

**Entwicklung und Optimierung
biomimetischer Modellsysteme
Cytochrom P450-abhängiger Reaktionen
für Diazepam
und die Anwendung auf
strukturverwandte sowie strukturfremde
Substrate**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Universität Hamburg
Fakultät für Mathematik, Informatik
und Naturwissenschaften

vorgelegt von

Steffi Jaeger

Hamburg 2009

Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Duchstein
Prof. Dr. P. Heisig

Datum der Disputation: 08. Mai 2009

Für meine Eltern

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 2005 bis Februar 2009 am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. H.-J. Duchstein.

Ihm danke ich für die interessante Aufgabenstellung, die zahlreichen Anregungen, für sein Vertrauen in meine Selbständigkeit und die immerwährende Motivation.

Herrn Prof. Dr. P. Heisig

danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. A. Klack und Herrn Dr. G. Schmeinck für die fachlichen Diskussionen, die emotionale Unterstützung und für das Korrekturlesen. Für letzteres danke ich ebenfalls meinen Eltern und Herrn F. Brocks.

Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Schultze danke ich für die Durchführung der GC-MS-Experimente. Des Weiteren danke ich Herrn Dr. T. Lemcke für seine stete Diskussionsbereitschaft und die angenehme Zusammenarbeit während der Praktikumsbetreuung. Weiterhin danke ich Frau C. Bostedt für die engagierte Unterstützung bei zahlreichen Experimenten.

Dem AK Geffken danke ich für die Bereitstellung der Synthesemikrowelle und die fachliche Unterstützung bei synthetischen Fragestellungen, wobei ich an dieser Stelle Frau Dr. K. Wehner besonders hervorheben möchte. Ebenso danke ich dem AK Meyer aus dem Institut für Organische Chemie für die Nutzung der Synthesemikrowelle. Dem AK Leopold bin ich für die uneingeschränkte Hilfe bei gerätebedingten Engpässen dankbar. Dem AK Duchstein danke ich herzlich für die immerwährende Diskussionsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die angenehme Atmosphäre.

Meinen Eltern, Herrn F. Brocks und allen Freunden danke ich für die liebevolle Unterstützung während des Studiums sowie der steten Motivation, Geduld und Nachsicht im Laufe der Promotion.

Abürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AV	Arbeitsvorschrift
bzw.	beziehungsweise
DNO	Diazepam-N-oxid
DZP	Diazepam
FeT4MPyPCL	5,10,15,20-Tetrakis-(N-methyl-4-pyridyl)-porphyrinato-Fe(III)pentachlorid
FeTFPPCL	5,10,15,20-Tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)-porphyrinato-Fe(III)chlorid
GC	Gaschromatographie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Im	Imidazol
m-CBA	m-Chlorbenzoesäure
m-CPBA	m-Chlorperoxybenzoesäure
min	Minute
mL	Milliliter
MMPP	Magnesiummonoperoxyphthalat-Hexahydrat
MS	Massenspektrometrie
MnT4MPyPCL	5,10,15,20-Tetrakis-(N-methyl-4-pyridyl)-porphyrinato-Mn(III)pentachlorid
MnTFPPCL	5,10,15,20-Tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)-porphyrinato-Mn(III)chlorid
Mw	Mittelwert
MW	Mikrowelle
n.a.	not applicable

n.d.	nicht detektierbar
NZP	Nordazepam
OZP	Oxazepam
PhI	Iodbenzol
PhIO	Iodosobenzol
quart.	quartär
RP	reversed phase
rpm	rounds per minute
s	Sekunde
Stabw	Standardabweichung
tert.	tertiär
TZP	Temazepam
Vk	Variationskoeffizient

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	15
1.1	Cytochrom P450-Enzymsystem	16
1.2	Biomimetische Modellsysteme.....	20
1.3	Metalloporphyrine	24
1.4	Sauerstoffdonatoren und Cokatalysatoren.....	26
1.4.1	Iodosobenzol	28
1.4.2	<i>m</i> -Chloroperoxybenzoesäure	30
1.4.3	Magnesiummonoperoxyphthalat.....	31
1.4.4	Wasserstoffperoxid	31
1.4.5	Imidazol.....	32
1.5	Mikrowellensynthese	33
1.5.1	Mikrowellen	33
1.5.2	Dielektrisches Heizen.....	35
1.5.3	Reaktionsgeschwindigkeit	36
1.5.4	Zusammenhang von Mikrowellensynthese und biomimetischem Modellsystem hinsichtlich der Reaktionsgeschwindigkeit	37
1.5.5	Mikrowellengeräte	38
2	Entwicklung biomimetischer Modellsysteme für Diazepam	40
2.1	Einleitung und Literaturübersicht.....	40
2.1.1	Diazepam.....	40
2.1.2	Modellsysteme	42
2.1.3	Zielsetzung	43
2.2	Analytik.....	44
2.3	Validierung	46
2.3.1	Allgemeines.....	46
2.3.2	Linearität	46

2.3.3	Wiederholpräzision	47
2.3.4	Wiederfindung und Richtigkeit.....	49
2.3.5	Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze	52
2.3.6	Selektivität und Spezifität	52
2.4	Katalytische Eigenschaften von Mn III ohne Pyrrolringstruktur .	54
2.5	Immobilisierung der verwendeten Metalloporphyrine unter Einsatz der Synthesemikrowelle	65
2.6	Methode zur Quantifizierung der immobilisierten Metalloporphyrine	67
2.6.1	Quantitative Bestimmung von immobilisiertem Mn/FeT4MPyPCL	67
2.6.2	Quantitative Bestimmung von immobilisiertem Mn/FeTFPPCL	68
2.6.3	Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen.....	70
2.7	Ermittlung des optimalen Lösungsmittel für die Mikrowellenbestimmung.....	71
2.7.1	Theoretische Betrachtung.....	71
2.7.2	Ergebnisse	77
2.8	Stabilität der Metalloporphyrine in Acetonitril	83
2.8.1	Semiquantitative Bestimmung der eisenhaltigen Metalloporphyrine	84
2.8.2	Semiquantitative Bestimmung der manganhaltigen Metalloporphyrine	86
2.9	Ermittlung der optimalen Synthesebedingungen für die Mikrowellenbestimmung.....	89
2.9.1	Parameteroptionen.....	90
2.9.2	Ergebnisse	95
2.9.3	Diskussion	97

2.10	Einfluss der Sauerstoffdonatoren auf die Aktivität der immobilisierten Porphyrine.....	99
2.10.1	Versuchsplanung.....	100
2.10.2	Ergebnisse.....	100
2.10.3	Diskussion.....	107
2.11	Durchführung von Blindversuchen.....	109
2.11.1	Ergebnisse unter Mikrowellenbedingungen.....	110
2.11.2	Ergebnisse unter Schüttelbedingungen.....	113
2.11.3	Vergleich der Ergebnisse aus Blind- und Mn(III)-acetat-Versuchen.....	115
2.12	Identifizierung des Diazepam-N-oxids.....	116
2.12.1	Vorversuche.....	117
2.12.2	Synthese.....	122
2.12.3	Aufreinigung.....	122
2.12.4	Analytik.....	123
2.13	Anwendung und Vergleich der verschiedenen Modellsysteme unter Verwendung von immobilisierten und nicht-immobilisierten Metalloporphyrinen.....	125
2.13.1	Versuchsplanung.....	125
2.13.2	<i>m</i> -CPBA.....	126
2.13.3	PhIO.....	131
2.13.4	MMPP.....	134
2.13.5	Wasserstoffperoxid.....	138
2.13.6	Wasserstoffperoxid und Imidazol.....	141
2.13.7	Abschließende Betrachtung.....	143
2.14	Bestimmung und Bedeutung der vom Trägermaterial freigesetzten Menge an Metalloporphyrin.....	146
2.14.1	Motivation.....	146

2.14.2	Methodenentwicklung.....	147
2.14.3	Quantitative Bestimmung des Überstandes	147
2.14.4	Wiederfindung.....	151
2.14.5	Anwendung auf das PhIO-Modell unter Schüttelbedingungen	153
2.14.6	Schlussfolgerung	155
2.15	Katalytische Säule.....	157
2.15.1	Motivation	157
2.15.2	Methodenentwicklung.....	157
2.15.3	Wiederfindung.....	162
2.15.4	Durchführung und Ergebnisse.....	163
2.15.5	Statistik und abschließende Betrachtung	165
2.15.6	Ausblick.....	166
3	Anwendung auf andere Substrate	168
3.1	N-Methyl- ϵ -caprolactam.....	168
3.1.1	Einleitung	168
3.1.2	Analytik	170
3.1.3	Durchführung	171
3.1.4	Ergebnisse und Diskussion.....	172
3.2	N-Methyl-2-piperidon.....	175
3.2.1	Einleitung	175
3.2.2	Analytik	177
3.2.3	Durchführung	179
3.2.4	Ergebnisse und Diskussion.....	179
3.3	Abschließende Betrachtung	181
3.4	Estradiol	183
3.4.1	Einleitung	183

3.4.2	Analytik.....	185
3.4.3	Durchführung	186
3.4.4	Ergebnisse	186
3.4.5	Synthese und Analytik von Estradioldiacetat	186
3.4.6	Verseifung von Estradioldiacetat.....	186
3.4.7	Umsetzung von Estradioldiacetat.....	187
3.4.8	Abschließende Betrachtung	188
4	Zusammenfassung	189
5	Summary.....	193
6	Experimenteller Teil.....	196
6.1	Verzeichnis der Geräte und allgemeinen Methoden	196
6.2	Versuche zur Entwicklung biomimetischer Modellsysteme für Diazepam	200
6.2.1	Methode und deren Validierung zur Bestimmung von Diazepam und seiner Metabolite	200
6.2.2	Vorschrift und Messdaten zur Bestimmung der katalytischen Eigenschaften von Mn III	224
6.2.3	Vorschrift zur Immobilisierung der verwendeten Metalloporphyrine	226
6.2.4	Methode zur Quantifizierung der immobilisierten Metalloporphyrine	227
6.2.5	Vorschrift und Messdaten zur Ermittlung des optimalen Lösungsmittels	231
6.2.6	Messdaten zur Bestimmung der optimalen Synthesebedingungen.....	234
6.2.7	Vorschrift und Messdaten zur Bestimmung der Aktivität.....	235
6.2.8	Messdaten zu den Blindversuchen.....	239
6.2.9	Analytische Daten zur Identifizierung des unbekanntes Produktes	241

6.2.10	Vorschriften und Messdaten zur Anwendung der verschiedenen Modellsysteme	245
6.2.11	Vorschriften und Messdaten zur Bestimmung der vom Trägermaterial freigesetzten Menge an Metalloporphyrin.....	260
6.2.12	Messergebnisse unter Verwendung der katalytischen Säule ..	266
6.3	Anwendung auf andere Substrate	267
6.3.1	Methode zur Bestimmung von N-Methyl- ϵ -caprolactam	267
6.3.2	Vorschriften und Messdaten zu N-Methyl- ϵ -caprolactam.....	270
6.3.3	Methode zur Bestimmung von N-Methyl-2-piperidon	272
6.3.4	Vorschriften und Messdaten zu N-Methyl-2-piperidon.....	274
6.3.5	Methode zur Bestimmung von Estradiol.....	276
6.3.6	Synthese von Estradioldiacetat	276
6.3.7	Methode zur Bestimmung von Estradioldiacetat	276
6.3.8	Analytische Daten zu Estradioldiacetat	277
7	Literaturverzeichnis	278
8	Anhang	290
8.1	Gefahrstoffverzeichnis	290
8.2	Lebenslauf.....	294

1 Einleitung

Die Gesamtheit aller biochemischen Veränderungen an Fremdstoffen im Organismus wird als Biotransformation bezeichnet. In der Regel führen diese Veränderungen der Moleküle zur Verbesserung der Exkretionsfähigkeit sowie zur Modifizierung pharmakologischer und toxischer Eigenschaften [1]. Biotransformation findet in vielen wichtigen Organen, wie der Niere, der Lunge, der Haut, dem Blut und vor allem der Leber statt, die den größten Anteil an metabolisch wirksamen Enzymen enthält. Diese, für die Biotransformation verantwortlichen Enzyme, sind in dem Membransystem des rauhen und glatten endoplasmatischen Retikulums (ER) integriert. Nach erfolgter Biotransformation werden die Metabolite in den Hohlräumen des ER angereichert und über den Golgi-Apparat in die Galle oder ins Blut abgegeben und somit biliär oder renal eliminiert [2].

Die einzelnen Prozesse der Biotransformation laufen hierbei meist in zwei Phasen ab (Abb. 1.1). Bei Phase I-Reaktionen werden funktionelle Gruppen in unpolare Moleküle eingeführt oder vorhandene funktionelle Gruppen umgewandelt. Es werden Metabolite mit hydrophileren Eigenschaften gebildet, die teilweise eliminierbar sind. Phase II-Reaktionen sind durch Konjugat-Bildungen gekennzeichnet. Hierbei koppeln die Produkte der Phase I-Reaktion mit körpereigenen sehr polaren Molekülen. Für die Konjugation verantwortliche Enzyme sind ausschließlich Transferasen [3].

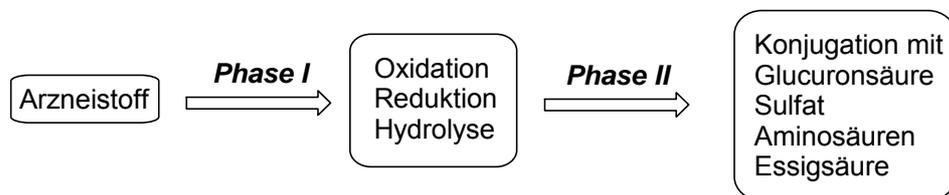


Abb. 1.1: Übersicht der wichtigsten Reaktionstypen der Biotransformations-Phasen I und II

Die Oxidationsreaktionen der Phase I-Reaktionen, denen die größte Bedeutung in der Biotransformation zukommt, werden von Cytochrom P450-Enzysystemen katalysiert.

1.1 Cytochrom P450-Enzysystem

Im Jahr 1958 wurde erstmals das spektroskopische Verhalten von, damals noch nicht charakterisierten, isolierten Cytochrom P450-Enzymen aus Rattenlebermikrosomen in Anwesenheit von Kohlenmonoxid (CO) beschrieben[4]. Ein Absorptionsmaximum bei 450 nm des zuvor reduzierten Eisen(II)-CO-Komplexes konnte beobachtet werden. *Omura* und *Sato* gaben dem Enzysystem aufgrund dieser Eigenschaften seinen Namen P450 (P=pigment) [5]. In späteren Untersuchungen wurde die Existenz von multiplen Formen des P450 in einem einzigen Gewebe nachgewiesen[6]. Heute erfolgt die Einteilung der mehr als 500 P450-Enzyme in Genfamilien, Subfamilien und innerhalb einer Subfamilie in die entsprechenden Isoformen, wobei die Nomenklatur auf der Grundlage der Sequenzhomologie auf Aminosäureebene basiert. Die systematische Einteilung wurde 1989 entwickelt und wird regelmäßig aktualisiert [7].

Das Cytochrom P450 gehört zu den Hämthiolatproteinen. Ein Eisenprotoporphyrin IX-Komplex (siehe Abb. 1.2) ist als prosthetische Gruppe über Wasserstoffbrücken zweier Propionatseitenketten und einem proximalen Cysteinliganden an das Apoprotein gebunden. Der, das Eisen koordinierende, Cysteinligand ist für das oben genannte spektroskopische Verhalten der P450-Enzyme verantwortlich [8].

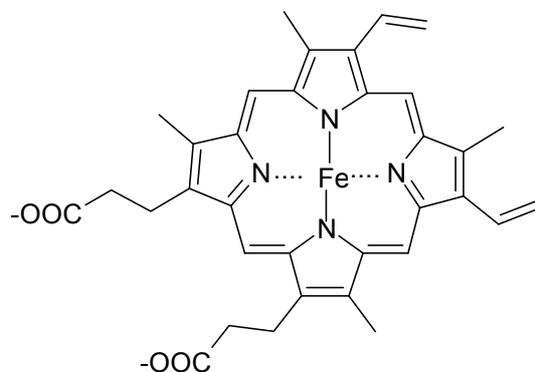
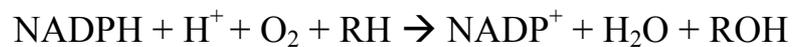


Abb. 1.2: Darstellung der Eisen-Protoporphyrin IX-Einheit der Cytochrom P450-Enzyme

Im Allgemeinen werden die oxidativen Biotransformationen der Phase I-Reaktionen von mikrosomalen Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen katalysiert. Diese Monooxygenasen katalysieren die reduktive Spaltung von molekularem Sauerstoff, wobei ein Sauerstoffatom auf das Substrat übertragen und das zweite zu Wasser reduziert wird. Die notwendigen Reduktionsäquivalente werden vom Coenzym NADPH bereitgestellt. Dessen Elektronen werden durch das Flavoprotein NADPH-P450-Oxidoreduktase auf die Monooxygenase übertragen [9]. Die Gesamtreaktion lässt sich wie folgt darstellen:



Charakteristisch für die Monooxygenasen der Cytochrom P450-Enzyme ist ihre breite Substratspezifität. So können Fremdstoffe mit unterschiedlicher chemischer Struktur durch dasselbe Enzym biotransformiert werden. Ebenso kann ein einziger Arzneistoff durch mehrere verschiedene P450-Enzyme verstoffwechselt werden.

Die Grundtypen der Cytochrom P450-katalysierten Reaktionen umfassen aliphatische und aromatische Hydroxylierungen, N-, O-, und S-Desalkylierungen, Epoxidierungen olefinischer als auch aromatischer Doppelbindungen, oxidative Desaminierungen und die Oxidation von Thioethern und tertiären Aminen zu Sulfoxiden und N-Oxiden [9].

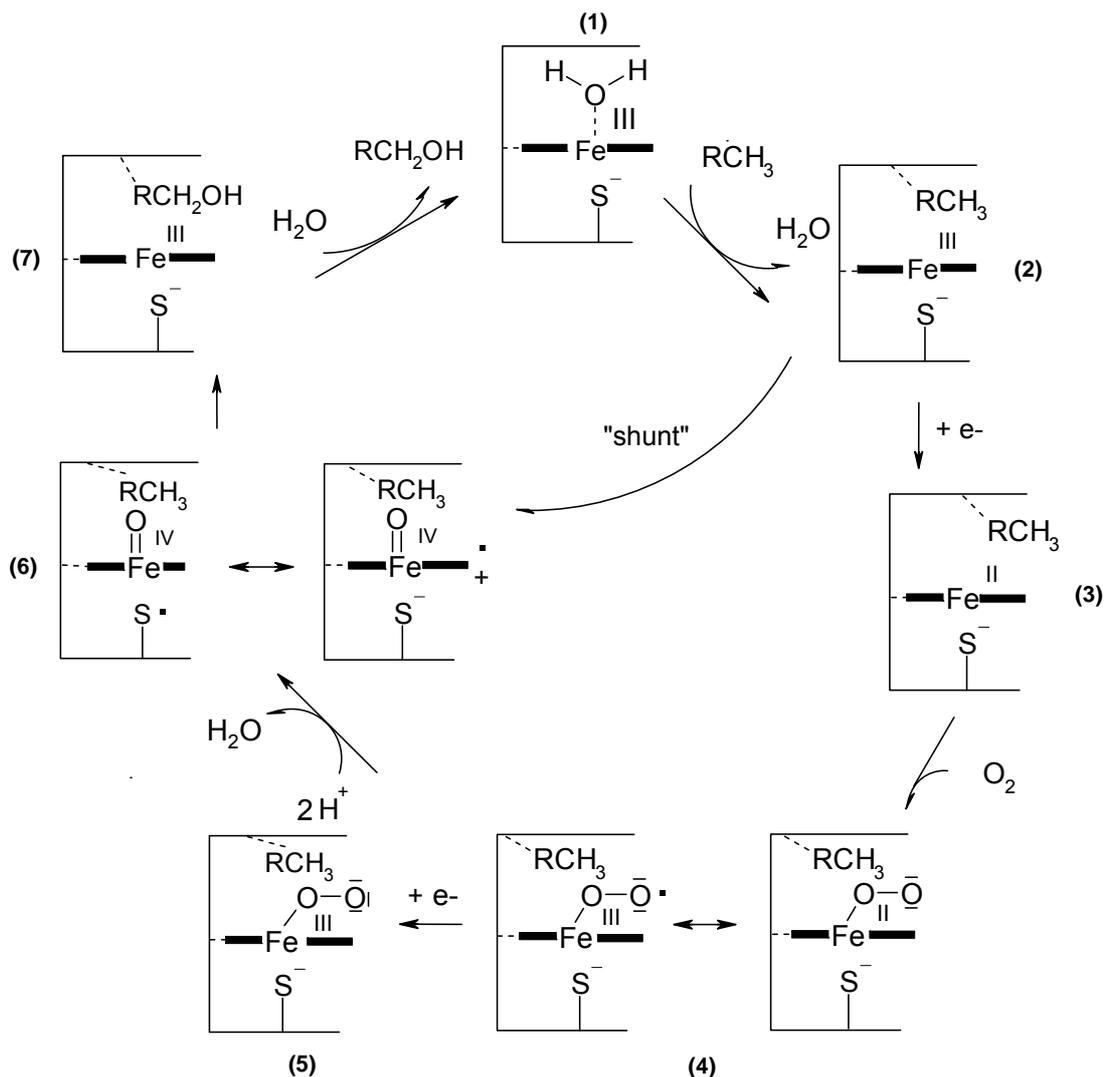


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des katalytischen Mechanismus von Cytochrom P450 nach Woggon [8]

Verbindung (6) stellt einen Elektronenmangelkomplex dar, der als Oxenoid oder Eisen-oxo-komplex bezeichnet wird [12]. Die O-Insertion des Substrats (7) durch die Oxenoidspezies resultiert in einem oxygenierten Produkt, das unter Wasseranlagerung und Erhalt des Grundzustands (1) freigesetzt wird.

Durch einen „shunt“ - Mechanismus können die Schritte (3)-(5) umgangen werden. Die Reaktion, als Peroxid-Shunt bezeichnet, wird durch die Zugabe von Peroxid (ROOH) zu substratgebundenen P450-Enzymen erzielt. Hierbei wird unmittelbar die reaktive Oxenoidspezies gebildet, die anschließend zur Oxygenierung des Substrats führt [12].

1.2 Biomimetische Modellsysteme

Unter Biomimetik sind chemische Modellsysteme zu verstehen, die natürliche und enzymatische Prozesse imitieren [13]. Die Simulation von Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasereaktionen spielte hierbei eine große Rolle. Im Allgemeinen wurden in derartigen biomimetischen Modellsystemen niedermolekulare Metallkomplexe als Cytochrom P450-imitierende Einheit verwendet. Den aktivierten Sauerstoff zur Darstellung des Katalysezyklus über den Shunt-Mechanismus lieferten meist chemische Sauerstoffdonatoren [14].

Modellsysteme zur Simulation des humanen Arzneistoffmetabolismus erlangten, angesichts der stetig sinkenden Zahl an Tierversuchen, immer größere Bedeutung. Sogenannte Ersatz- und Ergänzungsmethoden dienen der Identifizierung möglicher Arzneistoffmetabolite, um die Anzahl der im Arzneimittelgesetz geforderten Biotransformationsuntersuchungen auf ein Minimum zu reduzieren. Biologische Untersuchungen an isolierten perfundierten Organen, kultivierten Zellen oder isolierten Enzymen sowie chemische Modellsysteme spielten hierbei eine Rolle [1].

Biomimetische Modellsysteme können in der Regel die Bildung der Metabolite nicht voraussagen. Gründe sind die prinzipiellen Unterschiede von Enzymen und chemischen Katalysatoren, insbesondere im Hinblick auf Substratbindung, Induktion und Hemmung. Allerdings können derartige Modellsysteme erste Hinweise auf reaktive Zentren des zu untersuchenden Substrats, sowie Aussagen über dessen Oxidierbarkeit liefern und erste potentielle Metabolite aufzeigen.

Die Durchführung biomimetischer Modellreaktionen ist des Weiteren durch wenige Arbeitsschritte gekennzeichnet. Die synthetisierten Proben erfordern keine aufwendigen Aufreinigungsschritte vor der Analytik, wie dies in biologischem Material der Fall ist. Durch die Möglichkeit unphysiologische Substratkonzentrationen einzusetzen, die Reaktivität beeinflussende Parameter zu steuern, sowie variable Konzentrationen an sauerstoffliefernden Äquivalenten zu verwenden, können höhere Produktmengen erzielt werden. Die auf diese Art gewonnenen Metabolite können im Folgenden zu Vergleichszwecken z.B. für *in vivo*-Reaktionen

herangezogen werden oder zur Strukturaufklärung bis dahin unbekannter Metabolite dienen [1].

Der Nutzen biomimetischer Modellsysteme im Hinblick auf die Imitationsfähigkeit Cytochrom P450-abhängiger Monooxygenasereaktionen und die Aufklärung der Katalysezyklen wurde vielseitig belegt [14, 15]. Im Folgenden sollen einige Reaktionen von Cytochrom P450-imitierenden Modellsystemen, sowie deren pharmazeutisch interessanten Substrate schematisch dargestellt werden.

Nicotin

Nicotin (1) als suchterzeugender Inhaltsstoff des Tabaks sowie als Arzneimittel begleitend zur Raucherentwöhnung eingesetzt, wurde in biomimetischen Modellsystemen als Substrat verwendet. Continin (2) und 3'-Hydroxycontinin (3) stellen die Hauptmetabolite im menschlichen Organismus dar [16].

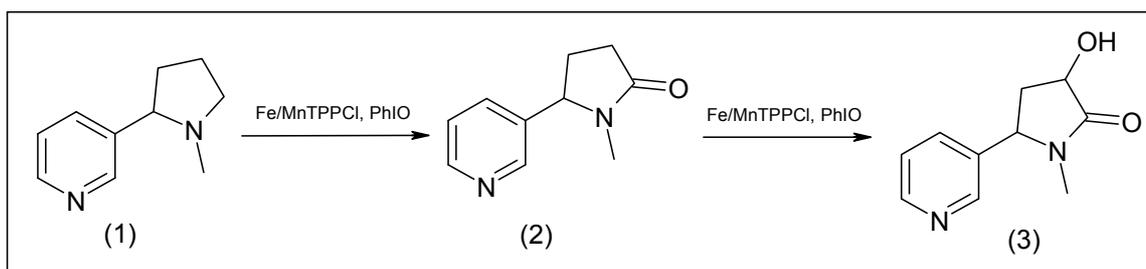


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Umsetzung von Nicotin im Modellsystem nach Chauncey und Ninomiya

Chauncey und Ninomiya setzten Nicotin mit Fe/MnTPPCL (Tetraphenylporphyrinato- Fe(III)/Mn(III) chlorid) als Cytochrom P450-imitierende Einheit und Iodosobenzol (PhIO) als Sauerstoffdonator um [17]. Unter Verwendung von FeTPPCL/PhIO konnte fast ausschließlich Continin nachgewiesen werden. Unter Einsatz von MnTPPCL/PhIO konnte die Ausbeute sogar gesteigert werden. 3'-Hydroxycontinin wurde erst in größeren Mengen durch eine Umsetzung von Continin (2) mit demselben Modellsystemen gebildet (siehe Abb. 1.5).

Tiagabin

Tiagabin gehört zur Gruppe der antiepileptisch wirkenden Arzneistoffe. Durch Hemmung der Wiederaufnahme von GABA (γ -Aminobuttersäure) in

die Glia- und Nervenzellen wird ihre erregungshemmende Wirkung verstärkt [18]. Tiagabin wird *in vivo* zum 5-Hydroxytiagabin biotransformiert.

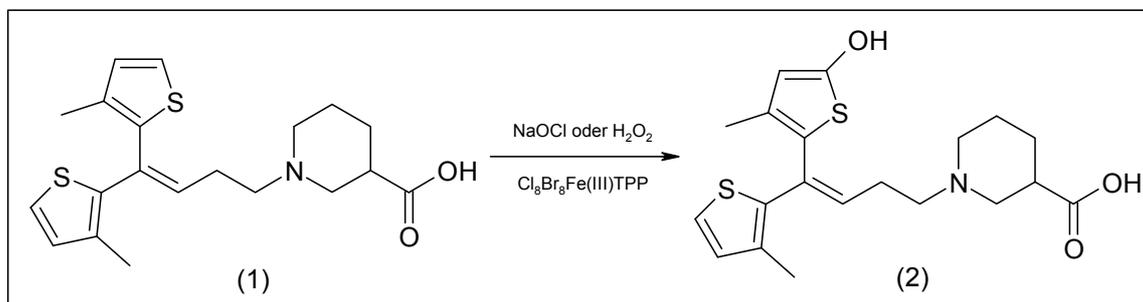


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Umsetzung von Tiagabin im Modellsystem zu 5-Hydroxytiagabin

Die Umsetzung von Tiagabin (1) mit NaOCl oder einer 30%igen Wasserstoffperoxidlösung als Sauerstoffdonatoren in einem biphasischen System unter Einfluss von $\text{Cl}_8\text{Br}_8\text{Fe(III)TPP}$ (5,10,15,20-Tetrakis-(2,6-dichlorophenyl)-octabromo-porphyrinato-Fe(III) chlorid) als Katalysator erzielte eine Ausbeute von 5-Hydroxytiagabin (2) von bis zu 74% (siehe Abb. 1.6) [19].

Aminophenazon

Aminophenazon (1) spielt *in vivo* eine Rolle zur Überprüfung der Funktionalität des Lebermetabolismus insbesondere bei Erkrankungen wie Leberzirrhose, chronischer Hepatitis und hepatozellulärem Karzinom. Als Hauptmetabolite im menschlichen Organismus wurden N-Formylaminophenazon (2), das einfach demethylierte Produkt 4-(Methylamino)-1,2-dihydro-1,5-dimethyl-2-phenyl-3H-pyrazol-3-on, sowie das zweifach demethylierte Produkt des Aminophenazons (3) detektiert.

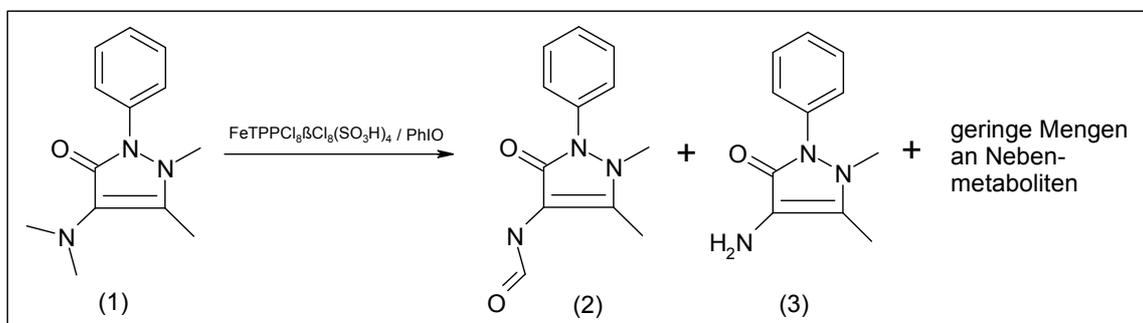


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der Umsetzung von Aminophenazon im Modellsystem und der resultierenden Metabolite

Weiterhin wird das am Stickstoff zweifach demethylierte Produkt im menschlichen Organismus an selbigem zusätzlich acetyliert [20, 21]. Als Hauptmetabolit des Aminophenazons im Modellsystem in einem Acetonitril-Wassergemisch unter Verwendung von PhIO als Sauerstoffdonator und einem 5,10,15,20-Tetrakis-(2,6-dichlorophenyl-3-sulfatophenyl)-octachloroporphyrinato-Fe(III) chlorid als Katalysator wurden das zweifach demethylierte Produkt (3) mit einer Ausbeute von bis zu 53% und das formylierte Produkt (2) mit bis zu 17% detektiert (siehe Abb. 1.7). Bei den Nebenprodukten handelte es sich um aliphatische und aromatische Hydroxylierungsprodukte sowie ein N-oxidiertes Produkt [22]. Durch dieses Modellsystem konnte neben der Hydroxylierung auch eine Demethylierung nachgewiesen werden, wobei diese das Hauptprodukt darstellte.

Carbamazepin

Modellstudien zur Erzeugung von Epoxiden an olefinischen Doppelbindungen wurden vielfältig durchgeführt [23]. Als prominentes Beispiel sei hier das Carbamazepin erwähnt, dessen Metabolismus ausführlich untersucht wurde [24, 25]. Hauptmetabolit im menschlichen Organismus ist das *trans*-Carbamazepin-diol, welches durch Hydrolyse des Carbamazepin-10,11-epoxids entsteht [26]. Das Epoxid wurde ebenfalls im Harn und Plasma nachgewiesen, was auf eine hohe Stabilität des Strukturtyps hinwies. Als weitere Metabolite traten ringhydroxylierte Produkte und durch Umlagerung entstandene Acridinderivate auf [27].

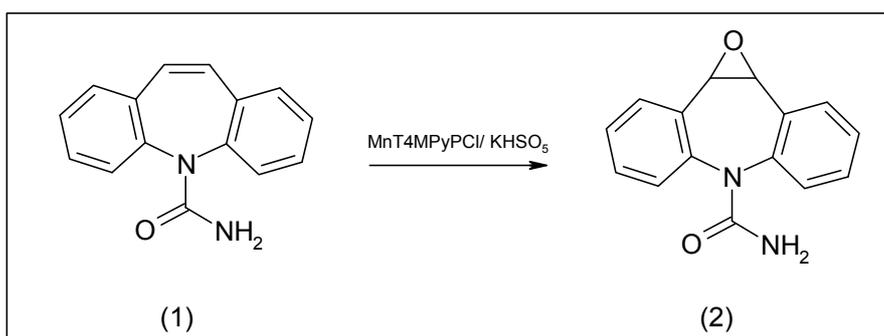


Abb. 1.8: Schematische Darstellung der Epoxidbildung aus Carbamazepin im Modellsystem nach Meunier

Im Modellsystem konnten Meunier und Mitarbeiter eine Umsetzung von Carbamazepin (1) mit 5,10,15,20-Tetrakis-(N-methyl-4-pyridyl)-porphyrinato-Mn(III) pentachlorid als Katalysator und KHSO₅ als Sauerstoff-

donator in wässrigem Medium zum Epoxid mit einer Ausbeute bis zu 80% erreichen (siehe Abb. 1.8) [28].

Die dargestellten Modellsysteme zeigen die Vielfalt der möglichen Reaktionen. In dieser Arbeit lag der Fokus auf Oxygenierungsreaktionen, wie der oxidativen Desalkylierung, der Hydroxylierung und der Bildung von Carbonylverbindungen. Die Oxygenierung wurde dabei als Inkorporation von einem Sauerstoffatom in ein Substrat verstanden, während die Oxidation eine Elektronenabgabe bedeutete.

1.3 Metalloporphyrine

Metalloporphyrine sind als Cytochrom P450-imitierende Einheit in Modellsystemen Analoga der prosthetischen Gruppe von Häm enthaltenden Enzymen. Strukturell weisen sie einen dem Protoporphyrin IX ähnlichen makrozyklischen Liganden auf, und als Zentralatom werden neben dem Eisen auch andere Übergangsmetallionen, wie Mangan-, Chrom-, Zink-, Ruthenium-, Cobalt- und Osmiumionen, eingesetzt.

Chemisch lassen sich drei verschiedene Substitutionsmuster bei der Porphyrinsynthese erreichen, die in Abb. 1.9 schematische dargestellt sind.

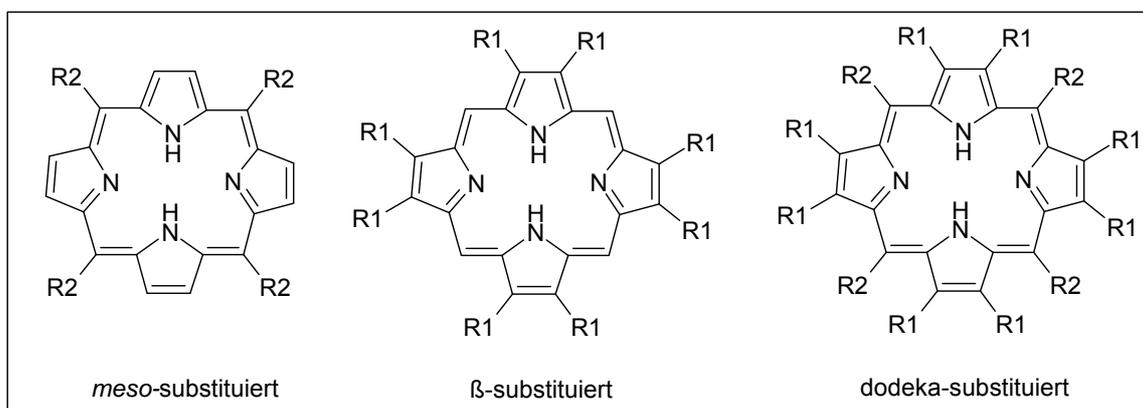


Abb. 1.9: Darstellung der verschiedenen Substitutionsmuster bei Metalloporphyrinen

Anhand ihres Substitutionsmusters und ihrer Weiterentwicklung über die Zeit zur Verwendung in biomimetischen Modellsystemen wurden die Metalloporphyrine weiterhin in Generationen eingeteilt [23]. Zu Metalloporphyrinen der ersten Generation gehören unterschiedlich metallierte *meso*-phenylsubstituierte Porphyrine [29], während die Protonen der Phenylsubstituenten in *meso*-Position bei Porphyrinen der zweiten

Generation bereits durch elektronenziehende Substituenten oder Alkylgruppen ersetzt wurden. Gründe für die Modifizierungen an Porphyrinen der ersten Generation waren unter anderem die geringe Stabilität gegenüber oxidativen Einflüssen der Reaktionsmedien sowie die Bildung von μ -oxo-Dimeren, auf dessen Eigenschaften in Kapitel 2.4 näher eingegangen wird. Weiterhin konnte durch Einführung von elektronenziehenden Substituenten, wie Halogen in die Phenylringe, die Elektrophilie der Metall-oxo-einheit gesteigert werden [30, 31].

Die dritte Generation ist durch zusätzliche Substituenten an den β -Positionen der Pyrroleinheiten gekennzeichnet. Durch elektronenziehende Substituenten sollten die, durch die zweite Generation bereits erreichten Verbesserungen, weiter gesteigert werden [32]. Allerdings waren die Katalysatoren der 2. Generation bei Einsatz in Modellsystemen den Katalysatoren der 3. Generation teilweise überlegen [33]. Hydroxylierungen einfacher Alkane katalysiert durch Eisen(III)-Porphyrine der 2. Generation lieferten hinsichtlich der Gesamtausbeute bessere Ergebnisse als ihre Vertreter der dritten Generation [34]. Für Mangan(III)-porphyrine erzielten die Katalysatoren der 3. Generation höhere Produktausbeuten, allerdings unter verminderter Regioselektivität [35].

In dieser Arbeit wurden Porphyrine der zweiten Generation eingesetzt, wobei zwei Gruppen unterschiedlicher Eigenschaften ausgewählt wurden. Bei der ersten Gruppe handelte es sich um perfluorierte Metalloporphyrine 5,10,15,20-Tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)-porphyrinato-Mangan(III)chlorid (MnTFPPCl; 1a) sowie 5,10,15,20-Tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)-porphyrinato-Eisen(III)chlorid (FeTFPPCl; 1b). Die zweite Gruppe wurde durch die kationischen Metalloporphyrine 5,10,15,20-Tetrakis-(*N*-methyl-4-pyridyl)-porphyrinato-Mangan(III)pentachlorid (MnT4MPyPCl; 2a) und 5,10,15,20-Tetrakis-(*N*-methyl-4-pyridyl)-porphyrinato-Eisen(III)pentachlorid (FeT4MPyPCl; 2b) repräsentiert. Diese *meso*-substituierten Metalloporphyrine sind in Abb. 1.10 dargestellt.

Während die perfluorierten Porphyrine gut in organischen Lösungsmitteln löslich sind, zeigen die kationischen auch eine gute Löslichkeit in wässrigem Medium.

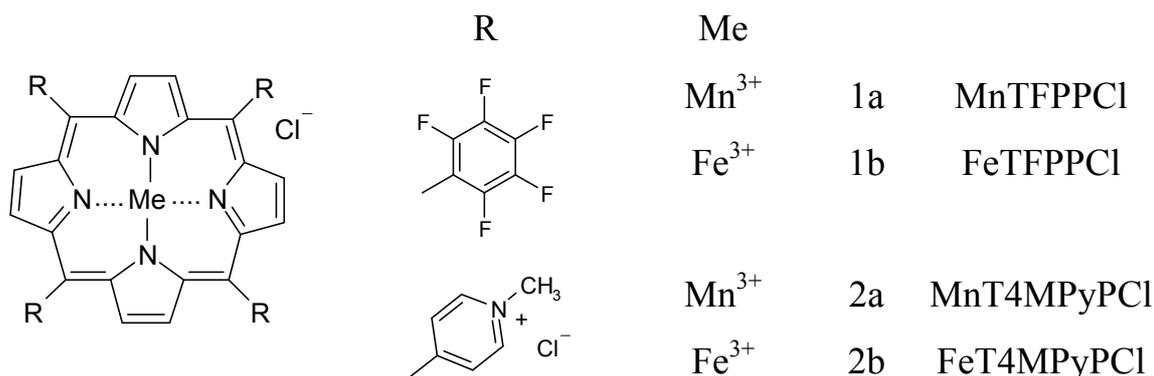


Abb. 1.10: Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Metalloporphyrine der 2. Generation

Neben den in der Literatur häufig verwendeten eisenhaltigen Porphyrinen, aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu den biologischen Häm enthaltenden Oxygenasen [23], konnten mit manganhaltigen Porphyrinen teilweise sogar höhere Ausbeuten erzielt werden [36, 37]. So zeigte sich $MnTFPPCl$ als effektiver Katalysator für Desalkylierungsreaktionen [36] und $MnT4MPyCl$ wurde u. a. als leistungsfähiger Katalysator für die Hydroxylierung von Alkanen beschrieben [38].

1.4 Sauerstoffdonatoren und Cokatalysatoren

Eine wichtige Rolle in biomimetischen Modellsystemen spielt neben dem Katalysator der sogenannte Sauerstoffdonator.

Cytochrom P450-Enzyme verwenden, wie in Kapitel 1.1 beschrieben, molekularen Sauerstoff als Sauerstoffquelle. Die Verwendung von molekularem Sauerstoff im Modellsystem in Gegenwart eines reduzierenden Agens war jedoch schwierig, da dieses mit dem Substrat um das aktive Oxidans konkurrierte [39]. Als reduzierende Agenzien fungierten beispielsweise Zink [40] oder 1,4-Dihydropyridine [41]. Aufgrund der genannten Problematik wurden häufig Sauerstoffdonatoren eingesetzt, die die reduktive Aktivierung von molekularem Sauerstoff durch den ebenfalls in Kapitel 1.1 benannten Peroxid-Shunt in Gegenwart eines Katalysators umgingen.

Zum Einsatz kamen u.a. Sauerstoffdonatoren, die nur mit einem Sauerstoffatom zur reaktiven Spezies führten, wie PhIO, Hypochlorite und N-Oxide, als auch Peroxoverbindungen, die eine vorherige Spaltung der O-

O-Bindung erforderlich machten. Diese Bindungsspaltung konnte sowohl homolytisch als auch heterolytisch erfolgen.

Die Art der O-O-Bindungsspaltung ist von vielen Faktoren abhängig, unter anderem vom Lösungsmittel. In Dichlormethan und Methanol konnten vermehrt heterolytische Bindungsspaltungen (siehe Abb. 1.11, (A)) von Persäuren durch Eisenporphyrinkomplexe beobachtet werden, wobei ein kationisches Eisen(IV)-oxo-porphyrinradikal als Intermediat auftrat. Homolytische Bindungsspaltungen (siehe Abb. 1.11, (B)) bei Peroxoverbindungen wurden dagegen in wässrigen Lösungen und aprotischen Lösungsmitteln beschrieben. Durch eine derartige Bindungsspaltung resultierten unerwünschte Hydroxyl- und Alkoxyradikale [42].

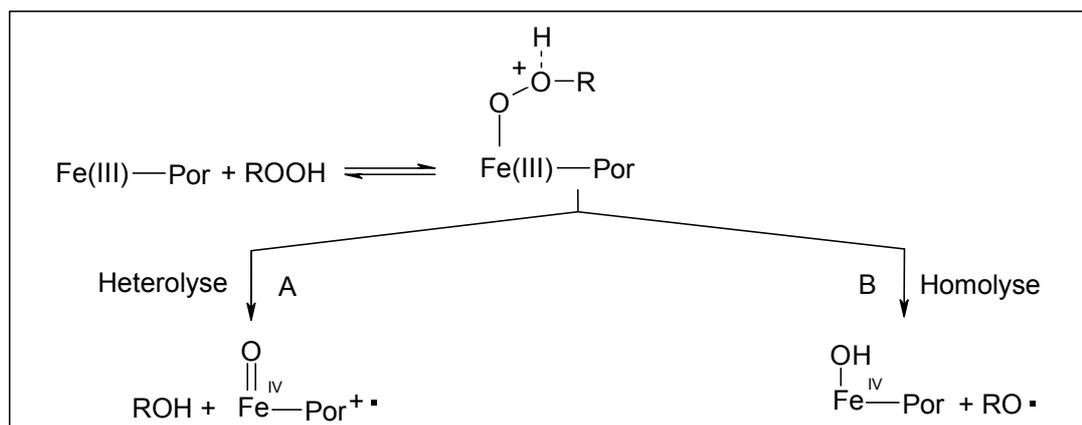


Abb. 1.11: Darstellung der heterolytischen und homolytischen O-O-Bindungsspaltung von Persäuren und Hydroperoxiden

Des Weiteren wurden im Zusammenhang der O-O-Bindungsspaltung, neben pH-Wert-Einflüssen, auch Abhängigkeiten zum Substitutionsmuster der verwendeten Porphyrine gefunden. So zeigten *Nam* und Mitarbeiter, dass Porphyrine mit elektronegativeren Substituenten einen hohen Prozentsatz an Heterolyse erreichen. Ebenso zeigten Lösungen mit niedrigeren pH-Werten eine höhere Tendenz zu heterolytisch gebildeten Produkten [43]. Allerdings dürfen die beiden Prozesse der Homo- und Heterolyse nicht getrennt voneinander betrachtet werden. *Taylor* und Mitarbeiter konnten zeigen, dass auch nach erfolgter Heterolyse der O-O-Bindung Alkoxyradikale durch noch nicht umgesetzte Alkylperoxide mit der reaktiven Eisen-oxo-spezies gebildet werden konnten (siehe Abb. 1.12) [44].

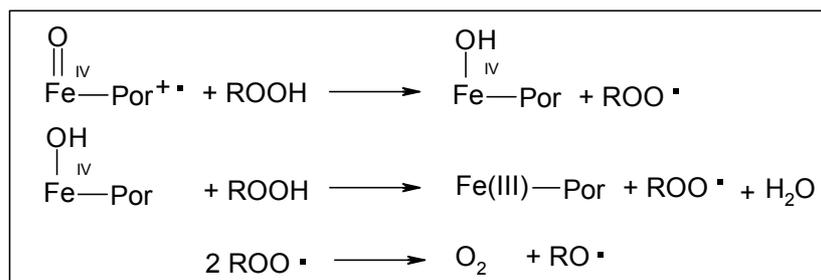


Abb. 1.12: Bildung von Alkoxyradikalen aus Alkylperoxiden durch reaktive Eisen-oxo-spezies

Als weiterer wichtiger Einflussparameter der O-O-Bindungsspaltung ist der Zusatz von Cokatalysatoren zu nennen. Cokatalysatoren sollen in biomimetischen Modellsystemen den im natürlichen Cytochrom P450 vorkommenden Thiolatliganden imitieren.

Im Folgenden werden die Sauerstoffdonatoren und Cokatalysatoren vorgestellt, die in dieser Arbeit Verwendung fanden.

1.4.1 Iodosobenzol

Iodosobenzol wird mittels alkalischer Hydrolyse aus Iodosobenzoldiacetat gewonnen [45]. Als hypervalente Iodverbindung disproportioniert die instabile Iodverbindung langsam bei Raumtemperatur und schneller durch Erhitzen in Gegenwart von Wasser zu Iodbenzol und Iodylbenzol [46]. Unter Aufnahme von zwei Elektronen kann die Verbindung als starkes Oxidationsmittel leicht Sauerstoff abgeben. Hierbei entsteht wiederum Iodbenzol (siehe Abb. 1.13).

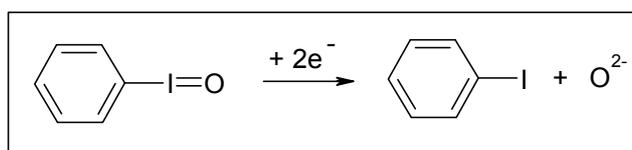


Abb. 1.13: Reaktion von Iodosobenzol zu Iodbenzol unter Aufnahme von zwei Elektronen

Iodosobenzol wurde in biomimetischen Modellsystemen unter Verwendung eisen- und manganhaltiger Porphyrinkatalysatoren vielseitig bei Hydroxylierungs-, Epoxidierungs- und Desalkylierungsreaktionen eingesetzt [23]. Als aktives Intermediat wurde in derartigen Reaktionen die Metall-oxo-spezies diskutiert [47] (siehe Abb. 1.14).

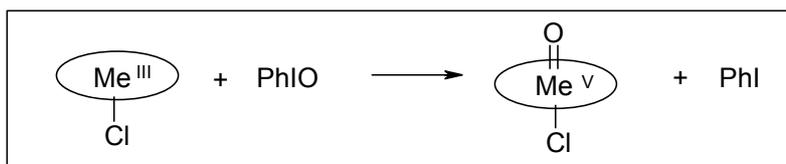


Abb. 1.14: Darstellung der Metallo-oxo-spezies eines Metalloporphyrins unter Einfluss von PhIO

Für den Mechanismus der Hydroxylierung eines Substrates wurde von *Meunier* die vorherige Abstraktion eines Wasserstoffatoms durch die Metallo-oxo-spezies postuliert [47]. Eine rasche Rekombination des organischen Substratradikals mit dem Metall-(IV)-OH-Komplex sollte anschließend zum hydroxylierten Produkt führen (siehe Abb. 1.15).

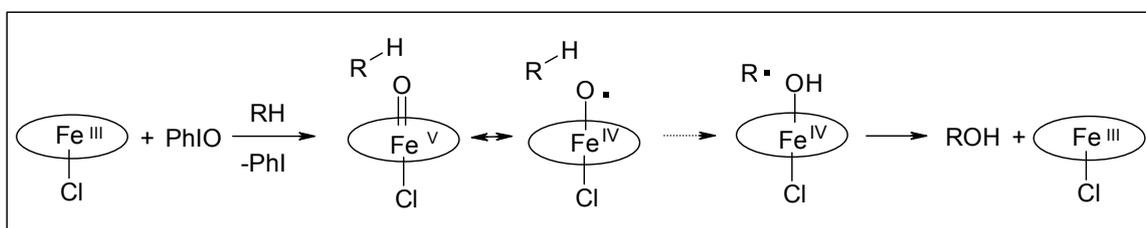


Abb. 1.15: Von *Meunier* und Mitarbeitern postulierter „Rebound-Mechanismus“ der Hydroxylierung eines Substrates mit einem eisenhaltigen Porphyrin

Biomimetische Untersuchungen zu O-, N- und allgemeinen Dealkylierungsreaktionen sind ebenfalls durchgeführt worden. *Smith* und Mitarbeiter verglichen kinetische Isotopeneffekte für die oxidative Demethylierung von Anisol in Lebermikrosomen und an einem Modellsystem, bestehend aus einem Eisenporphyrin-Iodosobenzol-system [48]. Aufgrund der ähnlichen Isotopeneffekte wurde für das Eisenporphyrinmodell der gleiche Mechanismus wie für das Lebermikrosomenmodell angenommen. Die Hydroxylierung der Methylgruppe stellte hierbei den essentiellen Schritt für die Demethylierung dar (siehe Abb. 1.16).

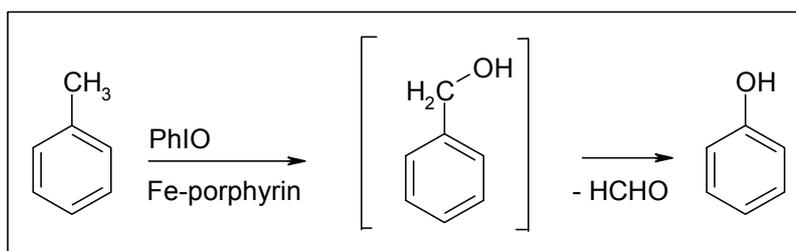


Abb. 1.16: Von *Smith* postulierter Mechanismus der oxidativen Demethylierung von Anisol

In einer weiterführenden Studie setzten *Smith* und Mitarbeiter für die oxidative Demethylierung von N,N-Dimethylbenzylamin eisen- und manganhaltige Porphyrine in Kombination mit Iodosobenzol als Sauerstoffdonator ein [49]. *Smith* postulierte zunächst die initiale Abspaltung eines Elektrons an N, N-Dimethylbenzylamin unter Bildung des Ammoniumradikals, dessen anschließende Wasserstoffatomabstraktion zu der hydroxylgruppen-übertragenden Porphyrinspezies führte. Diese sollte im Folgenden die Hydroxylgruppe auf das N, N-Dimethylbenzylaminradikal unter Ausbildung eines N, O-Halbacetal übertragen, welches als instabiles Intermediat unter Formaldehydaustritt das einfach demethylierte Produkt N-Methylbenzylamin generierte.

1.4.2 *m*-Chloroperoxybenzoesäure

Die *m*-Chloroperoxybenzoesäure (*m*-CPBA) ist ein effizienter Sauerstoffdonator, der häufig zur Generierung des hochvalenten Eisen-oxo-porphyrinkomplex eingesetzt wurde [23]. *Groves* und *Watanabe* beschrieben die Bildung eines Acylperoxy-eisen(III)-porphyrinkomplex durch Zusatz von *m*-CPBA zu einem eisenhaltigen Porphyrin (Abb. 1.17 (1)) [50]. Eine heterolytische O-O-Bindungsspaltung des Komplexes im Anschluss ist essentiell für die Generierung der aktiven Spezies. Ob es allerdings zu einer heterolytischen oder homolytischen Spaltung der O-O-Bindung kommt, ist unter anderem, wie bereits erwähnt, lösungsmittelabhängig. Die heterolytische Bindungsspaltung führte zu der reaktiven Eisen-oxo-spezies (Abb. 1.17 (2)), während die Homolyse das inaktive Eisen(III)-porphyrin-N-oxid (Abb. 1.17 (3)) generierte.

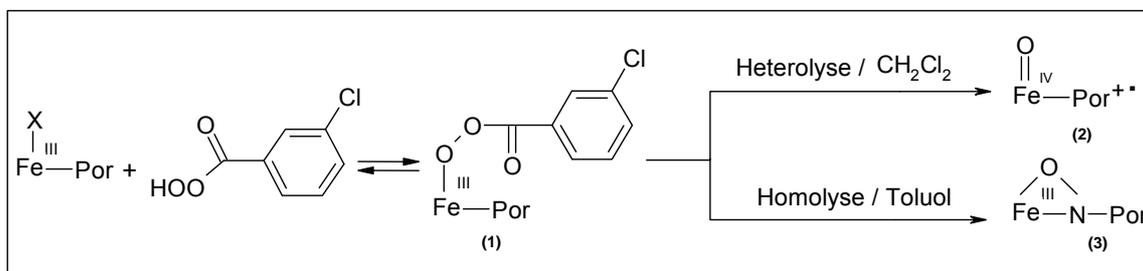


Abb. 1.17: O-O-Bindungsspaltung nach erfolgter Reaktion mit *m*-CPBA zum Acylperoxy-eisen(III)-porphyrin nach *Watanabe* und Mitarbeitern

Nach den Untersuchungen von *Watanabe* ist eine heterolytische Bindungsspaltung in Dichlormethan bevorzugt, während in Toluol der homolytische Weg vermehrt beobachtet wurde [51].

Die Bildung eines Acylperoxy-mangan(III)-porphyrin unter Zusatz von *m*-CPBA konnte ebenfalls nachgewiesen werden [52].

1.4.3 Magnesiummonoperoxyphthalat

Magnesiummonoperoxyphthalat ist das Salz einer milden Peroxycarbonsäure. Als Sauerstoffdonator in Modellsystemen wurde es vielfältig eingesetzt. So konnten Hydroxylierungen gesättigter Kohlenwasserstoffe [53], sowie Epoxidierungen von Alkenen unter Manganporphyrinkatalyse [54] erzielt werden. Die Bildung von Chinonen aus Benzen und Alkylbenzenen unter Katalyse von eisenhaltigen Porphyrinen konnte ebenfalls mit Magnesiummonoperoxyphthalat nachgewiesen werden [55].

1.4.4 Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid wurde aufgrund seiner umweltfreundlichen Zerfallsprodukte Wasser und Sauerstoff gern als Sauerstoffdonator eingesetzt. Allerdings wurde Wasserstoffperoxid im Zusammenhang mit Übergangsmetallkatalysierten Reaktionen kontrovers diskutiert [23]. Eine homolytische Bindungsspaltung des Wasserstoffperoxids in Fenton-ähnlichen Reaktionen generiert Hydroxylradikale. In Folge dessen würden unselektive Additionsreaktionen des Hydroxylradikals an aromatischen Strukturen stattfinden, dessen Produkte wiederum mit molekularem Sauerstoff reagieren [56]. In biomimetischen Modellsystemen ist dagegen eine heterolytische O-O-Bindungsspaltung gewünscht, die zu der selektiven Oxygenierung befähigter Metall-oxo-spezies führt.

Meunier und Mitarbeiter beschrieben die, in Abb. 1.18 dargestellten, möglichen Aktivierungswege von Wasserstoffperoxid durch Metalloporphyrine [57].

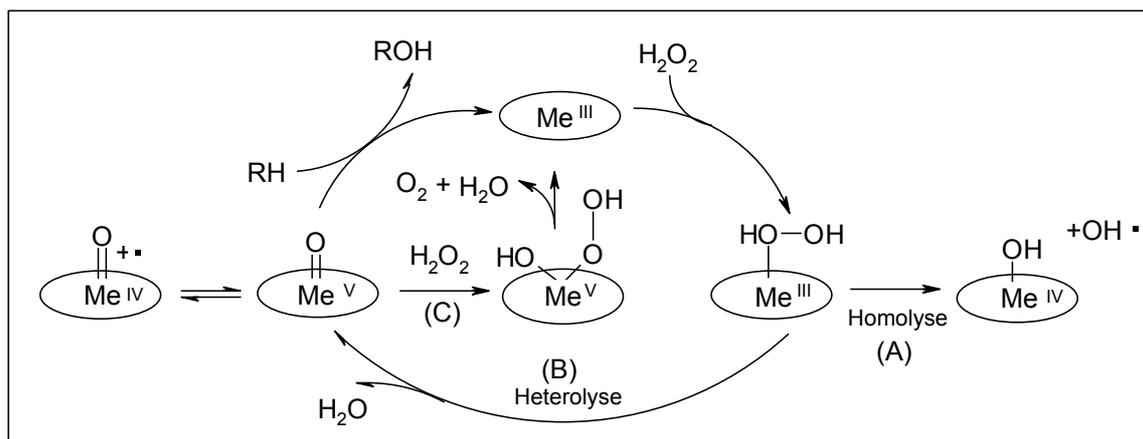


Abb. 1.18: Darstellung der möglichen Aktivierungswege von Wasserstoffperoxid durch Metalloporphyrine nach Meunier und Mitarbeiter

Neben der erwünschten Heterolyse (B) tritt nicht nur die ungewollte Homolyse (A) zu freien Hydroxylradikalen auf, sondern auch ein dem Katalasezyklus ähnlicher Weg (C). Dieser wird durch Anlagerung eines zweiten Wasserstoffperoxidmoleküls an den aktivierten Metall-oxo-komplex erreicht. Als Produkt des Weges (C) entstehen Wasser und molekularer Sauerstoff.

1.4.5 Imidazol

Eine heterolytische Bindungsspaltung von Wasserstoffperoxid kann durch die Verwendung von Cokatalysatoren gefördert werden. Bei derartigen Cokatalysatoren handelt es sich um Stickstoffbasen, wie Imidazol oder Pyridin, die man dem Reaktionsansatz zusetzt. Häufiger wird jedoch Imidazol in Kombination mit Wasserstoffperoxid eingesetzt [57], da Pyridin in solchen Modellsystemen ein kompetitives Substrat darstellt und zum N-Oxid umgewandelt werden kann [58]. Im Modellsystem übernehmen die Cokatalysatoren mehrere Aufgaben. Auf der einen Seite fungieren sie als fünfter axialer Ligand und erhöhen so die Elektronendichte am Zentralatom [59], andererseits agieren sie als Säure-Base-Katalysator und erleichtern den Austritt von Wasser und die Bildung der aktiven Metall-oxo-spezies [60]. Beide Mechanismen fördern auf diese Weise die heterolytische Bindungsspaltung, wie es in Abb. 1.19 für die Oxygenierungsreaktion von Kohlenwasserstoffen unter Anwendung von Manganporphyrinen postuliert wurde.

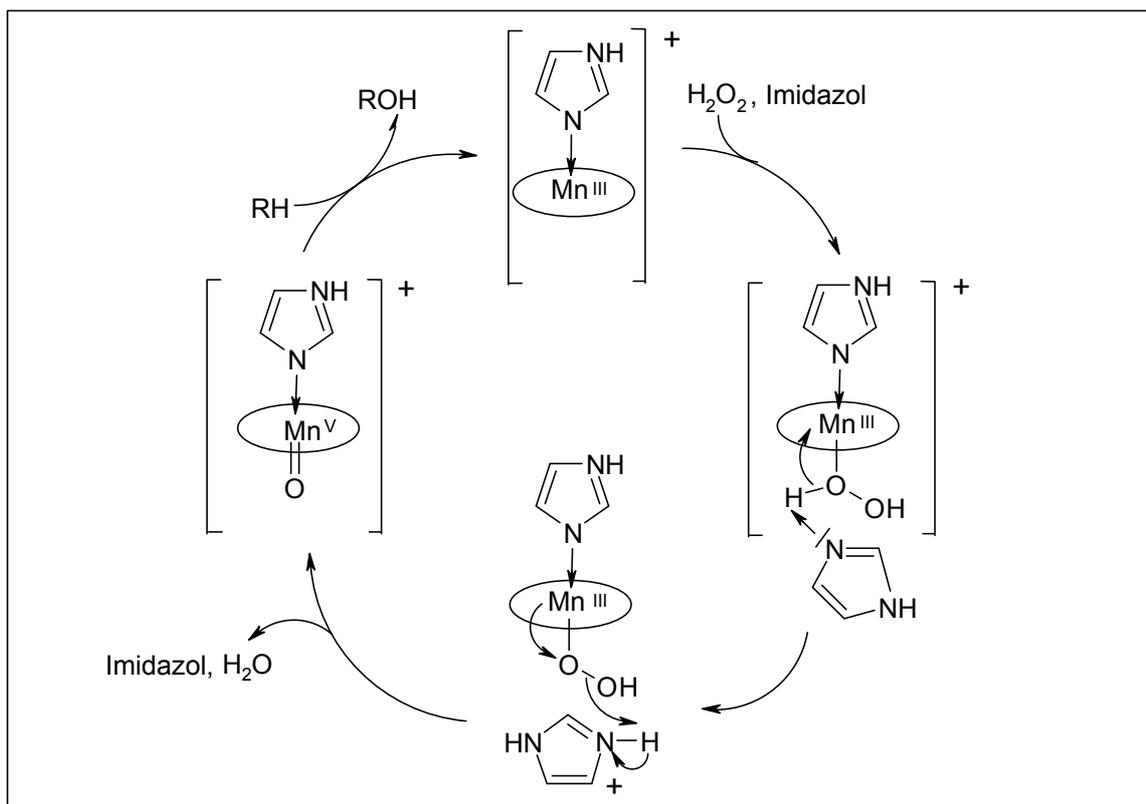


Abb. 1.19: Darstellung der verschiedenen katalytischen Einflüsse von Imidazol auf die Bindungsspaltung bei der Oxygenierung von Kohlenwasserstoffen mit Manganporphyrinen nach Battioni und Mitarbeiter [38]

1.5 Mikrowellensynthese

In dieser Arbeit sollte neben der konventionellen Energieübertragung durch Wärme der Nutzen von Mikrowellenenergie im Modellsystem, im Hinblick auf einen ausbeutenerhöhenden Effekt, diskutiert werden.

1.5.1 Mikrowellen

Mikrowellen sind elektromagnetische Strahlen und weisen eine Wellenlänge von 1 mm bis 1 m auf (siehe Abb. 1.20). Die Frequenzen der Mikrowellen liegen bei 300 MHz bis 300 GHz. In diesem Bereich wird die molekulare Struktur nicht beeinflusst. Allerdings kommt es bei einer Wechselwirkung mit dem Molekül zu Rotationen [61].

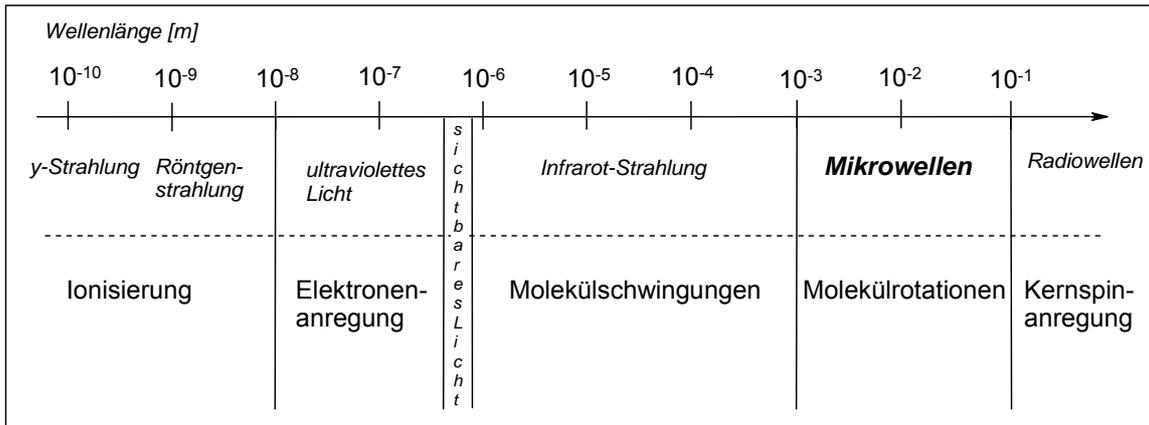


Abb. 1.20: Spektrum der elektromagnetischen Strahlung

Die Mikrowellenenergie wird durch ein elektrisches und ein magnetisches Feld erzeugt (siehe Abb. 1.21). Die Stärke des elektrischen Feldes wird durch die elektrische Feldstärke E und die des magnetischen Feldes durch die magnetische Feldstärke B dargestellt. Die beiden Felder sind bei freier Ausbreitung phasengleich und zueinander rechtwinklig. Beim Erhitzen einer Substanz wird allerdings nur Energie des elektrischen Feldes übertragen.

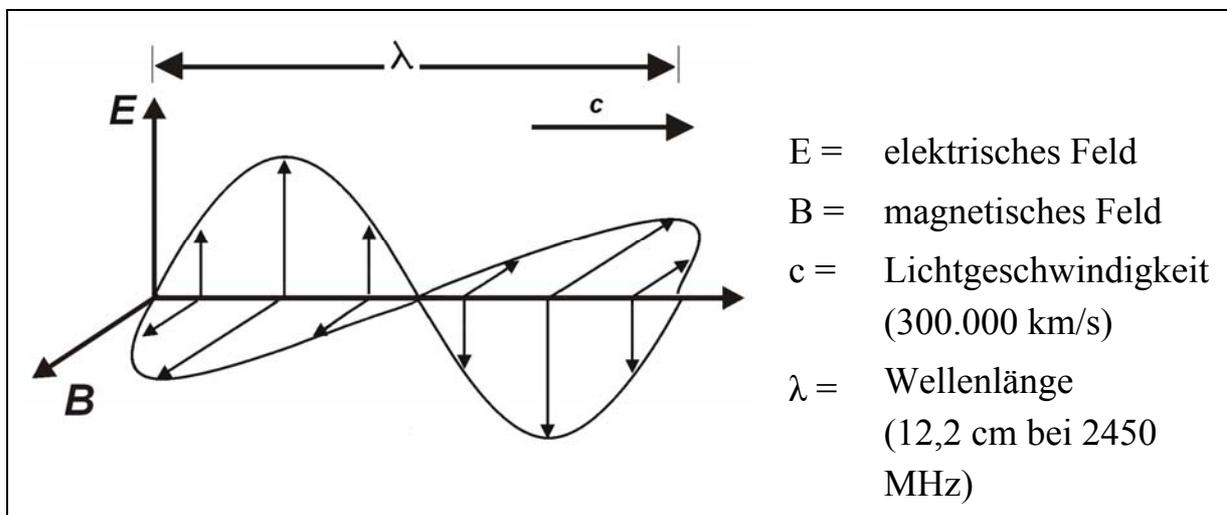


Abb. 1.21: Darstellung einer Mikrowelle

Mikrowellen bewegen sich mit Lichtgeschwindigkeit vorwärts. Die Energie eines Mikrowellenphotons (0,159 kJ/mol) ist, im Gegensatz zu der Energie die zum Bruch einer Molekülbindung (335-502 kJ/mol) benötigt wird, als gering einzustufen. Aufgrund dessen wird die Mikrowellenenergie die Struktur von Molekülen nicht beeinflussen [61].

1.5.2 Dielektrisches Heizen

Im Gegensatz zur Wärmeübertragung durch konvektives Heizen über eine externe Heizquelle übernimmt bei der Energieübertragung durch Mikrowellen das sogenannte dielektrische Heizen eine besondere Rolle. Während des konvektiven Heizens wird die Wärme von außen nach innen transportiert. Die Aufheizgeschwindigkeit ist somit unter anderem von der Wärmeleitfähigkeit des Behältermaterials abhängig. Des Weiteren kann konvektives Heizen schlecht gesteuert werden. Bei Kühlungsabsicht muss die externe Heizquelle physikalisch entfernt und aktiv gekühlt werden, um eine Temperatursenkung der Reaktionsmischung zu erreichen.

Mikrowellen hingegen koppeln direkt mit allen kopplungsfähigen Molekülen im Reaktionsmedium. Wie gut ein Molekül mit Mikrowellenenergie interagiert, hängt im Gegensatz zum konvektiven Heizen von seinen dielektrischen Eigenschaften ab. Die Kopplung mit Mikrowellenstrahlung resultiert in einem schnellen Temperaturanstieg und ist unabhängig von der Wärmeleitfähigkeit des Behältermaterials. Die für Mikrowellen meist transparenten Gefäße aus Quarzglas und Teflon werden erst durch das Aufheizen des Reaktionsmediums erwärmt. Dieser hierdurch erzeugte Temperaturgradient ist dem des konvektiven Heizens entgegengesetzt. Des Weiteren erfolgt nach Abschalten der Mikrowellenbestrahlung kein Energieeintrag mehr und es verbleibt nur latente Hitze im Reaktionsansatz [61].

Generell werden zwei Parameter beschrieben, die für das dielektrische Aufheizen eines Mediums durch Mikrowellenstrahlung verantwortlich sind. Zum Einen handelt es sich um die Dipolrotation und zum Anderen um die ionische Leitfähigkeit. Polare Moleküle versuchen sich an das alternierende elektrische Feld der Mikrowelle anzupassen. Durch den stetigen Versuch der Moleküle sich im Feld zu orientieren, kommt es zu Dipolrotationen und Energie wird in Form von Wärme durch molekulare Reibung frei. Die ionische Leitfähigkeit basiert auf einem ähnlichen Mechanismus. Sind in einem Reaktionsmedium freie Ionen anwesend, bewirkt das wechselnde elektrische Feld Ionenbewegungen. Ionen generieren auf diese Weise schnellere Temperaturanstiege als Dipole. Dieses Phänomen kann ausgenutzt werden, wenn ein Lösungsmittel schlecht mit Mikrowellenenergie koppelt und

dennoch eine schnelle Aufheizung des Mediums gefordert ist. Verwendung finden meist ionische Flüssigkeiten [62]. Das Verhalten von unterschiedlichen Lösungsmitteln unter Mikrowellenbestrahlung und deren dielektrischen Eigenschaften, sowie der hieraus resultierende Effekt auf eine Reaktion werden in Kapitel 2.7 näher beschrieben.

1.5.3 Reaktionsgeschwindigkeit

Der Einfluss von Mikrowellenenergie auf die Reaktionsgeschwindigkeit kann anhand der Arrheniusgleichung dargestellt werden (siehe Abb. 1.22).

$k = A \times e^{\frac{-E_a}{RT}}$	$k =$ Geschwindigkeitskonstante
	$E_a =$ Aktivierungsenergie [J/mol]
	$R =$ ideale Gaskonstante [8,314 J/K x mol]
	$T =$ absolute Temperatur [K]
	$A =$ Frequenzfaktor

Abb. 1.22: Arrhenius-Gleichung

Somit ist die Geschwindigkeitskonstante von zwei Hauptfaktoren, den Termen A und $e^{-E_a/RT}$ abhängig. A beschreibt eine Konstante, die für die jeweilige Reaktion charakteristisch ist und die Kollisionsfrequenz zwischen Molekülen beschreibt. Dieser Faktor ist allerdings bisher als Einflussparameter durch Mikrowellenenergie in der Literatur umstritten und wird in selbiger als non-thermaler oder spezieller Mikrowelleneffekt kontrovers diskutiert [63, 64].

Unter speziellen Mikrowelleneffekten werden Effekte beschrieben, die durch konvektives Heizen nicht zu reproduzieren sind. Trotzdem ist eine Zuordnung zu den thermischen Effekten möglich. In der Literatur wird an dieser Stelle u.a. das *superheating* beschrieben. *Superheating* ist die Fähigkeit von Lösungsmitteln unter Mikrowellenbestrahlung über ihren Siedepunkt erhitzt zu werden [65].

Von einem non-thermalen Effekt spricht man, wenn eine Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit oder eine höhere Produktausbeute nicht mit einer Temperaturerhöhung erklärt werden kann [66, 67]. Als Gründe werden Wechselwirkungen mit dem elektrischen Feld diskutiert. So könnten Reaktionsmechanismen mit polaren Übergangszuständen im wechselnden

elektromagnetischen Feld stabilisiert werden. Eine Reaktionsbeschleunigung wäre die Folge. Weiterhin könnte der Frequenzfaktor A durch die Orientierung von dipolaren Molekülen verändert werden [63].

Als ubiquitär anerkannter Einflussfaktor auf die Geschwindigkeitskonstante durch Mikrowellenbestrahlung wird der zweite Term ($e^{-E_a/RT}$) der Arrheniusgleichung in der Literatur beschrieben.

Anhand dieser Gleichung wird deutlich, dass die Geschwindigkeitskonstante k sich mit der Temperatur ändert. Aufgrund der exponentiellen Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k von der Temperatur T kann eine kleine Änderung von T bereits eine relativ große Veränderung von k und somit der Reaktionsgeschwindigkeit bewirken.

Nach Arrhenius kann demzufolge eine Temperaturerhöhung in einer Erhöhung der Geschwindigkeitskonstanten resultieren. Moleküle bewegen sich schneller und bewirken somit eine Erhöhung der Kollisionenwahrscheinlichkeit, was unter anderem in kürzerer Zeit zu höheren Ausbeuten in Synthesereaktionen führen kann [61]. Dieser Einfluss der Temperatursteigerung, hervorgerufen durch die Kopplung von Molekülen mit Mikrowellenenergie, wird in der Literatur als thermaler Effekt beschrieben [63, 64]. Die Aktivierungsenergie bleibt bei mikrowellenbeeinflussten Reaktionen jedoch konstant und wird nicht verändert.

1.5.4 Zusammenhang von Mikrowellensynthese und biomimetischem Modellsystem hinsichtlich der Reaktionsgeschwindigkeit

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, werden diverse Parameter diskutiert, die eine Reaktionsbeschleunigung ohne Beeinflussung der Aktivierungsenergie durch Mikrowellenenergie ermöglichen. Wie in Kapitel 1.3 erwähnt, finden in dieser Arbeit niedermolekulare Metallkomplexe als Cytochrom P450-imitierende Einheit Einsatz, die als Katalysator in den biomimetischen Reaktionen fungieren. Im Allgemeinen senken Katalysatoren die Aktivierungsenergie, wodurch eine erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit resultiert [68]. Beide Komponenten, die Mikrowelle und der Katalysator, beeinflussen demnach die Reaktionsgeschwindigkeit. Dies geschieht allerdings auf unterschiedliche

Weise. Durch die Kombination aus Katalysator und Mikrowelle sollen additive Effekte in biomimetischen Modellsystemen gegenüber der Kombination aus konventionellem Erhitzen und Katalysator, hinsichtlich einer Ausbeutensteigerung untersucht werden.

1.5.5 Mikrowellengeräte

Derzeit sind Multimode- und Singlemode-Reaktoren kommerziell erhältlich. Multimode-Geräte ähneln im Aufbau der gängigen Haushaltsmikrowelle. Vorteil dieser Bauweise ist die Möglichkeit des Einsatzes großer Probenmengen. Nachteilig ist die geringe Leistungsdichte durch den großen Innenraum sowie die inhomogene Verteilung der Mikrowellenstrahlung. Hierdurch ist reproduzierbares Arbeiten nicht möglich. Singlemode-Geräte produzieren dagegen ein homogenes Energiefeld mit hoher Leistungsdichte, das sehr gut reproduzierbar ist.

Die Mikrowellenstrahlung wird mit Hilfe eines Magnetrons erzeugt. Das Magnetron erzeugt eine stehende Welle innerhalb eines Wellenleiters. Die in dieser Arbeit verwendeten Synthesemikrowelle Discover™ der Firma CEM (siehe Abb. 1.23) nutzt das Prinzip eines zirkulärer Wellenleiters, der die Strahlung durch Schlitze in einem kreisförmigen Wellenleiter an die mittig positionierte Probenkavität abgibt[61].



Abb. 1.23: Synthesemikrowelle Discover™ und ein 10 mL Druckvial aus Quarzglas der Firma CEM, Kamp-Lintfort, Deutschland

Ein softwaregesteuertes Magnetron ermöglicht das Erreichen von exakten Temperaturen sowie das Einhalten einer definierten Temperatur über einen längeren Zeitraum. Des Weiteren existieren Sensoren, die den Druck am

Probengefäß messen, und somit ebenfalls als steuerbare und überprüfbare Medien während der Reaktion dienen.

Während dieser Arbeit fanden als Probenbehältnisse 10-mL Druckvials Verwendung, die mit selbstabdichtenden Septen verschlossen wurden.

2 Entwicklung biomimetischer Modellsysteme für Diazepam

2.1 Einleitung und Literaturübersicht

2.1.1 Diazepam

Pharmakokinetik

Diazepam gehört zur Gruppe der 1,4-Benzodiazepine. Die meisten Wirkungen der Benzodiazepine sind an die Anwesenheit endogener γ -Aminobuttersäure (GABA), einem inhibitorischen Neurotransmitter, gebunden. Benzodiazepine reagieren mit einer spezifischen Bindungsstelle an der α -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors, wodurch eine allosterische Veränderung des Rezeptors erfolgt. Freigesetzte GABA kann infolge dessen den GABA_A-Rezeptor, der einen Chloridkanal darstellt, effektiver stimulieren. Die Folge ist eine Zunahme der Offenwahrscheinlichkeit der Chloridkanäle und somit eine verstärkte Hemmung der Zelle. Der Hauptwirkort der Benzodiazepine befindet sich im limbischen System[9]. Die sedierende und anxiolytische Wirkung des Diazepams kann zur Behandlung von Angst- und psychischen Spannungszuständen genutzt werden. Weiterhin wird es als Muskelrelaxans und gegen die Entzugssymptome bei Alkoholabhängigkeit verwendet. Als Therapeutikum der 1. Wahl wird es heutzutage zur Behandlung des Status epilepticus eingesetzt [69].

Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik von Diazepam ist vielen interindividuellen Schwankungen unterworfen. Die Elimination ist unter anderem vom Grad der Plasmaproteinbindung, der Einnahmedauer, dem Alter des Patienten und seiner Leberfunktion abhängig. Demnach ist die Eliminationshalbwertszeit bei Älteren, Neugeborenen und Leberkranken verlängert. Bei Langzeiteinnahme kommt es zu Akkumulationen des aktiven N-demethylierten Metaboliten. Diazepam erreicht nach einmaliger oraler Gabe

den höchsten Plasmaspiegel nach 30-90 min. Aufgrund seiner hohen Lipophilie überwindet es die Blut-Hirnschranke. Die Plasmaeiweißbindung liegt bei 96-99% [70].

Der Metabolismus von Diazepam beim Menschen wurde von *Schwartz* und Mitarbeitern aufgeklärt [71].

Wie in Abb. 2.24 gezeigt, wird Diazepam (1) in einer Phase-I-Reaktion zu einem N1-demethylierten Produkt, dem Nordazepam (2) und einem C3-hydroxylierten Metaboliten, dem Temazepam (3), biotransformiert. Die Bildung des Nordazepams stellt den Hauptabbauweg im Menschen dar [70-72]. Oxazepam (4), ein weiterer Metabolit des Diazepams, wird entweder über eine C3-Hydroxylierung des Nordazepams oder eine N1-Demethylierung des Temazepams gebildet. Alle drei Abbauprodukte sind wirksame Metabolite.

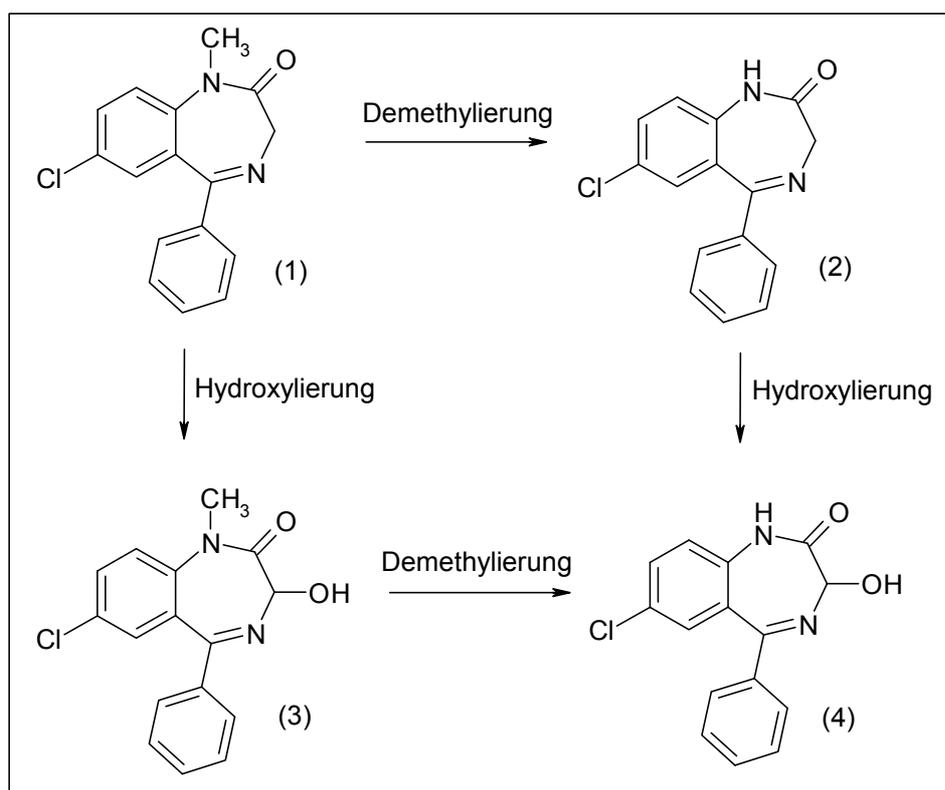


Abb. 2.24: Von Schwartz und Mitarbeitern beschriebene Metabolisierungswege des Diazepams

Die Eliminationshalbwertszeiten liegen für Diazepam bei 24 - 48 Stunden, während Nordazepam eine wesentlich längere Halbwertszeit von 51 - 120 Stunden aufweist [70]. Temazepam und Oxazepam werden nur in geringen Mengen im Plasma gefunden. Ihre Plasmahalbwertszeiten von 5 - 8 Stunden

für Temazepam und 10 - 12 Stunden für Oxazepam sind wesentlich kürzer [73]. In einer Phase-II-Reaktion werden die Metabolite glucuronidiert. Die glucuronidierten Formen stellen den Hauptanteil der im Urin exkretierten Metabolite dar. Hierbei fanden sowohl *Arnold* [74] als auch *Chiba* und Mitarbeiter [75] heraus, dass konjugiertes Temazepam nach 72 und 96 Stunden das Hauptexkretionsprodukt war. Der hohe Anteil an Nordazepam im Plasma ist somit leicht erklärbar. Temazepam und Oxazepam werden schneller glucuronidiert und infolge dessen exkretiert als Nordazepam.

2.1.2 Modellsysteme

Zur Aufklärung des Metabolismus von Diazepam fanden neben den *in vivo* Untersuchungen ebenfalls *in vitro*-Modellsysteme Anwendung. Neben biologischen Untersuchungen an isolierten perfundierten Organen [76] wurden vielfältig kultivierte Zellen eingesetzt. Anwendung fanden intakte Hepatozyten, deren Gewinnung einen aufwendigen Prozess darstellt, allerdings die cytosolischen Enzyme der Phase-II-Reaktion bei derartigen Modellen intakt bleiben [77]. Weiterhin wurden Untersuchungen an Lebermikrosomen durchgeführt. Sie können dagegen nur zur Evaluierung der Phase-I- Reaktionen eingesetzt werden [78, 79]. Ebenso wurden isolierte Enzyme oder c-DNA exprimierte P450 Cytochrome zur Aufklärung der am Metabolismus beteiligten Enzyme herangezogen [80, 81].

In der Literatur divergieren die experimentellen Daten zu den Mengen an gebildeten Metaboliten zwischen *in vivo* und *in vitro*-Untersuchungen teilweise stark. Während in der Literatur das Nordazepam als Hauptmetabolit *in vivo* beschrieben wurde [70, 71], fand man die Bildung der C3-hydroxylierten Form Temazepam als Hauptabbauweg *in vitro* [76]. *Yasumori* und Mitarbeiter entdeckten einen Zusammenhang zwischen dem Verhältnis aus Temazepam/Nordazepambildung und der Substratkonzentration. Die Verwendung von therapeutischen Dosen resultierte in gleichen Mengen der Metabolite gemäß den *in vivo* Untersuchungen, während bei 10-facher Dosis der genannte Überschuss an Temazepam resultierte.

Im Allgemeinen kann gesagt werden, dass *in vitro*-Modelle in erster Linie der Aufklärung von Kinetiken und Identifizierungen der Cytochrom P450-

Isoformen dienen, die an der Bildung der Diazepammetabolite beteiligt sind. Allerdings wird anhand der unterschiedlichen Verfahren und teilweise uneinheitlichen Ergebnissen deutlich, wie viele Einflussfaktoren den Metabolismus bestimmen. Eine einheitliche Aussage ist aufgrund individueller Eigenschaften der Zellen nicht möglich.

Chemische Modellsysteme sind gegenüber den *in vitro*-Methoden, wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, durch eine verminderte Komplexität und eine leichtere Handhabbarkeit gekennzeichnet. Sie dienen weiterhin dazu erste Aussagen hinsichtlich der Reaktivität eines Xenobiotikums treffen zu können. *Bernardelli* und Mitarbeiter untersuchten Diazepam im Modellsystem unter Verwendung von nicht-immobilisierten Porphyrinen. Die dargestellten Ergebnisse bestätigten die Fähigkeit des dort beschriebenen Modellsystems aus Diazepam mit manganhaltigem perfluorierten Porphyrin in Trifluortoluol unter Zusatz von PhIO sowie H_2O_2 die Metabolite Nordazepam, Temazepam und Oxazepam zu erzeugen. Der Sauerstoffdonator wurde während dieser Untersuchungen in Intervallen hinzugefügt [82].

2.1.3 Zielsetzung

Auf Grundlage der Untersuchungen von *Bernardelli* sollte in dieser Arbeit ebenfalls ein Modellsystem etabliert werden, dass die Fähigkeit besitzt unter Einsatz von Diazepam die drei Hauptmetabolite Nordazepam, Temazepam und Oxazepam zu bilden. Eine systematische Untersuchung der Einflüsse der Einzelkomponenten auf die Effektivität und Stabilität des Modellsystems stellte hierbei die Hauptaufgabe dar.

Infolge dessen wurden zunächst die Eigenschaften des Katalysators diskutiert. Die Rolle des Zentralatoms und der Liganden der verwendeten Metalloporphyrine sowie deren Stabilitäten unter Reaktionsbedingungen wurden untersucht. Neuere Entwicklungen führten zu an Trägermaterial gebundenen Katalysatoren [83]. Aus dem Blickwinkel der Recyclingfähigkeit stellt eine Immobilisierung der Porphyrine eine attraktive Methode neben dem Einsatz der löslichen Porphyrine dar. Der Einfluss einer derartigen Immobilisierung auf die Reaktivität des Katalysators im

Modellsystem sollte durch den Vergleich von immobilisierter und nicht-immobilisierter Form diskutiert werden.

Aus den gleichen Gründen war der Einsatz von Sauerstoffdonatoren mit möglichst geringem Gefährdungspotential für die Umwelt gewünscht. Der Vergleich diverser Sauerstoffdonatoren im Modellsystem, der Zusatz eines Cokatalysators sowie die Evaluierung diverser Lösungsmittel sollten zur Optimierung des Systems dienen.

Ferner sollte ein Modellsystem für Diazepam gefunden werden, welches unter den durchgeführten Bedingungen die höchsten Ausbeuten an Metaboliten lieferte. Neben der konventionellen Energieübertragung durch Wärme sollte in dieser Arbeit der Nutzen von Mikrowellenenergie im Modellsystem, im Hinblick auf einen ausbeutenerhöhenden Effekt, diskutiert werden. Durch den Vergleich von Mikrowelle und Schüttelapparatur bei Raumtemperatur sollten non-thermale Mikrowelleneffekte untersucht werden, während der Vergleich bei Siedetemperatur des verwendeten Lösungsmittels die Diskussionsgrundlage zu speziellen Mikrowelleneffekten bot.

Die Etablierung eines Systems zur Gewinnung isolierbarer Mengen an Oxazepam, Temazepam und Nordazepam sollte das Kapitel der Entwicklung biomimetischer Modellsysteme für Diazepam beschliessen.

Am Ende galt es die erlangten Erkenntnisse über die Modellsysteme für Diazepam auf andere Strukturen mit ähnlichem Grundkörper anzuwenden, um eventuelle Gesetzmäßigkeiten diskutieren zu können. Außerdem sollte die Übertragbarkeit auf ein grundsätzlich anderes Grundgerüst überprüft werden, um das Transferpotential der in dieser Arbeit etablierten Modellsysteme bewerten zu können.

2.2 Analytik

Für die Analytik von Diazepam und die zu erwartenden Metabolite Oxazepam, Temazepam und Nordazepam wurde eine isokratische HPLC-Methode entwickelt. Die Analyten konnten auf einer RP-18-Säule mit einem Elutionsmittelgemisch von Methanol/0,05 M Natriumacetatpuffer (41/59)

getrennt (Abb. 2.25) und mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 230 nm detektiert werden.

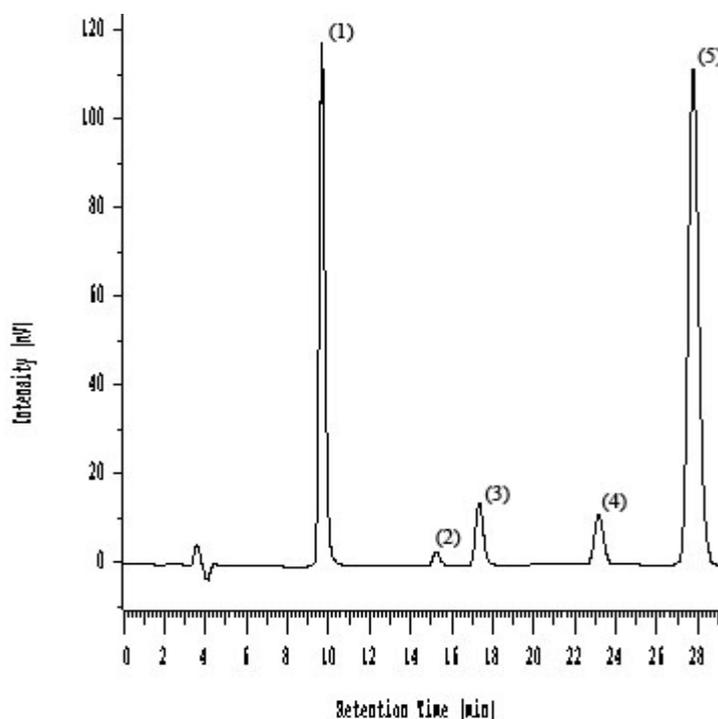


Abb. 2.25: Chromatogramm für Diazepam-N-oxid (1), Oxazepam (2), Temazepam (3), Nordazepam (4) und Diazepam (5)

Für Diazepam und seine Metabolite standen Referenzsubstanzen zur Verfügung. Die Identität der Referenzsubstanzen wurde gemäß Ph.Eur. 5.0 bestätigt. Des Weiteren konnte mit dieser Methode ein zunächst unbekanntes Produkt identifiziert und anschließend gleichfalls selektiv quantifiziert werden. Die eingesetzten Sauerstoffdonatoren *m*-CPBA, PhIO, MMPP und deren reduzierte Formen sowie der Cokatalysator Imidazol störten die spezifische Erfassung der Analyten nicht.

Zum Schutz der HPLC-Säule durch oxidative Einflüsse der Sauerstoffdonatoren, die vor der Analyse nicht abgetrennt werden konnten, wurden die Proben 1:100 verdünnt. Aufgrund dessen bewegten sich die Analysenergebnisse zum Teil nah an der Erfassungsgrenze der Methode. Peakflächen unterhalb der Erfassungsgrenze wurden nicht berücksichtigt und erscheinen infolge dessen auch nicht in den Diagrammen.

2.3 Validierung

2.3.1 Allgemeines

Als Grundlage für aussagekräftige Ergebnisse hinsichtlich der Überprüfung und Etablierung von biomimetischen Modellsystemen für Diazepam sollte eine geeignete HPLC-Methode entwickelt werden. Durch eine Validierung wurde sichergestellt, dass die Methode in Bezug auf Quantifizierung und Identifizierung zuverlässige und verwertbare Ergebnisse liefert.

Der Begriff der Validierung wurde von der ICH 1994 wie folgt definiert: „*The objective of validation of an analytical procedure is to demonstrate that it is suitable for its intended purpose.*“ In diesem Sinne wurden im Folgenden die üblichen Parameter einer Methodvalidierung an einen für diese Arbeit sinnvollen Rahmen angepasst und überprüft.

2.3.2 Linearität

Zur Bestimmung der Linearität für Diazepam und seiner Metabolite wurden für diese Substanzen Lösungen in mindestens sechs Konzentrationsniveaus aus der gleichen Anzahl unabhängiger Einwaagen hergestellt und jeweils dreimal vermessen. Die Proben wurden vor der Injektion membranfiltriert und nach AV 5 (siehe Kapitel 6.2.10) mit Acetonitril (ACN) verdünnt.

Die Regressionsanalyse erfolgte unter Zuhilfenahme des Programms Dintest®, dessen Berechnungen auf den Grundlagen der DIN 32645 beruhen.

Für alle Kalibrierkurven (siehe Kapitel 6.2.1) ergab die Regressionsanalyse eine lineare Regression als optimales Modell. Als Akzeptanzkriterium für das optimale Regressionsmodell wurde unter anderem der Mandel-Test nach DIN 38402 herangezogen. Eine Normalverteilung der Messergebnisse konnte ebenfalls für alle ermittelten Kurven bestätigt werden und es traten keine Trends der Residuen auf. Experimentell bedingte Abweichungen von der berechneten Regressionsgerade konnten demnach als zufällig interpretiert werden.

Als Maß für die Streuung der Residuen wurde die Reststandardabweichung berechnet, die wiederum als Grundlage für die Ermittlung der

Verfahrensstandardabweichung diene. Während diese die Leistungsfähigkeit einer Methode beschreibt, kann die relative Verfahrensstandardabweichung zum Vergleich zweier unterschiedlicher Methoden herangezogen werden, vorausgesetzt die Messwerte beziehen sich auf gleiche Konzentrationen.

Der berechnete Korrelationskoeffizient war bis auf eine Ausnahme für alle Kurven $\geq 0,999$. Das mathematisch ermittelte Modell wurde demnach gut an die experimentell generierten Daten angepasst. Vermutlich hing der geringere Korrelationskoeffizient von 0,9956 für die Bestimmung von Oxazepam mit der niedrigen Konzentration im Bestimmungsbereich zusammen. Es wurden hier Signale bei Konzentrationen gemessen, die teilweise unter einem μmol pro Liter lagen.

Die zum Nachweis der Linearität ermittelten Kurven wurden im Folgenden zur quantitativen Auswertung der Analyseergebnisse herangezogen.

2.3.3 Wiederholpräzision

Die Präzision als Maß für die Streuung von Analyseergebnissen sollte an dieser Stelle unter Wiederholbedingungen nach DIN 51848 ermittelt werden.

Die Wiederholpräzision wurde nicht für alle in dieser Arbeit untersuchten Bedingungen und Sauerstoffdonatoren sowie Katalysatoren durchgeführt, da diese Schritte bereits zur Entwicklung des biomimetischen Modellsystems gehörten. An dieser Stelle sollte nur die analytische Methode zur Bestimmung der entstandenen Reaktionsprodukte mit vorheriger Aufarbeitung validiert werden. Um eventuell auftretende Matrixeinflüsse beurteilen zu können, wurde eine reale Probe stellvertretend für alle weiteren Modelloptionen eingesetzt.

Messpräzision:

Zur Ermittlung der Streuung, die durch das Analysensystem selbst verursacht wird, wurde eine reale Probe untersucht. Die nach AV 5 (siehe Kapitel 6.2.10) hergestellte Probe mit *m*-CPBA als Sauerstoffdonator und einer Reaktionszeit von 10 min bei 82°C unter Schüttelbedingungen wurde membranfiltriert, mit Acetonitril verdünnt und sechs Mal vermessen. Den

Variationskoeffizient der Reaktionsprodukte wurde über über die Peakflächen bestimmt (vergleiche 6.2.1).

Tabelle 2.1: Ergebnisse der Messpräzision

	Oxazepam	Temazepam	Nordazepam	Diazepam	Diazepam-N-oxid
<i>VK [%]</i>	0,62	0,85	0,73	0,49	0,70

Der Variationskoeffizient für die Messpräzision entsprach dem für eine HPLC-Analytik angestrebten Wert von unter einem Prozent. Somit konnte von einem weitestgehend präzise arbeitenden Instrument ausgegangen werden.

Methodenpräzision:

Um Schwankungen zu ermitteln, die durch die gesamte Methode verursacht werden, wurde ebenfalls eine reale Probe verwendet. Die Probe wurde ebenfalls nach AV 5 (siehe Kapitel 6.2.10) mit *m*-CPBA als Sauerstoffdonator hergestellt und unter Schüttelbedingungen 10 min bei 82°C zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde der Probe sechsmal anteilig ein Volumen von 150µl entnommen und dieses jeweils membranfiltriert. Ein Aliquot des Filtrats wurde anschließend mit Acetonitril verdünnt und in sechs unabhängigen Gefäßen analysiert (siehe Experimenteller Teil 6.2.1).

Tabelle 2.2: Ergebnisse der Methodenpräzision

	Oxazepam	Temazepam	Nordazepam	Diazepam	Diazepam-N-oxid
<i>VK [%]</i>	2,08	2,21	2,26	2,01	1,50

Die Variationskoeffizienten der Methodenpräzision waren höher als die Variationskoeffizienten der Messpräzision. Gründe für die stärkere Streuung der Ergebnisse lagen einerseits in der zusätzlichen Membranfiltration und an zwei weiteren Verdünnungsschritten.

Die Forderungen an die Methodenpräzision in der pharmazeutischen Industrie liegen bei 1-2%, so dass die Variationskoeffizienten dieser Methode akzeptabel waren. Auf der anderen Seite liegen die Anteile an Oxazepam, Temazepam und Nordazepam im Reaktionsansatz zum größten Teil unter 20% im Verhältnis zum 100%-Wert für Diazepam, sodass ein höherer Variationskoeffizient als 2% durchaus gerechtfertigt war. Die Werte der Messreihen beider Präzisionsarten sind normalverteilt, die Residuen zeigten keinen Trend und der Dixon-Test liefert keine Hinweise auf Ausreisser.

2.3.4 Wiederfindung und Richtigkeit

Zur Bestimmung der Wiederfindung stand kein zertifiziertes Referenzmaterial zur Verfügung. Aufgrund dessen wurden Aufstockungsexperimente mit den jeweiligen Kalibriersubstanzen durchgeführt. Die Aufstockungsexperimente erfolgten auf Grundlage einer realen Probe. Hierbei handelte es sich erneut um eine Probe mit *m*-CPBA als Sauerstoffdonator und 10-minütiger Reaktionszeit bei 82°C unter Schüttelbedingungen. Dieser Probe wurde anschließend eine bekannte Menge an Kalibriersubstanz zugesetzt. Als Kalibriersubstanzen dienten die zu erwarteten Metabolite Oxazepam, Temazepam, Nordazepam, Diazepam-N-oxid sowie das Substrat Diazepam. Es wird empfohlen, die Wiederfindungsexperimente in fünf Konzentrationsniveaus durchzuführen, wobei die Einhaltung des Linearitätsbereiches Voraussetzung ist[84]. Insgesamt wurden pro Konzentrationsniveau und Kalibriersubstanz drei Lösungen hergestellt, die sämtliche Schritte der Methode durchliefen.

Lösung 1: zu V1 mL Probelösung wurden V2 mL Kalibrierlösung gegeben;
es wurde Signal S1 erhalten

Lösung 2: zu V1 mL Probelösung wurden V2 mL Lösungsmittel gegeben;
es wurde Signal S2 erhalten

Lösung 3: zu V1 mL Lösungsmittel wurden V2 mL Kalibrierlösung
gegeben; es wurde Signal S3 erhalten

Die Wiederfindungsrate W errechnet sich wie folgt: $W = \frac{(S1-S2)}{S3} \times 100$

Die Ergebnisse zur Bestimmung der Wiederfindungsrate sind in Tabelle 2.3 dargestellt. Die zudosierten Konzentrationen der jeweiligen Konzentrationsniveaus können dem Experimentellen Teil in Kapitel 6.2.1 entnommen werden.

Tabelle 2.3: Ergebnisse der Wiederfindungsexperimenten [%]

Konzentrationsniveau	Oxazepam	Temazepam	Nordazepam	Diazepam	Diazepam-N-oxid
1	102,72	97,26	104,11	103,29	100,17
2	100,87	97,39	103,89	102,42	100,92
3	101,50	102,45	103,70	101,14	99,29
4	103,35	102,35	102,14	102,68	100,59
5	97,80	104,19	98,34	103,25	100,94

Die Wiederfindung konnte insgesamt als gut eingestuft werden. Allgemein kann eine kleinere Wiederfindung akzeptiert werden, wenn der gemessene Wert die Differenz aus 100 und dem vierfachen Variationskoeffizient der Methodenpräzision nicht unterschreitet [84].

Richtigkeit

Die Richtigkeit wurde mangels zertifizierter Referenzsubstanzen über Wiederfindungsexperimente bestimmt. Hierzu wurde pro zu bestimmender Substanz eine Kurve aufgenommen, die nur die zudosierten Konzentrationen der Kalibriersubstanz zeigten. Anschließend bestimmte man die Aufstockkurve, die aus den ermittelten Werten der realen Probe bestand und den jeweils zudosierten Konzentrationen der Kalibriersubstanz. Wenn nun bewiesen werden konnte, dass die bei den untersuchten Konzentrationsniveaus aufgenommene Kurve der Kalibriersubstanzen eine Funktion der entsprechenden Aufstockkurve war, konnte man davon ausgehen, dass der ermittelte Wert richtig war.

Zur Überprüfung wurden aufgrund dessen ein Varianz-F-Test der Reststandardabweichungen und ein Mittelwert-t-Test der Steigungen von Aufstock- und Kalibrierkurve durchgeführt. Dem Prozess vorausgegangen war die Durchführung der linearen Regression mit Hilfe des Programms Dintest®, wodurch die benötigten Parameter zur Berechnung des Varianz-F-Tests und des Mittelwert- t-Test, wie folgt, bestimmt wurden:

$$F = \frac{Rs_1^2}{Rs_2^2} \quad ,wobei Rs_1 > Rs_2; Rs = Reststandardabweichung$$

$$t = \frac{|\bar{x} - \mu|}{s} \sqrt{n}$$

\bar{x} = Steigung der Aufstockkurve
 μ = Steigung der Kalibrierkurve
 s = Reststandardabweichung der Aufstockkurve
 n = Anzahl der Messwerte

Anschließend wurden die errechneten Parameter mit den tabellierten Werten der F-Tabelle und der t-Tabelle verglichen. Für Oxazepam, Temazepam, Nordazepam, Diazepam und das Diazepam-N-oxid waren die Varianzen der Aufstock- und Kalibrierfunktion mit einer Wahrscheinlichkeit von 99% homogen. Der Mittelwert- t-Test ergab im Anschluss mit einer Wahrscheinlichkeit von 99%, dass die Steigungen der Kalibrierkurven für die oben genannten Verbindungen innerhalb des Vertrauensbereiches der Steigungen ihrer Aufstockkurve lagen. Somit konnte mit angegebener Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass die Methode richtig arbeitete. Die Ergebnisse wurden im Experimentellen Teil (vergleiche 6.2.1) dargestellt.

2.3.5 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen für Oxazepam, Temazepam, Nordazepam, Diazepam und Diazepam-N-oxid wurden nach DIN 32645 berechnet. Die Ergebnisse befinden sich im Experimentellen Teil (vergleiche 6.2.1)

2.3.6 Selektivität und Spezifität

Zur Bestimmung der Selektivität wurden die Kalibriersubstanzen einzeln und in Kombination in den zu erwartenden Verhältnissen eingewogen und mit der zu validierenden Methode vermessen. Des Weiteren wurden zur Bestimmung der Spezifität die Sauerstoffdonatoren *m*-CPBA, MMPP, PhIO, H₂O₂ und Imidazol jeweils in den im Modellsystem verwendeten Konzentrationen einzeln und in Kombination mit allen Kalibriersubstanzen eingewogen und vermessen. Erwartungsgemäß veränderte das Versetzen der Kalibriersubstanzen mit H₂O₂ das Ausgangschromatogramm der Kalibriersubstanzen nicht, da Wasserstoffperoxid keine UV-Aktivität besitzt. MMPP, PhIO und Imidazol störten die Identifizierung der zu untersuchenden Verbindungen und somit die Selektivität ebenfalls nicht. Ferner wurden die deoxygenierten Formen der Sauerstoffdonatoren, die nach der Reaktion im Modellsystem als Produktpeak im Chromatogramm erscheinen konnten, untersucht. Bei PhIO handelte es sich um das Produkt Iodbenzol, bei MMPP Phthalsäure und bei *m*-CPBA Chlorbenzoesäure. Die Analyse erfolgte ebenfalls in Kombination mit allen Kalibriersubstanzen. Imidazol erschien

unverändert nach der Reaktion im Modellsystem. Wasserstoffperoxid reagierte zu Wasser und konnte demnach nicht UV/VIS-spektroskopisch detektiert werden. Alle beschriebenen Ansätze wurden ebenfalls mit derselben Methode, allerdings mit einem Diodenarraydetektor, untersucht. Somit konnte die Reinheit der auftretenden Peaks bestätigt, sowie Verunreinigungen über den gesamten Wellenlängenbereich ausgeschlossen werden. Keine der beschriebenen Substanzen beeinflusste die Selektivität und Spezifität der Kalibriersubstanzen, mit Ausnahme von *m*-CPBA.

Die im Modellsystem verwendete *m*-CPBA-Analysensubstanz beeinflusste den spezifischen Nachweis des Diazepam-N-oxid (siehe Abb. 2.26). Im Chromatogramm sind deutlich zwei Substanzen, gekennzeichnet durch Peak (1) und Peak (3) in Chromatogramm I, für das industriell gefertigte Produkt *m*-CPBA zu erkennen. *M*-CPBA befindet sich mit einer Reinheit von $\leq 77\%$ (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) im Handel. Mit der zu validierenden Methode wurden die verbleibenden 23% durch Aufdosierungsexperimente als *m*-Chlorbenzoesäure identifiziert. Da bei der Umsetzung von Diazepam mit *m*-CPBA als Sauerstoffdonator in Gegenwart eines Katalysators die Chlorperoxybenzoesäure quantitativ zu *m*-Chlorbenzoesäure reagierte, störte die Peroxybenzoesäure die Analytik und somit den spezifischen Nachweis des Diazepam-N-oxids letztendlich nicht. Chromatogramm II (siehe Abb. 2.26) zeigt eine deutliche Auflösung zwischen *m*-CBA (1) und Diazepam-N-oxids (2). Somit konnte die Methode auch unter Verwendung von *m*-CPBA als Sauerstoffdonator als ausreichend selektiv und spezifisch angesehen werden.

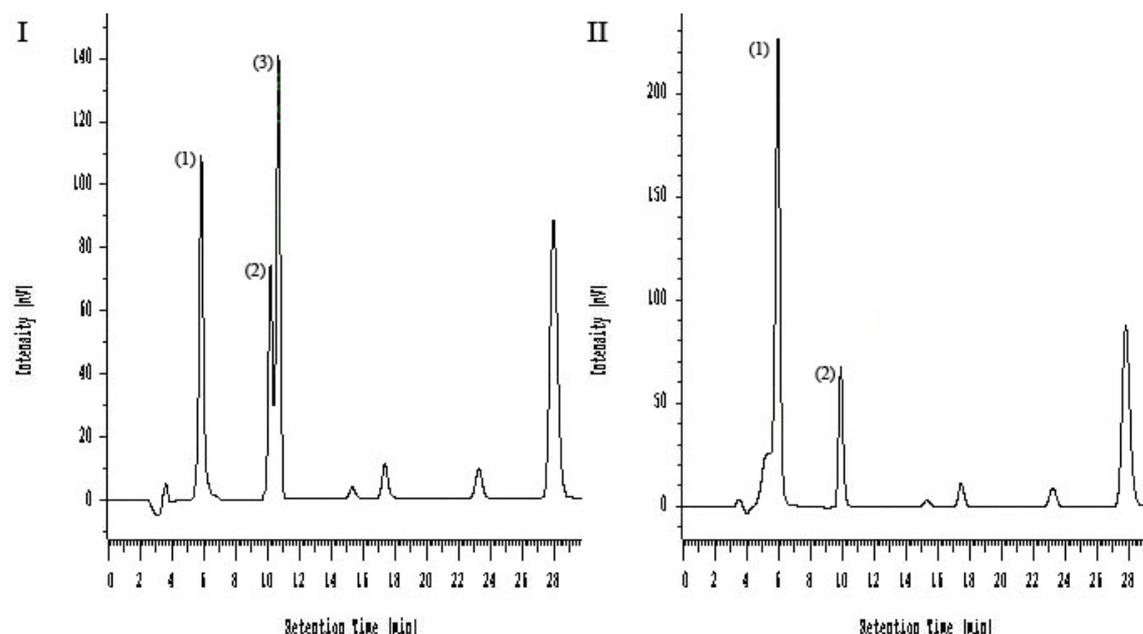


Abb. 2.26: I: Chromatogramm der Kalibriersubstanzen mit der im Modellsystem verwendete *m*-CPBA-Analysensubstanz als Sauerstoffdonator; (1) *m*-CBA, (2) Diazepam-*N*-oxid, (3) *m*-CPBA; II: Chromatogramm der Kalibriersubstanzen mit *m*-CBA(1) als deoxygeniertes Produkt der *m*-CPBA und Diazepam-*N*-oxid (2)

Generell konnte gesagt werden, dass die Methode für ihren Bestimmungszweck ausreichend selektiv und spezifisch arbeitete. Die Retentionszeiten aller untersuchten Substanzen sind im Experimentellen Teil aufgeführt (vergleiche 6.2.1).

2.4 Katalytische Eigenschaften von Mn III ohne Pyrrolringstruktur

In der Literatur stieß man auf der Suche nach Oxidationen, die durch Übergangsmetallkomplexe katalysiert werden, hauptsächlich auf synthetische Metalloporphyrine [23]. Die synthetischen Analoga der Häm enthaltenden Enzyme haben, wie in der Einleitung bereits erwähnt, aus Gründen der Substrat- und Stereoselektivität sowie erhöhter Stabilitäten im Reaktionsmedium über die Jahre umfangreiche Modifikationen erlebt [39]. Neben wechselnden Metallzentren blieb der Tetrapyrrolligand jedoch als Grundgerüst erhalten.

In diesem Kapitel sollte überprüft werden, ob der Tetrapyrrolligand für die katalytischen Eigenschaften und die Produktbildung essentiell ist oder ob

einfachere, kostengünstige Metallkomplexe bzw. -salze die gleichen Reaktionen katalysieren können.

Da in unserer Arbeitsgruppe gute Ergebnisse mit manganhaltigen Porphyrinen erzielt wurden [85], sollte in Analogie hierzu ebenfalls ein dreiwertiger einfacher Mangankomplex verwendet werden. Aus diesem Grund wurde das Mangan(III)-acetat Dihydrat ausgewählt. Hierbei handelt es sich um einen rötlich-braunen Komplex mit einer von Weinland [86] vorgeschlagenen Formel $[\text{Mn}_3(\text{CH}_3\text{COO})_6(\text{H}_2\text{O})_2](\text{CH}_3\text{COO})_3 \times 4\text{H}_2\text{O}$. Mangan(III)-acetat wurde in einer Vielzahl von Arbeiten als Oxidationsmittel eingesetzt. Als Ein-Elektronen-Oxidanz verlaufen die Reaktionen über freie Radikale, wobei Kohlenstoff-Kohlenstoff und Kohlenstoff-Heteroatombindungen gebildet wurden. Der Zweck ist die Cyclisierungen ungesättigter Systeme oder die Bildung von Lactonen, Alkylierungsreaktionen und Arylkopplungen [87]. Ein interessanter Ansatz wurde von *Ravikumar* und Mitarbeitern gefunden [88]. Sie verwendeten Mangan(III)-acetat als Katalysator für Epoxidierungen von verschiedenen Olefinen in Gegenwart von Pivalinaldehyd und molekularem Sauerstoff in Perfluoro-2-butyltetrahydrofuran oder 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol. Auf den Postulaten von *Nam* und Mitarbeitern [89], die entsprechende allgemeine Reaktionsmechanismen für metallkatalysierte Epoxidierungen in Gegenwart eines Aldehyds und molekularem Sauerstoff formulierten, basierten folgende Gleichungen:

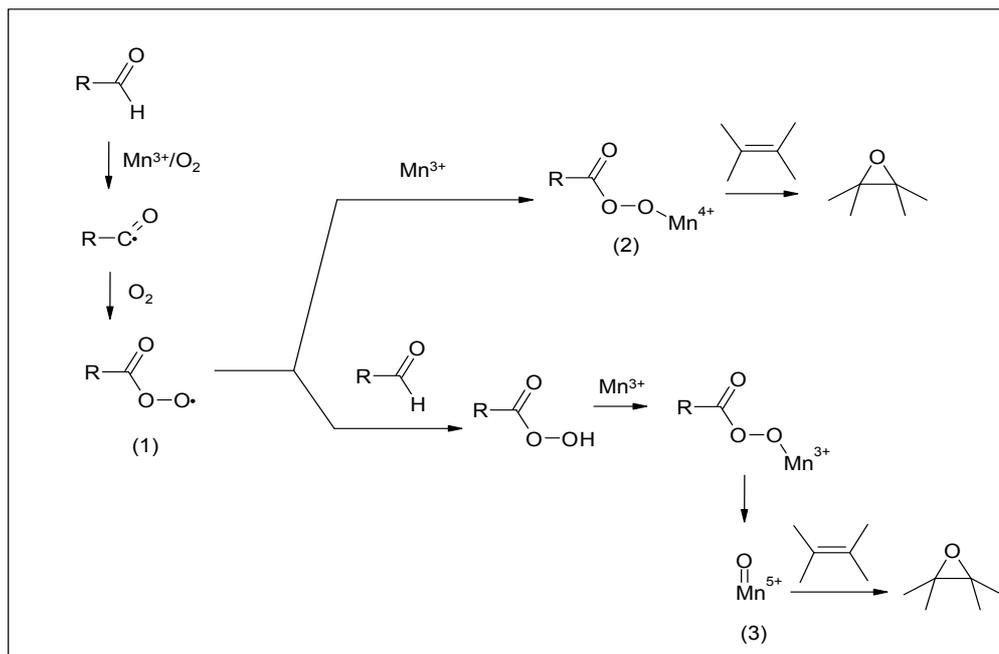


Abb. 2.27: Durch Nam und Valentine postulierter Mechanismus der metallkomplexcatalysierten Epoxidierung von Olefinen

Im ersten Schritt ging man von der Bildung eines Acylradikals durch Mn^{3+} aus, wobei das Metallion um ein Elektron reduziert wurde. Anschließend sollte das Acylradikal mit molekularem Sauerstoff zum Acylperoxyradikal (1) reagieren. Von diesem Intermediat ausgehend wurden zwei Möglichkeiten diskutiert. Der erste Weg verlief über die Bildung eines Manganperoxykomplex (2) zum Epoxid, während ein zweiter Weg über die Bildung einer hoch-valenten Metall-oxo-Spezies (3) durch Bruch der Sauerstoffbindung zum Produkt führte.

Da der zweite Weg über eine Peroxysäure verlief, könnte beim Einsatz der in dieser Arbeit verwendeten Sauerstoffdonatoren *m*-CPBA und MMPP ein ähnlicher Reaktionsmechanismus postuliert werden (vergleiche 1.4).

Gestützt wurde diese These durch eine spätere Arbeit von Nam und Mitarbeitern [90]. Hier wurde die katalytische Fähigkeit eines einfachen Metallsalzes mit denen seines porphyrinkoordinierten Metallions zur Hydroxylierung von Alkanen unter denselben Bedingungen verglichen. Als Metallsalze wurden die Perchlorate von Mn^{2+} , Fe^{2+} und Co^{2+} verwendet, während als Porphyrinliganden *Meso*-tetrakis(pentafluorophenyl)porphinato-perchlorate, mit entsprechendem dreiwertigem Metallzentrum koordiniert, dienten. Die Reaktion wurde in einem Gemisch aus Dichlormethan und

Acetonitril bei Raumtemperatur durchgeführt. Als Substrat wurde u.a. Cyclohexan eingesetzt. $\text{Co}(\text{ClO}_4)_2$ zeigte die besseren Ausbeuten gegenüber $\text{Mn}(\text{ClO}_4)_2$ und $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_2$. Im Vergleich wurde für Mangan die doppelte Menge an Cyclohexanol (44% Ausbeute, bezogen auf die Menge an zugesetzter *m*-CPBA) beim Einsatz des Porphyrinkomplexes gefunden. Zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus wurden H_2^{18}O -markierte Experimente mit $\text{Co}(\text{ClO}_4)_2$ und *m*-CPBA durchgeführt. Hierbei diente die Oxo-hydroxo-Tautomerie [91] zur Aufklärung eines hoch-valenten Metall-oxo-komplexes. Die Inkorporation des markierten Sauerstoffs in das Produkt Cyclohexanol lieferte so erste Hinweise auf ein hochvalentes Cobalt-oxo-intermediat und die Möglichkeit der Ausbildung hochvalenter Oxospezies durch Nichthäm-katalysatoren.

Nam und Mitarbeiter verwendeten einen Ansatz von Substrat, *m*-CPBA und Katalysator im Verhältnis 1000:3x10:1 [90]. Da im späteren Verlauf Korrelationen zwischen den Manganacetatergebnissen und denen ausgewählter Porphyrine und deren immobilisierten Formen als Katalysator erstellt werden sollten, wurde das Ansatzverhältnis modifiziert. Aufgrund von Löslichkeiten der Sauerstoffdonatoren und des Substrats, sowie Anpassungen an Literaturvorschriften, die gängige Ansatzverhältnisse in biomimetischen Modellsystemen beschrieben, wählte man ein Verhältnis von Sauerstoffdonator: Substrat: Katalysator von 40:10:1. Ferner sollte auch der Einfluss der Synthesebedingungen auf die Reaktion untersucht werden, sodass die Versuche zum einen unter Schüttel- und zum anderen unter Mikrowellenbedingungen durchgeführt wurden ($n=3$). Ein zusätzlicher variabler Parameter war die Temperatur. So wurden die Experimente unter Raumtemperatur (RT) bei 25°C und bei 82°C, der Siedetemperatur (ST) des Lösungsmittels ACN, durchgeführt.

Alle berechneten Gehalte für Oxazepam, Temazepam, Nordazepam, Diazepam-N-oxid und Diazepam nach der Reaktion bezogen sich in dieser Versuchsreihe, und in allen folgenden Untersuchungen mit Diazepam als Substrat, auf einen Diazepamausgangswert von 100%. Dieser wurde durch zweimaliges Vermessen der für eine Versuchsreihe hergestellten Stammlösung und anschließender Mittelung der zwei Werte bestimmt. Hierdurch konnten Fehler durch Wägung ausgeschlossen werden.

Schüttelbedingungen:

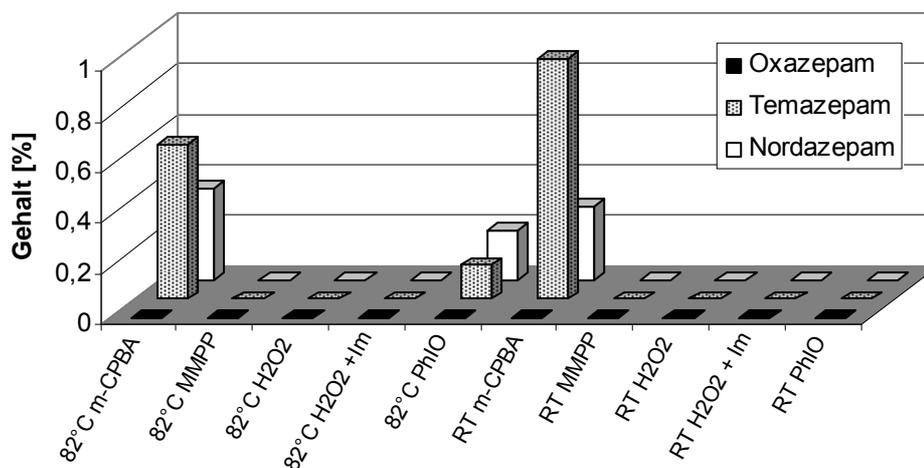


Abb. 2.28: Bestimmung von Oxazepam, Temazepam und Nordazepam nach Umsetzung von Diazepam unter Schüttelbedingungen mit Mn(III)-acetat und unterschiedlichen Sauerstoffdonatoren

Anhand der Abb. 2.28 wird ersichtlich, dass unter RT- und ST-Bedingungen mit *m*-CPBA als Sauerstoffdonator Temazepam und Nordazepam gebildet wurden. Unter Verwendung von PhIO wurde nur bei 82°C Temazepam und Nordazepam erzeugt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je drei Versuchen. Die genauen Messwerte und Streuungen befinden sich im Experimentellen Teil (vergleiche 6.2.2).

In dieser Versuchsreihe wurde das erste Mal bei der Verwendung von *m*-CPBA und MMPP ein neues Produkt, bis hierhin unbekannter Struktur, detektiert. Vergleicht man die entstandene Menge mit dem Gehalt an nicht umgesetztem Edukt, fiel auf, dass es sich um ein Reaktionsprodukt von Diazepam handeln musste. In Kapitel 2.12 wird die Identifizierung und die Synthese des Produktes beschrieben. Aus Gründen der Vollständigkeit wurde es an dieser Stelle als Diazepam-N-oxid bezeichnet und bekannt vorausgesetzt.

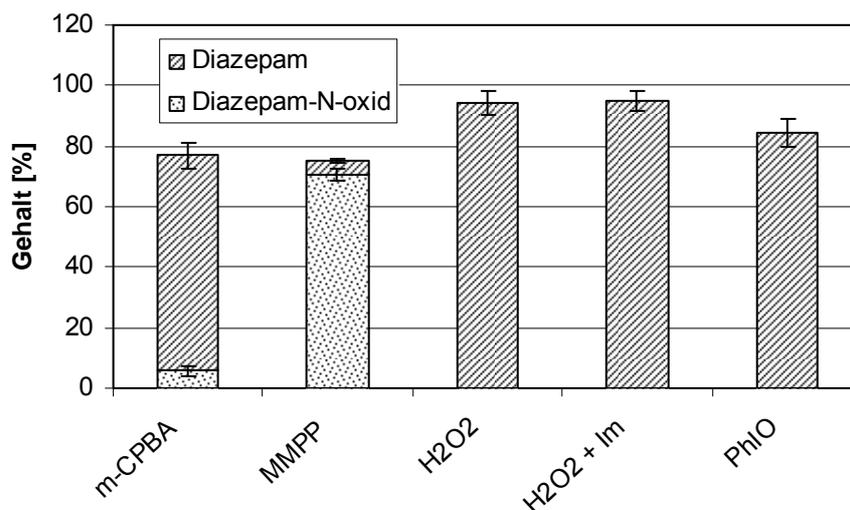


Abb. 2.29: Bestimmung von Diazepam und Diazepam-N-oxid nach Umsetzung von Diazepam unter Schüttelbedingungen bei 82°C mit Mn(III)-acetat und diversen Sauerstoffdonatoren

In Abb. 2.29 ist die Menge an Edukt nach der Reaktion unter Schüttelbedingungen bei 82°C gemeinsam mit der Menge an gebildetem Diazepam-N-oxid dargestellt. Unter Einfluss von Wasserstoffperoxid sowie dieses in Kombination mit Imidazol und bei Verwendung von PhIO wurde kein Diazepam-N-oxid detektiert.

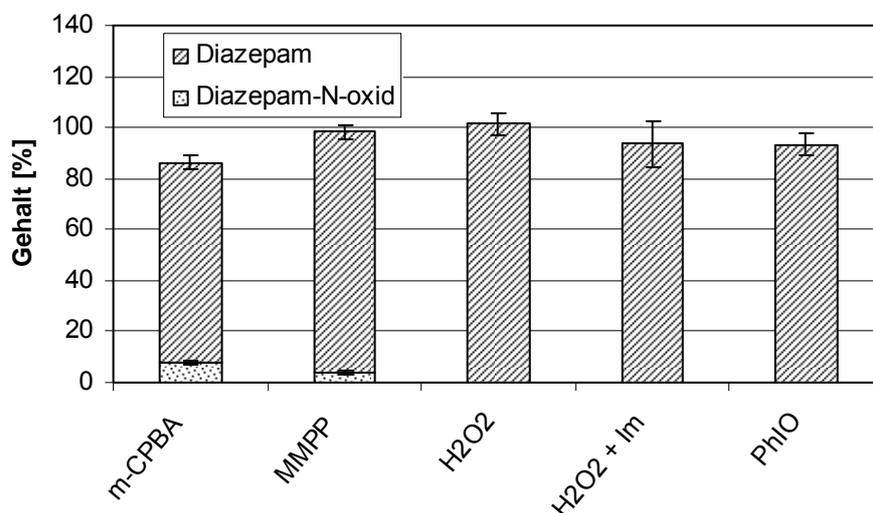


Abb. 2.30: Bestimmung von Diazepam und Diazepam-N-oxid nach Umsetzung von Diazepam unter Schüttelbedingungen bei RT mit Mn(III)-acetat und diversen Sauerstoffdonatoren

Vergleicht man die Diagramme von Abb. 2.29 und Abb. 2.30 so war eine deutliche Temperaturabhängigkeit in der Bildung von Diazepam-N-oxid bei der Verwendung von MMPP als Sauerstoffdonator zu erkennen. Hier

bestand ein signifikanter Unterschied zwischen RT und ST in der Bildung des N-Oxides, während unter Verwendung von *m*-CPBA als Sauerstoffdonator der Unterschied nicht signifikant war.

Zusätzlich wurde überprüft, ob die Bildung von Diazepam-N-oxid mit MMPP als Sauerstoffdonator, neben der Temperatur- auch eine Konzentrationsabhängigkeit zeigte. Hierzu wurde die Hälfte an MMPP nach AV 5 (siehe Kapitel 6.2.10) eingesetzt und unter RT und 82°C zur Reaktion gebracht. Folgende Daten wurden in Relation zur eingesetzten Menge an Substrat ermittelt:

	Schüttelbedingungen 82°C		Schüttelbedingungen RT	
	DNO[%]	DZP[%]	DNO[%]	DZP[%]
MMPP 40µmol	49,39±2,68	44,29±2,09	3,64±0,59	95,02±2,48
MMPP 80µmol	70,55±1,88	4,75±0,51	4,02±0,61	94,17±2,97

Während unter Raumtemperaturbedingungen bei den untersuchten Konzentrationsniveaus kein signifikanter Unterschied in der Bildung von Diazepam-N-oxid bestand, existierte ein derartiger Unterschied unter Siedetemperaturbedingungen. In Beziehung gesetzt zur verbleibenden Menge an Diazepam konnte man beim Einsatz von 80 µmol MMPP von einer nahezu quantitativen Umsetzung sprechen, während 40 µmol MMPP nur ca. die Hälfte an eingesetztem Substrat zu Diazepam-N-oxid oxidierten. Der beobachtete Substanzverlust beim Einsatz von 80 µmol MMPP wird später in diesem Kapitel diskutiert.

Bei der Verwendung von MMPP als Sauerstoffdonator unter Siedetemperaturbedingungen wurde eine weitere Substanz bei einer Retentionszeit von 18,6 min detektiert. Da die Selektivität der Methode durch den Peak nicht beeinflusst wurde und dessen Peakfläche unter einem Prozent der Peakfläche des Eduktes lag, erschien die strukturelle Aufklärung des unbekanntes Produktes nicht erforderlich.

Ferner wurde die Identität der gebildeten Metabolite über die Peakreinheit, für eine Probe aus dreien, überprüft. Hierzu arbeitete man mit derselben

Methode, aber mit einem Diodenarraydetektor anstelle eines UV-Detektors gearbeitet. Die ursprüngliche Probe wurde vermessen und die Peakreinheit der vermeintlichen Metabolite bestimmt. Anschließend wurden die in der Probe gefundenen Konzentrationen an Metabolit mit derselben Konzentration an Kalibriersubstanz zudosiert und vermessen. War beim ersten „ungespikten“ Lauf ein Metabolitenpeak rein ($\geq 95\%$) und nach dem „Spiken“ mit Kalibriersubstanz ebenfalls, galt die Identität des Metaboliten als bewiesen. Andernfalls wäre die Peakreinheit um die Hälfte gesunken. Desweiteren war es möglich, über den gesamten UV/VIS-Bereich die Bildung anderer Substanzen zu prüfen. Neben den genannten wurde allerdings keine weitere UV/VIS-aktive Substanz detektiert.

Es fiel auf, dass die Addition der Gehalte von Diazepam-N-oxid, Metaboliten und Substrat für *m*-CPBA und MMPP unter Siedebedingungen sowie für *m*-CPBA bei RT vom 100%-Wert stärker abwich. Da keine weiteren Nebenprodukte mittels DAD gefunden wurden, konnte eine Zersetzung des Substrates nicht ausgeschlossen werden. Die Untersuchung der konzentrationsabhängigen Bildung von Diazepam-N-oxid mit MMPP als Sauerstoffdonator weist ebenfalls auf diese Vermutung hin. Unter Einsatz von 40 μmol MMPP errechnet sich aus Diazepam, Diazepam-N-oxid und Metabolit ein Gesamtgehalt von annähernd 100%, während man bei Verwendung von 80 μmol MMPP nur ungefähr 75% Produkt im Verhältnis zur eingesetzten Menge an Substrat erhält.

Bei der Verwendung von H_2O_2 und H_2O_2 in Kombination mit Imidazol war der Wiederfindungswert an Substrat sehr hoch und es wurden weder Metabolite noch Diazepam-N-oxid detektiert. Aus diesen Gründen wurde eine zehnfach höhere Konzentration an Wasserstoffperoxid, sowie in Kombination mit derselben Menge an Imidazol nach AV 5 (siehe Kapitel 6.2.10) durchgeführt. Bei Raum- und Siedetemperatur konnte unter Schüttelbedingungen trotz höherer Wasserstoffperoxidkonzentrationen weder die Bildung von Metaboliten oder Diazepam-N-oxid, noch Substratzerstörung beobachtet werden.

Mikrowellenbedingungen:

Im Vergleich zu den Schüttelbedingungen sind in Abb. 2.31 die Ergebnisse der Modellversuche mit Mangan(III)-acetat als Katalysator in der Mikrowelle dargestellt.

In Anlehnung an die Versuche unter Schüttelbedingungen wurde auch hier die Identität der gebildeten Metabolite zusätzlich, für einen aus drei Ansätzen pro Sauerstoffdonator, über die Peakreinheit mittels DAD bestimmt. Die Durchführung erfolgte in gleicher Weise.

Bei der Verwendung von MMPP als Sauerstoffdonator und einer Temperatur von 82°C wurde, wie unter Schüttelbedingungen, ein unbekannter Peak bei einer Retentionszeit von 18,6 min beobachtet. Da dieser die Selektivität der Methode nicht beeinflusste, und die Peakfläche unter einem Prozent der Peakfläche des Ausgangssubstrats lag, wurde die Identität nicht überprüft.

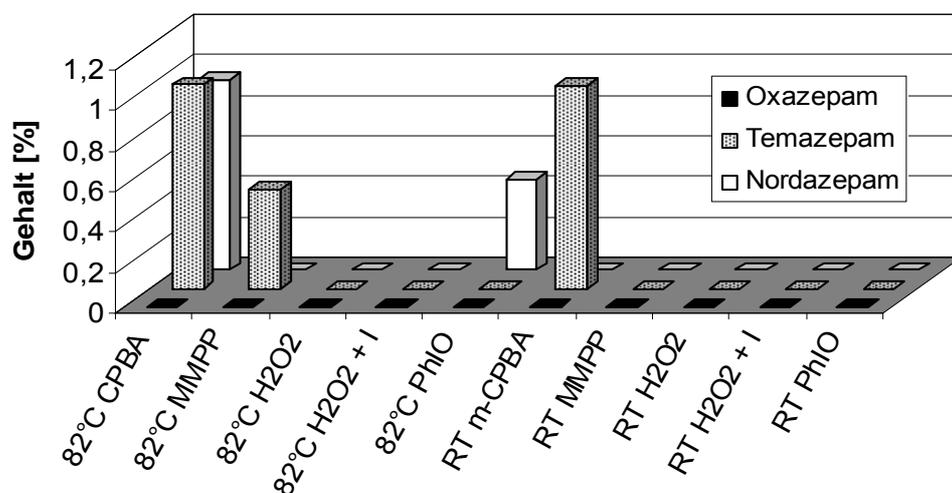


Abb. 2.31: Bestimmung von Oxazepam, Temazepam und Nordazepam nach der Umsetzung von Diazepam unter Mikrowellenbedingungen mit Mn(III)-acetat und unterschiedlichen Sauerstoffdonatoren

Der statistische Vergleich der Ergebnisse aus Abb. 2.28 und Abb. 2.31 durch eine einseitige Varianzanalyse ließ folgende Schlüsse zu. Die Bildung von Temazepam mit *m*-CPBA als Sauerstoffdonator war in allen Systemen gleichwertig. Die Bildung von Nordazepam war dagegen unter

Mikrowellenbedingungen bei 82°C signifikant höher gegenüber den Schüttel- (RT/82°C) und Mikrowellenbedingungen bei RT.

Auch die Bildung von Nordazepam unter Mikrowellenbedingungen bei 82°C mit Iodosobenzol als Sauerstoffdonator lieferte signifikant höhere Ausbeuten gegenüber den restlichen untersuchten Konditionen. Wohingegen die Bildung von Temazepam unter Schüttelbedingungen bei 82°C sowie unter Mikrowellenbedingungen bei 82°C und MMPP als Sauerstoffdonator keinen signifikanten Unterschied gegenüber dem Blindwert der übrigen Bedingungen zeigte.

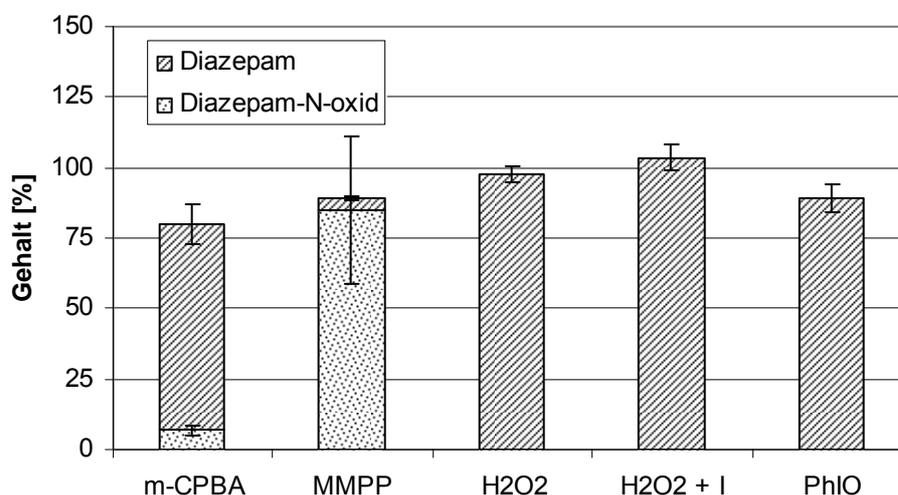


Abb. 2.32: Bestimmung von Diazepam und Diazepam-N-oxid nach Umsetzung von Diazepam unter Mikrowellenbedingungen bei 82°C mit Mn(III)-acetat und diversen Sauerstoffdonatoren

Hinsichtlich der Bildung von Diazepam-N-oxid bestand unter Mikrowellenbedingungen kein signifikanter Unterschied zwischen RT und ST bei der Verwendung von *m*-CPBA als Sauerstoffdonator. Wie in Abb. 2.32 und Abb. 2.33 deutlich zu erkennen ist, wurde unter MMPP- Einfluss und 82°C signifikant mehr Diazepam-N-oxid gebildet als unter RT-bedingungen. Die unter Einsatz von *m*-CPBA und MMPP bei 82°C, sowie bei *m*-CPBA und RT-bedingungen zu beobachtenden Substanzverluste lagen vermutlich, wie unter Schüttelbedingungen, in einer Substratzerersetzung begründet.

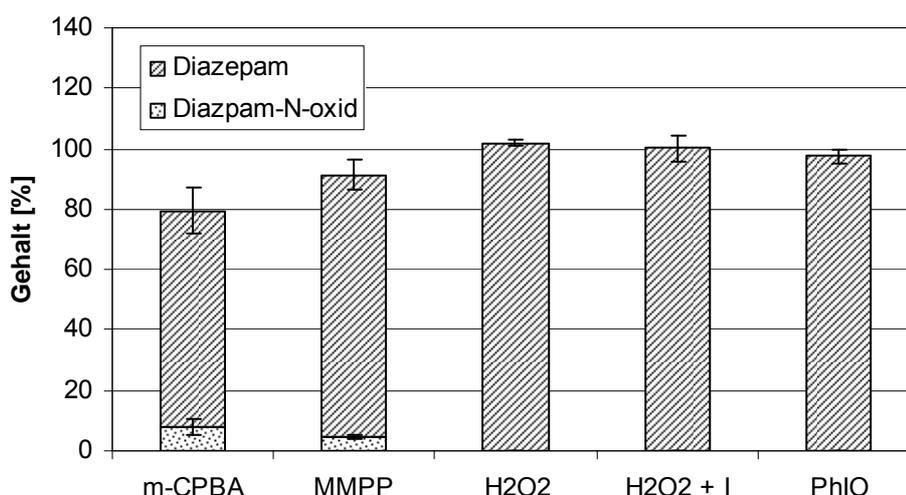


Abb. 2.33: Bestimmung von Diazepam und Diazepam-N-oxid nach Umsetzung von Diazepam unter Mikrowellenbedingungen bei RT mit Mn(III)-acetat und diversen Sauerstoffdonatoren

Diskussion:

Die Ausbeuten an Diazepammetaboliten waren gering. Dies konnte bedeuten, dass Mangan(III)-acetat unter den verwendeten Bedingungen Hydroxylierungs- und Dealkylierungsreaktion von Diazepam nur mäßig katalysierte. Um dies zu überprüfen wurden in nachfolgenden Versuchen ausgewählte Metalloporphyrine als Katalysatoren eingesetzt. In Blindversuchen (siehe Kapitel 2.11) blieb gleichzeitig zu klären, ob Mn(III)-acetat Dihydrat unter den verwendeten Bedingungen generell einen katalytischen Effekt zeigte oder ob diese Ergebnisse auch ohne Katalysator generiert werden konnten.

Des Weiteren konnte, bedingt durch die geringen Ausbeuten, keine allgemein gültige Aussage über die Effektivität von Mikrowellenenergie gegenüber konventioneller Energiezufuhr in Form von Wärme getroffen werden. Statistisch signifikant höhere Ausbeuten konnten unter Mikrowellenbedingungen bei der Bildung von Nordazepam mit *m*-CPBA und PhIO als Sauerstoffdonatoren gegenüber Schüttelbedingungen gefunden werden. Diese Aussage sollte jedoch gerade wegen der geringen Ausbeute kritisch gesehen werden. Eine Erhöhung der Ausbeute um $\geq 0,5\%$ durch Nutzung der Mikrowelle bestätigt nicht die Überlegenheit dieses Synthesystems gegenüber der Schüttelapparatur.

2.5 Immobilisierung der verwendeten Metalloporphyrine unter Einsatz der Synthesemikrowelle

Die gewählten Metalloporphyrine sollte aus Gründen einer besseren Abtrennung aus den Reaktionsansätzen sowie der Möglichkeit des erneuten Gebrauchs des Katalysators und ein hieraus resultierender umweltfreundlicherer Umgang mit selbigem, immobilisiert werden. *Battioni* und Mitarbeitern beschrieben Methoden zur Immobilisierung der perfluorierten Metalloporphyrine Mn/FeTFPPCl an modifiziertem Kieselgel und der kationischen Porphyrine Mn/FeT4MPyPCL an Kieselgel 60 [38, 92].

Bei der Immobilisierung der kationischen Porphyrine an Kieselgel handelte es sich um eine starke Adsorptionsreaktion, während die perfluorierten Metalloporphyrine, wie in Abb. 2.34 gezeigt, in *para*-Position des Perfluorophenylsubstituenten eine nukleophile Substitution mit der primären Aminogruppe des modifizierten Kieselgels eingingen.

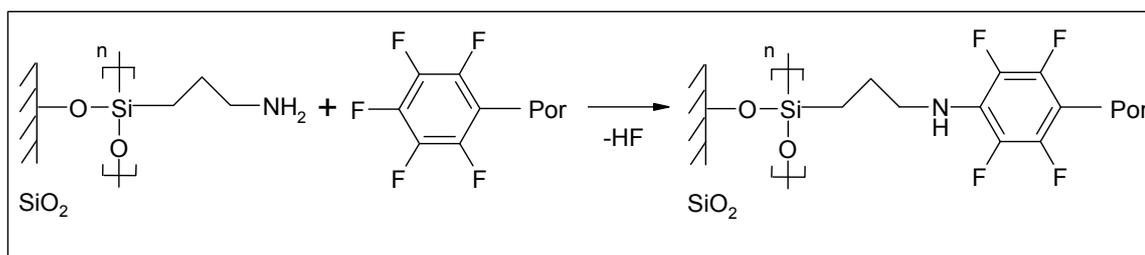


Abb. 2.34: Von *Battioni* und Mitarbeitern postulierter Mechanismus zur Immobilisierung von modifiziertem Kieselgel mit perfluorierten Porphyrinen

Auf den Grundlagen der Vorschriften von *Battioni* und Mitarbeitern [38, 92] entwickelte *Lübbe* eine mikrowellenunterstützte Immobilisierung ohne Lösungsmittel für MnT4MPyPCL und MnTFPPCl [85]. Lösungsmittelfreie Reaktionen in der Synthesemikrowelle wurden in der Literatur vielfältig beschrieben [93] und auch die Verwendung von an Kieselgel immobilisierten Katalysatoren in organischen Synthesen unter Mikrowellenbestrahlung sind mittlerweile gängige Methoden [94-96].

Die trockene Immobilisierung sollte in dieser Arbeit neben den genannten manganhaltigen Porphyrinen, auch für die eisenhaltigen Metalloporphyrine FeT4MPyPCL und FeTFPPCl angewendet werden.

In Anlehnung an die Vorschriften von *Battioni* wurde zur Immobilisierung von MnT4MPyPCL und FeT4MPyPCL Kieselgel 60 [38] und

Aminopropylkieselgel für MnTFPPCl und FeTFPPCl verwendet [92]. Das Trägermaterial wurde mit dem jeweiligen Metalloporphyrin und einem Magnetrührkern in ein 10 mL Mikrowellengefäß eingewogen. Wenige Tropfen Methanol wurden dem Ansatz wegen der besseren Durchmischung auf dem Magnetrührer zugesetzt. Nach kurzem Homogenisieren wurde das Mikrowellengefäß inklusive Inhalt in einen Rundkolben überführt, der mit Watte versehen war, um das Zerschneiden der beiden Glasgeräte zu verhindern. Umgehend wurde auf diese Art das Methanol unter vermindertem Druck entfernt und das Mikrowellengefäß samt trockenem Inhalt der Synthesemikrowelle zugänglich gemacht.

Mit einer Vorlaufzeit von 60 Sekunden wurden die Proben 10 min mit 300 Watt der Mikrowellenstrahlung ausgesetzt. Abb. 2.35 stellt repräsentativ die Reaktionsbedingungen der Immobilisierung für alle verwendeten Metalloporphyrine in der Synthesemikrowelle dar.

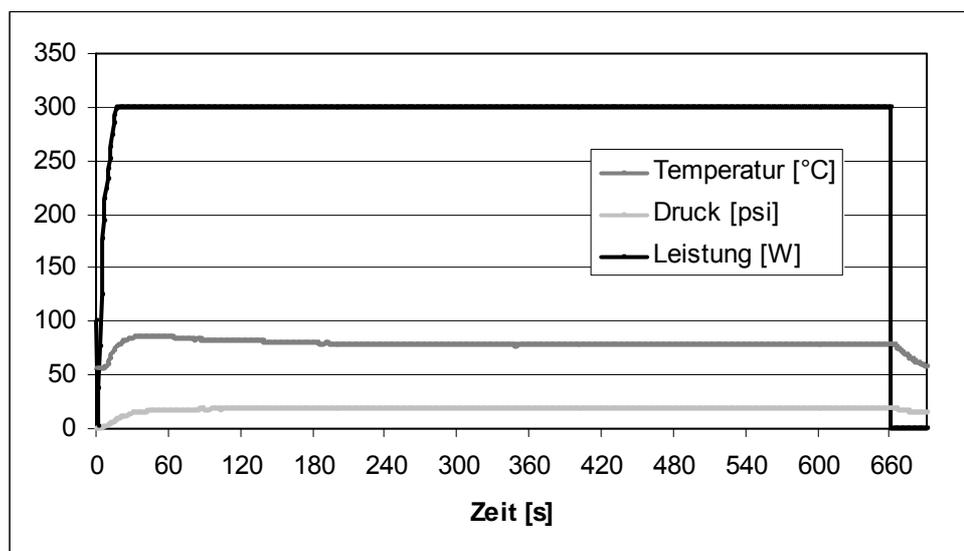


Abb. 2.35: Reaktionsbedingungen während der Immobilisierung von MnT4MPyPCL ohne Lösungsmittel¹

Die gleichmäßige Bestrahlung der Probe mit 300 Watt und der Temperaturverlauf während des gesamten Reaktionsverlaufes in Abb. 2.35 zeigten konstante Reaktionsbedingungen.

¹ aus Gründen der Übersicht wurde der Druck in psi angegeben (1 psi = 6894,76 Pa)

2.6 Methode zur Quantifizierung der immobilisierten Metalloporphyrine

Zur quantitativen Bestimmung des an Trägermaterial gebundenen Porphyrins wurden UV/VIS-spektroskopische Methoden herangezogen. Bei den verwendeten Methoden löste man die entsprechenden Porphyrine vom Trägermaterial herunter. Die quantitative Bestimmung erfolgte unter Verwendung einer Kalibrierkurve.

2.6.1 Quantitative Bestimmung von immobilisiertem Mn/FeT4MPyPCL

Nenoff und Mitarbeiter trennten die kationischen Metalloporphyrine mit 2 M HCl vom Kieselgel ab und verwendeten eine UV/VIS-spektroskopische Untersuchung der erhaltenen Lösung als Quantifizierungsmethode [97]. Die durch UV/VIS-Spektroskopie erzielten Ergebnisse für eisenhaltige Porphyrine verglichen *Nenoff* und Mitarbeiter mit Ergebnissen einer Elementaranalyse für Eisen derselben Immobilisierungscharge. Sie konnten bestätigt werden. Da die Elementaranalyse allerdings nur Eisen erfasste und nicht den gesamten Komplex, wurde sich in dieser Arbeit für die Verwendung der UV/VIS-spektroskopischen Methode entschieden. Zunächst wurde die Identität der verwendeten Porphyrine ebenfalls mittels UV/VIS-Spektroskopie überprüft, indem sie mit den Herstellerangaben verglichen wurden. *Porphyrin Systems* (Lübeck, Deutschland) gibt Absorptionsmaxima in Wasser für MnT4MPyPCL von 462 nm und für FeT4MPyPCL von 422 nm an. Die gefundenen Werte von 463 nm und 421 nm lagen innerhalb der nach Arzneibuch (Ph.Eur. 5.0) erlaubten Abweichungen von ± 3 nm für den sichtbaren Bereich bei der Überprüfung der Wellenlängenskala einer Holmiumperchlorat-Lösung *R* und bestätigten somit die Identität der kationischen Porphyrine.

Zur Quantifizierung der am Trägermaterial gebundenen kationischen Porphyrine wurden für MnT4MPyPCL und FeT4MPyPCL je drei unabhängige Immobilisierungschargen nach AV 1 (siehe Kapitel 6.2.3) hergestellt. Eine definierte Menge des Immobilisats wurde eingewogen und durch Zusatz von 2M HCl vom Kieselgel gelöst. Nach zehnmütigem Schütteln der Lösung wurde der Überstand abgenommen und gegen 2 M

HCl vermessen. Die Menge an abgetrenntem Porphyrin wurde über die im Experimentellen Teil dargestellten Kalibrierkurven bestimmt. Die Absorptionsmaxima der vom Trägermaterial gelösten Porphyrine unterschieden sich zu den löslichen Porphyrinen nicht. In Abb. 2.36 sind die UV/VIS-Spektren beispielhaft für MnT4MPyPcI dargestellt.

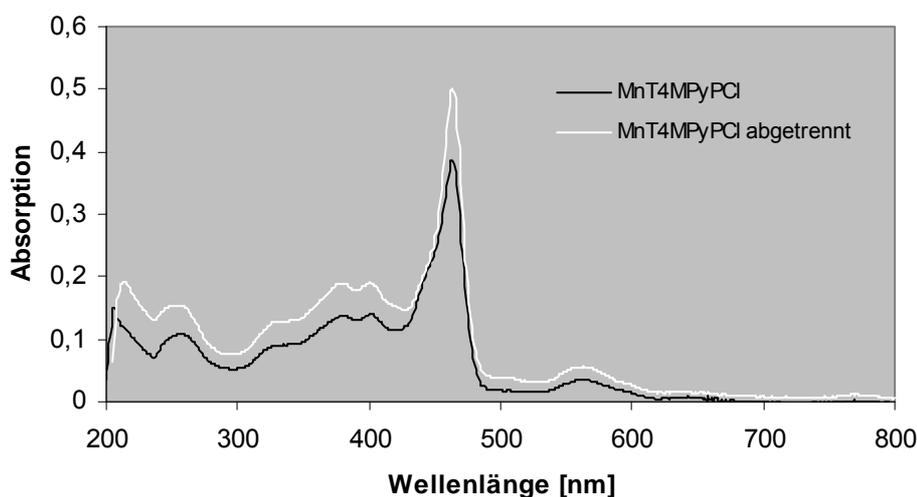


Abb. 2.36: UV/VIS-Spektren von MnT4MPyPcI in 2N HCl und MnT4MPyPcI nach Abtrennung vom Trägermaterial Kieselgel in 2N HCl in unterschiedlichen Konzentrationen; Maxima bei 464 nm

2.6.2 Quantitative Bestimmung von immobilisiertem Mn/FeTFPPcI

Die Trennung der perfluorierten Porphyrine von ihrem Trägermaterial war aufgrund der in Abschnitt 2.5 beschriebenen kovalenten Bindung mit verdünnter Salzsäure nicht möglich. Auf den Untersuchungen von *Gaget*, der die Spaltung von an Kieselgelen kovalent gebundenen Gruppen mit Flusssäure in Gegenwart von konzentrierter Schwefelsäure beschrieb [98], basierten die Versuche von *Battioni* und Mitarbeitern [92]. Sie trennten an Aminopropylkieselgel immobilisiertes *Meso*-tetra(pentafluorophenyl) - porphyrin, ein perfluoriertes Porphyrin ohne Metallzentralatom, mit Flusssäure in Gegenwart von konzentrierter Schwefelsäure ab und untersuchten die kovalente Bindung mittels ^1H -NMR-Spektroskopie. Das entstandene Produkte wurde als Porphyrin-NH[CH₂]₂CH₂SiF₃-Rest beschrieben.

In Anlehnung an die zuvor erwähnten Arbeiten entwickelte *Lübbe* eine Vorschrift zur Abtrennung der perfluorierten Porphyrine vom

Trägermaterial, die in dieser Arbeit ebenfalls Anwendung fand [85]. So wurden wiederum für MnTFPPCl und FeTFPPCl je drei unabhängige Immobilisierungschargen nach AV 1 (siehe Kapitel 6.2.3) hergestellt. Eine bestimmte Menge an immobilisiertem Porphyrin wurde genau eingewogen, unter Zusatz von Natriumfluorid in einem definierten Volumen konzentrierter Schwefelsäure suspendiert und 20 min bei 80°C gerührt.

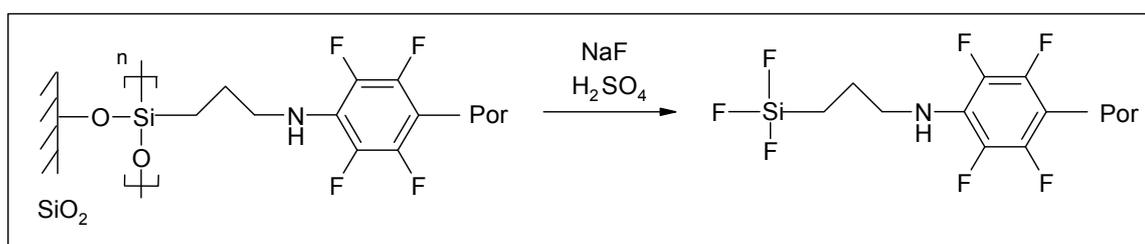


Abb. 2.37: *Postulierter Mechanismus der Trennung perfluorierter Porphyrine von Aminopropylkieselgel*

Die Lösung des abgetrennten MnTFPPCl zeigte die gleiche rötliche Färbung und die gleichen Absorptionsmaxima, wie die Kalibrierlösungen des löslichen MnTFPPCl. Auch die grüne Färbung der FeTFPPCl-Kalibrierlösungen entsprach der Farbe der Lösung des abgetrennten FeTFPPCl, sowie deren Absorptionsmaxima. Aufgrund dessen erfolgte die Quantifizierung der immobilisierten perfluorierten Porphyrine mit Hilfe der im Experimentellen Teil dargestellten Kalibrierkurven für MnTFPPCl und FeTFPPCl. In Abb. 2.38 sind beispielhaft für MnTFPPCl die UV/VIS-Spektren des Katalysators in konzentrierter Schwefelsäure und NaF und MnTFPPCl nach Abtrennung vom Aminopropylkieselgel ebenfalls in konzentrierter Schwefelsäure und NaF dargestellt. Da der Hersteller der Kunststoffküvetten einen Einsatzbereich ab 340 nm empfiehlt, wurden die Messungen erst ab dieser Wellenlänge ausgewertet.

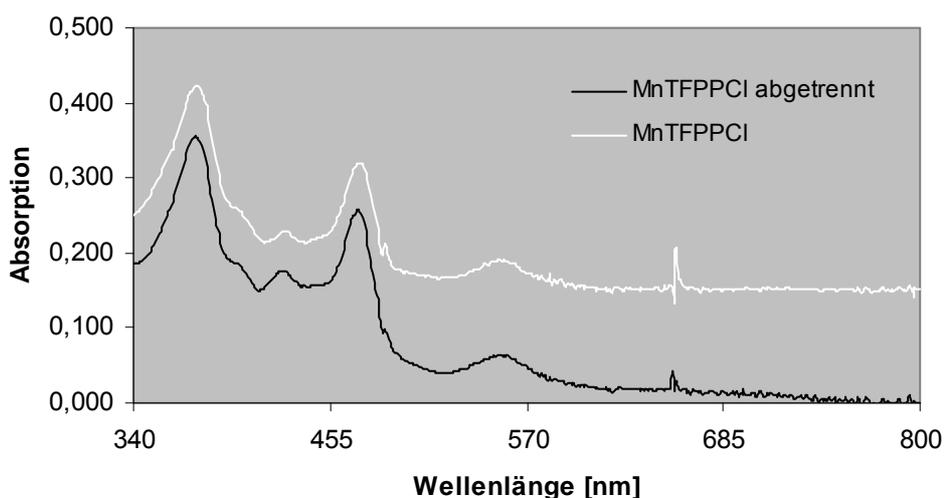


Abb. 2.38: UV/VIS-Spektren von MnTFPPCl in H_2SO_4/NaF und MnTFPPCl nach Abtrennung von Aminopropylkieselgel in H_2SO_4/NaF in unterschiedlichen Konzentrationen; Maxima bei 377nm

Zusätzlich wurde die Identität der perfluorierten Porphyrine durch den Vergleich mit den Herstellerangaben überprüft. *Porphyrin Systems* (Lübeck, Deutschland) gibt für MnTFPPCl in Dichlormethan ein Absorptionsmaximum von 475 nm an, während für FeTFPPCl in Dichlormethan ein Maximum bei 415 nm erwartet wird. Die Identitäten konnten durch Messung von 477 nm für MnTFPPCl und 412 nm für FeTFPPCl bestätigt werden.

2.6.3 Ergebnisse der quantitativen Bestimmungen

In Tabelle 2.4 sind die prozentualen, mittels UV/VIS-Spektroskopie ermittelten, Daten zur Belegung der Metalloporphyrine an Trägermaterial dargestellt.

Tabelle 2.4: Prozentuale Belegung der verwendeten Metalloporphyrine an Trägermaterial

	Belegung [%]	Stabw [%]
MnT4MPyPCL	9,86	0,65
FeT4MPyPCL	14,27	0,18
MnTFPPCl	7,91	0,96
FeTFPPCl	7,11	1,41

Die Messwerte wurden in den folgenden Versuchen als Grundlage für die Berechnung der Einwaagen des entsprechenden Katalysators herangezogen.

2.7 Ermittlung des optimalen Lösungsmittel für die Mikrowellenbestimmung

Die Löslichkeitseigenschaften von Verbindungen werden hauptsächlich durch ihre Polarität bestimmt. So lösen sich unpolare Substanzen bevorzugt in unpolaren bzw. wenig polaren Solventien, während polare Verbindungen auch polare Lösungsmittel benötigen. In der organischen Chemie beeinflussen Lösungsmittel nicht nur die Löslichkeit, sondern nehmen teilweise erheblichen Einfluss auf die Reaktivität von Substanzen. So senken protische Lösungsmittel wie Wasser durch Solvatisierung die Basizität von Anionen und somit ihre nucleophilen Eigenschaften, während aprotische Lösungsmittel die Nucleophilie des Anions steigern können. Neben diesen generellen Eigenschaften von Lösungsmitteln soll im Folgenden ihr Verhalten unter Mikrowellenbestrahlung dargestellt werden [99].

2.7.1 Theoretische Betrachtung

Die Kopplung eines Lösungsmittels mit Mikrowellenenergie beeinflusst die Geschwindigkeit mit der ein Reaktionsgemisch aufgeheizt wird. Diese ist wiederum abhängig von der Polarität eines Lösungsmittels. In diesem Kapitel sollte das optimale Lösungsmittel für das biomimetische Modellsystem von Diazepam in der Mikrowelle bestimmt werden.

Zum besseren Verständnis wurden an dieser Stelle einige Parameter erläutert, die die Kopplungsfähigkeit von Lösungsmitteln mit Mikrowellenenergie beschreiben. Die *Permittivität* ϵ oder auch dielektrische Leitfähigkeit gibt an, wie gut ein Material Ladungen eines von außen angelegten elektrischen Feldes speichern kann. Die *relative Permittivität* früher auch *Dielektrizitätskonstante* ϵ' gibt das Verhältnis zwischen der Kapazität eines mit Dielektrikum gefüllten Kondensators und der Kapazität desselben Kondensators mit Vakuum an. Die Größe der relativen Permittivität ϵ' ist abhängig vom *Dipolmoment* und von der Fähigkeit der Dipole sich im äußeren elektrischen Feld auszurichten. Verbindungen mit

großem Dipolmoment verfügen demnach über große relative Permittivitäten [100].

Wird das außen angelegte elektrische Feld umgepolt, orientiert sich der Dipol neu entlang der elektrischen Feldvektoren. Wird die Frequenz der elektromagnetischen Strahlung auf die Ebene von Mikrowellen angehoben, können die Moleküle dem oszillierenden Feld nicht mehr folgen und es kommt zu einer Phasenverschiebung δ . Diese Phasenverschiebung bewirkt eine Absorption von Energie aus dem elektrischen Feld (=Dielektrizitätsverlust) und führt letztendlich zur Aufheizung des Mediums. Die frequenzabhängige Phasenverschiebung kann über die komplexwertige relative Permittivität ϵ^* beschrieben werden:

$$\epsilon^* = \epsilon' - j\epsilon''$$

ϵ' beschreibt den realen Teil der relativen Permittivität und ϵ'' den imaginären Teil, auch als Dielektrizitätsverlust bezeichnet. Der Realteil der relativen Permittivität gibt an, in welchem Maße eine Substanz polarisierbar ist. Durch die Umpolung kommt es zu Reibung, die in Verlusten in Form von Wärme führen. Das Maß hierfür stellt den Imaginärteil der relativen Permittivität dar (Abb. 2.39).

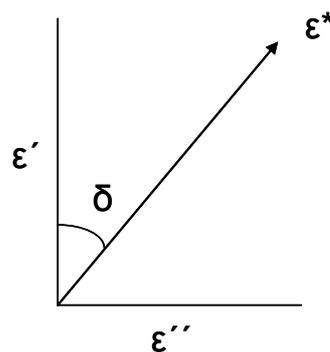


Abb. 2.39: Phasendiagramm zur Darstellung der komplexen relativen Permittivität; δ =Verlustwinkel bzw. Phasenverschiebungswinkel, ϵ' =Realteil, ϵ'' =Imaginärteil, ϵ^* =komplexe relative Permittivität

Aus dieser Beziehung lässt sich der dielektrische Verlustfaktor $\tan\delta = \epsilon''/\epsilon'$ ableiten, wobei ϵ'' und ϵ' frequenz- und temperaturabhängig sind. Da die Frequenz bei kommerziell erhältlichen Synthesemikrowellen eine fixe Größe

ist (2,45GHz), stellt nur die Temperatur eine variable Größe dar. Mit dem dielektrischen Verlustfaktor wurde ein Faktor definiert, der die Effizienz der Umwandlung von Mikrowellenenergie einer Substanz bzw. eines Lösungsmittels in Wärmeenergie beschreibt.

Ein weiterer wichtiger Einflußfaktor von Realteil ϵ' und Imaginärteil ϵ'' ist die *Relaxationszeit* τ .

$\epsilon' = \epsilon_{\infty} + \frac{\epsilon_s - \epsilon_{\infty}}{1 + \omega^2 \tau^2}$	$\tau =$ Relaxationszeit
$\epsilon'' = \epsilon_{\infty} + \frac{(\epsilon_s - \epsilon_{\infty})\omega\tau}{1 + \omega^2 \tau^2}$	$\omega =$ Winkelfrequenz der elektromagnetischen Strahlung
$\epsilon_{\infty} =$ Permittivität bei Frequenzen $> 1/\tau$	
$\epsilon_s =$ Permittivität in einem statischen Feld	

Abb. 2.40: Abhängigkeit der Permittivitäten ϵ' und ϵ'' von der Relaxationszeit

Wird an eine Lösung mit polaren Molekülen ein statisches elektrisches Feld angelegt, richten sich die Moleküle in Richtung des externen Feldes aus. Wird das Feld entfernt, benötigen die Moleküle eine gewisse Zeit, um aus dem geordneten in einen ungeordneten Zustand überzugehen. Diese Zeit wird als Relaxation bezeichnet. Sie ist abhängig vom Volumen des Moleküls, der Viskosität des Mediums und der Temperatur [101].

Generell werden die Relaxationszeit und die dielektrischen Parameter bei steigender Temperatur sinken, wodurch auch die Kopplungsfähigkeit mit Mikrowellen abnimmt.

Anhand des dielektrischen Verlustes können Lösungsmittel als hoch-, mittel- und niedrig absorbierend eingestuft werden[61]. Einige Lösungsmittel sind beispielhaft in Tabelle 2.5 mit zugehörigem Dipolmoment, der relativen Permittivität ϵ' , dem Dielektrizitätsverlust ϵ'' und dem dielektrischen Verlustfaktor $\tan \delta$ aufgeführt. Vergleicht man die Dipolmomente der einzelnen Lösungsmittel fällt auf, dass hohe Werte nicht zwingend hohe Dielektrizitätsverluste bedingen.

Tabelle 2.5: Dielektrische Parameter von 6 Lösungsmitteln, gemessen bei 2,45 GHz und Raumtemperatur [61], *[102]

Lösungsmittel (Siedepunkt [°C])	Dipol- moment [D]*	Verlust- faktor $\tan \delta$	relative Permittivität ϵ'	Dielektrizitäts- verlust ϵ''
Ethanol (78)	1,69	0,941	24,3	22,866
Methanol (65)	1,70	0,659	32,6	21,483
Wasser (100)	1,85	0,132	80,4	9,889
Acetonitril (82)	3,92	0,062	37,5	2,325
Dichlormethan (40)	1,60	0,042	9,1	0,382
Toluol (111)	0,37	0,040	2,4	0,096

Hochabsorbierende Lösungsmittel haben Dielektrizitätsverluste $> 14,00$ in Tabelle 2.5 dunkelgrau dargestellt, während Mediumabsorber Zahlenwerte von 1 bis 13,99 (Tabelle 2.5 mittelgrau) zugeordnet werden. Niedrig absorbierende Medien zeigen Dielektrizitätsverluste $< 1,00$ und sind in der Tabelle 2.5 hellgrau dargestellt.

An dieser Stelle wurden Lösungsmittel aus diesen drei Bereichen ausgewählt. Sie wurden in Bezug auf ihre Eignung als Energietrabant untersucht. Lösungsmittel mit geringem Dielektrizitätsverlust, die kaum mit Mikrowellenstrahlung koppeln, können zur Kühlung des Gutes dienen. So würde überschüssige Wärme durch das Lösungsmittel abtransportiert und mehr Mikrowellenenergie könnte mit dem Gut direkt koppeln. Lösungsmittel mit hohen Dielektrizitätsverlusten koppeln dagegen sehr effizient mit Mikrowellenstrahlung und führen zu einem schnellen Aufheizen der gesamten Probe. Ethanol und Methanol wurden als Vertreter der hochabsorbierenden, Wasser und Acetonitril als medium- und Dichlormethan als niedrigabsorbierende Lösungsmittel ausgewählt.

Obwohl verdünnte Salzsäure, mangels experimenteller Daten, nicht ohne Weiteres in dieses Schema einsortiert werden konnte, sollte sie aus zwei Gründen untersucht werden. Zunächst sollte auf ihre katalytischen Fähigkeiten in biomimetischen Modellsystemen hingewiesen werden.

Ohtake und Mitarbeiter konnten eine gesteigerte Aktivität von Rutheniumporphyrinkomplexen mit 2,6-disubstituiertem Pyridin-N-oxid als Sauerstoffdonator und verschiedenen Substraten in Gegenwart von geringen Mengen an HCl beobachten [103]. Bei der Verwendung von Adamantan als Substrat wurde in Gegenwart von HCl 68% Adamantan-1-ol gefunden, während ohne Säurezugabe nur 4% gebildet wurden. Die Bildung eines intermediären chloridkoordinierten Rutheniumkomplexes wurde in diesem Zusammenhang diskutiert. Eine weitere Begründung für den Einsatz von Salzsäure im Modellsystem lieferten ihre Leitfähigkeitseigenschaften. Auf den Effekt des Zusatzes von ionischen Flüssigkeit zu Reaktionsansätzen wurde bereits in der Einleitung (vergleiche 1.5.2) hingewiesen. Obwohl verdünnte Salzsäure nicht den ionischen Flüssigkeiten zugeordnet werden konnte, zeichnet sie sich durch eine hohe Leitfähigkeit aus und könnte infolge dessen zu einer schnelleren Aufheizung des Mediums in der Mikrowelle führen.

Salzsäure wurde in einer Konzentration von 0,25 M eingesetzt. Die Konzentration sollte aus zwei Gründen niedrig sein. Zum Einen sollten die nach *Ohtake* und Mitarbeiter katalytisch wirksamen Mengen mit 0,2-0,41 M eingehalten werden [103] und zum Anderen können höhere Konzentrationen ein Ablösen der kationischen Porphyrine vom Trägermaterial bewirken. Die dielektrischen Eigenschaften von verdünnten Salzsäurelösungen untersuchten *Hasted* und Mitarbeiter [104]. Sie bestimmten die relativen Permittivitäten für wässrige Salzsäurelösungen von 0,0625-0,5M bei 3°C und 10°C sowie einer Frequenz von 3,01GHz. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.6 dargestellt.

Tabelle 2.6: Auszüge aus den von Hasted und Mitarbeitern ermittelten dielektrischen Parameter einer wässrigen 0,25M HCl-lösung bei 3,01GHz und verschiedenen Temperaturen[104]

Temperatur [°C]	Verlustfaktor $\tan \delta$	relative Permittivität ϵ'	Dielektrizitäts- verlust ϵ''
10°C	0,214	70,5	15,1
3°C	0,256	69,6	17,8

Die von *Hasted* und Mitarbeiter ermittelten Werte konnten nicht zum direkten Vergleich mit den Werten aus Tabelle 2.5 herangezogen werden, da die Frequenz und die Temperatur der Messungen unterschiedlich waren. Allerdings konnte *Hasted* zeigen, dass die relative Permittivität und die Relaxationszeit bei steigenden HCl-Konzentrationen bei ein und demselben Temperaturwert abnahmen. Ferner konnte die Abnahme der relativen Permittivität mit steigender Temperatur in Analogie zum Wasser beobachtet werden. Erklärt wurde dieses Phänomen mit der Anwesenheit von Hydroxoniumionen. Die Anlagerung eines Protons resultiert in einer festen Assoziation von Wassermolekülen um das Kation, wodurch Rotation vermindert sein könnte [105]. Aufgrund der Ähnlichkeit zu Wasser bei der Anregungsfrequenz von 3 GHz wurde die verdünnte Salzsäure in die Kategorie der Mediumabsorber eingestuft. Man vergleiche näherungsweise Tabelle 2.6 und Tabelle 2.7.

Tabelle 2.7: Temperatur- und frequenzabhängige Parameter von Wasser bei 3 GHz aus Handbook of chemistry and physics[102]

Temperatur [°C]	Verlustfaktor $\tan \delta$	relative Permittivität ϵ'	Dielektrizitäts- verlust ϵ''
25°C	0,145	76,62	11,13

Ein Problem stellte die ungenügende Löslichkeit von Diazepam in Wasser dar. Aus diesem Grund wurde eine Diazepamstammlösung in Ethanol hergestellt. Aus dieser Lösung wurden 100µl abgenommen und mit Wasser bzw. mit 0,25 M HCl auf 1,0 mL aufgefüllt. Dielektrische Parameter für Ethanol-Wassermischungen wurden von *Bao* und Mitarbeitern generiert [106]. Aus Diagrammen für die relative Permittivität ϵ' und den Dielektrizitätsverlust ϵ'' bei 2450 MHz und 25°C konnten Werte von $\epsilon' = 72$ und $\epsilon'' = 11$ für eine 10% - ige Ethanollösung in Wasser abgelesen werden. Diese Werte bewegten sich wie reines Wasser weiterhin im Mediumabsorberbereich. Für Mischungen aus Ethanol und verdünnter Salzsäure konnten keine Daten aus der Literatur ermittelt werden.

Als Katalysator für die Modellreaktion wurde beispielhaft an Kieselgel immobilisiertes MnT4MPyPCL verwendet. Des Weiteren kamen *m*-CPBA,

MMPP, PhIO, Wasserstoffperoxid als Sauerstoffdonatoren und Wasserstoffperoxid in Kombination mit Imidazol zum Einsatz. Das molare Ansatzverhältnis entsprach dem in AV 5 (siehe Kapitel 6.2.10) beschriebenen. Die Reaktion wurde in der Mikrowelle bei der jeweiligen Siedetemperatur des Lösungsmittels mit einer Dauer von 10 min und einer Vorlaufzeit von 60 s durchgeführt. Die genauen Parameter können dem Experimentellen Teil entnommen werden.

2.7.2 Ergebnisse

Bei der Verwendung der hochabsorbierenden Lösungsmittel Ethanol und Methanol konnten, mit Ausnahme des Ausgangssubstrats Diazepam, weder Oxazepam, Temazepam, Nordazepam noch Diazepam-N-oxid mittels HPLC detektiert werden. Die Lösungen der bestrahlten Proben waren dunkelbraun gefärbt, so dass von einer Abtrennung des MnT4MPyPCL vom Trägermaterial ausgegangen werden kann. Aus diesen Gründen waren diese Lösungsmittel für den Einsatz im Modellsystem nicht geeignet.

Die Ergebnisse der als Mediumabsorber eingestuften Lösungsmittel Wasser und verdünnte Salzsäure sind in Abb. 2.41 dargestellt.

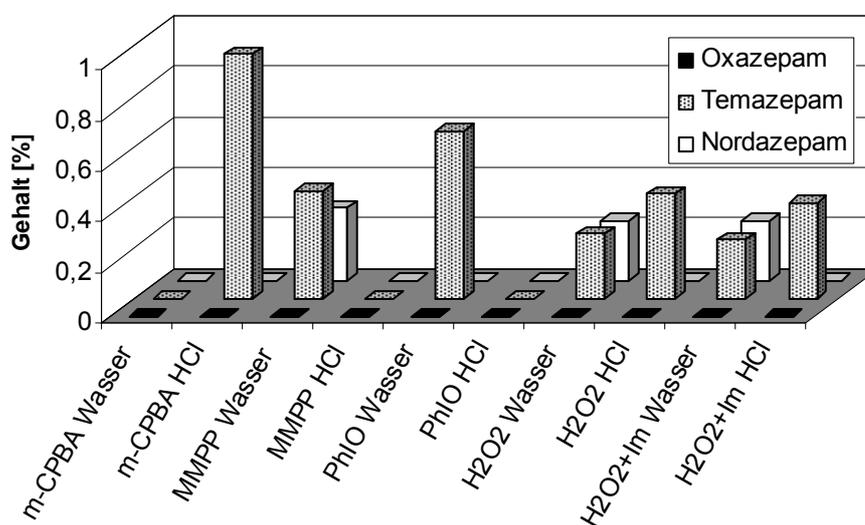


Abb. 2.41: Ergebnisse der Umsetzung von Diazepam mit unterschiedlichen Sauerstoffdonatoren in Wasser und 0,25 M HCl in der Mikrowelle bei 100°C

Bei der Verwendung von *m*-CPBA, MMPP, Wasserstoffperoxid als Sauerstoffdonatoren und Wasserstoffperoxid in Kombination mit Imidazol bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Bildung der Metabolite

zwischen Wasser und Salzsäure. Dagegen war der Unterschied in der Bildung von Temazepam in Wasser mit PhIO als Sauerstoffdonator signifikant gegenüber dem Ergebnis in Salzsäure. Allerdings lag die Ausbeute auch hier unter einem Prozent und war somit als nicht zufriedenstellend einzustufen. Oxazepam wurde unter den genannten Bedingungen nicht gebildet und auch Nordazepam konnte nur bei der Verwendung von Wasser als Lösungsmittel detektiert werden.

Generell konnte festgestellt werden, dass weder Wasser noch 0,25 M Salzsäure geeignete Lösungsmittel für die Umsetzung von Diazepam in der Mikrowelle im biomimetischen Modellsystem waren. Die Proben waren nach zehnminütiger Mikrowellenbestrahlung unter Einsatz von verdünnter Salzsäure hochviskos. Obwohl die Bildung von Metaboliten und Diazepam-N-oxid mittels beschriebener HPLC-Methode nicht detektiert werden konnte, fiel die geringe Menge an Substrat der bestrahlten Proben auf. So konnte unter Einsatz von *m*-CPBA, MMPP und PhIO Substratmengen von nur 10-20%, ausgehend von der eingesetzten Menge an Diazepam, wiedergefunden werden. Bei der Verwendung von Wasserstoffperoxid und Wasserstoffperoxid in Kombination mit Imidazol fand man kein Substrat wieder. Eine mögliche Erklärung für die Ergebnisse lieferten die Ergebnisse der Arbeit von *Han* und Mitarbeiter [107]. Sie beschrieben einen in Abb. 2.42 dargestellten Hydrolysemechanismus von Diazepam in 0,1 M salzsauren Lösungen bei 70-85°C.

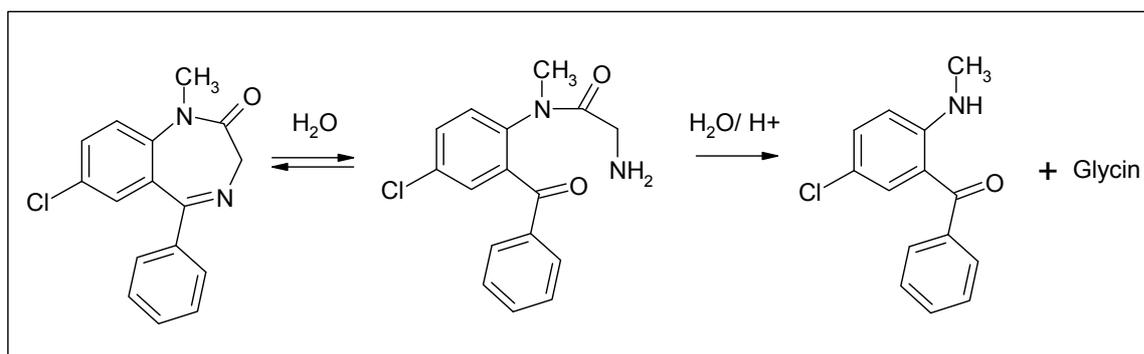


Abb. 2.42: Von Han und Mitarbeitern postulierter Mechanismus der säurekatalysierten Hydrolyse von Diazepam

Zunächst bildet sich reversibel ein ringoffenes Produkt, welches anschließend irreversibel und säurekatalysiert zu 2-Methylamino-5-chlorbenzophenon und Glycin reagiert. *Le Petit* beschrieb die

Eigenschaften dieses Benzophenons [108]. Die gelben Nadeln waren in Wasser unlöslich und in Chloroform gut löslich. Aufgrund der sauren Bedingungen in der durchgeführten Versuchsreihe wäre die Bildung des von *Le Petit* beschriebenen schlecht wasserlöslichen Hydrolyseproduktes ebenfalls denkbar. Eine Bestätigung dieser These lieferten die hohe Viskosität des Reaktionsgemisches sowie die geringe Wiederfindung an Diazepam in selbigem. Durch die Membranfiltration der Proben wurde das Benzophenon abgetrennt, während der geringe Anteil an Ethanol in der verdünnten Salzsäure ausreichend gewesen sein dürfte, das nicht hydrolysierte Diazepam weiter in Lösung zu halten und somit detektierbar zu machen. Wie bereits in diesem Abschnitt erwähnt, war unter Einsatz von Wasserstoffperoxid kein Substrat nachweisbar. Dies könnte darauf hinweisen, dass Wasserstoffperoxid die säurekatalysierte Hydrolyse noch zu beschleunigen oder eine Substraterstörung anderer Art zu bewirken, vermochte.

Auch bei der Verwendung von Wasser als Lösungsmittel konnten bei allen verwendeten Sauerstoffdonatoren, ebenso für Wasserstoffperoxid, nur 10-20% an Substrat nach der Bestrahlung wiedergefunden werden. Dieses Phänomen wurde ebenfalls von *Han* und Mitarbeitern beschrieben und ist in Abb. 2.43 dargestellt [107]. Der postulierte Katalysezyklus lief zwar in wässrigen Lösungen, bei höheren pH-Werten als der pK_s -Wert von Diazepam ($pK_s=3,3$), über eine andere Zwischenstufe ab, resultierte aber in denselben Produkten, dem 2-Methylamino-5-chlorbenzophenon und Glycin.

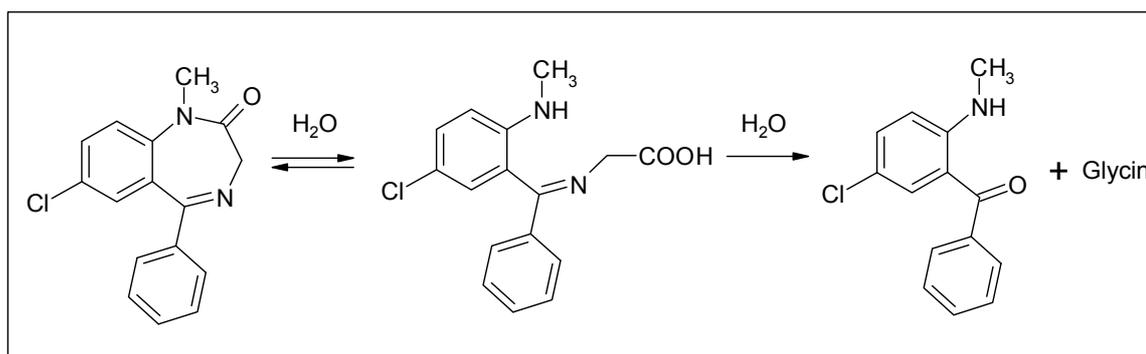


Abb. 2.43: Von Han und Mitarbeitern postulierter Mechanismus der Hydrolyse von Diazepam bei pH -Werten $\geq pK_s$ -Wert von Diazepam

Diazepam-N-oxid wurde nur, in einer Ausbeute von unter einem Prozent, mit Wasser und unter Verwendung von MMPP als Sauerstoffdonator nachgewiesen.

Die niedrigabsorbierenden Lösungsmittel Acetonitril und Dichlormethan lieferten in Abhängigkeit vom Sauerstoffdonator zufriedenstellendere Metabolitenausbeuten. Die Ergebnisse sind in Abb. 2.44 und in Abb. 2.45 graphisch dargestellt.

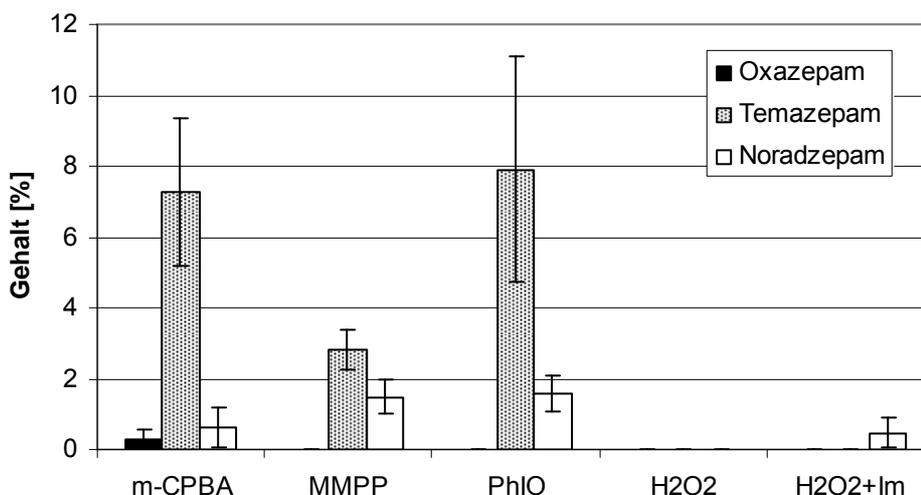


Abb. 2.44: Ergebnisse der Umsetzung von Diazepam mit unterschiedlichen Sauerstoffdonatoren in Acetonitril unter Mikrowellenbestrahlung bei 82°C

Vergleich man die Ausbeuten an Oxazepam, Temazepam und Nordazepam pro Sauerstoffdonator in Acetonitril und Dichlormethan konnten nur für *m*-CPBA und Wasserstoffperoxid in Kombination mit Imidazol signifikante Unterschiede festgestellt werden. In beiden Fällen war Acetonitril das potentere Lösungsmittel mit signifikant höheren Ausbeuten für Temazepam bei Verwendung von *m*-CPBA und für Nordazepam bei Einsatz von Wasserstoffperoxid mit Imidazol.

Diazepam-N-oxid konnte, unter Einsatz von MMPP und *m*-CPBA als Sauerstoffdonatoren, in beiden Lösungsmitteln nachgewiesen werden.

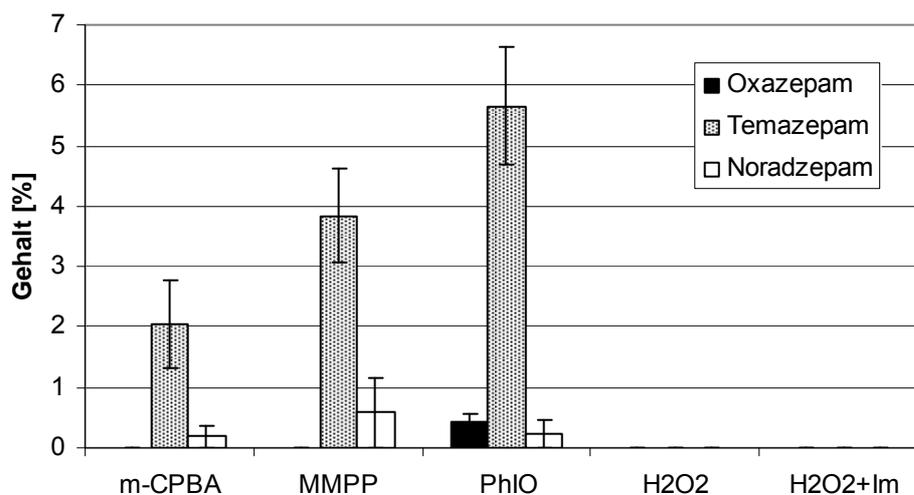


Abb. 2.45: Ergebnisse der Umsetzung von Diazepam mit unterschiedlichen Sauerstoffdonatoren in Dichlormethan unter Mikrowellenbestrahlung bei 40°C

Beide Lösungsmittel sind aprotisch. Acetonitril ist zusätzlich dipolar, während Dichlormethan in die Kategorie inert eingestuft werden konnte. Die Tatsache, dass polar protische Lösungsmittel die Umsetzung von Diazepam mit unterschiedlichen Sauerstoffdonatoren reduzierten und aprotische Lösungsmittel die Reaktion förderten, ließ verschiedene Erklärungen zu:

Betrachtete man die Lösungsmittel in ihrem Verhalten in der Mikrowelle, konnte festgestellt werden, dass Ethanol und Methanol keine geeigneten Lösungsmittel für die Umsetzung von Diazepam mit MnT4MPyPCI als Katalysator und unterschiedlichen Sauerstoffdonatoren darstellten. Aufgrund ihrer hohen Dielektrizitätsverluste wurde eine schnelle Überhitzung unter Mikrowellenbestrahlung erreicht, die eine Metabolitenbildung nicht förderte. Mediumabsorbierende Lösungsmittel wie z.B. Wasser und verdünnte Salzsäure schienen aufgrund ihrer Eigenschaften, nicht in zufriedenstellender Menge, aber dennoch eine detektierbare Metabolitenbildung zu ermöglichen. Acetonitril, welches laut Definition ebenfalls als Mediumabsorber, allerdings an der Grenze zum Niedrigabsorber, eingeordnet wurde, lieferte bis hierhin die höchsten Ausbeuten mit *m*-CPBA, MMPP und PhIO als Sauerstoffdonatoren. Vergleichbare Ergebnisse wurden mit Dichlormethan generiert. Resultierend aus diesen Ergebnissen konnte davon ausgegangen werden, dass Lösungsmittel mit geringen Dielektrizitätsverlusten die Umsetzung von Diazepam im Modellsystem, zumindest mit PhIO, *m*-CPBA

und MMPP förderten. Eine weniger schnelle Aufheizung der Probe oder eventuell kühlende Aspekte während der Reaktion schienen hierbei plausible Gründe darzustellen.

Betrachtete man das Lösungsmittel als Reaktivitätsmodulator, konnte davon ausgegangen werden, dass während der Umsetzung von Diazepam mit MnT4MPyPCL entweder keine stark polaren Übergangszustände entstanden waren, da diese sonst durch Ethanol oder Methanol stabilisiert worden wären, oder die reaktiven Intermediate waren nukleophiler Natur. Dies hätte bei guter Solvation durch protische Lösungsmittel bedeutet, dass die Nukleophilie gesenkt worden wäre und es somit zu verlangsamer oder gar keiner Reaktion gekommen wäre, wie im Falle von Ethanol und Methanol gezeigt werden konnte. Acetonitril und Dichlormethan als aprotische Lösungsmittel hätten dagegen das nukleophile Agens nicht solvatisiert, wodurch seine Reaktivität gesteigert und es somit zur Bildung von Reaktionsprodukten gekommen wäre [109].

Allerdings wurden wie in der Einleitung bereits erwähnt in der Literatur hauptsächlich zwei Mechanismen für die Übertragung des aktivierten Sauerstoffs durch Metalloporphyrinen in Gegenwart von Sauerstoffdonatoren auf Substrate genannt. Hierbei handelte es sich wie in Kapitel 1.4 beschreiben zum Einen um die hochvalente Metall-oxo-spezies und zum Anderen um die Hydroperoxy-spezies. Beides stellten elektrophile Intermediate dar. Trotzdem hätte auch eine positive Ladung durch aprotische Lösungsmittel weniger stark maskiert werden und so elektrophiler und reaktiver erscheinen können.

Der dekompensative Effekt von Methanol in biomimetischen Modellsystemen wurde vielfältig in der Literatur dargestellt [110, 111]. *Camenzind* und Mitarbeiter beschrieben unter Methanol und Iodosobenzol-Einfluss die Bildung eines Dimethoxy-Mangan(IV)-komplexes. Mit dessen Existenz könnte eine Deaktivierung des Porphyrinkomplexes und im Folgenden das Ausbleiben der Katalyse begründet werden [112].

Für die im Übergangszustand gebildeten Komplexe aus Porphyrin und Sauerstoffdonator oder mit Sauerstoff assoziierte aktivierte Porphyrine und Substrat konnte man anhand der vorhandenen Strukturen von einer Delokalisierung der Elektronen über ein größeres Volumen ausgehen.

Reaktionen bei denen Ladungen im aktivierten Komplex delokalisiert sind, werden bekanntermaßen durch Erhöhung der Lösungsmittelpolarität gehemmt [109].

Eine Stabilisierung des Porphyrinkomplexes nach Austritt des oxygenierten Substrates durch Acetonitrilmoleküle und einen hierdurch erreichten Energiegewinn stellen einen weiteren Erklärungsansatz dar. Für *Meso*-tetramesitylporphyrin-eisen(III)-chlorid (= [Fe III (TMP)(Cl)]) wurde nach Oxygenierung mit *m*-CPBA als Sauerstoffdonator der Komplex durch axiale Anlagerung zweier Acetonitrilmoleküle als [Fe III (TMP)(CH₃CN)₂] beschrieben [113].

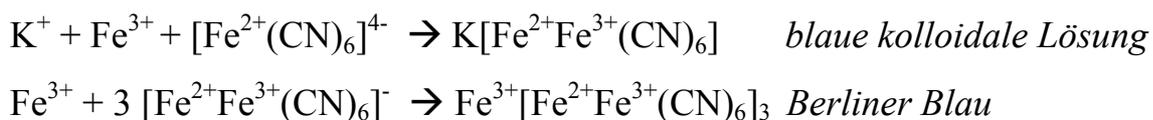
An dieser Stelle sollte der Mechanismus nicht weiter aufgeklärt werden. Die verbesserten Ausbeuten bei der Verwendung von Dichlormethan und Acetonitril im Modellsystem genügten um sich für eines der beiden als Lösungsmittel zu entscheiden. Wegen des höheren Siedepunktes von Acetonitril (82°C) gegenüber Dichlormethan (40°C) und der damit einhergehend geringeren Flüchtigkeit wurde Acetonitril als Lösungsmittel für die folgenden Versuche ausgewählt.

2.8 Stabilität der Metalloporphyrine in Acetonitril

Es wurde gezeigt, dass Acetonitril ein geeignetes Lösungsmittel für die biomimetische Umsetzung von Diazepam mit MnT4MPypCl und unterschiedlichen Sauerstoffdonatoren war. Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die ausgewählten Katalysatoren unter den Reaktionsbedingungen in Acetonitril auch stabil waren. Eine eventuelle Zerstörung der Komplexe unter Schüttelbedingungen und während der Bestrahlung mit Mikrowellen sollte ausgeschlossen werden. Eine strukturelle Veränderung oder Zerstörung der Metalloporphyrinstruktur während der Reaktion würde zu einem Anstieg an freien Metallionen in Lösung führen. Diese potenziell freiwerdenden Metallkationen sollten nasschemisch durch spezifische Einzelnachweise erfasst werden. Der anschließende Vergleich mit einer Lösung, die denselben Gehalt an Kationen aufwies, entspräche den semiquantitativen Bestimmungen der im Ph. Eur. benannten Grenzprüfungen. Eine an diese Grenzprüfungen anlehrende Bestimmung wurde für die eisen- und manganhaltigen Porphyrinkomplexe durchgeführt.

2.8.1 Semiquantitative Bestimmung der eisenhaltigen Metalloporphyrine

Versetzt man eine neutrale oder saure Eisen(III)-Lösung mit einer Kaliumhexacyanoferrat(II)-Lösung, fällt Berliner Blau aus. Bei geringen Mengen an Eisen(III)-Ionen kann sich auch nur eine blaue kolloidale Lösung bilden [114]:



Man stellte eine 0,05M Kaliumhexacyanoferratlösung in Wasser sowie eine Eisenchloridstammlösung in Acetonitril her. Anschließend wurden je 2 μmol der eisenhaltigen Porphyrine FeT4MPyPCL und FeTFPPCL in das Reaktionsgefäß eingewogen und mit 1000 μL Acetonitril versetzt. Die Ansätze wurden dann entweder 10 min bei 82°C oder RT geschüttelt oder 10 min bei der Einstellung von 300 Watt und maximal 18 bar bei 82°C oder RT in der Mikrowelle bestrahlt. Nach Ablauf der Zeit pipettierte man 500 μL des Überstandes ab. Der nichtgelöste Anteil von Metalloporphyrin wurde auf ein Filterpapier überführt und nach Konstantwiegen im Trockenschrank bei 110°C bestimmte man das Gewicht des Porphyrins. Auf diesem Wege konnte der Gehalt an gelöstem Porphyrin bzw. die Menge an Eisenionen in Lösung berechnet werden. 500 μL einer äquimolaren Menge an Eisen(III)-Ionen wurde aus der Eisen(III)-chloridstammlösungen als Vergleichslösung entsprechend für jedes Metalloporphyrin und jede Bedingung hergestellt, sowie ein Reagenzglas mit 500 μL reinem Acetonitril als Blindprobe bereitet. Anschließend wurden die Lösungen mit 500 μL der Kaliumhexacyanoferratlösung versetzt und makroskopisch miteinander verglichen.

Dargestellt sind beispielhaft für alle übrigen Versuche die Bilder der Ansätze von FeTFPPCL und FeT4MPyPCL unter Mikrowellenbedingungen bei 82°C (siehe Abb. 2.46, Abb. 2.47, Abb. 2.48, Abb. 2.49). Die dargestellten Lösungen von FeTFPPCL und FeT4MPyPCL waren nach der Mikrowellenbestrahlung grünlich braun gefärbt.

Nach Zugabe der Reagenzlösung fiel bei beiden kein blauer Niederschlag aus, während die entsprechenden Eisenchloridreferenzlösungen einen deutlich blauen Niederschlag zeigten. Die aufgetretenen Niederschläge in Blind- und Porphyrinlösung zeigten beide eine gelbweisse Farbe. Die Vermutung lag nah, dass es sich hierbei um Kaliumhexacyanoferrat handeln mußte, dass durch Erhöhung des organischen Lösungsmittelanteils sein Löslichkeitsprodukt überschritten hatte und ausfiel. Bestätigt wurde diese Vermutung durch Bestimmung der im Niederschlag enthaltenen Kaliumionen. Den Niederschlag filtrierte man ab und löste ihn wieder in Wasser. Die mit Salzsäure angesäuerte Lösung wurde mit Perchlorsäure versetzt, und es fiel weißes KClO_4 aus.

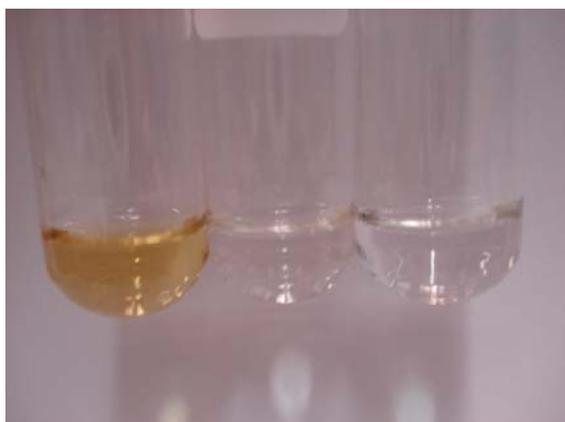


Abb. 2.46: FeT4MPyPCL (vor Reagenzienzugabe) von links nach rechts: FeT4MPyPCL , FeCl_3 -Referenz, Blindprobe



Abb. 2.47: FeT4MPyPCL (nach Reagenzienzugabe) von links nach rechts: FeT4MPyPCL , FeCl_3 -Referenz, Blindprobe



Abb. 2.48: FeTFPPCl (vor Reagenzienzugabe) von links nach rechts: FeTFPPCl , FeCl_3 -Referenz, Blindprobe

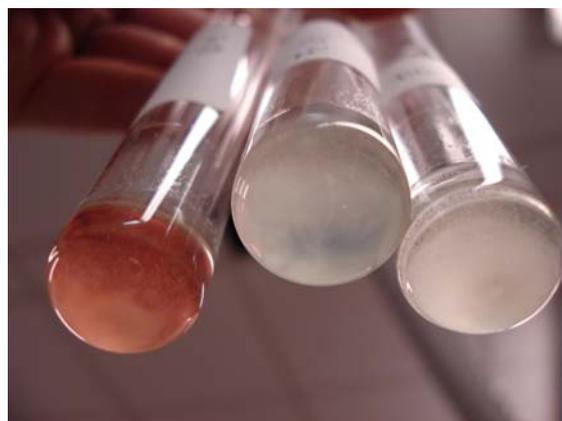
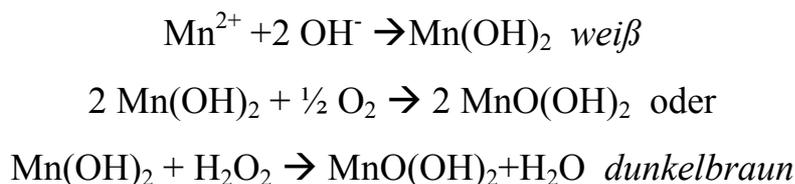


Abb. 2.49: FeTFPPCl (nach Reagenzienzugabe) von links nach rechts: FeTFPPCl , FeCl_3 -Referenz, Blindprobe

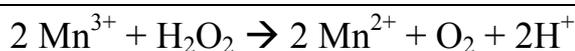
Unter Mikrowellenbedingungen bei RT sowie unter Schüttelbedingungen bei RT und ST traten ebenfalls keine abweichenden Ergebnisse auf. Die Niederschläge der Referenzlösungen wiesen alle eine blaue Färbung auf, während die Lösungen der eisenhaltigen Porphyrine weiterhin grünlich braun gefärbt blieben, und die gebildeten Niederschläge gelbweiss waren. Somit konnte gezeigt werden, dass die eisenhaltigen Porphyrine in Acetonitril unter allen genannten Reaktionsbedingungen stabil waren.

2.8.2 Semiquantitative Bestimmung der manganhaltigen Metalloporphyrine

Versetzt man eine manganhaltige Probelösung mit verdünnter Natronlauge, so fällt weißes Mangan(II)-hydroxid aus, das durch Luftsauerstoff oder Wasserstoffperoxid schnell zu ebenfalls schwerlöslichem Mangan(IV)-oxidhydrat, auch als Braunstein bezeichnet, oxidiert wird [114]:



Das Zentralatom der manganhaltigen Metalloporphyrine lag in der Oxidationsstufe +3 vor. Bei einer potentiellen Zerstörung des Porphyringerüsts unter Synthesebedingungen könnten Mn^{3+} -Ionen in Lösungen gehen. Die Bildung von Braunstein könnte anschließend auf direktem Weg oder über eine vorherige Reduktion erfolgen. *Wells* und Mitarbeiter postulierten aufgrund der starken oxidativen Eigenschaften von Mn^{3+} -Ionen und des redoxamphotereren Charakter von Wasserstoffperoxid folgenden Mechanismus. Demnach würde zunächst unter Sauerstoffbildung eine Reduktion von Mn^{3+} -Ionen zu Mn^{2+} -Ionen vorausgehen [115].



Im Anschluß daran würde die Bildung von Braunstein analog den oben beschriebenen Gleichungen über die Bildung von Manganhydroxid ablaufen. Eine direkte Oxidation ohne vorangegangene Reduktion scheint allerdings ebenfalls plausibel.

Analog der Bestimmungen der eisenhaltigen Porphyrine wurden je 2 μmol von MnTFPPCl bzw. MnT4MPyPCL in ein entsprechendes Reaktionsgefäß appliziert, mit 1000 μL Acetonitril versetzt und den vier in 2.8.1 beschriebenen Reaktionsbedingungen ausgesetzt. 500 μL des Überstandes wurden abgenommen, während der ungelöste Anteil ebenfalls nach dem Konstantwiegen bei 110°C im Trockenschrank bestimmt wurde. MnTFPPCl löste sich im Lösungsmittel komplett auf. Aufgrund der tief dunkelbraunen Farbe wurde diese Lösung 1:4 verdünnt. Als Vergleichslösung bereitete man zunächst eine $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$ -stammlösung. Aus dieser stellte man wiederum 500 μL einer Lösung mit äquimolaren Menge an Manganionen entsprechend der jeweiligen Ansätze des Manganporphyrins her. Als Blindlösung dienten 500 μL reines Acetonitril. Das Fällungsreagenz bestand aus 500 μL einer 1:1 Mischung von 30%-iger Natronlauge und 3%-igem Wasserstoffperoxid. Diese Komponenten wurden erst direkt vor Zugabe zur Untersuchungslösung gemischt.

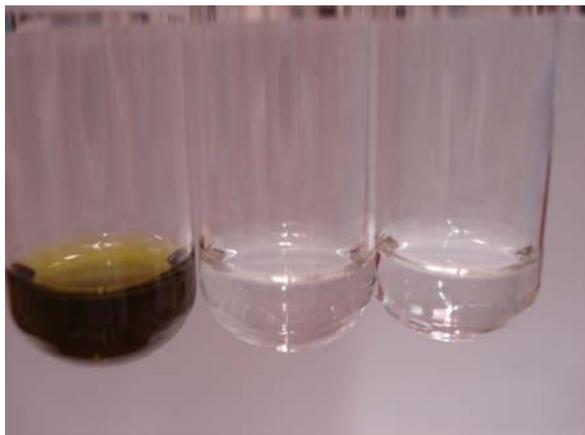


Abb. 2.50: *MnT4MPyPCL* (vor Reagenzienzugabe) von links nach rechts: *MnT4MPyPCL*, $Mn(NO_3)_2$ -Referenz, Blindprobe

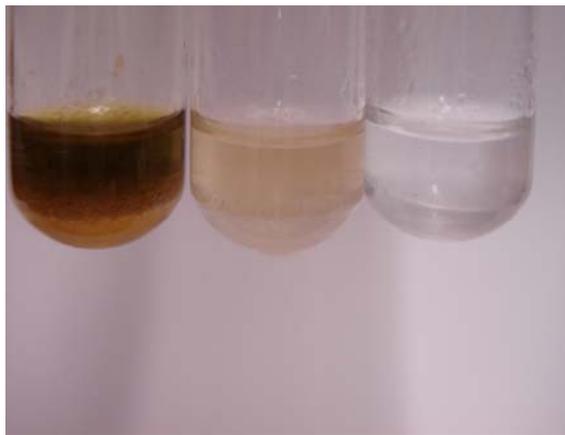


Abb. 2.51: *MnT4MPyPCL* (nach Reagenzienzugabe) von links nach rechts: *MnT4MPyPCL*, $Mn(NO_3)_2$ -Referenz, Blindprobe

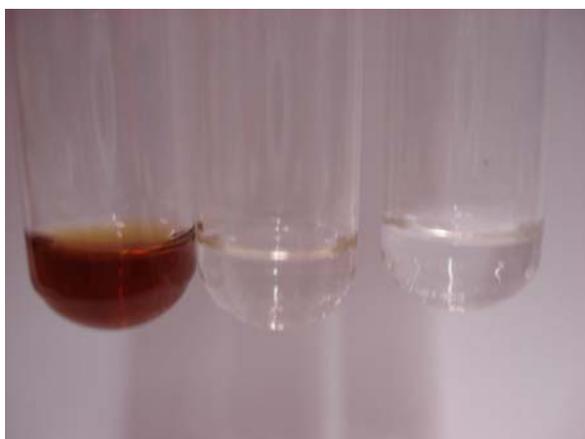


Abb. 2.52: *MnTFPPCL* (vor Reagenzienzugabe) von links nach rechts: *MnTFPPCL*, $Mn(NO_3)_2$ -Referenz, Blindprobe

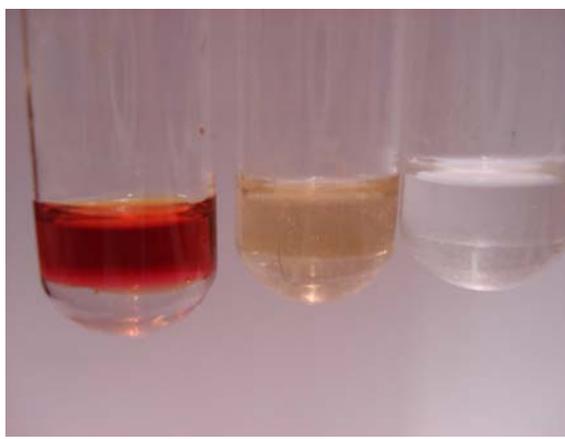


Abb. 2.53: *MnTFPPCL* (nach Reagenzienzugabe) von links nach rechts: *MnTFPPCL*, $Mn(NO_3)_2$ -Referenz, Blindprobe



Abb. 2.54: *MnT4MPyPCL* nach 24 Stunden; links: *MnT4MPyPCL*, rechts: $Mn(NO_3)_2$ -Referenz



Abb. 2.55: *MnTFPPCL* nach 24 Stunden; links: *MnTFPPCL*, rechts: $Mn(NO_3)_2$ -Referenz

Es werden beispielhaft für alle übrigen Versuche die Bilder der Ansätze von MnT4MPyPcI und MnTFPPcI in Acetonitril unter Mikrowellenbedingungen bei 82°C dargestellt (siehe Abb. 2.50, Abb. 2.51, Abb. 2.52, Abb. 2.53).

Im Falle von MnT4MPyPcI war anhand der Färbung nicht eindeutig auszuschliessen, dass sich kein Braunstein gebildet hatte. Die Mn(NO₃)₂-Vergleichslösung zeigte bereits eine schwache Braunfärbung nach Reagenzienzugabe, während die MnT4MPyPcI-Lösung ihre braune Färbung nach Zugabe von Reagenz nicht merklich veränderte. Aufgrund dessen wurden die Ansätze nach 24 Stunden nochmals betrachtet. In Abb. 2.54 ist in der Vergleichslösung eindeutig ein brauner Niederschlag von Braunstein zu erkennen, während im Falle von MnT4MPyPcI kein Niederschlag entstanden war und die Lösung nur eine gleichmäßig braune Färbung aufwies. Die gleiche Beobachtung konnte nach 24 Stunden auch in der Vergleichslösung für MnTFPPcI gemacht werden (siehe Abb. 2.55). Hier entstand ebenfalls ein Braunsteinniederschlag, während die MnTFPPcI-Lösung selbst keinen Niederschlag aufzeigte. Die obere organische Phase war rotbraun gefärbt, während die untere, wässrige Phase weiterhin farblos war.

Abweichende Ergebnisse konnten auch bei den übrigen Reaktionsbedingungen nicht gefunden werden, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die verwendeten manganhaltigen Porphyrinkomplexe unter den durchgeführten Bedingungen und in Acetonitril stabil waren. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass MnTFPPcI und MnT4MPyPcI auch nach 24 Stunden in Lösung nicht demetalliert wurden.

2.9 Ermittlung der optimalen Synthesebedingungen für die Mikrowellenbestimmung

Wie in der Einleitung dargestellt, wurden in der Literatur vielfältig thermische und nicht-thermische Phänomene diskutiert, die zu höheren Ausbeuten und kürzeren Reaktionszeiten unter Mikrowellenbestrahlung führten. Durch Verwendung von Synthesemikrowellen wurden außerdem Reaktionsbedingungen vielseitig beeinflussbar. Im Folgenden sollten die

apparativen Möglichkeiten der in dieser Arbeit verwendeten Synthesemikrowelle Discover™ (CEM GmbH, Kamp-Linfort) erläutert werden und der Effekt durch Veränderung steuerbarer Parameter am Metabolismusmodell für Diazepam untersucht werden.

2.9.1 Parameteroptionen

Kühlung

Eine integrierte Kühlungseinrichtung, die Druckluft direkt auf die Unterseite des Mikrowellenvials richtete, ließ zwei entscheidende Mechanismen zu. Erstens konnte in Form, der von der Firma CEM als *Powermaxcooling* bezeichneten Systemeinstellung, eine permanente Gegenkühlung während der Reaktion erfolgen. So wurden die Proben während des Reaktionsverlaufes mit Mikrowellen bestrahlt, ohne dass eine Überhitzung auftrat. Dies ließ wiederum die Möglichkeit eines gesteigerten Mikrowellenenergieeintrags bei gleichbleibender Temperatur zu. Zweitens bewirkte die Druckluft nach Beenden der Reaktion die schnelle Abkühlung der Probe und ein Verlangsamen der Weiterreaktion.

Druck

Das in dieser Arbeit verwendete Gerät Discover™ war mit einem indirekten Drucksensor ausgestattet. Dieser ermöglichte die Messung und Steuerung des Druckes im Mikrowellenvial. Durch erhöhten Druck im Behältnis, wölbte sich das Septum nach außen. Ein Sensor oberhalb des Septums maß den hieraus resultierenden Druck. Eine Überwurfmanschette wurde über den Druckbehälter gestülpt und durch einen Antriebsmotor selbständig fixiert. Aufgrund dessen wären Reaktionen in einem geschlossenen Mikrowellenvial bis zu einem Maximaldruck von 20 bar möglich gewesen. Lösungsmittel konnte man so über ihren jeweiligen Siedepunkt erhitzen.

Temperatur

Die Temperatur im Probengefäß wurde über einen IR-Sensor ermittelt, der sich unterhalb des Mikrowellenvials befand.

Temperatur und Leistung bedingten sich wechselseitig. Programmierte man einen Lauf mit einer bestimmten Temperatur, wurde der Mikrowelleneintrag automatisch so modifiziert, dass es nicht zum Überschreiten dieser

Temperatur kam. Wurde die Probe durch die Druckluft gekühlt, führte dies zu einer Temperaturabnahme im Gut und die Mikrowellenbestrahlung konnte hierdurch bis zur Maximalleistung gesteigert werden. Es kam erst dann zu einer Drosselung, wenn die programmierte Temperatur erreicht wurde.

Leistung

Die Maximalleistung des in dieser Arbeit verwendeten Discover™-systems lag bei 300 Watt. Wurde diese Leistung während eines Laufes gefordert, stieg der Mikrowelleneintrag rapide bis zur programmierten Leistung an, sofern die Temperatur hoch genug gewählt wurde. Denn der Mikrowelleneintrag konnte durch die Temperatur limitiert werden. Wurde eine vorher definierte Temperatur durch eine geringere Mikrowellenleistung erreicht, erfolgte im Weiteren ein reduzierter Leistungseintrag. Dieser war dann gerade so groß, um die programmierte Temperatur konstant zu halten. Sollte eine Probe allerdings mit 300 Watt Leistung bestrahlt werden, musste entweder die Temperatur ausreichend hoch gewählt werden, oder die Funktion des Powermaxcoolings (siehe *Temperatur*) wurde während des Laufes genutzt.

In einer Versuchsreihe sollten drei verschiedene Einstellungen an der Mikrowelle vorgenommen werden, deren Bewertung im Anschluss über die Metabolitenbildung von Diazepam erfolgen sollte (siehe Tabelle 2.8). Als Beispielkatalysator diente MnTFPPCl, welches vorher frisch nach AV 1 (siehe Kapitel 6.2.3) immobilisiert wurde. PhIO, MMPP und *m*-CPBA wählte man als Sauerstoffdonatoren aus, Acetonitril fand als Lösungsmittel Verwendung. Die Ansätze stellte man nach AV 5 (siehe Kapitel 6.2.10) her und bestrahlte sie für die Dauer von 10 min in der Mikrowelle. Es wurden jeweils vier Ansätze pro Sauerstoffdonator und Bedingung bereitet.

Der Einfluss des Powermaxcoolings und das Erhitzen der Probe über den Siedepunkt des Lösungsmittels hinaus sollten betrachtet werden. Als Referenzbedingung fungierte eine Mikrowelleneinstellung mit dem Siedepunkt des Lösungsmittels als Temperaturvorgabe und 300 Watt als Maximalleistung. Die Funktion des Powermaxcoolings wurde nicht aktiviert. Eine Übersicht ist in Tabelle 2.8 dargestellt.

Tabelle 2.8: Übersicht der untersuchten Mikrowellenparameter

Bedingung	Temperatur [°C]	Powermaxcooling
Referenz	82	aus
PMC	82	an
oPMC	120	aus

Für die Bedingung *oPMC* wurde eine Temperatur von 120°C ausgewählt, da der Schmelzpunkt von Diazepam bei 125°C liegt und oberhalb dieser Temperatur, auch in Acetonitril, mit temperaturbedingten Veränderungen der Molekülstruktur zu rechnen war. Trotzdem wurde diese Temperatur so hoch gewählt, um eine deutliche Aussage über den Effekt einer Temperaturerhöhung treffen zu können. Ferner wurde bei der Temperaturprogrammierung von 120 °C auf die Möglichkeit des Powermaxcoolings verzichtet. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass unter Einfluß des Powermaxcoolings keine Temperaturen oberhalb des Siedepunktes des Lösungsmittels erreicht werden konnten.

Beispielhaft ist das Verhalten der physikalischen Parameter Temperatur, Druck und Leistung in der Probe für alle drei untersuchten Bedingungen im Folgenden dargestellt:

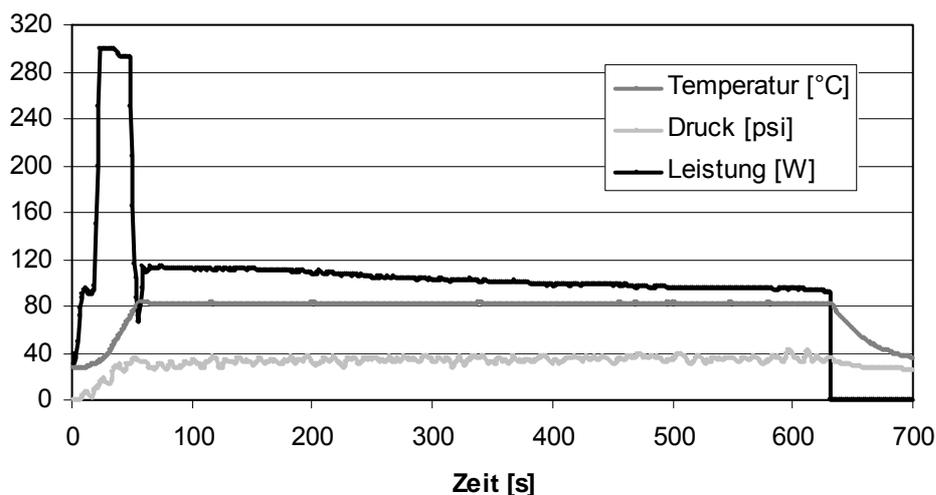


Abb. 2.56: Darstellung der Temperatur-, Druck- und Leistungskurven während der Mikrowellenreaktion bei 82°C ohne Powermaxcooling; Modellsystem: MnTFPPCI/PhIO/DZP/ACN

Das Diagramm in Abb. 2.56 zeigt deutlich die konstanten Temperaturbedingungen während der Reaktionszeit von 10 min. Allerdings war die Mikrowellenleistung während des Laufes nicht konstant. Bis zum Erreichen der Siedetemperatur war ein Maximum an Leistung zu verzeichnen, während danach die Leistung stark absank und relativ konstant, mit leicht sinkender Tendenz, über 10 min bei ca. 110 Watt verlief.

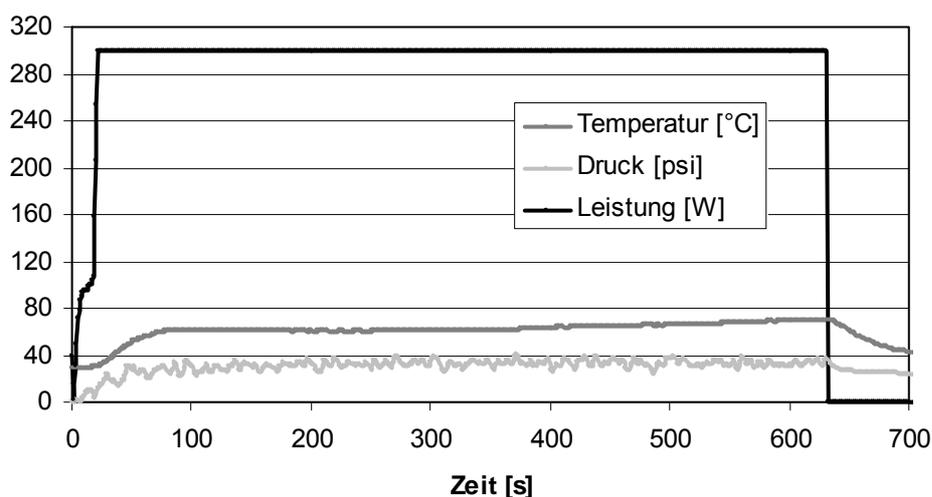


Abb. 2.57: Darstellung der Temperatur-, Druck- und Leistungskurven während der Mikrowellenreaktion bei 82°C und Powermaxcooling; Modellsystem: MnTFPPCI/PhIO/DZP/ACN

Der Einfluss des Powermaxcoolings wurde in Abb. 2.57 deutlich. Der Mikrowelleneintrag war konstant über 10 min bei einer Maximalleistung von 300 Watt, während die programmierte Temperatur von 82°C allerdings nicht erreicht wurde.

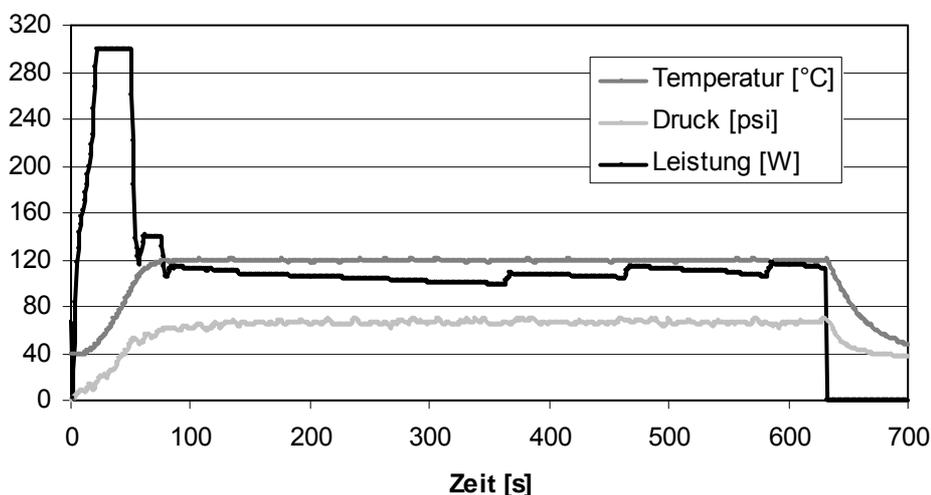


Abb. 2.58: Darstellung der Temperatur-, Druck- und Leistungskurven während der Mikrowellenreaktion bei 120°C; Modellsystem: MnTFPPCI/PhIO/DZP/ACN

Das Diagramm in Abb. 2.58 war, analog zu Abb. 2.56, durch ein anfängliches Leistungsmaximum gekennzeichnet, welches nach Erreichen der programmierten Temperatur von 120 °C stark absinkt. Die Leistung bewegte sich ab diesem Punkt in einem nahezu konstanten Bereich um 110 Watt über 10 min. Auffällig war der steigende Druck in dem Mikrowellengefäß. Dieser war, im Gegensatz zu den gezeigten 82°C-bedingungen, doppelt so hoch und konnte durch die gesteigerte Temperatur begründet werden.

Die Diagramme der unterschiedlichen Mikrowellenbedingungen von MMPP und *m*-CPBA ähnelten in ihrem Verlauf stark den dargestellten Diagrammen mit PhIO als Sauerstoffdonator. Somit war davon auszugehen, dass die Sauerstoffdonatoren den Verlauf der Druck-, Temperatur- und Leistungskurven in der Mikrowelle wenig beeinflussen.

2.9.2 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Umsetzung bei unterschiedlichen Bedingungen in der Mikrowelle wurden im Folgenden, nach eingesetzten Sauerstoffdonatoren geordnet, dargestellt.

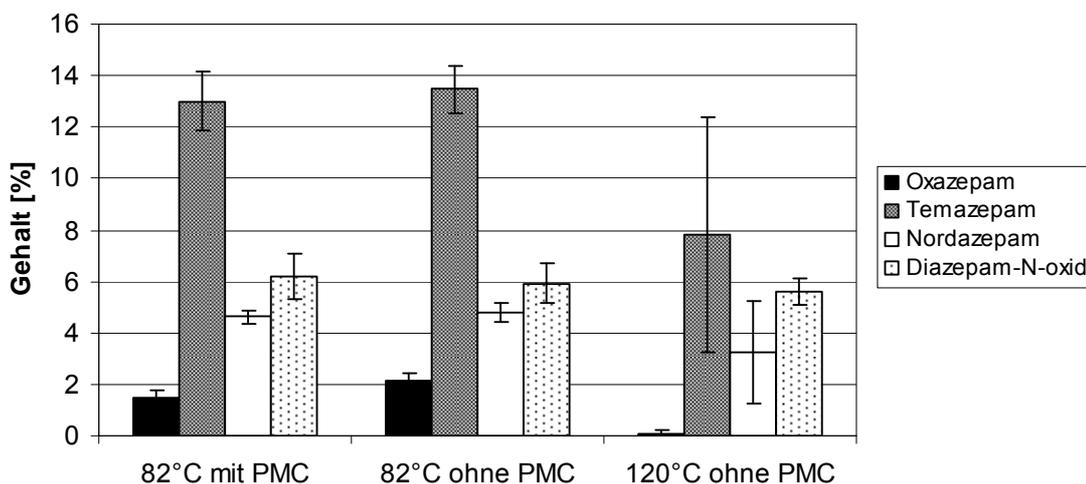


Abb. 2.59: Ergebnisse der Umsetzung von Diazepam mit $MnTFPPCl$ und $MMPP$ unter verschiedenen Mikrowellenbedingungen

Wie der Abb. 2.59 schon auf den ersten Blick zu entnehmen war, unterschieden sich die Ergebnisse der Referenz- und mPMC-Bedingung nur minimal. Betrachtete man die Ausbeuten der einzelnen Metabolite und das Diazepam-N-oxid innerhalb dieser beiden Bedingungen von der statistischen Seite, konnte auch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Allerdings konnten auch zwischen den Ergebnissen der Bedingungen 120°C ohne Powermaxcooling und der Referenz in Bezug auf die Metabolite und Diazepam-N-oxid kein signifikanter Unterschied ausgemacht werden, mit Ausnahme der Bildung von Temazepam. Unter 120°C und ohne Powermaxcooling wird signifikant weniger Temazepam gebildet als unter den beiden anderen Bedingungen.

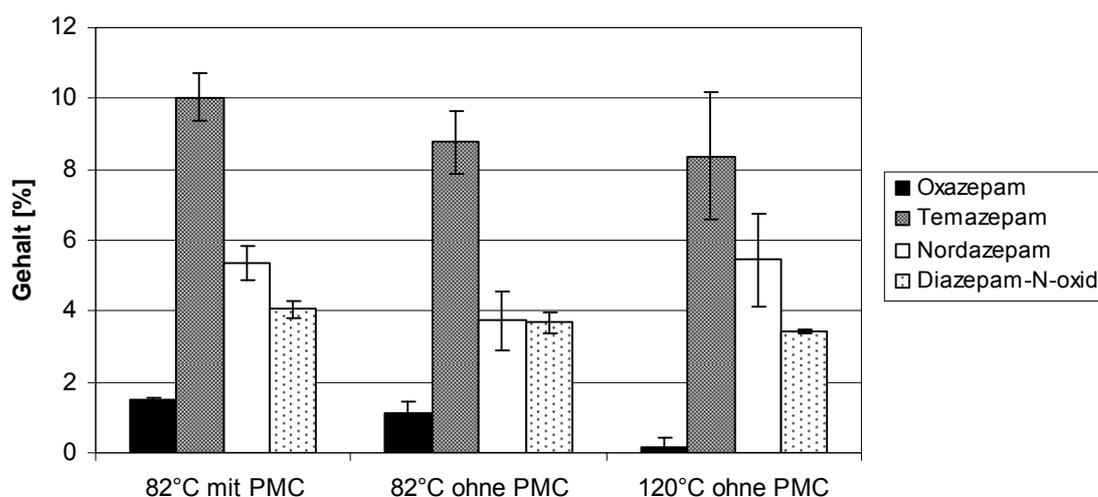


Abb. 2.60: Ergebnisse der Umsetzung von Diazepam mit $MnTFPPCl$ und m -CPBA unter verschiedenen Mikrowellenbedingungen

Vergleich man die Ausbeuten der einzelnen Metabolite und des Diazepam-N-oxid unter den verschiedenen Bedingungen aus Abb. 2.60, konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dies bedeutete, dass unter keiner Bedingung signifikant höhere Ausbeuten in Bezug auf eine einzelne betrachtete Substanz festgestellt werden konnte. Die Bedingungen waren mit m -CPBA als Sauerstoffdonator demzufolge als gleichwertig einzustufen.

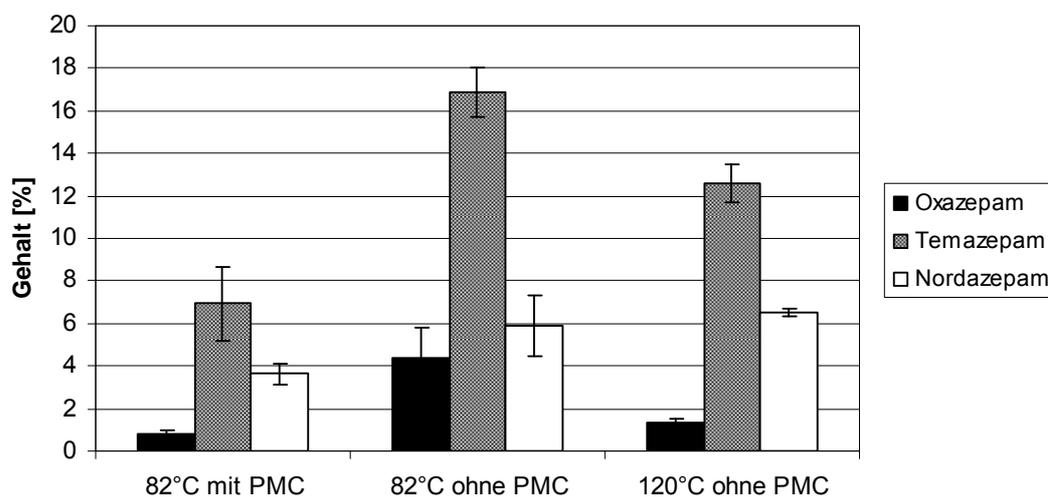


Abb. 2.61: Ergebnisse der Umsetzung von Diazepam mit $MnTFPPCl$ und PhIO unter verschiedenen Mikrowellenbedingungen

Unter Verwendung von PhIO als Sauerstoffdonator konnte die Bildung von Diazepam-N-oxid nicht nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse für Nordazepam unterschieden sich nicht signifikant, während die drei Synthesebedingungen für Temazepam derartige Unterschiede lieferten (siehe Abb. 2.61). Demzufolge war die Ausbeute an Temazepam unter Referenzbedingungen am höchsten. Analog verhielt es sich bei Oxazepam. Ohne Powermaxcooling wurde signifikant mehr Oxazepam gebildet als bei den beiden anderen Bedingungen. Referenz- und oPMC-Bedingungen unterschieden sich allerdings in den Ergebnissen für Oxazepam nicht signifikant.

2.9.3 Diskussion

Betrachtete man zunächst die Unterschiede in den Ausbeuten zwischen den Referenz- und mPMC-Bedingungen fielen keine Signifikanzen unter MMPP- und *m*-CPBA - Einsatz auf. Auch unter Verwendung von PhIO als Sauerstoffdonator waren nur die Ergebnisse der Oxazepam- und Temazepam-Bildung signifikant unterschiedlich. So wurden mit PhIO unter Referenzbedingungen sogar die höheren Ausbeuten detektiert. Aus den gesamten Ergebnissen der Referenz- und mPMC-Bedingungen ist zu schlussfolgern, dass die Verwendung des Powermaxcoolings keinen Gewinn an Produkt bewirkte. Die von *Hayes* beschriebenen Ausbeutenerhöhungen durch den Einsatz von Druckluft während der Mikrowellensynthese[61], konnten an dieser Stelle nicht bestätigt werden. Nach ihrer Auffassung wird überflüssige Wärme, die in einer Probe entsteht, durch die Druckluft abtransportiert. So sollen größere Mengen an Mikrowellenenergie mit der Probe koppeln können, während die Proben temperatur niedrig bliebe.

Die beschriebene Steigerung des Mikrowelleneintrages durch Verwendung der Druckluftkühlung konnte auch in diesen Versuchen bestätigt werden (siehe Abb. 2.57). Allerdings bewirkte die erhöhte Leistung an Mikrowellenstrahlung keine Steigerung der Produktausbeute. Somit konnte angenommen werden, dass nicht-thermale Mikrowelleneffekte unter Verwendung der in diesem Kapitel beschriebenen Modellsysteme keinen Einfluss hatten.

Würde man bei der Energieübertragung durch die Mikrowelle allerdings von rein thermischen Effekten ausgehen, ließe sich das Phänomen des gesteigerten Mikrowelleneintrages bei Verwendung des Powermaxcoolings

während der Synthese leicht erklären. Die eingesetzte Druckluft transportiert Energie in Form von Wärme ab, wodurch die Probe abkühlt und somit nicht mehr die programmierte Solltemperatur aufweist. Zum Erreichen dieser Temperatur muss wieder Energie in Form von Mikrowellenstrahlung in das System befördert werden. Dieser gegenläufige Mechanismus würde dann in einer Kurve mit maximalem Leistungseintrag resultieren.

Verglich man die Ergebnisse der Referenz- und mPMC-Bedingungen mit den oPMC-Bedingungen bei 120°C, fielen besonders die erhöhten Standardabweichungen in den MMPP- und *m*-CPBA-Diagrammen auf. Mit Ausnahme der Bildung von Temazepam bei der Verwendung von PhIO als Sauerstoffdonator konnten keine signifikant höheren Ausbeuten im Vergleich zu den anderen beiden Bedingungen verzeichnet werden. Unter Verwendung von MMPP als Sauerstoffdonator wurde sogar signifikant weniger Temazepam gebildet. Die Erhöhung der Synthesetemperatur ging generell nicht mit einer Ausbeutensteigerung einher. Die Ergebnisse wurden zusätzlich schlechter reproduzierbar, so dass diese Methode im weiteren Verlauf dieser Arbeit keine Verwendung fand.

Wurden die Ergebnisse der Referenz- und mPMC-Bedingungen verglichen, fiel nur der bereits erwähnte Unterschied bei Verwendung von PhIO auf. Hier wurden unter Referenzbedingungen signifikant mehr Temazepam und Oxazepam gebildet als unter mPMC-Bedingungen. Ansonsten schienen die Ergebnisse der Bedingungen gleichwertig. Da in folgenden Kapiteln der Arbeit Messergebnisse, die durch Einsatz von Mikrowellenenergie erzeugt wurden, mit Daten von rein konventioneller, thermischer Energieübertragung generiert, verglichen werden sollten, wurde sich für die powermaxcoolingunterstützte Synthesemethode für alle weiteren Versuche entschieden. Nur durch den Einsatz dieser Zusatzfunktion konnten nicht-thermische Mikrowelleneffekte für das verwendete Modellsystem diskutiert werden. Zusätzlich konnten nur durch Powermaxcooling vergleichbar hohe Mikrowellenenergieeinträge erzielt werden.

2.10 Einfluss der Sauerstoffdonatoren auf die Aktivität der immobilisierten Porphyrine

Sauerstoffdonatoren haben ein hohes oxidatives Potential. Somit war die Stabilität der Metalloporphyrine in biomimetischen Modellsystemen gegenüber dem Sauerstoffdonator unter Versuchsbedingungen eine wichtige Voraussetzung. Metalloporphyrine konnten zum Beispiel leicht durch autokatalytische Oxidationen an den β -Pyrrol- oder *meso*-Positionen sowie durch irreversible Bildung von μ -oxo-Dimeren deaktiviert (siehe Abb. 2.62) werden [116].

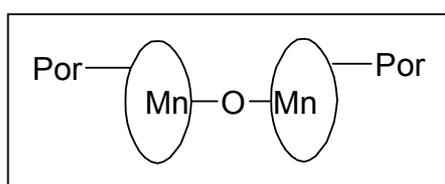


Abb. 2.62: Schematische Darstellung des μ -oxo-Dimers eines manganhaltigen Metalloporphyrins

Die chemische Stabilität konnte entscheidend durch Einführung von sterisch hindernden und/oder elektronenziehenden Substituenten verbessert werden [30]. Dies wurde beispielweise mit den in dieser Arbeit verwendeten perfluorierten Metalloporphyrinen umgesetzt. Trotz der verbesserten Stabilitäten, konnten die oben genannten, den Katalysator vergiftenden Mechanismen nicht komplett verhindert werden. So war eine genaue Abwägung der Verhältnisse von Sauerstoffdonator zu Katalysator und Substrat von entscheidender Bedeutung. Durch geeignete Wahl des Sauerstoffdonators und dessen Verhältnis zum Katalysator konnte die Stabilität und die hieraus resultierende Aktivität des Metalloporphyrins ausschlaggebend beeinflusst werden.

Aufgrund der hohen Anschaffungskosten der verwendeten Metalloporphyrine wurden sie, wie bereits erwähnt, vor Einsatz im Modellsystem immobilisiert. Somit wurde die Grundlage geschaffen, den Katalysator nach der Reaktion abzutrennen und eine Wiederverwendung möglich zu machen.

Der Einfluss der Versuchsbedingungen auf die Aktivität der immobilisierten Metalloporphyrine unter wiederholtem Gebrauch, insbesondere im Hinblick auf die eingesetzten Sauerstoffdonatoren, sollte nun in diesem Kapitel

untersucht werden. Hieraus resultierend wurden Angaben über einen Wiedereinsatz des Katalysators in weiteren Versuchen gemacht.

2.10.1 Versuchsplanung

Als Beispielporphyrine wurden je ein perfluoriertes und ein kationisches Porphyrin für die Untersuchung der Aktivitäten unter Wiederholbedingungen ausgewählt. Zum besseren Vergleich verwendete man MnT4MPyP_{Cl} und MnTFPP_{Cl} mit demselben katalytischen Zentrum. Als Sauerstoffdonatoren wurden PhIO, MMPP, *m*-CPBA, H₂O₂ und H₂O₂ in Kombination mit Imidazol, sowie Diazepam als Substrat ausgewählt. Imidazol sollte stabilitätserhöhend wirken, indem es sich als sechster Ligand am Metallzentrum des Porphyrins fixierte [117]. Die Wiederholungen der Versuchsbedingungen mit demselben immobilisierten Metalloporphyrin sollten in drei aufeinanderfolgenden Zyklen stattfinden.

Pro zu untersuchender Bedingung und Metalloporphyrin wurde, für einen Stichprobenumfang von drei, die entsprechende Anzahl an Immobilisierungschargen nach Vorschrift AV 1 (siehe Kapitel 6.2.3) hergestellt. Anschließend fand die Umsetzung im Modellsystem nach AV 5 (siehe Kapitel 6.2.10) in der Synthesemikrowelle unter Siedebedingungen statt.

Nach dem ersten Zyklus wurden die Ansätze filtriert und das immobilisierte Metalloporphyrin wieder gewonnen. Das Porphyrin unterwarf man anschließend einem Waschvorgang, indem es zunächst mit Ethanol, dann mit Chloroform und zum Schluss mit Acetonitril gespült wurde. Nachdem der Katalysator im Trockenschrank bei 50°C getrocknet worden war, konnte er für einen weiteren Zyklus mit dem gleichen Sauerstoffdonator nach AV 5 (siehe Kapitel 6.2.10) eingesetzt werden. Insgesamt wiederholte man diesen Vorgang zweimal. Nach jedem Zyklus wurde der Gehalt an gebildeten Metaboliten mittels HPLC bestimmt.

2.10.2 Ergebnisse

Die Messdaten werden in Diagrammen, nach Sauerstoffdonatoren sortiert, dargestellt. Die Ausbeuten der Metaboliten unter Verwendung von PhIO als

Sauerstoffdonator zeigten innerhalb der drei Zyklen für MnTFPPCl und MnT4MPypCl keine statistisch signifikanten Unterschiede (Abb. 2.63).

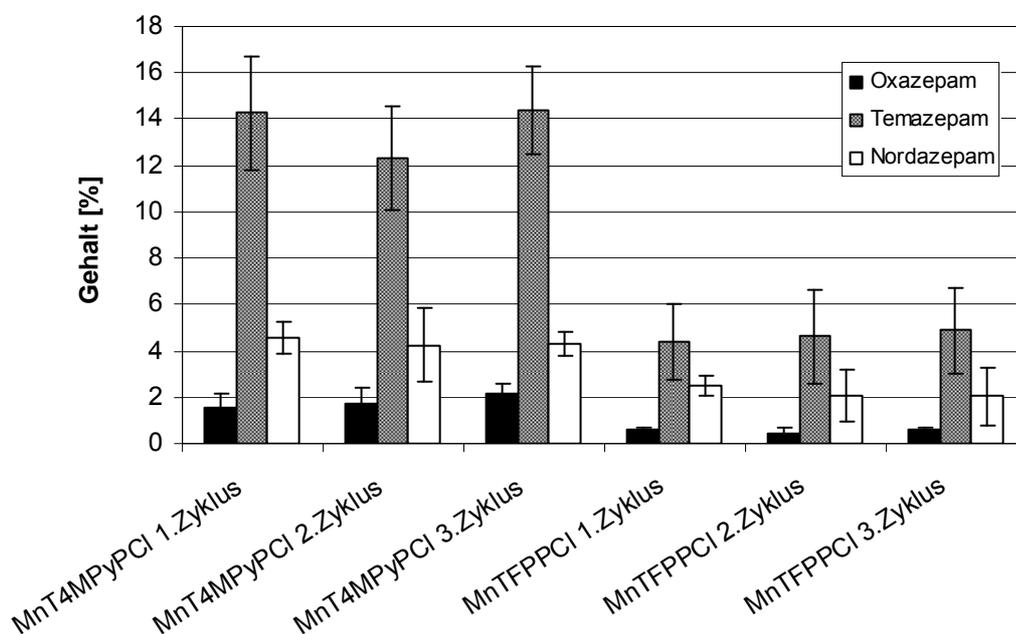


Abb. 2.63: Aktivitätsbestimmung von MnT4MPyPcI und MnTFPPcI im Modellsystem mit PhIO als Sauerstoffdonator in drei Zyklen

Die Ausbeuten unterschieden sich nur in Abhängigkeit vom verwendeten Katalysator. Unter Anwendung von PhIO als Sauerstoffdonator konnten demnach MnT4MPypCl und MnTFPPcI für drei aufeinanderfolgende Einsätze genutzt werden.

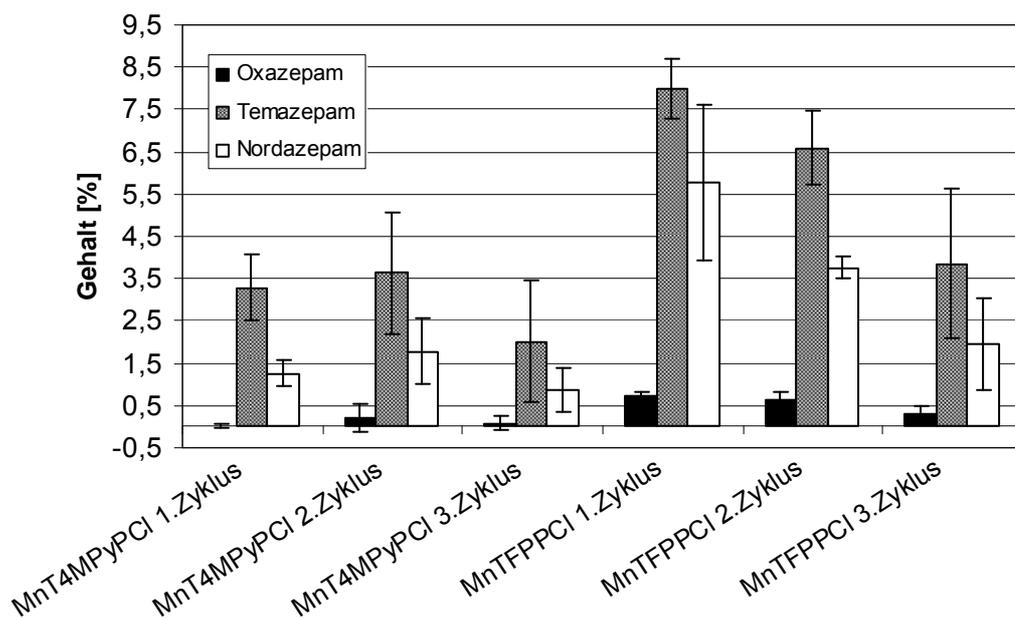


Abb. 2.64: Aktivitätsbestimmung von MnT4MPyPcI und MnTFPPcI im Modellsystem mit *m*-CPBA als Sauerstoffdonator in drei Zyklen

Innerhalb der drei Zyklen bestand unter Verwendung von MnT4MPyPcI kein statistisch signifikanter Unterschied in den Metabolitenausbeuten unter Anwendung von *m*-CPBA (Abb. 2.64). Dies galt ebenfalls für die Ausbeuten von Oxazepam mit MnTFPPcI als Katalysator. Der erste und der dritte Zyklus, nicht aber der erste und der zweite, unterschieden sich signifikant in den Ausbeuten von Temazepam und Nordazepam. Somit konnte festgestellt werden, dass der immobilisierte Katalysator MnTFPPcI unter Verwendung von *m*-CPBA in der dritten Anwendung niedrigere Ausbeuten liefert. Demnach wurde das Porphyrin in folgenden Versuchen in Modellsystemen nach dem zweiten Einsatz nicht wiederverwendet. Ebenso wurde mit MnT4MPyPcI verfahren. Zwar war der Unterschied der Ausbeuten zwischen Zyklus zwei und drei für diese Porphyrin nicht signifikant, trotzdem waren eine leichte Abnahme und eine zunehmend schlechtere Reproduzierbarkeit in Abb. 2.64 zu erkennen.

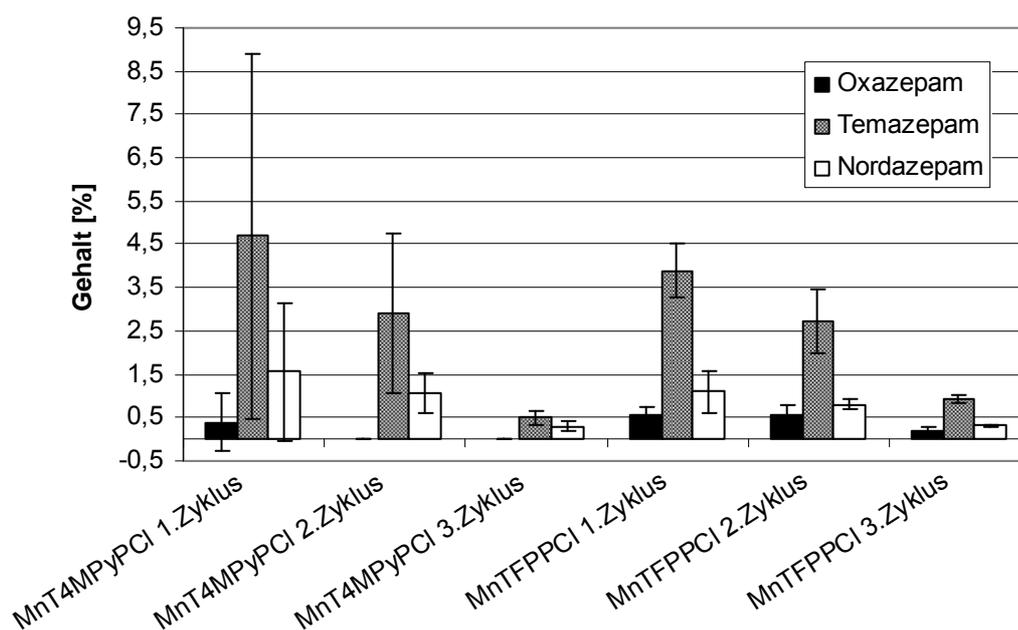


Abb. 2.65: Aktivitätsbestimmung von MnT4MPyPcI und MnTFPPcI im Modellsystem mit MMPP als Sauerstoffdonator in drei Zyklen

Die Ergebnisse der Metabolitenausbeuten unter Verwendung von MnT4MPyPcI waren durch relativ hohe Standardabweichungen gekennzeichnet. Diese waren auch dafür verantwortlich, dass in allen drei Zyklen keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Ausbeuten festzustellen waren. Ein abnehmender Trend der Ausbeutenmenge ist allerdings in Abb. 2.65 zu erkennen. Aufgrund dessen wurde schon nach einmaliger Anwendung von MnT4MPyPcI und MMPP, der Katalysator in kommenden Versuchen nicht wiederverwendet.

Unter MnTFPPcI-Anwendung waren für Oxazepam und Nordazepam keine signifikant unterschiedlichen Ausbeutenmengen in den drei Zyklen festzustellen. Allerdings unterschieden sich die Temazepamausbeuten in jedem Zyklus signifikant. Somit konnte auch unter Verwendung von MnTFPPcI eine Wiederverwendung in folgenden Versuchen mit MMPP als Sauerstoffdonator ausgeschlossen werden.

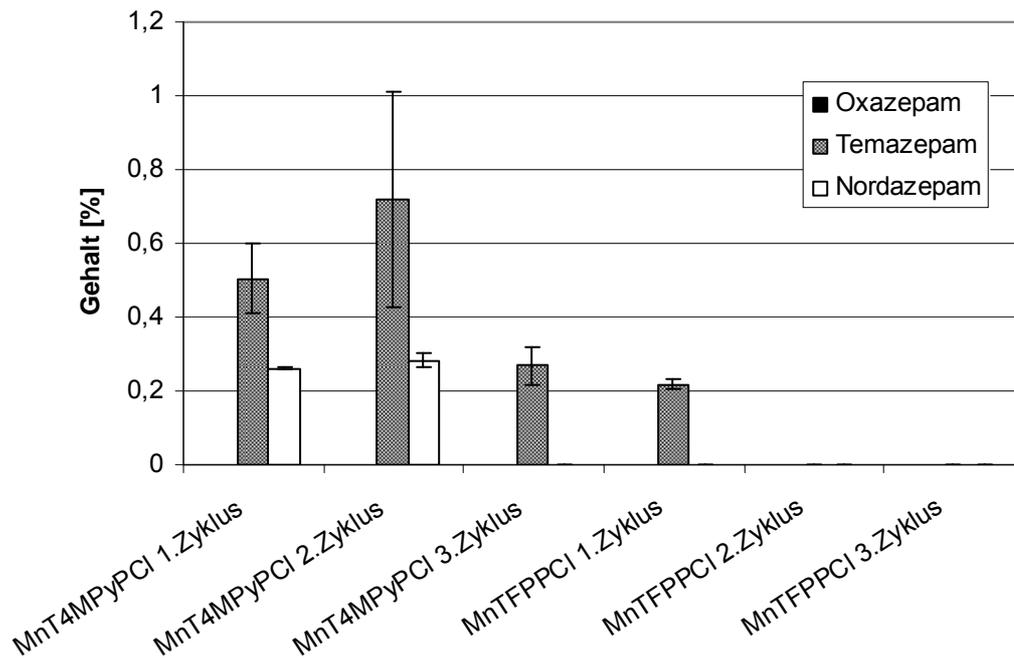


Abb. 2.66: Aktivitätsbestimmung von MnT4MPyPcI und MnTFPPcI im Modellsystem mit H_2O_2 als Sauerstoffdonator in drei Zyklen

Generell waren die Ausbeuten unter H_2O_2 -Anwendung sehr gering. Signifikante Unterschiede in der Metabolitenbildung unter MnT4MPyPcI konnten zwischen dem zweiten und dritten Zyklus für Temazepam ermittelt werden. Wie in Abb. 2.66 zu erkennen, wurde unter Verwendung von MnTFPPcI im ersten Zyklus nur Temazepam gebildet, während in den folgenden zwei Zyklen keine Metabolite detektiert wurden. Demzufolge war auch die Temazepamausbeute gegenüber dem zweiten und dritten Zyklus signifikant erhöht. Immobilisiertes MnT4MPyPcI wurde aufgrund dessen unter Einsatz von H_2O_2 als Sauerstoffdonator in folgenden Modellsystemen nur einmal wiederverwendet, während MnTFPPcI nur ein einziges Mal eingesetzt wurde.

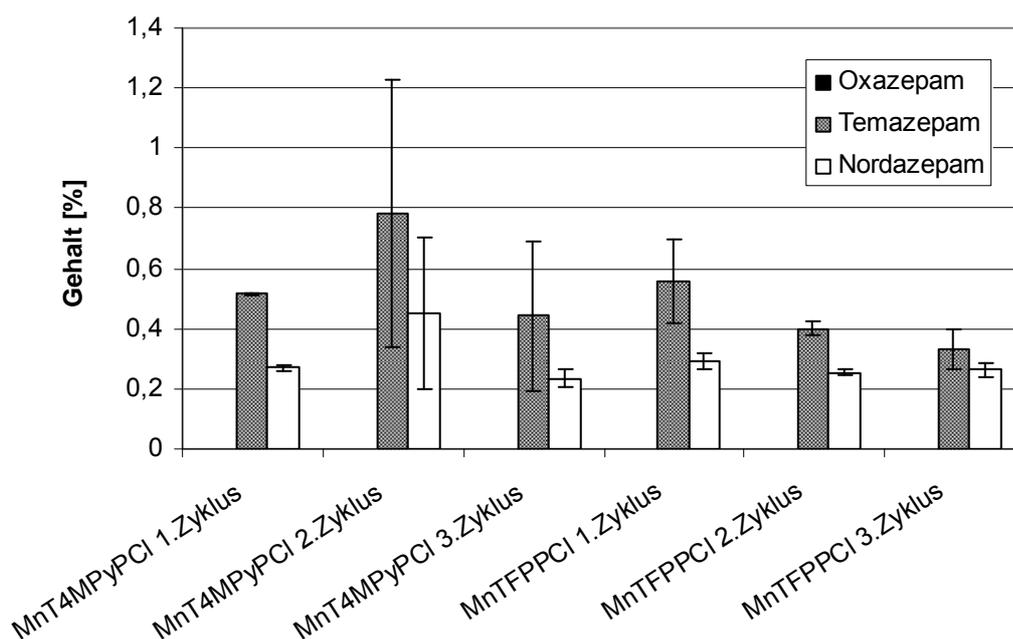


Abb. 2.67: Aktivitätsbestimmung von MnT4MPyPcI und MnTFPPcI im Modellsystem mit H_2O_2 als Sauerstoffdonator und Imidazol als Cokatalysator in drei Zyklen

Unter Verwendung der gleichen H_2O_2 -Konzentration, nur in Kombination mit Imidazol konnten für beide Katalysatoren relativ konstante Ergebnisse über drei Zyklen hinweg beobachtet werden (siehe Abb. 2.67). Die Metabolitenausbeuten unterschieden sich in den drei Zyklen für beide Porphyrine nicht signifikant. Eine leichte Abnahme der Metabolitenbildung war allerdings unter Verwendung von MnTFPPcI im Diagramm zu erkennen. Es konnte zwar nicht von einer überdurchschnittlichen Steigerung der Ausbeuten durch Imidazolzugabe, im Vergleich zu den Ergebnissen ohne Imidazol, gesprochen werden, aber zumindest wurde über drei Zyklen und bei beiden Porphyrinen Nordazepam nachgewiesen. Für den Einsatz der Katalysatoren in weiteren Modellsystemen mit H_2O_2 und Imidazol wurden zwei Wiederholungszyklen als akzeptabel angesehen.

Aufgrund der geringen Ausbeuten mit H_2O_2 als Katalysator wurde ein weiterer Versuch durchgeführt. Hierbei setzte man die zehnfache Konzentration an H_2O_2 ein und bestimmte die Aktivität ebenfalls über die Metabolitenbildung in drei Zyklen.

Die rein optische Analyse der an Trägermaterial immobilisierten Porphyrine korrelierte mit den tatsächlichen Messergebnissen. Die Katalysatoren, vor Einsatz dunkelbraun gefärbt, waren bereits nach dem zweiten Zyklus weniger stark und nach dem dritten Zyklus fast weiß gefärbt. Die Farbunterschiede waren bei MnT4MPyPcI stärker, als bei MnTFPPcI. Eine rein weiße Farbe hätte darauf hingedeutet, dass nur noch Trägermaterial ohne gebundenes Porphyrin existiert hätte. Eine Zerstörung des Katalysators konnte infolgedessen nicht ausgeschlossen werden.

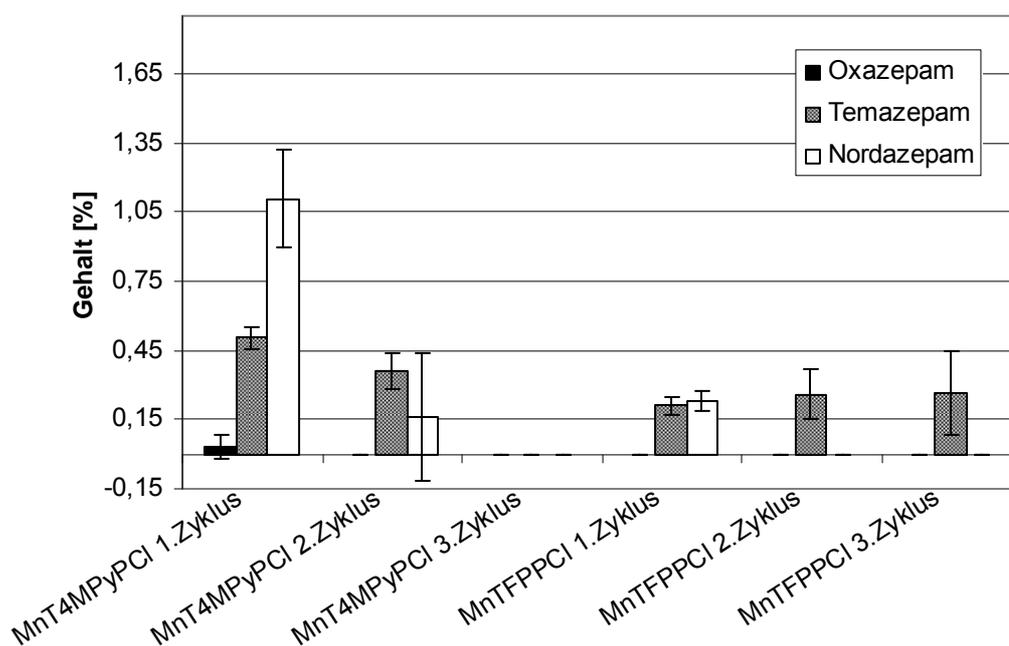


Abb. 2.68: Aktivitätsbestimmung von MnT4MPyPcI und MnTFPPcI im Modellsystem mit H_2O_2 in 10fach höherer Konzentration als Sauerstoffdonator in drei Zyklen

Mit der Kombination aus MnT4MPyPcI und einer zehnfach höheren H_2O_2 -Konzentration konnte im ersten Zyklus zwar erheblich mehr Nordazepam gebildet werden, jedoch sank der Gehalt schon im zweiten Zyklus signifikant (siehe Abb. 2.68). Im dritten Zyklus konnte gar kein Produkt mehr nachgewiesen werden. Unter Verwendung von MnTFPPcI konnte im ersten Zyklus, im Gegensatz zu den Ergebnissen mit geringeren H_2O_2 -Konzentrationen, sogar Nordazepam detektiert werden. Auch hier sank der Gehalt im zweiten Zyklus jedoch signifikant auf eine nicht detektierbare Konzentration ab. Hieraus konnten zwei Schlüsse gezogen werden. Erstens bewirkte eine Erhöhung der H_2O_2 -Konzentration keine deutliche

Ausbeutensteigerung, und zweitens wurden die Katalysatoren augenscheinlich bei diesen Konzentrationen zerstört.

Neben den, in den Diagrammen dargestellten, Metaboliten wurde auch Diazepam-N-oxid detektiert. Allerdings konnte es nur unter Verwendung von MMPP und *m*-CPBA nachgewiesen werden. Eine zyklusabhängige Bildung von Diazepam-N-oxid ist in Abb. 2.69 dargestellt.

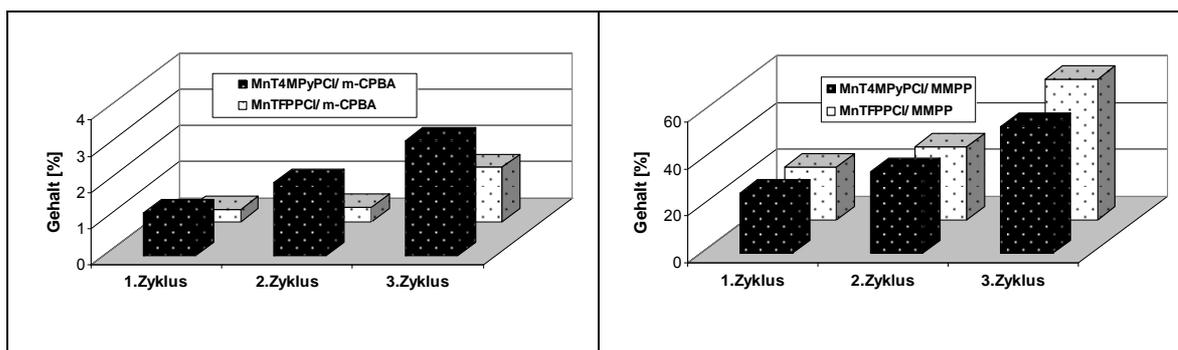


Abb. 2.69: Bildung von Diazepam-N-oxid unter Verwendung von *m*-CPBA(links) und MMPP(rechts) nach wiederholter Verwendung von MnT4MPyPcI/MnTFPPcI

Wie den Diagrammen zu entnehmen ist, stieg die Bildung des Diazepam-N-oxids mit der Häufigkeit des Wiedergebrauchs des Katalysators. MMPP schien generell im Vergleich zu *m*-CPBA ein potenterer N-Oxid-Bildner zu sein. Schon im ersten Zyklus wurde bei der Verwendung von MMPP über 20% Diazepam-N-oxid gebildet, während *m*-CPBA hier nur ungefähr 1%, abhängig vom Katalysator, zum N-Oxid oxidierte.

Betrachtet man die Metabolitenausbeuten in den Diagrammen in Abb. 2.64 und Abb. 2.65 sowie die Diazepam-N-oxid-Bildung in Abb. 2.69 konnte von einem gegenläufigen Prozess gesprochen werden. Während die Metabolitenbildung mit der Häufigkeit ihrer Anwendung sank, stieg der Gehalt an Diazepam-N-oxid. Ging man bei der N-Oxidbildung von einer unkatalysierten Reaktion aus konnte ein steigender N-Oxid-Gehalt als Zeichen für eine zunehmende Vergiftung oder Inaktivierung des Katalysators angesehen werden.

2.10.3 Diskussion

Interessanterweise zeigte der direkte Vergleich der Messergebnisse von immobilisiertem MnTFPPcI und MnT4MPyPcI keine einheitliche Präferenz in der Metabolitenbildung. Es stellte sich keiner der untersuchten

Katalysatoren als optimal für alle Sauerstoffdonatoren heraus. Die gebildete Menge an Metabolit musste immer im Zusammenhang mit dem Sauerstoffdonator betrachtet werden. Unter PhIO wurden wesentlich höhere Ausbeuten mit MnT4MPyPcI erreicht, als mit dem perfluorierten Komplex, während unter Verwendung von *m*-CPBA das immobilisierte MnTFPPcI höhere Ausbeuten lieferte.

PhIO beeinflusste beide Katalysatoren am wenigsten in ihrer verbleibenden Aktivität. Über drei Zyklen wurden gleichbleibende Ausbeuten registriert. MnT4MPyPcI lieferte im Vergleich höhere Metabolitenausbeuten als MnTFPPcI.

MnTFPPcI erlitt allerdings unter Verwendung von *m*-CPBA als Sauerstoffdonator einen Aktivitätsverlust bei erneuter Anwendung im Modellsystem. Demnach schien die Persäure den Katalysator stärker in seiner Aktivität zu mindern, als dies bei PhIO der Fall war. Die statistische Auswertung zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Metabolitenbildung des ersten Zyklus zwischen PhIO und *m*-CPBA, sodass keiner der beiden Sauerstoffdonatoren als effektiver unter MnTFPPcI-Anwendung angesehen werden konnte. Bei MnT4MPyPcI wurde allerdings signifikant mehr Temazepam und Nordazepam unter PhIO gebildet, als unter *m*-CPBA. Demnach erbrachte die Anwendung von *m*-CPBA keine höheren Metabolitenausbeuten und war zusätzlich noch aktivitätsmindernd hinsichtlich einer wiederholten Anwendung des Katalysators.

MMPP scheint ein sehr aggressiver Sauerstoffdonator zu sein. Die sinkenden Metabolitenausbeuten bei mehrmaliger Anwendung waren mit MnT4MPyPcI sehr deutlich. Des Weiteren fielen die hohen Standardabweichungen auf. Vermutlich bewegte sich die eingesetzte Menge MMPP an der Grenze zwischen höchster Aktivität und einsetzender Zerstörung des Katalysators. MnTFPPcI war zwar durch sinkende Aktivität bei mehrfacher Anwendung gekennzeichnet, allerdings waren die Standardabweichungen der Metabolitenausbeuten geringer. Eine höhere oxidative Stabilität war für MnTFPPcI gegenüber MMPP anzunehmen.

Wasserstoffperoxid ist zwar ein sehr umweltschonender, aber es war eher ein schlechter Sauerstoffdonator für die Umsetzung von Diazepam im biomimetischen Modell. Alle Ausbeuten lagen unter einem Prozent.

MnT4MPyPcI schien zunächst die stabileren Eigenschaften gegenüber den oxidativen Einflüssen des Sauerstoffdonators zu besitzen, da unter MnTFPPcI-Anwendung nur im ersten Zyklus Produkt gebildet wurde. Doch aufgrund der geringen Metabolitenausbeuten handelte es sich hierbei nicht um einen entscheidenden Vorteil.

Unter Zugabe von Imidazol waren die Ausbeuten nicht wesentlich gestiegen, doch war ein stabilisierender Effekt, wie in 2.10.1 beschrieben, anhand der konstanten Ausbeuten über drei Zyklen auch unter MnTFPPcI-Anwendung, nicht auszuschliessen.

Eine Steigerung der H_2O_2 -Konzentration führte nicht zur erhofften Ausbeutensteigerung. Im Gegenteil, die oxidative Zerstörung des MnT4MPyPcI wurde scheinbar noch gefördert.

Unter allen dargestellten Bedingungen war das Modellsystem MnT4MPyPcI in Kombination mit PhIO als Sauerstoffdonator das effektivste, bezogen auf die Metabolitenausbeuten und das schonendste hinsichtlich der verbleibenden Katalysatoraktivität bei mehrmaliger Anwendung.

In darauffolgenden Versuchen wurden die ermittelten, akzeptablen Wiederholungszyklen für die immobilisierten Katalysatoren bei Verwendung der entsprechenden Sauerstoffdonatoren ebenfalls für die eisenhaltigen Metalloporphyrine angenommen. So wurde immobilisiertes FeT4MPyPcI in gleicher Häufigkeit wiederverwendet, wie es für MnT4MPyPcI ermittelt wurde. Analog wurde mit den perfluorierten Metalloporphyrinen verfahren.

2.11 Durchführung von Blindversuchen

Um die verwendeten Modellsysteme ausreichend bewerten zu können, wurden Blindversuche durchgeführt. Anstelle des immobilisierten Katalysators wurde in den Blindversuchen nur das Trägermaterial eingesetzt. Im Falle der kationischen Porphyrine handelte es sich um Kieselgel 60, während als Ersatz der immobilisierten perfluorierten Porphyrine Aminopropylkieselgel Verwendung fand. Es wurden drei Ansätze pro Synthesebedingung und Sauerstoffdonator hergestellt. Unter den Synthesebedingungen waren die Bestrahlung der Probenansätze mit Mikrowellen bei RT und ST, sowie deren Schütteln in einem temperierbaren

Schüttler bei RT und ST zu verstehen. Zusätzlich zur üblichen Detektion mit einem UV-Detektor, wurde einer der drei Ansätze mit Hilfe des DAD vermessen. Hierbei sollte zum Einen die Peakreinheit der gebildeten Produkte, wie in Kapitel 2.4 beschrieben, untersucht werden und zum Anderen die Bildung von bis hierhin unbekanntem Oxidationsprodukten, deren Absorptionsmaxima möglicherweise nicht im Bereich der gewählten Wellenlänge der HPLC-Methode lagen, detektiert werden. Die Sauerstoffdonatoren und das Substrat wurden nach AV 5 (siehe Kapitel 6.2.10) eingewogen und den beschriebenen Reaktionsbedingungen ausgesetzt.

Der Einsatz der oben genannten Trägermaterialien unter Synthesebedingungen mit der üblichen 20 μmol -Menge an Diazepam in 1 mL Acetonitril, brachte keine Reaktionsprodukte hervor. Es konnte nur die eingesetzte Menge an Diazepam detektiert werden. Somit konnte eine oxidative Aktivität der Trägermaterialien ausgeschlossen werden.

Im Anschluss an die Ergebnisse der Blindversuche erfolgte eine Gegenüberstellung mit den Ergebnissen der Mn(III)-acetat-Experimente.

2.11.1 Ergebnisse unter Mikrowellenbedingungen

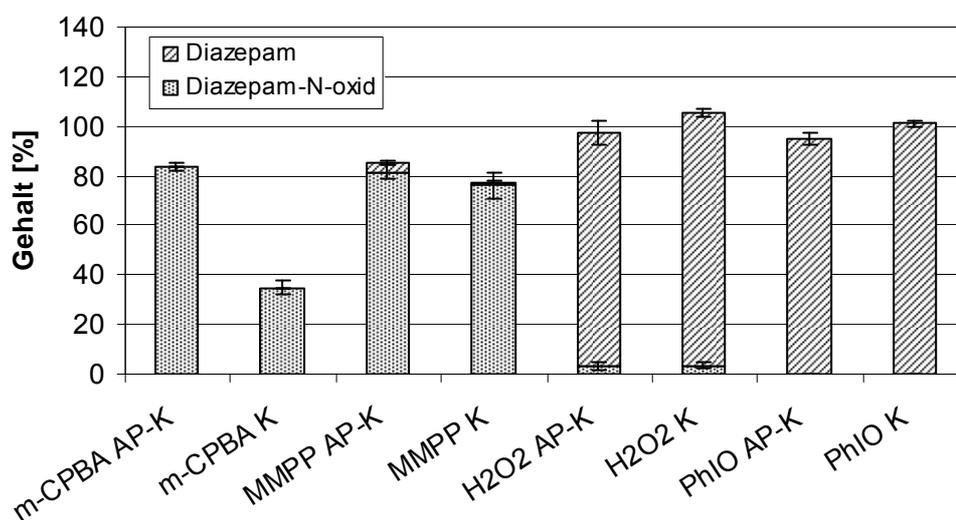


Abb. 2.70: Darstellung von Diazepam und Diazepam-N-oxid im Rahmen der Blindversuche unter Mikrowellenbedingungen bei 82°C und diversen Sauerstoffdonatoren; AP-K=Aminopropylkieselgel, K=Kieselgel

Unter Siedebedingungen waren außer sehr geringen Mengen an Temazepam keine weitere Metaboliten detektierbar (vergleiche Abb. 2.70 und Abb. 2.71). Unter Verwendung von PhIO wurde die eingesetzte Menge an Diazepam in akzeptablen Grenzen wiedergefunden. Im Rahmen dieser Blindversuche konnten unter H_2O_2 -Anwendung geringe Mengen an Diazepam-N-oxid nachgewiesen werden, während die übrige Menge an Substrat unverändert wiedergefunden wurde. Bei Einsatz von *m*-CPBA und MMPP als Sauerstoffdonatoren fand man hohe Mengen an Diazepam-N-oxid. Im Gegensatz zu den dargestellten Ergebnissen der Mn(III)-acetat-experimente unter Mikrowellenbedingungen und ST in Kapitel 2.4 wurden hier auch mit *m*-CPBA hohe Ausbeuten an Diazepam-N-oxid nachgewiesen.

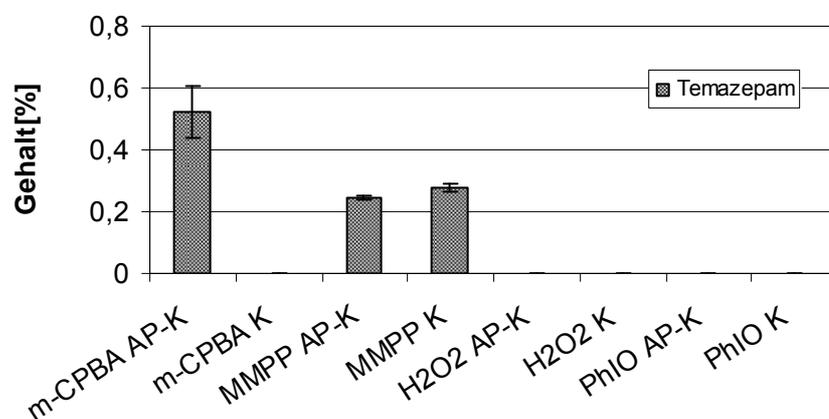


Abb. 2.71: Darstellung der Metabolitenausbeute im Rahmen der Blindversuche unter Mikrowellenbedingungen bei 82°C und diversen Sauerstoffdonatoren

Den Mn(III)-acetat-Versuchen allerdings ähnlich ist die niedrige Wiederfindungsrate für Diazepam und Diazepam-N-oxid bzw. deren Summe unter Verwendung von *m*-CPBA und MMPP. Die Summe der Gehalte von N-Oxid und Substrat lag annähernd bei 80%. Der Verlust der Menge von ca. 20% konnte an dieser Stelle zum größten Teil nur durch Substratzersetzung erklärt werden, da die Chromatogramme nur eine weitere Substanz bei beiden Sauerstoffdonatoren direkt nach dem detektierten Temazepam als Peak zeigten. Die Fläche der unbekanntes Substanz lag bei beiden Sauerstoffdonatoren unter 3% bezogen auf den Diazepam-Ausgangswert. Da dieser Peak nur in Mengen von unter einem Prozent während der Mn(III)-acetat-versuche und unter MMPP-Einsatz bei 82°C sowie unter Blindversuchsbedingungen nachgewiesen wurde und kein Hauptprodukt

darstellte, erfolgte keine Aufklärung der Struktur. Neben dieser unbekanntem Substanz konnte mittels DAD keine weitere Substanz unter Verwendung von *m*-CPBA und MMPP detektiert werden. Die Identität des detektierten Temazepam wurde zusätzlich durch Zudosierungsexperimente und anschließender Bestimmung der Peakreinheit eindeutig identifiziert.

Bei den Blindversuchen unter Verwendung von Kieselgel und *m*-CPBA konnte kein Diazepam und nur ungefähr ein Drittel des Diazepam-N-oxids detektiert werden. Hier war die Substratzerstörung sehr hoch.

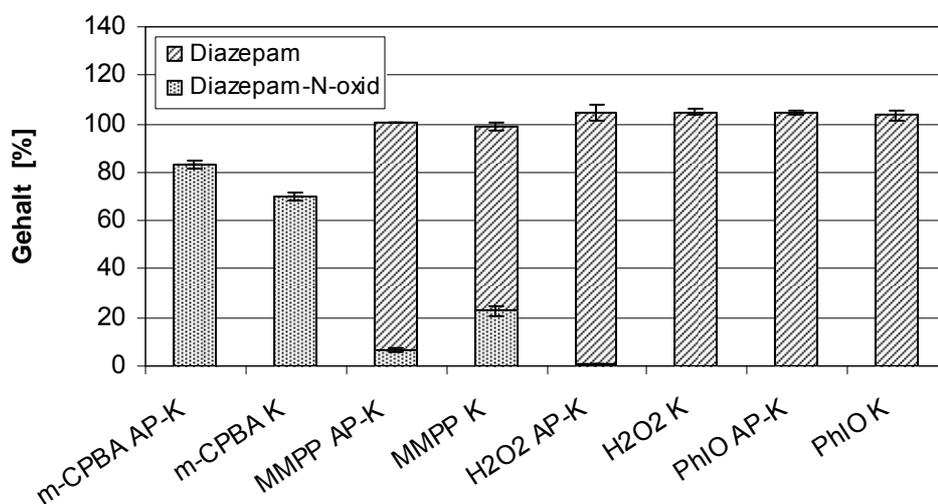


Abb. 2.72: Darstellung von Diazepam-N-oxid und Diazepam im Rahmen der Blindversuche unter Mikrowellenbedingungen bei 25°C und diversen Sauerstoffdonatoren AP-K=Amino-propylkieselgel, K=Kieselgel

Unter Verwendung von PhIO und H₂O₂ als Sauerstoffdonator bei RT wurde nur das Substrat in den eingesetzten Mengen detektiert. Für MMPP und *m*-CPBA wurde wieder Diazepam-N-oxid gebildet (siehe Abb. 2.72). Während die Menge an gebildetem N-Oxid bei MMPP signifikant weniger im Vergleich zu den Siedebedingungen war, konnte aber von einer verbesserten Wiederfindung gesprochen werden. Die Summe aus Substrat und N-Oxid war bei beiden Trägermaterialien annähernd 100%. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass unter RT-Bedingungen weniger Substrat zerstört wurde. Bei der Anwendung von *m*-CPBA konnte auch unter RT kein Diazepam mehr nachgewiesen werden. Es wurde nur Diazepam-N-oxid gebildet, sowie weniger als 2% der im oberen Absatz erwähnten unbekanntem Substanz. Den Großteil der von 100% abweichenden

Ergebnisse ordnete man aufgrund dessen erneut einer Substratzerstörung zu, da der DAD in allen Chromatogrammen keine weiteren Produkte in den Ansätzen detektierte.

2.11.2 Ergebnisse unter Schüttelbedingungen

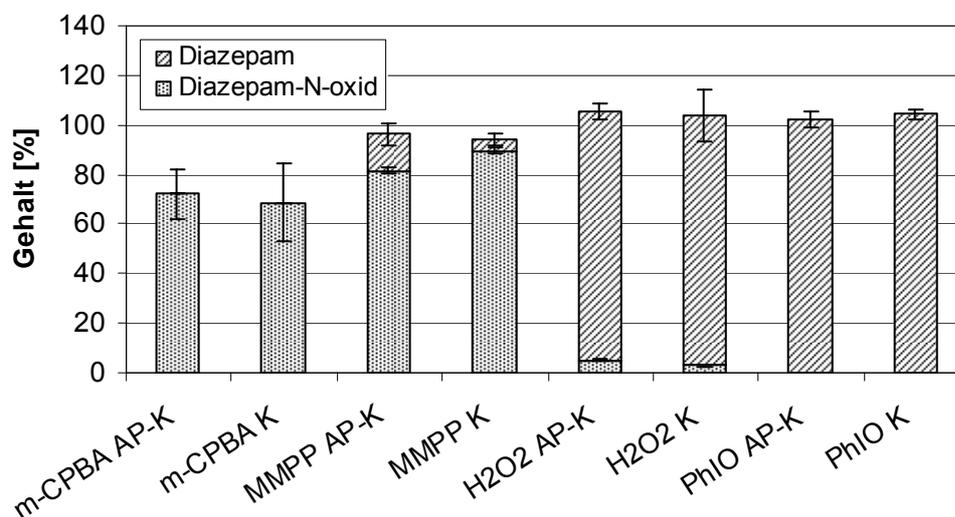


Abb. 2.73: Darstellung von Diazepam und Diazepam-N-oxid im Rahmen der Blindversuche unter Schüttelbedingungen bei 82°C und diversen Sauerstoffdonatoren; AP K=Aminopropylkieselgel, K=Kieselgel

Die Ergebnisse der Blindversuche unter Schüttelbedingungen ähnelten sehr den Messdaten unter Mikrowellenbestrahlung bei 82°C (vergleiche Abb. 2.70 und Abb. 2.73). Unter PhIO-Einfluss wurde für beide Trägermaterialien Diazepam wiedergefunden, während im Vergleich zur Mikrowelle auch im Schüttler und H₂O₂-Anwendung geringe Mengen an Diazepam-N-oxid neben dem unveränderten Substrat detektiert wurden. Die Substratzersetzung unter MMPP-Verwendung war hier deutlich geringer als unter Mikrowellenbedingungen, denn die Summe aus gebildetem N-Oxid und nicht umgesetztem Diazepam betrug annähernd 100%. Unter *m*-CPBA waren wieder eine stärkere Substratzersetzung und kein Diazepam zu registrieren sowie die Bildung geringe Mengen der unbekannt Substanz. Die Fläche dieser Substanz entsprach weniger als 2% der Fläche des Diazepamausgangswertes. Durch Verwendung des DAD und Zudosierungsexperimente mit Temazepam, sowie Bestimmung der Peakreinheit konnte sichergestellt werden, dass es sich bei der unbekannt Substanz nicht um Temazepam handelte.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen in der Mikrowelle wurden keine Metabolite nachgewiesen.

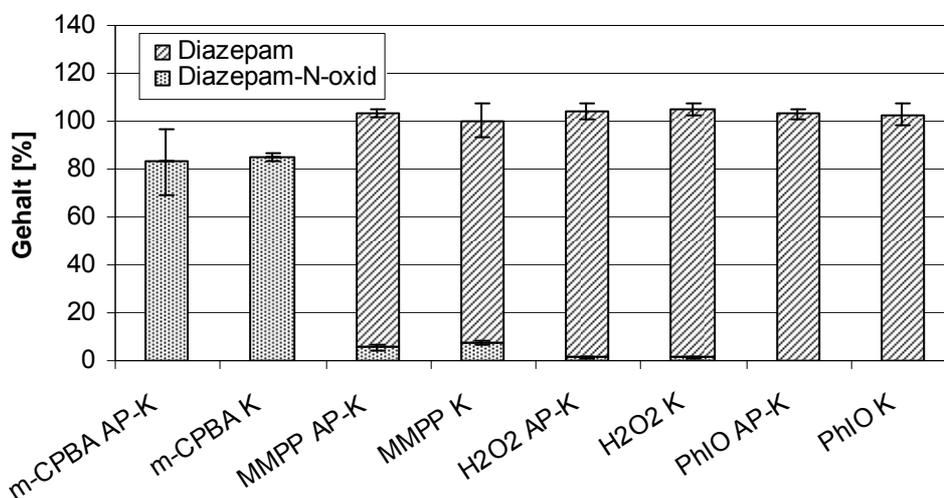


Abb. 2.74: Darstellung von Diazepam und Diazepam-N-oxid im Rahmen der Blindversuche unter Schüttelbedingungen bei 25°C und diversen Sauerstoffdonatoren; AP-K=Aminopropylkieselgel, K=Kieselgel

In Analogie zu den Blindversuchen bei 25°C in der Mikrowelle (vergleiche Abb. 2.72 und Abb. 2.74) wurde auch unter Schüttelbedingungen und PhIO-Anwendung nur das Ausgangssubstrat detektiert. Geringe Mengen N-Oxid wurden neben dem unveränderten Diazepam bei H₂O₂ nachgewiesen und MMPP hat wie unter Mikrowellenbedingungen bei RT auch hier geringere oxidative Eigenschaften, was in einer geringeren Bildung des Diazepam-N-oxids resultierte. Unter *m*-CPBA-Einfluss wurde erneut kein Ausgangssubstrat registriert, sondern ausschließlich das N-Oxid. Da hier nur ca. 1% der unbekannt Substanz detektiert werden konnte, wurde der Substanzverlust zum großen Teil auf die bereits erwähnte Substraterersetzung zurückgeführt.

Es konnten weiterhin keine Metabolite unter Schüttelbedingungen bei RT detektiert werden.

Generell konnte festgestellt werden, dass lediglich unter Mikrowellenbedingungen bei ST in Anwesenheit der Sauerstoffdonatoren *m*-CPBA und MMPP eine Metabolitenbildung detektiert wurde. Dabei wurden weder Oxazepam, noch Nordazepam, sondern nur Temazepam mit einer Konzentration unter einem Prozent nachgewiesen. Aufgrund dessen konnte

gesagt werden, dass der Einsatz eines Katalysators für die Umsetzung von Diazepam in seine Metabolite essentiell war. Ferner konnte festgestellt werden, dass PhIO das Ausgangssubstrat Diazepam unkatalysiert nicht oxidativ beeinflusst, wohingegen *m*-CPBA das Substrat ohne Einsatz von Katalysatoren stark veränderte. Ebenso detektierte man unter MMPP-Anwendung temperaturabhängig variierende Gehalte an Diazepam-N-oxid.

2.11.3 Vergleich der Ergebnisse aus Blind- und Mn(III)-acetat-Versuchen

Zur Beurteilung der katalytischen Aktivität von Mn(III)-acetat sollten die Ergebnisse mit denen aus den Blindversuchen hinsichtlich der Bildung von Diazepam-N-oxid und den Metaboliten verglichen werden.

Ein großer Unterschied in der Bildung von Diazepam-N-oxid konnte unter *m*-CPBA-Anwendung zwischen Blind- und Mn(III)-acetat-Versuchen festgestellt werden. In den Blindversuchen wurde unter allen vier Reaktionsbedingungen signifikant mehr Diazepam-N-oxid gebildet. Greift man die unter 2.10.3 diskutierte Integrität der Katalysatoren bei deren wiederholten Einsatz unter *m*-CPBA- und MMPP-Einfluss auf, kann anhand der erhöhten Bildung des N-Oxids unter Blindversuchsbedingungen für die Verwendung von *m*-CPBA das beschriebene Phänomen belegt werden. Eine zunehmende Inaktivierung des Katalysators würde demnach in steigenden N-Oxid-Gehalten resultieren und Reaktionen ohne Katalysator infolge dessen maximale Ausbeuten an N-Oxid ergeben. Dies wurde durch die Blindversuche bestätigt. Auf der anderen Seite würde eine vorhandene katalytische Aktivität geringe Mengen an Diazepam-N-oxid bedingen, wie es wiederum in den Mn(III)-acetat-Ergebnissen demonstriert wurde.

Unter MMPP-Einsatz konnte keine eindeutige Unterscheidung zwischen Blind- und Mn(III)-acetat-Ergebnissen getroffen werden, denn auch unter Zusatz des Mangansalzes wurden unter ST hohe N-Oxid-Ausbeuten detektiert. Mögliche Gründe hierfür konnten eine schlechte katalytische Wechselwirkung des MMPP mit dem Metallion sein, sodass eine direkte Oxidation des Diazepams zum N-Oxid erfolgte oder die schlechte Löslichkeit des MMPP in Acetonitril. Letzteres würde die höheren Ausbeuten unter ST und die geringeren Ausbeuten unter RT erklären.

Vergleicht man letztendlich die Ergebnisse der Blindversuche mit Kieselgel und die Mn(III)-acetat-Daten hinsichtlich ihrer Metabolitenbildung wurden unter Verwendung des Mangansalzes unter allen Versuchsbedingungen signifikant höhere Metabolitenausbeuten erzielt. Einzige Ausnahme bildeten die Ausbeuten für Temazepam unter MMPP-Einsatz und Mikrowellenbestrahlung bei 82°C.

Demzufolge konnte dem Mn(III)-acetat durchaus eine katalytische Aktivität zugesprochen werden. Im Vergleich zu den Ergebnissen der Blindversuche konnte somit gleichzeitig gezeigt werden, dass die beschriebenen Modellsysteme ohne Katalysator nicht zu den gewünschten Produkten führten und dass dem Zentralatom eine erhebliche Bedeutung in der Katalyse zukam. Vergleich man wiederum die bisher erlangten Ergebnissen der manganhaltigen Metalloporphyrinen als Katalysator, insbesondere während der Aktivitätsstudien in Abschnitt 2.10.2 und die Mn(III)-acetat-ergebnisse aus Kapitel 2.4 wurde deutlich, dass das Vorhandensein einer zentralatom-, sowie übergangszustandstabilisierenden Struktur, in diesem Fall eine Tetrapyrrolringstruktur, für die beschriebenen Reaktionen einen großen Unterschied in der Metabolitenausbeute bewirkte. Das konjugierte, aromatische System mit seiner Vielzahl an mesomeren Grenzstrukturen, sowie dessen Ringmodifikationen und die Konformation des Gesamtkomplexes schienen essentiell für die Reaktivität und Produktbildung zu sein. Zwar kam dem Zentralatom eine entscheidende Rolle in der Funktionalität der Metalloporphyrine zu, doch konnte auf die individuellen Eigenschaften des Tetrapyrrolrings und seine Reste nicht verzichtet werden.

2.12 Identifizierung des Diazepam-N-oxids

Die Erkenntnisse aus den Blindversuchen und die Mn(III)-acetat-Ergebnisse lieferten erste Hinweise auf das bis hierhin unbekanntes Oxidationsprodukt Diazepam-N-oxid. Zum Einen musste es sich um ein Oxidationsprodukt handeln, dass in einer unkatalysierten Reaktion entstand und zum Anderen wurde es in hohen Ausbeuten unter MMPP- und *m*-CPBA-Einsatz sowie Wärmezufuhr in Acetonitril erhalten.

Aufgrund der Ergebnisse aus den Blindversuchen wurde untersucht, ob die direkte Umsetzung von Diazepam mit MMPP unter Hitze zur Bildung der

unbekannten Substanz führte. Hierzu wurde ein Ansatz aus 0,2 mmol Diazepam und 0,8 mmol MMPP in 10 mL Acetonitril für 10 min unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen und Filtrieren wurde die Lösung 1:100 mit Acetonitril verdünnt und mittels HPLC untersucht. Das Chromatogramm zeigte eindeutig einen Peak mit der Retentionszeit der unbekannt Substanz aus den zuvor durchgeführten Modellsystemen. Neben dieser konnte noch der Sauerstoffdonator bzw. dessen reduzierter Form und geringe Mengen eines zusätzlichen Nebenproduktes, welches unter Kapitel 2.4 und 2.11 bereits Erwähnung fand, detektiert werden. Es wurde kein Diazepam nachgewiesen, womit von einer quantitativen Umsetzung unter genannten Bedingungen ausgegangen werden konnte. Bezogen auf die Gesamtfläche, abzüglich der Flächen des Sauerstoffdonators und dessen reduzierter Form, konnte der unbekannt Substanz 98 % der Gesamtfläche zugeordnet werden. Der Flächenanteil des zusätzlichen Nebenproduktes belief sich auf 2%.

Mit diesem Ansatz wurden zunächst verschiedene Vorversuche durchgeführt, die im kommenden Abschnitt näher erläutert wurden.

2.12.1 Vorversuche

In der Literatur wurden diverse Zersetzungsprodukte des Diazepams beschrieben. *Mayer* und Mitarbeiter untersuchten unter anderem die Stabilität des Diazepams [118]. In Gegenwart von Wasser konnte die Arbeitsgruppe ebenfalls die unter Kapitel 2.7.2 beschriebenen Hydrolyseprodukte des Diazepams nachweisen, sowie ein bis dahin unbekanntes ringverengtes Chinolonderivat. Letzteres konnte in Gegenwart sehr geringer Mengen Wasser (a) oder nach Isomerisierung (b) bei hohen Temperaturen detektiert werden. Die Bildung des 3-Amino-1,2-dihydro-6-chlor-1-methyl-4-phenylchinolons (2) ist in Abb. 2.75 dargestellt:

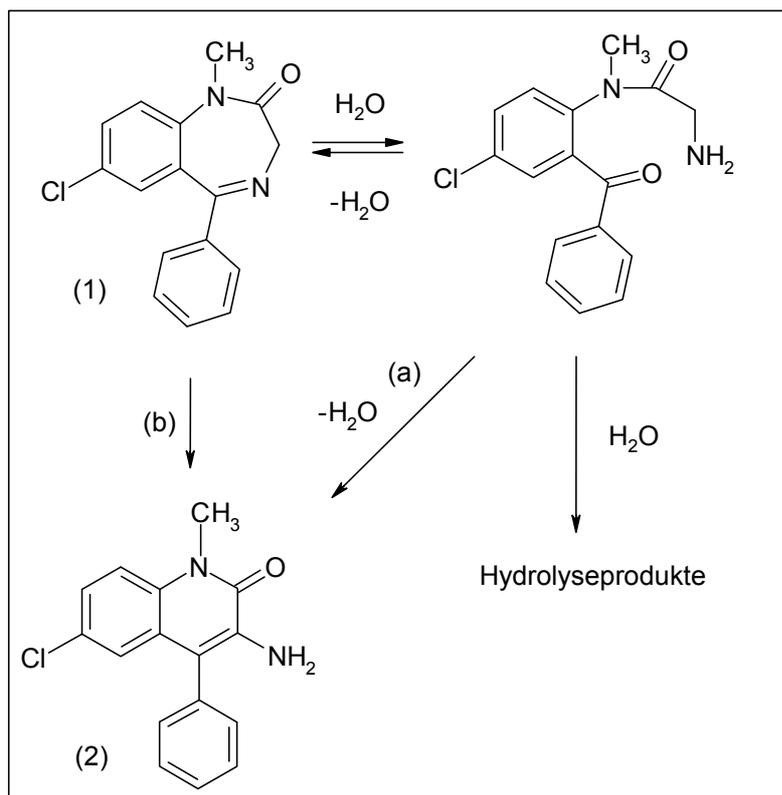


Abb. 2.75: Von Mayer und Mitarbeitern postulierter Mechanismus der Chinolonbildung; (1)= Diazepam, (2)= 3-Amino-1,2-dihydro-6-chlor-1-methyl-4-phenylchinolon

Da sich das Chinolonderivat bei hohen Temperaturen und schon in Gegenwart geringer Wassermengen bilden konnte, sollte überprüft werden, ob es sich bei der unbekannt Substanz um das Chinolon handelte. Aufgrund der pseudoaromatischen primären Aminogruppe wurde eine Diazotierung im Sauren und anschließender Kopplung mit Bratton-Marshall-Reagenz durchgeführt. Als Blindlösungen wurden 2 verschiedene Lösungen hergestellt, wobei Lösung 1 MMPP und Lösung 2 nur Lösungsmittel enthielten. Nach Reagenzienzugabe zu den Blindlösungen sowie der Analysenlösung zeigten alle drei Proben eine gelblich-orange Farbe, wobei die Analysenlösung sogar noch weniger intensiv gefärbt war als die Blindlösungen. Mayer beschrieb den gebildeten Azofarbstoff allerdings als tiefblau. Demnach konnte es sich bei der unbekannt Substanz nicht um das Chinolonderivat handeln und eine pseudoaromatische primäre Aminstruktur im Molekül konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit der Nachweisreagenzien wurde eine Positivprobe mit Sulfanilamid durchgeführt, da das Chinolonderivat als Referenzsubstanz nicht zur Verfügung stand. Es entstand ein tieferer Azofarbstoff. Die

Bedingungen für eine Kopplung mit dem Bratton-Marshall-Reagenz waren somit gegeben.

Sternbach und Mitarbeiter untersuchten die Oxidation von 1,4-Benzodiazepinen mit Rutheniumtetroxid [119]. Sie fanden ein Chinazolonderivat als Oxidationsprodukt des Diazepams. Der von *Sternbach* postulierte Mechanismus ist in Abb. 2.76 dargestellt.

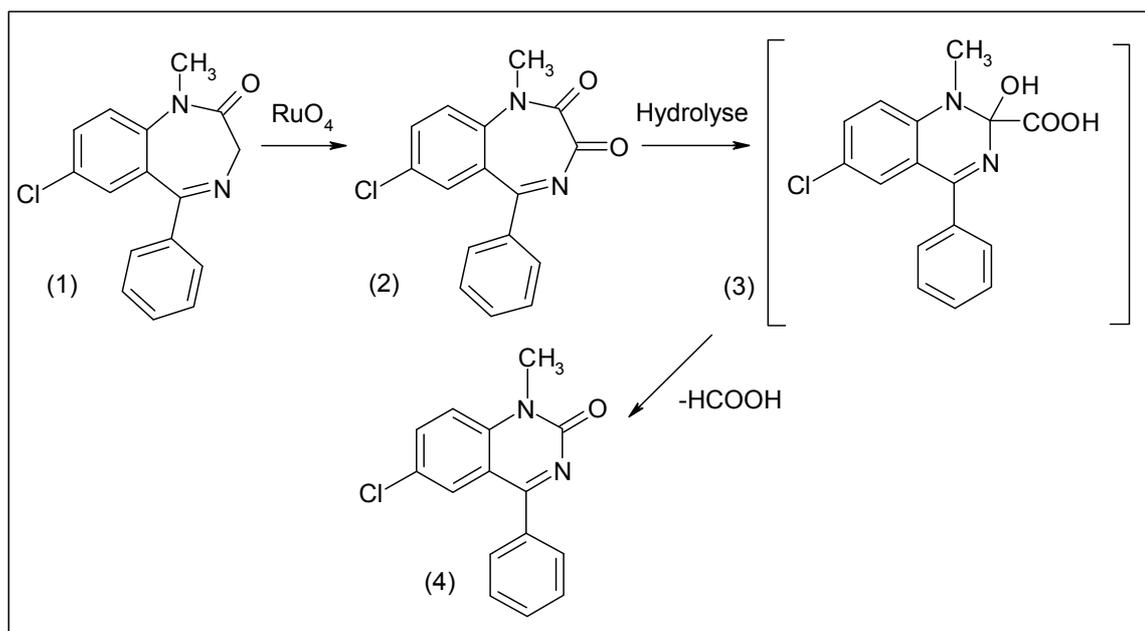


Abb. 2.76: Von *Sternbach* postulierte Mechanismus der Diazepam-Oxidation mit Rutheniumtetroxid zum 6-Chloro-1,2-dihydro-1-methyl-4-phenylchinazolin-2-on

Hierbei wurde das Diazepam (1) zunächst durch Rutheniumtetroxid zum Dion (2) oxidiert. Anschließend erfolgte eine Hydrolyse der 3,4-Bindung, gefolgt von einer Rezyklisierung (3) unter Ringverengung. Der Austritt der Ameisensäure führte dann zum detektierten Chinazolon (4). Um herauszufinden, ob es sich bei der unbekannt Substanz um das Chinazolon handelte, wurden Einzelnachweise auf die intermediär freiwerdende Ameisensäure durch Reduktion einer ammoniakalischen Silbernitratlösung zu metallischem Silber durchgeführt. Im Falle einer positiven Reaktion würde als Oxidationsprodukt der Ameisensäure CO₂ gebildet. Hierzu wurden wiederum 4 Lösungen, davon 2 Blindlösungen hergestellt. Eine Blindlösung enthielt dem Ansatz entsprechend äquimolare Mengen an MMPP, während die andere ausschließlich aus Lösungsmittel bestand. Als Referenz wurde eine 2 mmol Ameisensäurelösung in ACN bereit, während der zu untersuchende Ansatz unverändert Einsatz fand. Die Reagenzienlösungen

werden in Anlehnung an die Tollens Probe zur Prüfung auf Identität für Formaldehyd nach Ph.Eur. 5.0 hergestellt und sind im Experimentellen Teil (vergleiche 6.2.9) aufgeführt. Die Blindlösung mit reinem ACN blieb nach Reagenzienzugabe farblos klar, während die MMPP-Blindprobe eine gelbe, klare Farbe zeigte. Der zu untersuchende Ansatz wies dieselbe Farbe auf, während in der Positivprobe ein Silberspiegel, sowie einen beige-grauer Niederschlag im Reagenzglas sichtbar wurden. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte festgehalten werden, dass der Versuchsansatz keine Ameisensäure enthielt und hieraus resultierend ebenfalls auch keine Chinazolonbildung stattgefunden hatte.

Da die Vorversuche keinen eindeutigen Hinweis auf die Struktur der unbekannt Substanz lieferten, sollte sie massenspektroskopisch untersucht werden. Vorher mussten die MMPP und Phthalsäure aus dem Ansatz entfernt werden. Hierzu wurde der Ansatz zunächst unter Vakuum von Lösungsmittel befreit und im Anschluss in Dichlormethan aufgenommen. Die hierbei ausfallende MMPP bzw. Phthalsäure wurde abfiltriert. Zur gründlichen Entfernung schüttelte man die organische Phase zusätzlich mit wässriger NaHCO_3 -Lösung aus. Die organische Phase wurde durch Zugabe von NaSO_4 von restlichem Wasser befreit. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum wurde der harzähnliche Rückstand mittels EI-MS analysiert. Das Spektrum zeigte ein Molekül-Ionenpeak bei 300 m/z. Dieser bestätigte wiederum die Ergebnisse der Vorversuche und schloss gleichzeitig das von *Sternbach* durch Diazepamoxidation entstandene Dion als mögliche Struktur aus, da hier ein Molekül-Ionenpeak von 298 m/z erwartet worden wäre.

Ein von *Ebel* und *Schütz* verfasster Artikel befasste sich unter anderem mit der Darstellung von N-Oxiden aus 1,4-Benzodiazepinen unter Oxidation mit *m*-CPBA [120]. In selbigem Artikel wurde ein EI-Massenspektrum eines synthetisierten Diazepam-N-oxides abgebildet, welches dasselbe Massenpeakmuster aufwies, wie das Massenspektrum der unbekannt Substanz, hergestellt aus MMPP und Diazepam.

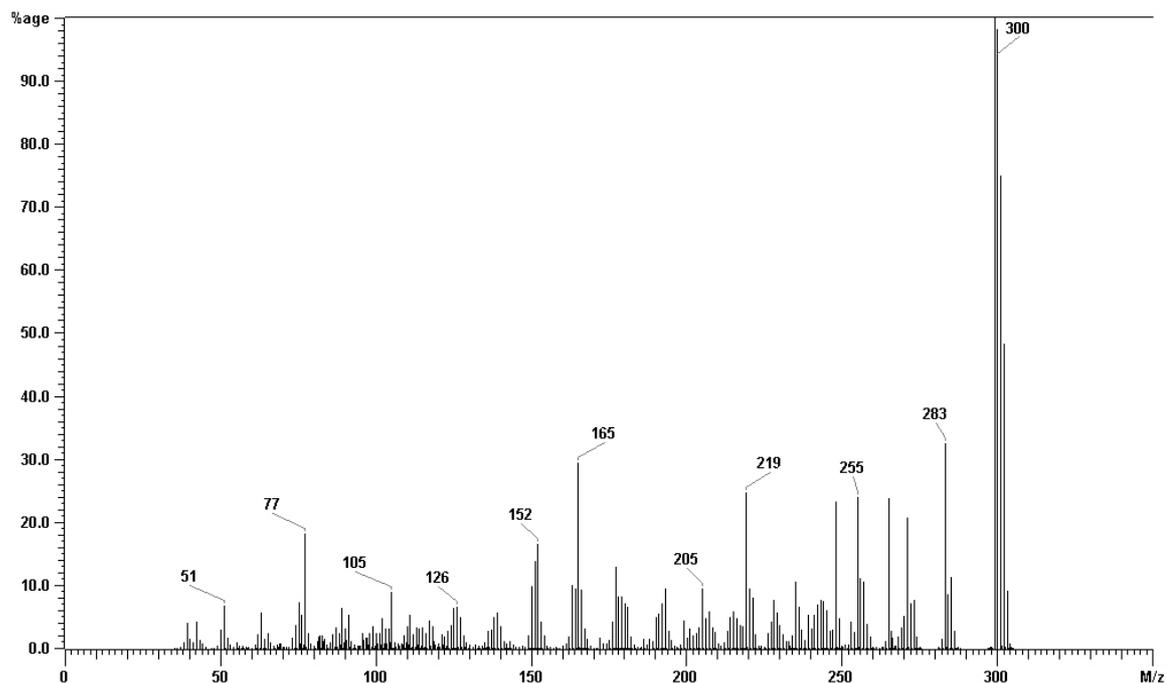


Abb. 2.77: EI-Massenspektrum des Diazepam-N-oxids

Für die detektierten Fragmentationen werden spekulative Ionenstrukturen in Abb. 2.78 dargestellt.

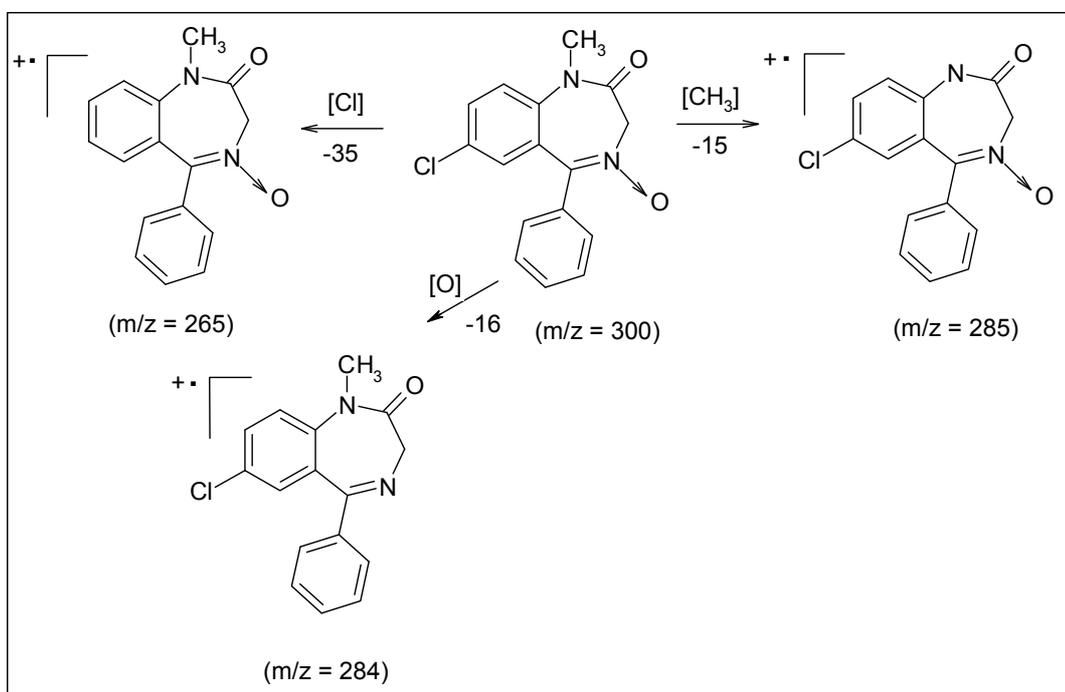


Abb. 2.78: Spekulative Fragmentationen des Diazepam-N-oxid-Zerfalls

Die entstehenden Fragmentationenpeaks bei $m/z = 285$ und $m/z = 284$ können durch Abspaltung der Radikale CH_3^\cdot und O^\cdot aus dem Molekülion entstanden

sein, ebenso wie Abspaltung des Chlorradikals einen Fragmentationenpeak bei $m/z = 265$ hätte erzeugen können. Die dargestellten Ionenpeaks bei $m/z = 51$ und $m/z = 77$ waren charakteristisch für aromatische Strukturen. Auf weitere Spekulationen wurden an dieser Stelle aufgrund der vielen folgenden Fragmentierungsmöglichkeiten verzichtet.

Die gewonnenen Erkenntnisse wurden nun zur Identifizierung der unbekannt Substanz herangezogen. Zunächst sollte das Diazepam-N-oxid nach synthetisiert werden [121]. Die Daten der anschließenden Analytik dieses Syntheseproduktes sollten als Grundlage zum Vergleich der im Modellsystem erzeugten unbekannt Substanz dienen.

2.12.2 Synthese

Die Synthese des Diazepam-N-oxides erfolgte nach einer Modifikation der Vorschrift von *Hansen* und *Boyd* [121]. Eine Lösung von *m*-CPBA in Dichlormethan wurde hierbei zu einer DiazepamLösung, ebenfalls in Dichlormethan gelöst, hinzugefügt. Den Reaktionsansatz erhitzte man 2 Stunden unter Rückflußkühlung. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch vom Lösungsmittel befreit und in Diethylether aufgenommen. Durch Einleiten von Ammoniakgas in den Reaktionsansatz erzeugte man im Folgenden das Ammoniumsalz der *m*-CBA. Nach dem Abfiltrieren des Salzes und Entfernen des Ethers, wurden aus n-Hexan umkristallisiert.

2.12.3 Aufreinigung

Die Überprüfung der Produktbildung mittels Dünnschichtchromatographie zeigte, dass neben dem gewünschten Produkt ebenfalls Edukt und vermutlich ein weiteres Oxidationsprodukt des Diazepams enthalten war. Aufgrund dessen erfolgte die Aufreinigung des Ansatzes mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel 60. Als Elutionsmittel wurde eine Mischung aus 30 Teilen ACN und 70 Teilen Toluol verwendet. Es wurden 10 mL Fraktionen gesammelt, die im Anschluss dünnschichtchromatographisch auf die Gegenwart des N-Oxids getestet wurden. Nach Vereinigung der N-Oxidhaltigen Fraktionen wurde wieder das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und aus Diethylether und n-Hexan auskristallisiert. Die Überprüfung der

Reinheit mittels HPLC mit der validierten Methode ergab 100 % Produkt bezogen auf die Gesamtflächen des Chromatogramms.

2.12.4 Analytik

Das EI-MS-Spektrum des nach Vorschrift von *Hansen* und *Boyd* umgesetzten Diazepams mit *m*-CPBA zeigte, wie die EI-MS-Spektren der MMPP-Umsetzung und der Literaturquelle [120], einen Moleküllionenpeak bei $m/z = 300$. Des Weiteren stimmten die Hauptfragmentationen in allen drei Spektren überein. Zur näheren Charakterisierung wurde ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des vermeintlichen Diazepam-N-oxides in CDCl_3 aufgenommen (siehe Abb. 2.79), sowie ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Eduktes Diazepam zum Vergleich (siehe Abb. 2.80).

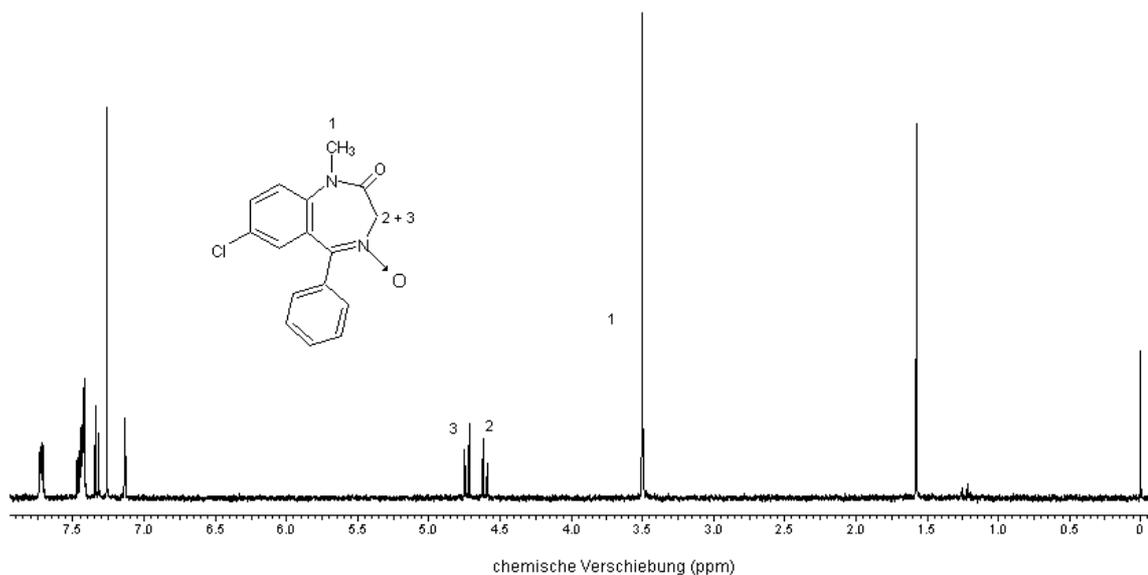


Abb. 2.79: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Diazepam-N-oxids

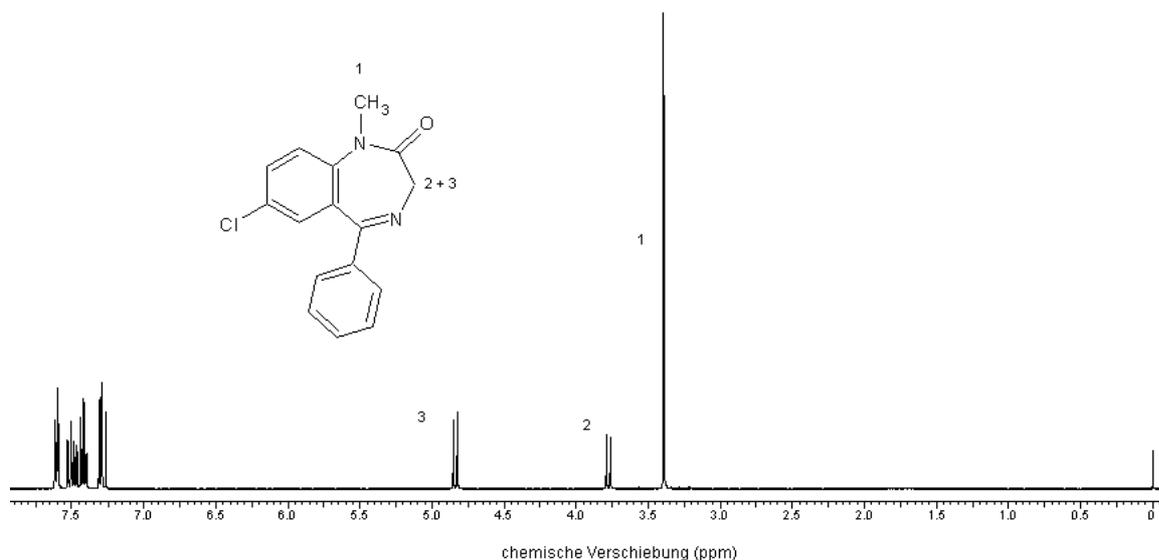


Abb. 2.80: ^1H -NMR-Spektrum von Diazepam

Zunächst wurde festgestellt, dass sich die Anzahl der Protonen nach der Umsetzung von Diazepam mit *m*-CPBA nicht verändert hatte. Die geminalen Wasserstoffatome (2+3) spalten aufgrund ihrer nicht frei drehbaren Bindung in beiden Spektren in zwei Dubletts auf. Das Spektrum des vermeintlichen N-Oxids zeigt gegenüber dem Diazepamspektrum allerdings eine starke Verschiebung des Resonanzsignals (2) ins tiefe Feld. Dies könnte durch die veränderte Ladungsdichte an N-4 in einem entschirmenden Effekt der benachbarten Protonen begründet liegen.

Des Weiteren wurde im ^{13}C -NMR-Spektrum ein tieffeldverschobenes Signal für die zum N-Oxid benachbarte Methylengruppe gegenüber dem Resonanzsignal der Methylengruppe im Diazepam-Spektrum beobachtet (siehe 6.2.9). Somit konnten die Veränderungen nach der Oxidation des Diazepams am Kohlenstoff- sowie Protonengerüst aufgeklärt und zugeordnet werden. Eine Ringverengung zum Chinolon, sowie die Elimination eines Grundbausteins aus dem Molekül zum Chinazolone konnten infolge dessen ausgeschlossen werden.

Zusätzlich wurden IR-Spektren von Diazepam und seines Oxidationsproduktes aufgenommen und miteinander verglichen. Das IR-Spektrum des N-Oxides zeigte eine für N-Oxide charakteristische Bande bei 1360 cm^{-1} [122], die im Diazepam-Spektrum nicht detektiert wurde.

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren des Diazepamoxidationsproduktes, welches mit MMPP als Sauerstoffdonator in Acetonitril hergestellt wurde (vergleiche 2.12), zeigten die gleichen Protonenkopplungen wie unter *m*-CPBA-Einwirkung. Da das Massenspektrum des MMPP-Ansatzes, wie bereits in 2.12.1 erwähnt, ebenfalls denselben Molekülionenpeak bei $m/z = 300$, sowie das gleiche Fragmentierungsmuster aufwies, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich auch hierbei um das Diazepam-N-oxid handelte. Somit wurde gleichzeitig ein weiterer einfacher Syntheseweg zur Herstellung des Diazepam-N-oxides mit MMPP aufgezeigt.

Nach der Identifizierung des Oxidationsproduktes von Diazepam mit *m*-CPBA und MMPP sollte noch geklärt werden, ob es sich bei der Umsetzung im Modellsystem auch tatsächlich um das Diazepam-N-oxid handelte. Hierzu wurden exemplarisch aus MMPP/Schütteln/82°C/MnT4MPyPcI- und *m*-CPBA/Schütteln/82°C/MnT4MPyPcI-Ansätzen Fraktionen des vermeintlichen Diazepam-N-oxid-Peaks bei einer Retentionszeit von 10 min nach Auftrennung mittels der validierten HPLC-Methode gesammelt. Anstelle des Natriumacetatpuffers wurde jedoch Aqua bidest verwendet um störende Signale im Massenspektrum zu vermeiden. Die eingengten N-Oxid-Fractionen der *m*-CPBA- und MMPP-Ansätze zeigten im Massenspektrum einen eindeutigen Molekülionenpeak von $m/z = 300$. Hierdurch konnte bewiesen werden, dass es sich bei dem bis hierhin unbekanntem Peak in den Modellsystemen um Diazepam-N-oxid handelte.

2.13 Anwendung und Vergleich der verschiedenen Modellsysteme unter Verwendung von immobilisierten und nicht-immobilisierten Metalloporphyrinen

2.13.1 Versuchsplanung

Bis hierhin fanden nur manganhaltige Porphyrine in immobilisierter Form im Modellsystem Anwendung. In diesem Kapitel sollten auch eisenhaltige Porphyrine auf ihre Eignung als Katalysatoren untersucht werden. Ferner sollten die Ergebnisse aus den Modellsystemen mit allen eisen- und manganhaltigen immobilisierten Porphyrinen mit denen nicht-immobilisierter verglichen werden. Des Weiteren wurden die

Synthesebedingungen und ihr Einfluss auf die Metaboliten-, sowie die Diazepam-N-oxid-Bildung erörtert. Hierbei findet ein Vergleich bei ST, sowie bei RT unter Mikrowellen- und Schüttelbedingungen statt. Die Ergebnisse wurden in den folgenden Abschnitten nach Sauerstoffdonator geordnet präsentiert. Schließlich sollte am Ende dieses Kapitels diskutiert werden, welches Modellsystem das am besten geeignete ist, um den Metabolismus des Diazepams zu imitieren bzw. die höchsten Ausbeuten an Metaboliten zu bilden. Des Weiteren sollte aus den gewonnenen Ergebnissen geschlussfolgert werden, ob der Einsatz der Synthesemikrowelle Vorteile gegenüber der klassischen Wärmeübertragung hatte.

Die im Folgenden präsentierten Daten für MnTFPPCl und MnT4MPyPCL bei Siedebedingungen unter Mikrowellenbestrahlung stammen aus Kapitel 2.10.2. Hier wurden die Ergebnisse aus dem 1. Zyklus der Aktivitätsbestimmung übernommen.

2.13.2 *m*-CPBA

Immobilisierte Katalysatoren:

Die höchsten Metabolitenausbeuten konnten unter Verwendung von MnTFPPCl als Katalysator verzeichnet werden (siehe Abb. 2.81). Unter Siedebedingungen und Schütteln war hier signifikant mehr Temazepam gegenüber den restlichen drei Bedingungen gebildet worden und somit auch gegenüber den Mikrowellenbedingungen bei gleicher Reaktionstemperatur. Bei RT-Bedingungen konnte kein signifikanter Unterschied in den Ausbeuten bei MnTFPPCl als Katalysator zwischen Schüttelapparatur und Mikrowelle festgestellt werden.

Unter MnT4MPyPCL-Einfluss waren die Metabolitenausbeuten geringer gegenüber der Verwendung von MnTFPPCl. Die Gehalte an Metaboliten unterschieden sich unter MnT4MPyPCL-Einfluss unter allen Bedingungen nicht signifikant.

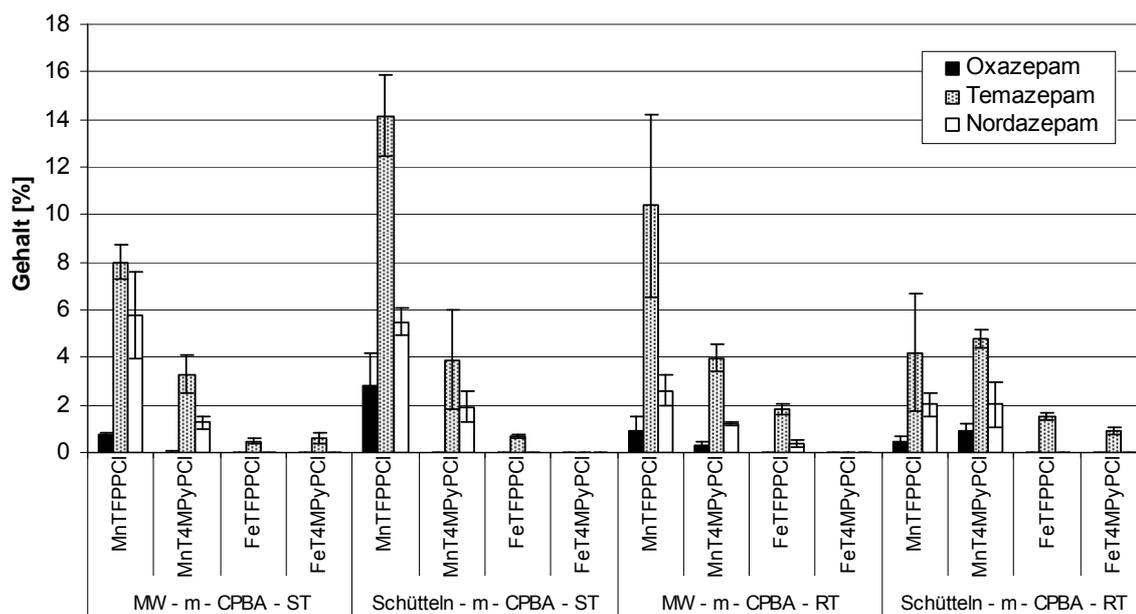


Abb. 2.81: Darstellung der Metabolite nach Umsetzung von Diazepam im Modellsystem mit *m*-CPBA als Sauerstoffdonator, unter Verwendung diverser immobilisierter Metalloporphyrine und variabler Reaktionsbedingungen

Die Metabolitenausbeuten unter Einsatz der eisenhaltigen Porphyrine FeTFPPCl und FeT4MPyPcI waren insgesamt geringer als die Gehalte der manganhaltigen Katalysatoren. Bei Verwendung von *m*-CPBA als Sauerstoffdonator waren die eisenhaltigen Metalloporphyrine im Modellsystem als weniger potent einzustufen.

Nicht-immobilisierte Katalysatoren:

Um die Ergebnisse der Modellsysteme unter Verwendung nicht-immobilisierter Porphyrine besser verstehen zu können, sei auf die Löslichkeitseigenschaften der einzelnen Metalloporphyrine hingewiesen. MnTFPPCl löste sich in dem verwendeten Probenvolumen vollständig, während die restlichen Katalysatoren nur zum Teil löslich waren. Aus Gründen der Vergleichbarkeit der Ergebnisse von immobilisierten und nicht-immobilisierten Katalysatoren wurden, trotz der geringeren Löslichkeiten der eisenhaltigen Porphyrine und MnT4MPyPcI, 2 μmol in Analogie zur Einwaage der immobilisierten Metalloporphyrine pro Versuchsansatz eingewogen.

Wie in Abb. 2.82 deutlich zu erkennen ist, wurden unter Verwendung von nicht-immobilisiertem MnTFPPCl insbesondere unter Schüttelbedingungen

die höchsten Ausbeuten erzielt. So konnte in der Schüttelapparatur signifikant mehr Temazepam gefunden werden als bei vergleichbarer Reaktionstemperatur in der Mikrowelle. Vermutlich war die bessere Löslichkeit des perfluorierten Porphyrins MnTFPPCl in ACN gegenüber dem kationischen, manganhaltigen Porphyrin für die Metabolitenbildung von entscheidender Bedeutung. Verwunderlich waren jedoch die verhältnismäßig geringen Ausbeuten unter Mikrowellenbestrahlung bei MnTFPPCl-Anwendung. Die Wiederholung der Versuche unter Mikrowellenbedingungen erbrachte keine signifikant besseren Ergebnisse.

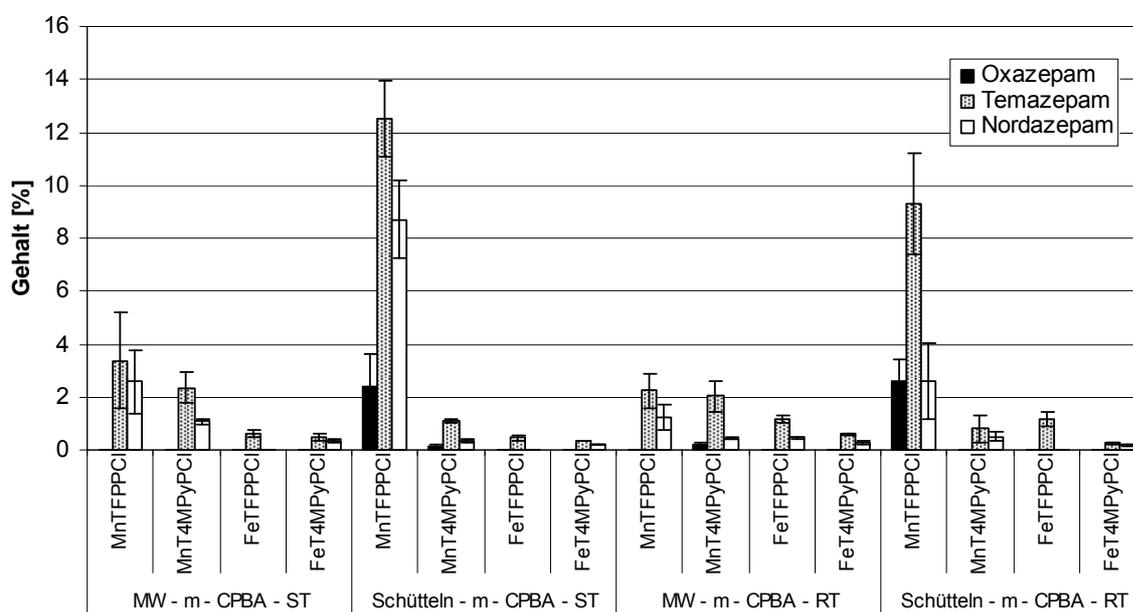


Abb. 2.82: Darstellung der Metabolite nach Umsetzung von Diazepam im Modellsystem mit *m*-CPBA als Sauerstoffdonator, unter Verwendung diverser nicht-immobilisierter Metalloporphyrine und variabler Reaktionsbedingungen

Unter MnT4MPyPcI-Anwendung konnte signifikant mehr Temazepam unter Mikrowellenbedingungen detektiert werden. Hierbei handelte es sich allerdings nur um eine Steigerung von näherungsweise einem Prozent.

Auch in nicht-immobilisierter Form waren die Ausbeuten der eisenhaltigen Metalloporphyrine am geringsten und diese Porphyrine somit geringer potent für den Einsatz in diesem Modellsystem gegenüber ihren manganhaltigen Analoga.

Verglich man nun die Ergebnisse der immobilisierten mit denen der nicht-immobilisierten Porphyrinen unter Verwendung von *m*-CPBA, konnte folgendes festgestellt werden:

Unter Verwendung von MnTFPPCl unterschieden sich die Temazepamausbeuten bei Raumtemperatur in der Mikrowelle, sowie in der Schüttelapparatur zwischen immobilisiertem und nicht-immobilisiertem Katalysator signifikant. Immobilisiertes MnTFPPCl lieferte höhere Temazepamausbeuten in der Mikrowelle, während geringere Ausbeuten unter Schüttelbedingungen bei RT detektiert wurden. Die restlichen Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Mit MnT4MPyPCL als Katalysator wurden unter allen Bedingungen, mit Ausnahme Mikrowelle/ST, signifikant höhere Temazepamausbeuten auf Seiten des immobilisierten Katalysators gefunden im Vergleich zu den nicht-immobilisierten. Für Oxazepam und Nordazepam konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Katalysatorformen festgestellt werden.

Auf einen statistischen Vergleich der eisenhaltigen Porphyrine zwischen den immobilisierten und den nicht-immobilisierten Formen wurde aufgrund der geringen Ausbeuten an dieser Stelle verzichtet. Denn die Modellsysteme mit *m*-CPBA als Sauerstoffdonator in Kombination mit FeTFPPCl bzw. FeT4MPyPCL standen nicht in Konkurrenz zu denselben Modellsystemen mit manganhaltigen Katalysatoren um die höchsten Metabolitenausbeuten.

In Abb. 2.83 sind die Gehalte an Diazepam-N-oxid bei Verwendung der immobilisierten und nicht-immobilisierten Katalysatorenformen dargestellt. Griff man an dieser Stelle die in Kapitel 2.10.2 formulierte These eines hohen Diazepam-N-oxid-Gehaltes bei zunehmender Inaktivierung bzw. der Abwesenheit eines Katalysators auf, konnten einige der dargestellten Ergebnisse diese weiter bestätigen.

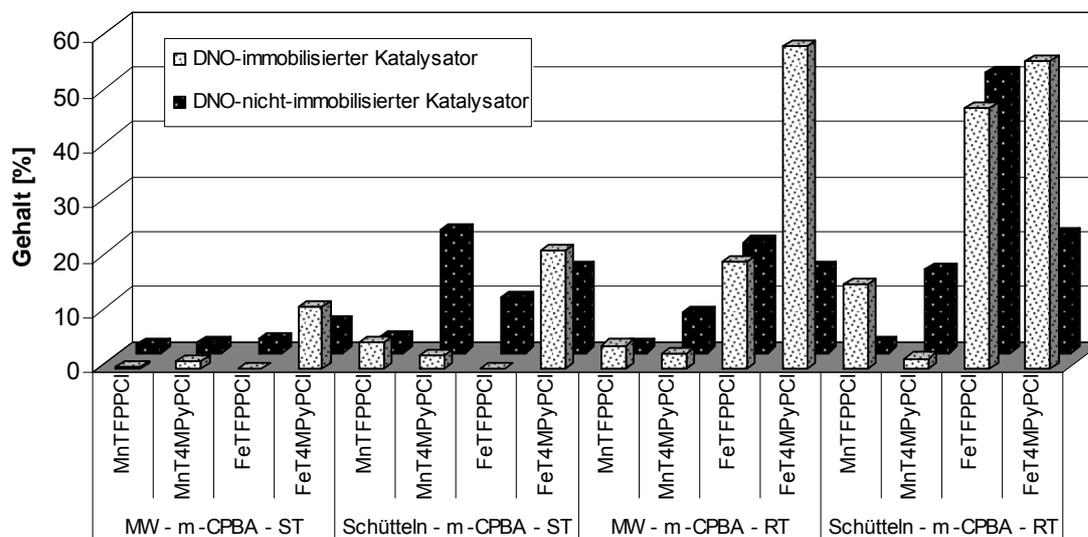


Abb. 2.83: Darstellung der Diazepam-N-oxid-Gehalte nach Umsetzung von Diazepam mit *m*-CPBA und diversen Katalysatoren in immobilisierter und nicht-immobilisierter Form im Vergleich

Wie bereits erwähnt, lösten sich 2 μmol nicht-immobilisiertes MnTFPPCl in dem verwendeten Ansatzverhältnis gut. Somit war ein hoher Anteil an aktivem Katalysator in Lösung gewährleistet. Dies erklärte die geringen Mengen an gebildetem Diazepam-N-oxid. Bei nicht-immobilisiertem MnT4MPyPcI war genau das Gegenteil der Fall. Die Löslichkeit war gering, wodurch sich wenig aktiver Katalysator in Lösung befand. Die Diazepam-N-oxid-Bildung ist demzufolge entsprechend höher als bei Verwendung der immobilisierten Form. Vermutlich bewirkte eine Oberflächenvergrößerung durch Immobilisierung des Katalysators an Kieselgel eine gesteigerte katalytische Aktivität und eine hieraus resultierende geringere Diazepam-N-oxid-Bildung. Hohe Diazepam-N-oxid-Ausbeuten bei Verwendung der eisenhaltigen Porphyrine in immobilisierter Form deuteten auf eine geringe katalytische Aktivität oder eine schnelle Zerstörung des Katalysators hin, während unter Einsatz der nicht-immobilisierten Formen erneut die verhältnismäßig schlechte Löslichkeit einen zusätzlichen Einfluss hatte.

2.13.3 PhIO

Immobilisierte Katalysatoren:

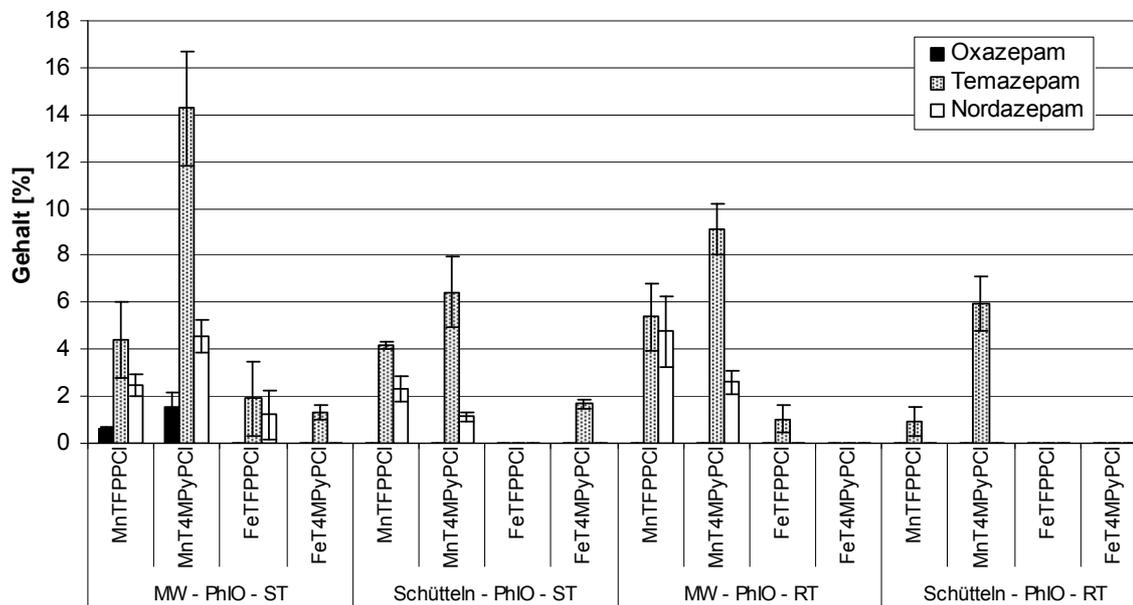


Abb. 2.84: Darstellung der Metabolite nach Umsetzung von Diazepam im Modellsystem mit PhIO als Sauerstoffdonator, unter Verwendung diverser immobilisierter Metalloporphyrine und variabler Reaktionsbedingungen

In Abb. 2.84 fallen zunächst die hohen Ausbeuten unter Mikrowellenbestrahlung bei Siedetemperatur und MnT4MPyPcI-Einsatz auf. Die Ausbeuten von Oxazepam, Temazepam und Nordazepam waren signifikant höher unter diesen Bedingungen gegenüber denen der Schüttelapparatur bei gleicher Reaktionstemperatur. Auch unter Raumtemperatur konnten in der Mikrowelle signifikant höhere Gehalte an Temazepam und Nordazepam gegenüber den Schüttelbedingungen registriert werden.

Unter Verwendung von MnTFPPCl wurden keine ausbeutensteigernden Effekte der Mikrowelle bei Siedebedingungen registriert. Allerdings konnten in der Mikrowelle bei RT höhere Ausbeuten an Nordazepam und Temazepam detektiert werden, als unter Schüttelbedingungen.

In Analogie zu den Ergebnissen unter *m*-CPBA- Anwendung lieferten die eisenhaltigen Metalloporphyrine die geringsten Ausbeuten. Verglich man in diesem Zusammenhang die Syntheseapparaturen unter PhIO-Einsatz miteinander, konnte man eine geringe Metabolitensteigerung bei erhöhten

Reaktionstemperaturen feststellen. Allerdings liegen auch hier die Gehalte insgesamt außerhalb der Metabolitenmengen die mit manganhaltigen Porphyrinen erzielt wurden.

Nicht-immobilisierte Metalloporphyrine:

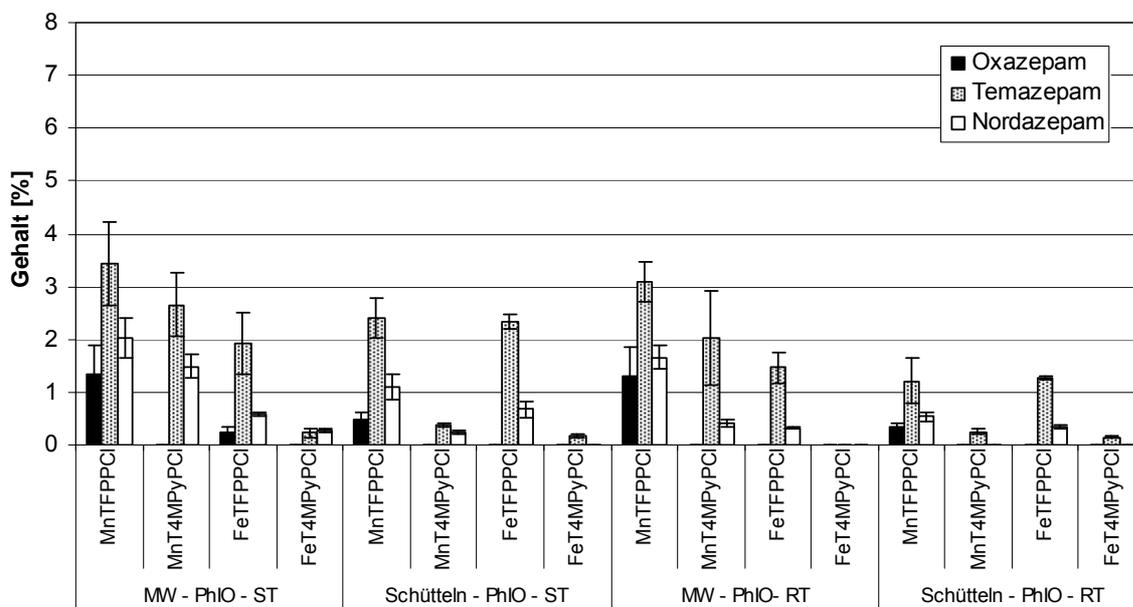


Abb. 2.85: Darstellung der Metabolite nach Umsetzung von Diazepam im Modellsystem mit PhIO als Sauerstoffdonator, unter Verwendung diverser nicht-immobilisierter Metalloporphyrine und variabler Reaktionsbedingungen

Unter Verwendung der nicht-immobilisierten Katalysatoren konnten unter MnTFPPCl-Einsatz geringfügig höhere Ausbeuten gegenüber MnT4MPyPcI registriert werden. Dies wurde ebenfalls mit einer besseren Löslichkeit des Katalysators in ACN begründet.

Unter Verwendung von MnTFPPCl war auffällig, dass keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Syntheseapparatur zwischen den Reaktionstemperaturen bestanden. Eine Temperaturerhöhung ging im Modellsystem demnach nicht automatisch mit einer Erhöhung der Ausbeute einher.

Wurde nicht-immobilisiertes MnT4MPyPcI eingesetzt, konnten generell signifikant höhere Ausbeuten für Temazepam und Nordazepam unter Mikrowellenbedingungen gegenüber den Schüttelbedingungen gefunden.

Unter FeTFPPCl-Anwendung konnten keine signifikanten Unterschiede in den Synthesebedingungen festgestellt werden. Doch war das nicht-immobilisierte FeTFPPCl im Verhältnis zu seinem nicht-immobilisierten manganhaltigen Analogon annähernd gleichwertig. FeT4MPyPCL lieferte die geringsten Ausbeuten.

Verglich man nun die Ergebnisse der nicht-immobilisierten mit den immobilisierten Formen, fielen zunächst die verhältnismäßig geringeren Ausbeuten unter Einsatz von nicht-immobilisiertem MnT4MPyPCL auf. So zeigte nicht-immobilisiertes MnT4MPyPCL unter Mikrowelle/ST signifikant geringere Metabolitenausbeuten als die immobilisierte Form. Ferner wurden signifikant höhere Temazepamausbeuten unter allen übrigen Synthesebedingungen mit dem immobilisierten Katalysator erreicht. Hieraus konnte geschlossen werden, dass MnT4MPyPCL in immobilisierter Form in Kombination mit PhIO als Sauerstoffdonator eine gesteigerte Aktivität gegenüber seiner nicht-immobilisierten Form aufwies. Grund hierfür konnte einerseits die durch die Immobilisierung erreichte Vergrößerung der Oberfläche des Katalysators sein. Andererseits konnte die geringe Löslichkeit des nicht-immobilisierten MnT4MPyPCL in ACN ebenfalls die niedrigeren Ausbeuten bedingen konnten.

Die Ergebnisse des Modellsystems von immobilisierten und nicht-immobilisierten MnTFPPCl unterschieden sich hinsichtlich der Bildung von Temazepam mit Ausnahme der Schüttelbedingungen unter ST nicht signifikant. Unter Schüttel/ST wurde mit der immobilisierten Form mehr Temazepam und Nordazepam gebildet.

Für die beiden Formen des FeTFPPCl wurden gegenteilige Ergebnisse verglichen mit den manganhaltigen Metalloporphyrinen erhalten. Hier wurden signifikant höhere Temazepamausbeuten unter Schüttelbedingungen für die nicht-immobilisierte Form gezeigt, wogegen der immobilisierten Form kein Produkt detektiert wurde. Innerhalb der Mikrowellenergebnisse bestanden allerdings keine signifikanten Unterschiede.

Aufgrund der geringen Ausbeuten bei beiden FeT4MPyPCL-Modellen wurde auf eine statistische Auswertung der Ergebnisse verzichtet.

Diazepam-N-oxid wurde unter PhIO-Einsatz nicht detektiert.

2.13.4 MMPP

Immobilisierte Katalysatoren:

Gute Ergebnisse konnten bei der Verwendung von immobilisiertem MnTFPPCl unter Schüttel/ST registriert werden (siehe Abb. 2.86). Die erhaltenen Ausbeuten unter diesen Bedingungen waren signifikant höher als bei gleicher Reaktionstemperatur in der Mikrowelle. Des Weiteren konnte unter MnTFPPCl-Verwendung eine signifikante temperaturabhängige Steigerung der Metabolitenausbeuten innerhalb der Syntheseapparaturen festgestellt werden, wobei unter Siedebedingungen die Ausbeuten höher waren.

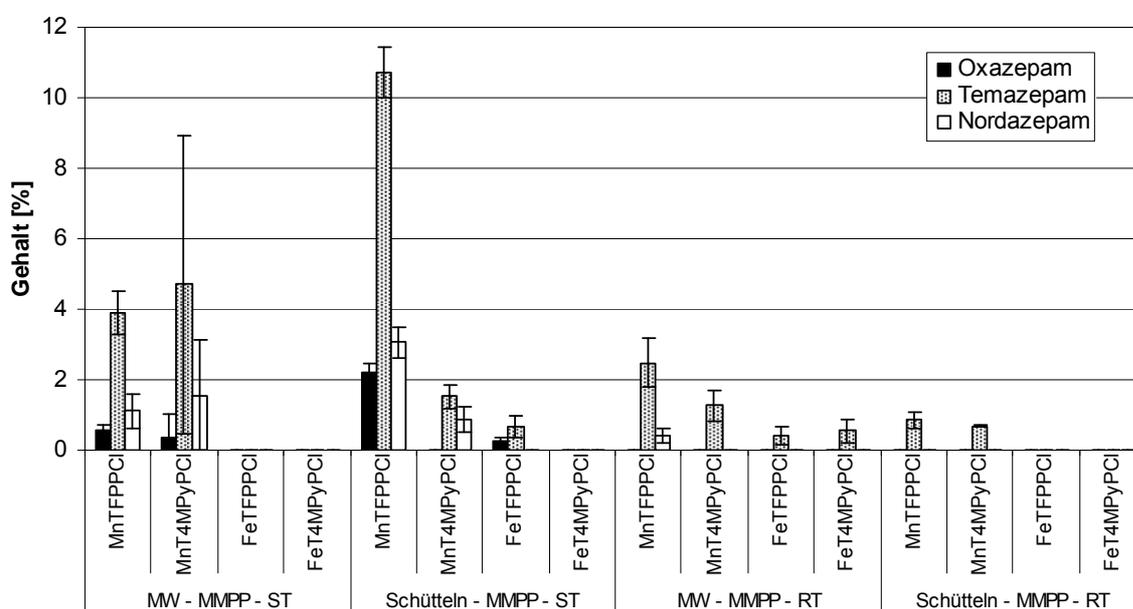


Abb. 2.86: Darstellung der Metabolite nach Umsetzung von Diazepam im Modellsystem mit MMPP als Sauerstoffdonator, unter Verwendung diverser immobilisierter Metalloporphyrine und variabler Reaktionsbedingungen

Unter Verwendung von immobilisiertem MnT4MPyPcI konnten signifikante Unterschiede nur bei der Menge an gebildetem Temazepam festgestellt werden. In der Mikrowelle unter Siedebedingungen wurden höhere Ausbeuten dieses Metaboliten registriert, verglichen mit der Schüttelapparatur bei derselben Temperatur sowie in der Mikrowelle unter Raumtemperatur. Generell waren die Metabolitenausbeuten bei Anwendung des immobilisierten MnT4MPyPcI als gering einzustufen. Eine deutliche Abgrenzung zu den eisenhaltigen Porphyrinen kann nicht gemacht werden.

Auf eine statistische Auswertung der Ergebnisse der eisenhaltigen Porphyrine wurde aufgrund der geringen und zum Teil nicht detektierbarer Metabolitenausbeuten verzichtet.

Nicht-immobilisierte Katalysatoren:

Wie bereits für die immobilisierte Form von MnTFPPCl konnten auch für das nicht-immobilisierte Modell gute Ausbeuten unter Schüttel/ST ermittelt werden. So wurden signifikant höhere Gehalte für Temazepam und Oxazepam unter diesen Bedingungen gegenüber der Mikrowelle/ST gefunden. Ferner wurde unter Verwendung des nicht-immobilisierten MnTFPPCl wieder eine temperaturabhängige Steigerung der Ausbeuten innerhalb der Syntheseapparaturen festgestellt. Unter Schüttel/ST wurden signifikant mehr Metabolite gebildet als unter RT, und auch in der Mikrowelle wurde signifikant mehr Temazepam und Nordazepam unter ST gebildet.

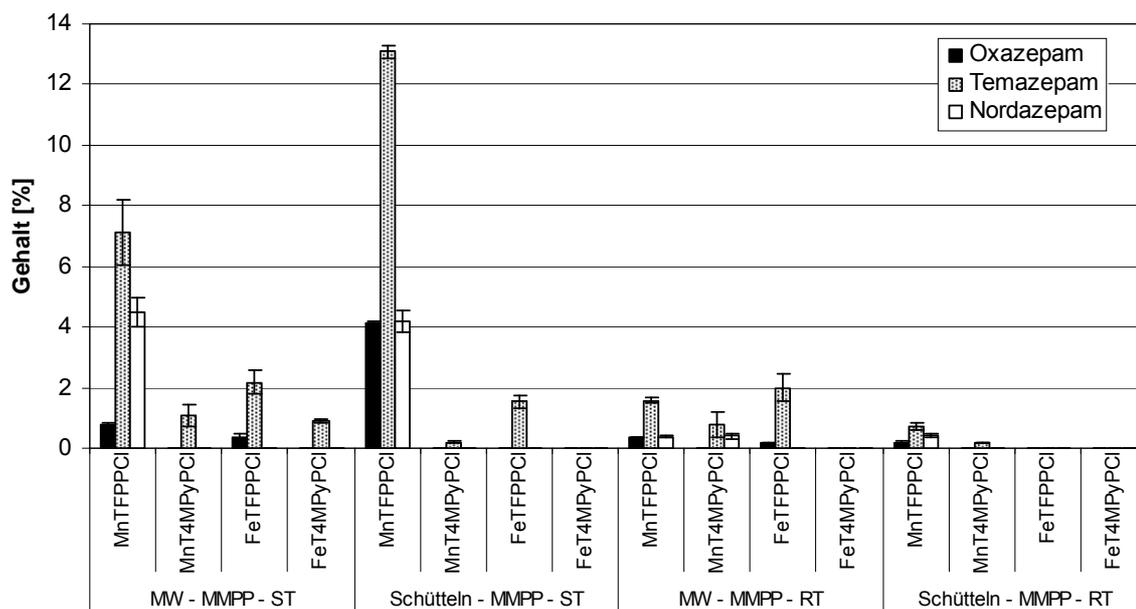


Abb. 2.87: Darstellung der Metabolite nach Umsetzung von Diazepam im Modellsystem mit MMPP als Sauerstoffdonator, unter Verwendung diverser nicht-immobilisierter Metalloporphyrine und variabler Reaktionsbedingungen

Die Metabolitenausbeuten bei Einsatz des nicht-immobilisierten MnT4MPyPcI waren sehr niedrig. Die Aktivität des Katalysators schien gehemmt zu sein. Die geringe Löslichkeit des kationischen Porphyrins in ACN und eine eventuelle Inaktivierung des Katalysators durch den

Sauerstoffdonator konnten für diese Ergebnisse verantwortlich sein. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Reaktionsbedingungen unter MnT4MPyPCL-Einfluß ermittelt werden.

In nicht-immobilisierter Form angewendet waren die Metabolitenausbeuten unter FeTFPPCL-Anwendung teilweise leicht erhöht. Wie gut zu erkennen ist, waren die Unterschiede unter MW/ST und MW/RT nicht signifikant, allerdings wurde unter Siedebedingungen in der Schüttelapparatur mehr Temazepam gebildet als bei RT. Die Temazepamausbeuten waren unter ST gegenüber MnT4MPyPCL sogar leicht erhöht. Vermutlich war das System aus FeTFPPCL und MMPP stabiler, als die Kombination aus MMPP und dem kationischen Porphyrin. Auf eine Auswertung der FeT4MPyPCL-Ergebnisse wurde aufgrund geringer bzw. teilweise nicht nachweisbarer Metabolitenbildung verzichtet.

Generell konnten zur Verwendung von MMPP als Sauerstoffdonator zwei einheitliche Aussagen getroffen werden. Die Metabolitenausbeuten unter Siedebedingungen waren höher als unter Raumtemperatur, und die perfluorierten Metalloporphyrine erzielten höhere Metabolitenausbeuten gegenüber ihren kationischen Analoga.

Der Vergleich der Ergebnisse von immobilisierten Katalysatoren und nicht-immobilisierter Katalysatoren ließ weiterhin folgende Aussagen zu. Im Falle von MnTFPPCL konnten unter Raumtemperaturbedingungen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Allerdings wurden unter Siedebedingungen in der Mikrowelle höhere Ausbeuten an Temazepam und Nordazepam, sowie in der Schüttelapparatur höhere Gehalte an Oxazepam und Temazepam bei Verwendung des nicht-immobilisierten MnTFPPCL registriert.

Ein einziger signifikanter Unterschied zwischen den beiden Katalysatorformen bei MnT4MPyPCL-Anwendung konnte nur unter Mikrowelle/ST festgestellt werden. Hier wurde unter Anwendung des immobilisierten Modells signifikant mehr Temazepam gebildet als für das nicht-immobilisierte.

Die Temazepamausbeute war unter Verwendung des nicht-immobilisierten FeTFPPCL mit Ausnahme von Schüttel/RT signifikant höher als unter

Einsatz des immobilisierten Modells. Auf einen Vergleich der Ergebnisse der beiden FeT4MPyPcI-Formen wurde aufgrund der geringen Ausbeuten verzichtet.

Wie in Abb. 2.88 deutlich zu erkennen ist, wurde unter MMPP-Einfluß unter Siedebedingungen mehr Diazepam-N-oxid gebildet als unter RT. Innerhalb der Siedetemperaturbedingungen konnten unter Verwendung der kationischen Porphyrine in immobilisierter und in nicht-immobilisierter Form zusätzlich die höchsten Ausbeuten detektiert werden. Dies bestätigt wiederum die beschriebene höhere Oxidationsempfindlichkeit der kationischen gegenüber der perfluorierten Porphyrinen [85]. Demnach fand bei den kationischen Porphyrinen eine schnellere Inaktivierung oder Zerstörung des Katalysators durch den Sauerstoffdonator statt, welches in einer erhöhten Bildung des Diazepam-N-oxids resultierte. Die zusätzliche Erhöhung des Diazepam-N-oxid-Gehaltes unter nicht- immobilisiertem MnT4MPyPcI gegenüber der immobilisierten Form lag vermutlich in der geringen Menge an Katalysator in Lösung, hervorgerufen durch die schlechte Löslichkeit in ACN. Die hohen Ausbeuten an Diazepam-N-oxid als unkatalysiertes Produkt erklärten auch die geringen Ausbeuten an Metaboliten unter den kationischen Metalloporphyrinen.

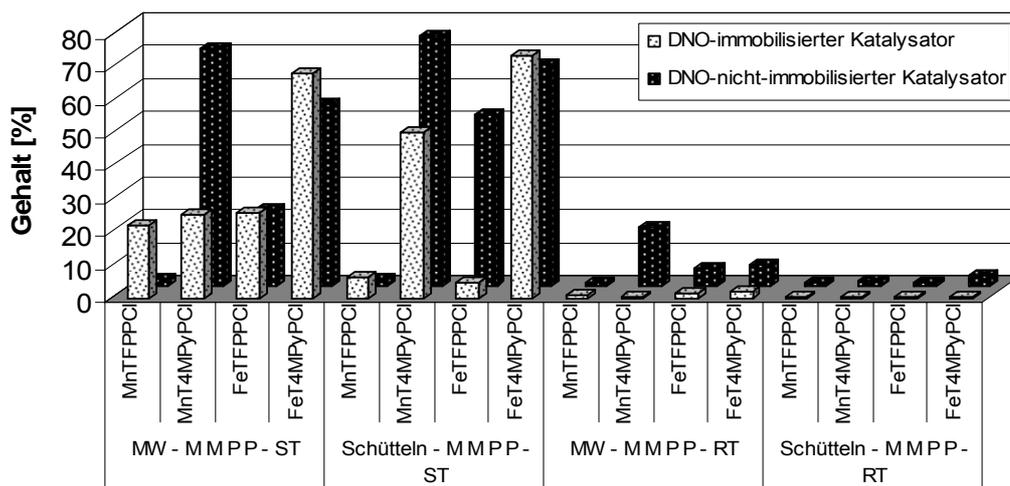


Abb. 2.88: Darstellung der Diazepam-N-oxid-Gehalte nach Umsetzung von Diazepam mit MMPP als Sauerstoffdonator und diversen Katalysatoren in immobilisierter und nicht-immobilisierter Form im Vergleich

2.13.5 Wasserstoffperoxid

Immobilisierte Katalysatoren:

Aufgrund seines umweltfreundlichen Reaktionsproduktes Wasser nach Umsetzung im Modellsystem stellte Wasserstoffperoxid einen attraktiven Sauerstoffdonator dar. Die Potenz, im Diazepam-Modellsystem unter Katalyse zu hydroxylieren, zu demethylieren, sowie beides am Zielmolekül zu erreichen, war allerdings gering. Bei vergleichbarem molaren Ansatzverhältnis war Wasserstoffperoxid, im Gegensatz zu den in diesem Kapitel bereits behandelten Sauerstoffdonatoren, der am wenigsten aktive. Die Metabolitenausbeuten beschränkten sich auf Werte unter einem Prozent. Wie in Abb. 2.89 dargestellt, wurde bis auf wenige Ausnahmen nur eine Hydroxylierung zum Temazepam nachgewiesen. Immobilisiertes FeTFPPCI lieferte unter allen vier Bedingungen keine detektierbaren Mengen an Metabolit.

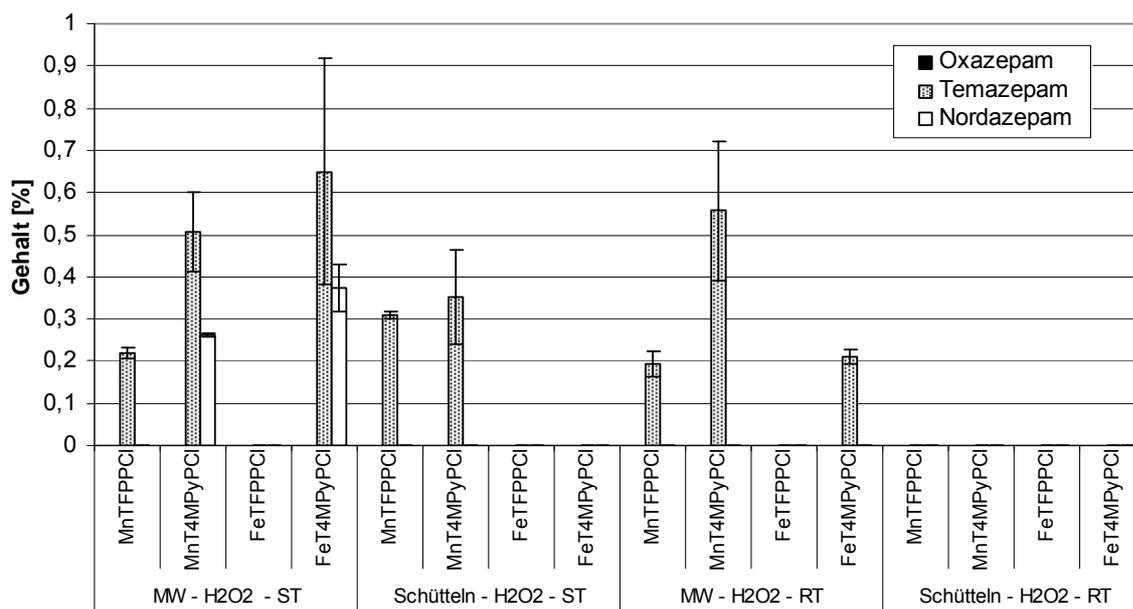


Abb. 2.89: Darstellung der Metabolite nach Umsetzung von Diazepam im Modellsystem mit H₂O₂ als Sauerstoffdonator, unter Verwendung diverser immobilisierter Metalloporphyrine und variabler Reaktionsbedingungen

Da dieses Modellsystem aufgrund der geringen Ausbeuten offensichtlich außer Konkurrenz zu denen in diesem Kapitel bereits beschriebenen Modellsystemen stand, wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

Um zu überprüfen, ob die eingesetzte Menge an Wasserstoffperoxid zu gering war, wurden Versuche mit einer zehnfach höheren Konzentration durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 2.90 dargestellt. Die Ausbeuten konnten zwar zum Teil gesteigert werden, doch erhöhten sich auch die Standardabweichungen der Ergebnisse. FeT4MPyPcI scheint unter Siedebedingungen im Vergleich zu den restlichen Katalysatoren die höchsten Ausbeuten zu erzielen. Allerdings wurde unter Raumtemperaturbedingungen kein Metabolit detektiert, sodass auch aus Gründen der Offensichtlichkeit auf einen statistischen Vergleich verzichtet wurde.

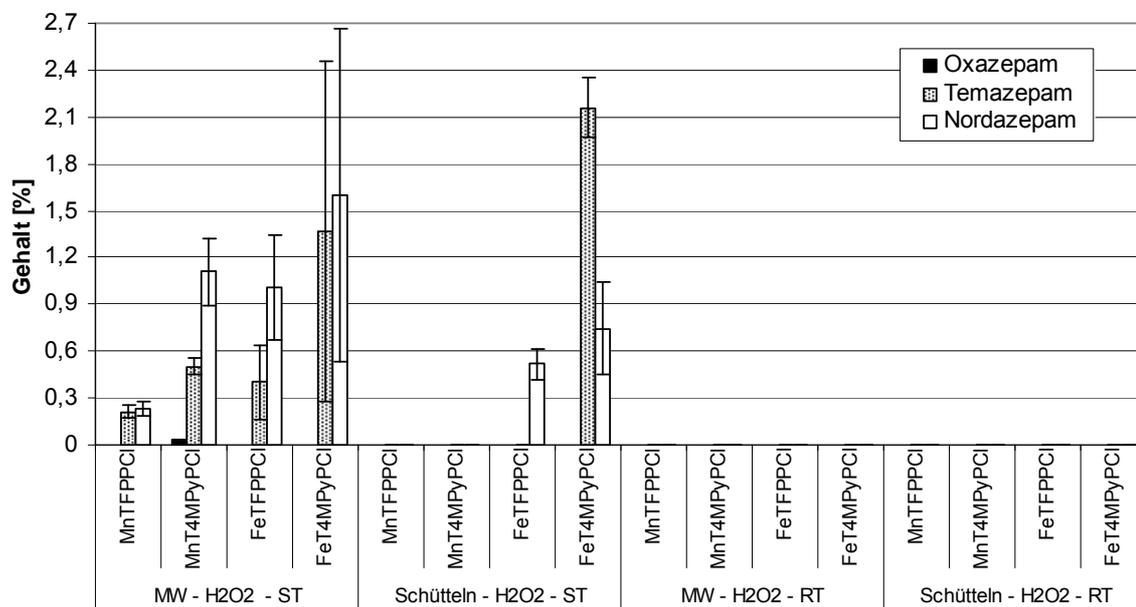


Abb. 2.90: Darstellung der Metabolite nach Umsetzung von Diazepam im Modellsystem mit 10-facher H₂O₂-Konzentration, unter Verwendung diverser immobilisierter Metalloporphyrine und variabler Reaktionsbedingungen

Nicht-immobilisierte Katalysatoren:

Durch die Verwendung von nicht-immobilisierten Metalloporphyrinen wurde ebenfalls keine Steigerung der Metabolitenausbeute erreicht. Auffällig war jedoch die Aktivität der eisenhaltigen Metalloporphyrine. Unter Siedebedingungen konnten vermehrt Metabolite detektiert werden. Aufgrund der teilweise sehr inhomogenen Ergebnisse von immobilisierten und nicht-immobilisierten Katalysatoren, wurde auf einen statistischen Vergleich, bedingt durch eine geringe Aussagekraft, verzichtet.

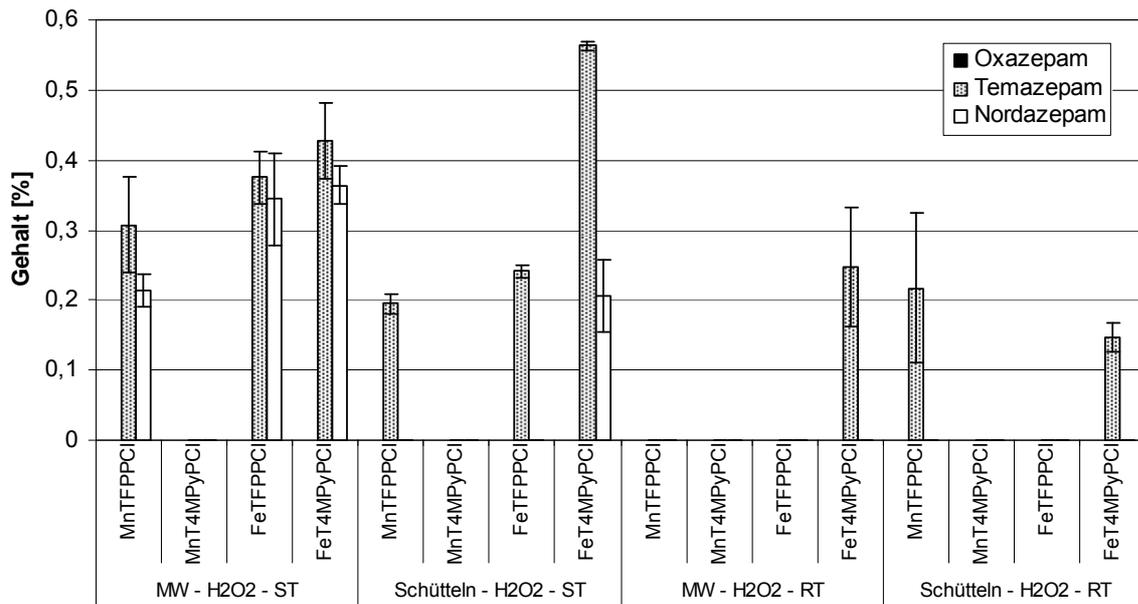


Abb. 2.91: Darstellung der Metabolite nach Umsetzung von Diazepam im Modellsystem mit H₂O₂ als Sauerstoffdonator, unter Verwendung diverser nicht-immobilisierter Metalloporphyrine und variabler Reaktionsbedingungen

Ursachen für die Inhomogenität waren unter anderem die niedrigen Ausbeuten. Die Ergebnisse lagen teilweise nah an der Erfassungsgrenze. Werte unter der Erfassungsgrenze wurden nicht berücksichtigt.

Generell konnte jedoch festgestellt werden, dass unter Siedebedingungen höhere Ausbeuten registriert wurden, wobei keiner der Katalysatoren grundsätzlich potenter war.

2.13.6 Wasserstoffperoxid und Imidazol

Immobilisierte Katalysatoren:

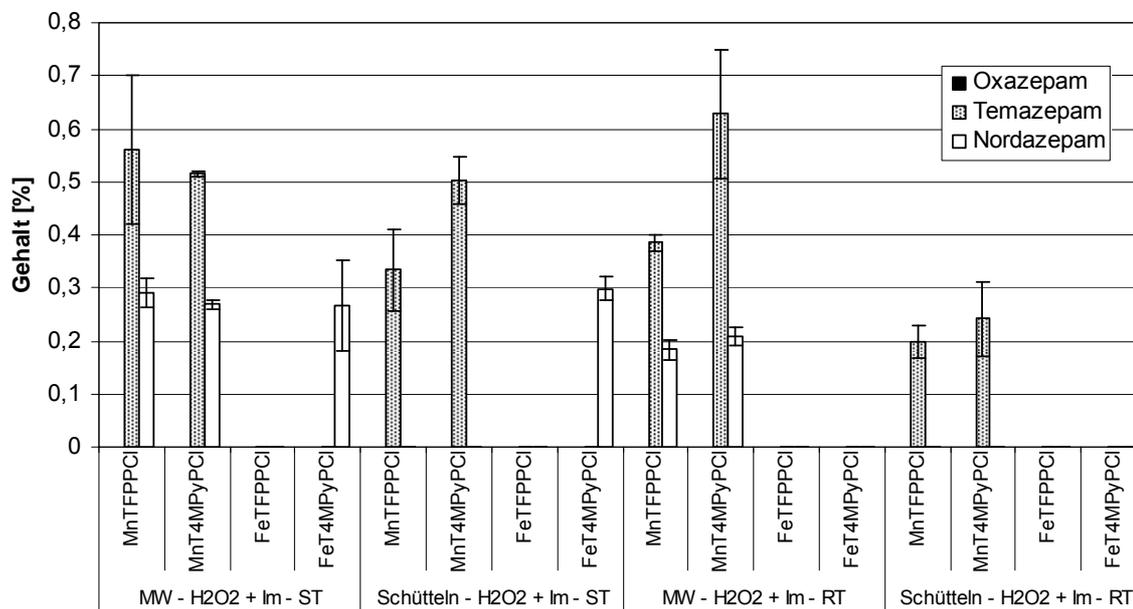


Abb. 2.92: Darstellung der Metabolite nach Umsetzung von Diazepam im Modellsystem mit H₂O₂ als Sauerstoffdonator, sowie Imidazol als Cokatalysator unter Verwendung diverser immobilisierter Metalloporphyrine und variabler Reaktionsbedingungen

Auf die stabilisierenden Eigenschaften des Imidazols in Verbindung mit Metalloporphyrinen wurde bereits in Kapitel 2.10.1 eingegangen. Nun sollte untersucht werden, ob der Zusatz von Imidazol einen ausbeutensteigernden Effekt unter Verwendung der aufgeführten Katalysatoren bewirkte.

Unter Zusatz von Imidazol konnten bei der Verwendung der immobilisierten Katalysatoren in Analogie zu den reinen Wasserstoffperoxidversuchen, ebenfalls nur Metabolitenausbeuten unter einem Prozent detektiert werden. Bei Verwendung der manganhaltigen Porphyrine wurde unter allen Bedingungen Temazepam nachgewiesen, jedoch zeigten die eisenhaltigen Katalysatoren im Vergleich eine sehr geringe bis gar keine Aktivität. So wurden unter FeT4MPyPCI-Einsatz nur unter Siedebedingungen geringe Mengen an Nordazepam detektiert. FeTFPPCI zeigte unter keiner der Synthesebedingungen eine Aktivität. Eine statistische Auswertung erfolgte aufgrund der geringen oder teilweise nicht detektierbaren Metabolitenbildung nicht.

Zusätzlich wurde überprüft, ob die Kombination aus einer zehnfach höheren Wasserstoffperoxidkonzentration mit Imidazolzusatz einen positiven Effekt auf die Metabolitenbildung hatte. Die Ergebnisse sind in Abb. 2.93 dargestellt.

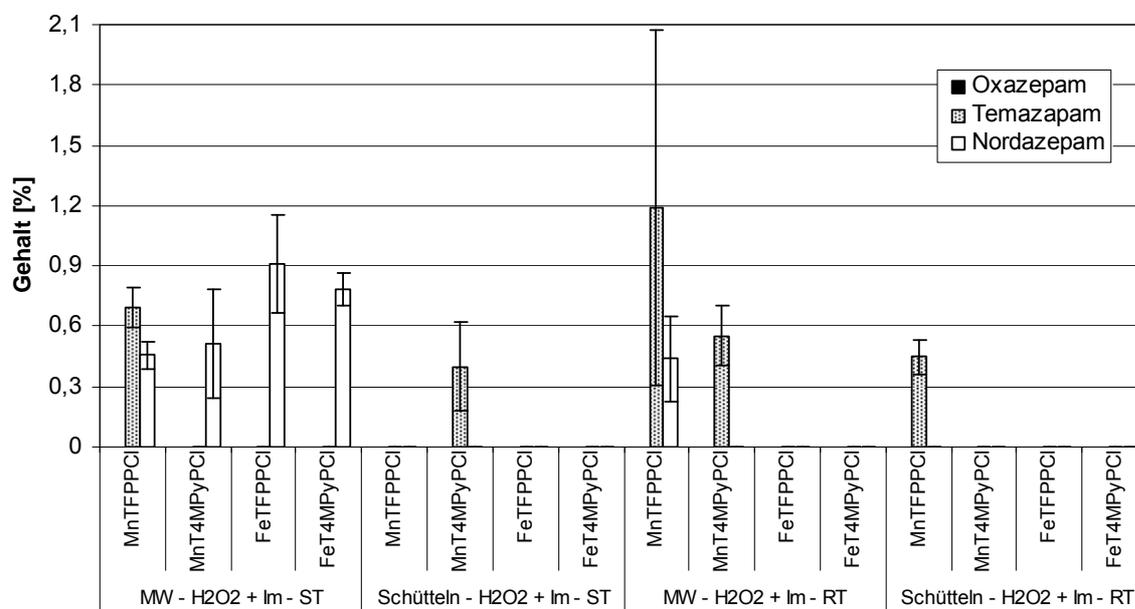


Abb. 2.93: Darstellung der Metabolite nach Umsetzung von Diazepam im Modellsystem mit 10-fach höherer H₂O₂-Konzentration, sowie Imidazol als Cokatalysator unter Verwendung diverser immobilisierter Metalloporphyrine und variablen Reaktionsbedingungen

Ähnlich den Ergebnissen unter Verwendung von reinem Wasserstoffperoxid in zehnfach höherer Konzentration konnten auch in Kombination mit Imidazol gesteigerte Nordazepammengen, gegenüber der Standardkonzentration von 80 µmol Sauerstoffdonator, detektiert werden. Die Nordazepamausbeuten wurden zwar gesteigert, jedoch wurden die Ergebnisse zunehmend schlechter reproduzierbar. Temazepam konnte teilweise gar nicht mehr detektiert werden. Die Steigerung der Wasserstoffperoxidkonzentration auf ein zehnfaches war somit nicht positiv zu bewerten. Eine statistische Auswertung erfolgte aus den genannten Gründen nicht.

Nicht-immobilisierte Katalysatoren:

Zunächst fiel die annähernd doppelt so hohe Menge an Temazepam unter Verwendung des nicht-immobilisierten MnTFPPCl gegenüber dem Einsatz des immobilisierten Modells auf (siehe Abb. 2.94). Als Erklärung für die

höheren Ausbeuten konnte auch hier die gute Löslichkeit des Katalysators in ACN herangezogen werden. Auf der anderen Seite konnte die schlechte Löslichkeit des MnT4MPyPcI in ACN für die nicht erfolgte Umsetzung des Diazepams verantwortlich gemacht werden.

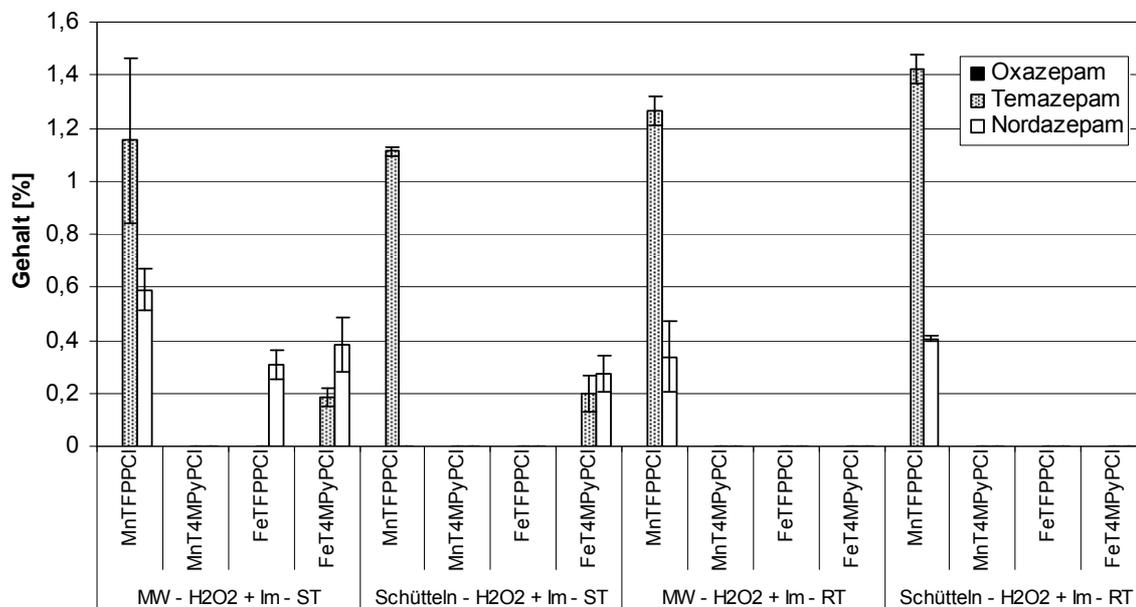


Abb. 2.94: Darstellung der Metabolite nach Umsetzung von Diazepam im Modellsystem mit H₂O₂ als Sauerstoffdonator, sowie Imidazol als Cokatalysator unter Verwendung diverser nicht-immobilisierter Metalloporphyrine und variabler Reaktionsbedingungen

Unter Siedebedingungen wurden auch bei Verwendung des nicht-immobilisierten FeT4MPyPcI Temazepam und Nordazepam gefunden, während unter Raumtemperatur bei keinem der eisenhaltigen Porphyrine Metaboliten detektiert werden konnten.

Die erzielten Ergebnisse für die Umsetzung von Diazepam im Modellsystem mit Wasserstoffperoxid in Kombination mit Imidazol waren aufgrund der geringen Ausbeuten nicht zufriedenstellend. Eine deutliche Steigerung der Metabolitenausbeuten durch Imidazolzusatz konnte nicht erreicht werden. Aus Gründen des geringen praktischen Nutzens einer statistischen Bewertung der Ergebnisse wird auf diese verzichtet.

2.13.7 Abschließende Betrachtung

PhIO, *m*-CPBA und MMPP haben sich als geeignete Sauerstoffdonatoren zur Bildung der im natürlichen Diazepammetabolismus nachgewiesenen

Metabolite Oxazepam, Temazepam und Nordazepam herausgestellt. MMPP zeigte hauptsächlich in Kombination mit MnTFPPCl sehr gute Ergebnisse. Wasserstoffperoxid ist aus Sicht der Umweltfreundlichkeit attraktiv, stellte aufgrund seiner geringen Potenz jedoch keine potente Alternative dar. Auch der zusätzliche Einsatz eines Cokatalysators brachte nicht die erwünschte Verbesserung der Metabolitenausbeute.

Betrachtete man die Ergebnisse der drei oben genannten potenten Sauerstoffdonatoren so wurde deutlich, dass die manganhaltigen Porphyrine tendenziell die höheren Ausbeuten gegenüber ihren eisenhaltigen Analoga generierten. Eine generelle Aussage bezüglich der Potenz von MnTFPPCl und MnT4MPyPCL konnte nicht getroffen werden. MnTFPPCl schien gegenüber den oxidativen Einflüssen von MMPP und *m*-CPBA stabiler zu sein. Dies wurde am Ausmaß der Bildung des Diazepam-N-oxides deutlich. Die Löslichkeit des Porphyrins im Lösungsmittel spielte für die Aktivität jedoch ebenfalls eine wichtige Rolle. So waren die hohen Ausbeuten unter Anwendung von nicht-immobilisiertem MnTFPPCl auf seine gute Löslichkeit im Reaktionsmedium zurückzuführen. Durch eine Immobilisierung profitierte dagegen das MnT4MPyPCL. Die Löslichkeit des kationischen nicht-immobilisierten Porphyrins war in ACN gering, allerdings verbesserte sich seine katalytische Aktivität durch die Immobilisierung. So konnte tendenziell eine Steigerung der Aktivität, ersichtlich an höheren Temazepamausbeuten, für MnT4MPyPCL beobachtet werden. Ebenso konnte aufgrund der geringen Diazepam-N-oxid-Bildung eine verringerte oxidative Zerstörung des immobilisierten MnT4MPyPCL gezeigt werden. MnTFPPCl erfuhr durch die Immobilisierung keine Aktivitätssteigerung. Die Ergebnisse waren mit denen, die bei Verwendung der nicht-immobilisierten Form generiert wurden, vergleichbar.

Generell konnten zur Immobilisierung der manganhaltigen Porphyrine hinsichtlich ihrer Aktivität im angewendeten Modellsystem folgende Aussagen getroffen werden. Eine Immobilisierung beeinflusste die Aktivität des Katalysators eher positiv. Eine Immobilisierung konnte, vermutlich aus Gründen der Oberflächenvergrößerung, sogar zu einer Aktivitätssteigerung führen, wenn der Katalysator im Reaktionsmedium schlecht löslich war.

Ebenso erfuhren oxidativ empfindlichere Katalysatoren wie MnT4MPyPcI durch die Immobilisierung eine geringere oxidative Zerstörung.

Anhand des Vergleiches der Ergebnisse zwischen Mikrowellen- und Schüttelbedingungen unter RT sollten die in Kapitel 1.5.3 beschriebenen speziellen- und non-thermalen Mikrowelleneffekte untersucht werden. In der Mehrzahl der Versuche konnte unter Einsatz der manganhaltigen Katalysatoren signifikant mehr Temazepam unter Mikrowellenbestrahlung nachgewiesen werden, was einen ersten Hinweis auf potentielle non-thermale Mikrowelleneffekte gab. Demgegenüber standen wenige Ergebnisse, die keinen signifikanten Unterschied zwischen den Syntheseapparaturen aufzeigten. An dieser Stelle war eine allgemeingültige Aussage anhand der gewonnenen Ergebnisse nicht möglich. Zur eindeutigen Klärung dieser Frage müssen in zukünftigen Arbeiten größere Stichprobenumfänge gewählt und eventuell bei niedrigeren Temperaturen als Raumtemperatur gearbeitet werden.

Generell konnte gesagt werden, dass unter den Sauerstoffdonatoren PhIO, MMPP und *m*-CPBA unter Verwendung der manganhaltigen Porphyrine die höchsten Ausbeuten bei ST erzielt werden konnten. Unter *m*-CPBA/Schütteln konnten bei 82°C für MnTFPPcI, sowohl in immobilisierter als auch nicht-immobilisierter Form die höchsten Ausbeuten an Metabolit verzeichnet werden. Gleiches galt für MMPP als Sauerstoffdonator. Unter Verwendung dieser beiden Sauerstoffdonatoren konnte keine Ausbeutensteigerung durch den Einsatz von Mikrowellenenergie, unter den sonst selben Bedingungen, gewonnen werden. Bedingt durch den Einsatz des Powermaxcoolings wurde zwar ein konstanter Energieeintrag gewährleistet, nur konnte auf diese Weise die geforderte Temperatur teilweise nicht erreicht werden. Vergleich man allerdings die Ergebnisse unter ST/Schüttel mit ST/MW fiel auf, das die Temperatur von 82°C für die Ausbeutenmenge durchaus einen Einfluss zu besitzen schien. Die Temperaturdifferenz bei Mikrowelleneinsatz war nicht durch einen hohen Mikrowellenenergieeintrag zu kompensieren. Es konnte gesagt werden, dass für MnTFPPcI in Kombination mit MMPP oder *m*-CPBA die Schüttelbedingungen bei ST die optimalen Bedingungen

darstellten. Potentielle spezielle Mikrowelleneffekte konnten in diesem System nicht nachgewiesen werden.

Unter PhIO konnten dagegen die höchsten Ausbeuten in der Mikrowelle/ST mit immobilisiertem MnT4MPypCl erzielt werden. Das Einwirken spezieller Mikrowelleneffekte auf das System war anhand dieser Ergebnisse nicht auszuschließen. Allerdings wurde durch die dargestellten Ergebnisse deutlich, dass die einzelnen Prozesse nicht getrennt voneinander betrachtet werden konnten. Eine generelle Aussage über die Eignung von Mikrowellenenergie in den angewendeten Modellsystemen war nicht einheitlich zu treffen. Während unter RT die Ergebnisse in der Mikrowelle in der Mehrheit besser waren, konnte unter Siedebedingungen dieser Vorteil nicht generell bestätigt werden.

Vergleiche können aufgrund dessen nur innerhalb eines Modellsystems, bei Verwendung eines geeigneten Sauerstoffdonators mit einem speziellen Porphyrin angestellt werden.

2.14 Bestimmung und Bedeutung der vom Trägermaterial freigesetzten Menge an Metalloporphyrin

2.14.1 Motivation

Nach erfolgter Reaktion mit den beschriebenen Modellsystemen unter Verwendung der immobilisierten Katalysatoren war der Überstand zum Teil gefärbt. Die Farben reichten von schwach gelb bis leicht braun. Es wurde vermutet, dass es sich hierbei um vom Trägermaterial abgetrenntes Porphyrin handeln könnte. In einem Vorversuch konnten diese Farben rekonstruiert werden, nachdem die immobilisierten Porphyrine mit 1 mL ACN versetzt und 10 min bei 82°C geschüttelt wurden. Somit konnte gezeigt werden, dass sich geringe Mengen des Katalysators unter den Reaktionsbedingungen vom Trägermaterial abtrennen. Die folgenden Versuche sollten eine Aussage über den katalytisch aktiven Anteil während der Reaktionen im Modellsystem ermöglichen. Hierbei war von Interesse, ob nur das sich in Lösung befindliche Porphyrin als Katalysator fungiert oder das sich an Trägermaterial gebundene ebenfalls katalytische Aktivität besaß.

2.14.2 Methodenentwicklung

Das geforderte Ziel konnte über mehrere Schritte erreicht werden. Zunächst wurde eine Methode entwickelt, mit der die Menge des vom Trägermaterial abgetrennten Porphyrins ermittelt werden konnte. Da es sich um farbige Lösungen handelte, bot sich eine UV/VIS-spektroskopische Methode an. In den Vorversuchen stellte sich jedoch heraus, dass die Konzentration an, vom Trägermaterial abgetrenntem Porphyrin zu gering war, um eine Absorption $\geq 0,2$ in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 10 mm zu messen. Aus diesem Grund wurde eine Quarzküvette, die eine Schichtdicke von 50 mm aufwies, eingesetzt.

Für die Erstellung der Kalibriergeraden, die eine Quantifizierung der verwendeten perfluorierten und kationischen Porphyrinen in ACN ermöglichte, mußten diese zunächst in selbigem Lösungsmittel gelöst werden. MnTFPPCl löste sich gut. 1 mg MnTFPPCl zeigte in 1 mL ACN keine erkennbaren Rückstände, während sich von MnT4MPyPCL nur 0,5 mg in 250,0 mL ACN nach 30 min im Ultraschallbad lösten. Bei den eisenhaltigen Porphyrinen lösten sich 0,5 mg in 250,0 mL nicht. Aufgrund dessen wurden 1,000 mg der eisenhaltigen Porphyrine genau gewogen und mit 50,0 mL ACN versetzt. Nach 30 min im Ultraschallbad wurde filtriert und der Bodensatz hierbei quantitativ auf ein Filterpapier überführt. Nach dem Konstantwiegen ermittelte man aus der Differenz der Einwaage und des Rückstandes die gelöste Menge an FeTFPPCl bzw. FeT4MPyPCL. Aus den filtrierten Lösungen stellte man anschließend die Kalibrierlösungen her. Die Vorschriften, sowie die ermittelten Kalibriergeraden befinden sich in Kapitel 6.2.11.

Um eine prozentuale Aussage über die unter Reaktionsbedingungen freigesetzte Menge an Porphyrin in ACN, bezogen auf die an Trägermaterial immobilisierte Menge zu machen, wurden die Belegungen der zu bestimmenden Metalloporphyrine ermittelt. Die in Kapitel 2.6.3 ermittelten Daten und die Metalloporphyrine selbst kamen an dieser Stelle zum Einsatz.

2.14.3 Quantitative Bestimmung des Überstandes

Zur Ermittlung der Menge an Porphyrin, die unter Reaktionsbedingungen freigesetzt wurde, setzte man eine definierte Menge an immobilisiertem

Katalysator ein. Es wurde hierbei eine Einwaage von 25,0 mg gewählt. Zu dieser Einwaage wurde das in den Modellsystemen verwendete übliche Probenvolumen von 1,000 mL ACN pipettiert. Die Ansätze wurden unverzüglich der jeweiligen Reaktionsbedingung ausgesetzt. Als Reaktionsbedingungen wurden das Schütteln im Thermomixer sowie das Bestrahlen in der Mikrowelle jeweils bei 82°C (ST) und 25°C (RT) verstanden. Die Reaktionsdauer betrug wie in den vorangegangenen Versuchen ebenfalls 10 min. Nach Ablauf der 10 min wurden die Überstände abpipettiert, membranfiltriert und vermessen. Pro Reaktionsbedingung und immobilisiertem Porphyrin wurden die Überstände aus drei Chargen ermittelt. Die Ergebnisse der Absorptionsuntersuchungen befinden sich im Experimentellen Teil (siehe 6.2.11).

Das Vermessen des Überstandes der reinen Trägermaterialien zeigte keinen Unterschied zum Spektrum des reinen Lösungsmittels.

Da die Menge, an vom Trägermaterial abgetrenntem Porphyrin im Überstand, auf die Menge der ermittelten Belegung mit Porphyrin vor der Reaktion bezogen wurde, war eine Mittelung der drei Chargenergebnisse an dieser Stelle nicht sinnvoll. Im Folgenden wurden die Ergebnisse tabellarisch, nach Reaktionsbedingung geordnet, aufgeführt (siehe Tabelle 2.9 und Tabelle 2.10). Die Ergebnisse aus Spalte (II) wurden unter Berücksichtigung der oben genannten Einwaage erhalten.

Eine generelle Aussage konnte aus den Ergebnissen der prozentualen Abtrennung bezogen auf die prozentuale Belegung direkt nach der Immobilisierung gemacht werden. Diese Daten sind der letzten Spalte der Tabelle 2.9 und Tabelle 2.10 zu entnehmen und errechneten sich aus $(II) \times 100 / (I)$. Vergleich man die Ergebnisse bei RT mit denen bei ST innerhalb eines Porphyrins, konnten nur für FeT4MPyPcI unter Mikrowellen- und Schüttelbedingungen signifikante Unterschiede festgestellt werden. So wurde unter Siedebedingungen in der Mikrowelle und in der Schüttelapparatur mehr FeT4MPyPcI abgetrennt als unter RT. Die abgetrennten Mengen bei MnT4MPyPcI, FeTFPPcI und FeT4MPyPcI unterschieden sich zwischen RT und ST nicht signifikant.

Schüttelbedingungen:

Tabelle 2.9: Darstellung der Ergebnisse der Überstandsuntersuchungen unter Schüttelbedingungen

Bedingung/ Charge	(I) Belegung Porphyrin an Trägermaterial [%]	(II) abgetrenntes Porphyrin aus Überstand [%]	prozentuale Ab- trennung bezogen auf (I) [%]
FeT4MPyPcI			
RT 1	14,48	0,229	1,58
RT 2	14,17	0,126	0,89
RT 3	14,16	0,174	1,23
ST 1	14,48	0,436	3,01
ST 2	14,17	0,226	1,59
ST 3	14,16	0,356	2,51
MnT4MPyPcI			
RT 1	9,47	0,004	0,04
RT 2	9,51	0,003	0,03
RT 3	10,61	0,006	0,05
ST 1	9,47	0,006	0,06
ST 2	9,51	0,005	0,05
ST 3	10,61	0,008	0,08
FeTFPPcI			
RT 1	8,74	0,012	0,14
RT 2	6,37	0,017	0,27
RT 3	6,23	0,011	0,18
ST 1	8,74	0,025	0,29
ST 2	6,37	0,018	0,28
ST 3	6,23	0,019	0,31
MnTFPPcI			
RT 1	7,09	0,021	0,30
RT 2	7,66	0,029	0,38
RT 3	8,97	0,028	0,31
ST 1	7,09	0,025	0,35
ST 2	7,66	0,024	0,31
ST 3	8,97	0,035	0,39

*Mikrowellenbedingungen:**Tabelle 2.10: Darstellung der Ergebnisse der Überstandsuntersuchungen unter Mikrowellenbedingungen*

Bedingung/ Charge	(I) Belegung Porphyrin an Trägermaterial [%]	(II) abgetrenntes Porphyrin aus Überstand [%]	prozentuale Ab- trennung bezogen auf (I) [%]
FeT4MPyPcI			
RT 1	14,48	0,235	1,62
RT 2	14,17	0,175	1,24
RT 3	14,16	0,187	1,32
ST 1	14,48	0,614	4,24
ST 2	14,17	0,321	2,27
ST 3	14,16	0,603	4,26
MnT4MPyPcI			
RT 1	9,47	0,008	0,08
RT 2	9,51	0,006	0,06
RT 3	10,61	0,005	0,05
ST 1	9,47	0,027	0,29
ST 2	9,51	0,012	0,13
ST 3	10,61	0,044	0,41
FeTFPPcI			
RT 1	8,74	0,028	0,32
RT 2	6,37	0,032	0,50
RT 3	6,23	0,026	0,42
ST 1	8,74	0,061	0,70
ST 2	6,37	0,060	0,94
ST 3	6,23	0,059	0,95
MnTFPPcI			
RT 1	7,09	0,011	0,16
RT 2	7,66	0,018	0,23
RT 3	8,97	0,023	0,26
ST 1	7,09	0,044	0,62
ST 2	7,66	0,035	0,46
ST 3	8,97	0,070	0,78

Nach einem statistischen Vergleich zwischen den Messdaten unter Mikrowellenbedingungen und denen unter Schüttelbedingungen innerhalb desselben Porphyrins und derselben Reaktionstemperatur an, konnten mit Ausnahme von FeT4MPyPCL/ST keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Unter Siedebedingungen wurde mehr FeT4MPyPCL in der Mikrowelle abgetrennt als unter Schüttelbedingungen.

Obwohl zwischen RT und ST keine signifikanten Unterschiede der Messergebnisse festgestellt wurden, war eine leichte Tendenz zu erkennen. Es wurden mit Ausnahme von MnTFPPCL unter allen Bedingungen höhere Mengen an Porphyrin unter Siedebedingungen im Überstand gefunden als unter RT.

Bezogen auf die frisch immobilisierte Menge an Porphyrin war der Anteil, der sich vom Trägermaterial unter Reaktionsbedingungen abtrennte, gering. Die Werte lagen für Mn/FeTFPPCL und MnT4MPyPCL teilweise weit unter einem Prozent bezogen auf die insgesamt an Trägermaterial gebundene Menge, wenn diese als 100%-Wert angesehen wird. Für FeT4MPyPCL wurden abgetrennte Anteile von 1-4% in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur detektiert. Eine Erklärung für diesen verhältnismäßig hohen abgetrennten Anteil konnte nicht aufgrund der Struktur erklärt werden. *Battioni* und Mitarbeiter beschrieben die Immobilisierung der kationischen Porphyrine als starke Adsorption an Kieselgel aufgrund der Ladung [38]. Da das manganhaltige Analogon mit Ausnahme des Zentralatoms dasselbe Gerüst aufwies, erschien eine schwächere Adsorption des eisenhaltigen Metalloporphyrins als Erklärung für eine erhöhte Menge an abgetrenntem Porphyrin nicht plausibel. Für die Durchführung der folgenden Experimente war die Aufklärung des beobachteten Phänomens nicht bedeutend, sodass es an dieser Stelle darauf verzichtet wurde.

2.14.4 Wiederfindung

Im Anschluss an die Untersuchungen der Menge an gelöstem Porphyrin im Überstand sollte der am Trägermaterial verbliebene Anteil im Rahmen einer Wiederfindungsstudie ermittelt werden. Die Wiederfindungsrate konnte somit gleichzeitig als Validierungsparameter der beiden Quantifizierungsmethoden (vergleiche 6.2.11) angesehen werden. Hierdurch

konnte überprüft werden, ob das unter Synthesebedingungen abgetrennte Porphyrin auch in einer gesunkenen Belegung des entsprechenden Porphyrins am Trägermaterial resultierte. Zugleich war eine indirekte Aussage über die Richtigkeit der beiden Methoden möglich.

Die Quantifizierung des verbliebenen Anteils an Porphyrin am Trägermaterial wurde nach AV 2 beispielhaft für FeT4MPyPCL und MnT4MPyPCL, die vorher den Schüttelbedingungen ausgesetzt waren, durchgeführt.

Die Ergebnisse der UV-Bestimmung befinden sich im Experimentellen Teil (siehe 6.2.11), während die Ergebnisse der Wiederfindung im Folgenden tabellarisch aufgeführt sind:

FeT4MPyPCL:

Tabelle 2.11: Bestimmung der Wiederfindung des FeT4MPyPCL nach der Behandlung mit ACN unter Reaktionsbedingungen

Bedingung vorher	Belegung vorher (I) [%]	Belegung nachher (II) [%]	Differenz aus (I) und Menge aus Überstand (III) [%]	Wiederfindung tatsächlich [%]: ((II)/(I)x100)	Wiederfindung erwartet[%]: (III)/(I)x100)
RT 1	14,48	14,38	14,25	99,31	98,41
RT 2	14,17	13,93	14,04	98,31	99,08
RT 3	14,16	13,97	13,99	98,66	98,77
ST 1	14,48	13,99	14,04	96,62	96,99
ST 2	14,17	13,81	13,94	97,53	98,41
ST 3	14,16	13,96	13,80	98,59	97,49

Die erwarteten Werte stimmten mit einer höchsten Abweichung von 1,10 % mit den tatsächlich gefundenen Werten überein. Somit konnten zwei Aussagen getroffen werden. Zum Einen resultierten die vom Kieselgel abgelösten Mengen an FeT4MPyPCL in entsprechend gesunkenen Belegungsanteilen des Trägermaterials mit selbigem Porphyrin und zum

Anderen sind die beiden Methoden geeignet, richtige Ergebnisse mit sehr guten Wiederfindungsraten für FeT4MPyPcI zu generieren.

MnT4MPyPcI:

Tabelle 2.12: Bestimmung der Wiederfindung des MnT4MPyPcI nach der Behandlung mit ACN unter Reaktionsbedingungen

Bedingung vorher	Belegung vorher (I) [%]	Belegung nachher (II) [%]	Differenz aus (I) und Menge aus Überstand (III) [%]	Wiederfindung tatsächlich [%]: ((II)/(I)x100)	Wiederfindung erwartet[%]: (III)/(I)x100)
RT 1	9,47	9,78	9,47	103,27	100,00
RT 2	9,51	9,67	9,51	101,68	100,00
RT 3	10,61	10,65	10,60	100,38	99,91
ST 1	9,47	9,68	9,46	102,22	99,89
ST 2	9,51	9,37	9,50	98,52	99,89
ST 3	10,61	10,31	10,60	97,17	99,91

Die erwarteten Werte stimmten mit einer höchsten Abweichung von 3,27 % mit den tatsächlich gefundenen Werten überein. Trotz der erhöhten Abweichung konnten die Ergebnisse als akzeptabel angesehen werden. Die Belegung vorher war im Vergleich zu FeT4MPyPcI bereits um etwa 1/3 geringer, wodurch eine Detektion von geringeren Konzentrationen gefordert war. Des Weiteren handelte es sich bei den ermittelten Werten um Mengen im µg-Bereich, sodass Wiederfindungsraten von 97-103% vertretbar waren. Gleichzeitig waren die beiden Methoden in der Lage, richtige Ergebnisse zur Quantifizierung von MnT4MPyPcI unter den beschriebenen Bedingungen zu generieren.

2.14.5 Anwendung auf das PhIO-Modell unter Schüttelbedingungen

In Kapitel 2.14.3 wurde ermittelt, wie viel Porphyrin sich unter Reaktionsbedingungen abgetrennt hatte und in Lösung ging. Dieser Anteil

sollte im Folgenden im Modellsystem eingesetzt werden, um den katalytisch aktiven Anteil im Modellsystem zu ermitteln. Würde nur der in Lösung befindliche Anteil an Katalysator reagieren, müssten Messergebnisse generiert werden, die mit den Daten aus Kapitel 2.13 vergleichbar sind.

Zur Überprüfung wurde das PhIO-Modellsystem unter Schüttelbedingungen ausgewählt. Zunächst stellte man Lösungen der vier verwendeten Porphyrine mit bekannter Konzentration her. Die unter RT sowie ST ermittelten Ergebnisse des im Überstand detektierten Porphyrins wurden gemittelt. Die gemittelten Werte dienten als Ausgangskonzentration für den jeweiligen im Modellsystem zu verwendenden Katalysatoranteil. Der 1 mL umfassende Reaktionsansatz enthielt entsprechend vor der Reaktion 80 μmol PhIO, 20 μmol Diazepam und eine Menge an gelöstem Porphyrin, die der im Überstand ermittelten Menge des jeweiligen Katalysators entsprach. Die Ergebnisse sind in Abb. 2.95 und Abb. 2.96 dargestellt.

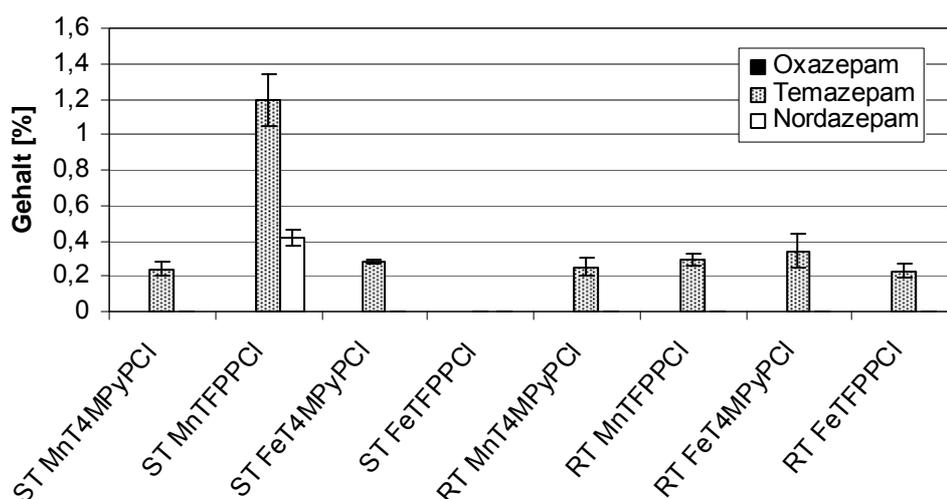


Abb. 2.95: Darstellung der Metabolitenausbeuten bei Verwendung des Modellsystem mit PhIO als Sauerstoffdonator und den aus dem Überstand ermittelten Anteilen an Katalysator unter Schüttelbedingungen bei RT und ST

Die Identität der Metabolite wurde für MnTFPPcI und FeT4MPyPcI unter RT und ST zusätzlich mit der validierten HPLC-Methode und dem Diodenarraydetektor über Zudosierungen der Metabolite und die Überprüfung der Peakreinheit bestimmt (vergleiche Kapitel 2.4). Die Darstellung der wiedergefundenen Mengen an Diazepam nach erfolgter

Reaktion in Abb. 2.96 zeigen, dass keine weiteren Nebenprodukte als die aufgeführten aus Diazepam gebildet wurden.

Unter Siedebedingungen konnten für MnTFPPCl und MnT4MPyP/ST signifikant höhere Ausbeuten bei Temazepam und Nordazepam unter Verwendung der immobilisierten Form gefunden werden. Ebenso wurden signifikant höhere Ausbeuten an Temazepam bei der immobilisierten Form unter Verwendung von FeT4MPyP/ST sowie bei MnT4MPyP/RT detektiert. Signifikante Unterschiede unter RT konnten, bis auf die bereits genannte Ausnahme MnT4MPyP/ST, nicht nachgewiesen werden.

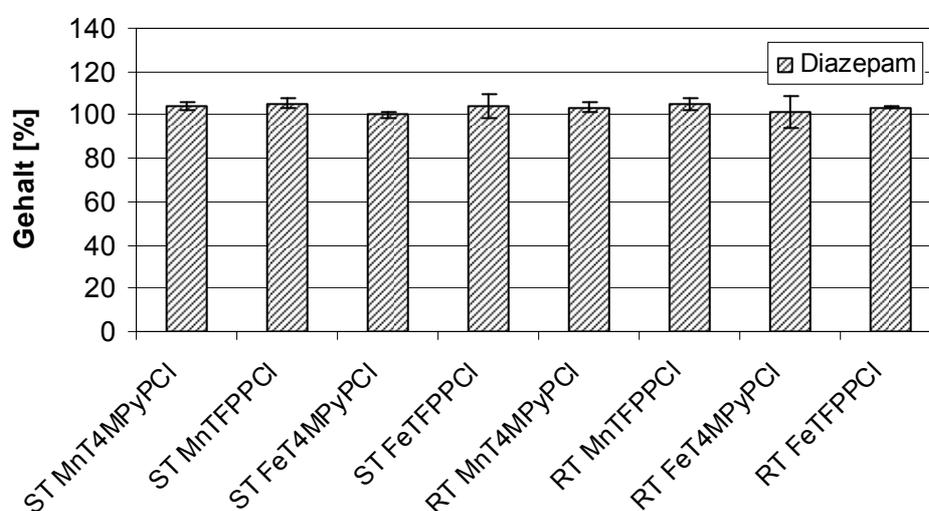


Abb. 2.96: Darstellung des Diazepamgehaltes nach Umsetzung mit PhIO als Sauerstoffdonator und den aus dem Überstand ermittelten Anteilen an Katalysator unter Schüttelbedingungen bei RT und ST

2.14.6 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse und die statistische Auswertung ermöglichen keine eindeutige aber eine tendenzielle Aussage. Betrachtete man die Ergebnisse der manganhaltigen Katalysatoren, die sich generell als potentere Katalysatoren in den verwendeten Modellsystemen gegenüber den eisenhaltigen herausgestellt hatten, konnten unter allen Bedingungen die zahlenmäßig höheren Mengen an Temazepam und Nordazepam bei Verwendung der immobilisierten Form registriert werden. Auch wenn die Unterschiede teilweise nicht signifikant waren, wurde jedoch ein Trend hin zu höheren Ausbeuten bei der immobilisierten Form erkannt.

Demnach kann für die manganhaltigen Katalysatoren der Schluss gezogen werden, dass der vom Trägermaterial abgetrennte Anteil nicht allein für die katalytische Aktivität im Modellsystem verantwortlich war. Die am Träger immobilisierte Menge zeigte zusätzliche Aktivität und war an den gesteigerten Metabolitenausbeuten maßgeblich beteiligt. So konnten durch eine Immobilisierung zwei wichtige Parameter beeinflusst werden. Es konnten Löslichkeitsprobleme des Katalysators überwunden werden, da durch die Immobilisierung Reaktionen in Medien ermöglicht wurden, in denen sich der Katalysator nicht oder nur schlecht löst. Zusätzlich konnten Produktausbeuten durch eine Immobilisierung sogar gesteigert werden, wie unter MnT4MPyPCL-Einsatz bereits gezeigt wurde. Ein möglicher Erklärungsansatz ist die, durch die Immobilisierung erreichte, vergrößerte Oberfläche des Katalysators. Ein vereinfachtes Schema der Überlegungen zum Zustand beider Katalysatorformen in einem Medium, in dem sich der Katalysator schlecht löst, ist in Abb. 2.97 dargestellt.

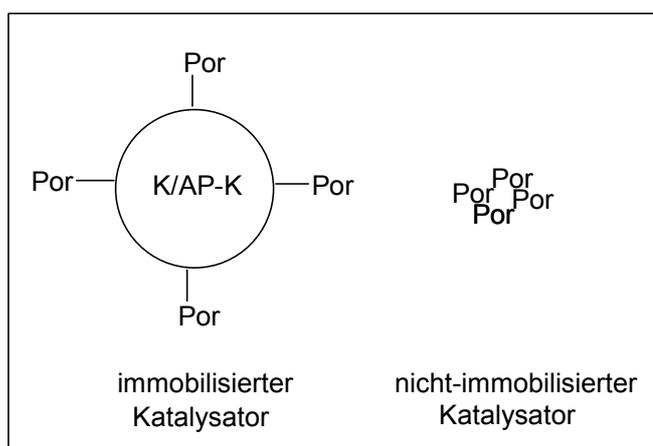


Abb. 2.97: Überlegungen zur Oberflächenbeschaffenheit der immobilisierten und nicht-immobilisierten Form eines Porphyrins in einem Medium, in dem sich der Katalysator schlecht löst; Por = Metalloporphyrinmolekül; K = Kieselgel; AP-K = Aminopropylkieselgel

Aufgrund der geringen bzw. teilweise nicht erfolgten Metabolitenbildung unter Verwendung der eisenhaltigen Metalloporphyrine, war ein Vergleich der beiden Katalysatorzustände an dieser Stelle nicht sinnvoll.

2.15 Katalytische Säule

2.15.1 Motivation

In den vorangegangenen Experimenten wurde im μmol -Maßstab gearbeitet. Die Reaktionen fanden separiert von deren Analytik statt. Anstelle von zwei getrennten Prozessen sollte ein System etabliert werden, dass die biomimetische Reaktion mit einer Auftrennungsmethode koppelt. Dieses System sollte die Erhöhung des Probenansatzes mit einer hieraus resultierenden gesteigerten Bildung an Metaboliten ermöglichen. Die direkt im Anschluss erfolgende Auftrennung der Reaktionsprodukte und Edukte sollte im Idealfall zu einer präparativen Gewinnung der Metaboliten führen.

2.15.2 Methodenentwicklung

Die Methodenentwicklung erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde ein säulenchromatographisches Verfahren entwickelt und optimiert, während in einem zweiten Schritt die Kombination mit der innovativen Katalysatoreinheit erfolgte.

In einem dünnschichtchromatographischen Vorversuch wurde ein geeignetes Elutionsmittelgemisch ermittelt. Über eine Trennstrecke von 15 cm konnten mit einem Elutionsmittelgemisch von 60 Teilen Toluol und 40 Teilen ACN folgende Rf-Werte mit ausreichender Trennung der Metabolite und Diazepam detektiert werden:

Diazepam: 0,58

Temazepam: 0,50

Nordazepam: 0,42

Oxazepam: 0,33

Als Sorptionsmittel setzte man Kieselgel 60 ein, dass zur Verbesserung der Trennleistung in einer Korngröße von 0,015-0,040 mm gewählt wurde. Aufgrund der geringen Korngröße war eine säulenchromatographische Trennung unter Normaldruck nicht praktikabel. Es wurde infolge dessen das Verfahren der Flashchromatographie angewendet, bei dem das zu trennende Gemisch mit einem leichten Überdruck über die Säule gepresst wurde. Das

Füllen der Säule mit Sorptionsmittel erfolgte als Suspension mit dem oben genannten Elutionsmittel als Dispersionsmittel.

Als optimale Säulenbefüllung stellten sich $47 \pm 0,5$ cm heraus. Eine 1 cm dicke Sandschicht zum Schutz vor Verwirbelungen wurde zusätzlich aufgebracht. Der Innendurchmesser der Säule betrug 20 mm. Sie war mit einer Fritte der Porengröße 3 und einer NS-Hülse versehen. Unter Verwendung der genannten Parameter sollte die Trennung von Diazepam, Temazepam und Oxazepam untersucht werden. Auf die Untersuchung von Nordazepam wurde aus Kostengründen verzichtet.

Zur Überprüfung des Retentionsverhaltens wurden je 40 mg Diazepam, Temazepam und Oxazepam in einem Gesamtvolumen von 6 mL ACN gelöst und mittels Pipette auf die Säule aufgebracht. Man sammelte 5 mL Fraktionen, die dünnschichtchromatographisch auf die Anwesenheit der drei Substanzen getestet wurden. Nach 170 mL Vorlauf in dem keine Substanz detektiert wurde, folgten 35 mL in denen nur Diazepam nachgewiesen wurde. In weiteren 15 mL detektierte man Diazepam und Temazepam nebeneinander. Nachfolgend wurde in 55 mL Elutionsmittel reines Temazepam gefunden. In den anschließenden 115 mL wurde keine Substanz detektiert, während in der nächsten Fraktion für weitere 70 mL Oxazepam gefunden wurde. In den 115 mL wäre in Anlehnung an die dünnschichtchromatographischen Vorversuche Nordazepam eluiert worden. Durch diese Vorversuche konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Vorversuche auf eine säulenchromatographische Trennung übertragbar und eine Gewinnung von reinem Diazepam, Temazepam und Oxazepam durch beschriebene Methode ebenfalls möglich war.

In einem zweiten Schritt wurde die katalytische Einheit konzipiert. Aufgrund der hohen Kosten des Katalysators, sowie aus Gründen der Umweltfreundlichkeit, sollte eine Wiedergewinnung nach erfolgter Reaktion ermöglicht werden. Gleichzeitig sollte eine Durchmischung der Probe und die Reaktion unter Siedebedingungen, aufgrund der guten Ergebnisse in Kapitel 2.13, gewährleistet werden.

Die Wiedergewinnung wurde auf der einen Seite durch die bereits beschriebene Immobilisierung des Katalysators an Trägermaterial ermöglicht

und zum Anderen durch die Entwicklung eines Edelstahlkörbchens (siehe Abb. 2.98), das flexibel in die Säule eingebracht und wieder entfernt werden konnte. Das Edelstahlkörbchen besaß einen siebartigen Boden, der mit Filterpapier ausgekleidet den immobilisierten Katalysator trug. Das Filterpapier verhinderte das Austreten des Katalysators in die Säule.

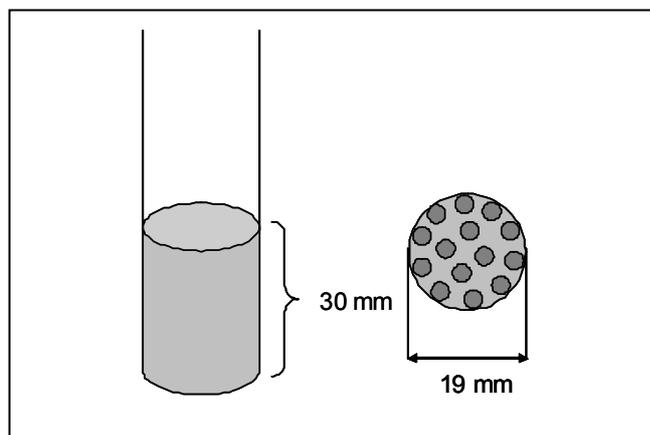


Abb. 2.98: Schematische Darstellung des Edelstahlkörbchens und seines siebartigen Bodens

Der siebartige Boden war essentiell, um die anschließende Elution des Probenansatzes sicher zu stellen. In dieses Körbchen wurde kurz oberhalb des immobilisierten Katalysators ein 15 mm breites Naturkautschukgummi, verbunden über einen Glasstab zu einem Laborrührer Heidolph Elektro KG Typ E 60, platziert. So wurde eine stetige Durchmischung des Reaktionsansatzes ermöglicht, ohne dabei das Säulenbett zu beschädigen. Abb. 2.99 zeigt den Aufbau des Systems zur Verwendung bei RT.

Um den Einfluss der Temperatur ebenfalls beurteilen zu können, war eine zusätzliche Wärmeeinheit, die eine Reaktion unter ST erlaubt, gefordert. Als externe Heizquelle wurde ein Haake F3 Thermostat, der mit einer temperierbaren Umwälzeinheit Haake CH kombiniert war, verwendet. Ein Silikonschlauch wurde ausgehend vom Thermostaten um die katalytische Einheit gewickelt (siehe Abb. 2.100), wodurch ein Transport der erhitzten Thermostatenflüssigkeit und eine gleichzeitige Erwärmung der umwickelten Einheit gewährleistet wurden. Zusätzlich isolierte man den Silikonschlauch, um den Wärmeverlust so gering wie möglich zu halten.



Abb. 2.99: Darstellung der katalytischen Säule für die Verwendung unter RT

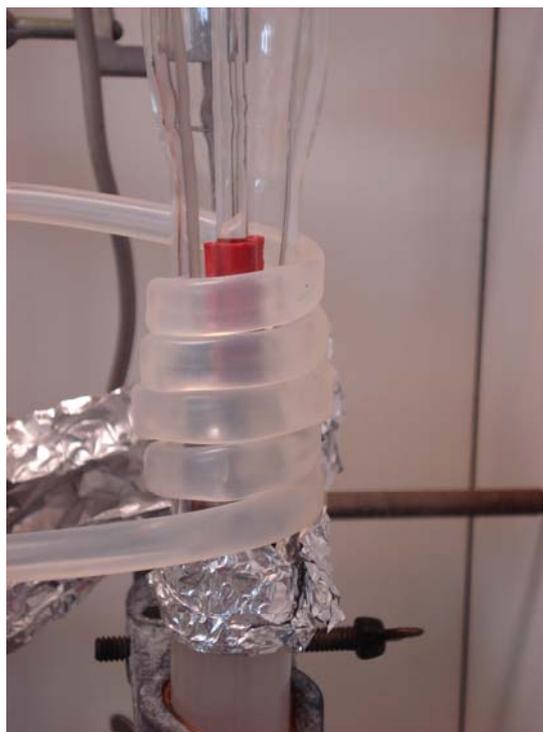


Abb. 2.100: Darstellung der katalytischen Einheit für die Verwendung unter ST; der Silikonschlauch ermöglichte die gezielte Erwärmung

Aufwärm- und Abkühlprofil der katalytischen Einheit

Um während der Reaktion eine gleichmäßige Temperatur zu gewährleisten, mussten die Bedingungen während der Reaktion standardisiert werden. Zunächst wurde das Aufwärmprofil von 6 mL ACN in der katalytischen Einheit bestimmt. Anstelle des Katalysators setzte man Kieselgel 60 ein. Als Temperaturmessgerät wurde ein testo[®] 720 Thermofühler der Firma testoterm verwendet. Dieser wurde mittig kurz oberhalb des Kieselgels platziert. Die Einstellung des Thermostaten betrug 96 °C. Zieltemperatur in der Säule sollten $81^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ sein, die über mindestens 10 min konstant gehalten werden mussten. Der Thermostat wurde sofort eingeschaltet, als die Lösung zupipettiert war. Das gleichzeitige Rühren mittels Laborrührer konnte aus mangelndem Raum, aufgrund des Thermofühlers in der Säule nicht simuliert werden. Stattdessen wurde gleichmäßig mit dem Thermofühler per Hand gerührt. Nachdem die Temperatur 10 min konstant gehalten wurde, wurde der Thermostat abgeschaltet und der Silikonschlauch

sowie das Edelstahlkörbchen samt Inhalt zügig entfernt. Umgehend erfolgte die Temperaturmessung zur Bestimmung der Abkühlkurve. Die Ergebnisse sind Abb. 2.101 zu entnehmen.

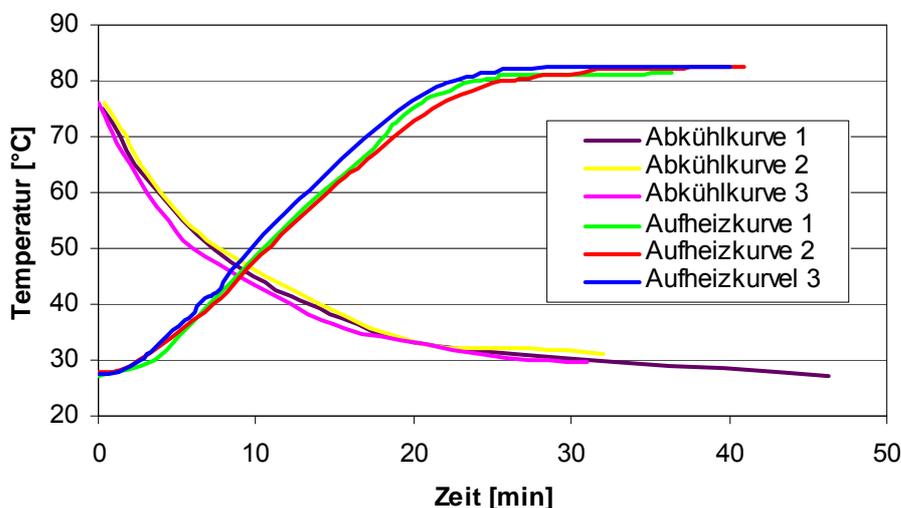


Abb. 2.101: Darstellung der Aufwärm- und Abkühlprofile von 6 mL ACN innerhalb der Säule bei einer Thermostateinstellung von 96°C

Für ein Gesamtvolumen von 6 mL wurde im Mittel nach 24 min die gewünschte Temperatur von 81°C erreicht. Die Aufheizkurve konnte allerdings nur als Richtwert angesehen werden. In den Hauptversuchen sollten 3,5 mL an ACN vorgelegt und anschließend 2,5 mL ACN, in denen der Sauerstoffdonator sowie das Substrat enthalten waren, zur Reaktion hinzugefügt werden. In einem zweiten Vorversuch wurde aufgrund dessen 3,5 mL ACN in der katalytischen Einheit vorgelegt, der Thermostat gestartet und 24 min gewartet, bevor 2,5 mL ACN zupipettiert wurden. Der Laborrührer wurde für eine Minute angeschaltet. Nach dieser Zeit wurde der Rührer entfernt und die Temperatur der Lösung wurde gemessen. Bereits nach dieser Zeit wurden Temperaturen aus drei Bestimmungen mit $80^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ nachgewiesen. Diese Ergebnisse wurden als akzeptabel eingestuft und die Einstellungen am Thermostat sowie die Aufteilung der Volumina und die Aufheizzeiten von 24 min wurden als Grundlage für die Hauptversuche herangezogen.

Die Bedingungen der Abkühlung konnte vollständig übernommen werden, da die Parameter 6 mL Gesamtvolumen über 10 min bei $81^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ohne Rühren auch in den Hauptversuchen nicht verändert wurden. Im Mittel

wurden nach 30 min 30°C erreicht. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Elution der Probe begonnen.

2.15.3 Wiederfindung

Aufgrund der niedrigen Substanzmengen wurde weiterhin die Wiederfindung der Substanzen nach Passieren der Chromatographiesäule überprüft, um eventuelle Substanzverluste durch diesen Vorgang ausschließen zu können.

Hierbei sollte die vor der Elution ablaufende Reaktion in der katalytischen Einheit unter RT simuliert werden. Da die Hauptversuche mit einer gesteigerten Menge von 400 µmol Diazepam erfolgen sollten, wurde für die Wiederfindungsexperimente die gleiche Menge eingesetzt. Temazepam und Oxazepam wurden als Metabolite eingesetzt. Als Anhaltspunkte für die Einwaagen der Metabolite wurden die prozentualen Ergebnisse unter *m*-CPBA/MnTFPPCl-Anwendung bei RT herangezogen und jeweils auf die erhöhte Substratmenge angepaßt. Für Diazepam, Temazepam und Oxazepam wurden Stammlösungen hergestellt. Aus diesen Stammlösungen stellte man die zu untersuchenden Ansätze, mit einem Endvolumen von 6 mL, her. Jeder Stammlösung wurden 2 x 100 µL entnommen und nach Verdünnung mittels HPLC quantifiziert. Die Ergebnisse wurden gemittelt. Diese Ergebnisse dienten als 100%-Wert bei der anschließenden Berechnung der Wiederfindungsrate. Da die Durchführung der Versuche analog zu den Hauptversuchen erfolgen sollte, wurde ebenfalls das Edelstahlkörbchen eingesetzt, wobei anstelle des Katalysators Kieselgel 60 verwendet wurde. Man pipettierte 6 mL substanzhaltiges ACN in das Körbchen und rührte 10 min. Nach Entfernen des Körbchens wurde mit Methanol eluiert. Die aufgefangene Menge an in Elutionsmittel enthaltenem Diazepam und Metaboliten wurde mittels HPLC untersucht und quantifiziert. Der Quotient aus der Menge an Substanz nach der Elution und der quantifizierten Menge aus der Stammlösung multipliziert mit 100 ergab die Wiederfindung in Prozent. Die Ergebnisse aus je drei Elutionsdurchgängen sind in Tabelle 2.13 dargestellt. Nordazepam wurde aus Kostengründen nicht untersucht.

Tabelle 2.13: Darstellung der Wiederfindungsraten von Oxazepam, Temazepam und Diazepam nach Elution bei vorangegangener Reaktionssimulation unter RT

Wiederfindung	Oxazepam [%]	Temazepam [%]	Diazepam [%]
1	101,76	103,50	99,87
2	100,14	100,38	92,63
3	97,45	98,98	98,97

Ein übliches Verhältnis von Substrat zu Adsorbens ist 1:100 [99]. Da eine gute Trennung gefordert war, wurde die Trennstufenhöhe gesteigert und ein Verhältnis von annähernd 1: 600 gewählt. Die Einwaagen der Substanzen lagen im mg-Bereich. Unter diesen Voraussetzungen konnten die Wiederfindungsraten unter vorheriger Simulation der Reaktionsbedingungen bei RT, als gut eingestuft werden.

2.15.4 Durchführung und Ergebnisse

Da die Ergebnisse der katalytischen Säule gleichzeitig unter dem Aspekt des Methodenvergleiches betrachtet werden sollten, wurde auf eine Fraktionierung und Auftrennung der einzelnen Metabolite nach erfolgter Reaktion verzichtet. Eine erfolgreiche Trennung der Metabolite wurde bereits unter Kapitel 2.15.2 beschrieben. Stattdessen wurde aus zeit- und elutionsmittelsparenden Gründen mit Methanol nach erfolgter Reaktion eluiert. Das Eluat untersuchte man im Anschluss unter Verwendung der validierten HPLC-Methode. Verglichen wurden die beiden manganhaltigen Porphyrine, sowie der Einsatz von MMPP, PhIO und *m*-CPBA als Sauerstoffdonator unter ST und RT. Es wurden drei Reaktionsansätze pro Porphyrin/Sauerstoffdonator/Temperatur untersucht. Nach drei erfolgten Reaktionen und anschließenden Elutionen wurde die Säule neu befüllt.

Da man ein 20-fach höheres Ansatzverhältnis für die Reaktionen in der katalytischen Säule auswählte, wurden entsprechend 40 μmol immobilisierter Katalysator, 400 μmol Substrat und 1,6 mmol Sauerstoffdonator eingesetzt.

Für die Ansätze unter RT wurde der zuvor nach AV 1 (siehe Kapitel 6.2.3) immobilisierte Katalysator in das mit Filterpapier ausgelegte Edelstahlkörbchen eingewogen und in der Säule platziert. 6 mL des substrat- und sauerstoffdonatorhaltigen Acetonitrils wurden in das Körbchen pipettiert. Nach Inbetriebnahme des Laborrührers, wurde 10 min gerührt. Im Anschluss entfernte man den Rührer, sowie das Edelstahlkörbchen samt Katalysator, um eine Weiterreaktion zu verhindern. Die Elution erfolgte mit 200 mL Methanol. Für die Ansätze unter ST wurde analog zu den Versuchen unter RT das immobilisierte Porphyrin eingewogen. Nach Platzierung des Edelstahlkörbchens in der Säule wurde der Silikonschlauch um die katalytische Einheit gewickelt und zusätzlich isoliert. Nach Zugabe von 3,5 mL ACN wurde für 24 min der Thermostat in Betrieb genommen, bevor die diazepam- und sauerstoffdonatorhaltigen 2,5 mL ACN zum Ansatz pipettiert wurden. Anschließend wurde für 10 min gerührt. Nach Ablauf der 10 min wurden das Körbchen und der Silikonschlauch entfernt. Ab diesem Zeitpunkt wartete man 30 min und eluierte mit 200 mL Methanol. Die Ergebnisse sind in Abb. 2.102 und Abb. 2.103 dargestellt. Sie wurden in Prozent angegeben und bezogen sich auf einen 100%-Diazepamausgangswert, der durch Quantifizierung mittels validierter HPLC-Methode aus zwei Aliquoten der Stammlösung berechnet wurde.

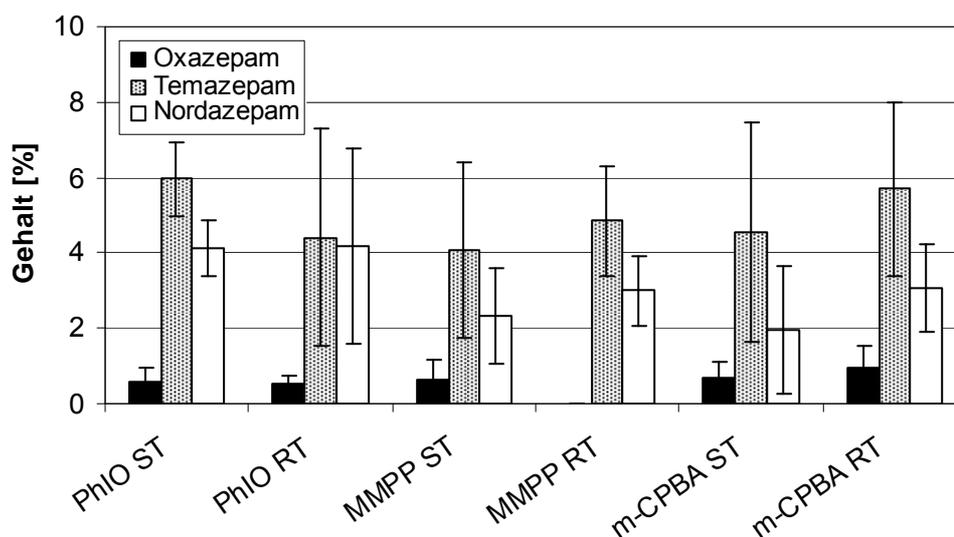


Abb. 2.102: Darstellung der Metabolitenausbeuten nach der Reaktion in der katalytischen Einheit und anschließender Elution mit Methanol unter Verwendung von MnTFPPCl als Katalysator

Im Anschluss wurde die Metabolitenbildung mit je einer der drei Säuleneleuate für alle Sauerstoffdonatoren und Bedingungen mittels DAD überprüft. Durch Zudosierungsexperimente der jeweiligen Referenzsubstanzen konnte die Identität zusätzlich über die Peakreinheit für alle beschriebenen Metabolite bestimmt werden (vergleiche Kapitel 2.4.)

Auffallend waren die hohen Standardabweichungen der berechneten Metabolitenausbeuten unter Verwendung von MnTFPPCl als Katalysator. Unter Verwendung von MMPP und *m*-CPBA wurde analog zu den bereits beschriebenen Reaktionen Diazepam-N-oxid gebildet. Die Ergebnisse hierfür sind im Experimentellen Teil (siehe 6.2.12) dargestellt.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen unter Anwendung von immobilisiertem MnTFPPCl waren die Metabolitenausbeuten unter MnT4MPyPCL-Einfluss durch weniger Schwankungen gekennzeichnet. Unter Verwendung von PhIO waren gute Ausbeuten, insbesondere an Temazepam zu verzeichnen.

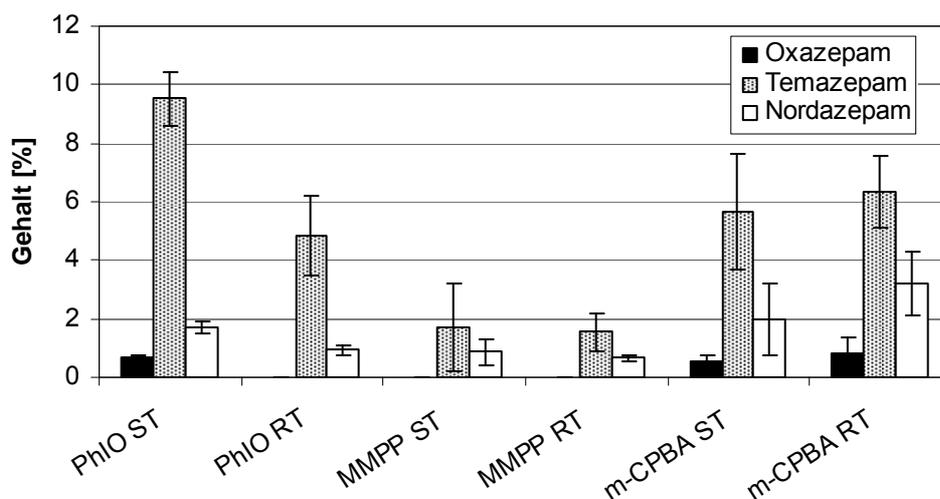


Abb. 2.103: Darstellung der Metabolitenausbeuten nach der Reaktion in der katalytischen Einheit und anschließender Elution mit Methanol unter Verwendung von MnT4MPyPCL als Katalysator

2.15.5 Statistik und abschließende Betrachtung

Als Beurteilungskriterium für die Leistungsfähigkeit der katalytischen Säule in Bezug auf die Ausbeuten an Metaboliten wurden die in der Säule generierten Werte mit denen unter Schüttelbedingungen aus Kapitel 2.13, jeweils innerhalb der gleichen Temperaturbedingungen, verglichen.

Mit Ausnahme der Ergebnisse für Temazepam unter Verwendung von PhIO bei ST konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Schüttelbedingungen und den Säulenversuchen unter Einsatz von MnT4MPyPCL festgestellt werden. So wurde unter Einsatz von PhIO unter Siedebedingungen in der katalytischen Säule sogar mehr Temazepam gebildet als unter Schüttelbedingungen. Demzufolge konnte die katalytische Säule als gleichwertig gegenüber den Schüttelbedingungen unter MnT4MPyPCL-Anwendung angesehen werden. Das gesteigerte Ansatzverhältnis äußerte sich nicht in einer sinkenden Effektivität in Bezug auf die Metabolitenausbeuten.

Beim Einsatz von MnTFPPCL als Katalysator waren die Ergebnisse der statistischen Auswertung weniger homogen. Unter RT schien das Säulensystem effektiver zu arbeiten. So wurden signifikant höhere Ausbeuten für Temazepam und Nordazepam unter PhIO- und MMPP-Einsatz gegenüber den Schüttelbedingungen verzeichnet. Unter Siedebedingungen wurden im Gegensatz dazu signifikant höhere Ausbeuten für Temazepam bei *m*-CPBA und MMPP unter Schüttelbedingungen registriert. Das katalytische System arbeitete schlussfolgernd unter Einsatz von MnTFPPCL bei RT ebenso gut, teilweise effektiver, als das Modellsystem unter Schüttelbedingungen. Gegenüber dem Schüttelsystem unter Siedebedingungen blieben noch Möglichkeiten der Optimierung offen.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Etablierung eines Systems gelungen war, mit dem Metabolitenausbeuten unter Verwendung der im Modellsystem untersuchten Parameter im mg-Bereich erreicht werden konnten. Der Transfer eines μmol -Ansatzes war zumindest unter Anwendung von MnT4MPyPCL weiterhin ohne Verlust der Effektivität auf einen mg-Ansatz möglich. Des Weiteren konnte auf diese Weise ein System etabliert werden, das eine katalytische Reaktion und die anschließende Trennung der Produkte vereinte.

2.15.6 Ausblick

Im Zuge der stetigen Optimierung und Steigerung der Metabolitenausbeuten könnte die katalytische Säule als Vorbild für weitere Modelle dienen. So wäre die Möglichkeit eines kontinuierlichen Verfahrens denkbar, in dem ein

fixiertes System aus Katalysator und Sauerstoffdonator stetig von substrathaltigem Medium durchflossen wird. Dieses System wäre in einem offenen Kreislauf mit stetig frischem Substratzufluss oder, zur Erreichung einer erschöpfenden Reaktion, in einem geschlossenen Kreislauf praktikierbar. So könnten unter anderem Substratzerstörungen durch zu hohe Sauerstoffdonatorkonzentration vermieden werden. Derartige Kreisläufe wären auch unter zusätzlichem Energieeintrag durch Mikrowellenstrahlung möglich, da offene Systeme in der Mikrowelle ebenfalls durchführbar sind.

3 Anwendung auf andere Substrate

Im Verlauf der Arbeit stellten sich die manganhaltigen Metalloporphyrine gegenüber ihren eisenhaltigen Vertretern als potente Katalysatoren für die angewendeten Modellsysteme mit Diazepam als Substrat heraus. Ebenso konnte gezeigt werden, dass PhIO in den eingesetzten Mengenverhältnissen ein leistungsfähiger und gleichzeitig schonender Sauerstoffdonator in Bezug auf seine katalysatorvergiftenden Eigenschaften war. Im Folgenden sollte die Übertragbarkeit derartiger Systeme auf andere Substrate überprüft werden. In den beiden ersten Abschnitten wurden zunächst Strukturabkömmlinge des Diazepams untersucht, um eventuelle Abhängigkeiten der Ringgröße und Einflüsse auf die Reaktion durch die amidischen Struktur zu erkennen. Hierbei handelte es sich nicht um Arzneistoffe.

In Kapitel 3.4 wird das PhIO-Modellsystem auf eine völlig andere Substratstruktur angewendet. Eines der bekanntesten Steroidhormone, das Estradiol, wurde im Modellsystem umgesetzt und auf seine Fähigkeit, den humanen Estradiolmetabolismus zu imitieren, überprüft.

3.1 N-Methyl- ϵ -caprolactam

3.1.1 Einleitung

Eine durch die verschiedenen angewendeten biomimetischen Modellsysteme hervorgerufene Hydroxylierung, Dealkylierung und die Kombination aus beiden am Diazepam-molekül konnte anhand der Bildung der Metabolite Temazepam, Nordazepam und Oxazepam nachgewiesen werden. In einem nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob diese Reaktionen ebenfalls bei vereinfachten strukturverwandten Molekülen in Erscheinung treten. So wurden formal der Anelland und der Phenylsubstituent vom Diazepinring entfernt, sowie dieser in ein Azepan unter Erhalt der amidischen Struktur umgewandelt. Es wurde das N-Methyl- ϵ -caprolactam erhalten.

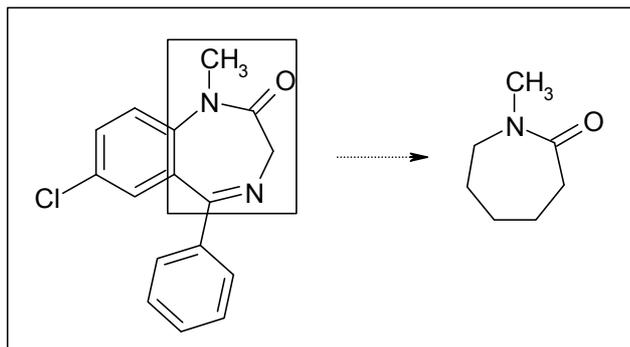


Abb. 3.104: Formale Betrachtungsweise der Diazepamstruktur und dessen Strukturverwandtschaft zu N-Methyl-ε-caprolactam

Im Folgenden sollte das PhIO-Modellsystem auf das N-Methyl-ε-caprolactam mit dem PhIO-Modellsystem angewendet und die gebildeten Produkte analysiert werden.

Iley und Mitarbeiter verglichen die chemische Umsetzung des N-Methyl-ε-caprolactams mit einer mikrosomalen Oxidation [123]. Für die chemische Umsetzung wurde ein 5,10,15,20-Tetraphenylporphyrinatoeisen(III)-chlorid/*tert.*-Butylhydroperoxid-System (TPPFe/Bu^tOOH) angewendet, während für die *ex vivo*-Experimente phenobarbitalinduzierte Rattenlebermikrosomen Verwendung fanden. Es wurde ein Norlactam (1), ein Norimidderivat (2) und ein N-Methylimid (3) detektiert (vergleiche Abb. 3.105).

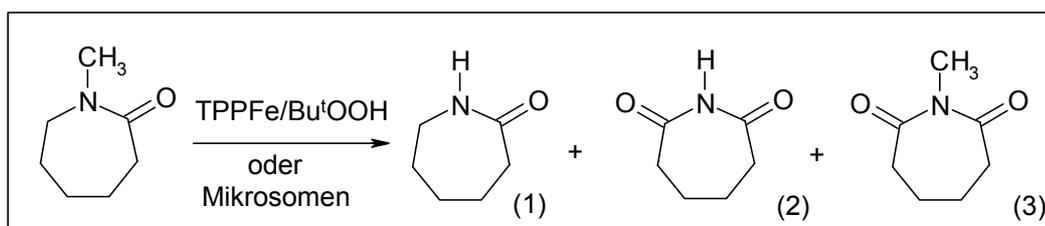


Abb. 3.105: Produkte der chemischen und mikrosomalen Oxidation von N-Methyl-ε-caprolactam nach Iley und Mitarbeiter

Die mikrosomalen Untersuchungen resultierten in denselben Produkten wie unter TPPFe/Bu^tOOH, allerdings war die Demethylierung in der mikrosomalen Reaktion bevorzugt. Ein hydroxyliertes Produkt wurde nicht beschrieben.

3.1.2 Analytik

Aufgrund der fehlenden UV-Aktivität des N-Methyl- ϵ -caprolactams (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) wurde eine gaschromatographische (GC) Methode entwickelt. Neben dem Substrat stand als Referenzsubstanz nur das demethylierte Produkt ϵ -Caprolactam (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) zur Verfügung. Es wurde eine Methode zur Trennung der in der Reaktion gebildeten Produkte, neben Toluol dem internen Standard und PhIO, etabliert. Nach erfolgter Umsetzung des N-Methyl- ϵ -caprolactams im Modellsystem sollten die Ansätze zusätzlich von einem Gaschromatographen, der mit einem Massenspektrometer (GC-MS) gekoppelt war, überprüft werden. Dies sollte Hinweise auf zusätzlich gebildete Umsetzungsprodukte liefern. Aufgrund der fehlenden Referenzsubstanzen konnte keine exakte Quantifizierung der Produkte vorgenommen werden.

Stattdessen wurde zur näherungsweisen Bestimmung der Produktausbeuten zunächst die Abnahme des Ausgangssubstrats bzw. der Gehalt an N-Methyl- ϵ -caprolactam nach der Reaktion bestimmt. Hierzu ermittelte man zunächst durch eine Doppelbestimmung die 100%-Fläche der in den kommenden Versuchen verwendeten Stammlösung. Diese Fläche ins Verhältnis gesetzt zu der Fläche an N-Methyl- ϵ -caprolactam nach der Reaktion ergab die umgesetzte Menge. Hierzu wurden zwei Kalibriergeraden für den Einsatz von 20 μmol und 100 μmol N-Methyl- ϵ -caprolactam aufgenommen. Die Kurven befinden sich im Experimentellen Teil (vergleiche 6.3.1). Anschließend wurden zur näherungsweisen Bestimmung der Produktausbeuten die Flächen der Produkte auf die 100%-Fläche bezogen. Die reduzierte Fläche des N-Methyl- ϵ -caprolactam nach erfolgter Reaktion im Mittel sollte mit den gemittelten und addierten Flächen der Produkte annähernd 100% ergeben.

Abb. 3.106 zeigt das Chromatogramm einer erfolgten Umsetzung von 100 μmol N-Methyl- ϵ -caprolactam mit PhIO über 2h unter Schüttelbedingungen bei 82°C.

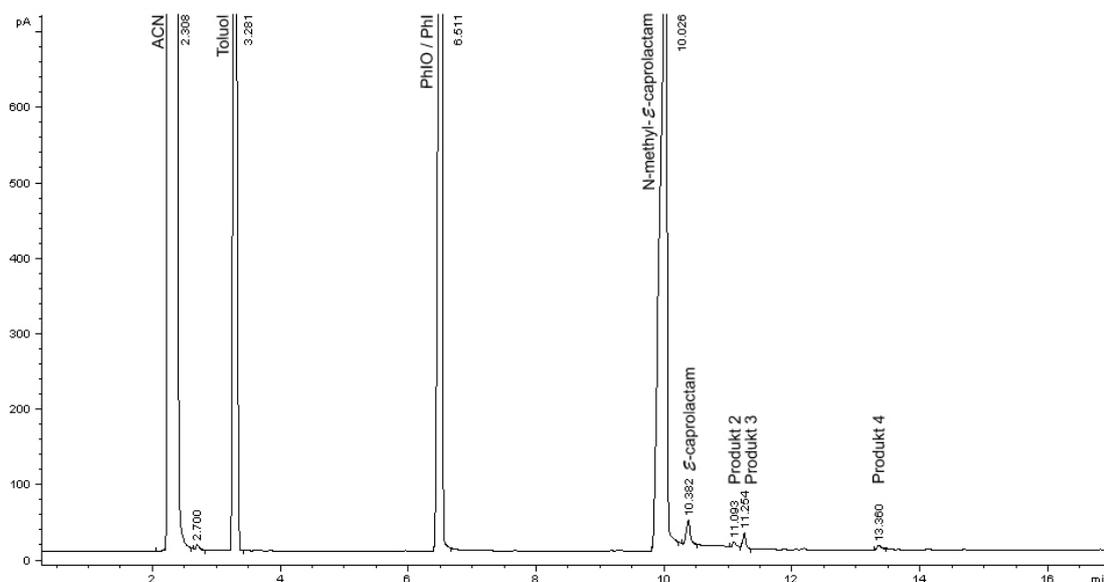


Abb. 3.106: GC-Chromatogramm der Produkte nach Umsetzung von 100 μ mol N-Methyl- ϵ -caprolactam mit PhIO und MnTFPPCl bei 82°C im Modellsystem

3.1.3 Durchführung

Als Katalysator wurde nach AV 1 (siehe Kapitel 6.2.3) frisch immobilisiertes MnTFPPCl eingesetzt, während als Sauerstoffdonator PhIO Verwendung fand. ACN diente als Lösungsmittel. Es wurden zwei verschiedene Ansatzverhältnisse ausgewählt. Zum Einen verwendete man das in den vorangegangenen Umsetzung mit Diazepam angewandte Verhältnis 1:10:40 (Katalysator: Substrat: Sauerstoffdonator) und zum Anderen 1:50:40. Die Versuche sollten unter Schüttelbedingungen untersucht werden, wobei die Reaktion bei RT und ST, sowie für die Reaktionszeiten von 10 min, 30 min und 120 min durchgeführt wurden. Nach erfolgter Reaktion wurden die Ansätze membranfiltriert. Anschließend wurden die Ansätze mit Toluol als internem Standard versetzt und unverdünnt mittels GC analysiert. Nach jedem Lauf erfolgte ein Spülprogramm (siehe Kapitel 6.2.3), um Substanzreste von der Kapillarsäule zu entfernen. Der Probenumfang betrug drei Messungen pro Versuchsbedingung. Eine Erhöhung der Ausbeuten durch längere Reaktionszeiten sollte geprüft werden. Im Anschluss an die GC-Analytik wurde ein Ansatz mittels GC-MS vermessen, um Hinweise auf die Struktur der gebildeten Produkte anhand der Masse zu erhalten.

3.1.4 Ergebnisse und Diskussion

Die Produktausbeuten waren gering, sowohl für die 20 μmol -, als auch für die 100 μmol -Ansätze. In Abb. 3.107 ist eine leichte Steigerung mit zunehmender Reaktionsdauer bei beiden Temperaturbedingungen zu erkennen. Einen Vorteil der Siedetemperatur in Bezug auf die Produktausbeute konnte jedoch nicht statistisch signifikant belegt werden. Einzige Ausnahme bildete Produkt 2. Hier konnte sogar signifikant mehr Produkt unter RT nachgewiesen werden. Unter RT-Bedingungen war mit Ausnahme von Produkt 3 nach 2 Stunden signifikant eine höhere Ausbeute detektiert worden als nach 10 min. Das heißt, unter RT war eine längere Reaktionsdauer in Bezug auf die Produktausbeute positiv zu bewerten. Mit Ausnahme der Ausbeute von ϵ -Caprolactam konnten unter ST keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen 10 min und 2 Stunden festgestellt werden.

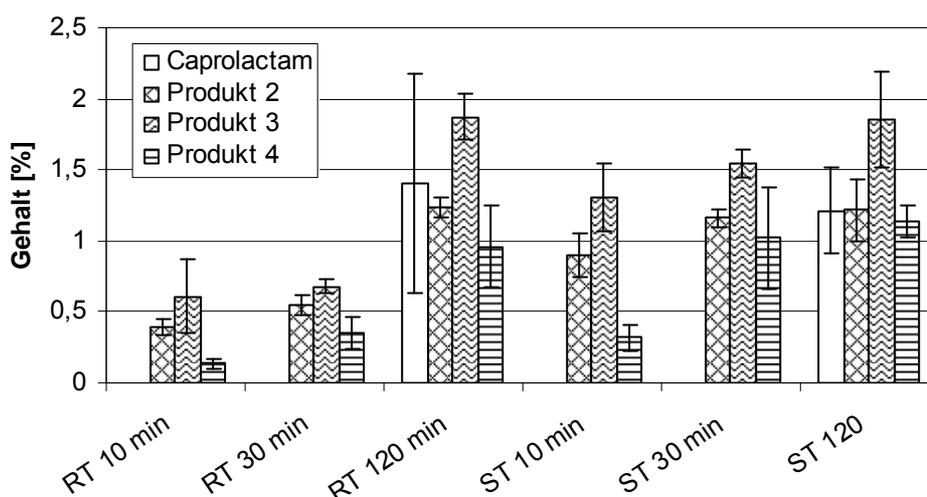


Abb. 3.107: Darstellung der Ergebnisse der Umsetzung von 100 μmol *N*-Methyl- ϵ -caprolactam im Modellsystem mit *PhIO* und *MnTFPPCl* bei RT und ST sowie variierenden Schüttelzeiten

Wie in Abb. 3.108 gut zu erkennen ist, konnte unter RT bei Verwendung des 20 μmol Ansatzes keine Ausbeutensteigerung durch verlängerte Reaktionszeiten erreicht werden. Dies wurde wiederum statistisch belegt. Mit Ausnahme von Produkt 2. Hier konnten unter ST nach 2 Stunden statistisch signifikant höhere Produktausbeuten gegenüber einer Reaktionszeit von 10 min registriert werden.

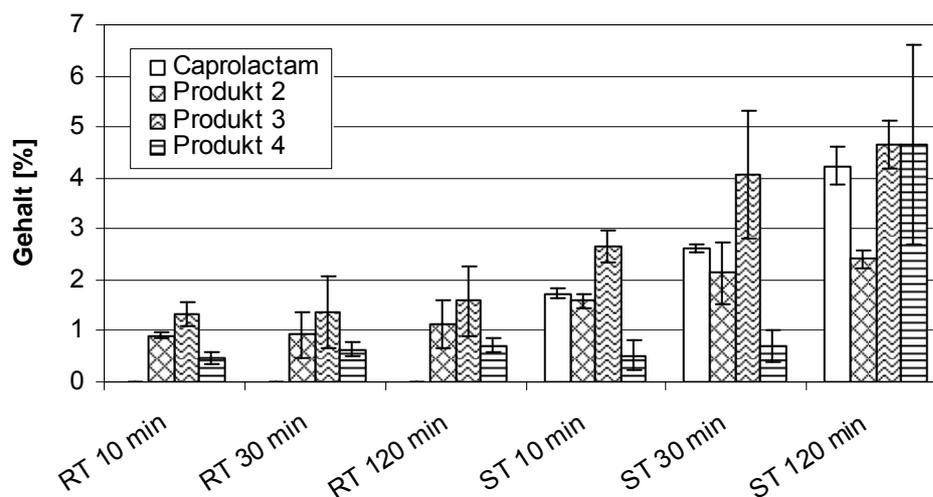


Abb. 3.108: Darstellung der Ergebnisse der Umsetzung von 20 μmol N-Methyl- ϵ -caprolactam im Modell-system mit PhIO und MnTFPPCl bei RT und ST, sowie variierenden Schüttelzeiten

Vergleich man die Ausbeuten der 100 μmol Ansätze mit denen der 20 μmol Ansätze so war zu erkennen, dass ein Überschuss des Sauerstoffdonators im Vergleich zum Substrat zu höheren Ausbeuten führte, als ein Überschuss des Substrats, wie es bei Verwendung der 100 μmol -Ansätzen der Fall war.

Die GC-MS-Analytik lieferte Hinweise auf die gebildeten Produkte. Sie stimmen mit den detektierten Produkten von Iley und Mitarbeiter überein. Das demethylierte Produkt ϵ -Caprolactam konnte zum Einen durch Zudosierungsexperimente mit der Reinsubstanz und zum Anderen mit einem Referenzspektrum eindeutig indentifiziert werden [124]. Für den Produkt 2 - Peak des GC-Chromatogramms wurde ein Molekülionenpeak von $m/z = 141$ gefunden, während der Produkt 3 - Peak ein Molekülionenpeak von $m/z = 127$ liefert. Für den Produkt 4 - Peak wurde wiederum ein Molekülionenpeak von $m/z = 141$ nachgewiesen, allerdings unterschied sich das Fragmentierungsmuster von Produkt 2. Aufgrund der ähnlichen Lage der Peaks im Chromatogramm von N-Methyl- ϵ -caprolactam/ ϵ -caprolactam zueinander, sowie Produkt 2/Produkt 3, wird für Produkt 2 angenommen, dass es sich um N-Methylimid und bei Produkt 3 um sein demethyliertes Produkt das Norimidderivat handelt.

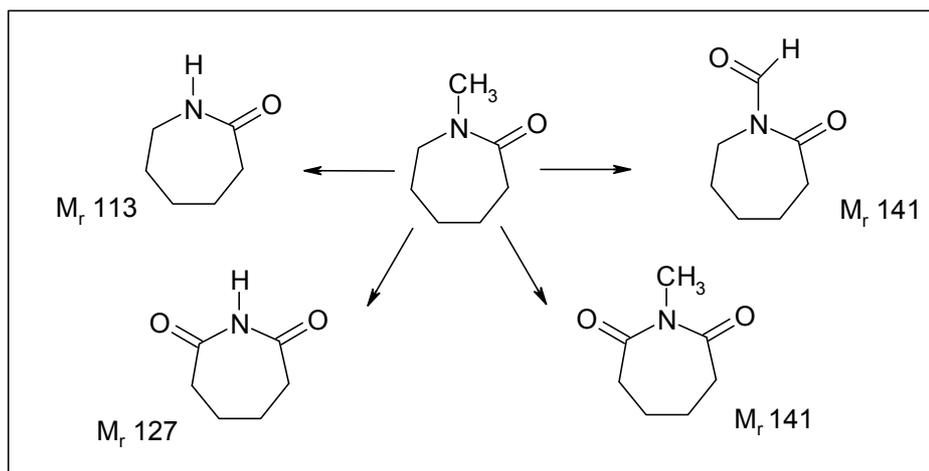


Abb. 3.109: Anhand der GC-MS Analytik postulierte Produkte der Umsetzung von N-Methyl- ϵ -caprolactam mit MnTFPPCl und PhIO

Da Produkt 4 eine andere Retentionszeit aufwies, allerdings den gleichen Molekülionenpeak wie Produkt 2 zeigte, konnten anhand der Molekülionenpeaks zwei Strukturisomere in Erwägung gezogen werden. Von Yoshifuji und Mitarbeiter wurde nach der Oxidation von N-Methyl- ϵ -caprolactam mit RuO_4 ein formyliertes Produkt detektiert [125]. Gegen die Bildung dieses Produktes sprach allerdings ein detektierter Fragmentationenpeak bei $m/z = 126$. Die Differenz von 15 ausgehend vom Molekülionenpeak ist charakteristisch für eine Methylgruppe. Dieser Peak würde bei benanntem formylierten Produkt nicht erwartet, da keine freie Methylgruppe abspaltbar wäre. Stattdessen hätte man nur ein für Aldehyde charakteristische Differenz von 29 vom Molekülionenpeak erwartet. Alternativ könnte eine andere Position des Ringes oxygeniert worden sein. Allerdings werden derartige Produkte in der Literatur nicht beschrieben, sodass diese Möglichkeit verworfen wurde. Die Bildung eines hydroxylierten Produktes ist aufgrund der gefundenen Molekülionenpeaks ebenfalls unwahrscheinlich. Auf eine weitere Aufklärung der Struktur wurde an dieser Stelle verzichtet.

Anders als beim Azepinring des Diazepam konnte bei der Umsetzung des N-Methyl- ϵ -caprolactams keine Hydroxylierung detektiert werden. Stattdessen wurde die Amidstruktur des N-Methyl- ϵ -caprolactams zum Imid oxygeniert. Die Oxygenierung an Position 7 war aufgrund der Mesomeriestabilisierung bevorzugt. Im Diazepam-molekül dagegen ist diese Position durch den Chlorbenzenannellanden besetzt und somit für eine

derartige Reaktion nicht zugänglich. Eine Demethylierung am Amidstickstoff konnte jedoch in Analogie zum Diazepam-molekül nachgewiesen werden. Ebenso die Kombination aus Oxygenierung und Demethylierung konnte mit N-Methyl- ϵ -caprolactam durch Bildung des Norimids, erreicht werden. Somit konnten folgende Schlüsse gezogen werden. Der Chlorbenzenannell, der Phenylrest und die 1,4-Diazepinstruktur oder die jeweils einzeln genannten Strukturelemente haben einen Einfluss auf die Bildung der 3-hydroxylierten Diazepammetabolite, während die Demethylierung ebenso mit einem strukturell einfacheren Substrat imitiert werden konnte. Ähnlich dem Diazepam-molekül war auch für N-Methyl- ϵ -caprolactam die Bildung der ring-oxygenierten Produkte in dem verwendeten Modellsystem gegenüber den demethylierten Formen bevorzugt.

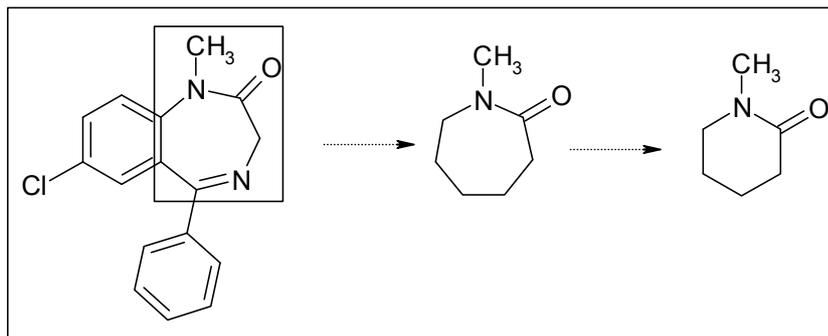
Wie *Iley* und Mitarbeiter beschrieben, wurden die hier gefundenen Produkte ebenfalls *ex vivo* in phenobarbitalinduzierten Rattenlebermikrosomen nachgewiesen. Das angewendete PhIO-Modellsystem war mit dem Zellmodell vergleichbar [123].

Das System eignet sich allerdings unter den beschriebenen Bedingungen nicht für den Erhalt von Metaboliten des N-Methyl- ϵ -caprolactam in größeren Ausbeuten. Eine Optimierung durch weitere Verlängerung der Reaktionszeiten wäre denkbar.

3.2 N-Methyl-2-piperidon

3.2.1 Einleitung

In einer weiteren Versuchsreihe sollte die Ringgröße des N-Methyl- ϵ -caprolactam um ein Kohlenstoffatom verringert werden, um eine mögliche Abhängigkeit der Metabolitenbildung von der Ringgröße zu erkennen. Die Amidstruktur sollte erhalten bleiben.



Des Weiteren konnte diese Metabolismusstudie erste Hinweise auf potentielle Biotransformationsprodukte neuer Arzneistoffe liefern. So wurde ein potentieller TNF- α -Converting-Enzym(TACE)-Inhibitor mit einem N-Methyl-2-piperidonstrukturelement entwickelt (vergleiche Abb. 3.110). Dieser TACE-Inhibitor soll eine reduzierte Bildung des Enzyms bewirken, was wiederum in einer verringerten Sekretion des Zytokins resultiert. Als Einsatzgebiet wird die rheumatoide Arthritis diskutiert [126].

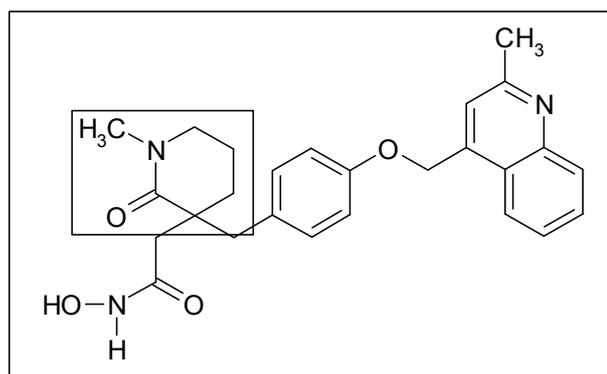


Abb. 3.110: Potentieller TNF- α -Converting-Enzym-Inhibitor der Firma Bristol-Myers Squibb

Ito und Mitarbeiter beschrieben die Oxidation von N-Methyl-2-piperidon mit einem Rutheniumporphyrinkomplex und Pyridin-N-oxid [127]. Der Reaktionsansatz wurde bei 40 °C 12 Stunden gerührt. Als Produkt wurde das Imidderivat (2) detektiert (vergleiche Abb. 3.111).

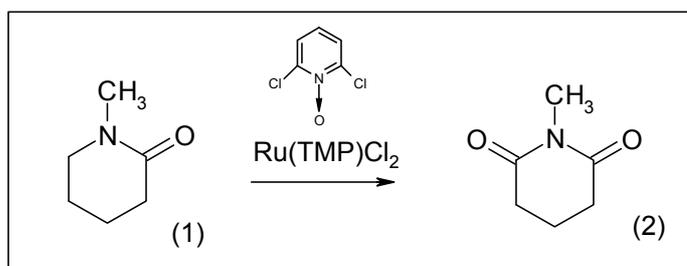


Abb. 3.111: Darstellung der von Ito und Mitarbeitern beschriebenen Oxidation von N-Methyl-2-piperidon und seinem resultierenden Oxidationsprodukt

Neben dem N-Methyl- ϵ -caprolactam untersuchten *Iley* und Mitarbeiter auch die Umsetzung von N-Methyl-2-piperidon mit TPPFe/Bu^tOOH und verglichen die Ergebnisse wiederum mit den Produkten, die durch Inkubation phenobarbitalinduzierten Rattenlebermikrosomen mit Substrat entstanden waren [123]. Als Umsetzungsprodukte wurden für die chemische Umsetzung und im *ex vivo*-Modell das Norlactam (1), Norimid (2) und N-Methylimid (3) detektiert (vergleiche Abb. 3.112).

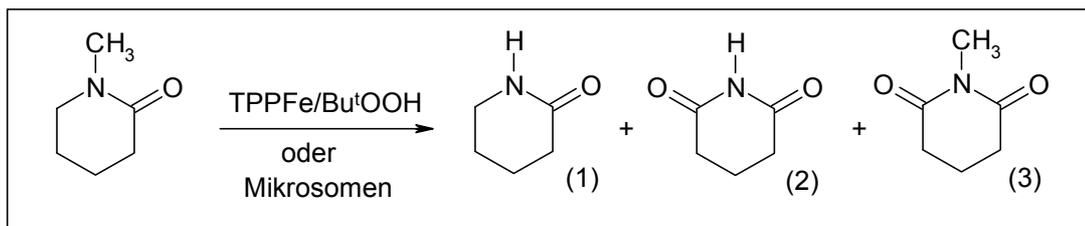


Abb. 3.112: Produkte der chemischen und mikrosomalen Oxidation von N-Methyl-2-piperidon nach *Iley* und Mitarbeiter

Unter Anwendung des PhIO/MnTFPPCl-Modellsystems sollte die Umsetzung des N-Methyl-2-piperidons im Folgenden in ACN unter Schüttelbedingungen bei ST und RT erfolgen. Die Reaktionszeiten wurden variiert, um eine Optimierung der Ausbeuten zu erwirken.

3.2.2 Analytik

Für die Bestimmung von N-Methyl-2-piperidon (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und seiner Metabolite wurde eine gaschromatographische Methode entwickelt. Neben dem Substrat stand als Referenzsubstanz nur das demethylierte Produkt 2-Piperidon (Acros Organics, Geel, Belgien) zur Verfügung. Als interner Standard wurde Toluol verwendet. Nach erfolgter Umsetzung des N-Methyl-2-piperidons im Modellsystem wurden die Ansätze zusätzlich mittels GC-MS-Messung untersucht. Hierdurch konnten erste Aussagen über die Identität der gebildeten Produkte gemacht werden. Aufgrund der fehlenden Referenzsubstanzen konnte allerdings keine exakte Quantifizierung der Produkte vorgenommen werden. Die näherungsweise Quantifizierung erfolgte analog der in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Weise. Die verwendeten Kalibrierkurven für die 20 μ mol- und 100 μ mol-Ansätze befinden sich im Experimentellen Teil.

Abb. 3.114 zeigt die Umsetzung eines 100 μmol aren Ansatzes von N-Methyl-2-piperidon unter Schüttelbedingungen/RT mit MnTFPPCl und PhIO als Sauerstoffdonator.

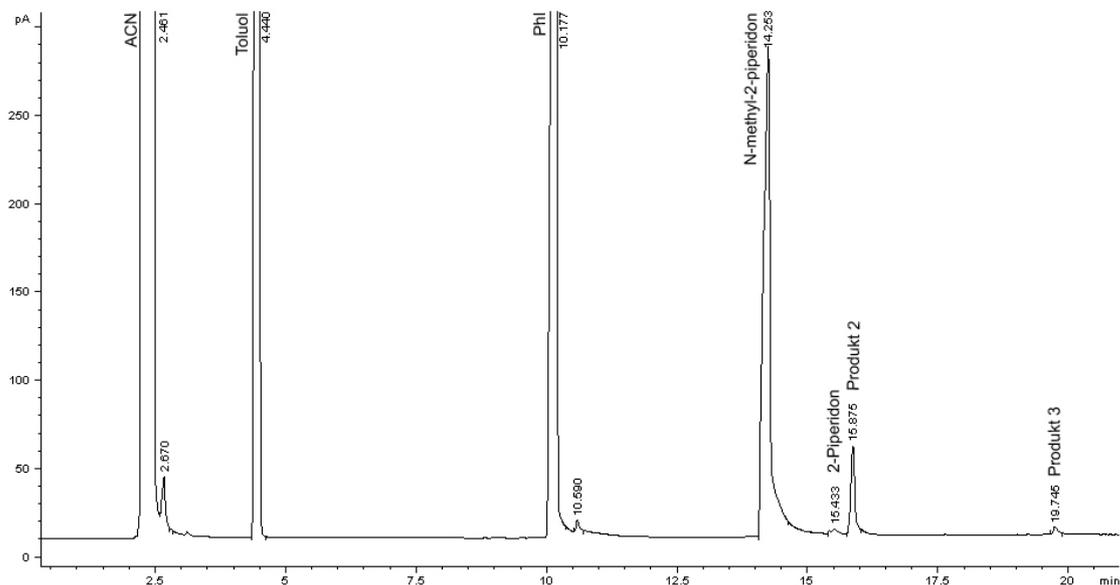


Abb. 3.113: GC-Chromatogramm der Produkte nach Umsetzung von 100 μmol N-Methyl-2-piperidon mit PhIO und MnTFPPCl bei RT im Modellsystem

Zunächst wurde versucht durch Zusatz von Derivatisierungsreagenzien die Peaksymmetrie zu verbessern [128]. In Vorversuchen wurde die Eignung des Silylierungsreagenz BSTFA (N, O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid) 99% + TMCS (Trimethylchlorsilan) 1% (Supelco, Bellefonte, PA, USA) für das Gemisch von N-Methyl-2-piperidon und 2-Piperidon untersucht. Zunächst versetzte man hierfür 2-Piperidon in ACN mit der stöchiometrisch doppelten und vierfachen Menge an Silylierungsreagenz und schüttelte bei 80°C 30 min bis 2 Stunden (vergleiche Abb. 3.114). Eine komplette Umsetzung konnte unter keinen Bedingungen erreicht werden, allerdings wurde nach 2 Stunden mit vierfacher Menge die beste Umsetzungsrate verzeichnet.

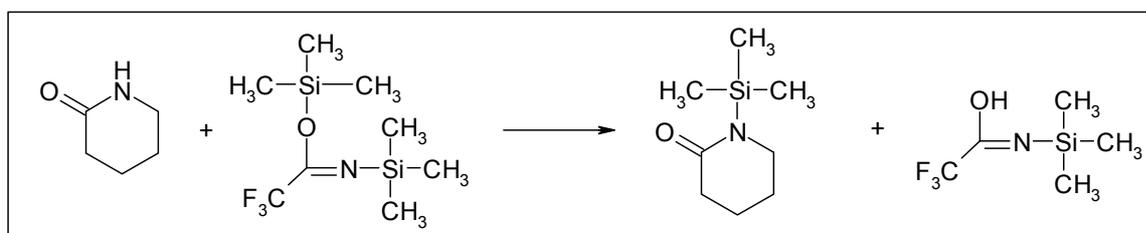


Abb. 3.114: Darstellung der Umsetzungsreaktion von 2-Piperidon mit BSTFA+TMCS-Reagenz

Anschließend wurde eine 100 μ molare Lösung N-Methyl-2-piperidon in ACN ebenfalls mit derselben Menge an Silylierungsreagenz versetzt, wie 2-Piperidon zuvor und 2 Stunden bei 80 °C geschüttelt. Es trat neben dem unveränderten N-Methyl-2-piperidon ein zusätzlicher Peak bei der gleichen Retentionszeit wie das silylierte 2-Piperidonderivat auf. Eine Demethylierung unter 2-stündigem Schütteln bei 80°C konnte ausgeschlossen werden. Eine Demethylierung des N-Methyl-2-piperidons mit gleichzeitiger Silylierung unter BSTFA+TMCS-Einfluss konnte nicht ausgeschlossen werden.

Aufgrund der nicht vollständig ablaufenden Umsetzung von 2-Piperidon und der Bildung von unerwünschten Nebenprodukten des N-Methyl-2-piperidons, wurde auf eine Derivatisierung verzichtet.

3.2.3 Durchführung

Die Durchführung der Versuche erfolgte auf die unter Kapitel 3.1.3 beschriebene Weise.

3.2.4 Ergebnisse und Diskussion

Die im Anschluss an die GC-Versuche durchgeführte GC-MS-Untersuchung diente dazu mögliche Strukturen der Umsetzungsprodukte zu diskutieren. 2-Piperidon konnte eindeutig durch Zudosierungsexperimente der Referenzsubstanz identifiziert werden. Für Produkt 2 wurde ein Molekülionenpeak $m/z = 127$ gefunden. Ein Vergleich dieses Spektrums mit Referenzspektren der MassLibTM-Bibliothek (Version 9.2) zeigten sehr große Übereinstimmungen mit dem Fragmentierungsmuster des Methylimids. Für Produkt 3 wurde ein Molekülionenpeak von $m/z = 113$ detektiert. Allerdings existierte für diese Substanz keine Referenzspektrum in der Spektrenbibliothek MassLibTM. Aufgrund der Masse konnte jedoch angenommen werden, dass es sich um das Norimidderivat des N-Methyl-2-piperidons handeln könnte, da Iley und Mitarbeiter bei Verwendung eines ähnlichen Modellsystems ebenfalls das Norimidderivat detektieren konnten.

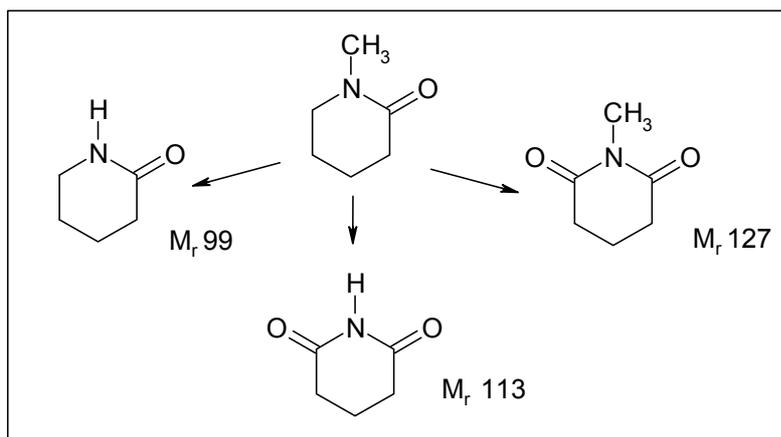


Abb. 3.115: Anhand der GC-MS Analytik postulierte Produkte der Umsetzung von N-Methyl-2-piperidon mit MnTFPPCl und PhIO

Unter Verwendung des Modellsystems mit 20 μmol N-Methyl-2-piperidon konnte für die Dauer von 10 min Reaktionszeit kein signifikanter Unterschied zwischen RT und ST festgestellt werden (vergleiche Abb. 3.116). Signifikante Unterschiede bestanden nur für Produkt 2 bei 30 min und 120 min, wobei unter RT höhere Ausbeuten erzielt wurden. Für 2-Piperidon wurde dagegen bei 120 min ein höherer Gehalt detektiert.

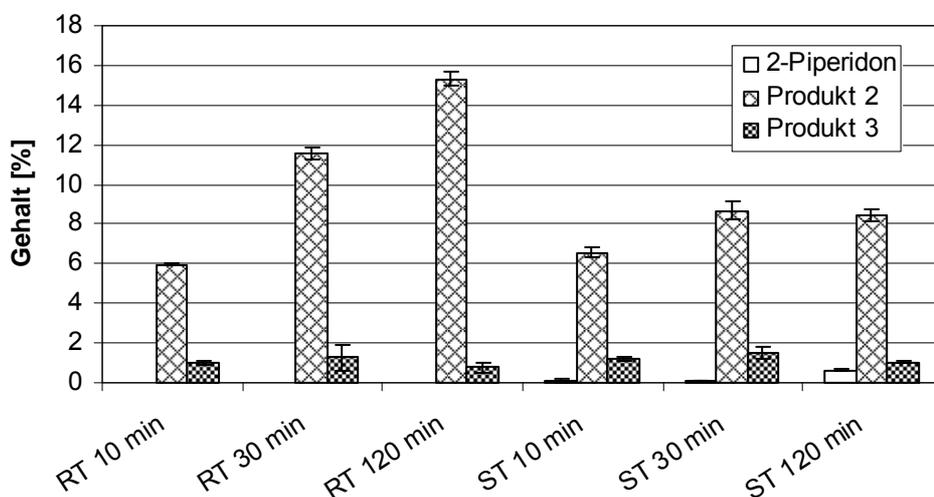


Abb. 3.116: Darstellung der Ergebnisse der Umsetzung von 20 μmol N-Methyl-2-piperidon im Modellsystem mit PhIO und MnTFPPCl bei RT und ST, sowie variierenden Schüttelzeiten

Unter RT-Bedingungen wurde mit jeder Steigerung der Reaktionszeit eine signifikante Erhöhung der Ausbeute von Produkt 2 erzielt. Für die Reaktionen unter ST konnte für Produkt 2 nur eine signifikante Steigerung des Gehaltes zwischen 10 min und 30 min, sowie 10 min und 120 min

erreicht werden. Für 2-Piperidon und Produkt 3 konnten keine erhöhten Ausbeuten durch Steigerung der Reaktionszeit nachgewiesen werden.

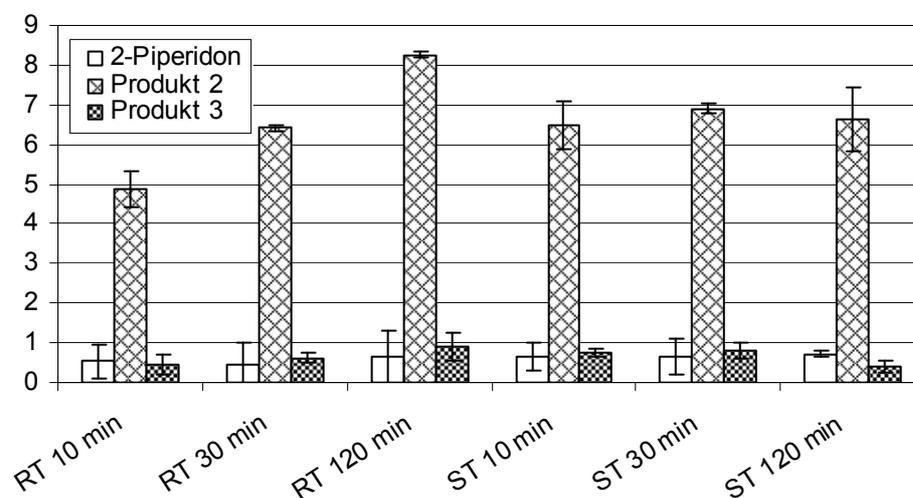


Abb. 3.117: Darstellung der Ergebnisse der Umsetzung von 100 μmol N-Methyl-2-piperidon im Modellsystem mit PhIO und MnTFPPCl bei RT und ST, sowie variierenden Schüttelzeiten

Bei der Verwendung des 100- μmol -Ansatzes konnten keine signifikanten Unterschiede in der Menge der gebildeten Produkte zwischen RT und ST festgestellt werden. Ebenfalls konnte innerhalb dieser Bedingungen keine Ausbeutensteigerung über eine verlängerte Reaktionszeit erreicht werden. Einzige Ausnahme bildet Produkt 2. Hier konnte unter RT ein höherer Gehalt detektiert werden.

Produkt 2 stellte signifikant unter allen Bedingungen das Hauptprodukt der Umsetzung dar.

In Analogie zu den Ergebnissen der Umsetzung von N-Methyl- ϵ -caprolactam resultierte die Verwendung eines Überschusses an Sauerstoffdonator auch unter Umsetzung von N-Methyl-2-piperidon zu erhöhten Ausbeuten an Produkten gegenüber eines Substratüberschusses, wie es in den 100 μmol - Ansätze verwirklicht wurde.

3.3 Abschließende Betrachtung

Das Ausmaß der Umsetzungsprodukte war von der Ringgröße des Substrates abhängig. Während unter Einsatz von N-Methyl-2-piperidon der Hauptmetabolit das vermeintliche Methylimid mit maximalen Ausbeuten

von 15 % war, konnte für N-Methyl- ϵ -caprolactam kein Hauptoxygenierungsprodukt benannt werden. Hier fanden die Methylimid- und Norimidbildung in nahezu ähnlichen Ausbeuten statt. Das Methylimid des N-Methyl- ϵ -caprolactam wurde im Vergleich zum Methylimid des N-Methyl-2-piperidon nur in Ausbeuten bis zu maximal 2 % gebildet. *Appleton* und Mitarbeiter untersuchten in biomimetischen Modellsystemen mit PhIO als Sauerstoffdonator die allylische Oxidation neben gleichzeitig stattfindender Epoxidierung von Cycloalkenen in Abhängigkeit der Ringgröße [129]. Sie beschrieben eine erhöhte Steigerung der allylischen Oxidation mit abnehmender Ringgröße. So detektierten sie die höchsten Ausbeuten an allylischen Oxidationsprodukten neben den epoxidierten Hauptprodukten bei den 5- und 6-gliedrigen Ringen, während diese bei Cyclohepten, -octen und -decen nicht auftraten. Diskutiert wurde die erhöhte allylische Oxidation des Sechsrings durch Stabilisierung des cyclischen Allylradikals und seines Übergangszustandes in seiner bevorzugten Konformation mit 5 koplanaren Kohlenstoffatomen [129]. Zwar handelt es sich bei den hier verwendeten Substraten nicht um Alkene, allerdings verursacht der π -Bindungsanteil der CN-Bindung des Amids bei den verwendeten Substraten ebenfalls eine ebene Anordnung [68], die in einer Konformation des Ringes ähnlich der oben beschriebenen Cycloalkene resultiert. Aufgrund dessen kann die verstärkte Methylimidbildung aus N-Methyl-2-piperidon ebenfalls in einer analogen Stabilisierung des intermediär auftretenden Radikals im Sechsring gegenüber dem Siebenring in N-Methyl- ϵ -caprolactam begründet liegen.

Generell war jedoch die alleinige Demethylierung beider Substrate im Modellsystem nicht der bevorzugte Mechanismus. Unter RT konnte bei den 20 μmol - Ansätze weder bei N-Methyl- ϵ -caprolactam noch bei N-Methyl-2-piperidon das demethylierte Produkt nachgewiesen werden. Erst unter Siedebedingungen und bei Einsatz von 100 μmol -Ansätzen wurde dieses detektiert. Eine an die Demethylierung angeschlossene Oxygenierung zum Norimidderivat scheint eine möglich Erklärung für die geringen Ausbeuten des alleinigen demethylierten Produktes zu sein.

Eine Hydroxylierung konnte bei beiden Substraten nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte gesagt werden, dass die Ringgröße einen Einfluss auf das Ausmaß der gebildeten Umsetzungsprodukte hat, allerdings nicht auf deren Art.

3.4 Estradiol

3.4.1 Einleitung

Estradiol gehört als wichtigster Vertreter der Estrogene zu den Steroidhormonen und ist aufgrund seiner Löslichkeit den lipophilen Hormonen zuzuordnen. Es wird vom Ovar und während der Schwangerschaft von der Placenta gebildet. Estradiol kontrolliert den Menstruationszyklus, fördert die Proliferation der Uterusschleimhaut und ist für die Ausprägung der weiblichen sekundären Geschlechtsmerkmale verantwortlich [130]. Des Weiteren werden die Erhaltung der Knochendichte und neuroprotektiven Eigenschaften dem Steroid zugeschrieben [131]. Die Beteiligung von Estradiol und seiner Metabolite bei der Entstehung und Proliferation des Mamma- und Endometriumkarzinoms, sowie in neueren Untersuchungen ebenfalls als Stimulus beim Zervixkarzinom wird vielfach diskutiert [131-133].

Einige Metabolite des Estradiols sind aufgrund dessen von großer Bedeutung und werden nach Darstellung des allgemeinen Metabolismus im Menschen kurz erläutert. Die potentiellen Angriffspunkte [134] wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit separat dargestellt.

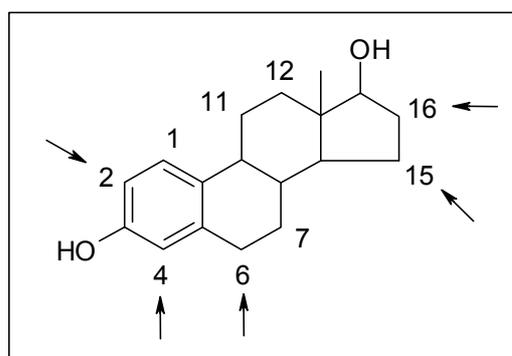


Abb. 3.118: Angriffspunkte des oxidativen Metabolismus bei Estradiol (E2) nach Martucci und Fishman [134]

Der erste Schritt des Estradiolmetabolismus stellt die Umwandlung von Estradiol (1; E2) zu Estron (2; E1) dar. Dieser Prozeß ist reversibel, wobei

die Estronbildung begünstigt ist [135]. Im weiteren Verlauf entstehen als Hauptmetabolite des A-Ring-Abbaus das 2-Hydroxyestron (3; 2-OH-E1) und 4-Hydroxyestron (4; 4-OH-E1), während im D-Ring 16 α -Hydroxyestron (5; 16 α -OH-E1)) und Estriol (6) gebildet werden. Des Weiteren werden die Bildung der entsprechenden Estradiolderivate des A-Ring-Abbaus wie 2-Hydroxyestradiol (7; 2-OH-E2) und 4-Hydroxyestradiol (8; 4-OH-E2), sowie die Epimere des D-Ring-Abbaus 16 β -Hydroxyestron (9) und 16 β -Hydroxyestradiol (10; 16 β -OH-E2) beschrieben [131]. Eine C6-Hydroxylierung konnte bei *in vitro* Versuchen durch *Breuer* und Mitarbeiter nachgewiesen werden, wobei die 6 α -Hydroxylierung an E2 (11; 6 α -OH-E2) bevorzugt war (vergleiche Abb. 3.119).

4-Hydroxyestradiol wird in der Literatur im Zusammenhang mit carcinogenen Ereignissen, aufgrund der Bildung reaktiver o-Chinone, die zu mutagenen DNA-Produkten reagieren können, diskutiert [136]. 2-Hydroxyestradiol bzw. das durch Catechyl-O-methyltransferase methylierte Produkt wurde dagegen mit seiner antiestrogene Wirkung, als antiproliferativer Metabolit beurteilt [131, 132].

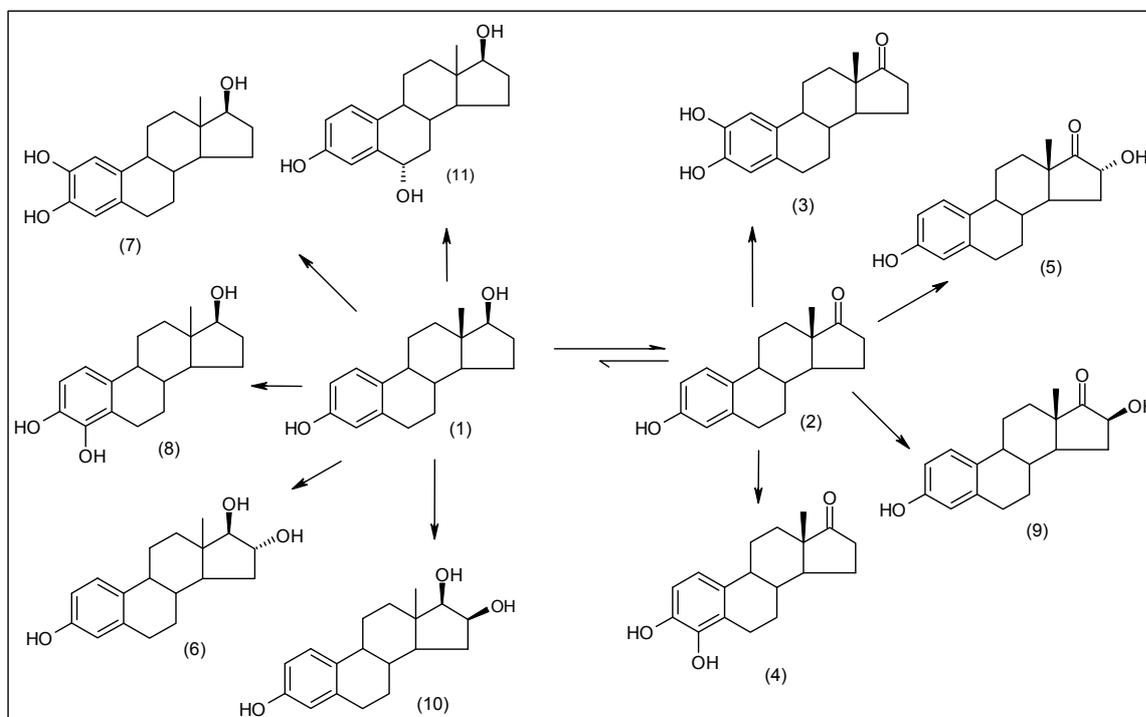


Abb. 3.119: Darstellung des Hauptabbauweges von Estradiol, sowie Nebenprodukte nach Martucci und Fishman [134]

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob eine Umsetzung im Modellsystem zu den dargestellten Metaboliten führt. Hierbei wurde zunächst eine Methode entwickelt, die 8 Metabolite und das Ausgangssubstrat detektieren konnte. Auf Metabolit (6) wurde aus Kostengründen verzichtet während von Metabolit (9) wegen seines niedrigen Stellenwertes im humanen Metabolismus abgesehen wurde.

3.4.2 Analytik

Für die Analytik von Estradiol und den zu erwartenden Metaboliten 6 α -OH-E2, 16 α -OH-E1, 16 β -OH-E2, 2-OH-E2, 4-OH-E2, 4-OH-E1, E1 (Steraloids Inc. Ltd., London, England) wurde eine isokratische HPLC-Methode entwickelt. Die Analyten konnten auf einer RP-18-Säule mit einem Elutionsmittelgemisch von Methanol/0,1% Ameisensäure (48/52) getrennt (siehe Abb. 3.120) und mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert werden.

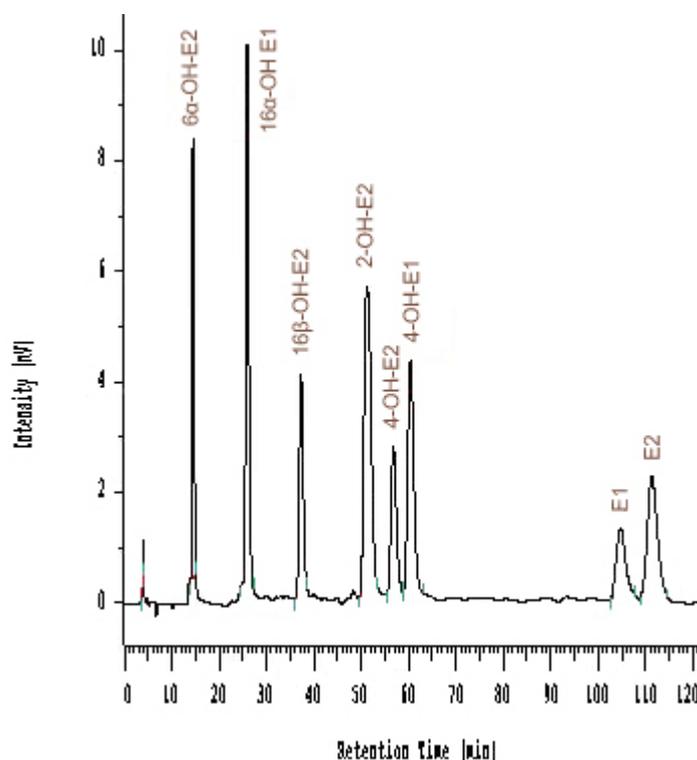


Abb. 3.120: Chromatogramm zur Auftrennung von Estradiol und seiner potentiellen Metabolite

2-OH-E1 wurde zur gleichen Zeit wie 4-OH-E2 eluiert. Eine Optimierung der Methode zur Trennung dieser beiden Metabolite konnte nicht erreicht

werden. Für den Fall der Bildung eines dieser beiden Metabolite nach der Umsetzung im Modellsystem hätte eine anschließende massenspektroskopische Untersuchung Aufschluss über die Identität gebracht.

3.4.3 Durchführung

Zunächst erfolgte eine Umsetzung im üblichen Ansatzverhältnis von 1:10:40 (immobilisiertes MnT4MPyPCL: Estradiol: PhIO) in Acetonitril bei 82°C für 10 min in der Mikrowelle. Es konnte keiner der erwarteten Metabolite nachgewiesen werden. Eine Umsetzung mit MMPP und *m*-CPBA führte ebenfalls nicht zu den erhofften Ergebnissen.

3.4.4 Ergebnisse

Da die Umsetzung von Estradiol weder zu Estron noch zu den hydroxylierten Metaboliten führte, sollten die beiden freien Hydroxylgruppen des Estradiol geschützt werden. Dies sollte zwei potentielle in der Literatur beschriebene Mechanismen unterbinden. Zum Einen führten oxidative Modellsysteme zu Polyaddukten. So kam es unter Einfluss von Meerrettichperoxidase/H₂O₂ zur Bildung von Polyestradiolen [137] und es wurden Dimere unter Tyrosinase/O₂ Einfluss detektiert [138]. Zum Anderen würde das Einführen einer Schutzgruppe eine mögliche Oxidation zu den in Kapitel 3.4.1 diskutierten o-Chinonen verhindern.

3.4.5 Synthese und Analytik von Estradioldiacetat

Es wurde eine Acetylierung zum Schutz der OH-Gruppen durchgeführt. Die Vorschrift erfolgte unter basischer Katalyse ([99]S. 477). Die Analytik zur Identität des gebildeten Diacetats befindet sich im Experimentellen Teil, sowie die Methode zur Bestimmung der Ausbeute mittels HPLC (siehe Kapitel 6.3.8 und 6.3.7).

3.4.6 Verseifung von Estradioldiacetat

Nach erfolgreicher Acetylierung wurde eine Methode zur Abtrennung der Acetylgruppen nach Umsetzung im Modellsystem etabliert. Somit konnten die Umsetzungsprodukte mit der oben beschriebenen Methode nachgewiesen werden. Die Untersuchung des Verseifungsgrades wurde ebenfalls mittels HPLC, allerdings mit einer anderen Methode, kontrolliert. Estradioldiacetat

und Estradiol konnten mit einer isokratischen Methode und einem Elutionsmittelgemisch von 0,1% Ameisensäure und Methanol (20/80) bei 280 nm getrennt werden. Diese Methode war identisch mit der Methode zur Bestimmung der Ausbeute des Estradioldiacetats und im Experimentellen Teil (siehe 6.3.7) dargestellt. Estradioldiacetat wies eine Retentionszeit von 25,1 min auf, während das vollständig verseifte Produkt Estradiol nach 6,5 min eluiert wurde.

Zur Verseifung diente eine 1,5 M ethanolische Kaliumhydroxidlösung. 200 μ L eines 20 μ molaren Estradioldiacetatansatzes wurden mit 200 μ L dieser Kaliumhydroxidlösung 20 min bei 300 rpm und RT geschüttelt. Hierbei konnten 96,2% Estradiol, ausgewertet über Flächenprozent, erhalten werden. Dieses Ansatzverhältnis von Kaliumhydroxid- zu Untersuchungslösung zum Zweck der Verseifungen wurde in folgenden Versuchen angewendet.

3.4.7 Umsetzung von Estradioldiacetat

Breslow und Mitarbeiter untersuchten Androstan-3,17-diol im Modellsystem [139]. Die Hydroxylgruppen an Position 3 und 17 wurden mit einem 4-*tert.*-Butylphenylrest versehen. Als Katalysator wurde ein manganhaltiger Porphyrinkomplex mit vier β -Cyclodextrineinheiten, sowie PhIO als Sauerstoffdonator eingesetzt. *Breslow* und Mitarbeiter verwendeten ein Ansatzverhältnis von 1:10:50 (Porphyrin: Substrat: Sauerstoffdonator). Als Lösungsmittel diente Methanol. Die Ansätze wurden 2 Stunden gerührt. Als Hydroxylierungsprodukt wurde nur das 6 α -Hydroxyprodukt des Androstan-3,17-diols detektiert.

In Anlehnung an diese Vorschrift wurde für die Umsetzung von Estradioldiacetat dasselbe Ansatzverhältnis verwendet. Als manganhaltiges Porphyrin fand MnT4MPyP-Cl Anwendung. Während *Breslow* und Mitarbeiter Methanol als Lösungsmittel verwendeten, wurde hier ebenfalls ein weiterer Ansatz mit ACN durchgeführt. Die Ansätze wurden 2 Stunden bei RT geschüttelt. Nach Membranfiltration wurden die Ansätze mit ethanolischer Kaliumhydroxidlösung 20 min geschüttelt und HPLC analysiert. Weder 6 α -OH-E2 noch ein weiterer der erwarteten Metabolite konnte detektiert werden.

3.4.8 Abschließende Betrachtung

Enzyme sind selektive Katalysatoren. Sie binden unter einer Vielfalt von möglichen Komponenten ein einziges Substrat und transformieren es unabhängig von der eigentlichen Reaktivität des Substrates. Der Substrat-Enzym-komplex kann die normale Reaktivität des Moleküls vollständig dominieren. Ein Beispiel für diese Dominanz ist die selektive Oxidation der drei Methylgruppen in Lanosterol durch das Cytochrom-P450-Enzymsystem in der Biosynthese von Cholesterol[8]. Zwei weitaus aktivere Doppelbindung und eine sekundäre Alkoholgruppe bleiben von der Oxidation unbeeinflusst.

Die Umsetzung des Estradiol in dem hier durchgeführten chemischen Modellsystem stößt an dieser Stelle an seine Grenzen. Die geometrische Kontrolle durch das Enzym nimmt bei diesem Substrat einen größeren Stellenwert ein, als die chemische Reaktivität des Substratmoleküls. Eine Imitierung der Selektivität scheint ein weitaus wichtigeres Vorhaben zu sein. Dies wurde in dem bereits erwähnten Modellsystem versucht. *Breslow* und Mitarbeiter erreichten eine gewisse Selektivität durch Modifizierung der Porphyrinkatalysatoren mit den bereits genannten β -Cyclodextrinresten. Sie bildeten eine Art Bindungstasche für die hydrophoben tert.-Butylreste, die vorher mit den freien OH-Gruppen der Androstanmoleküle reagiert hatten [139, 140]. *Yang* und Mitarbeiter entwickelten das Computermodell zu dem beschriebenen Komplex [141]. Untersuchungen mit derartigen Katalysatoren erfolgten allerdings nicht mit Estradiol als Substrat.

4 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war in einem ersten Schritt, ein effizientes biomimetisches Modellsystem für die Imitation der humanen Cytochrom P450-abhängigen Biotransformationsreaktionen von Diazepam zu etablieren. Es handelte sich hierbei um eine Hydroxylierung zu Temazepam, eine Dealkylierungen zu Nordazepam und eine Kombination der beiden Reaktionstypen zu Oxazepam. Den Kern dieser Arbeit bildete in einem zweiten Schritt die Optimierung der Metabolitenausbeuten durch die Etablierung der effektivsten Reaktionsbedingungen. Aus Gründen der Praktikabilität wurde aus den gewonnenen Erkenntnissen der Modellentwicklung ein System zur Generierung isolierbarer Mengen an Metaboliten entwickelt. Die Übertragbarkeit eines potenten Modellsystems auf ein grundsätzlich anderes Grundgerüst wurde abschließend überprüft, um das Transferpotential beurteilen zu können.

Im Brennpunkt der Untersuchungen zur Optimierung des Modellsystems für Diazepam standen die Art der Energieübertragung, die Reaktionstemperatur, die Sauerstoffdonatoren, das Lösungsmittel sowie das Katalysesystem. Basierend auf der katalytisch wirksamen Einheit der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen, die als prosthetische Gruppe eine Protoporphyrineinheit besitzen, sollte die Reaktivität des Zentralatoms im Modellsystem abgeschätzt werden. Als Übergangsmetall wurde Mangan in Form eines einfachen Salzes eingesetzt. Eine geringe katalytische Aktivität des Metallions konnte gegenüber den Blindversuchen bestätigt werden. Der Einsatz von Metalloporphyrinen als Katalysatoren, die als Übergangsmetall ebenfalls Mangan trugen, jedoch zusätzlich durch ein modifiziertes Porphyringerüst gekennzeichnet waren, zeigten einen weiteren ausbeutensteigernden Effekt. Aufgrund der höheren Ähnlichkeit zu der Protoporphyrineinheit der humanen Cytochrom P450 Monooxygenasen wurden auch ihre eisenhaltigen Analoga untersucht. Die manganhaltigen Katalysatoren waren allerdings den eisenhaltigen Analoga unter den meisten untersuchten Bedingungen überlegen. Aus Gründen der Recyclingfähigkeit und besseren Abtrennbarkeit aus dem Reaktionsansatz wurden die

verwendeten Metalloporphyrine an Kieselgel immobilisiert. Die Immobilisierung wurde ohne Lösungsmittel in der Synthesemikrowelle durchgeführt und erstmals auch bei eisenhaltigen Porphyrinen angewandt. Ein Vergleich der immobilisierten mit den nicht-immobilisierten Metalloporphyrinen zeigte, dass durch die Immobilisierung kein Aktivitätsverlust resultierte, und teilweise eine Aktivitätssteigerung möglich war. Unter Verwendung von immobilisiertem MnT4MPyPCL konnte in der Mehrheit höhere Metabolitenausbeuten gegenüber der nicht-immobilisierten Form detektiert werden. Gleichzeitig konnte für dasselbe Porphyrin eine höhere Stabilität gegenüber den oxidativen Einflüssen beobachtet werden. Als Marker für eine zunehmende oxidative Zerstörung der Katalysatoren im Modellsystem wurde ein, unter Verwendung von *m*-CPBA und MMPP, auftretendes Produkt identifiziert. Das als Diazepam-N-oxid charakterisierte Produkt konnte in Abwesenheit eines Katalysators aus Diazepam hergestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Inaktivierung des Katalysators und einer hieraus resultierenden Abnahme der Metabolitenbildung der Gehalt an Diazepam-N-oxid stieg. Im Verlauf der Identifizierung des Oxidationsproduktes wurde erstmals ein einfacher Syntheseweg des N-Oxids aus Diazepam mit MMPP dargestellt.

Aus dem Blickwinkel der Optimierung von Metabolitenausbeuten wurde neben der konventionellen Energieübertragung durch Wärme die Mikrowellenbestrahlung als potentieller Energielieferant diskutiert. Aufgrund der unterschiedlichen Energieübertragung wurde aus sechs Lösungsmitteln mit unterschiedlichen Charakteristika hinsichtlich ihres Verhaltens im Mikrowellenfeld Acetonitril für die Untersuchungen als optimal identifiziert. Ein Einfluss von non-thermalen und speziellen Mikrowelleneffekten konnte durch den Vergleich von Schüttelbedingungen mit Mikrowellenbedingungen bei 25°C und 82°C nicht eindeutig bewiesen werden. Unter RT konnten teilweise höhere Metabolitenausbeuten in der Mikrowelle generiert werden. Bei ST waren die Metabolitenausbeuten unter Schüttelbedingungen jedoch meist höher. Demnach konnte kein genereller Vorteil der Mikrowelle gegenüber der konventionellen Energieübertragung durch Wärme in den untersuchten Modellsystemen gezeigt werden. Allerdings zeichneten sich die Reaktionen in der Mikrowelle durch eine

leichte Steuerbarkeit der Reaktionsbedingungen und eine einfachere Handhabung aus.

Von den untersuchten Sauerstoffdonatoren zeigten *m*-CPBA, MMPP und PhIO eine ausreichende Potenz im Modellsystem. Mit Wasserstoffperoxid und Wasserstoffperoxid in Kombination mit Imidazol wurden deutlich geringere Metabolitenausbeuten detektiert. Bei der Untersuchung zur Recyclingfähigkeit der immobilisierten Porphyrine konnte abhängig vom Sauerstoffdonator ein zunehmender Aktivitätsverlust bei wiederholter Anwendung beobachtet werden. PhIO stellte sich als schonendster Sauerstoffdonator heraus. Die höchsten Metabolitenausbeuten konnte jedoch unter Verwendung von MMPP und *m*-CPBA festgestellt werden. Aufgrund des hohen oxidativen Potentials von MMPP und *m*-CPBA konnten die immobilisierte Porphyrine in Kombination mit diesen Sauerstoffdonatoren nur einmal wiederverwendet werden. In Kombination mit MnTFPPCl unter Schüttelbedingungen bei ST konnten die höchsten Ausbeuten erzielt werden.

Des Weiteren wurde eine katalytische Säule zur Generierung von isolierbaren Mengen an Diazepammetaboliten entwickelt. Die Besonderheit dieser katalytischen Säule bestand in der Kombination von katalytischer Reaktion und anschließender Auftrennung der Metabolite in demselben System. Eine externe Wärmequelle im Bereich der Reaktionszone ermöglichte zusätzlich die Reaktion unter Siedebedingungen.

Der im humanen Metabolismus und im Modellsystem chemisch veränderte Teil des Diazepam moleküls ist der Diazepinring. Eine formale Entfernung des Chlorbenzenannellanden sowie des Phenylrestes und die Umwandlung des Diazepins in ein Azepan ergab N-Methyl- ϵ -caprolactam. Anhand dieses Moleküls sollten eventuelle Gesetzmäßigkeiten hinsichtlich der für Diazepam beobachteten, katalysierten Reaktionen diskutiert werden. Durch die Umsetzung von N-Methyl-2-piperidon sollte zusätzlich der Einfluss der Ringgröße beurteilt werden. Bei beiden Modellsystemen konnte keine Hydroxylierung, allerdings eine Demethylierung, in Analogie zu den für Diazepam beobachteten Reaktionen detektiert werden. Die Ringgröße hatte weiterhin einen Einfluss auf die Menge der gebildeten Umsetzungsprodukte, jedoch nicht auf deren Art. Es konnte festgestellt werden, dass der Annelland

und der Phenylrest im Diazepam einen erheblichen Einfluss auf die Bildung der Oxygenierungsprodukte hatten.

Das Transferpotential der etablierten Modellsysteme auf ein strukturell grundsätzlich anderes Substrat war gering. Es gelang im Modellsystem nicht, die im humanen Metabolismus gefundenen Abbauprodukte des Estradiols durch Umsetzung des Substrates mit MnT4MPyPcI und PhIO zu erzeugen.

5 Summary

The main purpose of this work was the establishment of an efficient biomimetic model system to imitate the cytochrome p450 dependent biotransformation reactions of diazepam. These reactions comprise the hydroxylation to temazepam, the desalkylation to nordazepam and the combination of both reactions to yield oxazepam. The focus was on the development of efficient reaction conditions in order to improve the yields. For reasons of practicability a system was established to generate isolatable amounts of metabolites based on the findings of biomimetic model systems for diazepam. Finally the transferability of a potent model system to a basically different chemical structure was assessed.

For the purpose of improving the efficiency of the diazepam model systems the mode of energy transfer, the reaction temperature, the oxygen donors, the solvents and the scheme of catalysis were variegated. Cytochrome p450-containing monooxygenases incorporate a protoporphyrin device as prosthetic group. Based on this catalytic active centre the reactivity of the central atom in the model system was estimated. Manganese was used as transition metal in form of a simple salt. A slight catalytic activity of the metal ion could be observed compared to blind testing. The use of metalloporphyrins wearing manganese as central atom showed increased yields. They are characterized by an additional central atom surrounding porphyrin system. Ferrous analogs were also analyzed, as they have a high similarity to the human protoporphyrin. The manganese metalloporphyrins were predominant in most of the investigated conditions. In order to enable a reapplication and to simplify the removal from reaction mixture, the metalloporphyrins were immobilized on silica gel. The immobilization was accomplished by a solvent-free microwave synthesis. This method was applied to ferrous metalloporphyrins for the first time. Immobilized and soluble metalloporphyrins were compared. No loss of activity and in some cases an enhancement of activity when using the immobilized metalloporphyrins was observed. In comparison to the soluble form higher yields of metabolites were detected using immobilized MnT4MPyP_{Cl} at most times.

Simultaneously, a higher stability regarding oxidative impact could be demonstrated for the same immobilized porphyrin. When adding *m*-CPBA and MMPP to the mixture a different product from the named metabolites was detected. It was a marker for oxidative degradation and was characterized as diazepam-N-oxide. This product could be synthesized without any catalyst. Furthermore it was shown that with an increase of catalyst inactivation and a decrease in metabolite yields higher contents of diazepam-N-oxide appeared. During the process of the characterization this oxidation product, a simple way to synthesize the forming N-oxides, by treatment of diazepam with MMPP was developed for the first time.

With regard to improving the yields, two pathways of transferring energy into the reaction mixture were discussed. The conventional heat competed against microwave irradiation. Solvents behave different under microwave irradiation than during conventional heating. Due to this fact six different solvents were assessed regarding to their behaviour in a microwave field and acetonitrile proved to be suitable for the model system. Non-thermal and special microwave effects could not be confirmed by comparing shaking conditions with microwave conditions at 25°C and 82°C. Partially higher yields could be detected at 25°C under microwave irradiation. At 82°C higher yields were achieved under shaking conditions. No advantage for microwave energy compared to conventional heating appeared for the used model system regarding an improvement of yields. However, the reaction under microwave radiation showed a better controllability of the reaction conditions and an easier handling.

Concerning the applied oxygen donors *m*-CPBA, MMPP and PhIO had a high potency in the model system. Using hydrogen peroxide and hydrogen peroxide in combination with imidazole considerably lowered the yields. The oxygen donors were analyzed according to their influence on the reutilization of the porphyrin which is correlated to a loss of activation. PhIO turns out to be the oxygen donor with the lowest degradation capacity. MMPP and *m*-CPBA achieved the highest yields of metabolites. The immobilized metalloporphyrins could only be reused once when using MMPP and *m*-CPBA due to their high oxidative potential. The combination

with MnTFPPCl at boiling temperature under shaking conditions showed the highest results.

A catalytic column was established to generate isolatable amounts of diazepam metabolites. The particularity of the catalytic column is the combination of a catalytical unit and the chromatographic separation of the metabolites after termination of the biomimetic model reaction in the same system. An external thermal unit permitted the reaction under boiling conditions.

The chemical affected part of the diazepam molecule that is affected in the human metabolism and the biomimetic model system is the diazepam ring structure. A formal removal of the chlorobenzene annelland as well as the phenyl substituent and the conversion of diazepam to azepam led to N-methyl- ϵ -caprolactam. With these molecule principles regarding to the observed catalyzed reactions of diazepam should be discussed. By the use of N-methyl-2-piperidon in the model system the influence of the ring size should be estimated. No hydroxylation was detected for both reaction types. The demethylation as also observed in the reaction using diazepam, was detected. The ring size had an influence on the amount of generated chemical reaction products, but not on the type of products which formed. The annelland and the phenyl substituent of diazepam had a considerable influence on the oxygenation products.

The transfer potential of the established biomimetic model systems to a basically different substrate was marginal. The conversion of estradiol with MnT4MPyPCL and PhIO did not lead to the expected metabolites normally formed in the human metabolism.

6 Experimenteller Teil

6.1 Verzeichnis der Geräte und allgemeinen Methoden

¹H-NMR-Spektren

Bruker AMX 400 (400 MHz)

Angabe der chemischen Verschiebung δ in ppm

Innerer Standard: Tetramethylsilan (TMS)

Ermittlung der Protonenverhältnisse durch Integration

Abkürzungen der durch Spinkopplung auftretenden Signalmultiplizitäten:

s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett

¹³C-NMR-Spektren

Bruker AMX 400 (100,6 MHz)

Angabe der chemischen Verschiebung δ in ppm

Innerer Standard: Tetramethylsilan (TMS)

Darstellung von Iodosobenzol

Nach Saltzmann und Sharefkin [45] aus Iodosobenzoldiacetat mit NaOH

Dünnschichtchromatographie

DC-Mikroarten Polygram[®] oder Alugram[®] Sil G/UV₂₅₄, 40 x 80 mm, Schichtdicke 0,2 mm Kieselgel mit Fluoreszenzindikator, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

DC-Alufolien 10 x 20 cm Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, Darmstadt, Deutschland

Alle Untersuchungen wurden mit Kammersättigung durchgeführt.

GC

6890 GC Series System

Agilent Technologies

Software: GC ChemStation Rev. A. 09.03 [1417]

GC-MS

GC: HP 5890 A

Kapillarsäule: CP-Sil 5 CB 25m

MS: VG 250 S

Ionisierungsspannung: 70 eV

Quellentemperatur: 200°C

Pipetten

Eppendorf Research[®] Family Variable

10-100 µl

100-1000 µl

500-5000 µl Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Autoclavable Nichipet Model5000DG 2-20 µl, NICHIRYO, Japan

HPLC

Merck Hitachi La Chrom

Steuereinheit D-7000, Pumpe L-7100, Autosampler L-7200, Diodenarray-Detektor L-7455, UV-Detektor L-7400, Solvent Degasser L-7612

Software: Merck D-7000 HPLC System Manager für Windows NT 4.0

IR-Spektren

ATI Mattson

Genesis series

FTIR™

FTIR-Spektrometer TENSOR 37

Bruker Optik GmbH Karlsruhe

Optische Einheit: MIRacle™ ATR; PIKE Technologies; Madison, WI

Software: OPUS Spectroscopy Software Version 6.5

Massenspektren

Finnigan MAT 311 A

Ionisierungsspannung: 70 eV

Quellentemperatur: 200°C

pH-Meter

Metrohm 632 mit Glaselektrode Metrohm 6.0259.100

Deutsche Metrohm GmbH & Co. KG, Filderstadt, Deutschland

Die Kalibrierung erfolgte nach Ph. Eur. 5.0 bei 20°C mit Pufferlösungen pH 2,00, pH 7,00 und pH 4,62, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Pufferlösungen

Acetatpuffer

32,2 mL Lösung A + 67,8 mL Lösung B, eingestellt mit 1M NaOH

Lösung A: 0,05 M Essigsäure

Lösung B: 0,05 M Natriumacetat Trihydrat 6,81 g/L

Schüttler

Thermomixer comfort 1,5 mL, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Synthesemikrowelle

Mikrowellensystem Discover™, CEM GmbH, Kamp-Lintfort, Deutschland

Software: Synergy

UV/VIS-Spektrometer

Agilent 8453 UV-Visible Spectrophotometer, Agilent Technologies

Software: UV-Visible ChemStation, Rev. A. 09.01 [76]

Küvetten: Hellma Präzisionsküvetten aus Quarzglas SUPRASIL, Schichtdicken 10,00 mm und 50,01 mm, Müllheim, Deutschland

Mikro Einmalküvetten ratiolab® 1 cm, MÜLLER ratiolab, Dreiech, Deutschland

Verbrauchsmaterialien

Rotilabo® Spritzenfilter 13 mm, 0,45 µm, Nylon, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Einmalspritzen Injekt 2 mL, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Safe-seal-microtubes 2 mL, 1,5 mL, Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland

Waagen

Sartorius micro M 500 P, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

HR-120-EC, A&D Instruments Ltd., Ahrensburg, Deutschland

Zentrifuge

Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

6.2 Versuche zur Entwicklung biomimetischer Modellsysteme für Diazepam

6.2.1 Methode und deren Validierung zur Bestimmung von Diazepam und seiner Metabolite

HPLC-Methode:

Mit dieser Methode konnten Oxazepam, Temazepam, Nordazepam, Diazepam und das Diazepam-N-oxid detektiert werden.

Säule:	Purospher®Star LiChroCART 250-4 RP-18 endcapped 5 µm, Merck
Elutionsmittel:	Acetatpuffer pH 5/ Methanol (41/59)
Flussrate:	0,590 mL/min
Wellenlänge:	230 nm
Probenvolumen:	10 µL
Dauer:	30 min
Elutionstyp:	isokratisch

Validierung: Linearität

Zur Bestimmung der Linearität wurden aus sechs unabhängigen Einwaagen je sechs verschiedenen Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationsniveaus für Oxazepam, Temazepam, Nordazepam, Diazepam und Diazepam-N-oxid hergestellt. Jedes Konzentrationsniveau wurde dreimal vermessen.

Tabelle 6.1: Messwerte zur Bestimmung der Linearität von Oxazepam

x-Wert	Fläche [AU]			
Konz [µg/mL]	1.Messung	2.Messung	3.Messung	Mittelwert
0,20	6865	14707	13070	11547
0,40	11596	26197	33791	23861
0,60	39547	48048	46527	44707
0,80	50661	54530	72424	59205
1,00	65690	68559	83407	72552
1,20	89768	68424	119026	92406

Zur Erstellung der Kalibrierkurve (Abb. 6.121) wurden die Mittelwerte der Flächen herangezogen.

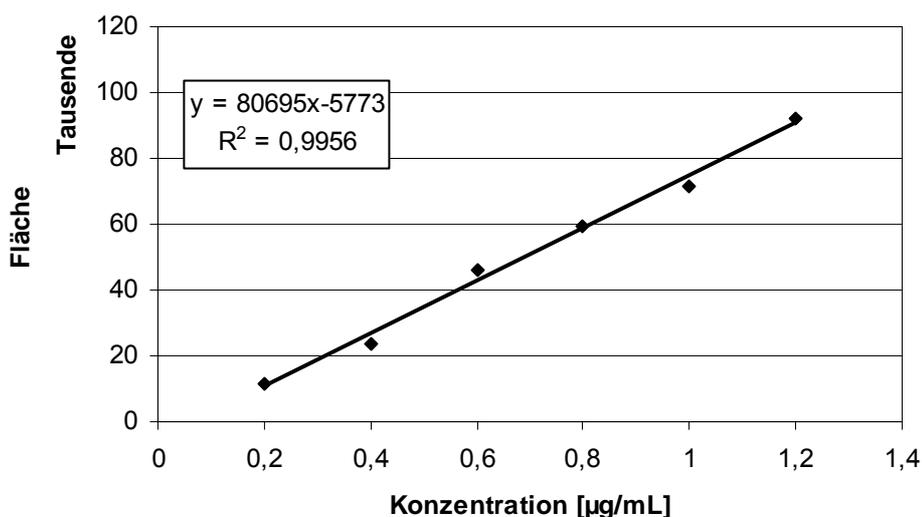


Abb. 6.121: Kalibrierkurve für Oxazepam

Die lineare Regression durch Dintest® lieferte folgende Ergebnisse:

Mittelwert :	0,700
Korrelationskoeffizient r :	0,9978
Reststandardabweichung s_y :	2249,771
Verfahrensstandardabweichung s_x :	0,028
Verfahrensvariationskoeffizient V_{k0} :	4,00 %

Des Weiteren waren die Residuen normalverteilt (R/s-Test, 99%) und zeigten keinen Trend (Neumann-Test, 99%).

Tabelle 6.2: Messwerte zur Bestimmung der Linearität von Temazepam

x-Wert	Fläche [AU]			
	1.Messung	2.Messung	3.Messung	Mittelwert
Konz [$\mu\text{g/mL}$]				
0,20	16189	13593	18789	16191
1,00	90413	100916	99960	97096
3,00	319753	292532	309290	307192
5,00	508949	482096	507707	499584
7,00	695898	651214	673821	673645
9,00	875321	960474	967626	934474
11,00	1122558	1168088	1151073	1147240

Zur Erstellung der Kalibrierkurve (Abb. 6.122) wurden die Mittelwerte herangezogen.

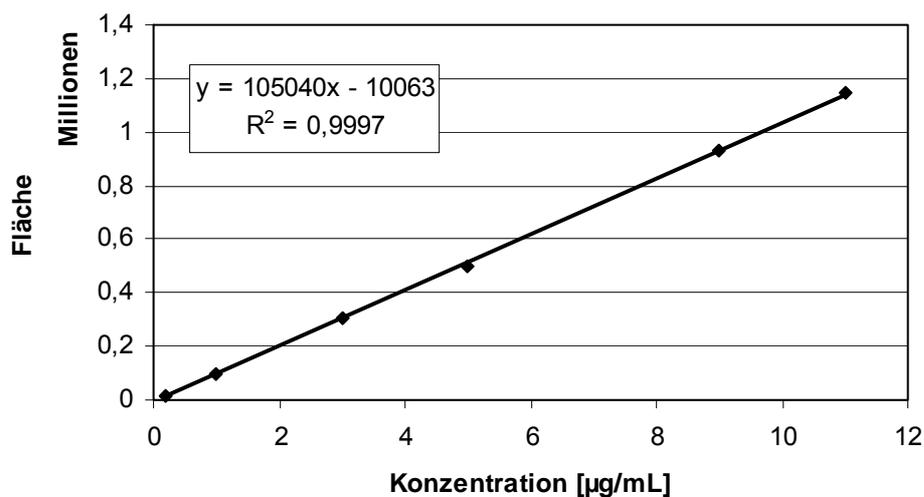


Abb. 6.122: Kalibrierkurve für Temazepam

Die lineare Regression durch Dintest® lieferte folgende Ergebnisse:

Mittelwert :	4,867
Korrelationskoeffizient r :	0,9998
Reststandardabweichung s_y :	9030,943
Verfahrensstandardabweichung s_x :	0,086
Verfahrensvariationskoeffizient V_{k0} :	0,02 %

Des Weiteren waren die Residuen normalverteilt (R/s-Test, 99%) und zeigten keinen Trend (Neumann-Test, 99%).

Kalibrator 5 (7µg/mL) war ein Ausreisser (F-Test, 99%) und wurde zur Bestimmung der linearen Regression nicht herangezogen.

Tabelle 6.3: Messwerte zur Bestimmung der Linearität von Nordazepam

x-Wert Konz [µg/mL]	Fläche [AU]			
	1.Messung	2.Messung	3.Messung	Mittelwert
0,2	16769	21249	12292	16771
1,00	95940	100231	122159	106110
2,00	202938	239056	239384	227126
4,00	456409	464850	452541	457933
6,00	678879	713780	748702	713787
8,00	935870	977179	974159	962403
10,00	1198855	1183619	1181850	1188108

Zur Erstellung der Kalibrierkurve (Abb. 6.123) wurden die Mittelwerte herangezogen.

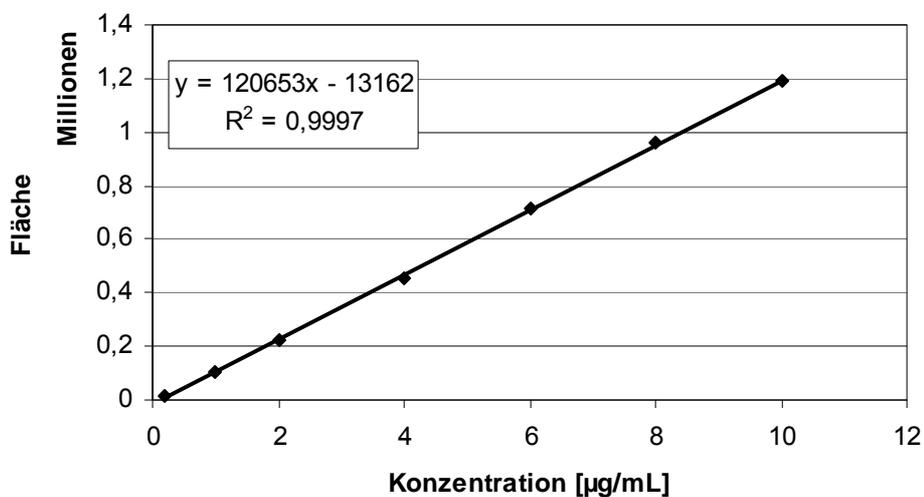


Abb. 6.123: Kalibrierkurve für Nordazepam

Die lineare Regression durch Dintest® lieferte folgende Ergebnisse:

Mittelwert :	4,457
Korrelationskoeffizient r :	0,9999
Reststandardabweichung s_y :	7912,413
Verfahrensstandardabweichung s_x :	0,066
Verfahrensvariationskoeffizient V_{k0} :	1,48 %

Des Weiteren waren die Residuen normalverteilt (R/s-Test, 99%) und zeigten keinen Trend (Neumann-Test, 99%).

Tabelle 6.4: Messwerte zur Bestimmung der Linearität von Diazepam

x-Wert Konz [µg/mL]	Fläche [AU]			
	1.Messung	2.Messung	3.Messung	Mittelwert
3,40	292193	343958	353330	329827
14,60	1497197	1516846	1503906	1505983
25,60	2635030	2658519	122159	2572347
37,10	3793736	3913646	3015117	3574166
47,23	4538363	4494375	4482011	4504916
58,22	5753151	5864250	5384854	5667418
69,42	6408331	6420006	6370014	6399450
76,14	7423867	7458444	7242543	7374951

Zur Erstellung der Kalibriergerade (Abb. 6.124) wurden die Mittelwerte herangezogen.

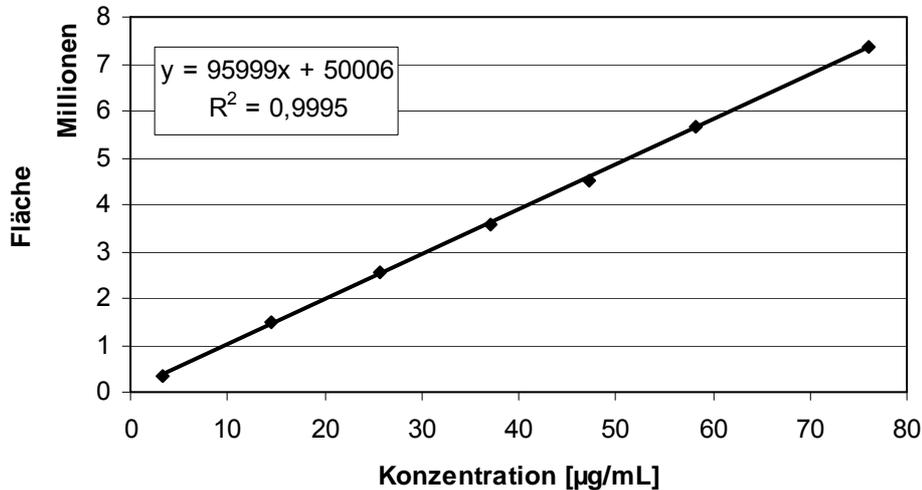


Abb. 6.124: Kalibrierkurve für Diazepam

Die lineare Regression durch Dintest® lieferte folgende Ergebnisse:

Mittelwert :	37,470
Korrelationskoeffizient r :	0,9997
Reststandardabweichung s_y :	60021,487
Verfahrensstandardabweichung s_x :	0,625
Verfahrensvariationskoeffizient V_{k0} :	1,67 %

Des Weiteren waren die Residuen normalverteilt (R/s-Test, 99%) und zeigten keinen Trend (Neumann-Test, 99%).

Kalibrator 7 war ein Ausreisser (F-Test, 99%) und wurde zur Bestimmung der linearen Regression nicht herangezogen.

Tabelle 6.5: Messwerte zur Bestimmung der Linearität von Diazepam-N-oxid

x-Wert Konz [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Fläche [AU]			
	1.Messung	2.Messung	3.Messung	Mittelwert
0,50	17388	18604	20318	18770
11,40	958383	925994	926576	936984
22,30	1729512	1749020	1759925	1746152
33,20	2697632	2686373	2634824	2672943
44,10	3513782	3417904	3476986	3469557
55,00	4551441	4552760	4499450	4534550

Zur Erstellung der Kalibrierkurve (Abb. 6.125) wurden die Mittelwerte herangezogen.

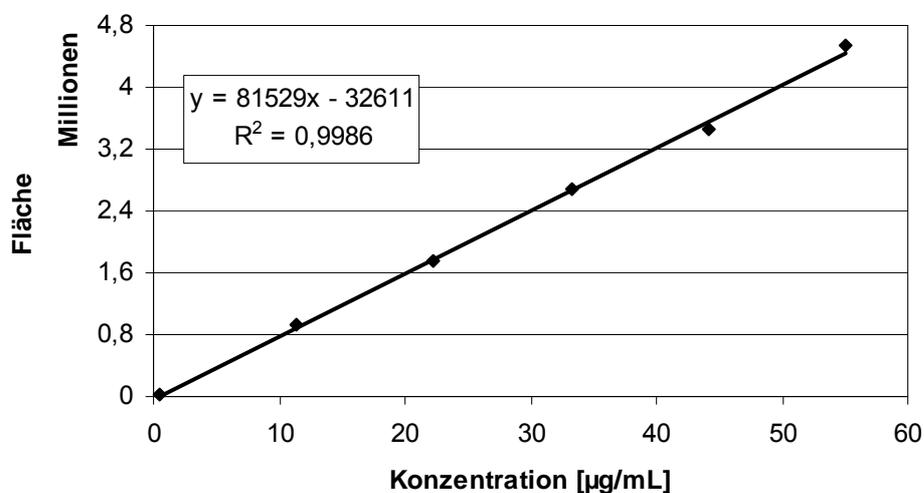


Abb. 6.125: Kalibrierkurve für Diazepam-N-oxid

Die lineare Regression durch Dintest® lieferte folgende Ergebnisse:

Mittelwert :	27,750
Korrelationskoeffizient r :	0,9993
Reststandardabweichung s_y :	68687,771
Verfahrensstandardabweichung s_x :	0,842
Verfahrensvariationskoeffizient V_{k0} :	3,03%

Des Weiteren waren die Residuen normalverteilt (R/s-Test, 99%) und zeigten keinen Trend (Neumann-Test, 99%).

Tabelle 6.6: Beurteilung der Linearität mit dem F-Test nach Mandel

	Varianzdifferenz DS^2	Prüfwert PW	F(P=99%, $f_1=1;f_2=3$); KW	Ergebnis
Oxazepam	$7,066 \times 10^5$	0,11	34,12	$PW \leq KW$
Temazepam	$2,188732 \times 10^8$	6,11	34,12	$PW \leq KW$
Nordazepam	$5,4340 \times 10^6$	0,07	21,20	$PW \leq KW$
Diazepam	$6,82886 \times 10^7$	0,01	21,20	$PW \leq KW$
Diazepam- N-oxid	$5,564482 \times 10^9$	1,25	34,12	$PW \leq KW$

DS^2 Differenz der Abweichungsvarianzen

Wiederholpräzision:

Messpräzision:

Zur Ermittlung der Messpräzision wurde eine Testlösung sechsfach injiziert und der Variationskoeffizient über die Peakflächen bestimmt.

Tabelle 6.7: Messwerte und Ergebnisse der Messpräzision

	Oxazepam	Temazepam	Nordazepam	Diazepam	Diazepam-N-oxid
Fläche	71173	983687	246944	1076770	1756958
Fläche	72334	970794	249273	1089076	1738923
Fläche	71841	965955	245320	1075494	1747312
Fläche	72081	965484	246384	1078959	1762844
Fläche	71838	983797	249669	1081556	1764174
Fläche	72408	970948	249075	1074896	1764517
<i>M_w</i>	71946	973444	247778	1079459	1752576
<i>Stabw</i>	448	8304	1799	5309	12321
<i>VK(%)</i>	0,62	0,85	0,73	0,49	0,70
<i>David-test</i>	2,76	2,19	2,42	2,67	2,08

David-Test: g_u/g_o (6, $P=99,9\%$): 1,83/3,10

Methodenpräzision:

Zur Ermittlung der Methodenpräzision wurde eine reale Probe mit *m*-CPBA als Sauerstoffdonator, die bei 82°C 10 min geschüttelt wurde, sechs Mal unabhängig analysiert und der Variationskoeffizient über die Peakflächen bestimmt.

Tabelle 6.8: Messwerte und Ergebnisse der Methodenpräzision

	Oxazepam	Temazepam	Nordazepam	Diazepam	Diazepam-N-oxid
Fläche	163642	815501	300399	2655078	804825
Fläche	167699	844027	320666	2769856	825173
Fläche	160183	855973	311203	2744772	789839
Fläche	159564	835817	315805	2739160	797239
Fläche	165568	853884	322345	2759752	804649
Fläche	166812	813425	307647	2644703	805441
<i>Mw</i>	<i>163911</i>	<i>836438</i>	<i>310695</i>	<i>271887</i>	<i>804528</i>
<i>Stabw</i>	<i>3417</i>	<i>18504</i>	<i>7016</i>	<i>54633</i>	<i>11799</i>
<i>VK (%)</i>	<i>2,08</i>	<i>2,21</i>	<i>2,26</i>	<i>2,01</i>	<i>1,5</i>
<i>David-test</i>	<i>2,38</i>	<i>2,30</i>	<i>2,09</i>	<i>2,29</i>	<i>2,99</i>

David-Test: g_u/g_o (6, $P=99,9\%$): 1,83/3,10

Wiederfindungsrate und Richtigkeit:

Zur Bestimmung der Wiederfindung und Richtigkeit wurde eine reale Probe mit *m*-CPBA als Sauerstoffdonator, die bei 82°C 10 min geschüttelt wurde, als Probelösung verwendet worden.

Für Oxazepam, Temazepam, Nordazepam, Diazepam und Diazepam-N-oxid wurden drei Lösungen (S1, S2, S3) mit 5 unterschiedlichen Konzentrationsniveaus hergestellt, vermessen und gegen die Konzentration aufgetragen.

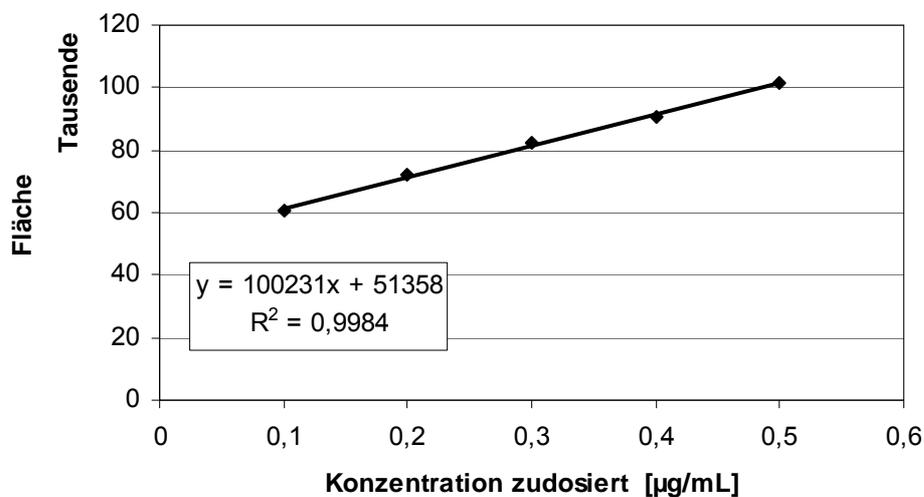
Oxazepam:

Abb. 6.126: Aufstockkurve der Lösung 1 für Oxazepam unter Erhalt von Signal S1

Tabelle 6.9: Lineare Regression mit Dintest® der Aufstockkurve von Abb. 6.126

Korrelationskoeffizient	0,9992
R/s-Test	Residuen sind normalverteilt
Neumann-Test, 99%	Residuen haben keinen Trend
F-Test, 99%	max. Abweichung kein Ausreisser
Reststandardabweichung s_y	751,284
Verfahrensstandardabweichung S_x	0,007
VB der Steigung	100231 ± 13877
VB des Achsenabschnitts	51358 ± 4602

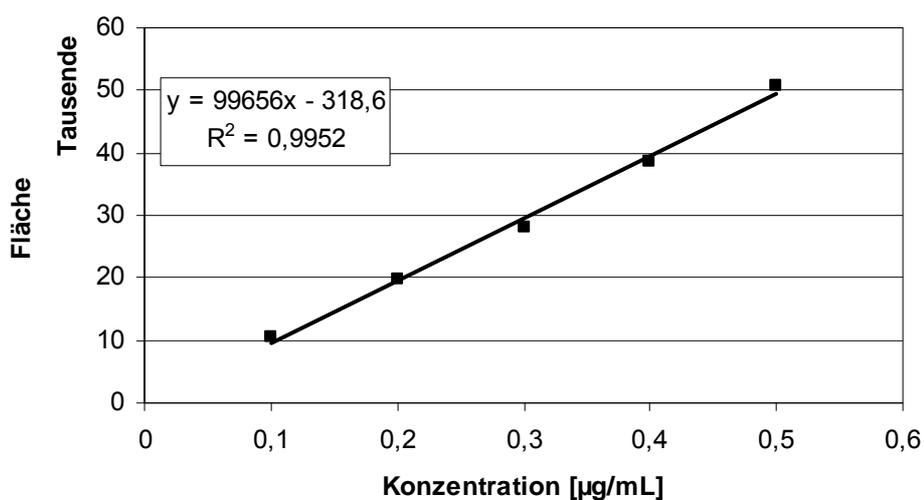


Abb. 6.127: Kalibrierkurve der Lösung 3 für Oxazepam unter Erhalt des Signal S3

Tabelle 6.10: Lineare Regression mit Dintest® der Kalibrierkurve von Abb. 6.127

Korrelationskoeffizient	0,9976
R/s-Test	Residuen sind normalverteilt
Neumann-Test, 99%	Residuen haben keinen Trend
F-Test, 99%	max. Abweichung kein Ausreisser
Reststandardabweichung s_y	1263,694
Verfahrensstandardabweichung S_x	0,013
VB der Steigung	99656 ± 23341
VB des Achsenabschnitts	-319 ± 7741

Tabelle 6.11: Bestimmung der Richtigkeit für Oxazepam

Varianz- F-Test	$F_{\text{tab}}(99\%,4,4) = 15,98$	$\geq F_{\text{err}} = 2,83$
Mittelwert- t-Test	$t_{\text{tab}}(99\%,4) = 4,604$	$\geq t_{\text{err}} = 1,71$

Tabelle 6.12: Bestimmung der Wiederfindung für Oxazepam

zudosierte Konzentration [$\mu\text{g/mL}$]	Wiederfindungsrate $W[\%]$
0,1	102,72
0,2	100,87
0,3	101,50
0,4	103,35
0,5	97,80

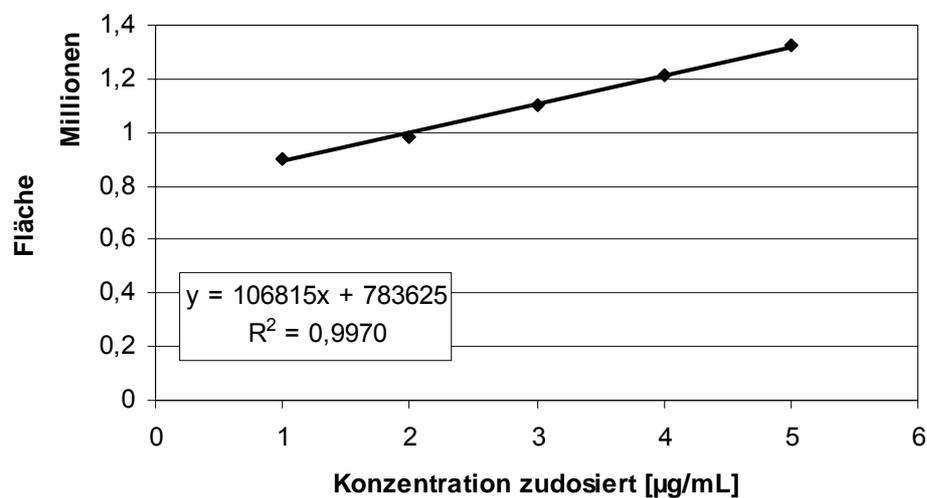
Temazepam:

Abb. 6.128: Aufstockkurve der Lösung 1 für Temazepam unter Erhalt des Signals S1

Tabelle 6.13: Lineare Regression mit Dintest® der Aufstockkurve von Abb. 6.128

Korrelationskoeffizient	0,9985
R/s-Test	Residuen sind normalverteilt
Neumann-Test, 99%	Residuen haben keinen Trend
F-Test, 99%	max. Abweichung kein Ausreisser
Reststandardabweichung s_y	10670,934
Verfahrensstandardabweichung S_x	0,100
VB der Steigung	106815 ± 19709
VB des Achsenabschnitts	783624 ± 65370

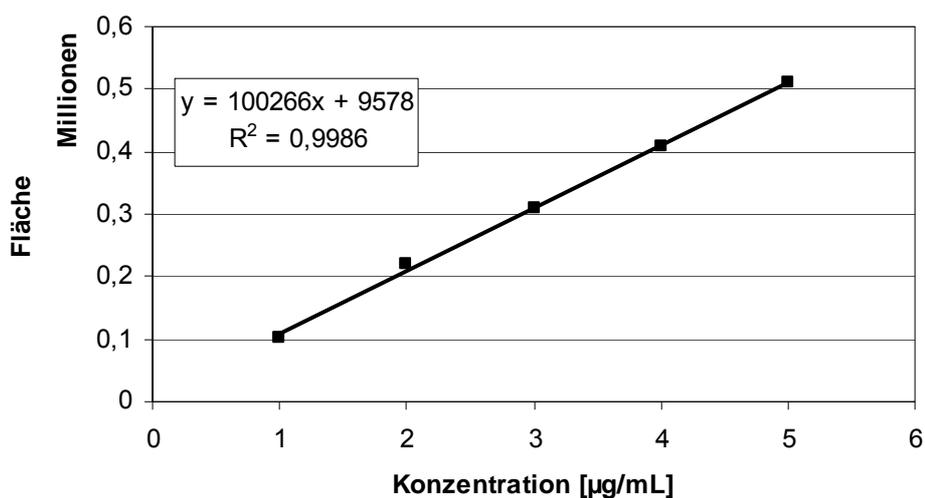


Abb. 6.129: Kalibrierkurve der Lösung 3 für Temazepam unter Erhalt von Signal S3

Tabelle 6.14: Lineare Regression mit Dintest® der Kalibrierkurve von Abb. 6.129

Korrelationskoeffizient	0,9985
R/s-Test	Residuen sind normalverteilt
Neumann-Test, 99%	Residuen haben keinen Trend
F-Test, 99%	max. Abweichung kein Ausreisser
Reststandardabweichung s_y	10670,934
Verfahrensstandardabweichung S_x	0,100
VB der Steigung	106815 ± 19709
VB des Achsenabschnitts	783624 ± 65370

Tabelle 6.15: Bestimmung der Richtigkeit für Temazepam

Varianz- F-Test	$F_{\text{tab}}(99\%,4,4) = 15,98$	$\geq F_{\text{err}} = 2,49$
Mittelwert- t-Test	$t_{\text{tab}}(99\%,4) = 4,604$	$\geq t_{\text{err}} = 1,37$

Tabelle 6.16: Bestimmung der Wiederfindung für Temazepam

zudosierte Konzentration [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Wiederfindungsrate $W[\%]$
1	97,26
2	97,39
3	102,45
4	102,35
5	104,19

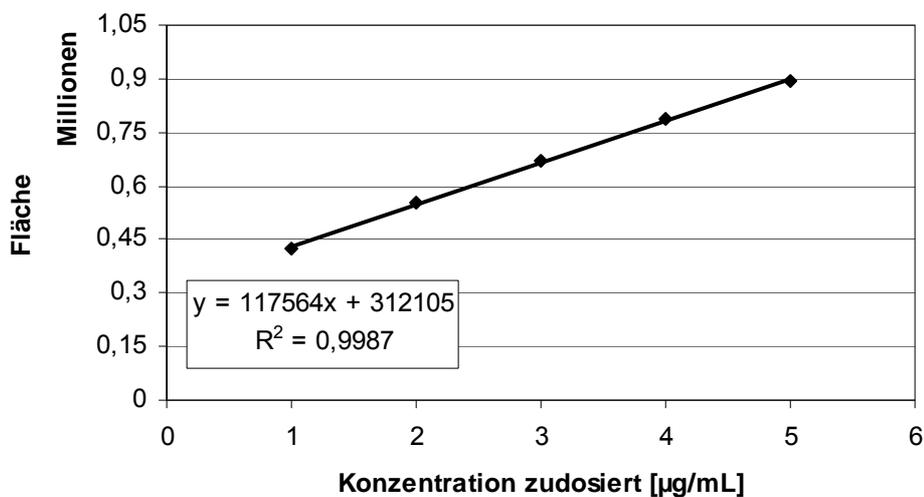
Nordazepam:

Abb. 6.130: Aufstockkurve der Lösung 1 für Nordazepam unter Erhalt von Signal S1

Tabelle 6.17: Lineare Regression mit Dintest® der Aufstockfunktion von Abb. 6.130

Korrelationskoeffizient	0,9993
R/s-Test	Residuen sind normalverteilt
Neumann-Test, 99%	Residuen haben keinen Trend
F-Test, 99%	max. Abweichung kein Ausreisser
Reststandardabweichung s_y	7880,100
Verfahrensstandardabweichung S_x	0,067
VB der Steigung	117564 ± 14555
VB des Achsenabschnitts	312105 ± 48273

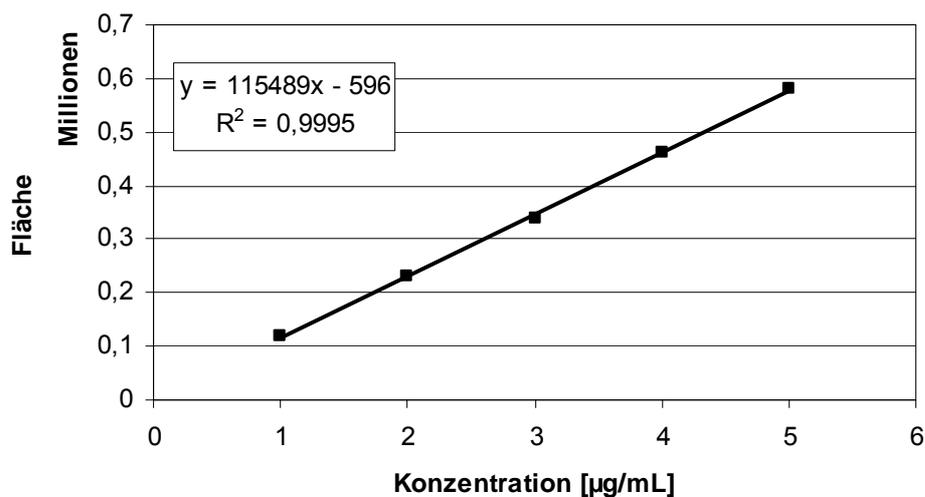


Abb. 6.131: Kalibrierkurve der Lösung 3 für Nordazepam unter Erhalt des Signals S3

Tabelle 6.18: Lineare Regression mit Dintest® der Kalibrierkurve von Abb. 6.131

Korrelationskoeffizient	0,9997
R/s-Test	Residuen sind normalverteilt
Neumann-Test, 99%	Residuen haben keinen Trend
F-Test, 99%	max. Abweichung kein Ausreisser
Reststandardabweichung s_y	4864,087
Verfahrensstandardabweichung S_x	0,042
VB der Steigung	115489 ± 8984
VB des Achsenabschnitts	-596 ± 29798

Tabelle 6.19: Bestimmung der Richtigkeit für Nordazepam

Varianz- F-Test	$F_{\text{tab}}(99\%,4,4) = 15,98$	$\geq F_{\text{err}} = 2,62$
Mittelwert- t-Test	$t_{\text{tab}}(99\%,4) = 4,604$	$\geq t_{\text{err}} = 0,95$

Tabelle 6.20: Bestimmung der Wiederfindung für Nordazepam

zudosierte Konzentration [$\mu\text{g/mL}$]	Wiederfindungsrate $W[\%]$
1	104,11
2	103,89
3	103,70
4	102,14
5	98,34

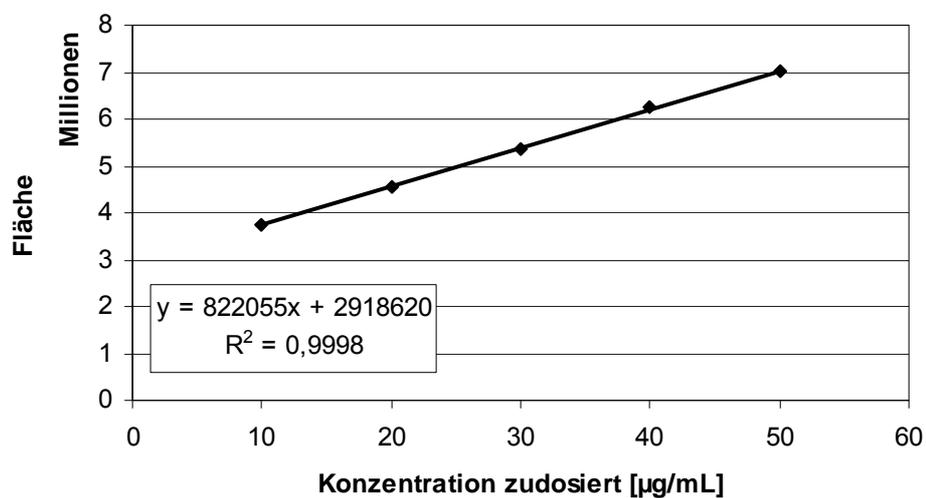
Diazepam:

Abb. 6.132: Aufstockkurve der Lösung 1 für Diazepam unter Erhalt von Signal S1

Tabelle 6.21: Lineare Regression mit Dintest® der Aufstockkurve von Abb. 6.132

Korrelationskoeffizient	0,9999
R/s-Test	Residuen sind normalverteilt
Neumann-Test, 99%	Residuen haben keinen Trend
F-Test, 99%	max. Abweichung kein Ausreisser
Reststandardabweichung s_y	23353,398
Verfahrensstandardabweichung S_x	0,028
VB der Steigung	822055 ± 43135
VB des Achsenabschnitts	2918620 ± 143063

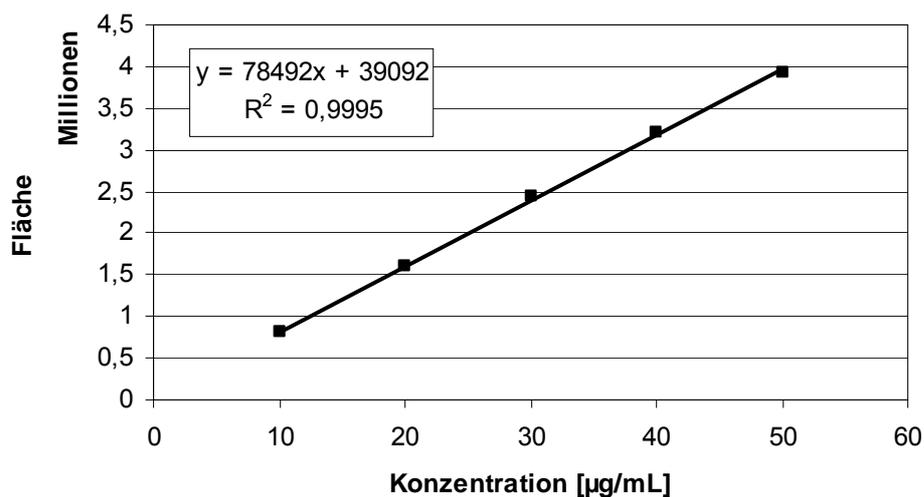


Abb. 6.133: Kalibrierkurve von Lösung 3 für Diazepam unter Erhalt von Signal S3

Tabelle 6.22: Lineare Regression mit Dintest® der Kalibrierkurve von Abb. 6.133

Korrelationskoeffizient	0,9997
R/s-Test	Residuen sind normalverteilt
Neumann-Test, 99%	Residuen haben keinen Trend
F-Test, 99%	max. Abweichung kein Ausreisser
Reststandardabweichung s_y	33215,202
Verfahrensstandardabweichung S_x	0,042
VB der Steigung	784920 ± 61350
VB des Achsenabschnitts	39092 ± 203476

Tabelle 6.23: Bestimmung der Richtigkeit für Diazepam

Varianz- F-Test	$F_{\text{tab}}(99\%,4,4) = 15,98$	$\geq F_{\text{err}} = 2,02$
Mittelwert- t-Test	$t_{\text{tab}}(99\%,4) = 4,604$	$\geq t_{\text{err}} = 3,56$

Tabelle 6.24: Bestimmung der Wiederfindung für Diazepam

zudosierte Konzentration [$\mu\text{g/mL}$]	Wiederfindungsrate $W[\%]$
10	103,29
20	102,42
30	101,14
40	102,68
50	103,25

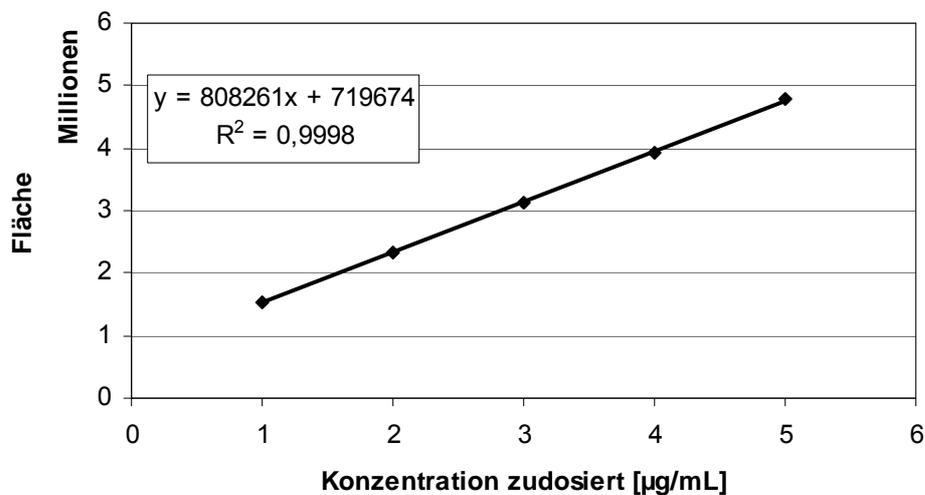
Diazepam-N-oxid:

Abb. 6.134: Aufstockkurve der Lösung 1 für Diazepam-N-oxid unter Erhalt des Signals S1

Tabelle 6.25: Lineare Regression mit Dintest® der Aufstockfunktion von Abb. 6.134

Korrelationskoeffizient	0,9998
R/s-Test	Residuen sind normalverteilt
Neumann-Test, 99%	Residuen haben keinen Trend
F-Test, 99%	max. Abweichung kein Ausreisser
Reststandardabweichung s_y	26870,564
Verfahrensstandardabweichung S_x	0,033
VB der Steigung	808261 ± 49631
VB des Achsenabschnitts	714819 ± 164609

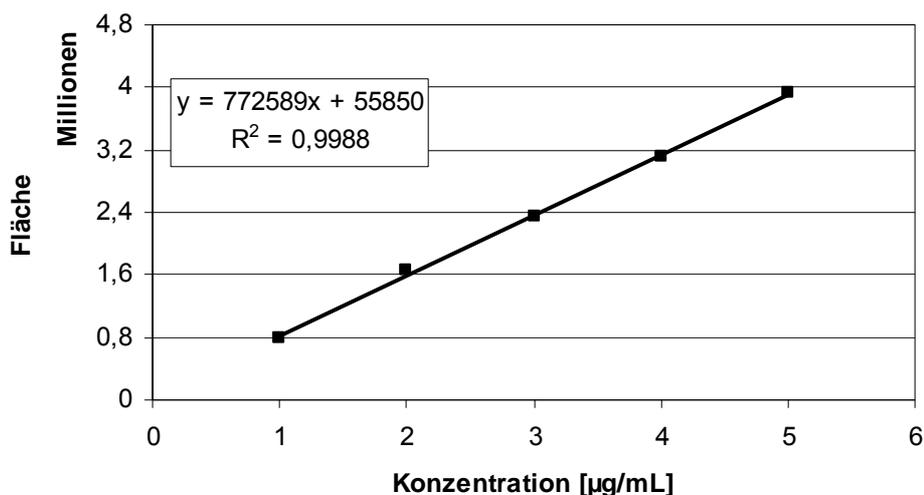


Abb. 6.135: Kalibrierkurve der Lösung 3 für Diazepam-N-oxid unter Erhalt des Signals S3

Tabelle 6.26: Lineare Regression mit Dintest® der Kalibrierkurve von Abb. 6.135

Korrelationskoeffizient	0,9994
R/s-Test	Residuen sind normalverteilt
Neumann-Test, 99%	Residuen haben keinen Trend
F-Test, 99%	max. Abweichung kein Ausreisser
Reststandardabweichung s_y	49599,563
Verfahrensstandardabweichung S_x	0,064
VB der Steigung	772589 ± 91613
VB des Achsenabschnitts	55850 ± 303847

Tabelle 6.27: Bestimmung der Richtigkeit von Diazepam-N-oxid

Varianz- F-Test	$F_{\text{tab}}(99\%,4,4) = 15,98$	$\geq F_{\text{err}} = 3,41$
Mittelwert- t-Test	$t_{\text{tab}}(99\%,4) = 4,604$	$\geq t_{\text{err}} = 4,098$

Tabelle 6.28: Bestimmung der Wiederfindung für Diazepam-N-oxid

zudosierte Konzentration [$\mu\text{g/mL}$]	Wiederfindungsrate $W[\%]$
1	100,17
2	100,92
3	99,29
4	100,59
5	100,94

Bestimmung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze wurden nach DIN 32645 berechnet und ergaben folgende Werte:

Tabelle 6.29: Bestimmung von Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze

	Oxazepam	Temazepam	Nordazepam	Diazepam	Diazepam-N-oxid
Nachweisgrenze [$\mu\text{g/mL}$]	0,144	0,279	0,187	1,930	2,945
Erfassungsgrenze [$\mu\text{g/mL}$]	0,229	0,558	0,374	3,859	5,890
Bestimmungsgrenze [$\mu\text{g/mL}$]	0,323	0,965	0,641	6,446	9,460

Selektivität und Spezifität:

Tabelle 6.30: Angabe der Retentionszeiten der Sauerstoffdonatoren und ihrer deoxygenierten Produkte in Anwesenheit der Kalibriersubstanzen

Sauerstoffdonator	Retentionszeit	Deoxygenierte Form	Retentionszeit
<i>m</i> -CPBA	10,7 min	Chlorbenzoesäure	5,9 min
MMPP	3,6 min	Phthalsäure	3,6 min
PhIO	41,0 min	Iodbenzol	40,5 min

Tabelle 6.34: Messdaten zur Umsetzung von Diazepam mit Mn(III)-acetat und diversen Sauerstoffdonatoren unter Schüttelbedingungen bei 82°C, Angaben in [%]

Ansatz	<i>m</i> -CPBA		MMPP		H ₂ O ₂		H ₂ O ₂ + Im		PhIO	
	DZP	DNO	DZP	DNO	DZP	DNO	DZP	DNO	DZP	DNO
Mw	71,15	5,83	4,75	70,55	94,32	n.d.	95,04	n.d.	82,50	n.d.
Stabw	4,14	1,58	0,51	1,88	3,83	-	3,41	-	4,24	-

Tabelle 6.35: Messdaten zur Umsetzung von Diazepam mit Mn(III)-acetat und diversen Sauerstoffdonatoren unter Schüttelbedingungen bei 25°C, Angaben in [%]

Ansatz	<i>m</i> -CPBA		MMPP		H ₂ O ₂		H ₂ O ₂ + Im		PhIO	
	DZP	DNO	DZP	DNO	DZP	DNO	DZP	DNO	DZP	DNO
MW	78,48	7,82	94,17	4,02	101,39	n.d.	93,47	n.d.	93,46	n.d.
Stabw	2,99	0,51	2,97	0,61	4,14	-	9,35	-	3,99	-

Tabelle 6.36: Messdaten zur Umsetzung von Diazepam mit Mn(III)-acetat und diversen Sauerstoffdonatoren unter MW-Bedingungen bei 82°C, Angaben in [%]

Ansatz	<i>m</i> -CPBA		MMPP		H ₂ O ₂		H ₂ O ₂ + Im		PhIO	
	TZP	NZP	TZP	NZP	TZP	NZP	TZP	NZP	TZP	NZP
Mw	1,01	0,94	0,49	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,45
Stabw	0,16	0,17	0,31	-	-	-	-	-	-	0,04

Tabelle 6.37: Messdaten zur Umsetzung von Diazepam mit Mn(III)-acetat und diversen Sauerstoffdonatoren unter MW-Bedingungen bei 25°C, Angaben in [%]

	Mw	Stabw
<i>m</i>-CPBA	TZP	TZP
	1,01	0,16

Tabelle 6.38: Messdaten zur Umsetzung von Diazepam mit Mn(III)-acetat und diversen Sauerstoffdonatoren unter MW-Bedingungen bei 82°C, Angaben in [%]

Ansatz	<i>m</i> -CPBA		MMPP		H ₂ O ₂		H ₂ O ₂ + Im		PhIO	
	DZP	DNO	DZP	DNO	DZP	DNO	DZP	DNO	DZP	DNO
Mw	73,38	6,73	4,50	84,91	97,72	n.d.	103,63	n.d.	88,94	-
Stabw	7,20	1,91	0,78	26,14	2,71	-	4,72	-	5,02	-

Tabelle 6.39: Messdaten zur Umsetzung von Diazepam mit Mn(III)-acetat und diversen Sauerstoffdonatoren unter MW-Bedingungen bei 25°C, Angaben in [%]

Ansatz	<i>m</i> -CPBA		MMPP		H ₂ O ₂		H ₂ O ₂ + Im		PhIO	
	DZP	DNO	DZP	DNO	DZP	DNO	DZP	DNO	DZP	DNO
Mw	71,65	7,87	86,47	4,82	101,96	n.d.	100,25	n.d.	97,48	n.d.
Stabw	7,52	2,74	5,05	0,72	1,20	-	4,30	-	2,08	-

6.2.3 Vorschrift zur Immobilisierung der verwendeten Metalloporphyrine

AV 1: Allgemeine Vorschrift zur Immobilisierung von Mn/FeTFPPCl und Mn/FeT4MPyPCI

250 mg Aminopropylkieselgel (Fluka, 35-70 µm, 0,9 mmol/g ± 0,1 T Aminogruppen) für Mn/FeTFPPCl oder 250 mg Kieselgel 60 (Merck, 40-63 µm) für Mn/FeT4MPyPCI wurden mit 50 mg des entsprechenden Metalloporphyrins in ein 10 mL Mikrowellengefäß eingewogen. 300 µL Methanol und ein Magnetrührer wurden dem Ansatz zugesetzt. Nach einer kurzen Durchmischung mittels Magnetrührer wurde das Methanol unter vermindertem Druck entfernt. Die Synthesemikrowelle wurde mit einer Maximalleistung von 300 Watt, einem Maximaldruck von 18 bar und einer Temperatur von 200°C programmiert. Gleichzeitig wurde die Funktion des *Powermaxcooling* aktiviert, die die Probe während der Reaktionszeit kühlt. Durch diese Einstellung erreichte der Reaktionsansatz keine Temperatur von

200°C, ermöglichte aber das Erreichen der Maximalleistung von 300 Watt. Die Probe wurde während der Bestrahlung gerührt. Die Reaktionszeit betrug 10 Minuten mit einer Vorlaufzeit von 60 Sekunden.

Nach der Reaktion wurde die Probe in ein mit Filterpapier ausgekleideten Trichter überführt und mit jeweils 10 mL Ethanol, Chloroform und Acetonitril gewaschen. Anschließend wurde die gewaschene Probe für eine Stunde in einer Soxhlet-Apparatur mit Dichlormethan zusätzlich gereinigt, gefolgt von einer 24-stündigen Trocknungsphase bei 80°C im Trockenschrank.

6.2.4 Methode zur Quantifizierung der immobilisierten Metalloporphyrine

AV 2: Allgemeine Vorschrift für die Quantifizierung von MnT4MPyPcI und FeT4MPyPcI

0,500 mg immobilisiertes Fe/MnT4MPyPcI wurden in 10,0 mL 2 M HCl für 10 min geschüttelt. Es wurde 30 s gewartet bis das Trägermaterial auf den Boden des Messkolbens abgesunken war. Der Überstand wurde abpipettiert, 1:1 verdünnt und in einer 10 mm Quarzküvette gegen 2 M HCl bei einer Wellenlänge von 464 nm für MnT4MPyPcI und 403 nm für FeT4MPyPcI je dreimal bei Raumtemperatur vermessen.

Kalibrierung zur Quantifizierung von Mn/FeT4MPyPcI:

Zur Erstellung einer Kalibrierkurve zur Quantifizierung von immobilisiertem Mn/FeT4MPyPcI wurde je dreimal eine 1,000 mg/mL Stammlösung aus löslichem FeT4MPyPcI und MnT4MPyPcI in 2M HCl hergestellt. Aus den Stammlösungen wurden je 15 µL, 30 µL, 45 µL, 60 µL, 75 µL und 90 µL abgenommen und mit 2M HCl auf 10,0 mL verdünnt. Die Ansätze wurden 10 min geschüttelt und 30 s stehen gelassen. Jede Lösung wurde in einer 10 mm Quarzküvette dreimal gegen 2 M HCl bei 403 nm für FeT4MPyPcI und

bei 464 nm für MnT4MPyPCL vermessen. Die Untersuchungen erfolgten bei Raumtemperatur. Das Auftragen der gemessenen und gemittelten Absorption gegen die Konzentration, ergaben folgende Kalibrierkurven:

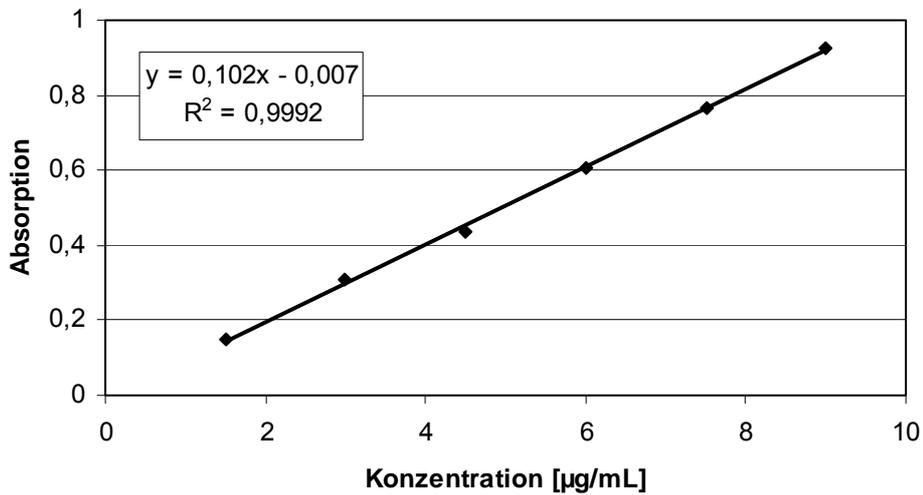


Abb. 6.136: Kalibrierkurve zur Quantifizierung von immobilisiertem FeT4MPyPCL

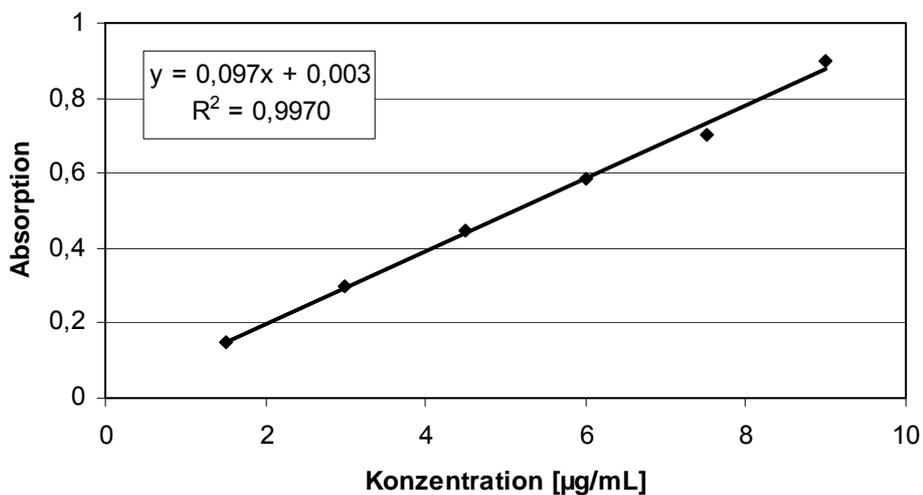


Abb. 6.137: Kalibrierkurve zur Quantifizierung von immobilisiertem MnT4MPyPCL

AV 3: Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Quantifizierung von MnTFPPCl und FeTFPPCl

2,500 mg immobilisiertes Mn/FeTFPPCl wurden unter Zusatz von 100 mg Natriumfluorid in 10,0 mL konzentrierter Schwefelsäure suspendiert. Anschließend wurden die Ansätze für 20 min bei 80°C gerührt. Nach zweiminütiger Abkühl- und Ruhephase wurde der Überstand abpipettiert und 1:3 verdünnt. In einer 10 mm Kunststoffküvette wurden die Proben bei 377 nm für MnTFPPCl und bei 434 nm für FeTFPPCl je dreimal gegen konzentrierte Schwefelsäure bei Raumtemperatur vermessen.

Kalibrierung zur Quantifizierung von Mn/FeTFPPCl

Zur Erstellung einer Kalibrierkurve für die Quantifizierung von immobilisiertem Mn/FeTFPPCl wurde je dreimal eine 1,000 mg/mL Stammlösung aus löslichem MnTFPPCl bzw. FeTFPPCl in konzentrierter Schwefelsäure hergestellt. Aus den Stammlösungen wurden je 25 µL, 45 µL, 65 µL, 85 µL und 105 µL abgenommen und mit konzentrierter Schwefelsäure auf ca. 9 mL aufgefüllt. Nach Zusatz von 100 mg Natriumfluorid wurde zu 10,0 mL mit konzentrierter Schwefelsäure aufgestockt. Die Ansätze wurden 20 min bei 80°C unter Rühren erwärmt. Nach einer Abkühlphase von zwei Minuten wurden die Proben bei 377 nm für MnTFPPCl und bei 434 nm für FeTFPPCl je dreimal gegen konzentrierte Schwefelsäure bei Raumtemperatur vermessen. Die gemessenen und gemittelten Absorptionen, aufgetragen gegen die Konzentration, ergaben folgende Kalibrierkurven:

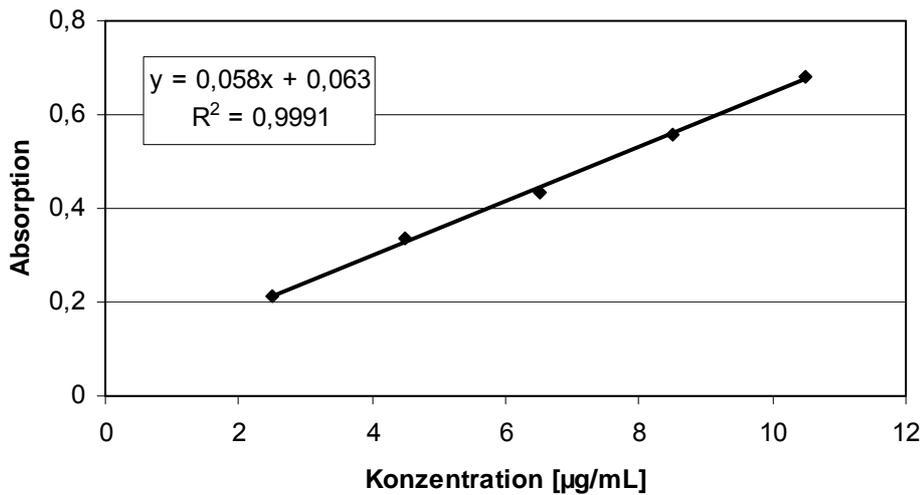


Abb. 6.138: Kalibrierkurve zur Quantifizierung von immobilisiertem MnTFPPCl

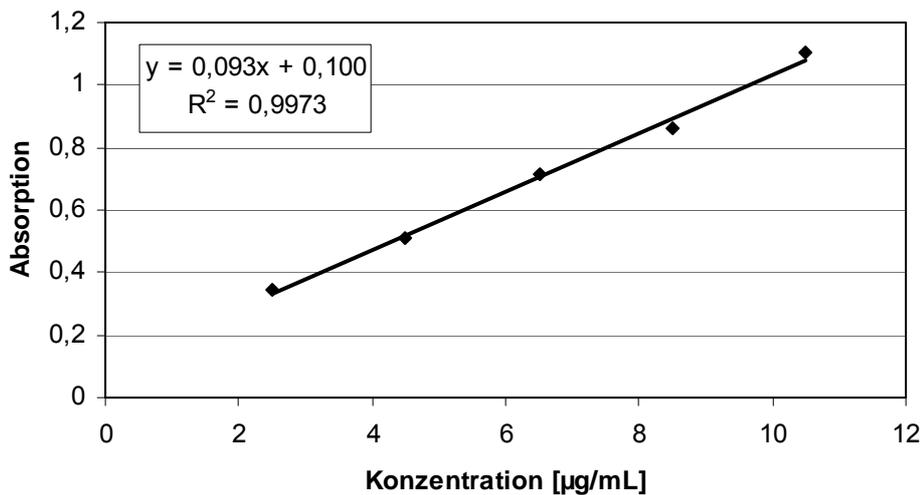


Abb. 6.139: Kalibrierkurve zur Quantifizierung von immobilisiertem FeTFPPCl

Die Ermittlung der Belegung aller verwendeten Metalloporphyrine an entsprechendem Trägermaterial erfolgt unter Verwendung der berechneten Regressionsgleichungen.

Messdaten zur Immobilisierung ohne Lösungsmittel:*Tabelle 6.40: Prozentuale Belegung der verwendeten Metalloporphyrine am Trägermaterial nach Immobilisierung in der MW ohne Lösungsmittel*

	Einwaage (immob.) [mg]	Absorption	Belegung [%]	Mw [%]	Stabw [%]
MnT4MPypCl	0,456	0,416	9,47	9,86	0,65
	0,416	0,381	9,51		
	0,634	0,662	10,61		
FeT4MPypCl	0,463	0,335	14,48	14,27	0,18
	0,512	0,363	14,17		
	0,424	0,299	14,16		
MnTFPPCl	2,342	0,324	7,09	7,91	0,96
	2,656	0,345*	7,66		
	2,362	0,327	8,97		
FeTFPPCl	2,918	0,693	8,74	7,11	1,41
	2,224	0,429	6,37		
	2,272	0,429	6,23		

*Verdünnung dieser Probe 1:4

6.2.5 Vorschrift und Messdaten zur Ermittlung des optimalen Lösungsmittels

AV 4 Allgemeine Vorschrift für die Untersuchung in unterschiedlichen Lösungsmitteln

In Anlehnung an AV 5 (siehe Kapitel 6.2.10) wurden 2 μmol des nach AV 1 (siehe Kapitel 6.2.3) immobilisierten MnT4MPyPcI in ein Mikrowellengefäß eingewogen. 20 μmol des Substrats in 100 μL einer Stammlösung, sowie 80 μmol des Sauerstoffdonators und entsprechendes Lösungsmittel wurden hinzugegeben. Wasserstoffperoxid wurde allein und

in Kombination nach AV 5 mit Imidazol eingesetzt. Es sollte ein Probenvolumen von 1000 μL entstehen. Die Diazepamstammlösungen wurden jeweils im zu untersuchenden Lösungsmittel hergestellt mit Ausnahme von Wasser und 0,25 M Salzsäure. Es werden Ethanol-, Methanol-, Acetonitril- und Dichlormethanstammlösungen bereitet. 100 μL der Ethanolstammlösung wurden aus Gründen der Löslichkeit den Wasser- und Salzsäureproben zugesetzt. Nach Versetzen der Reaktionsansätze mit einem Magnetrührer wurden diese für 10 min bei der Siedetemperatur des jeweiligen Lösungsmittels und einer Maximalleistung von 300 Watt, sowie einem Maximaldruck von 18 bar in der Synthesemikrowelle unter Rühren bestrahlt. Anschließend wurden die Proben membranfiltriert und analysiert.

	ACN	CH_2Cl_2	Ethanol	Methanol	Wasser	0,25M HCl
ST	82°C	40°C	78°C	65°C	100°C	100°C

Messdaten:

Die Messdaten wurden als Mittelwerte aus 3 Messungen mit Standardabweichung dargestellt. Bei Verwendung von Ethanol und Methanol wurden weder Metabolite noch Diazepam-N-oxid detektiert. Die Angaben erfolgten als Mittelwert aus drei Bestimmungen in Prozent bezogen auf 100 % Ausgangssubstrat.

Wasser	OZP		TZP		NZP	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
MMPP	n.d.	-	0,43	0,38	0,29	0,57
<i>m</i> -CPBA	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	-
PhIO	n.d.	-	0,66	0,59	n.d.	-
H_2O_2	n.d.	-	0,26	0,13	0,24	0,09
H_2O_2 +Im	n.d.	-	0,23	0,14	0,24	0,12

0,25 M HCl	OZP		TZP		NZP	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
MMPP	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
<i>m</i> -CPBA	n.d.	-	0,97	0,95	n.d.	-
PhIO	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
H ₂ O ₂	n.d.	-	0,42	0,36	n.d.	-
H ₂ O ₂ +Im	n.d.	-	0,38	0,25	n.d.	-

CH₂Cl₂	OZP		TZP		NZP	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
MMPP	n.d.	-	3,85	0,78	0,66	0,58
<i>m</i> -CPBA	n.d.	-	2,05	0,72	0,89	0,19
PhIO	0,44	0,13	5,66	0,98	2,11	0,24
H ₂ O ₂	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
H ₂ O ₂ +Im	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-

ACN	OZP		TZP		NZP	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
MMPP	n.d.	n.d.	2,82	0,55	1,47	0,48
<i>m</i> -CPBA	0,29	0,28	7,29	2,08	0,61	0,56
PhIO	n.d.	-	7,90	3,17	1,57	0,52
H ₂ O ₂	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
H ₂ O ₂ +Im	n.d.	-	n.d.	-	0,47	0,41

6.2.6 Messdaten zur Bestimmung der optimalen Synthesebedingungen

Die Messergebnisse wurden als Mittelwert aus 3 Bestimmungen mit Standardabweichung angegeben. Die Angaben erfolgten in Prozent bezogen auf 100 % Ausgangssubstrat.

MMPP								
	OZP		TZP		NZP		DNO	
Bedingungen	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
Referenz (82°C)	2,16	0,27	13,47	0,92	4,82	0,37	5,92	0,77
PMC (82°C)	1,51	0,24	13,00	1,16	4,61	0,25	6,20	0,86
oPMC (120°C)	0,09	0,16	7,85	4,57	3,23	1,98	5,61	0,51

<i>m</i> -CPBA								
	OZP		TZP		NZP		DNO	
Bedingungen	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
Referenz (82°C)	1,11	0,34	8,77	0,86	3,73	0,82	3,69	0,28
PMC (82°C)	1,49	0,09	10,02	0,67	5,36	0,50	4,05	0,25
oPMC (120°C)	0,17	0,25	8,38	1,81	5,45	1,31	3,43	0,06

PhIO								
	OZP		TZP		NZP		DNO	
Bedingungen	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
Referenz (82°C)	4,38	1,41	16,88	1,19	5,89	1,43	n.d.	-
PMC (82°C)	0,84	0,18	6,96	1,75	3,63	0,51	n.d.	-
oPMC (120°C)	1,33	0,16	12,57	0,88	6,50	0,17	n.d.	-

6.2.7 Vorschrift und Messdaten zur Bestimmung der Aktivität

Es wurden drei Immobilisierungschargen mit der Bezeichnung A, B und C für MnTFPPCl und MnT4MPyPcI hergestellt. Die Umsetzung mit Sauerstoffdonator und Substrat erfolgte nach AV 5 (siehe Kapitel 6.2.10). Die Ansätze wurden in der Mikrowelle bei 82°C, max. 300 Watt, max. 18 bar und Powermaxcooling 10 min gerührt. Anschließend wird der Katalysator abfiltriert und mit 10 mL Ethanol, 10 mL Chloroform und 10 mL Acetonitril gewaschen. Anschließend wurde der Katalysator eine Stunde bei 50°C im Trockenschrank von Lösungsmittelrückständen befreit. Das getrocknete Porphyrin wurde erneut nach AV 5 (siehe Kapitel 6.2.10) umgesetzt und mit derselben Mikrowellenmethode behandelt. Der Durchgang wurde noch ein drittes Mal wiederholt. Es resultierten drei Zyklen mit demselben Katalysator. Die Ansätze analysierte man mittels HPLC.

Die Messdaten wurden als Mittelwert aus drei Bestimmungen mit Standardabweichung in Prozent bezogen auf einen 100%-Diazepamausgangswert angegeben:

PhIO/MnT4MPyPcI								
	OZP		TZP		NZP		DNO	
Charge/Zyklus	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
A1,B1,C1	1,57	0,57	14,27	2,45	4,57	0,69	n.d.	-
A2,B2,C2	1,72	0,73	12,33	2,26	4,23	1,59	n.d.	-
A3,B3,C3	2,19	0,40	14,38	1,89	4,30	0,56	n.d.	-

PhIO/MnTFPPCl								
	OZP		TZP		NZP		DNO	
Charge/Zyklus	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
A1,B1,C1	0,61	0,12	4,37	1,62	2,48	0,45	n.d.	-
A2,B2,C2	0,46	0,19	4,61	2,00	2,09	1,12	n.d.	-
A3,B3,C3	0,60	0,07	4,88	1,85	2,04	1,23	n.d.	-

<i>m</i> -CPBA/MnT4MPyPCl								
	OZP		TZP		NZP		DNO	
Charge/Zyklus	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
A1,B1,C1	0,03	0,04	3,30	0,79	1,26	0,30	1,17	0,14
A2,B2,C2	0,21	0,33	3,63	1,42	1,78	0,76	2,01	0,69
A3,B3,C3	0,08	0,15	2,02	1,45	0,87	0,51	3,15	1,20

<i>m</i> -CPBA/MnTFPPCl								
	OZP		TZP		NZP		DNO	
Charge/Zyklus	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
A1,B1,C1	0,75	0,08	8,01	0,70	5,78	1,85	0,34	0,08
A2,B2,C2	0,62	0,20	6,59	0,87	3,76	0,24	0,40	0,04
A3,B3,C3	0,29	0,18	3,86	1,77	1,97	1,08	1,49	0,51

MMPP/MnT4MPyPCl								
	OZP		TZP		NZP		DNO	
Charge/Zyklus	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
A1,B1,C1	0,38	0,66	4,70	4,22	1,56	1,58	25,52	18,92
A2,B2,C2	n.d.	-	2,92	1,83	1,06	0,45	34,81	19,72
A3,B3,C3	n.d.	-	0,50	0,17	0,31	0,12	53,79	12,04

MMPP/MnTFPPCl								
	OZP		TZP		NZP		DNO	
Charge/Zyklus	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
A1,B1,C1	0,56	0,18	3,89	0,63	1,11	0,48	22,27	4,05
A2,B2,C2	0,55	0,22	2,73	0,72	0,81	0,13	30,90	5,81
A3,B3,C3	0,21	0,07	0,92	0,09	0,32	0,03	59,76	3,38

H ₂ O ₂ /MnT4MPyPCl								
	OZP		TZP		NZP		DNO	
Charge/Zyklus	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
A1,B1,C1	n.d.	-	0,51	0,09	0,26	0,003	n.d.	-
A2,B2,C2	n.d.	-	0,72	0,29	0,28	0,02	n.d.	-
A3,B3,C3	n.d.	-	0,27	0,05	n.d.	-	n.d.	-

H ₂ O ₂ /MnTFPPCl								
	OZP		TZP		NZP		DNO	
Charge/Zyklus	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
A1,B1,C1	n.d.	-	0,22	0,01	n.d.	-	n.d.	-
A2,B2,C2	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
A3,B3,C3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-

H ₂ O ₂ +Imidazol/MnT4MPyPCl								
	OZP		TZP		NZP		DNO	
Charge/Zyklus	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
A1,B1,C1	n.d.	-	0,52	0,005	0,27	0,009	n.d.	-
A2,B2,C2	n.d.	-	0,78	0,44	0,45	0,26	n.d.	-
A3,B3,C3	n.d.	-	0,44	0,25	0,23	0,03	n.d.	-

H ₂ O ₂ +Imidazol/MnTFPPCl								
	OZP		TZP		NZP		DNO	
Charge/Zyklus	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
A1,B1,C1	n.d.	-	0,56	0,14	0,29	0,03	n.d.	-
A2,B2,C2	n.d.	-	0,40	0,02	0,25	0,01	n.d.	-
A3,B3,C3	n.d.	-	0,33	0,07	0,26	0,02	n.d.	-

H ₂ O ₂ zehnfach/MnT4MPyPCl								
	OZP		TZP		NZP		DNO	
Charge/Zyklus	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
A1,B1,C1	0,03	0,05	0,05	0,05	1,11	0,21	n.d.	-
A2,B2,C2	n.d.	-	0,36	0,08	0,16	0,28	n.d.	-
A3,B3,C3	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-

H ₂ O ₂ zehnfach/MnTFPPCl								
	OZP		TZP		NZP		DNO	
Charge/Zyklus	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
A1,B1,C1	n.d.	-	0,21	0,04	0,23	0,05	n.d.	-
A2,B2,C2	n.d.	-	0,26	0,11	n.d.	-	n.d.	-
A3,B3,C3	n.d.	-	0,27	0,18	n.d.	-	n.d.	-

6.2.8 Messdaten zu den Blindversuchen

In den folgenden Tabellen wurden die Messdaten für Diazepam und Diazepam-N-oxid der Blindversuche dargestellt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert aus 3 Ansätzen mit Standardabweichung in Prozent bezogen auf einen 100 % Diazepamausgangswert angegeben.

<i>m</i> -CPBA	Aminopropylkieselgel				Kieselgel 60			
	DZP		DNO		DZP		DNO	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
Mikrowelle ST	0,07	0,04	83,30	1,59	n.d.	-	34,99	2,56
Mikrowelle RT	n.d.	-	83,46	1,60	n.d.	-	70,05	1,46
Schütteln ST	n.d.	-	72,22	10,23	n.d.	-	68,66	15,59
Schütteln RT	n.d.	-	82,94	13,70	n.d.	-	85,15	1,46

MMPP	Aminopropylkieselgel				Kieselgel 60			
	DZP		DNO		DZP		DNO	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
Mikrowelle ST	3,62	1,04	81,58	2,67	1,37	0,48	76,17	5,47
Mikrowelle RT	93,80	0,17	6,60	1,11	76,26	1,41	22,71	2,12
Schütteln ST	14,61	4,64	81,66	1,51	4,55	2,30	89,63	1,12
Schütteln RT	98,07	1,69	5,48	1,01	92,88	7,38	7,53	1,07

H ₂ O ₂	Aminopropylkieselgel				Kieselgel 60			
	DZP		DNO		DZP		DNO	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
Mikrowelle ST	94,08	5,07	3,31	1,73	101,84	1,61	3,60	1,44
Mikrowelle RT	103,38	3,43	0,93	0,14	104,81	1,05	n.d.	-
Schütteln ST	100,08	3,23	4,99	0,39	100,53	10,46	2,89	0,14
Schütteln RT	102,70	3,07	1,35	0,14	103,50	2,33	1,39	0,27

PhIO	Aminopropylkieselgel				Kieselgel 60			
	DZP		DNO		DZP		DNO	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
Mikrowelle ST	95,08	2,61	n.d.	-	101,05	1,00	n.d.	-
Mikrowelle RT	104,44	0,99	n.d.	-	103,41	1,74	n.d.	-
Schütteln ST	102,17	3,26	n.d.	-	104,28	2,20	n.d.	-
Schütteln RT	103,22	2,25	n.d.	-	102,63	4,47	n.d.	-

Angabe der Ausbeuten an Temazepam unter Mikrowellenbedingungen bei 82°C im Rahmen der Blindversuche:

	Aminopropylkieselgel		Aminopropylkieselgel		Kieselgel 60	
	<i>m</i> -CPBA		MMPP		MMPP	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
TZP	0,52	0,09	0,24	0,01	0,28	0,01

6.2.9 Analytische Daten zur Identifizierung des unbekanntes Produktes

Vorversuche:

Herstellung der Untersuchungslösung

0,2 mmol Diazepam und 0,8 mmol MMPP wurden in 10 mL ACN suspendiert und 10 min unter Rückflußkühlung zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der Ansatz filtriert und als Ausgangslösung für die Einzelnachweise herangezogen.

Nachweis auf die pseudoaromatische primäre Aminogruppe

Es wurden 4 Lösungen, jeweils mit einem Volumen von 1 mL, hergestellt:

Lösung 1: Untersuchungslösung 1:10 mit Ethanol verdünnt

Lösung 2: 8 μmol MMPP in 1 Teil ACN und 9 Teilen EtOH

Lösung 3: 1 Teil ACN und 9 Teilen EtOH

Lösung 4: 2 μmol Sulfanilamid in 1 Teil ACN und 9 Teilen EtOH

Alle Lösungen wurden mit dem gleichen Volumen 1N HCl auf einen pH-Wert von 1-2 eingestellt. Anschließend wurden 0,5 mL wässriger NaNO_2 -Lösung (2g/100ml) hinzugefügt und 3 min geschüttelt. Zum Schluss fügte man 0,5 mL des Bratton-Marshall-Reagenzes (N-(1-Naphthyl) ethylendiamin-dihydrochlorid) (1g/100 mL) hinzu.

Nachweis auf Ameisensäure nach Tollens

Es werden 4 Lösungen, jeweils mit einem Volumen von 1 mL, hergestellt:

Lösung 1: Untersuchungslösung in ACN

Lösung 2: 80 μmol MMPP in ACN

Lösung 3: ACN

Lösung 4: 20 μmol Ameisensäure in ACN

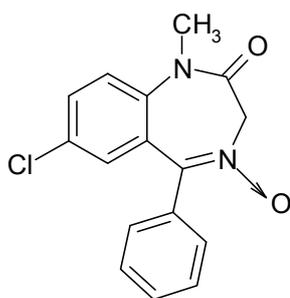
1 mL der jeweiligen Lösungen wurden mit 2 mL Aqua bidest und 2 mL Silbernitratlösung (17g/L) versetzt. Nach Zusatz von verdünnter Ammoniaklösung (14 g konzentrierte Ammoniaklösung auf 100 mL) bis zur schwach alkalischen Reaktion wurde im Wasserbad erhitzt.

Synthese von Diazepam-N-oxid:

Die Synthese von Diazepam-N-oxid erfolgt in Anlehnung an die von *Hansen* und *Boyd* erstellte Vorschrift [121]. 1,87 g *m*-CPBA wurden in 12,5 mL und 2,37 g Diazepam in 4,2 mL Dichlormethan gelöst. Die *m*-CPBA-Lösung

wurde tropfenweise zur Diazepam-Lösung unter Rühren hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde kräftig gerührt und 2 Stunden unter Rückfluß erwärmt ($< 50^{\circ}\text{C}$). Nach erfolgter Reaktion wurde das Dichlormethan unter vermindertem Druck entfernt und in 85 mL Diethylether aufgenommen. Anschließend leitete man für 5 min Ammoniakgas in den Reaktionsansatz ein. Das hierdurch erzeugte Ammoniumsalz der Chlorbenzoesäure filtrierte man ab. Nach Entfernen des Diethylethers unter vermindertem Druck wurde aus n-Hexan umkristallisiert. Im Anschluß erfolgte eine Reinigung mittels Flashchromatographie an Kieselgel 60 mit Toluol und ACN.

Analytische Daten zu Diazepam-N-oxid:



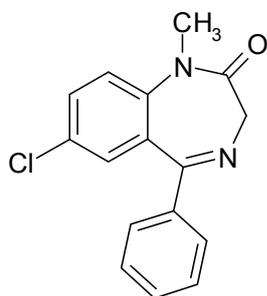
Ausbeute: 58 %

IR: 1678 cm^{-1} (C=O); 1360 ($\equiv\text{N}\rightarrow\text{O}$)

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3.49 (s, 3H, N- CH_3), 4.60 (d, 1H, $J = 12.72$ Hz, COCH_2) 4.73 (d, 1H, $J = 12.46$ Hz, COCH_2) 7.14 - 7.71 (8H, aromatisch)

$^{13}\text{C-NMR}$: (101 MHz, CDCl_3) = δ (ppm) 35.82 (N- CH_3), 68.70 (N- CH_2 -C=O), 123.41, 128.62, 130.58, 131.06, 131.13 (tert., aromatisch), 132.43, 140.83 (quart. aromatisch)²

² aufgrund geringer Substanzmengen sind vier quart. und ein tert. Kohlenstoffatom nicht detektierbar

Analytische Daten zu Diazepam:

IR: 1682 cm^{-1} (C=O),

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3) , δ (ppm): 3.39 (s, 3H, N- CH_3),
3.77 (d, 1H, $J=10.68$ Hz , COCH_2), 4.83(d, 1H, $J=10.94$ Hz,
 COCH_2), 7.26 – 7.62 (8H, aromatisch)

$^{13}\text{C-NMR}$: (101 MHz, CDCl_3) = δ (ppm) 35.27 (N- CH_3),
57.36 (N- CH_2 -C=O), 122.95, 128.82 (tert., aromatisch),
129.67 (quart., aromatisch), 129.88, 130.31 (tert., aromatisch),
130,46 (quart., aromatisch), 131.11, 131.87 (tert., aromatisch),
169.32 (C=N), 170.32 (C=O)

6.2.10 Vorschriften und Messdaten zur Anwendung der verschiedenen Modellsysteme

AV 5 Vorschrift zum Vergleich der Mikrowellen- und Schüttelbedingungen bei RT und ST

Zum Vergleich der Synthesebedingungen wurden zwei Apparaturen verwendet, deren Einstellungen für die Synthesedauer im Folgenden tabellarisch aufgeführt sind:

Geräte:	Mikrowellensystem: Discover™ (CEM)	Schüttelapparatur: eppendorf thermomixer comfort 1,5 mL
Bedingung:	RT	RT
Geräteparameter:	Temperatur: 25°C Druck: max 18 bar Leistung: 300 Watt Powermaxcooling: an Reaktionsdauer: 10 min	Temperatur: 25°C Schüttelfrequenz: 300 rpm Reaktionsdauer: 10 min
Bedingung:	ST	ST
Geräteparameter	Temperatur: 82°C Druck: max 18 bar Leistung: 300 Watt Powermaxcooling: an Reaktionsdauer: 10 min	Temperatur: 82°C Schüttelfrequenz: 300 rpm Reaktionsdauer: 10 min

Als Sauerstoffdonatoren fanden *m*-CPBA, MMPP, PhIO und Wasserstoffperoxid Verwendung, sowie Fe/MnT4MPyPCL und Fe/MnTFPPCL als Katalysatoren in immobilisierter und nicht-immobilisierter Form. Imidazol wurde nach Vorschrift von *Battioni* und

Mitarbeitern als Cofaktor nur in Kombination mit Wasserstoffperoxid eingesetzt [59].

Es wird ein gemeinsames Ansatzverhältnis von 1:10:40 (Porphyrin: Diazepam: Sauerstoffdonator) angewendet. 2 μmol des nach AV 1 (siehe Kapitel 6.2.3) immobilisierten Porphyrins oder nicht-immobilisierten Metalloporphyrin wurden in einem Probengefäß vorgelegt. 80 μmol des Sauerstoffdonators, sowie 20 μmol Diazepam in Form von 100 μL einer Stammlösung in ACN und ACN zum finalen Volumen von 1000 μL wurden hinzugegeben. Bei der Verwendung von Wasserstoffperoxid als Sauerstoffdonator wurde vorher eine 80 μmol Stammlösung aus 30% iger Wasserstoffperoxidlösung in ACN hergestellt und in Form von 100 μL zum Ansatz gegeben. Wurde dem Wasserstoffperoxidansatz Imidazol zugesetzt, erfolgt dies ebenfalls mittels einer Stammlösung. Hierbei wurde nach Vorschrift von *Battioni* und Mitarbeiter ein 20-facher Überschuss, bezogen auf das eingewogene Porphyrin, dem Ansatz hinzugegeben [59]. Demnach werden 40 μmol Imidazol in Form einer 100 μL Stammlösung der Probe zugesetzt. Nachdem die Proben 10 min in der jeweiligen Syntheseapparatur und den entsprechenden Bedingungen reagieren konnten, wurden sie mit Hilfe eines Spritzenfilters membranfiltriert und nach einem Verdünnungsschritt von 1:100 analysiert.

Messdaten zum Vergleich der Mikrowellen- und Schüttelbedingungen bei RT und ST

Die Messdaten wurden als Mittelwert aus drei Bestimmungen mit Standardabweichung in Prozent bezogen auf einen 100%-Diazepamausgangswert angegeben:

Tabelle 6.41: Messdaten der Umsetzung diverser immobilisierter Metalloporphyrine unter verschiedenen Reaktionsbedingungen mit *m*-CPBA

<i>m</i> -CPBA						
	OZP		TZP		NZP	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
MW 82°C						
MnTFPPCl	0,75	0,08	8,01	0,70	5,78	1,85
MnT4MPyPcI	0,03	0,04	3,30	0,79	1,26	0,3
FeTFPPCl	n.d.	-	0,48	0,10	n.d.	-
FeT4MPyPcI	n.d.	-	0,61	0,23	n.d.	-
Schütteln 82°C						
MnTFPPCl	2,81	1,35	14,16	1,74	5,49	0,58
MnT4MPyPcI	n.d.	-	3,89	2,09	1,92	0,66
FeTFPPCl	n.d.	-	0,71	0,08	n.d.	-
FeT4MPyPcI	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
MW 25°C						
MnTFPPCl	0,92	0,61	10,38	3,86	2,61	0,65
MnT4MPyPcI	0,29	0,14	3,99	0,58	1,21	0,10
FeTFPPCl	n.d.	-	1,82	0,25	0,38	0,17
FeT4MPyPcI	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
Schütteln 25°C						
MnTFPPCl	0,43	0,27	4,18	2,47	2,02	0,52
MnT4MPyPcI	0,93	0,26	4,80	0,39	2,02	0,95
FeTFPPCl	n.d.	-	1,52	0,18	n.d.	-
FeT4MPyPcI	n.d.	-	0,91	0,14	n.d.	-

Tabelle 6.42: Messdaten der Umsetzung diverser nicht-immobilisierter Metalloporphyrine unter verschiedenen Reaktionsbedingungen mit *m*-CPBA

<i>m</i> -CPBA						
	OZP		TZP		NZP	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
MW 82°C						
MnTFPPCl	n.d.	-	3,36	1,81	2,56	1,18
MnT4MPyPCL	n.d.	-	2,35	0,58	1,06	0,12
FeTFPPCl	n.d.	-	0,62	0,12	n.d.	-
FeT4MPyPCL	n.d.	-	0,51	0,14	0,35	0,08
Schütteln 82°C						
MnTFPPCl	2,37	1,26	12,53	1,45	8,69	1,46
MnT4MPyPCL	0,14	0,05	1,09	0,04	0,35	0,08
FeTFPPCl	n.d.	-	0,46	0,09	n.d.	-
FeT4MPyPCL	n.d.	-	0,33	0,01	0,20	0,03
MW 25°C						
MnTFPPCl	n.d.	-	2,22	0,65	1,24	0,49
MnT4MPyPCL	0,19	0,06	2,03	0,57	0,43	0,03
FeTFPPCl	n.d.	-	1,19	0,14	0,45	0,04
FeT4MPyPCL	n.d.	-	0,58	0,06	0,27	0,06
Schütteln 25°C						
MnTFPPCl	2,59	0,86	9,32	1,90	2,59	1,41
MnT4MPyPCL	n.d.	-	0,79	0,53	0,49	0,17
FeTFPPCl	n.d.	-	1,18	0,26	n.d.	-
FeT4MPyPCL	n.d.	-	0,25	0,03	0,20	0,03

Tabelle 6.43: Messdaten zur Bildung von Diazepam-N-oxid unter *m*-CPBA-Einsatz und Verwendung diversen Katalysatoren in immobilisierter und nicht-immobilisierter Form und verschiedenen Bedingungen

<i>m</i> -CPBA	nicht-immobilisiert		immobilisiert	
	DNO		DNO	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw
MW 82°C				
MnTFPPCl	1,50	0,84	0,34	0,08
MnT4MPyPCL	1,86	1,01	1,17	0,14
FeTFPPCl	2,53	1,30	n.d.	-
FeT4MPyPCL	5,53	4,24	11,09	1,53
Schütteln 82°C				
MnTFPPCl	2,80	0,62	4,63	1,58
MnT4MPyPCL	22,30	1,48	2,38	1,07
FeTFPPCl	10,04	0,71	n.d.	-
FeT4MPyPCL	15,29	0,66	21,30	10,38
MW 25°C				
MnTFPPCl	1,36	0,69	4,10	0,85
MnT4MPyPCL	7,30	0,50	2,58	0,37
FeTFPPCl	20,11	2,39	19,30	7,12
FeT4MPyPCL	15,28	4,99	58,62	16,39
Schütteln 25°C				
MnTFPPCl	1,62	0,84	15,25	9,31
MnT4MPyPCL	15,14	2,19	1,74	0,44
FeTFPPCl	50,89	8,23	47,27	6,67
FeT4MPyPCL	21,37	0,68	55,82	2,78

Tabelle 6.44: Messdaten der Umsetzung diverser immobilisierter Metalloporphyrine unter verschiedenen Reaktionsbedingungen mit PhIO

PhIO						
	OZP		TZP		NZP	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
MW 82°C						
MnTFPPCl	0,61	0,12	4,37	1,62	2,48	0,45
MnT4MPyPCL	1,57	0,57	14,27	2,45	4,57	0,69
FeTFPPCl	n.d.	-	1,90	1,58	1,22	1,03
FeT4MPyPCL	n.d.	-	1,32	0,30	n.d.	-
Schütteln 82°C						
MnTFPPCl	n.d.	-	4,17	0,17	2,30	0,56
MnT4MPyPCL	n.d.	-	6,45	1,49	1,12	0,20
FeTFPPCl	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
FeT4MPyPCL	n.d.	-	1,66	0,22	n.d.	-
MW 25°C						
MnTFPPCl	n.d.	-	5,39	1,44	4,76	1,52
MnT4MPyPCL	n.d.	-	9,11	1,06	2,61	0,52
FeTFPPCl	n.d.	-	1,02	0,58	n.d.	-
FeT4MPyPCL	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
Schütteln 25°C						
MnTFPPCl	n.d.	-	0,94	0,59	n.d.	-
MnT4MPyPCL	n.d.	-	5,94	1,14	n.d.	-
FeTFPPCl	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
FeT4MPyPCL	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-

Tabelle 6.45: Messdaten der Umsetzung diverser nicht-immobilisierter Metalloporphyrine unter verschiedenen Reaktionsbedingungen mit PhIO

PhIO						
	OZP		TZP		NZP	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
MW 82°C						
MnTFPPCl	1,35	0,55	3,43	0,79	2,03	0,37
MnT4MPyPCl	n.d.	-	2,66	0,61	1,49	0,23
FeTFPPCl	0,23	0,10	1,91	0,59	0,58	0,04
FeT4MPyPCl	n.d.	-	0,23	0,10	0,28	0,04
Schütteln 82°C						
MnTFPPCl	0,49	0,11	2,41	0,38	1,11	0,24
MnT4MPyPCl	n.d.	-	0,37	0,03	0,24	0,05
FeTFPPCl	n.d.	-	2,34	0,14	0,68	0,15
FeT4MPyPCl	n.d.	-	0,18	0,04	n.d.	-
MW 25°C						
MnTFPPCl	1,31	0,54	3,10	0,38	1,66	0,21
MnT4MPyPCl	n.d.	-	2,03	0,89	0,41	0,08
FeTFPPCl	n.d.	-	1,46	0,30	0,32	0,02
FeT4MPyPCl	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
Schütteln 25°C						
MnTFPPCl	0,34	0,09	1,21	0,42	0,55	0,08
MnT4MPyPCl	n.d.	-	0,26	0,05	n.d.	-
FeTFPPCl	n.d.	-	1,28	0,03	0,33	0,03
FeT4MPyPCl	n.d.	-	0,15	0,03	n.d.	-

Tabelle 6.46: Messdaten der Umsetzung diverser immobilisierter Metalloporphyrine unter verschiedenen Reaktionsbedingungen mit MMPP

MMPP						
	OZP		TZP		NZP	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
MW 82°C						
MnTFPPCl	0,56	0,18	3,89	0,63	1,11	0,48
MnT4MPyPCL	0,38	0,66	4,70	4,22	1,56	1,58
FeTFPPCl	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
FeT4MPyPCL	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
Schütteln 82°C						
MnTFPPCl	2,21	0,25	10,72	0,72	3,06	0,42
MnT4MPyPCL	n.d.	-	1,52	0,31	0,85	0,36
FeTFPPCl	0,25	0,12	0,67	0,32	n.d.	-
FeT4MPyPCL	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
MW 25°C						
MnTFPPCl	n.d.	-	2,48	0,71	0,42	0,22
MnT4MPyPCL	n.d.	-	1,26	0,44	n.d.	-
FeTFPPCl	n.d.	-	0,42	0,26	n.d.	-
FeT4MPyPCL	n.d.	-	0,54	0,36	n.d.	-
Schütteln 25°C						
MnTFPPCl	n.d.	-	0,86	0,23	n.d.	-
MnT4MPyPCL	n.d.	-	0,69	0,04	n.d.	-
FeTFPPCl	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
FeT4MPyPCL	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-

Tabelle 6.47: Messdaten der Umsetzung diverser nicht-immobilisierter Metalloporphyrine unter verschiedenen Reaktionsbedingungen mit MMPP

MMPP						
	OZP		TZP		NZP	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
MW 82°C						
MnTFPPCl	0,78	0,07	7,13	1,09	4,49	0,46
MnT4MPyPcI	n.d.	-	1,08	0,35	n.d.	-
FeTFPPCl	0,37	0,11	2,18	0,40	n.d.	-
FeT4MPyPcI	n.d.	-	0,89	0,06	n.d.	-
Schütteln 82°C						
MnTFPPCl	4,11	0,10	13,09	0,21	4,18	0,38
MnT4MPyPcI	n.d.	-	0,20	0,04	n.d.	-
FeTFPPCl	n.d.	-	1,55	0,21	n.d.	-
FeT4MPyPcI	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
MW 25°C						
MnTFPPCl	0,36	0,02	1,58	0,07	0,38	0,03
MnT4MPyPcI	n.d.	-	0,77	0,40	0,39	0,11
FeTFPPCl	0,15	0,03	2,00	0,47	n.d.	-
FeT4MPyPcI	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
Schütteln 25°C						
MnTFPPCl	0,17	0,04	0,73	0,11	0,42	0,07
MnT4MPyPcI	n.d.	-	0,18	0,02	n.d.	-
FeTFPPCl	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
FeT4MPyPcI	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-

Tabelle 6.48: Messdaten zur Bildung von Diazepam-N-oxid unter MMPP-Einsatz und Verwendung diversen Katalysatoren in immobilisierter und nicht-immobilisierter Form und verschiedenen Bedingungen

MMPP	nicht-immobilisiert		immobilisiert	
	DNO		DNO	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw
MW 82°C				
MnTFPPCl	2,01	0,28	22,28	4,05
MnT4MPyPCL	71,91	3,67	25,52	18,92
FeTFPPCl	22,86	1,30	25,99	10,51
FeT4MPyPCL	55,01	2,29	68,16	3,18
Schütteln 82°C				
MnTFPPCl	1,98	0,01	6,71	2,01
MnT4MPyPCL	75,80	3,64	50,54	8,33
FeTFPPCl	51,70	5,38	4,87	1,53
FeT4MPyPCL	67,21	0,26	73,65	8,95
MW 25°C				
MnTFPPCl	0,86	0,03	1,34	0,22
MnT4MPyPCL	17,79	1,35	n.d.	-
FeTFPPCl	4,97	0,13	1,48	0,62
FeT4MPyPCL	6,26	1,00	1,99	1,57
Schütteln 25°C				
MnTFPPCl	0,78	0,02	0,73	0,12
MnT4MPyPCL	1,65	0,28	n.d.	-
FeTFPPCl	0,72	0,09	n.d.	-
FeT4MPyPCL	2,97	2,35	0,75	0,27

Unter H_2O_2 Einsatz wurden bei einigen Katalysatoren keine Metabolite detektiert. Metalloporphyrine bei denen dies der Fall war, werden im Folgenden nicht aufgeführt.

Tabelle 6.49: Messdaten der Umsetzung diverser immobilisierter Metalloporphyrine unter verschiedenen Reaktionsbedingungen mit H_2O_2

H_2O_2						
	OZP		TZP		NZP	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
MW 82°C						
MnTFPPCl	n.d.	-	0,22	0,01	n.d.	-
MnT4MPyPCl	n.d.	-	0,51	0,09	0,26	0,003
FeTFPPCl	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
FeT4MPyPCl	n.d.	-	0,65	0,27	0,37	0,06
Schütteln 82°C						
MnTFPPCl	n.d.	-	0,31	0,01	n.d.	-
MnT4MPyPCl	n.d.	-	0,35	0,11	n.d.	-
MW 25°C						
MnTFPPCl	n.d.	-	0,19	0,03	n.d.	-
MnT4MPyPCl	n.d.	-	0,56	0,17	n.d.	-
FeT4MPyPCl	n.d.	-	0,21	0,02	n.d.	-
Schütteln 25°C	keine Metabolite innerhalb dieser Bedingung detektiert					

Tabelle 6.50: Messdaten der Umsetzung diverser immobilisierter Metalloporphyrine unter verschiedenen Reaktionsbedingungen mit H₂O₂ in zehnfacher Konzentration

H ₂ O ₂ /zehnfach						
	OZP		TZP		NZP	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
MW 82°C						
MnTFPPCl	n.d.	-	0,21	0,04	0,23	0,04
MnT4MPyPCL	0,03	0,05	0,50	0,04	1,11	0,21
FeTFPPCl	n.d.	-	0,40	0,24	1,01	0,34
FeT4MPyPCL	n.d.	-	1,37	1,09	1,60	1,07
Schütteln 82°C						
FeTFPPCl	n.d.	-	n.d.	-	0,52	0,10
FeT4MPyPCL	n.d.	-	2,16	0,19	0,74	0,20
MW 25°C	keine Metabolite innerhalb dieser Bedingung detektiert					
Schütteln 25°C	keine Metabolite innerhalb dieser Bedingung detektiert					

Tabelle 6.51: Messdaten der Umsetzung diverser nicht-immobilisierter Metalloporphyrine unter verschiedenen Reaktionsbedingungen mit H₂O₂

H ₂ O ₂						
	OZP		TZP		NZP	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
MW 82°C						
MnTFPPCl	n.d.	-	0,31	0,07	0,21	0,02
FeTFPPCl	n.d.	-	0,38	0,04	0,34	0,07
FeT4MPyPCL	n.d.	-	0,43	0,05	0,36	0,03
Schütteln 82°C						
MnTFPPCl	n.d.	-	0,19	0,01	n.d.	-
FeTFPPCl	n.d.	-	0,24	0,01	n.d.	-
FeT4MPyPCL	n.d.	-	0,56	0,01	0,21	0,05
MW 25°C						
FeT4MPyPCL	n.d.	-	0,25	0,09	n.d.	-
Schütteln 25°C						
MnTFPPCl	n.d.	-	0,22	0,11	n.d.	-
FeT4MPyPCL	n.d.	-	0,15	0,02	n.d.	-

Tabelle 6.52: Messdaten der Umsetzung diverser immobilisierter Metalloporphyrine unter verschiedenen Reaktionsbedingungen mit H_2O_2 und Imidazol

H ₂ O ₂ +Imidazol						
	OZP		TZP		NZP	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
MW 82°C						
MnTFPPCl	n.d.	-	0,56	0,14	0,29	0,03
MnT4MPyPCl	n.d.	-	0,52	0,01	0,27	0,01
FeT4MPyPCl	n.d.	-	n.d.	-	0,27	0,08
Schütteln 82°C						
MnTFPPCl	n.d.	-	0,33	0,08	n.d.	-
MnT4MPyPCl	n.d.	-	0,50	0,04	n.d.	-
FeT4MPyPCl	n.d.	-	n.d.	-	0,30	0,02
MW 25°C						
MnTFPPCl	n.d.	-	0,39	0,02	0,18	0,02
MnT4MPyPCl	n.d.	-	0,63	0,12	0,21	0,02
Schütteln 25°C						
MnTFPPCl	n.d.	-	0,20	0,03	n.d.	-
MnT4MPyPCl	n.d.	-	0,24	0,07	n.d.	-

Tabelle 6.53: Messdaten der Umsetzung diverser immobilisierter Metalloporphyrine unter verschiedenen Reaktionsbedingungen mit H₂O₂ in zehnfacher Konzentration und Imidazol

H ₂ O ₂ /zehnfach + Imidazol						
	OZP		TZP		NZP	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
MW 82°C						
MnTFPPCl	n.d.	-	0,69	0,10	0,46	0,06
MnT4MPyPCL	n.d.	-	n.d.	-	0,52	0,27
FeTFPPCl	n.d.	-	n.d.	-	0,91	0,24
FeT4MPyPCL	n.d.	-	n.d.	-	0,78	0,08
Schütteln 82°C						
MnT4MPyPCL	n.d.	-	0,40	0,22	n.d.	-
MW 25°C						
MnTFPPCl	n.d.	-	1,19	0,88	0,44	0,21
MnT4MPyPCL	n.d.	-	0,55	0,15	n.d.	-
Schütteln 25°C						
MnTFPPCl	n.d.	-	0,45	0,08	n.d.	-

Tabelle 6.54: Messdaten der Umsetzung diverser nicht-immobilisierter Metalloporphyrine unter verschiedenen Reaktionsbedingungen mit H_2O_2 und Imidazol

H ₂ O ₂ + Imidazol						
	OZP		TZP		NZP	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
MW 82°C						
MnTFPPCl	n.d.	-	1,15	0,31	0,59	0,08
FeTFPPCl	n.d.	-	n.d.	-	0,31	0,05
FeT4MPyPcI	n.d.	-	0,19	0,03	0,38	0,10
Schütteln 82°C						
MnTFPPCl	n.d.	-	1,11	0,02	n.d.	-
FeT4MPyPcI	n.d.	-	0,20	0,07	0,27	0,07
MW 25°C						
MnTFPPCl	n.d.	-	1,27	0,06	0,34	0,13
Schütteln 25°C						
MnTFPPCl	n.d.	-	1,42	0,06	0,41	0,01

6.2.11 Vorschriften und Messdaten zur Bestimmung der vom Trägermaterial freigesetzten Menge an Metalloporphyrin

Kalibrierung für die Quantifizierung des vom Trägermaterial freigesetzten MnT4MPyPcI in ACN

Es wurden dreimal 0,500 mg MnT4MPyPcI genau gewogen, je in einen 250,0 mL Messkolben überführt und mit ACN zur Eichmarke aufgefüllt. Zum Lösen behandelte man die Messkolben 30 min im Ultraschallbad. Aus jeder dieser Lösung wurden 5 Konzentrationsniveaus hergestellt und diese je dreimal gegen ACN bei 471 nm und Raumtemperatur vermessen. Als Messküvette fand eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 50 mm Anwendung. Nach dem Auftragen der gemessenen und gemittelten

Absorption gegen die Konzentration wurde die in Abb. 6.140 dargestellte Kalibrierkurve erhalten. Die Berechnung der vom Trägermaterial freigesetzten Menge an MnT4MPyPCL erfolgte unter Verwendung der berechneten Regressionsgleichung.

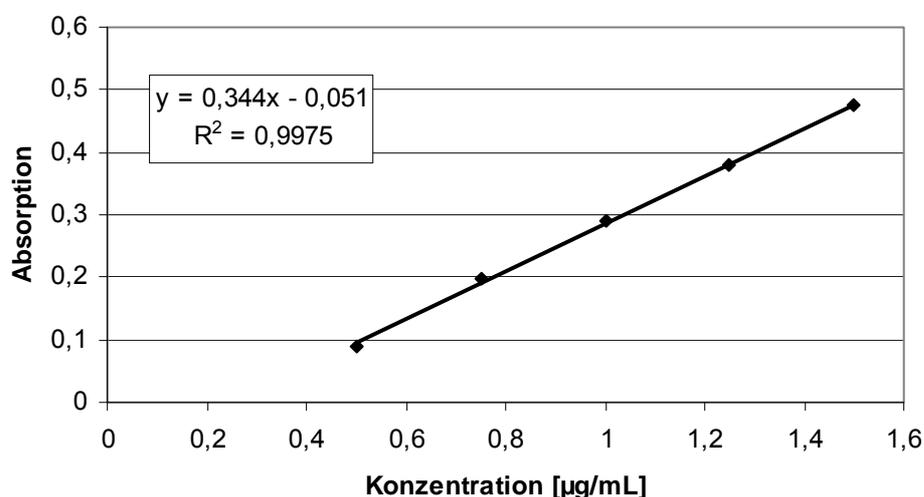


Abb. 6.140: Kalibrierkurve für die Quantifizierung des freigesetzten MnT4MPyPCL vom Trägermaterial in ACN

Kalibrierung für die Quantifizierung des vom Trägermaterial freigesetzten MnTFPPCL in ACN

Zur Erstellung einer Kalibrierkurve zur Quantifizierung vom Trägermaterial freigesetzten MnTFPPCL in ACN wurden aus je drei 1,000 mg/mL Stammlösungen 6 unterschiedliche Konzentrationsniveaus hergestellt. Diese wurden je dreimal bei 466 nm bei Raumtemperatur gegen ACN vermessen. Eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 50 mm wurde hierbei verwendet. Die gemessenen Absorptionen wurden gemittelt und gegen die Konzentration aufgetragen. Es wurde die in Abb. 6.141 dargestellte Kalibrierkurve erhalten. Die Berechnung der vom Trägermaterial freigesetzten Menge an MnTFPPCL erfolgte unter Verwendung der berechneten Regressionsgleichung.

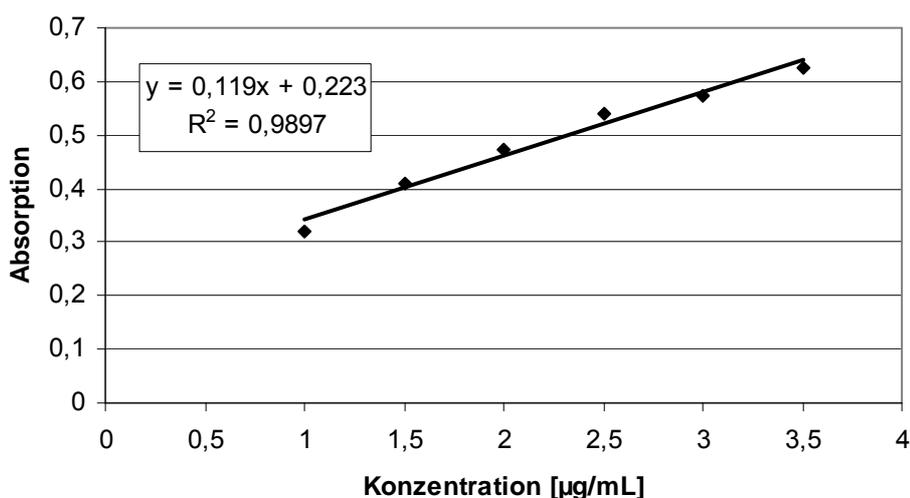


Abb. 6.141: Kalibrierkurve für die Quantifizierung des freigesetzten MnTFPPCl vom Trägermaterial in ACN

Kalibrierung für die Quantifizierung des vom Trägermaterial freigesetzten FeTFPPCl und FeT4MPyPCL in ACN

Zunächst wurden für FeTFPPCl und FeT4MPyPCL je dreimal 1,000 mg genau gewogen und in je einen 50,0 ml Messkolben quantitativ überführt und mit ACN bis zur Eichmarke aufgefüllt. Nach 30 minütiger Behandlung im Ultraschallbad wurden die Lösungen filtriert. Hierbei wurde der nicht gelöste Anteil des Porphyrins quantitativ in dem verwendeten Filterpapier aufgefangen. Diese Rückstände wurden dann in einem Zyklus von 30 min Trockenschrank bei 100°C und einer Abkühlphase von 10 min im Exsikkator bis zur Massenkonstanz getrocknet. Das Porphyrin wurde anschließend gewogen. Die Differenz aus Einwaage und Rückstand ergab die gelöste Menge an Porphyrin in ACN. Aus den drei filtrierten Stammlösungen pro eisenhaltiges Porphyrin wurden je 5 Konzentrationsniveaus hergestellt und bei Raumtemperatur in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 50 mm dreimal gegen ACN vermessen. Die Absorption von FeT4MPyPCL wurde bei 422 nm und von FeTFPPCl bei 342 nm gemessen. Die gemittelten Absorptionen wurden gegen die Konzentration aufgetragen. Abb. 6.142 und Abb. 6.143 zeigen die Kalibrierkurven für FeT4MPyPCL und FeTFPPCl. Zur Berechnung der vom Trägermaterial freigesetzten Menge an FeTFPPCl und FeT4MPyPCL wurden die berechneten Regressionsgleichungen verwendet.

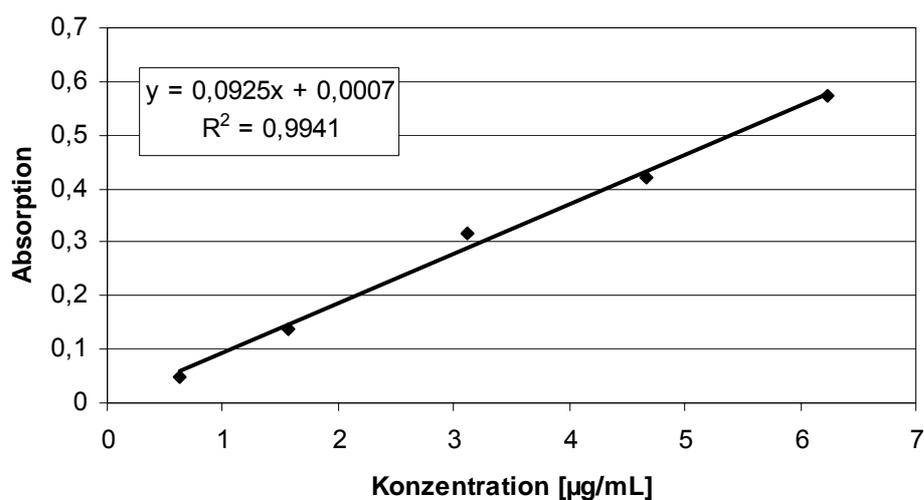


Abb. 6.142: Kalibrierkurve für die Quantifizierung des freigesetzten FeT4MPyPCL vom Trägermaterial in ACN

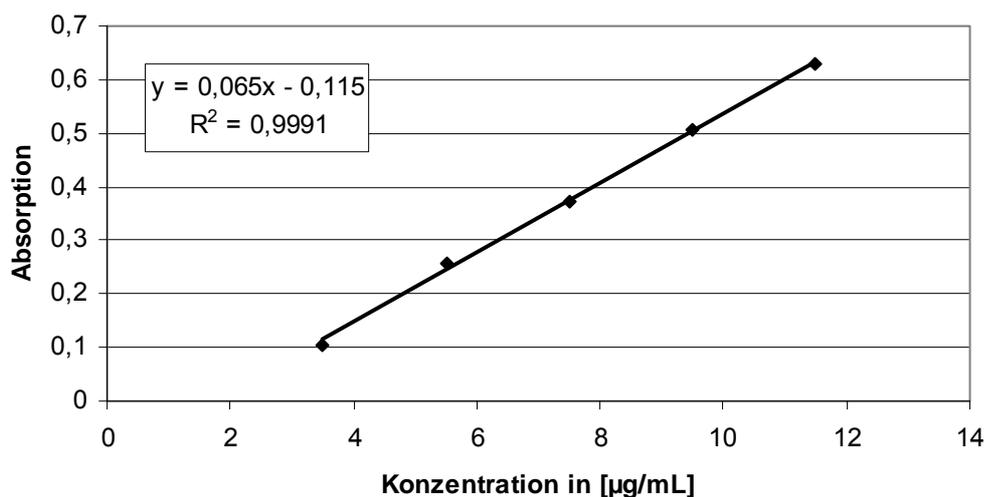


Abb. 6.143: Kalibrierkurve für die Quantifizierung des freigesetzten FeTFPPCL vom Trägermaterial in ACN

Messergebnisse der Überstandsbestimmung in ACN

Es wurden in dieser Versuchsreihe die Messdaten aus Tabelle 6.40, sowie die dort untersuchten Porphyrine verwendet. Aus den drei Chargen pro Porphyrin wurden je 25,0 mg des entsprechenden Porphyrins abgewogen und mit 1,000 mL ACN versetzt. Anschließend wurde der Ansatz den Synthesebedingungen Mikrowelle und Schüttelapparatur jeweils unter RT und ST ausgesetzt. Nach 10 min Reaktionszeit wurde der Überstand des Ansatzes abpipettiert und membranfiltriert. Die UV/VIS-spektroskopische

Untersuchung erfolgte unverzüglich unter Verwendung einer Quarzküvette der Schichtdicke 50 mm.

Der Überstand jeder Charge wurde dreimal vermessen. Die im Folgenden dargestellten Absorptionen stellen die Mittelwerte dar:

Charge	Absorption	Verdünnungsfaktor	Konzentration [µg/mL]	Absorption	Verdünnungsfaktor	Konzentration [µg/mL]
FeT4MPyPCL: ST / Schütteln				ST/ MW		
1	0,505	20,0	109,07	0,533	26,7	153,48
2	0,262	20,0	56,39	0,372	20,0	80,27
3	0,412	20,0	88,89	0,349	40,0	150,70
FeT4MPyPCL: RT /Schüttel				RT / MW		
1	0,265	20,0	57,22	0,544	10,0	58,79
2	0,365	8,0	31,55	0,406	10,0	43,84
3	0,403	10,0	43,54	0,433	10,0	46,78
MnT4MPyPCL: ST / Schüttel				ST / MW		
1	0,449	1,0	1,46	0,293	6,7	6,67
2	0,386	1,0	1,27	0,197	4,0	2,88
3	0,311	1,0	2,10	0,327	10,0	11,00
MnT4MPyPCL: RT / Schüttel				RT / MW		
1	0,308	1,0	1,04	0,250	2,4	2,08
2	0,214	1,0	0,77	0,152	2,6	1,52
3	0,192	1,0	1,41	0,121	2,6	1,30
FeTFPPCL: ST / Schüttel				ST / MW		
1	0,289	1,0	6,21	0,385	2,0	15,36
2	0,177	1,0	4,48	0,385	2,0	15,11
3	0,201	1,0	4,84	0,372	2,0	14,73

FeTFPPCl: RT / Schüttel				RT / MW		
1	0,087	1,0	3,09	0,141	1,8	6,97
2	0,155	1,0	4,14	0,153	1,9	7,97
3	0,059	1,0	2,66	0,100	2,0	6,44
MnTFPPCl: ST / Schüttel				ST / MW		
1	0,591	2,0	6,21	0,435	6,1	11,07
2	0,583	2,0	6,09	0,406	5,7	8,83
3	0,501	3,3	7,85	0,520	7,0	17,58
MnTFPPCl: RT / Schüttel				RT / MW		
1	0,551	2,5	6,94	0,335	2,9	2,75
2	0,568	2,5	7,29	0,457	2,3	2,51
3	0,537	2	5,31	0,495	2,5	5,79

Messergebnisse der Wiederfindungsexperimente für Fe/MnT4MPyPcI

Nach den Überstandsversuchen wurden die eingesetzten Porphyrine getrocknet und ihre Belegung für Fe/MnT4MPyPcI nach AV 2 bestimmt. Die Ergebnisse der Absorptionsbestimmungen sind in folgender Tabelle dargestellt:

Charge	Absorption	Verdünnungsfaktor	Konzentration an Porphyrin gefunden [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Konzentration an immobilisiertem Porphyrin [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Belegung [%]
FeT4MPyPcI					
ST 1	0,320	2	6,41	45,8	13,99
ST 2	0,301	2	6,05	43,8	13,81
ST 3	0,400	2	7,99	57,2	13,96
RT 1	0,345	2	6,90	48,0	14,38
RT 2	0,331	2	6,63	47,6	13,93

RT 3	0,329	2	6,59	46,2	13,97
MnT4MPyPcI					
ST 1	0,464	1	4,82	49,8	9,68
ST 2	0,403	1	4,18	44,6	9,37
ST 3	0,501	1	5,20	50,4	10,31
RT 1	0,475	1	4,93	50,4	9,78
RT 2	0,470	1	4,88	49,6	9,67
RT 3	0,501	1	5,20	48,8	10,65

6.2.12 Messergebnisse unter Verwendung der katalytischen Säule

Darstellung der Ergebnisse der katalytischen Säule unter Verwendung von MMPP, PhIO und *m*-CPBA als Sauerstoffdonator unter ST und RT. Es wurden drei Reaktionsansätze pro Porphyrin/Sauerstoffdonator/Temperatur untersucht. Die Angabe der Ergebnisse erfolgt als Mittelwert mit Standardabweichung aus drei Bestimmungen bezogen auf 100% Ausgangssubstrat.

MnTFPPcI								
Bedingung	OZP		TZP		NZP		DNO	
	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
PhIO/ST	0,58	0,36	5,96	1,00	4,13	0,76	n.d.	-
PhIO/RT	0,51	0,24	4,42	2,89	4,17	2,58	n.d.	-
MMPP/ST	0,63	0,51	4,06	2,33	2,32	1,27	13,49	4,17
MMPP/RT	n.d.	-	4,85	1,45	2,99	0,93	3,09	1,12
<i>m</i> -CPBA/ST	0,60	0,40	4,56	2,92	1,97	1,69	41,22	9,11
<i>m</i> -CPBA/RT	0,97	0,54	5,70	2,31	3,06	1,15	14,95	2,81

MnT4MPyPCI								
	OZP		TZP		NZP		DNO	
Bedingung	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
PhIO/ST	0,71	0,06	9,52	0,90	1,69	0,20	n.d.	-
PhIO/RT	n.d.	-	4,86	1,36	0,92	0,17	n.d.	-
MMPP/ST	n.d.	-	1,73	1,50	0,86	0,44	22,06	8,18
MMPP/RT	n.d.	-	1,53	0,65	0,66	0,12	2,09	0,78
<i>m</i> -CPBA/ST	0,55	0,22	5,66	1,97	1,99	1,22	11,30	3,83
<i>m</i> -CPBA/RT	0,85	0,53	6,31	1,22	3,19	1,10	9,69	2,36

6.3 Anwendung auf andere Substrate

6.3.1 Methode zur Bestimmung von N-Methyl- ϵ -caprolactam

GC-Methode:

Detektor	Flammenionisationsdetektor (FID) 220°C
Chromatographiesäule	HP-5 quervernetzt, 5% Phenylmethylsiloxan 300 cm x 0,32 mm x 0,25 μ m
FID Gasströme	H ₂ : 30 mL/min; synthetische Luft: 300 mL/min; Makeup: 20,0 mL/min
Injektor	Split: 10:1; 100°C
Trägergasstrom	Helium 1,4 mL/min
Temperaturprogramm	60°C bis 130°C (10°C/min), 3 min isotherm bei 130°C, 130°C bis 200°C (10°C/min)

Spülprogramm:

Detektor	siehe GC-Methode
Chromatographiesäule	siehe GC-Methode
FID Gasströme	siehe GC-Methode
Injektor	Split: 10:1; 150°C
Trägergasstrom	siehe GC-Methode
Temperaturprogramm	60°C bis 200°C (10°C/min)

Kalibrierung zur Quantifizierung von N-Methyl- ϵ -caprolactam

Zur Erstellung einer Kalibriergeraden für die Quantifizierung der nach erfolgter Reaktion verbleibenden Menge an N-Methyl- ϵ -caprolactam bei 20 μmol Ansätze wurden dreimal aus einer Stammlösung mit 642 $\mu\text{L}/25,0 \text{ mL}$ ACN 200 μL , 600 μL , 1000 μL , 1400 μL und 1800 μL entnommen und in einen 10,0 mL Messkolben überführt. Aus einer Toluolstammlösung mit 200 $\mu\text{L}/10,0 \text{ mL}$ ACN wurden jeweils 1000 μL dem jeweiligen Messkolben zugefügt. Anschließend wurde auf 10,0 mL aufgefüllt.

Zur Erstellung der Kalibriergeraden für die Quantifizierung der nach erfolgter Reaktion verbleibenden Menge an N-Methyl- ϵ -caprolactam bei 100 μmol Ansätze wurden dreimal aus einer Stammlösung mit 3210 $\mu\text{L}/25,0 \text{ mL}$ ACN 600 μL , 750 μL , 900 μL , 1050 μL und 1200 μL entnommen und in einen 10,0 mL Messkolben überführt. Aus einer Toluolstammlösung mit 600 $\mu\text{L}/10,0 \text{ mL}$ ACN wurden jeweils 1000 μL dem jeweiligen Messkolben zugefügt. Anschließend wurde auf 10,0 mL aufgefüllt.

Nach dem Auftragen der gemessenen und gemittelten Flächenverhältnisse von N-Methyl- ϵ -caprolactam/Toluol gegen deren Konzentrationsverhältnisse wurden die in Abb. 6.144 und Abb. 6.145 dargestellten Kalibrierkurven erhalten. Die Berechnung der nach der Reaktion verbleibenden Menge an N-Methyl- ϵ -caprolactam erfolgte unter Verwendung der berechneten Regressionsgleichungen.

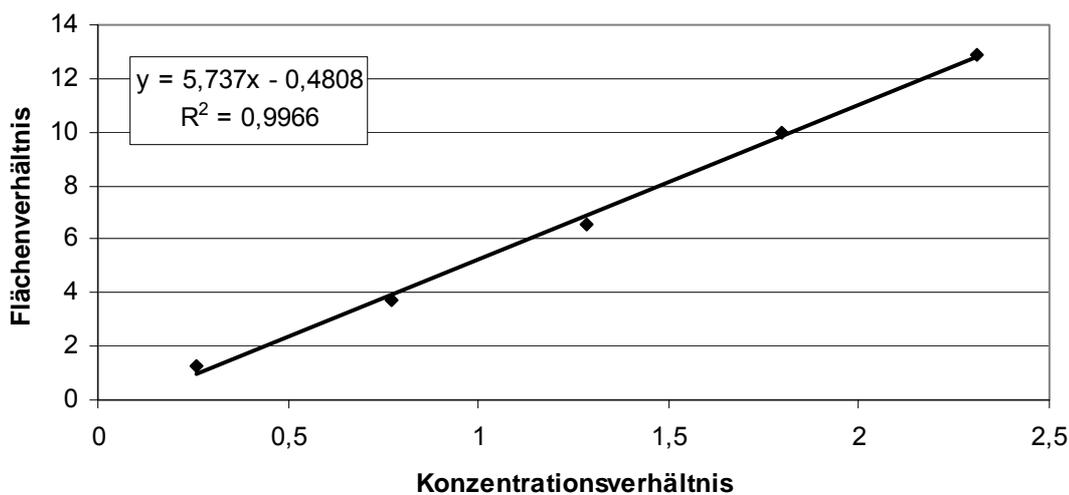


Abb. 6.144: Darstellung der Kalibrierkurve zur Quantifizierung der verbleibenden Menge an N-Methyl- ϵ -caprolactam nach erfolgter Reaktion für die Anwendung von 20 μmol -Ansätzen

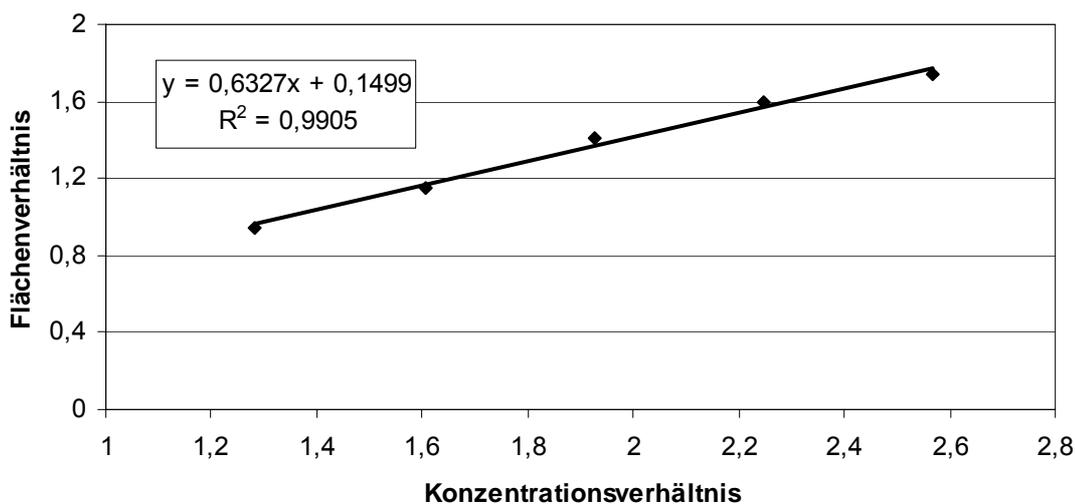


Abb. 6.145: Darstellung der Kalibrierkurve zur Quantifizierung der verbleibenden Menge an N-Methyl- ϵ -caprolactam nach erfolgter Reaktion für die Anwendung von 100 μmol -Ansätzen

6.3.2 Vorschriften und Messdaten zu N-Methyl- ϵ -caprolactam

AV 6 Allgemeine Vorschrift zur Umsetzung von N-Methyl- ϵ -caprolactam

Es wurde ein Ansatzverhältnis von 1:10:40, sowie 1:50:40 (Porphyrin: Diazepam: Sauerstoffdonator) angewendet. 2 μmol des nach AV 1 (siehe Kapitel 6.2.3) immobilisierten MnTFPPCl wurden in einem Probengefäß vorgelegt. 80 μmol des Sauerstoffdonators PhIO, sowie 20 μmol bzw. 100 μmol Methylcaprolactam in Form von 100 μL einer Stammlösung in ACN und ACN zum finalen Volumen von 1000 μL wurden hinzugegeben. Die Ansätze wurden bei 82°C und 25°C für die Dauer von 10 min, 30 min und 120 min bei 300 rpm geschüttelt. Nach erfolgter Membranfiltration wurde Toluol als interner Standard den Proben zugesetzt und diese unverdünnt gaschromatographisch analysiert. Nach jedem Analysenlauf wurde das Spülprogramm mit ACN vollzogen.

Die Messdaten wurden als Mittelwert aus drei Bestimmungen mit Standardabweichung in Prozent bezogen auf ein 100% Flächenverhältnis N-Methyl- ϵ -caprolactam/Toluol angegeben. Die Summe der Gehalte ergibt sich aus: Differenz des 100% -Gehaltes des Substrates und Gehalt des Substrates nach Umsetzung, bestimmt über die Kalibrierfunktion + Flächenverhältnisse ϵ -Caprolactam/Substrat 100% + Produkt 2/Substrat 100% + Produkt 3/Substrat 100% + Produkt 4/Substrat 100%.

100 μmol N- Methyl- ϵ -caprolactam						
	RT 10 min	RT 30 min	RT 120 min	ST 10 min	ST 30 min	ST 120 min
ϵ -Caprolactam Mw+Stabw	n.d. -	n.d. -	1,41 0,77	n.d. -	n.d. -	1,21 0,30
Produkt 2 Mw+Stabw	0,39 0,05	0,55 0,07	1,23 0,07	0,90 0,16	1,17 0,06	1,22 0,22
Produkt 3 Mw+Stabw	0,61 0,26	0,68 0,05	1,87 0,16	1,31 0,24	1,55 0,10	1,85 0,34
Produkt 4 Mw+Stabw	0,13 0,04	0,35 0,11	0,96 0,29	0,32 0,09	1,02 0,36	1,13 0,11
Σ Gehalte Mw+Stabw	103,58 6,59	94,46 1,50	84,81 4,17	92,27 19,58	94,18 2,04	104,90 10,49

20 μmol N- Methyl- ϵ -caprolactam						
	RT 10 min	RT 30 min	RT 120 min	ST 10 min	ST 30 min	ST 120 min
ϵ -Caprolactam Mw+Stabw	n.d. -	n.d. -	n.d. -	1,73 0,10	2,61 0,08	4,24 0,34
Produkt 2 Mw+Stabw	0,92 0,07	0,93 0,46	1,15 0,48	1,59 0,13	2,15 0,61	2,42 0,18
Produkt 3 Mw+Stabw	1,34 0,24	1,37 0,71	1,59 0,68	2,66 0,32	4,07 1,26	4,66 0,46
Produkt 4 Mw+Stabw	0,47 0,12	0,63 0,14	0,72 0,12	0,53 0,29	0,70 0,30	4,65 1,96
Σ Gehalte Mw+Stabw	100,07 1,80	93,21 4,68	81,94 1,53	89,09 1,58	94,47 6,01	103,73 3,87

6.3.3 Methode zur Bestimmung von N-Methyl-2-piperidon

GC-Methode:

Detektor	Flammenionisationsdetektor (FID) 230°C
Chromatographiesäule	HP-5 quervernetzt, 5% Phenylmethylsiloxan 300 cm x 0,32 mm x 0,25 µm
FID Gasströme	H ₂ : 30 mL/min; synthetische Luft: 300 mL/min; Makeup: 20,0 mL/min
Injektor	Split: 10:1; 80°C
Trägergasstrom	Helium 1,4 mL/min
Temperaturprogramm	50°C - 3 min isotherm, 50°C -100°C (10°C/min), 100°C - 7 min isotherm, 100°C-160°C (10°C/min)

Spülprogramm:

Detektor	siehe GC-Methode
Chromatographiesäule	siehe GC-Methode
FID Gasströme	siehe GC-Methode
Injektor	Split: 10:1; 150°C
Trägergasstrom	siehe GC-Methode
Temperaturprogramm	90°C bis 130°C (10°C/min)

Kalibrierung zur Quantifizierung von N-Methyl-2-piperidon

Zur Erstellung einer Kalibriergeraden für die Quantifizierung der nach erfolgter Reaktion verbleibenden Menge an N-Methyl-2-piperidon bei 20 µmol Ansätze wurden zweimal aus einer Stammlösung mit 2200 µL /100,0 mL ACN 200 µL, 600 µL, 1000 µL, 1400 µL und 1800 µL entnommen und in ein 10,0 mL Messkolben überführt. Aus einer Toluolstammlösung mit 200

$\mu\text{L}/10,0\text{ mL}$ ACN wurden jeweils $1000\ \mu\text{L}$ dem jeweiligen Messkolben zugefügt. Anschließend wurde auf $10,0\text{ mL}$ aufgefüllt.

Zur Erstellung der Kalibriergeraden für die Quantifizierung der nach erfolgter Reaktion verbleibenden Menge an N-Methyl-2-piperidon bei $100\ \mu\text{mol}$ Ansätze wurden zweimal aus einer Stammlösung mit $2750\ \mu\text{L}/25,0\text{ mL}$ ACN $600\ \mu\text{L}$, $750\ \mu\text{L}$, $900\ \mu\text{L}$, $1050\ \mu\text{L}$ und $1200\ \mu\text{L}$ entnommen und in ein $10,0\text{ mL}$ Messkolben überführt. Aus einer Toluolstammlösung mit $600\ \mu\text{L}/10,0\text{ mL}$ ACN wurden jeweils $1000\ \mu\text{L}$ dem jeweiligen Messkolben zugefügt. Anschließend wurde auf $10,0\text{ mL}$ aufgefüllt.

Nach dem Auftragen der gemessenen und gemittelten Flächenverhältnisse von N-Methyl-2-piperidon/Toluol gegen deren Konzentrationsverhältnisse wurden die in Abb. 6.146 und Abb. 6.147 dargestellten Kalibrierkurven erhalten. Die Berechnung der nach der Reaktion verbleibenden Menge an N-Methyl-2-piperidon erfolgte unter Verwendung der berechneten Regressionsgleichungen.

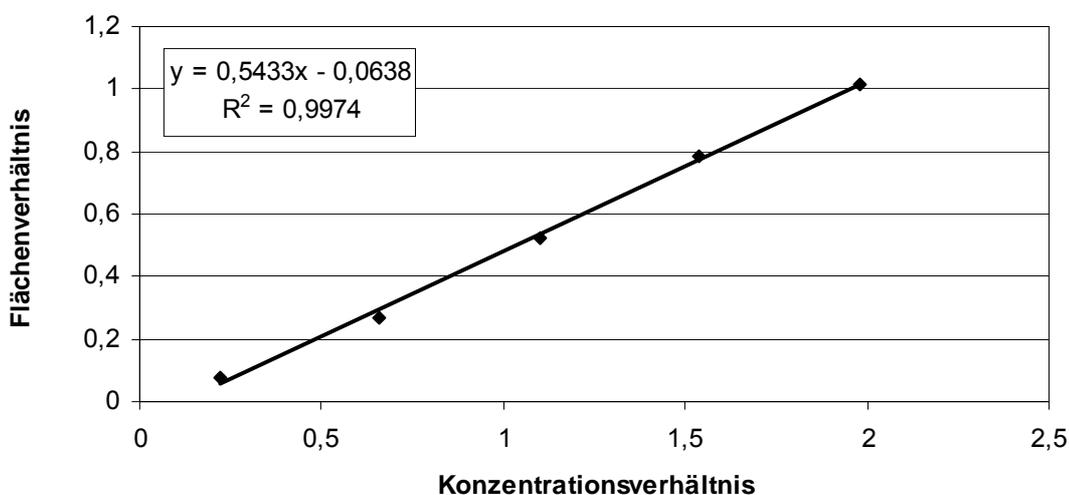


Abb. 6.146: Darstellung der Kalibrierkurve zur Quantifizierung der verbleibenden Menge an N-Methyl-2-piperidon nach erfolgter Reaktion bei Anwendung von $20\ \mu\text{mol}$ -Ansätzen

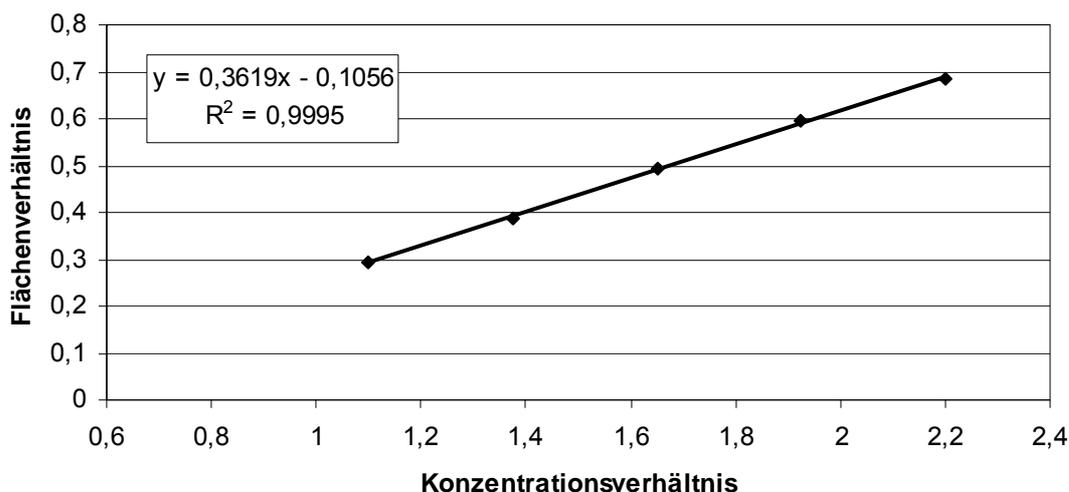


Abb. 6.147: Darstellung der Kalibrierkurve zur Quantifizierung der verbleibenden Menge an N-Methyl-2-piperidon nach erfolgter Reaktion bei Anwendung von 100 μmol -Ansätzen

6.3.4 Vorschriften und Messdaten zu N-Methyl-2-piperidon

Die Vorschrift für die Umsetzung des N-Methyl-2-piperidons im Modellsystem erfolgt in Analogie zu AV 6.

Die Messdaten werden als Mittelwert aus drei Bestimmungen mit Standardabweichung in Prozent bezogen auf ein 100% Flächenverhältnis N-methyl-2-piperidon/Toluol angegeben. Die Summe der Gehalte ergibt sich aus: Differenz des 100% -Gehaltes des Substrates und Gehalt des Substrates nach Umsetzung, bestimmt über die Kalibrierfunktion + Flächenverhältnisse 2-Piperidon/Substrat 100% + Produkt 2/Substrat 100% + Produkt 3/Substrat 100%.

20 μ mol N-Methyl-2-piperidon								
	2-Piperidon		Produkt 2		Produkt 3		Σ Gehalte	
Bedingung	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
10 min RT	n.d.	-	5,98	0,04	0,98	0,11	90,95	4,91
30 min RT	n.d.	-	11,55	0,31	1,30	0,27	75,78	3,36
120 min RT	n.d.	-	15,30	0,35	0,77	0,07	63,28	4,18
10 min ST	0,14	0,07	6,56	0,25	1,17	0,13	79,69	6,87
30 min ST	0,11	0,02	8,69	0,41	1,51	0,65	77,86	4,78
120 min ST	0,65	0,11	8,47	0,32	1,02	0,25	72,22	1,03

100 μ mol N-Methyl-2-piperidon								
	2-Piperidon		Produkt 2		Produkt 3		Σ Gehalte	
Bedingung	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw	Mw	Stabw
10 min RT	0,53	0,43	4,87	0,46	0,45	0,24	95,07	3,55
30 min RT	0,44	0,55	6,42	0,09	0,62	0,12	84,83	3,79
120 min RT	0,63	0,66	8,27	0,08	0,92	0,35	86,68	1,32
10 min ST	0,67	0,36	6,47	0,61	0,77	0,10	94,81	0,68
30 min ST	0,66	0,46	6,90	0,14	0,80	0,21	96,42	1,26
120 min ST	0,71	0,07	6,63	0,82	0,40	0,16	97,45	3,30

6.3.5 Methode zur Bestimmung von Estradiol

Säule:	Purospher®Star LiChroCART 250-4 RP-18 endcapped 5µm, Merck
Elutionsmittel:	0,1% Ameisensäure / Methanol (52/48)
Flussrate:	0,530 mL/min
Wellenlänge:	280 nm
Probenvolumen:	10 µL
Dauer:	130 min
Elutionstyp:	isokratisch

6.3.6 Synthese von Estradioldiacetat

Die Synthese des Estradioldiacetats erfolgt nach der allgemeinen Arbeitsvorschrift zur Darstellung von Essigsäureestern aus Acetanhydrid des Organikums [99]. Hierbei wurden 20 mmol frisch destilliertes Acetanhydrid, 10 mmol Estradiol und 24 mmol trockenes Pyridin 3 Stunden unter Rückfluss erhitzt und anschließend in Eiswasser gegossen. Der Niederschlag wurde zunächst mit 10 %-iger HCl gewaschen, anschließend mit Wasser. Den Ester nahm man in Dichlormethan auf versetzte die Lösung mit Magnesiumsulfat. Der Ansatz wurde filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. In Ethylacetat wurde umkristallisiert.

6.3.7 Methode zur Bestimmung von Estradioldiacetat

Säule:	Purospher®Star LiChroCART 250-4 RP-18 endcapped 5µm, Merck
Elutionsmittel:	0,1% Ameisensäure / Methanol (20/80)
Flussrate:	0,530 mL/min
Wellenlänge:	280 nm
Probenvolumen:	10 µL
Dauer:	35 min

Elutionstyp: isokratisch

6.3.8 Analytische Daten zu Estradioldiacetat

Masse: $m/z = 356$

IR: 1765 cm^{-1} (C=O, aromatisch); 1734 cm^{-1} C=O, aliphatisch)

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3) , δ (ppm): 2.06 (s, 3H, C- CH_3 , *aliphatisch*);
2.28 (s, 3H, C- CH_3 , *aromatisch*)³

HPLC: Säule *siehe Methode Estradiol*

Elutionsmittel: 0,1% Ameisensäure / Methanol (20/80)

Flussrate: 0,540 mL/min

Wellenlänge: 280 nm

Retentionszeit: 25,1 min

Reinheit: 99,1%

³ die restlichen Kopplungen werden nicht aufgeführt, da sie für die erfolgte Acetylierung unerheblich sind

7 Literaturverzeichnis

1. **Langner, A.**, Substitute and supplementary methods for the study of drug biotransformation. *Pharm Unserer Zeit* (24) 207-18, 1995.
2. **Auterhoff, H., Knabe, J., Höltje, H. D.**, Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie. 14.Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1999.
3. **Koolman, J., Röhm, K.-H.**, Taschenatlas der Biochemie. 2.Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1998.
4. **Klingenberg, M.**, Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* (75) 376-86, 1958.
5. **Omura, T., Sato, R.**, A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem* (237) 1375-6, 1962.
6. **Hildebrandt, A., Remmer, H., Estabrook, R. W.**, Cytochrome P-450 of liver microsomes--one pigment or many. *Biochem Biophys Res Commun* (30) 607-12, 1968.
7. **Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J.**, P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, (6) 1-42, 1996.
8. **Woggon, W.-D.**, Cytochrome P450: significance, reaction mechanisms and active site analogs. *Top Curr Chem*, (184) 39-96, 1997.
9. **Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K.**, General and Special Pharmacology and Toxicology, 7th Revised Edition, 1996.
10. **Fisher, M. T., Sligar, S. G.**, Control of heme protein redox potential and reduction rate: linear free energy relation between potential and ferric spin state equilibrium. *J Am Chem Soc*, (107) 5018-19, 1985.
11. **Sligar, S. G., Gunsalus, I. C.**, A thermodynamic model of regulation: Modulation of redox equilibria in camphor monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*, (73) 1078-82, 1976.
12. **Lippard, S. J., Berg, J. M.**, Bioinorganic Chemistry, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1995.

13. **Breslow, R.**, Centenary Lecture. Biomimetic chemistry. *Chem Soc Rev*, (1) 553-80, 1972.
14. **Mansuy, D., Battioni, P., Battioni, J. P.**, Chemical model systems for drug-metabolizing cytochrome-P-450-dependent monooxygenases. *Eur J Biochem*, (184) 267-85, 1989.
15. **Balogh, G. T., Keseru, G. M.**, Metalloporphyrin mediated biomimetic oxidations. A useful tool for the investigation of cytochrome P450 catalyzed oxidative metabolism. *ARKIVOC* 124-139, 2004.
16. **Rustemeier, K., Demetriou, D., Schepers, G., Voncken, P.**, High-performance liquid chromatographic determination of nicotine and its urinary metabolites via their 1,3-diethyl-2-thiobarbituric acid derivatives. *J Chromatogr* (613) 95-103, 1993.
17. **Chauncey, M. A., Ninomiya, S.**, Metabolic studies with model cytochrome P-450 systems. *Tetrahedron Lett*, (31) 5901-4, 1990.
18. **Schachter, S. C.**, A review of the antiepileptic drug Tiagabine. *Clin Neuropharmacol*, (22) 312-317, 1999.
19. **Andersen, K. E., Begtrup, M., Chorghade, M. S., Lee, E. C., Lau, J., Lundt, B. F., Petersen, H., Soerensen, P. O., Thøgersen, H.**, The synthesis of novel GABA uptake inhibitors. Part 2. Synthesis of 5-hydroxytiagabine, a human metabolite of the GABA reuptake inhibitor tiagabine. *Tetrahedron*, (50) 8699-10, 1994.
20. **Agundez, J. A., Martinez, C., Martin, R., Benitez, J.**, Determination of aminopyrine, dipyrone and its metabolites in urine by high-performance liquid chromatography. *Ther Drug Monit* (16) 316-22, 1994.
21. **Agundez, J. A. G., Martinez, C., Benitez, J.**, Metabolism of aminopyrine and derivatives in man: in vivo study of monomorphic and polymorphic metabolic pathways. *Xenobiotica*, (25) 417-27, 1995.
22. **Chorghade, M. S., Hill, D. R., Lee, E. C., Pariza, R. J., Dolphin, D. H., Hino, F., Zhang, L.-Y.**, Metalloporphyrins as chemical mimics of cytochrome P-450 systems. *Pure Appl Chem*, (68) 753-756, 1996.
23. **Meunier, B.**, Metalloporphyrins as versatile catalysts for oxidation reactions and oxidative DNA cleavage. *Chem Rev*, (92) 1411-56, 1992.
24. **Groves, J. T., Lee, J., Marla, S. S.**, Detection and Characterization of an Oxomanganese(V) Porphyrin Complex by Rapid-Mixing Stopped-Flow Spectrophotometry. *J Am Chem Soc*, (119) 6269-6273, 1997.

25. **Jin, N., Groves, J. T.,** Unusual Kinetic Stability of a Ground-State Singlet Oxomanganese(V) Porphyrin. Evidence for a Spin State Crossing Effect. *J Am Chem Soc*, (121) 2923-2924, 1999.
26. **Klotz, U.,** The role of pharmacogenetics in the metabolism of antiepileptic drugs: pharmacokinetic and therapeutic implications. *Clin Pharmacokinet*, (46) 271-279, 2007.
27. **Fenner, H. R., Hermann J.,** Arzneistoffe. 3.Auflage, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 2000.
28. **Bernadou, J., Fabiano, A.-S., Robert, A., Meunier, B.,** "Redox Tautomerism" in High-Valent Metal-oxo-aquo Complexes. Origin of the Oxygen Atom in Epoxidation Reactions Catalyzed by Water-Soluble Metalloporphyrins. *J Am Chem Soc*, (116) 9375-6, 1994.
29. **Groves, J. T., Nemo, T. E., Myers, R. S.,** Hydroxylation and epoxidation catalyzed by iron-porphine complexes. Oxygen transfer from iodosylbenzene. *J Am Chem Soc*, (101) 1032-3, 1979.
30. **Traylor, P. S., Dolphin, D., Traylor, T. G.,** Sterically protected hemins with electronegative substituents: efficient catalysts for hydroxylation and epoxidation. *J Chem Soc Chem Commun*, 279-80, 1984.
31. **Chang, C. K., Ebina, F.,** NIH shift in hemin-iodosylbenzene mediated hydroxylations. *J Chem Soc Chem Commun*, 778-9, 1981.
32. **Wijesekera, T., Matsumoto, A., Dolphin, D., Lexa, D.,** Highly chlorinated and perchlorinated meso-tetraphenylporphyrins. *Angew Chem*, (102) 1073-4, 1990.
33. **Lindemann, D., Froehlich, L., Goeber, B.,** Biomimetic hydroxylation of aromatic compounds. *Sci Pharm*, (64) 541-554, 1996.
34. **Carrier, M. N., Scheer, C., Gouvine, P., Bartoli, J. F., Battioni, P., Mansuy, D.,** Biomimetic hydroxylation of aromatic compounds: hydrogen peroxide and manganese-polyhalogenated porphyrins as a particularly good system. *Tetrahedron Lett*, (31) 6645-8, 1990.
35. **Gross, Z., Simkhovich, L.,** Hydroxylation of simple alkanes by iodosylbenzene is catalyzed more efficiently by second than by third generation iron(III) porphyrins. *Tetrahedron Lett*, (39) 8171-8174, 1998.
36. **Gotardo, M. C. A. F., de Moraes, L. A. B., Assis, M. D.,** Metalloporphyrins as Biomimetic Models for Cytochrome P-450 in the Oxidation of Atrazine. *J Agric Food Chem*, (54) 10011-10018, 2006.

37. **Groves, J. T., Kruper, W. J., Jr., Haushalter, R. C.,** Hydrocarbon oxidations with oxometalloporphyrinates. Isolation and reactions of a (porphinato)manganese(V) complex. *J Am Chem Soc*, (102) 6375-7, 1980.
38. **Battioni, P., Lallier, J. P., Barloy, L., Mansuy, D.,** Monooxygenase-like oxidation of hydrocarbons using supported manganese-porphyrin catalysts: beneficial effects of a silica support for alkane hydroxylation. *J Chem Soc Chem Commun*, 1149-51, 1989.
39. **Feiters, M. C., Rowan, A. E., Nolte, R. J. M.,** From simple to supramolecular cytochrome P450 mimics. *Chem Soc Rev*, (29) 375-384, 2000.
40. **Battioni, P., Bartoli, J. F., Leduc, P., Fontecave, M., Mansuy, D.,** A new and efficient biomimetic system for hydrocarbon oxidation by dioxygen using manganese porphyrins, imidazole, and zinc. *J Chem Soc Chem Commun*, 791-2, 1987.
41. **Okamoto, T., Sasaki, K., Shimada, M., Oka, S.,** Catalysis of aerobic C-C bond cleavage of 1,2-bis(4-methoxyphenyl)ethane-1,2-diol by meso-tetraphenylporphyrinatoiron(III). A model system for cytochrome P-450-dependent glycol cleavage. *J Chem Soc Chem Commun*, 381-3, 1985.
42. **Nam, W., Han, H. J., Oh, S.-Y., Lee, Y. J., Choi, M.-H., Han, S.-Y., Kim, C., Woo, S. K., Shin, W.,** New Insights into the Mechanisms of O-O Bond Cleavage of Hydrogen Peroxide and tert-Alkyl Hydroperoxides by Iron(III) Porphyrin Complexes. *J Am Chem Soc*, (122) 8677-8684, 2000.
43. **Nam, W., Choi, H. J., Han, H. J., Cho, S. H., Lee, H. J., Han, S.-Y.,** Use of 2-methyl-1-phenylpropan-2-yl hydroperoxide (MPPH) as a mechanistic probe for the heterolytic versus homolytic O-O bond cleavage of tert-alkyl hydroperoxide by iron(III) porphyrin complex. *Chem Commun (Camb)*, 387-388, 1999.
44. **Traylor, T. G., Kim, C., Fann, W.-P., Perrin, C. L.,** Reactions of hydroperoxides with iron(III) porphyrins: heterolytic cleavage followed by hydroperoxide oxidation. *Tetrahedron*, (54) 7977-7986, 1998.
45. **Saltzman, H., Sharefkin, J. G.,** Iodosobenzene. *Org Synth*, (43) 60-1, 1963.
46. **Lucas, H. J., Kennedy, E. R.,** Iodoxybenzene. I. Disproportionation of iodosobenzene. *Org Synth*, (22) 72-3, 1942.
47. **Meunier, B.,** Metalloporphyrin-catalyzed oxygenation of hydrocarbons. *Bull Soc Chim Fr*, 578-94, 1986.

48. **Lindsay Smith, J. R., Piggott, R. E., Sleath, P. R.,** Magnitude of the kinetic isotope effect for the oxidative demethylation of anisole and anisole-methyl-2H3: a new and simple criterion for assessing model systems for cytochrome P450 dependent monooxygenases. *J Chem Soc Chem Commun*, 55-6, 1982.
49. **Lindsay Smith, J. R., Mortimer, D. N.,** Oxidative N-dealkylation of N,N-dimethylbenzylamines by metalloporphyrin-catalyzed model systems for cytochrome P450 monooxygenases. *J Chem Soc Chem Commun*, 64-5, 1985.
50. **Groves, J. T., Watanabe, Y.,** Preparation and characterization of an (acylperoxo)iron(III) porphyrin. *Inorg Chem*, (26) 785-6, 1987.
51. **Watanabe, Y., Yamaguchi, K., Morishima, I., Takehira, K., Shimizu, M., Hayakawa, T., Orita, H.,** Remarkable solvent effect on the shape-selective oxidation of olefins catalyzed by iron(III) porphyrins. *Inorg Chem*, (30) 2581-2, 1991.
52. **Groves, J. T., Watanabe, Y.,** Oxygen activation by metalloporphyrins related to peroxidase and cytochrome P-450. Direct observation of the oxygen-oxygen bond cleavage step. *J Am Chem Soc*, (108) 7834-6, 1986.
53. **Querci, C., Ricci, M.,** Hydroxylation of saturated hydrocarbons by magnesium monoperoxyphthalate catalyzed by manganese porphyrins. *Tetrahedron Lett*, (31) 1779-82, 1990.
54. **Querci, C., Ricci, M.,** A very efficient alkene epoxidation by magnesium monoperoxyphthalate catalyzed by manganese porphyrins. *J Chem Soc Chem Commun*, 889-90, 1989.
55. **Bacocchi, E., Lanzalunga, O., Lapi, A.,** Formation of quinones in the iron porphyrin catalyzed oxidation of benzene and alkylbenzenes by magnesium monoperoxyphthalate. *Tetrahedron Lett*, (36) 3547-8, 1995.
56. **Walling, C.,** Fenton's reagent revisited. *Acc Chem Res*, (8) 125-31, 1975.
57. **Meunier, B., Robert, A., Pratviel, G., Bernadou, J.,** Metalloporphyrins in catalytic oxidations and oxidative DNA cleavage, in: K.M.Kadish, K.M.Smith, R.Guilard, *The Porphyrin Handbook*, Academic Press, New York, 2000.
58. **Collman, J. P., Chien, A. S., Eberspacher, T. A., Zhong, M., Brauman, J. I.,** Competitive Reaction of Axial Ligands during Biomimetic Oxygenations. *Inorg Chem*, (39) 4625-4629, 2000.
59. **Battioni, P., Renaud, J. P., Bartoli, J. F., Reina-Artiles, M., Fort, M., Mansuy, D.,** Monooxygenase-like oxidation of hydrocarbons by

- hydrogen peroxide catalyzed by manganese porphyrins and imidazole: selection of the best catalytic system and nature of the active oxygen species. *J Am Chem Soc*, (110) 8462-70, 1988.
60. **Balasubramanian, P. N., Schmidt, E. S., Bruice, T. C.**, Catalase modeling. 2. Dynamics of reaction of a water-soluble and non m-oxo dimer forming manganese(III) porphyrin with hydrogen peroxide. *J Am Chem Soc*, (109) 7865-73, 1987.
 61. **Hayes, B. L.**, Microwave Synthesis, CEM Publishing, Matthews, NC, USA, 2002.
 62. **Wathey, B., Tierney, J., Lidstrom, P., Westman, J.**, The impact of microwave-assisted organic chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today*, (7) 373-380, 2002.
 63. **de la Hoz, A., Diaz-Ortiz, A., Moreno, A.**, Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. *Chem Soc Rev*, (34) 164-178, 2005.
 64. **Jacob, J., Chia, L. H. L., Boey, F. Y. C.**, Thermal and non-thermal interaction of microwave radiation with materials. *J Mater Sci*, (30) 5321-7, 1995.
 65. **Chemat, F., Esveld, E.**, Microwave super-heated boiling of organic liquids: origin, effect and application. *Chem Eng Technol*, (24) 735-744, 2001.
 66. **Loupy, A., Perreux, L., Liagre, M., Burle, K., Moneuse, M.**, Reactivity and selectivity under microwaves in organic chemistry. Relation with medium effects and reaction mechanisms. *Pure Appl Chem*, (73) 161-166, 2001.
 67. **Jun, C. H., Chung, J. H., Lee, D. Y., Loupy, A., Chatti, S.**, Solvent-free chelation-assisted intermolecular hydroacylation: effect of microwave irradiation in the synthesis of ketone from aldehyde and 1-alkene by Rh(I) complex. *Tetrahedron Lett*, (42) 4803-4805, 2001.
 68. **Mortimer, C. E.**, Chemie: Das Basiswissen der Chemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart; New York, 1996.
 69. **Riss, J., Cloyd, J., Gates, J., Collins, S.**, Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics. *Acta Neurol Scand*, (118) 69-86, 2008.
 70. **Mandelli, M., Tognoni, G., Garattini, S.**, Clinical pharmacokinetics of diazepam. *Clin Pharmacokinet*, (3) 72-91, 1978.
 71. **Schwartz, M. A., Koechlin, B. A., Postma, E., Palmer, S., Krol, G.**, Metabolism of diazepam in rat, dog, and man. *J Pharmacol Exp Ther*, (149) 423-35, 1965.

72. **Greenblatt, D. J., Divoll, M., Abernethy, D. R., Ochs, H. R., Shader, R. I.,** Benzodiazepine kinetics: implications for therapeutics and pharmacogeriatrics. *Drug Metab Rev*, (14) 251-92, 1983.
73. **Breimer, D. D.,** Pharmacokinetics and metabolism of various benzodiazepines used as hypnotics. *Br J Clin Pharm*, (8) 7-13, 1979.
74. **Arnold, E.,** A simple method for determining diazepam and its major metabolites in biological fluids: application in bioavailability studies. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* (36) 335-52, 1975.
75. **Chiba, K., Horii, H., Chiba, T., Kato, Y., Hirano, T., Ishizaki, T.,** Development and preliminary application of high-performance liquid chromatographic assay of urinary metabolites of diazepam in humans. *J Chromatogr, B Biomed Appl*, (668) 77-84, 1995.
76. **Beischlag, T. V., Kalow, W., Mahon, W. A., Inaba, T.,** Diazepam metabolism by rat and human liver in vitro: inhibition by mephenytoin. *Xenobiotica*, (22) 559-67, 1992.
77. **Seddon, T., Michelle, I., Chenery, R. J.,** Comparative drug metabolism of diazepam in hepatocytes isolated from man, rat, monkey and dog. *Biochem Pharmacol*, (38) 1657-65, 1989.
78. **Andersson, T., Miners, J. O., Veronese, M. E., Birkett, D. J.,** Diazepam metabolism by human liver microsomes is mediated by both S-mephenytoin hydroxylase and CYP3A isoforms. *Br J Clin Pharmacol*, (38) 131-7, 1994.
79. **Yasumori, T., Nagata, K., Yang, S. K., Chen, L. S., Murayama, N., Yamazoe, Y., Kato, R.,** Cytochrome P450 mediated metabolism of diazepam in human and rat: involvement of human CYP2C in N-demethylation in the substrate concentration-dependent manner. *Pharmacogenetics* (3) 291-301, 1993.
80. **Yang, T. J., Shou, M., Korzekwa, K. R., Gonzalez, F. J., Gelboin, H. V., Yang, S. K.,** Role of cDNA-expressed human cytochromes P450 in the metabolism of diazepam. *Biochem Pharmacol*, (55) 889-896, 1998.
81. **Shou, M., Mei, Q., Ettore, M. W., Jr., Dai, R., Baillie, T. A., Rushmore, T. H.,** Sigmoidal kinetic model for two co-operative substrate-binding sites in a cytochrome P450 3A4 active site: an example of the metabolism of diazepam and its derivatives. *Biochem J*, (340) 845-853, 1999.
82. **Bernardelli, P.,** Process for catalyzing the oxidation of organic compounds, *Patent Application*, AU 200072738 B2, 2001.
83. **Cooke, P. R., Lindsay Smith, J. R.,** Alkene epoxidation catalyzed by iron(III) and manganese(III) tetraarylporphyrins coordinatively bound

- to polymer and silica supports. *J Chem Soc Perkin Trans I*, 1913-23, 1994.
84. **Kromidas, S.**, Validierung in der Analytik, Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
85. **Lübbe, A. N.**, Biomimetische Modellsysteme Cytochrom P450-abhängiger Epoxidierungen, Desalkylierungen und Hydroxylierungen. *Dissertation Universität Hamburg*, 2006.
86. **Weinland, R. F., Fischer, G.**, Manganic acetates and benzoates. *Z Anorg Allg Chem*, (120) 161-80, 1921.
87. **Demir, A. S., Emrullahoglu, M.**, Manganese(III) acetate: a versatile reagent in organic chemistry. *Curr Org Synth*, (4) 321-351, 2007.
88. **Ravikumar, K. S., Barbier, F., Begue, J.-P., Bonnet-Delpon, D.**, Manganese(III) acetate dihydrate catalyzed aerobic epoxidation of unfunctionalized olefins in fluoruous solvents. *Tetrahedron*, (54) 7457-7464, 1998.
89. **Nam, W., Kim, H. J., Kim, S. H., Ho, R. Y. N., Valentine, J. S.**, Metal Complex-Catalyzed Epoxidation of Olefins by Dioxygen with Co-Oxidation of Aldehydes. A Mechanistic Study. *Inorg Chem*, (35) 1045-9, 1996.
90. **Nam, W., Ryu, J. Y., Kim, I., Kim, C.**, Stereoselective alkane hydroxylations by metal salts and m-chloroperbenzoic acid. *Tetrahedron Lett*, (43) 5487-5490, 2002.
91. **Bernadou, J., Meunier, B.**, 'Oxo-hydroxo tautomerism' as useful mechanistic tool in oxygenation reactions catalyzed by water-soluble metalloporphyrins. *Chem Commun (Camb)*, 2167-2173, 1998.
92. **Battioni, P., Bartoli, J. F., Mansuy, D., Byun, Y. S., Traylor, T. G.**, An easy access to polyhalogenated metalloporphyrins covalently bound to polymeric supports as efficient catalysts for hydrocarbon oxidation. *J Chem Soc Chem Commun*, 1051-3, 1992.
93. **Varma, R. S.**, Solvent-free accelerated organic syntheses using microwaves. *Pure Appl Chem*, (73) 193-198, 2001.
94. **Ramesh, E., Sree Vidhya, T. K., Raghunathan, R.**, Indium chloride/silica gel supported synthesis of pyrano/thiopyranoquinolines through intramolecular imino Diels-Alder reaction using microwave irradiation. *Tetrahedron Lett*, (49) 2810-2814, 2008.
95. **Li, Z., Lu, Z., Zhu, A., Feng, X., Liu, J., Tian, G.**, Silica-supported phosphorus chloride: an efficient and recyclable catalyst for beckmann rearrangement of ketoximes and dehydration of aldoximes under microwave irradiation. *Catal Lett*, (120) 100-105, 2008.

96. **Desai, B., Kappe, C. O.**, Microwave-assisted synthesis involving immobilized catalysts. *Top Curr Chem*, (242) 177-208, 2004.
97. **Nenoff, T. M., Showalter, M. C., Salaz, K. A.**, Supported metalloporphyrins catalyze the oxidation of isobutane by dioxygen. *J Mol Catal A: Chem*, (121) 123-129, 1997.
98. **Gaget, C., Morel, D., Traore, M., Serpinet, J.**, Analysis of bonded silicas by hydrofluoric acid reaction and gas chromatography. *J Anal Chem*, (12) 386-92, 1984.
99. **Becker, H. G. O., Beckert, R., Domschke, G., Fanghaenel, E., Habicher, W. D., Metz, P., Pavel, D., Schwetlick, K.**, *Organikum*, Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
100. **Haken, H., Wolf, H. C.**, *Molekülphysik und Quantenchemie*, Springer, Berlin, 2006.
101. **Gabriel, C., Gabriel, S., Grant, E. H., Grant, E. H., Halstead, B. S. J., Mingos, D. M. P.**, Dielectric parameters relevant to microwave dielectric heating. *Chem Soc Rev*, (27) 213-224, 1998.
102. **Lide, D. R.**, *Handbook of Chemistry and physics*, CRC Press, Florida, 2003-2004.
103. **Ohtake, H., Higuchi, T., Hirobe, M.**, The highly efficient oxidation of olefins, alcohols, sulfides and alkanes with heteroaromatic N-oxides catalyzed by ruthenium porphyrins. *Heterocycles*, (40) 867-903, 1995.
104. **Hasted, J. B., Ritson, D. M., Collie, C. H.**, Dielectric properties of aqueous ionic solutions. I. *J Chem Phys*, (16) 1-11, 1948.
105. **Hasted, J. B., Roderick, G. W.**, Dielectric properties of aqueous and alcoholic electrolytic solutions. *J Chem Phys*, (29) 17-26, 1958.
106. **Bao, J.-Z., Swicord, M. L., Davis, C. C.**, Microwave dielectric characterization of binary mixtures of water, methanol, and ethanol. *J Chem Phys*, (104) 4441-450, 1996.
107. **Han, W. W., Yakatan, G. J., Maness, D. D.**, Kinetics and mechanisms of hydrolysis of 1,4-benzodiazepines. II: oxazepam and diazepam. *J Pharm Sci*, (66) 573-7, 1977.
108. **Le Petit, G.**, UV-spectrophotometric determination of diazepam. *Z Anal Chem*, (283) 199-202, 1977.
109. **Reichardt, C.**, Solvent effect on chemical reactions. *Chem Unserer Zeit*, (15) 139-48, 1981.
110. **Rebelo, S. L. H., Pereira, M. M., Simoes, M. M. Q., Neves, M. G. P. M. S., Cavaleiro, J. A. S.**, Mechanistic studies on metalloporphyrin epoxidation reactions with hydrogen peroxide: evidence for two active oxidative species. *J Catal*, (234) 76-87, 2005.

111. **Gross, Z., Nimri, S., Simkhovich, L.,** Iron porphyrin catalyzed hydroxylation of ethylbenzene by ozone. *J Mol Catal A: Chem*, (113) 231-238, 1996.
112. **Camenzind, M. J., Hollander, F. J., Hill, C. L.,** Syntheses, ground electronic state, and crystal and molecular structure of the monomeric manganese(VI) porphyrin complex dimethoxy(5,10,15,20-tetraphenylporphinato)manganese(IV). *Inorg Chem*, (21) 4301-8, 1982.
113. **Franke, A., Fertinger, C., van Eldik, R.,** Which oxidant is really responsible for P450 model oxygenation reactions? A kinetic approach. *Angew Chem Int Ed*, (47) 5238-5242, 2008.
114. **Werner, W.,** Qualitative anorganische Analyse für Pharmazeuten und Naturwissenschaftler, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1990.
115. **Wells, C. F., Mays, D. D.,** Mechanism of the reaction of manganese(III) with hydrogen peroxide. *Inorg Nucl Chem Lett*, (4) 43-5, 1968.
116. **Banfi, S., Montanari, F., Quici, S.,** New manganese tetrakis(halogenoaryl)porphyrins featuring sterically hindering electronegative substituents: synthesis of highly stable catalysts in olefin epoxidation. *J Org Chem*, (53) 2863-6, 1988.
117. **Pietzyk, B., Froehlich, L., Goeber, B.,** Characterization and stability of synthetic porphyrins. *Pharmazie*, (50) 747-50, 1995.
118. **Mayer, W., Erbe, S., Voigt, R.,** Analysis and stability of some pharmaceutically interesting benzodiazepines. 1. Diazepam and nitrazepam. Hydrolysis behavior and detection of a ring contraction to isomeric quinolone derivatives. *Pharmazie*, (27) 32-42, 1972.
119. **Felix, A. M., Earley, J. V., Fryer, R. I., Sternbach, L. H.,** Quinazolines and 1,4-benzodiazepines. XLIII. Oxidations with ruthenium tetroxide. *J Heterocycl Chem*, (5) 731-4, 1968.
120. **Ebel, S., Schuetz, H.,** Analytical data and synthesis of important 3-hydroxy-5-phenyl-1,4-benzodiazepin-2-one derivatives. *Arzneim-Forsch*, (29) 1317-25, 1979.
121. **Hansen, G. R., Boyd, R. L. B. R. L.,** Preparation and some reactions of 3-oxazoline N-oxide. *J Heterocycl Chem*, (7) 911-15, 1970.
122. **Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G. G.,** Instrumentelle pharmazeutische Analytik, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1992.
123. **Iley, J., Tolando, R., Constantino, L.,** Chemical and microsomal oxidation of tertiary amides: regio- and stereoselective aspects. *J Chem Soc Perkin Trans 2*, 1299-1305, 2001.

124. **Mitera, J., Kubelka, V.**, Fragmentation of caprolactam and its methyl derivatives under electron impact. *Org Mass Spectrom*, (5) 651-62, 1971.
125. **Yoshifuji, S., Arakawa, Y., Nitta, Y.**, Ruthenium tetroxide oxidation of N-alkyllactams. *Chem Pharm Bull*, (35) 357-63, 1987.
126. **King, B. W.**, Lactam derivates as inhibitors of matrix metalloproteinases and/or TNF-alpha converting enzyme, *Patent Application*, US 20040266751. 2004
127. **Ito, R., Umezawa, N., Higuchi, T.**, Unique Oxidation Reaction of Amides with Pyridine-N-oxide Catalyzed by Ruthenium Porphyrin: Direct Oxidative Conversion of N-Acyl-L-proline to N-Acyl-L-glutamate. *J Am Chem Soc*, (127) 834-835, 2005.
128. **Meyers, R. A.**, Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation Wiley Blackwell, 2000.
129. **Appleton, A. J., Evans, S., Lindsay Smith, J. R.**, Allylic oxidation and epoxidation of cycloalkenes by iodosylbenzene catalyzed by iron(III) and manganese(III) tetra(dichlorophenyl)porphyrin: the marked influence of ring size on the rate of allylic oxidation. *J Chem Soc Perkin Trans 2*, 281-5, 1996.
130. **Lüllmann, H., Moor, K.**, Pharmakologie und Toxikologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1999.
131. **Tsuchiya, Y., Nakajima, M., Yokoi, T.**, Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett*, (227) 115-124, 2005.
132. **Seeger, H., Wallwiener, D., Mueck, A. O.**, Estradiol metabolism and gynecological malignant tumors. *Gynecol Endocrinol*, (3) 134-139, 2005.
133. **Pike, M. C., Spicer, D. V., Dahmouh, L., Press, M. F.**, Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* (15) 17-35, 1993.
134. **Martucci, C. P., Fishman, J.**, P450 enzymes of estrogen metabolism. *Pharmacol Ther*, (57) 237-57, 1993.
135. **Fishman, J., Bradlow, H. L., Gallagher, T. F.**, Oxidative metabolism of estradiol. *J Biol Chem*, (235) 3104-7, 1960.
136. **Ricci, M. J., Liehr, G. J.**, 4-Hydroxylation of estrogens as marker of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, (93) 3294-3296, 1996.

137. **Norymberski, J. K.**, Products of estradiol/peroxidase interaction; their structural features and biopolymeric character. *J Steroid Biochem Mol Biology*, (39) 73-81, 1991.
138. **Pezzella, A., Lista, L., Napolitano, A., D'Ischia, M.**, Tyrosinase-Catalyzed Oxidation of 17 β -Estradiol: Structure Elucidation of the Products Formed beyond Catechol Estrogen Quinones. *Chem Res Toxicol*, (18) 1413-1419, 2005.
139. **Breslow, R., Huang, Y., Zhang, X., Yang, J.**, An artificial cytochrome P450 that hydroxylates unactivated carbons with regio- and stereoselectivity and useful catalytic turnovers. *Proc Natl Acad Sci USA*, (94) 11156-11158, 1997.
140. **Breslow, R., Yang, J., Yan, J.**, Biomimetic hydroxylation of saturated carbons with artificial cytochrome P-450 enzymes-liberating chemistry from the tyranny of functional groups. *Tetrahedron*, (58) 653-659, 2002.
141. **Yang, J., Gabriele, B., Belvedere, S., Huang, Y., Breslow, R.**, Catalytic Oxidations of Steroid Substrates by Artificial Cytochrome P-450 Enzymes. *J Org Chem*, (67) 5057-5067, 2002.

8 Anhang

8.1 Gefahrstoffverzeichnis

Chemikalienbezeichnung	Gefahrensymbole	R-Sätze	S-Sätze
Acetanhydrid	C	10-20/22-34	26-36/37/39-45
Acetonitril	F, Xn	11-20/21/22-36	16-36/37
Ameisensäure	C	10-35	26-45
Aminopropyl - Kieselgel	-	-	24/25
Ammoniak 25%	C, N	34-50	26-36/37/39-45-61
Ammoniak gasförmig	T, N	10-23-34-50	9-16-26-36/37/39-45-61
ϵ -Caprolactam	Xn	20/22-36/37/38	-
Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
deuteriertes Chloroform	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
Diazepam	Xn	21/22	36/37
Dichlormethan	Xn	40	23-24/25-36/37
Diethylether	F ⁺ , Xn	12-19-22-66-	9-16-29-33

		67	
Estradiol	T	45	53-45
1,3,5(10)-Estratrien-3 17 β -Diol	n.a.	n.a.	n.a.
1,3,5(10)-Estratrien-3,4-Diol-17-one	n.a.	n.a.	n.a.
1,3,5(10)-Estratrien-3-ol-17-one	n.a.	n.a.	n.a.
1,3,5,(10)-Estratrien-2,3,17 β -Triol	n.a.	n.a.	n.a.
1,3,5,(10)-Estratrien-3,4,17 β -Triol	n.a.	n.a.	n.a.
1,3,5,(10)-Estratrien-2,3-Diol-17-one	n.a.	n.a.	n.a.
Estron	T	45-60-61	45-53
Imidazol	C	22-34-63	22-26-36/37/39-45
Iodosobenzoldiacetat	T	8-22	22-24/25
Kaliumhexacyanoferrat (II) Trihydrat	N	52/53	50.1-61
Kieselgel 60	Xn	40-37	26-37/39
m-Chlorbenzoesäure	Xi	36/38	-
m-Chlorperoxybenzoesäure	O,C	22-24-7	17-26-36/37/39-45
Magnesiummonoperoxyphthalat	Xi	36/37/38/ 52	-
Methanol	F, T	11-23/24/25-39/23/24/25	7-16-36/37-45
Mn/FeT4MPyPCl	Xi	36/37/38	26-36

Mn/FeTFPPCl	Xi	36/37/38	26-36
N-1-Naphthylethylendiamin-dihydrochlorid	Xi	36/38	22
N-Methyl-ε-caprolactam	Xi	21/22-36/37/38	26-36/37/39
N-Methyl-2-piperidon	Xi	36/37/38	26-36
Natriumacetat	-	-	-
Natriumfluorid	T	25-32-36/38	22-36-45
Natriumhydrogencarbonat	-	-	-
Natronlauge, konzentriert	C	35	26-36/37/39-45
Natriumnitrit	O, T, N	8-25-50	45-61
Nordazepam	Xn	22	-
Oxazepam	Xn	40	36/37
Piperidon	Xi	36	24
Salzsäure 2N-1N	Xi	36/ 37/38	-
Salzäure, konzentriert	C	34-37	24-45
Schwefelsäure, konzentriert	C	35	26-30-45
Silbernitrat	C,N	34-50/53	26-45-60-61
Temazepam	Xn	22	-
Toluol	F, Xn	11-20	16-25-29-33
Trifluoressigsäureanhydrid	C	14-20-35-52/53	9-26-36/37/39-45-61
Trimethylchlorsilan	F, C	11-14-35-37	7/9-16-26-

			36/37/39-45
Wasserstoffperoxid 30%	C	34	3-26-36/37/39-45
Wasserstoff	F ⁺	12	9-16-33

8.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Steffi Jaeger
Geburtsdatum	24.03.1980
Geburtsort	Freiberg

Schulbildung

1986-1988	Grundschule Imstedt
1988-1990	Grundschule Humboldtstraße
1990-1999	Gymnasium Uhlenhorst-Barmbek

Studium

1999-2003	Studium der Pharmazie an der Universität Hamburg
Nov 2003-Apr 2004	Praktisches Jahr bei Sandoz Pharmaceutical GmbH, Gerlingen
Mai 2004-Okt 2004	Praktisches Jahr in der Lerchenfeld Apotheke, Hamburg
Februar 2005	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Mai 2005	Approbation als Apothekerin

Promotion

Apr 2005-Sept 2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Universität Hamburg, Institut für Pharmazie Betreuung der Praktika „Allgemeine und analytische Chemie der anorganischen Arznei-, Hilfs- und Schadstoffe unter Einbeziehung von Arzneibuchmethoden“, „Quantitative Bestimmung von Arznei-, Hilfs- und Schadstoffen unter Einbeziehung von Arzneibuchmethoden“ und „Pharmazeutische Chemie III“
--------------------	--

Berufstätigkeit

seit Oktober 2008

Produktmanagerin API/CMO im Bereich
Materialwirtschaft und strategische Beschaffung
bei der Medac GmbH, Wedel