

# Darstellung und Untersuchung cheletroper Fängersysteme für Stickstoffmonoxid

**DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie  
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

**Frank Stefan Hornig**

aus Menden (Sauerland)

**Mai 2007**

Vorsitzender: Prof. Dr. A. Hirner

Referent: Prof. Dr. Dr. h. c. R. Sustmann

Korreferent: Prof. Dr. Dr. H. de Groot

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Juli 2007

„Hiermit bestätige ich, die Arbeit nur mit den angegebenen Hilfsmitteln und ohne fremde Hilfe angefertigt zu haben.“

Diese Arbeit wurde im Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen unter Leitung von

**Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. R. Sustmann**

durchgeführt. Für die sehr interessante Themenstellung und die mir stets gewährte freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit möchte ich mich bedanken. Auch für die finanzielle Unterstützung durch die Werdelmann-Stiftung möchte ich mich herzlich bedanken.

Dank aussprechen möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. H. de Groot für die freundliche Übernahme des Korreferates und vor allem für die Möglichkeit, am Institut für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums Essen Experimente durchzuführen.

Bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am Institut für Organische Chemie für die sehr gute Arbeitsatmosphäre und insbesondere Frau H. Kallweit und Frau E. Verheggen für die hervorragende Zusammenarbeit sowie Herrn Dr. H.-G. Korth für die vielen Diskussionen und Anregungen.

Ein großes Dankeschön auch an die Mitglieder des Instituts für Physiologische Chemie, vor allem Frau Priv.-Doz. Dr. U. Rauen für die Hilfestellung bei den Zellexperimenten und den interessanten Diskussionen.

Mein weiterer Dank gilt den Herren H. Bandmann und W. Karow für die Aufnahme zahlreicher NMR-, Massen- und IR-Spektren, Frau K. Brauner und Frau V. Hiltenkamp für die Durchführung der Elementaranalysen und Frau U. Nüchter für die Hilfestellung bei der Aufnahme der Fluoreszenz- und UV-Spektren.

Bedanken möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie, die durch ihre ständige Hilfsbereitschaft das Zusammenstellen dieser Arbeit unterstützt hat.



# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Bedeutung von NO im Organismus	5
1.2	Nachweismethoden für Stickstoffmonoxid	12
1.3	Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie	26
2	Problemstellung	28
3	Synthese und Untersuchung der Stickstoffmonoxid-Fänger	30
3.1	Synthese der Vorstufen	30
3.2	Darstellung der Phenanthren-Fängersysteme	31
3.2.1	Synthese des Cyclons <b>39</b>	31
3.2.2	Synthese des Cyclons <b>44</b>	34
3.2.3	Synthese der phenanthrensubstituierten Fängersysteme	37
3.2.4	Darstellung des Fängersystems <b>60</b>	42
3.3	Darstellung der pyrensubstituierten Fängersysteme	44
3.3.1	Synthese von <b>67</b> und <b>68</b>	45
3.3.2	Synthese von <b>69</b> und <b>70</b>	47
3.3.3	Photodecarbonylierung der Ketone <b>67</b> bis <b>70</b>	49
3.4	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen der Stickstoffmonoxid-Fängersysteme	52
3.4.1	Phenanthren-Systeme	53
3.4.2	Pyren-Systeme	59
3.4.2.1	Untersuchung des NO-Abfangs durch Pyren-FNOCT-Säure <b>71</b>	65
3.4.2.2	Fluoreszenzeigenschaften der NO-Abfangprodukte <b>71b</b> und <b>73b</b>	68
3.4.2.3	Stabilität der Pyren-FNOCT-Säure <b>71</b>	77
3.5	UV/Vis-spektroskopische Untersuchungen der Pyren-Fängersysteme	79
3.6	Reaktion des FNOCT <b>52</b> bis <b>54</b> und <b>71</b> , <b>73</b> mit Stickstoffmonoxid unter ESR-spektroskopischer Detektion	83
4	Anwendung der Fängersysteme im biologischen System	88
4.1	Nachweis von exogen generiertem Stickstoffmonoxid in Fibroblasten	88

Inhalt	II	
4.1.1	Vitalitätsbestimmung der Zellen	88
4.1.2	Nachweis von Stickstoffmonoxid in beladenen Fibroblasten der Ratte	92
4.2	Nachweis von endogen gebildetem Stickstoffmonoxid in Alveolar-Makrophagen der Ratte	99
4.2.1	Stimulation der Alveolar-Makrophagen	99
4.2.2	Nachweis der NO-Bildung mittels Py-FNOCT-Säure <b>71</b> im Zellüberstand	100
5	Zusammenfassung	102
6	Ausblick	105
7	Experimenteller Teil	107
7.1	Allgemeine Arbeitstechnik	107
7.1.1	Arbeiten unter Schutzgas	107
7.1.2	Trocknen der Lösungsmittel	107
7.1.3	Instrumentelle Analytik	108
7.2	Synthese, Charakterisierung und Untersuchung der Produkte	110
7.2.1	Darstellung des Carbonsäure- und des Acetoxymethylester-Dienophils	110
7.2.1.1	Darstellung von Chlormethylacetat ( <b>32</b> ) <sup>[64]</sup>	110
7.2.1.2	Darstellung von Norborn-5-en-2,3-(E)-dicarbonsäureester <b>31</b> <sup>[65]</sup> und <b>55</b>	111
7.2.1.3	Darstellung von Norborn-5-en-2,3-(E)-dicarbonsäure ( <b>33</b> ) <sup>[66]</sup>	113
7.2.1.4	Darstellung von Norborn-5-en-2,3-(E)-dicarbonsäurediacetoxymethylester ( <b>34</b> ) <sup>[63]</sup>	114
7.3	Darstellung des Tetrahydroxymethyl-Dienophils	116
7.3.1	Darstellung von Brommalonsäuresäure-dimethylester ( <b>76</b> ) <sup>[106]</sup>	116
7.3.2	Darstellung von 1,1,2,2-Ethylentetracarbonsäure-tetramethylester ( <b>77</b> ) <sup>[107,108]</sup>	117
7.3.3	Darstellung von Norborn-5-en-2,3-tetracarbonsäure-tetramethylester ( <b>78</b> ) <sup>[74]</sup>	118
7.3.4	Darstellung von Norborn-5-en-2,3-tetrahydroxymethyl ( <b>58</b> ) <sup>[74]</sup>	119
7.4	Synthese der Cyclopentadienon-Derivate	120
7.4.1	Darstellung von 2,5-Diphenyl-3,4-(2,2'-biphenylen)-cyclopenta-2,4-dien-1-on ( <b>57</b> ) <sup>[73]</sup>	121
7.4.2	Synthese des Methylsubstituierten Phenanthrencyclons	123

7.4.2.1	Darstellung von 4-Hydroxy-2,5-dimethylcyclopentaphenanthren-2-enon ( <b>37</b> ) <sup>[69]</sup>	123
7.4.2.2	Darstellung von 1-Chlor-1,3-dimethylcyclopentaphenanthren-2-on ( <b>38</b> ) <sup>[69]</sup>	124
7.4.2.3	Darstellung des Dimers von 1,3-Dimethylcyclopentaphenanthren-2-on ( <b>39</b> ) <sup>[69]</sup>	125
7.4.3	Synthese des Estersubstituierten Phenanthrencyclons	127
7.4.3.1	Darstellung von 4-Hydroxy-2,5-bis(carbonsäuremethylester)-3,4-(2,2'-biphenylen)-cyclopent-2-en-1-on. ( <b>43</b> ) <sup>[70]</sup>	127
7.4.3.2	Darstellung des Diels-Alder-Dimers <b>44</b> <sup>[70]</sup>	129
7.4.4	Synthese des Pyrencyclons	132
7.4.4.1	Darstellung von Pyren-4,5-chinon <sup>[76]</sup>	132
7.4.4.2	Darstellung von 2',5'-Diphenyl-3',4'-(4,5-pyrenylen) cyclopenta-2',4'-dien-1'-on	134
7.4.5	Synthese des Di- <i>tert.</i> -butyl-Pyrencyclons	138
7.4.5.1	Darstellung von 2,7-Di- <i>tert.</i> -butylpyren <sup>[78]</sup>	138
7.4.5.2	Darstellung von 2,7-Di- <i>tert.</i> -butylpyren-4,5-dion <sup>[76]</sup>	140
7.4.5.3	Darstellung von Di- <i>tert.</i> -butylpyrencyclon	142
7.5	Synthese der Fängervorstufen durch Diels-Alder-Reaktion von substituierten Norbornen-Derivaten mit Cyclopentadienon-Derivaten	146
7.5.1	Synthese des Maleinsäureanhydridadduktes <b>46</b> <sup>[69]</sup>	147
7.5.2	Synthese des Ketons <b>47</b>	150
7.5.3	Synthese des Ketons <b>48</b>	152
7.5.4	Darstellung von 3,5-Diphenyl-3,5-(9,10-phenanthrylen)tricyclo[5.2.1.0 <sup>2,6</sup> ]decan-4-on-8,9-(E)-tetrahydroxymethyl ( <b>59</b> )	154
7.5.5	Synthese des Ketons <b>49</b>	158
7.5.6	Darstellung von 3,5-Bis(carbonsäuremethylester)-3,5-(9,10-phenanthrylen)-tricyclo[5.2.1.0 <sup>2,6</sup> ]decan-4-on-8,9-(E)-bis(carbonsäureethylester) ( <b>50</b> )	163
7.5.7	Darstellung von 3,5-Diphenyl-3,5-(2-methoxy-9,10-phenanthrylen)tricyclo[5.2.1.0 <sup>2,6</sup> ]decan-4-on-8,9-(E)dicarbonsäureethylester ( <b>51</b> )	168
7.5.8	Diels-Alder-Addition zu 3',5'-Diphenyl-3',5'-(4,5-pyrenylen)tricyclo-[5.2.1.0 <sup>2,6</sup> ]-decan-4'-on-8',9'-(E)-dicarbonsäure ( <b>67</b> )	173
7.5.9	Herstellung von 3',5'-Diphenyl-3',5'-(2,7-di- <i>tert.</i> -butyl-4,5-pyrenylen)tricyclo-[5.2.1.0 <sup>2,6</sup> ]-decan-4'-on-8',9'-(E)-dicarbonsäure ( <b>69</b> )	178
7.5.10	Herstellung von 3',5'-Diphenyl-3',5'-(4,5-pyrenylen)tricyclo-[5.2.1.0 <sup>2,6</sup> ]-decan-4'-on-8',9'-(E)-dicarbonsäure-diacetoxymethylester ( <b>68</b> )	183
7.5.11	Herstellung der Fängervorstufe <b>70</b>	187

---

7.6	Photochemische Darstellung der o-Chinodimethan-Derivate	192
7.6.1	Photolyse von <b>47</b>	193
7.6.2	Photolyse von <b>48</b>	194
7.6.3	Photochemische Decarbonylierung von <b>59</b>	195
7.6.4	Photochemische Decarbonylierung von <b>49</b>	199
7.6.5	Photochemische Decarbonylierung von <b>50</b>	204
7.6.6	Photochemische Decarbonylierung von <b>51</b>	208
7.6.7	Photometrische Decarbonylierung zu <b>71</b>	214
7.6.8	Photodecarbonylierung zu <b>73</b>	219
7.6.9	Photochemische Decarbonylierung von <b>68</b> zu <b>72</b>	223
7.6.10	Photochemische Decarbonylierung von <b>70</b> zu <b>74</b>	228
7.7	ESR-spektroskopische Untersuchungen von <b>52</b> bis <b>54</b> und <b>71</b> , <b>73</b>	233
7.8	Herstellung der Hydroxylamine aus den Fängersystemen <b>71</b> und <b>73</b>	234
7.9	Durchführung der kinetischen Messungen	235
8	Experimenteller biologischer Teil	236
8.1	Verwendete Biochemikalien und Chemikalien	236
8.2	Geräte für die Zellkultivierung	236
8.3	Materialien für die Sterilisation	237
8.4	Verwendete Wasch- und Inkubationsmedien	237
8.5	Verwendung von <b>71</b> zur Detektion von Stickstoffmonoxid in einzelnen Zellen	237
8.6	Bestimmung der intrazellulären Fängerkonzentration von FNOCT- Säure <b>71</b>	238
8.7	Bestimmung der Zellvitalität	239
8.8	Zellisolierung und Kultivierung	239
8.8.1	Kultivierung der Fibroblasten	239
8.8.2	Isolierung und Kultivierung von Schweineaorten-Endothelzellen	240
9	Literatur	241



# Verzeichnis der Akronyme

Arg	L-Arginin
cGMP	zyklisches Guaosin-3',5'-monophosphat
Cit	L-Citrullin
DAN	2,3-Diaminonaphthalin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTB	Di- <i>tert.</i> -Butyl
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
ESI	Elektrospray Ionisation
ESR	Elektronenspinresonanz
(F)NOCT	(Fluorescent) Nitric Oxide Cheletropic Trap
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i> (Hanks' gepufferte Salzlösung)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochleistungs-Flüssigchromatographie)
KH	Krebs Henseleit Puffer
L-NMA	N-methyl-L-arginin
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
MS	Massenspektrometrie
NAD(P)H	Nicotinamid-adenin-dinucleotid(-phosphat) (reduzierte Form)
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernresonanz)
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Pluronic F-127	Polyethylenglycol-polypropylenglycol-copolymer
ppm	<i>parts per million</i> (Anteil pro 100000)
Py	Pyren
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SpNO	SperminNONOat
THF	Tetrahydrofuran

# 1 Einleitung

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein farbloses, in Wasser nur wenig lösliches Gas, das bei  $-151.77\text{ °C}$  siedet und einen Erstarrungspunkt von  $-163.65\text{ °C}$  aufweist. Bis 1970 galt es vor allem als Zellgift. Das Molekül besitzt ein ungepaartes Elektron und ist somit eines der einfachsten freien Radikale, wobei der Radikalcharakter bezogen auf die Reaktivität nicht sehr stark ausgebildet ist. Dieses zeigt sich in der geringen Tendenz des Moleküls zur Dimerisierung (Schema 1).<sup>[1]</sup>

Schema 1



Die geringe Neigung des Stickstoffmonoxids zur Dimerisierung trotz seines Radikalcharakters lässt sich darauf zurückführen, dass das ungepaarte Elektron über das gesamte Molekül delokalisiert ist, und dass die Dimerisierung keine Änderung der Bindungsordnung bewirkt. Bei tiefen Temperaturen im flüssigen Zustand liegt bevorzugt  $\text{N}_2\text{O}_2$  vor. Dieses Molekül existiert als cis- und als trans-Konformer, wobei die cis-Form stabiler ist.<sup>[2-4]</sup>

Stickstoffmonoxid, welches von Luft sofort zu toxischem braunrotem Stickstoffdioxid oxidiert wird, ist eines der wenigen Hauptgruppen-Oxide mit ungerader Elektronenzahl. Tabelle 1<sup>[5]</sup> zeigt die Elektronenkonfiguration von NO im Grundzustand und in den ersten beiden elektronisch angeregten Zuständen. Gegenüber  $\text{N}_2$  besitzt NO ein zusätzliches Elektron in einem der antibindenden  $\pi^*$ -Orbitale. Dieses führt zu einer Verminderung der Bindungsordnung von 3 auf 2.5 und erklärt damit auch die Tatsache, dass der Abstand von N zum O zwischen dem des dreifach gebundenen  $\text{NO}^+$  (106 pm) und dem von NO-Derivaten mit doppelt gebundenem Stickstoff (120 pm) liegt. Die vergleichsweise niedrige

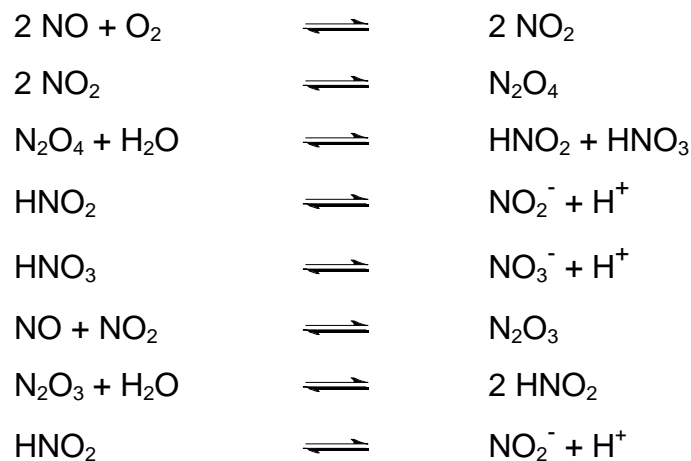
Ionisierungsenergie von nur 9.25 eV lässt sich ebenfalls damit erklären. Verglichen damit hat z.B. N<sub>2</sub> eine Ionisierungsenergie von 15.4 eV.

Z	ELEKTRONENKONFIGURATION	P <sub>b</sub>	P <sub>a</sub>	P <sub>b</sub> -P <sub>a</sub>	D <sub>0</sub> <sup>0</sup> [ev]
15	(σ2s) <sup>2</sup> (σ*2s) <sup>2</sup> (π2p) <sup>4</sup> (σ2p) <sup>2</sup> (π*2p)	4	1.5	2.5	6.5
	(σ2s) <sup>2</sup> (σ*2s) <sup>2</sup> (π2p) <sup>4</sup> (σ2p) <sup>2</sup> (σ*2p)	4	1.5	2.5	14.0
	(σ2s) <sup>2</sup> (σ*2s) <sup>2</sup> (π2p) <sup>3</sup> (σ2p) <sup>2</sup> (π*2p) <sup>2</sup>	3.5	2	1.5	3.3

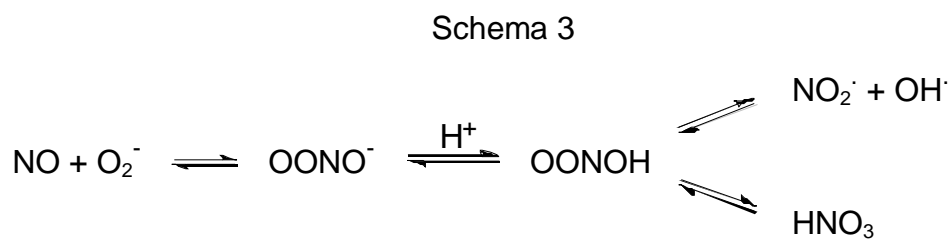
**Tabelle 1:** Elektronenkonfiguration von NO; Z = Anzahl der Elektronen, P<sub>b</sub> = Anzahl der bindenden Elektronenpaare, P<sub>a</sub> = Anzahl der antibindenden Elektronenpaare, D<sub>0</sub><sup>0</sup> = Dissoziationsenergie

Aufgrund dieses starken Einflusses des zusätzlichen Elektrons kann NO sehr leicht ein Elektron abgeben. Während bei Oxidationsreaktionen das relativ stabile Nitrosylkation NO<sup>+</sup> entsteht, das oft als reaktive Zwischenstufe bei Nitrosierungsreaktionen auftritt, führen Reduktionsreaktionen zum Nitrosylanion NO<sup>-</sup>. Diese beiden reaktiven Moleküle können im lebenden Säugetierorganismus mit einer Vielzahl anderer Substanzen, wie z. B. mit eisenhaltigen Proteinen, in Wechselwirkung treten. In Schema 2 ist eine Übersicht der wichtigsten Reaktionen von NO in sauerstoffhaltigen, wässrigen Lösungen zu den Oxidationsprodukten NO<sub>2</sub><sup>-</sup> und NO<sub>3</sub><sup>-</sup> veranschaulicht.<sup>[6,7]</sup>

Schema 2

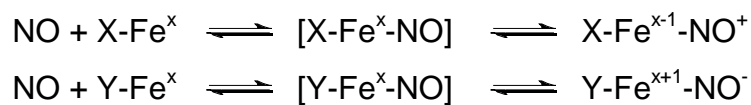


Die Halbwertszeit von NO in luftgesättigten (normoxischen) Pufferlösungen ist abhängig von der NO - Konzentration und liegt für 0.1 - 1  $\mu\text{M}$  bei 50 - 500 Sekunden. Wenn allerdings Superoxid ( $\text{O}_2^-$ ) anwesend ist, reagiert NO schnell ( $k \approx 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) zu Peroxynitrit ( $\text{OONO}^-$ ). Dieses kann dann zu Nitrat isomerisieren oder nach Protonierung zu  $\text{NO}_2^\cdot$  und  $\text{OH}^\cdot$  zerfallen. Die OH-Radikale sind wahrscheinlich mitverantwortlich für die Toxizität von NO (Schema 3).<sup>[8,9]</sup>



Bei der Reaktion von Übergangsmetallen mit NO entstehen Additions- oder Komplexverbindungen (Nitrosylkomplexe), die einen leichten Übergang des NOs in andere Oxidationsstufen ermöglichen.

Schema 4



In biologischen Systemen ist die Komplexbildung von NO mit metallhaltigen Proteinen in Hämoglobin oder den Enzymen der Atmungskette von wichtiger Bedeutung.<sup>[10,11]</sup> Durch die Bindung der Metallokomplexe wird das allosterische Verhalten der Enzyme, die biologische Verfügbarkeit von NO und dessen Oxidationszustand durch Nitrosylierung verändert.

Bei der Nitrosierung biologisch relevanter nukleophiler Zentren wie Stickstoff, Schwefel, Kohlenstoff oder Sauerstoff bilden sich Alkyl- und Aryl-Nitrite

(RO-NO), Nitrosamine (RNH-NO) und S-Nitrosothiole (RS-NO). Diese Verbindungen können als stabile biologische Transportformen des Stickstoffmonoxides angesehen werden. Diese erfüllen auch selbst physiologische Funktionen, wie die Regulation der Gefäßlumen und die Aktivierung von Enzymsystemen. Nitrosamine sind in hohem Maße cancerogen, da sich die Metabolite an die Erbsubstanz anlagern und die Replikation stören. Stickstoffmonoxid und die Erforschung von dessen Wirkungsweise in biologischen Systemen ist somit ein wichtiger Forschungszweig, da NO ein zentraler Bestandteil von wichtigen Signalkaskaden ist.

## 1.1 Die Bedeutung von NO im Organismus

Bis in die späten 80er Jahre spielte Stickstoffmonoxid (NO) in der biomedizinischen Forschung lediglich eine marginale Rolle als toxischer Luftschadstoff, der hauptsächlich bei Verbrennungsvorgängen entsteht.<sup>[12]</sup> In höheren Konzentrationen führt Stickstoffmonoxid zu zentralnervösen Vergiftungserscheinungen wie Schwindel oder Benommenheit sowie zur Bildung von Methämoglobin.<sup>[13]</sup>

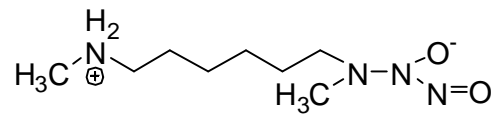
Der Pharmakologe Ferid Murad wurde Ende der 70er Jahre auf das Stickstoffmonoxid (NO) aufmerksam. Bei Untersuchungen mit organischen Nitraten - einer Substanzgruppe, die seit 100 Jahren bei Angina Pectoris eingesetzt wird<sup>[14]</sup> - entdeckte er, dass diese NO enzymkatalysiert bilden, welches eine Erweiterung (Dilatation) der Blutgefäße bewirkt.<sup>[15]</sup>

Auch der Pharmakologe Robert F. Furchgott untersuchte die Auswirkungen von Medikamenten auf Blutgefäße. Seine Ergebnisse bezogen sich auf die innerste Gefäßschicht, das Endothel. Hier wird eine unbekannt Substanz (Faktor) produziert, die in der darunterliegenden Muskelschicht eine Relaxierung induziert. Da Furchgott die Substanz zunächst nicht bestimmen konnte, nannte er sie EDRF (*Endothelium-derived relaxing Factor*, ein von dem Endothel stammender, Gefäßmuskulatur-erschlaffender Faktor).<sup>[16]</sup> Erst im Laufe der späten 80er Jahre gelang es dann schließlich, die Struktur von EDRF zu bestimmen: Unabhängig voneinander identifizierten Louis J. Ignarro und R. Furchgott EDRF als Stickstoffmonoxid.<sup>[17,18]</sup>

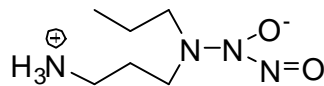
Seitdem ist eine Beteiligung von NO an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen in zahlreichen Arbeiten ermittelt worden. Die Zeitschrift „Science“ zeichnete das Molekül 1992 als „Molecule of the year“<sup>[19]</sup> aus und ein Jahr später wurde es als „Biochemistry's Unexpected New Superstar“<sup>[20]</sup> benannt. Stickstoffmonoxid ist ein lipophiles Gas und kann aufgrund seiner kleinen Molekülgröße ungehindert in die Gefäß-Muskelschicht diffundieren, wo es eine aktivierende Wirkung auf das Enzym Guanylatcyclase ausübt. Dieses bildet den Botenstoff cGMP, eine Substanz, die über weitere Schritte eine Erschlaffung der Gefäßmuskulatur bewirkt.<sup>[21-24]</sup>

Es gibt eine Reihe von Verbindungen, die NO entweder spontan oder durch chemische oder enzymatische Reaktionen freisetzen. Zu den spontan NO generierenden Verbindungen gehören die NONOate (Diazeniumdiolate)<sup>[25]</sup>, wie PAPA/NO oder MAHMA/NO (Schema 5). Die NO-Freisetzung verläuft bei diesen Verbindungen spontan. Die Produktion kann durch die Temperatur, den pH-Wert und durch Veränderung des freiwerdenden Nukleophils kontrolliert werden. Es wurden Halbwertszeiten von 77 Minuten für PAPA/NO und 1 Minute für MAHMA/NO bestimmt.<sup>[26]</sup> Diese unterschiedlichen Halbwertszeiten nehmen Einfluss auf die physiologischen Wirkungen. Versuche mit beispielsweise MAHMA/NO führen zu einer kurzen, starken Dilatation, während PAPA/NO länger wirksam ist. Bei einigen Herzmedikamenten, wie z. B. dem Nitroglycerin, wird NO enzymatisch freigesetzt. Diese sogenannten „Nitrovasodilatoren“ (Schema 5) werden z.B. bei Erkrankungen wie Atherosklerose zur Verhinderung einer Angina pectoris eingesetzt, um die ohnehin schon verengten Gefäße zur Erweiterung anzuregen.<sup>[27]</sup>

Schema 5

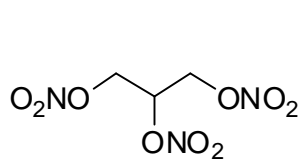


MAHMA/NO

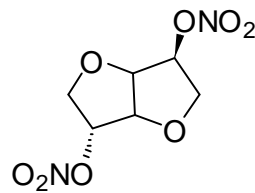


PAPA/NO

Diazeniumdiolate (spontane NO Freisetzung)



Glycerintrinitrat  
"Nitroglycerin"



Isosorbiddinitrat

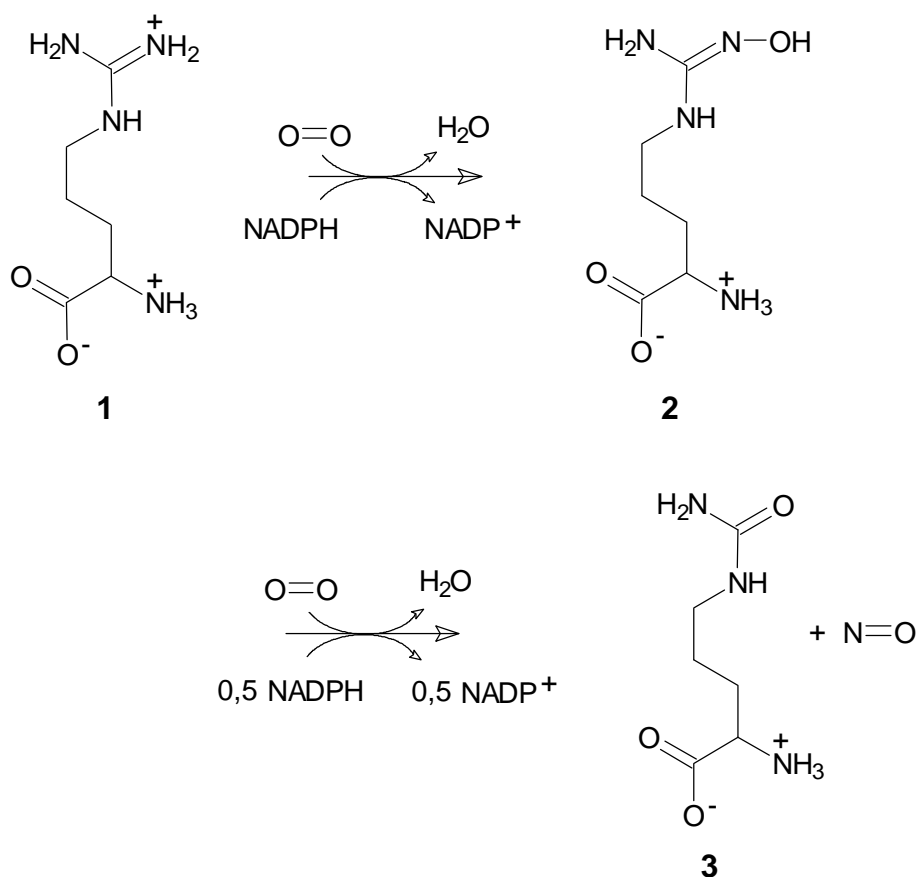
Enzymatische NO Freisetzung

NO ist ein Schlüssel - Messenger - Molekül im Stoffwechsel. Neben der Regulation des Blutdrucks fungiert das diffusible NO im Gehirn und peripheren autonomen Nervensystem als Neurotransmitter, dessen Wirkungsradius nicht durch Membranen, sondern durch die Halbwertszeit beschränkt ist. Im Gegensatz zu anderen Neurotransmittern wird NO nicht in Vesikeln gespeichert, sondern unmittelbar an seinem Wirkort aus der Aminosäure *L*-Arginin mit dem Enzym NO-Synthase (NOS) unter Mitwirkung von NADPH und Sauerstoff gebildet. Isotopenmarkierungsexperimente mit <sup>15</sup>N-markiertem *L*-Arginin charakterisierten die Guanidinogruppe des *L*-Arginins als Stickstoffmonoxidquelle.<sup>[28]</sup>



Bei der Bildungsreaktion (Schema 6) entsteht *L*-Citrullin **3**, das durch Verwendung von  $^{13}\text{C}$ -markiertem *L*-Arginin (**1**) als sicheres Produkt der Umsetzung identifiziert wurde. Als Zwischenprodukt der NO-Synthese wird in einer Zwei-Elektronen-Oxidation *N*<sup>w</sup>-Hydroxy-*L*-Arginin (**2**) gebildet, dessen Auftreten ebenfalls mittels Isotopenmarkierung bewiesen wurde.<sup>[29]</sup>

Schema 6



Die NO-Freisetzung verläuft in Abhängigkeit des Zelltyps unterschiedlich. Es werden drei Isoformen des Enzyms NOS unterschieden: Dabei handelt es sich um die induzierbare Isoform (iNOS), die endothelial konstitutive Isoform (eNOS) und die neuronal konstitutive Isoform (nNOS). Tabelle 2<sup>[30]</sup> zeigt einen Überblick über diese drei Isoformen der NO-Synthase.

<i>NOS-Isoform</i>	<i>Regulierung</i>	<i>Lokalisierung</i>
iNOS	Cytokine Endotoxine	Makrophagen Kupfferzellen Hepatozyten Endothelzellen Glattmuskelzellen
eNOS	Calcium/Calmodulin	Endothelzellen
nNOS	Calcium/Calmodulin	Neuronale Zellen Skelettmuskelzellen Lungenepithelzellen Blutplättchen

**Tabelle 2:** Unterscheidung der drei Isoformen der NO-Synthasen<sup>[30]</sup>

Stickstoffmonoxid besitzt selbst keine gefäßerweiternde Wirkung, sondern setzt eine Reaktion in Gang, die indirekt über mehrere Schritte zu einer Vergrößerung der Blutgefäße führt. Die erschlaffende und gefäßerweiternde Wirkung betrifft beispielsweise nicht nur die Muskulatur der Blutgefäße, sondern auch die Muskulatur des Bronchialbaums.

Durch die inhalative Gabe von NO beim Krankheitsbild des akuten Lungenversagens, des ARDS (*acute respiratory distress syndrome*) bei Erwachsenen bzw. des IRDS (*infant respiratory distress syndrome*) bei Neugeborenen sind vielversprechende Therapieansätze durch inhalative Gabe von NO entwickelt worden.<sup>[31]</sup>

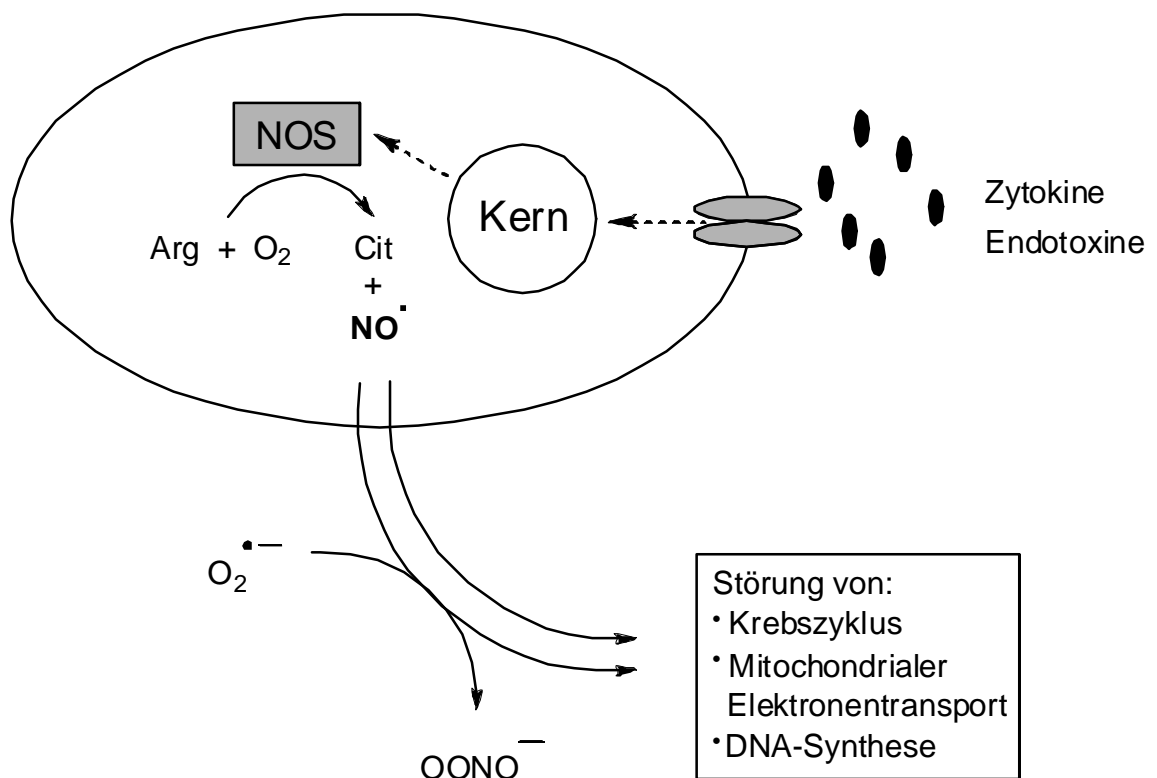
NO soll auch an der Funktion des Gedächtnisses beteiligt sein. Die Effektivität der Transmitter-Aktivität kann durch zusätzliche Mediatoren, so genannte Neuromodulatoren, geregelt werden. Die dadurch verursachte

Veränderlichkeit der synaptischen Signal-Übertragung wird als synaptische Plastizität bezeichnet.<sup>[2]</sup>

Stickstoffmonoxid nimmt als Neurotransmitter auch Einfluss auf die Magen - Darm - Funktionen. So rufen in der Darmwand gelegene Nervenenden durch die NO-Ausschüttung eine Relaxierung der Ringmuskulatur hervor.

Von Makrophagen wird NO neben Superoxid-Radikalanion ( $O_2^{\bullet-}$ ) bei der Abtötung von Bakterien, Endoparasiten und Tumorzellen produziert (Abbildung 1).<sup>[32]</sup> Endotoxine (z. B. LPS) und Zytokine, die von anderen Zellen des Immunsystems, z. B. den weißen Blutzellen freigesetzt werden, induzieren die Neusynthese von NOS in Makrophagen. Das so gebildete Enzym setzt nun *L*-Arginin zu *L*-Citullin und Stickstoffmonoxid um. Das NO-Radikal kann entweder direkt wirken oder mit Superoxid-Radikalanionen zu Peroxinitrit reagieren. Bakterien, Tumorzellen und Endoparasiten werden geschädigt, indem der Krebs-Zyklus, der mitochondriale Elektronentransport und die DNA-Synthese gestört wird.

## Makrophage



**Abbildung 1:** Synthese und Wirkung von Stickstoffmonoxid in Makrophagen

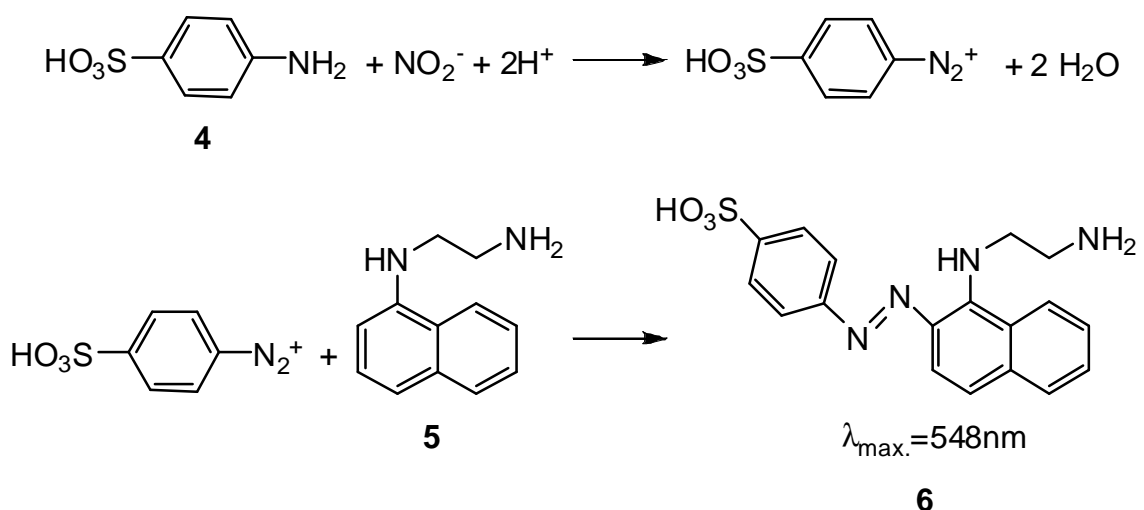
$NO$  wirkt in höheren Konzentrationen neuro- und cytotoxisch, wahrscheinlich durch Wirkung auf die Atmungskette der Mitochondrien. Bei einem septischen Schock kommt es zu einer übermäßigen Stimulation der Makrophagen. Der dadurch bedingte hohe  $NO$ -Ausstoß führt zu einem extremen Abfall des Blutdrucks.<sup>[33]</sup> Neben vielen weiteren physiologischen und pathophysiologischen Prozessen spielt  $NO$  auch bei der Blutplättchenaggregation<sup>[34]</sup> und der Wundheilung eine wichtige Rolle. Stickstoffmonoxid, das von den Endothelzellen in das Gefäßlumen abgegeben wird, kann die Zusammenlagerung von Blutplättchen verhindern.<sup>[35-37]</sup> Die Pathologie und Physiologie des  $NO$  in einzelnen Zellorganellen sowie weitere Anwendungsmöglichkeiten sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung und einer Vielzahl klinischer Studien.

## 1.2 Nachweismethoden für Stickstoffmonoxid

Um quantitative Aussagen über den NO-Gehalt und die NO-Bildung in chemischen und biologischen Systemen treffen zu können, sind eine Reihe von Nachweismethoden entwickelt worden. Dabei werden Folgeprodukte von Stickstoffmonoxid, im wesentlichen Nitrit, nachgewiesen. Der entscheidende Nachteil ist in der Tatsache begründet, dass auch andere Verbindungen im sauren Milieu als Nitrit-Donatoren fungieren können.<sup>[38]</sup>

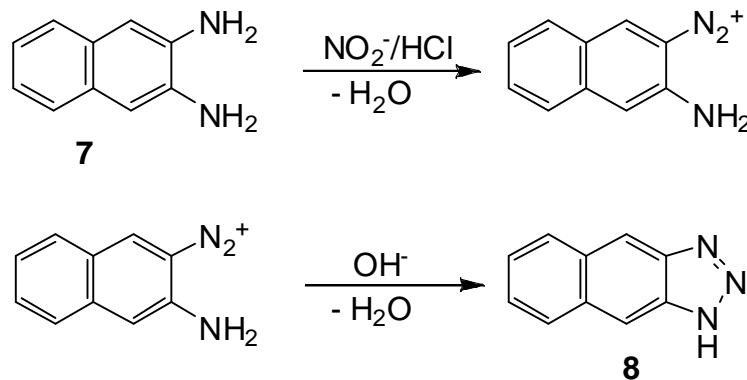
Mit der Griess-Reaktion<sup>[39]</sup> lässt sich disruptiv die Gesamtmenge an gebildetem NO über die aus ihm gebildeten Folgeprodukte Nitrit und Nitrat bestimmen. Zunächst wird das Nitrat zu Nitrit reduziert, dann im schwach sauren pH-Bereich Sulfanilsäure (**4**) diazotiert und das Diazoniumsalz mit einem Naphthalinderrivat z.B. N-(Naphthyl)-ethylendiamin (**5**) gekuppelt (Schema 7). Photometrisch wird anschließend der Gehalt an Farbstoff bestimmt und in die Konzentration an Stickstoffmonoxid umgerechnet. Die bei 548 nm detektierte Absorption ist proportional zur Stickstoffmonoxid-Konzentration.

Schema 7



Bei der DAN-Methode<sup>[40,41]</sup> (Schema 8) handelt es sich um einen verwandten fluoreszenzspektroskopischen Nachweis von Nitrit. Es wird 2,3-Diaminonaphthalin (DAN) (**7**) mit Nitrit in saurer Lösung zu einem Diazonium-Ion umgesetzt. Dieses reagiert dann intramolekular mit einer zweiten Amino-Gruppe zu 1-(H)-Naphtho-2,3-triazol (**8**). Das dabei entstandene Triazol kann mittels Fluoreszenzspektroskopie bestimmt werden. Diese Methode ist, wie die Griess-Reaktion, nur für Messungen im Zellüberstand oder nach Lyse der Zellen geeignet.

Schema 8

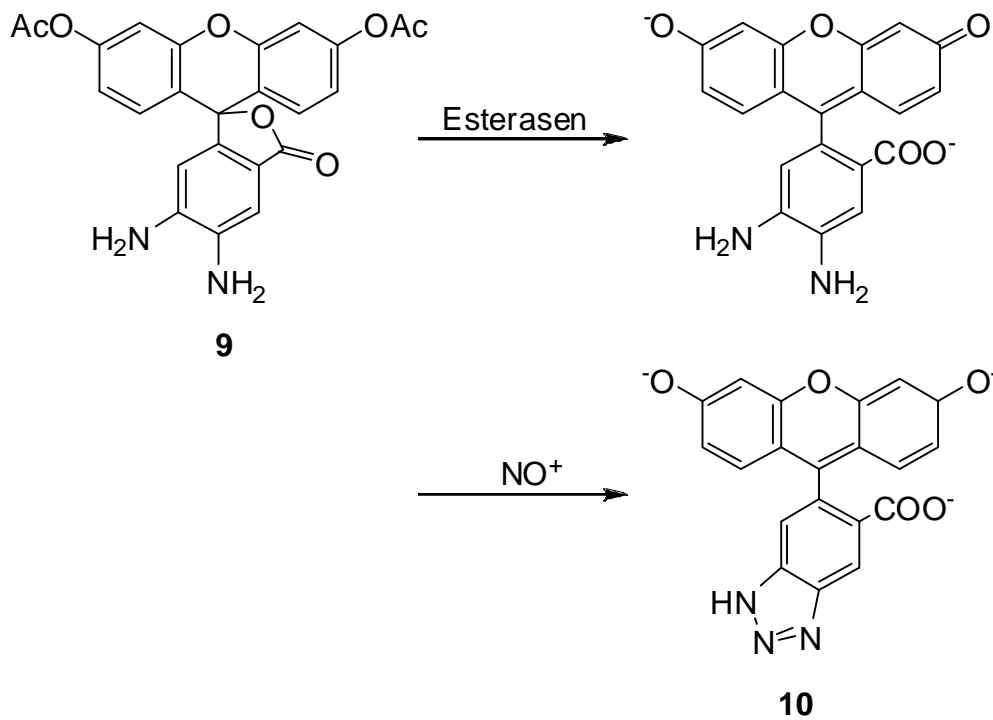


Um Stickstoffmonoxid mit einer dem DAN-Nachweis verwandten Methode in intakten Zellen zu detektieren, wurde zur Modifikation ein Fluorescein-Derivat verwendet (Schema 9), das den fluoreszenzspektroskopischen Nachweis unter physiologischen Bedingungen in der intakten Zelle ermöglicht.

Das eingesetzte Diacetat des 4,5-Diaminofluoresceins (**9**) ist membrangängig und wird in den Zellen durch Esterasen in ein Dianion überführt und angereichert. Gebildetes Stickstoffmonoxid wird durch anwesenden Sauerstoff zu  $\text{NO}^+$  oxidiert, das mit dem Diamin zu Triazol-4,5-fluorescein (**10**) reagiert, welches fluoreszenzspektroskopisch bei  $\lambda_{\text{exc.}} = 495 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em.}} = 515 \text{ nm}$  detektiert werden kann.<sup>[42]</sup>

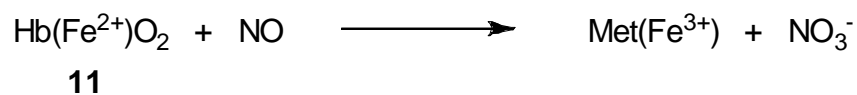
Nachteil all dieser Bestimmungen ist, dass die Detektion über Folgeprodukte des Stickstoffmonoxids stattfindet und kein direkter Nachweis möglich ist.

Schema 9



Eine weitere photometrische Methode ist die Reaktion von Oxyhämoglobin **11** zu Methämoglobin.<sup>[43,44]</sup>

Schema 10

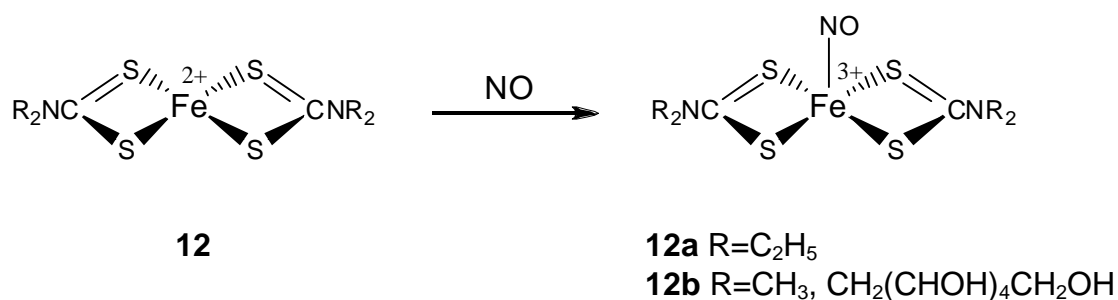


Durch den Verbrauch von Oxyhämoglobin **11** verringert sich dessen Absorption bei 433 nm, während sich eine Absorption bei 401 nm durch entstehendes Methämoglobin erhöht. Der Nachweis von Stickstoffmonoxid mit Oxyhämoglobin

kann auch ESR-spektroskopisch durch den gebildeten paramagnetischen Komplex erfolgen. Dazu muss jedoch die Reaktion zum Methämoglobin durch Kühlen auf 77 K verhindert werden. Oxyhämoglobin **11** ist zwar käuflich erwerbbar, jedoch ist der Nachweis mit vielfältigen Fehlerquellen behaftet. Die Reaktion ist stark pH-abhängig und andere Hämverbindungen können mit NO reagieren. Ausserdem liegt eine Empfindlichkeit gegen Redox-Reagenzien vor.

Eine weitere Methode bei der NO durch Bildung von Metallnitroso-Komplexen ESR-spektroskopisch nachgewiesen wird, ist die Umsetzung mit  $\text{Fe}^{2+}$ /Dicarbamat-Komplexen **12** zu paramagnetischen Nitrosokomplexen **12a** (Schema 11). Der Einsatz in biologischen Systemen ist jedoch durch die schlechte Löslichkeit und geringe Nachweisempfindlichkeit der Komplexe begrenzt.<sup>[45]</sup> Mit Hilfe anderer Liganden wie *N*-Methyl-*D*-glucamin-dithiocarbamat **12b** wurde zwar das Löslichkeitsproblem behoben, dafür zeigten diese Komplexe eine starke Sauerstoffempfindlichkeit.

Schema 11

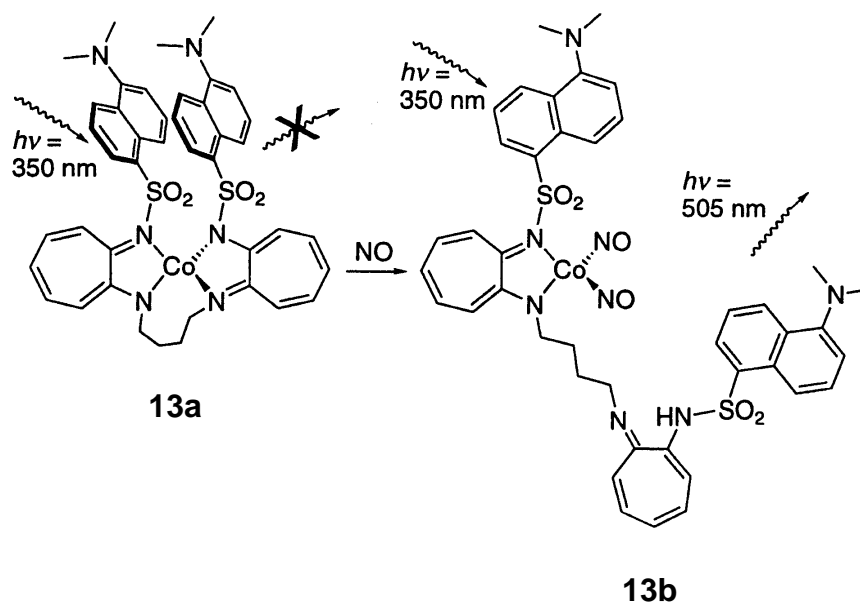


Die Basis einer neueren Nachweismethode ist ein Kobaltkomplex. Dieser Komplex  $[\text{Co}(\text{DATI-4})]$  **13a** besteht aus einem zentralen Kobalt(II)-ion (Schema 12), das durch den organischen Liganden  $\text{H}_2\text{DATI-4}$  (**14**) chelatartig umgeben wird. Eine Hälfte des vierzähligen Liganden (Schema 13) kann durch Stickstoffmonoxid verdrängt werden (**13b**). Nach der Anbindung von zwei NO-Molekülen verändert sich die Fluoreszenzeigenschaft des Liganden, die bestimmt werden kann.

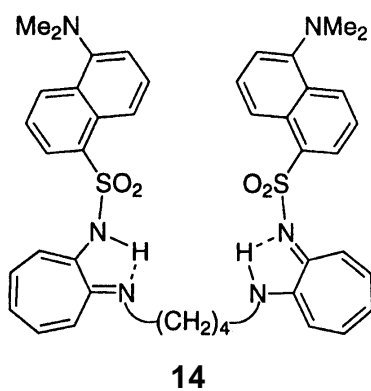


Allerdings steigt die Fluoreszenz nur auf das Vierfache der Grundfluoreszenz innerhalb von 6 Stunden an.<sup>[46]</sup>

Schema 12



Schema 13

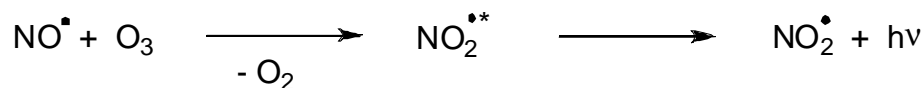


Die leichte Oxidierbarkeit von Stickstoffmonoxid kann für elektrochemische Messverfahren genutzt werden. Hierzu wird das Stickstoffmonoxid bei einem Potential von  $E_0 = 0.98 \text{ V}$  an einer speziell modifizierten Elektrode zu  $\text{NO}^+$  oxidiert.

Der entstehende elektrische Strom ist proportional zur umgesetzten Stickstoffmonoxid-Menge.<sup>[47]</sup>

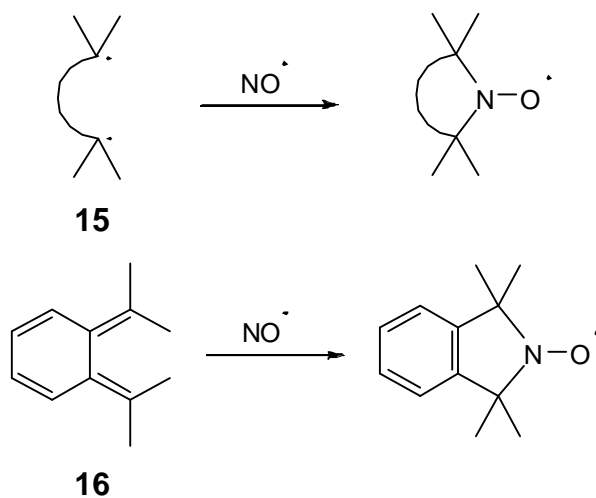
Ein ebenfalls eingesetztes Verfahren ist der Nachweis durch Chemilumineszenz. Stickstoffmonoxid wird mit Hilfe eines Inertgasstromes aus einer Lösung ausgetrieben und in einer Gasphasenreaktion durch Ozon oxidiert (Schema 14). Die frei werdende Lichtmenge ist proportional zur NO-Konzentration und kann mit Hilfe eines Photomultipliers gemessen werden. Das gesamte NO durch den Inertgasstrom in die Gasphase zu überführen ist allerdings problematisch.<sup>[38,48]</sup>

Schema 14



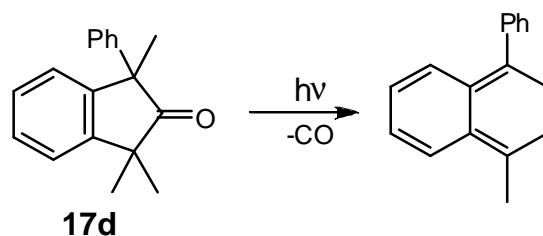
Die meisten der bislang beschriebenen Verfahren zum Nachweis von NO sind indirekter Natur, da sie Folgeprodukte nachweisen, oder keine räumliche und zeitliche Auflösung der NO-Bildung erlauben. Um diesen Nachteil zu beheben, wurde in unserem Laboratorium in den letzten Jahren eine Methode entwickelt, mit deren Hilfe NO direkt erfassbar ist. Hierbei wird das Radikal mit einem sogenannten Diradikaläquivalent **15** abgefangen (Schema 15). Die eingesetzten o-Chinodimethan-Derivate reagieren in einer formalen cheletropen Reaktion zu cyclischen Nitroxid-Radikalen, welche ESR-spektroskopisch nachgewiesen werden können. Aufgrund der formal cheletropen Abfangreaktion werden diese Nitroxide als „Nitric Oxide Cheletropic Traps“ (NOCTs) bezeichnet. In Schema 15 wird die Reaktion eines Diradikales mit NO bzw. die Reaktion von Tetramethyl-o-chinodimethan mit NO zu TMIO<sup>[49,50]</sup> aufgeführt.

Schema 15



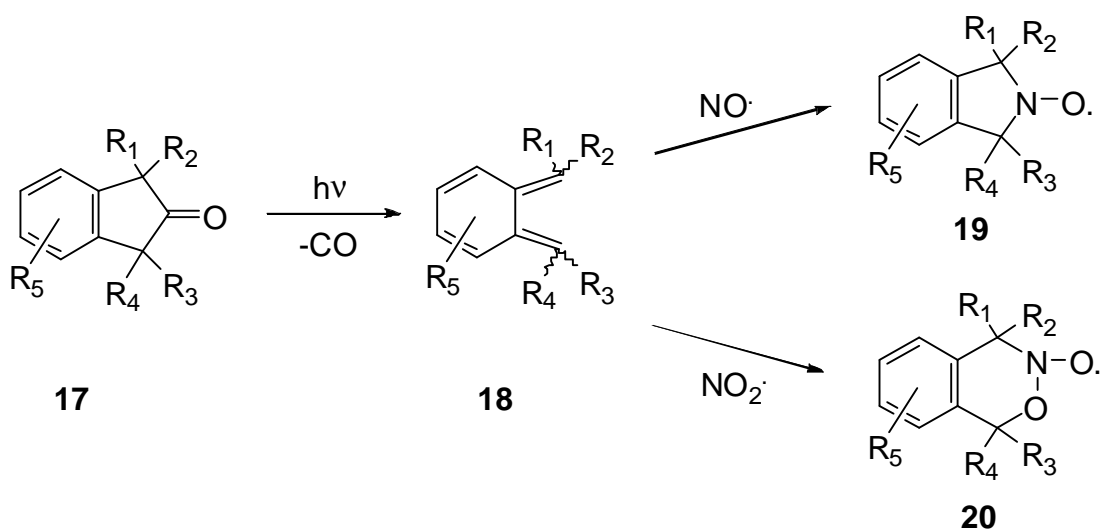
Als Weg zur Herstellung von substituierten *o*-Chinodimethanen **16** erweist sich die Photodecarbonylierung der entsprechenden Indanon-Derivate **17a** als günstig. Deren Herstellung erfolgte nach einer Vorschrift von Blomquist, ausgehend von 1,3-Diphenylaceton, welches monobromiert und anschließend mittels Friedel-Crafts-Acylierung gebildet wurde.<sup>[51]</sup> Die dadurch entstandenen offenkettigen *o*-Chinodimethane zeigen den beschriebenen NO-Abfang (Schema 16).<sup>[52]</sup>

Schema 16



Die so hergestellten Verbindungen **18** reagieren mit Stickstoffmonoxid zu stabilen Nitroxid-Radikalen **19**, die mit Hilfe der ESR-Spektroskopie detektiert werden können.<sup>[52]</sup> Schon während der Photolyse der Ketone **17** lagern die gebildeten *o*-Chinodimethane, sofern  $\alpha$ -Wasserstoffatome vorhanden sind, durch 1,5-H-Verschiebung zu Styrol-Derivaten um. Weitere Produkte sind durch elektrocyclischen Ringschluß gebildete Benzocyclobuten-Derivate, wie auch durch [4+2]- und [4+4]-Cycloadditionen entstehende dimere Verbindungen. Diese Folgeprodukte sind nicht zum Abfang von Stickstoffmonoxid geeignet. Die geringen Ausbeuten und die geringe Stabilität waren entscheidende Nachteile, die eine Optimierung der NOCT-Methode verlangten. Dennoch reichte die geringe Konzentration an gebildeten *o*-Chinodimethanen **18a** und **18b** aus, um das von stimulierten Makrophagen produzierte Stickstoffmonoxid unter Bildung der stabilen Nitroxidradikale **19a** und **19b** ESR-spektroskopisch detektieren zu können. Das bei *in vitro*-Experimenten durch die Anwesenheit von Sauerstoff entstandene Stickstoffdioxid wurde zu den Alkylalkoxynitroxid-Radikalen **20a** und **20b** umgesetzt, was in Schema 17 zu erkennen ist. Diese unterschiedlichen radikalischen Produkte unterscheiden sich in den ESR-Spektren deutlich von den NO-Addukten. Damit kann man prinzipiell beide Stickoxide parallel nachweisen.<sup>[49]</sup> Die Geschwindigkeitskonstanten der Stickstoffmonoxid-Abfangreaktionen mit monocyclischen, substituierten *o*-Chinodimethanen variieren abhängig von Struktur und Lösungsmittel zwischen  $10 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  für **18k** in Acetonitril bis  $3500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  für **18f** in Benzol. Die unterschiedlichen Substituenten haben nicht nur einen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit, sondern auch auf die Stabilität und weitere Eigenschaften, wie Wasser- und Lipidlöslichkeit der *o*-Chinodimethane **18**.

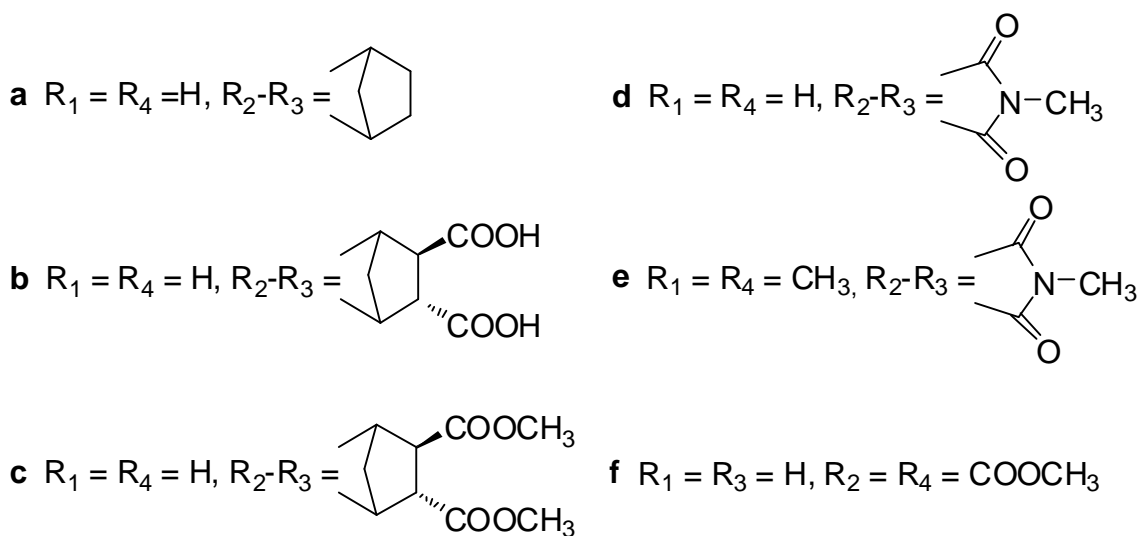
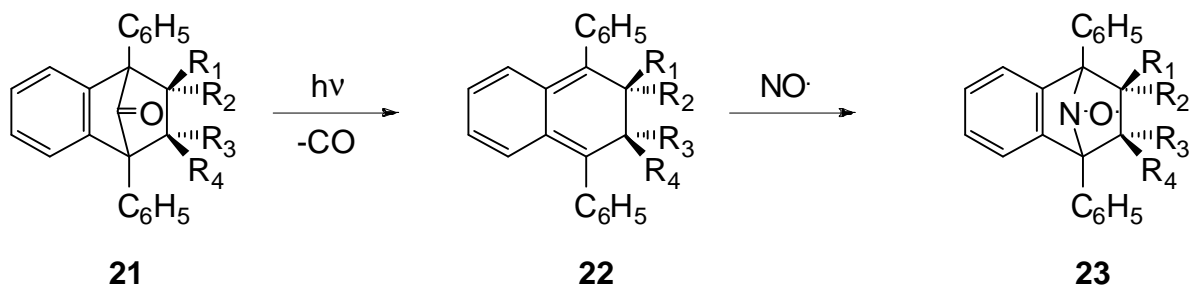
Schema 17



- a**  $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{R}_4 = \text{CH}_3, \text{R}_5 = \text{H}$   
**b**  $\text{R}_1 = \text{Indenyl}, \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{R}_4 = \text{CH}_3, \text{R}_5 = \text{H}$   
**c**  $\text{R}_1 = 3\text{-Methylindenyl}, \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{R}_4 = \text{CH}_3, \text{R}_5 = \text{H}$   
**d**  $\text{R}_1 = \text{C}_6\text{H}_5, \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{R}_4 = \text{CH}_3, \text{R}_5 = \text{H}$   
**e**  $\text{R}_1 = \text{R}_4 = \text{C}_6\text{H}_5, \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{CH}_3, \text{R}_5 = \text{H}$   
**f**  $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_4 = \text{C}_6\text{H}_5, \text{R}_3 = \text{CH}_3, \text{R}_5 = \text{H}$   
**g**  $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_4 = \text{C}_6\text{H}_5, \text{R}_3 = \text{H}, \text{R}_5 = \text{H}$   
**h**  $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_4 = \text{C}_6\text{H}_5, \text{R}_3 = \text{CN}, \text{R}_5 = \text{H}$   
**i**  $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_4 = \text{C}_6\text{H}_5, \text{R}_3 = \text{OH}, \text{R}_5 = \text{H}$   
**j**  $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_4 = \text{C}_6\text{H}_5, \text{R}_3 = \text{OCH}_3, \text{R}_5 = \text{H}$   
**k**  $\text{R}_1 = \text{R}_4 = \text{C}_6\text{H}_5, \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{OCH}_3, \text{R}_5 = \text{H}$   
**l**  $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_4 = \text{C}_6\text{H}_5, \text{R}_3 = \text{OCH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5, \text{R}_5 = \text{H}$   
**m**  $\text{R}_1 = \text{R}_4 = \text{C}_6\text{H}_5, \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{OCH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5, \text{R}_5 = \text{H}$   
**n**  $\text{R}_1 = \text{R}_4 = \text{C}_6\text{H}_5, \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{OCH}_2\text{CO}_2\text{H}, \text{R}_5 = \text{H}$   
**o**  $\text{R}_1 = \text{R}_4 = \text{CH}_3, \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{OCH}_3, \text{R}_5 = \text{H}$   
**p**  $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{R}_4 = \text{CH}_3, \text{R}_5 = \text{CO}_2^-\text{Na}^+$   
**q**  $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{R}_4 = \text{CH}_3, \text{R}_5 = \text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3^+\text{Cl}^-$   
**r**  $\text{R}_1 = \text{R}_4 = \text{C}_6\text{H}_5, \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{OCH}_2\text{CO}_2^-\text{Na}^+, \text{R}_5 = \text{H}$   
**s**  $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{R}_4 = \text{CH}_3, \text{R}_5 = \text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_3$

Aufgrund der beschriebenen Nachteile bezüglich der geringen Lebensdauer der ursprünglich verwendeten *o*-Chinodimethan-Derivate wurden umfangreiche Studien durchgeführt, um wasserlösliche und stabilere *o*-Chinodimethan-Derivate zu gewinnen. Um thermisch stabilere *o*-Chinodimethane zu erhalten, wurden die bicyclischen Derivate **22** durch Photodecarbonylierung aus den entsprechenden verbrückten Ketonen **21** in guten Ausbeuten hergestellt (Schema 18). Durch Fixierung des *o*-Chinodimethans in einem Sechsringsystem wird eine electrocyclische Benzocyclobuten-Bildung verringert und zusätzlich auch eine 1,5-H-Verschiebung zu Styrol-Derivaten gehemmt. Die bicyclischen *o*-Chinodimethan-Derivate **22** weisen eine höhere thermische Stabilität und zudem sehr unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeiten mit Stickstoffmonoxid im Vergleich zu monocyclischen *o*-Chinodimethanen **18** auf. Da das Reaktionszentrum des *o*-Chinodimethans **22e** durch zwei Methylgruppen abgeschirmt ist, wird eine relativ kleine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante in organischen Lösungsmitteln von  $24 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  beobachtet. Dagegen reagieren die Derivate **22a** bis **22d** um zwei Zehnerpotenzen schneller mit Stickstoffmonoxid als die monocyclischen *o*-Chinodimethane **18** ( $k = 6 - 12 \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ,  $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Die Stickstoffmonoxid-Addukte **23** können mittels ESR-Spektroskopie detektiert werden. Allerdings zeigte sich, dass der Abfang von NO zwar das entsprechende Nitroxidradikal ergab, jedoch erwies sich dieses als relativ kurzlebig. Hierdurch und aufgrund der Tatsache, dass Nitroxidradikale im biologischen System leicht zu Hydroxylaminderivaten reduziert werden, erwiesen sich diese Verbindungen für eine biologische Anwendung als ungeeignet.<sup>[53]</sup>

Schema 18



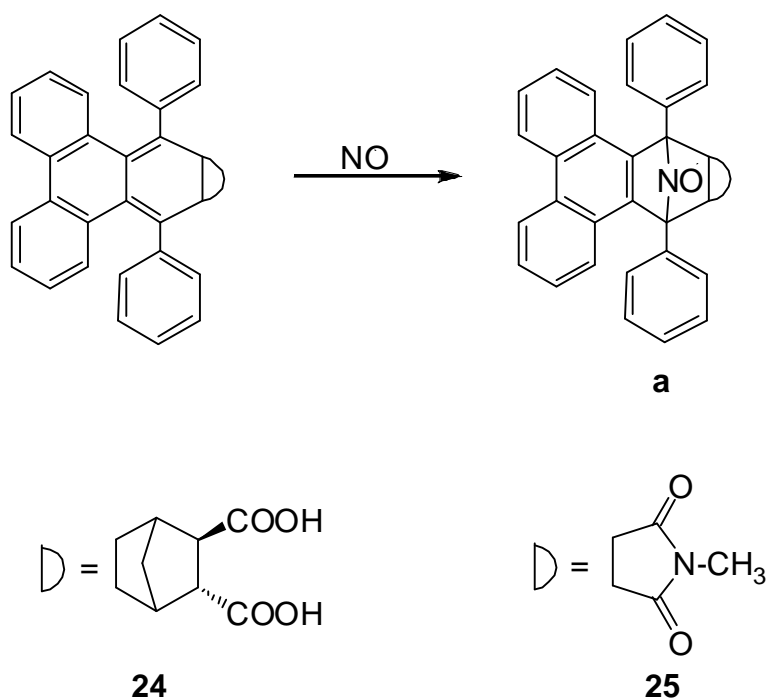
Dennoch wurden die entscheidenden Vorteile dieser Verbindungen für die Synthese neuer Fängersysteme übernommen. Das starre Ringgerüst stabilisiert das *o*-chinoide Gerüst und die beiden Carboxylgruppen verleihen der Verbindung eine ausreichende Wasserlöslichkeit.

Dieses führte zu einem neuen Prinzip des Stickstoffmonoxid-Nachweises auf fluoreszenzspektroskopischer Basis. Kondensierte Aromaten sind bekannte Fluorophore. Mit ihnen gelingt es, *o*-Chinodimethanderivate zu konzipieren, die nach NO-Fixierung und Reduktion des Nitroxidradikals kondensierte Aromaten bilden.

Die stabilen Verbindungen in Schema 19 wurden erstmals in guten Ausbeuten synthetisiert.<sup>[54]</sup> Die bicyclischen Nitroxid-Radikale **24a** und **25a** sind für ESR-spektroskopische Untersuchungen nicht ausreichend stabil, da sie zu

diamagnetischen Folgeprodukten abreagieren. Die paramagnetischen Nitroxide **20** sind wegen ihrer radikalischen Eigenschaften nicht sehr stark fluoreszierend. Der Grund hierfür ist, dass Nitroxid-Radikale „Fluoreszenzlöscher“ sind, d.h. sie unterdrücken ihre eigene Fluoreszenz.<sup>[55]</sup> Wird die paramagnetische Nitroxidgruppe in eine diamagnetische Einheit überführt, so kann die Fluoreszenz ohne Änderung der Anregungs- und Emissionswellenlänge um das 2.9 bis 60 fache ansteigen.<sup>[56]</sup> Das diamagnetische Folgeprodukt von **24a** kann fluoreszenzspektroskopisch bei einer Anregungswellenlänge von 315 nm und einer Emissionswellenlänge von 380 nm effektiv detektiert werden. Die für den ESR-spektroskopischen Nachweis von Stickstoffmonoxid als nachteilig erkannte leichte Reduzierbarkeit erweist sich für die Anwendung der Fluoreszenzspektroskopie als Detektionsmethode von Vorteil, insbesondere für zelluläre Systeme. Die Reduktion der Nitroxide **24a** und **25a** kann durch zelleigene Reduktionsmittel wie Glutathion oder Ascorbinsäure leicht erfolgen.

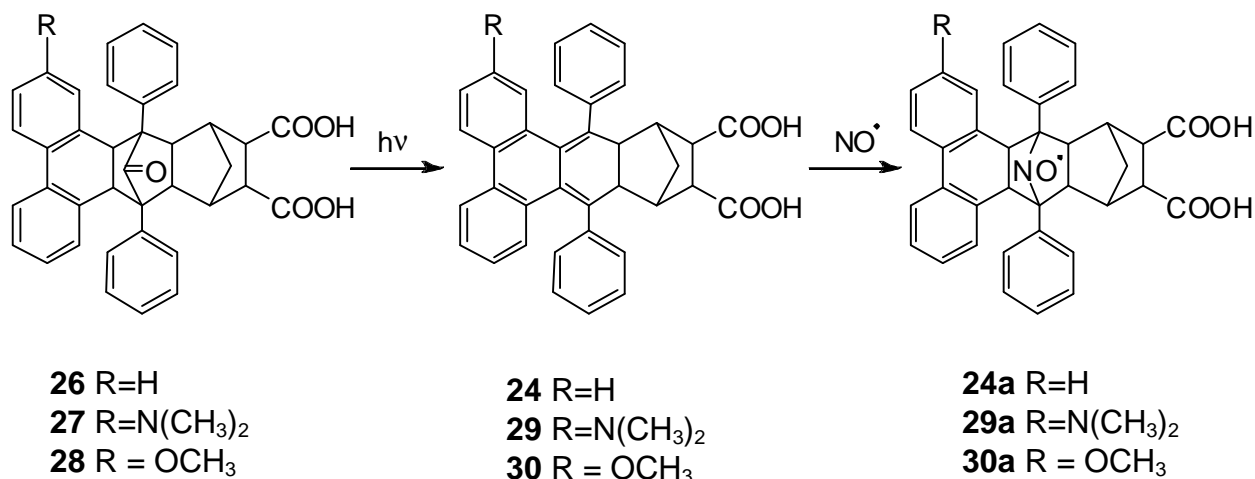
Schema 19





Auf diesen Fluorophoren wurde ein NO-Nachweis entwickelt. Verbindung **24** erfüllt die Voraussetzungen (Schema 20). Durch Reaktion mit NO wird ein Phenanthrengerüst erzeugt, dessen Fluoreszenz nachweisbar ist.

Schema 20



Das *o*-chinoide Gerüst (für **29** und **30**) fluoresziert ebenfalls, allerdings bei einer anderen Wellenlänge als der Phenanthrenfluoreszenz. Das unsubstituierte System **24** erwies sich als erfolgreich, hatte aber eine Fluoreszenzanregungswellenlänge, die für biologische Anwendungen zu kurzweilig war. Deswegen wurde das dimethylamino-substituierte Derivat **29** synthetisiert<sup>[57]</sup>, dessen NO-Abfangprodukt nach Reduktion bei  $\lambda_{\text{exc.}} = 380 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em.}} = 460 \text{ nm}$  fluoresziert. Das System lieferte nach NO-Abfang und Reduktion des Radikals ein intensives und leicht zu beobachtendes Fluoreszenzsignal. Die pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz, durch die Protonierung der Dimethylamino-Gruppe, erwies sich aber als nachteilig. Die daraufhin synthetisierte Methoxy-substituierte Verbindung<sup>[58]</sup> **30** zeigte das Verhalten der pH-Abhängigkeit nicht. Ein weiterer Vorteil dieses Fängersystems ist, dass bei Messungen kein Lösungsvermittler verwendet werden muss, da eine ausreichende Wasserlöslichkeit besteht.

Aufgrund der Detektionsmöglichkeit wurde diese Art von Stickstoffmonoxid-Fängern als „*Fluorescent Nitric Oxide Cheletropic Traps*“ (FNOCTs) bezeichnet.<sup>[52]</sup>

Vorteile dieser Methode zum direkten Nachweis von Stickstoffmonoxid sind die hohe Empfindlichkeit im nanomolaren Bereich und die Spezifität. Störungen wie etwa durch Sauerstoff, Superoxid-Radikalanionen, Wasserstoffperoxid, Hydroxyl-Radikale, Lösungsmittelpolarität, pH-Wert oder ionische Stickstoff-Sauerstoffverbindungen treten nicht auf. Wenn die vorliegenden Carbonsäuregruppen in die entsprechenden Acetoxymethylestergruppen überführt werden, kann Stickstoffmonoxid durch direkte Reaktion mit zeitlicher und räumlicher Auflösung auf die Einzelzellebene ohne Schädigung der Zellen erfasst werden. Diese Ester können ungehindert durch die Zellmembran diffundieren und durch intrazelluläre Esterasen gespalten werden.<sup>[59]</sup> Die Rückdiffusion des gebildeten Dicarboxylats durch die Zellmembran ist durch die negative Ladung stark gehindert. Somit kommt es zur Akkumulation des Farbstoffes in der Zelle.

Das Grundgerüst des *o*-Chinodimethans ist synthetisch vielfältig variierbar, um das System mit besserer Wasserlöslichkeit oder erhöhter Membrangängigkeit für biologische Anwendungen auszustatten. Zusätzlich können durch synthetische Variationsmöglichkeiten die Fluoreszenzeigenschaften günstig beeinflusst werden. Die Vergrößerung des aromatischen fluorophoren Systems könnte eine Fluoreszenzverschiebung in den bathochromen Bereich bewirken. Die Sensitivität der FNOCT-Methode könnte auch auf diesem Wege erhöht werden.

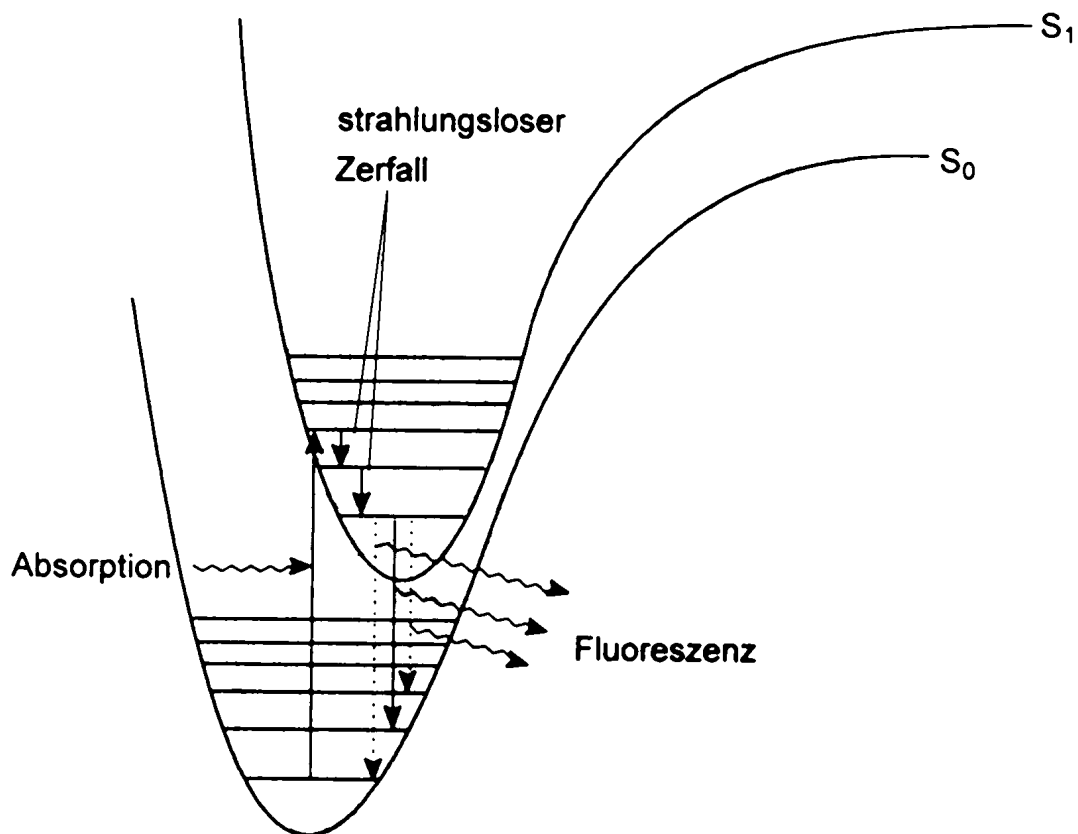
### 1.3 Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie

Ein elektronisch angeregter Zustand kann seine Energie auf verschiedenen Wegen wieder abgeben. Normalerweise geht diese in die Freiheitsgrade der Schwingung, Rotation und Translation der Moleküle der Umgebung über. Bei diesem "thermischen Abbau" wird die Anregungsenergie in Wärmeenergie umgewandelt. Der Abbau kann jedoch auch durch Abgabe eines Photons als Strahlung erfolgen. Dafür gibt es im wesentlichen zwei Mechanismen: Die Fluoreszenz und die Phosphoreszenz. Der Unterschied zwischen diesen beiden Prozessen besteht darin, dass bei der Fluoreszenz das absorbierte Licht sofort aus dem angeregten Singulettzustand reemittiert wird, während bei der Phosphoreszenz die Energie aus dem Triplettzustand langsam abgegeben wird.

Bei der Absorption wird das Molekül, gemäß dem Franck-Condon-Prinzip, in einem "vertikalen" elektronischen Übergang in einen angeregten Zustand angehoben. Im diesem Zustand gibt das Molekül durch Stöße mit Nachbarmolekülen Energie ab, so dass es in den Schwingungsgrundzustand des angeregten Zustandes übergeht. Das Molekül kann bei bestimmten Zuständen die Energiedifferenz spontan als Strahlung (Fluoreszenz) emittieren. Es erfolgt ein vertikaler elektronischer Übergang nach unten (im Sinne des Franck-Condon-Prinzips). Damit erhält das Fluoreszenzspektrum eine Schwingungsstruktur, die für den elektronischen Grundzustand charakteristisch ist (Abbildung 2).

Dieser Mechanismus erklärt zudem auch die Beobachtung, dass die Fluoreszenz bei einer Frequenz auftritt, die kleiner als die des eingestrahlen Lichtes ist, denn sie erfolgt aus den Schwingungsniveaus, nachdem ein Teil der Energie an die Umgebung abgegeben worden ist. Dieses Phänomen wird als Stokes-Shift bezeichnet.<sup>[60]</sup> Die Anregungs- und Emissionsspektren des Fluorophors dürfen nicht überlappen, da ansonsten die Empfindlichkeit des Nachweises zurückgeht. Pyren oder Phenanthren haben beispielsweise weit auseinanderliegende Anregungs- und Emissionswellenlängen, also einen starken Stokes-Shift.

Mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie können Substanz-Konzentrationen im nanomolaren Bereich erfasst werden. Die Empfindlichkeit dieser Methode ist dementsprechend etwa tausendfach größer als die der meisten anderen spektroskopischen Verfahren. Ein weiterer Vorteil ist die geringe thermische Belastung der Probe.<sup>[61]</sup>



**Abbildung 2:** Darstellung des Fluoreszenzvorgangs

## 2 Problemstellung

Das FNOCT-Molekül **30** wurde von Hornig<sup>[58]</sup> mit einer Methoxygruppe in der Zweierposition synthetisiert und mittels eines Acetoxymethylesters zu einem membrangängigen System erweitert. Besonders wichtig war, dass das FNOCT-Molekül nach Reaktion mit NO und Reduktion des Radikals ein intensives und leicht beobachtbares Fluoreszenzsignal liefert. Verglichen mit der von Meineke<sup>[62]</sup> synthetisierten dimethylamino-Verbindung **29** konnte die Wasserlöslichkeit geringfügig verbessert werden, was die notwendige Verwendung von Lösungsvermittlern überflüssig machte. Die unzureichende Wasserlöslichkeit ist auf die Phenylgruppen am Sechsring zurückzuführen, welche die Lipophilie des Systems erhöhen. Die Aufgabe bestand nun darin, diese Phenylreste gegen kleinere oder wasserlöslichere Substituenten auszutauschen. Nach eingehender Literaturrecherche können Methyl- und Methylestergruppen eingesetzt werden. Außerdem könnte die Norbornendicarbonsäure, welche bei der Synthese der Fängersysteme als Dienophil fungiert, mit zusätzlichen wasserlöslichen Gruppen versehen werden.

Durch Einführung geeigneter Substituenten in das Phenanthrengerüst konnte eine bathochrome Verschiebung der Fluoreszenz erreicht werden. Damit wurde eine Untersuchung der Zellen ohne Schädigung durch kurzwelliges Licht ermöglicht. Zusätzlich wurde eine Erhöhung der Quantenausbeute und damit der Empfindlichkeit des Nachweises erreicht. Eine Zweifachsubstitution des Phenanthrensystems mit zwei Dimethylaminogruppen in Position zwei und sieben hat allerdings nicht zum gewünschten Erfolg geführt.<sup>[63]</sup> Durch die Erweiterung des Fängersystems durch Pyren sollte eine zusätzliche bathochrome Verschiebung und eine Erhöhung der Quantenausbeute erreicht werden.

Zusätzlich ist es wünschenswert, die Phenylgruppen der Fänger durch Methyl oder Carboxylgruppen zu substituieren, um eine höhere Wasserlöslichkeit zu erreichen. Untersuchungen hinsichtlich des NO-Abfanges und der Wasserlöslichkeit sollten bei erfolgreicher Synthese in Betracht gezogen werden.

**Anforderungsprofil an das FNOCT Molekül**

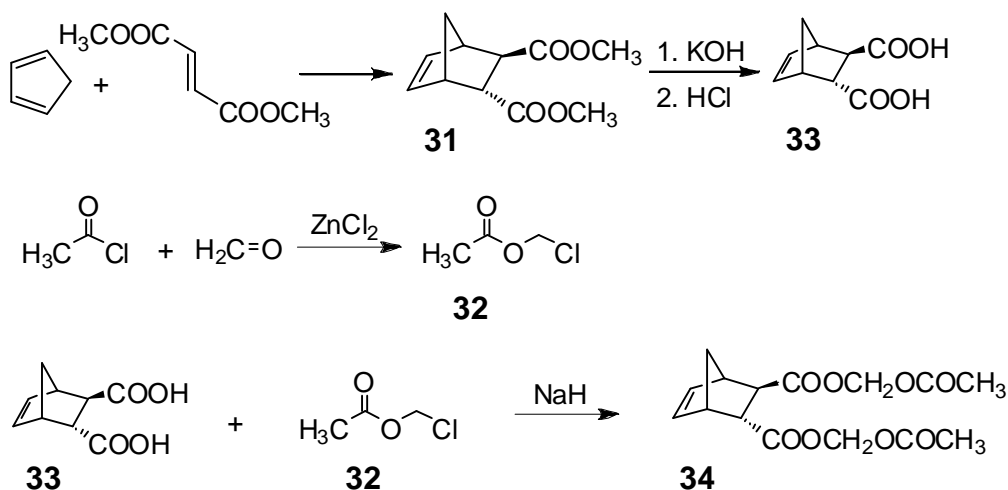
- ausreichende Löslichkeit der Fluoreszenzsonde im wässrigen System
- geeignete langwellige Fluoreszenz mit ausreichend hoher Quantenausbeute
- hohe Empfindlichkeit der Fluoreszenzspektroskopie als Detektionsmethode
- lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Fluorophorkonzentration
- leichte Reduzierbarkeit des Nitroxids mit verschiedenen physiologischen Reduktionsmitteln zu fluoreszenzfähigen Hydroxylaminen
- ausreichend hohe Reaktionsgeschwindigkeit des o-Chinodimethans mit NO
- Spezifität des fluoreszenzspektroskopischen NO-Nachweises gegenüber physiologisch relevanten Verbindungen z.B.  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Einflussgrößen z.B. pH-Wert
- leichte Hydrolysierbarkeit des Acetoxymethylesters durch Esterasen

## 3 Synthese und Untersuchung der Stickstoffmonoxid-Fänger

### 3.1 Synthese der Vorstufen

Die Synthese des Norbornendiacetoxydimethylesters (**34**) erfolgte auf konvergentem Wege durch Reaktion von Norbornendicarbonsäure (**33**) mit Chlormethylacetat. Ausgehend von Cyclopentadien und Fumarsäuredimethylester wurde in einer [4+2]-Cycloaddition der Norbornendicarbonsäuredimethylester **31** erhalten. Durch Verseifung mit KOH entstand als Produkt Norbornendicarbonsäure. Chlormethylacetat konnte durch die Umsetzung von Acetylchlorid mit Formaldehyd in Gegenwart von Zink(II)-chlorid als Lewis-Säure-Katalysator erhalten werden.<sup>[64]</sup> Chlormethylacetat **32** wurde unter Zusatz von Natriumhydrid mit Norbornendicarbonsäure **29**<sup>[65,66]</sup> in Dimethylformamid zum Norbornen-diacetoxydimethylester **34**<sup>[63]</sup> umgesetzt. Die Ausbeute betrug zur Herstellung der Dicarbonsäure **33** 76 % und die Gesamtausbeute am Diacetoxydimethylester **34** 47 %.

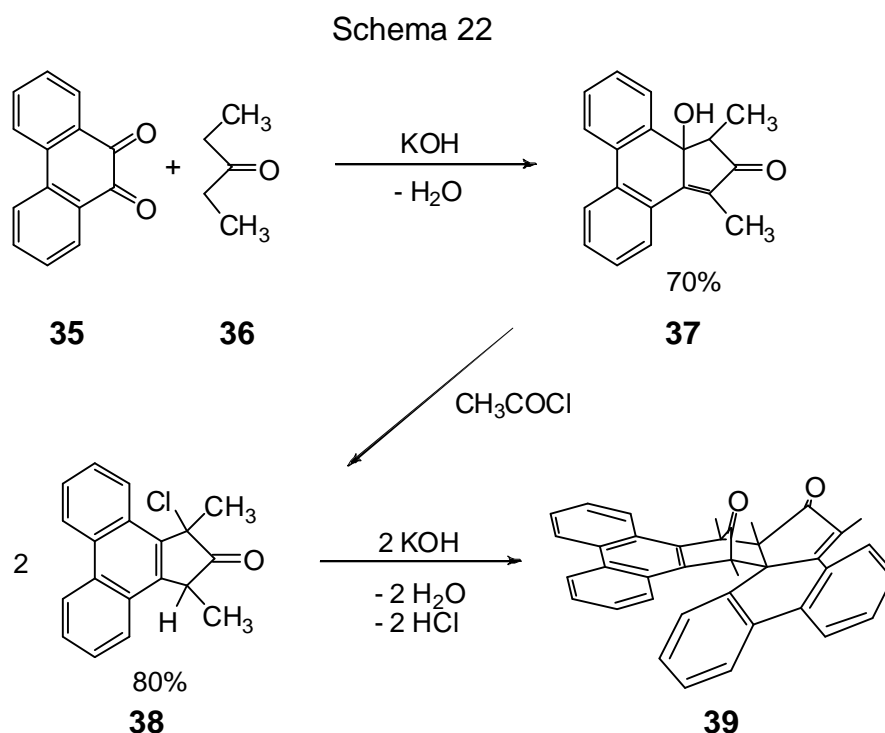
Schema 21



## 3.2 Darstellung der Phenanthren-Fängersysteme

In Anlehnung an die Herstellung des FNOCT **24**<sup>[53,67]</sup>, wurden Versuche unternommen, die Phenylgruppen durch Methyl- oder Carboxylgruppen zu substituieren (Schema 22 und 26). Zusätzlich wurde versucht, die Wasserlöslichkeit durch Einführen von hydrophilen Gruppen zu erhöhen (Schema 34).

### 3.2.1 Synthese des Cyclons **39**

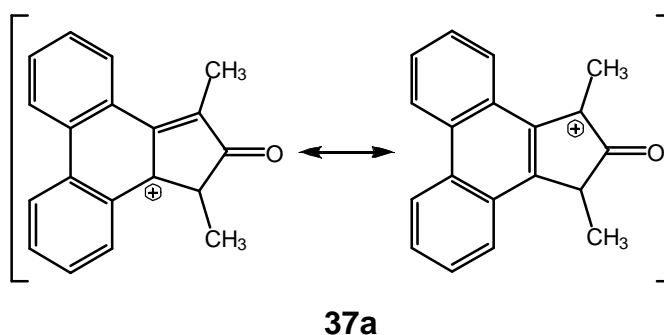


Im ersten Schritt wurde das Diketon **35** unter Basenkatalyse mit Pentan-3-on **36** umgesetzt. Hier wurde das enolisierbare Pentan-3-on **36** mit KOH in  $\alpha$ -Stellung zum resonanzstabilisierten Enolation anionisiert. Dieses greift eines der durch die Carbonylgruppe positiv polarisierten Kohlenstoffatome nukleophil an. Das Intermediat kann nach erneuter Enolisierung intramolekular mit dem zweiten



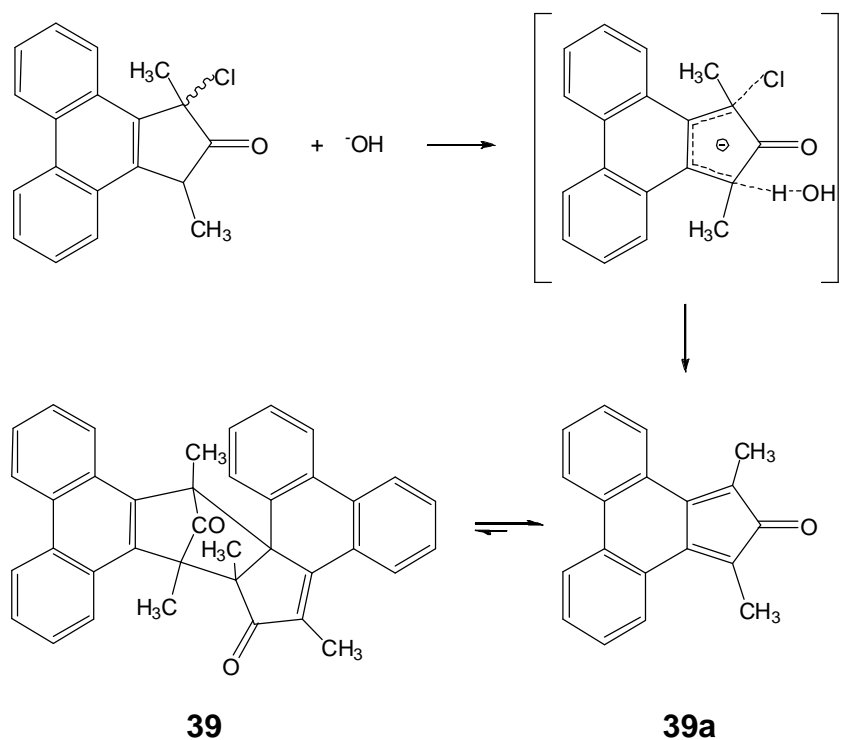
positiv polarisierten Carbonylkohlenstoffatom und anschließender Behandlung mit 2 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  unter Dehydratisierung zum 4-Hydroxy-2,5-dimethylcyclopentaphenanthren-2-enon **37** reagieren. Versuche Verbindung **37** säurekatalytisch zum Cyclopentadienon **39a** (Schema 24) zu dehydrieren blieben ohne Erfolg.<sup>[68]</sup> In einem zweiten Schritt erfolgte die Umsetzung des 4-Hydroxy-2,5-dimethylcyclopentaphenanthren-2-enon **37** zum 1-Chlor-1,3-dimethylcyclopentaphenanthren-2-on **38**. Unter Wirkung der Lewis-Säure Acetylchlorid tritt die Hydroxylgruppe des Hydroxyketons **37** aus. Das gebildete Carbenium-Ion **37a** ist resonanzstabilisiert (Schema 23).

Schema 23



Die Resonanzstruktur **37a** ist durch die erhöhten Ladungsdichte des Phenanthrengerüstes begünstigt. Eine weitere Resonanzformel mit drei aromatischen Ringen kann somit formuliert werden. Dieses Verhalten erklärt den bevorzugten Angriff des Chloridions an dem Kohlenstoffatom, welches mit einer Methylgruppe substituiert ist. Über eine Dehydrochlorierung wird das Chlorketon **38** in einer 1,4-Eliminierung in das Dimer des Phencyclons **39** überführt. An dieser Stelle wird ein konzertierter Reaktionsmechanismus angenommen, welcher durch basenkatalytische Abstraktion des Methinprotons des Cyclopentenonringes und Eliminierung des Chloridions initiiert wird (Schema 24).<sup>[69]</sup>

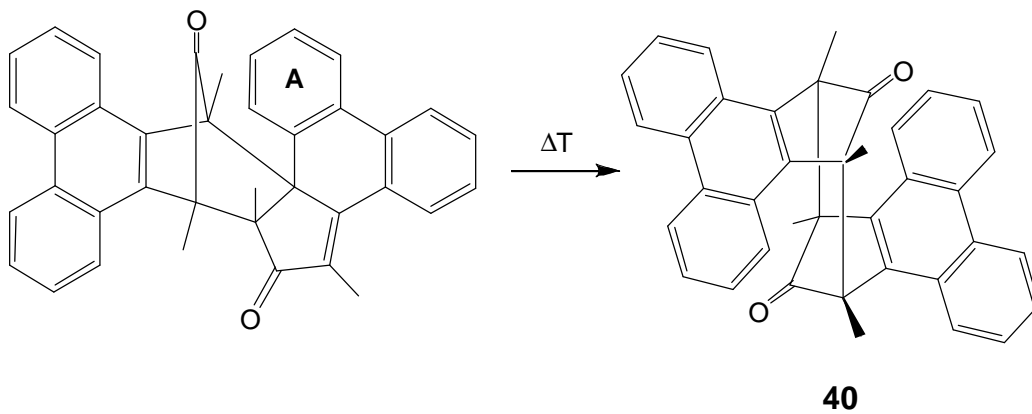
Schema 24



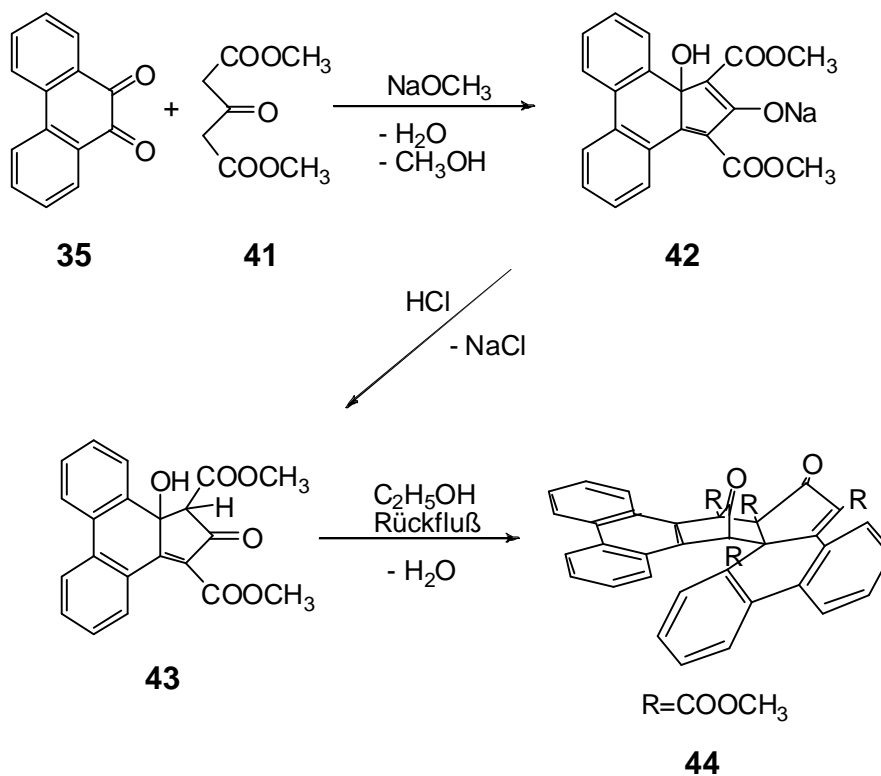
Formal handelt es sich bei der Dimerisierung des Monomers **39a** um eine [4+2]-Diels-Alder-Cycloaddition. Das Dimer **39** steht in Lösung bei Raumtemperatur im Gleichgewicht mit dem entsprechenden Monomer **39a**, wobei das Gleichgewicht weit auf der Seite des Dimers liegt.

Jones<sup>[69]</sup> postuliert bei höheren Temperaturen die Bildung eines unlöslichen, symmetrischen Dimers **40**. Es handelt sich hierbei um eine Cope-Umlagerung von **39** mit einer Aktivierungsenergie von  $11.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Triebkraft der Umlagerung ist die sterische Hinderung zwischen Ring A und der Methylgruppe (Schema 25).

Schema 25

3.2.2 Synthese des Cyclons **44**

Schema 26

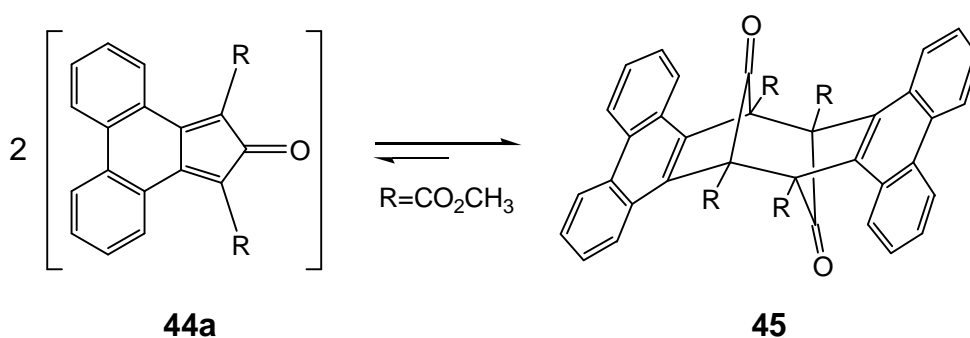


Die Durchführung eines von Weiss<sup>[70]</sup> beschriebenen Versuchs lieferte das reine Hydroxycyclopentenon **42** in 93 % Ausbeute. Abweichend von der Literaturvorschrift wurde eine frisch hergestellte Natriummethanolatlösung

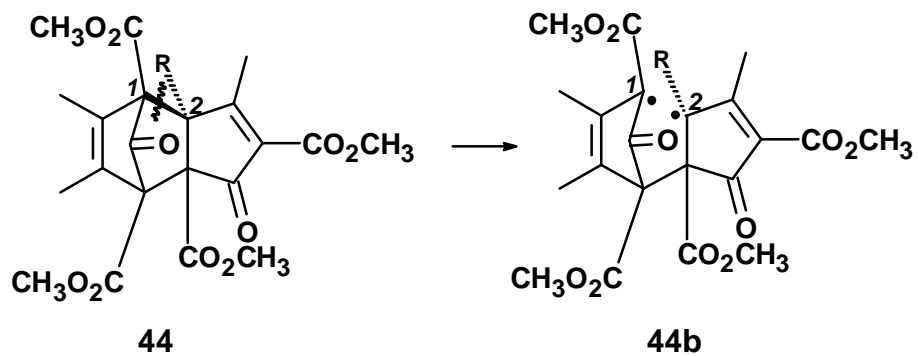
hergestellt und die Reaktion in absolutem Methanol unter Schutzgas-Atmosphäre mit einem 1.2-fachen Überschuß an Base und Glutarat **41** durchgeführt. Zudem wurde die Zwischenstufe **42** in Wasser gelöst und mit HCl gefällt, anstatt den Feststoff **42** direkt mit HCl zu behandeln.<sup>[71]</sup>

Auf der Grundlage eines von White<sup>[72]</sup> beschriebenen Versuchs, bei dem 4-5-Diphenyl-4-hydroxy-1,3-bis(carbonsäuredimethylester)-1-cyclopenten-2-on eingesetzt wurde, konnte das Hydroxycyclopentenon **43** nicht mit Acetanhydrid zum Cyclon dehydratisiert werden. Es entstand ein Produktgemisch, das nicht identifiziert werden konnte. Die Dehydratisierung des Hydroxycyclopentenons **43** gelang durch Erhitzen in siedendem Ethanol. Hierbei zeigte sich, dass eine Reaktionszeit von 15 Minuten vollkommen ausreichend ist, um **43** vollständig zu dehydratisieren. Es bildete sich das Dimer **44** in 93 prozentiger Ausbeute. Bei der Untersuchung des Diels-Alder-Dimers **44** kam es zur Bildung eines unlöslichen Feststoffs **45**, welcher auf Grundlage der von Jones<sup>[69]</sup> durchgeführten Versuche als das formale [4+4]-Cycloaddukt des Cyclopentadienons **44a** identifiziert werden konnte (Schema 27). Eine [4+4]-Cycloaddition ist thermisch verboten und sollte demnach nur eine stark untergeordnete Rolle spielen. Es ist als wahrscheinlich anzusehen, dass es durch eine 1,3- Umlagerung aus dem Diels-Alder-Dimer entsteht. Diese ist ebenfalls thermisch verboten, weshalb ein biradikalischer Mechanismus angenommen wird (Schema 28).

Schema 27

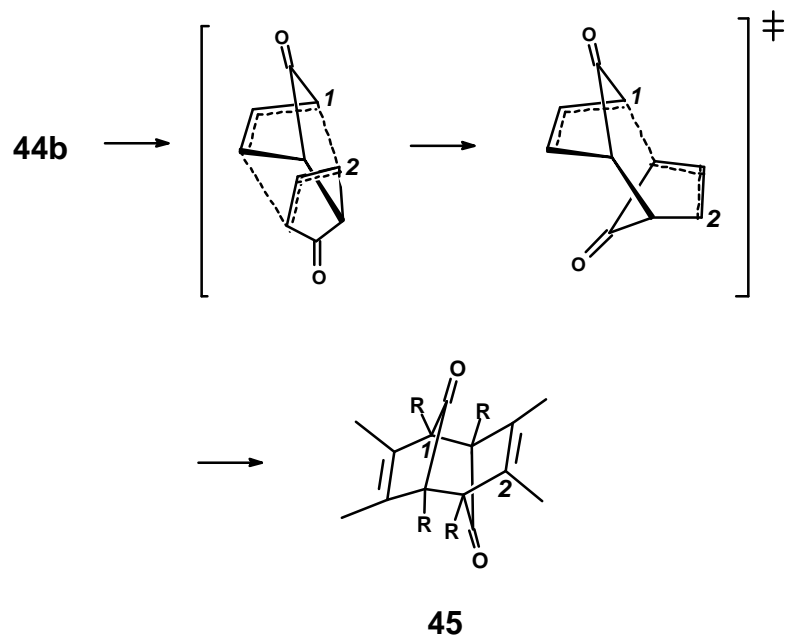


Schema 28



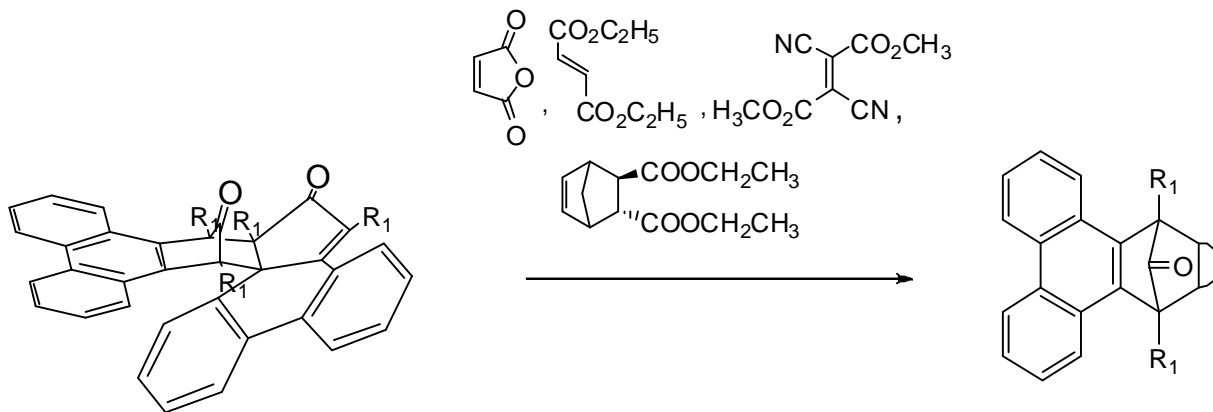
Nach Bildung des Diradikals **44b** erfolgt die Umlagerung, welche wahrscheinlich über die in Schema 29 dargestellten Übergangszustände abläuft. Nur durch die Bildung der diradikalischen Zwischenstufe kann die Bildung von **45** erfolgen, was den angenommenen Mechanismus in Schema 29 bekräftigt.

Schema 29



3.2.3 Synthese der phenanthrensubstituierten Fängersysteme

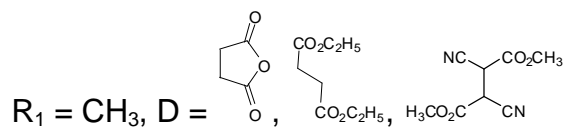
Schema 30



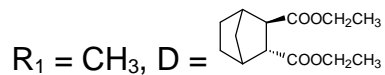
**39:**  $R_1 = \text{CH}_3$

**44:**  $R_1 = \text{COOCH}_3$

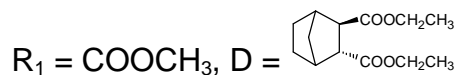
**46 - 48**



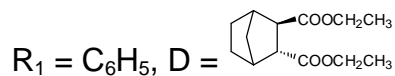
**49**



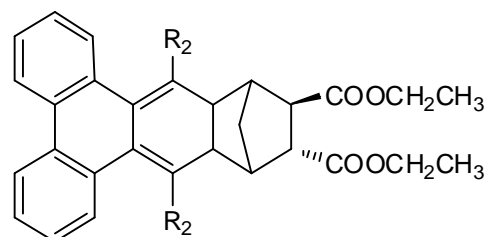
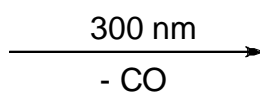
**50**



**51**



**46 - 51**



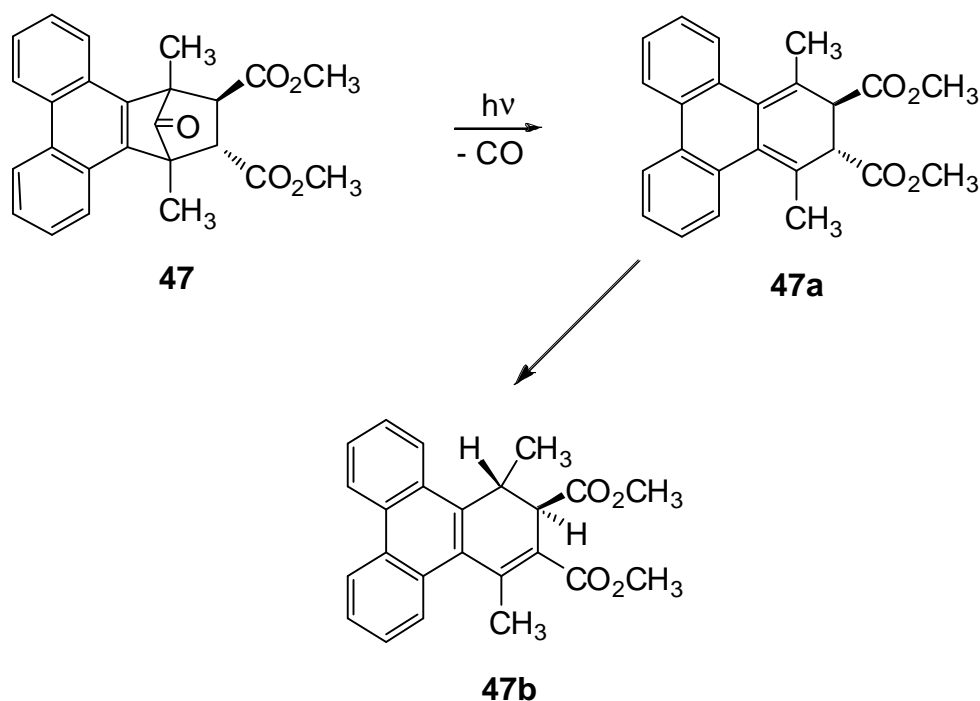
**52:**  $R_2 = \text{CH}_3$

**53:**  $R_2 = \text{COOCH}_3$

**54:**  $R_2 = \text{C}_6\text{H}_5$

Das Dimer **39** diente als Ausgangssubstanz zur Synthese der FNOCT-Ketone **46** bis **48**. Dazu wurde **39** mit unterschiedlichen Dienophilen in Toluol zum Sieden erhitzt. Nach der Aufarbeitung und der Reinigung erhielt man die FNOCT-Vorstufen **46** bis **48** in Ausbeuten von 60 bis 80 %. Auf eine Trennung möglicher Diastereomeren-Gemische kann verzichtet werden, da sie in der nachfolgenden Photodecarbonylierung in gleicher Weise reagieren sollten und die Stereochemie der *o*-Chinodimethanderivate für die Reaktion mit Stickstoffmonoxid unerheblich ist. Die Photolysierbarkeit wurde bei 300 nm in einem Rayonet-Reaktor und -10 °C mit Methanol p. A. als Kühlmittel durchgeführt (vgl. Kapitel 3.3.3). Bei der Verbindung **46** wurde das Anhydrid unter Austritt von CO und CO<sub>2</sub> zersetzt. Die gebildete FNOCT-Vorstufe **46** war demnach nicht photolysierbar. Die Decarbonylierung von **47** verlief auch nicht zufriedenstellend. Innerhalb von 7 Stunden entstand neben dem gewünschten Produkt **47** bis zu einem Anteil von 62% ein Nebenprodukt, bei dem es sich vermutlich um das Produkt **47b** handelt (Schema 31), welches durch eine 1,5-sigmatrope Wasserstoffverschiebung gebildet wurde. Bereits Bätz<sup>[53]</sup> hatte eine ähnliche Problematik untersucht. Sein untersuchtes Molekül wurde mit zwei Phenylgruppen am Fängerzentrum ausgestattet.

Schema 31

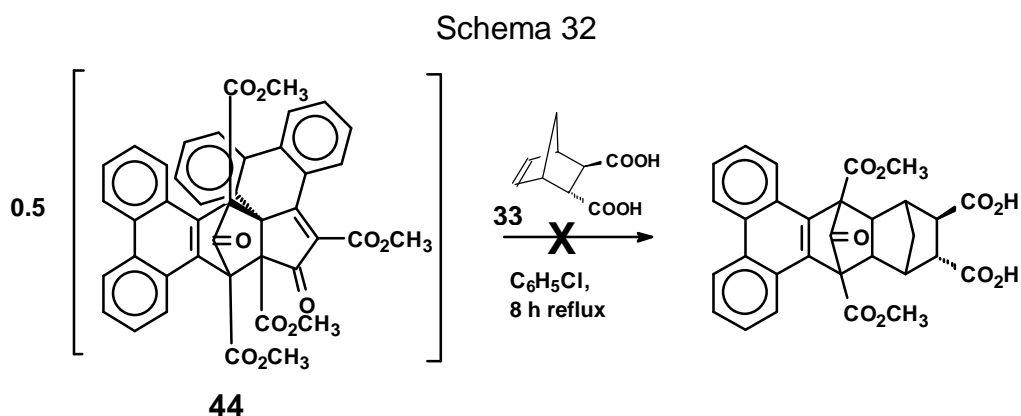


Die Synthese der Fängervorstufe **48** sollte durch das Einführen der CN-Gruppen diese Wasserstoffverschiebung verhindern. Das gewünschte Produkt **48** wurde in unterschiedlichen Konzentrationen in  $d_8$ -THF mit UV-Licht bei 300 nm bestrahlt. Bereits nach einer Stunde fiel ein farbloser Feststoff aus. Der Verlauf der Photolyse konnte mit Hilfe der NMR-Spektroskopie nicht verfolgt werden. Da die Intensität der Bande, die charakteristisch für den Dicyanofumarsäuredimethylester ist, mit der Zeit zunahm, ist an dieser Stelle eine photochemisch induzierte Retro-Diels-Alder-Reaktion denkbar, die zur Bildung des unlöslichen symmetrischen Dimers **40** führt.

Das Produkt **49**, welches aus einem Gemisch aus Dimer **39** und Norbornendicarbonsäurediethylester hergestellt wurde, zeigte hingegen ein gutes Verhalten bei der Photolyse. Die Photolyse wurde bei 300 nm in einem Rayonet-Reaktor und  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  mit Methanol p. A. als Kühlmittel durchgeführt. Nach 18 Stunden konnte mit Hilfe der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie ein Umsatz von 100 % festgestellt werden. Die farblose Eduktlösung **49** verfärbte sich in dieser Zeit in die gelb gefärbte Lösung des 3,6-Dimethyl-4,5-(2,2'-biphenylen)-tricyclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-3,5-dien-9,10-(*E*)-dicarbonsäurediethylesters **52**.

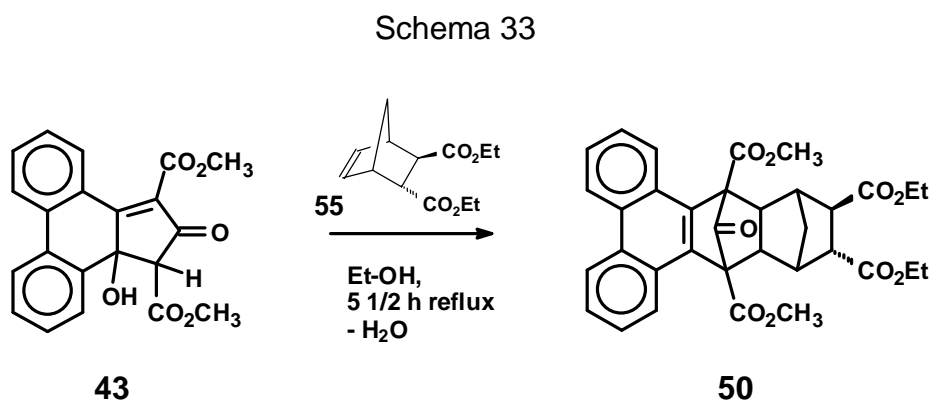


Laut Jones<sup>[69]</sup> kann das Diels-Alder-Dimer **44** mit zahlreichen Dienophilen, wie z.B. *N*-Phenylmaleinimid und Cyclopentadien, zur Reaktion gebracht werden und die entsprechenden Addukte bilden. Es wurde deshalb zunächst versucht, das Dimer **44** mit Norbornen-dicarbonsäure (**33**) in Chlorbenzol (Sdp.: 132 °C) umzusetzen (Schema 32).



Die Umsetzung von **44** mit **33** gelang jedoch nicht; es konnte zu 95 % das Diels-Alder-Dimer **44** zurückgewonnen werden. Dieses lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass **44** in Chlorbenzol sehr schwer oder unlöslich ist und das Monomer nur in geringer Konzentration vorliegt. Wäre **44** in Chlorbenzol löslich, hätte sich aufgrund der hohen Temperatur zumindest das unlösliche Dimer **45** bilden müssen.

Die Synthese gelang, indem man die Umsetzung von **43** mit einem zehnfachen Überschuss an Norbornen-dicarbonsäure-diethylester (**55**) in Ethanol durchführte (Schema 33). Dabei reagierte das in situ erzeugte Monomer **44a** bereitwillig mit dem Ester **55**.

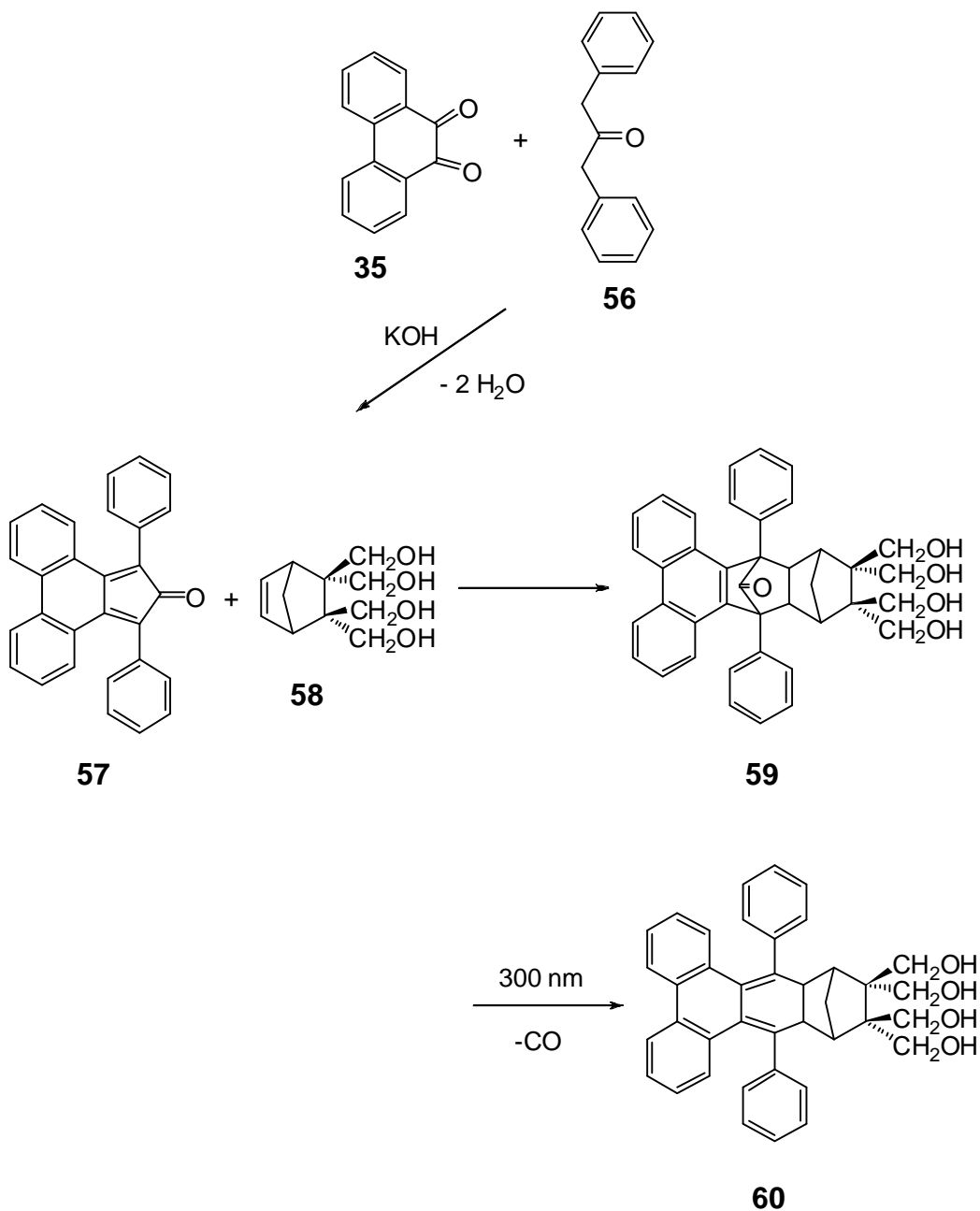


Hierbei wurde eine Lösung von **55** über einen Zeitraum von vier Stunden zugetropft, um die Bildung des Dimers **44** und als Folgereaktion die des unlöslichen Dimers **45** zu unterdrücken, da so das Monomer **44a** relativ zum Dienophil **55** in geringer Konzentration vorliegt. Das Keton **50** konnte in 49 prozentiger Ausbeute erhalten werden; das unlösliche Dimer **45** entstand zu 5 %. Die Photolyse wurde in einem Rayonet-Reaktor bei 300 nm und -10 °C mit Methanol p. A. als Kühlmittel durchgeführt. Nach 15 Stunden konnte durch <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopischer Analyse ein Umsatz von 100 % festgestellt werden.

Die Synthese der Verbindung **51** erfolgte in Anlehnung an die bisher durchgeführten Versuche. Es wurde Chlorbenzol als Lösungsmittel bei 120 °C verwendet. Unter Lichtausschluss und Schutzgasatmosphäre konnte nach sechsständiger Reaktionsdauer ein weißer Feststoff isoliert werden. Die Photolyse wurde 24 Stunden in einem Rayonet-Reaktor bei 300 nm und 0 °C mit Methanol p. A. als Kühlmittel durchgeführt und <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopisch überwacht. Die Verbindung **54** dient als Vergleichssubstanz bei der Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften der Fänger **52** und **53**. In Kapitel 3.4.1 wird das Abfangverhalten von Stickstoffmonoxid dieser unterschiedlich substituierten Fängersysteme untersucht und diskutiert.

3.2.4 Darstellung des Fängersystems **60**

Schema 34



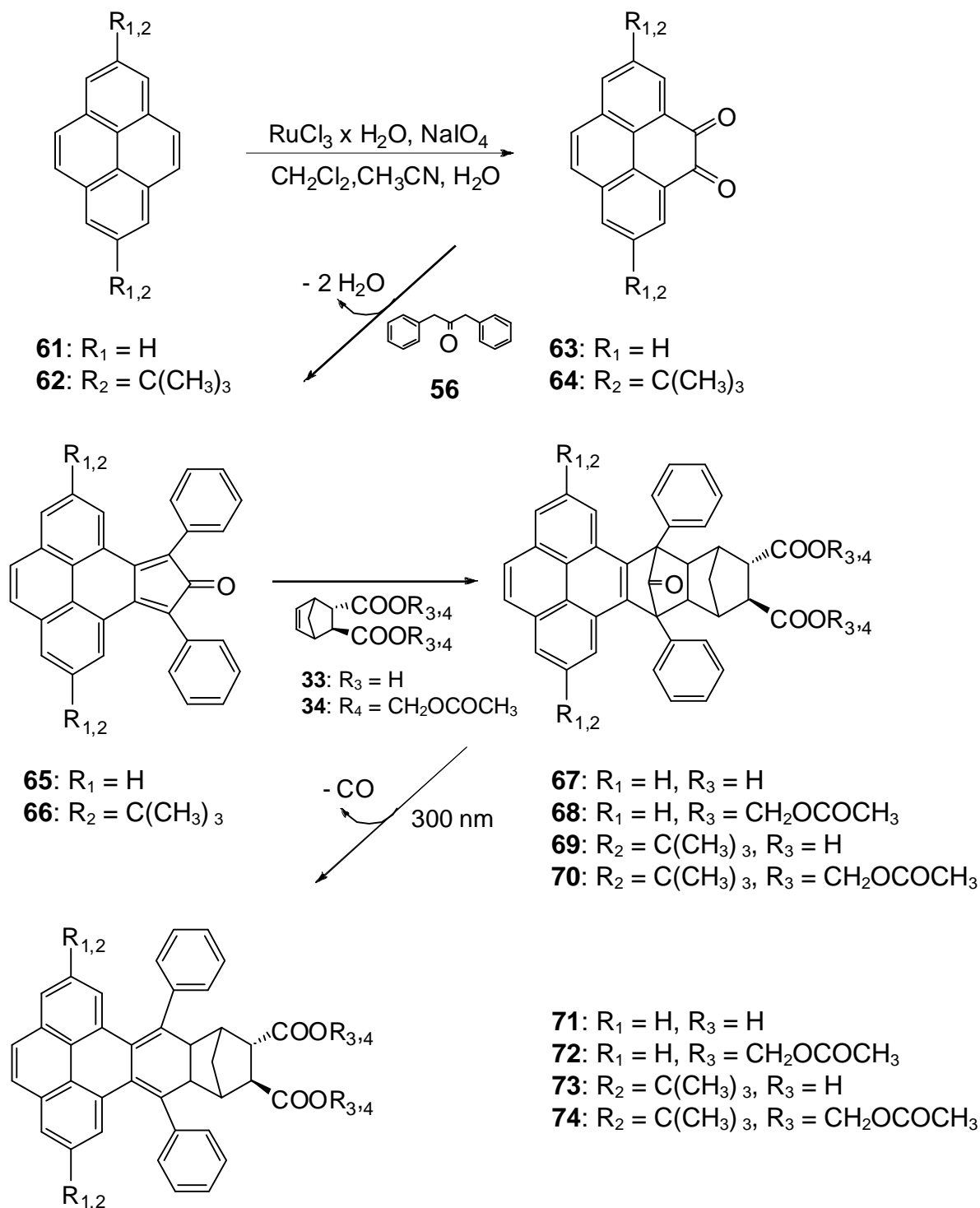
Zur Synthese der Verbindungen **59** und **60** wurde ausgehend von Phenanthren-9,10-chinon **35** und 1,3-Diphenylpropan-2-on **56**, durch basenkatalysierte Kondensation, das Phencyclon **57** hergestellt.<sup>[73]</sup> Diese Verbindung dient als Vorstufe für **54** und **60**. Die Fängervorstufe **59** wurde durch eine Diels-Alder-Reaktion mit Norborn-5-en-2,3-tetrahydroxymethyl **58**<sup>[74]</sup> gebildet. Hierbei wurden

nahezu äquimolare Mengen an Phencyclon **57** und Norborn-5-en-2,3-tetrahydroxymethyl **58** in Chlorbenzol bei 130°C unter Lichtausschluss und Schutzgasatmosphäre 20 Stunden gerührt. Der Grund für die Herstellung dieser Verbindung ist in der Beschaffenheit des Dienophils **58** zu begründen. Es weist vier Hydroxy-Gruppen auf, die dem Molekül eine gute Wasserlöslichkeit verleihen sollten. Bei Versuchen zur Löslichkeit in Phosphatpuffer<sup>[75]</sup> (pH = 7.30) zeigte sich aber der gegenteilige Effekt. Die Verbindung **59** war im wässrigen System sehr schlecht löslich. Die NMR-Spektren konnten nur in organischen Lösungsmitteln aufgenommen werden. Die Photodecarbonylierung dieser Verbindung wurde erfolgreich durchgeführt. Die Vermutung, dass die Vergrößerung des aromatischen Systems nach der Abspaltung von Kohlenmonoxid mit einer weiteren Verschlechterung des Lösungsverhaltens im wässrigen System einhergehen würde, bestätigte sich allerdings. Zusammenfassend ergibt sich daraus, dass die Wasserlöslichkeit der Fängersysteme durch die beschriebene Funktionalisierung mit vier Hydroxy-Gruppen nicht positiv beeinflusst werden kann.

### 3.3 Darstellung der pyrensubstituierten Fängersysteme

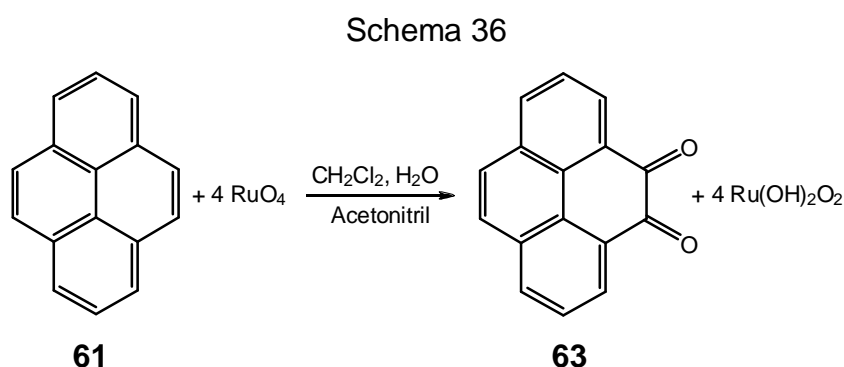
Es wurde versucht das Phenanthrengerüst der Fängersubstanzen durch Pyren zu ersetzen. Außerdem wurden weitere Gruppen am Pyrensystem eingeführt um die Eigenschaften des Fängersystems zu optimieren.

Schema 35

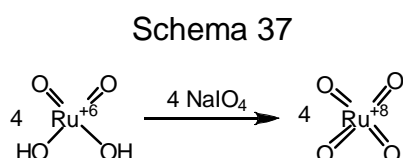


### 3.3.1 Synthese von **67** und **68**

Zur Synthese von **67** und **68** wurde ausgehend vom Pyren-4,5-chinon (**63**) und 1,3-Diphenylpropan-2-on (**56**) das Pyren-Cyclon **65** hergestellt und mit dem Dienophil **33** oder **34** umgesetzt. Die Synthese des Pyren-4,5-chinons (**63**) erfolgt auf konvergentem Wege durch die Oxidation von Pyren **61**. Aus Rutheniumchlorid und Natriummetaperiodat wird in situ das Oxidationsmittel Rutheniumoxid gebildet. Dieses oxidiert das Pyren (**61**) zum  $\alpha$ -Diketon **63** (Schema 36).<sup>[76]</sup>



Das Oxid liegt in katalytischen Mengen vor. Es wird bei der Oxidation selbst reduziert und vom Natriummetaperiodat direkt wieder oxidiert (Schema 37).



Bei der Aldolkondensation von Pyren-4,5-dion **63** mit 1,3-Diphenylaceton **56** unter Verwendung von Methanol als Lösungsmittel und Triton B, welches als Base dient, entstand das 2',5-Diphenyl-3',4'-(4,5-pyrenylen)-cyclopenta-2',4'-dien-1'-on **65**. Für diesen Reaktionsschritt mussten die optimalen Umsetzungsbedingungen gefunden werden. Nachdem KOH als Base nur schlechte Ausbeuten lieferte, wurde nach eingehender Literaturrecherche Triton B eingesetzt.<sup>[77]</sup> Nach aufwändiger Versuchsoptimierung konnte eine Erhöhung der Ausbeute und der Produktreinheit bei einer Reaktionstemperatur von 70°C und

50 Minuten Reaktionszeit erreicht werden. Bei der darauf folgenden Diels-Alder-Reaktion wurden die Norbonendicarbonsäure-Derivate **33** oder **34** mit Pyren cyclon **65** in Chlorbenzol bei 130°C zur FNOCT-Vorstufe **67** bzw. **68** umgesetzt. Das Pyren-Cyclon-Derivat **65** lieferte bei der [4+2]-Cycloaddition mit den (*E*)-substituierten Norbornen-Derivaten **33** oder **34** laut  $^1\text{H-NMR}$  nur ein Produkt. Dieses Produkt liegt aufgrund semiempirischer Berechnungen (PM3) in der *anti-endo*-Konfiguration vor (vgl. Kap. 3.3.2). Die Struktur wurde mit  $^1\text{H-NMR}$  und ESR-Spektroskopie (Kapitel 3.6) bestätigt, da die Brückenkopf-Wasserstoffatome eine starke Hochfeldverschiebung erfahren. Dieses ist durch die Wechselwirkungen des „inneren Ringstromes“ des Pyren-Systemes zu erklären. Dieses Phänomen kann nur bei der *anti-endo*-Struktur auftreten. Da das (*E*)-substituierte Norbornen-Derivat eingesetzt wird, können sich unterschiedliche Diastereomere bilden, die mittels  $^1\text{H-NMR}$  jedoch nicht unterschieden werden können.

### 3.3.2 Synthese von **69** und **70**

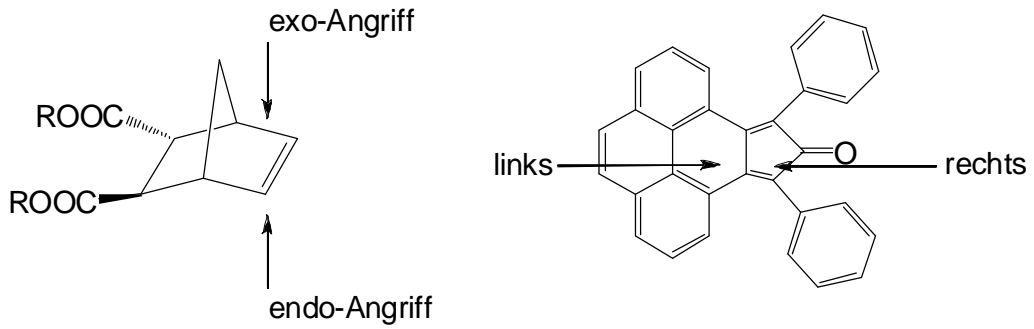
Die Synthese von **63** erfolgte ausgehend von Pyren (**61**) mit *tert.*-Butylchlorid durch Friedel-Crafts-Alkylierung mit Aluminiumchlorid als Lewis-Säure.<sup>[78]</sup>

Die Alkylierung findet an der Position zwei und sieben des Pyrens statt (Schema 35). Das so substituierte Produkt **62** ist thermodynamisch stabiler als die anderen Substitutionsprodukte, da die sterisch anspruchsvollen *tert.*-Butyl-Gruppen am weitesten voneinander entfernt sind und somit die Abstoßung am geringsten ist. Zudem wirkt die als erstes substituierte Alkylgruppe elektronenliefernd, wodurch die zweite Substitution an der entgegengesetzten Seite begünstigt ist. Die Synthese des 2,7-Di-*tert.*-butylpyrenchinons (**64**) erfolgte auf konvergentem Wege durch die Oxidation von 2,7-Di-*tert.*-butylpyren (**62**). Die Aldolkondensation von 2,7-Di-*tert.*-butylpyrenchinon (**64**) mit 1,3-Diphenylaceton (**56**) unter Verwendung von Methanol als Lösungsmittel und Triton B als Base, erfolgte in Anlehnung an die Synthese von **63**. Es bildete sich das Cyclopentadienon **66**.

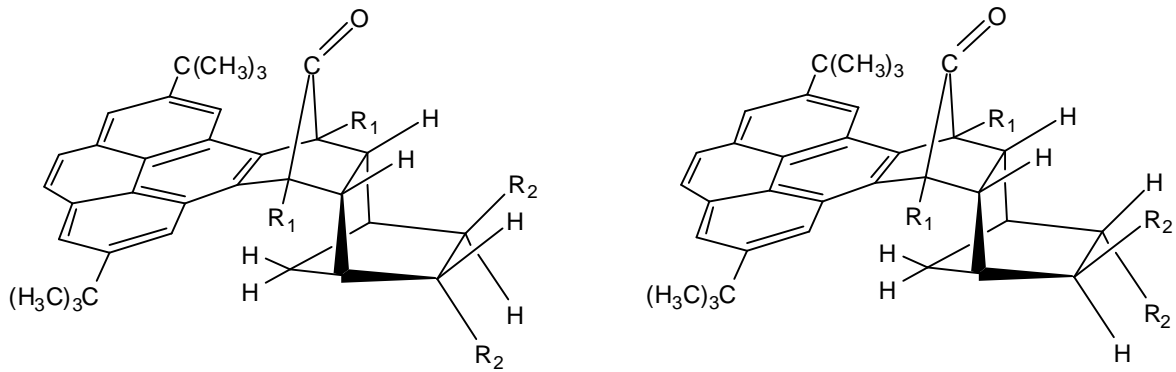
Weiterhin wurden die Norbonendicarbonsäure-Derivate **33** und **34** mit Pyren-Cyclon **66** zur FNOCT-Vorstufe **69** bzw. **70** umgesetzt. Bei dieser Diels-Alder-Reaktion können prinzipiell vier verschiedene stereoisomere Produkte gebildet werden. Es besteht einerseits die Möglichkeit der *exo*- und *endo*-Addition und andererseits ist das Dien nicht C<sub>2</sub>-symmetrisch, was die Anzahl der Diastereomere verdoppelt. Das Dien kann an das Dienophil von der Seite der Methanobrücke (*exo*-Angriff) oder von der anderen Seite des Moleküls (*endo*-Angriff) stattfinden. Zum anderen kann sich das Norbornen-System mit der Doppelbindung von der Seite des Pyrengerüsts (links, *endo* in Bezug auf das Pyrencyclon) oder von der Seite der Carbonylgruppe (rechts, *exo*) an das Dien annähern (Schema 38). Es können sich zwar unterschiedliche Diastereomere bilden, die mittels <sup>1</sup>H-NMR allerdings nicht unterschieden werden können (Abbildung 3). Wie man an dem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum der FNOCT-Vorstufe **69** (Abbildung 4) erkennen kann, erhält man bei dieser Diels-Alder-Reaktion das *endo*-Produkt.



Schema 38



R = H, CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub>



**Abbildung 3:** Mögliche Diastereomere der verbrückten FNOCT-Vorstufen (*endo*-Angriff in Bezug auf das Pyrenocyclon) R<sub>1</sub> = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>2</sub> = COOH, COOCH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub>

### 3.3.3 Photodecarbonylierung der Ketone **67** bis **70**

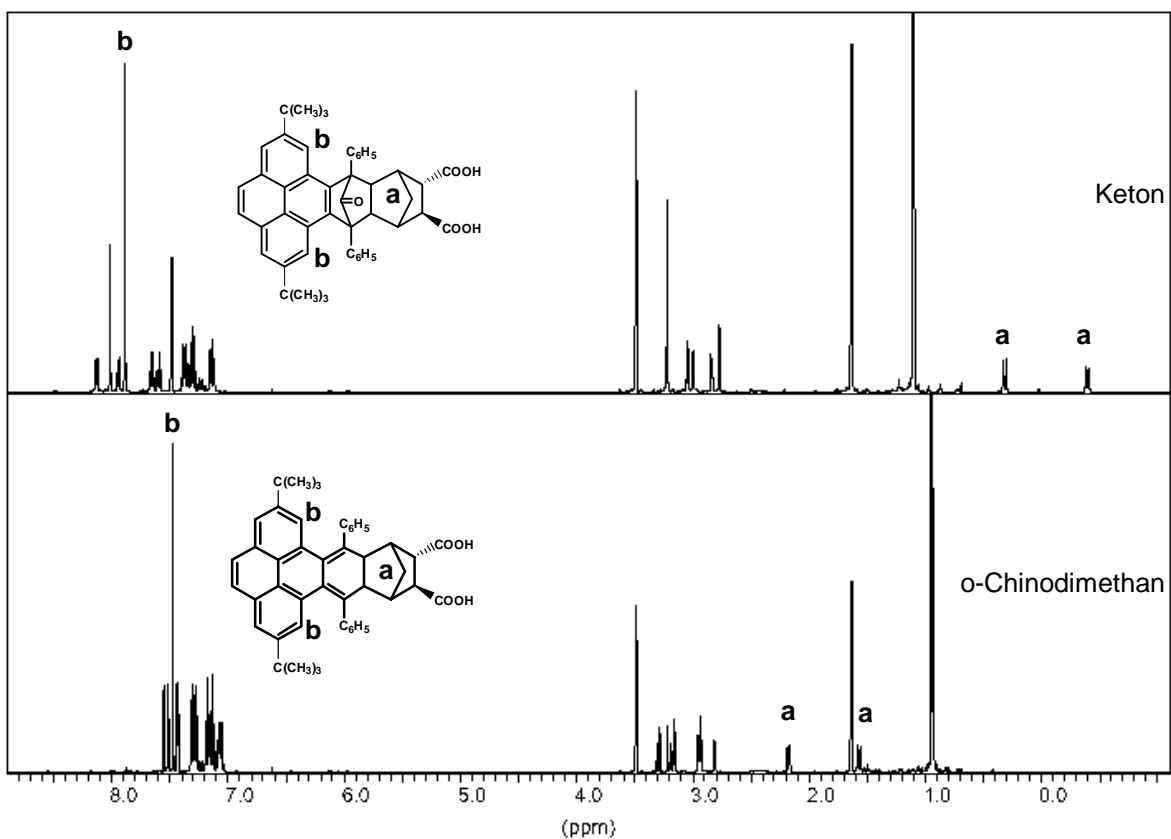
Ketone absorbieren Licht im Bereich von 280 bis 290 nm. Dabei wird ein nichtbindendes Elektron des Sauerstoffs in das antibindende  $\pi^*$ -Orbital der CO-Doppelbindung angehoben ( $n \rightarrow \pi^*$ -Übergang). Das angeregte Molekül kann eine  $\alpha$ -C,C-Bindung (Norrish-Typ-I) unter Bildung eines Alkyl-Acyl-Biradikals spalten. Kohlenmonoxid wird eliminiert und ein C,C-Biradikal entsteht, welches dem *o*-Chinodimethan **71** bis **74** entspricht.<sup>[79]</sup>

Für den letzten Schritt der Synthese der FNOCT-Verbindungen **71** bis **74** wurden die verbrückten Ketone **67** bis **70** unter Schutzgasatmosphäre bei Licht der Wellenlänge  $\lambda = 300$  nm bestrahlt. Die Reaktionstemperatur von  $-10$  °C während der Photolyse erwies sich als geeignet, da wenig Nebenprodukte gebildet wurden und ein vollständiger Umsatz erzielt werden konnte. Als Lösungsmittel wurde absolutes THF verwendet, welches keine Absorption bei 300 nm und ein gutes Lösungsverhalten gegenüber den verbrückten Ketonen **67** bis **70** aufweist. Die Photolysen werden im NMR-Maßstab durchgeführt (ca. 10 bis 20 mg ml<sup>-1</sup>).

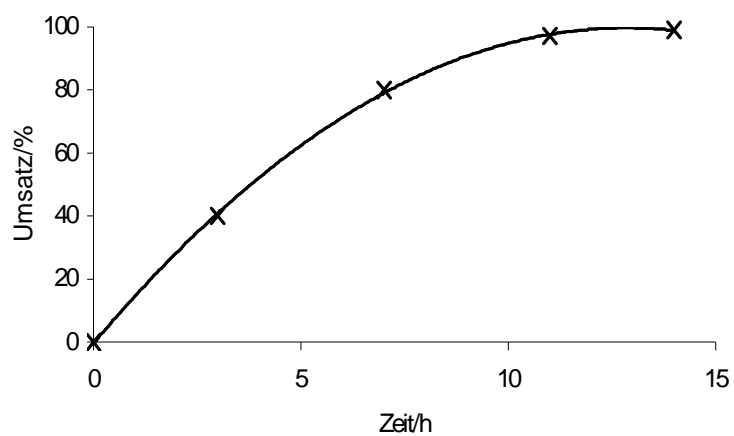
Der Photolyseverlauf wurde <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopisch (deuteriertes THF) verfolgt (Abbildung 4). Eine nützliche Sonde für die Beurteilung des Fortschritts der Photolyse sind die Brückenkopf-Wasserstoffatome (*a*) des Norbornanringes und die Protonen des Pyrens (*b*). Die Produkte **71** bis **74** zeigen eine Tieffeldverschiebung der Brückenkopf-Wasserstoffatomen von etwa zwei ppm verglichen mit den FNOCT-Vorstufen **67** bis **70**. Der Grund für die starke Hochfeldverschiebung dieser Protonen von **67** bis **70** ist die *anti-endo*-Anordnung der Brückenkopf-Wasserstoffatome. Die Wasserstoffatome des Pyrens (*b*) erleiden beim Übergang von den Fänger-Vorstufen **67** bis **70** zu den *o*-Chinodimethanen **71** bis **74** ebenfalls allmählich eine Tieffeldverschiebung.

Zusätzlich kann in einfacher Weise am Verschwinden des Signals der Carbonylgruppe der Fortschritt der Decarbonylierung mittels IR- und <sup>13</sup>C-Spektroskopie verfolgt werden.

Nach dem vollständigen Umsatz wird das Lösungsmittel abkondensiert. Die Photolysedauer wurde durch Variation der Konzentration der Lösungen optimiert, um einen möglichst hohen Umsatz bei geringer Nebenproduktbildung zu erhalten. Die Dauer der Photolyse ist aufgrund der Eigenabsorption der Lösung stark konzentrationsabhängig. Eine typische Umsatz/Zeit/Kurve ist in Abbildung 5 zu sehen. Je weiter die Reaktion voranschreitet, desto intensiver färbt sich das Reaktionsgemisch orange (Eigenabsorption der Lösung). Die vor der Bestrahlung farblose Lösung ist am Ende der Photolyse orange gefärbt.



**Abbildung 4:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Verbindungen **69** und **73** in  $d_8$ -THF. Charakteristische Protonenresonanzen zur Verfolgung des Reaktionsverlaufes: a = Norbornanbrücken-Wasserstoffatome, b = Protonen des Pyrens



**Abbildung 5:** Umsatz-Zeit-Kurve der Photolyse von **69** (0.021 M in  $d_8$ -THF, 300 nm, -10 °C, Kühlmittel: MeOH)

### 3.4 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen der Stickstoffmonoxid-Fängersysteme

Die Fluoreszenzspektroskopie zeichnet sich durch ihre hohe Empfindlichkeit gegenüber anderen spektroskopischen Messmethoden aus. Die Detektionsgrenze erstreckt sich in günstigen Fällen bis hin in den nanomolaren Bereich. Dadurch erhöht sich die Genauigkeit und die Sensitivität dieser Nachweismethode. Die zu messenden Proben werden thermisch nicht belastet.<sup>[61]</sup> Zudem kann die Fluoreszenzspektroskopie zu Routinemessungen eingesetzt werden. Die Messmethode kann sowohl extrazellulär als auch intrazellulär Anwendung finden. Sie ist eine wichtige biophysikalische Methode, um vitale Zellen und Gewebe zu untersuchen. Die Anregungs- und Emissionsspektren des Fluorophors dürfen dabei nicht überlappen, da sonst die Empfindlichkeit des Nachweises nicht mehr ausreichend gewährleistet ist. Aromatische Fluorophore wie Pyren oder Phenanthren zeichnen sich durch einen großen Stokes-Shift aus. Dabei sind die Anregungs- und Emissionsbanden weit voneinander separiert. Die Fluoreszenzspektroskopie in Kombination mit der FNOCT-Methode dient zum direkten Nachweis von Stickstoffmonoxid in vitalen Zellen.

Die treibende Kraft der NOCT-Methode ist die Rearomatisierung des *o*-Chinodimethans nach der Reaktion mit Stickstoffmonoxid. Bei der FNOCT-Methode liegt eine Erweiterung des Fluorophors durch ein konjugiertes aromatisches System zu Grunde. Nach dem Abfang bildet sich ausgehend vom *o*-Chinodimethan das fluorophore Grundsystem wieder zurück. Das ist entweder das Phenanthren- oder das Pyren-System. Diese Änderung der Eigenschaften des  $\pi$ -Systems geht mit einer drastischen Änderung der Fluoreszenzeigenschaften einher. Verglichen mit Phenanthren hat Pyren eine höhere Quantenausbeute (Phenanthren:  $Q = 0.125$ , Pyren:  $Q = 0.53$ , in polaren Lösungsmitteln).<sup>[80]</sup> Im folgenden Kapitel werden die Unterschiede beider Systeme untersucht und die Vor- und Nachteile hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit diskutiert.

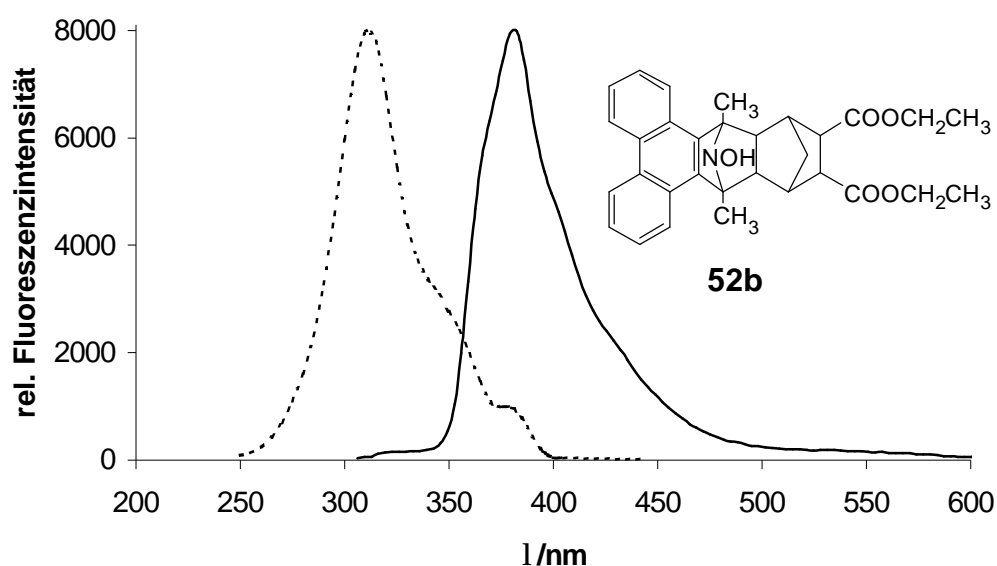
### 3.4.1 Phenanthren-Systeme

Die Fluoreszenzeigenschaften der Ketone **49** bis **51**, der Fänger-Verbindungen **52** bis **54** und der nach cheletroper Abfangreaktion mit Stickstoffmonoxid und Reduktion gebildeten Hydroxylamine (**52b** bis **54b**) wurde untersucht. Dabei ist aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten eine Analogie in den Fluoreszenzspektren der Hydroxylamine und der Ketone zu erkennen (Abbildung 6, 7).

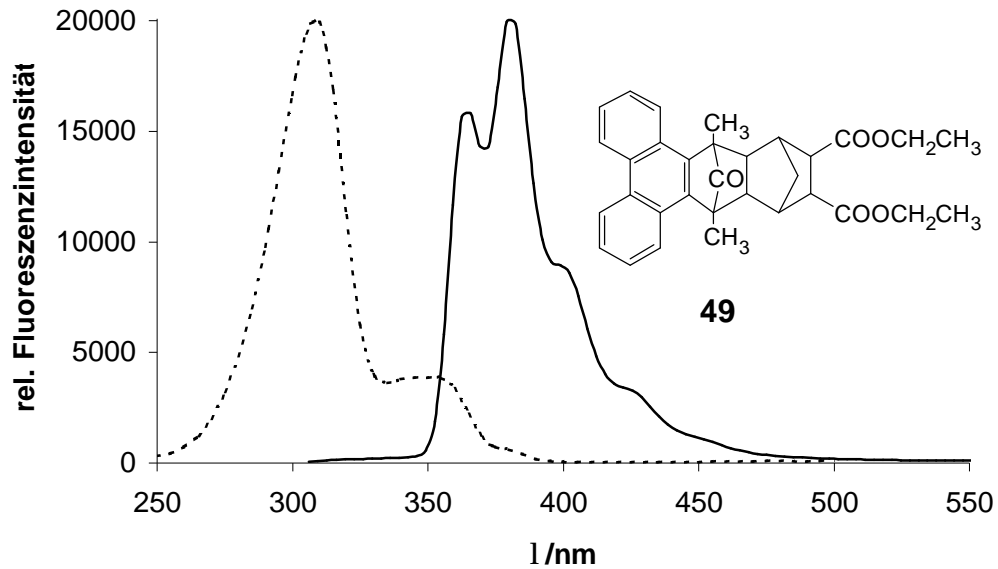
Nach dem NO-Abfang bildet sich das aromatische Phenanthrengerüst zurück, welches bei den Fänger-Vorstufen, den Ketonen vorhanden ist. Diese Tatsache lässt somit ein Abschätzen der Fluoreszenzeigenschaften der Hydroxylamine im Vorfeld zu. Bätz<sup>[67]</sup>, Meineke<sup>[62]</sup> und Hornig<sup>[58]</sup> haben bereits Untersuchungen mit einem auf Phenanthren basierendem Fängersystem gemacht, die an den cheletropen Bindungsstellen mit zwei Phenylgruppen versehen waren. Diese zeigten nach NO-Zugabe einen spontanen Fluoreszenzsprung, was von der schnellen Reaktion des FNOCTs mit dem Stickstoffmonoxid herrührt. Das Maximum der Fluoreszenz konnte in Abwesenheit eines geeigneten Reduktionsmittels aber erst nach Stunden beobachtet werden. Die schnelle Zunahme der Fluoreszenz zu einem Maximum ist somit nur durch Reduktionsmittel wie Ascorbinsäure oder Glutathion zu erreichen. Damit werden die zunächst gebildeten paramagnetischen Nitroxidradikale, die als Fluoreszenzlöscher bekannt sind, zu den fluoreszierenden diamagnetischen Hydroxylaminen umgewandelt.<sup>[55]</sup> Somit ist die Reaktion mit NO der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der FNOCT-Methode.

Die von Bätz<sup>[67]</sup>, Meineke<sup>[62]</sup> und Hornig<sup>[58]</sup> synthetisierten FNOCTs haben in ihren Abfangeigenschaften gute Erfolge gebracht und den Pool der bereitstehenden Fänger stark erweitert. Die strukturelle Gemeinsamkeit der Substanzen war zum einen das Phenanthrensystem als Fluorophor und zum anderen die Phenylgruppen am cheletropen Fängerzentrum (vgl. **24**). Diese Phenylgruppen wurden in der vorliegenden Arbeit durch Methyl- sowie Carboxylgruppen substituiert, um die Wasserlöslichkeit zu verbessern, da die Lipophilie durch Einführen geeigneter Gruppen verringert werden könnte. Als Vergleichssubstanz wurde die unsubstituierte Phenanthren-Verbindung **54** ausgewählt.

Durch Einführung der Methyl-Gruppen am cheletropen Fängerzentrums konnte die Wasserlöslichkeit im Vergleich zu Verbindung **54** verbessert werden, was den Zusatz von Lösungsvermittlern wie Pluronic-F-127 nicht mehr nötig macht. Zuerst wurden fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen vorgenommen. Hierbei wurden 50  $\mu\text{M}$  Lösungen der FNOCTs **52** und **54** sowie der jeweiligen Ketone **49** und **51** in THF hergestellt und unter Schutzatmosphäre fluoreszenzspektroskopisch vermessen. Die Abbildung 6 zeigt das Fluoreszenzspektrum des Hydroxylamins **52b**, welches eine maximale Fluoreszenz bei  $\lambda_{\text{exc.}} = 310 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 380 \text{ nm}$  aufweist und mit dem Spektrum des Ketons **49** übereinstimmt. Die Banden von **52b** und **49** unterscheiden sich in den Intensitäten, was auf den geringen Abfang des FNOCT **52** zurückzuführen ist und im Folgenden erläutert wird. Das Keton **49** zeigt im Emissionsspektrum zudem noch eine Schulter bei 360 nm und zwei kleine Schultern bei 400 und 420 nm. Im Anregungsspektrum erkennt man ein zweites Maximum bei 350 nm, welches aufgrund der Überschneidung mit der Emissionsbande keine Anwendung findet, da der Stokesshift zu gering ist und der Grad der Selbstlöschung sehr hoch ist. Das FNOCT **52** selber besitzt keine Fluoreszenz des *o*-chinoiden Systems.



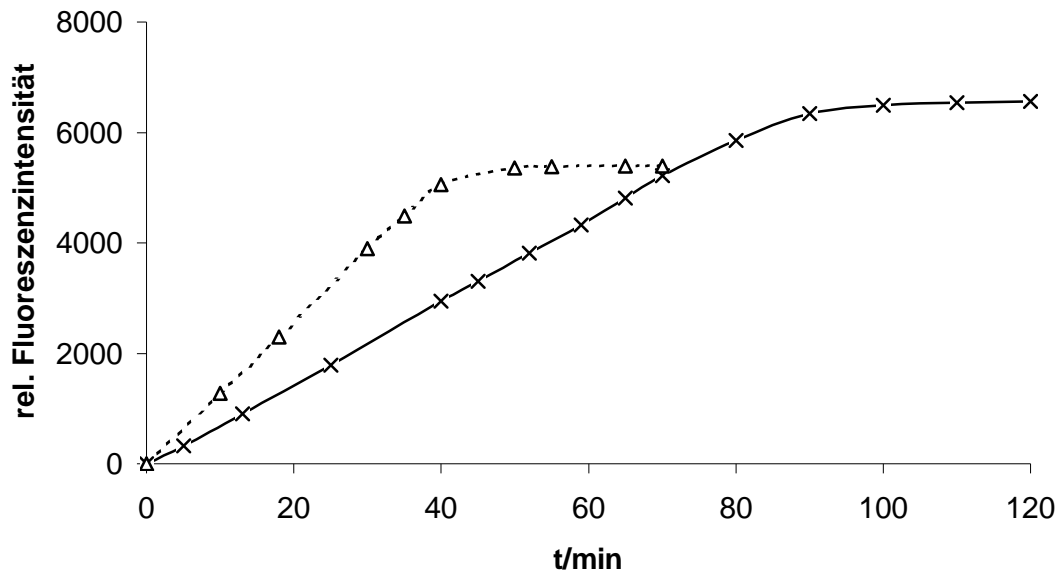
**Abbildung 6:** Anregungs (----)- und Emissions(—)-Fluoreszenzspektrum vom Hydroxylamin **52b** mit 150  $\mu\text{M}$  NO, 100  $\mu\text{M}$  Ascorbat in Phosphatpuffer pH 7.30 (50  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc.}} = 310 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 380 \text{ nm}$ )



**Abbildung 7:** Anregungs (----)- und Emissions(—)-Fluoreszenzspektrum von **49** in Phosphatpuffer pH 7.30 (50  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc.}}$  = 310 nm,  $\lambda_{\text{em.}}$  = 380 nm)

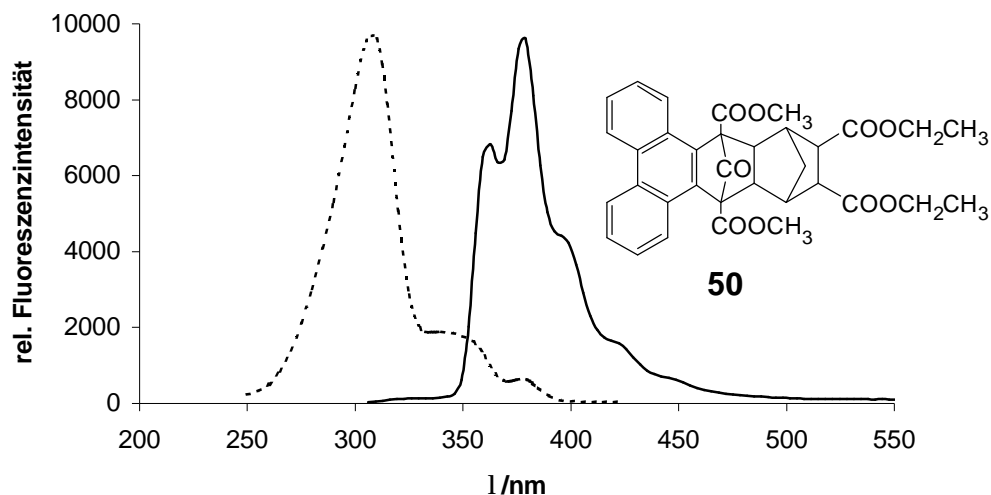
Als nächstes wurde der zeitabhängige Verlauf des NO-Abfanges von **52** im Vergleich zum FNOCT **54** untersucht. Dafür wurden einer 50  $\mu\text{M}$  Fängerlösung von **52** bzw. **54** mit 100  $\mu\text{M}$  Ascorbat ein Überschuss einer gesättigten NO-Lösung hinzugefügt. Das Fluoreszenzmaximum von **52** wurde erst innerhalb von 100 Minuten erreicht. Im Vergleich dazu erreichte die Fluoreszenz von **54** innerhalb von 40 Minuten einen konstanten Wert. Die Fluoreszenz-Zeit-Verläufe des FNOCTs **52** und **54** sind in Abbildung 8 aufgeführt. Die langsame Bildung des Hydroxylamins **52b** wird darauf zurückgeführt, dass die Methylgruppe einen deaktivierenden Effekt auf den NO-Abfang ausübt. Die Abfangreaktion mit NO ist somit geschwindigkeitsbestimmend.





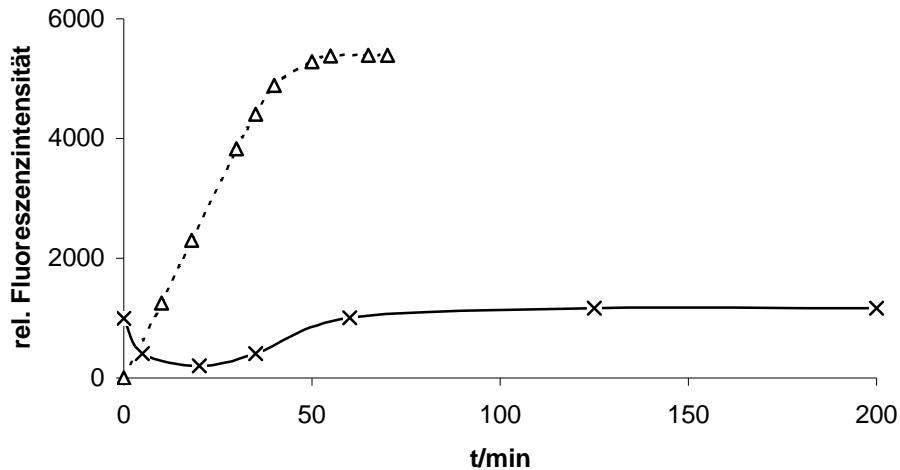
**Abbildung 8:** Veränderung der rel. Fluoreszenzintensität von **54** (- - $\Delta$ - -) und **52** (---x---) mit 150  $\mu\text{M}$  NO, 100  $\mu\text{M}$  Ascorbat in Phosphatpuffer pH 7.30 (50  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc.}} = 310 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 380 \text{ nm}$ )

Die Fluoreszenzeigenschaften des methoxycarbonylsubstituierten Fängers **53**, wurden auch fluoreszenztechnisch untersucht. Hierzu wurden zunächst Spektren des Ketons **50** sowie des *o*-Chinodimethans **53** aufgenommen. Die Wasserlöslichkeit der Fängersubstanz war sehr gut. Abbildung 9 zeigt das Fluoreszenzspektrum des Ketons **50**, welches vergleichbare Bandenstruktur wie das Hydroxylamin aufweisen sollte. Das *o*-Chinodimethan **53** zeigte keine Fluoreszenzbande.



**Abbildung 9:** Anregungs (----)- und Emissions(—)-Fluoreszenzspektrum von **50** in Phosphatpuffer pH 7.30 (50  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc.}}$  = 310 nm,  $\lambda_{\text{em.}}$  = 380 nm)

Um die Reaktion des *o*-Chinodimethans **53** mit Stickstoffmonoxid und die Bildung des Hydroxylamins **53b** zeitabhängig zu untersuchen, wurden einer 50  $\mu\text{M}$  Lösung von **53** mit 100  $\mu\text{M}$  Ascorbat als Reduktionsmittel ein Überschuss einer gesättigten NO-Lösung hinzugefügt. Hierbei fiel die Grundfluoreszenz von **53** innerhalb von 30 min zunächst ab, was allerdings nicht auf einen Verdünnungseffekt zurückzuführen ist (Abbildung 10). Dieses kann auf eine Fluoreszenzlöschung durch freies NO zurückgeführt werden. Die Energie des elektronisch angeregten Zustandes von **53** wird auf den Fluoreszenzlöcher (NO) übertragen und der Abfall der Restfluoreszenz resultiert. Die Fluoreszenz steigt dann innerhalb von 200 Minuten wieder an und erreicht eine maximale Fluoreszenzintensität, die nur etwas über der Grundfluoreszenz liegt.

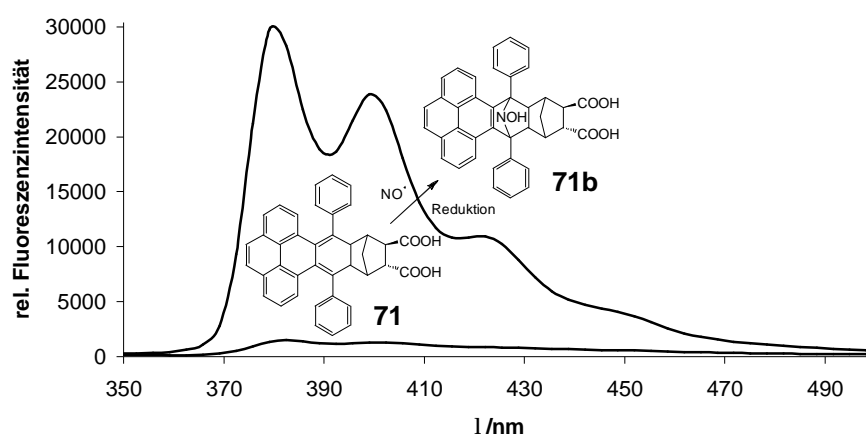


**Abbildung 10:** Veränderung der relativen Fluoreszenzintensität von **54** (- - $\Delta$ - -) vs. **53** (---x---) mit 150  $\mu\text{M}$  NO, 100  $\mu\text{M}$  Ascorbat in Phosphatpuffer pH 7.30 (50  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc.}} = 310 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 380 \text{ nm}$ )

Die Reaktionsgeschwindigkeit des *o*-Chinodimethans **53** mit Stickstoffmonoxid ist offensichtlich so klein, dass hierdurch eine praktische Anwendung unmöglich wird. Die Carboxylgruppe scheint somit einen desaktivierenden Effekt auf den Abfang zu haben. Eine wichtige Grundvoraussetzung der FNOCT-Methode, um Stickstoffmonoxid nachzuweisen, ist eine möglichst schnelle Abfangreaktion. Nur so macht der Nachweis Sinn, da zur Bildung des Hydroxylamins ein Reaktionsschritt noch hinzukommt, um das fluoreszenzfähige Abfangprodukt bilden zu können. Zugehörige ESR-spektroskopische Untersuchungen sind in Kapitel 3.6 beschrieben.

### 3.4.2 Pyren-Systeme

Wie bereits bei den Phenanthren-Systemen **52** bis **54** beschrieben, weisen die Pyren-Systeme **71** bis **74** ähnliche Abfangeigenschaften für NO auf. Abbildung 11 zeigt den Vergleich der Fluoreszenz des Abfangproduktes **71b** mit der Pyren-FNOCT-Säure **71**. Es ist eine zu vernachlässigende Fluoreszenz im Anregungsbereich des Pyrens bei  $\lambda_{exc.} = 350$  nm,  $\lambda_{em.} = 400$  nm zu erkennen. Die geringe Grundfluoreszenz ist vermutlich auf Verunreinigungen (z. B. Restketon) zurückzuführen. Sie stellt für einen sensitiven Test eine entscheidender Bedeutung da und sollte möglichst vermieden werden.



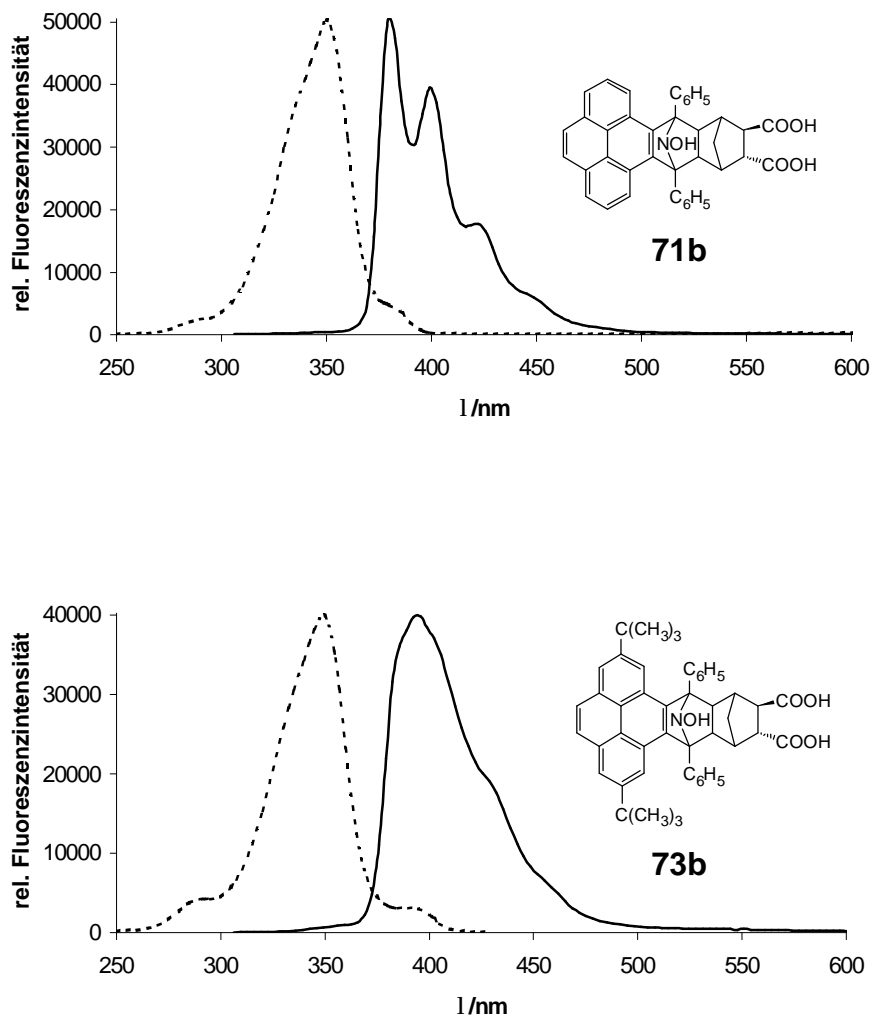
**Abbildung 11:** Emissions(—)-Fluoreszenzspektrum von **71** und **71b** mit 150  $\mu$ M NO, 100  $\mu$ M Ascorbat in Phosphatpuffer pH 7.30 (50  $\mu$ M,  $\lambda_{exc.} = 350$  nm,  $\lambda_{em.} = 380, 400, 420$  nm)

Untersuchungen der Pyren-FNOCTs **71** bis **74** zeigten, dass die o-chinodimethan-Einheit keine Fluoreszenz aufweist. Dieses wird in Kapitel 3.4.2.2 näher beschrieben. Nach der Reaktion mit Stickstoffmonoxid und Reduktion des Nitroxidradikals mittels Ascorbinsäure kann ein schneller Fluoreszenzanstieg detektiert werden. Der Grund dieses Verhaltens liegt in der Rearomatisierung des o-Chinodimethans nach der Abfangreaktion. Nach dem Abfang bildet sich das Pyren-System zurück und sorgt somit zur Fluoreszenzbildung. Die unsubstituierte

Pyren-FNOCT-Verbindung **71** und der entsprechende Acetoxymethylester **72** wurden synthetisiert. Diese neuen Vertreter der Fängersysteme zeigen ein analoges Abfangverhalten bezogen auf die bisher synthetisierten Fänger. Sie reagieren schnell mit NO, was durch UV/Vis kinetische Untersuchungen bewiesen wurde (siehe Kapitel 3.5). Für wässrige Systeme ist mit diesem Molekül ein sehr sensitiver NO-Nachweis konzipiert worden. Will man allerdings im organischen Medium NO nachweisen, so ist das unsubstituierte Pyren-System **71** nur bedingt geeignet. Nach NO-Zugabe in THF färbte sich die Lösung schlagartig braun, was möglicherweise auf eine Nitrierung am aromatischen System zurückzuführen ist. Aus diesem Grund und der in Kapitel 3.4.2.2 beschriebenen Aggregatbildung wurde das Pyren-System **71** in der besonders reaktiven Position zwei und sieben mit einer *tert.*-Butylgruppe ausgestattet. Mit **73** bzw. **74** konnte die Abfangreaktion in organischen Medien ungestört beobachtet werden; allerdings konnte die Excimerenbildung nicht zurückgedrängt werden. Der Zusatz von Löslichkeitsvermittlern, wie in Kapitel 3.4.2.2 beschrieben, konnte diesen Effekt aber weitestgehend ausschalten. Aufgrund der Beobachtungen mit den Phenanthrensystemen **52** und **53** wurde bei den Pyrensystemen eine Substitution der Phenylgruppen am Fängersystem nicht durchgeführt. Die Substitution durch Methyl- oder Carboxylgruppe resultierte beim Phenanthrensystem in einem verzögerten NO-Abfang und ist somit für die Konzeption weiterer FNOCTs nicht zu empfehlen.

Um das Fängersystem zum NO-Nachweis in biologischen Systemen einsetzen zu können, sollte es eine Anregungswellenlänge  $> 334$  nm aufweisen.<sup>[57,81]</sup> Der Grund für diese Minimalwellenlänge ist gerätetechnisch bedingt. Die kürzeste Anregungswellenlänge bei Standard-Fluoreszenz-Mikroskopen beträgt 334 nm. Ein weiterer Grund für die geforderte langwellige Fluoreszenz liegt in der schonenden Behandlung der Zellen begründet. Je kurzwelliger die Anregungswellenlänge ist, desto größer ist die Schädigung der Zellen durch die UV-Strahlung. Das unsubstituierte Phenanthren-FNOCT-System, welches von Bätz<sup>[67]</sup> synthetisiert wurde, zeigte ein Anregungsmaximum bei 310 nm und ein Maximum der Emission bei 380 nm.<sup>[82]</sup> Durch die Erweiterung zum Pyrensystem verschiebt sich das Maximum der Anregungswellenlänge

bathochrom um etwa 40 nm. Verbindungen **71** bis **74** können aufgrund der Struktur der Anregungsbande im Bereich von 350 nm angeregt werden und erlauben den NO-Nachweis durch die charakteristische Fluoreszenz bei 440 nm bis 380 nm (Abbildung 12). Ausserdem zeigen die Pyrensysteme eine wesentlich höhere Fluoreszenzausbeute, was die Empfindlichkeit stark erhöht bzw. die Detektionsgrenze erniedrigt (Kapitel 3.4.2.3). Die Fluoreszenzspektren der Hydroxylamine **71b** und **73b** (Abbildung 12) zeichnen sich auch durch weiter auseinander liegende Banden der Anregungs- und Emissionswellenlängen aus. Dieses ist vorteilhaft, da somit der Grad der Selbstlöschung geringer ist und damit die Empfindlichkeit der FNOCT-Methode erhöht wird.



**Abbildung 12:** Anregungs (----)- und Emissions(—)-Fluoreszenzspektrum von **71b** und **73b** mit 100  $\mu\text{M}$  NO in Phosphatpuffer pH 7.35, 0.2% SDS, 100  $\mu\text{M}$  Ascorbat (50  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc.}}$  = 350 nm,  $\lambda_{\text{em.}}$  = (380), 400, (420) nm)

Durch die Konzeption der Pyren-Fängersysteme **71** bis **74** konnten die Fluoreszenzeigenschaften positiv beeinflusst werden. Gleichzeitig konnte die Quantenausbeute erhöht werden. Die Fluoreszenzquantenausbeute  $Q_f$  ist der Quotient aus der Zahl der bei der Absorption von Licht sekundär ausgelösten Lichtquanten und der Zahl der insgesamt absorbierten Lichtquanten (Photonen).

$$Q = \frac{\text{Zahl der emittierten Lichtquanten}}{\text{Zahl der insgesamt absorbierten Lichtquanten}}$$

Die Bestimmung der Quantenausbeute von **28** (Methoxysubst. Phenanthren-Keton) und **67** erfolgte durch Einsatz eines Fluoreszenzstandards.<sup>[83]</sup> Dieses ist eine  $10^{-6}$  bis  $10^{-7}$  M Fluorescein-Lösung in 0.1 M NaOH ( $Q_f = 0.91$ ). Gemessen wird unter Anregung der schwachen Absorptionsbande des Fluoresceins bei ca. 320 nm.

Die Intensität der Absorption wurde durch Aufnahme eines UV/Vis-Spektrums der Fluorescein-Lösung und der zu bestimmenden Verbindung mit definierter Konzentration verglichen (Abbildung 13). Aus der relativen Fluoreszenzintensität der Verbindung mit unbekannter Quantenausbeute wurde durch Vergleich mit dem Spektrum des Fluoresceins als Standard die Quantenausbeute berechnet (Abbildung 14). Die in Tabelle 3 aufgeführten Quantenausbeuten von **26** und **27** wurden von Meineke<sup>[63]</sup> bestimmt.

Entsprechend Literatur<sup>[83]</sup> wurde eine vereinfachte Bestimmungsmethode angewendet. Anstelle der Flächen unter den Fluoreszenzspektren wurden die Intensitäten gemessen, da die Spektren von Fluorescein und dem Keton von **28** bzw. **67** in Tetrahydrofuran ähnlich sind. Mit folgender Formel wurden die Quantenausbeuten berechnet.

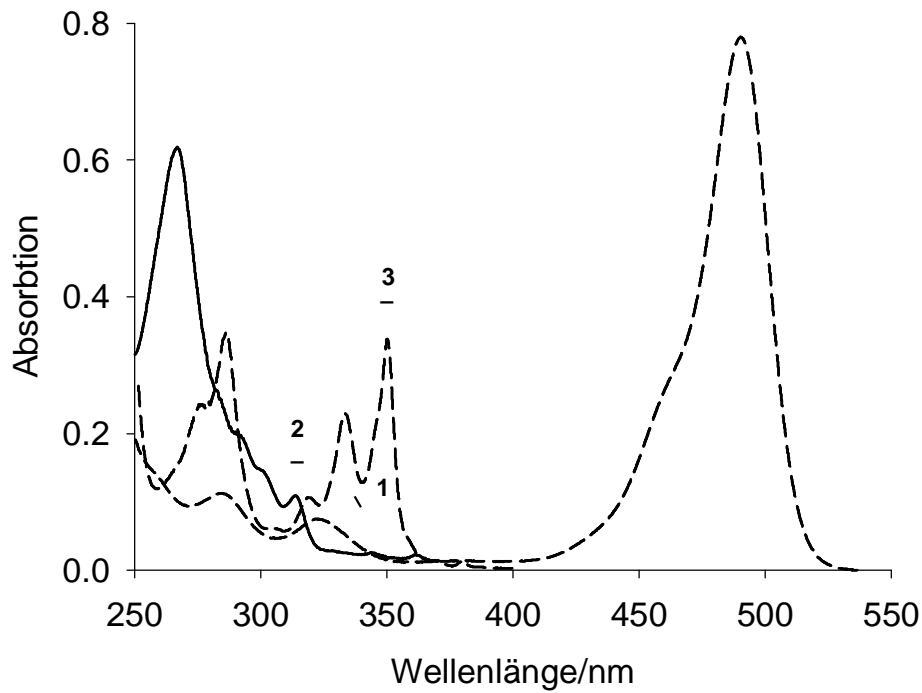
$$Q_2 = \frac{S_2}{S_1} \cdot \frac{A_1}{A_2} \cdot Q_1 \Rightarrow \frac{S_2}{S_1} = \frac{Q_2}{Q_1} \cdot \frac{A_2}{A_1}$$

1 = Fluorescein

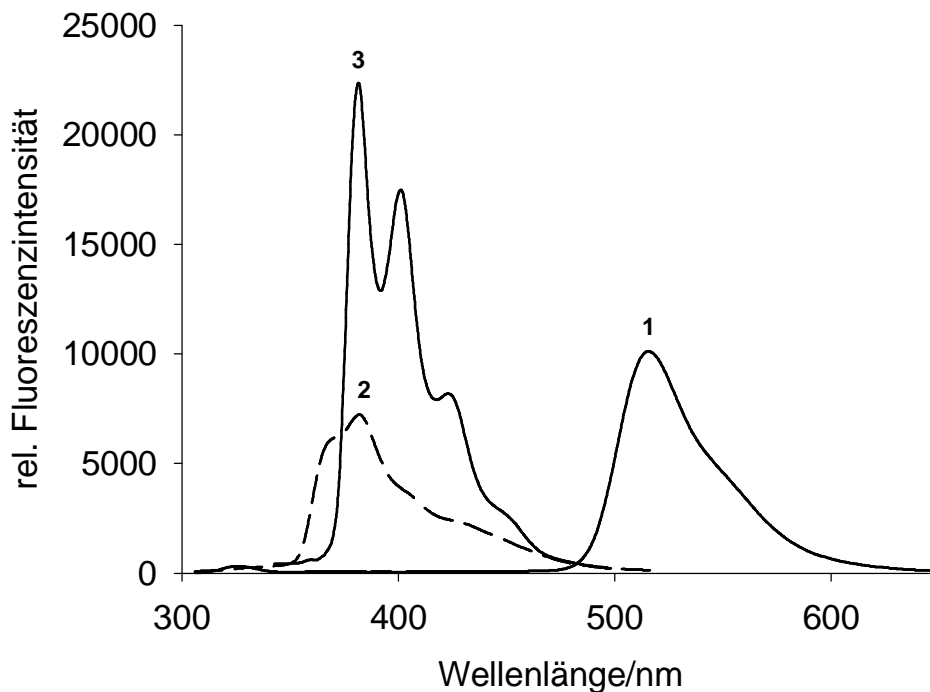
2 = Vergleichsverbindung

A = Intensität der Absorptionsbande

S = Intensität der Emissionsbande



**Abbildung 13:** UV/Vis-Spektren von Fluorescein (1) (10  $\mu\text{M}$  in 0.1 M Natronlauge) Keton von **28** (2) und **67** (3), (10  $\mu\text{M}$  in THF). Die Pfeile kennzeichnen die verwendeten Anregungswellenlängen zur Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensität.



**Abbildung 14:** Emissionsbanden von Fluorescein (1) (1  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc.}}$  = 330 nm, 10  $\mu\text{M}$  in 0.1 M Natronlauge), Keton von **28** (2) ( $\lambda_{\text{exc.}}$  = 315 nm) und **67** (3) ( $\lambda_{\text{exc.}}$  = 350 nm 10  $\mu\text{M}$  in THF)



Die Quantenausbeuten wurden für die Fängerketone bestimmt, da diese eine zu vergleichende Fluoreszenzintensität wie die entsprechenden Hydroxylamine aufweisen. Die ermittelten Quantenausbeuten sind in Tabelle 3 im Vergleich zu den vorher synthetisierten Fängersystemen dargestellt. Im Vergleich zum unsubstituierten Phenanthren-System **26** zeigt sich nach Substitution in Position zwei eine Zunahme der Quantenausbeute. Die dimethylamino-substituierte Verbindung **27** von Meineke<sup>[63]</sup> hat eine ähnliche Quantenausbeute verglichen mit der von Hornig synthetisierten methoxysubstituierten Phenanthrenverbindung **28**<sup>[58]</sup>. Hier konnte keine Erhöhung der Quantenausbeute erreicht werden. Das hergestellte Pyren-FNOCT-System wies eine um 57% erhöhte Quantenausbeute auf.

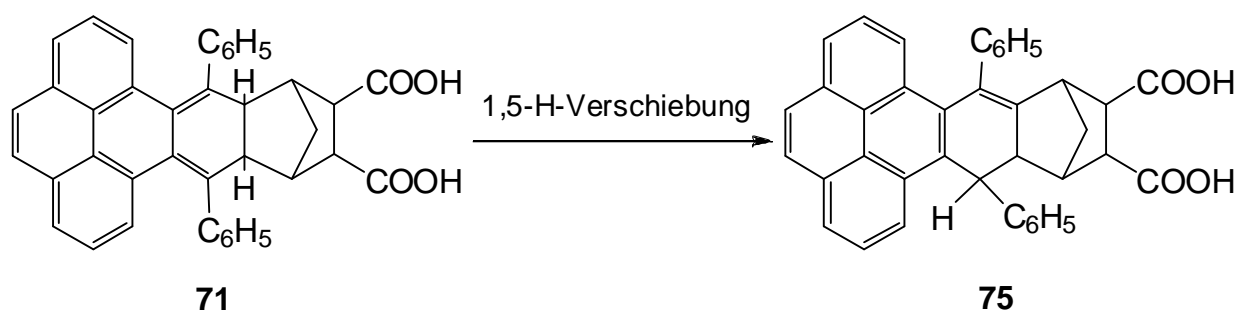
VERBINDUNG	QF
<b>26</b>	0.03
<b>27</b>	0.27
<b>28</b>	0.31
<b>67</b>	0.47

**Tabelle 3:** Ermittelte Quantenausbeuten der hergestellten Fängerketone **26**, **27**, **28** und **67**

### 3.4.2.1 Untersuchung des NO-Abfangs durch Pyren-FNOCT-Säure **71**

Die Reaktion eines FNOCT-Fängersystems mit Stickstoffmonoxid sollte schnell ablaufen, da in physiologischer Umgebung verschiedene Konkurrenzreaktionen zu einem raschen Abbau des NO führen. So bilden sich zum Beispiel in Gegenwart von Sauerstoff schnell die Oxidationsprodukte Nitrit und Nitrat. Das *o*-Chinodimethansystem sollte aber thermisch relativ stabil und inert gegenüber Sauerstoff sein. Nebenprodukte, die sich bilden können, entstehen wahrscheinlich durch eine säurekatalysierte 1,5-H-Verschiebung (Schema 39)<sup>[53]</sup>. Es bilden sich hierbei Styrol-Derivate **75**, die keinen NO-Abfang zeigen können. Für eine längere Aufbewahrung hat sich eine Lagerung der Fängersysteme bei -20 °C bewährt.

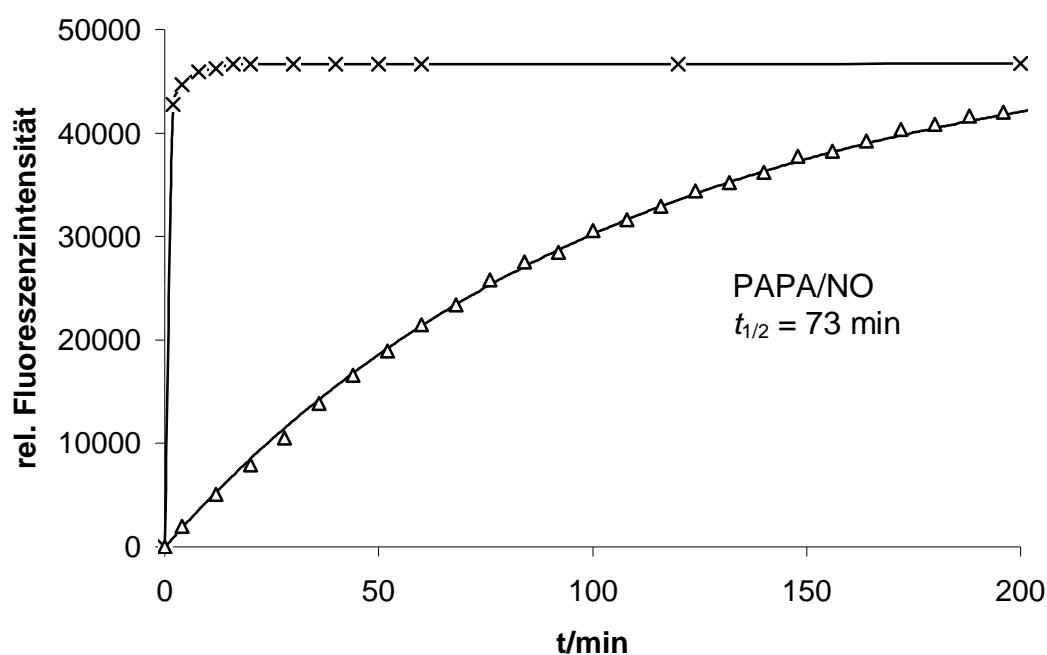
Schema 39



Die erhöhte thermische Stabilität der Fänger **71** bis **74** gegenüber den vorher beschriebenen Systemen ist durch die Erweiterung des  $\pi$ -Systems zu erklären. Durch die erweiterte Konjugation wird die Tendenz zur Aromatisierung über eine 1,5-H-Verschiebung geringer. Das ist neben den besseren Fluoreszenzeigenschaften der Grund, warum das *o*-chinoide Fängersystem mittels eines Pyrengerüsts (**71** bis **74**) bzw. Phenanthrengerüsts (**24**, **29** bis **30** und **52** bis **54**) erweitert wurde. Durch die erhöhte Stabilisierung des  $\pi$ -Systems ist jedoch auch der NO-Abfang gegenüber den kleineren  $\pi$ -Systemen weniger bevorzugt. Es wurden deshalb die Pyrensysteme hinsichtlich ihrer Kinetik des NO-Abfangs untersucht.

Eine 25  $\mu\text{M}$  Lösung von **71** in Phosphatpuffer pH 7.30<sup>[75]</sup> wurden mit 75  $\mu\text{l}$  gesättigter NO-Lösung ( $c = 1.5 \times 10^{-2} \text{ M}$ <sup>[84,85]</sup>) bzw. 12.5  $\mu\text{M}$  PAPA/NO Lösung unter Sauerstoffausschluss versetzt und das Anwachsen der Fluoreszenz des gebildeten Hydroxylamins **71b** ( $\lambda_{\text{exc.}} = 350 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em.}} = 380 \text{ nm}$ ) verfolgt (Abbildung 15). Beim Zusatz der 75  $\mu\text{M}$  NO-Lösung in Gegenwart von 50  $\mu\text{M}$  Ascorbat-Lösung als Reduktionsmittel bildete sich innerhalb kurzer Zeit das Hydroxylamin **71b**. Es konnte bereits nach zwei Minuten die maximale Fluoreszenzintensität detektiert werden.

Die Zunahme der relativen Fluoreszenz sollte bei dem NO-Donor PAPA/NO der in der Literatur angegebenen Zerfallsgeschwindigkeit dieser Verbindung ( $t_{1/2} = 77 \text{ min}$  bei 23 °C) entsprechen.<sup>[26]</sup> Das N-Diazeniumdiolat PAPA/NO setzt beim Zerfall zwei Äquivalente NO frei.

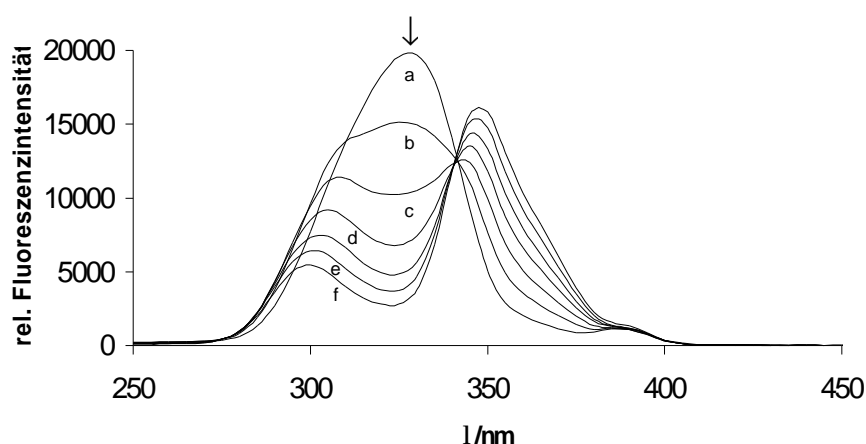


**Abbildung 15:** Zeitabhängigkeit der Reaktion der 25  $\mu\text{M}$  Pyren-FNOCT-Säure **71** (x) mit 50  $\mu\text{M}$  NO-Lösung (Phosphatpuffer pH 7.30, 0.2% SDS) in Gegenwart von 50  $\mu\text{M}$  Ascorbat-Lösung und ( $\Delta$ )-12.5  $\mu\text{M}$  PAPA/NO-Lösung. Messung der Fluoreszenzintensität, T = 23 °C,  $\lambda_{\text{exc.}} = 350 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 380 \text{ nm}$

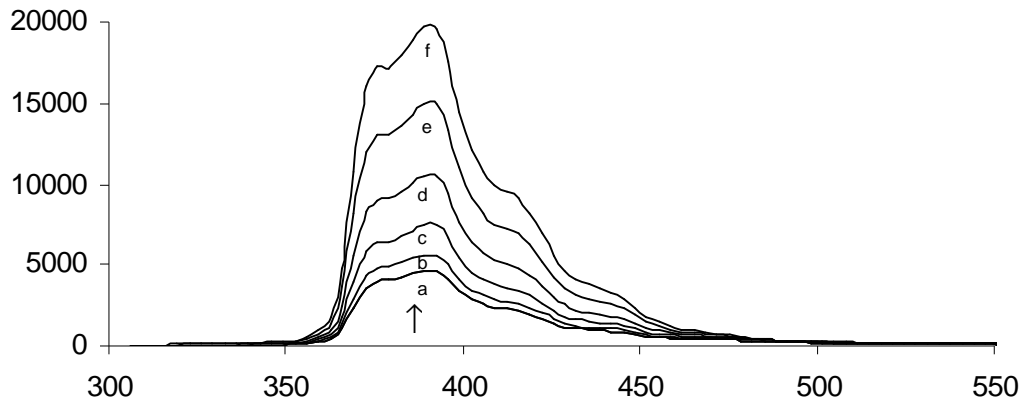
Um zu überprüfen, ob die cheletrope Abfangreaktion von NO in Anwesenheit eines Reduktionsmittels wie Ascorbat dieselbe Halbwertszeit des Zerfalls ergibt, wie die aus der UV-spektroskopisch verfolgten Abnahme der Absorption des NONOates, wurde der Zerfall von PAPA/NO in Phosphatpuffer pH 7.30<sup>[75]</sup> und  $T = 23\text{ °C}$  untersucht. Die Bildung des Stickstoffmonoxides aus PAPA/NO ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist damit durch den langsamen Zerfall des NONOates gehemmt, da es sich bei der Reaktion von FNOCT mit NO um eine Reaktion 2. Ordnung handelt. Der bei  $23\text{ °C}$  gemessene Wert von  $t_{1/2} = 73\text{ min}$  ist in guter Übereinstimmung mit dem Literaturwert von:  $t_{1/2} = 77\text{ min}$  bei  $23\text{ °C}$ .<sup>[26]</sup>

### 3.4.2.2 Fluoreszenzeigenschaften der NO-Abfangprodukte **71b** und **73b**

Um Stickstoffmonoxid in einem weiten Konzentrationsbereich detektieren zu können, ist ein linearer Verlauf der Fluoreszenzintensität mit der NO-Konzentration wünschenswert. Bei hohen Konzentrationen von gelösten Substanzen lassen sich die Moleküle häufig nicht mehr als isoliert betrachten. Infolge der Wechselwirkungen zwischen den Molekülen kommt es zu einer Nichtlinearität der Fluoreszenz mit der Konzentration. Dieses Verhalten der Nichtlinearität tritt häufig bei aromatischen  $\pi$ -Systemen auf. Hierbei treten mit wachsender Konzentration im Emissionsspektrum zusätzliche Banden auf, im Absorptionsspektrum jedoch nicht. Dieser Effekt ist häufig darauf zurückzuführen, daß sich erst im angeregten Zustand Dimere bilden. Man spricht dann von Excimeren. Literaturbekannt ist diese Excimerenbildung bei Pyren.<sup>[86]</sup> Abbildung 16 zeigt das Verhalten einer Lösung von Pyren in THF in einem Konzentrationsbereich von 50  $\mu\text{M}$  bis 300  $\mu\text{M}$ . Die relative Fluoreszenzintensität bei  $\lambda_{\text{exc.}} = 330 \text{ nm}$  steigt durch die Excimerenbildung nichtlinear an. Dieses ist durch die Bildung einer neuen Emissionsbande bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm zu erkennen, wie in Abbildung 17 zu sehen ist.

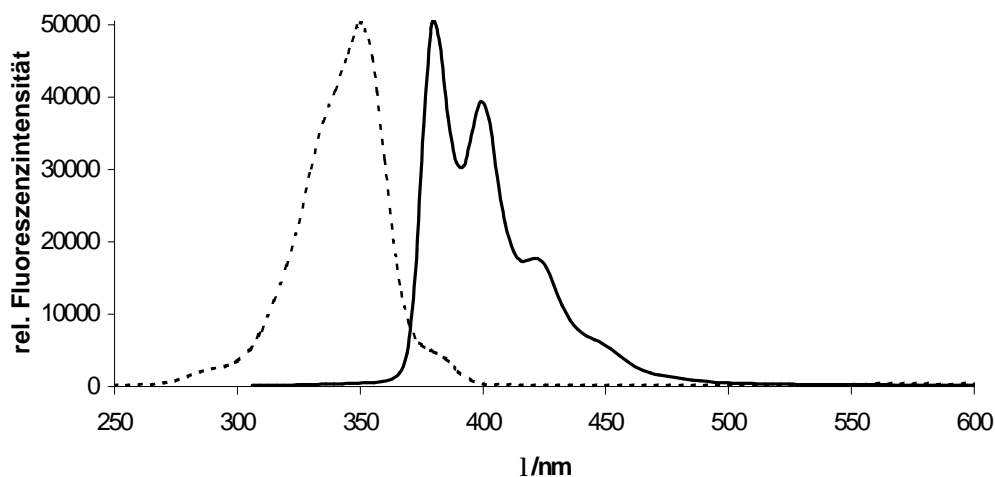


**Abbildung 16:** Emissions(—)-Fluoreszenzspektrum des Pyrens im Konzentrationsbereich von a = 50  $\mu\text{M}$ , b = 100  $\mu\text{M}$ , c = 150  $\mu\text{M}$ , d = 200  $\mu\text{M}$ , e = 250  $\mu\text{M}$ , f = 300  $\mu\text{M}$  in THF,  $\lambda_{\text{exc.}} = 330 \text{ nm}$



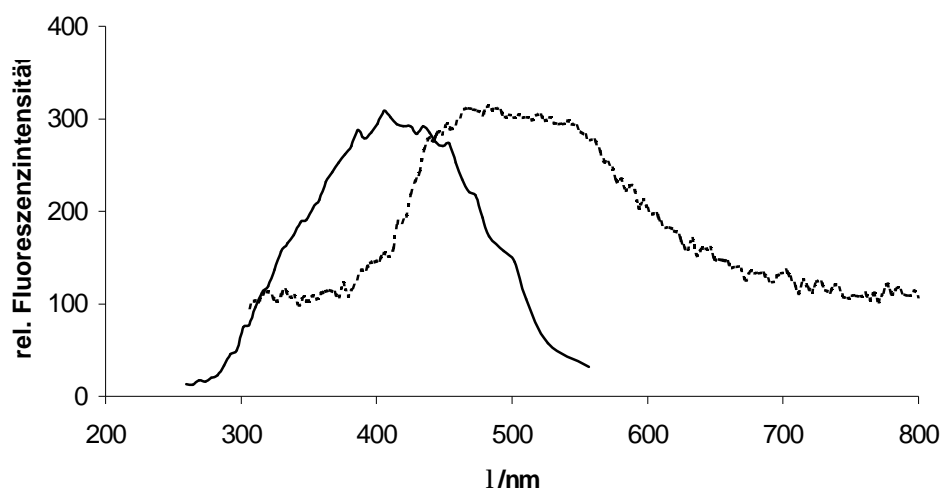
**Abbildung 17:** Emissions(—)-Fluoreszenzspektrum des Pyrens im Konzentrationsbereich von a = 50 µM, b = 100 µM, c = 150 µM, d = 200 µM, e = 250 µM, f = 300 µM in THF bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda_{exc.} = 350$  nm ( $\lambda_{em.} = 380$  nm).

Eine wesentliche Voraussetzung für die gute Anwendbarkeit der Fluoreszenzsonde, sollte eine maximale Intensität der Emissionsbande und eine maximale Löslichkeit ohne Excimerenbildung sein. Dieses konnte durch die Zugabe von 0.2 % SDS erreicht werden, wie das Fluoreszenzspektrum des Hydroxylamins **71b** belegt (Abbildung 18). Die Fluoreszenzmaxima liegen bei den Wellenlängen  $\lambda_{em.} = 380, 400$  und  $420$  nm bei Anregung  $\lambda_{exc.} = 350$  nm.



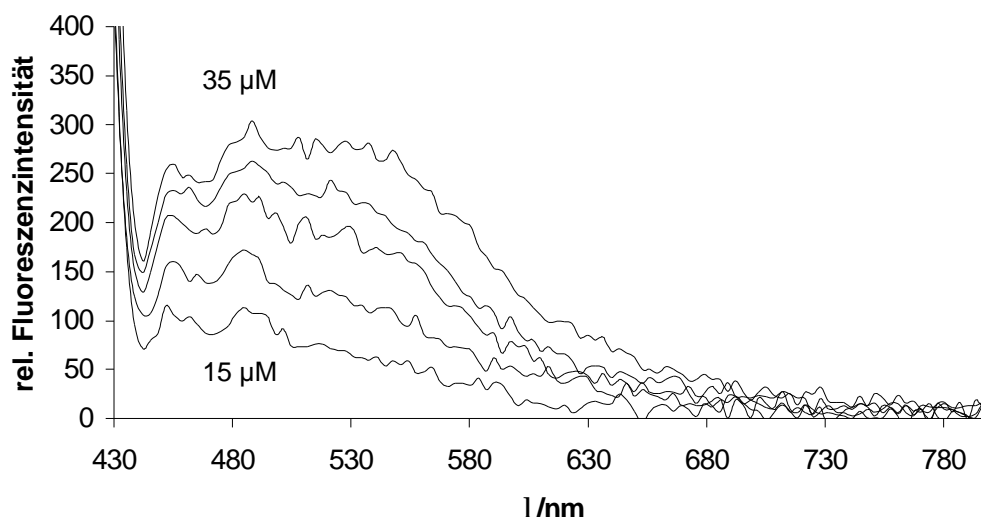
**Abbildung 18:** Anregungs (----)- und Emissions(—)-Fluoreszenzspektrum von **71b** nach Reaktion von 50 µM **71** mit 100 µM NO in Phosphatpuffer pH 7.30, in Gegenwart von 0.2% SDS und 100 µM Ascorbat,  $\lambda_{exc.} = 350$  nm,  $\lambda_{em.} = 380, 400, 420$  nm)

Wie eingangs beschrieben zeigt das auf Phenanthrenbasis synthetisierte dimethylamino-substituierte FNOCT **29** bereits eine Fluoreszenz des *o*-chinoiden Systems. Diese Fluoreszenz ist zwar deutlich schwächer als die der NO-Abfangprodukte, doch konnte sie vorteilhaft für sogenannte Ratio-Messungen eingesetzt werden, bei denen gleichzeitig die Abnahme der Fluoreszenzbande des *o*-chinoiden Systems und der Aufbau der Fluoreszenz des gebildeten Hydroxylamins gemessen wird. Die Pyren-Fänger-Systeme **71** bis **74** zeigten ebenfalls eine schwache Fluoreszenz im langwelligen Bereich um 500 nm. Es musste geklärt werden, ob es sich hierbei tatsächlich um die Fluoreszenz des *o*-chinoiden Systems oder um andere Effekte handelt (z. B. Aggregation). Abbildung 19 zeigt die im langwelligen Bereich auftretende Fluoreszenzbande. Diese Fluoreszenz sollte nach NO-Zugabe verschwinden bzw. sich verringern, wenn das FNOCT bereits fluoreszieren würde. Dieses Verhalten konnte allerdings nicht beobachtet werden. Eine Fluoreszenz des *o*-chinoiden Systems des Pyren-FNOCT konnte demnach nicht nachgewiesen werden. Im UV/Vis-Spektrum konnte hingegen bei der Zugabe von Stickstoffmonoxid das Verschwinden der charakteristischen *o*-Chinodimethanbande verfolgt werden. (Dieses ist auch Grundlage der kinetischen Messungen bezüglich der Abfanggeschwindigkeit der Fängersysteme **71** und **73**, welche in Kapitel 3.5 ausführlich diskutiert werden.)



**Abbildung 19:** Anregungs (----)- und Emissions(—)-Fluoreszenzspektrum der FNOCT-Säure **71** in Phosphatpuffer pH 7.3 (50  $\mu$ M,  $\lambda_{\text{exc.}}$  = 445 nm,  $\lambda_{\text{em.}}$  = 550 nm)

Die Intensität der langwelligen Bande in Abbildung 19 zeigte nur eine geringe Zeitabhängigkeit. Sie stieg innerhalb von 40 Minuten um ca. 50 % bis zu einem konstanten Wert an. Die Aggregatbildung scheint zu diesem Zeitpunkt abgeschlossen zu sein. Abbildung 20 zeigt die Aggregatbildung in Abhängigkeit der Konzentration von **71**.

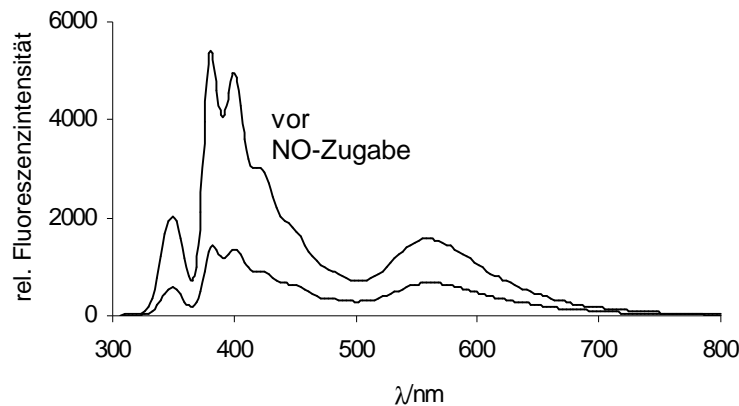


**Abbildung 20:** Aggregatbildung (Excimer-Banden) als Funktion der Konzentration der Pyren-FNOCT-Säure **71** (15, 20, 25, 30, 35  $\mu\text{M}$ , Phosphatpuffer pH 7.30, 100  $\mu\text{M}$  DTPA, Messung nach 60 min,  $\lambda_{\text{exc.}}$  = 420 nm,  $\lambda_{\text{em.}}$  = 520 nm)

Wie für eine Aggregatbildung zu erwarten, ist die Intensität dieser Bande konzentrationsabhängig. Die Aggregatbildung könnte allerdings Einfluss auf die NO-Abfangeigenschaften von **71** haben. Sofern die Aggregate in einem schnellen reversiblen Gleichgewicht mit dem monomeren Fänger existierten, könnte ihr Vorhandensein ignoriert werden, da die Reaktion mit NO das Gleichgewicht in Richtung des Monomeren verschieben würde. Um dieses zu testen wurden die oben beschriebenen FNOCT-Lösungen mit einem Überschuss an NO und Ascorbinsäure versetzt. Die Abbildung 21 zeigt die NO-Zugabe zu einer Lösung an Py-FNOCT-Säure **71** nach 60 Minuten. Es ist kein Verschwinden der langwelligen Bande festzustellen. Deshalb ist davon auszugehen, dass die gebildeten Aggregate den NO-Abfang behindern. In THF-Lösung konnte keine



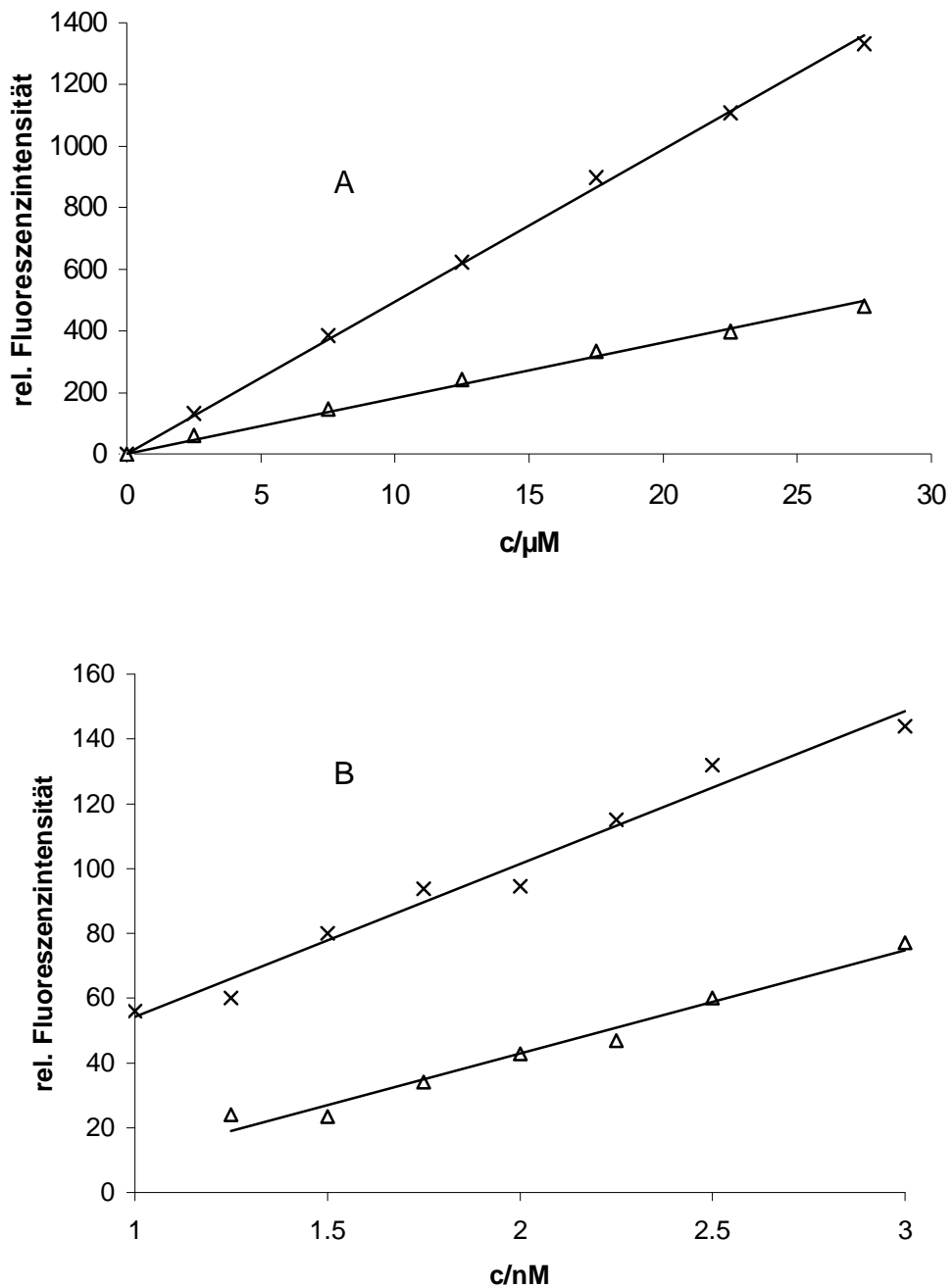
langwellige Bande detektiert werden, d.h. hier scheint es zu keiner Aggregatbildung zu kommen. Dieses beweist, dass es sich um einen Effekt handelt, der nur im wässrigen System auftritt, wie es auch von Mohr<sup>[87]</sup> beobachtet wurde.



**Abbildung 21:** Emissions(—)-Fluoreszenzbande der FNOCT-Säure **71** in Phosphatpuffer pH 7.30 (50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M DTPA, Messung nach 60 Minuten vor und nach NO-Zugabe,  $\lambda_{\text{exc.}}$  = 345 nm,  $\lambda_{\text{em.}}$  = 380 nm)

Es wurden Versuche durchgeführt um das Auftreten der Aggregate zu verhindern. Eine 25  $\mu$ M Lösung von FNOCT **71** in Phosphatpuffer<sup>[75]</sup> (pH = 7.30) wurde mit unterschiedlichen Zusätzen versetzt. Ein Zusatz von Ethanol brachte keinen Effekt. Beim Zusatz von Pluronic-F-127 und SDS konnte jedoch die Bildung der Aggregate (Excimer-Banden) unterdrückt werden. Für die Pyren-FNOCT-Säure **66** und der *tert.*-Butyl-Pyren-FNOCT-Säure **73** stellte sich als Optimum ein Zusatz von 0.2 % SDS oder 0.02 % Pluronic-F-127 heraus, wobei SDS im zellulären System nicht Anwendung finden kann, da die Zellen zerstört werden.

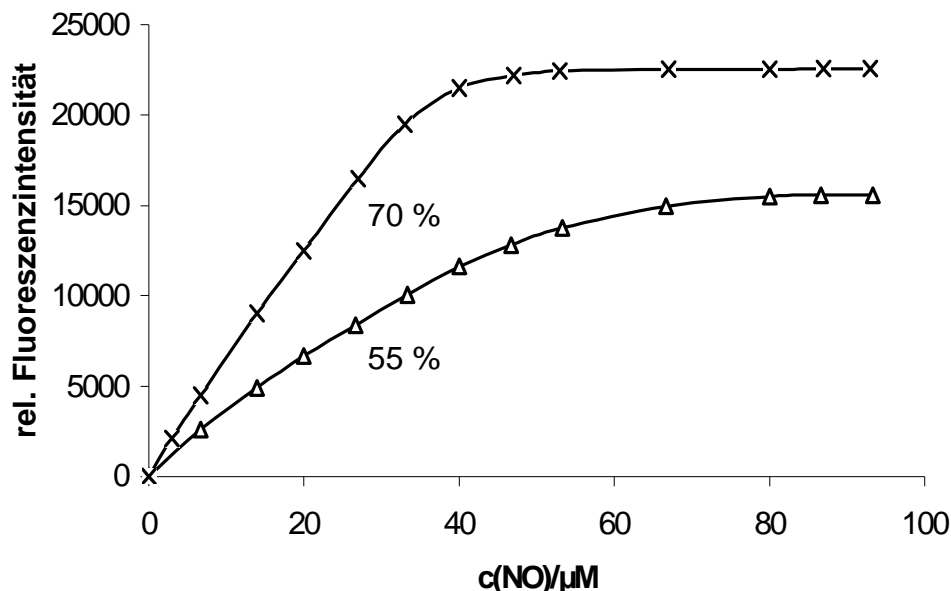
Der Zusatz von 0.2 % SDS als Lösungsvermittler führt dazu, dass die Fluoreszenz der NO-Abfangprodukte **71b** und **73b** einen streng linearen Konzentrationsverlauf bis zu einer Konzentration von 30  $\mu$ M zeigen (Abbildung 22). Diese Linearität ist eine wichtige Voraussetzung um die abgefangenen Stickstoffmonoxid-Menge quantifizieren zu können.<sup>[88]</sup> Aus Abbildung 22 ergibt sich für die Fängersysteme **71/71b** und **73/73b** eine Detektionsgrenze von 1.0 nm bzw. 1.25 nm für wässrige Lösungen.



**Abbildung 22:** Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität von der Konzentration der Hydroxylamine **71b** (--x--) und **73b** (--Δ--) in Phosphatpuffer pH 7.30, 0.2 % SDS (23°C,  $\lambda_{\text{exc.}} = 350 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 380, 400, 420 \text{ nm}$ ) mit 100 µM NO und 100 µM Ascorbat, (A) für den mikromolaren und (B) für den nanomolaren Bereich

Um die abgefangene Stickstoffmonoxid-Menge quantifizieren zu können, ist das Erstellen einer Kalibrationsgeraden notwendig. Von der Fluoreszenzintensität nach der Reaktion des Fängersystems mit NO unter Zusatz von

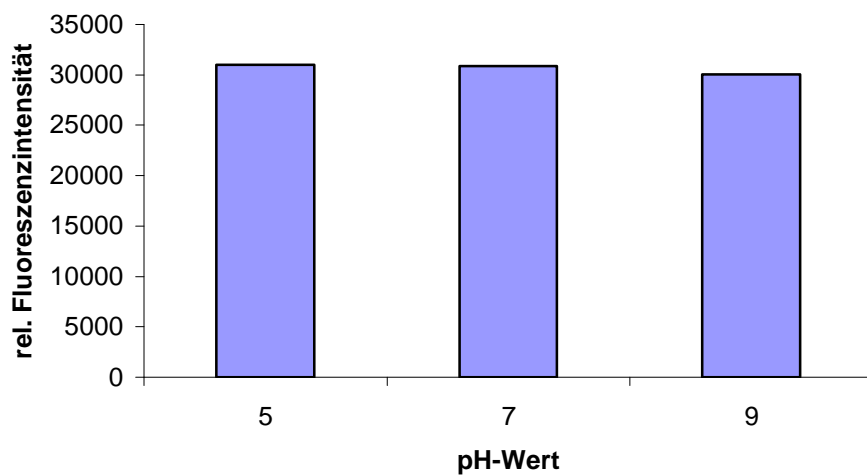
Reduktionsäquivalenten, kann die Konzentration des Stickstoffmonoxides in der Probelösung bestimmt werden. Eine solche Kalibrierung auf intrazellulärer Ebene ist jedoch wegen der hohen Diffusionsgeschwindigkeit von NO durch die Zellmembran und der hohen Reaktivität des Stickstoffmonoxides problematisch. Die Quantifizierung im Zellüberstand oder im chemischen System sollte aber ohne weiteres möglich sein. Zu einer Lösung des *o*-Chinodimethans **71** oder **73** wurden unterschiedliche Mengen einer gesättigten NO-Lösung gegeben. Die Fängerkonzentration betrug 25  $\mu\text{M}$  mit einem Zusatz an 0.2 % SDS. Die Abfangreaktion wurde fluoreszenzspektroskopisch bei  $\lambda_{\text{exc.}} = 350 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 380, 400, 420 \text{ nm}$  verfolgt. Die Moleküle **71** und **73** zeigen einen asymptotischen Verlauf der Fluoreszenzintensität zu einem Maximum. Der Abfang von NO durch das Fängersystems ist allerdings nicht quantitativ. Diese Erkenntnis muss bei der Quantifizierung der NO-Menge Berücksichtigung finden. Von dem zugesetzten NO wird 55 bzw. 70 % vom jeweiligen *o*-Chinodimethan (**71** bzw. **73**) abgefangen (Abbildung 23).



**Abbildung 23:** Bestimmung der abgefangenen Stickstoffmonoxid-Menge bei gleichbleibender Fängerkonzentration von 25  $\mu\text{M}$  **71** (--x--), 25  $\mu\text{M}$  **73** (--Δ--) in Phosphatpuffer pH 7.30, 0.2 % SDS. Der Anteil an abgefangenem Stickstoffmonoxid bei 25  $\mu\text{M}$  NO ist in Prozent angegeben.

Die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Lösungsmittelpolarität und von dem pH-Wert sind weitere wichtige Faktoren, die berücksichtigt werden müssen. Bei der Variation der Lösungsmittel (THF, Methanol, Ethanol, DMSO) konnte nur eine geringe Verschiebung von ca. 15 nm der Fluoreszenzbanden in den langwelligen Bereich, verglichen mit dem wässrigen System, festgestellt werden. Es konnte eine Verschiebung der Emissionsbande in Ethanol und Methanol von 15 nm in den langwelligen Bereich beobachtet werden. In unpolaren Lösungsmitteln lag die Verschiebung im Bereich von 10 nm. Die Fluoreszenzintensität blieb in allen Fällen auf vergleichbarem Niveau. Die Variation des Lösungsmittels, kann als Modellsystem für die Änderung der Fluoreszenzeigenschaften des FNOCTs bei Einlagerung in die Zellmembran betrachtet werden, da sich in solch einem Fall die Polarität spontan ändert.

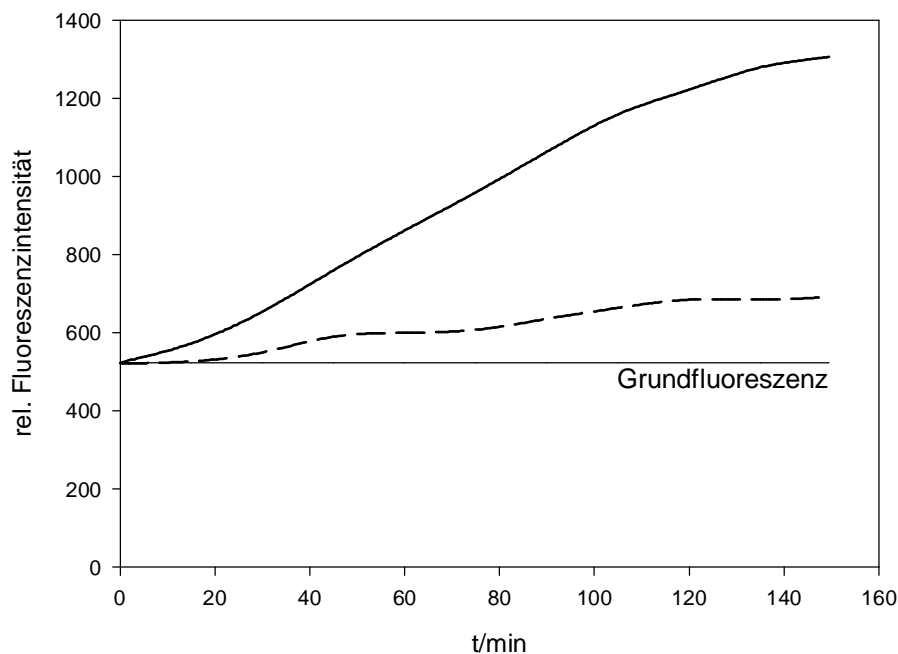
Physiologische pH-Werte liegen im Bereich von 7.0 bis 7.2, bei pathophysiologischen Bedingungen kann der pH-Wert auf 6.2 bis 6.5 absinken. Es ist somit wichtig die pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz des Fängersystems zu kennen, da die Abhängigkeit des Testsystems vom pH-Wert aufwändige Kalibrierungen zur Folge haben würden, bzw. zu hohen Ungenauigkeiten bei der Quantifizierung führen würde. Die Fluoreszenzintensitäten der pyrensubstituierten Fängersysteme erwiesen sich jedoch als pH-insensitiv in weiten pH-Bereichen von pH 6.0 bis pH 9.0 (Abbildung 24). Die Messungen wurden in sauerstofffreien Pufferlösungen pH 5.6 (Acetatpuffer), 7.35 (Phosphatpuffer) und 9.0 (Borat/KCl/NaOH-Puffer) durchgeführt. Hierbei wurde das Keton **67** verwendet, da seine Fluoreszenz mit dem NO-Abfangprodukt **71b** übereinstimmt. Die Fluoreszenzintensitäten einer 25  $\mu$ M Lösung des Ketons **67** waren in den unterschiedlichen Puffersystemen nahezu identisch.



**Abbildung 24:** Untersuchung der pH-Unabhängigkeit von 25  $\mu\text{M}$  Keton **67** bei 23  $^{\circ}\text{C}$  in Pufferlösungen pH 5.6 (Acetatpuffer), 7.35 (Phosphatpuffer) und 9.0 (Borat/KCl/NaOH-Puffer),  $\lambda_{\text{exc.}} = 350 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 400 \text{ nm}$

### 3.4.2.3 Stabilität der Pyren-FNOCT-Säure **71**

Um die Stabilität der Pyren-FNOCT-Säure im wässrigen System zu ermitteln wurde eine 25  $\mu\text{M}$  Lösung von **71** mit einer 50  $\mu\text{M}$  Ascorbat-Lösung und 0.2 % SDS als Lösungsvermittler versetzt und über einen Zeitraum von mehreren Stunden die Änderung der charakteristischen Fluoreszenzbande des Pyren-Fluorophors bei  $\lambda_{\text{exc.}} = 350 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em.}} = 380 \text{ nm}$  verfolgt. Diese Bande sollte nach Reaktion mit Stickstoffmoxid (Bildung des Hydroxylamins **71b**) oder einer eventuellen 1,5-H-Verschiebung (Bildung von **75**) zu beobachten sein. Gleichzeitig wurde der charakteristische Fluoreszenzbereich eventueller Aggregate bei  $\lambda_{\text{exc.}} = 445 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 550 \text{ nm}$  überprüft. Diese Fluoreszenz war nicht zu beobachten, was auf die gute Löslichkeit durch die Verwendung von 0.2 % SDS zurückzuführen ist. Bleibt die detektierte relative Fluoreszenzintensität zeitlich weitgehend konstant, kann man davon ausgehen, dass der Fänger in Lösung stabil ist und es nicht zu unerwünschten Nebenreaktionen, wie der 1,5-H-Verschiebung kommt.

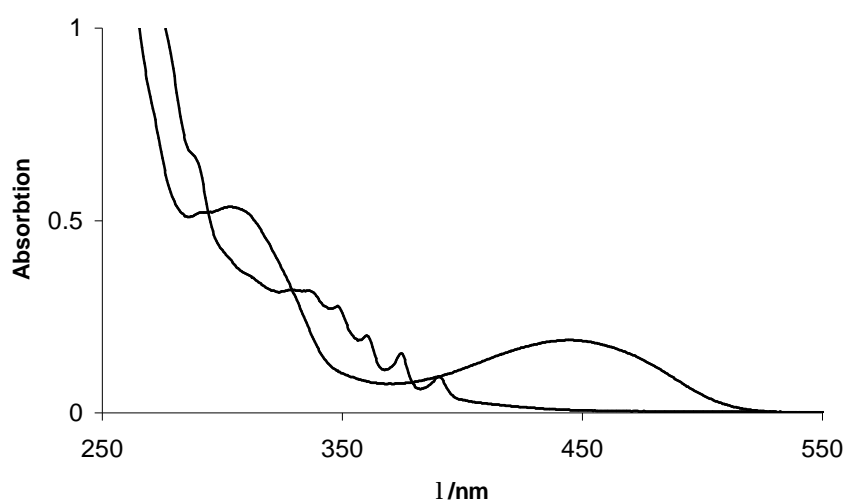


**Abbildung 25:** Langzeit-Stabilität der Lösung der 25  $\mu\text{M}$  Pyren-FNOCT-Säure **71** bei 23  $^{\circ}\text{C}$  mit 100  $\mu\text{M}$  Ascorbat-Lsg. in Phosphatpuffer,  $\lambda_{\text{exc.}} = 350 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 400 \text{ nm}$ , 0.2 % SDS, (—)-mit 100  $\mu\text{M}$  DTPA, (----)-ohne Zusatz von 100  $\mu\text{M}$  DTPA

Der Fänger erweist sich als recht stabil. Das zeitlich konstante Fluoreszenzsignal bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Fluoreszenzwellenlänge von 380 nm, entsprechend dem Hydroxylamin **71b** liefert den Nachweis der Fängerstabilität. Aus Abbildung 25 ist ersichtlich, dass innerhalb von 140 min nur eine geringe Änderung der Fluoreszenzintensität von 3% zu beobachten ist (bezogen auf die Maximalfluoreszenz nach NO-Abfang). Bei Zugabe des Eisenchelators DTPA wird der geringe Anstieg der Fluoreszenz weiter unterdrückt und die Änderung liegt bei nur 1%. Die genaue Ursache für den positiven Effekt dieser Substanz ist allerdings noch ungeklärt. Bei längeren Messungen sollte somit 100  $\mu$ M dieses Chelators dem Reaktionssystem hinzugegeben werden.

### 3.5 UV/Vis-spektroskopische Untersuchungen der Pyren-Fängersysteme

Eine hohe Reaktivität der Fängersysteme gegenüber Stickstoffmonoxid ist ein wichtiges Kriterium für die Anwendung zum Nachweis von NO in biologischen Systemen. Wird NO nicht hinreichend schnell abgefangen, kann es durch Sauerstoff oxidiert werden und/oder an Übergangsmetallkomplexe, wie zum Beispiel an Häm koordiniert werden.<sup>[89]</sup> Die Kinetik der Reaktion der FNOCT-Säuren **71** und **73** mit NO in Phosphatpuffer pH 7.30<sup>[75]</sup> wurde UV/Vis-spektrometrisch durchgeführt. Die Abnahme des Absorptionsmaximums der *o*-chinoiden Verbindung bei  $\lambda = 440$  nm ermöglicht eine Beobachtung des Reaktionsverlaufes, da die Abfangprodukte in diesem Bereich keine Absorption aufweisen. Die Messungen erfolgten in Abwesenheit von Luftsauerstoff um Verfälschungen durch Autoxidation des NO zu vermeiden. In Abbildung 25 sind die Absorptionsspektren des *o*-Chinodimethans **71** und des Hydroxylamins **71b** in Phosphatpuffer pH 7.30<sup>[75]</sup> gezeigt. In vielen Fällen sind die UV/Vis-Absorptionsbanden bei aromatischen Systemen fluoreszenzaktiv.<sup>[90]</sup> Dabei entsprechen diese Banden der Anregungswellenlänge der Fluoreszenz. Das Pyrensystem zeigt dieses Verhalten allerdings nicht (siehe Kapitel 3.4.1).



**Abbildung 26:** UV/Vis-Spektrum von 25 µM Pyren-FNOCT-Säure **71** in Phosphatpuffer pH 7.3, 0.2 % SDS, vor und nach Zugabe von NO. Die *o*-chinoide Bande bei 445 nm verschwindet sofort nach NO-Zugabe



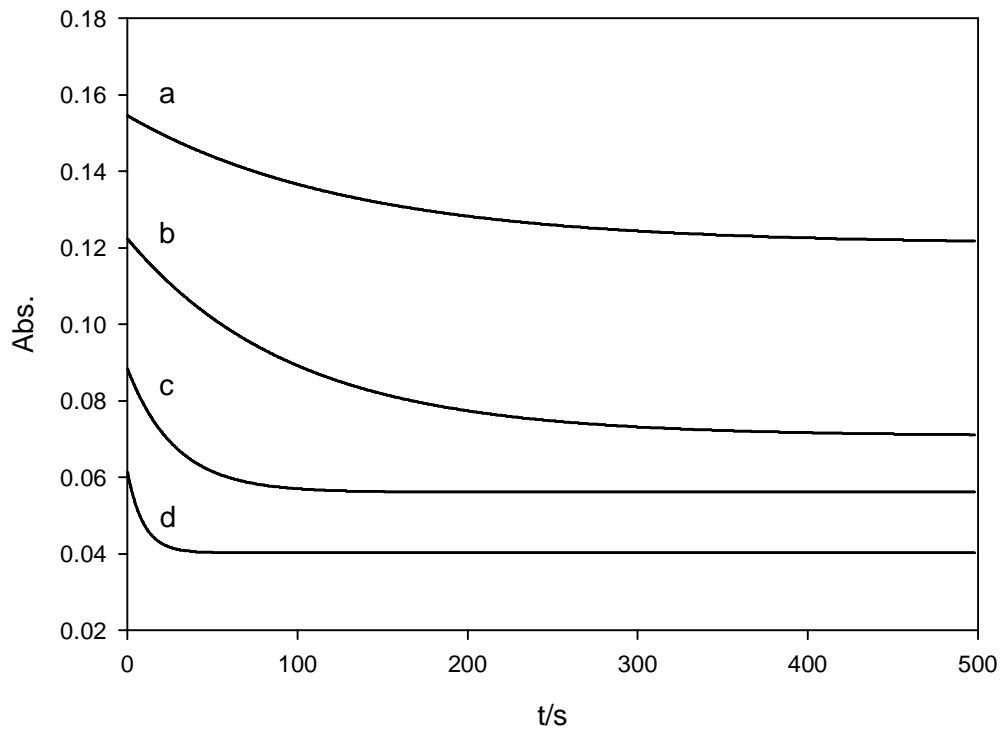
Die Konzentration der Lösungen wurde so gewählt, dass die Reaktion unter Bedingungen pseudo-1. Ordnung ablief. Die Konzentration des Stickstoffmonoxids in Phosphatpuffer<sup>[75]</sup> (pH = 7.30) war hierbei 10 bis 100 mal grösser als die Fängerkonzentration (25  $\mu\text{M}$ ). Aufgrund eines signifikanten Lösungsmittelleffektes in Wasser musste die Messzeit im Vergleich zur Reaktion in THF auf bis zu 8 Minuten verlängert werden. Es wurden Aliquote einer bei 21 °C gesättigten NO-Phosphatpufferlösung verwendet, deren Sättigungskonzentration  $2.0 \times 10^{-3}$  M beträgt.<sup>[84,91]</sup> Die experimentellen Geschwindigkeitskonstanten pseudo-1. Ordnung wurden bei vier verschiedenen NO-Konzentrationen gemessen (Abbildung 27) und die konzentrationsabhängigen Geschwindigkeitskonstanten gegen die NO-Konzentrationen aufgetragen (Abbildung 28). Aus der Steigung  $m$  der linearen Abhängigkeit errechnete sich eine Geschwindigkeitskonstante 2. Ordnung von

$$m = k_2 = \frac{k_{\text{exp}}}{[\text{NO}]}$$

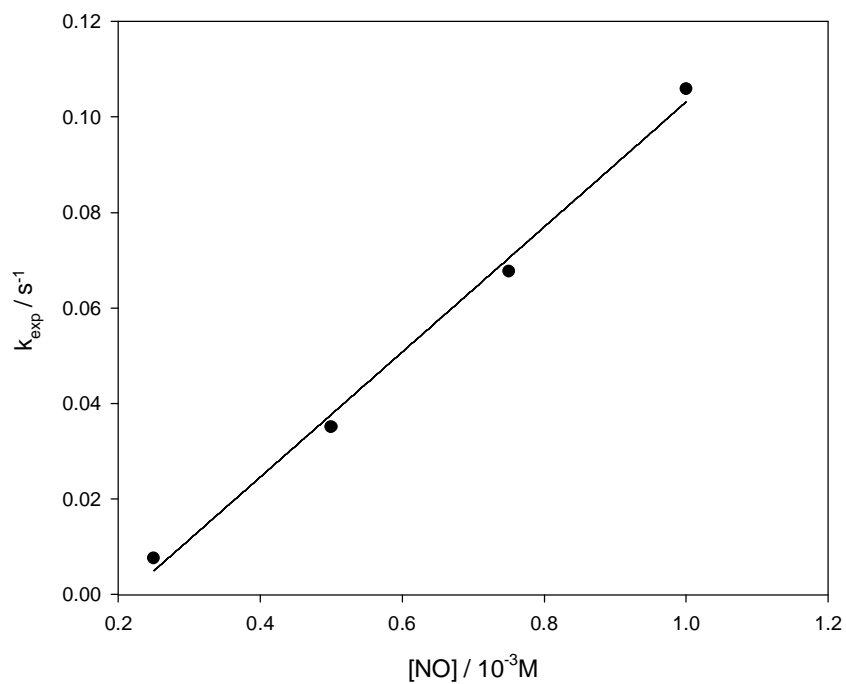
$$k_{2(71)} = 130 \pm 7 \text{ Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$$

$$k_{2(73)} = 180 \pm 5 \text{ Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$$

Die bestimmten Geschwindigkeitskonstanten von **71** und **73** in Phosphatpuffer pH 7.30<sup>[75]</sup> sind um 25 % größer, als die des von Meineke<sup>[57]</sup> hergestellten Fängersystems **29**. Dies zeigt, dass die Erweiterung des *o*-chinoiden Fängersystems von Phenanthren auf Pyren sich nur unwesentlich auf die Abfanggeschwindigkeit auswirkt.



**Abbildung 27:** Abnahme der  $\alpha$ -Chinodimethanbande bei 445 nm in Phosphatpuffer pH 7.30 nach Zugabe von NO-Lösungen unterschiedlicher Konzentration (a:  $c_{(\text{NO})} = 0.25 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ , b:  $c_{(\text{NO})} = 0.5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ , c:  $c_{(\text{NO})} = 0.75 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ , d:  $c_{(\text{NO})} = 1.0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ), 0.2 % SDS, 25  $\mu\text{M}$  Py-FNOCT-Säure **71**.



**Abbildung 28:** Auftragung der experimentellen Geschwindigkeitskonstanten pseudo-1. Ordnung für **71** gegen die NO-Konzentration.

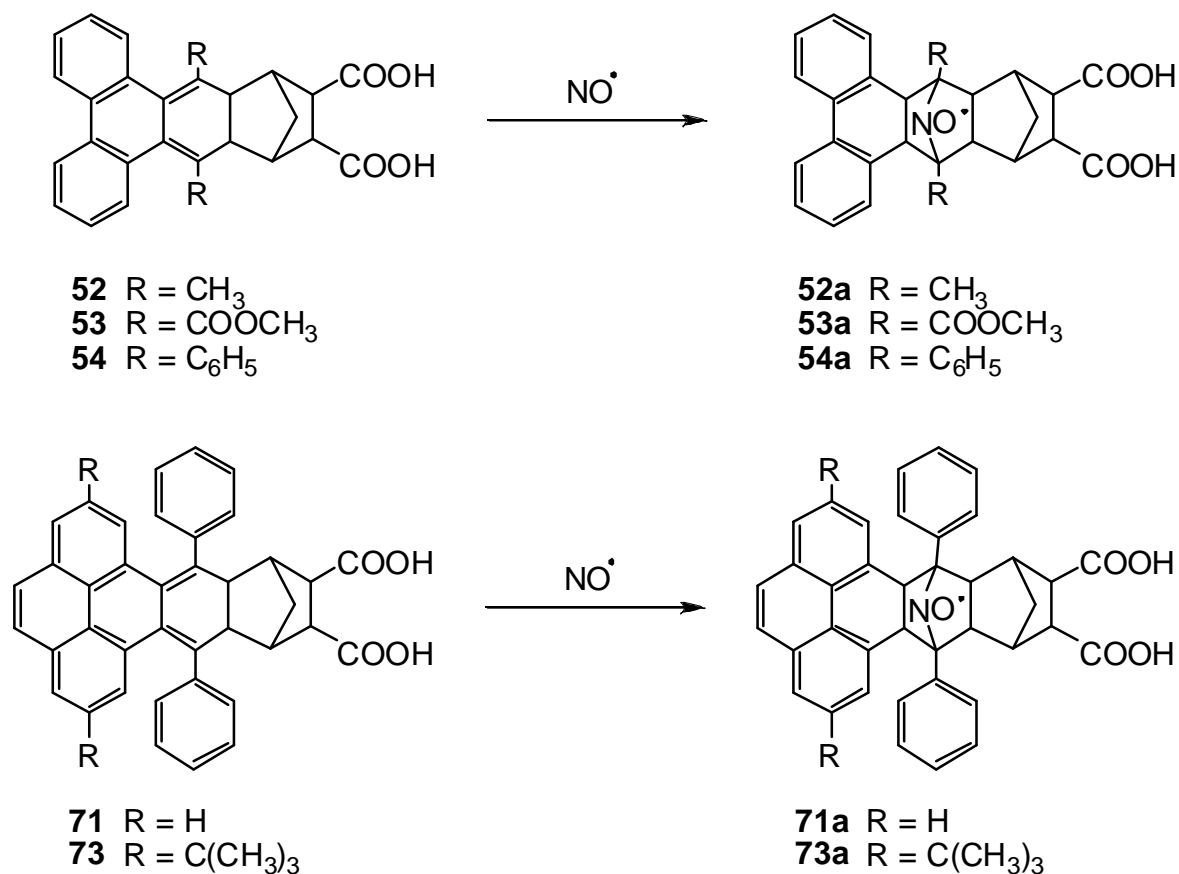
Die Verfolgung der Reaktion muss unter Schutzatmosphäre erfolgen. Bei Anwesenheit von Luftsauerstoff wird das NO zu  $N_2O_3$  bzw.  $NO_2$  oxidiert. Aufgrund der reaktiven Kohlenstoffatome zwei und sieben am Pyrensystem kommt es wahrscheinlich zur Nitrierung. Dieser Effekt konnte allerdings nur in THF-Lösungen von **71** beobachtet werden. Die entstandene Verbindung zeigt keine Fluoreszenz weshalb die Kinetikmessungen der unsubstituierten Pyren-FNOCT-Säure **71** nur in Phosphatpuffer pH 7.30<sup>[75]</sup> stattfinden konnten. Das substituierte System *ditert.*-butyl-Pyren-FNOCT-Säure **73** kann ohne Probleme in THF oder anderen organischen Lösungsmitteln vermessen werden. Das weist auf die postulierte Vermutung der Nitrierung hin. Beim substituierten Fängersystem **73** ist die zweier- und siebener- Position durch tert.-Butylgruppen blockiert. Dort kann das Nitrosylkation nicht angreifen und die Fluoreszenz des aromatischen Systems löschen.

Die dargestellten *o*-Chinodimethane **71** und **73** weisen eine hohe thermische Stabilität auf (vgl. Kapitel 3.4.2.4). Dieses ist ein großer Vorteil beim Einsatz der Pyren-FNOCTs für Langzeitmessungen, speziell bei biologischen Fragestellungen. Die hohe Stabilität geht aber zu Lasten der Abfanggeschwindigkeit von Stickstoffmonoxid. Diese Rahmenbedingungen sollten bei der Syntheseplanung weiterer FNOCTs berücksichtigt werden, damit die Stabilität nicht zulasten der Reaktivität geht.

### 3.6 Reaktion des FNOCT **52** bis **54** und **71**, **73** mit Stickstoffmonoxid unter ESR-spektroskopischer Detektion

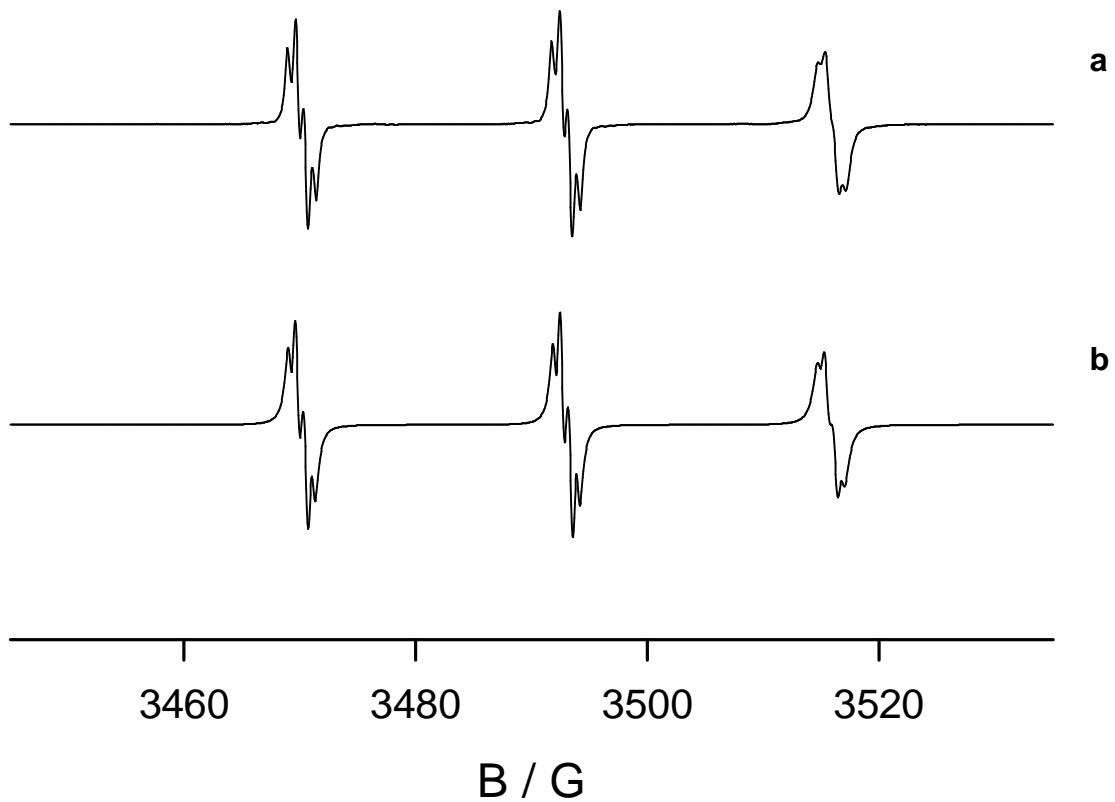
Die Fänger-Substanzen **52** bis **54** und **71**, **73** reagieren mit Stickstoffmonoxid zu überbrückten Nitroxidradikalen (Schema 40). Damit können sie mit Hilfe der ESR-Spektroskopie nachgewiesen werden und man erhält weitere Daten zur Strukturaufklärung der untersuchten Substanzen. Die Abfangversuche wurden mit Stickstoffmonoxid unter Ausschluss von Sauerstoff durchgeführt, um die sonst stattfindende Oxidation von NO zu vermeiden. Das Stickstoffmonoxid (Reinheit 99.8 %) wurde zur Reinigung über Ascarite<sup>®</sup> und durch eine 20 prozentige NaOH-Lösung geleitet. Zur ESR-spektroskopischen Vermessung wurde unter Schutzgas eine 4 mM FNOCT-THF-Probe (Photolyse-Lösung) mittels einer gasdichten Spritze in ein Suprasil-ESR-Röhrchen mit Septum überführt und mit gesättigter NO-THF-Lösung im Überschuss vermischt.

Schema 40

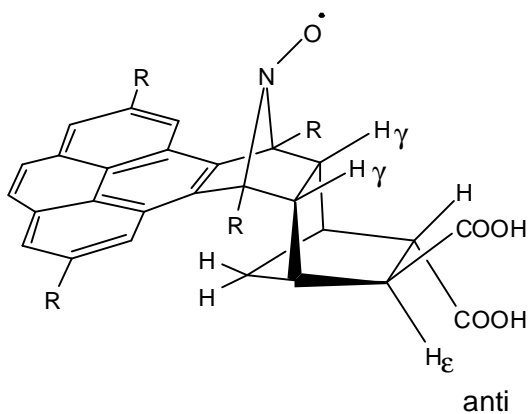


Die Elektronenspinresonanz liefert die Grundlage für eine wichtige und empfindliche analytische Methode der Spektroskopie durch Messung der paramagnetischen Eigenschaften von Atomen oder Molekülen im Magnetfeld. Die bei Raumtemperatur aufgenommenen ESR-Spektren der Pyren-FNOCTs **71a** und **73a** mit NO (Abbildung 29) sind identisch und zeigen eine charakteristische 1:1:1-Aufspaltung, bedingt durch die Kopplung mit dem  $^{14}\text{N}$ -Kern. Die Stickstoffkopplung von 22.86 G und der  $g$ -Wert von 2.00618 weist auf das Vorliegen eines Brücken-Nitroxid-Radikals hin. Für bekannte Nitroxide dieses Typs wurden Hyperfeinaufspaltungen des  $^{14}\text{N}$ -Kerns zwischen 20.00 bis 23.10 G und  $g$ -Werte von ca. 2.006 angegeben.<sup>[92]</sup>

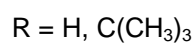
Die Hyperfeinaufspaltung der Wasserstoffatome konnte durch Simulation des Spektrums bestimmt werden. Die Triplett-Hyperfeinaufspaltung der  $^{14}\text{N}$ -Signale (0.69 G) und die zusätzliche Dublett-Hyperfeinaufspaltung (0.47 G) resultieren aus der Wechselwirkung des ungepaarten Elektrons mit den beiden äquivalenten  $\gamma$ -Wasserstoffatomen und einem  $\varepsilon$ -Wasserstoffatom. Die Tripletttaufspaltung von 0.69 G, lässt auf eine *exo*-ständige Konfiguration der Protonen schließen. Bei *endo*-ständiger Konfiguration wäre aufgrund der „W“-förmigen Bindungsanordnung eine etwas größere Hyperfeinaufspaltung zu erwarten gewesen.<sup>[93]</sup> In dem ESR-Spektrum ist zusätzlich ein Dublett zu erkennen, aus dem weitere Strukturmerkmale erhalten werden. Die relativ große Dublettaufspaltung von 0.47 G entsteht aus der Fernkopplung des ungepaarten Elektrons mit dem  $\varepsilon$ -Proton, welches in *anti*-Stellung zum Radikalzentrum angeordnet ist (doppel-„W“-Anordnung). Die Hyperfeinaufspaltung des Nitroxid-Radikals **71a** und **73a** lässt somit auf eine *anti-endo*-Struktur (Abbildung 30) schließen. Daraus resultiert, dass der Angriff des Stickstoffmonoxids auf das *o*-Chinodimethan-Gerüst jeweils von der sterisch weniger beanspruchten Seite her verlaufen sollte.



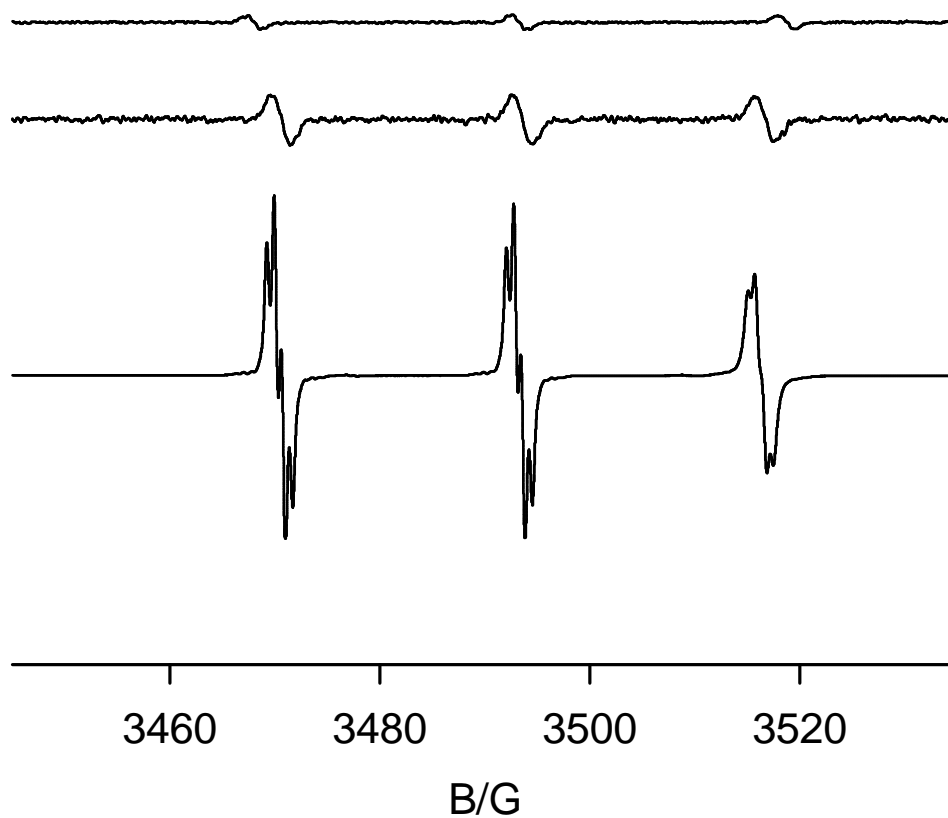
**Abbildung 29:** Experimentelles (a) und simuliertes (b) ESR-Spektrum des Nitroxid-Radikals **71a** in THF bei 23 °C [ $g = 2.00618$ ,  $a(^{14}\text{N}) = 22.81$ ,  $a(\text{H}_\gamma) = 0.69$ ,  $a(\text{H}_\epsilon) = 0.47$  G]



**Abbildung 30:** Konfiguration der *anti-endo*-Nitroxid-Radikale **71a** und **73a**



Unmittelbar nach der Zugabe von Stickstoffmonoxid bildete sich bei den Pyren-FNOCTs **71** und **73** die maximale Intensität der ESR-Signale aus. Dieser schnelle Anstieg wurde bereits bei anderen *o*-Chinodimethanen beobachtet.<sup>[94]</sup> Der Vergleich der Phenanthren-FNOCTs **52**, **53** und **54** lieferte zusätzliche Ergebnisse. Die strukturelle Gemeinsamkeit der Substanzen ist das Phenanthrengerüst, welches am cheletropen Fängersystem entweder mit einer Methylgruppe **52** einer Methoxycarbonylgruppe **53** oder einer Phenylgruppe **54** ausgestattet wurde. Wie bereits in Kapitel 3.4.1 beschrieben, bildete sich das Hydroxylamin **52** sehr langsam, was den verzögerten Anstieg der Fluoreszenzbande bei  $\lambda_{exc.} = 310 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em.} = 380 \text{ nm}$  erklärt. Der Fluoreszenzanstieg von **53** ist sehr gering. Die Methoxycarbonylgruppe hat einen deaktivierenden Einfluss auf die Abfangreaktion. Die Abbildung 31 zeigt den Vergleich der ESR-Spektren der Substanzen **52a** bis **54a** bei den gleichen Geräteeinstellungen und Konzentrationen wie in Abbildung 30. Alle Fängersysteme zeigen die charakteristische 1:1:1-Aufspaltung, welche durch die Kopplung mit dem <sup>14</sup>N-Kern entsteht. Die Stickstoff-Kopplung und die *g*-Werte weisen eindeutig auf Brücken-Nitroxid-Radikale hin (Tabelle 4). Es besteht aber ein großer Unterschied in der Intensität der Signale. Die Interpretation dieser Messergebnisse bestätigt die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen. Verbindung **54** reagiert schnell und mit hoher Intensität zum Nitroxidradikal. Der methylsubstituierte Fänger **52** reagiert nicht sehr schnell mit NO und die Radikalkonzentration ist geringer. Eine Lösung mit FNOCT **53** und Stickstoffmonoxid zeigt die geringste Nitroxidradikalkonzentration. Die Bildung der Nitroxide geht somit sehr stark in die Reaktionskinetik ein und wird damit zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion des FNOCT über das Nitroxid und der Reduktion zum Hydroxylamin. Dadurch geht der Aspekt der Erhöhung der Wasserlöslichkeit vollkommen zu Lasten des Abfangverhaltens.



**Abbildung 31:** Vergleich der ESR-Spektren der Nitroxid-Radikale **52a**, **53a** und **54a** in THF bei 23 °C

Nitroxid-Radikal	$g$ -Wert	Hyperfeinaufspaltung [G]	
		$a(^{14}\text{N})$	$a(\text{exo-H}\gamma)$
<b>54a</b>	2.00619(3)	22.86	0.678
<b>53a</b>	2.00619(3)	25.20	0.55
<b>52a</b>	2.0060(1)	22.90	0.51

**Tabelle 4:** ESR-Parameter der verbrückten Nitroxid-Radikale **52a**, **53a** und **54a** in THF bei 23 °C



## 4 Anwendung der Fängersysteme im biologischen System

Die synthetisierten NO-Fänger zeigen im chemischen System eine hohe Spezifität und eine hohe Sensitivität auf Stickstoffmonoxid. Die FNOCTs **71** und **73** sollen aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit für den Nachweis von Stickstoffmonoxid im Zellüberstand dienen. Die zugehörigen Acetoxymethylester **72** und **74** sind hydrophob und membrangängig und sollen für den intrazellulären NO-Nachweis angewendet werden. Da die Löslichkeit der auf Pyren basierten NO-Fänger **73** und **74** auch in Gegenwart von lösungsvermittelnden Substanzen wie z.B. Pluronic-F-127 zu gering war und die Substanzen eine hohe Neigung zu Aggregationseffekten zeigten, wurden Untersuchungen mit diesen Verbindungen im biologischen System zurückgestellt. Für diese Untersuchungen wurden die unsubstituierten Fänger **71** und **72** verwendet.

### 4.1 Nachweis von exogen generiertem Stickstoffmonoxid in Fibroblasten

#### 4.1.1 Vitalitätsbestimmung der Zellen

Für die erfolgreiche Anwendung der NO-Fänger in biologischen Systemen ist die Toxizität ein entscheidendes Kriterium. Hier wurde das Verhalten der Fibroblasten vom Typ L929 auf den Pyren-FNOCT-Ester **72** und die Pyren-FNOCT-Säure **71** untersucht. Über die Färbung mit Alamar-Blue kann die metabolische Aktivität der Zellen untersucht werden. Eine Schädigung der Plasmamembran kann dazu führen, dass aufgenommener Fänger wieder ausleckt. Weiterhin können cytosolische Proteine in den extrazellulären Raum gelangen und Fluoreszenzmessungen der Zellen nur bedingt funktionieren. Die Toxizität von FNOCT **71** und **72** auf die Fibroblasten wurde weiterhin über mehrere Stunden durch die Messung der freigesetzten Lactat-Dehydrogenase (LDH)<sup>[96]</sup> untersucht. Das cytosolische Enzym wird im Zellüberstand gemessen und gibt einen direkten Zusammenhang zum Grad der Toxizität<sup>[97]</sup> von **71** und **72**. Bei den Untersuchungen wurden die Fibroblasten über drei, vier und fünf Stunden mit

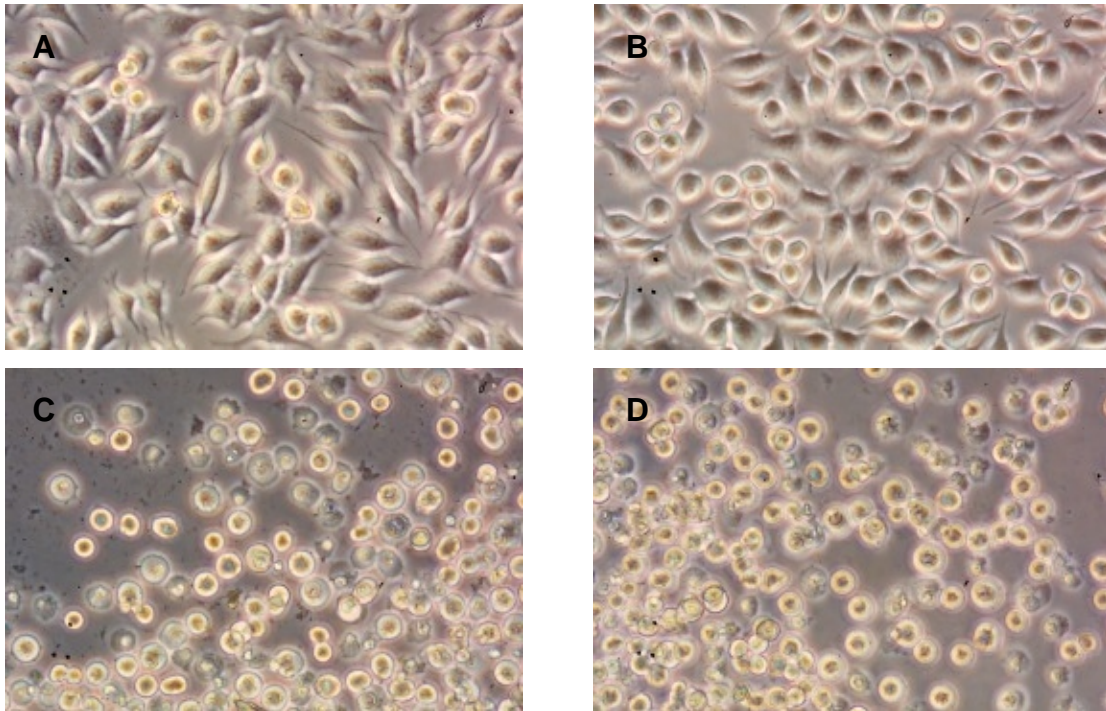
dem jeweiligen Fänger mit unterschiedlichen Konzentrationen beladen. Die Versuche wurden in wässriger Pufferlösung (KH, pH 7.35) durchgeführt.

Bei den Alamar-Blue Tests nach einer Stunde Beladung mit **71** bzw. **72** (10, 30, 50, 80  $\mu\text{M}$ ) zeigte sich, dass die metabolische Aktivität der Zelle zu 80 % intakt ist. Von intakten Zellen wird Alamar-Blue reduziert. Hierbei tritt ein Farbumschlag von blau nach rosa auf. Bei einer höheren Konzentrationen von 80  $\mu\text{M}$  Säure **71** und Ester **72** sank dieser Wert auf 70 % ab.

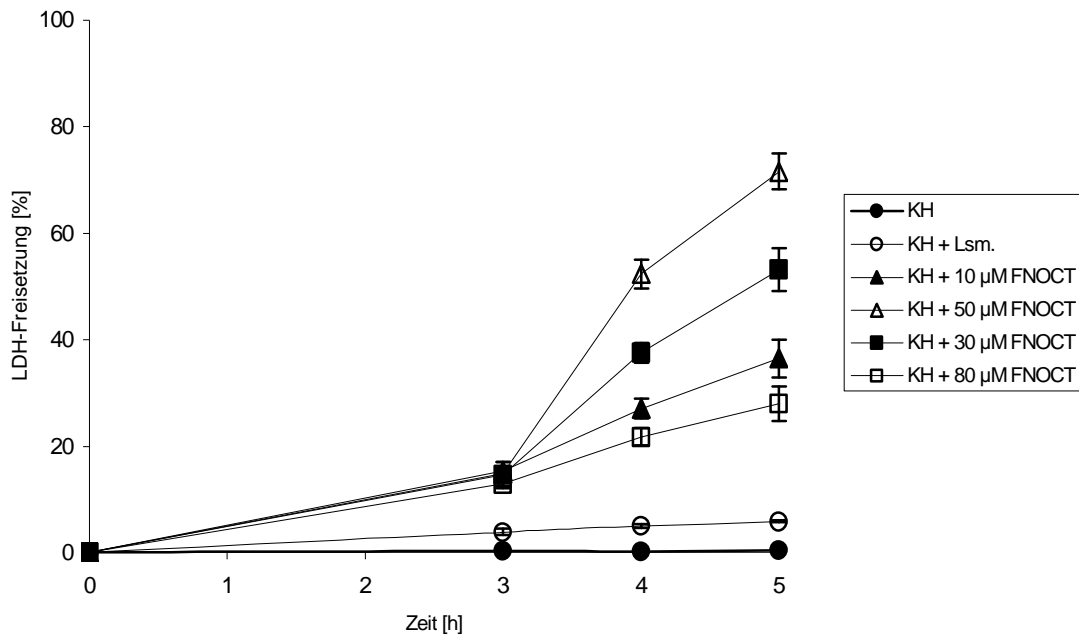
Diese Ergebnisse konnten auch durch mikroskopische Zellaufnahmen bestätigt werden. Abbildung 32 zeigt Fibroblasten, die mit unterschiedlichen Konzentrationen an FNOCT-Säure **71** eine Stunde beladen wurden. Bereits bei 50  $\mu\text{M}$  Fängerkonzentration zeigen sich Abkugelungen. Eine Konzentration von 80  $\mu\text{M}$  zeigt eine erhöhte Schädigung der Zellen. Viele Zellen haben sich bei diesem Versuch abgelöst oder wiesen Membranausstülpungen (Blebs) auf.

Abbildung 33 zeigt die LDH-Freisetzung der Fibroblasten nach Inkubation mit FNOCT **71** bei 37°C, 5.00 %  $\text{CO}_2/95$  % Raumluft, Luftfeuchtigkeit 100 %. Die Zellen wurden mit dem FNOCT **71** (Konzentration 10, 50, 30, 80  $\mu\text{M}$ ) beladen. Zur Verbesserung der Löslichkeit wurden 2 % DMSO und 0.02 % Pluronic-F-127 hinzugegeben. Als Lösungsmittelkontrolle wurden die Zellen mit KH bzw. KH mit 2 % DMSO und 0.02 % Pluronic-F-127 inkubiert. Eine Beladungskonzentration von 10  $\mu\text{M}$  zeigt bei einer Inkubationszeit von drei bis zu vier Stunden eine für Messungen noch tolerable Toxizität. Bei 30  $\mu\text{M}$  Fängerkonzentration sind ab einer Inkubationszeit von vier Stunden 40 % LDH-Freisetzung zu registrieren. Bei dieser und höheren Farbstoffkonzentration sollten die Zellen nicht länger mit dem Farbstoff behandelt werden, um beträchtliche Schädigungen zu vermeiden.

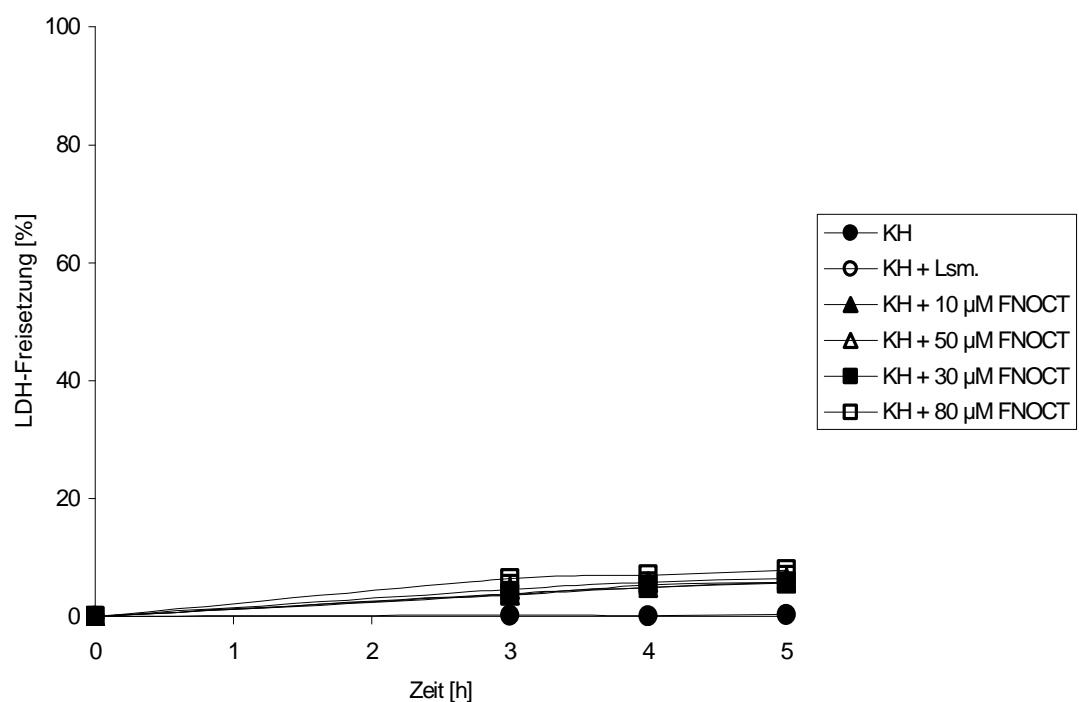
In Abbildung 34 ist die LDH-Freisetzung der Zellen nach Beladung mit FNOCT **72** bei 37°C, 5.00 %  $\text{CO}_2/95$  % Raumluft, Luftfeuchtigkeit 100 % dargestellt. Der Vorteil dieser Verbindung soll die Membrangängigkeit und deren Aggregation im Cytosol sein. Die Toxizität ist verglichen mit dem FNOCT **71** wesentlich geringer. Der Grund der verminderten Erhöhung der Fluoreszenzintensität verglichen mit der FNOCT-Säure **71** ist das schlechtere Lösungsverhalten. Der Fänger **72** fällt nach kurzer Zeit aus und kann nicht mit NO reagieren. Dadurch lässt sich auch die geringere Toxizität erklären.



**Abbildung 32:** Zellbilder von Fibroblasten L929 nach 1 Stunde Beladung (A: Kontrollmessung ohne FNOCT) mit 30  $\mu\text{M}$  (B), 50  $\mu\text{M}$  (C), 80  $\mu\text{M}$  (D) FNOCT-Säure **71** mit 2 % DMSO, 10 mM Glucose, 0.02 % Pluronic-F-127, 100  $\mu\text{M}$  DTPA in Phosphatpuffer pH 7.35



**Abbildung 33:** LDH-Freisetzung der beladenen Fibroblasten L929 mit FNOCT-Säure **71** (10, 50, 30, 80  $\mu\text{M}$ ), Beladungszeit: 1 Stunde, 37°C, 5.00 %  $\text{CO}_2/95$  % Raumluft, Luftfeuchtigkeit 100 % mit 2 % DMSO, 10 mM Glucose, 0.02 % Pluronic-F-127, 100  $\mu\text{M}$  DTPA in KH; n = 4



**Abbildung 34:** LDH-Freisetzung der beladenen Fibroblasten L929 mit FNOCT-Säure **72** (10, 50, 30, 80  $\mu\text{M}$ ), Beladungszeit: 1 Stunde, 37°C, 5.00 %  $\text{CO}_2/95$  % Raumluft, Luftfeuchtigkeit 100 % mit 2 % DMSO, 10 mM Glucose, 0.02 % Pluronic-F-127, 100  $\mu\text{M}$  DTPA in KH; n = 4

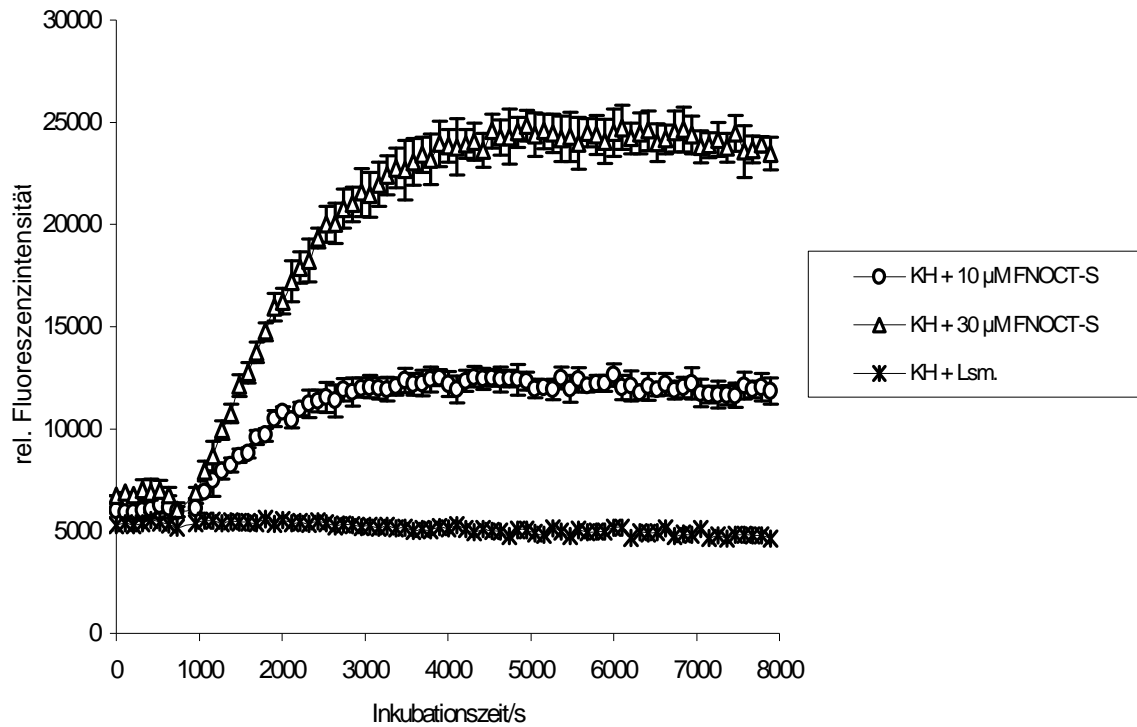
#### 4.1.2 Nachweis von Stickstoffmonoxid in beladenen Fibroblasten der Ratte

Der Nachweis von Stickstoffmonoxid in NO-Donor behandelten Fibroblasten (Mausfibroblasten, Zelllinie L929) diente der vergleichenden Gegenüberstellung der FNOCT-Säure (FNOCT-S) **71** und des FNOCT-Esters (FNOCT-AM) **72** im Hinblick auf deren Fängerverhalten und der Beladbarkeit der Zellen. Die Probengefäße, in denen die Zellen kultiviert werden, hatten einen Folienboden, um die störende Eigenfluoreszenz der normalerweise verwendeten Polystyrol-Kammern zu unterbinden. Somit war gewährleistet, dass auch kleine Fluoreszenzanstiege registriert werden konnten und nicht vom Grundsignal der Zellkulturplatten überdeckt wurden. Die Beladbarkeit und der NO-Abfang in den Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Pyren-FNOCT-Säure **71** und Pyren-FNOCT-Ester **72** wurde untersucht. Der NO-Fänger des membrangängigen Esters **72** soll sich erwartungsgemäß im Cytosol der Zelle anreichern und dort durch intrazelluläre Esterasen gespalten werden. Das dabei gebildete wasserlösliche Dicarboxylat sollte die Membran schlechter passieren können, was zu einer Akkumulation des Farbstoffes in den Zellen führen sollte. Die Versuche wurden mit Konzentrationen von 10, 20, 50, 80  $\mu\text{M}$  an FNOCT-Säure **71** und FNOCT-Ester **72** durchgeführt. In Vorversuchen hat sich gezeigt, dass der Fänger **71** ausreichend lipophil ist, um intrazellulär zu akkumulieren. Die Beladung der Zellen erfolgte in Gegenwart des Lösungsvermittlers Pluronic-F-127, zu dessen Anwendung eine 20-gewichtsprozentige Lösung in Dimethylsulfoxid eingesetzt wurde. Die Endkonzentration an Pluronic-F-127 betrug bei den Versuchen 0.02 %. Die Endkonzentration des zugesetzten Dimethylsulfoxids betrug 2 %, was auch seinen Anteil zur Lösungsverbesserung leistete. Ein Vormischen der FNOCT-Lösungen mit Pluronic-F-127 ist ratsam, da es sonst zur Ausfällung der Fängersubstanzen in der wässrigen Lösung kommen kann. Eine Beladungsdauer von einer Stunde stellte sich als Optimum für die Fibroblasten heraus. Die Beladung der Zellen wurde durch das Entfernen des überschüssigen Farbstoffes beendet. Hierzu wurden die Zellen mit HBSS dreimal gewaschen. Die Eigenfluoreszenz der beladenen Fibroblasten, hervorgerufen durch Verunreinigungen wie Restketon, bleibt vor der Zugabe eines NO-Donors über

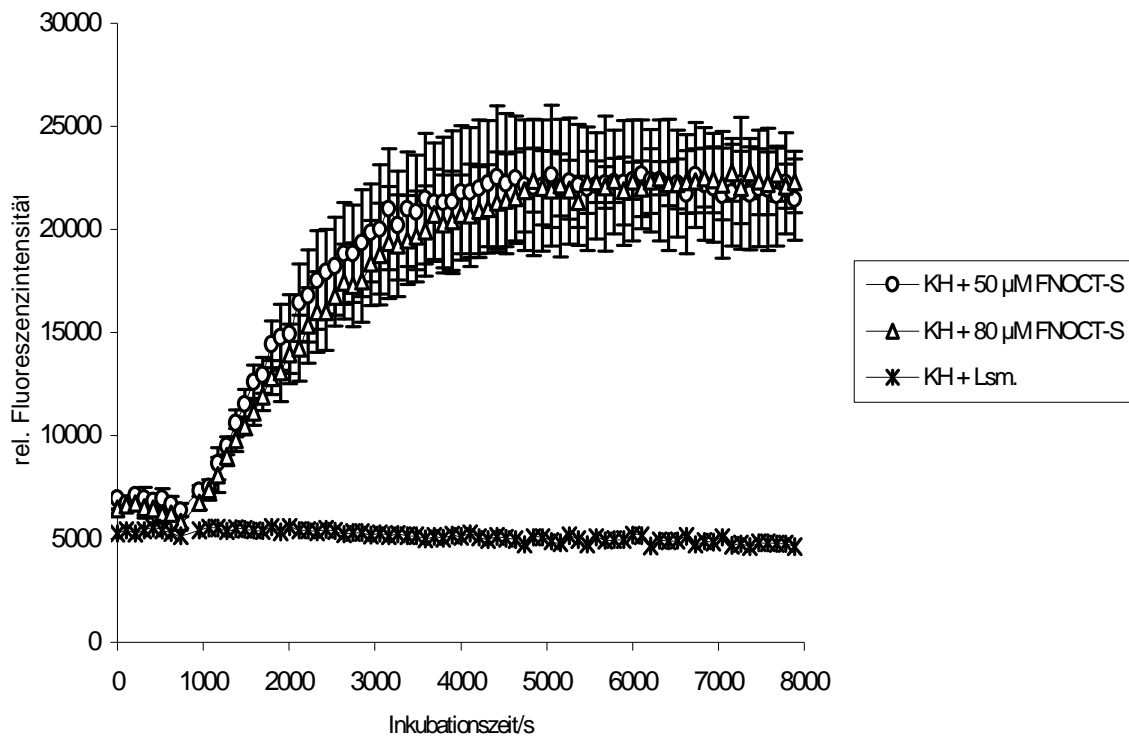
lange Zeit konstant (vgl. Abbildung 35).

Zur Fluoreszenzuntersuchung zum Nachweis von Stickstoffmonoxid wurde die Bildung der Hydroxylamine **71b** und **72b** verfolgt, welche bei  $\lambda_{\text{exc.}} = 340 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em.}} = 400 \text{ nm}$  angeregt bzw. detektiert werden können. Die Hydroxylamine bilden sich nach dem NO-Abfang und der Reduktion in den Zellen. Nach einer Stunde Inkubation in KH-Puffer wurden die Zellen mit HBSS gewaschen und mit KH-Puffer (ohne Bicarbonat) vermessen. Nach 15 Minuten Vorlauf und anschließender Zugabe von  $100 \mu\text{M}$  SpNO-Lösung konnte der Anstieg der Fluoreszenz bei  $\lambda_{\text{exc.}} = 340 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em.}} = 400 \text{ nm}$  detektiert werden. Eine wichtige Voraussetzung ist die Stabilität des FNOCTs. Die Grundlinie sollte sich ohne Zugabe von einem NO-Donors nicht ändern. Durch den Zusatz von  $100 \mu\text{M}$  DTPA, einem Eisenchelator, konnte eine geringe zeitliche Erhöhung der Grundfluoreszenz verhindert werden. Dieses ist gerade bei zeitlich längeren Messungen erforderlich, was auch im chemischen System untersucht wurde (vgl. Kapitel 3.4.2.3).

Die Abbildungen 35 und 36 zeigen den NO-induzierten Fluoreszenzanstieg bei den unterschiedlichen Konzentrationen von FNOCT **71**. Bei der Beladung der Fibroblasten mit  $30 \mu\text{M}$  Fänger **71** wurde nach Zugabe von  $100 \mu\text{M}$  SpNO bereits das Signalmaximum nach NO-Abfang und Bildung des Hydroxylamins **71b** erreicht (Abbildung 35). Verglichen dazu erwiesen sich Konzentrationen von  $50 \mu\text{M}$  bzw.  $80 \mu\text{M}$  **71** als ungünstig, da keine Steigerung des Fluoreszenzmaximums beobachtet werden konnte (Abbildung 36). Dieses Verhalten ist auf die bereits untersuchte Aggregatbildung von **71** zurückzuführen.



**Abbildung 35:** NO-induzierter Fluoreszenzanstieg bei Beladung der Zellen mit der FNOCT-Säure **71** (10, 30 μM) mit 100 μM SpNO, 2 % DMSO, 10 mM Glucose, 0.02 % Pluronic-F-127, 100 μM DTPA in Phosphatpuffer pH 7.35; Beladungszeit mit **71**: 1 Stunde ( $\lambda_{exc.} = 340 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em.} = 400 \text{ nm}$ ),  $n = 4$

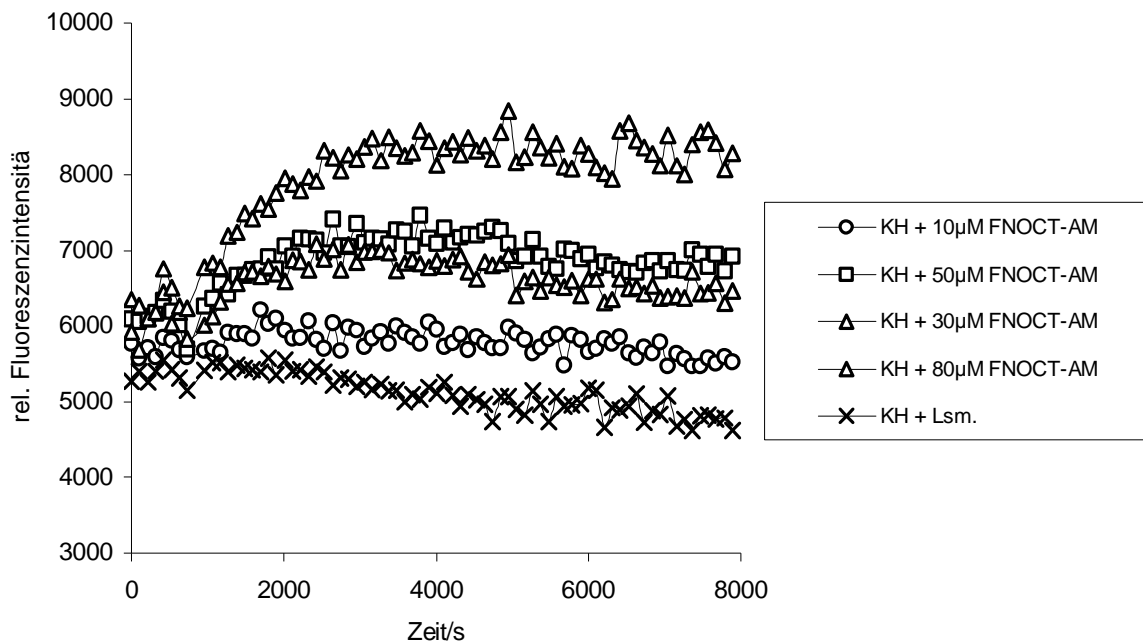


**Abbildung 36:** NO-induzierter Fluoreszenzanstieg bei Beladung der Zellen mit der FNOCT-Säure **71** (50, 80 µM) mit 100 µM SpNO, 2 % DMSO, 10 mM Glucose, 0.02 % Pluronic-F-127, 100 µM DTPA in Phosphatpuffer pH 7.35; Beladungszeit mit **71**: 1 Stunde ( $\lambda_{exc.} = 340 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em.} = 400 \text{ nm}$ ),  $n = 4$

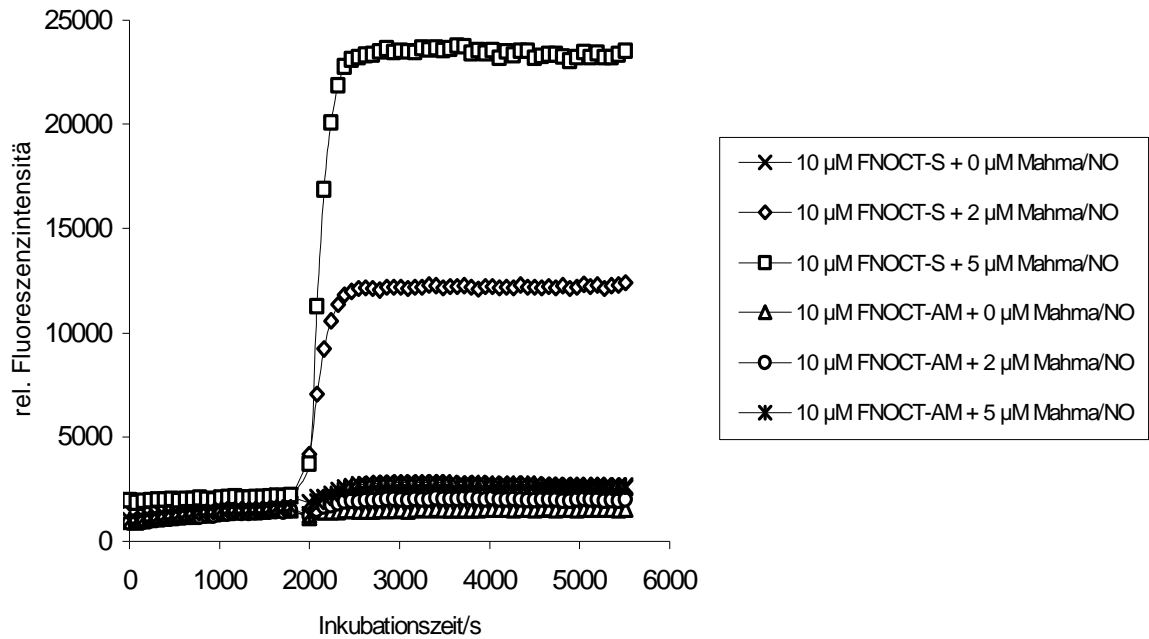
Abbildung 37 zeigt den analogen Versuch der Beladung und des NO-Abfanges mit dem Acetoxymethylester **72**. Vergleicht man die Fluoreszenzintensitäten, so ist eine deutlich bessere Beladung durch die FNOCT-Säure **71** gegeben. Liegt dies nun an der schlechteren Löslichkeit im wässrigen System oder fängt der Acetoxymethylester **72** schlechter Stickstoffmonoxid ab? Zur Beantwortung dieser Frage wurde der Ester **72** im zellfreien System mit der Säure **71** verglichen (Abbildung 38). Es zeigte sich bei dem Zusatz von 0.02 % Pluronic-F-127 ein sehr geringer Fluoreszenzanstieg von **72**. Der Zusatz des Lösungsvermittlers SDS, welcher im zellfreien System bis zu einem Anteil von 0.4 % Einsatz finden kann, lieferte ein ganz anderes Ergebnis (Abbildung 39). Hier zeigte sich ein wesentlich stärkerer Fluoreszenzanstieg des FNOCT-Esters **72**. Dieses Ergebnis beweist, dass es sich um ein Löslichkeitsproblem handelt, das nicht mit Pluronic-F-127 umgangen werden kann. SDS ist als Lösungsvermittler für Zellsysteme



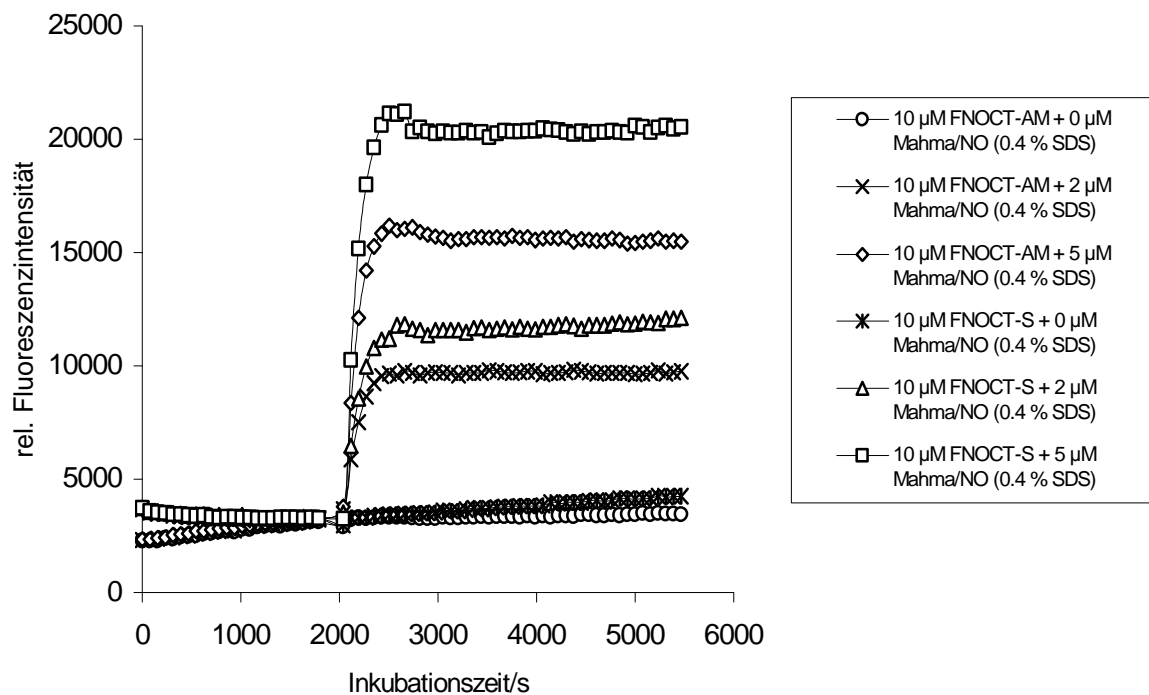
ungeeignet, da es die Zellmembran zerstört. Das Fängersystem **71** ist jedoch ausreichend lipophil, um in den Zellen zu akkumulieren und dort NO abzufangen. Der Acetoxymethylester **72** ist aufgrund seiner schlechten Löslichkeit nur bedingt als Fänger im Zellsystem einsetzbar.



**Abbildung 37:** NO-induzierter Fluoreszenzanstieg bei Beladung der Zellen mit dem FNOCT-Ester **72** (10, 30, 50, 80  $\mu$ M) mit 100  $\mu$ M SpNO, 2 % DMSO, 10 mM Glucose, 0.02 % Pluronic-F-127, 100  $\mu$ M DTPA in Phosphatpuffer pH 7.35; Beladungszeit mit **72**: 1 Stunde ( $\lambda_{exc.}$  = 340 nm,  $\lambda_{em.}$  = 400), n = 4



**Abbildung 38:** NO-induzierter Fluoreszenzanstieg bei Beladung der Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  **71** bzw. **72** mit 0, 2, 5  $\mu\text{M}$  Mahma/NO im zellfreien System, 2 % DMSO, 0.02 % Pluronic-F-127, 100  $\mu\text{M}$  DTPA in Phosphatpuffer pH 7.35, ( $\lambda_{\text{exc.}} = 340 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 400 \text{ nm}$ )



**Abbildung 39:** NO-induzierter Fluoreszenzanstieg bei Beladung der Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  **71** bzw. **72** mit 0, 2, 5  $\mu\text{M}$  Mahma/NO im zellfreien System, 2 % DMSO, 0.4 % SDS, 100  $\mu\text{M}$  DTPA in Phosphatpuffer pH 7.35, ( $\lambda_{\text{exc.}} = 340 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 400 \text{ nm}$ )

Es konnte somit in Fibroblasten vom Typ L929 Stickstoffmonoxid abgefangen und nachgewiesen werden, das extrazellulär in Form eines NO-Donators (hier SpNO) zugegeben wurde. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Bestimmung der aufgenommenen Farbstoffmenge. Um die intrazelluläre Fängerkonzentration bei Beladung mit 30  $\mu\text{M}$  FNOCT-Säure **71** zu ermitteln, wurden die Fibroblasten eine Stunde mit **71** beladen. Danach wurde der Zellüberstand entfernt, die Zellen mit HBSS gewaschen und danach mit 0.4 % SDS in KH lysiert. Der Zusatz von 100  $\mu\text{M}$  Mahma/NO führte zu einem Fluoreszenzanstieg, der mit den parallel gemessenen Kontrollen (1, 3, 6  $\mu\text{M}$  FNOCT-Säure **71** in KH mit 100  $\mu\text{M}$  Mahma/NO) verglichen wurde. Über die bestimmte Konzentration und der Zellzahl kann dann der Gehalt an Fänger pro Zelle berechnet werden. Bei Annahme eines mittleren Zellvolumens von 3.5  $\text{pl}^{[95]}$  ergab sich eine mittlere intrazelluläre Konzentration von  $5 \pm 1$  mM an Fänger **71** pro Zelle.

Untersuchungen zur räumlichen Verteilung des Farbstoffes wurden am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Da der Background des Gerätes zu hoch und kein Signalanstieg erkennbar war, konnten Untersuchungen zur räumlichen Verteilung von 30  $\mu\text{M}$  Py-FNOCT-Säure **71** in Fibroblasten der Ratte nicht durchgeführt werden.

## 4.2 Nachweis von endogen gebildetem Stickstoffmonoxid in Alveolar-Makrophagen der Ratte

Alveolar-Makrophagen sind dafür bekannt, dass sie Stickstoffmonoxid in grossen Mengen freisetzen. Diese Makrophagen der Lungenalveolen produzieren nach Stimulation mit LPS (Lipopolysaccharid, 0.5 µg/ml, siehe Kapitel 1.1, Abbildung 1) NO im mikromolaren Bereich, welches in den Zellüberstand abgegeben wird. Hier kann dann der NO-Abfang mittels FNOCT erfolgen. Anregungs- und Emissionswellenlänge wurden so gewählt, daß die Bildung des Abfangproduktes beobachtet werden kann ( $\lambda_{exc.} = 340 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em.} = 400 \text{ nm}$ ). Die hohe Empfindlichkeit und der schnelle Abfang der Pyren-FNOCT-Säure **71** ist eine wichtige Voraussetzung für den Erfolg des Experimentes.

### 4.2.1 Stimulation der Alveolar-Makrophagen

Durch die Zugabe von LPS (Lipopolysaccharid, 0.5 µg/ml) wird die Bildung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) angeregt. Nach Zugabe von L-Arginin wird Stickstoffmonoxid freigesetzt, welches in den Zellüberstand diffundiert und dort nachgewiesen werden kann. Bei der Zugabe von L-NMA (0.1 µM) wird die katalytische Aktivität der NO-Synthase inhibiert. Dadurch kann keine Stickstoffmonoxid-Produktion erfolgen. Die Messung der NO-Freisetzung erfolgte in „Lumox-Platten“. Diese zeichnen sich durch einen geringen Background der Kammerböden aus. Die Alveolar-Makrophagen wurden mit unterschiedlichen Zusätzen behandelt:

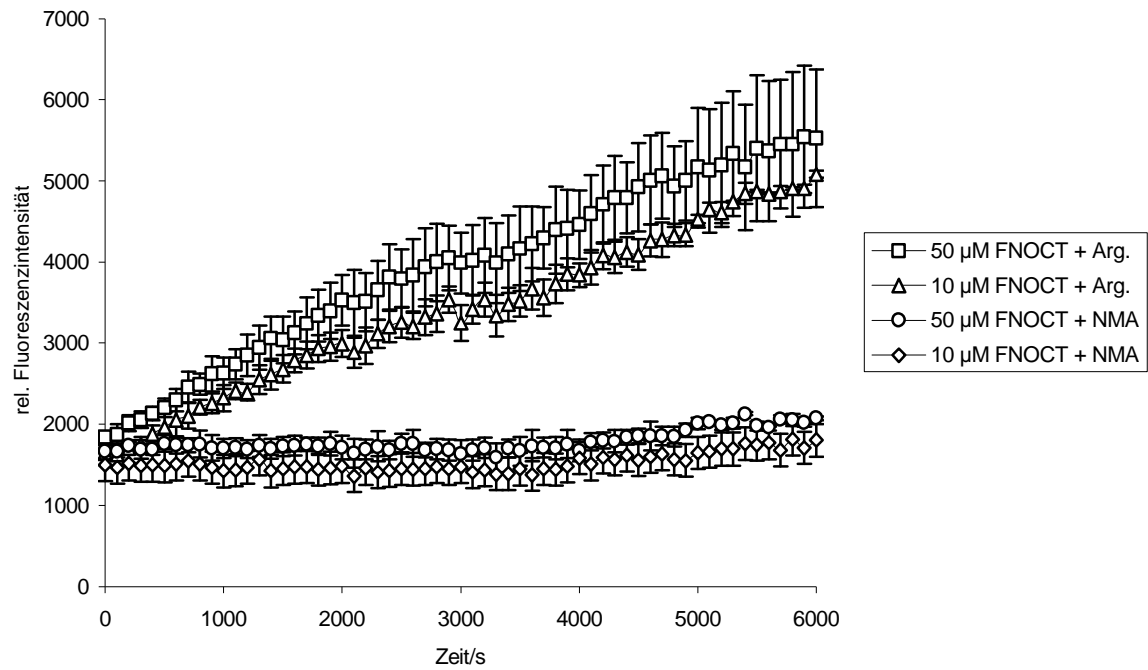
- a) 0.5 mM L-Arginin (nach Stimulation mit 0.5 µg/ml LPS)
- b) 0.1 mM L-NMA (nach Stimulation mit 0.5 µg/ml LPS)

Eine Inkubationszeit von 18 Stunden erwies sich als geeignet. Danach erfolgte nach Zugabe von L-Arginin die kontinuierliche Messung der NO-Freisetzung.

#### 4.2.2 Nachweis der NO-Bildung mittels Py-FNOCT-Säure **71** im Zellüberstand

Die Pyren-FNOCT-Säure **71** wurde zum Nachweis des aus der Zelle diffundierten, extrazellulären Stickstoffmonoxids verwendet. Dazu wurden die mit 0.5 µg/ml LPS stimulierten Alveolarmakrophagen mit 0.5 mM L-Arginin, 100 µM Trolox und 100 µM DTPA versetzt und die Freisetzung von NO kontinuierlich detektiert. Die umgesetzte FNOCT-Säure **71**-Menge wurde dem gebildeten Stickstoffmonoxid gleichgesetzt. Bei  $\lambda_{\text{exc.}} = 340 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{em.}} = 400 \text{ nm}$  wurde die Bildung des Abfangproduktes **71b** beobachtet. Da der Fänger im hohen Überschuss eingesetzt wurde, kann der Umsatz von FNOCT **71** zum Hydroxylamin **71b** der detektierten Stickstoffmonoxidmenge gleichgesetzt werden. Der Fänger wurde im Überschuss eingesetzt, um davon ausgehen zu können, dass möglichst viel NO abgefangen wird. Eine mögliche Fehlerquelle des Messprinzips ist allerdings die Tatsache, dass viele andere Reaktionen des Stickstoffmonoxides stattfinden können. Ein Teil des Radikals wird wahrscheinlich durch Sauerstoff oxidiert oder durch Reaktion im Zellinneren verbraucht, bevor es der Fluoreszenzsonde zur Reaktion zur Verfügung steht. Dieser Anteil kann nicht quantifiziert werden.

Abbildung 40 zeigt die Ergebnisse der kontinuierlichen Messung von Stickstoffmonoxid im Zellüberstand. Direkt nach Zugabe von 0.5 mM L-Arginin, 100 µM Trolox, 100 µM DTPA und 10 µM bzw. 50 µM Pyren-FNOCT-Säure **71** konnte endogen gebildetes Stickstoffmonoxid detektiert werden. Die Bildung von NO und dem entstehenden Abfangprodukt **71b** erfolgt kontinuierlich. Die mit 0.1 µM L-NMA behandelten Zellen zeigten in der gleichen Zeitspanne wie erwartet keine NO-Freisetzung. Die erfolgreiche kontinuierliche Detektion des endogen gebildeten Stickstoffmonoxides zeigt die hohe Empfindlichkeit des NO-Nachweises (siehe Kapitel 3.4.2.2).



**Abbildung 40:** Kontinuierliche Messung der NO-Freisetzung von Alveolar-Makrophagen nach 18 Stunden Stimulation mit 0.5 μg/ml LPS durch Zugabe von 0.5 mM L-Arginin bzw. 0.1 mM L-NMA, FNOCT-Säure **71** (10, 50 μM), 100 μM Trolox und 100 μM DTPA,  $\lambda_{exc.} = 340 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em.} = 400 \text{ nm}$ .

## 5 Zusammenfassung

Kondensierte Aromaten sind häufig gute Fluorophore. Es ist in den letzten Jahren gelungen, *o*-Chinodimethanderivate zu konzipieren, die nach NO-Fixierung und Reduktion des dabei gebildeten Nitroxidradikals ein fluoreszierendes aromatisches System bilden. Es erlaubt den direkten fluoreszenzspektroskopischen Nachweis von Stickstoffmonoxid. Diese Art von Stickstoffmonoxid-Fängern wurde als „*Fluorescent Nitric Oxide Cheletropic Trap*“ (FNOCT) bezeichnet. Besonders wichtig ist, dass nach Reaktion mit NO und Reduktion des Radikals ein intensives und leicht beobachtbares Fluoreszenzsignal entsteht. Das unsubstituierte Phenanthrensystem **24**, welches von Bätz<sup>[67]</sup> dargestellt wurde, hat eine Fluoreszenzanregungswellenlänge, die für biologische Anwendungen zu kurzweilig ist. Deswegen wurde von Meineke<sup>[57]</sup> das dimethylamino-substituierte Derivat **29** synthetisiert, dessen NO-Abfangprodukt nach Reduktion bei  $\lambda_{em.} = 460$  nm fluoresziert ( $\lambda_{exc.} = 380$  nm). Die pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz, durch die Protonierung der Dimethylamino-Gruppe, erwies sich aber als nachteilig. Die daraufhin von Hornig<sup>[58]</sup> synthetisierte methoxy-substituierte Verbindung **30** zeigte keine pH-Abhängigkeit, besitzt aber keine ausreichend bathochrome Verschiebung der Fluoreszenz um problemlos in biologischen Systemen anwendbar zu sein.

Die von Bätz<sup>[67]</sup>, Meineke<sup>[57]</sup> und Hornig<sup>[58]</sup> synthetisierten FNOCTs haben in ihren Abfangeigenschaften gute Erfolge gebracht und den Pool der bereitstehenden Fänger stark erweitert. Die strukturelle Gemeinsamkeit der Substanzen war zum einen das Phenanthrensystem als Fluorophor und zum anderen die Phenylgruppen am cheletropen Fängerzentrum (vgl. **24**). Diese Phenylgruppen wurden durch Methyl- sowie Carboxymethylester-Gruppen substituiert um die Wasserlöslichkeit zu verbessern, da die Lipophilie durch Einführen geeigneter Gruppen verringert werden könnte. Als Vergleichssubstanz wurde die unsubstituierte Phenanthren-Verbindung **54** ausgewählt. Es bildete sich bei **52** und **53** das Abfangprodukt **52b** bis **53b** nur sehr langsam, was darauf zurückzuführen ist, dass die Methylgruppe oder Carboxygruppe einen deaktivierenden Effekt auf den NO-Abfang ausübt. Die Abfangreaktion ist in

diesem Fall geschwindigkeitsbestimmend. Eine wichtige Grundvoraussetzung der FNOCT-Methode um Stickstoffmonoxid nachzuweisen ist aber eine möglichst schnelle Abfangreaktion.

Weitere substituierte Derivate sind wünschenswert, um die Palette verfügbarer Abfangreagenzien zu vergrößern und die Eigenschaften zu verbessern. Es wurde deshalb untersucht, ob die Konzeption eines Nachweises auf der Basis von Pyren als Fluorophor möglich ist.

Die Vergrößerung des aromatischen Systems erhöhte die Fluoreszenzverschiebung in den bathochromen Bereich. Gleichzeitig erhöhte sich die Quantenausbeute und die Sensitivität der FNOCT-Methode.

Die Synthese der Dicarbonsäuren **71** bzw. **73** und ihrer Diacetoxymethylester **72** bzw. **74** konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die NO-Abfangversuche waren ebenfalls erfolgreich und es konnten die erwarteten, bicyclischen Nitroxidradikale (Abbildung 29) ESR-spektroskopisch nachgewiesen werden. Die Nitroxide **71a** und **73a** können durch Reduktionsmittel wie Ascorbinsäure zu den fluoreszierenden Hydroxylaminen **71b** und **72b** umgesetzt werden. Durch das Pyrensystem verschiebt sich das Maximum der Anregungswellenlänge der Hydroxylamine bathochrom um ca. 50 nm, verglichen mit der unsubstituierten Phenanthrenverbindung **24**. Die Verbindungen können in Phosphatpuffer pH 7.30<sup>[75]</sup> im Bereich von 350 nm angeregt werden und zeigen somit eine ausreichend langwellige Fluoreszenz bei 380 nm bis 420 nm für den Einsatz im biologischen System (Abbildung 12). Das Hydroxylamin der Diacetoxymethylester **72b** und **74b** konnte aufgrund der schlechten Löslichkeit nur in THF vermessen werden und zeigte hier ein Maximum der Anregung bei 360 nm und ein Extinktionsmaximum bei 410 nm (Abbildung 113 bzw. 117).

Die Geschwindigkeit der Umsetzung der Pyren-FNOCT-Säure **71** mit Stickstoffmonoxid in Phosphatpuffer pH 7.30<sup>[75]</sup> wurde mittels UV/Vis-Kinetik verfolgt, wobei die Abnahme der *o*-Chinodimethanbande bei 445 nm vermessen wurde. Die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion der Pyren-FNOCT-Säure **71** mit NO beträgt bei 23 °C  $k_{2(66)} = 130 \pm 7 \text{ Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante von Pyren-FNOCT-Säure **71** in Phosphatpuffer pH



7.30<sup>[75]</sup> ist um 25 % größer, verglichen mit dem von Meineke<sup>[63]</sup> beschriebenen dimethylamino-substituierten Fängersystem **29**.

Für das Fluorophor **71** und **73** ergibt sich zusätzlich eine Detektionsgrenze von 1.0 nm bzw. 1.25 nm für das wässrige System (Kapitel 3.4.2.2). Der Abfang von NO durch das Fängersystems ist allerdings nicht quantitativ. Diese Erkenntnis muss bei der Quantifizierung der Stickstoffmoxid-Menge Berücksichtigung finden. Von dem zugesetzten NO wird 55 % (**73**) bzw. 70 % (**71**) vom *o*-Chinodimethan quantitativ abgefangen.

Die Stabilität des Fängersystems wurde über einem längeren Zeitraum verfolgt, indem die Änderung der Fluoreszenz der *o*-Chinodimethanbande der Pyren-FNOCT-Säure **71** bestimmt wurde. Es zeigte sich, dass der Fänger in Lösung für biologische Anwendungen hinreichend stabil ist.

Die Pyren-Fängersysteme **71** bis **74** wurden im biologischen System untersucht. Hierbei stellte sich allerdings die FNOCT-Säure **71** als tauglichstes FNOCT heraus. Die Acetoxymethylester **72** bzw. **74** sind aufgrund der geringen Löslichkeit nicht einsetzbar. Es konnte ein intrazellulärer NO-Abfang in Fibroblasten vom Typ L929 nachgewiesen werden. Hierzu wurde extrazellulär Stickstoffmonoxid in Form eines NO-Donators zugegeben. Eine Beladung mit 30  $\mu\text{M}$  FNOCT **71** erwies sich als Optimum bezogen auf die Toxizität und die Beladbarkeit. Die aufgenommenen Farbstoffmenge pro Zelle liegt bei  $5 \pm 1$  mM FNOCT-Säure **71**. Untersuchungen zur räumlichen Verteilung von 30  $\mu\text{M}$  Säure **71** in Fibroblasten der Ratte konnten mittels Fluoreszenzmikroskopie nicht durchgeführt werden, da der Background des Gerätes zu hoch war und kein Signalanstieg erkennbar war. Die FNOCT-Säure **71** wurde zum Nachweis der iNOS verwendet. Dazu wurden mit LPS stimulierte Alveolarmakrophagen mit L-Arginin versetzt und die Freisetzung von NO kontinuierlich detektiert. Direkt nach Zugabe von L-Arginin und FNOCT-Säure **71** konnte endogen gebildetes Stickstoffmonoxid detektiert werden.

## 6 Ausblick

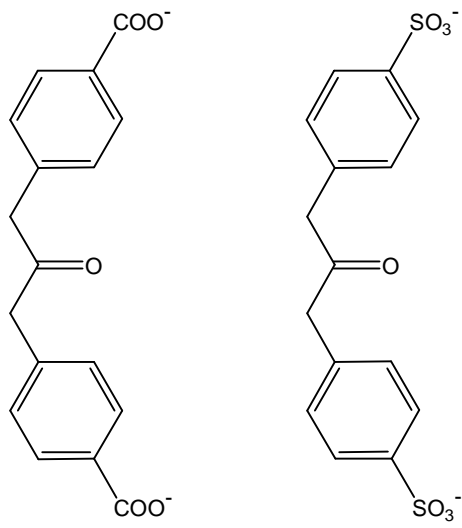
Mit der Herstellung und Untersuchung der Eigenschaften der Pyren-FNOCTs **71** bis **74** ist die Voraussetzung zum spezifischen Nachweis von Stickstoffmonoxid im biologischen System erfüllt.

Hinsichtlich der Optimierung der Eigenschaften neuer FNOCT-Systeme können folgende Fragen diskutiert werden:

- Weitere Verschiebung der Anregungs- und Emissionswellenlängen in den bathochromen Bereich durch geeignete Substitution
- Verbesserung der Membrangängigkeit und Wasserlöslichkeit
- Verbesserung der Ausbeuten

Eine Verbesserung der Wasserlöslichkeit des Acetoxymethylesters **72** bzw. **74** könnte eine wichtige Optimierung darstellen. Das Einführen von wasserlöslichen Gruppen in das FNOCT-System, ausgehend vom Diphenyl-1,3-propan-2-on, könnte zu einer positiven Beeinflussung führen. Dabei sind Carboxy-Gruppen<sup>[100,101]</sup> oder Sulfonsäure-Gruppen<sup>[102]</sup> ein möglicher Ansatz (Schema 41). Gelänge für die carboxy-substituierte Verbindung eine Umsetzung zu einem Methylester, so würde ein auf diese Weise modifiziertes FNOCT-Molekül vier Esterfunktionen tragen. Die Methylester würden zur Verbesserung der Löslichkeit im wässrigen Milieu einen entscheidenden Beitrag leisten und das Durchdringen der Zellwand durch den Farbstoff erleichtern. Somit könnten sich größere Mengen des Farbstoffes in der Zelle anreichern. Dazu kommt noch, dass die Verbindung nach Spaltung der Diacetoxymethylesterfunktionen zweifach negativ geladen ist und ein Austritt des Farbstoffes aus der Zelle in noch höherem Maße verhindert würde.

Schema 41



## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Allgemeine Arbeitstechnik

#### 7.1.1 Arbeiten unter Schutzgas

Für diese Arbeit waren Synthesen und Untersuchungen unter Schutzgas notwendig, da einige der hergestellten oder verwendeten Chemikalien feuchtigkeits- bzw. sauerstoffempfindlich sind. Als Schutzgas für die Synthesen wurde Argon 5.0 (Reinheit 99.999 %) der Firma Messer Griesheim eingesetzt. Dieses wurde einer fest installierten Trocknungsanlage entnommen, die jeweils 50 cm lange Säulen mit Kaliumhydroxid, Phosphor(V)oxid und Kieselgel enthielt. Die verwendeten Apparaturen wurden mit der Ölpumpe (1.0 Pa) evakuiert, mit einem Heißluftfön ausgeheizt und nach dem Abkühlen mit Argon gespült. Einige der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen in Pufferlösungen wurden unter Stickstoff 2.5 (Reinheit 99.5 % von Messer Griesheim) als Schutzgas durchgeführt. Hierzu wurden die verwendeten Pufferlösungen ca. eine Stunde in einer speziellen Begasungsapparatur mit Bodenfritte mit Stickstoff 2.5 gespült. Anschließend wurden sie unter Schutzgas entnommen und in eine Küvette überführt.

#### 7.1.2 Trocknen der Lösungsmittel

*Tetrahydrofuran* und *Toluol* wurden mit Natrium unter Argon zum Sieden erhitzt. Als Indikator wurde p-Phenylbenzophenon zugesetzt. Die Bildung des blauviolett-farbenen Ketylradikals<sup>[103]</sup> zeigt die vollständige Entfernung des Wassers an. Anschließend wurden die Lösungsmittel unter Argon in Vorratsgefäße abdestilliert.

*Ethanol* wurde je Liter mit 7 g Natrium und 27.5 g Phthalsäurediethylester versetzt und zwei Stunden zum Sieden erhitzt.<sup>[104]</sup> Anschliessend wurde unter Schutzgas in ein Vorratsgefäß abdestilliert.

Alle Lösungsmittel einschließlich des deuterierten Tetrahydrofurans wurden unter Schutzgas (Argon 5.0) aufbewahrt. Sauerstofffreie Lösungsmittel wurden durch 30 minütiges Spülen mit Argon 5.0 (Reinheit 99.999 %) oder Stickstoff 2.5 (Reinheit 99.5 %) der Firma Messer Griessheim erhalten.

### 7.1.3 *Instrumentelle Analytik*

#### *NMR-Spektroskopie*

Die NMR-Spektren wurden mit einem Varian Gemini-200 bzw. einem Bruker DRX-500 Gerät aufgenommen. Für die  $^1\text{H}$ -NMR Spektren betragen die Messfrequenzen 200 bzw. 500 MHz, für die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren 50 bzw. 125 MHz. Die chemischen Verschiebungen werden in ppm-Einheiten der  $\delta$ -Skala angegeben.

#### *Elementaranalytik*

Die CHN-Elementaranalysen wurden mit einem Elemental Analyzer Modell 1106 der Firma Carlo Erba durchgeführt.

#### *Massenspektrometrie*

Die Spektren für die Molmassenfeinbestimmung wurden mit einem ESITOF-Massenspektrometer BioTOF III mit Apollo-ESI-Ionenquelle (ESI - Elektrospray Ionisation) (Boston, USA) gemessen. Zur Auswertung der hochaufgelösten Massenspektren wurde das Signal des Isotopenmusters mit der geringsten Masse (*monoisotopic mass*) ausgewählt. Die Aufgabe der Proben erfolgte über eine HPLC-Anlage vom Typ Agilent Serie 1100 und einem automatischen Probengeber vom Typ Gerstel/CTC MPS3.

#### *Schmelzpunktbestimmung*

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Gerät 9100 der Firma Electrothermal bestimmt. Die Werte sind unkorrigiert.

*UV/Vis-Spektroskopie*

Die UV/Vis-Spektren wurden an dem Gerät Cary 300 Bio der Firma Varian aufgenommen. Da dieses Spektrometer ein Zweistrahlgerät ist, konnten die Probe und der entsprechende Leerwert gleichzeitig gemessen werden. Die Aufnahme und Auswertung der Spektren erfolgte mit dem zugehörigen Scan-Programm. Die Spektren umfassten einen Wellenlängenbereich von 250 nm bis 500 bzw. 700 nm.

*Fluoreszenz-Spektroskopie*

Die fluoreszenzspektroskopischen Experimente wurden an dem Spektrometer FL 3095 der Firma J&M Analytische Mess- und Regeltechnik GmbH durchgeführt. Für alle Spektren wurden Quarzküvetten verwendet. Aufnahme und Auswertung erfolgte mit dem Programm "FL 3095-Fluoroscan". Vor jeder Messung wurde eine automatische Hintergrundkorrektur vorgenommen.

*pH-Werte*

Die angegebenen pH-Werte wurden mit einem pH-Meter 765 Calimatic der Firma Knick (Berlin, Deutschland) ermittelt.

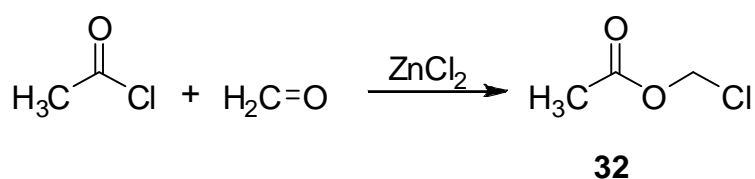
*LDH-Titrationsen*

Die LDH-Titrationsen erfolgten mit dem Gerät Vitalab Selectra E der Firma Vital Scientific N. V., Dieren/Niederlande (Vertrieb: VWR International GmbH, Darmstadt).

## 7.2 Synthese, Charakterisierung und Untersuchung der Produkte

### 7.2.1 Darstellung des Carbonsäure- und des Acetoxymethylester-Dienophils

#### 7.2.1.1 Darstellung von Chlormethylacetat (**32**)<sup>[64]</sup>



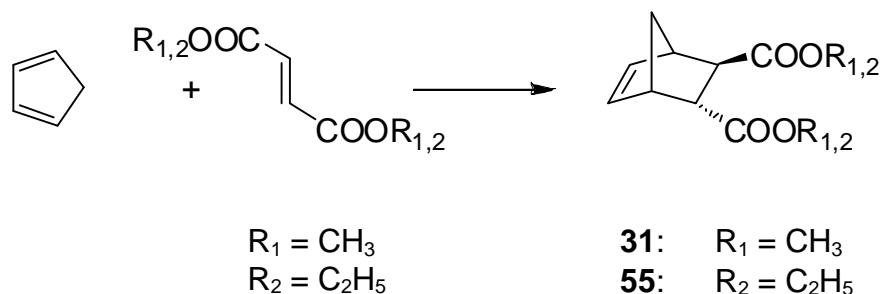
Eine Suspension von 160 g (143 ml, 2.00 mol) Acetylchlorid und 400 mg (2.90 mmol) Zink(II)chlorid wurde auf -5 °C unter Schutzgasatmosphäre gekühlt. Innerhalb eines Zeitraumes von 30 Minuten wurde die Reaktionsmischung mit 60.0 g (2.00 mol) Paraformaldehyd versetzt und anschließend zwei Stunden auf 45 °C erwärmt. Danach wurde nicht umgesetztes Paraformaldehyd sowie der Katalysator durch Filtration über 120 g basischem Aluminiumoxid (Woelm) mittels einer kühlbaren Umkehrfritte entfernt. Das Säulenmaterial wurde anschließend mit 180 ml Dichlormethan nachgewaschen.

Das Lösungsmittel wurde abkondensiert und der Rückstand zweimal mit jeweils 100 ml Dichlormethan versetzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, um leichtflüchtige Komponenten abzutrennen. Das farblose Chlormethylacetat **32** wurde mittels fraktionierter Kondensation im Ölpumpenvakuum gereinigt.

Ausbeute an **32** 80.5 g (0.74 mmol, 37 %; Lit.<sup>[64]</sup>: 32%)

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ =5.62 [s, 2H, CH<sub>2</sub>], 2.06 [s, 3H, CH<sub>3</sub>].

### 7.2.1.2 Darstellung von Norborn-5-en-2,3-(E)-dicarbonsäureester **31**<sup>[65]</sup> und **55**



Mittels einer Retro-Diels-Alder Reaktion wurde Cyclopentadien durch Erhitzen des Dicyclopentadiens auf 180 °C und anschließender Destillation erhalten.

Eine Suspension aus 144 g (1.00 mol) Fumarsäuredimethylester (bzw. 172 g, 1.00 mol Fumarsäurediethylester) und 198 g (3.00 mol) frisch destilliertem Cyclopentadien wurde mit 300 ml Dioxan 40 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde aus der gelblichen Lösung am Rotationsverdampfer entfernt. Der gelbe Feststoff wurde durch Feststoffdestillation im Ölpumpenvakuum gereinigt.

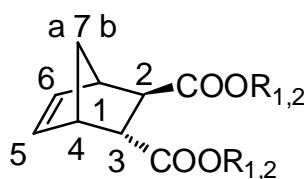
(Sdp.: 125 °C / 3.0 Pa; Lit.<sup>[65]</sup>: 96 - 98 °C / 2.0 Pa)

Ausbeute an **31**    197 g (0.94 mol, 94 %; Lit.<sup>[65]</sup>: 85 %)

Ausbeute an **55**    217 g (0.91 mol, 91 %)

Schmp. **31**        33 °C (Lit.<sup>[65]</sup>: 33 - 35 °C)

Sdp. **55**         138 °C, 10 mbar (Lit.<sup>[105]</sup>: 138 - 140 °C)

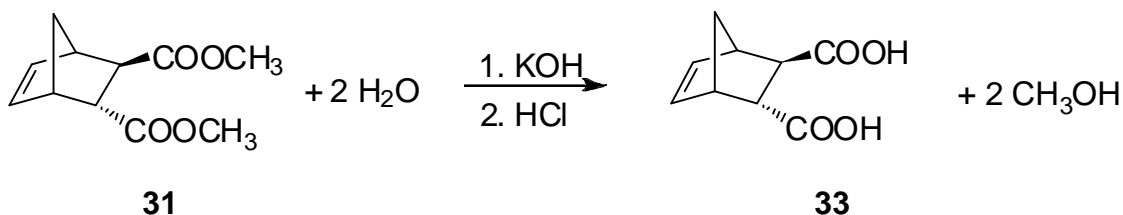


$R_1 = \text{CH}_3$   
 $R_2 = \text{C}_2\text{H}_5$



$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 6.23$  [dd,  $^3\text{J}(5\text{-H}, 6\text{-H}) = 6.0$  Hz,  $^3\text{J}(1\text{-H}, 6\text{-H}) = 3.0$  Hz, 1H, 6-H], 6.02 [dd,  $^3\text{J}(5\text{-H}, 6\text{-H}) = 6.0$  Hz,  $^3\text{J}(4\text{-H}, 5\text{-H}) = 3.0$  Hz, 1 H, 5-H], \*4.10 [q, 2 H,  $\text{CH}_2$ ], \*4.60 [q, 2 H,  $\text{CH}_2$ ], 3.67 [s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ], 3.60 [s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ], 3.33 [d,  $^3\text{J}(2\text{-H}, 3\text{-H}) = 4.4$  Hz, 1 H, 2-H], 3.21 [br s, 1 H, 1-H oder 4-H], 3.08 [br s, 1H, 1-H oder 4-H], 2.64 [dd, 1 H,  $^3\text{J}(2\text{-H}, 3\text{-H}) = 4.4$  Hz,  $^4\text{J}(7\text{a-H}, 2\text{-H}) = 1.6$  Hz, 2-H], 1.57 [d, 1 H,  $^2\text{J}(7\text{a-H}, 7\text{b-H}) = 8.8$  Hz, 7b-H], 1.41 [dd, 1 H,  $^2\text{J}(7\text{a-H}, 7\text{b-H}) = 8.8$  Hz,  $^4\text{J}(2\text{-H}, 7\text{a-H}) = 1.6$  Hz, 7a-H], \*1.27 [s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ], \*1.23 [s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ].

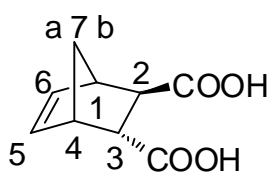
\*  $\text{R}_2 = \text{C}_2\text{H}_5$

7.2.1.3 Darstellung von Norborn-5-en-2,3-(*E*)-dicarbonsäure (**33**)<sup>[66]</sup>

Eine Suspension von 187.7 g (0.89 mol) Norbornendicarbonsäuredimethylester **31** wurde bei 60 °C mit 3.6 L 1 M KOH-Lösung eine Stunde gerührt. Von der gelben Lösung wurden jeweils 715 ml abgenommen und zur Entfernung von nicht hydrolysiertem Diester, dreimalig mit je 35 ml Trichlormethan extrahiert. Durch Ansäuern mit zehnpromzentiger Salzsäure bis pH 1 wurde die Norbornendicarbonsäure **33** als weißer Feststoff ausgefällt. Die abfiltrierte Norbornendicarbonsäure wurde dreimal mit je 100 ml VE-Wasser gewaschen und getrocknet.

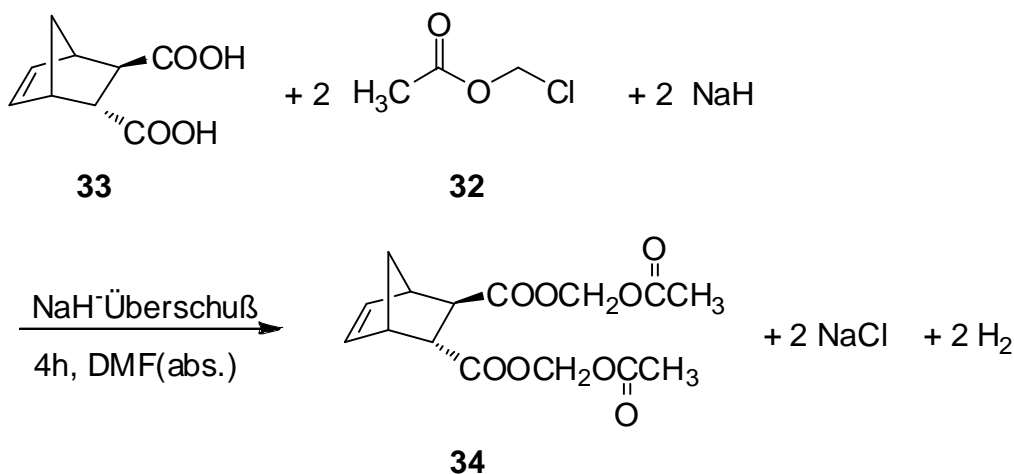
Ausbeute an **33** 122.2 g (0.67 mol, 76 %; Lit.<sup>[66]</sup>: 88 %)

Schmp. **33** 184 °C (Lit.<sup>[66]</sup>: 185 - 186 °C)



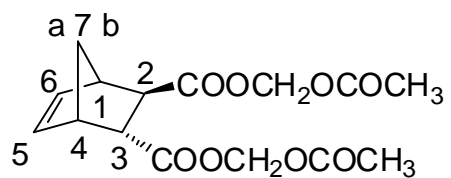
<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 12.3 [br s, 2H, COOH], 6.30 [dd, <sup>3</sup>J(5-H, 6-H) = 5.5 Hz, <sup>3</sup>J(1-H, 6-H) = 3.0 Hz, 1H, 6-H], 6.07 [dd, <sup>3</sup>J(5-H, 6-H) = 5.7 Hz, <sup>3</sup>J(4-H, 5-H) = 2.0 Hz, 1H, 5-H], 3.21 [s, 1-H oder 4-H], 2.43 [d, <sup>3</sup>J(2-H, 3-H) = 2.7 Hz, 1H, 2-H], 1.52 [d, <sup>2</sup>J(7a-H, 7b-H) = 8.5 Hz, 1H, 7b-H], 1.35 [d, <sup>2</sup>J(7a-H, 7b-H) = 8.5 Hz, 1H, 7a-H].

### 7.2.1.4 Darstellung von Norborn-5-en-2,3-(E)-dicarbonsäurediacetoxymethylester (**34**)<sup>[63]</sup>



Zu einer gerührten Lösung von 4.55 g (25.0 mmol) Norbornendicarbonsäure **33** in 50 ml absolutem über neutralem Aluminiumoxid (Woelm) filtriertem Dimethylformamid wurden bei 0 °C unter Argon in 10 Portionen 2.40 g (100 mmol) Natriumhydrid als Suspension in Paraffinöl zugegeben. Anschließend tropfte man zu der Suspension über einen Zeitraum von 30 Minuten 5.42 g (50.0 mmol) Chlormethylacetat **32**. Hierzu wurde ein kühlbarer Tropftrichter mit einer Mischung aus Trockeneis/Isopropanol (-10 °C) verwendet. Danach erwärmte man das Reaktionsgemisch drei Stunden auf 40 °C und filtrierte danach nicht umgesetztes Natriumhydrid ab. Das Lösungsmittel wurde bei Raumtemperatur abkondensiert und aus dem Rückstand das Produkt im Ölpumpenvakuum (10 Pa) unter Verwendung einer Kugelrohrapparatur bei 130 °C fraktionierend destilliert.

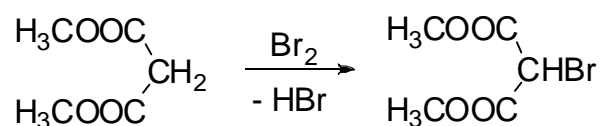
Ausbeute an **34** 3.83 g (11.8 mmol, 47 %; Lit.<sup>[63]</sup>: 38 %)



<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 6.31 [m, 1H, 6-H], 6.05 [m, 1H, 1H, 5-H], 5.85 - 5.30 [m, 4H, O-CH<sub>2</sub>-O, endo und exo], 3.45 [t, <sup>3</sup>J(2-H, 3-H) = 4.2 Hz, 1H, 3-H], 3.32 [br, s, 1H, 4-H], 3.15 [br, s, 1H, 1-H], 2.74 [dd, <sup>3</sup>J(2-H, 3-H) = 4.3 Hz, 1H, 2-H], 2.14-2.05 [d, 6H, CH<sub>3</sub>], 1.49-1.70 [m, 2H, 7a-H, 7b-H].

## 7.3 Darstellung des Tetrahydroxymethyl-Dienophils

### 7.3.1 Darstellung von Brommalonsäuresäure-dimethylester (**76**)<sup>[106]</sup>



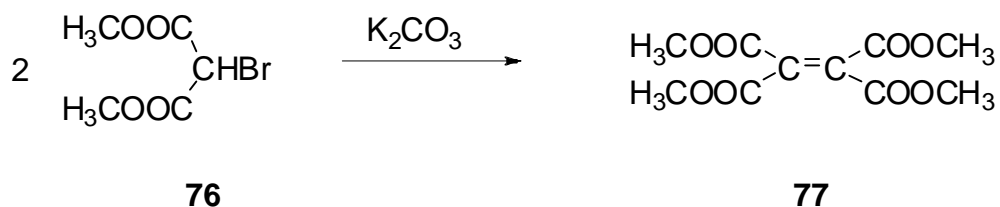
**76**

In einem Kolben mit Rückflusskühler wurde 100 ml (115g, 0.873 mol) Dimethylmalonat vorgelegt. Unter starkem Rühren wurde 46 ml (144.4 g, 0.904 mol) Brom in 90 Minuten zugetropft. Die orange-rote Reaktionslösung wurde weitere 60 Minuten nachgerührt und zweimal mit 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> extrahiert. Anschließend wurde dreimal mit 100 ml gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und noch zweimal mit 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> extrahiert, um das entstandene HBr zu entfernen. Das farblose Produkt **76** wurde nach dem Entfernen des Lösungsmittels mittels fraktionierter Kondensation im Ölpumpenvakuum gereinigt.

Ausbeute an **76** 127.6 g (0.49 mmol, 70 %)

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 4.82 [s, 1H, CH], 3.78 [s, 2x 3H, CH<sub>3</sub>].

### 7.3.2 Darstellung von 1,1,2,2-Ethylentetracarbonsäure-tetramethylester (**77**)<sup>[107,108]</sup>



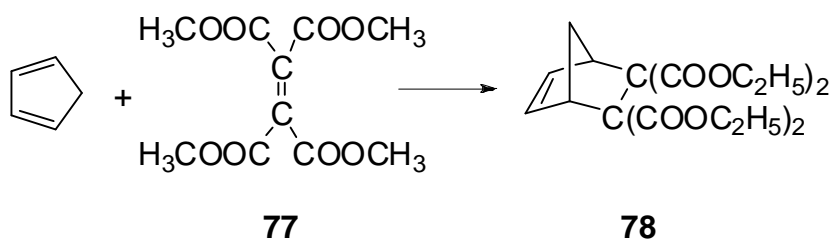
Zu einer Lösung von 127.6 g (0.6 mol) Dimethylbrommalonat in 300 ml DMF fügte man 82.9 g (0.6 mol)  $\text{K}_2\text{CO}_3$  hinzu. Nach 24 Stunden Rühren wurden die anorganischen Salze abfiltriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert und der Rückstand in Diethylether aufgenommen und filtriert, um anorganische Salze zu entfernen. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels erhielt man eine gelbe Flüssigkeit, die mit 5 ml Ethanol versetzt wurde. Bei 5 °C fiel das gewünschte Produkt **77** als weiße Nadeln aus. Durch Aufarbeitung der Mutterlauge durch Versetzen mit Ethanol bzw. Umkristallation konnte weiteres Produkt isoliert werden.

Ausbeute an **77** 22 g (0.08 mmol, 26 %, Lit.<sup>[107,108]</sup>: 52%)

Schmp. von **77** 120 °C (Lit.<sup>[107,108]</sup>: 119 - 120 °C)

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 3.07$  [s, 4x 3H,  $\text{CH}_3$ ].

### 7.3.3 Darstellung von Norborn-5-en-2,3-tetracarbonsäure-tetramethylester (**78**)<sup>[74]</sup>



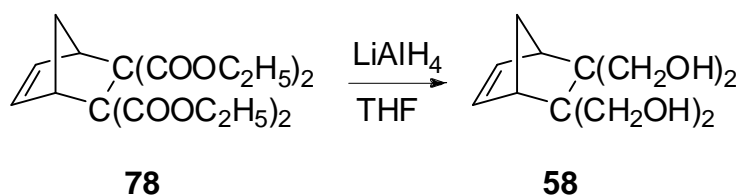
Eine Lösung von 1.72 g (6.6 mmol) 1,1,2,2-Ethylentetracarbonsäure-tetramethylester **77** in 28.8 g (0.44 mol) frisch destilliertem Cyclopentadien wurde in einer mit Argon befüllten und zugeschmolzenen Glasampulle 4 Stunden lang auf 85 °C erhitzt. Das Thermolysegemisch wurde nach Einengen im Vakuum 2 Stunden lang bei 50 °C und Ölpumpenvakuum getrocknet. Der Rückstand an **78** konnte aus Ethanol umkristalliert werden.

Ausbeute an **78** 1.44 g (3.77 mmol, 67 %, Lit.<sup>[74]</sup>: 88%)

Schmp. von **78** 63 °C (Lit.<sup>[74]</sup>: 64 - 65 °C)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):

δ[ppm] = 6.35 (t, J = 1.7 Hz, 2H, =CH), 4.12, 4.13, 4.20, 4.21 (4q, J = 7.1 Hz, 8H, OCH<sub>2</sub>), 3.44 - 3.46 (m, 2H, CCH), 1.51, 1.85 (t, 2J = 9.5, 3J = 1.6 Hz 2H, CHCH<sub>2</sub>CH), 1.21, 1.24 (2t, J = 7.1 Hz, 12 H, CH<sub>3</sub>).

7.3.4 Darstellung von Norborn-5-en-2,3- tetrahydroxymethyl (**58**)<sup>[74]</sup>

Zu einer Lösung von 11 ml 1 M LiAlH<sub>4</sub>-Lösung in 30 ml wasserfreiem THF wurde unter mäßigem Sieden eine Lösung von 1.34 g (3.5 mmol) Norbornen-tetracarbonsäure-tetramethylester **78** in 20 ml wasserfreiem THF getropft. Anschliessend wurde die Reaktionsmischung noch 15 Stunden zum Sieden erhitzt. Überschüssiges LiAlH<sub>4</sub> wurde durch Zutropfen einer Mischung von Essigester/H<sub>2</sub>O zersetzt und das Reaktionsgemisch mit 20% Schwefelsäure auf pH 8 eingestellt. Der Kolbeninhalt wurde abgesaugt, der Rückstand dreimal mit je 50 ml Ethanol ausgekocht und heiß filtriert. Alle Filtrate wurden vereinigt, das Lösungsmittel mittels Vakuum entfernt und der Rückstand aus MeOH/CHCl<sub>3</sub> 1:1 umkristallisiert. Man erhielt einen farblosen Feststoff.

Ausbeute an **58** 363.9 g (3.77 mmol, 40 %, Lit.<sup>[74]</sup>: 64%)

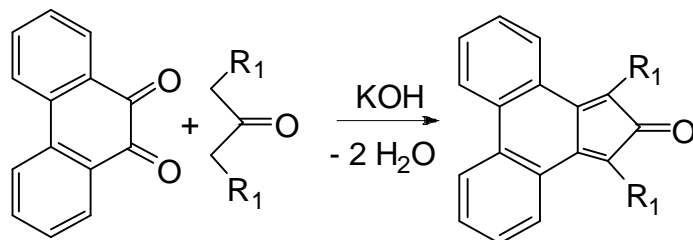
Schmp. von **58** 241 °C (Lit.<sup>[74]</sup>: 240 - 241 °C)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO):

δ[ppm] = 4.87 (s, 4H, OH), 3.80, 3.97 (AB, J = 11.2 Hz, 4H, exo-CH<sub>2</sub>O), 3.44, 3.58 (AB, J = 10.8 Hz, 4H, endo-CH<sub>2</sub>O), 1.29, 1.78 (AB, J = 9.1 Hz, 2H, CHCH<sub>2</sub>CH).



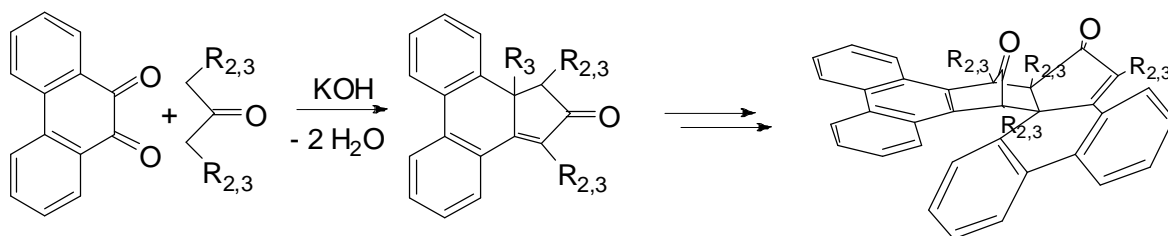
### 7.4 Synthese der Cyclopentadienon-Derivate



**35**

**56:** R<sub>1</sub> = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

**57:** R<sub>1</sub> = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>



**35**

**36:** R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>

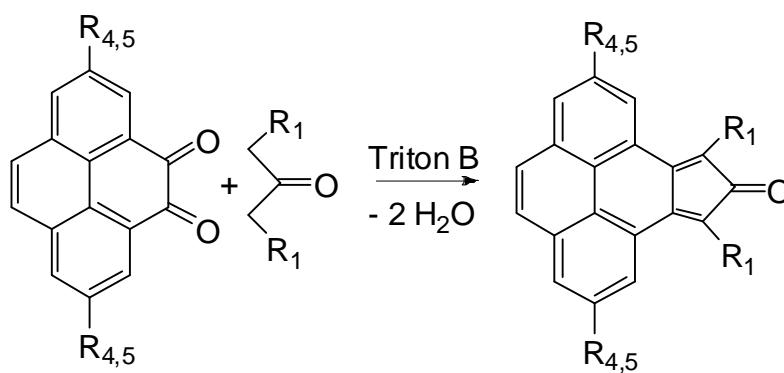
**37:** R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> = OH

**39:** R<sub>2</sub> = CH<sub>3</sub>

**41:** R<sub>3</sub> = COOCH<sub>3</sub>

**42:** R<sub>3</sub> = COOCH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> = OH

**44:** R<sub>3</sub> = COOCH<sub>3</sub>



**63:** R<sub>2</sub> = H

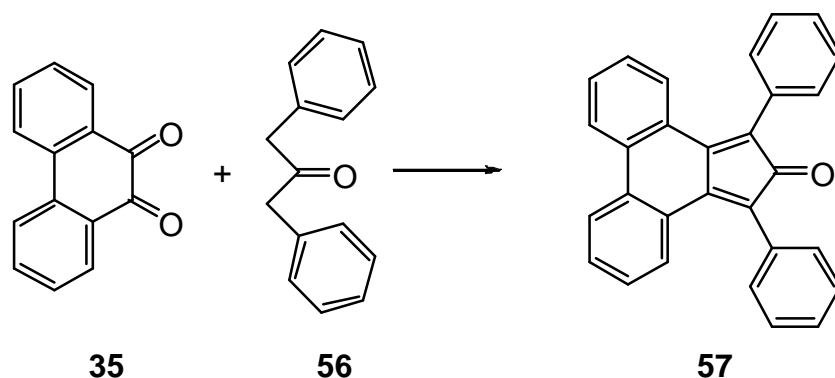
**56:** R<sub>1</sub> = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

**65:** R<sub>2</sub> = H

**64:** R<sub>3</sub> = C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>

**66:** R<sub>3</sub> = C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>

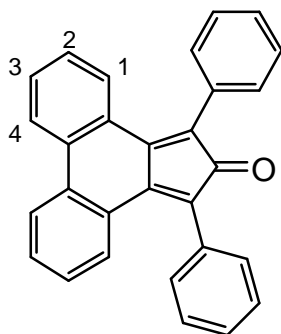
### 7.4.1 Darstellung von 2,5-Diphenyl-3,4-(2,2'-biphenylen)-cyclopenta-2,4-dien-1-on (**57**)<sup>[73]</sup>



Zu einer Suspension von 10.4 g (50.0 mmol) Phenanthren-9,10-chinon **35** und 10.5 g (50 mmol) 1,3-Diphenylpropan-2-on **56** in 260 ml Ethanol wurden bei Raumtemperatur 14 ml einer 3.5 M ethanolischen Kaliumhydroxid-Lösung (zwanzigprozentige Lösung von Kaliumhydroxid in Ethanol, 0.05 mol Kaliumhydroxid) getropft, bis das Chinon gelöst war. Dabei verfärbte sich die Lösung dunkelgrün. Anschließend erwärmte man das Reaktionsgemisch auf 45 °C und tropfte weitere 14 ml (0.05 mol Kaliumhydroxid) ethanolische Kaliumhydroxid-Lösung zu, wobei sich schwarze Kristalle abschieden. Diese Mischung wurde noch 30 Minuten auf 60 °C erwärmt, dann abgekühlt und der Niederschlag über eine Fritte abgetrennt, mit 100 ml Ethanol gewaschen und getrocknet. Umkristallisieren des grünen Produktes **57** aus Toluol (ca. 25 ml Toluol je 1 g Produkt) lieferte ein schwarz-grünes Pulver.

Ausbeute an **57** 16.0 g (41.5 mmol, 83 %; Lit.<sup>[73]</sup>: 90 %)

Schmp. 272 °C aus Toluol (Lit.<sup>[73]</sup>: 273 °C)

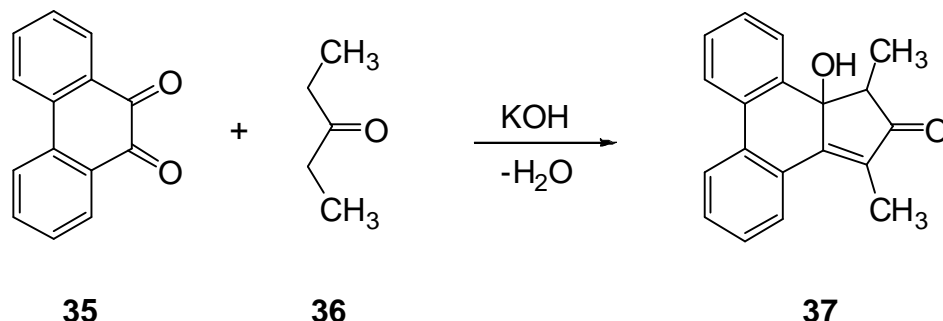


$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $[\text{D}_8]\text{THF}$ ):

$\delta = 7.95$  (d,  $^3J = 7.7$  Hz, 2 H, 1-H), 7.55 (d,  $^3J = 7.8$  Hz, 2 H, 4-H), 7.38 - 7.33 (m, 10 H,  $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 7.29 (dd,  $^3J(2\text{-H}, 3\text{-H}) = 7.4$  Hz,  $^3J(3\text{-H}, 4\text{-H}) = 7.8$  Hz, 2 H, 3-H), 6.94 (dd,  $^3J(2\text{-H}, 3\text{-H}) = 7.4$  Hz,  $^3J(1\text{-H}, 2\text{-H}) = 7.8$  Hz, 2 H, 2-H).

Fluoreszenz von **57** (50  $\mu\text{M}$  in Tetrahydrofuran): keine

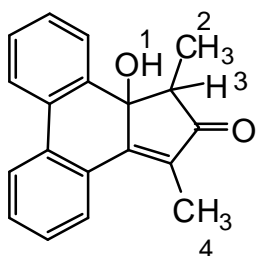
## 7.4.2 Synthese des Methylsubstituierten Phenanthrencyclons

7.4.2.1 Darstellung von 4-Hydroxy-2,5-dimethylcyclopentaphenanthren-2-enon (**37**)<sup>[69]</sup>

In einem 250 ml Einhalskolben mit Magnetrührstab wurden 25.4 g (122 mmol) Phenanthren-9,10-chinon **35** in einer methanolischen KOH-Lösung (1.5 g (27 mmol) KOH in 50 ml Methanol) gelöst. Im Anschluss werden 15 g (174 mmol) Pentan-3-on **36** unter ständigem Rühren zur Suspension zugegeben. Nach beendeter Zugabe wurde 24 Stunden über Nacht gerührt. Dabei verfärbte sich die Suspension dunkelbraun. Die Lösung wurde mit Wasser auf ungefähr das doppelte Volumen verdünnt und mit 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> stark angesäuert. Bei der Wasserzugabe fiel in der Eintropfstelle ein weißer Feststoff aus. Durch das Ansäuern verfärbte sich die Suspension farblos. Nach Filtration von **37** wurde in Toluol umkristallisiert.

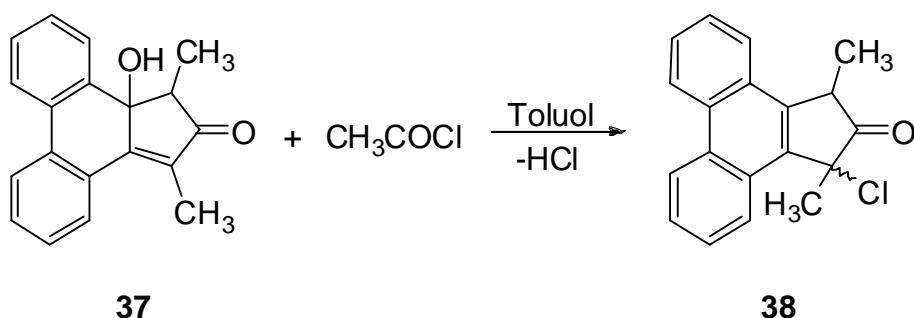
Ausbeute an **37** 23.4 g (85 mmol, 70 %) (Lit.<sup>[69]</sup>: 62.5%)

Schmp. **37** 151 °C (Lit.<sup>[69]</sup>: 154 °C)



<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): δ = 1.57 (d, <sup>3</sup>J (2-H, 3-H) = 7.5 Hz, 3H, 2-H), 1.97 br (s, exch. D<sub>2</sub>O, 1H, 1-H), 2.11 (s, 3H, 4-H), 3.09 (q, <sup>3</sup>J (2-H, 3-H) = 7.5 Hz, 1H, 3-H), 7.41 - 7.56 (sep., 5H), 7.72 (d, 1H), 7.91 - 8.01 (q, 3H).

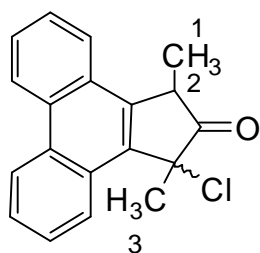
### 7.4.2.2 Darstellung von 1-Chlor-1,3-dimethylcyclopentaphenanthen-2-on (**38**)<sup>[69]</sup>



23.4 g (85 mmol) des Hydroxyketons **37** wurden unter leichtem Rühren bei Eiskühlung zu 72.5 ml (1.02 mol) Acetylchlorid gegeben, so dass die Temperatur 5 °C nicht überstieg. Nach beendeter Gasentwicklung wurde die leicht ockerfarbene Suspension noch 1 Stunde lang gerührt. Nach Abtrennung des Feststoffes wurde dieser mit Diethylether gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Man erhielt 18.7 g (63 mmol) 1-Chlor-1,3-dimethylcyclopentaphenanthen-2-on **38**.

Ausbeute an **38** 18.7 g (63 mmol, 79 %) (Lit.<sup>[69]</sup> 82%)

Schmp. **38** 132 °C (Lit.<sup>[69]</sup>: 140 - 145 °C)

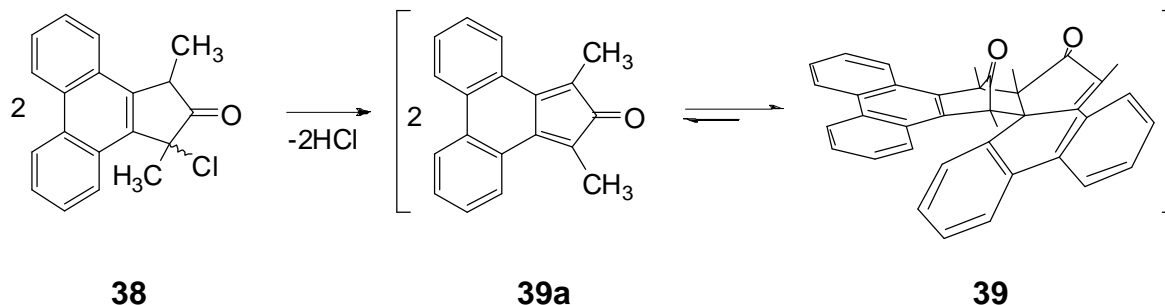


<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO): δ = 1.68 (d, <sup>3</sup>J (1-H, 2-H) = 7.6 Hz, 3H, 1-H), 1.80 (d, <sup>3</sup>J (1-H, 2-H) = 7.6 Hz, 3H, 1-H), 2.22 (s, 3H, 3-H), 2.26 (s, 3H, 3-H), 4.06 (q, 1H, 2-H), 4.19 (q, 1H, 2-H), 7.69 - 8.78 (m, 16H)

6.91 [dd, 1H, <sup>3</sup>J(4H) = 8.54 Hz, <sup>4</sup>J(1H) = 2.64 Hz, 3-H], 5.83 [s, 1H, NH<sub>2</sub>].

Isomerenverhältnis: 2:1 (Lit: 1:1)

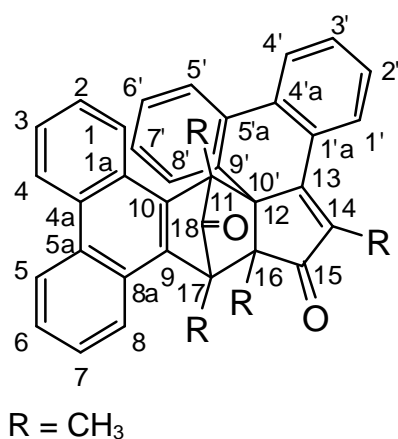
### 7.4.2.3 Darstellung des Dimers von 1,3-Dimethylcyclopentaphenanthren-2-on (**39**)<sup>[69]</sup>



18.7 g (49 mmol) des Chlorketons **38** wurden in 180 ml Dichlormethan gelöst und zu 115 ml einer ethanolischen KOH-Lösung (3 g KOH auf 115 ml Ethanol) bei 0 °C zugetropft. Nach einer halben Stunde Rühren wurde mit verdünnter HCl neutralisiert. Der farblose Feststoff wurde abgetrennt, mit Ether ausgewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Es konnten 6.4 g (12.5 mmol) isoliert werden. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase dreimal mit Dichlormethan extrahiert. Nach Trocknung der vereinigten organischen Phasen über MgSO<sub>4</sub> wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt in Ethanol / Toluol umkristallisiert. Aus der organischen Phase konnten weitere 1.7 g an **39** isoliert werden.

Ausbeute an **39** 8.10 g (16 mmol, 79 %) (Lit.<sup>[69]</sup>: 90 %)

Schmp. **39** 304 °C (Lit.<sup>[69]</sup>: 305 °C)

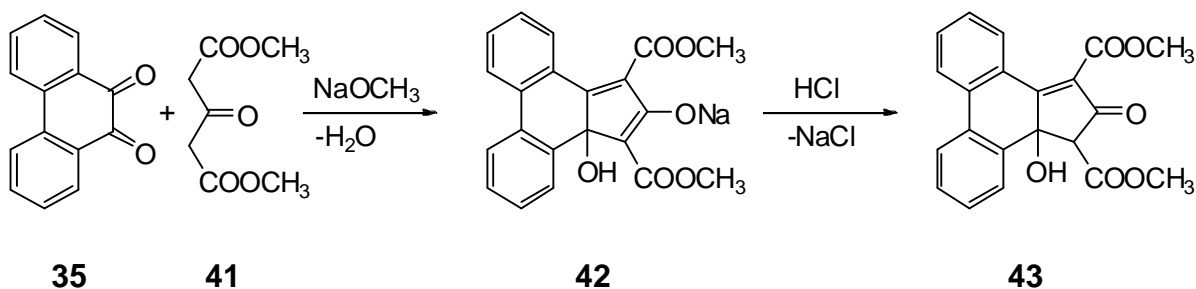


$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta[\text{ppm}] = 1.22$  (s, 6H, 2 Me), 1.89 (s, 6H, 2 Me), 6.96 (d, 1H, Aromat), 7.22 (t, 1H, Aromat), 7.55 (m, 3H, Aromat), 7.81 (s, 1H, Aromat), 8.36 (d, 2H, Aromat).

Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum weist nicht wie vermutet vier Signale für die verschiedenen Methylgruppen auf. Es besitzt lediglich zwei hochfeldverschobene Singulett, da laut Literatur<sup>[69]</sup> einerseits die Signale der Methylgruppen 1-Me und 2-Me und andererseits die Signale der Methylgruppen 3-Me und 4-Me zusammenfallen. Unterstützt wird die Behauptung der schnellen Umlagerung durch NMR-Messungen bei tiefen Temperaturen. Das Hochfeldverschobene Singulett verbreitert sich, während das andere Singulett bei  $-66\text{ }^\circ\text{C}$  in zwei Singulett aufspaltet.

Fluoreszenz von **39** (50  $\mu\text{M}$  in Tetrahydrofuran): keine

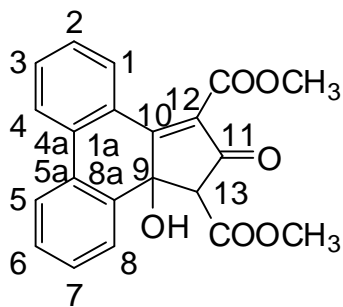
7.4.3 Synthese des Estersubstituierten *Phenanthrencyclons*7.4.3.1 Darstellung von 4-Hydroxy-2,5-bis(carbonsäuremethylester)-3,4-(2,2'-biphenylen)-cyclopent-2-en-1-on. (**43**)<sup>[70]</sup>

Zur Synthese des Hydroxycyclopentenons **43** wurden in einem 500 ml Dreihalskolben 4.16 g (20.0 mmol) 9,10-Phenanthrenchinon **35** sowie 3.68 g (21.1 mmol) Dimethyl-3-oxoglutarat **41** in 50 ml Methanol unter Rühren bei 20 °C und unter Schutzgasatmosphäre suspendiert. Zu dieser Suspension wurde eine Natriummethanolatlösung (2.7 g, 50 mmol Natrium in 70 ml Methanol gelöst) hinzugefügt. Es konnte ein Farbumschlag von gelb nach gelb-orange beobachtet werden. Nach Zugabe einer NaOCH<sub>3</sub>-Lösung wurde die Reaktionsmischung für vier Stunden bei 20 °C gerührt. Die Suspension verfärbte sich hierdurch tieforange. Nach Filtration wurde der Rückstand in 1.2 L H<sub>2</sub>O unter Rühren gelöst und tropfenweise mit einer zehnpromzentigen Salzsäurelösung versetzt, bis ein pH-Wert von 1 erreicht war. Hierdurch fiel ein hellgelber Feststoff **43** aus, der abgetrennt und getrocknet wurde.

Ausbeute an **43**      6.29 g (17.3 mmol, 87.0 %)

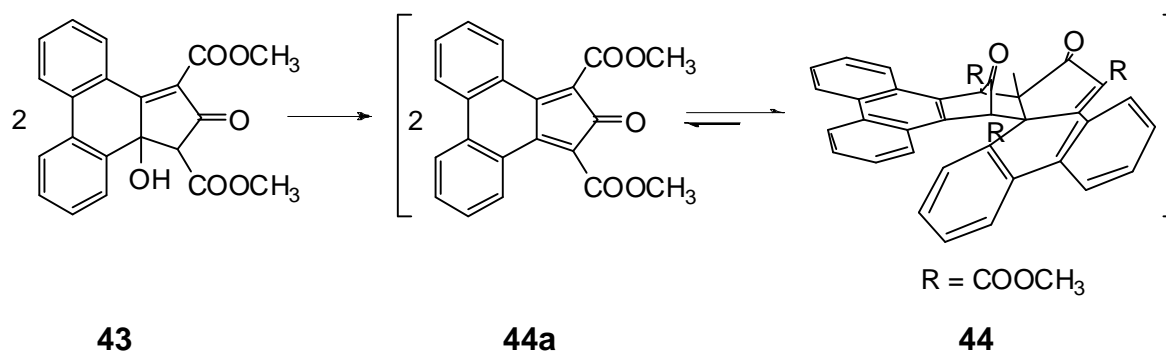
Schmp. **43**            172 °C (Lit.<sup>[70]</sup>: 175°C)





<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO):

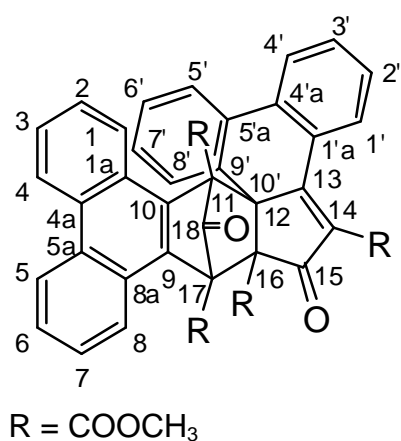
$\delta$  [ppm] = 8.0 - 7.3 (m, 8 H, C-1, C-2, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8), 6.5 (s, 1 H, OH), 4.6 (s, 1 H, 13-H), 3.9, 3.6 (2\*s, 6 H, CH<sub>3</sub>).

7.4.3.2 Darstellung des Diels-Alder-Dimers **44**<sup>[70]</sup>

Zur Synthese des Diels-Alder-Dimeren **44** wurden 0.5 g (1.37 mmol) des Hydroxycyclopentenons **43** in 8 ml Ethanol unter Rühren 15 Minuten zum Sieden erhitzt (hierbei war zu beobachten, dass sich der Feststoff von gelb nach weiß verfärbte), dann auf Raumtemperatur abkühlen lassen und der entstandene weiße Feststoff durch Vakuumfiltration abgetrennt. Der erhaltene Filtrückstand an **44** wurde zunächst mit 1 ml Ethanol gewaschen und dann im Vakuum über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet.

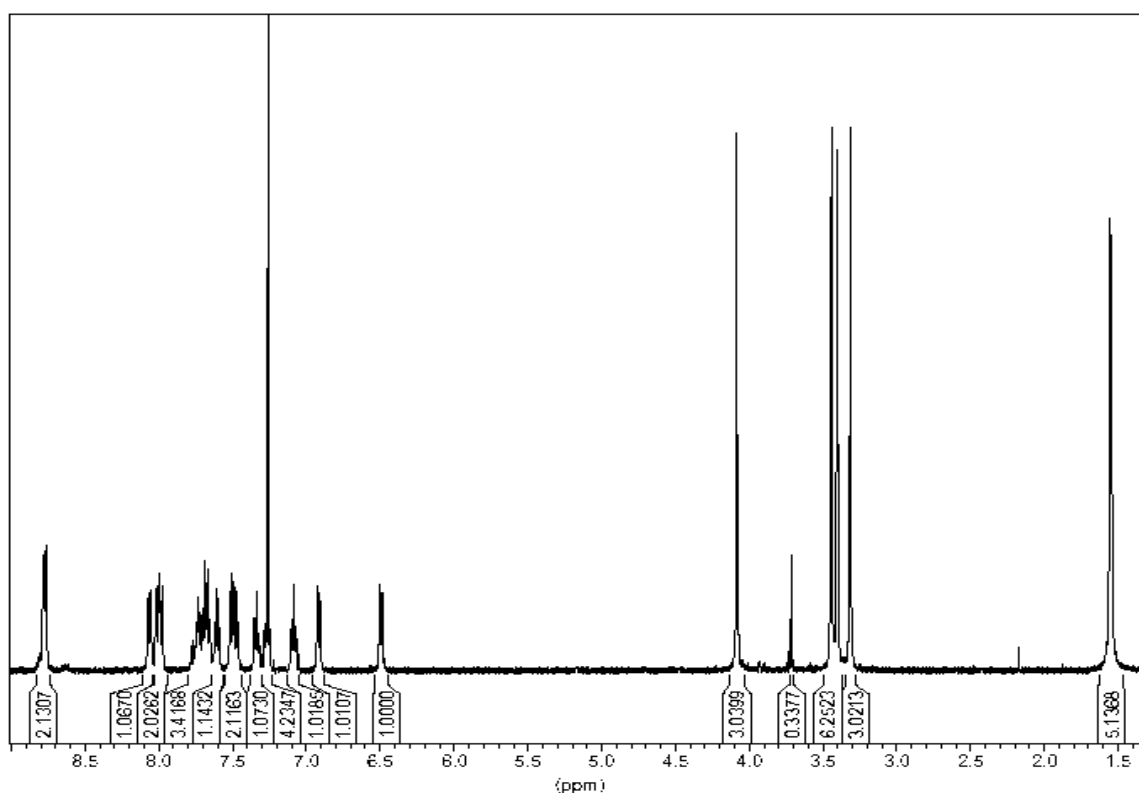
Ausbeute **44**            0.44 g (0.64 mmol, 93 %)

Schmp. **44**            275 °C, Lit.<sup>[70]</sup>: 275 - 280 °C



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  [ppm] = 8.77 (d, 2 H,  $^3J$  (4-H u. 5-H, 3-H u. 6-H) = 9.9 Hz, 4-H u. 5-H), 8.06 (d, 1 H,  $^3J$ (Ar-H, Ar-H) = 8.3 Hz, Ar-H), 8.01 (d, 1 H,  $^3J$ (Ar-H, Ar-H) = 7.7 Hz, Ar-H), 7.98 (d, 1 H,  $^3J$ (Ar-H, Ar-H) = 8.8 Hz, Ar-H), 7.75- 7.57 (m, 3H, Ar-H), 7.53 - 7.43 (m, 2 H, Ar-H), 7.34 (t, 1 H  $^3J$ ( Ar-H, Ar-H)= 7.2 Hz, Ar-H), 7.26 (t, 1 H  $^3J$ (Ar-H, Ar-H) = 10.5 Hz, 7.08 (t, 1 H  $^3J$ ( Ar-H, Ar-H) = 8.2 Hz, Ar-H), 6.92 (d, 1 H,  $^3J$ (Ar-H, Ar-H) = 9.6 Hz, Ar-H), 6.49 (d, 1 H,  $^3J$ (Ar-H, Ar-H) = 7.3 Hz, Ar-H), 4.08 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 3.44 (s, 3 H, Ester- $\text{CH}_3$ ), 3.40 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 3.31 (s, 3 H,  $\text{CH}_3$ ).



**Abbildung 41:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz,  $\text{THF-d}_8$ ) von **44** (zur Zuordnung vgl. Liste der chemischen Verschiebungen)

Das abgebildete Spektrum zeigt bei  $\delta = 3.715$  ppm ein Singulett, das von der monomeren Form des Diels-Alder-Dimers **44** hervorgerufen wird. Dieses Signal entspricht sechs H-Atomen und wird von den isochronen Methylestern hervorgerufen.

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $[\text{D}_8]\text{THF}$ ):

$\delta$  [ppm]: 190.89, 186.41 (C-15, C-18), 167.70, 166.94, 166.66, 166.04 (C-9a, C-9b, C-9c, C-9d), 162.74 (C-13), 137.71, 135.96, 135.73, 133.20, 132.26, 131.93, 131.42, 130.47, 129.04, 128.72, 128.39, 128.12, 127.12, 126.80, 126.67, 126.43, 126.15, 125.49, 124.56, 124.41, 124.27, 124.16, 123.86, 123.62, 123.24 (C-Ar), 77.74, 70.02, 67.55, 61.28, (C-11, C-12, C-16, C-17), 53.16, 53.06, 52.73, 52.29 (C-10a, C-10b, C-10c, C-10d).

Fluoreszenz von **44** (50  $\mu\text{M}$  in Tetrahydrofuran): keine

**EA:**

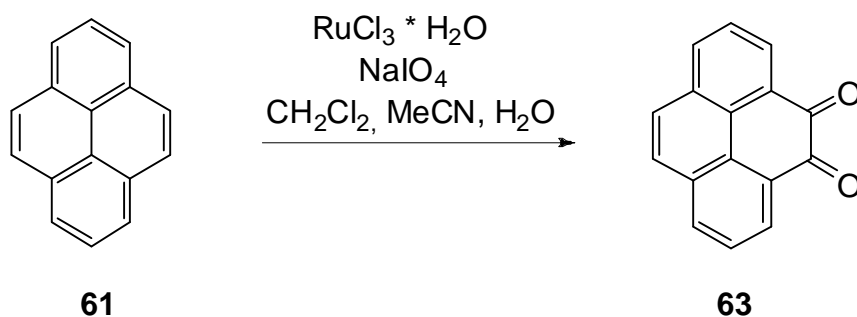
M = 692.7 g/mol

Ber.: **C** 72.83 **H** 4.07

Gef.: **C** 73.03 **H** 4.07

## 7.4.4 Synthese des Pyrenyclons

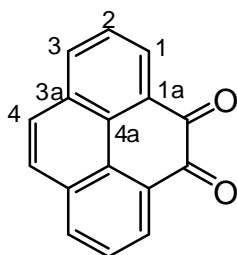
### 7.4.4.1 Darstellung von Pyren-4,5-chinon<sup>[76]</sup>



6.07 g (3.00 mmol) Pyren **61** wurden in 120 ml Dichlormethan und 120 ml Acetonitril gelöst. Zu dieser Lösung wurden 30.0 g (14 mmol)  $\text{NaIO}_4$ , 150 ml Wasser und 0.3 g  $\text{RuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0.13 mmol) gegeben. Nachdem die Suspension über Nacht rührte, wurde die Lösung in 1500 ml Wasser gegossen. Nach Abtrennen der organischen Phase wurde die wässrige Phase dreimal mit 150 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit je 600 ml Wasser gewaschen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt, bis die Kristallation des Produktes **63** begann. Zur vollständigen Kristallisation wurde die Lösung für einige Stunden in den Gefrierschrank gestellt. Der orangerote Feststoff wurde abfiltriert und getrocknet. Das Filtrat wurde nochmals eingeeengt und erneut ins Gefrierfach gestellt um so eine zweite Kristallfraktion zu erhalten.

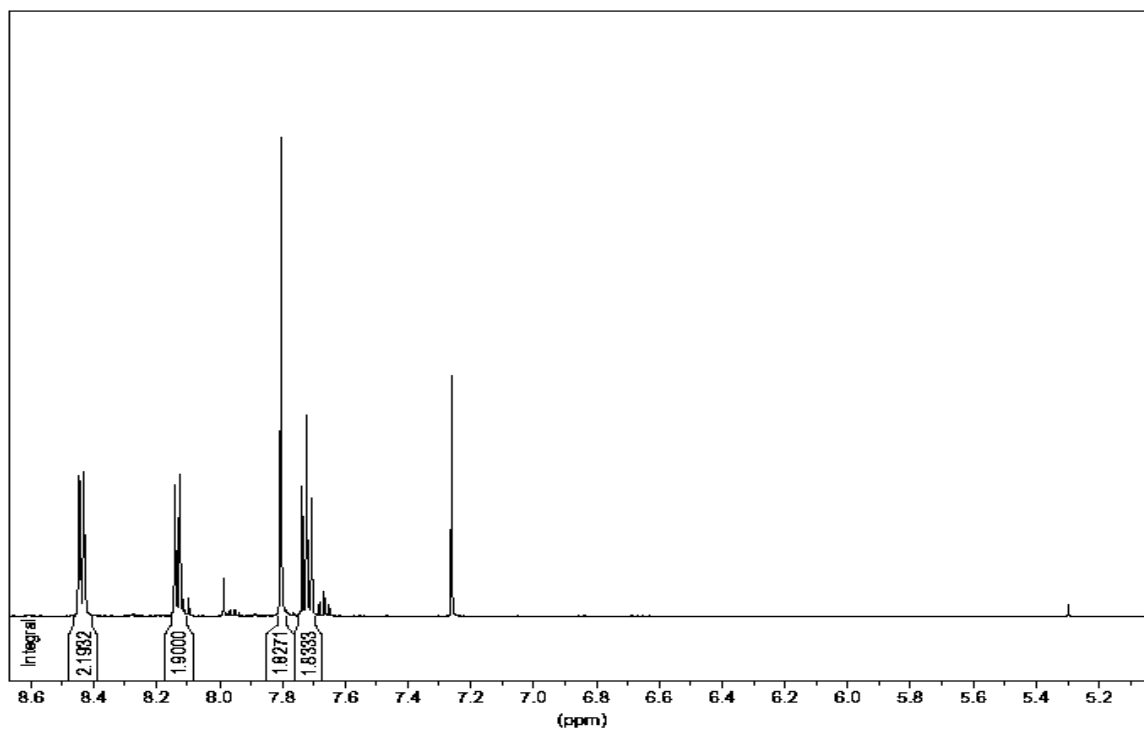
Ausbeute **63** 2.6 g (11.2 mmol, 40 %), Lit.<sup>[76]</sup>: 45%

Schmp. **63** 298 °C, Lit.<sup>[76]</sup>: 298 °C



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  [ppm] = 8.47 (dd,  $^3\text{J}(\text{H-1}, \text{H-2}) = 7.3 \text{ Hz}$ ,  $^4\text{J}(\text{H-1}, \text{H-3}) = 1.3 \text{ Hz}$ , 2H, H-1), 8.16 (dd,  $^3\text{J}(\text{H-3}, \text{H-2}) = 7.3 \text{ Hz}$ ,  $^4\text{J}(\text{H-3}, \text{H-1}) = 1.3 \text{ Hz}$ , 2H, H-3), 7.85 (s, 2H, H-4), 7.76 (t, 2H, H-2).

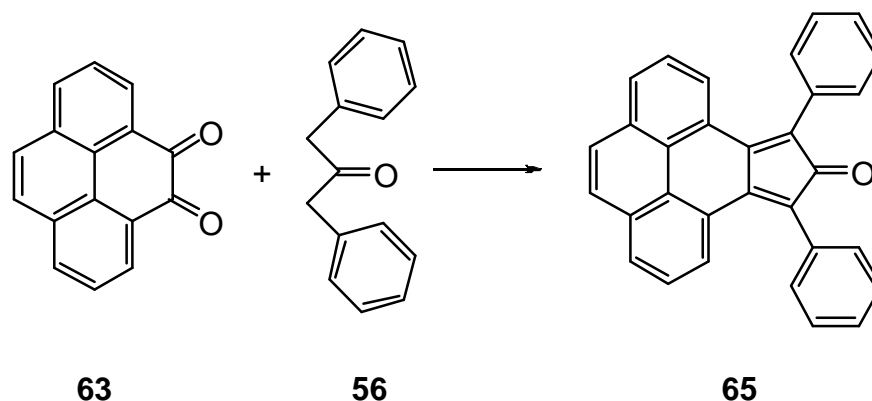


**Abbildung 42:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz,  $\text{THF-d}_8$ ) von **63** (zur Zuordnung vgl. Liste der chemischen Verschiebungen)

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $[\text{D}_8]\text{THF}$ ):

$\delta$  [ppm] = 180.5 (C=O), 135.9 (C-3), 132.1 (C-3a), 130.2 (C-1), 130.1 (C-1a), 128.5 (C-4a), 128.1 (C-2), 127.4 (C-4).

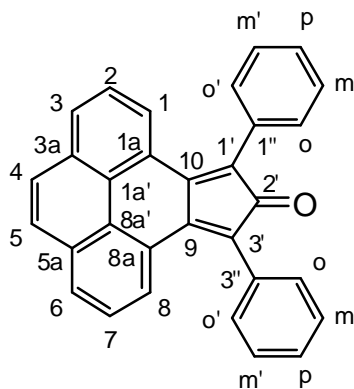
#### 7.4.4.2 Darstellung von 2',5'-Diphenyl-3',4'-(4,5-pyrenylen)cyclopenta-2',4'-dien-1'-on



3.0 g (13 mmol) Pyrenchinon **63** wurden in einem 500 ml-Zweihalskolben in 2.7 g (13 mmol) 1,3-Diphenylacetone **56** und 210 ml Methanol aufgeschlämmt, auf 70 °C erwärmt und 10 Minuten bei dieser Temperatur gehalten. Dann wurden 2.664 ml Triton B zugegeben und weitere 50 Minuten bei 70 °C rühren gelassen. Nachdem die Mischung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde sie über Nacht ins Tiefkühlfach gestellt und am nächsten Tag abfiltriert. Der Feststoff **65** wurde mit 10 ml kaltem Methanol gewaschen und getrocknet.

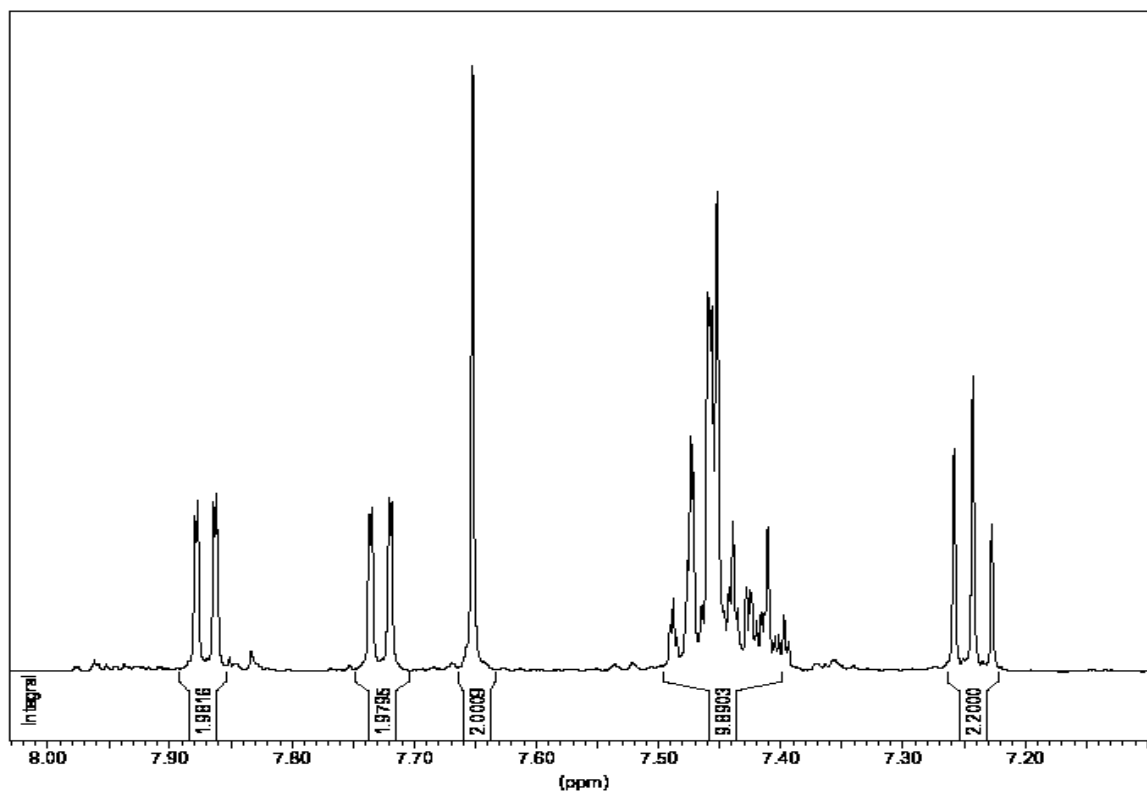
Ausbeute **65**      1.15 g (2.83 mmol), 66 %

Schmp. **65**      211 °C



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  [ppm] = 7.87 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 2H, 1-H, 8-H), 7.74 (d,  $^3J = 7.2$  Hz, 2H, 3-H, 6-H), 7.66 (s, 2H, 4-H, 5-H), 7.50 - 7.40 (m, 10H, o-H, o'-H, m-H, m'-H, p-H), 7.25 (t,  $^3J = 7.6$  Hz, 2 H, 2-H, 7-H).



**Abbildung 43:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz,  $\text{THF-d}_8$ ) von **65** (zur Zuordnung vgl. Liste der chemischen Verschiebungen)



$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  [ppm] = 200.50 ( $\text{C}=\text{O}$ )<sub>Keton</sub>, 148.08 (C-1'', C-3'), 132.80, 132.50, (C-10, C-1a), 134.01, 131.38, 130.12, 128.90, 128.70, 128.30, 127.90, 127.53, 127.20, 127.10, (C-o, C-o', C-m, C-m', C-p, C<sub>arom.</sub>), 127.05, 123.89 (C-1', C-3a).

Molmassenfeinbestimmung:  $\text{C}_{31}\text{H}_{19}\text{O}$  [ $\text{M}$ ]<sup>+</sup>  
(ESITOF)  $m/z$  [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>: ber. 407.1430  
gef. 407.1406  
Abweichung: 5.8 ppm

$\text{C}_{31}\text{H}_{18}\text{NaO}$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>  
 $m/z$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>: ber. 429.1250  
gef. 429.1238  
Abweichung: 2.9 ppm

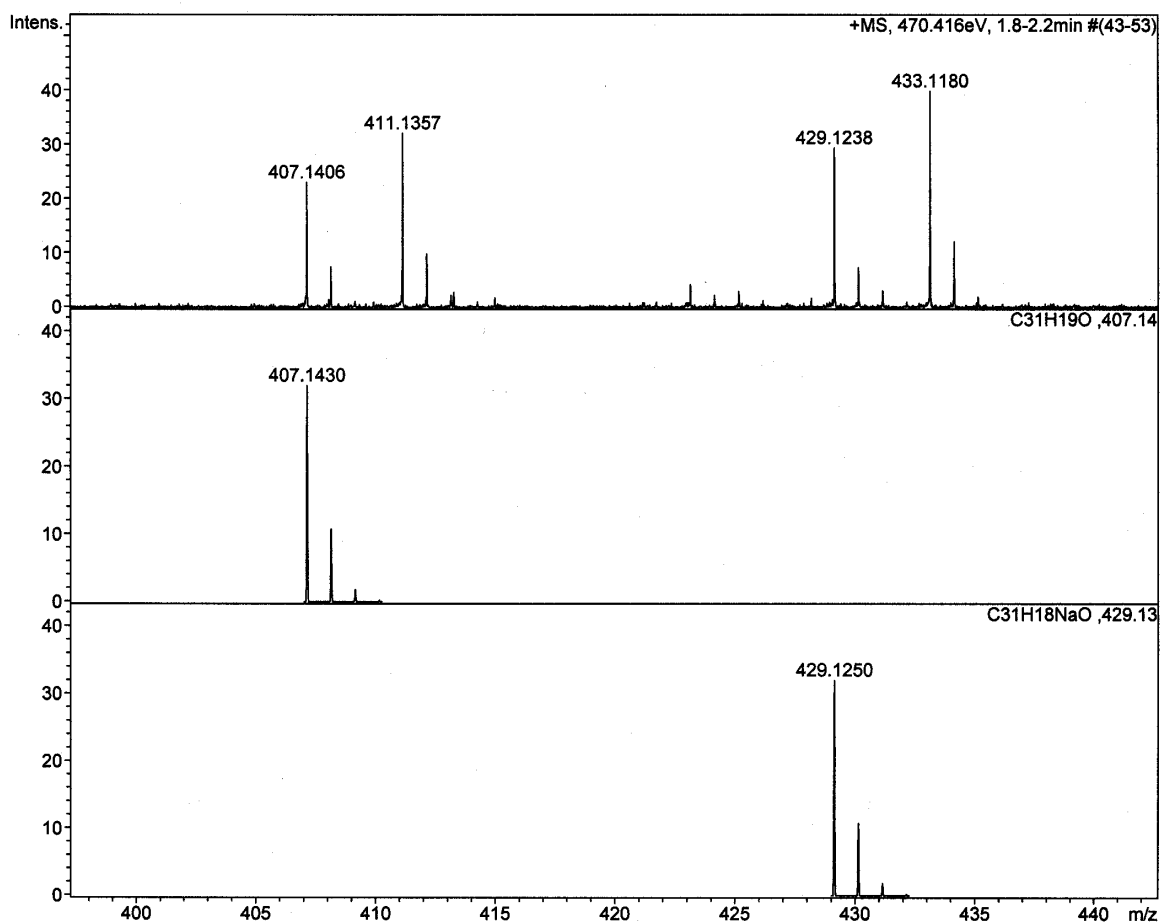
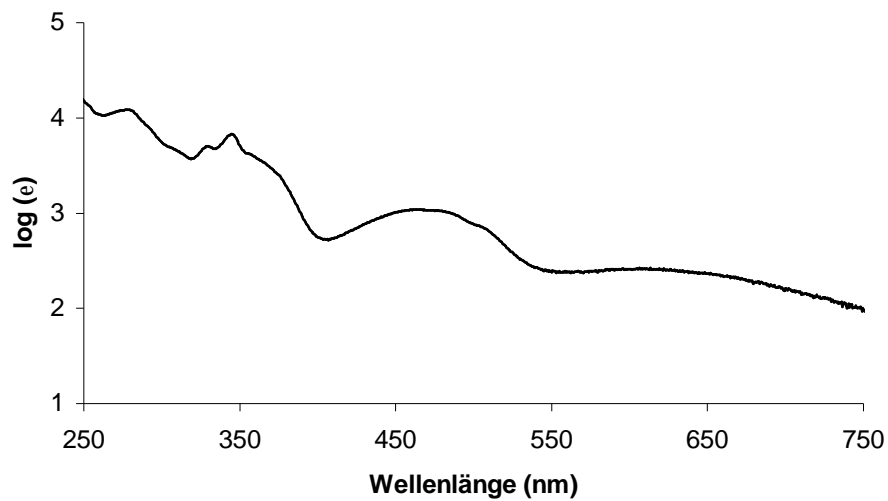


Abbildung 44: ESI-TOF Massenspektrum von 65

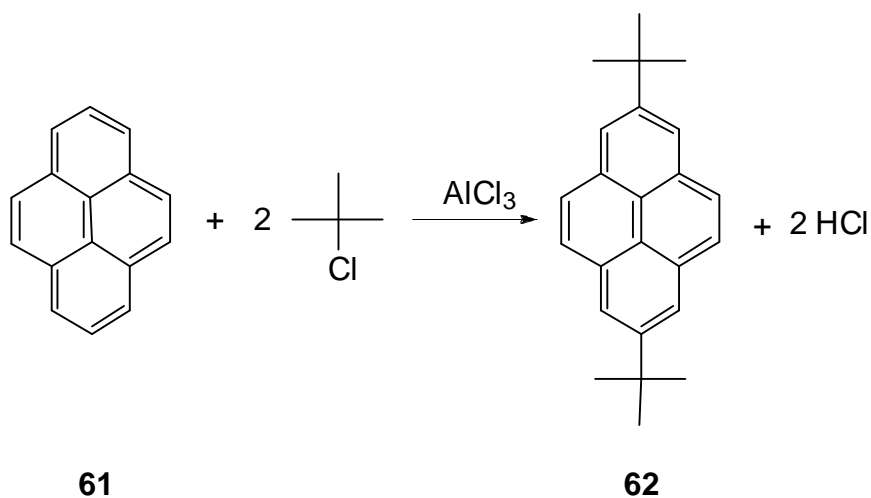
UV(THF):  $\lambda_{\max}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 275 nm (4.08), 341 nm (3.79), 305 nm (4.75),  
474 nm (3.03), 634 nm (2.40).



**Abbildung 45:** UV/Vis Spektrum des FNOCT **65**, Auftragung  $\log \epsilon$  vs. Wellenlänge (nm),  
(50  $\mu\text{M}$  in THF)

Fluoreszenz von **65** (50  $\mu\text{M}$  in THF): keine

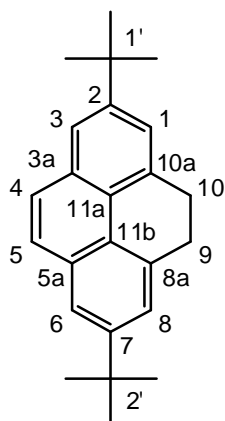
## 7.4.5 Synthese des Di-tert.-butyl-Pyrenyclons

7.4.5.1 Darstellung von 2,7-Di-tert.-butylpyren<sup>[78]</sup>

Zu einer Lösung aus 8.0 g (40 mmol) Pyren **61** und 200 ml tert-Butylchlorid wird 8.0 g (60 mmol) gemörstertes AlCl<sub>3</sub> bei 0 °C gegeben. Nach 3 Stunden rühren bei Raumtemperatur wird die Lösung in 200 ml Eiswasser gegeben und viermal mit 250 ml Dichlormethan extrahiert. Dabei sollte nur geschwenkt werden um das Ausbilden der Phasengrenze zu erleichtern. Die organischen Phasen werden vereinigt und zweimal mit je 200 ml H<sub>2</sub>O dest. gewaschen und danach über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wird der Feststoff **62** mit 40 ml Ethanol digeriert, abfiltriert und mit wenig Ethanol gewaschen.

Ausbeute **62** 7.32 g (0.02 mmol), 58 % (Lit.<sup>[78]</sup>: 80%)

Schmp. **62** 207 °C (Lit.<sup>[78]</sup>: 209 - 211 °C)

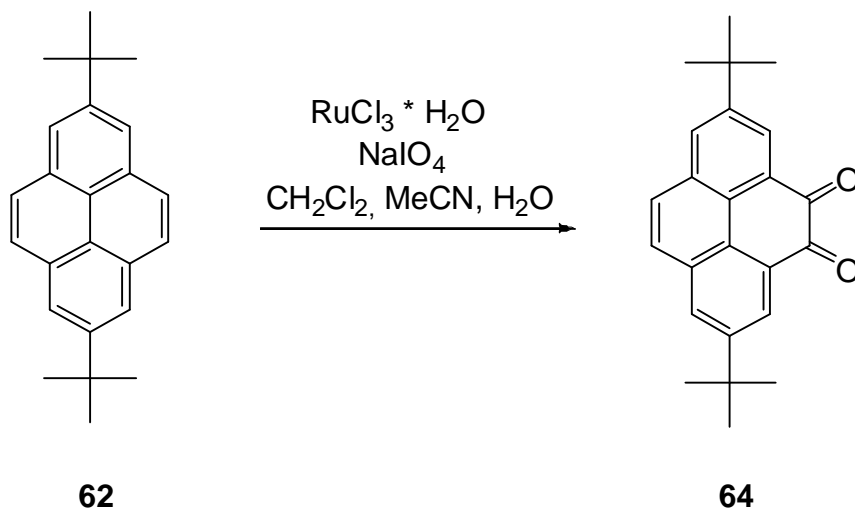


$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$ [ppm] = 8.18 (s, 4 H, 1-H, 3-H, 6-H, 8-H), 8.02 (s, 4 H, 4-H, 5-H, 9-H, 10-H), 1.58 (s, 18 H, 6 x  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$ [ppm] = 148.7 (C-2, C-7), 130.9 (C-11a, C-11b), 127.5 (C-4, C-5, C-9, C-10), 123.1 (C-3a, C-5a, C-8a, C-10a), 122.1 (C-1, C-3, C-6, C-8), 35.3 (C-1', C-2'), 32.1 (6 x  $\text{CH}_3$ ).

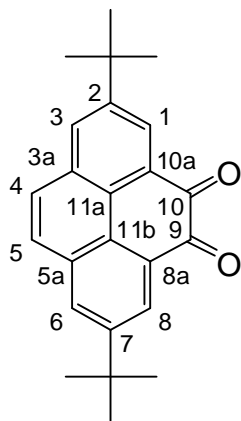
7.4.5.2 Darstellung von 2,7-Di-*tert.*-butylpyren-4,5-dion<sup>[76]</sup>

9.4 g (30 mmol) Di-*tert.*-butylpyren **62** werden in 120 ml Dichlormethan gelöst. Dann werden 30.0 g (140.4 mmol) Natriummetaperiodat in 120 ml Acetonitril gelöst und  $\text{RuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.3 g (0.13 mmol) in 150 ml Wasser hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

Nach dem Rühren wird das Gemisch in einen mit 1.5 L  $\text{H}_2\text{O}$  dest. gefüllten Scheidetrichter überführt. Die organische Phase wird abgetrennt. Die wässrige Phase wird dreimal mit je 150 ml Dichlormethan extrahiert. Zur besseren Unterscheidung der beiden Phasen kann eine Lampe verwendet werden. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit je 150 ml Wasser nachgewaschen. Anschließend wird die Lösung komplett einrotiert. Der feste Rückstand wird in Ethanol umkristallisiert, dann abfiltriert und getrocknet. Das Produkt **64** ist ein roter, kristalliner Feststoff.

Ausbeute **64**            5.27 g (0.015 mol), 50 % (Lit.<sup>[76]</sup>: 46 %)

Schmp. **64**            241 - 243 °C (Lit.<sup>[76]</sup>: 241 - 244 °C)

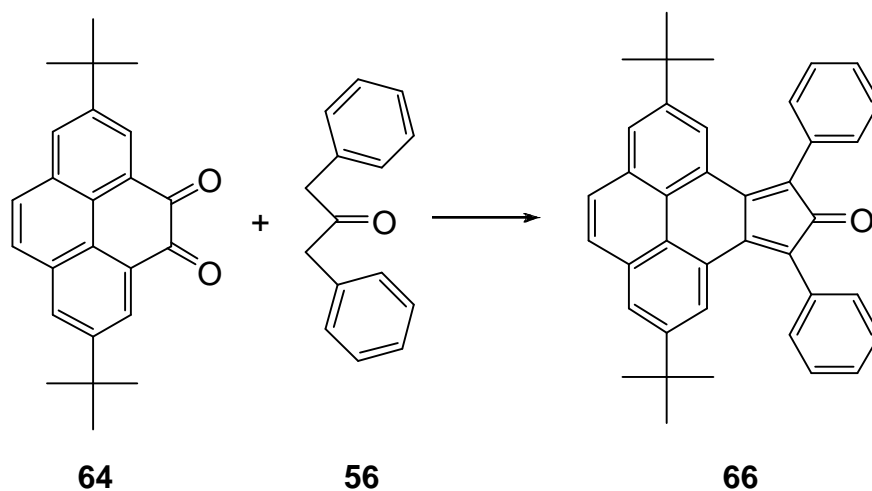


$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$ [ppm] = 8.52 (d, 2 H,  $^4J = 2.1$ , 1-H, 8-H), 8.10 (d, 2 H,  $^4J = 1.4$ , 3-H, 6-H), 7.77 (s, 2 H, 4-H, 5-H), 1.48 (s, 18 H, 6 x  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$ [ppm] = 181.1 (C-9, C-10), 151.2 (C-2, C-7), 132.0 (C-3a, C-5a), 131.9 (C-8a, C-10a), 131.6 (C-3, C-6), 129.8 (C-11a, C-11b), 128.4 (C-4, C-5), 127.3 (C-1, C-8), 35.3 (C-1', C-2'), 31.3 (6 x  $\text{CH}_3$ ).

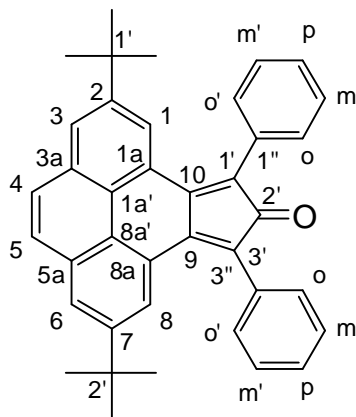
7.4.5.3 Darstellung von Di-*tert.*-butylpyrenyclon

1.482 g (4.3 mmol) Di-*tert.*-butylpyrenchinon **64** werden mit 0.9055 g Diphenylacetone **56** in 60 ml Methanol aufgeschlämmt und auf 70 °C erhitzt. Nun werden 0.888 ml Triton B hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch färbt sich schwarz, zuvor ist es orange-braun. Bei 70 °C wird 50 Minuten gerührt.

Danach wird das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt, über eine Fritte abgesaugt und mit 20 ml Methanol nachgewaschen. Das Produkt **66** ist ein anthrazitfarbener Feststoff, der anschließend getrocknet wurde.

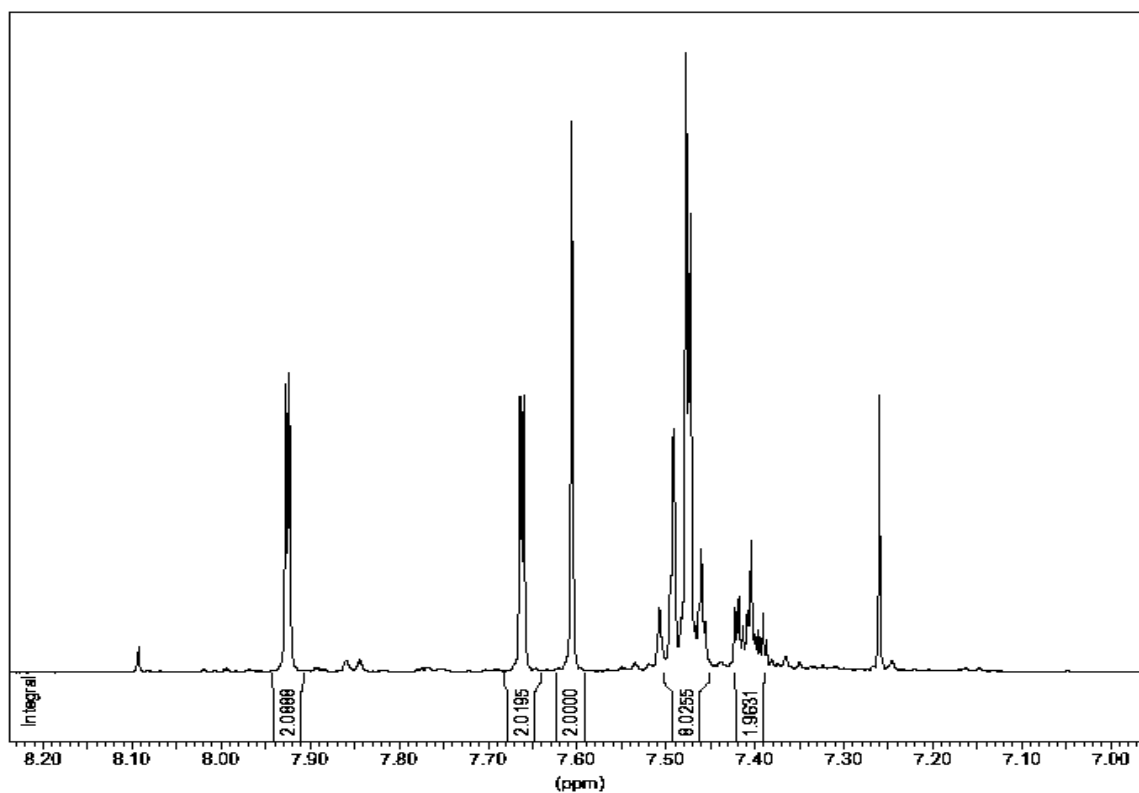
Ausbeute **66**            1.68 g (3.00 mol), 70 %

Schmp. **66**            236 - 242 °C



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$ [ppm] = 7.924 (d, 2 H,  $^4J = 1.9$ , 1-H, 8-H), 7.66 (d, 2 H,  $^4J = 1.9$ , 3-H, 6-H), 7.60 (s, 2 H, 4-H, 5-H), 7.50-7.45 (m, 8 H, m-H, m'-H, m''-H, m'''-H, o-H, o'-H, o''-H, o'''-H), 7.42-7.38 (m, 2 H, p-H, p'-H), 1.13 (s, 18 H, 6 x  $\text{CH}_3$ ).



**Abbildung 46:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz,  $\text{THF-d}_8$ ) von **66** (zur Zuordnung vgl. Liste der chemischen Verschiebungen)



$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$ [ppm] = 200.7 (C-3''), 149.7 (C-9, C-10), 148.7 (C-2, C-7), 133.2 (C-2'', C-4''), 132.1 (C-1'', C-5''), 130.1, 128.9, 128.1, 127.25, 127.2, 126.6 (C-1, C-3, C-4, C-5, C-6, C-8,  $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 126.8 (C-3a, C-5a), 124.9 (C-8a, C-10a), 123.6 (C-11a, C-11b), 34.7 (C-1', C-2'), 31.6, 30.8 (6 x  $\text{CH}_3$ ).

Molmassenfeinbestimmung:  $\text{C}_{39}\text{H}_{35}\text{O} [\text{M}]^+$   
(ESITOF)  $m/z [\text{M}+\text{H}]^+$ : ber. 519.2682  
gef. 519.2658  
Abweichung: 5.0 ppm

$\text{C}_{39}\text{H}_{34}\text{NaO} [\text{M}+\text{Na}]^+$   
 $m/z [\text{M}+\text{Na}]^+$ : ber. 541.2502  
gef. 541.2485  
Abweichung: 3.1 ppm

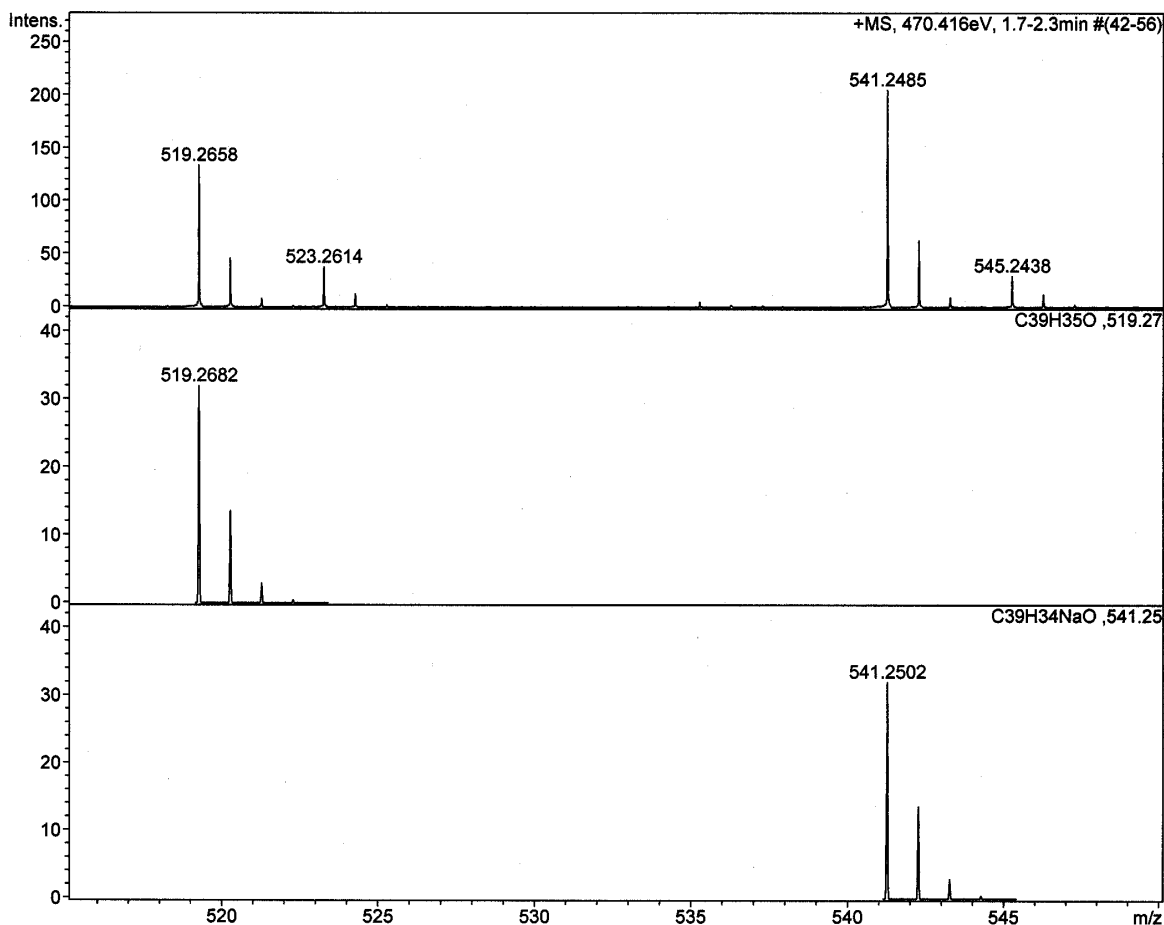
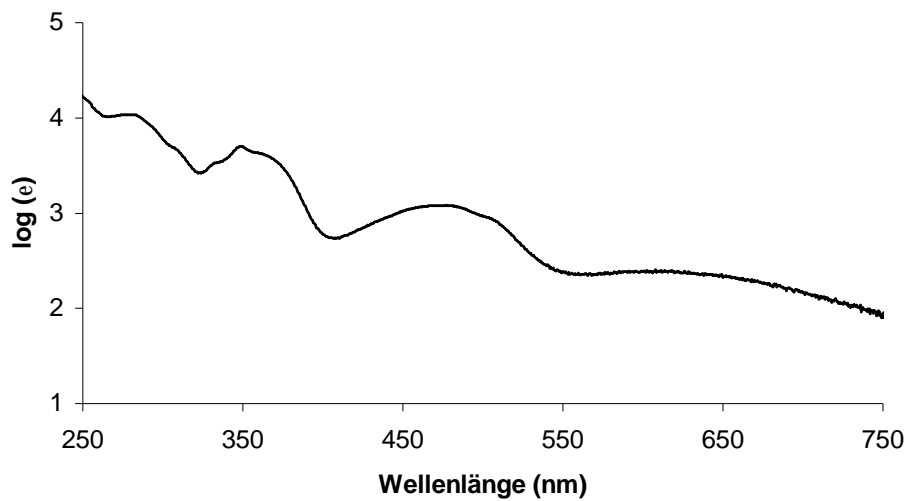


Abbildung 47: ESI-TOF Massenspektrum von 66

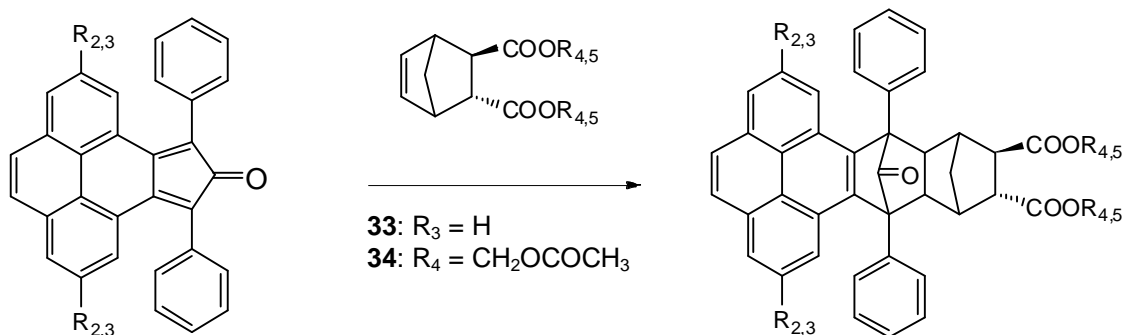
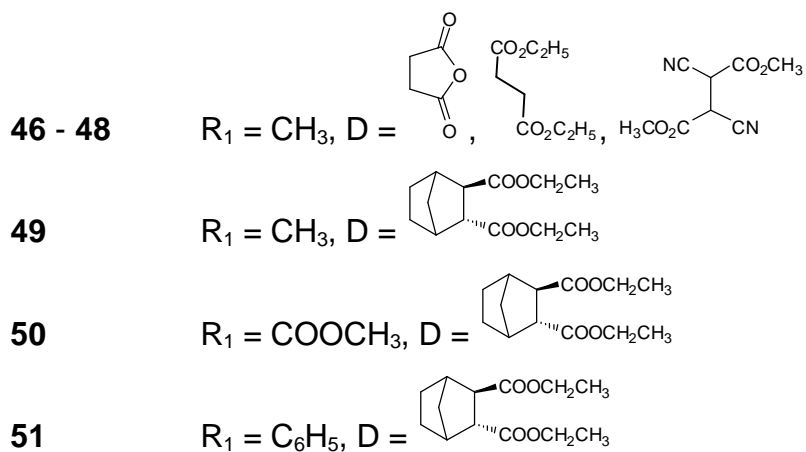
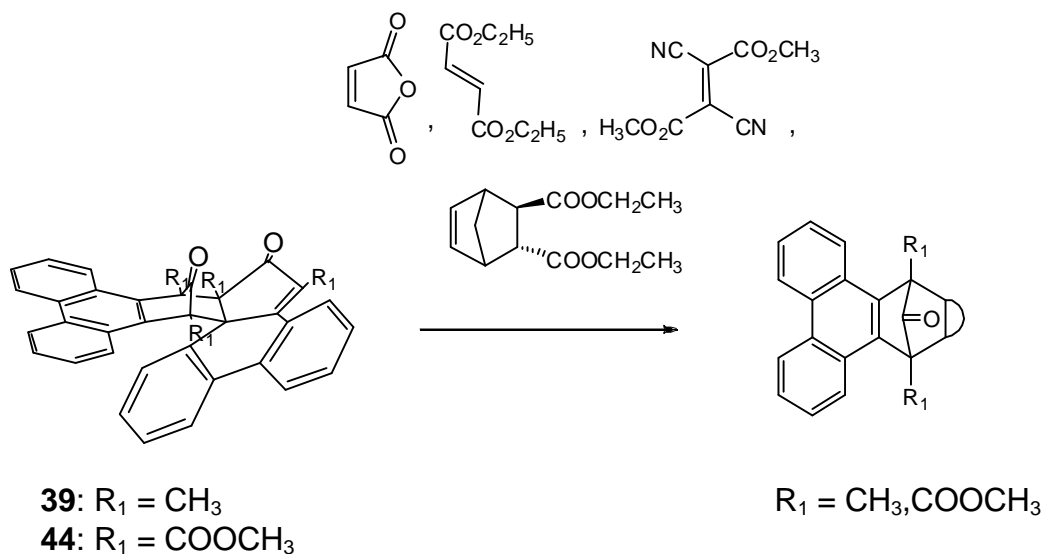
UV(THF):  $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 277 \text{ nm} (4.03), 346 \text{ nm} (3.69),$   
 $360 \text{ nm} (3.63), 475 \text{ nm} (3.08), 637 \text{ nm} (2.36).$



**Abbildung 48:** UV/Vis Spektrum des FNOCT **66**, Auftragung  $\log \epsilon$  vs. Wellenlänge (nm),  
(50  $\mu\text{M}$  in THF)

Fluoreszenz von **66** (50  $\mu\text{M}$  in THF): keine

## 7.5 Synthese der Fängervorstufen durch Diels-Alder-Reaktion von substituierten Norbornen-Derivaten mit Cyclopentadienon-Derivaten



**65:**  $R_2 = \text{H}$

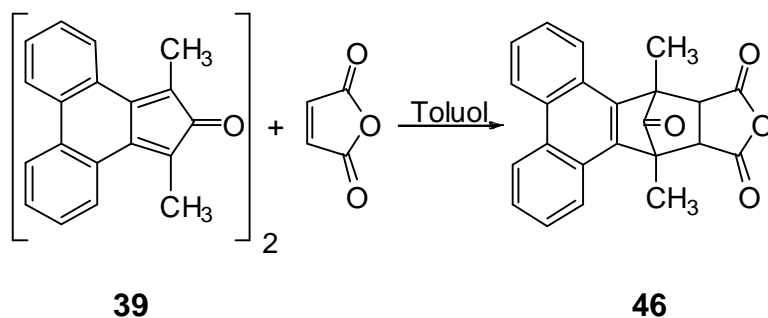
**66:**  $R_3 = \text{C}(\text{CH}_3)_3$

**67:**  $R_2 = \text{H}, R_4 = \text{H}$

**68:**  $R_2 = \text{H}, R_5 = \text{CH}_2\text{OCOCH}_3$

**69:**  $R_2 = \text{C}(\text{CH}_3)_3, R_4 = \text{H}$

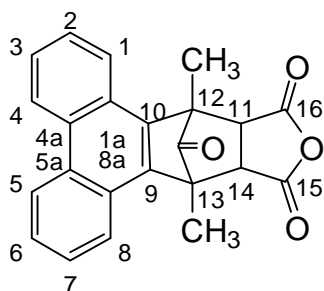
**70:**  $R_2 = \text{C}(\text{CH}_3)_3, R_5 = \text{CH}_2\text{OCOCH}_3$

7.5.1 Synthese des Maleinsäureanhydridadduktes **46**<sup>[69]</sup>

2.70 g (5.20 mmol) des Dimers **39** wurden bei 80 °C in 260 ml Toluol gelöst. Daraufhin wurden 2.56 g (26.0 mmol) Maleinsäureanhydrid im fünffachen Überschuss unter Sieden zugegeben. Nach 90 Minuten fiel ein farbloser Feststoff aus. Dieser wurde abgetrennt, getrocknet und nach Charakterisierung in Chloroform umkristallisiert. Es konnten 3.04 g (8.40 mmol) des gewünschten Produktes **46** erhalten werden.

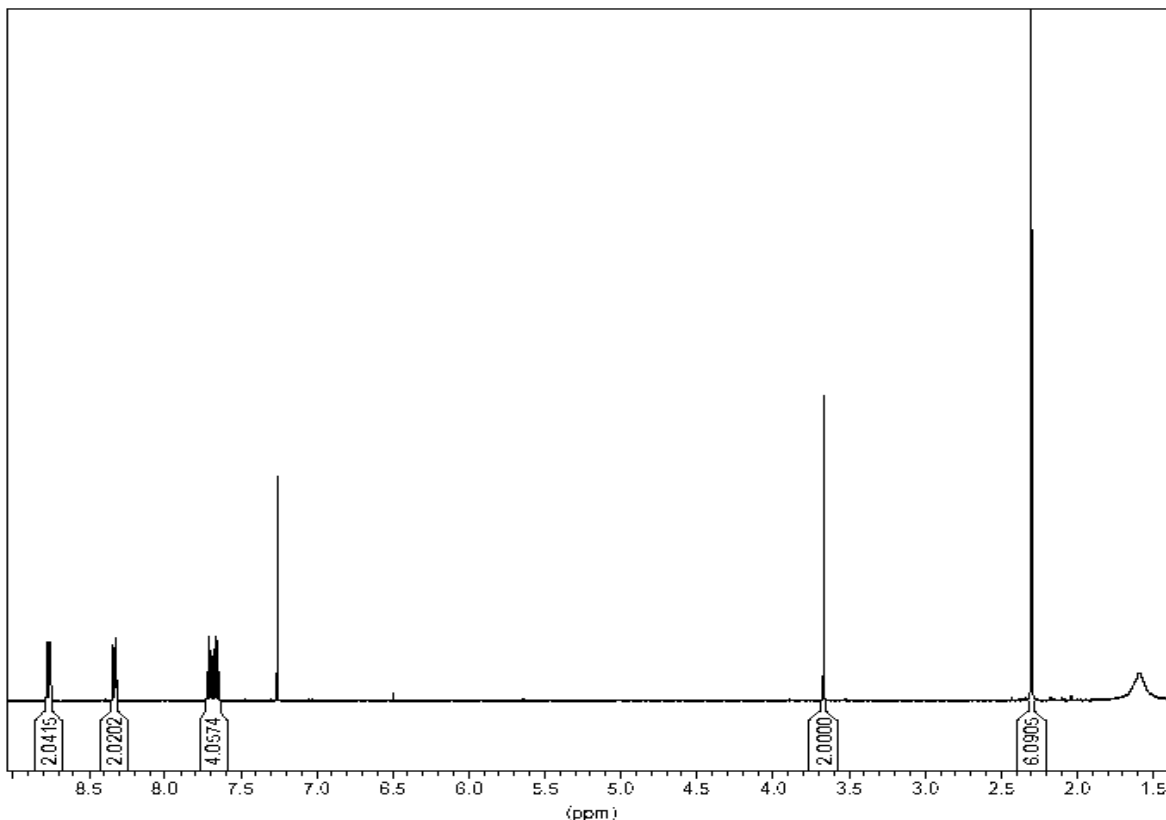
Ausbeute **46**            3.04 g (8.40 mmol, 80 %; Lit.<sup>[69]</sup>: 96 %)

Schmp. **46**            305°C (Lit.<sup>[69]</sup>: 325 °C)



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

$\delta$  [ppm] = 2.15 (s, 6H, 2\*CH<sub>3</sub>), 4.02 (s, 2H, 11-H, 14-H), 7.74 (m, 4H, 2-H, 3-H, 6-H, 7-H), 8.32 (d, 2H, 1-H, 8-H), 8.95 (d, 2H, 4-H, 5-H).



**Abbildung 49:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz, THF-d<sub>8</sub>) von **46** (zur Zuordnung vgl. Liste der chemischen Verschiebungen)

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

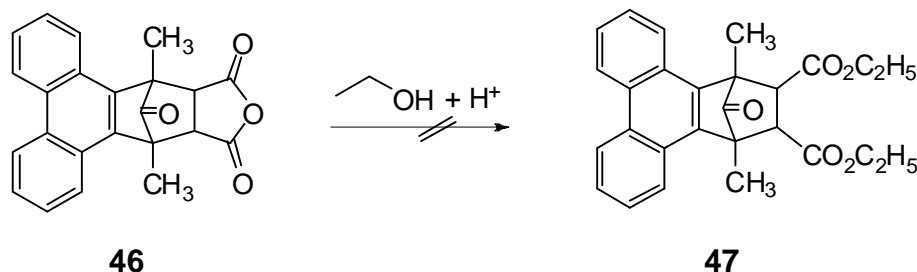
$\delta$  [ppm] = 198.29 (C=O)<sub>Keton</sub>, 169.13 (C=O)<sub>Ester</sub>, 132.90, 131.38, 127.68 (C-1'a, C-4'a, C-5'a, C-8'a, C-9, C-10), 127.52, 126.91, 124.88, 123.78 (C-1, C-2, C-3, C-4), 55.07, 49.11 (C-11, C-12, C-13, C-14), 14.65 (CH<sub>3</sub>).

Elementaranalyse: C<sub>23</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub> Molmasse: 356.4

ber.: C 77.52 H 4.53

gef.: C 75.81 H 4.55

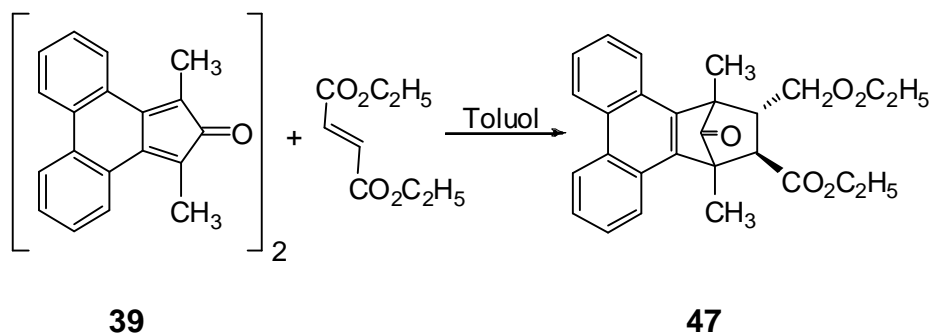
Die Photolyse von **46** zeigte, dass sich das Anhydrid unter Austritt von CO und CO<sub>2</sub> zersetzt. Daher wurde in einem nächsten Schritt versucht, säurekatalytisch das Maleinsäureanhydrid-Addukt **46** zum Phencyclon **47** zu verestern.



500 mg (1.40 mmol) des Maleinsäureanhydrid-Adduktes **46** wurden in 30 ml Chloroform gelöst. 0.81 ml (14.0 mmol) Ethanol, sowie 18 Tropfen konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurden hinzugegeben. Man ließ 90 Minuten unter Rückfluss erhitzen. Im Anschluss wurde die klare Lösung auf 10 ml Eiswasser gegossen, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase zweimal mit jeweils 10 ml Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 20 ml gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung im Scheidetrichter versetzt, mit 20 ml Wasser ausgewaschen und über MgSO<sub>4</sub> getrocknet.

Das Lösungsmittel wurde vollständig entfernt und der ockerfarbene Feststoff in Ethanol umkristallisiert. Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum ließ keine Rückschlüsse auf mögliche Produkte zu. Es bildete sich ein nicht identifizierbares Produkt.

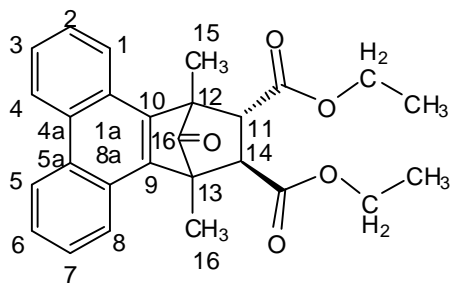
Daher wurde in einem weiteren Ansatz die Darstellung des Phencyclons **47** über die Umsetzung des Dimers mit Fumarsäurediethylester vorgenommen.

7.5.2 Synthese des Ketons **47**

2.00 g (3.90 mmol) des Dimers **39** wurden mit einem 2,5-fachen Überschuss an Fumarsäurediethylester (3.30 g, 9.80 mmol) in 300 ml Toluol versetzt und 90 Minuten unter Rückfluss erhitzt. Der ausgefallene Feststoff wurde abgetrennt und in Ethanol umkristallisiert. Die Lösung wurde bis auf wenige Milliliter eingeeengt und der ausgefallene farblose Feststoff **47** nach Filtration in Chloroform umkristallisiert.

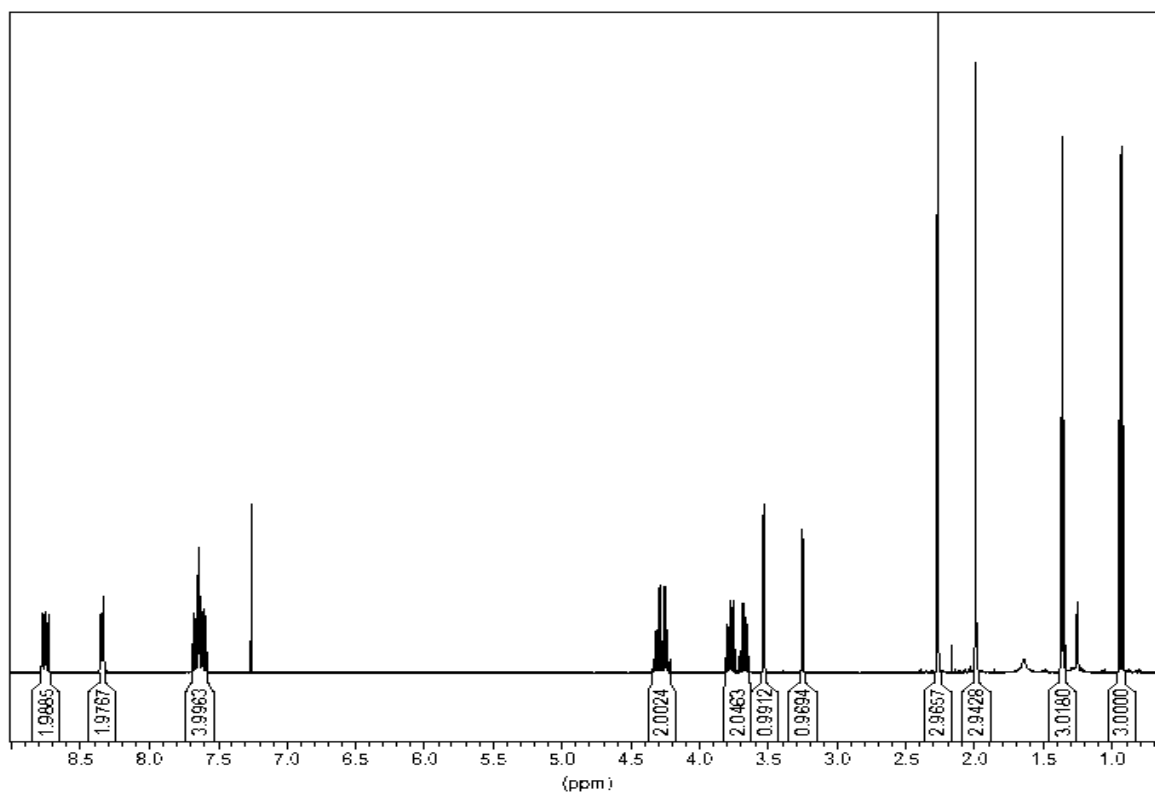
Ausbeute **47**            1.50 g (3.50 mmol, 45 %)

Schmp. **47**            198 - 199 °C



$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  [ppm] = 0.94 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.36 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.99 (s, 3H, 15-H oder 16-H), 2.27 (s, 3H, 15-H oder 16-H), 3.25 (d, 1H, 11-H oder 14-H), 3.53 (d, 1H, 11-H oder 14-H), 3.64 - 3.81 (qq, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.21 - 4.33 (qq, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 7.64 (m, 4H, 2-H, 3-H, 6-H, 7-H), 8.33 (d, 2H, 1-H, 8-H), 8.75 (d, 2H, 4-H, 5-H).



**Abbildung 50:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz,  $\text{THF-d}_8$ ) von **47** (zur Zuordnung vgl. Liste der chemischen Verschiebungen)

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

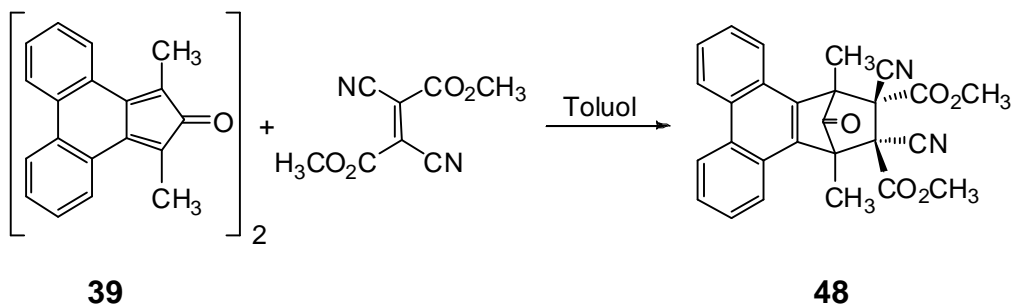
$\delta$  [ppm] = 201.81 ( $\text{C=O}$ )<sub>Keton</sub>, 172.10, 170.67 ( $\text{C=O}$ )<sub>Ester</sub>, 132.90, 131.38, 127.68 (C-1'a, C-4'a, C-5'a, C-8'a, C-9, C-10), 127.52, 126.91, 124.88, 123.78 (C-1, C-2, C-3, C-4), 61.66, 61.42 ( $\text{CH}_2$ ), 54.73, 54.26 (C-12, C-13), 51.85, 50.90 (C-11, C-14), 14.74, 14.44 (C-15, C-16), 13.91, 12.41 ( $\text{CH}_3$ ).

Elementaranalyse:  $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{O}_5$  Molmasse: 430.5

ber.: C 75.33 H 6.09

gef.: C 75.62 H 6.07

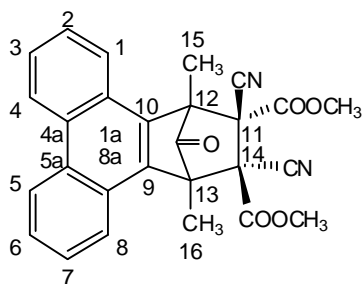


7.5.3 Synthese des Ketons **48**

1.00 g (1.90 mmol) an Dimer **39** wurden bei 80 °C in 150 ml Toluol gelöst. Nach portionsweiser Zugabe von 0.75 g (3.90 mmol) des Dicyanofumarsäuredimethylesters verfärbte sich die klare Lösung hellgelb. Man erhitzte bis zu 40 Stunden lang. Der Reaktionsverlauf wurde dünschichtchromatographisch überwacht. Nach der Abtrennung des farblosen Feststoffes mußte dieser mehrfach in Methanol umkristallisiert werden, um eine optimale Reinigung zu erreichen.

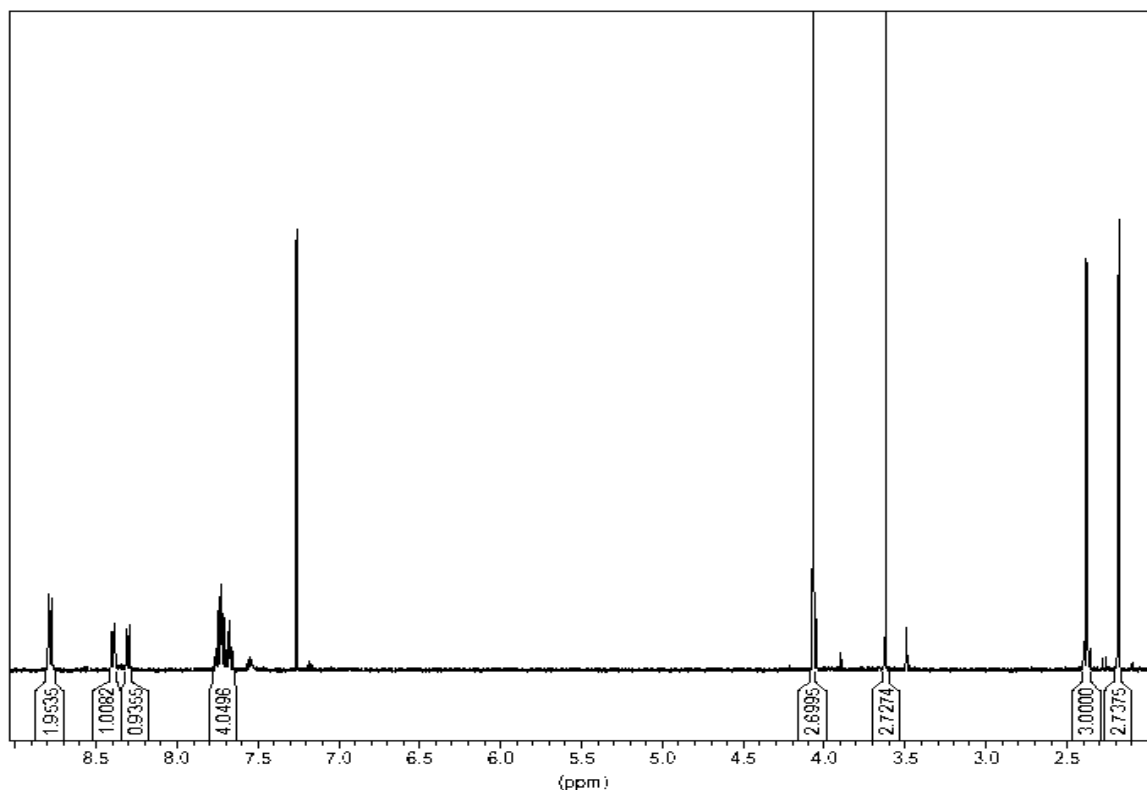
Ausbeute **48**      0.75 g (0.17 mmol, 42 %)

Schmp. **48**      188 - 190 °C



$^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  [ppm] = 2.18 (s, 3H, 15-H oder 16-H), 2.38 (s, 3H, 15-H oder 16-H), 3.62 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4.07 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 7.65 - 7.76 (m, 4H, 2-H, 3-H, 6-H, 7-H), 8.30 (d, 1H, 1-H, 8-H), 8.39 (d, 1H, 1-H, 8-H), 8.78 (d, 2H, 4-H, 6-H).



**Abbildung 51:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz,  $\text{THF-d}_8$ ) von **48** (zur Zuordnung vgl. Liste der chemischen Verschiebungen)

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

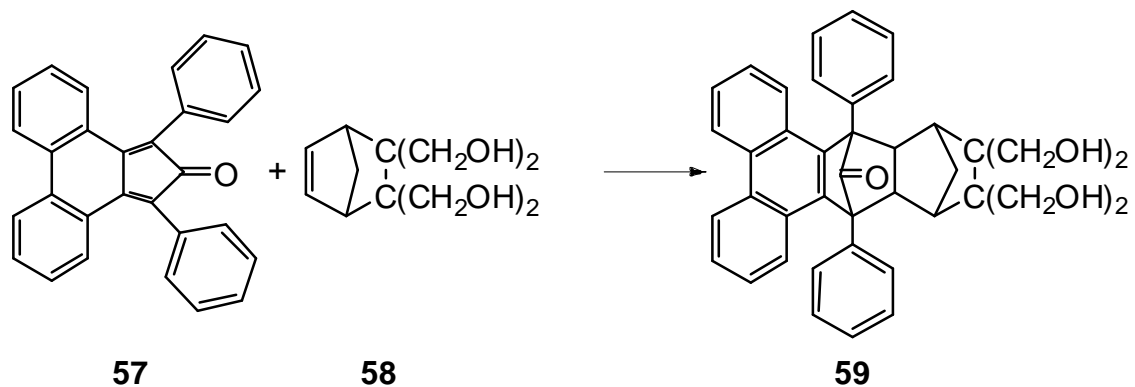
$\delta$  [ppm] = 208.14 ( $\text{C=O}$ )<sub>Keton</sub>, 173.27, 168.57 ( $\text{C=O}$ )<sub>Ester</sub>, 131.86, 128.08, 127.93, 127.55, 127.28, 125.90, 125.19, 124.00, 123.78 (C-1'a, C-4'a, C-5'a, C-8'a, C-9, C-10, C-1, C-2, C-3, C-4), 58.72, 55.09, 54.86 (C-11, C-14, C-12, C13, C-15, C-16), 13.69, 12.27 ( $\text{CH}_3$ ).

Elementaranalyse:  $\text{C}_{27}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{N}_2$  Molmasse: 452.5

ber.: C 71.67 H 4.46 N 6.19

gef.: C 71.37 H 4.47 N 6.20

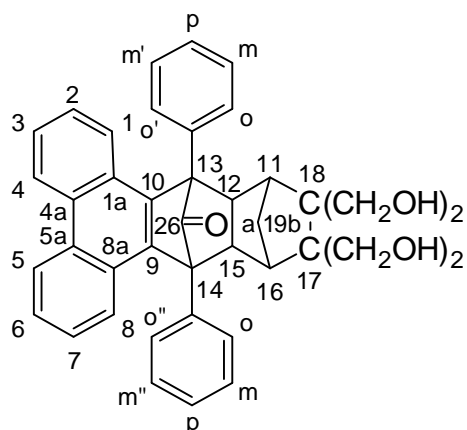
7.5.4 Darstellung von 3,5-Diphenyl-3,5-(9,10-phenanthrylen)tricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-on-8,9-(E)-tetrahydroxymethyl (**59**)



207 mg (0.54 mmol) 2,5-Diphenyl-3,4-(2,2'-biphenyl)cyclopenta-2,4-dien-1-on **57** und 111 mg (0.52 mmol) Norborn-5-en-2,3-tetrahydroxymethyl **58** in 15 ml Chlorbenzol wurden 20 Stunden bei 130°C und Lichtausschluss gerührt. Durch die Apparatur wurde während dieser Zeit Argon geleitet. Der entstandene weiße Niederschlag wurde abfiltriert und in 10 ml THF aufgenommen. Das Produkt **59** wurde durch Zugabe der zehnfachen Menge an n-Heptan unpolar ausgefällt und getrocknet.

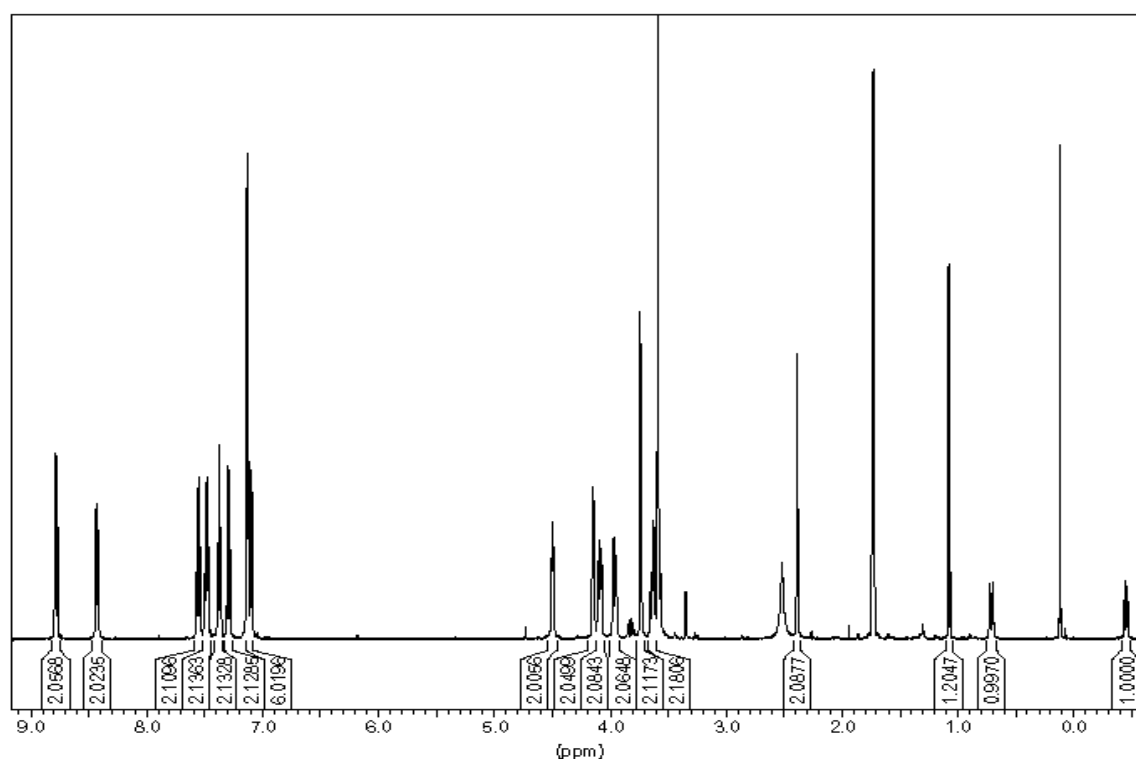
Ausbeute an **59** 113 mg (0.19 mmol, 37 %)

Schmp. **59** 235 °C



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $[\text{D}_8]\text{THF}$ ):

$\delta$  [ppm] = 8.78 (d,  $^3\text{J} = 8.1$  Hz, 2H, 4-H, 5-H), 8.43 (d,  $^3\text{J} = 7.8$  Hz, 1 H, 1-H, 8-H), 7.55 (t,  $^3\text{J} = 7.8$  Hz, 2 H, 3-H, 6-H), 7.48 (t,  $^3\text{J} = 7.6$  Hz, 2 H, 2-H, 7-H), 7.37 (t,  $^3\text{J} = 7.5$  Hz, 2 H, m'-H, m-H), 7.28 (t,  $^3\text{J} = 7.5$  Hz, 2 H, m''-H oder m'-H), 7.14 - 7.08 (m, 6 H, 1-H, 2-H, 7-H, 8-H, o-H, o'-H, o''-H, p-H), 4.49, 4.14, 4.08, 3.97 (4dd, 8H,  $\text{CH}_2$ ), 3.74 (s, 2H, OH), 3.63 - 3.55 (m, 4 H, 11-H, 16-H, 12-H, 15-H), 2.38 (s, 2H, OH), 0.70 (d,  $^2\text{J}$  (19a-H, 19b-H) = 11.1 Hz, 1 H, 19b-H), -0.44 (br d,  $^2\text{J}$  (19a-H, 19b-H) = 11.4 Hz, 1 H, 19a-H).



**Abbildung 52:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz,  $\text{THF-d}_8$ ) von **59** (zur Zuordnung vgl. Liste der chemischen Verschiebungen)

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $[\text{D}_8]\text{THF}$ ):

$\delta$  [ppm] = 199.63 ( $\text{C}=\text{O}$ )<sub>Keton</sub>, 139.02, 136.68, 132.60, 132.02, 129.95, 129.68 (C-1'a, C-4'a, C-5'a, C-8'a, C-9', C-10'), 129.20, 128.69, 127.87, 126.95 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 126.80, 126.62, 124.22 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7), 126.26, 124.42 (C-1, C-8), 59.74 (C-13, C-14), 54.92 ( $\text{CH}_2$ ), 51.42, 46.89, 42.55 (C-11, C-12, C-15, C-16, C-17, C-18), 30.49 (19a, 19b).

Molmassenfeinbestimmung:  $C_{40}H_{36}NaO_5 [M+Na]^+$   
(ESITOF)  $m/z [M+Na]^+$ : ber. 619.2455  
gef. 619.2459  
Abweichung: 0.6 ppm

$C_{84}H_{72}NaO_{10} [M_2+Na]^+$   
 $m/z [M_2+Na]^+$ : ber. 1215.5018  
gef. 1215.5011  
Abweichung: 0.6 ppm

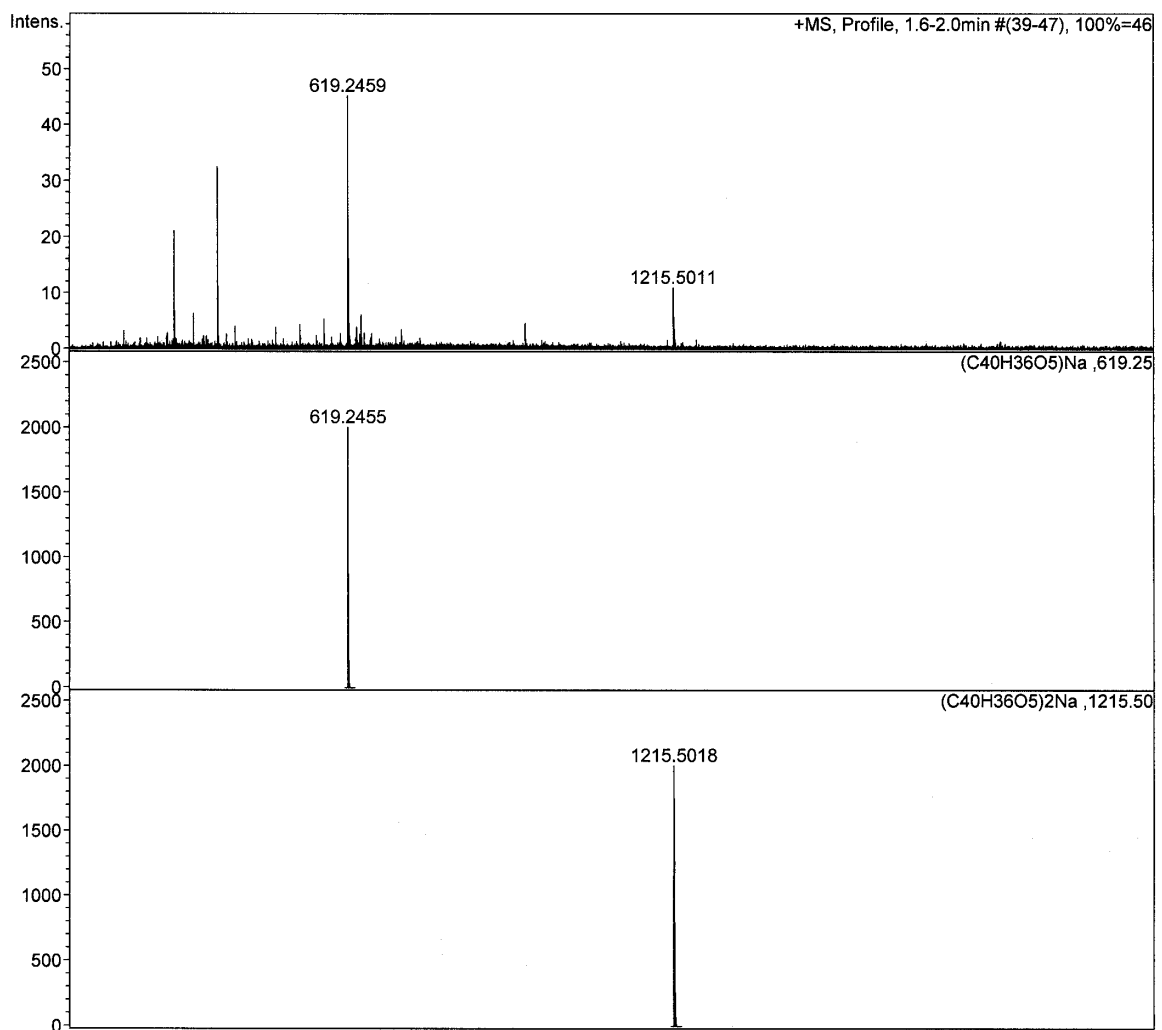
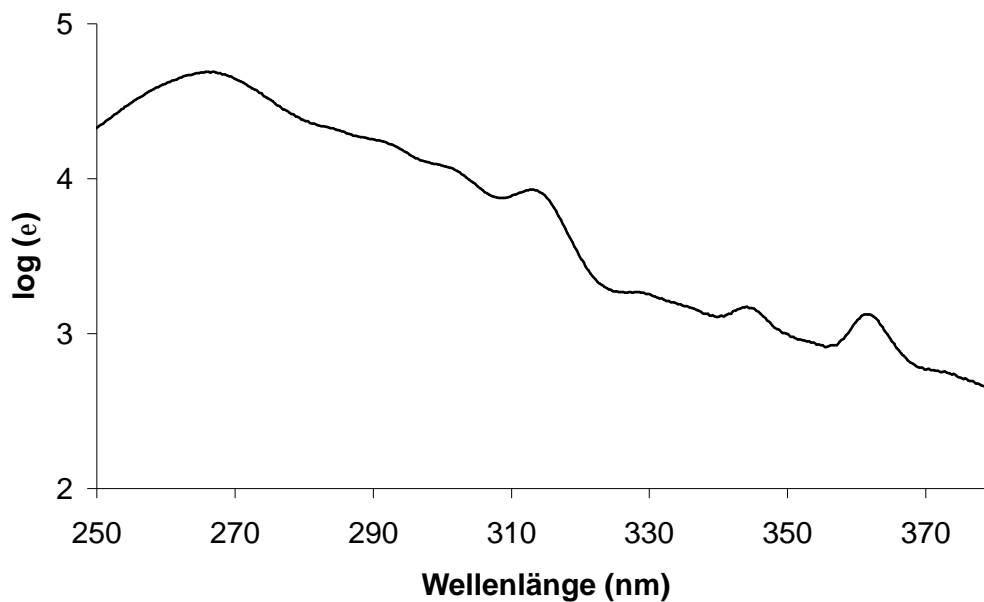
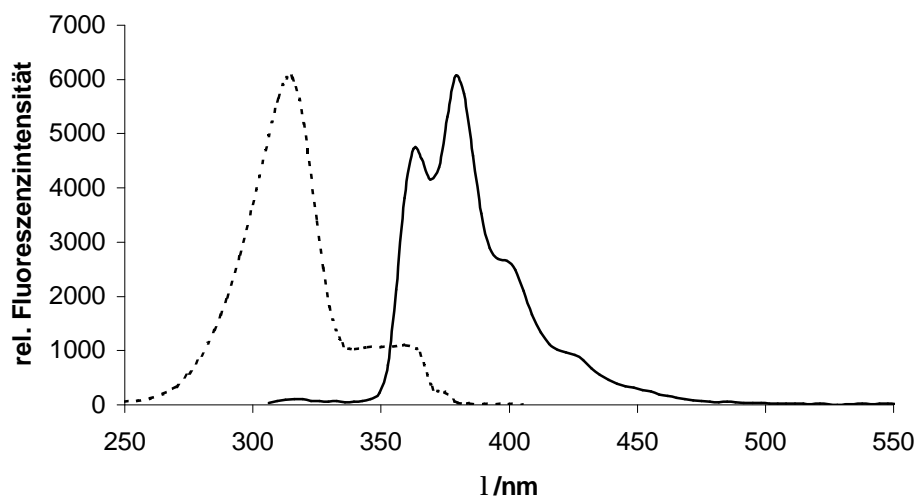


Abbildung 53: ESI-TOF Massenspektrum von 59

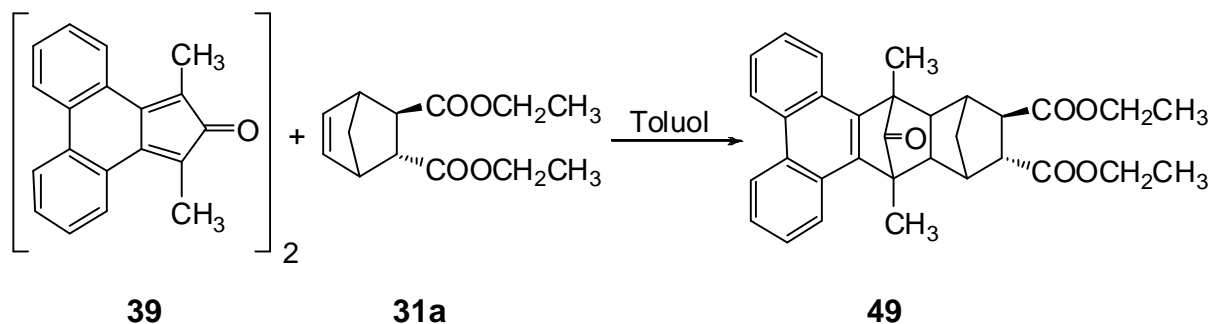
UV(THF):  $\lambda_{\max}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 360 nm (3.11), 343 nm (3.16), 312 nm (3.93),  
263 nm (4.67).



**Abbildung 54:** UV/Vis Spektrum des Ketons **59**, Auftragung  $\log \epsilon$  vs. Wellenlänge (nm),  
(50  $\mu\text{M}$  in THF)



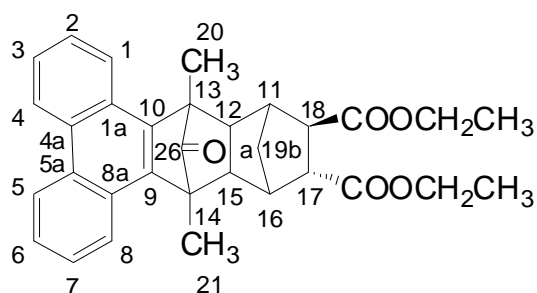
**Abbildung 55:** Anregungs (----)- und Emissions(—)-Fluoreszenzspektrum von **59** in THF (50  $\mu\text{M}$ ,  
 $\lambda_{\text{exc.}} = 314 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 380 \text{ nm}$ )

7.5.5 Synthese des Ketons **49**

Ein Gemisch aus 1.07 g (2.0 mmol) Dimer **39** und 12.1 g (50.8 mmol) Norbornendicarbonsäurediethylester wird unter Rühren auf 190 °C erhitzt. Nach einer Stunde war das Dimer in Lösung und die Reaktionsmischung färbte sich braun. Der überschüssige Norbornendicarbonsäurediethylester wird nach insgesamt 5 Stunden Reaktionszeit im Hochvakuum abdestilliert. Das bräunlich gefärbte Rohprodukt wird chromatographisch über neutralem Aluminiumoxid mit Hexan : Ethylacetat (8 : 2) gereinigt. Das reine Produkt **49** fällt als weißer Feststoff an.

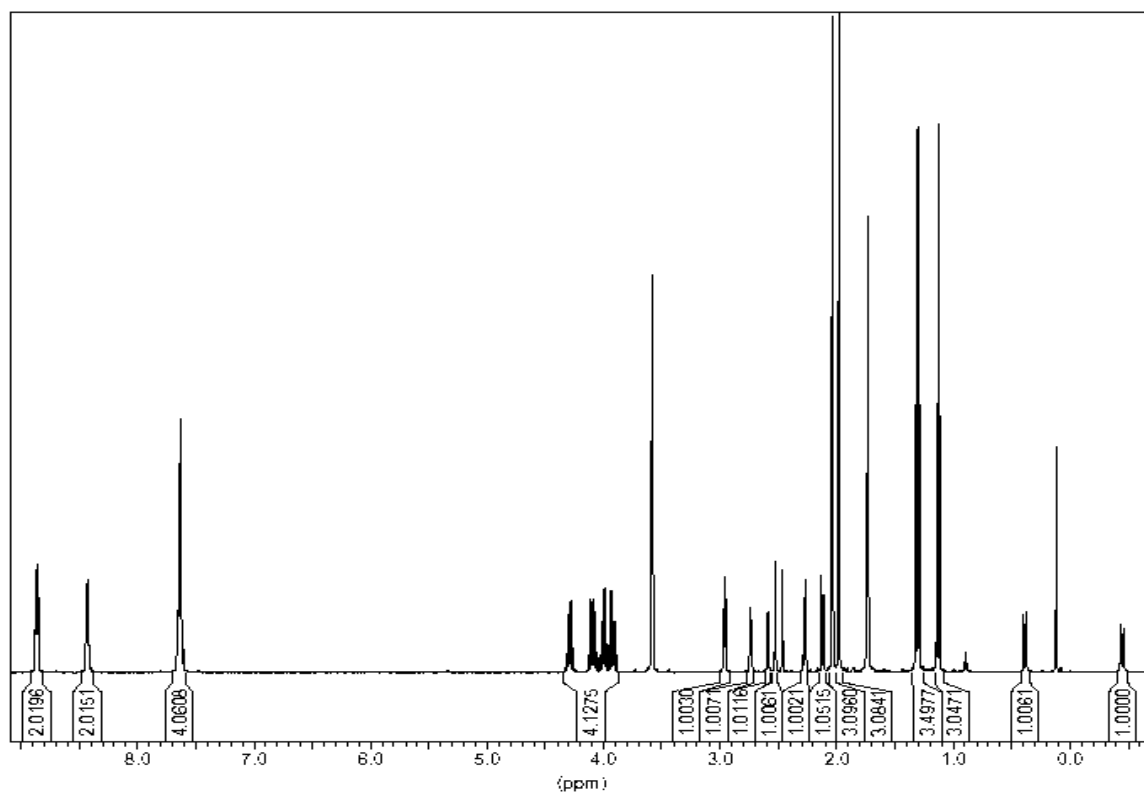
Ausbeute an **49**     595.5 mg (1.20 mmol, 30 %)

Schmp. **49**         193 °C



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $[\text{D}_8]\text{THF}$ ):

$\delta$  [ppm] = 8.85 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 2H, 4-H, 5-H), 8.42 (d,  $^3J = 7.2$  Hz, 2H, 1-H, 8-H), 7.63 (m, 4H, 2-H, 3-H, 6-H, 7-H), 3.93, 3.98, 4.10, 4.25 ( $4^*m$ , 4H,  $\text{CH}_2$ ), 2.96 (t,  $^3J = 7.6$  Hz, 1 H, 18-H oder 17-H), 2.59 (d,  $^3J = 7.5$  Hz, 1 H, 15-H oder 12-H), 2.53 (d,  $^3J = 8.1$  Hz, 1 H, 15-H oder 12-H), 2.47 (s, 1 H, 18-H oder 17-H), 2.27 (d, 1 H, 16-H), 2.12 (d,  $^3J = 7.8$  Hz, 1 H, 11-H), 2.04 (s, 3 H, 20-H), 1.97 (s, 3 H, 21-H), 1.31 (t,  $^3J = 8.2$  Hz, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 1.13 (t,  $^3J = 8.2$  Hz, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 0.39 (d,  $^2J(19a\text{-H}, 19b\text{-H}) = 11.7$  Hz, 1 H, 19b-H), -0.44 (*br* d,  $^2J(19a\text{-H}, 19b\text{-H}) = 13$  Hz, 1 H, 19a-H).



**Abbildung 56:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz,  $\text{THF-d}_8$ ) von **49** (zur Zuordnung vgl. Liste der chemischen Verschiebungen)



$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $[\text{D}_8]\text{THF}$ ):

$\delta$  [ppm] = 203.42 ( $\text{C}=\text{O}$ )<sub>Keton</sub>, 173.67, 172.59 ( $\text{C}=\text{O}$ )<sub>Ester</sub>, 135.53, 135.48, 131.54, 131.51, 127.22, 127.21 (C-1'a, C-4'a, C-5'a, C-8'a, C-9', C-10'), 129.66, 129.67, 127.71, 127.70, 125.47, 125.45 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7), 124.4, 124.3 (C-1, C-8), 61.31, 61.18 ( $\text{CH}_2$ ), 55.63, 55.11 (C-13, C-14), 52.09, 51.69, 51.28, 47.96, 44.66, 42.57 (C-11, C-12, C-15, C-16, C-17, C-18), 34.37 (C-19), 15.78, 15.59, 14.86, 14.47 ( $\text{CH}_3$ ).

Molmassenfeinbestimmung:  $\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{NaO}_5$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$   
(ESITOF)  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : ber. 519.2142  
gef. 519.2118  
Abweichung: 4.6 ppm

$\text{C}_{64}\text{H}_{64}\text{NaO}_{10}$   $[\text{M}_2+\text{Na}]^+$   
 $m/z$   $[\text{M}_2+\text{Na}]^+$ : ber. 1015.4392  
gef. 1015.4360  
Abweichung: 3.1 ppm

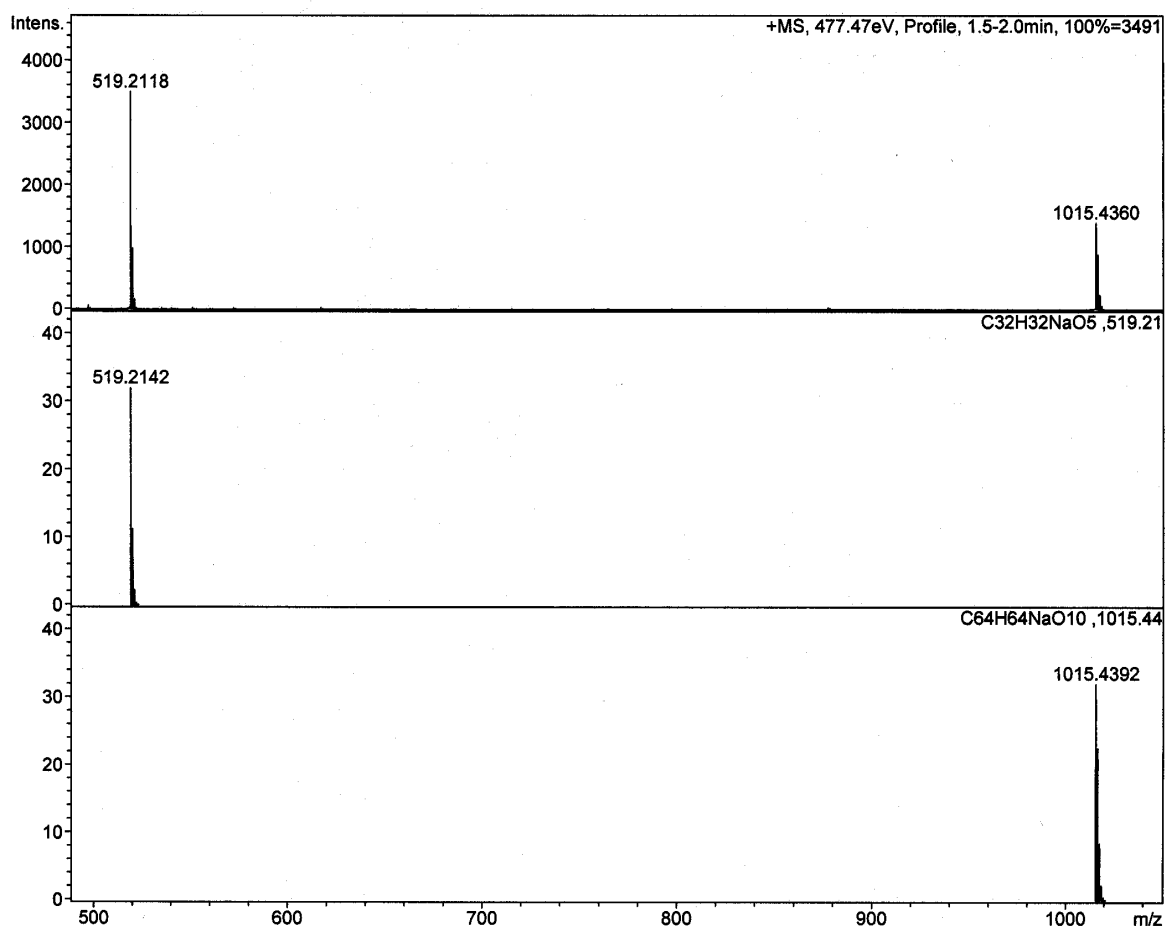
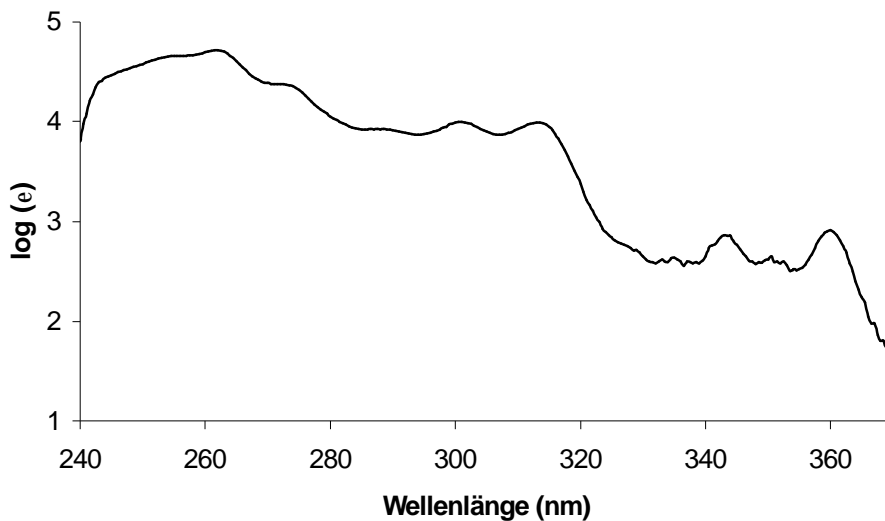
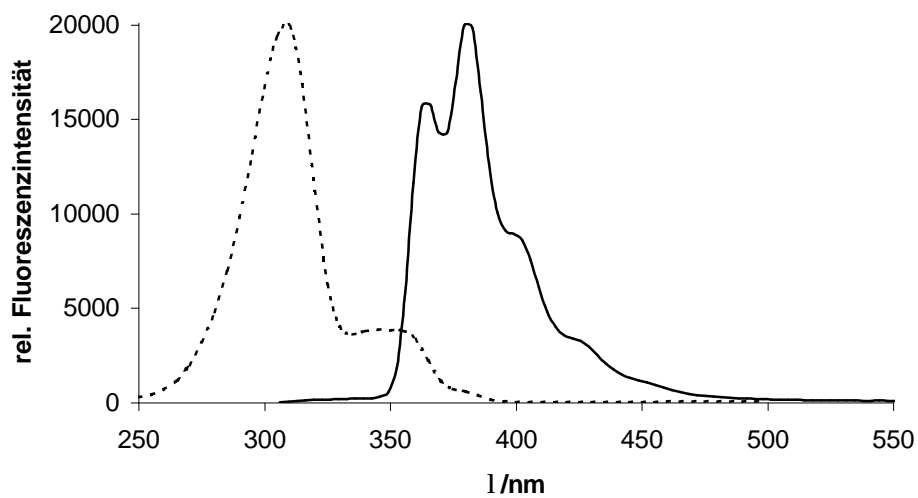


Abbildung 57: ESI-TOF Massenspektrum von 49

UV(THF):  $\lambda_{\max}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 360 nm (2.90), 343 nm (2.86), 313 nm (3.99), 300 nm (3.99), 273 nm (4.37), 262 nm (4.71).

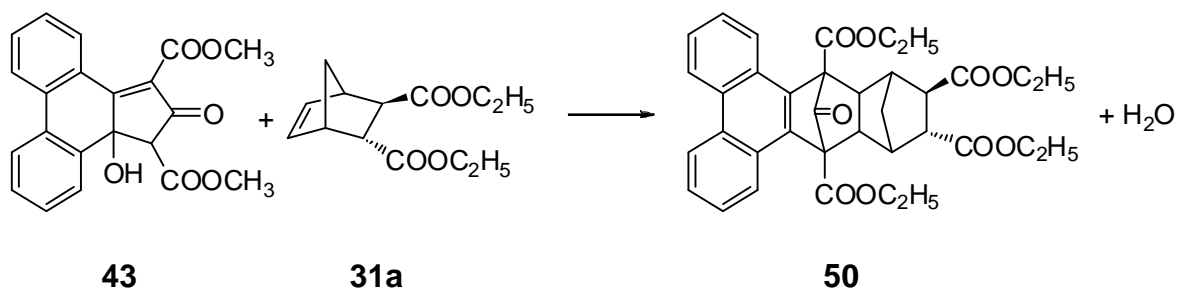


**Abbildung 58:** UV/Vis Spektrum des Ketons **49**, Auftragung  $\log \epsilon$  vs. Wellenlänge (nm), (50  $\mu\text{M}$  in THF)



**Abbildung 59:** Anregungs (----)- und Emissions(—)-Fluoreszenzspektrum von **49** in THF (50  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc.}} = 310 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 380 \text{ nm}$ )

7.5.6 Darstellung von 3,5-Bis(carbonsäuremethylester)-3,5-(9,10-phenanthrylen)-tricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-on-8,9-(E)-bis(carbonsäureethylester) (**50**)



Zur Synthese von **50** wurden in einem 100 ml-Zweihalskolben 0.92 g (2.53 mmol) Hydroxycyclopentenon **43** vorgelegt und in 6.00 g (25.2 mmol) Ester **31a** suspendiert und auf 85 °C (Badtemperatur) erhitzt. Über einen Tropftrichter wurde die Reaktionsmischung innerhalb von 4.5 Stunden mit 15 ml Ethanol versetzt und nach erfolgter Zugabe noch eine Stunde bei dieser Temperatur gerührt, dann auf Raumtemperatur abkühlen lassen und für 2 Tage gerührt.

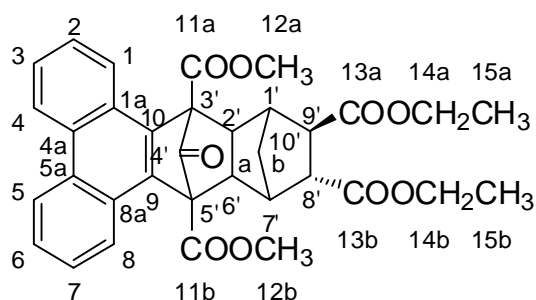
Es entstand ein beige gefärbter Kristallbrei, der durch Vakuumfiltration getrennt wurde. Der erhaltene Filtrerrückstand (das Filtrat wird als F<sub>1</sub> bezeichnet) wurde zunächst mit 6 ml Ethanol gewaschen, dann in 5 ml Ethanol aufgenommen und 30 Minuten gerührt. Die erhaltene Suspension wurde hierauf durch Vakuumfiltration getrennt, der erhaltene Filtrerrückstand mit 1 ml Ethanol versetzt und 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Die erhaltene Suspension wurde durch Vakuumfiltration getrennt und der Filtrerrückstand mit 40 ml Chloroform versetzt und 2 h bei 4000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Sediment (Bodenkörper) wurde erneut mit 40 ml HCCl<sub>3</sub> versetzt und 2 h zentrifugiert. Beide Zentrifugate wurden hierauf vereinigt. Die vereinigten Zentrifugate wurden erneut fünfmal nach gleicher Vorgehensweise behandelt, bis eine klare Lösung des Zentrifugats resultierte. Diese wurde, zunächst am Rotationsverdampfer, dann im Ölpumpenvakuum vom Lösungsmittel befreit. Es resultierten 0.72 g eines noch mit **31a** verunreinigten Rohprodukts, welches mit 1.5 ml Ethanol versetzt und 20 Minuten im Ultraschallbad behandelt wurde. Die entstandene Suspension wurde

durch Vakuumfiltration getrennt und der Filtrerrückstand mit 2 ml Ethanol gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Hieraus resultierten 0.61 g des reinen Addukts **50**.

Aus dem Filtrat F<sub>1</sub> fielen über Nacht im Eisschrank weiße Kristalle aus, diese wurden durch Vakuumfiltration abgetrennt, mit 1 ml Ethanol gewaschen, erneut mit 1 ml Ethanol im Ultraschallbad 15 Minuten suspendiert und durch Vakuumfiltration getrennt. Dieser Vorgang wurde erneut durchgeführt und der erhaltene Filtrerrückstand im Ölpumpenvakuum getrocknet. Hierdurch wurden 0.12 g des reinen Produkts **50** gewonnen.

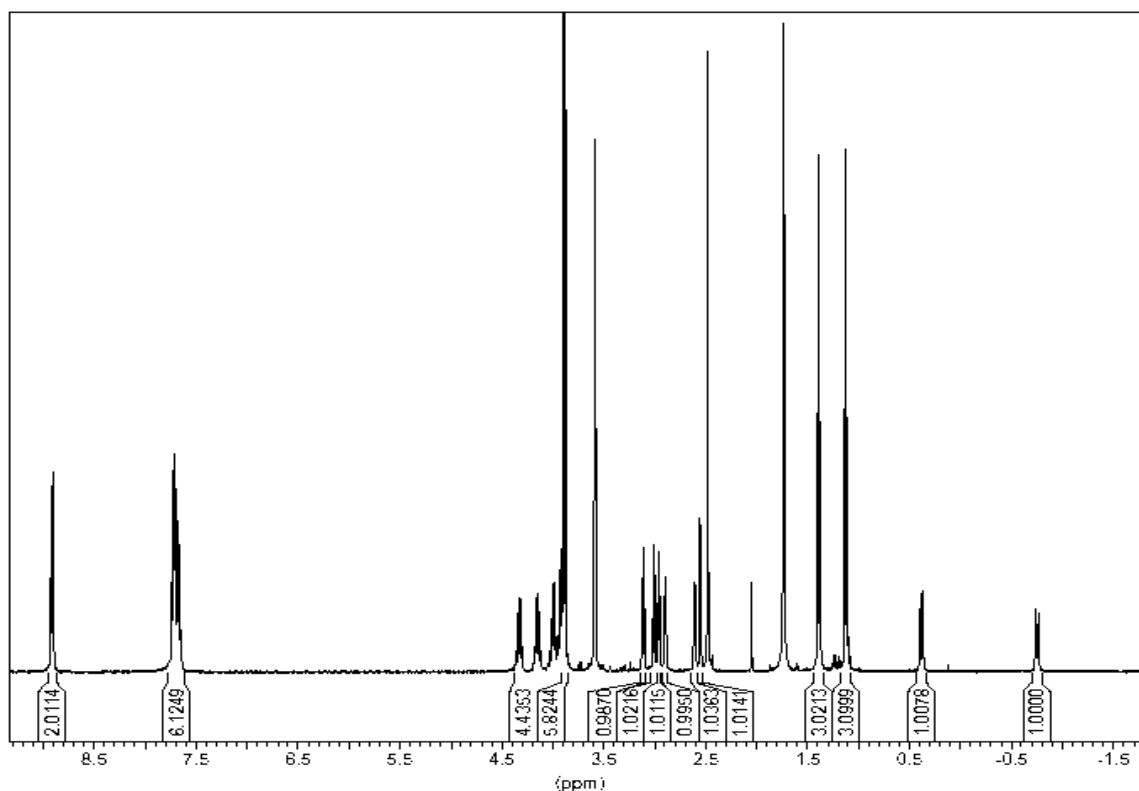
Ausbeute **50**            0.73 g (1.24 mmol, 50 %)

Schmp. **50**            197 °C



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, [D<sub>8</sub>]THF):

$\delta$  [ppm] = 8.78 (d, 2 H, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, 4-H, 5-H), 7.70 - 7.60 (m, 6 H, 1-H, 2-H, 3-H, 6-H, 7-H, 8-H), 4.95 - 4.36, 4.18 - 4.12, 4.03 - 3.96, 3.95 - 3.89 (4\*m, 4 H, <sup>3</sup>J = 7.3 Hz, H-14a, H-14b), 3.90 (s, 3 H, 12a-H o. 12b-H), 3.88 (s, 3 H, 12a-H, o. 12b-H), 3.11 (d, 1 H <sup>3</sup>J = 8.9 Hz, 2'-H), 3.00 (d, 1 H <sup>3</sup>J = 8.9 Hz, 6'-H), 2.96 (t, 1 H, <sup>3</sup>J = 5 Hz, 8'-H), 2.89 (dd, 1 H, <sup>3</sup>J = 5 Hz, 9'-H), 2.60 (d, 1 H, <sup>3</sup>J = 3.9 Hz, 7'-H), 2.55 (s, 1 H, 1'-H), 1.38 (t, 3 H, <sup>3</sup>J = 8.4 Hz, 15a-H o. 15b-H), 1.12 (t, 3 H, <sup>3</sup>J = 8.5 Hz, 15a-H, 15b-H), 0.38 (d, 1 H, <sup>2</sup>J = 11.2 Hz), -0.75 (dd, 1 H, <sup>2</sup>J = 11.8, <sup>3</sup>J = 1.5 Hz, 10'b-H).



**Abbildung 60:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (500 MHz,  $\text{THF-d}_8$ ) von **50** (zur Zuordnung vgl. Liste der chemischen Verschiebungen)

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $[\text{D}_8]\text{THF}$ ):

$\delta$  [ppm] = 189.02 (C-4'), 173.36, 172.34 (C-13a, C-13b), 169.26, 169.02 (C-11a, C-11b), 131.02, 130.99, 130.77, 127.68, 127.62, 126.86, 126.81, 124.39, 124.35, 124.07, 124.05 (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-1a, C-4a, C-5a, C-8a), 64.95, 64.58 (C-3', C-5'), 61.41, 61.15 (C-14a, C-14b), 53.00, 52.89 (C-12a, C-12b), 51.01, 50.08, 45.44, 43.73, 42.30, 41.55 (C-1', C-2', C-6', C-7', C-8', C-9'), 34.27 (C-10'a, C-10'b), 14.52, 14.28 (C-15a, C-15b).

Molmassenfeinbestimmung:	$\text{C}_{34}\text{H}_{32}\text{NaO}_9$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$
(ESITOF)	$m/z$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : ber. 607.1939
	gef. 607.1953
Abweichung:	2.3 ppm

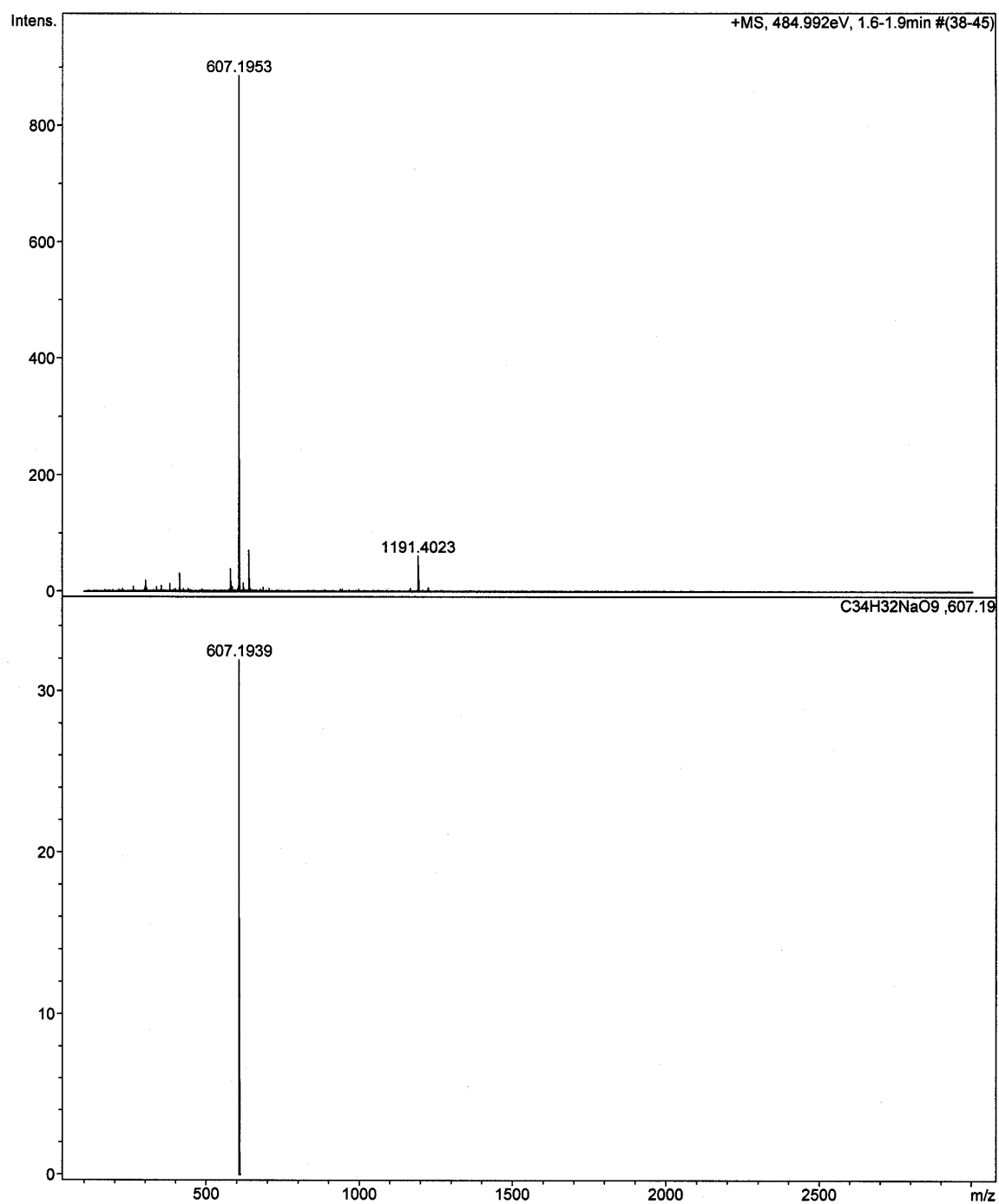
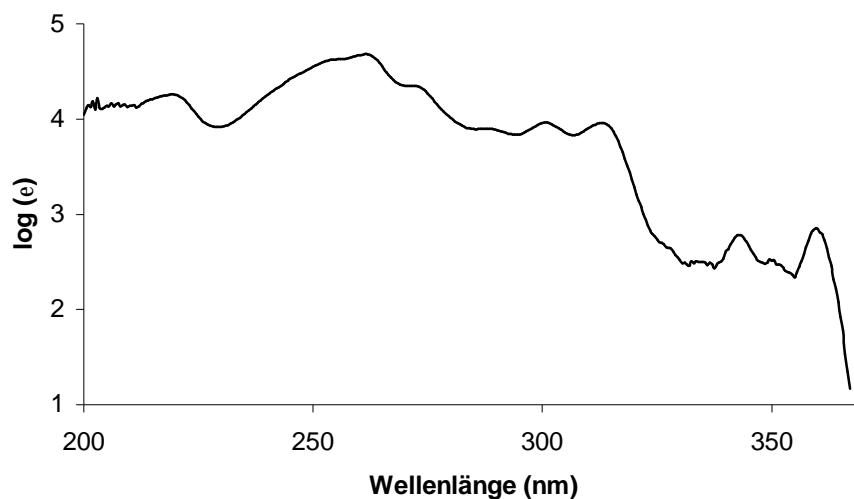
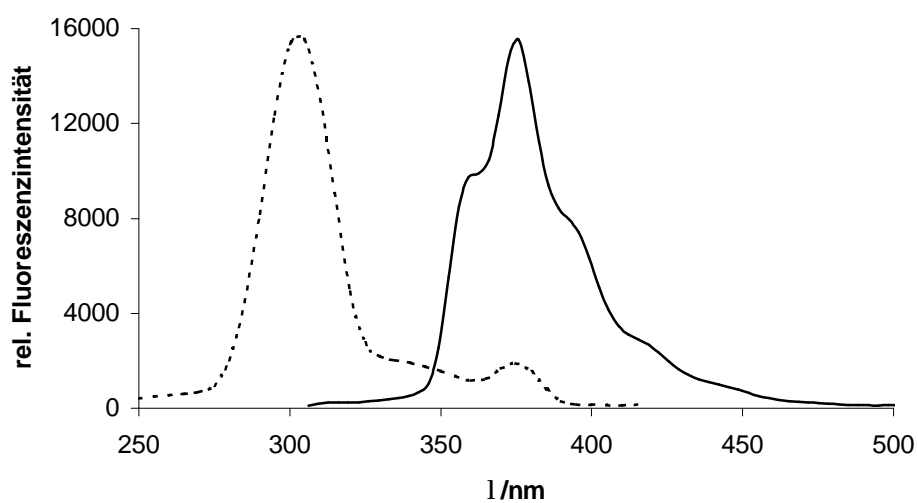


Abbildung 61: ESI-TOF Massenspektrum von 50

UV(THF):  $\lambda_{\max}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 358 nm (2.81), 342 nm (2.78), 311 nm (3.91), 300 nm (3.96), 271 nm (4.34), 258 nm (4.64).



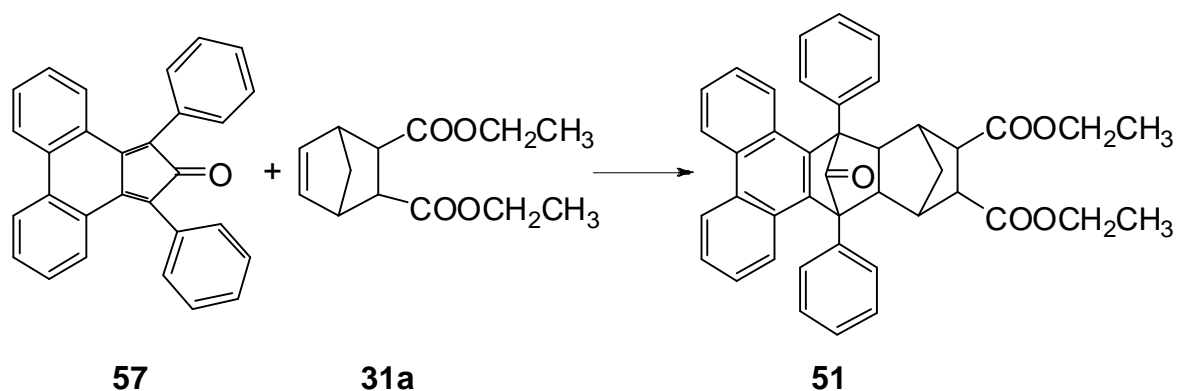
**Abbildung 62:** UV/Vis Spektrum des Ketons **50**, Auftragung  $\log \epsilon$  vs. Wellenlänge (nm), (50  $\mu\text{M}$  in THF)



**Abbildung 63:** Anregungs (----)- und Emissions(—)-Fluoreszenzspektrum von **50** in THF (50  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc.}}$  = 305 nm,  $\lambda_{\text{em.}}$  = 376 nm)



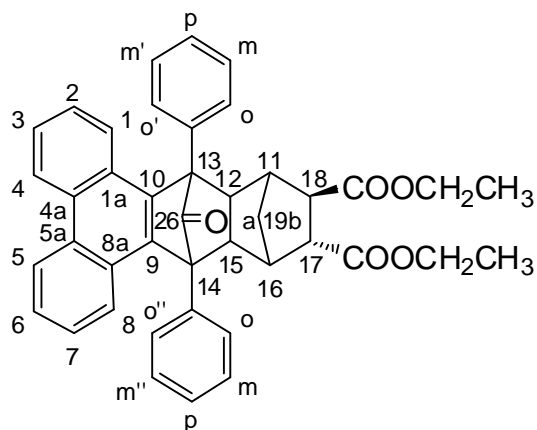
7.5.7 Darstellung von 3,5-Diphenyl-3,5-(2-methoxy-9,10-phenanthrylen)tricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-on-8,9-(E)dicarbonsäureethylester (**51**)



480 mg (1.26 mmol) 2,5-Diphenyl-3,4-(2,2'-biphenyl)cyclopenta-2,4-dien-1-on **57** und 310 mg (1.30 mmol) Norborn-5-en-2,3-(E)-dicarbonsäurediethylester **31a** in 12.5 ml Chlorbenzol wurden 6 Stunden bei 120°C und Lichtausschluss gerührt. Durch die Apparatur wurde während dieser Zeit Argon geleitet. Das Lösungsmittel wurde mittels Rotationsverdampfer entfernt und der hellgelbe Feststoff in 10 ml THF aufgenommen. Das Produkt **51** wurde durch Zugabe der zehnfachen Menge an n-Heptan unpolar ausgefällt. Die Umkristallisation erfolgte aus Ethanol.

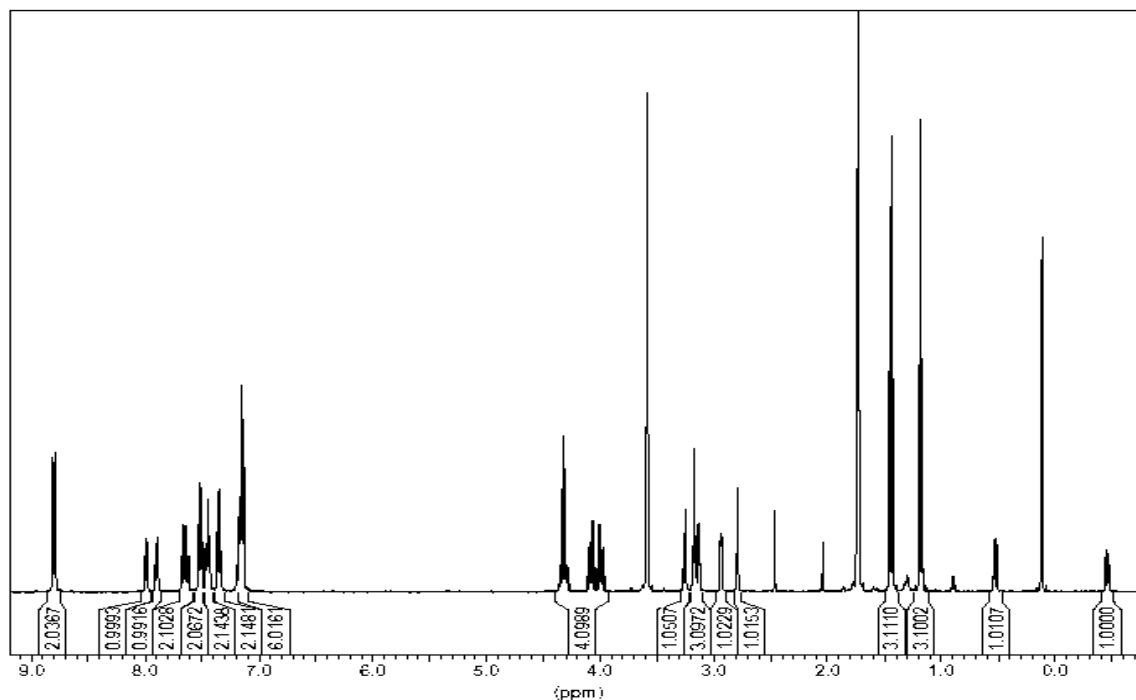
Ausbeute an **51**    0.41 g (0.65 mmol, 52 %)

Schmp. **51**        245 °C



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $[\text{D}_8]\text{THF}$ ):

$\delta$  [ppm] = 8.80 (d,  $^3J = 7.2$  Hz, 2H, 4-H, 5-H), 7.99 (d,  $^3J = 7.5$  Hz, 1 H, o'-H oder o''-H), 7.89 (d,  $^3J = 7.5$  Hz, 1 H, o'-H oder o''-H), 7.66 - 7.64 (m, 2 H, m-H, p-H), 7.70 (dd,  $^3J = 7.5$  Hz,  $^3J = 7.5$  Hz, 2 H, m'-H oder m''-H), 7.68 (dd,  $^3J = 7.5$  Hz,  $^3J = 7.5$  Hz, 2 H, m'-H oder m''-H), 7.52 (dd,  $^3J = 7.5$  Hz,  $^3J = 7.5$  Hz, 2 H, 3'-H, 6'-H), 7.19 - 7.12 (m, 6 H, 1-H, 2-H, 7-H, 8-H, o-H), 4.31 - 3.99 (4\*m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 3.24 (d,  $^3J = 7.5$  Hz, 1 H, 15-H oder 12-H), 3.17 - 3.11 (m, 3 H, 18-H, 17-H, 15-H, 12-H), 2.92 (d, 1 H, 11-H oder 16-H), 2.79 (s, 1 H, 12-H), 1.44 (t,  $^3J = 8.2$  Hz, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 1.18 (t,  $^3J = 8.5$  Hz, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 0.53 (d,  $^2J$  (19a-H, 19b-H) = 11.0 Hz, 1 H, 19b-H), -0.45 (br d,  $^2J$  (19a-H, 19b-H) = 12 Hz, 1 H, 19a-H).



**Abbildung 64:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz,  $\text{THF-d}_8$ ) von **51** (zur Zuordnung vgl. Liste der chemischen Verschiebungen)

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $[\text{D}_8]\text{THF}$ ):

$\delta$  [ppm] = 203.42 ( $\text{C}=\text{O}$ )<sub>Keton</sub>, 173.67, 172.59 ( $\text{C}=\text{O}$ )<sub>Ester</sub>, 138.35, 138.01, 135.88, 135.63, 132.64, 132.58 (C-1'a, C-4'a, C-5'a, C-8'a, C-9', C-10'), 132.07, 129.88, 129.66, 129.27, 128.86, 128.76, 128.70, 128.62 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 128.63, 128.39, 128.36, 127.11, 127.08, 126.28 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7), 126.26, 124.42 (C-1, C-8), 64.58, 64.10 ( $\text{CH}_2$ ), 61.77, 61.49 (C-13, C-14), 52.17, 51.42, 48.22, 45.45, 44.41, 43.19 (C-11, C-12, C-15, C-16, C-17, C-18), 34.72 (19a, 19b), 14.81, 14.51 ( $\text{CH}_3$ ).

Molmassenfeinbestimmung:

$\text{C}_{42}\text{H}_{36}\text{NaO}_5$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$

(ESITOF)

$m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : ber. 643.2455

gef. 643.2463

Abweichung: 1.2 ppm

$\text{C}_{84}\text{H}_{72}\text{NaO}_{10}$   $[\text{M}_2+\text{Na}]^+$

$m/z$   $[\text{M}_2+\text{Na}]^+$ : ber. 1263.5018

gef. 1263.5024

Abweichung: 0.4 ppm

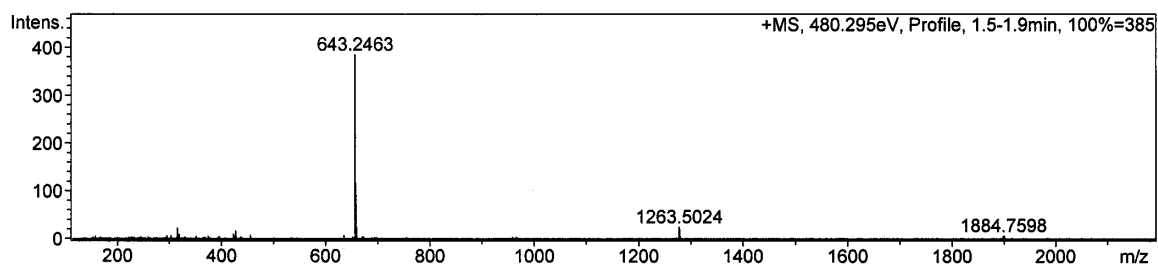


Abbildung 65: ESI-TOF Massenspektrum von 51

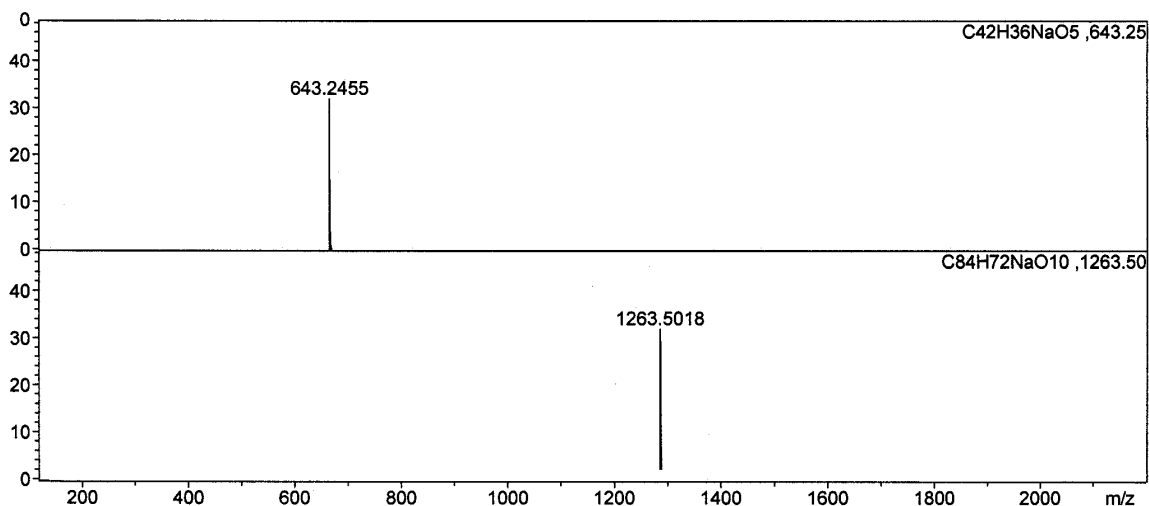


Abbildung 66: ESI-TOF Massenspektrum von **51**

UV(THF):  $\lambda_{\max}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 261 nm (4.67), 272 nm (4.36), 298 nm (3.98), 311 nm (3.99), 339 nm (2.76), 356 nm (2.71).

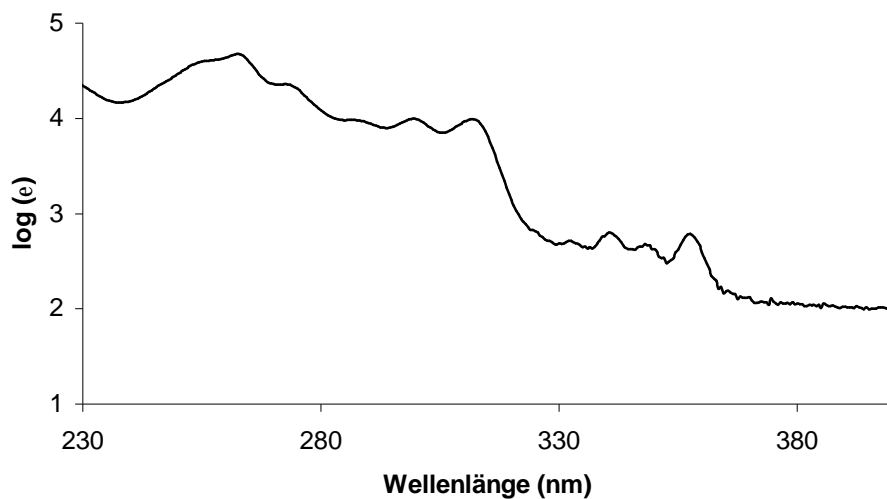
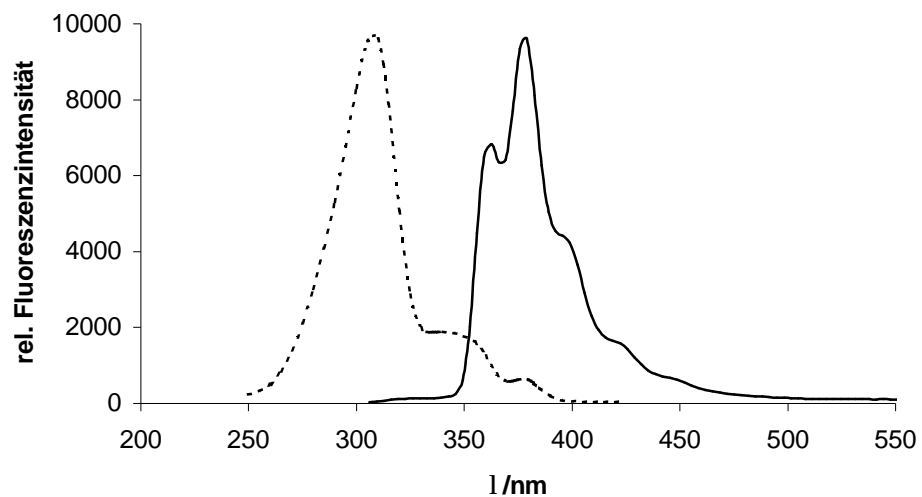
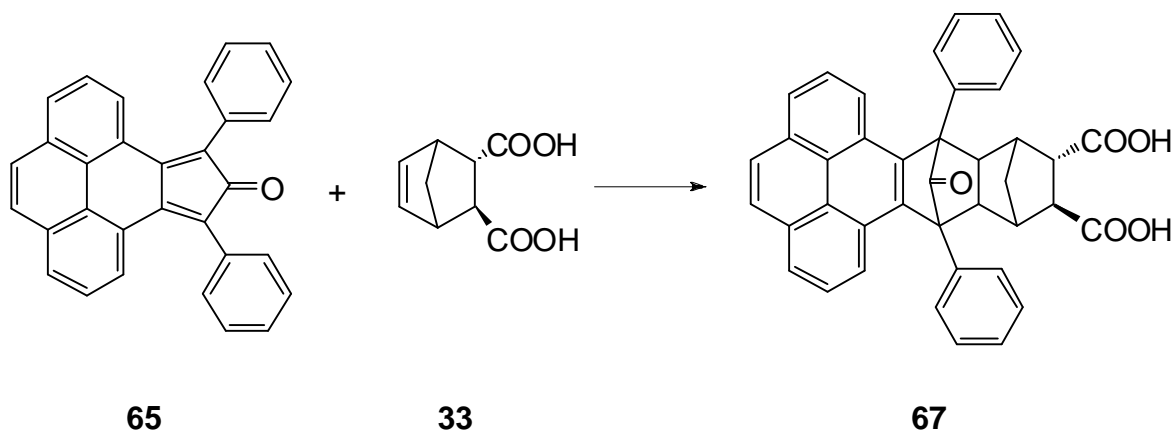


Abbildung 67: UV/Vis Spektrum des Ketons **51**, Auftragung  $\log \epsilon$  vs. Wellenlänge (nm), (50  $\mu$ M in THF)



**Abbildung 68:** Anregungs (----)- und Emissions(—)-Fluoreszenzspektrum von **51** in THF  
(50  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc.}}$  = 310 nm,  $\lambda_{\text{em.}}$  = 380 nm)

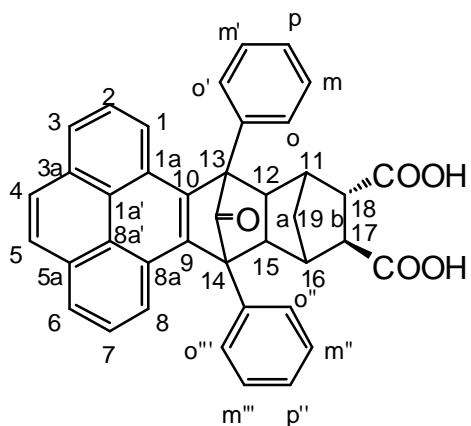
7.5.8 Diels-Alder-Addition zu 3',5'-Diphenyl-3',5'-(4,5-pyrenylen)tricyclo-[5.2.1.0<sup>2,6'</sup>]-decan-4'-on-8',9'-(E)-dicarbonsäure (**67**)



In einem 100 ml Einhalskolben werden 874 mg (2.15 mmol) Pyrenocyclon **65**, 368 mg (2.02 mmol) Norbornendicarbonsäure **33** und 30 ml Chlorbenzol 10 Stunden bei einer Temperatur von 130 °C unter Rückfluss gerührt. Anschließend wird die Suspension abgesaugt und zweimal mit je 10 ml kaltem Chlorbenzol gewaschen. Der bräunlich-gelblichen Feststoff wird getrocknet und in wenig THF gelöst. Nach Zugabe der zehnfachen Menge Cyclohexan fällt das Produkt **67** als weisser Feststoff an.

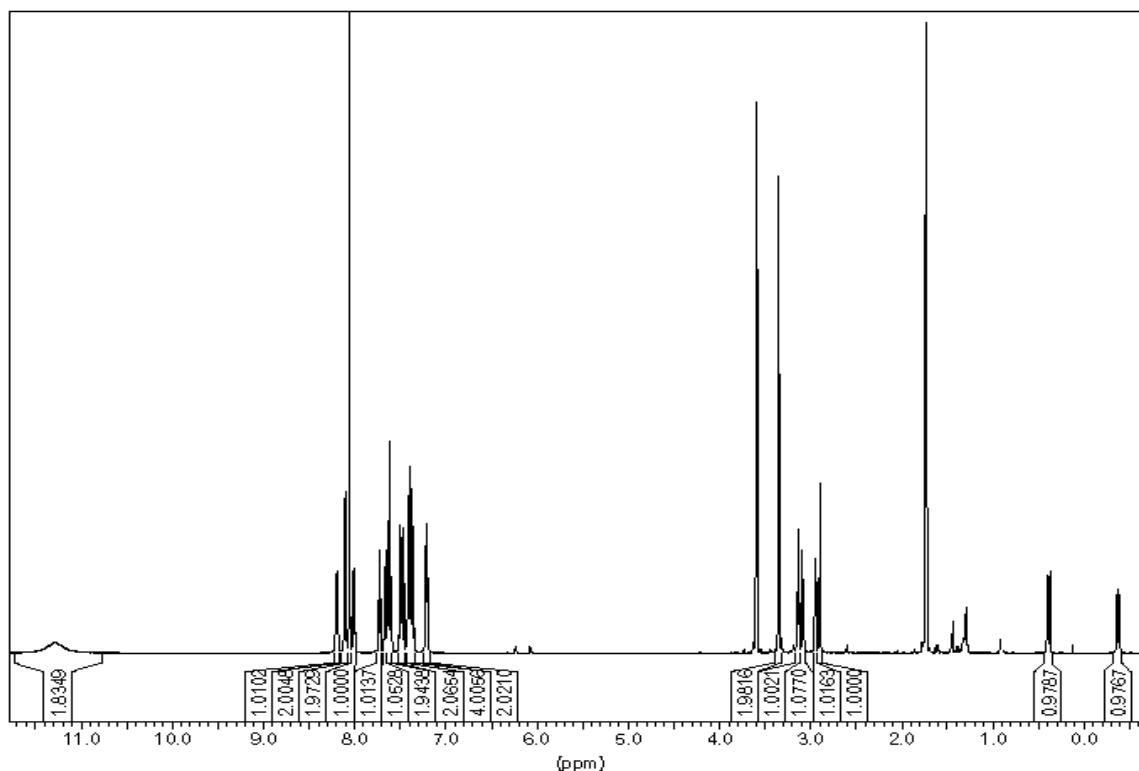
Ausbeute an **67** 400 mg (0.68 mmol, 32 %)

Schmp. **67** 281 °C



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$ [ppm] = 11.3 (s, 2 H, COOH), 8.19 (d, 1 H,  $^3J = 7.8$ , 1-H oder 8-H), 8.11 (d, 2 H,  $^3J = 1.44$ , 3-H oder 6-H), 8.08 (s, 1 H, 4-H oder 5-H), 8.00 (d, 2 H, 1-H oder 8-H), 7.72 (t, 1 H,  $^3J = 7.6$ , o-H oder o'-H), 7.66 (t, 1 H,  $^3J = 7.6$ , o-H oder o'-H), 7.62 (m, 2 H, o'-H, o'''-H), 7.50 - 7.46 (q, 2 H, m-H und m''-H oder m'-H und m'''-H), 7.41-7.36 (m, 4 H, m-H und m''-H oder m'-H und m'''-H), 7.23 (t, 2 H,  $^3J = 7.4$ , 2-H), 3.35 (s, 2 H, 12-H oder 15-H), 3.14 (t, 1 H,  $^3J = 4.6$ , 11-H oder 16-H), 3.08 (dd, 1 H,  $^3J = 6.9$ , 11-H oder 16-H), 2.92 (d, 1 H,  $^3J = 4.2$ , 17-H oder 18-H), 2.89 (s, 1 H, 17-H oder 18-H), 0.39 (d, 1 H,  $^2J$  (19a-H, 19b-H) = 11.2, 10b-H), -0.38 (d, 1 H,  $^2J$  (19a-H, 19b-H) = 12.8, 10a-H).



**Abbildung 69:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (500 MHz,  $\text{THF-d}_8$ ) von **67** (zur Zuordnung vgl. Liste der chemischen Verschiebungen)

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  [ppm] = 199.51 ( $\text{C}=\text{O}$ )<sub>Keton</sub>, 174.82 174.19 ( $\text{C}=\text{O}$ )<sub>Ester</sub>, 138.37, 138.04, 136.73, 132.90, 132.88, 132.80 (C-1a', C-3a, C-5a, C-8'a, C-9, C-10), 129.94, 129.78, 129.24, 129.14, 129.03, 128.91, 128.46, 128.43, 128.38 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 127.98, 127.91, 126.41, 126.36, 126.27, 125.86, 125.83, 123.70 (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8), 64.89, 64.44 (C-13, C-14), 51.86, 51.20, 48.40, 45.67, 44.48, 43.29 (C-11, C-12, C-15, C-16, C-17, C-18), 34.84 (19a, 19b).

Molmassenfeinbestimmung:  $\text{C}_{40}\text{H}_{27}\text{O}_5$  [M]<sup>+</sup>

(ESITOF)

m/z [M]<sup>+</sup>: ber. 587.1864

gef. 587.1814

Abweichung: 8.5 ppm



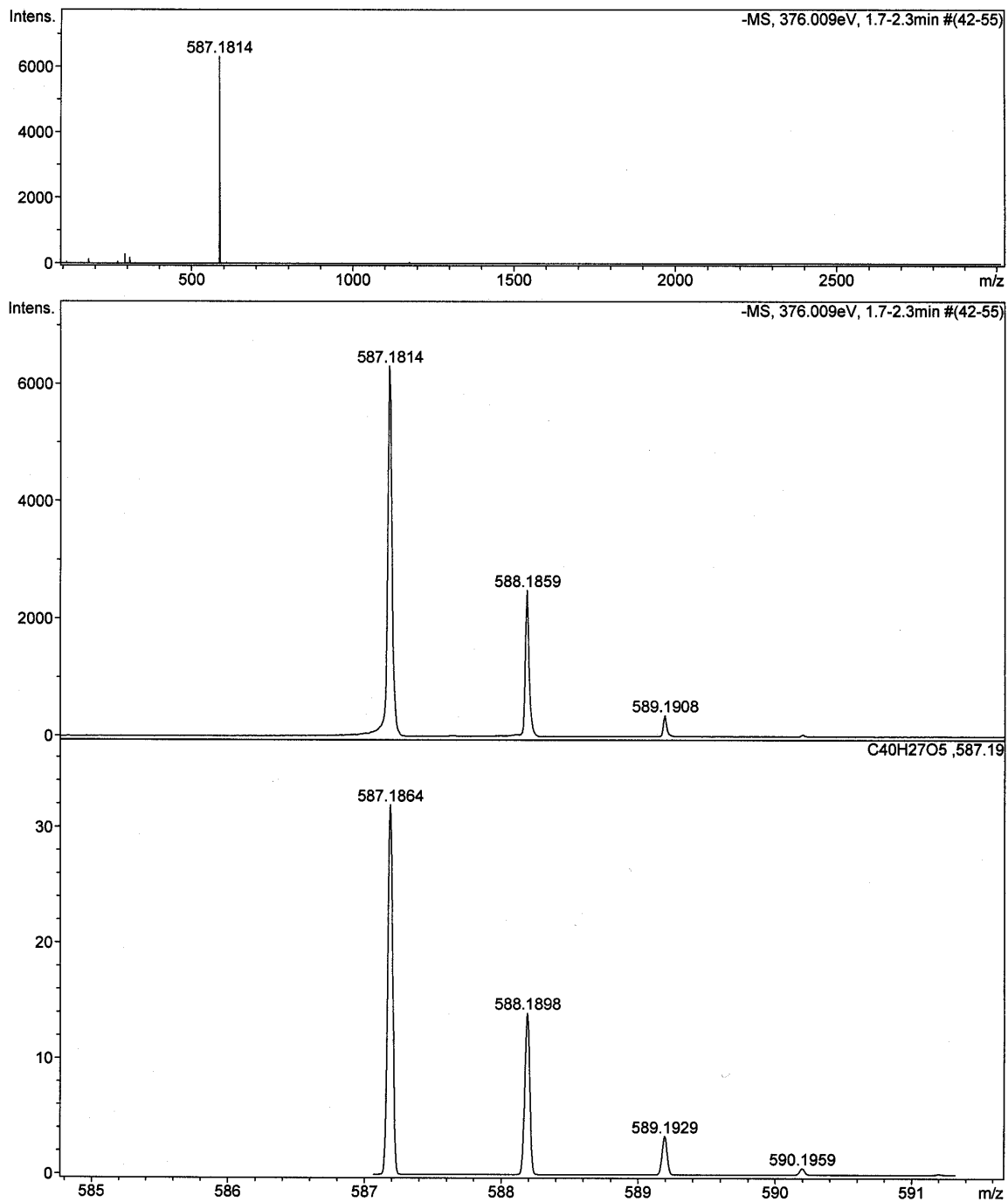
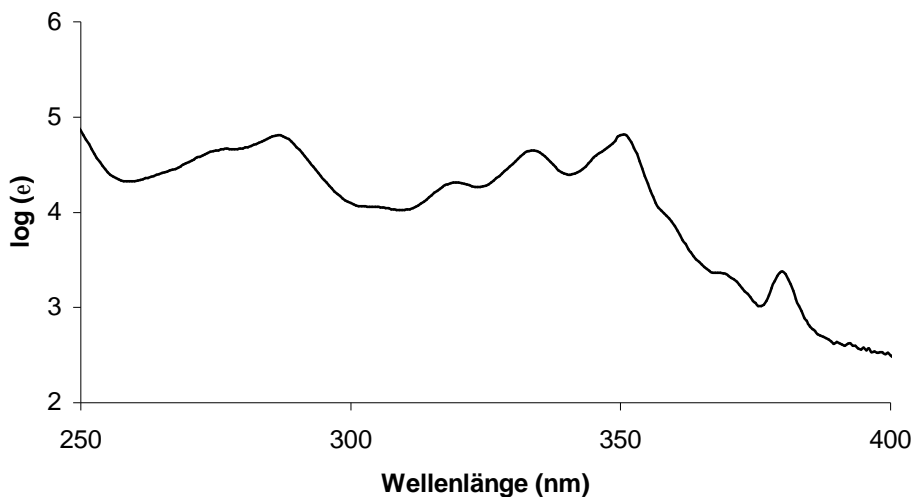
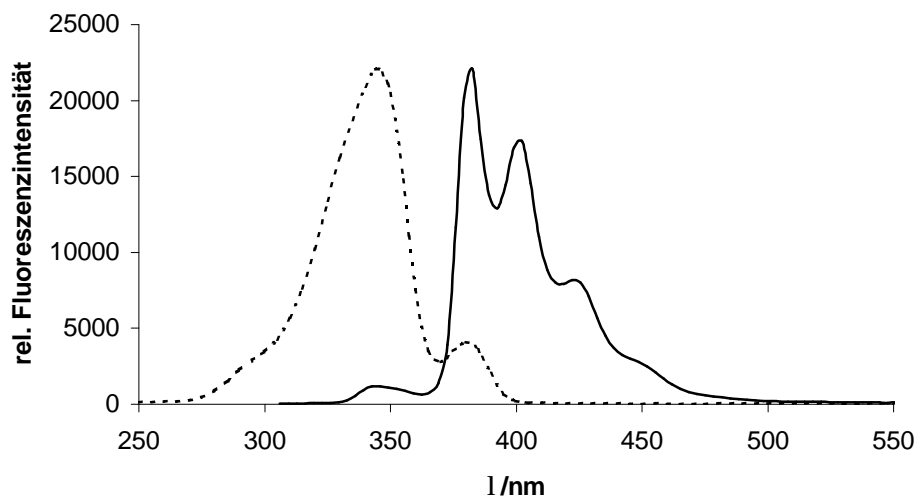


Abbildung 70: ESI-TOF Massenspektrum von 67

UV(THF):  $\lambda_{\max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 286 nm (4.81), 317 nm (4.38), 332 nm (4.63), 349 nm (4.74), 379 nm (3.33).

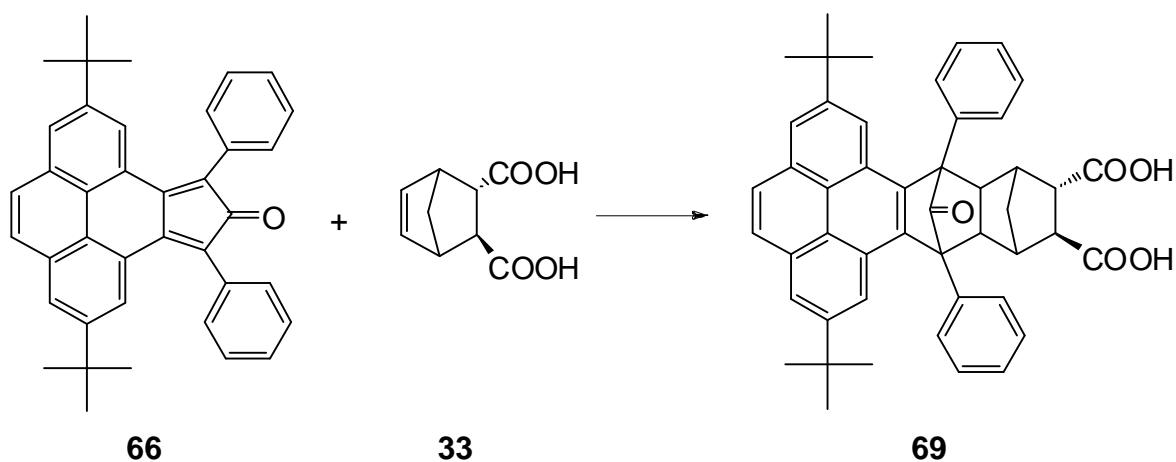


**Abbildung 71:** UV/Vis Spektrum des Ketons **67**, Auftragung  $\log \epsilon$  vs. Wellenlänge (nm), (50  $\mu\text{M}$  in THF)



**Abbildung 72:** Anregungs (----)- und Emissions(—)-Fluoreszenzspektrum von **67** in THF (10  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc.}}$  = 345 nm,  $\lambda_{\text{em.}}$  = 380 nm)

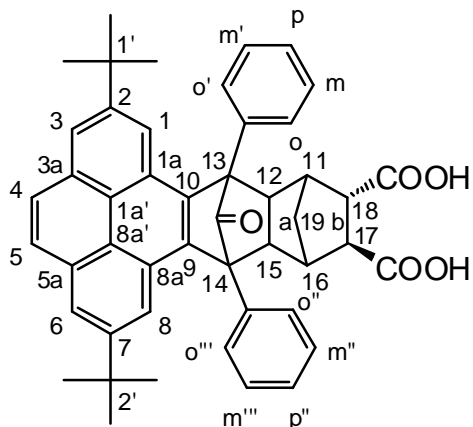
7.5.9 Herstellung von 3',5'-Diphenyl-3',5'-(2,7-di-tert.-butyl-4,5-pyrenylen)tricyclo-[5.2.1.0<sup>2,6'</sup>]-decan-4'-on-8',9'-(E)-dicarbonsäure (**69**)



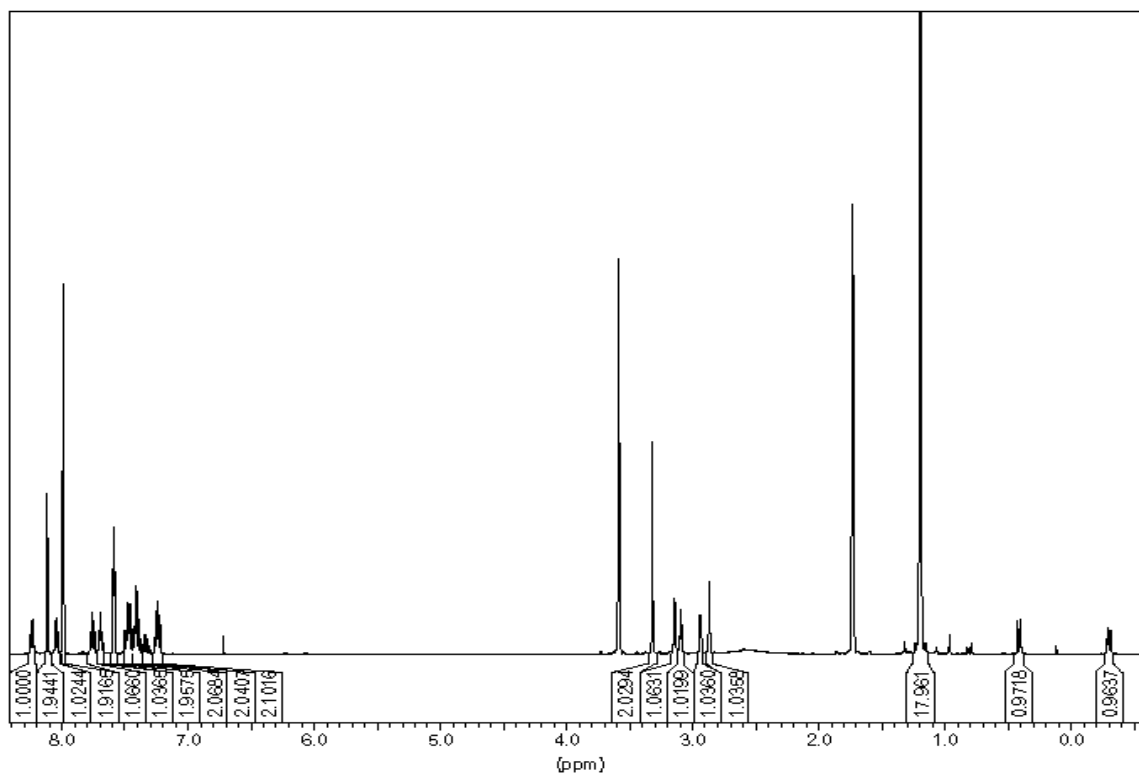
1.63 g (3.15 mmol) Di-*tert.*-butylpyrenocyclon **66** werden mit 0.547 g (3.00 mmol) Norbornendicarbonsäure **33** und 30 ml Chlorbenzol vermischt und 10 Stunden bei 130 °C gekocht. Die Reaktion wird unter Lichtausschluss durchgeführt. Nach der Reaktionszeit wird der Feststoff abgesaugt und mit Cyclohexan nachgewaschen. Anschließend wird das Produkt zur weiteren Reinigung in wenig THF gelöst. Dann wird mit dem zehnfachen Menge an Cyclohexan unpolar ausgefällt und das farblose Produkt **69** abfiltriert und getrocknet.

Ausbeute an **69** 1.24 g (1.76 mmol, 59 %)

Schmp. **69** 295°C



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 11.24 (s, 2 H, COOH), 8.23 (d, 1 H,  $^3J$  = 7.8, o-H oder o''-H), 8.11 (t, 2 H,  $^4J$  = 1.44, 1-H, 8-H), 8.04 (d, 1 H,  $^3J$  = 7.8, o-H oder o''-H), 7.98 (s, 2 H, 3-H, 6-H), 7.75 (t, 1 H,  $^3J$  = 7.6, m-H oder m''-H), 7.69 (t, 1 H,  $^3J$  = 7.6, m-H oder m''-H), 7.58 (t, 2 H,  $^4J$  = 2.1, 4-H, 5-H), 7.47 - 7.46 (q, 2 H, m'-H, m'''-H), 7.41 - 7.39 (m, 2 H, o'-H oder o'''-H), 7.23 (t, 2 H,  $^3J$  = 8.8, p-H, p'-H), 3.31 (s, 2 H, 12-H, 15-H), 3.14 (t, 1 H,  $^3J$  = 4.6, 11-H oder 16-H), 3.09 - 3.08 (dd, 1 H,  $^3J$  = 6.9, 11-H oder 16-H), 2.94 - 2.93 (d, 1 H,  $J$  = 4.2, 17-H oder 18-H), 2.86 (s, 1 H, 17-H oder 18-H), 1.197-1.191 (d, 18 H, 6 x  $\text{CH}_3$ ), 0.41 (d, 1 H,  $^2J$  = 11.2, 19b-H), -0.30 (dd, 1 H,  $^2J$  = 12.8, 10a-H).



**Abbildung 73:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz,  $\text{THF-d}_8$ ) von **69** (zur Zuordnung vgl. Liste der chemischen Verschiebungen)

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  [ppm] = 199.42 ( $\text{C}=\text{O}$ )<sub>Keton</sub>, 174.83 174.16 ( $\text{C}=\text{O}$ )<sub>Ester</sub>, 148.93, 138.86, 138.55, 136.27, 132.91, 130.08 (C-1a', C-3a, C-5a, C-8'a, C-9, C-10), 129.92, 129.36, 129.29, 129.09 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 128.98, 128.49, 128.42, 128.39, 123.02, 123.01, 121.48, 121.46 (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8), 64.77, 64.31 (C-13, C-14), 51.87, 51.17, 48.54, 45.71, 44.63, 43.35 (C-11, C-12, C-15, C-16, C-17, C-18), 35.57, 34.96 (C-1', C-2'), 31.88, 31.86 (19a, 19b).

Molmassenfeinbestimmung:

$\text{C}_{48}\text{H}_{44}\text{NaO}_5$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>

(ESITOF)

m/z [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>: ber. 723.3081

gef. 723.3125

Abweichung: 6.0 ppm

$\text{C}_{96}\text{H}_{88}\text{NaO}_{10}$  [ $\text{M}_2+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>

m/z [ $\text{M}_2+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>: ber. 1423.6270

gef. 1423.6377

Abweichung: 7.5 ppm

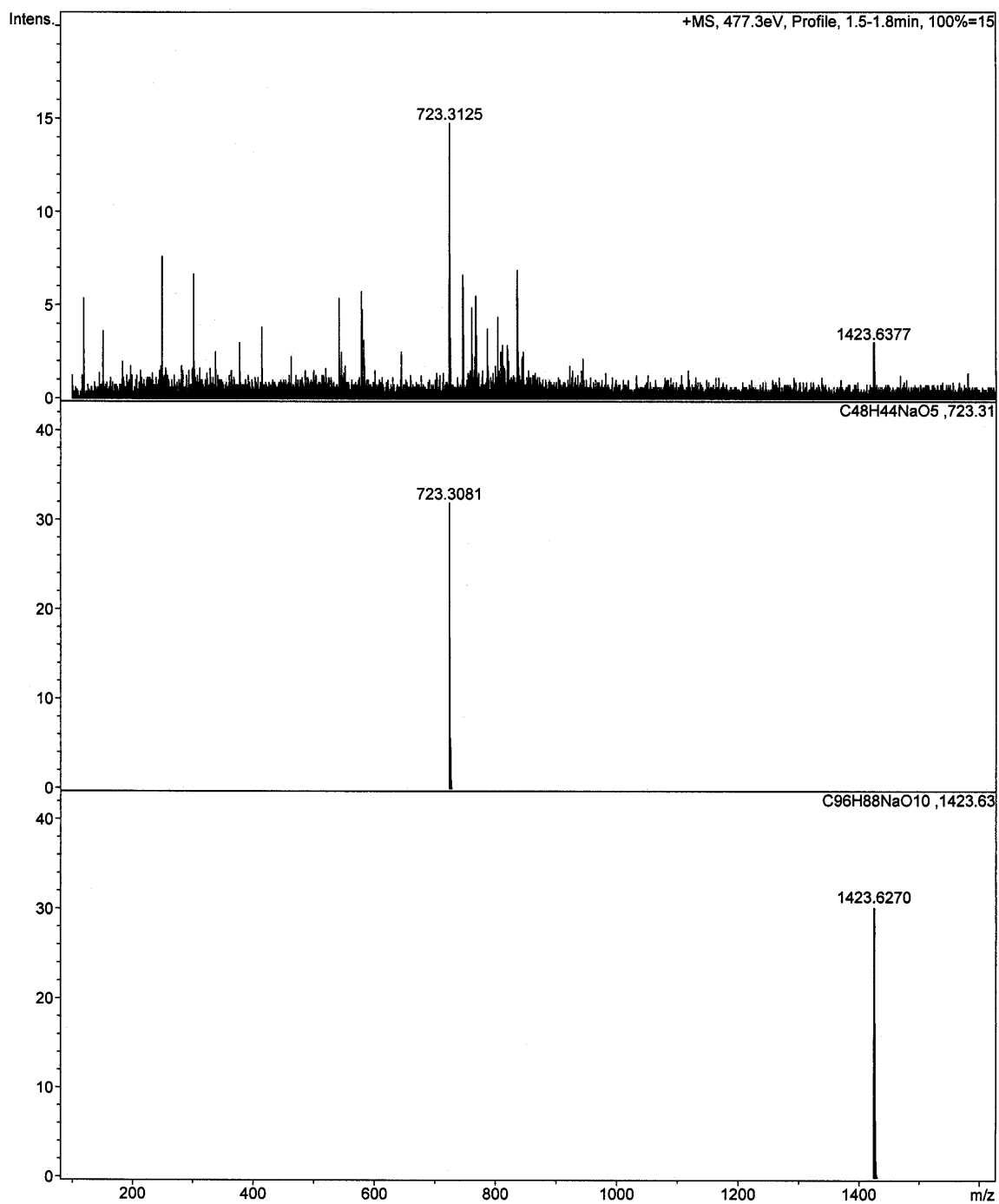
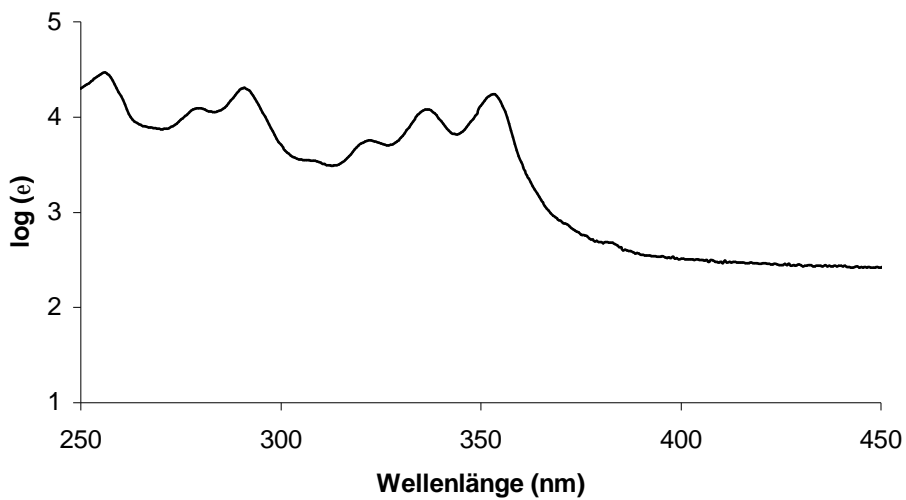
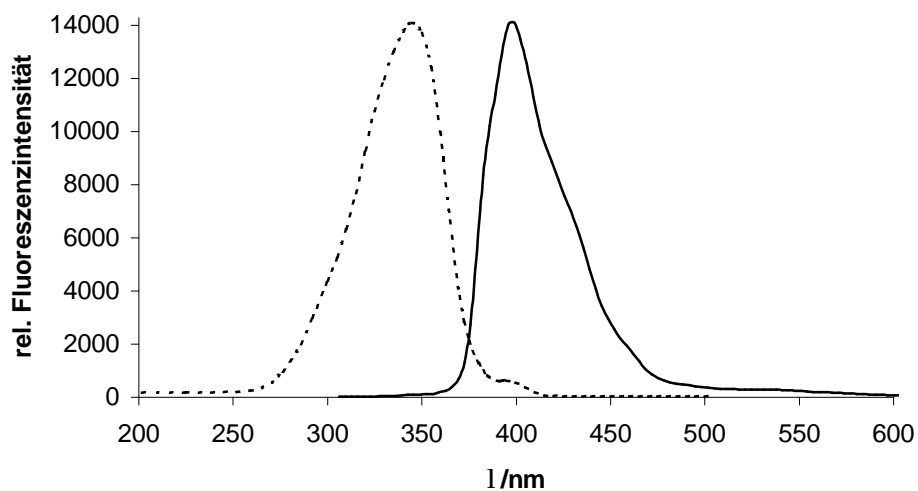


Abbildung 74: ESI-TOF Massenspektrum von **69**

UV(THF):  $\lambda_{\max}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 254 (4.44), 277 nm (4.06), 289 nm (4.28), 332 nm (4.63),  
335 nm (4.05), 352 nm (4.22).

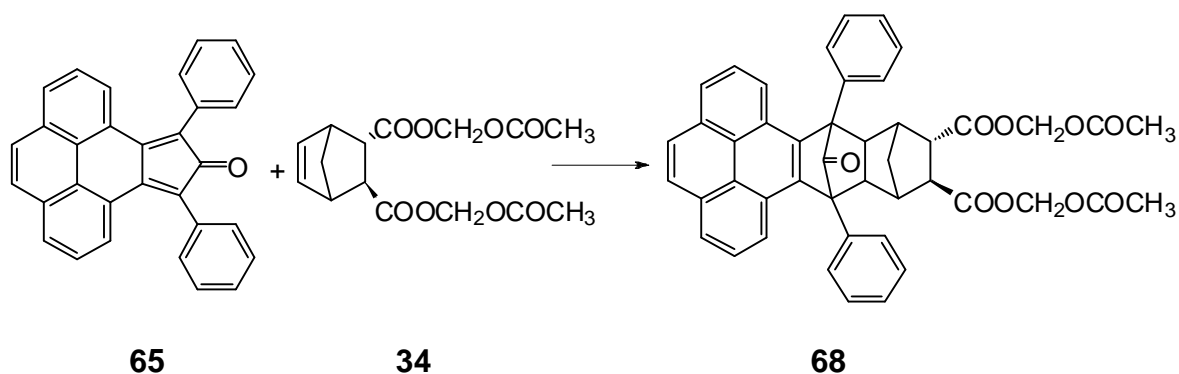


**Abbildung 75:** UV/Vis Spektrum des Ketons **69**, Auftragung  $\log \epsilon$  vs. Wellenlänge (nm), (50  $\mu\text{M}$  in THF)



**Abbildung 76:** Anregungs (----)- und Emissions(—)-Fluoreszenzspektrum von **69** in THF (50  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc.}}$  = 345 nm,  $\lambda_{\text{em.}}$  = 400 nm)

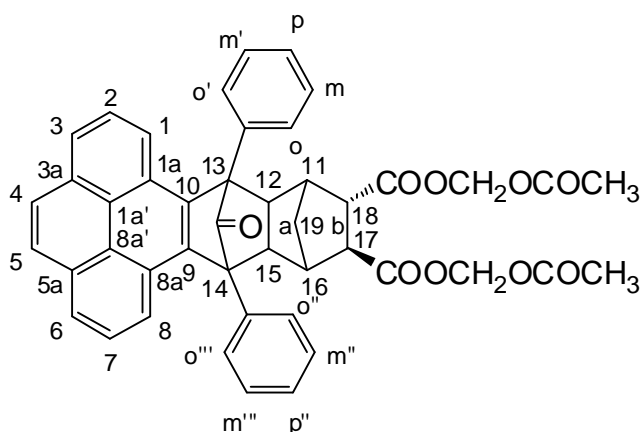
7.5.10 Herstellung von 3',5'-Diphenyl-3',5'-(4,5-pyrenylen)tricyclo-[5.2.1.0<sup>2',6'</sup>]-decan-4'-on-8',9'-(E)-dicarbonsäure-diacetoxymethylester (**68**)



Eine Mischung aus 594 mg (1.46 mmol) Pyrenocyclon **65**, 475 mg (1.45 mmol) Norbornendicarbonsäurediacetoxymethylester **34** und 13 ml Xylol 2d bei einer Temperatur von 70 °C unter Schutzgasatmosphäre und Lichtausschluss gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird getrocknet und säulenchromatographisch gereinigt. Als Laufmittel dient ein Gemisch aus Toluol/Ethylacetat (3:1 v/v). Neutrales Kieselgel wird als stationäre Phase verwendet. Das Lösungsmittel wird entfernt und man erhält einen farblosen Feststoff.

Ausbeute an **68** 349 mg (0.48 mmol, 33 %)

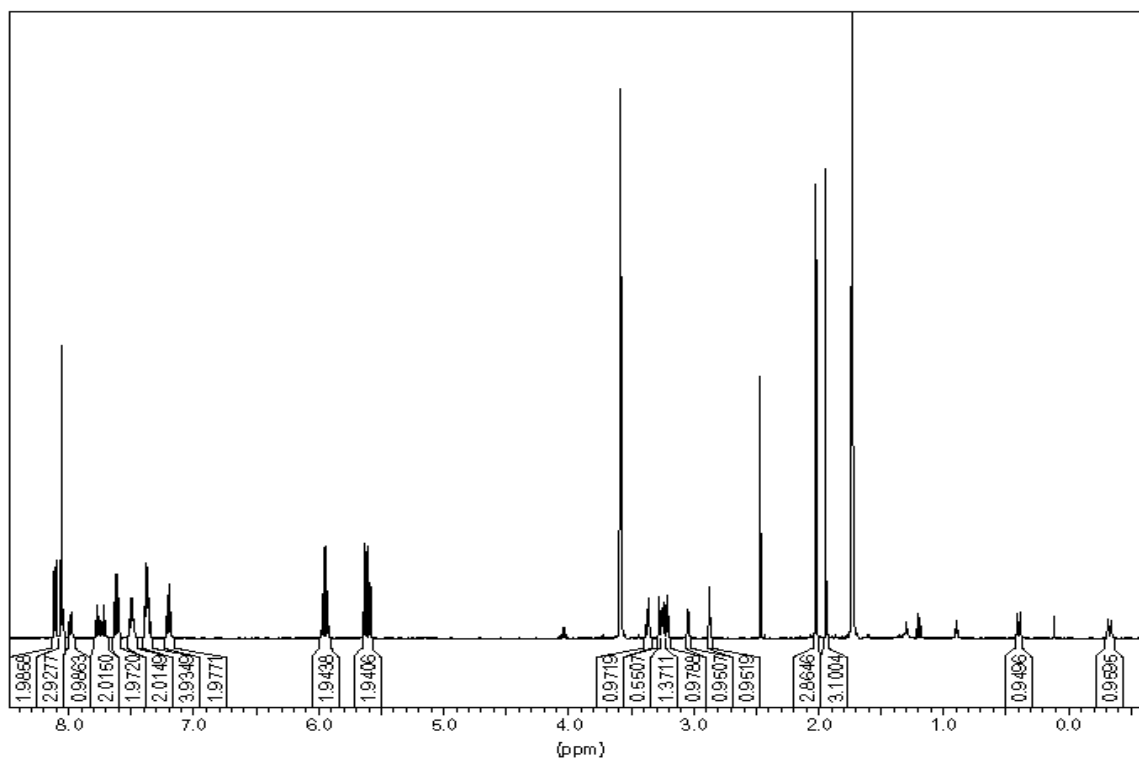
Schmp. **68** 199 - 200 °C





$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$ [ppm] = 8.12 (d, 1 H,  $^3J = 7.8$ , 1-H oder 8-H), 8.11 (d,s, 3 H, 3-H oder 6-H, 4-H oder 5-H), 7.99 (d, 2 H, 1-H oder 8-H), 7.76 (t, 1 H,  $^3J = 7.6$ , o-H oder o'-H), 7.72 (t, 1 H,  $^3J = 7.6$ , o-H oder o'-H), 7.62 (t, 2 H,  $^3J = 7.6$ , o'-H, o''-H), 7.50 - 7.48 (m, 2 H, m-H und m''-H oder m'-H und m'''-H), 7.38-7.37 (m, 4 H, m-H und m''-H oder m'-H und m'''-H), 7.20 (t, 2 H,  $^3J = 7.4$ , 2-H), 5.94 (q, 2H,  $^2J = 5.1$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 5.61 (q, 2H,  $^2J = 5.2$  Hz,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 3.35 (d, 1 H,  $^3J = 6.9$ , 12-H oder 15-H), 3.14 (m, 2 H, 11-H, 12-H oder 15-H, 16-H), 3.08 (t, 1 H,  $^3J = 6.5$ , 11-H oder 16-H), 3.05 (d, 1 H,  $^3J = 4.1$ , 17-H oder 18-H), 2.87 (s, 1 H, 17-H oder 18-H), 2.01 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.94 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0.39 (d, 1 H,  $^2J$  (19a-H, 19b-H) = 11.4, 10b-H), -0.33 (d, 1 H,  $^2J$  (19a-H, 19b-H) = 12.2, 10a-H).



**Abbildung 77:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz,  $\text{THF-d}_8$ ) von **68** (zur Zuordnung vgl. Liste der chemischen Verschiebungen)

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  [ppm] = 199.71 ( $\text{C}=\text{O}$ )<sub>Keton</sub>, 172.54, 171.79, 169.98, 169.62 ( $\text{C}=\text{O}$ )<sub>Ester</sub>, 138.12, 137.88, 136.81, 136.46, 133.04, 133.01 (C-1a', C-3a, C-5a, C-8'a, C-9, C-10), 132.90, 132.78, 130.32, 130.10, 129.42, 129.35, 129.05, 128.94, 128.74, 128.68, 128.62, 128.57, 128.46, 128.01, 127.91 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 126.89, 126.56, 126.53, 126.51, 126.00, 125.96, 123.81, 123.77 (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8), 80.92, 80.77 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 64.91, 64.54 (C-13, C-14), 51.83, 51.16, 48.22, 45.46, 44.56, 43.47 (C-11, C-12, C-15, C-16, C-17, C-18), 35.01 (C-19), 20.67 ( $\text{CH}_3$ ).

Molmassenfeinbestimmung:  $\text{C}_{46}\text{H}_{36}\text{NaO}_9$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$   
(ESITOF)  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : ber. 755.2280  
gef. 755.2252  
Abweichung: 5.8 ppm

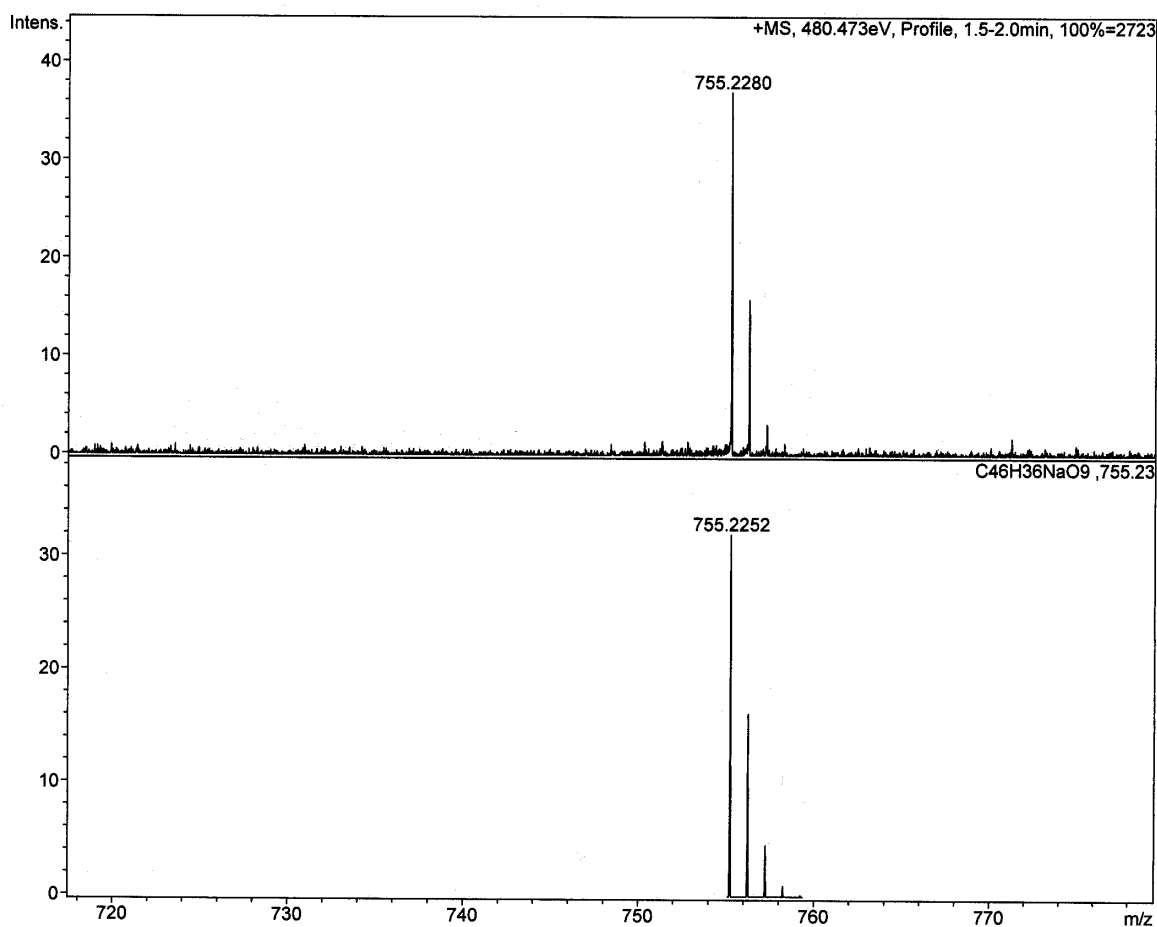
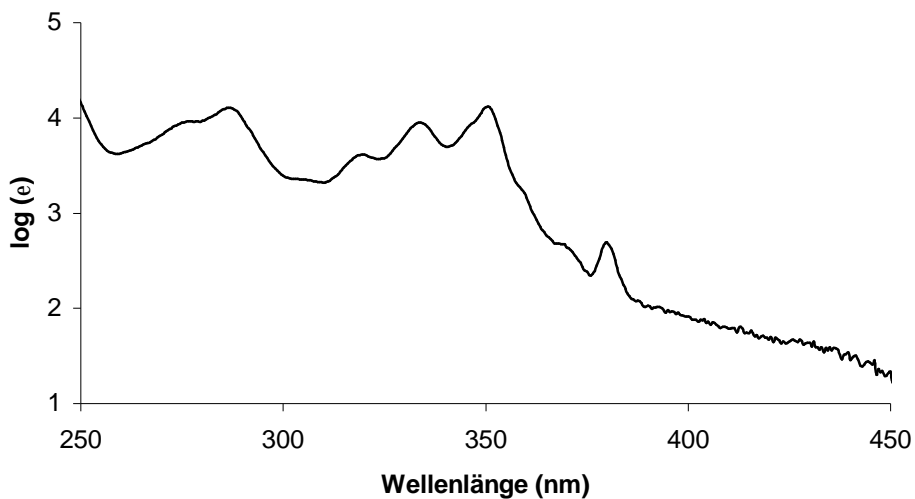
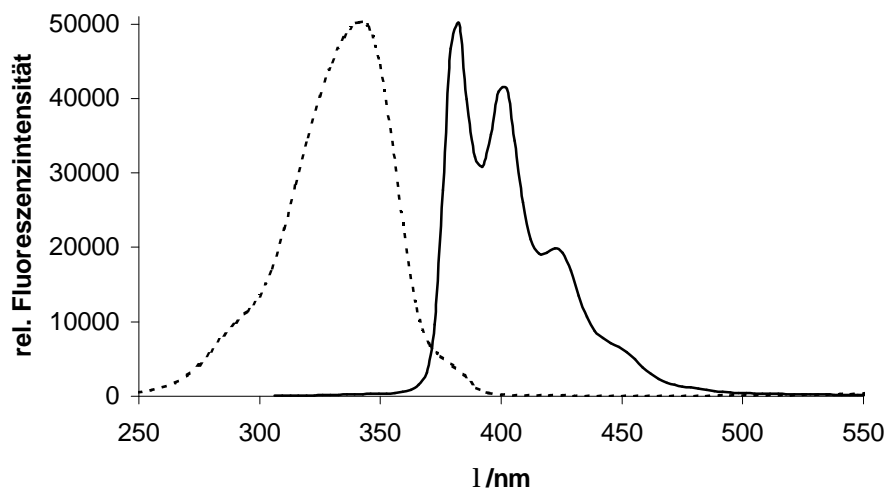


Abbildung 78: ESI-TOF Massenspektrum von 68

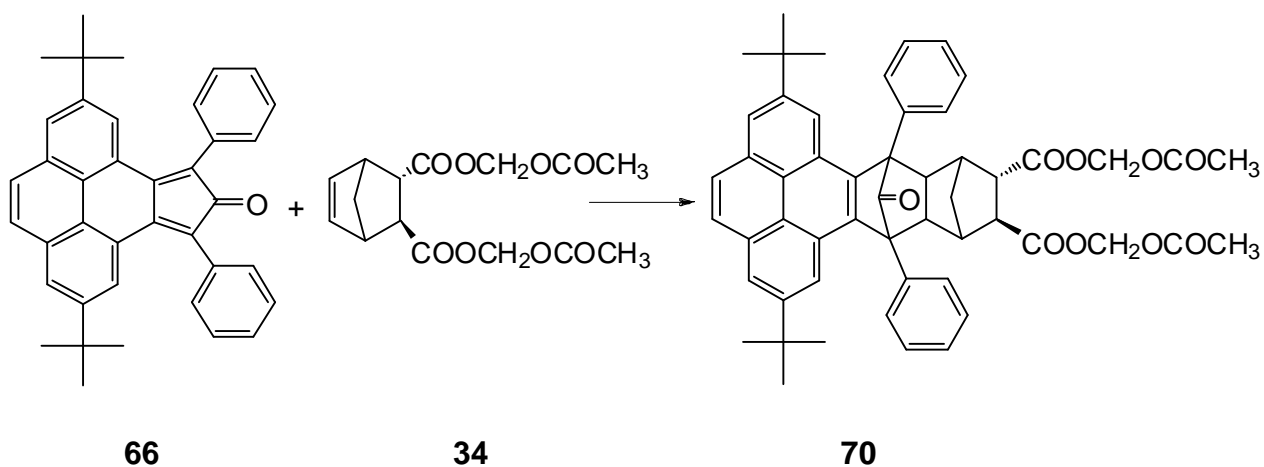
UV(THF):  $\lambda_{\max}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 285 nm (4.09), 318 nm (3.60), 333 nm (3.94), 349 nm (4.09), 378 nm (2.59).



**Abbildung 79:** UV/Vis Spektrum des Ketons **68**, Auftragung  $\log \epsilon$  vs. Wellenlänge (nm), (50  $\mu\text{M}$  in THF)



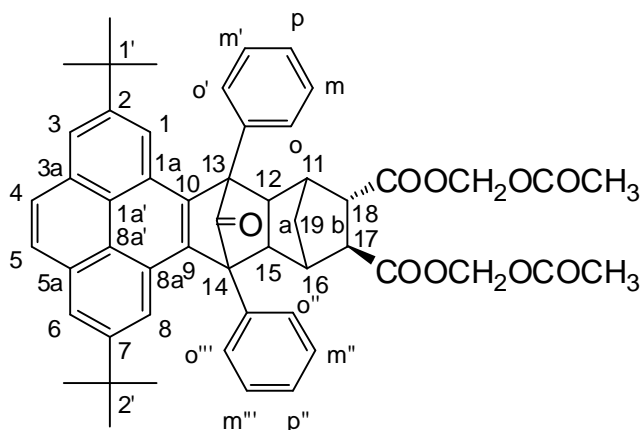
**Abbildung 80:** Anregungs (----)- und Emissions(—)-Fluoreszenzspektrum von **68** in THF (50  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc.}}$  = 340 nm,  $\lambda_{\text{em.}}$  = 380 nm)

7.5.11 Herstellung der Fängervorstufe **70**

Eine Mischung aus 522 mg (1.00 mmol) Di-*tert.*-butylcyclon **66**, 392 mg (1.20 mmol) Norbornendicarbonsäurediacetoxymethylester **34** und 15 ml Toluol 8 Stunden bei einer Temperatur von 100 °C unter Schutzgasatmosphäre und Lichtausschluss gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird mit Aktivkohle versetzt und eine Stunde gerührt. Nach dem Filtrieren wird das Lösungsmittel bis auf 2 ml mittels Rotationsverdampfer entfernt. Diese Lösung wird unter Rühren langsam zu 100 ml n-Hexan gegeben. Der ausgefallene Niederschlag wird in n-Hexan umkristallisiert.

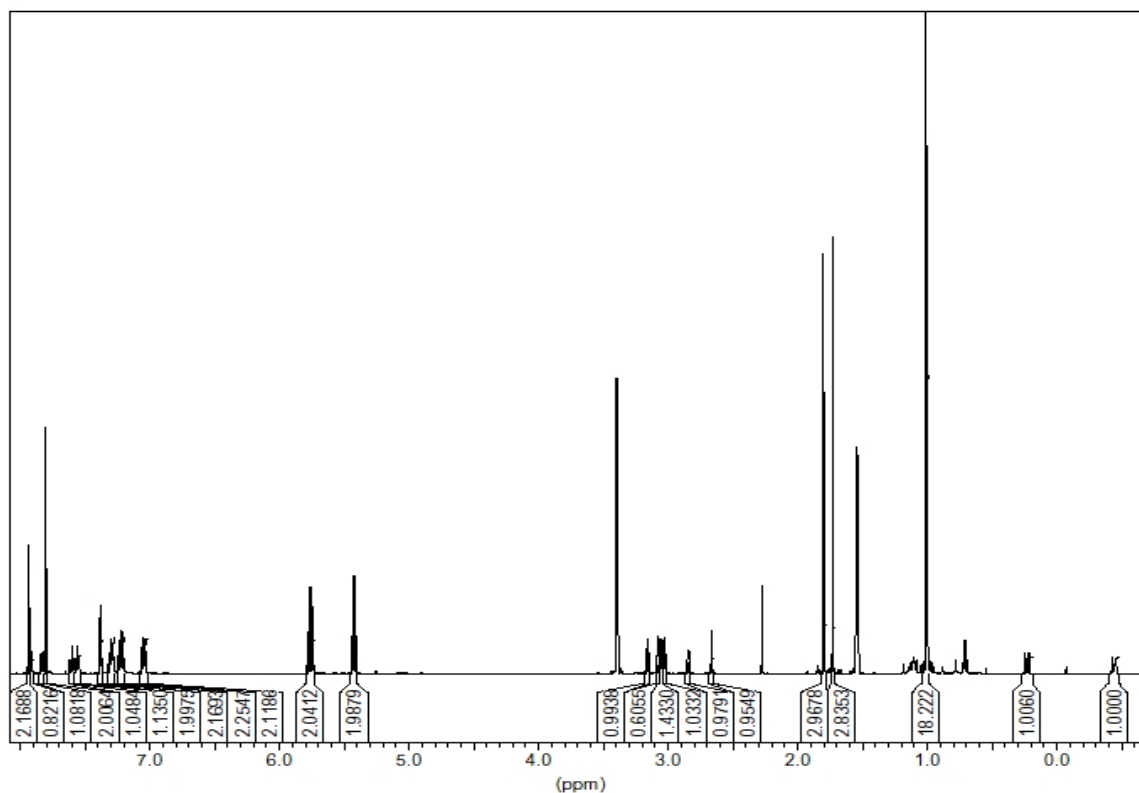
Ausbeute an **70** 300 mg (0.36 mmol, 36 %)

Schmp. **70** 217 °C



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$ [ppm] = 7.93 (t, 2 H,  $^4J = 1.35$ , 1-H, 8-H), 7.92 (d, 1 H, o-H oder o''-H), 7.80 (s, 2 H, 1-H, 8-H), 7.83 (d, 1 H,  $^3J = 7.6$ , o-H oder o''-H), 7.60 (t, 1 H,  $^3J = 7.5$ , m-H, m''-H), 7.56 (t, 1 H,  $^3J = 7.5$ , m-H, m''-H), 7.38 (m, 2 H, 3-H, 6-H), 7.30 (m, 2 H, o'-H, o'''-H), 7.22 (q, 2 H, m'-H, m'''-H), 7.05 (t, 2 H,  $^3J = 8.6$ , p-H, p'-H), 5.76 (q, 2 H,  $^2J = 5.3$  OCH<sub>2</sub>O), 5.42 (q, 2 H,  $^2J = 5.4$  Hz, OCH<sub>2</sub>O), 3.15 (d, 1 H,  $^3J = 6.9$ , 12-H oder 15-H), 3.08 (s, 1 H, 12-H, 15-H), 3.06 (m, 1 H, 11-H oder 16-H), 3.03 (t, 1 H,  $^3J = 4.6$ , 11-H oder 16-H), 2.84 (d, 1 H, 17-H oder 18-H), 2.66 (s, 1 H, 17-H oder 18-H), 1.80 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 1.73 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>), 1.01 (s, 18 H, 6 x CH<sub>3</sub>), 0.23 (d, 1 H,  $^2J$  (19a-H, 19b-H) = 11.3, 10b-H), -0.44 (d, 1 H,  $^2J$  (19a-H, 19b-H) = 11.6, 10a-H).



**Abbildung 81:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (500 MHz,  $\text{THF-d}_8$ ) von **70** (zur Zuordnung vgl. Liste der chemischen Verschiebungen)

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  [ppm] = 199.01 ( $\text{C}=\text{O}$ )<sub>Keton</sub>, 172.39, 171.72, 169.81, 169.46 ( $\text{C}=\text{O}$ )<sub>Ester</sub>, 149.05, 149.03, 138.51, 138.29, 136.42, 136.09 (C-1a', C-3a, C-5a, C-8'a, C-9, C-10), 132.88, 132.77, 132.53, 132.51, 130.34, 130.10, 129.45, 129.38, 129.00, 128.88, 128.60, 128.51, 128.47, 128.42 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 127.45, 127.34, 123.96, 123.93, 123.17, 123.14, 121.45, 121.41 (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8), 80.77, 80.61 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 64.66, 64.32 (C-13, C-14), 51.67, 51.09, 48.22, 45.42, 44.59, 43.46 (C-11, C-12, C-15, C-16, C-17, C-18), 35.60, 34.94 (C-1', C-2'), 31.88, 31.86 (C-19a, C-19b), 20.53, 20.29 ( $\text{CH}_3$ ).

Molmassenfeinbestimmung:	$\text{C}_{54}\text{H}_{53}\text{O}_9$ [ $\text{M}+\text{H}$ ] <sup>+</sup>
(ESITOF)	$m/z$ [ $\text{M}+\text{H}$ ] <sup>+</sup> : ber. 867.3504
	gef. 867.3514
	Abweichung: 1.2 ppm

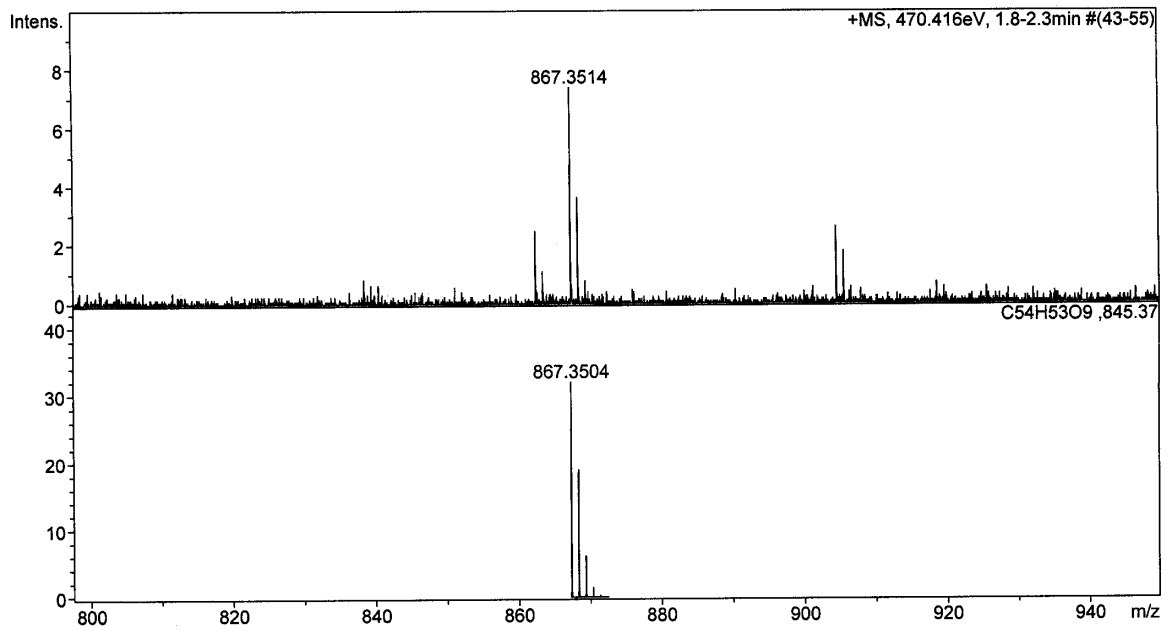


Abbildung 82: ESI-TOF Massenspektrum von **70**

UV(THF):  $\lambda_{\max}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 256 nm (4.76), 279 nm (4.41), 290 nm (4.60), 321 nm (4.07), 336 nm (4.38), 353 nm (4.52).

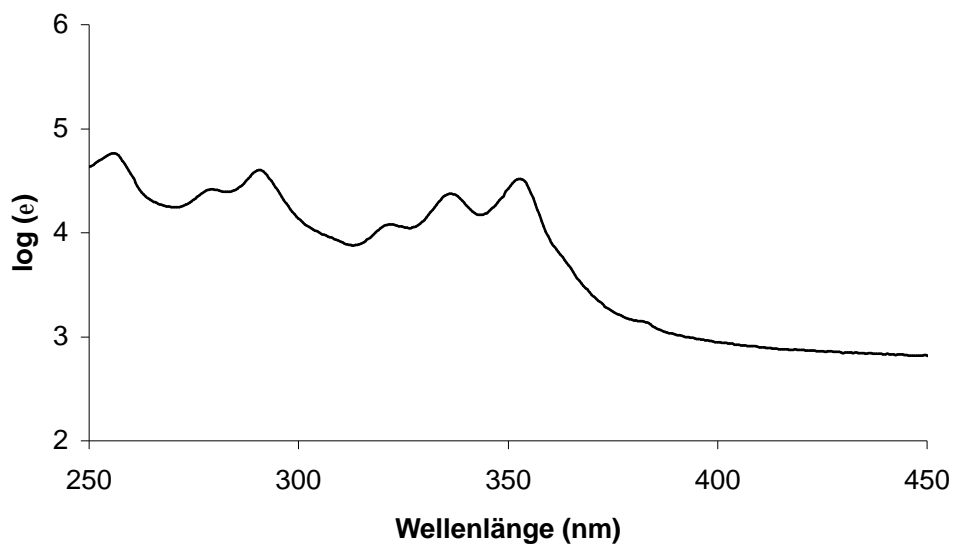
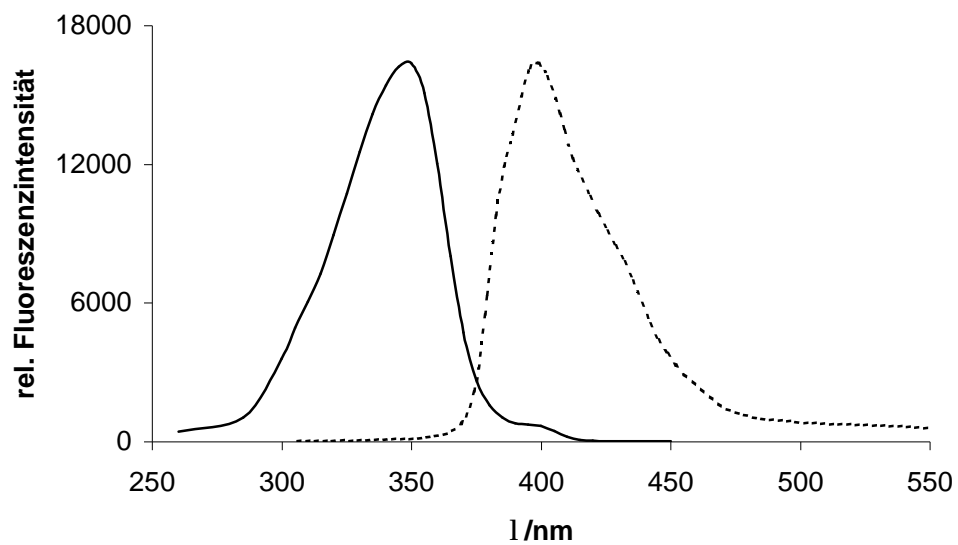


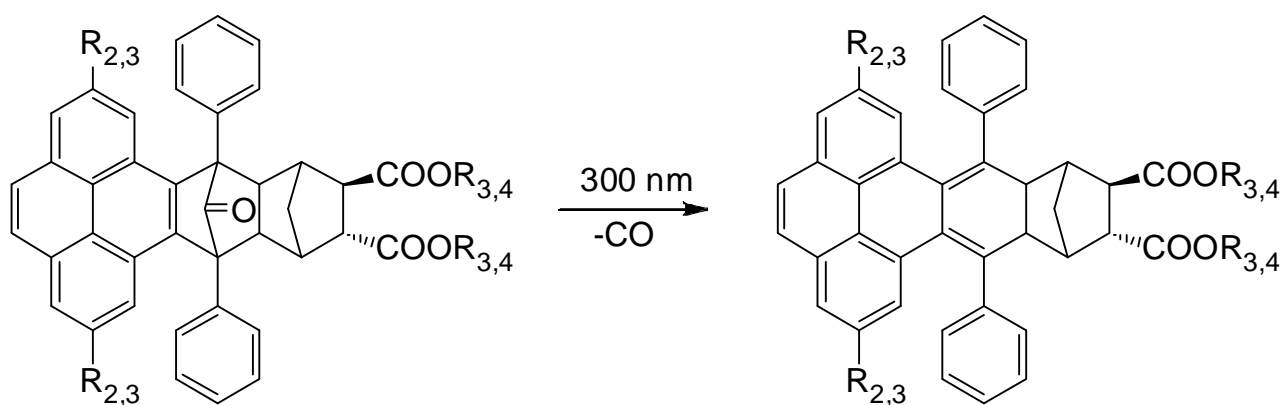
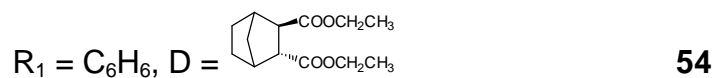
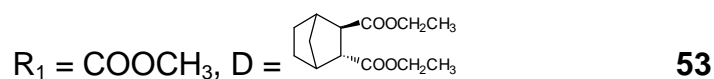
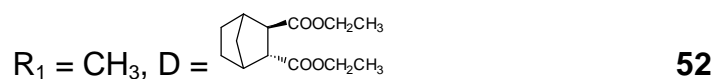
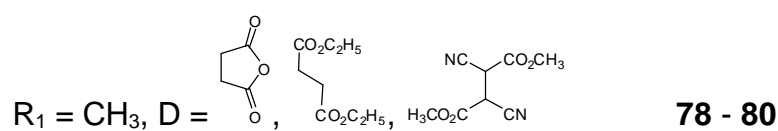
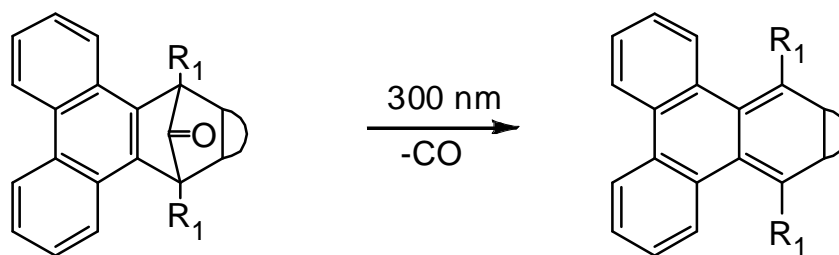
Abbildung 83: UV/Vis Spektrum des Ketons **70**, Auftragung  $\log \epsilon$  vs. Wellenlänge (nm), (50  $\mu\text{M}$  in THF)



**Abbildung 84:** Anregungs (----)- und Emissions(—)-Fluoreszenzspektrum von **70** in THF (50  $\mu$ M,  $\lambda_{\text{exc.}}$  = 350 nm,  $\lambda_{\text{em.}}$  = 400 nm)



## 7.6 Photochemische Darstellung der o-Chinodimethan-Derivate



**67:**  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{H}$

**68:**  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{CH}_2\text{OCOCH}_3$

**69:**  $R_2 = \text{C}(\text{CH}_3)_3$ ,  $R_3 = \text{H}$

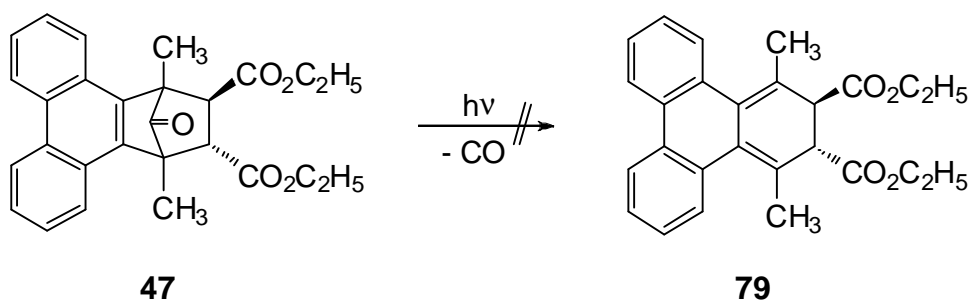
**70:**  $R_2 = \text{C}(\text{CH}_3)_3$ ,  $R_3 = \text{CH}_2\text{OCOCH}_3$

**71:**  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{H}$

**72:**  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{CH}_2\text{OCOCH}_3$

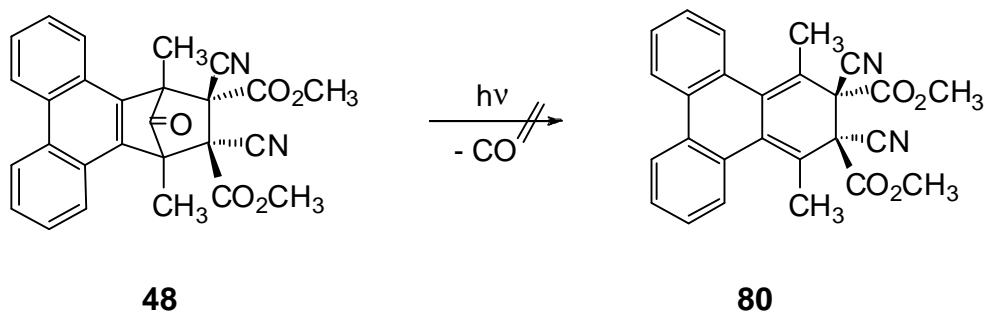
**73:**  $R_2 = \text{C}(\text{CH}_3)_3$ ,  $R_3 = \text{H}$

**74:**  $R_2 = \text{C}(\text{CH}_3)_3$ ,  $R_3 = \text{CH}_2\text{OCOCH}_3$

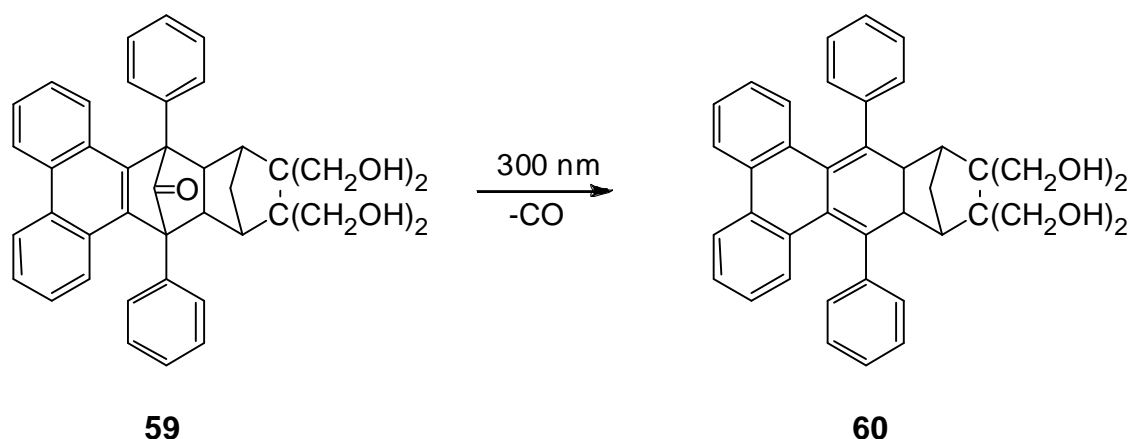
7.6.1 Photolyse von **47**

Die Photolyse von **47** erfolgte unter Variation des Lösungsmittels ( $[\text{d}_8]$ -Tetrahydrofuran bzw.  $\text{CDCl}_3$ ), der Temperatur und der Photolysedauer.

Allgemein ist ein schnellere Photolysegeschwindigkeit bei der Verwendung des deuterierten Chloroforms zu beobachten, was weiter nicht verwundert, bedenkt man die Eigenabsorption der beiden Lösungsmittel. Jedoch verlief die Photolyse unter keiner der gewählten Bedingungen quantitativ. Eine 48 prozentige Ausbeute konnte nach sieben Stunden bei einer Konzentration von 26 mmol/l in  $\text{CDCl}_3$  bei  $-10^\circ\text{C}$  erzielt werden, so dass nahezu keine Spaltprodukte anfielen. Nach längerer Photolysedauer nahmen die Verunreinigungen stark zu. Es ist davon auszugehen, dass eine 1.5-H-Verschiebung stattfindet.

7.6.2 Photolyse von **48**

Die Photolyse von **48** in  $\text{CDCl}_3$  bzw. THF bei  $-10^\circ\text{C}$  verlief ohne Erfolg. Bereits nach einer Stunde fiel ein farbloser Feststoff in beträchtlicher Menge aus. Ein Photolyseprodukt **80** konnte zu keiner Zeit festgestellt werden. Da die Intensität der Bande, die charakteristisch für den Dicyanofumar-säuredimethylester ist, mit der Zeit zunahm, ist an dieser Stelle eine photochemisch induzierte Retro-Diels-Alder-Reaktion, die zur Bildung des unlöslichen symmetrischen Dimers **40** führt, denkbar. Weiterhin ist eine Anregung der Cyanogruppe in Betracht zu ziehen, die dieses Verhalten erklären würde.

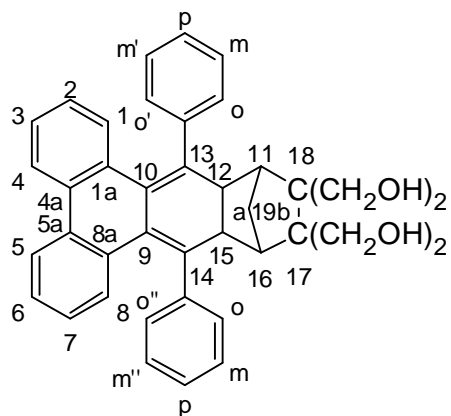
7.6.3 Photochemische Decarbonylierung von **59**

15.1 mg ( $2.52 \times 10^{-2}$  mmol) 3,5-Diphenyl-3,5-(9,10-phenanthrylen)-tricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-on-8,9-tetrahydroxymethyl **59** wurden in ein Quarz-NMR-Röhrchen eingewogen und in 1.0 ml  $d_8$ -THF gelöst. Die Photolyse wurde bei 300 nm in einem Rayonet-Reaktor und 0 °C mit Methanol p.A. als Kühlmittel durchgeführt. Nach 20 Stunden konnte durch <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopische Analyse ein Umsatz von 100 % festgestellt werden. Die gelbe Eduktlösung **59** verfärbte sich in dieser Zeit in die orange gefärbte Lösung der 3,6-Diphenyl-4,5-(2,2'-biphenylen)-tricyclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-3,5-dien-9,10-tetrahydroxymethyl **60**.

Danach überführte man die Lösung des Produktes **60** in ein Schlenkgefäß und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum.

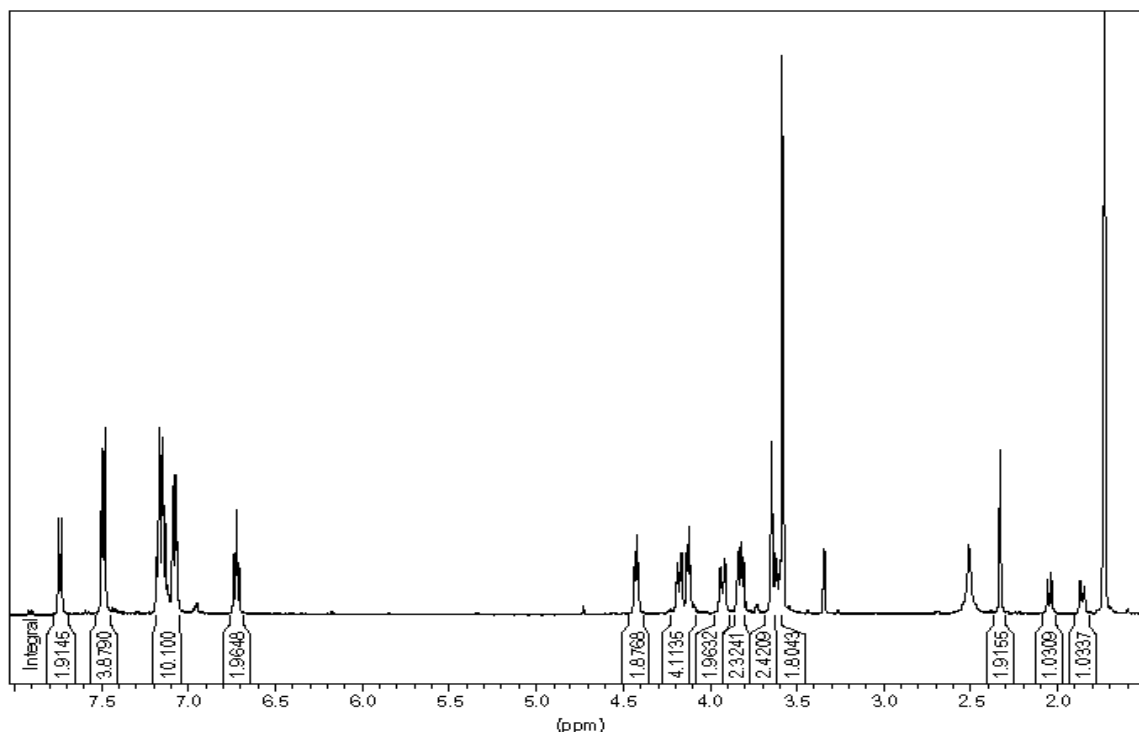
Ausbeute an **60**     Quantitativer Umsatz

Schmp. **60**         86 °C



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $[\text{D}_8]\text{THF}$ ):

$\delta$  [ppm] = 7.75 (d,  $^3\text{J} = 7.2$  Hz, 2H, 4-H, 5-H), 7.48 (d,  $^3\text{J} = 7.3$  Hz, 1 H, o'-H oder o''-H), 7.26 - 7.18 (m, 10 H, 1-H, 2-H, 3-H, 6-H, 7-H, 8-H,  $\text{H}_{\text{phen.}}$ ), 6.72 (t,  $^3\text{J} = 7.2$  Hz, 2-H oder 7-H), 4.42, 4.16, 4.12, 3.90 (4dd, 8H,  $\text{CH}_2$ ), 3.82 - 3.81 (m, 2H, 11-H, 16-H), 3.64 (s, 2H, OH), 3.62 - 3.61 (m, 2H, 12-H, 15-H), 2.33 (s, 2H, OH), 2.05 (d,  $^2\text{J}$  (19a-H, 19b-H) = 11.1 Hz, 1 H, 19b-H), 1.85 (br d,  $^2\text{J}$  (19a-H, 19b-H) = 11.4 Hz, 1 H, 19a-H).



**Abbildung 85:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz,  $\text{THF-d}_8$ ) von **60** (zur Zuordnung vgl. Liste der chemischen Verschiebungen)

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $[\text{D}_8]\text{THF}$ ):

$\delta$  [ppm] = 143.75, 134.80, 132.79, 132.69, 130.93, 129.18 (C-1'a, C-4'a, C-5'a, C-8'a, C-9', C-10'), 128.09, 127.78, 127.14, 126.80, 126.62, 124.22 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ , C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7), 124.24 (C-1, C-8), 65.96 (C-13, C-14), 63.13 ( $\text{CH}_2$ ), 54.23, 53.19, 46.32 (C-11, C-12, C-15, C-16, C-17, C-18), 31.25 (19a, 19b).

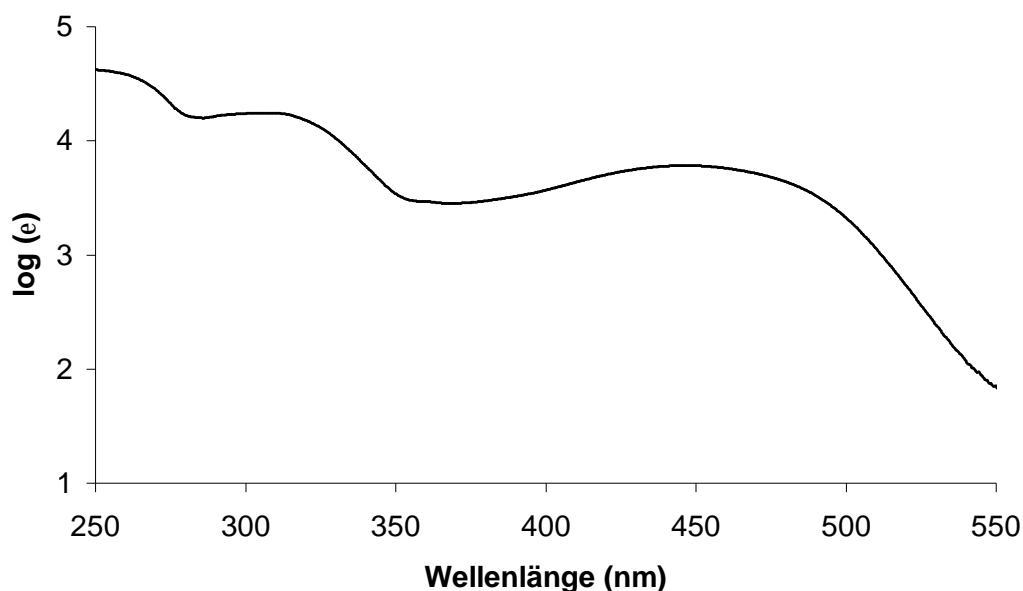
**EA:**

M = 568.70 g/mol

Ber.: C 79.84 H 6.11

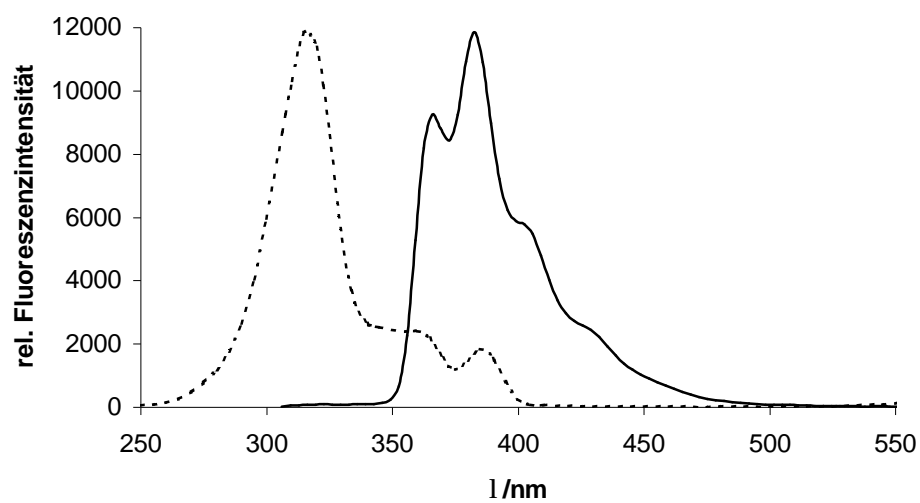
Gef.: C 78.26 H 5.97

UV(THF):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 260 nm (4.58), 316 nm (4.21), 453 nm (3.74).

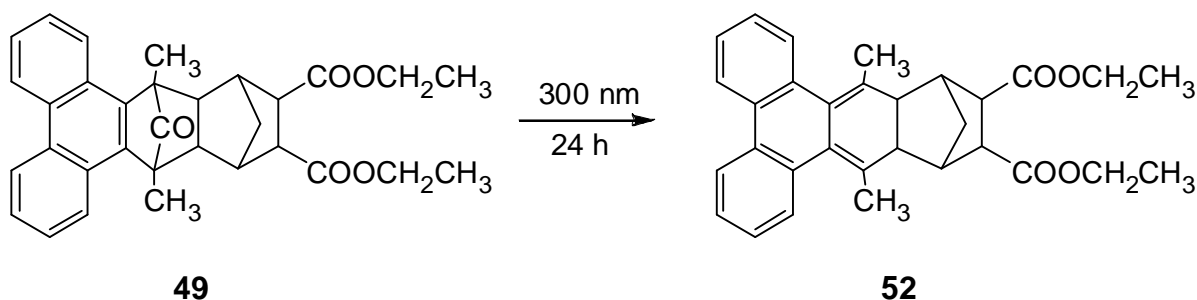


**Abbildung 86:** UV/Vis Spektrum des FNOCT **60**, Auftragung  $\log \epsilon$  vs. Wellenlänge (nm), (50  $\mu\text{M}$  in THF)

Fluoreszenz von **60** in THF: keine



**Abbildung 87:** Anregungs (----)- und Emissions(—)-Fluoreszenzspektrum vom Hydroxylamin **60b** in THF (50 μM,  $\lambda_{\text{exc.}} = 315 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 380 \text{ nm}$ )

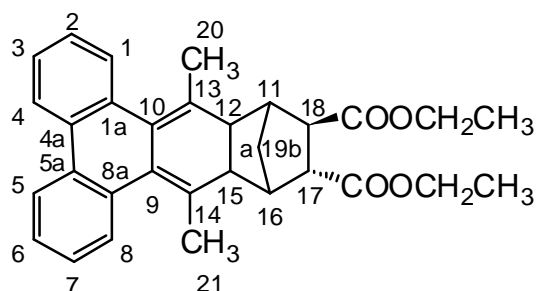
7.6.4 Photochemische Decarbonylierung von **49**

15.0 mg ( $3.02 \times 10^{-2}$  mmol) 3,5-Dimethyl-3,5-(9,10-phenanthrylen)-tricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-on-8,9-(E)-dicarbonsäurediethylester **49** wurden in ein Quarz-NMR-Röhrchen eingewogen und in 1.0 ml d<sub>8</sub>-THF gelöst. Die Photolyse wurde bei 300 nm in einem Rayonet-Reaktor und -10 °C mit Methanol p.A. als Kühlmittel durchgeführt. Nach 18 Stunden konnte durch <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopischer Analyse ein Umsatz von 100 % festgestellt werden. Die farblose Eduktlösung **49** verfärbte sich in dieser Zeit in die gelb gefärbte Lösung der 3,6-Dimethyl-4,5-(2,2'-biphenylen)-tricyclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-3,5-dien-9,10-(E)-dicarbonsäurediethylester **52**.

Danach überführte man die Lösung des Produktes **52** in ein Schlenkgefäß und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum.

Ausbeute an **52**     Quantitativer Umsatz

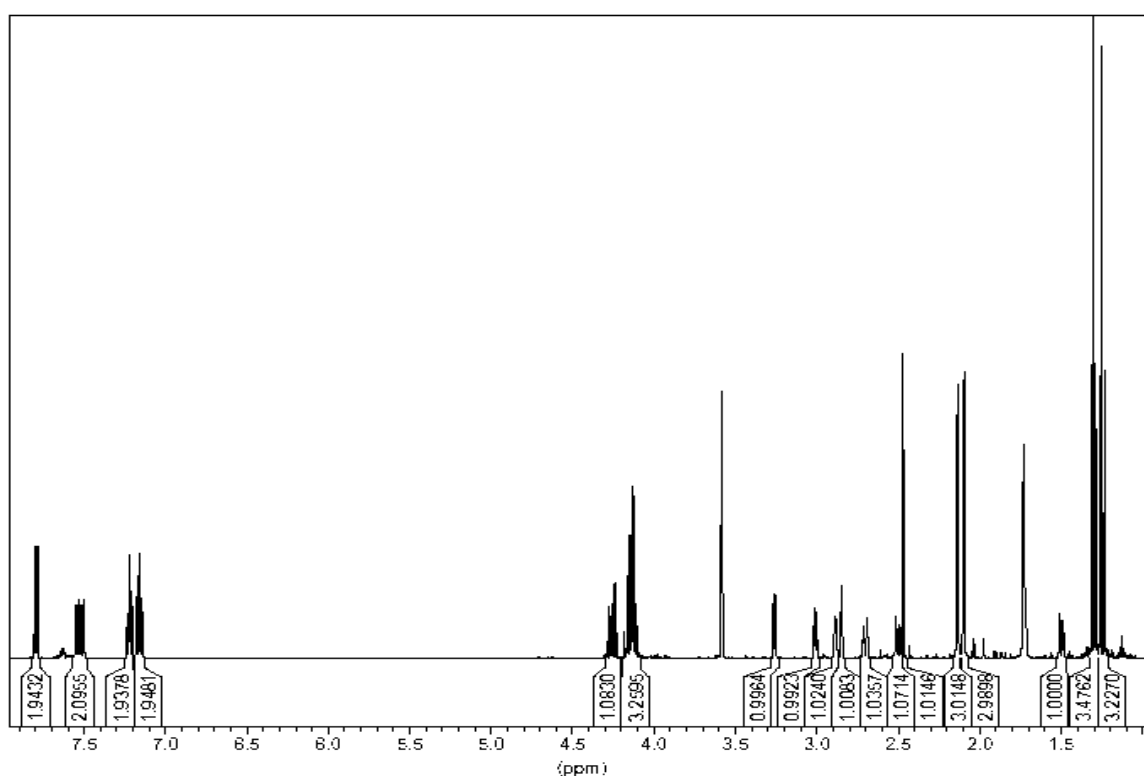
Schmp. **52**     81 - 82 °C





$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $[\text{D}_8]\text{THF}$ ):

$\delta = 7.79$  (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 2H, 4-H, 5-H), 7.51 (d,  $^3J = 7.2$  Hz, 1H, 1-H oder 8-H), 7.54 (d,  $^3J = 7.2$  Hz, 1H, 1-H oder 8-H), 7.22 (t, 2H, 2-H, 7-H oder 3-H, 6-H), 7.16 (t, 2H, 2-H, 7-H oder 3-H, 6-H), 4.11-4.28 (4\*m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 3.26 (t,  $^3J = 7.5$  Hz, 1 H, 18-H oder 17-H), 3.01 (d,  $^3J = 7.6$  Hz, 1 H, 15-H oder 12-H), 2.89 (d,  $^3J = 7.4$  Hz, 1 H, 15-H oder 12-H), 2.85 (s, 1 H, 18-H oder 17-H), 2.70 (d, 1 H, 16-H), 2.50 (d,  $^3J = 7.8$  Hz, 1 H, 11-H), 2.14 (s, 3 H, 20-H), 2.10 (s, 3 H, 21-H), 1.70 (d,  $^2J$  (19a-H, 19b-H) = 11.8 Hz, 1 H, 19b-H), 1.49 (*br* d,  $^2J$  (19a-H, 19b-H) = 14 Hz, 1 H, 19a-H), 1.32 (t,  $^3J = 8.3$  Hz, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 1.25 (t,  $^3J = 8.3$  Hz, 3 H,  $\text{CH}_3$ ).



**Abbildung 88:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz,  $\text{THF-d}_8$ ) von **52** (zur Zuordnung vgl. Liste der chemischen Verschiebungen)

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $[\text{D}_8]\text{THF}$ ):

$\delta = 173.67, 172.59$  ( $\text{C=O}$ )<sub>Ester</sub>, 135.53, 135.48, 131.54, 131.51, 127.22, 127.21 (C-1'a, C-4'a, C-5'a, C-8'a, C-9', C-10'), 129.66, 129.67, 127.71, 127.70, 125.47, 125.45 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7), 124.4, 124.3 (C-1, C-8), 61.27, 61.24 ( $\text{CH}_2$ ), 51.37, 50.99, 49.86, 49.16, 47.64, 46.65 (C-11, C-12, C-15, C-16, C-17, C-18), 35.58 (C-19), 21.78, 21.75, 14.84, 14.62 ( $\text{CH}_3$ ).

Molmassenfeinbestimmung:  $C_{31}H_{33}O_4$   $[M+H]^+$   
(ESITOF)  $m/z$   $[M+H]^+$ : ber. 469.2373  
gef. 469.2370  
Abweichung: 0.6 ppm

$C_{31}H_{32}NaO_4$   $[M+Na]^+$   
 $m/z$   $[M+Na]^+$ : ber. 491.2193  
gef. 491.2212  
Abweichung: 3.9 ppm

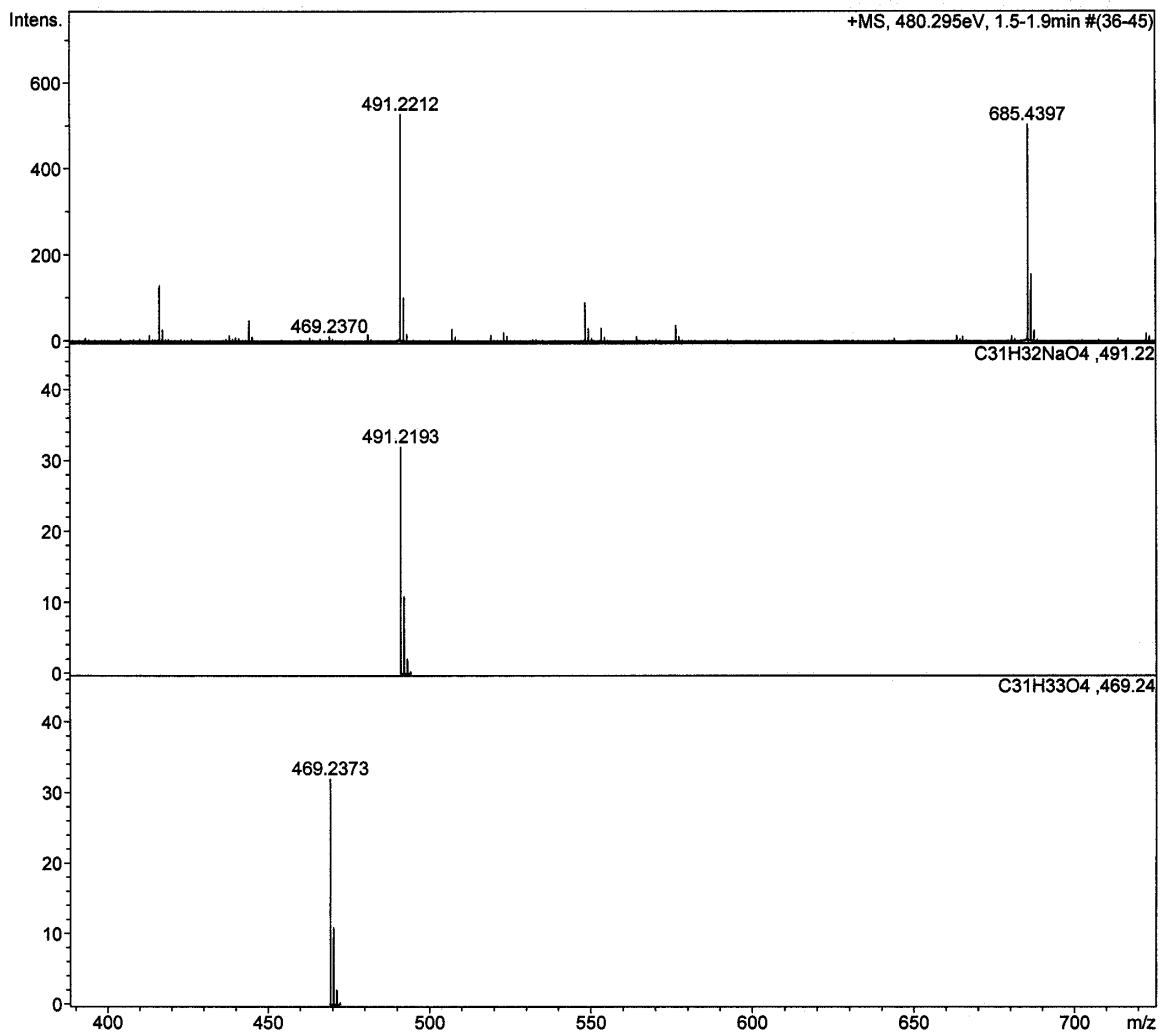
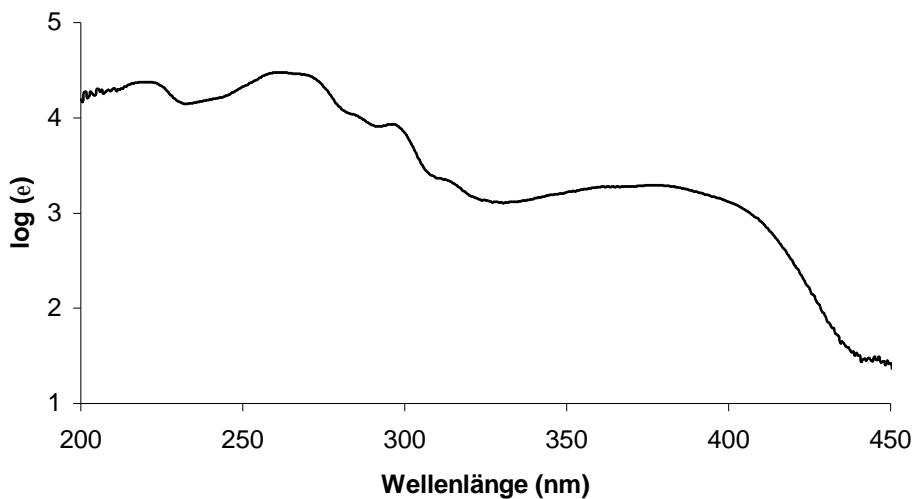


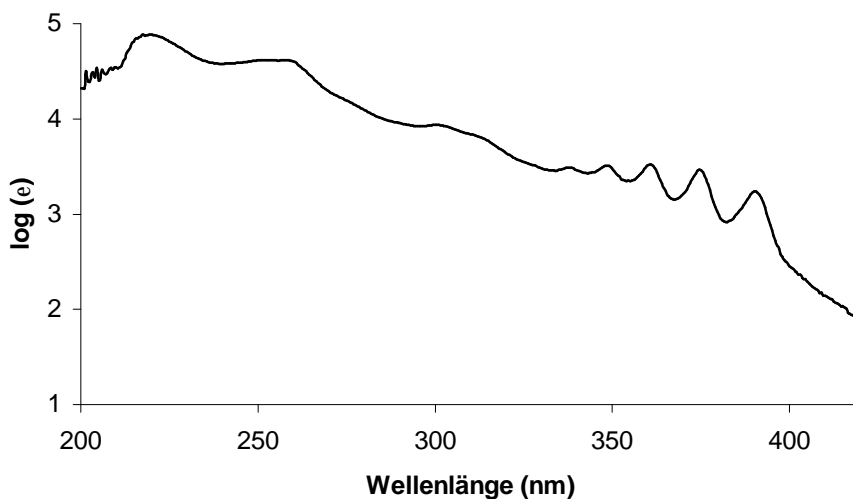
Abbildung 89: ESI-TOF Massenspektrum von 52

UV(THF):  $\lambda_{\max}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 385 nm (3.26), 296 nm (3.93), 265 nm (4.47), 219 nm (4.38).



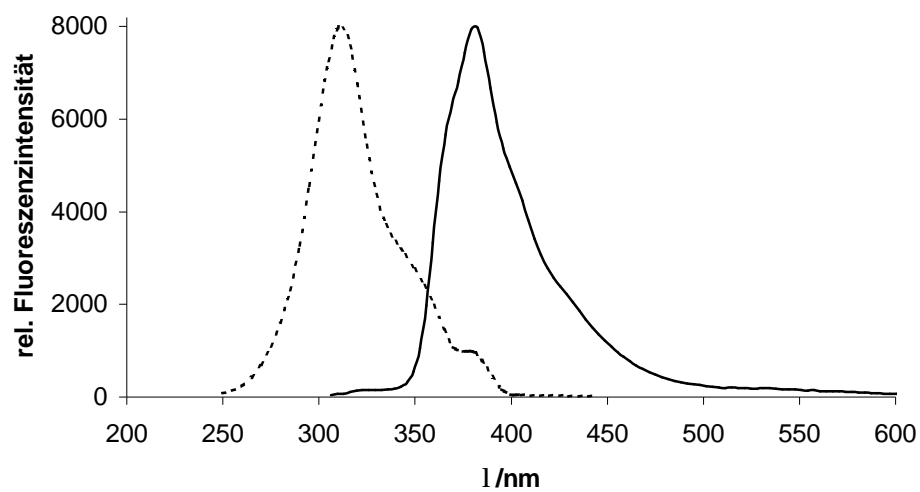
**Abbildung 90:** UV/Vis Spektrum des FNOCT **52**, Auftragung  $\log \epsilon$  vs. Wellenlänge (nm), (50  $\mu$ M in THF)

UV(Hydroxylamin in THF):  $\lambda_{\max}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 306 nm (3.88), 256 nm (4.61), 216 nm (4.86).

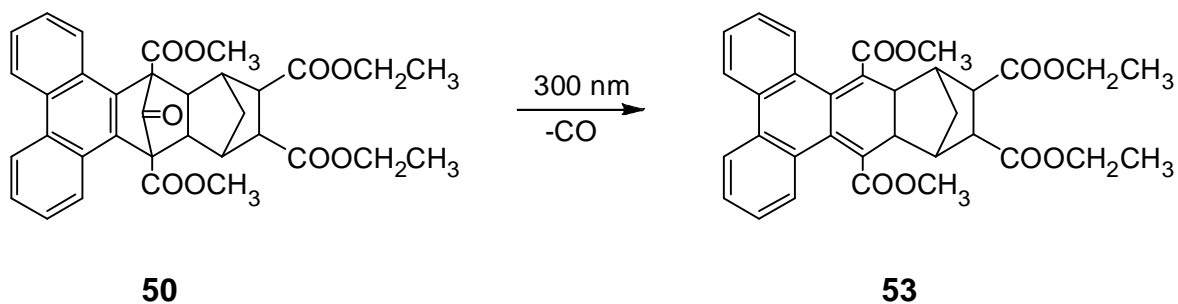


**Abbildung 91:** UV/Vis Spektrum des Hydroxylamin **52b**, Auftragung  $\log \epsilon$  vs. Wellenlänge (nm), (50  $\mu$ M in THF)

Fluoreszenz von **52** (50  $\mu\text{M}$  in Tetrahydrofuran): keine



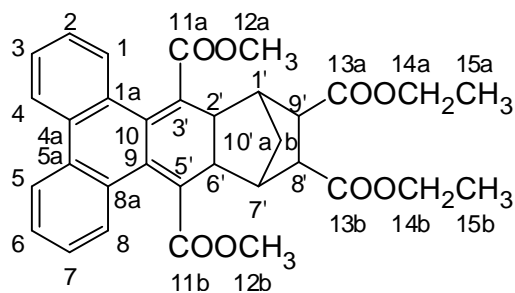
**Abbildung 92:** Anregungs (----)- und Emissions(—)-Fluoreszenzspektrum vom Hydroxylamin **52b** in THF (50  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc.}}$  = 310 nm,  $\lambda_{\text{em.}}$  = 380 nm)

7.6.5 Photochemische Decarbonylierung von **50**

Zur Synthese des *o*-Chinodimethans **53** wurden 10.0 mg (17.1  $\mu\text{mol}$ ) des Ketons **50** in einem NMR-Rohr (Quarzglas) eingewogen und unter Schutzgasatmosphäre mit 0.8 ml  $[\text{D}_8]$ -THF versetzt und verschlossen. Die zunächst farblose Lösung wurde nun, unter Kontrolle durch 200 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie, für 33 Stunden in einem UV-Reaktor bei  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  mit Methanol als Kühlmittel photolytisiert (Firma Rayonet, 128 W, 300 nm). Die Lösung wird in ein Schlenkgefäß überführt und das Lösungsmittel mittels Vakuum entfernt.

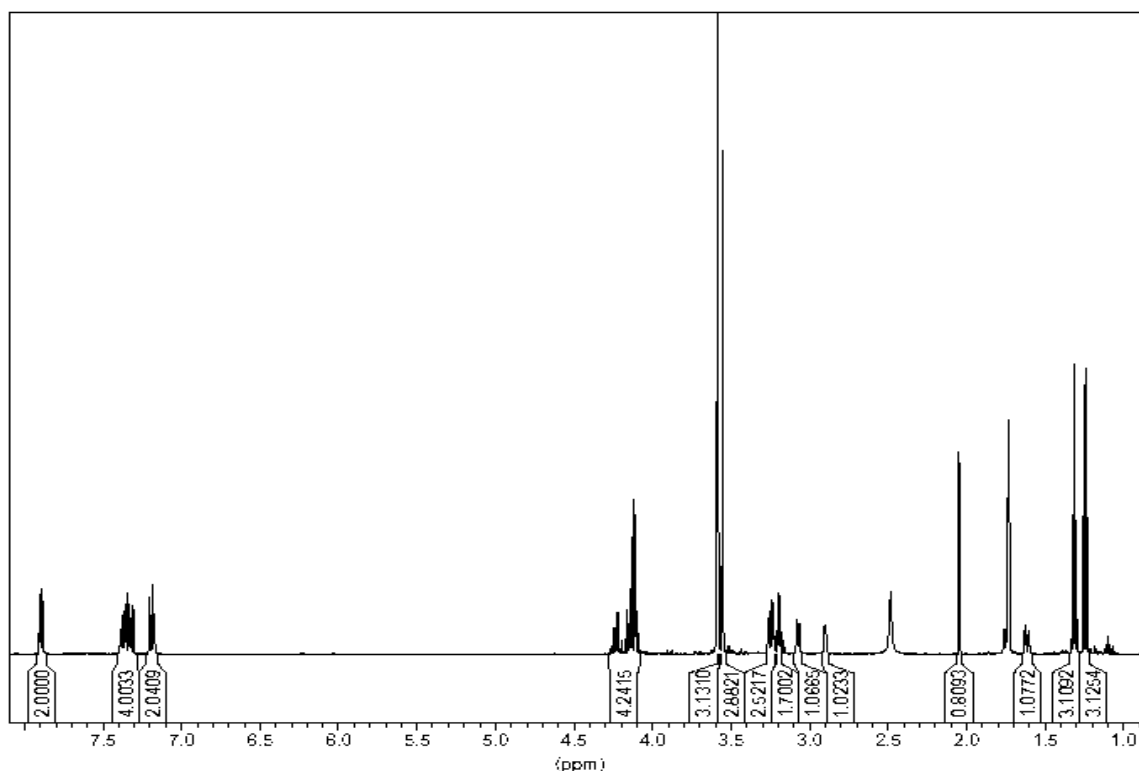
Ausbeute **53**            Quantitativer Umsatz

Schmp. **53**             $84\text{ }^\circ\text{C}$



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $[\text{D}_8]\text{THF}$ ):

$\delta$  [ppm] = 7.89 (d, 2 H,  $^3J = 7.9$  Hz, 4-H, 5-H), 7.28 - 7.4 (m, 4 H, 2-H, 3-H, 6-H, 7-H), 7.28 (t, 2 H  $^3J = 7.7$  Hz, 1-H, 8-H), 4.07 - 4.27 (m, 4 H, 14a-H u. 14b-H), 3.58 (s, 3 H, 12a-H o. 12b-H), 3.55 (s, 3 H, 12a-H o. 12b-H), 3.28 - 3.14 (m, 4 H, 18'-H, 17'-H, 16'-H, 15'-H), 3.07 (dd, 1 H,  $^3J = 5.6$  Hz, 9'-H), 2.90 (dd, 1H,  $^3J = 4.5$  Hz, 2'-H), 1.76 (d,  $^2J = 10.4$  Hz, 1 H, 10'b-H), 1.63 (d,  $^2J = 10.7$  Hz, 1 H, 10'a-H), 1.42 (t, 3 H,  $^3J = 8.4$  Hz, 15a-H o. 15b-H), 1.32 (t, 3 H,  $^3J = 8.5$  Hz, 15a-H, 15b-H).



**Abbildung 93:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz,  $\text{THF-d}_8$ ) von **53** (zur Zuordnung vgl. Liste der chemischen Verschiebungen)

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $[\text{D}_8]\text{THF}$ ):

$\delta$  [ppm] = 173.67, 172.99 (C-13a, C-13b), 171.91, 171.57 (C-11a, C-11b), 134.14, 134.12, 131.42, 130.93, 130.76, 130.08, 129.59, 128.34, 128.30, 127.93, 127.39, 124.83, 124.72 (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9, C-10, C-1a, C-4a, C-5a, C-8a), 61.47, 61.31 (C-3', C-5'), 52.21, 52.05 (C-14a, C-14b), 51.41, 51.13 (C-12a, C-12b), 50.92, 49.92, 49.75, 49.53, 47.79, 43.46 (C-1', C-2', C-6', C-7', C-8', C-9'), 34.89 (C-10'a, C-10'b), 14.63, 14.58 (C-15a, C-15b).

Molmassenfeinbestimmung:  $C_{33}H_{32}NaO_8$   $[M+Na]^+$   
(ESITOF)  $m/z$   $[M+Na]^+$ : ber. 579.1989  
gef. 579.2019  
Abweichung: 3.6 ppm

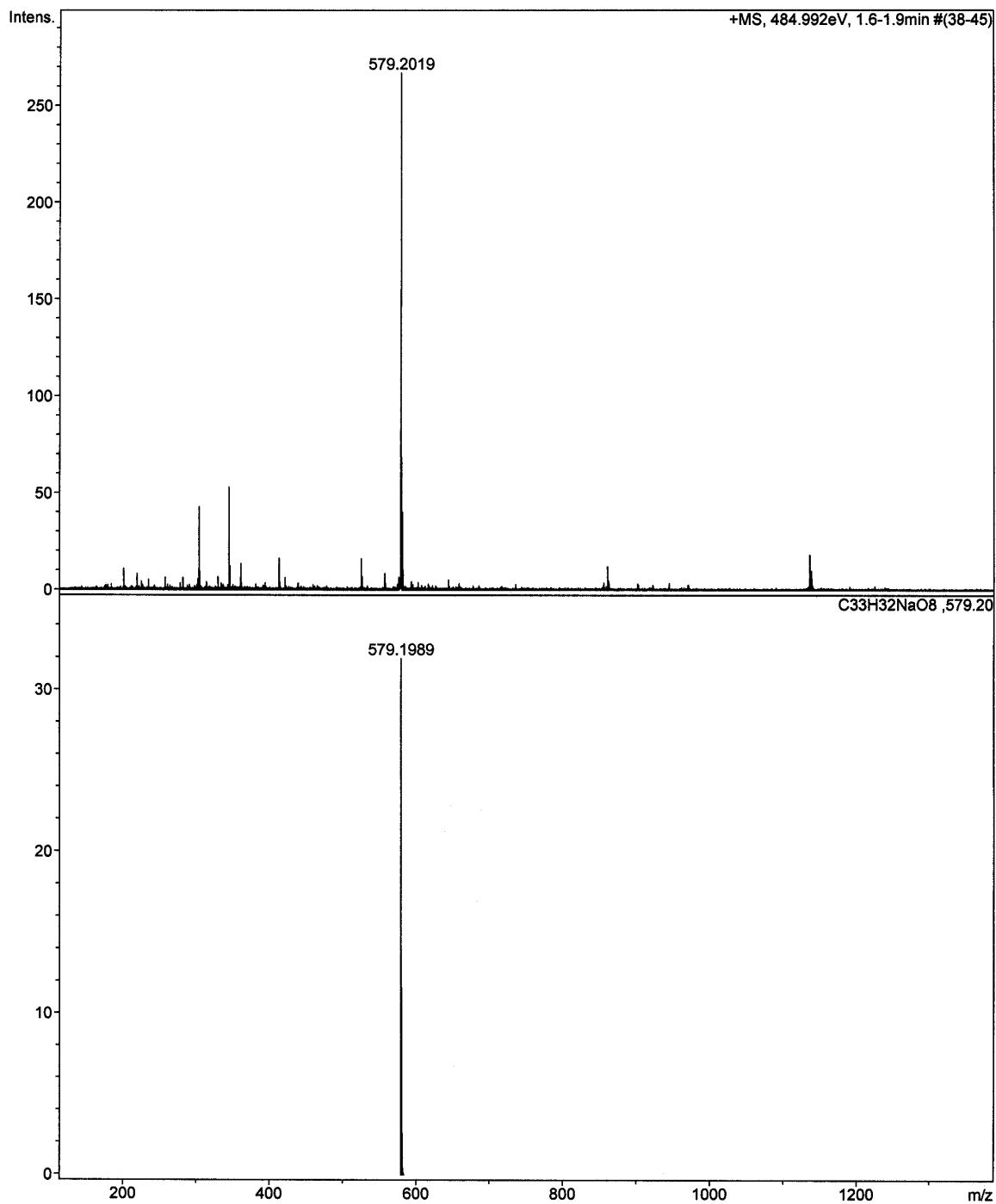
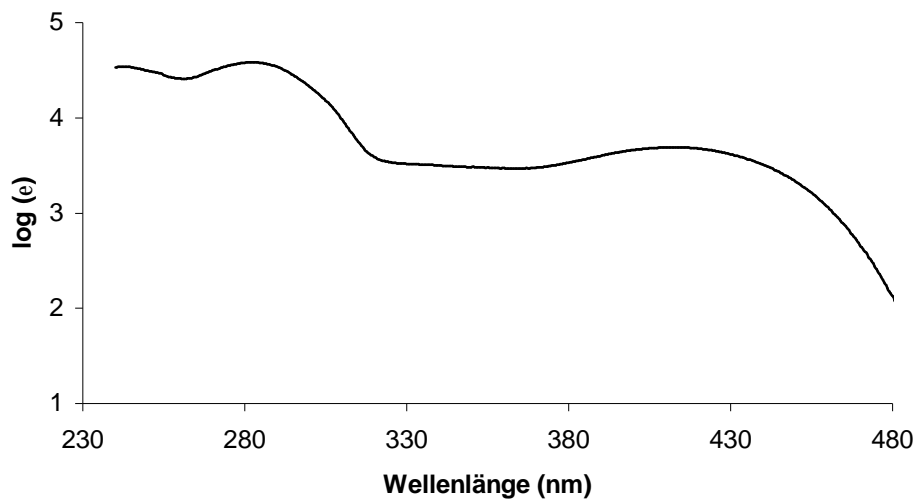
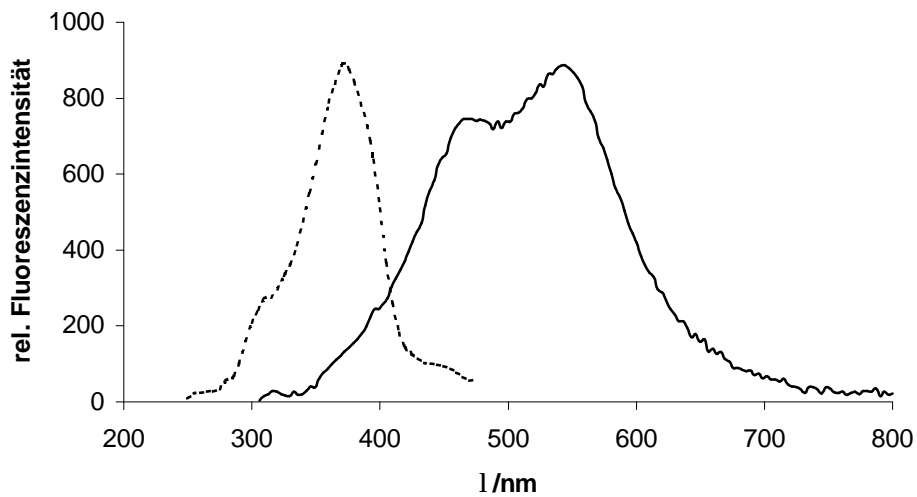


Abbildung 94: ESI-TOF Massenspektrum von 53

UV(THF):  $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 421 \text{ nm} (3.67), 283 \text{ nm} (4.58)$ .

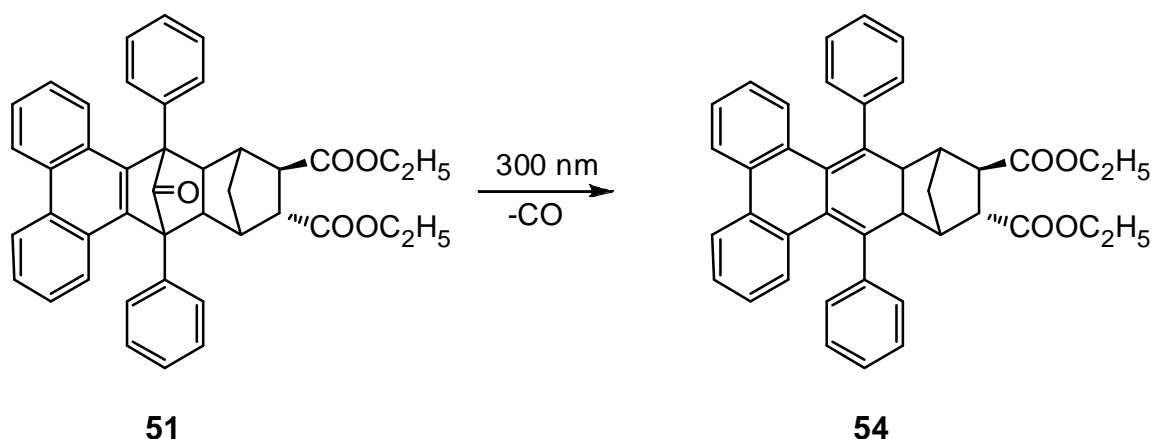


**Abbildung 95:** UV/Vis Spektrum des FNOCT **53**, Auftragung  $\log \epsilon$  vs. Wellenlänge (nm),  
(50  $\mu\text{M}$  in THF)



**Abbildung 96:** Anregungs (----)- und Emissions(—)-Fluoreszenzspektrum von **53** in THF  
(50  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc.}} = 375 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 544 \text{ nm}$ )



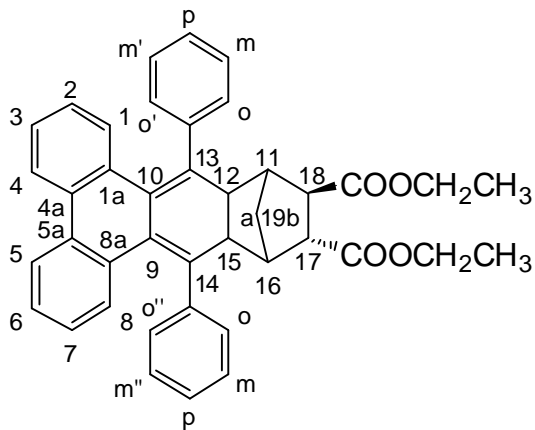
7.6.6 Photochemische Decarbonylierung von **51**

15.9 mg ( $2.67 \times 10^{-2}$  mmol) 3,5-Diphenyl-3,5-(9,10-phenanthrylen)-tricyclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]decan-4-on-8,9-(E)-dicarbonsäurediethylester **51** wurden in ein Quarz-NMR-Röhrchen eingewogen und in 1.0 ml d<sub>8</sub>-THF gelöst. Die Photolyse wurde bei 300 nm in einem Rayonet-Reaktor und 0 °C mit Methanol p.A. als Kühlmittel durchgeführt. Nach 24 Stunden konnte durch <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopische Analyse ein Umsatz von 100 % festgestellt werden. Die gelbe Eduktlösung **51** verfärbte sich in dieser Zeit in die orange gefärbte Lösung der 3,6-Diphenyl-4,5-(4-methoxy-2,2'-biphenylen)-tricyclo[6.2.1.0<sup>2,7</sup>]undeca-3,5-dien-9,10-(E)-dicarbon-säure **54**.

Danach überführte man die Lösung des Produktes **50** in ein Schlenkgefäß und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum.

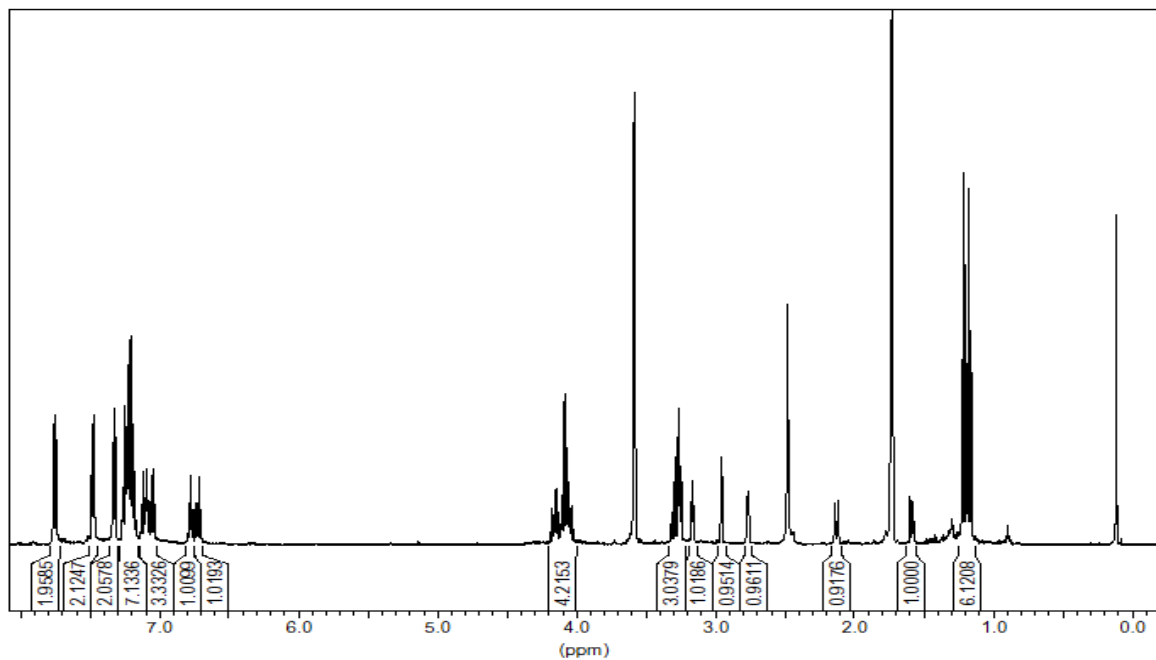
Ausbeute an **54**     Quantitativer Umsatz

Schmp. **54**     83 - 87 °C



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $[\text{D}_8]\text{THF}$ ):

$\delta$  [ppm] = 7.75 (d,  $^3J = 7.4$  Hz, 2H, 4-H, 5-H), 7.47 (d,  $^3J = 7.5$  Hz, 1 H, o'-H oder o''-H), 7.32 (dd,  $^3J = 7.5$  Hz,  $^3J = 7.5$  Hz, 2 H, 1-H, 8-H), 7.26 - 7.18 (m, 7 H, 1-H, 2-H, 7-H, 8-H,  $H_{\text{phen.}}$ ), 7.11 - 7.04 (m, 3 H, 3-H, 6-H, 7-H, 2-H), 6.72 (t,  $^3J = 7.2$  Hz, 2-H oder 7-H), 6.77 (t,  $^3J = 7.3$  Hz, 2-H oder 7-H), 4.17 - 4.03 (4\*m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 3.31 - 3.24 (m, 3 H, 15-H, 12-H, 11-H oder 16-H), 3.17 (d,  $^3J = 4.8$  Hz, 1 H, 17-H oder 18-H), 2.95 (s, 1 H, 11-H oder 16-H), 2.76 (d,  $^3J = 3.2$  Hz, 1 H, 17-H oder 18-H), 2.13 (d,  $^2J$  (19a-H, 19b-H) = 11.0 Hz, 1 H, 19b-H), 1.58 (br d,  $^2J$  (19a-H, 19b-H) = 11 Hz, 1 H, 19a-H), 1.21 (t,  $^3J = 8.2$  Hz, 3 H,  $\text{CH}_3$ ), 1.17 (t,  $^3J = 8.1$  Hz, 3 H,  $\text{CH}_3$ ).



**Abbildung 97:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz,  $\text{THF-d}_8$ ) von **54** (zur Zuordnung vgl. Liste der chemischen Verschiebungen)

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $[\text{D}_8]\text{THF}$ ):

$\delta$  [ppm] = 174.07, 173.24 ( $\text{C}=\text{O}$ )<sub>Ester</sub>, 143.89, 135.25, 135.22, 135.17, 135.10, 134.55 (C-1'a, C-4'a, C-5'a, C-8'a, C-9', C-10'), 133.88, 132.91, 132.71, 132.48, 130.73, 130.43, 129.56, 129.29 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 128.54, 128.32, 128.08, 127.99, 127.38, 124.37 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7), 124.34, 127.18 (C-1, C-8), 61.37, 61.28 ( $\text{CH}_2$ ), 52.52, 52.18 (C-13, C-14), 50.77, 49.89, 49.08, 48.08, 34.77 (C-11, C-12, C-15, C-16, C-17, C-18), 14.60, 14.54 ( $\text{CH}_3$ ).

Molmassenfeinbestimmung:  $\text{C}_{41}\text{H}_{37}\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$   
(ESITOF)  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : ber. 593.2686  
gef. 593.2675  
Abweichung: 1.9 ppm

$\text{C}_{41}\text{H}_{36}\text{NaO}_4$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$   
 $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : ber. 615.2506  
gef. 615.2509  
Abweichung: 0.5 ppm

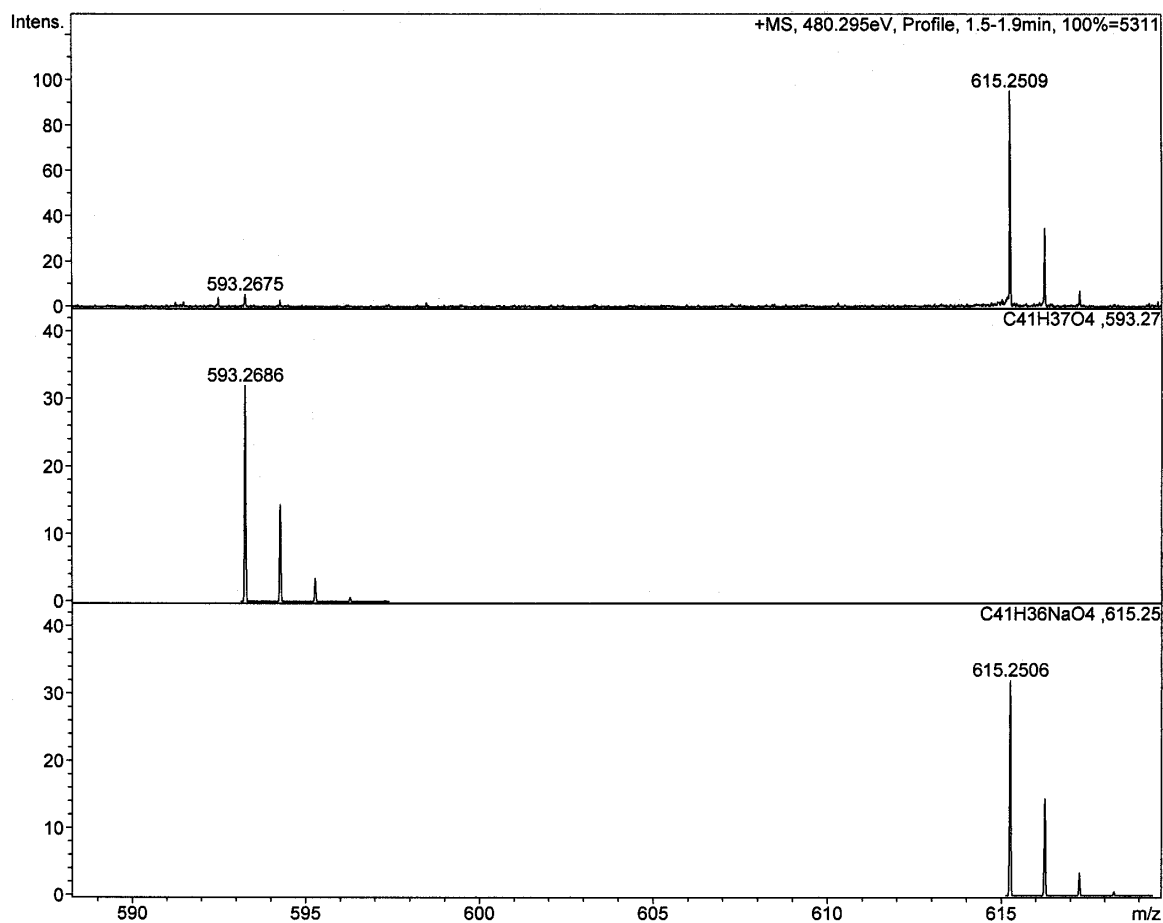
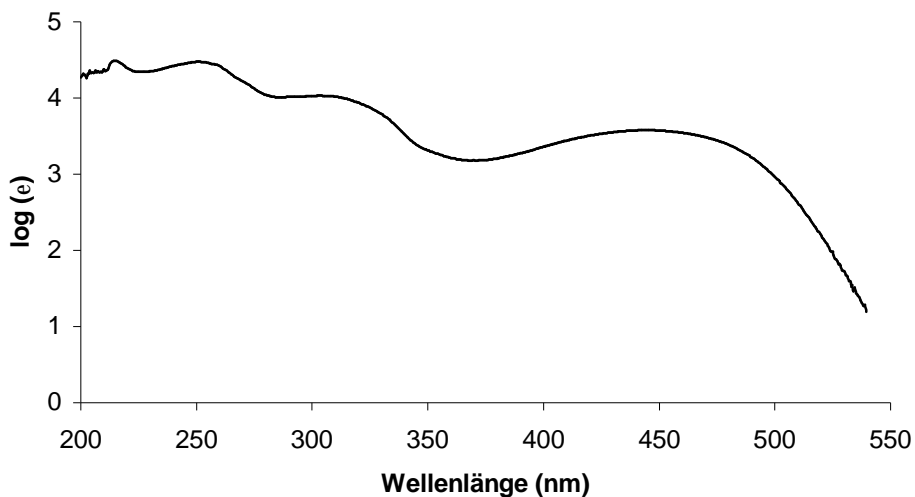


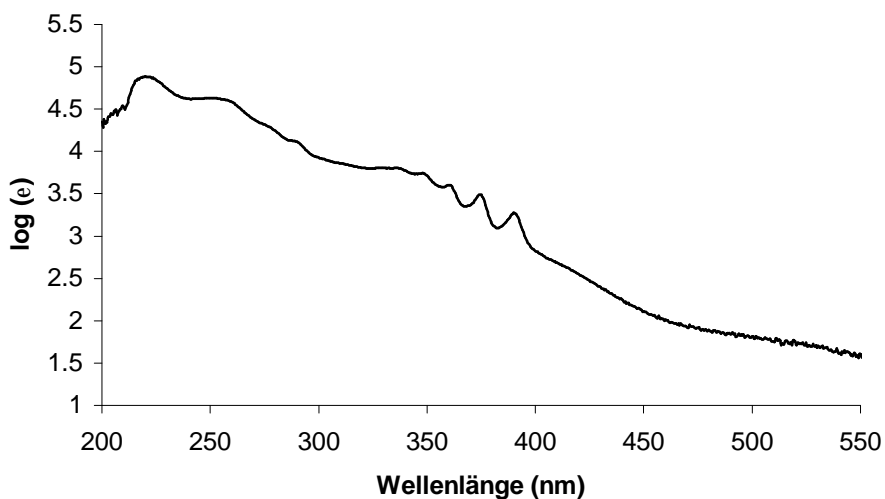
Abbildung 98: ESI-TOF Massenspektrum von 54

UV(THF):  $\lambda_{\max}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 212 nm (4.43), 250 nm (4.48), 318 nm (3.95), 455 nm (3.56).



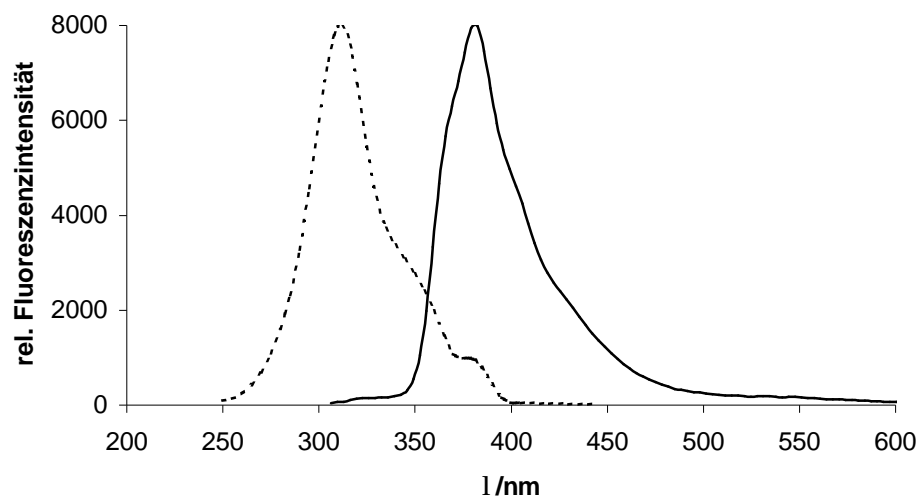
**Abbildung 99:** UV/Vis Spektrum des FNOCT **54**, Auftragung  $\log \epsilon$  vs. Wellenlänge (nm), (50  $\mu\text{M}$  in THF)

UV(THF-Hydroxylamin):  $\lambda_{\text{max}} (\lg \epsilon) = 219 \text{ nm} (4.87), 254 \text{ nm} (4.62), 356 \text{ nm} (3.58), 372 \text{ nm} (3.46), 388 \text{ nm} (3.23).$

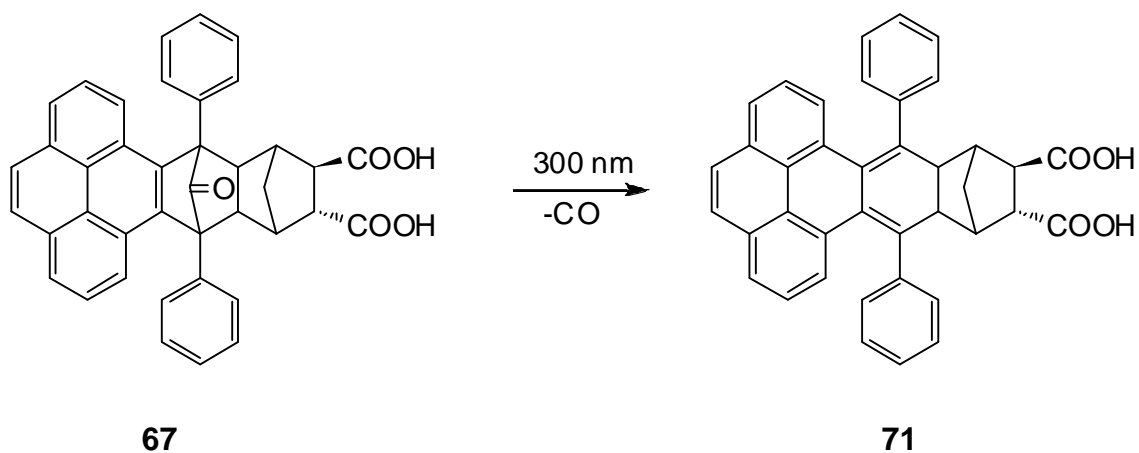


**Abbildung 100:** UV/Vis Spektrum des Hydroxylamin **54b**, Auftragung  $\log \epsilon$  vs. Wellenlänge (nm), (50  $\mu\text{M}$  in THF)

Fluoreszenz von **54** (50  $\mu\text{M}$  in Tetrahydrofuran): keine



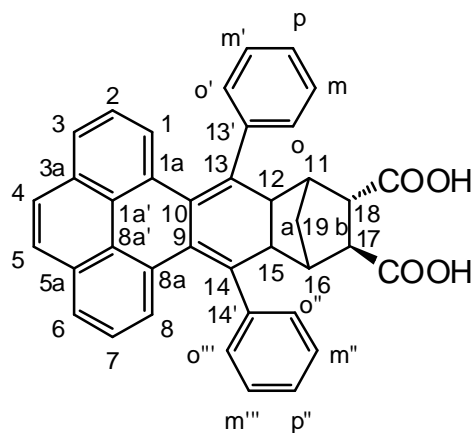
**Abbildung 101:** Anregungs (----)- und Emissions(—)-Fluoreszenzspektrum vom Hydroxylamin **54b** in THF (50  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc.}} = 310 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 380 \text{ nm}$ )

7.6.7 Photometrische Decarbonylierung zu **71**

20.0 mg ( $3.40 \times 10^{-2}$  mmol,  $c = 0.034$  M) 3',5'-Diphenyl-3',5'-(4,5-pyrenylen)tricyclo-[5.2.1.0<sup>2,6'</sup>]-decan-4'-on-8',9'-(E)-dicarbonsäure **67** wurden in ein Quarz-NMR-Röhrchen eingewogen und in 1.0 ml  $d_8$ -THF gelöst. Die Photolyse wurde bei 300 nm und  $-10$  °C mit Methanol p.A. als Kühlmittel in einem Rayonet-Reaktor durchgeführt. Nach 15 Stunden konnte anhand einer  $^1\text{H-NMR}$ -Analyse ein Umsatz von 100 % festgestellt werden. Danach wird die Lösung des Produktes **71** in ein Schlenkgefäß überführt und das Lösungsmittel mittels Vakuum entfernt.

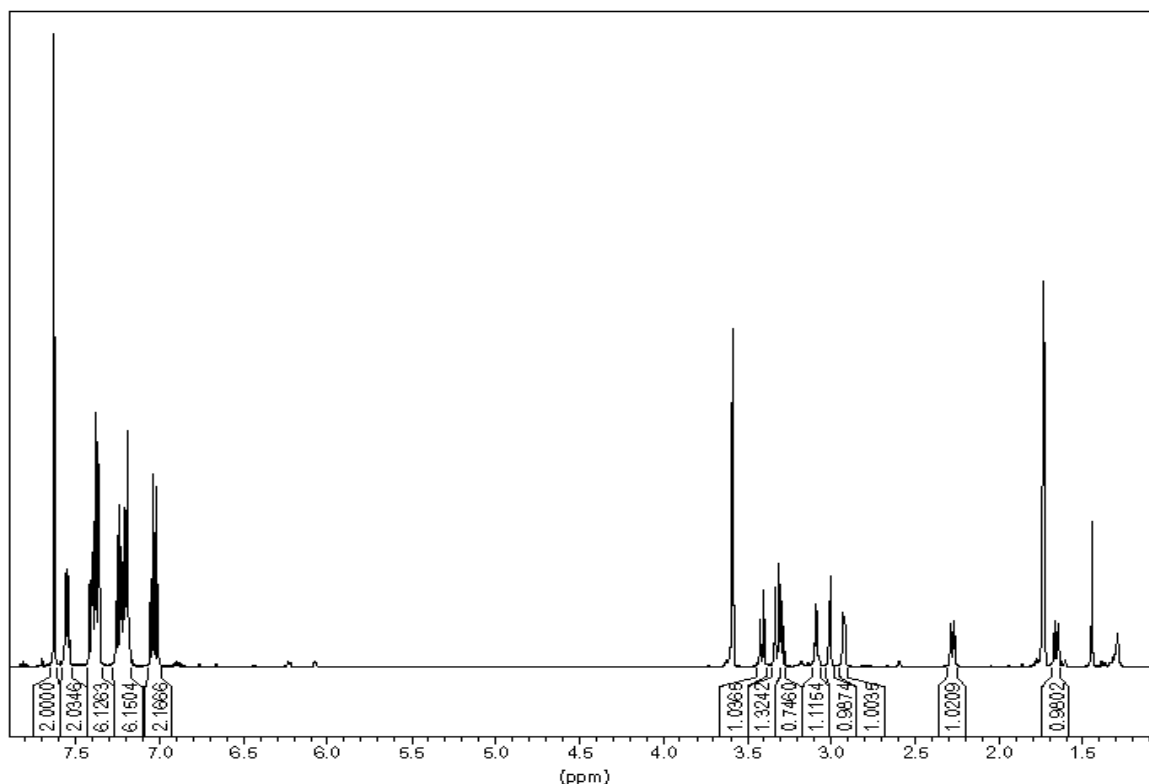
Ausbeute an **71**      Quantitativer Umsatz

Schmp. **71**           $158$  °C



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{d}_8\text{-THF}$ ):

$\delta$ [ppm] = 11.05 (s, 2 H, COOH), 7.63 (s, 2 H, 4-H, 5-H), 7.56 (d, 1 H,  $^3J = 5.2$ , 3-H oder 6-H), 7.54 (d, 1 H,  $^3J = 5.1$ , 3-H oder 6-H), 7.44 - 7.34 (m, 6 H, 1-H oder 8H, H-Phenyl), 7.27 - 7.17 (m, 6 H, 1-H oder 8H, H-Phenyl), 7.03 (dd,  $^3J = 7.2$ , 2 H, 2-H, 7-H), 3.41 (d, 1 H,  $^3J = 10.1$ , 12-H), 3.33 (d, 1 H,  $^3J = 9.9$ , 15-H), 3.30 (t, 1 H,  $^3J = 5.1$ , 18-H), 3.09 (dd, 1 H,  $^3J = 5.2$ , 17-H), 3.00 (s, 1 H, 11-H), 2.92 (d, 1H,  $^3J = 5.2$ , 16-H), 2.28 (d, 1 H,  $^2J$  (19b-H) = 9.8, 10b-H), 1.66 (d, 1 H,  $^2J$  (19a-H) = 10.1, 10a-H).



**Abbildung 102:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz,  $\text{THF-d}_8$ ) von **71** (zur Zuordnung vgl. Liste der chemischen Verschiebungen)



$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $d_8$ -THF):

$\delta$  [ppm] = 175.49 174.58 ( $\text{C}=\text{O}$ )<sub>Säure</sub>, 144.53, 144.41 (C-13', C-14'), 137.41, 137.12 (C-13, C-14), 132.79, 132.77, 132.12, 131.98, 131.90, 130.64, 130.60, 130.49 (C-1a', C-8a', C-3a', C-3a, C-5a, C-9, C-10, C-1a, C-8a), 130.43, 129.57, 129.41, 128.01, 127.99, 127.91, 127.82 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 127.31, 127.22, 127.10, 126.26, 126.21 (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8), 53.26 (C-13, C-14), 51.56, 50.78, 50.00, 49.29, 48.51 (C-11, C-12, C-15, C-16, C-17, C-18), 34.92 (19a, 19b).

Molmassenfeinbestimmung:  $\text{C}_{39}\text{H}_{27}\text{O}_4$  [ $\text{M}$ ]<sup>-</sup>

(ESITOF)

$m/z$  [ $\text{M}$ ]<sup>-</sup>: ber. 559.1915

gef. 559.1951

Abweichung: 6.4 ppm

$\text{C}_{78}\text{H}_{55}\text{O}_8$  [ $\text{M}_2$ ]<sup>-</sup>

$m/z$  [ $\text{M}_2$ ]<sup>-</sup>: ber. 1119.3902

gef. 1119.3990

Abweichung: 7.8 ppm

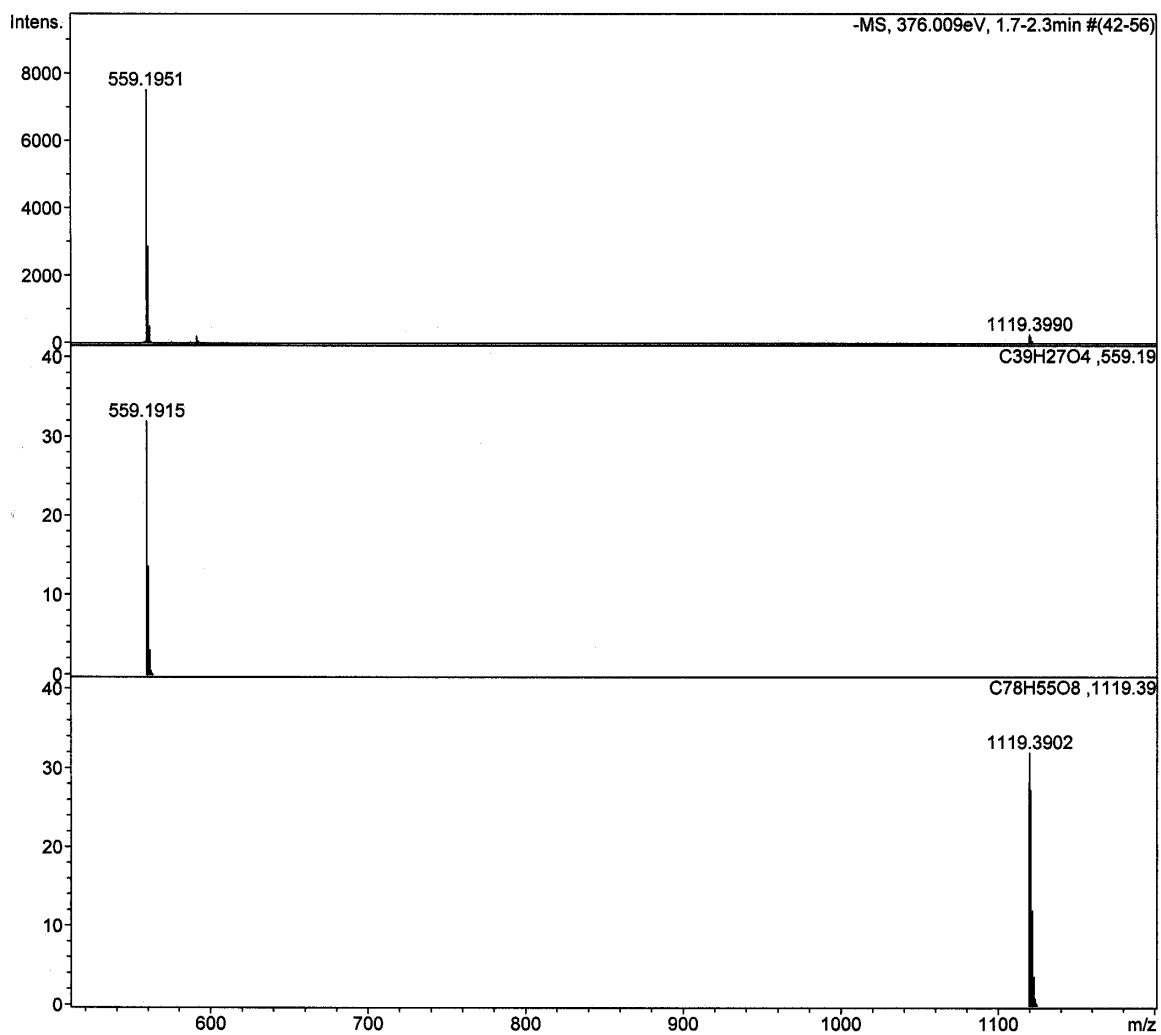
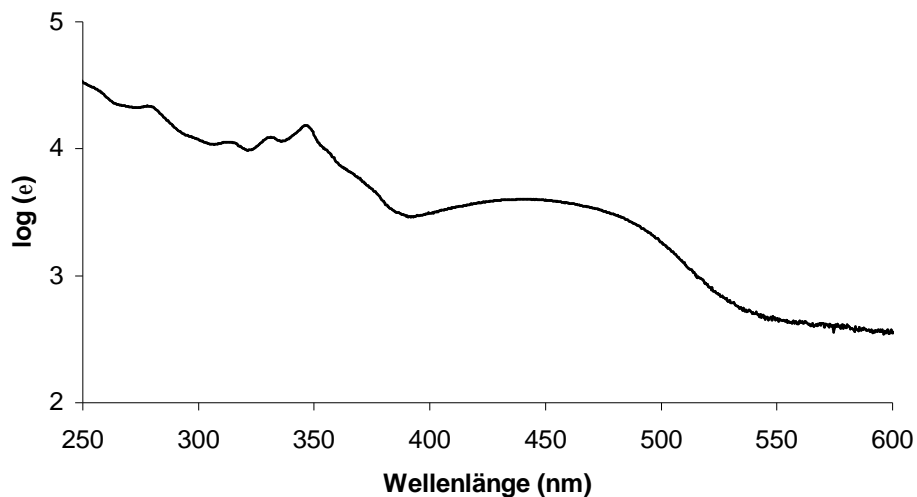


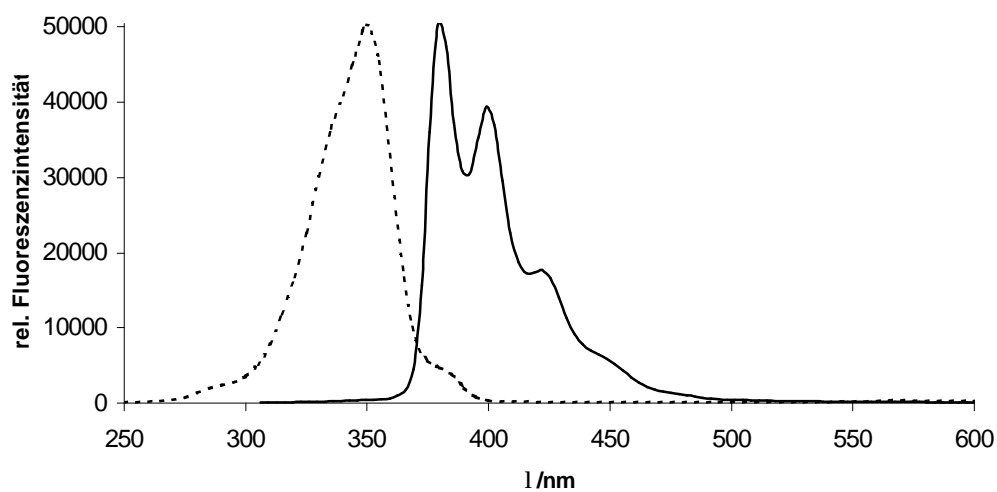
Abbildung 103: ESI-TOF Massenspektrum von 71

UV(THF):  $\lambda_{\max}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 276 nm (4.33), 310 nm (4.04), 328 nm (4.06), 345 nm (4.16), 464 nm (3.56).

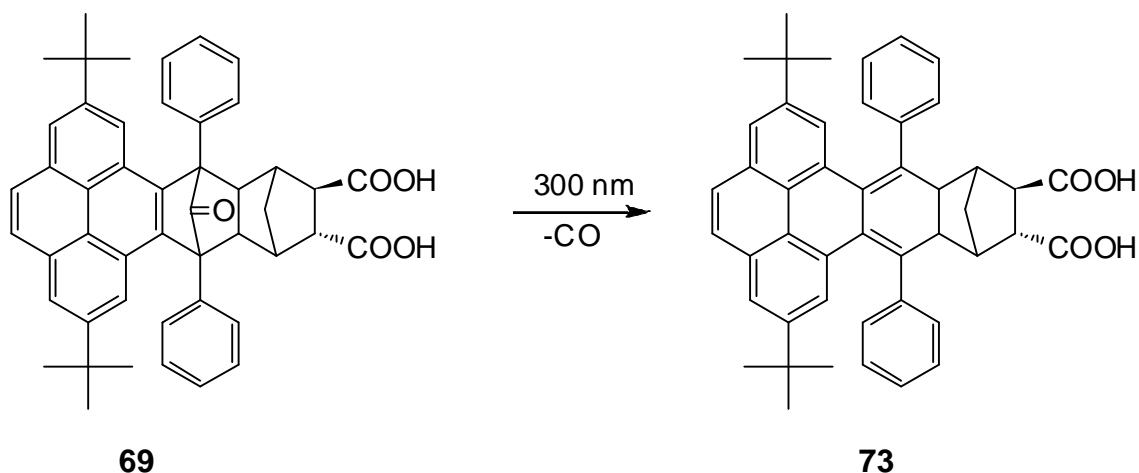


**Abbildung 104:** UV/Vis Spektrum des FNOCT **71**, Auftragung  $\log \epsilon$  vs. Wellenlänge (nm), (50  $\mu\text{M}$  in THF)

Fluoreszenz von **71** (50  $\mu\text{M}$  in Phosphatpuffer pH 7.30, THF): keine



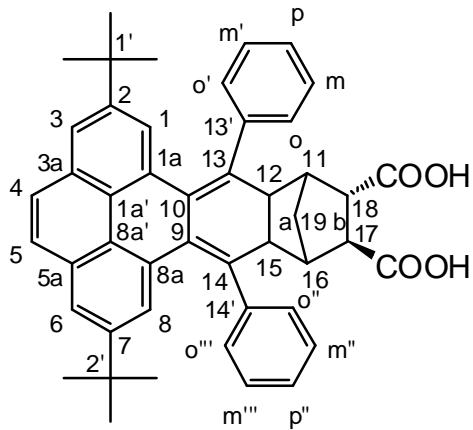
**Abbildung 105:** Anregungs (----)- und Emissions(—)-Fluoreszenzspektrum vom Hydroxylamin **71b** mit 100  $\mu\text{M}$  NO in Phosphatpuffer pH 7.35, 0.2% SDS, 100  $\mu\text{M}$  Ascorbat (25  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc.}}$  = 350 nm,  $\lambda_{\text{em.}}$  = 380, 400, 420 nm)

7.6.8 Photodecarbonylierung zu **73**

15.0 mg ( $2.14 \times 10^{-2}$  mmol,  $c = 0.021$  M) der 3',5'-Diphenyl-3',5'-(2,7-di-*tert.*-butyl-4,5-pyrenylen)tricyclo-[5.2.1.0<sup>2,6'</sup>]-decan-4'-on-8',9'-(*E*)-dicarbonsäure **69** wurden in ein Quarz-NMR-Röhrchen eingewogen und in 1.0 ml  $d_8$ -THF gelöst. Die Photolyse wurde 10 Stunden unter Schutzgasatmosphäre (Argon) mit Licht der Wellenlänge  $\lambda = 300$  nm durchgeführt. Nach vollständigem Umsatz, welcher mittels  $^1\text{H-NMR}$  Spektroskopie verfolgt werden kann, wurde das Lösungsmittel abkondensiert. Die gelbe Eduktlösung **69** verfärbt sich von hellgelb nach intensiv orange. Danach überführte man das Produkt **73** in ein Schlenkgefäß und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum.

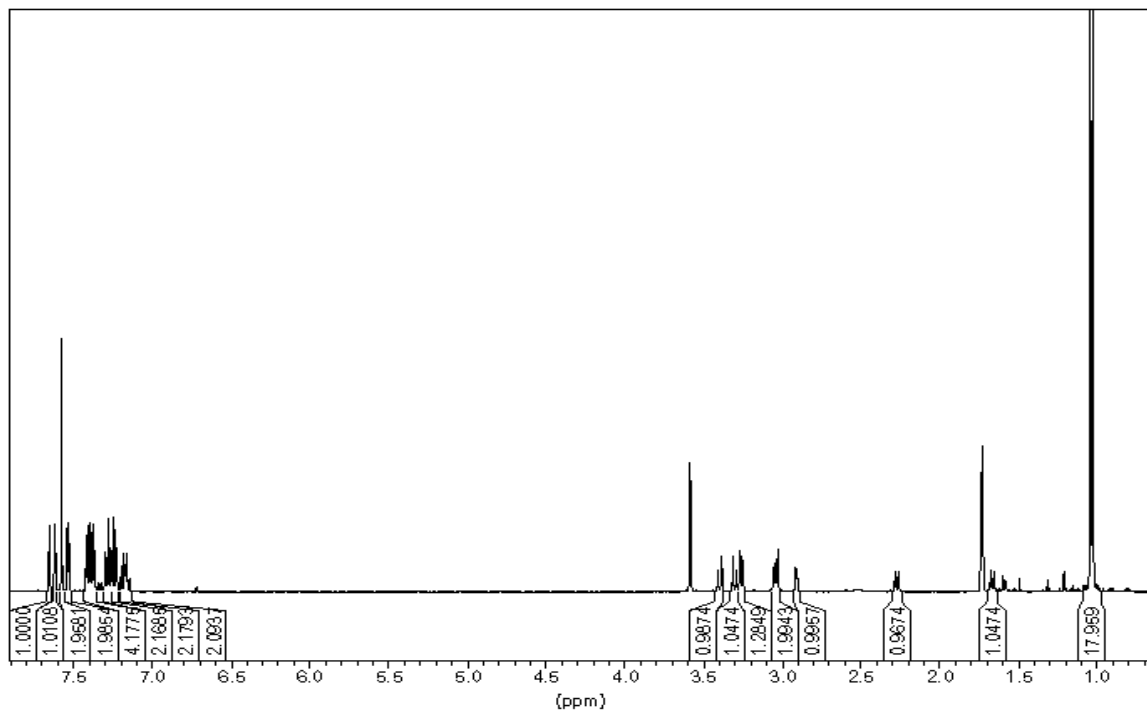
Ausbeute an **73**      Quantitativer Umsatz

Schmp. **73**            169 °C



$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{d}_8\text{-THF}$ ):

$\delta$ [ppm] = 11.24 (s, 2 H, COOH), 7.65 (d, 1 H,  $^3J = 5.2$ , 3-H oder 6-H), 7.62 (d, 1 H,  $^3J = 5.3$ , 3-H oder 6-H), 7.58 (s, 2 H, 4-H, 5-H), 7.41 - 7.36 (dd,  $^3J = 7.2$ , 2 H, 2-H, 7-H), 7.29 - 7.13 (m, 6 H, 1-H, 8H, H-Phenyl), 3.38 (d, 1 H,  $^3J = 10.2$ , 12-H), 3.31 (d, 1 H,  $^3J = 10.1$ , 15-H), 3.26 (t, 1 H,  $^3J = 5.2$ , 18-H), 3.04 (m, 2 H, 17-H, 11-H), 2.91 (d, 1H,  $^3J = 5.1$ , 16-H), 2.27 (d, 1 H,  $^2J$  (19b-H) = 9.8, 19b-H), 1.66 (d, 1 H,  $^2J$  (19a-H) = 10.1, 19a-H), 1.02 (s, 18 H, 6 x  $\text{CH}_3$ ).



**Abbildung 106:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz,  $\text{THF-d}_8$ ) von **73** (zur Zuordnung vgl. Liste der chemischen Verschiebungen)

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  [ppm] = 174.68 174.61 ( $\text{C}=\text{O}$ )<sub>Ester</sub>, 148.48, 148.35, 145.46, 145.18, 136.59, 136.41 (C-1a', C-3a, C-5a, C-8'a, C-9, C-10), 133.02, 132.20, 131.79, 131.61, 131.57, 131.56, 130.89, 130.74, 130.46, 129.85, 129.77 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 129.40, 129.256, 127.79, 127.76, 127.19, 125.92, 125.90, 123.42, 123.28 (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8), 52.81, 52.13 (C-13, C-14), 51.96, 51.19, 50.65, 49.55, 49.19, 48.04 (C-11, C-12, C-15, C-16, C-17, C-18), 35.13, 35.04 (C-1', C-2'), 31.52, 31.45 (19a, 19b).

Molmassenfeinbestimmung:  $\text{C}_{47}\text{H}_{44}\text{NaO}_4$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$   
(ESITOF)  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : ber. 695.3132  
gef. 695.3116  
Abweichung: 2.3 ppm

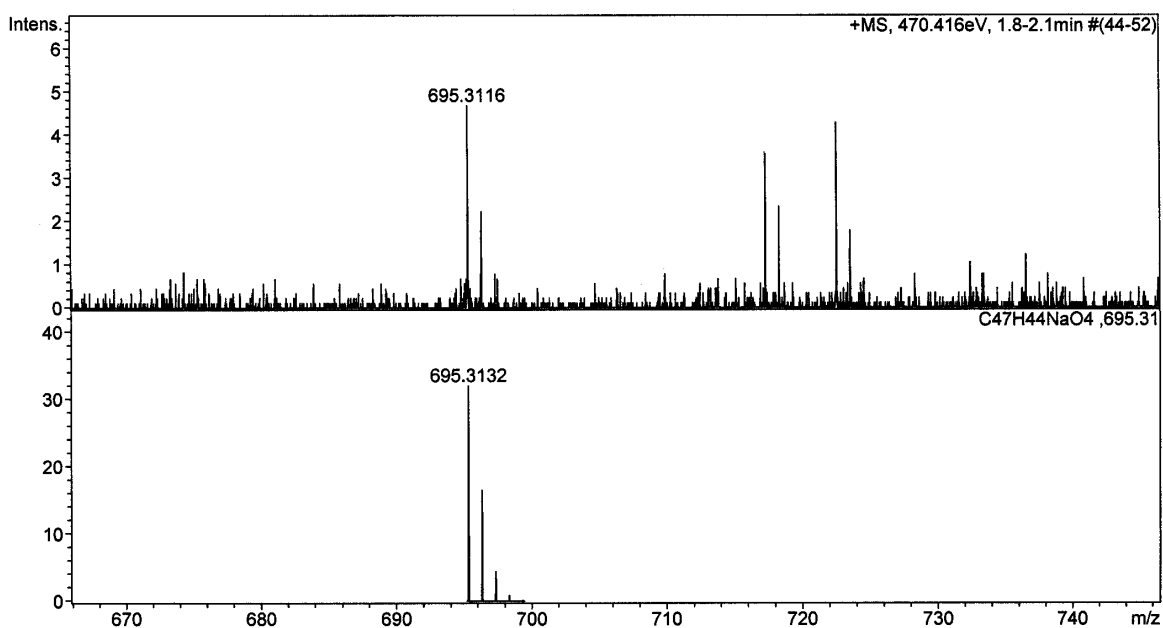
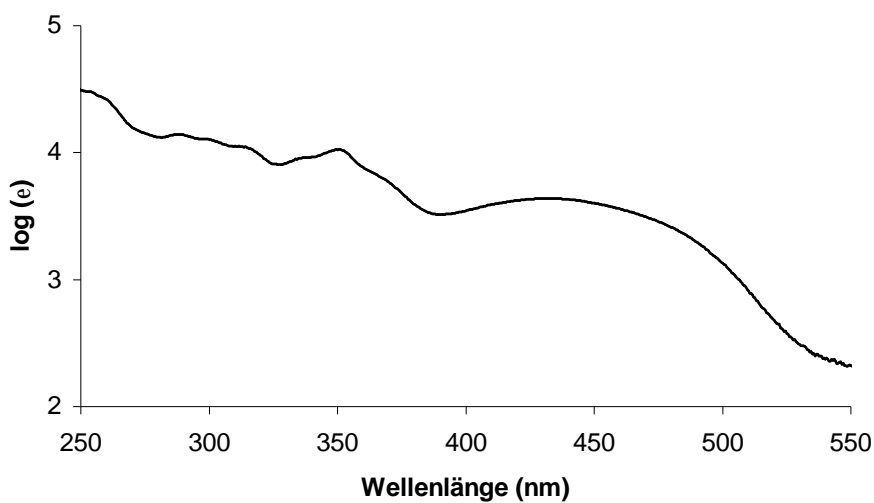


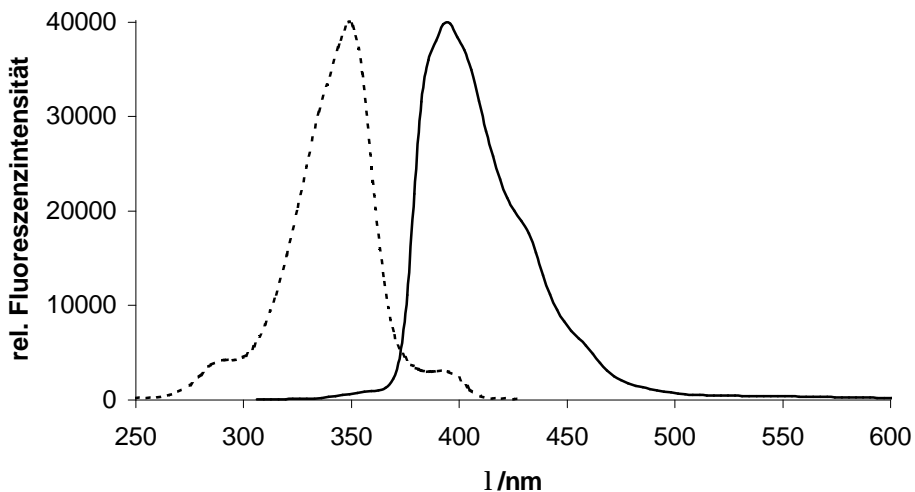
Abbildung 107: ESI-TOF Massenspektrum von 73

UV(THF):  $\lambda_{\max}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 251 nm (4.48), 287 nm (4.14), 313 nm (4.05), 349 nm (4.02), 437 nm (3.64).

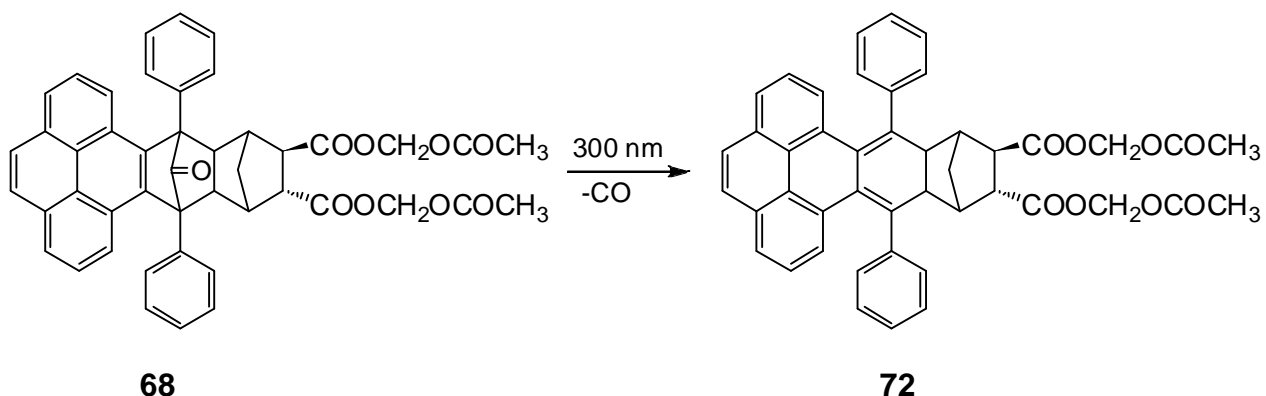


**Abbildung 108:** UV/Vis Spektrum des FNOCT **73**, Auftragung  $\log \epsilon$  vs. Wellenlänge (nm), (50  $\mu\text{M}$  in THF)

Fluoreszenz von **73** (50  $\mu\text{M}$  in Phosphatpuffer pH 7.30, THF): keine



**Abbildung 109:** Anregungs (----)- und Emissions(—)-Fluoreszenzspektrum vom Hydroxylamin **73b** mit 100  $\mu\text{M}$  NO in Phosphatpuffer pH 7.35, 0.2% Pluronic-F-127, 100  $\mu\text{M}$  Ascorbat (50  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc.}} = 350 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 400 \text{ nm}$ )

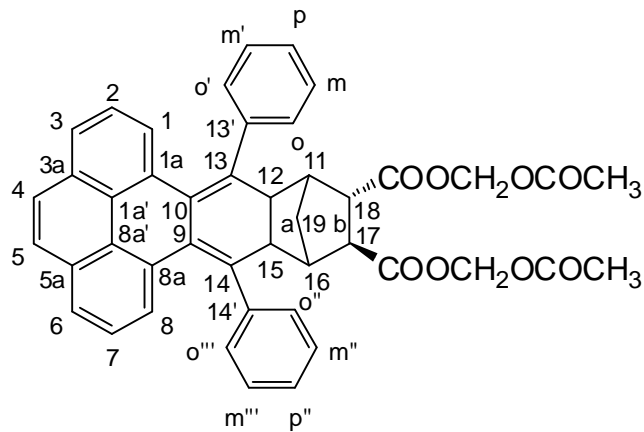
7.6.9 Photochemische Decarbonylierung von **68** zu **72**

20.0 mg ( $2.84 \times 10^{-2}$  mmol,  $c = 0.028$  M) 3',5'-Diphenyl-3',5'-(4,5-pyrenyl)tricyclo-[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]-decan-4'-on-8',9'-(E)-dicarbonsäurediacetoxymethylester **68** wurden in ein Quarz-NMR-Röhrchen eingewogen und in 1.0 ml  $d_8$ -THF gelöst. Die Photolyse wurde bei 300 nm und  $-10$  °C mit Methanol p.A. als Kühlmittel in einem Rayonet-Reaktor durchgeführt. Nach 15 Stunden konnte anhand einer  $^1\text{H-NMR}$ -Analyse ein Umsatz von 100 % festgestellt werden. Danach wird die Lösung des Produktes **72** in ein Schlenkgefäß überführt und das Lösungsmittel mittels Vakuum entfernt.

Ausbeute an **72**     Quantitativer Umsatz

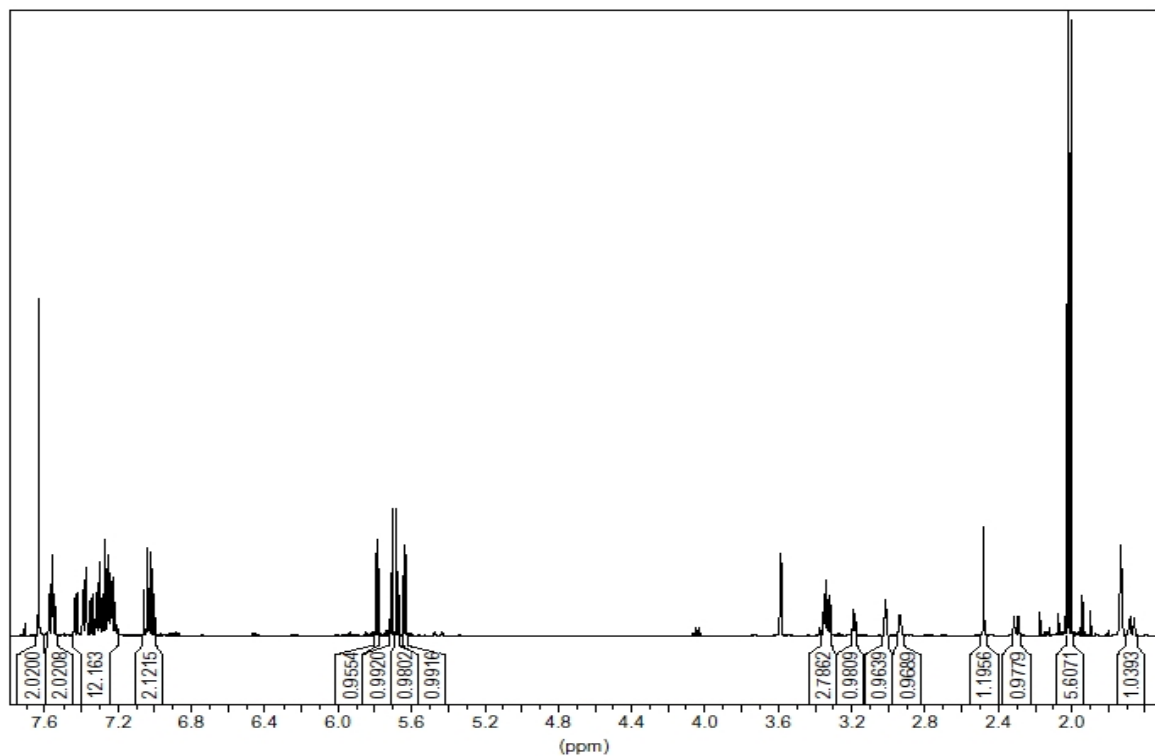
Schmp. **72**         158 °C





$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{d}_8\text{-THF}$ ):

$\delta[\text{ppm}] = 7.63$  (s, 2 H, 4-H, 5-H), 7.56 (t, 2 H,  $^3J = 5.2$ ,  $\text{m}'\text{-H}$ ,  $\text{m}'''\text{-H}$  oder  $\text{m-H}$ ,  $\text{m}''\text{-H}$ ), 7.44 - 7.34 (m, 12 H, 1-H, 3-H, 6-H, 8H, H-Phenyl), 7.04 (t,  $^3J = 5.3$ , 2 H, 2-H, 7-H), 7.01 (t,  $^3J = 5.2$ , 2 H, 2-H, 7-H), 5.79 (d, 1 H,  $^2J = 5.7$ ,  $\text{CH}_2$ ), 5.71 (d, 1 H,  $^2J = 5.6$ ,  $\text{CH}_2$ ), 5.68 (d, 1 H,  $^2J = 5.6$ ,  $\text{CH}_2$ ), 5.64 (d, 1 H,  $^2J = 5.7$ ,  $\text{CH}_2$ ), 3.34 - 3.33 (m, 3 H, 12-H, 15-H, 18-H), 3.18 (d, 1 H,  $^3J = 5.2$ , 17-H), 3.02 (s, 1 H, 11-H), 2.94 (d, 1H,  $^3J = 5.1$ , 16-H), 2.31 (d, 1 H,  $^2J$  (19b-H) = 9.8, 10b-H), 2.01 (d, 6 H,  $\text{CH}_3$ ), 1.68 (d, 1 H,  $^2J$  (19a-H) = 10.1, 10a-H).



**Abbildung 110:**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz,  $\text{THF-d}_8$ ) von **72** (zur Zuordnung vgl. Liste der chemischen Verschiebungen)

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  [ppm] = 172.83, 172.12, 169.55, 169.53 ( $\text{C}=\text{O}$ )<sub>Ester</sub>, 144.29, 138.49, 136.71, 136.65, 132.45, 132.25 (C-1a', C-3a, C-5a, C-8'a, C-9, C-10), 131.91, 130.66, 130.49, 130.47, 129.73, 129.72, 129.61, 128.95, 128.04, 128.02, 128.01 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 127.99, 127.48, 127.36, 127.16, 127.11, 126.29, 126.20, 126.09 (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8), 80.55, 80.51 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 52.87 (C-13, C-14), 51.32, 50.41, 49.78, 48.95, 48.24 (C-11, C-12, C-15, C-16, C-17, C-18), 34.94 (C-19), 20.46, 20.39 ( $\text{CH}_3$ ).

Molmassenfeinbestimmung:	$\text{C}_{45}\text{H}_{37}\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$
(ESITOF)	$m/z$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ : ber. 705.2483
	gef. 705.2497
	Abweichung: 1.9 ppm
	$\text{C}_{45}\text{H}_{36}\text{NaO}_8$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$
	$m/z$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : ber. 727.2302
	gef. 727.2365
	Abweichung: 0.9 ppm

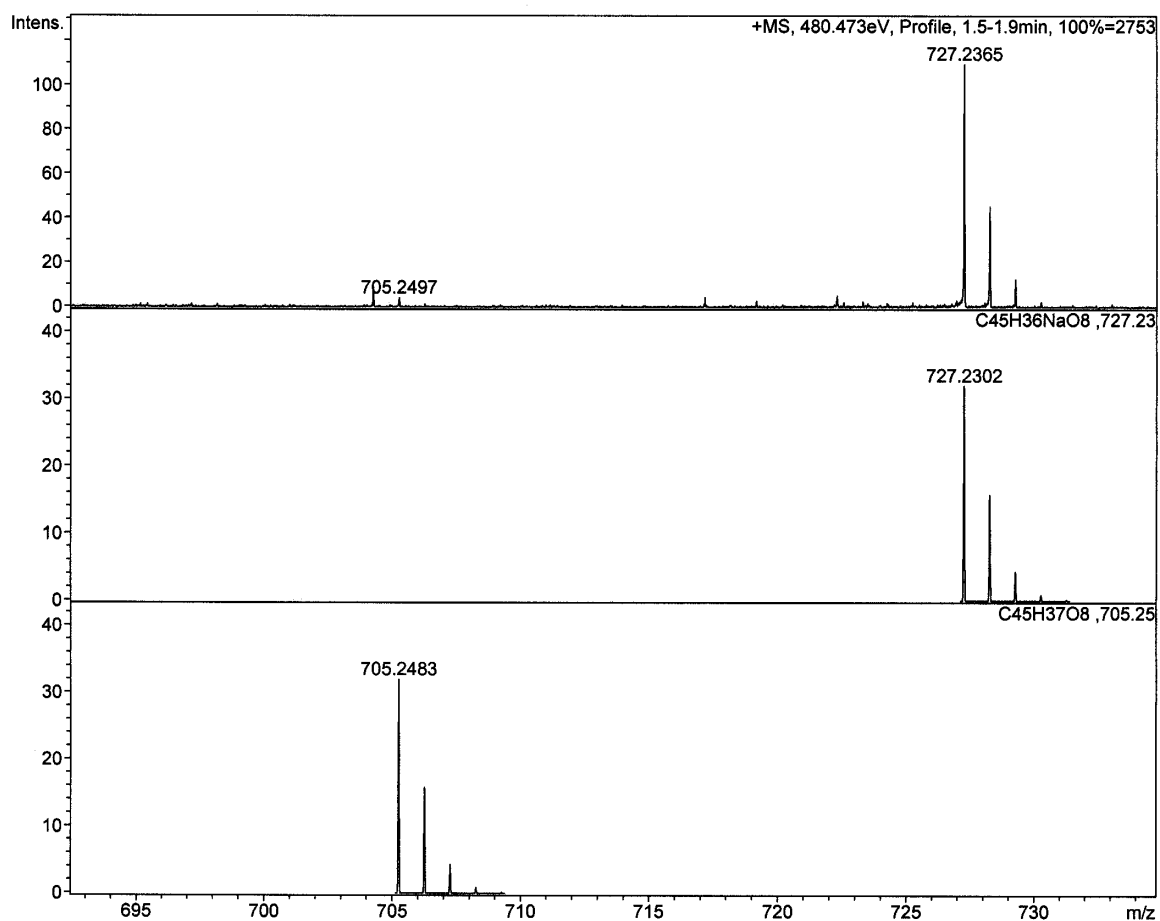
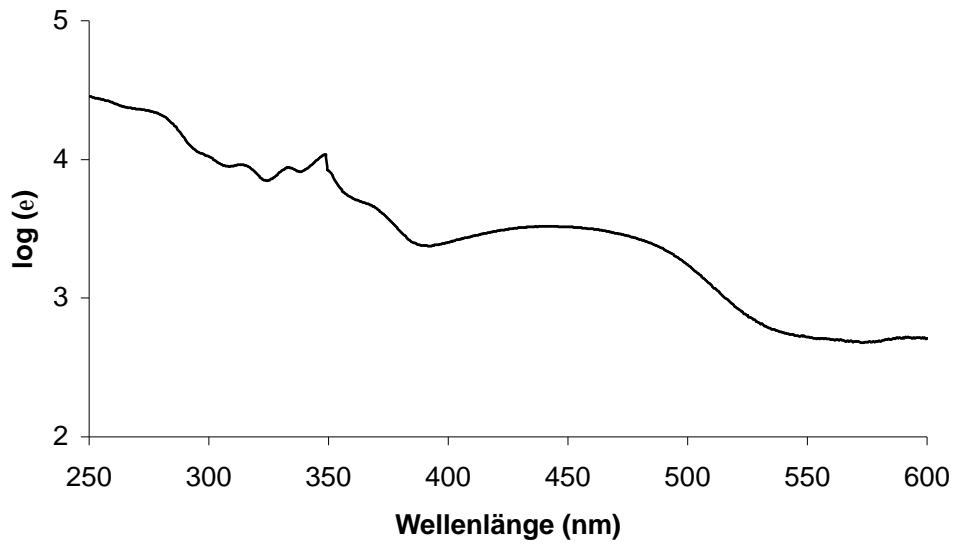
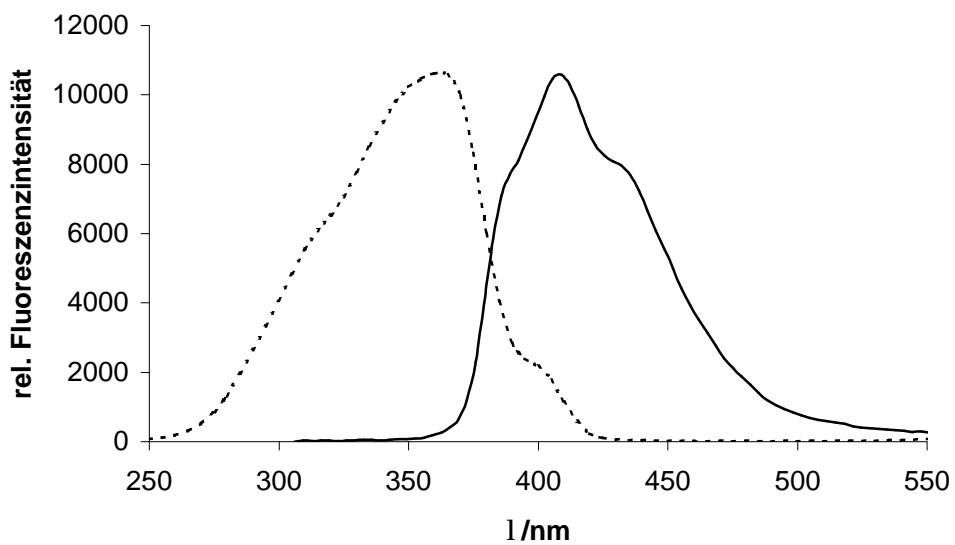


Abbildung 111: ESI-TOF Massenspektrum von 72

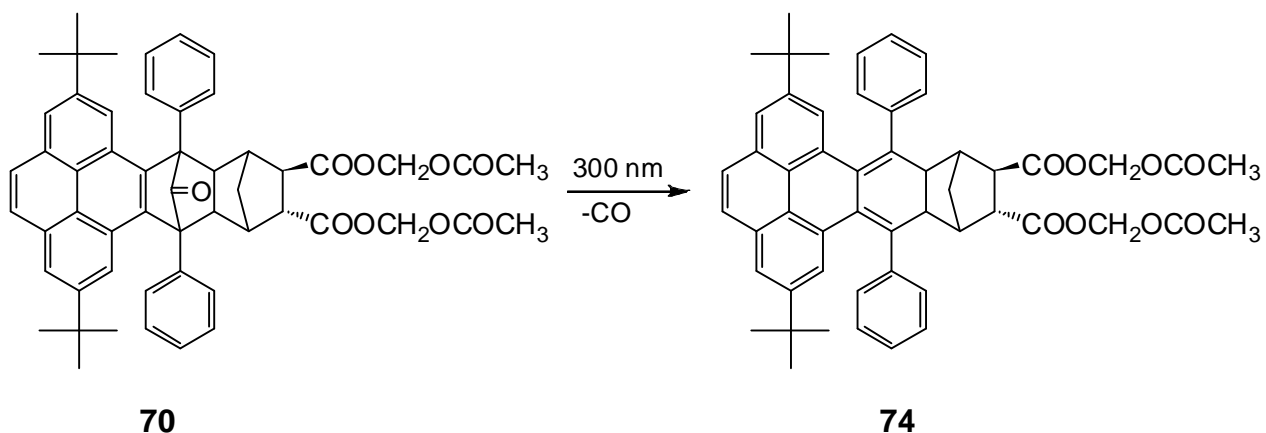
UV(THF):  $\lambda_{\max}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 278 nm (4.34), 313 nm (3.96), 332 nm (3.94), 347 nm (4.03), 446 nm (3.51).



**Abbildung 112:** UV/Vis Spektrum des FNOCT **72**, Auftragung  $\log \epsilon$  vs. Wellenlänge (nm), (50  $\mu\text{M}$  in THF)



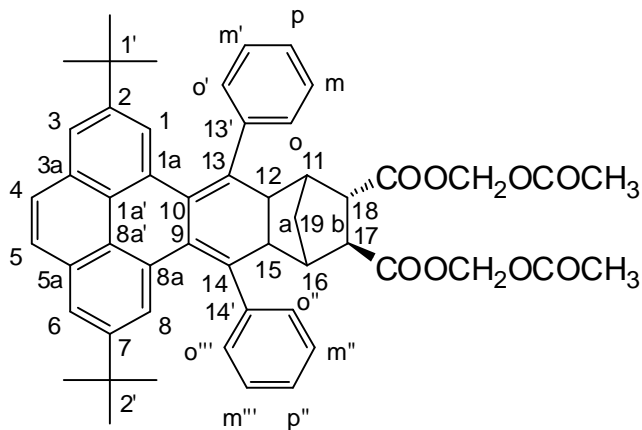
**Abbildung 113:** Anregungs (----)- und Emissions(—)-Fluoreszenzspektrum vom Hydroxylamin **72b** in THF (50  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc.}} = 360 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 410 \text{ nm}$ )

7.6.10 Photochemische Decarbonylierung von **70** zu **74**

20.0 mg ( $2.37 \cdot 10^{-2}$  mmol,  $c = 0.024$  M) 3',5'-Diphenyl-3',5'-(2,7-di-*tert.*-butyl-4,5-pyrenylen)tricyclo-[5.2.1.0<sup>2,6'</sup>]-decan-4'-on-8',9'-(*E*)-dicarbonsäure-diacetoxymethylester **70** wurden in ein Quarz-NMR-Röhrchen eingewogen und in 1.0 ml  $d_8$ -THF gelöst. Die Photolyse wurde bei 300 nm und  $-10$  °C mit Methanol p.A. als Kühlmittel in einem Rayonet-Reaktor durchgeführt. Nach 14 Stunden konnte anhand einer  $^1\text{H}$ -NMR-Analyse ein Umsatz von 100 % festgestellt werden. Danach wird die Lösung des Produktes **74** in ein Schlenkgefäß überführt und das Lösungsmittel mittels Vakuum entfernt.

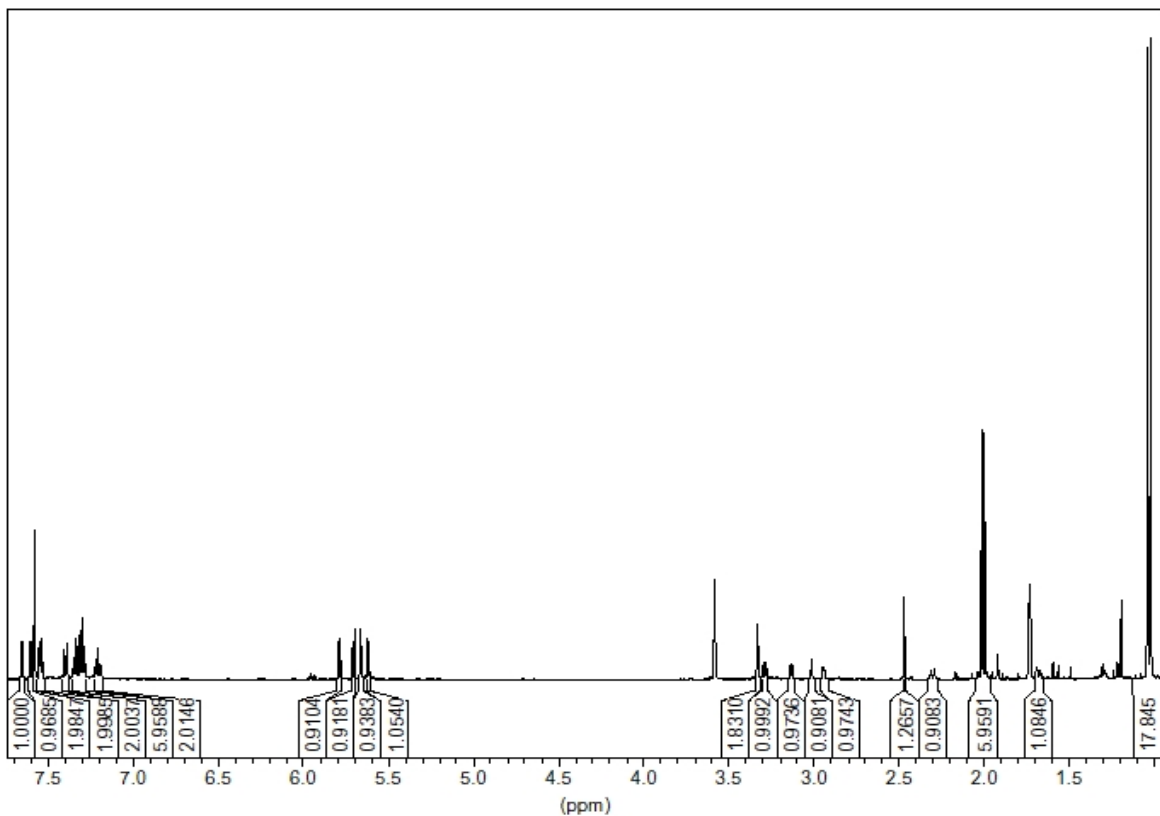
Ausbeute an **74**     Quantitativer Umsatz

Schmp. **74**         163 °C



<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, d<sub>8</sub>-THF):

$\delta$ [ppm] = 7.65 (d, 1 H, <sup>4</sup>J = 1.8, 1-H oder 8-H), 7.60 (d, 1 H, <sup>4</sup>J = 1.8, 1-H oder 8-H), 7.58 (s, 2 H, 4-H, 5-H), 7.41 - 7.18 (m, 10 H, H-Phenyl), 5.79 (d, 1 H, <sup>2</sup>J = 5.7, CH<sub>2</sub>), 5.71 (d, 1 H, <sup>2</sup>J = 5.6, CH<sub>2</sub>), 5.66 (d, 1 H, <sup>2</sup>J = 5.6, CH<sub>2</sub>), 5.61 (d, 1 H, <sup>2</sup>J = 5.7, CH<sub>2</sub>), 3.33 (s, 2 H, 12-H, 15-H), 3.29 (t, 1 H, <sup>3</sup>J = 5.3, 18-H), 3.13 (d, 1 H, <sup>3</sup>J = 9.7, 17-H), 3.01 (s, 1 H, 11-H), 2.94 (m, 1 H, 16-H), 2.30 (d, 1 H, <sup>2</sup>J (19b-H) = 9.7, 19b-H), 2.00 (d, 6 H, CH<sub>3</sub>), 1.68 (d, 1 H, <sup>2</sup>J (19a-H) = 9.8, 19a-H), 1.03 (s, 18 H, 6 x CH<sub>3</sub>).



**Abbildung 114:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (500 MHz, THF-d<sub>8</sub>) von **74** (zur Zuordnung vgl. Liste der chemischen Verschiebungen)

$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):

$\delta$  [ppm] = 172.88, 172.39, 172.12, 169.52 ( $\text{C}=\text{O}$ )<sub>Ester</sub>, 148.47, 148.41, 145.23, 145.17, 136.37, 136.16 (C-1a', C-3a, C-5a, C-8'a, C-9, C-10), 132.80, 132.66, 131.63, 131.61, 131.57, 130.78, 130.59, 129.94, 129.89, 129.45 ( $\text{CH}_{\text{arom.}}$ ), 129.31, 127.87, 127.84, 127.20, 125.94, 125.90, 123.46, 123.35 (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8), 80.48, 80.44 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 52.71, 50.75, 50.48, 49.66, 48.94, 47.86 (C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, C-16, C-17, C-18), 35.11, 34.06 (C-1', C-2'), 31.50, 31.45 (C-19a, C-19b), 20.44, 20.40 ( $\text{CH}_3$ ).

Molmassenfeinbestimmung:	$\text{C}_{53}\text{H}_{53}\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$
(ESITOF)	$m/z$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ : ber. 817.3735
	gef. 817.3701
	Abweichung: 4.1 ppm
	$\text{C}_{53}\text{H}_{52}\text{NaO}_8$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$
	$m/z$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : ber. 839.3554
	gef. 839.3507
	Abweichung: 5.5 ppm

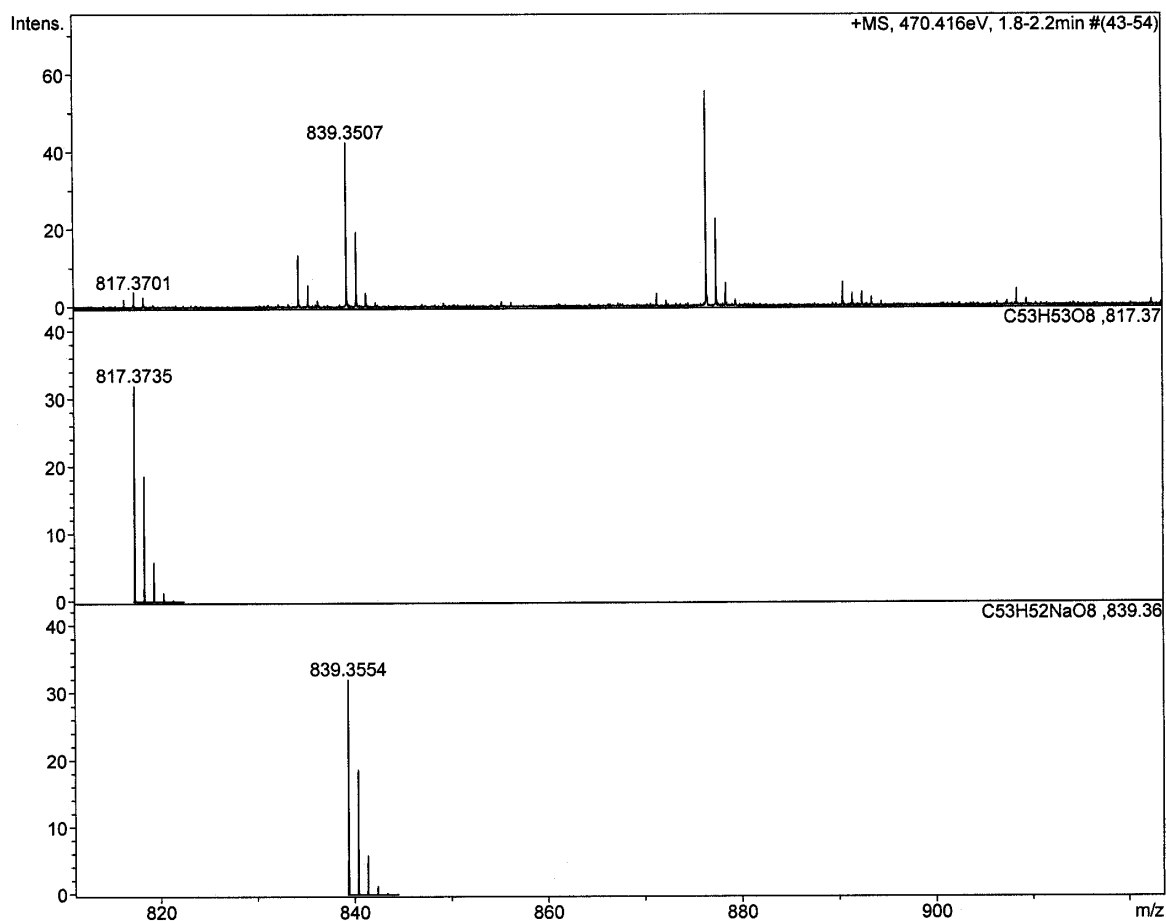
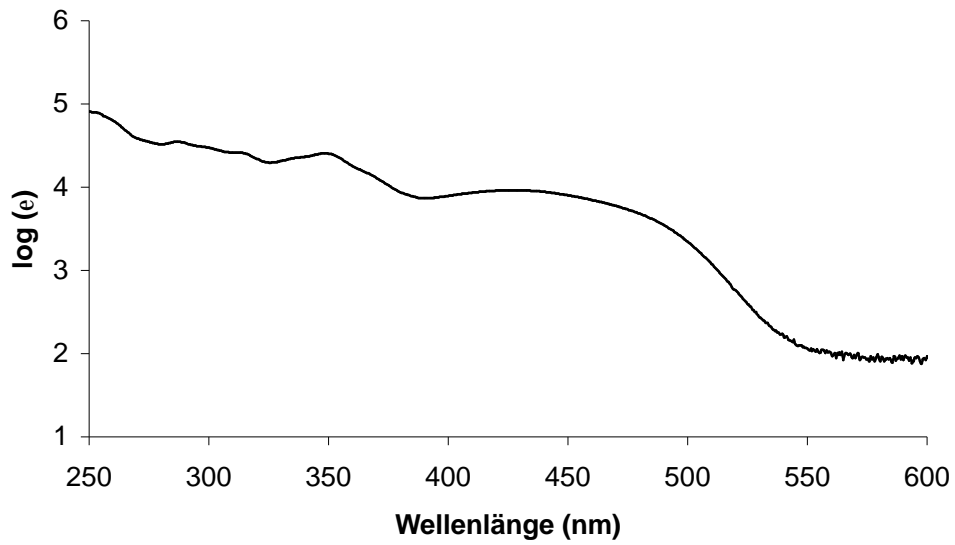


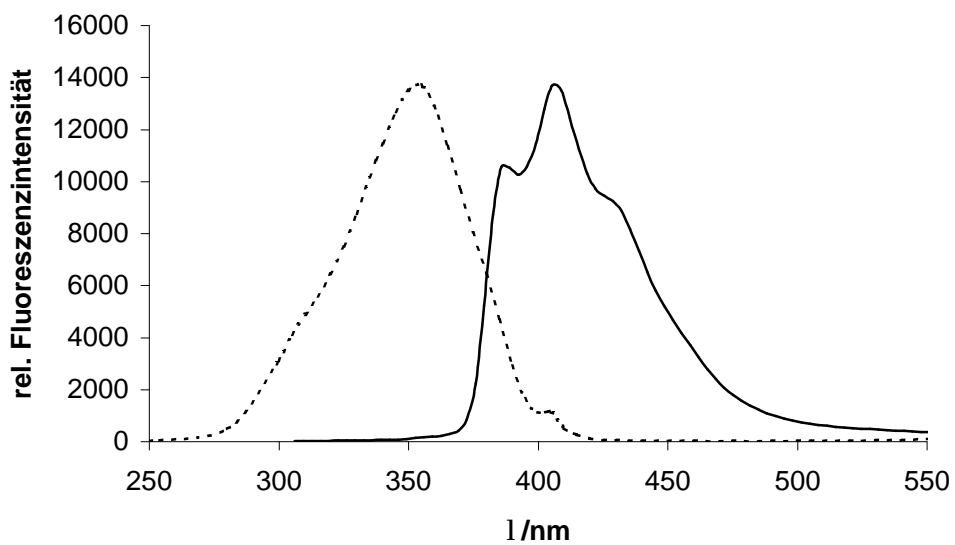
Abbildung 115: ESI-TOF Massenspektrum von 74

UV(THF):  $\lambda_{\max}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 285 nm (4.54), 313 nm (4.41), 348 nm (4.41), 464 nm (3.82).



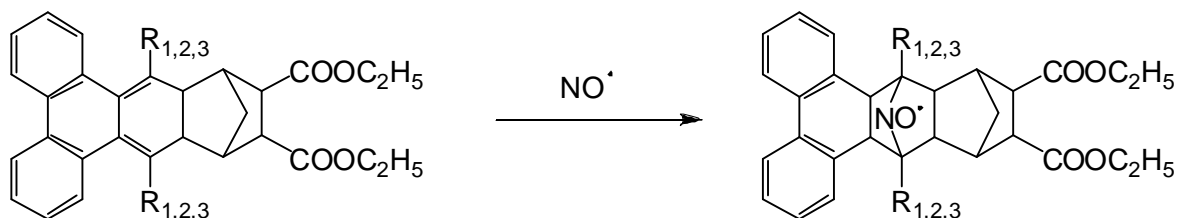


**Abbildung 116:** UV/Vis Spektrum des FNOCT **74**, Auftragung  $\log \epsilon$  vs. Wellenlänge (nm), (50  $\mu\text{M}$  in THF)



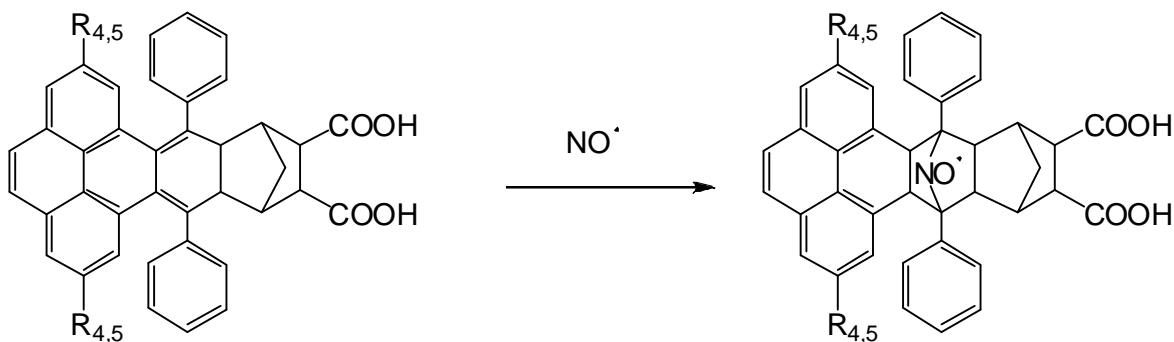
**Abbildung 117:** Anregungs (----)- und Emissions(—)-Fluoreszenzspektrum vom Hydroxylamin **74b** in THF (50  $\mu\text{M}$ ,  $\lambda_{\text{exc.}} = 355 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 405 \text{ nm}$ )

## 7.7 ESR-spektroskopische Untersuchungen von **52** bis **54** und **71**, **73**



**52:**  $R_1 = \text{CH}_3$   
**53:**  $R_2 = \text{COOCH}_3$   
**54:**  $R_3 = \text{C}_6\text{H}_5$

**52a:**  $R_1 = \text{CH}_3$   
**53a:**  $R_2 = \text{COOCH}_3$   
**54a:**  $R_3 = \text{C}_6\text{H}_5$



**71:**  $R_4 = \text{H}$   
**73:**  $R_5 = \text{C}(\text{CH}_3)_3$

**71a:**  $R_4 = \text{H}$   
**73a:**  $R_5 = \text{C}(\text{CH}_3)_3$

Die Umsetzung der FNOCTs **52** bis **54** und **71**, **73** mit Stickstoffmonoxid wurde unter Ausschluss von Sauerstoff durchgeführt, um die sonst stattfindende Oxidation von NO zu vermeiden. Das Stickstoffmonoxid (Reinheit 99.8 %) wurde zur Reinigung über Ascarite<sup>®</sup> (Firma Fluka, Buchs, Schweiz) und durch eine 20 prozentige KOH-Lösung geleitet. Durch das sauerstofffreie THF wurde 30 Minuten NO-Gas geleitet. Somit wurde eine gesättigte Stickstoffmonoxid-Lösung von ca.  $1.5 \times 10^{-2}$  M erhalten.<sup>[23,24]</sup> Zur ESR-spektroskopischen Vermessung wurde mit einer gasdichten Spritze unter Schutzgas eine 4 mM FNOCT-Probe in ein Suprasil-ESR-Röhrchen mit Septum überführt und mit NO-Lösung im Überschuss vermischt.

Die ESR-Parameter der Nitroxide **52a** bis **54a** und **71a**, **73a** wurden durch „least-square“-Anpassung der experimentellen an die simulierten Spektren mit dem Programm „WINSIM“<sup>[109]</sup> ermittelt (Kapitel 3.6, Abbildung 29).

## 7.8 Herstellung der Hydroxylamine aus den Fängersystemen **71** und **73**



**71**:  $R_1 = \text{H}$

**73**:  $R_2 = \text{C}(\text{CH}_3)_3$

**71b**:  $R_1 = \text{H}$

**73b**:  $R_2 = \text{C}(\text{CH}_3)_3$

Durch Lösen des *o*-Chinodimethans **71** oder **73** in DMSO wird eine 5 mM Stammlösung hergestellt. In einer Quarzküvette ( $d = 1 \text{ cm}$ ) wird von der Stammlösung  $30 \mu\text{l}$  in 3 ml Phosphatpuffer pH 7.35 unter Schutzgasatmosphäre pipettiert. Diese  $50 \mu\text{M}$  Fängerlösung **71** oder **73** wird danach mit  $100 \mu\text{mol}$  NO-Lösung versetzt. Dafür wird jeweils ein aliquoter Teil aus einer bei  $21 \text{ }^\circ\text{C}$  gesättigten NO-Lösung entnommen.

Die Stickstoffmonoxidlösung wurde durch 30 minütiges Einleiten von NO in das vorher sauerstofffrei gemachte Lösungsmittel erhalten. Diesem Gemisch wird  $30 \mu\text{l}$  ( $100 \mu\text{mol}$ ) Ascorbinsäurelösung aus einer 5 mM Stammlösung zugesetzt und die Fluoreszenz des Hydroxylamins **71b** oder **73b** vermessen. Durch Zugabe von NO-Donor-Substanzen wie PAPA/NO wird durch die Halbwertszeit der Substanzen das Maximum der Fluoreszenz zeitlich verzögert erreicht (Kapitel 1.1). Der Zusatz des Lösungsvermittlers SDS (0.2 %) war bei der Messung der FNOCTs **71** oder **73** erforderlich.

## 7.9 Durchführung der kinetischen UV/Vis-Messungen

Durch Lösen des *o*-Chinodimethans **71** oder **73** in DMSO wird eine 5 mM Stammlösung hergestellt. Die Stickstoffmonoxidlösung wurde durch 30 minütiges Einleiten von NO in den vorher sauerstofffrei gemachten Phosphatpuffer pH 7.30 erhalten. Die 50  $\mu$ M *o*-Chinodimethanlösung **71** oder **73** wurde in einer Quarzküvette ( $d = 1$  cm) im Volumenverhältnis von 1:1 mit NO-Lösungen unterschiedlicher Konzentration bei einer Temperatur von 21 °C vermessen. Die Konzentration der NO-Lösung wurde variiert, um die konzentrationsunabhängige Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  zu erhalten. Die Reaktion wurde unter Bedingungen pseudo-1.Ordnung durchgeführt.

### Messung in Phosphatpuffer pH 7.20:

$$c(\text{NO}) = 2.0 \times 10^{-3} \text{ M (gesättigt)}^{[23,24]}, 1.0 \times 10^{-3} \text{ M}, 0.75 \times 10^{-3} \text{ M}, 0.5 \times 10^{-3} \text{ M}, \\ 0.025 \times 10^{-3} \text{ M}$$

$$c(\mathbf{71}, \mathbf{73}) = 25 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$k_{2(71)} = 130 \pm 7 \text{ Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$$

$$k_{2(73)} = 180 \pm 5 \text{ Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$$

## 8 Experimenteller biologischer Teil

### 8.1 *Verwendete Biochemikalien und Chemikalien*

Aldrich	Steinheim (Deutschland)	L-NMA Acetat
BD Biosciences	Heidelberg (Deutschland)	Falcon 6-Well-Zellkulturplatten und -Flaschen, Polypropylen-Reaktionsgefäße 15 und 50 mL
Fluka	Buchs (Schweiz)	L-Arginin
Greiner	Solingen (Deutschland)	Pipettenspitzen, Lumox Multiwell 24 TC-Qualität
Menzel	Braunschweig (Deutschland)	Glasabdeckplättchen (Glasplättchen: Durchmesser 28 mm, Fläche 6.15 cm <sup>2</sup> , Dicke 0.17 mm ± 0.03 mm)
Molecular Probes Europe BV	Leiden (Niederlande)	Pluronic F-127
Sarsted	Nümbrecht (Deutschland)	Reagiergefäße 1.5 und 2.0 mL (Eppendorf-Cups)
Sigma	Steinheim (Deutschland)	Lipopolysaccharide
Situs	Frankfurt (Deutschland)	SperminNONOat; MahmaNO

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

### 8.2 *Geräte für die Zellkultivierung*

Zur Kultivierung der Zellen verwendete man einen Brutschrank (Typ B 5061, Heraeus, Hanau). Eine Temperierung der Zellen auf 37 °C ohne Begasung wurde im Wärmeschrank (Typ B 6760, Heraeus, Hanau) durchgeführt. Mit einem inversen Mikroskop ID 03 (Zeiss, Oberkochen) erfolgte die Zählung der Zellen.

### *8.3 Materialien für die Sterilisation*

Unter einer Sterilbank (Typ BSS6, Clean Air Technik, Woerden) wurden die sterilen Arbeiten durchgeführt. Mit Einmalrotrandfilterhaltern (0.2 µm, FP 030/3, Schleicher & Schuell, Dassel) wurden kleine Volumina steril filtriert, für größere Volumina wurden Filter von Sartorius, Göttingen (Sartobran, 0.2 µm-G) eingesetzt. Bei Verwendung des Sartorius-Filters war auch der Einsatz eines Druckbehälters (5 L, Sartorius) erforderlich. Für die Sterilisation von Wasser und Materialien wurde ein Dampfsterilisator (Varioklav Typ 400 EH, H + P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim) benutzt.

### *8.4 Verwendete Wasch- und Inkubationsmedien*

HBSS: 137 mM NaCl, 5.36 mM KCl, 0.95 mM CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 0.49 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.41 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM HEPES, pH 7.35

KH-Puffer: 115 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5.9 mM KCl, 1.18 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.23 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM HEPES, pH 7.35

PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.35, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>

### *8.5 Verwendung von 71 zur Detektion von Stickstoffmonoxid in einzelnen Zellen*

Alle fluoreszenzmikroskopischen Experimente wurden in KH-Puffer oder in HBSS ergänzt mit 10 mM D-Glucose durchgeführt. Der KH-Puffer wurde vor Versuchsbeginn mit einem Gemisch von 95 % Luft, versetzt mit 5 % CO<sub>2</sub>, begast. Zum Austesten der jeweiligen optimalen Beladungsbedingungen wurde die Inkubationszeit von 60 Minuten bei 37 °C unter Begasung mit einem Gemisch von

95 % Luft, versetzt mit 5 % CO<sub>2</sub>, in KH-Puffer verwendet. Die Fängerkonzentration **71** wurde zwischen 10 bis 80 µM unter Zusatz von 2 % Dimethylsulfoxid und 0.02 % Pluronic F-127 variiert.

Für fluoreszenzmikroskopische Messungen wurden die in den Probengefäßen auf 6.15 cm<sup>2</sup> Glasplättchen kultivierten Zellen (vgl. Kapitel 8.8.1) dreimal mit HBSS gewaschen und anschließend in der hergestellten Fänger-Lösung inkubiert. Nach beendeter Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal mit HBSS gewaschen. Die Zellen versetzte man mit 2 ml des Meßmediums, einem KH-Puffer oder HBSS ergänzt mit 10 mM D-Glucose. Bei den Fibroblasten wurde ein NO-Donor (100 µM SpNO bzw. Mahma/NO) verwendet um NO freizusetzen.

Die isolierten Alveolar-Makrophagen (vgl. Kapitel 8.8.2) wurden mit LPS (Lipopolysaccharid, 0.5 µg/ml) über einen Zeitraum von 18 Stunden stimuliert und nach dem Waschen (HBSS) mit 0.5 mM L-Arginin bzw. 0.1 mM L-NMA (100 µM Trolox und 100 µM DTPA) versetzt. Um das in den extrazellulären Raum austretende NO zu erfassen wurde eine 30 µM Fängerlösung von **71** verwendet. Die behandelten Zellen wurden am Mikroplattenreader vermessen ( $\lambda_{exc.} = 340$  nm und  $\lambda_{em.} = 400$  nm).

## ***8.6 Bestimmung der intrazellulären Fängerkonzentration von FNOCT 71***

Die Konzentration des Fängers in der Zelle wurde fluoreszenzspektroskopisch nach Zelllyse mit 0.4 % SDS bestimmt. Um diese Fängerkonzentration bei Beladung mit 30 µM FNOCT-Säure **71** zu ermitteln, wurden die Fibroblasten eine Stunde mit **71** inkubiert. Danach wurde der Zellüberstand entfernt, die Zellen mit HBSS gewaschen und mit 0.4 % SDS in KH lysiert. Der Zusatz von 100 µM Mahma/NO führte zu einem Fluoreszenzanstieg, der mit den parallel gemessenen Kontrollen (1, 3, 6 µM FNOCT-Säure **71** in KH) verglichen wurde.

## 8.7 Bestimmung der Zellvitalität

Die metabolische Aktivität wurde unter Verwendung von Alamar-Blue fluoreszenzspektrometrisch ( $\lambda_{\text{exc.}} = 560 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em.}} = 590 \text{ nm}$ ) nach einer Beladungszeit von einer Stunde mit FNOCT **71** und **72** durch die Redoxreaktion mit Farbumschlag bestimmt. Die Konzentrationen der Fänger betragen 10, 30, 50 und 80  $\mu\text{M}$ . Nach jeweils 20 Minuten Messzeit konnte die metabolische Aktivität der Zellen berechnet werden.

LDH (Lactat-Dehydrogenase) wird von toten Zellen freigesetzt und kann außerhalb der Zelle im Zellkulturmedium nachgewiesen werden. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an FNOCT **71** und **72** (10 bis 80  $\mu\text{M}$ ) bis zu 5 Stunden inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C (5.00 %  $\text{CO}_2$  / 95.0 % Raumluft, Luftfeuchtigkeit: 100 %). Es wurde ab der dritten Stunde stündlich jeweils eine Probe von 200  $\mu\text{l}$  des Inkubationsmediums entnommen und die LDH-Aktivität photometrisch über Abnahme der Extinktion von NADH bei 334 nm in einem enzymatischen Test bestimmt.

## 8.8 Zellisolierung und Kultivierung

### 8.8.1 Kultivierung der Fibroblasten

Die Fibroblasten der Zelllinie L929 wurden in *Eagle's minimal essential*-Medium kultiviert. Dem Medium wurde 10 % (v/v) fötales Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 100 U/mL Penicillin und 100  $\mu\text{g/mL}$  Streptomycin hinzugefügt. Die Kultivierung erfolgte in 75  $\text{cm}^2$  Zellkulturflaschen bei einer Temperatur von 37 °C (5.00 %  $\text{CO}_2$  / 95.0 % Raumluft, Luftfeuchtigkeit: 100 %). Die Subkultivierung erfolgte durch Behandlung mit Trypsin (0.25 % (v/v) Trypsin in Citratsalzlösung). Für die Messungen wurden die Zellen mit einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen/ $\text{cm}^2$  in 24-Well-Zellkulturplatten über 48 h kultiviert.



### 8.8.2 Isolierung und Kultivierung von Schweineaorten-Endothelzellen

Es wurden 10 Schweine-Aorten von 6 Monate alten Schweinen vom örtlichen Schlachthof geholt und direkt in 2.5 - 3.0 l, 20 - 25 °C warmes HBSS gegeben. Die Präparation der Endothelzellen erfolgte innerhalb von 4 Stunden nach der Schlachtung der Tiere.

Zur Kultivierung der Zellen wurden mittlere Flaschen (Falcon, 25 cm<sup>2</sup>) verwendet. Die Aorten wurden in Längsrichtung auf der Seite der Verzweigungen aufgeschnitten und mit sterilen Einwegkanülen (8 - 12 Stück) auf einer mit Aluminiumfolie überzogenen Korkplatte befestigt. Die Aorta wurde glatt und mit der Innenseite nach oben liegend aufgespannt. Die Folie wurde durch Abwischen mit Ethanol desinfiziert.

Die so befestigte Aorta wurde mehrmals mit sterilem HBSS gewaschen und die Endothelzellen mit der runden Seite eines Skalpells (Typ 21 der Firma Feather, Japan) durch Schaben mit einem Winkel von 60° über die Innenseite der Aorta isoliert. Die Endothelzellen waren als Belag auf dem Skalpell zu erkennen und wurden in 50 ml des Kulturmediums ohne Serum suspendiert.

Um keine unerwünschten Fibroblasten mit zu isolieren, durften die Schnittstellen der Aorta und die einmal behandelten Stellen nicht noch einmal behandelt werden.

Nach beendeter Isolation der Zellen, wurde die Zellsuspension bei 300 g und Raumtemperatur 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 5 ml Kulturmedium in einem Falconröhrchen suspendiert und in einer 25 cm<sup>2</sup> Flasche kultiviert (37 °C / 5 % CO<sub>2</sub>). Nach 24 Stunden wurden die Zellen dreimal mit HBSS gewaschen und das Kultur-Medium erneuert. Anschließend wurde alle 2 - 3 Tage das Medium gewechselt.

Wenn die Zellen konfluent gewachsen waren (ca. 7 Tage), wurden Subkulturen durch Trypsinisierung der Zellen erhalten. Dazu wurden die Zellen dreimal mit HBSS gewaschen und anschließend 3 Minuten mit 1 ml 0.25 % Trypsin-Lösung inkubiert (37 °C). Die Trypsinisierung wurde durch Zugabe von 5 ml Kulturmedium beendet, die Zellen wurden resuspendiert und auf 24-Well Zellkulturplatten (Lumox) kultiviert (Splitting-Verhältnis 1 : 3).

## 9 Literatur

- [1] F. Hollemann, E. Wiberg, N. Wiberg, *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, 91.-100. ed., Walter de Gruyter-Verlag Berlin, New York, **1985**.
- [2] Römpp, *Lexikon der Chemie*, 2. ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1999**.
- [3] E. G. Janzen, *Chem. Eng. News* **1994**, 4.
- [4] Y. Rees, G. H. Williams, *Adv. in Free-Radical Chemistry* **1969**, 3, 199-203.
- [5] G. Herzberg, R. Neeb, *Molekülspektren und Molekülstruktur I. Zweiatomige Moleküle*, Verlag von Theodor Steinkopff, Dresden, Leipzig, **1939**.
- [6] M. A. Marletta, *Chem. Res. Toxicol.* **1988**, 1, 249-257.
- [7] B. Gaston, J. M. Drazen, J. Loscalzo, J. S. Stamler, *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **1994**, 149, 538-551.
- [8] N. V. Blough, O. C. Zafiriou, *Inorganic Chem.* **1985**, 24, 3502-3504.
- [9] M. Saran, C. Michel, W. Bors, *Free Radical Res. Commun.* **1990**, 10, 221-226.
- [10] J. A. McCleverty, *Chem. Rev.* **1979**, 79, 53-76.
- [11] J. S. Stamler, D. J. Singel, J. Loscalzo, *Science* **1992**, 258, 1898-1902.
- [12] J. D. Butler, *Air Pollution Chemistry* **1979**, Kap. 1-4.
- [13] C.-J. Estler, *Lehrbuch der allgemeinen und systematischen Pharmakologie und Toxikologie*, Schattauer, Stuttgart, New York, **1990**.
- [14] W. Murrell, *Lancet* **1876**, 1, 80-81; 113-115; 151-152; 225-227.
- [15] S. Katsuki, F. Murad, *Mol. Pharmacol.* **1977**, 13, 330-341.
- [16] R. F. Furchgott, J. V. Zqwadski, *Nature* **1980**, 288, 373-376.
- [17] R. F. Furchgott, *Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides and Endothelium* **1988**, 401-414.
- [18] L. J. Ignarro, *vorgetragen auf dem IV International Symposium on Mechanisms of Vasodilatation*, Rochester, MN, USA, **1986**.
- [19] E. Culotta, D. E. Koshland, *Science* **1992**, 258, 1862-1865.
- [20] P. L. Feldman, O. W. Griffith, *Chem. Eng. News* **1993**, 71, 26-38.

- [21] S. Moncada, R. M. Palmer, E. A. Higgs, *Pharmacol. Rev.* **1991**, *43*, 109-142.
- [22] L. Ignarro, F. Murad, *Nitric Oxide: Biochemistry, Molecular Biology and Therapeutic Implications*, Vol. 34, New York, **1995**.
- [23] F. Murad, *Cyclic GMP Synthesis, Metabolism and Function: Advances in Pharmacology*, Vol. 26, Academic Press, New York, **1994**.
- [24] F. Murad, *Proc. Int. Congr. Pharmacol.* **1994**, *10*, 1-4.
- [25] J. A. Hrabie, L. K. Keefer, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1135-1154.
- [26] L. K. Keefer, R. W. Nims, K. M. Davis, D. A. Wink, in *Methods in Enzymology*, Vol. 268 A, **1996**, 281-293.
- [27] S. Moncada, E. A. Higgs, *N. Engl. J. Med.* **1993**, *329*, 2002-2012.
- [28] R. M. J. Palmer, A. G. Ferrige, S. Moncada, *Nature* **1988**, *333*, 664-666.
- [29] R. Iyengar, D. J. Stuehr, M. A. Marlette, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84*, 6369-6373.
- [30] L. Kobzik, H. H. H. W. Schmidt, in *Methods in Nitric Oxide Research*, Vol. 15, **1996**, 229.
- [31] W. M. Zapol, S. Rimar, N. Gillis, M. Marletta, C. H. Bosken, *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* **1994**, *149*, 1375-1380.
- [32] A. R. Butler, D. L. H. Williams, *Chem. Soc. Rev.* **1993**, 233-241.
- [33] R. Kilbourn, T. R. Billar, *Methods in Nitric Oxide Research* **1996**, Kapitel 43, 619-630.
- [34] B. T. Mellion, L. Ignarro, E. H. Ohlstein, E. G. Pontecorvo, P. L. Hyman, P. J. Kadowitz, *Blood* **1981**, *57*, 946-955.
- [35] B. Furlong, A. M. Henderson, M. J. Smith, *Br. J. Pharmacol.* **1987**, *90*, 687-692.
- [36] U. Förstermann, *Biochemie* **1994**, *24*, 62-69.
- [37] S. H. Snyder, D. S. Bredt, *Spektrum der Wissenschaft* **1992**, 72-80.
- [38] S. Archer, *FASEB J.* **1993**, *7*, 349-360.
- [39] L. Green, *Analyt. Biochem.* **1982**, *203*, 131-138.
- [40] M. Marzinzig, A. K. Nüssler, J. Stadler, E. Marzinzig, W. Barthlen, N. C. Nüssler, H. G. Beger, J. S. M. Morris, U. B. Brückner, *Nitric Oxide: Biologie and Chemistry* **1997**, *1*, 177-189.

- [41] T. P. Misko, R. J. Schilling, D. Salvemini, W. M. Moore, M. G. Currie, *Analyt. Biochem.* **1993**, *214*, 11-16.
- [42] H. Kojima, K. Sakurai, K. Kikuchi, S. Kawahara, Y. Kirino, H. Nagoshi, Y. Hirata, T. Nagano, *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 373-375.
- [43] M. P. Doyle, J. W. Hookstra, *J. Inorg. Biochem.* **1981**, *14*, 351-358.
- [44] E. Noack, D. Kubitzek, G. Kojda, *Neuroprotocols* **1992**, *1*.
- [45] A. Komarov, D. Mattson, M. M. Jones, P. K. Singh, C.-S. Lai, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1993**, *195*, 1191-1198.
- [46] K. J. Franz, N. Singh, S. J. Lippard, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2194-2197.
- [47] T. Malinski, Z. Taha, *Nature* **1992**, *358*, 676-678.
- [48] F. L. Kiechle, T. Malinski, *Clinical Chem.* **1993**, *100*, 567-575.
- [49] H.-G. Korth, R. Sustmann, P. Lommes, T. Paul, A. Ernst, H. de Groot, L. Hughes, K. U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2767-2777.
- [50] H.-G. Korth, K. U. Ingold, R. Sustmann, H. de Groot, H. Sies, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 915-917.
- [51] A. T. Blomquist, E. J. Moriconi, *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 3761-3769.
- [52] H.-G. Korth, K. U. Ingold, R. Sustmann, H. de Groot, H. Sies, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 891-893.
- [53] M. Bätz, *Doktorarbeit*, Universität Essen, **1997**.
- [54] M. Bätz, H.-G. Korth, P. Meineke, R. Sustmann, in *Methods Enzymol.*, Vol. *301*, **1998**, 532-539.
- [55] S. A. Green, D. J. Simpson, G. Zhou, P. S. Ho, N. V. Blough, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7337-7346.
- [56] N. V. Blough, D. J. Simpson, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1915-1917.
- [57] P. Meineke, U. Rauen, H. de Groot, H.-G. Korth, R. Sustmann, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1738-1747.
- [58] F. S. Hornig, H.-G. Korth, U. Rauen, H. de Groot, *Helv. Chim. Acta.* **2006**, *89*, 2281-2296.
- [59] R. Y. Tsien, *Nature* **1981**, *290*, 527-528.
- [60] G. G. Stokes, *Philos. Trans. Roy. Soc. London* **1852**, *142*, 463.
- [61] M. Zander, *Fluorometrie*, Springer Verlag, Berlin, **1973**.

- [62] P. Meineke, U. Rauen, H. de Groot, H.-G. Korth, R. Sustmann, *Biol. Chem.* **2000**, *381*, 575-582.
- [63] P. Meineke, *Doktorarbeit*, Universität Essen, **1999**.
- [64] M. Neuenschwander, R. Iseli, *Helv. Chim Acta* **1977**, *60*, 1061-1072.
- [65] H. Koch, *Monatsh.* **1962**, *93*, 1343-1347.
- [66] H. Koch, L. Katlan, K. Markut, *Monatsh.* **1965**, *96*, 1646-1657.
- [67] M. Bätz, Ph. D. thesis, Universität Essen **1997**.
- [68] F. Benzion, P. Mordechai, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *37*, 2501-2507.
- [69] D. W. Jones, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1977**, *1*, 980-987.
- [70] U. Weiss, *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 4053-4058.
- [71] G. G. Kubiak, J. M. Cook, *Tetrahedron Letters* **1985**, *26*, 2163-2166.
- [72] D. W. White, *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 1951-1952.
- [73] W. Dilthey, I. ter Horst, W. Schommer, *J. Prakt. Chem. N. F.* **1935**, *143*, 189-210.
- [74] W. Zeslawski, J. Baranska, M. Jamrozik, *Monatsh. Chemie* **1997**, *128*, 389-393.
- [75] F. W. Küster, A. Thiel, *Rechentafeln für die Chemische Analytik*, 104 ed., Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York, **1993**.
- [76] J. Hu, D. Zhang, F. W. Harris, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 707-708.
- [77] E. L. Shapiro, E. I. Becker, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 4769-4775.
- [78] T. Yamato, A. Miyazawa, M. Tashiro, *Chem. Ber.* **1993**, *126*, 2505-2511.
- [79] V. Wintgens, J. C. Netto-Ferreira, H. L. Casal, J. C. Scaiano, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2363-2367.
- [80] S. L. Murov, *Handbook of Photochemistry*, New York, **1973**.
- [81] G. G. Guilbault, *Practical Fluorescence*, 2 ed., Marcel Dekker Inc., New York, **1990**.
- [82] M. Bätz, H.-G. Korth, R. Sustmann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1501-1503.

- [83] J. M. Miller, *Standards in fluorescence spectrometry (Techniques in visible and ultraviolet spectrometry Volume 2)*, UV Spectrometry Group, Chapman and Hall, London, **1981**.
- [84] J. Wisniak, M. Herskowitz, *Solubility of Gases and Solids, Part B, Physical Sciences Data 18*, Elsevier, Amsterdam, **1984**.
- [85] C. L. Young, *Solubility Data Series, Vol. 8*, Pergamon Press, Oxford, **1981**.
- [86] I. B. Berlman, *Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules*, 2 ed., Academic Press, London and New York, **1971**.
- [87] A. Mohr, P. Talbirsky, H.-G. Korth, R. Sustmann, R. Boese, D. Bläser, H. Rehage, *in Vorbereitung* **2007**.
- [88] J. B. Birks, *Photophysics of Aromatic Compounds*, Wiley and Sons, New York, **1970**.
- [89] J. S. Stamler, M. Feelisch, *Methods in Nitric Oxide Research*, Wiley, **1996**.
- [90] G. Schwendt, *Fluorimetrische Analysen: Methode und Anwendungen, Vol. 1*, Verlag Chemie, Weinheim, **1981**.
- [91] S. Yang-Lan, M. Mueller-Johnson, J. Oehldrich, D. Wichman, J. M. Cook, *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 4053-4058.
- [92] A. R. Forrester, in *Landolt-Börnstein New Series, Magnetic Properties of Free Radicals, Vol. II/9, Part c1* (Eds.: H. Fischer, K. H. Hellwege), Springer Verlag, Berlin, **1979**.
- [93] F. W. King, *Chem. Rev.* **1976**, *76*, 157-186.
- [94] T. Paul, *Doktorarbeit*, Universität Essen, **1995**.
- [95] I. Lehnen-Beyel, H. de Groot, U. Rauen, *Biochem. J.* **2002**, *368*, 517-526.
- [96] A. L. Lehninger, *Biochemie*, 2 ed., VCH, Weinheim, **1987**.
- [97] H. O. Jauregui, N. T. Hayner, J. L. Driscoll, R. Williams-Holland, M. H. Lipsky, P. M. Galletti, *In Vitro* **1981**, *17*, 1100-1110.
- [98] M. Geiger, A. Stone, S. N. Mason, O. K. T., *Am. J. Physiol.* **1997**, *273*, L275-L281.
- [99] T. Az-ma, K. Fujii, O. Yuge, *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, *289*, 33-39.
- [100] S. Inaba, R. D. Rieke, *Chem. Lett.* **1984**, 25-28.
- [101] S. Inaba, R. D. Rieke, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1373-1381.
- [102] D. L. Brydon, *J. Chem. Soc. B.* **1971**, 1996-2006.

- [103] S. Herzog, *Z. Chem.* **1964**, *4*, 1-11.
- [104] *Organikum*, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, DDR, **1976**.
- [105] S. Morgan, *J. Am. Chem. Soc.* **1944**, *66*, 404-407.
- [106] C. A. Bischoff, *Chem. Ber.* **1907**, *40*, 3134-3150.
- [107] B. B. Corson, R. K. Hazen, J. S. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.* **1928**, *50*, 913.
- [108] R. C. Hallcher, M. M. Baizer, *Liebigs Ann. Chem.* **1977**, 737-746.
- [109] WINSIM, D. R. Duling, *Laboratory of Molecular Biophysics, NIEHS, NIH, Research Triangle Park, North Carolina, J. Magn. Reson. B.* **1994**, *104*, 105-110.





# Lebenslauf

**Name** : Frank Stefan Hornig

**Geburtsdatum** : 24.02.1975

**Geburtsort** : Menden (Sauerland)

**Wohnort** : Provinzialstrasse 297  
58708 Menden

**Familienstand** : Ledig

**Schulbildung** : 1981 - 1985 Grundschule  
1985 - 1991 Realschule

**Berufsausbildung** : Sept. 1991 - Juni 1994 Ausbildung zum  
chemisch-technischen Assistenten an den  
Beruflichen Schulen Olsberg  
Zivildienst Okt. 1994 - Dez. 1995 Altenheim  
Jochen-Klepper, Menden im Pflegedienst

**Berufstätigkeit** : Nov. 1994 - Juli 1997 als chemisch-technischer  
Assistent im Hygiene Institut Menden

**Studium** : Okt. 1997 Immatrikulation an der Universität  
Duisburg-Essen  
Okt. 2000 Diplom-Vorprüfung  
Mai 2003 Diplom-Hauptprüfung  
Juni 2003 - Januar 2004 Diplomarbeit unter  
Anleitung von Prof. Dr. Dr. h.c. R. Sustmann im  
Fach Organische Chemie  
Thema: Darstellung und Untersuchung neuer  
cheletroper Fängersysteme für Stickstoffmonoxid  
Ab Februar 2004 Promotion zum Dr. rer. nat. im  
Fach Organische Chemie unter Anleitung von  
Prof. Dr. Dr. h. c. R. Sustmann.