

**Optimierung der Synthesen von
stabilen Triarylmethyl-Radikalen
und deren in vitro Evaluierung
als mögliche Spinsonden für
die Elektronenspinresonanz (ESR)
gestützte Diagnostik**



DISSERTATION

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

der

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

von

Frau Apothekerin Diana Müller
geb. am 11.01.1982 in Köthen

Gutachter:

1. Prof. Dr. habil. Peter Imming
2. Prof. Dr. habil. Karsten Mäder
3. Prof. Dr. habil. Klaus Müller

Halle/Saale im Juli 2013

verteidigt am 21.11.2013

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	XI
Kurzfassung	XII
Abstract	XIII
1 Elektronenspinresonanz - eine neue diagnostische Methode	1
1.1 Zielsetzung	2
2 Thiole und zweiwertiger Schwefel	4
2.1 Herausforderungen im Umgang mit molaren Mengen an Thiol	4
2.2 Verwendung weniger geruchsintensiver Thiole	5
2.2.1 Tetrathiobenzol-Derivate	6
2.3 Abluftreinigung	10
2.3.1 Adsorption	10
2.3.2 Abluftwäsche.....	11
2.3.3 Thermische Abluftnachbehandlung	11
3 Synthese	13
3.1 Strukturelle Anforderungen an Trityl-Spinsonden.....	13
3.2 Schwefelalkylierte Triarylmethan-Derivate	14
3.2.1 Synthese des Tris-(8-carboxyl-2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]- dithiol)methyl-Radikals (13).....	16
3.2.2 Synthese des Tris-(8-carboxyl-2,2,6,6-tetra(² H ₃ -methyl)benzo[1,2-d;4,5- d']bis[1,3]dithiol)methyl-Radikals (14)	21
3.2.3 sulfonierte Triarylmethan-Derivate	23
3.2.4 Synthese von OXO63	28
3.2.5 Optimierung des Synthesewegs von OXO63.....	30
3.3 Chlorierte Triarylmethan-Derivate	34
3.3.1 Tris-(2,3,5,6-tetrachlor-4-hydroxycarbonylphenyl)methan	34
3.3.2 Tris-(2,3,5,6-tetrachlor-4-chlorsulfonylphenyl)methan	36
3.3.3 Tris-(2,3,5,6-tetrachlor-4-hydroxysulfonylphenyl)methyl-Radikal	38
3.4 nicht alkylierte Triarylmethan-Derivate.....	39
3.4.1 Triphenylmethan-4,4',4''-tricarbonsäure.....	39
3.4.2 Triphenylmethan-4,4',4''-trisulfonsäurechlorid.....	40

3.5	Verknüpfungsreaktionen mit Hydroxyethylstärke (HES)	41
3.5.1	Modifizierungen der Hydroxyethylstärke	43
3.5.2	Aktivierung der Hydroxyethylstärke	44
3.5.2.2	Herstellung von aminierter Hydroxyethylstärke	46
3.6	Verknüpfung von TAM-Derivaten mit aminierter HES	47
3.6.1	aminierte HES an Triphenylmethan-4,4',4''-tricarbonsäure	47
3.6.2	aminierte HES an Triphenylmethan-4,4',4''-trisulfonsäurechlorid	48
3.6.3	aminierte HES an Radikal 13	49
4	Elektronenspinresonanz	50
4.1	Das erste Triphenylmethyl-Radikal	50
4.2	Das erste ESR-Experiment.....	51
4.3	Physikalische Grundlagen der ESR-Spektroskopie	51
4.4	ESR Messprinzip und -technik.....	53
4.5	Bestimmung freier Radikale.....	54
4.6	ESR-Spektroskopie in der Biopharmazie	55
4.7	ESR-Experimente mit TAM-Radikalen	56
4.7.1	physikochemische Untersuchungen	56
4.8	ESR-Imaging	81
5	Zusammenfassung und Ausblick	88
6	Experimenteller Teil	95
6.1	Allgemeines.....	95
6.1.1	Arbeitstechniken	95
6.1.2	Verwendete Chemikalien	95
6.2	Chromatographie	96
6.3	Instrumentelle Analytik.....	97
6.3.1	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	97
6.3.2	Infrarot-Spektroskopie (IR).....	97
6.3.3	Schmelzpunkte	97
6.3.4	Elementaranalytik	97
6.3.5	UV-Vis-Spektroskopie.....	97
6.3.6	Massenspektrometrie (MS).....	98
6.4	Methoden der ESR-Experimente	98
6.5	Synthesen.....	101
6.5.1	3-Benzylthio-3-methylbutansäure	101
6.5.2	3-Mercapto-3-methylbutansäure (5f)	102

6.5.3	1,2,4,5-Tetra(<i>n</i> -hexylthio)benzol (4c).....	103
6.5.4	1,2,4,5-Tetra(<i>n</i> -oktylthio)benzol (4b).....	104
6.5.5	1,2,4,5-Tetra- <i>tert</i> -butylthiobenzol (2a).....	105
6.5.6	2,2,6,6-Tetramethylbenzo[1,2- <i>d</i> ;4,5- <i>d'</i>]bis[1,3]dithiol (3a).....	106
6.5.7	2,2,6,6-Tetra(² H ₃ -methyl)benzo[1,2- <i>d</i> ;4,5- <i>d'</i>]bis[1,3]dithiol (d3a).....	107
6.5.8	2,2,6,6-Tetramethylbenzo[1,2- <i>d</i> ;4,5- <i>d'</i>]bis[1,3]dithiol-sulfonsäurechlorid (15)	108
6.5.9	Tris-(2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2- <i>d</i> ;4,5- <i>d'</i>]bis[1,3]dithiol)methanol (9)	109
6.5.10	Tris-(2,2,6,6-tetra(² H ₃ -methyl)benzo[1,2- <i>d</i> ;4,5- <i>d'</i>]bis[1,3]dithiol)methanol (d9)	110
6.5.11	Tris-(2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2- <i>d</i> ;4,5- <i>d'</i>]bis[1,3]dithiol)methan (20)	111
6.5.12	Tris-(2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2- <i>d</i> ;4,5- <i>d'</i>]bis[1,3]dithiol)chinon (18).....	112
6.5.13	Tris-(8- <i>tert</i> -butoxycarbonyl-2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2- <i>d</i> ;4,5- <i>d'</i>]bis[1,3]dithiol)methanol (12)	113
6.5.14	Tris-(8- <i>tert</i> -butoxycarbonyl-2,2,6,6-tetra(² H ₃ -methyl)benzo[1,2- <i>d</i> ;4,5- <i>d'</i>]bis[1,3]dithiol)methanol (d12)	114
6.5.15	Benzo[1,2- <i>d</i> ;4,5- <i>d'</i>]bis[1,3]dithiol-2,2,6,6-tetraessigsäuremethylester (29).....	115
6.5.16	2,2,6,6-Tetra(hydroxyethyl)benzo[1,2- <i>d</i> ;4,5- <i>d'</i>]bis[1,3]dithiol (24).....	116
6.5.17	2,2,6,6-Tetra(<i>tert</i> -butoxyethyl)benzo[1,2- <i>d</i> ;4,5- <i>d'</i>]bis[1,3]dithiol (25)	117
6.5.18	2,2,6,6-Tetra(<i>tert</i> -butoxyethyl)4-iodbenzo[1,2- <i>d</i> ;4,5- <i>d'</i>]bis[1,3]dithiol (26).....	118
6.5.19	Tris-(2,2,6,6-tetra(<i>tert</i> -butoxyethyl)benzo[1,2- <i>d</i> ;4,5- <i>d'</i>]bis[1,3]dithiol)methanol (27)..	119
6.5.20	Triphenylmethan-4,4',4''-tricarbonsäure (41)	120
6.5.21	Triphenylmethan-4,4',4''-trisulfonsäurechlorid (43)	121
6.5.22	Tris-(2,3,5,6-tetrachlorphenyl)methan (33)	122
6.5.23	Tris-(2,3,5,6-tetrachlorphenyl)methancarbonsäure (34a).....	123
6.5.24	Tris-(2,3,5,6-tetrachlor-4-hydroxysulfonylphenyl)methan (38).....	124
6.6	Triarylmethyl-Radikale	125
6.6.1	Tris-(8-carboxyl-2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2- <i>d</i> ;4,5- <i>d'</i>]bis[1,3]dithiol)methyl-Radikal (13).....	125
6.6.2	Tris-(8-carboxyl-2,2,6,6-tetra(² H ₃ -methyl)benzo[1,2- <i>d</i> ;4,5- <i>d'</i>]bis[1,3]dithiol)methyl-Radikal (14)	126
6.6.3	Tris-(2,3,5,6-tetrachlor-4-hydroxysulfonylphenyl)methyl-Radikal (32)	127
6.7	Derivatisierung der Hydroxyethylstärke	128
6.7.1	Tosylimidazol (45).....	128
6.7.2	tosylierte Hydroxyethylstärke (44).....	129
6.7.3	aminierte Hydroxyethylstärke (46)	131
6.7.4	aminierte HES an Triphenylmethan-4,4',4''-tricarbonsäure (48).....	132
6.7.5	aminierte HES an Triphenylmethan-4,4',4''-trisulfonsäurechlorid (49).....	133

6.7.6 aminierte HES an Radikal 13	134
Literaturverzeichnis	135
Danksagung	142
Lebenslauf	143
Eidesstattliche Erklärung	144

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

h	Plancksches Wirkungsquantum [Js]
ν	Frequenz der Mikrowellenstrahlung [Hz]
g	Landé-Faktor (g-Wert)
μ_B	Bohr'sche Magneton [J/T]
B_0	Feldstärke des äußeren Magnetfeldes [mT]
g_e	gyromagnetische Konstante des freien Elektrons
δ	chemische Verschiebung
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
aHES	aminierte Hydroxyethylstärke
Äq.	Äquivalente
ber.	berechnet
<i>cw</i>	continuous wave
d	Dublett (NMR)
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
dest.	destilliert
DCM	Dichlormethan
Diboc	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO-D ₆	Dimethylsulfoxid (deutertiert)
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl-Radikal
DS	degree of substitution
EA	Elementaranalyse
EDA	Ethylendiamin
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Elektrospray-Ionisation
ESR (EPR)	Elektronenspinresonanz (engl. Electron Paramagnetic Resonance)
Et ₂ O	Diethylether
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
GC	Gaschromatographie
gef.	gefunden
ges.	gesättigt
Gew.%	Gewichtsprozent
HES	Hydroxyethylstärke

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
<i>i</i> -PrOH	Isopropanol
IR	Infrarot
Kat.	Katalysator
konz.	konzentriert
LM	Laufmittel/Fließmittel
LTB	Luft- und Thermotechnik Bayreuth GmbH
M	Molarität (mol/l)
MeOH	Methanol
max.	maximal
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
MPLC	Mitteldruckflüssigkeitschromatographie (Middle Performance Liquid Chromatography)
M _R	molare Masse
MS	Massenspektrometrie
MS	molarer Substitutionsgrad
Mtsl	(1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-3-methyl)methanthiosulfonat-Radikal
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
NMR	Kernspinresonanz (Nuclear Magnetic Resonance)
org.	organisch
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
ppm	parts per million
q	Quartett (NMR)
RT	Raumtemperatur
RTO	Regenerative Thermische Oxidationsanlage
s	Singulett (NMR)
SC	Säulenchromatographie
sog.	sogenannte
t	Triplett (NMR)
<i>tert</i>	tertiär
TAM	Triarylmethyl
TEA	Triethylamin
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl
TEMPOL	4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl
TFA	Trifluoressigsäure
tHES	tosylierte Hydroxyethylstärke
THF	Tetrahydrofuran
TMEDA	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TPM	Tris(2,3,5,6-tetrachlorphenyl)methan
Tris-HCl	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiolhydrochlorid (1:1)
UV	ultraviolett

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: chemische Struktur persistierender, stabiler organischer Radikale	2
Abbildung 2: chemische Struktur persistierender, stabiler π -Radikale.....	2
Abbildung 3: allgemeine Grundstruktur der Triarylmethyl (TAM)-Radikale	3
Abbildung 4: klassischer (Reaktionsschritt a, b) und alternativer (Reaktionsschritt c) Syntheseweg zur Darstellung von 2,2,6,6-Tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol (3a)	5
Abbildung 5: Syntheseplan für 2,2,6,6-Tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol (3a)	6
Abbildung 6: Syntheschema von 3a	8
Abbildung 7: Synthese von tertiären Thiolen aus dem entsprechenden Alkohol.....	9
Abbildung 8: ESR-Spektrum von Tris-(8-methoxycarbonyl-2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dioxol-4-yl)methyl-Radikal (A) in THF aus Reddy et al. ^[13]	14
Abbildung 9: Syntheseweg des TAM-Radikals (11) nach Patent US 5530140 ^[8]	15
Abbildung 10: optimierter Syntheseweg des Tris-(8-carboxyl-2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]-dithiol)methyl-Radikals (13).....	16
Abbildung 11: Syntheseweg von 3a nach Patent WO 9112024 ^[7]	17
Abbildung 12: Synthese von 1,2,4,5 Tetra- <i>tert</i> -butylthiobenzol (2a)	17
Abbildung 13: Einsparung eines Reaktionsschrittes	18
Abbildung 14: Synthese des Trimers 9	18
Abbildung 15: Synthese des <i>tert</i> -Butylesters 12 und Bildung des Radikals 13	19
Abbildung 16: DC-Verlauf des Radikals 13 , Fließmittel C.....	20
Abbildung 17: chemische Struktur des deuterierten TAM-Radikals (dTAM, 14)	21
Abbildung 18: Verbindung d52 , decarboxyliertes Radikal 14	22
Abbildung 19: IR-Spektren im Vergleich von Radikal 14 und d52	22
Abbildung 20: Chlorsulfonierung des Monomers 3a	23
Abbildung 21: Chlorsulfonierung des Trimer 9	24
Abbildung 22: unerwarteter Reaktionsverlauf.....	24
Abbildung 23: Vergleich der IR Spektren von 9 (schwarze Linie) und 18 (rote Linie)	25
Abbildung 24: Syntheseweg der Trisulfonsäure-Derivate 16 und 19	26
Abbildung 25: Reduktion des Trimer 9 zu 20	27
Abbildung 26: Sulfonierungsreaktion von 20	28
Abbildung 27: chemische Struktur der Tetrathiatriarylmethyl-Radikale OXO63 und OXO31	28
Abbildung 28: Synthese von OXO63 nach Patent US 6013810 ^[51]	30
Abbildung 29: 1. Schritt der Synthese von OXO63.....	31
Abbildung 30: 2. Schritt der Synthese von OXO63.....	31

Abbildung 31: 3. Schritt der Synthese von OXO63.....	32
Abbildung 32: 4. Schritt der Synthese von OXO63.....	32
Abbildung 33: 5. Schritt der Synthese von OXO63.....	33
Abbildung 34: allgemeine Struktur der Tris-(2,3,5,6-tetrachlorphenyl)methyl-Radikale	34
Abbildung 35: chemische Struktur polychlorierter TAM-Radikale.....	34
Abbildung 36: Darstellung von Tris-(2,3,5,6-tetrachlor-4-hydroxycarbonylphenyl)methan (34).....	35
Abbildung 37: Darstellung von Tris-(2,3,5,6-tetrachlor-4-chlorsulfonylphenyl)methan (37).....	36
Abbildung 38: hypothetische radikalische Chlorierung von 1,2,4,5 Tetrachlorbenzol (1) ^[61,62]	37
Abbildung 39: Bildung des Tris-(2,3,5,6-tetrachlor-4-hydroxysulfonylphenyl)methyl-Radikals (32).....	38
Abbildung 40: Friedel-Crafts-Acylierung von Triphenylmethan (40)	39
Abbildung 41: Darstellung des Trisulfonsäurechlorids 43	40
Abbildung 42: IR-Spektrum von 43	40
Abbildung 43: chemische Struktur von HES, deren OH-Gruppen in Position 2 teilweise hydroxyethyliert sind	41
Abbildung 44: teilweise Zuordnung der ¹ H-NMR-Signale der HES.....	42
Abbildung 45: Hydroxyethylstärke mit verschiedenen Fettsäuren.....	43
Abbildung 46: chemische Struktur der HES verknüpft mit PEGM.....	43
Abbildung 47: Darstellung der tosylierten HES (tHES, 44)	44
Abbildung 48: Ausschnitt des ¹ H-NMR Spektrums der tHES.....	45
Abbildung 49: Darstellung des Tosylimidazols (45) nach Byun et. al. ^[80]	45
Abbildung 50: Darstellung der tosylierten HES (44).....	46
Abbildung 51: Aminierung der aktivierten HES (44)	46
Abbildung 52: Verknüpfung von 40 mit aHES (46).....	47
Abbildung 53: Verknüpfung von 43 mit aHES (46).....	48
Abbildung 54: Verknüpfungsreaktion von Finland-Radikal mit aHES	49
Abbildung 55: ESR-Signal des Verknüpfungsproduktes 13 mit HES (2.5 %) und 13 (0.22 mg/ml).....	49
Abbildung 56: Darstellung des Triphenylmethyl-Radikals (54 , Gomberg-Radikal)	50
Abbildung 57: Energieaufspaltung eines freien Elektrons im Magnetfeld (B ₀).....	51
Abbildung 58: Die Feldmodulation liefert die erste Ableitung (b) des Absorptionssignals (a) einer paramagnetischen Probe und erklärt so die Linienform des ESR-Spektrums. Dabei ist Δ B _{pp} die peak-to-peak Linienbreite, Δ B ₀ die Modulationsamplitude des Magnetfelds und Δ V die daraus resultierende Modulationsamplitude der Mikrowelle. ^[92]	52
Abbildung 59: ESR-Signal von 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPOL, c = 0.25 mmol/l in isotonischem Saccharose-Puffer (pH 7.4); Temperatur: 25 °C gemessen mittels S-Band-ESR Spektrometer) ^[95]	53

Abbildung 60: links ein X-Band ESR-Spektrometer, rechts graphische Darstellung des Aufbaus eines ESR-Spektrometers.....	54
Abbildung 61: chemische Struktur der Radikale 13 und 14	56
Abbildung 62: Veränderung der Linienbreite des ESR-Signals von Radikal 14 in Abhängigkeit der Konzentration	57
Abbildung 63: Konzentrationsabhängigkeit des ESR-Signals von 14	58
Abbildung 64: Abhängigkeit des ESR-Signals (Radikal 14) bei gleichbleibender Konzentration und unterschiedlicher Dämpfung der Mikrowellenleistung	59
Abbildung 65: Abhängigkeit des ESR-Signals (Radikal 14) bei gleichbleibender Konzentration und unterschiedlichen Modulationsamplituden	59
Abbildung 66: Konzentrationsabhängige ESR-Signale von Radikal 32	60
Abbildung 67: Abhängigkeit der Linienbreite des ESR-Spektrums von 14 vom pH-Wert und der Zeit (6 Wochen).....	61
Abbildung 68: Veränderung der Ausgangs-Radikal-Lösung (B) nach Sauerstoff- (A) bzw. Argonzusatz (C)	62
Abbildung 69: UV-VIS Spektrum aus Liu et al. ^[105] von 10 µM AMT-02 in PBS mit 5 % DMSO, inkubiert mit Schweineleberesterase (50 U/mL) über einen Zeitraum von 60 Minuten, CT-03 = Radikal 13	62
Abbildung 70: 24 h-Bestrahlung von 14 (49.2 µM in PBS pH 7.4) unter Argonatmosphäre mit UV 254 nm	63
Abbildung 71: 24 h-Bestrahlung von 14 (49.2 µM in PBS pH 7.4) unter Sauerstoffatmosphäre mit UV 254 nm	63
Abbildung 72: Linienbreite des Radikals 14 unter Argonatmosphäre und 24 h UV 254 nm Bestrahlung	64
Abbildung 73: Bestrahlung von 14 (40 µM in MeOH) unter Sauerstoffatmosphäre mit UV-A-Licht bis zu einer maximalen Energiemenge von 16.08 J/cm ²	65
Abbildung 74: Vergleich der UV-VIS-Spektren in MeOH von d52 und dem Natrium-Salz von 14	65
Abbildung 75: Abhängigkeit der Linienbreite der ESR-Spektren von 14 in unterschiedlichen Lösungsmitteln und verschiedenen Zeitpunkten der Lagerung	68
Abbildung 76: Abhängigkeit der ESR-Linienbreite von 14 in unterschiedlichen Glycerol-Wassermischungen	69
Abbildung 77: Abhängigkeit der ESR-Linienbreite der Radikale 13 und 14 in unterschiedlichen Glycerol-Wassergemischen (maximaler Sauerstoffanteil 2 %).....	70
Abbildung 78: Sauerstoffbindungskurve nach Mutschler ^[107]	71
Abbildung 79: Abhängigkeit der Linienbreite von der Sauerstoffkonzentration aus Dhimitruka et al. ^[14] (betrachtet wurde Radikal 13 (1.6 mM in Phosphatpuffer 0.1 M, pH 7.4) im X Band mit 1.2 GHz)	74
Abbildung 80: Abhängigkeit der Linienbreite der Radikale 13 , 14 und 32 von der Sauerstoffkonzentration	75

Abbildung 81: Langzeit-Sauerstoffbestimmung über 1.5 h.....	76
Abbildung 82: Langzeit-Sauerstoff-Messung über 6 h	76
Abbildung 83: Reduktive Spaltung des gelben Farbstoffes MTT in blaues Formazan; Darstellung aus ^[117]	77
Abbildung 84: Viabilität in % mit Serum (A) und ohne Serum (B) Zusatz.....	78
Abbildung 85: Zyklovoltammetrische Kurve für eine reversible kathodische Reduktion des Edukts mit anschließender anodischer Oxidation des Produkts ^[119]	79
Abbildung 86: Inkubation verschiedener Radikale mit Xenopus laevis Zellextrakt (1:3) – zeitabhängige ESR-Messung verschiedener Radikale	81
Abbildung 87: ESR-Signal und chemische Struktur des Nitroxid-Radikals (1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-3-methyl)-methanthiosulfonat (Mtsl)	82
Abbildung 88: ESR Signal von Radikal 14	83
Abbildung 89: ESR-Imaging einer Kapillare mit der TAM-Lösung (14 , 1 mM).....	83
Abbildung 90: Abnahme der Signalintensität bei Erhöhung des angelegten Gradienten	84
Abbildung 91: Probenhalter für ein einfaches ESR-Imaging-Experiment.....	85
Abbildung 92: ESR-Imaging Aufnahme des Probenhalters mit 60 Winkeln für 14 (unten) und Mtsl (oben) mit unterschiedlichen Messzeiten, Rekonstruktion mit einem iterativen Verfahren nach 50 Schritten	85
Abbildung 93: Verhältnis der Signalform vom Ortsanteil	86
Abbildung 94: Zeitlicher Verlauf an der Position z = -3.0 mm der Abbildung 92.....	86
Abbildung 95: Kapillare und Monolith nach dem Experiment	86

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Tertiäre (5) und primäre (6) Thiole als Ausgangsmaterialien für die Synthese der Sulfide 2 und 4 sowie des Bis(thioketals) 3a	6
Tabelle 2: Fließmittelzusammensetzungen für die DC-Trennung von Radikal 13	20
Tabelle 3: Reaktionsbedingungen der Synthese von 16 bzw. 19	26
Tabelle 4: Bestimmung des Verteilungskoeffizienten von Radikal 13 und 14 mit der Methode aus Kapitel 6.4c.....	66
Tabelle 5: typische Viskositätswerte aus der Literatur	70
Tabelle 6: Ergebnisse des Thrombozyten-Testes	78
Tabelle 7: umgerechnete Standardpotentiale (NHE) verschiedener Spinsonden	80
Tabelle 8: Zusammenfassende Darstellung der synthetisierten Substanzen	91

KURZFASSUNG

Die ESR-Spektroskopie ist ein Hoffnungsträger zur nichtinvasiven *in vitro* und *in vivo* Bestimmung wichtiger lokaler Eigenschaften (z.B. Sauerstoffgehalt, pH-Wert) in Geweben und Arzneistoffträgersystemen. Sie verfügt im Vergleich zur NMR-Spektroskopie über eine höhere Empfindlichkeit. Dadurch können Spektren gemessen werden, die im Vergleich zur optischen Spektroskopie und Schwingungsspektroskopie einen höheren Informationsgehalt aufweisen. Aufgrund fehlender Spinsonden ist der Anwendungsbereich der ESR-Spektroskopie noch vergleichsweise gering und als Methode wenig verbreitet. Für *in vivo* Messungen wird bevorzugt das ESR-Imaging-Verfahren angewendet. Hierfür sind Spinsonden erforderlich, die ein sehr schmales und scharfes Signal im ESR-Spektrum erzeugen, um daraus das Bild zu erzeugen. In dieser Anwendung ist die NMR-Spektroskopie durch den Einsatz der MRT-Technik deutlich weiter entwickelt. Die ESR-Technik stößt in diesem Bereich an ihre Grenzen, denn es muss der Spagat zwischen der Feldstärke des Magnetfeldes, der Eindringtiefe in das Gewebe und der Auflösung für die Bildgebung (Imaging) gemacht werden. Die bisherigen ESR-Anwendungen beziehen sich auf die direkte Messung von z.B. Sauerstoffsuperoxid-Konzentrationen bzw. freien Radikalen im Organismus. Seit einigen Jahren wird an der direkten Bestimmung von Sauerstoffkonzentrationen und/oder pH-Werten in biologischen Systemen geforscht. Grundlage hierfür sind spezielle stabile, langlebige organische Radikale.

Gegenstand dieser Arbeit ist der Entwurf und die Synthese von Triarylmethyl (TAM)-Radikalen, die insbesondere für pharmazeutische und medizinische Einsatzmöglichkeiten – *in vitro*-Analytik und *in vivo*-Diagnostik – ausgerichtet sind. Es erfolgte eine Optimierung der Patent-geschützten Synthesen und die Verknüpfung von Tris-(8-carboxyl-2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol)methyl-Radikal (**13**) mit Hydroxyethylstärke. Es wurden umfangreiche Untersuchungen zur Löslichkeit, Stabilität, Redoxverhalten und Toxizität der verschiedenen TAM-Derivate (**13**, **14** und **32**) durchgeführt. Der Verteilungskoeffizient wurde mit Hilfe der ESR-Spektroskopie bestimmt und die Abhängigkeit der Linienbreite von der Viskosität, dem pH-Wert und dem Sauerstoffgehalt untersucht. Die Forschungsergebnisse zeigen eine deutliche Abhängigkeit der Linienbreite vom Sauerstoffgehalt der Umgebung und stützen die Eignung als sauerstoffempfindliche Spinsonde. Im Anschluss daran wurde die Eignung von Tris-(8-carboxyl-2,2,6,6-tetra(²H₃-methyl)benzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol)methyl-Radikal (**14**) für ESR-Imaging-Experimente untersucht. Das Radikal **14** weist in dem ESR-Imaging-Experiment einen deutlichen Vorteil gegenüber den bis dato eingesetzten Nitroxid-Radikalen auf. Bei gleicher Bildqualität wird eine viel kürzere Messzeit benötigt. Die synthetisierten Radikale weisen nur eine geringe Toxizität auf und zeigen keinen Einfluss auf das Aggregationsverhalten von Thrombozyten.

ABSTRACT

The EPR-spectroscopy is a major hope for a non-invasive in vivo determination of essential local properties (such as oxygen concentration, pH value) in tissue and pharmaceutical excipient systems. Compared to NMR-spectroscopy, EPR disposes of a higher sensitivity. Thus, spectra contain a higher content of information in comparison to optical spectroscopy and oscillation spectroscopy. Due to the lack of spin-probes the range of application of EPR-spectroscopy is still narrow and this method has spread insufficiently. For in vivo measurements the ESR-Imaging procedure is applied preferentially.

Therefore, spin-probes which generate a very narrow and sharp signal in the EPR-spectrum are necessary to generate an evaluable picture. NMR-spectroscopy was successfully developed for the magnetic resonance imaging application resulting in the MRT-technology. Up to date, the utilization of ESR-technology is limited due to the challenging balancing acts between the field strength of the magnetic field, the penetration depth into the tissue and the resolution for the EPR-Imaging. The present applications of EPR refer to the direct measurement of e.g. oxygen superoxide concentrations or free radicals in the organism. For some years, the direct determination of oxygen concentrations and/or pH values in biological systems is being investigated. The most important foundation for these applications of EPR are specific stable and persistent organic radicals.

Subject of this work is the design and the synthesis of triarylmethyl (TAM) radicals which are aimed in particular for pharmaceutical and medical applications – in vitro analysis and in vivo diagnosis. The patented syntheses of TAMs were improved and subsequently, tris-(8-carboxyl-2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol)methyl radical (**13**) was covalently attached to hydroxyethyl starch. Extensive investigations were carried out on solubility, stability, redox-behavior and toxicity of the different TAM derivatives (**13**, **14** and **32**). The distribution coefficient was determined via ESR-spectroscopy and the dependence of the line width on the viscosity, the pH value and the oxygen content was investigated. The results show an evident dependence of the line width on the oxygen content of the surroundings and support the suitability of TAMs as oxygen-sensitive spin-probes. Subsequently, the suitability of tris-(8-carboxyl-2,2,6,6-tetra(²H₃methyl)benzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol)methyl radical (**14**) for ESR-Imaging experiments was investigated. The radical **14** shows an evident advantage compared to nitroxide radicals, which are used to date in ESR-Imaging experiments. The measuring time could be decreased significantly without losing image quality. The synthesized radicals show low toxicity and no influence on platelet aggregation.

1 ELEKTRONENSPINRESONANZ - EINE NEUE DIAGNOSTISCHE METHODE

Magnetische Resonanzmethoden sind in der naturwissenschaftlichen und medizinischen Analytik und Diagnostik unverzichtbar. Die bekannteste Methode ist die Kernspin-Resonanz-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie). In der Medizin wird sie für bildgebende Diagnostik (Darstellung von Struktur und Funktion von Geweben und Organen) herangezogen.

Im Schatten der NMR-Spektroskopie existiert seit über 50 Jahren eine weitere Methode, die sich ebenfalls eine magnetische Resonanz zu Nutze macht, die Elektronenspinresonanz (ESR).^[1] Die ESR-Spektroskopie beruht auf der Aufspaltung der Energieniveaus des Elektronenspins in einem äußeren Magnetfeld. Ein wesentlicher Unterschied zwischen der ESR- und NMR-Spektroskopie sind die unterschiedlichen magnetischen Momente, bedingt durch die unterschiedlichen Massen von Kern und Elektron. Aus dem größeren Besetzungsunterschied der Energieniveaus ergibt sich daraus eine höhere Empfindlichkeit der ESR-Spektroskopie. Freie Radikale lassen sich mit der ESR-Spektroskopie noch im nanomolaren Bereich detektieren.^[2] Das macht sie zu einer hervorragend geeigneten Methode zur Untersuchung von Proben, die über ein permanentes magnetisches Moment aufgrund ungepaarter Elektronen verfügen. Dazu gehören Radikale, Übergangsmetallkomplexe, Metalloproteine und reaktive Sauerstoffspezies. In der Regel besitzen stabile Moleküle nur gepaarte Elektronen. Diese Moleküle sind diamagnetisch und können deshalb nicht ESR-spektroskopisch untersucht werden.

Neuere Entwicklungen gestatten die zerstörungsfreie Aufnahme mehrdimensionaler spektral, zeitlich oder räumlich aufgelöster ESR-Spektren. Somit ist die Grundlage geschaffen, mittels ESR-Spektroskopie nichtinvasiv im lebenden biologischen System an einem bestimmten Ort die Kinetik von Prozessen direkt zu verfolgen.

Zum heutigen Zeitpunkt ist die ESR-Spektroskopie im Unterschied zur NMR-Spektroskopie aber noch nicht weit genug entwickelt, um eine pharmazeutisch und medizinisch breit einsetzbare Methode zu sein. Das Fehlen geeigneter paramagnetischer Spinsonden (Spinsonden sind Radikale, die als Diagnostika und Modellarzneistoffe dienen können^[2]) und die fehlende Verfügbarkeit systematischer Studien ihrer Einsatzmöglichkeiten verhindern die breite Anwendung der ESR-Spektroskopie.

Ein konkretes pharmazeutisches Ziel ist die Erhöhung der Anwendungsbreite der ESR-Spektroskopie zur nichtinvasiven *in vitro* und *in vivo* Bestimmung wichtiger lokaler Eigenschaften (z.B. Sauerstoffgehalt, pH-Wert) in Geweben und Arzneistoffträgersystemen, die mit bisherigen klassischen Methoden nicht oder schlechter zugänglich sind.^[3] Voraussetzung hierfür ist die Bereitstellung von Spinsonden mit speziell auf bestimmte Einsatzgebiete abgestimmten physikochemischen Eigenschaften.

Die vorliegende Arbeit erforscht den Entwurf und die Synthese von Triarylmethyl (TAM)-Spinsonden, die insbesondere für pharmazeutische und medizinische Einsatzmöglichkeiten – *in vitro*-Analytik und *in vivo*-Diagnostik – ausgerichtet sind.

1.1 ZIELSETZUNG

Bei einem Großteil der anorganischen bzw. organischen Radikale handelt es sich um sehr reaktive Verbindungen, die sehr kurzlebig sind.^[4] Die hohe Reaktivität dieser Moleküle resultiert aus dem Bestreben ihre fehlenden Valenzen durch Dimerisierung, H-Abstraktion oder Disproportionierungsreaktionen auszugleichen. Im Gegensatz dazu gibt es eine Minderheit an Radikalen, bei denen die genannten Reaktionen aufgrund von sterischer Hinderung, Mesomerieeffekten oder elektronischer Stabilisierung nicht oder nur eingeschränkt stattfinden. Solche Radikale lassen sich aufgrund der Stabilisierung des freien Elektrons mühelos mit der ESR-Spektroskopie untersuchen.^[5] Stabile organische Radikale lassen sich in verschiedene Strukturtypen (Abbildung 1) unterteilen, wie z.B. Phenoxy-(Galvonoxyl-Radikal), Hydrazyl- (DPPH) und Nitroxid-Radikale (Fremy's Salz und TEMPO).

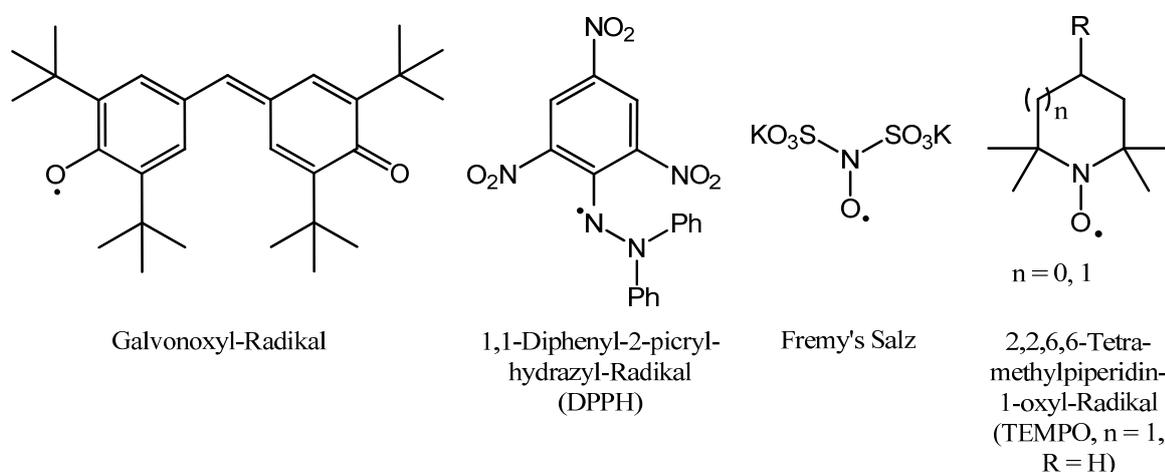


Abbildung 1: chemische Struktur persistierender, stabiler organischer Radikale

Darüber hinaus gibt es noch eine Reihe an π -Radikalen, die auf aromatischen Kohlenwasserstoffen basieren. Ein wichtiger Vertreter dieser Substanzklasse ist das Triarylmethyl-Radikal (Gomberg-Radikal, Abbildung 2), welches als Leitstruktur der hier vorliegenden Arbeit dient. Bereits vor über 100 Jahren gelang es dem Chemiker Moses Gomberg ein stabiles Radikal herzustellen und zu isolieren.^[6] Detaillierte Ausführungen hierzu werden im Kapitel 4 gemacht.

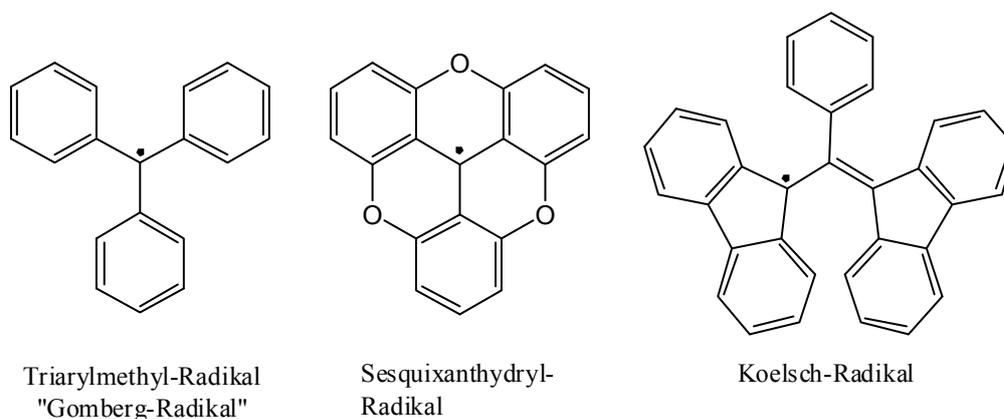


Abbildung 2: chemische Struktur persistierender, stabiler π -Radikale

Der Entwurf und die Synthese stabiler Radikale, welche gut auswertbare ESR-Spektren liefern, sind jedoch aufwändig und erfordern spezielles Know-how. Die Entwicklung von neuen stabilen organischen Radikalen im Hinblick auf ihre technisch relevanten Eigenschaften hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Von solchen Spinsonden wird speziell für Imaging-Anwendungen verlangt, dass sie nur eine sehr schmale, un-aufgespaltene Linie im ESR-Spektrum zeigen. Strukturell setzt dies enge Grenzen hinsichtlich der Symmetrie der Moleküle und der Atomtypen, über die das ungepaarte Elektron delokalisiert sein darf.

Durch neue diagnostische Bildgebungssysteme (ESR-Imaging) und speziell dafür entwickelte Spinsonden eröffnen sich völlig neue Möglichkeiten zur Prognose, Diagnose, Information und Therapie von Erkrankungen.

Ende des 20. Jahrhunderts entwickelte die Firma Nycomed Innovation AS^[7-11] (heute: GE Healthcare) das bis dahin bekannte und einfach zugängliche Gomberg-Radikal weiter, verbesserte die Stabilität, erhöhte die Wasserlöslichkeit und beseitigte die Hyperfeinaufspaltung durch Substitution der aromatischen Protonen.^[12] Die Synthese von TAM-Radikalen (Abbildung 3) war bis vor einigen Jahren nur aus den Patenten von Nycomed Innovation AS zu entnehmen. Reddy et al.^[13] und in den darauffolgenden Jahren auch Dhimitruka et al.^[14] unternahmen erste Versuche, die in Patenten beschriebenen Synthesen nachzuarbeiten, abzuwandeln und damit allgemeinen Zugang zu solchen Radikalen zu schaffen.

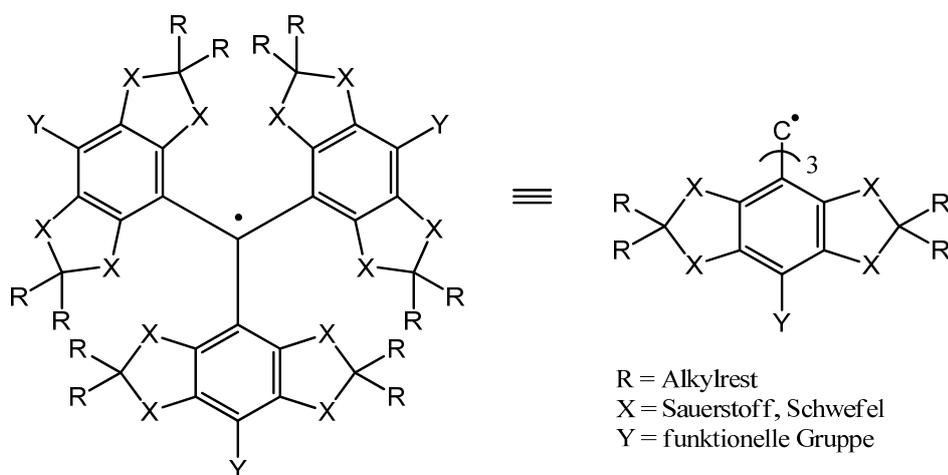


Abbildung 3: allgemeine Grundstruktur der Triarylmethyl (TAM)-Radikale

Das Ziel dieser Arbeit war die Optimierung der Synthesen der TAM-Radikale, insbesondere des Tris-(8-carboxyl-2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]-dithiol)methyl-Radikals (Finland-Radikal, **13**) in Bezug auf Reaktionsschritte, Ausbeuten und Substanzmengen, wie sie für eine Anwendung in lebenden Organismen notwendig sind. Mit Hilfe von neuen funktionellen Gruppen bzw. der gezielten strukturellen Abwandlung sollten die physikochemischen Eigenschaften verbessert werden. Für zukünftige ESR-Imaging-Experimente sollten mögliche Radikale an Polymere (wie z.B. Hydroxyethylstärke) geknüpft und deren Verwendung als neue funktionelle Spinsonden für in vitro und in vivo Anwendungen angepasst werden. Insgesamt soll dadurch die ESR-Spektroskopie als pharmazeutische und medizinische Analysemethode vorangetrieben und etabliert werden.

2 THIOLE UND ZWEIWERTIGER SCHWEFEL

Schwefelverbindungen sind weit verbreitet und erfüllen zentrale Funktionen in Organismen. Von den im Merck Index 2012 gelisteten Wirkstoffen (Arzneistoffe, Pflanzenschutzmittel, physiologische Substanzen) weisen 13 % ein bis mehrere Schwefelatome auf - davon liegt bei 40 % der Schwefel in einer sulfidischen Bindung vor und sogar 4 % als Thiol. In fast allen Fällen erfordert der synthetische Zugang zu den Wirkstoffen den Einsatz geruchsintensiver (zweiwertiger) Schwefelverbindungen. Die Schwefelatome müssen den Synthesen oft in frühen Phasen zugeführt werden. Hierbei werden durchaus große Mengen dieser Stoffe umgesetzt. Die Geruchsintensität hat dazu geführt, dass im Forschungsbereich vieler Labore diese Verbindungen nicht oder nur in kleinen Mengen zugänglich sind. Auch der kommerzielle Zugang ist eingeschränkt. Es gibt sehr wenige spezialisierte Synthesefirmen, die beispielsweise mit niedermolekularen Thiolen arbeiten.

Typische Thiole zur Einführung von Schwefel durch nukleophile Substitution sind Ethylthiol, *n*- und *i*-Propylthiol und *tert*-Butylthiol. Sie sind kurzketzig, leicht flüchtig und weisen einen ausgeprägten und sehr unangenehmen Geruch auf. Aus diesem Grund werden Thiole auch dem Erdgas zur Leckerkennung zugesetzt. Daher wird Thiolgeruch typischerweise als Gasaustritt interpretiert. Zudem ist die Geruchsschwelle dieser Thiole außerordentlich niedrig. Ein typisches Gemisch in der Regel aus drei der genannten Thiole wird dem Erdgas in der geringen Menge von 3.8 mg/m^3 zugesetzt. Diese Konzentration ergibt sich aus der Vorgabe, dass ihr Geruch deutlich wahrgenommen werden muss, wenn die Gaskonzentration in der Luft das 0.2-fache der unteren Zündgrenze erreicht.^[15] Diese Konzentration muss im Umgang mit solchen Thiolen demzufolge deutlich unterschritten werden, um nicht auffallend wahrgenommen und irrtümlich als Gasaustritt gedeutet zu werden.

2.1 HERAUSFORDERUNGEN IM UMGANG MIT MOLAREN MENGEN AN THIOL

Die allgemeine Struktur des Tetrathiatriarylmethyl-Radikals (Abbildung 3, X = Schwefel), eines der Zielradikale dieser Arbeit, weist am aromatischen Grundkörper jeweils zwei 1,3-Dithiolan Ringe auf. Die Einführung eines sulfidischen Schwefels im TAM ist für ein schmales unaufgespaltenes ESR-Signal unumgänglich und erhöht die Radikalstabilität. Detaillierte Erläuterungen dazu befinden sich in Kapitel 4.

In der Literatur wird die Einführung der Schwefelatome mit Hilfe von *i*-Propylthiol oder 2-Methyl-2-propanthiol (*tert*-Butylthiol) beschrieben. Diese Substanzen sind im hohen Maße geruchsbelästigend. Für die Durchführung der Synthesen im Labor ist eine hermetische Abriegelung des Reaktionsgeschehens von der Umgebungsluft unumgänglich, welche mit einer konventionellen Laborausstattung nicht zu erreichen ist. Das Ausgangsmaterial 1,2,4,5-Tetra-*tert*-butylthiobenzol (**2a**, Abbildung 4) ist kommerziell nicht zu erhalten. Nach eigenen umfangreichen Recherchen nahm sich nur ein Lohnhersteller der synthetischen Herausforderung von **2a** an. Die dabei hergestellte Menge an Substanz wurde dem Arbeitskreis von Prof. Khramtsov zur Verfügung gestellt. Um kurzfristig mit der Synthese der Radikale beginnen zu

können, überließ Prof. Khrantsov unserem Arbeitskreis eine kleine Teilmenge, die schnell verbraucht war.

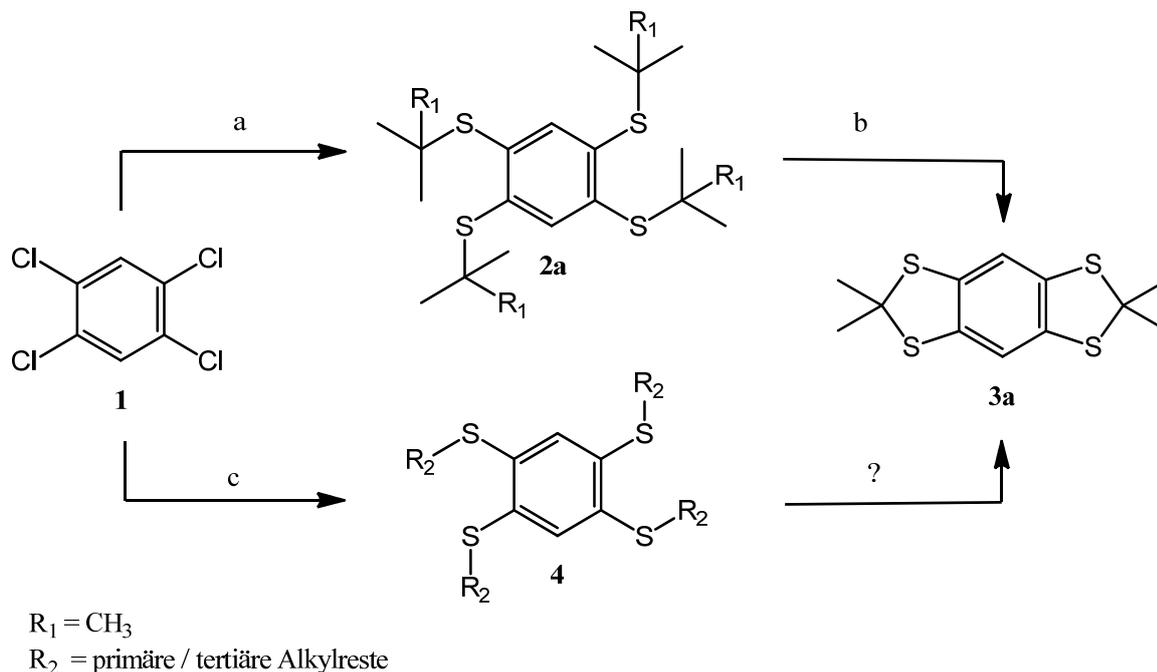


Abbildung 4: klassischer (Reaktionsschritt a, b) und alternativer (Reaktionsschritt c) Syntheseweg zur Darstellung von 2,2,6,6-Tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol (**3a**)

Reagenzien und Bedingungen: (a) Argonatmosphäre, DMF, *tert*-Butylthiol, NaH 60 % (w/w) in Mineralöl 0 °C → 2 h Rückfluss; (b) HBF₄ 54 % in Et₂O, Aceton, Toluol; (c) Argonatmosphäre, DMF, primäre bzw. tertiäre Thiole, NaH 60 % (w/w) in Mineralöl 0 °C → 2 h Rückfluss

Der Grundbaustein **2a** stellt das Ausgangsmaterial für alle synthetisierten schwefelhaltigen Radikale dar und wird demnach in molaren Mengen benötigt. Seine Synthese stellt große Herausforderungen an Mensch und Technik, da mit molaren Mengen an *tert*-Butylthiol gearbeitet werden muss. Um Geruchsbelästigung und somit irrtümlich folgende Gasalarne zu vermeiden und dennoch molare Mengen der Thiole umsetzen zu können, bestand die Notwendigkeit nach alternativen Ausgangsverbindungen (**4**) (Abbildung 4, Reaktionsschritt c) zu suchen oder ein geeignetes technisches Verfahren zur Abluftreinigung für den Umgang mit molaren Mengen an Thiolen - im speziellen *tert*-Butylthiol - zu finden. Folgende Maßnahmen wurden dazu untersucht:^[16]

2.2 VERWENDUNG WENIGER GERUCHSINTENSIVER THIOLE

Eine technische Herausforderung bei der Herstellung schwefelhaltiger TAM-Radikale ist die initiale Einführung des sulfidischen Schwefels. Das in der Patentvorschrift^[7] verwendete *i*-Propylthiol, mit seinem äußerst intensiven Geruch, erinnert sofort an austretendes Erdgas. Dhimitruka et al.^[14] verwenden für die Herstellung von **2a** in ihrer Synthese *tert*-Butylthiol in molaren Mengen, welches ebenfalls sehr geruchsintensiv ist. Aus diesem Grund wurde nach alternativen Thiolen (R-SH) gesucht, die weniger geruchsintensiv sind und gut als S-Nukleophil reagieren. Eine weitere synthetische Anforderung besteht darin, dass der Alkylrest R im Folgeschritt (siehe dazu Abbildung 5, Reaktionsschritt b) als Carbeniumion abspaltbar sein muss.

2.2.1 TETRATHIOBENZOL-DERIVATE

Für die Darstellung der TAM-Radikale stellt *i*-Propylthiol (**6h**, siehe Tabelle 1) das gängigste Thiol-Edukt dar. Es sollen alternative Thiole gefunden werden, die bei der Synthese von 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol (**1**) mit einem primären (**6a-f**) bzw. tertiären (**5a-f**) Thiol unter der Geruchsschwelle des Erdgases liegen und zum jeweiligen 1,2,4,5-Benzotetrathioether-Derivat (**2**, **4**) führen. Die Abbildung 5 und Tabelle 1 beschreiben den zweistufigen Syntheseplan für die Herstellung des Monomers **3a**.

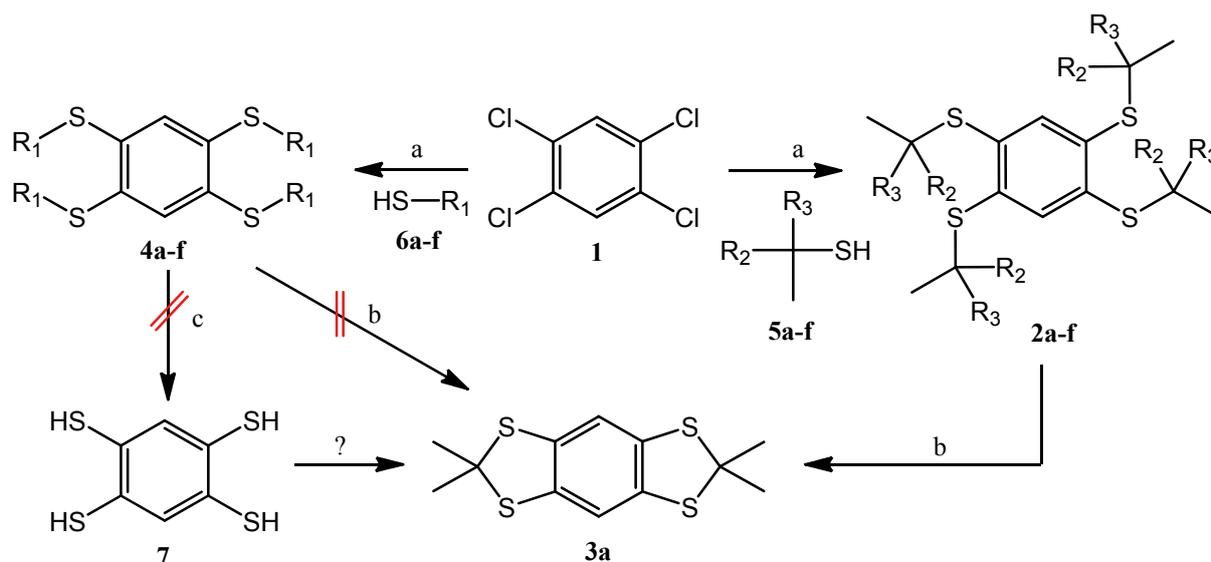


Abbildung 5: Syntheseplan für 2,2,6,6-Tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol (**3a**)

Reagenzien und Bedingungen: (a) Argonatmosphäre, DMF, Thiol (**5**, **6**), NaH 60 % (w/w) in Mineralöl, 0 °C → 2-12 h Rückfluss; (b) HBF₄ 54 % in Et₂O, Aceton, Toluol; (c) Na/NH₃

Tabelle 1: Tertiäre (**5**) und primäre (**6**) Thiole als Ausgangsmaterialien für die Synthese der Sulfide **2** und **4** sowie des Bis(thioketals) **3a**.

Thiol	R ₁	R ₂	R ₃	Tetrakis(thioalkyl)benzol ^a , Ausbeute	3a ^b , Ausbeute
5a	-	CH ₃	CH ₃	2a , 60 %	70 %
5b	-	CH ₃	C ₉ H ₁₉	2b , - ^e	-
5c	-	CH ₃	C ₆ H ₁₃	2c , - ^e	-
5d ^c	-	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	2d ^f	-
5e ^c	-	CH ₃	C ₃ H ₇	2e ^f	-
5f ^d	-	CH ₃	CH ₂ COOH	2f ^g	-
6a	C ₁₂ H ₂₅	-	-	4a , - ^e	-
6b	C ₈ H ₁₇	-	-	4b , 85 % ^h	- ^e
6c	C ₆ H ₁₃	-	-	4c , 80 % ^h	- ^e
6d	CH ₂ COOH	-	-	4d , - ⁱ	-
6e	CH ₂ C ₆ H ₅	-	-	4e , - ⁱ	-
6f	CH ₂ C ₆ H ₄ OCH ₃	-	-	4f , - ⁱ	-

Thiol	R ₁	R ₂	R ₃	Tetrakis(thioalkyl)benzol ^a , Ausbeute	3a ^b , Ausbeute
6g	CH ₃	-	-	4g ^g	-
6h	CH(CH ₃) ₂	-	-	4h ^g	-

a Methode a; *b* Methode b; *c* Synthese nach Literatur^[17]; *d* Synthese nach Literatur^[18]; *e* nicht identifizierbares Produktgemisch; *f* nicht synthetisiert, Thiol zu geruchsintensiv; *g* nicht synthetisiert, Thiol unlöslich in Toluol; *h* Synthese nach Literatur^[19]; *i* unvollständige Substitution

Im gezeigten Syntheseweg (Abbildung 5) wird zuerst versucht über Methode a die Reaktion von 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol (**1**) mit einem primären Thiol (**6a-f**) zum jeweiligen 1,2,4,5-Benzotetrathioether (**4**) umzusetzen^[14,20] bzw. im folgenden Reaktionsschritt b oder c 2,2,6,6-Tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol (**3a**) herzustellen. Verbindung **3a** ist der monomere Baustein der Tetrathiatriarylmethyl-Derivate, welcher in Folge zum TAM-Grundgerüst trimerisiert wird.

Um das Monomer **3a** in ausreichender Menge herzustellen werden molare Mengen von 1,2,4,5-Tetrathioalkylsubstituierten Benzol-Derivaten (**2**, **4**) benötigt. Für die Synthese der verschiedenen Tetrathiobenzolderivate werden häufig die 1,2,4,5-Tetraalkylthiobenzole **4g**, **4h** und **2a** mit Methyl-, *i*-Propyl- bzw. *tert*-Butylresten am Schwefel hergestellt.^[21-29] Da Methyl-, *i*-Propyl- und *tert*-Butylthiol bereits im nanomolaren Bereich sehr geruchsintensiv sind, wurden diese Thiole vorerst aus dem Synthesepfad ausgeschlossen. Kommerziell erhältliche primäre Alkylthiole wurden olfaktorisch auf ihre Geruchsintensität und Flüchtigkeit geprüft. Für die Synthesen kamen danach nur *n*-Dodecan- (**6a**), *n*-Octan- (**6b**) und *n*-Hexanthiol (**6c**) in Frage. Mittels Reaktionsschritt a in Abbildung 5 sollten diese Thiole an 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol (**1**) substituiert werden.

Entgegen der in der Literatur^[19] beschriebenen Weise konnte das Reaktionsprodukt (**4a**) nicht aus dem Ansatz mit *n*-Dodecanthiol (**6a**) isoliert werden. Es entstand eine ölige aus dem Reaktionsansatz nicht abtrennbare Substanz. Aufgrund der Kettenlänge des Thiols war eine Aufarbeitung nach der herkömmlichen Methode - den Reaktionsansatz auf Eis gießen und den Niederschlag abfiltrieren - nicht erfolgreich. Es kam stattdessen zur Emulsionsbildung. Mittels Zentrifugation wurde eine Phasentrennung erreicht. Es war trotzdem nicht möglich das gewonnene Produkt zu reinigen bzw. zu identifizieren. Mögliche Ursachen können ein Überschuss des eingesetzten Thiols sein, welches sich nicht aus dem Reaktionsgemisch abtrennen ließ oder eine unvollständige Substitution an **1**. Die massenspektrometrische Untersuchung konnte nicht eindeutig zeigen, ob eine ein-, zwei-, drei- oder vierfache Substitution erfolgte.

Isolierbare Produkte (**4b**, **4c**) entstanden nur mit den mittelkettigen Thiolen wie *n*-Octan- (**6b**) und *n*-Hexanthiol (**6c**) durch Ausfällen des Produktes mit Eiswasser und seine anschließende Abfiltration und Trocknung. Die erhaltenen Tetrathiobenzol-Derivate **4b** und **4c** sollten anschließend zu dem gewünschten Monomer **3a** umgesetzt werden. Dabei war zu beachten, dass die Ablösung eines primären Carbeniumions wesentlich schwieriger als die Ablösung eines *i*-Propyl- oder *tert*-Butylcarbeniumions ist. In Abbildung 6 wird gezeigt, dass bei Methode b die Alkylkette durch S_EAr-Reaktion auf ein Toluol-Molekül übertragen wer-

den soll (s.a. Abbildung 5) - dafür muss das Carbokation ausreichend stabil sein, damit es intermediär entsteht.

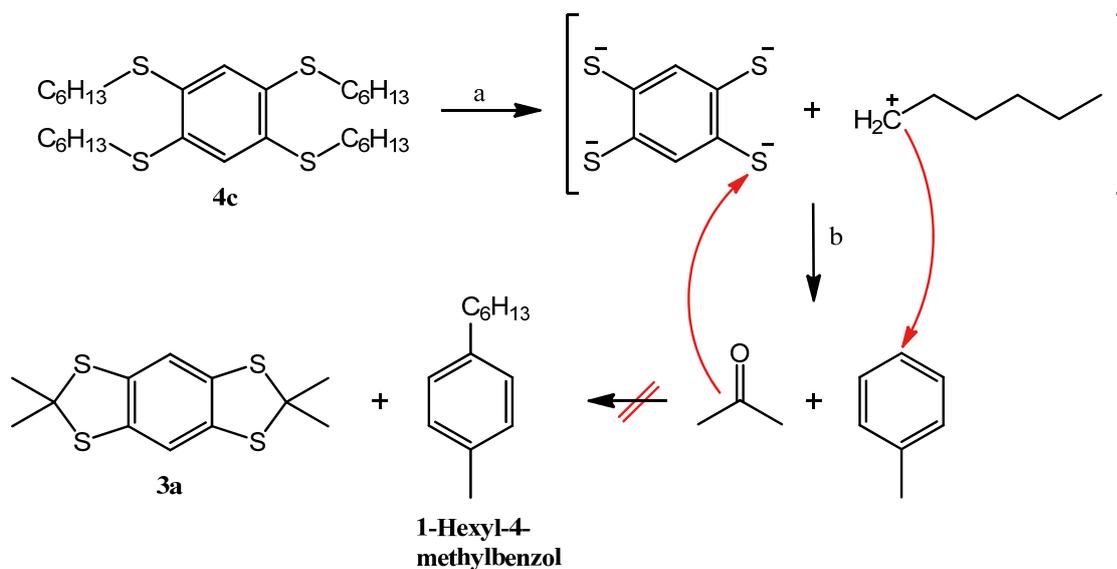


Abbildung 6: Syntheschema von **3a**

Reagenzien und Bedingungen: (a) Toluol, HBF₄ 54 % in Et₂O (b) Aceton

Auf dem herkömmlichen Syntheseweg^[14] war die Umsetzung von **4b** und **4c** zum Monomer **3a** nicht erfolgreich (Abbildung 6). Die erfolglose Umsetzung lag vermutlich an der Nichtentstehung des sehr instabilen primären Carbokations. Der Versuch, die Kohlenstoffkette weiter zu verkürzen, um eventuell ein leichter übertragbares primäres Carbokation zu erhalten, konnte wegen der Flüchtigkeit der entsprechenden Thiole und ihrem unangenehmen Geruch nicht realisiert werden. Deshalb wurde bei der Verwendung der primären Thiole **6b** und **6c** alternativ die Synthese des Monomers **3a** über 1,2,4,5-Benzotetrathiol (**7**) durch Reduktion der Alkylsulfide (**4b**, **4c**) mit Natrium in flüssigem Ammoniak versucht (Abbildung 5, Methode c).^[30] Die durch diese Methode gewonnen Produkte waren wiederum nicht abtrennbar, da sich das Tetranatrium-1,2,4,5-Benzotetrathiolat bei der Aufarbeitung durch Säurezusatz nicht zu **7** umsetzte, sondern vermutlich rasch polymerisierte. Die massenspektrometrische Untersuchung zeigte kein Produkt **7**.

Der Einsatz von Benzylthiol (**6e**), para-Methoxybenzylthiol (**6f**) und Thioglycolsäure (**6d**) bot weitere Möglichkeit mit primären Thiolen zu arbeiten. Obwohl in der Literatur eine sechsfach Substitution von Hexachlorbenzol mit Benzylthiol beschrieben ist,^[31] gelang die Vierfachsubstitution zu **4e** auf diese Weise nicht. Eine Alternative wurde mit dem Einsatz von para-Methoxybenzylthiol (**6f**) versucht. Auch hier konnte kein vierfach substituiertes Produkt **4f** isoliert werden. Ein weiterer Versuch wurde mittels Thioglycolsäure (**6d**) durchgeführt. Eine Isolierung des Produktes war aufgrund der erhöhten Wasserlöslichkeit der Carbonsäurefunktion im Gegensatz zu den bis dahin durchgeführten Synthesen mit derselben Methode nicht möglich. Mit den Thiolen **6d-f** konnten nur unvollständig substituierte Derivate **4** erhalten werden. Die mäßigen Synthesergebnisse mit primären Thiolen machten den Einsatz von tertiären Thiolen unumgänglich (Abbildung 5, Methode a, b). Sekundäre Thiole wurden nicht verwendet, da sie genauso geruchsintensiv sind wie die primären Thiole und keine nennens-

werten Vorteile gegenüber den tertiären Thiolen aufweisen. Kommerziell sind *tert*-Dodecylthiol (**5b**) und *tert*-Nonylthiol (**5c**) erhältlich. Bei der Umsetzung von **5b** und **5c** zu **2b**, **2c** traten ähnliche Probleme auf wie bei der Umsetzung mit **6a**. Es entstanden erneut ölige, aus dem Reaktionsansatz nicht abtrennbare Substanzen.

Aufgrund dieser Erkenntnisse blieben alternativ nur noch mittelkettige tertiäre Alkylthiole übrig. Diese sind kommerziell nicht erhältlich und mussten synthetisiert werden. Für die Thiole **5d**, **5e** diente eine Synthesevorschrift von Lee et al.^[32] als Anregung. Hierbei wurden die entsprechenden Alkohole mit Thioharnstoff, Eisessig und Bromwasserstoff (48 %) vermischt und 30 Minuten lang unter Rückfluss erhitzt, anschließend auf eiskalte 15 %ige NaOH-Lösung gegossen und über Nacht gerührt (Abbildung 7). Da sich schnell herausstellte, dass diese Thiole und Thiolate sehr starken, unangenehmen Geruch aufwiesen, stellten sie gegenüber *tert*-Butylthiol keinen Vorteil dar. Die Reaktionsansätze wurden abgebrochen und auf eine weitere Umsetzung verzichtet.

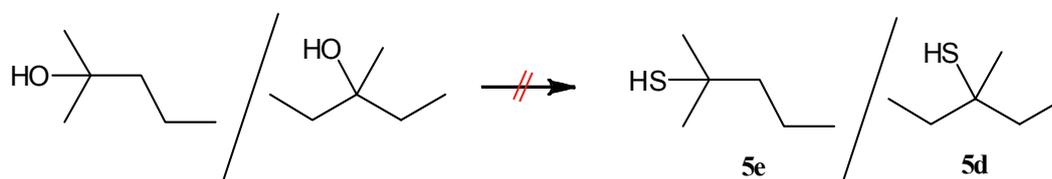


Abbildung 7: Synthese von tertiären Thiolen aus dem entsprechenden Alkohol
Reagenzien: Thioharnstoff, Eisessig, HBr (48 %) und NaOH (15 %)

Die nach Süß^[32] aus 3-Benzylthio-3-methylbutansäure hergestellte 3-Methyl-3-thio-butansäure **5f** war schließlich aufgrund der Carbonsäuregruppe nicht ausreichend in Toluol löslich; somit konnte auch dieses Thiol für die weitere Umsetzung nicht verwendet werden.

Zusammenfassung:

In Tabelle 1 (s.o.) sind alle untersuchten Thiole sowie deren Synthesergebnisse aufgeführt. Thiole mit einer Alkylkette mit weniger als sechs C-Atomen sind sehr leicht flüchtig, verursachen dadurch weitreichende Geruchsbelästigung und wurden, nicht verwendet. Die wichtigste Erkenntnis aus den Experimenten ist, dass der sulfidische Schwefel an einem tertiären Kohlenstoffatom gebunden sein muss, um im Folgeschritt die Übertragung der Alkylkette mit dem entstehenden tertiären Carbokation auf Toluol zu gewährleisten. Die eingesetzten Thiole stellen hinsichtlich ihres Geruchs keine Verbesserung gegenüber *tert*-Butylthiol (**5a**) dar. Die Synthesen ergaben jedoch keine definierbaren Produkte, oder die Produkte waren für den weiteren Syntheseweg nicht geeignet. Daher musste nach einer anderen Lösung gesucht werden.

2.3 ABLUFTREINIGUNG

In Kapitel 2.2 wurde beschrieben, dass kein geruchsarmes alternatives Thiol gefunden wurde, das zum gewünschten Grundbaustein 2,2,6,6-Tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]-dithiol (**3a**) führt. Daher musste ein technisches Verfahren herangezogen werden, um doch *tert*-Butylthiol (**5a**) zu verwenden, aber den Thiolgeruch unter die Wahrnehmungsschwelle zu senken.

Aus der beschriebenen Synthese von **2a** (Abbildung 4) ergaben sich folgende Parameter: Luft als Trägergas aus einem Laborabzug mit den üblichen Raumlufbedingungen (Emissionstemperatur 20 °C - 30 °C; 45 % - 60 % relative Feuchte; keine überlagerten Fremdstoffen, nur prozessbedingte Komponenten). Als primär abzuscheidende Verunreinigung wurde *tert*-Butylthiol definiert, dessen Konzentration bis zu einem Restgehalt von maximal 0.01 mg/m³ (Mindest-Odoriermittelkonzentration^[15] für Thiole: 0.03 mg/m³; selbst Menschen mit schwach ausgeprägtem Geruchssinn können den Geruch auch bei Vermischung mit Luft sicher wahrnehmen) vor Abgabe an die Umgebung sicher reduziert werden musste. Des Weiteren waren nicht unerhebliche Mengen an *N,N*-Dimethylformamid, 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol (**1**) und reaktionsbedingten Zwischenprodukten zu erwarten, die gemäß der Verwaltungsvorschrift zum Bundes-Immissionsschutzgesetz „Technische Anleitung zur Reinhaltung der Luft“ (TA Luft)^[33] bis auf maximal zulässige 20 mg C_{ges}/m³ in der gereinigten Abluft verringert werden sollten. Die beschriebene Synthese stellt ferner eine diskontinuierliche Betriebsweise dar, bei der sich die Konzentrationen der angegebenen Substanzen während der Zeit sehr stark verändern.

2.3.1 ADSORPTION

Als Adsorbentien wurden zwei unterschiedliche, pelletierte Aktivkohlen in einem Rohrreaktor mit ca. 700 mm Schüttungslänge und einem Durchmesser von ca. 50 mm der Syntheseabluft nachgeschaltet. Bei einer durchschnittlichen Schüttdichte von 300 bis 450 kg/m³ ergibt sich daraus eine Aktivkohlemenge von ca. 500 g. Bei optimalen Adsorptionsbedingungen (Anströmgeschwindigkeit, Höhe zu Breite Verhältnis der Adsorbenschüttung, Wärme- und Stofftransportmechanismen, Feuchte, Temperatur- und Partialdruckniveaus, keine Verdrängungsreaktionen oder Coadsorption von Wasser, etc.) und einer maximal erreichbaren Beladung von 20 Gew.-% kann eine Schadstoffmenge bis 100 g absorbiert werden. Im Forschungslabor ergibt sich bei einer minimalen Abluftmenge von 150 Nm³/h eine Anströmgeschwindigkeit von mindestens 21 m/s. Im Vergleich zum theoretischen Optimum von circa 1 m/s wird der Adsorber massiv „überfahren“, die resultierende Verweilzeit ist für eine vollständige Adsorption viel zu gering. Olfaktorisch wurde im Synthese-Experiment mit den genannten Abluftwäschebedingungen festgestellt, dass die Konzentration des Thiols nicht unter die Geruchsschwelle sank.

2.3.2 ABLUFTWÄSCHE

Zur Optimierung wurden dem Aktivkohleabsorber Waschflaschen mit jeweils 500 ml Waschflüssigkeit vorgeschaltet und die Abluft über eine Sinterfritte eingeperlt. Für die Messung der gasförmigen Schadstoffe wurde die übliche Methodik nach VDI 2450^[34] angewandt. Folgende zwei Methoden wurden untersucht.

a. OXIDATION

Ziel der Versuche war es, das *tert*-Butylthiol physikalisch in der Waschflüssigkeit zu lösen und mit Hilfe einer Kaliumpermanganat-Lösung (4 %) zu oxidieren. Alternativ wurde Wasserstoffperoxid (3 %) als Oxidationsmittel verwendet. Hierfür wurden zwei Waschflaschen in Reihe geschaltet.

b. SALZBILDUNG

Das Thiol sollte mittels Natronlauge (20 %) deprotoniert und in ein schwer flüchtiges Salz überführt werden.

In beiden Fällen sank die austretende Thiolkonzentration nicht unter die Geruchsschwelle. Tertiäre Thiole werden unvollständig und deutlich langsamer als primäre und sekundäre Thiole oxidiert.^[35] Die Rahmenbedingungen der Experimente (diskontinuierlicher, stark schwankender Gasstrom und Geruchsstoffaustritt) sind nicht optimal, denn zum einen entstehen sehr kleine Volumenströme mit hohen Verweilzeiten im Waschmedium und zum anderen liegen sehr große Austauschflächen mit schlechtem Oberflächen/Volumenverhältnis der Gasblasen vor.

Die Reaktionsträgheit des Geruchsstoffes, die außerordentlich niedrige Geruchsschwelle und die eingesetzten molaren Mengen führten dazu, dass die durchgeführte Abluftwäsche unzureichend war.

2.3.3 THERMISCHE ABLUFTNACHBEHANDLUNG

Ein katalytisches Niedertemperaturverfahren ist auf Grund des Schwefelgehaltes in der Abluft und der hohen und stark schwankenden Konzentrationen aller Abluftkomponenten also unzureichend. Mit diesen Rahmenbedingungen und den Erkenntnissen der Abluftwäsche war eine thermische Abluftnachbehandlung angezeigt. Sie erfolgte in Zusammenarbeit mit der Firma Luft- und Thermotechnik Bayreuth GmbH (LTB). Sie zeichnete sich in ihrer Anwendung durch geringe Kosten, hohem Wirkungsgrad, am schnellsten umzusetzende und vor allem sicherste Lösung aus. Eine gut dimensionierte Abluftverbrennungsanlage ist unempfindlich gegenüber stark und schnell schwankenden Konzentrationen der Schadstoffkomponenten (Batch- oder Dauerbetrieb) und der Zusammensetzung der Abluft. Wechselwirkungen, wie z.B. Verdrängungsreaktionen am Adsorbens, treten bei einer thermischen Abluftverbrennung nicht auf. Gesetzliche Vorgaben bezüglich Explosionsschutz und Emissionsgrenzwerten (z.B. Dioxine, Furane, Aerosole, C_{ges}) wurden durch entsprechende Dimensionierung der Anlage und des Luftdurchsatzes eingehalten.^[33] Besonderes Augenmerk galt etwaiger Korrosion. Die physikalischen und chemischen Eigenschaften (Flammpunkt, Kohlenwasserstoff, Heizwert, etc.) von *tert*-Butylthiol und der übrigen verwendeten Substanzen eignen sich gut für eine thermische Nachbehandlung der Syntheseabluft.

In einem von der Fa. LTB bereitgestellten Laborabzug wurden die Synthese, die Aufarbeitung und die Reinigung des Versuchsproduktes (**2a**) durchgeführt. Der Laborabzug wurde mit einer RTO (*Regenerative Thermische Oxidationsanlage*) so verbunden, dass über den Hauptventilator der RTO ein konstant geregelter Volumenstrom von 900 Nm³/h über den Laborabzug abgesaugt wurde. Dieser hohe Abluftstrom sollte jeglichen Austritt von *tert*-Butylthiol aus dem Abzug in die Umgebungsluft vermeiden. Im Bedarfsfall konnte über einen weiteren Ansaugstutzen der RTO vor der Verbrennung zusätzlich Frischluft zur Verdünnung zugeführt werden. Das wäre erforderlich gewesen, falls die Austrittskonzentrationen nach der RTO noch deutlich über der Geruchsschwelle oder die Eintrittskonzentrationen über 25 % UEG (DIN EN 12753: Grenzwert bzgl. der *Unteren ExplosionsGrenze*) gelegen hätten. Dieser Betriebszustand trat nicht ein. Die Brennkammertemperatur wurde auf den Erfahrungswert von 900 °C geregelt, das sollte gewährleisten, dass das der Verbrennung zugeführte 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol (**1**) nicht zu einer Überschreitung der gesetzlich zulässigen Höchstwerte für Dioxine führt. Die Zeiten des Spül- und Klappenumschaltzyklus wurden an die Synthesebedingungen angepasst. Da in der Abluft der Verbrennungsanlage olfaktorisch kein Thiol mehr wahrgenommen werden konnte, war damit das Versuchsziel erreicht. Auf weitere Abgasanalysen wurde verzichtet.

3 SYNTHESE

3.1 STRUKTURELLE ANFORDERUNGEN AN TRITYL-SPINSONDEN

Um Spinsonden als spektroskopisches Diagnostikum verwenden zu können, sollte das entstehende ESR-Signal eine schmale starke Linie im Spektrum ohne Signalaufspaltung ergeben, weil die Substanzen in vivo nur in sehr geringen Mengen und Konzentrationen eingesetzt werden können. Strukturell setzt das enge Grenzen hinsichtlich der Symmetrie der Verbindungen bzw. der Moleküle und der Atomtypen über die das ungepaarte Elektron delokalisiert sein darf.

Aufgrund dieser Anforderungen müssen die aromatischen Protonen des TAM-Grundkörpers mit geeigneten Gruppen ersetzt werden um eine Hyperfeinaufspaltung im ESR-Spektrum zu vermeiden. Welche Atome kommen dafür generell in Frage? Sauerstoffatome sind kleiner als Schwefelatome und besitzen ebenfalls einen Kernspin (I) von Null. Unter diesen Voraussetzungen wäre keine Signalaufspaltung zu erwarten, sie tritt jedoch trotzdem ein. Befinden sich Sauerstoffatome in Position X in Abbildung 3 führen die Methylgruppen der Esterfunktion der Verbindung A in Abbildung 8 zu einer Signalaufspaltung. Die Protonen, die nicht wie an der Seitenkette durch ein weiteres Kohlenstoffatom abgeschirmt sind, tragen zur Signalaufspaltung bei. In der Literatur ist kein Finland-Sauerstoffanalogon-Radikal (**13**) beschrieben. Wir vermuten, dass aufgrund der guten Delokalisierung des freien Elektrons das Radikal rasch reduziert werden würde und somit nicht von Interesse ist. Diese Annahme wird durch die Signalaufspaltung des Tris-(8-formyl-2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis-[1,3]dioxol-4-yl)methyl-Radikals aus dem Patent WO91/12024^[7] unterstützt.

Fluoratome verhalten sich ähnlich wie Wasserstoff (¹H). Sie weisen einen Kernspin von +1/2 auf und führen zu einer entsprechenden Signalaufspaltung und wurden deshalb bisher in unseren Spinsonden nicht verwendet. Um den eingangs beschriebenen Anforderungen gerecht zu werden, wurden entweder schwefelalkylierte Aromaten oder chlorierte Aromaten (Kernspin von Chlor = + 3/2) verwendet. Beide Molekültypen ergeben im ESR-Spektrum jeweils nur eine sehr schmale unaufgespaltene Linie.

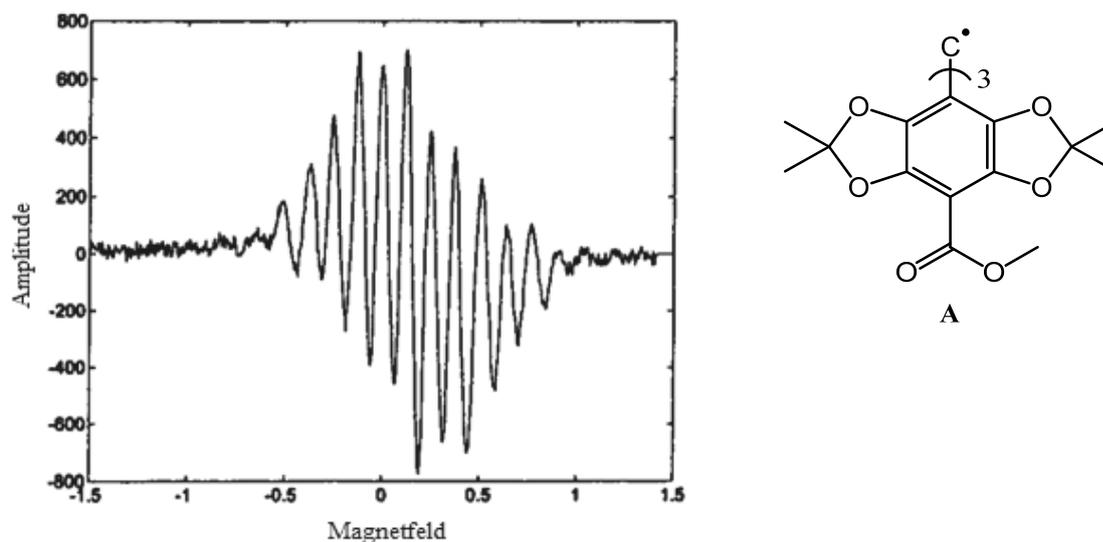


Abbildung 8: ESR-Spektrum von Tris-(8-methoxycarbonyl-2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dioxol-4-yl)methyl-Radikal (A) in THF aus Reddy et al.^[13]

3.2 SCHWEFELALKYLIERTE TRIARYLMETHAN-DERIVATE

Die Synthese und die Grundstruktur der „Finland-Radikale“ (Abbildung 3) wurde erstmals 1991 im Patent^[7] der Fa. Nycomed Innovation AS und elf Jahre später von Reddy et al.^[13] beschrieben. Aus den Patenten^[7-11] geht hervor, dass das Einführen von Heteroatomen mit dem damit verbundenen Austausch der aromatischen Protonen des TAM-Gerüsts zu einem schmalen ESR-Signal führt. Die Einführung von Heteroatomen und damit verbundenen sterisch anspruchsvollen Gruppen begünstigt nicht nur das ESR-Signal, sondern führt auch zu einer verbesserten Beständigkeit gegenüber Oxidations- und Reduktionsmitteln in biologischen Systemen. Das ungepaarte Elektron bzw. der radikalische Charakter ist räumlich abgeschirmt und erhöht die Stabilität des Radikals.

Die ersten Vertreter der „Finland-Radikale“ weisen noch Sauerstoffatome auf (Abbildung 3, X = Sauerstoff), an deren Stelle erwiesen sich im Forschungsverlauf Schwefelatome als besser. Daraufhin wurden in dem folgenden Patent US 5530140^[8] die Sauerstoffatome teilweise bzw. vollständig durch Schwefelatome ersetzt. In Abbildung 9 wird der Syntheseweg des Tris-(8-ethylcarboxyl-2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol-4-yl)methyl-Radikals (**11**) aus dem Patent US 5530140 gezeigt.

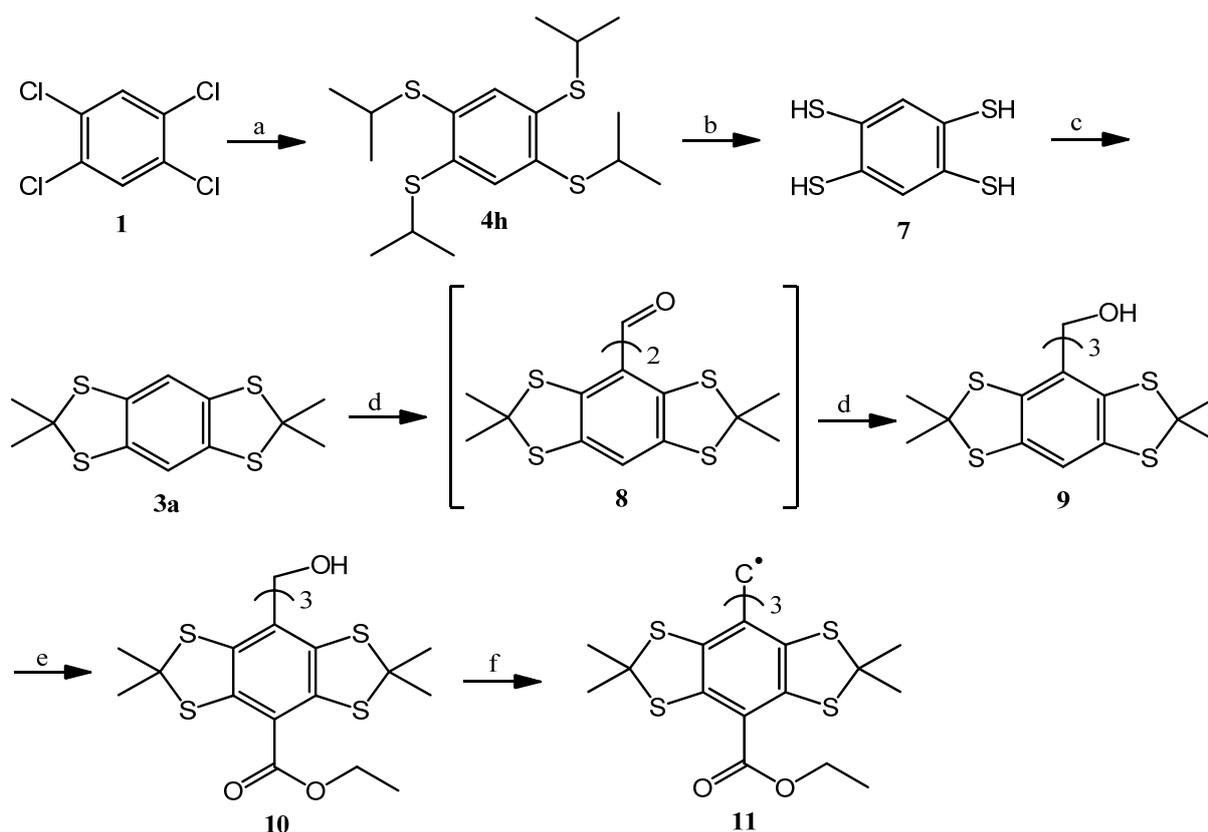


Abbildung 9: Syntheseweg des TAM-Radikals (**11**) nach Patent US 5530140^[8]

Reagenzien und Bedingungen: (a) Na, DMF, *i*-Propanthiol (**6h**); (b) Pyridin, Na; (c) HBF₄ 54 % in Et₂O, Aceton, Toluol; (d) *n*-BuLi 2.5 M in Hexan, (EtO)₂CO (0.33 Äq.); (e) *n*-BuLi 2.5 M in Hexan, (EtO)₂CO (3 Äq.); (f) SnCl₂, BF₃·Et₂O

Diese Synthese diente als Grundlage für diese Arbeit und soll zur Umgehung des Patentschutzes abgewandelt und in der Anzahl der Syntheseschritte bzw. eingesetzten Reagenzien optimiert werden. Die Grundstruktur der TAM-Radikale bildet das Triphenylmethan (**40**, siehe Abbildung 40). Diese Substanz ist kommerziell erhältlich und mit weniger als 1 € pro Gramm sehr preiswert. Chemisch ist es aber nicht möglich an **40** eine direkte Schwefeinführung durchzuführen, um die gewünschte Tetrathiatriarylmethyl-Struktur der „Finland-Radikale“ zu erhalten. Daher muss der Triphenylmethan-Grundkörper in einzelnen Schritten aufgebaut werden, was im folgenden Kapitel 3.2.1 detailliert beschrieben wird.

3.2.1 SYNTHESE DES TRIS-(8-CARBOXYL-2,2,6,6-TETRAMETHYLBENZO[1,2-D;4,5-D']BIS[1,3]-DITHIOL)METHYL-RADIKALS (**13**)

Verbindung **2a** wurde wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben in ausreichender Menge hergestellt. Infolgedessen konnte mit der Abwandlung und Optimierung der „Finland-Synthesen“ aus den Patentvorschriften^[7,8,36] bzw. der Veröffentlichung von Reddy et al.^[13] begonnen werden. Abbildung 10 gibt einen Überblick über die abgewandelte und verkürzte Synthese des Tris-(8-carboxyl-2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol)methyl-Radikals (**13**).

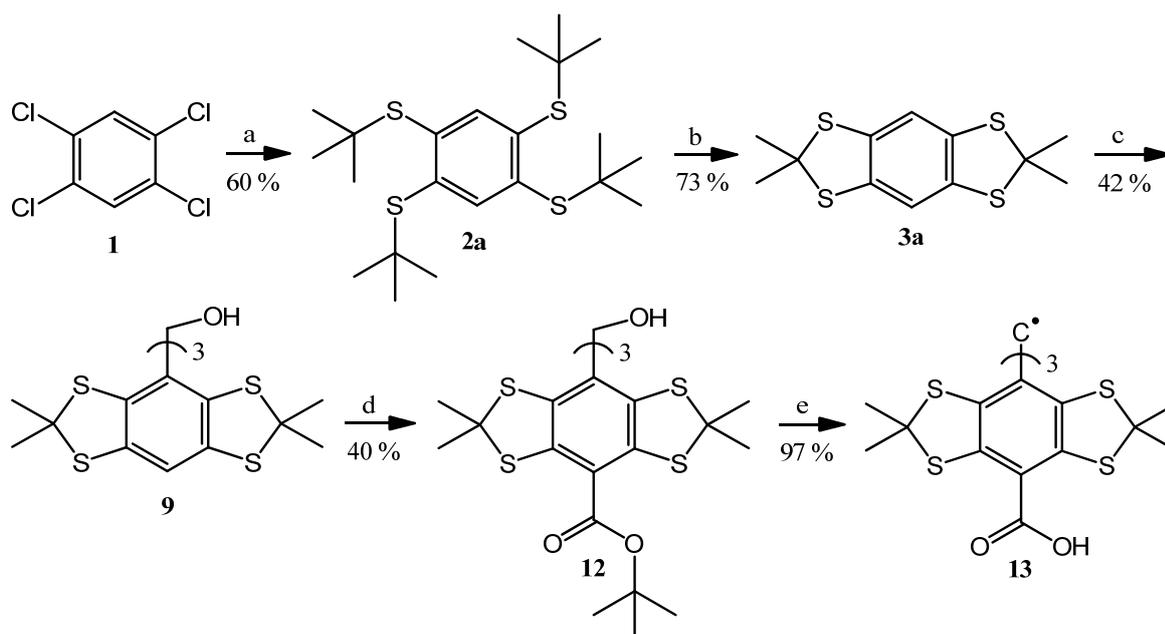


Abbildung 10: optimierter Syntheseweg des Tris-(8-carboxyl-2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]-dithiol)methyl-Radikals (**13**)

Reagenzien und Bedingungen: (a) Argon, DMF, *tert*-Butylthiol (**5a**), NaH 60 % (w/w) in Mineralöl 0 °C → 2 h Rückfluss; (b) HBF₄ 54 % in Et₂O, Aceton, Toluol; (c) Et₂O, *n*-BuLi 2.5 M in Hexan (1 Äq.), Chlorameisensäuremethylester (C₂H₃ClO₂, 0.3 Äq.); (d) *n*-BuLi 2.5 M in Hexan und TMEDA (jeweils 10 Äq.), Überschuss an Diboc; (e) CF₃COOH

Anstelle des von Nycomed synthetisierten Diethylester-Radikals (**11**, Abbildung 9) wurde bewusst das Carbonsäure-Radikal (**13**, Abbildung 10) hergestellt, um die Hydrophilie des Radikals zu verbessern. Im Folgenden werden die Teilschritte der optimierten Synthese aus Abbildung 10 einzeln betrachtet und im Detail ihre Abwandlung und/oder Verbesserung in Bezug auf die Synthese des Patentes US 5530140^[8] (Abbildung 9) erläutert.

Im Patent WO 9112024^[7] von 1991 wurde Verbindung **3a** noch aus 1,3,5,7-Tetrathias-indacen-2,6-dion^[37] hergestellt (Abbildung 11). Diese Verbindung wurde aus **4h** mittels Phosgen hergestellt. Wie Abbildung 11 verdeutlicht, ist der erste Syntheseweg von **3a** noch recht umständlich gewählt, da zwei Mal das polymerisationsanfällige 1,2,4,5-Tetrathioindacen-2,6-dion (7) intermediär entsteht. In den darauffolgenden Patenten^[11,38] wurde dieser Schritt, wie in Abbildung 9 dargestellt, eingespart und gleichzeitig die Verwendung von Phosgen umgangen.

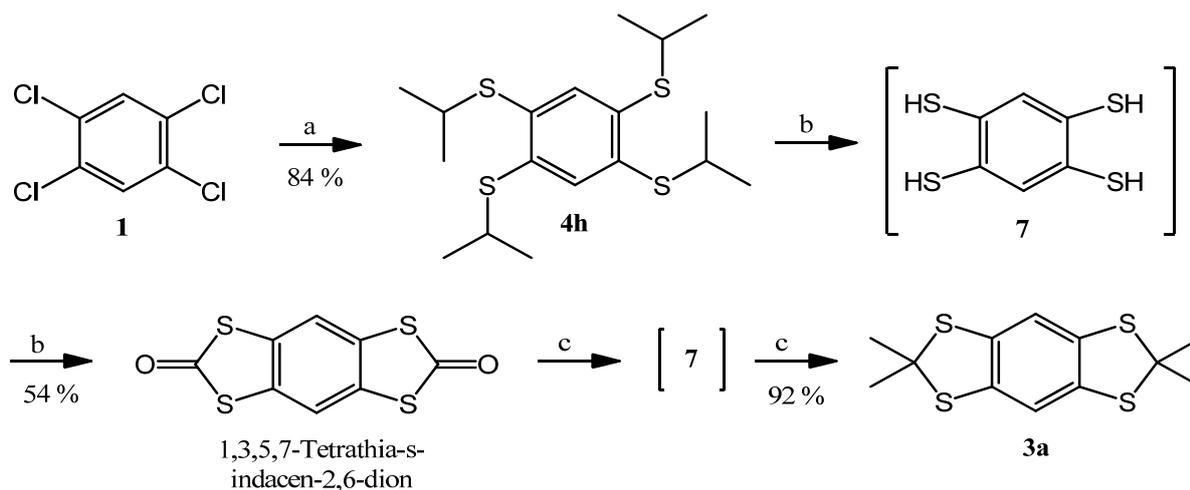


Abbildung 11: Syntheseweg von **3a** nach Patent WO 9112024^[7]

Reagenzien und Bedingungen: (a) HMPTA, *i*-Propanthiol (**6a**), Na; (b) Stickstoffatmosphäre, Pyridin, Na, COCl₂; (c) HBF₄ 54 % in Et₂O, Aceton, Toluol

Für den Syntheseschritt (a) aus Abbildung 9 konnte keine weitere Verbesserung erreicht werden. Dhimitruka et al.^[14] umgingen bereits den Einsatz von *i*-Propylthiol (Abbildung 9, Reaktionsschritt a), indem sie **1** mit *tert*-Butylthiol (**5a**) reagieren ließen und dieses dann direkt zu **3a** umsetzten. Wie eingangs beschrieben, stellte das Ausgangsmaterial (Abbildung 12) die größte Hürde für die Synthese der schwefelhaltigen TAMs dar. Somit ist die Optimierung der Herstellung des Ausgangsmaterials **2a** in molaren Mengen mittels Abluftreinigung (vgl. Kapitel 2.3.3) eine sehr wesentliche Verbesserung.

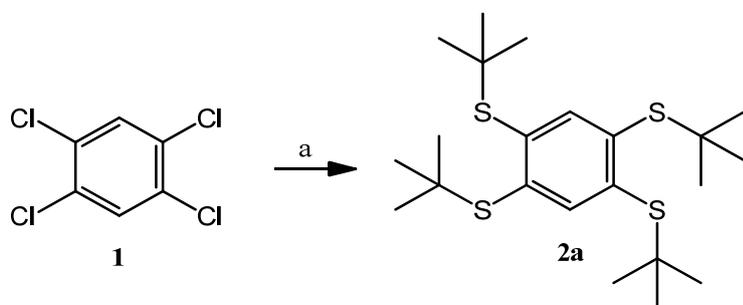


Abbildung 12: Synthese von 1,2,4,5 Tetra-*tert*-butylthiobenzol (**2a**)

Reagenzien und Bedingungen: (a) Argon, DMF, NaH 60 % (w/w) in Mineralöl, *tert*-Butylthiol (**5a**)

Die Optimierung des nächsten Reaktionsschrittes (Abbildung 13) besteht in der Umgehung der Zwischenverbindung **7** durch Abspaltung der *tert*-Butylgruppen von **2a** und direkten Umsetzung zu **3a**. Somit wird ein Reaktionsschritt eingespart.

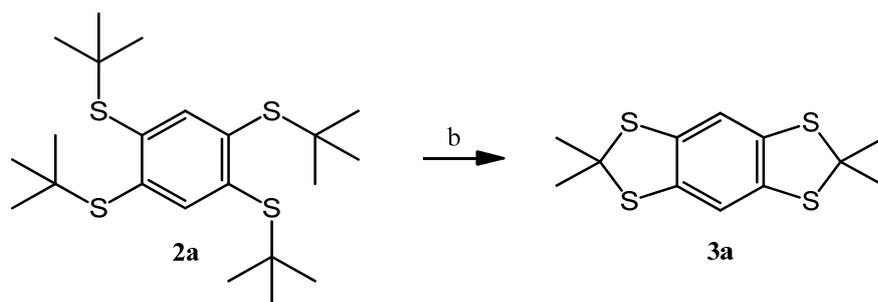


Abbildung 13: Einsparung eines Reaktionsschrittes
 Reagenzien und Bedingungen: (b) Toluol, HBF_4 54 % in Et_2O , Aceton

Im „Trimerisierungs-Reaktionsschritt“ (siehe dazu Abbildung 9, Schritt d) gilt es die Nebenreaktion zum Dimer **8** zu unterdrücken. Das wird durch den Austausch des Diethylcarbonats gegen den reaktiveren Chlorkohlensäuremethylester (ClCOOMe) als Trimerisierungsreagenz erreicht; dadurch wird bevorzugt das Trimer **9** gebildet (Abbildung 14). Der Austausch des Reagenzes hat zudem eine höhere Ausbeute zur Folge. Sie wird dadurch erreicht, dass der Chlorkohlensäuremethylester im geringen Unterschuss zugesetzt wird, dadurch wird zuerst die äquimolare Menge an Monomer-Baustein **3a** verbraucht. Der Folgeschritt zum Dimer **8** ist langsamer als der erste Schritt zum Ester, aus diesem Grund braucht die Reaktion viel Zeit, das wird durch die sehr langsame Zugabe des Chlorkohlensäuremethylesters realisiert. Die sehr langsame Zugabe erforderte den Einsatz einer Spritzenpumpe. Für die Umsetzung von millimolaren Mengen des Monomers **3a** wird nur ein Drittel Äquivalent des Chlorkohlensäuremethylesters benötigt, daher liegt die eingesetzte Menge des Reagenzes im mikromolaren Bereich. Es wurde in 50 ml Diethylether über 24 - 48 h infundiert. Im letzten Schritt bildet sich das Trimer **9**. Mit den genannten Verbesserungen konnte eine Ausbeute von 42 % erzielt werden.

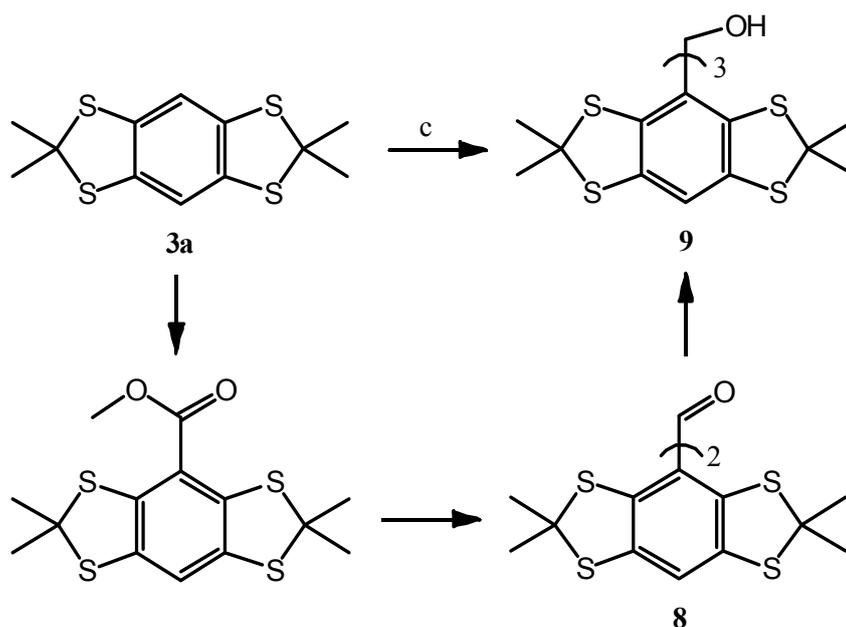


Abbildung 14: Synthese des Trimers **9**
 Reagenzien und Bedingungen: (c) Et_2O , $n\text{-BuLi}$ 2.5 M in Hexan (1 Äq.), ClCOOMe (0.3 Äq.)

Reaktionsschritte d und e, Abbildung 10:

Die Optimierung des nächsten Reaktionsschrittes (Abbildung 15) betrifft die Einführung des *tert*-Butylesters. Im Patent^[8] bzw. in der Publikation von Reddy et al.^[13] wird mit *tert*-Butyllithium und Diethylcarbonat gearbeitet. Der Austausch des sehr reaktiven, selbstentzündlichen *tert*-Butyllithiums gegen *n*-Butyllithium erhöht die Sicherheit und führt zu keinem Ausbeuteverlust. Die Verwendung von Di-*tert*-butyldicarbonat (Diboc) lieferte annähernd gleiche Ausbeuten (40 %). Der Vorteil der Verbindung **12** liegt in der anschließenden Herstellung des Radikals **13** (Abbildung 15).

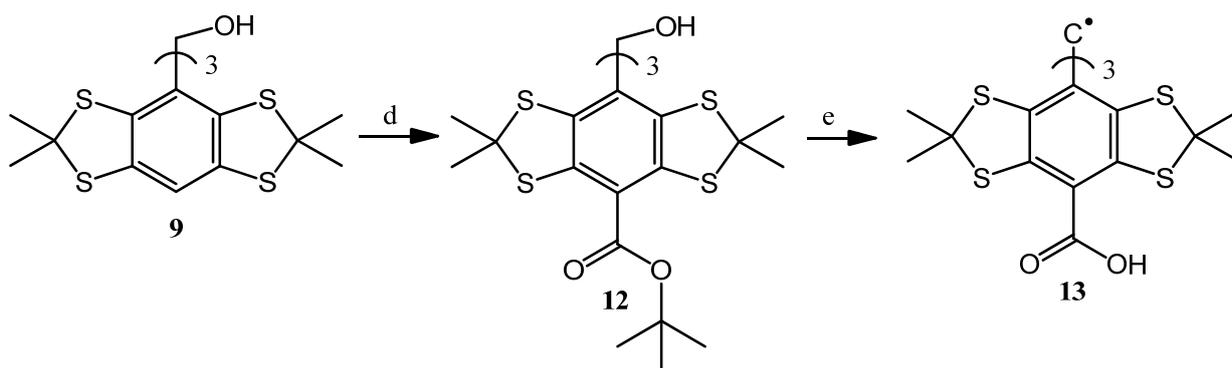


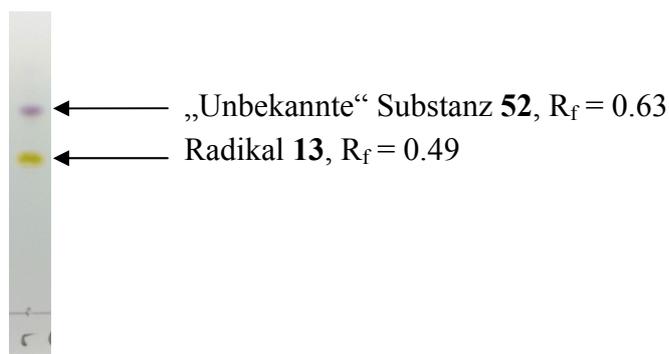
Abbildung 15: Synthese des *tert*-Butylesters **12** und Bildung des Radikals **13**

Reagenzien und Bedingungen: (d) Benzol, *n*-BuLi 2.5 M in Hexan und TMEDA (jeweils 10 Äq.), Überschuss an Diboc; (e) CF₃COOH

Verbindung **12** wird mit Trifluoressigsäure über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, dabei bildet sich Radikal **13** über folgenden vermuteten Mechanismus: Die Behandlung von **12** mit Trifluoressigsäure führt zur Abspaltung des *tert*-Butylkations, das sich durch Verlust eines Protons zu 2-Methylpropen stabilisieren kann. Der „Tritylalkohol“ wird vermutlich zunächst von Trifluoressigsäure an der OH-Gruppe protoniert, diese wird in Folge als Wasser abgespalten und ein Tritylkation resultiert. Das Tritylkation reagiert mit 2-Methylpropen zum Tritylradikal und *tert*-Butylradikal; letzteres oligomerisiert. Anschließend wird die Trifluoressigsäure im Vakuum entfernt. Die anschließende DC-Untersuchung (Hexan/EtOAc; 7/3, v/v) zeigte überraschender Weise einen grünen und einen violetten Substanzfleck. Dieses „Phänomen“ wurde in der Literatur noch nicht beschrieben (Ausbeute an Radikal wurde immer mit 99 % angegeben). Um herauszufinden, um welche Substanz es sich handelt, wurde ein geeignetes Fließmittel für die DC und anschließende säulenchromatographische Reinigung (SC) gesucht. In Tabelle 2 werden die verwendeten Fließmittel nach Stahl^[39] für organische Säuren aufgelistet. Am geeignetsten war die Fließmittelzusammensetzung C nach Braun und Greenen,^[40] siehe dazu Abbildung 16.

Tabelle 2: Fließmittelzusammensetzungen für die DC-Trennung von Radikal **13**

	Fließmittelzusammensetzung	Verhältnisse in [ml] (v/v)	R _f grün	R _f violett
	Hexan - Ethylacetat	7 + 3	0.12	0.15
A	Ethanol 96 % - Wasser - Ammoniak 25 %	7.8 + 0.95 + 1.25	0.65	0.72
B	Benzol - Methanol - Eisessig	7.9 + 1.4 + 0.7	0.69	0.76
C	Propanol - konz. Ammoniak	7.0 + 3.0	0.49	0.63
D	Ethanol - Chloroform - konz. Ammoniak - Wasser	5.3 + 3.0 + 1.5	0.49	0.59
E	Methanol - 5 N Ammoniaklösung	80 + 20	0.91	0.91

Abbildung 16: DC-Verlauf des Radikals **13**, Fließmittel C

Nachdem das optimale Fließmittel bestimmt wurde, konnte Verbindung **52** mittels Middle Pressure Liquid Chromatography (MPLC) abgetrennt werden. Sein Anteil an Produktgemisch betrug ca. 3 %, siehe Kapitel 4.7.1d.

Zusammenfassung:

Die Optimierung der TAM-Synthese kann wie folgt beschrieben werden:

- (a) Durch Umgehung der Bildung des sauerstoffempfindlichen 1,2,4,5-Tetrathiobenzols (**7**) kann das Verfahren um einen Reaktionsschritt verkürzt werden.
- (b) Durch den Austausch von *tert*-Butyllithium gegen *n*-Butyllithium wird die Versuchsdurchführung vereinfacht und sicherer gemacht, was besonders für größere Ansätze sehr wichtig ist.
- (c) Durch den Austausch von Diethylcarbonat gegen Chlorkohlensäuremethylester und die langsame Infusion mittels einer Spritzenpumpe wird die Bildung des Dimers **8** zurückgedrängt und die Gewinnung des Trimers **9** begünstigt.
- (e) Durch die Synthese eines *tert*-Butylesters (**12**) ist die Radikalerzeugung **13** stark vereinfacht, da **12** nur über Nacht mit Trifluoressigsäure gerührt wird und im Anschluss die Trifluoressigsäure im Vakuum wieder entfernt wird, anstatt einer Behandlung mit Zinn(II)-chlorid und BF₃·Et₂O.

3.2.2 SYNTHESE DES TRIS-(8-CARBOXYL-2,2,6,6-TETRA($^2\text{H}_3$ -METHYL)BENZO[1,2-D;4,5-D']BIS[1,3]DITHIOL)METHYL-RADIKALS (**14**)

Die Linie des TAM-Radikals (**13**) ist mit 0.021 mT bereits sehr schmal.^[14] Um ein noch schmaleres ESR-Signal zu bekommen wurden die ^1H -Atome der Methylgruppen gegen ^2H -Atome ersetzt. Das Deuterium besitzt einen Kernspin von eins, deshalb entstehen mehr Superhyperfeinaufspaltungen im ESR-Spektrum, aber das magnetische Moment ist um den Faktor sechs kleiner und verringert dadurch die Linienbreite.

Die synthetischen Arbeiten dazu führte ich während meines Auslandsaufenthaltes im Arbeitskreis von Prof. Dr. Khramtsov im Davis Heart and Lung Research-Institute in Columbus (Ohio, USA) durch; siehe dazu "Synthesis, structure, and EPR characterization of deuterated derivatives of Finland trityl radical".^[41] Die Synthese des Tris-(8-carboxyl-2,2,6,6-tetra($^2\text{H}_3$ -methyl)benzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol)methyl-Radikals (**14**, Abbildung 17) erfolgt in gleicher Weise wie **13**, siehe dazu Kapitel 3.2.1. Der einzige Unterschied besteht im Austausch von Aceton gegen Aceton- D_6 im Reaktionsschritt b. Für die Syntheseprodukte der Teilschritte werden in dieser Arbeit die gleichen Zahlen vergeben wie bei der Synthese von **13**. Sie erhalten zur Unterscheidung zusätzlich das Präfix **d**. Die Gesamtausbeute über alle fünf Reaktionsschritte entspricht der des undeuterten Radikals **13**. Sie liegt bei akzeptablen 7.2 % gegenüber 5.2 % der im Patent US 5530140 beschriebenen Synthese. In unseren ESR-Experimenten haben wir vorwiegend mit dem deuterierten TAM-Radikal **14** gearbeitet, da in der Literatur bereits die ESR-Charakterisierung des Radikals **13** beschrieben wurde. Ein weiterer Vorteil liegt in der nochmals knapp 2/3 schmalen ESR-Linienbreite von 0.0074 mT gegenüber 0.021 mT bei **13**.^[8]

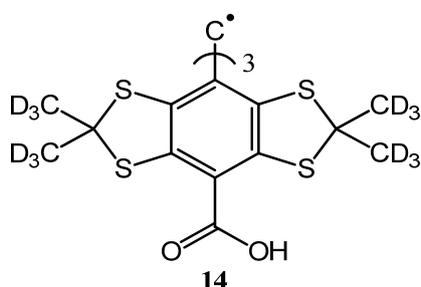
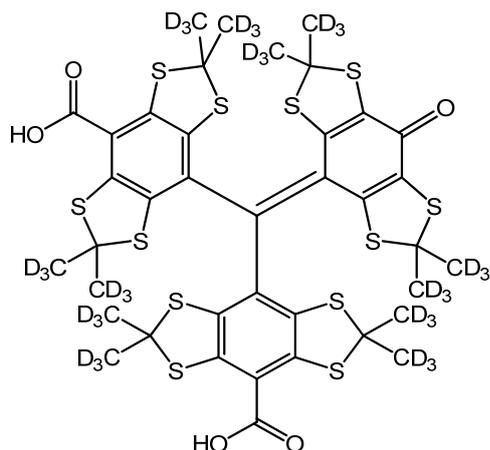
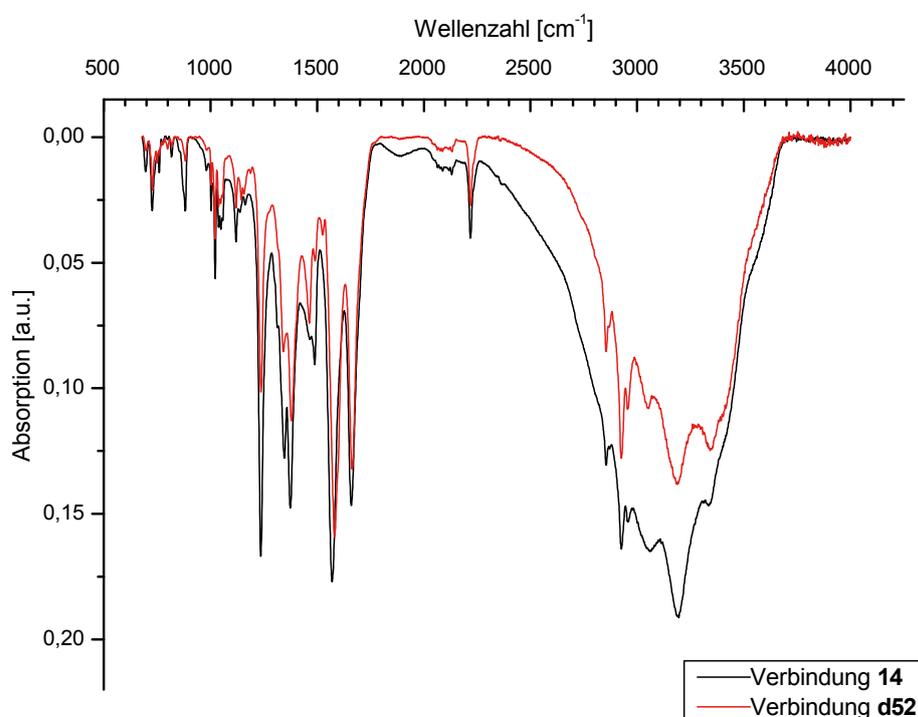


Abbildung 17: chemische Struktur des deuterierten TAM-Radikals (dTAM, **14**)

Wie bei der Diskussion der Synthese in Kapitel 3.1.1 bemerkt, trat auch bei der Synthese von Radikal **14** eine unbekannte, violette Substanz auf. Da sich die R_f Werte von **13** und **14** nicht unterscheiden und **14** in größerer Menge als **13** vorlag, wurde die Charakterisierung dieses Nebenproduktes mit der unbekanntenen Substanz **d52** durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde mittels MPLC und dem Fließmittelgemisch C (siehe Seite 20) an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) getrennt. Trotz der intensiven violetten Farbe, die sich über mehrere Fraktionen erstreckte, hatte das Nebenprodukt nur einen Anteil von rund 3 % am Produktgemisch, das im Wesentlichen aus **14** bestand (vgl. Kapitel 3.2.1). Das im Negativmodus aufgenommene ESI-Massenspektrum zeigte für **d52** eine relative Molmasse von 1005.16. Der Unterschied von 29.01 zum Radikal **14** macht eine Decarboxylierung und Oxidation zum Semichinon (Abbildung 18) wahrscheinlich.

Abbildung 18: Verbindung **d52**, decarboxyliertes Radikal **14**Abbildung 19: IR-Spektren im Vergleich von Radikal **14** und **d52**

Im IR-Spektrum (Abbildung 19) sind keine Veränderungen der Banden zu erkennen, die einen klaren Beweis für die vermutete Umwandlung enthalten. Einen Hinweis, dass es sich um zwei verschiedene Substanzen handelt, ergibt sich nur aus der schwächeren C-OH Schwingung ($3000\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$) und der verstärkten C-O Schwingung ($\sim 1700\text{ cm}^{-1}$) gegenüber Radikal **14** (unter Betrachtung annähernd gleicher Konzentrationen). In der Literatur^[42] wird eine Decarboxylierung von Verbindung **13** mit Oxidationsmittel und/oder Enzymen beschrieben. Überraschend ist die relativ leichte, wenn auch nicht in großen Ausmaß stattfindende oxidative Decarboxylierung der Verbindungen **13** und **14** ohne enzymatische Einwirkung. Da **d52** nur in einem geringen Anteil entstand, reichte die gewonnene Menge nicht für ein gut

auswertbares ^{13}C NMR, um den in Abbildung 19 gemachten Strukturvorschlag weiter zu erhärten.

Jedenfalls konnte gezeigt werden, dass geringe Mengen vermutlich eines Chinons entstehen können, die zwar im ESR-Experiment nicht auffallen, aber beachtet werden müssen, wenn das Radikal **13** oder **14** genau abgewogen eingesetzt werden.

3.2.3 SULFONIERTE TRIARYLMETHAN-DERIVATE

Im Rahmen der ESR-Charakterisierung (vgl. Kapitel 4) wurde festgestellt, dass das TAM-Radikal **13** und sein deuteriertes Derivat **14** unterhalb von pH 6 schlecht wasserlöslich sind. Darin begründet sich das Vorhaben der Entwicklung von neuen TAM-Radikalen mit Sulfonsäuregruppen um die Hydrophilie zu steigern. Der Austausch der Carbonsäuregruppen gegen Sulfonsäuregruppen verbessert vermutlich die Hydrophilie. Andererseits ist zu bedenken, dass Sulfonsäuregruppen wegen ihrer hohen Azidität bei pH 7.4 fast vollständig anionisch vorliegen und die Substanzen daher vermutlich keine Membrangängigkeit mehr aufweisen. Somit ist abzuwägen, welche Eigenschaften für eine Anwendung erforderlich sind.

Zeitgleich zu diesen Versuchen wurde ein phosphonyliertes Finland-Radikal-Analogon von Driesschaert et al.^[43] und nur wenig später von Dhimitruka et al.^[44] (mit geringfügig abgewandelter Synthesevorschrift) in der Literatur beschrieben. Diese Publikationen gaben den Anlass, die Hydrophilie durch Einführung von Sulfonsäure- bzw. Chlorsulfonsäuregruppen zu verbessern. Es wurde zunächst mit Chlorsulfonierungs-Experimenten begonnen, denn in Anbetracht der geplanten ESR-Imaging-Experimente bzw. der späteren Verknüpfung der Radikale mit Hydroxyethylstärke ist eine bereits aktivierte Säurefunktion (Chlorsulfonsäuregruppe) vorteilhaft. Schwefelsäure besitzt starke oxidative Eigenschaften. In der Literatur werden häufig Sulfonierungsreaktionen mittels Schwefelsäure beschrieben. Um eine mögliche Oxidation der Schwefelatome oder Ringöffnungsreaktionen auszuschließen (Abbildung 20) wurde zu Beginn die Chlorsulfonierung an dem Monomer **3a** ausprobiert. Eine übertragbare Synthesevorschrift lieferte Hoffart et al.^[45]

a. REAKTION MIT CHLORSULFONSÄURE

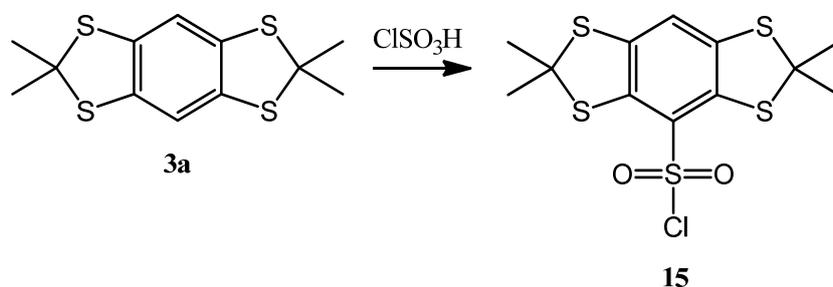
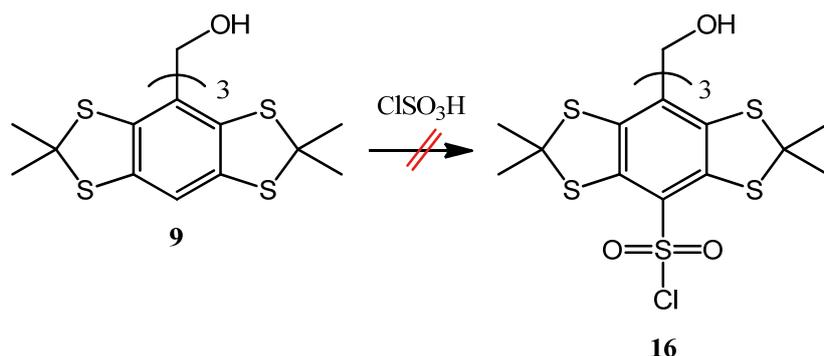


Abbildung 20: Chlorsulfonierung des Monomers **3a**

Das Produkt **15** konnte in geringer Ausbeute isoliert werden. Verbindung **3a** war demzufolge beständig gegenüber Säuren. Die Synthese wurde ohne weitere Optimierung auf das Trimer **9** übertragen (Abbildung 21).

Abbildung 21: Chlorsulfonierung des Trimer **9**

Die Arbeitsvorschrift für die Synthese von **15** konnte nicht erfolgreich auf die Bildung von **16** übertragen werden. Sobald dem Reaktionsansatz eine Säurekomponente hinzugegeben wurde, erfolgte ein Farbumschlag von gelb-orange nach grün. DC-Untersuchungen zeigten kein neues Produkt. Diese Reaktion wurde unter Variation der Lösungsmittel, der Anzahl der Reaktionsäquivalente an Chlorsulfonsäure, der Temperatur sowie der Reaktionsdauer wiederholt. Alle Experimente führten zu keiner Umsetzung. Rathore et al.^[46,47] beschreiben ein ähnliches Verhalten, wobei sich Hexakis(4-diphenyl-4-hydroxymethylphenyl)benzol durch Zusatz von Methansulfonsäure in Dichlormethan zu einem Poly-Trityl-Kation umsetzte, welches isoliert und charakterisiert wurde.

Daraufhin wurde der grüne Reaktionsansatz untersucht. Nach der Reinigung mittels SC wurde festgestellt, dass neben noch vorhandenem Edukt die grüne Substanz (**17**) radikalischer Natur ist, denn bei der ESR-Analyse wurde ein schwaches ESR-Signal festgestellt. Die zweite Verbindung, violett (**18**), konnte ebenfalls charakterisiert werden, siehe dazu Abbildung 22.

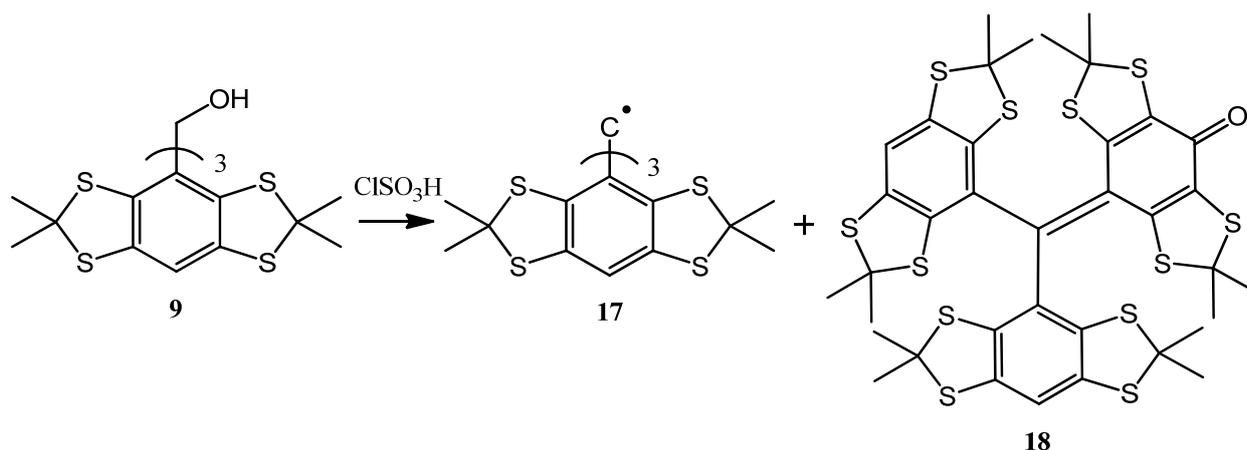


Abbildung 22: unerwarteter Reaktionsverlauf

Mittels Massen- und IR Spektroskopie (Abbildung 23) konnte Verbindung **18** eindeutig charakterisiert werden. Im IR-Spektrum sieht man im Vergleich zum Edukt **9** das Verschwinden der C-OH Schwingung bei 3300 cm^{-1} und das Auftreten der neuen Carbonylschwingung bei 1750 cm^{-1} .

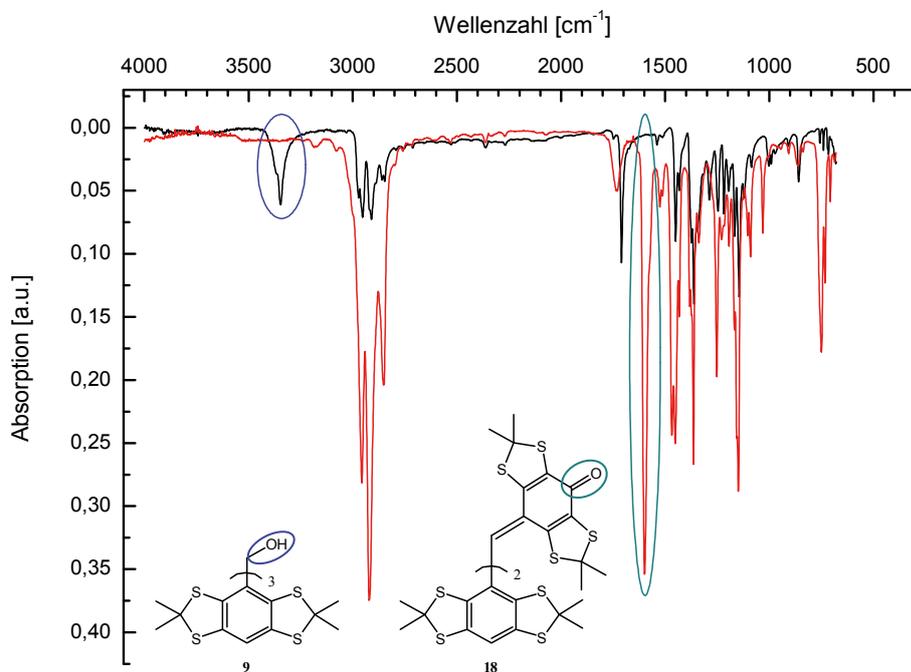


Abbildung 23: Vergleich der IR Spektren von **9** (schwarze Linie) und **18** (rote Linie)

Verbindung **9** ist als tertiärer Alkohol mit drei Phenylresten am zentralen Kohlenstoffatom in der Lage, leicht Hydroxid oder ein Hydroxyl-Radikal abzuspalten und das resultierende Kation oder Radikal gut zu stabilisieren. Durch den Einfluss der Chlorsulfonsäure wird vermutlich die Hydroxylgruppe als Wasser abgespalten und bildet ein Kation oder Radikal-Kation. Durch Oxidation entsteht schließlich die chinoide Verbindung **18**.

b. REAKTION MIT TRIMETHYLSILYLCHLORSULFONAT

Um den Einsatz von Säure zu umgehen, wurde eine andere Synthesestrategie verfolgt. Die Sulfonierung sollte in Anlehnung an eine Synthesevorschrift von Hofmann et al.^[48] unter Verwendung von Trimethylsilylchlorsulfonat ($\text{ClSO}_2\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$) durchgeführt werden. Dazu wurde die Synthese erneut erst am Monomer **3a** ausprobiert. Hier konnte keine Umsetzung erzielt werden. Trotzdem wurde die Synthesevorschrift auf **9** übertragen (Abbildung 24).

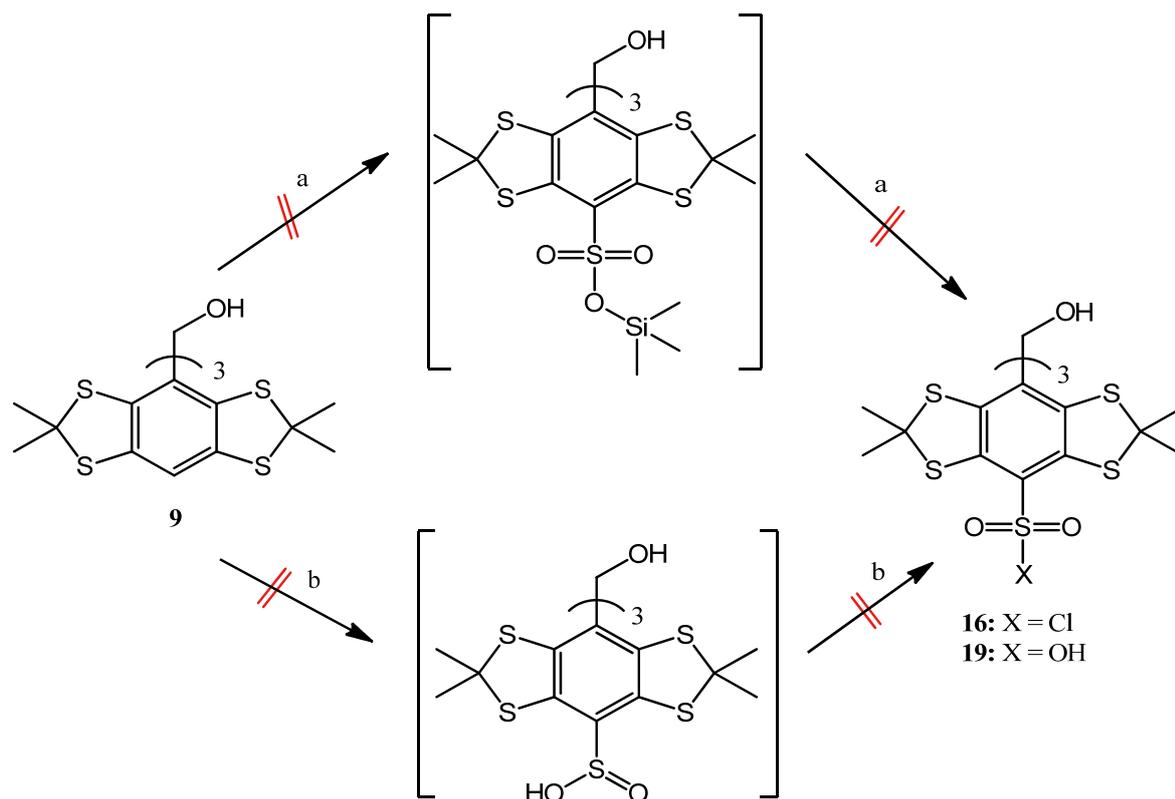


Abbildung 24: Syntheseweg der Trisulfonsäure-Derivate **16** und **19**

Reagenzien und Bedingungen: (a) *n*-BuLi 2.5 M in Hexan und TMEDA, ClSO₃Si(CH₃)₃; (b) *n*-BuLi 2.5 M in Hexan und TMEDA, SO₂/SO₂Cl₂

Die erfolglosen Sulfonierungsversuche mit Trimethylsilylchlorsulfonat (Abbildung 24, Reaktionsschritt a) ließen vermuten, dass die unsubstituierte Position am Aromat **9** eine ungenügende Nukleophilie für den Angriff des Trimethylsilylchlorsulfonats aufweist, weshalb durch Zugabe von Basen wie *n*-BuLi und *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (TMEDA) die Abspaltung des aromatischen Protons begünstigt und der Angriff des Sulfonierungsreagenzes am intermediären Carbeniumion gefördert werden sollte. Dazu wurden die Reaktionsbedingungen variiert (siehe dazu Tabelle 3). Benzol schien als Lösungsmittel am geeignetsten zu sein, da es das entstehende Li-Salz besser solubilisieren kann und somit das Carbeniumion gut stabilisiert. Da auch Variationen in Bezug auf die Temperatur durchgeführt wurden, musste das Lösungsmittel ausgetauscht werden. Zur Anwendung kamen THF und Diethylether.

Tabelle 3: Reaktionsbedingungen der Synthese von **16** bzw. **19**

Ansatz	LM	TMEDA	T bei <i>n</i> -BuLi Zugabe	ClSO ₃ -Si(CH ₃) ₃	T während der Reagenzzugabe	Bedingungen
1	Benzol	ja	RT	50-facher Überschuss	RT	2 h
2	Benzol	ja	0-5 °C	50-facher Überschuss	6 °C	20 min bei 6 °C und 12 h bei 20 °C

Ansatz	LM	TMEDA	T bei <i>n</i> -BuLi Zugabe	ClSO ₃ -Si(CH ₃) ₃	T während der Reagenzzugabe	Bedingungen
3	THF	nein	RT	150-facher Überschuss	-50 °C	30 min bei -50 °C und 12 h bei 20 °C
4	Et ₂ O	ja	0-5 °C	50-facher Überschuss	-70 °C	12 h bei 20 °C

c. REAKTION MIT SCHWEFELDIOXID

Die veränderten Reaktionsbedingungen führten nicht zum gewünschten Produkt **16** oder **19**. Es wurde ein anderer Weg gewählt (Abbildung 24, Reaktionsschritt b). Die Synthesvorschrift dazu lieferte Johnson et al.^[49] Schwefeldioxid (SO₂) wurde in den Reaktionsansatz eingeleitet. Anschließend sollte die erhoffte Sulfinsäure mit Hilfe von Sulfurylchlorid in das Sulfonsäurechlorid überführt werden. In den ersten Experimenten wurde Schwefeldioxid noch aus Natriumsulfit und Schwefelsäure (75 %) hergestellt. Diese Reaktion war heftig und schlecht kontrollierbar. Damit die zugeführte Menge an SO₂ länger im System bleibt bzw. der Reaktion zur Verfügung steht, wurde Schwefeldioxid direkt aus einer Gasflasche in den Reaktionsansatz eingeleitet. Zusätzlich wird die Reaktion in der Kälte (-40 °C) durchgeführt, denn dabei verbessert sich die Löslichkeit von SO₂ im Lösungsmittel. Diese Reaktion wurde mehrmals durchgeführt; aus den vorangegangenen Versuchen stellte sich Benzol als geeignetes Lösungsmittel heraus. Die Synthesen wurden bei unterschiedlichen Temperaturen und Reaktionsdauern durchgeführt, hierbei wurde das Lösungsmittel entsprechend angepasst. Die veränderten Bedingungen führten aber nicht zur Zielverbindung **16**.

d. REAKTION AM TRIARYLMETHAN (20)

Die gewünschten Verbindungen **16** und **19** konnten also mit beiden Methoden nicht hergestellt werden. Daraufhin wurde nach einer weiteren Möglichkeit gesucht. Da das Trimer **9** unter Einfluss von Säuren unkontrolliert bzw. unerwartet reagiert, sollte durch eine Reduktion der Hydroxylfunktion von **9** die Nebenreaktion zu **17** und **18** verhindert werden. Nach Filler et al.^[50] wurde das Triarylmethanol **9** mit Phosphortribromid zum entsprechenden Triarylmethan **20** reduziert (Abbildung 25).

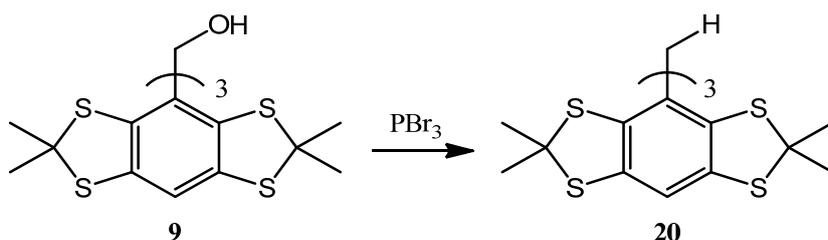


Abbildung 25: Reduktion des Trimer **9** zu **20**

Die mit dem Alkohol **9** durchgeführten Sulfonierungsversuche wurden mit dem nun nicht mehr säureempfindlichen Triarylmethan **20** wiederholt (Abbildung 26).

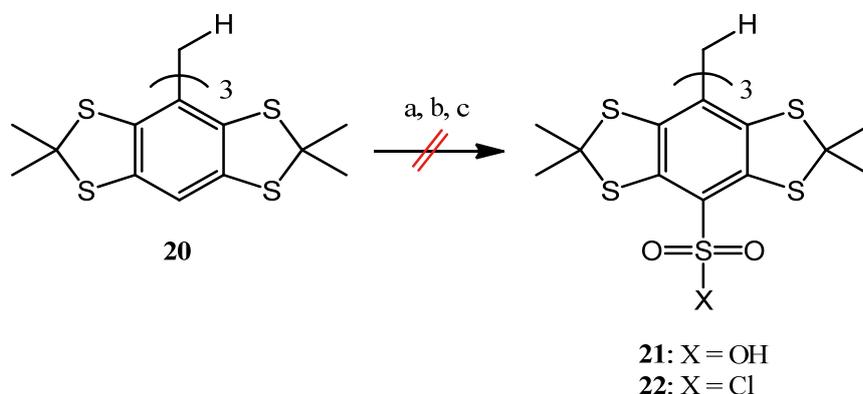


Abbildung 26: Sulfonierungsreaktion von **20**
Reagenzien: (a) ClSO_3H ; (b) $\text{SO}_2/\text{SO}_2\text{Cl}_2$; (c) $\text{ClSO}_3\text{Si}(\text{CH}_3)_3$

Die Reaktionsbedingungen zur Bildung von **21** bzw. **22** wurden in gleicher Weise wie für **16** bzw. **19** gewählt (vgl. vorhergehende Abschnitte a, b, c), zusätzlich wurde ein Ansatz getestet, in dem ClSO_3H sowohl als Reagenz, als auch als Lösungsmittel eingesetzt wurde. Diese Experimente führten ebenfalls nicht zum sulfonierten TAM (**21** bzw. **22**).

3.2.4 SYNTHESE VON OXO63

Die Fa. Nycomed entwickelte neben dem bereits beschriebenen Radikal **13** noch zwei weitere Tetrathiatriarylmethyl-Radikale für diagnostische Verwendungen: OXO63 und OXO31 (Abbildung 27).

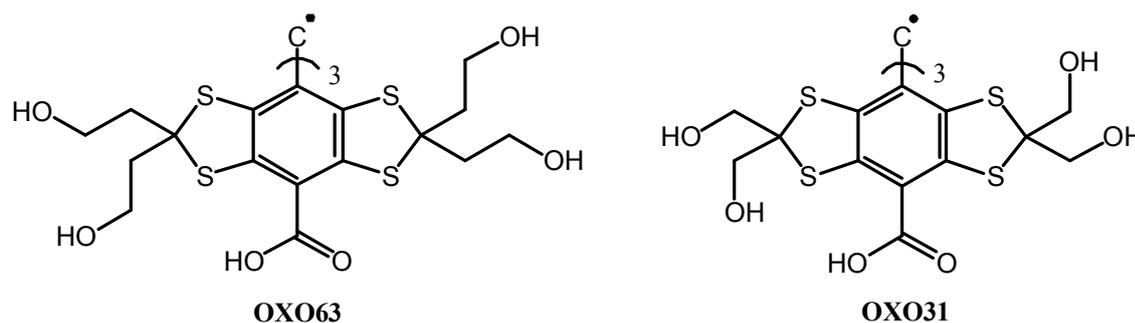


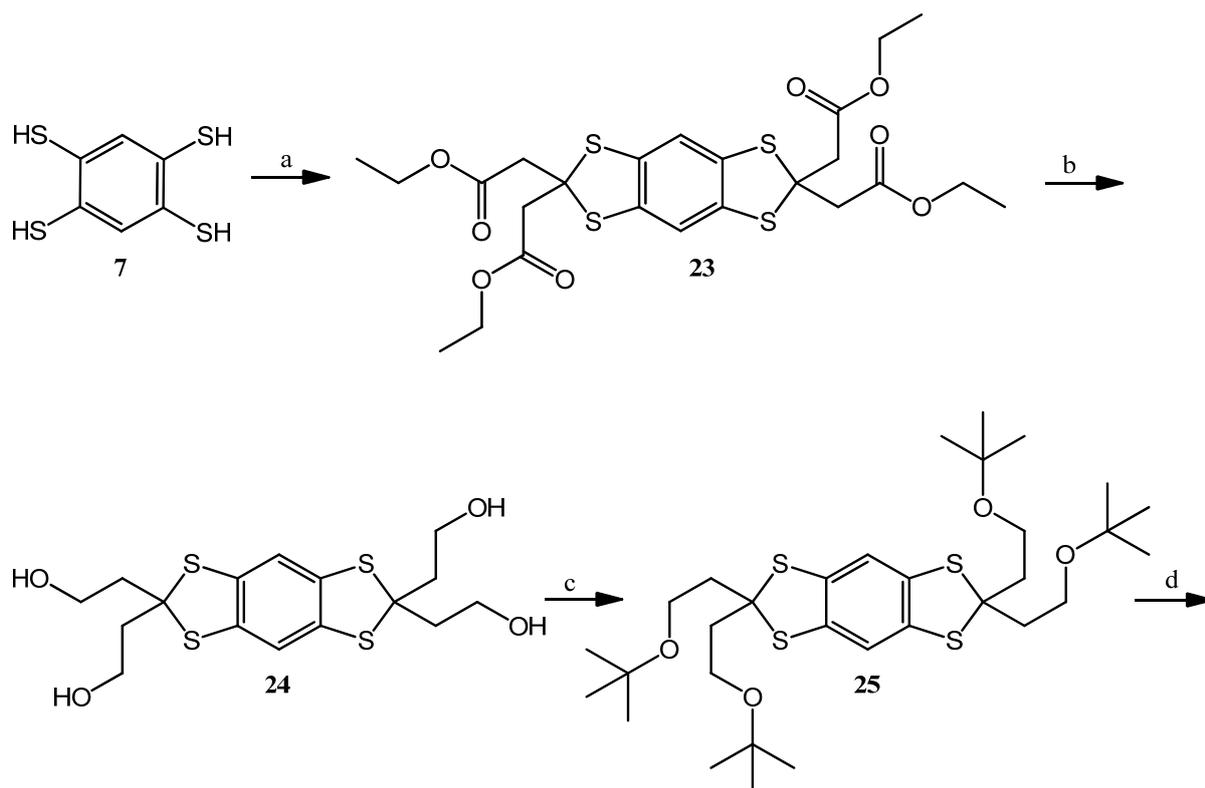
Abbildung 27: chemische Struktur der Tetrathiatriarylmethyl-Radikale OXO63 und OXO31

Die bisher genannten Tetrathiatriarylmethyl-Radikale (**13**, OXO63 und OXO31) unterscheiden sich strukturell nur durch die Seitenketten des Thioketalteils. OXO31 weist im Gegensatz zu **13** Hydroxymethylen- statt Methylgruppen auf. In der Struktur des OXO63 wird die Seitenkette noch um eine Methyleneinheit erweitert. Diese Radikale sind kommerziell nicht erhältlich. Die Firma GE Healthcare stellt Arbeitsgruppen, welche sich mit den Eigenschaften und Einsatzmöglichkeiten der TAM-Radikale als Spinsonden beschäftigen, eventuell OXO63 als Schenkung in sehr kleiner Menge und mit genauer Festlegung der erlaubten

Untersuchungen zur Verfügung. In der Literatur findet man neben dem Patent^[50] keine Synthesevorschriften von OXO63 bzw. OXO31. Die Charakterisierung dieser Substanzen ist demzufolge nur spärlich.^[51-53]

Der Gedanke, TAM-Radikale durch Sulfonsäuregruppen eine verbesserte Hydrophile zu verleihen (siehe Kapitel 3.2.3), konnte synthetisch nicht realisiert werden. Daraufhin wurde versucht, OXO63 nach der Patentvorschrift von Nycomed^[50] zu synthetisieren und die Teilschritte zu optimieren. OXO63 schien gegenüber OXO31 der geeignetere Kandidat zu sein, da nicht sicher ausgeschlossen werden kann, dass OXO31 in vivo in den notwendigen Mengen toxisch wirkt (persönliche Mitteilung Prof. Dr. Fuminori Hyodo, Kyushu Universität, Fukuoka, Japan). In Abbildung 28 wird der Syntheseweg aus dem Patent US 6013810 dargestellt. Wie bereits bei der „Finland-Synthese“ erfahren, sollte die Synthese von OXO63 ebenfalls eine große Herausforderung darstellen. Im Patent^[50] werden wichtige Details ausgelassen oder nur ansatzweise erwähnt.

Ausgangsmaterial der Synthese ist erneut 1,2,4,5-Tetrathiobenzol (**7**). In Kapitel 2.2.1 wurde erläutert, warum Verbindung **7** für die Synthesen nicht in Frage kommt. Daher wurde **2a** als Ausgangsmaterial verwendet. Dementsprechend wurde bei der Synthese des OXO63 ebenfalls der erste Reaktionsschritt abgewandelt und optimiert, siehe dazu Kapitel 3.2.5.



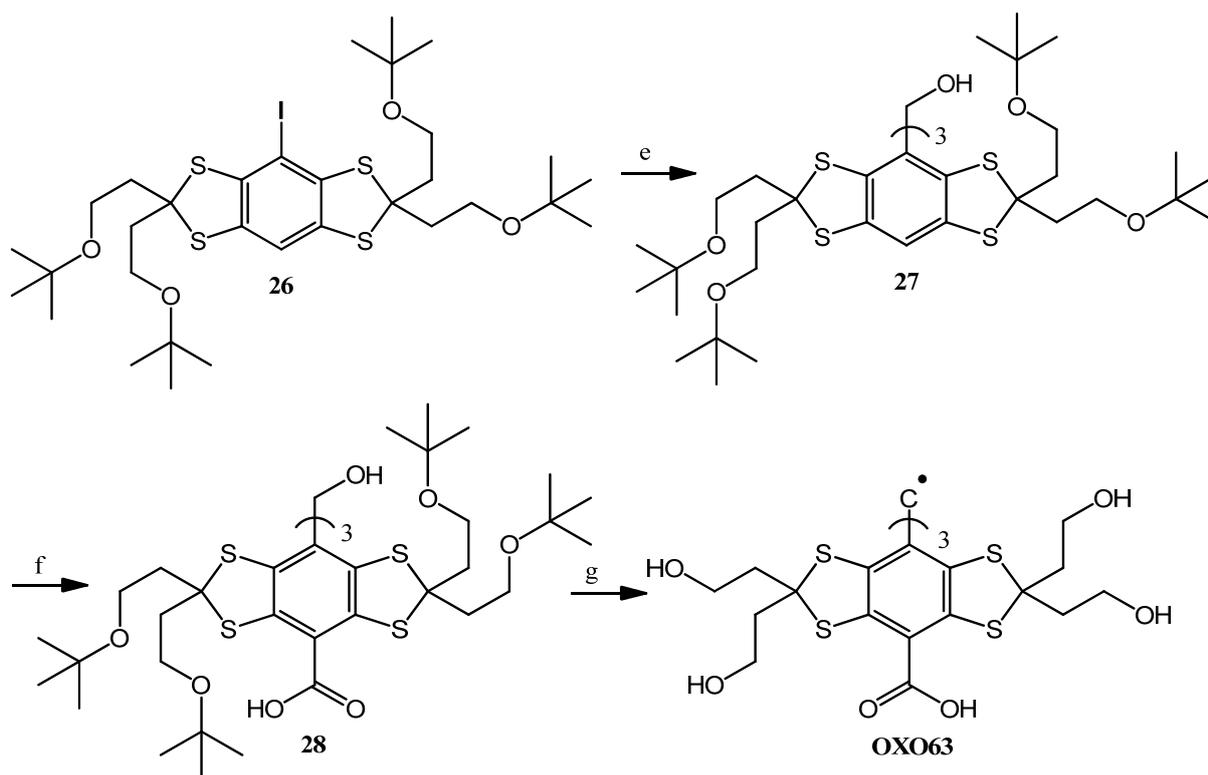


Abbildung 28: Synthese von OXO63 nach Patent US 6013810^[51]

Reagenzien und Bedingungen: (a) Diethyl-1,3-acetondicarboxylat, DCM, HBF_4 54 % in Et_2O , Na_2CO_3 ; (b) Et_2O , LiAlH_4 ; (c) THF, Isobuten, Trifluormethansulfonsäure; (d) THF, *n*-BuLi 2.5 M in Hexan, Iod; (e) Et_2O , *n*-BuLi 2.5 M in Hexan (1 Äq.), Diethylcarbonat (0.3 Äq.); (f) TMEDA, *n*-BuLi 2.5 M in Hexan, Überschuss CO_2 ; (g) Acetonitril, Trifluormethansulfonsäure, DCM, ZnCl_2 , präparative HPLC

3.2.5 OPTIMIERUNG DES SYNTHESWEGS VON OXO63

Im Folgenden werden die Teilschritte der Synthese von OXO63 genau diskutiert, insbesondere im Hinblick auf die Gründe und Ergebnisse von Veränderungen gegenüber dem Patent US 6013810 der Fa. Nycomed.

Als Ausgangsmaterial wird Verbindung **2a** eingesetzt, welches in Toluol gelöst und mit Dimethyl-1,3-acetondicarboxylat und Tetrafluorborsäure (54 % als Diethyletherkomplex) versetzt und bei Raumtemperatur über Nacht mit hoher Drehzahl gerührt wird (Abbildung 29). Das Reaktionsende ist sehr gut an der Farbveränderung von farblos nach gelb-orange zu erkennen. Der entstandene Niederschlag wird abgetrennt und getrocknet. Dieser Reaktionsschritt liefert im Vergleich zum Patent 2 % mehr Ausbeute, umgeht den Einsatz des geruchsintensiven Tetrathiobenzols **7** und erleichtert durch den Einsatz von **2a** die Handhabung der Synthese (vgl. Kapitel 2.2.1).

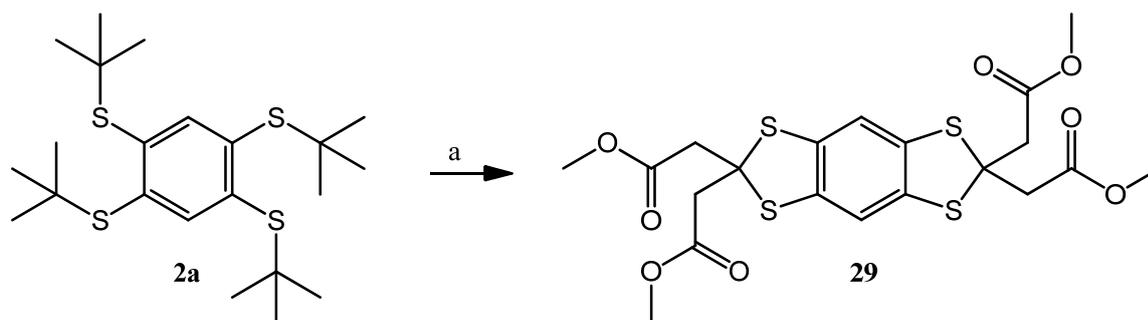


Abbildung 29: 1. Schritt der Synthese von OXO63

Reagenzien und Bedingungen: (a) Toluol, Dimethyl-1,3-acetondicarboxylat, HBF_4 54 % in Et_2O

Für den nächsten Reaktionsschritt dient Verbindung **29** als Edukt, das analog der Patentvorschrift US 6013810 mit LiAlH_4 zum Alkohol reduziert wird (Abbildung 30). Das Patent verwendet Diethylether als Lösungsmittel, jedoch wurde aufgrund der schlechten Löslichkeit von **29** in Et_2O dieses durch THF ersetzt. Im Gegensatz zum Patent kann bei der Verwendung von THF auf das Erhitzen unter Rückfluss verzichtet werden, es genügt das Rühren über Nacht bei Raumtemperatur. Der Überschuss an LiAlH_4 wird mittels Methanol zerstört. Dann wird der Ansatz mit Wasser versetzt und THF im Vakuum abgetrennt. In der zurückbleibenden wässrigen Phase fällt das Produkt **24** aus, welches abgetrennt und getrocknet wird. Die erzielte Ausbeute von 89 % entspricht der des Patents.

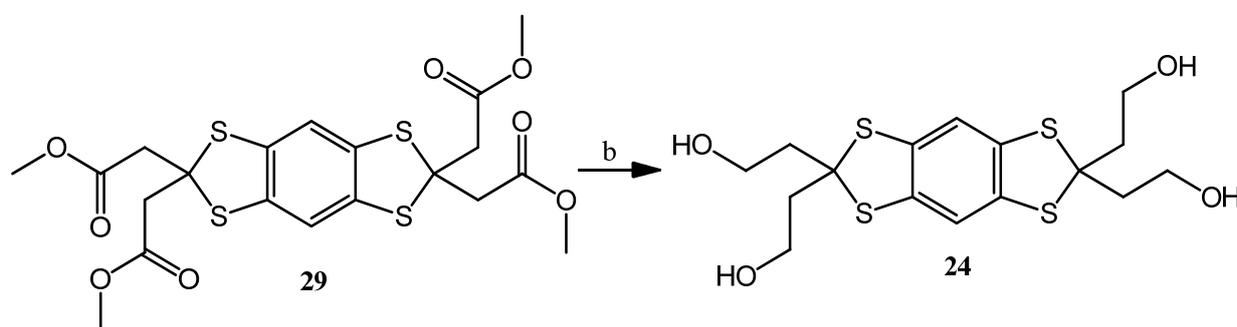


Abbildung 30: 2. Schritt der Synthese von OXO63

Reagenzien und Bedingungen: (b) THF, LiAlH_4

Die Synthese von Verbindung **25** erfolgte analog Patent US 6013810 (Abbildung 31). Das Edukt **24** wird in THF gelöst und auf -20 °C gekühlt, anschließend wird Isobuten eingeleitet, mit Trifluormethansulfonsäure versetzt und eine Stunde lang gerührt. Als Indiz für das Reaktionsende wird ein Farbumschlag nach lachsfarben benannt. Ein violetter Farbumschlag ist Anzeichen für eine Polymerisationsreaktion des Isobutens. Dies lässt den Ansatz sehr schwer aufarbeiten, denn sobald das Lösungsmittel abgetrennt ist, bleibt eine sehr zähe, viskose, schlecht lösliche Masse zurück. Das Produkt **25** hieraus abzutrennen, ist nur mit hohen Ausbeuteverlusten zu kompensieren. Das bedeutet, dass die Reaktionsdauer von einer Stunde sehr genau eingehalten werden sollte.

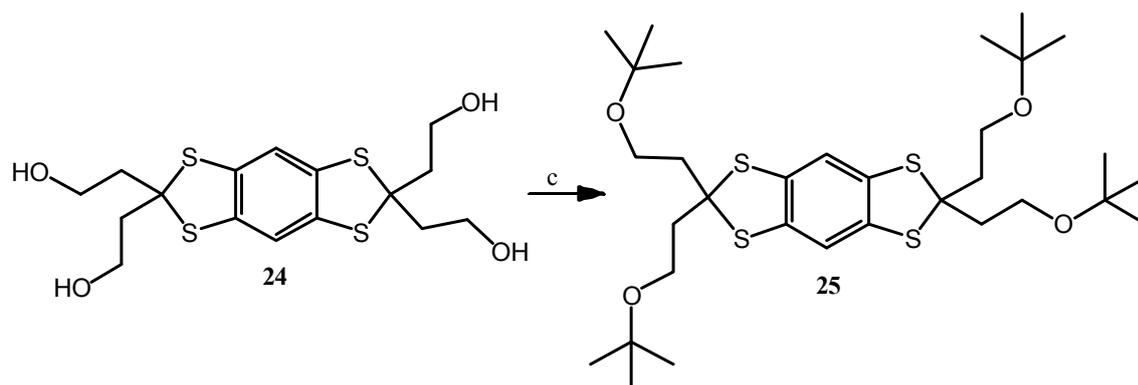


Abbildung 31: 3. Schritt der Synthese von OXO63
Reagenzien und Bedingungen: (c) THF, Isobuten, Trifluormethansulfonsäure

Für die Synthese von Verbindung **26** sind die Patentangaben nicht eindeutig. Es wird nicht beschrieben, bei welcher Temperatur die Iodzugabe erfolgt bzw. wann die Reaktion beendet ist. Aus einer Vielzahl eigenen Reihenversuchen ergab sich die folgende beste Temperatur- und Reagenzzugabe-Charakteristik: Bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde die iodhaltige THF-Lösung hinzugegeben und bis zum Erreichen der Raumtemperatur gerührt, anschließend wurde der Ansatz aufgearbeitet. Aufgrund der sehr ähnlichen R_f -Werte von Edukt und Produkt war eine Trennung nur mittels MPLC möglich, da der Gradient des Eluenten hierbei exakter gesteuert werden konnte. Zudem ist das Produkt nicht stabil und muss unter Argon und Lichtausschluss gelagert werden, sowie möglichst schnell weiter verarbeitet werden. Die Ausbeute von 50 % aus dem Patent wurde bestätigt.

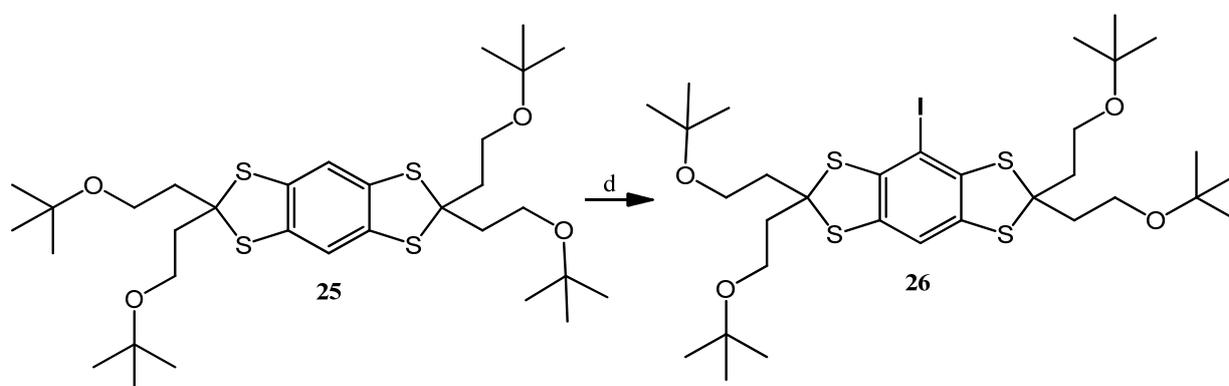


Abbildung 32: 4. Schritt der Synthese von OXO63
Reagenzien und Bedingungen: (d) THF, *n*-BuLi 2.5 M in Hexan, Iod

Als "Trimerisierungsreagenz" zur Verknüpfung der Aromaten über ein zentrales C-Atom wurde von der Fa. Nycomed Diethylcarbonat verwendet. Es konnte bereits bei der Synthese von **13** gezeigt werden, dass der Austausch von Diethylcarbonat gegen Chlorkohlensäuremethylester den Reaktionsverlauf zum Trimer begünstigt. Die vorher erfolgende Einführung eines Iodsubstituenten ist für diese Trimerisierungsreaktion, speziell zu Verbindung **27**, essentiell. Das Iodidion ist eine bessere Abgangsgruppe und erleichtert den Eintritt des Chlorkohlensäuremethylesters. Die gegenüber dem „Finland-Radikal“ (**13**, **14**) verlängerte Seitenkette erschwert den Eintritt des Chlorkohlensäuremethylesters deutlich. Vermutlich verdeckt die

Seitenkette konformativ die freie Position am Aromaten und behindert so den Eintritt des Chlorkohlensäuremethylesters. Abwandlungen der Reaktionszeiten oder Reaktionstemperaturen führten nicht reproduzierbar zum Produkt **27** (Abbildung 33). Verbindung **26** ist sehr instabil und zersetzt sich durch Iodabspaltung leicht zu Verbindung **25**. Für die Trimerisierungsreaktion ist es folglich sehr schwierig, die optimalen molaren Anteile der Reagenzien zu bestimmen.

Ebenfalls untersucht wurde die direkte Trimerisierung von **25**. Dabei erfolgte kein Umsatz; demzufolge ist die "Aktivierung" des Aromaten durch Iodierung essentiell. Auch ein Dimer, analog zu Verbindung **8** (Kapitel 3.2), wurde nicht in den Reaktionsansätzen nachgewiesen. Die verlängerte Seitenketten und damit verbundene Sperrigkeit des Moleküls **26** scheinen Trimerisierungen zu verhindern.

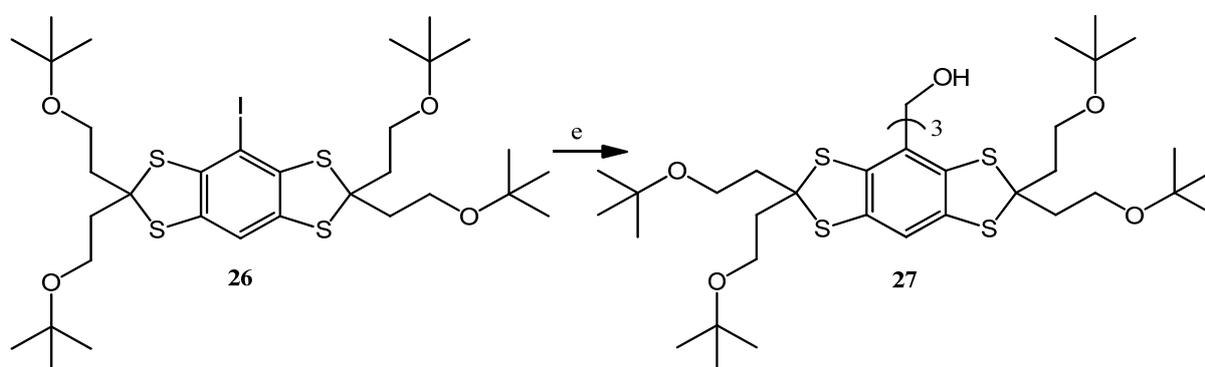


Abbildung 33: 5. Schritt der Synthese von OXO63
Reagenzien und Bedingungen: (e^-) Et_2O , $n\text{-BuLi}$ 2.5 M in Hexan, ClCOOCH_3

3.3 CHLORIERTE TRIARYLMETHAN-DERIVATE

Tris-(perchlortriphenyl)methyl-Radikale (Abbildung 34) bilden neben den Tetrathia-triarylmethyl-Derivaten eine weitere Klasse von TAM-Radikalen, die für ESR-Experimente von Interesse sind.

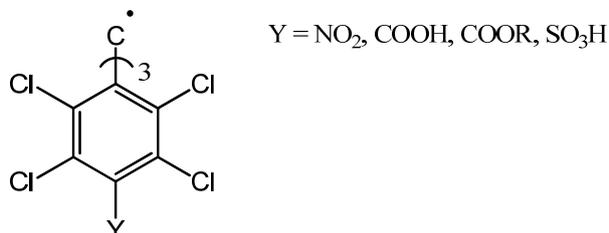


Abbildung 34: allgemeine Struktur der Tris-(2,3,5,6-tetrachlorphenyl)methyl-Radikale

Diese perchlorierten TAMs wurden wie das kommerziell erhältliche 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl-Radikal (DPPH, Abbildung 1) eingesetzt, um die antioxidativen Eigenschaften von natürlich vorkommenden bzw. synthetisch gewonnenen Polyphenolen aufzuklären bzw. zu testen.^[52-54] Die schlechte Hydrophilie macht sie unbrauchbar für die geplanten *in vivo* bzw. *in vitro* ESR-Experimente. Da jedoch keine neuen schwefelalkylierten Spinsonden erzeugt werden konnten, galt unser Interesse der Herstellung von neuen hydrophilen perchlorierten TAM-Radikalen **30-32** (Abbildung 34).^[55]

Wie in Kapitel 3 beschrieben, sind Chloratome ebenfalls ein geeigneter Ersatz für ¹H-Atome, um eine Hyperfeinaufspaltung zu unterbinden und ein schmales, nicht aufgespaltenes ESR-Signal zu erhalten. In Abbildung 35 werden mögliche chlorierte TAM-Radikale aufgeführt und im Folgenden die synthetischen Zugänge diskutiert.

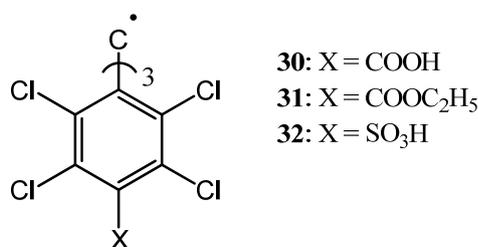


Abbildung 35: chemische Struktur polychlorierter TAM-Radikale

3.3.1 TRIS-(2,3,5,6-TETRACHLOR-4-HYDROXYCARBONYLPHENYL)METHAN

In Anlehnung an eine Synthesevorschrift von Ballester et al.^[56] wurde Tris-(2,3,5,6-tetrachlorphenyl)methan (**33**) hergestellt (Abbildung 36; Reaktionsschritt a). Anstelle des in der Literatur beschriebenen Glasdruckgefäßes wurde die Reaktion in einem Stahlautoklaven durchgeführt. Dieser gewährleistet eine höhere Sicherheit, auch aufgrund des eingebauten Druckablassventiles und einem Manometer. Dadurch kann mit höheren Temperaturen und Drücken gearbeitet werden und folglich die Reaktion besser kontrolliert bzw. gesteuert werden. Für diesen Reaktionsverlauf und dessen Ausbeute ist die Einhaltung der Reaktionstemperatur und -dauer sehr entscheidend, da neben dem Produkt (**33**) auch höher kondensierte Ne-

benprodukte, wie das feste rötlich-bräunliche 2,3,5,6-Tetrachlor- $\alpha,\alpha,\alpha',\alpha'$ -tetrakis-(2,3,5,6-tetrachlorphenyl)-*p*-xylol entstehen können. Optimierungsversuche durch Änderung der Stoffmengenverhältnisse von $1/\text{CHCl}_3/\text{AlCl}_3$ (9:1:1) auf 6:1:1 oder 3:1:3 führten zu keiner erhöhten Ausbeute. Eine Verlängerung der Reaktionszeit konnte die Ausbeute an **33** ebenfalls nicht erhöhen. Temperaturveränderungen ergaben ebenfalls keine Verbesserung der Ausbeute an **33** und führten bei Erhöhung vornehmlich zu Zersetzungsreaktionen und begünstigten die Bildung von höher kondensierten Produkten. Eine Absenkung der Temperatur war nur bedingt durchführbar, da **1** unter 140 °C erstarrt und dadurch sehr viel länger zur Reaktion benötigt. Die in der Literatur angegebene Ausbeute (22 %) konnte mit 19 % bestätigt werden.

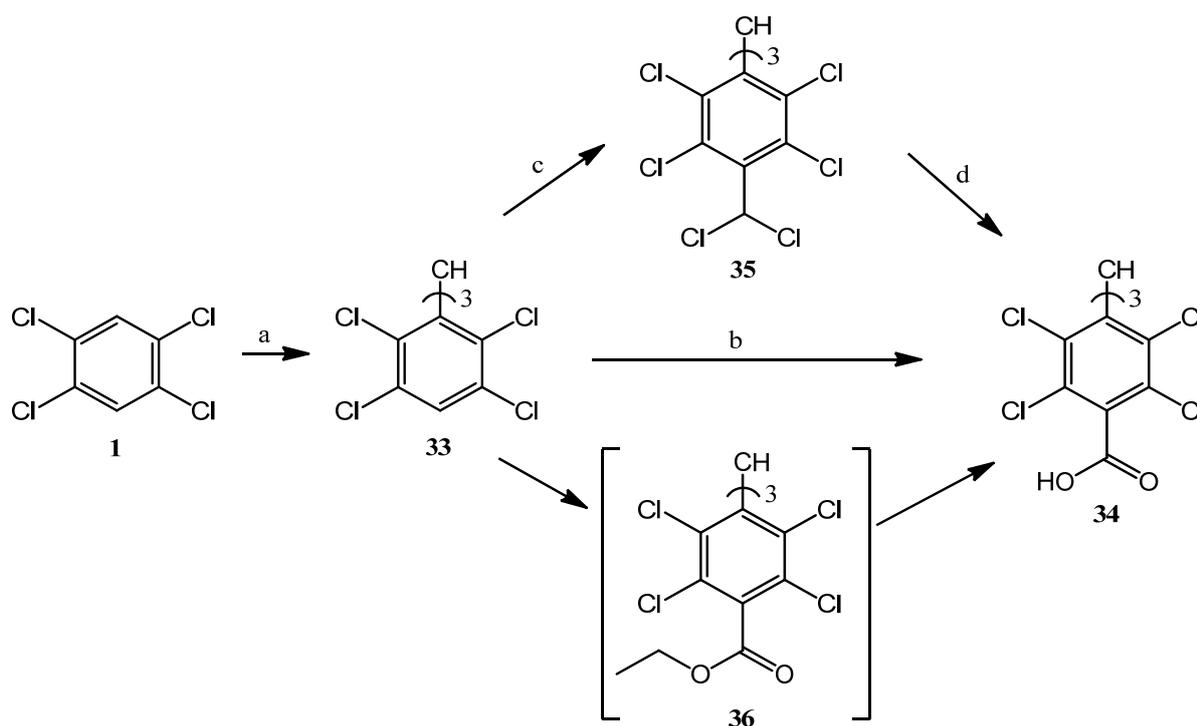


Abbildung 36: Darstellung von Tris-(2,3,5,6-tetrachlor-4-hydroxycarbonylphenyl)methan (**34**)

Reagenzien und Bedingungen: (a) $\text{CHCl}_3/\text{AlCl}_3$; (b) THF, *n*-BuLi 2.5 M in Hexan, CO_2 ; (c) $\text{CHCl}_3/\text{AlCl}_3$; (d) Oleum (20 %)

Nun sollte zunächst auf direktem Weg aus **33** (Abbildung 36; Reaktionsschritt b) das Tricarbonsäure-TAM **34** hergestellt werden. Hierfür wurde zunächst die Synthesevorschrift aus dem Patent WO 9112024^[7] herangezogen. Eine direkte Einführung der Carbonsäuregruppe mittels festem Kohlenstoffdioxid führte nur zum einfach substituierten Carbonsäure-Derivat (**34a**) von **33**.

Ein alternativer Weg wurde über Tris-(2,3,5,6-tetrachlor-4-dichlormethylphenyl)methan (**35**) gewählt (Abbildung 36, Reaktionsschritt c und d), die Maspoeh et al.^[57] beschreiben. Dabei wird in einer Zweistufensynthese **33** mit CHCl_3 und AlCl_3 (Reaktionsschritt c) zum Zwischenprodukt **35** umgesetzt, welches im Anschluss mit 20 %igem Oleum (Reaktionsschritt d) versetzt und 12 h lang auf 150 °C erhitzt wird. Die Zwischenstufe **35** konnte nicht isoliert bzw. nachgewiesen werden. Auf diesem Syntheseweg war die Herstellung von **34** ebenfalls nicht möglich.

Ein weiterer Versuch zur Darstellung von **34** war über die Zwischenstufe des Tris-(2,3,5,6-tetrachlor-4-ethoxycarbonylphenyl)methans (**36**) nach der Vorschrift von Dang et al.^[58], welches im Anschluss durch Spaltung des Esters zu **34** umgesetzt wurde. Diese Experimente werden in einer anderen Dissertation unserer Arbeitsgruppe beschrieben.^[59]

3.3.2 TRIS-(2,3,5,6-TETRACHLOR-4-CHLORSULFONYLPHENYL)METHAN

Die Wasserlöslichkeit, insbesondere der perchlorierten TAM-Derivate sollte durch Einführung von Sulfonsäuregruppen zu den entsprechenden Trisulfonsäure- bzw. Trichlor-sulfonsäure-TAMs verbessert werden. Über die Trisulfonsäure- bzw. Tricarbonsäuregruppen sollen für zukünftige ESR-Imaging-Experimente die TAM-Derivate mit Hydroxyethylstärke (HES) verknüpft werden (siehe Kapitel 3.6). Mit Blick auf die spätere Veresterung mit HES wurde zuerst eine direkte Chlorsulfonierung versucht (Abbildung 37; Reaktionsschritt a); denn die anschließende Veresterung eines Sulfonsäurechlorides ist leichter durchführbar als mit einer nicht aktivierten Sulfonsäure. Die direkte Umsetzung von **33** mit Chlorsulfonsäure wurde entsprechend der in Kapitel 3.1.3a beschriebenen Methode durchgeführt. Das gewünschte Produkt **37** konnte so nicht erhalten werden.

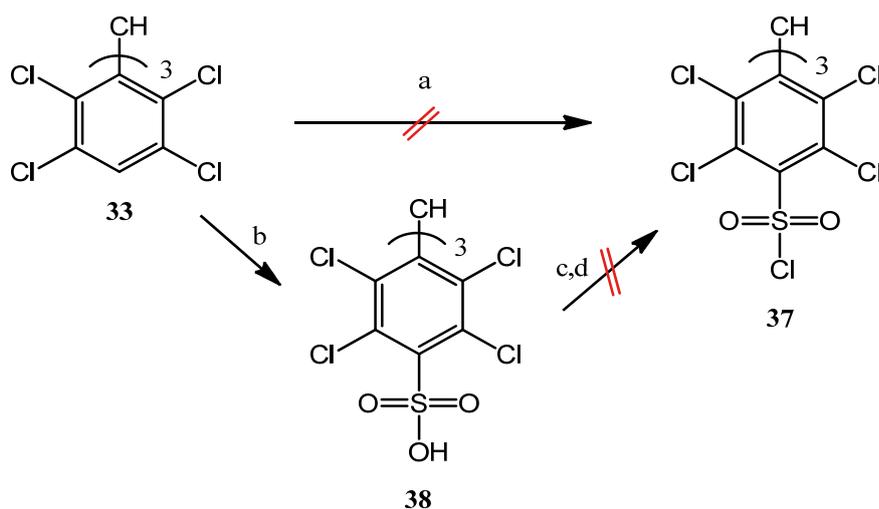


Abbildung 37: Darstellung von Tris-(2,3,5,6-tetrachlor-4-chlorsulfonylphenyl)methan (**37**)
Reagenzien: (a) ClSO_3H ; (b) Oleum (60 %); (c) PCl_5 ; (d) SOCl_2 ^[49]

Chivers et al.^[60] diskutieren in dieser Veröffentlichung, warum bei der Chlorsulfonierung mit Tetra- bzw. Pentachlorbenzol unterschiedliche substituierte Produkte zu erwarten sind. Man erwartet, dass Pentachlorbenzol bei elektrophilen Substitutionen am Aromaten weniger reaktiv ist als Tetrachlorbenzol, da ein zusätzliches Chloratom eigentlich zu einer weiteren Desaktivierung des aromatischen Ringes führt. Der unerwartete Anstieg der Reaktivität von Pentachlorbenzol im Vergleich zu Tetrachlorbenzol ist vermutlich durch die Nichtplanarität aufgrund der fünf sterisch anspruchsvollen Substituenten begründet. Zum anderen diskutieren sie, dass Tetrachlorbenzol relativ unreaktiv gegenüber einer elektrophilen Substitution ist und sich eher über einen radikalischen Mechanismus zu Pentachlorbenzol umsetzt. Folgender Reaktionsverlauf wird dafür verantwortlich gemacht (Abbildung 38):

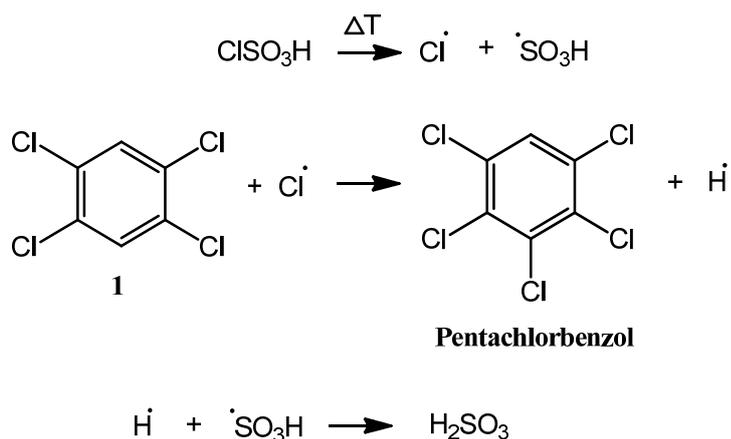


Abbildung 38: hypothetische radikalische Chlorierung von 1,2,4,5 Tetrachlorbenzol (**1**)^[61,62]

Auch aus Ausführungen von Cremlyn und Cronje^[61] geht hervor, dass die Ausbeute an Sulfonsäurechloriden stark von den Reaktionsbedingungen und vom eingesetzten halogenierten Aromat abhängt. Aus diesen Betrachtungen ist ersichtlich, dass eine direkte Chlorsulfonierung nicht automatisch auf **33** übertragbar ist.

Es wurden verschiedene Versuchsvariationen durchgeführt: (a) ein zehnfacher Überschuss an Chlorsulfonsäure, (b) die Chlorsulfonsäure wurde selbst als Lösungsmittel und Reaktant verwendet, (c) Veränderungen von Temperatur und Dauer der Reaktion. Keine Variation führte zum gewünschten Produkt (**37**).

Nachdem eine direkte Einführung der Chlorsulfonsäure nicht erfolgreich war, wurde die Trisulfonsäure (**38**) mit Oleum und fünf tägigem Erhitzen unter Rückfluss nach Mesa et al.^[55] hergestellt (Abbildung 37, Reaktionsschritt b). Hierbei wurde beobachtet, dass die Konzentration des Oleums den entscheidenden Faktor darstellt. Wird die Konzentration des Oleums auf etwa 60 % reduziert, kann dadurch die Siedetemperatur deutlich gesteigert werden, was die Ausbeute an Tris-(2,3,5,6-tetrachlor-4-hydroxysulfonylphenyl)methan (**38**) erhöht und reproduzierbar zum gewünschten Produkt führt, was bei der Literaturvorschrift auch gemäß Auskunft der Autoren nicht der Fall war. Die Trisulfonsäure sollte nach einer Synthesevorschrift von Chivers et al.^[60] (Abbildung 37, Reaktionsschritt c) mit Phosphor-pentachlorid zum Tris-(2,3,5,6-tetrachlor-4-chlorsulfonylphenyl)methan (**37**) umgesetzt werden.^[63,64] Diese Umsetzung wurde auch mit Thionylchlorid (Abbildung 37, Reaktionsschritt d)^[65] versucht. NMR-spektroskopische Untersuchungen zeigten keinen Unterschied zwischen Sulfonsäure und Sulfonsäurechlorid. Die Unterscheidung der Verbindungen **37** und **38** erfolgt mittels IR-Spektroskopie. Aufgrund der noch vorhandenen O-H-Streckschwingung der Sulfonsäure bei der Wellenzahl 3400 cm⁻¹ ist das Produkt **37** eindeutig auszuschließen. Beide beschriebenen Wege konnten das Sulfonsäurechlorid nicht herstellen, somit stand für weitere Experimente nur das Sulfonsäure-TAM **38** zur Verfügung.

3.3.3 TRIS-(2,3,5,6-TETRACHLOR-4-HYDROXYSULFONYLPHENYL)METHYL-RADIKAL

Die Darstellung des Radikals **32** (Abbildung 39) erfolgte nach der Vorschrift von Me-
sa et al.^[55] Tris-(2,3,5,6-tetrachlor-4-hydroxysulfonylphenyl)methan (**38**) wurde in einem
Wasser/THF Gemisch gelöst. Durch Zugabe von KOH färbte sich die Lösung über rosa nach
tiefviolett. Der Reaktionsansatz wurde mit 2,3,5,6-Tetrachlor-1,4-benzochinon (Chloranil)
versetzt. Das erhaltene Radikal-Anion wurde aufgearbeitet, getrocknet und mit einem sul-
fonsauren Kationenaustauscher (Amberlit IR 120) in das Sulfonsäure-Radikal überführt und
anschließend säulenchromatographisch gereinigt.

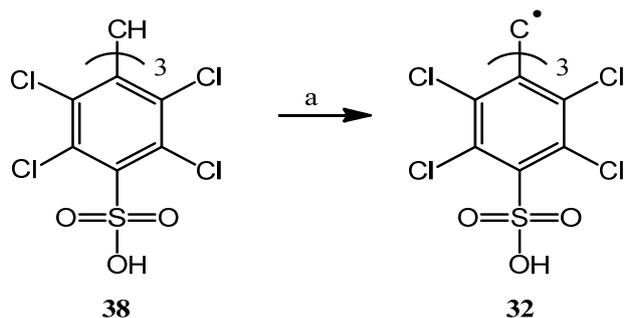


Abbildung 39: Bildung des Tris-(2,3,5,6-tetrachlor-4-hydroxysulfonylphenyl)methyl-Radikals (**32**)
Reagenzien und Bedingungen: (a) H₂O/THF, KOH, Chloranil

3.4 NICHT ALKYLIERTE TRIARYLMETHAN-DERIVATE

Die im Folgenden beschriebenen Substanzen dienen in erster Linie der Bereitstellung von Triarylmethan-Strukturen mit Carbon- bzw. Sulfonsäuregruppen. Diese Modellsubstanzen dienen der Etablierung eines Syntheseweges, wie Hydroxyethylstärke (HES) an entsprechende Radikale mit Carbonsäure- und/oder Sulfonsäuregruppen geknüpft werden kann.

Die von der Arbeitsgruppe Prof. Mäder der MLU Halle entwickelte Methode zur Verknüpfung von Polymeren mit Nitroxide-Radikalen diente als Grundlage für die Verknüpfungsreaktionen mit den TAM-Radikalen und sollte für diese optimiert werden. Der Vorteil der Verknüpfung mit HES begründet sich in ihrer Eigenschaft, sehr gut Hydrogele zu bilden, welche für weiterführende Experimente (z.B. ESR-Imaging) und technologische Anwendungen einsetzbar sind. Es ist erwiesen, dass HES nicht toxisch, nicht immunogen, biologisch abbaubar und mit tierischem Gewebe biokompatibel ist, demzufolge unschädlich für den Organismus.

3.4.1 TRIPHENYLMETHAN-4,4',4''-TRICARBONSÄURE

Zur Einführung der Carbonsäure zur Tricarbonsäure **41** wurde mittels Friedel-Crafts-Acylierung nach einer sehr alten Vorschrift von C. Liebermann^[66,67] gearbeitet (Abbildung 40). Das von Liebermann verwendete Lösungsmittel Kohlenstoffdisulfid wurde gegen das nicht reproduktionstoxische, nicht brennbare Dichlormethan ausgetauscht.

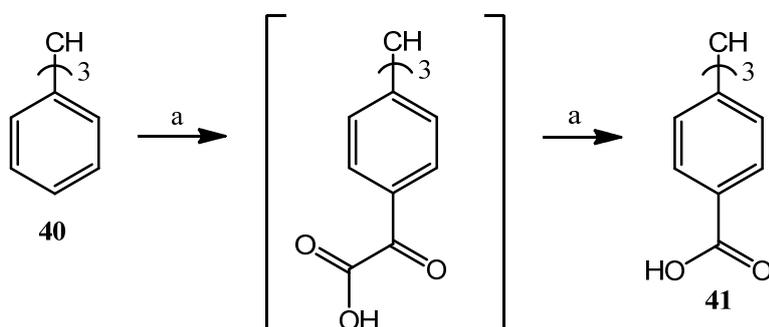
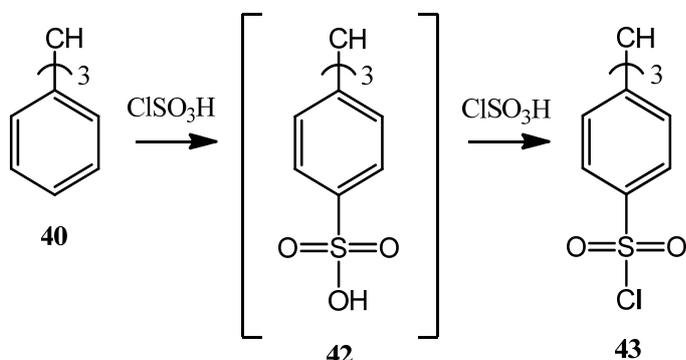


Abbildung 40: Friedel-Crafts-Acylierung von Triphenylmethan (**40**)
Reagenzien und Bedingungen: (a) DCM, C₂O₂Cl₂, AlCl₃, HCl

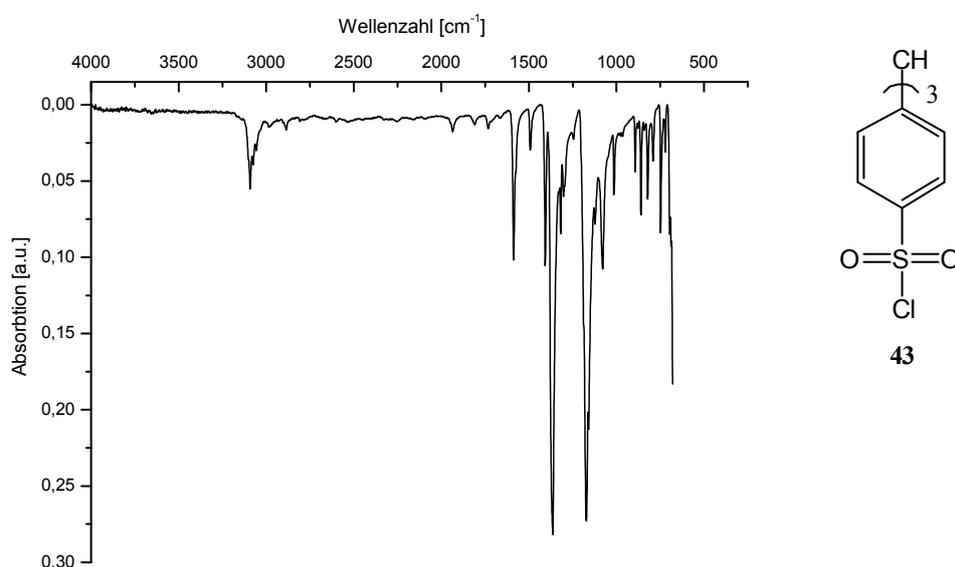
Substanz **40** wird in DCM gelöst und das Oxalylchlorid unter Eiskühlung in zwei Teilmengen hinzugegeben. Die Bildung des typischen Katalysator-Produkt-Komplexes war an der tiefen Orangefärbung zu erkennen. Ein Zwischenprodukt ist die unbeständige Ketocarbonsäure (Abbildung 40), die sich durch Absenken des pH-Wertes auf 1 infolge von Decarboxylierung in die freie Carbonsäure (**41**) umsetzt. Die direkte Reindarstellung der Tricarbonsäure war nicht möglich, da ein Produktgemisch aus Mono-, Di- und Tricarbonsäure sowie unverbrauchtes Edukt vorlag. Eine erneute Umsetzung des Produktgemisches mit Oxalylchlorid und AlCl₃ mit anschließender Umkristallisation aus Nitromethan ermöglichte die Darstellung der Tricarbonsäure in sehr geringer Ausbeute. Die Ausbeute konnte durch angepasste Stoffmengenkonzentrationen von **40**:C₂O₂Cl₂:AlCl₃ (1:3:6) auf 11 % gesteigert werden.

3.4.2 TRIPHENYLMETHAN-4,4',4''-TRISULFONSÄURECHLORID

Neben dem Carbonsäure-Derivat sollte auch das Sulfonsäure-Derivat hergestellt werden. Analog zu den Arbeiten von Hoffart et al., der Tetraphenyladamantan^[45] bzw. Sarma und Nangi, die Tetraphenylmethan^[68] mit Chlorsulfonsäure umsetzen, konnte das Trisulfonsäurechlorid (**43**) hergestellt werden.

Abbildung 41: Darstellung des Trisulfonsäurechlorids **43**

Ein Vorteil des Sulfonsäurechlorids **43** ist die aktivierte Sulfonsäuregruppe, welche die Verknüpfung mit HES und anderen Nukleophilen erleichtert. Elementaranalyse und IR (fehlende OH Schwingung bei $\sim 3000\text{ cm}^{-1}$) bestätigen die Existenz des Sulfonsäurechlorids **43** (Abbildung 42).

Abbildung 42: IR-Spektrum von **43**

Somit standen zwei TAM-Gerüste (**41**, **43**) für die Verknüpfungsexperimente mit HES zur Verfügung. Die Verknüpfungsmethode sollte anschließend auf das jeweilige Radikal mit der entsprechenden funktionellen Gruppe übertragen werden.

3.5 VERKNÜPFUNGSREAKTIONEN MIT HYDROXYETHYLSTÄRKE (HES)

HES (Abbildung 43) ist ein enzymatisch hergestelltes Polymer aus Wachsmaisstärke oder aus Kartoffelstärke. Sie besteht fast ausschließlich aus Amylopektin, mit α -1,4-glycosidisch verknüpften Glucosemolekülen. Jede 17. Glucoseeinheit weist zudem eine α -1,6-glycosidisch verknüpfte Glucosekette auf. Die Glucoseeinheiten werden teilweise hydroxyethyliert, um einen zu schnellen Abbau des Amylopektins durch das endogene Enzym Amylase zu verhindern. Die Hydroxyethylierung ist notwendig, um die Wasserlöslichkeit der Stärke zu erhöhen. Bei der Herstellung müssen die Stärkekörner zunächst aufgebrochen und die Makromoleküle durch Säureeinwirkung oder enzymatischen Abbau bis zu einer geeigneten Größe (200 kDa bis 450 kDa) gespalten werden. Anschließend erfolgt in alkalischer Lösung eine Veretherung mit Ethylenoxid zur HES.

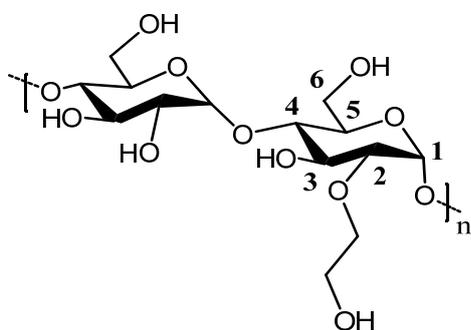


Abbildung 43: chemische Struktur von HES, deren OH-Gruppen in Position 2 teilweise hydroxyethyliert sind

HES ist biokompatibel und bioabbaubar, deshalb liegt das Haupteinsatzgebiet der HES in der Volumen-Ersatztherapie beim Menschen. HES wird routinemäßig in der Notfallmedizin zur Stabilisierung des Herzkreislaufsystems, als Blutersatz und zur Schockbehandlung eingesetzt.^[69] Aufgrund der Vielfalt der auf dem Markt befindlichen HES-Typen müssen die physikochemischen Parameter angegeben werden, da diese Einfluss auf die pharmakologische Wirkung haben. Die Kenngrößen **MS**, **DS** und **C2/C6** sind im Wesentlichen für alle Stärkederivate gebräuchlich. Die Abkürzung MS bedeutet **molarer Substitutionsgrad**, eine Kenngröße die angibt, wie viel Mol Substituent (also hier Hydroxyethylgruppen) pro Mol Glucose gebunden vorliegt. Eine etwas andere Form der Angabe des Substitutionsgrades ist der DS-Wert („**degree of substitution**“). Der DS-Wert stellt das Mengenverhältnis von substituierten Glucoseresten zur Gesamtzahl aller Glucosereste dar und kann maximal 1.0 betragen. Zum Erreichen eines Löslichkeitsoptimums liegt er meist nur bei 0.4-0.7. Bei höheren Werten steigt die Gefahr der Akkumulation aufgrund der geringen Löslichkeit.^[70]

Inhaltlich sind der MS- und DS-Wert gleich zu setzen. Für die Pharmakokinetik ist bedeutsam, an welcher Hydroxylgruppe der Glucose (Hydroxylgruppe an C-2, C-3 oder C-6) der Substituent gebunden vorliegt. Eine C2-Substitution verhindert sterisch den Angriff der Amylase. Der sogenannte C2/C6 Wert gibt das Verhältnis der partiellen Substitutionsgrade an C-2 und C-6 wieder.^[71] Über gaschromatographische Verfahren ist es möglich, DS-, MS-Werte und das Substitutionsmuster von HES auf der Monomerebene zu bestimmen.^[72] Der DS von HES lässt sich zudem auch über ¹H-NMR bestimmen.^[73]

Das Substitutionsmuster kann teilweise mit ^1H -NMR und aufwändiger, mit hochauflösender ^{13}C -NMR quantitativ erfasst werden.^[74] Im Folgenden beschränkt sich die Charakterisierung auf die Analyse von ^1H -NMR-Spektren.

Um die Derivatisierung der verwendeten HES nachvollziehen zu können, wurde vorab ein ^1H -NMR der unmodifizierten HES aufgenommen. Anhand eines Ausschnittes der HES wird die Zuordnung der Signale in folgender Abbildung dargestellt (Abbildung 44):

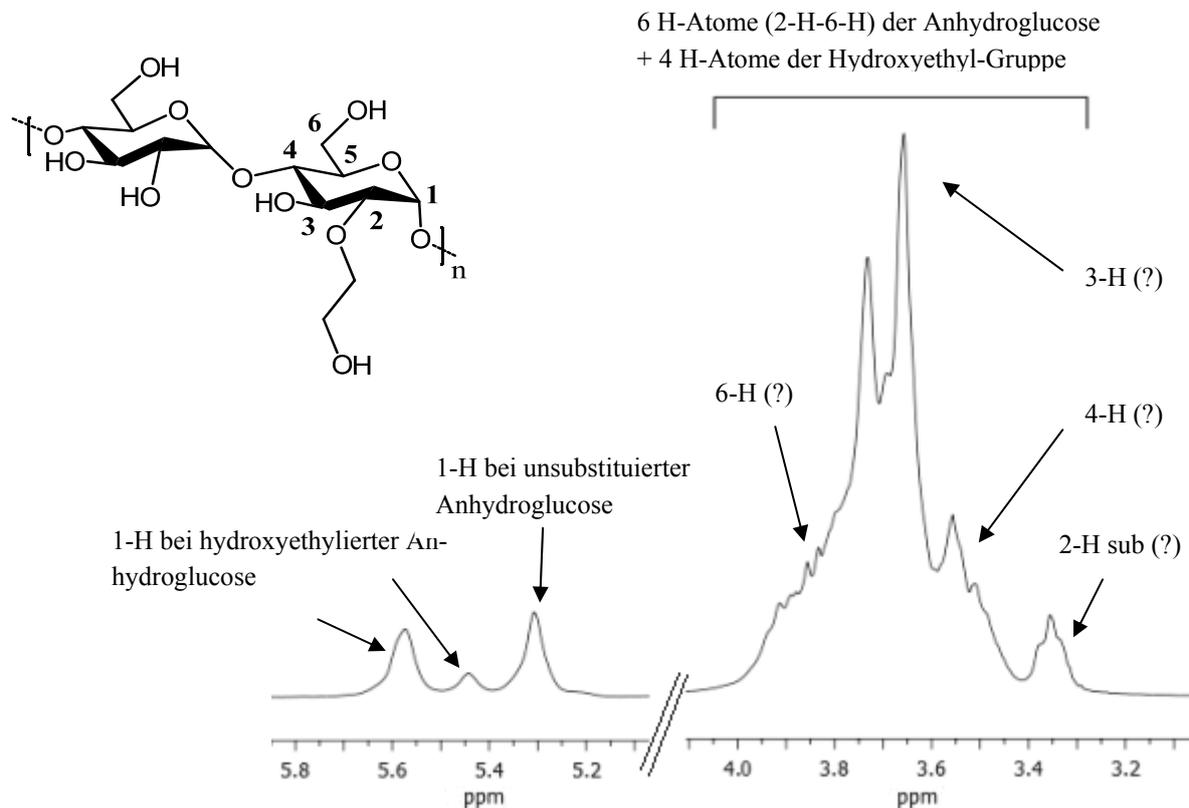


Abbildung 44: teilweise Zuordnung der ^1H -NMR-Signale der HES

Die Zuordnung der ^1H -NMR-Signale erfolgt mit den wenigen verfügbaren Referenzspektren der HES aus der Literatur.^[75,76] Demnach sind die Signale hoher chemischer Verschiebung von 5.1 bis 5.8 ppm den substituierten und unsubstituierten Atomen 1-H der Glucoseeinheiten zuzuordnen. Der Bereich zwischen 3.2 und 4.2 ppm entspricht den anderen 5 H-Atomen der Glucoseeinheiten (2-H-6-H) und 4 H-Atomen der Hydroxyethylgruppe. Von einer genaueren Zuordnung der einzelnen Peaks sehen wir und alle anderen Autoren ab, da keine Belege in Form von Isotopenaustausch oder NMR-Korrelationsexperimenten existieren.

3.5.1 MODIFIZIERUNGEN DER HYDROXYETHYLSTÄRKE

Es werden verschiedene Modifizierungen angewendet, um die HES an spezielle pharmazeutische Anforderungen anzupassen. Um es zur Verkapselung hydrophober Arzneimittel und zur Stabilisierung von Wasser/Öl Emulsionen einzusetzen, wird HES u.a. mit Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure oder Laurinsäure verestert (Abbildung 45).^[77] Dabei entstehen amphiphile Moleküle, die Mizellen bilden können und ausgeprägte oberflächenaktive Eigenschaften zeigen. Die modifizierte HES ist bei einem geringen Veresterungsgrad mit Palmitin- bzw. Laurinsäure noch wasserlöslich. Es ist möglich, hydrophobe Arzneimittel in die Mizellen einzulagern, die nachfolgend *in vitro* und *in vivo* kontrolliert freigesetzt werden. Modifizierte HES ist außerdem ein sehr guter Stabilisator für viele pharmazeutische Emulsionen, die auf Basis von Polyethylenoxid und Polypropylenoxid hergestellt werden.

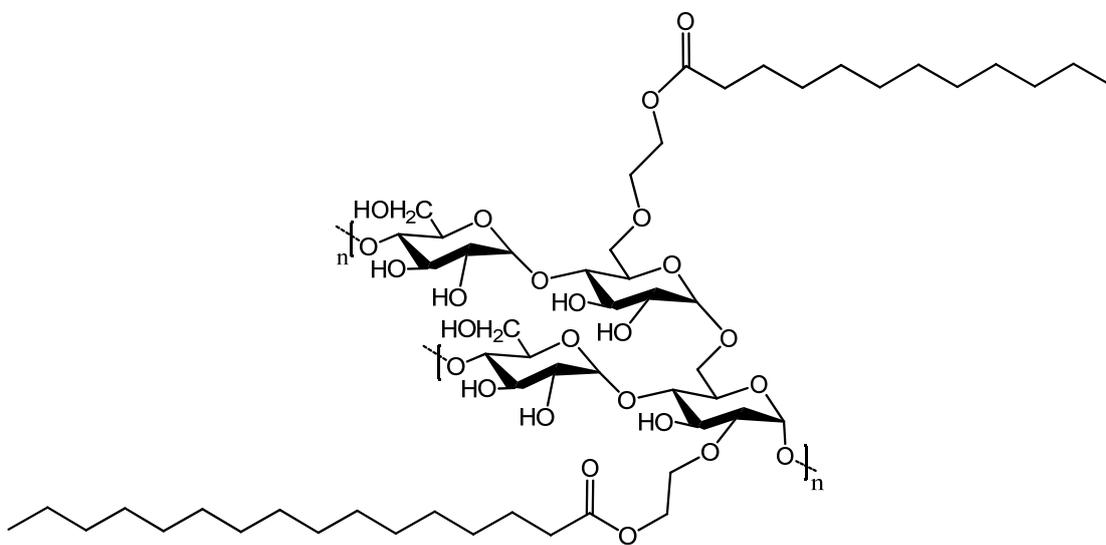


Abbildung 45: Hydroxyethylstärke mit verschiedenen Fettsäuren

Eine weitere Möglichkeit der Modifizierung ist die Verknüpfung der HES mit Polyethylenglykoldimethacrylat (PEGM, Abbildung 46), wobei das entstehende Produkt in Anwesenheit von Proteinen zu einem Hydrogel weiter vernetzt werden kann. Dabei ist das Hydrogel in der Lage, die Proteine über einen bestimmten Zeitraum an das Zielgewebe abzugeben, wo sie ihre spezifische Wirkung entfalten.

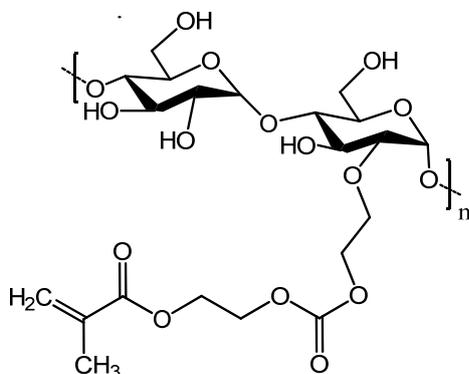
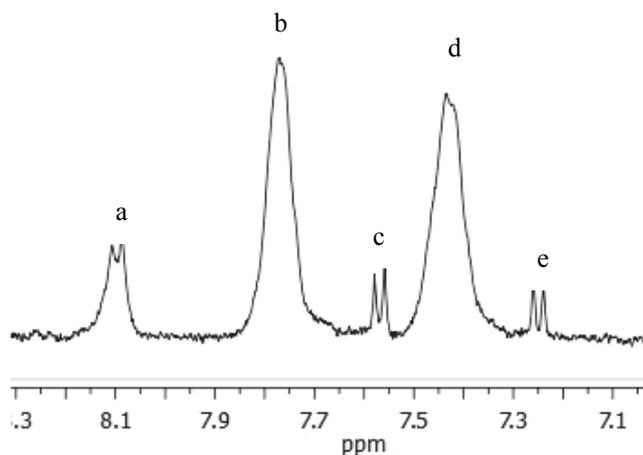


Abbildung 46: chemische Struktur der HES verknüpft mit PEGM



- a = Verunreinigung
- b = *ortho*-H-Atome der gebundenen Tosylgruppe
- c = *ortho*-H-Atome der freien *p*-Toluolsulfonsäure
- d = *meta*-H-Atome der gebundenen Tosylgruppe
- e = *meta*-H-Atome der freien *p*-Toluolsulfonsäure

Abbildung 48: Ausschnitt des ^1H -NMR Spektrums der tHES

Über die Integrale des ^1H -NMR-Spektrums wurde ein Tosylierungsgrad von etwa 2 % bestimmt. Um den Tosylierungsgrad zu steigern, wurde die Stoffmenge an Tosylchlorid und TEA um den Faktor 3 erhöht. Mit den angepassten Stoffmengenverhältnissen konnte der Tosylierungsgrad auf 4.6 % gesteigert werden.

b. MIT N-(4-TOLUOLSULFONYL)IMIDAZOL

Erstmalig wurden die OH-Gruppen der HES auch mittels Tosylimidazol (**45**) für nukleophile Substitutionen aktiviert, welches dafür nach Byun et. al.^[80] hergestellt wurde (Abbildung 49).^[81]

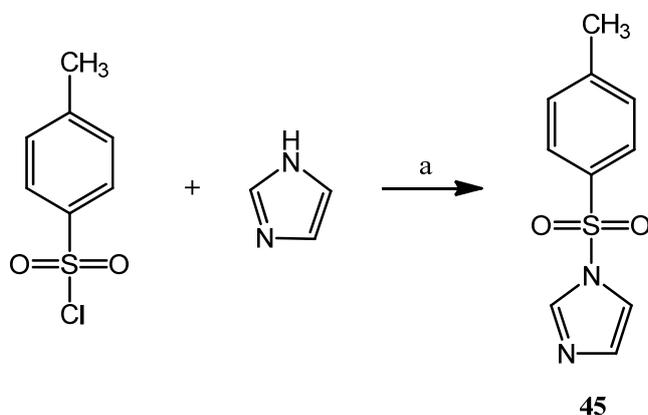


Abbildung 49: Darstellung des Tosylimidazols (**45**) nach Byun et. al.^[80]
Reagenzien und Bedingungen: (a) DCM, 4-Toluolsulfonylchlorid

Tosylimidazol (**45**) wurde mit HES verknüpft und das Produkt ^1H -NMR-spektroskopisch in D_2O untersucht, wobei die Umsetzung durch die Tosylat-Signale im ^1H -NMR bei 7.4 und 7.9 ppm bestätigt wurde. Diese bisher noch nicht beschriebene Methode der HES-Tosylierung mit Tosylimidazol konnte somit erfolgreich zur Darstellung von tHES (**44**) angewendet werden. Das Signal (a) bei 8.1 ppm wurde nicht detektiert, damit erreicht Methode b eine größere Einheitlichkeit der Tosylierung **44** und führt zu einem Tosylierungsgrad von 2.7 %.

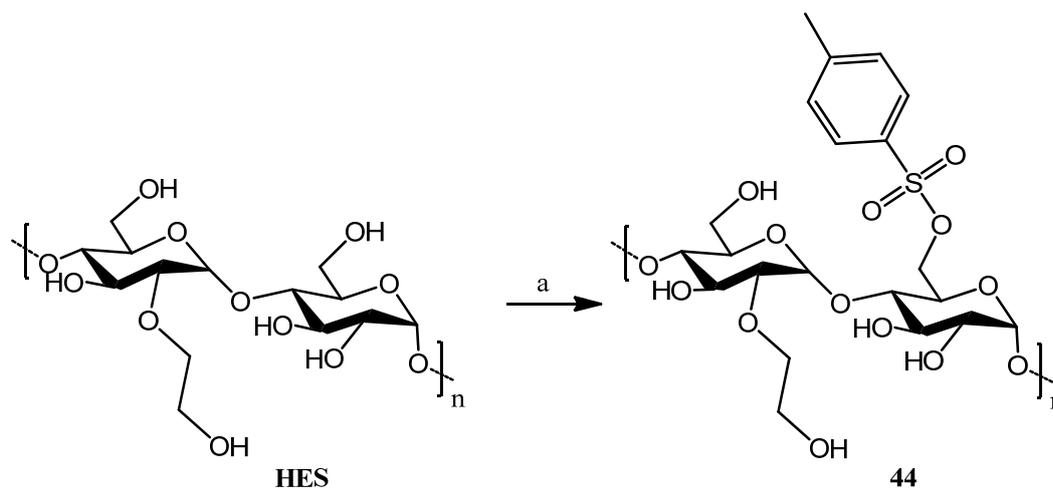


Abbildung 50: Darstellung der tosylierten HES (**44**)

Reagenzien und Bedingungen: (a) Tosylimidazol (**45**), NaOH, NH₄Cl, H₂O

3.5.2.2 HERSTELLUNG VON AMINIERTER HYDROXYETHYLSTÄRKE

Nach der Aktivierung wurde **44** ebenfalls nach einer Vorschrift von Besheer^[79] unter Verwendung von Ethylendiamin (EDA) zur aminierten HES (aHES, **46**) umgesetzt. Die Aminierung wurde NMR-spektroskopisch durch das Vorhandensein der Signale für Amin- und Ethylengruppen bestätigt. Die Einführung einer Ethylendiamingruppe dient als Linker für die Amidbindung.

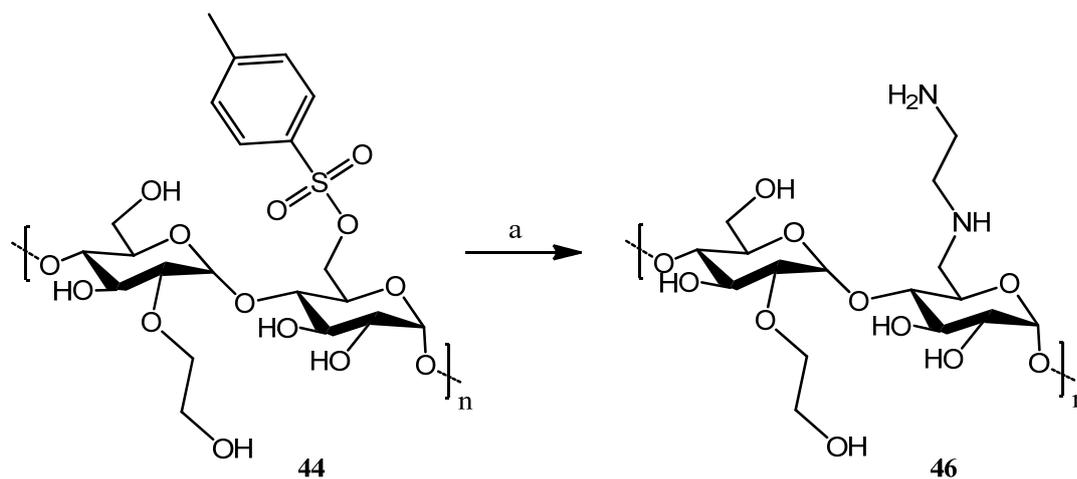


Abbildung 51: Aminierung der aktivierten HES (**44**)

Reagenzien und Bedingungen: (a) DMF, EDA, Boratpuffer

3.6 VERKNÜPFUNG VON TAM-DERIVATEN MIT AMINIERTER HES

Für die Verknüpfungsexperimente wurde die aminierte Hydroxyethylstärke (aHES) als Trägerpolymer für das Radikal **13** eingesetzt. Die in Kapitel 3.4 beschriebenen Verbindungen dienten der Etablierung einer Methode, aHES mit TAM-Carbonsäuren und Sulfonsäuren zu verknüpfen.

3.6.1 AMINIERTER HES AN TRIPHENYLMETHAN-4,4',4''-TRICARBONSÄURE

Eine direkte Umsetzung von **40** mit **46** war aufgrund der geringen Elektrophilie der Carbonsäure bei Temperaturen, die von aHES vertragen werden, nicht erfolgreich. Durch Kombination verschiedener Vorschriften wurde ein Syntheseweg erstellt (Abbildung 52), bei dem die Carbonsäure **40** zuerst mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) aktiviert (a) und im Folgeschritt (b) mit **46** unter Zuhilfenahme von Diisopropylethylamin als Hilfsbase verknüpft wurde. Das markierte Polymer (**48**) fiel als weißer Niederschlag aus, welcher im Anschluss abgetrennt und mehrere Tage mittels Dialyse gereinigt wurde.

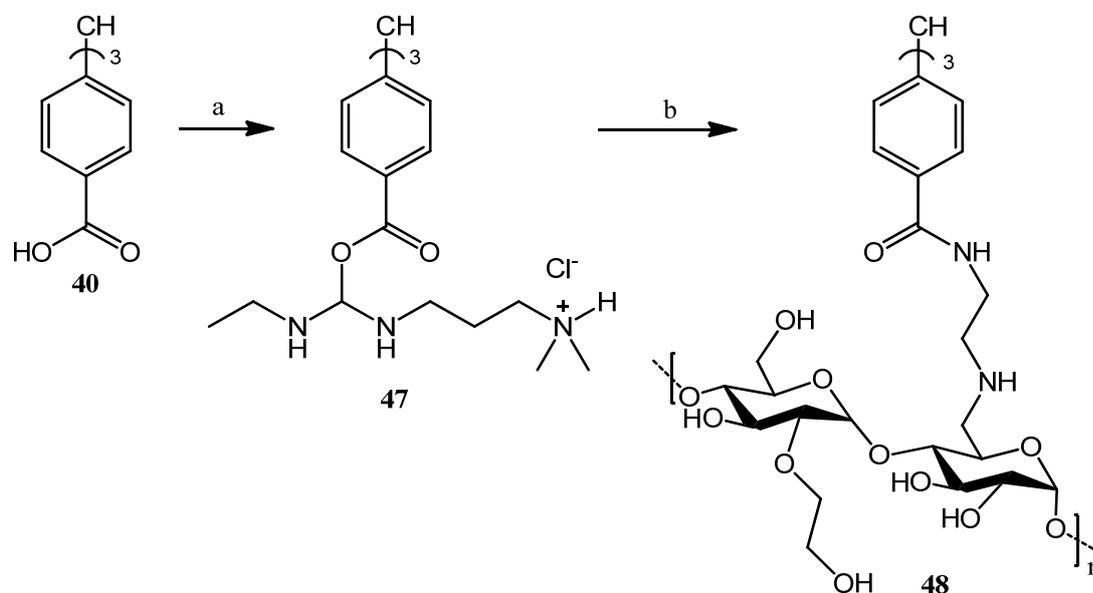


Abbildung 52: Verknüpfung von **40** mit aHES (**46**)

Reagenzien und Bedingungen: (a) EDC, Diisopropylethylamin (b) aHES (**46**)

3.6.2 AMINIERTER HES AN TRIPHENYLMETHAN-4,4',4''-TRISULFONSÄURECHLORID

Die Verknüpfung des Sulfonsäurechlorids **43** mit **46** wurde nach einer allgemeinen Arbeitsvorschrift^[82] durchgeführt (Abbildung 53). Das markierte Polymer (**49**) fiel als weißer Niederschlag aus, wurde abgetrennt und mehrere Tage mittels Dialyse gereinigt. Die maximale theoretische Beladung beträgt 6 % aufgrund des Eduktverhältnisses von 50 zu 3. Mittels der Integral-Verhältnisse der Tosyl-Signale im ¹H-NMR-Spektrum wurde ein Beladungsgrad von 4 % ermittelt.

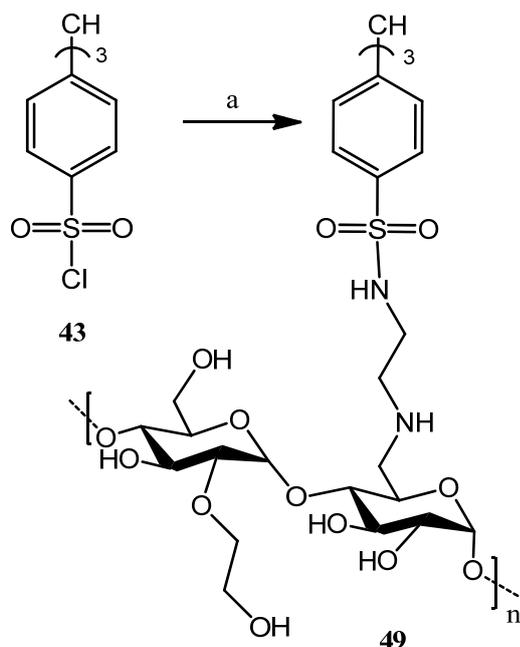


Abbildung 53: Verknüpfung von **43** mit aHES (**46**)
 Reagenzien und Bedingungen: (a) DMF, **46**

Zusammenfassung:

Die Carbonsäure- und die Sulfonsäuregruppe der TAM-Modellverbindungen **40** und **43** konnten durch diese Methode mit der aminierte HES verknüpft und Beladungsgrade von 3-4 % erreicht werden. Anschließend sollte in gleicher Weise Radikal **13** mit aHES verknüpft werden.

3.6.3 AMINIERTE HES AN RADIKAL **13**

Radikal **13** wurde nach der zuvor beschriebenen Methode (Kapitel 3.6.1) mit aHES zum markierten Polymer (**51**) verknüpft (Abbildung 54).

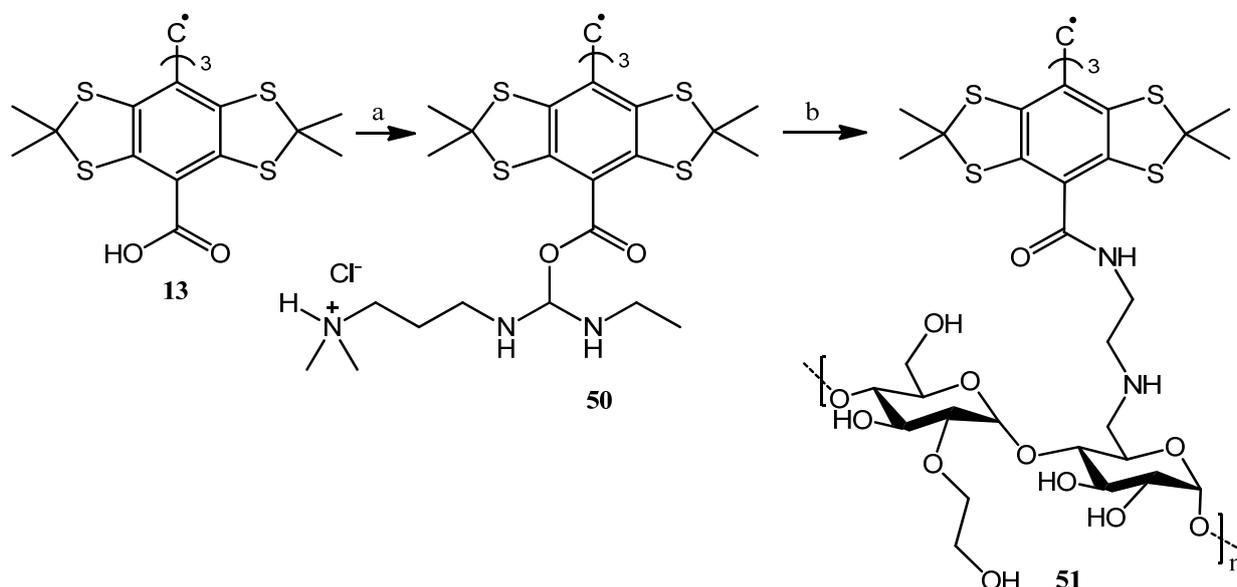


Abbildung 54: Verknüpfungsreaktion von Finland-Radikal mit aHES
Reagenzien und Bedingungen: (a) EDC, Diisopropylethylamin (b) aHES

Substanz **51** wurde in wässriger Lösung bei einer Konzentration von 0.22 mg/ml ESR-spektroskopisch untersucht. Die Linienbreite beträgt 0.0403 mT und ist damit erfreulicherweise nur etwa 1.3x breiter als die des ungebundenen Radikals (**13**, 0.0316 mT, Abbildung 55). Die Linienverbreiterung kommt vermutlich durch Einschränkung der freien Beweglichkeit des an aHES gebundenen Radikals zustande.

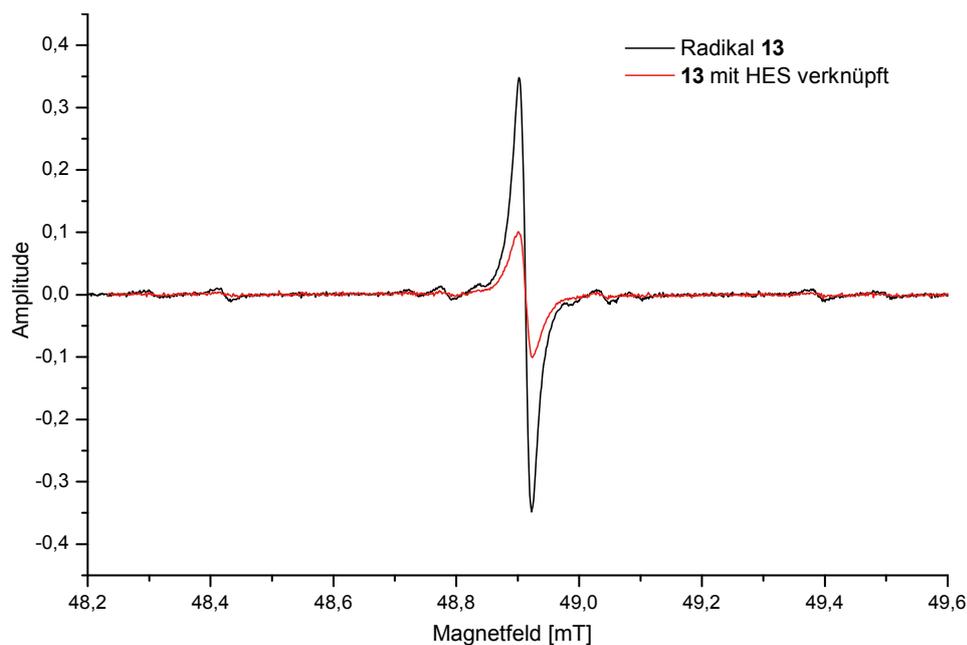


Abbildung 55: ESR-Signal des Verknüpfungsproduktes **13** mit HES (2.5 %) und **13** (0.22 mg/ml)
Bedingungen: L-Band, 6 dB, 100 mG und 160s

4 ELEKTRONENSPINRESONANZ

4.1 DAS ERSTE TRIPHENYLMETHYL-RADIKAL

Im Jahr 1900 gelang Moses Gomberg^[83-85] erstmals der direkte Nachweis eines freien organischen Radikals - des Triphenylmethyl **54** (Abbildung 56). Bei dem Versuch Hexaphenylethan (**53**) aus Triphenylchlormethan (**52**) zu synthetisieren, schied sich bei mehrstündigem Erhitzen mit metallischem Silber eine farblose, halogenfreie, kristalline Verbindung ab, die sich laut Elementaranalyse als sauerstoffhaltig erwies. Es handelte sich um das Triphenylmethylperoxid (**55**), an dessen Entstehen der Sauerstoff der Luft beteiligt sein musste. Um dies zu beweisen, wiederholte Gomberg den Versuch in einer CO₂-Atmosphäre. Dabei erhielt er eine klare Lösung, die sich bei Erwärmen färbte, beim Abkühlen wieder farblos wurde und schnell mit Sauerstoff reagierte, wobei sich wiederum das Triphenylmethylperoxid (**55**) abschied. Gomberg kam dann zu dem Schluss, dass **54** intermediär entstanden war.^[86,87]

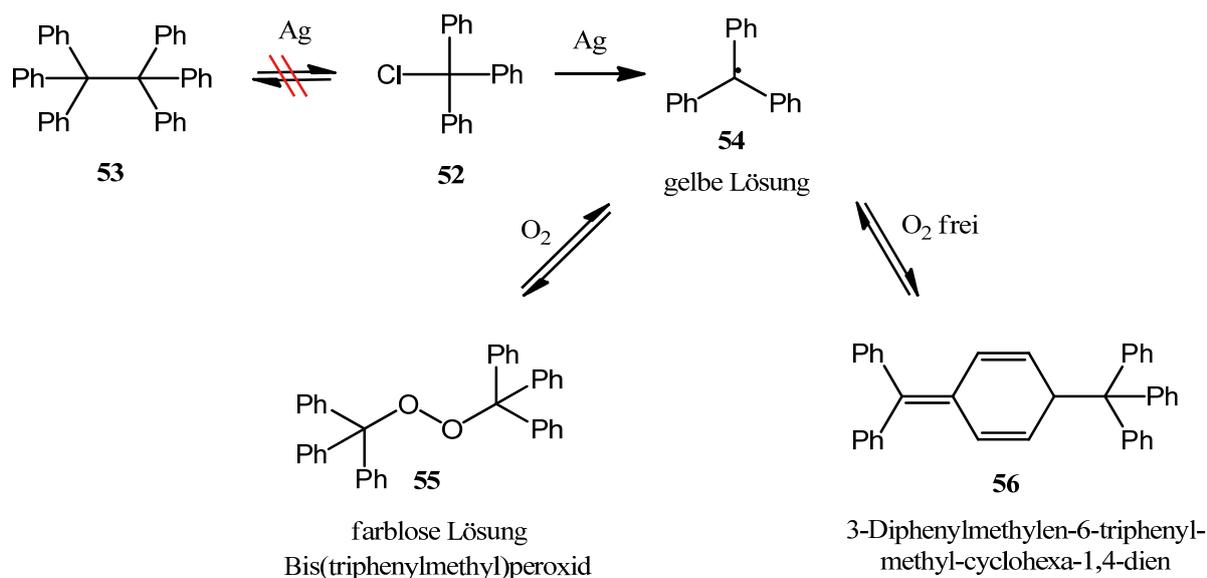


Abbildung 56: Darstellung des Triphenylmethyl-Radikals (**54**, Gomberg-Radikal)

4.2 DAS ERSTE ESR-EXPERIMENT

Zavoisky^[88] entdeckte 1945 als erster den Resonanz-Peak eines Elektrons mit einer $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ Probe und ebnete dadurch der Entwicklung der ESR-Spektroskopie den Weg. Bereits in den Jahren von 1956 bis 1960 wurden grundlegende theoretische und experimentelle Arbeiten gefördert, die den Zusammenhang zwischen der Struktur der beobachteten ESR-Spektren und den Aufbau der zugehörigen freien Radikale klärten und dadurch die Methode zu einem Identifizierungs- und Analyseverfahren erweiterten.

Die ESR-Spektroskopie ist eine hochempfindliche, hochselektive und hochauflösende Methode zur Charakterisierung von Systemen mit ungepaarten Elektronen. Systeme mit ungepaarten Elektronen bezeichnet man als paramagnetisch, so dass im englischen Sprachgebrauch statt ESR häufig auch „electron paramagnetic resonance“ (EPR) als Synonym verwendet wird. Dementsprechend galten die ersten Experimente in der ESR-Spektroskopie insbesondere der Untersuchung von chemischen Reaktionen mit beteiligten instabilen und reaktiven Zwischenprodukten mit ungepaarten Elektronen.^[4] Typische Beispiele hierfür sind: Paramagnetische Übergangsmetall-Ionen in Lösung und im Festkörper (Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+}), durch ionisierende Strahlung erzeugte Radikale in Kristallen, organische Moleküle im Triplett-Zustand ($^3\text{O}_2$), organische Radikale in Lösung und auch Stickstoffmonoxid im Gewebe.^[5,89]

4.3 PHYSIKALISCHE GRUNDLAGEN DER ESR-SPEKTROSKOPIE

Voraussetzung für die Anwendbarkeit der ESR-Spektroskopie ist das Vorhandensein von ungepaarten Elektronen. Elektronen besitzen einen Eigendrehimpuls, einen sogenannten Spin. Dieser bewirkt, dass sich die Teilchen wie Kreisel verhalten und mit einem magnetischen Dipolmoment ausgestattet sind. Durch ein von außen angelegtes Magnetfeld (B_0) richten sich die Spins aufgrund ihres magnetischen Dipolmoments aus. Die Orientierung des Spins kann parallel oder antiparallel zu B_0 erfolgen. Dabei treten zwei energetisch unterschiedliche Zustände auf, deren Energiedifferenz direkt proportional zur Stärke des angelegten Magnetfelds ist und von der Art des spintragenden Teilchens abhängt (Abbildung 57).

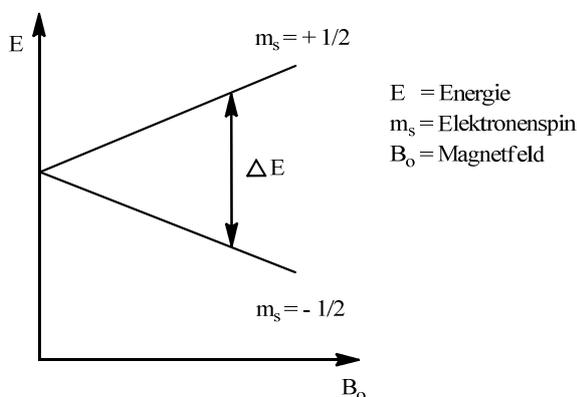


Abbildung 57: Energieaufspaltung eines freien Elektrons im Magnetfeld (B_0)

Die Aufspaltung der Energieniveaus im B_0 wird Zeeman-Aufspaltung genannt. Diese Aufspaltung hängt von der Stärke des Magnetfeldes ab. Übergänge können durch die Einstrahlung einer elektromagnetischen Welle induziert werden.^[90] Die Resonanzbedingung wird beschrieben durch:

$$\Delta E = h \cdot \nu = g \cdot \mu_B \cdot B_0$$

h = Plancksches Wirkungsquantum [Js]

ν = Frequenz der Mikrowellenstrahlung [Hz]

g = Landé-Faktor (g-Wert)

μ_B = Bohr-sches Magneton [J/T]

B_0 = Feldstärke des äußeren Magnetfeldes [mT]

Bei einem gegebenen Magnetfeld (B_0) tritt eine Absorption der eingestrahlten Photonenenergie ein, die als Absorptionssignal im ESR-Spektrum sichtbar wird^[91] (Abbildung 58).

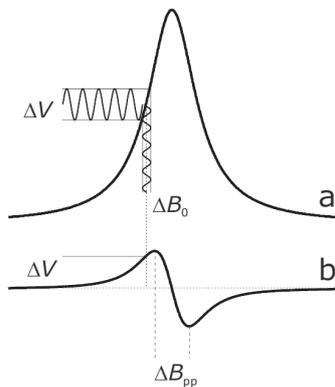


Abbildung 58: Die Feldmodulation liefert die erste Ableitung (b) des Absorptionssignals (a) einer paramagnetischen Probe und erklärt so die Linienform des ESR-Spektrums. Dabei ist ΔB_{pp} die peak-to-peak Linienbreite, ΔB_0 die Modulationsamplitude des Magnetfeldes und ΔV die daraus resultierende Modulationsamplitude der Mikrowelle.^[92]

Bei passender Magnetfeldstärke und Mikrowellenstrahlung wird die Resonanzbedingung erfüllt. Aufgrund der hoch entwickelten Radartechnologie sind elektromagnetische Strahlungen von etwa 9.5 bis zu 35 GHz am weitesten verbreitet. Für ein typisches organisches Radikal erfolgt die Resonanz bei etwa 1.5 GHz, was dem Frequenzband L (kurz: L-Band) entspricht. Wie erwähnt, wird dabei das Absorptionssignal in seiner ersten Ableitung detektiert.

Spins wechselwirken mit magnetischen Feldern. Da Spins ein magnetisches Moment besitzen und damit ebenfalls ein Magnetfeld erzeugen, kann neben der Wechselwirkung des Elektronenspins mit dem äußeren Magnetfeld auch die Wechselwirkung des Elektronenspins mit einem im Radikal vorhandenen Kernspin (I) sichtbar werden, indem er eine weitere Aufspaltung der Energieniveaus bewirkt. Diese zusätzliche Aufspaltung wird Hyperfeinaufspaltung genannt. Man kann die Hyperfeinaufspaltung durch ein lokales Feld erklären, das der Kernspin (I) am Ort des Elektrons erzeugt. Die ESR-Linie wird für $I = \frac{1}{2}$ mit $m_s = \pm \frac{1}{2}$ zu einem Dublett aufgespalten. Als Ergebnis werden im ESR-Spektrum zwei Signale gleicher

Intensität erhalten, deren Abstand der Hyperfeinkopplungskonstante entspricht. Eine Kopplung mit einem Kern von $I = 1$ führt zu einer Aufspaltung in drei Signale ($m_s = +1, 0, -1$) gleicher Intensität (Abbildung 59).^[93] Von einer Superhyperfeinaufspaltung spricht man, wenn der Elektronenspin mit dem Kernspin eines Nachbaratoms wechselwirkt.^[94]

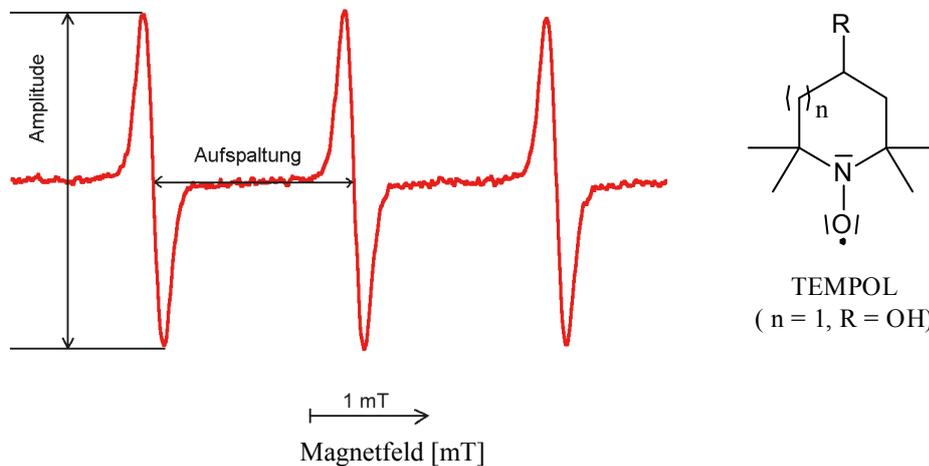


Abbildung 59: ESR-Signal von 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPOL, $c = 0.25$ mmol/l in isotonischem Saccharose-Puffer (pH 7.4); Temperatur: 25 °C gemessen mittels S-Band-ESR Spektrometer)^[95]

Die Hyperfeinstruktur des Spektrums ist eine Art Fingerabdruck, der bei der Identifizierung der Radikalspezies behilflich ist. Die Größe der Aufspaltung gibt Hinweise auf den Atomkern, mit dem das Elektron wechselwirkt, und über die Struktur des Radikals; denn die Hyperfeinaufspaltung ist proportional zur Spindichte an dem entsprechenden Atom.

4.4 ESR MESSPRINZIP UND -TECHNIK

Die gegenwärtig genutzten Frequenzbereiche liegen zwischen 1 und 100 GHz. Die gebräuchlichste ESR-Frequenz liegt bei 1.5 GHz im L-Band oder 9.5 GHz im Frequenzband X (kurz: X-Band). Wie auch bei der NMR-Spektroskopie verbessert der Übergang zu höheren Frequenzen die spektrale Auflösung. In der ESR-Spektroskopie arbeitet man entweder mit der Dauerstrich- (engl. continuous wave, *cw*) oder der Puls-Methode. Bei der *cw*-Methode entsteht das Spektrum durch Einstrahlen einer konstanten Mikrowellenfrequenz, während das Magnetfeld im Verlauf der Messung variiert wird. Bei der Puls-Methode wird das Spektrum durch einen Mikrowellenimpuls bei konstantem Magnetfeld erzeugt.

Ein *cw*-ESR-Spektrometer (Abbildung 60) besteht aus einer Mikrowellenquelle, einem Magneten mit variabel einstellbarer Feldstärke, einem Resonator (Cavity), in dem die Probe eingeführt wird, Feldmodulationsspulen, einer Mikrowellendiode als Detektor, einem phasensensitiven Detektor, sowie einem Computer, der die Daten verarbeitet und das Spektrometer steuert. Eine konstante Mikrowellenstrahlung wird in der Mikrowellenquelle erzeugt und gelangt über einen Waveguide (eine Mikrowellenleitung) in die Cavity. Waveguide und Cavity haben die Dimension einer Mikrowellenlänge. In der Cavity wird dadurch die eingestrahlte Mikrowellenenergie gespeichert. Damit das gelingt, muss die Wellenlänge der eingestrahlten Mikrowellenenergie durch Tunen an die Dimension der Cavity und die Impedanz der Cavity

an die Impedanz der Mikrowellenquelle (üblicherweise 50Ω) angepasst werden. Im Normalfall findet kein Energieaustausch zwischen Cavity und Mikrowellenquelle statt. Im Resonanzfall wird dieses Gleichgewicht gestört und Mikrowellenstrahlung wird aus der Cavity reflektiert und gelangt zum Detektor. Dieser ist im Prinzip eine Diode und liegt in der Ebene des elektrischen Feldvektors der Mikrowellenstrahlung. Damit die reflektierte Mikrowellenstrahlung nicht zur Quelle gelangt, ist ein Zirkulator zwischengeschaltet. Dieser sorgt dafür, dass die Strahlung von der Quelle lediglich in die Cavity geleitet wird und die Strahlung aus der Cavity zum Detektor. Das am Magneten angelegte Feld wird durch Modulationsspulen mit üblicherweise 100 kHz moduliert. Die Modulation führt dazu, dass die Feldabhängigkeit der Signalintensität für kleine Änderungen der Feldstärke gemessen wird. Mathematisch entspricht das der Bildung der ersten Ableitung des Signals. Gleichzeitig wird damit das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert. Die Ableitung wird vom phasensensitiven Detektor gebildet, der das Signal an den Computer weiterleitet. Für eine gute Nachweismempfindlichkeit und Vermeidung von Signalverfälschungen sollte die Amplitude des äußeren Magnetfeldes möglichst groß, aber kleiner als die Linienbreite des ESR-Signals gewählt werden. Auch die Modulationsfrequenz sollte kleiner als die Linienbreite sein, da sie Seitenbänder im Abstand der Modulationsfrequenz verursacht.

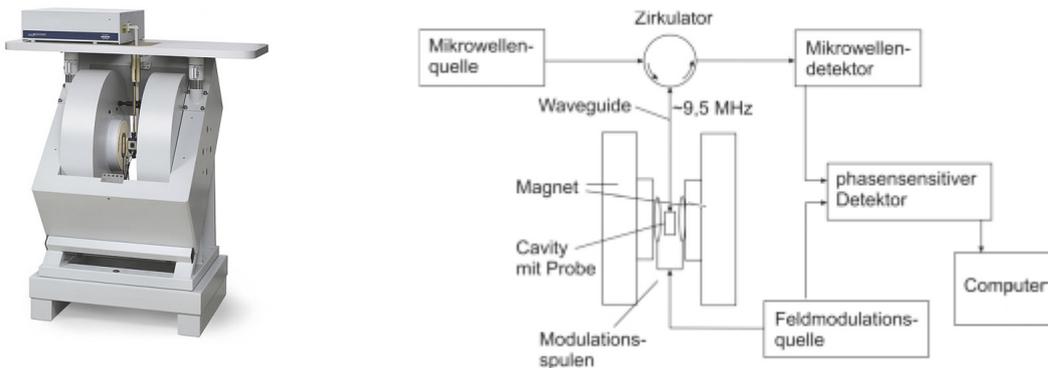


Abbildung 60: links ein X-Band ESR-Spektrometer, rechts graphische Darstellung des Aufbaus eines ESR-Spektrometers

4.5 BESTIMMUNG FREIER RADIKALE

Für die qualitative bzw. quantitative Bestimmung freier Radikale gibt es unter Verwendung der ESR-Spektroskopie drei verschiedene Möglichkeiten. Die erste ist die direkte Bestimmung. Dabei wird das vorhandene Radikal ohne eine weitere Reaktion direkt gemessen.^[96] Diese Methode wirft aber im Falle der Quantifizierung von z.B. Superoxidation-Radikalen ($\cdot\text{O}_2^-$) in Zellen einige Probleme auf; denn die Halbwertszeit des Superoxidation-Radikals ist mit ungefähr 1 ms extrem kurz und die intrazelluläre Konzentration sehr niedrig ($\sim 1 \text{ nM}$). Daraus folgt, dass zumindest das Superoxidation-Radikal mit seiner kurzen Halbwertszeit in biologischen Systemen für eine direkte ESR-Messung nicht erfassbar ist. Aus diesem Grund wurden Methoden zur indirekten Bestimmung von Radikalen etabliert, das sog. „Spin-Trapping“. Ein kurzlebiges Radikal reagiert mit einer diamagnetischen Komponente und bildet dadurch ein langlebigeres Radikal. Dieses Produkt reichert sich bis zu einer Kon-

zentration an, bei der es mittels ESR-Spektroskopie möglich ist es zu identifizieren und quantifizieren.^[97]

Weitere Techniken zum Nachweis von Radikalen sind z.B. das sogenannte „Spin-Labeling“. Ein Spin-Label ist eine paramagnetische Substanz, oft ein Nitroxid-Radikal,^[98] das sich kovalent an ein Molekül bindet. Dieses Addukt wird mittels ESR-Spektroskopie analysiert. Wenn eine paramagnetische Komponente, die sich kovalent an das Radikal bindet, auf diese Weise eingesetzt wird, wird die paramagnetische Substanz auch als „Spin-Probe“ bezeichnet. Die gezielte Spinmarkierung ist bereits für Lipide, DNS oder RNS, aber auch für synthetische Makromoleküle etabliert.^[99]

Bevorzugt verwendete Spinsonden sind bis dato Nitroxid-Radikale. Das ungepaarte Elektron im Nitroxid-Radikal TEMPOL (Abbildung 59) ist dabei über Stickstoff- und Sauerstoff-Orbitale delokalisiert, wobei etwa 60 % der Spindichte auf das Sauerstoffatom entfallen. Nitroxid-Radikale sind sehr stabil; sie können monatelang ohne besondere Vorkehrungen gelagert werden. Diese Stabilität wird vor allem durch die sterische Abschirmung des ungepaarten Elektrons durch die Methylgruppen erreicht. Das typische ESR-Spektrum eines Nitroxid-Spinmarkers wird durch die Hyperfeinwechselwirkung mit dem Stickstoffkern ^{14}N geprägt. Aufgrund des Kernspins des ^{14}N von $I = 1$ erscheint das Signal im X-Band-Spektrum, in wässriger Lösung bei Raumtemperatur als Triplett (vgl. Abbildung 59).

Man ist auf der Suche nach Radikalen, welche keine Hyperfeinaufspaltung zeigen. Auf diesen Aspekt wurde bereits ausführlich in der Zielstellung (Kapitel 1) eingegangen.

4.6 ESR-SPEKTROSKOPIE IN DER BIOPHARMAZIE

Die ESR-Spektroskopie ist ein physikalisches Messverfahren. Sie erlangte im Laufe der Zeit große Bedeutung auf dem Gebiet der physikalischen Chemie und später auch in der Biologie. Mit Hilfe der ESR-Spektroskopie werden biologisch und pharmazeutisch relevante Systeme mit spektraler und räumlicher Auflösung (ESR-Imaging) untersucht, beispielsweise Enzyme wie die Superoxiddismutasen (SOD) und Lipoxygenase (LOX), Organe und Organeile sowie in vivo Kleinsäugetiere.^[96,100] Die gewünschte Information würde sich aus der Resonanz systemeigener paramagnetischer Übergangsmetallionen (Fe^{3+} , Cu^{2+}) oder freier Radikale wie Superoxid ergeben, welche aber aufgrund sehr geringer Konzentrationen schlecht oder nicht messbar sind (vgl. Kapitel 4.5). Es gelang immerhin in vitro, die Lage der Häm-Systeme in Hämoglobin- und Myoglobin-Kristallen zu bestimmen.^[89]

Durch die Anwendung von Spin-Sonden oder der ESR-Trapping-Technik können weiterhin Aussagen über Mikroviskosität, -polarität, pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck und aktuelle, ortsabhängige Konzentrationen freier Radikale erhalten werden. Zusammen mit kinetischen Messungen an Modellpharmaka können auch Aussagen über Biotransformationsprozesse gewonnen werden.^[3,101]

Heutzutage befasst sich die ESR-Forschung im pharmazeutisch-medizinischen Kontext vor allem mit der Fragestellung, in wie weit bzw. wo die ESR-Spektroskopie in der klinisch-chemischen Diagnostik eingesetzt werden kann. Nachdem bis heute bereits verschiedenste spektroskopische Messverfahren in der klinischen Diagnostik eingesetzt werden (z.B. MRT), soll die ESR-Spektroskopie in Zukunft nicht mehr nur auf die Labordiagnostik begrenzt sein, sondern direkt im und am lebenden Organismus angewendet werden.

4.7 ESR-EXPERIMENTE MIT TAM-RADIKALEN

TAM-Radikale weisen eine Besonderheit im Vergleich zu vielen anderen Spinsonden auf. Das freie Elektron ist im Gegensatz zu den Nitroxiden nicht über Stickstoff- und Sauerstoff-, sondern über Kohlenstoffatome delokalisiert. Das Kohlenstoffisotop ^{12}C besitzt einen Kernspin von $I = 0$. Demnach zeigt das ESR-Spektrum von TAM-Radikalen keine – bzw. wegen der geringen natürlichen Häufigkeit von ^{13}C nur eine sehr schwache - Hyperfeinaufspaltung.^[102] Aufgrund der Abwesenheit von benachbarten Wasserstoffatomen tritt auch keine Superhyperfeinaufspaltung auf. Die Stabilität von TAM-Radikalen ist durch Delokalisierung des ungepaarten Elektrons über die drei aromatischen Ringsysteme gegeben. Des Weiteren schützt die konformelle Inflexibilität (Propeller-ähnliche Konformation)^[103] des Radikals vor der bei einfacheren TAM-Radikalen eintretenden Dimerisierung, Anlagerung anderer Radikale oder Oxidation.^[86] Durch Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel kann es zu einer Linienverbreiterung kommen, weshalb der Einfluss des Lösungsmittels ebenfalls genauer analysiert werden muss.

Die in dieser Arbeit hergestellten TAM-Radikale (**13**, **14** und **32**) sollen im Folgenden auf ihre Eignung als Spinsonden geprüft werden. Dabei wurden die Spektren der Substanzen in gepufferten wässrigen Systemen und in polaren Lösungsmitteln (z.B. Methanol oder DMSO) aufgenommen. Für die Messungen wurden dünne Glaskapillaren verwendet, damit die Messung möglichst wenig durch substanzabhängige Störeffekte in der Kavität beeinflusst werden. Es wird nicht die Lage der Signale angegeben, sondern die peak-to-peak Linienbreite (ΔB_{pp}) des ESR-Signals in der Einheit mT.

4.7.1 PHYSIKOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

a. ABHÄNGIGKEIT DES ESR-SIGNALS VON DER KONZENTRATION

Die physikochemischen Untersuchungen der synthetisierten TAM-Radikale **13** und **14** (Abbildung 61) wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. K. Mäder an der MLU Halle durchgeführt. Die ESR-Imaging- und Zellysat-Experimente wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. M. Drescher am Fachbereich Chemie der Universität Konstanz durchgeführt. Die Thrombozyten- und Zytotoxuntersuchungen wurden in den Arbeitsgruppen von Prof. Presek, Prof. Langner und Dr. Erdmann an der MLU Halle durchgeführt.

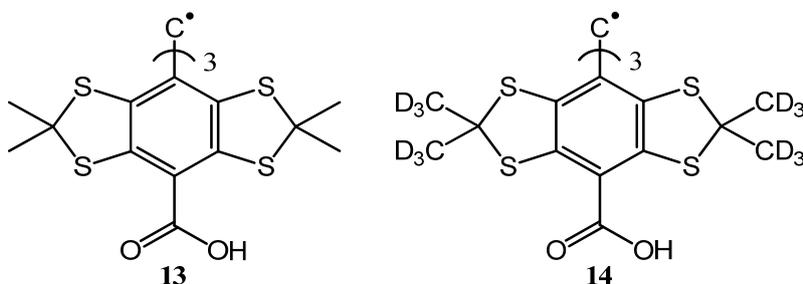


Abbildung 61: chemische Struktur der Radikale **13** und **14**

Die ESR-Spektren wurden zuerst hinsichtlich der Linienbreiten untersucht. Bei den ersten Messungen wurde beobachtet, dass ein gut auswertbares ESR-Signal stark von der Konzentration abhängig ist. Für die weiteren Experimente wurde zuerst die Konzentration bestimmt, die noch ein gut auswertbares ESR-Signal liefert, möglichst substanzsparend durchgeführt werden kann und in ihrer Größenordnung Konzentrationen entspricht, die für Untersuchungen in physiologischen Milieus sinnvoll und erreichbar scheinen. Liu et al. ^[104] verwendeten für intrazelluläre Experimente beispielsweise eine Konzentration von 20 μM . Radikal **13** und **14** können aufgrund ihres anionischen Charakters nur bedingt in die Zelle eindringen, denn bei $\text{pH} = 7.4$ liegen Carbonsäuren teilweise ionisiert, teilweise neutral vor (letzte Form ist membrangängig). Die folgenden Experimente sind zunächst auf in vitro bzw. extrazelluläre Messungen beschränkt.

Um in vivo Verhältnisse bestmöglich zu simulieren, wurden beide Radikale (**13**, **14**) jeweils in einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS-Pufferlösung, $\text{pH} = 7.4$) gelöst und im L-Band-Spektrometer vermessen. Für die Bestimmung der optimalen Versuchskonzentration wurde eine Verdünnungsreihe des Radikals **14** in PBS-Pufferlösung mit Konzentrationen von 10, 25, 50, 75 und 100 μM untersucht. Bei einer Konzentration von 50 μM war einerseits das ESR-Signal (Abbildung 62) noch schmal und groß genug und wies ein akzeptables Signal-Rausch-Verhältnis auf (im Gegensatz zum Signal mit 10 μM). Andererseits trat noch keine Linienverbreiterung durch Spin-Spin-Austausch auf (wie bei einer höheren Konzentration von 100 μM aufgrund von Präzipitation). Die kleinen Signale in Abbildung 62 bei 48.64 mT bzw. 48.89 mT werden durch die Kopplung mit ^{13}C hervorgerufen.

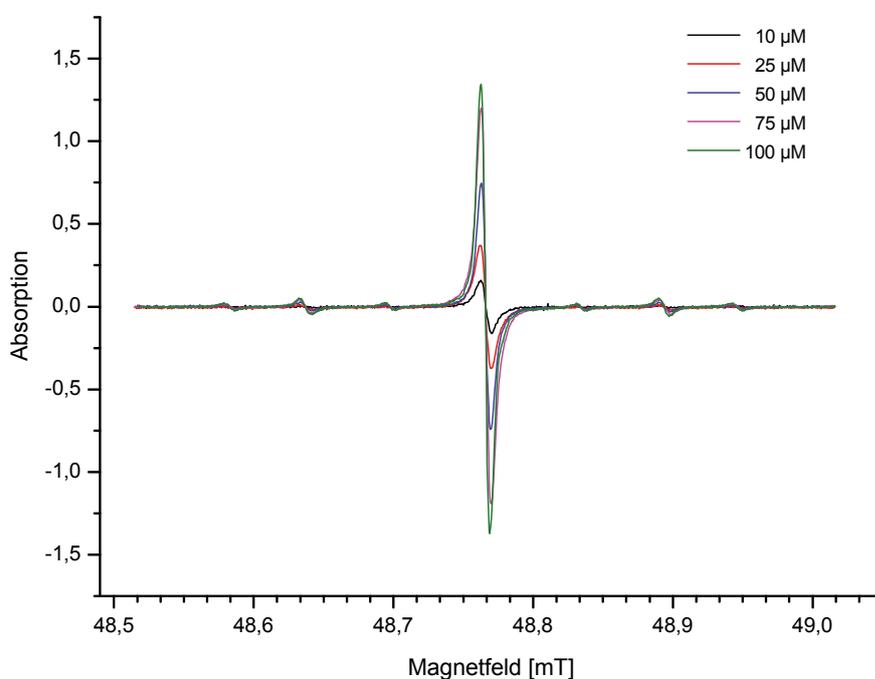


Abbildung 62: Veränderung der Linienbreite des ESR-Signals von Radikal **14** in Abhängigkeit der Konzentration

Mit der optimalen Versuchskonzentration von Radikal **14** von $\sim 50 \mu\text{M}$ sollte durch Variation verschiedener Geräteeinstellungen festgestellt werden, bis zu welcher geringsten Konzentration ein schmales, starkes, symmetrisches Signal erhalten werden kann. Abbildung 63 zeigt, dass die kleinste Konzentration von $0.19 \mu\text{M}$ noch ein detektierbares Signal erzeugt. Diese Information ist für in vivo Experimente sehr wichtig, um zu wissen, bis zu welcher Konzentration und der vorliegenden Gerätekonfiguration Messungen noch möglich sind. Die Messparameter werden im Einzelnen nicht erwähnt, für die Konzentration von $48 \mu\text{M}$ soll aber im folgenden der Einfluss der Geräteparameter (Modulation, Dämpfung, Verstärkung (Gain) und sweep-time) gezeigt werden.

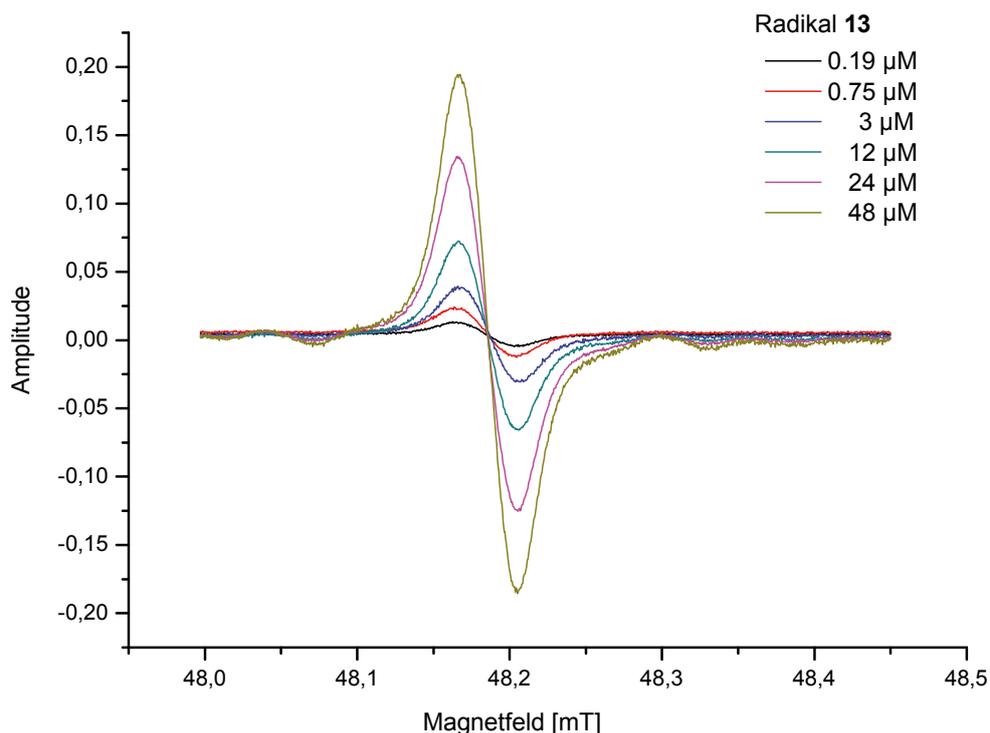


Abbildung 63: Konzentrationsabhängigkeit des ESR-Signals von **14**

Um weitere Informationen über das ESR-Signal von **14** zu bekommen bzw. die richtigen Geräteparameter zu bestimmen, wurde dieses noch mit unterschiedlichen Mikrowellenleistungen (Abbildung 64) als Dämpfung wurde $20 \text{ dB} = 0.5 \text{ mW}$ und $6 \text{ dB} = 12.5 \text{ mW}$ verwendet und unterschiedlichen Modulationsamplituden (zw. $43 - 100 \text{ mG}$; Abbildung 65) vermessen. Diese Parameter wurden soweit optimiert, dass damit noch ein gut detektierbares ESR-Signal bei möglichst geringer Konzentration erreicht wird.

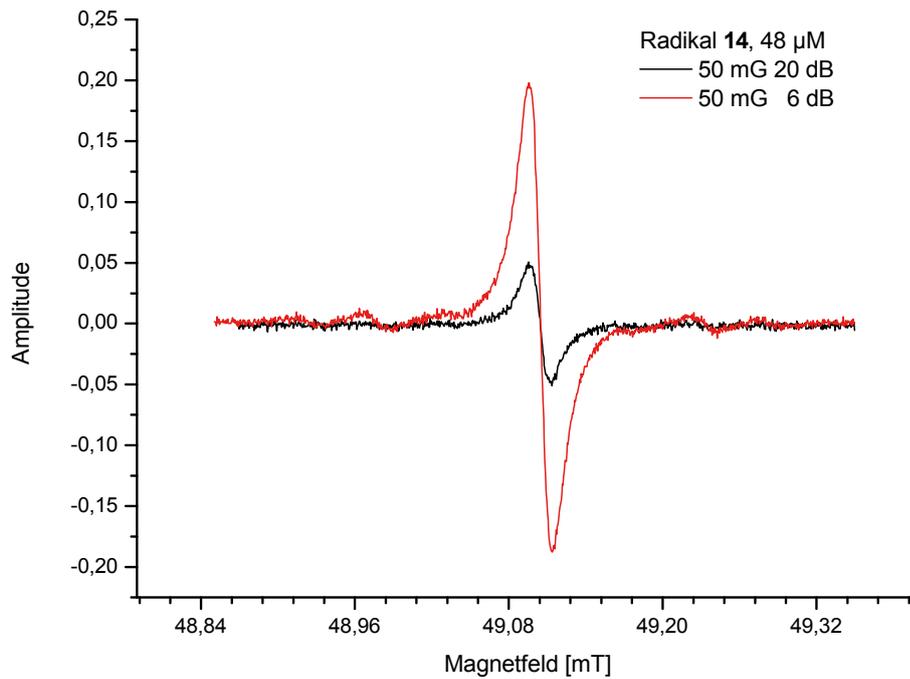


Abbildung 64: Abhängigkeit des ESR-Signals (Radikal 14) bei gleichbleibender Konzentration und unterschiedlicher Dämpfung der Mikrowellenleistung

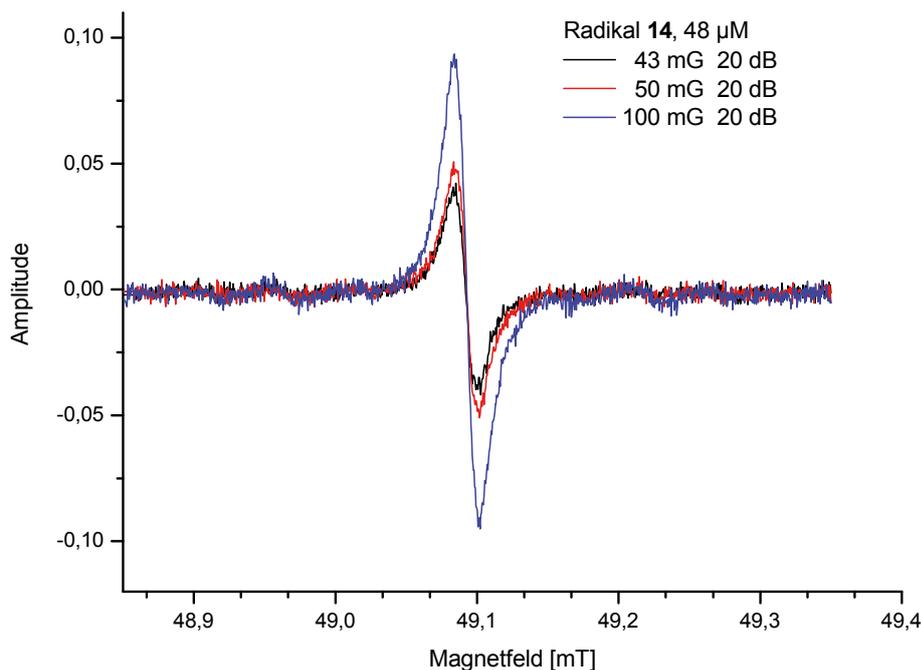


Abbildung 65: Abhängigkeit des ESR-Signals (Radikal 14) bei gleichbleibender Konzentration und unterschiedlichen Modulationsamplituden

Für das Radikal **32** wurde ebenfalls die – unter unseren Messbedingungen - optimale Versuchskonzentration bestimmt. Dazu wurde das Spektrum bei 50 µM und 100 µM (nicht auswertbar, da Signal-Rausch-Verhältnis zu klein), 250 µM, 500 µM und 1 mM PBS-Pufferlösungen (pH = 7.4) aufgenommen (Abbildung 66). In der Literatur^[55] findet man nur ein ESR-Spektrum von **32**, dieses wurde in wässriger Lösung bei 20 °C mit einer Konzentra-

tion von 1 mM und folgenden Geräteeinstellungen (X-Band, Mikrowellenleistung: 8 mW; Modulationsfrequenz: 100 kHz; Modulationsamplitude: 0.5 G) aufgenommen. Dabei wurde eine peak-to-peak Linienbreite (ΔB_{pp}) von 0.07 mT ermittelt. In Experimenten mit 1 mM Lösung wurde eine Linienbreite von 0.0649 mT ermittelt.

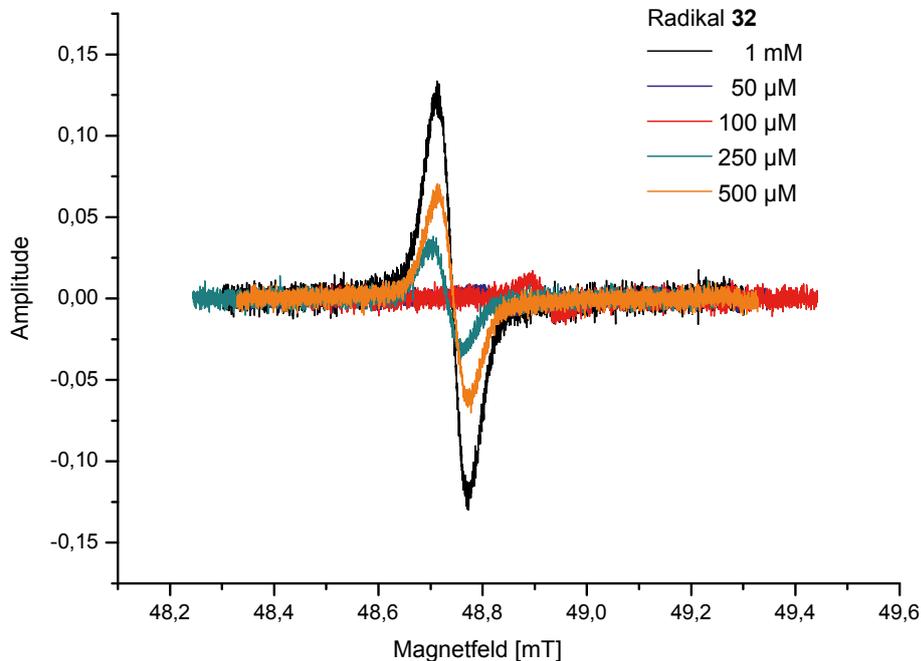


Abbildung 66: Konzentrationsabhängige ESR-Signale von Radikal 32

b. PH WERT-MESSUNGEN

Die pH-Abhängigkeit der ESR-Signale von **13** und **14** wurde mit der ermittelten besten Konzentration untersucht. In Übereinstimmung mit Literaturangaben^[14] stellten wir fest, dass unterhalb von pH 7.4 die Wasserlöslichkeit so stark abnimmt, dass ausreichende Löslichkeit nicht mehr gegeben ist. Trotz intensiver Ultraschallbehandlung waren visuell noch vereinzelt nicht gelöste Partikel („Agglomerate“) des Radikals **14** zu erkennen, auch eine leichte Erwärmung (30 °C) führte nicht zu ausreichender Löslichkeit. Die begrenzte Löslichkeit von **13** und **14** in wässrigen Systemen begrenzt deren in vivo Anwendung. Sie würden z.B. in entzündetem Gewebe (pH ca. 5) ausfallen. Für in vitro Anwendung werden Maximalkonzentrationen der TAM-Derivate (**13**, **14**) von bis zu 2 mM in pH ~ 7 angegeben, oberhalb dieser Konzentration kommt es zur Ausfällung der Partikel. Dhimitruka et al.^[14] beschreiben, dass es bei einem pH unterhalb von 3.5 zur Aggregation der Teilchen kommt, denn bei diesem pH-Wert liegen die Carboxylgruppen protoniert vor.

In unserem Experiment wurde der pH-Bereich von 6.0 bis 8.0 betrachtet (Abbildung 67). Liegen die drei Carbonsäurefunktionen der Radikale **13** und **14** protoniert vor, so sind sie schlecht in Wasser löslich, aber gut in mittelpolaren organischen Lösungsmitteln löslich.

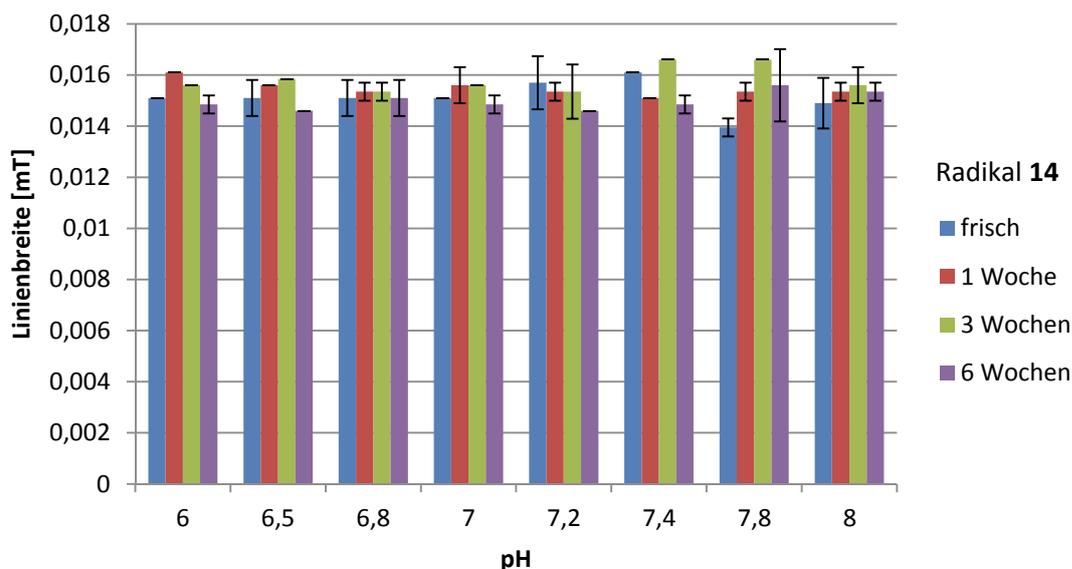


Abbildung 67: Abhängigkeit der Linienbreite des ESR-Spektrums von **14** vom pH-Wert und der Zeit (6 Wochen)

Die Linienbreite blieb im Rahmen der experimentellen Fehlerbreite im pH-Bereich von 6-8 in etwa gleich, auch nach einer Lagerung von sechs Wochen (Abbildung 67). Eine Linienverbreiterung wird in unseren Experimenten nur in Verbindung mit erhöhten Konzentrationen bzw. aufgrund der Präzipitation der Radikale beobachtet. Als Ursache nehmen wir einen Spin-Spin-Austausch an oder auch eine Präzipitation der Radikale mit einer daraus folgenden Verbreiterung und Asymmetrie des Signals.

c. UNTERSUCHUNGEN ZUR STABILITÄT

Wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, wurde ein Decarboxylierungsprodukt des Radikals **13** bzw. **14**, die Verbindung **52** bzw. **d52**, identifiziert. Bei den DC-Untersuchungen fiel außerdem auf, dass sich das abgetrennte grüne Radikal auf der DC Platte (Kieselgel 60 F₂₅₄) über Nacht violett färbte. Diese Beobachtung trat bei den Löslichkeitsversuchen ebenfalls auf; denn mit fortschreitender Zeit fand eine Farbveränderung der wässrigen Lösungen von grün nach leicht braun statt (siehe dazu auch Abbildung 68). Laut DC-Untersuchung hatte sich erneut Verbindung **52** bzw. **d52** gebildet. Um deren Einfluss und Entstehung zu klären, wurde neben der Löslichkeit bei unterschiedlichen pH-Werten auch gleichzeitig die Stabilität der Radikale **13** und **14** in Bezug auf ihre Linienbreite über einen Zeitraum von 6 Wochen untersucht (Abbildung 67).

Für die Stabilitätsuntersuchung wurden die Proben in ein 1 ml Braunglas-Vial gefüllt und im ESR-Spektrometer (L-Band) vermessen. Anschließend dicht verschlossen, bei -8 °C gelagert und für die jeweilige zeitabhängige Messung erneut auf Raumtemperatur gebracht und vermessen.

Wie beschrieben änderte sich die Linienbreite trotz erkennbare Farbänderung von grün nach bräunlich nicht signifikant mit der Zeit (s.o. Abbildung 67). Das visuell sehr auffällige Entstehen der nicht radikalischen Verbindungen **52** bzw. **d52** hatte demnach im beobachteten Zeitraum keinen Einfluss auf die Linienbreite. Es ist zu vermuten, dass eine ausreichend hohe Konzentration des Radikals **13** bzw. **14** in den Untersuchungslösungen verblieb. Gemäß

MPLC-Isolierung entstanden ca. 3 % **52** bzw. **d52**, die also für die Beobachtung der Linienbreiten von **13** bzw. **14** bei in-vitro- oder in-vivo-Experimenten unschädlich sind.

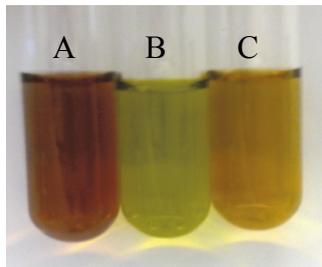
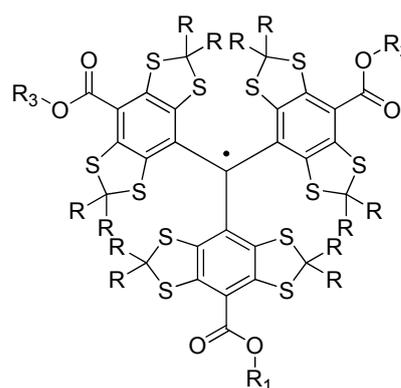
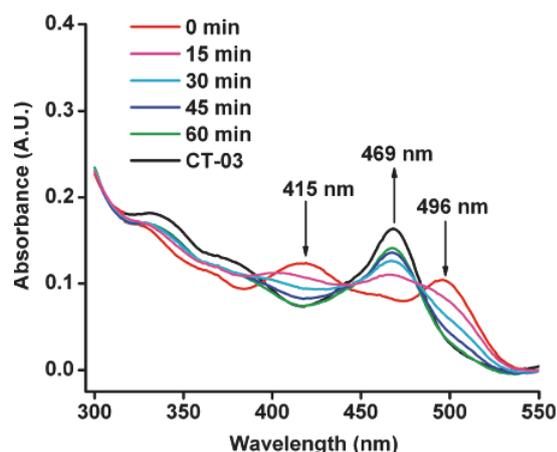


Abbildung 68: Veränderung der Ausgangs-Radikal-Lösung (B) nach Sauerstoff- (A) bzw. Argonzusatz (C)

d. EINFLÜSSE AUF DIE ZERSETZUNG DER RADIKALE **13** UND **14**

Um die Bedingungen für die Stabilität der Radikale näher einzugrenzen, wurde untersucht, ob die Farbveränderung/Zersetzung der grünen Radikallösung durch Einfluss von pH-Wert, Sauerstoff oder UV-Strahlung (Licht) induziert wird. In der Veröffentlichung von Liu et al.^[105] wurde mittels UV-Vis-Spektrometrie die Esterhydrolyse von Bis(8-acetoxymethoxycarbonyl-2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']-bis[1,3]dithiol-4-yl)mono-(8-carboxyl-2,2,6,6-tetra-methylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol-4-yl)methyl-Radikal (AMT-02) durch Inkubation mit einer Schweineleberesterase in das freie Radikal **13** (CT-03) verfolgt (Abbildung 69). Nach 60 Minuten war die Esterspaltung vollständig abgeschlossen, da sich die rote Linie (AMT-02) fast vollständig der schwarzen Linie annähert. Dabei kam es zu einer Abnahme der beiden Banden bei 415 nm und 496 nm und gleichzeitig zu einer Zunahme der Bande bei 469 nm.



CT-03: R = CH₃, R₁ = R₂ = R₃ = Na
 AMT-02: R = CH₃, R₁ = R₂ = CH₂OC(O)CH₃,
 R₃ = H

Abbildung 69: UV-VIS Spektrum aus Liu et al.^[105] von 10 µM AMT-02 in PBS mit 5 % DMSO, inkubiert mit Schweineleberesterase (50 U/mL) über einen Zeitraum von 60 Minuten, CT-03 = Radikal **13**

Das beschriebene UV-Vis-Experiment von Liu et al. gab Anlass den Abbau/ Zersetzung von Radikal **13** zu untersuchen. Zuvor wurde eruiert ob Sauerstoff an der Zersetzung von **14** beteiligt ist. Dazu wurden zwei DC-Platten (Kieselgel 60 F₂₅₄) mit **14** und **d52** entwi-

ckelt. Im Anschluss wurden diese in einer Kammer mit Argon- bzw. Sauerstoffsättigung 24 h lang gelagert. Die DC-Platte in der Argonkammer zeigte keine Farbveränderung des grünen Radikalflecks im Gegensatz zur DC-Platte in der Sauerstoffkammer. Hier färbte sich der Substanzfleck **14** von grün nach dunkelviolett.

Mit dieser Erkenntnis wurden in einem Quarzglaskolben jeweils $\sim 50 \mu\text{M}$ Radikallösung (**14**, PBS-Puffer 7.4) mit Sauerstoff bzw. Argon begast und mit einer UV-Lampe (254 nm) 24 h lang bestrahlt (ohne Kenntnis der Energiedichte), dann 48 h stehen gelassen und anschließend nochmals mit einer UV-A-Quelle $12 \text{ J}/\text{cm}^2$ bestrahlt. Die Bande bei 469 nm blieb über den gesamten Zeitraum unverändert. Die Annahme, dass Sauerstoff die Zersetzung induziert, konnte im wässrigen Medium bei pH 7.4 nicht bestätigt werden (Abbildung 70 und Abbildung 71).

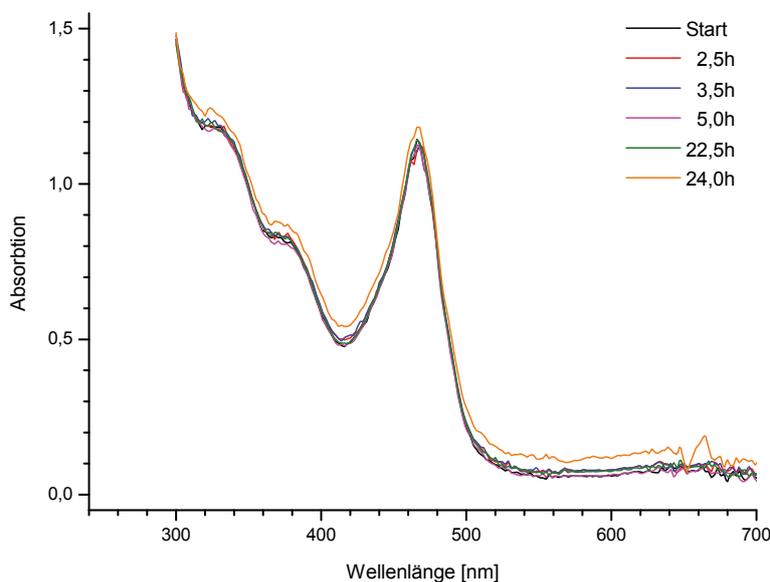


Abbildung 70: 24 h-Bestrahlung von **14** (49.2 μM in PBS pH 7.4) unter Argonatmosphäre mit UV 254 nm

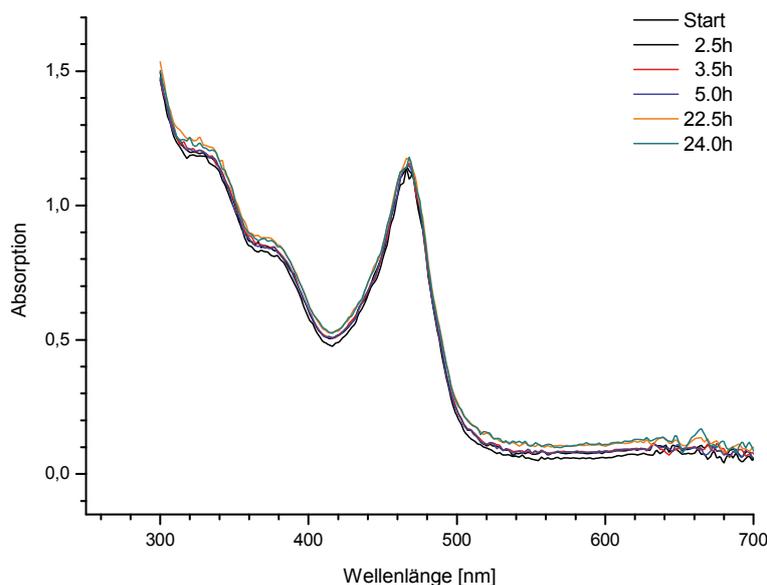


Abbildung 71: 24 h-Bestrahlung von **14** (49.2 μM in PBS pH 7.4) unter Sauerstoffatmosphäre mit UV 254 nm

Die Proben der Argonatmosphäre wurden mit ESR-Messungen kontrolliert. (Abbildung 72). Es wurde nur das Argon-Experiment untersucht, da nur der Einfluss der UV-Bestrahlung (ohne Sauerstoffeinfluss) untersucht werden sollte.

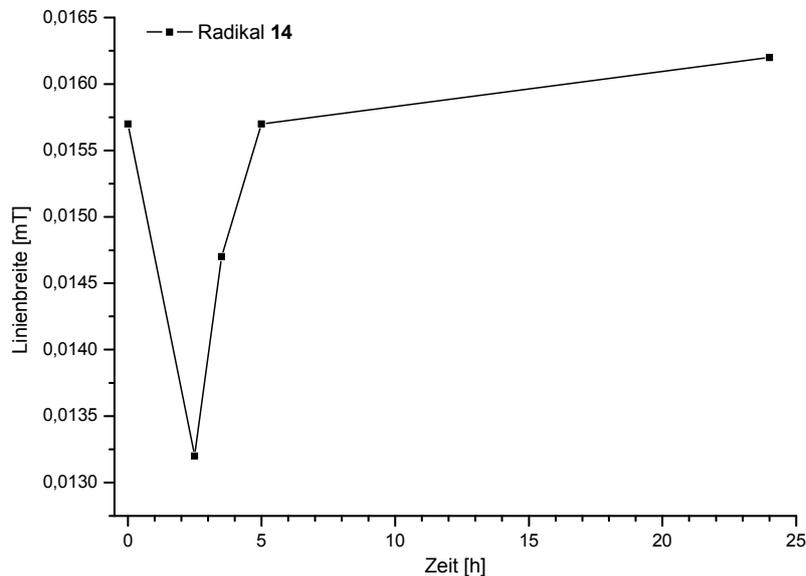


Abbildung 72: Linienbreite des Radikals 14 unter Argonatmosphäre und 24 h UV 254 nm Bestrahlung

Aus Abbildung 72 wird ersichtlich, dass die Ausgangslinienbreite (0.0157 mT) sich unter Argon-Atmosphäre und zusätzlicher UV-Bestrahlung über 24 h nur geringfügig um 0.0005 mT erhöht. Die starke Linienbreitenabnahme zu Beginn des Experiments (Zeitpunkt 2.5 h) erklären wir mit dem verringerten Sauerstoffangebot im System, welches in folgenden Experimenten (siehe Kapitel 4.7.1g) bestätigt werden konnte. Den steilen Anstieg nach 2.5 h können wir nicht hinreichend interpretieren. Erwartet wurde, dass die Linienbreite bei dem Wert bleibt, der nach Argonbegasung und Sauerstoffvertreibung die schmalste Linienbreite besitzt (ca. 0.013 mT). Der erneute Anstieg innerhalb 5 h auf die Ausgangslinienbreite könnte bedeuten, dass die UV-Bestrahlung doch eine Veränderung induziert. In den parallel erfolgten UV-Messungen war aber keine Veränderung zu sehen. Da die Linienbreite nach 24 h nur geringfügig von der Ausgangslinienbreite abweicht, gehen wir davon aus, dass vermutlich Sauerstoff ins System eingedrungen ist.

Um weitere Effekte - z.B. durch das Lösungsmittel - auszuschließen, wurde das Bestrahlungsexperiment in Methanol wiederholt. Es wurde ebenfalls eine Radikalkonzentration von $\sim 40 \mu\text{M}$ verwendet. Diese Probe wurde in einem Quarzglas unter Sauerstoffatmosphäre mit UV-A-Licht mit einer Gesamtenergiemenge von 16.08 J/cm^2 bestrahlt. Abbildung 73 verdeutlicht die Abnahme der UV-Absorption bei 469 nm über den Zeitraum der Bestrahlung.

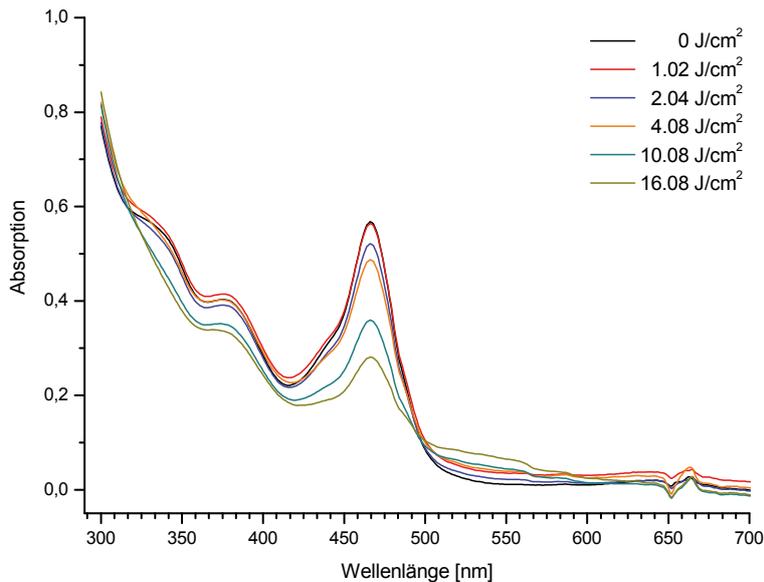


Abbildung 73: Bestrahlung von **14** (40 µM in MeOH) unter Sauerstoffatmosphäre mit UV-A-Licht bis zu einer maximalen Energiemenge von 16.08 J/cm²

Die Absorption der Bande bei 469 nm in Methanol nimmt unter UV-A Licht ab, was auf eine Zersetzung schließen lässt. In Abbildung 74 ist das Spektrum von **d52** im Vergleich zum Radikal **14**-Natrium-Salz dargestellt. In Abbildung 73 ist bei der größten Bestrahlungsdauer von 16.08 J/cm² schon zu erkennen, dass die Bande bei 469 nm abnimmt und im Bereich 500-550 nm eine Erhöhung der Absorption zu erkennen ist. In diesem Bestrahlungsexperiment wird somit deutlich, dass das UV-Spektrum von **14** langsam in das von **d52** übergeht (Wegfall des Maximums bei 469 nm, neues Maximum bei 500-560 nm, Abbildung 74), sich also **14** unter UV-A in sauerstoffhaltigem Methanol zu **d52** zersetzt. Interessanterweise liegt die Absorption von **d52** bei ähnlicher Konzentration (~50 µM) gegenüber **14**-Natrium-Salz fast doppelt so hoch.

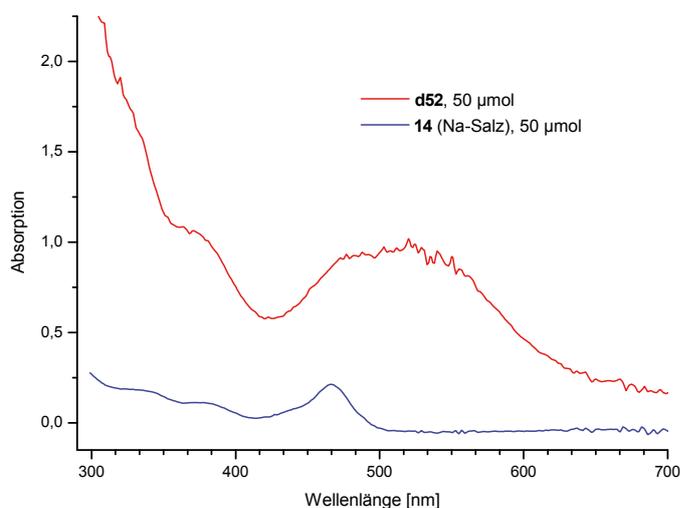


Abbildung 74: Vergleich der UV-VIS-Spektren in MeOH von **d52** und dem Natrium-Salz von **14**

Um Kenntnis zu erlangen, wie weit die oxidative Decarboxylierung getrieben werden kann, wurden 1.21 mM **14** (in PBS Puffer 7.4) mit 1 N HCl auf pH 3 eingestellt. Dabei veränderte sich die grüne Farbe der Lösung nach orange-braun und eine braune Substanz fiel aus. Mittels DC Überprüfung war neben Verbindung **d52** immer noch Radikal **14** vorhanden und wurde nur farblich überdeckt. Um die Decarboxylierung zu verstärken, wurde die Lösung auf 50 °C erwärmt und offen über Nacht gerührt. Der Ansatz wurde anschließend mittels MPLC gereinigt. Die decarboxylierte Form war wiederum nur zu etwa 3 % entstanden. Auch bei dieser drastischen Behandlung konnte keine vollständige Zersetzung des Radikals beobachtet werden. Das zeigt die Stabilität von **14** gegenüber Licht, Sauerstoff und Säure und stützt die Hoffnung auf ihren Einsatz als Spinsonde.

e. BESTIMMUNG DES VERTEILUNGSKOEFFIZIENTEN

Der Verteilungskoeffizient ($\log P$, K_{ow}) ist ein experimentell bestimmbares Maß für die Verteilung einer Substanz in zwei nicht miteinander mischbaren Lösungsmitteln und wird durch den Nernst'schen Verteilungssatz beschrieben.

$$P = \frac{C_o}{C_w}$$

c_o = Konzentration im organischen Lösungsmittel

c_w = Konzentration im wässrigen Lösungsmittel

Der $\log P$ charakterisiert die hydrophilen und lipophilen Eigenschaften einer Verbindung. Neben der klassischen Methode der Verteilung zwischen Oktanol und Wasser wurde von uns auch eine Bestimmung mit mittelkettigen Triglyceriden (MCT) und PBS-Puffer (pH 7.4) durchgeführt. Als Ausgangskonzentrationen wurden für das Radikal **13** 50 µg/ml (46.88 µM) und für das Radikal **14** 55.2 µg/ml (50.06 µM) eingesetzt. Die Verteilung in den Phasen wurde mittels ESR-Spektroskopie bestimmt und ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Bestimmung des Verteilungskoeffizienten von Radikal **13** und **14** mit der Methode aus Kapitel 6.4c

Radikal 13

Oktanol/ Wasser	Amplitude [a.u.]	Konz. [µM]	$P = \frac{C_o}{C_w}$	$\log P$
Oktanol Start	423400	46.88	0.0443	<u>-1.35</u>
Wasser Start	1450700	46.88		
Oktanol nach Schütteln	35620	3.94		
Wasser nach Schütteln	2752600	88.95		

MCT/ Puffer pH 7.4	Amplitude [a.u.]	Konz. [μM]	$P = \frac{C_o}{C_w}$	log P
MCT Start	771520	46.88	0.0484	<u>-1.32</u>
Puffer Start	1412200	46.88		
MCT nach Schütteln	69620	4.23		
Puffer nach Schütteln	2634800	87.47		

Radikal 14

Oktanol/ Wasser	Amplitude [a.u.]	Konz. [μM]	$P = \frac{C_o}{C_w}$	log P
Oktanol Start	481840	50.06	0.0369	<u>-1.43</u>
Wasser Start	1134900	50.06		
Oktanol nach Schütteln	41200	4.28		
Wasser nach Schütteln	2629400	115.98		

MCT/ Puffer pH 7.4	Amplitude [a.u.]	Konz. [μM]	$P = \frac{C_o}{C_w}$	log P
MCT Start	879760	50.06	0.0262	<u>-1.58</u>
Puffer Start	1396850	50.06		
MCT nach Schütteln	44380	2.53		
Puffer nach Schütteln	2684400	96.2		

Der Verteilungskoeffizient von -1.35 für **13** und -1.43 für **14** belegt den hydrophilen Charakter der Radikale, wenn sie als Carboxylate bei physiologischem pH (7.4) gelöst sind. Das große Interesse am Verteilungskoeffizient besteht zum einen wegen der Verwendung der Radikale in Formulierungen mit der Fragestellung: In welche Phase von z.B. Emulsionen, Nanopartikeln, Implantaten oder mehrphasigen Arzneiformen wird wie viel der Spinsonde übergehen? Aus dem ESR-Signal soll ja auf die Umgebungsbedingungen des Radikals geschlossen werden. Zum anderen gibt der log P einen groben Anhaltspunkt über die Verteilung in vivo. Da der Verteilungskoeffizient keine Aussage über die Löslichkeit macht, kann man mit diesem Wert nur auf bestimmte Eigenschaften der Substanz schließen. Neben dem log P wird deshalb auch oft entsprechend der Distributionskoeffizient (log D) angegeben, der das Verhältnis der Summe der Konzentration aller Formen der Substanz (ionisiert plus nichtionisiert) in jeder der zwei Phasen wiedergibt. Für die Radikale **13** und **14** ist also eine starke Anreicherung in hydrophilen Kompartimenten und keine ZNS-Gängigkeit zu erwarten.

f. ABHÄNGIGKEIT DER LINIENBREITE VON DER VISKOSITÄT DES LÖSUNGSMITTELS

Polarität und Viskosität des Lösungsmittels haben bekanntlich Einfluss auf die Linienbreite von ESR-Signalen. Daher sollte untersucht werden, ob ein systematischer Zusammenhang für die von uns bearbeiteten Radikale erkennbar ist. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass der Parameter „Viskosität“ nicht unabhängig von anderen Parametern verändert werden kann, die ebenfalls Einfluss auf die Linienbreite haben wie; Polarität (gegeben), O₂-Gehalt (einstellbar), Solvation (gegeben) oder relatives Verhältnis von Carbonsäure und Carboxylat-Form der TAMs (abhängig vom pH, Solvens und Ionenstärke). Wie im UV-Vis-Experiment in Kapitel 4.7.1d beschrieben, nimmt die Absorption beim Austausch von Wasser gegen Methanol über die Zeit rasch ab. Daraufhin wurde untersucht, ob die veränderte Absorption von einer Änderung der Linienbreite begleitet ist. Folglich wurde **14** in der Standardkonzentration von 50 μM in verschiedenen Lösungsmitteln vermessen (Abbildung 75) und eine Stabilitätsuntersuchung durch über 6 Wochen wiederholte Messung der Lösungen, die zwischenzeitlich im Kühlschrank (2-8 °C) gelagert wurden, durchgeführt.

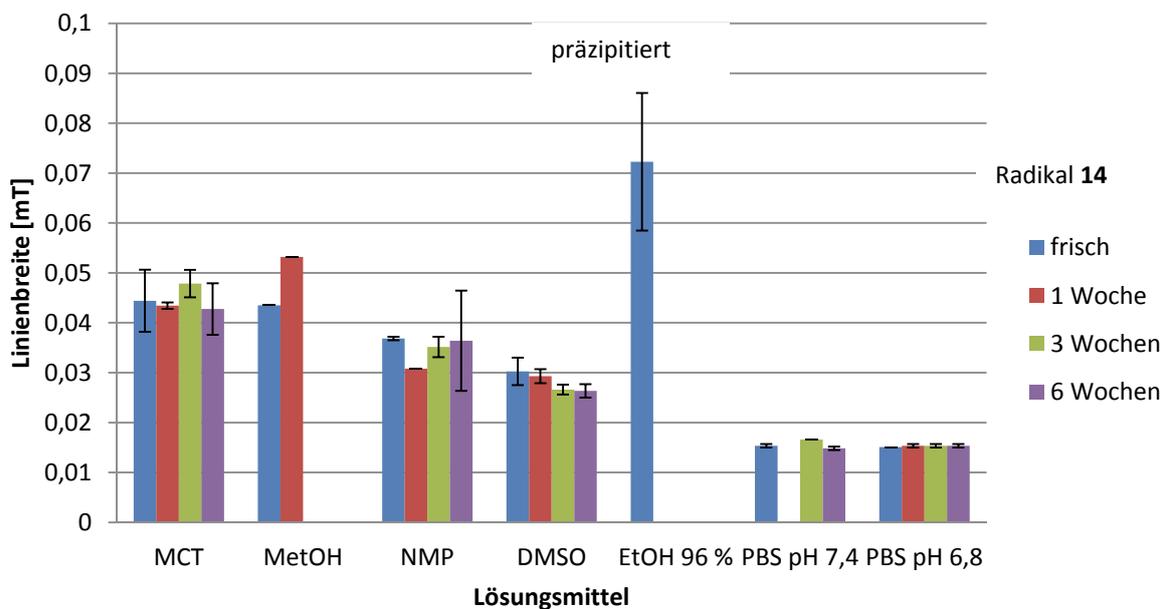


Abbildung 75: Abhängigkeit der Linienbreite der ESR-Spektren von **14** in unterschiedlichen Lösungsmitteln und verschiedenen Zeitpunkten der Lagerung (NMP = *N*-Methyl-2-pyrrolidon)

Das Messergebnis in Ethanol war mit einer Linienbreite von ~ 0.07 mT sehr auffällig. Diese Linienbreite ist das Vierfache derer bei pH 7.4 in PBS-Puffer. Wir erklären dieses Phänomen mit der sehr schlechten Löslichkeit von **14** in Ethanol. Auffällig war auch, dass sich die *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP)-Lösung sehr schnell rotbraun verfärbte, was aber keinen signifikanten Einfluss auf die Linienbreite hatte. Allgemein ist auch hier für jedes Lösungsmittel einzeln betrachtet keine Abhängigkeit der Linienbreite über die Lagerungsdauer festzustellen, also ist das Radikal oder der größte Teil davon über diese Zeit und Lagerbedingungen stabil. Viskosere Lösungsmittel (MCT, NMP) führen konsistent und erwartungsgemäß zu breiteren Linien.

Um diesen Sachverhalt detaillierter zu untersuchen, wurde ein Viskositäts-Experiment mit Glycerol-Wasser-Mischungen als Lösungsmittel durchgeführt. Glycerol ist in unterschiedlichen Reinheiten im Handel erhältlich. Für pharmazeutische Zwecke wird es in den Qualitäten 99.8 % und ~ 86 % mit unterschiedlicher Viskosität (99.8 %: 1480 mPa·s und 86 % ~ 100 mPa·s bei 20 °C) angeboten. Für die Viskositäts-Experimente wurden Glycerol)-Wasser-Gemische verschiedener Konzentration (0, 8.5, 21.3, 42.5, 63.8 % und 85 % Glycerol) hergestellt.

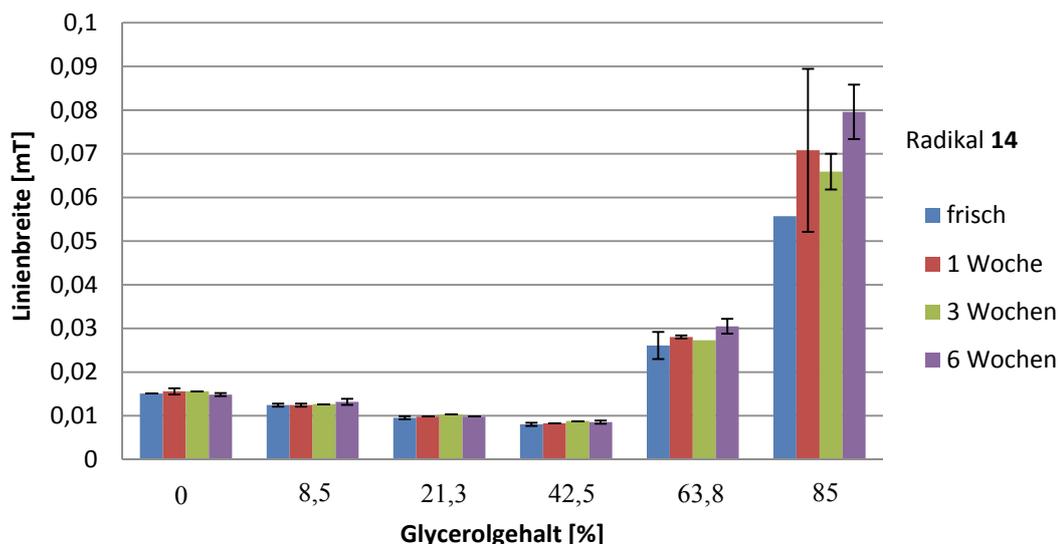


Abbildung 76: Abhängigkeit der ESR-Linienbreite von **14** in unterschiedlichen Glycerol-Wassermischungen

Im Bereich von 0 bis 40 % Glycerol-Anteil gibt es eine leichte Abnahme der Linienbreite. Kutsche et al.^[106] untersuchten die Sauerstofflöslichkeit von kurzkettigen Alkoholen (MeOH, EtOH, Isopropanol und *n*-Butanol sowie Glycerol) bis zu einem Gewichtsprozent von 18 und stellten fest, dass die Sauerstoff-Löslichkeit bei 25 °C in kurzkettigen Alkoholen größer ist als in Wasser, aber mit steigender Kettenlänge der Alkohole abnimmt. In Glycerol-Wassermischungen (25 °C) nimmt die Löslichkeit des Sauerstoffs mit steigenden Gewichtsprozenten an Glycerol ab. Demzufolge ist die Abnahme der Linienbreite in unserem Experiment eher auf eine geringer werdende Sauerstoff-Löslichkeit als auf einen Viskositätseinfluss zurückzuführen.

Der starke Anstieg der Linienbreite ab einem Glycerolanteil von 60 % in Abbildung 76 ist auf die schlechte Löslichkeit von **14** in diesem Mischungsverhältnis zurückzuführen.

Um zu klären, von welchem der Parameter die Linienbreite wesentlich abhängt, wurden Glycerol-Wassergemische mit 8.5, 21.3, 42.5 und 63.8 % hergestellt und darin 50 µM **13** und **14** gelöst. Die Lösungen wurden zwei Minuten mit Stickstoff begast und der Restsauerstoffanteil (max. 2 %) mittels Sauerstoffsonde bestimmt. Anschließend wurden die Proben mittels ESR vermessen und die Linienbreite des Signals bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 77 dargestellt.

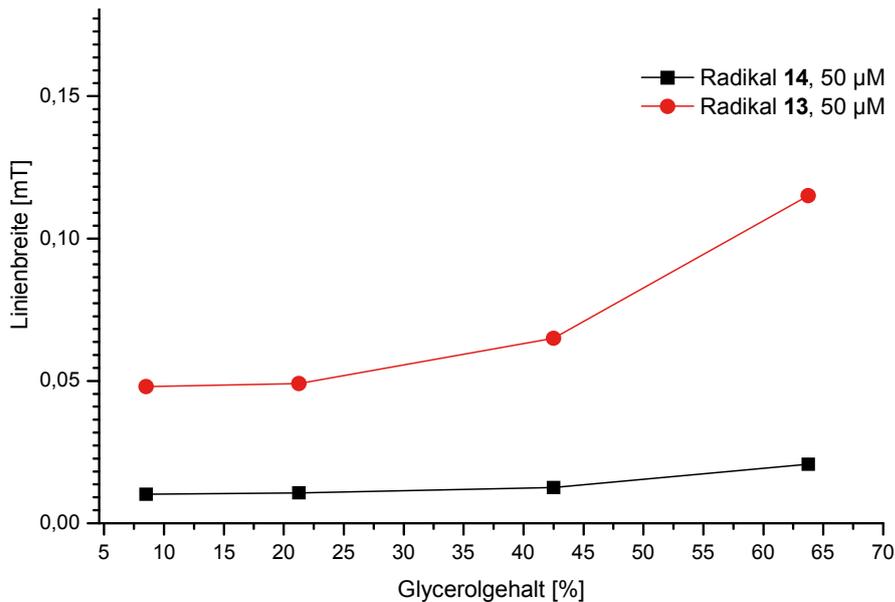


Abbildung 77: Abhängigkeit der ESR-Linienbreite der Radikale **13** und **14** in unterschiedlichen Glycerol-Wassergemischen (maximaler Sauerstoffanteil 2 %)

Aus diesem Experiment ist ersichtlich, dass die Viskosität bis zu einem Wert von ca. 40 % Glycerol-Anteil keinen Einfluss auf die Linienbreite hat, sondern der Anteil an gelösten Sauerstoff für die beobachtete Veränderung der Linienbreite verantwortlich ist. Der Anstieg der Linienbreite ab einer Glycerol-Konzentration größer ca. 40 % ist auf die schlechte Löslichkeit zurück zu führen. Die Erkenntnis, dass die Viskosität keinen signifikanten Einfluss auf die Linienbreite ausübt, ist für in vivo-Experimente wichtig. Blut hat eine dynamische Viskosität von 4.5 mPa·s bei 37 °C. Diesen Wert nimmt eine 50 %ige Glycerollösung bei etwa 40 °C an. Somit kann bei in vivo Bestimmungen der Einfluss der Viskosität auf die ESR-Signallbreite vernachlässigt werden. Tabelle 5 führt zum Vergleich dynamische Viskositätswerte der eingesetzten Lösungsmittel bei unterschiedlichen Temperaturen unter Normaldruck auf.

Tabelle 5: typische Viskositätswerte aus der Literatur

Substanz	η in mPa·s
Wasser (20 °C)	1.002
Miglyol 812 (MCT)	27-33
DMSO (20 °C)	1.996
N-Methyl-2-pyrrolidon (NMP, 25 °C)	1.65
Methanol (20 °C)	0.59
Ethanol (20 °C)	1.19
Blut (37 °C)	~4.5
Serum (20 °C)	1.56
Plasma (20 °C)	1.73

Die in Abbildung 75 gezeigten Linienverbreiterungen lassen sich mit den in Tabelle 5 aufgeführten Viskositätswerten besser erklären. DMSO und NMP haben eine ähnliche Viskosität bei 20 °C, was sich auch in der ähnlichen Linienbreite widerspiegelt. MCT führt neben Methanol und Ethanol mit einem Viskositätswert von $\sim 30 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ zu der größten Linienverbreiterung. Die Linienverbreiterungen hängen außerdem mit der sehr guten Sauerstofflöslichkeit in Methanol und Ethanol und mit der schlechteren Löslichkeit des Radikals in MCT und Ethanol zusammen.

g. BESTIMMUNG DER SAUERSTOFFABHÄNGIGKEIT

Physiologische Bedeutung des Sauerstoffs:

Für den Energiegewinn benötigt der Organismus molekularen Sauerstoff, damit ist er der elementare Bestandteil der lokalen Gewebeversorgung. Er wird von den Zellen aus dem Kapillarblut entnommen und im oxidativen Stoffwechsel verbraucht. Dazu muss der Sauerstoff aber zuerst in die Zelle gelangen und dafür sind (neben dem Transportmedium) zwei Parameter von Bedeutung: Der Sauerstoffpartialdruck und die Sauerstoffsättigung. Letzteres spiegelt den Anteil von HbO_2 am Gesamthämoglobin wieder. Abbildung 78 beschreibt die Abhängigkeit der Sauerstoffsättigung vom Sauerstoffpartialdruck. Sie weist einen sigmoidalen Verlauf mit Sättigungsverhalten auf. Die O_2 -Bindungskurve begünstigt die O_2 -Aufnahme in der Lunge und die O_2 -Abgabe ins Gewebe.

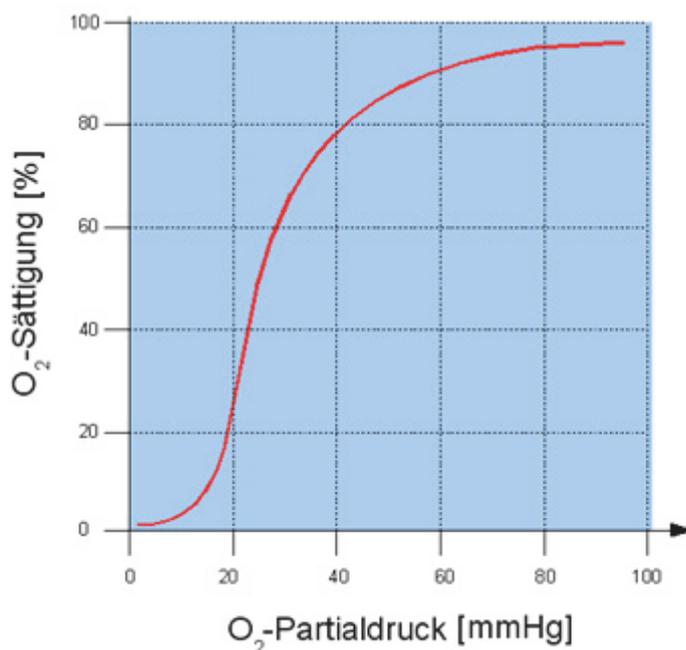


Abbildung 78: Sauerstoffbindungskurve nach Mutschler^[107]

Der Sauerstoffgehalt der Luft beträgt ca. 21 Vol. % bei 1.01 bar bzw. 760 mmHg Luftdruck. Der Partialdruck des Sauerstoffs (p_{O_2}) in der Einatemluft beträgt also ca. 160 mmHg. Durch Vermischung mit der Totraumluft und nach Abzug der Wasserdampfsättigung der Luft bleibt in den Alveolen ein p_{O_2} von $\sim 100 \text{ mmHg}$ ($\sim 13 \text{ Vol. \%}$) übrig. Das venöse

Blut weist einen pO_2 von ca. 40 mmHg (~ 5 Vol. %) auf. Im Gewebe liegt der Sauerstoffdruck unter dem des arteriellen Blutes, folglich diffundiert der Sauerstoff entlang des Druckgefälles in das Gewebe. Ist die adäquate Sauerstoffversorgung des Gewebes infolge einer Erkrankung gestört, tritt Sauerstoffmangel ein. Dieser Mangel kann bis zum Zelltod und damit zur Gewebsnekrose führen. Die rechtzeitige klinische Erfassung der Sauerstoffminderversorgung ist für ein erfolgreiches Behandlungsergebnis von entscheidender Bedeutung. Erkrankungen wie Krebs, Herzinfarkt, Schlaganfall stehen in großem Zusammenhang mit vermindertem Sauerstoffangebot im Körper. Der arterielle Sauerstoffpartialdruck ist somit eine der wichtigsten (patho)physiologischen Regelgrößen. Durch zahlreiche Regelprozesse wird der arterielle pO_2 unter physiologischen Bedingungen konstant bei 95 mmHg (~ 12.5 % O_2) gehalten. Sinkt der arterielle pO_2 auf Werte unter 70 mmHg, (~ 9.2 % O_2) ist die ausreichende Sauerstoffversorgung des Gesamtorganismus nicht mehr gewährleistet und es herrscht Hypoxie. Bereits eine drei Minuten andauernde Hypoxie kann zu einer irreversiblen Schädigung von Gehirnzellen führen. Ab einem pO_2 von 70 mmHg konzentriert sich der Körper auf die Versorgung lebenswichtiger Organe mit Sauerstoff, vorrangig des Gehirns. Dieser Kompensationszustand bricht ab einem pO_2 von 50 mmHg (~ 6.5 % O_2) zusammen: Die Herzfrequenz fällt ab (Bradykardie) und der Blutdruck sinkt (Hypotonie). Ein pO_2 von 30 mmHg (~ 4 % O_2) wird als letale Schwelle angesehen.^[108,109] Ursache für eine global verschlechterte Sauerstoffversorgung des Organismus kann eine Atmungs- und Herz-Kreislaufstörung oder Anämie sein. Auch ein lokal gesteigerter Bedarf an Sauerstoff (z.B. bei schnell wachsenden Tumoren) kann einen relativen Sauerstoffmangel im Gewebe herbeiführen. Chronisch entzündetes Gewebe ist, wie z.B. bei der Rheumatoiden Arthritis von sauerstoffarmen (hypoxischen) Arealen gekennzeichnet. Bei unvollständiger Reduktion von molekularem O_2 entstehen reaktive Sauerstoff-Spezies (Singulett-Sauerstoff (1O_2), Hydroxyl-Radikale ($\cdot OH$), Alkoxy-Radikale ($R\cdot O$), Superoxidanion-Radikal ($\cdot O_2^-$), Peroxyl-Radikale ($R\cdot OO\cdot$), Stickstoffmonoxid und Wasserstoffperoxid). In hohen Konzentrationen können diese Biomoleküle vor allem DNA schwer schädigen. Alle Vorgänge, die eine vermehrte Bildung reaktiver O_2 -Spezies auslösen, werden unter der Bezeichnung oxidativer Stress zusammengefasst.^[107] Reaktive O_2 -Spezies sind in der Lage, durch Membranschädigung das Abtöten von Bakterien zu erleichtern. Sie können aber auch zytotoxisch gegen körpereigene Zellen wirken, sowie die Gewebematrix zerstören.

Die Konzentration an Sauerstoff im Gewebe zu kennen bzw. zu bestimmen ist also von enormer Bedeutung. Hierfür gibt es immer noch keine ausgereifte Methode. Es wurden invasive Techniken wie die Clark-Elektrode^[110] für die Sauerstoff-Quantifizierung entwickelt.^[111-113] Neben der Invasivität dieser Methode besteht ihr Nachteil darin, dass die Elektroden direkt im Blut oder in dem zu untersuchendem Gewebe platziert werden müssen. Demzufolge können sie die Sauerstoffkonzentration nur punktuell bzw. in der direkten Umgebung der Messelektroden wiedergeben.

Traditionelle Methode zur Bestimmung des pO_2 :

Zur Bestimmung des pO_2 wendet man hauptsächlich ein elektrochemisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von gelösten Stoffen an.^[114,115] Das Prinzip beruht auf der amperometrischen Messung von Sauerstoff mit z.B. dem Oxygen-Meter Typ Clark, wobei als

Messelektrode (Kathode) eine Platin- oder Goldelektrode und als Bezugslektrode (Anode) eine Ag/AgCl-Elektrode verwendet wird, die beide in eine Elektrolytlösung eintauchen. Die angelegte Spannung bleibt konstant (~ 700 mV). Gemessen wird der Stromfluss, der proportional zur Sauerstoffkonzentration ist. Gelangen O_2 -Moleküle an die Oberfläche des Edelmetalls, so werden sie dort reduziert. Die damit verbundene Ladungsverschiebung in dem geschlossenen Stromkreis wird mit einem Amperemeter gemessen. Die Stromstärke ist unmittelbar abhängig von der Zahl der O_2 -Moleküle, die durch Diffusion an die Elektrodenoberfläche gelangen und damit direkt proportional dem pO_2 in der Lösung.^[110]

Diese invasive Methode wird als eine diagnostisch wichtige und sichere Methode beurteilt. Sie steht allerdings bis dato leider nur für den Einsatz in Weichgeweben zur Verfügung, da die Elektroden, wie bereits erwähnt, direkt im Blut oder in dem zu untersuchendem Gewebe platziert werden müssen. Hier soll die ESR-Messtechnik wichtige Fortschritte bringen: Erstens als nicht-invasive Methode zur O_2 -Bestimmung, zweitens durch den Einsatz speziell entwickelter Spinsonden die O_2 -Messungen an verschiedenen Stellen und in verschiedenen Gewebstypen. Bisher wird die ESR-Spektroskopie noch bevorzugt zur Untersuchung von reaktiven O_2 -Spezies in verschiedenen isolierten biologischen Systemen verwendet, um deren Einfluss bei der Entstehung verschiedener (z.B. kardiovasulärer) Erkrankungen besser verstehen zu können.^[116] Doch in naher Zukunft sollen nach Applikation entsprechender Spinsonden (ähnlich den Röntgenkontrastmitteln beim Röntgen) mittels ESR verschiedene physiologische Zustände (pH, O_2 -Gehalt) bestimmbar sein.

Es wird in den folgenden Experimenten untersucht, in wie weit die TAM-Radikale diesen Anforderungen gerecht werden und als nicht invasive sauerstoffabhängige Spinsonden zum Einsatz kommen können.

Grundlagen zur Bestimmung der Sauerstoffabhängigkeit von TAM-Radikalen:

Der Partialdruck eines Gases korreliert mit dessen Konzentration (*Henry-Dalton-Gesetz*).^[107]

$$c = \alpha \cdot P$$

c = Konzentration des gelösten Gases

α = Bunsen'sche Löslichkeitskoeffizient

P = Partialdruck

Je höher der Partialdruck, desto größer ist auch der Anteil des in einer Flüssigkeit (z.B. Blut) gelösten Gases. Wesentlich beeinflusst wird die Löslichkeit allerdings von der stoffspezifischen Konstante α . Aufgrund dieses Zusammenhanges ist der pO_2 von Bedeutung für die Löslichkeit und den Transport von Sauerstoff im Blut mit Hilfe des Hämoglobins in den Erythrozyten. In fast allen Flüssigkeiten können Gase bis zu einem gewissen Grad aufgenommen oder, anders ausgedrückt, physikalisch gelöst werden. Die Menge des gelösten Gases (in unseren Versuchen N_2 und O_2) ist dabei vom jeweiligen Partialdruck abhängig. Bringt man die Flüssigkeit und das Gas so lange in Beziehung zueinander, bis ein thermodynamisch

ches Gleichgewicht zwischen Gasphase und flüssiger Phase eingetreten ist, dann kann man dem Gas in der Flüssigkeit den gleichen Partialdruck zuordnen, wie er in der Gasphase vorliegt. Man spricht vereinfachend in diesem Sinne vom Gaspartialdruck in einer Flüssigkeit.^[107] Der Gaspartialdruck ist somit einer der Faktoren, von dem die Konzentration eines gelösten Gases in der Flüssigkeit abhängt. Die Löslichkeit von Sauerstoff in einem Liter Blut beträgt $1.38 \mu\text{mol}$ pro mmHg bei 37°C .

Experiment:

Tritt molekularer Sauerstoff mit einer Spinsonde in Wechselwirkung, erfolgt eine Linienverbreiterung im ESR-Signal. Für dieses Phänomen gibt es aber nur wenige Untersuchungen bzw. sind dafür noch keine geeigneten validierten Messmethoden entwickelt worden. Dhimitruka et al.^[14] beschreiben eine lineare Abhängigkeit der Linienbreite bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen (Abbildung 79). Da in ihrem Experiment nur sehr wenige Messpunkte (0 %, 21 %, 100 %) zur Beschreibung der Abhängigkeit der Linienbreite vom Sauerstoff herangezogen werden und gerade der (patho)physiologisch interessierende Bereich zwischen 5 % und 15 % fehlt, ist das Experiment von Dhimitruka medizinisch von sehr begrenzter Aussagekraft. Im Folgenden wird erstmals die Untersuchung der Linienbreiten von TAM-Radikalen in Abhängigkeit von niedrigen Sauerstoffkonzentrationen beschrieben.

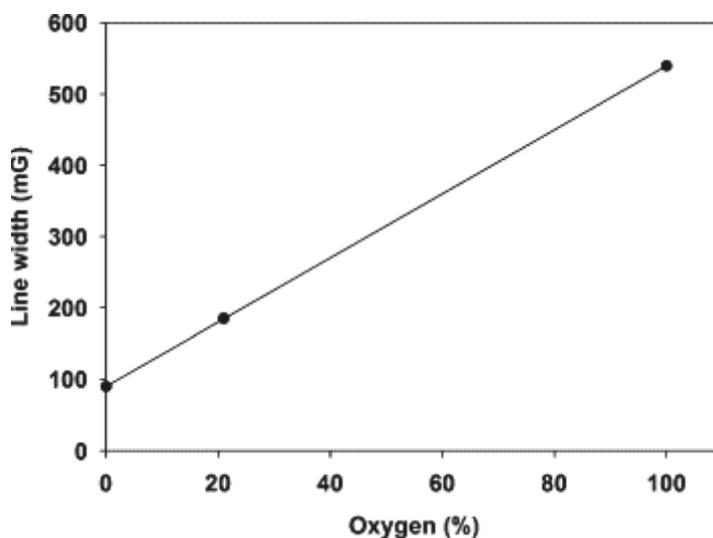


Abbildung 79: Abhängigkeit der Linienbreite von der Sauerstoffkonzentration aus Dhimitruka et al.^[14] (betrachtet wurde Radikal **13** (1.6 mM in Phosphatpuffer 0.1 M, pH 7.4) im X Band mit 1.2 GHz)

Die TAM-Radikale (**13/14** in einer Konzentration von ca. $50 \mu\text{M}$ sowie **32** in einer Konzentration von ca. 1 mM gelöst in PBS-Pufferlösung pH 7.4) wurden bei Normaldruck und Raumtemperatur hergestellt und mit der in Kapitel 6.4d beschriebenen Methode auf die jeweilige Sauerstoffkonzentration eingestellt. Die jeweiligen eingestellten O_2 -Konzentrationen wurden mit Hilfe des Oxygen Microsensors[®] kontrolliert. Aus Abbildung 80 ist ersichtlich, dass mit zunehmender Sauerstoffkonzentration die Linienbreite aller drei TAM-Radikale

linear zunimmt. Auch für die breitere Linie des Radikals **32** mit ~ 0.0055 mT kann eine lineare Abhängigkeit der Linienbreite von der Sauerstoffkonzentration gezeigt werden. Der Vorgang war reversibel, denn nachdem die Proben mit der jeweiligen Sauerstoffkonzentration begast wurden, fiel die Linienbreite nach erneuter Begasung mit Luft auf den Ausgangswert zurück. Durch den Austausch der ^1H -Atome in den Methylgruppen gegen ^2H -Atome verringerte sich die Linienbreite des ESR-Signals von **14** noch um 0.0034 mT gegenüber **13**.

Für alle drei Radikale konnte in vitro eindeutig ein linearer Zusammenhang zwischen Linienbreite und Sauerstoffgehalt, auch im (patho)physiologisch relevanten Bereich von 5 % bis 15 % Sauerstoffgehalt nachweisen werden. Der flache Anstieg der drei Geraden erschwert jedoch die Möglichkeit, durch kleine Änderungen in der Linienbreite eine unterschiedliche Sauerstoffkonzentration akkurat und präzise zu quantifizieren. Ob sich der lineare Zusammenhang zwischen Sauerstoff und Linienbreite auch in vivo bestätigen lässt und andere neue TAM-Radikale ebenfalls einen deutlichen linearen Zusammenhang zwischen Sauerstoffgehalt und Linienbreite aufzeigen, werden zukünftige Untersuchungen klären müssen.

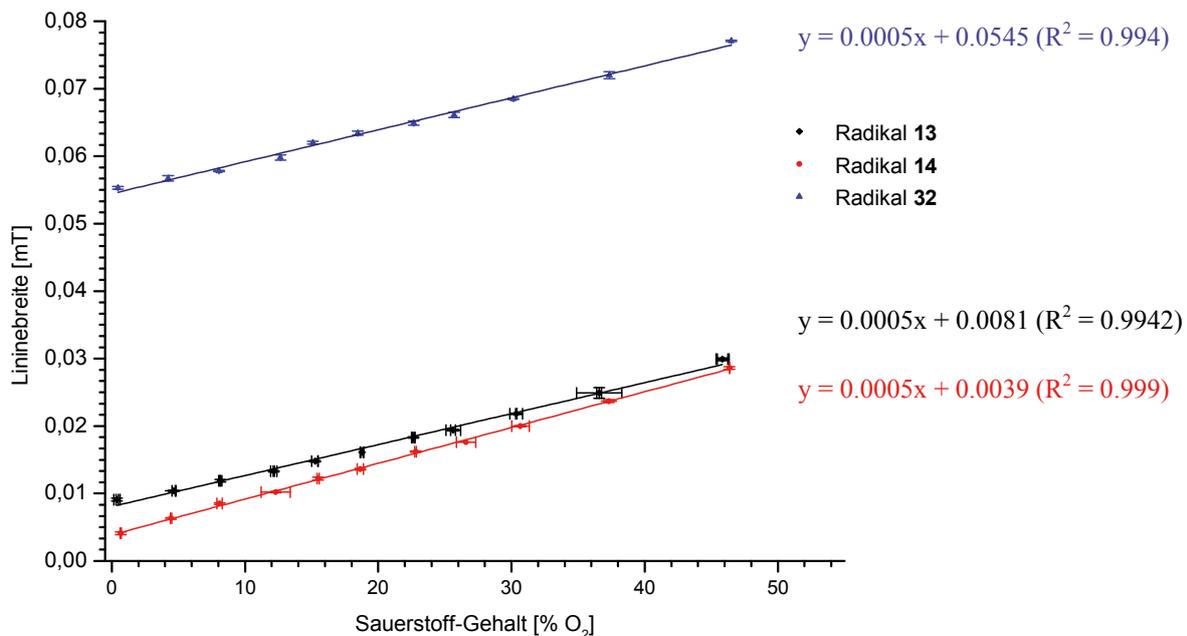


Abbildung 80: Abhängigkeit der Linienbreite der Radikale **13**, **14** und **32** von der Sauerstoffkonzentration

Da die ESR-Messung und die anschließende Sauerstoffbestimmung ungefähr 30 Minuten in Anspruch nehmen, wurde die Stabilität des Sauerstoffsgehaltes im verschlossenen Vial (Dichtigkeit des Vials) mit Hilfe des folgenden Experiments überprüft:

Langzeitmessung der O₂-Sonde – Dichtigkeitsprüfung der Vials:

Ein Vergleichsvial wurde mit PBS-Pufferlösung (pH 7.4) gefüllt und zwei Minuten lang mit reinem Stickstoff über eine Kanüle (Braun[®], Sterican Gr. 1) durch das Septum mit Auslasskanüle (Braun[®], Sterican Gr. 1) begast. Anschließend wurde der Sauerstoffgehalt mit-

tels O₂-Sonde jede Minute innerhalb der ersten Stunde (später alle 5 Minuten) bestimmt (Abbildung 81). Nach der Begasung blieb der Sauerstoffgehalt für ca. 30 - 45 Minuten konstant, danach stieg er langsam an. Nach ca. 3 Stunden (Abbildung 82) begann ein steiler Anstieg des O₂-Gehaltes. Da während der gesamten Messzeit das Septum mit der Kanüle der O₂-Sonde perforiert war, kann davon ausgegangen werden, dass die Werte für nicht-perforierte Septen (verschlossene Vials während der ESR-Messung) noch „besser“ sind. Begasung, ESR-Messung und O₂-Messung sind in unseren Versuchen innerhalb einer Stunde abgeschlossen gewesen und damit im Zeitbereich von unter zwei Stunden, in welchem der Sauerstoffgehalt im Probengefäß annähernd konstant bleibt.

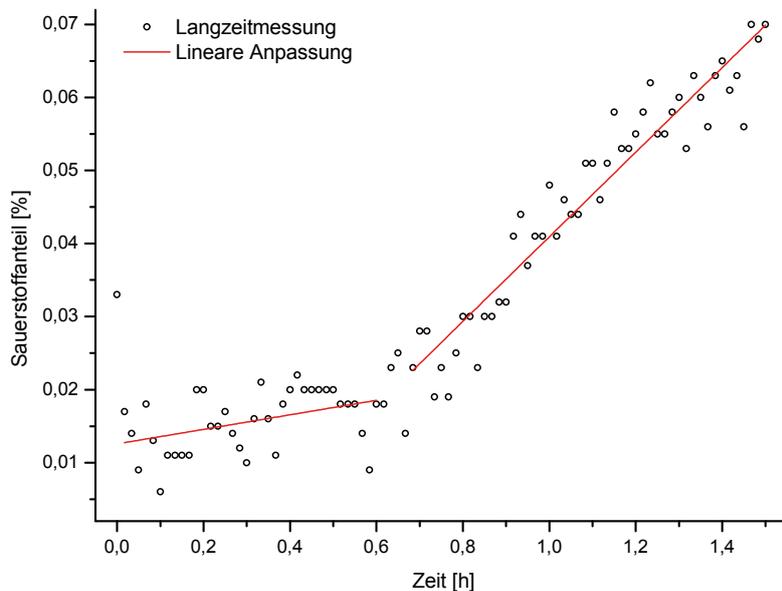


Abbildung 81: Langzeit-Sauerstoffbestimmung über 1.5 h

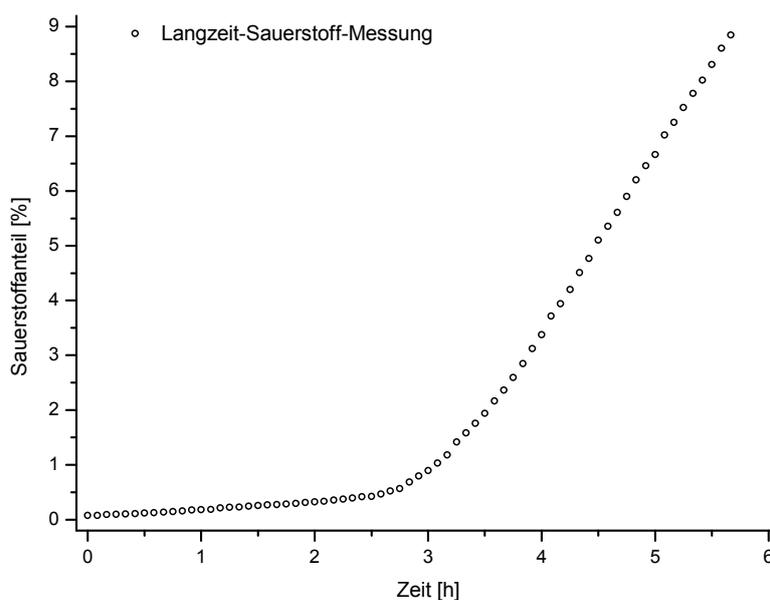


Abbildung 82: Langzeit-Sauerstoff-Messung über 6 h

Wie aus dem Experiment zur Langzeitmessung ersichtlich ist, veränderte sich der Sauerstoffgehalt im Vial über die ersten zwei Stunden nur minimal (Anstieg von 0.01 auf 0.3 %). Somit kann für die Sauerstoffmessungs-Experimente in dieser Arbeit von einem eingestellten und im Rahmen der Messgenauigkeit der O₂-Sonde exakt bekannten Sauerstoffgehalt ausgegangen werden.

h. ZYTOTOXIZITÄTSUNTERSUCHUNGEN

Um TAM-Radikale als diagnostische Methode einsetzen zu können, ist die Kenntnis über deren mögliche Toxizität von besonderer Wichtigkeit. Die Lebensfähigkeit von Zellen kann mit Hilfe eines MTT-Testes bestimmt werden. In diesem Viabilitätstest wird die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen bestimmt. Die Methode beruht auf der enzymatischen Reduktion des wasserlöslichen, gelben Tetrazoliumsalzes MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu einem blauen, wasserunlöslichen Formazan (Abbildung 83).

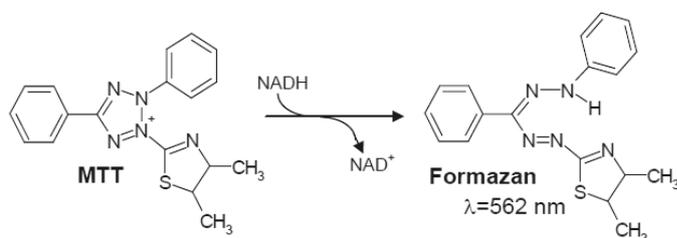


Abbildung 83: Reduktive Spaltung des gelben Farbstoffes MTT in blaues Formazan; Darstellung aus ^[117]

Das Wachstumsmedium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM) der HepG2-Zellen (humanen Leberkarzinomzellen) enthält 2 mM Glutamin; parallel dazu wird einem Test noch 10 % fötales Kälberserum (FCS) hinzugesetzt. Die Zellen werden für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die untersuchten Radikale **14** und **32** wurden dazu in DMSO gelöst und wiesen folgende Konzentrationen auf: 500 μM, 250 μM, 125 μM, 62.5 μM, 31.3 μM und 15.6 μM. Die Dreifach-Bestimmung wurde gemittelt und die gemessenen Exstinktionen in ein prozentuales Verhältnis gesetzt. Die Viabilitätswerte (in %) beziehen sich auf unbehandelte Zellen (= 100 %). Für die Auswertung wurden die optischen Dichte(OD)-Werte mit dem Blank subtrahiert (OD_{kor.}). Die Zellviabilität wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Viabilität [\%]} = \frac{100 \times (\text{OD}_{\text{kor. behandelte Zellen}})}{\text{OD}_{\text{kor. unbehandelte Zellen}}}$$

Die Konzentration, bei der die Zellviabilität bei 50 % liegt entspricht dem IC₅₀-Wert. Nach Aussagen von M. C. Krishna liegt die LD₅₀ von TAM-Radikalen (kein genaues benannt) bei rund 2 mM.^[118] Die Testergebnisse zeigen, dass die getesteten Radikale **14** und **32** an den HepG2-Zellen untoxisch sind. Die Standardabweichungen der Messpunkte sind mit 1 bis 15 % (Variabilitätskoeffizient) akzeptabel (Abbildung 84).

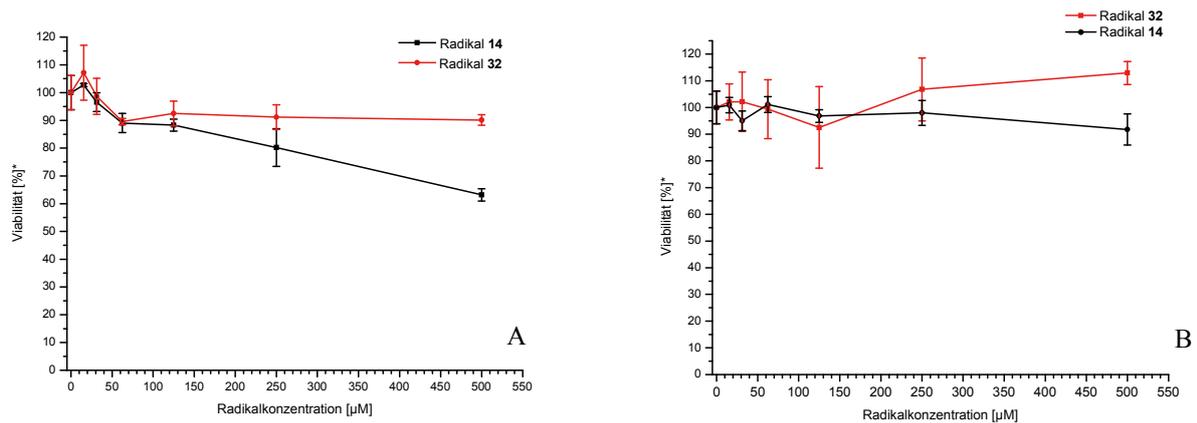


Abbildung 84: Viabilität in % mit Serum (A) und ohne Serum (B) Zusatz

Mit diesen Erkenntnissen wurden die Radikale noch auf ihr Verhalten in Anwesenheit von Thrombozyten und ihr Oxidations- bzw. Reduktionsverhalten getestet.

i. THROMBOZYTEN-TEST

Für dieses Experiment (durchgeführt von unserem Kooperationspartner am Universitätsklinikum Halle) wurde mit frisch gereinigten humanen Thrombozyten durchgeführt. Nach der Blutentnahme der Probanden wurden die Thrombozyten einer Reihe von Zentrifugationschritten unterzogen, anschließend die Zellen in unterschiedlichen Puffer-Lösung resuspendiert, auf eine Zellzahl von $3 \times 10^8/\text{ml}$ eingestellt und entsprechend dem Versuchsplan (Tabelle 6) mit folgenden Fragestellungen weiter behandelt.

Tabelle 6: Ergebnisse des Thrombozyten-Testes

Test 1	Kann 14 (Na-Salz) in Konzentrationen von 2.5, 5, 7.5 und 10 µM alleine die Thrombozyten aktivieren?	Nein
Test 2	Sind die Plättchen sensitiv für Collagen (natürlicher Aktivator, c = 1, 3 oder 5 µg/ml) in Abhängigkeit von der Konzentration?	ja, d.h. Zustand der Plättchen ist in Ordnung
Test 3	Kann 14 (Na-Salz) in Konzentrationen von 2.5, 5, 7.5 und 10 µM zusammen mit einem unterschwelligen Collagenstimulus (1 µg/ml) die PL aktivieren?	Nein
Test 4	Wirkt 14 (Na-Salz) in Konzentrationen von 2.5, 5, 7.5 und 10 µM als Inhibitor?	Nein
Test 5	Kann 14 (Na-Salz) in Konzentrationen von 2.5, 5, 7.5 und 10 µM zusammen mit einem unterschwelligen Epinephrinstimulus (c = 10 µM) die PL aktivieren?	Nein
Test 6	Sind die Plättchen sensitiv für Collagen (natürlicher Aktivator) in Abhängigkeit von der Konzentration?	ja, d.h. Zustand der Plättchen ist in Ordnung
Test 7	Kann 14 (Na-Salz) in Konzentrationen von 2.5, 5, 7.5 und 10 µM zusammen mit einem unterschwelligen Thrombinstimulus (c = 0.01 U/ml) die PL aktivieren?	Nein
Test 8	Wirkt 14 (Na-Salz) als Inhibitor?	Nein

Im Thrombozyten-Test zeigte sich, dass Radikal **14** (Na-Salz, 50 μM) weder ein direkter Aktivator der PL ist, noch als Inhibitor wirkt. Damit wurde gezeigt, dass die Radikale wenig physiologische Eigenwirkung haben, da die Aggregation von Thrombozyten von vielen pharmakologischen Faktoren beeinflusst werden kann.

j. OXIDATIONS- BZW. REDUKTIONSVERHALTEN

(a) zyklische Voltammetrie

Mit Hilfe der Redoxpotentiale sollen die oxidativen und reduktiven Eigenschaften der TAM-Radikale abgeschätzt werden. Die zyklische Voltammetrie ist eine wichtige Methode zur Untersuchung der Kinetik von Elektrodenprozessen. Dabei untersucht man den Stromfluss an einer Elektrode, während man das anliegende Potential verändert. Der Verlauf der so gewonnenen Strom-/Spannungs-Kurve erlaubt Rückschlüsse auf die Reversibilität und Kinetik der einzelnen Elektrodenprozesse. Die Potentialdifferenz ist umso größer, je stärker die Reduktionsmittel und Oxidationsmittel sind. Die Skala der Normalpotentiale erstreckt sich von ca. - 3 V bis ca. + 3 V. Starke Reduktionsmittel haben ein stark negatives Normalpotential und starke Oxidationsmittel haben ein stark positives Normalpotential. In Abbildung 85 ist ein allgemeines Zyklovoltammogramm dargestellt. Die wichtigsten charakteristischen Größen sind das kathodische (E_{pc}) und anodische (E_{pa}) Peakpotential, und das aus diesen beiden Werten ermittelbare Halbstufenpotential ($E_{1/2}$), welches eine gute Näherung für das Normalpotential (E^0) darstellt.

$$E_{1/2} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2} \approx E^0$$

Bei einer reversiblen, ungehinderten Redoxreaktion erhält man bei Absenkung der Spannung einen Strompeak mit umgekehrtem Vorzeichen und gleicher Intensität, der aus der Rückreaktion des Produkts resultiert. Bei ausreichend hoher Differenz zwischen Halbstufenpotential und Umschaltpotential besitzen die Peakpotentiale einen Abstand von $58/n$ mV bei 20 °C zueinander; das Halbstufenpotential $E_{1/2}$ ergibt sich praktisch aus dem Mittelwert der beiden Peakpotentiale (Abbildung 85).^[119]

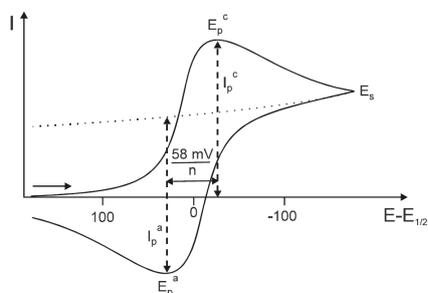
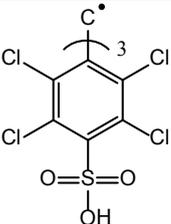
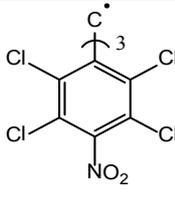
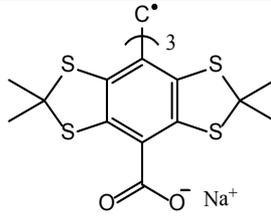


Abbildung 85: Zyklovoltammetrische Kurve für eine reversible kathodische Reduktion des Edukts mit anschließender anodischer Oxidation des Produkts^[119]

Das Redoxpotential einiger unserer TAM-Spinsonden wurde in der Literatur mittels Zyklovoltammetrie beschrieben und ist in Tabelle 7 zusammengefasst. Um die Daten aus der Literatur vergleichen zu können, müssen die gemessenen Potentiale zuvor auf die Normalwasserstoffelektrode (NHE) umgerechnet werden (Tabelle 7).

Tabelle 7: umgerechnete Standardpotentiale (NHE) verschiedener Spinsonden

Strukturformel			
Substanzbezeichnung	32	Tris-(2,3,5,6-tetrachlor-4-nitrophenyl)methyl-Radikal	13-Na-Salz
Literaturwerte	$E_{\text{red}}^0 = -0.42 \text{ V}^{[55]}$	$E_{\text{(red)}}^0 = 0.28 \text{ V}^{[54]}$	$E_{1/2 \text{ (red)}} = -0.626 \text{ V}$ $E_{1/2 \text{ (ox)}} = 0.458 \text{ V}^{[105]}$
Elektrode	Kalomelektrode (SCE)	Kalomelektrode (SCE)	Ag/AgCl Elektrode
Bedingungen	1 mM in 0.1 M LiC-IO ₄ , Scan Rate von 50 mVs ⁻¹ , 25 °C unter Argon	1m M in CHCl ₃ /MeOH (2:1) mit 0.1 M Bu ₄ NClO ₄ , Scan Rate von 100 mVs ⁻¹	1 mM in H ₂ O mit 0.15 M KCl mit einer Scan Rate von 10 mV s ⁻¹
angepasste Werte*			
E ⁰ in V	-0.179 (red)	0.521	
E _{1/2 (red)} in V			-0.429
E _{1/2 (ox)} in V			0.655

(*Berechnungsgrundlage: Ag/AgCl: $E^0 \text{ Ag/AgCl} = E^0 \text{ NHE} - 0.197$; SCE: $E^0 \text{ SCE} = E^0 \text{ NHE} - 0.241$; Wie eingangs beschrieben, entspricht das Halbstufenpotential in etwa dem des Standardpotentials.)

Die umgerechneten Werte können nun miteinander verglichen werden. Hieraus werden die Beobachtungen aus unseren Experimenten [vgl. Kapitel 4.7.1j(b)] bestätigt. Radikal **32** wird leicht reduziert, ist aber oxidationsstabil. Für Radikal **13** ist es umgekehrt: Es ist reduktionsstabil, aber oxidationsempfindlich. Durch die sterische Hinderung wird die Oxidationsempfindlichkeit zudem noch weiter herab gesetzt.

(b) Zelllysate-Untersuchungen

Mit Hilfe von Zelllysate-Experimenten (durchgeführt in der Arbeitsgruppe von Dr. M. Drecher Universität Konstanz) lässt sich herausfinden, wie schnell Substanzen durch Enzyme im Zelllysate reaktiv abgebaut werden. Unsere Versuche wurden mit einem *Xenopus laevis* Oocyten Zellextrakt durchgeführt. Der *Xenopus laevis* Oocyten Versuch ist ein etabliertes und einfach zu handhabendes Modellsystem, um z.B. Mikroinjektionsexperimente durchzuführen. In unserem Experiment wurden 5 µl der jeweiligen Spinsonde (0.5 mM von **14**, **30**, **32**

und 2,2,5,5-Tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy-Radikal) mit 15 μl des Zelllysats versetzt und 10 Sekunden gevortext. Diese Mischung wurde in einer Ringcaps-Kapillare vermessen. Wie Abbildung 86 veranschaulicht, ist das Radikal **14** hinsichtlich seiner Reduktionsempfindlichkeit vergleichbar mit der Nitroxides. Die chlorierten TAMs (**30**, **32**) schneiden, wie aus den Standardredoxpotentialen bekannt, mit einer Halbwertszeit unter zehn Minuten sehr schlecht ab, was sie für eine in vivo Anwendung ungeeignet erscheinen lässt. Ihre Stabilität kann eventuell durch Anbindung an einen polymeren Träger verbessert werden; hierzu laufen Studien in unserer Arbeitsgruppe.

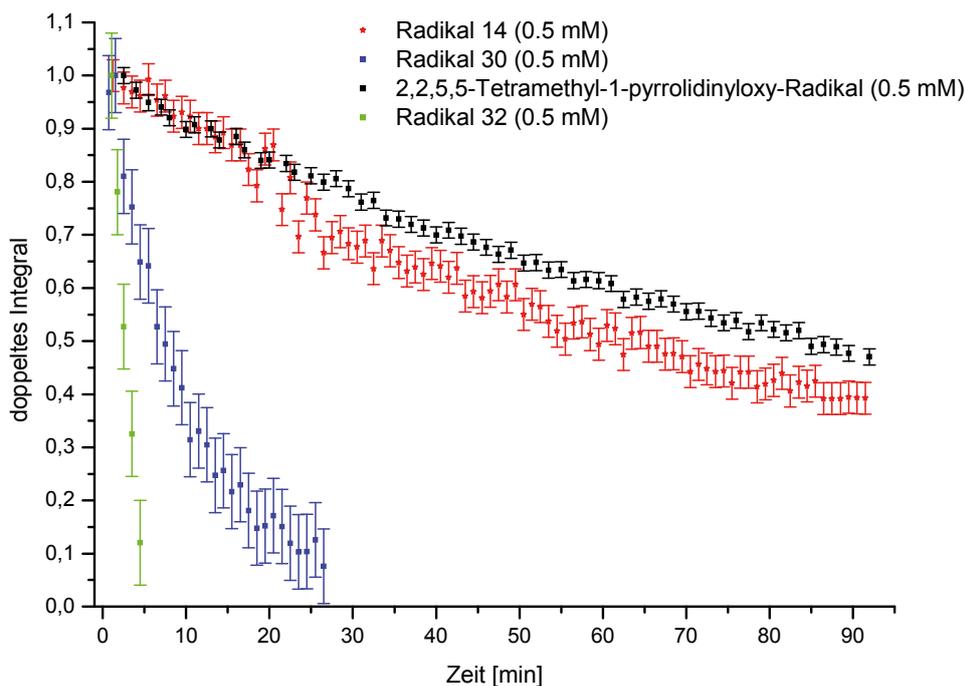


Abbildung 86: Inkubation verschiedener Radikale mit *Xenopus laevis* Zellextrakt (1:3) – zeitabhängige ESR-Messung verschiedener Radikale

Die Zellysats-Experimente bestätigen die Aussagen der Redoxpotentialen. Somit kann **14** als oxidationsempfindlich und reduktionsunempfindlich eingestuft werden und für die chlorierten TAMs (**30**, **32**) ist es genau umgekehrt. Sie sind oxidationsstabil, aber sehr leicht reduzierbar.

4.8 ESR-IMAGING

Der Einsatz der ESR-Spektroskopie für in-vivo-Untersuchungen wird dann am aussagekräftigsten, wenn er als Imaging-Verfahren durchgeführt würde. Für diesen Zweck müssen Spinsonden ein schmales und scharfes Signal im ESR-Spektrum erzeugen, um Bilder mit guter Auflösung zu generieren. Die NMR-Spektroskopie ist mit der MRT-Technik auf diesem Gebiet der ESR-Spektroskopie schon weit voraus. Die ESR-Technik stößt in verschiedener Hinsicht an ihre Grenzen; denn es muss der Spagat zwischen - durch physiologischen Gründe begrenzter - Feldstärke des Magnetfeldes, der Eindringtiefe in das Gewebe und der Auflösung für das Imaging gelingen. Die bisherigen ESR-Anwendungen beziehen sich auf die direkte

Messung von z.B. Sauerstoffsuperoxid bzw. freien Radikalen im Organismus. Die am häufigsten genutzten Radikale für ESR-Imaging-Experimente sind Nitroxid-Radikale.^[3]

Nitroxide waren die ersten Spinsonden für die ESR-Oximetrie, und ihr Einsatz ist immer noch aufgrund ihrer Vorteile in Bezug auf Strukturvariabilität, Löslichkeit und zielgerichteter Anwendung (z.B. Spin-Spin-Abstands-Messungen zur Gewinnung von Strukturinformationen eines Moleküls) berechtigt. Ein breites Spektrum an pH-sensitiven Nitroxiden wurde entwickelt, um in Echtzeit die pH-Wertänderung *in vitro* und *in vivo* zu verfolgen. Weil aber Nitroxid-Radikale rasch zu ESR-inaktiven Hydroxylaminen reduziert werden, ist ihr Einsatz insbesondere *in vivo* begrenzt.^[120-122]

TAM-Radikale haben das Potential als sauerstoffempfindliche Spinsonde für die ESR-Anwendung, besonders ESR-Imaging und verwandte Techniken wie dynamische Kernpolarisation eingesetzt zu werden. Ihre gegenüber Nitroxiden deutlich erhöhte Stabilität gegenüber Redoxprozessen im Gewebe verleiht den TAM-Radikalen einen entscheidenden Vorteil gegenüber Nitroxiden.

Experimente:

Für ein erstes ESR-Imaging-Experiment mit dem Radikal **14** wurde eine 1 mM Lösung verwendet. Sie wurde in eine Kapillare gefüllt und so an beiden Enden abgeschmolzen, dass die Lösung von beiden Seiten mit Luft umgeben war. In gleicher Weise wurde eine Kapillare mit dem Nitroxid (1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-3-methyl)methanthiosulfonat-Radikal (Mtsl) ebenfalls als 1 mM Lösung hergestellt. Mit diesen beiden Proben wurden zur Orientierung einfache ESR-Spektren aufgenommen. Abbildung 87 und 88 zeigen die Spektren.

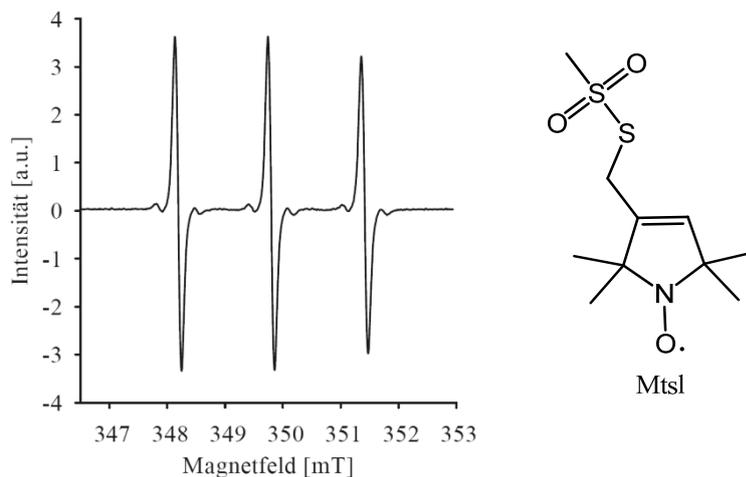


Abbildung 87: ESR-Signal und chemische Struktur des Nitroxid-Radikals (1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-3-methyl)methanthiosulfonat (Mtsl)

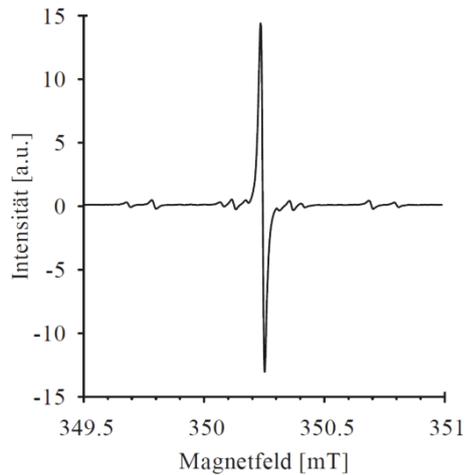


Abbildung 88: ESR Signal von Radikal **14**

Die Linienbreite im Spektrum von **14** beträgt 0.015 mT und die von Mtsl 0.113 mT. Das bedeutet, dass man für dieselbe räumliche Auflösung mit Mtsl eine ungefähr 7-mal so hohe Gradientenstärke des Spektrometers benötigt wie mit **14**. Mit schwächeren Gradienten kann man höhere Auflösungen erzielen.

An der Kapillare wurde anschließend in y (längs)- und z (quer)-Richtung ein Gradient angelegt und die Gradientenstärke variiert. Abbildung 89 zeigt die Kapillare, wie sie sich im ESR-Bild darstellt.

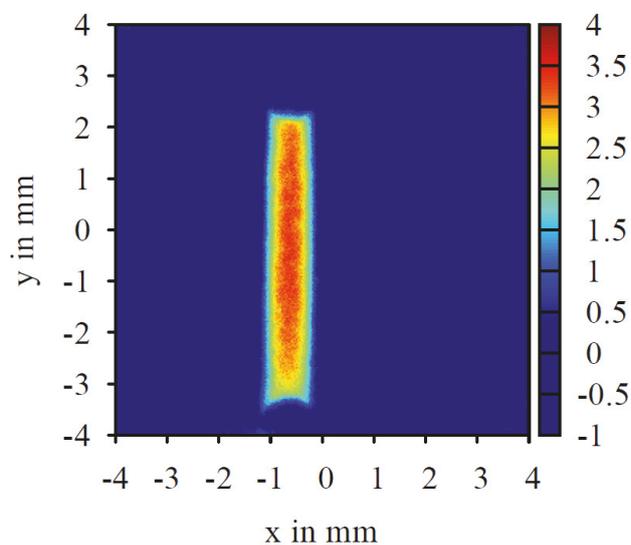


Abbildung 89: ESR-Imaging einer Kapillare mit der TAM-Lösung (**14**, 1 mM)

Abbildung 90 beschreibt die Abnahme der Signalintensität mit Erhöhung des angelegten Gradienten. Aufgetragen ist jeweils die Signalintensität bei angelegtem Gradient relativ zur ursprünglichen Intensität ohne angelegten Gradienten. Die Gradientenskala von Mtsl (oben) ist fünf Mal größer eingeteilt als die von **14** (unten).

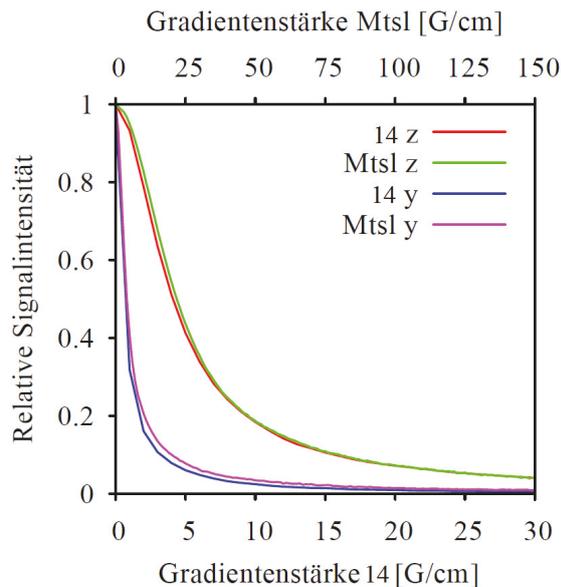


Abbildung 90: Abnahme der Signalintensität bei Erhöhung des angelegten Gradienten

Durch die schmalere Linienbreite von **14** nimmt die Signalintensität mit zunehmender Gradientenstärke etwa fünf Mal schneller ab als bei Mtsl.

Es wird deutlich, dass bei einem entsprechenden experimentellen Aufbau und anfänglich gleichem Signal-Rausch-Verhältnis sowohl mit **14** als auch mit Mtsl ein gut aufgelöstes Bild erhalten werden kann. Bei Mtsl würde man aber eine 7-mal höhere Gradientenstärke wählen müssen. Bei einer Verdoppelung der Auflösung würde sich das Signal-Rausch-Verhältnis auch in ungefähr gleichem Maß verändern. Der Faktor fünf der Gradientenstärke (Abbildung 90) und der Faktor 7 der Linienbreite soll für diese Argumentation als ähnlich genug angesehen werden. Da sich bei gleicher Probengeometrie und Konzentration im Absorptionsspektrum, also dem Integral über das ESR-Signal, dieselbe Anzahl an Spins bei **14** auf ein kleineres Intervall verteilt, ist das anfängliche Signal-Rausch-Verhältnis ohne angelegten Gradienten entsprechend besser. Mit Radikal **14** erhält man also bei deutlich kürzerer Messzeit gleiche Bildqualität und -information.

Mit dieser Erkenntnis wurde ein weiteres ESR-Imaging-Experiment aufgesetzt. Aus einem Teflonzylinder wurde ein Teil ausgefräst. In diese Fläche wurden längliche Bohrungen gesetzt (Abbildung 91), die dann jeweils mit einer 1 mM Lösung **14** bzw. Mtsl gefüllt wurden. Die Messparameter wurden für eine Auflösung von 0.65 mm eingestellt und dann mit Messgeschwindigkeiten zwischen 60 Sekunden und 2.4 Sekunden pro Durchgang für die Magnetfeldänderung (Field Sweep) gemessen, wobei jeweils die Zeitkonstante (Time Constant, Wartezeit wegen Trägheit des Messinstruments) im gleichen Verhältnis wie die Rechenzeit für einen Messpunkt (Conversion Time) verkürzt wurde. Radikal **14** wurde mit einer Gradientenstärke von 23.1 G/cm gemessen, Mtsl mit 174 G/cm. Das entspricht jeweils einer Linienbreiten-Verschiebung (Maximum zu Minimum) zwischen benachbarten Pixeln. Abbildung 92 zeigt die ESR-Bilder der Bohrungen des Probenhalters.

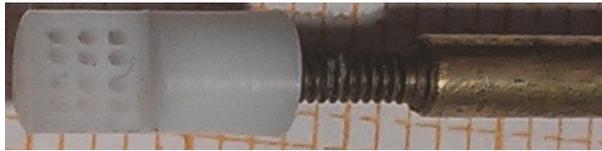


Abbildung 91: Probenhalter für ein einfaches ESR-Imaging-Experiment

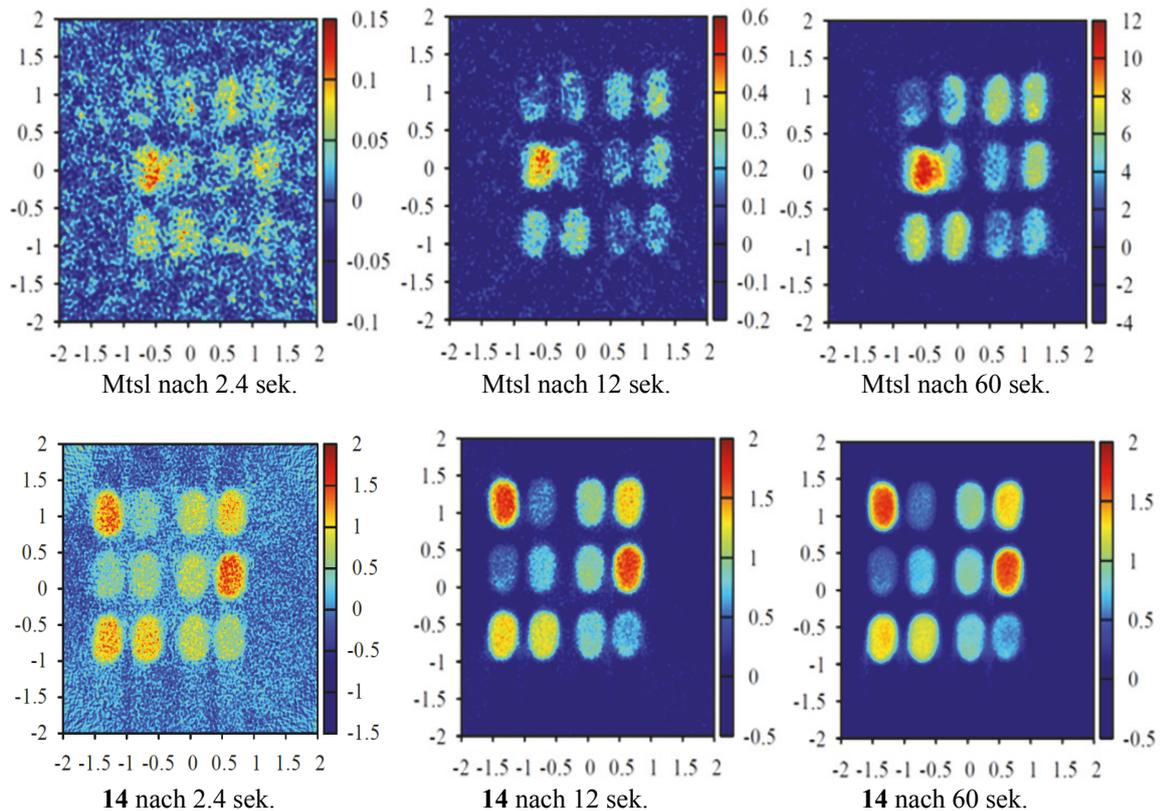


Abbildung 92: ESR-Imaging Aufnahme des Probenhalters mit 60 Winkeln für **14** (unten) und Mtsl (oben) mit unterschiedlichen Messzeiten, Rekonstruktion mit einem iterativen Verfahren nach 50 Schritten

Schließlich sollte das ESR-Imaging-Verfahren auf ein Diffusions-Experiment angewendet werden. Ein Monolith aus mesoporösem Organosilikat, Porengröße etwa 4 nm, wurde zwei Tage lang mit Tris-Puffer getränkt und dann in ein Probenröhrchen gesteckt. Zum Zeitpunkt Null wurde eine mit 1 mM TAM-Lösung **14** in Tris-Puffer gefüllte Kapillare auf den Monolith gestellt, ein Gradient in y-Richtung angelegt und nacheinander Field Sweeps von jeweils 20 Sekunden Länge aufgenommen. Nach der Dekonvolution (Entfaltung), mit der die Signalform vom Ortsanteil getrennt wird, erhält man Abbildung 93. Der Zeitverlauf an der Position -3.0 mm ist in Abbildung 94 zu sehen. In Abbildung 95 ist die Kapillare mit dem teilweise benetzten Monolith zu sehen.

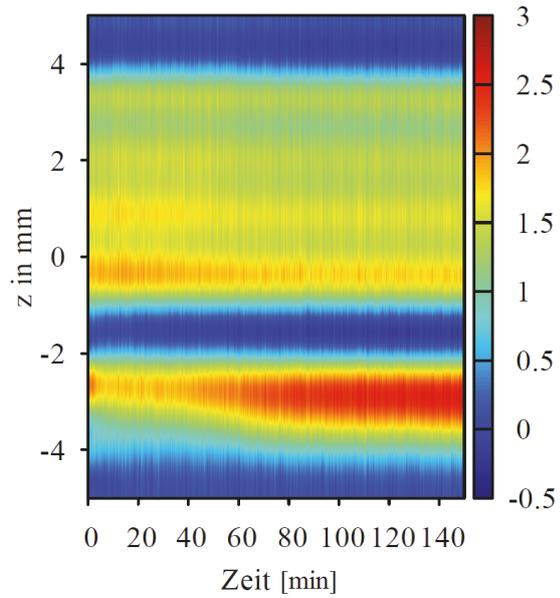


Abbildung 93: Verhältnis der Signalform vom Ortsanteil

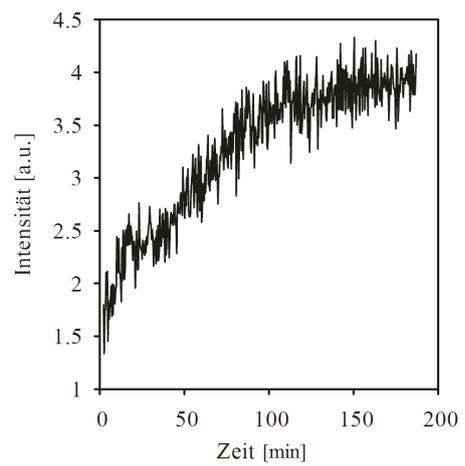


Abbildung 94: Zeitlicher Verlauf an der Position $z = -3.0$ mm der Abbildung 92



Abbildung 95: Kapillare und Monolith nach dem Experiment

Zusammenfassung:

Radikal **14** ist insoweit als Spinsonde für Diffusionsprozesse geeignet, da das Signal-Rausch-Verhältnis bei 20 Sekunden Sweep-Geschwindigkeit so gut ist, dass sowohl eine sehr gute Qualität von eindimensionalen Messungen erreicht wird als auch beispielsweise ein zweidimensionales z.B. 10 x 10 Pixel Bild im Abstand von 10 Minuten aufgenommen werden kann, um einen Diffusionsvorgang mit zu verfolgen. Das vorherige Tränken des Monoliths im Lösungsmittel wirkt sich zudem positiv auf die Experiment-Dauer (wird deutlich verlangsamt) aus; denn diese würde im trockenen Fall von der Kapillarkraft dominiert werden und wäre für ESR-Experimente dieser Art viel zu schnell.

Das hier dargestellte Experiment stellt vorerst ein „Proof of Concept“ dar, um weitere ESR-Imaging-Experimente mit diesen Trityl-Radikalen zu planen. Diese Spinsonden erweisen sich für ESR-Imaging-Experimente als sehr gut geeignet, da sie in vivo entsprechend stabil sind und aufgrund der schmalen einzelnen Linie im Gegensatz zu den kopplungsbedingten drei Linien der Nitroxide ein viel besseres Signal-Rausch-Verhältnis aufweisen. Damit können sogar Spektrometer mit einer limitierten Gradientenstärke eine relativ hohe Auflösung erreichen.

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die Patent-geschützten Synthesen von Tris-(8-carboxyl-2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol)methyl-Radikal (**13**) und Tris-(8-carboxyl-2,2,6,6-tetra(²H₃-methyl)-benzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol)methyl-Radikal (**14**) wurden in Bezug auf Ansatzgröße, Anzahl der Reaktionsschritte und Ausbeute deutlich verbessert. Einen Überblick über die erfolgreich synthetisierten Verbindungen zeigt Tabelle 8. Die strukturelle Abwandlung von **13** am Monomer-Baustein (2,2,6,6-Tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol, **3a**) war erfolgreich, die Übertragung der Reaktionsbedingungen von 2,2,6,6-Tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiolsulfonsäurechlorid (**15**) auf Tris-(2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol)methanol (**9**) gelang nicht. Jeglicher Säurezusatz führte zu einer Radikalerzeugung bzw. zu einem Trityl-Kation. Deshalb wurde **9** mit Phosphortribromid zu Tris-(2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol)methan (**20**) reduziert. Die Übertragung der Reaktionsbedingungen von **15** auf **20** gelang nicht. Die Verknüpfungsreaktion von Radikal **13** mit aminierter Hydroxyethylstärke war erfolgreich und wird in weiterführenden Arbeiten mit Chitosan bzw. mit anderen TAM-Radikalen angewendet, z.B. Tris-(2,3,5,6-tetrachlor-4-hydroxycarbonylphenyl)methyl-Radikal (**30**) und Tris-(2,3,5,6-tetrachlor-4-hydroxysulfonylphenyl)methyl-Radikal (**32**).

Die Patent-geschützte Synthese von OXO63 wurde teilweise verbessert. Durch die großtechnische Herstellung von 1,2,4,5-Tetra-*tert*-butylthiobenzol (**2a**) stand dieses auch als Ausgangsmaterial für OXO63 zur Verfügung. Somit konnte ausgehend von **2a** ein neues Zwischenprodukt Benzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol-2,2,6,6-tetraessigsäuremethylester (**29**) hergestellt werden. Die anschließende Esterspaltung zum Alkohol (2,2,6,6-Tetra(hydroxyethyl)benzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol, **24**) wurde aufgrund der besseren Löslichkeit in THF durchgeführt und konnte somit bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Für die folgenden zwei Reaktionsschritte wurden die exakten Reaktionsbedingungen ermittelt. Der Trimerisierungsschritt zu Tris(2,2,6,6-tetra(*tert*-butoxyethyl)benzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol)methanol (**27**) gelang. Die Wiederholung der Synthese gelang nicht. Die Vielzahl der erforderlichen synthetischen Versuche zur Trimerisierung von 2,2,6,6-Tetra(*tert*-butoxyethyl)4-iodbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]-dithiol (**26**) zeigen deutlich die Empfindlichkeit dieses Reaktionsschrittes gegenüber Einflüssen wie z.B. Restfeuchte in Lösungsmitteln, Temperatur und Reaktionsdauer. Somit stellt der Trimerisierungsschritt der OXO63-Synthese den limitierenden Faktor dar. Es ist davon auszugehen, dass mit steigender Seitenkettenlänge des Monomers die anschließende Di- bzw. Trimerisierungsreaktion erschwert wird. Aus diesem Grund wird ein aromatisches Proton in 2,2,6,6-Tetra(*tert*-butoxyethyl)benzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol (**25**) durch ein Iod-Atom ausgetauscht, um eine bessere Abgangsgruppe zu erzeugen. Bei dieser Synthese ist darauf hinzuweisen, dass die säulenchromatographische Reining durch einen ähnlichen R_F-Wert von Edukt **25** und Produkt **26** erschwert wird und somit nur zu etwa 50 % Austausch führt. Erschwerend kommt im Folgeschritt die Instabilität von **26** hinzu, da unter Lichteinfluss bzw. in Lösung eine schnelle Umsetzung zu **25** erfolgt.

Die Synthese von Radikal **32** gelang mit einer akzeptablen Ausbeute von 38 %. In fachlicher Diskussion mit dem Arbeitskreis von Prof. Luis Julià (Universität Barcelona) wurde von beiden Seiten die schlechte Reproduzierbarkeit hervorgehoben. Verbindung **32** konnte nach Literaturvorgabe^[55] erst nach Veränderung der Oleumkonzentration (~ 60 %) reproduzierbar hergestellt werden, da eine Mindestreaktionstemperatur erforderlich war. Andere Syntheseversuche von Tris-(2,3,5,6-tetrachlorphenyl)methan (**33**) zu Tris-(2,3,5,6-tetrachlor-4-chlorsulfonylphenyl)methan (**37**) mit z.B. Chlorsulfonsäure bestätigen die in der Literatur beschriebenen Nebenreaktionen und führten nicht zum gewünschten Produkt **37** bzw. **30**. Tris-(2,3,5,6-tetrachlor-4-hydroxycarbonylphenyl)methan (**34**) konnte nicht hergestellt werden, aber mittels Kohlenstoffdioxid wurde eine Einfachsubstitution der Carbonsäure-Gruppe erreicht (**34a**). Eine weitere Optimierung stellt die Dreifachsubstitution dar, welche im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war, aber als erfolgversprechend bewertet wird.

Das Ziel, die synthetisierten Spinsonden (**13**, **14** und **32**) als pH-abhängige und sauerstoffempfindliche Sonden einzusetzen, muss differenziert betrachtet werden und Unterschiede der Tritylradikale besonders hinsichtlich Linienbreiten (Umhüllende), Hyperfeinkopplungen (mit zusätzlichen auswertbaren ESR-Signalparametern), Oxidations- bzw. Reduktionsstabilität, ihrer Aciditäten sowie Hydro/Lipophilie ins Kalkül nehmen. Der Grundstein für eine eventuelle in-vivo-Anwendung ist mit der geringen Toxizität gegeben. Eine durch Diskussion mit anderen Arbeitskreisen vermutete Thrombozytenaggregation konnte widerlegt werden. Die schlechte Wasserlöslichkeit von **13** und **14** verringert die Anwendungsbreite bzw. das Einsatzgebiet als Spinsonde, vorteilhafter ist der Einsatz des Na-Salzes. Die Abhängigkeit der Linienbreite vom pH-Wert kann wegen ihrer relativ hohen Acidität (pKa ca. 3) vernachlässigt werden, wenn man im physiologischen pH-Bereich arbeitet bzw. die Grenzen von pH 6 bis 8 einhält. In diesem Bereich ist die Linienbreite in einem ausreichend konstanten Bereich und in Lösung mehrere Wochen stabil. Unterhalb von pH 6 ist der Einsatz der Spinsonde nicht mehr anzuraten, es kommt bei **13** bzw. **14** unterhalb von pH 3.5 zur Ausfällung. Die Linienbreite von **13** und **14** ist vom Lösungsmittel bzw. dessen Polarität und/oder seiner Viskosität abhängig. Mit dem Glycerin-Wasser-Gemisch Experiment wurde ein eindeutiger Zusammenhang zwischen gelösten Sauerstoff im Lösungsmittel und der Viskosität aufgezeigt.

Da die Linienbreite erst bei Viskositäten oberhalb derer von Blut vergrößert wird, ist sie im Blut hauptsächlich vom Anteil an gelöstem Sauerstoff im Lösungsmittel abhängig. (Messungen der Abhängigkeit von der Ionenstärke stehen noch aus). Radikal **13**, **14** und **32** zeigen in dem untersuchten Sauerstoffbereich von ~ 0.5 % bis ~ 46 % einen linearen Zusammenhang zwischen Linienbreite und Sauerstoffkonzentration. Die Linienbreite von **13** wird in diesem Experiment von Radikal **14** aufgrund des Austausches der H-Atome gegen ²H-Atome nochmals schmaler.

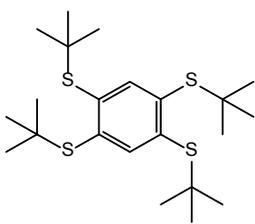
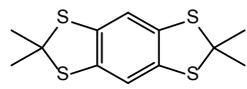
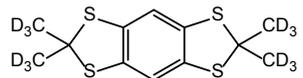
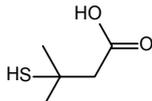
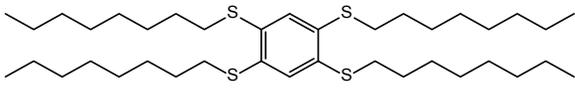
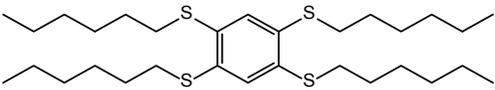
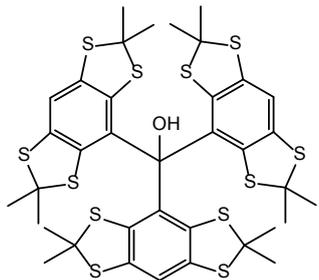
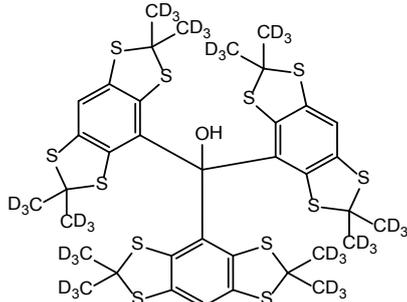
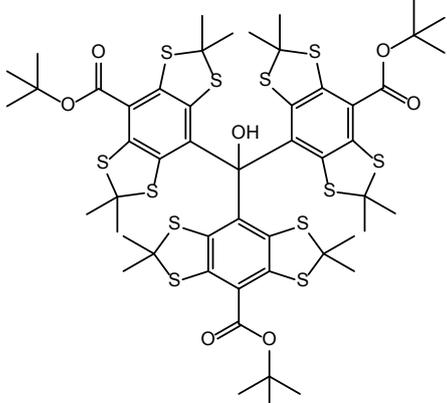
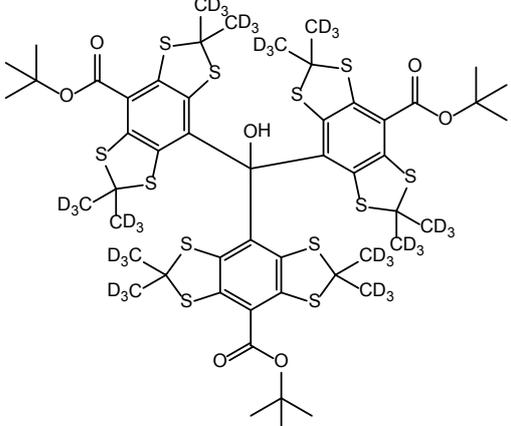
Radikal **32** wurde aufgrund seiner ausgezeichneten Wasserlöslichkeit hinsichtlich dieser Eigenschaft nicht weiter untersucht. Die Linienbreite ist im Vergleich zu Radikal **13** um den Faktor sieben größer, was für Imaging-Versuche sowie für Abstandsmessungen mittels ESR – in dieser Arbeit nicht behandelt – von Vorteil ist. Die Eignung als sauerstoffempfindliche Sonde ist aufgrund der sehr schnellen Reduktion im Zelllysate nicht gegeben. Eine Verwendung als pH-sensitive Sonde wäre wegen der hohen Acidität (pKa von Sulfonsäuren ca. -3) nur im sehr stark sauren Milieu möglich.

Für die weitere Entwicklung der ESR-Spektroskopie sind weitere Forschungen an Spinsonden erforderlich. Hierbei sollten weitere chemische Abwandlungen zur Verbesserung der Reduktions- und Oxidationseigenschaften untersucht werden. Die vorhandenen Spinsonden zeigen eine Abhängigkeit zu vielen Parametern. In vitro können mehrere Parameter vernachlässigt oder unterdrückt werden. Im Organismus ist diese Möglichkeit nicht gegeben.

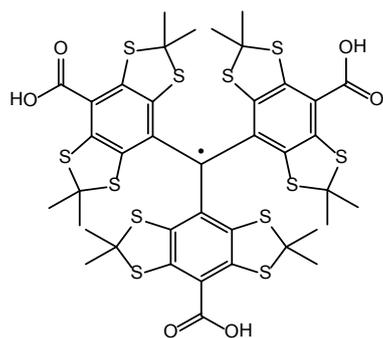
Die vorliegende Arbeit ist ein Beitrag zur ESR-Grundlagenforschung in Verbindung mit Triarylmethyl-Radikalen. Für den Einsatz der Elektronenspinresonanz als Diagnostikum müssen künftige Arbeiten noch viele Aufgaben lösen. Es gilt die Synthese von idealen Spinsonden weiter zu optimieren und für großtechnische Ansätze praktikabel zu gestalten.

Der Weg der Elektronenspinresonanz zum Diagnostikum erfordert optimale Spinsonden und eine Weiterentwicklung der ESR-Messtechnik. Hier sind Forschungen hinsichtlich der Abhängigkeit der Magnetfeldstärke, der Eindringtiefe ins Gewebe, der Größe der Kavität usw. nützlich, um auch größere Organismen untersuchen zu können.

Tabelle 8: Zusammenfassende Darstellung der synthetisierten Substanzen

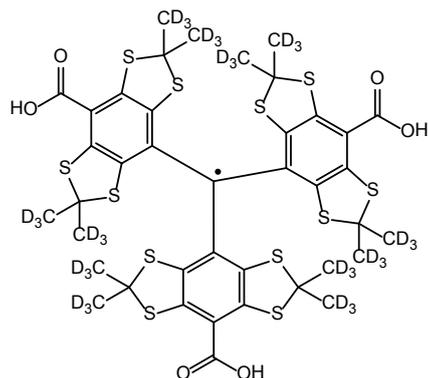
<p>2a</p>  <p>1,2,4,5-Tetra-tert-butylthiobenzol</p>	<p>3a</p>  <p>2,2,6,6-Tetramethylbenzo[1,2-d;-4,5-d']bis[1,3]dithiol</p>
<p>d3a</p>  <p>2,2,6,6-Tetra(²H₃-methyl)benzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol</p>	<p>5f</p>  <p>3-Mercapto-3-methylbutansäure</p>
<p>4b</p>  <p>1,2,4,5-Tetra(n-oxylthio)benzol</p>	<p>4c</p>  <p>1,2,4,5-Tetra(n-hexylthio)benzol</p>
<p>9</p>  <p>Tris-(2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol)methanol</p>	<p>d9</p>  <p>Tris-(2,2,6,6-tetra(²H₃-methyl)benzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol)methanol</p>
<p>12</p>  <p>Tris-(8-tert-butoxycarbonyl-2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol)methanol</p>	<p>d12</p>  <p>Tris-(8-tert-butoxycarbonyl-2,2,6,6-tetra(²H₃-methyl)benzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol)methanol</p>

13



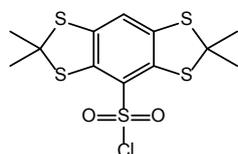
Tris-(8-carboxyl-2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]-dithiol)methyl-Radikal

14



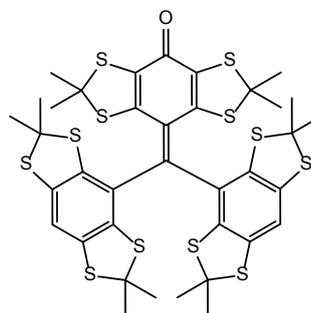
Tris-(8-carboxyl-2,2,6,6-tetra(²H₃-methyl)benzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]-dithiol)methyl-Radikal

15



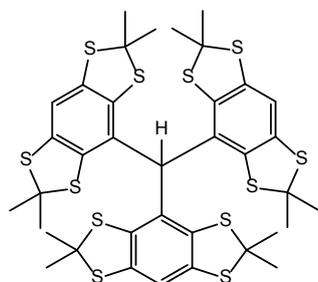
2,2,6,6-Tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol-sulfonsäurechlorid

18



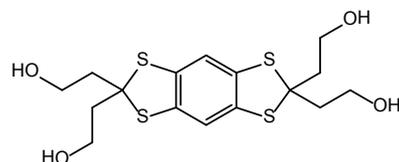
Tris-(2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol)chinon

20



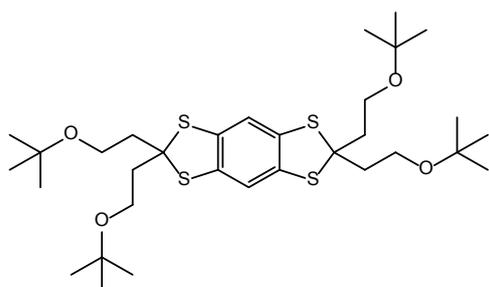
Tris-(2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol)methan

24



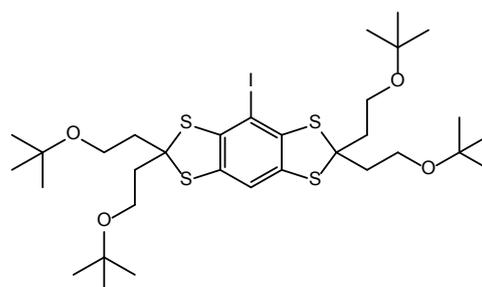
2,2,6,6-Tetra-(hydroxyethyl)benzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol

25



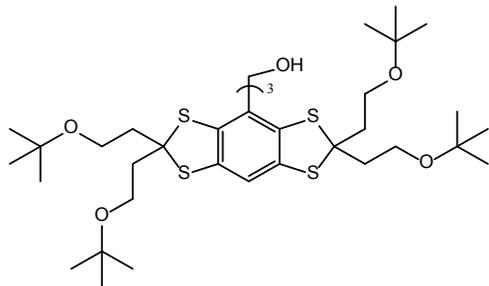
2,2,6,6-Tetra-(tert-butoxyethyl)benzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol

26



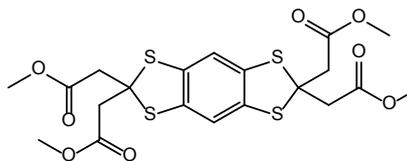
2,2,6,6-Tetra-(tert-butoxyethyl)4-iodobenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol

27



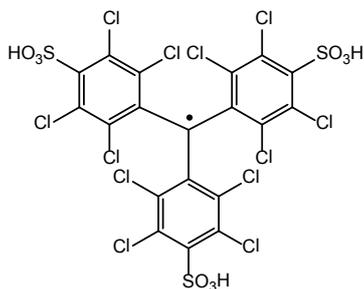
Tris-(2,2,6,6-tetra(tert-butoxyethyl)-benzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol)methanol

29



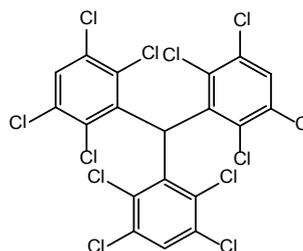
Benzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol-2,2,6,6-tetraessigsäuremethylester

32



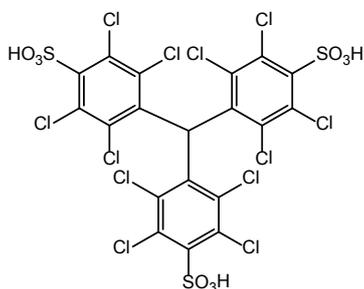
Tris-(2,3,5,6-tetrachlor-4-hydroxy-sulfonylphenyl)methyl-Radikal

33



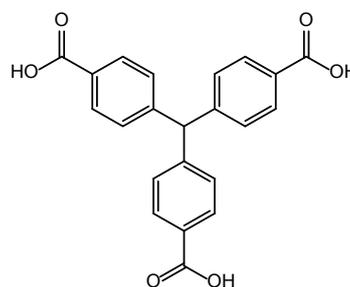
Tris-(2,3,5,6-tetrachlorphenyl)methan

38



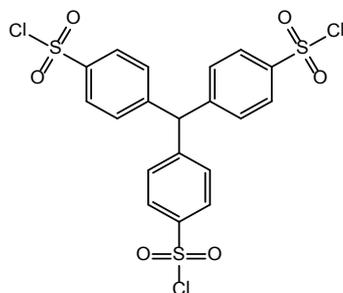
Tris-(2,3,5,6-tetrachlor-4-hydroxy-sulfonylphenyl)methan

41



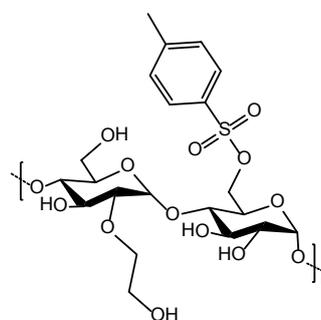
Triphenylmethan-4,4',4''-tricarbonsäure

43



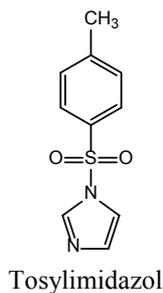
Triphenylmethan-4,4',4''-trisulfon-säurechlorid

44

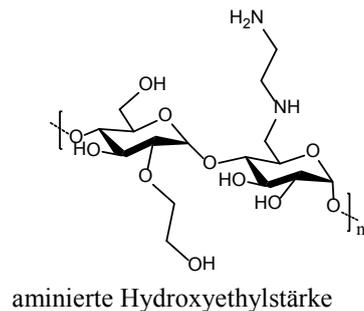


tosylierte Hydroxyethylstärke

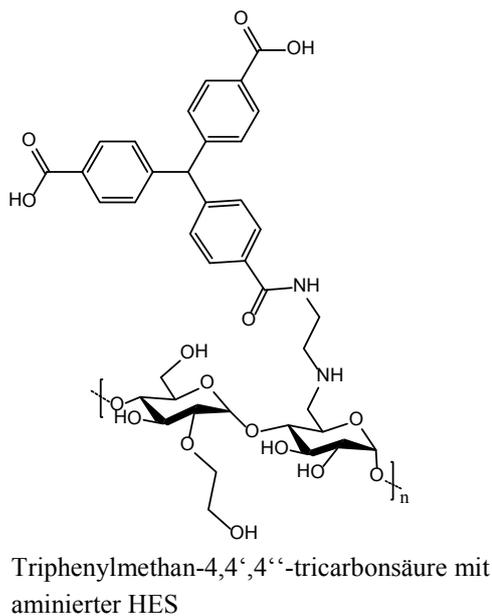
45



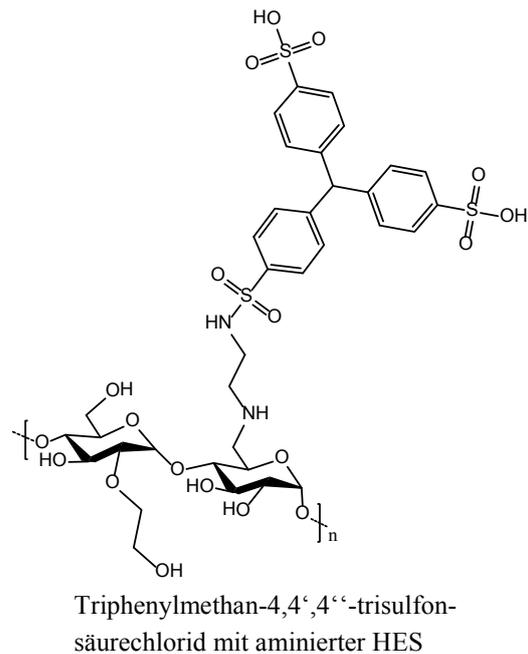
46



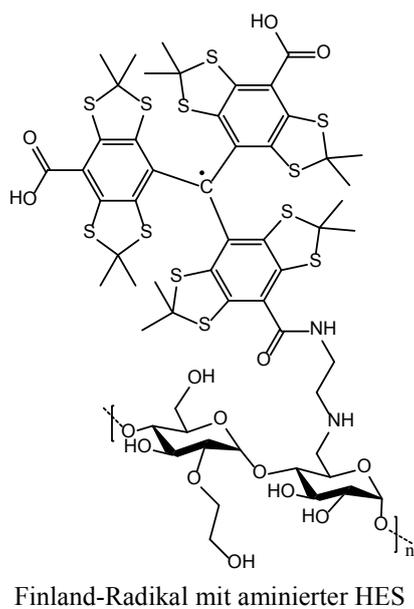
48



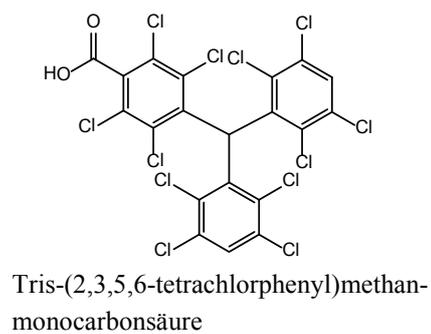
49



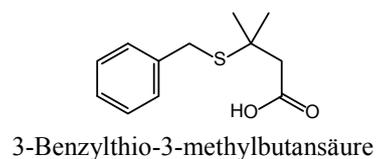
-



34a



-



6 EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 ALLGEMEINES

Für die Synthesen wurden handelsübliche Lösungsmittel verwendet, die falls erforderlich nach den gängigen Standardmethoden gereinigt und getrocknet wurden. Die Angaben der Ausbeuten beziehen sich auf isolierte Produkte.

6.1.1 ARBEITSTECHNIKEN

Alle wasser- und luftempfindlichen Reaktionen wurden mit im Vakuum ausgeheizten und mit Argon 5.0 (Reinheit 99.999 %) der Firma Liquide Air gefüllten Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Lagerung von Feuchtigkeits- und/oder sauerstoffempfindlichen Chemikalien und auch der Zwischen- und Endprodukte erfolgte unter Argon. Flüssigkeiten wurden mit Einweg-Spritzen der Fa. Braun[®] oder Glaspipetten zugegeben. Zum Entgasen der wässrigen ESR-Proben wurden diese zunächst in einer inerten Atmosphäre (Argon) eingefroren. Anschließend wurden die Proben im Hochvakuum aufgetaut, bis sie gerade wieder vollständig flüssig war. Dann wurden die Proben erneut mit Argon begast („freeze, pump, thaw“-Methode). Dieser Vorgang wurde bis zu dreimal wiederholt.

6.1.2 VERWENDETE CHEMIKALIEN

Die verwendeten Lösungsmittel und Reagenzien stammten überwiegend aus dem Bestand der Chemikalienausgabe des Institutes für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, weitere Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich, Alfa-Aesar oder Acros bezogen und sind nachfolgend aufgeführt.

Aceton-1,3-dicarbon säuremethylester
Aceton-D6
Aluminium(III)chlorid
Amberlite IR 120H
Benzylmercaptan
n-Butyllithium (2.5 M in Hexan)
Chlorkohlensäureethylester
Chlorkohlensäuremethylester
Chlorsulfonsäure
Diisopropylethylamin (Hünig-Base)
3,3-Dimethylacrylsäure
1,1-Dimethylheptanthiol
Dinatriumtetraborat-Decahydrat (Borax)
Di-*tert*-butyldicarbonat
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
Ethylendiamin

n-Hexanthiol

Hydroxyethylstärke (der Fa. Fresenius mit einem mittleren Molekulargewicht von 130000 ± 20000 g/mol, mit einem MS von 0.38-0.45, einem DS vom 0.32-0.40 und einem C-2/C-6-Substitutionsverhältnis größer 8:1112)

Isobuten

Iod

Kohlenstoffdioxid/Trockeneis

Lithiumaluminiumhydrid

2-Methyl-2-propanthiol

Natriumhydrid 60 % (w/w) in Mineralöl

1-Tetradecanthiol

Tetrafluorborsäure (54 % in Et₂O)

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

Tosylchlorid

Triethylamin

Trifluoressigsäure

6.2 CHROMATOGRAPHIE

a. DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE (DC)

Die Dünnschichtchromatographie diente zur Kontrolle des Reaktionsverlaufs sowie der Reinheitsprüfung von isolierten Zwischen- und Endprodukten. Als Trägermaterial kamen Fertigplatten der Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland) zum Einsatz, deren stationäre Phase aus Kieselgel 60 F₂₅₄ bestand. Die Substanzen wurden in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst, mittels einer Kapillare dünn aufgetragen und in einer Chromatographiekammer unter Kammerfüllung entwickelt. Als mobile Phase wurden Standardlaufmittel wie *n*-Hexan, Ethylacetat, Chloroform und Methanol und deren Zusammensetzung in unterschiedlichen Verhältnissen verwendet. Die Detektion der Chromatogramme erfolgte nach Trocknung unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm.

b. SÄULENCHROMATOGRAPHIE (SC)

Die Säulenchromatographie diente zur Trennung und Reinigung der Zwischen- und Endprodukte. Als Trennmittel kam Kieselgel 60 der Fa. Merck, mit einer Korngröße von 0.040 - 0.063 mm für die Flash-Chromatographie zum Einsatz. Als Elutionsmittel dienten Chloroform, Methanol, *n*-Hexan und Ethylacetat und deren Mischungen in unterschiedlichen Verhältnissen, wobei die Polarität entsprechend auch dis- oder kontinuierlich verändert wurde. Die Detektion erfolgte durch DC-Untersuchungen der einzelnen Fraktionen.

c. MEDIUM PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY (MPLC)

Die MPLC wurde mit einem Gerät der Fa. Interchem (Montluçon, Frankreich) durchgeführt. Diese wurde vorwiegend zur Trennung und Reinigung der Endprodukte bzw. der Trennung von Zwischenprodukten verwendet, die aufgrund von ähnlichen R_F-Werten mit der SC nicht trennbar waren. Als stationäre Phase wurden Kartuschen unterschiedlicher Größe, die mit Kieselgel (12 - 120 g) einer Korngröße von 15 bis 40 µm gefüllt waren verwendet. Als Elutionsmittel dienten *n*-Hexan und Ethylacetat und deren Mischungen in unterschiedlichen

Verhältnissen, wobei die Polarität dementsprechend auch dis-/ oder kontinuierlich erhöht wurde. Die Flussrate und die Mischung der Elutionsmittel wurden an das jeweilige Trennproblem angepasst. Das Injektionsvolumen betrug je nach Löslichkeit des Produkts 0.5 - 5 ml. Die Detektion erfolgte durch DC-Untersuchungen der einzelnen Fraktionen.

6.3 INSTRUMENTELLE ANALYTIK

6.3.1 KERNRESONANZSPEKTROSKOPIE (NMR)

Die Kernresonanzspektren wurden mit dem Gerät Bruker Varian Inova Unity 500 mit einer Arbeitsfrequenz von 500 MHz für ^1H -NMR und 125 MHz für ^{13}C -NMR aufgenommen. Die Referenzierung erfolgte auf das Signal undeuterten Restlösungsmittels des verwendeten NMR-Lösungsmittels. Die Proben wurden in D_2O , DMSO-, Aceton- D_6 , CDCl_3 oder Methanol- D_4 gelöst. Alle chemischen Verschiebungen (δ) sind in der Einheit [ppm] angegeben. Für die Signale der ^1H -NMR Spektren sind in Klammern die Protonenzahl und die Kopplungskonstante J in Hz angegeben. Die Multiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet).

6.3.2 INFRAROT-SPEKTROSKOPIE (IR)

IR-spektroskopische Untersuchungen erfolgten an einem FT-IR-Spektrometer der Firma BIO RAD, Modell FTS 135. Gemessen wurde mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} über 32 Scans. Die Lagen der Absorptionsbanden sind in Wellenzahlen (cm^{-1}) angegeben. Für die Messung wurde die Substanz in Methanol oder Chloroform gelöst und auf einen Zinkselenid-Kristall aufgetragen, das Lösungsmittel wurde abgedampft und anschließend die Probe vermessen.

6.3.3 SCHMELZPUNKTE

Die Schmelzpunktbestimmung erfolgte mit einem Boetius-Heiztischmikroskop. Die angegebenen Schmelzpunkte sind nicht korrigiert.

6.3.4 ELEMENTARANALYTIK

Die Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Schwefelanteile wurden an einem CHNS-932 Analysenautomat der Firma Leco-Corporation (St. Joseph, Michigan, USA) im automatischen Mikroverfahren bestimmt. Der Halogengehalt wurde im Halbmikroverfahren durch Verbrennen der Substanz am Platinkontakt in reinem Sauerstoff und anschließender Titration mit Quecksilbernitrat gegen Diphenylcarbazid ermittelt. Es sind Mittelwerte einer Zweifachbestimmung angegeben, die auf die zweite Nachkommastelle gerundet wurden.

6.3.5 UV-VIS-SPEKTROSKOPIE

Die UV-Messungen wurden mit dem Einstrahlgerät Spekol 1200 (Analytik Jena GmbH, Deutschland) aufgenommen. Die Proben wurden, wenn nicht anders angegeben, in methanolischer oder wässriger Lösung in Standard-Quarz-Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm vermessen. Als Blindwert diente das entsprechende reine Lösungsmittel. Von den erhaltenen Spektren wurde das Lösungsmittelspektrum subtrahiert und die Daten mittels der

MicroCal ORIGIN Pro 8G Software ausgewertet. Die Spektren umfassen einen Wellenlängenbereich von 250 bis 700 nm.

6.3.6 MASSENSPEKTROMETRIE (MS)

a. ELEKTRONENSTOß-IONISATION (EI)

Die Aufnahme der EI-Massespektren erfolgte an einem AMD 402 (70 eV) der Firma AMD Intecta GmbH (Harpstedt, Deutschland).

b. ELEKTRONENSPRAY-IONISATION (ESI)

Die Probe wurde in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst, mittels einer Spritzenpumpe (Havard Apparatus 22) über das ESI-Interface in das Ionenfallen-Massenspektrometer Finnigan MAT SSQ 710 C eingesprüht (Thermo Separation Products, San José, USA bzw. Thermoquest, Egelsbach, Deutschland) und vermessen. Die Ionisation wurde dabei im Elektrospray bei 4.5 kV positiv und negativ durchgeführt. Das Gerät verfügt über eine auf 200 °C beheizbare Kapillare und weist eine Flussrate von 20 µl/min auf. Zum Lösen der Proben wurde ein Lösungsmittelgemisch aus Chloroform, Methanol und Wasser unterschiedlicher Zusammensetzung verwendet.

6.4 METHODEN DER ESR-EXPERIMENTE

Die ESR-Experimente wurden mit einem L-Band oder X-Band Spektrometer der Firma MagnetTech (Deutschland) aufgenommen. Die Messparameter werden bei den jeweiligen Experimenten angegeben.

a. PROBENPRÄPARATION

Für wässrige Proben wurden, wenn nicht anders benannt, in einem PBS-Puffer (phosphate buffered saline, pH = 7.4) verwendet. Ein Liter PBS-Puffer hat folgende Bestandteile: 8.0 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.42 g Na₂HPO₄ oder 1.78 g Na₂HPO₄ • 2 H₂O und 0.27 g KH₂PO₄.

b. PH-WERT-BESTIMMUNG

Die pH-Werte der Pufferlösungen wurden mit dem pH-Meter 766 Calimetric der Firma Knick bei 20 °C bestimmt.

c. VERTEILUNGSKOEFFIZIENT

Der Verteilungskoeffizient wurde klassisch in Oktanol und Wasser und in MCT und Puffer pH 7.4 bestimmt. Als Ausgangskonzentrationen wurden von Radikal **13** 50 µg/ml (46.88 µM) und von Radikal **14** 55.2 µg/ml (50.06 µM) eingesetzt. Beide Proben wurden im End-over-End-Shaker bei 37 °C 3 h lang geschüttelt. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur am X-Band MagnetTech (Deutschland) mit folgender Geräteeinstellung: Modulationsamplitude 0.005 mT, Microwave Attenuation 8 dB, Sweep 6 G und Time 60 Sekunden.

d. SAUERSTOFF-BESTIMMUNG

Die wässrigen Proben (PBS-Puffer pH = 7.4) wurden bei Raumtemperatur, mit einer Konzentration von ~ 50 µM für Radikal **13** und **14** und mit 1 mM für Radikal **32** in ein 1 ml Glasvial mit Septum gefüllt. Die Proben wurden zwei Minuten mit reinen Stickstoff bzw. einem Sauerstoff-Stickstoff-Gemisch über eine Kanüle (Braun[®], Sterican Gr. 1) über ein Sep-

tum mit Auslasskanüle (Braun[®], Sterican Gr. 1) begast (Flussrate: 1 ml/min). Anschließend wurden die Proben im ESR-Spektrometer vermessen und danach der Sauerstoffgehalt mittels einer Sauerstoffsonde (Oxygen Microsensors Sensortyp PSt1) bestimmt.

e. ZELLYSAT-BESTIMMUNG

Die Versuche wurden mit einem *Xenopus Laevis* Zellextrakt durchgeführt. Das Zellysat wurde bei -80 °C gelagert und für das jeweilige Experiment entsprechend aufgetaut. 5 µl der jeweiligen Spinsonde (0.5 mM) wurde mit 15 µl des Zellextrakts versetzt und 10 Sekunden gevortext. Diese Mischung wurde in einer Ringcaps-Kapillare (HIRSCHMANN, DURAN-Glas) im Miniscope MS400 (Magnetech) mittels vorherigem Autotunings in den jeweiligen Zeitintervallen mit 0.5G/s Sweep bei Centerfield (B_0) ~ 336 mT und MW-Frequenz = 9.43 GHz vermessen.

f. GERÄTEEINSTELLUNGEN ESR-MESSUNGEN

Die ESR-Experimente wurden an einem Spektrometer der Fa. Bruker (L-Band) mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

Samples 4096, Gain 400

Radikal 13 und 14	Radikal 32
Modulationsamplitude variierend	Modulationsamplitude 10 mT
Mikrowellenleistung 6 dB	Mikrowellenleistung 20dB
Sweep 0.5 mT	Sweep 2 mT
Time 200 s	Time 100 s oder 200 s

Die Auswertung der ESR-Signale erfolgt als Fit mittels MagicPlot für **13** und **14** mittels Lorentzfunktion und für **32** mittels Gausfunktion. Es wird die Peak-to-Peak-Linienbreite der ersten Ableitung (ΔB_{pp}) in [mT] angegeben.

g. ESR-IMAGING-EXPERIMENTE

Experiment 1:

Probe-Lösungen waren Radikal **14** (1 mM in 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl) und (1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-3-methyl)methan-thiosulfonat-Radikal (Mtsl, 1 mM in H₂O). Die Lösungen wurden jeweils in eine Kapillare (Füllhöhe 5 mm, Innendurchmesser 1.02 mm, Außendurchmesser 1.50 mm) gefüllt und so an beiden Enden abgeschmolzen, dass die Lösung von beiden Seiten mit Luft umgeben war.

Experiment 2:

Ein Teflonzylinder mit länglichen Bohrungen wurde jeweils mit einer 1 mM Lösung **14** bzw. Mtsl gefüllt. Die Messparameter wurden für eine Auflösung von 0.65 mm eingestellt und dann mit verschiedenen Messgeschwindigkeiten zwischen 60 Sekunden pro Field Sweep und 2.4 Sekunden pro Field Sweep gemessen, wobei jeweils die Time Constant im gleichen Verhältnis wie die Conversion Time verkürzt wurde. Radikal **14** wurde mit einer Gradientenstärke von 23.1 G/cm gemessen, Mtsl mit 174 G/cm.

ESR-Imaging-Experimente wurden an einem Spektrometer der Fa. Bruker E580 (X-Band) mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

Microwave Frequency: 9.79 Ghz Microwave Attenuation: 30 dB
Microwave Power: 0.2 mW Modulation Amplitude: 0.05 G
Modulation Frequency: 100 kHz
Center Field: 3492.3 G (Kapillare), 3495.4 G (Probenhalter)
Sweep Width: 17.2 G (Kapillare), 14.9 G (Probenhalter)
Number of points per scan: 4096
Sweep Time: 30 s
Conversion Time: 7.3 ms (Kapillare), 7.4 ms (Probenhalter)
Time Constant: 20.48 ms
Gradient Strength: 7.9 G/cm (Kapillare), 10 G/cm (Probenhalter)
Number of angles: 804 (Kapillare), 600 (Probenhalter)

Dekonvolution:

Dazu Referenzmessung ohne Gradient, 10 scans für Dekonvolution. ESR-Messung mit Gradient nach der Dekonvolution mit dem Signal ohne Gradient. Das Magnetfeld wurde bereits durch die Gradientenstärke geteilt um die räumliche Position zu erhalten.

Rekonstruktion für Kapillare:

Rekonstruktion mit einem SIRT Algorithmus auf einem 1024 x 1024 Punkte Grid, Pixelkantenlänge 9 μm , 150 Iterationen. Um Rauschen zu unterdrücken wurde die Farbskala so gewählt, dass sie für kleine Werte konstant ist.

Rekonstruktion für Probenhalter:

Rekonstruktion mit einem SIRT Algorithmus auf einem 512 x 512 Punkte Grid, Pixelkantenlänge 10 μm , 150 Iterationen. Um Rauschen zu unterdrücken wurde die Farbskala so gewählt, dass sie für kleine Werte konstant ist.

h. KALIBRIERUNG DES OXYGEN MICROSENSORS SENSORTYP PST1

Die Kalibrierung des Oxygen Microsensors erfolgte über eine Zweipunktkalibrierung mit sauerstofffreiem Wasser (cal 0) und mit Luft gesättigtem Wasser (cal 100):

sauerstofffreies Wasser (cal 0):

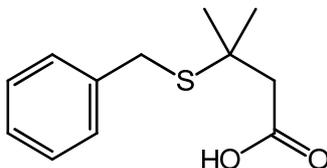
Um sauerstofffreies Wasser herzustellen wurden 1 g Na_2SO_3 und 50 μL $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ ($\rho(\text{Co}) = 1 \text{ g/L}$; in HNO_3 0.5 mol/L) in 100 ml Wasser gelöst. Die Probe wurde dicht verschlossen. Mit dieser Lösung wurde die Sonde auf den sauerstofffreien Wert (cal 0) kalibriert.

sauerstoffgesättigtes Wasser:

Um sauerstoffgesättigtes Wasser herzustellen wurde Luft unter Rühren und Blasenbildung 20 Minuten lang Wasser eingeleitet. Anschließend wurde die Luftzufuhr gestoppt und das Wasser zehn Minuten lang nur gerührt um sicher zu stellen, dass das Wasser nicht mit Sauerstoff übersättigt ist. Mit dieser Lösung wurde die Sonde auf den sauerstoffgesättigten Wert (cal 100) kalibriert.

6.5 SYNTHESSEN

6.5.1 3-BENZYLTHIO-3-METHYLBUTANSÄURE



Eine Mischung aus 3,3-Dimethylacrylsäure (10.0 g, 0.1 mol), frisch destilliertem Piperidin (20 ml) und Benzylmercaptan (11.7 ml, 0.1 mol) wurde für 24 h unter Rückfluss erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf RT abgekühlt, mit eisgekühlter 1 N Salzsäure angesäuert und die entstehende Suspension mehrmals mit Et₂O extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen, die wässrige Phase anschließend nochmals mit konzentrierter Salzsäure angesäuert und mit Et₂O extrahiert. Die vereinigten Etherphasen wurden über MgSO₄ getrocknet. Unter Vakuumdestillation wurde dann das ölige Produkt gewonnen.

Summenformel: C₁₂H₁₆O₂S

Molmasse (g/mol): 224.09

Ausbeute: 20.2 g (90 %) blass gelbes Öl, kristallisiert unter Zugabe von Pentan zu weißen Prismen aus (Schmelzpunkt: 33-35 °C)

Siedepunkt: 167-170 °C (2 mbar)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 10.64 (s, COOH, 1H), 7.38-7.22 (m, ArH, 5H), 3.83 (s, CH₂, 2H), 2.68 (s, CH₂, 2H), 1.51 (s, CH₃, 6H)

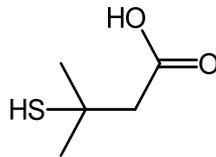
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 177.1, 137.7, 129.1, 128.6, 127.1, 47.0, 43.9, 33.4, 28.7

Elementaranalyse:

ber.:	C: 64.25 %	H: 7.19 %	S: 14.29 %
gef.:	C: 64.01 %	H: 6.98 %	S: 13.97 %

6.5.2 3-MERCAPTO-3-METHYLBUTANSÄURE (5F)



3-Benzylthio-3-methylbutansäure (11.2 g, 50 mmol) wurde mit flüssigem Ammoniak (60 ml) versetzt. Zu dieser Mischung wurde über 30 min frisches, in kleine Stücke geschnittenes Natrium (2.3 g, 0.1 mol) hinzugegeben. Die Lösung wurde 2 h bei RT gerührt. Anschließend wurde der überschüssige Ammoniak mit Stickstoff aus dem Ansatz getrieben. Der feste Rückstand wurde mit verdünnter Salzsäure gelöst und mehrmals mit Et₂O gewaschen. Die org. Phase wurde mit gesättigter NaCO₃-Lösung versetzt. Die wässrige Phase wurde erneut mit konzentrierter Salzsäure versetzt und mit CHCl₃ gewaschen. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und unter Vakuumdestillation anschließend das ölige Produkt gewonnen.

Summenformel: C₅H₁₀O₂S

Molmasse (g/mol): 134.04

Ausbeute: 6.4 g (95 %) gelbes Öl, kristallisiert langsam zu Nadeln aus

Siedepunkt: 195 °C (1 mbar)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 11.39 (s, COOH, 1H), 2.67 (s, CH₂, 2H), 2.31 (s, SH, 1H), 1.46 (s, CH₃, 6H)

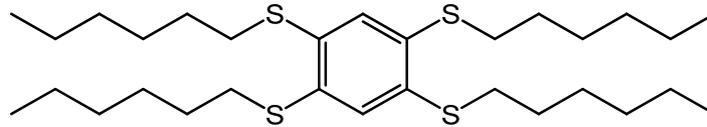
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃,)

δ (ppm) 177.3, 50.3, 41.2, 32.5

Elementaranalyse:

ber.: C: 44.75 % H: 7.51 % S: 23.89 %

gef.: C: 45.01 % H: 7.80 % S: 23.52 %

6.5.3 1,2,4,5-TETRA(*N*-HEXYLTHIO)BENZOL (**4c**)

Natriumhydrid 60 % (w/w) in Mineralöl (3.8 g, 0.1 mol) wurde in DMF (250 ml) gelöst. *n*-Hexanthiol (14.1 ml, 0.1 mol) wurde langsam bei 0 °C zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde der Ansatz bis Erreichen der RT gerührt. 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol (**1**) (3.6 g, 16.6 mmol) wurde hinzugegeben und für 2 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Reaktionsgemisch auf Eis (50 g) gegossen, der entstandene Niederschlag abfiltriert und mehrmals mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Summenformel: C₃₀H₅₄S₄

Molmasse (g/mol): 542.31

Ausbeute: 7.2 g (80 %) kurze weiße Nadeln

Schmelzpunkt: 56-57 °C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 7.17 (s, ArH, 2H), 2.88 (t, ³J = 7.43 Hz, ³J = 7.24 Hz, SCH₂, 6H), 2.68 (t, ³J = 7.43 Hz, ³J = 7.24 Hz, SCH₂, 2H), 1.66 (m, CH₂, 8H), 1.44 (m, CH₂, 8H), 1.30 (m, CH₂, 16H), 0.89 (m, CH₃, 12H)

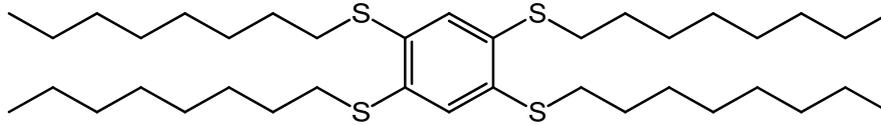
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 135.3, 129.4, 33.7, 31.4, 28.9, 28.7, 22.6, 14.0

Elementaranalyse:

ber.: C: 66.36 % H: 10.02 % S: 23.62 %

gef.: C: 66.25 % H: 9.83 % S: 23.99 %

6.5.4 1,2,4,5-TETRA(*N*-OKTYLTHIO)BENZOL (**4B**)

Natriumhydrid 60 % (w/w) in Mineralöl (3.84 g, 0.1 mol) wurde in DMF (250 ml) gelöst. *n*-Oktanthiol (17.4 ml, 0.1 mol) wurde langsam bei 0 °C zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde der Reaktionsansatz bis Erreichen der RT gerührt. 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol (**1**) (3.6 g, 16.6 mmol) wurde hinzugegeben und für 2 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Reaktionsgemisch auf Eis (50 g) gegossen, der entstandene Niederschlag abfiltriert und mehrmals mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Summenformel: C₃₈H₇₀S₄

Molmasse (g/mol): 655.22

Ausbeute: 9.3 g (85 %) weiße lange Nadeln

Schmelzpunkt: 63-64 °C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 7.17 (s, ArH, 2H), 2.88 (t, ³J = 7.43 Hz, SCH₂, 8H), 1.66-1.29 (m, CH₂, 48H), 0.89 (t, ³J = 7.04 Hz, CH₃, 12H)

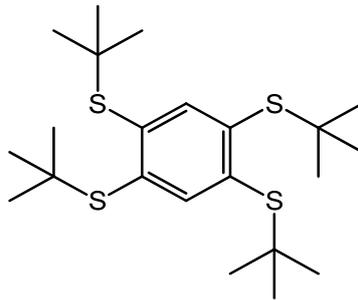
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 135.3, 129.3, 33.7, 31.4, 29.2, 29.2, 29.0, 29.0, 22.6, 14.1

Elementaranalyse:

ber.: C: 69.66 % H: 10.77 % S: 19.58 %

gef.: C: 69.57 % H: 10.53 % S: 19.63 %

6.5.5 1,2,4,5-TETRA-*TERT*-BUTYLTHIOBENZOL (**2A**)

Natriumhydrid 60 % (w/w) in Mineralöl (80 g, 2 mol) wurde in DMF (1000 ml) gelöst. 2-Methyl-2-propanthiol (225 ml, 2 mol) wurde langsam bei 0 °C zugetropft. Nach vollständiger Zugabe wurde der Reaktionsansatz bis Erreichen der RT gerührt. 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol (**1**) (75.0 g, 0.347 mol) wurde hinzugegeben und für 2 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Reaktionsgemisch auf Eis (800 g) gegossen, der entstandene Niederschlag abfiltriert und mehrmals mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Summenformel: C₂₂H₃₈S₄

Molmasse (g/mol): 430.80

Ausbeute: 89.8 g (60 %) gräulich/weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 152-155 °C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 7.95 (s, ArH, 2H), 1.38 (s, CH₃, 36H)

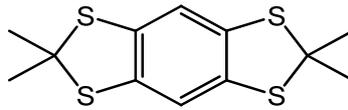
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 144.7, 139.3, 48.2, 31.3

Elementaranalyse:

ber.: C: 61.34 % H: 8.89 % S: 29.77 %

gef.: C: 61.08 % H: 8.88 % S: 30.12 %

6.5.6 2,2,6,6-TETRAMETHYLBENZO[1,2-D;4,5-D']BIS[1,3]DITHIOL (**3A**)

1,2,4,5-Tetra-*tert*-butylthiobenzol (**2a**) (16.0 g, 37.2 mmol) wurde in Toluol (500 ml) gelöst. Zu dieser Lösung wurde Tetrafluorborsäure (54 % in Et₂O, 10 ml, 37.0 mmol) hinzugegeben und für 30 min bei RT mit hoher Drehzahl gerührt. Nach der Zugabe von Aceton (10 ml, 136 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 EtOAc (30 ml) extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum bis fast zur Trockne eingeengt. 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: C₁₂H₁₄S₄

Molmasse (g/mol): 286.50

Ausbeute: 7.8 g (73 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 146-147 °C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 7.02 (s, ArH, 2H), 1.88 (s, CH₃, 12H)

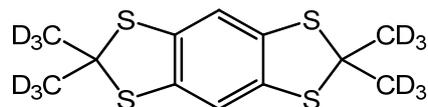
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 135.7, 116.8, 65.7, 31.3

Elementaranalyse:

ber.: C: 50.31 % H: 4.93 % S: 44.77 %

gef.: C: 50.71 % H: 4.76 % S: 44.96 %

6.5.7 2,2,6,6-Tetra(²H₃-METHYL)BENZO[1,2-D;4,5-D']BIS[1,3]DITHIOL (**D3A**)

1,2,4,5-Tetra-*tert*-butylthiobenzol (**2a**) (16.0 g, 37.2 mmol) wurde in Toluol (500 ml) gelöst. Zu dieser Lösung wurde Tetrafluorborsäure (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 EtOAc (30 ml) extrahiert. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und im Vakuum bis fast zur Trockne eingeengt. 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 (g/mol): 289.57

Ausbeute: 8.1 g (73 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 143-145 °C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 7.01 (s, ArH, 2H)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)

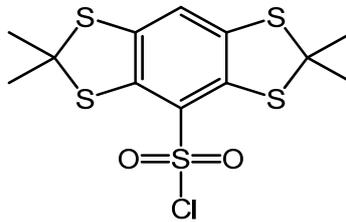
δ (ppm) 135.7, 116.8, 65.7, 31.3

Elementaranalyse:

ber.: C: 48.27 % H: 8.77 % S: 42.96 %

gef.: C: 48.35 % H: 8.89 % S: 42.78 %

6.5.8 2,2,6,6-TETRAMETHYLBENZO[1,2-D;4,5-D']BIS[1,3]DITHIOL-SULFONSÄURECHLORID (**15**)



2,2,6,6-Tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol (**3a**) (1.0 g, 3.5 mmol) wurde in DCM (30 ml) gelöst. Zu dieser Lösung wurden 10 Äq. Chlorsulfonsäure (2.3 ml, 35 mmol) über fünf min hinzu getropft, wobei sich das Reaktionsgemisch dunkelbraun bis schwarz verfärbte. Der Reaktionsansatz wurde für 1 h zum Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde vorsichtig und langsam gesättigte Na_2CO_3 -Lösung (10 ml) zugesetzt (pH \sim 5). Die wässrige Phase wurde dreimal mit EtOAc (20 ml) extrahiert. Die vereinigten org. Phasen über wurden MgSO_4 getrocknet und im Vakuum eingengt. Die wässrige Phase wurde anschließend gefriergetrocknet. Das Produkt war nicht vollständig aus der org. Phase extrahierbar, deshalb wurden beide Fraktionen vereint. Die säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes erfolgte diskontinuierlich an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit EtOAc und MeOH (0 % bis 3 %) als Eluent.

Summenformel: $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{ClO}_2\text{S}_5$

Molmasse (g/mol): 383.92

Ausbeute: 390 mg (29 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 145-147 °C

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD)

δ (ppm) 7.07 (s, ArH, 1H), 1.80 (s, CH_3 , 12H)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3)

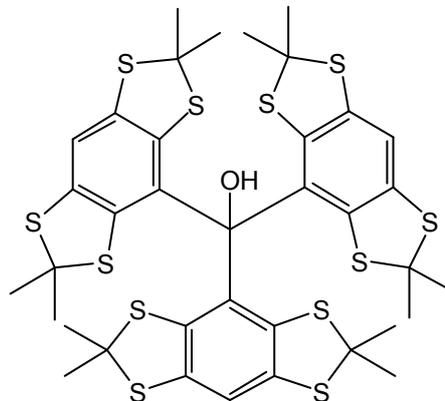
δ (ppm) 136.8, 135.0, 134.4, 116.8, 62.4, 30.1

Elementaranalyse:

ber.:	C: 37.44 %	H: 3.40 %	S: 41.64 %	Cl: 9.21 %
gef.:	C: 37.60 %	H: 3.59 %	S: 41.98%	Cl: 9.17 %

6.5.9 TRIS-(2,2,6,6-TETRAMETHYLBENZO[1,2-D;4,5-D']BIS[1,3]DITHIOL)METHANOL (**9**)

2,2,6,6-Tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol (**3a**) (3.5 g, 12.2 mmol) wurde in Et₂O (150 ml) gelöst. Dem Reaktionsansatz wurde langsam *n*-BuLi (2.5 M in Hexan 4.88 ml, 12.2 mmol) hinzugegeben und für 2 h bei RT gerührt. Das entstandene Lithiumsalz fiel dabei aus. Chlorameisensäuremethylester (315 µl, 4.0 mmol) in Et₂O (40 ml) wurde mit Hilfe einer Spritzenpumpe über Nacht infundiert (Flussrate 1 ml/h). Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter NaHCO₃-Lösung (150 ml) beendet. Es wurde so lange gerührt, bis sich der Niederschlag vollständig gelöst hat. Die org. Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase anschließend mit EtOAc gewaschen. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und eingeeengt. Die säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes erfolgte an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit dem Eluent *n*-Hexan und EtOAc (100:1, V/V). 1.5 g Edukt wurden zurück gewonnen.



Summenformel: C₃₇H₄₀OS₁₂

Molmasse (g/mol): 883.97

Ausbeute: 1.5 g (42 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 250-255 °C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 7.19 (s, ArH, 3H), 6.25 (s, OH, 1 H), 1.85 (s, CH₃, 9H), 1.83 (s, CH₃, 9H), 1.75 (s, CH₃, 9H), 1.70 (s, CH₃, 9H)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 139.2, 138.3, 137.8, 137.3, 131.9, 118.2, 83.7, 64.1, 63.4, 34.8, 32.2, 29.2, 27.6

IR:

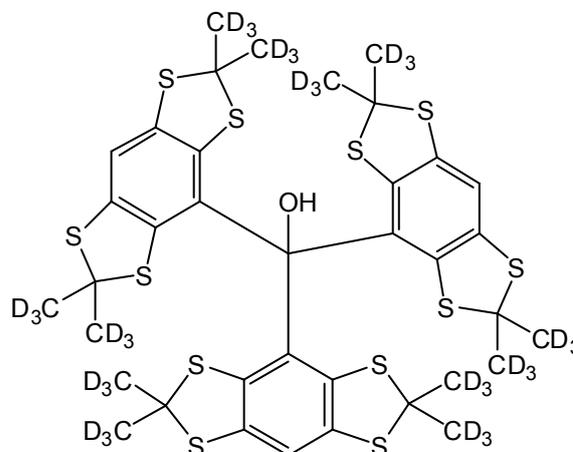
ν (cm⁻¹) 3346 (OH-Valenz), 2972, 2953, 2918, 2910, 2888, 2859, 2846 (C-H Schwingung), 1709 (spitz), 1450 (C-C Aromat)

Elementaranalyse:

ber.: C: 50.19 % H: 4.55 % S: 43.45 %
 gef.: C: 50.67 % H: 4.78 % S: 44.00 %

6.5.10 TRIS-(2,2,6,6-TETRA(²H₃-METHYL)BENZO[1,2-D;4,5-D']BIS[1,3]DITHIOL)METHANOL (**D9**)

2,2,6,6-Tetra(²H₃-methyl)benzo[1,2-d;4,5-d']-bis[1,3]dithiol (**d3a**) (3.49 g, 11.7 mmol) wurde in Et₂O (150 ml) gelöst. Dem Reaktionsansatz wurde langsam *n*-BuLi (2.5 M in Hexan 4.68 ml, 11.7 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 einer Spritzenpumpe über Nacht infundiert (Flussrate 1 ml/h). 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 EtOAc gewaschen. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und eingeeengt. Die säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes erfolgte an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit dem Eluent *n*-Hexan und EtOAc (100:1, V/V). 1.5 g Edukt wurden zurück gewonnen.



Summenformel: C₃₇H₄D₃₆OS₁₂

Molmasse (g/mol): 920.20

Ausbeute: 1.4 g (40 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 250-253 °C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 7.19 (s, ArH, 3H), 6.25 (s, OH, 1 H)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)

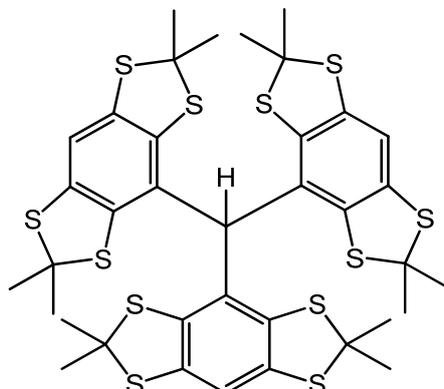
δ (ppm) 139.2, 138.3, 137.8, 137.3, 131.9, 118.2, 83.7, 64.1, 63.4, 34.8, 32.2, 29.2, 27.6

Elementaranalyse:

ber.: C: 48.21 % H: 8.30 % S: 41.75 %

gef.: C: 48.01 % H: 7.90 % S: 41.66 %

6.5.11 TRIS-(2,2,6,6-TETRAMETHYLBENZO[1,2-D;4,5-D']BIS[1,3]DITHIOL)METHAN (20)



Tris-(2,2,6,6-tetramethylbenzol[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol)methanol (**9**) (0.15 g, 0.17 mmol) wurde mit Phosphortribromid (1.7 ml, 18 mmol) für 3 h bei 120 - 130 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der Reaktionsansatz mit Tetrachlorkohlenstoff (10 ml) und Wasser (10 ml) versetzt und für einige Minuten gerührt. Die org. Phase wurde abgetrennt, über MgSO₄ getrocknet und anschließend zur Trockne eingeeengt. Der erhaltene Rückstand setzte sich klebrig, ölig an der Glaskolbenwand fest. Durch Suspension mit Methanol und erneutes Einengen wurde ein pulveriger Feststoff gewonnen.

Summenformel: C₃₇H₄₀S₁₂

Molmasse (g/mol): 267.98

Ausbeute: 140 mg (95 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 256-262 °C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 7.05 (s, ArH, 3 H), 5.03 (s, CH, 1 H), 1.82 (s, CH₃, 9H), 1.81 (s, CH₃, 9H), 1.78 (s, CH₃, 9H), 1.76 (s, CH₃, 9H)

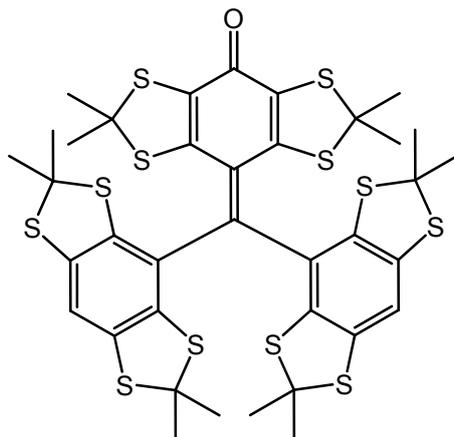
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 139.3, 137.6, 137.3, 135.7, 127.6, 116.3, 65.4, 64.4, 59.8, 33.8, 31.1, 30.2, 28.7

Elementaranalyse:

ber.:	C: 51.11 %	H: 4.64 %	S: 44.25 %
gef.:	C: 50.89%	H: 4.32 %	S: 43.99 %

6.5.12 TRIS-(2,2,6,6-TETRAMETHYLBENZO[1,2-D;4,5-D']BIS[1,3]DITHIOL)CHINON (18)



Bei der Chlorsulfonierung von Tris-(2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol) methanol (9) wurde ein Nebenprodukt isoliert und charakterisiert. Es stellt die oxidierte Form dar.

Summenformel: $C_{37}H_{38}OS_4$

Molmasse (g/mol): 881.96

Ausbeute: 3 % violetter Feststoff

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$)

δ (ppm) 7.08 (s, ArH, 2H), 1.90 (s, CH_3 , 6H), 1.88 (s, CH_3 , 6H), 1.79 (s, CH_3 , 6H), 1.78 (s, CH_3 , 6H), 1.75 (s, CH_3 , 6H), 1.71 (s, CH_3 , 6H)

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$)

δ (ppm) 139.2, 138.3, 137.8, 137.3, 131.9, 118.2, 83.7, 64.1, 63.4, 34.8, 32.2, 29.2, 27.6

IR:

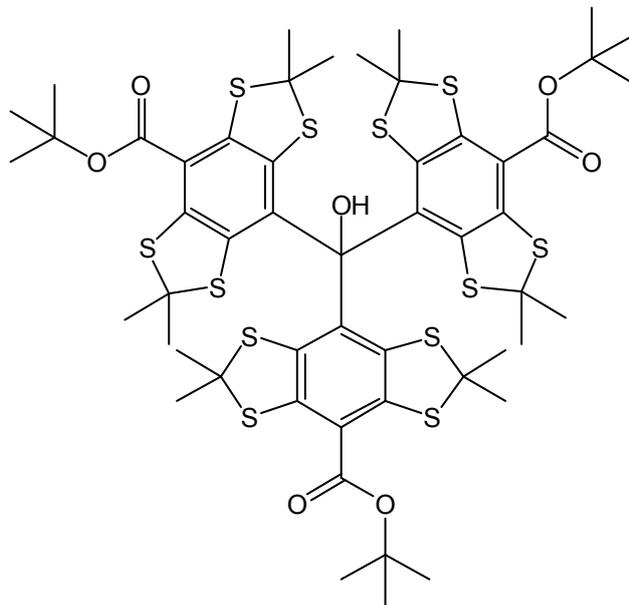
ν (cm^{-1}) 2956, 2921, 2851 (C-H Valenz-Schwingung), 1731 (breit, C=O Valenz), 1598 (C-C Aromat)

Elementaranalyse:

ber.:	C: 50.30 %	H: 4.34 %	S: 43.55 %
gef.:	C: 50.22 %	H: 4.30 %	S: 43.50 %

6.5.13 TRIS-(8-*TERT*-BUTOXYCARBONYL-2,2,6,6-TETRAMETHYLBENZO[1,2-*D*;4,5-*D'*]BIS[1,3]DITHIOL)METHANOL (**12**)

Tris(2,2,6,6-Tetramethylbenzo[1,2-*d*;4,5-*d'*]bis[1,3]dithiol)-methanol (**9**) (1.0 g, 1.13 mmol) und TMEDA (1.69 ml, 11.3 mmol) wurden in Benzol (10 ml) gelöst und langsam mit *n*-BuLi (2.5 M in Hexan 4.52 ml, 11.3 mmol) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min 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 zwei Tage lang bei RT gerührt. Der Überschuss an DiBoc wurde durch langsame Zugabe von MeOH zerstört. Der Ansatz wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde in EtOAc aufgenommen und mit 2 M HCl versetzt. Die org. Phase wurde abgetrennt, mit MgSO₄ getrocknet und eingengt. Die säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes erfolgte an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit dem Eluent *n*-Hexan und EtOAc (92:8, V/V).



Summenformel: C₅₂H₆₄O₇S₁₂

Molmasse (g/mol): 1184.13

Ausbeute: 540 mg (40 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: Zersetzung ab 250 °C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 6.70 (s, OH, 1H), 1.75 (s, CH₃, 9H), 1.72 (s, CH₃, 9H), 1.64 (s, CH₃, 9H), 1.64 (s, CH₃, 9H), 1.63 (s, CH₃, 27H)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 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

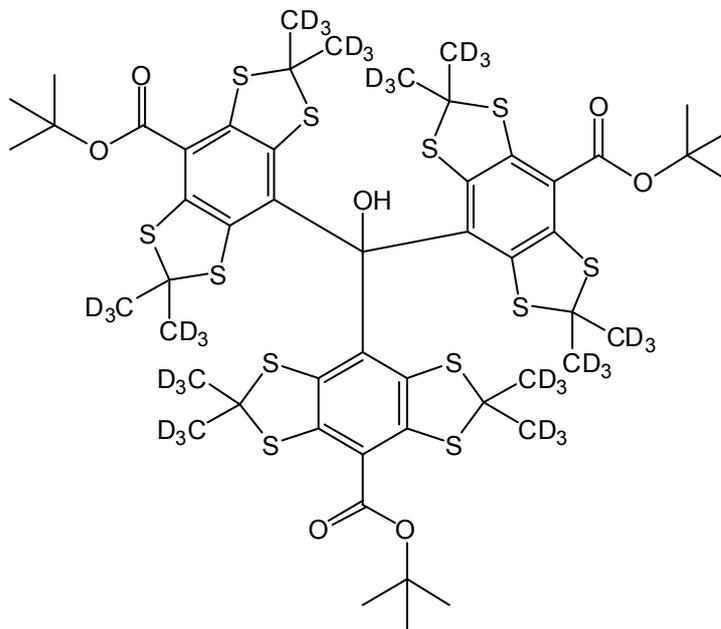
Elementaranalyse:

ber.: C: 52.67 % H: 5.44 % S: 32.45 %

gef.: C: 52.19 % H: 4.99 % S: 32.03 %

6.5.14 TRIS-(8-*TERT*-BUTOXYCARBONYL-2,2,6,6-TETRA(²H₃-METHYL)BENZO[1,2-d;4,5-d']BIS[1,3]DITHIOL)METHANOL (**D12**)

Tris-(2,2,6,6-tetra-(²H₃-methyl)-benzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]-dithiol)-methanol (**d9**) (1.0 g, 1.08 mmol) und TMEDA (1.69 ml, 11.3 mmol) wurden in Benzol (10 ml) gelöst und langsam mit *n*-BuLi (2.5 M in Hexan 4.52 ml, 11.3 mmol) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 30 min. 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 zwei Tage lang bei RT gerührt.



Der Überschuss an DiBoc wurde durch langsame Zugabe von MeOH zerstört. Der Ansatz wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde in EtOAc aufgenommen und mit 2 M HCl versetzt. Die org. Phase wurde abgetrennt, mit MgSO₄ getrocknet und eingengt. Die säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes erfolgte an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit dem Eluent *n*-Hexan und EtOAc (92:8, V/V).

Summenformel: C₅₂H₂₈D₃₆O₇S₁₂

Molmasse (g/mol): 1220.36

Ausbeute: 520 mg (39 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: Zersetzung ab 250 °C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 6.70 (s, OH, 1H), 1.63 (s, CH₃, 27H)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)

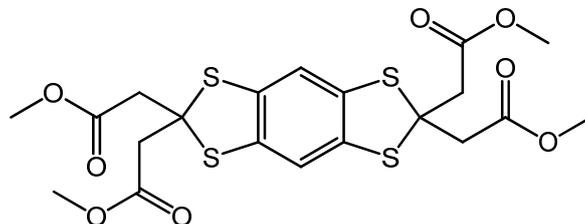
δ (ppm) 165.4, 141.2, 140.9, 140.3, 139.1, 133.8, 122.9, 84.3, 84.3, 60.9, 60.9, 34.0, 31.9, 29.3, 28.6, 28.4

Elementaranalyse:

ber.: C: 51.11 % H: 8.24 % S: 31.49 %

gef.: C: 50.97% H: 8.10 % S: 31.33 %

6.5.15 Benzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol-2,2,6,6-Tetraessigsäuremethylester (**29**)



1,2,4,5-Tetra-*tert*-butylthiobenzol (**2a**) (10 g, 23 mmol) wurde in Toluol (500 ml) gelöst. Der Reaktionsansatz wurde zuerst mit Aceton-1,3-dicarbonsäurediemethylester (20 ml, 0.14 mol) und dann mit Tetrafluorborsäure (54 % in Et₂O, 50 ml, 0.37 mol) versetzt und über Nacht mit hoher Drehzahl bei RT gerührt. Das entstandene Produkt wurde filtriert, mit MeOH gewaschen und getrocknet.

Summenformel: C₂₀H₂₂O₈S₄

Molmasse (g/mol): 518.02

Ausbeute: 8.3 g (69 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 189-192 °C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 6.97 (s, ArH, 2H), 3.71 (s, CH₃, 12H), 3.51 (s, CH₂, 8H)

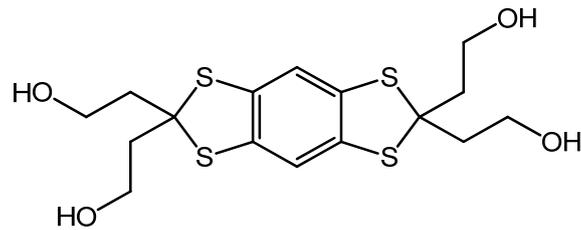
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 170.2, 134.6, 116.2, 64.9, 52.0, 43.4

Elementaranalyse:

ber.: C: 46.32 % H: 4.28 % S: 24.73 %

gef.: C: 46.48% H: 4.21% S: 24.69 %

6.5.16 2,2,6,6-Tetra(hydroxyethyl)benzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol (**24**)

Benzo[1,2-d:4,5-d']bis(1,3)dithiol-2,2,6,6-tetraessigsäuremethylester (**29**) (8.3 g, 23.5 mmol) wurde in THF (500 ml) gelöst. LiAlH_4 (2.4 g, 63 mmol) wurde vorsichtig hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei RT gerührt. Durch Zugabe von MeOH (100 ml) verbrauchte sich der Überschuss an LiAlH_4 . Anschließend wurde Wasser (100 ml) hinzugegeben. Die entstandenen Lithium- und Aluminiumhydroxide wurden mittels einer Fritte abgetrennt. Am Rotationsverdampfer wurde das THF aus dem Filtrat verdampft. Aus der übrig gebliebenen wässrigen Phase fiel das Produkt aus, wurde abgetrennt und mehrmals mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{S}_4$

Molmasse (g/mol): 406.04

Ausbeute: 5.8 g (89 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 151-153 °C

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

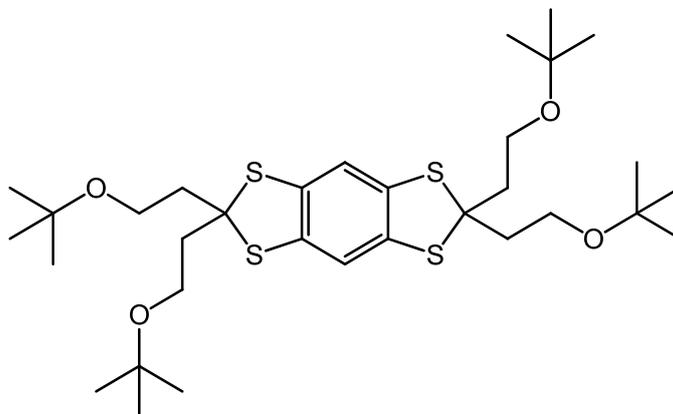
δ (ppm) 7.21 (s, ArH, 2H), 4.67 (s, OH, 4H), 3.55 (t, $J = 6.8$ Hz, CH_2OH , 8H), 2.23 (t, $J = 6.8$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, 8H)

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

δ (ppm) 135.4, 116.4, 71.0, 58.3, 39.5

Elementaranalyse:

ber.:	C: 47.26 %	H: 5.45 %	S: 31.54 %
gef.:	C: 47.30 %	H: 5.63 %	S: 31.30 %

6.5.17 2,2,6,6-Tetra(*tert*-BUTOXYETHYL)BENZO[1,2-*D*;4,5-*D'*]BIS[1,3]DITHIOL (25)

2,2,6,6-Tetra(hydroxyethyl)benzo[1,2-*d*;4,5-*d'*]bis[1,3]dithiol (**24**) (6.0 g, 15 mmol) wurde in THF (150 ml) gelöst. Unter Trockeneiskühlung wurde Isobuten (40 ml) in das Reaktionsgemisch eingeleitet. Anschließend wurde langsam Trifluormethansulfonsäure (2.6 ml) hinzugegeben die Kühlung entfernt und für 1 h gerührt. Das violette Reaktionsgemisch wurde anschließend auf Na₂CO₃ (10 g) gegossen und mit hoher Drehzahl gerührt. Das nun lachsfarbene Reaktionsgemisch wurde filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Kristallisation aus EtOH ergab einen weißen Feststoff.

Summenformel: C₃₂H₅₄O₄S₄

Molmasse (g/mol): 630.29

Ausbeute: 6.5 g (70 %) weiße Nadeln

Schmelzpunkt: 140-142 °C unter Zersetzung

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 6.97 (s, ArH, 2H), 3.58 (t, J = 6.7 Hz, CH₂O, 8H), 2.36 (t, J = 6.7 Hz, CH₂CH₂O, 8H), 1.23 (s, CH₃, 36H)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)

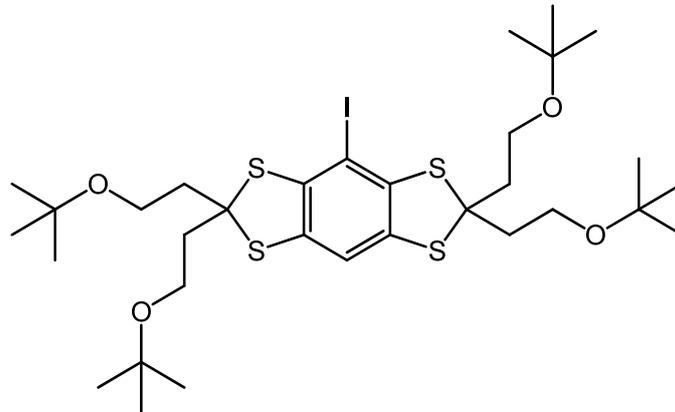
δ (ppm) 135.4, 116.2, 73.1, 71.4, 58.6, 41.2, 27.5

Elementaranalyse:

ber.: C: 60.91 % H: 8.63 % S: 20.33 %

gef.: C: 61.20 % H: 8.54 % S: 20.63 %

6.5.18 2,2,6,6-Tetra(*tert*-butoxyethyl)4-iodbenzo[1,2-*d*;4,5-*d'*]bis[1,3]dithiol (**26**)



2,2,6,6-Tetra(*tert*-butoxyethyl)benzo[1,2-*d*;4,5-*d'*]bis[1,3]dithiol (**25**) (3.0 g, 1.6 mmol) wurde bei -20 °C in THF (100 ml) gelöst. Dem Reaktionsansatz wurde langsam *n*-BuLi (2.5 M in Hexan 3.8 ml, 3.2 mmol) hinzugegeben, für 30 min gerührt und anschließend mit einer Iodlösung (6.0 g in 15 ml THF) versetzt. Der Ansatz wurde bis zum Erreichen der RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf eine gesättigte wässrige Na₂S₂O₃-Lösung gegossen und mehrmals mit Et₂O ausgeschüttelt. Die org. Phase wurde nochmals mit wässriger Na₂S₂O₃-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Die säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes erfolgte mit Hilfe der MPLC mit dem Eluent *n*-Hexan und EtOAc (100:1, V/V).

Summenformel: C₃₂H₅₃IO₄S₄

Molmasse (g/mol): 756.19

Ausbeute: 1.8 g (50 %) gelbes Öl

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 6.87 (s, ArH, 1H), 3.57 (t, J = 6.6 Hz, CH₂O, 8H), 2.35 (t, J = 6.6 Hz, CH₂CH₂O, 8H), 1.18 (s, CH₃, 36H)

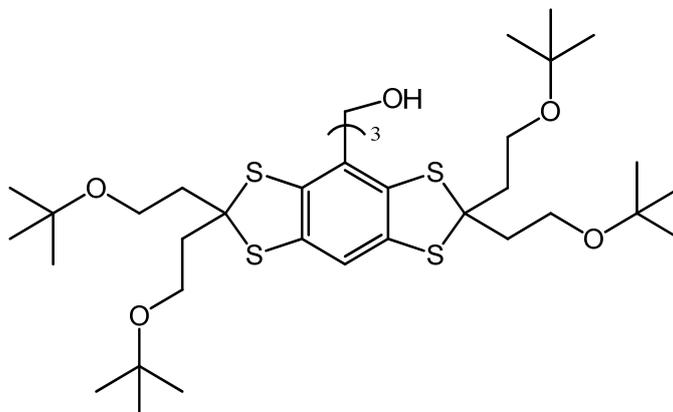
¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 141.4, 132.7, 115.4, 81.5, 73.1, 68.7, 58.4, 41.4, 27.5

Elementaranalyse:

ber.:	C: 50.78 %	H: 7.06 %	S: 16.94 %	I: 16.77 %
gef.:	C: 50.99 %	H: 7.51 %	S: 17.12 %	I: 16.54 %

6.5.19 TRIS-(2,2,6,6-TETRA(*tert*-BUTOXYETHYL)BENZO[1,2-D;4,5-D']BIS[1,3]DITHIOL)METHANOL (**27**)



2,2,6,6-Tetra(*tert*-butoxyethyl)4-iodbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol (**26**) (800 mg, 1.06 mmol) wurde in Et₂O (5 ml) gelöst. Der Reaktionsansatz wurde auf -78 °C gekühlt und *n*-BuLi (2.5 M in Hexan 0.42 ml, 1.07 mmol) langsam hinzugegeben und für 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Chlorameisensäuremethylester (27 µl, 0.35 mmol) in Et₂O (40 ml) wurde mit Hilfe einer Spritzenpumpe über Nacht infundiert (Flussrate 1 ml/h). Die Reaktion wurde durch Zusatz von gesättigter wässriger NaH₂PO₄-Lösung (10 ml) beendet. Die org. Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase anschließend mit Et₂O gewaschen. Die vereinigten org. Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und eingeeengt. Die säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes erfolgte diskontinuierlich an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit dem Eluent *n*-Hexan und EtOAc (auf 10 %). Das Produkt war instabil und konnte nicht reproduziert werden. Die gewonnene Menge wurde für die analytische Charakterisierung und für den anschließenden Reaktionsschritt verbraucht.

Summenformel: C₉₇H₁₆₀O₁₃S₁₂

Molmasse (g/mol): 1916.85

Ausbeute: 35 mg (5 %) gelber Feststoff

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

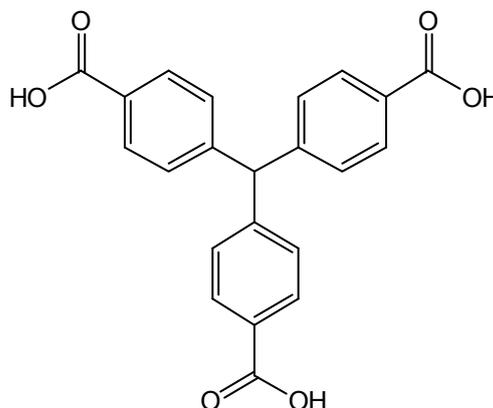
δ (ppm) 7.01 (s, ArH, 3H), 6.65 (s, OH, 1H), 3.55 (t, J = 6.6 Hz, CH₂O, 24H), 2.27 (t, J = 6.6 Hz, CH₂CH₂O, 24H), 1.17 (s, CH₃, 108H)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 139.3, 137.2, 132.2, 115.9, 75.1, 72.8, 67.7, 58.6, 40.9, 27.5

6.5.20 TRIPHENYLMETHAN-4,4',4''-TRICARBONSÄURE (**41**)

Eine Mischung aus Triphenylmethan (**40**) (7.5 g, 30.7 mmol), Oxalylchlorid (25.0 g, 197 mmol) und DCM (100 ml, 1.56 mol) wurde im Eisbad auf 0 °C abgekühlt, danach vorsichtig AlCl₃ (5.0 g, 37.5 mmol) hinzugegeben und 1 h bei 0 °C gerührt. Es erfolgte eine weitere Zugabe von AlCl₃ (5.0 g, 37.5 mmol) und nochmaliges Rühren für 4 h bei 0 °C. Der Reaktionsansatz wurde zweimal mit HCl (10 %, 50 ml) und einmal mit Wasser (50 ml) gewaschen, die org. Phase abgetrennt und am Rotationsverdampfer eingengt.



Der Rückstand wurde in Na₂CO₃-Lösung (5 %, 150 ml) aufgenommen und anschließend filtriert. Dem Filtrat wurde solange Salzsäure (7.5 M) hinzugefügt bis keine Schaum- und Bläschenbildung mehr zu erkennen war. Dabei fiel ein weißer bis hellgelber Feststoff aus. Dieser wurde abgetrennt und getrocknet. Die säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes erfolgte an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit dem Eluent Chloroform und MeOH (9:1, V/V) unter Zusatz von 0.1 % TFA. Anschließend wurde aus Nitromethan umkristallisiert.

Summenformel: C₂₂H₁₆O₆

Molmasse (g/mol): 376.09

Ausbeute: 371 mg (5 %) weißen Feststoff

Schmelzpunkt: 267-269°C

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD)

δ (ppm) 7.97 (d, ArH, 6H), 7.24 (d, ArH, 6H), 5.84 (s, CH, 1H), 4.82 (s, OH, 3H)

¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD)

δ (ppm) 169.6, 149.5, 57.7, 130.5, 130.6, 131.1

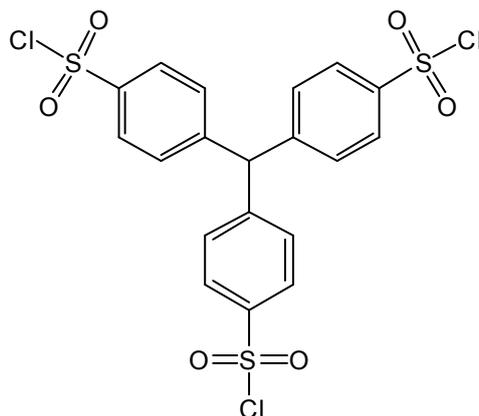
IR:

ν (cm⁻¹) 3010, 2898, 1691, 1607

Elementaranalyse:

ber.: C: 70.21 % H: 4.29 %

gef.: C: 69.88 % H: 4.39 %

6.5.21 TRIPHENYLMETHAN-4,4',4''-TRISULFONSÄURECHLORID (**43**)

Triphenylmethan (**40**) (1.0 g, 4.09 mmol) wurde in DCM (20 ml) gelöst. Zu dieser Lösung wurde Chlorsulfonsäure (2.7 ml, 40.5 mmol) langsam hinzu getropft und anschließend für 1 h bei 35 °C erwärmt. Nach dem Abkühlen auf RT erfolgte eine Zentrifugation. Die org. Phase wurde abgetrennt und am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde mit Wasser überschichtet und für wenige Minuten im Ultraschallbad behandelt, wobei ein weißer Feststoff ausfiel. Dieser wurde filtriert und gefriergetrocknet. Die säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes erfolgte an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit dem Eluent *n*-Heptan und EtOAc (1:1, V/V) unter Zusatz von 0.05 % TFA.

Summenformel: C₁₉H₁₃Cl₃O₆S₃

EI-Masse (g/mol): 540 (100%), 538 (92%), 542 (42%)

Ausbeute: 378 mg (33 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 215-218 °C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-D₆)

δ (ppm) 7.53 (d, J = 8.31 Hz, ArH, 6H), 7.03 (d, J = 8.12 Hz, ArH, 6H), 5.64 (s, CH, 1H)

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-D₆)

δ (ppm) 146.4, 144.4, 128.9, 126.1, 55.2

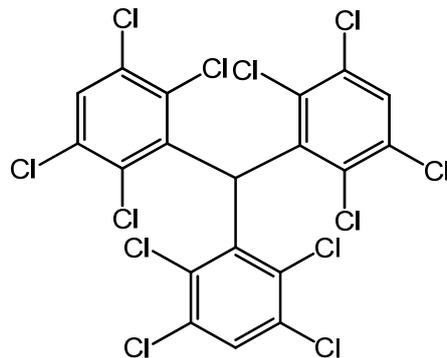
IR:

ν(cm⁻¹) 3092, 1587, 1492, 1406, 1363, 1172 (SO₂), 1172, 1014

Elementaranalyse:

ber.: C: 42.27 % H: 2.43 % S: 17.82 %

gef.: C: 42.30 % H: 2.85 % S: 17.03 %

6.5.22 TRIS-(2,3,5,6-TETRACHLORPHENYL)METHAN (**33**)

1,2,4,5-Tetrachlorbenzol (**1**) (9.6 g, 44.5 mmol), AlCl_3 (0.73 g, 5.2 mmol) und CHCl_3 (0.4 ml, 4.9 mmol) wurden in einem Stahllautoklav mit Teflon-Innenbehälter vermischt und druckdicht verschlossen, im Ölbad auf 160 °C erhitzt und 45 min gerührt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend auf ein Gemisch aus Eis und HCl (1 M, 50 ml) gegossen und dreimal mit CHCl_3 (50 ml) extrahiert. Die org. Phasen wurden vereinigt, zweimal mit Wasser (100 ml) und einmal mit 10 %iger NaHCO_3 -Lösung (100 ml) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Die säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes erfolgte an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit dem Eluent *n*-Hexan. Wiedergewonnen wurden 4.13 g an 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol (**1**).

Summenformel: $\text{C}_{19}\text{H}_4\text{Cl}_{12}$

Molmasse (g/mol): 657.67

Ausbeute: 2.85 g (19 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 293-295 °C

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3)

δ (ppm) 7.58 (s, ArH, 3H), 6.91 (s, CH, 1H)

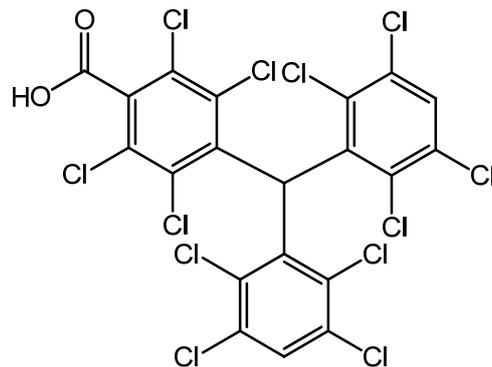
^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3)

δ (ppm) 138.6, 133.6, 132.4, 130.4, 56.1

Elementaranalyse:

ber.: C: 34.70 % H: 0.61 % Cl: 64.69 %

gef.: C: 34.33 % H: 1.01 % Cl: 64.52 %

6.5.23 TRIS-(2,3,5,6-TETRACHLORPHENYL)METHAN CARBONSÄURE (**34A**)

Tris-(2,3,5,6-tetrachlorophenyl)methan (**33**) (150 mg, 0.22 mmol) wurde in THF (5 ml) gelöst. Der Reaktionsansatz wurde auf $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt und *n*-BuLi (2.5 M in Hexan 0.3 ml, 0.75 mmol) langsam hinzugegeben und für 4.5 h bei dieser Temperatur gerührt. Durch das Erwärmen von Trockeneis wurde über 1.5 h in das Reaktionsgemisch Kohlenstoffdioxid (wasserfrei) eingeleitet. Anschließend wurde der Reaktionsansatz am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der Rückstand wurde mit Wasser (2.5 ml) und Et₂O (1.5 ml) versetzt. Die wässrige Phase wurde abgetrennt und zwei Mal mit Et₂O gewaschen und mit 1 N HCl auf pH = 3 eingestellt. Die säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes erfolgte an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit dem Eluent Petrolether/Et₂O/Essigsäure (20:10:1.5, V/V).

Summenformel: C₂₀H₄Cl₁₂O₂

Molmasse (g/mol): 701.68

Ausbeute: 35 mg (22 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: 260-263 °C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 7.63 (s, ArH, 2H), 6.97 (s, CH, 1H)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃)

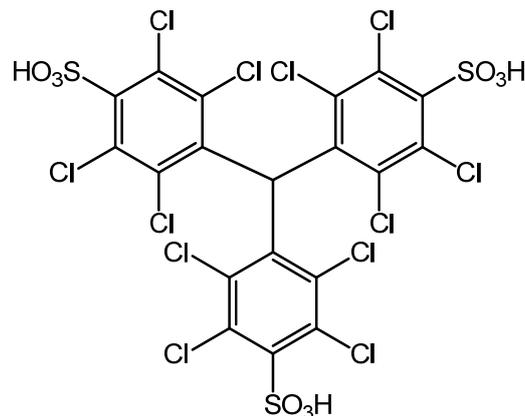
δ (ppm)

166.7, 139.6, 138.1, 135.2, 133.6, 132.5, 130.5, 130.2, 129.2, 56.2

Elementaranalyse:

ber.: C: 34.23 % H: 0.57 % Cl: 60.63 %

gef.: C: 34.46 % H: 0.39 % Cl: 60.53 %

6.5.24 TRIS-(2,3,5,6-TETRACHLOR-4-HYDROXYSULFONYLPHENYL)METHAN (**38**)

Tris-(2,3,5,6-tetrachlorphenyl)methan (**33**) (2.0 g, 3.0 mmol) wurde mit Oleum (40 %, 100 ml) versetzt und für fünf Tage bei 110 °C unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde der Ansatz vorsichtig auf Eis (250 g) gegeben und über Nacht stehen gelassen. Der gebildete Niederschlag wurde zentrifugiert und mit wenig kaltem Wasser gewaschen. Der erhaltene Feststoff wurde gefriergetrocknet. Die säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes erfolgte an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit dem Eluent EtOAc und MeOH (2:1, V/V) unter Zusatz von 0.1 % TFA.

Summenformel: C₁₉H₄Cl₁₂O₉S₃

Molmasse (g/mol): 897.52

Ausbeute: 1.1 g (40 %) weißer Feststoff

Schmelzpunkt: > 360 °C

¹H NMR (500 MHz, D₂O)

δ (ppm) 7.05 (s, 1H), 4.68 (s, 3H)

¹³C NMR (125 MHz, D₂O)

δ (ppm) 140.4, 139.3, 136.3, 135.6, 132.5, 131.4, 57.9

IR

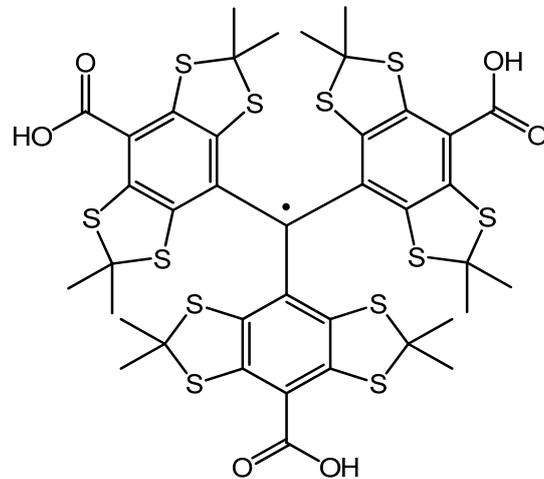
ν (cm⁻¹) 3421, 2950, 1685, 1342, 1213, 1147, 805, 784, 727, 699, 684, 663, 614

Elementaranalyse:

ber.:	C: 25.42 %	H: 0.45 %	S: 10.71 %	Cl: 47.38 %
gef.:	C: 25.72 %	H: 0.55 %	S: 11.01 %	Cl: 47.63 %

6.6 TRIARYLMETHYL-RADIKALE

6.6.1 TRIS-(8-CARBOXYL-2,2,6,6-TETRAMETHYLBENZO[1,2-D;4,5-D']BIS[1,3]DITHIOL)METHYL-RADIKAL (**13**)



Tris-(8-*tert*-butoxycarbonyl-2,2,6,6-tetramethylbenzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol)methanol (**12**) (100 mg, 80 μmol) wurde mit TFA (3 ml) versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Der Reaktionsansatz wurde eingengt und getrocknet.

Summenformel: $\text{C}_{40}\text{H}_{39}\text{O}_6\text{S}_{12}$

Molmasse (g/mol): 998.94

Ausbeute: 81 mg (97 %) grüner Feststoff

Schmelzpunkt: > 360 °C

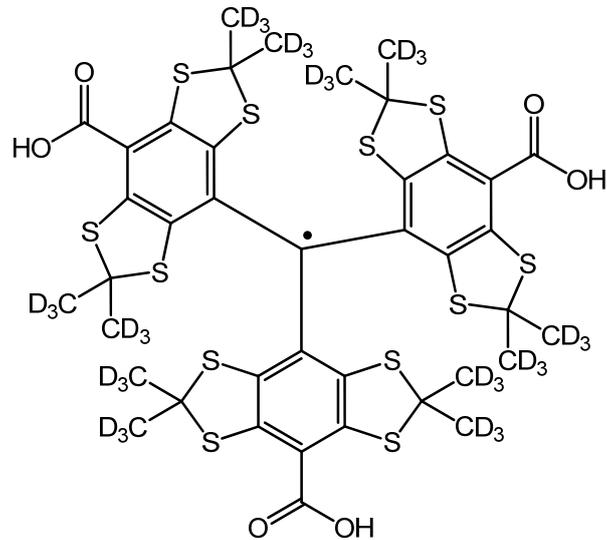
ESR-Signal: (PBS-Puffer pH = 7.4): $\Delta B_{\text{pp}} = 0.0183 \text{ mT}$

Elementaranalyse:

ber.: C: 48.02 % H: 3.93 % S: 38.46 %

gef.: C: 48.30 % H: 4.02 % S: 38.69 %

6.6.2 TRIS-(8-CARBOXYL-2,2,6,6-TETRA(²H₃-METHYL)BENZO[1,2-D;4,5-D']BIS[1,3]DITHIOL)METHYL-RADIKAL (**14**)



Tris-(8-*tert*-butoxycarbonyl-2,2,6,6-tetra(²H₃-methyl)benzo[1,2-d;4,5-d']bis[1,3]dithiol)-methanol (**d12**) (100 mg, 82 μmol) wurde mit TFA (3 ml) versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Der Reaktionsansatz wurde eingengt und getrocknet.

Summenformel: C₄₀H₃D₃₆O₆S₁₂

Molmasse (g/mol): 1035.17

Ausbeute: 88 mg (97 %) grüner Feststoff

Schmelzpunkt: > 360 °C

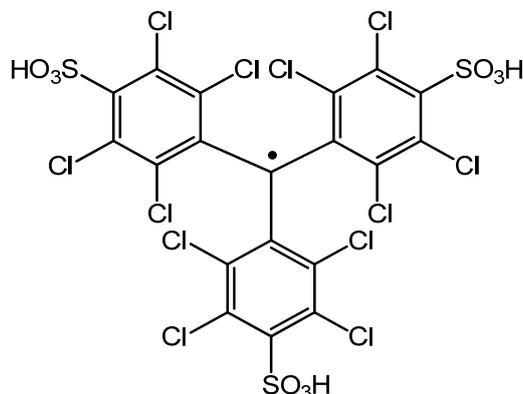
ESR-Signal: (PBS-Puffer pH = 7.4): ΔB_{pp} = 0.0162 mT

Elementaranalyse:

ber.: C: 46.34% H: 7.29 % S: 37.11 %

gef.: C: 46.30% H: 7.02 % S: 36.69 %

6.6.3 TRIS-(2,3,5,6-TETRACHLOR-4-HYDROXYSULFONYLPHENYL)METHYL-RADIKAL (32)



Tris-(2,3,5,6-tetrachlor-4-hydroxysulfonylphenyl)methan (**38**) (508 mg, 0.67 mmol) wurde in THF und H₂O (5:1 (V/V), 60 ml) gelöst, mit 1 M KOH-Lösung (2.5 ml) versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurde Chloranil (528 mg, 2.1 mmol) hinzugegeben und für weitere 6 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand in einem Gemisch aus EtOAc und MeOH (2:1 (V/V), 10 ml) aufgenommen. Der Rückstand wurde filtriert, getrocknet, in MeOH (20 ml) gelöst und mit dem Kationenaustauscher Amberlite IR 120H (1.5 g) versetzt. Nach 12 h Rühren bei RT wurde der Ansatz filtriert und eingengt. Die säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes erfolgte an Kieselgel 60 (0.04 - 0.063 mm) mit dem Eluent EtOAc und MeOH (2:1, V/V) unter Zusatz von 0.1 % TFA.

Summenformel: C₁₉H₃Cl₁₂O₉S₃

ESI (g/mol): 896.51405

Ausbeute: 175 mg (35 %) rotvioletter Feststoff

Schmelzpunkt: > 360 °C

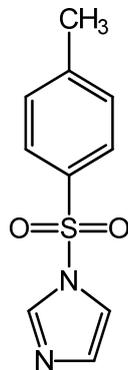
ESR-Spektroskopie: (PBS-Puffer pH = 7.4, 298 K): $\Delta B_{pp} = 0.0649$ mT

IR:

ν (cm⁻¹) 3402, 1687, 1311, 1212, 1145, 805, 785, 728, 699, 689, 663, 614

6.7 DERIVATISIERUNG DER HYDROXYETHYLSTÄRKE

6.7.1 TOSYLIMIDAZOL (45)



Imidazol (6.5 g, 95 mmol) wurde in DCM (30 ml) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Zu dem Reaktionsansatz wurde eine Lösung aus Tosylchlorid (8 g, 42 mmol) in DCM (30 ml) über einen Tropftrichter über 1.5 h hinzugegeben. Nach Erwärmen auf RT wurde der Reaktionsansatz über Kieselgel (10 g) filtriert und mit EtOAc und *n*-Hexan (1:1 (V/V), 50 ml) gewaschen. Das erhaltene Filtrat wurde eingedunstet und anschließend in 5 ml EtOAc aufgenommen. Die Umkristallisation aus *n*-Hexan ergab das Produkt.

Summenformel: C₁₀H₁₀N₂O₂S

Molmasse (g/mol): 222.05

Ausbeute: 7.7 g (82 %) weißen Feststoff

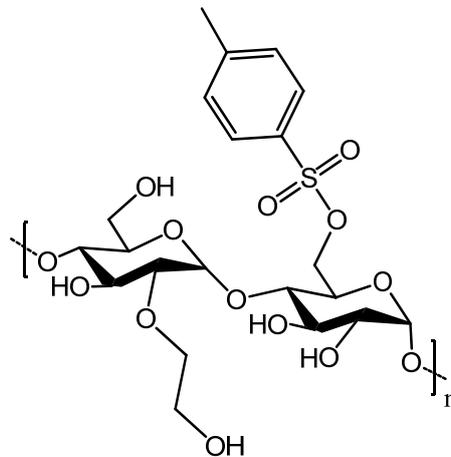
Schmelzpunkt: 77 °C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃)

δ (ppm) 8.00 (s, 1H), 7.82 (d, J = 8.35 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 8.35 Hz, 2H), 7.28 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 2.43 (s, 3H)

6.7.2 TOSYLIERTE HYDROXYETHYLSTÄRKE (**44**)

a. MIT TOSYLCHLORID

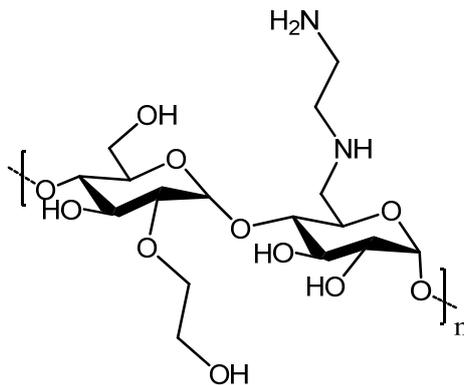


Ein Gemisch aus HES (2 g, 4.4 μ mol) und TEA (4 ml, 28.7 mmol) wurde in DMF (40 ml) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Unter Lichtausschluss wurde Tosylchlorid (0.6 g, 3.2 mmol) in DMF (5 ml) gelöst und zu dem Reaktionsansatz hinzugegeben und 2 h lang gerührt. Nach Zugabe von Aceton (120 ml) wurde der entstandene Niederschlag filtert und zweimal mit Aceton (25 ml) gewaschen. Der Feststoff wurde in Wasser (50 ml) gelöst, 72 h dialysiert und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 1.386 g (56 %) weißer Feststoff

¹H NMR (500 MHz, D₂O)

δ (ppm) 7.77 (s, ArH, 2H), 7.43 (s, ArH, 2H), 5.55 (s), 5.43 (s), 5.29 (s), 3.71 (s), 3.64 (s), 3.54 (s), 3.34 (s), 2.38 (s, CH₃, 3H)

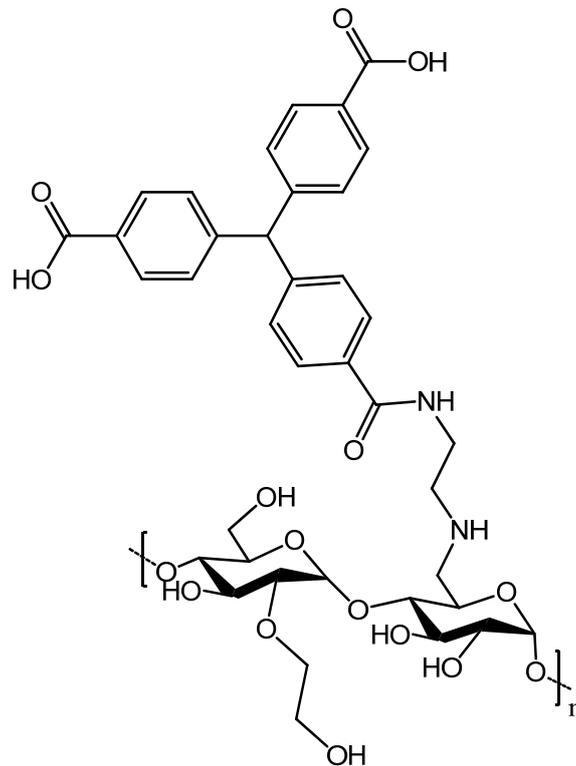
6.7.3 AMINIERTE HYDROXYETHYLSTÄRKE (**46**)

Borax (3.165 g, 8.3 mmol) wurde in Wasser (166.6 ml) gelöst, mit einer 0.1 M NaOH-Lösung auf pH 9.5 eingestellt und anschließend mit DMF auf 250 ml aufgefüllt. **44** (0.5 g) wurde in 60 ml dieser Pufferlösung gelöst. Zu diesem Reaktionsansatz wurde eine weitere Lösung, bestehend aus EDA (2 g, 33.3 mmol) in 20 ml Pufferlösung hinzugegeben und für 18 h unter Lichtausschluss bei RT gerührt. Der Reaktionsansatz wurde mit einem Gemisch aus MeOH und *i*-PrOH (1:1 (V/V), 100 ml) versetzt, der entstandene Niederschlag wurde filtriert und zweimal mit der Alkohollösung (MeOH/*i*-PrOH, 20 ml) gewaschen. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, für 72 h dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

Ausbeute: 0.44 g (17 %) weißer Feststoff

¹H NMR (500 MHz, D₂O)

δ (ppm) 7.84 (s, 2H), 7.46 (s, 2H), 5.58 (s), 5.44 (s), 5.31 (s), 3.73 (s), 3.66 (s), 3.56 (s), 3.36 (s), 3.24 (s), 2.88 (m, 2H), 2.78 (m, 2H), 2.42 (s, 3H), 2.13 (s, 1H), 1.97 (s, 2H)

6.7.4 AMINIERTE HES AN TRIPHENYLMETHAN-4,4',4''-TRICARBONSÄURE (**48**)

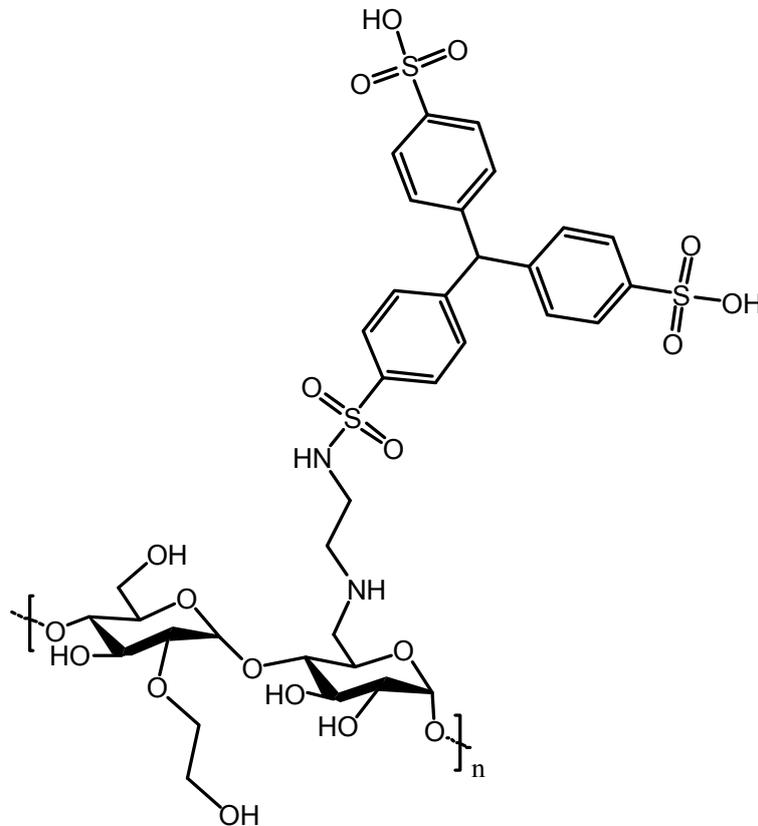
In einem Becherglas wurden **46** (200 mg) und **41** (4 mg, 10.6 μmol) in DMF (20 ml) gelöst und mit Diisopropylethylamin (1.374 mg, 10.6 μmol) versetzt. Unter Lichtausschluss wurde unter kräftigen Rühren EDC (2.241 mg, 11.7 μmol) zugesetzt und für 30 min bei 0 °C und weiter bei RT über Nacht gerührt. Der Reaktionsansatz wurde mit einem Gemisch aus MeOH und *i*-PrOH (1:1 (V/V), 40 ml) versetzt, der entstandene Niederschlag wurde filtriert und zweimal mit der Alkohollösung (MeOH/*i*-PrOH, 10 ml) gewaschen. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, für 72 h dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

Ausbeute: 128 mg (63 %) weißer Feststoff

^1H NMR (500 MHz, D_2O)

δ (ppm) 7.85 (s, ArH, 6H), 7.51 (s, ArH, 2H), 7.21 (s, 2H), 5.62 (s), 5.49 (s), 5.36 (s), 3.78 (s), 3.71 (s), 3.61 (s), 3.41 (s), 2.87 (s, 4H), 2.45 (s, 3H), 2.17 (s, 2H)

6.7.5 AMINIERTE HES AN TRIPHENYLMETHAN-4,4',4''-TRISULFONSÄURECHLORID (49)

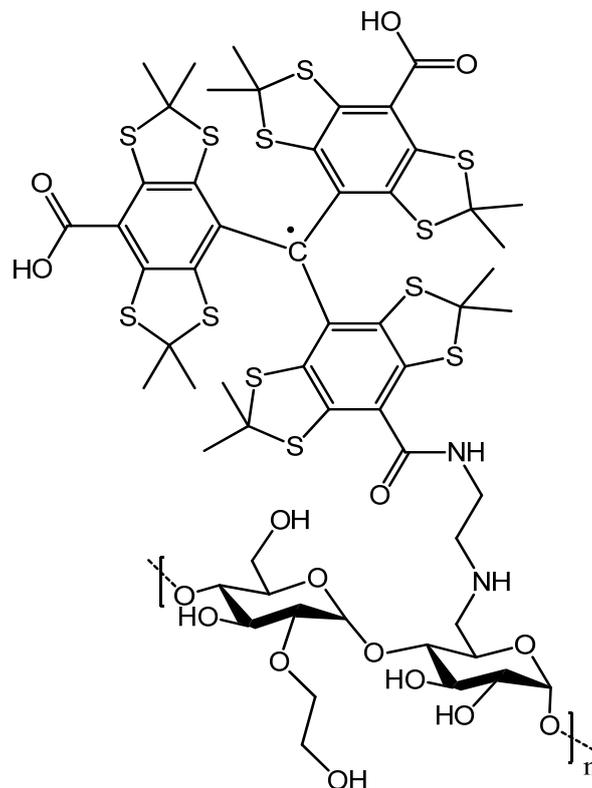


In einem Becherglas wurden **46** (250 mg) und **43** (15 mg, 27.8 μmol) in DMF (25 ml) gelöst und über Nacht bei 50 °C gerührt. Der Reaktionsansatz wurde mit einem Gemisch aus MeOH und *i*-PrOH (1:1 (V/V), 60 ml) versetzt, der entstandene Niederschlag wurde filtriert und zweimal mit der Alkohollösung (MeOH/*i*-PrOH, 15 ml) gewaschen. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, für 72 h dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

Ausbeute: 205 mg (77 %) weißer Feststoff

¹H NMR (500 MHz, D₂O)

δ (ppm) 7.77 (s, 2H), 7.70 (d, $J = 8.00$, 6H), 7.45 (s, 2H), 7.24 (d, $J = 7.83$, 2H), 5.57 (s), 5.44 (s), 5.30 (s), 3.73 (s), 3.66 (s), 3.55 (s), 3.38 (s), 2.82 (s, 4H), 2.43 (s, 3H), 2.12 (s, 2H)

6.7.6 AMINIERTE HES AN RADIKAL **13**

46 (200 mg) und **13** (4 mg, 4 μmol) wurden in DMF (15 ml) gelöst und mit Diisopropylethylamin (1.374 mg, 10.6 μmol) versetzt. Unter Lichtausschluss wurde unter kräftigem Rühren EDC (2.241 mg, 11.7 μmol) zugesetzt, dann für 30 min bei 0 °C und weiter über Nacht bei RT gerührt. Der Reaktionsansatz wurde mit einem Gemisch aus MeOH und *i*-PrOH (1:1 (V/V), 30 ml) versetzt, der entstandene Niederschlag wurde filtriert und zweimal mit der Alkohollösung (MeOH/*i*-PrOH, 10 ml) gewaschen. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, für 72 h dialysiert und anschließend gefriergetrocknet.

Ausbeute: 138 mg (67 %) grüner Feststoff

ESR-Spektroskopie: (D_2O): $\Delta B_{\text{pp}} = 0.0404 \text{ mT}$

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Jeschke, G.; Vorlesungsskript: *Einführung in die ESR-Spektroskopie*; Universität-Konstanz, **2006**.
- [2] Lurie, D. J.; Mäder, K.; Monitoring drug delivery processes by EPR and related techniques-principles and applications, *Advanced drug delivery reviews*, **2005**, *57*, 1171-90.
- [3] Kempe, S.; Dissertation: *Non-invasive characterization of in situ forming implants*; Martin-Luther-Universität, **2012**.
- [4] Nonhebel, D. C.; Walton, J. C.; Free-radical chemistry structure and mechanism; Cambridge University: Cambridge, **1974**.
- [5] Hicks, R. G.; Stable radicals: fundamentals and applied aspects of odd-electron compounds; John Wiley & Sons: Chichester, **2011**.
- [6] Gomberg, M.; An instance of trivalent carbon: Triphenylmethyl, *Journal of the American Chemical Society*, **1900**, *22* (11), 757-71.
- [7] Joergensen, M.; Rise, F.; Andersson, S.; Almen, T.; Aabye, A.; Wisdtrand, L.-G.; Wikstroem, H.; Golman, K.; Servin, R.; Michelsen, P.; Triarylmethyl radicals and the use of inert carbon free radicals in MRI, WO/9112024, **1991**.
- [8] Andersson, S.; Radner, F.; Rydbeck, A.; Servin, R.; Wistrand, L. G.; Free Radicals, US/5530140 (A), **1996**.
- [9] Ardenkjaer-Larsen, J. H.; Leunbach, I.; A method of determining oxygen concentration in a sample, WO/9709633, **1997**.
- [10] Andersson, S.; Radner, F.; Rydbeck, A.; Servin, R.; Wistrand, L.-G.; Free Radicals, US/5728370 (A), **1998**.
- [11] Thaning, M.; Triarylmethyl free radicals as image enhancing agents, WO/9839277 (A1), **1998**.
- [12] Ardenkjaer-Larsen, J. H.; Laursen, I.; Leunbach, I.; Ehnholm, G.; Wistrand, L. G.; Petersson, J. S.; Golman, K.; EPR and DNP Properties of Certain Novel Single Electron Contrast Agents Intended for Oximetric Imaging, *Journal of Magnetic Resonance*, **1998**, *133* (1), 1-12.
- [13] Reddy, T. J.; Iwama, T.; Halpern, H. J.; Rawal, V. H.; General Synthesis of Persistent Trityl Radicals for EPR Imaging of Biological Systems, *The Journal of Organic Chemistry*, **2002**, *67*, 4635-9.
- [14] Dhimitruka, I.; Velayutham, M.; Bobko, A. A.; Khramtsov, V. V.; Villamena, F. A.; Hadad, C. M.; Zweier, J. L.; Large-scale synthesis of a persistent trityl radical for use in biomedical EPR applications and imaging, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2007**, *17*, 6801-5.
- [15] DVGW Regelwerk Technische Regel, *Arbeitsblatt G 280-1 "Gasodorierung"*, **August 2004**.
- [16] Müller, D.; Adelsberger, K.; Imming, P.; Organic preparations with molar amounts of volatile malodorous thiols, *Synthetic Communications*, **2013**, *43* (11), 1447-54.
- [17] Tkachenko, B. A.; Fokina, N. A.; Chernish, L. V.; Dahl, J. E. P.; Liu, S.; Carlson, R. M. K.; Fokin, A. A.; Schreiner, P. R.; Functionalized nanodiamonds part 3: thiolation of tertiary/bridgehead alcohols, *Organic Letters*, **2006**, *8*, 1767-70.
- [18] Pattenden, G.; Shuker, A. J.; Synthetic studies towards Leinamycin. A concise synthesis of the spiro-fused 1,3-Dioxo-1,2-dithiolane moiety, *Tetrahedron Letters*, **1991**, *32*, 6625-8.
- [19] Pastor, S. D.; Hessell, E. T.; Substitution of unactivated aryl halides by thiolate anions in polyglymes, *The Journal of Organic Chemistry*, **1985**, *50*, 4812-5.
- [20] Dirk, C. W.; Cox, S. D.; Wellman, D. E.; Wudl, F.; Isolation and purification of benzene-1,2,4,5-tetrathiol, *The Journal of Organic Chemistry*, **1985**, *50*, 2395-7.

- [21] Fanghänel, E.; Alsleben, I.; Gebler, B.; Herrmann, A.; Herrmann, R.; Palmer, T.; Strunk, K.; Ullrich, A.; Lüders, K.; Mahdjour, H.; Chemistry of Multi-Sulfur Substituted Arenes and Sulfur Rich Heterocycles - Relations to Advanced Materials, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, **1997**, *120*, 121-43.
- [22] Testaferri, L.; Tiecco, M.; Tingoli, M.; Chianelli, D.; Montanucci, M.; Simple Syntheses of Aryl Alkyl Thioethers and of Aromatic Thiols from Unactivated Aryl Halides and Efficient Methods for Selective Dealkylation of Aryl Alkyl Ethers and Thioethers, *Synthesis*, **1983**, *1983*, 751-5.
- [23] Gingras, M.; Raimundo, J.-M.; Chabre, Y. M.; Persulfurierte aromatische Verbindungen, *Angewandte Chemie*, **2006**, *118*, 1718-45.
- [24] Sweetman, B. J.; Vestling, M. M.; Ticaric, S. T.; Kelly, P. L.; Field, L.; Merryman, P.; Jaffe, I. a.; Biologically oriented organic sulfur chemistry. 8. Structure-activity relationships of penicillamine analogs and derivatives, *Journal of Medicinal Chemistry*, **1971**, *14*, 868-72.
- [25] Fanghänel, E.; Herrmann, R.; Herbert, N.; Novel benzo[d]1,2,3-trithioles and their hexachloroantimonates derived from benzenehexathiol, *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 2533-42.
- [26] Yip, H. K.; Schier, A.; Riede, J.; Schmidbaur, H.; Benzenehexathiol as a template rim for a golden wheel: synthesis and structure of [$\{CSAu(PPh_3)\}_6$], *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, **1994**(15), 2333-4.
- [27] Becher, J.; Stidsen, C. E.; Toftlund, H.; Asaad, F. M.; Sodium 2-methyl-2-propylthiolate, a versatile sulfur reagent. Preparation of protected polysulfur ligands and their nickel (II) complexes, *Inorganica chimica acta*, **1986**, *121* (1), 23-6.
- [28] Fanghänel, E.; Wegner, R.; Beye, N.; Peters, K.; Müllen, K.; Peralkylthio-substituierte Dibenzotetrathiafulvalene (DBTTF) aus Benzolhexathiolat, *Journal für Praktische Chemie/Chemiker Zeitung*, **1995**, *337* (1), 299-306.
- [29] Testaferri, L.; Tingoli, M.; Tiecco, M.; Reactions of polychlorobenzenes with alkanethiol anions in HMPA. A simple, high-yield synthesis of poly (alkylthio) benzenes, *The Journal of Organic Chemistry*, **1980**, *45* (22), 4376-80.
- [30] Odorisio, P. A.; Pastor, S. D.; Spivack, J. D.; Rodebaugh, R. K.; 1,2,4,5-Tetramercaptobenzene. A Facile Route to the Benzo[1,2-d:4,5-d']bis[1,3]dithiole Ring System, *Phosphorous and Sulfur and the Related Elements*, **1982**, *13*, 309-13.
- [31] MacNicol, D. D.; Mallison, P. R.; Murphy, A.; Sym, G. J.; An efficient synthesis of hexa-substituted benzenes and the discovery of a novel host conformation for hexakis ([beta]-naphthylthio) benzene, *Tetrahedron Letters*, **1982**, *23* (40), 4131-4.
- [32] Lee, D. F.; Saville, B.; Trego, B. R.; A simple synthesis of tertiary alkanethiols, *Chemistry and Industry*, **1960**, 868-9.
- [33] TA Luft; BImSchG; BImSchV; DIN EN 12753.
- [34] VDI/DIN-Handbuch Reinhaltung der Luft - Band 5: Analysen- und Messverfahren.
- [35] Rheinboldt, H.; Mott, F.; Motzkus, E.; Tertiäres Butylmercaptan, *Journal für Praktische Chemie*, **1932**, *134* (9-12), 257-81.
- [36] Golman, K.; Andersson, S.; Rise, F.; Wistrand, L. G.; Wikstroem, H.; Use of persistent free radicals in magnetic resonance imaging, WO/9302711 (A1), **1993**.
- [37] Larsen, J.; Bechgaard, K.; 1,3,5,7-Tetrathia-s-indacene-2,6-dione chemistry. Synthesis of new multisulfur donor molecules and nickel-dithiolene electron-transfer complexes, *The Journal of Organic Chemistry*, **1987**, *52* (15), 3285-8.
- [38] Andersson, S.; Radner, F.; Rydbeck, A.; Servin, R.; Wistrand, L.-g.; Preparation of (benzobisdithioly)-, (benzobisdioxoly)-, and (benzobisoxathioly)methyl free radicals as image enhancing agents in magnetic resonance imaging, US/5728370 (A), **1998**.
- [39] Stahl, E.; Dünnschicht-Chromatographie: Ein Laboratoriumshandbuch; Springer-Verlag OHG: Heidelberg, **1962**.

- [40] Braun, D.; Geenen, H.; Dünnschichtchromatographie von Carbonsäuren, *Journal of Chromatography A*, **1962**, 7, 56-9.
- [41] Dhimitruka, I.; Grigorieva, O.; Zweier, J. L.; Khramtsov, V. V.; Synthesis, structure, and EPR characterization of deuterated derivatives of Finland trityl radical, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2010**, 20, 3946-9.
- [42] Decroos, C.; Li, Y.; Bertho, G.; Frapart, Y.; Mansuy, D.; Boucher, J. L.; Oxidative and reductive metabolism of tris (p-carboxyltetrathiaaryl) methyl radicals by liver microsomes, *Chemical research in toxicology*, **2009**, 22 (7), 1342-50.
- [43] Driesschaert, B.; Marchand, V.; Leveque, P.; Gallez, B.; Marchand-Brynaert, J.; A phosphonated triarylmethyl radical as a probe for measurement of pH by EPR, *Chemical Communications*, **2012**, 48 (34), 4049-51.
- [44] Bobko, A. A.; Dhimitruka, I.; Komarov, D. A.; Khramtsov, V. V.; Dual-Function pH and Oxygen Phosphonated Trityl Probe, *Analytical Chemistry*, **2012**, 84 (14), 6054-60.
- [45] Hoffart, D. J.; Côté, A. P.; Shimizu, G. K. H.; An adamantane-based coordination framework with the first observation of discrete metal sulfonate clusters, *Inorganic Chemistry*, **2003**, 42, 8603-5.
- [46] Rathore, R.; Burns, C. L.; Guzei, I. A.; Synthesis and Isolation of Polytrityl Cations by Utilizing Hexaphenylbenzene and Tetraphenylmethane Scaffolds, *The Journal of Organic Chemistry*, **2004**, 69 (5), 1524-30.
- [47] Rathore, R.; Zhu, C.; Lindeman, S. V.; Kochi, J. K.; Spontaneous oxidation of organic donors to their cation radicals using Bronsted acids. Identification of the elusive oxidant, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, **2000**(9), 1837-40.
- [48] Hofmann, K.; Simchen, G.; Sulfosilylierung von Carbonylverbindungen und Trimethylsilylenolethern mit Chlorsulfonsäure-trimethylsilylester, *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, **1984**, 1984, 39-47.
- [49] Johnson, T. C.; Martin, T. P.; Mann, R. K.; Pobanz, M. A.; Penoxsulam—Structure–activity relationships of triazolopyrimidine sulfonamides, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **2009**, 17 (12), 4230-40.
- [50] Filler, R.; Fiebig Jr, A. E.; Mandal, B. K.; Fluorocarbanion chemistry. Tris(4-nitro-2,3,5,6-tetrafluorophenyl) methane and companions, *Journal of Fluorine Chemistry*, **2000**, 102 (1–2), 185-8.
- [51] Thaning, M.; Pettersson, G.; Free Radicals US/6013810 (A), **2000**.
- [52] Carreras, A.; Esparbé, I.; Brillas, E.; Rius, J.; Torres, J. L. s.; Julià, L.; Oxidant Activity of Tris(2,4,6-trichloro-3,5-dinitrophenyl)methyl Radical with Catechol and Pyrogallol. Mechanistic Considerations, *The Journal of Organic Chemistry*, **2009**, 74 (6), 2368-73.
- [53] Velasco, D.; Castellanos, S.; López, M.; López-Calahorra, F.; Brillas, E.; Julià, L.; Red Organic Light-Emitting Radical Adducts of Carbazole and Tris(2,4,6-trichlorotriphenyl)methyl Radical That Exhibit High Thermal Stability and Electrochemical Amphotericity, *The Journal of Organic Chemistry*, **2007**, 72 (20), 7523-32.
- [54] Torres, J. L.; Carreras, A.; Jiménez, A.; Brillas, E.; Torrelles, X.; Rius, J.; Julià, L.; Reducing Power of Simple Polyphenols by Electron-Transfer Reactions Using a New Stable Radical of the PTM Series, Tris(2,3,5,6-tetrachloro-4-nitrophenyl)methyl Radical, *The Journal of Organic Chemistry*, **2007**, 72 (10), 3750-6.
- [55] Mesa, J. A.; Velázquez-Palenzuela, A.; Brillas, E.; Torres, J. L.; Julià, L.; Synthesis of a new stable and water-soluble tris(4-hydroxysulfonyltetrachlorophenyl)methyl radical with selective oxidative capacity, *Tetrahedron*, **2011**, 67, 3119-23.

- [56] Ballester, M.; Riera, J.; Castaner, J.; Rovira, C.; Armet, O.; An Easy, High-yield Synthesis of Highly Chlorinated Mono-, Di- and Triarylmethanes, *Synthesis*, **1986**, 1986 (1), 64-6.
- [57] Maspoch, D.; Domingo, N.; Ruiz-Molina, D.; Wurst, K.; Vaughan, G.; Tejada, J.; Rovira, C.; Veciana, J.; A Robust Purely Organic Nanoporous Magnet, *Angewandte Chemie*, **2004**, 43 (14), 1828-32.
- [58] Dang, V.; Wang, J.; Feng, S.; Buron, C.; Villamena, F. A.; Wang, P. G.; Kuppusamy, P.; Synthesis and characterization of a perchlorotriphenylmethyl (trityl) triester radical: a potential sensor for superoxide and oxygen in biological systems, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2007**, 17, 4062-5.
- [59] Elewa Mohamed, M.; Dissertation: *Synthese und Labelling von Chitosan-Oligomeren*; Martin-Luther-Universität, **in Arbeit**.
- [60] Chivers, G. E.; Cremlyn, R. J. W.; Cronje, T. N.; Martin, R. A.; Studies in the chemistry of polyhalogenobenzene compounds. The synthesis and reactivity of 2,3,5,6- and 2,3,4,5-tetrachlorobenzenesulphonyl chlorides and related compounds, *Australian Journal of Chemistry*, **1976**, 29, 1573-82.
- [61] Cremlyn, R. J. W.; Cronje, T.; Chlorination of aromatic halides with chlorosulfonic acid, *Phosphorous and Sulfur and the Related Elements*, **1979**, 6 (3), 495-504.
- [62] Cremlyn, R. J.; Chlorosulfonic Acid: A Versatile Reagent, **2002**.
- [63] Caesar, P. D.; 1,5-Naphthalenedisulfonyl chloride, *Organic Syntheses*, **1963**, 4, 693.
- [64] Armet, O.; Veciana, J.; Castañer, J.; Riera, J.; Carilla, J.; Rianza, J.; Updating of pentachlorobenzenesulfonic acid, *Phosphorus and sulfur and the related elements*, **1988**, 35 (3-4), 273-9.
- [65] Guan, Z.; Chai, X.; Yu, S.; Hu, H.; Jiang, Y.; Meng, Q.; Wu, Q.; Synthesis, molecular docking, and biological evaluation of novel triazole derivatives as antifungal agents, *Chemical Biology & Drug Design*, **2010**, 76 (6), 496-504.
- [66] Liebermann, C.; Über die Einwirkung des Oxalylchlorids auf aromatische Kohlenwasserstoffe, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **1912**, 45 (1), 1186-217.
- [67] Liebermann, C.; Zsuffa, M.; Zur Carboxylierung mehrkerniger aromatischer Kohlenwasserstoffe, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **1911**, 44 (1), 202-10.
- [68] Sarma, B.; Nangia, A.; Tetrakis(4-sulfophenyl)methane dodecahydrate. Reversible and selective water inclusion and release in an organic host, *CrystEngComm*, **2007**, 9, 628.
- [69] Lüllmann, H.; Mohr, K.; Hein, L.; Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie; Thieme, **2006**; Vol. 16. Aufl.
- [70] Boldt, J.; Hydroxyethylstärke (HES), *Wiener Klinische Wochenschrift*, **2004**, 116 (5), 159-69.
- [71] Böttger, F.; Dissertation: *Synthese und Charakterisierung neuer Stärkederivate für die klinische Anwendung*; Universität, **2003**.
- [72] Lawin, P.; Ackern, K. v.; Hydroxyethylstärke: eine aktuelle Übersicht; Thieme, **1989**.
- [73] Augsten, C.; Dissertation: *Asymmetrische Fluß Feld-Fluß Fraktionierung in Verbindung mit Mehrwinkellichtstreuung – Eine neue bedeutende Methode der Pharmazeutischen Analytik zur Charakterisierung von Makromolekülen und Nanopartikeln*; Martin-Luther-Universität, **2008**.
- [74] Ye Min, L.; XU, G. Y.; Positional and Quantitative Characterization of the Hydroxyethyl Groups in Hydroxyethyl Starch by GC/MS or NMR, *Chinese Chemical Letters*, **2002**, 13 (11), 1097-99.

- [75] De Graaf, R. A.; Lammers, G.; Janssen, L. P. B. M.; Beenackers, A. A. C. M.; Quantitative Analysis of Chemically Modified Starches by $^1\text{H-NMR}$ Spectroscopy, *Starch-Stärke*, **1995**, 47 (12), 469-75.
- [76] Furuta, H.; Saito, H.; Ishizaki, T.; Determination of molar substitution of hydroxyethyl starch by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Iyakuin Kenkyu*, **1997**, 28 (7), 517-22.
- [77] Kressler, J.; Drug Release System basierend auf modifizierter Hydroxyethylstärke München, **2005**.
- [78] Lindner, O.; Rodefeld, L.; In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Wiley-VCH Verlag: **2000**.
- [79] Besheer, A. I. H.; Dissertation: *Nanomedicines based on modified hydroxyethyl starch - From synthesis to in vivo evaluation*; Martin-Luther-Universität, **2008**.
- [80] Byun, H.-S.; Zhong, N.; Bittman, R.; 6A-(4-methylbenzenesulfonate)- β -Cyclodextrin, *Organic Syntheses*, **2004**, Coll. Vol. 10, 690-1.
- [81] Wong, F. F.; Chen, K.-L.; Lin, C. M.; Yeh, M.-Y.; New investigation of 1-substituted imidazole derivatives as thermal latent catalysts for epoxy-phenolic resins, *Journal of applied polymer science*, **2007**, 104 (5), 3292-300.
- [82] Becker, R.; Becker, H. G. O.; Organikum: organisch-chemisches Grundpraktikum; Wiley VCH: Weinheim, **2009**.
- [83] Gomberg, M.; The existence of free radicals, *Journal of the American Chemical Society*, **1914**, 36, 1144-70.
- [84] Ihde, A.; The history of free radicals and Moses Gomberg's contributions, *Pure and Applied Chemistry*, **1967**, 15 (1), 1-14.
- [85] Gomberg, M.; Über Triphenylmethyl, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, **1904**, 37 (2), 1626-44.
- [86] Rüdhardt, C.; Mayer-Rüdhardt, I.; Die Chemie freier Radikale, *Chemie in Unserer Zeit*, **1969**, 3 (2), 40-9.
- [87] Rüdhardt, C.; Sonderdruck: *Radikale - Eine chemische Theorie in historischer Sicht*; Albert-Ludwigs-Universität, **1992**.
- [88] Zavoiskii, E.; Paramagnetic absorption of a solution in parallel fields, *Journal of Physics* 8, **1944**, 377-80.
- [89] Schoffa, G.; Anwendung der Elektronenspinresonanz in der Biologie und Medizin, *Biomedizinische Technik*, **1964**, 9 (1-4), 199-201.
- [90] Jeschke, G.; Vorlesungsskript: *Kurze Einführung in die elektronenparamagnetische Resonanzspektroskopie*; Universität-Konstanz, **2007**.
- [91] Galla, H. J.; Müller, H. J.; In *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*; Georg Thieme Verlag: **1988**.
- [92] Schleidt, S.; Dissertation: *EPR-Spektroskopie zur Untersuchung von Struktur und Dynamik in Polymer-Ton-Nanokompositen*; Johannes Gutenberg Universität, **2006**.
- [93] Bär, F.; Berndt, A.; Dimroth, K.; Physikalische Methoden in der Chemie: ESR-Spektroskopie organischer Radikale I, *Chemie in Unserer Zeit*, **1975**, 9 (1), 18-24.
- [94] Gerson, F.; Huber, W.; Electron spin resonance spectroscopy of organic radicals; Wiley-VCH, **2006**.
- [95] Kroll, C.; Dissertation: *Analytik, Stabilität und Biotransformation von Spinsonden sowie deren Einsatz im Rahmen pharmazeutisch-technologischer und biopharmazeutischer Untersuchungen*; Humboldt-Universität, **1999**.
- [96] Mäder, K.; Stöber, R.; Borchert, H.-H.; Direkter Nachweis freier Radikale an der lebenden Maus durch Elektronenspinresonanz, *Pharmazie in unserer Zeit*, **1992**, 21 (3), 111-34.
- [97] Dikalov, S.; Jiang, J.; Mason, R. P.; Characterization of the high-resolution ESR spectra of superoxide radical adducts of 5-(diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline

- N-oxide (DEPMPO) and 5, 5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO). Analysis of conformational exchange, *Free Radical Research*, **2005**, 39 (8), 825-36.
- [98] Likhtenshtein, G.; Yamauchi, J.; Nakatsuji, S.; Smirnov, A. I.; Tamura, R.; Nitroxides: Applications in Chemistry, Biomedicine, and Materials Science; Wiley-VCH, **2008**.
- [99] Berliner, L. J.; Reuben, J.; Spin Labeling: Theory and Applications, *Biological Magnetic Resonance*, Eds. (1989), Band XIII, New York: Plenum Publishing Corp.
- [100] Mäder, K.; Pharmaceutical applications of in vivo EPR, *Physics in medicine and biology*, **1998**, 43, 1931-5.
- [101] Bohne, M.; Dissertation: *Anwendung der Elektronenspinresonanzspektrometrie und der Spin-Trapping-Methode für die Untersuchung der Wirkung von Retinoiden und Carotinoiden auf die Bildung von Sauerstoffradikalen in stimulierten neutrophilen Granulozyten*; Otto-von-Guericke-Universität **2002**.
- [102] Paniagua, J. C.; Mugnaini, V.; Gabellieri, C.; Feliz, M.; Roques, N.; Veciana, J.; Pons, M.; Polychlorinated trityl radicals for dynamic nuclear polarization: the role of chlorine nuclei, *Physical chemistry chemical physics*, **2010**, 12, 5824-9.
- [103] 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.; Halpern, H. J.; 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 Journal of Organic Chemistry*, **2012**, 2012, 623-9.
- [104] Liu, Y.; Villamena, F. A.; Sun, J.; Wang, T.-Y.; Zweier, J. L.; Esterified trityl radicals as intracellular oxygen probes, *Free Radical Biology and Medicine*, **2009**, 46, 876-83.
- [105] Liu, Y.; Villamena, F. A.; Sun, J.; Xu, Y.; Dhimitruka, I.; Zweier, J. L.; Synthesis and characterization of ester-derivatized tetrathiatriarylmethyl radicals as intracellular oxygen probes, *The Journal of Organic Chemistry*, **2008**, 73, 1490-7.
- [106] Kutsche, I.; Gildehaus, G.; Schuller, D.; Schumpe, A.; Oxygen solubilities in aqueous alcohol solutions, *Journal of Chemical and Engineering Data*, **1984**, 29 (3), 286-7.
- [107] Mutschler, E.; Thews, G.; Vaupel, P.; Schaible, H. G.; Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen; 6. Auflage ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, **2007**.
- [108] Danckwerth, F.; Bornscheuer, A.; Kirchner, E.; Lübke, N.; Die Sauerstoffgehaltsbestimmung: Vergleichsmessung zwischen dem neuen Oxystat®-Photometer und dem Lex-O2-Con®, *Anästhesiologie. Intensivmedizin. Notfallmedizin. Schmerztherapie*, **1991**, 26 (7), 408-11.
- [109] Kretz, F. J.; Schäffer, J.; Anästhesie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie; Springer, **2008**.
- [110] Severinghaus, J.; Astrup, P.; History of blood gas analysis. IV. Leland Clark's oxygen electrode, *Journal of Clinical Monitoring*, **1986**, 2 (2), 125-39.
- [111] Hofer, S. O. P.; Timmenga, E. J. F.; Christiano, R.; Bos, K. E.; An intravascular oxygen tension monitoring device used in myocutaneous transplants: A preliminary report, *Microsurgery*, **1993**, 14 (5), 304-9.
- [112] Hjortdal, V.; Timmenga, E.; Kjølseth, D.; Brink, H. T.; Stender, H. E.; Djurhuus, J.; Gottrup, F.; Continuous direct tissue oxygen tension measurement. A new application for an intravascular oxygen sensor, *Annales chirurgiae et gynaecologiae*, **1991**, 80, 8.
- [113] Vaupel, P.; Schlenger, K.; Knoop, C.; Höckel, M.; Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O2 tension measurements, *Cancer research*, **1991**, 51 (12), 3316-22.
- [114] Gleichmann, U.; Lübbers, D. W.; Burger, W.; Eschweiler, W.; Die Messung des Sauerstoffdruckes in Gasen und Flüssigkeiten mit der Pt-Elektrode unter besonderer Berücksichtigung der Messung im Blut, *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, **1960**, 271 (4), 431-55.

- [115] Gleichmann, U.; Ingvar, D.; Lübbers, D.; Siesjö, B.; Thews, G.; Tissue pO₂ and pCO₂ of the cerebral cortex, related to blood gas tensions, *Acta Physiologica Scandinavica*, **1962**, 55 (2-3), 127-38.
- [116] Dröge, W.; Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiological reviews*, **2002**, 82 (1), 47-95.
- [117] Prof. Dr. Kahl, R.: *Praktikumsscript Toxikologie*, **2003**.
- [118] Elas, M.; Williams, B. B.; Parasca, A.; Mailer, C.; Pelizzari, C. A.; Lewis, M. A.; River, J. N.; Karczmar, G. S.; Barth, E. D.; Halpern, H. J.; Quantitative tumor oxymetric images from 4D electron paramagnetic resonance imaging (EPRI): Methodology and comparison with blood oxygen level-dependent (BOLD) MRI, *Magnetic resonance in medicine*, **2003**, 49 (4), 682-91.
- [119] Rücker, G.; Neugebauer, M.; Willems, G. G.; Instrumentelle pharmazeutische Analytik: Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen und elektrochemischen Analysenmethoden; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, **2008**.
- [120] Backer, J. M.; Budker, V. G.; Eremenko, S. I.; Molin, Y. N.; Detection of the kinetics of biochemical reactions with oxygen using exchange broadening in the ESR spectra of nitroxide radicals, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1977**, 460 (1), 152-6.
- [121] Glockner, J. F.; Norby, S.-W.; Swartz, H. M.; Simultaneous measurement of intracellular and extracellular oxygen concentrations using a nitroxide-liposome system, *Magnetic resonance in medicine*, **1993**, 29 (1), 12-8.
- [122] Halpern, H. J.; Yu, C.; Peric, M.; Barth, E.; Grdina, D. J.; Teicher, B. A.; Oxymetry deep in tissues with low-frequency electron paramagnetic resonance, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **1994**, 91 (26), 13047-51.

DANKSAGUNG

Diese wissenschaftliche Arbeit wurde in der Zeit von 06/2008 bis 03/2013 im Institutsbereich Pharmazeutische Chemie und Klinische Pharmazie des Instituts für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg und von 12/2009 bis 05/2010 am Davis Heart & Lung Research Institut, Department of Internal Medicine (Pulmonary, Allergy, Critical Care & Sleep Medicine) in Columbus (Ohio) angefertigt.

Die vorliegende Dissertationsschrift wäre nicht ohne die Unterstützung, den Rat und die Geduld zahlreicher Personen möglich gewesen, bei denen ich mich abschließend herzlich bedanken möchte.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. habil. Peter Imming, für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Dissertation und der Überlassung des spannenden und interdisziplinären Themas sowie dessen sehr freie Gestaltung. Seine fortwährende, freundliche und wohlwollende Betreuung, die zahlreichen anregenden Diskussionen sowie die vielen Tipps und Ratschläge praktischer Natur bleiben unvergessen und haben in großem Maße zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen. Allen Mitarbeitern (besonders: Aline, Katja, Lilyana) seiner Arbeitsgruppe danke ich für das freundliche Arbeitsklima und der guten Zusammenarbeit. Ganz besonderen Dank gilt meiner lieben Labor-Kollegin Ines für die außerordentlich gute Zusammenarbeit in unserem Labor und -abzug, steten Möglichkeit zur Kommunikation und Diskussion, sowie dem offenen Ohr in allen Belangen.

Ein großer Dank geht ebenfalls an Herrn Prof. Dr. habil. Karsten Mäder und seinen Mitarbeitern (besonders Dr. Sabine Kempe und Juliane Frank) für die zahlreichen ESR-Untersuchungen.

Zu außerordentlichem Dank bin ich Klaus Adelsberger der Firma Luft- und Thermotechnik Bayreuth GmbH verpflichtet, ohne die Bereitstellung der Abluftverbrennungsanlage und der damit verbundenen Möglichkeit das Ausgangsmaterial synthetisieren zu können, wäre diese Arbeit nicht in diesem Umfang entstanden.

Weiter danke ich ganz besonders Dr. Malte Drescher vom Fachbereich Chemie der Universität Konstanz und seiner Arbeitsgruppe, die mir mit vielen fachlichen Hinweisen und Anmerkungen das Verständnis des ESR-Imagings nähergebracht haben.

Herrn Assistenzprofessor Dr. Valery V. Khramtsov danke ich für das ermöglichte Auslandsstipendium am Davis Heart & Lung Research Institut, Department of Internal Medicine in Ohio (Columbus).

Herrn Dr. Simon Drescher danke ich an dieser Stelle ebenfalls für die sehr gute Zusammenarbeit und der kritischen Auseinandersetzung mit diesem Manuskript.

Allen Angehörigen des Institutsbereichs für Pharmazeutische Chemie und Klinische Pharmazie, die mich während der Anfertigung der Dissertation unterstützt haben, hier aber unerwähnt geblieben sind, bin ich ebenfalls zu besonderem Dank verpflichtet.

Aus tiefstem Herzen danke ich Michael für das ständige Interesse an meiner Arbeit, für das enorme Verständnis, für die große Geduld und für die liebevolle moralische Unterstützung.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

geboren am 11.01.1982 in Köthen
Familienstand ledig
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulische Ausbildung

07.2000 Gymnasium "An der Rüsternbreite" Köthen
Abitur

Berufliche Ausbildung

08.2000 - 06.2002 Pharmazeutisch technische Assistentin (PTA)
"Hugo Junkers" Dessau
07.2002 - 12.2002 Praktische PTA Ausbildung Stadtapotheke Köthen
01.2003 Berufsabschluss PTA

Berufstätigkeiten

01.2003 - 03.2007 Stadtapotheke Köthen und deren Filiale und Zweigapotheke
(Rosenapotheke Osternienburg und Stadtapotheke Köthen)

Studium

04.2003 - 03.2007 Pharmaziestudium in Braunschweig
Abschluss 2. Staatsexamen

Praktisches Jahr

05.2007 - 10.2007 Stadtapotheke Köthen Filiale Sonnenapotheke
11.2007 - 04.2008 Boehringer Ingelheim Abteilung Drug Delivery

Berufsabschluss

05.2008 Approbation

Berufstätigkeiten

06.2008 - 03.2013 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für
Pharmazie der Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissen-
schaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter
der Leitung von Prof. Dr. P. Imming
Nebentätigkeit als Apothekerin, Sonnenapotheke Köthen
04.2013 Pharmazeutische Expertin, Aeropharm GmbH Rudolstadt

Auslandsaufenthalt

12.2009 - 05.2010 Davis Heart & Lung Research Institute, Department of Internal
Medicine (Pulmonary, Allergy, Critical Care & Sleep Medicine) in
Columbus (Ohio)

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich gemäß der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dass ich die vorgelegte Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Datum, Unterschrift