenprodukte gebildet wurden. Die Diastereomere *cis*- und *trans-7* konnten durch wiederholte Säulenchromatographie voneinander getrennt werden. Das Isomeren-Verhältnis betrug etwa 1:1. Die Enantiomere von **12** wurden nicht voneinander getrennt. In den IR-Spektren waren die Carboxy-Gruppen als breite Banden zwischen $3500 - 2500 \text{ cm}^{-1}$ nachweisbar. Die Positionen der Carbonyl-Streckschwingung von *cis-7* (1694 cm^{-1}) und *trans-7* (1705 cm^{-1}) unterschieden sich innerhalb der spektralen Auflösung (2 cm^{-1}) geringfügig.

2.2.1.2 Nitroxide als Spin-Label – Synthese unterschiedlicher **12**- und **3-CP**-markierter Substanzen

Aufgrund der einzelnen Carboxy-Gruppe eignen sich **12** und **3-CP** sehr gut zur weiteren Derivatisierung. Sie können daher nicht nur als Spin-Sonden, sondern auch als Spin-Label verwendet werden. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit an zwei Beispielen gezeigt.

Zum einen wurden **12** und **3-CP** an das Polyamin Spermin und zum anderen **3-CP** an ein Tetrazin-Derivat geknüpft. Die so synthetisierten Substanzen können zur Charakterisierung sogenannter „Polyplexe“ (siehe Abschnitt 2.2.4) bzw. zur Charakterisierung von Proteinen (siehe Abschnitt 2.2.5) mittels EPR verwendet werden.

Synthese von Nitroxid-Spermin-Derivaten

Der Syntheseweg für die Nitroxide **14** und **15** ist in *Abbildung 16* dargestellt. Zunächst wurde Tri-Boc-Spermin (**13**) unter Zuhilfenahme orthogonaler Schutzgruppen entsprechend einer bereits publizierten Vorschrift synthetisiert.⁵⁰ Dafür wurde Spermin im ersten Schritt mit einem Äquivalent Ethyltrifluoracetat umgesetzt. Ethyltrifluoracetat reagiert bevorzugt mit primären Amino-Gruppen. Das einfach-geschützte Spermin wurde dann ohne vorherige Aufarbeitung mit einem Überschuss an Boc-Anhydrid umgesetzt, wodurch die restlichen Aminogruppen geschützt werden. Im 3. Reaktionsschritt wurde die Orthogonalität der Boc- und TFA-Schutzgruppen ausgenutzt, um eine primäre Amino-Gruppe selektiv zu entschützen.

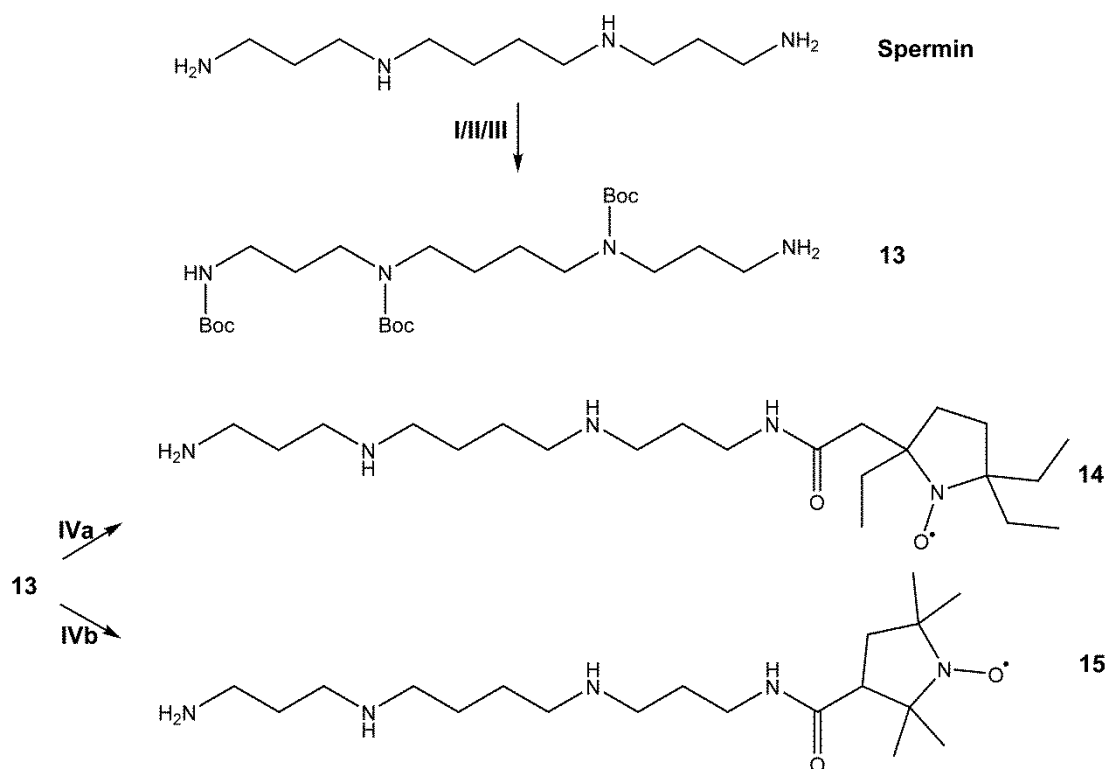


Abbildung 16 Synthese von **14** und **15**. Reagenzien und Bedingungen: (I) Ethyltrifluoracetat, Methanol, -78 °C, 30 min. (II) Boc-Anhydrid in Methanol, 0 °C - RT, über Nacht. (III) NH₃ bis pH 11, RT, 11 h. (IVa) 1. **12**, 4-DMAP, DCC, DCM, 2 h bei 0 °C, 24 h bei RT. 2. DCM, TFA, 3 h, RT. (IVb) **3-CP**, 4-DMAP, DCC, DCM, 2 h bei 0 °C, 24 h bei RT. 2. DCM, TFA, 3 h, RT.

Dafür wurde durch Zugabe einer wässrigen NH_3 -Lösung der pH-Wert etwa auf 11 eingestellt und die Reaktionsmischung 11 h bei RT gerührt. **13** konnte säulenchromatographisch gereinigt und mit einer Ausbeute von 58 % erhalten werden. Die nachfolgende Synthese von **14** und **15** (Schritte IVa und IVb) ist eine einfache Amin-Kupplung. Als Kupplungsreagenz wurde DCC (N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid) und als Katalysator 4-DMAP (4-N,N'-Dimethylaminopyridin) verwendet. Die Boc-geschützten Zwischenstufen von **14** und **15** wurden säulenchromatographisch gereinigt und anschließend mit TFA in Dichlormethan entschützt. Für die nachfolgenden EPR-Messungen wurden **14** und **15** als TFA-Salz verwendet. Der Überschuss an TFA konnte auch durch mehrmaliges einengen mit Toluol unter Vakuum nicht entfernt werden und wurde bei der Herstellung der Probenlösungen berücksichtigt.

Synthese des 3-CP-Tetrazin-Derivats 16 und Kupplung an GFP – Kupferfreie Click-Chemie

Die sogenannte „Click-Chemie“ bezeichnet eine Gruppe von Reaktionen, die stereospezifisch ablaufen, modular aufgebaut und breit anwendbar sind. Solche Reaktionen müssen eine hohe Ausbeute liefern, die Nebenprodukte müssen unbedenklich und ohne aufwendige Reinigung zu entfernen sein. Die Reaktionen sollten unter milden Reaktionsbedingungen bevorzugt im wässrigen Milieu ablaufen und schnell und bevorzugt nur ein Reaktionsprodukt bilden.⁵¹ Click-Reaktionen sind ein attraktives Werkzeug für die bioorthogonale Chemie. Die bioorthogonale Chemie hat zum Ziel, Biomoleküle wie Proteine und Nucleinsäuren in lebenden Systemen mit „Sondenmolekülen“ zu modifizieren, sodass diese in ihrer natürlichen Umgebung untersucht werden können.⁵²

Diese Reaktionen müssen also schnell, unter physiologischen Bedingungen und selektiv in Gegenwart einer Vielzahl funktioneller Gruppen ablaufen. Klassische Click-Reaktionen wie die Azid-Alkin-[1+3]Cycloaddition benötigen Kupfer(I)-Katalysatoren, was die Biokompatibilität erheblich einschränkt.⁵² Es wurden daher Click-Reaktionen entwickelt, die ohne Kupfer auskommen. Die Antriebskraft dieser Reaktionen beruht auf der Ringspannung eines der beiden Reaktionspartner. Zu diesen Reaktionen gehört auch die hier durchgeführte „SPIEDAC“-Reaktion. „SPIEDAC“ steht für „*Strain-promoted inverse electron-demand Diels-Alder-Cycloaddition*“. Dabei reagieren unter Ringspannung stehende Dienophile wie cis-Cyclooctin (SCO) oder trans-Cyclooctin (TCO) mit Tetrazinen oder Triazinen.⁵³ Einziges Nebenprodukt der Reaktion ist molekularer Stickstoff. Cyclooctin-modifizierte Aminosäuren können während der Translation gezielt in das zu untersuchende Protein eingebaut und anschließend mit einer Tetrazin-Sonde modifiziert werden.

Bisher wurden auf diese Weise ausschließlich Fluoreszenzfarbstoffe in die zu untersuchenden Proteine eingeführt.⁵³⁻⁵⁵ Im Zuge dieser Arbeit sollte diese Methode am Beispiel von SCO-Lysin-markiertem GFP auf Spin-Label übertragen werden, sodass diese Art des Labelings auch EPR-spektroskopische Methoden zur Untersuchung von Struktur und Dynamik von Proteinen nutzbar gemacht werden kann.

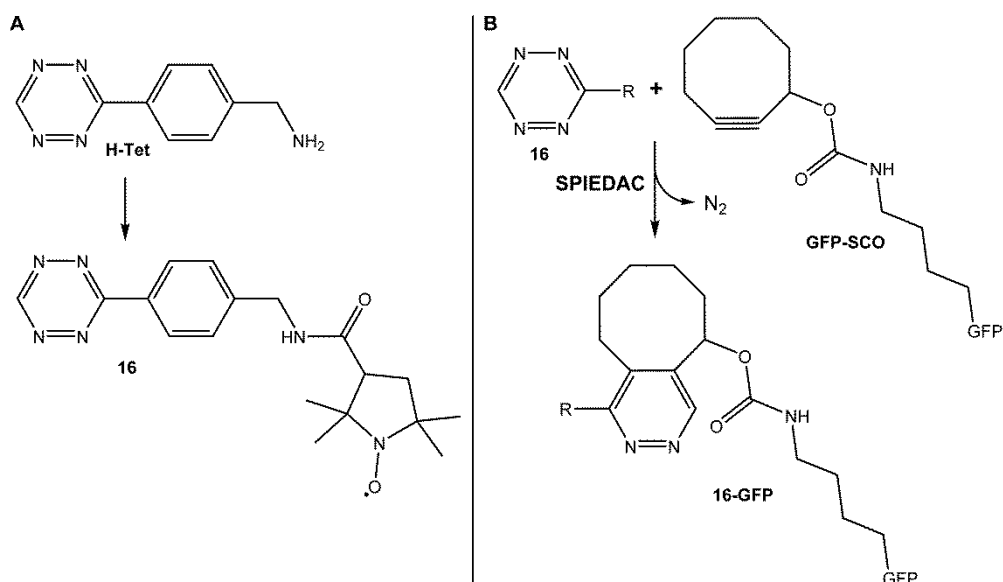


Abbildung 17 (A) Synthese von **16**. Reagenzien und Bedingungen: DIPEA, PyBOP, **3-CP**, DCM, RT. (B) Kopplung von **16** an SCO-markiertes GFP mittels Kupfer-freier Click-Chemie. Reagenzien und Bedingungen: PBS-Puffer pH 7.4, **16** in DMSO, 2 h, RT.

Dazu wurde zunächst das **3-CP**-markierte Tetrazinderivat **16** (Abbildung 17(A)) synthetisiert. Es handelt sich hierbei um eine einfache Amin-Kupplung. Die Reaktion wurde in DCM mit PyBOP als Kupplungsreagenz durchgeführt. Als nicht-nukleophile Hilfsbase diente DIPEA. Das Zielprodukt konnte mittels Säulenchromatographie isoliert werden.

Die Kopplung von Label **16** an SCO-Lysin markiertes GFP[†] (Green Fluorescent Protein) erfolgte auf Grundlage der SPIEDAC-Reaktion (Abbildung 17(B)). Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur in PBS-Puffer bei pH 7.4 durchgeführt. Dazu wurde das Protein in Puffer vorgelegt und **16** gelöst in DMSO in 10-fachem Überschuss hinzugefügt. Der Überschuss an **16** wurde nach erfolgter Reaktion durch Waschen mit PBS-Puffer entfernt.

[†] GFP^{SCO} und das Protokoll zur Durchführung des Labelings wurden von Prof. Edward Lemke, JGU Mainz und Christine Koehler, EMBL Heidelberg zur Verfügung gestellt. Die modifizierte Aminosäure wurde in Position 39 anstelle von Tyrosin eingeführt.

Sowohl das freie als auch das Protein-gebundene Radikal **16** wurde anschließend EPR-spektroskopisch untersucht (siehe Abschnitt 2.2.5).

2.2.2 Kristall- und Molekülstrukturen von *cis-7* und **12**

Cis-7 und **12** wurden mittels Einkristallstrukturanalyse charakterisiert. Die Kristallisation von *cis-7* erfolgte aus einer Mischung von Toluol und Dichlormethan durch langsames Verdunsten des Lösungsmittelgemisches. Versuche, **12** auf ähnliche Weise zu kristallisieren, scheiterten. Zur Einkristallstrukturanalyse geeignete Kristalle der zunächst hochviskosen Substanz wurden allerdings nach mehrmonatiger Lagerung bei -20 °C erhalten. *Trans-7* konnte nicht kristallisiert werden.

Die Molekülstrukturen von *cis-7* und **12** sind in *Abbildung 18* dargestellt. Ausgewählte Bindungslängen und -winkel sind in Tabelle 1 angegeben. Die geometrischen Parameter des Pyrrolidin-*N*-oxyl-Rings liegen im erwarteten Bereich.⁵⁶⁻⁶¹

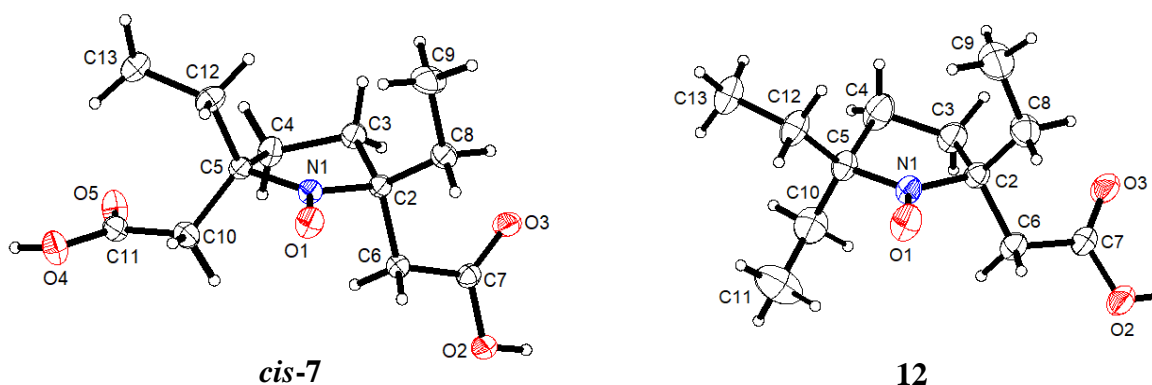


Abbildung 18 Molekülstrukturen von *cis-7* (2*R*, 5*S*) und **12** (2*R*) im Kristall. Die Kristallstrukturen sind zentrosymmetrisch, enthalten also jeweils beide Enantiomere. Auslenkungsellipsoide entsprechen 30 % der Aufenthaltswahrscheinlichkeit. Wasserstoffatome sind als Kugeln mit willkürlich gewählter Größe dargestellt.

Die Konformation des Fünfrings in *cis-7* und **12** entspricht ehesten einem "Briefumschlag"⁶², wobei C3 bzw. C4 aus der Ringebene herausragt. Die Konformationen der peripheren Substituenten an den C_{Pyrrolidin}-C_{Methylen}-Bindungen in *cis-7* sind, abgesehen von der Ethyl-Gruppe an C2, bezogen auf das Pyrrolidin-Stickstoffatom *antiperiplanar*. Die Ethyl-Gruppe an C2 liegt in *synclinaler* Konformation vor. In **12** zeigen die Ethyl-Gruppen an C2 und die dazu *trans* stehende Ethyl-Gruppe an C5 eine *synclinale* Konformation bezogen auf das Stickstoffatom. Die Konformationen der Carboxy-Gruppe an C2 und der zweiten Ethyl-Gruppe an C5 sind dagegen *antiperiplanar*.

Tabelle 1 Ausgewählte Bindungslängen (Å) und Bindungswinkel (°) für die Radikale *cis-7* und **12**.

	<i>cis-7</i>	12
O1–N1	1.2735(14)	1.273(3)
N1–C2	1.4854(15)	1.475(3)
N1–C5	1.4844(16)	1.485(3)
C2–C3	1.5297(18)	1.528(4)
C3–C4	1.5281(18)	1.491(4)
C4–C5	1.5298(18)	1.549(4)
O1–N1–C2	121.86(10)	121.7(2)
O1–N1–C5	122.33(10)	123.1(2)
C2–N1–C5	115.41(10)	115.2(2)
N1–C2–C3	100.80(9)	102.0(2)
C4–C3–C2	105.22(10)	107.1(2)
C3–C4–C5	106.24(11)	106.2(3)
N1–C5–C4	101.32(9)	99.9(2)

In den Kristallstrukturen von *cis-7* und **12** sind die Moleküle über Wasserstoffbrückenbindungen des Typs O–H \cdots O zwischen den Carboxy-Gruppen mit einem zentrosymmetrischen R_2^2 -(8)-Motiv verbunden.⁶³ Daraus ergeben sich in *cis-7* polymere „Zickzack“-Ketten, welche sich in [10-1]-Richtung ausdehnen, und in **12** Dimere (Abbildung 19). Die geometrischen Parameter (Tabelle 2), sprechen für starke O–H \cdots O-Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Carboxy-Gruppen.⁶⁴ Das Muster der Wasserstoffbrückenbindungen in *cis-7* und **12** ist in Übereinstimmung mit *Etters* dritter Regel für Wasserstoffbrückenbindungen, welche besagt, dass jeweils der beste Wasserstoffbrücken-Donor und der beste Wasserstoffbrücken-Akzeptor miteinander Wasserstoffbrücken ausbilden.⁶⁵ Das Sauerstoff-Atom der Nitroxid-Gruppe kann im Vergleich zur Carboxy-Gruppe als der schwächere Wasserstoffbrücken-Akzeptor angenommen werden. Daher zeigen die Nitroxid-Gruppen in *cis-7* und **12** nur C–H \cdots O-Kontakte, die kürzer sind als die Summe der korrespondierenden van-der-Waals-Radien.⁶⁶ Sie bilden keine klassischen Wasserstoffbrückenbindungen aus.

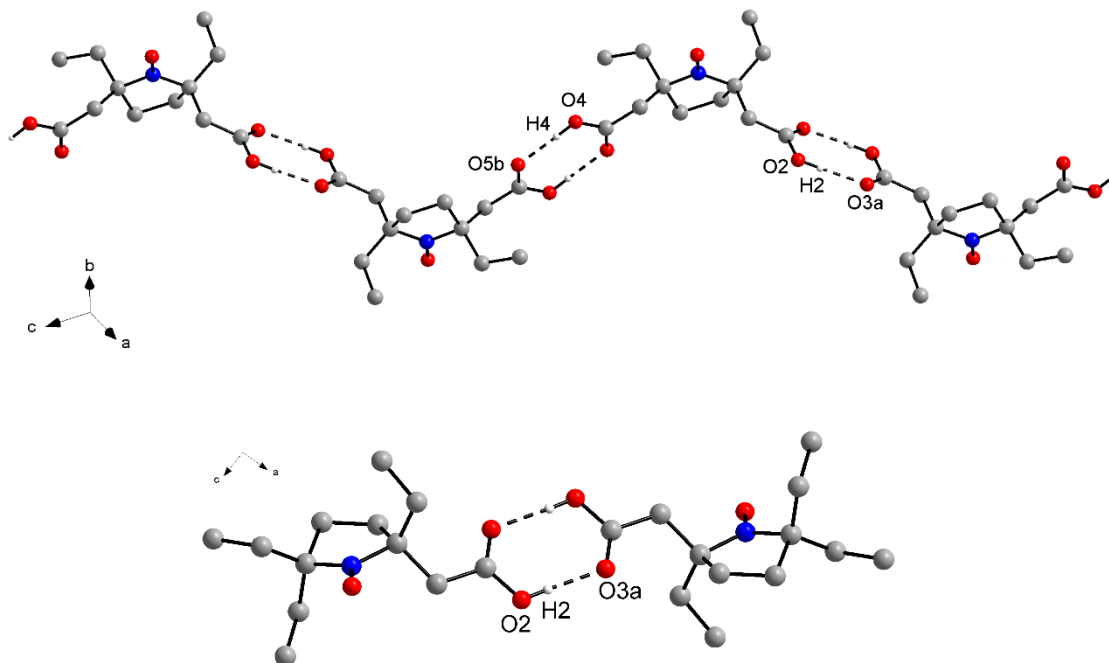


Abbildung 19 *cis-7*-Molekülketten (oben) und **12**-Dimere (unten). Die Moleküle sind über Wasserstoffbrückenbindungen (dargestellt als gestrichelte Linie) miteinander verknüpft. Kohlenstoff-gebundene Wasserstoffatome wurden zur Verbesserung der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Symmetriecodes: (a) $-x+1, -y, -z$; (b) $-x, -y, -z+1$.

Tabelle 2 Geometrie der Wasserstoffbrückenbindungen ($\text{\AA}, ^\circ$) von *cis-7* und **12**.

$D-H\cdots A$	$d(D-H)$	$d(H\cdots A)$	$d(D\cdots A)$	$\angle(DHA)$
<i>cis-7</i>				
O2–H2\cdotsO3a	0.858(14)	1.789(15)	2.6450(14)	175.0(18)
O4–H4\cdotsO5b	0.878(15)	1.748(15)	2.6248(15)	176.3(19)
12				
O2–H2\cdotsO3a	0.83	1.83	2.657(3)	177.9

* Symmetriecodes: (a) $-x+1, -y, -z$; (b) $-x, -y, -z+1$.

2.2.3 EPR-spektroskopische Charakterisierung der Radikale *cis-7*, *trans-7* und **12**

2.2.3.1 Evaluierung des Einflusses von Molekülstruktur und pH-Wert auf die EPR-Spektren

Zunächst wurden die EPR-Spektren von *cis-7*, *trans-7*, **12** und **3-CP** in Pufferlösungen mit unterschiedlichem pH-Wert gemessen. *Abbildung 20* zeigt das experimentelle und das simulierte Spektrum jedes Radikals bei pH 7.4. Die Simulation wurde mit EasySpin⁶⁷ mit der Funktion „Garlic“ durchgeführt. Die Spektren bestehen wie erwartet aus je drei Signalen und sind annähernd isotrop.³⁶

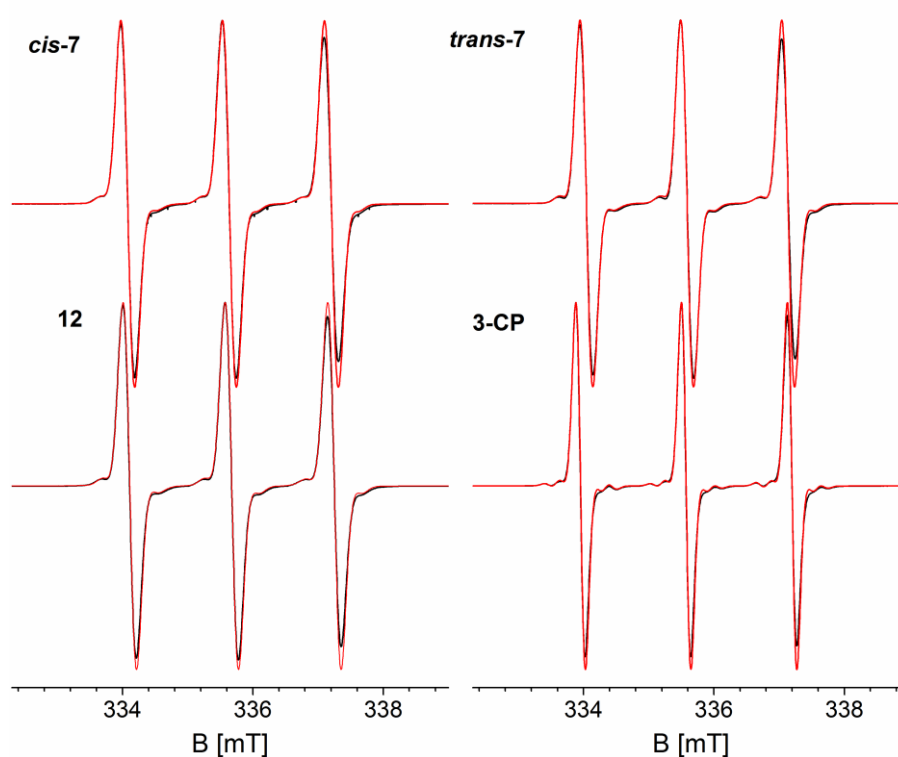


Abbildung 20 X-Band-EPR-Spektren (rote Linie: simuliert, schwarze Linie: experimentell) von *cis-7*, *trans-7*, **12** und **3-CP** in Phosphat-Puffer pH 7.4 (Ph. Eur., c = 1 mM) bei RT.

Die Hyperfeinkopplungskonstanten $a(\text{N})$ und $a(\text{C})$

Die Hyperfeinkopplungskonstanten $a(\text{N})$ (Tabelle 3) sind für *cis-* und *trans-7* etwa gleich und werden in folgender Reihenfolge größer: *cis-/trans-7* < **12** < **3-CP**. Die Hyperfeinkopplungskonstante $a(\text{N})$ hängt von extrinsischen und intrinsischen Faktoren wie der Polarität des Lösungsmittels und der Molekülstruktur ab. Die Nitroxid-Gruppe (*Abbildung 21*) kann in zwei unterschiedlichen Grenzstrukturen vorliegen. Polare

Lösungsmittel wie Wasser stabilisieren die ionische Struktur (b). Dadurch erhöht sich die Spindichte am Stickstoffkern und die Hyperfeinkopplungskonstante $a(\text{N})$ wird größer.^{36, 68}

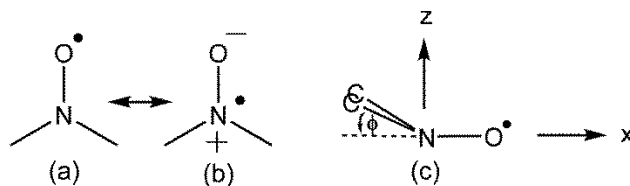


Abbildung 21 Mesomere Grenzstrukturen (a) und (b) der Nitroxid-Funktion und „Out-of-plane“-Winkel ϕ (c) der Nitroxid-Funktion.

Da die Radikale *cis-7*, *trans-7*, **12** und **3-CP** unter gleichen Umgebungsbedingungen unterschiedliche Hyperfeinkopplungskonstanten aufweisen (Tabelle 3), müssen diese Differenzen durch Unterschiede in der Molekülstruktur der Radikale bedingt sein. Die Hyperfeinkopplungskonstante $a(\text{N})$ wird grundsätzlich größer, wenn die Pyramidalisierung der N–O•-Gruppe, welche durch den „Out-of-plane“-Winkel (Winkel zwischen der N1-O1-Bindung und der C2-N1-C5-Ebene) beschrieben werden kann, größer wird.⁶⁹ Dies kann durch eine Hybridisierung des 1s- und des 2pz-Orbitals des Stickstoffs mit zunehmendem „Out-of-plane“-Winkel erklärt werden (Abbildung 21). Mit zunehmendem s-Charakter des p-Orbitals wird der Einfluss des freien Elektrons auf den Stickstoffkern verstärkt. Für Fünfring-Nitroxide ist dieser Winkel normalerweise eher klein.⁷⁰ Er bewegt sich in der Regel zwischen 0 – 5 °. Bei Sechsring-Nitroxiden liegt er dagegen eher bei 15 – 20 °.⁷ Anhand der Kristallstrukturen konnten die Winkel zwischen der N1-O1-Bindung und der C2-N1-C5-Ebene bestimmt werden: Er beträgt für *cis-7* 6.01(12)°, für **12** 0.8(3)° und für **3-CP** laut Literatur 3.24(14)°⁵⁷. Die Vergrößerung des „Out-of-plane“-Winkels (**12** < **3-CP** < *cis-7*) geht demnach in diesem Fall *nicht* mit der Vergrößerung der Hyperfeinkopplungskonstante einher. Natürlich muss hierbei bedacht werden, dass die „Out-of-plane“-Winkel im festen Zustand bestimmt wurden und nicht zwangsläufig auf die Situation in Lösung übertragen werden können. $a(\text{N})$ hängt außerdem auch von der torsionalen Oszillation der Nitroxid-Funktion ab, welche durch die Substitution in α -Position beeinflusst wird. Es konnte gezeigt werden, dass die Substituenten in α -Position die torsionale Oszillation hindern und dadurch die Hyperfeinkopplungskonstante $a(\text{N})$ verringern.⁶⁹ Es kann daher angenommen werden, dass die Verringerung von $a(\text{N})$ von **3-CP** zu *cis/trans-7* durch eine Reduktion der Ringflexibilität infolge der Substitution mit sterisch anspruchsvollen Ethyl- und Carboxymethyl-Gruppen hervorgerufen wird.

Die Stickstoffsignale der untersuchten Radikale werden von ^{13}C -Satelliten begleitet. Auch diese unterscheiden sich je nach Nitroxid. Die Spektren von *cis-7*, *trans-7* und **12** haben je eine Gruppe von ^{13}C -Satelliten. Das Spektrum von **3-CP** hat zwei Gruppen von ^{13}C -Satelliten. Aufgrund der geringen Bedeutung dieser Kopplungen für die Anwendung der Radikale wurden diese jedoch nicht weiter untersucht.

Tabelle 3 Hyperfeinkopplungskonstanten a und Peak-zu-Peak-Linienbreiten (ΔB_{pp}) von **3-CP**, *cis-7*, *trans-7* und **12** bei unterschiedlichen pH-Werten.

Radikal	pH	$a(\text{N})$ [mT]	$a(\text{C1})/a(\text{C2})^*$ [mT]	ΔB_{pp} (Gauss/Lorentz) [mT]
<i>cis-7</i>	4.5	1.527	0.653 (6)	0.185/0.015
	7.4	1.565	0.653 (6)	0.210/0.010
	8.8	1.559	0.653 (6)	0.210/0.010
<i>trans-7</i>	4.5	1.529	0.653 (6)	0.180/0.015
	7.4	1.552	0.653 (6)	0.190/0.015
	8.8	1.552	0.653 (6)	0.190/0.015
12	4.5	1.556	0.669 (6)	0.190/0.015
	7.4	1.572	0.669 (6)	0.200/0.015
	8.8	1.572	0.669 (6)	0.195/0.015
3-CP	4.5	1.615	0.962 (5)/0.530 (2)	0.135/0.012
	7.4	1.625	0.962 (5)/0.530 (2)	0.140/0.012
	8.8	1.624	0.962 (5)/0.530 (2)	0.140/0.012

* Die Anzahl der Kohlenstoffatome, die für die Simulation verwendet wurden, ist in Klammern angegeben.

Die Peak-zu-Peak-Linienbreite

Die Form der Signale folgt dem Voigt-Profil, wobei der Gauss-Anteil entsprechend der Simulation mit EasySpin deutlich überwiegt. Die EPR-Signale von *cis-7*, *trans-7* und **12** sind 50 - 70 μT breiter als die Signale von **3-CP** (*Tabelle 3*). Die Linienbreite eines EPR-Signals wird grundsätzlich von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst. Dazu gehören unaufgelöste Hyperfeinkopplungen (z.B. von Wasserstoffatomen), anisotrope Wechselwirkungen und Interaktionen wie Heisenberg-Austausch mit anderen paramagnetischen Spezies.^{7, 68} Da nicht unter anoxischen Bedingungen gearbeitet wurde, sind alle Spektren durch Austauschwechselwirkungen mit Sauerstoff verbreitert. Die wahrscheinlichste Erklärung für die unterschiedlichen Linienbreiten sind unaufgelöste Hyperfeinkopplungen und anisotrope Wechselwirkungen. Protonen der Ethyl- und Carboxymethyl-Gruppen können durch Hyperkonjugation und „long-range“-Kopplungen die Signale von *cis/trans-7* und **12**

verbreitern.⁷ Die geringere Linienbreite von **3-CP** geht außerdem mit der größeren Hyperfeinkopplungskonstante $a(N)$ einher. Torsionale Oszillation und eine hohe Flexibilität des Rings vergrößern $a(N)$. Die effektive Hyperfeinkopplungskonstante $a(H)$ wird dagegen durch die dynamische Ausmittelung der Hyperfeinkopplungskonstanten verschiedener Ringkonformationen verkleinert.^{7,71}

Die pH-Wert-Abhängigkeit

Nitroxidradikale mit einer funktionellen Gruppe, die zur Aufnahme oder Abgabe eines Protons fähig ist, sind pH-sensitiv. Diese Sensitivität macht sich in einer Veränderung des g-Faktors und der Hyperfeinkopplungskonstanten $a(N)$ bemerkbar.²⁰ Die Änderung des g-Faktors ist frequenzabhängig und in der Regel sehr klein. Daher wird normalerweise die frequenzunabhängige Änderung der Kopplungskonstanten zur Evaluierung des pH-Wertes herangezogen. Bereits die Messung der EPR-Spektren von *cis-7*, *trans-7*, **12** und **3-CP** in Puffern mit dem pH-Wert 4.5, 7.4 und 8.8 zeigt eine Abhängigkeit von $a(N)$ im sauren pH-Bereich (Tabelle 3). Die ¹³C-Hyperfeinkopplungskonstante $a(C)$ wird nicht durch den pH-Wert beeinflusst. Die pH-Abhängigkeit von $a(N)$ im sauren Medium wurde mittels Ermittlung der Titrationskurven der Radikale bestätigt (Abbildung 22).

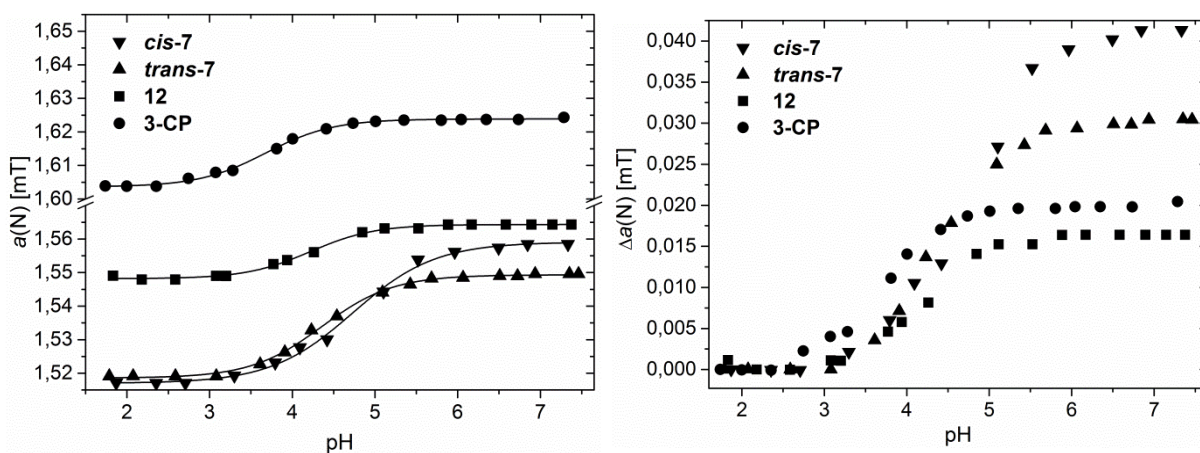


Abbildung 22 pH-Wert-Abhängigkeit von $a(N)$ von *cis-7*, *trans-7*, **12** und **3-CP**. (A) Absolute Änderung und (B) relative Änderung von $a(N)$ mit steigendem pH-Wert. $C_{\text{Radikal}} = 0.5 \text{ mM}$ in 150 mM NaCl -Lösung. pH-Wert-Einstellung erfolgte mit wässriger HCl- bzw. NaOH-Lösung.

Die Abhängigkeit besteht im Bereich von pH 2.5 bis 6.5, wobei der exakte Bereich vom pKa-Wert des jeweiligen Radikals abhängt. Innerhalb des physiologischen pH-Bereichs kommt es bei keinem der Radikale mehr zu einer nennenswerten Änderung von $a(N)$. Die in

Tabelle 4 aufgeführten pKa-Werte wurden aus den Titrationskurven anhand folgender Gleichung näherungsweise berechnet: $a(N) + a(N)^{-2}/2$.⁶⁸ Der so abgeschätzte pKa-Wert für **3-CP** ist vergleichbar mit anderen Literaturwerten (pKa = 3.89⁶⁸; 3.40⁷²). Die beiden pKa-Werte von *cis/trans-7* konnten auf Grundlage der erhaltenen Daten nicht differenziert werden. Der mittlere pKa-Wert von *cis/trans-7* und **12** liegt innerhalb des erwarteten Bereichs für Carboxy-Gruppen.

Die pH-Sensitivität, bestimmt als maximale Änderung von $a(N)$ ($\Delta a(N)_{\max}$, *Tabelle 4* und *Abbildung 22 (B)*) sinkt in folgender Reihenfolge: *cis-7* > *trans-7* > **3-CP** \approx **12**. Die höhere Sensitivität von *cis-* und *trans-7* im Vergleich zu **12** und **3-CP** ist am wahrscheinlichsten auf den elektrostatischen Einfluss der zweiten Carboxy-Gruppe von *cis-* und *trans-7* zurückzuführen: Die zweite geladene Carboxy-Gruppe erhöht zusätzlich die Polarität in der Nähe der Nitroxid-Gruppe, wodurch die zwitterionische Form (b) besser stabilisiert wird und $a(N)$ stärker ansteigt. Die Differenz zwischen *cis-* und *trans-7* ist davon ausgehend am ehestens auf eine unterschiedlich gute Stabilisierung der zwitterionischen Nitroxid-Struktur zurückzuführen.

Tabelle 4 Maximale Änderung der Hyperfeinkopplungskonstante $\Delta a(N)_{\max}$ in Abhängigkeit vom pH-Wert und pKa-Werte.

	$\Delta a(N)_{\max}$ [μ T]	pKa
<i>cis-7</i>	41	4.75
<i>trans-7</i>	30	4.34
12	16	4.32
3-CP	20	3.69

2.2.3.2 Bestimmung der reduktiven Stabilität

Die reduktive Stabilität von Nitroxiden ist ausschlaggebend für deren Anwendbarkeit *in vivo* und in Zellversuchen. Gängige, kommerziell verfügbare Nitroxidradikale zeigen eine geringe Stabilität gegenüber Reduktionsmitteln und die Bestrebungen, die Stabilität mit neuen Derivaten zu verbessern, sind nach wie vor groß.^{29, 45} Eine gängige Methode, um die reduktive Stabilität von Nitroxid-Radikalen zu bestimmen, ist das Ascorbinsäure-Assay.⁷³ Dazu wird das zu untersuchende Radikal mindestens mit einer 10-fachen Menge an Ascorbinsäure versetzt und die Abnahme der Signalintensität, gemessen als Peakhöhe des Tieffeld-Peaks, bestimmt. Durch den großen Überschuss an Ascorbinsäure erhält man eine Kinetik pseudo-1. Ordnung, auf deren Grundlage die initiale Reduktionsrate als

Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung bestimmt werden kann (siehe 2.4.3.2). Nach der Durchführung des Ascorbinsäure-Assays ergaben sich die in *Abbildung 23* gezeigten Reduktionskurven von *cis/trans-7* und **12** und den kommerziellen Nitroxiden **3-CP** und **4-CT** und die in *Tabelle 5* aufgeführten initialen Reduktionsraten.

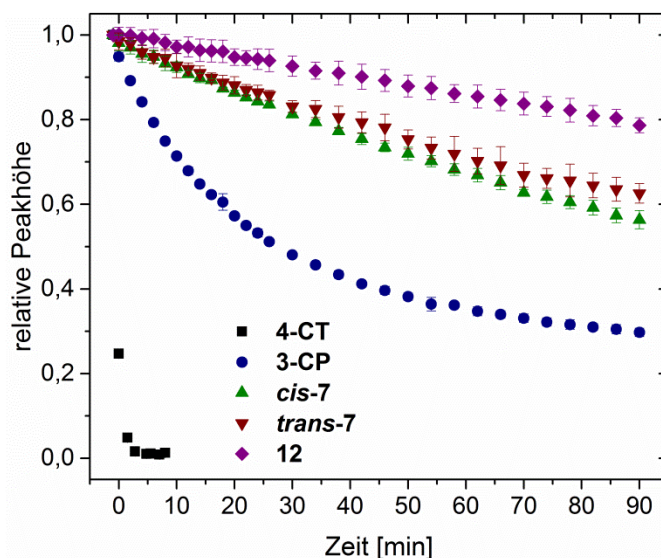


Abbildung 23 Abnahme der Peakhöhe des Tieffeld-Peaks der getesteten Nitroxide nach Zugabe von Ascorbinsäure in Abhängigkeit von der Zeit. $C_{\text{Radikal}} = 0.5 \text{ mM}$, 10-facher Überschuss an Ascorbinsäure in Phosphat-Puffer pH 7.4 (50 mM, 2 mM EDTA), $n = 3$.

Tabelle 5 Mittlere initiale Reduktionsrate (*avg k*) der getesteten Radikale und restliche Radikalmenge nach 90 min.

	<i>avg k</i> [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	Radikalmenge nach 90 min [%]
<i>cis-7</i>	0.0207 \pm 0.002	56.7 \pm 2.1
<i>trans-7</i>	0.0174 \pm 0.002	62.7 \pm 2.3
12	0.0086 \pm 0.0005	78.7 \pm 1.7
3-CP	0.0946 \pm 0.001	29.7 \pm 0.9
4-CT	3.6253 \pm 0.140	0.0 \pm 0.0

Die Ergebnisse zeigen zum einen, dass die Pyrrolidin-Nitroxide eine deutlich größere Stabilität aufweisen als das Piperidin-Nitroxid **4-CT**. Für die Pyrrolidin-Nitroxide steigt die Stabilität in folgender Reihenfolge: **3-CP** < *cis-7* \approx *trans-7* < **12**.

Die reduktive Stabilität cyclischer Nitroxidradikale hängt vor allem von der Ringgröße ab. In der Vergangenheit wurde bereits gezeigt, dass die Stabilität sprunghaft ansteigt, wenn statt eines Sechsrings (Piperidin) ein Fünfring (Pyrrolidin) als Grundstruktur verwendet

wird.⁴³ Das hier durchgeführte Ascorbinsäure-Assay macht dies nochmals deutlich. Im Gegensatz zu Pyrrolidin-Nitroxiden können 6-gliedrige Piperidin-Derivate wegen ihrer flexibleren „Sesselform“ Konformationsänderungen durchlaufen, die dazu führen, dass die Nitroxid-Funktion für Reduktionsmittel besser zugänglich ist.⁷⁴

Die reduktive Stabilität der Nitroxide wird des Weiteren durch sterische, elektrostatische und induktive Effekte der Ringsubstituenten beeinflusst.⁷⁴ Sterisch anspruchsvolle Alkyl-Gruppen benachbart zur Nitroxyl-Funktion verringern die Reduktionsrate durch sterische Abschirmung.^{29, 73} Ionisierbare Gruppen führen zu einer reduzierten (z.B. $-\text{NH}_3^+$) oder vergrößerten (z.B. $-\text{COO}^-$) reduktiven Stabilität durch elektrostatische Anziehung oder Abstoßung von Reduktionsmitteln wie dem Ascorbinsäureanion.^{44, 74} Diese Beobachtungen erklären die verbesserte Stabilität von *cis/trans*-**7** und **12** im Vergleich zu **3-CP**. Um die Unterschiede zwischen *cis/trans*-**7** und **12** erklären zu können, müssen die induktiven Effekte der Substituenten betrachtet werden. Entsprechend der bisherigen Literatur kann man davon ausgehen, dass elektronenziehende Substituenten die Zugänglichkeit der Nitroxid-Funktion für Reduktionsmittel erhöhen und elektronenschiebende Substituenten die Zugänglichkeit der Nitroxid-Gruppe für Reduktionsmittel verringern.^{45, 74, 75} Es wurde außerdem versucht, diesen Einfluss mit Parametern wie dem Swain/Lupton F-Parameter, welcher induktive und Feldeinflüsse von Substituenten beschreibt, in Korrelation zu bringen.⁴⁵ Substituenten mit positiven F-Werten haben einen elektronenziehenden Effekt. Die F-Werte⁷⁶ der Substituenten der Nitroxide, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind in *Tabelle 6* gelistet. Die Summe der F-Werte der Substituenten korreliert mit der Stabilität der Pyrrolidin-Nitroxide. Die Stabilisierung durch elektrostatische Abstoßung wird bei *cis/trans*-**7** offensichtlich durch den destabilisierenden Elektronenzug der beiden Carboxymethyl-Gruppen überkompensiert, sodass *cis*- und *trans*-**7** in Summe weniger stabil sind als **12**. Die Reduktionsrate von **12** ist etwa 11-mal geringer als die Reduktionsrate von **3-CP**. Eines der bisher stabilsten Nitroxidderivate, das Tetraethyl-Analogon von **3-CP** (**3-EtCP**, *Abbildung 13 (C)*) ist allerdings 63-mal stabiler als **3-CP**. Das Einführen von Carboxymethyl-Substituenten in α -Position zur Nitroxid-Gruppe scheint daher nicht vorteilhaft hinsichtlich einer sehr guten reduktiven Stabilität zu sein.

Tabelle 6 Swain/Lupton F-Parameter.⁷⁶

Radikal	F-Werte
<i>cis/trans-7</i>	2×0.19 (Carboxymethyl) + 2×0.00 (Ethyl)
12	1×0.19 (Carboxymethyl) + 3×0.00 (Ethyl)
3-CP	4×0.01 (Methyl)
4-CT	4×0.01 (Methyl)

2.2.4 EPR-spektroskopische Charakterisierung von 14 und 15

Das Polyamin Spermin, verzweigte makromolekulare Sperminderivate und andere kationische Polymere können verwendet werden, um sogenannte „Polyplexe“ herzustellen. Polyplexe sind Kondensate aus kationischen Polymeren und DNA. Sie haben Potential als nicht-virale Genvektoren und sind daher von wachsendem Interesse im Bereich der Gentherapie.⁷⁷⁻⁷⁹ Die Effektivität der Transfektion, also der Aufnahme der kondensierten DNA in die Zelle, hängt von zahlreichen Faktoren ab. Eine Rolle spielen beispielsweise Molekulargewicht, dreidimensionale Struktur und Flexibilität des Polymers, sowie Ladungsdichte, Ladungsverteilung und Nettoladung im Komplex mit der DNA und die sich daraus ergebende dreidimensionale Struktur der Polyplexe.⁷⁷ Um die Transfektion durch Polyplexe zu verstehen, ist es daher essentiell, diese hinsichtlich der genannten Eigenschaften zu charakterisieren. Als Standardmethoden zur Charakterisierung nicht-viraler Genvektoren werden unter anderem die Fluoreszenzspektroskopie, Transmissionselektronenmikroskopie, dynamische Lichtstreuung und ζ -Potential-Messung und die isotherme Titrationskalorimetrie verwendet.⁸⁰ Die EPR-Spektroskopie ist dagegen eine bisher kaum verwendete Methode zur Charakterisierung der DNA-Kondensation. In einer 2000 publizierten Studie wurde die Komplexierung von DNA durch sogenannte „Poly(amidoamin)-Starburst-Dendrimere“ mittels EPR untersucht.⁸¹ 2011 erschien eine Publikation (Hinderberger et al.), in der die Kondensation von DNA durch die bereits genannten verzweigten Sperminderivate untersucht wurde.⁷⁸ Als Spin-Label wurden **4-CT** bzw. **3-CP** verwendet, welche kovalent an die entsprechenden Amine gekoppelt wurden.

Ein mittels EPR messbarer Parameter ist die Packungsdichte der Polyplexe, da sich diese auf die Mobilität und damit die EPR-Spektren der Sonden auswirkt.⁷⁸ Um auch geringe Änderungen in der Packungsdichte erfassen zu können, sollten die Spin-Sonden möglichst sensitiv sein. *Abbildung 24* zeigt die Strukturen der beiden synthetisierten Spermin-Derivate

14 und **15**. **14** enthält das über eine Amidbindung gekoppelte Radikal **12**. **15** dagegen das Standardnitroxid **3-CP**.

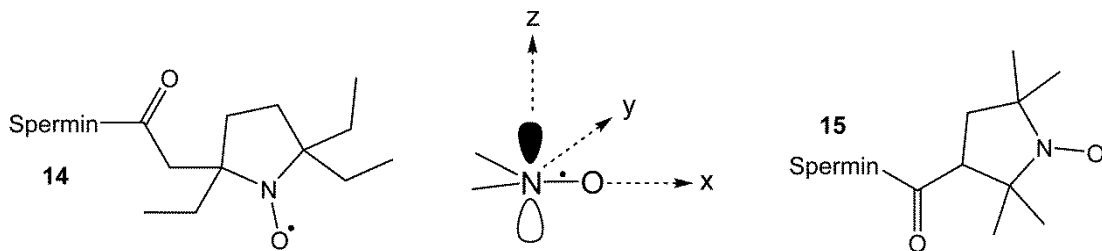


Abbildung 24 Molekülstrukturen von **14** und **15** und Rotationsachsen der Nitroxidradikale.

12 ist über die α -ständige Carboxymethyl-Gruppe kovalent an Spermin gebunden; **3-CP** über die Carboxyl-Gruppe in Position 3 des Rings. Die unterschiedliche Kopplung sollte durch die unterschiedliche Lage der Rotationsachsen der Nitroxide in Bezug auf Spermin die Rotationsdiffusion der Moleküle insgesamt beeinflussen. Des Weiteren könnte die Rotation um die Carboxymethyl-Gruppe bei Nitroxid **14** durch die Ethyl-Gruppen sterisch gehindert sein. Ob sich dies auf die Sensitivität der Sonden bei der Bestimmung der Packungsdichte in Komplexen mit Polyanionen auswirkt, sollte im Zuge dieser Arbeit ermittelt werden.

Dafür wurden die EPR-Spektren der Radikale ungebunden und im Komplex mit einem Polyanion in Citrat-Puffer pH 5.0 (50 mM) und mit unterschiedlicher Ionenstärke am Q-Band-Spektrometer gemessen. Als kostengünstigere Alternative zu DNA wurde für die Versuche das Polyanion Heparin-Na verwendet.

Abbildung 25 zeigt die EPR-Spektren im Vergleich. Das Signal/Rausch-Verhältnis der Spektren ist relativ gering, was die Auswertung erschwert. Zunächst fällt auf, dass die Signalintensität der Peaks bei allen Messungen deutlich vom Tieffeld- zum Hochfeldpeak sinkt. Dies ist auf die bessere Auflösung von Anisotropieeffekten durch der Messung bei einer wesentlich höheren Frequenz im Vergleich zum X-Band zurückzuführen. Bei **14** ohne Heparin steigt die Peak-zu-Peak-Linienbreite des Signals in Gegenwart von 150 mM NaCl. **15** ohne Heparin zeigt dieses Verhalten bei Erhöhung der Ionenstärke nicht. Die Spektren sind bis auf geringe Unterschiede in der Intensität des Hochfeld-Peaks identisch. Betrachtet man die EPR-Spektren beider Sonden in Gegenwart von Heparin zeichnen sich deutliche Unterschiede ab. Bei **15** sind die Spektren in Gegenwart von Heparin unabhängig von der Natriumchlorid-Konzentration identisch. Im Vergleich zu den Spektren von **15** ohne Heparin ist die Signalintensität des Hochfeldpeaks reduziert, was auf eine geringe Reduktion der Rotationsgeschwindigkeit in Gegenwart von Heparin hinweist. Die Spektren von **14** weisen

in Gegenwart von Heparin wesentlich deutlichere Veränderungen auf. Das Spektrum von **14** mit Heparin ohne NaCl ist eine Mischung zweier Spezies, die sich jeweils in ihrer Rotationsdiffusionsrate unterscheiden.

Die Diffusionsrate einer Spezies ist deutlich reduziert. Dies zeigt sich in der Verbreiterung des mittleren und Hochfeld-Peaks. Die Diffusionsrate der zweiten Spezies ist höher und entspricht eher derjenigen von **12** ohne Heparin. Enthält der Puffer zusätzlich 150 mM NaCl, tritt die langsam rotierende Radikalspezies nicht mehr auf. Dies kann durch die geringere elektrostatische Interaktion zwischen der Sonde und Heparin erklärt werden. Es ist ein bekanntes Phänomen, dass die Packungsdichte von Polyplexen bei höherer Ionenstärke abnimmt.⁸² In diesem Versuch reagiert die Spin-Sonde **14** also eindeutig sensitiver auf Veränderungen in der Packungsdichte der Komplexe als **15**.

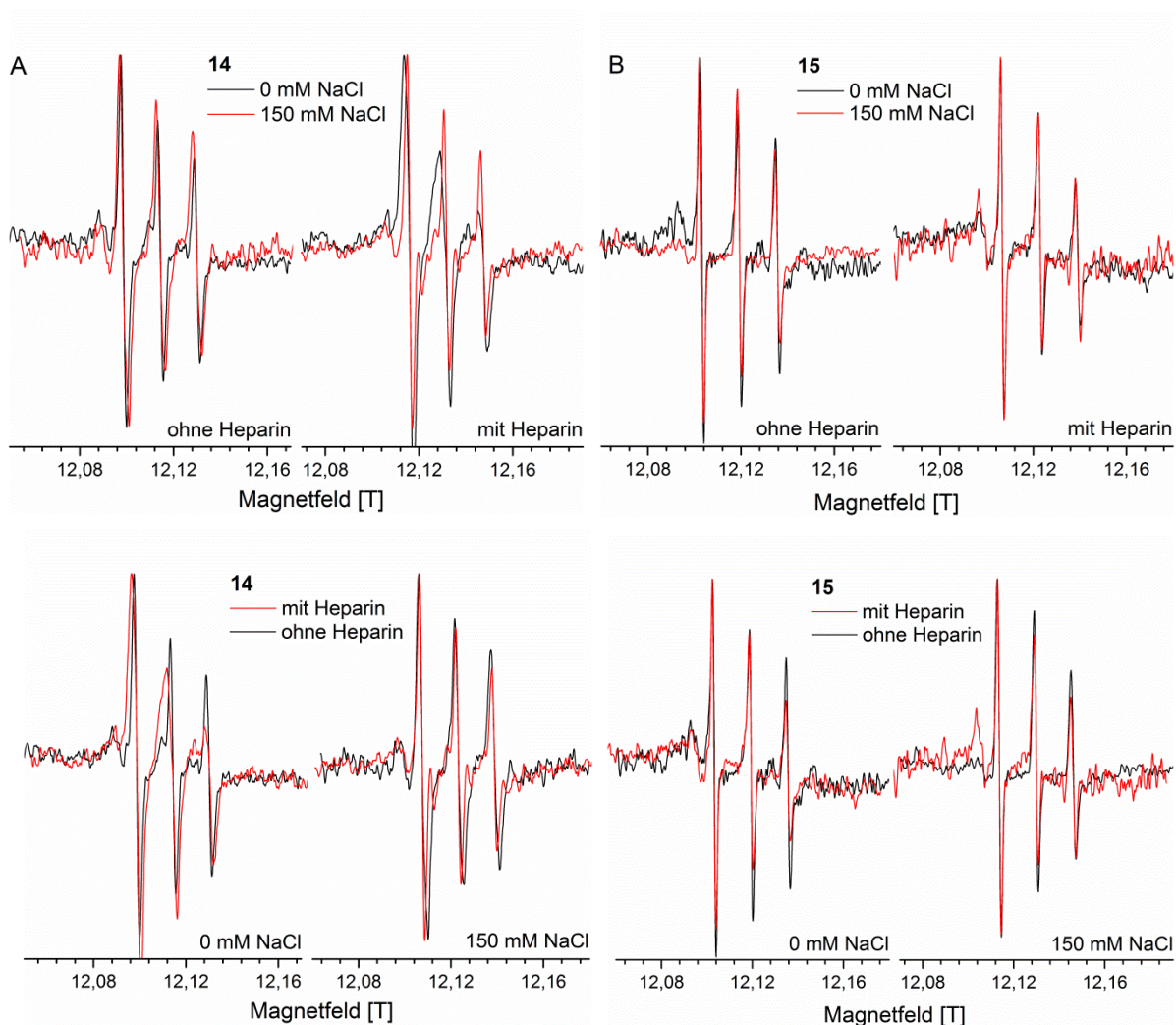


Abbildung 25 Q-Band EPR-Spektren von (A) **14** und (B) **15** ($c = 0.5$ mM) in Citrat-Puffer pH 5 (50 mM) mit und ohne Heparin (ca. 0.1 mM, 1 mg/ml, Aktivität 288 U/ml) und unterschiedlicher Ionenstärke (0 mM NaCl, 150 mM NaCl) bei RT im Vergleich.

In zukünftigen Versuchen sollte getestet werden, ob sich die Ergebnisse auch auf Polyplexe mit DNA statt mit Heparin als Polyanion übertragen lassen. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die Verwendung von Nitroxid **12** als Spin-Label auch bei anderen kationischen Polymeren wie den höhermolekularen, verzweigten Sperminderivaten von Vorteil ist.

2.2.5 EPR-spektroskopische Charakterisierung des freien und Protein-gebundenen Spin-Labels **16**

Das Einführen von Spin-Labels in Proteine (*Site-directed spin labeling*, SDSL) ist eine etablierte Methode zur Charakterisierung der Proteinstruktur. Auf diese Weise können Informationen über dynamische Strukturänderungen und Wechselwirkungen mit anderen Proteinen, Peptiden oder Substraten gewonnen werden. Befinden sich mehrere Spin-Labels in räumlicher Nähe zueinander können außerdem Distanzen zwischen diesen gemessen werden.⁴¹ Das am häufigsten verwendete Spin-Label ist *2,2,5,5-Tetramethyl-1-oxyl-3-methylmethanthiosulfonat* (MTSL, *Abbildung 26*). Es bindet spezifisch und kovalent an Cystein-Reste eines Proteins. Nachteil dieser Methode ist, dass sämtliche Cysteine, die nicht modifiziert werden sollen und nicht als Disulfid vorliegen, durch andere Aminosäuren ersetzt werden müssen. Dies birgt die Gefahr, dass das Protein seine Funktion verliert. Weiterhin ist die Disulfid-Bindung reversibel, sodass das Nitroxid wieder freigesetzt und/oder ausgetauscht werden kann.⁵

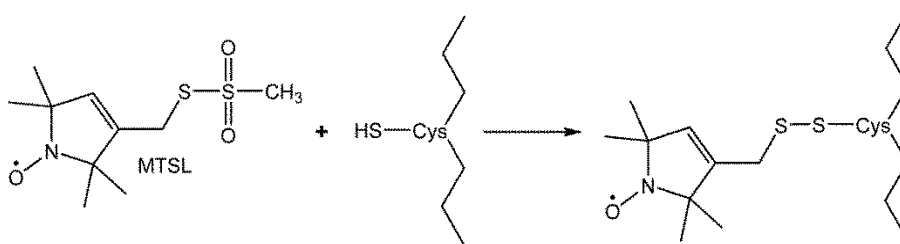


Abbildung 26 Kovalente Bindung von MTSL an Cystein-Reste.⁴¹

Im Zuge dieser Arbeit sollte die Eignung der bioorthogonalen SPIEDAC-Reaktion zum Einführen von Spin-Labels in Proteine am Beispiel von GFP untersucht werden. Die SPIEDAC-Reaktion und die Bindung des Labels **16** an GFP^{SCO} wurden bereits im Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben. Gegenüber der Verwendung von MTSL bietet die SPIEDAC-Reaktion den Vorteil, dass sie irreversibel ist. Weiterhin müssen die zu untersuchenden Proteine zu einem geringeren Ausmaß modifiziert werden, da nur die Position durch Austausch einer

Aminosäure gegen eine SCO/TCO-Aminosäure verändert werden muss, an der das Label gebunden werden soll.

Um die spektroskopischen Eigenschaften des freien und des GFP-gebundene Spin-Labels **16** zu untersuchen und miteinander zu vergleichen, wurden jeweils die EPR-Spektren am X-Band bei 5 °C, 20 °C und 37 °C gemessen. Dazu wurden etwa 10 μM Lösungen von **16** und **16-GFP** in PBS-Puffer (pH 7.4) hergestellt. *Abbildung 27* zeigt die EPR-Spektren bei der jeweiligen Temperatur im Vergleich.

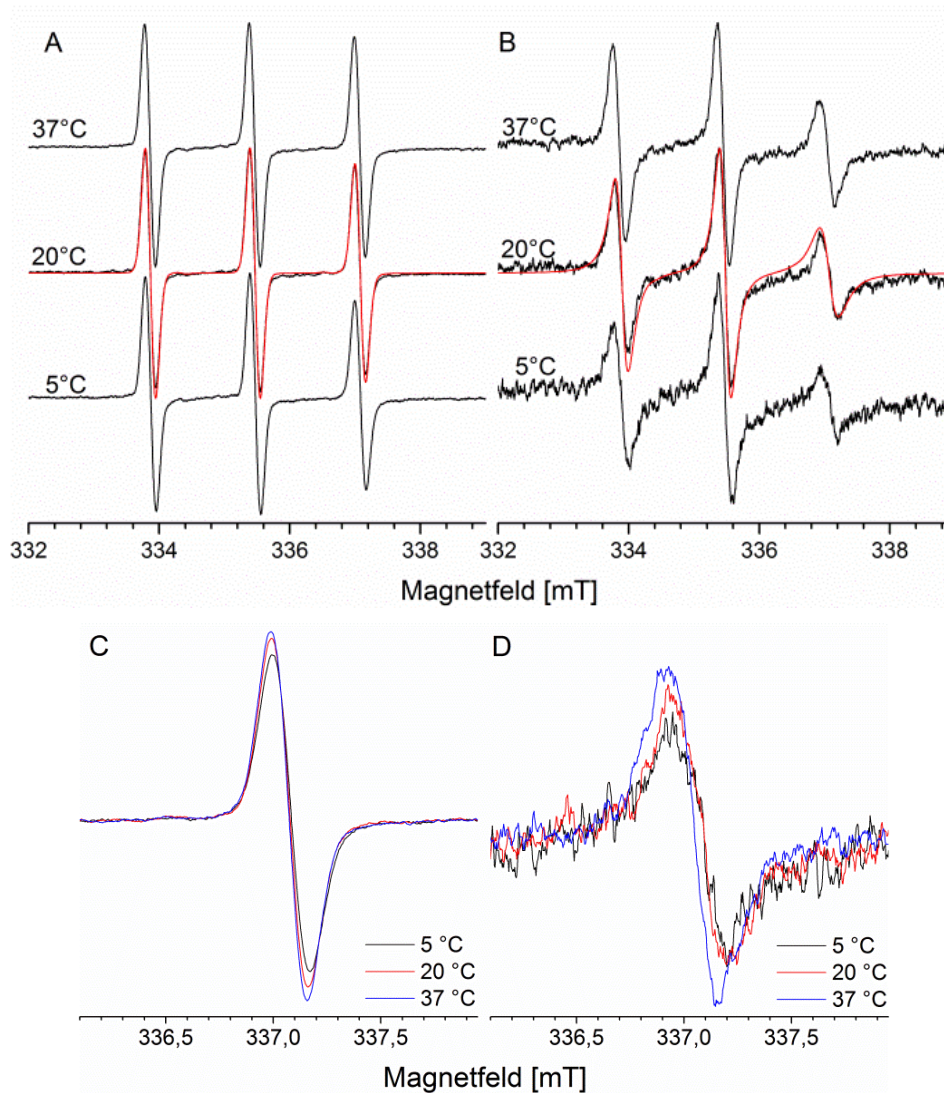


Abbildung 27 Oben: EPR-Spektren von (A) **16** (10 μM in PBS-Puffer pH 7.4) und (B) **16-GFP** (ca. 10 μM in PBS-Puffer pH 7.4) bei unterschiedlichen Temperaturen. (Experimentelle Spektren: schwarz, simulierte Spektren: rot.); Unten: Hochfeld-Peaks von (C) **16** und (D) **16-GFP** bei unterschiedlichen Temperaturen.

Zunächst fällt auf, dass das Signal/Rausch-Verhältnis bei **16-GFP** deutlich schlechter ist. Dies kann unterschiedliche Ursachen haben. Zum einen kann GFP unvollständig modifiziert worden sein. Zum anderen kann während des Labelings und der Probenaufbereitung GFP verloren gegangen sein. Der PBS-Puffer, der für die Labeling-Reaktion verwendet wurde, enthielt außerdem 0.2 mM TCEP (*Tris(2-carboxyethyl)phospin*), ein Reduktionsmittel, das verwendet wird, um Disulfidbrücken in Proteinen zu spalten oder die Bildung von Disulfidbrücken zu verhindern.⁸³ TCEP kann Nitroxidradikale reduzieren, auch, wenn die Reduktionsrate im Vergleich zu anderen Reduktionsmitteln wie DTT (*Dithiothreitol*) zwei- bis viermal geringer ist.⁸³

Der genaue Vergleich der Spektren zeigt, dass **16** sehr sensitiv auf Veränderungen in der Umgebung anspricht. Am auffälligsten ist Anisotropie des EPR-Spektrums beim Protein-gebundenen Spin-Label **16**, was eine verlangsamte Rotationsdiffusion anzeigt. Die Rotationsdiffusion eines an ein Makromolekül gebundenen Spin-Labels wird durch die Beweglichkeit der Seitengruppe, an der das Label gebunden ist, die Beweglichkeit des Rückgrates am Ort der Verknüpfung und die Rotation des gesamten Makromoleküls beeinflusst.⁴² Unter Zuhilfenahme entsprechender Modelle sind Rückschlüsse auf die Struktur des Makromoleküls möglich. Im Falle des GFP-gebundenen **16**-Labels kann man anhand der Intensitätsverteilung der Peaks bereits sagen, dass die Rotation des Radikals insgesamt verlangsamt ist, und dass Rotation bevorzugt um die y-Achse stattfindet.⁴² Dies bestätigt sich auch durch die mit der EasySpin-Funktion „Chili“ durchgeführten Simulation der bei 20 °C gemessenen Spektren (*Abbildung 27, Tabelle 7*).

Tabelle 7 Simulationsparameter von **16** und **16-GFP**.

Parameter	16	16-GFP
g-Faktor* (g_{xx} , g_{yy} , g_{zz})	2.0097, 2.0067, 2.0033	2.0097, 2.0066, 2.0032
$a(N)$ (a_{xx} , a_{yy} , a_{zz}) [MHz]	18.25, 18.25, 98.95	17.70, 17.70, 98.55
ΔB_{pp} (Lorentz/Gauss) [mT]	0.180/0.0	0.050/0.130
Rotationsdiffusionsrate (D_x , D_y , D_z) [s ⁻¹]	$1.0 \cdot 10^9$, $4.5 \cdot 10^9$, $5.0 \cdot 10^9$	$1.5 \cdot 10^8$, $6.0 \cdot 10^8$, $1.0 \cdot 10^8$

*g-Faktoren sind unkorrigiert.

Die Rotationsgeschwindigkeit bzw. -rate hängt natürlich auch von der Umgebungstemperatur ab. Dies ist in *Abbildung 27 (C)* und *(D)* eindeutig an der Erhöhung der Peakintensität bzw. Reduktion der Peakbreite des Hochfeld-Peaks mit zunehmender Temperatur zu erkennen. Die Simulation der 20 °C-Spektren zeigt weiterhin, dass die

Hyperfeinkopplungskonstante $a(N)$ des GFP-gebundenen Labels kleiner ist. Wie bereits in Abschnitt 2.2.3.1 erklärt, hängt die Kopplungskonstante von der Polarität der Umgebung der Nitroxid-Gruppe ab. In diesem Fall scheint also die Polarität in der Umgebung der markierten Position (Tyr-39) im GFP-Molekül im Vergleich zu PBS-Puffer verringert zu sein. Diese Beobachtung geht mit der dreidimensionalen Struktur von GFP einher, welche im Bereich der markierten Aminosäure eine reduzierte Lösungsmittelzugänglichkeit aufweist.⁸⁴

Insgesamt konnte anhand dieses Beispiels gezeigt werden, dass sich die auf der SPIEDAC-Reaktion basierende Labeling-Methode sehr gut eignet, um gezielt Spin-Labels in Proteine einzuführen. Die Synthese und Reinigung des Labels **16** ist einfach und mit einer sehr guten Ausbeute (> 90 %) aus kommerziell erhältlichen Edukten durchführbar. Selbst bei der geringen Auflösung von X-Band-Spektren sind Änderungen hinsichtlich Mobilität des Labels und Polarität der Umgebung messbar. In zukünftigen Versuchen sollte daher versucht werden, diese Methode auf andere Proteine zu übertragen.

2.3 Zusammenfassung

Es wurden erfolgreich drei neue Nitroxidradikale (*cis*- und *trans*-**7** und **12**) synthetisiert. Die Molekül- und Kristallstrukturen von *cis*-**7** und **12** konnten mittels Röntgenkristallographie untersucht werden. Der Einfluss der Molekülstruktur auf das EPR-Spektrum und die reduktive Stabilität der neuen Nitroxide wurden im Vergleich zu kommerziellen Nitroxiden untersucht. Sowohl **12** als *cis*- und *trans*-**7** weisen eine verbesserte Stabilität auf, was durch den sterischen Schutz der Nitroxid-Gruppe durch die Ethyl-Gruppen und die elektrostatische Abschirmung durch die Carboxy-Gruppen erklärt werden kann. *Cis*-/*trans*-**7** sind wegen des elektronenziehenden Effekts der Carboxymethyl-Gruppen instabiler als **12**. Weiterhin wurde die Verwendung von Nitroxiden als Spin-Label an zwei Beispielen untersucht. Gekoppelt an Polyamine wie Spermin eignet sich Nitroxid **12** als Spin-Sonde zur Untersuchung von Polyplexen. Erste Versuche geben Hinweise darauf, dass die Spin-Sonde **14** im Vergleich zur Standard-Spin-Sonde sensitiver auf Veränderungen in der Struktur von Polyplexen anspricht. Außerdem wurde **3-CP** mittels Amin-Kupplung an das Tetrazin-Derivat H-Tet geknüpft und die Eignung dieser Spin-Sonde (**16**) zur strukturellen Untersuchung von Proteinen am Beispiel von GFP untersucht. Die Spin-Sonde **16** hat einige Vorteile gegenüber der Standard-Spin-Sonde MTSL. Zum einen muss das zu untersuchende Protein weniger stark modifiziert werden. Zum anderen ist die Kopplung von **16** an das Protein über die SPIEDAC-Reaktion irreversibel.

2.4 Experimenteller Teil

2.4.1 Synthese

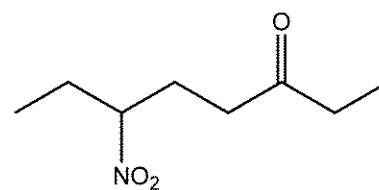
2.4.1.1 Materialien und allgemeine Methoden für die Synthese und analytische Charakterisierung

Siehe Abschnitt 6.

2.4.1.2 Synthesevorschriften

6-Nitrooctan-3-on (3).

1-Nitropropan (35.7 ml, 414 mmol) und Diisopropylamin (20.0 ml, 142 mmol) wurden in CHCl_3 (200 ml) gelöst. Die Reaktionsmischung wurde unter Rühren auf 60 °C erwärmt. Ethylvinylketon (38.9 ml, 400 mmol)



wurde innerhalb von 2 h hinzuge tropft. Danach wurde die Mischung für weitere 16 h bei 60 °C gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das LM unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Et_2O gelöst und zunächst mit 5 %-iger HCl-Lösung (30 ml), dann zweimal mit Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und unter Vakuum eingeeengt. Die Reinigung des Produktes erfolgte mit Hilfe einer Vakuumdestillation bei ca. 27 mbar.

Summenformel: $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_3$

Molmasse: 173.12 g/mol

Ausbeute: 28.5 g (41 %)

Aussehen: farblose Flüssigkeit

Siedepunkt: 140 - 142 °C (27 mbar)

R_f-Wert: 0.32 (EtAc/Heptan, 2/8)

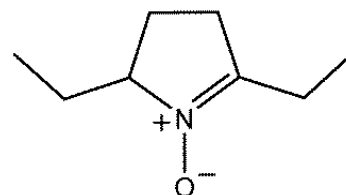
¹H NMR: (400 MHz, CDCl_3) δ 4.41 (m, $J = 9.2, 4.8$ Hz, CHNO_2 , 1H), 2.48 - 2.35 (m, CH_2 , 4H), 2.16 - 2.02 (m, CH_2 , 2H), 2.02 - 1.89 (m, CH_2 , 1H), 1.85 - 1.70 (m, $J = 14.4, 7.4, 4.8$ Hz, CH_2 , 1H), 1.03 (t, $J = 7.4, 0.9$ Hz, CH_3 , 3H), 0.94 (t, $J = 7.4$ Hz, CH_3 , 3H)

¹³C NMR: (101 MHz, CDCl_3) δ 209.26, 89.41, 37.63, 36.03, 27.24, 27.09, 10.14, 7.67

HRMS (ESI): berechnet für $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 174.113; gefunden 174.113

2,5-Diethyl-3,4-dihydro-2*H*-pyrrol-1-oxid (4).

3 (22.0 g, 127 mmol) und NH₄Cl (7.4 g, 138 mmol) wurden in 170 ml Wasser gelöst. Die Mischung wurde mit einem Eisbad gekühlt. Unter Rühren wurde portionsweise Zinkpulver (33.0 g, 505 mmol) zur Mischung hinzugegeben, sodass die Reaktionstemperatur 10 °C nicht überschritt. Die Mischung wurde dann für weitere 12 h gerührt, wobei die Reaktionsmischung sich langsam auf Raumtemperatur erwärmte. Das Gemisch wurde dann durch Celite545[®] gefiltert. Der Filtrerrückstand wurde mehrfach mit MeOH gewaschen. Das Filtrat wurde unter Vakuum eingedampft und siebenmal mit je 20 ml CHCl₃ gewaschen. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet. Das LM wurde im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Produktes erfolgte mit Hilfe einer Vakuumdestillation bei ca. 17 mbar.



Summenformel: C₈H₁₅NO

Molmasse: 141.21 g/mol

Ausbeute: 14.60 g (72 %)

Aussehen: gelbliche Flüssigkeit

Siedepunkt: 94 - 96 °C (17 mbar)

R_f-Wert: 0.32 (EtAc/Heptan, 2/8)

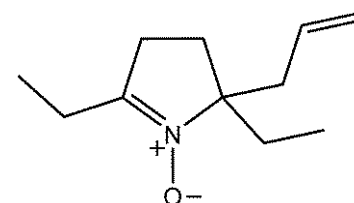
¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 3.94 (m, *J* = 10.4, 5.1, 3.4, 1.8 Hz, NCH, 1H), 2.60 (m, *J* = 7.6, 3.3, 1.7 Hz, CH₂, 2H), 2.51 (m, *J* = 12.5, 7.8, 6.2, 3.2, 1.5 Hz, CH₂, 2H), 2.28 - 2.15 (m, CH₂, 1H), 2.09 (m, *J* = 13.7, 7.6, 3.4 Hz, CH₂, 1H), 1.82 - 1.61 (m, CH₂, 2H), 1.09 (t, *J* = 7.7 Hz, CH₃, 3H), 0.90 (t, *J* = 7.5 Hz, CH₃, 3H)

¹³C NMR: (101 MHz, CDCl₃) δ 147.87, 73.50, 28.75, 25.16, 22.00, 19.95, 9.35, 8.79

HRMS (ESI): berechnet für C₈H₁₆NO [M+H]⁺ 142.123; gefunden 142.122

2-Allyl-2,5-diethyl-3,4-dihydro-2*H*-pyrrol-1-oxid (5).

4 (3.0 g, 21.24 mmol) wurde in Et₂O (7 ml) gelöst und tropfenweise unter Rühren zu einer auf -10 °C gekühlten Lösung von Allylmagnesiumbromid (1.0 M, 31.9 ml) in Et₂O hinzugefügt. Die Mischung wurde dann für weitere 12 h gerührt,



wobei die Reaktionsmischung sich langsam auf Raumtemperatur erwärmte. Nach 12 h wurden 2.5 ml gesättigte NH₄Cl-Lösung, gefolgt von 2.5 ml Wasser zur Mischung hinzugefügt. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert und die org. Phase wurde vom

Filtrat abgetrennt. Diese wurde dann mit einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen und unter Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde in 43 ml MeOH gelöst. Zur Lösung wurden 1.1 ml konz. NH₃-Lösung und wasserfreies Kupfer(II)acetat (0.12 g, 0.045 mmol) hinzugefügt. Die gelbe Lösung wurde so lange unter Rühren mit O₂ begast, bis sich die Lösung blau färbte. Danach wurde das Reaktionsgemisch unter Vakuum eingengt und der Rückstand in CHCl₃ aufgenommen. Die org. Phase wurde nachfolgend mit einer gesättigten Na₂CO₃-Lösung, dann mit einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Nachdem das LM unter Vakuum entfernt wurde, folgte die Aufreinigung des Rohproduktes säulenchromatographisch an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit EtAc und MeOH im Verhältnis 9:1 als Eluent.

Summenformel: C₁₁H₁₉NO

Molmasse: 181.28 g/mol

Ausbeute: 2.43 g (60 %)

Aussehen: bräunliche, ölige Flüssigkeit

R_f-Wert: 0.19 (EtAc/MeOH, 9/1)

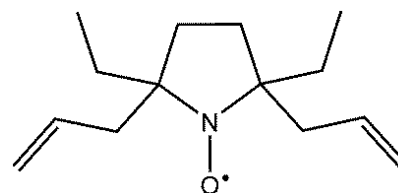
¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 5.66 (m, *J* = 17.1, 10.1, 8.5, 6.1 Hz, CH₂=CHCH₂, 1H), 5.18 - 5.06 (m, CH₂=CHCH₂, 2H), 2.72 - 2.60 (m, CH₂=CHCH₂, 1H), 2.50 (m, *J* = 7.9 Hz, CH₂CH₃, 4H), 2.25 (m, *J* = 13.8, 8.6, 0.8 Hz, CH₂=CHCH₂, 1H), 2.10 - 1.50 (m, CH₂CH₂, 4H), 1.09 (t, *J* = 7.6 Hz, CH₃, 3H), 0.84 (t, *J* = 7.4 Hz, CH₃, 3H)

¹³C NMR: (101 MHz, CDCl₃) δ 147.42, 132.73, 119.16, 79.31, 41.85, 30.28, 27.78, 24.32, 19.99, 9.49, 7.66

HRMS (ESI): berechnet für C₁₁H₂₀NO [M+H]⁺ 182.155; gefunden 182.153

2,5-Diallyl-2,5-diethylpyrrolidin-1-oxyl (6).

5 (0.98 g, 5.41 mmol) wurde in 2 ml trockenem Et₂O gelöst und tropfenweise zu einer auf -10 °C gekühlten, gerührten Lösung von Allylmagnesiumbromid (1.0 M, 8.1 ml) in Et₂O hinzugefügt. Nach 1.5 h wurden 1.0 ml einer



gesättigten NH₄Cl-Lösung, gefolgt von 1.0 ml Wasser zur Reaktionsmischung hinzugefügt. Die Mischung wurde dann durch eine Glasfritte gefiltert. Der Rückstand wurde mit erst mit NH₄Cl-Lösung, dann mit Et₂O gewaschen. Die org. Phase wurde vom Filtrat abgetrennt und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde einmal mit Et₂O gewaschen. Die vereinigten org. Phasen wurden unter Vakuum eingengt. Der Rückstand

wurde in 11 ml Methanol aufgenommen, dann wurden 0.3 ml konz. NH₃-Lösung und Kupfer(II)acetat (26 mg, 0.146 mmol) hinzugefügt. Die gelbe Lösung wurde unter Rühren mit O₂ begast. Nachdem sich die Lösung blau gefärbt hatte, wurde diese noch weitere 30 min mit O₂ begast. Danach wurde das Reaktionsgemisch unter Vakuum eingengt und es folgte die Aufreinigung des Rohproduktes säulenchromatographisch an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit EtAc und Heptan im Verhältnis 1:9 als Eluent.

Summenformel: C₁₄H₂₄NO[•]

Molmasse: 222.35 g/mol

Ausbeute: 0.85 g (71 %)

Aussehen: orange, ölige Flüssigkeit

R_f-Wert: 0.38 (EtAc/Heptan, 1/9)

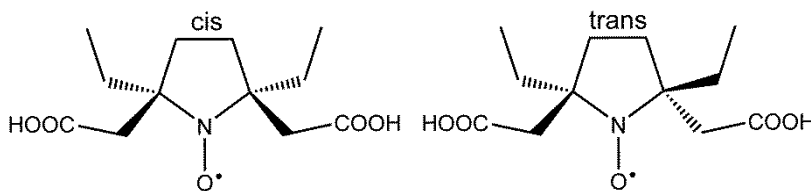
IR (ATR): 3076, 3005, 2965, 2938, 2880, 1639, 1462, 1441, 1434, 1407, 1380, 1312, 1292, 1218, 996, 965, 912, 797 cm⁻¹

HRMS (ESI): berechnet für C₁₄H₂₄NO [M]⁺ 222.185; gefunden 222.185

2,5-Bis(carboxymethyl)-2,5-diethylpyrrolidin-1-oxyl (*cis/trans*-7).

KMnO₄ (2.95 g, 18.89 mmol) wurde in Benzol (25 ml) mit Hilfe von 18-Krone-6 (0.33 g,

1.26 mmol) teilweise gelöst. **6** (0.70 g, 3.15 mmol) wurde hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde für 48 h bei RT gerührt und dann filtriert. Der Rückstand wurde zuerst mit NaOH-Lösung (5 % in Wasser) und dann mit Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde vom Filtrat abgetrennt, mit HCl angesäuert (pH ≈ 1) und mehrfach mit CHCl₃ extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und bis zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) gereinigt mit CHCl₃, MTBE und HAc im Verhältnis 4:6:0.2 als Eluent. *Cis*- und *trans*-Diastereomer des Produktes konnten dadurch teilweise voneinander getrennt werden.



Summenformel: C₁₂H₂₀NO₅[•]

Molmasse: 258.29 g/mol

Ausbeute: 0.10 g (12 %, *cis/trans* 1:1)

Aussehen (*cis*): oranger Feststoff

Aussehen (*trans*): oranger, klebriger Feststoff

R_f-Wert (*cis*): 0.40 (CHCl₃/MTBE/HAc, 4:6:0.2)

R_f-Wert (*trans*): 0.55 (CHCl₃/MTBE/HAc, 4:6:0.2)

Schmelzpunkt (*cis*): 106 - 110 °C

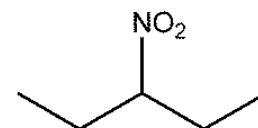
IR (ATR, *cis*): 3682-2222, 3018, 2979, 2969, 2935, 2884, 2745, 2666, 2634, 2570, 1694, 1460, 1447, 1408, 1346, 1329, 1312, 1274, 1255, 1232, 1203, 1156, 1123, 1092, 1068, 1015, 990, 977, 941, 916, 889, 916, 799, 714 cm⁻¹

IR (ATR, *trans*): 3585-2295, 2970, 2942, 2883, 1776, 1704, 1463, 1412, 1385, 1309, 1188, 1177, 1120, 955, 931, 905, 878, 846, 825, 801, 736 cm⁻¹

HRMS (ESI): berechnet für C₁₂H₂₁NO₅ [M+H]⁺ 259.142; gefunden 259.141

3-Nitropentan (8).

m-CPBA (51.5 g, 229.5 mmol) wurde in 1,2-Dichlorethan (345 ml) gelöst und unter Rühren zum Rückfluss erhitzt. 3-Aminopentan (5.0 g, 57.37 mmol) wurde in 1,2-Dichlorethan (60 ml) gelöst und tropfenweise zur *m*-CPBA-Lösung hinzugefügt. Danach wurde die Reaktionsmischung für weitere 4 h unter Reflux gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde der Reaktionsansatz gefiltert. Das Filtrat wurde 4-mal mit je 250 ml NaOH-Lösung (1.0 M) gewaschen und anschließend über MgSO₄ getrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte mit Hilfe von Vakuumdestillation.



Summenformel: C₅H₁₁NO₂

Molmasse: 117.15 g/mol

Ausbeute: 3.9 g (58 %)

Aussehen: farblose Flüssigkeit

Siedepunkt: 90 °C (133 mbar)

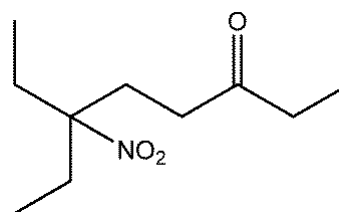
¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 4.32 (tt, *J* = 9.2, 4.7 Hz, CHNO₂, 1H), 1.97 (m, *J* = 14.6, 9.1, 7.3 Hz, CH₂, 2H), 1.78 (m, *J* = 14.5, 7.4, 4.7 Hz, CH₂, 2H), 0.96 (t, *J* = 7.4 Hz, CH₃, 6H)

¹³C NMR: (101 MHz, CDCl₃) δ 91.83, 26.78, 10.21

HRMS (ESI): berechnet für C₅H₁₂NO₂ [M+H]⁺ 118.087; gefunden 118.086

6-Ethyl-6-nitrooctan-3-on (9).

Zur Herstellung einer Natriummethoxid-Lösung wurde unter Rühren langsam MeOH (15 ml) zu Natrium (0.49 g, 21.26 mmol) hinzuge tropft. Nachdem das Natrium vollständig umgesetzt wurde, wurde **6** (3.0 g, 25.61 mmol) hinzugefügt und



anschließend Ethylvinylketon wurde dann hinzuge tropft. Nach 4.5 h wurden 2.0 ml Essigsäure hinzuge tropft. Danach wurde das LM unter Vakuum entfernt und der Rückstand wurde in DCM aufgenommen und nacheinander mit NaCO₃-Lösung (10 %) und konz. NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wurde über MgSO₄ getrocknet. Das LM wurde unter Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde durch Vakuumdestillation gereinigt.

Summenformel: C₁₀H₁₉NO₂

Molmasse: 201.14 g/mol

Ausbeute: 2.37 g (53 %)

Aussehen: blass gelbe Flüssigkeit

Siedepunkt: 110 - 113 °C (0.14 mbar)

¹H NMR: (500 MHz, CDCl₃) δ 2.47-2.39 (q, CH₂, 2H), 2.38 – 2.14 (m, CH₂, 4H), 2.06 - 1.83 (m, CH₂, 4H), 1.06 (t, *J* = 7.4, 1.0 Hz, CH₃, 3H), 0.86 (t, *J* = 7.5, 1.0 Hz, CH₃, 6H)

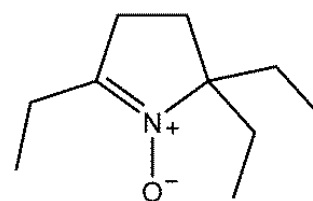
¹³C NMR: (101 MHz, CDCl₃) δ 209.27, 94.65, 36.32, 36.04, 28.80, 27.70, 8.05, 7.75

HRMS (ESI): berechnet für C₁₀H₂₀NO₃ [M+H]⁺ 202.144; gefunden 202.144

2,2,5-Triethyl-3,4-dihydro-2H-pyrrol-1-oxid (10).

NH₄Cl (0.52 g, 9.66 mmol) wurde in Wasser gelöst (12 ml).

9 (1.80 g, 8.94 mmol) wurde unter Rühren hinzugefügt. Die Mischung wurde auf -10 °C gekühlt. Zinkpulver (2.34 g, 35.8 mmol) wurde schrittweise hinzugefügt, sodass die



Temperatur des Reaktionsansatzes 10 °C nicht überstieg. Danach wurde die Reaktionsmischung für weitere 4 h bei RT gerührt und anschließend über Celite545[®] gefiltert. Der Rückstand wurde mit MeOH gewaschen. Das Filtrat wurde dann unter Vakuum eingedunstet und mit CHCl₃ (5 x 10 ml) extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet. Das LM wurde unter Vakuum entfernt. Die Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit dem Eluent CHCl₃/MeOH (10:0.2).

Summenformel: C₁₀H₁₉NO

Molmasse: 169.27 g/mol

Ausbeute: 1.49 g (98 %)

Aussehen: orange Flüssigkeit

R_f-Wert: 0.13 (CHCl₃/MeOH, 10:0.2)

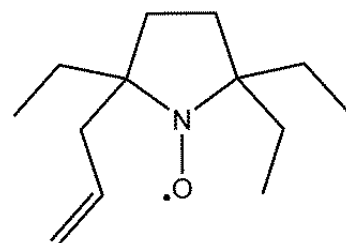
¹H NMR: (500 MHz, CDCl₃) δ 2.59-2.44 (m, CH₂CH₂, 4H), 2.00 - 1.49 (m, CH₃CH₂, 6H), 1.09 (t, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 3H), 0.81 (t, *J* = 7.4, 1.6 Hz, 6H)

¹³C NMR: (101 MHz, CDCl₃) δ 147.47, 80.00, 77.32, 77.21, 77.01, 76.69, 30.31, 27.86, 24.19, 19.97, 9.45, 7.67

HRMS (ESI): berechnet für C₁₀H₂₀NO [M+H]⁺ 170.155; gefunden 170.154

2-Allyl-2,5,5-triethylpyrrolidin-1-oxyl (11).

10 (1.0 g, 5.91 mmol) wurde in 2 ml trockenem Et₂O gelöst und tropfenweise zu einer auf -10 °C gekühlten Lösung von Allylmagnesiumbromid (1.0 M, 8.9 ml) in Et₂O unter Rühren hinzugegopft. Nach 1.5 h wurden nacheinander 1 ml gesättigte NH₄Cl-Lösung und 1 ml Wasser zum Reaktionsansatz getropft.



Die Reaktionsmischung wurde dann durch eine Glasfritte gefiltert. Der Rückstand wurde mit Et₂O gewaschen. Die org. Phase wurde abgetrennt und mit konz. NaCl-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in MeOH (11 ml) aufgenommen. Konz. NH₃-Lösung (0.3 ml) und wasserfreies Kupfer(II)acetat (30 mg, 0.16 mmol) wurden hinzugefügt. Die gelbe Lösung wurde unter Rühren mit O₂ begast. Nachdem sich die Lösung blau gefärbt hatte, wurde diese noch weitere 30 min mit O₂ begast. Das LM wurde unter Vakuum entfernt. Die Aufreinigung des Rohprodukts erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel 60 (0.04 – 0.063 mm) mit dem Eluent EtAc/Heptan (1:9).

Summenformel: C₁₃H₂₄NO[•]

Molmasse: 210.34 g/mol

Ausbeute: 0.83 g (67 %)

Aussehen: orange, ölige Flüssigkeit

R_f-Wert: 0.48 (EtAc/Hetpan, 1/9)

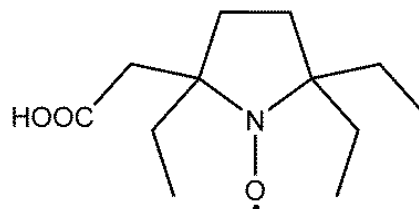
IR (ATR): 3076, 2965, 2937, 2879, 1639, 1462, 1444, 1406, 1380, 1347, 1331, 1314,

1295, 1219, 1554, 1112, 997, 968, 953, 913, 888, 866, 849, 800, 734 cm^{-1}

HRMS (ESI): berechnet für $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{NO}$ $[\text{M}]^+$ 210.186; gefunden 210.185

2-(Carboxymethyl)-2,5,5-triethylpyrrolidin-1-oxyl (12).

KMnO_4 (2.71 g, 17.12 mmol) wurde in Benzol (23 ml) mit Hilfe von 18-Krone-6 (0.30 g, 1.14 mmol) teilweise gelöst. **11** (0.6 g, 2.85 mmol) wurde hinzugefügt.



Das Reaktionsgemisch wurde für 24 h bei RT gerührt und

dann filtriert. Der Rückstand wurde zuerst mit NaOH-Lösung (5 % in Wasser) und dann mit Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde vom Filtrat abgetrennt, mit HCl angesäuert ($\text{pH} \approx 1$) und mehrfach mit CHCl_3 extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und bis zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) gereinigt mit CHCl_3 und HAc als Eluent (10:0.2).

Summenformel: $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{NO}_3$

Molmasse: 228.31 g/mol

Ausbeute: 0.19 g (29 %)

Aussehen: oranger, sehr langsam kristallisierender Feststoff

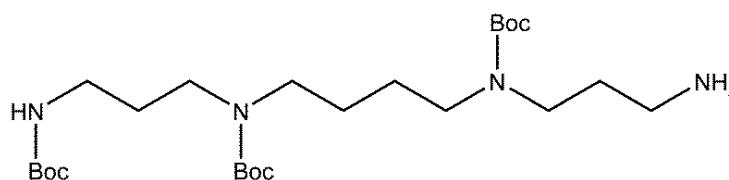
Rf-Wert: 0.50 (CHCl_3/HAc , 10:0.2)

IR (ATR): 3408-2242, 3089, 3024, 2965, 2939, 2924, 2881, 2740, 2658, 2633, 2546, 1703, 1459, 1455, 1426, 1407, 1376, 1339, 1328, 1290, 1260, 1234, 1218, 209, 1160, 1140, 975, 961, 926, 890, 880 cm^{-1}

HRMS (ESI): berechnet für $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{NO}_3$ $[\text{M}]^+$ 228.160; gefunden 228.160

Tri-tert-butyl-carboxylspermin (13)

Spermin (0.5 g, 2.47 mmol) wurde in Methanol (35 ml) gelöst und auf -78 °C gekühlt. Ethyltrifluoracetat (0.29 ml,



2.47 mmol) wurde über 30 min hinzugegropft. Die Temperatur des Reaktionsansatzes wurde auf 0 °C erhöht. Boc-Anhydrid (2.16 g, 9.88 mmol) wurde in Methanol (10 ml) gelöst und tropfenweise innerhalb von 5 min zur Mischung hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Abspaltung des Trifluoracetatrestes wurde der

pH-Wert durch Zugabe von konz. Ammoniak auf pH 11 erhöht und für weitere 11 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit DCM, Methanol und Ammoniak als Eluent gereinigt (7:1:0.1 - 5:1:0.1).

Summenformel: C₂₅H₅₀N₄O₆

Molmasse: 502.373 g/mol

Ausbeute: 0.73 g (58 %)

Aussehen: blass gelbe, hochviskose Flüssigkeit

R_f-Wert: 0.49 (DCM/MeOH/NH₃, 7:5:0.1)

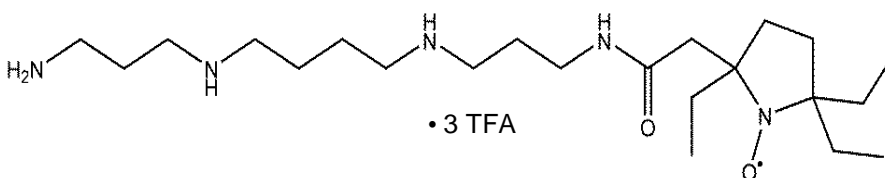
¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 5.27 (s, NH₂, 2H), 4.76 (s, NH, 1H), 3.99 - 3.55 (m, 3H), 3.41 - 2.96 (m, 11H), 2.75 (d, *J* = 17.3 Hz, 2H), 1.90 - 1.54 (m, 4H), 1.53 - 1.29 (m, Boc, 27H)

¹³C NMR: (101 MHz, CDCl₃) δ 156.57, 156.13, 155.53 (C_q, Boc), 80.08, 79.60, 78.86 (C_q, Boc), 46.92, 46.39, 44.12, 43.94, 43.41, 39.18, 37.92, 37.32 (CH₂), 28.89, 28.40 (CH₃, Boc), 25.95 (CH₂)

HRMS (ESI): berechnet für C₂₅H₅₁N₄O₆ [M+H]⁺ 503.380; gefunden 503.379

[2-(((3-((4-[(3-aminopropyl)amino]butyl)amino)propyl]carbonyl)methyl)-2,5,5-triethylpyrrolidin-1-yl]oxidanyl (14).

13 (44 mg, 0.088 mmol), **12** (20 mg, 0.088 mmol) und 4-DMAP



(10 mg, 0.088 mmol) wurden in DCM (2 ml) gelöst. Der Reaktionsansatz wurde auf 0 °C gekühlt. DCC gelöst in DCM (2 ml) wurde zur Reaktionsmischung hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für weitere 2 h bei 0 °C und 24 h bei RT gerührt. Das Präzipitat (DCU) wurde abfiltriert und das Filtrat unter Vakuum zur Trockne eingedunstet. Das Zwischenprodukt wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit CHCl₃/MeOH (98:2, R_f = 0.25) als Eluent gereinigt. Das Zwischenprodukt wurde als oranger Feststoff erhalten (42 mg, 0.059 mmol, 67 % Ausbeute). 22 mg des Zwischenprodukts (0.031 mmol) wurden zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppen in DCM (1 ml) gelöst und mit TFA (0.4 ml) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 3 h bei Raumtemperatur gerührt und

anschließend unter Vakuum zur Trockne eingengt. Der Überschuss an TFA konnte nicht vollständig entfernt werden.

Summenformel: $C_{22}H_{46}N_5O_2 \cdot 3 C_2HF_3O_2$

Molmasse: 412.64 g/mol

Ausbeute (TFA-Salz): 29 mg (123 %); (Zwischenprodukt: 42 mg (67 %))

Aussehen: oranger Feststoff

IR (ATR) (freie Base): 3550 - 3150, 2959, 2924, 2878, 2852, 1645, 1595, 1559, 1460, 1440, 1405, 1378, 1200, 1175, 1128, 800, 719 cm^{-1}

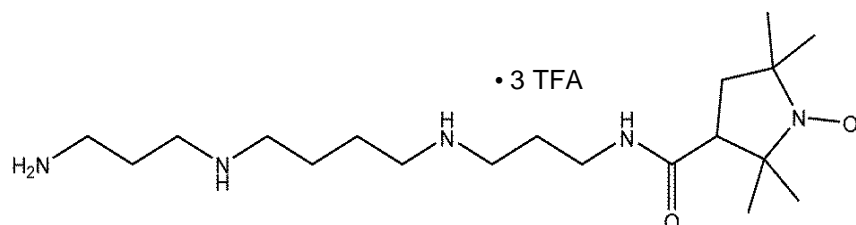
HRMS (ESI): berechnet für $C_{22}H_{46}N_5O_2 \cdot [M+H]^+$ 371.323; gefunden 371.317

Gewinnung der freien Base für die IR-Spektroskopie:

14 wurde in DCM/MeOH (1:1) gelöst, mit 30 eq. des gereinigten und getrockneten Ionenaustauschers Amberlyst A21 (4.8 meq/g) versetzt und für 1 h bei RT gerührt. Danach wurde der Ionenaustauscher abfiltriert und mehrfach mit DCM/MeOH gespült. Die vereinigten Filtrate wurden unter Vakuum zur Trockne eingengt.

(3-((3-((4-[(3-aminopropyl)amino]butyl)amino)propyl)carbonyl)-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-yl)oxidanyl (15).

13 (108 mg, 0.215 mmol), **3-CP** (40 mg, 0.215 mmol) und 4-DMAP (27 mg, 0.215 mmol) wurden in



DCM (2 ml) gelöst. Der Reaktionsansatz wurde auf 0 °C gekühlt. DCC gelöst in DCM (1 ml) wurde zur Reaktionsmischung hinzugetropft. Der Reaktionsansatz wurde für weitere 2 h bei 0 °C und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Präzipitat (DCU) wurde abfiltriert und das Filtrat unter Vakuum zur Trockne eingengt. Das Zwischenprodukt wurde säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit DCM/MeOH (95:5, $R_f = 0.34$) als Eluent gereinigt. Es wurden 121 mg Zwischenprodukt erhalten (Ausbeute: 84 %, oranger Feststoff). 75 mg des Zwischenprodukts (0.112 mmol) wurden zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppen in DCM (2 ml) gelöst und mit TFA (1.3 ml) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 3 h bei RT gerührt und anschließend unter Vakuum zur Trockne eingengt. Der Überschuss an TFA konnte nicht vollständig entfernt werden.

Summenformel: $C_{19}H_{40}N_5O_2 \cdot 3 C_2HF_3O_2$

Molmasse: 712.63 g/mol (TFA-Salz)

Ausbeute (TFA-Salz): 108 mg (135 %); (Zwischenprodukt: 121 mg (84 %))

Aussehen: oranger Feststoff

IR (ATR) (freie Base): 3520 - 3150, 2973, 2925, 2871, 2853, 1653, 1595, 1552, 1462, 1381, 1366, 1304, 1234, 1200, 1177, 1131, 832, 799, 720 cm^{-1}

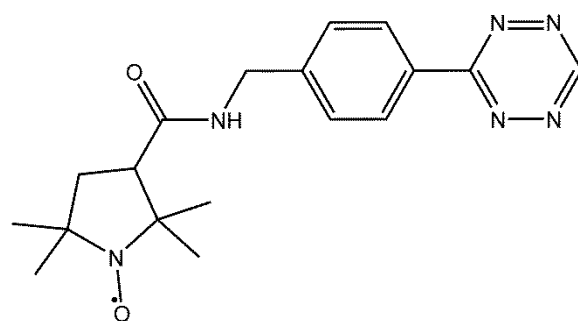
HRMS (ESI): berechnet für $C_{19}H_{41}N_5O_2^+ [M+H]^+$ 371.326; gefunden 371.317

Gewinnung der freien Base für die IR-Spektroskopie: siehe **12**.

[3-((1,1'-biphenyl)-4-yl)carbamoyl)-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-yl]oxidanyl (16).

(4-(1,2,4,5-tetrazin-3-yl)phenyl)-

methanamin•HCl (**H-Tet**, 75 mg, 0.335 mmol) und DIPEA (0.175 ml, 1.00 mmol) wurden in 30 ml DCM gelöst. Unter Rühren wurde PyBOP (209 mg, 0.402 mmol) hinzugefügt. Nach 5 min wurde



3-CP (74 mg, 0.370 mmol) hinzugefügt. Der Fortschritt der Reaktion wurde mittels DC verfolgt. Nachdem die Reaktion abgeschlossen war, wurde die org. Phase zur Trockne eingengt, in EtAc aufgenommen und nacheinander mit Zitronensäure-Lösung (5 %), $NaHCO_3$ -Lösung (5 %), Wasser und konz. NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet und unter Vakuum zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt säulenchromatographisch auf Kieselgel 60 (0.04 – 0.063 mm) mit EtAc und Heptan als Eluent gereinigt (8:2).

Summenformel: $C_{18}H_{21}N_6O_2^+$

Molmasse: 355.42 g/mol

Ausbeute: 119 mg (92 %)

Aussehen: violetter Feststoff

R_f-Wert: 0.32 (EtAc/Heptan, 8:2)

IR (ATR): 3638, 3540 - 3382, 3265, 3080, 2972, 2930, 2877, 2420, 1660, 1368, 1610, 1552, 1536, 1461, 1433, 1362, 1346, 1301, 1248, 1230, 1184, 1166, 1140, 1116, 1105, 1079, 1042, 1024, 1010, 913, 899, 842, 802 cm^{-1}

HRMS (ESI): berechnet für $C_{18}H_{21}N_6O_2^+ [M]^+$ 355.188; gefunden 355.188

2.4.2 Kristallstrukturanalyse

Die Datensammlung für *cis-7* und **12** wurde auf einem STOE IPDS 2T bzw. einem STOE IPDS II-Diffraktometer durchgeführt. In beiden Fällen wurde graphit-monochromatisierte Mo-K α -Strahlung verwendet.

Tabelle 8 Kristallographische Daten für *cis-7* und **12**.

	<i>cis-7</i>	12
Summenformel	C ₁₂ H ₂₀ NO ₅	C ₁₂ H ₂₂ NO ₃
<i>M_r</i>	258.29	228.30
λ (Å)	0.71073	0.71073
Kristallgröße (mm)	0.50 × 0.18 × 0.15	0.246 × 0.221 × 0.164
Kristallsystem	Monoklin	Monoklin
Raumgruppe	<i>P2₁/n</i>	<i>P2₁/n</i>
<i>T</i> (K)	200(2)	213(2)
<i>a</i> (Å)	8.4588(8)	8.9620(7)
<i>b</i> (Å)	9.5452(6)	9.5965(5)
<i>c</i> (Å)	16.2549(14)	15.0929(12)
β (°)	97.014(7)	93.166(6)
<i>V</i> (Å ³)	1302.61(19)	1296.07(16)
<i>Z</i>	4	4
ρ_{calc} (g cm ⁻³)	1.317	1.170
μ (mm ⁻¹)	0.102	0.083
<i>F</i> (000)	556	500
θ -Bereich (°)	4.243 – 29.278	2.516 – 25.000
Daten gesammelt / unabhängig	14319 / 3503	8125 / 2288
<i>R_{int}</i>	0.0386	0.0420
Beobachtete Daten [<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>)]	2166	1691
Güte der Anpassung auf <i>F</i>²	0.858	1.036
Parameter / Restraints	171 / 2	145 / 0
<i>R1</i> [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)]	0.0390	0.0697
<i>wR2</i> (alle Daten)	0.0940	0.2226
Restelektronendichte (eÅ⁻³)	0.239 / –0.153	0.698 / –0.286

Die Kristallstrukturen wurden mit SHELXT⁸⁵ gelöst und mit SHELXL-2018/3⁸⁶ verfeinert. OLEX2 wurde als graphische Oberfläche verwendet.⁸⁷ Anisotrope Auslenkungsparameter wurden für alle Nichtwasserstoffatome verwendet. Mit Ausnahme

der Methyl- und Carboxygruppen in *cis-7* wurden alle Wasserstoffatome in geometrisch berechneten Positionen platziert und reitend verfeinert mit $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.2 U_{\text{eq}}(\text{C}, \text{O})$ (1.5 für Methylgruppen). Die Torsionswinkel der Methylgruppen in *cis-7* wurden initial durch Differenz-Fouriersynthesen bestimmt und anschließend und Beibehaltung der Tetraederwinkel verfeinert. Die Positionen der Carboxy-Wasserstoffatome in *cis-5* wurden mittels Differenz-Fouriersynthesen bestimmt und anschließend verfeinert mit $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.2 U_{\text{eq}}(\text{O})$, wobei Restraints für die O–H-Bindungslänge mit einem Zielwert von $0.84(2) \text{ \AA}$ verwendet wurden. Abbildungen der Kristall- und Molekülstrukturen wurden mit DIAMOND (2016, K. Brandenburg, Crystal Impact GbR, Bonn, Deutschland) erstellt. Kristallographische Daten für *cis-7* und **12** sind in Tabelle 8 angegeben.

2.4.3 EPR-Messungen

Alle EPR-Experimente wurden mit einem X-Band (9.30 - 9.55 GHz) Spektrometer (Miniscope MS 400) der Firma Magnettech (Berlin, Deutschland) oder einem Q-Band (34 GHz) Spektrometer der Firma Bruker (Billerica, USA) durchgeführt. Die Messeinstellungen werden bei den jeweiligen Experimenten angegeben.

Die Auswertung der EPR-Spektren und deren Simulation wurde mit OriginPro2016G (Additive, Friedrichsdorf, Deutschland) bzw. mit Matlab (The MathWorks, Inc., Natic, USA) unter Verwendung von EasySpin⁶⁷ durchgeführt. Details der Simulationen werden bei den jeweiligen Experimenten angegeben.

2.4.3.1 EPR-Spektren von *cis/trans-7*, **12** und **3-CP**

(A) Messung in unterschiedlichen Puffer-Lösungen

Probenpräparation und Messung. Lösungen ($c = 1 \text{ mM}$) von *cis-7*, *trans-7*, **12** und **3-CP** in Acetat-Puffer pH 4.5 (2.3 M, Ph. Eur.), Phosphat-Puffer pH 7.4 (0.08 M, Ph. Eur.) und Tris-HCl-Puffer pH 8.8 (1.5 M, Ph. Eur.) wurden hergestellt. Die EPR-Spektren wurden in 50 μl -Kapillaren am X-Band-Spektrometer mit den in *Tabelle 9* aufgeführten Einstellungen bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ unter Atmosphärenluft vermessen.

Auswertung. Die Hyperfeinkopplungskonstanten a und die Peak-zu-Peak-Linienbreiten ΔB_{pp} wurden aus den erhaltenen EPR-Spektren durch Simulation mit Matlab unter Verwendung der EasySpin-Funktion „Garlic“ bestimmt. Die Peak-zu-Peak-

Linienbreiten wurden dabei auf Grundlage des Voigt-Modells unter Angabe des Lorentz- und des Gauss-Anteils der Linienbreite ermittelt.

Tabelle 9 Geräteparameter für die EPR-Messung.

Mikrowellenleistung	3.162 mW
Modulationsamplitude	0.100 mT
Modulationsfrequenz	100 kHz
Messspanne	11.715 mT
Messzeit	60 s
Messpunkte	4096

(B) Messung der Titrationskurven

Probenpräparation und Messung. **cis-7**, **trans-7**, **12** und **3-CP** wurden in einer 150 mM NaCl-Lösung gelöst ($c = 0.5$ mM). Der pH-Wert wurde mit Hilfe einer wässrigen Salzsäure-Lösung ($c = 0.1$ M oder 1.0 M) oder einer wässrigen Natriumhydroxid-Lösung ($c = 0.1$ M oder 1.0 M) eingestellt und direkt vor und nach der EPR-Messung mittels eines pH-Meters (Orion VersaStar, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gemessen. Der Mittelwert beider Messwerte wurde für die Auswertung verwendet. Die EPR-Spektren wurden in 50 μ l-Kapillaren am X-Band-Spektrometer mit den in *Tabelle 10* aufgeführten Einstellungen bei 25 °C unter Atmosphärenluft vermessen.

Tabelle 10 Geräteparameter für die EPR-Messung.

Mikrowellenleistung	3.162 mW
Modulationsamplitude	0.020 mT
Modulationsfrequenz	100 kHz
Messspanne	11.715 mT
Messzeit	60 s
Messpunkte	4096

Auswertung. Die pH-Wert-abhängige Hyperfeinkopplungskonstante $a(N)$ wurden aus den erhaltenen EPR-Spektren durch Simulation mit Matlab unter Verwendung der EasySpin-Funktion „Chili“ bestimmt. Die Titrationskurven wurden durch Auftragen der Kopplungskonstante $a(N)$ gegen den pH-Wert erhalten. Die ungefähren Säurekonstanten (pK_a) wurden aus den Titrationskurven mit Hilfe folgender Gleichung berechnet:

$$pKs = \frac{a(N) + a(N)^n}{2}$$

2.4.3.2 Bestimmung der reduktiven Stabilität mittels Ascorbinsäure-Assay

Probenpräparation. 100 μ l Radikal-Lösung (*cis-7*, *trans-7*, **12**, **3-CP**, **4-CT**, $c = 1$ mM) in Phosphat-Puffer pH 7.4 (50 mM, 2 mM ETDA) wurden mit 100 μ l Ascorbinsäure-Lösung ($c = 10$ mM in Phosphat-Puffer pH 7.4, 50 mM mit 2 mM EDTA). Nach dem Mischen wurde ein Aliquot der Probe sofort in eine 50 μ l-Kapillare überführt und die EPR-Messung gestartet. Innerhalb von 90 min wurde alle 2 min eine Messung durchgeführt. Zwischen dem Mischen der Probe und dem Start der EPR-Messung lagen maximal 2 Minuten. Die Messungen wurden mit den in *Tabelle 11* aufgeführten Einstellungen durchgeführt.

Tabelle 11 Geräteparameter für die EPR-Messung.

Mikrowellenleistung	3.162 mW
Modulationsamplitude	0.030 mT
Modulationsfrequenz	100 kHz
Messspanne	11.715 mT
Messzeit	60 s
Messpunkte	4096

Auswertung. Zur Ermittlung der Zerfallskurve wurde zunächst die Peakhöhe des Tieffeld-Peaks des jeweiligen Radikals ermittelt und gegen die Zeit aufgetragen. Aus diesen Zerfallskurven wurde mit Hilfe eines Literaturprotokolls⁸⁸ die Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung k ($M^{-1}s^{-1}$) für die initiale Reduktion bestimmt: Zunächst wurde die Zerfallskurve durch logarithmieren linearisiert. Mittels linearer Regression wurde dann die Geschwindigkeitskonstante Pseudo-1.Ordnung k' (s^{-1}) bestimmt. Die Geschwindigkeitskonstante 2.Ordnung k wird auf Grundlage folgender Gleichung berechnet:

$$k = \frac{k'}{x}$$

mit x = Ausgangskonzentration der Ascorbinsäure in der Probe.

2.4.3.3 Vergleich der Spermin-gebundenen Nitroxide **14** und **15**

Probenpräparation. Zunächst wurden Stammlösungen von Heparin-Na ($c \approx 1$ mM, Calbiochem, $M_r = 15000 \pm 2000$, Aktivität 192 U/mg), **14** ($c = 5$ mM) und **15** ($c = 5$ mM) in Citrat-Puffer pH 5.0 (50 mM, 0 mM NaCl) und Citrat-Puffer pH 5.0 (50 mM, 150 mM NaCl)

hergestellt. Für die Heparin-freien Proben wurden je 100 μl Radikal-Stammlösung mit je 900 μl des jeweiligen Puffers verdünnt ($c_{\text{Radikal}} = 0.5 \text{ mM}$). Für die Heparin-haltigen Proben wurden je 100 μl Radikal-Stammlösung, 100 μl Heparin-Stammlösung und 800 μl des jeweiligen Puffers gemischt ($c_{\text{Radikal}} = 0.5 \text{ mM}$, $c_{\text{Heparin}} = 0.1 \text{ mM}$). Die EPR-Spektren wurden in Quarz-Kapillaren am Q-Band-Spektrometer bei Raumtemperatur unter Atmosphärenluft gemessen. Die Geräteparameter sind in *Tabelle 12* aufgeführt.

Tabelle 12 Geräteparameter für die EPR-Messung.

Mikrowellenleistung	1.231 mW
Modulationsamplitude	100 mT
Modulationsfrequenz	100 kHz
Messspanne	13.18 mT
Messzeit	10 Messungen mit je 60 s Messdauer
Messpunkte	1318

Auswertung. Die Daten wurden mittels Matlab und Origin graphisch dargestellt.

2.4.3.4 Vergleich von Protein-gebundenem und freiem **16**

Labeling-Reaktion. 5.16 μl GFP^{SCO} (26.9 kDa, 387.7 μM in PBS-Puffer pH 7.4, 25 % Glycerol) wurden auf Eis langsam aufgetaut und in einen Proteinfiter (Amicon Ultra, 0.5 ml, 3kDa cutoff, Merck Millipore) überführt. Um das Glycerol zu entfernen wurde das Protein 1-mal mit PBS-Puffer (Zusammensetzung: siehe *Tabelle 13*) gewaschen und dann auf 20 μl konzentriert ($c_{\text{GFP}} \approx 100 \mu\text{M}$). Zu der Protein-Lösung wurde 1 μl **16**-Lösung in DMSO ($c = 10 \text{ mM}$) hinzugefügt. Der Ansatz wurde 2 h bei RT gerührt. Nach 2 h wurde der Ansatz 3-mal mit PBS-Puffer (mit 25 % Glycerol) gewaschen, auf etwa 80 μl eingengt und zur Lagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Tabelle 13 Zusammensetzung des PBS-Puffers (pH 7.4) für die Labeling-Reaktion

Substanz	Konzentration [mM]
NaCl	137.0
KCl	2.7
Na₂HPO₄	10.0
KH₂PO₄	1.8
TCEP	0.2

Probenpräparation für die EPR-Messung. Das gelabelte Protein wurde auf Eis aufgetaut. 40 μl wurden in einen Proteinfiter (Amicon Ultra, 0.5 ml, 3kDa cutoff, Merck Millipore) überführt und 3-mal mit PBS-Puffer (Zusammensetzung: siehe Tabelle 13 (ohne TCEP)) gewaschen um das Glycerol zu entfernen. Die Lösung wurde dann konzentriert, in ein Eppendorf-Tube eluiert und mit PBS-Puffer zu 100 μl verdünnt. **16** wurde in dem gleichen Puffer gelöst ($c = 10 \mu\text{M}$). Die EPR-Spektren wurden in 50 μl -Kapillaren am X-Band-Spektrometer mit den in *Tabelle 14* aufgeführten Einstellungen bei 25 °C unter Atmosphärenluft vermessen.

Tabelle 14 Geräteparameter für die EPR-Messung.

Mikrowellenleistung	3.162 mW
Modulationsamplitude	0.150 mT
Modulationsfrequenz	100 kHz
Messspanne	125.83 mT
Messzeit	60 s
Messpunkte	4096

Auswertung. Die experimentellen EPR-Spektren wurden durch Simulation mit Matlab unter Verwendung der EasySpin-Funktion „Chili“ ausgewertet. Die Peak-zu-Peak-Linienbreiten wurden dabei auf Grundlage des Voigt-Modells unter Angabe des Lorentz- und des Gaussanteils der Linienbreite ermittelt. Die Tensoren der g-Faktoren, der Kopplungskonstanten und der Rotationsdiffusion wurden näherungsweise bestimmt.

3 Galvinoxylradikale

3.1 Einleitung

3.1.1 Galvinoxylradikale

3.1.1.1 Das erste Galvinoxylradikal und bekannte Derivate

Das als Feststoff tiefblau gefärbte Galvinoxyl, auch „Coppinger“-Radikal (**18**, *Abbildung 28*) genannt, gehört zur Gruppe der Phenoxyradikale. Diese sind definiert als monovalente Sauerstoffradikale, deren ungepaartes Elektron über einen aromatischen Ring delokalisiert ist.²² Es wurde zuerst von Galvin M. Coppinger im Jahr 1957 ausgehend von *4,4'-Methylenbis(2,6-di-tert-butylphenol)* (**17**) durch Oxidation mit Bleidioxid in Ether oder Isooktan synthetisiert.⁸⁹ Seitdem wurde es eingehend untersucht und die Synthese und die Charakterisierung zahlreicher Galvinoxylderivate wurde veröffentlicht.⁹⁰⁻⁹²

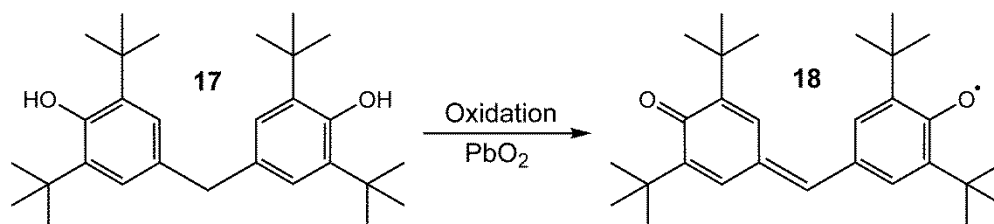


Abbildung 28 Synthese von Galvinoxyl **18** aus 4,4'-Methylenbis(2,6-di-tert-butylphenol) **17**.

Die bisherigen Ansätze zur Modifizierung von Galvinoxylradikalen zielten dabei vor allem darauf ab, das Proton der Methylenbrücke gegen andere funktionelle Gruppen wie *tert*-Butyl⁹³ oder gegen unterschiedliche Aromaten auszutauschen.^{90, 92} Des Weiteren wurden auch Galvinoxyl-Mehrspinsysteme ausführlich beschrieben.^{91, 92} Die *tert*-Butyl-Gruppen des Galvinoxyls wurden bisher lediglich gegen Methyl⁹⁴- und Phenylreste⁹⁵ ausgetauscht. Dies führt jedoch zu Radikalen, die aufgrund von Hyperfeinkopplungen deutlich kompliziertere Spektren aufweisen und wegen des geringeren sterischen Schutzes weniger stabil sind. Es sind bisher keine Derivate mit anderen sterisch anspruchsvollen Alkylgruppen synthetisiert worden. Weiterhin wurden auch die Synthese und Charakterisierung deuterierter Galvinoxyle veröffentlicht.^{96, 97, 98} Die Protonen der *tert*-Butyl-Gruppe, die aromatischen Protonen und das Proton an der Methin-Gruppe wurden jeweils gegen Deuterium ausgetauscht. In der Reihe fehlt bisher das vollständig deuterierte Galvinoxyl.

3.1.1.2 Stabilität von Galvinoxyl und dessen Anwendungsbereich

Die Stabilisierung des freien Elektrons beruht bei Galvinoxylen auf der Delokalisierung über das aromatische System und auf der sterischen Abschirmung durch die *tert*-Butyl-Gruppen in *ortho*-Position.²²

Über die Stabilität von Galvinoxyl gegenüber unterschiedlichen Reaktanten und Reaktionsbedingungen ist trotz zahlreicher Publikationen bisher vergleichsweise wenig bekannt. In Gegenwart von Säuren und Basen ist Galvinoxyl instabil.⁹⁹⁻¹⁰¹ In der Gegenwart von Reduktionsmitteln wie Ascorbinsäure, Glutathion oder Cystein wird es sofort oder innerhalb weniger Minuten reduziert.¹⁰² Galvinoxyl reagiert außerdem sehr schnell mit anderen kurzlebigen Radikalen, was es zu einem hilfreichen und häufig genutzten Radikalfänger macht.^{23, 103, 104} Galvinoxyl wird weiterhin verwendet, um das antioxidative Potential anderer Substanzen zu bestimmen.²⁴

Coppinger postulierte, dass Galvinoxyl sowohl als Feststoff als auch in Lösung stabil gegenüber Sauerstoff ist.⁸⁹ Andere Autoren zeigten dagegen später, dass Galvinoxyl in Lösung sehr schnell mit Sauerstoff reagiert.¹⁰⁵ Sauerstoff greift dabei wahrscheinlich in *para*-Position zum Carbonyl-Kohlenstoff an einem der aromatischen Ringe an. Es bildet sich ein Endoperoxid (**18-O₂**), welches dann in nachfolgenden Reaktionen zu unterschiedlichen Abbauprodukten zerfällt (Abbildung 29).¹⁰⁶ Isolierbare Zerfallsprodukte sind 2,6-Di-*tert*-Butyl-4-hydroxybenzaldehyd und 2,6-Di-*tert*-Butyl-1,4-benzochinon.^{105, 106}

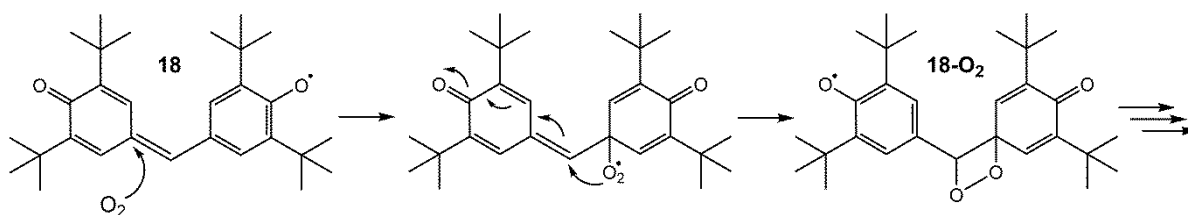


Abbildung 29 Reaktion von **18** mit Sauerstoff unter Bildung des Endoperoxids von **18** (**18-O₂**).

Es wurde gezeigt, dass Galvinoxyl durch die Zugabe von Hydrogalvinoxyl (**18-H**, Abbildung 41) gegenüber der Reaktion mit Sauerstoff stabilisiert werden kann.¹⁰⁵ **18-H** ist die direkte Vorstufe von Galvinoxyl. Es fällt bei dessen Synthese als Nebenprodukt an und ist aufgrund des sehr ähnlichen chromatographischen Verhaltens schwierig zu entfernen.¹⁰⁵ Der Mechanismus dieser Stabilisierung wurde bis heute nicht weiter untersucht.

3.1.2 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die EPR-spektroskopischen Eigenschaften von Galvinoxylradikalen weiter zu untersuchen und zu präzisieren. Dazu sollten im Zuge dieser Arbeit zunächst die geschilderten Lücken bei der Synthese unterschiedlicher Galvinoxyl-derivate durch die Herstellung zwei neuer Derivate geschlossen werden (*Abbildung 30*). Das vollständig deuterierte Derivat **26** (Galvinoxyl-D41) und das Adamantyl-Derivat **31** sollten dann EPR-spektroskopisch untersucht und mit Galvinoxyl verglichen werden.

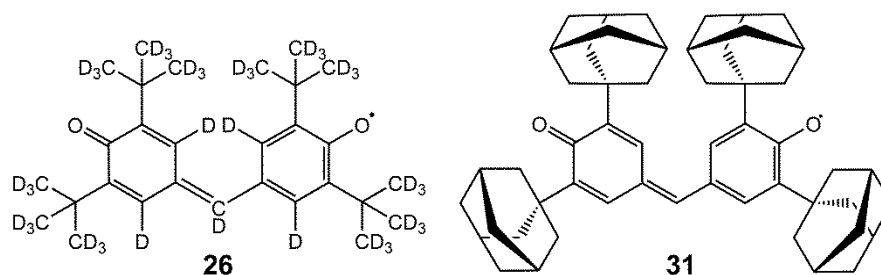


Abbildung 30 Molekülstrukturen von Galvinoxyl-D41 (**26**) und Adamantylgalvinoxyl (**31**).

Um den Anwendungsbereich von Galvinoxylen zu erweitern, sollte weiterhin deren Verwendbarkeit als Spin-Sonden in der EPR-Oximetrie überprüft werden (Für Details zur EPR-Oximetrie siehe Abschnitt 4.1.2.1). Für die Handhabung von Galvinoxylradikalen ist es außerdem sehr wichtig zu wissen, welche Faktoren die Stabilität der Radikale beeinflussen. Auf diesem Gebiet wurden bisher nur wenige Informationen veröffentlicht. Der Einfluss von Hydrogalvinoxyl auf die Stabilität und vor allem der Mechanismus dieser Stabilisierung sowie der Einfluss des Lösungsmittels auf die Stabilität wurden bisher noch nicht eingehend untersucht. Diese Einflussfaktoren sollten daher weiter untersucht und ein wahrscheinlicher Mechanismus für die Stabilisierung durch Hydrogalvinoxyl gefunden werden.

3.2 Ergebnisse und Diskussion

3.2.1 Synthese neuer Galvinoxylderivate

3.2.1.1 Galvinoxyl-D41

Die Synthese deuterierter Substanzen kann prinzipiell auf zwei unterschiedliche Weisen erfolgen. Zum einen können sie ausgehend vom undeuterten Analogon der Zielsubstanz durch einen Metall-katalysierten H/D-Austausch synthetisiert werden. Zum anderen ist eine Synthese ausgehend von deuterierten Edukten möglich. Die Vorteile der ersten Methode liegen auf der Hand: Sind undeuterte Analoga oder deren Vorstufen kommerziell erhältlich, können Synthesewege deutlich verkürzt werden. Weiterhin dienen beim H/D-Austausch in der Regel D₂ oder D₂O als Deuteriumquellen, welche im Vergleich zu anderen kommerziell erhältlichen deuterierten Substanzen relativ preisgünstig sind. Voraussetzung für diese Methode ist allerdings eine ausreichende thermische Stabilität der Edukte, da ein Austausch häufig erst bei hohen Temperaturen stattfindet.¹⁰⁷

Davon ausgehend wurde zunächst versucht, Galvinoxyl-D41 (**26**) aus undeuterten Edukten durch katalytischen H/D-Austausch herzustellen. Ein H/D-Austausch kann in Alkyl-substituierten Aromaten durch die kombinierte Verwendung von Palladium auf Kohlenstoff (Pd/C) und Platin auf Kohlenstoff (Pt/C) in Gegenwart einer geringen Menge Wasserstoff mit D₂O als Deuteriumquelle erreicht werden.^{107, 108} Kommerziell erhältlich ist 4,4'-Methylenbis(2,6-di-tert-butylphenol) (**17**), welches durch Oxidation in nur einem Reaktionsschritt zu Galvinoxyl **18** umgesetzt werden kann.

Die Verwendung von je 20 % Massenanteilen 5% Pd/C und 5% Pt/C bezogen auf **17** (*Abbildung 31*, Variante I) führte nicht zur Bildung des erwarteten Produkts **20**, sondern zur Bildung des Cyclohexanon-Derivats **19**. **19** wurde mittels NMR- und IR-Spektroskopie identifiziert. *Abbildung 32* zeigt die IR-Spektren von **17** und **19** im Vergleich. Bei **19** fehlt eindeutig die C-OH-Steckschwingung ($\sim 3600\text{ cm}^{-1}$), dagegen tritt eine intensive Carbonyl-Bande bei 1700 cm^{-1} auf. Die Banden zwischen $2000 - 2300\text{ cm}^{-1}$ bei **19** sind auf die teilweise Deuterierung zurückzuführen. Das ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum von **19** zeichnen sich durch das völlige Fehlen aromatischer Protonen- bzw. Kohlenstoffsignale aus. Weiterhin zeigt sich im ¹³C-NMR-Spektrum ein Signal mit sehr hoher Linksverschiebung ($\sim 214\text{ ppm}$), typisch für Carbonylkohlenstoff. Der Deuterierungsgrad von **19** wurde nicht bestimmt. Um mildere Reaktionsbedingungen zu erreichen, wurden in einem zweiten Synthese-Ansatz Katalysatoren mit einem geringeren Beladungsgrad (1 % Pd/C, 1 % Pt/C, *Abbildung 31*,

Variante II) verwendet. Nach einer Reaktionszeit von 24 h bis 5 d wurde das Zielprodukt **20** mit unterschiedlicher Ausbeute und Deuterierungsgrad isoliert (Tabelle 15).

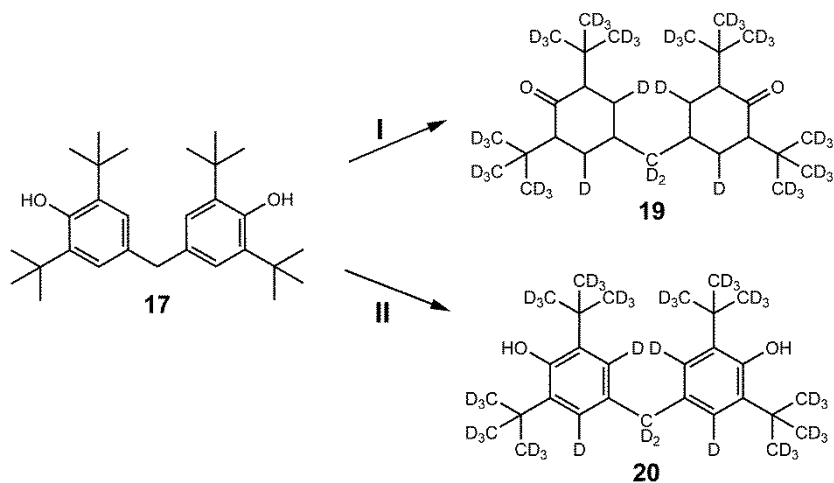


Abbildung 31 Deuterierung von **17** durch H/D-Austausch. Reagenzien und Bedingungen: (I) 5 % Pd/C (20 Gew.%), 5% Pt/C (20 Gew.%), D₂O, 180 °C, H₂ (1 atm), 15 - 24 h. (II) 1 % Pd/C (100 Gew.%), 1 % Pt/C (100 Gew.%), D₂O, 180 °C, H₂ (1 atm), 24 h - 5 d.

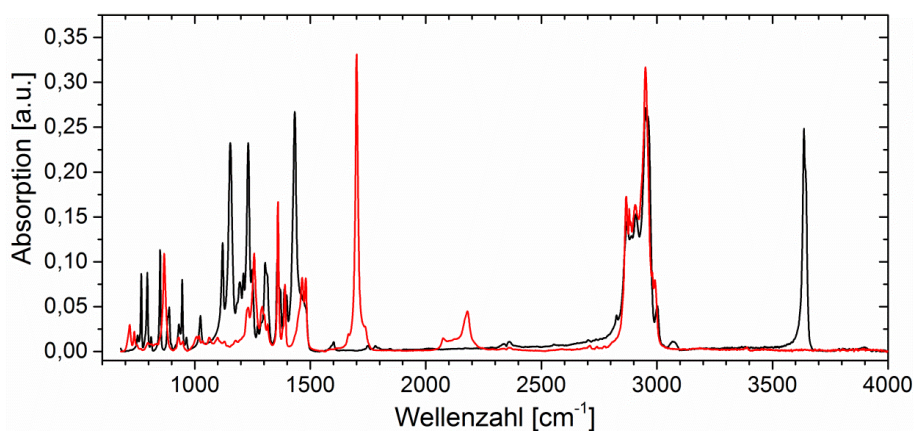


Abbildung 32 IR-Spektren von **19** (rot) und **17** (schwarz) im Vergleich.

Tabelle 15 Ausbeute und Deuterierungsgrad* von **20** je nach Reaktionszeit

Reaktionszeit	Ausbeute	Deuterierungsgrad
24 h	34 %	Sehr gering, nur Methylenbrücke wurde deuteriert
3 d	19 %	53 % (Aromat: 5 %, <i>tert</i> -Butyl: 56 %, Methylenbrücke: 95 %)
5 d	4 %	87 % (Aromat: 53 %, <i>tert</i> -Butyl: 90 %, Methylenbrücke: 96 %)

* Der Deuterierungsgrad wurde mittels NMR unter der Verwendung von HMB als internen Standard bestimmt.

Das Ergebnis zeigt, dass die vollständige Deuterierung von **17** auch auf diese Weise nicht möglich ist. Während bei den *tert*-Butyl-Gruppen und der Methylenbrücke ein fast vollständiger Austausch der Protonen erreicht wurde, war dies bei den aromatischen Protonen nicht möglich. Dies liegt mit größter Wahrscheinlichkeit an der sterischen Hinderung dieser Position durch die benachbarten *tert*-Butyl-Gruppen. Die geringe Ausbeute ist auf die Degradation von **17** unter den gegebenen Bedingungen zurückzuführen. DC-Untersuchungen des Rohprodukts zeigten zahlreiche Nebenprodukte. Die Degradation zeigte sich auch durch einen im Vergleich zum Ausgangszustand erhöhten Druck im Autoklaven nach Ende der Reaktion und Abkühlen auf RT. Dies deutet auf die Bildung gasförmiger Abbauprodukte hin, wie z.B. Isobuten durch Abspaltung der *tert*-Butyl-Gruppen.

Aufgrund der guten Ergebnisse bei der Deuterierung der *tert*-Butyl-Gruppen wurde zunächst versucht, das Gesamtergebnis der Deuterierung durch Austausch von **17** gegen *2,6-Di-tert-butylphenol* (**21**) zu verbessern. Die *meta*-Positionen sind in **21** wegen der freien *para*-Position insgesamt weniger sterisch gehindert als in **17**, sodass hier ein effektiverer H/D-Austausch möglich sein sollte. Die Verwendung von je 20 % Massenanteilen 5% Pd/C und 5% Pt/C bezogen auf **21** (*Abbildung 33*, Variante I) führte auch hier nicht zur Bildung des erwarteten Produkts, sondern zur erneuten Bildung eines Cyclohexanon-Derivats (**22**). Unter mildereren Reaktionsbedingungen mit 1 % Pd/C und 1 % Pt/C (*Abbildung 33*, Variante II) konnte das Zielprodukt nach säulenchromatographischer Reinigung isoliert werden.

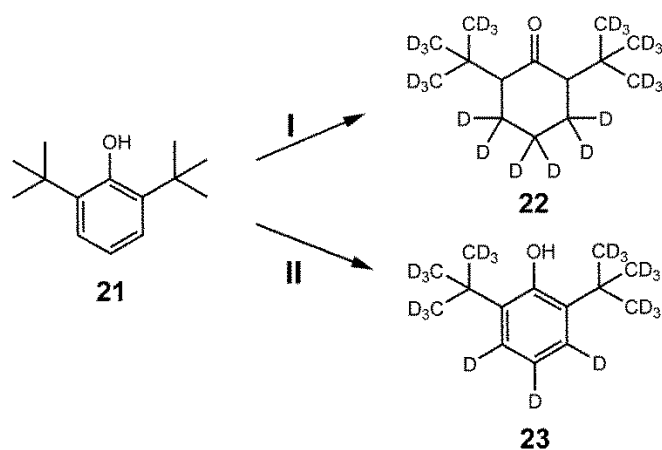


Abbildung 33 Deuterierung von **21** durch eine H/D-Austausch-Reaktion. Reagenzien und Bedingungen: (I) 5 % Pd/C (20 Gew.%), 5% Pt/C (20 Gew.%), D₂O, 180 °C, H₂ (1 atm), 15 h - 3 d. (II) 1 % Pd/C (100 Gew.%), 1 % Pt/C (100 Gew.%), D₂O, 180 °C, H₂ (1 atm), 2 - 3 d.

Tabelle 16 zeigt, dass durch Verwendung von **21** der H/D-Austausch in der sterisch gehinderten *meta*-Position zur Hydroxy-Gruppe mit 69 % deutlich gesteigert werden konnte. Eine Verlängerung der Reaktionszeit brachte keine weitere Verbesserung des Deuterierungsgrads, führte jedoch zu einem deutlichen Ausbeuteverlust durch Degradation und Polymerisation des Edukts.

Tabelle 16 Ausbeute und Deuterierungsgrad* von **21** je nach Reaktionszeit

Reaktionszeit	Ausbeute	Deuterierungsgrad
2 d	28 %	92 % (Aromat (<i>meta</i>): 69 %, Aromat (<i>para</i>): 96 %, <i>tert</i> -Butyl: 95 %)
3 d	18 %	Keine Verbesserung

* Der Deuterierungsgrad wurde mittels NMR unter der Verwendung von HMB als internen Standard bestimmt.

Weitere Versuche, einen verbesserten Austausch der sterisch gehinderten Wasserstoffatome zu erreichen, waren nicht erfolgreich (*Tabelle 17*).

Tabelle 17 Weitere Versuche zur Deuterierung von **21**, insbesondere in *meta*-Position.

Reaktionsbedingungen	Beobachtungen
Pt ₂ O (2 mol%), D ₂ O, Argon, 200 °C, über Nacht	52 % Ausbeute, minimaler Austausch in <i>para</i> -Position und in den <i>tert</i> -Butyl-Gruppen
D ₂ SO ₄ , D ₂ O, 50 °C, bis 10 d	Kein Austausch, kein Abbau des Edukts
DCl, D ₂ O, 140 - 180 °C, 24 h	Vollständige Degradation des Edukts

Um dennoch das Zielprodukt Galvinoxyl-D41 zu erhalten, wurde daher die Synthese in vier Reaktionsschritten aus den kommerziell erhältlichen Edukten *tert*-Butanol-D10 und 4-Bromophenol-2,3,5,6-D4 (**24**) durchgeführt (*Abbildung 34*).

Im ersten Reaktionsschritt wurden zwei *tert*-Butyl-Gruppen in *ortho*-Position in **24** eingeführt. Dafür wurde **24** unter sauren Bedingungen und bei hoher Temperatur (160 °C) in einem dicht verschlossenen Glasdruckgefäß mit *tert*-Butanol-D10 umgesetzt. Dabei wird zunächst *in situ* das *tert*-Butylkation bzw. Isobuten generiert, welches dann in Form einer Friedel-Crafts-Alkylierung den Aromaten *ortho*-alkyliert. Die Verwendung von **24** als Edukt verhindert die Bildung schwierig abzutrennender *para*-alkylierter Nebenprodukte. Um eine möglichst hohe Ausbeute zu erreichen, wurde Reaktionsschritt I nach Isolierung des Produktes mit nicht umgesetztem oder monosubstituiertem Edukt mehrfach wiederholt. Die Gesamtausbeute blieb mit etwa 30 % bezogen auf das eingesetzte 4-Bromophenol dennoch gering. Dies ist vor allem ein Resultat der sterischen Hinderung der zweiten *ortho*-Position nach erfolgter einfacher Substitution.

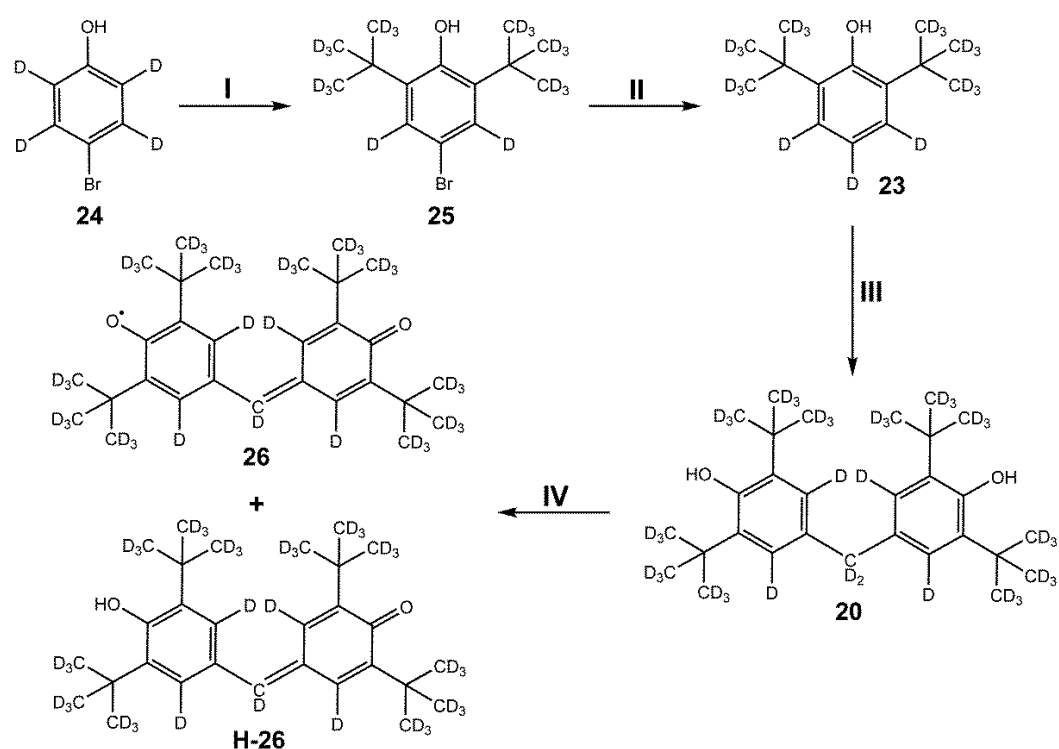


Abbildung 34 Synthese von **26** ausgehend von deuterierten Edukten. Reagenzien und Bedingungen: (I) *tert*-Butanol (D10, 98 %), D₂SO₄ (99.5 % D), 160 °C, 3 h, Glasdruckgefäß. (II) 5 % Pd/C (50 Gew.%), D₂ (8 bar), DCM/Methanol-D1 (2:1), RT, 7 h. (III) Paraformaldehyd (D2, 99 %), Isopropanol-D1, NaOD (40 %) in D₂O, 35 °C, Argon, 40 min. (IV) K₃Fe(CN)₆, NaOD (40 %) in D₂O, Benzol-D₆, Argon, RT, 60 min.

Im nachfolgenden Reaktionsschritt wurde dann die *para*-Position von **25** durch Debromierung entschützt. Dies erfolgte in Form einer katalytischen Hydrierung unter Verwendung von 5 % Pd/C und D₂. Die Reaktionsschritte III und IV wurden anhand bereits veröffentlichter Vorschriften zur Synthese von Galvinoxyl durchgeführt.⁹⁹ Reaktionsschritt III ist eine basenkatalysierte Kondensation von **23** mit Formaldehyd-D₂, bei der unter Elimination von Wasser das Diarylmethan-Derivat **20** gebildet wird. Der Gesamtdeuterierungsgrad von **20** beträgt etwa 96 % (ESI-HRMS). Das ¹H-NMR zeigt, dass sich die verbleibenden Protonen auf das gesamte Molekül verteilen.

20 wurde nachfolgend mit Kaliumhexacyanoferrat(III) zu **26** oxidiert. Die Oxidation findet über mehrere Zwischenstufen statt und wird im Abschnitt 3.2.4.1 genauer besprochen. Ein Nebenprodukt der Oxidation ist Hydrogalvinoxyl-D₄₂ (**26-H**). Hydrogalvinoxyl wird auch bei der Synthese von undeutertem Galvinoxyl (**18**) gebildet und ist dessen direkte Vorstufe. Die Verlängerung der Reaktionsdauer oder die Erhöhung der Kaliumhexacyanoferrat(III)-Menge führte nicht zu einer vollständigen Umsetzung von **20** zu

26. Aufgrund der sehr ähnlichen chromatographischen Eigenschaften ist die Entfernung von Hydrogalvinoxyl sehr schwierig, sodass **26** ohne weitere Reinigung für die weitere Charakterisierung verwendet wurde. Der Deuterierungsgrad von **26** wurde mittels ESI-MS bestimmt und stimmt mit 98 % ungefähr mit dem Deuterierungsgrad der Vorstufe überein.

3.2.1.2 Adamantylgalvinoxyl

Wie zuvor beschrieben wurden die *tert*-Butyl-Gruppen von Galvinoxyl bisher nur gegen Phenyl- und Methyl-Gruppen ausgetauscht. Dadurch erhält man Radikale mit zusätzlichen Hyperfeinkopplungen und einer verringerten Stabilität wegen des geringeren sterischen Schutzes.^{94, 95} In dieser Arbeit wurden die *tert*-Butyl-Gruppen gegen sterisch anspruchsvolle Adamantyl-Gruppen ausgetauscht, welche nicht zu zusätzlichen Hyperfeinkopplungen führen. Zwar sind *tert*-Butyl und Adamantyl-Gruppen hinsichtlich ihres sterischen Anspruchs etwa gleichwertig, allerdings sind Adamantyl-Gruppen wegen ihres polycyclischen Charakters rigider. Weiterhin befinden sich benachbart zum Spinsystem Methylen-Gruppen statt Methyl-Gruppen. Der Einfluss dieser Unterschiede auf die spektroskopischen Eigenschaften des Radikals wird im Abschnitt 3.2.2.1 besprochen.

Die Synthese von Adamantylgalvinoxyl (**31**, *Abbildung 35*) stimmt im Wesentlichen mit der Synthese von **26** überein.

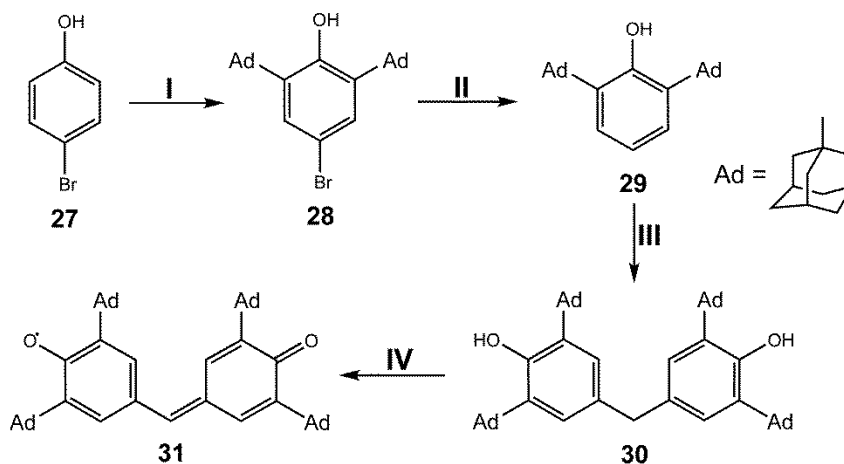


Abbildung 35 Synthese von **31**. Reagenzien und Bedingungen: (I) **AdOH**, **AdBr**, 210 °C, 3 h, Glasdruckgefäß. (II) 5 % Pd/C (50 wt %), H₂ (5 bar), Methanol/DCM, RT, über Nacht. (III) Paraformaldehyd, Ameisensäure, Rückfluss, 2.5 h. (IV) K₃Fe(CN)₆, NaOH (40 %) in H₂O, Benzol, Argon, RT, 60 min.

Im ersten Schritt müssen die Adamantylreste in den aromatischen Ring eingeführt werden. Dies erfolgte in Form einer elektrophilen Substitution am Aromaten. Hierzu wurde

von Sokolenko et al. eine Synthesevorschrift publiziert.¹⁰⁹ Darin wurde ein System aus 1-Adamantol (**AdOH**) mit 10 % 1-Bromoadamantan (**AdBr**) verwendet, um eine zweifache Substitution von Phenol in *ortho*-Position zu erreichen. Um die *para*-Position vor der Alkylierung zu schützen, wurde auch hier 4-Bromophenol (**27**) als Edukt verwendet. Sokolenko et al. erhielten nach einer Reaktionsdauer von 15 h bei 210 °C **28** mit einer Ausbeute von 75 %. Dieses Ergebnis konnte nicht reproduziert werden. Unter den gleichen Reaktionsbedingungen war nach 15 h aufgrund starker Degradation keinerlei Produkt isolierbar. Erst nach Reduktion der Reaktionsdauer auf 3 h wurde **28** mit einer Ausbeute von 30 % erhalten. Im zweiten Reaktionsschritt wurde die *para*-Position von **28** durch katalytische Hydrierung entschützt.

Die Kondensation von **29** mit Paraformaldehyd wurde unter stark sauren Bedingungen mit Ameisensäure als Lösungsmittel durchgeführt. Nach chromatographischer Reinigung wurde **30** mit einer Ausbeute von 87 % isoliert. Die bei der Synthese von **20** angewendete basenkatalysierte Kondensation führte bei der Synthese von **30** nicht zum Erfolg. Unter basischen Bedingungen wurde ein Substanzgemisch erhalten, aus dem **30** nicht isoliert werden konnte.

30 wurde dann im letzten Reaktionsschritt durch Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat(III) zu **31** umgesetzt. Im Gegensatz zu **20** wurde **30** laut IR- und DC-Untersuchung vollständig zum Radikal oxidiert. Es wurde kein Hydroadamantylgalvinoxyl (**31-H**, *Abbildung 42*) im Produkt gefunden.

3.2.2 Analyse der EPR-Spektren von Galvinoxyl-D41 und Adamantylgalvinoxyl

Um die EPR-spektroskopischen Eigenschaften der neu synthetisierten Galvinoxyl-derivate **26** und **31** zu untersuchen und mit den Eigenschaften des kommerziellen Galvinoxyls **18** zu vergleichen, wurden jeweils L-Band-Spektren unter anoxischen Bedingungen in den Lösungsmitteln Toluol und/oder Octanol ($C_{\text{Radikal}} \sim 1 \text{ mM}$) aufgenommen.

3.2.2.1 Adamantylgalvinoxyl

Das EPR-Spektrum von **18** (*Abbildung 36(B)*) zeigt das erwartete Kopplungsmuster eines Dupletts, welches nochmals in ein Quintett aufgespalten ist. Die Quintette sind nicht vollständig aufgelöst. Die Hyperfeinaufspaltung kommt durch die Wechselwirkung des freien Elektrons mit dem Proton der Methingruppe bzw. mit den vier aromatischen Protonen

zustande. Das Intensitätsverhältnis der Signale innerhalb der Quintetts ist entsprechend der Binomialverteilung 1:4:6:4:1.

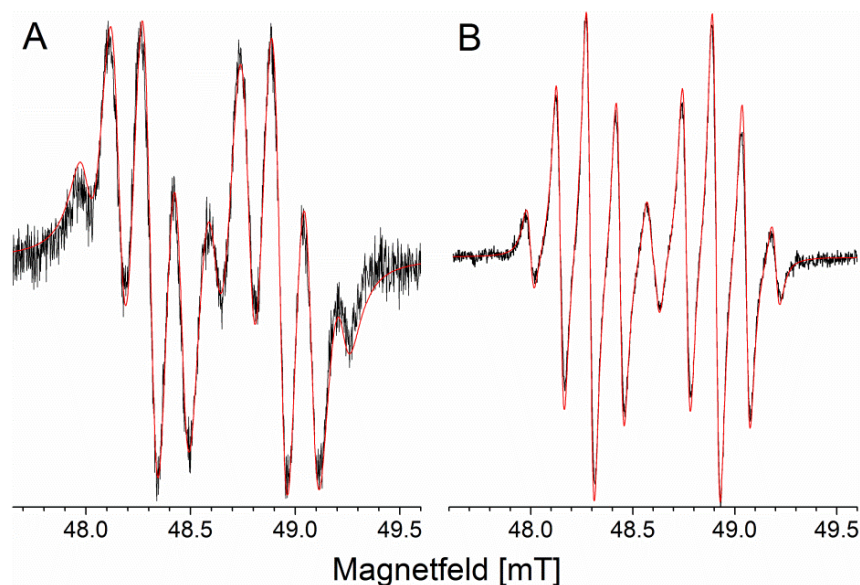


Abbildung 36 Experimentelles (schwarz) und simuliertes (rot) L-Band-EPR-Spektrum von (A) **31** und (B) **18** (1 mM in Toluol unter Stickstoffatmosphäre, RT).

Das Spektrum von **31** besteht ebenfalls aus einem Duplett (Kopplung mit dem Methin-Proton), dessen beide Signale nochmals in ein Quintett (Kopplung mit den aromatischen Protonen) aufgespalten sind. Dennoch unterscheiden sich die EPR-Spektren beider Radikale deutlich voneinander. Um diesen Unterschied zu erklären wurden zunächst die Hyperfeinkopplungskonstanten a_1 (Kopplung mit Methin-Proton) und a_2 (Kopplung mit aromatischen Protonen) und die Peak-zu-Peak-Linienbreite ΔB_{pp} durch Simulation der Spektren mit EasySpin ermittelt (Tabelle 18). Die Kopplungskonstanten beider Radikale sind ungefähr gleich groß. Ein deutlicher Unterschied tritt jedoch bei der Peak-zu-Peak-Linienbreite auf, welcher die Gesamterscheinung der Spektren beeinflusst.

Tabelle 18 Hyperfeinkopplungskonstanten und Linienbreiten der Radikale **31** und **18**.

Radikal	a_1 [MHz]	a_2 [MHz]	ΔB_{pp}^* [μ T]
31	17.35	4.20	90
18	17.30	4.10	40

* Der Simulation von ΔB_{pp} wurde die Lorentz-Funktion zugrunde gelegt.

Dieser Unterschied lässt sich durch den Einfluss der Alkylgruppen auf die EPR-Spektren erklären. Die Hyperfeinkopplungskonstanten der Protonen der Alkylgruppen sind

aufgrund der geringen Spindichte sehr klein und im EPR-Spektrum nicht aufgelöst. Sie führen stattdessen zu einer Verbreiterung der Signale.⁷ Die Adamantyl-Funktion enthält drei unterschiedliche Gruppen von Protonen (γ -H, δ -H, ε -H). *Tert*-Butyl-Gruppen wiederum enthalten nur γ -Protonen (Abbildung 37).

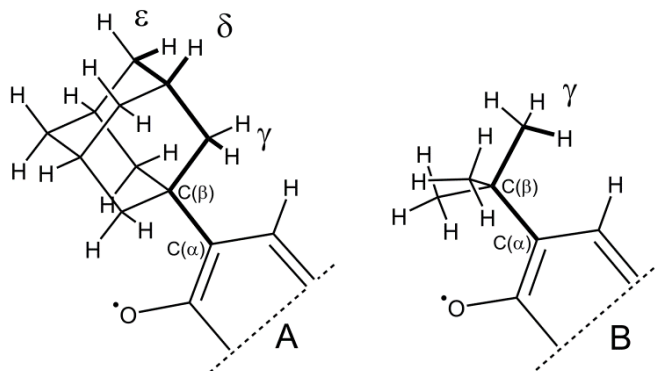


Abbildung 37 Dreidimensionale Struktur der Alkylsubstituenten von (A) **31** und (B) **18**.

Die vergrößerte Linienbreite von **31** resultiert aus unaufgelösten „long-range“-Hyperfeinaufspaltungen der γ -, δ - und ε -Protonen. Sogenannte „long-range“-Kopplungen beruhen auf π - σ -Spin-Delokalisation über mehrere Bindungen hinweg. Sie kommen vor allem zum Tragen, wenn die $2p_z$ -Achse des aromatischen Rings und die σ -Bindungen zwischen dem jeweiligen Kohlenstoffatom und den γ -, δ - und ε -Protonen etwa in einer Ebene liegen und in einer „Zick-Zack-Linie“ angeordnet sind.⁶ Bei δ -Protonen nennt man dies auch „W-Anordnung“.⁶ Durch den polycyclischen Charakter der Adamantyl-Gruppe ist diese Zick-Zack-Anordnung in **31** fixiert und daher besonders effektiv (Abbildung 37(A)). Durch die Rotation um die C(α)-C(β)-Achse und die Symmetrie der Adamantyl-Gruppe ist eine optimale Anordnung außerdem in drei Positionen möglich.

3.2.2.2 Galvinoxyl-D41

Die Spektren von Galvinoxyl-D41 (**26**) in Toluol und Octanol unter sauerstofffreien Bedingungen (Abbildung 38(A) bzw. (B)) zeigen eine teilweise aufgelöste Hyperfeinstruktur. Diese kommt durch Überlagerung der Kopplungen des freien Elektrons mit den aromatischen Deuteriumatomen und dem Deuteriumatom der Methin-Gruppe zustande. Ein vollständig aufgelöstes EPR-Spektrum von **26** bestünde aus 27 einzelnen Signalen (Nonett eines Triplets). Die Kopplungskonstanten a_1 (Kopplung mit Methin-Deuteriumatom) und a_2 (Kopplung mit aromatischen Deuteriumatomen) und die Peak-zu-Peak-Linienbreite ΔB_{pp} wurden erneut durch Simulation der Spektren mit EasySpin ermittelt (Tabelle 19).

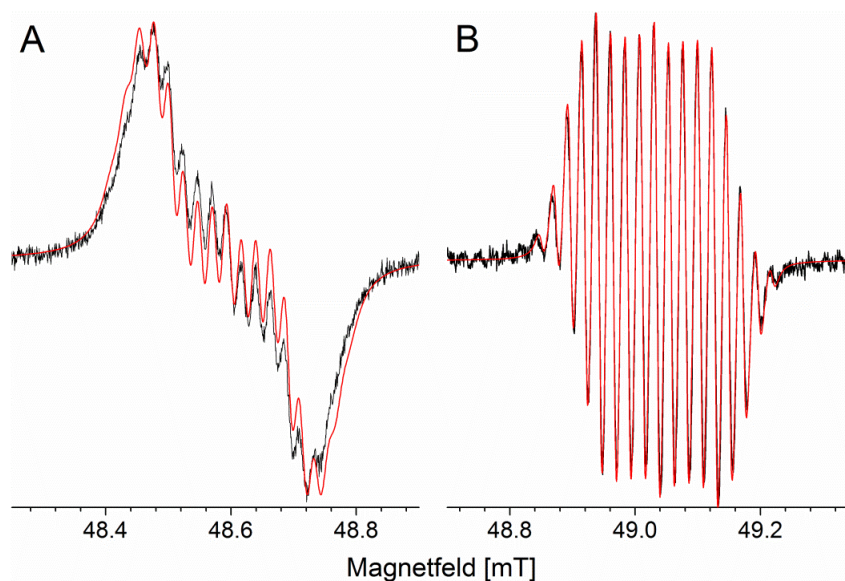


Abbildung 38 Experimentelles (schwarz) und simuliertes (rot) L-Band-EPR-Spektrum von **26** in (A) Toluol und (B) in Octanol (1 mM in unter Stickstoffatmosphäre, RT).

Tabelle 19 Hyperfeinkopplungskonstanten und Linienbreiten von **26**.

Lösungsmittel	a_1 [MHz]	a_2 [MHz]	ΔB_{pp}^* [μ T]
Toluol	2.59	0.64	25
Octanol	2.59	0.64	11

* Der Simulation von ΔB_{pp} wurde die Lorentz-Funktion zugrunde gelegt.

Die Hyperfeinkopplungskonstanten sind deutlich kleiner im Vergleich zu Radikal **18**. Die Reduktion korreliert in etwa mit der kleineren gyromagnetischen Konstante von Deuterium ($g_n(D) = 0.8574$) verglichen mit Wasserstoff ($g_n(H) = 5.5854$).⁶ Die Linienbreite von **26** in Toluol beträgt 25 μ T. Das entspricht einer Reduktion von 37.5 % im Vergleich zu **18** und ist auf die Verkleinerung der Hyperfeinkopplungskonstanten der *tert*-Butyl-Deuteriumatome zurückzuführen. In Octanol ist das EPR-Spektrum von **26** durch die geringere Linienbreite in 18 einzelne Signale aufgespalten. Dies ist auf die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Lösungsmittel und deren spezifischen Wechselwirkung mit **26** zurückzuführen.

Der Deuterierungsgrad von **26** beträgt etwa 96 - 98 %. Das heißt im Rückschluss, dass ein geringer Anteil von **26** ein vom vollständig deuterierten Radikal leicht abweichendes Deuterierungsmuster hat, in dem einzelne Deuteriumatome durch Wasserstoff ausgetauscht sind. Wenn von diesem Austausch die aromatischen Deuteriumatome oder das Methin-Deuteriumatom betroffen sind, wirkt sich das auf das Kopplungsmuster des EPR-Spektrums

aus. Im Hoch- und Tieffeldbereich des in Octanol gemessenen EPR-Spektrums sind die EPR-Signale dieser nicht ganz vollständig deuterierten Molekülspezies zu sehen. Die Intensität dieser zusätzlichen Signale ist gering.

3.2.3 Sauerstoffsensitivität von Galvinoxyl und Galvinoxyl-D41

Anders als ursprünglich behauptet verhalten sich Galvinoxylradikale nicht inert gegenüber Sauerstoff.⁸⁹ Im Gegenteil, in gelöster Form reagieren sie sogar sehr schnell mit diesem, wobei unterschiedliche Abbauprodukte gebildet werden. Dennoch eignen sich Galvinoxylradikale potentiell als Spin-Sonden für die EPR-Oximetrie, da sie in der Gegenwart ihrer reduzierten Analoga gegenüber der Reaktion mit Sauerstoff stabilisiert werden.¹⁰⁵ Daher sollte der Einfluss von Sauerstoff auf die EPR-Spektren der Galvinoxyle untersucht werden.

Da Galvinoxyle aufgrund ihrer hohen Lipophilie nicht wasserlöslich sind, musste zunächst ein geeignetes Lösungsmittel gefunden werden, um ihre Sauerstoffsensitivität zu prüfen. Dieses Lösungsmittel sollte die Radikale in einem ausreichenden Maß lösen, aber im Hinblick auf potentielle *in vivo*-Anwendungen auch eine gute Biokompatibilität aufweisen. Als weitestgehend geeignet zeigte sich hier 1-Octanol. Es wurde bereits *in vivo* sowohl am Tier als auch am Menschen getestet und hat eine sehr gute Verträglichkeit.^{110, 111} Bei Stabilitätsuntersuchungen (siehe Abschnitt 3.2.4) zeigte Galvinoxyl **18** gelöst in Octanol außerdem über mehrere Stunden keine Degradation. Die Löslichkeit von Radikal **31** in Octanol war nicht ausreichend, sodass dieses nicht auf seine Sauerstoffsensitivität hin untersucht wurde.

Um die Verwendbarkeit von **26** und **18** als sauerstoffsensitive Sonden zu prüfen, wurden diese in Octanol (~ 1 mM) gelöst und mit unterschiedlichen Sauerstoff/Stickstoff-Gemischen äquilibriert. Die EPR-Spektren wurden nachfolgend an einem L-Band-Spektrometer vermessen. Für *in vivo*-Anwendungen sind vor allem Sauerstoffkonzentrationen zwischen 0 und 10 % von Bedeutung, weshalb auf Messungen bei wesentlich höherem Sauerstoffgehalt verzichtet wurde.¹¹²

3.2.3.1 Galvinoxyl

Da sich die Sauerstoffsensitivität eines Radikals als Verbreiterung der EPR-Signale zeigt, wurde die Peak-zu-Peak-Linienbreite ΔB_{pp} durch Simulation der experimentellen Spektren bestimmt. Die Simulation wurde mit Hilfe von Matlab und der EasySpin-Funktion „Garlic“ durchgeführt. Um eine bestmögliche Übereinstimmung zwischen experimentellem

und simuliertem Spektrum zu erreichen, wurde der Berechnung bei den 0 % O₂-Spektren eine Gauss-Funktion und oberhalb von 0 % Sauerstoff eine Lorentz-Funktion zugrunde gelegt.

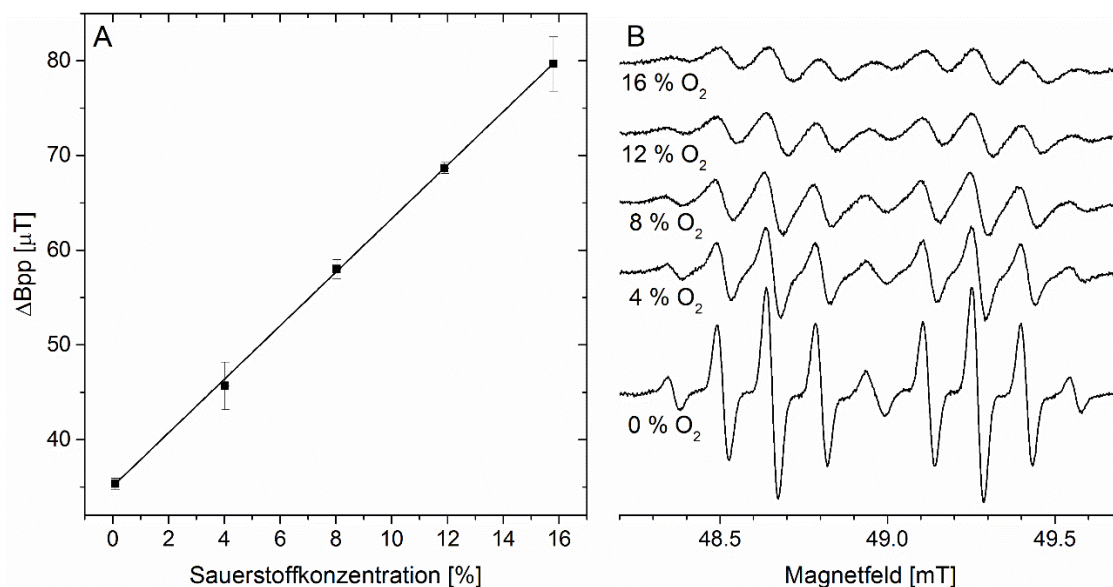


Abbildung 39 (A) Abhängigkeit der Linienbreite von **18** von der Sauerstoffkonzentration ($c = 1$ mM, $n = 3$); $R^2 = 0.999$. (B) EPR-Spektren von **18** mit steigender Sauerstoffkonzentration bei RT.

Die Linienbreite von **18** ist linear abhängig von der Sauerstoffkonzentration (Abbildung 39(A)). Die Sensitivität beträgt etwa $2.8 \mu\text{T}/\% \text{O}_2$. Sie ist somit deutlich höher als die Sensitivität hydrophiler Sauerstoffsonden wie dem „Finland“-Radikal (ca. $0.5 \mu\text{T}/\% \text{O}_2$ in PBS-Puffer pH 7.4).¹¹³ Die höhere Sensitivität ist ein Resultat der besseren Sauerstofflöslichkeit in organischen Lösungsmitteln im Vergleich zu Wasser. Bei 20°C und 0.213 bar O₂ (entspricht 21 % Sauerstoff in der Atmosphäre) löst 1-Octanol 1.5 mmol/l Sauerstoff. Wasser hingegen nur 0.29 mmol/l.¹¹⁴ Das heißt, dass beim gleichen Sauerstoffpartialdruck in Octanol mehr Sauerstoff gelöst vorliegt und es daher in einem größeren Ausmaß zur Linienverbreiterung durch Heisenberg-Spinaustausch kommt. Die Signalintensität der EPR-Spektren sinkt mit zunehmender Linienbreite (Abbildung 39(B)). Die absoluten Linienbreiten und die Sensitivität sind vergleichbar mit den Linienbreiten und der Sensitivität chlorierter Tritylradikale gelöst in einem lipophilen Medium wie Isopropylmyristat.¹¹³

Im Gegensatz zu Tritylradikalen, welche aufgrund ihrer nicht aufgespaltenen und schmalen Signale bevorzugt als Sauerstoffsonden verwendet werden, ist **18** kommerziell und

relativ preisgünstig erhältlich. Weiterhin ist die Sauerstoffsensitivität mit der chlorierter lipophiler Trityle, welche bereits in der EPR-Oximetrie verwendet werden, vergleichbar. Ein Nachteil von **18** ist die, durch die Aufspaltung des Signals, geringere Signalintensität im Vergleich zu Tritylen bei gleicher Konzentration. Dies kann sich ungünstig auf das Signal-Rausch-Verhältnis auswirken. Trotzdem sollte **18** wegen der vorhandenen Vorteile als Alternative in der EPR-Oximetrie in Betracht gezogen werden. Dies gilt vor allem dann, wenn niedrige Sauerstoffkonzentrationen bestimmt werden sollen, da dann das geringere Signal/Rausch-Verhältnis weniger ins Gewicht fällt.

3.2.3.2 Galvinoxyl-D41

Wie bereits in Abschnitt 3.2.2.2 gezeigt wurde, ist das Spektrum von **26** unter anoxischen Bedingungen in Octanol sehr gut aufgelöst. Mit steigender Sauerstoffkonzentration (*Abbildung 40(A)*) kommt es zu einer Verbreiterung des Signals, was letztendlich zu einem kompletten Verlust der Hyperfeinstruktur zwischen 5 % und 6 % Sauerstoff führt. Der Einfluss von Sauerstoff auf das Spektrum zeigt sich demnach wie erwartet in einer Zunahme der Peak-zu-Peak-Linienbreite (1), aber auch in einer Veränderung der Linienform (2).

(1) Die Linienbreiten (ΔB_{pp}) wurden durch Simulation der experimentellen Spektren mittels Matlab und der EasySpin-Funktion „Garlic“ bestimmt. Das bestmögliche Ergebnis wurde durch zugrunde legen des Lorentz-Modells erhalten. *Abbildung 40(B)* zeigt den linearen Zusammenhang zwischen Linienbreite und Sauerstoffkonzentration. Aufgrund der geringeren Linienbreite von **26** im Vergleich zu **18** bei 0 % Sauerstoff, ist **26** wesentlich sensitiver gegenüber Sauerstoff ($4.8 \mu\text{T}/\% \text{ O}_2$). Die hohe Sensitivität ist vorteilhaft bei der Messung geringer Änderungen der Sauerstoffkonzentration und verringert statistische Fehler bei deren Bestimmung im Vergleich zu Messungen mit hydrophilen Spinsonden in wässriger Umgebung.

(2) Die EPR-Spektren von **26** zeigen durch den zunehmenden Rückgang der spektralen Auflösung auch eine Änderung der Linienform. Diese Änderung kann durch das Verhältnis aus maximaler Amplitude zur Amplitude im Zentrum des Spektrums beschrieben werden (siehe Markierung durch Sterne (*) in *Abbildung 40(A)*). Dadurch ergibt sich ein gut reproduzierbarer, nicht-linearer Zusammenhang zwischen Linienform und Sauerstoffkonzentration. Die Reproduzierbarkeit dieser Analysemethode geht zwischen einer Sauerstoffkonzentration von 5 % und 6 % verloren, da in diesem Konzentrationsbereich auch die Hyperfeinstruktur vollständig verloren geht. Zwischen 1 % - 6 % Sauerstoff ist der

Zusammenhang durch halblogarithmische Darstellung linearisierbar, was in der Praxis die Datenanalyse vereinfacht.

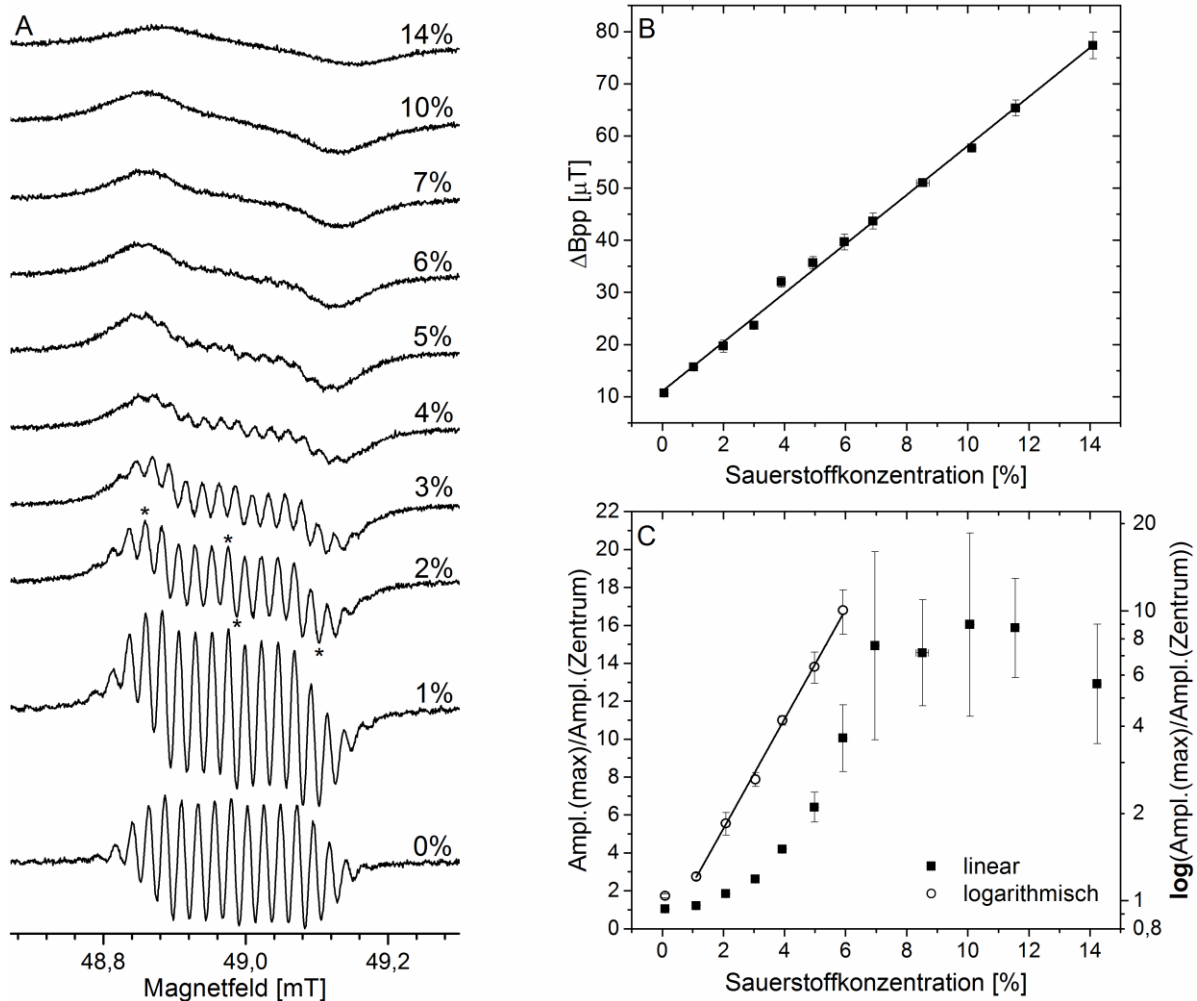


Abbildung 40 (A) EPR-Spektren von **26** mit steigender Sauerstoffkonzentration. $R^2 = 0.997$. (B) Linienbreite (ΔB_{pp}) von **26** in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration. (C) Änderung der Amplituden von **26** in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration in linearer und halblogarithmische Darstellung ($R^2 = 0.998$). ($c = 1 \text{ mM}$, $n = 3$).

Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich zusammenfassen, dass das vollständig deuterierte Galvinoxyl **26** gegenüber dem undeuterierten Galvinoxyl **18** dann von Vorteil ist, wenn kleine Veränderungen der Sauerstoffkonzentration in einem System erfasst werden sollen. Dies gilt vor allem im Bereich geringer Sauerstoffkonzentrationen ($< 6\%$), da in diesem Messbereich durch die Analyse der Spektrenform eine ergänzende Methode der Datenauswertung zur Verfügung steht.

3.2.4 Stabilitätsuntersuchungen an Galvinoxyl und Adamantylgalvinoxyl

Die Stabilität von Galvinoxylradikalen hängt von unterschiedlichen Faktoren ab. Es ist bereits bekannt, dass die Reaktion der Radikale mit Sauerstoff durch die Anwesenheit der entsprechenden Hydrogalvinoxyle gehemmt wird.¹⁰⁵ Der genaue Mechanismus dieser Stabilisierung ist in der Literatur bisher nicht weiter betrachtet worden. Der Entstehung von Hydrogalvinoxyl während der Radikalsynthese und dessen Einfluss auf die Stabilität, sowie Lösungsmiteleinflüsse auf die Stabilität von Galvinoxylen soll daher nachfolgend genauer betrachtet werden.

3.2.4.1 Bildung von Hydrogalvinoxyl als Nebenprodukt der Galvinoxyl-Synthese

Die Untersuchung von kommerziell erworbenem Galvinoxyl (**18**, Sigma Aldrich) mittels HPLC ergab, dass dieses etwa 50 % Hydrogalvinoxyl enthält. Auch bei der Synthese von Radikal **26** wurde das entsprechende Hydrogalvinoxyl im letzten Reaktionsschritt als Resultat einer unvollständigen Oxidation gebildet. Hydrogalvinoxyl entsteht *nicht* erst während der Lagerung der Galvinoxyle. Diese Beobachtungen stimmen mit der veröffentlichten Literatur überein.⁹⁴

Abbildung 41 zeigt einen möglichen Reaktionsweg für die Bildung von Hydrogalvinoxyl am Beispiel der Oxidation von **18**: sowohl **18** als auch **18-H** bilden sich in einem mehrschrittigen Oxidationsprozess ausgehend von **17**. Zwischenprodukte wie das sehr instabile Radikal **18-H₂[•]** können dabei in Form von Umlagerungen und Disproportionierung weiterreagieren.

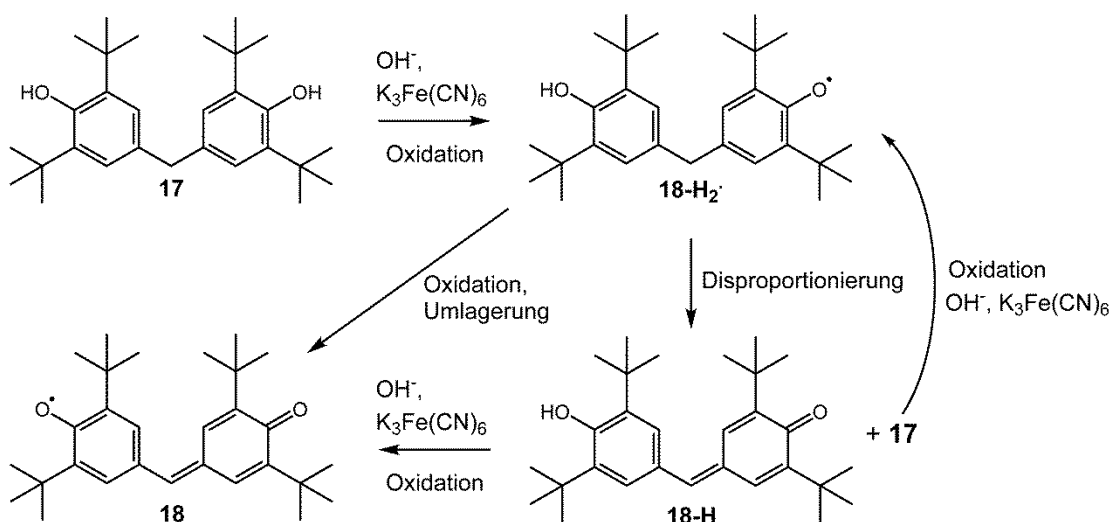


Abbildung 41 Mögliche Reaktionswege für die Bildung von **18** und **18-H** ausgehend vom Methylenbisphenol **17**. Abbildung adaptiert von Omelka et al.⁹⁴

3.2.4.2 Einfluss der Hydrogalvinoxyle auf die Radikalstabilität

Die Anwesenheit von **18-H** neben **18** führt zur Inhibition des Abbaus von **18** über eine bestimmte Zeitdauer. Während dieser „Inhibitionszeit“ ist die Degradation des Radikals gering. Ist diese Zeit überschritten, kommt es zu einem sprunghaften, sehr schnellen Abfall der Radikalkonzentration durch Reaktion mit Sauerstoff. Identifizierbare Abbauprodukte sind 2,6-Di-*tert*-butyl-4-hydroxy-benzaldehyd und 2,6-Di-*tert*-butyl-1,4-benzochinon.^{105, 106} Die Länge dieser Inhibitionsphase ist direkt von der Konzentration von **18-H** abhängig.¹⁰⁵

Diese Abhängigkeit konnte auch für **31** in der Gegenwart steigender Mengen **31-H** gezeigt werden. Dafür wurden EPR-Spektren von **31** in Toluol (Konzentration zu Beginn 1 mM) mit unterschiedlichen Anteilen **31-H** über mehrere Stunden am X-Band-Spektrometer gemessen. Die Proben wurden direkt nach Herstellung zur Messung in 50 µl-Kapillaren überführt. Um ein verdampfen des Toluols und Gasaustausch mit der Umgebung zu verhindern, wurden die Kapillaren dicht verschlossen. Die unterschiedlichen **31/31-H**-Mischungen wurden durch Mischen unterschiedlicher Mengen **30** mit **31** generiert. DC-Untersuchungen haben gezeigt, dass beide Substanzen in Lösung sofort unter der Bildung von **31-H** miteinander reagieren (Abbildung 42).

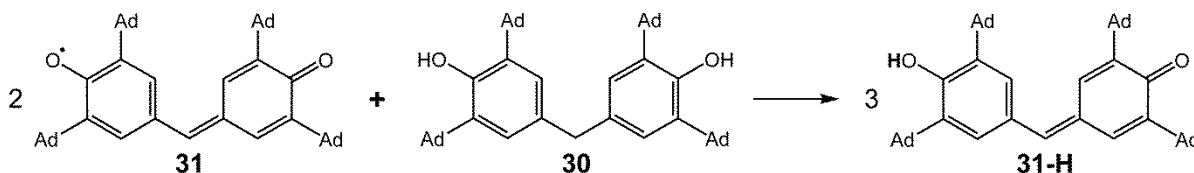


Abbildung 42 Bildung von **31-H** aus **30** und **31**.

Abbildung 43 (A) zeigt die Stabilität von **31**, gemessen als AUC, mit steigender **31-H**-Konzentration. Das reine Radikal ohne Zusatz von **31-H** ist nach ca. 2 h fast vollständig zerfallen. Der Prozess des schnellen Abbaus setzt etwa 1 h nach Herstellung der Lösung ein. Mit steigender **31-H**-Konzentration wird die „Inhibitionszeit“ verlängert. Die Degradationsrate nach Einsetzen des „schnellen Abbaus“ ändert sich dagegen bis 21 % **31-H** kaum. Oberhalb von 21 % **31-H** ist auch die Geschwindigkeit des „schnellen Abbaus“ reduziert. Abbildung 43 (B) zeigt die EPR-Spektren von **31** mit 0 % **31-H** und 50 % **31-H**. Bei den Spektren des reinen **31** kommt sowohl zu einer Verkleinerung der Signalamplitude als auch zu einer verbesserten Auflösung der Hyperfeinstruktur. Nach etwa 1.58 h ist die AUC etwa um 30 % reduziert und die Hyperfeinstruktur des Spektrums beginnt sich zu zeigen. Die zunehmende Auflösung der Hyperfeinstruktur kann durch den Verbrauch von

Sauerstoff infolge der Degradation des Radikals erklärt werden. Das gleiche Verhalten wurde auch bei den anderen Proben beobachten, hier exemplarisch gezeigt für die Probe mit 50 % **31-H**-Gehalt. Aber im Gegensatz zur reinen **31**-Probe, kommt es bei einem Gehalt von 50 % und 60 % **31-H** über die Zeit zu einem *Anstieg* der Signalamplitude.

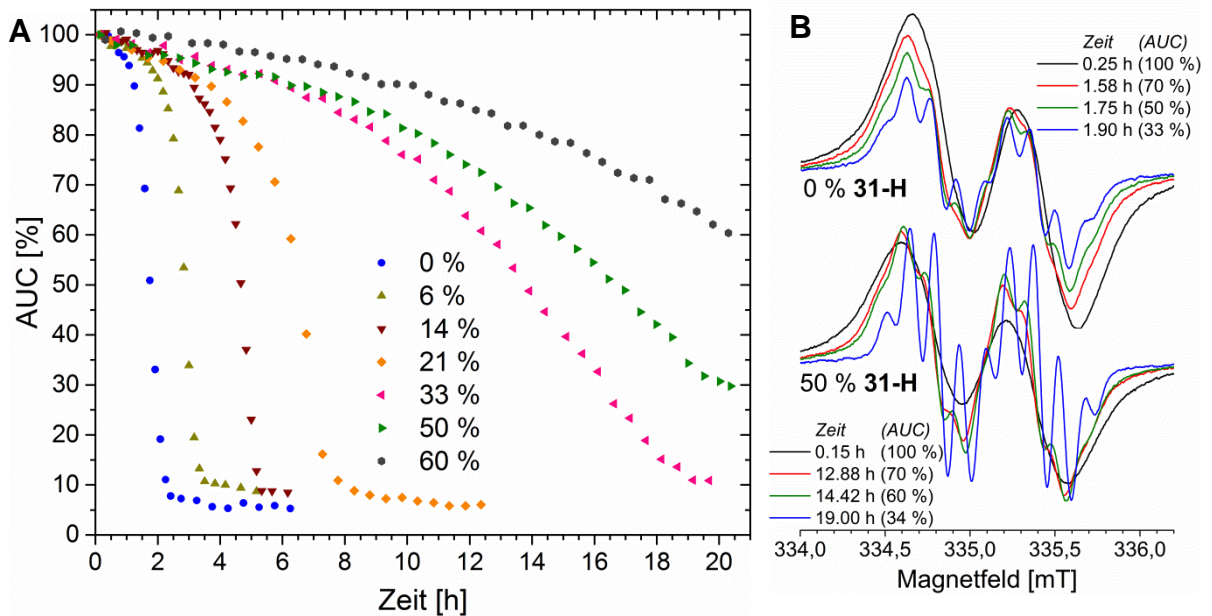


Abbildung 43 (A) Stabilisierung von **31** ($c_{\text{Start}} = 1 \text{ mM}$ in Toluol) durch **31-H**. Die AUC wurde durch doppelte Integration der EPR-Spektren ermittelt. (B) EPR-Spektren von **31** mit 0 % und 50 % **31-H** zu ausgewählten Zeitpunkten.

Unter 50 % **31** wurde lediglich ein weniger starker Abfall bzw. eine gleichbleibende Amplitude beobachtet. Ein solches Verhalten kommt zustande, wenn der Abfall der AUC durch die Reduktion der Linienbreite des Signals überkompensiert wird. Die geringere Linienbreite legt nahe, dass bei gleicher AUC die Sauerstoffkonzentration in der Probe mit dem höheren **31-H**-Gehalt niedriger ist (siehe *Abbildung 43 (B)*: 0 % **31-H**: 1,9 h/33 % AUC; 50 % **31-H**: 19 h/34 % AUC).

Diese Beobachtungen legen drei mögliche Mechanismen nahe, mit denen die Stabilisierung von Galvinoxylen durch die entsprechenden Hydrogalvinoxyle erklärt werden kann:

(1) Hydrogalvinoxyl könnte das Radikal sterisch schützen und so die Interaktion zwischen Radikal und Sauerstoff reduzieren. Dagegen spricht allerdings, dass die Linienbreite des ersten Spektrums jeder Probe etwa gleich groß ist (ca. 210 - 220 mT). Würde das Hydrogalvinoxyl effektiv die Interaktion zwischen Sauerstoff und Radikalen reduzieren,

müsste sich dies von Beginn an in einer Reduktion der Linienbreite mit steigender Hydrogalvinoxyl-Konzentration zeigen.

Ein weiterer potentieller Mechanismus basiert auf einer chemische Reaktion zwischen Hydrogalvinoxyl und Sauerstoff bzw. zwischen Hydrogalvinoxyl und Galvinoxyl:

(2) Hydrogalvinoxyl könnte direkt mit Sauerstoff reagieren. Dieses könnte dadurch entweder selbst zum Radikal oxidiert werden und den Abbau des Radikals ausgleichen und/oder Abbauprodukte bilden und so lediglich Sauerstoff abfangen. Gegen diesen potentiellen Mechanismus spricht, dass ESI-MS-Analysen von reinen **18-H** über mehrere Tage ($c = 1 \text{ mM}$ in Toluol) keinerlei Abbauprodukte zeigten, die auf eine Reaktion mit Sauerstoff hindeuten. Weiterhin zeigte die Lösung von **18-H** nur eine minimale EPR-Aktivität am X-Band unter Standardmesseinstellungen für **18**. Die Signalintensität vergrößerte sich auch nicht nach Begasen der Lösung mit reinem Sauerstoff (10 min, 0.1 l/min)

Der dritte potentielle Mechanismus scheint die bisherigen Beobachtungen am besten zu erklären:

(3) Galvinoxyl reagiert mit Sauerstoff. Dabei bilden sich als Zwischenprodukte Endo- und Hydroperoxide, die dann weiter zu anderen Endprodukten zerfallen. Hydrogalvinoxyl könnte mit diesen Zwischenprodukten in Form einer Redoxreaktion reagieren, wobei es selbst zum Radikal oxidiert wird und so den Verlust an Galvinoxyl wieder ausgleicht. Dieser Mechanismus wird auch durch die Beobachtungen unter den Abschnitten 3.2.4.3 und 3.2.4.4 gestützt.

3.2.4.3 Stabilisierung von Galvinoxylen durch andere Substanzen

Um weitere Belege zu finden, die für den 3. Mechanismus sprechen wurde auch der Einfluss einiger anderer Substanzen auf die Stabilität von Galvinoxylen untersucht. Dazu wurden Lösungen von Radikal **31** (1 mM in Toluol) mit je etwa 13 % einer weiteren Substanz hergestellt und unter den gleichen Bedingungen wie unter Abschnitt 3.2.4.2 am X-Band-Spektrometer vermessen.

Die Zugabe von p-Chloranil und Benzophenon führte nicht zu einer Stabilisierung von **31**. Beide Substanzen sind sterisch anspruchsvoll und könnten beispielsweise durch π - π -Wechselwirkungen mit **31** wechselwirken und so einen sterischen Schutz des Radikals bewirken. Dies wurde allerdings nicht beobachtet, was den ersten potentiellen Mechanismus

weiter entkräftet. Phenol und 2,6-Di-*tert*-Butylphenol als aromatische, zur Wasserstoffbrückenbindung fähige Substanzen haben *indirekt* zu einer Stabilisierung geführt. DC-Untersuchungen haben gezeigt, dass sowohl Phenol als auch 2,6-Di-*tert*-Butylphenol mit **31** unter der Bildung von **31-H** reagieren. **31-H** ist demnach in diesen Mischungen das eigentlich stabilisierende Agens. Diese Untersuchung zeigt auch, dass phenolische Substanzen Wasserstoff auf Galvinoxyle übertragen können. Es ist davon auszugehen, dass es auch zwischen Galvinoxylen und Hydrogalvinoxylen zu einer ständigen Übertragung eines Wasserstoffatoms kommt. Da dabei aber die Gesamtmenge an Radikal erhalten bleibt, macht sich dies nicht durch eine Reduktion der Signalintensität bemerkbar. Diese Beobachtung unterstützt die dritte Theorie zum Mechanismus der Stabilisierung Galvinoxylen: Hydrogalvinoxyl überträgt ein Wasserstoffatom auf Galvinoxyl/Sauerstoff-Addukte. Es wird dabei selbst zum Radikal oxidiert und gleicht so Galvinoxylverluste aus.

3.2.4.4 Einfluss des Lösungsmittels auf die Radikalstabilität

X-Band-EPR-Messungen von **18** (Sigma Aldrich; *Abbildung 44*) in unterschiedlichen Lösungsmitteln zeigen einen starken Einfluss des Lösungsmittels auf die Stabilität des Radikals.

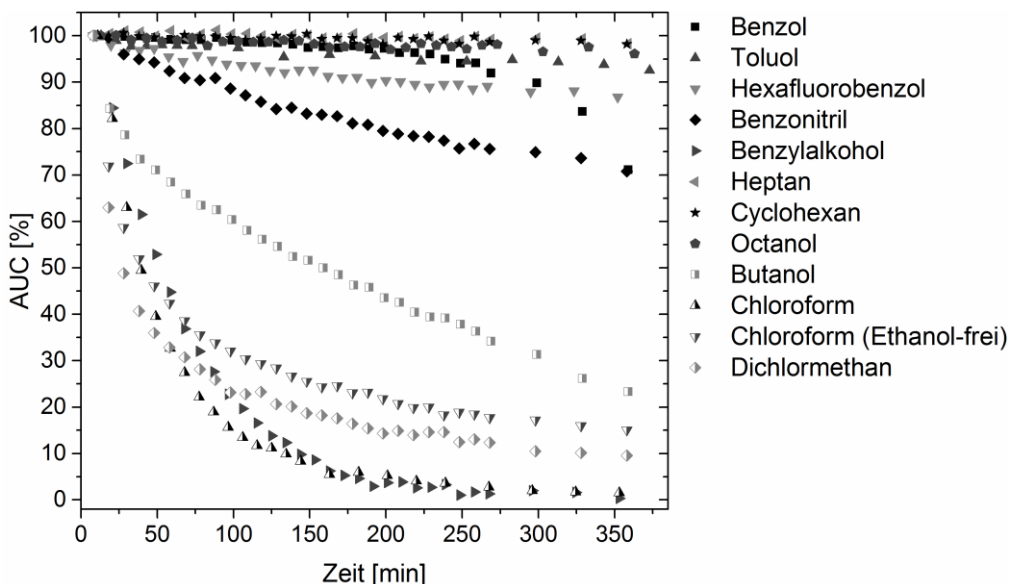


Abbildung 44 Stabilität von **18** in unterschiedlichen Lösungsmitteln ($c_{\text{Start}} = 1 \text{ mM}$). Die AUC wurde durch doppelte Integration der erhaltenen EPR-Spektren bestimmt.

Auf Grundlage der in *Abbildung 44* gezeigten Ergebnisse können folgenden Schlussfolgerungen gezogen werden:

- (1) Der Einfluss der Sauerstofflöslichkeit in den Lösungsmitteln auf die Stabilität von **18** ist vernachlässigbar. Chloroform und Cyclohexan lösen beispielsweise beide etwa 2.4 mM Sauerstoff ($0.213 \text{ bar O}_2, 20 \text{ °C}$)¹¹⁴, aber die Stabilität von **18** ist völlig unterschiedlich. Das gleiche gilt für Octanol und Butanol. Beide lösen etwa gleich viel Sauerstoff (1.5 mM bzw. 1.8 mM bei 0.213 bar O_2 und 20 °C). Die Stabilität von **18** in Octanol ist ausgezeichnet. In Butanol hingegen kommt es innerhalb weniger Stunden zu einem fast vollständigen Abbau.
- (2) Mit sinkender Polarität bzw. steigender Lipophilie steigt die Stabilität. **18** zeigt innerhalb von 6 h kaum Degradation in wenig polaren oder unpolaren Lösungsmitteln wie Heptan, Cyclohexan, Toluol und Octanol. In polarerer Lösungsmitteln wie Butanol, Chloroform, Dichlormethan wird **18** dagegen sehr schnell abgebaut.

Lösungen von **18** ($c \sim 1 \text{ mM}$) in Toluol, Heptan, Octanol, Butanol, Benzylalkohol und Dichlormethan wurden auch mittels ESI-MS im Verlauf mehrerer Tage auf die Entstehung von Abbauprodukten hin untersucht. Dafür wurden die Lösungen bei Raumtemperatur unter Atmosphärenluft gelagert. Nach einem Tag konnte in Toluol, Butanol, Benzylalkohol und Dichlormethan **18** nicht mehr nachgewiesen werden. In Heptan und Octanol hingegen war **18** nach einem Tag noch nachweisbar, was mittels EPR-Spektroskopie bestätigt werden konnte. Nach drei Tagen war **18** auch in Heptan vollständig abgebaut, während in Octanol noch ein EPR-Spektrum mit hoher Intensität gemessen werden konnte. Sogar nach 5 Tagen war in der Octanol-Lösung noch ein EPR-Spektrum von **18** messbar. Die Analyse der Abbauprodukte ergab einen deutlichen Unterschied zwischen protischen und aprotischen Lösungsmitteln. In aprotischen Lösungsmitteln waren identifizierbare Abbauprodukte 2,4-Di-*tert*-Butyl-4-hydroxybenzaldehyd, 2,6-Di-*tert*-Butyl-1,4-benzochinon und weitere Sauerstoffaddukte wie das Hydro- oder Endoperoxid. In protischen Lösungsmitteln war das Hauptabbauprodukt das Hydrogalvinoxyl **18-H**. **18-H** war auch das Hauptprodukt in Octanol nach vollständigem Verlust des EPR-Signals von **18**. Aus diesen Beobachtungen folgt, dass die Reaktionsgeschwindigkeit mit Sauerstoff mit steigender Lipophilie des Lösungsmittels sinkt und in protischen Lösungsmitteln praktisch keine Reaktion mit Sauerstoff stattfindet.

Die folgenden mechanistischen Annahmen können diese Beobachtungen erklären: In lipophilen Lösungsmitteln wird die Interaktion zwischen Galvinoxyl und Hydrogalvinoxyl durch intermolekulare Wechselwirkungen gefördert, da beide Substanzen kaum solvatisiert vorliegen. Sie formen transiente Komplexe durch polare Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen. Dadurch werden intermolekulare Reaktionen wie die Übertragung eines Wasserstoffatoms oder Elektrons gefördert. Mit zunehmender Lipophile

des Lösungsmittels erhöht sich somit die Wahrscheinlichkeit, dass Hydrogalvinoxyl durch Wasserstoffübertragung zu Galvinoxyl oxidiert wird und so Verluste durch dessen Degradation ausgleicht. Hydrogalvinoxyl ist somit eine Art von „Radikal-Reservoir“. Dies unterstützt erneut die dritte Theorie zur Stabilisierung von Galvinoxylen, die in Abschnitt 3.2.4.2 erläutert wurde. Die Abhängigkeit des Wasserstofftransfers zwischen phenolischen Substanzen und Galvinoxyl von der Polarität aprotischer Lösungsmittel wurde bereits in früheren Studien beobachtet.¹¹⁵ In protischen Lösungsmitteln ist die Wasserstoffübertragung offensichtlich wesentlich schneller als die Reaktion mit Sauerstoff. Es liegt nahe, dass das Lösungsmittel selbst an der Übertragung des Wasserstoffatoms beteiligt ist, was aber nicht weitergehend untersucht wurde.

Diese Ergebnisse und mechanistischen Erklärungen sind für die Anwendung von Galvinoxyl und Galvinoxylderivaten von praktischer Bedeutung. Für die Anwendung als Spin-Sonden in wässriger Umgebung einschließlich *in vivo* sollten Galvinoxyle in einem möglichst lipophilen Medium mit neutralem pH-Wert „verpackt“ werden. Möglichkeiten wären hier beispielsweise lipophile (*in situ*-)Gele oder Micro- bzw. Nanokapseln mit einem lipophilen Kern. Dadurch würde das Radikal zugleich vor der reduktiven Umgebung *in vivo* geschützt. Weiterhin sollte das Galvinoxylderivat mindestens 50 % des entsprechenden Hydrogalvinoxyls enthalten. Octanol hat sich als besonders gut geeignetes Lösungsmittel herausgestellt. Unter diesen Bedingungen können Galvinoxyle bis zu mehrere Tagen als Sauerstoffsonden verwendet werden.

3.3 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Synthese zwei neuer Galvinoxylderivate gezeigt und deren Eigenschaften untersucht. Adamantylgalvinoxyl **31** konnte mit hoher Reinheit gewonnen werden. Die Adamantyl-Gruppen führen zu einer Vergrößerung der Linienbreite des EPR-Spektrums durch unaufgelöste „Long-range“-Kopplungen des freien Elektrons mit den Protonen der Adamantyl-Gruppen. Die Hyperfeinkopplungen mit den aromatischen Protonen und des Methin-Protons werden durch den Austausch der Alkylgruppen nicht beeinflusst. Das vollständig deuterierte Galvinoxyl-Derivat **26** wurde aus deuterierten Edukten synthetisiert. Die Synthese mittels H/D-Austausch war nicht möglich. Das EPR-Spektrum zeigt ein komplexes Muster durch die Überlagerung und teilweise Auflösung von Hyperfeinkopplungen mit den Deuteriumatomen. Unter sauerstofffreien Bedingungen sind die einzelnen Signale sehr schmal, was z.B. vorteilhaft bei der Verwendung als sauerstoff-

sensitive Sonde ist. Des Weiteren wurde die Sauerstoffsensitivität von **26** und **18** untersucht. Beide Radikale zeigen eine gute Sensitivität im physiologischen Bereich und sind daher potentiell als Spinsonden für die EPR-Oximetrie geeignet. Zum Schluss wurden der Stabilisierungsmechanismus von Galvinoxylen durch Hydrogalvinoxyl und der Einfluss des Lösungsmittels auf die Stabilität von Galvinoxylen untersucht. Aufgrund der Ergebnisse erscheint es plausibel, dass Galvinoxyl nicht direkt gegen die Reaktion mit Sauerstoff stabilisiert wird. Stattdessen wird Galvinoxyl kontinuierlich aus Hydrogalvinoxyl durch Wasserstoffübertragung auf Galvinoxylabbauprodukte nachgebildet. Auch die Auswahl des Lösungsmittels beeinflusst die Galvinoxylstabilität maßgeblich. Um eine hohe Stabilität zu erzielen, sollte das Lösungsmittel möglichst lipophil sein. Wenn es zudem auch noch protisch ist wie beispielsweise 1-Octanol, wird die Degradation des Radikals durch Reaktion mit Sauerstoff zurückgedrängt.

3.4 Experimenteller Teil

3.4.1 Synthese

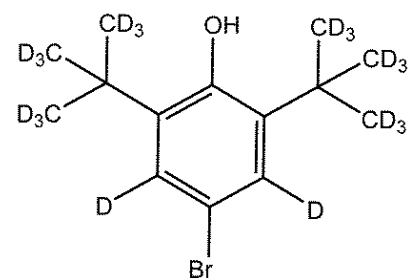
3.4.1.1 Materialien und allgemeine Methoden für die Synthese und analytische Charakterisierung

Siehe Abschnitt 6.

3.4.1.2 Synthesevorschriften

4-bromo-2,6-bis[2-(²H₃)methyl(1,1,1,3,3,3-²H₆)propan-2-yl](²H₂)phenol (**25**).

4-Bromophenol-2,3,5,6-D₄ (1 g, 5.64 mmol) wurde in einem Glasdruckgefäß mit *tert*-Butanol-D₁₀ (2.66 ml, 28.24 mmol) und D₂SO₄ (150 µl, 2.66 mmol) gemischt. Das Gefäß wurde fest verschlossen und unter Rühren für 3 h auf 160 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionsmischung in CHCl₃ gelöst (50 ml) und



nacheinander mit Wasser und konz. NaCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel 60 (0.04 – 0.063 mm) mit Heptan und EtAc (10:0 bis 9:1) als Eluent gereinigt. Das Produkt wurde isoliert. Alle anderen Fraktionen, die Edukt oder monosubstituiertes Edukt enthielten wurden zur Trockne eingengt und die Reaktion wurde nochmals durchgeführt. Die Reaktion wurde insgesamt viermal durchgeführt.

Summenformel: C₁₄HD₂₀BrO

Molmasse: 305.35 g/mol

Ausbeute: 500 mg (29 %)

Aussehen: blassgelber Feststoff

R_f-Wert: 0.43 (Heptan)

Schmelzpunkt: 74 - 76 °C

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.24 (s), 5.14 (s), 1.37 (s)

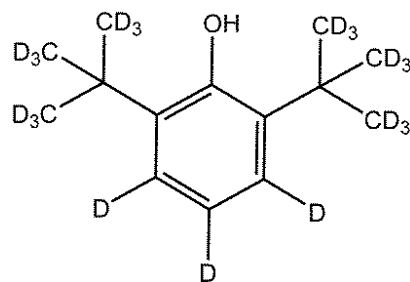
¹³C NMR: (101 MHz, CDCl₃) δ 152.89 , 138.06 , 129.46 - 125.73 (m), 112.36 , 34.75, 30.09 - 27.86 (m)

HRMS (ESI): berechnet für C₁₄D₂₀BrO [M - H]⁻ 303.196; gefunden 303.196

Deuterierungsgrad: 97.7 % (ESI-MS)

Bis[2-(²H₃)methyl(1,1,1,3,3,3-²H₆)propan-2-yl](²H₃)phenol (23**).**

Methode A (H/D-Austausch). 2,6-di-tert-butylphenol (1.40 g, 6.79 mmol) wurde in einer Hydrierapparatur in D₂O (60 ml) suspendiert. 1 % Pd/C (1.40 g, 100 wt%) und 1 % Pt/C (1.40 g, 100 wt%) wurden hinzugefügt. Die Hydrierapparatur wurde fest verschlossen. Der Reaktionsansatz wurde unter Wasserstoffatmosphäre (1 atm) bei



180 °C für 2 d gerührt. Nach dem Abkühlen wurde der Katalysator abfiltriert. Katalysator und Hydrierapparatur wurden mehrfach mit CHCl₃ gewaschen. Die wässrige Phase wurde abgetrennt und mehrfach mit CHCl₃ extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und zur Trockne unter Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit Pentan und DCM (10:0 bis 8:2) als Eluent gereinigt.

Methode B (Synthese aus deuterierten Edukten). **25** (456 mg, 1.49 mmol) wurde in einer Hydrierapparatur in DCM/MeOH (55 ml, 2:1) gelöst. 5 % Pd/C (230 mg, 50 wt%) wurden hinzugefügt. Die Mischung wurde unter Deuteriumatmosphäre (8 bar) für 7 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde der Katalysator abfiltriert und mehrfach mit DCM gewaschen. Die vereinigten org. Phasen wurden zur Trocken unter Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit Heptan und EtAc (10:0.2) als Eluent gereinigt.

Summenformel: C₁₄HD₂₁O

Molmasse: 227.46 g/mol

Ausbeute

Methode A: 435 mg (28 %)

Methode B: 340 mg (88 %)

Aussehen: farblose Flüssigkeit

R_f-Wert: 0.38 (Heptan/CHCl₃, 9:1)

¹H NMR: (500 MHz, CDCl₃) δ 7.17 (s,), 6.83 (s), 5.17 (s), 1.45 - 1.38 (m)

¹³C NMR: (126 MHz, CDCl₃) δ 153.84, 135.80, 124.72, 124.48, 124.24, 119.38, 119.10, 118.86, 77.31, 77.19, 76.99, 76.67, 33.55, 29.38, 29.19, 29.00

HRMS (ESI): berechnet für C₁₄D₂₁O [M - H]⁻ 226.292; gefunden 226.296

Deuterierungsgrad

Methode A: 93 % (NMR) (*tert.* butyl 95 % D, ortho 69 % D, para 96 % D)

Methode B: 97.7 % (ESI-MS)

4-((4-hydroxy-3,5-bis[2-(²H₃)methyl(1,1,1,3,3,3-²H₆)propan-2-yl](2,6-²H₂)phenyl)(²H₂)methyl)-2,6-bis[2-(²H₃)methyl(1,1,1,3,3,3-²H₆)propan-2-yl](²H₂)phenol (20).

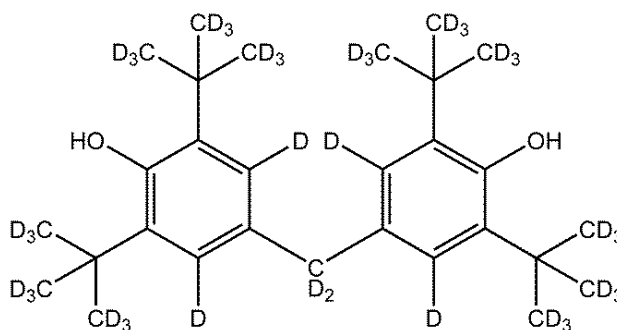
Methode A (H/D-Austausch). 4,4'-

Methylenebis(2,6-di-*tert*-butylphenol)

(1.40 g, 3.30 mmol) wurde in einer Hydrierapparatur in D₂O (60 ml) suspendiert. 1 % Pd/C (1.40 g, 100 wt%) und 1 % Pt/C (1.40 g, 100 wt%) wurden hinzugefügt. Die Hydrierapparatur wurde

fest verschlossen und der Reaktionsansatz wurde unter H₂-Atmosphäre (1 atm) bei 180 °C für 3 d gerührt. Nach dem Abkühlen wurde der Katalysator abfiltriert. Katalysator und Hydrierapparatur wurden mehrfach mit CHCl₃ gewaschen. Die wässrige Phase wurde abgetrennt und mehrfach mit CHCl₃ extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und zur Trockne unter Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit Heptan und CHCl₃ (8:2) als Eluent gereinigt.

Methode B (Synthese aus deuterierten Edukten). **23** (197 mg, 0.867 mmol) und Paraformaldehyd-D₂ (111 mg, 3.464 mmol) wurden in 2 ml Isopropanol-D₁ und 250 µl D₂O unter Argonatmosphäre gelöst. Die Mischung wurde unter Rühren auf 35 °C erwärmt und



100 μ l NaOD (40 % in D₂O) wurden hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde für 40 min gerührt. Während dieser Zeit änderte sich die Farbe des Reaktionsgemisches von farblos zu tief rot. Danach wurde der Reaktionsansatz mit D₂SO₄ angesäuert bis die Farbe der Mischung auf gelb umschlug. Das Reaktionsgemisch wurde mit DCM verdünnt. Die org. Phase wurde einmal mit Wasser gewaschen. Die wässrige Phase wurde abgetrennt und noch mehrfach mit DCM extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und unter Vakuum zur Trockne eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit Heptan und CHCl₃ (8:2) als Eluent gereinigt.

Summenformel: C₂₉H₂D₄₂O₂

Molmasse: 466.93 g/mol

Ausbeute

Methode A: 280 mg (19 %)

Methode B: 115 mg (57 %)

Aussehen: farbloser bis gelblicher Feststoff

R_f-Wert: 0.39 (Heptan/CHCl₃, (8:2))

Schmelzpunkt: 151 - 152 °C

¹H NMR: (500 MHz, CDCl₃) δ 7.03 (s), 5.03 (s), 3.76 (s), 1.38 (s)

¹³C NMR: (126 MHz, CDCl₃) δ 151.87, 135.59, 131.75, 125.17, 124.99, 124.80, 40.56, 40.43, 40.33, 40.27, 33.66, 33.59, 29.84, 29.68, 29.54, 29.38, 29.23, 29.07, 28.94, 28.78

HRMS (ESI): berechnet für C₂₉H₁D₄₂O₂ [M - H]⁻ 465.591; gefunden 465.599

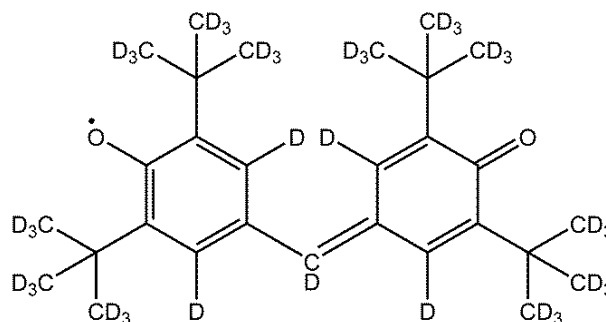
Deuterierungsgrad

Methode A: 53 % (NMR) (*tert.* butyl 56 %, ortho 5 %, Methylenebrücke 95 %).

Methode B: 96 % (ESI-MS)

[4-((3,5-bis[2-(2H3)methyl(1,1,1,3,3,3-2H6)propan-2-yl]-4-oxo(2,6-2H2)cyclohexa-2,5-dien-1-ylidene)(2H)methyl)-2,6-bis[2-(2H3)methyl(1,1,1,3,3,3-2H6)propan-2-yl](3,5-2H2)phenyl]oxidanyl (26).

K₃Fe(CN)₆ (246 mg, 0.748 mmol) wurde unter Argonatmosphäre in D₂O (6.5 ml) gelöst. 40 % NaOD in D₂O (1.3 ml) und Benzol-D₆ (6ml) wurden hinzugefügt. **20** (97 mg, 0.208 mmol) wurde in Benzol-D₆ (15 ml) gelöst und tropfenweise unter



Argonatmosphäre zur Reaktionsmischung hinzugefügt. Danach wurde das Reaktionsgemisch für weitere 60 min bei Raumtemperatur gerührt. Die org. Phase wurde abgetrennt, mit Wasser gewaschen bis die wässrige Phase farblos war und dann über MgSO_4 getrocknet. Das LM wurde unter Vakuum entfernt. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

Summenformel: $\text{C}_{29}\text{D}_{41}\text{O}_2$

Molmasse: 462.90 g/mol

Ausbeute: 97 mg (100 %)

Aussehen: dunkelblauer Feststoff

Rf-Wert: 0.18 (Heptan/EtAc, 10:0.2)

Schmelzpunkt: 150 - 152 °C

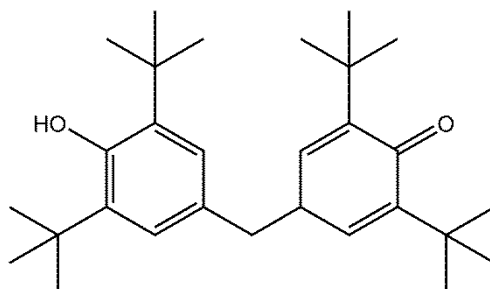
HRMS (ESI): berechnet für $\text{C}_{29}\text{HD}_{41}\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 463.576; gefunden 463.576

IR (ATR): 3619, 3550 - 3208, 3114, 2929, 2205, 2132, 2088, 2069, 2047, 1655, 1606, 1564, 1529, 1490, 1409, 1319, 1280, 1254, 1209, 1159, 1131, 1061, 1047, 1008, 958, 905, 780, 742 cm^{-1}

Deuterierungsgrad: 98 % (ESI-MS)

2,6-di-tert-butyl-4-[(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)methyl]cyclohexa-2,5-dien-1-on (18-H).

4,4'-Methylenebis(2,6-di-tert-butylphenol) (5 g, 11.77 mmol) wurde in Toluol (12 ml) gelöst. P-Chloranil (2.89 g, 11.77 mmol) wurde hinzugefügt und die Mischung wurde unter Rühren für 2 h unter Reflux gekocht. Nach dem Abkühlen wurde das Präzipitat abfiltriert und mit Acetonitril gewaschen.



Die vereinigten org. Phasen wurden unter Vakuum zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde aus Acetonitril umkristallisiert um das saubere Produkt zu erhalten.

Summenformel: $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_2$

Molmasse: 424.67 g/mol

Ausbeute: 3.5 g (70 %)

Aussehen: goldene Nadeln

Rf-Wert: 0.15 (Heptan/EtAc, 10:0.2)

Schmelzpunkt: 155 - 157 °C

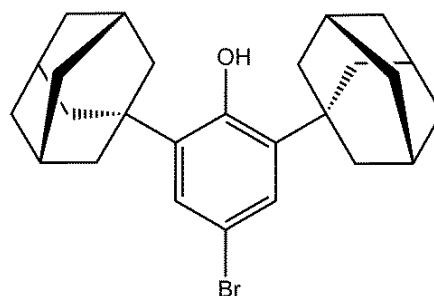
¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.61 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.36 (s, 2H), 7.16 (s, 1H), 7.01 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 5.55 (s, 1H), 1.48 (s, 18H), 1.33 (d, *J* = 2.7 Hz, 18H)

¹³C NMR: (126 MHz, CDCl₃): δ 186.40, 155.45, 148.74, 146.85, 144.42, 136.42, 135.61, 129.90, 128.13, 128.10, 127.59, 35.44, 34.92, 34.42, 30.24, 29.65, 29.52

HRMS (ESI): berechnet für C₂₉H₄₅O₂ [M + H]⁺ 423.326; gefunden 423.325

2,6-bis(adamantan-1-yl)-4-bromophenol (28).

4-Bromophenol (1.5 g, 8.67 mmol) wurde in einem Glasdruckgefäß mit 1-Adamantanol (2.64 g, 17.34 mmol) und 1-Bromoadamantan (392 mg, 1.82 mmol) gemischt. Das Gefäß wurde dicht verschlossen und für 3 h auf 210 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Rohprodukt mittels MPLC und Heptan als Eluent gereinigt.



Summenformel: C₂₆H₃₃BrO

Molmasse: 441.45 g/mol

Ausbeute: 1.18 g (30 %)

Aussehen: weißer Feststoff

R_f-Wert: 0.35 (Heptan)

Schmelzpunkt: > 260 °C

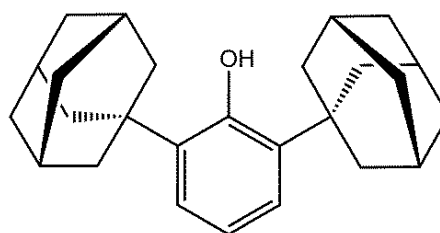
¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.19 (s, 2H), 5.32 (s, 1H), 2.10 (s, 18H), 1.78 (s, 12H)

¹³C NMR: (126 MHz, CDCl₃) δ 153.58, 138.10, 127.75, 113.26, 77.24, 76.99, 76.73, 41.01, 36.94, 36.86, 28.93

HRMS (ESI): berechnet für C₂₆H₃₃BrO [M]⁺ 440.171; gefunden 440.170

2,6-bis(adamantan-1-yl)phenol (29).

28 (200 mg, 0.453 mmol) wurde in einer Hydrierapparatur in DCM/MeOH (1:1, 80 ml) gelöst. 5 % Pd/C (100 mg, 50 wt%) wurden hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde unter H₂-Atmosphäre (8 bar) über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der



Katalysator wurde abfiltriert und mehrfach mit DCM gewaschen. Die org. Phase wurde unter

Vakuum zur Trockne eingengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit Heptan als Eluent gereinigt.

Summenformel: C₂₆H₃₃O

Molmasse: 362.56 g/mol

Ausbeute: 1.47 g (90 %)

Aussehen: weißer Feststoff

R_f-Wert: 0.32 (Heptan)

Schmelzpunkt: 255 - 258 °C

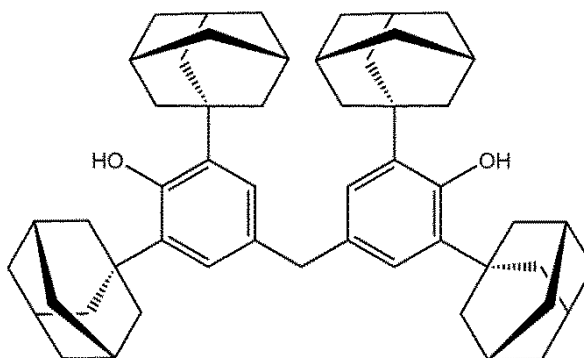
¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.12 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 6.87 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.35 (s, 1H), 2.22 - 2.04 (m, 18H), 1.80 (s, 12H)

¹³C NMR: (126 MHz, CDCl₃) δ 154.57, 135.92, 124.71, 119.92, 76.67, 41.21, 36.87, 29.05

HRMS (ESI): berechnet für C₂₆H₃₂O [M-H]⁻ 361.254; gefunden 361.252

2,6-bis(adamantan-1-yl)-4-([3,5-bis(adamantan-1-yl)-4-hydroxyphenyl]methyl)phenol (30).

29 (295 mg, 0.814 mmol) wurde in Ameisensäure (3.5 ml) suspendiert. Paraformaldehyd (24 mg, 0.814 mmol) wurde hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde unter Rühren für 2.5 h zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 2 ml Wasser hinzugefügt und das Präzipitat abfiltriert. Der Rückstand wurde in CHCl₃ gelöst und mit Wasser neutral gewaschen. Die org. Phase wurde dann über MgSO₄ getrocknet und das LM im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit Heptan und CHCl₃ als Eluent gereinigt (9:1 bis 0:10).



Summenformel: C₅₃H₆₈O₂

Molmasse: 737.13 g/mol

Ausbeute: 250 g (83 %)

Aussehen: blassgelber Feststoff

R_f-Wert: 0.06 (Heptan)

Schmelzpunkt: > 330 °C (Zersetzung)

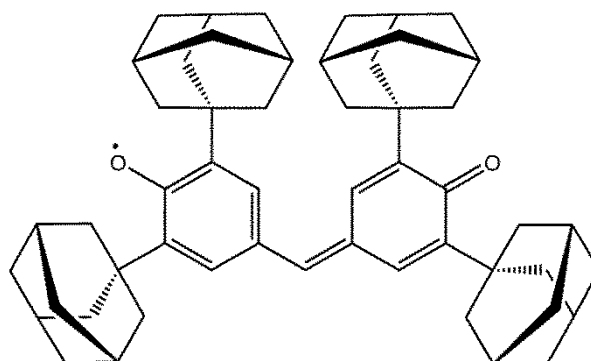
^1H NMR: (500 MHz, CDCl_3): δ 7.00 (s, 4H), 5.19 (s, 2H), 3.86 (s, 2H), 2.17 - 2.06 (m, 36H), 1.79 (s, 24H)

^{13}C NMR: (126 MHz, CDCl_3): δ 152.55, 135.63, 132.05, 125.26, 41.47, 41.34, 37.06, 36.78, 29.09

HRMS (ESI): berechnet für $\text{C}_{53}\text{H}_{67}\text{O}_2$ $[\text{M}-\text{H}]^+$ 735.514; gefunden 735.515

[2,6-bis(adamantan-1-yl)-4-([3,5-bis(adamantan-1-yl)-4-oxocyclohexa-2,5-dien-1-ylidene] methyl)phenyl]oxidanyl (31).

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (129 mg, 0.391 mmol) wurde in Wasser (5 ml) gelöst. 40 % NaOH in Wasser (1 ml) und Benzol (15 ml) wurden hinzugefügt. Unter Argonatmosphäre wurde **30** (80 mg, 0.109 mmol) gelöst in Benzol (60 ml) langsam hinzugegossen. Danach wurde der



Reaktionsansatz für weitere 60 min bei RT gerührt. Während dieser Zeit änderte sich die Farbe der Reaktionsmischung von gelb zu rötlich/dunkelbraun. Die org. Phase wurde abgetrennt und mit Wasser gewaschen bis die wässrige Phase farblos war. Die org. Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und unter Vakuum zur Trockne eingedunstet. Das Produkt wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

Summenformel: $\text{C}_{53}\text{H}_{65}\text{O}_2$

Molmasse: 734.10 g/mol

Ausbeute: 100 mg (125 %, Überschuss durch Benzolrückstand in Produkt)

Aussehen: dunkelblauer Feststoff

R_f -Wert: 0.31 (Heptan/ CHCl_3 , 8:2)

Schmelzpunkt: ≥ 250 °C (Zersetzung)

HRMS (ESI): berechnet für $\text{C}_{53}\text{H}_{65}\text{O}_2$ $[\text{M}]^+$ 733.499; gefunden 733.497

IR (ATR): 3004, 2966, 2898, 2845, 2675, 2655, 1573, 1510, 1453, 1341, 1312, 1253, 1224, 1216, 1204, 1164, 1104, 1024, 983, 908, 827, 751 cm^{-1}

3.4.2 EPR-Messungen

Alle EPR-Experimente wurden mit einem L-Band (1.3 GHz) oder X-Band (9.30 - 9.55 GHz) Spektrometer der Firma Magnostech (Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die Messeinstellungen werden bei den jeweiligen Experimenten angegeben.

Die Auswertung der EPR-Spektren und deren Simulation wurde mit OriginPro2016G (Additive, Friedrichsdorf, Deutschland) bzw. mit Matlab (The MathWorks, Inc., Natic, USA) unter Verwendung von EasySpin⁶⁷ durchgeführt.

3.4.2.1 EPR-Messungen bei definiertem Sauerstoffgehalt

Probenpräparation und EPR-Messung. Messungen mit definiertem Sauerstoffgehalt wurden in 4 ml-Glasvials durchgeführt. Für Messungen in Toluol oder Octanol mit 0 % O₂-Gehalt wurde 1 ml der Probe ($c_{\text{Radikal}} = 1 \text{ mM}$) für 3 min (Flussrate 0.8 l/min) mit reinem Stickstoff begast. Dafür wurde der Stickstoff über eine Kanüle für den Einlass und eine Kanüle für den Auslass durch ein Septum in das Glasvial ein- bzw. ausgeleitet. Um Proben mit einem definierten Sauerstoffgehalt zwischen 0.5 % und 21 % herzustellen wurde je 1 ml Probelösung ($c_{\text{Radikal}} = 1 \text{ mM}$ in Octanol) auf die gleiche Weise mit definierten Sauerstoff/Stickstoff-Mischungen begast. Der Sauerstoffgehalt wurde mit Hilfe eines Gasmischers (Dräger, Lübeck, Deutschland) eingestellt und mittels einer Sauerstoffsonde (Oxygen Microsensors Sensortyp PSt1, PreSens, Regensburg, Deutschland) gemessen. Die EPR-Messungen wurden am L-Band Spektrometer bei RT ohne weitere Temperaturkontrolle direkt nach dem Begasen durchgeführt. Danach wurde noch einmal der Sauerstoffgehalt bestimmt. Die Messeinstellungen variieren je nach Radikal und sind in *Tabelle 20* angegeben. Alle Messparameter wurden so gewählt, dass die EPR-Spektren nicht beeinflusst wurden.

Tabelle 20 Geräteparameter für die EPR-Messungen.

Mikrowellenleistung	0.42 mW
Modulationsamplitude	0.0011 - 0.0113 mT
Modulationsfrequenz	100 kHz
Messspanne	0.75 - 2.00 mT
Messzeit	600 - 1200 s
Messpunkte	1024

Auswertung. Die erhaltenen EPR-Spektren wurden mit Matlab unter Verwendung der EasySpin⁶⁷-Funktion „Garlic“ simuliert. Die Peak-zu-Peak-Linienbreiten wurden dabei entweder auf Grundlage einer Gauss- oder Lorentz-Funktion bestimmt. Die g-Faktoren

wurden nicht bestimmt und für die Simulationen auf 2.0023 festgelegt. Um die Sauerstoffsensitivität zu ermitteln wurde die Linienbreite (ΔB_{pp}) in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration dargestellt und die Steigung der erhaltenen Geraden durch linearere Regression ermittelt. Für **26** wurde zusätzlich die Sauerstoffsensitivität als Funktion der Spektrenform bestimmt. Dazu wurden die maximale Amplitude des Signals und die Amplitude im Zentrum des Spektrums ermittelt. Der nach folgender Gleichung ermittelte Faktor F wurde in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration dargestellt.

$$F = \frac{\text{Amplitude(max)}}{\text{Amplitude(Zentrum)}}$$

3.4.2.2 Stabilisierung von **31** durch **31-H**

Probenpräparation und EPR-Messung. Um den Einfluss von **31-H** auf die Stabilität von **31** zu bestimmen, wurden Lösungen von **31** in Toluol mit steigendem Anteil (0 - 60 %, *Tabelle 21*) an **31-H** hergestellt. Dazu wurde jeweils direkt vor der Messung **31** in Toluol ($c = 2.0$ mM) gelöst. Zu dieser Lösung wurde eine bestimmte Menge einer **30**-Lösung in Toluol (Konzentration variierend) und reines Toluol hinzu pipettiert, sodass die Endkonzentration von **31** nach Ablauf der Reaktion 1 mM betrug. Die Proben wurden sofort in eine 50 μ l-Kapillare gefüllt, die Enden der Kapillare mittels eines Bunsenbrenners verschlossen und die EPR-Messungen mit den in *Tabelle 22* aufgeführten Einstellungen bei RT ohne weitere Temperaturkontrolle durchgeführt.

Tabelle 21 Zusammensetzung der Proben.

31-H		31		30		Toluol	
[%]	c [mM]	v [μ l]	c [mM]	v [μ l]	c [mM]	v [μ l]	
0	-	100	2.0	-	-	100	
8	0.09	100	2.0	30	0.2	58	
14	0.17	100	2.0	50	0.2	30	
21	0.26	100	2.0	50	0.3	20	
33	0.50	100	2.0	25	1.0	25	
50	1.00	100	2.0	20	2.0	-	
60	1.50	100	3.0	25	3.0	25	

Tabelle 22 Geräteparameter für die EPR-Messungen.

Mikrowellenleistung	3.162 mW
Modulationsamplitude	0.05 mT
Modulationsfrequenz	100 kHz
Messspanne	6.76 mT
Messzeit je Messung	60 s, alle 9 - 29 min über 6 - 22 h
Messpunkte	4096

Auswertung. Die Fläche unter der Kurve (AUC) jedes Spektrums wurde durch doppelte Integration berechnet. Die AUC der ersten Messung jeder Probe wurde als 100 % angenommen und der relative Abfall der AUC gegen die Zeit dargestellt.

3.4.2.3 Stabilisierung von **31** durch andere Substanzen

Probenpräparation. Vor jeder Messung wurde eine frische Lösung von **31** (2 mM in Toluol) hergestellt. 100 μ l dieser Lösung wurden mit 100 μ l einer 0.3 mM Lösung der jeweiligen Substanz in Toluol gemischt. Ein Aliquot dieser Mischung wurde sofort in eine 50 μ l-Kapillare überführt. Beide Enden der Kapillare wurden mit Hilfe eines Bunsenbrenner sofort verschlossen und die Messung am X-Band-Spektroskop gestartet.

Für *Geräteeinstellungen* und *Auswertung*, siehe Abschnitt 3.4.2.2.

3.4.2.4 Bestimmung der Stabilität von Galvinoxyl in unterschiedlichen Lösungsmitteln

Probenpräparation für die EPR-Messung. Für die EPR-Messungen wurde Galvinoxyl (**18**) in dem entsprechenden Lösungsmittel gelöst ($c = 1$ mM), in eine 50 μ l-Kapillare gefüllt und die Enden der Kapillare mit Hilfe eines Bunsenbrenner zugeschmolzen. Die EPR-Messung wurde direkt nach der Probenpräparation gestartet.

Geräteparameter für die EPR-Messungen. Alle Messungen wurden am X-Band Spektrometer bei RT ohne weitere Temperaturkontrolle durchgeführt (Einstellungen, siehe Abschnitt 3.4.2.2).

Auswertung der EPR-Messung. Siehe Abschnitt 3.4.2.2.

3.4.3 ESI-MS-Messungen

Für die ESI-MS-Messungen wurde Galvinoxyl in unterschiedlichen Lösungsmitteln gelöst und in 4 ml-Braunglasvials unter Atmosphärensauerstoff gelagert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden ESI-MS-Spektren (LCQ classic, Thermo Finnigan, San Jose, California, USA) der Proben gemessen.

3.4.4 Bestimmung des 18-H-Gehalts von 18 mittels HPLC-Analyse

Probenpräparation. Galvinoxyl (**18**) wurde bei Sigma Aldrich erworben. Hydrogalvinoxyl (**18-H**) wurde wie im Abschnitt 3.4.1.2 beschrieben synthetisiert. Um die Prüflösung herzustellen wurde Galvinoxyl in einer Mischung aus MeOH und CHCl₃ (3:1) gelöst (c = 1 mM). Diese wurde sofort nach Herstellung mittels HPLC analysiert (Aufgabemenge: 10 µl). Für die **18-H**-Kalibrierkurve wurde eine **18-H** in MeOH gelöst (c = 1 mM). Durch anpassen der Aufgabemenge der Lösung wurde die Konzentration an **18-H** zwischen 0.3 mM bis 1.0 mM variiert.

Geräteparameter und Auswertung. Die HPLC-Analyse wurde an einer Anlage von Shimadzu (LC-10AD, SIL-HAT auto sampler; Kyoto, Japan) mit einer RP-18-Säule (3.5 µM, 3,9 x 100mm) der Firma Waters (Milford, MA, USA) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit einem UV-Vis-Detektor (SPD-M10A VP PDA) bei 399 und 430 nm. Die Flussrate betrug 0.5ml /min. Als Laufmittel wurde ein Gradient aus Wasser und Methanol gewählt. Zur Erstellung der **18-H**-Kalibrierkurve wurde jeweils die AUC des **18-H**-Signals bestimmt und gegen die aufgegebene Probenmenge aufgetragen. Die AUC des **18-H**-Peaks der Galvinoxylprobe wurde analog bestimmt und die Konzentration mittels der **18-H**-Kalibriergeraden bestimmt.

4 Triarylmethylradikale

4.1 Einleitung

4.1.1 Triarylmethylradikale

4.1.1.1 Das erste Triarylmethylradikal und daraus entstandene Tritylklassen

Das erste Triarylmethylradikal (auch Trityl oder TAM genannt) wurde bereits 1900 von Moses Gomberg entdeckt.¹¹⁶ Dieses sogenannte „Gomberg-Radikal“ (Abbildung 45) bildet den Grundstein der Substanzklasse der Tritylradikale. Aufgrund seiner Eigenschaften wird es nicht als Spin-Sonde verwendet. Beispielsweise dimerisiert es in Lösung^{117, 118}, reagiert zügig mit Sauerstoff unter der Bildung von Peroxiden^{116, 119} und hat aufgrund von Hyperfeinkopplungen mit den aromatischen Wasserstoffatomen ein eher kompliziertes EPR-Spektrum.

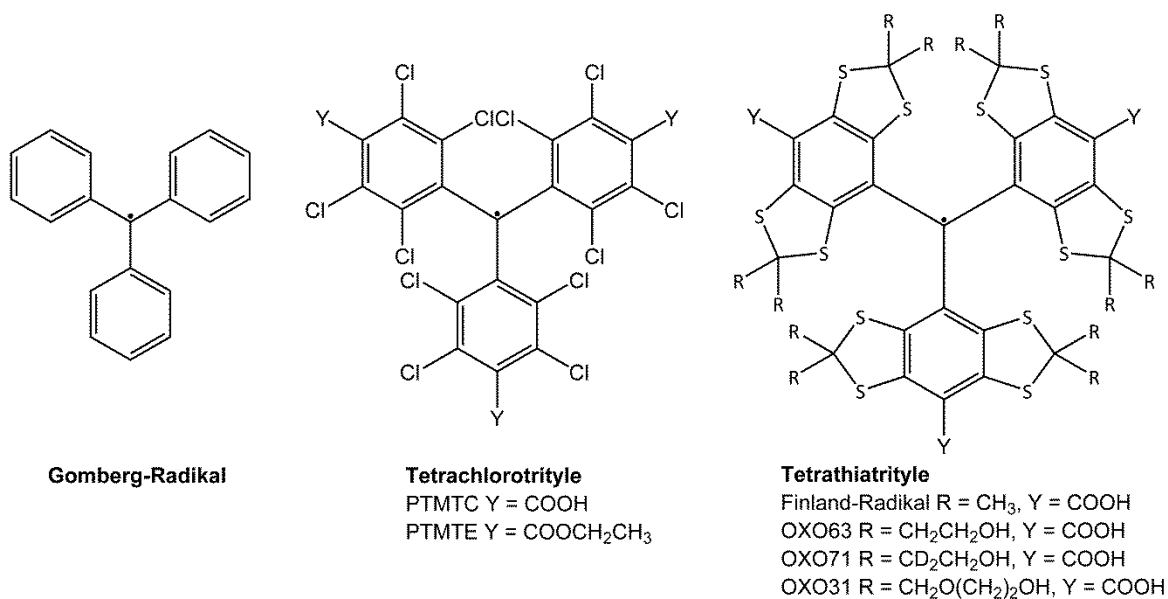


Abbildung 45 Molekülstruktur unterschiedlicher Triarylmethylradikale.

Um Radikale als (*in vivo*-)EPR-Spin-Sonden verwendet werden zu können, sollten diese chemisch stabil sein, eine ausreichend lange Halbwertszeit, eine geringe Toxizität aufweisen sowie ein möglichst einfaches EPR-Spektrum haben. Weiterhin sollte das EPR-Spektrum des Radikals durch die zu messende Größe, z.B. Sauerstoff oder pH-Wert, selektiv beeinflusst werden.²¹ Um diese Anforderungen zu erfüllen, wurden daher ausgehend vom Gomberg-Radikal weitere Triarylmethylradikale entwickelt.

Die für die EPR-Spektroskopie verwendeten Trityle können in zwei Klassen unterteilt werden: die *Tetrathiatrityle* und die *Tetrachlorotrityle* (Abbildung 45). Die Gruppe der chlorierten Tritylradikale wurde beginnend in den 1960er Jahren von Ballester et al. entwickelt.^{120, 121} Ein sehr bekanntes und ausführlich untersuchtes chloriertes Trityl ist **PTMTC**. Die Tetrathiatrityle wurden von Hafslund Nycomed Innovation AB (seit 2011 Teil der Takeda Pharmaceutical Company Limited) in den 1990er Jahren entwickelt.¹²²⁻¹²⁶ Ursprünglich wurden sie nicht als EPR-Sonden, sondern als Signalverstärker für das Magnetresonanztomographie (sog. „Overhauser enhanced MRI, OMRI) entwickelt. Bekannte Vertreter dieser Gruppe sind in *Abbildung 45* dargestellt.

4.1.1.2 Struktur, Stabilität und magnetische Eigenschaften der Tetrathia- und Tetrachlorotrityle

Strukturelle Anforderungen an Tetrathia- und Tetrachlorotrityle

Wie bereits erwähnt hat das Gomberg-Radikal ein kompliziertes EPR-Spektrum und ist vor allem in Lösung nicht ausreichend stabil, um selbst als Spin-Sonde in Frage zu kommen. Diese Eigenschaften lassen sich auf das Vorhandensein aromatischer Protonen zurückführen.

Um die Stabilität der Radikale zu verbessern und die EPR-Spektren zu vereinfachen, müssen also die aromatischen Protonen gegen andere Atome bzw. funktionelle Gruppen ausgetauscht werden. Verwendet werden Atome, deren Kernspin gleich null ist (z.B. Schwefel, Sauerstoff und Kohlenstoff (^{12}C)) oder deren Wechselwirkungen mit dem freien Elektron zu Hyperfeinkopplungen führen, die nicht aufgelöst werden wie z.B. bei Chlor (Kernspin $I = +3/2$).^{120, 126} Durch Variation der Substituenten in *para*-Position können die Eigenschaften der Trityle wie z.B. die Wasserlöslichkeit weiter gesteuert werden. Bei den in *Abbildung 45* aufgeführten, wasserlöslichen Tritylen wurden in *para*-Position jeweils Carboxy-Gruppen eingeführt. Das EPR-Spektrum solcher Trityle besteht nur noch aus einem Signal.

Bei den Tetrathiatritylen können zudem auch die Methylenbrücken der schwefelhaltigen Fünfringe modifiziert werden, um die chemischen und spektroskopischen Eigenschaften zu beeinflussen.¹²⁷ Im einfachsten Fall ($R = \text{CH}_3$, $Y = \text{COOH}$) erhält man das bekannte „Finland-Radikal“.

Chemische und metabolische Stabilität von Tetrathia- und Tetrachlorotritylen

Der Austausch der Protonen in *para*-Position gegen andere funktionelle Gruppen verhindert auch die Dimerisierung der Radikale und erhöht die Stabilität gegenüber der

Reaktion mit Sauerstoff, da dieser bevorzugt an der unsubstituierten *para*-Position der aromatischen Ringe angreift.¹⁹ Die Substitution der Protonen in *ortho*- und *meta*-Position gegen Chlor- und Schwefelatome reduziert nicht nur die Hyperfeinkopplung, sie trägt auch maßgeblich zu Stabilisierung der Radikale bei. Sie führt dazu, dass die Radikale nicht planar, sondern in einer Propellerkonformation vorliegen.^{120, 128} Die Propellerkonformation verringert zwar die Mesomeriestabilisierung des freien Elektrons durch Abnahme der Überlappung des π -Elektronensystems, erhöht dafür aber dessen sterische Abschirmung erheblich.¹²⁷

Dadurch sind sowohl Tetrathiatrityle als auch chlorierte Trityle sehr stabil gegenüber unterschiedlichen chemischen und metabolischen Einflüssen. Chlorierte Trityle reagieren weder mit Chlor (unter Lichtausschluss), noch mit Brom, Iod, Stickstoffmonoxid oder Chinonen. Sie sind sogar in konzentrierter Schwefelsäure oder Salpetersäure und bei Temperaturen von bis zu 300 °C stabil.^{120, 121, 129} Gelöste chlorierte Trityle reagieren jedoch zum Teil sehr sensitiv auf Lichteinstrahlung.¹³⁰ In Gegenwart von Reduktionsmitteln werden chlorierte Trityle leicht zum entsprechenden Triarylmethanderivat reduziert. Am Beispiel von **PTMTC** konnte zwar gezeigt werden, dass dieses in Gegenwart geringer Konzentration von Glutathion (1 mM) oder Ascorbinsäure (100 μ M) stabil ist.¹³¹ Allerdings wird **PTMTC** durch größere Mengen Ascorbinsäure (10 mM, Halbwertszeit ca. 60 min), in Gegenwart von Blut

(40 % Signalverlust innerhalb von 30 min) und Zelllysaten (*Xenopus laevis* Oocyten, Halbwertszeit < 10 min) sehr schnell reduziert.^{131, 132}

Tetrathiatrityle wie das bekannte **OXO63** oder dessen deuteriertes Analogon **OXO71** sind im Gegensatz zu chlorierten Tritylen sehr stabil gegenüber Reduktionsmitteln. **OXO63** (0.1 mM in PBS pH 7.4) reagiert z. B. nicht mit Glutathion (1 mM), Ascorbinsäure (1 mM) und NADPH (1 mM).¹³³ *In vivo* wird **OXO63** zum Großteil unmetabolisiert renal eliminiert.¹³⁴ In Gegenwart von Oxidationsmitteln wie dem Hydroxylradikal (OH^\bullet), Superoxid (O_2^\bullet) oder Alkylperoxidradikalen (ROO^\bullet) kommt es durch oxidative Decarboxylierung zur Bildung des korrespondierenden Chinonmethids (QM, *Abbildung 46*).^{133, 135} Dies scheint auch der Hauptmetabolisierungsweg *in vivo* zu sein, wie Versuche mit Lebermikrosomen gezeigt haben.¹³⁶

Wie zu Beginn erwähnt, könnten statt Schwefel- auch Sauerstoffatome verwendet werden, um die aromatischen Protonen zu ersetzen. Im ersten Nycomed-Patent von 1991¹²⁶ werden diese „Tetraoxatrityle“ beschrieben. Reddy et al. veröffentlichte 2002 die Synthese des Carbonsäuremethylesters des Tetraoxa-Analogons des **Finland**-Radikals.¹³⁷ Die freie

Carbonsäure dieses Radikals ist nicht bekannt. Tetraoxaradikale scheinen sehr instabil zu sein und eine Reproduktion der Ergebnisse der Publikation von Reddy et al. gelang bisher nicht.¹³⁸ Meiner Vermutung nach ist die Instabilität auf den kleineren Radius der Sauerstoffatome im Vergleich zu Schwefel zurückzuführen: Durch den kleineren Radius ist die Propellerkonformation weniger stark ausgeprägt und das freie Elektron ist zu einem größeren Anteil über die aromatischen Ringe delokalisiert. Dadurch könnte das Molekül wiederum z. B. Redoxreaktionen besser zugänglich sein.

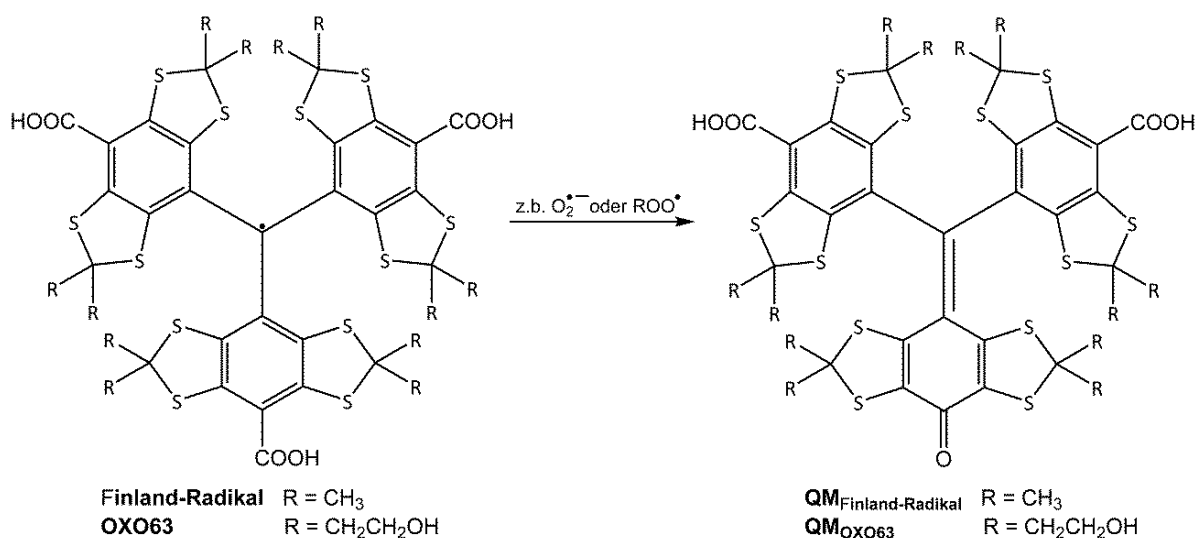


Abbildung 46 Oxidative Decarboxylierung von Tetrathiatritylen.

Magnetische Eigenschaften der Trityle

Durch die bereits erläuterte Propellerkonformation der Tritylradikale ist die Spindichte des freien Elektrons nicht gleichmäßig über das aromatische System verteilt. Der Großteil der Spindichte (ca. 60 %) konzentriert sich auf das zentrale Methylkohlenstoffatom. Durch die verbliebene Konjugation des π -Elektronensystems, π - σ -Polarisation und Hyperkonjugation verteilt sich die restliche Spindichte in unterschiedlichen Anteilen über das gesamte Molekül. Je nach Art des Atomkerns und der Spindichte an der betreffenden Position in Molekül kann dies zu Hyperfeinwechselwirkungen führen, die sich entweder als Signalverbreiterung oder -aufspaltung zeigen.¹²⁷

Allgemein zeichnen sich die EPR-Spektren von Tetrathia- und Tetrachlorotritylen durch eine sehr geringe Peak-zu-Peak-Linienbreite aus. Die *ortho*- und *meta*-ständigen Schwefelatome in Tetrathiatritylen haben einen Kernspin von null. Daher kommt es zu keiner Hyperfeinwechselwirkung und das resultierende EPR-Signal ist sehr schmal. Durch Verwendung deuterierter Reste an den Methylenbrücken der schwefelhaltigen Fünfringe

(R, *Abbildung 45*) bzw. deuterierter Alkylester in *para*-Position (wenn Y = Carbonsäureester, *Abbildung 45*) kann die Linienbreite noch weiter verringert werden.¹³⁹ Im Vergleich zu den Tetrathiatritylen sind die EPR-Signale der chlorierten Trityle deutlich breiter. Dies ist auf den Kernspin der Chloratome ($^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl} \quad I = +3/2$) zurückzuführen.¹²⁹ Die Hyperfeinkopplungskonstanten sind wegen der kleinen gyromagnetischen Konstanten von ^{35}Cl und ^{37}Cl (0.546 bzw. 0.454)¹⁴⁰ so gering, dass sie nicht aufgelöst werden, sondern zu einer inhomogenen Verbreiterung des EPR-Signals führen.

Ob das EPR-Signal der Trityle aus einem oder mehreren Signalen besteht hängt von den Substituenten in *para*-Position ab. Das EPR-Spektrum von Carbonsäure(-ester)-Derivaten von Tritylen besteht i. d. R. nur aus einem Signal. In Ausnahmefällen können die Hyperfeinkopplungen der Alkylester im Spektrum teilweise aufgelöst sein.¹¹³ pH-sensitive Spin-Sonden (siehe Abschnitt 4.1.2.2) enthalten statt Carboxy-Gruppen Phosphonsäure- oder Amino-Gruppen. Das Kopplungsmuster hängt dann von der Anzahl und dem Kernspin der Phosphor- bzw. Stickstoffatome ab. Außerdem können ^{13}C -Satelliten in den EPR-Spektren sichtbar sein. Die Intensität dieser Signale ist aufgrund des geringen Vorkommens von ^{13}C klein.^{132, 141}

4.1.1.3 Synthese von Tetrathia- und Tetrachlorotritylen

Die Synthese der Tetrathiatrityle wurde in den 1990er Jahren von Nycomed Innovation AB¹²²⁻¹²⁶ entwickelt und von unterschiedlichen Forschungsgruppen fortgeführt und verbessert.^{113, 139, 142-145} Dadurch entstanden eine Vielzahl von Derivaten für unterschiedlichste Anwendungsgebiete (siehe Abschnitt 4.1.2). Die Synthese der chlorierten Trityle wurde maßgeblich von Manuel Ballester beginnend in den 1960er Jahren geprägt.^{120, 121, 129, 146-150} Mit Entwicklung der EPR-Oximetrie (siehe Abschnitt 4.1.2.1) wurden die chlorierten Trityle auch für andere Arbeitsgruppen von zunehmendem Interesse, sodass auch die Synthese dieser Trityle zunehmend optimiert wurde.^{132, 138, 151}

Details der Synthese von Tetrathia- und Tetrachlorotritylen werden im Abschnitt 4.2.1 vorgestellt und diskutiert.

4.1.2 Verwendung von Triarylmethylradikalen als Spin-Sonden in der EPR-Spektroskopie

Im Vergleich zu Nitroxiden haben die EPR-Spektren von Tritylradikalen durch die schmalen EPR-Signale häufig ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis.² Durch die schmalen Signale sind sie außerdem nicht nur für CW-EPR-Messungen geeignet, sondern auch für

Puls-EPR und EPR-Imaging.²¹ Biomedizinisch relevante Anwendungsbereiche von Triarylmethylradikalen als Spin-Sonden sind die Bestimmung des Sauerstoffgehalts^{2, 21, 152-155}, des pH-Werts^{144, 145, 156-159}, des Redoxstatus¹⁶⁰, der Thiol¹⁶¹- und der Superoxidkonzentration^{131, 133, 162-164} in Organen bzw. Geweben *in vivo* und *in vitro*. Aufgrund der Relevanz der Anwendung von Tritylen als Sauerstoff- und pH-sensitive Spin-Sonden für die hier vorgestellten Ergebnisse sollen diese Anwendungen in den nachfolgenden Abschnitten genauer beschrieben werden.

4.1.2.1 EPR-Oximetrie

Der Sauerstoffgehalt in Geweben und Organen *in vivo* ist für unterschiedlichste physiologische und pathophysiologische Prozesse wie die Heilung von Wunden¹⁶⁵ und Frakturen¹⁶⁶, Tumorwachstum³⁹ oder ischämische Erkrankungen^{112, 167} wie die periphere arterielle Verschlusskrankheit und Herzinfarkt von Bedeutung. Sauerstoff ist außerdem essentiell für die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies.¹⁶⁸ Um diese Prozesse besser zu verstehen und bestehende Therapiemöglichkeiten verbessern zu können, ist es daher notwendig, den Sauerstoffgehalt von Geweben und Organen *in vivo* messen zu können.

Innerhalb der letzten Jahrzehnte wurden unterschiedliche Methoden entwickelt, um solche Messungen durchführen zu können. Diese beruhen unter anderem auf der Positronen-Emissions-Tomographie (PET), der Magnet-Resonanz-Spektroskopie (MRT), der Nah-Infrarot-Spektroskopie (NIRS), der Clark-Elektrode und der EPR-Spektroskopie (EPR-Oximetrie).^{112, 169} Jede dieser Methoden hat sowohl Vor- als auch Nachteile.¹⁶⁹ Die Vorteile der EPR-Oximetrie sind eine geringe Invasivität und die Möglichkeit der Messung absoluter Sauerstoffkonzentrationen bzw. O₂-Partialdrücke (pO₂). Nachteilig sind z. B. die Notwendigkeit der Applikation von Spin-Sonden, die Abnahme der Eindringtiefe ins Gewebe mit steigenden Frequenzen und das häufig geringe Signal/Rausch-Verhältnis.²

Das Prinzip der EPR-Oximetrie

Die EPR-Oximetrie beruht auf der physikalischen Interaktion zweier paramagnetischer Substanzen: der exogenen Spin-Sonde und dem im Gewebe oder Blut gelösten Sauerstoff. Molekularer Sauerstoff selbst liegt als Diradikal vor. Da die beiden ungepaarten Elektronen ständig untereinander wechselwirken, ist die Relaxationszeit des Sauerstoffs so kurz, dass eine direkte Erfassung mittels EPR nicht möglich ist. Durch die Interaktion von Sauerstoff mit anderen paramagnetischen Substanzen wie Tritylradikalen wird aber auch die Relaxationszeit der paramagnetischen Substanz verringert, was sich im EPR-Spektrum in einer Vergrößerung der Peak-zu-Peak-Linienbreite äußert. Die Interaktion beruht

hauptsächlich auf dem Heisenberg-Austausch (*Abbildung 47*). Das Ausmaß der Linienverbreiterung ist direkt proportional zum Sauerstoffpartialdruck bzw. der Sauerstoffkonzentration, sodass nach entsprechender Kalibrierung auch absolute Sauerstoffwerte gemessen werden können.^{2, 21}

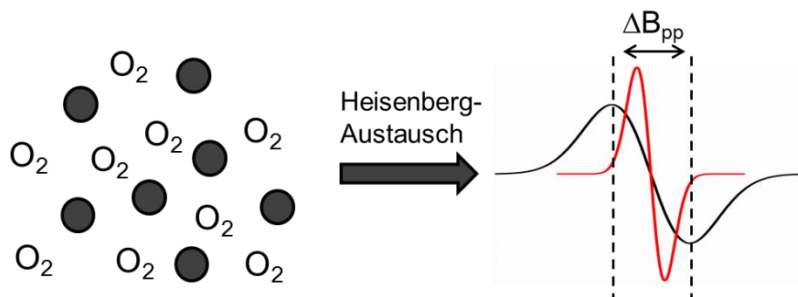


Abbildung 47 Der Effekt intermolekularer Wechselwirkung zwischen Spin-Sonden und Sauerstoff auf die Peak-zu-Peak-Linienbreite. Nach Ahmad et al.²

Partikuläre und lösliche Spin-Sonden

Grundsätzlich können zwei unterschiedliche Typen von Spin-Sonden für die EPR-Oximetrie verwendet werden: partikuläre und lösliche.¹⁶⁹

Zu den partikulären Spin-Sonden gehören z. B. Lithiumphthalocyanine¹⁷⁰ oder Pigmente wie India Ink¹⁷¹. Vorteile der partikulären Sonden sind ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis (aufgrund der hohen Spindichte) und die Möglichkeit wiederholte Messungen durchzuführen. Dem gegenüber stehen Nachteile, wie eine geringe Reproduzierbarkeit bei der Herstellung der Materialien, z. T. fehlende Linearität der Sauerstoffempfindlichkeit und geringe oder nicht vorhandene Bioabbaubarkeit.²

Lösliche Spin-Sonden wie Nitroxidradikale und Tritylradikale sind dagegen chemisch eindeutig definiert. Vor allem Trityle eignen sich als Spin-Sonden in der EPR-Oximetrie aufgrund ihres sehr schmalen, nur aus einer Linie bestehenden EPR-Spektrums und der guten Sauerstoffsensitivität.² Wasserlösliche Radikale verteilen sich nach Injektion im Körper, sodass mit Hilfe bildgebender EPR-Verfahren auch die Verteilung von Sauerstoff z. B. in Tumorgewebe erfasst werden kann.¹⁵⁵ Lösliche Radikale verweilen nicht im Körper, sondern werden durch Metabolisierung und Exkretion wieder aus dem Körper entfernt.^{134, 172} Verteilung, Metabolisierung und Exkretion führen aber auch dazu, dass lösliche Spin-Sonden kurze *in vivo*-Halbwertszeiten haben. Daher sind sie nicht für wiederholte Messungen über einen längeren Zeitraum geeignet. Die Injektion von Tritylradikalen kann außerdem problematisch hinsichtlich toxischer Effekte sein. Die betrifft vor allem lipophilere Trityle. So ist bekannt, dass Mäuse nach der Injektion von **Finland**-Radikal sterben¹⁷³, während das

hydrophilere **OXO63** eine geringe Toxizität aufweist.¹⁷⁴ Die Verteilung oder Anreicherung von löslichen Spin-Sonden in unterschiedlichen Kompartimenten *in vivo*, kann weiterhin dazu führen, dass Faktoren wie Viskosität oder Polarität die Linienbreiten beeinflussen. Die Erstellung von Kalibriergeraden ist daher komplex und *in vitro*-Daten lassen sich nicht immer auf *in vivo*-Daten übertragen.

Verkapselung löslicher Spin-Sonden zur Verbesserung der *in vivo*-Anwendbarkeit

Eine ideale Spin-Sonde muss eine Reihe von chemischen, EPR-spektroskopischen, biologischen und toxikologischen Anforderungen erfüllen. Wie im vorangehenden Abschnitt geschildert, gibt es diese „ideale Spin-Sonde“ bislang nicht. Eine Strategie, um die genannten Nachteile der löslichen Spin-Sonden zu beheben, ist deren Verkapselung in Partikel, Kapseln, Gele und andere Formulierungen. In der Literatur wurden dazu bereits einige Untersuchungen veröffentlicht.

Frank et al. beschrieben die Verkapselung lipophiler Trityle in Nanokapseln.¹¹³ Die geringe Größe der Nanokapseln erlaubt prinzipiell eine intravaskulär Anwendung, z. B. zur Untersuchung von physiologischen Verteilungsprozessen oder die Akkumulation in Geweben und Organen wie Tumoren. Durch die geringe Beladungskapazität der Kapseln war die Signalintensität allerdings sehr gering und deren *in vivo*-Anwendung daher schwierig. Um die Biokompatibilität von lipophilen Tritylen wie **PTMTE** zu verbessern, wurde versucht, diese in BSA-Mikropartikel zu verpacken.¹⁷⁵ Die *in vivo*-Halbwertszeit dieser Partikel aber war gering. Auch Nitroxide wurden in BSA-Mikropartikeln verkapselt, wodurch die Sauerstoffsensitivität und die reduktive Stabilität verbessert werden konnte. Die Verkapselung führte aber auch zu einer Reduktion der Signalintensität.¹⁷⁶ Charlier et al. entwickelten eine auf fluorierten Lösungsmitteln basierende Nanoemulsion, in der sie fluorierte, lipophile Trityle verkapselten. Auch diese Formulierungen zeigten eine sehr gute Sauerstoffsensitivität. Die Signalintensität *in vivo* war aber erneut aufgrund der großen Linienbreiten und der geringen Beladungskapazität sehr gering.¹⁷⁷ Abbas et al. untersuchten ein auf Poloxamer 407 basierendes Hydrogel, um die *in vivo*-Halbwertszeit hydrophiler Trityle zu verlängern und unerwünschte Umgebungseinflüsse auf die Linienbreite zu verhindern. Die *in vivo*-EPR-Spektren dieser Formulierung zeigten ein sehr gutes Signal/Rausch-Verhältnis. Die Signalintensität nahm in narkotisierten Mäusen innerhalb von 3 h nur etwa 7 % ab. Allerdings zeigt das Gel keine ausreichende mechanische Stabilität, sodass es durch die Bewegung wacher Mäuse schnell abgebaut wurde.¹⁷⁸

4.1.2.2 Tetrathiatrityle zur simultanen Bestimmung von pH-Wert und Sauerstoffgehalt *in vivo*

Die Bedeutung des Sauerstoffgehalts für zahlreiche physiologische und pathophysiologische Prozesse wurde bereits im vorangehenden Abschnitt erläutert. Daneben ist auch der pH-Wert entscheidend für viele dieser Prozesse, darunter Tumorwachstum¹⁷⁹, inflammatorische^{180, 181} und ischämische¹⁸² Erkrankungen und Wundheilung¹⁸³. Durch gesteigerte Glykolyse und Milchsäureproduktion in hypoxischem Gewebe, ist eine niedrige Sauerstoffkonzentration mit dem Auftreten einer Azidose verbunden.¹⁸⁴ Aufgrund dieser Zusammenhänge ist die Verwendung von Tritylradikalen, mit denen sowohl pH-Wert als auch Sauerstoffkonzentration erfasst werden können, für biomedizinische Untersuchungen vorteilhaft.

Diesen Ansatz verfolgten zuerst Bobko et al, indem sie 2007 die Eignung von **OXO63**, **Finland**-Radikal (Abbildung 45) und asymmetrisch substituierten **Finland**-Derivaten (**c_nTAM**, Abbildung 48) zur Simultanbestimmung von pH- und Sauerstoffwerten untersuchten.¹⁴⁴ **OXO63** und **Finland**-Radikal tragen je drei Carboxy-Gruppen mit einem pKa-Wert von ca. 2.6. Je nach Protonierungszustand der Carboxy-Gruppen ändern sich Parameter wie z. B. die Polarität, was sich in einer wiederum in einer Änderung des EPR-Spektrums zeigt (siehe auch Abschnitt 2.2.3.1, Nitroxide). Die pH-Sensitivität äußert sich bei **OXO63** und **Finland**-Radikal aufgrund fehlender Hyperfeinkopplungen lediglich in einer geringen Verschiebung des g-Faktors. Diese Verschiebung ist frequenzabhängig und bei niedrigen Frequenzen (L-Band (ca. 1.3 GHz) oder geringer), die für *in vivo*-Messungen nötig sind, nicht mehr messbar. Aufgrund des geringen pKa-Werts der Carboxyl-Gruppen ist die pH-Sensitivität außerdem außerhalb des physiologischen pH-Bereichs.

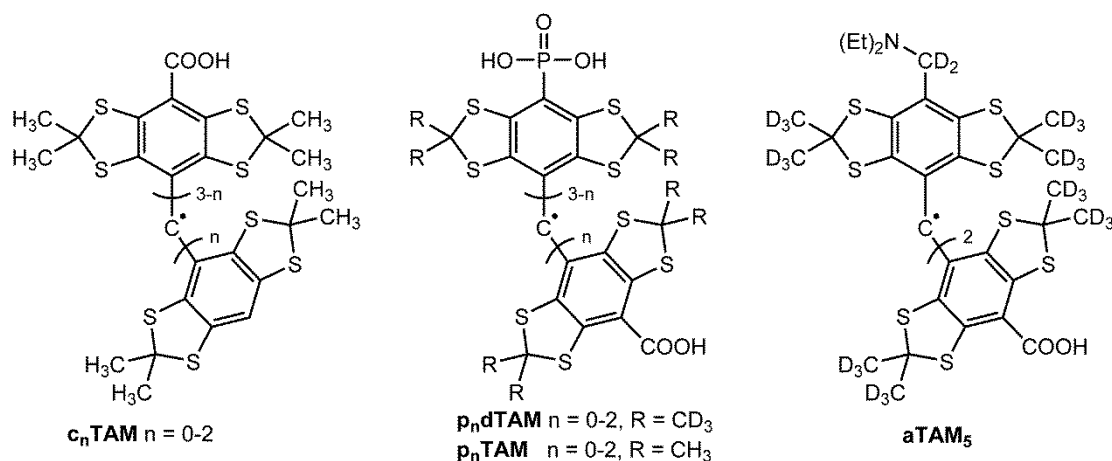


Abbildung 48 Molekülstrukturen einiger pH-sensitiver Tritylradikale.

In den asymmetrischen **Finland**-Derivaten **c_nTAM** (n = 1, 2) wurden eine oder zwei Carboxy-Gruppen durch Protonen ersetzt. Durch die Protonen ergibt sich ein Kopplungsmuster mit der Hyperfeinkopplungskonstante $a(\text{H})$. Eine Änderung des pH-Wertes äußert sich dann nicht mehr nur in einer g-Faktorverschiebung, sondern auch in einer frequenzunabhängigen Änderung von $a(\text{H})$. Dies ist vorteilhaft hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und der Messung bei niedrigen Frequenzen. Die Änderungen von $a(\text{H})$ sind aber wegen der Distanz zwischen den Protonen und den Carboxy-Gruppen sehr klein und weiterhin außerhalb des physiologischen pH-Bereichs. Um die pH-Sensitivität in den physiologischen Bereich zu verschieben, mussten Trityle synthetisiert werden, die eine saure oder basische funktionelle Gruppe mit einem pKa/pKb von ca. 7 tragen. Dafür eignen sich Phosphonsäure- und Amino-Gruppen. In *Abbildung 48* sind solche Tritylderivate dargestellt. Symmetrische und asymmetrische Aminotrityle (z. B. **aTAM₅**) wurden von 2008 von Dhimitruka et al. synthetisiert und untersucht.¹⁵⁶ Diese Trityle zeigen eine gute pH-Sensitivität zwischen pH 6.8 bis 9.0 durch Änderung der Stickstoff- und Wasserstoffhyperfeinkopplung. Die Sauerstoffsensitivität ist weiterhin durch eine sauerstoffinduzierte Linienverbreiterung gegeben. Ein großer Nachteil dieser Trityle sind die komplizierten und dadurch schwierig auszuwertenden EPR-Spektren. Driesschaert et al. und Dhimitruka et al. synthetisierten daraufhin symmetrische und asymmetrische Phosphonsäuretrityle (z. B. **p_n(d)TAM**).^{145, 157, 158} Wie die Aminotrityle zeigen auch die Hyperfeinkopplungskonstanten der Phosphonsäuretrityle eine sehr gute pH-Abhängigkeit im physiologischen pH-Bereich. Davon unabhängig beeinflusst die Sauerstoffkonzentration die spektrale Linienbreite. Das EPR-Spektrum von dreifach substituiereten Phosphonsäuretritylen (**p₀TAM**) besteht aus vier Linien. Das einfach substituierte Derivat (**p₂TAM**) hat dagegen ein Zwei-Linien-Spektrum. Die verringerte Aufspaltung verbessert das Signal/Rausch-Verhältnis der Spektren dieses Radikals. Das EPR-Spektrum von **p₀TAM** ist je nach pH-Wert eine Überlagerung von Spektren mehrerer Ionisierungszustände von **p₀TAM**. Am Neutralpunkt tragen beispielsweise vier unterschiedlich ionisierte Radikale zum Spektrum bei. Bei einfach substituierten Derivaten wie **p₂TAM** vereinfacht sich dementsprechend die Spektrenanalyse, da sich die Anzahl möglicher Ionisierungsgrade verringert. Ein Nachteil aller Phosphonsäuretrityle ist Abhängigkeit der EPR-Spektren von der Anwesenheit anderer Protonendonatoren wie Phosphat. Mit steigender Phosphatkonzentration im Medium kommt es zu schnellen Protonenaustausch-Prozessen zwischen dem Phosphat und den Phosphonsäuretritylen, was zu einer Verbreiterung der Signale führt und dementsprechend mit der Sauerstoffbestimmung interferiert. Dieser Einfluss muss bei der Kalibrierung bedacht

werden. Unter physiologischen Bedingungen ist die Phosphatkonzentration in der Regel gering (≈ 1 mM). Eine Beeinflussung der Linienbreite ist in diesem Konzentrationsbereich nicht zu erwarten.

4.1.3 Zielstellung

4.1.3.1 Untersuchung der Eignung verkapselter Trityle als sauerstoffsensitive Spin-Sonden für *in vivo*-EPR-Messungen bei 300 MHz

Wie im Abschnitt 4.1.2.1 erläutert, können durch die Verkapselung von Spin-Sonden deren Eigenschaften (z.B. die Sauerstoffsensitivität und die *in vivo*-Halbwertszeit) modifiziert werden. Hinsichtlich der Signalintensität und der Verlängerung der *in vivo*-Halbwertszeit zeigte sich die Verkapselung in ein Hydrogel gegenüber der Verkapselung in Mikro- oder Nanopartikel oder -kapseln als vorteilhaft. In dieser Arbeit sollte die Verkapselung auf lipophile Gelformulierungen übertragen und *in vitro* und *in vivo* getestet werden. Dafür wurden zwei unterschiedliche Klassen von lipophilen Gelen zur Verkapselung von lipophilen als auch hydrophilen Tritylen ausgewählt: ein ***in situ*-Oleogel** und ein **Emulgel**. Solche Formulierungen wurden bisher nicht für die lokale Applikation von Spin-Sonden und die EPR-Oximetrie verwendet. Die folgenden Fragestellungen waren dabei von besonderem Interesse:

- (1) Können die Trityle durch die Verkapselung effektiv vor der Elimination geschützt und damit die *in vivo*-Halbwertszeiten auf Tage bis Wochen verlängert werden?
- (2) Reduziert die Verkapselung die Toxizität lipophiler Trityle?
- (3) Behalten die verkapselten Trityle ihre Sauerstoffsensitivität *in vitro* und *in vivo*?

Im ersten Schritt der Untersuchung sollte die Zusammensetzung dieser Formulierungen optimiert werden. Oleogele bestehen generell aus einem lipophilen Lösungsmittel und einem niedermolekularen Gelbildner, welcher ein dreidimensionales Gitter in der lipophilen Grundlage ausbildet (*Abbildung 49*).¹⁸⁵ Lipophile Emulsionsgele („Emulgele“) enthalten zusätzlich eine wässrige Phase, die durch einen Emulgator stabilisiert wird (*Abbildung 49*). Die in dieser Arbeit verwendeten Gele basieren auf Isopropylmyristat (IPM), einem niedrigviskosen, biokompatiblen Ester und 12-Hydroxystearinsäure (12-HSA) als Gelbildner.

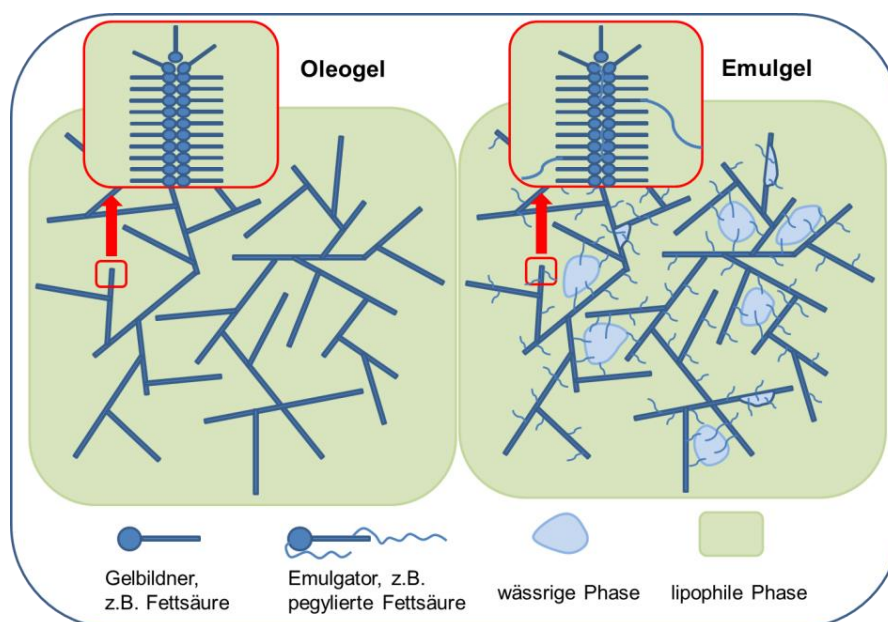


Abbildung 49 Strukturmodell von Oleogelen und Emulgelen.

Nachfolgend sollte die Sauerstoffsensitivität unterschiedlicher Tritylradikale (Abbildung 50) in Lösung und verkapselt in die Gele EPR-spektroskopisch untersucht und verglichen werden. Zur Untersuchung des Oleogels wurden drei unterschiedliche Trityle verwendet: das chlorierte Trityl **44** (auch **PTMTE** genannt) und der lipophile tris-*tert*-Butylester des bekannten **Finland**-Radikals mit deuterierten bzw. undeuterierten Methylgruppen (**36-D** und **36-H**). Zur Untersuchung des Emulgels wurde das hydrophile Trityl **46** (als **OXO71** bekannt) verwendet. **44** und **36-D** wurden synthetisiert. **36-H** und **46** wurden für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt (siehe dazu Abschnitt 4.3.2.1). Nach der *in vitro*-Testung sollte die Stabilität und Sauerstoffsensitivität der Gele in ersten *in vivo*-Tests untersucht werden.

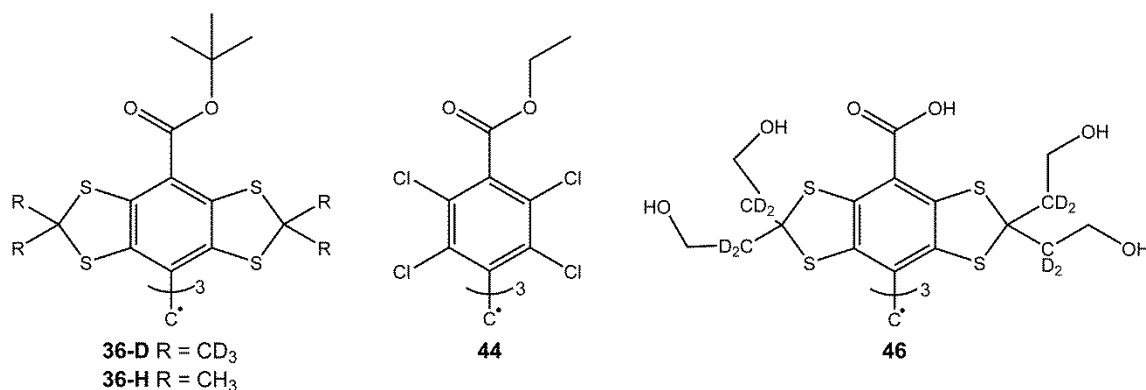


Abbildung 50 Molekülstrukturen der für die Verkapselung verwendeten Trityle.

4.1.3.2 Untersuchung der Eignung neuer Methylenphosphonsäuretrityle als pH- und sauerstoffsensitive Spin-Sonden

Im Abschnitt 4.1.2.2 wurden Tetrathiatrityle vorgestellt, die sich potentiell zur simultanen Bestimmung von pH-Wert und Sauerstoffkonzentration eignen. In dieser Arbeit sollten die genannten Phosphonsäuretrityle durch Einführen einer deuterierten Methylenbrücke zwischen Aromat und Phosphonsäure modifiziert werden. Dafür sollte im ersten Schritt die synthetische Zugänglichkeit der beiden Derivate **39a** und **40a** (Abbildung 51) evaluiert werden.

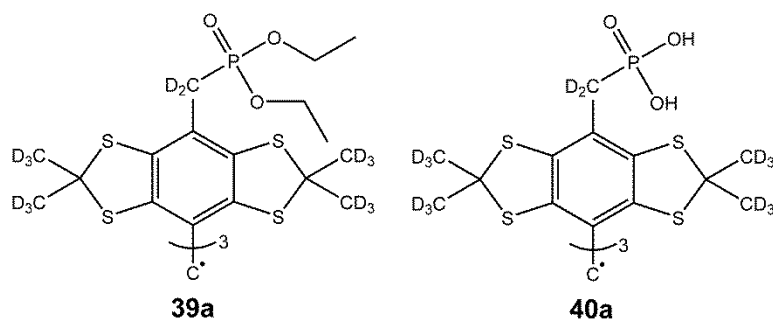


Abbildung 51 Molekülstrukturen der Methylenphosphonsäuretrityle **39a** und **40a**.

Im zweiten Schritt sollte dann der Einfluss der Methylengruppe auf das EPR-spektroskopische Verhalten und die Eignung der Derivate als pH- und/oder O₂-sensitive Spin-Sonden untersucht werden.

4.2 Ergebnisse und Diskussion

4.2.1 Synthese

Die Synthese des lipophilen Tetrathiatriarylmethylradikals **36-D** bzw. von dessen Vorstufen und der perchlorierten Trityle **44** (PTMTE) und **45** (PTMTC) wurde anhand etablierter Vorschriften durchgeführt. Diese Vorschriften wurden bereits ausführlich in zwei an der Martin-Luther-Universität angefertigten Dissertationen^{138, 186} und zahlreichen Publikationen bzw. Patenten^{113, 122, 126, 129, 137, 139, 142, 143, 148, 150, 163, 187-190} diskutiert. Die Ausbeuten entsprachen jeweils etwa den Literaturwerten. Die Synthese der neuen Methylenphosphonsäuretrityle **39a** und **40a** stimmt bis zur Stufe des Triarylmethanols (**34**) mit der Synthese von **36-D** überein.

4.2.1.1 Tetrathiatriarylmethylradikale

Synthese des Triarylmethanol-Vorstufe **34**

Die Synthese des Edukts 1,2,4,5-Tetra-*tert*-butylthiobenzol (**32**) ist aufgrund der Verwendung des sehr geruchsintensiven *tert*-Butylthiol äußerst schwierig. Letztlich konnte Dr. Diana Müller durch Verwendung eines Laborabzugs mit thermischer Abluftreinigung eine ausreichende Menge **32** herstellen, auf welches in dieser Arbeit zurückgegriffen werden konnte.¹⁸⁶ Ausgehend von **32** war der erste Syntheseschritt (*Abbildung 52 (A)*) die Substitution von jeweils zwei *tert*-Butyl-Gruppen durch Aceton-D6. Dafür wurde **32** über Nacht mit Aceton-D6 und Tetrafluorborsäure (HBF₄) in Toluol umgesetzt. Während der Synthese von **33** kam es zu einem Austausch von Deuterium gegen Protonen an den Methyl-Gruppen, wodurch der Deuteriumgehalt auf ca. 76 % reduziert wurde (ermittelt durch NMR; ESI-HRMS: 77 %). Es ist anzunehmen, dass dies ein generelles Problem bei der Synthese von **33** ist. Dennoch wurde diese Beobachtung in den bisherigen Publikationen nicht weiter erwähnt. Potentielle Quellen für Protonen sind HBF₄, Diethylether, Toluol oder Spuren von Wasser. Am plausibelsten erscheint ein Austausch auf Stufe des Acetons durch Keto-Enol-Tautomerie (*Abbildung 52 (B)*). Im zweiten Syntheseschritt erfolgte die Trimerisierung von **33** mit Chlorameisensäuremethylester zum Triarylmethanolderivat **34**. Der Deuteriumgehalt von **34** differiert je nach Bestimmungsmethode. Mittels NMR wurde ein Deuteriumgehalt von 64 % ermittelt. Mittels ESI-HRMS hingegen ein Gehalt von 77 %, was dem Deuteriumgehalt des Edukts entspricht. Für die Bestimmung mittels NMR wurden die aromatischen Protonen von **34** als interner Standard verwendet. Durch etwaige geringe

Verunreinigungen im Bereich der chemischen Verschiebung der CD_nH_m -Gruppen ist es möglich, dass das Ausmaß des H/D-Austauschs bei dieser Methode überschätzt wird.

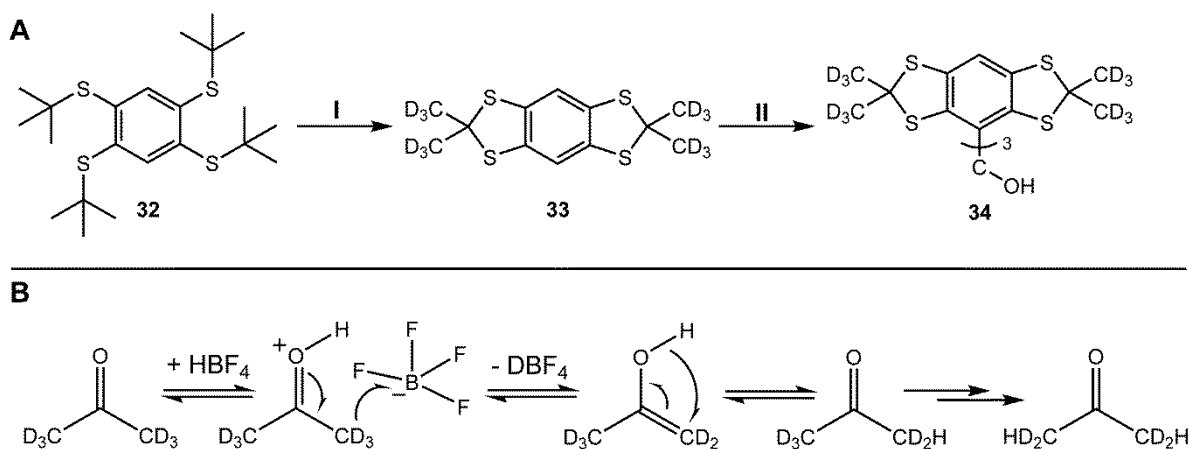


Abbildung 52 (A) Synthese der Tritylvorstufe **34**. Reagenzien und Bedingungen: (I) **32**, HBF_4 in Diethylether, Aceton- D_6 , Toluol, 4 h RT, Reflux über Nacht. (II) **33**, $n-BuLi$, Chlorameisensäuremethylester, Diethylether, RT, über Nacht. (B) H/D-Austausch durch Keto-Enol-Tautomerie während Synthese-Schritt (I).

Synthese des lipophilen Trityls **36-D**

Zur Synthese von **36-D** wurde zunächst Triarylmethanol **34** durch Lithiierung mit $n-BuLi$ aktiviert und anschließend mit Diboc zu **35** umgesetzt (*Abbildung 53*).

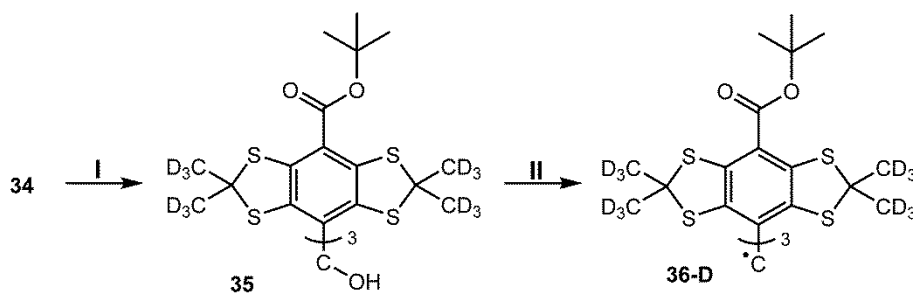


Abbildung 53 Synthese von **36-D** ausgehend von Triarylmethanol **34**. Reagenzien und Bedingungen: (I) $n-BuLi$, TMEDA, Hexan, 4 h RT; Diboc, 2 d, RT. (II) $BF_3 \cdot Diethylether$, DCM (trocken), Argon, 1 h, RT; $SnCl_2$ in THF, 10 min, RT.

Der Deuterierungsgrad schwankt erneut je nach Bestimmungsmethode. Die NMR-Analyse ergab einen Gehalt von 59 % D (als interner Standard wurden die *tert*-Butyl-Gruppen von **35** verwendet); die ESI-HRMS-Analyse ergab einen Gehalt von 82 % D. Durch etwaige Verunreinigungen im Alkyl-Bereich des NMR ist die Analyse mit einem entsprechenden Fehler behaftet. Auch die ESI-HRMS-Analyse ist durch die Überlagerung

des Schwefel-Isotopenmusters mit dem Deuteriummuster erschwert. Insgesamt ist davon auszugehen, dass sich die Menge an Deuterium im weiteren Syntheseverlauf nicht wesentlich verändert hat. Im zweiten Syntheseschritt wurde **35** zum Radikal **36-D** reduziert. Dafür wurde zuerst durch Zugabe von Bortrifluorid das Kation von **35** generiert, welches dann mit Zinn(II)chlorid zum Radikal reduziert wurde.

Synthese der Methylenelephosphonsäuretrityle **40a** und **39a**

Das Syntheschema für die Synthese der Radikale **39a** und **40a** ist in *Abbildung 54* dargestellt. Im ersten Schritt wurde jeweils eine deuterierte Hydroxymethyl-Gruppe in *para*-Position der drei Arylreste von **34** eingeführt. Dafür wurde wie bei der Synthese von **35** zunächst die *para*-Position durch Lithiierung mit *n*-BuLi in trockenem Diethylether aktiviert.

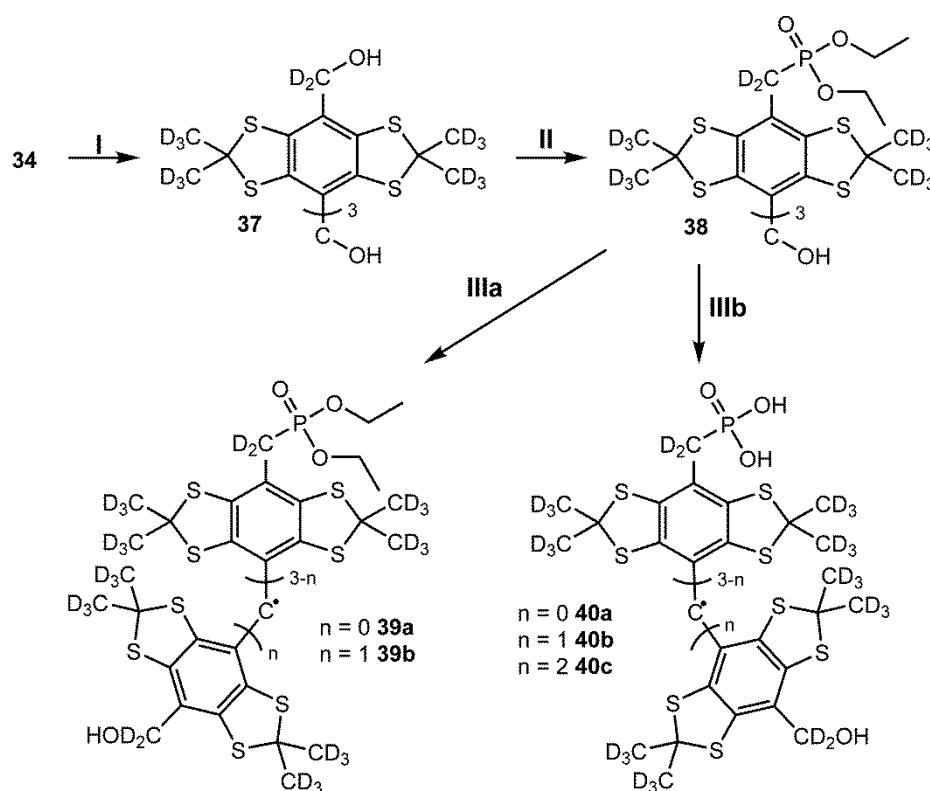


Abbildung 54 Synthese der Trityle **39a** und **40a**. Reagenzien und Bedingungen: (I) TMEDA, 2.5 M *n*-BuLi in Hexane, trockener Diethylether, 0 °C bis RT, 3.5 h, Paraformaldehyd-D₂ (99 % D), 24 h, RT. (II) ZnI₂, Triethylphosphit, trockenes Toluol, 80 °C, über Nacht. (IIIa) BF₃•Et₂O, DCM, 1 h, RT; SnCl₂ in trockenem THF, 10 min, RT. (IIIb) Bromotrimethylsilan, DCM, über Nacht, RT; Methanol, 4 h, Reflux.

Anschließend wurde ein Überschuss an Paraformaldehyd-D₂ zum Reaktionsansatz hinzugefügt. Paraformaldehyd löste sich nur sehr schlecht in Diethylether. Dennoch konnte

nach 24 h Reaktionszeit das Produkt **37** mit einer Ausbeute von 59 % isoliert werden. Daneben entstand auch der mono- und di-substituierte Tritylalkohol, welche aber säulenchromatographisch abgetrennt werden konnten. Die ESI-HRMS-Analyse ergab einen Deuteriumgehalt von etwa 79 % D. Das $^1\text{H-NMR}$ (Abbildung 55) von **37** zeigt nur drei Signale, die der Substanz zugeordnet werden können. Das Signal der Methylenbrücke sollte aufgrund der Entschirmung im Bereich zwischen 3 bis 5 ppm sichtbar sein. In diesem Bereich aber ist nur ein Restsignal von Ethylacetat sichtbar, was darauf hindeutet, dass es während der Reaktion zu keinerlei H/D-Austausch kam.

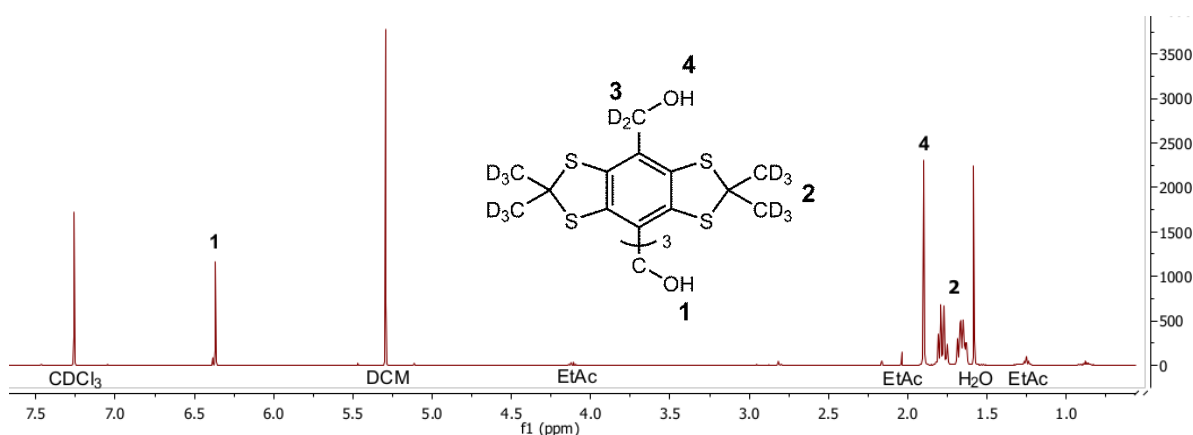


Abbildung 55 $^1\text{H-NMR}$ von **37**.

Im zweiten Reaktionsschritt wurden die Hydroxy-Gruppen in *para*-Position durch Phosphonsäurediethylester-Gruppen substituiert. Dafür wurde **37** in trockenem Toluol gelöst und mit Triethylphosphit in der Gegenwart von ZnI_2 unter Reflux über Nacht gekocht.¹⁹¹ Die Reaktion ist eine Lewis-Säure-vermittelte Michaelis-Arbuzov-Reaktion: Zunächst bildet das Zinkiodid einen Komplex mit den beiden Reaktanten aus. Innerhalb des Komplexes kommt es dann zur einer Umlagerung mit Ausbildung einer neuen C - P-Bindung. Das intermediär gebildete Phosphoniumsalz zerfällt. Zinkoxid und Ethyliodid werden freigesetzt.^{191, 192} Das Produkt **38** konnte nach säulenchromatographischer Reinigung mit einer Ausbeute von 69 % isoliert werden. **38** wurde dann in zwei unterschiedlichen Reaktionen zu den Radikalen **39a** und **40a** umgesetzt. Die Synthese von **38** zu **39a** entspricht der Umsetzung von **35** zu **36-D**: **38** wurde in Dichlormethan gelöst. $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, gefolgt von ZnCl_2 wurde hinzugefügt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde **39a** fast quantitativ erhalten. Es enthielt etwa 5 % des Bis-methylenphosphonsäureestertrityls **39b**. Die Quantifizierung erfolgte EPR-spektroskopisch (siehe Abschnitt 4.2.3). Die Synthese von **40a** wurde analog zu bereits publizierten Vorschriften zur Synthese von Phosphonsäuretritylen hergestellt.^{145, 158} **38**

wurde in Dichlormethan gelöst und über Nacht mit Bromotrimethylsilan gerührt. Die Reaktion beruht auf einer Umesterung des Edukts zum entsprechenden Bis(trimethylsilyl)phosphonat. Aus diesem wurde dann durch Methanolyse die Phosphonsäure freigesetzt.¹⁹³ Während dieser Reaktion wurde zugleich auch das Radikal geformt. Es wurde auf unterschiedliche Weise versucht, das Rohprodukt aufzureinigen. Sowohl die Reinigung mit Hilfe von Hypersep C₁₈-Säulen (Thermo Scientific) als auch mittels präparativer HPLC scheiterte. Die Analyse der, nach der präparativen HPLC, erhaltenen Fraktionen mittels ESI-HRMS und EPR zeigten, dass eine Mischung aus dem Mono-, Bis- und Trismethylenphosphonsäuretrityl (**40a-c**) vorlag. Für eine der Fraktionen wurde mittels Simulation des EPR-Spektrums folgendes Mischungsverhältnis ermittelt: 70 % **40a**, 20 % **40b** und 10 % **40c** (siehe auch Abschnitt 4.2.3). Da für die Synthese von **39a** und **40a** das gleiche Edukt verwendet wurde und **39a** eine Reinheit von 95 % aufwies muss die Spaltung der C - P-Bindung bei **40a** während der Synthese und/oder Reinigung des Rohproduktes stattgefunden haben. Ein EPR-Spektrum des Rohproduktes, welches vor dem Versuch der Reinigung aufgenommen wurde, konnte mit 5 - 10 % **40b** als Verunreinigung simuliert werden. Der Vergleich der EPR-Spektren, die vor bzw. nach der Reinigung gemessen wurden, legt daher nahe, dass die Degradation von **40** während der Reinigungsversuche stattfand. Die Synthese von Phosphonsäuren aus den Dialkylestern mittels Bromotrimethylsilan und anschließender Methanolyse ist ein häufig verwendete und sehr milde Methode, sodass die Spaltung der C - P-Bindung während der Reaktion nicht sehr plausibel erscheint.¹⁹³ Es ist bekannt, dass es durch Einwirkung von UV-Strahlung zu einer Spaltung kommen kann.¹⁹⁴ Die dafür benötigte Bestrahlungsintensität ist allerdings deutlich intensiver als sie beispielsweise durch einen UV-Detektor während der HPLC-Analyse erfolgt. Was genau zur Degradation des Radikals geführt haben könnte, ist daher nach wie vor unklar.

4.2.1.2 Perchlorierte Triarylmethylradikale

Die Synthese (*Abbildung 56*) der perchlorierten Triarylmethylradikale beginnt mit dem Aufbau des Tritylgrundgerüsts (**42**). Dafür wurde 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol (**41**) mit Chloroform in der Gegenwart von AlCl₃ umgesetzt. Bei der Reaktion handelt es sich um eine Lewis-Säure-vermittelte Friedel-Crafts-Alkylierung. Jedes Chloratom des Chloroforms wird dabei gegen ein Molekül **41** substituiert. Im zweiten Schritt wurden die *para*-Positionen in **42** mit *n*-BuLi lithiiert und dann mit Chlorameisensäureethylester zum Triarylmethanderivat **43** umgesetzt.

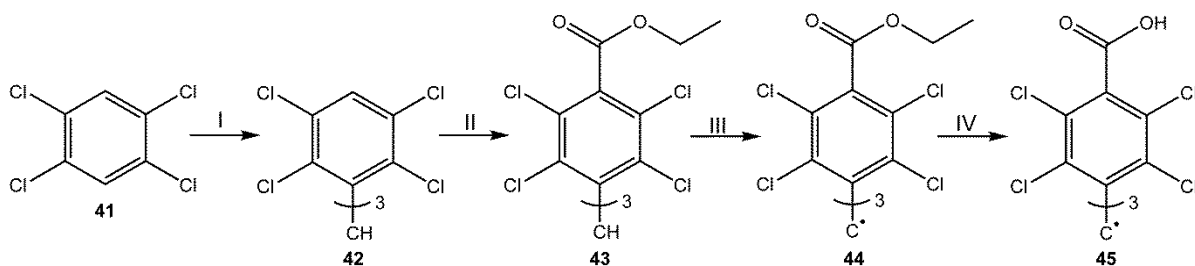


Abbildung 56 Synthese der perchlorierten Trityle **44** und **45**. Reagenzien und Bedingungen: (I) AlCl_3 , CHCl_3 , Glasdruckgefäß, $160\text{ }^\circ\text{C}$, 45 min. (II) TMEDA, $n\text{-BuLi}$, THF, $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 1h; Chlorameisensäureethylester, $-78\text{ }^\circ\text{C}$ bis RT, über Nacht. (III) Bu_4NOH , THF, RT, 1 h; *p*-Chloranil, RT, über Nacht. (IV) konz. H_2SO_4 , $90\text{ }^\circ\text{C}$, über Nacht.

43 wurde dann zum tiefroten, lipophilen Trityl **44** oxidiert. Dafür wurde aus **43** durch die starke Base Bu_4NOH das Triarylmethananion generiert, welches dann mit *p*-Chloranil zu Radikal oxidiert wurde. Das hydrophile Tricarbonsäuretrityl **45** (entspricht PTMTC)[‡] wurde durch das Erhitzen von **44** in konzentrierter Schwefelsäure erhalten.

4.2.2 Lipophile Gelformulierungen für die Verkapselung von Tritylradikalen als Spin-Sonden für die *in vivo*-EPR-Oximetrie bei 300 MHz[§]

4.2.2.1 Zusammensetzung des *in situ*-Oleogels und des Emulgels

Die Zusammensetzung der Gele basiert auf dem Patent „Injizierbare Depotformulierungen zur kontrollierten Wirkstofffreisetzung“ (Mäder et al.).¹⁹⁵

Es wurden ausschließlich bekannte und sichere Hilfsstoffe verwendet (*Abbildung 57*), die bereits in pharmazeutischen und kosmetischen Zubereitungen verwendet werden. Als lipophile Basis für das Oleogel wurde Isopropylmyristat (IPM) verwendet. IPM ist ein häufig verwendeter Penetrationsvermittler in topischen pharmazeutischen Formulierungen¹⁹⁶ und wird *in vivo* gut vertragen.¹⁹⁷ Ein Vorteil von IPM ist die geringe Viskosität ($\eta = 5 - 6\text{ mPa}\cdot\text{s}$ bei $20\text{ }^\circ\text{C}$) im Vergleich zu anderen lipophilen, flüssigen Grundlagen wie

[‡] **45** und das Triarylmethan-Analogon **H-45** (Synthese siehe Abschnitt 4.3.1.2) wurden Dr. Agnieszka Boś-Liede (NanoBioMedical Centre, Adam Mickiewicz University, Poznań, Polen) für toxikologische Untersuchungen und die Entwicklung einer neuen EPR-Imaging-Methode zur Bestimmung von Sauerstoffkonzentrationen *in vivo*, insbesondere in Tumorgewebe, zur Verfügung gestellt. Erste Ergebnisse dieser Kooperation wurden in *Cell Biochemistry and Biophysics* 76 (2018) 19 - 28 veröffentlicht.

[§] Alle in diesem Abschnitt beschriebenen EPR-spektroskopischen Versuche wurden während eines Forschungsaufenthaltes am Center for Cancer Research, National Cancer Institute, NIH (Bethesda, MD, USA) in der Forschungsgruppe von Dr. Murali C. Krishna durchgeführt. Die Gelformulierungen wurden in Zusammenarbeit mit Professor Karsten Mäder (Abteilung Pharmazeutische Technologie, Institut für Pharmazie, MLU Halle-Wittenberg) entwickelt. Die Ergebnisse wurden in der Zeitschrift „Free Radical Biology & Medicine“ veröffentlicht (Lampp et al., *Free Radical Biology and Medicine* 130 (2019) 120 - 127).

MCT (Mittelkettige Triglyceride, $\eta = 25 - 33 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$).¹¹³ Eine möglichst geringe Viskosität des Mediums ist wichtig, da mit steigender Viskosität auch die Peak-zu-Peak-Linienbreite der Radikale zunimmt und somit die Sensitivität und Spezifität für Sauerstoff abnimmt.¹⁰

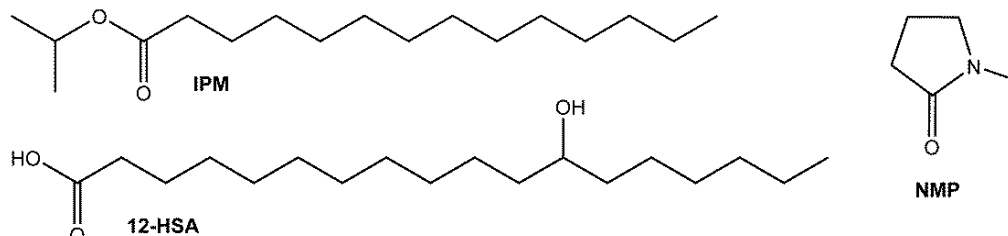


Abbildung 57 Molekülstrukturen der Inhaltsstoffe des Oleogels.

Als Gelbildner wurde 12-Hydroxystearinsäure (12-HSA) verwendet. 12-HSA ist ein weit verbreiteter Gelbildner für die Herstellung von Oleogelen.¹⁹⁸ In der Regel wird für die Gelbildung 12-HSA mit der lipophilen Grundlage erwärmt. Beim Abkühlen der Lösung sinkt die Löslichkeit der 12-HSA und es kommt zur Ausbildung intermolekularer fibrillärer, verzweigter Strukturen, in denen das lipophile Medium eingeschlossen wird.¹⁹⁹ Auf 12-HSA basierende Oleogele sind viskoelastisch und damit anfällig für Scherbelastung. Eine Injektion des Gels würde dementsprechend durch Rheodestruktion auch dessen Stabilität *in vivo* beeinflussen.²⁰⁰ Es sind daher Formulierungen vorteilhaft, die erst nach Injektion „*in situ*“ gelieren. Dies wurde durch die Zugabe von N-Methylpyrrolidon (NMP) erreicht. NMP ist ein biokompatibles organisches Lösungsmittel, welches die Löslichkeit von 12-HSA in IPM erhöht und somit die Gelbildung verhindert. Nach Injektion der flüssigen Formulierung, z.B. subkutan oder intramuskulär, diffundiert das ebenfalls wasserlösliche NMP aus der Formulierung in die extrazelluläre Matrix und es kommt zur Gelbildung („Lösungsmittelaustausch-induzierte Gelbildung“). Diese Strategie wird bereits kommerziell in dem Polymerimplantat Eligard[®] (Tolmar Pharmaceuticals) verwendet.

Um eine Formulierung zu erhalten, die auch zur Verkapselung hydrophiler Trityle geeignet ist, wurde die beschriebene Oleogelzusammensetzung durch Hinzufügen einer wässrigen Phase modifiziert. Damit die wässrige Phase in diesem „Emulgel“ ausreichend stabil inkorporiert vorliegt, wurde außerdem ein Emulgator hinzugefügt. Verwendet wurde für diesen Zweck PEG-30-Dipolyhydroxystearat (Cithrol[®] DPHS, Croda International). PEG-30-Dipolyhydroxystearat wird durch Veresterung von 12-HSA mit Macrogol hergestellt und besteht hauptsächlich aus Diestern von polymerisierter 12-HSA und

Macrogol (Ph. Eur. 9.0). Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit von Gelbildner und Emulgator, kann letzterer in das Gerüst des Gelbildners mit eingebaut werden. Dies wirkt sich positiv auf die Homogenität der Zubereitung aus.²⁰¹ Im Falle des Emulgels wurde auf eine *in situ*-Gelbildung verzichtet, da dies zu einer Separation der wässrigen und lipophilen Phase (z.B. durch Aufräumung) und somit zu einer inhomogenen Verteilung führen könnte. Auch das Emulgel ist viskoelastisch. Aufgrund der Schereigenschaften lässt es sich aber dennoch durch 25 G-Nadeln applizieren.²⁰¹

Um beide Gele zu optimieren, wurden unterschiedliche Zusammensetzungen hinsichtlich des Mengenanteils der Komponenten getestet. Um IPM ausreichend zu gelieren wurden 9 % (m/m) 12-HSA benötigt. Durch Zugabe von 10 % (m/m) NMP konnte der Gelbildungsprozess gehemmt werden. Das Emulgel konnte bei einem Anteil von 5.5 % (m/m) 12-HSA und 2 % Cithrol[®] DPHS (m/m) bis zu 70 % wässrige Phase aufnehmen. Hinsichtlich der zu erwartenden mechanischen Einwirkung auf das Emulgel *in vivo* wurde der Anteil der wässrigen Phase auf 50 % festgelegt. Die genaue Zusammensetzung ist in *Tabelle 23* angegeben.

Tabelle 23 Zusammensetzung der Formulierungen. Die Anteile sind in Massenprozent angegeben (% , m/m).

In-situ-Oleogel		Emulgel	
IPM	81.0	IPM	42.5
12-HSA	9.0	12-HSA	5.5
NMP	10.0	Cithrol [®] DPHS	2.0
		PBS 7.4	50.0

4.2.2.2 *In vitro*-Sauerstoffkalibrierung der verkapselten Trityle

Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden die lipophilen Radikale **36-D**, **36-H** und **44** zunächst in IPM und **46** in PBS-Puffer pH 7.4 gelöst. Um Proben mit definierter Sauerstoffkonzentration zu erhalten, wurden diese dann mit Gasmischungen begast, deren O₂-Gehalt zwischen 0 % und 20.9 % O₂ lag. Die erhaltene Peak-zu-Peak-Linienbreite ΔB_{pp} wurde bezogen auf O₂-Gehalt dargestellt und mittels linearer Regression analysiert (*Abbildung 58*). Anschließend wurden die Radikale in das Oleogel bzw. Emulgel verkapselt und ebenfalls die Peak-zu-Peak-Linienbreite bei 0 % und 5 % O₂ ermittelt. Das Signal/Rausch-Verhältnis der bei 300 MHz gemessenen EPR-Spektren war bei 20.9 % O₂ aufgrund der breiten Signale und der daraus resultierenden geringen Signalintensität zu

gering für eine sichere Bestimmung der Linienbreiten. Da sich *in vivo* relevante O₂-Konzentrationen ohnehin zwischen 0 % bis 10 % bewegen¹¹², wurden diese Daten nicht weiter betrachtet. Das vollständige Entfernen von Sauerstoff aus den Proben war aufgrund der Methodik der Probenpräparation (siehe Abschnitt 4.3.2.3) zum Teil schwierig und gelang auch nach wiederholten Versuchen nicht immer vollständig, was am Beispiel von Radikal **44** in *Abbildung 58 (A)* deutlich zu sehen ist. Da die Linienbreite des verkapselten Radikals **44** bei 0 % O₂ auf der Kalibriergeraden lag, erschien die plausibelste Erklärung für die Abweichung der Linienbreite des in IPM gelösten Radikals eine unvollständige Sauerstoffentfernung zu sein.

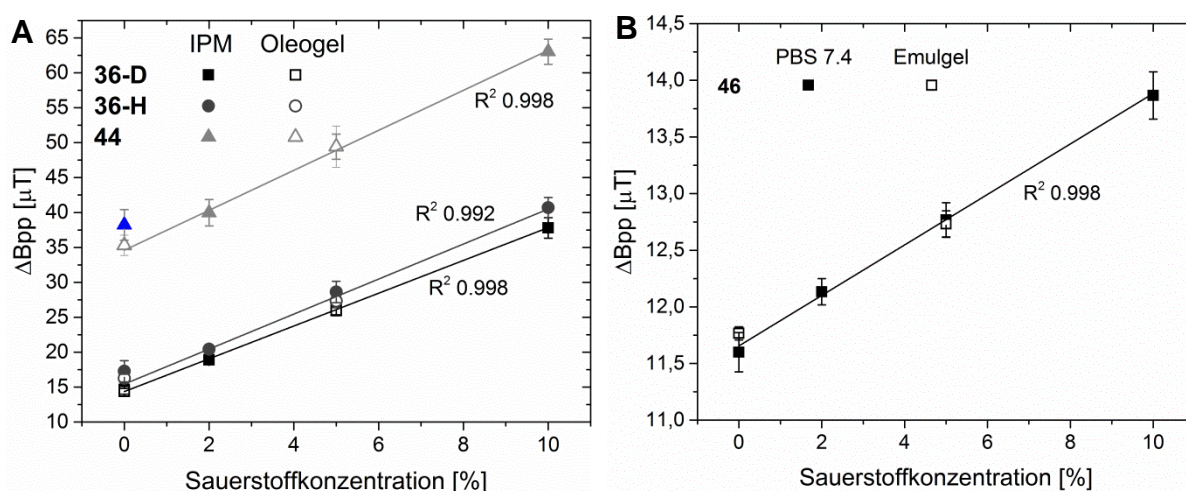


Abbildung 58 (A) Sauerstoffkalibriergeraden der lipophilen Radikale gelöst in IPM (**36-D**, **36-H**: 1 mM; **44**: 5 mM) und Linienbreite der Radiale verkapselt in das Oleogel bei 0 % und 5 % O₂. (B) Sauerstoffkalibriergeraden des hydrophilen Radikals **46** (*c* = 1 mM) gelöst in PBS pH 7.4 und Linienbreite des Radikals verkapselt in das Emulgel bei 0 % und 5 % O₂. Die lineare Regression wurde mit den Daten der Radikallösungen in IPM bzw. PBS durchgeführt; *n* = 3. Die Messwerte bei 0 % O₂ von **44** wurden bei der linearen Regression nicht berücksichtigt.

Die Sauerstoffsensitivität der lipophilen Radikale gelöst in IPM beträgt etwa 2.5 μT/% O₂, die Sensitivität des wasserlöslichen Radikals **46** beträgt hingegen nur 0.22 μT/% O₂ (*Abbildung 58*). Diese Unterschiede können auf die geringere Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser im Vergleich zu lipophilen Lösungsmitteln zurückgeführt werden (siehe auch *Galvinoxyle*, Abschnitt 3.2.3).²⁰² So löst Wasser nur 0.6 % (v/v) O₂ bei 22 °C und 0.213 bar O₂²⁰³ und IPM unter den gleichen Bedingungen 2.9 % (v/v)¹¹³. Die höhere O₂-Sensitivität der lipophilen Radikale erleichtert die Messung kleiner Änderungen der O₂-

Konzentration und verringert zugleich statistische Fehler bei der Bestimmung des O₂-Gehalts. Die hohe Sensitivität und die daraus resultierenden großen Linienbreiten bergen allerdings auch Nachteile, da diese mit einer starken Reduktion der Spin-Spin-Relaxationszeit T₂ einhergehen. Dadurch ist die Verwendung gepulster EPR-Messmethoden, die im Vergleich zur CW-Methode deutlich kürzere Messzeiten benötigen, bei lipophilen Radikalen sehr schwierig.²⁰⁴ Versuche an einem 300 MHz-Puls-EPR-Spektrometer zeigten, dass bei den Radikalen **36-D**, **36-H** und **44** kein oder nur ein schwaches Signal messbar war (Daten nicht gezeigt). Für Radikal **36-D** und **36-H** war ein Signal bis 5 % O₂ detektierbar. Bei **44** konnte nur bei 0 % O₂ ein Signal erfasst werden.

Die Linienbreiten des chlorierten Radikals **44** sind deutlich größer als die Linienbreiten der Tetrathiatritylradikale **36-D**, **36-H** und **46**. Dies führt zu einer geringeren Präzision bei der Bestimmung der Linienbreiten, was sich wiederum in einer größeren Standardabweichung zeigt. Dadurch war es auch notwendig die Konzentration von **44** auf 5 mM zu erhöhen, um auch bei einem höheren O₂-Gehalt eine ausreichende Signalintensität zu erhalten. **36-D** und **36-H** konnten aufgrund der begrenzten Löslichkeit in IPM nicht höher konzentriert verwendet werden. Die Unterschiede zwischen **36-H** und dem deuterierten Analogon **36-D** sind sehr gering. Die Verwendung der, in der Herstellung kostenintensiveren, deuterierten Radikale scheint in diesem Fall keinen signifikanten Vorteil zu haben.

Um zu überprüfen, ob die Verkapselung der Radikale die Linienbreite und/oder die Sensitivität beeinflusst, wurden diese ebenfalls EPR-spektroskopisch bei 0 % und 5 % O₂ untersucht. Die Linienbreiten der verkapselten Radikale liegen innerhalb der Standardabweichungen der Linienbreiten der gelösten Radikale. Sauerstoff kann die Gele demnach ohne Hinderung permeieren und die Mikroviskosität von IPM bzw. PBS werden durch die Gelbildung nicht erhöht.

4.2.2.3 *In vivo*-Untersuchungen der verkapselten Trityle

Nach Bestimmung der *in vitro*-Sauerstoffsensitivität sollte auch die Stabilität und Sensitivität der verkapselten Radikale *in vivo* getestet werden. Weiterhin sollte das Verhalten der Mäuse beobachtet werden, um Rückschlüsse auf eine eventuelle Toxizität der Radikale bzw. der Formulierungen ziehen zu können. Dafür wurden jeweils 0.2 ml der Formulierung intramuskulär in das rechte Hinterbein einer weiblichen C3H-Maus injiziert. Für jede Radikal-Formulierung wurden zwei Mäuse verwendet. Das EPR-Signal der applizierten Gele wurde über drei Wochen verfolgt und das Verhalten der Mäuse beobachtet. Es wurden EPR-Messungen an Tag 0 (Tag der Injektion), 2, 4, 7, 14 und 21 durchgeführt. Zwischen den Messungen wurden die Mäuse in Fünfergruppen mit Wasser und Futter *ad libitum* gehalten.

Toxizität

Nach der Injektion der Formulierungen zeigten die Mäuse keine Anzeichen von Stress oder Schmerzen. Ihr Verhalten unterschied sich innerhalb der drei Wochen nicht von dem unbehandelter Mäuse.

Es ist bekannt, dass die Toxizität von Tritylen mit steigender Lipophilie zunimmt. Die Toxizität des hydrophilen **OXO63** – dem undeutierten Analogon von **46 (OXO71)** – ist mit einer LD₅₀ von 8 mmol/kg Körpergewicht (K.G.) sehr gering.¹⁷⁴ Mäuse, denen **Finland-Radikal** injiziert wurde, sterben jedoch kurze Zeit nach der Applikation.¹⁷³

200 µl des injizierten Oleogels enthalten etwa 182 nmol der Radikale **36-D** und **36-H** und 910 nmol des Radikals **44**. Das entspricht etwa 7.3 µmol/kg K.G. (**36-D**, **36-H**) bzw. 36.4 µmol/kg K.G. (**44**), was eine sehr geringe Gesamtdosis ist. Die *tert*-Butylester-Gruppen der Radikale **36-D** und **36-H** können in wässriger Umgebung hydrolysiert werden und so das toxische **Finland-Radikal** freisetzen. In den Oleogel-Implantaten lagen die Radikale **36-D** und **36-H** jedoch über einen Zeitraum von Tagen bis Wochen *in vivo* vor, ohne dass es zu beobachtbaren toxischen Effekten kam. Weder die Radikale selbst, noch deren Abbauprodukte scheinen also bei der applizierten Menge toxisch zu sein.

Ein weiterer Vorteil der Verkapselung ist, dass die Radikale am Ort der Injektion verbleiben und sich nicht in der gesamten Maus verteilen, wie es bei der Injektion von Radikallösungen der Fall ist. Die Konzentration der Radikale im Oleogel beträgt etwa 1 mM (**36-D**, **36-H**) bzw. 5 mM (**44**). Um vergleichbare Konzentrationen *in vivo* zu erhalten, wenn sich die Spin-Sonde im ganzen Körper verteilt, müssten bei **36-D** und **36-H** 0.9 mmol/kg K.G. und bei **44** sogar 4.5 mmol/kg K.G. vor jeder Messung appliziert werden. Diese ungefähre Berechnung berücksichtigt noch nicht die Akkumulation der Radikale in der Blase und deren Metabolisierung. Zum Vergleich: um eine Konzentration von **OXO63** von 1 mM im Blut im *steady state*-Zustand zu erreichen, müssen 0.75 mmol/kg K.G. des Radikals als Bolus, gefolgt von einer Infusion 0.06 mmol/kg K.G./min appliziert werden.¹³⁴

200 µl des Emulgels enthalten etwa 100 nmol **46** oder 4 µmol/kg K.G., was erneut einer drastischen Reduktion der Gesamtdosis im Vergleich zur Applikation als i. v. entspricht. Die Verwendung verkapselter Spin-Sonden ist nicht nur vorteilhaft hinsichtlich der Reduktion der Toxizität, sondern auch zur Einsparung kostenintensiver Tritylradikale, wenn nur in einem begrenzten Areal O₂-Konzentrationen bestimmt werden sollen.

Stabilität

Abbildung 59 zeigt die Abnahme der Signalintensität (berechnet als AUC (Fläche unter der Kurve)) der *in vivo*-EPR-Spektren in Abhängigkeit von der Zeit. Neben der Radikalmenge beeinflussen weitere Parameter wie die exakte Position der Maus im Resonator oder die Abstimmung des Messsystems die Intensität des EPR-Signals. Dies führt dazu, dass quantitative EPR-Messungen, vor allem *in vivo* und über einen längeren Zeitraum, fehleranfällig sind.¹⁶ Dennoch geben die in Abbildung 59 dargestellten Signalintensitäten einen Hinweis auf die Stabilität der Formulierungen *in vivo* nach intramuskulärer Injektion.

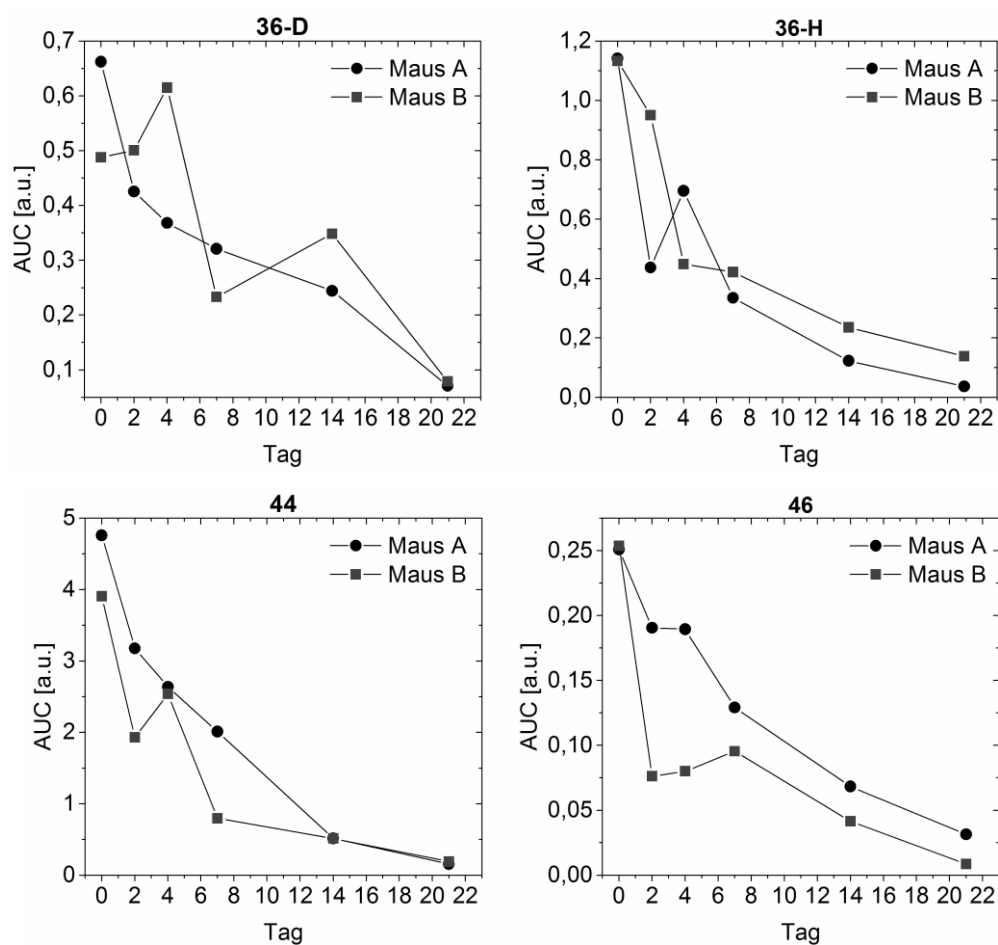


Abbildung 59 Signalintensität (AUC) der verkapselten Radikale *in vivo*.

Wenn Radikale als Lösungen injiziert werden, nimmt die Intensität der EPR-Signale durch Distribution im Körperkreislauf, Metabolisierung und Elimination sehr schnell ab.^{134, 178, 205} Die Anfälligkeit für unterschiedliche Metabolisierungsreaktionen hängt von der Art des Trityls ab. Tetrathiatrityle sind gegenüber unterschiedlichen Reduktionsmitteln relativ inert. Sie sind beispielsweise gegenüber Ascorbinsäure oder Zelllysaten stabil, wohingegen chlorierte Trityle durch diese schnell reduziert werden.^{73, 132} Diese Unterschiede im

Redoxverhalten sollten dazu führen, dass die verschiedenen Tritylklassen eine unterschiedliche Halbwertszeit *in vivo* aufweisen. Aber unabhängig vom Radikaltyp sind die EPR-Signale der verkapselten Radikale bis zu drei Wochen messbar. Die Halbwertszeit beträgt etwa eine Woche.

Ähnliche Oleogele und Emulgelle waren nach subkutaner Injektion bis zu drei Monate nach der Applikation noch nachweisbar.¹⁹⁹ Die Stabilität der Gele wird primär durch den lipaseinduzierten Abbau des Lipids beeinflusst. Fügt man zu einem in einem Puffer vorliegenden Oleogel eine Lipase hinzu, hängt die Abbaurate von der Konzentration des Gelbildners und der Lipase selbst ab.¹⁹⁹ Der Reduktion des EPR-Signals schreitet in dieser Studie also deutlich schneller voran als es aufgrund der vorhandenen *in vivo*-Daten für Gele ähnlicher Zusammensetzung zu erwarten gewesen wäre. Da in der hier dargestellten Studie eine intramuskuläre Applikation vorgenommen wurde, ist anzunehmen, dass der beschleunigte Abbau ein Resultat der größeren mechanischen Beanspruchung der Gele nach intramuskulärer in Vergleich zu subkutaner Injektion ist. Die Beobachtung, dass alle verkapselten Radikale unabhängig von ihrem Redoxverhalten und ihrer Stabilität in biologischen Flüssigkeiten etwa die gleichen *in vivo*-Halbwertszeiten haben, legt weiterhin nahe, dass diese durch die Abbaurate der Gele und nicht durch die Radikaleigenschaften bestimmt wird. Die Radikale werden durch die Verkapselung also effektiv vor Umgebungseinflüssen geschützt. Das Hinzufügen einer wässrigen Phase wie im Fall des Emulgels beeinflusst die Stabilität offenbar nicht. Sowohl das Oleogel als auch das Emulgel sind *in vivo* deutlich stabiler als ein früher getestetes Radikal-haltiges Hydrogel, welches in wachen Mäusen infolge des mechanischen Stresses durch die Bewegung der Mäuse innerhalb von Stunden angebaut wurde.¹⁷⁸

Sauerstoffsensitivität

Die Sauerstoffsensitivität der verkapselten Trityle wurde *in vivo* durch Verringerung des Sauerstoffgehalts in der Atemluft der Mäuse getestet (*Abbildung 60 (B)*).

Die Ergebnisse dieser Messungen sind in *Abbildung 60 (A)* dargestellt. Die Peak-zu-Peak-Linienbreite der Radikale verringerte sich eindeutig unter verminderter Sauerstoffzufuhr. Nachdem die Sauerstoffzufuhr wieder auf 20.9 % erhöht wurde, wurden auch die EPR-Signale wieder breiter. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die verkapselten Radikale auch *in vivo* auf unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen ansprechen. Wie erwartet ist der Effekt bei den lipophilen Radikalen **36-D**, **36-H** und **44** wegen der hohen O₂-Löslichkeit in IPM deutlich ausgeprägter als beim hydrophilen Radikal **46**.

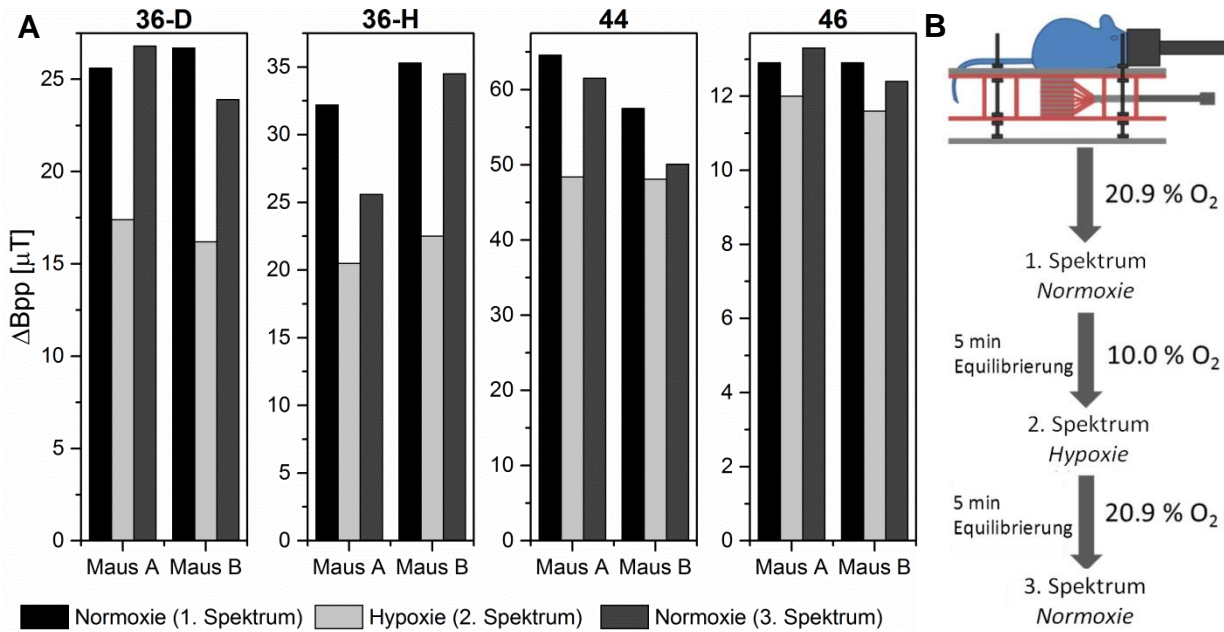


Abbildung 60 (A) Linienbreiten der verkapselten Radikale *in vivo* unter Normoxie (20.9 % O₂) und Hypoxie (10 % O₂) am Tag der Injektion. (B) Vorgehensweise bei der Messung der EPR-Spektren mit unterschiedlichem Sauerstoffgehalt in der Atemluft.

Ein überraschendes Ergebnis war, dass sich die Linienbreiten der Radikale innerhalb der drei Wochen deutlich verringerten (**Abbildung 61**). Außerdem lagen die aus dem Linienbreiten berechneten Sauerstoffwerte an Tag 0 zwischen 5 - 10 %. Dies ist für Muskelgewebe außergewöhnlich hoch.

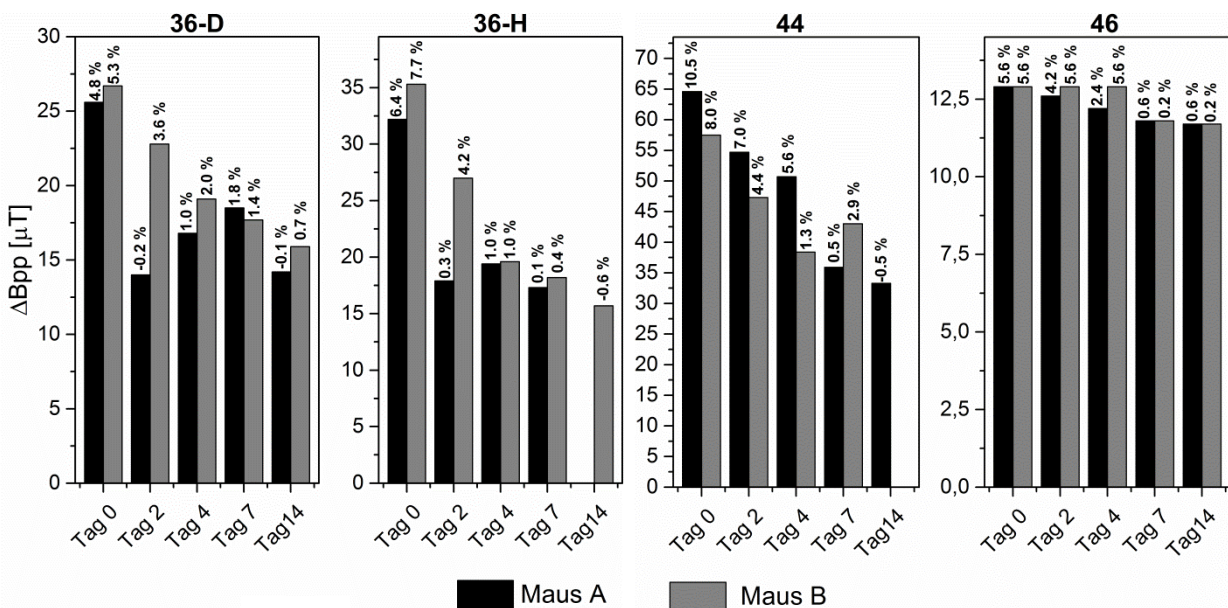


Abbildung 61 Peak-zu-Peak-Linienbreiten der Radikale an den Tagen 0 bis 14 unter Normoxie und die daraus berechneten Gewebesauerstoffkonzentrationen.

Der Sauerstoffpartialdruck in Muskeln liegt normalerweise etwa bei 3.8 %.¹¹² Unterschiedliche Faktoren können sowohl zu dieser Anomalie und als auch zu der großen Variabilität zwischen den Mäusen beigetragen haben:

- (1) Die hohen Sauerstoffwerte könnten eine physiologische Reaktion auf die Gewebeschädigung durch die Injektion der Gele sein. Mit voranschreitendem Heilungsprozess würde dann die Sauerstoffkonzentration wieder sinken.
- (2) Ein Teil des Gels könnte zu Beginn in direktem Kontakt mit Blutgefäßen stehen und die EPR-Messung dadurch insgesamt eher für den Blutkreislauf charakteristische Sauerstoffwerte liefern. Durch Umverteilung des Blutflusses in umgebene Gewebe könnte dann wiederum die gemessene Sauerstoffkonzentration sinken.
- (3) Durch Alterung des Gels könnte sich die Mobilität und damit die Linienbreite der Spin-Sonden oder auch die Löslichkeit und Mobilität von Sauerstoff im Gel ändern.
- (4) Die Verkapselung von Implantaten durch Ausbildung einer Bindegewebshülle ist eine bekannte physiologische Reaktion auf körperfremdes Material.²⁰⁶ Dies könnte zur Ausbildung einer Diffusionsbarriere führen, sodass mit der Zeit eine zu geringe Sauerstoffkonzentration gemessen werden würde.
- (5) Der Abfall der Gewebesauerstoffkonzentration könnte auch eine Adaption der Mäuse an die wiederholte Anästhesie und Hypoxie während der drei Wochen sein.

Eine detaillierte Untersuchung der genannten Prozesse war im Rahmen dieser Promotion nicht möglich. Durch Änderung der Gelformulierungen, des Vorgehens bei der Injektion und/oder durch Änderung des Messprotokolls sollten diese Einflüsse aber minimiert werden können.

Ein weiterer Optimierungsbedarf besteht auch hinsichtlich des Signal/Rausch-Verhältnisses der *in vivo*-EPR-Spektren. Wie an den *in vivo*-EPR-Spektren des verkapselten Radikals **36-D** (*Abbildung 62*) zu sehen ist, ist das Signal/Rausch-Verhältnis sehr gering. Dies erschwert die Bestimmung der Peak-zu-Peak-Linienbreiten und macht die Ergebnisse fehleranfällig. Zwar konnte bei allen Mäusen auch drei Wochen nach der Injektion der Gele ein EPR-Signal registriert werden. Es war aber nicht in jeden Fall möglich aus den Daten die Linienbreite zu ermitteln. Das Signal/Rausch-Verhältnis könnte verbessert werden durch

- (1) Optimierung der Messparameter,
- (2) Verbesserung der Gerätetechnik,
- (3) Verwendung von Wavelet-Filtern und Denoising-Software²⁰⁷,
- (4) Erhöhung der Radikalkonzentration in den Gelformulierungen.

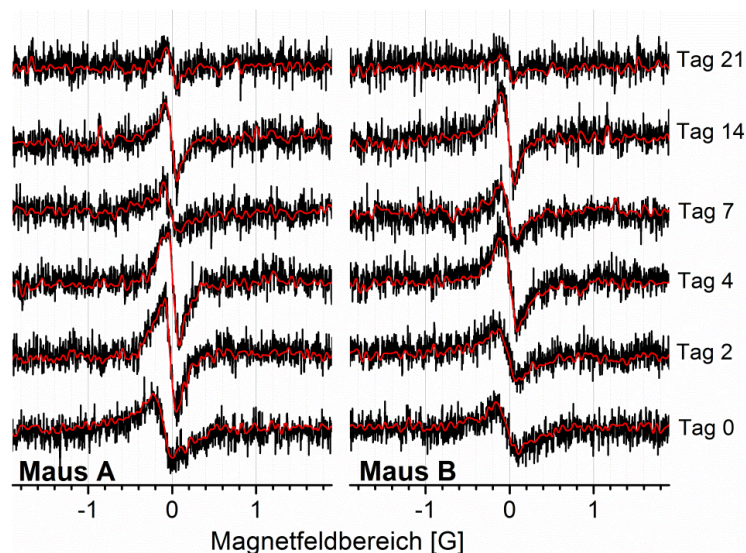


Abbildung 62 *In vivo*-EPR-Spektren von Radikal **36-D** verkapselt im Oleogel an unterschiedlichen Tagen nach der Injektion. Sauerstoffgehalt der Atemluft während der Messung: 20.9 %. Schwarz: Rohdaten; rot: gefilterte Daten.

Für **OXO63** wurde beispielsweise gezeigt, dass es bis zu einer Konzentration von 3 mM zu keiner konzentrationsabhängigen Linienverbreiterung kommt.¹³⁴ Die Konzentration der Tetrathiatrityle, die in dieser Studie verwendet wurde, ist weitaus geringer.

Trotz der genannten Einflussfaktoren, welche die Quantifizierung des Sauerstoffpartialdrucks im Gewebe beeinflussen, zeigt diese Studie, dass durch Verkapselung von Spin-Sonden in lipophile Gelformulierungen unterschiedliche Gewebesauerstoffkonzentrationen registriert werden können. Die hier gezeigten Gelformulierungen für eine quantitative Langzeitmessung lokaler Sauerstoffkonzentrationen *in vivo* stellen also einen guten Ausgangspunkt für eine weitere Optimierung und Untersuchungen solcher Formulierungen dar.

4.2.2.4 Zusammenfassung

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Verkapselung von Spin-Sonden eine sehr gute Methode zur Verlängerung der *in vivo*-Halbwertszeit und zur Reduktion der Toxizität der Spin-Sonden ist, wenn lokal Gewebesauerstoffkonzentrationen gemessen werden sollen. *In vivo*-EPR-Messungen bei verringerter Sauerstoffzufuhr zeigen weiterhin, dass die verkapselten Radikale unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen registrieren können. Allerdings ist die Injektion der Gelformulierungen selbst zu invasiv. Um den Einfluss der Gele auf das Gewebe zu verringern und somit Störungen der Gewebesauerstoffkonzentration zu verringern, sollte beispielsweise das zu injizierende Volumen des Gels reduziert werden.

Dies könnte durch eine Erhöhung der Radikalkonzentration oder durch eine Verbesserung der Gelstabilität erreicht werden. Die Verkapselung der Radikale führt außerdem zu einer Reduktion der applizierten Gesamtdosis, wodurch nicht nur die Toxizität verringert wird, sondern auch Kosten eingespart werden können, da wiederholte Messungen über einen längeren Zeitraum ohne erneute Radikalinjektion möglich sind. Durch die Verkapselung der Sonden können deren Eigenschaften (z.B. Löslichkeit, Toxizität und Halbwertszeit) in einem gewissen Maß durch Anpassung der Formulierung modifiziert werden, sodass ein breites Spektrum an Radikalen als EPR-Sonden verwendet werden kann.

4.2.3 EPR-spektroskopische Charakterisierung der Methylphosphonsäuretrityle **39a** und **40a**

4.2.3.1 Analyse der Reinheit der Radikale **39a** und **40a** durch Simulation der EPR-Spektren

Für die EPR-spektroskopische Untersuchung wurden Radikal **39a** und die Mischung von **40a-c** in DMSO gelöst und entgast. Die EPR-Spektren der Lösungen wurden bei 9.4 GHz (X-Band) bei Raumtemperatur vermessen (*Abbildung 63*).

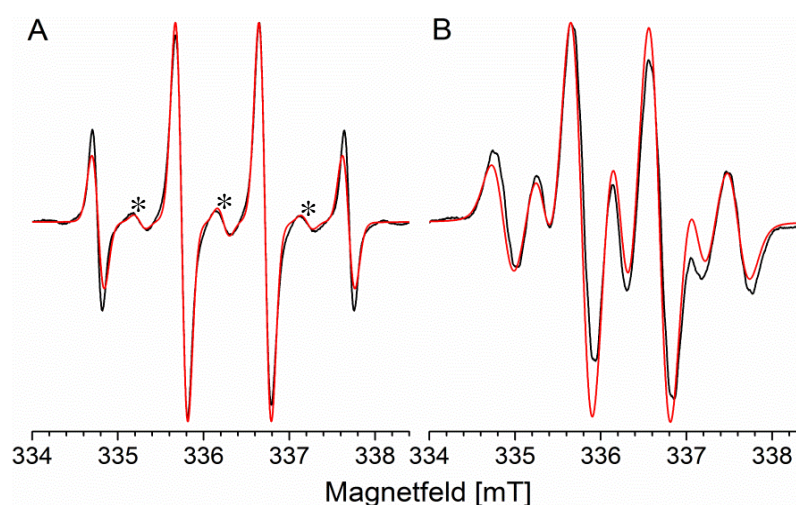


Abbildung 63 X-Band-EPR-Spektren von (A) **39a** mit etwa 5 % **39b** und (B) **40a-c** in DMSO ($c \approx 200 \mu\text{M}$, Proben entgast) bei 25 °C.

Das Spektrum von Radikal **39a** besteht wie erwartet aus vier Signalen mit einem Intensitätsverhältnis von 1:2:2:1. Das Kopplungsmuster entsteht durch die Wechselwirkung des freien Elektrons mit drei äquivalenten Phosphoratomen (Kernspin $I = \frac{1}{2}$). Daneben ist das EPR-Signal einer weiteren Substanz zwischen den Peaks von **39a** sichtbar (markiert in *Abbildung 63* (A) durch *). Die Simulation des Spektrums mit EasySpin zeigt, dass dieses Signal durch eine Verunreinigung mit etwa 5 % **39b** verursacht wird. Die Parameter der

Simulation sind in *Tabelle 24* angegeben. Versuche, die Verunreinigung durch Säulenchromatographie oder HPLC zu entfernen, waren nicht erfolgreich. **40a** konnte wie im Abschnitt 4.2.1.1 beschrieben nicht als Reinsubstanz, sondern nur in einem Gemisch mit **40b** und **40c** gewonnen werden. Die Verunreinigung zeigt sich sehr deutlich im EPR-Spektrum (*Abbildung 63 (B)*). Eine annähernde Simulation des Spektrums gelang mit einem Mischungsverhältnis der Komponenten von 70:20:10 (*Tabelle 24*). Die Verunreinigung mit **40b** und **40c** wird durch die massenspektrometrische Analyse gestützt.

Tabelle 24 Parameter der in *Abbildung 63* gezeigten Simulationen.

Parameter*	System 1	System 2	System 1	System 2	System 3
Substanz	39		40		
	a	b	a	b	c
Kern	P	P	P	P	P
Anzahl der Kerne	3	2	3	2	1
a(P) [μT]	974	974	914	892	982
$\Delta\text{B}_{\text{pp}}$ [μT] (Gauss/Lorentz)	140/10	140/10	240/60	200/60	200/60
Anteil [%]	95	5	70	20	10

* Wasserstoffhyperfeinkopplungen wurden zur Vereinfachung der Simulation nicht berücksichtigt.

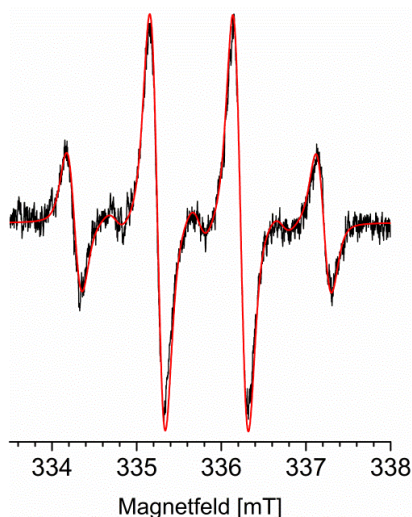


Abbildung 64 X-Band-EPR-Spektrum von **40a** (gelöst im DCM, Konzentration unbekannt) vor dem Versuch der Reinigung bei RT. Schwarz: experimentelles Spektrum; rot: simuliertes Spektrum.

Abbildung 64 zeigt ein EPR-Spektrum von **40a** vor dem Versuch der Aufreinigung. Der Anteil an Verunreinigungen scheint hier deutlich geringer zu sein. Eine annähernde Simulation des Spektrums gelang in diesem Fall mit einem Anteil von 5 - 10 % an **40b**.

4.2.3.2 Untersuchung des Einflusses der Molekülstruktur auf die Hyperfeinkopplungskonstanten und die Linienbreiten

Die in *Tabelle 24* aufgeführten Kopplungskonstanten und Linienbreiten von **39a** und **40a** sind im Vergleich zu **poTAM** (*Abbildung 48*) sehr groß. Für eine 0.1 M Lösung von **pTAM** im PBS-Puffer pH 7.4 beträgt $a(\text{P})$ 350 μT und ΔB_{pp} 17 μT .¹⁴⁵ Die Hyperfeinkopplungskonstante von **39a** und **40a** sind also 2.6 - 2.8-mal größer als von **poTAM** und die Signale 8- bzw. 15-mal breiter.

Dieses unerwartete EPR-spektroskopische Verhalten kann auf die strukturellen Eigenschaften von **39a** und **40a** zurückgeführt werden. In den beiden Radikalen sind die Phosphonsäurer(ester)-Gruppen über ein sp^3 -hybridisiertes Kohlenstoffatom an den Tritylgrundkörper gebunden. Daraus ergibt sich ein Bindungswinkel von ca. 110° . Die sterisch anspruchsvollen Schwefelatome in *ortho*-Position behindern die Rotation der Phosphonsäure(ester)-Gruppen, sodass, wie in *Abbildung 65 (A)* dargestellt, die bevorzugte Position der Gruppen außerhalb der aromatischen Ebene ist. Dies führt zu einer verstärkten Hyperkonjugation durch eine intensivere Überlappung des 2p_z -Orbitals des aromatischen Systems und dem 3s -Orbital des Phosphoratoms.

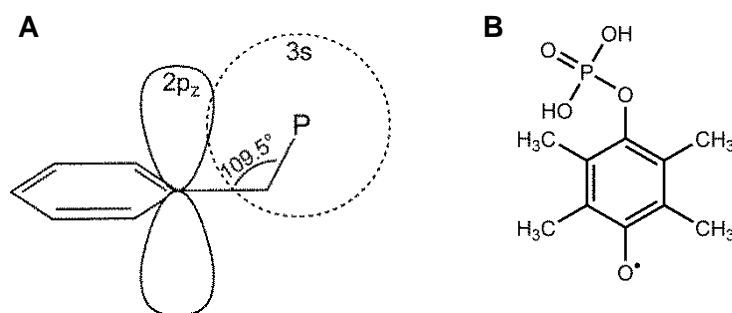


Abbildung 65 (A) Überlappung der Phosphor-3s-Orbitals mit dem Kohlenstoff-2pz-Orbital. Abbildung modifiziert nach Allen et al.²⁰⁸ (B) Semichinonphosphatradikal 2,3,5,6-tetramethyl-1,4-benzosemichinon-1-phosphat.

Durch die Hyperkonjugation erhöht sich die Spindichte am Phosphoratom und dadurch auch die Hyperfeinkopplungskonstante. Die Effektivität der Hyperkonjugation hängt vom Torsionswinkel der beteiligten Atome ab und ist am effektivsten, wenn der Winkel 0° erreicht und ist am schwächsten bei einer Drehung von 90° . Wegen der sterisch anspruchsvollen Schwefelatome sollten die Torsionswinkel in **39a** und **40a** im Mittel eher klein sein und daher

die Hyperkonjugation sehr effektiv. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits 1964 von Allen et al. für Semichinonphosphatradikale beobachtet.²⁰⁸ Sterisch gehinderte Semichinonphosphatradikale wie *2,3,5,6-tetramethyl-1,4-benzosemichinon-1-phosphat* (Abbildung 65 (B)) wiesen in dieser Studie um ein vielfaches größere Hyperfeinkopplungskonstanten auf im Vergleich zu solchen Radikalen, bei denen die Rotation um die O - P-Bindung nicht gehemmt war. Betrachtet man im Vergleich zu **39a** und **40a** das Phosphonsäuretrityl **pTAM**, liegt bei diesem Trityl das Phosphoratom in der Knotenebene des aromatischen Systems. Die Kopplung des freien Elektrons mit dem Phosphorkern ist daher lediglich ein Resultat indirekter π - σ -Polarisation. Hyperkonjugation trägt nicht maßgeblich dazu bei. Das Auftreten der sehr großen Peak-zu-Peak-Linienbreiten ist damit noch nicht erklärt. Am wahrscheinlichsten werden diese aber auch durch die gehinderte Rotation der Phosphonsäure(ester)-Gruppen verursacht, da dadurch die je nach Torsionswinkel leicht unterschiedlichen, unaufgelösten Proton-Hyperfeinkopplungen nicht mehr dynamisch ausgemittelt werden können.

4.2.3.3 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Die hier gezeigten Ergebnisse machen deutlich, dass das Einführen eines „Linkers“ zwischen dem aromatischen System eines Trityls und einem Atomkern, dessen Kernspin ungleich null ist, zu einem unerwarteten Verhalten hinsichtlich Kopplungskonstante und Linienbreite führen kann. Sowohl große Linienbreiten als auch Kopplungskonstanten sind bei Tritylradikalen von Nachteil, da sich dies negativ auf die Verwendbarkeit als Spin-Sonden bei EPR-Messungen und vor allem Imaging-Experimenten auswirkt (geringes Signal/Rausch-Verhältnis, geringe Auflösung bei Imaging-Experimenten). Aufgrund dessen wurde auf eine weitere Untersuchung der Radikale hinsichtlich Sauerstoff- bzw. pH-Sensitivität verzichtet. Auch wurde die Synthese und Reinigung der Radikale nicht weiter optimiert. Die Ergebnisse dieser Studie sind dennoch wichtig, da sie eine Erweiterung des Wissens im Bereich der Synthese und Eigenschaften von vollständig substituierten Triarylmethylradikalen darstellen.

4.3 Experimenteller Teil

4.3.1 Synthese

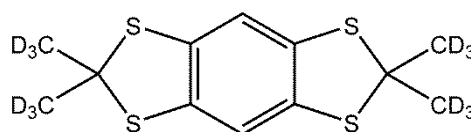
4.3.1.1 Materialien und allgemeine Methoden für die Synthese und analytische Charakterisierung

Siehe Abschnitt 6.

4.3.1.2 Synthesevorschriften

2,2,6,6-Tetra(²H₃-methyl)benzo[1,2-d:4,5-d']bis[1,3]dithiol (33).

1,2,4,5-Tetra-*tert*.butylthiobenzol (16.0 g, 37.2 mmol) wurde in Toluol (500 ml) gelöst. Zu dieser Lösung wurde HBF₄ (54 % in Et₂O, 10 ml, 37.0 mmol)



hinzugegeben und für 30 min bei RT mit hoher Drehzahl gerührt. Nach der Zugabe von Aceton-D₆ (10 ml, 148 mmol) wurde der Reaktionsansatz für weitere 4 h bei RT gerührt und anschließend über Nacht zum Rückfluss erhitzt, wobei sich das Reaktionsgemisch dunkelbraun bis schwarz verfärbte. Nach dem Abkühlen wurde unter starkem Rühren langsam gesättigte NaCO₃-Lösung (100 ml) zugesetzt. Es wurde ein Farbumschlag von schwarz über grün nach gelb-orange beobachtet. Die wässrige Phase wurde dreimal mit EtAc (30 ml) extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum bis fast zur Trockne eingengt. Durch Zusatz von Ethanol (50 ml) kristallisierte das Produkt aus und das Nebenprodukt (*tert*-Butyl-4-methylbenzol) blieb in Lösung. Das Produkt wurde abfiltriert, mehrmals mit Ethanol gewaschen und getrocknet.

Summenformel: C₁₂H₂D₁₂S₄

Molmasse: 289.57 g/mol

Ausbeute: 9.93 g (86 %)

Aussehen: weißer Feststoff

R_f-Wert: 0.35 (Heptan)

Schmelzpunkt: 143 - 145 °C

¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 7.02 (s, ArH, 2H), 1.90 - 1.82 (m, CD_nH_m, 3H)

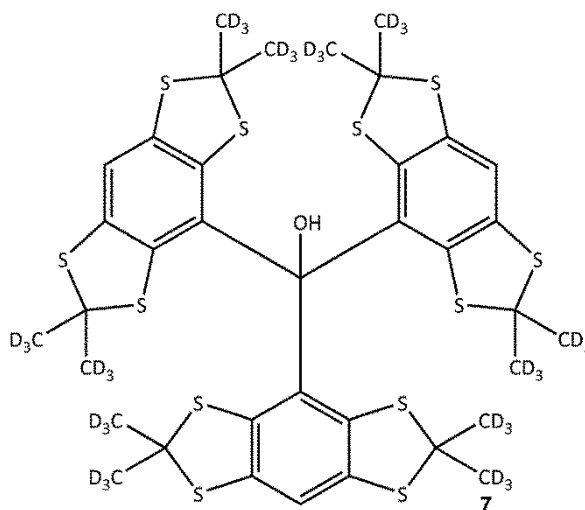
¹³C NMR: (101 MHz, CDCl₃) δ 135.70, 116.79, 65.46, 30.64

HRMS (ESI): berechnet für C₁₂H₂D₁₂S₄ [M]⁺ 298.073; gefunden 298.072

Deuterierungsgrad: 77 % (ESI-MS), 76 % (NMR)

Tris-(2,2,6,6-tetra(²H₃-methyl)benzo[1,2-d:4,5-d']bis[1,3]dithiol)methanol (34).

33 (3.50 g, 11.7 mmol) wurde in trockenem Et₂O (150 ml) gelöst. Dem Reaktionsansatz wurde langsam n-BuLi (2.5 M in Hexan 4.69 ml, 11.72 mmol) hinzugegeben und für 2 h bei RT gerührt. Das entstandene Lithiumsalz fiel dabei aus. Chlorameisensäuremethylester (0.3 ml, 3.9 mmol) in Et₂O (40 ml) wurde mit Hilfe eines Tropftrichters langsam über Nacht zugetropft. Die Reaktion wurde durch Zugabe



von gesättigter NaHCO₃-Lösung (150 ml) beendet. Es wurde so lange gerührt, bis sich der Niederschlag vollständig gelöst hatte. Die org. Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase anschließend mit EtAc gewaschen. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Die säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes erfolgte an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit Heptan und EtAc (100:1) als Eluent.

Summenformel: C₃₇H₄D₃₆S₁₂

Molmasse: 920.20 g/mol

Ausbeute: 1.57 g (43 %)

Aussehen: weißer Feststoff

R_f-Wert: 0.35 (Heptan)

Schmelzpunkt: 250 - 255 °C

¹H NMR: (500 MHz, CDCl₃) δ 7.17 (s, ArH, 3H), 6.21 (s, COH, 1H), 1.90 - 1.59 (m, CD_nH_m, 11H)

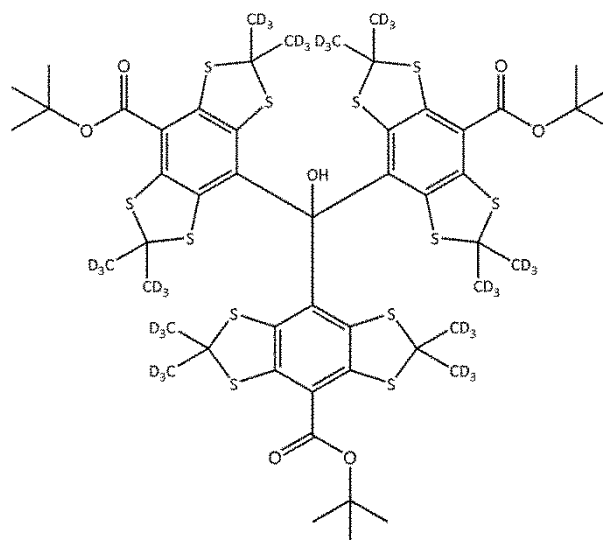
¹³C NMR: (100 MHz, CDCl₃) δ 139.5, 138.6, 138.1, 137.6, 132.2, 118.5, 83.9, 63.9, 63.6, 63.2

HRMS (ESI): berechnet für C₃₇H₄D₃₆S₁₂ [M]⁺ 920.199; gefunden 920.120

Deuterierungsgrad: 75 % (ESI-MS), 77 % (NMR)

Tris-(8-*tert*-butoxycarbonyl-2,2,6,6-tetra(²H₃-methyl)benzo[1,2-*d*:4,5-*d'*]bis[1,3]dithiol) methanol (35).

34 (1.0 g, 1.08 mmol) und TMEDA (1.69 ml, 11.3 mmol) wurden in Hexan (10 ml) gelöst. *n*-BuLi (2.5 M in Hexan, 4.52 ml, 11.3 mmol) wurde tropfenweise hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde für 4 h bei RT gerührt. Diese Mischung wurde mit Hilfe einer Spritze langsam in einen mit Diboc (24.0 g, 0.11 mol) bestückten Kolben gegeben und 2 Tage lang bei RT gerührt. Der Überschuss an Diboc wurde durch langsame Zugabe von MeOH (ca. 20 ml) zerstört. Der Ansatz wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde in EtAc aufgenommen und mit 2 M HCl-Lösung gewaschen. Die org. Phase wurde abgetrennt, mit MgSO₄ getrocknet und eingengt. Die säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes erfolgte diskontinuierlich an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit Heptan und EtAc (95:5 bis 65:35) als Eluent.



Summenformel: C₅₂H₂₈D₃₆O₇S₁₂

Molmasse: 1222.02 g/mol

Ausbeute: 0.41 g (30 %)

Aussehen: weißer bis blassgelber Feststoff

R_f-Wert: 0.13 (Heptan/Ethylacetat 9:1)

Schmelzpunkt: > 250 °C (Zersetzung)

¹H NMR: (500 MHz, CDCl₃) δ 6.72 (s, COH, 1H), 1.65 (s, tert. butyl, 27H), 1.79 - 1.60 (m, CD_nH_m, 8H)

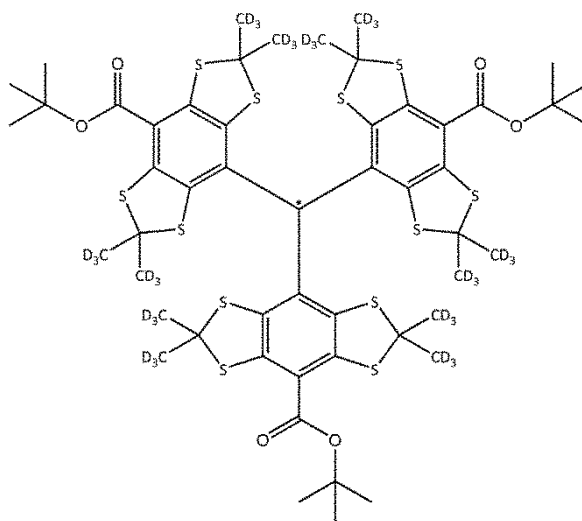
¹³C NMR: (125 MHz, CDCl₃) δ 165.4, 141.2, 140.9, 140.3, 139.1, 133.8, 122.9, 84.3, 84.3, 60.9, 60.9, 34.0, 31.9, 29.3, 28.6, 28.4

HRMS (ESI): berechnet für C₅₂H₂₈D₃₆O₇S₁₂ [M]⁺ 1220.356; gefunden 1220.355

Deuterierungsgrad: 82 % (ESI-MS), 69 % (NMR)

Tris-(8-*tert*-butoxycarbonyl-2,2,6,6-tetra(²H₃-methyl)benzo[1,2-*d*:4,5-*d'*]bis[1,3]dithiol) methylradikal (36-D).

35 (100 mg, 0.164 mmol) wurde in trockenem DCM (10 ml) unter Argonatmosphäre gelöst. Anschließend wurde lichtgeschützt BF₃•Et₂O (85 µl, 0.655 mmol) zugetropft und der Reaktionsansatz für eine Stunde gerührt. Zur schwarzverfärbten Lösung wurde SnCl₂ (wasserfrei, 26 mg, 0.139 mmol, in 5 ml trockenem THF) zugefügt und für weitere 10 min im lichtgeschützt gerührt. Zu dem Reaktions-



ansatz wurde gesättigte KH₂PO₄-Lösung (8 ml) zugegeben. Die org. Phase wurde abgetrennt, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Die säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes mittels MPLC mit Heptan und EtAc (100:0 bis 70:30) als Eluent.

Summenformel: C₅₂H₂₇D₃₆O₆S₁₂

Molmasse: 1205.01 g/mol

Ausbeute: 0.41 g (30 %)

Aussehen: dunkelgrüner Feststoff

R_f-Wert: 0.5 (Heptan/Ethylacetat 7:3)

Schmelzpunkt: > 360 °C (Zersetzung)

HRMS (ESI): berechnet für C₅₂H₂₇D₃₆O₆S₁₂ [M]⁺ 1203.353; gefunden 1203.352

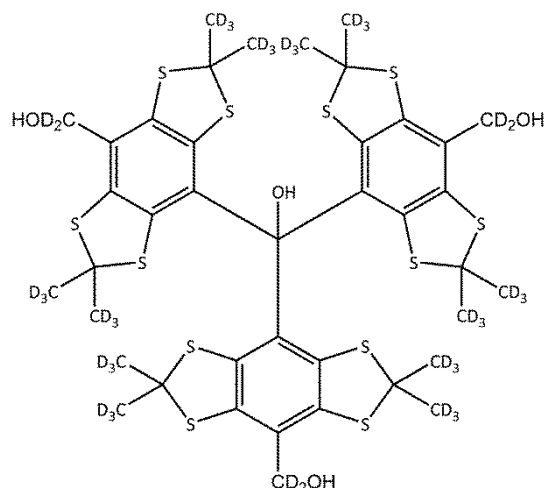
IR (ATR): 2981, 2927, 2212, 1692, 1588, 1480, 1455, 1392, 1367, 1279, 1229, 1159, 1130, 1048, 1022, 982, 898 cm⁻¹

Deuterierungsgrad: 82 % (ESI-MS)

Tris[8-hydroxy(²H₂)methyl-2,2,6,6-(²H₃-tetramethyl)benzo[1,2-*d*:4,5-*d'*]bis([1,3]dithiol)-4-yl]methanol (37).

34 (850 mg, 0.922 mmol) wurde in trockenem Et₂O (80 ml) gelöst. Der Reaktionsansatz wurde auf 0 °C gekühlt, dann wurden nacheinander TMEDA (1.45 ml, 9.68 mmol) und n-BuLi (2.5 in Hexan, 2.67 ml, 9.68 mmol) hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde für 3.5 h gerührt, wobei die Temperatur langsam auf RT anstieg. Paraformaldehyd-D₂ (99 % D,

0.59 g, 18.45 mmol) wurde hinzugefügt und 24 h bei RT gerührt. 20 ml D₂O wurden zum Reaktionsansatz hinzugegeben und gerührt bis das Präzipitat gelöst war. Die org. Phase wurde abgetrennt. Die wässrige Phase wurde mehrfach mit EtAc gewaschen. Die vereinigten org. Phasen wurden einmal mit konz. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und unter Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wurde chromatographisch mittels MPLC gereinigt. Als Eluent wurde ein Heptan/EtAc-Gradient verwendet.



Summenformel: C₄₀H₄D₄₂O₄S₁₂

Molmasse: 1017.78 g/mol

Ausbeute: 0.553 g (59 %)

Aussehen: grünlicher Feststoff

R_f-Wert: 0.32 (Heptan/EtAc 1:1)

Schmelzpunkt: > 250 °C

¹H NMR: (500 MHz, CDCl₃) δ 6.37 (s, 1H, C-OH), 1.90 (s, CD₂-OH, 3H), 1.85 - 1.60 (m, 9H, CD_nH_{3-n})

¹³C NMR: (126 MHz, CDCl₃) δ 140.10, 139.12, 138.57, 137.87, 131.39, 130.47, 83.72, 65.24, 65.05, 64.89, 63.13 - 62.32, 34.84 - 33.54, 32.27 - 30.68, 29.42 - 28.04, 27.61 - 26.50

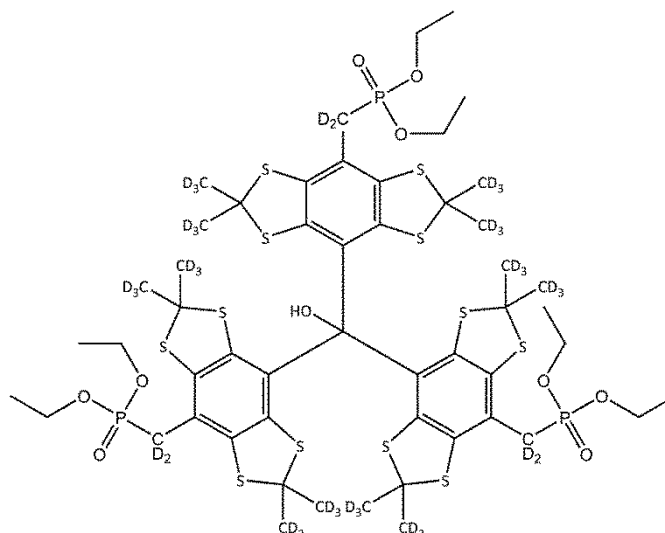
HRMS (ESI): berechnet für C₄₀H₄D₄₂O₄S₁₂ [M]⁺ 1016.268; gefunden 1016.267

Deuterierungsgrad: 79 % (ESI-MS), 78 % (NMR)

Tris[8-diethoxyphosphoryl(²H₂)methyl-2,2,6,6-(²H₃-tetramethyl)benzo[1,2-*d*:4,5-*d'*]bis([1,3]dithiol)-4-yl]methanol (38).

ZnI₂ (282 mg, 0.882 mmol) und Triethylphosphit (306 µl, 1.764 mmol) wurden in trockenem Toluol (50 ml) gelöst. **37** (0.200 g, 0.196 mmol) wurde zu der Lösung hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde auf 80 °C erhitzt und über Nacht bei dieser Temperatur gerührt. Das LM und flüchtige Nebenprodukte wurden unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in EtAc (50 ml) aufgenommen und mit NaOH-Lösung (25 % in Wasser) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mehrfach mit EtAc gewaschen. Die

vereinigten org. Phasen wurden einmal mit konz. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und dann am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromato-graphische Reinigung des Rohproduktes erfolgte an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit EtAc und MeOH (95:5) als Eluent.



Summenformel: C₅₂H₃₁D₄₂O₁₀P₃S₁₂

Molmasse: 1378.04 g/mol

Ausbeute: 0.202 g (69 %)

Aussehen: grünlicher Feststoff

R_f-Wert: 0.22 (Ethylacetat/Methanol 95:5)

Schmelzpunkt: 120 - 124 °C

¹H NMR: (500 MHz, CDCl₃) δ 5.97 (s, 1H, C-OH), 4.12 - 3.96 (m, 12H, CH₂CH₃), 1.82 - 1.57 (m, 11H, CD_nH_{3-n}), 1.28 (dt, *J* = 15.8, 7.1 Hz, 18H, CH₂CH₃)

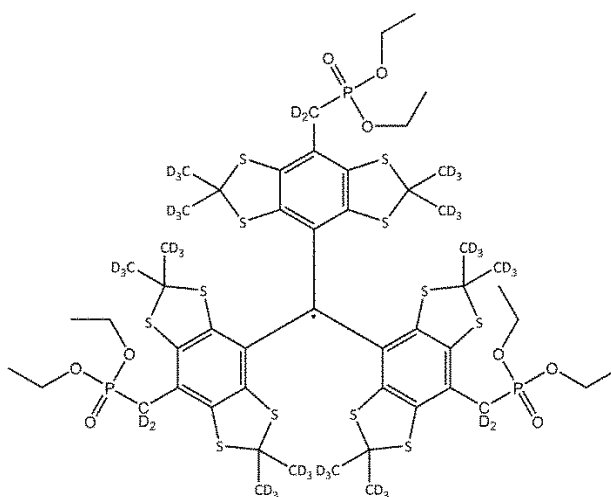
¹³C NMR: (126 MHz, CDCl₃) δ 139.99, 139.51, 138.72, 138.59, 130.82, 122.95, 83.85, 62.50, 62.45, 62.39, 62.34, 36.08 - 33.20, 32.79 - 30.27, 29.60 - 27.30, 27.16 - 25.20, 16.64, 16.59, 16.54

HRMS (ESI): berechnet für C₅₂H₃₁D₄₂O₁₀P₃S₁₂Na [M+Na]⁺ 1399.360; gefunden 1399.360

Deuterierungsgrad: 82 % (ESI-MS), 72 % (NMR)

Tris[8-diethoxyphosphoryl(²H₂)methyl-2,2,6,6-(²H₃-tetramethyl)benzo[1,2-*d*:4,5-*d'*]bis([1,3]dithiol)-4-yl]methylradical (39).

38 (100 mg, 0.073 mmol) wurde in trockenem DCM (10 ml) gelöst. Anschließend wurde lichtgeschützt BF₃•Et₂O (72 μl, 0.584 mmol) vorsichtig zutropft und der Reaktionsansatz für 1 h bei RT gerührt. Zur Lösung wurde SnCl₂ (wasserfrei, 235 mg, 1.241 mmol, in 3.5 ml trockenem THF) zugefügt und für weitere 10 min im lichtgeschützt gerührt. Zu dem



Reaktionsansatz wurde gesättigte KH_2PO_4 -Lösung (10 ml) zugegeben. Die org. Phase wurde abgetrennt, über MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingengt. Das Rohprodukt wurde chromatographisch mittels MPLC gereinigt. Als Eluent wurde ein EtAc/MeOH-Gradient (99:1 bis 95:5) verwendet.

Summenformel: $\text{C}_{52}\text{H}_{30}\text{D}_{42}\text{O}_9\text{P}_3\text{S}_{12}^\bullet$

Molmasse: 1361.04 g/mol

Ausbeute: 100 mg (100 %)

Aussehen: dunkelgrüner Feststoff

R_f -Wert: 0.23 (EtAc/MeOH 95:5)

Schmelzpunkt: 108 - 110 °C

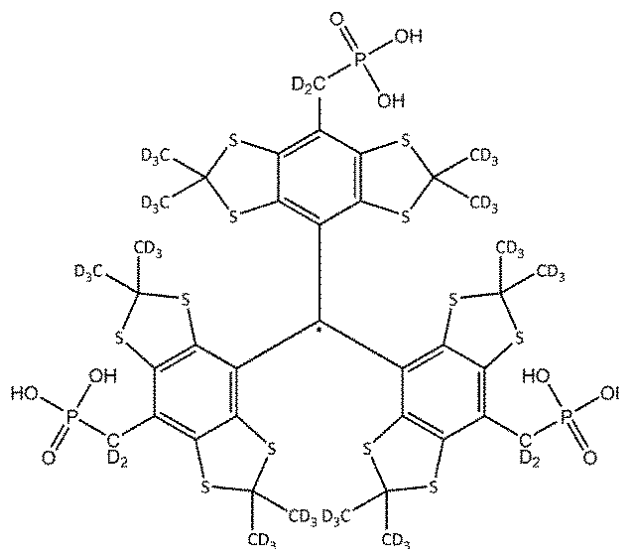
HRMS (ESI): berechnet für $\text{C}_{52}\text{H}_{30}\text{D}_{42}\text{O}_9\text{P}_3\text{S}_{12}\text{Na} [\text{M}]^+$ 1359.367; gefunden 1359.368

IR (ATR): 3680 - 3180, 2978, 2926, 2906, 2866, 2219, 2138, 2082, 1636, 1252, 1475, 1441, 1390, 1367, 1350, 1238, 1162, 1097, 1049, 1017, 962, 871, 815, 800, 772 cm^{-1}

Deuterierungsgrad: 77 % (ESI-MS)

Tris[8-phosphoryl($^2\text{H}_2$)methyl-2,2,6,6-($^2\text{H}_3$ -tetramethyl)benzo[1,2-*d*:4,5-*d'*]bis([1,3]dithiole)-4-yl]methylradical (40).

38 (100 mg, 0.073 mmol) wurde in Dichlormethan (20 ml) gelöst. Bromotrimethylsilan (383 μl , 2.903 mmol) wurde hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde licht-geschützt über Nacht bei RT gerührt, dann wurde Methanol (15 ml) hinzugefügt und für 4 h zum Reflux erhitzt und gerührt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Reaktionsansatz am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Es wurde versucht, den Rückstand mittels HPLC an einer RP18-Säule mit einem Wasser/Methanol-Gradienten mit 1 % TFA zu reinigen. Ein grüner Feststoff wurde erhalten, welcher eine Mischung aus dem Mono-, Di- und Trimethylenphosphonsäuretrityl darstellt.



Summenformel: $\text{C}_{40}\text{H}_6\text{D}_{42}\text{O}_9\text{P}_3\text{S}_{12}^\bullet$

Molmasse: 1192.71 g/mol

Ausbeute: 42 mg (24 %) eines Gemischs aus dem Mono-, Di- und Trimethylenphosphonsäuretrityl

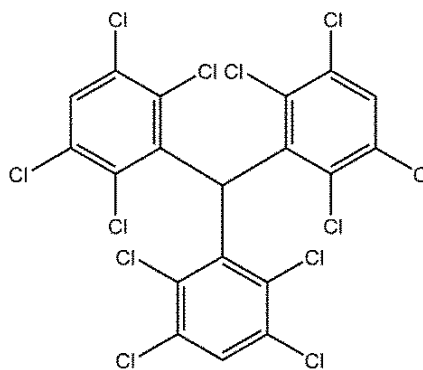
Aussehen: dunkelgrüner Feststoff

HRMS (ESI): berechnet für $C_{40}H_{17}D_{30}O_9P_3S_{12}^{2-}$ $[M-H]^{2-}$ 589.049; gefunden 589.048

Deuterierungsgrad: 77 % (ESI-MS)

Tris(2,3,5,6-tetrachlorophenyl)methan (42).

1,2,4,5-Tetrachlorobenzol (9.6 g, 44 mmol) wurde zusammen mit $AlCl_3$ (0.73 g, 5.2 mol) und trockenem, ethanolfreien $CHCl_3$ (0.4 ml, 4.9 mmol) in ein Glasdruckgefäß gegeben. Dieses wurde dicht verschlossen und in einem Ölbad für 45 min auf 160 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden zunächst Eis und 1M HCl (ca. 25 ml) auf den festen Reaktionsansatz gegeben. Dann wurde $CHCl_3$ hinzugefügt und der Ansatz so lange



gerührt, bis sich alle Komponenten gelöst hatten. Die wässrige Phase wurde abgetrennt und noch dreimal mit $CHCl_3$ gewaschen. Die vereinigten org. Phasen wurden nacheinander mit Wasser, $NaHCO_3$ -Lösung (5 % in Wasser) und konz. $NaCl$ -Lösung gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Das LM wurde unter Vakuum entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel 60 (0.063 – 0.200 mm) mit Heptan als Eluent gereinigt.

Summenformel: $C_{19}H_4Cl_{12}$

Molmasse: 657.64 g/mol

Ausbeute: 1.9 g (60 %)

Aussehen: weißer Feststoff

R_f-Wert: 0.52 (Heptan)

Schmelzpunkt: > 280 °C

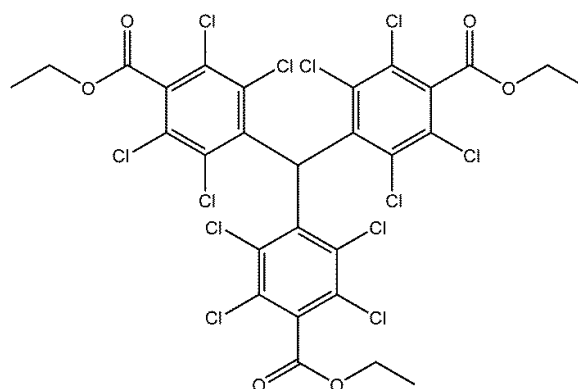
¹H NMR: (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.65 (s, ArH, 3H), 6.98 (s, Ar_3CH , 1H)

¹³C NMR: (100 MHz, $CDCl_3$) δ 138.0, 134.3, 133.6, 133.3, 132.4, 130.3, 56.1

HRMS (ESI): berechnet für $C_{19}H_3Cl_{12}$ $[M-H]^-$ 656.642; gefunden 656.639

Tris(4-ethoxy-carbonyl-2,3,5,6-tetrachlorophenyl)methan (43).

42 (445 mg, 0.677 mmol) und TMEDA (1.02 ml, 6.767 mmol) wurden in trockenem THF (50 ml) unter Argonatmosphäre gelöst. Und auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. N-BuLi (2.5 M in Hexan, 2.71 ml, 6.767 mmol) wurde hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 1 h bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt, dann wurde Chlorameisensäureethylester (644 μl , 6.767 mmol)



hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht gerührt. Währenddessen erhöhte sich die Temperatur langsam auf RT. Das THF wurde unter Vakuum entfernt, der Rückstand wurde in DCM (ca. 50 ml) aufgenommen, mit Wasser und konz. NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das LM wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand chromatographisch mittels MPLC mit einem Heptan/EtAc-Gradienten (100:0 bis 85:15) gereinigt.

Summenformel: $\text{C}_{28}\text{H}_{16}\text{Cl}_{12}\text{O}_6$

Molmasse: 873.83 g/mol

Ausbeute: 306 mg (51 %)

Aussehen: weißer Feststoff

R_f-Wert: 0.22 (Heptan/EtAc 12:1)

Schmelzpunkt: 173 - 175 $^{\circ}\text{C}$

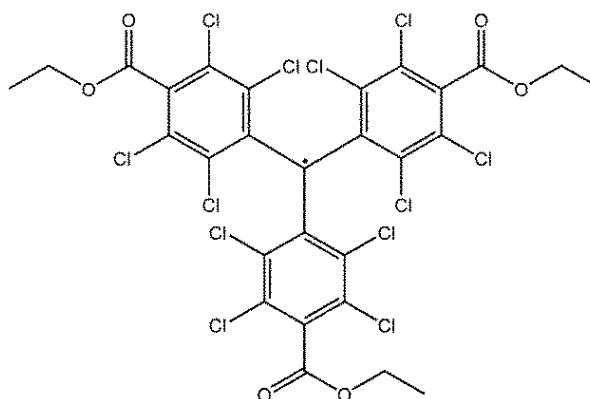
^1H NMR: (400 MHz, CDCl_3) δ 7.01 (s, Ar_3CH , 1H), 4.49 (q, $J = 7.1$ Hz, 6H), 1.43 (t, $J = 7.1$ Hz, 9H)

^{13}C NMR: (100 MHz, CDCl_3) δ 163.1, 138.4, 135.5, 135, 134, 130.5, 129.5, 63.1, 56.3, 14

HRMS (ESI): berechnet für $\text{C}_{28}\text{H}_{17}\text{Cl}_{12}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 874.720; gefunden 874.719

Tris(4-ethoxy-carbonyl-2,3,5,6-tetrachlorophenyl)methylradikal (44).

43 (500 mg, 0.57 mmol) wurde in THF (50 ml) gelöst. Bu₄NOH (1 M in Methanol, 720 µl, 0.69 mmol) wurde hinzugefügt und die Mischung wurde lichtgeschützt 1 h bei RT gerührt. P-Chloranil (563 mg, 2.29 mmol) wurde hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde lichtgeschützt über Nacht bei RT gerührt.



Das LM wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand möglichst lichtgeschützt chromatographisch mittels MPLC mit einem Heptan/EtAc-Gradienten (100:0 bis 80:20) gereinigt.

Summenformel: C₂₈H₁₅Cl₁₂O₆[•]

Molmasse: 872.82 g/mol

Ausbeute: 485 mg (97 %)

Aussehen: roter Feststoff

R_f-Wert: 0.30 (Heptan/Ethylacetat 9:1)

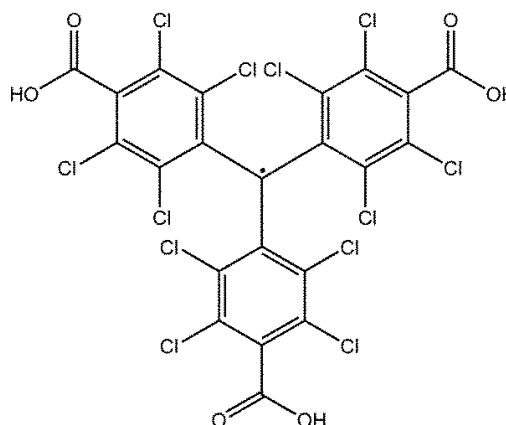
Schmelzpunkt: 158 - 160 °C

HRMS (ESI): berechnet für C₂₈H₁₅Cl₁₂O₆ [M]⁺ 872.720; gefunden 872.725

IR (ATR): 2981, 1742, 1688, 1679, 1572, 1456, 1445, 1373, 1342, 1329, 1260, 1224, 1136, 1111, 1017, 857, 755 cm⁻¹

Tris(4-carboxy-2,3,5,6-tetrachlorophenyl)methylradikal (45).

44 (480 mg, 0.550 mmol) wurde in konz. H₂SO₄ (60 ml) gelöst. Die Mischung wurde auf 90 °C erhitzt und über Nacht lichtgeschützt gerührt. Die Reaktionsmischung wurde nach dem Abkühlen auf Eis gegossen und mehrfach mit Et₂O extrahiert. Die vereinigten Et₂O-Phasen wurden mit Na₂CO₃-Lösung (5 % in Wasser) extrahiert. Die basische wässrige Phase wurde tropfenweise mit konz. HCl-



Lösung angesäuert (bis pH ca. 1 - 2) und dann mehrfach mit Et₂O extrahiert. Die vereinigte org. Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und bis auf wenige Milliliter eingengt. Zu dieser

Lösung wurde Hexan hinzugegeben bis das Produkt ausfiel. Das Produkt wurde abgesaugt, mit Hexan gewaschen und getrocknet. Die Mutterlauge wurde eingengt und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Eventuell nachgefallenes Produkt wurde abgesaugt, gewaschen und getrocknet.

Summenformel: $C_{22}H_3Cl_{12}O_6$

Molmasse: 788.66 g/mol

Ausbeute: 337 mg (77 %)

Aussehen: roter Feststoff

R_f-Wert: 0.2 (Ethylacetat/Methanol 5:2)

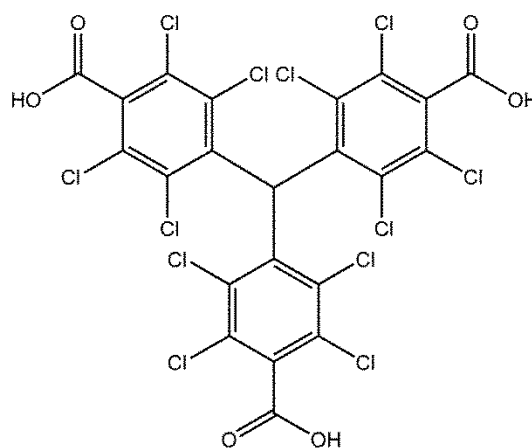
Schmelzpunkt: > 280 °C

HRMS (ESI): berechnet für $C_{22}H_4Cl_{12}O_6$ $[M+H]^+$ 798.618; gefunden 798.618

IR (ATR): 3702 - 2643, 1703, 1661, 1602, 1536, 1401, 1348, 1325, 1281, 1240, 1124, 1041, 859, 752, 724 cm^{-1}

Tris(4-carboxy-2,3,5,6-tetrachlorophenyl)methan (H-45).

43 (280 mg, 0.320 mmol) wurde in konz. H_2SO_4 (25 ml) gelöst. Die Mischung wurde auf 90 °C erhitzt und über Nacht lichtgeschützt gerührt. Die Reaktionsmischung wurde nach dem Abkühlen auf Eis gegossen und mehrfach mit MTBE extrahiert. Die vereinigten MTBE-Phasen wurden mit $NaHCO_3$ -Lösung (5 % in Wasser) extrahiert. Die basische wässrige Phase wurde tropfenweise mit konz. HCl -Lösung angesäuert



(bis pH ca. 1-2) und dann mehrfach mit Et_2O extrahiert. Die vereinigte org. Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet und bis zur Trockne eingengt. Es wurden 273 mg einer weißen Substanz erhalten, was einer Ausbeute von 108 % entspricht. Daher wurde versucht das Produkt säulenchromatographisch zu reinigen, was aufgrund der schlechten Löslichkeit schwierig war. Als Eluent wurden EtAc und MeOH mit 2 % HAC verwendet (7:3 bis 0:10). Nach nochmaligem Fällen aus Hexan wurden 173 mg Produkt erhalten.

Summenformel: $C_{22}H_4Cl_{12}O_6$

Molmasse: 789.67 g/mol

Ausbeute: 173 mg (68 %)

Aussehen: weißer Feststoff

R_f-Wert: 0.125 (EtAc/MeOH 7:3)

Schmelzpunkt: > 250 °C

¹H NMR: (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.07 (s, Ar₃CH, 1H)

¹³C NMR: (100 MHz, Methanol-*d*₄) δ 164.30, 138.02, 137.10, 134.60, 133.70, 129.78, 128.78, 56.27

HRMS (ESI): berechnet für C₂₂H₃Cl₁₂O₆⁻ [M-H]⁻ 788.610; gefunden 788.612

4.3.2 Lipophile Trityle als Spin-Sonden für die EPR-Oximetrie

4.3.2.1 Materialien für die Gelherstellung und Probenpräparation

12-Hydroxystearinsäure wurde von Rockleigh Industries Inc. (New Jersey, USA), Isopropylmyristat (Pionier IPM) von Hansen und Rosenthal (Hamburg, Deutschland) und wasserfreies N-Methylpyrrolidon von Alfa Aesar (Ward Hill, USA) erworben. Cithrol DPHS wurde von Croda International Plc. (Snaith, UK) zur Verfügung gestellt. Andere verwendete Materialien waren Epoxid-Harz (Gorilla Glue, Inc., USA) und PBS-Puffer pH 7.4 (BioWhittaker Reagents, Lonza Group AG, Basel, Switzerland). Die Gasgemische für die *in vitro*-Sauerstoff-Kalibrierung wurden von der Roberts Oxygen Company Inc. (Rockville (MD), USA) erworben. Argongas wurde von Praxair Inc. (Danbury (CT), USA) geliefert. Wasser wurde vor Verwendung doppelt destilliert.

Die Radikale **44** und **36-D** wurden synthetisiert (siehe Abschnitt 4.2.1). Radikal **36-H** wurde von V. Tormyshev und **OXO73** (Nycomed Innovation AB (Malmö, Schweden)) von M. C. Krishna zur Verfügung gestellt.

4.3.2.2 Herstellung der Gele

Beide Gele wurden auf der Basis injizierbarer Depotformulierungen für die kontrollierte Wirkstofffreisetzung, welche von Mäder et al. entwickelt wurden, hergestellt.¹⁹⁵ Die Herstellung der Gele erfolge jeweils direkt vor der Verwendung.

In-situ-Oleogel. 12-Hydroxystearinsäure (9 %, m/m) wurde mit Isopropylmyristat (81 %, m/m) und N-Methylpyrrolidon (10 %, m/m) gemischt. Die Mischung wurde auf 75 °C erhitzt bis alle Bestandteile gelöst waren und dann für 10 s gevortext.

Emulgel. 12-Hydroxystearinsäure (11 %, m/m), Cithrol DPHS (4 %, m/m) und Isopropylmyristat (85 %, m/m) wurden gemischt und auf 75 °C erhitzt und gevortext bis sich alle Bestandteile zu einer homogenen Lösung gemischt hatten. Währenddessen wurde

PBS-Puffer auf 75 °C temperiert. Der erwärmte Puffer wurde im Mischungsverhältnis 1:1 (m/m) zu den lipophilen Komponenten hinzugefügt. Die Mischung wurde für 5 s gevortext und dann 2 min bei 75 °C mit Hilfe eines UltraTurrax T8 homogenisiert. Die Formulierung wurde möglichst frei von Luftblasen und vor Abkühlen unter die Phasenübergangstemperatur in eine 1 ml-Spritze eingefüllt.

4.3.2.3 Probenpräparation für die *in vitro*-Sauerstoffkalibrierung

Radikal-Lösungen. Die lipophilen Radikale wurden in Isopropylmyristat gelöst ($c_{36-D} = 1 \text{ mM}$, $c_{36-H} = 1 \text{ mM}$, $c_{44} = 5 \text{ mM}$). 0.5 ml dieser Lösungen wurden in Glasampullen gefüllt und für 3 h mit Argon oder der jeweiligen Gasmischung (*Tabelle 25*) begast. Dafür wurden die Öffnungen der Ampullen zunächst mit Epoxid-Kleber verschlossen und 2 Löcher für den Gaseinlass und -auslass gebohrt. Die Probe wurde eingefüllt und das Gas über eine Kanüle durch eine der Öffnungen eingeleitet. Nach Ende der Equilibrierung wurden die Öffnungen sofort mit Epoxid-Kleber verschlossen. **46** wurde in PBS-Puffer pH 7.4 gelöst ($c_{46} = 1 \text{ mM}$). 0.1 ml dieser Lösung wurden in ein Pyrex®-Vial eingefüllt und für 45 min mit Argon bzw. den Gasmischungen auf die gleiche Weise begast.

Tabelle 25 Zusammensetzung der Gasmische für die Equilibrierung der Proben.

Zusammensetzung der Gasmische		
O ₂ (vol%)	CO ₂ (vol%)	N ₂ (vol%)
2	5	93
5	5	90
10	0	90

In-situ-Oleogel und Emulgel. Die Gele wurden wie in Abschnitt 4.3.2.2 beschrieben hergestellt. Für die *in situ*-Oleogele wurden Radikal-Lösungen in IPM ($c_{36-D} = 1 \text{ mM}$, $c_{36-H} = 1 \text{ mM}$, $c_{44} = 5 \text{ mM}$) verwendet. Für das Emulgel wurde als wässrige Phase eine **46**-Lösung in PBS-Puffer pH 7.4 ($c = 1 \text{ mM}$) benutzt. 0.2 ml jedes Gels wurden in eine Glasampulle mit je 0.4 ml Wasser gefüllt und für 3 h mit Argon oder den Gasmischen aus *Tabelle 25* equilibriert. Die Ampullen wurden dafür wie zuvor vorbereitet und nach dem Equilibrieren verschlossen.

4.3.2.4 Präparation und Haltung der Tiere für die *in vivo*-EPR-Spektroskopie

Alle *in vivo*-Experimente wurden in Übereinstimmung mit dem „Guide for the care and use of laboratory animal resources“ (National Research Council, 1996) durchgeführt und

wurden durch das „National Cancer Institute Animal Care and Use Committee“ (NCI-CCR-ACUC, Bethesda, MD, Protokoll-Nr. RBB-153, 155 und 159) geprüft.

Für die Versuche wurden etwa 15 Wochen alte, weibliche C3H-Mäuse mit einem Gewicht von ca. 25 g verwendet. Die Tiere wurden vom „Frederick Cancer Research Center“ (Frederick, MD, USA) bezogen. Je fünf Mäuse wurden in einem Käfig in einem Raum mit automatisierter Temperatur- und Lichtsteuerung gehalten. Nahrung und Wasser stand *ad libitum* zur Verfügung.

Für die Injektion der Gele wurden die Mäuse mit Isofluran (1.5 % in der Atemluft) narkotisiert. 0.2 ml der jeweiligen Formulierung wurden dann intramuskulär mit einer 25G-Nadel in das rechte Hinterbein der Mäuse injiziert. Für die EPR-Messungen wurden die Mäuse erneut mit Isofluran (1.5 % in der Atemluft) narkotisiert und auf dem Bauch liegend so auf dem Resonator platziert, dass sich das rechte Hinterbein in dem Resonator befand. Die Atemfrequenz wurden mit einem Druckwandler (SA Instruments, Inc., NY, USA) kontrolliert und durch Anpassung der Isoflurandosis bei etwa 60 ± 10 Atemzügen/Minute gehalten. Die Körperkerntemperatur wurde rektal mit Temperaturfühler gemessen und mit einem stetigen Strom warmer Luft bei etwa 36 ± 1 °C gehalten. Für die Normoxie-Experimente wurde ein Atemluftgemisch mit 20.9 % Sauerstoff verwendet. Die Hypoxie-Experimente wurde die Sauerstoffkonzentration auf 10 % reduziert. Die Mäuse inhalierten dieses Luftgemisch zunächst 5 min, dann wurde die EPR-Messung gestartet. Nach dem Hypoxie-Experiment wurde der Sauerstoffgehalt der Atemluft wieder auf 20.9 % erhöht und nach 5 min eine weitere EPR-Messung durchgeführt.

4.3.2.5 CW-EPR-Messungen

EPR-Spektrometer und Messeinstellungen. Sowohl die *in vitro*- als auch die *in vivo*-EPR-Messungen wurden an einem am National Cancer Institut konstruierten 300 MHz-CW-EPR-Spektrometer mit einem 15 mm-Parallelsolen-Resonator durchgeführt. Die Messeinstellungen sind in *Tabelle 26* aufgeführt.

Tabelle 26 Geräteparameter für die *in vivo*- und *in vitro*-EPR-Messung bei 300 MHz.

Mikrowellenleistung	< 0.92 mW (lipophile Radikale), < 0.25 mW (46);
Modulationsfrequenz	13.5 kHz
Messspanne	0.2 - 4.24 mT
Messzeit	ca. 5 min
Messpunkte	1000, jeder Punkt ist der Mittelwert mehrerer Messungen, die innerhalb von 0.2 s durchgeführt wurden

Datenerfassung und Auswertung. Die Erfassung der Messdaten wurde mit LabView (National Instruments, Austin, USA) durchgeführt. Die Rohdaten wurden mit Hilfe von LabView unter Verwendung eines Butterworth-Filters geglättet. Die Peak-zu-Peak-Linienbreite ΔB_{pp} wurde aus den gefilterten Daten mit Hilfe von Matlab (The Mathworks, Inc, Natick, USA) ermittelt. Um die *in vitro*-Sauerstoffsensitivität der Radikale zu bestimmen, wurde die Peak-zu-Peak-Linienbreite jeder Probe als Funktion der Sauerstoffkonzentration dargestellt und durch lineare Regression die Steigung der Geraden ermittelt (OriginPro2016G (OriginLab Corporation, Northampton, USA)). Für die Auswertung der *in vivo*-Messungen wurde die AUC durch doppelte Integration der EPR-Spektren ermittelt (OriginPro2016G (OriginLab Corporation, Northampton, USA)). Die Gewebe-Sauerstoffkonzentrationen wurden anhand der Regressionsgeraden der *in vitro*-Daten berechnet. Das Signal/Rausch-Verhältnis der Spektren wurde als Verhältnis der Peak-zu-Peak-Amplitude der gefilterten Daten und der Standardabweichung des Rauschens der Rohdaten berechnet.

4.3.2.6 Gepulste EPR-Messungen

EPR-Spektrometer und Messeinstellungen. Die gepulsten EPR-Messungen wurden an einen am National Cancer Institut konstruierten 300 MHz-Puls-EPR-Spektrometern mit einem 15 mm-Parallelsulen-Resonator durchgeführt. Die Messeinstellungen sind in *Tabelle 27* aufgeführt.

Tabelle 27 Geräteparameter für die gepulsten EPR-Messung bei 300 MHz.

Länge Anregungspulses	70 ns
Repetitionszeit	6 - 20 μ s
Messspanne	0.2 - 4.24 mT
„Receiver input range“	0.5
Puls-Leistung am Resonator	20 W
Mittlere Trigger-Verzögerungszeit	0.350 μ s
Anzahl der Messpunkte des FID	592 - 1600
Messwiederholungen	4000 - 200000

Auswertung. Die FID-Daten wurden mit Hilfe von Matlab (The Mathworks, Inc, Natick, USA) über eine Fourier-Transformation in Absorptionsspektren umgewandelt ausgewertet.

4.3.3 EPR-spektroskopische Charakterisierung von 39 und 40

Probenpräparation und EPR-Messung. Die Radikale **39** und **40** wurden in DMSO gelöst ($c \approx 200 \mu\text{M}$) und in 50 μl -Kapillaren gefüllt. Die Proben wurden in den Kapillaren direkt vor der EPR-Messung entgast und verschlossen. Die Messungen wurden bei 25 °C am X-Band-Spektrometer bei 9.30 – 950 MHz (Miniscope MS400, Magnettech, Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die Messeinstellungen sind in *Tabelle 28* aufgeführt.

Tabelle 28 Geräteparameter für die EPR-Messung.

Mikrowellenleistung	3.162 mW
Modulationsamplitude	0.060 mT
Modulationsfrequenz	100 kHz
Messspanne	4.773 mT
Messzeit/Wiederholungen	60 s/10
Messpunkte	4096

Auswertung. Die Hyperfeinkopplungskonstante $a(\text{P})$ und die Peak-zu-Peak-Linienbreiten ΔB_{pp} wurden aus den erhaltenen EPR-Spektren durch Simulation mit Matlab⁶⁷ unter Verwendung der EasySpin-Funktion „Garlic“ bestimmt. Die Peak-zu-Peak-Linienbreiten wurden dabei auf Grundlage des Voigt-Modells unter Angabe des Lorentz- und des Gaussanteils der Linienbreite ermittelt. Die g-Faktoren wurden nicht ermittelt und für die Simulationen auf 2.0023 festgelegt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Gruppen stabiler organischer Radikale hinsichtlich ihrer Eigenschaften und Verwendbarkeit für verschiedene EPR-spektroskopische Methoden untersucht.

5.1 Nitroxide

Der Schwerpunkt bei der Gruppe der Nitroxidradikale lag bei der Verbesserung der reduktiven Stabilität. Dies ist notwendig, um eine ausreichend lange Halbwertszeit der Radikale bei Untersuchungen *in vivo* und auf zellulärer Ebene zu erhalten.⁴³

Es wurden drei neue Nitroxidradikale (**12**, *cis*- und *trans*-**7**) unter Verwendung bekannter Synthesewege synthetisiert. Der kritische Schritt bei der Synthese war die oxidativen Spaltung der Allyl-Gruppe zur Carboxymethyl-Gruppe. Die Gesamtausbeute der Synthesen war aufgrund dessen gering.

Die Molekül- und Kristallstrukturen von **12** und *cis*-**7** konnten röntgenkristallographisch untersucht werden. Die Strukturparameter liegen im erwarteten Bereich für pentacyclische Nitroxide.

Die EPR-spektroskopischen Eigenschaften der neuen Nitroxide zeigten untereinander und im Vergleich zu dem Standard **3-CP** geringfügige Unterschiede. Diese konnten auf strukturelle Unterschiede zurückgeführt werden. **12** und *cis*-/*trans*-**7** zeigten in einem Ascorbinsäure-Assay eine wesentlich bessere Stabilität als **3-CP** und **4-CT**. Die Stabilität von *cis*- und *trans*-**5** war etwa gleich gut. **12** war gegenüber Ascorbinsäure am stabilsten. Die Verbesserung Stabilität ist ein Resultat des sterischen und elektrostatischen Schutzes der Ethylgruppen bzw. Carboxymethyl-Gruppen in α -Position zur Aminoxyl-Gruppe. Die geringere Stabilität von *cis*- und *trans*-**7** im Vergleich zu **12** ist wahrscheinlich auf den stärkeren elektronenziehenden Effekt von zwei Carboxymethyl-Gruppen in *cis*- und *trans*-**7** zurückzuführen.

Weiterhin wurde die Eignung von Nitroxiden als Spin-Label anhand zweier Beispiele untersucht. In ersten Experimenten zeigte das kovalent an Spermin gebundene Nitroxid **12** im Vergleich zu der auf **3-CP** basierenden Sonde Vorteile hinsichtlich der Sensitivität bei der Untersuchung von Komplexen aus Polyanionen und Polykationen („Polyplexe“). **3-CP** wurde außerdem mit Hilfe einer Amidkupplung an das Tetrazinderivat H-Tet gekoppelt (**16**). Die Eignung dieses Spin-Labels zur strukturellen Untersuchung von Proteinen wurde am Beispiel von GFP untersucht.

5.2 Galvinoxyle

Ein Schwerpunkt bei der Untersuchung der Galvinoxylradikale stellte die Synthese und Charakterisierung neuer Galvinoxyl-derivate dar.

Es wurden daher zunächst zwei neue Galvinoxyle, das Adamantyl-derivat **31** und das perdeuterierte Derivat **26**, hergestellt. Ausbeute-limitierender Schritt bei der Synthese von **31** war die Einführung der Adamantyl-Gruppen in p-Bromophenol. Das perdeuterierte Derivat Galvinoxyl-D41 (**26**) sollte zunächst durch Metall-katalysierten H/D-Austausch aus undeuterten Edukten synthetisiert werden. Dieser Ansatz war nicht erfolgreich. Zwar konnten die *tert*-Butyl-Gruppen in *ortho*-Position der beiden möglichen Edukte 2,6-Di-*tert*-butylphenol und 4,4'-Methylenebis(2,6-di-*tert*-butylphenol) jeweils zu mindestens 90 % deuteriert werden, die sterisch anspruchsvollen *tert*-Butyl-Gruppen verhinderten aber einen vollständigen Austausch der aromatischen Protonen. **26** wurde daher aus kommerziell erhältlichen deuterierten Edukten synthetisiert. Der Deuterierungsgrad von **26** betrug etwa 98 %.

Die EPR-spektroskopischen Eigenschaften von **31** sind denen von Galvinoxyl **18** sehr ähnlich. Durch unaufgelöste Hyperfeinkopplungen der Protonen der Adamantyl-Gruppen ist die Peak-zu-Peak-Linienbreite von **31** größer. Das EPR-Spektrum von **26** in Octanol besteht unter sauerstofffreien Bedingungen durch Hyperfeinkopplung mit Deuteriumatomen aus 18 sehr schmalen Signalen.

Galvinoxyle wurden bisher nicht als Spin-Sonden für biomedizinische (*in vivo*-) Untersuchungen verwendet. Um den Anwendungsbereich der Galvinoxyle zu erweitern, wurden daher die Galvinoxyle **18** und **26** hinsichtlich ihrer Sauerstoffsensitivität untersucht. Beide Radikale zeigten in Octanol eine gute Sauerstoffsensitivität und sind daher potentiell als Sonden für die EPR-Oximetrie geeignet.

Es ist bekannt, dass Galvinoxyle durch ihre direkte Vorstufe („Hydrogalvinoxyle“) gegen die Reaktion Sauerstoff stabilisiert werden.¹⁰⁵ Dieser Vorgang wurde untersucht und eine mögliche Erklärung gefunden: Die Reaktion von Galvinoxyl mit Sauerstoff wird nicht verhindert. Hydrogalvinoxyl fungiert stattdessen als „Reservoir“, welches durch Zwischen- und Abbauprodukte des Galvinoxyls zum Radikal oxidiert wird.

Die Untersuchung des Lösungsmiteleinflusses auf die Stabilität ergab, dass Galvinoxyle nur in aprotischen Medien mit Sauerstoff reagieren. In protischen Lösungsmitteln wurde ausschließlich die Bildung von Hydrogalvinoxyl beobachtet. In unpolaren Lösungsmitteln war Galvinoxyl generell stabiler als in polaren Lösungsmitteln. In Octanol konnte Galvinoxyl selbst nach Tagen noch nachgewiesen werden.

5.3 Triarylmethylradikale

Triarylmethylradikale sind vor allem als Sauerstoff- und zunehmend auch als pH-sensitive Spin-Sonden von Bedeutung.^{113, 145} Die Anwendung von Tritylen *in vivo* ist aber durch Stabilitäts- und z. T. Toxizitätsprobleme eingeschränkt.

Im Zuge dieser Arbeit wurde untersucht, ob diese Nachteile bei der *in vivo*-EPR-Oximetrie durch Verkapselung der Trityle in lipophile Gele behoben werden können. Dafür wurden zunächst die lipophilen Tritylradikale **36-D** und **44 (PTMTE)** anhand bekannter Synthesevorschriften synthetisiert. Die Sauerstoffsensitivität dieser Trityle sowie des lipophilen Trityls **36-H** und des hydrophilen Trityls **46** wurde *in vitro* in Lösung bestimmt und mit der Sensitivität der verkapselten Trityle verglichen. Die Linienbreiten und die Sensitivität der gelösten und verkapselten Trityle stimmten überein. In ersten *in vivo*-Untersuchungen der verkapselten Trityle in C3H-Mäusen wurde eine deutliche Verlängerung der *in vivo*-Halbwertszeit festgestellt. Innerhalb des Untersuchungszeitraums zeigten die Mäuse keine Verhaltensänderung. Die *in vivo*-Sauerstoffsensitivität der Trityle wurde durch Reduktion des Sauerstoffgehalts der Atemluft der Mäuse überprüft. Am Tag der Injektion zeigte sich die geringere Sauerstoffzufuhr eindeutig in einer Reduktion der Linienbreite der Radikale. Im Verlauf der dreiwöchigen Messzeit trat eine Verringerung der Linienbreite auch unter normoxischen Bedingungen auf. Eine Reihe von Faktoren könnten zu diesem Verhalten beigetragen haben, welche auf die zu hohe Invasivität der Gele zurückgeführt werden können.

Es wurden weiterhin die Methylenphosphonsäuretrityle **39a** und **40a** synthetisiert. **40a** ist aufgrund der Phosphonsäure-Gruppen potentiell Sauerstoff- und im physiologischen Bereich pH-sensitiv. Die Synthese von **39a** gelang mit guter Ausbeute und Reinheit. **40a** wurde nur als ein Gemisch aus **40a - c** erhalten. Die Reinigung gelang nicht. **39a** und das Gemisch von **40a - b** wurden mittels EPR-Spektroskopie untersucht. Es zeigte sich, dass sowohl die Kopplungskonstanten als auch die Linienbreiten um ein Vielfaches größer waren als bei bekannten Phosphonsäuretritylen. Ursächlich für dieses Verhalten ist die Molekülgeometrie. Im Gegensatz zu den bekannten Phosphonsäuretritylen wie **pTAM** liegen bei den Methylenphosphonsäuretritylen die Phosphonsäure(ester)-gruppen außerhalb der Ringebene der Aromaten. Dies verändert die Spindichte am Phosphoratom und die Rotationsdynamik der Phosphonsäure(ester)-gruppen und damit die Hyperfeinkopplungskonstante und Linienbreite.

5.4 Ausblick

Die *in vivo*-Elektronenspinresonanz-Spektroskopie ist eine vielversprechende Methode zur Bestimmung physiologisch relevanter Parameter wie der Sauerstoffkonzentration und dem pH-Wert in Geweben und Organen. Damit diese Methode erfolgreich in der Erforschung und potentiell auch in der Diagnostik von Erkrankungen wie Krebs eingesetzt werden kann, besteht aber nach wie vor ein großer Entwicklungsbedarf. Sowohl die Spin-Sonden und deren Applikation als auch die Hardware müssen weiter optimiert werden.

So muss die reduktive Stabilität von Nitroxidradikalen weiter verbessert werden, um deren Eignung für Messungen *in vivo* und auf zellulärer Ebene zu verbessern. Auch bei Tritylradikalen besteht weiterhin Forschungsbedarf hinsichtlich Stabilität und Toxizität und deren Optimierung für bestimmte Anwendungsbereiche wie der pH-Wert-Messung.

Da der Halbwertszeit von löslichen Radikalen durch Distribution und Elimination *in vivo* auch bei bestmöglicher Strukturoptimierung Grenzen gesetzt sind, muss außerdem auch die Applikation der Radikale weiter verbessert werden. Im Bereich der EPR-Oximetrie ist die Verkapselung in Gelformulierungen ein vielversprechender Ansatz, um die Stabilität und Toxizität von löslichen Spin-Sonden zu verbessern. Die im Zuge dieser Arbeit untersuchten lipophilen Gelzubereitungen sind hinsichtlich Stabilität und Sauerstoffsensitivität noch nicht optimal. Sie zeigen jedoch auf, welche Anforderungen solche Formulierungen erfüllen müssen und was getan werden muss, um diese Anforderungen zu erfüllen. Auch die Verkapselung von Galvinoxylradikalen als Sauerstoffsonden sollte, als kostengünstigere und leicht zugängliche Alternative zu Tritylen, in Betracht gezogen werden.

Die in dieser Arbeit gezeigte Anwendung von Nitroxiden als Spin-Label zur Untersuchung von Polyplexen bzw. Proteinen sollten in weiteren Versuchen auf andere Systeme übertragen werden, um deren Eigenschaften weiter zu charakterisieren.

6 Materialien und allgemeine Methoden für die Synthese und analytische Charakterisierung

6.1 Materialien

Für die Synthese, Aufarbeitung und Chromatographie wurden handelsübliche Lösungsmittel verwendet. Diese wurden aus der Chemikalienausgabe des Instituts für Pharmazie (MLU Halle-Wittenberg) bezogen. Die Lösungsmittel wurden vor Verwendung i. d. R. destilliert und sofern notwendig auch getrocknet. Für die Trocknung wurde je nach Lösungsmittel Natrium, Molsieb (4 Å) oder Phosphorpentoxid verwendet. Trockene Lösungsmittel wurden unter Argonatmosphäre gelagert.

Ausgangsstoffe und Reagenzien wurden entweder aus der Chemikalienausgabe oder von den unten aufgeführten Anbietern bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

- Sigma-Aldrich,
- abcr GmbH,
- VWR International GmbH,
- Alfa Aesar,
- Acros Organics,
- C/D/N Isotopes Inc,
- Cambridge Isotope Laboratories, Inc.

6.2 Arbeitstechniken

6.2.1 Synthese unter inerten Bedingungen

Sofern notwendig wurden Reaktionen unter Ausschluss von Wasser und Sauerstoff durchgeführt. Dafür wurden die verwendeten Glasgefäße unter Vakuum mit Hilfe eines Heißluftföhns ausgeheizt. Zum Abkühlen auf RT wurden die Apparaturen unter Argon gesetzt. Argongas wurde von AirLiquid bezogen (Restfeuchte und $O_2 < 2$ ppm-mol). Die Lösungsmittel wurden wie beschrieben getrocknet und mit Hilfe von Einwegspritzen zum Reaktionsansatz hinzugefügt. Um das Eindringen von Sauerstoff und Luftfeuchtigkeit in die Apparaturen zu verhindern wurde eine stets mit leichtem Argonüberdruck gearbeitet. Feste Reagenzien wurden unter Argonstrom in das Reaktionsgefäß eingefüllt.

6.2.2 Synthese in Druckgefäßen

Wasserstoff/Deuterium-Austausch-Reaktionen wurden in Druckgefäßen der Firma Parr Instrument Company (Miline, IL, USA) durchgeführt. Verwendet wurden Druckreaktoren der Serie 5500 und der Serie 4790 (Parr 5500 Series Compact Reactor bzw. Parr 4790 Series Pressure Vessel System).

6.2.3 Chromatographische Reinigung

6.2.3.1 Säulenchromatographie

Die säulenchromatographische Reinigung wurde an Kieselgel 60 (Korngröße: 0.040 - 0.063 mm oder 0.063 - 0.200 mm) der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurde die benötigte Kieselgelmenge (Verhältnis (m/m) Kieselgel/Substanzmenge: 100/1 bis 50/1) in dem Fließmittel suspendiert und in die Säule eingefüllt. Das zu trennende Substanzgemisch wurde entweder in dem Fließmittel gelöst oder als „Dry Load“ auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte kontinuierlich oder diskontinuierlich mit einem geeigneten Lösungsmittel(gemisch). Für die Herstellung eines „Dry Loads“ wurde das Substanzgemisch in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst. Dann wurde die 2- bis 3-fache Menge Kieselgel 60 (0.063 - 0.200 mm) hinzugefügt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer wieder entfernt. Die Detektion erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie.

6.2.3.2 MPLC

Die Reinigung mittels MPLC (Middle Pressure Liquid Chromatography) wurde an einer PuriFlash 430 von Interchim (Montluçon, Frankreich) durchgeführt. Je nach Trennproblem wurden vorgepackte Kieselgelsäulen mit Partikelgrößen von 15 - 30 µm und Kieselgelmengen von 12 - 120 g verwendet. Die Elution erfolgte kontinuierlich oder diskontinuierlich mit einem geeigneten Lösungsmittel(gemisch) als Laufmittel. Das Substanzgemisch wurde als „Dry Load“ mit Hilfe einer Vorsäule auf die Trennsäule aufgebracht. Die Detektion erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie.

6.2.3.3 Präparative HPLC

Die Aufreinigung mittels präparativer HPLC wurde an einer Anlage von Shimadzu (Kyoto, Japan; LC-10AD, SIL-HAT auto sampler) durchgeführt. Dafür wurde eine gepackte 7,8 x 300mm XTerra RP-18 Säule (7µM) der Firma Waters (Milford, MA, USA) verwendet. Der UV-Vis-Detektor SPD-M10A VP PDA wurde auf 254 nm eingestellt. Zur Trennung wurde ein Gradient aus Wasser und MeOH verwendet, dem 0,1% TEA zugesetzt waren. Die

aufzureinigende Menge an Substanz wurde in Methanol gelöst. Produkthaltige Fraktionen wurden gesammelt und mittels analytischer HPLC weiterhin auf ihre Reinheit untersucht.

6.3 Analytische Methoden zur Charakterisierung

6.3.1 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren wurden an einem Varian Gemini 2000 (400 MHz für ^1H -NMR und 100 MHz für ^{13}C -NMR) und an einem Varian Inova 500 (500 MHz für ^1H -NMR und 125 MHz für ^{13}C -NMR) aufgenommen. Die Substanzen wurden in einem geeigneten deuterierten Lösungsmittel gelöst. Das Lösungsmittel diente zugleich als interner Standard. Verwendete Frequenz und Lösungsmittel können den analytischen Daten der jeweiligen Substanz entnommen werden. Die chemische Verschiebungen (δ) sind in der Einheit [ppm] angegeben. Die Signale der ^1H -NMR-Spektren enthalten zusätzlich Informationen über die Anzahl/Art der Protonen und falls möglich die Kopplungskonstanten (J) in [Hz]. Die Multiplizitäten wurden wie folgt abgekürzt angegeben: (Singulett), d (Duplett), t (Triplett), dd (Duplett vom Duplett), ddd (Duplett vom Duplett vom Duplett), dt (Duplett vom Triplett), m (Multiplett). Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der MestReNova Software.

6.3.2 Massenspektrometrie (MS)

Die massenspektrometrische Untersuchung erfolgte mittels Elektrosprayionisation (ESI-MS) an einem LCQ-Classic Ionenfallen-Massenspektrometer der Firma Thermo Finnigan (San Jose, CA, USA). Die Substanzen wurden dafür in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und über eine Spritzenpumpe injiziert (20 $\mu\text{l}/\text{min}$). Die Ionisation wurde im Elektrospray bei 5.0 kV im positiv- und negativ-Modus durchgeführt. Die Kapillartemperatur betrug 220 $^{\circ}\text{C}$.

Alternativ zu ESI-MS-Messungen wurden APCI-Massenspektren unter Verwendung eines Advion Expression^S CMS-Massenspektrometers (Advion, Inc., Ithaca, NY, USA) erstellt. Die Substanzen wurden dafür in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und mit einem ASAP-Messkopf vermessen.

Die hochauflösende Massenspektrometrie wurde an einem LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) mit einer nano-ESI-Quelle (Proxeon) durchgeführt. Die Ionisierung erfolgte mittels nano-Elektrospray mit einem mit Gold

bedampften Glasemitter. Gemessen wurde im positiv- und negativ-Modus bei 1.3 - 1.9 kV. Die Auslösung des Oribtrap-Analysators betrug 100.000 bei m/z 400.

6.3.3 Infrarotspektroskopie (IR)

IR-Spektren wurden an einem FT-IR-Spektrometer (IFS 28) der Firma Bruker (Billerica, MA, USA) gemessen. Für die Messung wurde die Substanz auf einen Zink-Selenit-Kristall der Firma Pike Technologies (Fitchburg, WI, USA) aufgetragen und angepresst. Es wurden je 32 Scans mit einem Einstrahlwinkel von 45° durchgeführt. Die Lage der Absorptionsbanden ist in Wellenzahlen [cm^{-1}] angegeben. Die Auflösung der Spektren beträgt 2 cm^{-1} .

6.3.4 Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden an einem Boetius-Heiztischmikroskop bestimmt. Die angegebenen Schmelzpunkte sind nicht korrigiert.

6.3.5 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie wurde zur Kontrolle des Reaktionsverlaufs, zur Beurteilung der Reinheit von Zwischen- und Endprodukten und zur Charakterisierung der Substanzen durch Bestimmung der R_f -Werte verwendet. Die angegebenen R_f -Werte sind nicht korrigiert. Die Proben wurden in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und auf mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete DC-Platten der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Macherey-Nagel (Düren, Deutschland). Die Entwicklung erfolgte in Chromatographie-Kammern mit einem geeigneten Laufmittelgemisch. Die Detektion erfolgte mittels UV-Licht (254 nm), Bedampfung mit Iod oder mittels Ninhydrin-Lösung.

6.3.6 Bestimmung des Deuterierungsgrads

6.3.6.1 Bestimmung mittels NMR-Spektroskopie

Die zu untersuchende Substanz wurde genau abgewogen und in einer definierten Menge eines deuterierten Lösungsmittels gelöst. Bei den Galvinoxylderivaten wurde Hexamethylbenzol (HMB) als interner Standard hinzugefügt. Das Methyl-Signal von HMB und die Signale der zu untersuchenden Substanz wurden integriert und aus dem Verhältnis der Signalintensitäten wurde die Menge der Protonen an jeder Position der untersuchten

Substanz berechnet. Bei den Vorstufen der Tetrathiatriarylmethylradikale erfolgte die Bestimmung ohne zusätzlichen internen Standard. Als Bezugspunkt wurden die Signale von undeuterten Positionen in der jeweiligen Substanz verwendet.

6.3.6.2 Bestimmung mittels ESI-HRMS

Mittels Massenspektrometrie lässt sich nur der Gesamtdeuterierungsgrad einer Substanz bestimmen. Die MS-Spektren deuterierter Substanzen bestehen normalerweise aus einer Vielzahl von Signalen, deren Intensitäten annähernd gaussverteilt sind. Jedes dieser Signale wird durch ein Molekül mit einer unterschiedlichen Anzahl (n) Deuteriumatomen verursacht.

Zur Bestimmung des Deuterierungsgrads wurde die Signalintensität der Signale der untersuchten Substanz bestimmt und über das Verhältnis der Signalintensitäten die relative Häufigkeit jedes Moleküls mit n Deuteriumatomen berechnet. Aus den relativen Häufigkeiten wurde die durchschnittliche Anzahl an Wasserstoff- und Deuteriumatomen pro Molekül ermittelt.

Literaturverzeichnis

- [1] Zavoisky, E. (1945) Paramagnetic Relaxation of Liquid Solutions for Perpendicular Fields, *J. Phys. U.S.S.R.* 9, 211 - 216.
- [2] Ahmad, R., and Kuppusamy, P. (2010) Theory, instrumentation, and applications of electron paramagnetic resonance oximetry, *Chem. Rev.* 110, 3212 - 3236.
- [3] Jeschke, G. (1993) Einführung in die EPR-Spektroskopie, *Vorlesungsskript, Universität Mainz*.
- [4] Kempe, S., Metz, H., and Mäder, K. (2010) Application of Electron Paramagnetic Resonance (EPR) spectroscopy and imaging in drug delivery research – Chances and challenges, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 74, 55 - 66.
- [5] Bowman, M. K., and Carbonera, D. (2008) Electron Paramagnetic Resonance in Biochemistry and Biophysics, In *Electron Paramagnetic Resonance: A Practitioner's Toolkit* (Brustolon, M., and Giamello, E., Eds.), pp 383 - 426, Wiley.
- [6] Gerson, F., and Huber, W. (2003) *Electron Spin Resonance Spectroscopy of Organic Radicals*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.
- [7] Weil, J. A., and Bolton, J. R. (2007) *Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications*, 2 ed., John Wiley & Sons, Inc.
- [8] Lurie, D. J., and Mäder, K. (2005) Monitoring drug delivery processes by EPR and related techniques-principles and applications, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 57, 1171 - 1190.
- [9] Jeschke, G. (2008) Kurze Einführung in die elektronenparamagnetische Resonanzspektroskopie, *Vorlesungsskript, Universität Konstanz, Lehrstuhl PC: Struktur und Dynamik der Materie*.
- [10] Eaton, S. S., Eaton, G. R., and Berliner, L. J. (2006) *Biomedical EPR - Part A: Free Radicals, Metals, Medicine and Physiology*, Springer US.
- [11] Subramanian, S., and Krishna, M. C. (2016) Electron paramagnetic resonance imaging, *Resonance* 21, 717 - 740.
- [12] Subramanian, S., and Krishna, M. C. (2016) Electron Paramagnetic Resonance imaging, *Resonance* 21, 597 - 619.
- [13] Bär, F., Berndt, A., and Dimroth, K. (1975) Physikalische Methoden in der Chemie: ESR-Spektroskopie organischer Radikale II, *Chem. unserer Zeit* 9, 43 - 49.
- [14] Walton, J. C. (2012) Analysis of Radicals by EPR, In *Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials* (Chatgililoglu, C., and Studer, A., Eds.), John Wiley & Sons, Ltd.
- [15] Barr, D., Eaton, S. S., and Eaton, G. R. (2008) Workshop on Quantitative EPR, In *31st Annual International EPR Symposium*, Breckenridge, Colorado (USA).
- [16] Nagye, E. (1994) Quantitative EPR: Some of the Most Difficult Problems, *Appl. Magn. Reson.* 6, 259 - 285.
- [17] Neumann, W. P., Penenory, A., Stewen, U., and Lehnig, M. (1989) Sterically hindered free radicals. 18. Stabilization of free radicals by substituents as studied by using triphenylmethyls, *J. Am. Chem. Soc.* 111, 5845 - 5851.
- [18] Forrester, A. R., and Thomson, R. H. (1964) Stable Nitroxide Radicals, *Nature* 203, 74 - 75.
- [19] Hicks, R. G. (2011) *Stable Radicals: Fundamentals and Applied Aspects of Odd-Electron Compounds*, John Wiley & Sons, Ltd.
- [20] Likhtenshtein, G. L., Yamauchi, J., Nakatsuji, S. i., Smirnov, A. I., and Tamura, R. (2008) *Nitroxides. Applications in Chemistry, Biomedicine, and Materials Science*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim.
- [21] Epel, B., and Halpern, H. J. (2015) In Vivo pO₂ Imaging of Tumors: Oxymetry with Very Low-Frequency Electron Paramagnetic Resonance, *Methods Enzymol.* 564, 501 - 527.
- [22] Altwicker, E. R. (1967) The Chemistry of Stable Phenoxy Radicals, *Chem. Rev.* 67, 475 - 531.
- [23] Koprivnjak, O., Kriško, A., Valić, S., Carić, D., Krapac, M., and Poljuha, D. (2016) Antioxidants, radical-scavenging and protein carbonylation inhibition capacity of six monocultivar virgin olive oils in Istria (Croatia), *Acta Aliment.* 45, 427 - 433.
- [24] Pokorny, J., Yanishlieva, N., and Gordon, M. H. (2001) *Antioxidants in Food: Practical Applications*, CRC Press, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge.
- [25] Bagryanskaya, E. G., Krumkacheva, O. A., Fedin, M. V., and Marque, S. R. A. (2015) Chapter Fourteen - Development and Application of Spin Traps, Spin Probes, and Spin Labels, In *Methods in Enzymology* (Qin, P. Z., and Warncke, K., Eds.), pp 365 - 396, Academic Press.

- [26] Frémy, E. (1845) Sur un nouvelle série d'acides formés d'oxygène, de soufre, d'hydrogène et de d'azote, *Ann. Chim. Phys.* 3, 408 - 488.
- [27] Giethlen, B., and Schaus, J. M. (1997) Oxidation of indolines with Fremy's salt: A mechanistic proposal, *Tetrahedron Lett.* 38, 8483 - 8486.
- [28] Piloty, O., and Schwerin, B. G. (1901) Ueber das Nitril der Nitrosoisobuttersäure und seine Derivate, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 34, 1863 - 1870.
- [29] Dobrynin, S. A., Glazachev, Y. I., Gatilov, Y. V., Chernyak, E. I., Salnikov, G. E., and Kirilyuk, I. A. (2018) Synthesis of 3,4-Bis(hydroxymethyl)-2,2,5,5-tetraethylpyrrolidin-1-oxyl via 1,3-Dipolar Cycloaddition of Azomethine Ylide to Activated Alkene, *J. Org. Chem.* 83, 5392 - 5397.
- [30] Haugland, M. M., Lovett, J. E., and Anderson, E. A. (2018) Advances in the synthesis of nitroxide radicals for use in biomolecule spin labelling, *Chem. Soc. Rev.* 47, 668 - 680.
- [31] Keana, J. F. W. (1978) Newer aspects of the synthesis and chemistry of nitroxide spin labels, *Chem. Rev.* 78, 37 - 64.
- [32] Haugland, M. M., Anderson, E. A., and Lovett, J. E. (2017) Tuning the properties of nitroxide spin labels for use in electron paramagnetic resonance spectroscopy through chemical modification of the nitroxide framework, In *Electron Paramagnetic Resonance: Volume 25*, pp 1 - 34, The Royal Society of Chemistry.
- [33] Hideg, K., and Lex, L. (1984) A versatile new method for the synthesis of various pyrrolidin-1-oxyl fatty-acids, *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.*, 1263-1265.
- [34] Hideg, K., and Lex, L. (1986) Synthesis of various new nitroxide free-radical fatty-acids, *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1*, 1431-1438.
- [35] Sakai, K., Yamada, K., Yamasaki, T., Kinoshita, Y., Mito, F., and Utsumi, H. (2010) Effective 2,6-substitution of piperidine nitroxyl radical by carbonyl compound, *Tetrahedron* 66, 2311 - 2315.
- [36] Bordignon, E. (2017) EPR Spectroscopy of Nitroxide Spin Probes, In *eMagRes*, pp 235 - 254.
- [37] Foster, M. A., Grigor'ev, I. A., Lurie, D. J., Khramtsov, V. V., McCallum, S., Panagiotelis, I., Hutchison, J. M. S., Koptioug, A., and Nicholson, I. (2003) In vivo detection of a pH-sensitive nitroxide in the rat stomach by low-field ESR-based techniques, *Magn. Reson. Med.* 49, 558 - 567.
- [38] Sotgiu, A., Mäder, M., Placidi, G., Colacicchi, S., Ursini, C. L., and Alecci, M. (1998) pH-sensitive imaging by low-frequency EPR: a model study for biological applications, *Phys. Med. Biol.* 43, 1921 - 1930.
- [39] Tatum, J. L., Kelloff, G. J., Gillies, R. J., Arbeit, J. M., Brown, J. M., Chao, K. S., Chapman, J. D., Eckelman, W. C., Fyles, A. W., Giaccia, A. J., Hill, R. P., Koch, C. J., Krishna, M. C., Krohn, K. A., Lewis, J. S., Mason, R. P., Melillo, G., Padhani, A. R., Powis, G., Rajendran, J. G., Reba, R., Robinson, S. P., Semenza, G. L., Swartz, H. M., Vaupel, P., Yang, D., Croft, B., Hoffman, J., Liu, G., Stone, H., and Sullivan, D. (2006) Hypoxia: importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy, *Int. J. Radiat. Biol.* 82, 699 - 757.
- [40] Khramtsov, V. V., Yelinova, V. I., Glazachev, Y. I., Reznikov, V. A., and Zimmer, G. (1997) Quantitative determination and reversible modification of thiols using imidazolidine biradical disulfide label, *J. Biochem. Bioph. Meth.* 35, 115 - 128.
- [41] Klug, C. S., and Feix, J. B. (2008) Methods and Applications of Site-Directed Spin Labeling EPR Spectroscopy, *Method. Cell Biol.* 84, 617 - 658.
- [42] Hinderberger, D., and Jeschke, G. (2006) Site-specific Characterization of Structure and Dynamics of Complex Materials by EPR Spin Probes, In *Modern Magnetic Resonance* (Webb, G. A., Ed.), pp 1529 - 1537, Springer Netherlands, Dordrecht.
- [43] Paletta, J. T., Pink, M., Foley, B., Rajca, S., and Rajca, A. (2012) Synthesis and Reduction Kinetics of Sterically Shielded Pyrrolidine Nitroxides, *Org. Lett.* 14, 5322 - 5325.
- [44] Keana, J. F. W., Pou, S., and Rosen, G. M. (1987) Nitroxides as potential contrast enhancing agents for MRI application: Influence of structure on the rate of reduction by rat hepatocytes, whole liver homogenate, subcellular fractions, and ascorbate, *Magn. Reson. Med.* 5, 525 - 536.
- [45] Huang, S., Zhang, H., Paletta, J. T., Rajca, S., and Rajca, A. (2018) Reduction kinetics and electrochemistry of tetracarboxylate nitroxides, *Free Rad. Res.* 52, 327 - 334.
- [46] Ballini, R., Marziali, P., and Mozzicafreddo, A. (1996) Amberlyst A-27, an efficient heterogeneous catalyst for the Michael reaction of nitroalkanes with beta-substituted alkene acceptors, *J. Org. Chem.* 61, 3209 - 3211.

- [47] McMurry, J. E., and Melton, J. (1988) Conversion of nitro to carbonyl by ozonolysis of nitronates - 2,5-heptanedione, *Org. Synth* 50-9, 648 - 651.
- [48] Rundel, W. (1968) In *Houben-Weyl: Methoden der Organischen Chemie* (Müller, E., Ed.), pp 311 - 448, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- [49] Morris, W. D., and Mayer, J. M. (2017) Separating Proton and Electron Transfer Effects in Three-Component Concerted Proton-Coupled Electron Transfer Reactions, *J. Am. Chem. Soc.* 139, 10312 - 10319.
- [50] Geall, A. J., Taylor, R. J., Earll, M. E., Eaton, M. A. W., and Blagbrough, I. S. (2000) Synthesis of Cholesteryl Polyamine Carbamates: pKa Studies and Condensation of Calf Thymus DNA, *Bioconjugate Chem.* 11, 314 - 326.
- [51] Kolb, H. C., Finn, M. G., and Sharpless, K. B. (2001) Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angew. Chem. Int. Edit.* 40, 2004 - 2021.
- [52] Sletten, E. M., and Bertozzi, C. R. (2009) Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality, *Angew. Chem. Int. Edit.* 48, 6974 - 6998.
- [53] Pitzscke, A. (2017) Molekulare Leuchttürme, *Laborjournal* 1, 60 - 62.
- [54] Nikić, I., Plass, T., Schraidt, O., Szymański, J., Briggs, J. A. G., Schultz, C., and Lemke, E. A. (2014) Minimal Tags for Rapid Dual-Color Live-Cell Labeling and Super-Resolution Microscopy, *Angew. Chem. Int. Edit.* 53, 2245 - 2249.
- [55] Plass, T., Milles, S., Koehler, C., Szymański, J., Mueller, R., Wießler, M., Schultz, C., and Lemke, E. A. (2012) Amino Acids for Diels–Alder Reactions in Living Cells, *Angew. Chem. Int. Edit.* 51, 4166 - 4170.
- [56] Keana, J. F. W., Hideg, K., Birrell, G. B., Hankovszky, O. H., Ferguson, G., and Parvez, M. (1982) New monofunctionalized and difunctionalized 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine and delta-3-pyrroline-1-oxyl nitroxide spin labels, *Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim.* 60, 1439 - 1447.
- [57] Wetherington, J. B., Ament, S. S., and Moncrief, J. W. (1974) Structure and absolute-configuration of spin-label r-(+)-3-carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy, *Acta Crystallogr. Sect. B-Struct. Sci.Cryst. Eng. Mat.* 30, 568 - 573.
- [58] Uchida, Y., Tamura, R., Ikuma, N., Masaki, K., Takahashi, H., Shimono, S., and Yamauchi, J. (2006) Antiferromagnetic interactions arising from a close contact between nitroxyl oxygen and β -methyl carbon atoms carrying an α -spin in the solid state, *Mendeleev Commun.* 16, 69 - 71.
- [59] Chion, B., and Lajzerowicz, J. (1975) Crystallographic structures of racemic and optically-active forms of 2,2,5,5-tetramethyl pyrrolidine-3-carboxamide-1-oxyl, *Acta Crystallogr. Sect. B-Struct. Commun.* 31, 1430 - 1435.
- [60] Kirilyuk, I. A., Polienko, Y. F., Krumkacheva, O. A., Strizhakov, R. K., Gatilov, Y. V., Grigor'ev, I. A., and Bagryanskaya, E. G. (2012) Synthesis of 2,5-Bis(spirocyclohexane)-Substituted Nitroxides of Pyrroline and Pyrrolidine Series, Including Thiol-Specific Spin Label: An Analogue of MTSSL with Long Relaxation Time, *J. Org. Chem.* 77, 8016 - 8027.
- [61] Chion, B., Lajzerowicz, J., Collet, A., and Jacques, J. (1976) Optical antipode mixtures .119 example of solid-solution between enantiomers - 2,2,5,5-tetramethyl-3-hydroxypyrrolidine nitroxide crystallography, *Acta Crystallogr. Sect. B-Struct. Commun.* 32, 339 - 344.
- [62] Fuchs, B. (1978) Conformations of Five-Membered Rings, In *Topics in Stereochemistry (Volume 10)* (Eliel, E. L., and Allinger, N. L., Eds.), John Wiley & Sons, Inc. .
- [63] Bernstein, J., Davis, R. E., Shimoni, L., and Chang, N. L. (1995) Patterns in hydrogen bonding - functionality and graph set analysis in crystals, *Angew. Chem.-Int. Edit.* 34, 1555 - 1573.
- [64] Thakuria, R., Sarma, B., and Nangia, A. (2017) 7.03 - Hydrogen Bonding in Molecular Crystals, In *Comprehensive Supramolecular Chemistry II* (Atwood, J. L., Ed.), pp 25 - 48, Elsevier, Oxford.
- [65] Etter, M. C. (1990) Encoding and decoding hydrogen-bond patterns of organic-compounds, *Accounts Chem. Res.* 23, 120 - 126.
- [66] Bondi, A. (1964) van der Waals Volumes and Radii, *J. Phys. Chem.* 68, 441 - 451.
- [67] Stoll, S., and Schweiger, A. (2006) EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR, *J. Magn. Reson.* 178, 42 - 55.
- [68] Saracino, G. A. A., Tedeschi, A., D'Errico, G., Improta, R., Franco, L., Ruzzi, M., Corvaia, C., and Barone, V. (2002) Solvent Polarity and pH Effects on the Magnetic Properties of Ionizable Nitroxide Radicals: A Combined Computational and Experimental Study of 2,2,5,5-Tetramethyl-3-carboxypyrrolidine and 2,2,6,6-Tetramethyl-4-carboxypiperidine Nitroxides, *J. Phys. Chem. A* 106, 10700 - 10706.

- [69] Rockenbauer, A., Györ, M., Hankovszky, H. O., and Hideg, K. (1988) E.S.R. of the conformation of 5- and 6-membered cyclic nitroxide (aminoxyl) radicals, In *Electron Spin Resonance: Volume 11A* (Symons, M. C. R., Ed.), pp 145 - 182, The Royal Society of Chemistry, London.
- [70] Lajzerowicz-Bonneteau, B. (1976) 6. Molecular Structure of Nitroxides, In *Spin Labeling: Theory and Applications* (Berliner, L. J., Ed.) 1st Edition ed., Academic Press.
- [71] Burks, S. R., Makowsky, M. A., Yaffe, Z. A., Hoggie, C., Tsai, P., Muralidharan, S., Bowman, M. K., Kao, J. P. Y., and Rosen, G. M. (2010) The Effect of Structure on Nitroxide EPR Spectral Linewidth, *J. Org. Chem.* *75*, 4737 - 4741.
- [72] Schwartz, R. N., Peric, M., Smith, S. A., and Bales, B. L. (1997) Simple test of the effect of an electric field on the N-14-hyperfine coupling constant in nitroxide spin probes, *J. Phys. Chem. B* *101*, 8735-8739.
- [73] Jagtap, A. P., Krstic, I., Kunjir, N. C., Hänsel, R., Prisner, T. F., and Sigurdsson, S. T. (2015) Sterically shielded spin labels for in-cell EPR spectroscopy: Analysis of stability in reducing environment, *Free Rad. Res.* *49*, 78 - 85.
- [74] Morris, S., Sosnovsky, G., Hui, B., Huber, C. O., Rao, N. U. M., and Swartz, H. M. (1991) Chemical and Electrochemical Reduction Rates of Cyclic Nitroxides (Nitroxyls), *J. Pharm. Sci.* *80*, 149 - 152.
- [75] Kirilyuk, I. A., Bobko, A. A., Semenov, S. V., Komarov, D. A., Irtegov, I. G., Grigor'ev, I. A., and Bagryanskaya, E. (2015) Effect of Sterical Shielding on the Redox Properties of Imidazoline and Imidazolidine Nitroxides, *J. Org. Chem.* *80*, 9118 - 9125.
- [76] Hansch, C., Leo, A., and Taft, R. W. (1991) A survey of Hammett substituent constants and resonance and field parameters, *Chem. Rev.* *91*, 165 - 195.
- [77] Fischer, D., and Fahr, A. (2011) Nichtvirale Gentransfer-Arzneimittel. Therapie mit synthetischen Vektoren, *PharmuZ* *40*, 212 - 219.
- [78] Kurzbach, D., Velte, C., Arnold, P., Kizilsavas, G., and Hinderberger, D. (2011) DNA condensation with spermine dendrimers: interactions in solution, charge inversion, and morphology control, *Soft Matter* *7*, 6695 - 6704.
- [79] Wagner, E. (1999) Application of membrane-active peptides for nonviral gene delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* *38*, 279 - 289.
- [80] Madeira, C., Loura, L. M. S., Aires-Barros, M. R., and Prieto, M. (2011) Fluorescence methods for lipoplex characterization, *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* *1808*, 2694 - 2705.
- [81] Ottaviani, M. F., Furini, F., Casini, A., Turro, N. J., Jockusch, S., Tomalia, D. A., and Messori, L. (2000) Formation of Supramolecular Structures between DNA and Starburst Dendrimers Studied by EPR, CD, UV, and Melting Profiles, *Macromolecules* *33*, 7842 - 7851.
- [82] Amiji, M. M. (2004) *Polymeric Gene Delivery: Principles and Applications*, CRC Press, Taylor & Francis Group.
- [83] Getz, E. B., Xiao, M., Chakrabarty, T., Cooke, R., and Selvin, P. R. (1999) A Comparison between the Sulfhydryl Reductants Tris(2-carboxyethyl)phosphine and Dithiothreitol for Use in Protein Biochemistry, *Anal. Biochem.* *273*, 73 - 80.
- [84] Schwede, T. (09.03.2010) "Q6YGGZ0 (Q6YGGZ0_9CNID) Aequorea coerulea (belt jellyfish)-Green fluorescent protein. Crystal structure of GFP-like protein aceGFP_G222E (A. coerulea). UV-photoconverted green form.", Protein Structure Bioinformatics Group, Swiss Institute of Bioinformatics, Biozentrum, University of Basel.
- [85] Sheldrick, G. M. (2015) SHELXT – Integrated space-group and crystal-structure determination, *Acta Crystallogr. A Found. Adv.* *71*, 3 - 8.
- [86] Sheldrick, G. M. (2015) Crystal structure refinement with SHELXL, *Acta Crystallogr. C Struct. Chem.* *71*, 3-8.
- [87] Dolomanov, O. V., Bourhis, L. J., Gildea, R. J., Howard, J. A. K., and Puschmann, H. (2009) OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program, *J. Appl. Crystallogr.* *42*, 339 - 341.
- [88] Corbett, J. F. (1972) Pseudo first-order kinetics, *J. Chem. Educ.* *49*, 663.
- [89] Coppinger, G. M. (1957) A Stable Phenoxyl Radical Inert to Oxygen, *J. Am. Chem. Soc.* *79*, 501 - 502.
- [90] Gierke, W., Harrer, W., Kurreck, H., and Reusch, J. (1973) Metallorganische Synthese und EPR-Spektroskopie von Galvinoxyl-Verbindungen, *Tetrahedron Letters* *38*, 3681-3684.

- [91] Gierke, W., Harrer, W., Kurreck, H., and Reusch, J. (1976) Über Galvinole und Galvinoxyle, II EPR-HFS- und elektronen-spektroskopische Untersuchung von Galvinoxyl-Mehrspinsystemen., *Z. Naturforsch. B* 31, 965 - 973.
- [92] Harrer, W., Kurreck, H., Reusch, J., and Gierke, W. (1975) Über Galvinole und Galvinoxyl-Mehrspinsysteme—I : Eine neue metallorganische Synthese von Mono- und Oligo-Galvinolen *Tetrahedron* 31, 625 - 632.
- [93] von Gersdorff, J., Kirste, B., Niethammer, D., Harrer, W., and Kurreck, H. (1988) EPR and ENDOR Investigations of Dynamic Processes in Sterically Overcrowded Phenoxy-Type Galvinoxyl Radicals, *Magn. Reson. Chem.* 26, 416 - 424.
- [94] Omelka, L., Tkáč, A., Jiráčková, L., and Pospíšil, J. (1982) Radical reactions in the co-ordination sphere of transition metals. XIII Radicals derived from 4,4'- and 2,2'-Alkylidenebisphenolic Antioxidants, *Org. Magn. Reson.* 19, 153 - 159.
- [95] Khudyakov, I. V., Levin, P. P., De Jonge, K., and Bekman, K. M. (1977) Electronic spectra of some phenyl-substituted phenoxy radicals, *Russ. Chem. Bull.* 26, 1525 - 1527.
- [96] von Gersdorff, J., Kirste, B., and Kurreck, H. (1986) Synthesis and EPR and ENDOR investigations of Coppinger's radical with perdeuteriated tert-butyl groups, *Magn. Reson. Chem.* 24, 1077 - 1079.
- [97] Kirste, B., Kurreck, H., and Sordo, M. (1985) Syntheses and ENDOR Studies of Selectively Deuterated Galvinoxyl Radicals. Complete Determination of the ¹³C Hyperfine Coupling Constants of Coppinger's Radical, *Chem. Ber.* 118, 1782 - 1797.
- [98] Tsiao, C., Wild, C., Gu, J., and Dorn, H. C. (1991) Preparation of the a-[D]Galvinoxyl Radical, *J. Labelled Comp. Radiopharm.* 24, 945 - 948.
- [99] Kharasch, M. S., and Joshi, B. S. (1957) Reactions of Hindered Phenols. I. Reactions of 4,4'-Dihydroxy-3,5,3',5'-tetra-tert-butyl Diphenylmethane, *J. Org. Chem.* 22 1435 - 1438.
- [100] Kharasch, M. S., and Joshi, B. S. (1957) Reactions of Hindered Phenols. II. Base-Catalyzed Oxidations of Hindered Phenols, *J. Org. Chem.* 22 1439 - 1443.
- [101] Screttas, C. G., Heropoulos, G. A., and Karayannis, M. I. (1984) A question concerning the pk range within which an organic free radical exhibits normal radical behaviour. The case of galvinoxyl, *Tetrahedron* 40, 5275 - 5279.
- [102] Tsuchiya, J., Yamada, T., Niki, E., and Kamiya, Y. (1985) Interaction of galvinoxyl radical with ascorbic acid, cysteine, and glutathione in homogeneous solution and in aqueous dispersions, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 58, 326 - 330.
- [103] Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, L. R., Gardner, P. T., Heinonen, M. I., Hopia, A., Huynh-Ba, T., Lambelet, P., McPhail, D., Skibsted, L. H., and Tijburg, L. (2001) Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds, *Eur. Food. Res. Technol.* 212, 319 - 328.
- [104] Nishikawa, T., Ando, T., Kamigaito, M., and Sawamoto, M. (1997) Evidence for Living Radical Polymerization of Methyl Methacrylate with Ruthenium Complex: Effects of Protic and Radical Compounds and Reinitiation from the Recovered Polymers, *Macromolecules* 30, 2244 - 2248.
- [105] Greene, F. D., and Adam, W. (1963) Autoxidation of Galvinoxyl, *J. Org. Chem.* 28, 3550 - 3551.
- [106] Colegate, S. M., and Hewgill, F. R. (1980) Oxidation of bisphenols. II. Some compounds related to galvinoxyl, *Aust. J. Chem.* 33, 351 - 369.
- [107] Esaki, H., Aoki, F., Umemura, M., Kato, M., Maegawa, T., Monguchi, Y., and Sajiki, H. (2007) Efficient h/d exchange reactions of alkyl-substituted benzene derivatives by means of the Pd/C-H(2)-D(2)O system, *Chemistry* 13, 4052 - 4063.
- [108] Ito, N., Watahiki, T., Maesawa, T., Maegawa, T., and Sajiki, H. (2006) Synergistic Effect of a Palladium-on-Carbon/Platinum-on-Carbon Mixed Catalyst in Hydrogen/Deuterium Exchange Reactions of Alkyl-Substituted Aromatic Compounds, *Adv. Synth. Catal.* 348, 1025 - 1028.
- [109] Sokolenko, W. A., Svirskaya, N. M., and Rubaylo, A. I. (2013) Reaction of phenols with 1-adamantanol in the presence of 1-bromoadamantane, *Russ. Chem. Bull.* 62, 1293 - 1296.
- [110] Bushara, K. O., Goldstein, S. R., Grimes, G. J., Burstein, A. H., and Hallett, M. (2004) Pilot trial of 1-octanol in essential tremor, *Neurology* 62, 122 - 124.
- [111] (2015) 1-Octanol, Toxicology Data Network (Toxnet), U.S. National Library of Medicine.

- [112] Carreau, A., El Hafny-Rahbi, B., Matejuk, A., Grillon, C., and Kieda, C. (2011) Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia, *J. Cell. Mol. Med.* 15, 1239 - 1253.
- [113] Frank, J., Elewa, M., Said, M. M., El Shihawy, H. A., El-Sadek, M., Muller, D., Meister, A., Hause, G., Drescher, S., Metz, H., Imming, P., and Mäder, K. (2015) Synthesis, Characterization, and Nanoencapsulation of Tetrathiatriarylmethyl and Tetrachlorotriarylmethyl (Trityl) Radical Derivatives-A Study To Advance Their Applicability as in Vivo EPR Oxygen Sensors, *J. Org. Chem.* 80, 6754 - 6766.
- [114] Montalti, M., Credi, A., Prodi, L., and Gandolfi, M. T. (2006) Solvent Properties, In *Handbook of Photochemistry*, CRC Press, Taylor & Francis Group.
- [115] Caldin, E. F., Dagnall, S. P., Mak, M. K. S., and Brooke, D. N. (1982) Kinetics of hydrogen-atom transfer from phenols to galvinoxyl in aprotic solvents, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 74, 215 - 228.
- [116] Gomberg, M. (1900) An instance of trivalent carbon: Triphenylmethyl, *J. Am. Chem. Soc.* 22, 757 - 771.
- [117] Jacobson, P. (1905) Zur «Triphenylmethyl»-Frage, *Ber. d. d. chem. Gesell.* 38, 196 - 199.
- [118] Lankamp, H., Nauta, W. T., and MacLean, C. (1968) A new interpretation of the monomer-dimer equilibrium of triphenylmethyl- and alkylsubstituted-diphenyl methyl-radicals in solution, *Tetrahedron Lett.* 9, 249 - 254.
- [119] Janzen, E. G., Johnston, F. J., and Ayers, C. L. (1967) The Reversible Thermal Decomposition of Triphenylmethylperoxy Radical to Triphenylmethyl Radical and Oxygen, *J. Am. Chem. Soc.* 89, 1176 - 1183.
- [120] Ballester, M. (1967) Inert carbon free radicals, *pac* 15, 123 - 152.
- [121] Ballester, M., Riera-Figueras, J., Castaner, J., Badfa, C., and M. Monso, J. (1971) Inert carbon free radicals. I. Perchlorodiphenylmethyl and perchlorotriphenylmethyl radical series, *J. Am. Chem. Soc.* 93, 2215 - 2225.
- [122] Andersson, S., Radner, F., Rydbeck, A., Servin, R., and Wistrand, L.-G. (1996) Free Radicals (United States Patent US5530140 (A)), *Nycomed Imaging AS*.
- [123] Ardenkjær-Larsen, J. H. (1997) A Method of Determining Oxygen Concentration in a Sample (WO 97/09633), *Nycomed Imaging AS*.
- [124] Thaning, M. (1998) Triarylmethyl Free Radicals as Image Enhancing Agents (WO 98/39277), *Nycomed Imaging AS*.
- [125] Andersson, S., Radner, F., Rydbeck, A., Servin, R., and Wistrand, L.-G. (1998) Free Radicals (United States Patent US5728370 (A)), *Nycomed Imaging AS*.
- [126] Jørgensen, M., Rise, F., Andersson, S., Almén, T., Aabye, A., Wistrand, L.-G., Wikström, H., Golman, K., Servin, R., and Michelsen, P. (1991) Triarylmethyl radicals and the use of inert carbon free radicals in MRI (WO 9112024), *Hafslund Nycomed Innovation Ab*.
- [127] Bowman, M. K., Mailer, C., and Halpern, H. J. (2005) The solution conformation of triarylmethyl radicals, *J. Magn. Reson.* 172, 254 - 267.
- [128] Driesschaert, B., Robiette, R., Lucaccioni, F., Gallez, B., and Marchand-Brynaert, J. (2011) Chiral properties of tetrathiatriarylmethyl spin probes, *Chem. Commun.* 47, 4793 - 4795.
- [129] Juliá, L., Ballester, M., Riera, J., Castaner, J., Ortin, J. L., and Onrubia, C. (1988) Inert Carbon Free Radicals. 9. The First Perchlorinated Triarylmethyl and Fluorenyl Radicals with a Heteroaromatic Ring, and Related Compounds, *J. Org. Chem.* 53, 1267 - 1273.
- [130] Fox, M. A., Gaillard, E., and Chen, C. C. (1987) Photochemistry of stable free radicals: the photolysis of perchlorotriphenylmethyl radicals, *J. Am. Chem. Soc.* 109, 7088 - 7094.
- [131] Kutala, V. K., Villamena, F. A., Ilangovan, G., Maspocho, D., Roques, N., Veciana, J., Rovira, C., and Kuppusamy, P. (2008) Reactivity of Superoxide Anion Radical with a Perchlorotriphenylmethyl (Trityl) Radical, *J. Phys. Chem. B* 112, 158 - 167.
- [132] Elewa, M., Maltar-Strmecki, N., Said, M. M., El Shihawy, H. A., El-Sadek, M., Frank, J., Drescher, S., Drescher, M., Mader, K., Hinderberger, D., and Imming, P. (2017) Synthesis and EPR-spectroscopic characterization of the perchlorotriarylmethyl tricarboxylic acid radical (PTMTC) and its ¹³C labelled analogue (¹³C-PTMTC), *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19, 6688 - 6697.

- [133] Rizzi, C., Samouilov, A., Kutala, V. K., Perinandi, N. L., Zweier, J. L., and Kuppusamy, P. (2003) Application of a Trityl-based Radical Probe for Measuring Superoxide, *Free Radic. Biol. Med.* 35, 1608 - 1618.
- [134] Matsumoto, K., English, S., Yoo, J., Yamada, K., Devasahayam, N., Cook, J. A., Mitchell, J. B., Subramanian, S., and Krishna, M. C. (2004) Pharmacokinetics of a triarylmethyl-type paramagnetic spin probe used in EPR oximetry, *Magn. Reson. Med.* 52, 885 - 892.
- [135] Decroos, C., Li, Y., Soltani, A., Frapart, Y., Mansuy, D., and Boucher, J. L. (2010) Oxidative decarboxylation of tris-(p-carboxyltetraaryl)methyl radical EPR probes by peroxidases and related heme proteins: intermediate formation and characterization of the corresponding cations, *Arch. Biochem. Biophys.* 502, 74 - 80.
- [136] Decroos, C., Li, Y., Bertho, G., Frapart, Y., Mansuy, D., and Boucher, J.-L. (2009) Oxidative and Reductive Metabolism of Tris(p-carboxyltetraaryl)methyl Radicals by Liver Microsomes, *Chem. Res. Toxicol.* 22, 1342 - 1350.
- [137] Reddy, T. J., Iwama, T., Halpern, H. J., and Rawal, V. H. (2002) General Synthesis of Persistent Trityl Radicals for EPR Imaging of Biological Systems, *J. Org. Chem.* 67, 4635 - 4639.
- [138] Elewa, M. S. M. A. E.-m. M. (2015) Synthesis, EPR characterization and chitosan labelling of triarylmethyl radicals (Dissertation), Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).
- [139] Dhimitruka, I., Grigorieva, O., Zweier, J. L., and Khramtsov, V. V. (2010) Synthesis, structure, and EPR characterization of deuterated derivatives of Finland trityl radical, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 3946 - 3949.
- [140] Shrader, E. F., Millman, S., and Kusch, P. (1940) On the Nuclear Gyromagnetic Ratios of the Chlorine Isotopes, *Phys. Rev.* 58, 925 - 925.
- [141] Kuzhelev, A. A., Tormyshev, V. M., Rogozhnikova, O. Y., Trukhin, D. V., Troitskaya, T. I., Strizhakov, R. K., Krumkacheva, O. A., Fedin, M. V., and Bagryanskaya, E. G. (2017) Triarylmethyl Radicals: EPR Study of ¹³C Hyperfine Coupling Constants, *Z. Phys. Chem. (N F)* 231, 777 - 794.
- [142] Tormyshev, V. M., Genaev, A. M., Sal'nikov, G. E., Rogozhnikova, O. Y., Troitskaya, T. I., Trukhin, D. V., Mamatyuk, V. I., Fadeev, D. S., and Halpern, H. J. (2012) Triarylmethanols with Bulky Aryl Groups and the NOESY/EXSY Experimental Observation of a Two-Ring-Flip Mechanism for the Helicity Reversal of Molecular Propellers, *European J. Org. Chem.* 2012, 623 - 629.
- [143] Liu, Y., Villamena, F. A., Sun, J., Wang, T. Y., and Zweier, J. L. (2009) Esterified trityl radicals as intracellular oxygen probes, *Free Radic. Biol. Med.* 46, 876 - 883.
- [144] Bobko, A. A., Dhimitruka, I., Zweier, J. L., and Khramtsov, V. V. (2007) Trityl Radicals as Persistent Dual Function pH and Oxygen Probes for in Vivo Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy and Imaging: Concept and Experiment, *J. Am. Chem. Soc.* 129, 7240 - 7241.
- [145] Driesschaert, B., Marchand, V., Levêque, P., Gallez, B., and Marchand-Brynaert, J. (2012) A phosphonated triarylmethyl radical as a probe for measurement of pH by EPR, *Chem. Commun.* 48, 4049 - 4051.
- [146] Ballester, M., Castaner, J., Riera, J., and Pascual, I. (1984) Spin-charge exchange in a stable radical-carbenium ion, *J. Am. Chem. Soc.* 106, 3365 - 3366.
- [147] Ballester, M., and Pascual, I. (1991) Nucleophilic substitution of chlorine in triphenylmethyl radicals. Reverse effect and a related single-electron transfer, *J. Org. Chem.* 56, 4314 - 4317.
- [148] Ballester, M., Riera, J., Castaner, J., Rovira, C., Veciana, J., and Onrubia, C. (1983) Inert carbon free radicals. 4. Spin labeling of amino acids and peptides, *J. Org. Chem.* 48, 3716 - 3720.
- [149] Ballester, M., Riera, J., Castaner, J., Rodriguez, A., Rovira, C., and Veciana, J. (1982) Inert carbon free radicals. 3. Monofunctionalized radicals from perchlorotriphenylcarbenium hexachloroantimonate, *J. Org. Chem.* 47, 4498 - 4505.
- [150] Ballester, M., Riera, J., Castañer, J., Rovira, C., and Armet, O. (1986) An Easy, High-yield Synthesis of Highly Chlorinated Mono-, Di- and Triarylmethanes, *Synthesis* 1986, 64 - 66.
- [151] Bratasz, A., Kulkarni, A. C., and Kuppusamy, P. (2007) A highly sensitive biocompatible spin probe for imaging of oxygen concentration in tissues, *Biophys. J.* 92, 2918 - 2925.
- [152] Dunn, J. F., and Swartz, H. M. (2003) In vivo electron paramagnetic resonance oximetry with particulate materials, *Methods* 30, 159 - 166.

- [153] Swartz, H. M., and Clarkson, R. B. (1998) The measurement of oxygen in vivo using EPR techniques, *Phys. Med. Biol.* *43*, 1957 - 1975.
- [154] Matsumoto, K., Subramanian, S., Devasahayam, N., Aravalluvan, T., Murugesan, R., Cook, J. A., Mitchell, J. B., and Krishna, M. C. (2006) Electron paramagnetic resonance imaging of tumor hypoxia: enhanced spatial and temporal resolution for in vivo pO₂ determination, *Magn. Reson. Med.* *55*, 1157 - 1163.
- [155] Subramanian, S., Devasahayam, N., McMillan, A., Matsumoto, S., Munasinghe, J. P., Saito, K., Mitchell, J. B., Chandramouli, G. V., and Krishna, M. C. (2012) Reporting of quantitative oxygen mapping in EPR imaging, *J. Magn. Reson.* *214*, 244 - 251.
- [156] Dhimitruka, I., Bobko, A. A., Hadad, C. M., Zweier, J. L., and Khramtsov, V. V. (2008) Synthesis and Characterization of Amino Derivatives of Persistent Trityl Radicals as Dual Function pH and Oxygen Paramagnetic Probes, *J. Am. Chem. Soc.* *130*, 10780 - 10787.
- [157] Dhimitruka, I., Bobko, A. A., Eubank, T. D., Komarov, D. A., and Khramtsov, V. V. (2013) Phosphonated Trityl Probes for Concurrent in Vivo Tissue Oxygen and pH Monitoring Using Electron Paramagnetic Resonance-Based Techniques, *J. Am. Chem. Soc.* *135*, 5904 - 5910.
- [158] Bobko, A. A., Dhimitruka, I., Komarov, D. A., and Khramtsov, V. V. (2012) Dual-function pH and oxygen phosphonated trityl probe, *Anal. Chem.* *84*, 6054 - 6060.
- [159] Liu, Y., Villamena, F. A., and Zweier, J. L. (2008) Highly stable dendritic trityl radicals as oxygen and pH probe, *Chem. Commun.*, 4336 - 4338.
- [160] Liu, Y., Villamena, F. A., Rockenbauer, A., and Zweier, J. L. (2010) Trityl-nitroxide biradicals as unique molecular probes for the simultaneous measurement of redox status and oxygenation, *Chem. Commun.* *46*, 628 - 630.
- [161] Liu, Y., Song, Y., Rockenbauer, A., Sun, J., Hemann, C., Villamena, F. A., and Zweier, J. L. (2011) Synthesis of Trityl Radical-Conjugated Disulfide Biradicals for Measurement of Thiol Concentration, *J. Org. Chem.* *76*, 3853 - 3860.
- [162] Poncelet, M., Driesschaert, B., Bobko, A. A., and Khramtsov, V. V. (2018) Triarylmethyl-based biradical as a superoxide probe, *Free Radic. Res.* *52*, 373 - 379.
- [163] Dang, V., Wang, J., Feng, S., Buron, C., Villamena, F. A., Wang, P. G., and Kuppusamy, P. (2007) Synthesis and characterization of a perchlorotriphenylmethyl (trityl) triester radical: a potential sensor for superoxide and oxygen in biological systems, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *17*, 4062 - 4065.
- [164] Driesschaert, B., Bobko, A. A., Khramtsov, V. V., and Zweier, J. L. (2017) Nitro-Triarylmethyl Radical as Dual Oxygen and Superoxide Probe, *Cell Biochem. Biophys.* *75*, 241 - 246.
- [165] Sen, C. K. (2009) Wound healing essentials: let there be oxygen, *Wound Rep. Regen.* *17*, 1 - 18.
- [166] Lu, C., Saless, N., Wang, X., Sinha, A., Decker, S., Kazakia, G., Hou, H., Williams, B., Swartz, H. M., Hunt, T. K., Miclau, T., and Marcucio, R. S. (2013) The role of oxygen during fracture healing, *Bone* *52*, 220 - 229.
- [167] Taniyama, Y., and Griendling, K. K. (2003) Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms, *Hypertension* *42*, 1075 - 1081.
- [168] Touyz, R. M. (2004) Reactive Oxygen Species, Vascular Oxidative Stress, and Redox Signaling in Hypertension. What is the Clinical Significance?, *Hypertension* *44*, 248 - 252.
- [169] Springett, R., and Swartz, H. M. (2007) Measurements of oxygen in vivo: overview and perspectives on methods to measure oxygen within cells and tissues, *Antioxid. Redox. Signal.* *9*, 1295 - 1301.
- [170] Frank, J., Gundel, D., Drescher, S., Thews, O., and Mader, K. (2015) Injectable LiNc-BuO loaded microspheres as in vivo EPR oxygen sensors after co-implantation with tumor cells, *Free Radic. Biol. Med.* *89*, 741 - 749.
- [171] Swartz, H. M., Liu, K. J., Goda, F., and Walczak, T. (1994) India ink: A potential clinically applicable EPR oximetry probe, *Magn. Reson. Med.* *31*, 229 - 232.
- [172] Serda, M., Wu, Y. K., Barth, E. D., Halpern, H. J., and Rawal, V. H. (2016) EPR Imaging Spin Probe Trityl Radical OX063: A Method for Its Isolation from Animal Effluent, Redox Chemistry of Its Quinone Methide Oxidation Product, and in Vivo Application in a Mouse, *Chem. Res. Toxicol.* *29*, 2153 - 2156.

- [173] Halpern, H. J. Persönliche Kommunikation mit V. M. Tormyshev (Koautor des Artikels "A radical containing injectable in-situ-oleogel and emulgel for prolonged in-vivo oxygen measurements with CW EPR" (2019) *Free Rad. Biol. Med.* 130, 120 - 127).
- [174] Krumkacheva, O., and Bagryanskaya, E. (2017) Trityl radicals as spin labels, In *Electron Paramagnetic Resonance: Volume 25*, pp 35 - 60, The Royal Society of Chemistry.
- [175] Sostaric, J. Z., Pandian, R. P., Bratas, A., and Kuppusamy, P. (2007) Encapsulation of a Highly Sensitive EPR Active Oxygen Probe into Sonochemically Prepared Microspheres, *J. Phys. Chem. B* 111, 3298 - 3303.
- [176] Liu, J. K., Grinstaff, M. W., Jiang, J., Suslick, K. S., Swartz, H. M., and Wang, W. (1994) In Vivo Measurement of Oxygen Concentration Using Sonochemically Synthesized Microspheres, *Biophys. J.* 67, 896 - 901.
- [177] Charlier, N., Driesschaert, B., Wauthoz, N., Beghein, N., Preat, V., Amighi, K., Marchand-Brynaert, J., and Gallez, B. (2009) Nano-emulsions of fluorinated trityl radicals as sensors for EPR oximetry, *J. Magn. Reson.* 197, 176 - 180.
- [178] Abbas, K., Boutier-Pischon, A., Auger, F., Francon, D., Almario, A., and Frapart, Y. M. (2016) In vivo triarylmethyl radical stabilization through encapsulation in Pluronic F-127 hydrogel, *J. Magn. Reson.* 270, 147 - 156.
- [179] Corbet, C., and Feron, O. (2017) Tumour acidosis: from the passenger to the driver's seat, *Nat. Rev. Cancer* 17, 577 - 593.
- [180] Coakley, R. J., Taggart, C., McElvaney, N. G., and O'Neill, S. J. (2002) Cytosolic pH and the inflammatory microenvironment modulate cell death in human neutrophils after phagocytosis, *Blood* 100, 3383 - 3391.
- [181] Haas, R., Marelli-Berg, F., and Mauro, C. (2013) In the eye of the storm: T cell behavior in the inflammatory microenvironment, *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* 2, 146 - 155.
- [182] Zöllner, J. P., Hattingen, E., Singer, O. C., and Pilatus, U. (2015) Changes of pH and Energy State in Subacute Human Ischemia Assessed by Multinuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, *Stroke* 46, 441 - 446.
- [183] Schneider, L. A., Korber, A., Grabbe, S., and Dissemond, J. (2007) Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy?, *Arch. Dermatol. Res.* 298, 413 - 420.
- [184] Kubasiak, L. A., Hernandez, O. M., Bishopric, N. H., and Webster, K. A. (2002) Hypoxia and acidosis activate cardiac myocyte death through the Bcl-2 family protein BNIP3, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 12825 - 12830.
- [185] Kempe, S., and Mäder, K. (2012) In situ forming implants - an attractive formulation principle for parenteral depot formulations, *J. Control. Release* 161, 668 - 679.
- [186] Müller, D. (2013) Optimierung der Synthesen von stabilen Triarylmethyl-Radikalen (Dissertation), *Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- [187] Dhimitruka, I., Velayutham, M., Bobko, A. A., Khramtsov, V. V., Villamena, F. A., Hadad, C. M., and Zweier, J. L. (2007) Large-scale synthesis of a persistent trityl radical for use in biomedical EPR applications and imaging, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 6801 - 6805.
- [188] Xia, S., Villamena, F. A., Hadad, C. M., Kuppusamy, P., Li, Y., Zhu, H., and Zweier, J. L. (2006) Reactivity of Molecular Oxygen with Ethoxycarbonyl Derivatives of Tetrathiaarylmethyl Radicals, *J. Org. Chem.* 71, 7268 - 7279.
- [189] Rogozhnikova, O. Y., Vasiliev, V. G., Troitskaya, T. I., Trukhin, D. V., Mikhulina, T. V., Halpern, H. J., and Tormyshev, V. M. (2013) Generation of Trityl Radicals by Nucleophilic Quenching of Tris(2,3,5,6-tetrathiaaryl)methyl Cations and Practical and Convenient Large-Scale Synthesis of Persistent Tris(4-carboxy-2,3,5,6-tetrathiaaryl)methyl Radical, *European J. Org. Chem.* 2013, 3347 - 3355.
- [190] Müller, D., Adelsberger, K., and Imming, P. (2013) Organic Preparations with Molar Amounts of Volatile Malodorous Thiols, *Synth. Commun.* 43, 1447 - 1454.
- [191] Richardson, R. M., Barney, R. J., and Wiemer, D. F. (2012) Synthesis of dialkyl and diaryl benzylphosphonates through a ZnI₂-mediated reaction, *Tetrahedron Lett.* 53, 6682 - 6684.
- [192] Rajeshwaran, G. G., Nandakumar, M., Sureshbabu, R., and Mohanakrishnan, A. K. (2011) Lewis Acid-Mediated Michaelis–Arbuzov Reaction at Room Temperature: A Facile Preparation of Arylmethyl/Heteroarylmethyl Phosphonates, *Org. Lett.* 13, 1270 - 1273.
- [193] Sevrain, C. M., Berchel, M., Couthon, H., and Jaffrès, P.-A. (2017) Phosphonic acid: preparation and applications, *Beilstein J. Org. Chem.* 13, 2186 - 2213.

- [194] Crespi, S., Protti, S., Ravelli, D., Merli, D., and Fagnoni, M. (2017) Sugar-Assisted Photogeneration of Didehydrotoluenes from Chlorobenzylphosphonic Acids, *J. Org. Chem.* 82, 12162 - 12172.
- [195] Mäder, K., Windorf, M., and Kutza, J. (2015) Injizierbare Depotformulierungen zur kontrollierten Wirkstofffreisetzung (WO 2015/062571 A1), *Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- [196] Lane, M. E. (2013) Skin penetration enhancers, *Int. J. Pharm.* 447, 12 - 21.
- [197] Liebert, M. A. (1982) Final Report on the Safety Assessment of Myristyl Myristate and Isopropyl Myristate, *J. Am. Coll. Toxicol.* 1, 55 - 80.
- [198] Terech, P., and Weiss, R. G. (1997) Low Molecular Mass Gelators of Organic Liquids and the Properties of Their Gels, *Chem. Rev.* 97, 3133 - 3160.
- [199] Windorf, M. (2017) 12-Hydroxystearic acid-based in situ forming organogels : development and characterization (Dissertation), *Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- [200] Yu, X., Chen, L., Zhang, M., and Yi, T. (2014) Low-molecular-mass gels responding to ultrasound and mechanical stress: towards self-healing materials, *Chem. Soc. Rev.* 43, 5346 - 5371.
- [201] Kutza, J. (2014) Oleogele auf 12-Hydroxystearinsäurebasis als injizierbare Implantate zur kontrollierten Proteinfreisetzung (Dissertation), *Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- [202] Battino, R. (1981) *Oxygen and ozone. IUPAC solubility data series*, Vol. 7, Pergamon Press, Oxford, UK.
- [203] Battino, R., Rettich, T. R., and Tominaga, T. (1983) The Solubility of Oxygen and Ozone in Liquids, *J. Phys. Chem. Ref. Data* 12, 163 - 178.
- [204] Prisner, T., Rohrer, M., and MacMillan, F. (2001) Pulsed EPR spectroscopy: biological applications, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 52, 279 - 313.
- [205] Bézière, N., Decroos, C., Mkhitarian, K., Kish, E., Richard, F., Bigot-Marchand, S., Durand, S., Cloppet, F., Chauvet, C., Corvol, M.-T., Rannou, F. o., Xu-Li, Y., Mansuy, D., Peyrot, F., and Frapart, Y.-M. (2012) First Combined In Vivo X-Ray Tomography and High-Resolution Molecular Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Imaging of the Mouse Knee Joint Taking into Account the Disappearance Kinetics of the EPR Probe, *Mol. Imaging* 11, 220 - 228.
- [206] Wright, J. C., and Burgess, D. J. (2012) *Long Acting Injections and Implants*, Springer New York.
- [207] Srivastava, M., Anderson, C. L., and Freed, J. H. (2016) A New Wavelet Denoising Method for Selecting Decomposition Levels and Noise Thresholds, *IEEE Access* 4, 3862 - 3877.
- [208] Allen, B. T., and Bond, A. (1964) The Hyperfine Structure of the Electron Spin Resonance Spectrum of Semiquinone Phosphates, *J. Phys. Chem.* 68, 2439 - 2444.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Peter Imming für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Forschungsgruppe anzufertigen. Die zahlreichen Diskussionen, Anregungen und Ratschläge mit und von Professor Imming waren ein unverzichtbarer Bestandteil meiner Promotionszeit und waren nicht nur in wissenschaftlicher Hinsicht stets eine Bereicherung. Sehr dankbar bin ich auch für die Auslandsaufenthalte, die Professor Imming mir ermöglicht hat. Dazu gehört unter anderem ein dreimonatiger Aufenthalt am National Cancer Institut in der Arbeitsgruppe von Dr. Murali Cherukuri, bei dem ich mich auf diesem Weg ebenfalls für die interessante Zeit bedanken möchte.

Ich möchte mich weiterhin bei Professor Karsten Mäder und seinen Mitarbeitern für die tatkräftige Unterstützung bei Entwicklung der Gelformulierungen, dem zur Verfügung stellen der EPR-Spektrometer und der Hilfe bei jeglichen Fragen zur EPR-Spektroskopie bedanken. Gleiches gilt für Professor Dariush Hinderberger und seine Arbeitsgruppe für die Unterstützung bei zahlreichen EPR-Messungen und die Einführung in die Spektrensimulation. Dr. Mykhailo Azarkh aus der Arbeitsgruppe von Professor Malte Drescher an der Uni Konstanz danke ich herzlich für die Unterstützung bei der Simulation einiger EPR-Spektren. Bei Professor Kurt Merzweiler und Dr. Rüdiger Seidel möchte ich für die Durchführung und Analyse der röntgenkristallographischen Untersuchungen bedanken.

Bei meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe von Professor Imming möchte ich mich für die immer gute Arbeitsatmosphäre bedanken. Das freundschaftliche Miteinander auch nach der Arbeit, z. B. bei DVD-Abenden und Tanzveranstaltungen, war und ist eine Bereicherung, die ich nicht missen möchte. Christoph L. danke ich außerdem für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Ilona und Sabine für die praktischen Tipps bei der Laborarbeit und die Organisation des Laboralltags.

Weiterhin danke ich allen Kollegen, die im Rahmen der Probenvermessung die IR-, NMR- und (HR)MS- und HPLC-Messungen durchgeführt haben.

Meiner Familie danke ich für die immer währende Unterstützung und den Rückhalt, den sie mir gibt. Ohne sie wäre mein bisheriger Lebensweg so nicht möglich gewesen.

Christoph H. danke ich aus tiefstem Herzen für seine liebevolle Unterstützung, sein Interesse an meiner Arbeit, seine Begeisterungsfähigkeit und seinen Forschungsdrang, welcher auch mich während meiner Promotion immer wieder angespornt und motiviert hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 24.09.1989
Geburtsort: Alsfeld
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Tel.: 017680181528
E-Mail: lisa.lampp@pharmazie.uni-halle.de

Lebenslauf

- 01/2015 - 12/2018 **Promotionsstudentin**
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie,
Abteilung Pharmazeutische Chemie,
Thema der Dissertation: „Synthese, Charakterisierung und Anwendung von
stabilen organischen Radikalen als Spin-Sonden für die
Elektronenspinresonanz-Spektroskopie“ (Betreuer: Professor Peter Imming)
Lehraufgaben: Praktikum „Instrumentelle Analytik“, Vorlesung „Organische
Chemie“ (vertretungsweise)
- 03 - 05/2017 Forschungsaufenthalt am National Cancer Institut, National Instituts of
Health, Bethesda, Maryland, USA
- 12/2014 **Erhalt der Approbation**
- 11/2014 3. Staatsexamen
- 11/2013 - 10/2014 **Pharmaziepraktikum/Diplom**
August-Bebel-Apotheke,
August-Bebel-Platz 9, 06108 Halle (Saale)
und
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie,
Anfertigung der Diplomarbeit „Vergleich physikochemischer Methoden zur
Charakterisierung der DNA-Komplexierung durch kationische Lipide“ zur
Erlangung des Akademischen Grades Diplom-Pharmazeutin (Dipl. Pharm.)
- 10/2009 - 09/2013 **Pharmaziestudium**
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 09/2013 2. Staatsexamen
- 08/2011 1. Staatsexamen
- 2000 - 2009 **Abitur**
Melanchthon-Schule
34628 Willingshausen-Steinatal

Publikationen und Poster

Publikationen

Agnieszka Boś-Liedke, Magdalena Walawender, Anna Woźniak, Dorota Flak, Jacek Gapiński, Stefan Jurga, Małgorzata Kucińska, Adam Plewiński, Marek Murias, Marwa Elewa, Lisa Lampp, Peter Imming, Krzysztof Tadyszak: *EPR Oximetry Sensor—Developing a TAM Derivative for In Vivo Studies*

Publiziert: Cell Biochemistry and Biophysics **2018**, 76, 19 - 28

DOI: <https://doi.org/10.1007/s12013-017-0824-3>

Lisa Lampp, Olga Yu. Rogozhnikova, Dmitry V. Trukhin, Victor M. Tormyshev, Michael K. Bowman, Nllathamby Devasahayam, Murali C. Krishna, Karsten Mäder, Peter Imming: *A radical containing injectable in-situ-oleogel and emulgel for prolonged in-vivo oxygen measurements with CW EPR*

Publiziert: Free Radical Biology and Medicine **2019**, 130, 120 - 127

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.442>

Lisa Lampp, Uwe Morgenstern, Kurt Merzweiler, Peter Imming, Rüdiger W. Seidel: *Synthesis and characterization of sterically and electrostatically shielded pyrrolidine nitroxide radicals*

Publiziert: Journal of Molecular Structure **2019**, 1182, 87 - 94

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.01.015>

Lisa Lampp, Mykhailo Azarkh, Malte Drescher, Peter Imming: *Galvinoxyl radicals: Synthesis of new derivatives, determination of low oxygen contents, and stability studies*

Publiziert: Tetrahedron **2019**, 75 (18), 2737 – 2747

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2019.03.051>

Lisa Lampp, Peter Imming: *Synthesis and surprising EPR behavior of new methylenephosphonate-substituted triarylmethyl radicals*

In Vorbereitung.

Poster

Lisa Lampp, Kurt Merzweiler, Heike Schimm, Dariush Hinderberger, Peter Imming: *Two new nitroxide spin labels*. The III International Conference "Spin physics, spin chemistry and spin technology" Novosibirsk, Russland

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift gemäß der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe.

Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Die daraus wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde ausschließlich der Naturwissenschaftlichen-Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt und an keiner anderen universitären Einrichtung, weder im In- noch im Ausland, zur Erlangung des Doktorgrades eingereicht.

Datum, Ort

Lisa Lampp